

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14602
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24550078
 研究課題名(和文) 蛋白質表面相互作用が可能な光増感金属錯体の開発と多段階電子・エネルギー移動反応

 研究課題名(英文) Photoinduced electron- and energy-transfer reactions of protein-photosensitizer complexes

 研究代表者
 高島 弘 (HIROSHI, TAKASHIMA)

 奈良女子大学・自然科学系・准教授

 研究者番号：80335471

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では酵素とその活性中心近傍へ特異的に結合する小分子リガンドの作用機序に着目して、光増感剤(photosensitizer)を基体とした酵素(カルボニックアンヒドラーゼおよびキモトリプシン)-リガンド複合体の構築と、その多段階的な光誘起電子・エネルギー移動反応システムの開発とその詳細な機構解明を行った。また、Ru(bpy)₃錯体やその類縁体の発光性金属錯体の開発を目的に、種々のピピリジン、ターピリジン配位子を組み合わせた発光性ルテニウム(II)およびイリジウム(III)錯体を合成し、光物理的物性を実験的に評価し、また光励起状態についてDFT計算より理論的にも検証を行った。

研究成果の概要(英文)：By using preferential enzyme-inhibitor interactions, we study the photophysical properties of artificial Carbonic Anhydrase or Chymotrypsin-[Ru(bpy)₃]²⁺ type complex and the detailed photoinduced electron- or energy-transfer mechanisms are discussed. For example, we prepared a Ru(II)-based CA inhibitor, tethering a benzenesulfonamide group and a [Ru(bpy)₃]²⁺ moiety and constructed the artificial CA-Ru(II) complex. After steady-state photoirradiation, the photo-excited triplet state of Ru(II)* was quenched by a sacrificial quencher through an intermolecular photoinduced ET mechanism, giving the oxidized Ru(III) complex. The following intramolecular electron abstraction from an amino-acid residue near the active site of CA proceeded. On the other hand, several types of the [Ru(bpy)₂(L)]²⁺ complexes were synthesized and their electrochemical and spectral properties were examined. Spin densities were analyzed to characterize triplet states in those complexes.

研究分野：生物無機化学

キーワード：光 電子移動 ルテニウム キモトリプシン カルボニックアンヒドラーゼ 金属錯体 DFT計算

1. 研究開始当初の背景

生命・医療・環境・エネルギー問題の観点から、光(太陽光)をエネルギー源として利用する生体分子の新規機能発現システムの開発が注目を集めている。一方で、生体内では光合成を始めとした光を利用する幾つもの段階的な電子移動、エネルギー移動反応が進行しており、蛋白質・酵素がそれらの複雑な系における中心的な役割を担っている。

このような蛋白質・酵素の光誘起電子移動反応に関連して、酸化還元と共役する分子間相互作用を利用した蛋白質光誘起電子移動システムが開発されている。我々は以前に、電子伝達蛋白質シトクロム *c*(cyt *c*)表面へ特異的に結合するトリスピリジン型ルテニウム($\text{Ru}(\text{bpy})_3$)錯体を先駆的に発表し(*Chem. Commun.* **1999**, 2345.)、成書にも取り上げられている (G. Stochel et al., *Bioinorganic photochemistry*, WILEY, 2009.)。

これまでに、蛋白質表面相互作用を指向するリガンドの開発は、酵素活性阻害剤(薬物)開発の観点から合目的に設計されてきており、例えば、キモトリプシン(CHT)においては、表面のカチオン性ドメインに結合するテトラフェニルポルフィリン(TPP)誘導体などが報告されてきた背景がある(A. D. Hamilton et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 8.)。

2. 研究の目的

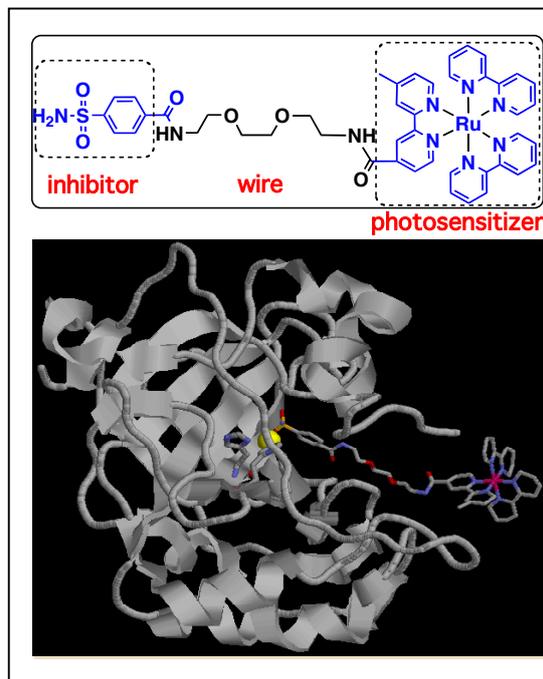
上記の研究背景から、本研究では酵素とその活性中心近傍や疎水性空間へ特異的に結合する小分子リガンドの作用機序に着目して、光増感剤(photosensitizer)を基体とした酵素-リガンド複合体の構築と、その多段階的な光誘起電子・エネルギー移動反応システムの開発とその詳細な機構解明を目的とする。本研究では、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体やその類縁体の発光性金属錯体を基体とする新規な金属酵素阻害剤を開発する。

3. 研究の方法

具体的な研究方法は以下の通りである。

(1) まず生体内のモデル金属酵素として単核の亜鉛(II)を含むカルボニックアンヒドラーゼ(CA)を考え、CA活性中心に阻害剤として結合可能な $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体と、その簡便な配位と光増感によって光誘起電子移動反応を行うことを考えた。この反応は、電子受容体の存在下で多段階反応を行い、酵素内の活性中心近傍に存在するチロシンが関与したプロトン共役多段階電子伝達移動反応を経ることが予測される。現在まで $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体を光増感剤とするプロトン共役多段階光誘起電子移動は、有機低分子をドナー-アクセプターとした系に限られており、申請者の知る限りでは、金属酵素中の芳香族アミノ酸を反応点とした例はない。したがって、天然の光合

成系(PS II)のモデル反応とも成り得る、基礎研究としての重要性も高い実験系である。さらにレーザー光を利用し、光誘起プロトン共役多段階電子移動反応を時間分解分光測定によって詳細に検討するため、その学術的意義も大きい。



現在まで、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体を基体とする蛋白質リガンドはこれまでビオチン誘導体など数例報告があるが、金属酵素へ適用し、また酵素活性を光電子移動で制御した例は見当たらない。さらに、阻害剤の合成は簡単な有機合成操作でライブラリー化が行え、様々な金属蛋白質-阻害剤の組み合わせが利用可能な汎用性ある手法と言える。

(2) 次に、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 型錯体として側鎖末端にベンゼンスルホニルフルオリド基を有する阻害剤を設計した。ベンゼンスルホニルフルオリド誘導体は、従来知られている CHTの“不可逆的”活性阻害剤として、活性中心の Ser195 へ選択的に反応可能であることが分かっており、共有結合によって金属錯体を CHT 表面へ導入する点が大きな特徴である。さらに、セリンプロテアーゼである CHT の触媒活性阻害能を評価し、結合特性を明らかにする。その後、CHT 複合体における、多段階光電子・エネルギー移動反応を高速時間分解分光測定により検証する。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 型錯体-CHT 複合系では、メチルビオローゲン(MV^{2+})のような電子受容体の複合体への添加により多段階光電子移動反応を構築させる。

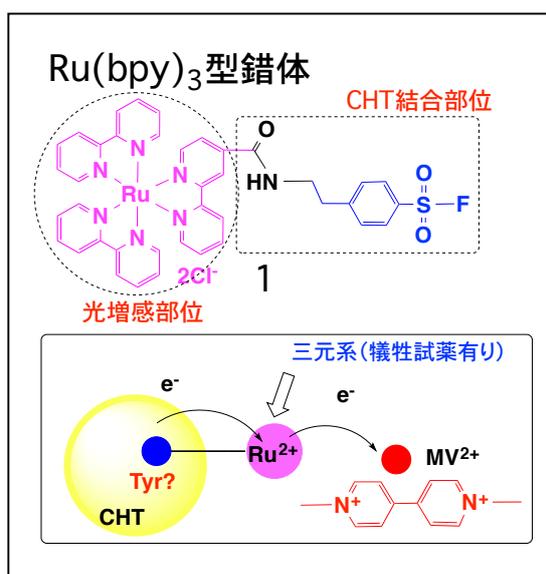
(3) さらなる光増感作用を有する金属錯体の開発として、種々のピリジン、ターピリジン配位子を組み合わせた発光性ルテニウム(II)およびイリジウム(III)錯体の開発を行う。その合成、ならびに光物理的物性を実験

的に評価し、また光励起状態について DFT 計算より理論的にも検証を行う。

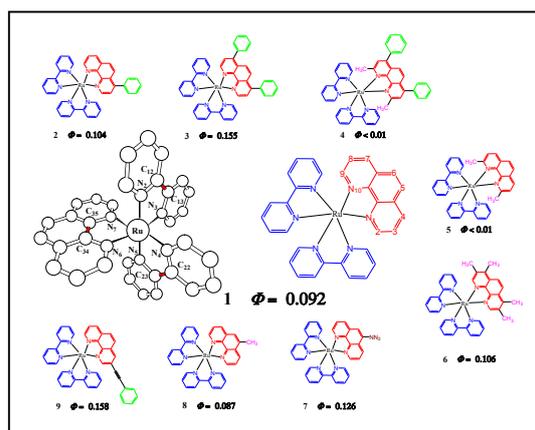
4. 研究成果

(1) に関して、CA に結合可能な光増感剤として、上図の化合物のような、非対称型トリスビピリジンルテニウム($\text{Ru}(\text{bpy})_3$)錯体を有する活性阻害剤の開発に成功した。次いで、模式図のように $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 型阻害剤を CA 活性中心へ特異的に配位結合させ、その活性阻害機能を評価した。また、酸化的犠牲試薬の存在下、定常光照射実験を行い、蛋白質分解反応と酵素活性制御について検討した。ここで行われる酸化的光電子移動反応は、レーザーフラッシュフォトリシス等による時間分解分光測定により速度論的に検証した。その結果として、何れも光誘起電子移動反応においては、速度論的にはナノ秒スケールでの早い電子移動反応を観測出来た。

(2) に関して、下図のように合成した $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 型阻害剤 **1** を CHT に結合させた。この CHT 複合体に MV^{2+} のような酸化的電子アクセプターを共存させ、多段階光誘起電子移動反応系を構築した。錯体 **1** の光励起と MV^{2+} への電子移動により生成する酸化種 $\text{Ru}(\text{III})$ 錯体は、CHT 活性中心近傍の芳香族アミノ酸 (例えばチロシン Tyr) の電子引き抜き反応を行う。その結果、逆電子移動反応の抑制が起こり、長寿命の電荷分離状態を作り出すことが出来ると期待される。具体的な時間分解分光測定として、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体の選択的光励起に伴うピコ-ミリ秒の幅広い時間領域に渡って発光寿命測定や過渡吸収スペクトル測定を行ったところ、410 nm を吸収極大とする電荷分離状態である $\text{Tyr}^{\bullet+}$ ラジカルと、610 nm を吸収極大とする $\text{MV}^{\bullet+}$ ラジカル種を検出することが出来、その反応機構を速度論的に明らかにすることが出来た。



(3) に関して、ビピリジン配位子の π 共役系拡張や 4,4'-位への電子供与性置換基の導入は、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 型錯体の発光量子収率の向上や、 $^3\text{MLCT}$ 励起状態の安定化をもたらすと期待される。図に一例を示したが、種々のビピリジンおよびフェナントロリン混合配位子を有する Ru および Ir 錯体を、マイクロ波合成法によって開発した。さらに、結晶構造解析および DFT 計算によって、その光励起 $^3\text{MLCT}$ および MC 状態でのエネルギーを見積もった。発光波長および励起エネルギー、寿命、発光量子収率等を既存の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 型錯体と比較することにより、光増感金属錯体としての特性評価を行うことに成功した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Naokazu Yoshikawa, Shinichi Yamabe, Shigeyoshi Sakaki, Nobuko Kanehisa, Tsuyoshi Inoue, Hiroshi Takashima

「Transition States of the $^3\text{MLCT}$ to ^3MC Conversion in $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phen derivative})^{2+}$ Complexes」*Journal of Molecular Structure*, 1094, 98-108, 2015. (査読有) DOI : 10.1016/j.molstruc.2015.04.011

② Naokazu Yoshikawa, Shinichi Yamabe, Shigeyoshi Sakaki, Nobuko Kanehisa, Tsuyoshi Inoue, Hiroshi Takashima

「A DFT Study of the Triplet Excited States of Iridium(III) Complexes with Terpyridine Ligands」*Canadian Chemical Transactions*, 2, 134-148, 2014. (査読有) DOI : 10.13179/canchemtrans.2014.02.02.0081

③ Hiroshi Takashima, Misa Fukuda, Fumie Nakagaki, Tomoko Ogata, Keiichi Tsukahara

「Photoinduced Electron-Transfer Reactions of Carbonic Anhydrase Inhibitor Containing tris(2,2'-Bipyridine)ruthenium(II) Analogue」*The Journal of Physical Chemistry, B*, 117/9, 2625-2635, 2013. (査読有) DOI :

[学会発表] (計 13 件)

① 永里夏子・高島 弘、トリスビピリジン型ルテニウム(II)錯体を活性中心へ導入したキモトリプシンの光誘起電子移動反応、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 27 日、日本大学理工学部 船橋キャンパス (千葉県船橋市)

② 諏訪美生子・高島 弘、カルボニックアンヒドラーゼ活性阻害部位を導入した種々のトリスビピリジン型ルテニウム(II)錯体の光誘起電子移動反応、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日、日本大学理工学部 船橋キャンパス (千葉県船橋市)

③ 永里夏子・高島 弘、キモトリプシン活性中心へ導入したトリスビピリジン型ルテニウム(II)錯体の光誘起電子移動反応、日本化学会秋季事業 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014、2014 年 10 月 14 日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

④ 永里夏子・高島 弘、キモトリプシン活性中心へ導入したトリスビピリジン型ルテニウム(II)錯体の光誘起電子移動反応、錯体化学会第 6 4 回討論会、2014 年 9 月 18 日、中央大学理工学部 後楽園キャンパス (東京都文京区)

⑤ 諏訪美生子・高島 弘、カルボニックアンヒドラーゼ活性阻害部位を複数導入したトリスビピリジン型ルテニウム(II)錯体の光誘起電子移動反応、錯体化学会第 6 4 回討論会、2014 年 9 月 18 日、中央大学理工学部 後楽園キャンパス (東京都文京区)

⑥ 永里夏子・高島 弘、トリスビピリジン型ルテニウム(II)錯体のキモトリプシンへの導入と光特性、錯体化学会第 6 3 回討論会、2013 年 11 月 4 日、琉球大学 千原キャンパス (沖縄県中頭郡)

⑦ Hiroshi Takashima、PHOTOINDUCED ELECTRON TRANSFER REACTIONS OF WATER SOLUBLE QUANTUM DOT COORDINATED BY CYTOCHROME C、New Trends of Nano- or Bio-materials Design in Supramolecular Chemistry、2013 年 9 月 21 日、九州大学医学部キャンパス (福岡県福岡市)

⑧ 吉川直和・山邊信一・榊 茂好・金久展子・井上 豪・高島 弘、DFT 計算と発光エネルギーによるポリピリジン配位子を含むルテニウム(II)錯体の励起三重項状態の研究、第 2 5 回配位化合物の光化学討論会、2013 年 8 月 7 日、唐津ロイヤルホテル (佐賀県唐津市)

⑨ 早藤未帆・高島 弘・塚原敬一、水溶性 CdSe/ZnS(コア/シェル型)量子ドットを利用したシトクロム c の光還元反応、日本化学会第 9 3 春季年会、2013 年 3 月 23 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)

⑩ 山崎菜々実・高島 弘・塚原敬一、亜硝酸還元酵素活性中心モデル銅(II)錯体を結合した亜鉛ミオグロビンの調製と光特性、錯体化学会第 6 2 回討論会、2012 年 9 月 21 日、富山大学五福キャンパス (富山県富山市)

⑪ 今村菜留未・高島 弘・塚原敬一、銅置換カルボニックアンヒドラーゼの調整と非対称トリスビピリジン型ルテニウム(II)錯体との相互作用、錯体化学会第 6 2 回討論会、2012 年 9 月 21 日、富山大学五福キャンパス (富山県富山市)

⑫ 吉川直和・山邊信一・榊 茂好・金久展子・井上 豪・高島 弘・塚原敬一、DFT 計算によるターピリジンとアニオン配位子を含むイリジウム(III)錯体の三重項状態の研究、第 2 4 回配位化合物の光化学討論会、2012 年 8 月 6 日、東京大学 駒場リサーチキャンパス (東京都目黒区)

⑬ 高島 弘、金属蛋白質表面での相互作用を利用した光誘起電子・エネルギー移動反応、錯体化学若手の会 近畿地区勉強会、2012 年 6 月 2 日、京都大学吉田キャンパス (京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.chem.nara-wu.ac.jp/~takashima/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 弘 (TAKASHIMA, Hiroshi)
奈良女子大学・自然科学系・准教授
研究者番号：80335471

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：