

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410167

研究課題名(和文) 楕円率検出型円二色性分光法の超高感度化と生体分子-薬剤間相互作用解析への応用

研究課題名(英文) Sensitivity improvement of Elliptically-polarization-detected CD spectroscopy for the drug-biomolecule binding study

研究代表者

荒木 保幸 (ARAKI, Yasuyuki)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：80361179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カチオン性ポルフィリン類と二重らせんDNA (dsDNA)は様々な結合様式により錯体形成を行う。本研究では、数種類のカチオン性ポルフィリンとdsDNAとの相互作用とそのダイナミクスをCDの時間変化から検討した。かさ高い置換基を導入しても、カチオン性ポルフィリンはdsDNAへインターカレーションし、一方で、可視光(532 nm)のナノ秒パルスレーザーにより、ポルフィリンを選択的に光励起することで、誘起CDスペクトルに時間変化が現れた。この時間変化は、別途測定した過渡吸収スペクトルとの比較から、ポルフィリンの励起三重項状態の生成にもなる、基底状態ポルフィリンの減少に伴う変化であると判断された。

研究成果の概要(英文)：Cationic porphyrins are well-known as small molecules bound to double strand DNA (dsDNA) and also known as typical reagents of the photodynamic therapy.

Recently, we reported new methodology for high sensitive circular dichroism (CD) spectroscopy and application for the analysis of the interaction dynamics of cationic porphyrins with dsDNA.

In this study, we demonstrated the variety of cationic porphyrin derivatives with dsDNAs formed the intercalating complexes. Our time resolved CD measurement system revealed that the photo-irradiation of porphyrins intercalated to dsDNA showed the photo-bleaching, those were the originated from the photo-excited triplet state generating inside dsDNA. Transient absorption study for these porphyrin-dsDNA complexes were also consistent with these transient CD data. Thus we have concluded that we have successfully observed the photo-dynamics of porphyrin-dsDNA complexes by using our transient CD technique.

研究分野：光化学

キーワード：キラリティ 円二色性

1. 研究開始当初の背景

生体分子である核酸(DNA, RNA)は、生命における遺伝情報保存や、生体機能発現のためのタンパク質合成における遺伝情報伝達手段として、教科書に記述され広く認識されているような役割の他に、近年はリボスイッチに代表されるような RNA の構造多様性そのものが生体機能調整に必要とされる事が多数報告されてきている。一方核酸の構造については、ワトソン・クリックにより提唱された二重螺旋構造が特に有名であり、X線構造解析などによる構造決定は疑いようも無い。一方で、三重鎖 DNA、テロメアに見られる四重鎖 DNA など、二重螺旋構造以外の安定構造も多数報告されている。特に、テロメアに見られる四重鎖 DNA 構造は、テロメラーゼによるテロメア構造の認識や、テロメラーゼ阻害する薬剤との間の相互作用において、その構造解析のみではなく、構造ゆらぎに関する注目が集まっているなど、生体関連分子の構造に関する研究は、現在も発展し続けている。

申請者は現在、これまで培ってきた経験をもとにした新たなチャレンジとして、本申請の連携研究者である和田健彦教授と共同で、生体分子の構造揺らぎやダイナミクスの研究に従事するに当たり、円二色性(CD)の新たな検出法の開拓を新たなテーマとして研究を遂行している。

CD測定は、キラルな分子における左右円偏光に対する吸光度の違いを検出する手法で、溶液中での生体分子の構造に関して広く知見を与える。CDスペクトル形状の変化は生体分子構造の変化を意味する。そのため、生体分子の構造研究に関してのCD測定法の有用性や一般性は非常に高いが、必ずしも一般的に使われるツールとして認識されているとは言えない。その理由の一つは、CD信号は微弱であり、そのため比較的高濃度な試料が必要であると認識されているからである。高濃度の試料が必要ということは、大量スケールでの準備が非常に困難である生体分子研究において弱点である。そればかりか、たとえ生体分子を大量に試料を調達できた場合でも、その自己会合性の高さから、高濃度条件での測定に困難さが伴うことが多い。

一方、申請者は、ここ数年来、新たな観点からCD信号の検出を達成するための測定原理の発案から測定装置開発、そしてDNA-小分子相互作用の時間分解CD手法による検出を達成してきた。これまでの結果から、我々のCD検出手法は、市販のCD装置同等以上の検出感度を有し、かつ時間分解能が原理的には、光検出器の時間分解能に依存する(現有装置では、100 ns程度)など、これまでのCD測定に比較して有用となるポイントが存在する。この手法をさらに飛躍させる上で、重要なポイントも判明してきた。

我々の円二色性測定法は、円二色性を示す(生体)分子が楕円偏光の楕円率を変化させ

ることに着目し、楕円偏光をサンプルに透過させ、その楕円率変化を観測するものである。ただし乗り越えなければならない技術的課題も存在する。それは、ひとえに楕円偏光を作成するための光源の安定性と絶対光量不足である。この点は、微弱光検出手法であるフォトンカウンティング法を用いることで改善する。フォトンカウンティング法は、微弱な発光現象を捉えるために常用されている手法であり、CD測定のような透過光測定に用いられることは稀である。しかしながら、本手法の弱点である透過光強度不足を逆手にとることで、超高感度CD検出法を確立し、生体分子と薬剤間相互作用解析へと応用することが、本申請の骨子である。

2. 研究の目的

生体分子であるたんぱく質や核酸は、大量スケールでの入手が難しくかつ高額になるだけではなく、特に高濃度条件では不可逆な自己会合により沈殿の形成があるため、高濃度条件での各種実験に困難さが伴うことが多い。円二色性(CD)測定は、核酸やタンパク質の高次構造を鋭敏に検出可能であり、生体内環境、つまりは溶液中における構造・動的挙動解明の有効な手法の一つであるが、比較的高濃度試料が必要であるため、上記した生体機能分子由来の問題点により、その有用性が遺憾なく発揮されているとはいえない。本申請では、申請者がこれまで独自に取り組んできた楕円偏光を利用するCDの新規測定手法を進展させ、CD測定装置の超高感度化を達成し、超希薄溶液中でのCD測定を可能とし、生体機能分子-薬剤間相互作用の解析へと応用する。

3. 研究の方法

まず、25年度において、これまで申請者が提案してきている楕円率検出CD測定法において、光検出器にフォトンカウンターを用いた実験系へと再構築し、実際に生体分子を用いた微量検出の実証実験を行う。その際、可視領域から紫外領域までを通したCD検出をもくろみ、可視領域から紫外領域にかけて広範囲にCDを示すPYP, GFP等の発光タンパク質や、可視光に光吸収帯を示す基質を取り込んだ核酸等の試料を用いたCD測定の超高感度化の実証実験を行う。

26年度以降は、具体的な超高感度CD検出法の応用例として、希薄溶液中での誘起CDを用い、非常に解離定数(K_d)の小さな生体分子-薬剤系の相互作用測定や、多数の相互作用点を持つような複雑な生体分子-薬剤間相互作用解析を通して、超高感度CD検出法の有用性を実証する。

4. 研究成果

本研究において申請時に設定していた予算額が大幅に削減されて交付された関係で、想定していたフォトンカウンターの購入が困難となった。そのために、現有設備を活用した研究の遂行の必要性に迫られた。しかしながら、本研究において、以下のような成果

を上げることができた。

かさ高い置換基を導入したカチオン性ポルフィリンと二重らせん DNA (dsDNA) との相互作用解析と、ポルフィリン光励起後の光ダイナミクス解析

カチオン性ポルフィリン類は、二重らせん DNA (dsDNA) と様々な結合様式により錯体形成を行うことが知られており、がんおよび皮膚疾患における光線力学療法における一重項酸素の増感剤として用いられている。一重項酸素の高効率発生のために、カチオン性ポルフィリン類と dsDNA の相互作用およびその結合様式の同定が重要な研究課題として挙げられ、結合様式の同定には円二色性 (CD) スペクトル測定が有用である。例えば、代表的なカチオン性ポルフィリンであるメチル化されたピリジル基を有する tetrakis(N-methylpyridium-4-yl)porphyrin (H2TMPyP) は、dsDNA の G-C 塩基対に対してインターカレートすることが知られており、H2TMPyP の Solet 帯に負の CD が誘起される。我々はこれまで、過渡吸収法、蛍光寿命測定、そしてナノ秒時間分解 CD 測定法の結果から、dsDNA にインターカレートしている H2TMPyP は、光励起後 dsDNA から一部解離し、マイクロ秒の時間スケールで再結合するという構造ダイナミクスを提案してきた。また、時間分解 CD 測定の結果は、この構造ダイナミクスの再結合過程において、中間体として dsDNA の側鎖に結合した H2TMPyP の存在を強く示唆していた。インターカレートに至るまでの構造ダイナミクスは、ピリジル基にかさ高い置換基を導入することで、容易に制御可能である可能性がある。そこで本研究では、かさ高い置換基をカチオン性ポルフィリンへと導入し、その効果が構造ダイナミクスへどのように反映されるかを検討した。

ピリジル基に導入する置換基として、propyl-, hexyl-, 2-ethoxy-2-oxoethyl-基を選択し、各ポルフィリン誘導体は常法に従い合成した。溶媒は phosphate buffer (5 mM, pH=6.9) を用い、dsDNA として calf-thymus DNA ならびに herring sperm DNA (Aldrich) を用いた。

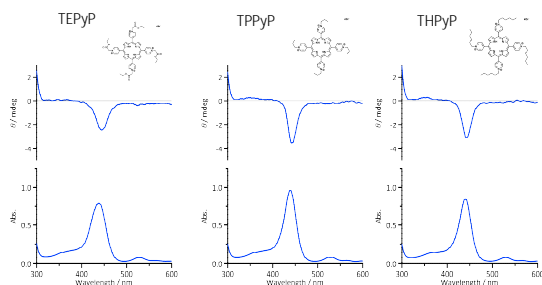


図 1 カチオン性ポルフィリンと、dsDNA との相互作用により生じた誘起 CD スペクトル (上) および uv-vis スペクトル (下)

これらカチオン性ポルフィリンは、かさ高い置換基を導入しても、負の誘起 CD を示す

ことから、dsDNA とインターカレーションすることが判明した。一方で、かさ高い置換基を導入することで若干の結合定数の低下が観測された。このことは、ポルフィリン dsDNA 間の結合 乖離ダイナミクスに置換基の寄与が見られることが期待されたため、その効果を間接的に観測することが可能である光励起後の誘起 CD の変化の観測を試みた。

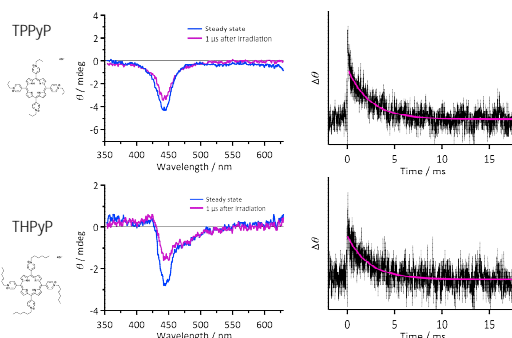


図 2 光励起に伴うカチオン性ポルフィリンの誘起 CD スペクトル変化 (左) とその時間依存性 (右)

可視光 (532 nm) のナノ秒パルスレーザーにより、ポルフィリンを選択的に光励起することで、誘起 CD スペクトルに時間変化が現れた。この時間変化は、別途測定した過渡吸収スペクトルとの比較から、ポルフィリンの励起三重項状態の生成にともなう、基底状態ポルフィリンの減少に伴う変化であると推測することができたが、これ以上の解析にはもう一段の S/N の改善が必要不可欠であると判断された。このことから、本研究で得られた知見を踏まえ、本申請の中核技術である円二色性測定法の改善を行い、より明確な時間分解測定法へと継続開発する予定である。

また、本研究のような測定技術の発展研究には必要不可欠な、安定かつ容易に調達可能なキラル化合物の調査を行った。特に光を使った時間分解測定を志向する本研究の場合、蛍光量子収率、三重項生成量子収率等の光励起に伴う物理量の知見が欠かせない。本研究では、共同研究を通して、多様なヘリセン化合物において、そのような物理量の決定を行い、多数の報告を行うことができたことを合わせて報告する。

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 1 1 件)

(1) Hayato Sakai, Takako Kubota, Junpei Yuasa, Yasuyuki Araki, Tomo Sakanoue, Taishi Takenobu, Takehiko Wada, Tsuyoshi Kawai, and Taku Hasobe

Synthetic Control of Photophysical Process and Circularly Polarized Luminescence of [5]Carbohelicene Derivatives Substituted by

Maleimide Units

J. Phys. Chem. C, **2016**, *120*, 7860–7869.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01344

(査読あり)

(2) Yuki Yamamoto, Hayato Sakai, Junpei Yuasa, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Tomo Sakanoue, Taishi Takenobu, Tsuyoshi Kawai, and Taku Hasobe

Controlled Excited-State Dynamics and Enhanced Fluorescence Property of Tetrasulfone[9]helicene by a Simple Synthetic Process

J. Phys. Chem. C, **2016**, *120*, 7421–7427.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01123

(査読あり)

(3) Takao Sakuma, Hayato Sakai, Yasuyuki Araki, Tadashi Mori, Takehiko Wada, Nikolai V. Tkachenko, and Taku Hasobe

Long-Lived Triplet Excited States of Bent-Shaped Pentacene Dimers by Intramolecular Singlet Fission

J. Phys. Chem. A, **2016**, *120*, 1867–1875.

doi: 10.1021/acs.jpca.6b00988

(査読あり)

(4) Y. Yamamoto, H. Sakai, J. Yuasa, Y. Araki, T. Wada, T. Sakanoue, T. Takenobu, T. Kawai, T. Hasobe,

Synthetic Control of the Excited-State Dynamics and Circularly Polarized Luminescence of Fluorescent “Push–Pull” Tetrathia[9]helicenes
Chem. Eur. J. **2016**, *22*, 4263–4273.

Doi: 10.1002/chem.201504048

(査読あり)

(5) Hayato Sakai, Sho Shinto, Jatish Kumar, Yasuyuki Araki, Tomo Sakanoue, Taishi Takenobu, Takehiko Wada, Tsuyoshi Kawai, Taku Hasobe

Highly Fluorescent [7]Carbohelicene Fused by Asymmetric 1,2-Dialkyl-Substituted Quinoxaline for Circularly Polarized Luminescence and Electroluminescence

J. Phys. Chem. C, **2015**, *119*, 13937–13947.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b03386

(査読あり)

(6) 荒木保幸, 和田健彦

生体機能分子の構造変化検出を指向した時間分解円二色性測定法の開発

光化学：光化学協会誌, 46(1), 41–44(2015.1)

(査読あり)

(7) Hayato Sakai, Sho Shinto, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Tomo Sakanoue, Taishi Takenobu, Taku Hasobe

Formation of One-Dimensional Helical Columns and Excimerlike Excited States by Racemic

Quinoxaline-Fused [7]Carbohelicenes in the Crystal

Chem. Eur. J., **2014**, *20*, 10099–10109.

Doi:10.1002/chem.201402426

(査読あり)

(8) Sunao Hirayama, Hayato Sakai, Yasuyuki Araki, Minako Tanaka, Masaki Imakawa, Takehiko Wada, Taishi Takenobu, Taku Hasobe
Systematic Control of the Excited-State Dynamics and Carrier-Transport Properties of Functionalized Benzo[ghi]perylene and Coronene Derivatives

Chem. Eur. J., **2014**, *20*, 9081–9093.

DOI: 10.1002/chem.201304679

(査読あり)

(9) Koichi Ida, Hayato Sakai, Kei Ohkubo, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Tomo Sakanoue, Taishi Takenobu, Shunichi Fukuzumi, Taku Hasobe

Electron-Transfer Reduction Properties and Excited-State Dynamics of Benzo[ghi]peryleneimide and Coroneneimide Derivatives

The Journal of Physical Chemistry

C, 118(14), 7710–7720(2014.3)

(査読あり)

(10) Nishijima, M., Kato, H., Yang, C., Fukuhara, G., Mori, T., Araki, Y., Wada, T. and Inoue, Y.
Catalytic Bio-Supramolecular Photochirogenesis: Batch-Operated Enantiodifferentiating Photocyclodimerization of 2-Anthracenecarboxylate with Human Serum Albumin

ChemCatChem, 2013, *5*, 3237–3240.

doi:10.1002/cctc.201300160

(査読あり)

[学会発表] (計 1 2 件)

(1) M. Kuronuma, Y. Araki, S. SAKAMOTO, T. Wada

Time-resolved circular dichroism study on the photodynamics of cyclodextrin encapsulated aromatic molecules.

Pacificchem 2015, ホノルル(アメリカ合衆国), 2015.12.15-2015.12.20

(2) 佐藤岳仁, 黒沼 慎, 村上 慎, 荒木保幸, 坂本清志, 和田健彦
生体機能分子の構造変化の高感度・長時間分解解析を目指した CD 測定装置の開発 二重らせん DNA ポルフィリン誘導体相互作用の動的挙動解析の検討

第 64 回高分子討論会, 東北大学川内キャンパス(仙台市), 2015.9.15-2015.9.17

(3) 黒沼 慎, 荒木保幸, 坂本清志, 和田健彦
時間分解円二色性(CD)測定を活用したシクロデキストリン包接錯体の光励起状態における動的挙動解析
第64回高分子討論会, 東北大学川内キャンパス(仙台市), 2015.9.15-2015.9.17

(4) 荒木保幸, 佐藤岳仁, 黒沼慎, 坂本清志, 和田健彦
かさ高い置換基を導入したカチオン性ポルフィリンと二重らせん DNA 間相互作用の時間分解 CD 法による検討
2015年光化学討論会, 大阪市立大(大阪市), 2015.9.9-2015.9.11

(5) 黒沼慎, 荒木保幸, 佐野豊, 坂本清志, 和田健彦
高感度時間分解円二色性(CD)測定を活用したシクロデキストリン-芳香族化合物錯体の光励起状態の動的挙動解析
日本化学会 第95春季年会, 日本大学船橋キャンパス(船橋市), 2015.3.26-2015.3.29

(6) 荒木保幸, 黒沼慎, 坂本清志, 森直, 井上佳久, 和田健彦
キラルなダイマー分子の光励起状態の時間分解円二色性測定による検討
日本化学会 第95春季年会, 日本大学船橋キャンパス(船橋市), 2015.3.26-2015.3.29

(7) 荒木保幸, 黒沼 慎, 坂本 清志, 和田健彦
時間分解 CD 測定によるシクロデキストリン包接錯体の光励起ダイナミクスの検討
2014年光化学討論会, 北海道大学(札幌市), 2014.10.11-2014.10.13

(8) 荒木保幸, 西嶋政樹, YOSPANYA Wijak, 奥木暢, 井上佳久, 和田健彦
Saturation Transfer Difference (STD) 法を用いた血清アルブミンと 2-アントラセンカルボン酸間相互作用の解析
日本化学会 第94春季年, 名古屋大学(名古屋市), 2014.3.27-2014.3.30

(9) Yasuyuki Araki, Yoshiki Hamada, Makoto Murakami, Seiji Sakamoto, Takehiko Wada
Cation Exchange Induced G-Quadruplex Structural Dynamics Studied by Circular Dichroism Spectroscopy
ISNAC2013 第40回国際核酸化学シンポジウム, 神奈川大学(横浜市), 2013.11.13-2013.11.15

(11) Yasuyuki Araki, Yoshiyuki Hamada, Makoto Murakami, Seiji Sakamoto, Takehiko Wada
橢円率変化検出CD測定法の発展とその生物系への応用 (Development of elliptically-polarization-detected CD

apparatus and its application to the biological systems)

第51回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館(京都市), 2013.10.28-2013.10.30

(11) 荒木保幸, 濱田 芳生, 村上 慎, 坂本清志, 和田健彦
時間分解円二色(CD)スペクトル法を用いたカチオン交換により誘起される四重鎖核酸構造の動的挙動解析 (Time-resolved CD studies on dynamics of G-quadruplex structural changes induced by the replacement of species)
第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋大学(名古屋市), 2013.9.27-2013.9.29

(12) 荒木保幸, 濱田 芳生, 村上 慎, 坂本清志, 和田健彦
生体機能分子の構造変化の高感度・高時間分解能解析を目指した CD 測定装置の開発(XX)-塩交換による四重鎖核酸構造変化の動的挙動解析-
第23回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学(東京), 2013.7.31-2013.8.1

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/lab/wada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木保幸 (ARAKI, Yasuyuki)
東北大学・多元物質科学研究所・准教授
研究者番号: 80361179

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

和田健彦 (WADA, Takehiko)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号: 20220957