

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702034

研究課題名(和文) アジド・アルキン基を用いたVCDによる天然物・生体高分子の三次元構造解析法

研究課題名(英文) 3D structural analysis of (macro)molecules using VCD in the region above 1900 cm⁻¹

研究代表者

谷口 透 (Taniguchi, Tohru)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00587123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子の立体構造を簡便に決定しうる手法の開発は、薬剤や酵素など様々な分子の機能の理解に資するとともに、生命の起源にも新たな知見を与える。本研究では、赤外円二色性(VCD)という分光法を用いて、各種分子の立体構造を解析する手法の開発を行った。その結果、ポリエステルなど高分子の立体構造(二次構造)を解析する手法も確立できた。また、生命進化への関わりが示唆される脂質分子の構造も簡単に決定できることを見出した。VCDを用いることによって、既存の分析法では得られない構造情報も得られるため、各種分子の構造に対する理解がより深まるようになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Development of a method to analyze molecular stereostructures provides a detailed understanding of the functions of various molecules such as medicines and enzymes and of the origin of life. This work has established a new convenient method for analyzing molecular stereostructures by using vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy. For example, this work has demonstrated its effectiveness toward the secondary structure of macromolecules such as polyesters. Another example for the use of our VCD method is facile determination of lipid molecules that are suggested to have involved in the development of life. Because VCD spectroscopy provides structural information that can not be obtained by the other available methods, this method should deepen our understandings on molecular stereostructures.

研究分野：天然物化学・キラル化学

キーワード：有機化学 赤外円二色性 キラリティー タンパク質 構造解析

1. 研究開始当初の背景

分子の三次元構造を簡便に解析しうる手法の開発は天然物化学・有機合成化学・生体関連化学などの諸研究を加速させるとともに、生命現象のより詳細な理解に資する。低分子や中分子においては、NMR や MS による平面構造決定法が確立されている一方、相対配置・絶対配置・立体配座の決定法は限られている。生体高分子においては、溶液中の二次構造・高次構造をできるだけ自然に近い状態で、簡便かつ詳細に解析しうる手法の開発が求められる。

本研究の代表者である谷口(以下、代表者)はこれまで、赤外円二色性(以下、VCD)分光法を用いて、分子の立体構造を簡便に決定する方法論の開発に従事してきた。2012年に、代表者はVCDシグナルの感度を高めつつ、かつシグナルの形状から分子の立体構造を決定する手法「VCD励起子キラリティー法」を開発した(*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3695.)。本手法は二つのカルボニル基の相互作用に基づくツインピーク型VCDシグナルの符号・強度から各種分子の絶対配置や立体配座を決定する(図1)。本手法は高分子化合物や様々な微量生体分子の構造解析にも利用可能と予想されたものの、その適用範囲は実験的には示されていない。また、本手法の物理化学機構も不明なままだった。さらに、カルボニル基を多数含む分子(タンパク質など)においてはスペクトルの解釈が複雑化するという弱点があった。

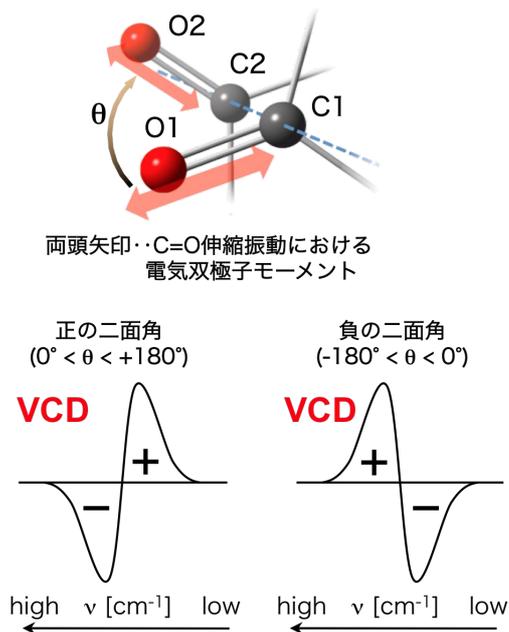


図1. VCD励起子キラリティー法を用いると、分裂型VCDシグナルの形状から、分子の構造解析ができる。二つの官能基(ここではカルボニル基)が手前から奥に向かって時計回りに位置する場合は、低波数側から高波数側にかけて正・負のVCDシグナルが観察される。反時計回りの場合は、負・正のVCDシグナルが観察される。

2. 研究の目的

そこで本研究ではまず、VCD励起子キラリティー法の適用範囲と物理化学機構の解明を目指した。本研究の達成により、VCD励起子キラリティー法が様々な分子の構造解析への有用性が確立され、構造解析を伴う様々な研究が加速されると考えられる。

さらに、カルボニル基以外の官能基についても本手法が適用されるかどうかを検証することとした。ここでは、アジド基やアルキン基などを用いて検証を進めることとした。アジドやアルキンが吸収を示す2100 cm⁻¹付近の領域は、通常の生体分子が吸収を示さないため、これらの官能基を解析対象の分子に導入することで望みの部位の構造情報を抽出して観測できるようになると考えられる。

3. 研究の方法

物理化学的機構の解明には、特に精度の高いVCD測定が必要である。また、2100 cm⁻¹付近は、通常のVCD装置では測定できない領域であるため、そのような特殊なVCDを測定しうる装置が求められた。そこで、日本分光社から、2100 cm⁻¹領域も含めて、広い範囲を感度良く測定しうる装置を特注で購入し、それを主に本研究に用いた。

測定対象とした各種試料は、主に代表者らが化学合成した。一部の化合物については、共同研究者からご提供いただいた。

4. 研究成果

本項では、研究成果を(1)～(4)に分けて記載する。

(1) VCD励起子キラリティー法による高分子の解析:

ポリエステルはタンパク質のエステル類縁体であり、ペプチドミメティック研究への利用が期待できるものの、その二次構造の解析は困難だった。そこで本研究ではVCD励起子キラリティー法を、代表的なポリエステルであるポリ(L-乳酸)に適用し、その二次構造の解析しうるかを検討することとした。

図2に示すように、ポリ(L-乳酸)は各種溶液中で低波数側から高波数側にかけて強い負・正のVCDシグナルを示した。本結果より、ポリ(L-乳酸)は溶液中で左巻きらせんを形成することが示唆された。また、L-乳酸の2~6量体を有機合成し、そのVCDを解析することによって、ポリ(L-乳酸)の二次構造を左巻き10₃様らせんと結論した。さらに、VCD励起子キラリティー法は、ポリ(L-乳酸)を内包したアミロース複合体の構造解析にも利用可能であることも示した(*Macromolecules* 2014)。

一方我々は、非平面アミド結合を主鎖に有するペプチド類縁体についても、VCDによる構造解析を行った。その結果、理論計算を用いた解析によって、非平面アミドの立体配座は側鎖の構造によって制御されうること

を見出した (Chem. Commun. 2016)

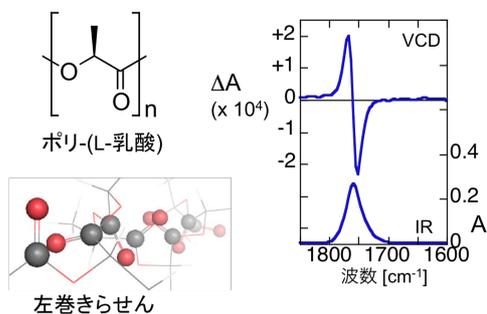


図 2. VCD 励起子キラリティー法によるポリエステル
の構造解析。低波数側から高波数側にかけて負-正の VCD
シグナルを示したことより、ポリ-(L-乳酸)は溶液中で
左巻きらせんを形成することが分かった。

(2) VCD 励起子キラリティー法によるグリセロリン脂質の構造解析:

グリセロリン脂質はほぼ全ての生物の細胞において、最も多く存在する脂質群である。グリセロリン脂質の立体配置は、細菌では sn-3、古細菌では sn-1、哺乳類では sn-3 と考えられてきた (図 3)。しかし、これらの立体配置を調べる手法はほとんどなく、実際に例外も知られている。そこで本研究では、VCD 励起子キラリティー法を用いてグリセロリン脂質の立体配置を簡便に決定しうる手法の開発に着手した。

検討の結果、グリセロリン脂質は 2 本のアシル鎖のカルボニル基の相互作用によって、グリセロール部分の立体配置を反映した分裂型 VCD シグナルを示すことを見出した。本方法論を用いると、VCD シグナルの符号を見るだけでグリセロリン脂質の立体配置を帰属できる。実際に本研究では、大腸菌抽出、鶏卵抽出、ウシ心筋ミトコンドリア由来の各種グリセロリン脂質について本手法を適用し、これらの立体配置について実験的に確かめた (J. Am. Chem. Soc. 2015)。

VCD 励起子キラリティー法の利用は、立体配座の自由度が小さい環状化合物数種のみについての応用を示せたのみだったが、グリセロリン脂質の成果によって、鎖状化合物にも本手法が有効であることが示された。

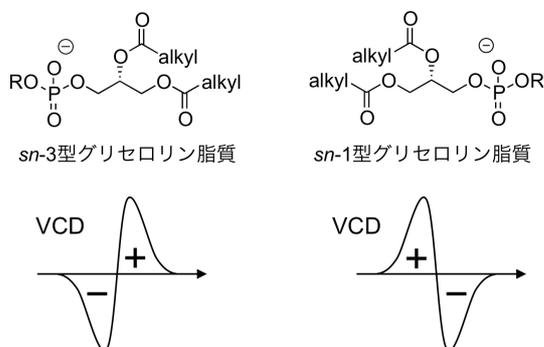


図 3. グリセロリン脂質の立体配置と分裂型 VCD シグナルの関係。この関係性を用いると、グリセロリン脂質

の立体配置を容易に決定できる。

(3) 小分子の VCD 構造解析および VCD 励起子キラリティー法の物理化学機構の研究:

グリセロリン脂質以外の小分子への VCD 励起子キラリティー法の適用は、すでに代表者らによって数例報告されている。本研究ではこれに加えて、カンクロリド類やルプロブラミドにも VCD 励起子キラリティー法を適用し、その立体配置を決定した (Org. Biomol. Chem. 2016 および Angew. Chem. Int. Ed. 2016)。一方、他グループも VCD 励起子キラリティー法を用いた低分子・超分子の構造解析を進めており、このことから VCD 励起子キラリティー法の汎用性が示されたと考えている。

本研究では、実験結果を基に VCD 励起子キラリティー法の物理化学機構を議論すべく研究を進めていたが、S. Abbate らを始めとする理論化学者が研究を先行し、2015 年頃から各種論文を報告している。2015 年から 2017 年に報告された論文について、議論を簡潔にまとめると、

- ・ VCD 励起子キラリティー法で観察される VCD シグナルの増強現象は、励起子相互作用以外の効果が認められること。
- ・ 柔軟性の高い分子への利用は注意を要すること。ただし、原田・中西らによる UV-CD の励起子キラリティー法の性質を考えると、この点は明らかである。
- ・ 自由度の低い分子に対するカルボニル基を用いた VCD 励起子キラリティー法の利用については、これまで反例が示されていない。

代表者の研究、ならびに他グループの動向について、以下数篇の論文にまとめた (Polymer J. 2016、有機合成化学協会誌 2017、Bull. Chem. Soc. Jpn. 2017)。

(4) アジド基を有する有機化合物の VCD 解析:

糖やステロイドを基本骨格として、アジド基を 1 つ乃至 2 つ有する化合物を有機合成し、その VCD を測定したところ、2 つ有する場合にのみ 2100 cm^{-1} 付近に図 1 に示したような正-負または負-正の VCD シグナルを観察することができた。予想通り、アジド基に由来する励起子型 VCD シグナルはカルボニル基存在化でも観察することができた。アジド基を一つのみ有する場合の例については、Org. Lett. 2017 に報告した。

アジド基を発色団として用いる場合の問題点は、C-N 結合の回転が制御できない点である。そこで次に、アルキン基を始めとして、1900 cm^{-1} から 2300 cm^{-1} に吸収を示す各種官能基を 2 つ有するキラル低分子化合物を合成し、その VCD を検討した。その結果、アジド基以外にも有望な官能基を数種発見した。また、そのような官能基を生体高分子に導入し、カルボニル基以外の官能基を用いる

ことによって VCD 励起子キラリティー法を拡張し、生体高分子の構造情報を抽出して観測することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- 1 谷口透「Analysis of Molecular Configuration and Conformation by Electronic and Vibrational Circular Dichroism: Theoretical Calculation and Exciton Chirality Method.」Bull. Chem. Soc. Jpn. 査読有、2017、印刷中。
- 2 谷口透、門出健次「Analysis of Configuration and Conformation of Furanose Ring in Carbohydrate and Nucleoside by Vibrational Circular Dichroism.」Org. Lett. 査読有、Vol. 19、2017、pp. 404-407.
- 3 谷口透、中野貴恵、馬場亮佑、門出健次「Analysis of Configuration and Conformation of Furanose Ring in Carbohydrate and Nucleoside by Vibrational Circular Dichroism.」Org. Lett. 査読有、Vol. 19、2017、pp. 404-407.
- 4 水谷将馬、小森健太、谷口透、門出健次、倉持幸司、椿一典「A Bioinspired Synthesis of (±)-Rubrobramide, (±)-Flavipucine, and Isoflavipucine.」Angew. Chem. Int. Ed. 査読有、Vol. 55、2016、pp. 9553-9556.
- 5 谷口透、本元貴大、門出健次「Studying the stereostructures of biomolecules and their analogs by vibrational circular dichroism.」Polymer J. 査読有、Vol. 48、2016、pp. 925-931.
- 6 門出健次、谷口透「VCD 励起子キラリティー法」分光研究、査読有、Vol. 65、2016、pp. 137-144.
- 7 Wang S.、谷口透、門出健次、他 4 名「Hydrogen Bonding to Carbonyl Oxygen of Nitrogen-Pyramidalized Amide – Detection of Pyramidalization Direction Preference by Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy.」Chem. Commun. 査読有、Vol. 52、2016、pp. 4018-4021.
- 8 浅井禎吾、森田峻太郎、谷口透、門出健次、大島吉輝「Epigenetic stimulation of polyketide production in *Chaetomium cancroroides* by an NAD⁺-dependent HDAC Inhibitor.」Org. Biomol. Chem. 査読有、Vol. 14、2016、pp. 646-651.
- 9 谷口透、真井大輔、柴田将孝、板橋豊、門出健次「Stereochemical Analysis of Glycerophospholipids by Vibrational Circular Dichroism.」J. Am. Chem. Soc. 査読有、Vol. 137、2015、pp. 12191-12194.
- 10 谷口透「赤外円二色性による天然物の三次元構造解明」現代化学、査読無、

Vol. 531、2015、pp. 34-35.

- 1 1 本元貴大、谷口透、野村晋太郎、門川淳一、門出健次「In Depth Study on Solution-State Structure of Poly(lactic acid) by Vibrational Circular Dichroism.」Macromolecules 査読有、Vol. 47、2014、pp. 5313-5319.

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1 谷口透「立体構造解析から拓く天然物化学」第 4 回慶応有機化学若手シンポジウム、2016 年 5 月 8 日、慶応義塾大学(神奈川県横浜市)
- 2 谷口透「キラル分光法を用いた生理活性物質・糖・ペプチドの構造解析」第 23 回農芸化学 Frontiers シンポジウム、2016 年 3 月 30 日、定山溪ビューホテル(北海道札幌市)
- 3 谷口透、「赤外円二色性で見るキラル高分子の立体構造」2015 年度北海道高分子若手研究会、2015 年 8 月 29 日、定山溪グランドホテル瑞苑(北海道札幌市)
- 4 谷口透、「赤外円二色性によるキラル構造解析から拓く生体高分子化学」第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 27 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- 5 谷口透「赤外円二色性による立体配置・立体配座決定法の開発」日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 28 日、日本大学(千葉県船橋市)
- 6 谷口透、「Easy Access to Molecular Stereostructure by Vibrational Circular Dichroism」第 8 回シンガポール国際化学会議、2014 年 12 月 15 日シンガポール国立大学(シンガポール、シンガポール)
- 7 谷口透、「赤外円二色性キラル構造解析から拓く天然物化学」天然物ケミカルバイオロジー 第 6 回若手研究者ワークショップ、2014 年 10 月 29 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
- 8 谷口透、「Seeing what other methods can not see: VCD calculation and the VCD exciton chirality method」第 4 回国際振動光学活性会議、2014 年 10 月 27 日、河北大学(中国、河北)
- 9 谷口透「赤外円二色性による天然有機化合物の三次元構造解析」日本農芸化学会若手の会、2014 年 9 月 23 日、定山溪ビューホテル(北海道札幌市)
- 10 谷口透「キラル構造解析から拓く天然物化学」第 49 回天然物化学談話会、2014 年 7 月 3 日、せとうち児島ホテル(岡山県倉敷市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口透(TANIGUCHI, Tohru)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号：00587123