

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月13日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17849

研究課題名(和文) 界面近傍の水と、そこから少し離れた水の運動状態を動的核分極NMR計測で比較する。

研究課題名(英文) Comparing the rheology of water surrounding soft matter surfaces using dynamic nuclear polarization NMR measurement.

研究代表者

景山 義之 (KAGEYAMA, Yoshiyuki)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：90447326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：たんぱく質や細胞膜など、水中の高分子や分子集合体は、周囲の水との相互作用によって安定的な構造を保つとともに、機能発現においても、水との協同的な作用を利用しています。このような高分子・分子集合体の周りの水について、その流動性をはじめとした動的性状を計測する手法を向上させることが、本研究の目的です。

この目的の下、自作計測装置の改良を行いました。また、光を当てると分子構造を変える機能的な計測用プローブの合成を達成しました。現在得られつつある計測結果について、今後は物理学者との共同研究によって解釈を検討し、分子集合体を取り囲む水の運動性状を明らかにしていきます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

たんぱく質や細胞膜など、水中で機能する柔らかな分子集合体は、その構造や機能において、周囲の水と連携していると考えられています。この水の性状を知ることが、生命現象の分子科学的理解、薬理効果の理解、薬物動態についての理解の進展が期待される他、昨今急速に研究が進む、ソフト素材や分子ロボットによる「力の発現」機構の設計にも活かされると思われます。このような応用研究を発展させるための基盤として、1ピコ秒～1000ピコ秒スケール(ピコ秒は1秒の1兆分の1)の水の運動性状を調べる研究が国際的に進められています。その一翼として、計測を支援する分子を開発したことが、この研究の成果になります。

研究成果の概要(英文)：Polymers and molecular assemblies exhibited in water (e.g. peptides and bio-membranes), stabilize their structures with the interaction between water and are worked cooperatively with water molecules. The aim of this research project is in developing the method to reveal the dynamic behavior of water surrounding such soft assemblies.

In this project, we developed our home-made measurement system for in-situ dynamic nuclear polarization nuclear magnetic resonance, with synthesizing a newly functional probe, which change its structure by light-irradiation. Next step, we will develop the understanding about movement of water molecule around soft materials via discussion about the obtained results with physicists.

研究分野：生体機能関連化学・有機化学・物理化学

キーワード：水 分子集合体 核磁気共鳴 分子運動 光開裂反応 有機合成 オーバーハウザー効果 緩和計測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴分光法 (NMR 分光法) は、有機化合物の構造決定の他、分子の動きを解析するためにも使われてきた分光法です。

生きた細胞の中では、たくさんの有機分子が水を媒体として集まり、「生きる」という動きを伴った特徴的な機能を発現しています。細胞のような小さな空間で水は、有機分子と近接することで、バケツやビーカーの中の水(「バルクの水」という)とは異なる振る舞いをみせていると考えられます。近年では、たんぱく質が形成される過程で、たんぱく質周囲の水がどのようにたんぱく質から離れていくのか、という水の振る舞いが、たんぱく質の構造を決めているのではないかと考えられています。このような背景の下、分子・高分子や、分子集合体に接している水の振る舞いを明確化していくことは、分子科学的に興味を持たれています。

分子・高分子・分子集合体の周りの水を計測するための手法として、今世紀に入り、動的核分極 NMR 分光法(DNP-NMR 分光法)を用いた計測が行われるようになりました。DNP は、電子スピン-核スピン間の相互作用が核スピンの分極状態を偏らせる結果、NMR シグナルが強くなる現象です。DNP-NMR 分光法は、NMR シグナルが高感度化されることから、主に二つの用途で注目されています。一つは、微量の物質の NMR 計測による構造決定です。ジャイロトロンの実用化、クロスポーラリゼーション、ソリッドエフェクトの発見や応用により、極めて高感度な固体 NMR 計測ができるようになりました。もう一つは、電子スピンの相互作用する空間に領域を絞った、対象選択的な NMR 計測です。一例として、分子・高分子・分子集合体の周りの水を対象を絞った、軽水中でのプロトン NMR 計測が行われるようになりました。

分子集合体や高分子の周りの水を対象にした DNP-NMR 計測は研究開始当初から行われていました(例えば J. M. Franck, *et al.* JACS 2015; 研究代表者ら ACIE 2014; S. Han, *et al.* JACS 2009)。一方、それらの計測では、計測中の温度上昇による試料環境の変化が大きいこと、分子運動を等方的と仮定しての解析、確度の悪い濃度見積り、試料交換に伴う計測系の歪み形成など、改善すべき点を含んでいることから、計測の信頼性を向上させるために、計測手法の改善、さらなるデータ取得が求められていました。

2. 研究の目的

同一容器の試料を対象に、二つの状態での DNP-NMR 計測を行い結果を比較することで、電子スピン(ラジカル分子)と水分子との相互作用(相関時間)の特徴を明らかにしていくことを目的としました。特に、分子集合体の近くにラジカル(電子スピン)がある場合と、分子集合体から離れてラジカル(電子スピン)がある場合との、電子スピン・水のプロトン核スピンとの相互作用の違いを研究対象にしました。(図1)

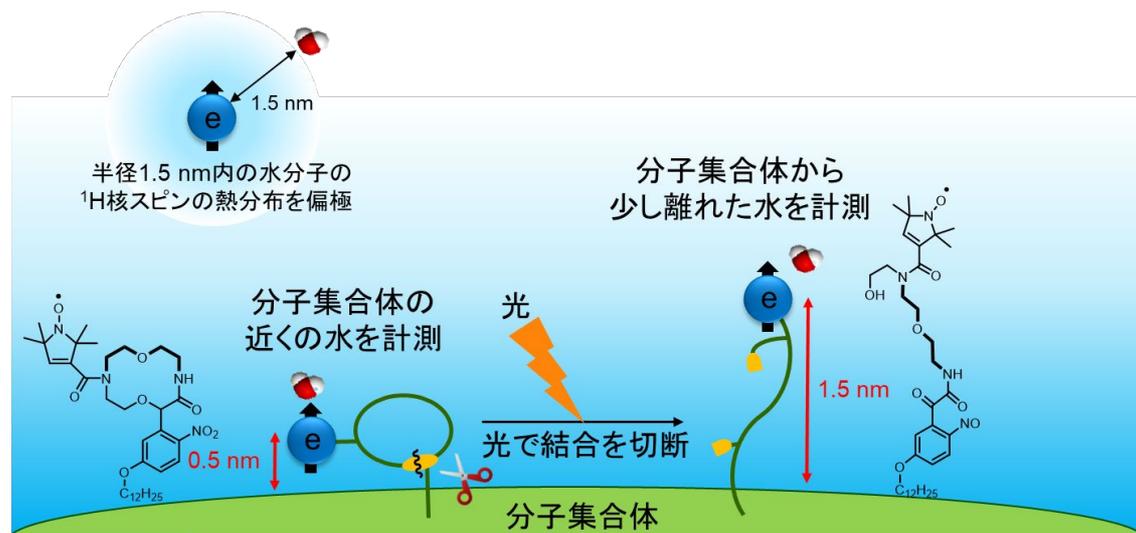


図1 同一容器の試料を対象に、分子集合体の周りの水の動的性状を DNP-NMR で二通り計測する方法の概要

3. 研究の方法

(1) 光によって構造変化するラジカルプロープの設計と合成

光開裂性を示す *ortho*-ニトロベンジル部位を大環状構造に有するラジカルプロープは、照射によって、ラジカル部位とアンカー部位の平均距離を大きく変えることができると考えられます。このようなラジカルを新規に合成し、分子集合体に修飾すると、ラジカル部位は、照射前には分子集合体の近傍に、照射後には分子集合体から少し離れたエリアに位置すると考えられます。

(2) 二状態（光照射前・照射後）での分子集合体周囲の水の DNP-NMR 計測

合成したラジカルプローブを修飾した分子集合体について、光照射前後で DNP-NMR 計測を行うことで、分子集合体の近接領域と、そこから少し離れた領域の水の動きを定量的に比較します。

また、この計測ができるように、自主製作した *in-situ* DNP-NMR 分光装置の計測確度・精度の改善します。

4. 研究成果

(1) 光によって構造変化するラジカルプローブの設計と合成

当初計画のラジカルプローブの合成

当初計画では、8 ステップでのラジカルプローブ合成を目指していました(図2)。図2の4→5のステップは、4-ブロモマンデロニトリルを用いたモデル合成ではできていたものの、2位にニトロ基を導入したマンデロニトリルでは進みませんでした。種々の経路変更で8までの合成を目指したものの進めることができず、ラジカルプローブの設計を29へと見直すことにしました(図3および図4)。

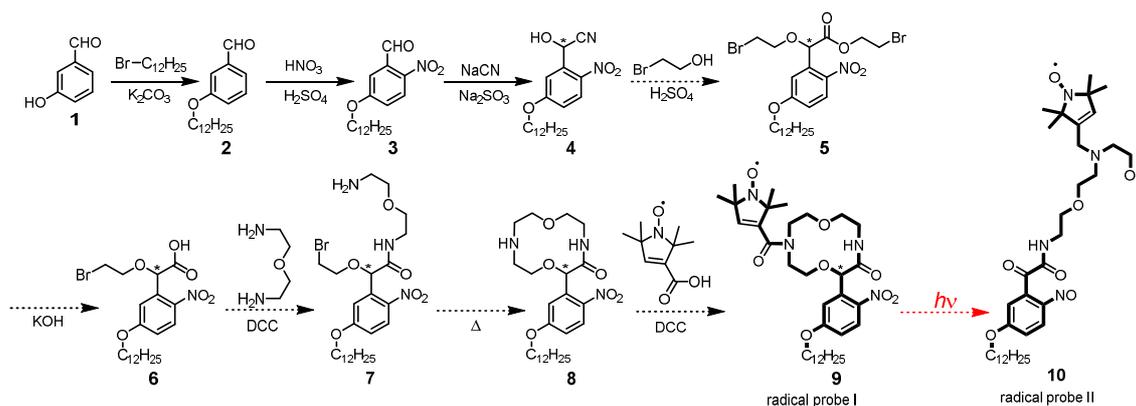


図2 当初計画のラジカルプローブ(9)の合成スキームとその光開裂反応

設計変更後の、ラジカルプローブのモデルの合成

設計変更により合成ステップ数が増えたことから、まずはアンカー部位をもたないモデルラジカル 21 を合成することにしました。ラセミ体の 18 から環化反応で 19 を得る反応は、立体選択性が求められることから最も困難なステップであると考えていたものの、6割を超える収率での合成に成功しました。ノシル基の脱保護およびニトロキシドラジカルの結合によりラセミ体の 21 を合成を達成しました(但し不純物を含む)。得られた 21 を対象に、光照射による 22 の発生(高速液体クロマトグラフ(HPLC)および紫外吸収分光で調査)と、その前後での電子スピン共鳴(ESR)シグナルの変化の有無を調査し、ラジカル部位を有していても、光開裂反応が進行すること、および光照射によってラジカルが失活しないことを確認しました。

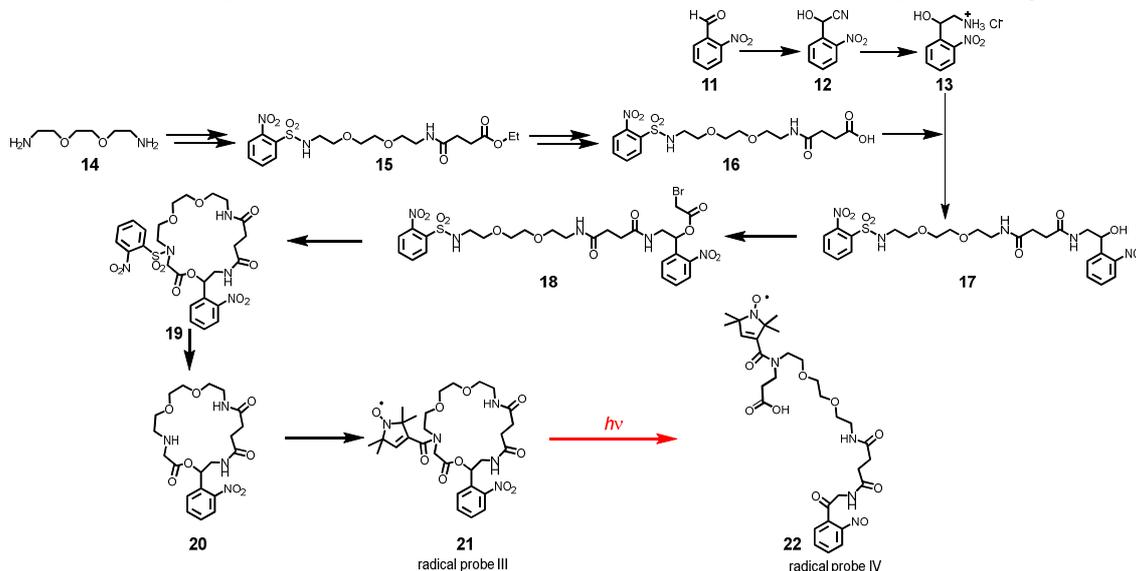


図3 設計変更したラジカルプローブ(29)のモデル化合物(21)の合成と光開裂反応

設計変更後の、ラジカルプローブの合成

引き続き、アンカー部位をもつラジカルプローブ(29)の合成を行いました。研究期間終了時まで、ラセミ体の 29 を数十ミリグラムスケールで合成しました。鍵段階である環化反応は、所要反応時間が長くなったものの、収率は 60% を越えました。途中ラセミ体の 28 の構造決定は、¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹H-COSY NMR、高分解能質量分析によって行いました。また、ラセミ体の 29 の構造決定は、高分解能質量分析によって行うとともに、純度は HPLC で確認しました。ただし、ジアステレオマーの立体構造は研究期間終了時までには明らかにできませんでした。

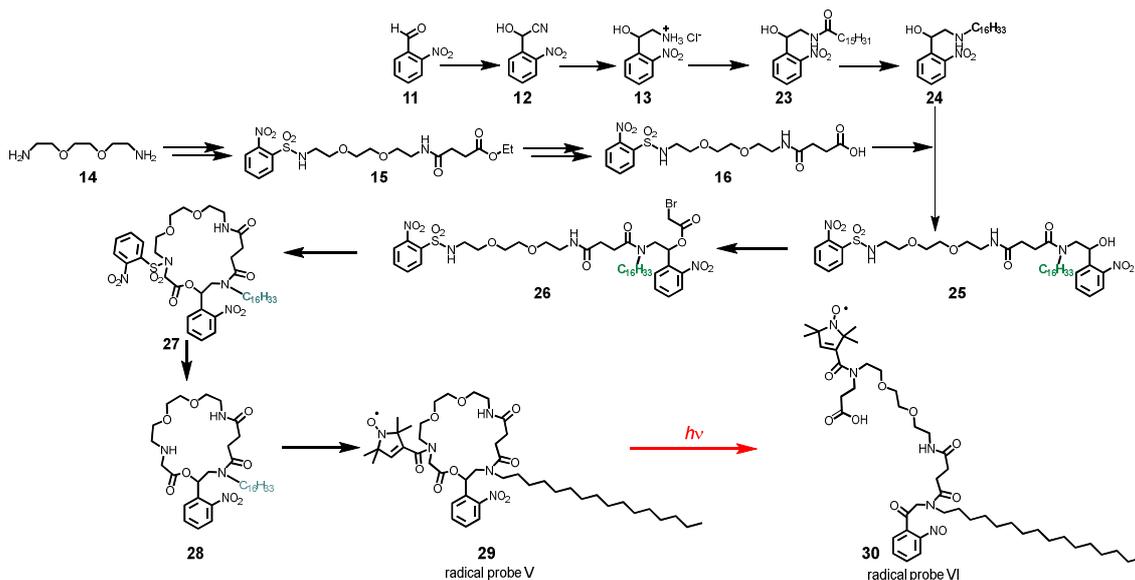


図 4 設計変更したラジカルプローブ(29)の合成と光開裂反応

(2) 二状態（光照射前・照射後）での分子集合体周囲の水の DNP-NMR 計測

自主製作した *in-situ* DNP-NMR 分光装置の計測確度・精度の改善

NMR 計測用のラジオ周波数コイル(rf-コイル)の細線化や、冷却剤の利用による試料温度変化の抑制等を通じ、計測精度の向上が進みました。

アゾベンゼン誘導体とラジカル修飾脂肪酸を含有するリポソームを対象にした、暗所 / 光照射下での DNP-NMR 計測

自主製作 *in-situ* DNP-NMR 分光装置で、外部光源を用いた光照射実験を行うデモンストレーション実験として、アゾベンゼン含有リポソームを取り囲む水を対象にした、光照射前後での DNP-NMR 計測を行いました。アゾベンゼン含有リポソームの粒径は、暗所と光照射下で僅かに変わります（我々が用いた実験系では約 5% 変化）。このことに起因する、「カップリング定数」と呼ばれる電子スピンと核スピンの相互作用の程度を示す定数は、照射前後とも約 0.035 で大きくは変動しないことが明らかになりました。

合成したラジカルプローブ 29 を用いた分子集合体を取り囲む水の DNP-NMR 計測

研究期間終了時まで 29 の合成は達成したものの、DNP-NMR による水の運動の定量的解析とその解釈の推進までは期間内に実施できませんでした。終了翌年度（平成 31 年度・令和元年度）の夏までに通りの計測を完了し、得られたデータについての検討を国際共同研究により進めていく予定です。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 7 件)

○李ギョレ・景山義之・武田定, 「DNP-NMR を用いたソフトマター近傍の水のダイナミクス解析のための光開裂性ラジカルプローブの設計と合成」, 第 99 日本化学会春季年会 (2019 年 3 月 16 日-19 日, 甲南大学 (神戸市・兵庫県))

○李ギョレ・景山義之・武田定, 「DNP-NMR を用いた分子集合体近傍の水のダイナミクス解析のための光開裂性ラジカルプローブの設計と合成」, 第 57 回電子スピンサイエンス学会 (2018 年 11 月 1 日-3 日, 北海道大学(札幌市・北海道))

○景山義之, 「機能的動的核偏極 NMR (fDNP-NMR) を志向したラジカルプローブの合成」, 2018 構造有機化学研究会・ミニシンポジウム (2018 年 9 月 21 日-22 日, 滋賀県立大学(彦根市・滋賀県))

○Gyeorye Lee, Yoshiyuki Kageyama, Sadamu Takeda, "Light-powered self-sustained mechanical motion of azobenzene crystal as the resultant of a couple of photoreaction and phase transition", 岡崎

コンファレンス 2018 (2018 年 8 月 31 日-9 月 2 日, 分子科学研究所(岡崎市, 愛知県))
○李ギョレ・景山義之・武田定, 「DNP-NMR を用いた水の流動性解析のための光照射でリ
ンカー長が変わるラジカルプローブの設計と合成」, 第 55 回電子スピンサイエンス学会 2016
(2016 年 11 月 9 日-11 日, 大阪市立大学(大阪市・大阪府))
○近藤僚太・景山義之・武田定, 「動的核分極 NMR 法を用いたベシクルの大きさ変化に伴
うベシクル表面の水の流動性変化の計測」, 第 55 回電子スピンサイエンス学会 2016 (2016 年
11 月 9 日-11 日, 大阪市立大学(大阪市・大阪府))
○Gyeorye Lee, Yoshiyuki Kageyama, Sadamu Takeda, "Design and synthesis of radical molecule
with photolabile group for analysis of rheology of water using DNP-NMR", in *HOKUDAI-NCTU
International Joint Symposium on Nano, Opto and Bio Sciences* (2016 年 10 月 4 日-5 日, 北海道大
学 (札幌市・北海道))

〔その他〕

ホームページ

<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~y.kageyama/public/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名： 武田 定

ローマ字氏名：(TAKEDA, Sadamu)

研究協力者氏名： 近藤 僚太

ローマ字氏名：(KONDO, Ryota)

研究協力者氏名： 李 ギョレ

ローマ字氏名：(LEE, Gyeorye)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。