

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05567

研究課題名(和文) 光増感金属錯体を導入した人工蛋白質複合体内チロシンラジカル生成と化学反応系の創製

研究課題名(英文) Photoinduced electron transfer reactions in an artificial protein incorporating photosensitized metal complex and its tyrosine radical formation

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質ラジカル種は一般に単寿命な不安定中間体であり、その生成や反応性の制御は非常に困難な課題である。光合成反応中心で見られるように、なぜチロシン残基がラジカル種発生の役割を果たし、どのように高い反応活性を保っているかについては、分光学的検出とその化学反応性の系統的な解析の困難さや、複雑な蛋白質電子移動反応機構のため、明確に結論付けることは未だ容易ではない。

本研究では、新たに酵素とその活性中心へ特異的に結合する小分子の作用機序に着目して、光増感剤を基体とした酵素複合体を人工的に構築し、その多段階的な光誘起電子移動反応の解析と蛋白質内チロシンラジカルの位置選択的かつ安定な生成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、化学的手法により蛋白質内光誘起電子移動反応系を人工的に構築し、チロシンラジカルのような化学反応中間体を人工蛋白質内に位置選択的かつ安定に生成させる取り組みを行った。

我が国のエネルギー政策においても、クリーンなエネルギー源である光(太陽光)を利用する生体分子の新規機能発現システムの開発が、社会的にも注目を集めているところである。今後さらに、触媒反応系と組み合わせたチロシンラジカルの光化学反応性を調査する予定である。これらは、エネルギー・環境問題にかかる人工光合成、例えば光照射による水からの酸素発生反応なども視野に入れた、新規な光エネルギー変換反応系の創製へと繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein radical species are generally unstable intermediates, and controlling their formation and reactivity is a very difficult task. It is still not easy to clearly conclude why tyrosine residues play a important role in radical species generation and how they maintain high reaction activity, as seen in photosynthetic reaction centers, due to the difficulty of spectroscopic detection and systematic analysis of their chemical reactivity and the complex protein electron transfer reaction mechanism.

In this study, we constructed an artificial protein complex based on a photosensitizer and analyzed its multi-step photoinduced electron transfer reaction and site-selective and stable generation of tyrosine radicals in the protein.

研究分野：光化学、超分子化学、生物無機化学

キーワード：光誘起電子移動 キモトリプシン 酵素 阻害剤 ルテニウム錯体 発光性化合物 光増感

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、生命・環境・エネルギー問題などの観点から、光（太陽光）をエネルギー源として利用する、生体分子による光エネルギーの化学エネルギーへの変換システムの開発が注目を集めている。自然界では植物の光合成を始めとした、光を利用したエネルギー生産や代謝経路等が良く知られており、それらの本質である重要な素過程として、蛋白質・酵素で見られる高速・高効率な多段階電子移動反応が挙げられる。このような生体内電子移動反応の多くでは、蛋白質・酵素が中心的な触媒機能を担っており、その触媒機能には蛋白質内のアミノ酸残基が酸化されて生じる蛋白質ラジカル中間体が大きく関与している。代表的な例として、光合成反応中心 Photosystem II における水からの酸素発生系(oxygen evolving complex, OEC)に関与するとされるチロシンラジカルが挙げられる。その一方で、蛋白質ラジカル種は一般に単寿命な不安定中間体であり、その生成や反応性の制御は非常に困難な課題である。光合成反応中心で見られるように、なぜチロシン残基がラジカル種発生の役割を果たし、どのように高い反応活性を保っているかについては、分光学的検出とその化学反応性の系統的な解析の困難さや、複雑な蛋白質電子移動反応機構のため、明確に結論付けることは未だ容易ではない。

このような蛋白質ラジカル種を人工的に生成させ、その化学反応性を制御するには、安定なラジカル種を高収率で位置選択的に得ることが第一に重要となる。現在まで、化学的手法により人工的な光誘起電子移動反応系を構築し、チロシンラジカルのような反応中間体を蛋白質内で位置選択的かつ安定に生成させる試みが幾つかの研究グループにより進められてきている。例えば、リボヌクレオチドレダクターゼの $\alpha 2$ サブユニットへ結合可能な、ベンゾフェノンまたはアントラキノン系を非天然部位とするチロシン含有ペプチドを開発し、その光照射によりチロシンラジカル生成と電子移動反応性を観測した例や、光増感作用を示すトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$) 錯体を用い、チロシンを疎水空間に配置した 3α -ヘリックスポリペプチドとの混合系による光誘起電子移動反応により、チロシンラジカルを観測に成功した例などが報告されてきた。

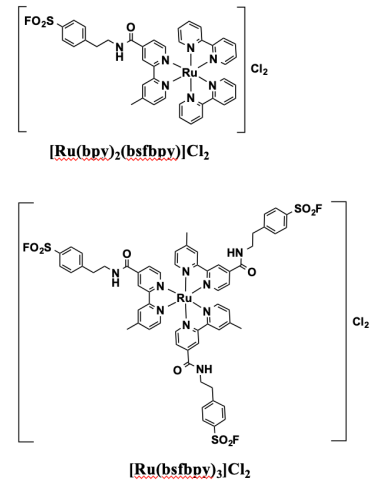
2. 研究の目的

上記のような背景から我々は、蛋白質・酵素が行う巨大で複雑な生体内光電子移動反応を、より単純化したモデルとするため比較的小さな蛋白質・酵素を用いることで人工的に再構築し、その反応機構の解析や新たな蛋白質の光電子・エネルギー伝達系の創製を目指した基礎的研究を進めていた。本研究では、酵素とその活性中心へ特異的に結合する小分子の作用機序に着目して、光増感剤を基体とした酵素複合体を人工的に構築し、その多段階的な光誘起電子移動反応の解析と蛋白質内チロシンラジカル位置選択的かつ安定な生成を目的とした。

具体的に我々は、光エネルギーを利用した蛋白質内多段階光電子移動反応系を構築するため、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体およびその類縁錯体、その他蛍光性化合物を光増感分子として用いることとした。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体とその類縁錯体は、可視光領域に吸収を示す酸化還元活性な光増感素子である。また bpy 配位子には、合成化学的に位置選択的な置換基の導入が容易であり、その数や種類を変化させることで、光機能性・酸化還元活性を調節することができる。一方で、光増感剤を導入する酵素として、構造・機能が良く知られている加水分解酵素であるキモトリプシン(ChT)を選択し、その“活性中心への特異的結合または化学修飾が可能かどうか”に分子設計における着眼点を置いた。

3. 研究の方法

CHT においては、活性中心のセリン(Ser 195)残基へ不可逆的に共有結合するベンゼンスルホニルフルオリド誘導体を bpy 配位子に結合した、Ru(bpy)₃ 型錯体の分子設計を行った。その結果、水溶液中で CHT と混合することにより、それぞれの活性中心へ結合が可能な Ru(bpy)₃ 型錯体、すなわち右図に示すような [Ru(bpy)₂(bsfbpy)]Cl₂, [Ru(bsfbpy)₃]Cl₂ の開発に成功した。また調製した CHT-Ru(bpy)₃ 型錯体複合系に対し、メチルビオローゲン(MV²⁺)を電子受容体として用いたときの光誘起電子移動反応を発光、発光寿命、過渡吸収スペクトル測定等により検討した。



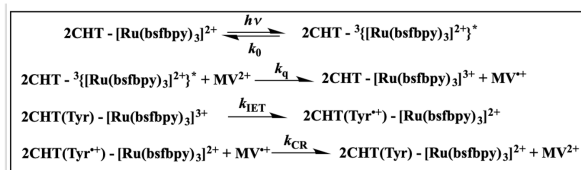
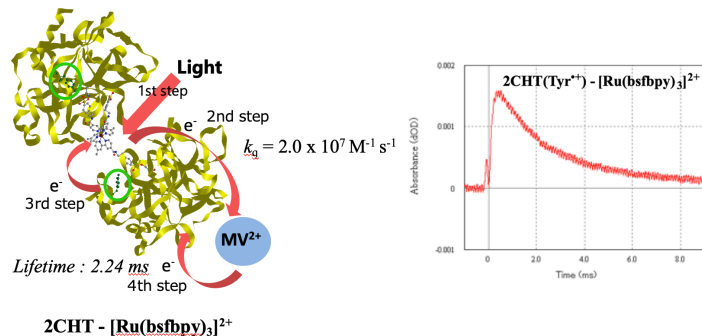
4. 研究成果

阻害剤存在下による CHT の触媒活性評価等の解析により、CHT と結合が可能な [Ru(bpy)₂(bsfbpy)]Cl₂, [Ru(bsfbpy)₃]Cl₂ では、それぞれ CHT との溶液内混合により置換基末端が Ser 195 に共有結合し、[Ru(bpy)₂(bsfbpy)]Cl₂ 錯体では CHT と等量反応した CHT-[Ru(bpy)₂(bsfbpy)]²⁺ 複合体を、[Ru(bsfbpy)₃]Cl₂ では CHT が 1:2 の割合で反応した 2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体を与えた (下図)。

[Ru(bsfbpy)₃]Cl₂ は CHT に対して 3 つの結合部位をもつが、CHT との結合により Ru(bpy)₃ 型錯体まわりが立体的に嵩高くなるため、1:2 の割合で結合した複合体が結果的に得られた。

続いて、CHT-[Ru(bpy)₂(bsfbpy)]²⁺ 複合体および 2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体に対し、光誘起電子移動反応を検討した。図にはそれらの反応スキームを示している。MV²⁺ との電子移動消光反応速度定数 k_q の値は、それぞれ $k_q = (4.89 \pm 0.40) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_q = (2.00 \pm 0.20) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり 2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体の方が小さくなったが、これは CHT の立体障害によって電子移動反応が遅くなったためであると考えられた。さらに、過渡吸収スペクトル測定から、どちらの複合体においても CHT 中のチロシン残基(Tyr 6)から光誘起電子移動反応後に生じた Ru(III)錯体への分子内電子移動反応(IET)によって生じたと考えられる、チロシンラジカル由来シグナルの観測に成功した(図)。2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体では、このラジカルの寿命が 2.24 ms であり、この値は CHT-[Ru(bpy)₂(bsfbpy)]²⁺ と比較して 1.4 倍に長寿命化していた。

以上の結果より、Ru(bpy)₃ 型錯体-酵素複合体においては、共有結合を介して酵素活性中心に金属錯体を導入した 2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体が、最も安定なチロシンラジカルを生成した。最も立体障害の大きな複合体である 2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体では、生成したチロシンラジカルと MV⁺ との電荷再結合反応が抑制されたためと考えられる。したがって、化学的手法により



2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体では、このラジカルの寿命が 2.24 ms であり、この値は CHT-[Ru(bpy)₂(bsfbpy)]²⁺ と比較して 1.4 倍に長寿命化していた。

以上の結果より、Ru(bpy)₃ 型錯体-酵素複合体においては、共有結合を介して酵素活性中心に金属錯体を導入した 2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体が、最も安定なチロシンラジカルを生成した。最も立体障害の大きな複合体である 2CHT-[Ru(bsfbpy)₃]²⁺ 複合体では、生成したチロシンラジカルと MV⁺ との電荷再結合反応が抑制されたためと考えられる。したがって、化学的手法により

光をエネルギー源とする蛋白質内光誘起電子移動反応系を人工的に構築し、チロシンラジカルのような化学反応中間体を人工蛋白質内に位置選択的かつ安定に生成できた。今後さらに、生成したチロシンラジカルと基質とのカップリング反応や、触媒反応系と組み合わせた光化学反応性を調査することで、エネルギー・環境問題にかかる人工光合成、例えば光照射による水からの酸素発生反応なども視野に入れた、新規な光エネルギー変換反応系の創製が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhichao Wang, Shoko Yamazaki, Tsumoru Morimoto, Hiroshi Takashima, Ayane Nakaoku, Makoto Shimizu, Akiya Ogawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Intramolecular Cyclization Reactions of Arylpropargyl Amides of Electron-deficient , - Alkenyl Carboxylates and Related Compounds	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 2172-2187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3ob00129f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuna Kamimoto, Ryoya Ikemura, Yoshitane Imai, Norimitsu Tohnai, Shoko Yamazaki, Eiji Nakata, Hiroshi Takashima	4. 巻 13
2. 論文標題 Circularly polarised luminescence from excimer emission of anthracene derivatives complexed with -cyclodextrin in the solid state	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 1914-1922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2RA07971B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naokazu Yoshikawa, Shoko Yamazaki, Shiori Eguchi, Ayaka Nishiyama, Yuki Yamashita, Norimitsu Tohnai, Eiji Nakata, Hiroshi Takashima	4. 巻 1271
2. 論文標題 Octahedrons of 1,10-phenanthroline and 4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine induced by protonation of nitrogen atoms: synthesis and structural analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Structure	6. 最初と最後の頁 134075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molstruc.2022.134075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhichao Wang, Shoko Yamazaki, Yuji Mikata, Miho Oba, Hiroshi Takashima, Tsumoru Morimoto, Akiya Ogawa	4. 巻 87
2. 論文標題 Intramolecular Diels-Alder Reactions of -Bromostyrene-Functionalized Unsaturated Carboxamides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11148-11164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c01417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mika Sawai, Sayaka Matsumoto, Yuki Mimura, Yoshitane Imai, Shoko Yamazaki, Nobuko Kanehisa, Norimitsu Tohnai, Eiji Nakata, Hiroshi Takashima	4. 巻 102
2. 論文標題 Circularly polarized luminescence (CPL) characteristics of hydrophobic pyrene derivatives/ β -cyclodextrin (β -CD) complexes in aqueous solution dissolved by grinding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry	6. 最初と最後の頁 133-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10847-021-01108-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naokazu Yoshikawa, Shoko Yamazaki, Ayaka Nishiyama, Yuki Yamashita, Nobuko Kanehisa, Norimitsu Tohnai, Eiji Nakata, Hiroshi Takashima	4. 巻 1251
2. 論文標題 Structures, atomic charges, emission properties and DFT studies of biquinoline derivatives induced by protonation of a nitrogen atom	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Structure	6. 最初と最後の頁 131990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molstruc.2021.131990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naokazu Yoshikawa, Shoko Yamazaki, Yuna Kakimoto, Shiori Eguchi, Risa Yokoyama, Nobuko Kanehisa, Norimitsu Tohnai, Eiji Nakata, Hiroshi Takashima	4. 巻 1242
2. 論文標題 Emission properties of 1,10-phenanthroline derivatives induced by protonation of a nitrogen atom	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Structure	6. 最初と最後の頁 130728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molstruc.2021.130728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高島弘	4. 巻 54
2. 論文標題 光増感金属錯体の酵素活性中心への導入と光誘起電子移動によるラジカル生成反応系の構築	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 27-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroko Kimura, Natsuko Nagasato, Natsumi Kato, Mei Kojima, Chisato Enomoto, Eiji Nakata, Hiroshi Takashima	4. 巻 6
2. 論文標題 Photophysical and electron-transfer reaction properties of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)-based inhibitors that covalently bound to the active site of chymotrypsin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 100027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpap.2021.100027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naokazu Yoshikawa, Shoko Yamazaki, Kana Kimori, Yuna Kakimoto, Kanako Mito, Shiori Eguchi, Risa Yokoyama, Nobuko Kanehisa, Norimitsu Tohnai, Eiji Nakata, Hiroshi Takashima	4. 巻 19
2. 論文標題 Structures, DFT calculations and emission properties of protonated adenine, cytosine and guanine bases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Photochemistry & Photobiology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計18件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 横山理沙, 今井喜胤, 中田栄司, 高島弘
2. 発表標題 ピレンおよびナフタルイミド分子のキモトリプシン活性中心への導入とその光特性
3. 学会等名 第15回有機パイ電子系シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江口詩織, 今井喜胤, 中田栄司, 高島弘
2. 発表標題 キラルビス1,8-ナフタルイミド誘導体の分子内エキシマー形成とその円偏光発光特性
3. 学会等名 第15回有機パイ電子系シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島弘, 横山理沙, 中田栄司
2. 発表標題 活性中心へ光増感分子を導入したキモトリプシンの発光および光電子移動反応特性
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江口詩織, 今井喜胤, 中田栄司, 高島弘
2. 発表標題 光学活性なビス1,8-ナフタルイミド誘導体の合成とその円偏光発光特性
3. 学会等名 第32回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王 智超, 山崎祥子, 森本 積, 大場美穂, 高島 弘, 小川昭弥
2. 発表標題 分子内Diels-Alder反応による修飾ナフタレン誘導体の合成; 反応機構と生成物の物性
3. 学会等名 第32回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王智超, 山崎祥子, 森本積, 大場美穂, 高島弘, 小川昭弥
2. 発表標題 -プロモスチレン修飾フマル酸アミドの分子内Diels-Alder反応を利用したナフタレン誘導体の合成
3. 学会等名 第51回複素環化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島 弘, 柿本 悠奈, 池村 僚矢, 今井 喜胤, 藤内 謙光, 山崎 祥子, 中田 栄司
2. 発表標題 アントラセン誘導体と β -シクロデキストリンの固体状態での複合化と光学特性
3. 学会等名 2022年光化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島弘, 江口詩織, 横山理沙, 中田栄司
2. 発表標題 Photoinduced electron-transfer reactions of photosensitizers bound to the active site of enzyme
3. 学会等名 The 13th International Symposium of Advanced Energy Science -Research Activities on Zero-Emission Energy Network- (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島弘, 柿本悠奈, 池村 僚矢, 今井喜胤, 藤内謙光, 山崎祥子, 中田栄司
2. 発表標題 アントラセン誘導体と β -シクロデキストリンの固体状態での複合化と円偏光発光特性
3. 学会等名 第19回 ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下友希、高島弘
2. 発表標題 ビス-1,8-ナフタルイミド誘導体の合成と分子内エキシマー発光特性
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山理沙、今井喜胤、中田栄司、高島弘
2. 発表標題 キモトリブシン活性中心へのピレン分子の導入とその光特性
3. 学会等名 第31回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口詩織、今井喜胤、中田栄司、高島弘
2. 発表標題 水中における疎水性ピレン誘導體/ β -シクロデキストリン錯体の円偏光発光特性
3. 学会等名 第31回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿本悠奈、今井喜胤、中田栄司、高島弘
2. 発表標題 アントラセン誘導體のシクロデキストリンによる固体状態での包接とその光学特性
3. 学会等名 2021年光化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島弘、柿本悠奈、江口詩織、横山理沙、中田栄司
2. 発表標題 Photoinduced electron-transfer reactions of metal complexes as photosensitizers bound to the active site of enzyme
3. 学会等名 The 12th International Symposium of Advanced Energy Science ~ Beyond the Decade of Zero Emission Energy ~ (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島弘、中田栄司
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第32回配位化合物の光化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木守住那、中田栄司、高島弘
2. 発表標題 酵素活性部位に結合したトリスビピリジン型ルテニウム錯体の光誘起電子移動反応
3. 学会等名 第14回有機電子系シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Takashima, Kana Kimori, Eiji Nakata
2. 発表標題 Photoinduced electron-transfer reactions of metal complexes as photosensitizers bound to the active site of enzyme
3. 学会等名 The 10th International Symposium of Advanced Energy Science ~ Beyond the Decade of Zero Emission Energy ~ (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿本悠奈、高島弘、味村優輝、今井喜胤
2. 発表標題 シクロデキストリンによるアントラセン誘導体の固体状態における包接と円偏光発光
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良女子大学理学部化学生物環境学科化学コース 高島研究室ホームページ
<https://www.chem.nara-wu.ac.jp/~takashima/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------