

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750147

研究課題名(和文) 光反応における生体高分子の超分子構造変化のリアルタイム追跡

研究課題名(英文) Real-time measurements of supramolecular structural change of biological macromolecules in photoreaction

研究代表者

湯浅 順平 ( YUASA JUNPEI )

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：00508054

研究成果の概要(和文)：本申請研究の目的は光反応における生体高分子の超分子構造変化をリアルタイムに追跡することである。具体的にはDNAに相互作用した発光プローブの円偏光発光(CPL)を測定する。この円偏光発光は発光プローブがキラルな超分子構造(二重螺旋構造)を持つDNAに相互作用することにより誘起される。円偏光発光からは左右円偏光成分の発光強度差から与えられる物理量、g値を正確に求めることができる。g値は発光プローブの励起状態におけるキラリティーを明確に反映するため、DNAの超分子構造変化に対して極めて敏感である。このg値の経時変化を測定することでDNAの超分子構造変化をリアルタイムに追跡することができる。プローブ分子の発光が大きいg値を示すためには、発光分子が強い励起子相互作用を起こすことが鍵となる。本研究ではカルバゾールの3、6位にイミダゾールを導入したDNAプローブの開発を行った。このプローブは2つのイミダゾール基をメチル化しカチオン化することでDNAと相互作用することがわかった。またDNAとの相互作用によってプローブの吸収帯に円二色性が誘起されることを明らかにした。これらに関連して新規蛍光プローブを開発し論文として報告した(Angew. Chem. Int. Ed. Chem. Commun.を含む計6報)。

研究成果の概要(英文)：Circularly polarized luminescence (CPL) represents the differential emission of left and right circularly polarized light from a sample, being a reflection of the chirality of the excited fluorophore. This method has been used extensively to obtain structural information of biomolecules. In order to apply the CPL spectroscopic system to DNA, we will synthesize various luminescent probes for labeling biomolecules. Time-resolved CPL (TR-CPL) measurements of the fluorescence probes attached to biomolecules enable us to detect supramolecular structural changes of biological macromolecules in photoreaction. We have published 6 papers during this study duration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：プローブ、DNA、構造変化、タンパク質、時間分解、CPL

## 1. 研究開始当初の背景

DNAは生命の遺伝情報を司る重要な生体高分子であり、様々な光反応（光誘起電子移動による酸化反応、水素引き抜き反応など）により損傷を受ける（ガンなどの病気や老化の原因）ことが知られている。このDNAの光反応による損傷は、 $\pi$ 系平面分子のDNAへのインターカレートや、DNAとカチオン性分子との相互作用により促進される。DNAとDNA結合プローブ（インターカレーター、カチオン性分子）との相互作用の強さはDNA結合プローブの光励起によって変化し、そのことがDNAの超分子構造に変化を与えると考えられる。この構造変化はDNAの光反応性に大きな影響を与える可能性が示唆されていた。DNAの光反応は非常に速いタイムスケール（ナノ秒〜ミリ秒）で起こるにも関わらず、従来のDNAの構造に対する分析手法（DNA塩基配列決定法、X線結晶構造解析、円偏光二色性(CD)など）では、分析装置の時間分解能が低いため光反応におけるDNAの構造の速い動的変化をとらえるのは困難な状況であった。それに対し、円偏光発光(CPL)はDNA結合プローブの発光を検出するので分析装置の時間分解能が極めて高い。すなわちDNAの超分子構造の速い動的変化をとらえるのに適している。このような観点からCPL分光を用いて光反応における生体高分子の超分子構造変化のリアルタイム追跡を行なうという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本申請研究の目的は光反応におけるDNAの超分子構造変化をリアルタイムに追跡することであった。具体的にはDNAに相互作用した発光プローブの円偏光発光(CPL)を測定する。この円偏光発光は発光プローブがキラリな超分子構造（二重螺旋構造）を持つDNAに相互作用することにより誘起される。円偏光発光からは左右円偏光成分の発光強度差から与えられる物理量、 $g$ 値を正確に求めることができる。 $g$ 値は発光プローブの励起状態におけるキラリティーを明確に反映するため、DNAの超分子構造変化に対して極めて敏感である。この $g$ 値の経時変化を測定することでDNAの超分子構造変化をリアルタイムに追跡することができると考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) プローブの分子開発

DNAと結合することでキラリティーが誘起される分子設計としてフレキシブルに結合軸を回転することのできるビフェニル骨格に注目した。プローブ分子の発光が大きい $g$ 値を示すためには、発光分子が強い励起子相互作用を起こすことが鍵となる。そのためには

2つの発光分子を近接した位置に導入する必要がある。本申請研究ではビフェニル基の $p$ -位に2つの発光分子を導入する。これによりプローブ分子がDNAへ結合することで2つの発光分子に強い励起子相互作用が引き起こされることを期待した。これらの分子設計戦略を基盤に、合成ルートを検討した結果、最終的にカルバゾール骨格の3、6位に三重結合を介してイミダゾリニウム基を導入した $(Im^+)_2Cz$ を合成することが出来た。

### (2) CPL分光

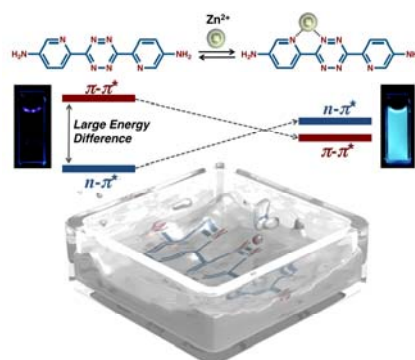
プローブから得られるCPLはCPL顕微分光装置を用いて測定を行なった。

## 4. 研究成果

以上の指針を基に、DNA蛍光プローブ及び新規蛍光センサー分子に関して研究を遂行した結果、以下に示す顕著な研究業績を挙げることができた。

### (1) 新規水溶性発光体

1, 2, 4, 5-テトラジンの3, 6位にアミノピリジル基を導入したジアミノテオラジン $(PyNH_2)_2Tz$ が水溶液中で亜鉛イオン $(Zn^{2+})$ と相互作用することで許容遷移である $\pi-\pi^*$ 発光に由来する強い発光を示すことを初めて見いだした。この $(PyNH_2)_2Tz$ の発光応答は $Zn^{2+}$ に対して高い選択性を示すことを明らかにし、テトラジンの水溶性蛍光センサーとしての応用の可能性を見いだした(Chem. Commun. 2011 in press)。



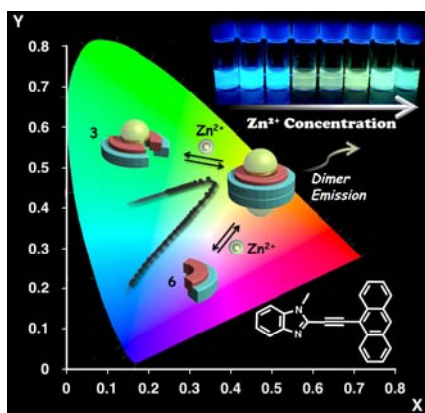
### (2) DNA結合プローブ

カルバゾール骨格の3、6位に三重結合を介してイミダゾリニウム基を導入した $(Im^+)_2Cz$ を合成した。この $Im_2Cz$ はDNAとそれらの濃度変化に対応して、安定性の異なる2種類の複合体を可逆に形成することを見出し、この段階的自己集合のメカニズムを明らかにした(論文投稿中)。

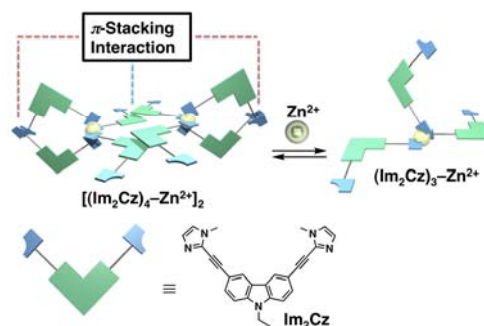
### (3) レシオメトリック蛍光プローブの開発

アントラセンに三重結合を介してベンズイ

ミダール基を導入したアントラセン誘導体、BzIm-Anを合成した。このBzIm-Anは低濃度の亜鉛イオン ( $Zn^{2+}$ ) 存在下で亜鉛イオン 2 つに BzIm-An分子が 6 分子結合した 6:2 の組織構造、 $[(BzIm-An)_3-Zn^{2+}]_2$  を与える。この  $[(BzIm-An)_3-Zn^{2+}]_2$  は錯体内に  $\pi$  スタックしたアントラセン部位を形成するため、BzIm-Anの本来の青色発光がアントラセンの 2 量体の会合状態に由来した白色発光へと変化する。この  $[(BzIm-An)_3-Zn^{2+}]_2$  錯体は亜鉛イオン濃度を増大させると亜鉛イオン 1 つに BzIm-An分子が 2 分子結合した 2:1 の組織構造、 $(BzIm-An)_2-Zn^{2+}$  へと変化する。この  $(BzIm-An)_2-Zn^{2+}$  錯体は錯体内に  $\pi$  スタックしたアントラセン部位を持たないため、 $[(BzIm-An)_3-Zn^{2+}]_2$  の白色発光はこの組織構造変化にตอบสนองして  $(BzIm-An)_2-Zn^{2+}$  の緑色発光へと変化する。このような段階的組織構造変化に由来した発光色調変化は亜鉛イオンに対してのみ観測され、マグネシウムやカルシウムイオンなどその他の金属イオンについてはこのような発光色調変化は観測されなかった。以上のことから、このBzIm-Anが亜鉛イオンに選択的にตอบสนองし、その濃度変化にตอบสนองして発光色調を変化させるレシオメトリック発光プローブとして機能することを明らかにした (*Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5110-5114.)。



(4) カルバゾール誘導体の段階的複合体  
 前述した  $Im_2Cz$  は亜鉛イオン ( $Zn^{2+}$ ) が低濃度の領域で亜鉛イオン 2 つに  $Im_2Cz$  分子が 8 分子結合した 8:2 の組織構造、 $[(Im_2Cz)_4-Zn^{2+}]_2$  を形成する。この  $[(Im_2Cz)_4-Zn^{2+}]_2$  は亜鉛イオンが高濃度の領域では亜鉛イオン 1 つに  $Im_2Cz$  分子が 3 分子結合した  $(Im_2Cz)_3-Zn^{2+}$  へと構造変化する。この  $(Im_2Cz)_3-Zn^{2+}$  が錯体内に  $\pi$  スタックしたカルバゾール部位を持たないのに対して、 $[(Im_2Cz)_4-Zn^{2+}]_2$  は錯体内に計 4ヶ所の  $\pi$ - $\pi$  相互作用を有することを詳細な NMR の解析から明らかにした (*Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3929-3931.)。



#### 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 6 件)

1.  $\pi - \pi^*$  Emission from a Tetrazine Derivative Complexed with Zinc Ion in Aqueous Solution: A Unique Water-Soluble Fluorophore J. Yuasa\*, A. Mitsui, T. Kawai\*, *Chem. Commun.* 2011, *47*, 5807-5809 (査読有り)
2. Circularly Polarized Light from Chiral Lanthanide(III) Complexes in Single Crystals H. Tsumatori, T. Harada, J. Yuasa, Y. Hasegawa, T. Kawai\*, *Appl. Phys. Express*, 2011, *4*, 011601-3 (査読有り)
3. Highly Selective Ratiometric Emission Color Change by Zinc-Assisted Self-Assembly Processes T. Ogawa, J. Yuasa\*, T. Kawai\*, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2010, *49*, 5110-5114. (査読有り)
4. Reversible Modulation of  $\pi$ -Association between 3,6-Disubstituted Carbazole Ligands in a Multistep Assembling Process N. Inukai, J. Yuasa\*, T. Kawai\*, *Chem. Commun.* 2010, *46*, 3929-3931. (査読有り)
5. Remarkable Rate Acceleration of [4+2] Cycloaddition of an Ethynylanthracene Derivative J. Yuasa\*, T. Ogawa, T. Kawai\*, *Chem. Commun.* 2010, *46*, 3693-3695. (査読有り)
6. Effects of Counter Anions on Intense Photoluminescence of 1-D Chain Gold(I) Complexes M. Saitoh, A. L. Balch, J. Yuasa, T. Kawai, *Inorg. Chem.* 2010, *49*, 7129-7134. (査読有り)

[学会発表] (計 37 件)

1. 妻鳥紘之、原田聖、湯浅順平、長谷川靖哉、河合壯、キラル Eu(III) 錯体単結晶の結晶構造と円偏光発光計測、第 58 回 応用物理学関係連合講演会、神奈川、2011/03/24
2. 向隆介、湯浅順平、長谷川靖哉、河合壯、

- 新規水溶性ユーロピウム錯体の温度依存スペクトル形状変化、日本化学会第 91 春季年会、神奈川、2011/03/24
- 高木淳一、妻鳥紘之、湯浅順平、河合壯、円偏光蛍光顕微鏡を用いた高分子媒体中でのキラルカルバゾールダイマーの光学カイラリティー評価、日本化学会第 91 春季年会、神奈川、2011/03/24
  - 山田雅隆、湯浅順平、河合壯、亜鉛イオンとの錯形成によって誘起されるエチニルキノリン誘導体の発光色調変化、日本化学会第 91 春季年会、神奈川、2011/03/24
  - 麻島 可奈子、斉藤大志、湯浅順平、河合 壯、キラル 1,1'-ビナフチル配位子を有する金(I)錯体の発光特性、日本化学会第 91 春季年会、神奈川、2011/03/24
  - 小川拓哉、湯浅順平、河合壯、イミダゾリルアントラセン誘導体と亜鉛イオンとの高度自己組織化を利用した発光色変調、日本化学会第 91 春季年会、神奈川、2011/03/24
  - 斉藤大志、湯浅順平、多田和也、小野田光宣、中嶋琢也、河合壯、強発光性を有する金(I)錯体のナノ結晶化と電界析出法による発光パターンニング、第 58 回 応用物理学関係連合講演会、神奈川、2011/03/24
  - M. Saitoh, J. Yuasa, K. Tada, M. Onoda and, T. Kawai. Syntheses of Cationic Au(I) Complexes and Systematic Control of Photoluminescence in Crystalline State. 9th International Conference on Nano-Molecular Electronics, ICNME 2010, Kobe (Japan), 2010/12/14
  - J. Yuasa; R. Mukai; Y. Hasegawa; T. Kawai, Emission Spectral Analysis of Europium(III) Probes Attached to Proteins, 揺らぎと生体機能 第 4 回公開シンポジウム, ピアザ淡海, 2010/12/01
  - H.; Tsumatori, T.; Harada, J.; Yuasa, Y.; Hasegawa, T. Kawai, Chiroptical Luminescence Spectra of Chiral Eu(III) Complex Single Crystal, 10th GIST/NAIST Joint Symposium on Advanced Materials, Nara (Japan), 2010/11/15
  - Norie Inukai, Junpei Yuasa, Tsuyoshi Kawai,  $\pi$ -Association between 3,6-Disubstituted Carbazole Ligands in Zinc Complexes and Their Reactivity, 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry in OSAKA, JAPAN, 2010/09/27
  - 廣原 志保、社嶺 耕平、川崎 勇児、小幡 誠、湯浅 順平、河合 壯、長谷川 靖哉、寺田 佳世、安藤 剛、谷原 正夫、グルコース連結ポルフィリン誘導体の光線力学効果、第 4 回バイオ関連シンポジウム、大阪大学、2010/09/24
  - 三井亮人、湯浅順平、河合壯、二つのマレイミド基を有するテトラジン誘導体の合成とその反応性、2010 年光化学討論会、千葉大学、2010/09/09
  - 原田聖、妻鳥紘之、湯浅順平、河合壯、長谷川靖哉、キラルEu(III)錯体の配位構造に依存した円偏光発光特性、2010 年光化学討論会、千葉大学、2010/09/09
  - 向隆介、湯浅順平、長谷川靖哉、河合壯、二つのスクシンイミド基を有する希土類錯体を用いた蛍光標識試薬の合成及び特性評価、2010 年光化学討論会、千葉大学、2010/09/09
  - 湯浅順平・小川拓也・河合壯、段階的錯形成を利用した金属イオンの蛍光センシング、第 22 回配位化合物の光化学討論会、富山、2010/08/03
  - 犬飼章恵、湯浅順平、河合壯、亜鉛イオンとカルバゾール誘導体との段階的構造体形成とその反応性、第 22 回配位化合物の光化学討論会、富山、2010/08/03
  - 湯浅順平、亜鉛イオンの濃度変化を可視化できる発光プローブ、奈良先端科学技術大学 新技術説明会、東京、2010/07/26
  - Tsumatori, H.; Harada, T.; Yuasa, J.; Hasegawa, Y.; T. Kawai, Circularly Polarized Luminescence of Single-Crystal Chiral Eu(III) Complexes, XXIII IUPAC Symposium on Photochemistry, Ferrara, Italy, 2010/07/11
  - T. Ogawa, J. Yuasa, T. Kawai, Well-Defined Self-Assembling Systems in Ratiometric Emission Change Depending on Zinc Ion Concentrations, XXIII IUPAC Symposium on Photochemistry, Ferrara, Italy, 2010/07/11
  - J. Yuasa, T. Ogawa, T. Kawai, Self-Association of a Zinc Complex of Three Imidazolylanthracene Ligands, International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals 2010, Kyoto, Japan, Kyoto, Japan, 2010/07/04
  - 湯浅 順平、光受容タンパク質の揺らぎ変化の緩和過程の検出、平成 22 年度合同班会議、大津、2010/06/27
  - Norie Inukai, Junpei Yuasa, Tsuyoshi Kawai, Multistep Assembling Process of 3,6-Disubstituted Carbazole ligands with Zinc Ion, 5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, Nara, Japan, 2010/06/10

24. Norie Inukai, Junpei Yuasa, Tsuyoshi Kawai, Stepwise Complexation of DNA Carbazole Derivatives, 5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, Nara, Japan, 2010/06/10
25. T. Ogawa, J. Yuasa, T. Kawai, Well-Designed Self-Assembly Systems for Highly Selective Ratiometric Emission Color Changes in Response to  $Zn^{2+}$  Concentrations, 5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, Nara, Japan, 2010/06/10
26. 小山ふみ・湯浅順平・河合壯、1,1,1-トリプロモエタンとジフェニルアミンの光重合反応によって生成するジフェニルメタン型オリゴマーとその電気化学特性、日本化学会第90春季年会(2010)、近畿大学、2010/03/27
27. 大飼章恵、湯浅順平、河合壯、 $Zn^{2+}$ イオンとの錯形成によって誘起される3,6置換カルバゾール誘導体の $\pi-\pi$ 相互作用、日本化学会第90春季年会(2010)、近畿大学、2010/03/26
28. 湯浅順平・大野智子・宮田康平・妻鳥紘之・原田聖・長谷川靖哉・河合壯、キラルなビスオキサゾリンピリジン配位子を有するユーロピウム錯体の円偏光発光、日本化学会第90春季年会(2010)、近畿大学、2010/03/26
29. 三井亮人、湯浅順平、河合壯、二つのスクシンイミド基を有するテトラジン誘導体の合成とその反応性、日本化学会第90春季年会(2010)、近畿大学、2010/03/26
30. 向隆介、湯浅順平、長谷川靖哉、河合壯、二つのスクシンイミド基をもつユーロピウム錯体の合成とタンパク質への固定化、日本化学会第90春季年会(2010)、近畿大学、2010/03/26
31. Junpei Yuasa, Yasuchika Hasegawa, Tsuyoshi Kawai, Spectroscopic Analysis of Circular-Polarized Luminescence of Proteins Labeled with Europium Complexes, The 3rd International Symposium Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Nagoya, Japan, 2009/12/21
32. Norie Inukai, Junpei Yuasa, Tsuyoshi Kawai, Spectroscopic Analysis of Induced Circular Dichroism of 3,6-Disubstituted Carbazole Derivatives Interacting with DNA, The 3rd International Symposium Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, Nagoya, Japan, 2009/12/21
33. Norie Inukai, Junpei Yuasa, Tsuyoshi Kawai, Coordination-Driven OFF-ON-OFF Switching on  $\pi$  Association of Carbazole Derivatives, The 1st NCTU-NAIST Workshop on "Molecular/Nano Science, Hsinchu, Taiwan, 2009/11/11
34. 小川拓哉、湯浅順平、河合壯、イミダゾリルアントラセン誘導体-亜鉛錯体の $\pi$ 会合体形成を利用した亜鉛イオンの蛍光センシング、2009年光化学討論会、千葉大学、2009/09/16
35. 湯浅順平、光受容タンパク質の揺らぎ変化の緩和過程の検出、「揺らぎと生体機能」第1回合同班会議、ホテルグリーンピア南阿蘇、2009/09/11
36. Junpei Yuasa, Tomoko Ohno, Yasuchika Hasegawa, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka, Shingo Katoh, Tsuyoshi Kawai, Emission Spectral Characterization of Europium(III) Complexes Attached to Proteins, 18th International Symposium on the Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds, Hokkaido, Japan, 2009/07/04
37. Norie Inukai, Junpei Yuasa, Tsuyoshi Kawai, Switching of  $\pi$  Association of 3,6-Disubstituted Carbazole Derivative in Response to Ion Concentration of Zinc, 18th International Symposium on the Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds, Hokkaido, Japan, 2009/07/04

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：円偏光発光性希土類錯体

発明者：湯浅 順平、宮田 康平、妻鳥 紘之、原田 聖、長谷川 靖哉、河合 壯

権利者：国立大学法人奈良先端技術大学院大学

種類：特許

番号：PCT/JP2011/054956

出願年月日：2011.03.24

国内外の別：国外

名称：円偏光発光性希土類錯体

発明者：湯浅 順平、宮田 康平、妻鳥 紘之、長谷川 靖哉、河合 壯

権利者：国立大学法人奈良先端技術大学院大学

種類：特許

番号：特願 2010-052358

出願年月日：2010.03.09

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：亜鉛発光プローブ及び発光体

発明者：湯浅 順平、小川 拓哉、河合 壯

権利者：国立大学法人奈良先端技術大学院大学

種類：特許

番号：特開 2011-013102 (P2011-013102A)

取得年月日：2011.01.20

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://mswebs.naist.jp/LABs/kawai/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯浅 順平 (YUASA JUNPEI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：00508054

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：