

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05413

研究課題名(和文) 広範囲な分子の立体構造解析を目指した円二色性スペクトルの実験・理論的研究

研究課題名(英文) Experimental and theoretical studies of circular dichroism spectroscopy aimed at the structural analysis of a wide range of molecules

研究代表者

根平 達夫 (Nehira, Tatsuo)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・准教授

研究者番号：60321692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子の立体構造解析法として円二色性(CD)に着目し、3つの研究を推進した。第一に、実験CDスペクトルを量子化学計算によって解析することにより、新規天然有機化合物と新規合成化合物の絶対配置を決定した。第二に、蛍光検出円二色性(FDCD)の基礎研究として、蛍光性と非蛍光性の発色団をいずれも含む励起子キラリティー系有機小分子を解析した。CDとFDCDは必ずしも一致しないこと、蛍光性の6-メトキシ-2-ナフトエートを発色団とするならFDCDスペクトルはCDと同様に解析できることを明らかにした。第三に、キラルアレンの絶対配置決定法の開発に関連して、いくつかのプロパルギルアルコールをキラル合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で注目するCDスペクトルは測定が容易なので、分子の立体構造解析法として非常に有望である。一方、得られるスペクトルが単純な曲線であることから、CDスペクトルの有用性を高めるためには、解析の手段を増やすことと測定の幅を広げることが鍵となる。本研究では、CDスペクトルの経験則が使えない場合に、理論計算によって解析した例を複数提供した。いずれの場合にも計算条件を予め絞り込んで実施しており、将来の理論計算でもこれらの条件はガイドライン的な役割になると期待できる。また、本研究により励起子キラリティー系に適した蛍光発色団を提案したことで、FDCDによって測定の幅を広げられることも示された。

研究成果の概要(英文)：Focusing on circular dichroism (CD) as a method for the three-dimensional structure analysis of molecules, we conducted the following three research issues. First, the absolute configurations of novel natural product and novel synthetic compound were determined by analyzing the experimental CD spectra via quantum mechanics calculations. Second, as a fundamental study of fluorescence detected circular dichroism (FDCD), we analyzed exciton chirality-based organic small molecules that contain both fluorescent and non-fluorescent chromophores. We clarified that CD and FDCD do not necessarily coincide, and that FDCD spectra can be analyzed in the same way as CD when fluorescent 6-methoxy-2-naphthoate is used as the chromophore. Third, in the course of developing a method for the stereochemical analysis of chiral allenes, we synthesized some chiral propargyl alcohols.

研究分野：構造有機化学

キーワード：円二色性 量子化学計算 絶対立体化学

1. 研究開始当初の背景

自然界には、生物活性をもつ有機化合物からタンパク質まで、様々な分子が見られる。特に生命現象はあまねく分子間相互作用の集積であり、それらを理解するには立体構造の解析は非常に重要である。立体構造の解析において X 線法や NMR 法は古くから信頼されている代表的な手法であるが、いずれの方法も高度に制御された測定装置が必要であるし、適用できる試料も限られており万能ではない。迅速かつ簡便な分子の立体構造解析の方法としては、吸収または蛍光スペクトルの利用や、タンパク質ならば酵素による分解反応を精査する方法もあるが、いずれも限定的である。そこで本研究で立体構造解析の手法として注目するのは、溶液状態の試料であればワンクリックで必ず測定可能な、円二色性 (CD) スペクトルである。CD スペクトルを測定すれば圧倒的に安価で迅速に、多くの試料で立体構造の情報を得ることができる。ただし CD スペクトルは単純な二次元の曲線であるため、一見しただけで立体構造の情報を引き出すのは容易ではなく、この CD スペクトルの解析方法には未開拓の領域が多く残っている。故にこの汎用性の高い CD スペクトルの適用範囲を拡大することは、分子の立体構造解析への大きな貢献につながる。

2. 研究の目的

本研究では、分子の立体構造の観測法として汎用性の高い CD の適用範囲を最大限に広げることを大目標としつつ、視点をより絞り込んだ以下の 3 つの目的を設定した。

- (1) CD スペクトルを理論的に予測するためのガイドライン作成： CD スペクトルは単純な曲線となる場合がほとんどであり、立体構造解析に利用する際にはこの曲線をどう読み解くかが鍵である。古くから知られている経験則は適用範囲が限定的であるため、量子化学計算による予測が非常に有用である。この量子化学計算はほとんどの分子で実行可能な反面、目的の化合物系に合った計算条件を選ぶ必要がある。本研究では可能な限り適用例を増やすことにより、目的化合物に合わせた標準的なガイドラインを体系化する。
- (2) FDCCD で観測できる構造の明確化： 測定装置と理論の両方で長く不完全性が報告されてきた蛍光円二色性 (FDCCD) について、研究代表者が提案した新世代の測定装置では装置の不完全性は解消されている。この実験環境で果たして従来からある FDCCD 理論は妥当であるのかを実験的に調べ、必要に応じて理論を再定義する。
- (3) VUVCD スペクトルによる新しい絶対配置決定法の開発： 構造解析に CD スペクトルを適用できる範囲を、これまでほとんど利用されていなかった短波長領域にも広げるため、真空紫外領域での CD スペクトル (VUVCD) を利用した立体構造解析法の開発を検討した。この波長領域には、自然界にしばしば見られ、かつ他の官能基とは特性の異なるアレン構造やエン構造がত্যよく特徴的な吸収をもつ。

3. 研究の方法

(1) CD スペクトルの理論的予測のためのガイドライン作成

本研究の開始前には計算サーバーの故障により理論計算できなくなっていたので、まず量子化学計算の計算機環境を再構築した。この計算環境で、天然物化学者や合成化学者との共同研究を通して、様々な分子構造の CD スペクトルを量子化学計算によって予測し、実験から得られた CD スペクトルと比較しながら考察した。

CD スペクトルの理論的予測は、網羅的な配座探索、構造精密化による配座解析、各配座の CD スペクトルの計算、の 3 段階で実行した。得られた各配座の CD スペクトルを配座解析から得られる存在確率を用いて統合することにより、その分子の理論 CD スペクトルとした。網羅的な配座探索では、貯水地型アルゴリズム (CONFLEX および Monte-Carlo) により発生させた初期配座をすべて分子力場計算により最適化した。次に、合計で 90%以上の存在確率をカバーするように選んだ安定配座を全て密度汎関数法 (DFT) によって最適化してから配座解析した。再び 90%以上の存在確率を考慮するよう安定配座を選び、時間依存密度汎関数法 (TDDFT) により CD スペクトルを計算した。CD スペクトル計算に用いた汎関数は、経験的に最も良い結果を与える B3LYP を中心に、高エネルギー領域にパラメータ補正を加えた CAM-B3LYP と、交換汎関数と相関汎関数の割合が異なる BHandHLYP を加えた 3 種類を選び、配座解析から選び出した安定配座全てに対して常に行って比較した。以上の手順において、いずれの化合物でも溶媒効果は考慮せず基底関数は cc-pVDZ に固定することにより、時間とコストを現実的な範囲に収めた。これは電氣的に中性の有機小分子に関する限り、理論的予測により得られる CD スペクトルの形状には溶媒効果や基底関数が大きく影響しないという、研究代表者の経験に基づく判断である。また、DFT 法によって最適化した安定配座の解析では、熱振動エネルギーによる補正を入れたものと入れないものとの両方を常に行って比較した。

(2) FDCD で観測できる構造の明確化

本研究では FDCD により観測可能な構造情報を、さらに 2 つの視点に分けて考えた。

第一に、有機小分子の FDCD は常に CD と一致するかどうかを調べる実験として、キラルな *trans*-1,2-cyclohexanediol の 2 つの-OH 基にそれぞれ蛍光性と非蛍光性の様々な発色団をエステル結合の形成によって導入することにより、単純な励起子キラリティー系を構築した。代表的な蛍光性発色団を選び、相手の非蛍光性発色団を系統的に変えながらモデル分子を合成し、それらの CD および FDCD スペクトルを解析した。

第二に、FDCD の観測メカニズムにおいて蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の関与を証明する実験を試みた。FRET モデルの骨格を、キラルドナー部 / リンカー部 / アキラルアクセプター部からなるハイブリッド分子とした。このような分子の CD および FDCD スペクトルを測定することにより、アキラルアクセプターの蛍光のみを検出しながら FDCD を観測した場合、FRET の関与があるときキラルドナーの CD 曲線が得られ、FRET の関与がないとき CD 曲線はベースラインのままと予想される。このような分子系でリンカーの長さを変えながらモデル分子を充実させることにより、FDCD への FRET 機構の関与を証明できると考えている。リンカー部は炭素鎖 4-6 程度の単純分子の連結とし、連結数によって長さを変えながらいくつかのモデルを合成することとした。

(3) VUVCD スペクトルによる新しい絶対配置決定法の開発

天然物にも見られる部分構造で、しばしば構造決定が難航するキラルアレンについて、その新しい絶対配置決定法の開発を検討した。アレン骨格は 185-190 nm 付近に特徴的な吸収をもつため、この吸収バンドが示す円偏光への応答を量子化学計算により解析することで、絶対配置を決定できると考えた。実際、絶対配置の分かっているいくつかの合成中間体では、VUVCD スペクトルを量子化学計算によって解析することにより迅速かつ確実に絶対配置を決定できることが、先行研究によって明らかになっている。

本研究では、プロパルギルアルコールから 2 段階の既知反応によりプロモアレンに誘導可能な合成ルートを想定し、脂肪鎖や芳香族を置換基とする数種類のプロパルギルアルコールを合成した。キラルアレンの合成にはキラルプロパルギルアルコールが鍵中間体となるので、研究代表者らの開発した不斉補助基を適用してエナンチオマー分割した。

4. 研究成果

(1) CD スペクトルの理論的予測のためのガイドライン作成

オリーブの害虫であるオリーブアナアキゾウムシが産生する天然有機化合物の構造を絶対配置まで決定し、生理活性と合わせて報告した。このとき CD スペクトルを量子化学計算によって予測することにより絶対配置を決定した (J. Nat. Prod. 2022)。

キラル結晶性材料のシード化合物と期待できる新規テトラアリアルメタンについて、量子化学計算により CD スペクトルを予測した。このとき理論計算からは複数の特徴的な Cotton 効果が真空紫外領域に現れると予測されたことから、この例では VUVCD スペクトルを測定して比較することにより、確実に絶対配置を決定できた (国際誌論文準備中)。

(2) FDCD で観測できる構造の明確化

第一に挙げた有機小分子の FDCD が常に CD と一致するかどうかを調べる実験として、蛍光性および非蛍光性の発色団両方を備えた単純な励起子キラリティー系の化合物を系統的にいくつか合成した。現在の FDCD 理論では、有機小分子では CD と FDCD は必ず一致し、不一致は蛍光偏光に由来するアーティファクトによる影響である、と考えられているが、本研究の先行研究の中で、アーティファクトを完全に回避しても CD と FDCD は必ずしも一致しないことを実験により示していた。

本研究ではさらに、単純な励起子キラリティー系で明瞭なカップリングを示すことが知られている発色団のうち、実用性の高いものを提案することとした。予備実験の結果から、これまでに報告のある励起子キラリティー系に適した蛍光発色団のうち 6-methoxy-2-naphthoate (6-MN) を選び、非蛍光性の発色団と励起子カップリング相互作用するときに CD および FDCD スペクトルがどう振る舞うかを調べた。電子供与性から電子求引性まで様々な置換基をもつ非蛍光性発色団との相互作用を調べた結果、非蛍光性発色団の電子密度が低い場合に CD と FDCD は不一致となる傾向はあるが、この 6-MN を用いる限り、FDCD スペクトルは明瞭な励起子カップリングを示し、CD 励起子キラリティー法の原則に基づいて解析可能であることを明らかにした (再投稿の準備中)。

第二に挙げたキラルドナー部 / リンカー部 / アキラルアクセプター部からなるハイブリッド分子の合成について、本研究では特にリンカー部について検討した。単純なリンカーを複数連結

することで長さを段階的に変えられる合成戦略とし、6-アミノヘキシル酸に保護基導入の反応を行った。この反応は文献既知であったが再現性が著しく低かったため、反応の条件を見直して大量合成を可能にした。

得られた 6-アミノヘキシル酸の保護体は初めて安定供給が可能となったため、関連研究として以下に述べる酵素の基礎研究に応用した。脱リン酸化酵素として知られる CaMKP の酵素活性を蛍光強度で測定できる分子に対して、6-アミノヘキシル酸を介して基質認識部を連結させた。このときリンカーの長さを段階的に変えて用意した 4 つの基質分子は、いずれも酵素を用いた試験管内の実験において認識部位のない基質より観測感度と基質特異性が大幅に向上した。さらにこのとき、リンカーは長過ぎても短過ぎても基質特異性が損なわれることから、リンカーには最適な長さがあることが分かった（国際誌論文準備中）。

(3) VUVCD スペクトルによる新しい絶対配置決定法の開発

研究代表者らは先行研究で、VUVCD スペクトルを量子化学計算により解析してキラルプロモアレンの絶対配置を決定する方法を提案した。本研究では、この方法が広くキラルアレン一般に適用可能であることを証明するため、置換基の異なる様々なアレン化合物モデルの合成を進めた。この過程で本研究では、アレンの鍵中間体として置換基の異なる 6 種類の第二級プロパルギルアルコールを合成した。これら全てについて、研究代表者らの開発したキラル補助基（キラルフタル酸、CPA）を用いてエナンチオマー分割できることを示し、このうち 4 種類については絶対配置を X 線結晶解析などにより確実に決定した（国際誌論文準備中）。CPA をプロパルギルアルコールに適用したのは本研究が初めての例であり、プロパルギルアルコールを立体制御する方法としては、両方のエナンチオマーを特別な実験装置を使わず低コストで分割できる点で他の方法より優れている。さらに種々検討したところ、芳香族性の置換基をもつプロパルギルアルコールからプロモアレンへの化学変換はうまく進行しなかったため、目的に合ったキラルアレンの分子設計は見直しの必要があることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujikawa Aya, Ishihara Yasuhiro, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M., Ohta Shinji	4. 巻 85
2. 論文標題 Isolation of Fluorescent Benzoxazines with Neuroprotective Activity from the Olive Weevil <i>Pimelocerus perforatus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2740 ~ 2745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c00670	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 該当する
1. 著者名 Ohta Shinji, Takeda Manami, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M., Ishihara Yasuhiro	4. 巻 191
2. 論文標題 Janohigenins: Long-chain anacardic acid derivatives with neuroprotective activity from <i>Ophiopogon japonicus</i> seeds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112904 ~ 112904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2021.112904	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 該当する
1. 著者名 Ze-Peng Sheng, Amu Nakai, Yoshiki Koyama, Tatsuo Nehira, Hiromi Tsubota	4. 巻 18
2. 論文標題 Detection of allelopathic activity of Chinese tallow <i>Triadica sebifera</i> (Euphorbiaceae) by the sandwich method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hikobia	6. 最初と最後の頁 157-163
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 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 該当する
1. 著者名 Akizuki Kazutoshi, Ishikawa Shun, Obatake Rika, Ozaki Hana, Shimoda Nao, Nehira Tatsuo, Yamazaki Takeshi, Kinumi Tomoya, Osawa Jin, Sueyoshi Noriyuki, Kameshita Isamu, Shigeri Yasushi, Ishida Atsuhiko	4. 巻 720
2. 論文標題 CaM kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F/POPX2) is specifically inactivated through gallate-mediated protein carbonylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109170 ~ 109170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109170	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 El Halmouch Yasser, Ibrahim Hassan A.H., Dofdaa Nourhan M., Mabrouk Mona E.M., El-Metwally Mohammad Magdy, Nehira Tatsuo, Ferji Khalid, Ishihara Yasuhiro, Matsuo Koichi, Ibrahim Mohamed I.A.	4. 巻 311
2. 論文標題 Complementary spectroscopy studies and potential activities of levan-type fructan produced by Bacillus paralicheniformis ND2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 120743 ~ 120743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2023.120743	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masaya Fukumoto, Kazunobu Igawa, Koichi Matsuo, Taiki Umezawa, Katsuhiko Tomooka, Tatsuo Nehira
2. 発表標題 Toward a Versatile Method for Determination of Absolute Configuration for Chiral Allenes Using Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism
3. 学会等名 19th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (CD2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
研究 分 担 者	松尾 光一 (Matsuo Koichi) (40403620)	広島大学・放射光科学研究センター・准教授 (15401)	

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
---------	---------