

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550007

研究課題名（和文） 置換核酸塩基とその酸素錯体の励起状態と光線力学療法

研究課題名（英文） Excited state of substituted nucleic-acid bases and their oxygen complexes for photodynamic therapy

研究代表者

鈴木 正（SUZUKI TADASHI）

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30251606

研究成果の概要（和文）：本研究は、DNA/RNA を構成する核酸塩基の一部を S または N に置換した置換核酸塩基の励起状態および緩和・反応過程を調べ、新たな光線力学療法の基礎となる知見を得ることを目的とした。励起置換核酸塩基は、通常核酸塩基とは大きく異なる励起三重項状態への項間交差が主な緩和過程である。その電子励起状態と緩和過程の相関を議論し、量子化学計算を用いて緩和ダイナミクスを調べた。また、長波長の光による励起の可能性を探るため二光子吸収スペクトルの測定を行うとともに、一重項酸素の生成過程や反応についても知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Excited state and relaxation/reaction processes of S- or N-substituted nucleic-acid bases have been studied by transient absorption spectroscopy, photothermal spectroscopy, near-infrared spectroscopy, and quantum chemical calculations. The quantum yield of the substituted bases was almost unity; however, it strongly depended on the character of the excited singlet state. Non-resonant two-photon absorption spectrum by optical-probing photoacoustic spectroscopy, singlet oxygen formation and its reaction were also discussed. These distinct properties clearly indicate that the substituted bases have a high potential for photodynamic therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学、物理化学

キーワード：核酸塩基、励起状態、一重項酸素、緩和過程、光線力学療法、近赤外発光、過渡吸収、光音響法

1. 研究開始当初の背景

核酸塩基は DNA/RNA の構成要素であり、遺伝情報のストレージや伝達など生命活動に欠かせない重要な役割を果たしている。また、核酸塩基は UVB 領域に吸収帯をもつが、励起一重項状態の寿命は 1 ps 以下と非常に

短く、ほぼ量子収率 1 で熱的に基底状態に緩和する内部変換であることが知られている。すなわち、核酸塩基は光に対して極めて安定な化合物であるといえる。

通常の核酸塩基の酸素原子または骨格の炭素原子を S や N 原子で置換した置換核酸塩

基は、通常核酸塩基とその分子構造が類似しており、自然界（人体）にも存在することが知られている。これらは抗ウイルス薬や抗がん剤などの医薬品として医療にも用いられているが、光線過敏症を発症することが近年報告されている。特にチオ置換体は UVA 領域に強い吸収帯をもつとともに、がん細胞の DNA 中に取り込まれ、そこに UVA 光を照射するとアポトーシスを誘起することが Karran らの研究グループによって明らかとなった。我々は、ナノ秒過渡吸収分光法を用いてチオ置換核酸塩基の励起状態について詳細に調べ、非常に高い項間交差量子収率をもつことを明らかにした。通常核酸塩基とは異なり、チオ置換核酸塩基は非常に特異的な励起状態の性質をもっている。

アザ置換核酸塩基の緩和過程には、項間交差か内部変換かといったドラスティックな緩和過程の違いが現れるものがあることがわかった。これら分子の励起状態のポテンシャル曲面を実験的かつ理論的に考察することは、生体に用いられている通常塩基の励起状態緩和ダイナミクス、すなわち「なぜ内部変換が極めて効率的に起こるのか？」という疑問を明らかにするための糸口となる。置換核酸塩基の緩和過程と電子状態を詳細に検討することによって、励起状態と基底状態のポテンシャル曲面の円錐交差による緩和ダイナミクスを理解する上で、重要な知見が得られるだろう。

置換核酸塩基を取り込んだ細胞に光照射することによってアポトーシスを誘導できるということは、新たな機構による光線力学療法への応用が期待できる。そのために、DNA 鎖中で核酸塩基と酸素分子との相互作用や一重項酸素の生成機構を明らかにする必要がある。置換核酸塩基をがん細胞の核内 DNA 中に取り込ませ、核内で活性酸素種を発生させることで、致命的なダメージを与えることができる新たな機構による光線力学療法（PDT）の可能性が見えてくる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、通常核酸塩基とは異なる緩和過程を有するチオおよびアザ置換核酸塩基の励起状態を調べ、緩和過程との関連や一重項酸素生成機構、またその反応性について知見を得ることである。それによって、置換核酸塩基を用いた新たな機構による光線力学療法の基礎となる知見を得る。

これまで、過渡吸収法および時間分解熱レンズ法を用いて置換核酸塩基の緩和・反応ダイナミクスの解明を行ってきた。同じアザ置換核酸塩基でも項間交差か内部変換かといった大きく緩和過程の異なるものがあることが分かってきた。しかし、知見が少なく電子状態との関連について詳細に調べられて

はいない。また、置換核酸塩基によって一重項酸素が生成する過程についても疑問が残る。置換核酸塩基と酸素分子との何らかの強い相互作用、例えば錯体形成が考えられる。さらに、細胞中での活性酸素種の発生を考えた際、DNA 鎖中の置換核酸塩基からどのように一重項酸素が生成するのか、その機構がいまだにわかっていない。そこで、本研究で明らかにする点は、

- (1) チオ及びアザ置換核酸塩基の電子励起状態と緩和過程との関連
- (2) 核酸塩基と酸素分子との相互作用（錯体形成）とその励起状態
- (3) 一重項酸素と核酸塩基の反応性、および DNA ダメージ機構の基礎研究

3. 研究の方法

チオおよびアザ置換核酸塩基の励起状態を調べ、緩和過程との関連や一重項酸素生成機構、またその反応性について知見を得る目的を達成するために、以下の実験を行った。

- (1) 一連のチオおよびアザ置換核酸塩基の吸収・発光スペクトルを測定し、量子化学計算の結果と併せて電子励起状態の知見を得る。
- (2) 過渡吸収法、時間分解熱レンズ法を用いて、励起状態の緩和過程の情報を得る。
- (3) 量子化学計算による置換核酸塩基の緩和過程の知見を得る。
- (4) 近赤外分光法及び熱レンズ法を用いて、一重項酸素の生成および反応過程を調べる。
- (5) 置換核酸塩基を含むオリゴマーを合成し、励起状態の緩和過程や一重項酸素生成に関する知見を得る。また、反応についても調べる。
- (6) 長波長の光による置換核酸塩基の励起を検討するために、光検出光音響法を用いて非共鳴二光子吸収スペクトルの測定を行う。

4. 研究成果

- (1) チオおよびアザ置換核酸塩基の吸収・発光スペクトルを測定し、量子化学計算との比較検討を行った。

チオ置換核酸塩基である 4-チオチミンおよび 4-チオチミジンは、最低励起一重項状態が ${}^1\pi\pi^*$ であり、大きなモル吸収係数をもつ。糖が結合することによって、分子軌道や遷移エネルギーに大きな違いはなかった。しかし、2-チオチミンと 6-アザ-2-チオチミンの最低励起一重項状態は ${}^1n\pi^*$ であり、近傍に $S_2({}^1\pi\pi^*)$ 状態が存在することがわかった。励起状態のエネルギー準位は、チオ置換することによって大きく低下する。

アザ置換核酸塩基についても同様の実験を行った。6-アザウラシルと 8-アザアデニンの最低励起一重項状態は $^1n\pi^*$ で、5-アザシトシンと 8-アザグアニンは $^1\pi\pi^*$ 状態である。

- (2) 過渡吸収法、時間分解熱レンズ法を用いて、項間交差量子収率を見積もり、励起一重項状態からの緩和過程について検討を行った。チオ置換核酸塩基の項間交差量子収率は 1 である。アザ置換核酸塩基では最低励起一重項状態が $^1n\pi^*$ である分子の項間交差収率がほぼ 1 であるのに対し、 $^1\pi\pi^*$ 状態では励起三重項状態は観測できなかった。このことから、 $^1n\pi^*$ 状態が励起三重項状態への doorway state になっているものと考えられる。
- (3) 置換核酸塩基の励起三重項状態は、基底状態の置換核酸塩基によって自己消光を受けることがわかった。置換核酸塩基による細胞のアポトーシスを誘発する機構は、以下に述べる活性酸素による Type II だけでなく、反応による Type I の可能性もあることがわかった。また、この励起三重項状態はチオール化合物によっても消光を受けることから、生体内でグルタチオンのようなチオールが存在すると PDT 効果が低くなる可能性を示した。
- (4) 過渡吸収法、時間分解熱レンズ法、および近赤外分光法を用いて、置換核酸塩基の励起三重項状態から一重項酸素生成収率を求めた。一重項酸素の発光は 1270 nm 付近にピークをもって観測される。置換核酸塩基は非常に高い一重項酸素収率をもつことがわかった。このことから、主に活性酸素による Type II の PDT 機構でアポトーシスが誘起されているものと考えられる。しかし、核酸塩基によって一重項酸素の生成量に大きな違いがあることがわかった。例えば 2-チオチミンと 6-アザ-2-チオチミンの一重項酸素の生成収率は、それぞれ 0.36 と 0.69 であった。本研究では、明確な錯体の証拠は得られなかったが、このように生成収率に大きな差があることは、核酸塩基によって酸素分子との相互作用の強さの違いを反映しているものと思われる。
- (5) 置換核酸塩基は一重項酸素生成に重要であることが明らかとなったが、一重項酸素との反応性も高いことが初めて明らかとなった。一重項酸素の置換核酸塩基による消光実験を行ったところ、明らかにその寿命が短くなった。Stern - Volmer プロットから消光速度定数を求めた。したがって、置換核酸塩基は一重項酸素生成に寄与していると同時に、その一重項酸素の攻撃を受けて反応して

いるものと考えられる。このことが、置換核酸塩基、特にチオ核酸塩基がより高い PDT 効果を示す要因であろう。

- (6) 光線力学療法への応用を考える際に、より長波長の光を用いて置換核酸塩基を励起することが望ましい。そこで赤～近赤外レーザー光照射によってチオ核酸塩基を励起する研究を行った。光検出光音響分光法を用いて、6-チオグアニンの多光子吸収スペクトルを測定することに成功した。このことにより、生体内のチオ置換核酸塩基を長波長の光で励起できることが明らかとなった。
- (7) 置換核酸塩基を含むオリゴマーの合成に成功した。今後、電子状態や緩和・反応過程について研究を継続していく。特に一重項酸素生成についての知見は、細胞内での現象を紐解く緒になると考えられる。
- (8) 6-アザウラシルの励起状態からの緩和過程を理解するために量子化学計算を行い、その結果について考察を行った。南部伸孝教授 (上智大学) の協力を得て、*ab initio* MD 法を用いて 6-アザウラシルの $S_2 \rightarrow S_1$ の非断熱遷移を検討した。異なるポテンシャル間での非断熱遷移を調べるため、Tully の提唱した古典軌道ホップ法 (TSH) 法と Zhu-Nakamura (ZN) 理論を取り入れ非断熱遷移を考慮した。トラジェクトリのほとんどが 40 fs 以内に遷移したことから、 S_2 から S_1 への非断熱遷移は 40 fs という超高速で起きていることが明らかとなった。 S_1 状態では 800 fs を経たトラジェクトリもあり、 S_0 状態への内部変換は通常核酸塩基ほど速くないことが明らかとなった。このことが高い項間交差収率を得る原因になっているものと考えられる。

本研究により、アザ及びチオ置換核酸塩基の励起状態、および緩和・反応における多くの新たな知見が得られた。これらの研究成果は、国内外の研究者からも注目され、参考文献として数多くの引用がなされている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. “Effect of Basic Amino Acids on Photoreaction of Ketoprofen in Phosphate Buffer Solution”, Tadashi Suzuki, Yohei Osanai, Tasuku Isozaki, Photochem. Photobiol. 2012, 88, 884-888. 査読有 DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01132.x
2. “Multi-Photon Excitation Studies of 6-Thioguanosine as a Potential Agent for

- Photodynamic Therapy”, Tasuku Isozaki, Jun Ikemi, Tadashi Suzuki, *Photomed. Photobiol.* 2012, 34, 67–68. 査読無
<http://square.umin.ac.jp/jspp/member/proceed/proceedings.pdf>
3. “‘Dark’ Excited States of Diphenylacetylene Studied by Nonresonant Two-Photon Excitation Optical-Probing Photoacoustic Spectroscopy”, Tadashi Suzuki, Mitsuko Nakamura, Tasuku Isozaki, Tadaaki Ikoma, *Int. J. Thermophys.* 2012, 33, 2046–54. 査読有
 DOI: 10.1007/s10765-012-1296-8
 4. “Excited-State Dynamics of 6-Aza-2-thiothymine and 2-Thiothymine: Intersystem Crossing and Singlet Oxygen Photosensitization”, Hikaru Kuramochi, Takashi Kobayashi, Tadashi Suzuki, Teijiro Ichimura, *J. Phys. Chem. B* 2010, 114 (26), 8782–8789. 査読有
 DOI: 10.1021/jp102067t
 5. “Triplet Formation of 6-Azauridine and Singlet Oxygen Sensitization with UV Light Irradiation”, Takashi Kobayashi, Hikaru Kuramochi, Tadashi Suzuki, Teijiro Ichimura, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 5140–5148. 査読有
 DOI: 10.1039/b921568a
 6. “Ultrafast Intersystem Crossing of 4-Thiothymidine in Aqueous Solution”, Yosuke Harada, Chie Okabe, Takashi Kobayashi, Tadashi Suzuki, Teijiro Ichimura, Nobuyuki Nishi, Yao-Zhong Xu, *J. Phys. Chem. Lett.* 2010, 1, 480–484. 査読有
 DOI: 10.1021/jz900276x
 7. “Direct Evidence for Weak Intramolecular O–H… π Hydrogen Bonding in 1-Hydroxytetralin”, Tasuku Isozaki, Yu-ichiro Tsutsumi, Tadashi Suzuki, Teijiro Ichimura, *Chem. Phys. Lett.* 2010, 495, 175–178. 査読有
 DOI: 10.1016/j.cplett.2010.06.081
 8. “Fluorescence Spectroscopy of Jet-Cooled o-Fluoroanisole: Mixing through Duschinsky Effect and Fermi Resonance”, Tasuku Isozaki, Kosaku Sakeda, Tadashi Suzuki, Teijiro Ichimura, *J. Chem. Phys.* 2010, 132, 214308–1–9. 査読有
 DOI: 10.1063/1.3442490
- [学会発表] (計 10 件)
1. 光検出光音響分光法による 6-チオグアノシンの多光子吸収～光線力学療法への応用を目指して～、磯崎 輔、池見 淳、鈴木 正、平成 24 年度 日本分光学会年次講演会 (東京)、平成 24 年 11 月 27 日 (火) ～11 月 29 日 (木)
 2. Photochemistry and Photodynamics of Aza- and Thio-substituted Nucleic Acid Bases and Their Nucleosides, Tadashi Suzuki and Tasuku Isozaki, 7th Asian Photochemistry Conference 2012 (APC2012), 2012 年 11 月 12 日～15 日, Osaka, Japan
 3. Multi-photon Excitation Studies of Thioguanosine as a Potential Agent for Photodynamic Therapy, Tasuku Isozaki, Jun Ikemi, Tadashi Suzuki, 7th Asian Photochemistry Conference 2012 (APC2012), 2012 年 11 月 12 日～15 日, Osaka, Japan
 4. チオ核酸塩基の光励起による一重項酸素の生成とその反応過程、岸のぞ実、磯崎 輔、鈴木 正、光化学討論会 2012 (大岡山)、2012 年 9 月 12～14 日
 5. チオ置換核酸塩基の多光子吸収過程を利用した光線力学療法への試み、磯崎 輔、池見 淳、鈴木 正、第 34 回日本光医学・光生物学会 (神戸)、2012 年 7 月 27 日～28 日
 6. 光検出光音響法を用いたチオ置換核酸塩基の二光子吸収スペクトル、池見 淳、磯崎 輔、鈴木 正、分子科学討論会 (札幌)、2011 年 9 月 20 日 (火)～23 日 (金)
 7. チオ置換核酸塩基の PDT への応用とチオールの影響、鈴木 正、宮下 恵、磯崎 輔、光化学討論会 (宮崎)、2011 年 9 月 6 日 (火)～8 日 (木)
 8. “Excited State Properties of Thio- and Aza-Substituted Nucleoacids /Nucleosides and Their PDT Applications, T. Suzuki and T. Isozaki, 5th Asia Oceania Conference on Photobiology “AOCP 2011”, 2011 年 7 月 30 日～8 月 1 日, Nara Prefectural New Public Hall, Nara, Japan
 9. チオおよびアザ置換核酸塩基の励起状態ダイナミクス、倉持 光、鈴木正、Bo Albinsson、竹内佐年、田原太平、市村

禎二郎、分子科学討論会（豊中）、2010年9月14日（火）～17日（金）

10. アザ及びチオ置換核酸塩基の励起状態、鈴木正、小林高士、倉持光、高橋英明、磯崎輔、市村禎二郎、光化学討論会（千葉）、2010年9月8日（水）～10日（金）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.chem.aoyama.ac.jp/Chem/ChemHP/phys4/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 正 (SUZUKI TADASHI)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30251606