

# バイオ計測学特論07

2021年度 第4Q

佐藤しのぶ

# 本日のトピック

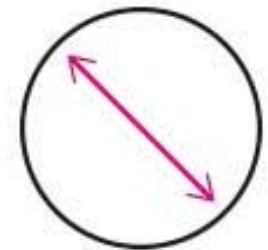
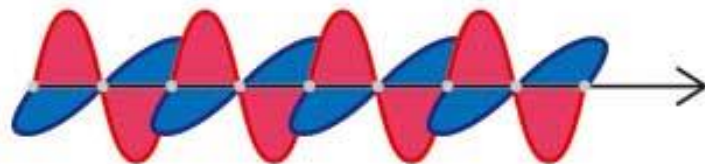
- CDスペクトル測定

# 偏光とは？

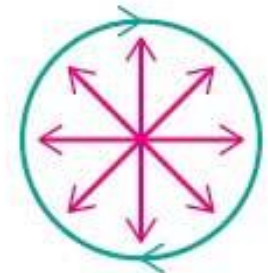
光が電磁波であり、電磁波は、直行する電場と磁場中を進行方向に垂直に振動して伝わる横波である。

自然界の光には、様々な向きに振動する光の成分が含まれているが、振動面がそろった光を直線偏光、光の波の進行に伴い振動面が回転する偏光を円偏光という。

直線偏光

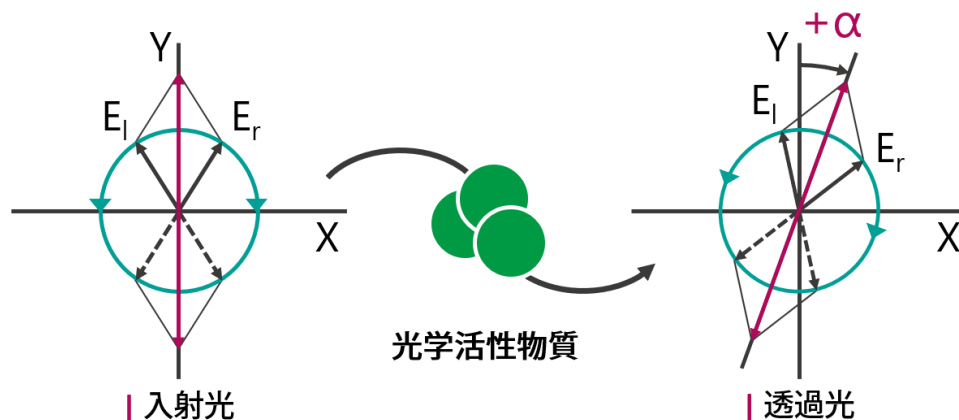


円偏光



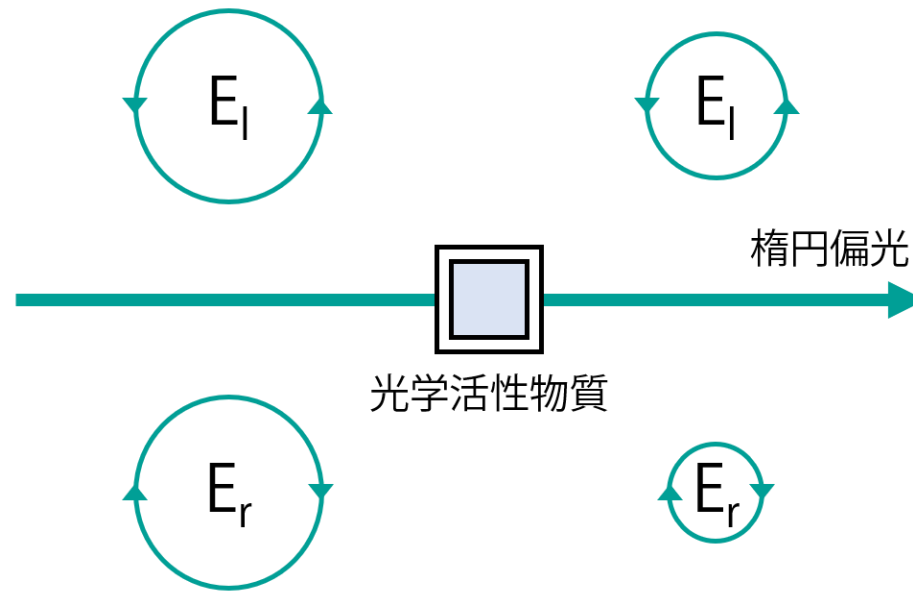
# 旋光性について

- 光学活性物質は、L体、D体という鏡像関係の異性体を持つ物質です。サリドマイドやグリセルアルデヒドなどがその例です。光学活性物質は、直線偏光の偏光面を回転させる性質、旋光性（OR）を持ち、その波長依存性を旋光分散（optical rotatory dispersion: ORD）と呼びます。
- Y軸方向の直線偏光が左側に回転するものをlevo (l) または (-) 旋光性（左旋性）といい、右側に回転するものを、dextro (d) または (+) 旋光性（右旋性）といいます。ここで回転角 $\alpha$ が旋光角、+または-により回転方向を表します。



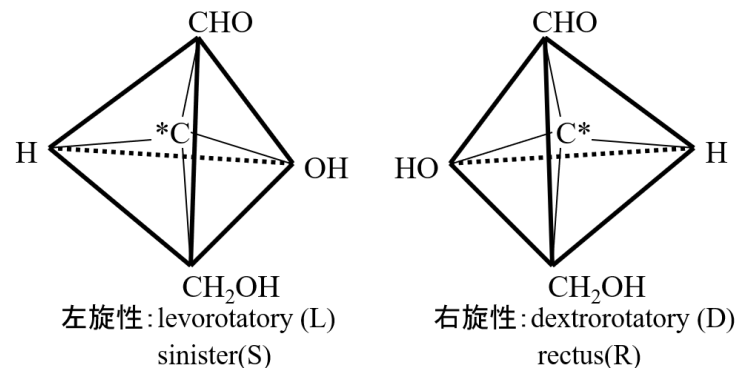
# CD測定 の原理

- 円二色性（circular dichroism: CD）は、光学活性物質の吸収波長領域において、左右円偏光の吸収の度合が異なる現象です。CD測定は、光学活性な試料に左右の円偏光を通すことで、それらの吸収の差を検出します。左右の円偏光の吸収の差により透過光は楕円偏光となり、この不等吸収の現象を円二色性（CD）と呼び、楕円率 $\theta$ で表します。この楕円率の波長依存性をプロットしたものを円二色性スペクトル（CDスペクトル）と呼びます。



# 旋光性とキラリテイ

- 医薬品や食品には光学活性（キラリテイ）をもつ物質が数多く存在します。はグリセルアルデヒドのL体、D体で、自然界では通常D体で存在します。キラルな医薬品や食品は、それらが働く生体がキラルな場であるために、鏡像関係にある光学異性体で異なった性質・効果を示します。例えばメントールのL体は清涼剤としてガムや歯磨き粉に使用されますが、D体は清涼感に乏しく使用されません。パーキンソン病の治療薬、ドーパはL体のみ効果があります。このように、L体とD体で作用が異なるため、使用する物質がどちらなのか、純度はどれくらいなのかを知る必要があります。キラル分子に吸収帯がある場合はCD測定が有効ですが、ORDや旋光度測定は吸収帯がない場合でも威力を発揮します。



# キラル分子の識別

- キラル分子、光学異性体（L体、D体）の識別には以下のような方法があります。結晶の晶癖による分離
- バイオアッセイ
- X線結晶構造解析
- 核磁気共鳴装置（NMR）
- 旋光度測定
- ORD・CD測定
- 旋光度測定、ORD・CD測定は分光学的測定法であり、特別な前処理を必要とせず、試料を溶液状態のまま測定できる点が特徴です。

# 旋光度測定

- 旋光度（OR）測定は、ある波長における旋光角を測定するもので、濃度や光学純度（L体、D体の割合）の計測に最も簡便な方法です。日本薬局方、アメリカ薬局方、ヨーロッパ薬局方により医薬品の試験項目が定められ、測定波長、温度、濃度などの測定条件が国際標準化されています。このように対象試料の調製方法、測定条件などの分析手順（SOP）を揃えることにより、世界中で分析結果の比較が可能になります。

$$[\alpha]_{\lambda}^t = 100\alpha/cl$$

[ $\alpha$ ]: 比旋光度  
 $\lambda$ : 測定波長または光源  
t: 温度(°C)  
 $\alpha$ : 旋光度  
c: 濃度  
l: セル長

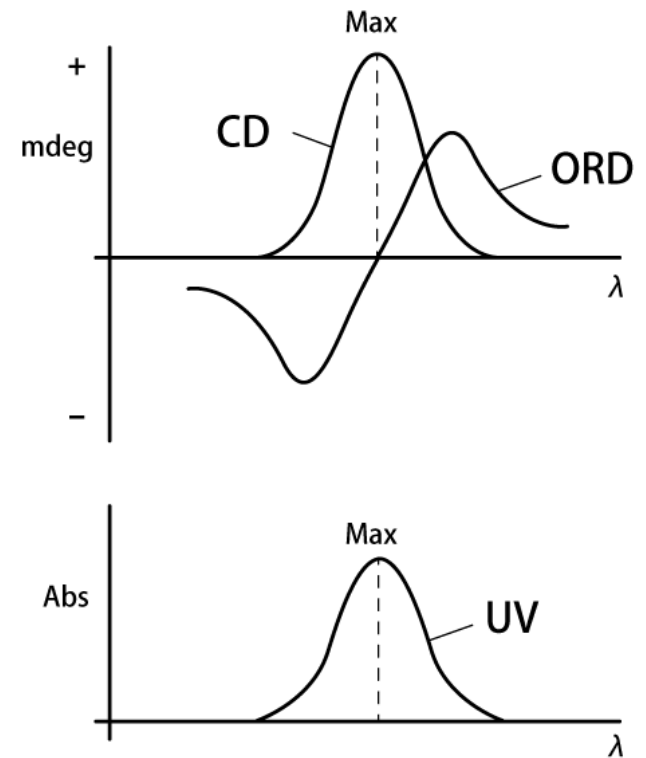
セル長  
試料の濃度  
温度

旋光度と比例の関係  
旋光度と比例しない(比旋光度が変化)  
旋光度と比例しない(比旋光度が変化)



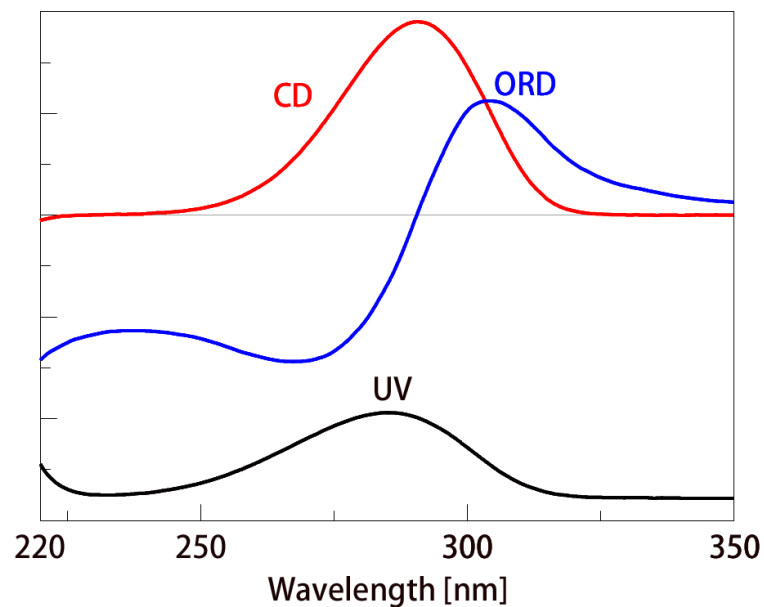
# コットン効果

- 吸収帯波長領域におけるCD、ORD、UVスペクトルの関係を模式的に示しています。UVスペクトル領域内では、ORD曲線の異常分散とCDのピークが観測されます。この2つの現象はコットン効果と呼ばれ、光学活性物質の立体配置、立体配座を知る手がかりになります。コットン効果に関する情報は、まとめると以下の3つになります。符号(±): CD(+)、ORD(長波長側極大値)
- 大きさ: CDピーク値、ORDの山、谷の振幅
- 位置: CDピーク波長 = ORDの変曲点



# コットン効果

- (1S)-(+)-10-Camphorsulfonic acid ammonium saltのUV、ORD、CDスペクトルです。220～350nmの波長領域でコットン効果を示しています。このように長波長側にORDの極大値を持つ場合を正のコットン効果といい、短波長側にORDの極大値を持つ場合を負のコットン効果といいます。(1S)-(+)-10-Camphorsulfonic acid ammonium saltの光学異性体である(1R)-(-)-10-Camphorsulfonic acid ammonium saltは、短波長側にORDの極大値を持ちます。ORD、CDスペクトルを測定すれば、D体、L体どちらであるかを判別することができます。



# ORD・CD法の特徴

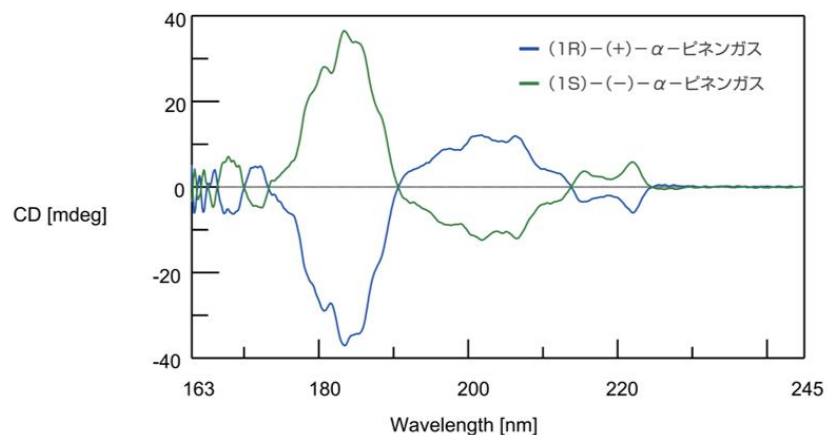
- ORD、CD測定は、物質の細かな構造を解析するよりはむしろ、コンフォメーションや相互作用の変化を検出することを得意とします。また、コットン効果の解析と測定のしやすさでは、ORDよりもCD測定が優位です。

要素	ORD	CD
コットン効果のパターン	パターンが複雑	分離がよく、パターンは単純
応用のしやすさ	しにくい（濁り、歪みに敏感）	しやすい
定量分析	可能	可能
試料の同定	適する	難しい
測定対象	光学活性物質	不等吸収を持つ化合物

# ORD、CD測定の実用例(1) 有機化合物

## • 既知光学異性体の識別

- 対掌体のORD・CDスペクトルは完全なミラーイメージになるので、光学異性体の立体配置の識別が可能です。図にピネンガスのCDスペクトルの例を示します。光学異性体である各々のCDスペクトルが上下対称になっていることが分かります。また、立体配置が既に分かっている光学異性体のORD・CDスペクトルをもとに、類似構造の光学活性体の立体配置解析が行われています。



# ORD、CD測定の実用例(1)有機化合物

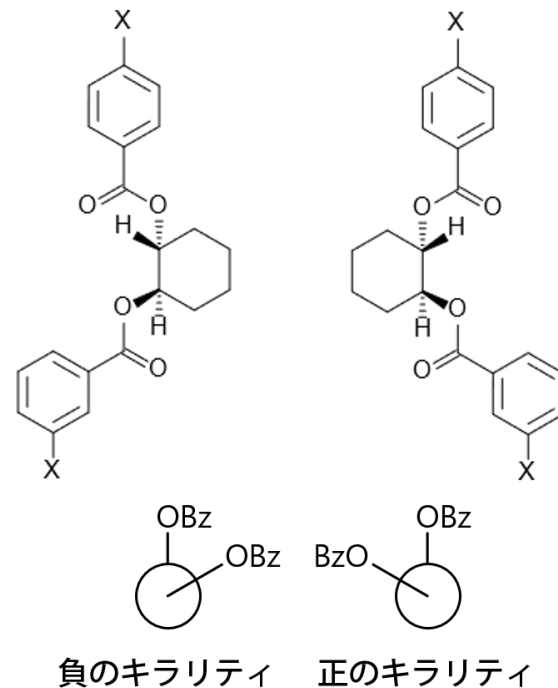
- 経験則を利用する立体配置、配座の解析
- 発色団周囲の立体環境によって生じるコットン効果は、多くのものが調べられています。主な発色団に関するコットン効果の経験則を表に示しました。

発色団	遷移	$\lambda_{\text{ext}}[\text{nm}]$ 、 $\Delta\epsilon$	経験則
飽和ケトン	$n \rightarrow \pi^*$	290~305、0~4	ケトンのオクタント則
$\alpha, \beta$ -エポキシケトン $\alpha, \beta$ -シクロプロピルケトン	$n \rightarrow \pi^*$	280~307、0~5	逆オクタント則
$\beta, \gamma$ -不飽和ケトン	$n \rightarrow \pi^*$	295~305、0~10	オクタント則
$\alpha, \beta$ -不飽和ケトン	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$ -	320~350、0~3 230~250、0~15 210~215、0~15	逆オクタント則、らせん性則、アシル位アキシアル置換基則
C=C二重結合	-	180~220、0~10	オレフィンオクタント則、ねじれ効果、アシル位アキシアル置換基則
共役ジエン	$\pi \rightarrow \pi^*$	230~250、0~10	らせん性則、アシル位アキシアル置換基則
ベンゼン環	$\pi \rightarrow \pi^*$ 、 ${}^1L_b$ $\pi \rightarrow \pi^*$ 、 ${}^1L_a$	260~280、0~2 200~220、0~5	ベンゼン・セクター則

# ORD、CD測定の実用例(1)有機化合物

## • 励起子キラリティ法

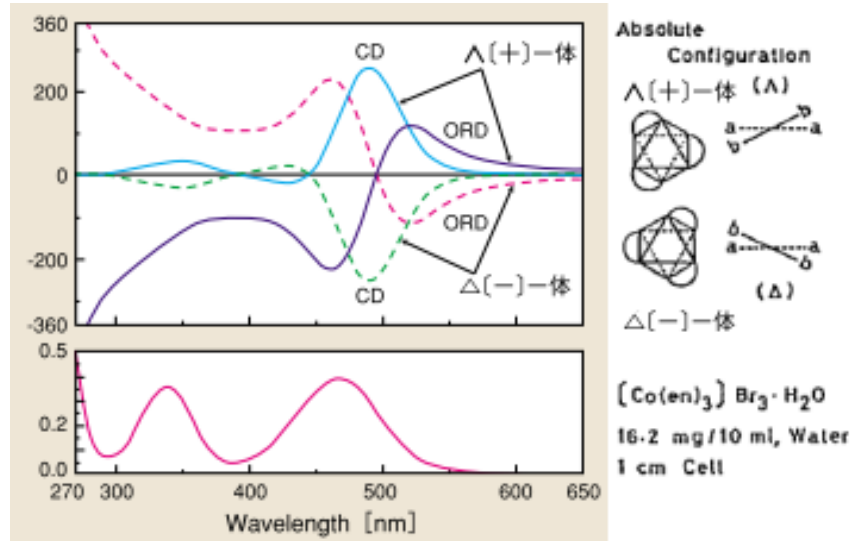
- 強い $\pi$ - $\pi^*$ 吸収帯をもつ2個以上の等価な発色団が互いに不斉の位置に存在する場合、ねじれ方向がコットン効果の符号を決定します。この方法は理論的に確立された適用範囲の広い方法で、ジオール類（2個のOH）などの吸収を示さない官能基をジベンゾエート体に誘導して（図）、立体配置の決定に応用しています



# ORD、CD測定の実用例(2)金属錯体

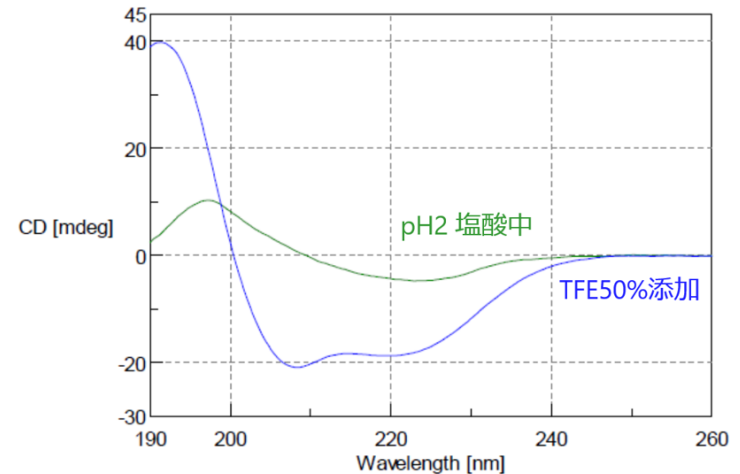
## 六配位・正八面体光学活性錯体

六配位・正八面体の光学活性錯体は、X線構造解析による絶対配置との関係が古くから調べられてきました。図は、3価コバルトイオンにエチレンジアミンが配位した光学活性錯体のORD・CDです。配位子として、各種置換型ジアミン、アミノ酸(2座)、トリアミン型(3座)、からEDTA(6座)まで様々な錯体が合成されています。六配位正八面体型錯体としては、Co(III)の他、Co(II) Cr(III)、Ru(III)、Rh(III)、Pt(II)、Ir(III)、Ni(II)等が研究されています。



# ORD、CD測定の実用例(3) タンパク質、ポリペプチド

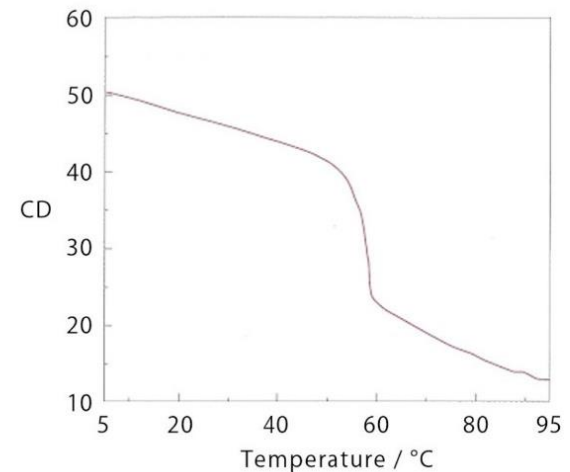
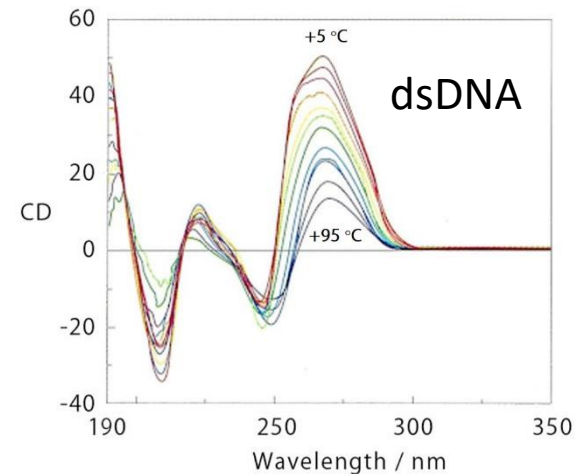
- CDスペクトルから、タンパク質の基本構造、 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート及びランダムコイルの構成比の推定が可能です。例としてコンカナバリンAのCDスペクトルを図4に示します。天然状態では $\beta$ -sheetに富んだ構造を有していますが、フルオロエタノール（TFE）により $\alpha$ -Helixに富んだ構造へ変化します。pH2塩酸中では $\beta$ -sheet構造に特徴的なCDスペクトルを示すのに対し、TFEを50%加えた溶液中では $\alpha$ -Helixに富むCDスペクトルを示します。





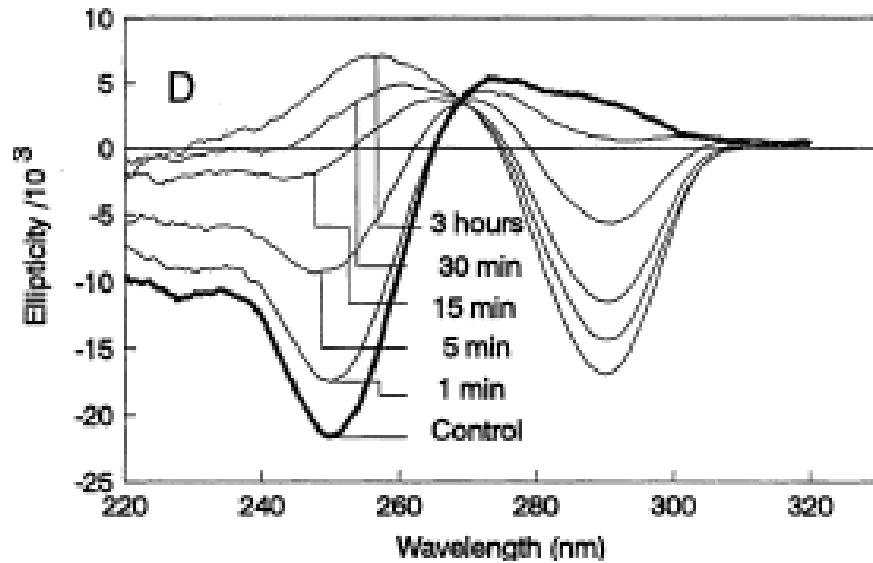
# ORD、CD測定の実用例(4)核酸

- 二重らせんモデルで知られるDNAや、タンパク質合成に関わるRNAなどの核酸も、その構造により特徴的なCDスペクトルを示します。その一例に、CDによる左巻きZ型DNA構造の発見が挙げられます。らせんの左右の特定に、CDの符号が決め手となりました。核酸のCD測定で最も広く用いられるのは、温度変化測定です。核酸の二重鎖が熱によりほどけていく過程（メルティング）を追跡、その構造変化から熱安定性を解析します。

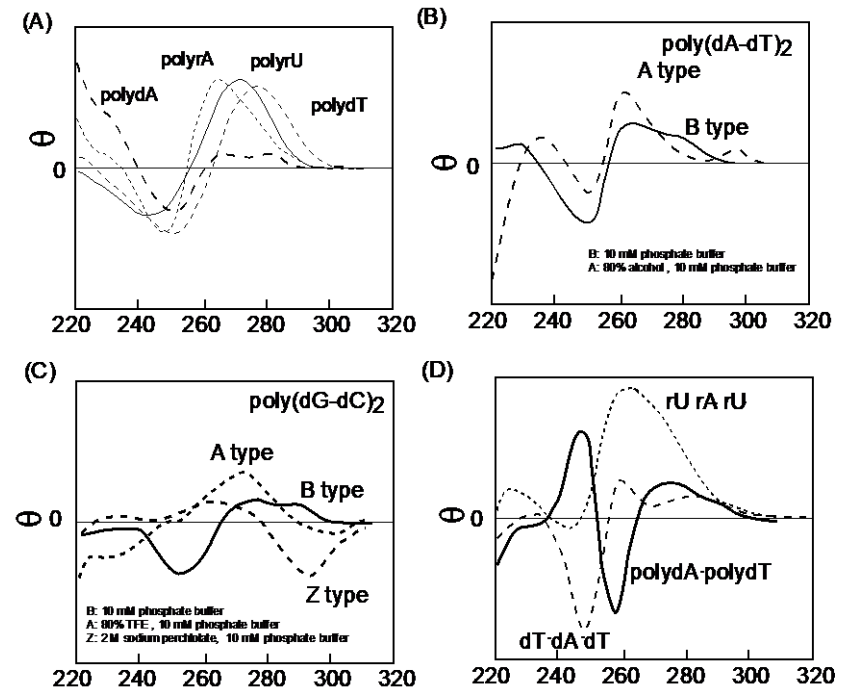


# ORD、CD測定の実用例(4)核酸

[Poly(m5dC-dG)2のB型からZ型への遷移



Eur Biophys J (1998) 27: 417-423



# ORD、CD測定の実用例(4)核酸

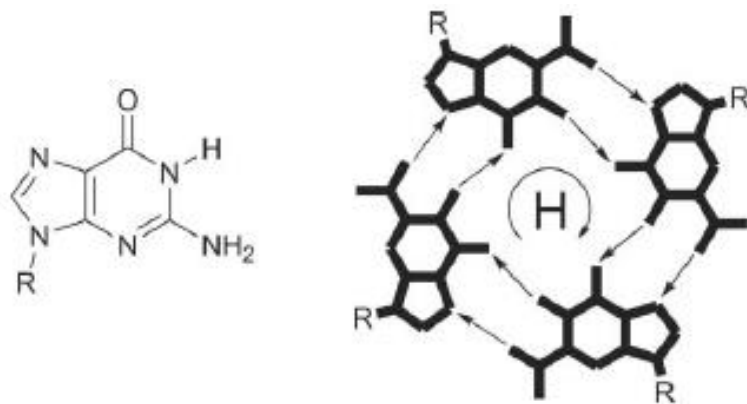
## A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures†

Stefano Masiero,<sup>a</sup> Roberta Trotta,<sup>b</sup> Silvia Pieraccini,<sup>a</sup> Stefano De Tito,<sup>b</sup> Rosaria Perone,<sup>a</sup> Antonio Randazzo<sup>\*b</sup> and Gian Piero Spada<sup>\*a</sup>

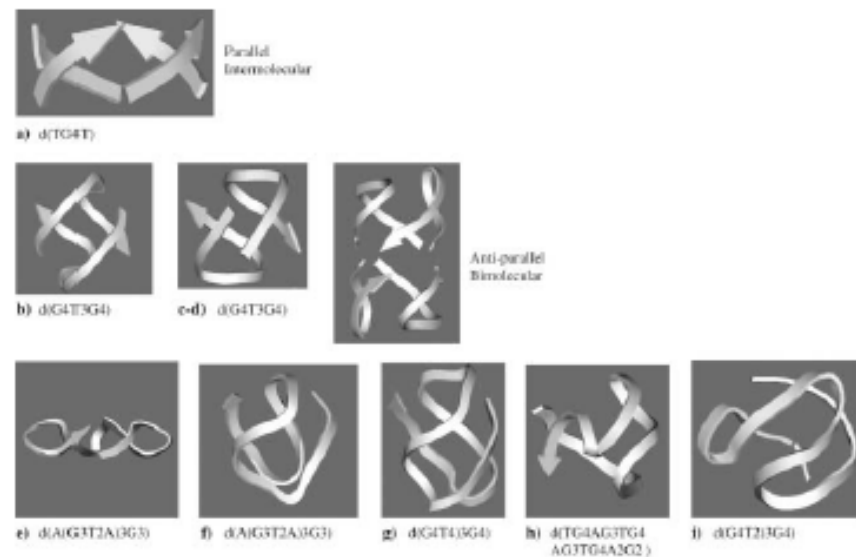
Received 23rd February 2010, Accepted 7th April 2010

First published as an Advance Article on the web 4th May 2010

DOI: 10.1039/c003428b

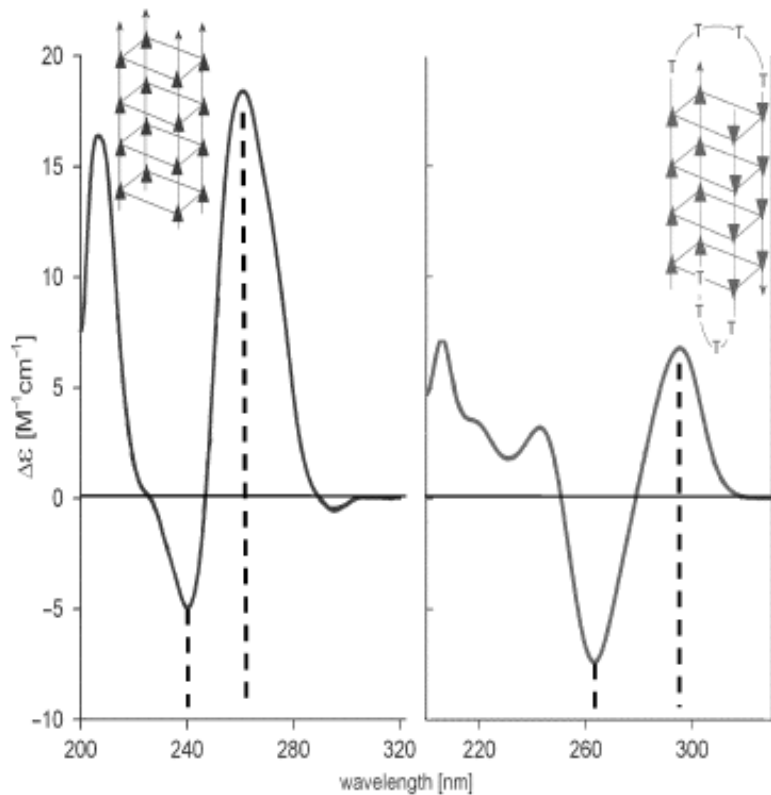


**Fig. 1** The guanine moiety and the G-quartet. The G-quartet shows its “head” (H) side (from donor to acceptor H-bonding runs clockwise); the reverse side is referred as “tail” (T) (from donor to acceptor H-bonding runs counter-clockwise).

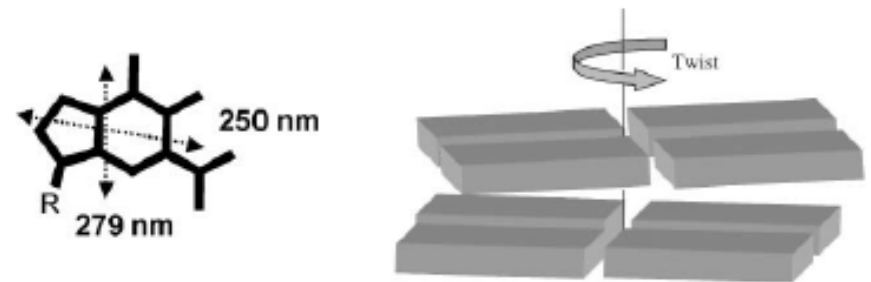


**Fig. 2** Typical folding topologies of G4-DNA forming sequences: a parallel intermolecular structure (a), bimolecular antiparallel structural motifs (b–d), intramolecular parallel (e) and antiparallel (f–i) monomolecular structures. Arrows represent backbones running from 5' to 3' end. (Reproduced by permission of Royal Society of Chemistry from ref. 2).

# ORD、CD測定の実用例(4)核酸

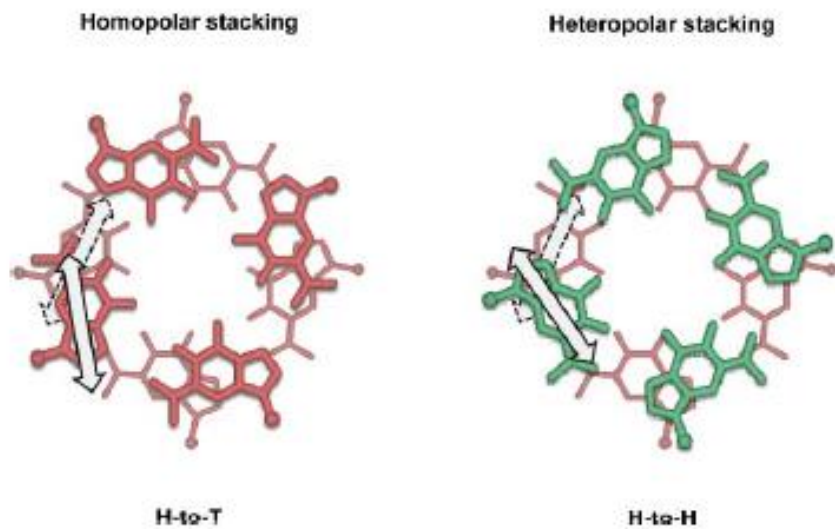


**Fig. 3** CD spectra of guanine quadruplexes. Left side: the parallel-stranded quadruplex  $[d(G_4)]_4$  stabilized by 16 mM  $K^+$ ; right side:  $Na^+$ -induced antiparallel bimolecular quadruplex of  $[d(G_4T_4G_4)]_2$ . The triangles in the sketches indicate guanines and point in the 5'-3' direction.  $\Delta\epsilon$  is expressed in terms of nucleotide molar concentration (adapted from ref. 13).

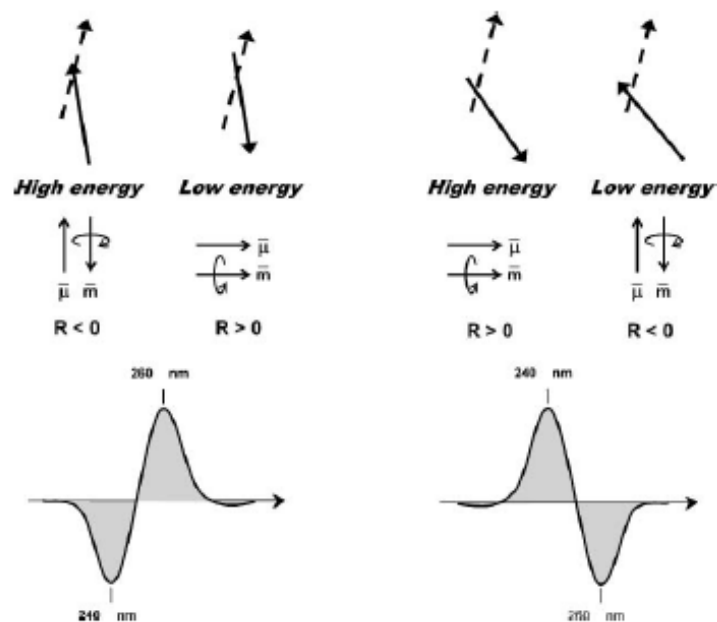


**Fig. 4** Orientation of the two most relevant electric transition moments (dotted double-head arrows) of the guanine chromophore (left) and a sketch of the chiral arrangement of two adjacent G-quartets (each parallelepiped represents a guanine base).

# ORD、CD測定の実用例(4)核酸

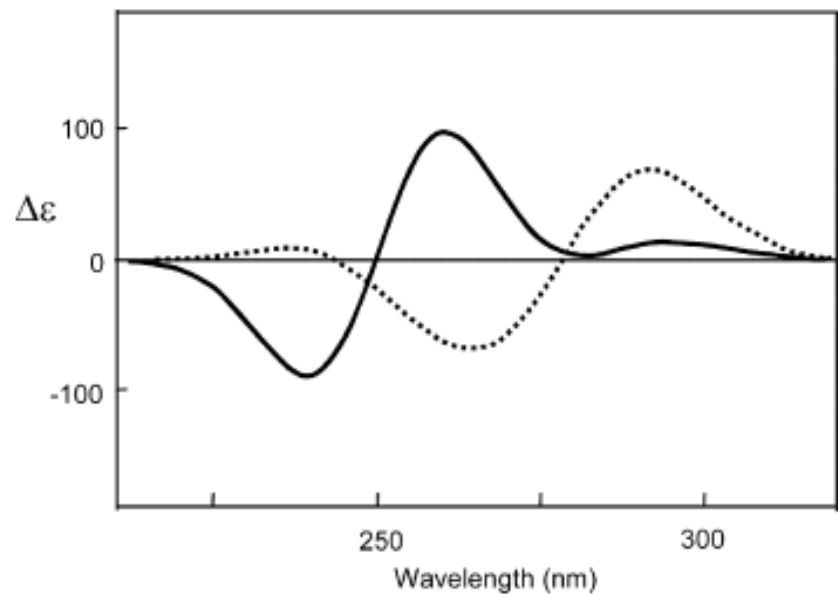


**Fig. 6** Top view of the heteropolar and homopolar stacking of two G-quartets: the “head” and the “tail” sides of the G-quartets are represented in red and green, respectively (the double-head arrows represent the transition moments corresponding to the absorption band at *ca.* 250 nm).



**Fig. 7** A simplified model for the origin of the positive (left side) and negative (right side) exciton couplets for the head-to-tail (H-to-T) and head-to-head (H-to-H) G-quartet stacking, respectively. Top: the arrangement of two 250 nm electric transition moments (full line: front vector; dashed line: rear vector) located in two closest guanines. Middle: the magnetic ( $\vec{m}$ ) and electric ( $\vec{\mu}$ ) moments generated by the coupling of the two guanine chromophore (more in details, in the high energy coupling of the left-side panel, the two electric transition moments—top—sum to a total electric vector pointing upward—and generate a charge rotation with a resulting magnetic moments pointing downward, that is antiparallel). Bottom: the predicted CD spectra.

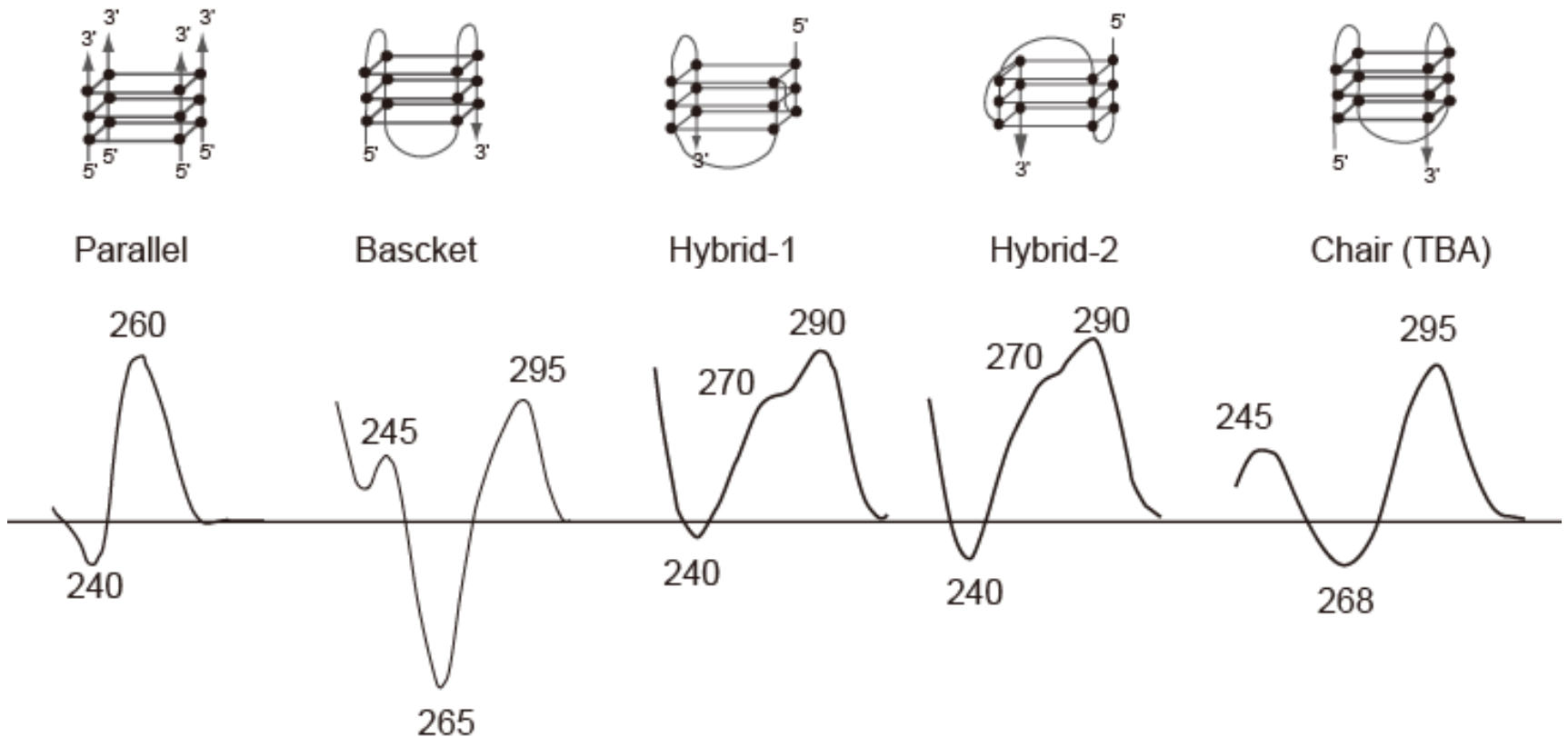
# ORD、CD測定の実用例(4)核酸



**Fig. 8** Superimposed calculated CD spectra of two G-quartets stacked in the H-to-T (solid line) or H-to-H (dashed line) orientation as shown in Fig. 6. The relative orientation of the G-quartets for the calculation were extracted from the solution structure of  $d(G_3T_4G_3)$  that present mixed polarities of stacked G-quartets.<sup>22</sup>

# ORD、CD測定の実用例(4)核酸

## G4DNAのCDスペクトル



## 1/7 宿題について

出欠および評価のため、  
Moodleの課題を提出して下さい。

**課題提出締め切り： 1/14**