

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25410100
研究課題名(和文) 分子の捕捉・放出制御を目指した分子バルブの開発

研究課題名(英文) Development of Light-Powered Molecular Valves

研究代表者

桑原 俊介 (KUWAHARA, Shunsuke)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：40359550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：分子マシンとは、外部から得たエネルギーを機械的動作に変換する分子のことである。我々は、光を照射することで分子の一方方向輸送を制御する分子マシンである分子バルブを設計した。本研究では、分子バルブ(E,E)-2、(Z,Z)-2の合成、構造決定に成功した。また、光照射により(E,E)-2と(Z,Z)-2との間で構造変換できることを明らかにした。一方、分子バルブの単一分子の動きを確認するために必要な蛍光色素 Cy5-COTを開発することに成功した。今後、Cy5-COTを用いて分子バルブの一方方向の回転挙動を明らかにする予定である。

研究成果の概要(英文)：A molecular machine is a molecule or a molecular system capable of converting external energy into mechanical motion. We have designed molecular valves, which have a potential to regulate the flow of molecules by blocking and opening passageways. Molecular valves (E,E)-2 and (Z,Z)-2 have been synthesized by the Barton-Kellogg reaction as a key step. The structures of (E,E)-2 and (Z,Z)-2 were determined by X-ray analysis. Photoisomerization between (E,E)-2 and (Z,Z)-2 was also observed. To clarify the rotation of the rotor part of the molecular valves by fluorescence correlation spectroscopy (FCS), we developed photostable Cy5-COT fluorophores for detecting the movement. We found that the Cy5-COT fluorophores provide an almost twofold increase in photostability compared to the previous Cy5 fluorophores. This improvement in photostability will further the study of the behavior of the molecular valves in solution.

研究分野：構造有機化学

キーワード：分子マシン 分子バルブ 光異性化 蛍光相関分光法

1. 研究開始当初の背景

生体内において、ATP 合成酵素はタンパク質複合体を一方方向に回転させることにより ATP を合成している。このように機械的な動作によって生理機能を発現する酵素やタンパク質は生体分子マシンと呼ばれ、その特異な構造と機能に興味を持たれてきた。一方、1980 年代頃より生体分子マシンを模倣して人工の分子マシンを作成する試みが行われてきた。現在までに分子モーターなど機械的な動作を示す人工分子マシンが報告されているが、生体分子マシンの機能を超越するような分子マシンの開発には至っていない。

我々はこれまでにキラル分子モーターの開発を報告してきた。キラル分子モーターは、光照射による二重結合の *cis-trans* 異性化と続く熱異性化によって一方方向の回転が起こる。さらに 360 度回転し元の構造に戻ることから、機械のように一方方向の連続回転が可能である。本研究では、この「外部刺激による一方方向の回転」を利用した分子マシンである「分子バルブ」を新たに設計した。

2. 研究の目的

分子バルブは物質の一方方向の輸送を制御する機能性分子マシンである。分子バルブはクラウンエーテルを含む開口部分で分子を捕捉できる。その後、弁を一方方向に回転させることにより分子を一方方向に移動させることができると考えられる。分子バルブを筒状の超分子構造体に連結することで、分子を超分子構造体の中に効率よく捕捉することができる。さらに、弁を反対方向に回転させることで捕捉した分子を再び外部に放出することができると考えられる。

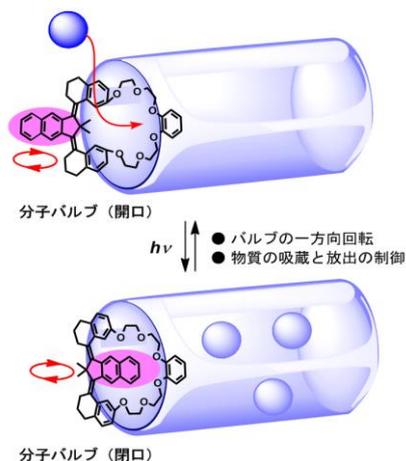


Figure 1

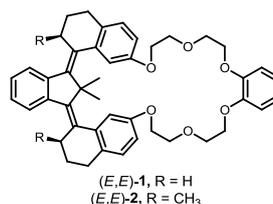
本研究では分子バルブを薬剤の捕捉、放出を制御する DDS として応用することを目指した。はじめに分子バルブの基本骨格を合成し、その光異性化反応により中心の弁部分であるベンゼン環の一方方向の回転挙動を明らかにする。その後、カーボンナノホーン、およびメソポーラスシリカとの連結を行い、分

子の捕捉、放出の挙動を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分子バルブの設計と合成

分子バルブ **1**, **2** は物質を捕捉するためのクラウンエーテル部位、弁として物質を移動させるための芳香環部位、光異性化を起こすためのオレフィン部位、弁を一方方向に回転させるためのキラリティー部位が必要である。はじめにキラリティー部位を合成し、エチレンオキシド鎖と連結した後、二か所のオレフィン部位を含む芳香環を導入する合成ルートを設計した。



(2) 分子バルブの光異性化反応

合成した分子バルブに光照射し異性化の挙動を ¹H NMR などのスペクトルを用いて追跡する。光照射にはモノクロメーターを用い、最適な照射波長の検討も行う。

(3) 分子バルブの回転挙動

光異性化によって生じた異性体の構造を NMR スペクトルや X 線結晶構造解析により明らかにし、弁の部分の一方方向の回転を明らかにする。

(4) 分子バルブと超分子構造体との連結

分子バルブをカーボンナノホーン、およびメソポーラスシリカと連結する。その後、物質の捕捉、放出の挙動を各種スペクトルや電子顕微鏡などにより調べる。

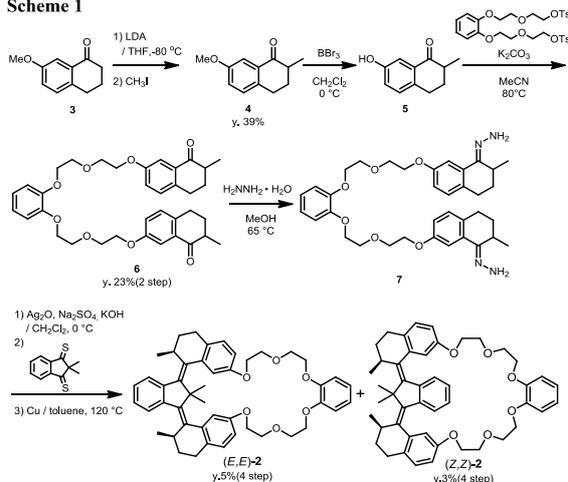
4. 研究成果

(1) 分子バルブの合成

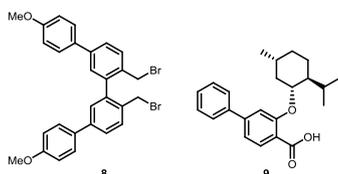
すでに合成に成功していた分子バルブ **1** の合成ルートを参考にし、キラリティー部位を導入した分子バルブ (*Z,Z*)-**2**, (*E,E*)-**2** の合成を Scheme 1 に従って行った。メトキシテトラロン **3** のモノメチル化、脱保護の後、ジトシラートを作用させ、ジケトン **6** を合成した。**6** をヒドラゾン **7** に変換した後、酸化銀(I)を用いて酸化し、ジアゾ体を得た。ジアゾ体と別途調製したジチオケトン **5** を用いた Barton-Kellogg 反応により種々の異性体を含むエピスルフィドを得た。エピスルフィドは精製することなく銅粉末を用いた脱硫反応を行った。反応後、HPLC (シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル = 2:1) で精製を行い、分子バルブ (*Z,Z*)-**2**, (*E,E*)-**2** をそれぞれ得ることに成功した。*(Z,Z)*-**2**, (*E,E*)-**2** の構造は各種 NMR

スペクトル, FAB-MS, および X 線結晶構造解析によって決定した。

Scheme 1



一方, キラルな分子バルブ中間体を効率よく合成するための新規プローブ **8** および **9** の開発にも成功した。



(2) 分子バルブの光異性化反応

$^1\text{H NMR}$ を用いて分子バルブ (Z,Z) -**2**, (E,E) -**2** の光異性化反応の挙動を追跡した。 (Z,Z) -**2**, または (E,E) -**2** を重ジクロロメタンに溶解し, モノクロメーターを用いて室温で光照射を行った。 各異性体比の決定は (Z,Z) -**2**, (E,E) -**2** とともに 0.46, 1.45 ppm の弁部位におけるメチル基プロトンの積分比を用いた。

はじめに (E,E) -**2** に 278 nm の光を照射したところ, 照射時間の経過に伴って, (E,E) -**2** のシグナルが消失していった (Figure 2)。 光照射 1 分後には異性化した (Z,Z) -**2** のシグナルが出現し, また 3 分後には非対称の構造を持つ (E,Z) -**2** のシグナルが現れた。 (E,Z) -**2** の存在比は 45 分後に最大となったが, 光を照射し続けると (E,Z) -**2** のシグナルは時間の経過とともに消失していき, 240 分後には完全に消失した。 300 分後には (Z,Z) -**2** と (E,E) -**2** の光定常状態に達した。 光定常状態における異性体の存在比は (E,E) -**2**: (Z,Z) -**2** = 4:96 となった。

Scheme 2

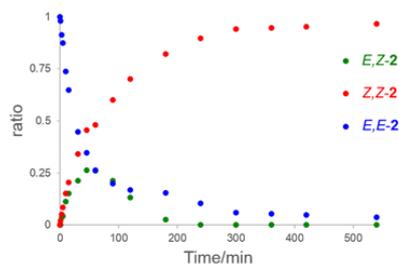
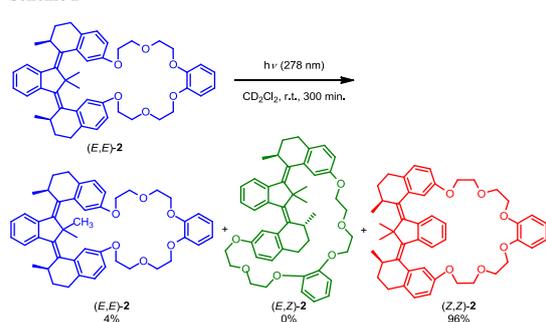


Figure 2

一方, (Z,Z) -**2** に 420 nm の光を照射したところ, 照射時間の経過に伴って, (Z,Z) -**2** のシグナルが消失していった (Figure 3)。 また, 光照射 5 分後には異性化した (E,E) -**2** のシグナルが出現した。 光照射 780 分後には光定常状態に達し, 異性体の存在比は (Z,Z) -**2**: (E,E) -**2** = 27:63 の比となった。 中間体と考えられる (E,Z) -**2** のシグナルは観測されなかったことから, (E,E) -**2** から (Z,Z) -**2** への光異性化とは別の経路をとって光異性化が進行した可能性がある。

Scheme 3

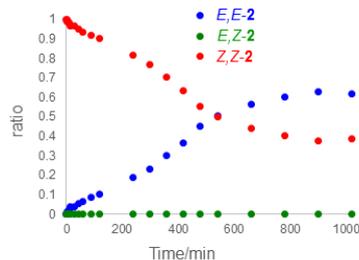
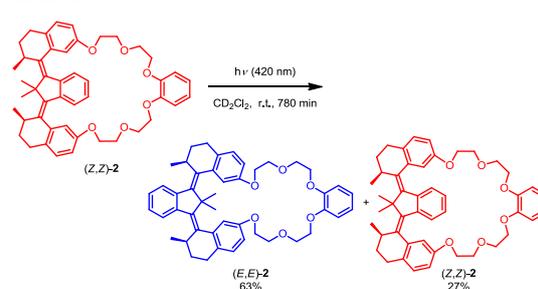


Figure 3

以上, $^1\text{H NMR}$ を用いた追跡実験では通常の分子モーターの一方方向の回転で観測される不安定中間体の存在が確認できず, 分子バルブの一方方向の回転を明らかにすることができなかった。

(3) 分子バルブの回転挙動

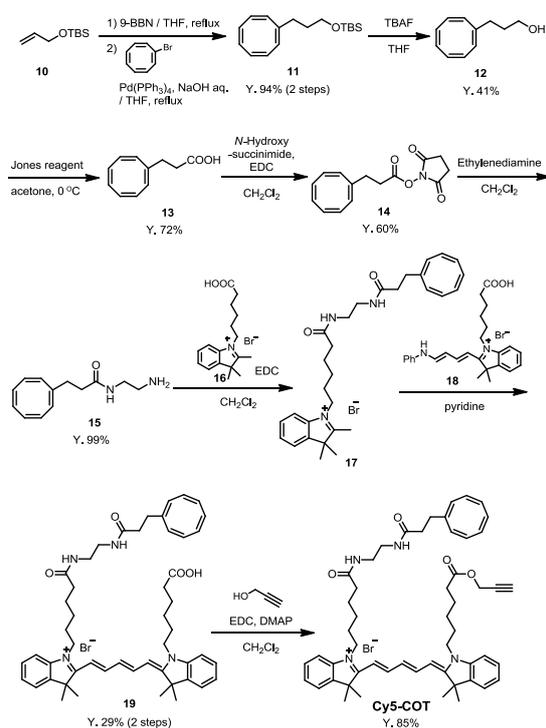
分子バルブの一方方向の回転を証明するため, 蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS) を用いることにした。 この方法は米国ライス大学の James Tour 教授らが, 一方方向の回転による分子マシンの一方方向の動きを観測するのに用いている。 FCS を用いて分子バルブの単一分子の動作の追跡を行うためには, 1) 追跡の計測に必要な時間 (1.5 秒以上) に消光せず, 2) 分子バルブの動作を

阻害しない蛍光色素が必要である。今回、蛍光色素の候補としてシアニン系蛍光色素 Cy5 を選んだ。Cy5 の励起波長 (> 630 nm) は、分子マシンの動作のための励起波長 (365 nm) と離れており、分子マシンの動作を阻害しない。しかし Cy5 の光安定性は低く、分子バルブの動作を十分に追跡できないことに問題があった。

本研究では、まずフォトブリーチングによる消光を防ぐため、シクロオクタテトラエンを連結した蛍光色素 Cy5-COT を設計、合成を行った (scheme 4)。

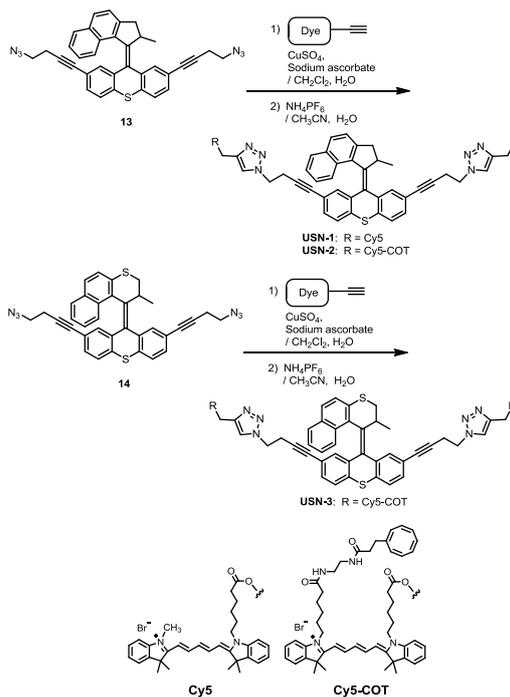
オレフィン **10** を 9-BBN でヒドロホウ素化した後、1-ブロモシクロオクタ-1,3,5,7-テトラエンとの鈴木-宮浦カップリングにより TBS エーテル **11** を得た。**11** の TBS 基の除去、Jones 酸化によりカルボン酸 **13** を得た。**13** に *N*-ヒドロキシスクシンイミドを作用させ活性エステル **14** とした後、エチレンジアミンを作用させ、アミン **15** を得た。**15** とカルボン酸 **16** を縮合させてアミド **17** とした後、イミニウム塩 **18** とカップリングさせカルボン酸 **19** を得た。最後に、分子マシン類との連結部位としてアルキンを導入し、目的物である Cy5-COT を得た。

Scheme 4



分子バルブに適用する前に、これまで単一方向の回転を起こすことが明らかになっている分子マシン (Unimolecular Submersible Nanomachine: USN) を用いて、Cy5-COT が FCS 法に適用できるかを調べた。アジド **13**, **14** に対し Cy5 または Cy5-COT を作用させ、連結体 USN-1-3 を得た (Scheme 5)。

Scheme 5



次に、FCS を用いて USN-1, USN-2 の光安定性を調べた。ガラス基板上の USN-1, USN-2 の DMSO 溶液に 637 nm の光を照射し、80 x 80 μm^2 の範囲での単一分子に相当する蛍光スポットを一定時間ごとに検出した (500 frames, 50 ms/frame)。蛍光スポットは時間が経過するにつれて消光し、その際の蛍光強度、スポットの数、および消光するまでの寿命 (τ) を追跡した (Figure 4, 5)。

USN-1 の場合、731 個の分子を蛍光スポットとして追跡し、1.5 s 以上の長寿命の分子数は全体の 23% であった。一方、USN-2 の場合、631 個の分子を追跡し、1.5 s 以上の長寿命の分子数は全体の 43% と大幅に増加した。さらに USN-1 と USN-2 の全ての τ の平均値、および減衰曲線より見積もった平均寿命を求めた (Figure 5)。その結果、USN-2 の τ の平均値および平均寿命は、USN-1 と比べて 2 倍程度増加することが分かり、FCS による分子バルブの単一分子追跡に適用可能であることが分かった。

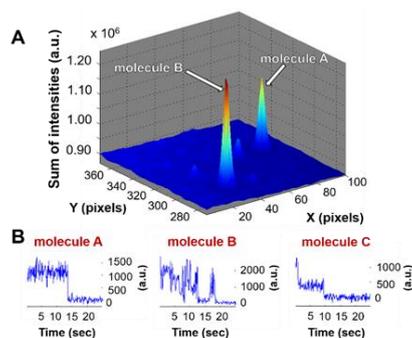


Figure 4

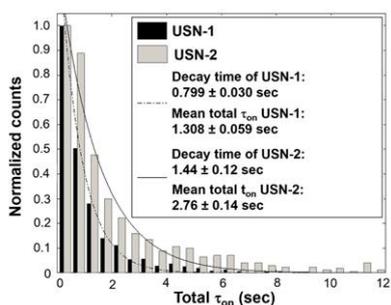


Figure 5

以上、本研究においてキラリティーを導入した分子バルブ(*Z,Z*)-**2**、(*E,E*)-**2**の合成とその構造決定に成功した。*(E,E)*-**2**に278 nmの光照射を行うと96%の割合で(*Z,Z*)-**2**に異性化した。一方、(*Z,Z*)-**2**に420 nmの光照射を行うと63%の割合で(*E,E*)-**2**に戻ることが分かった。一方、分子バルブの単一分子の動きを確認するために必要な蛍光色素 Cy5-COTを開発することに成功した。今後、Cy5-COTを用いて分子バルブの一方向の回転を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① 3-Menthoxybiphenyl-4-carboxylic Acid: A Versatile Reagent for Chiral Resolution and Determination of the Absolute Stereochemistry of Aromatic Alcohols
Kuwahara, S.; Tasaki, N.; Suzuki, Y.; Nakagawa, M.; Ikeda, M.; Habata, Y.
Tetrahedron: Asymmetry, **2017**, in press.
DOI: org/10.1016/j.tetasy.2017.05.008
査読有
- ② Synthesis and Photostability of Unimolecular Submersible Nanomachines: Toward Single-Molecule Tracking in Solution
García-López, V.; Jeffet, J.; Kuwahara, S.; Martí, A. A.; Ebenstein, Y.; Tour, J. M.
Org. Lett., **2016**, *18* (10), 2343–2346.
DOI: 10.1021/acs.orglett.6b00506
査読有
- ③ Combination of a New Chiroptical Probe and Theoretical Calculations for Chirality Detection of Primary Amines
Kuwahara, S.; Nakamura, M.; Yamaguchi, A.; Ikeda, M.; Habata, Y.
Org. Lett., **2013**, *14* (22), 5738–5741.
DOI: 10.1021/ol402767a
査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Synthesis and Photoisomerization of Molecular Valves with Two Rotating Units

Kuwahara, S.; Nakano, Y.; Mori, T.; Ogawa, T.; Ikeda, M.; Habata, Y.

(International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC 2017), July 2, 2017, Cambridge, UK)

- ② クォーターフェニルプローブを用いた第一級アミンおよびアミノアルコールの絶対配置決定

桑原俊介, 中村将也, 山口昂, 小林睦実, 池田茉莉, 幅田揚一

(シンポジウム モレキュラー・キラリティー2014, 2014年6月6日, 仙台国際センター(宮城県仙台市))

- ③ Synthesis and complexing behavior of a new photoresponsive crown ether
Nakanishi, K.; Habata, Y.; Kuwahara, S.
(4th Asian Conference on Coordination Chemistry, November 5, 2013, Jeju, Korea)

- ④ Chirality Transcription of Secondary Ammonium Salts by Forming [2]Pseudorotaxane

Kuwahara, S.; Tsuchiya, S.; Chamura, R.; Ikeda, M.; Habata, Y.

(4th Asian Conference on Coordination Chemistry, November 5, 2013, Jeju, Korea)

- ⑤ Chirality Transcription of Primary and Secondary Ammonium Salts by Forming [2]Pseudorotaxane

Kuwahara, S.; Tsuchiya, S.; Chamura, R.; Ikeda, M.; Habata, Y.

(8th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC-8), July 7, 2013, Arlington, USA)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

桑原 俊介 (KUWAHARA, Shunsuke)
東邦大学・理学部化学科・准教授
研究者番号：40359550

- (2) 連携研究者

幅田 揚一 (HABATA, Yoichi)
東邦大学・理学部化学科・教授
研究者番号：40218524

菅井 俊樹 (SUGAI, Toshiki)

東邦大学・理学部化学科・准教授
研究者番号：50262845