

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05845

研究課題名(和文)がん細胞膜の破壊を目指した分子マシンの開発

研究課題名(英文)Development of new molecular machines for disruption of lipid bilayers in tumor cells

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の選択的破壊を目指し、可視光で回転する分子モーター(1)を設計した。Ru(bpy)₃発色団が可視光照射により励起され、分子モーター部分へのエネルギー移動により回転が起こると予想した。

1の合成の過程において、分子モーターの新規E-Z熱異性化を発見した。分子モーター(E)-9から(Z)-9へのE-Z熱異性化の動力学を明らかにし、3ステップで回転する機構を提唱することができた。(E)-1aに452 nmの光を照射した結果、80%程度の割合で(Z)-1cに異性化した。同様に(Z)-1cから(E)-1aへの異性化も確認することができ、可視光で回転する分子モーターを開発することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のがん治療は放射線療法、化学療法が主流であるが、副作用を伴う。副作用を最小限にするためにがん細胞だけを殺すための分子標的薬が開発されているが、その数は少ない。近年、フタロシアニンを連結した抗体をがん細胞に導入し、近赤外光の照射で発生させた熱の圧力波でがん細胞を死滅させる方法が報告された。本研究では分子マシンの回転運動でがん細胞だけを破壊することで、より副作用がないがん治療が行えるのではないかと考えた。開発した分子モーターは、細胞に有害な紫外線ではなく、可視光の照射で機能させることができた。分子モーターのさらなる改良によって、新しいがん疾患の治療手段の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently several physical techniques are reported to open lipid bilayers of cellular membranes for biomedical applications. We designed a new molecular motor (1) with Ru(bpy)₃ chromophore which rotates by visible light irradiation. We expected that the rotation would be occurred by intramolecular energy transfer from the triplet excited state of Ru(bpy)₃ to the motor part.

In the process of the synthesis of 1, we revealed a new pathway for thermal E-Z isomerization in the molecular motors. Stable (E)-9a directly converts to stable (Z)-9c without photoisomerization. The three-step rotation mechanism has the advantage that rotation can be controlled by UV irradiation with a single fixed wavelength.

When (E)-1a was irradiated with 452 nm light, photoisomerization to (Z)-1c was occurred at about 80%. While photoisomerization of (Z)-1c at same conditions was occurred at about 50%. Further studies about the application to open lipid bilayers of cellular membranes is now in progress.

研究分野：構造有機化学

キーワード：分子モーター 分子マシン E-Z熱異性化 光異性化

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。

近年、米国ライス大学のJames Tourらは、分子マシンのプロペラ部分の機械的動作を利用して、細胞膜の脂質二重層に物理的に穴を開け、細胞膜の破裂、すなわち細胞死を制御できる可能性があることを報告した¹。しかし、上記の分子マシンでは紫外線照射そのものが細胞に損傷を与えてしまう可能性があるため、照射波長をよりエネルギーの低い可視光領域にシフトさせることが求められている。一方、米国国立がん研究所の小林らは、がん細胞の細胞膜をターゲットとした新しいタイプの新しいがん治療法を報告した²。彼らは、がん細胞の細胞膜に存在する上皮成長因子受容体と結合するモノクローナル抗体にフタロシアニン誘導体を連結し、その抗体をがん細胞に導入後近赤外の光を照射した。その結果、光照射によって発生した熱の圧力波で細胞膜に障害を与え、がん細胞を死滅させたと報告した。

本研究ではこれらの結果に注目し、研究代表者がこれまで研究してきた分子モーター^{3,4}を利用することを計画した。その機械的動作でがん細胞膜の破壊を制御することができれば、熱で細胞膜を破壊する小林らの方法よりも副作用なくがん治療が行えるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではがん細胞膜の破壊の制御を目指した新規分子モーターの開発を目的とした。分子モーターは、分子のプロペラ部分を単一方方向に回転させる動作に特徴がある。アゾベンゼン系の光異性化分子などよりも分子の動きの可動域が大きいため、その動きを他の構造体に伝える能力が優れているといえる。その回転の速度は非常に速く、室温で 3×10^6 回転/秒程度である。また、光照射という外部刺激により回転運動を制御できる点も優れている。しかし細胞膜の破裂を制御する分子モーターを開発するには、1) 可視光~近赤外光による分子モーターの回転制御、2) 細胞膜と強く相互作用させるための置換基の導入、3) 水溶性の向上、の3点の改良が必要である。

本研究では、以上の点を考慮した新規分子モーター1を設計した。分子モーターの側鎖に細胞膜との結合に用いられるエチレンオキシド側鎖を導入する。一方、可視光による回転制御を行うため、Tris(2,2'-Bipyridine) Ruthenium (Ru(bpy)₃) 発色団を導入する。可視光(500 nm)で励起されたRu(bpy)₃からのエネルギー移動で分子モーターの中心二重結合が励起され、回転運動を起こすと予想した(図1)。

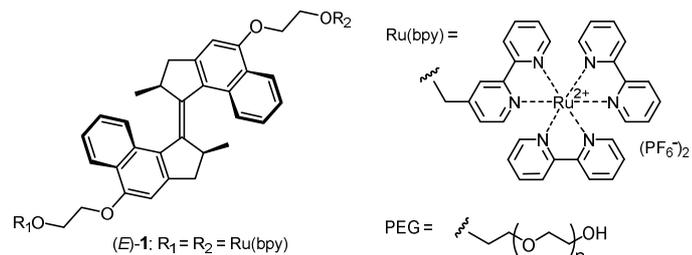


図1 新規分子モーター1の分子設計。

3. 研究の方法

(1) 分子モーターの合成

はじめに分子モーターの前駆体である環状ケトンを合成する。環状ケトンのMcMurryカップリングを行い、分子モーター骨格を合成する。その後側鎖にピペリジン部位を導入する。最後にRu(bpy)₃部位を構築し分子モーター1を合成する。

(2) 光照射条件の検討と回転挙動の追跡

合成した分子モーター1に光照射を行い、一方方向の回転が起こることをNMR, UVスペクトルなどにより調べる。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を行う。特に可視光領域の光を照射した場合、Ru(bpy)₃発色団が励起され、分子モーター部分への三重項エネルギー移動により回転が起こるかどうかを詳細に検討する。可視光照射により分子モーターの回転が可能であれば、さらに光物性、光安定性、水溶性などを調べ、細胞膜への導入が可能な分子モーターの改良を行う。

(3) 分子モーターの細胞膜への導入

合成した分子モーターを細胞膜へ導入し、がん細胞膜の破裂の制御の検討を行う。がん細胞は、細胞膜の裏側を支える裏打ちタンパク質の形成が不十分である。そのためがん細胞は、正常細胞に比べて細胞膜が有意に柔軟であることが知られている。本研究では、はじめに通常細胞に合成

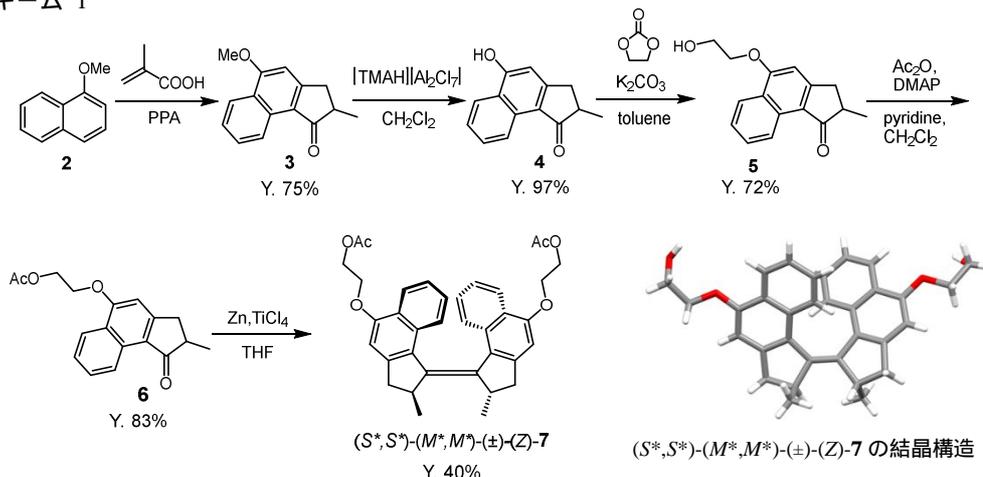
した分子モーターを導入する．光照射を行いながら細胞を観察し，細胞の挙動を調べる．

4．研究成果

(1) 分子モーターの新規 *E-Z* 熱異性化反応の解明

1-メトキシナフタレン **2** を出発物質とし，4 段階の反応で環状ケトン **6** を得た (スキーム 1)．環状ケトンの McMurry 反応を検討した結果，保護基としてアセチル基を用いた **6** の場合のみ反応が容易に進行し，分子モーターの中心骨格である二量体 **7** が得られた．**7** の構造は，X 線結晶構造解析により立体障害の少ない (*E*)-体ではなく，(*Z*)-体であることがわかった．

スキーム 1



この原因として高温での McMurry 反応中に *E-Z* 熱異性化が起こっているのではないかと考え，種々の分子モーターの熱異性化反応を各種スペクトルで追跡した．(*S*,S**)-(*M*,M**)-(±)-(*E*)-**8a** および (*S,S*)-(*M,M*)-(±)-(*E*)-**9a** の DMSO-*d*₆ 溶液を 130-150°C に加熱し ¹H NMR で追跡した結果，(*E*)-体から (*Z*)-体へ一方向的に異性化していることがわかった (図 2)．さらに (*S,S*)-(*M,M*)-(±)-(*E*)-**9a** を用いて熱異性化反応を CD スペクトルで追跡した結果，ラセミ化を伴うことなく (*Z*)-体へ異性化することを明らかにした (図 3)．

スキーム 2

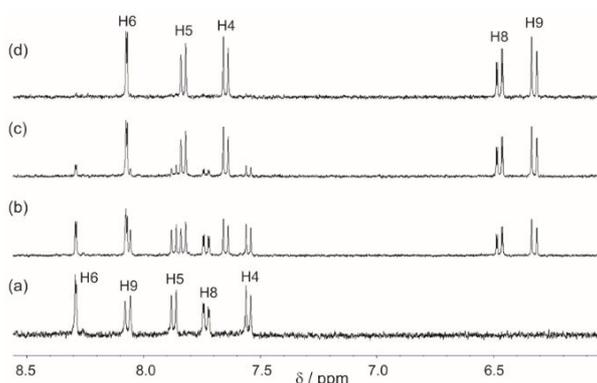
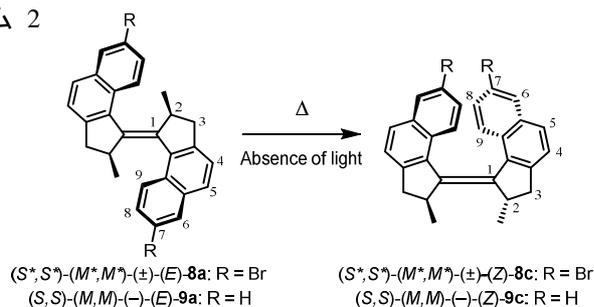


図 2. (*S*,S**)-(*M*,M**)-(±)-(*E*)-**8a** を 150 °C に加熱した後の ¹H NMR スペクトル変化 (400 MHz, DMSO-*d*₆, 1.5 × 10⁻³ M, 23 °C). (a) 加熱前, (b) 1 h 加熱後, (c) 2 h 加熱後, (d) 3 h 加熱後.

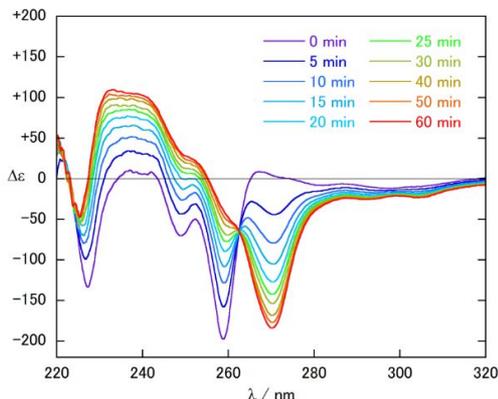
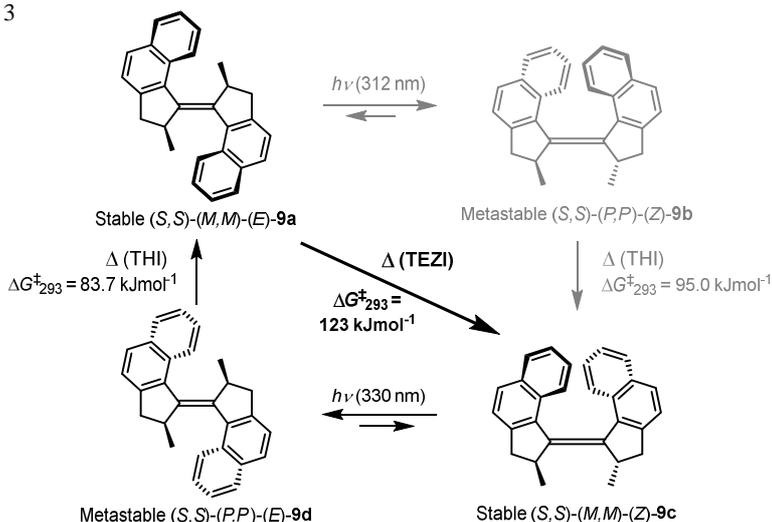


図 3. (*S,S*)-(*M,M*)-(±)-(*E*)-**9a** を 146.8 °C に加熱した後の CD スペクトル変化 (2.66 × 10⁻⁴ M, nonane, 23 °C).

各温度において、反応時間に対し不安定シス体 (*S,S*)-(*M,M*)-(*E*)-**2** の濃度の自然対数をプロットすると、直線関係が得られ、その傾きから各温度での反応速度定数 (*k*) と半減期 ($t_{1/2}$) を求めた。さらに温度変化の Arrhenius と Eyring プロットから、活性化エネルギー $E_a = 113 \text{ kJmol}^{-1}$ 、活性化エンタルピー $\Delta H^\ddagger = 110 \text{ kJmol}^{-1}$ 、活性化エントロピー $\Delta S^\ddagger = -42.3 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ 、活性化自由エネルギー $\Delta G^\ddagger_{293} = 123 \text{ kJmol}^{-1}$ を得た。また、DFT 計算を行った結果、(*E*)-体よりも(*Z*)-体 11.4 kJ/mol 程度安定であることがわかった。これまで報告されてきた分子モーターは、光による *E-Z* 光異性化と熱によるヘリックス反転を繰り返した 4 つのステップ (**9a**→**9b**→**9c**→**9d**) で回転するメカニズムであった。本研究では、(*E*)-体から(*Z*)-体への *E-Z* 熱異性化が存在することを明らかにし、分子モーターが 3 つのステップ (**9a**→**9c**→**9d**) で回転するメカニズムを提唱することができた (スキーム 3)。

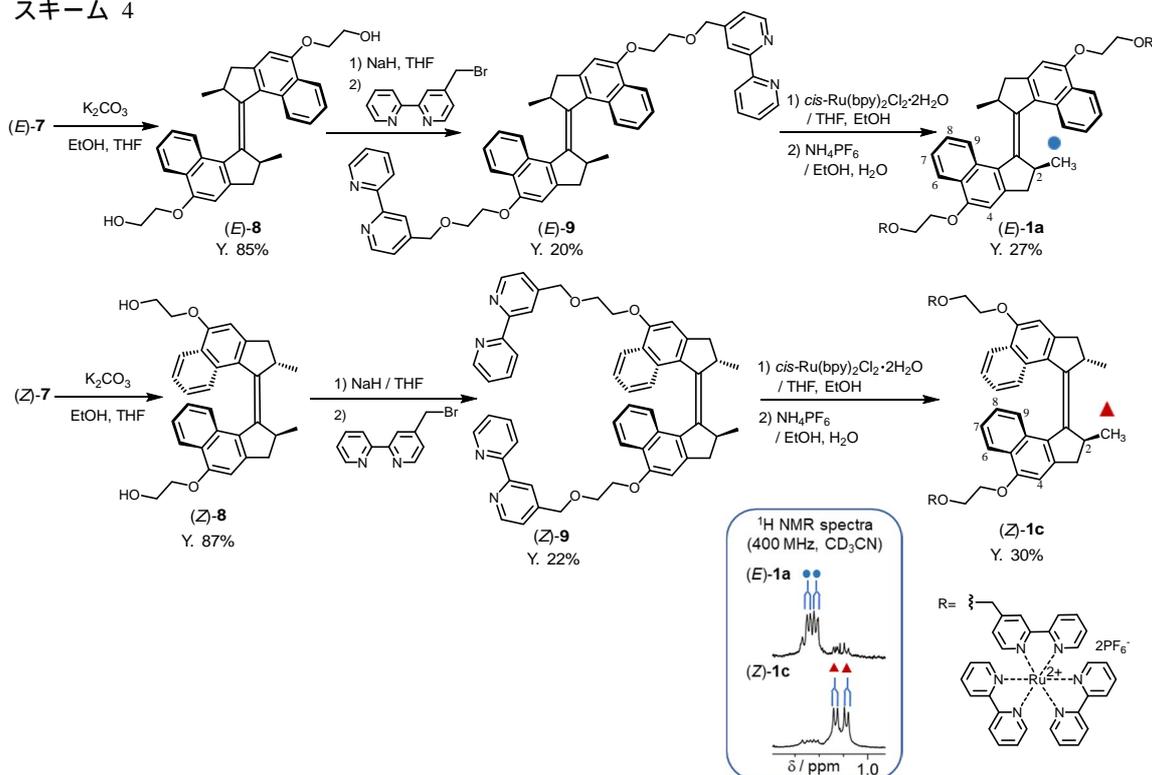
スキーム 3



(2) 分子モーター(*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** の合成と構造決定

本研究によって McMurry 反応中に *E-Z* 熱異性化が起こる可能性があることを明らかにした。この知見をもとに反応条件を制御することで(*E*)-**7**, (*Z*)-**7** を作り分けることに成功した。(*E*)-**7**, (*Z*)-**7** を加水分解しそれぞれジオール(*E*)-**8**, (*Z*)-**8** を得た。(*E*)-**8**, (*Z*)-**8** にピピリジル部位を導入した後、ルテニウム錯体と反応させて Ru(bpy)₃ 部位を合成し目的の分子モーター(*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** をそれぞれ得ることができた (スキーム 4)。

スキーム 4



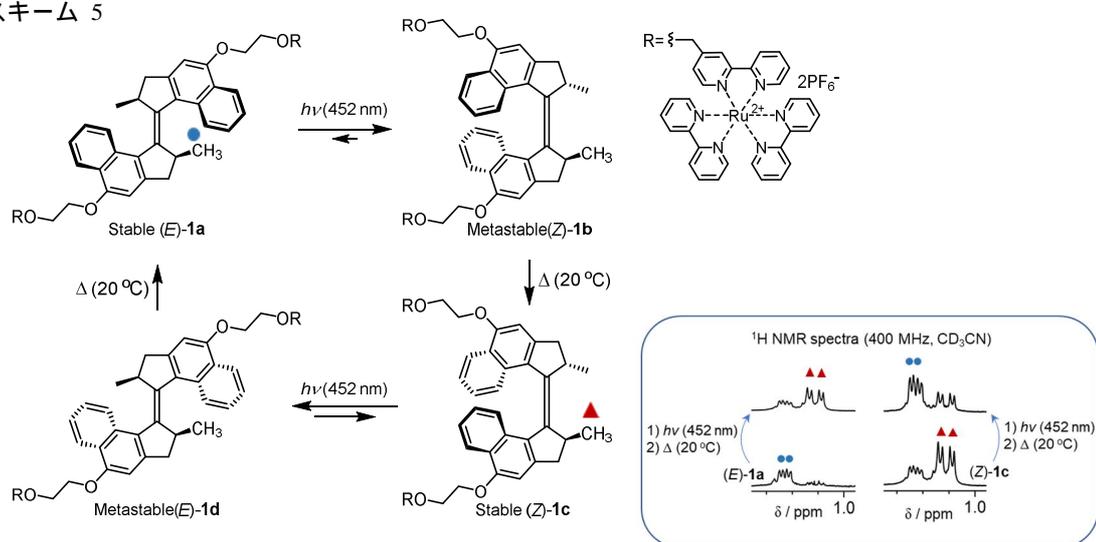
(*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** の構造は, ^1H NMR スペクトルおよび CSI-MS により決定した. (*Z*)-**1c** では ^1H NMR スペクトルにおいてナフタレン環の 8, 9 位のプロトンが 6.38–6.72 ppm と高磁場に観測された. これはナフタレン環が近接することにより生じる磁気異方性効果のためであり, *Z* 体の構造であることを確認した. 一方, (*E*)-**1a** では, ナフタレン環の近接によりメチル基の付け根の 2 位のプロトンの高磁場シフトが観測され, *E* 体の構造と決定した. また, (*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** のメチル基はそれぞれ 2 種類観測された. これは 2 つの $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 部位に Δ 体と Λ 体の鏡像異性体が存在するため, Δ - Λ 体あるいは Λ - Λ 体の 2 種類のジアステレオマーが生成していると考えられる.

(*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** の CSI-MS では, それぞれ $[\text{M}+\text{Ru}_2]^{4+}$, $[\text{M}+\text{Ru}_2+\text{PF}_6]^{3+}$, $[\text{M}+\text{Ru}_2+2\text{PF}_6]^{2+}$, $[\text{M}+\text{Ru}_2+3\text{PF}_6]^+$ に由来するピークがそれぞれ, $m/z = 411.11$, 596.47 , 967.19 , 2078.91 にフラグメントイオンピークとして確認された. 以上のことから, 分子モーター(*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** の構造を決定した.

(3) 可視光照射による分子モーター(*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** の回転挙動

分子モーター(*E*)-**1a**, (*Z*)-**1c** の UV-Vis スペクトルでは 452 nm に $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 発色団由来の極大吸収が観測されたことから, 光照射には 452 nm の可視光を用いることにした. (*E*)-**1a** の重アセトニトリル溶液を -50°C に冷却し, モノクロメーターを用いて 452 nm の光を 30 分間照射した. 20°C に昇温し生成した(*Z*)-**1b** から(*Z*)-**1c** へ熱異性化させた結果, 80% 程度の割合で(*E*)-**1a** から(*Z*)-**1c** に異性化することが ^1H NMR 測定の追跡により明らかになった. 一方, (*Z*)-**1c** と(*E*)-**1a** の混合物(*Z*)-**1c** : (*E*)-**1a** = 4:1) に同様の条件で可視光を照射し 20°C に昇温した結果, 50% 程度の割合で(*Z*)-**1c** から(*E*)-**1a** に異性化することがわかった.

スキーム 5



同様の可視光照射を $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 発色団が連結されていない分子モーター(*E*)-**8**, (*Z*)-**8** を用いて行った場合, 異性化反応は全く起こらないことを確認した. 以上の結果から, 可視光照射により $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 発色団が励起され, 続いて三重項エネルギー移動により分子モーターが励起されて光異性化が起こることがわかった.

以上, 本研究により可視光照射で回転可能な分子モーターを開発することに成功した. 今後, 片方の側鎖へのエチレンオキシド鎖を連結した後, 細胞膜へ導入し, その開裂制御を検討する予定である.

<引用文献>

- 1) García-López, V.; Chen, F.; Nilewski, L. G.; Duret, G.; Aliyan, A.; Kolomeisky, A. B.; Robinson, J. T.; Wang, G.; Pal, R.; Tour, J. M. *Nature*, **2017**, *548*, 567.
- 2) Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosen-blum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nat Med*, **2011**, *17*, 1685–1691.
- 3) Koumura, N.; Zijlstra, R. W. J.; van Delden, R. A.; Harada, N.; Feringa, B. L. *Nature* **1999**, *401*, 152–155.
- 4) a) Fujita, T.; Kuwahara, S.; Harada, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4533–4543. b) Kuwahara, S.; Fujita, T.; Harada, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4544–4556.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 KUWAHARA, Shunsuke; SUZUKI, Yuri; SUGITA, Naoya; IKEDA, Mari; NAGATSUGI, Fumi; HARADA, Nobuyuki; HABATA, Yoichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Thermal E/Z Isomerization in First Generation Molecular Motors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 4800 ~ 4804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.7b03264	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 TAKENAKA, Moe; LEE, Eunji; IKEDA, Mari; HABATA, Yoichi; KUWAHARA, Shunsuke
2. 発表標題 Photoisomerization of a novel molecular motor with Ru(bpy) ₃ ²⁺ chromophore
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KUWAHARA, Shunsuke
2. 発表標題 Development of Molecular Machines: Rotation Mechanism of Molecular Motor and Molecular Valves
3. 学会等名 4th Toho Univ.-GNU Joint Symposium on Advanced Chemical Science (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中 萌・李 恩智・朱 喜英・池田 茉莉・幅田 揚一・桑原 俊介
2. 発表標題 Ru(bpy) ₃ ²⁺ 発色団を導入した新規分子モーターの合成および光異性化学動
3. 学会等名 第30回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中 萌・李 恩智・朱 喜英・池田 茉莉・幅田 揚一・桑原 俊介
2. 発表標題 Ru(bpy)3 ²⁺ 発色団を導入した分子モーターの光異性化学挙動
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 TAKENAKA, Moe; LEE, Eunji; JU, Huiyeong; IKEDA, Mari; HABATA, Yoichi; KUWAHARA, Shunsuke
2. 発表標題 Synthesis and photoisomerization behavior by visible light irradiation of a molecular motor with Ru(bpy) ₃ chromophore side arms
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 KUWAHARA, Shunsuke; IKEDA, Mari; HABATA, Yoichi	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 22
3. 書名 Chiral Analysis, 2nd Edition, Chapter 8	

〔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