

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659011

研究課題名(和文)リン酸化・脱リン酸化によってリングが移動するロタキサン型超分子の創製

研究課題名(英文)Development of Rotaxane-type Supramolecular Complexes Whose Ring Moves Upon Phosphorylation and Dephosphorylation

研究代表者

青木 伸 (Aoki, Shin)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：00222472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ATP合成酵素に代表される分子モーターは、ATPの化学反応エネルギーを利用して駆動する生体内「分子機械」である。本研究では、その原理を模倣し、水溶液中で酵素的リン酸化と脱リン酸化に伴って構造が変化する人工超分子を開発する。リング部(シクロデキストリン, CyD)とその中を通過する軸部からなるロタキサン構造を持ち、CyDの水酸基がリン酸化されるとその位置が変化し、脱リン酸化で元に戻る化合物を設計した。Station 1として働くアゾベンゼン骨格を中央に、Station 2となる亜鉛-サイクレン錯体を両端へ移し軸を設計し、この軸分子が真ん中を通るようにCyDが存在するロタキサン分子を合成した。

研究成果の概要(英文)：Molecular motors such as ATP synthetase are so-called "molecular motors" that utilize chemical bonding energy of ATP. The purpose of this project is to design and synthesize artificial supramolecular complexes, the structure of which are altered by enzymatic phosphorylation and dephosphorylation reactions. We have designed the rotaxane-like supramolecular complexes that contain a macrocycle part (cyclodextrin (CyD)) and an axis part that is threaded through a CyD ring. In this work, we have succeeded in the synthesis of the rotaxane molecule that contains an azobenzene unit as "Station 1" at the center of the axis and two Zn<sup>2+</sup>-cyclen complex units as "Station 2" at the edge of the axis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 化学系薬学

キーワード：リン酸化 脱リン酸化 ロタキサン 超分子 酵素反応 分子機械

### 1. 研究開始当初の背景

生体内では、タンパク質が集積して分子機械となり、その立体構造を変化させて生命活動に不可欠な機能を発揮する。中でも ATP 合成酵素は、ATP の化学反応エネルギーで駆動する分子モーターとして知られている。一方、1990 年代に K. E. Drexler による「ナノマシン」の提唱以来、いくつかの人工分子機械が報告されてきた。その殆どは、光、熱、電位変化、pH 変化などの外部刺激に対応して構造が変化する。例えば、光励起や酸化還元反応によってリングの位置が移動するロタキサン型分子シャトル (Leigh ら *Science*, 2001、Stoddart ら *Science*, 2000) や、二重結合の光異性化反応によって回転運動する分子モーター (原田ら *Nature*, 1999)、光駆動型分子ピンセット (金原ら *Nature*, 2006) が代表例である。しかし、ATPase のように水溶液中で生体内 (酵素) 反応によって駆動する例はない。

### 2. 研究の目的

ATP 合成酵素 (ATPase) に代表される分子モーターは、ATP の化学反応エネルギーを利用して駆動する生体内「分子機械」である。本研究では、その原理を模倣し、水溶液中でリン酸基転移酵素 (キナーゼ) 及びリン酸加水分解酵素 (ホスファターゼ) によるリン酸化と脱リン酸化に伴って構造が変化する人工超分子の開発を目的とした。リング部 (シクロデキストリン, CyD) とその中を通過する軸部からなるロタキサン構造を持ち、CyD の水酸基がリン酸化されるとその位置が変化し、脱リン酸化で元に戻る化合物を設計・合成することにした。軸部には、疎水性基を「Station 1 (S1)」として、亜鉛錯体 (ZnL) を「Station 2 (S2)」として導入する。CyD が、疎水性相互作用によってその内孔に「S1」を包接してこの位置に局在する。キナーゼによる CyD のリン酸化によって、CyD リングが「S2」へ移動することにより、分子構造変換を証明できると考えた。

### 3. 研究の方法

本研究で設計・合成する超分子は、リング部とその中を貫通する軸部から成るロタキサン型構造をもつ。リング部にはシクロデキストリン ( $\alpha$ -グルコースの環状化合物、CyD と略) を用いる。一方、軸部はポリ (エチレンオキシ) 鎖からなり、両端にストッパー兼 Station1(S1) となる官能基を、中央に Station2(S2) として大環状テトラアミンの亜鉛錯体 (ZnL) を配置することにした。CyD の水酸基がリン酸化される前の CyD は、S1 との疎水性相互作用 (S1 部が CyD に包接される) によって主に S1 部に存在する。そして、CyD の水酸基がキナーゼ (E1) によってリン酸化されると、リン酸アニオンと ZnL 部の  $Zn^{2+}$  イオンとの配位結合によって、リング位置の平衡は S2 へ片寄る。この場合、リングと軸部

は分子内にあるので、この配位結合は分子内配位結合であり、分子外のリン酸 (ATP など) との配位結合よりも有利であろう。次に、5 のリン酸エステルをホスファターゼ (E3) によって加水分解して 6 にすると、リングは再び S1 へ移動する (6 → 3)。また、3 → 4 でリン酸基供与体として用いられた Adenosine 5' -triphosphate (ATP) は ADP に変換されるので、これをホスホエノールピルビン酸 (PEP) とピルビン酸キナーゼ (E2) を用いてリン酸化し、ATP を再生する。これは、キナーゼ阻害剤である ADP の量をできるだけ少なくするためである。

### 4. 研究成果

前項で述べた分子シャトルの設計と合成を検討した。しかし、目的化合物を得ることができず、当初設計した化合物の合成は断念せざるを得なかった。

そこで次に、「Station 2 (S2)」となる亜鉛 サイクレン錯体を両端へ移し、「Station 1 (S1)」として働くアゾベンゼン骨格を中央にもつ軸を設計し、この軸分子が真ん中を通るように CyD が存在するロタキサン分子を設計した。最終段階におけるアミド結合反応を、DMT-MM (4, (4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride) を用い、MOPS 緩衝液中で行うことで、ロタキサン分子の合成に成功した。

このロタキサン分子と軸分子単独の  $^1H$  NMR、UV、CD スペクトルを測定したところ、 $^1H$  NMR スペクトルでは、軸分子のアゾベンゼン部のプロトンは全て磁氣的に等価であり、シングレットとして観測されるのに対し、ロタキサン分子では 4 つの異なるダブレットとして観測された。また、軸分子は不斉中心をもたないアキラルな分子であるため、CD スペクトル上でコットン効果が観測されないのに対し、ロタキサン分子は 340 nm 付近に大きな正のコットン効果が観測された。以上の実験結果は、ロタキサン分子中にアゾベンゼン部が CyD のもつキラルな内部空間に包接されていることを強く示唆している。

次に、ロタキサンの CyD の水酸基の酵素的リン酸化反応を検討した。Hexokinase と glycerol kinase を酵素として、ATP をリン酸供与剤として用いたが、残念ながら CyD のリン酸化を確認することができなかった。現在、CyD の水酸基に異なる水酸基ユニットを導入し、上記のような kinase によるリン酸化を実現したいと考えている。

実は、アゾベンゼンには立体異性体が存在し、基底状態では trans 型が安定であるが、紫外線照射によって cis 型へ、cis 型は可視光照射によって trans 型へ戻ることが知られている。そこで現在、光照射による異性化反応と、Zn-cyclen 分子を架橋する有機分子を共存させることにより、光異性化によるカテナン型分子への変形を検討中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Shinya Ariyasu, Akiko Sawa, Akinori Morita, Kengo Hanaya, Misato Hoshi, Ippei Takahashi, Bing Wang, and Shin Aoki, “Design and Synthesis of 8-Hydroxyquinoline -based Radioprotective Agents” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2014**, in press (査読有).
2. Mohd Zulkefeli, Yosuke Hisamatsu, Asami Suzuki, Yuya Miyazawa, Motoo Shiro, and Shin Aoki, “Supramolecular Phosphatases Formed by the Self-Assembly of Bis(Zn<sup>2+</sup>-cyclen) Complex, Copper(II), and Barbitol Derivatives in Water (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane)” *Chemistry-Asian Journal* **2014**, in press (査読有).
3. 岡田 正人, 金盛 克俊, 青木 伸, 大和田 勇人, “機械学習による創薬支援のための高精度バーチャルスクリーニング法の開発” *人工知能学会論文誌*, **2014**, 29 (1), SP3-D, 194-200 (査読有).
4. Akinori Morita, Shinya Ariyasu, Soichiro Ohya, Ippei Takahashi, Bing Wang, Kaoru Tanaka, Takatoshi Uchida, Haruna Okazaki, Kengo Hanaya, Atsushi Enomoto, Mitsuru Neno, Masahiko Ikekita, Shin Aoki, and Yoshio Hosoi “Evaluation of Zinc (II) Chelators for Inhibiting p53-Mediated Apoptosis” *Oncotarget* **2013**, 4 (12), 2439-2450 (査読有).
5. Akihiro Nakagawa, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Masahiro Kohno, and Shin Aoki, “Synthesis of Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Having Pyridyl Moiety by Regioselective Substitution Reactions and Their Photochemical Properties.” *Inorganic Chemistry* **2014**, 53 (1), 409-422 (査読有).
6. Susumu Itoh, Takuya Tokunaga, Masayuki Kurihara, and Shin Aoki, “Asymmetric Aldol Reactions between Cyclic Ketones and Benzaldehyde Catalyzed by Chiral Zn<sup>2+</sup> Complexes of Aminoacyl 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane: Effects of Solvent and Additives on Controlling the Stereoselectivities of the Aldol Products” *Tetrahedron Asymmetry*, **2013**, 24 (24), 1583-1590 (査読有).
7. Susumu Itoh, Shotaro Sonoike, Toshinari Itakura, Masanori Kitamura, and Shin Aoki, “Asymmetric Aldol Reactions of Acetone and Benzaldehydes Catalyzed by Chiral Zn<sup>2+</sup> Complexes of Aminoacyl 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane: Fine Tuning of Amino Acid Side Chains and a Revised Reaction Mechanism” *Chemistry-An Asian Journal*, **2013**, in press (査読有).
8. Shinya Ariyasu, Kengo Hanaya, Eita Watanabe, Toshinori Suzuki, Kazutaka Horie, Masanori

- Hayase, Ryo Abe, and Shin Aoki, “The Selective Capture and Collection of Live Target Cells Using a Silicon Wafer Device Modified with Antibodies via a Photocleavable Linker” *Langmuir*, **2012**, 28 (36), 13118-13126 (査読有)
- 9 Shinsuke Moromizato, Yosuke Hisamatsu, Yasuki Matsuo, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe, Shin Aoki, “Design and Synthesis of Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Complex Having *N,N*-Diethylamino Group that Stains Acidic Intracellular Organelles and Induces Cell Death by Photoirradiation” *Inorganic Chemistry*, **2012**, 51 (23), 12697-12706 (査読有).
  10. Kengo Hanaya, Miho Suetsugu, Shinya Saijo, Ichiro Yamato, and Shin Aoki, “Potent Inhibition of a Dinuclear Zinc(II) Peptidase, Aminopeptidase from *Aeromonas Proteolytica*, by 8-Quinololinol Derivatives: Inhibitor Design Inspired by Zinc(II) Fluorophores, Kinetic Study, and X-ray Crystallographic Study.” *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2012**, 17 (4), 517-529 (査読有).
  11. Shin Aoki, Satoshi Suzuki, Masanori Kitamura, Motoo Shiro, Mohd Zulkefeli, and Eiichi Kimura, “Molecular Recognition of Hydrocarbon Guests by A Supramolecular Capsule Formed by the 4:4 Self-Assembly of Tris(Zn<sup>2+</sup>-cyclen) and Trithiocyanurate in Aqueous Solution (Cyclen = 1,4,7,10-tetraazacyclododecane).” *Chemistry-An Asian Journal*, **2012**, 7 (5), 944-956 (査読有).
  12. Shotaro Sonoike, Toshinari Itakura, Masanori Kitamura, and Shin Aoki, “One-pot Chemoenzymatic Synthesis of Chiral 1,3-Diols Using An Enantioselective Aldol Reaction with Chiral Zinc(II) Complex Catalysts and Enzymatic Reduction Using Oxidoreductases with Cofactor Regeneration” *Chemistry-An Asian Journal*, **2012**, 7 (1), 64-74 (Selected as a Inside Cover Picture Article) (査読有).

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 軸中に亜鉛錯体を含むロタキサンの設計と合成、大田麻人、田中智博、青木伸、日本薬学会第 134 年会、平成 26(2014)年 3 月 28-30 日、熊本市
2. 環状ペプチドを連結した C<sub>3</sub>-対称性トリシクロメタレート型イリジウム錯体の設計・合成と人工デスリガンドとしての機能評価、久松洋介、渋谷愛、田中裕志、鈴木希美、有安真也、鈴木利宙、安部良、犬飼岳史、青木伸、日本薬学会第 134 年会、平成 26(2014)年 3 月 28-30 日、熊本市
3. 可視光で切断可能な 8-キノリノールスルホン酸エステル誘導体の設計・合成と光分解性リンカーへの応用、向井祐人、有安真也、竹田礼紗、早瀬仁則、安部良、青木伸、日本薬学会第 134 年会、平成 26(2014)年 3 月 28-30 日、熊本市
4. Sulfoquinovosyl acylglycerol (SQAG)を母骨

格としたがん組織集積型ハイブリッド分子の設計・合成、田中智博、澤本泰宏、久松洋介、鈴木利宙、堀江和峰、安部良、荒木力太、西道孝臣、小野公二、青木伸、日本薬学会第134年会、平成26(2014)年3月28-30日、熊本市

5. Design and Synthesis of Artificial Death Ligands Based on Metal-Centered Homotrimeric Self-Assembly of Chelator-Peptide Hybrids、Abdullah-Al Masum, Kaori Koinuma, Yu Miyata, Yosuke Hisamatsu, and Shin Aoki、日本薬学会第134年会、平成26(2014)年3月28-30日、熊本市

6. Summary Report of Research Projects of Drug Discovery Team in Pharmaceutical DDS Group (PDG), Shin Aoki, 2nd International Symposium of Center of Technologies against Cancer (ISCT2014), 平成26(2014)年3月8-9日、東京

7. Design and Synthesis of Photochemically and Biologically Active Iridium Complexes for Cell Imaging and Induction of Cell Death, Shin Aoki, Symposium on Molecular Science and Synthesis of Functional Molecules for Next Generation、平成26(2014)年3月10-11日、東広島市 (Invited lecture).

8. 放射線治療の副作用を低減させる薬剤の設計と合成、有安真也、森田明典、澤晶子、高橋一平、王冰、星美里、内田孝俊、大谷聡一郎、細井義夫、第31回メディシナルケミストリーシンポジウム、平成25(2013)年11月20-22日、広島市

9. p53の亜鉛イオンをターゲットとする放射線防御剤の設計と合成、有安真也、森田明典、高橋一平、澤晶子、花屋賢悟、内田孝俊、大谷聡一郎、細井義夫、青木伸；第39日本化学会春季年会、平成25(2013)年3月22-25日、草津市

10. Disaccharide nucleosidesの合成を目的としたヌクレオシドのO-グリコシル化反応、福本健人、栗原正幸、駒引伸哉、斉藤重人、久松洋介、青木伸、第39回反応と合成の進歩シンポジウム、平成25(2013)年11月5-6日、福岡

11. シクロデキストリン及び亜鉛錯体を有するロタキサン設計と合成、大田麻人、田中智博、久松洋介、青木伸、第55回日本薬学会関東支部大会、平成25(2013)年10月26日、東京

12. C<sub>3</sub>対称性シクロメタレート型イリジウム錯体を中心骨格に有するTRAIL様人工デスリガンドの設計・合成と活性評価、久松洋介、洪谷愛、田中裕志、鈴木希美、鈴木利宙、安部良、青木伸、第55回日本薬学会関東支部大会、平成25(2013)年10月26日、東京

13. Development of Photochemical Devices for Diagnosis and Treatment of Cancer, Shin Aoki, Shinya Ariyasu, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Ai Shibuya, Eita Watanabe, Toshihiro Suzuki, Masanori Hayase, and Ryo

Abe, 9th AFMC International Medicinal and Chemical Symposium (AIMEC13), 平成25(2013)年10月15~18日, Taipei, Taiwan

14. Design and Synthesis of pH-Responsive Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Complex for Cell Imaging and Phototherapy, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe, Shin Aoki, 13th AFMC International Medicinal and Chemical Symposium (AIMEC13), 平成25(2013)年10月15~18日, Taipei, Taiwan

15. Recent Progress of Basic Research in Center for Technologies against Cancer (CTC) of Tokyo University of Science, Shin Aoki, 2nd International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2013 (iPoPS2013), 平成25(2013)年9月4~5日, Puncak Alam, Malaysia

16. Design and Synthesis of Luminescent Iridium Complexes as Photochemical and Biomedical Tools, Shin Aoki, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Akihiro Nakagawa, Ai Shibuya, Aya Kando, Hiroshi Tanaka, Toshihiro Suzuki, and Ryo Abe, 15th Asian Chemical Congress (15ACC), 平成25(2013)年8月20~23日, Singapore

17. Binary Classification of Compounds by Learning from Docking Software Results and Chemical Information, Okada, M.; Kanamori, K.; Ohwada, H.; Aoki, S., 5th International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (BICOB-2013)、平成25(2013)年3月4-6日、Honolulu, USA

18. The Selective Capture and Collection of Live Target Cells using a Photoreactive Silicon Wafer Device Modified with Antibodies via Photocleavable Linkers, Ariyasu, S.; Hanaya, K.; Watanabe, E.; Hoshi, M.; Suzuki, T.; Horie, K.; Hayase, M.; Abe, R.; Aoki, S., 13th Tetrahedron Symposium- Asia Edition-, Taipei, Taiwan、平成24年11月27~30日 (Elsevier Best Poster Award)

19. Development of a Photoreactive Silicon Device Modified with Antibodies via Photocleavable Linkers for the Selective Capture and Collection of Live Target Cells, Aoki, S., Ariyasu, S.; Watanabe, E.; Hoshi, M.; Suzuki, T.; Horie, K.; Hayase, M.; Abe, R., 17th Malaysian Chemical Congress (17MCC), 平成24(2012)年10月15-17日, Kuala Lumpur, Malaysia (Invited lecture)

20. 光分解可能なケミカルリンカーを用いた目的細胞の選択的捕捉、回収用デバイスの開発、有安真也、花屋賢悟、渡邊瑛太、星美里、鈴木利宙、堀江和峰、早瀬仁則、安部良、青木伸、第38回反応と合成の進歩シンポジウム、平成24(2012)年11月5~6日、東京都

21. 血中循環がん細胞の効率の検出・回収を目的とした基盤技術の開発、有安真也、花屋賢悟、星美里、陶山敬樹、渡邊瑛太、鈴木利

宙、早瀬仁則、安部良、青木伸：第6回バイオ関連化学シンポジウム、平成24(2012)年9月6-8日、札幌

22. Development of Photochemical Devices for Diagnosis and Treatment of Cancer, Aoki, S.; Ariyasu, S.; Hisamatsu, Y.; Moromizato, S.; Shibuya, A.; Watanabe, E.; Suzuki, T.; Hayase, M.; and Abe, R., 1st International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2012 (iPoPS2012), 平成24(2012)年6月28~30日、Puncak Alam, Malaysia (Plenary Lecture)

23. 細胞のイメージングと細胞死誘導を目的とするシクロメタレート型イリジウム錯体の設計と合成、青木伸、渋谷愛、大多和修平、諸見里真輔、大和田紘喜、久松洋介、有安真也、北村正典、鈴木利宙、安部良、第22回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、平成24(2012)年5月31日-6月1日、金沢市

24. 錯体化学・光化学からアプローチするがん診断と創薬—東京理科大学における異分野共同研究の試み—、青木伸、第38回理研ケミカルバイオロジー領域勉強会、平成24(2012)年5月23日、和光市

〔図書〕(計1件)

1. ベーシック薬学教科書シリーズ第4巻「無機化学」 青木伸編集、杉浦幸雄監修、化学同人、2011(2011年5月10日) ISBN: 978-4-7598-1254-1, 総ページ数206

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ガラスフィルタ及び細胞分離方法  
発明者：安盛敦雄、青木伸、柳田さやか、齋藤理久

権利者：東京理科大学

種類：

番号：特願2013-180416

出願年月日：平成25(2013)年8月30日

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木伸 (AOKI SHIN)

東京理科大学薬学部・教授

研究者番号：00222472

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：