

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620049

研究課題名(和文) 直接合成による階層的金属錯体メゾ空間の構築と構造解析

研究課題名(英文) Direct Synthesis of Hierarchical Meso-space Consisting of Metal Complexes, and Their Structural Analysis

研究代表者

大場 正昭 (Ohba, Masaaki)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00284480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、新しい高機能な反応場の構築を目指して、柔軟かつ異方的なメゾスケール空間を提供するリポソームに着目し、多様な機能を示す金属錯体を合理的に組み込んだ「階層的金属錯体メゾ空間」の構築と構造の評価を推進した。階層的金属錯体メゾ空間構築のために、(1) 膜チャネルを用いたリポソーム内水相における金属錯体の直接合成、(2) 膜ドメイン構造を利用した金属錯体の階層的集積化、の手法を開発し、構造評価と集積した機能性分子の機能の運動に成功した。

研究成果の概要(英文)：Creation of multifunctional reaction systems like photosynthesis in nature is one of the most considerable topics in current chemistry. Although various chemical reactors consisting of polymers and proteins have been studied, it is still difficult to construct reaction systems in which different functions work simultaneously. Here we focus on liposome, which is an artificially-prepared spherical vesicle composed of a bilayer of phospholipids, as a platform for linking functions. We succeeded in developing new synthetic methods, (1) the direct synthesis of coordination polymers in the inner aqueous phase through membrane channels and (2) the hierarchical integration of functional metal complexes using membrane domain structure. These composites of liposome and functional compounds exhibited well-linked and more effective functions successfully.

研究分野：錯体化学

キーワード：金属錯体 脂質 膜チャネル 膜ドメイン

1. 研究開始当初の背景

当研究グループでは、これまでに金属錯体および配位高分子の構造と物性・機能の合理的制御、並びに外場による構造・電子状態・磁気特性の変換に関する研究を展開してきた。これらの研究において、細孔機能と磁性が連動する、多重機能性金属錯体の開発に成功した。この段階では、単一の多孔性配位高分子に着目していたが、より高度な機能の発現には、分子設計や系の自由度を上げることが必要になってきた。そこで、次の段階として、金属錯体の機能を連動させるために、生体内でエネルギー移動、電子移動、触媒反応等の複数の反応を効率良く進行させる場として働く「脂質二重層膜」に着目した。そこで、細胞における生体膜に代えて、リポソームの表面および内部に目的に応じた機能性金属錯体を合理的に集積させた「階層的金属錯体メゾ空間」構築を提案した。異なる機能性金属錯体をリポソームの界面反応場（外表面、疎水性の膜内部、内表面および内水相）に選択的に組み込むことで、電子移動・物質移動・化学反応が動作する高機能な空間を構築する（図1）。従来、膜と無機物質や金属錯体との複合体では、殆どが親水性の界面のみを利用しており、膜の疎水領域を利用した例は少なく、リポソームの各部位に選択的に金属錯体を組込んだ例はなかった。

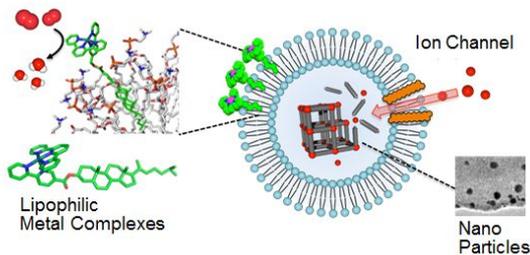


図1 階層的金属錯体集積空間：リポソームの外表面、膜内部、内表面及び内水相に異なる機能性金属錯体を組込んで、個々の機能が連動する高機能な化学反応場を構築する。

複数の金属錯体や有機分子等の機能分子の空間配置を制御した化学反応系の構築は、人工光エネルギー変換システムなどの多段階触媒反応の分子設計において重要である。天然の光合成系は、膜厚 5 nm の空間に埋込めこまれた蛋白質複合体を用いて何十個ものコファクター分子を精密に固定化し、エネルギー移動、電子伝達反応や触媒反応などの異なる化学反応を協同的に進行させている。共有結合や架橋配位子を用いて、錯体の集積制御による電子伝達体や光触媒の構築が、国内外で盛んに行われてきた。しかし、合成化学を駆使した従来の手法だけでは、合成上の制限から望みの集積体構築が困難であるため、拡張性・汎用性の高い新たな手法の開発が望まれてきた。このような背景の下で、本課題では球状リポソーム空間に着目して、階

層的金属錯体メゾ空間の合理的構築、並びにその構造解析を推進した。

2. 研究の目的

本研究では、界面反応場として電子移動・物質移動・化学反応が動作する新しい「高機能な空間」の創出を目的とし、柔軟かつ異方的なメゾスケール空間を提供するリポソームに、多様な機能を示す金属錯体を合理的に組み込んだ「階層的金属錯体集積空間」の構築と構造評価の基盤技術の確立を目指した。

これまでの研究で、親脂質性金属錯体触媒を開発し、1. リポソームの外表面への固定化、2. 複合化による触媒能の向上、3. 膜表面を利用した触媒能の制御、に成功した（図2左）。しかし、この時点ではリポソームの内部を有効に活用できていないため、本課題では「イオンチャネルを用いたリポソーム内水相における金属錯体の直接合成法」を開発し（図2右）、その合成を進めた。

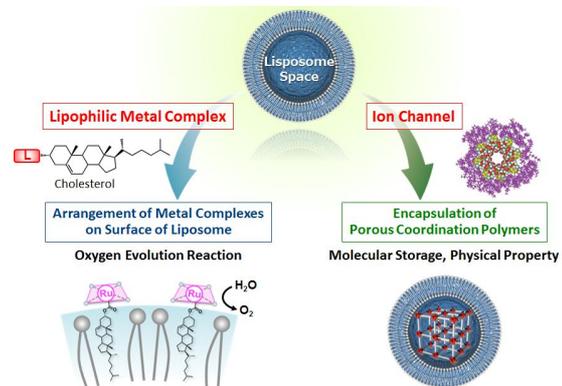


図2 リポソームを基盤とする階層的な金属錯体集積化の手法：(左)親脂質性配位子を用いた金属錯体の外表面への組み込み、(右)イオンチャネルを利用した内水相における金属錯体の直接合成。

3. 研究の方法

本研究では、機能性分子として構成成分の組み合わせにより分子吸着、磁性、発光などの様々な機能・物性を発現する配位高分子 (CP) に着目し、内水相への CP の組み込みによるリポソームの機能化を目指した。従来の手法では、リポソームと CP の粒子を攪拌して強引に内包させるなど、サイズや無い豊漁の制御が困難であるため、我々は脂質膜に膜透過性チャネルを形成する抗生物質 Amphotericin B (AmB: 図3) に着目して、内水相で CP を直接合成する新規手法を開発した。この手法を用いて、(1) プルシアンブルー (PB) の直接合成とセシウム吸着能評価、(2) 蛍光性 CP の直接合成とアニオンセンシング能評価、を推進した。また、より多様かつ選択的な金属錯体集積空間の構築を目指して、(3) 膜ドメイン構造を利用した金属錯体の階層的集積化、についてその手法の確立を進めた。

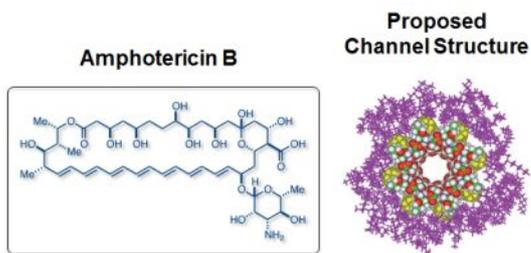


図3 AmB の構造と AmB 8量体からなるチャンネルの推定構造

4. 研究成果

(1) プルシアンブルー (PB) の直接合成とセシウム吸着能

まず $K_3[Fe(CN)_6]$ を内包させたリポソームを作成し、次いでモル塩 $(NH_4)_2Fe^{II}(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ と AmB を添加することで、膜へのチャンネルを形成し、それに伴って内水相への Fe^{2+} イオンを流入させることで、内水相において PB を直接合成した(図4)。

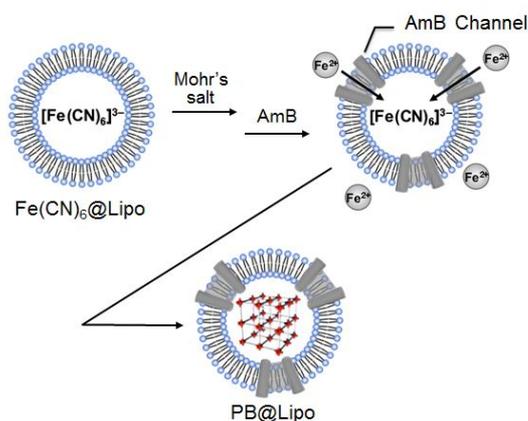


図4 リポソーム内水相における PB の直接合成のスキーム

PB の生成は、粉末 X 線回折、IR および UV-vis スペクトル、並びに金属定量から確認した。TEM 観察から、リポソーム内部において PB 粒子の形成が確認された(図5左)。動的分散法 (DLS) により、内水相で生成した PB の粒子径は 6.8 ± 3.1 nm と見積もられた。また、PB@Lipo の平均径は約 108 nm であり、 $Fe(CN)_6@Lipo$ の約 111 nm とほぼ等しいことから、PB 形成によるリポソームの凝集などが起きていないことを確認した(図5右)。

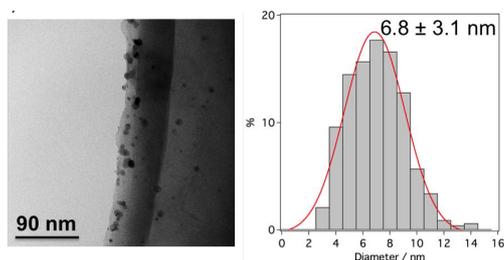


図5 PB@Lipo の TEM 画像と粒子径分布のヒストグラム

バルクの PB は Cs^+ を吸着することが知られている。そこで、水懸濁液における PB@Lipo の Cs^+ 吸着能を評価したところ、バルクの PB の約 3 倍の吸着能を示した。AmB チャンネルを形成しただけのリポソームでは、 Cs^+ の吸着は観測されなかった。よって、PB@Lipo において、AmB チャンネルのイオン透過能と PB の Cs^+ 吸着能が連動し、PB の Cs^+ 吸着能の向上に成功したと言える。バルク PB では、 Cs^+ 吸着が進むにつれて粒子が凝集し、PB の沈殿が生じた。一方、Pb@Lipo では、沈殿は生じなかった。この結果より、粒子サイズおよび内表面への粒子の固定化による凝集抑制が、 Cs^+ 吸着能の向上に有効であったと考えられる。今後詳細な検討を進めて、系の最適化を進める。

(2) 蛍光性配位高分子 (CP) の直接合成とアニオンセンシング

有機配位子に 1,3,5-Benzenetricarboxylic acid (H_3BTC)、金属イオンに Tb^{3+} を用いて、蛍光性 CP $Tb(BTC) \cdot 6H_2O$ ($TbBTC$) の内水相における直接合成を検討した。 $TbBTC$ 内包リポソーム ($TbBTC@Lipo$) は、図4に示すスキームと同様の手順で作成した。まず凍結融解法により CP の架橋配位子となる BTC^{3-} を内包したリポソーム ($BTC@Lipo$) を作成した。次いで、 $BTC@Lipo$ に $Tb(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ と AmB を加えて、リポソーム内水相において $TbBTC$ を直接合成した。 BTC^{3-} の内包と AmB の導入は UV-Vis スペクトルで、リポソーム内水相における $Tb(BTC)$ の形成は FT-IR スペクトル、蛍光スペクトル、粉末 X 線回折および TEM 測定によりそれぞれ確認した。DLS および TEM 観察から、約 140 nm のリポソーム内部に約 20-30 nm の $Tb(BTC)$ の粒子が形成されていることがわかった。また、粉末 X 線回折パターンから、バルクの $Tb(BTC)$ と比較して、一部のピークが消失していることから、結晶が異方的に成長していることが示唆された。蛍光スペクトルにおいては、254 nm の励起光により、545 nm に 5D_4 7F_5 遷移に帰属される Tb^{3+} の強い発光が観測された。AmB を加えない対照実験では、この発光が観測されないことから、リポソーム内部に $Tb(BTC)$ が形成されたことが裏づけられた。

$Tb(BTC)$ は、水溶液中でアニオンを加えると架橋カルボン酸がアニオンと置換して発光が変化する。そこで、 $TbBTC@Lipo$ のアニオンセンシング能を 545 nm の発光強度により評価したところ、バルクの $Tb(BTC)$ とは異なる傾向を示した。 $TbBTC@Lipo$ のイオン選択性に関しては、特に F^- イオンに対して顕著な応答を示した(図6)。そこで、 F^- イオンに対する応答性を詳細に検討したところ、バルクの $Tb(BTC)$ と比べて、低濃度領域において高いセンシング能が確認された。現在、粒子サイズ依存など、更に詳細な検討を進めている。

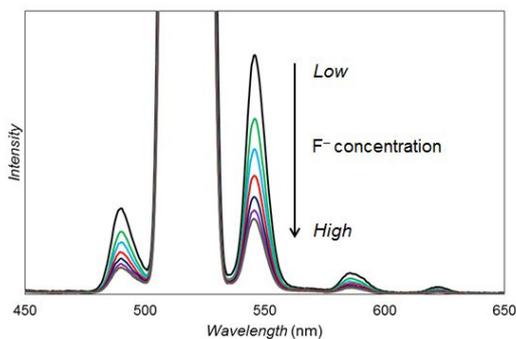


図6 Tb(BTC)@Lipo 発光スペクトルの F⁻イオン濃度依存性

(3) 膜ドメイン構造を利用した金属錯体の階層的集積化

本実験では、飽和および不飽和リン脂質とコレステロールの組成比を調整することで、リポソーム膜に飽和リン脂質とコレステロールに富んだ L_o 相と、不飽和リン脂質に富んだ L_d 相の膜ドメインが形成する点に着目した。この性質を利用して、ドメインの親水部に光捕集分子を、疎水領域にエネルギー受容体を集積化させることで、ドメイン形成によるアンテナ効果を検討した。

リポソームのドメイン表面には、凍結水合法により、不飽和リン脂質 DOPE の親水部分に Fluorescein を修飾した蛍光分子 (Flu) を光捕集分子として固定化した。また、エネルギー受容体となる Zinc protoporphyrin diethyl ester (ZnP) は、ピリジン修飾したステロイド pregnenolonepyridine (pregpy) を軸配位させることで、ドメイン内部の疎水領域に部位特異的に集積化させた。共焦点レーザー顕微鏡による観察により、Flu および ZnP が共に L_d 相に集積していることが確認され、図7に示すような階層構造を構築していることが示唆された。

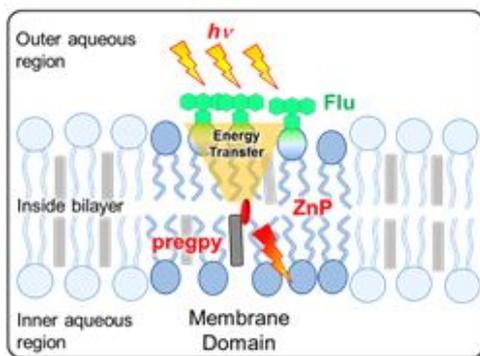


図7 L_d 相の膜表面および内部への光捕集分子 Flu およびエネルギー受容体 ZnP + pregpy の階層的集積とエネルギー移動の模式図

蛍光スペクトル測定により、Flu の蛍光強度の減衰と ZnP の蛍光強度の増大が観測され、Flu から ZnP への蛍光共鳴エネルギー

移動が確認された。さらに、Flu、ZnP、リン脂質の濃度が一定の条件でドメインの有無でエネルギー移動効率を比較したところ、ドメインを形成させたリポソームでは、ドメインが無い系と比較して効率が約 1.5 倍に向上し、光捕集系における膜ドメインの有用性が示された。現在、Flu および ZnP の濃度とエネルギー移動効率の関係を詳細に評価している。

以上、リポソームの特定部位への金属錯体の組み込みによる複合化手法の確立と複合体の構造評価、ならびに複合化による金属錯体の機能の向上を推進した。実験 (1) および (2) では、膜チャネルの機能と内包した CP の機能の連動と単独の CP を上回る機能性の発現、(3) では階層的に集積した機能性分子間の効率的なエネルギー移動に成功した。今後は、機能向上における要因およびその制御条件を詳細に検討する。汎用性のある複合化の手法を確立できたことで、今後は目的に応じたシステムの最適化や新たな触媒系などの機能性複合体の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

T. Koshiyama, N. Kanda, K. Iwata, M. Honjo, S. Asada, T. Hatae, Y. Tsuji, M. Yoshida, M. Okamura, R. Kuga, S. Masaoka, M. Ohba, Regulation of Cerium(IV)-driven O₂ Evolution Reaction using Composites of Liposome and Lipophilic Ruthenium Complexes, *Dalton Trans.*, 44, 15126-15129 (2015). 査読有, DOI: 10.1039/C5DT00793C

K. Nakanishi, T. Koshiyama, S. Iba, M. Ohba, Lipophilic Ruthenium Salen Complexes: Incorporation into Liposome Bilayers and Photoinduced Release of Nitric Oxide, *Dalton Trans.*, 44, 14200-14203 (2015). 査読有, DOI: 10.1039/C5DT02352A

〔学会発表〕(計30件)

M. Ohba, T. Koshiyama, Hierarchical Composites Consisting of Coordination Compounds and Liposome, 招待講演, 16th Asian Chemical Congress (16ACC), 2015 月 11 月 20 日, Dhaka (Bangladesh)

M. Ohba, T. Koshiyama, Functional Space Integrated Lipophilic Coordination Compounds and Liposome, 招待講演, 10th Japan-China Joint Symposium on Metal Cluster Compounds, 2015 月 10 月 25 日, Fuzhou (China)

越山友美、浅田紗成、本庄正幸、小金丸莉菜、大場正昭、抗生物質チャネルを利用したリポソーム空間の機能化、口頭発表、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 9 月 11 日、熊本

本庄正幸、波多江達、越山友美、大場正昭、リポソーム内水相における金属錯体形成の直接観察、ポスター発表（若手研究者奨励賞受賞）、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6 月 27 日、北九州

T. Koshiyama、M. Ohba、Composite of Liposome and Metal Complexes: Toward Creating a New Chemical Reaction Space、招待講演、Computational Chemistry (CC) Symposium in ICCMSE 2015、2015 年 3 月 22 日、Athens (Greece)

越山友美、本庄正幸、大場正昭、リポソーム内水相における多孔性材料の直接合成と機能発現、口頭発表、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、岡山

M. Ohba、Integrated Metal Complexes and Liposome Space、招待講演、2nd Japan-UK Joint Symposium、2014 年 9 月 17 日、東京

M. Ohba、M. Honjo、A. Mishima、T. Koshiyama、Construction of Functional Space Based on Metal Complexes and Liposome、招待講演、41th International Conference on Coordination Chemistry (ICCC41)、2014 年 7 月 23 日、Singapore

中西契太、波多江達、越山友美、大場正昭、親脂質性 salen 型錯体を用いたリポソームの機能化、ポスター発表（ポスター賞受賞）、日本膜学会第 36 年会、2015 年 5 月 12 日、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/Sakutaibussei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 正昭 (OHBA, MASA AKI)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：00284480

(2) 連携研究者

越山 友美 (KOSHIYAMA, TOMOMI)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：30467279