

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01990

研究課題名(和文)芳香環ナノポケットを活用した生体活性分子の選択識別と機能変換

研究課題名(英文) Selective Recognition of Biomolecules by Polyaromatic Nanopockets

研究代表者

吉沢 道人 (Yoshizawa, Michito)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：70372399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内のタンパク質ナノポケットが持つ空間機能に発想を得て、プラスチック内で特異な空間機能を創出するため、芳香環ナノポケットを活用した生体分子の選択的なセンシングに挑戦した。その結果、水溶性の芳香環ナノポケットを利用することで、水中、男性および女性ホルモンの混合物から、男性ホルモン(テストステロンなど)を選択的に捕捉できることを見出した。また、不飽和数の異なる脂肪酸の混合物から、特定の脂肪酸を選択的に識別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

ナノ空間の化学は、新規な分析・分離材料や高性能な反応・触媒の開発の観点から、国内外で勢力的に研究されている。しかしながら、その大部分は有機溶媒中での研究で、また、その対象は金属イオン・ガス分子・合成化合物などに限定されていた。本研究では、生体と同じ水を溶媒として、重要な生体分子を対象とし、独自の芳香環ナノポケットを活用することで、簡便で高選択的なセンシングシステムを開発した。

研究成果の概要(英文)：For the development of selective sensing systems for various biomolecules in water, we designed and prepared polyaromatic nanopockets inspired by biological protein nanopockets. Using the synthetic nanopocket, we succeeded in the selective binding of male hormones such as testosterone from a mixture of male and female hormones in water. In addition, selective recognition of fatty acids with multiple unsaturated units was also achieved by the nanopocket.

研究分野：超分子化学

キーワード：生体分子 センシング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の集合体からなる生体ナノポケットは、常温・常圧・水中で、高選択な分子認識と高効率な化学反応を達成している。これらを人工的に再現することは、環境負荷の少ない持続可能な科学技術社会の構築に大きく貢献できる。しかしながら、生体ポケットの活性部位周辺を切り出してフラスコ内に入れても、同様の空間機能は全く発現しない。また、生体構造を模倣し、柔軟な脂肪族化合物を用いて、数多くの人工ポケットが合成されてきたが、水中での生体分子の厳密な識別や高活性な触媒反応はほとんど達成されていない。生体系の構造模倣ではなく機能模倣を目指すには、新たな発想と戦略による、人工ナノポケットの設計と開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内のタンパク質ナノポケットが持つ魅力的な空間機能に発想を得て、フラスコ内で特異な空間機能を創出するため、“芳香環ナノポケット”を活用した生体活性分子の選択的な識別とその機能変換を達成することである。その戦略として、芳香環のみで囲まれた1ナノサイズの空間を有する水溶性の分子カプセルおよびチューブを利用する。研究の第1目標として、申請者が開発したこれらの芳香環ナノポケットを用い、水中で様々な生体関連分子の選択的な識別を達成する。第2目標では、ナノポケット内に取り込まれた生体分子の構造と物性を解明し、機能の変換を目指す。さらに第3目標では、酵素反応を模倣して、芳香環ナノポケットを反応場とした水中・室温での高活性な触媒機能を開拓する。これらを通じて、医療や材料分野での最先端分子技術となる独創的な人工空間機能を創出する。

3. 研究の方法

我々は2008年に研究グループをスタートし、芳香環のみで囲まれたナノ空間を有するフラーレンやカーボンナノチューブの三次元構造を手本に、入手容易で蛍光性のアントラセンを出発原料としたナノ構造体を作製してきた。実際に、8つのアントラセン環に囲まれた球状の1ナノサイズ空間を有する配位結合性カプセル (*J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 11438)、4つのアントラセン環に囲まれた筒状の1ナノ空間を有する配位結合性チューブ (*J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12976) や共有結合性チューブ (*Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 259)、柔軟なアントラセン環のシエルを持つミセルタイプの π -スタック型カプセル (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 2308) などの合成に成功した。本研究方法の基盤となる芳香環ナノポケットを持つ独自のナノ構造体の作製と構造決定を達成している。

4. 研究成果

初年度は、芳香環ナノポケットが、水中、瞬時にかつ100%の収率で、親水性の乳酸オリゴマーを内包できることを見出した。また、分子レベルでの詳細なメカニズムの検証から、内包体は多点の分子間相互作用に基づく負のエンタルピー変化により、水中で安定化することが明らかになった。さらに、両親媒性のオリゴエチレンオキシドが水中・室温で、瞬時かつ定量的に、ナノカプセルと結合することを見出した。結合様式は基質の長さに依存し、約3 nmまでのひも状分子はカプセル内部に包み込まれ、それより長いひも状分子はカプセル骨格を貫いて結合した。詳細な熱量分析から、この前例のない貫通型ナノ構造体の形成は、カプセル内面とひも状分子の多点相互作用が駆動力と判明した。水中での芳香環ナノポケットと生体関連分子の相互作用を明らかにした。

次年度は、芳香環ナノポケットが、水中で、超微量で高活性な機能を持つステロイド性ホルモンを定量的に内包できることを解明した。まず、様々な組み合わせの内包の競争実験から、男性ホルモンのテストステロンが女性ホルモンのプロゲステロンや β -エストラジオールより、優先的に内包されることを見出した。次に、各性ホルモンの中での親和性の序列を解明した。続いて、親和性の原因を明らかにするため、内包体のX線結晶構造解析を行った。その結果、芳香環ナノ空間内でのホルモンによる induced-fit 機構とそれによる多点分子間相互作用が示された。さらに、蛍光性色素を利用したテストステロンの微量蛍光検出を達成した。水中での芳香環ナノポケットと生体関連分子の特異な相互作用を明らかにした。

最終年度は、柔軟で相互作用の弱いアルキル鎖を持ち、その骨格中の不飽和部位の数の違いで、異なる性質を示す脂肪酸をターゲットにした。この生体分子に対して、芳香環ナノポケットを活用して、水中で内包挙動を解明した。その結果、不飽和数の異なる脂肪酸の混合物から、特定の脂肪酸を選択的に識別することに成功した。また、ポリ不飽和のDHAやEPAを内包することで、それらが酸素や光に対して顕著に安定化することを見出した。さらに、女性ステロイドホルモンを選択的に捕捉する芳香環ナノポケットの合成に成功した。酵素反応を模倣して、 π -スタック

ング型カプセルが提供する芳香環ナノポケットを反応場とした水中・室温での高活性な光触媒反応も開発した。

上記の研究成果の中で、特に注目すべき成果「芳香環ナノポケットによるステロイドホルモンの高選択的認識と蛍光検出」について、下記に具体的な成果を記述する。

様々な生体分子の中でステロイド性ホルモンは、その構造および機能的な特徴によりアンドロゲン（＝男性ホルモン）、プロゲステロゲン（＝女性ホルモン）とエストロゲン（＝女性ホルモン）に分類される（図 1a）。これらの性ホルモンの分子構造は類似しており、主な違いは4つの環状骨格のAとD環上の官能基のみである。生体のタンパク質ポケットは、その微細な構造の違いを厳密に識別できる。しかしながら、人工のかご型やカプセル型分子では、比較的大きな性ホルモンを捕捉すること自体が困難であり、また、男女の識別は達成されていなかった。

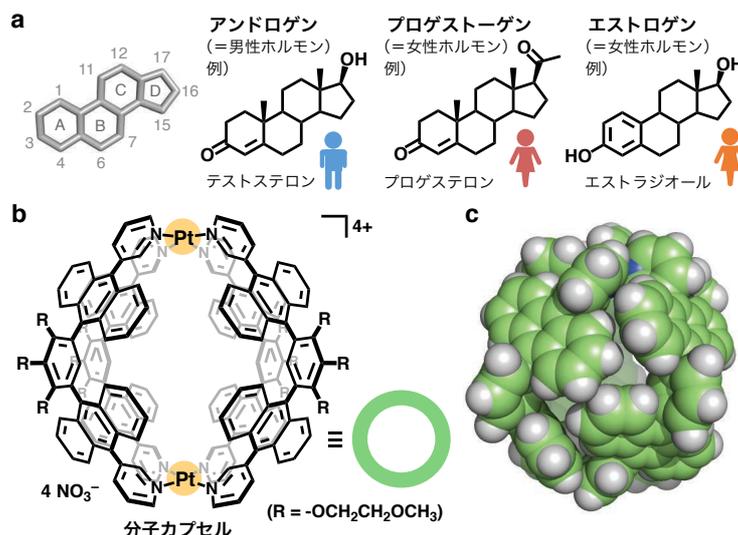


図 1. (a) ステロイド性ホルモンの母骨格と代表的な性ホルモン. (b) 分子カプセルの構造と (c) その空間充填モデル (R は省略) .

本研究では、アンドロゲンレセプターの約 10 分の 1 の大きさの分子カプセル（図 1b）が、種々のステロイド性ホルモンを水中で強く捕捉することを見出した。また、詳細な競争実験より、分子カプセルが男性と女性ホルモンの混合物から、男性ホルモン（アンドロゲン）を選択的に捕捉できることを明らかにした。捕捉後の分子カプセルの結晶構造解析から、識別のメカニズムは、カプセル骨格がホルモン構造に誘起されて変形し、分子間相互作用が多点で働くことに起因すると判明した。さらに、蛍光色素を予め捕捉させた分子カプセルを利用することで、水中に溶解する数ナノグラム量の男性ホルモンの蛍光検出に成功した。

男性ステロイドホルモンの選択的捕捉: まず、分子カプセルのステロイド性ホルモンに対する捕捉能を調査した。代表的なアンドロゲンのテストステロン（1 当量）を分子カプセルの水溶液に添加し、加熱攪拌すると、水に難溶なテストステロンは疎水効果により定量的にカプセル内に捕捉された。捕捉の事実は¹H NMR および ESI-TOF MS 分析で確認した。同様の方法で、代表的なプロゲステロゲンのプロゲステロンとエストロゲンのエストラジオールもそれぞれ効率良く分子カプセルに捕捉された。

続いて、競争実験により捕捉の選択性を評価した。分子カプセルの水溶液に対して、上記のテストステロン、プロゲステロン、エストラジオールを 1 当量ずつ添加し、加熱攪拌した。その結果、テストステロンが 98%以上の選択性で分子カプセルに捕捉されることが判明した（図 2a）。その捕捉の強さは、プロゲステロンの 100 倍以上であった。興味深いことに、この選択性は 1 当量のテストステロンと大過剰量のプロゲステロンとエストラジオールを混合した場合でも維持された。

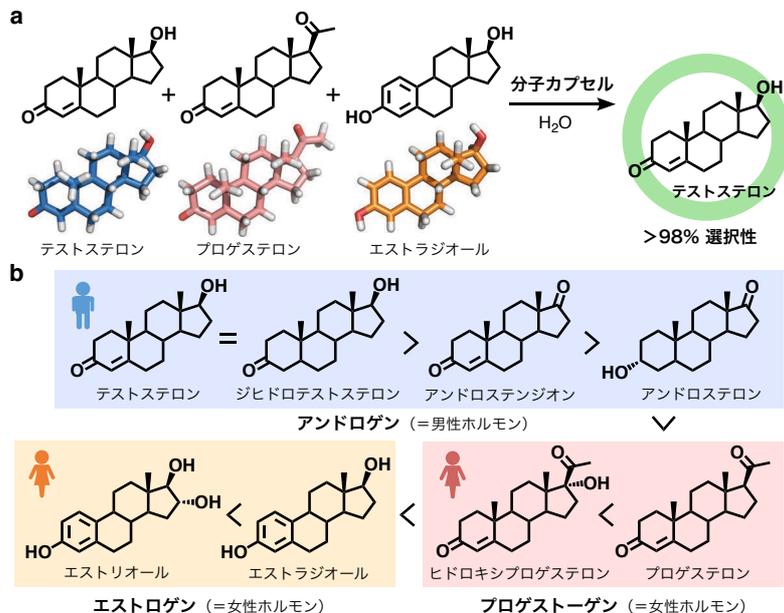


図2. (a) 分子カプセルによる男性/女性ホルモン混合物中からの男性ホルモンの選択的捕捉. (b) 分子カプセルによる性ホルモン識別の優先順位.

他のステロイド性ホルモンに関して捕捉の競争実験を行った結果、分子カプセルはテストステロンやジヒドロテストステロンやアンドロステロンなどのアンドロゲン（男性ホルモン）に対して、プロゲステロンやヒドロキシプロゲステロンのプロゲストーゲン（女性ホルモン）、エストラジオールやエストリオールのエストロゲン（女性ホルモン）よりも強く捕捉することが判明した（図2b）。すなわち、男性と女性ホルモンを明確に識別できることが明らかになった。また、アンドロゲンの中での捕捉の優先順位では、テストステロン、ジヒドロテストステロン、アンドロステンジオンに続いて、アンドロステロンとなった。得られた捕捉の順序は、性ホルモン自身の水溶性の違いには依存していない。

選択的な捕捉のメカニズム解明：なぜ、分子カプセルが男性ホルモンを選択的に捕捉できるかを解明するため、テストステロンを含む分子カプセルの単結晶を作製し、そのX線結晶構造解析を行った。その結果、約1 nmサイズのカプセル空間に、同サイズのテストステロンが完全に内包されていることが判明した（図3a, b）。このとき、本来の球状カプセル骨格は、板状のテストステロンに合わせて大きく変形していた。この現象は、柔軟なタンパク質ポケットで見られる誘導適合モデルと同様であるが、剛直な人工空間での発現は稀である。この立体構造変化で、分子カプセルを構成する芳香環パネルは、テストステロンのAとD環に最近接し、環上の官能基が多点のCH/OH- π 相互作用および水素結合していた（図3c）。性ホルモンの構造の差異は、両端のA/D環上の官能基に大きく依存することから、D環がより嵩高いプロゲステロンやA環がより剛直なエストラジオールより、テストステロンがカプセル空間に最も適合したと考えられる。

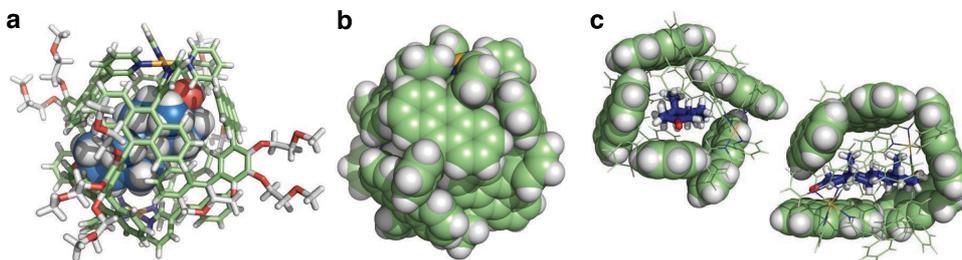


図3. テストステロン内包体のX線結晶構造. (a) 分子カプセル：棒モデル、テストステロン：空間充填モデル、(b) 空間充填モデル、(c) 2つの角度から見たカプセル空間とテストステロンの配置.

極微量の男性ホルモンの蛍光センシング：高感度な男性ホルモンの検出デバイスを志向し、分子カプセル内での分子交換反応を利用した、テストステロンの蛍光センシングに挑戦した。本来、水に不溶性なクマリン系色素は分子カプセルに捕捉されると水溶化し、紫外光照射で青緑色に発光する。この水溶液に、約200ナノグラムのテストステロンを含む水溶液を添加すると、テストステロンが優先的に捕捉され、クマリンは放出された。その結果、紫外光照射に対して蛍光が顕著に低下した。この蛍光変化は、紫外可視分光光度計でも明確に検出された。男性ホルモンのナノグラムセンシングに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hanafusa Mamiko, Tsuchida Yamato, Matsumoto Kyosuke, Kondo Kei, Yoshizawa Michito	4. 巻 11
2. 論文標題 Three host peculiarities of a cycloalkane-based micelle toward large metal-complex guests	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19886-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kishida Natsuki, Matsumoto Kyosuke, Tanaka Yuya, Akita Munetaka, Sakurai Hidehiro, Yoshizawa Michito	4. 巻 142
2. 論文標題 Anisotropic Contraction of a Polyaromatic Capsule and Its Cavity-Induced Compression Effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 9599 ~ 9603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c02932	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 -
1. 著者名 Dobashi Hiroki, Catti Lorenzo, Tanaka Yuya, Akita Munetaka, Yoshizawa Michito	4. 巻 59
2. 論文標題 N Doping of Polyaromatic Capsules: Small Cavity Modification Leads to Large Change in Host?Guest Interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 11881 ~ 11885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202004168	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 -
1. 著者名 Wang Yue, Kai Hiroto, Ishida Masatoshi, Gokulnath Sabapathi, Mori Shigeki, Murayama Tomotaka, Muranaka Atsuya, Uchiyama Masanobu, Yasutake Yuhstake, Fukatsu Susumu, Notsuka Yusuke, Yamaoka Yoshihisa, Hanafusa Mamiko, Yoshizawa Michito, Kim Gakhyun, Kim Dongho, Furuta Hiroyuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Synthesis of a Black Dye with Absorption Capabilities Across the Visible-to-Near-Infrared Region: A MO-Mixing Approach via Heterometal Coordination of Expanded Porphyrinoid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 6807 ~ 6813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c01824	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 該当する

1. 著者名 Niki Keita, Tsutsui Takahiro, Yamashina Masahiro, Akita Munetaka, Yoshizawa Michito	4. 巻 59
2. 論文標題 Recognition and Stabilization of Unsaturated Fatty Acids by a Polyaromatic Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 10489 ~ 10492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202003253	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 -

1. 著者名 Yoshizawa Michito, Catti Lorenzo	4. 巻 52
2. 論文標題 Bent Anthracene Dimers as Versatile Building Blocks for Supramolecular Capsules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 2392 ~ 2404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.9b00301	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 -

1. 著者名 Sato Yoshiyuki, Catti Lorenzo, Akita Munetaka, Yoshizawa Michito	4. 巻 141
2. 論文標題 A Redox-Active Heterocyclic Capsule: Radical Generation, Oxygenation, and Guest Uptake/Release	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 12268 ~ 12273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b03419	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 -

1. 著者名 Matsumoto Kyosuke, Kusaba Shunsuke, Tanaka Yuya, Sei Yoshihisa, Akita Munetaka, Aritani Kazushi, Haga Masa aki, Yoshizawa Michito	4. 巻 58
2. 論文標題 A Peanut Shaped Polyaromatic Capsule: Solvent Dependent Transformation and Electronic Properties of a Non Contacted Fullerene Dimer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 8463 ~ 8467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201903117	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 -

1. 著者名 Catti Lorenzo, Kishida Natsuki, Kai Tomokuni, Akita Munetaka, Yoshizawa Michito	4. 巻 10
2. 論文標題 Polyaromatic nanocapsules as photoresponsive hosts in water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09928-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishioka Tomoya, Kuroda Kiyonori, Akita Munetaka, Yoshizawa Michito	4. 巻 58
2. 論文標題 A Polyaromatic Gemini Amphiphile That Assembles into a Well Defined Aromatic Micelle with Higher Stability and Host Functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6579 ~ 6583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201814624	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 -

1. 著者名 Yamashina Masahiro, Tsutsui Takahiro, Sei Yoshihisa, Akita Munetaka, Yoshizawa Michito	4. 巻 5
2. 論文標題 A polyaromatic receptor with high androgen affinity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav3179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aav3179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroda Kiyonori, Yazaki Kohei, Tanaka Yuya, Akita Munetaka, Sakai Hayato, Hasobe Taku, Tkachenko Nikolai V., Yoshizawa Michito	4. 巻 58
2. 論文標題 A Pentacene based Nanotube Displaying Enriched Electrochemical and Photochemical Activities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 1115 ~ 1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201812976	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 該当する

1. 著者名 Origuchi Sakura, Kishimoto Mai, Yoshizawa Michito, Yoshimoto Soichiro	4. 巻 57
2. 論文標題 A Supramolecular Approach to the Preparation of Nanographene Adlayers Using Water Soluble Molecular Capsules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 15481 ~ 15485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201809258	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 -

1. 著者名 Yamashina Masahiro, Kusaba Shunsuke, Akita Munetaka, Kikuchi Takashi, Yoshizawa Michito	4. 巻 9
2. 論文標題 Cramming versus threading of long amphiphilic oligomers into a polyaromatic capsule	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06458-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusaba Shunsuke, Yamashina Masahiro, Akita Munetaka, Kikuchi Takashi, Yoshizawa Michito	4. 巻 57
2. 論文標題 Hydrophilic Oligo(lactic acid)s Captured by a Hydrophobic Polyaromatic Cavity in Water	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 3706 ~ 3710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201800432	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6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 M. Yoshizawa
2. 発表標題 Polyaromatic Nanocapsules: Selective Recognition of Biomolecules
3. 学会等名 Modern Trends In Inorganic Chemistry-XVIII (MTICXVIII) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yoshizawa
2. 発表標題 Polyaromatic Nanocapsules: from Rational Design to Host Functions
3. 学会等名 Department Seminar Indian Institute of Science (IISc) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yoshizawa
2. 発表標題 Polyaromatic Nanocapsules: from Rational Design to Host Functions
3. 学会等名 Department Seminar Indian Institute of Technology (IIT) Madras (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yoshizawa
2. 発表標題 Polyaromatic Nanocapsules with Unique Host Functions
3. 学会等名 4th International Symposium on Center of Excellence for Innovative Material Sciences Based on Supramolecules (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Yoshizawa
2. 発表標題 Unusual Phenomena within Polyaromatic Molecular Capsules
3. 学会等名 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Yoshizawa
2. 発表標題 Unique Host Properties of Polyaromatic Coordination Capsules
3. 学会等名 The 255th ACS National Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 揮発性有機化合物の吸着方法 (特許出願)	発明者 角田瑠輝・吉沢道人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-11658	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

吉沢研究室 http://www.res.titech.ac.jp/~smart/nspace.html
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------