

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 6月 7日現在

機関番号：11301  
研究種目：若手研究（S）  
研究期間：2009～2013  
課題番号：21675003  
研究課題名（和文） 化学機能を制御する超分子ツールの創製  
研究課題名（英文） Development of supramolecular tools for control of chemical events  
研究代表者  
金原 数（KINBARA KAZUSHI）  
東北大学・多元物質科学研究所・教授  
研究者番号：30282578  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）69,400,000円、（間接経費）20,820,000円

## 研究成果の概要（和文）：

有機合成化学を利用したボトムアップ的なアプローチと、生体分子を応用したトップダウン的なアプローチの両者により、刺激に応答して機械的な動きを起こすことで化学機能を制御する様々な分子ツールの開発に成功した。また、歪みを生じさせるのに有効な2次元の形状を有する分子骨格の設計に対する基本的な指針を得ることに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

By a fully bottom-up approach based on organic synthesis as well as a top-down approach making use of biological molecules, we have succeeded to develop molecular tools which would be applicable to control the chemical functions of the target molecules in response to external stimuli. In addition, a basic concept for designing a two-dimensional molecular framework, which generates efficient distortions of the target molecule, could be established.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：超分子、分子素子、機能触媒

## 1. 研究開始当初の背景

物理的、あるいは化学的刺激に応答して物性が変化する刺激応答性分子は、分子センサー、分子メモリ等の分子デバイスの根幹を成す極めて重要な合成分子である。我々はこのような刺激応答性分子の中で、刺激により機械的な構造変化を起こす、「分子機械」に注目し、既存の刺激応答性分子では実現できない新機能の発現を目指し、複雑な動きを実現する分子設計の方法論を開拓してきた。

分子生物学の発展に伴い、生体系ではタンパク質を中心とした巨大分子が、高度に制御された機械的な動きを起こす例が数多く見いだされている。それらは、物質生産、エネルギー変換、シグナル伝達、物質移動など機械的な動きを通して、様々な化学現象をコントロールしている。一方で、合成/半合成分子機械については、ポストシリコンデバイスとしての応用を意識した電子デバイス開拓が主流となっており、

生体系にみられる化学的機能を指向した研究はまだ極めて萌芽的な段階にあった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、生体系で実現されている機能のうち、「物質/エネルギー変換」という役割に着目した。分子の機械的な動きによって、化学反応の制御やエネルギー変換、エネルギー貯蔵などを実現できれば、既存の機能分子とは一線を画した、機能性マテリアルの新潮流を創出することが期待される。そこで、これらを実現する合成/半合成分子機械の構築を目指して、その分子設計指針を得ることを目的として検討を行った。

## 3. 研究の方法

本研究の鍵となるコンセプトは、「分子の歪みの可逆制御」である。人工触媒、あるいは酵素反応において、反応活性中心部の立体的環境が反応速度、選択性に大きな影響を与えることは周知の事実である。このような触媒

活性を有する分子に外部から分子機械を作用させてその構造を物理的に歪ませ、さらに可逆的にこれを戻すことができれば、これらの反応活性、反応選択性を可逆的に変化させることができる。この原理は単純であるが故、様々な化学反応の制御に適用できる普遍性を有する。また、歪んだ分子構造を生成することができれば、入力に用いる物理的なエネルギーとは異なる形の化学エネルギーとしてこれを貯蔵あるいは取り出すことができる可能性がある。本研究課題では、これらを実現するため、完全にボトムアップ的に構築する合成分子機械と、生体分子の化学修飾により機能性分子を得る半合成分子機械の2つのアプローチから目的達成に挑戦した。具体的には、(1)人工分子機械の創製、(2)生体分子機械を利用した刺激応答性材料の創製、(3)分子機械構築の基盤となる基礎的分子骨格の設計、の3点を中心に検討を行ない、多くの成果をあげることができた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 触媒機能を有する分子機械の構築

分子に歪み加えることで化学反応性を制御することを目的として、刺激応答性部位を組み込んだ有機金属触媒の構築を検討した。まずこの目的のため、フォトクロミック分子として代表的な分子であるアゾベンゼンを含むジイミン型配位子を設計、合成した(図1)。

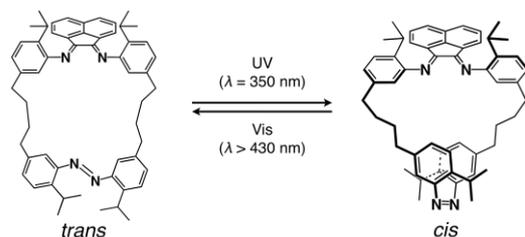


図1 アゾベンゼンを含む配位子の構造と光異性化

この配位子(トランス体)に紫外光(350 nm)を照射したところ、光定常状態において、トランス/シス=25/75の混合物が得られた。さらに、これらの配位子をPdCl(Me)(cod)と混合することにより、目的とするPd(II)錯体を得ることに成功した。このPd(II)錯体の触媒活性について、ジアリルマロネートをモノマーとした閉環重合を検討したところ、トランス体錯体は、重合活性を示し対応するポリマーを与えた。一方、シス体錯体はほとんど重合活性を示さないことが示唆された。また、配

位子は光反応性を有するのに対し、Pd(II)錯体は光反応性を示さないことが分かった。

興味深いことに、得られたポリマーは含塩素有機溶媒をゲル化した。種々の検討結果から、ポリマーのくし形の形状により、分子がファンデルワールス相互作用により交互にかみ合うことでナノファイバーの形成が起きたと考えられる。

##### (2) シャペロニンを利用した刺激応答性ナノキャリアの構築

シャペロニンは熱ショックタンパク質として知られおり、生体内で合成直後の新生ポリペプチドのフォールディングや変性タンパク質のリフォールディングに欠かせない存在である。シャペロニンに遺伝子工学的手法によりシステインを導入し、その空孔入り口付近をフォトクロミック分子であるスピロピランで化学的修飾した。興味深いことに、この修飾シャペロニンがマグネシウムイオン存在下で集積化し、直線的に集合したチューブ状集合体を形成することを見いだした(図2)。

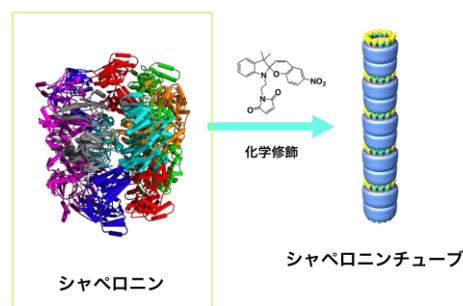


図2 シャペロニンチューブのイメージ図

さらに、この内シャペロニンチューブの内部空間には、変性タンパク質等のゲストを導入することが分かった。さらに、このチューブ状集合体はキレート剤やATP等の化学的的刺激に応答して解離することを見いだした。これの性質から、ドラッグデリバリーのキャリアとしての応用が期待される。

##### (3) 生体分子を利用した光応答性モジュールの構築

光受容タンパク質 photoactive yellow protein (PYP) PYPは、青色光を吸収することで発色団の異性化を伴った高次構造変化を引き起こす。すなわち、可視光照射により変性し、照射を止める自発的にフォールドする光応答性タンパク質として知られている。遺伝子工学的手法を用いて、目的タンパク質である孔形成毒素 alpha-hemolysin (H1a)のC末端にPYPを融合し、H1aの溶血活性を光で自在にコントロールすることを目指した

(図3)。

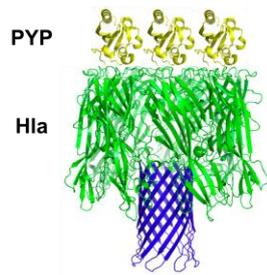


図3 PYP 融合 alpha-hemolysin (H1a)のイメージ図

大腸菌発現系を用いて目的蛋白質を大量調製し、p-クマル酸無水物を添加することでPYP部位の再構成を行った。紫外可視吸収スペクトル測定を行ったところ、野生型PYPと同様に446 nmに極大をもつ吸収帯が確認できた。また、野生型H1aと同様に、C-PYP-H1aは水溶液中で単量体として存在することもわかった。綿羊赤血球に対する溶血速度を用いて蛋白質の活性を評価したところ、450 nmの光照射下で溶血速度の低下が観察された。したがって、PYPを遺伝子工学的にH1aのC末端に融合させることにより、H1aの溶血活性に光応答性を付与することが出来た。今後、光により細胞膜上での物質透過を自在に操作することが可能になれば、細胞挙動に対する人為的制御の実現が期待できると期待される。

#### (4) 生体分子を超分子化学的に制御する分子糊の開発

近年、生体分子に対し化学的に修飾を施すことで、本来の機能を越えた高機能性を有する複合体を創製することが広く試みられている。特に、生体分子と様々な物質とを結合するバイオインターフェイスに注目が集まっている。これまで、生体分子の機能制御を目的として合成分子で修飾する場合、共有結合を介した化学修飾や、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用など、特異性の高い生体由来のモジュールが広く用いられてきた。一方、一般的な分子間相互作用を利用して超分子化学的に修飾を行うことができる汎用性の高い分子を設計できれば、単なる機能性官能基の付与だけでなく、生体分子を貼り合わせる糊など、新たな応用可能性が広がることが期待される。このような発想のもと、多数の機能団と生体分子を自在に糊付けできる高分子ツールとして“モレキュラールグー(分子糊)”を開発した(図4)。

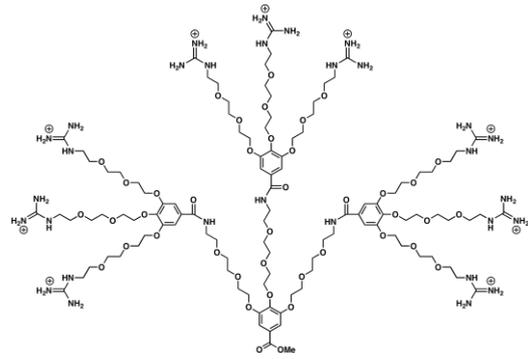


図4 モレキュラールグーの分子構造

動的な機能を有するタンパク質集合体に対する分子糊の効果について検討したところ、ATPの存在下、滑り運動を起こしているアクチンミオシンに分子糊を添加すると、強い接着効果を示し、その動きが停止した。さらに、停止後のアクチンミオシンにATPを含むバッファ水溶液を加え、洗浄操作を施すことにより再び滑り運動が復活した。このように、分子糊が可逆的にアクチンミオシンの滑り運動を制御できることを見出した。

#### (5) 単分散オリゴエチレングリコール鎖を骨格として有する構造化PEGの開発

ポリエチレングリコール(PEG)は、高い生体親和性から生体材料として広く用いられている。しかし、現在利用されているPEGのほとんどは直鎖状のものに限られる。そこで、PEGの形状や疎水部の導入が物性に与える効果を精密に調べるために、非直鎖状の単分子PEG類縁体を開発した(図5)。

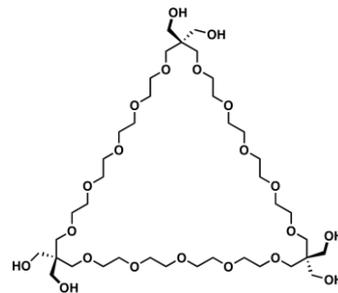


図5 三角形型PEG分子の構造

その中で開発された三角形型PEG分子が、通常の直鎖状PEGに比べ、より低温で脱水を示すことが分かった。さらにこの性質を応用することで、タンパク質の熱凝集を効果的に抑制することができることを明らかにした。また、両親媒性PEG分子が曇点を示すことも明らかとなり、選択的ペプチド抽出などへの応用可能性があることを見いだした。

(6) 交互両親媒性ブロックオリゴマーの合成と機能開拓

膜貫通型タンパク質は、細胞膜に存在するタンパク質で、親水性のペプチド鎖と疎水性のヘリックス構造が交互に配列した、マルチブロックコポリマーである。疎水性ヘリックス構造が2分子膜を貫通するような形で高次構造を形成（フォールディング）しており、シグナル伝達、物質透過、細胞骨格形成など様々な役割を担っている。このような膜貫通型タンパク質の構造的特徴を取り入れたマルチブロック両親媒性オリゴマーを合成し、高次構造形成により機能を発現するような新たな機能分子の創製を目指した。具体的には、親水的部としてテトラエチレングリコールと安息香酸、疎水的部としてビスフェニルエチルベンゼン (BPEB) を有し、それらが交互に並んだ構造を有する化合物を合成した (図6)。

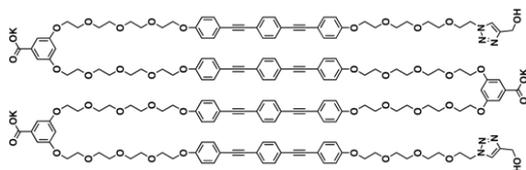


図6 膜貫通型タンパク質を模倣した交互両親媒性ブロックオリゴマーの構造

リポソーム中で、この分子の立体構造を調べたところ、低濃度でも BPEB 部が相互作用し膜貫通型タンパク質の類似構造をとっていることが強く示唆された。さらに興味深いことに、この分子がイオン透過能を示すことが分かった。詳細な解析の結果、この分子は脂質二分子膜中で4量体を形成し、それがイオンチャネルとした働いていることが強く示唆された (図7)。

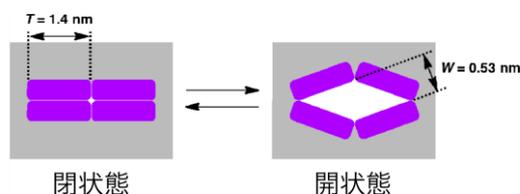


図7 イオンチャネルのイメージ図

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計27件)

①Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka,

Daisuke Abe, Yuji Sasanuma, Dwiky Rendra Graha Subekti and Kazushi Kinbara, Thermoresponsive Self-assembly and Conformational Changes of Amphiphilic Monodisperse Short Poly(ethylene glycol)s in Water, *Chem. Lett.*, 査読有, 2014, in press. DOI: 10.1246/cl.140241

②Takahiro Muraoka, Kota Adachi, Rainy Chowdhury and Kazushi Kinbara, Transesterification on Polyols by Intra- and Intermolecular Nucleophilic Substitutions, *PLoS ONE*, 査読有, 2014, 9, e91912. DOI: 10.1371/journal.pone.0091912

③Takahiro Muraoka, Nabanita Sadhukhan, Mihoko Ui, Shunichi Kawasaki, Enrikko Hazemi, Kota Adachi, and Kazushi Kinbara, Thermal-Aggregation Suppression of Proteins by a Structured PEG Analogue: Importance of Denaturation Temperature for Effective Aggregation Suppression, *Biochem. Eng. J.*, 査読有, 2014, 86C, 41–48. DOI: 10.1016/j.bej.2014.03.001

④Shuvendu Biswas, Kazushi Kinbara, Tatsuya Niwa, Hideki Taguchi, Noriyuki Ishii, Sumiyo Watanabe, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka, and Takuzo Aida, Biomolecular Robotics for Chemomechanically Driven Guest Delivery Duelled by Intracellular ATP, *Nature Chem.*, 査読有, 2013, 5, 613–620. DOI: 10.1038/nchem.1681

⑤Takahiro Muraoka, Kota Adachi, Mihoko Ui, Shunichi Kawasaki, Nabanita Sadhukhan, Haruki Obara, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, and Kazushi Kinbara, A Structured Monodisperse PEG for the Effective Suppression of Protein Aggregation, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 査読有, 2013, 52, 2430–2434. DOI: 10.1002/anie.201206563

⑥Takahiro Muraoka, Tatsuya Shima, Tsutomu Hamada, Masamune Morita, Masahiro Takagi, Kazuhito V. Tabata, Hiroyuki Noji, and Kazushi Kinbara, Ion Permeation by a Folded Multiblock Amphiphilic Oligomer Achieved by Hierarchical Construction of Self-Assembled Nanopores, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 2012, 134, 19788–19794. DOI: 10.1021/ja308342g.

⑦Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, and Kazushi Kinbara, Amplification of Light-induced Molecular-Shape Change by Supramolecular Machines., *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 査読有, 2012, 25, 655–658. DOI: 10.2494/photopolymer.25.6555

⑧Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Toshiaki Takei, Kouhei Tsumoto, and Kazushi Kinbara, Application of

- Photoactive Yellow Protein as a Photoresponsive Module for Controlling Hemolytic Activity of Staphylococcal  $\alpha$ -Hemolysin, *Chem. Commun.*, 査読有, **2012**, 48, 4737–4739.  
DOI: 10.1039/C2CC18118E
- ⑨ Takahiro Muraoka, Tatsuya Shima, Tsutomu Hamada, Masamune Morita, Masahiro Takagi, and Kazushi Kinbara, Mimicking Multipass Transmembrane Proteins: Synthesis, Assembly and Folding of Alternating Amphiphilic Multiblock Molecules in Liposomal Membranes, *Chem. Commun.*, 査読有, **2011**, 47, 194–196.  
DOI: 10.1039/C0CC02420A
- ⑩ Kou Okuro, Kazushi Kinbara, Kuniaki Takeda, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima, and Takuzo Aida, Adhesion Effects of a Guanidinium Ion Appended Dendritic "Molecular Glue" on the ATP-Driven Sliding Motion of Actomyosin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 査読有, **2010**, 49, 3030–3033.  
DOI: 10.1002/anie.200906139
- ⑪ Yasunao Miyamura, Kazushi Kinbara, Yohei Yamamoto, Vakayil K. Praveen, Kenichi Kato, Masaki Takata, Atsushi Takano, Yushu Matsushita, Eunji Lee, Myongsoo Lee, and Takuzo Aida, Shape-Directed Assembly of a "Macromolecular Barb" into Nanofibers: Stereospecific Cyclopolymerization of Isopropylidene Diallylmalonate, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **2010**, 132, 3292–3294.  
DOI: 10.1021/ja910901e
- ⑫ Shuvendu Biswas, Kazushi Kinbara, Nobuhiro Oya, Noriyuki Ishii, Hideki Taguchi, and Takuzo Aida, A Tubular Biocontainer: Metal Ion-Induced 1D Assembly of a Molecularly Engineered Chaperonin, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **2009**, 131, 7556–7557.  
DOI: 10.1021/ja902696q
- [学会発表] (計 108 件)
- ① Kazushi Kinbara, Monodisperse Amphiphilic PEG Macromonomer Refolds Protein Effectively, NATCOSEB, 2013 年 11 月 30 日、インド・チェンナイ
- ② Kazushi Kinbara, Design of Engineered  $\alpha$ -Hemolysins for Regulation of Hemolytic Activity by External Stimuli, Tenth International Conference on Flow Dynamics, 2013 年 11 月 26 日、仙台
- ③ Kazushi Kinbara, Amplification of molecular motions in supramolecular machines, SYMMETRY FESTIVAL, 2013 年 8 月 5 日、オランダ・デルフト
- ④ Kazushi Kinbara, Multiblock Amphiphilic Molecules with Alternating Hydrophilic and Hydrophobic Sequences as Mimics of Multipass Transmembrane Protein, International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials, 2012 年 10 月 23 日、オーストラリア、ブリスベン
- ⑤ Kazushi Kinbara, Development of Supramolecular Tools for Manipulation of Proteins, The Second Asian Chemical Biology Conference, 2012 年 7 月 4 日、沖縄
- ⑥ Kazushi Kinbara, Amplification of Light-induced Molecular-Shape Change by Supramolecular Machines, 29th International Conference of Photopolymer Science and Technology, 2012 年 6 月 29 日、千葉
- ⑦ 金原 数, 高分子の超分子化学と機能物質設計, 第 14 回生命化学研究会, 2011 年 12 月 3 日、南紀白浜
- ⑧ 金原 数, 生体のしくみに学ぶ機能物質設計, 第 27 回日本 D D S 学会, 2011 年 6 月 9 日、東京
- ⑨ 金原 数, 分子間で動きを伝える精密分子機械の設計, 平成 22 年度 化学系学協会 東北大会 有機化学コロキウム, 2010 年 9 月 25 日、盛岡
- ⑩ Kazushi Kinbara, Development of supramolecular tools for regulation of biomacromolecules, The 5th International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials, 2010 年 8 月 16 日、ジャマイカ・モンテゴベイ
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/kinbara/index-j.html>
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
金原 数 (Kinbara Kazushi)  
東北大学・多元物質科学研究所  
研究者番号：30282578