

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号	10101
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2011～2012
課題番号	23655111
研究課題名（和文）	生体マイクロチューブの重合ダイナミクスの可逆的光制御と擬似細胞マシン創製への応用
研究課題名（英文）	Reversible photoregulation of microtubule dynamics and development of artificial bio-molecular machines
研究代表者	
	深港 豪 (FUKAMINATO TSUYOSHI)
	北海道大学・電子科学研究所・助教
	研究者番号：80380583

研究成果の概要（和文）：本研究は、フォトクロミック分子の一つであるアゾベンゼンの光異性化反応で、微小管の重合・脱重合ダイナミクスを光可逆的にコントロールできるアゾベンゼンを開発し、それを擬似細胞マシンの創製へと応用することを目的としている。置換基の種類や置換位置の異なる種々のアゾベンゼン誘導体を合成し、微小管の重合阻害作用に及ぼす影響を徹底的に検討した結果、微小管に相互作用できる親水性のアミノ酸と、疎水性のアルキル鎖をパラ位に有することが可逆的な微小管の重合ダイナミクスには必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to synthesize novel azobenzene derivatives, which can reversibly regulate the microtubule depolymerization-polymerization dynamics with external light stimuli, and attempted to develop artificial bio-molecular machines. For such purpose, we prepared several azobenzene derivatives having different kinds of substituent with different positions and rigorously investigated the effect on the microtubule polymerization dynamics. From detailed investigations, it was revealed that the amphiphilic structure of azobenzene was essential to achieve the reversible photoregulation of microtubule polymerization dynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：フォトクロミズム・微小管・重合阻害剤・アゾベンゼン・生体機能・分子マシン

### 1. 研究開始当初の背景

近年、光で可逆的に分子構造や物性を変化させるフォトクロミック分子を利用し、生体分子の構造や機能を光で制御する試みが活発に行われている。そのような背景の中、我々はキネシン-微小管系の運動特性をフォトクロミック分子の光異性化反応により光で制御することを目指した研究に取り組んでいる。

そのような取り組みの中で我々は、光で可逆的にトランス-シス光異性化反応を示すアゾベンゼンを微小管に静電的に相互作用

させ、その運動特性を光で制御することを目指した研究を行い、その過程において我々の開発したアゾベンゼン誘導体が「トランス体の状態では微小管の重合過程を著しく阻害するのに対し、シス体では阻害作用を示さず、さらにその阻害作用が外部からの紫外光/可視光照射により可逆的にスイッチできる」という、当初予想もしなかった興味深い現象に巡り合った。

微小管の重合ダイナミクスを可逆的に光制御できる現象は、他に例のない唯一のものである。微小管の重合および重合阻害という

ダイナミクスは、真核生物における様々な生命現象に深く関わっているため、その光制御は本質的に生命現象を光で制御できる可能性を意味している。また、視点を変えると、ナノメートルサイズのチューブリン分子がマイクロスケールの微小管まで自己組織化する特性を光で可逆的に制御できるという、他に例のない新規な材料特性を手にしたことを意味している。しかしながら、その光可逆的な微小管重合阻害作用に対する分子構造との相関性は全く不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述した我々が見出した極めて新しい『光可逆的な微小管重合阻害作用』に対するアゾベンゼン分子の構造との相関性を明らかとし、最終的に光で駆動する擬似細胞マシンの創製へとつなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

「光可逆的な微小管重合阻害作用」(図1)の機構を明らかとするために、我々が合成するアゾベンゼン誘導体の、微小管との相互作用や重合阻害作用に及ぼす置換基の種類や結合位置の影響を詳細に調べ、分子構造と重合阻害作用との相関性を明らかにする。

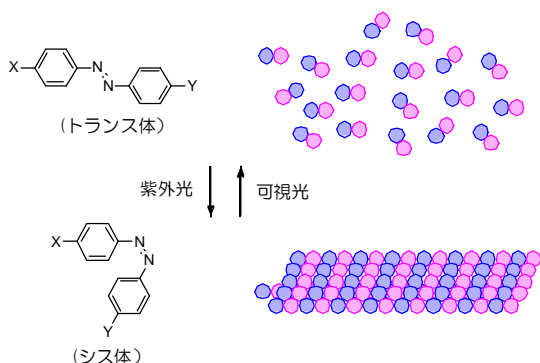


図1：アゾベンゼンの光異性化に伴う微小管重合ダイナミクスの光制御の概念図

以下に示す条件を基本的な分子設計の指針とする。

- (1) 微小管とアフィニティーを示すアミノ基やカルボキシル基などの官能基を有する
- (2) 光により可逆的に構造や極性を変化させるアゾベンゼンを有する
- (3) 水に可溶である
- (4) アゾベンゼンのトランス体およびシス体のうち、少なくとも片方の異性体において微小管ダイナミクスに影響を与えることができる

これら条件を満たす分子として、微小管とアフィニティーを有する部位、光異性化で可逆的に分子構造を変化させるアゾベンゼンユニット、および微小管重合阻害作用を示す

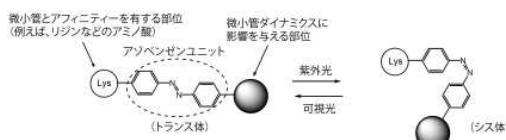


図2：微小管ダイナミクスの光制御を可能とするアゾベンゼンの基本分子構造

部位の三つにユニットを分け(図2)、置換基の種類および置換位置の異なる分子を合成していき、置換基の違いや分子構造の違いが微小管ダイナミクスにどのような影響を与えるのかを一つ一つ系統的に明らかにしていく。

また、微小管と相互作用をもつ部位についても、その種類や長さを変えた分子を合成し、微小管と水溶性アゾベンゼンとの間の相互作用の強さが微小管ダイナミクスにどのような影響を及ぼすのかを明らかとする。最終的には、そのような分子を共有結合で修飾したチューブリンを合成し、光でその重合と脱重合というダイナミクスを制御できる微小管を創製する。このダイナミックな重合過程の光制御を利用した擬似細胞マシン創製への応用を検討する。

## 4. 研究成果

本研究では、置換基の種類や置換位置が異なる種々のアゾベンゼン誘導体(1-5, 図3)を合成し、微小管の重合-脱重合挙動の光スイッチング能に及ぼす分子構造の影響を詳細に検討し、そのメカニズムに対する考察をin-vitroの実験で明らかとするを目標とした。

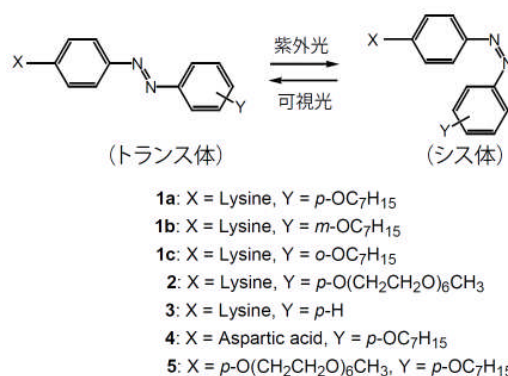


図3：本研究で合成したアゾベンゼン誘導体の分子構造と光異性化反応

合成した分子1-5は水溶液(4および5は10% DMSOとの混合溶媒)中において、紫外光・可視光照射に伴い可逆的な光異性化反応を示すことが認められた。アゾベンゼン誘導体(1-5)がローダミン標識微小管の重合挙動に及ぼす影響を蛍光顕微鏡下の観測により定性的に評価した結果、X部分にリジン基の

ような正に帯電したアミノ酸を有し、パラ位の Y 部分に疎水性の置換基を有するときに、トランス体の状態において微小管の重合挙動を阻害することが確認された。また、リジン基を有しアルキル鎖の結合位置をパラ、メタ、およびオルト位と変えた分子 (**1a**, **1b** および **1c**) を用いて微小管の重合挙動に及ぼす置換位置の影響を検討した結果、メタ型の分子 **1b** ではトランス体およびシス体ともに微小管の重合を阻害するのに対し、オルト型の分子 **1c** では両異性体ともに微小管の重合挙動に影響を与えないことが認められた。これらの結果から、分子内に親水性と疎水性の置換基を有し、水溶液中においてミセル等の集合体を取りやすい両親媒性の分子構造のアゾベンゼン誘導体において、微小管の重合ダイナミクスの可逆的な光制御が可能であることが推測された。この考えを明らかにするために、水溶液中でトランス体の状態においてミセルを形成し、シス体へと光異性化するとそのミセル状態が崩壊することが明らかとされている、光応答性界面活性剤として知られている分子 **6** (図 4) を用いて同様の微小管の重合ダイナミクスの光制御が可能であるかを確認した。その結果、分子 **6** においても同様に、トランス体の状態では微小管の不安定化が誘起され、シス体へと光異性化するとそのような不安定化は起こらず微小管が重合状態を取ることが確認された (図 4)。この結果から、微小管重合ダイナミクスの光制御には両親媒性の分子構造を有するアゾベンゼン誘導体が必須であることを明らかにすることができた。

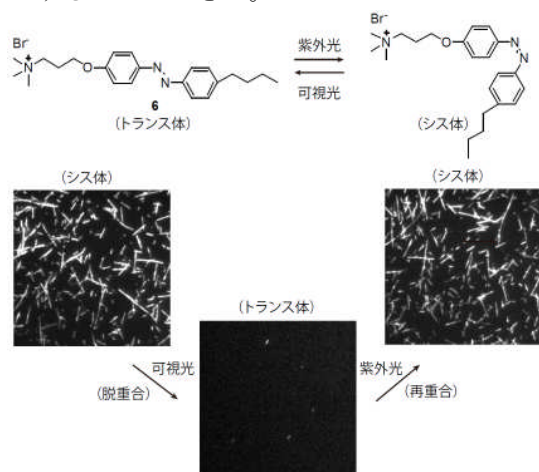


図 4 : 光応答性界面活性剤 **6** の分子構造と光異性化に伴う微小管重合ダイナミクスの光スイッチング

さらに生体分子マシンの創製を目指して、これらのアゾベンゼン誘導体が生細胞中の微小管にどのような影響を与えるのかを検討した。そのために、赤色蛍光タンパク mCherry を遺伝子発現させた微小管を有する

COS 細胞を用意し、この COS 細胞にアゾベンゼン **1a** および **2** をそれぞれ 100  $\mu$ M の濃度で投与し、その様子を観測した結果、in-vitro において顕著な微小管の脱重合挙動が観測される **1a** を投与した COS 細胞は投与後 15 分程度で内部の微小管の構造が完全に確認されなくなり、細胞骨格の形態も大きく変形することが認められた (図 5 上)。一方、in-vitro で微小管の脱重合挙動が観測されない **2** を投与した場合、投与後 1 時間経過しても細胞内部の微小管や細胞骨格の形態に変化は認められなかった (図 5 下)。

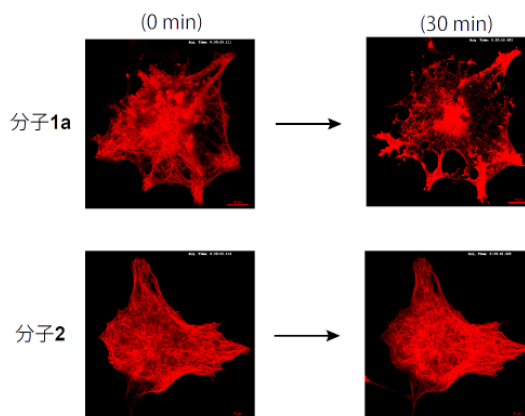


図 5 : 分子 **1a** および **2** を投与したときの COS 細胞の形態に与える影響

このことから、in-vivo においても in-vitro と同様のメカニズムで微小管の脱重合が誘起されている可能性が示唆された。この結果は、今後光駆動生体分子マシンを創製していく上で極めて重要であると考えられる。

## 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 6 件)

- (1) T. Fukaminato, E. Tateyama, T. Tamaoki, "Fluorescence photoswitching based on a photochromic  $pK_a$  change in aqueous solutions", *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 48, No. 88, 2012, pp. 10874-10876  
DOI: 10.1039/c2cc35889a
- (2) T. Kamei, T. Fukaminato, T. Tamaoki, "A photochromic ATP analogue driving a motor protein with reversible light-controlled motility: controlling velocity and binding manner of a kinesin-microtubule system in an *in vitro* motility assay" *Chemical Communications*, 査読有, Vol.

- 48, No. 61, 2012, pp.7625-7627  
DOI:10.1039/c2cc33552b
- (3) M. K. A. Rahim, T. Kamei, N. Tamaoki,  
“Dynamic photo-control of kinesin on a photoisomerizable monolayer - hydrolysis rate of ATP and motility of microtubules depending on the terminal group” *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有, Vol. 10, No. 16, 2012, pp.3321-3331  
DOI:10.1039/c2ob07167c
- (4) T. Fukaminato, “Single-molecule Fluorescence Photoswitching: Design and Synthesis of Photoswitchable Fluorescent Molecules” *Journal of Photochemistry and Photobiology C; Photochemistry Reviews*, 査読有, Vol. 12, No. 3, 2011, pp.174-208  
DOI:10.1016/j.jphotochemrev.2011.08.006
- (5) M. K. A. Rahim, T. Fukaminato, T. Kamei, N. Tamaoki, “Dynamic photocontrol of the gliding motility of a microtubule driven by kinesin on a photoisomerizable monolayer surface” *Langmuir*, 査読有, Vol. 27, No. 17, 2011, pp.10347-10350  
DOI:10.1021/la2024499
- (6) 深港 豪、入江 正浩  
「フォトクロミック分子を用いた単一分子蛍光スイッチング」  
*高分子*, 査読無、2011年、60巻、74-75

[学会発表] (計 17 件)

- ① T. Fukaminato、「Photoregulation of Bio-activities based on photochromic materials」、2012年12月13日、The 13th RIES-Hokudai International Symposium “律” (招待講演)、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo、Sapporo
- ② T. Fukaminato, E. Tateyama, N. Tamaoki、「Fluorescence photoswitching based on photochromic pKa changes in aqueous conditions」、2012年12月13日、The 13th RIES-Hokudai International Symposium “律”、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo、Sapporo
- ③ T. Kamei, T. Fukaminato, N. Tamaoki、「Photo-control of motility of a kinesin/microtubule system by photochromic ATP analogues」、2012年12月13日、The 13th RIES-Hokudai International Symposium “律”、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo、Sapporo
- ④ T. Fukaminato、「Photoswitching of

- fluorescence properties based on photochromic materials」、2012年12月6日、One day symposium du PPSM 2012 (招待講演)、ENS Cachan、France
- ⑤ T. Fukaminato, N. Tamaoki、「Fluorescence photoswitching based on a photochromic pKa change in water」、2012年12月1日、Phenics International Network symposium 2012、Universite de Nantes、France
- ⑥ T. Kamei, T. Fukaminato, N. Tamaoki、「A photochromic ATP analogue driving a motor protein with reversibly light-controlled motility」、2012年11月29日、Phenics International Network symposium 2012、Universite de Nantes、France
- ⑦ J. Su, R. Metivier, J. Piard, K. Nakatani, T. Fukaminato、「Highly efficient fluorescence photoswitching in molecular nanosystems based on diarylethenes」、2012年11月29日、Phenics International Network symposium 2012、Universite de Nantes、France
- ⑧ T. Fukaminato、「Single-molecule fluorescence photoswitching with a non-destructive readout capability」、Groupe Francais de Photochemie, Photophysique et Photosciences (招待講演)、2012年11月23日、Laboratoire de Chimie Physique-Matiere et Rayonnement、France
- ⑨ 深港豪、「光応答性分子材料を用いた分子スイッチおよび生体機能の光制御」、6回日本質量分析学会北海道談話会・研究会 (招待講演)、2012年10月16日、北海道大学、札幌
- ⑩ 深港豪・亀井敬・齊藤健太・永井健治・玉置信之、「アゾベンゼンの光異性化による微小管重合-脱重合ダイナミクスの光制御」、2012年光化学討論会、2012年9月14日、東京工業大学・大岡山キャンパス、東京都
- ⑪ 深港豪・玉置信之、「フォトクロミズムによる pKa 変化を利用した水溶性蛍光スイッチング分子」、2012年光化学討論会、2012年9月12日、東京工業大学・大岡山キャンパス、東京都
- ⑫ 深港豪・亀井敬・玉置信之、「光スイッチング機能を有する微小管重合阻害剤：重合阻害に及ぼす置換基依存性」、日本化学会春季年会、2012年3月27日、慶応義塾大学日吉キャンパス、東京都
- ⑬ 亀井敬・深港豪・玉置信之、「新規なフォトクロミックヌクレオチドアナログによる生体ナノモーターの駆動と運動の光制

御」、日本化学会春季年会、2012年3月27日、慶応義塾大学日吉キャンパス、東京都

- ⑭ T. Kamei, T. Fukaminato, N. Tamaoki、  
「Photo-control of motility of a kinesin/microtubule system by photochromic ATP analogues」、2011年11月21日、The 12th RIES-Hokudai International Symposium “観”、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo、Sapporo
- ⑮ 大原裕樹・森本正和・深港豪・玉置信之・入江正浩、「アントラセン基を有するジチアゾリルエテン誘導体のフォトクロミズムと蛍光特性」、2011年光化学討論会、2011年9月8日、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎県
- ⑯ 深港豪・亀井敬・玉置信之、「アゾベンゼンのフォトクロミズムによる微小管タンパク質の重合-脱重合挙動の制御」、2011年光化学討論会、2011年9月6日、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎県
- ⑰ 深港豪、「フォトクロミック分子を用いた単一分子蛍光の光制御」第1回光科学異分野横断萌芽研究会（招待講演）、2011年8月10日、かんぼの宿奈良、奈良

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深港 豪 (FUKAMINATO TSUYOSHI)  
北海道大学・電子科学研究所・助教  
研究者番号：80380583

### (2) 研究分担者

亀井 敬 (KAMEI TAKASHI)  
北海道大学・電子科学研究所・助教  
研究者番号：90450650

玉置 信之 (TAMAOKI NOBUYUKI)  
北海道大学・電子科学研究所・教授  
研究者番号：00344218

### (3) 連携研究者

該当なし