

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655052

研究課題名(和文) 脂質二重層膜を基盤とする階層的金属錯体集積空間の構築と構造解析

研究課題名(英文) Creation and structure analysis of hierarchical metal-complex-assembled space based on lipid bilayers

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：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「高機能な化学反応場」の創出を目指した。柔軟かつ異方的なメソ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を確立するために、(1) 親脂質性配位子および金属錯体の合成、(2) 内水相への金属錯体の導入、(3) 膜表面への金属錯体の導入、(4) リポソーム-金属錯体複合体の構造評価を推進した。

研究成果の概要(英文)：The research project targeted creating novel "highly-functional chemical reaction field" in which electron transfer, mass transfer and chemical reaction linked. We tried to establish basic technique for creation and structural analysis of "hierarchical metal-complex-assembled space" in which various functional metal complexes were incorporated rationally. In the project, we succeeded in the following points, (1) synthesis of lipophilic ligands and lipophilic metal complexes, (2) incorporation of metal complexes in the inner aqueous space of liposome, (3) incorporation of metal complexes on the liposome surface and (4) structure evaluation of liposome-metal complex composites.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：金属錯体化学 脂質二重層膜 リポソーム

### 1. 研究開始当初の背景

筆者らは、これまでに金属錯体の構造と物性・機能の合理的制御、および外場による構造・電子状態・磁気特性の変換に関する研究を展開してきた。その過程で、金属錯体の機能を連動させてより高度な機能を発現させるために、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、細胞における生体分子に代えて、目的に応じた機能性金属錯体をリポソームの表面および内部に合理的に集積させた「階層的金属錯体集積メゾ空間」構築の発案に至った。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反応場を構築する（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。

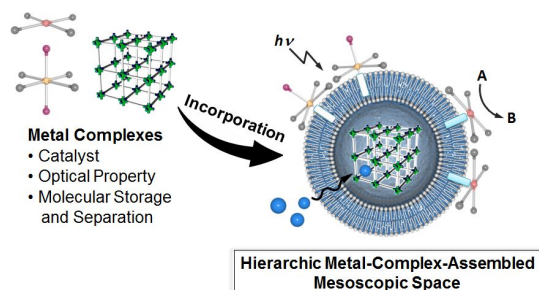


図1 階層的金属錯体集積空間：リポソームの外表面、膜内部、内表面及び内水相に異なる機能性金属錯体を組込んで、個々の機能が連動する高機能な化学反応場を構築する。

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。様々な人工光誘起反応のターゲット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。これまでに、共有結合や架橋配位子を用いた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「高機能な化学反応場」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。

### 3. 研究の方法

本課題では、脂質二重層膜で形成される直径 1 μm サイズのリポソームの外表面、疎水性の膜内部、親水性の内表面及び内水相に異なる多様な機能性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」の制御形成と構造評価を目指して、(1) 親脂質性配位子および金属錯体の合成、(2) 内水相への金属錯体の導入、(3) 膜外表面への金属錯体の導入、(4) リポソーム - 金属錯体複合体の構造評価を推進した。

### 4. 研究成果

#### (1) 親脂質性配位子および金属錯体の合成

図2に示すアルキル長鎖またはコレステロールを導入した膜親和性配位子を合成し、それらを用いて、Ru 錯体を中心に親脂質性金属錯体の合成を進めた。

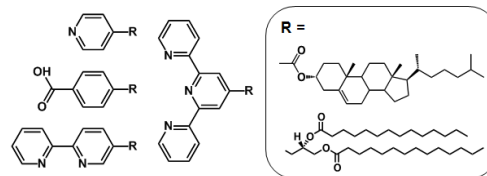


図2 親脂質性配位子の例

エステル化によるコレステロールの配位子への導入、およびリン脂質のアミノ基とスクシニミド基とのカップリングによるアミド結合形成反応を利用したアルキル長鎖の導入、による親脂質性配位子の合成手法を

確立した。

コレステロールを 2,2'-bipyridine に導入した親脂質性配位子 (bpy-cho) を用いた Ru 錯体  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy-cho})(\text{H}_2\text{O})](\text{PF}_6)_2$  (terpy = 2,2';6',2''-terpyridine) については、単結晶 X 線構造解析に成功した。構造解析の結果より、Ru 周りの反応部位がコレステロールとは逆方向に配向しており (図3)、リポソーム外表面に組み込んだ際に、活性中心が膜表面に露出できることが示唆された。

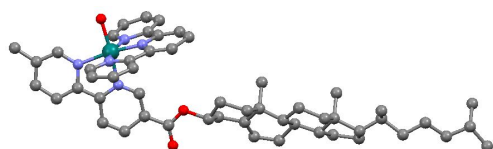


図3  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy-cho})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  の構造

### (2) 内水相への金属錯体の導入

リポソーム作成時に金属錯体を加える直接法、ならびに内側に親水基が向いた逆ミセルを利用する逐次法を検討した。

直接法では、水溶性の  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_3$  を脂質フィルムと水和し凍結融解することで、内水相へ Ru 錯体を導入した。親水部が負電荷をもつリン脂質を用いることで、静電的相互作用により Ru 錯体の内包量が向上した。

逐次法では、水中で安定なプルシアンブルー  $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (PB) を内包したリポソームを合成した。まずは、 $\text{FeCl}_2$  内包逆ミセルと  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  内包逆ミセルをそれぞれミネラルオイル中で作成して融合することで、PB 内包逆ミセルを作成した。次に、オイル相と水相の間にリン脂質の単分子膜を形成し、PB 内包逆ミセルを通過させることで PB 内包リポソームへと変換し、ゲルろ過により精製した。

金属錯体の内包は、共焦点レーザー顕微鏡観察や各種スペクトル測定で確認した。特に PB 内包リポソームでは、粉末 X 線回折および磁気測定からも、その内包を確認した。

### (3) 膜外表面への金属錯体の導入

(1) で合成した親脂質性金属錯体の溶液をリポソームに添加して、リポソーム外表面への直接的な組み込みを試みた。また、脂質の成分比により膜ドメインを制御形成させて、ドメイン構造による機能性分子の集積化も試みた。

親脂質性金属錯体を含む脂質フィルムの

水和し凍結融解することで、膜表面へ金属錯体を導入した。この手法では、外表面および内表面に金属錯体が組み込まれた。親脂質性かつ水溶性の  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-cho})]\text{Cl}_2$  の場合は、この錯体の水溶液を先に調整したリポソームの溶液に加えることで、外表面に導入することができた。この手法を利用して、PB 内包リポソームの外表面への Ru 錯体の組み込みにも成功した。

$[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy-cho})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  を膜表面に組み込んだリポソーム溶液に、酸化剤として硝酸セリウム(IV)アンモニウムを加えると、酸素発生が確認された。この Ru 錯体を単独で使用した場合は、ほとんど触媒活性は見られなかった(図4)。これらの結果より、この Ru 錯体はリポソームとの複合化により水溶性となり、触媒部である Ru 錯体が膜内部に埋もれることなく、 $\text{Ce}^{4+}$  がアクセスして水の酸化反応が進行することが示された。また、Ru 錯体のリンカー部分の長さを変えて、膜表面の触媒の固定位置を変える、リン脂質のヘッドユニットの電荷と構造を変える、PEG 修飾リン脂質や炭化水素鎖の長いリン脂質を用いる、ことで、触媒能を向上させることができた。

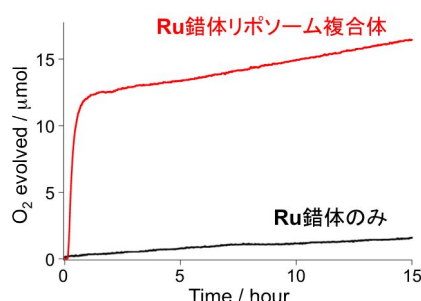


図4  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy-cho})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  の水の酸化反応による酸素発生量

膜ドメイン構造を利用した手法では、膜ドメインが飽和リン脂質とコレステロールに富んだ構造を有していることから、亜鉛プロトポルフィリン錯体 (ZnP) に飽和リン脂質を修飾した親脂質性 ZnP を合成し、リン脂質と水和して凍結融解し、膜ドメイン外表面に ZnP を集積化させた。

金属錯体の組み込みは、共焦点レーザー顕微鏡観察や各種スペクトル測定で確認した。特に膜ドメインを利用した系では、ZnP は膜ドメインに集積化してリポソーム上に不均一に分布していることが確認された。



(4) リポソーム - 金属錯体複合体の構造評価  
 合成したリポソーム - 金属錯体複合体の構造を、SPring-8 におけるナノビーム X 線蛍光分析によるマッピング、NMR-HR-MAS、共焦点レーザー顕微鏡観察、cryo TEM 等を用いて評価した。

Ru 錯体を組み込んだリポソームを用いて、放射光ナノビームを用いた蛍光 X 線分析を行った。図 5 に元素分布のマッピングを示す。求めた空間分解能よりは低かったものの、リポソームのリン脂質の P と Ru の分布が一致しており、複合化を確認できた。

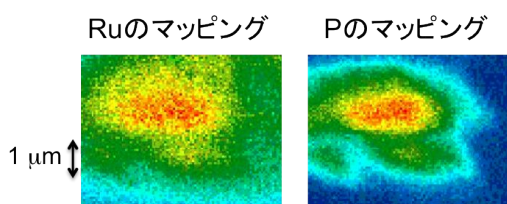


図 5 放射光ナノビームによる、Ru 錯体 - リポソーム複合体の元素マッピング

親脂質性金属錯体  $[\text{Mn}(\text{N})(\text{CN})_4(\text{L})]^{2-}$  ( $\text{L} = 1,4\text{-diazabicyclo}[2,2,2]\text{octane}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ ) を膜表面に組み込んで、さらに  $\text{Mn}^{2+}$  を添加することで、リポソーム外表面に配位高分子  $\text{Mn}[\text{Mn}(\text{N})(\text{CN})_4(\text{L})]$  の層の形成に成功した。NMR-HR-MAS により  $[\text{Mn}(\text{N})(\text{CN})_4(\text{L})]^{2-}$  の膜への組み込み、ならびにリン脂質との相互作用が確認された。また、cryo TEM により、外表面における配位高分子層の形成により、リポソームの外形が変形して多面体ベシクルとなることが確認された(図 6)。

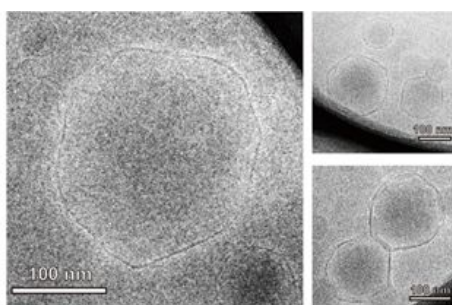


図 6 リポソーム外表面への配位高分子の組み込みにより形成された多面体ベシクルの TEM 画像

以上、親脂質性金属錯体の開発、リポソームの特定部位への金属錯体の複合化と構造評価、ならびに複合化による触媒能の発現に成功した。汎用性のある親脂質性配位

子および金属錯体の合成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金属錯体触媒の開発が期待できる。構造評価についても、放射光ナノビームを用いた測定は前例のないものであったが、測定系を工夫することで測定に成功し、非常に重要な知見が得られた。今後、この階層的金属錯体集積空間を、複数の金属錯体の機能が連動するシステムへと展開するための基盤を確立できた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

K. Kajitani, T. Koshiyama, A. Hori, R. Ohtani, A. Mishima, K. Torikai, M. Ebine, T. Oishi, M. Takata, S. Kitagawa, M. Ohba, Guest Responsivity of a Two-Dimensional Coordination Polymer Incorporating a Cholesterol-Based Co-Ligand, *Dalton Trans.*, 42, 15893-15897 (2013). 査読あり、DOI: 10.1039/C3DT51465J

〔学会発表〕(計 3 1 件)

越山友美、本庄正幸、三島章雄、大場正昭、抗生物質チャネルを利用した金属錯体-リポソーム複合体の創成、口頭発表、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 30 日、名古屋、優秀講演賞(学術)受賞

K. Nakanishi, T. Hatae, T. Koshiyama, M. Ohba, Incorporation of Lipophilic Salen Complexes into Liposomes and Expression of Their Functions、口頭発表、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 30 日、名古屋

M. Ohba, T. Koshiyama, R. Ohtani, A. Mishima, A. Hori, M. Takata, S. Kitagawa, Programmed Functional Space: from Porous Coordination Polymers to Liposome、招待講演、International Symposium on Coordination Programming 2014 (ISCP2014)、2014 年 1 月 20 日、東京

越山友美、本庄正幸、大場正昭、配位高分子によるリポソーム内水相の機能化、口頭発表、錯体化学会第 62 回討論会、2013 年 11 月 4 日、沖縄

T. Koshiyama, M. Ohba, Construction of a Novel Reaction System using Liposome Space、招待講演、International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan、2013 年 9 月 28 日、仙台

越山友美、岡村朋哉、岩田浩輝、中西契太、波多江 達、吉田将己、正岡重行、大場正昭、リポソーム空間への金属錯体

の部位特異的固定化による新規反応場の構築、口頭発表、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 25 日、滋賀  
越山友美、岩田浩輝、波多江 達、岡村朋哉、吉田将己、正岡重行、大場正昭、親脂質性金属錯体とリポソームによる酸素発生触媒場の構築、口頭発表、錯体化学会第 62 回討論会、2012 年 9 月 23 日、富山  
越山友美、岩田浩輝、波多江達、岡村朋哉、吉田将己、正岡重行、大場正昭、リポソームを利用した酸素発生触媒場の構築、口頭発表、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 8 日、札幌

〔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