

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620119

研究課題名(和文)細胞内に物理的摂動を与える分子の作成

研究課題名(英文)Design and synthesis of a molecular providing physical perturbation on living cell

研究代表者

塩路 幸生 (SHIOJI, Kosei)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：80291839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：光を照射することで物理的な動きを誘起する物質の光化学的效果は、近年注目されている。中でも染料であるアゾ化合物への紫外光照射による光異性化は良く知られている。アゾ化合物のうち可視光のみで光異性化をおこす化合物に蛍光色素と、細胞膜透過性ならびに細胞内微小器官への局在性を向上させるためにホスホニウム塩を導入した化合物を合成し、その物性評価と細胞内動態の観察を行った。

研究成果の概要(英文)：Photomechanical effects of photochromic materials, which induce mechanical motions upon photoirradiation, have attracted a great deal of attention in recent years. Azo compounds are famous as dye and known for its photoisomerization by irradiation of UV light. We have synthesized an azo compound, having triphenylphosphonium salt to improve the subcellular localization ability, BODIPY as a fluorophore. The azo compound photoisomerized by visible light only. Furthermore, we observed the changes in cell morphological by effect of photoirradiation when introducing the compound into living cells.

研究分野：有機化学

キーワード：光異性化 アゾベンゼン 細胞 ホスホニウム塩

1. 研究開始当初の背景

細胞内微小器官はそれぞれの器官が独立に機能しているわけではなく、互いにコンタクトを取りながら協奏的に相互作用することで生命の恒常性を維持している。たとえば、ミトコンドリアは、ATPの形でエネルギーを産生するとともに細胞内のカルシウムイオン濃度の緩衝作用をもつ微小器官であり、多くの細胞内過程の中心的役割を果たしている。このミトコンドリアは、融合と分裂の間のバランスと細胞内のミトコンドリアの位置どりによって調節を受け、さまざまな過程を駆動するのに十分な局所濃度のATPを供給している(J. F. Foley, *Sci. Signal.*, **2011**, 4, ec99., M. Hoth *et al.*, *The EMBO Journal*, **2011**, 30, 1187-1189.)。また、心筋細胞においてはミトコンドリアと筋小胞体のひとつであるJSR (junctional sarcoplasmic reticulum)が約50 nmの間隙で隣接し、それがカルシウムイオン濃度の変化を感知していることが示唆されており、そのシミュレーション実験も行われている(A. Hatano *et al.*, *生体医工学*, **2011**, 49, 829-835.)。ミトコンドリアに限らずどの細胞内微小器官においてもこのような空間的配置に対する秩序は存在すると考えられる。しかしながら、時間・空間的解像度の問題から、細胞内の空間的配置の重要性を直接的に証明する手立ては現在のところ存在し得ない。このような細胞の空間的配置の意味を知るためには、薬物による化学的刺激ではなく、分子生物学的手法による過剰発現やノックアウトでもない。まさしく、物理的摂動を加え細胞内微小器官を直接移動させることができれば細胞内の空間的配置が関与する事象に対して飛躍的な研究成果が得られる。

これまでに我々は、細胞内微小器官のひとつであるミトコンドリアに局在化し、ミトコンドリア内で産生する脂質過酸化産物のみを捕捉する蛍光プローブを合成している(K. Shioji *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 3911-3915.)。その蛍光プローブを用いることで、細胞内に侵入する抗酸化剤の抗酸化能として、細胞内での移動能が重要な要因を占める結果となった。すなわち、細胞内での分子の挙動は細胞各所において均一な濃度で均一な運動性をもって存在するのではなく、その周辺環境に応じた分子状態と濃度で存在するといえる。これらの、仮定を実証するためには細胞内の微小器官あるいは細胞質自体に、攪拌をイメージさせるような物理的摂動を加える必要がある。

近年、アゾベンゼン骨格を有する分子の非晶質プレートに平面偏光を照射するとアゾ基のシストランス異性化に伴いナノサイズあるいはそれ以上の大きな粒子をも一定方向に移動させることができるほどの物理的力が生じることを中野らは見出した(H. Nakano *et al.* *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 3702-3704.)。このことは、適度な分子間力をもって局在あるいは凝集する分子を設

計・選択すれば分子内の異性化のような小さな駆動力でも大きな力に変換できることを意味している。細胞内にこの骨格を有する分子を導入し、局在あるいは凝集させ、この駆動力を利用すれば、細胞に与える影響が少ない波長の光照射をもって細胞に物理的摂動を加えることが可能であると考えた。

2. 研究の目的

細胞は核や小胞体、ミトコンドリアなどの微小器官の集合であり、それらは脂質膜により他の微小器官と隔てられている自己組織化したナノ集合体の集まりと考えることができる。これらは、一見、無秩序に配置されているように見られるものの、細胞内での損傷に対する修復の迅速さや、シグナル情報伝達の正確さを鑑みると、微小器官の集合体である細胞の中でその微小器官の存在する位置、あるいはタンパク質の遊走する場所に意味を考へることを禁じえない。本研究では、細胞内の特定の微小器官に対して、薬物による化学的刺激ではなく、分子生物学的手法による過剰発現やノックアウトでもない、アゾベンゼン骨格の光異性化を利用した物理的摂動を加えることのできる分子の作成を行う。

3. 研究の方法

アゾベンゼンやその誘導体は染料として知られる一方、光照射による可逆的な構造異性化を生じる代表的なフォトクロミック化合物として知られている(Fig.1)。通常は熱力学的に安定なトランス体で存在するアゾベンゼンは、紫外光照射にて π - π *遷移によるトランス体からシス体へと異性化を生じる。対照的に可視光照射にて n - π *遷移によるシス体からトランス体への光異性化を生じる。

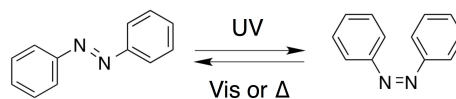


Fig.1 Photo-isomerization of azobenzene.

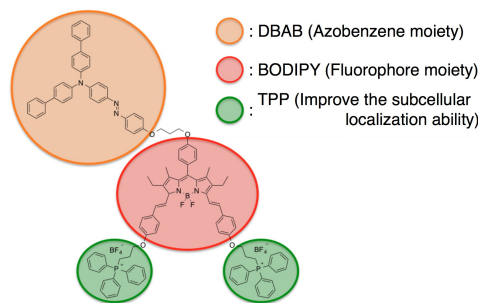


Fig.2 Molecular structure of DBT

本研究ではこの骨格を利用した細胞内光応答

性分子として、細胞内局在能を向上させるために TPP (triphenylphosphonium salt) と、細胞内挙動を可視化するための蛍光団として BODIPY をそれぞれ分子内に有する DBAB-BODIPY-TPP (Fig. 2) を設計した。通常の BODIPY の励起光は DBAB の異性化波長と重なるため、BODIPY に共役側鎖を結合させる事によって、励起蛍光波長を意図的にレッドシフトさせている。また、赤色蛍光を発することで、他の細胞染色剤と干渉することも防いでいる。この化合物を細胞に導入し、光異性化によって細胞内部の環境を乱すことによる影響の観察を行った。

4. 研究成果

最終的に DBT は 11 段階、総収率 0.34 % で合成に成功した。DBT の紫外可視スペクトルでは、450 nm 付近に *trans*-DBAB 由来の強い π - π^* 遷移吸収帯と、550 nm 付近に弱い n - π^* 遷移吸収帯が観測された。450 nm の光を照射することで 450 nm 付近の吸収帯の減少と 550 nm 付近の吸収帯の僅かな増加が観測され、*cis*-DBAB への光異性化を確認できた (Fig. 3)。550 nm の光照射により *trans*-DBAB への異性化が生じ、この光異性化は複数回確認された。BODIPY 由来の極大蛍光は 667 cm^{-1} のストークシフトを伴って 686 nm に観測された (Fig. 3)。

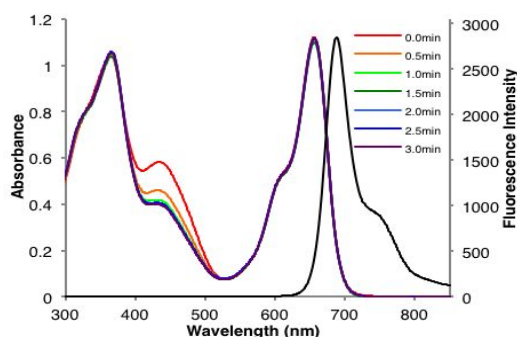


Fig. 3 UV/Vis spectra and changes of DBT solution in DMSO upon irradiation with 450 nm light for 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 min (color line). Fluorescence spectrum is black line ($\lambda_{\text{ex}} = 655\text{ nm}$).

続いて人肝臓がん由来の HepG2 細胞を用いて DBT とリソソーム染色剤である LysoTracker[®]Green との二重染色実験を行った。二重染色法は同一の生体試料に、蛍光波長の重複しない細胞染色剤と共に導入し、蛍光顕微鏡の異なるバンドパスフィルターを通して観察することで、目的試料の局在部位を特定する手法である。DBT および LysoTracker[®] Green の蛍光はそれぞれ赤色、緑色であり、お互いの蛍光波長が離れているため、二重染色が可能である。DBT 5 μM , LysoTracker[®] Green 25 nM, 2 % DMSO 溶液をロード溶液として作成し、細胞導入後蛍光顕微鏡にて観察を行った。蛍光観察フィルターには TR ($\lambda_{\text{ex}} = 562, \lambda_{\text{em}} = 624\text{ (nm)}$),

および FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 670, \lambda_{\text{em}} = 514\text{ (nm)}$) を使用した。重ね合わせ画像より、DBT の赤色蛍光部位および LysoTracker[®] Green の緑色蛍光部位が一致していることから、DBT が細胞内微小器官の一つであるリソソームに局在化していることが示唆された。DBT の細胞内への取込が確認できたので、細胞内光異性化実験を行った。光源には DBT の異性化波長である 473 nm のレーザー光を使用したところ、結果的に照射時間に伴い細胞全体がダメージを受けたような形態変化が観測された。初めの状態を 0 分とし、最終的に 20 分照射後ではダメージはさらに大きくなっていた。大きく形態変化を生じた細胞に死細胞染色剤であるトリパンブルー染色を行ったところ、陽性を示し、細胞死を引き起こしていることが分かった。 (Fig. 4)

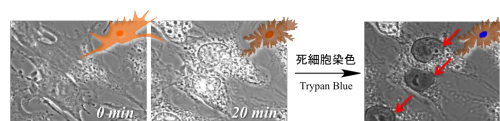


Fig. 4 Continuous irradiation 473 nm polarized laser on DBT in HepG2 cell.

次に、この細胞死の原因について、検討を行った。DBT は分子内に蛍光基 BODIPY を有している。BODIPY は酸素雰囲気下で光照射を行うと一重項酸素を発生することが知られている。実際に、酸素雰囲気下の溶液中で DBT に BODIPY の励起波長である 525 nm の光照射を行ったところ、BODIPY に由来する吸収が変化すると同時に、蛍光強度の減衰が確認された。この現象は、光照射により発生した一重項酸素が BODIPY と反応し、BODIPY の構造が分解したためであると考えられる。一方 DBAB の光異性化波長である 473 nm の光を同一条件で行っても BODIPY 部位に由来する蛍光の減衰は観測されない。同様に細胞内で、DBT を導入した細胞にそれぞれの波長の光を照射し、蛍光強度の変化を観測したところ、DBAB の光異性化波長を照射しても BODIPY の蛍光強度の減衰は観測されない事がわかった。これにより、リソソームに局在化している DBT が異性化波長照射によって光異性化に反応し、細胞内部を動的に乱すことで細胞形態の変化を生じさせ、細胞死を引き起こすことができたと考えられる。DBT が細胞内にどのように物理的摂動を加えたのかは今後更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

N. Nagahora, T. Ogawa, M. Honda, M. Fujii, H. Tokumaru, T. Sasamori, K. Shioji, K. Okuma “Syntheses, Structures, and Properties of Biphosphinines Tethered Aromatic π -System” *Chem. Lett.* **44** (2015) 492-494, DOI: org/10.1246/cl.150103. 査読有

K. Okuma, T. Koga, S. Ozaki, Y. Suzuki, K.

Horigami, N. Nagahora, K. Shioji, M. Fukuda and M. Deshimaru "One-pot synthesis of dibenzo[b,h][1,6]naphthyridines from 2-acetylaminobenzaldehyde: application to a fluorescent DNA-binding compound" *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 15525-15528, DOI: 10.1039/C4CC07807A. 査読有

S. Toyofuku, H. Morita, S. Ando, K. Okuma, N. Nagahora, Y. Aizawa, H. Nakagawa, K. Shioji, "Synthesis and Analysis of the Intracellular Molecular Dynamics of a Novel Fluorescent Probe Having a Myristoylated Peptide" *Peptide Science* **2014** 289-292. 査読有

K. Okuma, K. Hirano, Y. Tanabe, R. Itoyama, A. Miura, N. Nagahora, K. Shioji, "Novel One-pot Synthesis of Polysubstituted Isocoumarins from Arynes and Trifluoroacetylated β -Diketones", *Chem. Lett.* **43** (2014) 492-494. DOI: org/10.1246/cl.131112. 査読有

N. Nagahora, T. Wasano, K. Nozaki, T. Ogawa, S. Nishijima, D. Motomatsu, K. Shioji and K. Okuma, "The First Formation of (1Z)-1-Alkylidene-1H-isobenzofuranium Amides and 1H-Inden-1-ones: Acid-Promoted 5-exo Cyclization and Hydration/Aldol Condensation Reactions of o-Ethynylbenzophenones", *European J. Org. Chem.* **2014**, 1423-1430. DOI: 10.1002/ejoc.201301599. 査読有

S. Yasui, Y. Ogawa, K. Shioji, M. Mishima, S. Yamazaki "Dramatic Effect of Atmosphere on Product Distribution from Steady-State Photolysis of Triarylphosphines" *Bull. Chem. Soc. Jap.* **87** (2014) 988-996. DOI: org/10.1246/bcsj.20140100. 査読有

S. Yasui, Y. Ogawa, K. Shioji, S. Yamazaki "Atmosphere-controlled Dual Reactivity of Triarylphosphine in the Photoexcited State: P-C Bond Cleavage vs. Electron Transfer" *Chem. Lett.* **42** (2013) 1478-1480. DOI: org/10.1246/cl.130748. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

長洞記嘉、徳丸裕士、塩路幸生、大熊健太郎、ハロゲンおよびスルホン酸エステル置換基を有するホスフィン類の合成、第 95 春季年会、日本大学(千葉県、船橋市) 2015 年 3 月 26 日~3 月 29 日

大熊健太郎、堀上健太、塩路幸生、長洞記嘉、キラルな 4,4'-アリール-1,1'-ビ-2-ナフトール誘導体の合成、第 95 春季年会、日本大学(千葉県、船橋市) 2015 年 3 月 26 日~3 月 29 日

尾崎雅司、中川裕之、長洞記嘉、大熊健太郎、塩路幸生、細胞内分子モーターを指向したアゾベンゼン誘導体の合成とその光特性、日本化学会第 95 春季年会、日本大学(千葉県、船橋市) 2015 年 3 月 26 日~3 月 29 日

塩路幸生、豊福修平、安東勢津子、長洞記嘉、大熊健太郎、中川裕之、相澤康則、脂質修飾を受けるペプチドの細胞内動態解析プローブの合成と分析、日本化学会 第 95 春季年会、日本大学(千葉県、船橋市) 2015 年 3 月 26 日~3 月 29 日

尾崎雅司、長洞記嘉、大熊健太郎、塩路幸生、分子内にホスホニウム塩とアゾベンゼンを有する化合物の合成とその光特性、第 41 回有機典型元素化学討論会、宇部市文化会館(山口県、宇部市) 2014 年 11 月 27 日~11 月 29 日

Shuhei Toyofuku, Haruka Morita, Setsuko Ando, Kentaro Okuma, Noriyoshi Nagahora, Yasunori Aizawa, Hiroyuki Nakagawa, Kosei Shioji, Synthesis and analysis of intracellular molecular dynamics of novel fluorescent probe having myristoylated peptide, 第 51 回ペプチド討論会 徳島大学(徳島県、徳島市) 2014 年 10 月 22 日~10 月 24 日

田邊祐紀子、長洞記嘉、大熊健太郎、塩路幸生、アラインとジカルボニル化合物を用いた 2,3-ベンゾジアゼピン誘導体の合成、日本化学会 第 94 春季年会、名古屋大学(愛知県、名古屋市) 2014 年 3 月 27 日~3 月 30 日

長洞記嘉、藤井元美、大熊健太郎、塩路幸生、2-ベンゾチオおよび 2-ベンゾセレのピリリウム塩類縁体の合成、日本化学会 第 94 春季年会、名古屋大学(愛知県、名古屋市) 2014 年 3 月 27 日~3 月 30 日

長洞記嘉、小川環樹、大熊健太郎、塩路幸生、共役系スペーサーで連結したホスフィン二量体の合成と性質の解明、日本化学会 第 94 春季年会、名古屋大学(愛知県、名古屋市) 2014 年 3 月 27 日~3 月 30 日

松井宏幸、長洞記嘉、大熊健太郎、塩路幸生、チオフェンコンと求電子試薬との反応: Wagner-Meerwein 転位、日本化学会 第 94 春季年会、名古屋大学(愛知県、名古屋市) 2014 年 3 月 27 日~3 月 30 日

揚村 雄、中川裕之、長洞記嘉、大熊健太郎、塩路幸生、過酸化水素を捕捉する DNA 局在化蛍光プローブ第 40 回有機典型元素化学討論会、近畿大学(大阪府、東大阪市) 2013 年 12 月 5 日~12 月 7 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩路 幸生 (SHIOJI Kosei)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：80291839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし