

# 刺激応答性交互両親媒性マルチブロック分子の創製

## Development of stimuli-responsive amphiphilic alternating multiblock molecules

(高分子学会推薦)

代表研究者 東京工業大学 金原 数

Tokyo Institute of Technology

Kazushi KINBARA

As simple structural mimics of MTM proteins, we developed alternating amphiphilic multiblock molecules consisting of linearly connected hydrophilic and hydrophobic units, where chiral units introduced into the hydrophobic unit allow for visualization of changes in their conformation and mode of assembly in lipid bilayers. Indeed, an amphiphile consisting of five blocks, where the central hydrophobic unit bears a flexible chiral aliphatic part with aromatic units, was prepared. At the junction point between the aromatic and octaethylene glycol units, phosphate groups are inserted as ligand-binding sites capturing aromatic amines through electrostatic, hydrogen-bonding and aromatic interactions. At the both ends of the molecule, hydrophobic triisopropylsilyl (TIPS) groups are appended. Interestingly, a flexible hydrophobic component leads to the formation of a supramolecular half-channel. Microscopic observation, spectroscopic study and Langmuir-Blodgett assay indicate that the central and terminal hydrophobic parts are embedded in a bilayer membrane so that the molecule adopts a “M-shape” conformation with intramolecular aromatic stacking. Interestingly, this molecule embedded in a membrane interacts with 2-phenethyl amine (PA), thereby changing the conformation around the aromatic units so as to initiate the ion transportation.

### 研究目的

細胞やオルガネラを囲んでいる生体膜では、生命活動を維持するための様々な活動が行われている。例えば、細胞は光、熱、振動、湿度、磁場、固さ、臭いなどの多種多様な刺激を感受して、それらに対して適切な応答を示す刺激応答性を有しているが、このような外部刺激に対する生体センサー分子の多くは生体膜中に存在する。また、膜内外でイオンに濃度差がある場合、それはそのまま電気化学ポテンシャルを生み出すため、光合成に代表される光エネルギー変換、イオン勾配を利用した物質生産など、エネルギーのやりとりを伴う様々な機能も膜を介して行なわれる。生体のこのような環境感受性と、それと連動した物質・情報・エネルギー変換の機能を化学構造を精密に制御した人工分子により実現することができれば、既存の材料では達成されていない環境刺激応答性やエネルギー変換特性を有する次世代機能物質の開発に直結するため、その意義は極めて大き

いと考えられる。本研究課題は、このような膜タンパク質を模倣した刺激応答性分子を構築することを目的に、種々検討を行った<sup>1</sup>。

膜タンパクの主要な構造モチーフには、安定で大きな孔を形成するのに有利な $\beta$ -バレル型構造と、刺激応答性を付与するのに有利な複数回膜貫通型構造 (MTM 構造, Fig. 1) が知られている。MTM 構造は複数の疎水部が二分子膜内で会合することで様々な機能を発現しているが、構造に柔軟性があるため、特に刺激応答性を中心とした動的機能を付与するために有利な構造と思われる。しかしながら、これま

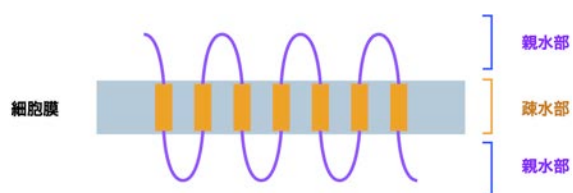


Fig. 1. Schematic image of MTM structure.

で MTM 構造を模した分子の報告例はなかった。そこで、MTM 構造を基本にした分子設計、すなわち親水部と疎水部が交互に配列したマルチブロック構造を有する分子が、二分子膜中でおりたたみ構造を形成し、膜タンパク質類似の刺激応答性を有する機能分子としてはたらくのではないかと考えた。

## 研究経過

我々はこれまでに、疎水部としてトラン骨格、親水部として単分散オリゴエチレングリコールユニットを交互に複数回連結したマルチブロック構造を基本に、まず最初のモデル化合物 (**4mer**) を合成した (Fig. 2)。トラン骨格は分子間でスタックすることにより蛍光がシフトするが、これを利用して二分子膜に導入した際の挙動を検討したところ、二分子膜中では濃度にほとんど依存せずに疎水部の会合が保たれていることを見出している<sup>2</sup>。さらに、膜タンパク質の最も重要な機能の一つであるイ

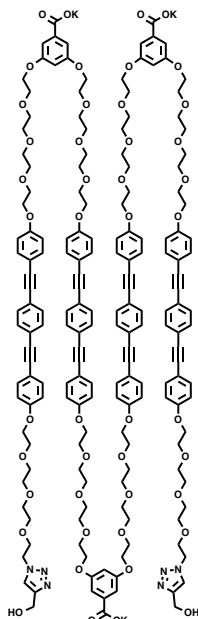


Fig. 2. **4mer**.

オン透過性に着目し、**4mer** をベシクルに導入した際のイオン透過性を検討した。その結果、2 分子膜中に **4mer** を含むベシクルは  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  などのカチオン透過性を有することが分かった。形成されたイオンチャンネルの構造を Hill 解析により調べたところ、**4mer** が形成するイオンチャンネルには 4 分子の **4mer** が含まれることが示唆された。**4mer** の分子設

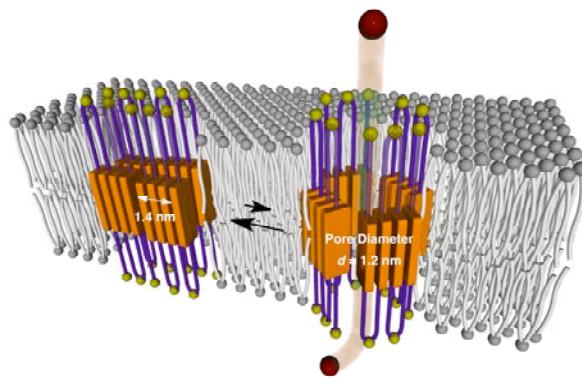


Fig. 3. Schematic image of ion channel.

計の際には、この分子が単独でイオンチャンネルを形成するものと期待していたが、4 分子が二分子膜中で会合して超分子集合体を形成することは予想外の結果であった。さらに詳細な解析の結果、ここで形成されたイオンチャンネルの内

径はおよそ 0.53 nm であることが分かった。単純に **4mer** の疎水部がスタックした場合の厚みはおよそ 1.4 nm であるの見積もられることから、歪んだ菱形のような構造のイオンチャンネルが形成されたのではないかと推察している (Fig. 3)<sup>3</sup>。

これらの結果を受け、刺激応答性として、リガンドの添加にตอบสนองしてイオンチャンネルの開閉を起こすようなリガンド応答性チャンネルが構築できないかと考えた。まず、マルチブロック構造中にゲスト分子との相互作用部位として、疎水部中に共役した芳香環、親水部にリン酸基を導入した分子を設計した。ここで、疎水部の芳香環部の間にキラリティーを導入することにより、分光学的手法により二分子膜中でのコンフォメーションや会合状態を解析できるようにした (Fig. 4)。具体的なキラリ部位としては、できるだけ単純な飽和脂肪鎖骨格を有する部位を用いることにした。

この分子の疎水部の長さは、ちょうど脂質二分子膜の疎水部の厚さと同様になるように分子設計した。しかしながら、大変興味深いことに、飽和脂肪鎖部分が柔軟性を有していることから、二分子膜中では分子が期待したような膜貫通構造で

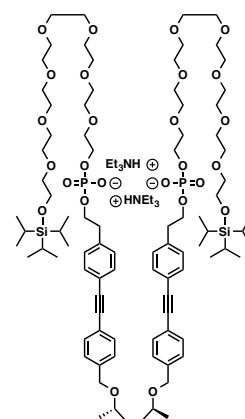


Fig. 4 Design of Ligand-responsive molecule.

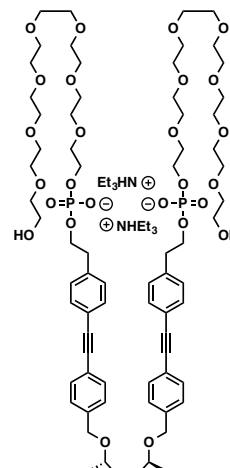


Fig. 5 Triblock molecule.

はなく, Fig. 4 に示したようなU字型に曲がったコンフォメーションをとることが強く示唆された。また, 末端が水酸基になっているトリブロック分子 (Fig. 5) を合成し, 末端の疎水部の有無によるコンフォメーションの違いなどを詳細に検討した。その結果, 末端が疎水的な TIPS 基の場合, TIPS 基は二分子膜の疎水部に埋め込まれており, ちょうど二分子膜中でアンカーのような役割を果たしていることも示唆された。

このU字型分子を単独で含む二分子膜はイオン透過性をほとんど示さなかった。これに対し, ゲストとして1-フェニルエチルアミン (PA) を加えた場合, 興味深い応答性を示した。まず, 二分子膜の片側から PA を加えたところ, イオン透過性に目立った変化は見られなかった。さらにこの状態で二分子膜の反対側に PA を加えたところ, イオン透過性を示すようになることが分かった。先に述べたように, この分子は, 二分子膜中で膜貫通型構造をとらず, U字型のコンフォメーションをとっていると考えられる。このため, この分子の分子長は二分子膜の半分程度であると予想される。ここで, 二分子膜の片側からゲスト分子 (PA) を加えた場合, PA は二分子膜を透過できないため, 同じ側に含まれるU字型分子と相互作用することになる。その結果, ゲスト分子の添加により二分子膜中の片側で, U字型分子と PA がハーフチャネルを形成したと考えられる。この状態で二分膜の反対側から PA を添加すると, 同様に反対側でもハーフチャネルが形成されることになる。形成されたハーフチャネルが二分子膜の上下で会合することで, 最終的に分子膜を貫通するイオンチャネルが形成され, イオンが二分子膜を透過できるようになってのではないかと考えている。

ここで形成されたイオンチャネルは, U字型分子と PA の会合により生じていることから, 分子の解離にともない開閉していると考えられる。実際, 観測されたイオン電流は常に一定ではなく, イオンチャネルが会合解離の平衡状態にあることが強く示唆された。また, 今回の系でイオンチャネルが形成において, ゲスト分子とU字型分子の分子間相互作用が最も重要であると考えられることから, 添加したゲスト分子と相互作用する他の宿主分子を添加することで, イオンチャネルを解離させることが出来ると予想された。実際, この系に1-フェニルエチルアミンと錯形成することが知られている $\beta$ -シク

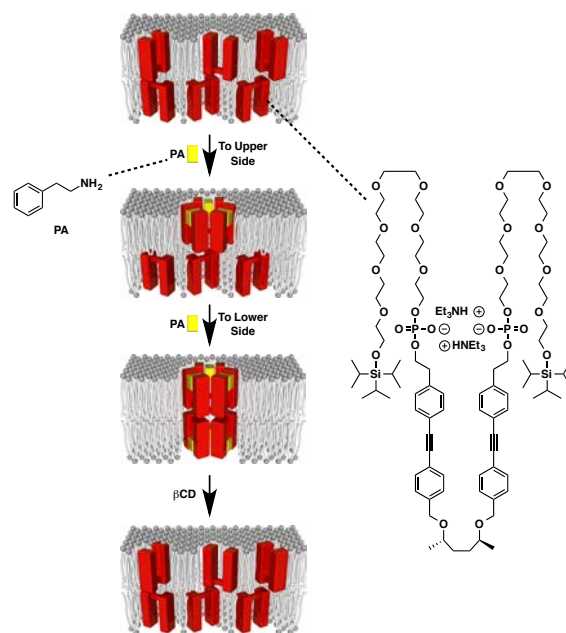


Fig. 6. Reversible control of ion permeation by addition of ligand PA and  $\beta$ -CD.

ロデキストリンを加えたところ, イオン透過性が消失することが分かった。また, この場合には, 二分子膜の片側に $\beta$ -シクロデキストリンを加えた段階で, イオン透過はほとんど見られなくなった。これは, 二分子膜の片側でU字型分子と PA が作るハーフチャネルが解離することで, 膜貫通構造を形成できなくなったためであると考えられる。このように, リガンドとリガンド親和性を有する宿主を加えることで, 可逆的に二分子膜を介したイオン透過性を制御できることが分かった。

## 考察

ここでは, 親水性部位と疎水性部位を交互に配列したマルチブロック両親媒性分子が, 二分子膜中でリガンド応答性イオンチャネルを形成することに成功した。すなわち膜タンパク質の類似構造の柔軟性により, 刺激応答性を獲得できたものと考えられる。この分子設計の拡張性は広いため, 様々な応答性を設計することが可能である。実際, 今回得られた結果をもとに, より剛直な疎水部を有する分子を設計し, そのリガンド応答性とイオン透過性についても検討している。その結果, 疎水部を剛直にすることで, 二分子膜中での分子の折れ曲がり防止し, 単独の分子で膜貫通型構造をとれるようになった。期待通りイオン透過性を示したことから, さらに, リ

ガンド応答性について検討を加えている。

複数回膜貫通型構造をとる多回膜貫通型タンパク質は、7回膜貫通型、13回膜貫通型など、様々な種類が知られており、その機能も様々である。今回は繰り返し長が比較的短い分子を用いた結果、分子の会合による超分子型のイオンチャネルの構築に成功した。今後はより繰り返し数の多い分子を作ること、単分子ではたらくイオンチャネルの構築を行っていきたいと考えている。

## 参考文献

1. T. Muraoka, Kazushi Kinbara, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 2667–2678.
2. T. Muraoka, T. Shima, T. Hamada, M. Morita, M. Takagi, K. Kinbara, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 194–196.
3. T. Muraoka, T. Shima, T. Hamada, M. Morita, M. Takagi, K. V. Tabata, H. Noji, K. Kinbara, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 19788–19794.
4. T. Muraoka, T. Endo, K. V. Tabata, H. Noji, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, R. Li, K. Kinbara, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 15584–15595.

## 研究の発表

口頭発表

1. 金原 数, 人工機動分子の合成と機能評価, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月
2. 金原 数, 生体刺激に応答する膜タンパク質模倣化合物の開発, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月
3. 村岡 貴博・金原 数, マルチブロック化合物の

刺激応答性, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月

4. 片岡 拓也・村岡 貴博・金原 数, ポリシラン骨格含有分子の開発と脂質集合体中での分光学的特性, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月
5. 加藤 真帆・村岡 貴博・金原 数, ステロイド含有交互両親媒性分子の開発, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月
6. 加藤真帆・村岡貴博・金原 数, ステロイド含有交互両親媒性分子の開発, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 10 月
7. 鍋谷光太・村岡貴博・金原 数, 大環状交互両親媒性化合物の開発と熱物性解析, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 10 月
8. 片岡拓也・村岡貴博・金原 数, ポリシラン骨格含有分子の開発と脂質集合体中での分光学的特性, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 10 月
9. Maho Kato, Takahiro Muraoka and Kazushi Kinbara, *Synthesis and Functions of Multi-block Oligomers with Steroids*, IPC2016, 2016 年 12 月