

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
プロジェクト研究（重点領域・推進プロジェクト研究）
2014年度研究【経過・成果】報告書

研究代表者	所属部局・職		氏名			
	理学部・教授		常盤 広明 印			
研究課題	フォトクロミックバイオプローブの合理的設計と新機能創製					
研究組織	所属研究機関・部局・職		氏名			
	立教大学・未来分子研究センター・副センター長 立教大学・理学部・准教授 立教大学・理学部・教授 立教大学・理学部・教授 立教大学・理学部・教授 国立感染症研究所・ウイルス3部・部長 広島国際大学・薬学部・准教授 立教大学大学院・薬品化学研究所・教授 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程 立教大学大学院・理学研究科・博士前期課程		入江 正浩 森本 正和 木下 勉彦 岡 敏 後藤 聡 藤田 誠 竹田 潔 池田 宗 大坪 忠 吹政 可 津 未 細 拓 石 梨 市 智 川 浩 崎 航 平 野 碧 宇 碧 田 正 留 治 稲 徹 李 幸 野 勲 中 佑 藤 香 小 侑 林 愛 伊 直 東 人			
研究期間	2014 年度		～ 2016 年度		年度	
研究経費 (上段：支出金額) (下段：採択金額)	2014 年度	2015 年度	2016 年度	総計		
	14,999,994 円	15,000,000 円	15,000,000 円	1,499,994 円 45,000,000 円		

研究の概要 (200～300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

本プロジェクトは、「フォトクロミック分子材料」と「生命理学的バイオプローブ」とを有機的に融合することにより、「フォトクロミックプローブの合理的設計開発と新機能創成」という統合化新領域の確立を目的とする。従来までのフォトクロミック分子は、各種デバイス材料などさまざま領域で利用されてきたが、その水溶性の低さから生体系への適用には限りがあった。その一方で、近年のバイオプローブを用いたイメージング技術革新には目覚ましいものがあり、基礎生物学的な利用から臨床応用まで幅広く用いられている。そこで本プロジェクトでは、フォトクロミックバイオプローブを開発し、ウイルス、卵細胞などの生体系へ応用する。さらには、超高解像度顕微鏡への応用を目指す。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[フォトクロミック分子] [バイオプローブ] [多次元化]

研究【経過・成果】の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

本立教 SFR 重点プロジェクトでは、本学を拠点とした新学術領域プロジェクト研究や科研費基盤 (S) などの多年度に渡る外部大型プロジェクト申請に向けた基盤整備を目的として、バイオイメージングに適用可能な**高性能フォトクロミックバイオプローブ**の創出を目指して、**高精度理論計算**に基づく合理的な設計開発戦略の下、

- i) 「蛍光量子収率・光反応量子収率の精密制御」
- ii) 「可視光応答性の付与」
- iii) 「水溶性・生体認識能の付与」

の各項目について、

合理的設計、戦略立案： 常盤、入江 (学内)、池田 (学外)

光物性計測測定： 入江、森本 (ともに学内)

化学合成： 池田、大坪、津吹 (すべて学外)

生体システムへの適用： 木下、岡、後藤 (学内) および 竹田 (学外)

の各グループ内およびグループ間の領域横断型プロジェクト研究を展開した。特に、最終的なアウトプットとなる実際の生体システムへの応用に関しては、学内の3名のグループによる細胞および各種オルガネラへの応用に加えて、国立感染研の竹田の参画により各種ウイルスへの応用展開も図った。一般にフォトクロミズムとは、光照射により異性化反応が起こり、色が可逆的に変化する現象のことであり、熱で戻り反応が起こる T 型と、熱で戻り反応が起こらない P 型の二種類に分類されている。その中でも特に、ジアリールエテンは、光の照射のみで異性化反応が進む P 型に属し、熱安定性、繰り返し耐久性、光応答性に優れているため、光スイッチメモリーや光学デバイスへの「物理、化学領域」における応用研究が多数なされてきた。ジアリールエテンはその末端の修飾部位へ様々な置換基を導入することによって、その物性を容易にコントロールできる。そこで本申請プロジェクトでは、簡便な化学的合成法で各種置換基を導入できる新規ジアリールエテンを合理的に設計開発し、「バイオプローブとしての生命理学系への応用」を行った。ジアリールエテンをバイオプローブとして応用するためには、水に溶けることが必須であるが、従来までのジアリールエテンは、一般的に水には溶解せず、水中ではフォトクロミズムを示さなかった。そこで、ジアリールエテンに水溶性を付与するために、標的の生体分子に影響を及ぼしにくい非イオン性置換基として、糖置換基を導入した。もしジアリールエテンをバイオプローブとして利用できれば、対象生体系への添加物質は単一で済む。また染色によって色を区別するという点では、多色に発色するジアリールエテンがより有用である。さらに、光照射による完全消光が可能であれば、可視光の回折限界を超えた超解像顕微鏡への利用も可能となる。非接触光応答による蛍光スイッチング可能な水溶性ジアリールエテンを設計開発し、実際のウイルス、卵細胞、および各種オルガネラなどの生体系への応用を目指した。

上記の通り実際の本プロジェクトの主眼は、プロジェクトの学内参画メンバーである入江が中心となって今まで世界を牽引してきたフォトクロミック分子技術を化学・物理以外の領域、すなわち「**生命理学領域**」へ応用展開することにある。そのために、本申請プロジェクトでは、「理学基礎技術が学術領域のパラダイムシフトを引き起こす」を基礎理念として、生命理学領域において、独自の研究技術を有する学内の木下、岡、後藤、さらには学外から竹田の参画により、化学・生命理学という異分野に跨る広領域で利用可能な洗練された技術の開発発展を狙った。しかし、残念ながら我が国では、「生命理学」と「化学」は異なる学問体系として独自に発展してきたため、基礎化学と生命理学との接点はあまりなく、本学でも今までは学内の小さな共同研究レベルに留まっていた。それに対して本申請プロジェクトでは、初年度ながら化学合成されたジアリールエテン分子を実際に種々の生命系へ応用することにより、国内外のさまざまな学会にて発表、発信することができた。また、本プロジェクトの開始早々において、脂溶性ビタミンアナログ開発の世界的権威であるスペインの Prof. Antonio Mourino のグループから、ガンの中性子線照射療法に適用可能な新規アナログおよびパーシャルアゴニスト開発に携わっていた Rocio Garcia を招聘した。彼女が開発合成した核内受容体アナログの生体内バイオプローブとしての可能性について検討することで、今後の分子設計指針を得ることができた。これは、本プロジェクト研究が、第一線級の研究者との「出会いの場」としての役割を果たし、教員だけでなく本学大学院生にも貴重な機会となった好例である。また、入江によって開発されたフォトクロミック分子について、その放射能簡易測定への応用を特許申請した。このように本申請プロジェクトでは、プロジェクト内の成果は基礎学術的な発表に留まらず、臨床応用や薬物候補化合物としての利用など、社会へ直接還元できる形へも展開していく。さらには、真のグローバル化に耐えうる若手研究者を育成するために、初年度から、ポルトガル、スペイン、アメリカ (Asilomar, Honolulu) などにおける国際会議での大学院学生の発表を支援し、また、スロバキア、スペインの海外共同研究先への短期滞在支援も行った。

研究【経過・成果】の概要 つづき

それぞれ研究をすすめている i) ii) については、フォトクロミックバイオプローブの中核を担うジアリールエテン分子の機能改質を目的となっているが、初年度は特に化学合成の分野を中心に積極的に展開し、種々の分子の設計合成開発を行うことに成功し、各種学会や論文などに多数発表した。これまでに、ジアリールエテン分子に対して、様々な側鎖置換基の修飾、あるいは中央エテン部位としてジシアノエチレンや無水マレイン酸などを導入した新規骨格の構築などを行い、合成したそれらの誘導体について蛍光量子収率・光反応量子収率・可視光応答性を評価した。その結果、蛍光量子収率を大きく低下させることなく光反応量子収率を増大させた分子、あるいは可視光に応答してスイッチングする分子が得られており、今後このような分子を合理的に設計するための指針に関する知見が蓄積されてきている。これまでのジアリールエテン分子については、入江らによって、詳細な Review に纏められた。(Chem.Rev.2014) その一方で、実際にジアリールエテンに対して、バイオプローブとして利用する際の生体系への適用性を付与するために、インフルエンザやデングウイルスなどの各種ウイルスタンゲットや糖尿病、高脂血症、高血圧などの標的核内受容体のアナログなどの合理的設計開発やその生体内での機能について、理論解析を実行し、その成果を *J.Med.Chem.* や *FEBS Lett* などの専門誌に公表し、一部発表はメディア向け特別講演に採択された。今後、ジアリールエテンの修飾部位にこれらのアナログを結合し、標的タンパク質に特異的結合性を付与された光応答分子の開発が期待される。現在、東京大の浦野らによる化学平衡を利用したバイオプローブ分子の開発が進んでいるが、それに対して本プロジェクトによって、特定位置にのみ結合する蛍光性ジアリールエテンが開発されれば、非接触光応答によるバイオイメーキングが可能となり、生体内において経時的に作用分子の動きをトレースすることができ、実際にどのように作用するのか原子分子のレベルでの解明に繋がるものと考えられる。そのような中、特に本プロジェクトメンバーの大学院生の発表が、国際糖質学会および 4th-NSV-J において審査の結果、発表助成を獲得し、日本薬学会では優秀発表賞を受賞したのは特筆される。

本プロジェクトの立ち上げと時を同じくし、学外から参画した池田らによって開発された新規蛍光分子は、新たなウイルスタンゲットのバイオプローブ分子としての利用が期待され、*Sci.Rep.* に公表された分子はインフルエンザウイルスの簡易高速感染判断キットなどに利用が可能で、すでに一般試薬としての販売も開始される。今後、同様な官能基を有するジアリールエテンを開発できれば、光応答機能をも有する新規バイオプローブとして、期待できる。今までにさまざまな非イオン性置換基や糖置換基の導入によって、光応答性機能を減ずることなく、水溶性機能を向上したジアリールエテン分子の開発に成功した。これらの分子の一部は超高解像度顕微鏡への応用を目指して、具体的な光物性の解析が進んでいる。また、水溶性を向上させたジアリールエテンばかりでなく、脂溶性などの多様な性質のジアリールエテン分子をアフリカツメカエルの卵細胞および麻しんウイルスなどに応用したところ、生体内でのフォトクロミズムの観測に初めて成功した。現在、光スイッチング機能発現のための条件検討などを行い、各分子の光応答性の向上を目指している。今後、必要に応じて、ターゲットの生体系の特定部位への照射などにより、新たなバイオイメーキングが可能になるものと考えられる。細胞膜や脂肪細胞など脂溶性に富んだ生体標的もあるため、次年度はさらに多様なジアリールエテンの適用範囲を探ることも大きな課題である。特に細胞膜透過性については、バイオプローブとしては最も重要な性質の一つであるため、ターゲットに対応した物性をコントロールするための効率的な分子設計が望まれる。

しかしながらその一方で、光物性解析実験をすすめる過程の中で、鍵となる合成中間体において、分子量は同一でありながら置換基の位置が異なる異性体が生じている可能性が示唆され、合成したジアリールエテン分子の一部について、通常的光反応によって生成するものとは異なる、想定外の光異性体が生じている可能性が示唆された。合成したジアリールエテン分子の光機能を詳細に議論し、またその結果を学術論文として発表するためには、これらの異性体の立体構造を原子分解能レベルで精密に決定する必要があるが、このような実験は現有の核磁気共鳴 (NMR) 分光装置や質量分析装置では不可能である。原子分解能レベルで立体構造決定を行うためには、試料を冷却することにより原子振動を抑制した条件での解析が必要となる。また、iii) 水溶性・生体認識能の付与の研究、さらには本プロジェクトの最終目標である様々な生体系への応用、超高解像顕微鏡 (PALM・STORM など) への応用についても、i) および ii) 光機能を明らかにした中核ジアリールエテン分子に対して水溶性・生体認識性置換基を導入した誘導体を合成し、それを生体用蛍光プローブとして用いるため、やはり中核ジアリールエテン分子の立体構造決定が重要であることが改めて示唆された。そこで、初年度における化学合成の次のステップとして、次年度には立体構造解析を重点項目として遂行していく予定である。構造の詳細を知ること、さらに効率的な分子設計が可能となり、本プロジェクトの最終的な目標である時間軸をも含む多次元化された光応答性バイオプローブの開発に結びつくことが期待される。そんなためには溶液系だけでなく、ジアリールエテンの結晶系の構造解析や、可能であれば標的タンパク質に結合したジアリールエテンを含む共結晶の構造解析に挑む。特定位置に結合したバイオプローブの構造解析により、実際の生体分子がどこにどのように作用して、生理活性を発現するのか明らかにすることができる。特に疾病ターゲットのタンパク質の共結晶解析に成功すれば、本プロジェクトを基盤とした外部大型プロジェクト申請への道が開かれることを期待される。

※ この(様式 2)に記入の、経過・成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書(A 4 縦型横書き 1 枚・自由様式)を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ① 雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ② 図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③ シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④ その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 専門論文

- 1) K. Fukushima, T. Takahashi, a. H. Ueyama, M. Takaguchi, S. Ito, K. Oishi, A. Minami, E. Ishitsubo, H. Tokiwa, T. Takimoto, T. Suzuki, "Amino acid substitutions contributing to α 2,6-sialic acid linkage binding specificity of human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase" *FEBS Lett. in print* (2015).
- 2) K. Kawata, K. Morishita, S. Yamada, M. Nakayama, T. Kobayashi, Y. Furusawa, S. Arimoto-Kobayashi, T. Oohashi, M. Makishima, H. Naitou, E. Ishitsubo, H. Tokiwa, A. Tai, and H. Kakuta, "RXR Partial Agonist Produced by Side-Chain Repositioning of Alkoxy RXR Full Agonist Retains Anti-type 2 Diabetes Activity without the Adverse Effects" *J. Med. Chem.* **58**(2), 912-926(DOI: 10.1021/jm501863r) (2015).
- 3) M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake, "Photochromism of diarylethene molecules and crystals: Memories, switches, and actuators" *Chem. Rev.* **114**, 12174-12277. (2014) DOI: 10.1021/cr500249p
- 4) K. Okatsu, M. Kimura, T. Oka, K. Tanaka and N. Matsuda, "Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment." *Journal of Cell Science* vol. 128, 964-978 (2015) (DOI: 10.1242/jcs.161000)
- 5) Y. Kurebayashi, T. Takahashi, T. Otsubo, K. Ikeda, S. Takahashi, M. Takano, T. Agarikuchi, T. Sato, Y. Matsuda, A. Minami, H. Kanazawa, Y. Uchida, T. Saito, Y. Kawaoka, T. Yamada, F. Kawamori, R. Thomson, M. von Itzstein, T. Suzuki, "Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells", *Sci. Rep.*, **4**, 4877 (2014) など合計 41 報

③ シンポジウム、招待講演など

- 1) M. Irie, "Making and Breaking Bonds with Light: Discovery and Development of Photochromic Diarylethenes" (Porter Medal Lecture) Irie, M., XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry, Palais des Congrès in Bordeaux, France, July 13-18, 2014
- 2) M. Irie, "Photochromism of Diarylethene Molecules and Crystals" Irie, M., Le Giornate di Chimica Organica a Pavia, Pavia, Italy, October 15, 2014
- 3) M. Morimoto, "Photochromism of diarylethene single crystals: photoinduced shape change and photomechanical performance", Breaking and Making Bonds with Light Workshop, Colorado, USA, June 30-July 4, 2014.
- 4) 常盤広明「最新の計算科学による脂肪酸と受容体との理論的精密解析」第 13 回ホスファチジルセリン研究会、東京、2014.11.7
- 5) 岡 敏彦「ミトコンドリア形態とクリステ構造の形成機構」、第 25 回フォーラム・イン・ドージン、熊本、2014.11.14
- 6) 竹田 誠「呼吸器ウイルスに挑んだ二人の英雄の話」、国立感染症研究所一般公開、サイエンスカフェ、2014 年 10 月 4 日 などシンポジウム、招待講演 計 16 件

④ その他

受賞: "The Porter Medal" (European Photochemistry Association, The Inter-American Photochemistry Society and The Asian and Oceanian Photochemistry Association), 入江正浩, 2014 年

特許:

- 1) "水溶性フォトクロミック分子" PCT 出願, 常盤広明、入江正浩、池田潔、大坪忠宗
- 2) "放射線線量の測定方法およびその線量計" 入江正浩 他

学会発表:

- 1) M. Irie "Photochromism of Diarylethene Molecules and Crystals", Le Giornate di Chimica Organica a Pavia, Pavia, Italy, October 15, 2014
- 2) E. Ishitsubo, T. Hosozawa, M. Igarashi, K.N.Kirshner, N. Sriwilaijaroen, H. Yokoe, M. Tsubuki, Y. Suzuki, H. Tokiwa "Development of Novel Multi-target Inhibitor for HA & NA of Influenza Virus", Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrates Research (JSCR), November 16-19, 2014, Honolulu, Hawaii, USA.

など国際会議 22 件、国内学会 94 件