

研究終了報告書

「ロタキサン型メカノプローブの開拓とメカノバイオロジーへの応用」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：相良 剛光

1. 研究のねらい

近年、“こする”や“すりつぶす”といった機械的な刺激に応答し、発光特性が変化する有機材料・有機金属錯体が、数多く報告されている。観察される発光色変化は、機械的な刺激により発光部位の共有結合が切断されることが原因ではなく、材料内の発光部位の分子集合構造が変化することで達成されている。このような機械的刺激応答性発光材料は、日常的に我々の生活の中で起きる機械的刺激を検出するための魅力的な材料であり、特に生体内で作用する微小な力を評価・可視化するには、既存のタッチパネルなどで用いられるような力⇔電気信号の変換技術を使用できないため、とても有望である。しかし、極めて微小な力、例えば生きた細胞やモータータンパク質が生み出す力(数 pN～数 100 pN)などを検出できるほど鋭敏で、かつ汎用性がある分子集合体に基づく材料はほぼ開発されていない。

時を同じくして、「メカノバイオロジー」と呼ばれる研究分野が世界中で大きな潮流となりつつある。この分野で盛んに研究されている研究対象の一つに、「インテグリン」がある。インテグリンは膜貫通タンパク質の一つであり、細胞が外部と力をやり取りする際に重要な役割を担っていることがわかってきた。しかしその一方で、「インテグリンなどのレセプターが分子レベルで生み出す微細な力を、高精度かつ定量的にイメージングする技術」が、細胞が機械的刺激を生み出すメカニズムを解明する上で極めて重要な要素技術であるにもかかわらず、未だ汎用性のある方法が確立されていない。

そこで本研究では、上記の二つの学術分野の背景と、それぞれが直面している課題を踏まえ、細胞が出すような微細な力を幅広い範囲で高感度で検出できるロタキサン型超分子メカノフォアを創製することを目指した。網羅的にロタキサン型超分子メカノフォアを設計・合成し、蛍光特性変化の動作原理の汎用性・普遍性を確かめると共に、原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定機能を用いて activation に必要な力を定量評価する。その後インテグリンがメカノフォアを認識するように cRGD 配列をメカノフォアの末端に導入し、実際に生細胞を用いて、細胞接着斑内の個々のインテグリンが生み出す力を正確に定量評価することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では超分子化学の分野で長年研究されてきたインターロック分子の一つであるロタキサンをモチーフとした超分子メカノフォアの開発を行った。ロタキサン型超分子メカノフォアの動作原理を下図に示す。このメカノフォアは、電子ドナー性の高い蛍光部位を持つ環状分子と、電子アクセプター性の高い消光団と立体的にかさ高いストッパー部位からなるロッド状分子で形成される。機械的刺激が印加されていない状態では、消光団が蛍光性環状分子にインターカレートされ、蛍光性環状分子からの蛍光は完全に消光される(図1左)。しかし、いったん機械的な刺激が加わると(図1左、矢印の方向)、蛍光性環状分子が消光団からスライ

ドして離れ、その結果、蛍光性環状分子由来の蛍光が消光されず、強い蛍光が観察されるようになる。

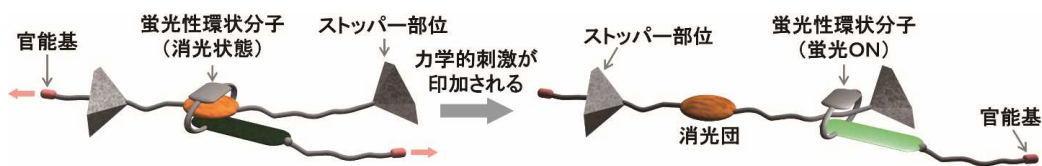


図1. ロタキサン型超分子メカノフォアの動作機構

本さがけ研究の開始直前に、上述した動作原理で駆動するロタキサン型超分子メカノフォアのプロトタイプは完成した。さがけ期間内での成果としては、まず、本ロタキサン型超分子メカノフォアの動作原理の普遍性、及び分子設計の容易さを示すことを目指し、導入する蛍光団を単純に変更するだけで、異なる蛍光色の On/Off スイッチが容易に達成できることを明らかとした。さらに、開発した青色、緑色、橙色の三種の蛍光色を示すロタキサン型超分子メカノフォアを同時使用することで白色蛍光の On/Off スイッチが実現できることを示した。次に、ロタキサン型超分子メカノフォアの分子骨格改変を試み、分子骨格の簡略化・低コスト化を達成した。そして、他の材料に導入するための官能基に対し、官能基変換を試み、アミノ基やアジド基など、様々な官能基に変換する手法も確立した。これらの分子骨格改変により、力を見たいニーズがある異分野で応用することが容易になったと考えている。小型化したいくつかのロタキサンに関しては、力を受けて環状分子がストッパー部位から抜ける挙動が観察され、分子骨格と機械的刺激に対する蛍光特性の応答性との相関関係も明らかとなった。

(2) 詳細

本さがけ研究により、従来の分子集合体を利用した機械的刺激応答性発光材料の課題であった、「実用的なメカノセンサーとしては使えない」という問題を解決する突破口を見出すことができた。また、従来の共有結合を切断する必要があるタイプのメカノフォアと比較して、超分子化学の概念を導入したメカノフォアが、可逆性、機械的刺激特異性、分子設計の容易さなどの優れた特性を持つことが明らかとなった。以下、期間内に明らかにしたことを述べる。

研究テーマA 「ロタキサン型超分子メカノフォアの動作原理の普遍性の確認」

プロトタイプのリタキサン型超分子メカノフォア(図2)の報告(*J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 1584)の後、上述した動作機構に果たして一般性があるかどうかを明らかにすることが最初の課題となった。そこで、超分子

メカノフォアの分子設計の容易さを併せて示すため、蛍光団として π 共役が拡張したピレン誘導体、アントラセン誘導体、レーザー色素として有名なDCM誘導体を用いたロタキサン

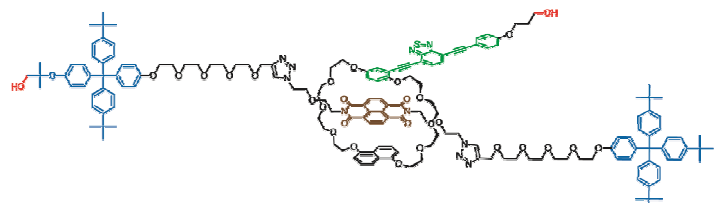


図2. プロトタイプのリタキサン型超分子メカノフォア

型超分子メカノフォア Py-Rot、An-Rot、および、DM-Rot を設計・合成した(図3)。

溶液中では、ロタキサン形成に伴い、それぞれの蛍光団からの青色、緑色、橙色蛍光が完全に消光されることがわかった。次に、先行研究と同様に、それぞれのロタキサン型超分子メカノフォアをポリウレタン主鎖に共有結合を介して導入した、Py-Rot-PU、An-Rot-PU、および、DM-Rot-PUを共重合法により合成した。各ロタキサンの導入率は 0.45 wt% となっている。それぞれのポリウレタンをキャスト法により製膜して dog-bone 型に切り抜き、均一な厚さを持つポリウレタン

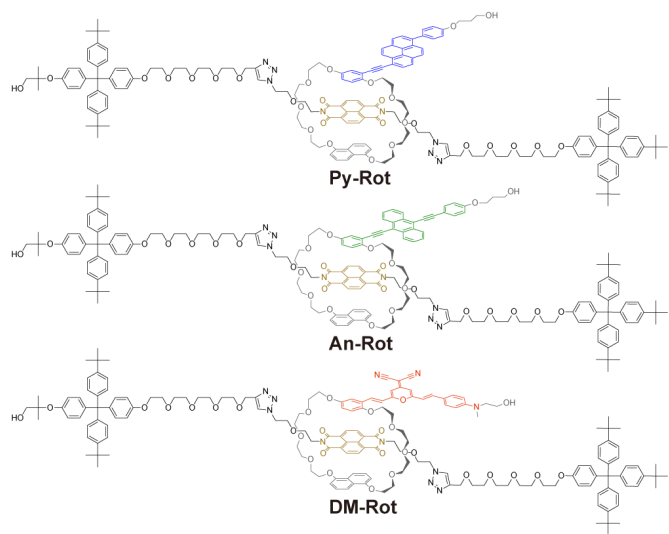


図3. Py-Rot、An-Rot、および、DM-Rot の分子骨格

フィルムを得た。それぞれのフィルムは、365 nm の励起光照射下、伸縮に応じて青色、緑色、橙色の蛍光色を瞬時かつ可逆的に On/Off スイッチすることがわかった(図4) (ACS Cent. Sci. 2019, 5, 874)。さらに、これらの三種類のポリウレタンを、重量比8:16:5の割合で混合して得られるポリウレタン(Mix-Rot-PU)が、励起光(365 nm)照射下、伸縮に応じて白色蛍光を On/Off スイッチすることがわかった(図5)。以上の実験結果により、ロタキサン型超分子メカノフォアの動作原理の普遍性が確かめられた。



図4. Py-Rot-PU、An-Rot-PU、および、DM-Rot-PU が示す蛍光特性変化

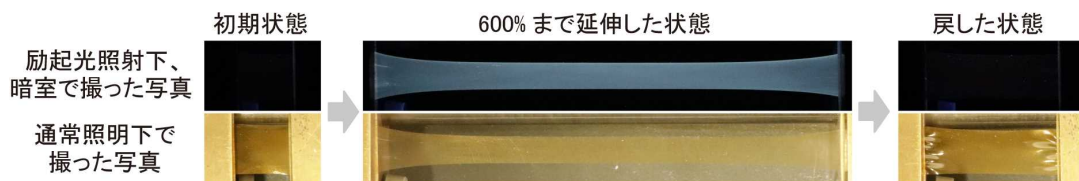


図5. MIX-Rot-PU が示す蛍光特性変化

一方で、赤色蛍光の On/Off スイッチを目指し、蛍光団として BODIPY 誘導体を用いたロタキサン型超分子メカノフォア BP-ROT も作成した。しかし、この BP-ROT をポリウレタンに導入した後に製膜すると機械的刺激を印加する前から無視できないレベルでの赤色蛍光が観察される結果となった。これは、蛍光団と消光団の会合定数が低いことが原因であると考えられ、On/Off タイプの超分子メカノフォアを作製するには、蛍光団と消光団の会合定数を如何にして大きくするかが重要であるという知見を得た。さらに、この低い蛍光コントラストは、ポリマーフィルムを溶媒により膨潤させることで改善できることを発見した(ACS Appl. Mater. Interfaces 2019, 11, 24571)。

研究テーマB「ロタキサン型超分子メカノフォアの分子構造改変」

① 小型化と新たな機械的刺激に対する応答性

上述したロタキサンは分子骨格が複雑であり、今後他分野での応用を考えた際には現実的ではない。そこで本研究項目ではロタキサンの分子骨格の簡略化を試みた。ストッパー部位をテトラフェニルメタン誘導体から単純なベンゼン誘導体に変更し、消光団もナフタレン

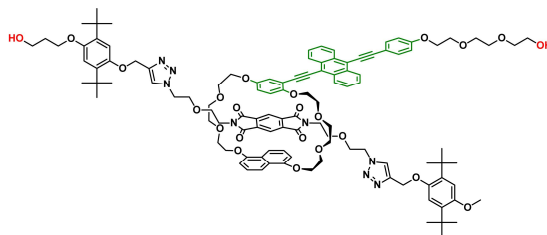


図6. 小型化したロタキサン型超分子メカノフォア

ジイミドからピロメリット酸ジイミドに変更した。これに伴い、環状分子の環構造を縮小した。得られたロタキサン(図6)は興味深いことに蛍光強度の可逆変化と不可逆変化を両方示すメカノフォアとなった。これは一定以上の力が印加された場合、環状分子がストッパー部位をすり抜けてしまうことが原因であることが明らかとなった。

② 官能基変換

将来的に様々な材料へロタキサン型超分子メカノフォアを導入することを考えた際には、これまでのロタキサンで導入していた官能基である二つの水

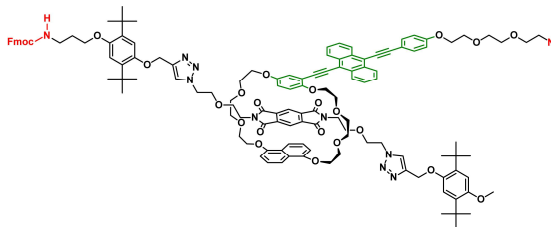


図7. 官能基変換したロタキサン型超分子メカノフォア

酸基をそれぞれ別の官能基に変換する必要がある。そこで上述した小型化したロタキサンに対して官能基変換を試みた。その結果、図7に示したように片方に Fmoc 保護されたアミノ基、そしてもう一方にアジド基を導入したロタキサン型超分子メカノフォアの合成ルートを確認することに成功した。

3. 今後の展開

本研究では、ロタキサン型超分子メカノフォアの動作原理の普遍性が確認された。特に分子骨格を簡素化でき、官能基変換の合成ルートを確認できたことは非常に大きく、今後は微小な力を可視化するニーズのある、高分子材料分野、レオロジーの分野、メカノバイオロジーの分野等への応用が期待できる。さらに、本動作機構を考えれば、蛍光のみならず、エネルギー移動や円偏光蛍光等様々な光機能を一分子レベルで機械的刺激により制御できると考えられる。そして、超分子化学の分野ではロタキサンのみならず、シクロファンやカテナンなども長年研究されてきた経緯があり、それらの新規モチーフを用いることで、一分子レベルの「超分子メカノケミストリー」とも言うべき学術分野が創成されると考えている。

4. 自己評価

《研究目的の達成状況》

最初の目標であったロタキサン型超分子メカノフォアの開発は、当初想定していた分子数よりも多くのロタキサン分子を開発できたと考えており、この点に関しては研究目的を達成できたと考えている。さらに新たな共同研究や、新しい派生テーマが次々と生まれ、ある意味嬉しい悲鳴となった。その一方で、最終目標であるメカノバイオロジーへの応用は、ロタキサンの分

子骨格改変を優先した結果、未だ達成しておらず、引き続き取り組んでいく。

《研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)》

本さがけ研究の最初の2年半は北海道大学電子科学研究所にて行われ、最終年度の一年は東京工業大学物質理工学院で行われた。さがけ研究に関しては、各年度、最大でも学生一名、研究補助員一名を加えた計三名の小さな研究組織であったが、効率的に多種多様な実験・検討を行ってきたと自負している。研究費は主に研究を推進するための測定機器の購入、及び研究補助員の人件費、そして日々消費する有機合成試薬やガラス器具の購入費、さらに、学会発表のための参加費・旅費に充当され、効果的かつ適切に使用されたと考える。

《研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果》

今後、高分子材料の劣化具合を可視化・評価したい産業界へのニーズに応えることができ、また、メカノバイオロジー分野におけるメカノプローブとしての応用、粘菌やモータータンパク質などを扱う生物物理などへの展開が期待できる。

《異分野との交流等による新たな研究ネットワークの構築》

メカノバイオロジーや生物物理分野の研究者とのディスカッションにより、メカノプローブのニーズに関する理解を深めることができた。また、スイスの共同研究者とのつながりも強化することができた。これらの異分野の研究者とは今後共同研究を推進する予定である。

《新たな視点や発想の創出、もしくは創出への貢献》

そもそも1分子レベルで機能する超分子メカノフォア概念自体が新しい。さらに、さがけ期間を通じて、専門の異なる研究者の多様な考え方・視点に触れることで、将来推進すべき研究テーマ群に関して着想を深化・ブラッシュアップできたと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 3件

1. **Yoshimitsu Sagara**, Marc Karman, Atsushi Seki, Mehboobali Pannipara, Nobuyuki Tamaoki, Christoph Weder, Rotaxane-Based Mechanophores Enable Polymers with Mechanically Switchable White Photoluminescence, *ACS Central Science* **2019**, *5*, 874-881.

先行研究であるプロトタイプのリタキサン型超分子メカノフォアに関する論文(*J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 1584)の成果を受けて、超分子メカノフォアの利点の一つである分子設計の容易さを示した論文。リタキサンに導入する蛍光団を変更することで、機械的刺激を受けて瞬時かつ可逆的にOn/Offスイッチする蛍光色を青色、緑色、橙色と簡単にチューニングできることを明らかとした。さらに三種類のメカノフォアを同時使用することにより、白色蛍光のOn/Offスイッチを達成した。

2. Tatsuya Muramatsu, **Yoshimitsu Sagara**, Hanna Traeger, Nobuyuki Tamaoki, Christoph Weder, Mechanoresponsive Behavior of a Polymer-Embedded Red-Light Emitting

Rotaxane Mechanophore, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11*, 24571–24576.

上述した二つの論文の研究成果を踏まえて、さらに長波長側の赤色蛍光を示すロタキサン型超分子メカノフォアの開発を行った。赤色蛍光団としては π 共役が拡張された BODIPY 誘導体を用いた。先行研究と異なり、差開発したロタキサンを導入したポリウレタンフィルムは、機械的刺激に対する顕著な蛍光強度変化は示さなかった。しかし、フィルムを有機溶媒で膨潤させることにより引っ張り前後の蛍光強度比を大きく改善できることを明らかとした。

3. **Yoshimitsu Sagara**, Nobuyuki Tamaoki, Gaku Fukuhara, Cyclophane-Based Fluorescence Tuning Induced by Hydrostatic Pressure Changes, *ChemPhotoChem* **2018**, *2*, 959–963.

ピレン誘導体を蛍光団として持つシクロファン溶液中での吸収・発光特性が、静水圧の印可によりどのように変化するかを明らかとした論文。同じ蛍光団を持ち環状構造を持たない参照化合物では静水圧の上昇と共に蛍光強度の上昇が認められたが、環状構造を持つシクロファンでは、逆に蛍光強度の減少が観察された。高静水圧下では、蛍光団と環状構造に導入されたナフタレン部位が π スタックした構造をより多く形成するため、シクロファンでは蛍光強度が減少したと考えられる。

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表(招待講演)】

“Development of rotaxane-based supramolecular mechanoluminophores”,

The 19th RIES-HOKUDAI International Symposium, 12th Dec 2018, Sapporo. (招待講演)

【受賞】

1. 文部科学省より 文部科学大臣表彰 若手科学者賞を受賞(2019年4月)
2. 高分子学会より 広報委員会パブリシティ賞を受賞(2019年11月)
3. 東京工業大学より 東工大挑戦的研究賞 末松特別賞を受賞(2020年7月)

【著作物】

「伸ばすと光るゴム—超分子メカノミノフォアの創製—」、現代化学、572、56–59、2018。

【プレスリリース】

「引っ張ると白い蛍光を出すゴムの開発に成功～材料が受けるダメージの可視化に期待～」と題するプレスリリースを日本語と英語で行った。(2019年4月24日)

参考 URL: <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190424/index.html>

<https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/polymers-to-give-early-warning-signs/>

* 本プレスリリースののち、Chem-Station への解説記事も執筆している。

参考 URL: <https://www.chem-station.com/blog/2019/07/mechanophores.html>