

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「細胞自在操作のための分子化学技術
の開発拠点形成」
スタートアップ講演会

講演プログラム・要旨集

2015年11月14日（土）

同志社大学京田辺キャンパス

恵道館 KD203

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

私立大学戦略的研究基盤形成事業

「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」スタートアップ講演会

主催：同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

開催日時：11月14日（土）13時-17時

開催場所：同志社大学京田辺キャンパス恵道館KD203

プログラム

13:00 開会の挨拶 研究センター長：小寺政人

13:10 グループ1 「細胞機能を人工的に制御するためのケミカルツールの創製」

趣旨説明：北岸宏亮

13:20 講演①「副作用の少ない抗がん剤の開発：低pH領域でDNA切断を促進する金属錯体」

講演者：小寺政人

13:40 講演②「細胞間シグナル伝達分子の拡散過程の可視化を目指したプローブ開発」

講演者：人見 積

14:00 講演③「生体内物質の選択的除去による生理機能探索」

講演者：北岸宏亮

（休憩）

14:30 グループ2 「細胞モデルを用いた細胞機能の自在操作技術」

趣旨説明：塩井章久

14:40 講演④「不均一場での化学反応と分子ダイナミクスの分光計測」

講演者：木村佳文

15:00 講演⑤「コロイド溶液中で形成される細胞膜状構造の秩序化のメカニズムの解明」

講演者：貞包浩一朗

15:20 講演⑥「生物的な運動性を示すコロイド」

講演者：塩井章久

（休憩）

16:00 特別講演会 "Biomedical applications of fluorocarbons and perfluoroalkylated amphiphiles" Prof. Marie Pierre Krafft

17:00 閉会

Biomedical applications of fluorocarbons and perfluoroalkylated amphiphiles

Marie Pierre Krafft

University of Strasbourg. Institut Charles Sadron (CNRS), 23 rue du Loess. 67034 Strasbourg,
France
krafft@unistra.fr

Fluorocarbons (FCs) and *F*-alkylated moieties offer a unique combination of properties, including extreme hydrophobicity, lipophobic character, quasi-insolubility in water, yet spreadability on a water surface and high volatility relative to molecular weight [1,2]. *F*-alkylated surfactants provide an effective driving force for manipulating thin soft matter films self-assembled at the air/water interface. pH-Sensitive microbubbles with outstanding shell elasticity were obtained from *F*-alkyl phosphates [3]. The reinforcement of the interfacial film allowed grafting of magnetic nanoparticles [4], providing novel dual-mode MRI/ultrasound contrast agents. FC gases profoundly modify the formation, stability and behaviour of phospholipid interfacial films. The phospholipid adsorption kinetics at the air/water interface was strongly accelerated and the interfacial tension at equilibrium was strongly decreased by a FC gas [5]. The latter facilitates replacement of albumin by phospholipids, which has important fallout on the design of novel lung surfactant substitutes [6]. A FC gas allowed recruitment and immobilization of a fluorinated biomarker across an interfacial phospholipid film [7]. We will also present the spontaneous generation of ordered ensembles of liquid FC droplets that spontaneously undergo synchronous motion on water [8]. The droplets are ejected as linear surface jets and form quasi-hexagonal patterns. Such dynamic self-assemblies capable of collective motion may mimic the complex organization of living organisms.

- [1] M.P. Krafft and J. G. Riess, *Chem. Rev.* 109(2009)1714-92.
- [2] M.P. Krafft, *Acc. Chem. Res.* 45(2012)514-24.
- [3] A. Kovalenko, P. Polavarapu, G. Pourroy, G. Waton, M.P. Krafft, *Langmuir* 30(2014)6339–47.
- [4] P.N. Nguyen, G. Nikolova, P. Polavarapu, G. Waton, L.T. Phuoc, G. Pourroy, M.P. Krafft, *RSC Adv.* 3(2013)7743-46; A. Kovalenko, P. Polavarapu, M.P. Krafft, G. Waton, G. Pourroy, *Soft Matter* 10(2014)5147-56.
- [5] P. N. Nguyen, T. T. Trinh Dang, G. Waton, T. Vandamme, M. P. Krafft, *ChemPhysChem* 12(2011)2646-52.
- [6] M.P. Krafft, *Soft Matter* 11(2015)5982-94; P.N. Nguyen, G. Waton, T. Vandamme, M.P. Krafft, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52(2013)6404-08; P.N. Nguyen, G. Waton, T. Vandamme, M.P. Krafft, *Soft Matter* 9(2013)9972-76.
- [7] G. Yang, M. O'Duill, V. Gouverneur, M.P. Krafft, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54(2015)8402-06.
- [8] D. Yamamoto, C. Nakajima, A. Shioi, M.P. Krafft, K. Yoshikawa, *Nat. Commun.* 6(2015) 7189.

副作用の少ない抗がん剤の開発： 低 pH 領域で DNA 切断を促進する金属錯体

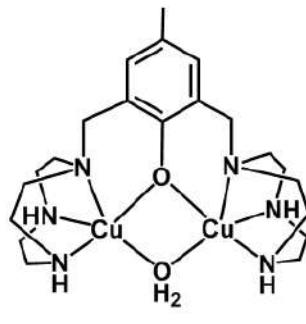
小寺政人

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科
E-mail address: mkodera@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】がん腫瘍内部組織は低 pH 環境(pH6.0~6.9)が特異的に形成されている。我々はこれに注目して低 pH 領域で高い DNA 切断活性を示す金属錯体の開発を目指した。minor groove binder である framidine は三日月型構造を持ち、両末端にカチオン部位を持つ。これは、framidine 以外の minor groove binder にも共通する構造的特徴である。金属錯体に同様の構造を付与できれば、高い DNA 切断能や結合能をもつ金属錯体が開発できると考えた。このような金属錯体の開発は低 pH 領域でのがん細胞の悪性形質の発現機構を明らかにし、その経路を遮断する手段によりがん細胞の転移を抑制する新しい抗がん剤の開発につながるため、重要である。今回は、図に示す bcmp 配位子の二核錯体に注目し、その DNA 切断活性について検討したので報告する。

【実験】bcmp、そのアミン部分をメチル化した Me₄bcmp、tacn を cyclen に変えた bcc 配位子を合成し、その銅錯体を得た。それらの銅錯体と DNA の結合定数の測定を等温滴定熱測定(ITC)によって行った。また、様々な pH における DNA 切断活性を測定した。

【結果と考察】p-クレゾールの 2,6-位に 2 つのトリアザシクロノナン(tacn)をペニダント基としてもつ bcnp 配位子の二核銅錯体を合成し、その錯体を用いた DNA 切断活性の測定および DNA に対する結合定数の測定を行った。pH 6.0 の低 pH 領域で錯体が DNA に強く結合し高い DNA 切断活性を示した。Me₄bcnp および bcc 配位子の錯体は bcnp のものと比べ、DNA 切断活性が大きく低下した。また、Me₄bcnp 配位子の錯体は bcnp のものと比べ、結合定数が大きく低下することが分かった。これらの結果から、DNA のリン酸エ斯特ルの加水分解において錯体に配位した水分子の必要性や tacn の N-H と DNA のリン酸エ斯特ル部位の水素結合が DNA の加水分解による切断に重要な働きを示すことが明らかになった。



[Cu₂(μ-OH₂)bcnp]

細胞間シグナル伝達分子の拡散過程の 可視化を目指したプローブ開発

人見 穂

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: yhitomi@mail.doshisha.ac.jp

学位を取得した1999年に、米国ノースウェスタン大学のO'Halloran研で博士研究員として、DNA結合亜鉛センサー蛋白質ZnTRの機能解析とレシオ型亜鉛蛍光プローブの開発に携わる機会をえた[1]。細胞を用いた研究と有機合成をパラレルに推進する新しい研究スタイルに惹かれ、以来、細胞内の小分子、特にシグナル伝達分子の可視化に焦点を置いた研究を進めている。これまでに、レシオ型亜鉛蛍光プローブ[2]、可逆的にエチレンガスを検出するプローブ分子[3]、高感度な過酸化水素蛍光プローブ[4]、高感度なMRI造影剤となるマンガンポルフィリン被覆金ナノ粒子[5]の開発に成功している。特に、エチレンガスと過酸化水素蛍光プローブは、金属酵素の反応メカニズムに範をとったものであり、バイオインスピアード型蛍光プローブと呼ぶことのできるユニークなプローブである。

エチレンガスは、食物ホルモンの一つであり、その受容体ETR1によってセンシングされている。ETR1は蛋白質の内部に銅(I)イオンを有しており、その銅(I)イオンへのエチレンガスのπ配位がETR1に可逆的な構造変化を誘起し、エチレンガスの存在を下流に伝達しているとされている。我々は、エチレンとπ配位し、空气中で安定な銀(I)イオンに着目し、蛍光团アントラセン有する銀(I)錯体をデザインした。錯体の銀(I)イオンはアントラセン部位と分子内でπ配位しているが、エチレン存在下ではエチレンとπ結合を形成し、アントラセンと銀(I)イオンとのπ配位は解消される。この構造変化により、エチレンガスの存在をアントラセンの吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル変化として読み出すことができる[3]。

過酸化水素蛍光プローブ MBFh (Metal-based Fluorescence Probe for Hydrogen Peroxide)は、ヘム依存型ペルオキシダーゼのメカニズムにヒントを得て設計した。ヘム依存型ペルオキシダーゼは、過酸化水素と反応し、compound Iやcompound IIと呼ばれる酸化活性種を発生し、外部基質を1電子酸化する。この反応は微量の過酸化水素を用いても高速で進行するために、高感度の検出が求められる免疫染色などに広く利用されている。たとえば、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)とプロ蛍光分子AmplexRedを用いて、酵素反応により生じる微量の過酸化水素を高速に検出すること

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
スタートアップ講演会

が可能である。我々は、この HRP/AmpexRed システムの機能を1分子で達成できる蛍光プローブを作成することができれば細胞が情報伝達物質として放出する微量の過酸化水素を高速、高感度に細胞内で検出できると考えた。問題は如何にして、西洋わさびペルオキシダーゼの機能を再現できる人工分子を設計するかであった。単純に鉄錯体と AmpexRed を繋いだ MBFh1 は、設計通りグルコースオキシダーゼが放出する微量過酸化水素を検出することができるが、細胞が成長因子の刺激によって細胞が產生する過酸化水素を検出することはできなかった[4a]。しかし、並行して行っている選択的酸化触媒の研究開発の過程で[6]、水中でペルオキシダーゼを発現する単核鉄錯体を発見し、蛍光プローブ開発が進展した[6d]。開発した単核鉄錯体 Fe-mepaq を過酸化水素との反応点に有する分子を新たにデザインし、反応性を調べた結果、高選択的に過酸化水素と反応するだけでなく、 μM オーダーの過酸化水素と反応し赤色蛍光色素レゾルフィンを秒オーダーで生成することが分かった。このプローブを A431 細胞の培養液に加え、上皮細胞成長因子 EGF の刺激した結果、A431 細胞が產生する過酸化水素を細胞内で蛍光可視化することができた[4b]。

本「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」プログラムでは、これまでと同じく、錯体のユニーク反応性に着目し、一酸化窒素、一酸化炭素に次ぐ第3の情報伝達ガス状分子として注目されている硫化水素に対して高感度、可逆的に反応する蛍光プローブ分子の開発を進める計画である。既にその核となる化合物として、Hong-Cai Zhou らによって開発された水中で安定な Metal-Organic Framework PCN-222 の合成を既に終えている[7]。次年度にかけて、PCN-222 をもとに合成した硫化水素プローブ分子の細胞内導入、細胞膜固定化と基板固定化を行い、全反射蛍光顕微鏡(本プログラムにより導入済み)を用いて、細胞が生産する硫化水素ガスの產生過程、膜透過、細胞外への拡散過程を可視化する技術を確立する計画である。

References

- [1] Y. Hitomi, C. E. Outten, T. V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 8614 (2001).
- [2] Y. Hitomi et al. *Peptide Science*, 48, 319 (2011).
- [3] Y. Hitomi et al. *Chem. Commun.*, 48, 10392 (2012).
- [4] a) Y. Hitomi et al. *Anal. Chem.*, 83, 9213 (2011); b) Y. Hitomi et al. *Chem. Commun.*, 49, 9929 (2013); c) Y. Hitomi et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 87, 819 (2014).
- [5] a) Y. Hitomi et al. *Chem. Lett.*, 12, 1901 (2014); b) Y. Hitomi et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 83, 1392 (2010); c) Y. Hitomi et al. *Chem. Commun.*, 6300 (2008).
- [6] a) Y. Hitomi et al. *Chem. Commun.*, 50, 7485 (2014); b) Y. Hitomi et al. *Chem. Eur. J.*, 43, 14697 (2013); c) Y. Hitomi et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 3448 (2012); d) Y. Hitomi et al. *Dalton Trans.*, 42, 12878 (2013).
- [7] D. Feng, Z.-Y. Gu, J.-R. Li, H.-L. Jiang, Z. Wei, H.-C. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 10307 (2012).

生体内物質の選択的除去による生理機能探索

北岸 宏亮

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

生体内に存在する様々な物質の生理的な機能や役割を調べる手法として、その物質の発生源となる遺伝子を抑制あるいは消去する遺伝子ノックダウン/ノックアウト法が挙げられる。本来生体にあるべき物質を人為的に消去した「機能欠失検体」を作成し、そのときの生体内挙動を調べることで、標的物質の生理的な存在意義を調べる一般的な手法である。この手法により多くの細胞内シグナル伝達経路が解明されてきた。しかしながら、このような遺伝子操作に頼る手法では、標的とする生体内物質がタンパク質に限定されてしまい、生体内の様々な代謝過程で発生するガス状物質や有機小分子などのタンパク質以外の物質が担う生理機能を探索する際には適用できない系が多い。

我々はこれまでにシクロデキストリンを利用して、水溶液中や生理条件下で機能する超分子化学をめざした研究を展開してきた。本「細胞自在操作のための分子化学技術」プロジェクトでは、これまでにってきた超分子化学を基軸として、生体内で標的物質を効率的に捕捉する化合物（ケミカルツール）を開発し、さらにこれらを実際に生体内に投与することで標的物質の「機能欠失検体」を作成、未解明な生体内物質の生理機能探索へのアプローチを行う。具体的には、下記2点の生体内物質に着目した研究を行う。

1. 内因性一酸化炭素の生理機能探索：我々は以前に水中で一酸化炭素(CO)を非常に高い選択性によって捕捉する鉄(II)ポルフィリン/シクロデキストリン超分子錯体”hemoCD”を報告した。hemoCD の CO 結合機能は生理条件下でも損なわれず、マウスやラットなどの生体内に存在する内因性の CO を定量的に捕捉して尿排出されることが分かっている¹。したがって hemoCD を生体に投与すると、生体内で常時発生している内因性 CO を一時的に欠乏した「擬ノックダウン状態」を作成することが可能となる。現在 hemoCD を用いて CO 欠乏状態における生体内の遺伝子発現状況の変化について調査を進めしており、未解明部分の多い内因性 CO の生理機能に対して我々が開発したケミカルツールを利用してアプローチしている。本研究により内因性 CO の知られざる生理機能が明らかになりつつある。本講演ではその成果について一

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
スタートアップ講演会

部紹介する。さらに細胞内における内因性 CO のシグナル伝達機能を調査するため、細胞膜透過性を持たない hemoCD の骨格の一部に膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンを導入した新規ケミカルツールの開発も進めており²、CO 結合能を維持したままで細胞膜透過能を付与する方法が確立しつつある。この膜透過 hemoCD をケミカルツールとして用い、細胞内の CO を「擬ノックダウン状態」へと導き、細胞内 CO が示す抗炎症作用などの内因性 CO の作用機序解明をめざした研究を展開する。

2. 細胞内でのコレステロールの捕捉: シクロデキストリン(CD)は水中や生理条件下で生体内分子であるコレステロールと包接錯体を形成し、難容性のコレステロールを可溶化させることができ古くから知られている。近年、この性質が再び注目され始めている。すなわち従来のように CD を DDS における薬物キャリアとして利用するのではなく、CD 自体を薬物として投与し、生体内の余剰コレステロールを軽減させる試みが盛んになされている。我々は以前に hemoCD を細胞内に送達させる目的で、膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン(R8)を CD に縮合した R8-CD を開発した³。元々 CD は水溶性が高く、細胞膜を透過する性質を持たないが、我々が開発した R8-CD は、非常に効率よく細胞膜を透過して細胞質内へと到達する。この R8-CD の性質は、薬物を細胞内に送達する DDS キャリアとして利用できるだけでなく、細胞内へ送達する水溶性ホスト分子として、細胞内コレステロールを効率よく軽減させる試薬としての利用が考えられる。特にリソゾーム病の一種であり、遺伝的な欠失によりコレステロールがリソゾーム内に異常に蓄積する希少病「Niemann-Pick 病 C 型」では、CD の細胞質内への導入が鍵となっていることから、R8-CD の活用経路が十分に考えられる。本プロジェクトでは、細胞内コレステロールの捕捉を行うことができるケミカルツール R8-CD を行いて、細胞内でのコレステロールの生理機能探索や余剰コレステロールの軽減による疾患治療薬の新規開発をめざす。

参考文献 (1) H. Kitagishi, S. Negi, A. Kiriyama, A. Honbo, Y. Sugiura, A. T. Kawaguchi, K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1312–1315. (2) (a) H. Kitagishi, S. Hatada, T. Itakura, Y. Maki, Y. Maeda, K. Kano, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3203–3211; (b) H. Kitagishi, K. Minami, K. Kano, *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 1095–1097. (3) H. Kitagishi, F. Chai, S. Negi, Y. Sugiura, K. Kano, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2421–2424.

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
スタートアップ講演会

不均一場での化学反応と分子ダイナミクスの分光計測

木村佳文

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

yokimura@mail.doshisha.ac.jp

我々の研究グループではイオン液体を主な題材として、種々の分光計測手法を用いることにより、反応速度やダイナミクスに環境が及ぼす効果を検討している。イオン液体はカチオンとアニオンから構成される常温で液体状態の塩である。カチオンやアニオンの分子構造ならびにその組み合わせを変化させることにより、通常の液体にない機能を付与することが可能である。最近では、イオン液体と生体分子の親和性も着目されており、タンパク質の長期保存や酵素反応の活性化、バイオマスの処理など様々なアプローチが進められている。イオン液体では、カチオンとして電荷をもつ部位と電荷をもたない非極性の部位が混在したものを用いることで、局所構造をもった不均一な溶液構造を形成し、これが化学反応や分子ダイナミクスに特異な効果をもたらすことがわかつてきた。このような不均一環境と反応や分子ダイナミクスのかかわりを明らかにし、生体分子とのかかわりをあきらかにしていくために、種々の分光学的なアプローチをすすめ、本研究拠点のテーマ推進に貢献していくことを企画している。

用いる分光手法により大まかには以下の研究を推進することを企画している。

1. 超高速レーザー分光法による素反応過程の研究

電荷移動反応やプロトン移動反応などの基本的な反応プロセスは、反応分子の環境（電荷分布や水素結合）によって大きな影響を受ける。超高速レーザーによる時間分解蛍光法や過渡吸収分光法などにより評価する。

2. 過渡回折格子法による分子ダイナミクスの評価

過渡回折格子法では光励起の結果生じる反応分子の構造変化や並進拡散などの分子ダイナミクスが評価できる。単純な分子からタンパク質などの複雑な分子のダイナミクスを評価することを企画している。

3. 蛍光顕微鏡をもちいたイオン液体中の反応やゆらぎの評価

比較的大きな構造をもった系（バイオマスなどの反応素材）に対し、蛍光顕微鏡をもちいてイオン液体との反応過程の空間的な解析をすすめる。また、蛍光相関や蛍光寿命イメージングなどをとおして、イオン液体やイオン性柔粘性結晶のもつ長距離構造の特徴を明らかにする。

コロイド溶液中で形成される細胞膜状構造の 秩序化のメカニズムの解明

貞包 浩一朗

同志社大学生命医科学部医情報学科

E-mail address: ksadakan@mail.doshisha.ac.jp

溶液中のイオンの振舞いを理解することは、物理化学の基礎として重要なだけでなく、産業利用や生命科学の分野においても重要な課題である。その中で我々はこれまでに、溶媒とイオンとの静電的な相互作用（溶媒和効果）が、コロイド溶液で形成される秩序構造に対してどのような影響を与えるのか、という点に着目して研究を進めている。

図1はこれまでに得られている研究結果の1例であり、水と有機溶媒である3-メチルピリジンの混合溶液に「拮抗的な塩」である NaBPh_4 を加えた系において発見された秩序構造の模式図と顕微鏡写真である。この系では3-メチルピリジンが厚さ数 nm の膜として振舞い、それが20nm程度の間隔で積層して秩序性の高いラメラ構造を形成する、という知見が中性子散乱実験から得られている（図1(a), KS, et al., PRL, 2009）。また最近では、この溶液を振り混ぜることで纖維状の構造が自発的に形成され、溶液の流動性が著しく失われる、という現象も観察された（図1(b)）。このように、水と有機溶媒に拮抗的な塩を加えた溶液では、低分子のシンプルな成分で構成されているにも関わらず、界面活性剤溶液や高分子溶液で見られるような複雑な物性が現れることが我々の研究から明らかになっている。

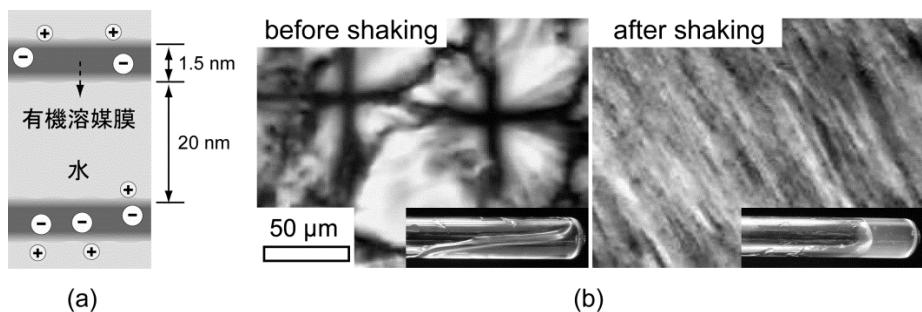


図1: (a) 水/3-メチルピリジン/ NaBPh_4 の混合溶液で自発的に形成されるラメラ膜構造の模式図。(b) 同混合溶液の偏光顕微鏡写真。溶液を振り混ぜた後（右図）では纖維構造の形成や流動性の低下など、高分子ゲルの溶液で見られるような挙動を示す。

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
スタートアップ講演会

生物的な運動性を示すコロイド

塩井章久

同志社大学理工学部化学システム創成工学科

ashioi@mail.doshisha.ac.jp

第 2 グループでは、細胞の部分的特徴を再現するモデル細胞を作製し、その内部における分子、分子集合体ならびに分子集団の挙動を解明することを目指している。細胞は生きている組織であり、強い非平衡性は細胞が備えている特徴の中でも本質的なものの一つである。この非平衡性が顕著に表れるのが、自己運動性や時空間パターン形成に見られる動的性質である。非平衡の化学系では、系とその外側の界面で進む物質移動により物理化学的過程が維持されることが多いが、細胞のようにコロイドスケールで比表面積の大きい系では、界面近傍の動的プロセスが系全体の特徴を支配することになり、全体として生命らしさを感じさせるリズムや空間パターンが現れる。多細胞生物の特徴のいくつかは、このような基本単位が集合体をつくり、それらが物質の交換などを通じて相互作用した結果、発現しているとして理解できるかもしれない。

この事実のため、生き物のように動くコロイドを簡単な物質から作り出すことが可能である。このような系は、生命らしさを物理化学的な機構で理解するためのモデルを提供するとともに、能動輸送、化学走性、クオラムセンシングなどの生命的機能を単純な物質で模倣するための方法を示すであろう。

本発表では、微粒子、油水界面、両親媒性分子集合体などのコロイド系を用いて、生命的なダイナミクスを示す系を実際につくることができるることを示す。とくに、生命的な特徴を示す系に共通の性質である“自発的に不均一状態が形成される”という点に着目し、酸化還元反応で自己運動する触媒粒子¹⁾、能動輸送性を示す液滴²⁾、化学物質を感知して運動状態を変える油水系³⁾や微小な pH 変動を感じて動く両親媒性分子集合体⁴⁾を紹介する。

参考文献

- (1) Yamamoto et al., *Nanoscale*, 7, 13186, 2015; *J. Chem. Phys.* 139, 034705, 2013.
- (2) Goto et al., *Sci. Rep.*, 5, No. 14348, 2015.
- (3) Yasui et al., *Langmuir* 31, 11005, 2015.
- (4) Nawa et al., *Soft Matter*, 9, 7832, 2013; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* doi.org/10.1246/bcsj.20150190, 2015.

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「細胞自在操作のための分子化学技術
の開発拠点形成」
2015年度・成果報告会

講演プログラム・要旨集

2016年3月12日（土）
同志社大学京田辺キャンパス
夢告館 MK102・MK203

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

私立大学戦略的研究基盤形成事業

「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」2015年度・研究成果報告会

主催：同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

開催日時：2016年3月12日（土）10時-16時30分

開催場所：同志社大学京田辺キャンパス夢告館MK102および203

プログラム

研究成果報告会・午前の部【10:00-12:00】夢告館MK102

開会の挨拶

研究センター長：小寺政人

講演1. 自己組織性ペプチドを基盤とする三次元マトリックス材料の開発

古賀智之（同志社理工）

講演2. 亜鉛要求性酵素はどのようにして活性化されるのか？

～活性中心に亜鉛が配位するメカニズムを探る～

神戸大朋（京大院生命）

講演3. イオン液体のベシクルへの分配とその菌体に対する毒性

松本道明（同志社理工）

講演4. 酸素発生型光合成膜の生理的状態を読み取る多角的顕微分光イメージング

熊崎茂一（京大院理）

（昼食・休憩）

特別講演会【13:30-14:30】夢告館MK102

講演題目「光機能を創る」

講師：入江 正浩 先生（立教大学理学部未来分子研究センター）

研究成果報告会・午後の部【15:00-16:30】夢告館MK203 <ポスター形式>

発表題目一覧

1. 副作用の少ない抗がん剤の開発：低pH領域でDNAを特異的に切断するMinor groove binder模倣二核金属錯体の開発
小寺政人・麻生健太・福井克樹
2. 生理条件下でも安定なポルフィリンMOFの調製
宮地亮昌・岩本勇次・人見 穎

3. トポロジカル制御されたペプチド・ポリマー自己組織体による細胞シート足場材の開発
平田絢葉・東 信行
4. 生体内一酸化炭素の擬ノックダウンによる生理機能探索
峯岸彩夏・北岸宏亮
5. 細胞膜透過能を有するシクロデキストリンの開発
中上敦貴・北岸宏亮
6. 脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による細胞死メカニズムの解析
浦野泰臣
7. 触媒機能を有する His4 型亜鉛フィンガータンパク質の構造および機能
根木 滋
8. pH 感知性の運動を示すベシクル
名和愛利香・山本大吾・塩井章久
9. 水面上でのフッ素系油の蒸発誘起型自発運動
山本大吾
10. イオン液体中での分子の並進ならびに回転ダイナミクスの研究
木村佳文・八坂能郎・機田祐人
11. イオン液体中の疎水場で活性化されたギ酸イオンによる芳香族塩素化合物の脱塩素化
八坂能郎・田中輝・木村佳文
12. Protect effect of ascorbic acid against double-strand breaks in genome-sized DNA evaluated by single-molecule observation
馬 越・吉川祐子・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一
13. ガス刺激に対する液滴の正/負の走化性
作田浩輝・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一
14. レーザーによる cm サイズの固体物体の搬送
小吉圭祐・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一
15. 直立-倒置-直立の再帰性時間発展 振動盤上の固体物体の集団運動に現れる特異性
鷹取慧・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一
16. ポリアミンによる遺伝子発現の促進と阻害作用の二面性
金村愛・清水佑太・吉川祐子・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一
17. 低周波振動によるゲノムサイズ DNA の二本鎖切断一分子観察による定量的計測
菊池駿斗・吉川祐子・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一
18. 時間変動する入力の協同効果による識別
上野 洋・剣持貴弘・貞包浩一郎・吉川研一

特別講演会

光機能を創る

入江 正浩

フォトクロミズムの研究者が抱く夢には、例えば、次のものがある。

- (i) 分子1つ1つのフォトクロミック反応を直接に観測し解析する
 - (ii) 光反応に伴う分子の幾何構造変化を、マクロレベルの材料の運動につなげる
- 本講演では、これらの夢の実現に向けた試みを紹介する。

【1】ジアリールエテンのフォトクロミズム [1]

光スイッチ分子に要求される必須の性能は両異性体の保存安定性であるが、この性能付与は容易でなく、長い間フォトクロミズム研究において最大の課題であった。我々は、「光応答性高分子」の研究過程において、偶然に両異性体がともに長期保存安定性をもつ「ジアリールエテン」を発見した。

【2】単一分子の光反応の直接観測 [2]

もし、分子1個が記憶素子1ビットとして機能すれば、現状の光ディスクの100万倍の記録密度が達成されることになる。長年の夢のであった分子1個のフォトクロミズムの直接観測に成功し、単一分子の光反応過程の解析を行った。

【3】フォトメカニカル機能 [3 - 7]

分子結晶を用いて、分子レベルの幾何構造変化を、マクロレベルでの運動につなげることを試みた。ジアリールエテンの板状あるいは棒状結晶は、紫外光と可視光の交互照射により可逆的に、正方形から菱形に、あるいは屈曲運動する。紫外光照射による最大光発生応力は~50 MPaにも達し、これは生体筋肉の180倍にもなっている。

【4】蛍光光スイッチング [8]

蛍光量子収率0.92を示す”turn-on”型の蛍光光スイッチングするジアリールエテン誘導体を合成することが出来た。Super-resolution bioimagingへの応用が期待される。

参考文献

- 1) a) M. Irie, M. Mohri, *J. Org. Chem.* 1988, **53**, 803-808 b) M. Irie, *Chem. Rev.* 2000, **100**, 1685-1716
c) M. Irie et al. *Chem. Rev.* 2014, **114**, 12174-12277
- 2) M. Irie, T. Fukaminato, T. Sasaki, N. Tamai, T. Kawai, *Nature*, 2002, **420**, 759-760
- 3) M. Irie, S. Kobatake, M. Horichi, *Science*, 2001, **291**, 1769-1772
- 4) S. Kobatake, S. Takami, H. Muto, T. Ishikawa, M. Irie, *Nature*, 2007, **446**, 778-781
- 5) M. Morimoto, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, **132**, 14172-14178
- 6) F. Terao, M. Morimoto, M. Irie, *Ang. Chem. Int. Ed.* 2012, **51**, 905-904
- 7) S. Ohshima, M. Morimoto, M. Irie, *Chem. Sci.* 2015, **6**, 5746-5752
- 8) K. Uno, H. Niikura, M. Morimoto, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 13558-13564

講演 1

自己組織性ペプチドを基盤とする三次元マトリックス材料の開発

古賀 智之

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

tkoga@mail.doshisha.ac.jp

[緒言] 我々は三次元細胞足場材料の高機能化を念頭に、自己組織性ペプチドを活用したハイドロゲル材料の開発を進めている。ペプチドは、アミノ酸配列により立体構造や機能を容易に制御することができる。本研究では新規インジェクタブルゲルとして、生体親和性の高いポリ(2-メタクリロイルオキシエチレンホスホリルコリン)のグラフト鎖に、自己組織性オリゴアラニンとPEGからなるブロックポリマーを導入したペプチド-ポリマー・ハイブリッド (**1_X**) (Fig. 1A)を設計した。ゲル特性および三次元マトリックス材への応用について報告する。

[結果と考察] PEG 結合型樹脂を用いて、Fmoc 固相合成法により順次アミノ酸およびメタクリル酸無水物を縮合させることでマクロモノマーを合成した。このマクロモノマーと MPC を様々な組成比で共重合することで **1_X** ($X = 6, 10, 20, 28, 32, 40\%$)を得た。**1₆** 以外のグラフトポリマーは高濃度条件(15 wt%)において、オリゴアラニンセグメントが自己組織的に β -シート架橋点を形成し、グラフト率に応じて様々な貯蔵弾性率(G')のハイドロゲルを形成した。また、いずれのゲルもひずみを加えると、(i) 約 1%を超えたあたりから G' 値が減少はじめ、(ii) 30%程度で完全に崩壊($G' < G''$)、(iii)その後ひずみを 1%に戻すと G' 値は初期のおよそ 8 割まで瞬時に回復し、(iv)時間経過に伴いさらに回復するといった優れたインジェクタブル能を有することもわかった。

Fig. 1B は、**1₂₈**-ハイドロゲルに軟骨細胞を内包させて二日間培養した後、生死細胞を染色して蛍光観察を行った結果である。生細胞由来の緑色の蛍光が多数観察され、このハイドロゲルが軟骨細胞の三次元マトリックスとして機能することが示唆された。また、このゲルは細胞をほとんど死滅させることなく、シリジンから射出できることもわかった。

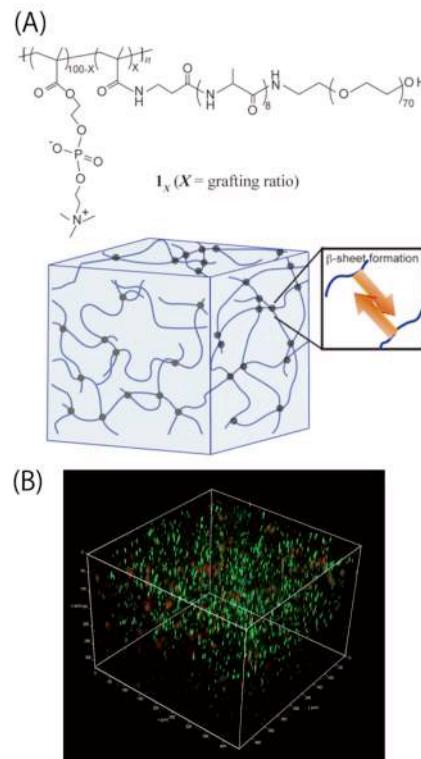


Fig. 1 (A) Chemical structure of peptide-polymer hybrid (**1_X**) and schematic illustration of peptide network. (B) Multi-photon fluorescence microscopic image of cartilage cells after incubation for 2 days in **1₂₈**-hydrogel.

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
2015年度 成果報告会

講演 2

亜鉛要求性酵素はどのようにして活性化されるのか?
～活性中心に亜鉛が配位するメカニズムを探る～

神戸大朋

京都大学大学院生命科学研究科・生体情報応答学分野
E-mail address: kambe1@kais.kyoto-u.ac.jp

亜鉛は、味覚や創傷治癒、免疫機能の他、記憶に関連した神経機能など、多岐に渡って重要な役割を果たす必須微量元素である。最近の亜鉛トランスポーターに関する研究成果によって、亜鉛の生理機能や疾患との関わりについては劇的に解明されてきているが、亜鉛トランスポーターがどのように亜鉛を輸送し、標的分子に亜鉛を受け渡すのかについては、これまでほとんど明らかにされておらず、亜鉛研究の次なる課題となっている。

我々は、この課題を解決することを目的に、分泌型・膜結合型の亜鉛要求性酵素の活性化に関わる分子メカニズムについて焦点を絞った解析を実施してきた。特に、組織非特異的アルカリフオスファターゼ (TNAP) の活性には、小胞体やゴルジ体に代表される早期分泌経路に局在する亜鉛トランスポーター ZnT5-ZnT6 ヘテロダイマーと、ZnT7 ホモダイマーが必須の役割を果たすことを証明しており、両ダイマーの機能についてのいくつかの所見を提示してきた。現在、これら亜鉛トランスポーターによる TNAP の活性化機構を基準にして、他の分泌型・膜結合型亜鉛要求性酵素の活性化機構について解析を進めている。今回は、その中でも、がんとの関連性から注目を集めるマトリックスマタロプロテアーゼ (MMP) や炭酸脱水酵素 (CA) などに焦点を当て、その活性化に関わる亜鉛トランスポーターについての解析結果を紹介したい。

生体内での亜鉛の基本的役割は“構造”、“触媒”、“調節”という3つのキーワードで代表されるように、実に多岐に渡る。亜鉛トランスポーターは、これら機能の鍵となる重要分子であるため、本研究から得られた基礎的知見が、亜鉛が関連する新しい研究分野への展開に貢献することを期待している。

講演 3

イオン液体のベシクルへの分配とその菌体に対する毒性

松本 道明

同志社大学理工学部化学システム創成工学科

E-mail address: mmatsumo@mail.doshisha.ac.jp

イオン液体は不揮発性の有機塩の液体で、分離プロセスにおいては次のような利点および欠点をもっている。

利点 1) 無視できる蒸気圧のため、大気への放出がない。2) 幅広い温度範囲で安定な液体。3) 塩の種類を変えることで物理化学的特性をチューニングできる。

欠点 1) 粘度が大きいことが多い。2) 通常、密度が水より大きい。3) 通常の有機溶媒に比べて価格がかなり高い。4) イオン液体によっては水性生物に対して毒性

本研究では、生体膜モデルとしてのベシクルへのイオン液体の分配を検討し、菌体(*Escherichia coli* K-12)への毒性との関係を調べた。結果を次表に示した。菌体毒性はディスク拡散法で調べ、毒性が大きいほど、大きな阻止円直径が得られる。親水性の大きいイオン液体についてはベシクル-緩衝液間の分配比(log $P_{M/B}$)は測定限界以下で求められなかつたが、阻止円直径とベシクル系の分配比は大まかに相関していると考えられる。

Table Diameter of inhibition zone and distribution ratio

ILs	Diameter	$\log P_{O/W}$	$\log P_{M/B}$
	[cm]	[-]	[-]
[Omim][Tf ₂ N]	2.20	0.79	2.61
[Hmim][Tf ₂ N]	2.07	-0.02	2.79
[P ₄₄₄₁][Tf ₂ N]	2.07	0.41	2.66
[N ₄₄₄₁][Tf ₂ N]	2.01	0.43	2.27
[Mppyr][Tf ₂ N]	2.10	-0.84	2.40
[Emim][CH ₃ SO ₃]	0.75	$\ll -3$	—
[Emim][BF ₄]	0.85	$\ll -3$	—
[Bmim][BF ₄]	0.73	$\ll -3$	—
[Hmim][BF ₄]	0.92	$\ll -3$	—
[Omim][BF ₄]	0.91	$\ll -3$	—

講演 4

酸素発生型光合成膜の生理的状態を読み取る
多角的顕微分光イメージング

熊崎茂一

(京都大学大学院理学研究科・化学専攻)

E-mail address: kumazaki@kuchem.kyoto-u.ac.jp

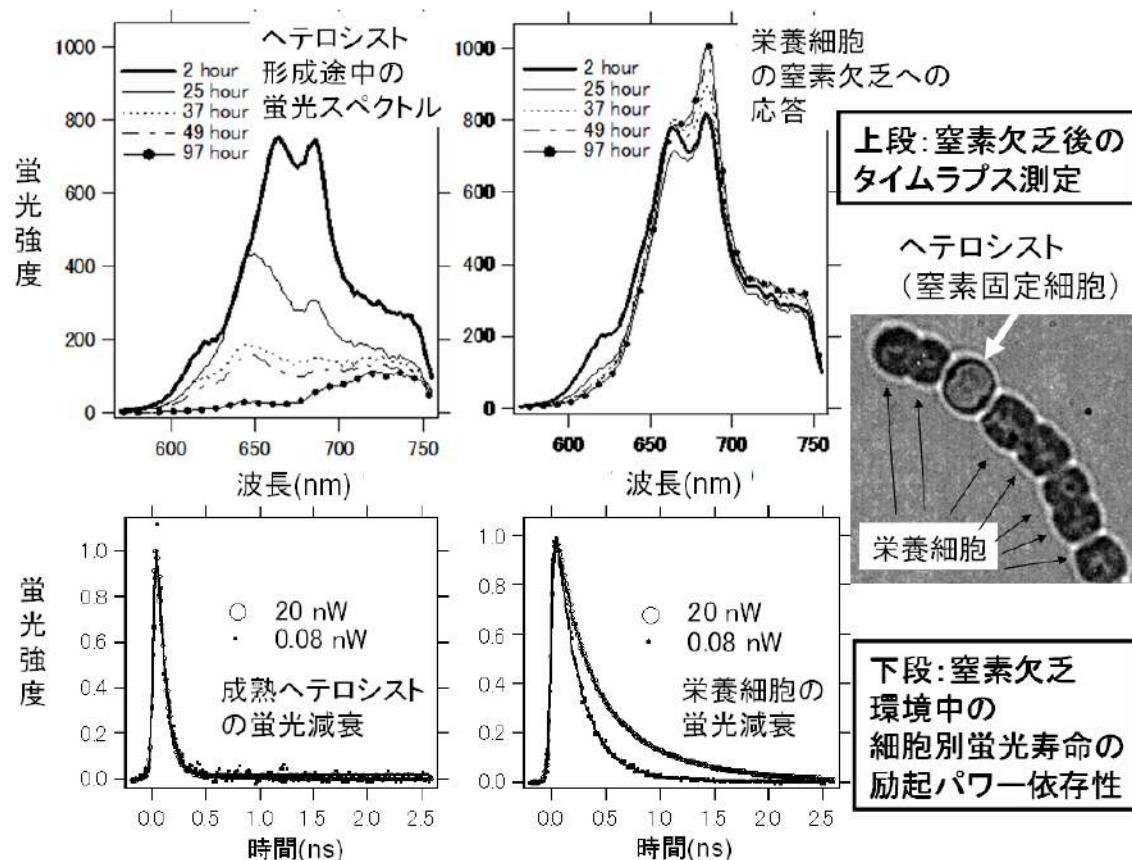
【背景】顕微光学技術やプローブ導入の発展で細胞内生理を捉える際の解像度と情報量は目覚ましく改良されている。しかし、試料特性によっては通用しない技術もある。植物を含む光合成生物が高い濃度で含む光合成色素は、低い光透過性、屈折率不均一性、強い自家発光等の原因となり、自在な細胞観察や、操作を妨害する。しかし、生態系のエネルギー生産を支える光合成器官である葉緑体の植物内特性の組織毎変化や環境応答を理解すること自体が重要である。また、光合成色素に由来する障害を克服できる技術は、動物組織や人工材料の観察・操作にも応用が期待される。私は主に光合成生物を研究対象とし、幾つかの顕微分光法の開発と光合成膜の生理的現象の解析を行っている。

水を電子源として利用できる酸素発生型光合成の始まりは30億年以上前のシアノバクテリアに遡り、それが、藻類や植物の葉緑体の起源であると考えられている。単細胞のシアノバクテリアもあるが、糸状に細胞が連結して細胞間分業を行うので、多細胞生物の最も単純なモデルともいえる。糸状シアノバクテリアの一部では、環境中の固定窒素（アンモニウム塩、硝酸塩等）が不足する時に、酸素発生型光合成を行う栄養細胞の5-10%が窒素固定を行う異質細胞（ヘテロシスト）へと変化する【次頁図参照】。この生理的変化では、酸素で不活性化されてしまう窒素固定酵素（ヒドログナーゼ）を細胞内で機能させるために、酸素を発生する光合成色素—タンパク質複合体である光化学系II（系II）を減少させる。系IIの消失は光合成膜に劇的な変化をもたらす。この際の個々の細胞の光合成膜の変化の一部始終をタイムラプス蛍光スペクトルイメージングによって追跡観察することに成功した[1]。それに引き続き、蛍光スペクトル限らず、蛍光寿命イメージング顕微鏡[2]やラマン散乱スペクトル顕微鏡を用いて栄養細胞と異質細胞の違いを明らかにすること、および細胞分化に関する遺伝子の発現を緑色発光タンパク質の導入で可視化しながら光合成膜の変化を追跡することも試みてきた。それらの各種試みを本講演では紹介したい。

【実験結果と考察】糸状シアノバクテリアの一種 *Anabaena variabilis* を窒素

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
 私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
 2015年度 成果報告会

充足培地から窒素欠乏培地へ移植し、移植後の細胞毎の顕微スペクトルを得た（図上段）。スペクトル分解により5種類の色素—タンパク質の時間変化を導出し、光合成膜が機能転換を遂げる際の詳細な分子モデルを提案した。また、窒素欠乏培地中で十分時間が経過した時点で、栄養細胞とヘテロシストにおいて、蛍光寿命が励起レーザーパワーに依存する様子を調べた（図下段）。今回の実験条件では励起強度に依存して蛍光寿命が変化するのは系IIだけである（系Iの寿命は変わりにくい）。22個中の17個の窒素細胞では系IIの存在を示すような蛍光寿命変化が検出限界以下であった。5個の細胞には僅かな系IIが残留している可能性がある。



窒素固定細胞でも系IIが残留して光化学反応活性を維持していると主張する報告もある[3]。しかし、本研究ではそのような窒素固定細胞は2割程であった。本測定の方が空間分解能が高く、栄養細胞からの光化学系IIの信号混入が少ないことが、この差異をもたらした主要原因ではないかと現在考えている。

- [1] S. Kumazaki* et al., **Plant Physiology**, 161, 1321 - 1333, (2013).
- [2] S. Nozue et al., **Biochimica et Biophysica Acta** 1857 (2016) 46–59.
- [3] N. Ferimazova et al., **Photosynth. Res.** 116 (2013) 79–91.

P O 1

副作用の少ない抗がん剤の開発:低 pH 領域で DNA を特異的に切斷する Minor groove binder 模倣二核金属錯体の開発

小寺政人、麻生健太、福井克樹

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: mkodera@mail.doshisha.ac.jp

本研究では、水中で金属錯体を安定に形成することができるトリアザシクロノナン(tacn)をペンドント基として使用し、二核構造を安定化するフェノール部位をもつ二核化配位子 2,6-bis(1,4,7-triazacyclonon-1-ylmethyl)-4-methylphenol (Hbcm)を用いて二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-H₂O)(bcm)](ClO₄)₃ (**1**)を合成した。錯体 **1** が水中で安定であることを各種分光学的測定から明らかにした。単結晶 X 線構造解析から、フェノキソ架橋とアクリア架橋により二核構造が安定化され、Cu \cdots Cu 間距離がリン酸ジエステル結合 1 つを認識することができる約 3.1 Å 程度であり、minor groove に結合するために必要な三日月型、末端カチオンの構造を有していることが示された。pH 滴定の結果、錯体 **1** は pH 5 までの低 pH 領域でトリアザシクロノナンに二核銅が配位し、フェノキソ酸素とアクリア架橋も形成することがわかった。錯体 **1** による DNA 加水分解活性の pH 依存性では、10 時間の反応で pH 5.5 で 71%, pH 6.0 で 81% のプラスミド DNA の一本鎖切断による Form II が形成された。一方、中性領域である pH 7.4, 8.0 では DNA 切断は殆ど起こらなかった。また minor groove binder を用いた DNA の加水分解阻害測定では、加水分解が大きく阻害された。錯体 **1** と DNA の結合定数は ITC の測定から pH 6.0 で $1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり、エントロピー変化(ΔS)が正であることから、疎水性相互作用的により DNA と結合することが示唆された。また DNA との結合定数およびその加水分解活性について錯体 **1** と関連する二核銅錯体を比較検討したところ、二核銅に水分子が架橋することにより DNA 加水分解活性が大きく向上し、また環状アミンの窒素原子に結合する水素の数が多くなるほど DNA と錯体との結合定数が大きくなることがわかった。このことから、本研究で用いた bcm 配位子による二核銅錯体の DNA 加水分解には二核銅に架橋した水分子が必須であり、環状アミンの水素が DNA のリン酸ジエステル結合を水素結合により活性化することが示唆された。この結果は、環状アミンをもつ二核銅錯体の DNA 加水分解機構に関する新たな知見を与えた。本錯体は、がん細胞の DNA を特異的に切斷できる副作用の少ない抗がん剤の開発につながると期待される。

生理条件下でも安定なポルフィリン MOF の調製

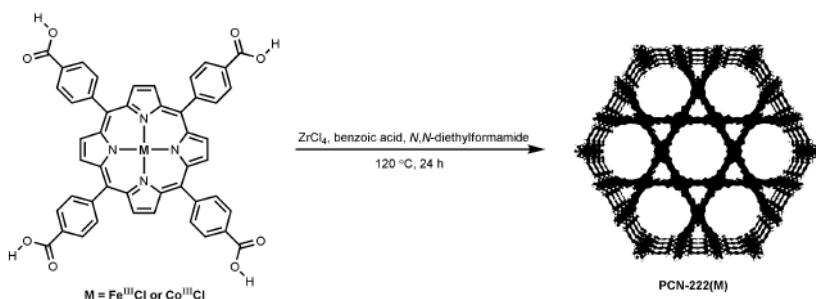
○宮地亮昌、○岩本勇次、人見 穂

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: yhitomi@mail.doshisha.ac.jp

ポルフィリン MOF とは、カルボン酸などの金属イオンへの配位部位を有するポルフィリン誘導体を架橋基とする金属有機構造体 (metal-organic framework, MOF) である。MOF は多孔性材料であり、ガス吸着や分離を初めとする様々な応用研究が展開されているが、なかでもポルフィリン MOF はポルフィリン特有の可視光吸收、発光、触媒機能のために単純な MOF を超える機能性材料となると期待されている。本研究では、生理条件下で安定なポルフィリン MOF を用いて、ポルフィリン金属錯体に由来する生体機能関連活性の発現、および、情報伝達物質を検出のためのプローブとしての利用を目指している。

既に、Hong-Cai Zhou らは、tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin (TCPP) の鉄錯体 Fe-TCPP と ZrCl₄ から水熱合成で得られる zirconium-porphyrin MOF (PCN-222(Fe)) が幅広い pH の水中において安定であること、さらに、濃塩酸中、24 時間安定であることを報告している。更に彼らは、PCN-222(Fe)が生体機能関連活性の 1 つであるペルオキシダーゼ活性を示すことも確認している[1]。



我々は、Zhou らの報告[1]に従い、Fe-TCPP と Co-TCPP からそれぞれ水熱合成により、PCN-222(Fe)および PCN-222(Co)を合成した。XRD 測定により、PCN-222 特有のカゴメ様構造を確認している。PCN-222(Fe)および PCN-222(Co)は、いずれも純水中、24 時間安定であることを追認した。しかし、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) 中では分解し、Fe-TCPP あるいは Co-TCPP が溶け出すことを見出した。リン酸がジリコニウムイオンと強固に結合するために、PCN-222(M)が溶解すると考えている。

[1] D. Feng, Z. Y. Gu, J. R. Li, H. L. Jiang, Z. Wei and H. C. Zhou, *Angew. Chem.*, 2012, **124**, 10453–10456.

トポロジカル制御されたペプチド・ポリマー自己組織体による 細胞シート足場材の開発

Thermo-responsive polymer brushes from amino acid-derived vinyl polymers and their applications in cell-sheet engineering

○平田絢葉・東 信行

同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科

E-mail: nhigashi@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】 今世紀は“培養細胞を徹底的に利用する時代”といわれているが、その際重要なのは、細胞と培養基板表面という異質な界面を分子レベルで制御することである。当研究室ではこれまでにアミノ酸由来温度応答性ビニルポリマーの開発を進めてきた。用いるアミノ酸の構造によって LCST 型や UCST 型に応答様式を設計できること、さらに異なるアミノ酸種の共重合化により相転移温度を自在に制御できることを明らかにした¹⁾。本研究では細胞との親和性も期待できるアミノ酸由来ビニルポリマーを固体表面に修飾した新しいスマート表面の調製を目指した (Fig. 1)。

【結果および考察】 ATRP 法により、N-アクリロイルアラニンメチルエステル (NAAMe) をモノマーとして表面グラフト重合を行った。ガラス表面はあらかじめ 3-アミノプロピルトリエトキシシランを縮合したのち 2-ブロモイソブチリルブロミドを反応させて開始部位を導入した。溶媒に水/メタノール (v/v = 1/1)、配位子に PMDETA、CuBr₂、還元剤にアスコルビン酸を用いて 60 °C で 24 時間行った。ATR FT-IR スペクトルにより表面グラフト重合の進行を確認した。まず poly(NAAMe) の溶液中と固体表面上での温度応答性を比較した。Fig. 2(A) は同条件で調製した poly(NAAMe) の水中での透過率を温度に対してプロットしたものである。水中での LCST は 16 °C であることがわかる。一方 Fig. 2(B) は基板を水に浸漬させ、気泡の接触角を温度に対してプロットしたものである。温度を上昇させると 10 °C から 15 °C にかけてより疎水的な表面への変化が観察され、固体表面上においても明確な温度応答性を示すことがわかった。発表時には、この表面を用いた細胞培養特性についても報告する。

1) N. Higashi, R. Sonoda, T. Koga, *RSC Adv.*, **5**, 67652 (2015).

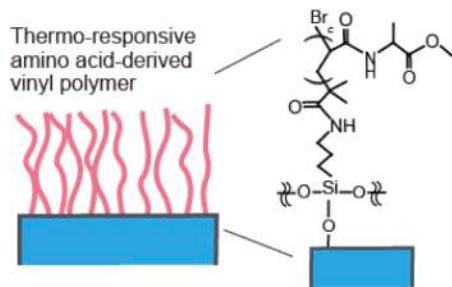


Figure 1. Thermo-responsive poly(NAAMe) brushes on glass surface.

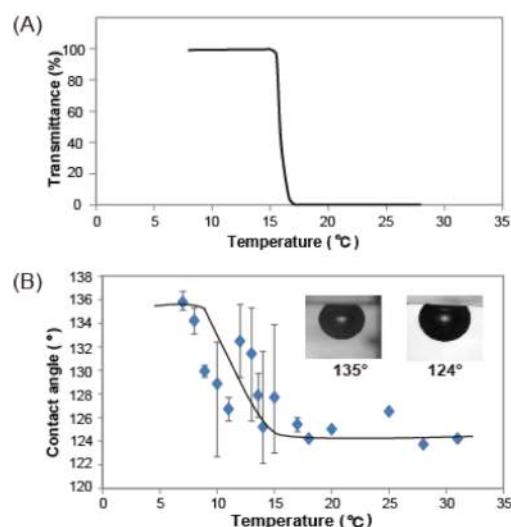


Figure 2. Temperature-dependences of poly(NAAMe) in pure water (A) and on glass surface (B). Turbidity was measured at 1 wt% during heating (1°C/min) process. Contact angle was measured using captive bubble method.

生体内一酸化炭素の擬ノックダウンによる生理機能探索

峯岸彩夏・北岸宏亮・根木 滋・加納航治

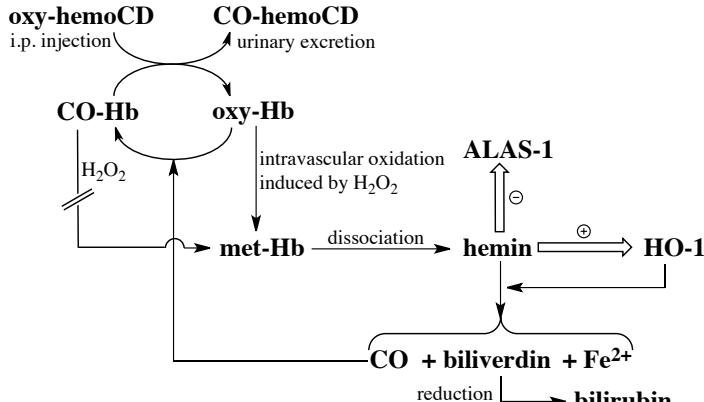
同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻

E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

一酸化炭素(CO)は生体にとって有毒なガスであるが、生体内では微量ながら常に産生されており、生体内シグナルメディエーターとして働くことが知られている。しかしながら CO の生理機能には未解明な部分がきわめて多い。内因性 CO の主な発生源は酵素ヘムオキシゲナーゼ(HO)によるヘムの代謝分解であり、この反応の副産物として CO はビリベルディン、鉄イオンと共に体内産生される。CO の生理機能を調べるために発生源である HO の遺伝子をノックアウトあるいはノックダウンすると、ヘム代謝が停止してしまい、CO 本来の生理機能のみを選択的に調べることができない。そこで本研究では、生体内で CO のみを選択的に捕捉する合成化合物 hemoCD を使って、生体が有する内因性 CO を「擬ノックダウン」状態へと誘導し、そのときの生体内反応を調べることによって、CO の生理機能解明にアプローチできるかを試みた。

hemoCD をマウスの腹腔に投与すると、hemoCD の尿中への排泄が観測された。尿中の hemoCD には CO が結合していたことから、hemoCD にはマウス体内に存在する内因性 CO を捕捉して体外へと排出させる機能があることが分かった。hemoCD の投与によって体内の CO を一時的に欠乏させたマウス肝臓内では、酵素 HO-1 の発現が強く誘導されており、内因性 CO の欠乏によって、ヘム代謝が促進されることが明らかとなった。一方、培養細胞(HepG2 細胞)を用いて hemoCD を投与する実験を行った結果、HO-1 の誘導は全く見られなかった。このことから、hemoCD は動物の体内では CO-Hb から CO を奪うことによって、図に示したような間接的なメカニズムで HO-1 を誘導しているのではないかと推測した。



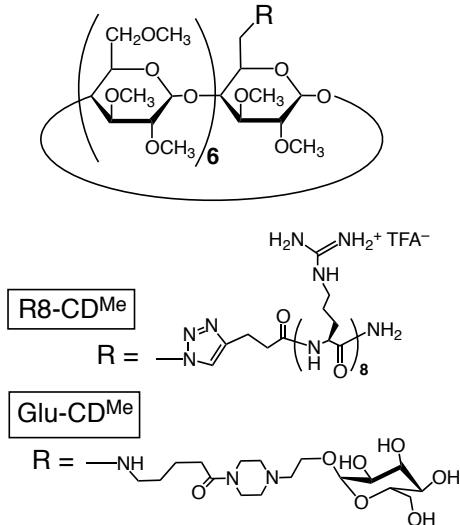
細胞膜透過能を有するシクロデキストリンの開発

中上敦貴・北岸宏亮・根木 滋・加納航治
同志社大学理工学部機能分子・生命化学科
E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

シクロデキストリン(CD)は水中において様々な疎水性化合物を内包する性質を示すことから、薬物キャリアとしての応用が試みられてきた。さらに近年では、CDを用いて生体内で不必要に蓄積したコレステロールなどの脂溶性物質を包接により水溶化し、代謝不全を正常化するという報告もあり、現在CDの生体内投与に対する需要はますます高まっている。しかしながらCDには細胞膜を透過する性質がなく、このままでは活躍する場が細胞外に限られてしまう。そこで本研究では、CDに細胞膜透過能を付与した化合物を合成し、その物性評価を行った。

β -CDのひとつ的第一級水酸基をオクタアルギニンペプチドで修飾したR8-CD、および完全O-メチル化体であるR8-CD^{Me}を合成した。R8-CD^{Me}はゲスト分子として水溶性ポルフィリンを非常に強く包接し、包接状態のままで細胞内へと取り込まれる様子が観測された。共焦点顕微鏡による細胞内スペクトル観察により、細胞内に取り込まれたポルフィリンはR8-CD^{Me}との包接状態を保っていることが示唆された。

つぎに血液脳関門(Blood Brain Barrier, BBB)の透過を目指したCDの合成を試みた。BBBにはグルコーストランスポーター(GLUT)が多数発現しており、これによりグルコースは細胞に認識されて脳内へと効率よく取り込まれる。近年、グルコース分子をタグとして導入した蛍光色素がBBBを一部透過して脳内に到達できることが報告された¹⁾。本研究では、先行研究の分子構造を参考にして、CDの第一級水酸基へのグルコースタグ分子の導入を試みた。



1) S. B. Park *et al.*, *Chem. Comm.* **2014**, 50, 9251-9254.

脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による 細胞死メカニズムの解析

浦野泰臣

同志社大学生命医科学部医生命システム科

E-mail address: yurano@mail.doshisha.ac.jp

脳特異的オキシステロールである 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) はアルツハイマー病や軽度認知症患者の脳脊髄液中で増加していることや神経細胞死を誘導することが報告されている。また、生成酵素である cholesterol 24-hydroxylase の多型がアルツハイマー病発症の危険因子として報告されており、24S-OHC と神経変性疾患の関連が示唆されている。

これまで我々は、カスパーゼ 8 を発現していないヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、24S-OHC がカスパーゼ非依存性プログラム細胞死である Necroptosis を誘導することを明らかにした。本研究ではその細胞死メカニズムについて明らかにすることを目的とし、脂質の変化に着目して以下の解析を行った。

中性脂質を染める Nile red で細胞を染色したところ、24S-OHC 誘導性細胞死の初期に脂肪滴様構造が形成されることを見出した。コレステロールのエステル化酵素である Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) の阻害剤や siRNA によりエステル化を抑制すると、脂肪滴様構造が消失とともに、24S-OHC 誘導性細胞死が抑制された。そこで細胞内に蓄積した脂質について HPLC 法や DART 質量分析法を用いて測定したところ、細胞死誘導過程において 4 種類の長鎖不飽和脂肪酸がエステル結合した 24S-OHC エステル体が蓄積していることを明らかにした。同定された各脂肪酸を 24S-OHC と同時添加すると細胞死が増悪したことから、特定の種ではなく、全体として 24S-OHC エステル体が蓄積することが細胞死を誘導すると考えられた。また電子顕微鏡を用いた観察により、24S-OHC 処理細胞では肥大化した小胞体と結合した脂肪滴様構造が形成されていることを見出した。以上の結果から、ACAT1 による 24S-OHC のエステル化と脂肪滴様構造の形成は、24S-OHC 誘導性細胞死における重要な初期イベントであることが示唆された。

触媒機能を有する His₄型亜鉛フィンガータンパク質の構造と機能

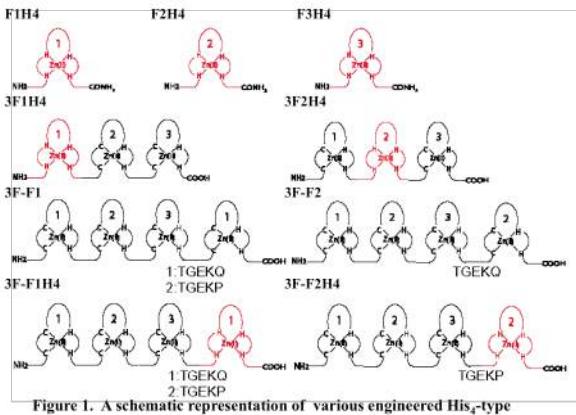
○根木滋・吉岡美智子・杉浦幸雄

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:snegi@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

我々は、金属配位部位のリデザインによる機能性人工亜鉛フィンガータンパク質の創製に取り組んでいる。これまでに、Sp1 の 2 つ目のフィンガー(F2)の亜鉛イオン配位部位である Cys₂His₂ 型を His₄ 型配位に変異させた F2H4 を作製し、4-nitrophenyl acetate のエステル結合を効果的に加水分解することを見出した。このような背景を受けて本研究では、Sp1 亜鉛フィンガータンパク質のそれぞれのフィンガードメインを His₄ 型に変えた変異体 3FxH4(X=1,2 および 3)、さらに亜鉛フィンガータンパク質に加水分解能を有する F1H4 および F2H4 を融合させた 4 フィンガータンパク質 3F-FxH4(x=1,2) の作製し、それらの構造および触媒機能について詳細に検討を行った。



【研究方法】

Sp1-FxH4 (x=1,2,3)をFmoc固相合成法により島津PSSM-8ペプチド合成機を用いて合成し、3FxH4(x=1,2)、3F-Fx および 3F-FxH4(x=1,2)は大腸菌タンパク質発現系で作製した。CD 測定では、Sp1-FxH4 のアポ体および Zn(II)配位体の二次構造形成について検討した。さらに、ゲルシフト法によりオリゴヌクレオチドに対する結合能および切断能の検討を行った。

【結果および考察】

FxH4(x=1,2,3)の CD スペクトル測定では、F1H4 および F2H4 は Zn(II)存在下で ββα 構造を形成しており、F3H4 はランダム構造を形成していることが明らかとなった。3FxH4(x=1,2)を用いたゲルシフト法の結果から、すべてのタンパク質で DNA に対する結合能をもつことが明らかとなった。また、3F1H4 のみに 2 つのバンドが確認されたことから、3 フィンガーの F1H4 により基質 DNA の切断が行われ 2 つのバンドが生じたと考えられた。次に、3F-FxH4(x=1,2)および 3F-Fx(x=1,2)を用いたゲルシフト法では、いずれも同程度の DNA 結合親和性を示したことから、DNA 親和性は Sp1wt 部分により決定していると考えられる。また、オリゴ DNA の標的 GC 配列位置を変化させると、2 つのバンド間の距離の長さが異なったことから、4 フィンガーの F1H4 の部分で DNA の切断が起こっていると考えられる。以上の結果より、3F-F1H4 が 3F-F2H4 よりオリゴヌクレオチドをより効率的に切断することが明らかとなった。

pH感知性の運動を示すベシクル

名和愛利香、山本大吾、塩井章久

同志社大学大学院理工学研究科

E-mail address: eun1703@mail4.doshisha.ac.jp

生物は自らの体内において実際に多様に生体システムを機能させている。そこで、従来型のシステムに生物に見られるような自律的・自発的な運動性を与えることができれば、生物を模倣したような化学システムを構築できるのではないかと考えられる。本研究では、pH勾配下における様々な構造をもったオレイン酸系ベシクル（オレイン酸とそれがイオン化した物質によって構成されている）の様々な周期的^[1]・可逆的^[2]な運動を実現し、その運動メカニズムの解明を通して生体機能を模倣するようなベシクルを設計するためのモデル系として確立することを目的として、実験および数理モデルによる運動機構の検討をおこなった。Fig. 1 の左にベシクルの周期的運動、Fig. 1 の右に可逆的運動の観察結果を示す。ベシクルの周期的運動では外見上二重球のベシクルが反転と回転を交互に繰り返し、サイズの減少は伴わずに運動を持続させた。可逆的運動では扁平状のベシクルが高pH側に向かってアメーバのような擬足を伸縮させる様子が観察された。これらのベシクルの運動機構を物理的に理解するとともに、得られた知見に基づいて、化学反応（グルコースの酸化反応）を利用してベシクル自体が周囲にpH変動を生み出し運動する系を見出した^[3]。

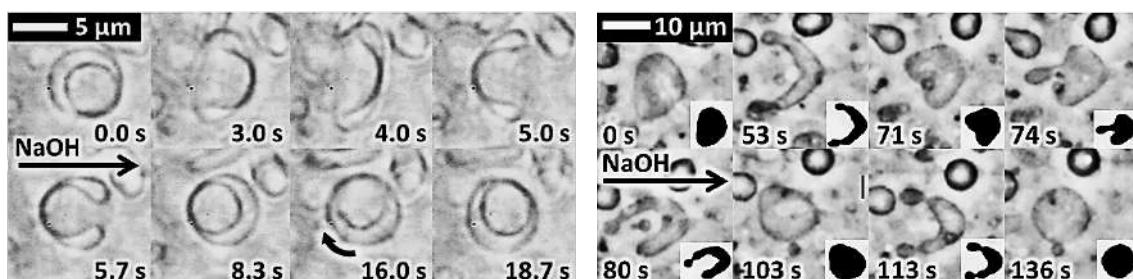


Fig.1 The left figure is time course of a vesicle shape change. 1 M NaOH aqueous solution diffuses from the left side of vesicle, and the initial pH of vesicle solution is approximately 8.0. The right figure is time course of the reversible extrusion of pseudopod-like structure. 100 mM NaOH aqueous solution diffuses from the left side of vesicle, and the initial pH of vesicle solution is approximately 8.4.

- [1] E. Nawa, Y. Nishigaki, D. Yamamoto and A. Shioi, *Soft Matter*, **9**, 7832 (2013).
- [2] E. Nawa, D. Yamamoto and A. Shioi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 1536 (2015).
- [3] E. Nawa, K. Owaki, D. Sakashita, D. Yamamoto and A. Shioi, *Colloid Interface Sci. Commun.*, **8**, 10, (2016).

水面上でのフッ素系油の蒸発誘起型自発運動

山本 大吾

(同志社大学理工学部化学システム創成工学科)

E-mail address: dyamamot@mail.doshisha.ac.jp

1. 緒言

近年、材料化学の分野において、物質の「自己組織化」に関する研究が盛んに行なわれている。例えば、コロイド結晶、ラングミュア膜、自己集合膜、超分子などの形成は自己組織化の例であるが、これらは構造論・平衡論に基づく静的な自己組織化である。一方、BZ 反応などの化学的な振動反応、自然界では魚の群泳など、自発的なリズムやパターンの形成などが時間とともに変化するような非平衡系に現れる秩序構造を動的な「自己組織化」と呼ぶ。ここで、自然現象の多くが非平衡的現象であるにも拘わらず、平衡系と比べて系が非常に複雑であるため詳細なメカニズムの解明が未だに進んでいないことが現代科学の一つの課題となっている。本研究では新たな動的「自己組織化」の例を提示し、できる限りシンプルな数理モデルを立てることを目的としている。今回、水面に滴下したフッ素系油の液滴の自律運動系に関して、興味深い非平衡現象が観察されたので報告する。

2. 実験方法

ペトリ皿(直径 91 mm)に超純水を 30 ml いれ、その上にフッ素系油である perfluoroctylbromide (PFOB) または perfluorodecalin (PFD) を数 μl 滴下した時の様子をマイクロスコープ (VW-6000/5000、Keyence) を用いて観察した。また、水面に数 μl 滴下した炭化水素油(リノール酸)または円形のアルミ箔の近傍に PFD を数 μl 滴下した複合物体(三相系)の観察も行った。

3. 結果と考察

3.1 PFOB の自己組織化

PFOB を水面に 8 μl 滴下した後の様子を図 1 に示す。PFOB を水面に滴下すると一瞬にして水面全体に広がり薄膜(厚み: ~1 μm)を形成し、図 1(a) のように PFOB が局所的に蒸発することで薄膜に水面が曝露した空孔が観察された。空孔がある程度大きくなると PFOB/水の界面である薄膜の周縁部に隆起部が数珠状に形成し、ミクロサイズの液滴として図 1(b) のように PFOB 薄膜から空孔に向かって連続的に放出された。ミクロ滴の放出は非常にリズミカルでおよそ一定の周期で放射状に放出されていた。放射状に一次元配列したミクロ滴は集団として伸縮を繰り返し、図 1(c) のようにヘキサゴナル状に二次元配列した。その後、約 10 秒程度で蒸発し、PFOB ミクロ滴はなくなった¹⁾。

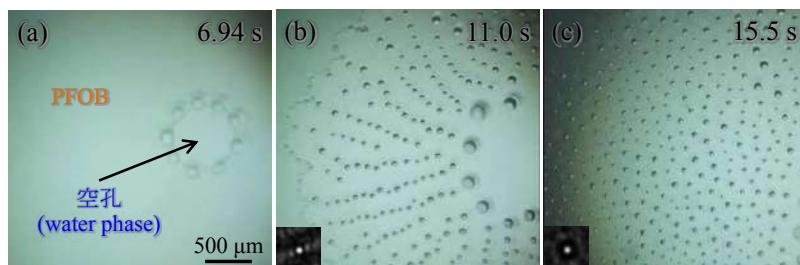


図 1 水面でのフッ素系油(PFOB)の滴群の 1D→2D パターンへの自発形成

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
2015年度 成果報告会

3.2 PFD の自発変形と PFD 複合物体の規則運動

開放系において PFD を $10 \mu\text{L}$ 滴下した後の画像を図 2 に示す。PFD を水面に滴下すると油滴表面が(a)のように少しずつ同心円状に拡がり、その後 (b)で示すようにフィンガリング現象に似た拡がり方が見られた。さらに、その先端部から分裂し、(c)のように小さな油滴群を放出した。その油滴群は(d)のように、集団として局所的な配置をとりながら、合一することなくお互いにぶつからない距離で不規則な動きを繰り返した。ここで、PFOB の場合には水面全体に瞬時に拡がり薄膜を形成し、そこからカスケード的な時空間パターンが生み出されるが、この挙動の違いは、フッ素系油の蒸発速度および水表面への濡れ性のバランスの違いに起因するものであると考えられる。

また、リノール酸を滴下し、その近傍に PFD を滴下した PFD/リノール酸複合物体の運動の様子を図 3 に示す。PFD を滴下後、二つの滴の接触が起こり、PFD がリノール酸を牽引するような並進運動が観察された。さらに、これらの二滴はペトリ皿の壁に近づくと進行方向を変化させ、壁と一定距離を保ちながら時計または反時計回りに周回運動を行い、決して壁に接触しなかった。次に、円形のアルミ箔の近傍に PFD を滴下した PFD/Al 複合物体の運動の様子を図 4 に示す。リノール酸を用いた時と同様に周回運動を示したが、興味深いことにリノール酸では PFD がリノール酸を牽引しながら運動していたのに対し、アルミ箔を用いると PFD がアルミ箔を押しながら周回運動を行うことがわかつた。

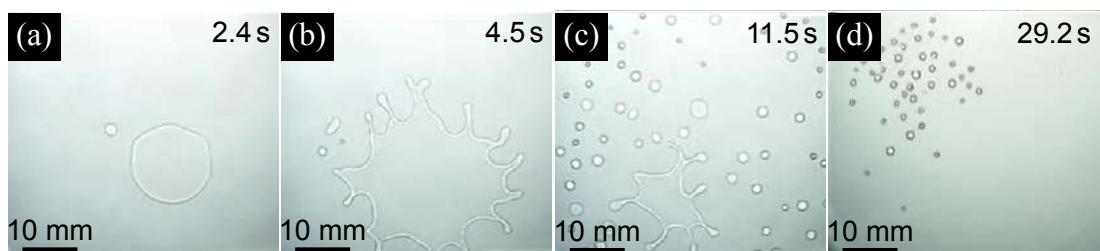


図 2 水面での PFD の自己組織化

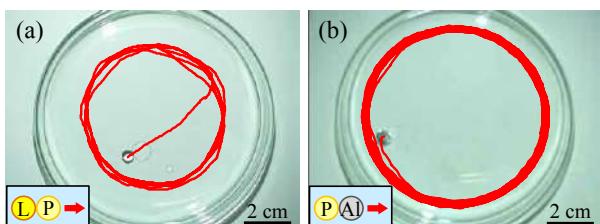


図 3 (a) PFD/リノール酸複合物体の運動の軌跡 (15 min)
(b) PFD/Al 複合物体の運動の軌跡 (15 min)

4. 結言

フッ素系油を水面に滴下したシンプルな系で、自己組織化、自発変形・規則運動などの新たな自発運動パターンを発現させることができた。

参考文献

- [1] D. Yamamoto, C. Nakajima, A. Shioi, M. P. Krafft, and K. Yoshikawa, *Nat. Commun.*, **6**, 7189 (2015)

イオン液体中の分子の並進ならびに回転ダイナミクスの研究

木村佳文、八坂能郎、機田祐人

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻

yokimrua@mail.doshisha.ac.jp

【諸言】イオン液体は、構成するカチオンやアニオンによって、種々の特性を示すことが知られている。近年、生体系とイオン液体との親和性にも興味がもたれ、新しい研究開発が進んでいる。このようなイオン液体の可能性を開拓していくにあたって、イオン液体中の分子ダイナミクスの詳細を明らかにすることは重要である。溶液中の分子の回転運動や並進運動は、溶質と溶媒の相互作用によって大きく影響を受ける。本発表では、イオン液体のカチオンの種類を様々に変えたときに、溶質分子の並進および回転ダイナミクスがどのように変化するのかを、特に小さい分子(一酸化炭素 CO)に的を絞って検討した結果を報告する。

【実験】CO の並進拡散係数は、ジフェニルシクロプロペノンの光解離反応を利用した過渡回折格子法(TG 法)によって決定した。CO の回転緩和時間は同位体置換(¹⁷O)をおこなった CO を用意し、¹⁷O 核の縦緩和時間 T_1 を NMR をもちいて測定し、回転緩和時間を決定した。イオン液体としては、アニオンをNTf₂⁻に統一し、アルキル鎖長の短いイミダゾリウムカチオン(C₂C₁Im⁺, C₄C₁Im⁺)と、長いアルキル鎖長をもつホスホニウムカチオン(P₄₄₄₄⁺, P₈₈₈₈⁺)で測定を行った。

【結果と考察】Fig.1 に 298K の C₂C₁Im⁺ 中での値を基準として並進拡散係数と回転緩和時間が相対的にどのように変化するかを示す。図から明らかなように並進拡散と回転緩和がほぼ同じような T/η 依存性を示していることがわかる。また同じ T/η ではアルキル鎖の長いイオン液体中では運動が速いことがわかる。これらの結果は CO がバルクの粘度が運動の指標とはならず、不均一な溶媒和環境が重要な役割を果たしていることを示している。

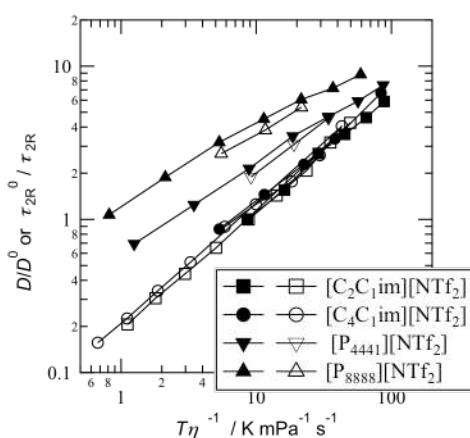


Fig. 1. η/T dependence of τ_{2R} of CO in various ILs at different temperatures.

イオン液体中の疎水場で活性化されたギ酸イオンによる 芳香族塩素化合物の脱塩素化

八坂能郎、田中輝、木村佳文

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

yyasaka@mail.doshisha.ac.jp

有機塩素化合物は有機溶媒や医薬品、プラスチックの原料などとして幅広い用途をもつが、有害で環境残留性が高い物質も多い。本研究では芳香族有機塩素化合物がギ酸イオンによって還元的に脱塩素化される新規反応の詳細を調べた。

脱塩素化反応はイオン液体に有機塩素化合物を溶解し、温度一定条件下（30から50°C）において攪拌することで進行する。用いたイオン液体はテトラオクチルホスホニウムギ酸塩（融点13°C）で、溶媒兼反応物として働く。有機塩素化合物として1,3-ジクロロベンゼンを選んだ。Fig. 1に¹³C NMRで見た反応の経時変化を示す。生成物は、一原子脱塩素化されたモノクロロベンゼンと帰属された。このモノクロロベンゼンのメタ位の水素原子は、ギ酸イオンからもたらされたことが同位体ラベル実験から判明した。

つぎにイオン液体をわざと含水させ、それ以外は同条件で脱塩素化を試みたところ、水のモル比がギ酸イオンに対して1に達した時点で反応収率が無水条件と比べ1/10に低下した。このことから、ギ酸イオンは水分子と水素結合することで還元性を失うことが推測される。イオン液体中という疎水性環境下でギ酸イオンが活性化されることが、脱塩素化反応の鍵になっていることがわかった。

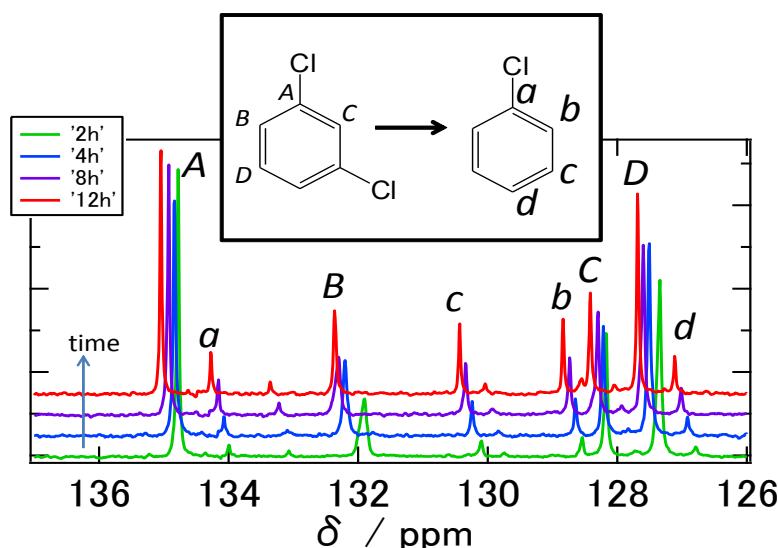


Fig. 1. The time evolution of ¹³C NMR spectra for the dechlorination of 1,3-dichlorobenzene.

Protect effect of ascorbic acid against double-strand breaks in genome-sized DNA evaluated by single-molecule observation

馬 越・吉川祐子・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一

同志社大学生命医科学研究科・生命物理研究室

E-mail address: emp1501@mail4.doshisha.ac.jp

The protective effect of ascorbic acid (AA) against double-strand breaks (DSBs) in DNA caused by various sources of radiation was evaluated by single-molecule observation of giant DNA (T4 DNA; 166 kbp) through the use of fluorescence microscopy. Samples were exposed to three different forms of radiation: visible light, γ -ray and ultrasound. With regard to irradiation with visible light in the presence of a photo-sensitizer to induce active oxygen, 1 mM AA reduced the damage down to ca.30%. The same concentration of AA decreased the damage caused by γ -ray to ca.65%. In contrast, AA had almost no protective effect against the damage caused by ultrasound.

Summarizing the results and discussion we may conclude as that: 1) The significant protective effect of AA against photo-induced damage may reflect the effective diminish of reactive oxygen species (ROS) by AA. 2) There exist the protective effect by AA but a little bit weaker than the case of photo irradiation. This may be due to the generation of plural number of ROS by single photon of γ -ray. Surviving oxygen species against the diminishment effect by AA may cause DSBs. 3) As for the DSBs by ultrasound, physical damage caused by the shockwave through the generation of cavitation dominates. Thus, the chemical effect of AA is considered to be negligible small for the protection of DSBs.

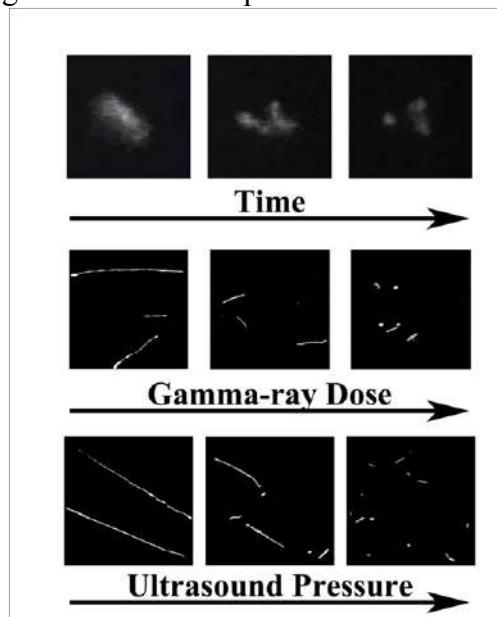


Figure 1: Representative images of single-molecule observation

ガス刺激に対する液滴の正/負の走化性

作田 浩輝、貞包 浩一朗、剣持 貴弘、吉川 研一

同志社大学大学院 生命医科学研究科

hisakuta@dmpl.doshisha.ac.jp

[諸言]

微生物や細胞といった神経系を持たない生物が外部からの化学的な刺激に対して応答し自発的に運動することはよく知られている。それらの生物、組織は応答して運動する際、等温条件で化学エネルギーを機械エネルギーへの直接変換が行われてるが、化学応答の仕組みも含めて、感知・運動応答のメカニズムは不明な点が多く残されている。化学→運動のエネルギー変換のモデルとして自発的に運動する液滴系が注目され、近年多くの論文が報告されてきている。本研究では、このような自発的な運動をおこすことのできる液滴に、さらに刺激ガス(匂い)を嗅いで逃げるという知性を持たせ、生物の走化性を模倣する人工モデルを構築することを目的としている。

[実験、結果・考察]

酸性であるオレイン酸の cm サイズの液滴を水層の上に浮かべ、塩基性のアンモニアガスを刺激ガスとして与えた場合に生じる液滴の運動について報告する (Fig.1 (a))。オレイン酸液滴に対してアンモニアを近づけると Fig.1(b) に示すようにオレイン酸液滴はアンモニアから逃げる方向に運動した。Fig.1(c) に示す位置の時間変化より、運動開始時の駆動力を導出したところおよそ $5\mu\text{N}$ の駆動力が得られていることが分かった。この運動の原理として、オレイン酸とアンモニアの間で生じる酸塩基反応でオレイン酸がイオン化されることで界面活性を示し、界面張力が場所特異的に変化することで生じるマランゴニ流により運動が誘起されていると考えられる。加えて、塩基性のアニリン液滴と酸性の塩酸ガスによる系についても示す。アニリン・塩酸系においてはガスに引き付けられる方向に運動した。これについても議論する。

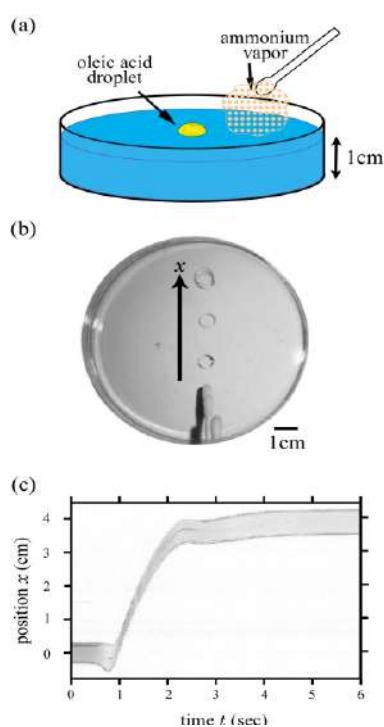


Fig. 1 (a) Experimental setup. (b) Snapshots of escaping motion. (c) Spatio-temporal diagram of the droplet motion.

レーザーによる cm サイズの固体物体の搬送

小吉 圭祐

同志社大学大学院 生命医科学研究科

E-mail address: dmp0013@mail4.doshisha.ac.jp

レーザー光を用いて非接触的に物質を操作する手法として、光ピンセット法が知られており、主に生命科学の分野で幅広く利用されている。ただし、光ピンセットでは物質が $10 \mu\text{m}$ 以上のサイズになると制御が難しくなる、という欠点がある。これに対し我々は最近、水に浮かぶ 1cm サイズの油滴をレーザー光で動かすことができることを明らかにした[1]。この手法は光ピンセットとは異なり、レーザー照射により発生するマランゴニ対流（油滴の周りに温度勾配が発生し、これに伴う界面張力差が誘起する対流）が動力の起源である [1]。

この知見を踏まえ、本研究ではレーザー光を用いて、油滴の代わりに水上に浮遊する 1cm サイズの固体物体の操作を試みた。具体的には、水上に浮遊するアルミ箔に波長 532nm のレーザー光を照射した際のアルミ箔の運動を観測した(図 1(a) 参照)。その結果、レーザーの照射によりアルミ箔が数 mm 程度、逃避運動をすることが分かった。このときの移動量、移動速度、加速度はレーザー光の強度が大きくなるにつれ大きくなつた(図 1(b) 参照)。運動の定量的な解析により、この実験系から得られる駆動力の大きさは μN スケールであると推定される(図 1(c) 参照)。駆動力はレーザー照射により生じるアルミ箔の温度勾配による界面張力差が起因していると考えられる。

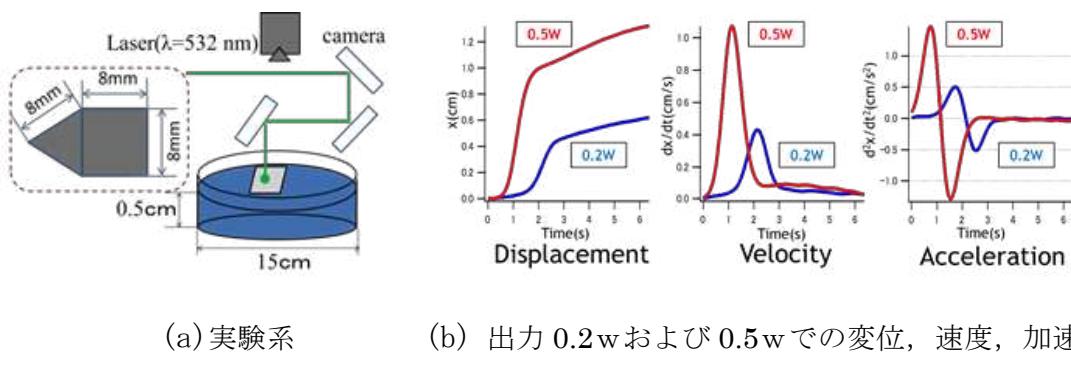


図 1 レーザーによる逃避運動

参考文献

- "Mode Bifurcation of Droplet Motion Under Stationary Laser Irradiation", F. Takabatake, et al., *J.Chem. Phys.*, 141, 051103 (2014).

直立—倒置—直立の再帰性時間発展 振動盤上の固形物体の集団運動に現れる特異性

鷹取 慧

同志社大学大学院 生命医科学研究科

E-mail address: fiddich.2006-12.20@outlook.com

これまでに鉛直方向に振動する板（図1）の上に凸型物体（図2）が作り出す運動のモードの分岐（倒置、推進、直立）について研究を進めてきており、物理学会においても自己推進粒子と関連付けて報告を複数回行っている。今回は凸型物体が密に敷き詰められた状態（図3(a)）を初期条件として、定常的な振動を印加した時の時間発展について、粒子間の配列の対称性の変化に着目して実験結果を解析した。その結果、直立—倒置—直立の回帰転移により作られたである最終状態は同じ敷き詰められた初期状態とは、全く違う形で存在していることが明らかになった。まず初期の凸型物体の配列状態は四方格子が主となっている。一方振動によって物体の自己組織化現象を利用して作られた配列状態は六方格子が支配的になっていることがわかる。この事から、回帰転移にともない、回転対称の秩序パラメータが顕著に変化していることが明確となった。初期条件の対称性と、終状態の対称性が著しくことなることを明らかにすることが出来た。このような解析に基づき、この現象が興奮波の発生として特徴づけることが出来る事を示す。さらに、疑似一次元に境界条件を制限した系についても実験を行い、再帰性が、興奮波の伝搬として観察可能であることも示すことが出来た。今回はこれらについて報告を行う予定である。

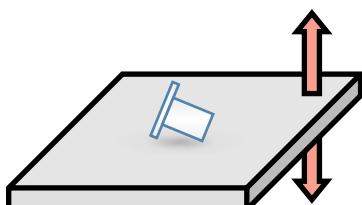


図1 鉛直方向に振動する板

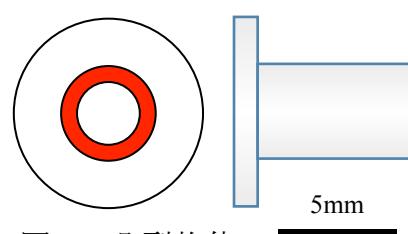


図2 凸型物体

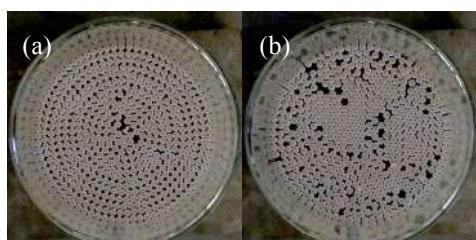


図3 敷き詰めた状態

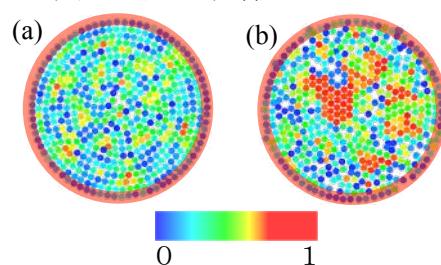


図4 初期状態と最終状態の秩序
パラメータの空間分布

ポリアミンによる遺伝子発現の促進と阻害作用の二面性

金村愛・清水佑太・吉川祐子・貞包浩一郎・剣持貴弘・吉川研一

同志社大学生命医科学部

saranichan3@gmail.com

ヒトのDNAは2重らせん構造をとり、1つの細胞核内に46本(23対)存在する。DNA1本の直径は約2nm、長さは数cmであり、46本を繋ぎ合わせると全長約2mにも達する。このように非常に細長い高分子であるゲノムDNAは、約10μmの核内に収納されており、DNAの高次構造変化が遺伝子発現の自己調節機能などに深い関わりを持つと考えられている。しかしながら、これまでには断片化された短いDNAの研究が主流で、細胞環境に近い長いゲノムサイズDNAの高次構造変化の性質については、いまだ不明な点が多い。ポリアミンは細胞分裂やタンパク質合成に関わる細胞内物質である。このポリアミンの濃度を変化させると、DNAの高次構造が変化することが報告されている。そこで、本研究では代表的な生体ポリアミンの一種であるスペルミンSP(4+)とスペルミジンSPD(3+)を用いて、DNAの遺伝子発現にポリアミンが与える影響を調べた。その結果、ポリアミンは遺伝子発現において、濃度の違いによって促進性と阻害性という全く異なる二面性を示すことを見出した。さらに、原子間顕微鏡(AFM)を用いて、ポリアミン濃度に依存したDNAの高次構造変化の計測も行った。AFM観察のデータを合わせて考察することにより、DNA遺伝子発現は、DNAがゆるく凝縮した状態のときに最も活性され、強く凝縮した状態では完全に阻害されていることが示唆された。Fig.1はポリアミンによる遺伝子発現量の変化をルシフェラーゼアッセイ法によって測定したものである。

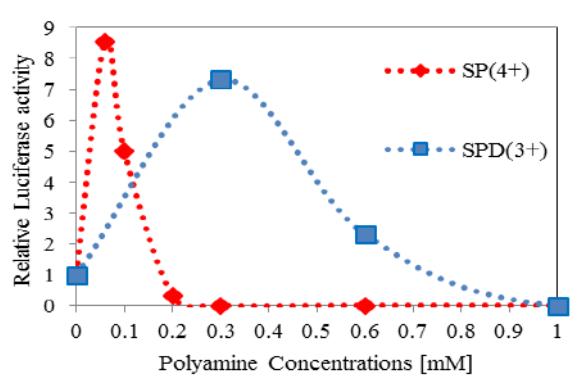


Fig. 1 Biphasic change on the activity on gene-expression caused by polyamines. Luciferase assay was adapted for T7 phage DNA (4.3 kbp).

低周波振動によるゲノムサイズDNAの二本鎖切断 一分子観察による定量的計測

菊池駿斗 吉川研一 貞包浩一朗 吉川祐子 離田倫子

同志社大学 生命医科学部 医情報学科 生命物理科学研究室

E-mail address: kyouj0903@gmail.com

【緒言】

ヒトの細胞には遺伝子情報を担うDNAが存在する。ひとつのゲノムサイズのDNAは数億塩基対[bp]、全長は数cmにもなる巨大分子である。ゲノムサイズの長鎖DNAは、試料調整のピペット操作や、攪拌時の機械的刺激が与えられると容易に切断されてしまうことが経験的に知られている。本研究では試料調整の際の一般的な混合方法で用いられる低周波の振動(攪拌による試料の混合)が引き起すDNA二本鎖切断についての傾向、およびメカニズムの解明を目的とした。

【実験】

本実験では、自然長が異なるT4-DNA($57\mu\text{m}$, 166kbp)と、 λ -DNA($16\mu\text{m}$, 48kbp)の2種類を使用した。機械的刺激として、DNA溶液を入れたマイクロチューブをボルッテクスミキサーに固定し、 3000rpm (50Hz)の低周波振動を与えた。加振する時間は $1\text{s} \sim 300\text{s}$ まで変化させた(図1)。

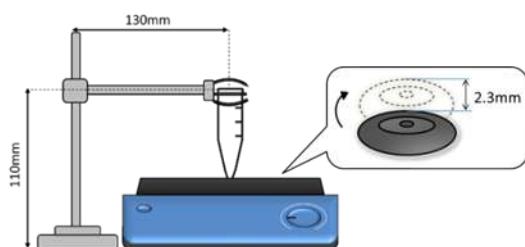


Fig.1 Experimental scheme to vibration by Voltex.

【実験成果】

加振時間におけるDNAの平均長の推移を示している。この結果よりDNAが低周波刺激により切断されたことが確認され、また、一分子観察の手法を用いたDNA二本鎖切断の定量的計測を可能とした。

今回の結果より、1)加振の最初の数秒の間での切断速度が顕著に大きい。2)切断が進行するにつれて切断速度が減少し、 $6\text{-}8\mu\text{m}$ の長さに漸近する傾向がある、といったことが明らかとなった。

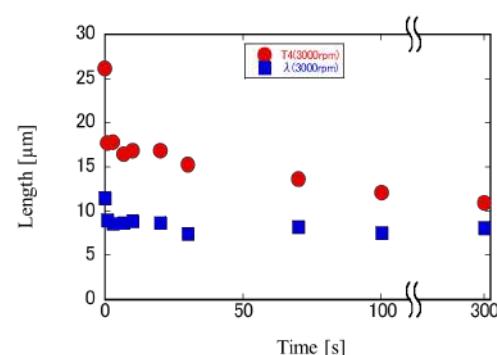


Fig.2 Change of DNA length depending on the period of mechanical agitation (3000[rpm]). Results on T4-DNA and λ -DNA are shown.

時間変動する入力の協同性による識別

上野 洋

同志社大学生命医科学部・医情報学科

uaeneau@dmpl.doshisha.ac.jp

Many physical, chemical, and biological systems exhibit a cooperative or sigmoidal response with respect to the input. In biochemistry, such behavior is called an allosteric effect. Here, we demonstrate that a system with such properties can be used to discriminate the amplitude or frequency of an external periodic perturbation. Numerical simulations performed for a model sigmoidal kinetics [Figure 1] illustrate that there exists a narrow range of frequencies and amplitudes within which the system evolves toward significantly different states [Figure 2]. Therefore, observation of system evolution should provide information about the characteristics of the perturbation. The discrimination properties for periodic perturbation are generic. They can be observed in various dynamical systems [2] and for different types of periodic perturbation. (文献[1] Abstract より。註は発表者。)

$$(1) \frac{dx}{dt} = -ax + y + A(1 + (2\pi ft + \phi_0))$$

$$(2) \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\varepsilon} \left(\frac{x^n}{1+x^n} - y \right)$$

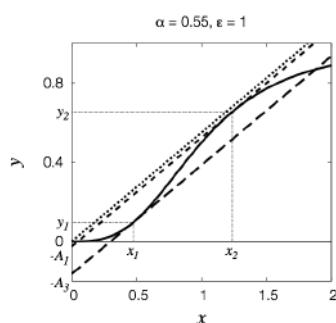


Figure 1: 上式、周期的非自律系のヌルクライ。破線 (1) は入力の振幅 A の値に従い周期的に振動しながら、実線 (2) と共に固定点を与える。

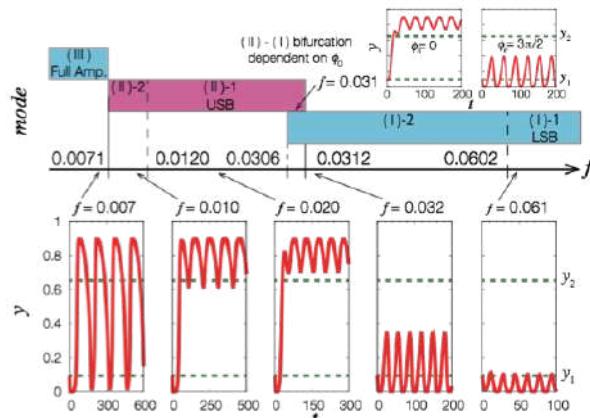


Figure 2: この周期的非自律系の時間発展 ($A = 0.12$ に固定)。振動数 f の値に応じて、(III)～(II)では緩やかに、他方(II)～(I)では鋭く転移する。

参考文献

1. HU, T. Tsuruyama, B. Nowakowski, J. Gorecki, and K. Yoshikawa, Chaos **25**, 103115 (2015).
2. J. Gorecki, HU, and K. Yoshikawa et al., Sensing time dependent inflow parameters with an enzymatic reaction, 2016, submitted

1st Nano/Bioscience International Symposium

**Research Center for Nano-Bioscience
Doshisha University**

Nano/Bioscience International Symposium

Keido-kan KD201, Doshisha University, Kyotanabe Campus

Friday, 7 Oct 2016

9:20 Opening Remarks Masahito Kodera (Doshisha University)

General Lectures (9:30–10:50) [Chair: A. Shioi]

9:30–9:50

GL-1 “Synthesis of cyclodextrins bearing a cell-penetrating peptide”

Hiroaki Kitagishi (Doshisha University)

9:50–10:10

GL-2 “Regular motion of an oil/water interface depending on several kinds of cations”

Akihisa Shioi (Doshisha University)

10:10-10:30

GL-3 “Synthetically and Biologically Useful Molecules Based on Bioinspired Complexes”

Yutaka Hitomi (Doshisha University)

10:30–10:50

GL-4 “Divalent cation shrinks DNA but inhibits its compaction with trivalent cation“

Takahiro Kenmotsu (Doshisha University)

Break (10:50–11:00)

A Special Lecture (11:00–11:40) [Chair: M. Kodera]

SL-1 “Vertical Innovation - A Colorful Life” (in Japanese)

Dr. Makoto Shimazaki (Otsuka Pharmaceutical)

Lunch Break (11:40–13:00)

Student Session (13:00–14:15)

[Chair: Y. Urano]

13:00–13:15

- S-1 “Chemo-sensitive liquid droplet: Attractive/Repulsive motion against gas stimuli”

Hiroki Sakuta (Doshisha University)

13:15–13:30

- S-2 “Artificial GFP model from peptide-polymer hybrids”

Shin-nosuke Nishimura (Doshisha University)

13:30–13:45

- S-3 “The physiological roles of endogenous CO revealed by its selective depletion in the blood”

Saika Minegishi (Doshisha University)

13:45–14:00

- S-4 “Phase transition in a single giant DNA molecule: Differences between 1-propanol and 2-propanol aqueous solutions

Yue Ma (Doshisha University)

14:00–14:15

- S-5 “Preparation and characterization of a series of iron(III) hydroperoxo species having a carboxamido ligand”

Ryosuke Sakai (Doshisha University)

Break (14:15–14:30)**Invited Lectures (14:30–17:30)**

14:30–15:20 [Chair: Y. Hitomi]

- IL-1 “Single molecule imaging approach to reveal molecular motions and functions in cellular events”

Dr. Hideaki Yoshimura (The University of Tokyo)

15:20–16:20 [Chair: D. Yamamoto]
IL-2 “Structural variety in polyelectrolyte-surfactant complexes (PESCs)
- Dependence on pH and composition“
Prof. Michael Gladzielski (Technische Universität Berlin)

Break (16:20–16:30)

16:30–17:30 [Chair: S. Negi]
IL-3 “Synthetic molecules for cell biology and cell therapy“
Prof. Motonari Uesugi (Kyoto University)

Banquet (19:00–21:00, Torisei@Fushimi)

Saturday, 8 Oct 2016

Student Session II (9:20–10:35) [Chair: Y. Kimura]

9:20–9:35

- S-6 “Photo-triggered catalytic formation of hydrogen peroxide inside cells via nitric oxide release from a manganese nitrosyl complex”

Yuji Iwamoto (Doshisha University)

9:35–9:50

- S-7 ”Improvement of metal-based fluorescent probes for intracellular hydrogen peroxide imaging”

Ryosuke Miyachi (Doshisha University)

9:50–10:05

- S-8 ”Development of fluorescent probes for reactive oxygen species based on C-O bond cleavage

Tomokazu Suetsugi (Doshisha University)

10:05–10:20

- S-9 “Extremely high turnover for direct oxidation of benzene to phenol with H₂O₂ catalyzed by dicopper complexes”

Tomokazu Tsuji (Doshisha University)

10:20–10:35

- S-10 “Can only ssDNA be detected by anionic gold nanoparticles?”

José M. Carnerero (University of Seville)

Break (10:35–10:50)

Invited Lectures (10:50–11:50)

10:50–11:50 [Chair: T. Kemmotsu]

- IL-4 “Playing 3D templates in nano/micro scales - block copolymer, algae, diatom, and protein -

Prof. Tomokazu Iyoda (Tokyo Institute of Technology)

Lunch Break (11:50–13:10)

General Lectures (13:10–13:50)

13:10–13:30 [Chair: A. Shioi]

GL-5 “(to be inserted)”

Prof. Marie Pierre Krafft (Université de Strasbourg)

13:30–13:50 [Chair: H. Kitagishi]

GL-6 “Molecular metamorphism through π -dimerization of viologen radicals”

Dr. Christophe Kahlfuss (Université de Strasbourg)

Break (13:50–14:00)

Invited Lectures (14:00–17:30) [Chair: H. Kitagishi]

14:00–14:50

IL-5 “Playing with two metals cations and porphyrins : A new dynamic game”

Prof. Bernard Boitrel (Université de Rennes 1)

14:50–15:40

IL-6 “Redox controlled supramolecular chemistry based on viologen architectures”

Prof. Jean Weiss (Université de Strasbourg)

Break (15:40–15:50)

15:50–16:40

IL-7 “Non-noble metal electrocatalysts for hydrogen economy”

Dr. Bruno Jousselme (CEA Saclay)

16:40–17:30

IL-8 “Carbon nanotube-templated synthesis of covalent porphyrin network for oxygen reduction reaction”

Dr. Stephane Campidelli (CEA Saclay)

Closing (17:30–17:40)

Access



恵道館 (Keido-kan) KD201 教室



Synthesis of Cyclodextrins Bearing a Cell-Penetrating Peptide

Hiroaki Kitagishi, Atsuki Nakagami, Naomi Hasegawa

Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan

The use of cell-penetrating peptides (CPPs) for intracellular delivery of molecules across the cell membrane has been paid much attention because of their potentials for therapeutic applications. CPP is typically a short peptide consisting of less than 30 amino acids with a high basic amino acid density. Among CPPs, oligoarginine peptide is known to show high efficiency to translocate through the cell membranes. In this study, we show the oligoarginine-conjugated cyclodextrins (R8-CDs) as non-covalent intracellular delivery tools for guest molecules of CDs.

We first used a water-soluble porphyrin as a fluorescent guest molecule to demonstrate the non-covalent intracellular delivery. The UV-vis and NMR measurements revealed that R8-CD^{Me} formed a stable 2:1 inclusion complex with TPPS in aqueous solution. The cellular uptake of R8-CD^{Me} complexed with TPPS was studied using HeLa cells. The fluorescence confocal microscope and flow cytometry measurements revealed that the inclusion complex was taken by the cells and localized in the cytosol. The structure of the inclusion complex was studied using BODIPY-labeled R8-CD^{Me}, which showed fluorescent energy transfer (FRET) between TPPS in the inclusion state in the solution. As a result, clear FRET phenomenon was observed in the living cells. The result suggests that the supramolecular complexation between R8-CD^{Me} and TPPS also occurred in the living cells.

Then we used a fluorescent molecule having an adamantane tag as a guest molecule for the intracellular delivery by R8-CD or R8-CD^{Me}. In this case, the adamantane tag was more preferably captured by R8-CD than by R8-CD^{Me}. Therefore, the adamantane tagged fluorophore was effectively delivered into the cells by the complexation with R8-CD.

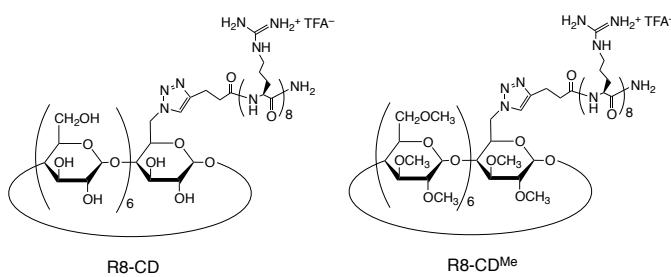


Figure 1. Structures of R8-CD and R8-CD^{Me}.

Ref. H. Kitagishi, F. Chai, S. Negi, Y. Sugiura, K. Kano, *Chem. Comm.* **2015**, 51, 2421.

Regular motion of an oil/water interface depending on several kinds of cations

Akihisa Shioi

Department of Chemical Engineering & Materials Science, Doshisha University

Moving colloids driven by chemical reactions can move in characteristic ways that resemble the movements of living matter. Typical examples of this are systems that exhibit chemotactic and stimulus-responsive behaviors. Self-moving colloids containing liquid droplets have recently been studied in depth, where the Marangoni effect plays a crucial role.

An oil/water interface containing an oil-soluble anionic surfactant, bis(2-ethylhexyl) phosphate (DEHP), has been found to exhibit self-agitation¹. Spontaneous motion and tension oscillation of this oil/water interface responds to specific cations. Ion exchange between the anionic surfactant and cation caused the instability. The results showed that the surfactant-cation combination forms an oil-soluble complex with reduced surface activity. These molecules are aggregated at the oil/water interface. This aggregation retarded the desorption rate of the complex. We were able to generate ion-selective instability by imposing mechanical and electrochemical perturbations to the interface at equilibrium. The results from these efforts suggested that the aggregation is a type of thermodynamic transition and is required for the onset of instability.

When a float was put at the interface, it exhibited back-and-forth, intermittent, or vibrational motion depending on the cation species present. Most forms of biological motion are sensitive to the presence of specific cations, such as Ca^{2+} , Na^+ , and K^+ . These cations affect the macroscopic characteristics of the motion. If ionic (chemical) control of the macroscopic motion can be achieved without using biomolecules, then biomimetic motion can be used in numerous technologies using colloidal systems. Moreover, an understanding of how the macroscopic nature of spontaneous motion is produced depending on the cation species provides insight that could aid in the design of colloidal systems in which biomimetic motion occurs. In this study, interplay between microscopic desorption and the macroscopic flow provides a unique spatiotemporal pattern.

Reference

- (1) Shioi et al., *Langmuir*, 16, 8383 (2000); *ibid*, 18, 5516 (2002); *ibid*, 27, 14131 (2011); *ibid*, 31, 11005 (2015); *Chaos*, 22, 037111 (2012); *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 79, 1696 (2006); *ibid*, 87, 863 (2014); *J. Chem. Eng. Jpn*, 48, 80 (2015)

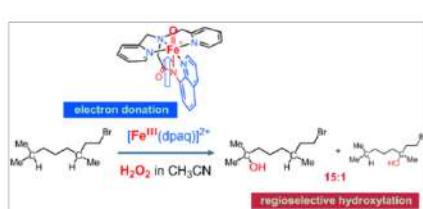
Synthetically and Biologically Useful Molecules Based on Bioinspired Complexes

Yutaka Hitomi

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, Tatara Miyakodani 1-3, Kyotanabe, Kyoto 610-0394, Japan.
E-mail: yhitomi@mail.doshisha.ac.jp

Our research interests have focused on two topics mainly; the first one is the development of synthetically and biologically useful molecules such as selective oxidation catalysts,¹⁻⁴ fluorescent probes for hydrogen peroxide,⁵⁻⁷ catalytic antioxidants,^{8,9} ethylene-gas probes,¹⁰ photo-responsive NO donors¹¹ and so on. All the molecules have been designed based on inspiration from metalloenzymes or metalloproteins. The second one is the development of biologically useful molecules with unique structures, which include membrane permeable reagents for photodynamic therapy,¹² and gold nanoparticles covered with manganese porphyrins in a monolayer as non-gadolinium-based MRI contrast agents.¹³⁻¹⁶ In this presentation, I will introduce our recent research results concerning the reaction of iron complexes with hydrogen peroxide.

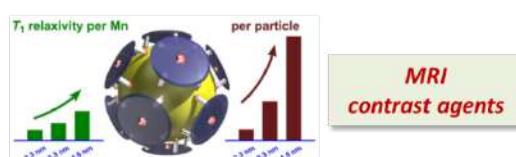
Bioinspired Catalysts



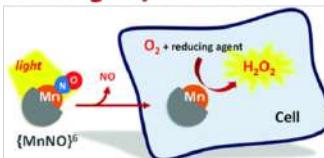
Fluorescent Probes



Porphyrin-coated Au nanoparticles



ROS Scavengers/Generators



References

1. Y. Hitomi, K. Arakawa, T. Funabiki, and M. Kodera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3448.
2. Y. Hitomi, K. Arakawa, and M. Kodera, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14697.
3. Y. Hitomi, K. Hiramatsu, K. Arakawa, T. Takeyasu, M. Hata, and M. Kodera, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 12878.
4. Y. Hitomi, K. Arakawa, and M. Kodera, *Chem. Comm.* **2014**, *50*, 7485.
5. Y. Hitomi, T. Takeyasu, T. Funabiki, and M. Kodera, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9213.
6. Y. Hitomi, T. Takeyasu, and M. Kodera, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9929.
7. Y. Hitomi, T. Takeyasu, and M. Kodera, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *87*, 819.
8. Y. Hitomi, Y. Iwamoto, A. Kashida, and M. Kodera, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8702.
9. Y. Hitomi, T. Ekawa, and Masahito Kodera, *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 732.
10. Y. Hitomi, T. Nagai, and Masahito Kodera, *Chem. Comm.* **2012**, *48*, 10392 (selected as the back cover).
11. Y. Iwamoto, M. Kodera, and Y. Hitomi, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9539.
12. A. Nomura, N. Ohashi, R. Miyachi, M. Kodera and Y. Hitomi, *Peptide Science* **2015**, 261-264.
13. Y. Hitomi, K. Aoki, R. Miyachi, J. Ohyama, M. Kodera, T. Tanaka, and F. Sugihara, *Chem. Lett.* **2014**, *12*, 1901.
14. Y. Hitomi, J. Ohyama, Y. Higuchi, K. Aoki, T. Shishido, T. Funabiki, M. Kodera, and T. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, *83*, 1392.
15. J. Ohyama, Y. Hitomi, Y. Higuchi, and T. Tanaka, *Top. Catal.* **2009**, *52*, 852.
16. J. Ohyama, Y. Hitomi, Y. Higuchi, M. Shinagawa, H. Mukai, M. Kodera, K. Teramura, T. Shishido, and T. Tanaka, *Chem. Commun.* **2008**, 6300.

Divalent cation shrinks DNA but inhibits its compaction with trivalent cation

T. Kenmotsu, C. Tongu, Y. Yoshikawa and K. Yoshikawa

Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyotanabe 610-0321, Japan

We have performed single DNA observation on the higher order structure of giant DNA molecules in solution in the presence of cations with different valences by fluorescence microscope [1]. T4 phage DNA molecules (166kbp, contour length 57 μm) as a giant genomic DNA was adapted to evaluate the conformational change. Figure 1 shows long-axis length of T4 DNA molecules observed by fluorescence microscope as a function of concentration of Mg(2+) with 0 and 0.1 mM SPD(3+). As has been well established, spermidine, SPD(3+), causes compaction on the giant DNA, where the conformational change is induced as all-or-none first-order phase transition[2]. Whereas, divalent cations, such as Mg (2+) and Ca (2+) induces loose shrinkage, characterized as gradual change of the conformation. Interestingly, it is found that Mg(2+) induces unfolding of the compact DNA in the presence of SPD as indicated in the Fig. 1, suggesting the competitive, or antagonistic, effect on the condensation of DNA. Here, it is to be noted that, in general, shielding efficiency on electronically charged species has been usually interpreted as the summation of the effects from the surrounding counter ions with different valences: Debye length $\lambda_D \sim I^{1/2}$ where ionic strength $I \sim \sum c_i Z_i^2$. The discrepancy from the classical Debye picture is attributable to the correlation effect of negative charges along the double stranded DNA chain. Based on the argument of counter ion condensation on polyelectrolytes, we may expect the present of relatively large number of counter ions on highly charged DNA. Thus, it is essentially important to evaluate the effect on the ion-exchange between the intrinsic monovalent cations and multivalent cations, when multivalent cations are added to the solution. In the presentation we will show the semi-quantitative reproduction on the antagonistic effect with a simple theory by introducing the change of the net translational entropy of coexisting cations as shown in Fig.2 [2].

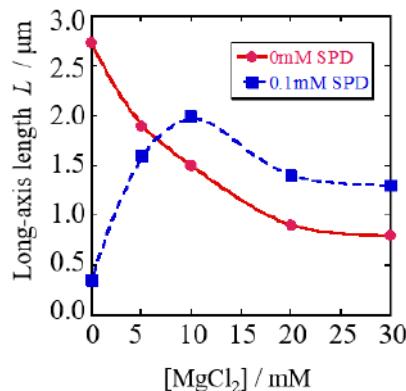


Figure 1: Experimental: Long-axis length of T4 DNA molecule observed by fluorescence microscopy with MgCl₂ in the solution of 0 and 0.1 mM SPD [1].

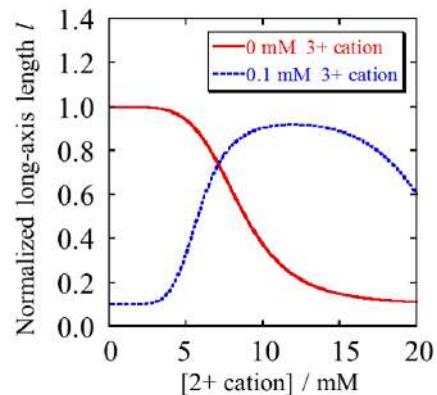


Figure 2: Theoretical: Normalized long-axis length of DNA with MgCl₂ in the solution of 0 and 0.1 mM SPD [1].

REFERENCES

1. C. Tongu, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa, A. Zinchenko, N. Chen, K. Yoshikawa, J. Chem. Phys., **144**, 205101 (2016).
2. M. Takahashi, K. Yoshikawa, V. V. Vasilevskaya and A. R. Khokhlov, J. Phys. Chem. B, **101**, 9396 (1997).

Vertical Innovation - A Colorful Life

島崎 真 Makoto Shimazaki, Ph.D.

大塚製薬株式会社

執行役員 メディカルコミュニケーション担当

要旨：高齢化社会への突入とともに変革の時代がやってきた。デジタル革命で感光式フィルムやレコード盤が消え去ったときと同規模の変流が吹き荒れ、製薬企業はいかにこの環境に順応し、どう生き延びるかを考えなくてはならない。鳥の目で世界を見てみよう。空高くから垂直方向に見下ろす景色は新鮮で斬新なアイデアを与えてくれる。10年前、外資系製薬メーカーは日本の研究所を次々と閉鎖した。Specialty Medicineへのシフト。同時にジェネリック医薬品という言葉が拡がった。そして、この10年間に分子生物学の進歩もあり、分子標的薬やバイオ医薬品が登場し、抗がん剤を筆頭に Specialty Medicine のパラダイムシフトが起きた。しかし、それらは今、崖っぷちに立たされている。「パテント・クリフ」。Specialty 領域にもジェネリック医薬品が参入してくる。しかも欧米で Complex Generic と呼ばれる革新性をもったジェネリック医薬品。このような時代にあっても、未だに良い治療法がない疾病の数は2万とも3万とも言われている。これまでのやり方・考え方では、これらの疾病を克服することは難しいので新たな視点での革新が必要となる。それが Vertical Innovation。天空から見下ろす景色にはイロイロな要素が詰まっている。ビジネスもさることながら、個人のキャリアにも複数のイロが求められている。AIが益々進化して職を奪い取られないためにも、複雑なスキルを身につけることが望ましい。製薬業界の時流と環境の変化を演者のキャリアと照らしあわせながら述べさせていただく。

Chemo-sensitive liquid droplet: Attractive/Repulsive motion against gas stimuli

Hiroki Sakuta

Lab. of Life Physics, Grad. Sch. Life and Medical Sciences, Doshisha Univ.

We report the chemotactic behavior of a liquid oil droplet, stimulated by a gas. We will show experimental verification on the formation of self-moving object with the ability of chemotactic response, by adapting floating oil droplets on a water surface.

It is found, for example, that an acid droplet of oleic acid indicated the repulsive motion against ammonia vapor, negative chemotaxis against unfavorable gas. We observed the motion of cm-sized droplet of oleic acid in response to ammonium vapor as shown in Fig. 1. After ca. 1 sec on the administration of ammonia vapor, the droplet began to move toward the opposite direction of the stimulating gas, continued the motion for the length of several cm, and then finally stopped. From the analysis of the profile of the time-dependent motion, we evaluated the driving force on the initial stage of the escaping motion and got the value of several μN as the driving force. The mechanism such chemotactic behavior will be discussed in terms of the induction of spatial gradient of interfacial tension caused by the generation of surface-activity with ionized oleic acid. We have measured the flow profile to analyze the chemotactic motion in detail. It was confirmed that the flow on the two-dimensional surface play the most predominant role on the self-propelled motion after the exposure to the gas stimuli.

On a similar system, we found the occurrence of positive chemotaxis, attractive motion, of aniline droplet to the hydrochloric acid vapor, as shown in Fig. 2. In this experiment, the interfacial tension close to the gas stimuli is expected to increase because the positively charged aniline complexed with hydrochloric acid tends to dissolve into the bulk aqueous layer, i.e., a gradient of interfacial tension is generated between the sides of the droplet.

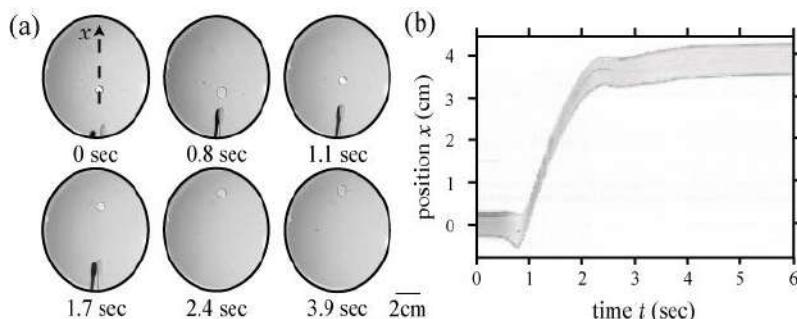


Fig.1 Repulsive motion of oleic acid droplet against NH_3 vapor.⁴

(a) Snapshots of an oleic acid droplet moving away from vapor.

(b) Spatio-temporal diagram of droplet motion

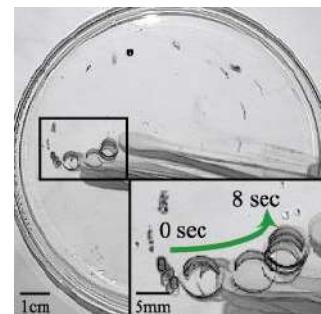


Fig. 2 Attractive motion of aniline droplet toward HCl vapor.⁴

Superimposed images of motion

REFERENCES

1. K. Yoshikawa and N. Magome, Bull. Chem. Soc. Japan, 66, 3352(1993).
2. N. Magome and K. Yoshikawa, J. Phys. Chem., 100, 19102(1996).
3. Y. J. Chen, Y. Nagamine, K. Yoshikawa, Phys. Rev. E, 80, 016303(2009).
4. H. Sakuta, N. Magome, Y. Mori, K. Yoshikawa, Appl. Phys. Lett., 108, 203703(2016).

Artificial GFP Model from Peptide-Polymer Hybrids

Shin-nosuke NISHIMURA, Nobuyuki HIGASHI, Tomoyuki KOGA

Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Doshisha University

INTRODUCTION

The green fluorescent protein (GFP) is recently used in various fields, especially in molecular biology field, because it shows fluorescence *via* intramolecular cyclization of β -barrel-surrounded Phe-Ser-Tyr-Gly-Val (FSYGV) peptide core. The fluorescence emission mechanism of GFP has been actively investigated, however, there is no report on the accomplishment of GFP-like cyclization of the FSYGV peptide core by chemical approach. To establish an artificial GFP model using peptide-polymer hybrids, various peptide-polymer hybrids inspired by GFP-high order structure were newly designed (Figure 1). The strategy in this work is quite simple, namely GFP-based FSYGV oligopeptide is employed as core segment and amphiphilic block polymer is introduced at both N- and C-termini of the peptide as hydrophobic and hydrophilic segments instead of β -barrel structure of native GFP. In this study, various hybrid polymers were synthesized and their fluorescence properties were examined in detail.

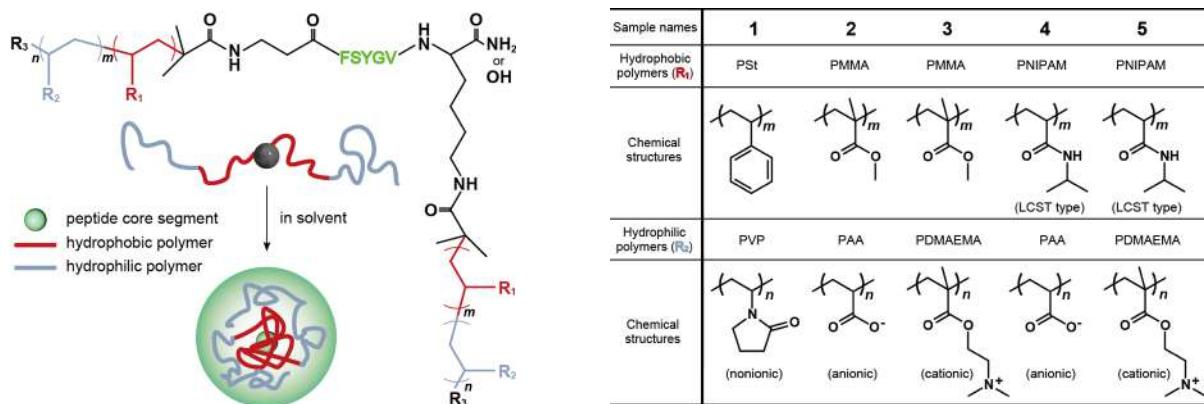


Figure 1. Chemical structure of peptide-polymer hybrid and its structural model in solvent (Left). Polymer species employed in this study as hydrophobic (R₁) and hydrophilic (R₂) blocks (Right).

RESULTS AND DISCUSSION

Objective peptide-polymer hybrids (**1-5**) were synthesized by combining a solid phase peptide synthesis using Fmoc chemistry with an atom transfer radical polymerization or a reversible addition-fragmentation chain transfer radical polymerization. These hybrid polymers were characterized by ¹H NMR and GPC analyses. Water-soluble hybrid polymers **2-5**, except for **1** that was insoluble to water, were subsequently subjected to the fluorescence study. Interestingly, hybrid polymers **4** and **5**, which have common PNIPAM as hydrophobic segments, showed green fluorescence with an emission maximum at 510 nm in water ($\lambda_{ex} = 472$ nm), although **2** and **3** did not. Furthermore, fluorescence intensity of hybrid polymer **4** with PAA as hydrophilic segments increased stepwise and drastically by repeating thermal cycle from 4 to 60°C. Thermo-induced increment in hydrophobicity of PNIPAM segment, as well as their conformational change, seems to promote the transformation of linear FSYGV peptide core into fluorescent cyclic one. On the other hand, PDMAEMA-containing hybrid polymer **5** showed similar thermal effect as of **4**, but the fluorescence intensity was significantly lower than that of **4**. Thus, the fluorescence behavior of this peptide-polymer hybrid system depended on the character of both hydrophobic and hydrophilic segments.

The physiological roles of endogenous CO revealed by its selective depletion in the blood

Saika Minegishi¹, Hiroaki Kitagishi¹, Shigeru Negi², Koji Kano¹

¹Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Doshisha University, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts.

Carbon monoxide (CO) is continuously produced in mammalian organisms. The major source of endogenous CO is the degradation reaction of heme by heme oxygenase (HO). The endogenous CO is bound to hemoglobin (Hb) in blood and circulates in the CO-Hb form. The functional mechanism of CO in biological systems have been extensively studied, but not fully understood due to the difficulty in preparing the loss-of-function phenotype of CO.

We previously synthesized a supramolecular complex, hemoCD, which is composed of Fe(II)porphyrin and per-O-methylated β -cyclodextrin dimer with a pyridine linker. It has been found that hemoCD is capable of capturing endogenously-produced CO in blood of rats (Figure 1)¹.

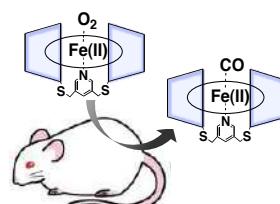


Figure 1. Removal of CO in the living organism by hemoCD.

In this study, we used hemoCD as a CO remover and the depleting effect of CO from the blood of mice was investigated. As a result, the gene expression level of heme oxygenase-1 (HO-1) in the mice liver was temporarily but strongly enhanced as measured by quantitative real-time PCR. The result suggests that the biological feedback for the CO homeostasis was activated by the HO-1 induction (Figure 2)². The concentration of hemin in the plasma of hemoCD-dosed mice was increased, indicating that the HO-1 induction can be caused by accumulation of free hemin. The removal of CO causes the formation of cell-free oxy-Hb, which is quickly oxidized to met-Hb by the reaction with reactive oxygen species such as H₂O₂ in blood. Cell-free met-Hb readily releases free hemin in blood that triggers the induction of HO-1. It is assumed that endogenous CO plays a crucial role in suppressing the autoxidation reaction of ferrous Hb to met-Hb through its ligation to the heme iron. These results suggest that the major role of endogenous CO in blood is to adjust the free hemin concentrations in the bloodstream.

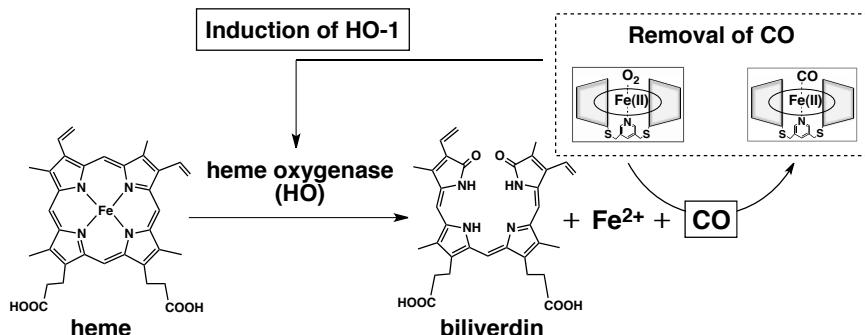


Figure 2. The homeostatic feedback system of endogenous CO.

References

- (1) H. Kitagishi, S. Negi, A. Kiriyama, A. Honbo, Y. Sugiura, A. T. Kawaguchi, K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1312–1315 (2010).
- (2) H. Kitagishi, S. Minegishi, A. Yumura, S. Negi, S. Taketani, Y. Amagase, Y. Mizukawa, T. Urushidani, Y. Sugiura, K. Kano, *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 5417–5425 (2016).

Phase transition in a single giant DNA molecule: Differences between 1-propanol and 2-propanol aqueous solutions

Yue Ma, Yuko Yoshikawa, Koichiro Sadakane, Tadahiro Kenmotsu, Kenichi Yoshikawa
Faculty of Biological and Medical Sciences, Doshisha University, Kyotanabe 610-0394, Japan

1. Introduction

During the past couple of decades, it has been found that long DNA above the size of several tens kbp exhibits unique conformational characteristics, as has been demonstrated by single molecular observation in bulk solutions with high sensitive fluorescence microscopy.¹⁻³

Here, we will report the effect of isopropanol isomers on the higher order structure of λ DNA (48 kbp) through single-molecule by fluoresce microscopy. We performed the comparative study between 1- and 2-propanols. 2-Propanol is often used to isolate DNA molecules from cells through the generation of precipitation. 1-propanol is used as a solvent in the pharmaceutical industry mainly for resins and cellulose esters.

2. Methods

2.1 Single-molecule observation of DNA molecules by fluorescence microscopy

λ DNA (48 kbp) was dissolved in propanol-water solution with a final concentration of 30 μ M in nucleotide units. The fluorescent dye YOYO-1 (final concentration: 1 μ M) was added to the DNA solution, together with the antioxidant 4% (v/v) 2-ME. All observations were carried out at around 24 °C.

2.2 Measurement of the long-axis length of single DNA molecules by fluorescence microscopy

Figure 1(a) exemplifies fluorescence images of DNA molecules in propanol-water solutions. The long-axis length, $\langle L \rangle$, was evaluated as in the corresponding schematic representation of Figure 1(b).

3. Results and Discussion

As showed in Figure 2, for DNA molecules in different concentrations of 1-propanol solutions, two minima of average length appear at 60% (v/v) and 80% (v/v). In 2-propanol solutions, the average long-axis length of DNA decreased and transited from elongated coil state to folded globule is generated around 70-75% (v/v).

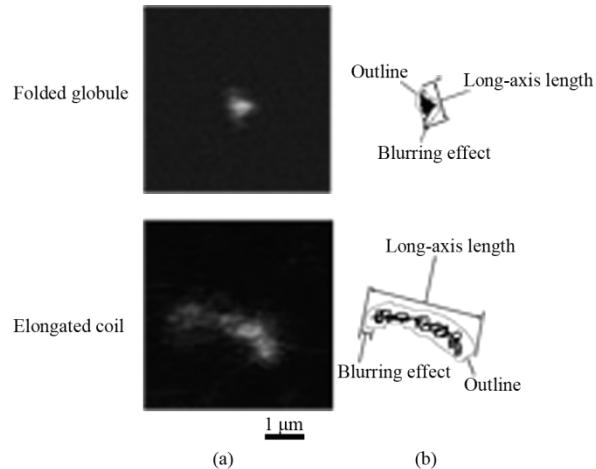


Figure 1. Fluorescent image of single DNA in 50% and 10% 1-propanol solution, together with the schematics

Above 75% (v/v), DNA maintained as folded globule and the average length of DNA molecules remains essentially the constant. The observed large difference of the effect of propanol isomers on the DNA conformation will be discussed in relation to the nano-structure of alcohol solution.³

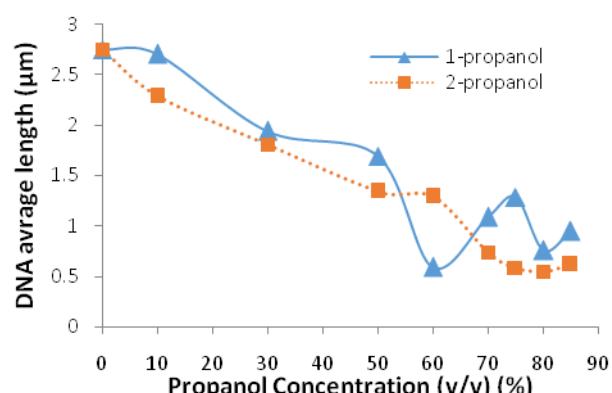


Figure 2. Average long-axis lengths of DNA, $\langle L \rangle$, vs. the concentration of propanol isomers.

4. References

1. Yue Ma, et al., Chem. Phys. Lett., **638**, 205–209 (2015).
2. M. Ueda, et al., Phys. Rev. Lett. **77**, 2133 –2136 (1996).
3. Y. Oda, et al., ChemPhysChem, **17**, 471–473 (2016).

Preparation and Characterization of a Series of Iron(III) Hydroperoxo Species Having a Carboxamido Ligand

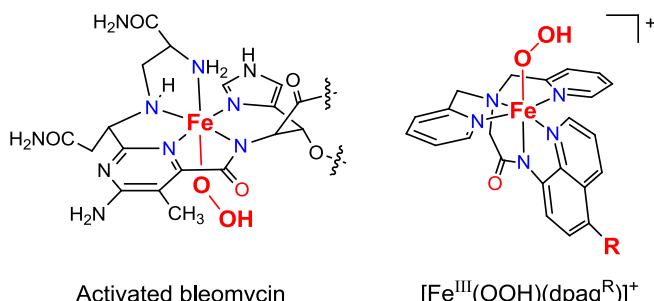
Ryosuke Sakai

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan

Iron(III) hydroperoxo species is the last detectable intermediate species prior to double strand DNA cleavage by the iron complex of a glycopeptide antitumor antibiotic, bleomycin.¹ The DNA strand scission has been proved to be initiated *via* the abstraction of the C-4' hydrogen atom of the DNA deoxyribose sugar moiety; however, it is still of intense debate whether the iron(III) hydroperoxo species is directly responsible for the oxidation of DNA or is a precursor to generate another oxidants such as iron(IV)oxo species/OH radicals or iron(V)oxo species. Recently, the direct H-atom abstraction by iron(III) hydroperoxo species was experimentally and theoretically proposed by Solomon and co-workers.² However, what controls the stability and reactivity of mononuclear nonheme iron(III) hydroperoxo species has not been clarified yet. For example, iron-bleomycin has a carboxamido ligand to the iron(III) center, but its role on the formation and reactivity of iron(III) hydroperoxo species has not been explored.

Previously, we have reported the design and synthesis of an iron(III) complex with a nitrogen-based pentadentate ligand having one carboxamide functionality, Fe^{III}dpaq (dpaq: 2-[bis(pyridine-2-ylmethyl)]amido-N-quinolin-8-yl-acetamide).³ In this study, we have prepared a series of iron complexes supported by dpaq ligands with a substituent group (R = OMe, H, Cl or NO₂) on the 5 position of the quinolone moiety to explore the effect of the electron donor ability of the carboxamido ligand on the stability and reactivity of the corresponding iron(III) hydroperoxo species.^{4,5}

Prior to the generation of iron(III) hydroperoxo species of Fe(dpaq^R), Fe^{III}dpaq^R was converted to the corresponding methoxide complex, [Fe^{III}(dpaq^R)(OMe)]⁺, by treatment of 1 equiv. of triethylamine in methanol, which was assigned by UV–Vis, EPR, and ESI-MS spectroscopies. Addition of H₂O₂ to the solution of the methoxoiron(III) complex at -40°C slowly generated a reddish purple species with a broad band at ca. 530 nm over 30 min. ESI-MS measurement suggests the formation of [Fe^{III}(dpaq^R)(OOH)]⁺. EPR spectrum of the reddish purple species showed signals at *g* = 2.28, 2.16, and 1.96 for R = H, similar to those of low-spin ABLM (*g* = 2.26, 2.17, and 1.94).



References

- Burger, R. M. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1153–1169.
- Decker, A.; Chow, M. S.; Kemsley, J. N.; Lehnert, N.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4719–4733.
- Hitomi, Y.; Arakawa, K.; Funabiki, T.; Kodera, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3448–3452.
- Hitomi, Y.; Arakawa, K.; Kodera, M. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14697–14701.
- Hitomi, Y.; Iwamoto, Y.; Kodera, M. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 2161–2167.

Single molecule imaging approach to reveal molecular motions and functions in cellular events.

Hideaki Yoshimura

Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo

Live cell fluorescence imaging, especially single molecule imaging, is a powerful technique to reveal molecular mechanisms of physiological functions through analysis of the dynamics of biomolecules in living cells. Single molecule imaging elicits variety of intracellular molecular motions such as directed movements, transient stalling of diffusion, and colocalization of molecules, which provide information to understand mechanisms of living systems. Despite its usefulness, single molecule imaging approach has not applied for endogenous RNAs. We show here a novel RNA labeling method in living cells, and single molecule imaging studies using this RNA labeling method to understand the function and mechanism of a non-coding RNA in living cells.

Non-coding RNA (ncRNA) is a recent target of interest in its physiological roles and mechanism of its functions. In this study, telomeric-repeat containing RNA, TERRA, is selected as the target ncRNA. TERRA is a transcription product from telomeres, consisting of a subtelomere region and a telomeric repeat sequence of $(UUAGGG)_n$. Several hypothetic roles of TERRA in telomere maintenance have been proposed such as transporting telomere-related proteins to telomere regions, stabilize RNA-protein complexes on telomeres, etc. However, which roles TERRA really takes is still unknown. Analysis of TERRA dynamics in living cells will provide clues to reveal the mechanisms of TERRA functions.

We developed a fluorescent probe to visualize TERRA in living cells with using a sequence-specific RNA-binding protein domain, PUM-HD, and reconstitution of fluorescent protein fragments. After binding the probe to a TERRA, a fluorescence protein reconstitutes on the TERRA to evoke fluorescence emission. Single molecule fluorescence imaging of TERRA in living cells using the present probe showed that the diffusion motion of TERRA was categorized into two modes: the free diffusive mode and the stationary mode. A noteworthy point is that some TERRA molecule around a telomere switched their diffusion modes between the two; some diffusing TERRAs were transiently confined around a telomere. This result suggests that TERRA takes a role to transport some telomere-related proteins rather than a stabilization factor of telomere complexes.

Structural Variety in Polyelectrolyte-Surfactant Complexes (PESCs) - Dependence on pH and Composition

Leonardo Chiappisi,^{1,2} Ingo Hoffmann,^{1,2} Philipp Buchold,^{1,2}, Miriam Simon,¹, Sylvain Prévost,^{1,3},
Isabelle Grillo,², Michael Gradzielski*,¹

¹ Stranskij-Laboratorium für Physikalische Chemie und Theoretische Chemie, Institut für Chemie,
Technische Universität Berlin, Berlin, Germany;

² Institut Laue-Langevin (ILL), Grenoble, France;

³ European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France

Keywords: chitosan, hyaluronate, cellulose, SAXS, SANS, polyelectrolyte-surfactant complexes (PESCs)

Complexes of surfactants with biopolymers are a very interesting way of forming nanostructured hybrid materials, which typically have a high degree of biocompatibility. Of course, due to the large variability of different biopolymers (differing with respect to chain stiffness, charge density, location of the charge, ...) and surfactants (types of head groups and hydrophobic parts), an almost endless number of combinations, with a large variety of different structures is possible (see Fig. 1) [1].

In our investigations we studied in a systematic fashion structure and properties of such complexes for different types of biopolymers, in particular: cationically modified cellulose JR400, (modified) chitosan, and hyaluronic acid (HA). They became combined with oppositely charged surfactant and the formed structures were studied by means of light, x-ray and neutron scattering (SLS, SAXS, SANS). This mesoscopic structural information was then combined with the rheological properties observed, which can vary by many orders of magnitude for an otherwise identical composition (by mass/charges), depending on the choice of biopolymer and surfactant.

From our investigations we then can draw conclusions regarding how especially the molecular build-up of the biopolymers controls the mesoscopic structure and dynamics - and thereby the macroscopic properties of these systems. As an example, the high stiffness of the HA and its location of the charge close to the backbone render it a molecule that is only weakly interacting with oppositely charged surfactant. Accordingly its intrinsically high viscosity is little affected. Very much in contrast, JR400 with its much more flexible arrangement of the charges allows to have much stronger interactions with the surfactant and by forming extended mixed aggregates an enormous enhancement in viscosity is achieved [2]. Most of these systems are quite pH-sensitive. Therefore, especially when combining chitosan with carboxylic acid surfactants, one can achieve systems with extreme pH-dependence, which can be employed for selective sequestration purposes [3].

These examples show how by appropriate choice of components from biopolymers and surfactants and their smart combination one can achieve biofriendly hybrid materials with tailor-made properties for applications from the fields of drug delivery, viscosity control or sequestration.

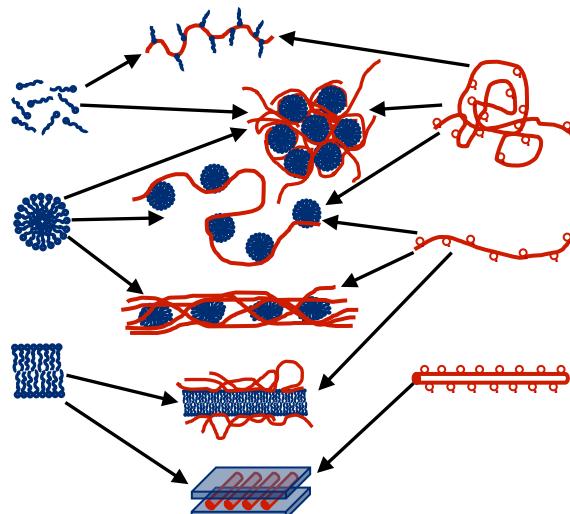


Fig. 1: Different complex structures for surfactant/polyelectrolyte complexes

- [1]. L. Chiappisi, I. Hoffmann, M. Gradzielski, *Soft Matter* **2013**, 9, 3896-3909.
- [2]. I. Hoffmann, B. Farago, R. Schweins, P. Falus, M. Sharp, S. Prévost, M. Gradzielski, *J. Chem. Phys.* **2015**, 143, 074902.
- [3]. L. Chiappisi, M. Simon, M. Gradzielski, *ACS Appl. Mat. Interfaces* **2015**, 7, 6139-6145.

Synthetic Molecules for Cell Biology and Cell Therapy

Motonari Uesugi, Ph.D.

Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS) & Institute for Chemical Research, Kyoto University, AMED-CREST, AMED Gokasho, Uji-shi, Kyoto 611-0011, Japan

In human history, bioactive small molecules have had three primary uses: as medicines, agrochemicals, and biological tools. Among them, we have been focusing on the discovery and use of biological tools. In addition to tool discovery, our laboratory has been interested in exploring another application of small molecules: small molecules for cell therapy. Although small molecule drugs will continue to be important, cell therapy will be a powerful approach to curing difficult diseases that small molecule drugs are unable to handle. Stable, completely defined molecules, which are usually amenable to cost-effective mass production, may be able to help the clinical application of cell therapy.

This presentation provides a quick overview of the recent results we obtained regarding several unique molecules. These molecules were originally discovered by phenotypic cell-based screenings of our in-house chemical libraries. Molecular understanding of their mechanisms of actions led to the design of mid-sized molecules that can be used both for basic cell biology research and for cell therapy applications.

References

- A small molecule that represses translation of G-quadruplex-containing mRNA. Katsuda, Y., et al. *J. Am. Chem. Soc.* (in press)
- A potent and site-selective agonist of TRPA1. Takaya, J., et al. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 15859-15864 (2015).
- Live-cell imaging of endogenous mRNAs with a small molecule. Sato, S., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1855-1858 (2015).
- Synthetic molecules that protect cells from anoikis and their use in cell transplantation. Frisco-Cabanos, H.L. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53 (42), 11208-11213 (2014).
- Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative. Kuo, T.F., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 136 (28), 9798-9801 (2014).
- A chemical probe that labels human pluripotent stem cells. Hirata, N., et al., *Cell Reports* 6(6), 1165-1174 (2014)
- VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta cell differentiation. Sakano, D. et al., *Nat. Chem. Biol.* 10, 141-148 (2014).

Photo-triggered Catalytic Formation of Hydrogen Peroxide inside Cells via Nitric Oxide Release from a Manganese Nitrosyl Complex

Yuji Iwamoto

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan

The development of photo-caged generators of bioactive small molecules has been received attention because these compounds can allow the spatially and temporally controlled release of biologically relevant small molecules.¹ Recently, we prepared a water-stable manganese nitrosyl complex that can release nitric oxide (NO) under light irradiation at 650 nm.² The manganese nitrosyl complex showed strong cytotoxicity after light exposure ($IC_{50} = 17 \pm 1 \mu\text{M}$), although it showed no cytotoxicity for Hela cells under dark ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). We found that the cell death is caused by a manganese(II) complex (UG1) generated from UG1NO through the photo-dissociation of NO, but not by NO released by manganese nitrosyl complex (UG1NO). In addition, we found that the manganese nitrosyl complex induces changes in cell morphology by photo-irradiation. Similar morphological changes were observed when Hela cells have been treated with H_2O_2 . Mechanistic studies *in vitro* revealed that manganese(II) complex consumes dioxygen and catalytically produces hydrogen peroxide (H_2O_2) only in the presence of reducing agents such as ascorbic acid and glutathione in aqueous media. These results indicate that UG1NO is a photo-responsible NO donor but also a photo-caged catalytic generator of H_2O_2 (Figure 1).³ In this presentation, I will report the mechanism of the catalytic H_2O_2 generation by the manganese(II) complex.

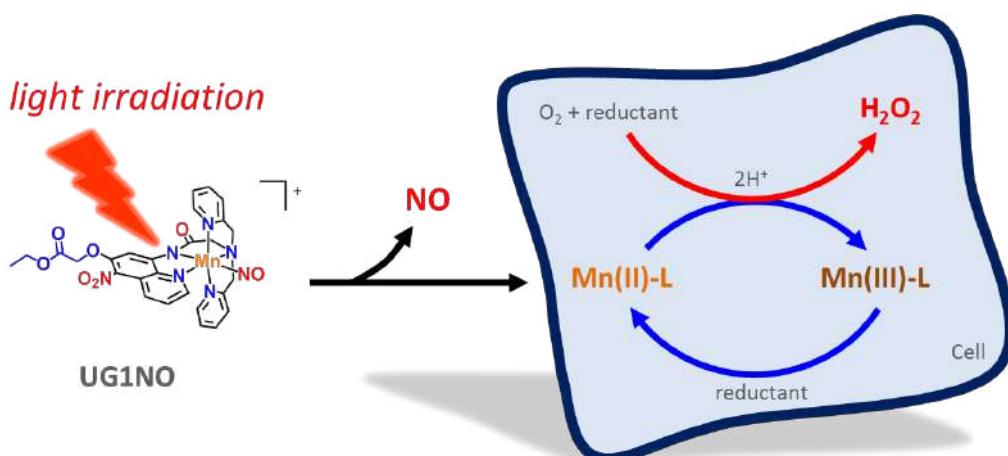


Figure 1. Photo-induced generation of H_2O_2 from a manganese complex (UG1) inside a cell.

References

- (1) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Hechel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446-8476.
- (2) Hitomi, Y.; Iwamoto, Y.; Kodera, M. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 2161-2167.
- (3) Iwamoto, Y.; Hitomi, Y.; Kodera, M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9539-9542.

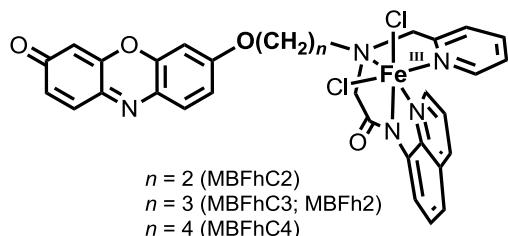
Improvement of Metal-based Fluorescent Probes for Intracellular Hydrogen Peroxide Imaging

Ryosuke Miyachi

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan

Hydrogen peroxide (H_2O_2) has been known to be a harmful metabolic product, and a component of immune response to microbial invasion. Nowadays, it is also acknowledged as a messenger molecule related to cell proliferation, migration, and differentiation.^{1,2} H_2O_2 can be visualized using fluorescent probes with unique H_2O_2 -responsive components. For example, Chang and coworkers reported a series of fluorescent probes using oxidative conversion of an arylboronate ester to a phenol derivative by H_2O_2 .³⁻⁵ Owing to the reliability of this methodology, most of H_2O_2 fluorescent probes utilize the arylboronate ester as a reactive site. However, the arylboronate ester reacts with H_2O_2 slowly, taking several minutes to give a fluorophore. Therefore, the low reactivity of the arylboronate ester becomes a problem especially if researchers try to monitor intracellular H_2O_2 generation in real time. To overcome this issue, we have developed a mononuclear nonheme iron complex having *O*-alkyl resorufin via a propane (C3) linker, MBFh2 (MBFhC3).⁶ MBFhC3 is capable of reacting with H_2O_2 to release a red-emitting fluorophore resorufin in seconds, which is apparently much faster than organic reaction-based fluorescence probes. With MBFhC3 in hand, we succeeded in visualizing intracellular H_2O_2 endogenously produced by A431 cells, which overexpress epidermal growth factor receptor (EGFR), upon stimulation of epidermal growth factor (EGF).

In this study, we synthesized and characterized three derivatives of MBFhs, whose linker length is systematically varied from a chain of two to four atoms. MBFhC2 and MBFhC4 have ethylene (C2) and butane (C4) linkers between the iron complex and *O*-alkylresorufin, respectively. We recently found that MBFhC2 showed much higher efficacy to release resorufin upon addition of H_2O_2 than MBFhC3 does. With the new efficient H_2O_2 fluorescent probe, we found that intracellular generation of H_2O_2 can be monitored not only with A431 cells but also with HeLa cells, even though the latter cells express lesser amount of EGFR.



References

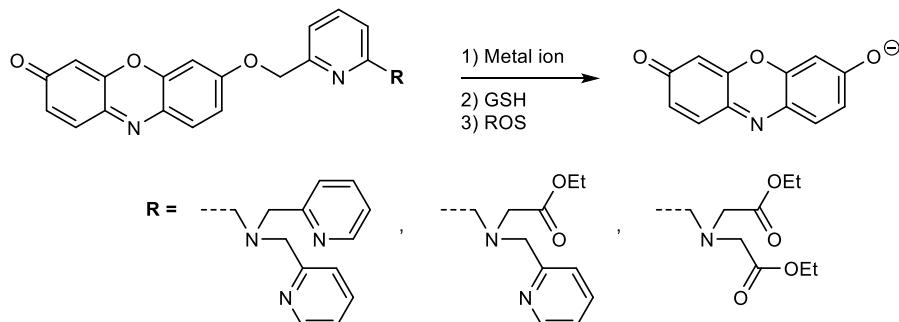
- 1 Rhee, S. G. *Science* **2006**, *312*, 1882.
- 2 Zhao, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3022.
- 3 Chang, M. C. Y.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392.
- 4 Miller, E. W.; Albers, A. E.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16652.
- 5 Lippert, A. R.; Van De Bittner, G. C.; Chang, C. J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 793.
- 6 Hitomi, Y.; Takeyasu, T.; Kodera, M. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9929.

Development of Fluorescent Probes for Reactive Oxygen Species Based on C–O Bond Cleavage

Tomokazu Suetsugi, Ryuki Morimoto, Ryosuke Miyachi, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi

Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto, 610-0321, Japan

Reactive oxygen species (ROS) are produced via NADPH oxidases in immune response to bacterial invasion. In addition, ROS production at physiological levels are believed to be necessary in regulating diverse cellular processes such as cell migration, differentiation and proliferation.¹ ROS are also generated during mitochondrial oxidative phosphorylation as well as during disulfide-bond formation in ER protein folding. When ROS are generated over the capacity of cellular antioxidant defense system, they cause damage of biomolecules (DNA, lipids, and proteins). Therefore, imbalanced metabolism or overproduction of ROS results into a range of disorders such as aging, cancer, and neural disorders (Alzheimer's disease and Parkinson's disease). In fact, elevated levels of ROS have been detected in almost all cancers.² Therefore, it might be useful to develop prodrugs that can be transformed to active drugs under cancer cell environments with high levels of ROS. We have developed a mononuclear nonheme iron complex having *O*-alkyl resorufin via a propane linker as a fluorescence probe for hydrogen peroxide (MBFhC3).³ MBFhC3 reacts with hydrogen peroxide to release a red-emitting fluorophore resorufin in seconds *via* oxidative cleavage of the linker between the iron complex and resorufin. However, the conversion of MBFhC3 to free resorufin is not quantitative. To improve the efficacy, we focused on the oxidative C–O bond cleavage of benzylic groups, because Taki and Chang co-workers independently reported fluorescence probes for iron, cobalt and copper ions, which release a fluorophore via reductive dioxygen activation on the metal center followed by the oxidative C–O bond cleavage of benzylic groups.^{4–6} In this study, we have prepared three derivatives of *O*-alkyl resorufin having a metal chelator, and examined whether they can release resorufin in the presence of glutathione (GSH) upon addition of hydrogen peroxide or peroxynitrite (Scheme 1).



Scheme 1. *O*-alkyl resorufin derivatives studied here.

References

1. P. D. Ray, B. Huang, Y. Tsuji *Cell Signal* **2012**, *24*, 981.
2. G.-Y. Liou, P. Storz *Free Radic. Res.* **2014**, *44*, 479.
3. Y. Hitomi, T. Takeyasu, M. Kodera *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9929.
4. H. Y. Au-Yeung, J. Chan, T. Chantarojisiri, C. J. Chang *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15165.
5. H. Y. Au-Yeung, J. Elizabeth, J. New, C. J. Chang *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5268.
6. M. Taki, S. IyosInhi, A. Ojida, I. Hamachi, Y. Yamamoto *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5939.

Extremely High Turnover for Direct Oxidation of Benzene to Phenol with H₂O₂ Catalyzed by Dicopper Complexes

(¹Doshisha Univ.) ○Tomokazu TSUJI,¹ Yutaka HITOMI,¹
and Masahito KODERA¹

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan

Abstract: We found that direct oxidation of benzene to phenol with H₂O₂ is rapidly and efficiently catalyzed by a dicopper(II) complex with 6-hpa ligand [Cu₂(μ-OH)(6-hpa)](ClO₄)₃ (**1**). The catalytic activity of **1** for the direct oxidation of benzene to phenol with H₂O₂ at 50°C in MeCN is extremely high where turnover frequency/1 h and total turnover number/30 h exceeded 1000 and 12000, respectively. Here, we report the high reactivity, high selectivity, and high efficiency of **1** for the catalysis of the conversion of benzene to phenol.

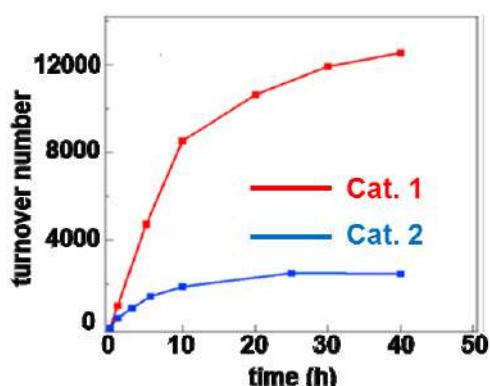
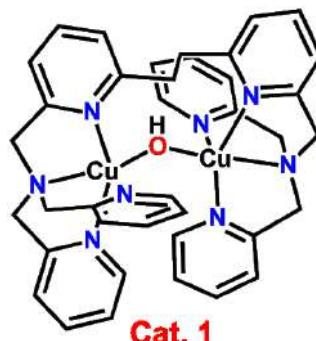
Although particulate methane monooxygenases catalyze conversion of methane to methanol via O₂-activation at the dicopper center,¹ yet a bio-inspired dicopper complex that can oxidize low reactivity substrates, such as methane and benzene, has never been reported.

Recently, Fukuzumi and Itoh reported that mononuclear copper(II)² and nickel(II)³ complexes, [Cu(MeCN)(tmpa)](ClO₄)₂ (**2**) and [Ni(OAc)(tepa)](BPh₄) (**3**) catalyze direct oxidation of benzene to phenol with H₂O₂, where **3** showed the total turnover number (216 h) of 749. We applied bio-inspired copper complexes to this reaction, and found extremely high activity.

Here, we report the synthesis, structure, and high reactivity of dicopper(II) complex with 6-hpa [Cu₂(μ-OH)(6-hpa)](ClO₄)₃ (**1**). The catalytic activity of **1** for the direct oxidation of benzene to phenol with H₂O₂ at 50°C in MeCN is extremely high where turnover frequency (h⁻¹) and total turnover number (30 h) exceeded 1000 and 12000, respectively. The yield of oxidized product based on benzene consumed is 99%, where the relative yield of phenol and benzoquinone is 96 and 4%, respectively. The H₂O₂ efficiency is at most 50%, dependent on the amount of benzene used. The KIE value for C₆H₆/C₆D₆ is 1.08. When H₂¹⁸O₂ was used, ¹⁸O-atom incorporation rate in phenol is 95±2 %. On addition of H₂¹⁸O, ¹⁸O-atom was not incorporated into phenol.

[Reference]

- 1) A C. Rosenzweig, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 7640.
- 2) S. Fukuzumi, et al., *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 2856-2863.
- 3) S. Itoh, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 5867-5870.



Can only ssDNA be detected by anionic gold nanoparticles?

José M. Carnerero,¹ Rafael Prado-Gotor,¹ Marco Betti² and Aila Jimenez-Ruiz¹

¹ Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Seville

c/ Profesor García González s/n, 41012, Seville, Spain.

² Department of Vegetal Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Seville

c/ Profesor García González s/n, 41012, Seville, Spain.

jcarnerero2@us.es

In the last decades there has been a drastic rise of studies about gold nanoparticles' (AuNPs) interaction with DNA. For example, a colorimetric method which quantifies the monomer-AuNP interaction has been recently described.¹ One of the most interesting applications of the interactions AuNPs-DNA lies in the ability of DNA to adsorb on the AuNP surface, giving the complex increased stability to salt-induced aggregation.² This phenomenon allows to discern between single stranded DNA and double stranded DNA, since the rigidity of the latter minimizes interaction between the nucleobases and the gold surface, so it does not protect the colloid from aggregation. However, when anionic AuNPs were added in samples containing different dsDNA concentrations and a fixed amount of salt (NaCl), it was observed that aggregation did not happen after a certain DNA concentration. That fact, which was not expected, has allowed us to develop a colorimetric detection protocol for dsDNA strands in aqueous media. The main difference of our system with previous citrate capped AuNPs studies lies in the fact that these works were centered in the detection of short chain ssDNA,³ while we worked with *calf thymus* DNA (CT-DNA) (double-stranded, more than 10.000 bp). The method was also applied to fragmented CT-DNA (around 1500 bp) with no result changes observed in respect to those obtained with long CT-DNA.

In order to explain those results, it is important to note that numerous works about the effect of the medium on DNA have been described up to date. For example, cationic gemini surfactants cause a compaction of the structures, although this effect reverts at higher concentrations of surfactant.⁴ In the case of anionic silica nanoparticles, compaction is followed by unstabilization of DNA at the higher particle concentrations.⁵ In our case, the observed effect allows DNA to accommodate cations and interact with AuNPs, in turn protecting the particles from the effects of the salt, and works for both single and double stranded DNA chains. Furthermore, viscosity and DLS studies show that anionic AuNPs, in absence of salt, cause a bending effect over DNA molecules.

Acknowledgements: This work was financed in part by the Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía (P08-FQM-03623) and by the Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (2010/00000762). We thank University of Sevilla for the grant of the VPPI-US.

¹ R. Prado-Gotor, A. Jimenez-Ruiz, J. M. Carnerero, E. Grueso, I. Villa, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 85039–85045.

² H. Li and L. J. Rothberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10958–10961.

³ S. Rho, S. J. Kim, S. C. Lee, J. H. Chang, H. G. Kang, and J. Choi, *Curr. Appl. Phys.*, 2009, **9**, 534–537.

⁴ E. Grueso, E. Kuliszewska, E. Roldan, P. Perez-Tejeda, R. Prado-Gotor, L. Brecker, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 29433–29445.

⁵ A. Zinchenko, K. Tsumoto, S. Murata, K. Yoshikawa, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**, 1256–1262.

Playing 3D Templates in Nano/Micro Scales - Block Copolymer, Algae, Diatom, and Protein -

Tomokazu Iyoda

Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology
JST-ERATO Supra-integrated Materials Project

Our motivation to develop templated materials in nano/micro scales is placed on manufacturing processing as engineering materials so as to break stereotype of materials science, which have achieved remarkable outcomes individually in all the fields classified by the kinds of substances but often faced fatal difficulty in their own processes upon integration with other materials and their technological transfer. Less care has been taken of applicability of their fabrication processes than their new structures and properties, since they are scarcely used as they are solely but often integrated with other known materials and technology. Most of new functional materials have been created by accidental finding and its optimization in time- and effort-consuming exploratory research. Development of their fabrication processes integrated with other known materials almost holds true. Here, I would like to propose the following process-directed materials harmoniously integrating plural required materials as innovative exploratory research.

Herein, I would like to introduce our recent research on function-integrated nano/micro-materials: The first is amphiphilic liquid crystalline block copolymer thin film which shows perpendicularly oriented hexagonal cylindrical nanostructures with high aspect ratio through liquid-crystal-induced microphase separation, which a wide variety of nanodot and nanorod arrays are fabricated as a universal template processes. The second is mass fabrication of one-handed metal microcoils biotemplated from coiled algae for chiral metamaterials in terahertz electromagnetic wave. The third is protein condensate stoichiometrically mixed with PEO-based detergents, segregated from water and preserving native activity.

- [1] Chemically Directed Self-Assembly of Perpendicularly Aligned Cylinders by Liquid Crystalline Block Copolymer, N. Yamashita S. Watanabe, K. Nagai, M. Komura, T. Iyoda, K. Aida, Y. Tada, H. Yoshida, *J. Mater. Chem. C*, **3**, 2837-2847 (2015). Longitudinal and lateral integration of conducting polymer nanowire arrays via block-copolymer-templated electropolymerization, H. Komiyama, M. Komura, Y. Akimoto, K. Kamata, T. Iyoda, *Chem. Mater.*, **27**, 4972-4982 (2015).
- [2] Single molecule electroluminescence and photoluminescence of polyfluorene unveils the photophysics behind the green emission band, Y. Honmou, S. Hirata, H. Komiyama, J. Hiyoshi, S. Kawauchi, T. Iyoda, M. Vacha, *Nat. Commun.*, **5**, 4666 (2014).
- [3] Spirulina-templated metal microcoils with controlled helical structures for THz electromagnetic responses, K. Kamata, Z. Piao, S. Suzuki, T. Fujimori, W. Tajiri, K. Nagai, T. Iyoda, A. Yamada, T. Hayakawa, M. Ishiwara, S. Horaguchi, A. Belay, T. Tanaka, K. Takano, M. Hangyo, *Sci. Rep.*, **4**, 4919 (2014).

Dynamic Self-Assembly Induced by Fluorocarbons Applications in Materials Science and Medicine

Dr. Marie Pierre Krafft, Institut Charles Sadron (CNRS), University of Strasbourg,
23 rue du Loess, 67034 Strasbourg, France. krafft@unistra.fr

The dynamic self-assembly of locally interacting entities to form patterns with higher-level structures and complexity plays an essential role in nature, science and technology. We will show that fluorocarbons (*FCs*) can provide highly effective self-assembling entities, either in the form of individual molecules or as large molecular ensembles,¹ owing to unique combination of properties, including extreme hydrophobicity, lipophobicity, spreadability on aqueous surfaces and high volatility relative to molecular weight.²

We have recently established that attractive fluorine-fluorine interactions can arise between a *FC* gas, perfluorohexane, and a C_nF_{2n+1} -labelled compound across a phospholipid monolayer, allowing recruitment and immobilisation of the fluorinated compound in the phospholipid layer. This new phenomenon allowed preparation of microbubbles loaded with a C_2F_5 -labelled hypoxia biomarker with potential applications in diagnosis.³ Further examples will show that controlling the kinetics of adsorption and the structural organization of a variety of compounds (proteins, polymers, biomarkers, etc.) and nanoparticles at interfaces self-assembled from phospholipids or other surfactants using *FC* gases has potential applications in microbubble-mediated drug delivery and ultrasound imaging,⁴ as well as for the design of more effective lung surfactant substitutes.⁵

References:

- [1] D. Yamamoto, C. Nakajima, A. Shioi, M.P. Krafft, K. Yoshikawa, *Nature Commun.* **2015**, 6, 7189.
- [2] M.P. Krafft, J.G. Riess, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 1714; M.P. Krafft, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 514.
- [3] G. Yang, M. O'Duill, V. Gouverneur, M.P. Krafft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8402.
- [4] L. Gazzera, R. Milani, L. Pirrie, C. Blanck, M. Schmutz, G. Resnati, P. Metrangolo, M.P. Krafft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 10263.
- [5] M.P. Krafft, *Soft Matter* **2015**, 11, 5982.

Molecular metamorphism through π -dimerization of viologen radicals

C. Kahlfuss,^{a,c} E. Dumont,^a E. Saint-Aman,^b and C. Bucher^a

a) Laboratoire de Chimie (UMR5182), Univ. de Lyon 1, ENS-Lyon/CNRS, Lyon-France ;

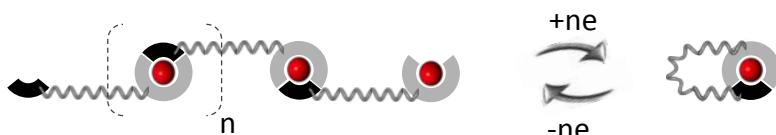
b) Département de Chimie Moléculaire (UMR5250), UJF/CNRS, Grenoble-France ;

c) Institut de Chimie de Strasbourg (UMR7177), UdS/CNRS, Strasbourg-France.

e-mail: kahlfuss@unistra.fr

The ability to control the structure and organization of molecular materials has emerged in the past decade as a major scientific objective that is mainly motivated by exciting foreseeable applications in nanoscience. Enormous technologic interests are indeed at stake in being able to devise molecular objects that could respond to external stimuli by changes in structure and function. These particular properties can lead to applications in various domains as (i) in molecular electronics, (ii) in analytic science, with switchable hosts allowing the controlled binding/release of pollutants or drugs, (iii) in materials science with the development of adaptive supramolecular polymers.

In this lecture, the syntheses and detailed physico-chemical properties of a series of switchable molecular architectures whose movements are triggered by electrochemically driven self-assembly of organic radicals will be presented.¹⁻⁴ Particular emphasis will be given to porphyrin based molecular tweezers allowing redox-controlled binding/release of guest molecules or to control the organization within self-assembled coordination polymers.⁵⁻⁷ The dynamic properties of these redox-responsive molecular architectures and molecular materials will mainly be discussed on the basis of electrochemical, spectroelectrochemical and ESR experiments supported by quantum chemical calculations.



References

- (1) Kahlfuss, C.; Saint-Aman, E.; Bucher, C. "Redox-controlled intramolecular motions triggered by π -dimerization and pimerization" In *Organic Redox Systems: Synthesis, Properties, and Applications*; Nishinaga, T., Ed.; John Wiley and sons, in press.
- (2) Iordache, A.; Oltean, M.; Milet, A.; Thomas, F.; Baptiste, B.; Saint-Aman, E.; Bucher, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2653–2671.
- (3) Iordache, A.; Kanappan, R.; Métay, E.; Duclos, M.-C.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M.; Milet, A.; Saint-Aman, E.; Bucher, C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4383.
- (4) Kahlfuss, C.; Métay, E.; Duclos, M.-C.; Lemaire, M.; Milet, A.; Saint-Aman, E.; Bucher, C. *Chem. Eur. J.* **2014**, *21*, 2090; ibid *C. R. Chimie* **2014**, *17*, 505.
- (5) Iordache, A.; Retegan, M.; Thomas, F.; Royal, G.; Saint-Aman, E.; Bucher, C. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7648.
- (6) Huo, Z. ; Gisselbrecht, J. P. ; Farha, R. ; Goldmann, M.; Saint-Aman, E.; Bucher, C., Ruhlmann, L. *Electrochim. Acta* **2014**, *122*, 108.
- (7) Bucher and co-workers. *Submitted works*.

Acknowledgement: The ANR (ANR-12-BS07-0014-01) is greatly acknowledged for financial support.

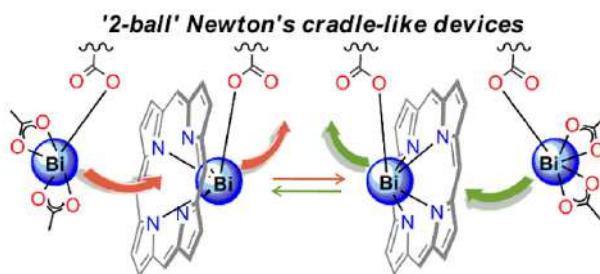
Playing with two metals cations and porphyrins : A new dynamic game

Bernard Boitrel,^a Stéphane Le Gac^a

^a UMR CNRS 6226, Institut des Sciences Chimiques de Rennes, Université de Rennes 1, 263 avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes cedex, France. Email : bernard.boitrel@univ-rennes1.fr

ABSTRACT

Among the various strategies encountered in the supramolecular chemistry of metalloporphyrins, axial ligation of an exogenous ligand to the metal cation bound in the porphyrin N core is the most popular.¹ Very little attention, if any, has been paid to the dynamic binding of metal cations (translocation) to the N core. In this context, we have initially described the formation of a Pb(II) bimetallic porphyrin complex according to a translocation-coupled transmetallation process:² translocation of a lead cation (Pb1) from the N-core of a porphyrin to a hanging carboxylate group is coupled to a transmetallation process with a second lead cation (Pb2). A novel *hanging-atop* coordination mode in the dinuclear species is responsible for the dynamic and stereocontrolled binding of lead to the porphyrin core.



We have extended these findings to Pb(II), Bi(III), Cd(II) and Tl(III/I) bimetallic complexes of a bis-strapped porphyrin ligand with an overhanging COOH group on each side of the macrocycle.^{3,4} In the presence of acetate anions, these complexes exhibit a unique intraligand coupled migration process of the two metal ions, that resembles the motion of spheres in a Newton's cradle device. The process is under allosteric and/or acid-base control, and can be classified either as compartmentalized or non compartmentalized translocations.⁵

REFERENCES

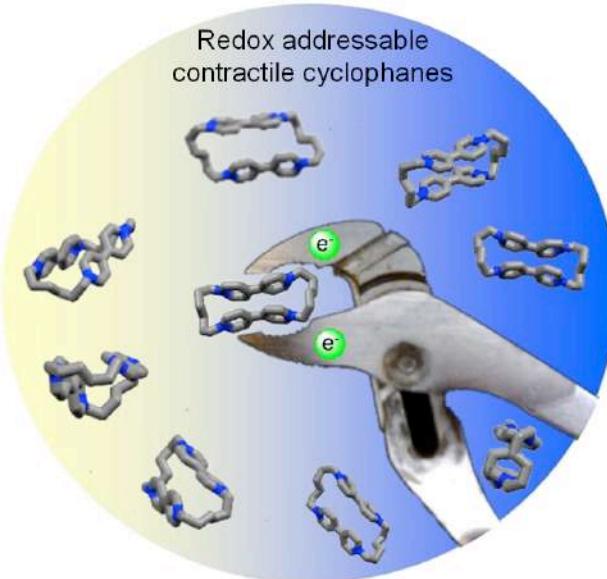
1. I. Beletskaya, V. S. Tyurin, A. Y. Tsividze, R. Guillard, C. Stern *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1659-1713.
2. S. Le Gac, B. Najjari, L. Fusaro, T. Roisnel, V. Dorcet, M. Luhmer, E. Furet, J.-F. Halet, B. Boitrel *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3724-3726.
3. B. Najjari, S. Le Gac, T. Roisnel, V. Dorcet, B. Boitrel *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16017-16032.
4. S. Le Gac, L. Fusaro, V. Dorcet, B. Boitrel *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 13376-13386. Le Gac, S.; Fusaro, L.; Roisnel, T.; Boitrel, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6698–6715 Ndoyom, V.; Fusaro, L.; Dorcet, V.; Boitrel, B.; Le Gac, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3806–3811.
5. V. Ndoyom, L. Fusaro, T. Roisnel, S. Le Gac, B. Boitrel *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 517-520. S. Le Gac, B. Boitrel *New J. Chem.*, **2016**, *in press*, DOI: 10.1039/C5NJ03120F.

Redox controlled supramolecular chemistry based on viologen architectures

WEISS Jean

*Chimie des Ligands à Architecture Contrôlée, Institut de Chimie, UMR 7177CNRS-Université de Strasbourg,
France.
jweiss@unistra.fr*

Violagens undergo two reductions at a low redox potential and with a high degree of reversibility. Three stable redox states are thus accessible, among which the radical cation is of particular interest for its ability to form π -dimers under appropriate conditions.¹ These properties make violagens the perfect candidate for the design of effective redox responsive materials. During the past decade, violagens have been widely exploited as a key component in redox responsive molecular machines² and materials, such as liquid crystals,³ with potential applications in optoelectronics, conductive materials, and information storage. To be fully effective, the π -dimerization of violagens requires a confined environment. Therefore, to favor π -dimerization, the choice of substituents on the viologen is crucial. Our aim is to use the π -dimerization of violagens as the driving force for the construction of molecular assemblies or as redox-triggered expandable and shrinkable structures and to investigate the electrochemical responsiveness of discrete species of bis-violagens cyclophanes on surfaces. Our latest results will be presented, including the preparation of bis-viologen cyclophanes.



¹ Bookman, T. M.; Kochi, J. K. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4127-4135.

² Fang, L.; Fahrenbach, A. C.; Trabolsi, A.; Botros, Y. Y.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1805-1809.

³ Tanabe, K.; Yasuda, T.; Yoshio, M.; Kato, T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4271-4274.

Carbon Nanotube-Templated Synthesis of Covalent Porphyrin Network for Oxygen Reduction Reaction

I. Hijazi, T. Bourgeau, R. Cornut, A. Morozan, B. Jousselme and S. Campidelli

¹LICSEN, NIMBE, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, CEA Saclay 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

The fabrication of functional hybrid materials that preserves and combines the properties of their building blocks is a central issue of nanosciences. Among the different classes of nanomaterials, carbon nanotubes are promising for electronics, catalysis and composite applications. Within the context of sustainable development and renewable energy, we and others envisioned the use of functionalized or doped carbon nanotubes in electrocatalytic systems.^{1,2} In such systems, the catalytic sites need to be supported on conducting materials. Carbon nanotubes, thanks to their electrical conductivity and their high surface area appear as the ideal material for that purpose.

In actual proton exchange membrane fuel cell devices (PEMFC), the reactions at the electrodes and in particular the reduction of oxygen is performed by platinum nanoparticles. The cost of platinum encourages the development of new catalysts based on non-noble metals. In nature, the reduction of oxygen is performed by iron porphyrins in the active center of enzymes. Thus bio-inspired catalysts based on cobalt or iron macrocycles have been extensively studied for oxygen reduction reaction (ORR).^{3,4}

Here, we describe the formation of a covalent network of porphyrins around MWNTs. Our approach is based on adsorption of ethynylporphyrins followed by the dimerization of the triple bonds. The nanotube acts as a template for the formation of the polymeric layer. The nanotube hybrids were characterized and tested for the ORR in a series of electrochemical measurements in acidic conditions. Compared to similar systems in which monomeric porphyrins are simply physisorbed, the nanotube hybrid showed a higher activity, a higher current density, a lower overpotential and a four electrons reaction pathway.⁵

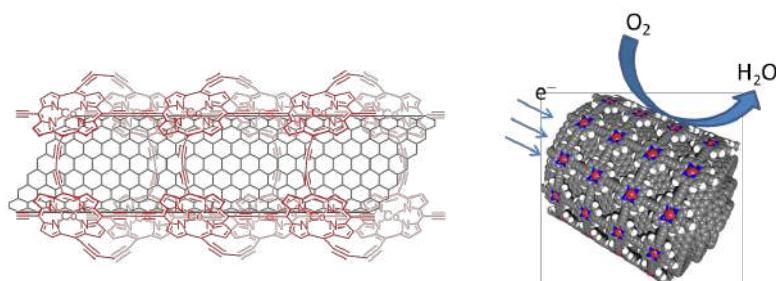


Figure. Representation of a MWNT with cobalt porphyrins polymerized at its surface for oxygen reduction reaction.

References

- (1) Zhang, W.; Sherrell, P.; Minett, A. I.; Razal, J. M.; Chen, J. *Energy Environ. Sci.* **2010**, *3*, 1286-1293.
- (2) Morozan, A.; Jousselme, B.; Palacin, S. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 1238-1254.
- (3) Zagal, J. H.; Griveau, S.; Silva, J. F.; Nyokong, T.; Bedioui, F. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2755-2791.
- (4) Morozan, A.; Campidelli, S.; Filoromo, A.; Jousselme, B.; Palacin, S. *Carbon* **2011**, *49*, 4839-4847.
- (5) Hijazi, I.; Bourgeau, T.; Cornut, R.; Morozan, A.; Filoromo, A.; Leroy, J.; Derycke, V.; Jousselme, B.; Campidelli, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6348-6354.

Non-noble metal Electrocatalysts for Hydrogen economy

Bruno Jousselme

IRAMIS, NIMBE/UMR 3685, LICSEN, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France

E-mail: Bruno.jousselme@cea.fr

Electrolysers and Fuel cells are important devices for the development of sustainable energy conversion and storage and have the potential to revolutionize the way we power our Society, offering cleaner, more efficient alternatives to the combustion of gasoline and other fossil fuels. However, the viability of an economy based on hydrogen is related to the development of catalysts without scarce, expensive noble platinum group metals catalysts ((PGM) Pt, Ir and Ru) as presently used. Thus one of the first objectives of the LICSEN group with collaborators is to develop new, cheap, efficient and stable catalysts based on carbon nanotubes for cathodes and anodes of fuel cells and electrolyzers. Thus, the catalytic activity for both the production and the uptake of hydrogen of nickel-based bio-inspired catalysts covalently bound on carbon nanotubes^{1,2} will be presented. This extremely stable material operates in highly acidic environment and is compatible with the Nafion® membranes. Moreover, they are highly selective with the substrate unlike platinum nanoparticles which are irreversibly polluted by gases or organic traces. Similarly, new materials for oxygen reduction reaction (ORR)³ still based on modified carbon nanotubes will be discussed. These catalysts were synthesized by heat treatment of a mixture of carbon nanotubes, a nitrogen precursor and with or without a non-noble metal catalyst.^{4,5} ORR activities studied by electrochemistry show really good performances for N-enriched carbon nanotubes in basic condition but in acidic condition, catalysts present still a high overpotential with a number of electrons involved below four. Recently, nickel molecular H₂ oxidation catalysts and noble metal-free O₂-reducing materials were combined, to fabricate a noble metal-free PEMFC, with an 0.74 V open circuit voltage and a 23 μW cm⁻² output power under technologically relevant conditions.⁶ In a second part of the talk, Photoelectrochemical (PEC) cells for solar hydrogen production will be discussed. PECs are studied in many configurations and photoelectrodes are mainly constructed with crystalline semiconductors and/or rare materials. With the objective of producing hydrogen at a lower cost than fossil fuels, organic semiconductors (P3HT:PCBM bulk heterojunction) have been coupled to a noble metal-free low-cost catalyst (MoS₃) for proton reduction. Tested in a three-electrode configuration this photocathode performed the hydrogen evolution reaction (HER) at the reversible hydrogen electrode (RHE) potential with 50 μA cm⁻². 180 μA cm⁻² were obtained when MoS₃ was mixed with TiO₂ to enhance electronic transfer between P3HT:PCBM and MoS₃.⁷ To further improve the performances, we sought to increase this charge transfer between P3HT:PCBM and MoS₃ with different interfacial layers. With an organic layer the performances were greatly enhanced: 1.8 mA cm⁻² at RHE potential were obtained. A metallic interfacial layer made the photocurrent increase to 8 mA cm⁻² with an anodic shift of the HER onset potential of 0.6 V, close to the Voc of the P3HT:PCBM solar cell.⁸ Recently, the performance and stability of P3HT:PCBM\MoS₃-based photocathodes were considerably improved by changing the hole-extracting layer (HEL).⁹

References:

1. A. Le Goff, V. Artero, B. Jousselme, P.D. Tran, N. Guillet, R. Metaye, A. Fihri, S. Palacin and M. Fontecave. *Science*, **326** 1384-1387 (2009).
2. P.D. Tran, A. Le Goff, J. Heidkamp, B. Jousselme, N. Guillet, S. Palacin, H. Dau, M. Fontecave, and V. Artero. *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 1371- 1374 (2011).
3. A. Morozan, B. Jousselme and S. Palacin *Energy Environ. Sci.*, **4**, 1238-1254 (2011).
4. A. Morozan, P. Jegou, M. Pinault, S. Campidelli, B. Jousselme, and S. Palacin *ChemSusChem* **5** 647-651 (2012).
5. A. Morozan, P. Jegou, B. Jousselme, and S. Palacin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 21600- 21607 (2011).
6. P.D. Tran, A. Morozan, S. Archambault, J. Heidkamp, P. Chenevier, H. Dau, M. Fontecave, A. Martinent, B. Jousselme and V. Artero. *Chem. Sci.* **6**, 2050-2053 (2015).
7. T. Bourgeteau, D. Tondelier, B. Geffroy, R. Brisse, C. Laberty-Robert, S. Campidelli, R. de Bettignies, V. Artero, S. Palacin, B. Jousselme *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 2706-2713.
8. T. Bourgeteau, D. Tondelier, B. Geffroy, R. Brisse, R. Cornut, V. Artero, B. Jousselme *ACS Appl. Mater. Inter.* **2015**, *7*, 16395–16403.
9. T. Bourgeteau, D. Tondelier, B. Geffroy, R. Brisse, S. Campidelli, R. Cornut, B. Jousselme *J. Mater. Chem. A* **2016**, *4*, 4831-4839.

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「細胞自在操作のための分子化学技術
の開発拠点形成」

2016年度・成果報告会

講演プログラム・要旨集

2017年4月22日（土）

同志社大学京田辺キャンパス

恵道館 KD202・KD204

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

私立大学戦略的研究基盤形成事業

「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」2016年度・研究成果報告会

主催：同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

開催日時：2017年4月22日（土）10時-17時

開催場所：同志社大学京田辺キャンパス恵道館202および204

プログラム

研究成果報告会1【10:00-12:00】 恵道館KD202

開会の挨拶

研究センター長：小寺政人

講演1. 生体内COを捕捉するケミカルツール hemoCDについて

北岸 宏亮（同志社理工）

講演2. イオン液体中での化学反応と分子ダイナミクスの分光計測

木村 佳文（同志社理工）

講演3. H₂O₂/二核銅錯体触媒によるベンゼンからフェノールへの高選択的直接酸化：

二核銅錯体の特異的に高い触媒活性(TOF, TON)

小寺 政人（同志社理工）

講演4. 細胞模倣によるミクロ材料創成

柳澤 実穂（東京農工大）

メンバーアクセス（SC622, 昼食）

特別講演会1【13:20-14:20】 恵道館KD202

座長：小寺 政人

講演題目「細胞機能を明らかにする *in vivo* イメージングプローブ」

講師：菊地 和也 先生（大阪大学大学院工学研究科・教授）

特別講演会2【14:30-15:30】 恵道館KD202

座長：人見 積

講演題目「細胞イメージングに向けた分子設計戦略」

講師：多喜 正泰 先生（名古屋大学トランスフォーマティブ

生命分子研究所・特任准教授）

研究成果報告会2【15:40-17:00】 恵道館KD204 <ポスター形式>

ポスター発表題目一覧

1. DNA の酸化的切断を促進する二核銅錯体の開発
角谷優樹・福井克樹・野村章子・小寺政人
2. G-quadruplex DNA と選択的に結合する二核銅錯体の開発
斎藤 樹・角谷優樹・小寺政人
3. 過酸化水素を検出する蛍光プローブの高感度化
宮地亮昌・人見 穩
4. 異なる電子状態を有する鉄錯体による活性酸素の消去および生成と酸化還元電位との相関
岩本勇次・人見 穗
5. アミノ酸由来ビニルポリマー：LCST の自在制御と細胞足場材の調製
東 信行・平田絢葉・古賀智之
6. pH 高速応答型ペプチド・ハイドロゲルの調製とその特性
古賀智之・大當悠太・東 信行
7. マウス血中 CO の選択的除去による体内時計リズム変化
峯岸彩夏・北岸宏亮
8. 脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による細胞死メカニズムの解析
浦野泰臣
9. 亜鉛フィンガータンパク質の生体内レドックスセンサー機能の可能性
根木滋・鳥見 優・北野莉加・杉浦幸雄
10. 大腸菌膜組成をもつリン脂質ベシクルへのイオン液体の分配
仁保早紀子・松本道明
11. 摊定常 pH 勾配を仕事に変換する分子集合体
名和愛利香・中尾友紀・塩井章久
12. 有機燃料を含む水溶液中の Pt 触媒粒子の集団運動
久保内雅生・井尾祐斗・山本大吾
13. フッ素含有 n 型 π 共役系ポリマーのレドックス特性と芳香族アミンセンシング機能
野瀬啓二・彌田智一・三治敬信・萬井 知康・Matthew Bird・John R. Miller
14. 身体ゆらぎの非線形ダイナミクス：時間反転対称性の破れの評価
馬場ひかり・鷹取慧・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
15. 活性酸素が引き起こす DNA 二本鎖切断の PEG による抑制効果
臼井萌絵・吉川祐子・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

16. 結合した非線形光振動子による距離空間の識別
保田祐輔・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
17. 音響に内在する時間反転対称性の破れ情報抽出への試み
東山拓司・上野 洋・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
18. 無接点直流型マイクロモーターの構築の試み -電極配置による運動の制御-
岡田和也・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
19. ポリアミンによるゲノム DNA の高次構造転移：温度依存性
西尾天志・吉川祐子・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
20. 「細胞に優しい細胞間配列手法」 -Albumin 溶液中でのレーザーによる遠隔操作-
山崎健広・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
21. 水/水ミクロ相分離現象を活用した細胞集団の自己組織化
山名悠輔・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
22. Smart response of self-motile droplet: Energy transduction from chemical to mechanical motion under isothermal condition—位置を感知する自発運動液滴：等温での化学→運動エネルギー変換系モデル—
佐藤志帆・作田浩輝・吉川研一
23. レーザーによる DNA 高次構造操作の試み
柏樹祐輔・吉川祐子・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
24. ロウソクの燃焼による振動現象
笛木靖郎・鷹取慧・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一
25. Nanocrystal self-assembly driven self-organization in nematic liquid crystal
Kaustabh Dan, Kenichi Yoshikawa

懇親会 18:00 ~ 20:00

「月の蔵人」 075-623-4630 <http://19an.com/kurabito/>

近鉄桃山御陵前駅下車徒歩 8 分

※昨年度の成果報告会懇親会と同じお店です。今回は掘りごたつの席になります。



特別講演 1

細胞機能を明らかにする *in vivo* イメージングプローブ

菊地和也^{1,2}

大阪大学¹ 大学院工学研究科、² 免疫学フロンティア研究センター

破骨細胞が実際に骨を溶かしている部位を可視化する蛍光プローブを作製し、独自に開発した生体2光子励起イメージング装置を用いて、*in vivo*（生体そのまま）における破骨細胞の機能評価に成功した。低分子プローブには標的細胞が存在する特定の組織への選択的輸送ができる仕組みを施し、骨を溶かす場所でのみ蛍光を発するスイッチ機能も組み込まれることで、破骨細胞活性を選択的に可視化できることを示した。また、蛍光タンパク質により標的細胞をラベル化し、低分子プローブと蛍光タンパク質の蛍光シグナルを同時に検出することで、細胞の局在変化と活性変化をリアルタイムに画像化し、骨を溶かす強さを定量化し薬物活性評価に応用可能であることを示した。

Glucose transporter 4 (GLUT4) も細胞内動態が生体のホメオスタシスの維持に必須の蛋白質の一つである。GLUT4は、N結合型糖鎖を持つ膜蛋白質であり、インスリン刺激により、細胞膜に移行しグルコースを取り込むことが知られている。その細胞内動態の異常は2型糖尿病の原因となることから、動態機構の解明は生命科学・医学分野における大きな課題となっている。しかしながら、GLUT4のN結合型糖鎖は、細胞内動態への役割に関しては論争があり、明確に解明されていない。そこで、演者らが開発した蛋白質ラベル化法であるPYP (Photoactive yellow protein) タグを用いたイメージング技術を応用して、GLUT4の動態を可視化するとともに、N結合型糖鎖の役割を調べた。特に、遊離状態では非蛍光性で、PYP タグとの標識反応に伴い蛍光強度を上昇させる「発蛍光プローブ」を開発し、迅速かつ高いS/N比で生細胞内の蛋白質を可視化することに成功している。本研究では、異なる波長の蛍光を発する複数の発蛍光プローブを用いることで、GLUT4の動態の時空間イメージング技術の開発を行った。この技術を応用し、糖鎖形成阻害剤とGLUT4糖鎖欠失変異体を用い可視化解析することで、GLUT4のN結合型糖鎖の細胞内動態における機能を明らかにした。

Ref 1. H. Maeda, T. Kowada, J. Kikuta, M. Furuya, M. Shirazaki, S. Mizukami, M. Ishii & K. Kikuchi, “Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity”, *Nat. Chem. Biol.*, 12, 579-585 (2016).

Ref 2. S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki & K. Kikuchi, “Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-Glycosylation in Intracellular Trafficking”, *Nat. Chem. Biol.*, 12, 853-859 (2016).

特別講演 2

細胞イメージングに向けた分子設計戦略

多喜正泰

名古屋大学 ITbM

E-mail address: taki@itbm.nagoya-u.ac.jp

蛍光顕微鏡技術の目覚ましい発展は生命科学研究の手法を一変し、今なお進化し続けている。特に回折限界を超えた空間分解能を実現する超解像顕微鏡技術や生体分子の蛍光一分子追跡技術により、細胞内の複雑な微細構造や機能について多大な情報がもたらされてきた。しかし、一般に高い時空間分解能で蛍光イメージングを達成するためには、強いレーザー光照射が必要になる。例えば STED 顕微鏡は励起レーザーに加え、非常に強力な STED レーザーを照射して超解像画像を得ている。そのため、STED 顕微鏡においては蛍光色素の褪色が著しく、イメージング画像の連続取得が困難であった。したがって、強レーザー照射下においても褪色しにくい蛍光分子を開発することは、細胞を用いたイメージング研究において重要な課題であるといえる。本講演では、我々が現在取り組んでいる「超耐光性蛍光色素」の分子設計戦略について紹介する。

1. 平面固定による構造強化

スチルベン骨格を炭素、硫黄、リンなどの各種元素で平面固定し、構造を強化することによって光褪色に圧倒的に強い蛍光色素を得ることに成功した。ここで重要なのは、架橋原子である硫黄やリンを酸化することによって、電子受容基としても機能させていることである。一連の化合物を用いて①STED 画像の連続取得、②細胞骨格の超解像 3D イメージング、③マルチカラー STED イメージング、④細胞内脂肪滴の経時追跡などに成功した。

2. リンオキシドを含むキサンテン骨格

キサンテン骨格の 9 位の酸素原子を様々なヘテロ原子に置き換えることで優れた蛍光特性を付与することができる。我々は、リンオキシドで置換したフルオレセインは 600 nm 以上の長波長領域に吸収および蛍光極大をもつことを見出した。同様にローダミン骨格について検討した結果、700 nm 以上の近赤外域まで長波長シフトしたことに加え、一分子レベルでも極めて高い光安定性を有することを明らかにした。

[1] E. Yamaguchi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 4539-4543 (2015).

[2] C. Wang et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 15213-15217 (2015).

[3] A. Fukazawa et al., *Chem. Commun.*, **52**, 1120-1123 (2016).

講演 1

生体内 CO を捕捉するケミカルツール hemoCD について

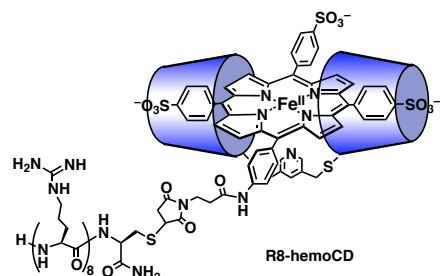
北岸 宏亮

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】一酸化炭素(CO)は細胞内で余剰のヘムが酵素ヘムオキシゲナーゼ(HO)によって代謝分解される際の副産物として常時產生されている。このような内因性 CO は細胞内シグナル分子として様々な生理機能を発揮すると考えられているが、その全容は明らかでない。HO 遺伝子のノックアウトは CO 产生機能だけでなくヘム代謝や他の代謝副産物(ビリルビン、鉄イオン)の产生にも影響をおよぼすため、内因性 CO の生理機能研究は一般的手法では難しい。

我々はこれまでに水中で機能するバイオミメティック錯体 hemoCD が生体類似環境において選択的に CO を捕捉する「CO 除去剤」として有用であることを報告してきた。¹ hemoCD の投与により動物体内は一時的に内因性 CO の機能を失った“擬ノックダウン状態”となる。² この性質を利用すれば生体内 CO の生理機能探索がかなり容易に行えると考えている。今回、我々は hemoCD を細胞にも適用できるように細胞膜透過性の hemoCD を新規に設計し、その機能評価を行ったので報告する。³



【結果と考察】まず、膜透過性を持たない hemoCD を用いて細胞内 CO の定量実験を行い、hemoCD が細胞内 CO 定量試薬として有用であることを示した。次に膜透過性ペプチドであるオクタアルギニンを修飾した R8-hemoCD を合成し、その機能評価を行った。R8-hemoCD は細胞内に侵入して内因性 CO を捕捉することにより、細胞内活性酸素種(ROS)のレベルに有意な影響を及ぼすことが明らかとなった。

【文献】

- 1) H. Kitagishi, S. Negi, A. Kiriyama, A. Honbo, Y. Sugiura, A. T. Kawaguchi, K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 1312–1315 (2010).
- 2) H. Kitagishi, S. Minegishi, A. Yumura, S. Negi, S. Taketani, Y. Amagase, Y. Mizukawa, T. Urushidani, Y. Sugiura, K. Kano, *J. Am. Chem. Soc.*, 138, 5417–5425 (2016).
- 3) S. Minegishi, A. Yumura, H. Miyoshi, S. Negi, S. Taketani, R. Motterlini, R. Foresti, K. Kano, H. Kitagishi, *J. Am. Chem. Soc.*, ASAP (2017).

講演 2

イオン液体中の化学反応と分子ダイナミクスの分光計測

木村佳文

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: yokimura@mail.doshisha.ac.jp

イオン液体とタンパク質などの生体分子の親和性について、近年多くの研究がなされている。例えばコリニウムカチオンとリン酸二水素アニオンからなるイオン液体($[CH][DHP]$)に少量の水を混合してできる水和イオン液体($Hy[CH][DHP]$)は、タンパク質をよく溶解し、さらにその活性を長時間保持するという研究結果が報告されている[1]。このようにイオン液体が生体分子と親和性があることをかんがみ、我々の研究室ではイオン液体の高度な利用を目指して、多角的なアプローチを進めている。

過渡回折格子分光法は、レーザーパルスを交差させて分子を励起することにより、光の干渉パターンにそって励起分子を生成し、その後の化学反応や分子の運動をプローブ光の回折強度(TG信号)の時間変化によって観測する手法である。信号の時間変化からは反応速度や分子の拡散定数が評価でき、信号の強度からは反応熱や化学反応にともなう体積変化が評価できる。我々は、まずイオン液体中のTG信号の強度が定量できるシステムの開発に取り組み、二分割セルと移動ステージを利用して、イオン液体中で簡単な光解離反応の反応エンタルピーを決定することに成功した。次に、イオン液体中のタンパク質ダイナミクスの測定の手始めとして、光センサーフタントンパク質であるPYPのTG測定を試みた。PYPは図に示すような光サイクルを示し、そのTG信号にはpG状態とpB状態の拡散に由来する信号が現れる。バッファー水溶液中のタンパク質に $[CH][DHP]$ を添加していくと、拡散信号の強度が弱くなっていくことが分かった。この結果はpG状態とpB状態の拡散係数が近くなっていくことを表している。pB状態とpG状態の拡散係数の違いをもたらしているのは末端ヘリックスの変性によるものということがわかつており、PYPに対しては $[CH][DHP]$ は変成作用をもたらすことが分かった。今後はタンパク質の揺らぎを評価することで、イオン液体中の溶存状態の詳細を明らかにしていく予定である。

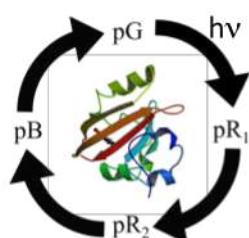


Fig. 1. PYP の光サイクル

[1] Fujita and Ohno, *Biopolymers.* **93**, 1093-1099 (2010).

講演 3

H_2O_2 /二核銅錯体触媒によるベンゼンからフェノールへの高選択的直接酸化：二核銅錯体の特異的に高い触媒活性(TOF, TON)

小寺政人

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科
 E-mail address: mkodera@mail.doshisha.ac.jp

フェノールは様々な化学物質の原料となる重要な中間体で、クメン法などにより生産されている。クメン法は、(1)爆発性のクメンヒドロペルオキシドを経由し、(2)反応条件が強酸性・高温で環境負荷が高く、(3)フェノールの収率は5%と低いなどの欠点があり、ベンゼンの直接酸化によるフェノール生産法の開発が望まれている。 H_2O_2 によるベンゼンから

フェノールへの直接酸化を触媒する不均一触媒が報告されているが、機構解明が難しく、合理的な触媒設計ができない。最近、伊東らはニッケル錯体の均一触媒で¹、福住らは単核銅錯体(**2**)² (Fig. 1)をメソポーラスシリカアルミナに担持した触媒で H_2O_2 によるベンゼンのフェノールへの直接酸化に成功した。しかし、turnover number (TON)は前者が 60°C で 749 (200 h)、後者が室温で 4320 (118 h)、turnover frequency (TOF h^{-1})はそれぞれ 4、33 であり、触媒活性は低い。活性中心に二核銅や二核鉄を持つメタンモノオキシゲナーゼ(pMMO, sMMO)はメタンやベンゼンなどの高難度酸化基質をメタノールやフェノールに変換することから、これに学ぶ高活性酸化触媒の開発が期待される。我々は、溶液中で二核構

造を安定化する 6-hpa 配位子の二核銅錯体(**1**)を合成した(Fig. 2)。錯体 **1** は H_2O_2 によるベンゼンのフェノールへの直接酸化を触媒し、50°C で TOF h^{-1} が 1010、TON が 12000 (40 h)と高活性で、フェノール選択性は 95% だった。TOF は従来例よりも 250、30 倍大きく、TON は **1** が **2** の 5 倍大きい(Fig. 3)。また C_6H_6/C_6D_6 の KIE 値、様々な置換基を持つベンゼン誘導体の反応性の比較、反応中間体の分光学的検出、速度論的解析、DFT 計算などから、二核銅錯体による H_2O_2 の活性化とベンゼン水酸化の機構を推定した。

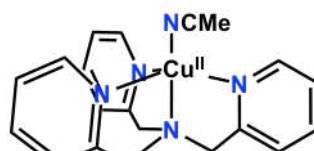


Fig. 1 Structure of **2**.

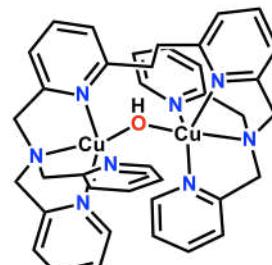


Fig. 2 Structure of **1**.

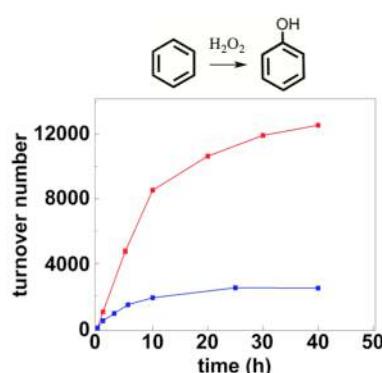


Fig. 3 Time courses of phenol production in the reaction of benzene (60 mmol) with H_2O_2 (120 mmol) catalyzed by **1** (1 μ mol) (red) and **2** (2 μ mol) (blue) in the presence of Et_3N (5 and 10 μ mol for **1** and **2**) in MeCN (20 mL) at 50°C.

Reference

- (1) Y. Morimoto, S. Bunno, N. Fujieda, H. Sugimto, S. Itoh, *S. J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5867-5870.
- (2) M. Yamada, K. D. Karlin, S. Fukuzumi, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2856-2863.

講演 4

細胞模倣によるミクロ材料創成

柳澤 実穂

東京農工大学 大学院工学研究院 先端物理工学部門

E-mail address: myanagi@cc.tuat.ac.jp

【緒言】リン脂質膜小胞（リポソーム）や高分子ミクロゲルは、医薬品や日用品において必要不可欠なミクロ材料である。我々はこれらの物性を細胞模倣により制御することを目的として研究してきた。本講演では、(A) 柔らかく崩壊しやすいリポソームへ細胞骨格様のゲル薄膜を付与する研究と、(B) 高分子ミクロゲルの弾性を膜により増大させる新規手法について報告する。

【結果】(A) 近年ナノマテリアルとして注目されているDNAに対し、接着部(Sticky-end)を末端にもつDNAを設計した(図1)。本DNAは溶液中でゲル微粒子を構築する。負に帯電するDNAゲル微粒子を正に帯電する脂質(DOTAP)で覆われた油中水滴に内包すると、静電相互作用によりDNAゲルは膜近傍に局在し裏打ちゲル構造を自発的に形成された(図2)。この油中水滴をリポソームへと変換することで、DNAゲル骨格を備えたリポソームとした。膜張力を測定した結果、DNAのエンタルピーに由来する張力上昇が確認できた(Kurokawa, et al., *in revision*)。

(B) 上記の油中水滴内に、DNAゲルの代わりにゼラチン溶液を入れると、ミクロゲルを得ることが出来る。サイズの異なるミクロゲルに対して、表面の弾性率を測定した結果、ミクロゲルの弾性はサイズの逆数に比例して上昇し、半径が約60 μmではバルクゲルの弾性率の約7倍の硬さを持つことを見出した。これは、脂質膜がゲルの架橋構造を作るヘリックス構造形成を誘起することを示唆している(Sakai, et al., *submitted*)。

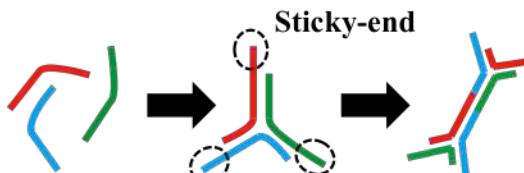


図1 :Y モチーフ DNA

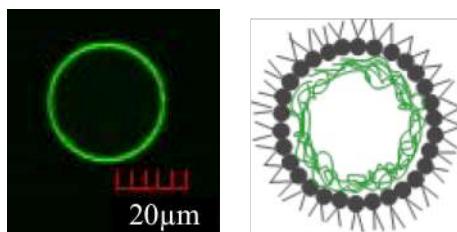


図2 :DNAゲル骨格をもつ直径32μmのエマルションを示す蛍光画像と模式図。

DNA の酸化的切断を促進する二核銅錯体の開発

角谷 優樹・福井 克樹・野村 章子・小寺 政人
同志社大学大学院理工学研究科 応用化学専攻
E-mail address: duq0716@mail4.doshisha.ac.jp

1. 緒言

単核白金(II)錯体である *cisplatin* や *oxaliplatin* などは DNA に強く結合してその複製を阻害し、がん細胞の増殖を妨げる。これらは様々ながんに効果を示すため、抗がん剤として広く臨床利用されてきたが、正常細胞にも作用し、嘔吐、腎毒性、脱毛などの深刻な副作用を示す。

そこで我々は副作用の少ない新たな抗がん剤の開発を目指し、Fig. 1 に示す様々な二核化配位子を開発してきた。また、がん細胞は正常細胞とは異なり、(1) 低酸素・高 H_2O_2 、(2) 銅や鉄などの濃縮などの特徴を持つ。そこで H_2O_2 による DNA の酸化切断を促進する金属錯体を開発できれば、副作用の少ない抗がん剤の開発につながると考えられる。今回、新規アミド型二核化配位子 Hbcamide を合成し、その二核銅錯体が H_2O_2 存在下、高い DNA 酸化切断活性を示したので報告する。

2. 結果および考察

Fig. 1 の Hbcmcp, HMe₄bcmp, Hbcc などのアミン型二核化配位子の二核銅錯体は H_2O_2 による DNA 切断活性が低く、これまでに多く報告されている例と同様に、これらの錯体が H_2O_2 と反応することにより酸化分解していると考えた。そこで、本研究ではペンドント基をアミド結合で結合させた二核化配位子を新たに開発した。この二核銅錯体は H_2O_2 と反応しても分解せず、高い DNA 切断活性を示した。この錯体は H_2O_2 および錯体の濃度に依存して DNA の切断活性が変化することが判明した。その DNA 酸化切断による Form II 生成速度の H_2O_2 濃度依存性を Fig. 2 に示す。60 分という非常に短い時間で DNA の Form II が 90% 以上生成し、120 分で Form III が生成することも明らかになった。これらのことから、この二核銅錯体はがん細胞に存在する H_2O_2 と反応したときにのみ活性を示し、かつ非常に高い DNA 酸化切断活性を有することがわかり、副作用の少ない抗がん剤につながると期待される。

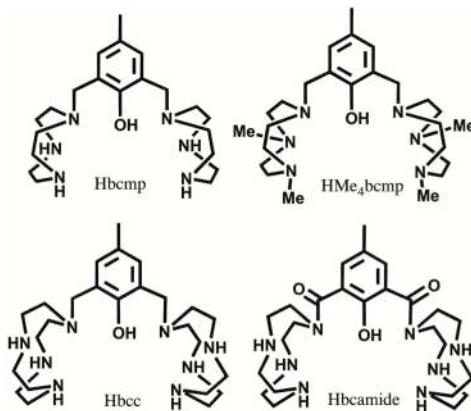


Fig. 1 二核化配位子の化学構造

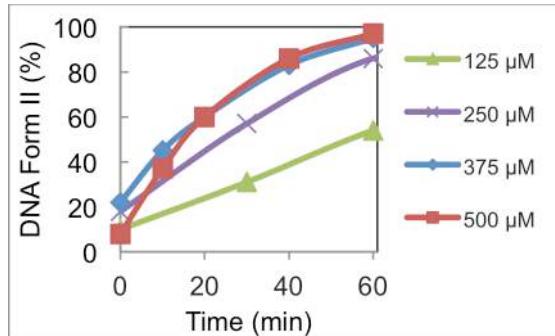


Fig. 2 bcamide の二核銅錯体の存在下における DNA 酸化切断による Form II 生成速度の H_2O_2 濃度依存性

G-quadruplex DNA と選択的に結合する二核銅錯体の開発

齋藤 樹・角谷優樹・小寺政人
 同志社大学院理工学部応用化学専攻
 ctwb0753@mail4.dpshisha.ac.jp

1. 緒言

近年、抗がん剤の研究において G-quadruplex DNA が注目されている。G-quadruplex DNA はテロメア領域に存在し、がん遺伝子の発現調整に関与しているプロモーター領域でも多く存在することが報告されている。そこで選択的に G-quadruplex DNA と結合する化合物群の開発が進められている。また遷移金属錯体は DNA を加水分解または酸化によって切断する反応を促進する事が知られている。我々はこれまでに、特異的に DNA を切断することができる二核錯体を開発してきた。本研究では、G-quadruplex DNA を選択的に認識することにより G-quadruplex DNA に対する選択性を向上させ、がん細胞の DNA を特異的に切断する二核錯体の開発を目指した。今回は、dibenzoimidazolylphenyl 構造を持つ G-quadruplex DNA の特異的認識部位を二核錯体に導入する事を目的として化合物 **1** (Fig. 1) の合成を試みたので報告する。

2. 実験

dimethyl 5-hydroxyisophthalate を原料として化合物 **3** を 3 段階の反応で合成した。次に 2-hydroxyethylpiperazine を原料として 2 段階の反応で化合物 **7** を合成した。さらに Scheme 1 に示す反応において、**3** と **7** を縮合させ、さらにこれを空気酸化することにより目的の化合物 **1** の前駆体である新規化合物 **9** を合成した。

3. 結果と考察

Fig. 1 に示す化合物 **1** を合成するために多段階の合成実験を行った。また Fig. 2 に示す化合物 **2** は既知の方法に従って合成した。化合物 **1** の前駆体である化合物 **9** は化合物 **3** と化合物 **7** の縮合により合成した (Scheme 1 参照)。ここでは、化合物 **3**, **7**, **9** の合成について記述する。

化合物 **3** の合成： 5-hydroxyisophthalic acid と触媒量の濃硫酸を MeOH に加えて加熱するとメチルエステル **4** が生成した。これを propagyl bromide と反応させ、水酸基をプロパギル化して **5** を得た。**5** を THF に溶かし、LiAlH₄ で還元してジヒドロキシ体である **6** を得た。**6** を CH₂Cl₂ 中、PCC で酸化してジアルデヒド体である **3** を得た。

化合物 **7** の合成： 1-(2-hydroxyethyl)piperazine と 5-chloro-2-nitroaniline を K₂CO₃ の存在下、DMF 中、110°C で一晩反応させるとニトロアニリン体 **8** が生成した。**8** を EtOH に溶かし、Pd/C を加え、水素添加して **7** を得た。

化合物 **9** の合成： **3** と **7** を EtOH に加え、Na₂S₂O₅ 存在下、空気下で反応させると目的の化合物 **9** が得られた。

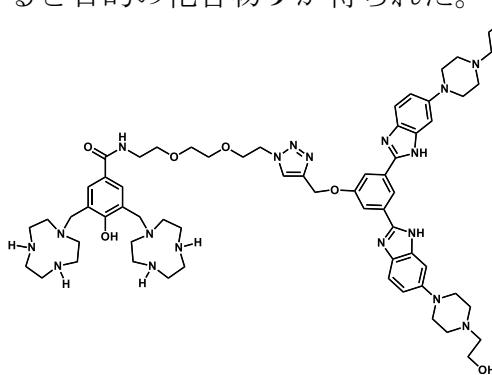


Figure 1. Chemical structure of **1**.

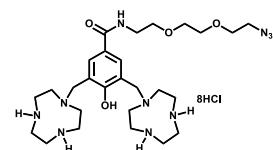
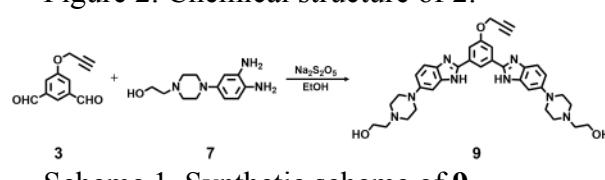


Figure 2. Chemical structure of **2**.



Scheme 1. Synthetic scheme of **9**.

過酸化水素を検出する蛍光プローブの高感度化

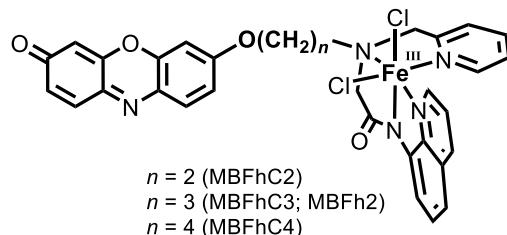
宮地 亮昌

同志社大学理工学研究科分子生命化学研究室

E-mail address: eup1703@mail4.doshisha.ac.jp

活性酸素種 (ROS, Reactive Oxygen Species) は生体内でマクロファージや好中球が外来のバクテリアを殺菌するために NADPH オキシダーゼによって生産されるが、その他の ROS は生体内の還元剤によってあるいは酸素の還元反応の副生成物として発生し DNA 損傷や細胞死を引き起こすと考えられてきた。近年これらに加えて、マクロファージや好中球以外の通常の細胞が低レベルの H₂O₂ を細胞の分化や成長に関わるシグナル伝達物質として生産し、リン酸化酵素などを活性化することが明らかにされ注目を集めている (S. G. Rhee, *Science*, **2006**, 312, 1882)。

我々は、このシグナル伝達物質として生産される H₂O₂ の蛍光イメージングを目指し、酸化酵素機能モデル錯体を利用した金属錯体型 H₂O₂ 蛍光プローブである MBFh (Metal Based Fluorescent Probe for



Hydrogen Peroxide) を報告してきた (*Anal. Chem.*, **2011**; *Chem. Commun.*, **2013**; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2014**)。特に、MBFh2 (MBFhC3) は細胞培養液中でも安定であり、上皮細胞成長因子の添加により A431 細胞が産生する H₂O₂ を蛍光検出することができる。

本研究では、酸化酵素機能モデル錯体とプロ蛍光団 (*O*-アルキルレゾルフィン) とを繋ぐアルキル鎖長の異なる類縁体 (MBFhC2 および MBFhC4) を新たに合成し、H₂O₂ 蛍光応答を評価した。その結果、MBFhC2 は 0.5 μM の H₂O₂ に対

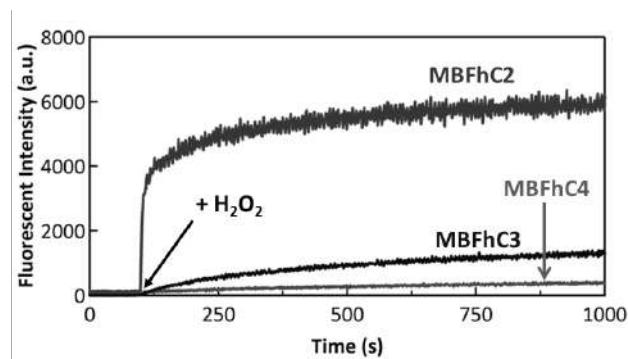


Figure. Time-course of the fluorescence response of MBFh (5 μM) to H₂O₂ (100 μM).

しても効率良く赤色蛍光物質レゾルフィンを生成し、その効率は既報の MBFhC3 (MBFh2) の約 9 倍であることを見出した。

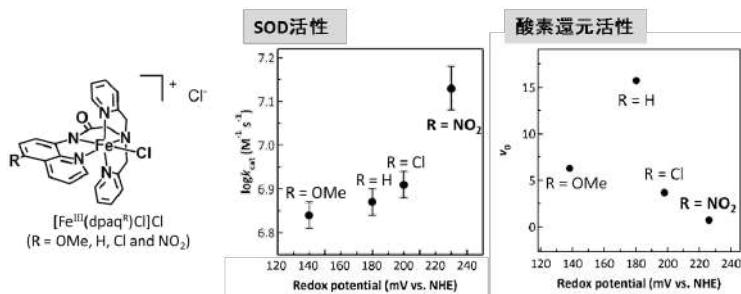
異なる電子状態を有する鉄錯体による活性酸素の 消去および生成と酸化還元電位との相関

岩本 勇次

同志社大学大学院 理工学研究科

E-mail address: eup1702@mail4.doshisha.ac.jp

活性酸素種の一種であるスーパーオキサイドアニオンラジカル(O_2^-)は、主にミトコンドリアの電子伝達系から副生成物として生成し、細胞に酸化ストレスを与えることが知られている。その O_2^- を水と過酸化水素に不均化するスーパーオキシドディスクターゼ(SOD)活性を有する分子は、細胞内の酸化ストレスを軽減することから、抗酸化剤としての応用が期待されている。これまでに、本研究室では、カルボキサミドアニオン配位を有する鉄錯体およびその誘導体が SOD 活性を有することを報告している。また、その活性は酸化還元電位が正にシフトするに従い向上することが判明した[1]。しかし、近年 SOD 活性を有する金属錯体が還元剤存在下、酸素を還元し、活性酸素種を生成することで細胞に酸化ストレスを与えることが報告されている[2]。そこで、SOD 活性を有する異なる電子状態を持った 4 種の鉄錯体を用い、還元剤であるアスコルビン酸存在下、酸素の還元活性を評価した結果、無置換体が最も高い活性を示すベル型の相関が得られた。以上の結果から、本研究で用いた 138–226 mV vs. NHE の範囲の酸化還元電位を有する鉄錯体では、鉄 2 価状態が安定であるニトロ置換体が、SOD 活性が高く、且つ、還元剤存在下においても活性酸素を生成しないために、細胞内の活性酸素濃度を最も効率的に低下させることが期待される。本発表では、4 種の鉄錯体の SOD 活性および酸素の還元活性だけでなく、培養細胞内の活性酸素消去活性についても報告する。



参考文献

1. Y. Hitomi et al., *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 8702-8704.
2. I. Batinic-Haberle et al., *Inorg. Chem.*, **2014**, 53, 11467-11483.

アミノ酸由来ビニルポリマー : LCST の自在制御と細胞足場材の調製

○東 信行・平田絢葉・古賀智之

同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科

E-mail:nhigashi@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】

これまでにアミノ酸由来ビニルポリマーが温度応答性を示すことを見出してきた。また、用いるアミノ酸の構造によって LCST 型や UCST 型に応答様式を設計できること、さらに異なるアミノ酸種の共重合化により相転移温度を自在に制御できることを明らかにした。我々はこの系を溶液から固体表面に展開し、新しいスマート表面の調製を目指した。具体的には、表面開始 ATRP 法によりアミノ酸由来ビニルポリマーを修飾する方法 (Fig. 1) を採用し、その温度応答性の検討ならびに細胞培養基材への応用を試みた。

【結果と考察】

ガラス表面にアラニンおよびグリシン由来ビニルモノマー(NAAMe、NAGMe)を表面開始 ATRP によりグラフトすることで温度応答性の発現を狙った。重合の進行は、ATR FT-IR スペクトルより確認した。生成した高分子ブラシのキャラクタリゼーションは、¹NMR スペクトルならびに GPC により行った。また、水溶液の濁度測定により、LCST はそれぞれ PNAAMe で 17 °C、poly(NAAMe0.70-co-NAGMe0.30) は、22 °C 、 poly(NAAMe0.66-co-NAGMe0.34) は 25 °C であることがわかり、グリシンの導入で高温側へシフトした。

次に高分子修飾表面の温度応答性を液中気泡法による接触角測定により評価した。どの組成の基板も温度上昇に伴って接触角が小さくなり、表面が疎水的化するLCST 型の温度応答挙動を示した。興味深いことに、表面グラフトポリマーにおいてもグリシンの組成比が大きくなるほど転移温度が上昇し、水中でのLCST と対応している。このように、共重合によって表面の応答温度が広範囲に制御できることがわかった。次にこれら基板上でマウス由来繊維芽細胞を培養した。生死染色の結果、生細胞が多く観察されたことから、この基板は細胞毒性を有していないと判断した。さらに、コウシ血清入りの培地中で24 時間培養した後に4 °C の緩衝液に基板を浸漬させると細胞はシート状に剥離した(Fig. 1)。また、ポリマーの種類（転移温度）により剥離温度も可変可能であることが明らかになった。

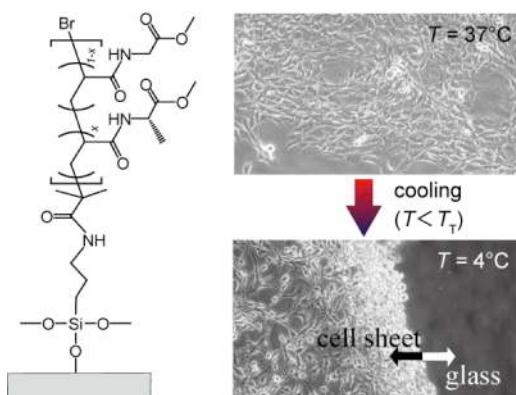


Fig. 1 Molecular structure of polymer brushes and cell-sheet detachment by phase transition.

pH 高速応答型ペプチド・ハイドロゲルの調製とその特性

○古賀 智之・大當 悠太・東 信行
 (同志社大学理工学部機能分子・生命化学科)

E-mail address: tkoga@mail.doshisha.ac.jp

[緒言] 我々は三次元細胞足場材料や化学エネルギーを利用して運動する分子システムへの展開を念頭に、自己組織性ペプチドを活用したハイドロゲル材料の開発を進めている。人工ペプチドは、アミノ酸配列により立体構造制御や刺激応答性付与を容易に実現できる。本研究では自己組織化ペプチドをゲル骨格に導入することで自己集合性ネットワークフレームからなる新しいタイプのハイドロゲルの設計を行った。これらゲルの pH 応答性や物性を報告する。

[結果と考察] 両端にチオール基を有し、自己集合性の異なる 2 種類のペプチド $\mathbf{CE}_8\mathbf{C}$ および $\mathbf{C}(\mathbf{LE})_4\mathbf{C}$ を調製した。これらをマレイミド修飾 4 分岐 PEG と反応させることで化学架橋型ハイドロゲル ($\mathbf{1}_{\mathbf{E}8}, \mathbf{1}_{(\mathbf{LE})4}$) を調製した。また片末端のみにチオール基を有する $\mathbf{C}(\mathbf{LE})_4$ を 4 分岐型 PEG 末端に導入した $\mathbf{2}_{(\mathbf{LE})4}$ (自己組織化ゲル)も合成した(Figure 1)。化学架橋型 $\mathbf{1}_{\mathbf{E}8}$ 及び $\mathbf{1}_{(\mathbf{LE})4}$ は、ネットワークフレームの二次構造変化(ランダムコイル $\leftrightarrow \beta$ -シート)に基づいて pH 可逆的な膨潤収縮挙動を示した。一方、 $\mathbf{2}_{(\mathbf{LE})4}$ は、pH 変化に対して可逆的にゾルゲル転移を示すことがわかった。ハイドロゲル(2 wt%)の貯蔵弾性率(G')の pH 依存性を検討した結果、pH 6 付近では G' は 20 Pa 程度のゾル状態であったが pH 5 付近を境に急激に増加し、pH 3 付近では 650 Pa となった。この pH 領域はペプチドのランダムコイル $\leftrightarrow \beta$ -シート転移を示す pH とよく対応しており、ペプチドの β -シート形成により可逆的に架橋点が形成されていることを示している。また興味深いことにゾル状態の $\mathbf{2}_{(\mathbf{LE})4}$ を酸性にすると瞬時にゲル化し、pH 変化に対して高速に応答することがわかった。

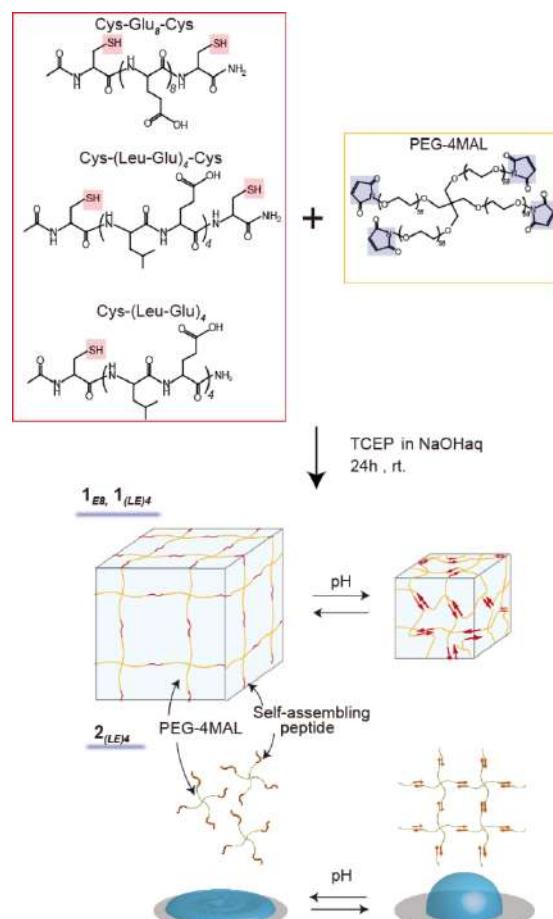


Figure 1. Schematic illustration for the synthesis of pH-responsive peptide-hydrogels with self-assembling network frame.

マウス血中 CO の選択的除去による体内時計リズム変化

峯岸彩夏, 北岸宏亮

同志社大学理工学研究科応用化学専攻

E-mail address: euq1703@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】

2002年、一酸化炭素(CO)が概日リズムの調節に関与することが報告された¹⁾。しかし、生体内に微量しか存在しない CO が概日リズムの制御においてどのような役割があるのか、その詳細は未だ解明されていない。本研究では、生体内 CO 除去分子である hemoCD (鉄ポルフィリン / シクロデキストリン複合体)^{2,3)} をマウス腹腔に投与し、内因性 CO を除去した際の時計遺伝子群(*Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した(Figure 1)。CO 除去による生体内 CO 濃度変化と時計リズム変動の関連について、詳細な機構を検討した。

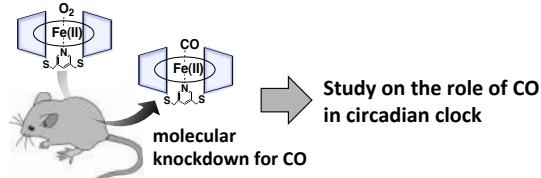


Figure 1. CO receptor “hemoCD” for investigation of the physiological role of CO.

【結果および考察】

hemoCD を投与したマウスの肝臓内において、時計遺伝子群の発現量は一旦増加し、定常値へ戻った後、投与 24 時間後まで減少するという結果が得られた(Figure 2)。続いて hemoCD 投与による肝臓内 CO 濃度変化を検討したところ、投与 30 分後の肝臓内で CO 量は減少し、投与 3 時間後の肝臓内では増加することがわかった。これより、マウス血中 CO を除去すると肝臓内 CO 濃度は減少、続いて増加し、それに応じて時計遺伝子の発現量が変化することが示唆された。本研究により *in vivo* での CO 減少が体内時計リズムに大きく影響を及ぼすことが初めて明らかとなった。

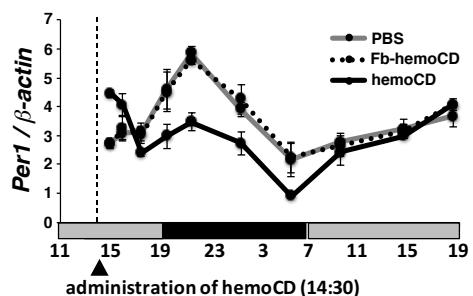


Figure 2. The mRNA levels for the clock gene (*Per1*) in the mice liver.

【参考文献】

- 1) E. M. Dioum, J. Rutter, J. R. Tuckerman, G. Gonzalez, M. Gilles-Gonzalez, S. L. McKnight, *Science*, **2002**, 297, 2385.
- 2) H. Kitagishi, S. Minegishi, A. Yumura, S. Negi, S. Taketani, Y. Amagase, Y. Mizukawa, T. Urushidani, Y. Sugiura, K. Kano, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5417.
- 3) S. Minegishi, A. Yumura, H. Miyoshi, S. Negi, S. Taketani, R. Motterlini, R. Foresti, K. Kano, H. Kitagishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, ASAP.

脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による 細胞死メカニズムの解析

浦野泰臣

同志社大学生命医科学部・医生命システム科

E-mail address: yurano@mail.doshisha.ac.jp

脳特異的オキシステロールである 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) は脳内のコレステロール恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。一方でアルツハイマー病 (AD) や軽度認知症患者の脳脊髄液中で増加することが報告されている。また、24S-OHC の生成酵素である cholesterol 24-hydroxylase の多型が AD 発症の危険因子として報告されており、24S-OHC と AD の発症や進行との関連が示唆されている。

これまで我々は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、過剰な 24S-OHC がカスパーゼ非依存性プログラム細胞死である necroptosis 様の細胞死を誘導すること、さらに初期段階で acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) によりエステル化した 24S-OHC が蓄積することを見出した。本研究ではその細胞死メカニズムについて明らかにすることを目的とし、以下の解析を行った。

まず細胞内に蓄積した脂質に着目し、HPLC 法や DART 質量分析法を用いて測定したところ、細胞死誘導過程において 4 種類の長鎖不飽和脂肪酸がエステル結合した 24S-OHC エステル体が蓄積していることを明らかにした。同定された各脂肪酸を 24S-OHC と同時添加すると細胞死が増悪したことから、特定の種ではなく、全体として 24S-OHC エステル体が蓄積することが細胞死を誘導すると考えられた。次に電子顕微鏡による観察において、24S-OHC 処理細胞では脂肪滴様構造の形成と共に小胞体の肥大化が観察され、ACAT 阻害剤によりこれらの構造の形成が抑制されることを見出した。小胞体構造の変化が認められることから小胞体ストレスについて解析したところ、ストレス応答として知られる unfolded protein response (UPR) 経路の活性化が確認された。また ACAT 阻害剤処理により UPR の活性化が抑制されたことから、24S-OHC のエステル化に伴って小胞体ストレスが生じていることが明らかとなった。以上の結果から、ACAT によりエステル化された 24S-OHC が増加し、異常な脂肪滴様構造を形成することが小胞体ストレスを誘導することで、細胞死が引き起こされる可能性が考えられた。

亜鉛フィンガータンパク質の生体内レドックスセンサー機能 の可能性

○根木滋・鳥見 優・北野莉加・杉浦幸雄

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:snegi@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

近年、亜鉛フィンガータンパク質(ZFP)は細胞内において転写やシグナル伝達に関する「レドックス・スイッチ」のような役割を果たしている可能性が示唆されている。本研究では、3つのフィンガードメインを有し、レドックス応答性といわれているSp1 ZFPを用い、各フィンガードメインおよび3フィンガータンパク質の構造および酸化反応性や安定性、DNA結合能について検討を行った。

【研究方法】

1. 各フィンガードメインにおける酸化還元反応、2. 各フィンガードメインの酸化体・還元体・再還元体についてのCDによる構造解析、3. 3フィンガータンパク質の酸化還元挙動およびDNA結合能についてそれぞれ検討した。

【結果および考察】

Sp1を用いてH₂O₂による酸化反応について検討を行った。F1ではジスルフィド型酸化体のみ生成するが、F2およびF3ではジスルフィド体およびMet残基のSが酸化されスルホキシ型酸化体も生成することが明らかとなった。また、酸化反応生成物をTCEPによる還元反応を行ったところ、F1ではジスルフィド部分は還元されたが、F2およびF3の場合、ジスルフィド部分はSH基に戻ったが、Met残基のスルホキシ部分はTCEPにより還元されず、不可逆的な酸化反応が起こっていることが明らかとなった。CDより酸化型の各フィンガードメインは、S-S結合を形成によりZn(II)と配位できず、な二次構造が形成できないことが分かった。Sp1-F123の酸化反応後は、1および2つのジスルフィド結合を含む酸化体、さらにすべてのSH基が酸化されて3つのジスルフィド結合をもちかつ1あるいは2つの酸素をMet残基の部分に有する酸化体が生成していることが明らかとなった。さらに、酸素付加体の酸化体に対してゲルシフトアッセイを行ったところ、すべての酸化体ではDNA結合能は失われており、TCEP還元反応により得られた再還元体では1酸素付加体ではDNA結合能が回復したが、2酸素付加体ではDNA結合能が回復しないことが明らかとなった。

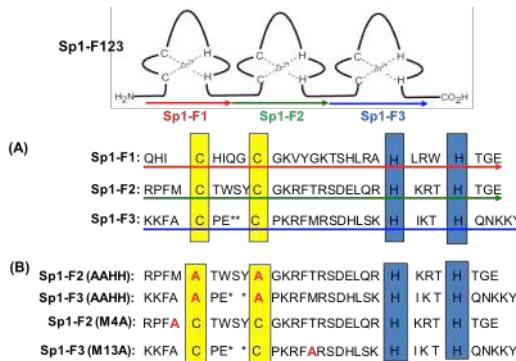


Figure 1. Sp1 zinc finger protein (Sp1-F123) with 3 zinc finger domains. Each domain has a typical Cys₂His₂-type zinc finger motif as a DNA-binding domain. (A) Primary sequence of each Sp1 finger domain (Sp1-F1 (red), Sp1-F2 (green), and Sp1-F3 (blue)). (B) Primary sequence of mutant peptides of Sp1-F2 and F3 (Sp1-F2(AAHH), F3(AAHH), F2(M4A), and F3(M13A)). Mutated amino acid residue is highlighted by red color. Cys and His residues participating the Zn(II) coordination are yellow and blue boxed.

大腸菌膜組成をもつリン脂質ベシクルへのイオン液体の分配

○仁保早紀子・松本道明

同志社大学理工学部化学システム創成工学科

E-mail address: ctwb0744@mail4.doshisha.ac.jp

1.緒言

イオン液体は、不揮発性、難燃性、熱安定性が高いなどの優れた特性から環境調和型溶媒として注目されているが、環境中に放出された後の生物蓄積、生態学的影響は十分に解明されていない。そこで本研究では、菌体である大腸菌に注目し、大腸菌膜組成をもつリン脂質ベシクルを用いて、イオン液体のベシクルへの分配機構を解明することを目的とし、ベシクル/水溶液系の分配係数を測定した。さらに、DSC を用いてイオン液体によるベシクルの相転移温度の変化を検討した。

2.実験方法

2.1 DPPG ベシクル(IUV)懸濁液の調製

脂質濃度が 10 mM になるようにリン脂質 DPPG に NaCl 溶液を加えてベシクル懸濁液を調製した。40 °C付近で超音波処理しボルテックスミキサーで 5 min 攪拌した後、押し出し法により IUV 懸濁液を調製した。

2.2 DPPE/DPPG 混合ベシクル(IUV)懸濁液の調製

リン脂質 DPPE と DPPG を重量比 4:1 になるように秤量し、30 vol%のメタノールを含むクロロホルムに溶解させ、エバポレーターを用いて 70 °Cで蒸発させた。得られた粉末より 2.1 と同様にして IUV 懸濁液を調製した。

2.3 イオン液体のベシクルへの分配量の測定

2.1 および 2.2 で調製したベシクル懸濁液と任意の濃度のイオン液体を 30 °C の恒温槽で 48 時間平衡透析を行った。平衡後、水相をサンプリングし誘導結合プラズマ分析装置(ICP)を用いて平衡透析前後のイオン液体濃度を測定した。ベシクル/水溶液系分配係数($\log P_{M/S}$)を式(1)より算出した。ここで、 C_{lip} および $C_{solution}$ はそれぞれ平衡後のベシクル内及び水溶液中のイオン液体濃度である。

$$\log P_{M/S} = \log \frac{C_{lip}}{C_{solution}} \quad (1)$$

2.4 相転移温度の測定

2.3 のベシクル懸濁液相を示差走査熱量測定器(DSC)で測定した。

3.実験結果と考察

様々なイオン液体について $\log P_{M/S}$ の測定結果を Table 1 に示す。アニオンを固定すると、カチオンのアルキル鎖が長いほど $\log P_{M/S}$ が小さくなる。これは、アルキル鎖による立体障害のために分配量が減少したと考えられる。一方、カチオンを固定すると、アニオンの構造が大きい方が分配量は多くなる。これは、ベシクルの表面が負に帯電しており、アニオンの電荷密度が大きいと静電作用が大きいため、分配量が減少したと考えられる。

また、種々のイオン液体分配前後の相転移温度差について、Fig.1 に示した。アニオンを固定して考えると、イオン液体の構造が大きいほどベシクルの相転移温度差は減少した。これは、カチオンのアルキル鎖が長いほどベシクルの流动性が増大したためであると考えられる。

4.結言

分配係数はイオン液体のカチオンは構造の大きさ、アニオンは電荷密度が影響していると示唆された。さらに、相転移温度差はカチオンのアルキル鎖が長いほど小さくなる傾向が見られた。

Table 1 $\log P_{M/S}$ of ionic liquids

Ionic liquid	$\log P_{M/S}$	
	DPPG	DPPE/DPPG
[emim][BF ₄]	2.41	2.49
[hmim][BF ₄]	2.38	2.45
[omim][BF ₄]	2.36	2.37

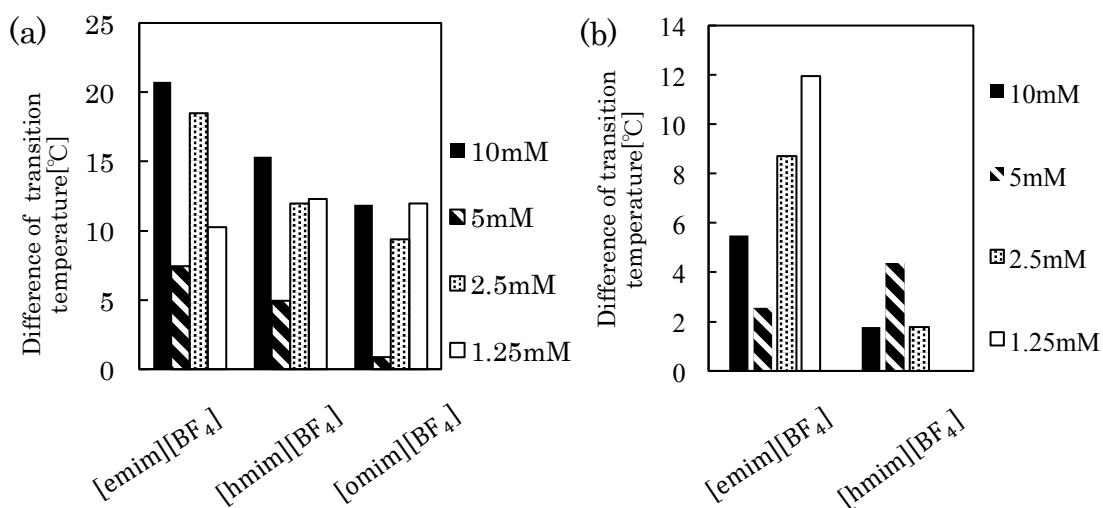


Fig.1 Difference in phase transition temperature between vesicle and vesicle with ionic liquid (a)DPPG (b)DPPE/DPPG

擬定常 pH 勾配を仕事に変換する分子集合体

名和 愛利香、中尾 友紀、塩井 章久
同志社大学研究開発推進機構及び理工学部
E-mail address: enawa@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】細胞や細菌は、様々な化学物質の濃度勾配下で多様な仕事を得ている。このような生態機能を人工的に再現できれば科学技術の発展への影響は大きいと思われる。そこで、生体機能と類似した機能を発現する単純な系を理解することが非常に重要である。このような観点から、擬似細胞としても利用されるベシクルの研究は興味深い。

【実験】多数のオレイン酸系ベシクルを含む pH8.40 の Bicine 緩衝液（オレイン酸ナトリウム濃度としては 24.6 mM）を注入した流路の一端に New Coccine(赤色着色料)を含む 1M の NaOH 水溶液、もう一端に pH8.40 の Bicine 緩衝液を設置し、流路内に pH12.4 から pH8.40 の pH 勾配および New Coccine の勾配を形成させ (Fig.1)、光学顕微鏡を用いてベシクルの運動と New Coccine 輝度分布を観察した。また、 Na^+ と New Coccine の拡散係数が殆ど変わらないと仮定して、New Coccine の色勾配から、 Na^+ 濃度および pH の勾配を推定した。

【結果と考察】観察されたベシクルは赤血球が丸まったような形状をしており、Fig.2 のような変化を繰り返した。この周期運動は反転運動と回転運動で構成されており^[1]、それぞれ反転速度（ベシクルが扁平になった状態を基準とした前後 45°、合計 90°をその所要時間で割った値）と回転速度（回転した角度をその所要時間で割った値）を計算した。また、ベシクルの周期運動が停止した時点の New Coccine 輝度分布から、ベシクル付近の pH と pH 勾配(∇pH)を推定した。

観察したベシクルの内、8 回以上周期運動を観察できたものについて、縦軸を反転速度および回転速度の平均値、横軸を pH、 ∇pH 、ベシクルの直径としたグラフを作成した。これを Fig.3 に示す。反転速度、回転速度ともに、pH に対する系統的な依存性は見られなかったが、 ∇pH の増加に伴い増加している。これよりベシクル運動の速度は、pH の絶対値よりも pH 勾配の大きさに影響を受けていると考えられる。ただし、ベシクルの直径の増加に伴い運動速度が減少する傾向も認められ、更なる検討が必要である。

また、本実験方法を用いれば運動しているベシクルの周囲の pH 等が算出できることに着目し、オレイン酸系ベシクルの運動の中でも特に回転運動に必要な

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
 私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
 2016年度 成果報告会

駆動力を、ベシクルの回転に必要なモーメントとそれによって生じる抵抗力から推算したところ、およそ 0.1 pN オーダーであり、ベシクルの直径に比例することが見出された。この駆動力は細胞内の分子モータから生み出される力よりも 1~2 衍小さいオーダーである。本実験系におけるベシクル運動のエネルギー源は単純な中和反応であると考えており、反応系と力の大きさの関係について極めて興味深い知見が得られている。

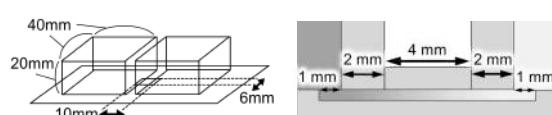


Fig.1 A device to form steady pH gradient.



Fig.2 Rhythmic shape change of vesicle.

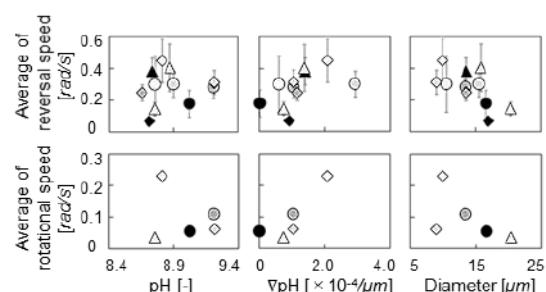


Fig.3 Results of average of reversal and rotational speeds against pH, ∇pH and diameter of vesicle.

【参考文献】

- [1] E. Nawa et al., Soft Matter, 2013, 9, 7832

有機燃料を含む水溶液中の Pt 触媒粒子の集団運動

久保内 雅生, 井尾 祐斗, 山本 大吾
同志社大学理工学研究科 応用化学専攻
E-mail address: dyamamot@mail.doshisha.ac.jp

1. 緒言

集団運動は生物界において普遍的に見られており、鳥の群飛や魚の群泳などがその一例である。一方でバクテリア、ミドリムシなどの構造が単純な单細胞生物でさえ、集団の場合コロニーとして知られる幾何学パターンを形成する。本研究室では、このような自発運動系を化学システムに組み込むことでプロセスの自由度が飛躍的に上がると考えており、シンプルな実験系で集団運動を再現し、その運動を発現するための機構を追究することを目的としている。本研究室ではこれまでに、過酸化水素やアルコールを含む水溶液中で Pt 触媒粒子が、指向的運動を示すことを見出している^{[1][2]}。そこで本研究では、濃厚な Pt 粒子サスペンションを用いて、反応溶液中の Pt 粒子の挙動を観察した。

2. 実験方法

まず、反応物質を含む濃厚な Pt 粒子のサスペンション(300 mg/L)を調製した。ここで反応物質濃度が 1.0 vol% (エタノール、メタノール、アセトアルデヒド水溶液)、 5×10^{-4} wt% (H_2O_2 水溶液)となるよう濃度を調整した。この溶液 300 μ L を採取し、ガラスベースディッシュの内側のホール (直径 : 12 mm, 深さ : 2 mm) に注入した (図 1-a)。また、ホールの周りにシーリング剤を塗布しておき、注入後にカバーガラスで蓋をし、ホールを密閉した。観察方法としては、マクロレンズ (巨視的観察) と光学顕微鏡 (微視的観察) を用いて、連続撮影した。また、Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) で加工したポリジメチルシリコン(PDMS)基板を用いて、制限空間における Pt 粒子の集団運動を検討した。ガラスベースディッシュのホールに円形の溝 (直径 : 1 mm) を有する PDMS 基板を設置し、上述の各種サスペンションを 2.00 mL 注入した (図 1-b)。この円形溝内の Pt 粒子の運動を、光学顕微鏡を用いて観察した。

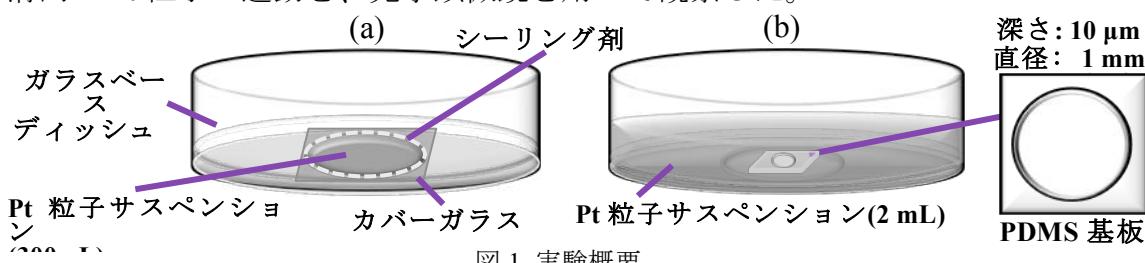


図 1 実験概要

3. 結果と考察

1.0 vol%エタノール水溶液中でのガラスベースディッシュのホール内における Pt 粒子の集団運動の様子を図 2 に示す。図 2-a はホール全体を写した巨視的観察の結果である。溶液注入直後は Pt 粒子が均一に分布しているが、時間が経つにつれて Pt クラスターが形成し (30 分後)、合一することで成長する (60-240 分後)。その後崩壊する様子が確認できた (300 分後)。この一連の様子をより詳細に検討するために、微視的観察を行った (図 2-b)。溶液注入から 1 分後では、Pt 粒子が均一に分布しているが、その後 Pt クラスターが形成し始め (21 分後)、成長する様子が観察できた (32-61 分後)。その後、十分に時間が経過すると、クラスターを形成する粒子は徐々に解散し始め、元のように均一に分散する挙動が見られた (92-180 分後)。メタノール水溶液中とアセトアルデヒド水溶液中では、エタノールで実験したときと同様に Pt 粒子の集団運動が観察されたが、超純水あるいは H_2O_2 水溶液を用いた場合、このような Pt 粒子の特徴的な集団運動は見られなかった。ここで、この集団運動のメカニズムを考察する。Pt 粒子単体は表面付近の溶存酸素との相互作用力によって、溶存酸素濃度の低い方向

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
 私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
 2016年度 成果報告会

に運動することがわかっている^[2]。アルコールやアルデヒドを含む水溶液中では、反応が進行し酸素が消費されると近距離にある粒子間で引力が生じ、クラスターを形成する。このクラスターは大きくなるほど周囲の酸素を消費しやすく、より強い引力を引き起こす。これにより、周囲のPt粒子やクラスターを吸収し、クラスターが成長していくと考えられる。そして十分に時間が経過すると、周囲の溶存酸素が消費されつくし濃度勾配がなくなり、Pt粒子の運動がブラウン運動になり、クラスターが崩壊すると考えられる。またH₂O₂水溶液中では、Pt粒子近傍で酸素が生成されるため、粒子間には斥力が働くことで、クラスターを形成しないと考えられる。

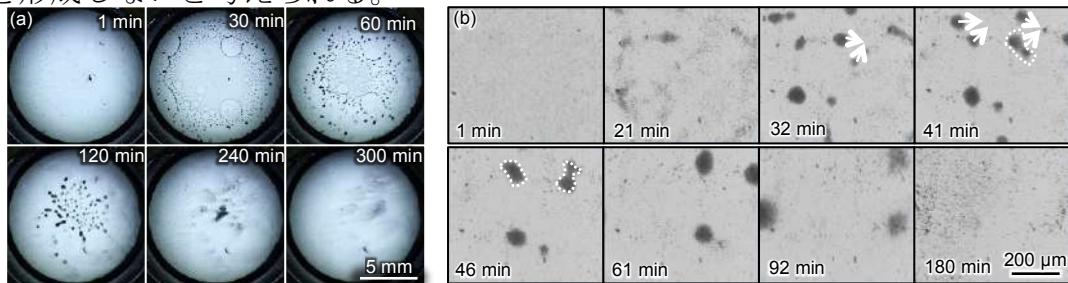


図2 1.0 vol%エタノール水溶液中のPt粒子の集団運動(a)巨視的観察, (b)微視的観察

次に1.0 vol%エタノール水溶液中での円形の制限空間におけるPt粒子の集団運動の様子を、光学顕微鏡で撮影したものを図3に示す。図3はPt粒子サスペンションを注入してから約5分後の円形溝の全体図、図3-a, bはそれぞれ図3の状態から、60 s毎、15 s毎の拡大図を示している。溶液注入直後は、Pt粒子は均一に分散しているが、次第に円形溝の周縁部に集まる。このとき図3-aに示すように周縁部には、粒子濃度が高い密な部分（クラスター）と疎の部分が周期的に繰り返されるような時空間パターンが形成した。さらにこのクラスターを観察すると、図3-aに示すように円形溝周縁部を円周方向に沿った進行波であることが確認できた。このとき、進行波の終点付近でPt粒子が溜まっていくことはなかった（図3-b）。この進行波を形成する一つ一つのPt粒子の運動を見るためにさらに高倍率で観察を行った。溶液注入後、約3分経過後の拡大図と、ある1つの粒子の時間に対するy方向の変位と進行波の時空間プロットを図4に示す。図3-aから、Pt粒子は進行波に沿って移動しているように見えるが、図4に示すように一つ一つの粒子はその場で進行波方向に振動しており、縦波の疎密波の特徴を有していることがわかった。すなわち、溶液注入直後は、Pt粒子は均一に分散しているが、次第に円形溝の周縁部に集まり、密の部分と疎の部分を繰り返したパターンを形成する。このとき、Pt粒子が振動運動し、隣り合う粒子の振動の位相差が一定にずれることで密の部分が進行波として伝播すると考えられる。また、メタノールとアセトアルデヒドで実験を行った結果、エタノールで行ったときと同様の時空間パターンが観察されたが、H₂O₂水溶液や超純水を用いた場合はこのようなパターンが観察されなかつた。よって運動性微粒子であっても特徴的な集団パターンを形成するとは限らず、特定の反応機構でのみ集団運動をするのではないかと考えられる。

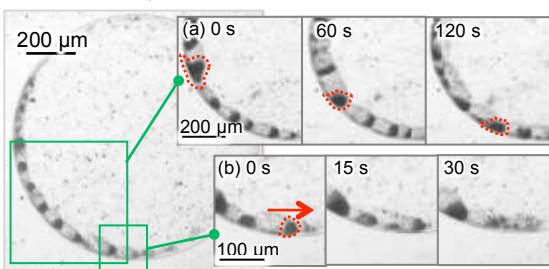


図3 制限空間内のPt粒子の集団運動の全体図と
 (a)進行波の拡大図、(b)終点付近の拡大図

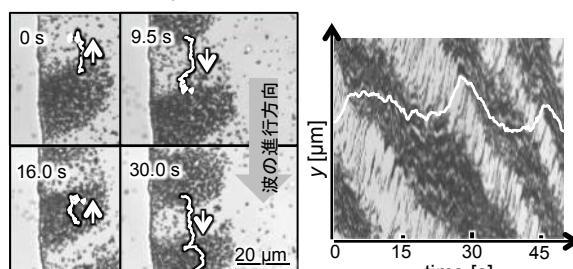


図4 エタノール水溶液中のPt粒子の振動運動の軌跡と
 Pt粒子のy変位と進行波の時空間プロット

4. 参考文献

- [1] D. Yamamoto et al., *J. Chem. Phys.*, **139**, 034705 (2013)
- [2] D. Yamamoto et al., *Nanoscale*, **7**, 13186-13190 (2015)

P 1 3

フッ素含有 n 型 π 共役系ポリマーのレドックス特性と芳香族アミンセンシング機能○野瀬啓二¹、彌田智一¹、三治敬信¹、萬井 知康², Matthew Bird²、John R. Miller²

JST-ERATO 彌田超集積材料プロジェクト¹、ブルックヘブン国立研究所化学科²

E-mail address: nose.k.aa@m.titech.ac.jp

π 共役系高分子は、その光電子物性を利用して、化学物質や生体物質のセンシング材料として応用が期待されている。中でも、ポリアリーレンエチニレン類 (PAEs)

は、蛍光の消光を利用したセンシング材料として、幅広く用いられている。本研究では、芳香族アミンと相互作用する部位としてテトラフルオロアレンユニットを主鎖中に有する PAEs (図 1) を設計し、その酸化還元電位と芳香族アミンとの相互作用について検討した。

ピコ秒電子線パルスをサンプル溶液に照射し、発生した対象分子のアニオンラジカルと参照分子との電子移動平衡状態を形成させる方法により、還元電位を決定したところ、P2において最も低く、 $E_{\text{red}} = -1.44 \text{ V vs Ag/AgCl}$ と決定された。この値は、ポリフルオレン ($E_{\text{red}} = -2.27 \text{ V vs Ag/AgCl}$) よりも十分に電子欠乏性と言える。そこで、ドナー分子として p -フェニレンジアミンを、P3 水溶液に添加したところ蛍光が消光されることを確認した(図 2)。一方、ポリフルオレンの蛍光は、芳香族アミンによって消光しない。これらの結果は、含フッ素 PAEs が、従来の p 型 π 共役系高分子では困難なドナーワーク機能を有する可能性があることを示唆している。

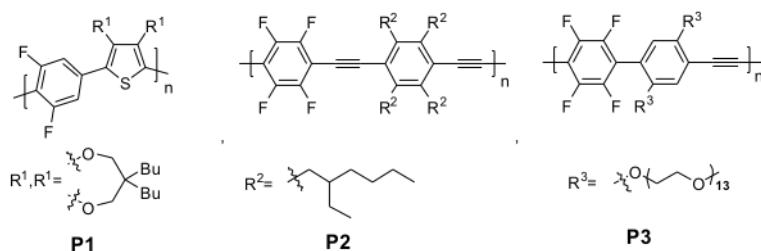


Figure 1. Chemical structures of p -conjugated polymers investigated in this study.

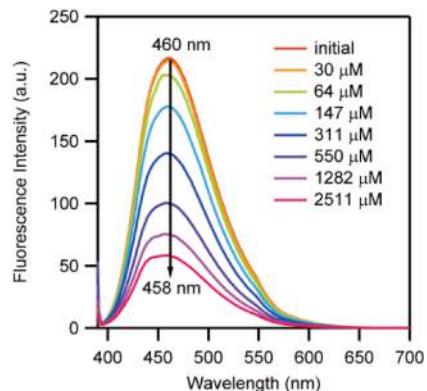


Figure 2. Fluorescence spectra of P3 with addition of

身体ゆらぎの非線形ダイナミクス：時間反転対称性の破れの評価

馬場 ひかり, 鷹取 慧, 貞包 浩一朗, 剣持 貴弘, 吉川 研一

同志社大学生命医科学研究科 生命物理科学研究室

E-mail address: ctub1003@mail4.doshisha.ac.jp

【目的】

我々ヒトを含む生物は、時間発展ゆらぎによって立位状態を維持する。このようなゆらぎの解析は、時間変化をフーリエ変換して得られるパワースペクトルによるものが大半である。そこでは、時間反転対称性の破れに関する情報は捨て去れている。本研究では、身体のゆらぎに内在する時間反転対称性の破れに注目し、時間軸情報に隠されていた情報を抽出する新規な解析方法を提案する。

【実験方法】

直立状態での身体の重心動揺を5分間計測し、解析を行った。重心動揺の時間変化からTime-delay map(下記参照)を作成し、時間反転対象性の破れを評価した。

【Time-delay map】

Time-delay mapは横軸にt秒のデータ、縦軸にt+τ秒のデータをとることで、それらの相関関係を表す。Time-delay mapを用いるとプロットの位置と個数で波形のゆがみを評価することができる。

【結果と考察】

得られたTime-delay mapから図4の通り、時間反転対称性の破れを評価するパラメータ ξ を作成した。これらから前にゆっくり傾き、後ろに速く傾くようなゆらぎの特徴が抽出された。

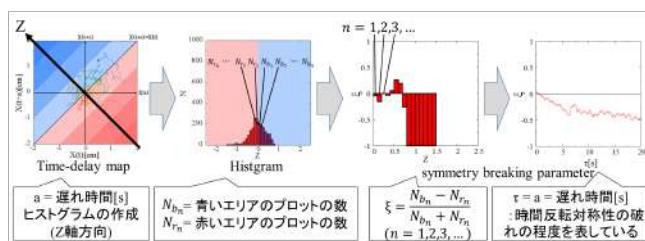


図4 時間反転対称性の破れ評価パラメータ ξ

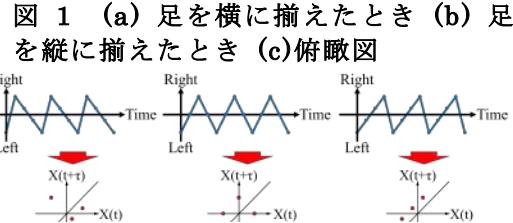
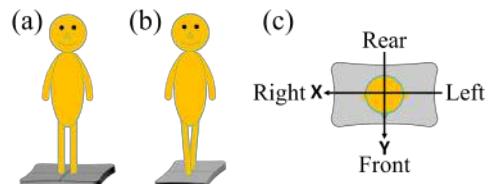


図2 Time-delay map

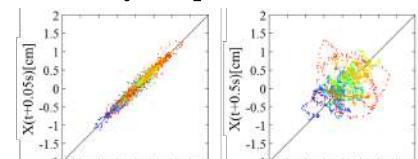


図3 得られた Time-delay map

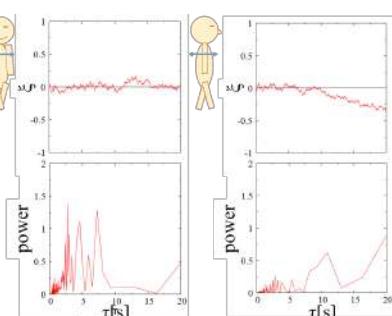


図5

活性酸素が引き起こす DNA 二本鎖切断の PEG による抑制効果

臼井 萌絵, 吉川 祐子, 貞包 浩一朗, 剣持 貴弘, 吉川 研一

同志社大学大学院生命医科学研究科 生命物理科学研究室

E-mail address: ctub1051@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】PEG とは Polyethylene Glycol の略称であり、生体毒の少ない中性高分子であるという性質から、ドラッグデリバリーシステムや遺伝子導入などに利用されている。本研究では、PEG の抗酸化作用に着目し、光誘起による DNA 切断に対する PEG の抑制効果を定量的に評価した。

【実験】蛍光顕微鏡による DNA 1 分子観察法を用いて、光誘起活性酸素によって DNA 分子が切断される様子の観察を行った。個々の DNA 分子について、照射開始から切断までの時間を計測し、PEG の分子量、濃度を変化させたときの切断抑制効果を比較検討した。Fig. 1 に切断されるまでの様子を例示した。

【結果と考察】 実験より DNA 未切断率の時間毎の変化は Fig. 2 のようになつた。PEG の濃度に依存して切断時間が延長されることが確認できた。PEG が存在しないときを 1 としたときの PEG 30g/L での反応速度比は、PEG600 は 0.32, PEG4000 は 0.14, PEG6000 は 0.03 という結果となつた。このことから、分子量が大きい程、DNA 切断の抑制効果が高くなることが分かった。

【参考文献】 Y. Yoshikawa, et al., FEBS Lett., 566, 39-42 (2004)

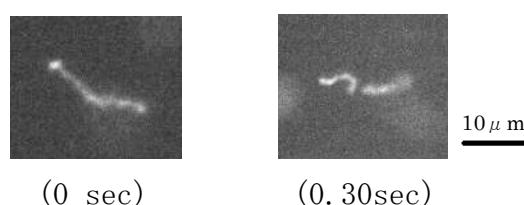


Fig. 1 Real-time observation on double-strand break induced by photo-irradiation

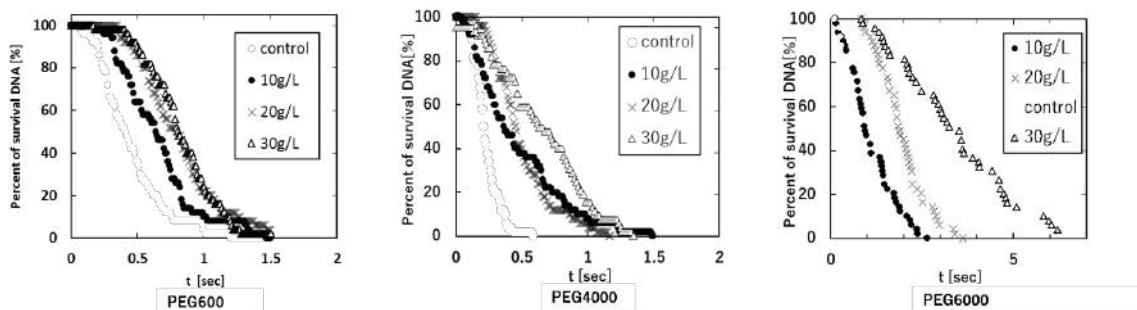


Fig. 2 Survival DNA molecules during photo-irradiation

結合した非線形光振動子による距離空間の識別

保田 祐輔、貞包 浩一朗、剣持 貴弘、吉川 研一

同志社大学 生命医科学研究科 生命物理科学研究室

E-mail address: cutb1011@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】 On/off 型の発光のリズムを示す,LED と光ダイオードからなる電子回路を作成した. 単一回路では一定周期で発振をするが, 光結合させた回路では相互同期をおこし振動に変化がみられる. 装置間の距離に依存して, 特徴的な同調パターンが生じることを見出したので報告する.

【実験】 実験装置を Fig.1,2 に示す. Fig.2 の実験例では, 実験機間の距離を増大させたときと減少させたときの点滅を記録した.

【結果と考察】 Fig.3 には光による一対の結合振動子の発振パターンの時空間プロットをしめした. 距離を増大させたときは 0.1m 以下の距離では 1:1 に同調し, 0.1~0.2m の距離では 1:2 の同期が起こっていることがわかる. 減少させた場合も同様の振動比が見られたが, 分岐を起こす距離に変化が見られた. この模式図を Fig.4 に示す. Fig.4 より, 距離空間の増大を識別し分岐点の位置を変化させたことから, 結合した非線形光振動子は履歴の情報を持っていると考えられる.

【参考文献】

T. Kousaka, H. Kawakami and T. Ueta; Synchronization of electric fireflies by using square wave generators, IEICE Trans. Fundamentals, vol. E81-A, No.4 1998.

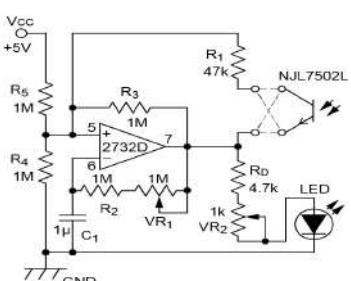


Fig.1 Electronic circuit

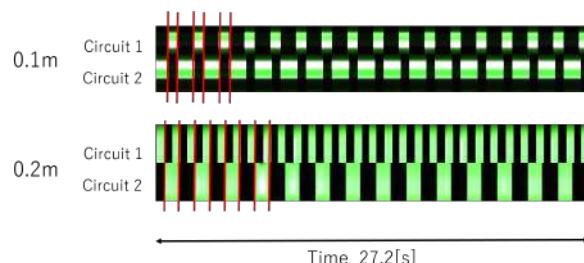


Fig.3 Lighting rhythm due to the distance

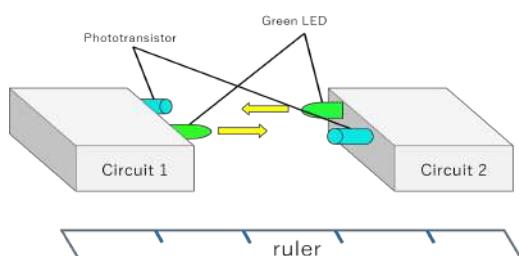


Fig.2 Experimental Setup.

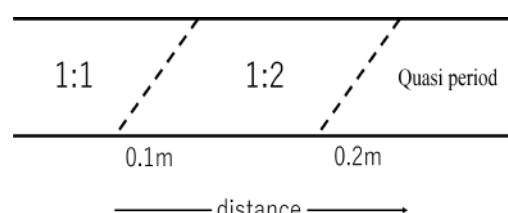


Fig.4 Phase diagram

P 1 7

音響に内在する時間反転対称性の破れの情報抽出の試み

東山 拓司, 上野 洋, 貞包 浩一朗, 剣持 貴弘, 吉川 研一
 同志社大学大学院 生命医科学研究科 医工・医情報専攻 生命物理科学研究室
 E-mail: ctub0006@mail4.doshisha.ac

【諸言】これまで楽器音の解析で主流に行われてきたフーリエ変換では時間軸上の反転対称性の破れに関する情報が消失している。このことに注目して、楽器からの音に内在している時間反転対称性の破れを定量的に評価する手法の確立を目指して研究を行った。

【解析方法】音の時間反転対称性の破れを可視化するための解析手法として、波形の振幅情報を時間遅れ τ ごとに取り出すことで、定性的に可視化する方法、Time delay map を考案した。Time delay map の作成手法を図 1 に示す。

【結果と考察】実際に録音した Woodbase の生音をあるフォルマント周波数で τ を取り、冒頭、中盤、終盤に分けて解析を行った。一例として、 $\tau = 1.1\text{ms}$ の冒頭部分の Time delay map を図 2 に示す。次に、作成した Time delay map を定量化する方法として、 $A(t+\tau) = A(t)$ からの最短距離を $d(t)$ とおき、ヒストグラムを作成する。一例として、 $\tau = 1.1\text{ms}$ の冒頭部分の Time delay map をヒストグラム化したものを図 3 に示す。 $A(t)$ は時間 t の時の振幅を表す。

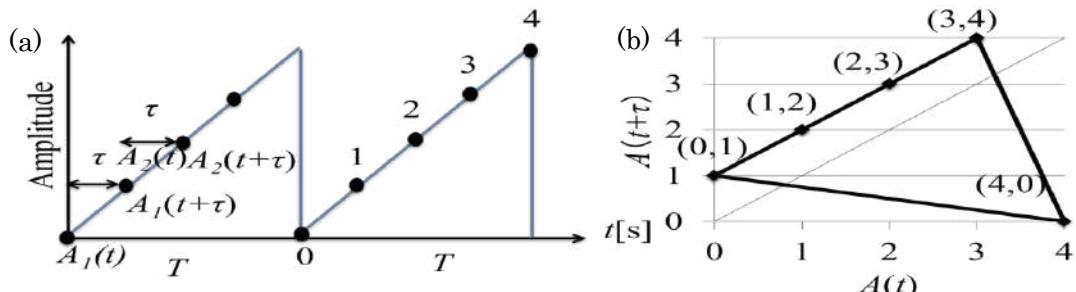


Fig. 1 Scheme of the analysis of degree of symmetry breaking of time-translation, as exemplified on the case of sawtooth wave pattern: (a) Time profile, (b) Time delay map.

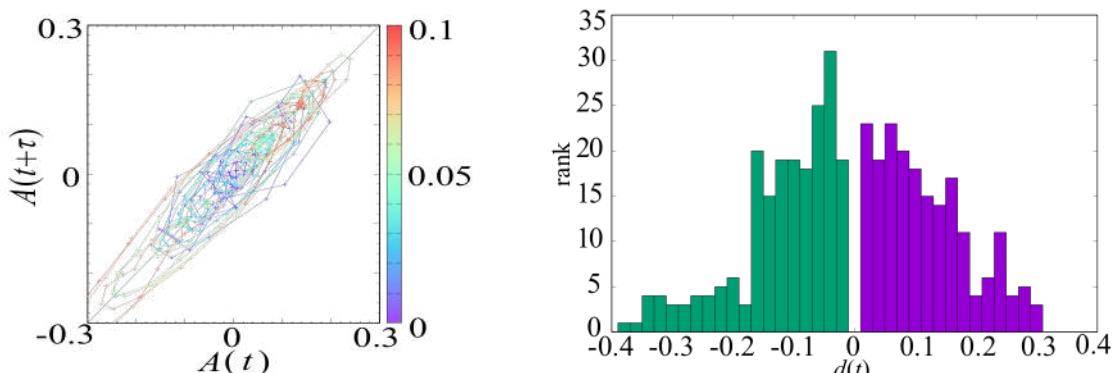


Fig. 2 Examples of Time-delay map of a sound with woodbase: $\tau = 1.1\text{ms}$

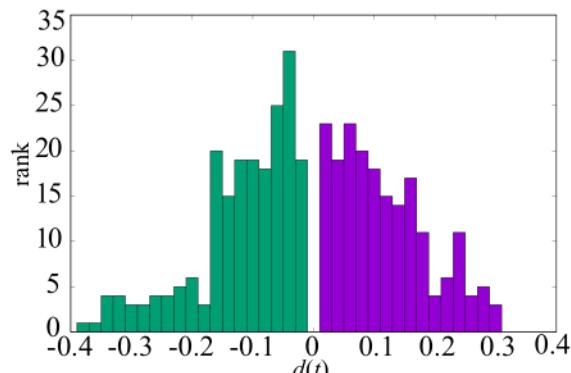


Fig. 3 Time-reversal symmetry-breaking as depicted by histogram. .

【参考文献】北原和夫, 吉川研一, 非平衡系の科学 I 反応・拡散・対流の現象論, (1994), pp. 28-58, 株式会社講談社サイエンティフィク

無接点直流型マイクロモーター構築の試み —電極配置による運動制御—

岡田和也, 貞包浩一朗, 劍持貴弘, 吉川研一
(同志社大学 生命医科学研究科 生命物理科学研究室)
E-mail address: ctub0020@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】我々のグループはこれまでに、定常直流電場下でシリコンオイル中のミクロ水滴が針状電極間を往復運動したり、プラスチック粒子が針状電極間で2巻の安定な公転運動をしたりすることを報告してきた。^[1,2,3]

【実験】Fig. 1 に示す実験系にて、アニオン性界面活性剤を含有させたシリコンオイルに定常直流電圧を印加し、油相中の polyethylene 粒子(PE 粒子)の動きを追った。Fig. 2 に示す電極(c)を(c')まで動かした場合と電極(a)の on, off を切り替えた場合で実験を行った。

【結果と考察】電圧を印加すると、PE 粒子は 3 本の電極間で公転運動をした。電極を動かす実験では、PE 粒子が中心を移動させながら公転し続けた。(Fig. 3(a)) また、電極の on, off を切り替える実験では公転運動する PE 粒子の周期に変化生じた。Fig. 3(b)には切り替え前後での 3.3s 間の連続写真を示した。

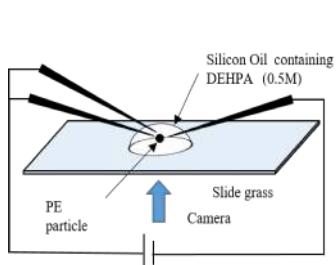


Fig. 1 Experimental setup

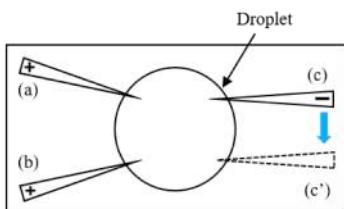


Fig. 2 Arrangement of electrodes

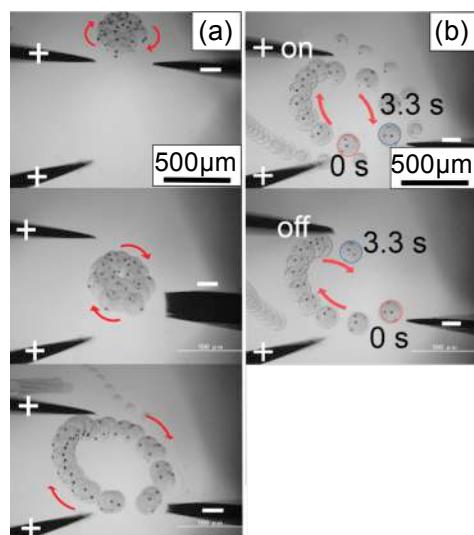


Fig. 3 Rotational motion under 150V steady DC electric voltage :
(a) time successive snapshot interval 0.33 s, (b) time successive snapshot interval 0.33 s

【参考文献】[1] M. Hase, et al., Phys. Rev. E, 74, 046301 (2006). [2] M. Takinoue, et al., Appl. Phys. Lett., 96, 104105(2010). [3] T. Kurimura, et al., Phys. Rev. E, 88, 042918 (2013).

ポリアミンによるゲノム DNA の高次構造転移：温度依存性

西尾天志, 吉川祐子, 貞包浩一朗, 劍持貴弘, 吉川研一
同志社大学大学院生命医科学研究科生命物理科学研究室

E-mail address: i.am.angel7329@gmail.com

【緒言】高温環境で生存する好熱菌の持つポリアミンはわれわれのような室温環境で生存する生物の持つ直鎖型ポリアミンと異なり分岐型の構造であることが明らかとなっている。本研究は直鎖・分岐鎖のポリアミンにより、通常の細胞が生育困難である、50°C以上の温度条件下、DNA の高次構造にたいしてどのように作用するのかを調べた。

【実験】本実験では直鎖型の SPD と分岐型の 3(3)(3)4 を用いて DNA を凝縮させ蛍光顕微鏡による DNA 一分子観察を 24°Cから 60°Cまで温度を変化させ行った。

【結果と考察】図 1 に SPD により凝縮した DNA, 図 2 に 3(3)(3)4 により凝縮した DNA の 24°Cから 60°Cの蛍光顕微鏡像をそれぞれ示した。50°Cの時の図 1, 2 を見ると、SPD により凝縮した DNA は脱凝縮していることがわかるが、3(3)(3)4 により凝縮した DNA は凝縮状態のままである。また図 2 の 60°Cの時を見てみると、凝縮したDNAが脱凝縮しているが、SPDの時と違い部分的に脱凝縮している。これらのことより直鎖型、分岐型のポリアミンでは温度上昇に伴う脱凝縮の過程が異なり、そのため脱凝縮の始まる温度に差があると考えられる。

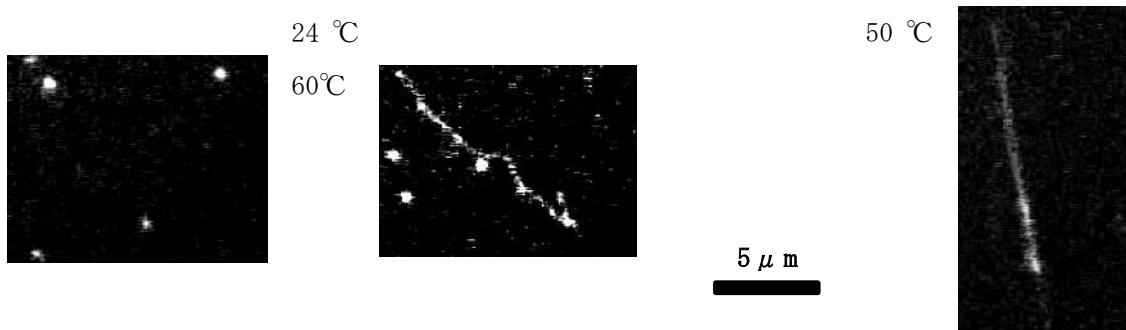


図 1 0.6mM SPD により凝縮した 0.1 μ M T4 DNA の各温度での蛍光顕微鏡像

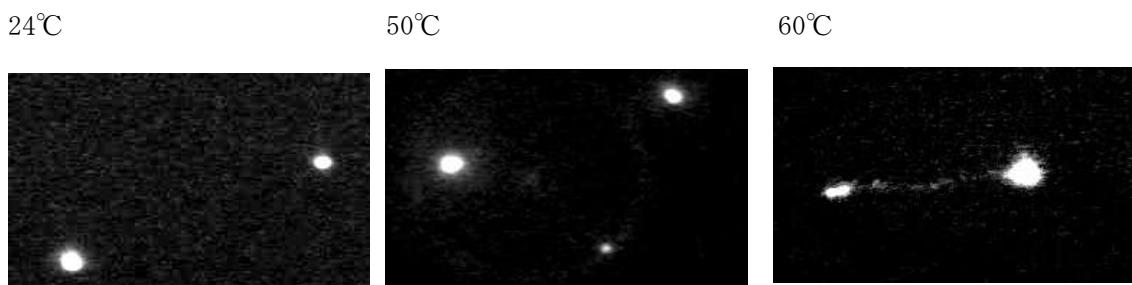


図 2 5 μ M 3(3)(3)4 により凝縮した 0.5 μ M T4 DNA の各温度での蛍光顕微鏡像

細胞に優しい細胞間配列手法 -Albumin 溶液中でのレーザーによる遠隔操作-

山崎健広, 辻翔都, 貞包浩一郎, 剣持貴弘, 吉川研一

同志社大学生命医科学研究科 生命物理科学研究室

E-mail address: t.yamazaki13lifephysy@gmail.com

【緒言】iPS や ES 細胞を用いる再生医療分野の発展にとって、任意の培養細胞を操作し組織化するような技術の創出は重要な課題となっている。我々の研究グループでは、従来の足場を用いた手法に代わり高分子混雑環境下で光ピンセットを用い細胞集団の安定的形成を生体本来の環境下で実現したので報告する。

【実験】細胞を 200 倍で希釈した Albumin と細胞の混合溶液を 200 μl 作成し、Albumin の濃度を 0 ~ 150 mg/ml とした。光ピンセット装置 Fig.1 を用い細胞を相対的に搬送し細胞の配列実験を行った。

【結果と考察】細胞の配列実験を生理食塩水環境下、高分子混雑環境下それぞれで行った実験結果を Fig.2 に示す。生理食塩水環境下では細胞のブラウン運動によって細胞同士が解離してしまったが高分子混雑環境下では安定的な配列状態を維持することを明らかにした。高分子混雑環境下では細胞同士が接触することで細胞の持つ排除体積が減少し高分子の並進エントロピーが増大することで系全体のエントロピーは増大に向い細胞の安定的な配列を維持できたと考える。

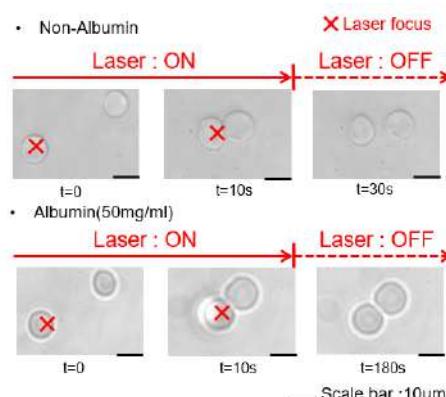


Fig.1 Cell-manipulation by laser tweezers.

【参考文献】

- [1] S.Hashimoto, et al., Chem.Phys.Lett.(2016).
- [2] S.Asakura,et.al., J.Polym.Sci.(1958).

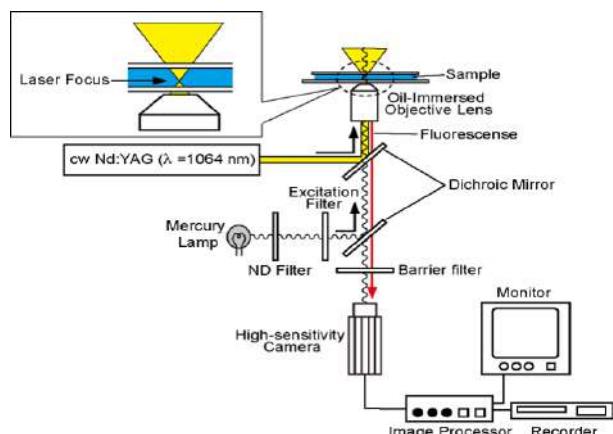


Fig.2 Experimental example on the formation of cell-cell contact by laser.

水 / 水系ミクロ相分離現象を活用した細胞集団の自己組織化

山名 悠補 貞包 浩一朗 劍持貴弘 吉川研一

同志社大学生命医科学研究科・生命物理科学研究室

ctub0029@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】二種類の水溶性高分子を混合する事で発生するミクロ液滴を使用し、細胞を入れた際どのような配置を取りか研究した。また、レーザーによる細胞の再配置の可能性を見出したので報告する。

【実験】実験装置を Fig.1 に示す。二相状態の水溶液の上部と下部のみを顕微鏡下で観察し、細胞配置に相違があるか観察した。Fig.2 に上部、Fig.3 に下部の観察図を示す。また、液滴内に存在する細胞にレーザーを当てることで細胞操作可能か観察した。Fig.4 に観察図を示す。

【結果と考察】上部の PEG-rich 相では液滴界面に細胞が存在し、下部の dextran-rich 相では液滴外部に細胞が存在することが明らかになった。このことから細胞は dextran-rich な場所に選択的に配置され、高分子の構造のちがいからこの現象が起こると考えた。液滴内に存在する細胞付近にレーザーを照射することで界面付近において細胞操作可能であることが分かった。レーザーの誘電ポテンシャルにより、界面張力が低下したことで細胞が再配置したと考えられる。

【参考文献】Kanta Tsumoto, Masafumi Arai, Naoki Nakatani, Shun N.Watanabe and Kenichi Yoshikawa. Does DNA Exert an Active Role in Generating Cell-Sized Spheres in an Aqueous Solution with a Crowding Binary Polymer? Life vol.5 (2015) pp. 459-466.

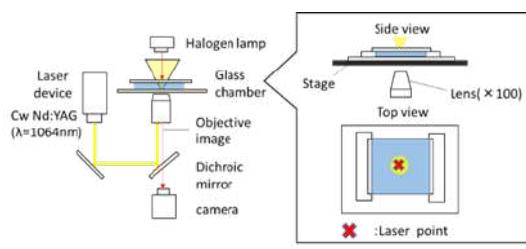


Fig.1 Laser experimental system

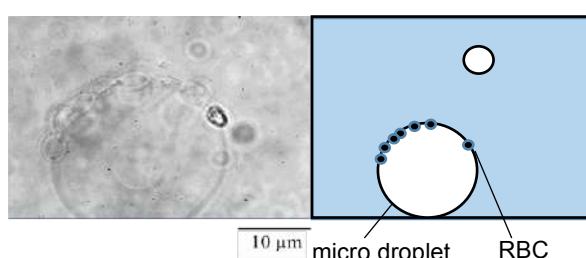


Fig.2 Photograph of PEG-rich phase

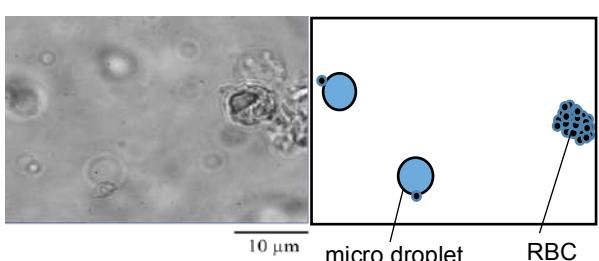


Fig.3 photograph of dextran-rich phase

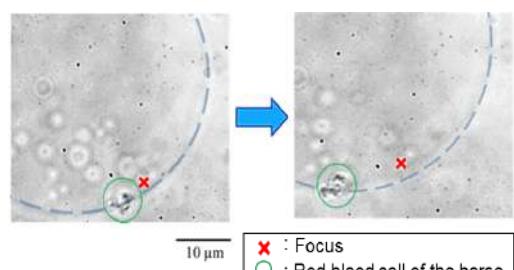


Fig.4 Lases induced rearrangement of cell

P 2 2

Smart response of self-motile droplet: Energy transduction from chemical to mechanical motion under isothermal condition

位置を感知する自発運動液滴：等温での化学→運動エネルギー変換系モデル

佐藤 志帆, 作田 浩輝, 吉川 研一

同志社大学大学院 生命医科学研究科 生命物理科学研究所

E-mail address: limmip6613@gmail.com

本研究では1. 等温, 2. 規則性を持つ, 3. 系が簡単であるという条件を満たすような生物のエネルギー変換機構を無生物によっての再現を目的とし, 今回は液滴の自発運動系について運動モード間の転移現象を中心に報告する. シャーレに酢酸水溶液を水相として1cm程度の深さで用意し, その上にニトロベンゼンを滴下するとニトロベンゼン液滴が自発運動を行い, Fig. 1a-d)に示したような運動モードが観察された. 同一の実験条件においても初期位置の違いによって往復直線運動(中心に滴下, Fig. 1b))または公転運動(端に滴下, Fig. 1a))が起こる(Fig. 1). 液滴の体積と水溶液中の酢酸濃度をパラメーターとしたものの運動モードをFig. 1e)に相図として示した. 結果として得られた運動モードのスイッチングのメカニズムを界面の張力不安定性と関連づけて論じる予定である.

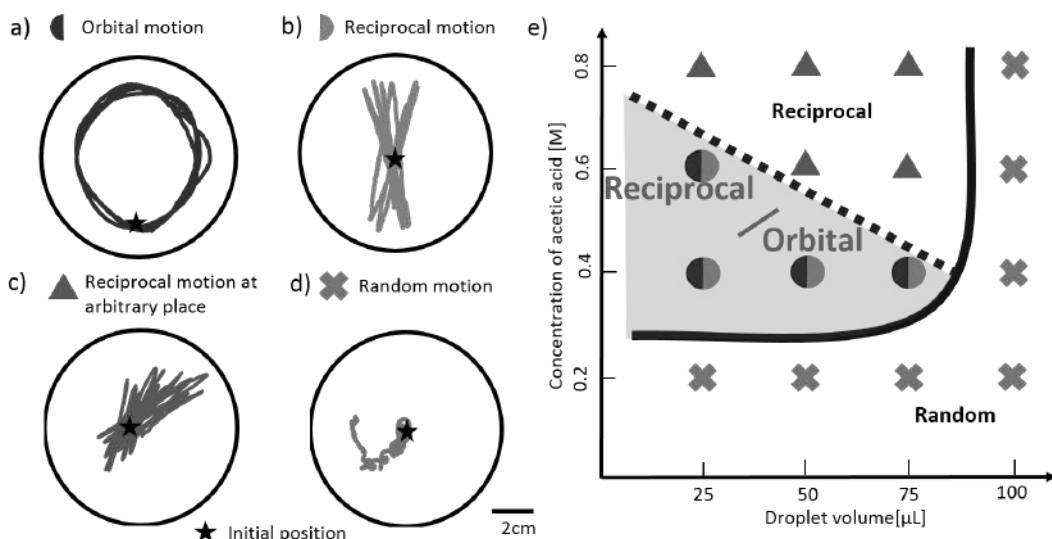


Fig.1 Mode bifurcation of the droplet motion in two dimensions . a) When the initial position is center. b) When initial position is edge. c) Regardless of where you place anywhere reciprocal random motion. d) An example of random motion. e) Distribution map.

Reference

- 1) Y. J. Chen, Y. Nagamine and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. E*, **80**, 016303 (2009)
- 2) H. Sakuta, N. Magome, et al , *Appl. Phys. Lett.* **108**, 203703 (2016)
- 3) Y. Sumino and K. Yoshikawa , *Eur. Phys. J. Special Topics* **223**, 1345–1352 (2014)
- 4) F. Takabatake, N. Magome, et al , *J. Chem. Phys* **134**, 114704 (2011)

レーザーによるDNA高次構造操作の試み

柏樹 祐輔, 吉川 祐子, 貞包 浩一朗, 劍持 貴弘, 吉川 研一

同志社大学生命医科学研究科・生命物理科学研究室

E-mail address: ctub1022@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】 本研究では、Figure1に示すようなDNAのコイルグロビュール相転移を利用して様々な多価カチオン性分子を用いて凝縮させたDNAの直接レーザートラップし、多価カチオン濃度を低下させた溶液環境へ非接触搬送を行った。そして、搬送前後のDNAの流体力学的半径を計算し、DNAの高次構造変化を定量的に評価することにより、高次構造の安定性についての研究を行ったので報告する。

【実験】 Figure2に実験の模式図を示す。T4DNA(166kbp)をSPD(spermidine)、MgCl₂、また、Figure3に示すテトラゾイド架橋白金(Ⅱ)錯体を用いて凝縮させたDNAを波長1.06μmのYAGレーザーを用いてレーザートラップし、高塩濃度環境下へ非接触搬送を行った。

【結果と考察】 流体力学的半径算出結果をTable Iに示す。SPDで凝縮させたDNAは搬送前後で流体力学的半径が明らかに大きくなっていることが確認できた。また、5-H-Yで凝縮させたDNAとMgCl₂で凝縮させたDNAの流体力学的半径はトラップ搬送前後で大きな変化がないという結果が得られた。5-H-Yは2価の金属イオンと同じく一定の凝縮状態を示し、高塩濃度条件でも脱凝縮を起こさないことが判明した。これらのことから、本実験手法は薬物によるDNA高次構造変化に対する安定性の評価に有効であることが示唆された。



Figure 1. Fluorescence images of (a) the coil state and (b) globule state of the T4 DNA observed by fluorescence microscopy. Scale bar is 5 μm.

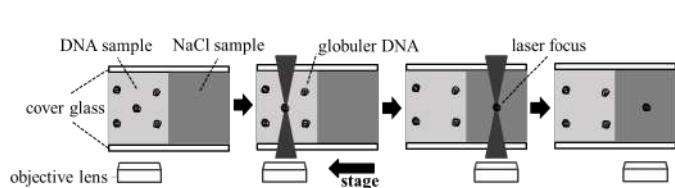


Figure 2. Schematic diagram of experiment

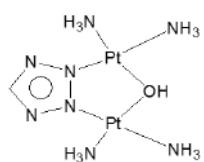


Figure 3. Chemical formula of tetrazolato-bridged dinuclear

Table I. Hydrodynamic radius of T4DNA

	Before transportation(μm)	After transportation(μm)
SPD	0.28±0.09	0.50±0.17
5-H-Y	0.84±0.28	0.82±0.27
MgCl ₂	0.76±0.25	0.80±0.27

蝋燭の燃焼によるリズム現象

笛木靖郎, 鷹取慧, 貞包浩一朗, 劍持貴弘, 吉川研一

同志社大学生命医科学研究科生命物理科学研究室

E-mail address:ctub1005@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】複数本の蝋燭を近づけて配置させると、炎の形状がすべて同じリズムで周期的に変化することが知られている[1]。一方、蝋燭を単体で設置させた場合には炎は定常に燃え続け、このような振動現象は生じないとされてきた[1]。これに対し我々は最近、単体の蝋燭であっても、周囲を容器(Fig.1 参照)で取り囲むことによって、炎の形状が周期的に変化する(Fig.2 参照)ことを明らかにした。この結果を踏まえ、本研究では、「蝋燭と容器」からなる振動子を二組近づけて配置させた時にどのような現象を示すのか検証した。

【実験】Fig.1 に示すように二つの蝋燭を容器に入れ、燃焼させ振動の様子を確認した。その後芯間距離 d を変えていくことにより、振動子間の結合モードの変化について実験した。

【結果と考察】Fig.3 は蝋燭の火の揺れを gray 値でとり、其々を軸にすることで得られた左右の火の揺れの相関である。蝋燭を容器に入れていない条件では、2 つの蝋燭を束ねたろうそく振動子であっても d が 5cm 以上ではそれぞれの振動が干渉しないことが確認された(Fig.3 右図)。一方蝋燭を容器に入れた場合には d が 5.5cm の条件まで逆相同期を示すことが分かった (Fig.3 左図)。

【参考文献】H. Kitahata, et al *J.Phys. Chem.A* **113**, 8164-8168(2009).

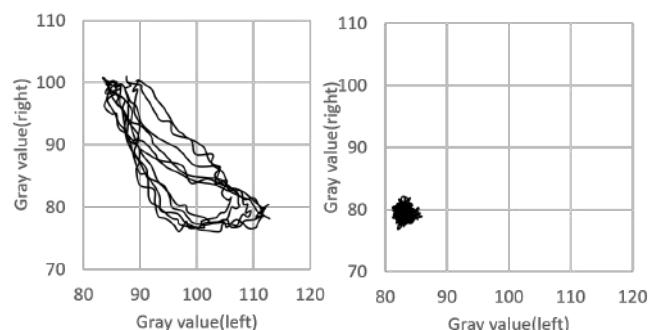
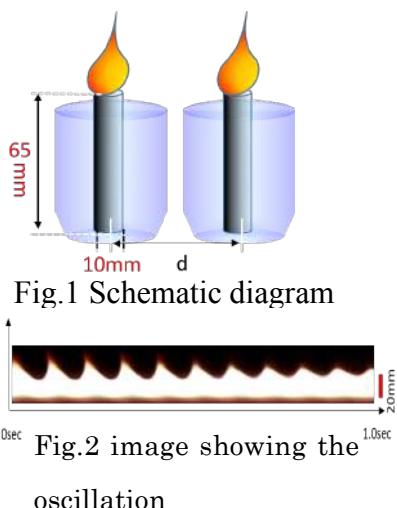


Fig.3 correlation maps
(left: in a vessel right: without vessel)

Nanocrystal self-assembly driven self-organization in nematic liquid crystal

Kaustabh Dan, Koichiro Sadakane, Takahiro Kenmotsu, Kenichi Yoshikawa
Doshisha University, Faculty of Life and Medical Sciences
E-mail address: kaustabhdan@gmail.com

We report one step, eco-friendly and green synthesis of noble metal nanocrystals such as Au and Ag using nematic liquid crystalline molecule MBBA (N-(4-methoxybenzylidene)-4-butylaniline) as template as well as reducing agent. A detailed time evolution study on the growth of nanocrystals were carried out through scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) which reveals simultaneous co-existence of both equilibrium faceted and non-equilibrium dendritic or tree like structures which is unique because of the involvement of two different kinetic processes in a single reaction environment. This complex growth protocol of the dendritic or tree like morphologies is believed to follow a diffusion limited aggregation mode where nanoparticles cluster formation occurs by sticking of particles together with random path to a selected seed in contact allowing the particles to form a growing structure. The surfactant provides significant control over the nucleation and directional aggregation which gives rise to a non-equilibrium system thereby favouring the formation of dendritic structure. Combined analysis from grazing incidence X-ray diffraction (GIXRD) and selected area electron diffraction (SAED) indicates that the nanocrystals are in *fcc* cubic phase and they are polycrystalline in nature. The optical properties of the nanocrystals were investigated through UV-Visible (UV-Vis) spectroscopy which exhibits shift of the characteristic plasmon resonance peaks of Au and Ag towards longer wavelength with increasing time and precursor concentration indicating increase in the particle size in the solution. During nanocrystal assembly, a distinct change in the optical texture from nematic to smectic is observed accompanied by considerable increase in the Nematic-Isotropic transition temperature and associated enthalpy indicating self-organization of the liquid crystalline phase. The molecular basis of the macroscopic self-organization of MBBA is investigated through fourier transform infrared (FTIR) and UV-Vis spectroscopy.