〔ノ ー ト〕

光応答性分子を導入した繊維状ウイルスが示す液晶性の評価

野原 崇稔^{*1}・澤田 敏樹^{*1}・芹澤 武^{*1}

(受付 2017 年 1 月 11 日・審査終了 2017 年 1 月 19 日)
(早期公開 2017 年 3 月 8 日・DOI:10.1295/koron.2017-0001)

1 緒 言

ウイルスは宿主細胞に感染して自己を無限に複製することができる分子集合体であり、自身のゲノム (DNA もしくは RNA) およびそれを取り囲むタンパク質や脂質で構成されている。また、ウイルスは一般に数十ナノメートルから1マイクロメートル程度のサイズをもち、その集合構造はゲノムにより一義的に規定されている¹⁾。一方で、一部のウイルスでは、それらのゲノムに外来遺伝子を人工的に挿入することにより、ウイルス表層のタンパク質 (キャプシド) に任意のペプチドやタンパク質を提示できることが知られている^{2),3)}。また最近では、キャプシドを構成するアミノ酸側鎖を介して、有機合成化学の手法により分子修飾できることも報告されており⁴⁾、遺伝子工学に依存しないウイルスの機能化が可能となっている。そのため、ウイルスそのものをプログラム可能な機能性分子集合体と見なし、ソフトマテリアルの構成要素として利用する研究が展開されつつある^{5)~7)}。

繊維状ウイルスの一種である M13 バクテリオファージ (以下、ファージと略称する) は、直径 6.6 nm、長さ 880 nm、分子量 1630 万の巨大で細長い構造をもつ^{1),2)}。その細長く、均一な構造に起因し、ファージは高濃度懸濁液においてリोटロピック液晶を形成することが知られている。その液晶構造はファージ濃度の上昇とともに変化し、低濃度側からネマチック液晶、コレステリック液晶、さらにスメクチック液晶となる⁸⁾。これまでに、ファージが形成する規則的な集合特性と、遺伝子工学ならびに有機合成化学的なファージの機能化を併せて利用することにより、高度に構造制御されたファージ系ソフトマテリアルが構築でき、さまざまな分野で応用できることが示されてきた^{9)~13)}。とくに、ファージが形成す

Figure 1. Schematic illustration of the modification of phages with azobenzene derivatives.

る液晶構造がソフトマテリアルの光学特性などに大きく影響することが見いだされている^{10),14),15)}。

このようなファージの集合特性を外部刺激によって自在に変化させることができれば、ソフトマテリアル素材としてのファージの応用範囲がさらに拡大されることが期待される。そこで本報では、光応答性分子をファージ表層に導入することで、ファージの集合特性を光照射により制御することを目的とした。光応答性分子として、光照射により異性化するアゾベンゼンに着目し、ファージ表層のアミノ基に対するアミド形成反応により 4-(フェニルアゾ)安息香酸を有機合成化学的に導入した (Figure 1)。ファージ表層に導入したアゾベンゼンの光異性化に加え、得られたファージの光照射前後における液晶構造を評価した。

2 実 験

2.1 試薬

M13 ファージならびに大腸菌 ER2738 株は New England Biolabs 社より購入した。4-(フェニルアゾ)安息香酸は東京化成工業 (株) より購入した。3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (シナピン酸), ACTH Fragment 18-39 MALDI-MS スタンダード (ACTH), Insulin MALDI-

^{*1} 東京工業大学物質理工学院応用化学系 (☎ 152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1-H121)

MS スタンダードは ProteoMass Kits for MALDI Calibration 付属の試薬を使用し、キットは Sigma-Aldrich 社より購入した。日新 EM ステイナーは日新 EM (株) より購入した。その他の試薬はとくに表記しない限りナカライテスク (株) より購入し、特級以上の試薬を使用した。いずれの試薬もさらなる精製をすることなく使用した。超純水は Milli-Q システム (Milli-Q Advantage A-10, Merck Millipore) により供給された。

2.2 ファージに対するアゾベンゼンの化学修飾

既報に従い、大腸菌に感染させることでファージを増殖した¹¹⁾。ファージへのアゾベンゼンの化学修飾は、Belcher らの報告を参考にプロトコルの一部を改変して実施した¹⁶⁾。すなわち、ジメチルスルホキシド中で、4-(フェニルアゾ)安息香酸 (6.6 mM)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC, 6.6 mM) および *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS, 6.6 mM) を混合し、25°C で 1 h マグネチックスターラーを用いてかくはんした。マグネシウム不含リン酸緩衝食塩水 (pH 7.4) に溶解させたファージ溶液 (0.021% (w/v)) 19 mL に上記の溶液 1 mL を滴下し、25°C で 2 h マグネチックスターラーを用いてかくはんした (ファージ表層のアミノ基に対して 5 当量の 4-(フェニルアゾ)安息香酸の仕込みに相当)。未反応の 4-(フェニルアゾ)安息香酸と他の試薬は透析 (分画分子量 12–14 kDa) により除去し、4°C で保存した。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF/MS) によりファージの外殻タンパク質 pVIII を同定することで、アゾベンゼンの導入を評価した。すなわち、ファージ溶液 (0.1% (w/v)) 26 μ L に 6 M グアニジン塩酸塩 4 μ L を添加し、30°C で 30 min 静置した。Ziptip (Merck Millipore) を用いてサンプルを脱塩し、マトリックス (1% (w/v) シナピン酸, 0.05% (v/v) TFA, 50% (v/v) アセトニトリル) と脱塩後のサンプルを交互にサンプルターゲットプレートに 1 μ L マウントして風乾する操作を 5 回繰返すことで測定サンプルを調製した。窒素レーザー ($\lambda=337$ nm) を備えた AXIMA-performance (島津製作所) を用いて、リニア・ポジティブイオンモードで測定した。一方で、紫外可視 (UV-vis) 分光光度計 (V-550 もしくは V-670, JASCO) により、269 nm (ファージ由来) および 326 nm (アゾベンゼン由来) の吸光度を測定し、ファージ表層のアミノ基に対するアゾベンゼンの導入率を算出した。

2.3 ファージの透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

超純水に溶解させた野生型ファージ (0.03% (w/v)) および、アゾベンゼン導入ファージ (0.005% (w/v)) の液滴 (15 μ L) にコロジオン支持膜を載せ、30 min 静置した。超純水の液滴 (15 μ L) にコロジオン支持膜を 10 sec 載せて洗浄し、日新 EM ステイナーの液滴 (15 μ L) にコロジオ

ン支持膜を 1 min 載せて染色した。調製したサンプルを一晩乾燥させ、TEM (H7560 Zero.A, 日立製作所) を用いて加速電圧 100 kV で観察した。

2.4 ファージに導入されたアゾベンゼンの光異性化

超純水に溶解させたアゾベンゼン導入ファージ溶液 (0.01% (w/v), 2% (w/v)) を光路長 10 mm もしくは 0.05 mm の石英セルに分取し、トランスイルミネーター LM26 (UVP) を用いて紫外光 (8 W) および可視光を交互に照射することで、ファージに導入したアゾベンゼンの光異性化を評価した。UV-vis 分光光度測定により、アゾベンゼンの極大吸収波長である 326 nm の吸光度から光異性化率を算出した。

2.5 ファージ溶液の偏光顕微鏡 (POM) 観察

超純水に溶解させた野生型ファージ (1, 2, 5% (w/v)) および、アゾベンゼン導入ファージ (1, 2, 5% (w/v)) 25 μ L をスライドガラス上に滴下し、ギャップカバーガラス (Gap size: 20 μ m, 松浪硝子工業 (株)) を静置した。溶媒の蒸発を防ぐため、スライドガラスとギャップカバーガラスの間隙をシリコングリース (東レダウ・コーニング (株)) により塞いだ。ECLIPSE LV100ND および DS-Fi2 (Nikon) を用いて一般的な手法で POM 観察し、POM 付属の光源 Intensilight C-HGFI (Nikon) を用い、顕微鏡付属のフィルターを通過させることで紫外光 (UV-2A, 355 nm) および可視光 (B-2A, 470 nm) を照射し、照射位置で経時的に観察した。

3 結果と考察

ファージに対するアゾベンゼンの導入を MALDI-TOF/MS 測定により評価した (Figure 2a)。野生型ファージおよびアゾベンゼン導入ファージのいずれにおいても $m/z=5227$ にピークが検出された。この値は野生型ファージの主要外殻タンパク質 pVIII の分子量 5241¹⁷⁾ とよく一致した。アゾベンゼン導入ファージでは $m/z=5436$ にもピークが検出され、二つのピークの m/z の差は 209 であった。この差はアミド結合を介して導入さ

Figure 2. (a) MALDI-TOF-MS of the azobenzene-modified and WT phages. (b) UV-vis spectrum of the modified phage prepared with or without coupling agents (EDC/NHS).

Figure 3. TEM images of (a) the azobenzene-modified and (b) WT phages.

れた4-(フェニルアゾ)安息香酸の分子量と一致した。このように、ファージの主要外殻タンパク質であるpVIIIにアゾベンゼンが導入されていることがわかった。ファージ (269 nm) およびアゾベンゼン (326 nm) の吸光度の比からpVIIIのアミノ基 (ファージ一分子あたり5400個のアミノ基が存在) に対するアゾベンゼンの導入率を算出した (Figure 2b)。その結果、ファージ一分子に対して1600個のアゾベンゼンが導入されており、その導入率は30%と算出された。一方で、カップリング剤 (EDC および NHS) を添加することなく4-(フェニルアゾ)安息香酸とファージを混合した場合には326 nmの吸収はほとんど見られなかった。このことから、アゾベンゼンは非特異的な物理吸着ではなく、共有結合によりファージに導入されていることが支持された。

アゾベンゼンの導入がファージの集合特性に与える影響をTEMにより評価した (Figure 3)。野生型ファージではファージがよく分散している様子が観察されたのに対し (Figure 3b)、アゾベンゼン導入ファージは、より低濃度でサンプルを調製したにも関わらず、バンドル化している様子が観察された (Figure 3a)。野生型ファージは表層タンパク質を構成する電荷アミノ酸の寄与より、ファージ全体として負に帯電していることが知られている^{16),18)}。よって、ファージ間の静電反発が有効に働くことでよく分散していると考えられる。一方で、アゾベンゼン導入ファージでは、ファージ表層のアミノ基の減少によるファージの疎水化に加え、アゾベンゼン間の疎水性相互作用によりバンドル化したと考えられる。つまり、ファージ表層へのアゾベンゼンの導入がファージの集合特性に影響を与えることが示唆された。

アゾベンゼン導入ファージに紫外光および可視光を照射することで、ファージに導入されたアゾベンゼンの光異性化について評価した (Figure 4)。紫外光の照射時間が5 min までは、照射時間に依存して326 nmの吸光度が減少し、ファージ上でもアゾベンゼンは光異性化することがわかった。326 nmの吸光度から光異性化率を算出した結果、ファージ濃度が0.01% (w/v) の場合には約50%であったのに対し (Figure 4a)、2% (w/v) の場合に

Figure 4. UV-vis spectra of the azobenzene-modified phage at (a) 0.01% (w/v) and (b) 2% (w/v) at different times of ultraviolet (UV) light irradiation. (c) Isomerization ratio of azobenzene groups on phages at a phage concentration of 0.01 and 2% (w/v).

は約15%であり (Figure 4b)、より高濃度のファージ溶液中では光異性化効率が低下することがわかった。2% (w/v) のファージ溶液は液晶性を示すことが知られている⁸⁾。よって、液晶化してよくパッキングしたファージ間に存在するアゾベンゼンの光異性化が立体障害により抑制されたものと考えられる。また、紫外光および可視光を繰返し照射した結果、ファージ濃度によらずアゾベンゼンの光異性化を可逆的にスイッチングできることがわかった (Figure 4c)。なお、紫外光を照射した後に暗室で12 h 静置してもアゾベンゼンはシス体のまま維持された。

紫外光照射前後におけるファージの液晶特性をPOM観察により評価した (Figure 5)。照射前において、ファージ濃度が1% (w/v) の場合はアゾベンゼン導入ファージ (Figure 5a) および野生型ファージ (Figure 5b) はいずれも視野全体が暗く、複屈折性を示さなかった。一方で、2% (w/v) 以上では複屈折性を示し、ファージが規則的に集合化して液晶性を示した。同濃度での液晶構造を比較すると、アゾベンゼン導入ファージがより緻密な層状ドメインを形成したことから、より秩序性の高い液晶構造を形成していることが示唆された。紫外光照射前のアゾベンゼンはトランス体であり、疎水的なアゾベンゼンの寄与により、野生型ファージとは異なる緻密なドメインをもつ液晶構造を形成したと考えられる。この

Figure 5. POM images of (a) the azobenzene-modified phage and (b) WT phage solutions at 1, 2, and 5% (w/v). The scale bar represents 100 μm .

ことは、アゾベンゼン導入ファージがバンドルを形成しやすいことを示したTEM観察の結果 (Figure 3) とも矛盾しなかった。

アゾベンゼン導入ファージに対して紫外光を1h照射した結果、ファージが形成する液晶構造が変化した。とくに2% (w/v) の場合、わずかな変化ではあるが、ドメインサイズが有意に大きくなった。アゾベンゼンは光異性化により極性が変化し、トランス体比べてシス体により親水的であることが知られている¹⁹⁾。紫外光の照射により、ファージに導入したアゾベンゼンがより親水的なシス体へと光異性化し、ファージ粒子間の相互作用が変化することでより大きなドメインをもつ液晶構造へと再配向したものと考えられる。ただし、上述したように、2% (w/v) の場合、異性化効率が低いため、十分な効果が観察できなかった。なお、紫外光を1h以上照射しても、液晶構造にそれ以上の変化はなかった。実際に、アゾベンゼン導入ファージの濃度が5% (w/v) の場合には、2% (w/v) の場合と比較して紫外光の照射による液晶構造の変化はほとんど観察されなかった。高濃度のファージ溶液中ではアゾベンゼンの異性化効率がさらに低下するためと考えられる。

紫外光を照射したアゾベンゼン導入ファージに可視光を照射しても液晶構造の変化は見られず、残念ながら液晶構造を可逆的にスイッチングすることはできなかった。紫外光の照射により得られた液晶構造が安定であることが影響していると考えられ、今後の改善が必要である。

4 結 論

ファージの主要外殻タンパク質pVIIIに対してアミド形成反応にもとづきアゾベンゼンを導入することができ、その導入率は30%と算出された。TEM観察の結果、アゾベンゼンの導入によりファージ粒子がバンドル化しやすいことがわかった。アゾベンゼン導入ファージに紫外光および可視光を交互に照射した結果、ファージ上においてもアゾベンゼンの光異性化を可逆的にスイッチングできることがわかった。アゾベンゼン導入ファージの液晶特性をPOM観察により評価した結果、紫外光の照射によりファージの液晶構造が変化することがわかった。以上より、光応答性分子をファージに導入することで、ファージの液晶構造を光刺激により制御できる可能性が明らかとなった。今後、本知見を発展させることにより、ファージを構成成分とする魅力的なスマートソフトマテリアルが創製できるものと期待される。

謝 辞 本研究を行うにあたり、TEM観察をご支援頂きました東京工業大学技術部大岡山分析部門のみなさまに深く感謝致します。

文 献

- 1) Z. Liu, J. Qiao, Z. Niu, and Q. Wang, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 6178 (2012).
- 2) G. P. Smith and V. A. Petrenko, *Chem. Rev.*, **97**, 391 (1997).
- 3) J. W. Kehoe and B. K. Kay, *Chem. Rev.*, **105**, 4056 (2005).
- 4) J. A. Kritzer, S. Hamamichi, J. M. McCaffery, S. Santagata, T. A. Naumann, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, and S. Lindquist, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 655 (2009).
- 5) S. Yang, W.-J. Chung, S. McFarland, and S.-W. Lee, *Chem. Rec.*, **13**, 43 (2013).
- 6) R. Farr, D. S. Choi, and S.-W. Lee, *Acta Biomater.*, **10**, 1741 (2014).
- 7) M. Karimi, H. Mirshekari, S. M. Moosavi Basri, S. Bahrami, M. Moghooei, and M. R. Hamblin, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **106**, 45 (2016).
- 8) Z. Dogic and S. Fraden, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **11**, 47 (2006).
- 9) K. Nam, D.-W. Kim, P. Yoo, C.-Y. Chiang, N. Meethong, P. Hammond, Y.-M. Chiang, and A. M. Belcher, *Science*, **312**, 885 (2006).
- 10) X. Dang, H. Yi, M.-H. Ham, J. Qi, D. Yun, R. Ladewski, M. Strano, P. Hammond, and A. M. Belcher, *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 377 (2011).
- 11) T. Sawada, S. Kang, J. Watanabe, H. Mihara, and T. Serizawa, *ACS Macro Lett.*, **3**, 341 (2014).
- 12) T. Sawada, H. Chen, N. Shirakawa, S. Kang, J. Watanabe, and T. Serizawa, *Polym. J.*, **46**, 511 (2014).
- 13) T. Sawada, M. Yanagimachi, and T. Serizawa, *Mater. Chem. Front.*, **1**, 146 (2017).
- 14) W.-J. Chung, J.-W. Oh, K. Kwak, B. Y. Lee, J. Meyer, E. Wang, A. Hexemer, and S.-W. Lee, *Nature*, **478**, 364 (2011).

- 15) B. Y. Lee, J. Zhang, C. Zueger, W.-J. Chung, S. Y. Yoo, E. Wang, J. Meyer, R. Ramesh, and S.-W. Lee, *Nat. Nanotechnol.*, **7**, 351 (2012).
- 16) Y. S. Nam, T. Shin, H. Park, A. P. Magyar, K. Choi, G. Fantner, K. A. Nelson, and A. M. Belcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1462 (2010).
- 17) J. Rong, L. A. Lee, K. Li, B. Harp, C. M. Mello, Z. Niu, and Q. Wang, *Chem. Commun.*, 5185 (2008).
- 18) G. Souza, D. Christianson, F. Staquicini, M. Ozawa, E. Snyder, R. Sidman, J. Miller, W. Arap, and R. Pasqualini, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 1215 (2006).
- 19) W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, and B. L. Feringa, *Chem. Rev.*, **113**, 6114 (2013).

[Notes]

Characterization of Liquid Crystalline Properties of Filamentous Viruses Conjugated with Photo-Responsive Molecules

Takatoshi NOHARA^{*1}, Toshiki SAWADA^{*1}, and Takeshi SERIZAWA^{*1}

^{*1}*Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology (2-12-1-H121 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan)*

One of the filamentous viruses, M13 bacteriophage (phage), has attracted growing interest as a functional biopolymer assembly due to its liquid crystalline properties and designable functionalities based on genetic engineering and organic synthetic approaches. Recent studies revealed that phage could be utilized as superior building blocks for functional soft materials. By controlling the assembled states of phages by external stimuli, the potential applications of phage-based soft materials can be broadened. Herein, phages were chemically modified with azobenzene derivatives through an amidation reaction and the liquid crystalline properties of the azobenzene-modified phages were analyzed by polarized optical microscopy. It was revealed that 1600 molecules of the azobenzene derivatives were conjugated to a single phage. The liquid crystalline structure of the azobenzene-modified phage changed in response to ultraviolet light. Our findings will contribute to the construction of stimuli-responsive smart soft materials.

KEY WORDS Phage / Virus / Liquid Crystal / Photo-Response / Azobenzene /

(Received January 11, 2017; Accepted January 19, 2017; Advance Publication March 8, 2017)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **74**, 203—207 (2017)]

©2017, The Society of Polymer Science, Japan