

## 光機能性フラーレンを用いた細胞機能の光制御アプローチ

高野 勇太

カゴ型の分子形状を持つフラーレン $C_{60}$ は、そのユニークな形状とともに分子表面に剛直で大きく非局在化した $\pi$ 電子雲を持つため特徴的な電子的特性を示す(図1)<sup>1)</sup>。たとえば、電子受容性の電子軌道(最低非占有軌道:LUMO)は三重に縮退しており、6個の電子を安定して受容することができる。この優れた電子受容性を利用して有機太陽電池材料などの分子材料への応用に向けた研究が盛んになされている<sup>2)</sup>。

生物分野においてもフラーレンは新規材料としての研究が盛んにされている<sup>3)</sup>。一例として、光線力学療法への利用があげられる。フラーレン $C_{60}$ に光照射を行うと、フラーレン $C_{60}$ は一重項励起状態から内部項間交差を経て、ほぼ100%の量子収率で三重項励起状態へと移る(図2)。この際、酸素分子が近傍に存在するとエネルギー移動を起こして一重項酸素( $^1O_2$ )を生成する。 $^1O_2$ は活性酸素の中でも高い反応性を持ち、細胞死を誘導しやすいことが知られている。フラーレンを選択的にガン組織内に導入した後に $^1O_2$ を光照射によって発生させることで、殺ガン細胞効果のある光治療を実現できる可能性がある。

このようにフラーレンは、ユニークな分子形状と特異な電子的特性を持つため、新たなバイオ材料としての利用が期待できる。筆者らはこれまでに、フラーレンの「光

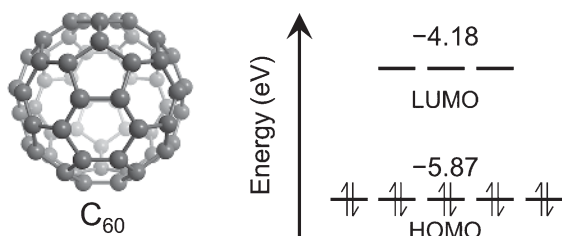


図1. フラーレン $C_{60}$ の構造とフロンティア軌道

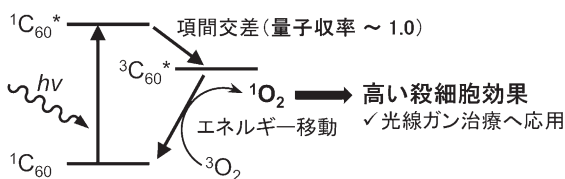


図2. フラーレン $C_{60}$ における光励起状態の遷移経路と酸素分子へのエネルギー移動

誘起電子移動反応」と呼ばれる現象を利用した細胞機能制御法の開発研究を行ってきた。以下に、当該研究とその関連分野における研究例を概観していく。

## 光誘起電子移動反応を細胞機能制御に利用する

電子供与性を有する分子(ドナー分子:D)と、フラーレンなどの電子受容性を有する分子(アクセプター分子:A)が空間的に近づいた状態で、光照射によってどちらか(あるいは両方)の分子を励起させることにより、DからAへの電子移動( $D^{+\bullet}$ ,  $A^{-\bullet}$ の生成)を引き起こすことが可能である(図3)。これが分子内における光誘起電子移動反応である。この反応により生成した $D^{+\bullet}$ ,  $A^{-\bullet}$ は電荷が分離した状態(電荷分離状態)にあるといえる。この電荷分離状態の寿命が十分に長ければ、 $D^{+\bullet}$ と $A^{-\bullet}$ は、後続の分子間反応を引き起こすことができる。一般的にナノ秒オーダー以上の寿命があれば分子間電子移動を伴う酸化・還元反応などの後続反応が誘起可能である。

たとえば、電子受容性分子であるキノンやフラーレンが一電子を受け取った状態( $A^{-\bullet}$ )で、かつ酸素分子が近傍に存在していると、電子は $A^{-\bullet}$ よりも電子受容性の高い酸素分子に移っていく。結果としてスーパーオキシド( $O_2^-$ )が生成する。 $O_2^-$ は活性酸素の一種であるが、 $^1O_2$ と比べると細胞毒性は弱く、細胞内ではシグナリングのトリガーとしても利用されている<sup>4)</sup>。つまり、 $A^{-\bullet}$ から酸素分子への分子間電子移動を利用して人為的に生成させた $O_2^-$ をシグナリングなどの細胞活動制御に利用することが可能である。

## 生物の光合成効率に匹敵する人工D-A分子

光誘起による電荷分離状態の発生と、その後続の電子

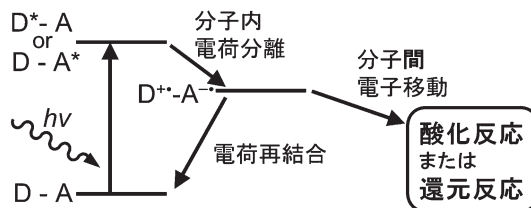
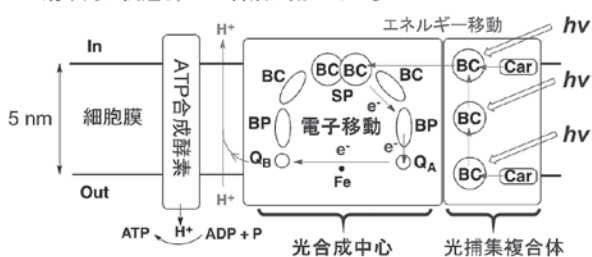


図3. D-A分子における光励起状態の遷移経路と後続する分子間反応

➤ 植物の光合成では電子移動反応を利用して光エネルギー( $h\nu$ )を効率的に伝達し、ATP合成に用いている。



➤ フラーレン-ポルフィリン-フェロセン連結型分子は、人工的な電子移動を効率的に起こせる。

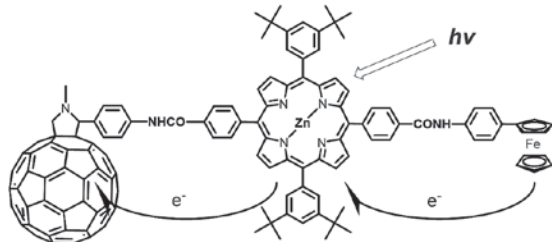


図4. (上段) 生物における光合成の模式図と、(下段) 今堀らが報告した高効率光誘起電子移動を実現する人工分子<sup>6)</sup>

移動反応は生物の光合成システムの根幹を担っていることが知られている。光合成においては、D-A分子群が精密に配列され、電子伝達経路が最適化されている。これにより、ほぼ100%の量子効率で吸収した光エネルギーを生体維持に必要なエネルギー変換(ATP生成)に利用している(図4上段)。

この植物の光合成を人為的に模倣して、光エネルギーを効率的に物質変換や再生エネルギー発生に利用することを指向した研究が多くなされてきている<sup>2,5)</sup>。ここでは光誘起の電荷分離状態をいかに高効率で後続反応に利用するかが鍵となる。光エネルギーのロスなく、後続反応を高い量子収率で実現するための要は、高効率かつ長寿命の光誘起電子移動反応の実現である。2001年に今堀らは、フルーレンが優れた電子受容性を有することに着目し、これに光捕集性に優れたポルフィリン骨格と電子供与性に優れたフェロセン部位を組み合わせることで、99%の量子収率で7.7マイクロ秒の長寿命の電荷分離状態の発生を初めて人工的に達成した(図4下段)<sup>6)</sup>。量子収率として植物システムに匹敵する系の実現に初めて成功した特筆すべき報告である。後述の筆者らの研究では、本分子の優れた電荷分離特性を礎にしている。

### フルーレンをベースとした分子の細胞工学的利用

$C_{60}$ 単体は光照射により $^1O_2$ を発生させる「光細胞毒性」を示す。これをガン組織内で用いることで、光線ガン治療薬向け化合物としての利用が可能である。

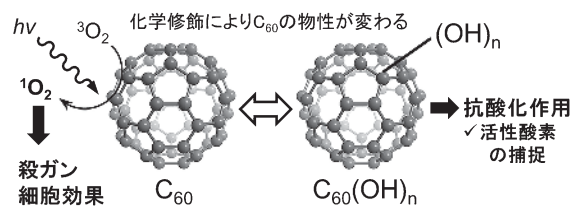


図5. フラーレン $C_{60}$ の生体関連分野への応用例

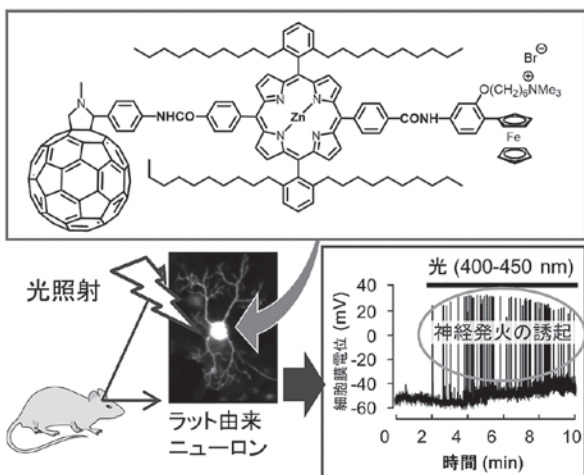
一方、フルーレンの表面を水溶性置換基によって多重に化学修飾した誘導体 $[C_{60}(OH)_n]$ では(図5)、 $^1O_2$ 発生能が抑えられるとともに活性酸素を捕捉して不活化するため、抗酸化作用を示すことが知られている<sup>7)</sup>。これは以下の二つの作用によって主に説明される。(i) 多重化学修飾の結果として光励起状態における三重励起状態への内部変換効率が下がる。これによって $^1O_2$ 発生が抑えられる。(ii) 多重化学修飾後にも保持される $\pi$ 共役電子系および多数導入された水酸基によって、反応活性の強い活性酸素が捕捉される。

このように、フルーレン表面の化学修飾によって分子特性のチューニングや改良が可能であることもフルーレンの特長である。

最近筆者らは、フルーレンを用いたD-A分子が高効率の光誘起電荷分離状態をとりうることに着目し、これを用いた細胞機能の光制御への応用展開を行った。電荷分離状態は分子内で正電荷と負電荷が局在した状態であるため、局所的な電場の誘起が可能であるとともに<sup>8)</sup>、光励起状態は基底状態と異なる分子極性を有する。筆者らはこれらの電荷分離状態特有の性質が細胞膜環境に影響を与え、細胞膜電位を変化させることを期待し、細胞膜電位の光制御に利用することを考えた(図6)。四級アンモニウム部位の導入によって親水性を付与したD-A分子を、神経モデル細胞として用いられるPC12細胞の細胞膜に導入した後に、パッチクランプ法によって細胞膜電位の変化を記録した。その結果、D-A分子の導入後に光照射を行った細胞では、光誘起電荷分離状態の発生によって細胞膜電位が変化し、細胞膜の脱分極が引き起こされることを見いだした<sup>9)</sup>。これは光誘起電荷分離という光物理学現象を細胞工学的に利用した稀有な例である。

本研究では、フルーレンとポルフィリンを鍵分子として用いたが、これらは分子単体では高い $^1O_2$ 発生能を示す。しかし、両者を接続したD-A分子においては、高い量子収率で発生する電荷分離状態への遷移のために、 $^1O_2$ を発生させるきっかけとなる三重項励起状態の寿命が著しく短くなるため、結果として $^1O_2$ 産生に由来する光細胞毒性が現れることがなかった。これはD-A分子の電荷分離状態を利用したことによる大きな利点である。

▶ 光誘起電荷分離する分子を利用して、細胞膜脱分極と神経発火の光誘起が可能。



▶ 親水性置換基の複数個導入により、細胞膜における光誘起電荷分離の量子収率は大きく向上する。

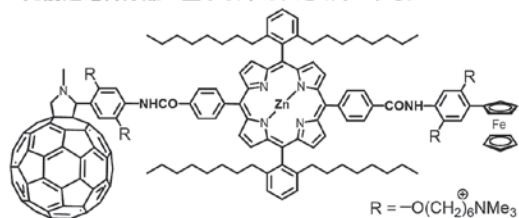


図6. 筆者らによるフラーレンをベースとしたD-A分子の特異な光励起状態を利用した細胞膜電位の光操作アプローチ

筆者らのD-A分子が光細胞毒性を引き起こすことなく細胞膜電位を光制御できることを利用して、ニューロンの膜電位制御も試みた。ラット由来の初代培養ニューロンに対してD-A分子を導入し、光照射を行いながら膜電位変化を観測した。その結果、D-A分子存在下においてのみ有意な膜電位の変化が、細胞膜の脱分極として観測された。神経細胞において1秒未満のパルスとして起こる大きな膜電位変化(=神経発火)が各種神経伝達にて重要な役割を担っていることが知られている。細胞膜の脱分極は神経発火の頻度を増加させることが知られており、本手法による脱分極誘起によっても神経発火頻度を増加させられることが明らかとなった(図6中段)。これにより本D-A分子を利用することで、各種シグナリングの根幹を担う種々の神経活動の光制御の可能性が示された<sup>10)</sup>。

ここまでの筆者らの研究において、D-A分子は細胞膜電位の光制御に有効であることが示されたが、筆者らが時間分解吸収スペクトル測定によって実験系中の光誘起電荷分離の量子効率を見積もると、その値は27%程度にとどまることが示された。これは光照射による細胞膜脱分極を引き起こすには十分な値であるものの、分子が蛍光をほとんど発しないことなどから考えて、大部分

の光エネルギーが有効に使われず、無輻射失活している可能性を示唆している。具体的な要因として、電荷分離状態における分子内および分子間での逆電子移動がD-A分子同士の会合によって加速される可能性が考えられた。そこで筆者らは、D-A分子の会合を抑制し、細胞膜内での分散性を向上させるために四級アンモニウム部位の導入個数の検討を行った<sup>11)</sup>。

D-A分子に対して四級アンモニウム部位を1~4個導入した分子を合成し(図6下段)、これらの分子の細胞膜における様子を高感度共焦点顕微鏡によって蛍光観察した。その結果、四級アンモニウム部位を4個導入した分子(TC4)において、顕著に細胞膜での分散性が向上したことが示された。さらにこの分子を細胞膜に導入した上で光照射を行ったところ、光照射に伴う大きな脱分極を観測した。

TC4分子は、細胞中や生体模倣系中の単分子において報告されている長寿命光誘起電荷分離の量子収率としてのチャンピオンレコード(86%)を記録することに成功した。今後この値を100%に近づけることで、高効率でありながら副反応や副作用を限界まで減らした光操作分子プローブの開発が可能になると期待される。

以上述べてきたように、フラーレンが有するユニークな電子的性質を効果的に利用することにより、細胞の光制御に新たな方法論を提示する分子プローブの開発が可能である。筆者らはこれまでにフラーレンを鍵分子として、その光励起をトリガーとする電荷分離状態の細胞内利用を行ってきた。電荷分離状態は後続の電子移動反応につなげることが可能であるため、今回紹介した細胞膜電位操作だけではなく、その他にも細胞内酸化・還元反応の光制御などが実現できると期待できる<sup>12,13)</sup>。これらの技術は、細胞機能の解明と制御のための新しい光操作法の開発にもつながるであろう。

## 文 献

- 1) 日本化学会: 化学の要点シリーズ7 フラーレンの化学, 共立出版(2016).
- 2) Lai, Y. Y. *et al.*: *Energy Environ. Sci.*, **7**, 1866 (2014).
- 3) Anilkumar, P. *et al.*: *Curr. Med. Chem.*, **18**, 2045 (2011).
- 4) Liu, M. *et al.*: *Circ. Res.*, **107**, 967 (2010).
- 5) Karkas, M. D. *et al.*: *Chem. Rev.*, **114**, 11863 (2014).
- 6) Imahori, H. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2607 (2001).
- 7) Markovic, Z. *et al.*: *Biomaterials*, **29**, 3561 (2008).
- 8) Gosztola, D. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2041 (1995).
- 9) Numata, T. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6092 (2012).
- 10) Takano, Y. *et al.*: *Chem. Sci.*, **7**, 3331 (2016).
- 11) Cai, N. *et al.*: *J. Phys. Chem. C*, **121**, 17457 (2017).
- 12) Takano, Y. *et al.*: *Nanoscale*, **9**, 17909 (2017).
- 13) Takano, Y. *et al.*: *Nanoscale*, **9**, 18690 (2017).