

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05563

研究課題名(和文) 光電荷分離分子による細胞小器官機能の光制御法開発

研究課題名(英文) Development of optical control method of cell organelle function by photoinduced charge separation molecule

研究代表者

高野 勇太 (Takano, Yuta)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：60580115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光による新たな細胞機能制御法および光治療法開発に向けた基盤技術として、分子の光誘起による電荷分離状態を利用した機能性分子開発を行った。主に両親媒性フェロセン-ポルフィリン-フラレン連結型分子やメシチル-アクリジニウム骨格を有する分子について、細胞内光機能性を検討した。

成果として、細胞膜流動性を高めた分子の開発により高い電荷分離効率によって細胞膜の光誘起脱分極を起こすことに成功した。また、薬物輸送キャリアの利用または分子構造の最適化により生細胞のミトコンドリア選択的な分子輸送に成功し、その上での光照射により細胞内で光酸化・還元反応を引き起こす手法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, novel functional molecules utilizing the photoinduced charge separation were developed for a fundamental technology to develop photocontrol methods of cellular activities. We investigated intracellular optical functionality mainly for amphipathic ferrocene-porphyrin-fullerene linked molecules and aryl-acridinium molecules.

As research outcomes, we succeeded in photoinduced depolarization of the cell membrane by high charge separation efficiency due to development of molecules with enhanced cell membrane fluidity.

In addition, we succeeded in mitochondria selective molecular transport in living cells by utilization of drug transport carriers or optimization of molecular structure. The molecules demonstrated successful method for triggering photooxidation/reduction reactions in cells by irradiation with light.

研究分野：有機化学、光物理化学、細胞工学

キーワード：光誘起電荷分離分子、フラレン、ポルフィリン、金属内包フラレン、スーパーオキシド、ミトコンドリア、光線療法、光酸化還元反応

1. 研究開始当初の背景

光による人為的な細胞活動の制御は、ミリ秒以下の時間精度、ミリメートル以下の空間分解能による生体機能制御を可能とする、このため、基礎研究から医療応用分野までの幅広い利用が期待できる細胞工学的・創薬化学的に有用な技術である。これを実用化につなげるため、近年、光感応性分子を用いた細胞膜機能制御法が多く研究されているが、既存のアプローチの多くが光照射による分子の構造変化を利用したものである(図1a)

その一方で申請者は最近、光誘起により電荷分離状態(図2)を効果的に生成する分子(光電荷分離分子)を細胞に導入し、細胞膜電位を人為的に変化させることに成功した(*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6092 報告)。これは光電荷分離状態の分子が生細胞に与える効果を評価した初めての例であり、従来までの光照射-分子構造変化による細胞機能制御アプローチとは一線を画す手法である(図1b)。

図1: 光($h\nu$)による細胞機能制御のためのアプローチ

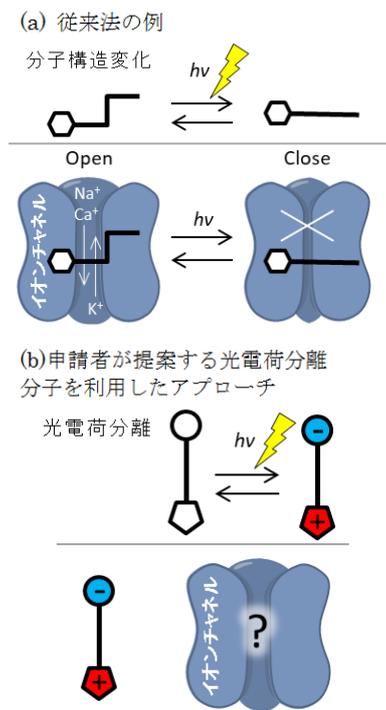
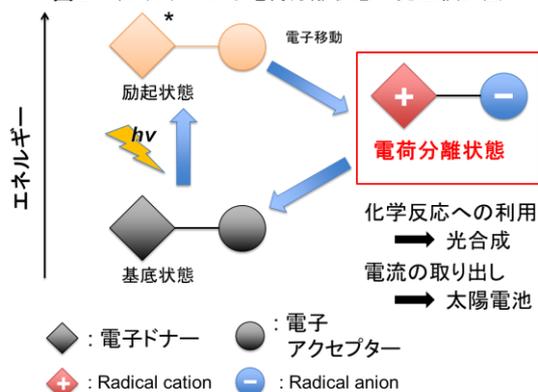


図2: 光($h\nu$)による電荷分離状態の発生模式図



しかしながら、申請者らを含めこれまでの報告では、水などの高極性溶媒中や細胞系中における光電荷分離状態の光利用率(量子収率)が高くなかった。これを改善したうえで、細胞内の部位選択的に分子を配置することにより、新たな光細胞制御手法の開発が可能になることが期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機能性分子の開発による光誘起電荷分離状態を高効率で利用した細胞小器官機能制御法の確立である。

光照射により電荷分離状態を効果的に生成する分子(光電荷分離分子)は、光スイッチング可能な大きな酸化還元能および双極子モーメントを発生させることができる。この分子特性は、任意の光照射をトリガーとして、細胞内環境と細胞活動に直接的な影響を与え得る。

これを実現するため本研究では、細胞内環境(細胞膜および細胞基質内)で高効率に働く光電荷分離分子を開発し、その分子が細胞小器官活動へ与える効果の評価と細胞挙動変化の解明を行うことで、光電荷分離分子の利用による新たな細胞機能制御法の確立へ向けた基盤技術創出を行った。

3. 研究の方法

光誘起電荷分離を利用した細胞小器官機能制御を実現するため、以下の研究を段階的に遂行した。

Step 1) 細胞小器官や細胞膜中での利用に適した光電荷分離分子の開発

Step 2) 光電荷分離分子が細胞小器官機能に与える効果の解明

Step 3) 光電荷分離分子の有効性実証による細胞小器官機能制御法の確立

4. 研究成果

Step 1) 細胞小器官や細胞膜中での利用に適した光電荷分離分子の開発

光誘起による酸化還元を起こす分子の各種設計と合成を行った。分子の骨格としては、モデル分子系・有機溶媒中において既に高い電荷分離量子収率(約100%)を示すことが報告されている(a)フェロセン-ポルフィリン-フラレン連結型分子、(b)9-メチルアクリジニウム分子を主に研究対象とした。それぞれについて、水溶液中での分子凝集による光誘起電荷分離効率の低下を防ぐ目的で、ドナー部位あるいはアクセプター部位にそれぞれかさ高いアルキル基を導入した分子を検討した。さらにフラレンの特異な電子的磁氣的性質を細胞内での酸化還元分子機能発現に応用展開するため(c)金属を内包したフラレンについても誘導体合成を検討した。

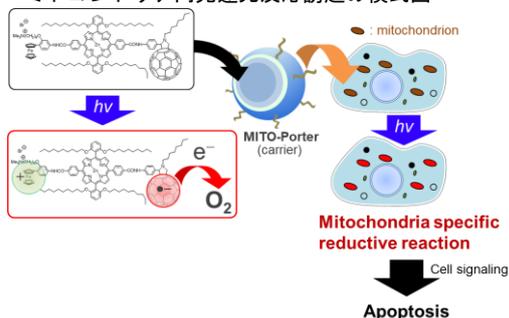
(a)では基礎的な物性解明と細胞内での分子性能評価を行った。かねてより物性解明を行っていた両親媒性フェロセン-ポルフィリ

ン-フラレン連結型分子について、神経細胞の細胞膜表面において光誘起電荷分離を引き起こすことを見出した。そしてこれを利用して神経発火の光制御を可能とした (Chemical Science 誌 2016 年掲載成果)。また一方、これまでトリガー光として青色光の利用しか確認していなかったが、分子改良により細胞膜流動性を高めることで、電荷分離効率を向上させることに成功し、これをもとに緑色光照射をトリガーとして細胞膜電位変化を引き起こすことを可能とした (J. Phys. Chem. C 誌 2017 年掲載成果)。

Step 2 と Step 3) 光電荷分離分子が細胞小器官機能に与える効果の解明、有効性実証による細胞小器官機能制御法の確立

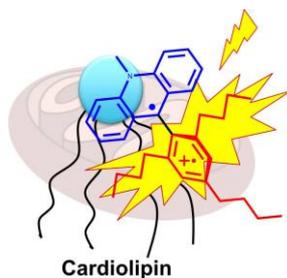
両親媒性フェロセン-ポルフィリン-フラレン連結型分子を薬物輸送キャリアに搭載することで、生細胞 (HeLa 細胞) のミトコンドリアへの選択的輸送を達成した。そのうえで光照射を行うことで、ミトコンドリア内選択的な還元反応を誘起することに成功した。この還元反応によりスーパーオキシドを部位特異的に発生させ、細胞シグナリングの結果によるアポトーシス誘導に成功した (図 3 : Nanoscale 誌 2017 年掲載成果)。

図 3: 分子のミトコンドリアへの選択的輸送と、ミトコンドリア内光還元反応誘起の模式図



一方、9-メシチルアクリジニウム分子系においては、分子脂溶性を適切にデザインすることで薬物輸送キャリア無しに分子単独でミトコンドリア指向性が得られることを見出した。分子をミトコンドリア内に送達させた後、光照射を行うことで分子の酸化能を利用したミトコンドリア内脂質の選択酸化反応誘起および、それに引き続くアポトーシス誘導に成功した (図 4 : Nanoscale 誌 2017 年掲載成果)。

図 4: 9-メシチルアクリジニウム分子系とミトコンドリア内脂質の親和性を利用した、ミトコンドリア内選択的脂質光酸化反応の模式図



これらの成果から、光誘起電荷分離分子を巧妙に細胞内にて利用することで、生体内の各種酸化還元反応を人為的に制御する有用なアプローチを与えることが明らかになった。つまり当初計画通り、本研究手法の有効性実証を成しえた。

本研究は総じて、当初計画通り研究を進めることができ、光誘起電荷分離現象を利用した新しい細胞操作および光治療法開発に向けた基盤づくりができた。将来的には、誘起光反応および細胞内部位の選択性向上と in vivo 系への展開を行うことで、革新的な光治療の実用化にむけた、社会に貢献し得る分子材料技術の開発につなげていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 高野 勇太, 査読無し招待記事 「光機能性フラレンを用いた細胞機能の光制御アプローチ」、生物工学会誌、日本生物工学会、95(12): 705-707 (2017 年)
- ② Y. Takano, E. Hanai and H. Imahori, 査読有 “Photoinduced electron transfer reaction in mitochondria for spatiotemporal selective photo-oxidation of lipids by donor/acceptor linked molecules” *Nanoscale*, 2017 年, 47 巻, 17909. DOI: 10.1039/C7NR04919F
- ③ Y. Takano, R. Munechika, V. P. Bui, H. Harashima, H. Imahori and Y. Yamada, 査読有 “Optical Control of Mitochondrial Reductive Reactions in Living Cells using an Electron Donor-Acceptor Linked Molecule” *Nanoscale*, 2017 年, 47 巻, 18690. DOI: 10.1039/C7NR06310E
- ④ #N. Cai, #Y. Takano, T. Numata, R. Inoue, Y. Mori, T. Murakami and H. Imahori, 査読有 “Strategy to Attain Remarkably High Photoinduced Charge-Separation Yield of Donor-Acceptor Linked Molecules in Biological Environment via Modulating Their Cationic Moieties” *J. Phys. Chem. C*, 2017 年, 121 巻, 17457-17465. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b04466 #共同第一著者
- ⑤ Y. Takano, R. Tashita, M. Suzuki, S. Nagase, H. Imahori and T. Akasaka, 査読有 “Molecular Location Sensing Approach by Anisotropic Magnetism of an Endohedral Metallofullerene” *J. Am. Chem. Soc.*, 2016 年, 138 巻, 8000-8006. DOI: 10.1021/jacs.6b04037
- ⑥ Y. Takano, T. Numata, K. Fujishima, K. Miyake, K. Nakao, W. D. Grove, R. Inoue, M. Kengaku, S. Sakaki, Y. Mori, T. Murakami, and H. Imahori, 査読有 “Optical Control of Neuronal Firing via Photoinduced Electron Transfer in Donor-Acceptor Conjugates” *Chem. Sci.*, 2016 年, 7 巻, 3331-3337. DOI:

10.1039/C5SC04135J

- ⑦ M. Suzuki, M. Yamada, Y. Maeda, S. Sato, Y. Takano, F. Uhlik, Z. Slanina, Y. F. Lian, X. Lu, S. Nagase, M. M. Olmstead, A. L. Balch and T. Akasaka, 査読有”The Unanticipated Dimerization of Ce@C_{2v}(9)-C₈₂ upon Co-crystallization with Ni(octaethylporphyrin) and Comparison with Monomeric M@C_{2v}(9)-C₈₂ (M = La, Sc, and Y)” *Chem. Eur. J.*, **2016年**, 22巻, 18115-18122. DOI: 10.1002/chem.201602595

[学会発表] (計 8 件)

- ① Y. Takano, R. Munechika, V. P. Biju, H. Harashima, H. Imahori and Y. Yamada: “Photoinduced reductive reaction in mitochondria by electron donor/acceptor linked molecules”, 日本化学会第98春季年会, 日本大学理工学部 船橋キャンパス (2018年)
- ② 高野 勇太, 宗近 玲那, Vasudevanpillai Biju, 原島 秀吉, 山田 勇磨, 今堀 博: 「 Fullerene-porphyrin-ferrocene linked molecule for optically-controlled intracellular electron transfer in mitochondria for targeted cancer cell death」、第53回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム、京都、京都大学 宇治キャンパス (2017年)
- ③ 高野 勇太, 宗近 玲那, 福田 豊, Vasudevanpillai Biju, 今堀 博, 原島 秀吉, 山田 勇磨: 「光誘起電荷分離分子からの電子移動反応を利用した癌細胞ミトコンドリア内での光還元反応手法の開発」、2017年光化学討論会、宮城、東北大学青葉山キャンパス (2017年)
- ④ 山田 勇磨, 高野 勇太, 宗近 玲那, 福田 豊, 今堀 博, 原島 秀吉: 「癌細胞ミトコンドリアを標的とした光殺細胞効果の検証」、第70回日本酸化ストレス学会学術集会、茨城、つくば国際会議場 (2017年)
- ⑤ 高野 勇太, 花井 衣里奈, Vasudevanpillai Biju, 今堀 博: 「光誘起電子移動反応を利用したミトコンドリア内脂質の選択的光酸化剤の開発」、第12回日本ケミカルバイオロジー学会年会、北海道大学、札幌 (2017年)
- ⑥ 前田 由佳利, 平田 恵理, 高野 勇太, 佐伯 歩, 柴田 健一郎, 湯田坂 雅子, 横山 敦郎: 「カーボンナノホーンへ担持させたミノサイクリンの静菌作用の増強」、第七回ナノカーボンバイオサテライトシンポ、京都府宇治市 (2017年)
- ⑦ Y. Takano: “Unique Properties of Paramagnetic Endohedral Metallofullerenes for the Future Molecular Tools”, 2nd International Symposium on NanoCarbons - Fullerenes, Endofullerenes, Carbon Nanotubes, Graphenes and Carbon Nanostructures, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, China, China (2017年)

- ⑧ Y. Takano: “Electron Transfer for Photocontrol of Cellular Activities”, The RIES International Seminar on 'Light, Molecules and Nanomaterials', Hokkaido Univ., Hokkaido, Japan (2017年)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

日本語版: <http://bijulab.main.jp/jp/>

英語版: <http://bijulab.main.jp/en/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 勇太 (TAKANO, Yuta)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号: 60580115

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

今堀 博 (IMAHORI, Hiroshi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号: 90243261

村上 達也 (MURAKAMI, Tatsuya)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号: 90410737

山田 勇磨 (YAMADA, Yuma)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号: 60451431

(4) 研究協力者

なし