

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810098

研究課題名(和文)膜タンパク質機能制御のための光誘起電荷分離分子開発

研究課題名(英文)Photoinduced charge separation molecules for control on membrane protein functions

研究代表者

高野 勇太 (Takano, Yuta)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：60580115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜電位は神経細胞等において各種細胞活動を制御する重要な要素である。そのため、膜電位の人為制御は医療分野への利用も期待できる細胞工学的アプローチである。本研究では、光により細胞膜電位を制御する新規手法の開発を行った。この目的のために、細胞環境において光誘起により高効率で電荷分離する分子の構造を模索し、凝集体構造をとりながらも41%の量子収率を示す分子開発に成功した。この分子と、各種比較対象分子をPC12細胞やラット由来ニューロンの細胞膜に導入し、光照射することにより有意に細胞膜の脱分極を引き起こせることと、その脱分極の度合いが電荷分離状態への量子収率に相関を有していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cell membrane potential plays a crucial role in cellular functions in various cells such as nerve cells. Therefore, artificial control on the membrane potential is promising technology for cellular engineering and medical applications. For the control, we have studied on organic molecules which can generate charge separated state by irradiation in cellular environment. As a fruit, we found a molecular system which display efficient charge separation (quantum yield = 41%). In a series of study revealed that the molecules can induce depolarization in membrane of PC12 and rat hippocampal neurons. In addition, the degrees parallel the charge separation efficiency.

研究分野：機能物質化学

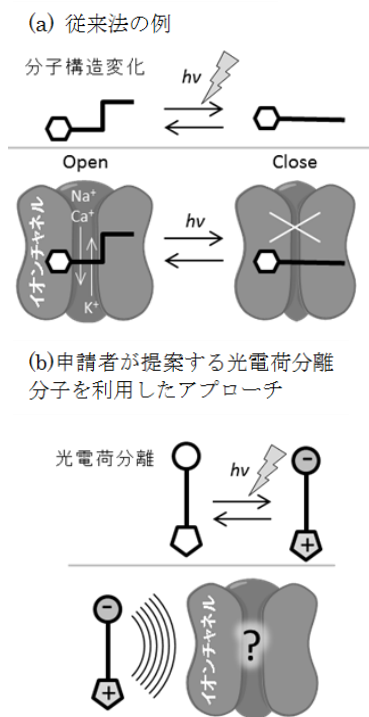
キーワード：光誘起電荷分離分子 脱分極 フラレーン 金属内包フラレーン ポルフィリン 光線療法 PC12細胞

1. 研究開始当初の背景

光 (特にレーザー光) 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ため、医療分野への利用が大いに期待できる新しい細胞工学技術である。また、細胞膜電位は、神経細胞などにおいてその活動制御の根幹をなすものであるため、細胞膜電位の人為制御は細胞工学的・創薬化学的に有用なアプローチである。これを実用化につなげるため、近年、光感应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ほとんど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)。

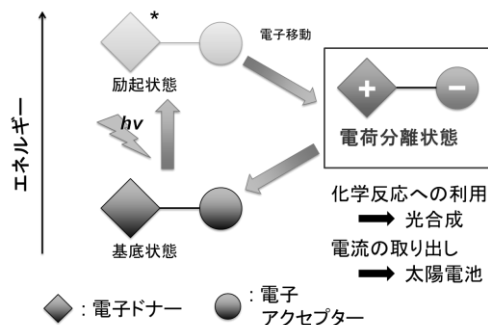
その一方で申請者は最近、光誘起により電荷分離状態 (図 2) を効果的に生成する分子 (光電荷分離分子) を細胞に導入し、細胞膜電位を人為的に変化させることに成功した (*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6092)。これは光電荷分離が生きた細胞に与える効果を評価した初めての例であり、従来の光照射-分子構造変化による細胞機能制御アプローチとは一線を画す手法である (図 1b)。

図 1: 光による細胞機能制御のためのアプローチ



しかしながら、申請者が報告した手法は、膜電位変化が $\Delta +15$ mV 程度と小さいこと、光に対する応答性が遅いこと (数秒~数分オーダー) などから、光による細胞活動制御手法としては大きく改善の余地があるとともに、その作用機構は不明な点が多いことが本研究開始当初の背景であった。

図 2: 光による電荷分離状態の発生模式図



2. 研究の目的

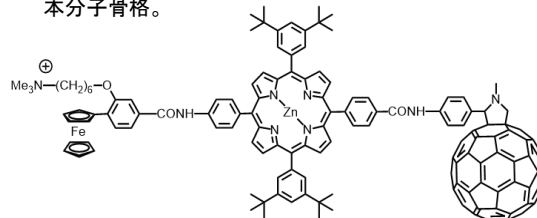
本研究の目的は、機能性分子の開発による光誘起電荷分離状態を利用した細胞膜制御法の確立である。光電荷分離分子により、細胞膜電位の任意調節や膜たんぱく質機能の制御が出来れば、各種イオンチャネル・電位依存性チャネルのイオン透過性に起因する細胞活動や機能を、人為的に制御できるようになる。

そこで本研究では、細胞内環境において高効率に光電荷分離状態を発生させる分子の開発により、高効率・高選択的に細胞膜環境の変調誘起を実現する分子を完成させ、その作用メカニズムを解明することで光による新規細胞機能制御法の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究目標達成のために、鍵分子としたのはフラレンおよびポルフィリンを基にした両親性電荷分離分子 (図 3) である。フラレンおよびポルフィリンは、特異な π 電子構造を有し、電子の授受特性と吸光特性が非常に優れているために光電荷分離分子の重要なパーツとして作用し得る。申請者はこれまでに、これら π 共役系分子の化学修飾による機能化法と光誘起電荷分離挙動について、種々の重要な知見を報告してきている (*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16103; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8048)。

図 3: 本研究で用いた両親性電荷分離分子の基本分子骨格。



この鍵分子を基に、光誘起電荷分離を利用した細胞機能制御を実現するため、以下のよう研究を段階的に遂行した。

(1) 細胞利用に適した光電荷分離分子の研究開発

細胞内環境において高効率 (= 高量子収率) に光電荷分離状態を実現するために、C₆₀ フラレン-ポルフィリン連結型分子をペー

スとして、導入する親水性置換基や側鎖について各種検討を行った上での細胞親和性分子の開発を行った。

(2) 光電荷分離分子が細胞に影響を及ぼすメカニズムの解明

開発した分子を神経モデル細胞 (PC12 細胞など) に導入し、照射を行うことで細胞膜の定常電位や活動電位に及ぼす影響を評価した。

(3) 光電荷分離分子を利用した細胞機能制御法の有効性の実証

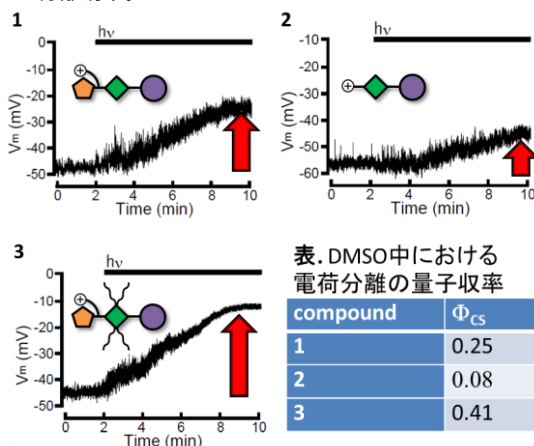
ここまでで得られた分子機能と作用メカニズムに関する知見をもとに、光電荷分離分子を用いた神経細胞活動や筋細胞活動の人為的制御実現を目指した。

本研究提案のように人工的な光電荷分離分子を細胞内で利用した先行研究報告例は無いため、以上の研究により分子開発と電荷分離状態・細胞内局在等の物性評価から、効率的な細胞制御の実証までを行った。

4. 研究成果

分子開発の結果、C₆₀ フラーレン-ポルフィリン連結型分子について、ポルフィリン周りの嵩高い置換基の効果が細胞内環境を模した高極性溶媒 (DMSO および DMSO/H₂O (1/99, v/v)) 中において高効率な光電荷分離状態を実現するための重要な要因であることを、一連の C₆₀ フラーレン-ポルフィリン連結型分子を詳細に比較検討することで明らかにした。さらに、その電荷分離状態を利用することで細胞膜電位の光制御が可能であることを見出した (図 4)。さらに、既存の分子系 (*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 6092.; 変化量+13 mV) よりも高効率の膜電位変化 (本研究; +36 mV) を達成した。また、化合物が有する電荷分離効率と膜電位変化の大きさに関連があることを見出した。作用メカニズム検証のために、電荷分離と直接関わりのない要因 (活性酸素発生による細胞膜ダメージ

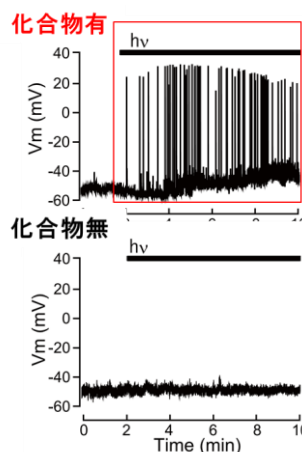
図 4: PC12 細胞における照射による細胞膜脱分極誘起。パッチクランプ法により照射 (400-450nm, 2.0 mW/cm) の有無における細胞膜電位測定結果と、各化合物の DMSO 中における電荷分離効率。



など) によって膜電位変化が引き起こされたのではないことを、照射による一重項酸素発生・スーパーオキシド発生・細胞死誘導アッセイから検証・確認した。

また、本研究により開発した光誘起による細胞膜脱分極誘導法をラット由来ニューロンにも適応可能であることを見出すとともに、光誘起膜電位制御に起因する神経発火の変調誘起に成功した (図 5)。このことから、本手法は神経発火に関連する種々の細胞機能制御に有効な新規手法となり得ることが示された。

図 5: ラット由来ニューロンにおける照射による細胞膜脱分極と神経発火誘起。パッチクランプ法により照射 (400-450nm, 2.0 mW/cm) の有無における細胞膜電位を測定。



さらに本研究における分子系の飛躍的な機能改良のため、電子受容性部位のフルーレンとして、内部金属効果により他に類を見ない電子的・磁気的物性を有する金属内包フルーレンの利用を検討した。そして、この実現の足掛かりとなる分子変換法開発に成功した。まず、[4+2]型環化付加反応による分子変換法の開発に成功し、これまで報告されてきた金属内包フルーレンの[4+2]型環化付加としては類まれな熱への安定性を有する分子の合成法を確立した。また、初めて金属内包フルーレンの炭素ケージ上に水素原子を導入することに成功した。この水素は更なる反応の基軸部位となり得るため、本成果からの知見を用いることで、細胞導入および電荷分離状態の利用に最適な分子変換を可能にすると期待される。

以上のように、本研究のより光誘起の電荷分離状態を細胞内環境において効果的に発生させることが可能となり、それを利用した一例として、光による細胞膜電位の脱分極誘起に成功した。今後は、本知見を利用することにより、細胞内における電荷分離状態を利用した反応の光誘起、新規生体プローブ開発などへの足掛かりになることが期待される。

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2件)

- ① Yuta Takano, Zdenek Slanina, Jaime Mateos, Takayoshi Tsuchiya, Hiroki Kurihara, Filip Uhlik, Maria A. Herranz, Nazario Martin, Shigeru Nagase and Takeshi Akasaka, "Unprecedented Chemical Reactivity of a Paramagnetic Endohedral Metallofullerene La@C₈₂ that Leads Hydrogen Addition in the 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction" *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 17537-17546. (査読有)
- ② Yuta Takano, Yuki Nagashima, Maria A. Herranz, Nazario Martin and Takeshi Akasaka, "Thermodynamically stable [4+2] cycloadducts of lanthanum-encapsulated endohedral metallofullerenes" *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 714-721. (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① Yuta Takano, Tomohiro Numata, Kazuto Fujishima, Tatsuya Murakami, Mineko Kengaku, Yasuo Mori and Hiroshi Imahori
Porphyrin-Fullerene Based Donor-Acceptor Conjugates for Photocontrol of Cell Membrane Potentials
227th the Electrochemical Society (ECS) meeting, 25-28th May. 2015, Chicago, U.S.A.
- ② Yuta Takano, Takeshi Akasaka,
Unprecedented Chemical Reactivities and Potential Utilities of Paramagnetic Endohedral Metallofullerenes
227th the Electrochemical Society (ECS) meeting, 25-28th May. 2015, Chicago, U.S.A.
- ③ 高野 勇太, 沼田 朋大、見学 美根子、村上 達也、森 泰生、今堀 博
ポルフィリン・フラーレンを鍵分子とした両親媒性ドナー・アクセプター連結型分子の開発による細胞膜電位の光制御
第95回日本化学会春季年会、2015年3月26-29日、日本大学船橋キャンパス
- ④ 高野 勇太、今堀 博
Development of Porphyrin-Fullerene Based Donor-Acceptor Conjugates for Utilizing Photoinduced Charge Separated State in Cell Environment
第二回ナノカーボンバイオシンポジウム、2015年2月20日、東京大学本郷キャンパス
- ⑤ 高野 勇太、沼田 朋大、三宅 和彰、村上 達也、森 泰生、今堀 博
フラーレン/ポルフィリン分子によるPC12細胞膜電位の光照射による脱分極誘起

第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸ポートアイランド

- ⑥ Yuta Takano, Tomohiro Numata, Tatsuya Murakami, Fumiaki Kawashima, Nobuhiro Morone, John E. Heuser, Yasuo Mori and Hiroshi Imahori
Photoregulation of Mammalian Cell Membrane Potential by Porphyrin/Fullerene based Donor/Acceptor Linked Molecules
The 15th International Symposium on Novel Aromatic Compounds (ISNA-15), 28th Jul.-2nd Aug., 2013, Taipei, Taiwan-ROC.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 勇太 (TAKANO, Yuta)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号： 60580115

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し