

博士論文（要約）

**Preparation of cell-membrane permeable polymeric electron  
transporters for regulating intracellular redox state**

（細胞内酸化還元状態を制御する細胞膜透過型電子輸送ポリマーの創製）

金子 真大

## 1. 緒言

細胞内における酸化還元状態は、生細胞のエネルギー代謝と密接に関係している。したがって、細胞内酸化還元状態の自在な制御法の確立は、環境・エネルギー・医療といった生細胞の関与する幅広い分野において重要である。細胞膜透過性の脂溶性電子輸送分子の利用は、細胞内酸化還元状態を制御するために研究されてきた。しかし、従来用いられてきた脂溶性分子は、水に対する溶解性が低く、また細胞毒性を有する[1]といった問題が明らかになっている。そこで、これらの問題を解決する新たな電子輸送分子の創製が求められていた。

本研究では、電子輸送分子の基体として、リン脂質分子の構造を模倣した 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマー に注目した。MPC ポリマーはその特徴である水和構造により、タンパク質の吸着や細胞の接着・活性化を誘引しないことが報告されている[2]。また、水溶性の両親媒性 MPC ポリマーは、単純拡散により細胞膜を透過することが確認されている[3]。Nishio らは、両親媒性 MPC ポリマーを応用することで、細胞

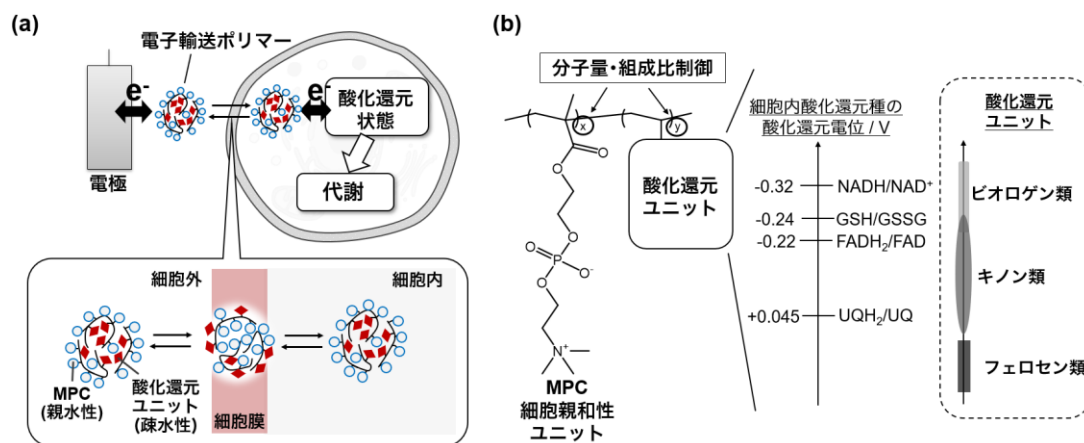


図 1. (a) 電子輸送ポリマーを用いた細胞内酸化還元状態制御の模式図、(b) 分子量・ユニット組成比の制御と酸化還元ユニットの選定による電子輸送ポリマーの分子設計。

胞親和性と細胞膜透過性を兼ね備えた電子輸送ポリマー[4]を創出した。この電子輸送ポリマーは、MPC ユニットと酸化還元ユニットから構成されるランダム共重合体である (図 1)。これまでに、フェロセンを酸化還元ユニットとする電子輸送ポリマー、poly[MPC-co-vinyl ferrocene (VFc)] (pMFC, 酸化還元電位  $E = +0.50$  V. SHE) [4]を利用することで、微生物からの電子排出と、代謝制御が実現されている[5]。これまで、電子輸送ポリマーの利用は微生物細胞からの電子排出に限られていたが、その応用範囲を広げるためには、より精密かつ柔軟に細胞内酸化還元状態を調整することが求められる。こうした課題認識の下、本研究では、電子輸送ポリマーの基本的な設計指針を得ることを目的に、酸化還元ユニットの置換による生細胞への電子注入と、pMFC の分子量・ユニット組成比をパラメータとした電子輸送速度の制御を実施した。さらに、本手法の適用対象となる細胞種を拡張するため、ヒト乳がん細胞をモデルとして、電子輸送ポリマーを哺乳類細胞に適用し、がん細胞の活性抑制を行なった。

## 2. 電子輸送速度に与える電子輸送ポリマーの構造の影響

任意の目的に応じて、電子輸送ポリマーによる代謝改変効果をコントロールするためには、電子輸送ポリマーを介した電子輸送速度の制御が必要とされる。そこで電子輸送ポリマー-pMFC をモデルとして利用し、ポリマーの分子量・ユニット含有比と電子輸送速度の検討を通して、電子輸送速度の制御手法を確立した。

MPC と VFc をモノマーとして 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) を開始剤とするフリーラジカル重合により、疎水性ユニット含有比 ( $R$ ) と  $M_w$  (分子量) の異なる 3 種類の pMFC を合成した。3 種類の pMFC の比較により、各パラメータが電子輸送速度に与える影響を調査した。大腸菌と酵母を 3 極系電気化学セル内の最小培地に添加し、作用極に +0.60 V の電位を印加することで、グルコース代謝由来の代謝電流値の比較を行った。その結果、両者において、 $R$  が電子輸送速度に対して大きな影響を及ぼすこと、また  $M_w$  が小さくなると電子輸送速度が大きくなることが確認された。次に、各 pMFC における電子輸送速度の大小に応じて、代謝改変の度合いが実際に変化するかを、酵母のグルコース嫌気解糖代謝 (エタノール発酵) をモデルケースとして検証した。酸化体の pMFC が存在する条件下で酵母を嫌気培養し、培地中のエタノール濃度を測定したところ、エタノール発酵の変化量と電子輸送速度は良い相関を示した。以上の結果は、pMFC の適切な分子設計により、電子輸送速度、ひいては酵母の代謝改変の度合いが制御可能であることを示している[6]。

## 3. 適切な酸化還元電位を有した酸化還元ユニットの選定による生細胞への電子注入の実現

微生物に対して電気化学的に還元力を供給し、その有用物質生産能を向上させる微生物電気合成は、余剰な電力を化学エネルギーへ固定化する効果的な方法であり、近年の再生可能エネルギーの急速な需要増加に伴い大きな注目を集めている。微生物電気合成の発展には、微生物に対して還元力を供給する手法の開発が極めて重要である。本研究では、新規電子輸送ポリマーの創製により、生細胞へ還元力を供給する手法の確立を試みた。

これまで用いられてきた電子輸送ポリマー-pMFC の酸化還元電位は、主要な細胞内酸化還元種よりも正であったため、生細胞への電子注入は不可能であった。ここでは、生細胞への電子注入の実現を目的として、ビオロゲン(Vi) を酸化還元ユニットとして利用した。AIBN を開始剤とするフリーラジカル重合により、より負な酸化還元電位を有する電子輸送ポリマー-poly[MPC-co-*n*-butyl methacrylate (BMA)-co-Vi] (pMBVi) ( $E = -0.28$  V) を新規合成した。-0.40 V の電位を作用極に印加した状態で、pMBVi (電子供与体) と硝酸カリウム (電位受容体) の両方を含む 3 極系電気化学セル内の最小培地に大腸菌を導入したところ、還元電流が観測された。この電流は、大腸菌、pMBVi、硝酸のどれか一つでも欠けた場合には観測されなかった。この結果は、pMBVi を介して大腸菌細胞内へ電極から電子が注入されたことを示している[7]。

## 4. 細胞内酸化還元状態の変調によるヒトがん細胞の増殖抑制を指向した電子輸送ポリマーの創製

両親媒性 MPC ポリマーは、種々の哺乳類細胞の細胞膜を透過することが示されている[3]。したがって、本研究で創製した電子輸送ポリマーは、哺乳類細胞に対しても適用可能であると考えられる。哺乳類細胞のモデルとして、ヒトがん細胞に注目した。近年、新規作用機序に基づく抗がん剤の創出が求められる中、細胞内レドックスバランスの変動に対する

がん細胞の脆弱性に着目した抗がん剤開発が注目されている。こうした背景を踏まえ、電子輸送ポリマーを介してがん細胞内の酸化還元状態に摂動を与えることで、がん細胞の増殖を抑制できるという作業仮説をたてた。そこで電子輸送ポリマーを介した細胞内レドックス状態の変調による、がん細胞の増殖抑制の実現可否を検討した。

pMFC の哺乳類細胞への細胞膜透過性を検討するため蛍光標識したポリマー (rho-pMFC) を、合成時に微量のローダミンモノマー(rho)を共重合することで得た。rho-pMFC を MDA-MB-231 (ヒト乳線がん) 細胞の培地に添加し共焦点顕微鏡により観察を行ったところ、細胞内からポリマー由来の蛍光が認められた。この結果は pMFC が MDA-MB-231 の細胞膜を透過することを示している。次いで、pMFC を介した電子排出が細胞生存率に及ぼす影響を検討するため、酸化体及び還元体の pMFC をそれぞれ MDA-MB-231 細胞を含む培地に添加した。その結果、還元体 pMFC を添加した系では細胞生存率の低下は見られなかった。一方で、電子を受け取ることが出来る酸化体 pMFC を添加した系では、細胞生存率が濃度依存的に低下した。次いで、酸化体あるいは還元体 pMFC 存在下で培養された細胞に対してアポトーシス解析を行った。その結果、酸化体 pMFC 共存下でのみ、細胞へのアポトーシスの誘導が認められた。以上の結果は、pMFC を介した細胞内からの電子排出により、MDA-MB-231 細胞にアポトーシスを誘導出来ること示している[8]。

次に、電子輸送ポリマーの酸化還元特性と細胞増殖抑制の関係を検討するため、キノン類を酸化還元ユニットとし、異なる酸化還元電位を有する poly(MPC-co-3-(3,5,6-trimethyl-1,4-benzoquinon-2-yl)-propyl methacrylate)] (pMQ,  $E = + 0.07$  V)、poly(MPC-co-BMA-co-vinyl anthraquinone) (pMBAQ,  $E = -0.29$  V) を、AIBN を開始材とするフリーラジカル重合により合成した。続いて、酸化体の電子輸送ポリマーpMFC、pMQ、pMBAQ を MDA-MB-231、NHDF (正常ヒト皮膚線維芽細胞)、MCF 10A (正常ヒト乳腺上皮細胞)の培地に対して添加し、細胞生存率への影響を検討した。その結果、pMFC、pMBAQ を添加した場合は、MDA-MB-231 細胞だけでなく、正常細胞の生存率も低下した。pMFC は細胞内酸化還元種との反応性の高さ、pMBAQ は酸素との反応性の高さに起因して、非選択的な増殖抑制が誘引されたことが推測される。一方、pMQ を添加した場合は、がん細胞株 MDA-MB-231 のみ、ポリマー濃度の上昇とともに細胞生存率が低下していく傾向が認められた。この結果から、pMQ ががん細胞の増殖を抑制するうえで適切な酸化還元特性を有していたことを示している。以上の結果は、電子輸送ポリマーの精密な分子設計により、がん細胞株の選択的増殖抑制が実現可能であることを示している[9]。

## 5. 結言

本研究では、細胞内酸化還元状態の制御を実現するうえで、重要となる電子輸送ポリマーの分子設計パラメータを提示した。まず、電子輸送ポリマーpMFC の分子量・ユニット組成比を調節することにより電子輸送速度の制御を行うことに成功した。次に、ビオロゲン類を酸化還元ユニットとして利用し、電子輸送ポリマーpMBVi を新規合成することで、生細胞への電子注入を実現した。酸化還元ユニットの種類・ユニット比と分子量は互いに独立したパラメータであるため、本研究で得られた知見を元に、種々の酸化還元電位・電子輸送速度を有する電子輸送ポリマーライブラリーの創出が可能となる。続いて、MDA-MB-231 細胞を用いて、電子輸送ポリマーの適用種が哺乳類細胞へと拡張可能である

こと実証し、電子輸送ポリマーががん細胞選択的な増殖抑制手法として有用であることを見い出した。本研究は、遺伝子操作によらず細胞内酸化還元状態、ひいては代謝を制御するマテリアル工学的手法として、エネルギー・環境・医療といった生細胞が関与する諸分野への貢献が期待される。

#### 【参考文献】

- [1] Sikkema *et al.*, *Microbiol. Rev.*, **1995**, 59, 201. [2] Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res.* **2019**, 105, 933. [3] Goda *et al.*, *Biomaterials*, **2010**, 31, 2380. [4] Nishio *et al.*, *ChemPhysChem*, **2013**, 14, 2159. [5] Nishio *et al.*, *Env. Soc. Technol. Lett.*, **2014**, 1, 40. [6] Kaneko *et al.*, *Bioelectrochemistry*, **2017**, 114, 8. [7] Kaneko *et al.*, *Electrochem. Commun.*, **2017**, 75, 17. [8] Kaneko *et al.*, *Biomacromolecules*, 2019, published on WEB (DOI:10.1021/acs.biomac.9b01184). [9] Kaneko *et al.*, in preparation.