

141.99, 142.08, 142.12, 142.15, 142.30, 142.33, 142.46, 142.53, 142.66, 142.69, 143.05, 143.15, 143.24, 144.35, 144.41, 144.62, 144.66, 144.83, 145.08, 145.12, 145.14, 145.16, 145.21, 145.23, 145.27, 145.52, 145.59, 145.60, 145.79, 145.80, 145.84, 146.10, 146.12, 146.15, 146.21, 146.32, 146.36, 146.92, 146.99, 147.25, 147.29, 147.35, 152.82, 154.50, 154.62, 155.79. MS (MALDI-MS):  $m/z$  = 1009.

**Compound 2c.**  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.81 (s, 3H), 3.05–3.10 (dt, 1H,  $J$  = 3.5, 11.4 Hz), 3.40–3.42 (d, 1H,  $J$  = 11.0 Hz), 4.10–4.14 (dt, 1H,  $J$  = 2.6, 11.4 Hz), 4.22–4.26 (t, 1H,  $J$  = 10.3 Hz), 4.24–4.26 (d, 1H,  $J$  = 10.5 Hz), 4.75–4.77 (dd, 1H,  $J$  = 3.2, 10.1 Hz), 4.81–4.83 (dd, 1H,  $J$  = 3.1, 10.5 Hz), 7.30–7.32 (dd, 1H,  $J$  = 2.3, 8.5 Hz), 7.41–7.43 (m, 1H), 7.42–7.43 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz), 7.44 (s, 1H), 7.48–7.50 (dd, 1H,  $J$  = 2.3, 8.5 Hz), 7.55–7.57 (m, 1H), 7.55–7.57 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz), 7.66–7.68 (dd, 1H,  $J$  = 2.3, 8.5 Hz), 8.19–8.21 (dd, 1H,  $J$  = 2.3, 8.5 Hz)  $^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.74, 47.86, 66.74, 67.48, 70.87, 71.82, 79.06, 82.13, 126.79, 127.59, 128.76, 128.85, 129.07, 131.23, 133.80, 133.81, 135.80, 136.12, 136.54, 137.36, 138.06, 138.92, 139.49, 139.75, 140.35, 141.33, 141.54, 141.60, 141.65, 141.80, 141.94, 141.96, 142.03, 142.09, 142.23, 142.29, 142.30, 142.33, 142.47, 142.59, 142.71, 142.74, 143.09, 143.28, 144.30, 144.33, 144.47, 144.53, 144.71, 145.16, 145.19, 145.22, 145.24, 145.28, 145.33, 145.34, 145.42, 145.60, 145.68, 145.87, 145.93, 146.15, 146.16, 146.19, 146.28, 146.34, 146.38, 146.48, 146.58, 147.30, 147.38, 152.07, 152.94, 153.31, 153.37. MS (MALDI-MS):  $m/z$  = 1079.

**Compound 2d.**  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.81 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.07–3.11 (dt, 1H,  $J$  = 3.4, 11.4 Hz), 3.45–3.47 (d, 1H,  $J$  = 10.9 Hz), 4.10–4.14 (dt, 1H,  $J$  = 2.8, 11.4 Hz), 4.22–4.24 (d, 1H,  $J$  = 11.1 Hz), 4.22–4.26 (d, 1H,  $J$  = 10.9 Hz), 4.79–4.81 (t, 1H,  $J$  = 7.9 Hz), 4.79–4.82 (t, 1H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.10–7.11 (d, 1H,  $J$  = 8.1 Hz), 7.26–7.29 (m, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.54–7.56 (d, 2H,  $J$  = 8.2 Hz), 7.59–7.61 (dd, 1H,  $J$  = 1.9, 8.1 Hz), 8.10–8.12 (dd, 1H,  $J$  = 1.9, 8.1 Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.70, 21.15, 21.25, 47.84, 66.89, 67.35, 71.00, 71.90, 79.50, 82.54, 126.04, 126.18, 127.43, 129.27, 129.32, 129.37, 130.13, 135.57, 136.30, 136.43, 136.82, 137.34, 137.43, 137.60, 138.70, 139.35, 139.60, 140.24, 141.30, 141.49, 141.61, 141.66, 141.71, 141.92, 141.97, 142.00, 142.09, 142.25, 142.27, 142.32, 142.40, 142.53, 142.63, 142.64, 142.66, 143.02, 143.09, 143.22, 144.30, 144.36, 144.57, 144.62, 144.68, 145.08, 145.10, 145.13, 145.8, 145.21, 145.25, 145.26, 145.49, 145.64, 145.68, 145.81, 145.87, 146.07, 146.10, 146.21, 146.30, 146.35, 146.80, 147.05, 147.27, 152.81, 153.70, 153.84, 153.93. MS (MALDI-MS):  $m/z$  = 1039.

**Compound 2e.**  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.19–1.21 (t, 3H,  $J$  = 7.6 Hz), 1.28–1.30 (t, 3H,  $J$  = 7.6 Hz), 1.813 (s, 3H), 2.61–2.65 (q, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 2.69–2.73 (q, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 3.08–3.12 (dt, 1H,  $J$  = 3.5, 11.4 Hz), 3.47–3.49 (d, 1H,  $J$  = 11.0 Hz), 4.10–4.15 (dt, 1H,  $J$  = 2.3, 11.4 Hz), 4.23–4.26 (t, 1H,  $J$  = 11.0 Hz), 4.22–4.24 (d, 1H,  $J$  = 11.1 Hz), 4.80–4.81 (d, 1H,  $J$  = 10.5 Hz), 4.80–4.81 (d, 1H,  $J$  = 10.3 Hz), 7.10–7.11 (dd, 1H,  $J$  = 1.7, 8.1 Hz), 7.29–7.31 (m, 3H), 7.49 (s, 1H), 7.58–7.60 (m, 2H), 7.61–7.62 (dd, 1H,  $J$  = 2.0, 8.1 Hz), 8.13–8.14 (dd, 1H,  $J$  = 1.9, 8.1 Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.53, 15.60,

20.66, 28.47, 28.54, 47.82, 66.89, 67.34, 71.01, 71.89, 79.55, 82.58, 125.99, 126.22, 127.51, 128.00, 128.03, 128.14, 128.23, 129.04, 130.16, 135.50, 136.31, 136.31, 136.64, 136.84, 137.35, 138.61, 139.22, 139.34, 139.59, 140.23, 141.29, 141.59, 141.62, 141.65, 141.67, 141.71, 141.92, 141.97, 142.00, 142.09, 142.25, 142.26, 142.32, 142.52, 142.62, 142.63, 142.66, 143.02, 143.22, 143.91, 143.98, 144.30, 144.37, 144.59, 144.63, 144.67, 145.07, 145.10, 145.13, 145.14, 145.21, 145.24, 145.25, 145.49, 145.63, 145.68, 145.81, 145.86, 146.06, 146.09, 146.10, 146.19, 146.30, 146.35, 146.80, 146.84, 147.05, 147.27, 147.31, 152.81, 153.71, 153.85, 153.95. MS (MALDI-MS):  $m/z = 1067$ .

**Compound 2f.**  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.82–0.84 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 0.88–0.91 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 1.18–1.39 (m, 16H), 1.84 (s, 3H), 2.57–2.60 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz), 2.64–2.67 (t, 2H,  $J = 7.8$  Hz), 3.09–3.13 (dt, 1H,  $J = 3.5, 11.4$  Hz), 3.48–3.49 (d, 1H,  $J = 11.1$  Hz), 4.10–4.14 (dt, 1H,  $J = 2.3, 11.4$  Hz), 4.22–4.24 (d, 1H,  $J = 11.1$  Hz), 4.22–4.26 (t, 1H), 4.80–4.81 (d, 1H,  $J = 10.6$  Hz), 4.80–4.82 (d, 1H,  $J = 10.7$  Hz), 7.08–7.09 (dd, 1H,  $J = 1.5, 8.1$  Hz), 7.26–7.27 (m, 1H), 7.46–7.48 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz), 7.50 (s, 1H), 7.56–7.59 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.60–7.62 (dd, 1H,  $J = 1.8, 8.1$  Hz), 7.96–7.98 (m, 1H), 8.12–8.14 (dd, 1H,  $J = 1.9, 8.1$  Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.15, 20.61, 22.63, 22.67, 28.54, 29.08, 31.16, 31.47, 31.71, 31.75, 35.45, 35.64, 47.80, 66.90, 67.36, 71.00, 71.89, 79.59, 82.63, 125.86, 126.12, 127.44, 128.32, 128.58, 128.66, 133.11, 135.45, 136.32, 136.72, 136.85, 137.13, 137.37, 138.56, 139.34, 139.58, 140.24, 141.29, 141.50, 141.59, 141.63, 141.69, 141.93, 141.98, 142.00, 142.09, 142.26, 142.31, 142.53, 142.62, 142.64, 142.66, 142.73, 143.02, 143.23, 144.31, 144.37, 144.60, 144.65, 144.67, 145.07, 145.11, 145.12, 145.15, 145.22, 145.25, 145.50, 145.64, 115.69, 145.82, 145.86, 146.06, 146.10, 146.11, 146.20, 146.31, 146.35, 146.81, 146.87, 147.05, 147.27, 147.32, 152.80, 153.71, 153.86, 153.95. MS (MALDI-MS):  $m/z = 1179$ .

**Compound 2g.**  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.93 (s, 3H), 3.15–3.19 (dt, 1H,  $J = 3.3, 11.2$  Hz), 3.54–3.56 (d, 1H,  $J = 11.0$  Hz), 4.15–4.19 (dt, 1H,  $J = 2.4, 11.4$  Hz), 4.26–4.30 (t, 1H,  $J = 11.6$  Hz), 4.27–4.29 (d, 1H,  $J = 11.5$  Hz), 4.83–4.87 (t, 1H,  $J = 11.4$  Hz), 4.84–4.87 (t, 1H,  $J = 8.9$  Hz), 7.32–7.35 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz), 7.36–7.39 (dt, 1H,  $J = 7.4$  Hz), 7.42–7.44 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 7.46–7.48 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 7.58–7.60 (dd, 1H,  $J = 1.9, 8.2$  Hz), 7.61 (s, 1H), 7.63–7.64 (dd, 2H,  $J = 1.2, 8.4$  Hz), 7.66–7.67 (dd, 1H,  $J = 1.2, 8.4$  Hz), 7.70–7.71 (m, 2H), 7.75–7.78 (m, 3H), 7.82–7.84 (dd, 1H,  $J = 1.9, 8.2$  Hz), 8.33–8.34 (dd, 1H,  $J = 1.9, 8.2$  Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.75, 47.96, 66.90, 67.49, 71.05, 71.92, 79.53, 82.51, 126.71, 126.98, 127.06, 127.23, 127.38, 127.45, 128.08, 128.82, 128.86, 130.59, 135.69, 136.29, 136.77, 137.43, 138.65, 138.76, 139.43, 139.67, 140.31, 140.34, 140.38, 140.55, 140.71, 141.31, 141.64, 141.67, 141.78, 141.95, 141.99, 142.03, 142.10, 142.25, 142.28, 142.35, 142.55, 142.66, 142.67, 142.70, 143.04, 143.06, 143.10, 143.25, 144.33, 144.37, 144.57, 144.60, 144.69, 145.12, 145.17, 145.19, 145.23, 145.27, 145.30, 145.50, 145.67, 145.84, 145.89, 146.11, 146.13, 146.16, 146.23, 146.34,

146.38, 146.72, 146.75, 146.90, 147.29, 147.34, 152.59, 153.56, 153.64, 153.66. MS (MALDI-MS):  $m/z$  = 1163.

**Compound 2h.**  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.06 (s, 3H), 3.13–3.17 (dt, 1H,  $J$  = 3.3, 11.1 Hz), 3.79 (br, 1H), 4.09–4.13 (dt, 1H,  $J$  = 2.1, 11.6 Hz), 4.20–4.23 (m, 2H), 4.70–4.73 (dd, 1H,  $J$  = 3.1, 10.1 Hz), 4.78–4.80 (dd, 1H,  $J$  = 3.3, 10.6 Hz), 7.01 (br, 1H), 7.08–7.10 (dd, 2H,  $J$  = 3.5, 5.0 Hz), 7.23–7.24 (dd, 1H,  $J$  = 1.1, 3.6 Hz), 7.27–7.28 (d, 1H,  $J$  = 4.9 Hz), 7.33 (br, 1H), 7.75 (s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.11, 29.68, 66.74, 70.66, 71.56, 76.57, 82.99, 123.98, 124.86, 127.80, 136.35, 136.55, 137.26, 138.70, 139.62, 140.25, 141.31, 141.41, 141.55, 141.59, 141.77, 141.93, 142.03, 142.13, 142.26, 142.39, 142.55, 142.60, 142.68, 143.05, 143.23, 144.30, 144.36, 144.46, 144.56, 144.69, 145.07, 145.14, 145.24, 145.33, 145.53, 145.67, 145.83, 145.87, 146.04, 146.08, 146.13, 146.26, 146.33, 146.39, 146.57, 147.29, 147.35, 147.79, 153.19, 153.47. MS (MALDI-MS):  $m/z$  = 1024 ( $[\text{M}+\text{H}]$ ).

**Compound 3a by TfOH acidification.** To the solution of **2a** (5 mg, 0.0049 mmol) in chlorobenzene, trifluoromethanesulfonic acid (TfOH, 18 mg, 0.12 mmol) was dropwisely added. The solution was stirred 5 h at 80 °C. The reaction was quenched by adding water, and extracted with chlorobenzene. The solution was concentrated in vacuo. The product was purified by column chromatography, to give **3a** (3.30 mg, 59%).  $^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.93 (s, 3H), 2.82–2.83 (d, 1H,  $J$  = 10.3 Hz), 3.08–3.12 (dt, 1H,  $J$  = 4.9, 11.2 Hz), 3.38–3.41 (d, 1H,  $J$  = 14.7 Hz), 3.97–4.01 (dt, 1H,  $J$  = 2.5, 11.2 Hz), 3.98–4.01 (d, 1H,  $J$  = 14.7 Hz), 4.20–4.22 (d, 1H,  $J$  = 10.6 Hz), 4.21–4.24 (t, 1H,  $J$  = 10.6 Hz), 4.43–4.45 (dd, 1H,  $J$  = 3.4, 10.3 Hz), 4.81–4.83 (dd, 1H,  $J$  = 3.4, 10.6 Hz), 6.99–7.02 (t, 1H,  $J$  = 7.3 Hz), 7.04–7.07 (t, 2H,  $J$  = 7.8 Hz), 7.19–7.21 (d, 2H,  $J$  = 7.2 Hz), 7.42–7.45 (dt, 1H,  $J$  = 1.2, 7.7 Hz), 7.46–7.47 (d, 1H,  $J$  = 7.7 Hz), 7.51–7.54 (dt, 1H,  $J$  = 1.2, 7.7 Hz), 7.85–7.87 (d, 1H,  $J$  = 7.7 Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  33.77, 44.88, 45.52, 51.08, 67.06, 71.39, 71.96, 80.26, 85.07, 126.08, 127.03, 127.23, 128.23, 128.75, 129.36, 136.38, 136.59, 136.75, 139.10, 139.53, 139.76, 139.99, 140.63, 141.32, 141.37, 141.47, 141.69, 141.81, 141.86, 141.98, 141.99, 142.05, 142.14, 142.38, 142.54, 142.58, 142.76, 143.14, 144.00, 144.22, 144.50, 144.58, 144.85, 145.08, 145.12, 145.16, 145.22, 145.28, 145.30, 145.52, 145.56, 145.82, 145.88, 145.93, 146.00, 146.15, 146.21, 146.26, 146.61, 146.80, 147.15, 147.2, 148.82, 150.65, 153.48, 153.75, 153.93, 154.43.

**Oxidation of pyrrolidinofullerene 2a.** DDQ (22.4 mg, 0.10 mmol) was added in the chlorobenzene solution of **2a** (10.0 mg, 0.098 mmol). The mixture was slightly warmed at 50 °C with stirring 72 h. After cooling to rt, water and chlorobenzene were added to the solution. The organic layer was separated and evaporated. The residue was purified by column chromatography, to give pristine  $\text{C}_{60}$  (6.1 mg, 85%).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Kyoko Inoue for the NMR measurements. This work was partly supported by a Grant-in-Aid

for Young Scientist (B) (No. 24750039) from JSPS and by Health Labor Sciences Research Grants from MHLW.

## REFERENCES AND NOTES

1. a) M. Maggini, G. Scorrano, and M. Prato, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9798; b) M. Prato and M. Maggini, *Acc. Chem. Res.*, 1998, **31**, 519.
2. Y. Zhao, L. Gan, D. Zhou, C. Luo, and C. Huang, *Chin. Sci. Bull.*, 1997, **42**, 1360.
3. A. Bianco, M. Maggini, and G. Scorrano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 4072.
4. S. Filippone, E. E. Maroto, A. Martín-Domenech, M. Suárez, and N. Martín, *Nature Chem.*, 2009, **1**, 578.
5. a) S. Campidelli, R. Deschenaux, J.-F. Eckert, D. Guillon, and J.-F. Nierengarten, *Chem. Commun.*, 2002, 656; J. Lenoble, N. Maringa, S. Campidelli, B. Donnio, D. Guillon, and R. Deschenaux, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1851.
6. a) H. Imahori, K. Hagiwara, T. Akiyama, M. Aoki, S. Taniguchi, T. Okada, M. Shirakawa, and Y. Sakata, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **263**, 545; b) P. A. Troshin, A. S. Peregudov, S. I. Troyanov, and R. N. Lyubovskaya, *Russ. Chem. Bull.*, 2009, **57**, 887.
7. N. Ikuma, H. Yamamoto, K. Kokubo, and T. Oshima, *Chem. Lett.*, 2014, **43**, 1648.
8. R. S. Ashraf, M. Shahid, E. Klemm, M. Al-Ibrahim, and S. Sensfuss, *Macromol. Rapid Commun.*, 2006, **27**, 1454.
9. T. Michinobu, T. Nakanishi, J. P. Hill, M. Funahashi, and K. Ariga, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10384.
10. MALDI-MS of **2a** showed the fragment peak due to the elimination of methylstyrene (M-117) as shown in ref. 7.
11. K. Kokubo, S. Tochika, M. Kato, Y. Sol, and T. Oshima, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 3335.
12. a) G. A. Olah, I. Bucsi, and C. Lambert, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 9388; b) A. Iwashita, Y. Matsuo, and E. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 3513.
13. Although pristine fullerene was inactive with TfOH, fullerene derivatives having basic sites reacted with TfOH, followed by arylation of aromatic solvents. See: M. Nambo, Y. Segawa, and K. Itami, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 2402.
14. a) N. Martín, M. Altable, S. Filippone, A. Martín-Domenech, L. Echegoyen, and C. M. Cardona, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 110; b) S. Filippone, M. I. Barroso, A. Martín-Domenech, S. Osuna, M. Solà, and N. Martín, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 5198.

# 球面反応場に着目したフラーレン ケージ内外の制御による新規機能 分子の創製と応用

上野 裕  
伊熊 直彦  
小久保 研\*

*Synthesis and Application of Novel Functional Molecules by Inner and Outer Control of Fullerenyl Cage Focused on the Spherical Reaction Sites*

Hiroshi Ueno, Naohiko Ikuma, and Ken Kokubo\*

Various types of functionalized fullerenes have been widely developed by considering unique reactivities of the spherical reaction sites; such as not only the enhanced reactivity due to the curved and thus strained C=C double bonds, but also the multiple addition and its electronic control for the selective monoaddition, the regioselectivity controls by spherical  $\pi$ -conjugation and by twisted C=C double bond, the unprecedented substitution mechanism, the highly symmetrical multiple addition via fullerene anion, and the drastic reactivity change by ion encapsulation. The derivatives also proved effective against many potential applications to CMP polishing slurry, antioxidant, anti-inflammatory agent, resist materials, n-type materials for organic photovoltaics, and more.

**Key words:** nanocarbon materials, water soluble fullerene, fullerene multiadduct, lithium ion-encapsulated fullerene, anti-Bredt double bond

## はじめに

○, △, □といった様々な形の「分子パーツ」がこれまでに多数創られ、まるでブロックを組み立てるかのようには、分子の世界は超分子の世界へと広がりを見せている。このような有機合成化学の分子パーツという観点から見ても、フラーレンは唯一無二の球状分子である。その形状の美しさに惹かれ、あるいはその物性のユニークさに着目し、1985年の発見<sup>1a)</sup>、1990年のラボスケール合成の成功以降<sup>1b)</sup>、有機合成化学的な側面からも数多くの研究が行われてきた<sup>2)</sup>。また、近年、フラーレンを端とする「球面の化学」から、カーボンナノチューブ<sup>3)</sup>やナノホーン<sup>4)</sup>などのナノ炭素材料のみならず、お椀分子<sup>5)</sup>やリング分子<sup>6)</sup>なども生み出されている。

市販フラーレン(C<sub>60</sub>)は有機合成的に製造されていないものの、Flash vacuum pyrolysis というやや苛酷な条件下(1,100℃)では全合成もされている<sup>7)</sup>。溶解性の向上や新たな機能付与のため、これまでに多くの誘導体が有機合成的手法により開発されている<sup>8)</sup>。このことは、フラーレンケージに湾曲歪みをもたらす5員環が多く(C<sub>60</sub>中に12個)存在し、高度に広がった $\pi$ 共役系(60 $\pi$ )および深いLUMOエネルギー準位(-3.23 eV)のため

に、ラジカル付加反応や求核付加反応に対する反応性が高いことと関係している(図1)。官能基を1つ2つ付与する場合、電子的特性や構造安定性をあまり損なうことなく、溶解性などを目的に合わせて改善できる。また、反応点(C=C結合)の多さを利用し、官能基を40個以上導入することも可能であり、この場合は元の物性から大きく異なる新たな炭素材料を創ることができる。

本論文では、こうした有機合成的観点に基づき、我々が最近開発したいくつかのフラーレン誘導体(図2)について、その合成法の特徴や反応性、物性について述べ、

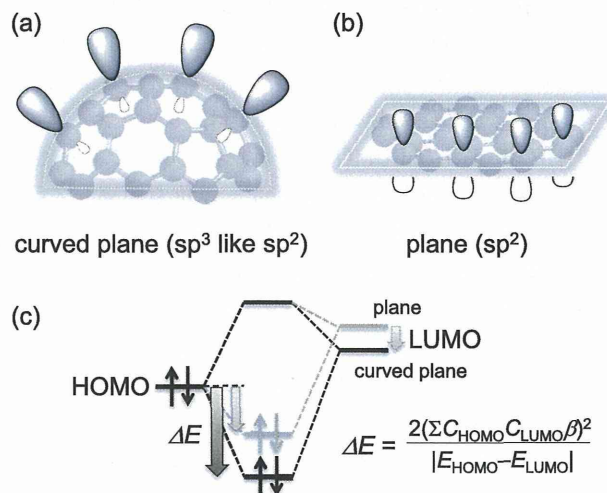


Fig. 1 Comparison of frontier molecular orbital interaction between curved plane and plane structure.

\* 大阪大学大学院工学研究科(565-0871 吹田市山田丘 2-1)

\* Graduate School of Engineering, Osaka University(2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

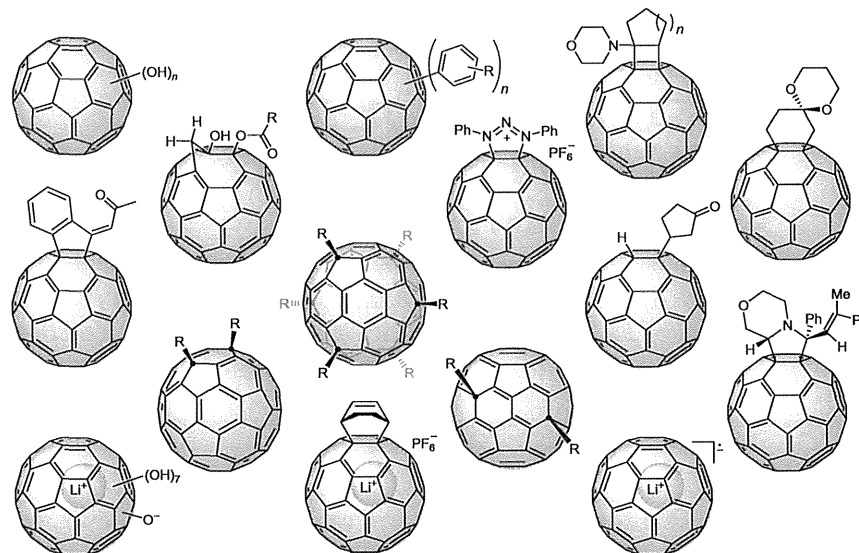


Fig. 2 Fullerene derivatives developed in this work.

いくつかの応用展開例を紹介する。

### 1. フラーレンの構造と反応性の特徴

フラーレンの構造的特徴は「球」であるということはいくつまでもないが、反応性という観点から眺めると、球面により生じる「歪み」が  $sp^2$  炭素の反応性を高めていることに気付く。すなわち、平面  $sp^2$  炭素の場合、p 軌道のローブは面の上下に等しく広がるのに対し、歪んだ球面の場合、正四面体形の  $sp^3$  性が混じることで上下のローブの大きさに偏りができ、より球面外側のローブが大きくなる(図 1a)。この平面からのずれは pyramidalization angle という角度で定量的に表される(図 3)<sup>9)</sup>。分子軌道理論によると、軌道相互作用による安定化エネルギーは、ローブの大きさ(軌道係数)の二乗に比例するため<sup>10)</sup>、pyramidalization angle の大きさが反応性に対して 1 つの重要な因子であることがわかる。また、立体障害という観点からも、球面であることの有利さが推測される。もう 1 つ重要な反応性の因子は、フロンティア軌道(HOMO および LUMO)のエネルギー準位である(図 1c)。球面による歪みとエネルギー準位も関連しており、リング分子 CPP においてその輪の大きさが小さくなるほど(すなわち  $sp^2$  炭素の歪みが大きくなるほど) HOMO は上昇し、LUMO は低下することが知られている<sup>6)</sup>。フラーレン  $C_{60}$  の場合、三重に縮重した LUMO によって電子を 6 個まで安定に受け取ることが可能であり<sup>11)</sup>、よい電子アクセプターとして、その深い LUMO を利用した反応の開発や<sup>12)</sup>、有機薄膜太陽電池の n 型半導体材料としての応用研究がなされている<sup>13)</sup>。

以下に、反応種別に分類した各種フラーレン誘導体の合成的特徴と性質や応用について述べる。

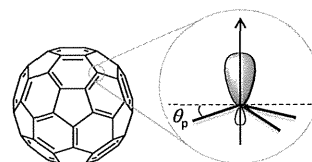


Fig. 3 Pyramidalization angle  $\theta_p$ .

### 2. 多付加反応

#### 2.1 水酸化フラーレンの合成

上述した深い LUMO エネルギー準位のため、フラーレンへの付加反応は、Prato 反応と呼ばれる 1,3-双極子付加反応や Diels-Alder 反応のような協奏的反應の他、Bingel 反応とよばれる求核的付加反応のようなタイプがほとんどである<sup>12)</sup>。高度な共役により HOMO の準位も比較的浅いため、*m*CPBA などによる求電子的酸化反応<sup>14)</sup>のほか、プロトンの求電子的付加により生じるフラーニルカチオン種が芳香環と反応する Friedel-Crafts 反応<sup>15)</sup>も知られているが、それぞれ強力な酸化剤や超強酸  $H^+ AlCl_4^-$  を必要とするなど、反応例は少ない。

我々は、「水」を求核剤として用いて水酸基を多数導入し、物性を大きく改変した「水溶性」のフラーレン誘導体、すなわち水酸化フラーレン(フラーノール)を合成することを、フラーレン化学修飾研究の発端として行った。すでに知られていたいくつかの水酸化フラーレンのように<sup>16)</sup>、多数の置換基を導入した「フラーレン多付加体」は、球状分子ならではのユニークな誘導体であるが、水酸基数の分布はあくまで平均であり、導入位置は決定不能、かつ、おそらく多数の位置異性体の混合物という、「分子」というより「材料」というべき物質である。本

誌には、高価な合成試薬で多段階かけてでも有機合成の力量を持って美しく「分子」を合成する研究が多く紹介されるが、高価なフラーレンの工業的利用を目指す我々には、いかに簡便・安価に合成するか、という課題が優先順位の高い合成設計指針であった。また、フラーレンの工業的生産ではC<sub>60</sub>の他に約20%のC<sub>70</sub>と約15%の高次フラーレンを含む「混合フラーレン」が粗生成物として得られ、そこからC<sub>60</sub>の単離にはカラム操作が必要なため、工業的利用には混合フラーレンの利用が望まれる。そのため、フラーレン多付加体の合成方法は、用途によっては、むしろ歓迎される手法である。

我々の開発以前に用いられていたフラーレンの主な水酸化試薬のうち、発煙硫酸は取り扱いが困難であり<sup>16a)</sup>、水酸化ナトリウムは残留ナトリウム塩の精製が大変であった<sup>16d)</sup>。当初我々は、フラーレンがラジカル種に対して多付加反応しやすいことから、ヒドロキシラジカルの発生を念頭に安価な過酸化水素水に着目し、様々な条件において水酸化反応を検討した。しかし、C<sub>60</sub>は煤のような真っ黒な固体で、全く水溶性がないため、ただ混合させても反応しなかった。そこで、若干親水性を有すると期待された非水溶性のC<sub>60</sub>(OH)<sub>12</sub>を用いて30%過酸化水素水中、60℃で数日間反応させたところ、1-2日でほぼクリアな溶液となり、3-4日で完全に均一な黄色水溶液となることを見出した<sup>17)</sup>。貧溶媒沈殿により取り出した黄色固体の水酸化フラーレン1は、反応過程で過酸化水素水溶液中に溶解していたことから予想されるように、高水溶性(17.5 mg/mL)であった。同定は多くの分析、IR、UV、TGA、元素分析、MS、DLS、IGなどを組み合わせ、平均推定構造C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>·8H<sub>2</sub>Oと決定した(図4)<sup>17)</sup>。水酸基がフラーレン炭素数の半分以上付加したものとしては世界で初めての例であり、それ以前の研究では無視されていた二次結合水(水和水)をきちんと定量して分子式に組み込んだのも我々が初めてである。続いて、この2段階反応を1段階に短縮できないか検

討を行った。上述したC<sub>60</sub>が過酸化水素と反応しなかった理由として、水中での分散性の低さ、または反応性そのものの低さ、の両方を念頭に条件を模索したところ、アンモニア水を共存させる方法<sup>18)</sup>、ならびに、相間移動触媒存在下で二液相にする方法<sup>19)</sup>の両方において、目的の反応が進行した。過酸化水素水にアンモニアを共存させた場合、アミノ化されたフラーレン前駆体が酸化および水酸化されるため、生成物中には含窒素官能基も同時に導入されていた。一方、相間移動触媒として第四級アンモニウム塩のテトラブチルアンモニウムヒドロキシド(TBAH)存在下、有機溶媒に溶解させたC<sub>60</sub>と過酸化水素水を二液相で接触させた場合、接触効率が改善され、さらに塩基性TBAHによって過酸化水素が活性化されたため、より短時間で水溶性水酸化フラーレン2が得られた。上述の手法により同定したところ、平均推定構造はC<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub>·8H<sub>2</sub>Oと決定され、溶解度はさらに高い58.9 mg/mLであった<sup>19)</sup>。

## 2.2 水酸化フラーレンの応用

親水性・両親媒性ナノ粒子としての水酸化フラーレンの水中や極性溶媒中における分散・凝集挙動は非常に興味深い。水中における水酸化フラーレンC<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>(1)の粒径測定を行ったところ、分子サイズとほぼ等しい、およそ1 nmの粒径分布を示した<sup>17)</sup>。一方、この水溶液に徐々にアルコールを添加して粒径を測定したところ、いったん6-8 nmの準安定クラスターを形成し、その後、さらに凝集する2段階の凝集挙動を示すことを見出した<sup>20)</sup>。球状の粒子がこのようなクラスター形成することは、Magic number effectとして気相中のC<sub>60</sub>などではよく知られているが、溶液中でのこのような挙動は例を見ない。わずか数nmという領域でも精度よく測定ができたInduced Grating(IG)法<sup>21)</sup>の開発に伴って初めて明かされた現象である。

このような水酸化フラーレンは、粒が均一に揃っている水溶性ナノ粒子とみなせるため、半導体分野で使用されるChemical Mechanical Polishing(CMP)研磨スラリーの砥粒成分としての応用を高谷、林らとともに検討した。その結果、C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>(1)を添加した専用研磨スラリーの調製により、1 cm角の銅板を1 nmRMS以下の平均粗さにまで精密研磨できることを見出した<sup>22)</sup>。実際には、機械的強度に優れた砥粒成分というより、化学的に銅原子と結合して脆弱な被膜を作り、それが削れることで精密研磨されるということが明らかにされている<sup>23)</sup>。

他の用途として、フラーレンのラジカル種に対する高い反応性を利用して活性酸素種を捕捉する抗酸化作用が、バイオサイエンス分野において大いに期待されている<sup>24)</sup>。これは、フラーレンの高度なπ共役による

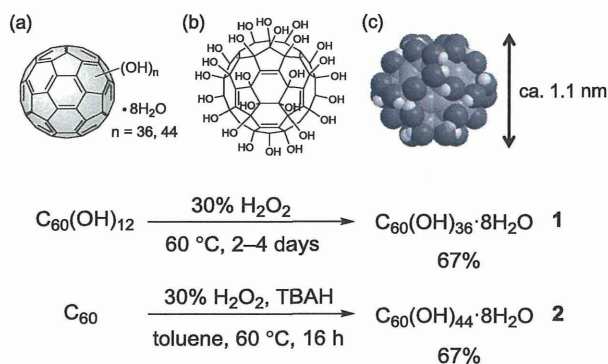


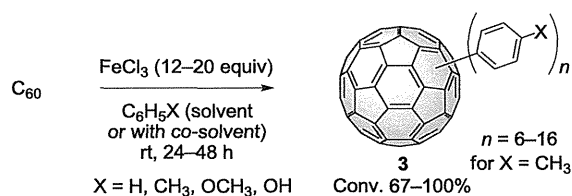
Fig. 4 Synthesis of water-soluble fullereneols 1 and 2: (a) Estimated average structure, (b) a possible isomer of C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub>, and (c) its 3D model structure.

い HOMO ならびに深い LUMO が、ともにラジカル種の SOMO と強く相互作用しやすいという分子軌道論的根拠に基づいている。

実際、同様な抗酸化剤として知られる共役化合物の  $\beta$ -カロテンと比較を行ったところ、フラレン誘導体のほうが、過酸化脂質ラジカルに対する相対反応速度が速いという結果を得ている<sup>25)</sup>。特に、水溶性の高いフラレン誘導体として、上述した水酸化フラレン 1,2 においても、抗酸化<sup>26)</sup>、抗菌<sup>27)</sup>、抗炎症、流産予防、骨格筋再生などに対する効果が報告されている。この場合、置換基の導入により共役が減少することで、炭素二重結合部でのラジカル種との反応性は低下すると考えられるが、予想以上に効果が見られたことから、極度の歪みによる反応性の向上や、フラレン共役系に結合する水酸基の特異的な反応性が、共役の低下をうまく相補していると思われる。

### 2.3 マルチアリール化フラレン

多付加体合成のノウハウを活かし、芳香環の多付加反応についても様々な検討を行った。中村らは、 $C_{60}$  の 1 つの 5 員環を中心として芳香環を 5 つ導入した、5 重付加体を高選択的に合成することに成功している<sup>8,28)</sup>。これは、銅触媒存在下で Grignard 試薬との反応により得られ、条件を工夫すれば、10 重付加体も合成されている<sup>29)</sup>。一方で、実用化には合成コストが高価になるため、Olah らが開発した塩化アルミニウム触媒を用いるヒドロアリール化反応<sup>15)</sup> (あるいは Friedel-Crafts フラレン化反応ともいう) が、安価で簡便に同等な誘導体を合成する反応として知られる。中村、松尾らは、このヒドロアリール化反応を段階的に調べ<sup>30)</sup>、塩化鉄でも同様なマルチアリール化反応が進行することを報告している<sup>31)</sup>。我々のグループもほぼ同時期に同様な反応条件探索を行い、芳香環が 6–16 個程度導入されることを確認している (スキーム 1)。これら芳香環多付加体 3 は、半導体製造のマスク材料やレジスト材料として応用研究が進められている<sup>32)</sup>。



Scheme 1 Synthesis of multiarylated fullerenes 3.

### 3. 位置選択的反応

前項では多付加反応について述べた。これらの反応では、一付加目の反応に比べて二付加目、三付加目と徐々

に反応が加速するため、一般に付加数を制御するのが難しい。また、対称な置換基が環化付加する場合でも、二付加目は 8 種類の位置異性体が生成可能であり、数に加え、付加位置の制御はさらに挑戦的な合成テーマである。我々は、下記に示すいくつかの例において、一付加 (付加数) 選択的な反応、もしくは位置選択的に多付加体を得る反応の開発にも成功している。

#### 3.1 熱的 [2+2] 環化付加反応

一付加体を選択的に生成するための方法として、求核性の大きな付加基を電子移動により付加させる方法がある。この反応は、求核剤の HOMO と求電子剤であるフラレンの LUMO の準位が大きく影響している。求核剤の付加した一付加体は LUMO 準位が上昇するので、求核剤の多付加は起こりにくい (図 5)。

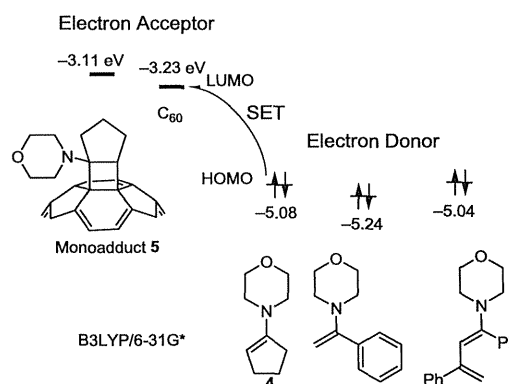


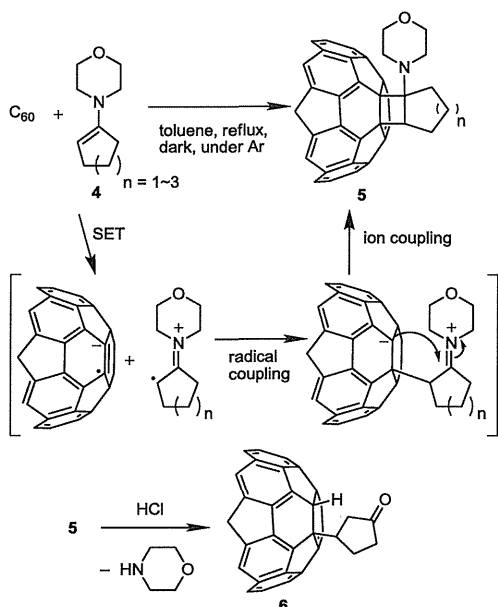
Fig. 5 HOMO orbitals of enamines/dienamine and LUMO orbitals of  $C_{60}$  and [2+2] monoadduct 2.

上記の戦略を基にして、代表的な求核剤であるモルフォリノエナミン 4 の  $C_{60}$  への付加反応を試みた。その結果、[2+2] 環化付加反応が起こり、シクロブタン環を有するフラレン誘導体 5 が得られた (スキーム 2)<sup>33)</sup>。この化合物は酸性条件下で加水分解し、カルボニル基を有するフラレン誘導体 6 を容易に得ることができた。類似するピロリジノエナミンの付加反応において同様にカルボニルフラレンが得られているが<sup>34)</sup>、こちらも本法と同じ機構により [2+2] シクロブタン中間体を経由している可能性がある。

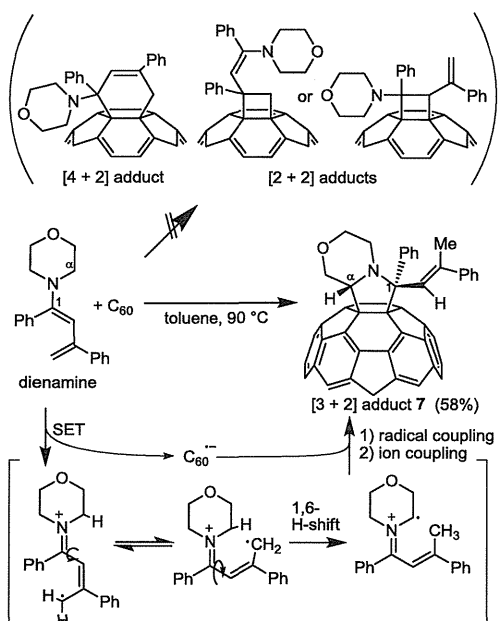
本法による芳香族官能基導入の可能性を DFT 計算により検討したところ、芳香族エナミンは脂肪族エナミンより HOMO が低く、低い反応性になることが予想された (図 5)。そこで、HOMO 準位がエナミンより上昇している芳香族ジエナミンの反応を試みたところ、[2+2] 環化付加反応ではなく水素移動の伴った [3+2] 環化付加生成物 7 が得られた (スキーム 3)<sup>35)</sup>。ジエナミンにわずかに含まれる芳香族エナミン不純物は、分子軌道計算の予想どおりに反応に関与しなかった (図 5)。

なぜ従来の [2+2] ないし Diels-Alder 生成物である [4





Scheme 2 [2+2] cycloaddition of morpholinoenamine 4 with  $C_{60}$ , and acidic hydrolysis of monoadduct 5.



Scheme 3 [3+2] cycloaddition of diaryldienamine via single electron transfer and 1,6-hydrogen shift.

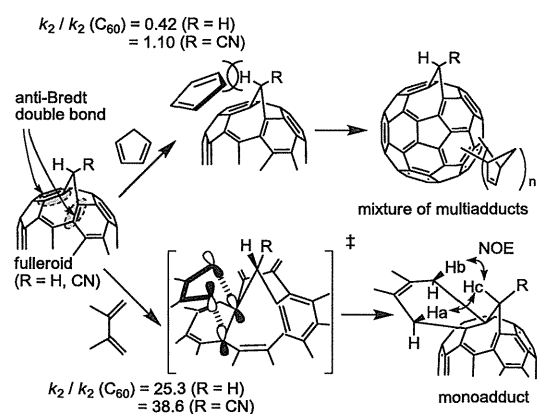
+2]付加体が生成せず、水素移動による付加体が生成したのか、その理由を明らかにするため、分子軌道計算を行った(スキーム3)。その結果、一電子移動で生成したジエナミンラジカルカチオンの1,6-水素移動過程の可能性が示唆された。実際、ラジカル種をトラップすることが知られているニトロソベンゼン共存下でEPRスペクトル測定を行ったところ、ニトロキシドのスペクトルが観察され、本反応系がラジカル過程を含んだ電子移動反応であることが示された。また、[2+2]生成物やDiels-

Alder反応による[4+2]生成物はDFT計算によると熱力学的に不安定で生成しにくいことが判明した。

### 3.2 フレロイド

$C_{60}$ の等価な二重結合に対し、置換基導入により一部をより歪ませることができれば、その部位に選択的に付加反応を起こすと期待できる。[5,6]二重結合にメタノ架橋させたフレロイドは、その橋頭に大きくねじれたanti-Bredt二重結合を有しているため、高い反応性が予想される。実際、フレロイドの水素化反応は、この2つの二重結合に対し選択的に還元された $C_{61}H_2$ 、 $C_{61}H_4$ が得られている<sup>36)</sup>。本研究においてはDiels-Alder反応と*m*CPBAの酸化反応を試み、その反応性の評価を行った。

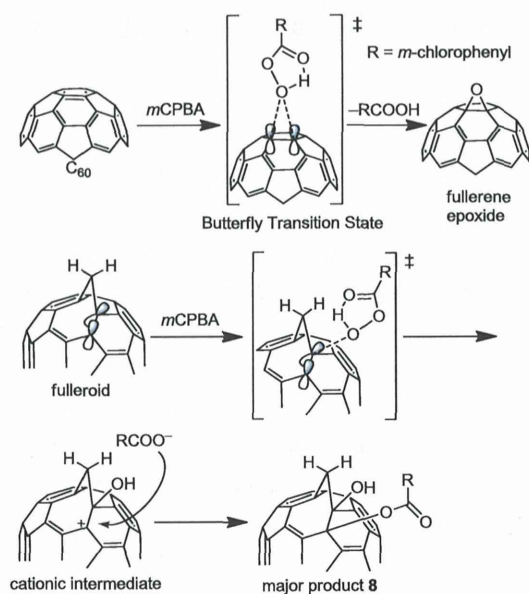
まず、無置換のメチレン架橋フレロイドに対して種々のジエンを反応させ、その反応速度を測定した(スキーム4)<sup>37)</sup>。シクロペンタジエンなどの環状ジエンの場合、 $C_{60}$ と同程度の反応速度であり、HPLCピークも異性体が多く、橋頭位への選択的な反応性を示さなかった。これは、橋頭二重結合が大きくねじれており、平面性の環状ジエンとはうまく軌道相互作用できないのが原因と考えられる。一方、対称的な非環状ジエンの場合は、1種類の付加生成物を与え、ジエン上の水素と橋頭メチレン基の水素の間でNOEが観測された。さらに、 $C_{60}$ に対する反応速度の比は25-38倍と大きく、橋頭位に対する位置選択的な反応性を示唆した。種々の置換基を導入したフレロイドに対しても同様の反応を行った。フェニル基などの大きな置換基を有するフレロイドでは、非環状ジエンの場合でも立体障害のため位置選択性が低下した<sup>38)</sup>。



Scheme 4 Diels-Alder reaction of fulleroid with cyclic and non-cyclic dienes.

$C_{60}$ を過酸で酸化するとその二重結合がエポキシ化されたフラレーンエポキシドが得られることが知られている。フレロイドに対し*m*-クロロ過安息香酸(*m*CPBA)

による酸化反応を試みたところ、エポキシ体ではなく *m*-クロロベンゾエート基がフラーレンに付加した  $\alpha$ -ヒドロキシ- $\beta$ -エステル付加体 8 が得られた(スキーム 5)<sup>39)</sup>。分子軌道計算で遷移状態を求めたところ、橋頭二重結合が大きく拗れているため従来のエポキシ化反応で見られる“Butterfly Transition State”は得られず、*m*CPBA の末端 OH 部位の求電子の付加反応を起こす遷移状態が得られた。遊離したカルボン酸アニオンが、OH 基が付加したカチオン中間体に求核付加し、エステル体を与えたと考えられる。



Scheme 5 Oxidation of  $C_{60}$  and fulleroid with *m*-chloroperbenzoic acid (*m*CPBA).

### 3.3 トリアゾリウム

$C_{60}$  は一般的に求電子剤として知られており、その LUMO と反応しうる電子供与的付加基による環化付加反応は多く知られているが、HOMO 準位と反応する求電子的な付加反応は *m*CPBA やオゾンによる酸化反応などわずかしち知られていない。本研究では求電子的な共役カチオンの  $C_{60}$  への付加反応に注目した。トリアゼン化合物から得られる 1,3-ジアザ-2-アゾニアアレンカチオンは求電子的な大きな中間体として知られており、アルキンやアルケンと反応してトリアゾリウム塩を生成する<sup>40)</sup>。本研究においてその  $PF_6^-$  塩をフラーレンと反応させたところ、トリアゾリウムフラーレン 9 の生成に成功した(図 6)<sup>41)</sup>。分子軌道計算によると、その反応機構は協奏的なカチオン性[3+2]環化付加反応であることが明らかになった。この化合物は、ペリ共役によりカチオンの求電性がフラーレン上まで影響しているため、その LUMO 準位は従来のイオン性フラーレンより低くその求電性が増大している。それゆえ、従来のイオン

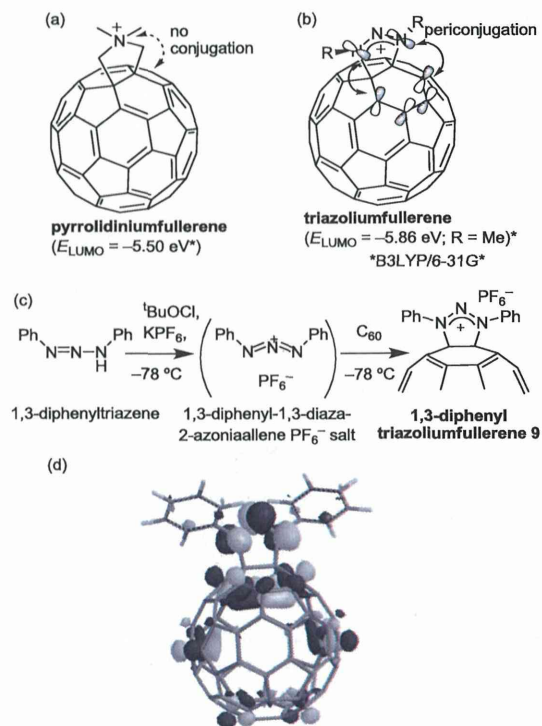
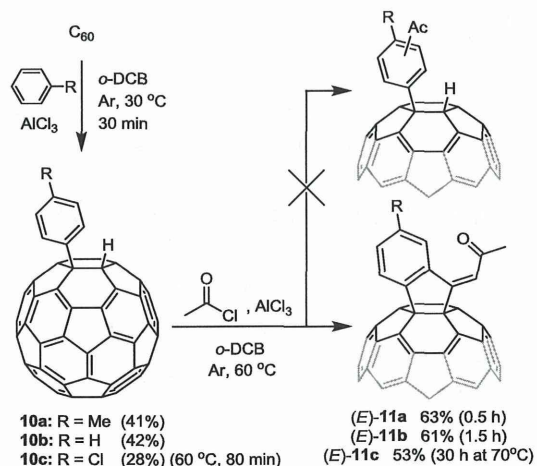


Fig. 6 Structure of (a) conventional nonconjugated ionic fullerene (pyrrolidiniumfullerene) and (b) periconjugated triazoliumfullerene. (c) Synthesis of 1,3-diphenyltriazenes (d) LUMO orbital of 9 (B3LYP/6-31G(d)).

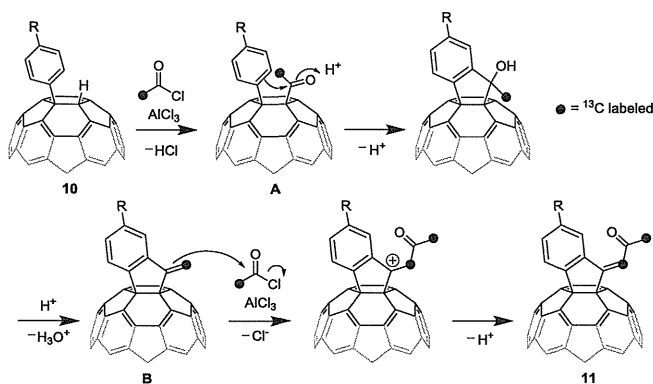
性フラーレンと異なる特性を示すイオン材料や、新反応の合成中間体への応用が見込まれる。

### 3.4 タンデムアセチル化反応

求電子種とフラーレンの別の反応例が、タンデムアセチル化反応である。塩化アセチルと塩化アルミニウムから発生させたアシルカチオンを求電子種として用い、ヒドロアリアル化フラーレン 10 との置換反応を行った(スキーム 6)。この場合、一般的な Friedel-



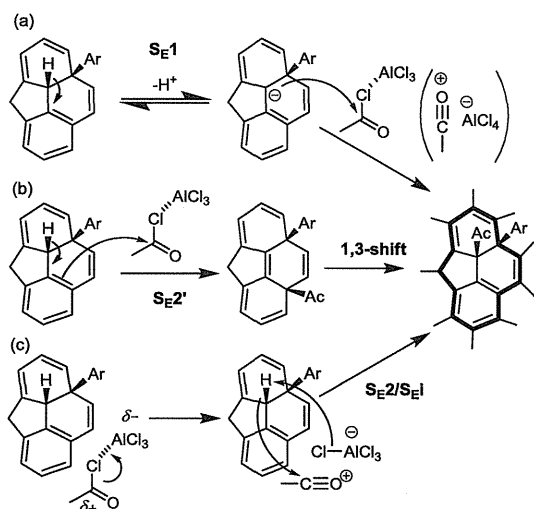
Scheme 6  $AlCl_3$ -catalyzed tandem acetylation of hydroarylated [60]fullerenes.



Scheme 7 Mechanism of tandem acetylation of hydroarylated [60]fullerenes.

Crafts 反応条件でありながら、フラーレン上の芳香環には全く反応が起こらず、フラーレン骨格と芳香環の間で新たな炭素原子を挟んで環化した誘導体 11 が収率 53–63% で得られた<sup>42)</sup>。

一見、不可解な反応であるが、<sup>13</sup>C 標識した塩化アセチルを用いた標識実験により、スキーム 7 に示す位置に標識された炭素が 2 つ導入されていたことから、いったんフラーレン上の水素がアセチル基に置換された後、分子内 Friedel-Crafts 反応が起こり、続く脱水反応、さらに 2 段階目の Friedel-Crafts 反応が起こることにより、生成物 11 を与えると推察された。



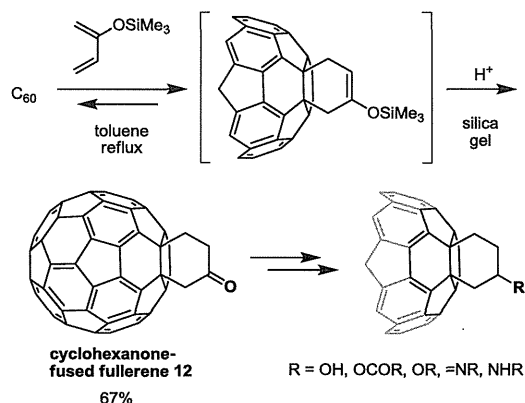
Scheme 8 Mechanism of the first-step acetylation of hydroarylated [60]fullerenes.

スキーム 8 に示した反応機構の最初の段階は、アシリウムカチオンによるフラーレン上プロトンの求電子置換反応である。フラーレンのような球状分子ではケージの外側からしか試薬はアプローチできないので、 $S_N2$ のような立体反転は起こり得ず、形式上、 $S_E1$  または  $S_E2'$  のような置換が起こる(スキーム 8a および b)。また、 $S_N2$

と違って、 $S_E2$  ではアシリウムカチオンの LUMO が相互作用する軌道は  $\sigma_{C-H}$  軌道(HOMO)なので、ケージの外側からの攻撃によってでも立体を保持しながら同じ炭素上で置換が起こる。

### 3.5 スピロアセタール化反応

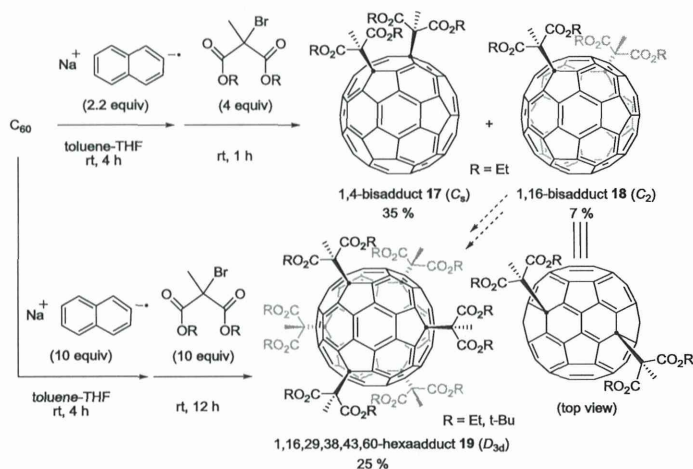
ねじれや歪みを利用した上述の反応とは異なる別の選択的誘導体化の合成戦略として、広範に変換可能な官能基を導入した「合成中間体フラーレン」を経由する手法が挙げられる。エポキシ酸素を導入した酸化フラーレンや<sup>43)</sup>、アジリジン環を有するアジリジノフラーレンからの合成展開がその例である<sup>44)</sup>。以前に Rubin らは、 $C_{60}$  と 2 位にトリメチルシロキシ基を有するジエンとの Diels-Alder 反応により、シクロヘキサノン縮環フラーレン 12 が簡便に合成できることを報告している(スキーム 9)<sup>45)</sup>。一般的に Diels-Alder 反応は協奏的な[4+2]付加環化であり、可逆反応であるため生成物の熱安定性は低い。しかし、本反応では生成物中のシリル基がシリカゲル程度の酸性度で簡単に脱離するため、逆反応は進行しなくなり、容易に 12 が得られる。この誘導体は比較的極性なカルボニル基を有するため、未反応  $C_{60}$  や二付加体と容易に分離・精製ができる。また、カルボニル基の反応は多様性に富み、アルコール、エステル、エーテル、イミン、アミンなどの多岐にわたる誘導体へとさらに変換されていることから、我々はこの誘導体 12 を鍵中間体として用いることにした。



Scheme 9 Synthesis of cyclohexanone-fused [60]fullerene 12 and its derivatives.

ケトンに対する求核剤として、最も種類が豊富で入手が容易である種々アルコールを選び、酸触媒存在下で容易に反応が進行すると期待されたアセタール化反応を 12 に対して試みた。その結果、四塩化チタンをルイス酸触媒として用いることで室温でも反応が進行し、対応する種々アセタール化フラーレン 13a–c を与えた(スキーム 10)<sup>46)</sup>。ジオールを用いた場合は、対応する 5–7

員環のスピロアセタール化フラレン 14a-c が良好な収率で得られた。さらに、アルコールに代えてチオールを用いた場合も反応は進行し、ほぼ定量的に対応する5-7員環スピロチオアセタール化フラレン 15a-c を与えた。アルキル鎖長をさらに伸長し、1,5-ペンタンジチオールや1,6-ヘキサンジチオールを用いた場合、ジオールと同様に対応するスピロチオアセタールは得られず、しかしこの場合、ジチオールが2分子付加したチオアセタール化フラレン 16d, e を与えた。この場合、中員環生成の歪みのため分子内環化は起こらなかったものの、アルコールに比べてチオールの求核性が高く、2分子目のチオールが反応することにより生成したと考えられる。



Scheme 11 Synthesis of 2-methylmalonate  $D_{3d}$ -hexaadduct and its bisadduct precursors.

ついて調べ、1,4-および1,16-二付加体2種類の構造を明らかにし、さらにマイナー生成物である1,16-二付加体18が六付加体19生成の前駆体となることを見出している(スキーム11)<sup>48)</sup>。

#### 4. イオン内包フラレン

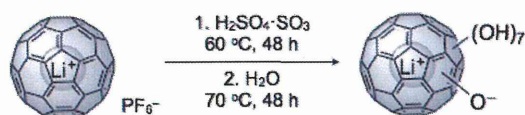
フラレンの「球状構造」は、その分子内部の直径数Å程度の空間へ、原子やイオン、水などの小分子を導入できる点でも極めて特異的である。我々は、最近開発されたリチウムイオン内包フラレン[Li<sup>+</sup>@C<sub>60</sub>](X<sup>-</sup>)に特に注目した<sup>49)</sup>。この内包フラレンは、他の超原子型と呼ばれる金属内包フラレンとは異なり、そのカウンターアニオン(X<sup>-</sup>)がケージ外部に存在している。リチウムイオンの内包により、LUMO準位は空のフラレンと比較して0.7 eV程度深く、電子受容性はより顕著なものとなっている<sup>49)</sup>。また、一般的な金属内包フラレンは内包金属からの電子移動のためケージ自身がアニオンであるのに対し<sup>50)</sup>、リチウムイオン内包フラレンのケージは電気的に中性である。

以下に、リチウムイオン内包フラレンの新規誘導体化、反応特異性およびイオン伝導度について紹介する。

##### 4.1 リチウムイオン内包水酸化フラレン

優れた抗酸化能を発現するナノメディシンとしての応用を目指し、親水的なリチウムイオン内包水酸化フラレンの合成を試みた(スキーム12)<sup>51)</sup>。

本反応の第1段階は、発煙硫酸中に平衡として存在するH<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub>による電子酸化反応である。この反応中間体



Scheme 12 Synthesis of Li<sup>+</sup>-encapsulated fullerene.

Scheme 10 Synthesis of spiro-acetylated [60]fullerenes.

### 3.6 還元的アルキル化反応

立体選択的な反応例の最後に、球状分子フラレンならではの超特異的な反応を紹介する。Chiangらは、ナトリウムナフタレナイドを用いてC<sub>60</sub>を還元し、生じたフラレンアニオン種と2-ブromo-2-メチルマロン酸エステルを反応させ、6つの炭素-炭素結合形成を一気に、しかも完全に決まった位置に選択的に6つの置換基を導入することに成功している(スキーム11)<sup>47)</sup>。この誘導体19は、フラレンの北半球部分に3つ、南半球部分に3つの置換基がD<sub>3d</sub>対称に導入されており、そのため、ちょうど赤道のベルト部分にtrans-アヌレン([18]トラヌレン)と呼ばれるall-transの共役ポリエチン構造を有している。ヒュッケル則により芳香族性が示唆されるこの特殊な環状π共役構造により、この誘導体は固体でも液体でも緑色をしており、他のフラレン誘導体(C<sub>60</sub>は黒、置換基の導入数により、赤から黄色、白色へと変化する)とは全く異なった性質を示す。さらに、近赤外領域の850 nmに強い吸収があり、二光子励起材料として光線力学療法などへの応用が期待されている。

我々は、Chiangらと共同でこの誘導体の反応機構に

の紫外可視近赤外吸収スペクトルを比較したところ、空のフラーレンからは多価のカチオン種が、リチウムイオン内包フラーレンからは一価のラジカルカチオン種がそれぞれ生じていた。これは、リチウムイオン内包フラーレンの HOMO 準位のほうが 0.7 eV 深いため、 $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_7$  の酸化力では多段階酸化を受けなかったものと解釈できる。興味深いことに、この反応経路の相違により生成物の異性体分布に劇的な変化がもたらされ、空のフラーレンでは付加位置の異なる多数の異性体混合物が得られるのに対し、リチウムイオン内包フラーレンを用いた反応では主生成物がおよそ 70% の選択性で主に 3 種類となる異性体混合物を与えた。

分析の結果、生成物中には出発物質に含まれた  $\text{PF}_6^-$  は見られず、8 つの水酸基の 1 つがカウンターアニオンとなる構造が示唆された。得られたリチウムイオン内包水酸化フラーレンは DMSO や DMF といった極性溶媒に対して高い溶解度を示し、粒径分布測定より、分子レベルで単分散していることがわかった。

#### 4.2 Diels-Alder 反応

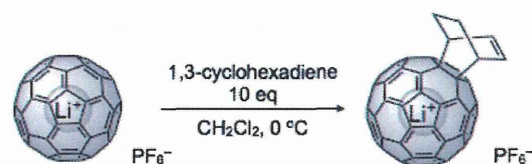
続いて、Diels-Alder (DA) 反応によるリチウムイオン内包フラーレン誘導体の合成と、内包リチウムイオンによる反応性の変化の定量的な評価を試みた<sup>52)</sup>。一般的に DA 反応は、ジエンの HOMO 準位とジエノフィルの LUMO 準位のエネルギー差が小さな系において、その反応の進行が有利である。前述のように、リチウムイオン内包フラーレンの深い LUMO 準位は、DA 反応に対して極めて高い反応性を示すと考えられる。また、リチウムイオン内包フラーレンの  $\text{C}_{60}$  ケージは空のフラーレンと同じ大きさであり、さらにリチウムイオンはケージ内部に存在するため、立体障害を無視して電子的な効果だけで反応性の比較ができる優れた系である。

まず、リチウムイオン内包フラーレンとシクロヘキサジエンとの DA 反応生成物をスキーム 13 に従って合成・単離し、その構造解析を行ったところ、空のフラーレンを用いた場合と同様、フラーレンケージの [6,6] 結合部位で環化付加した生成物であることが単結晶 X 線構造解析により確認された(図 7)。

次に、この反応のシクロヘキサジエン過剰の擬一次条件において、反応速度測定を行った。予想どおり、リチウムイオン内包フラーレンの反応は極めて速く、同温度での反応速度の比較が困難であったため、空のフラーレンに対して 80~100 °C、リチウムイオン内包フラーレンに対し -20~0 °C において二次速度定数  $k_2$  をそれぞれ求めた(表 1)。

アレニウスプロットの外挿から算出した同温度(303 K)における反応速度定数を比較すると、リチウムイオン内包フラーレンの反応はおよそ 2,400 倍の速度で進行

していることがわかった。参考まで、これまでに報告されているリチウムイオンによる DA 反応の加速効果は数倍程度である<sup>53)</sup>。この著しい反応加速効果は M06-2X/6-31G(d) を用いた理論計算によっても支持され、活性化エネルギーの値は実験値と非常によい一致が見られた(図 8)。



Scheme 13 DA reaction of  $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$  with 1,3-cyclohexadiene.

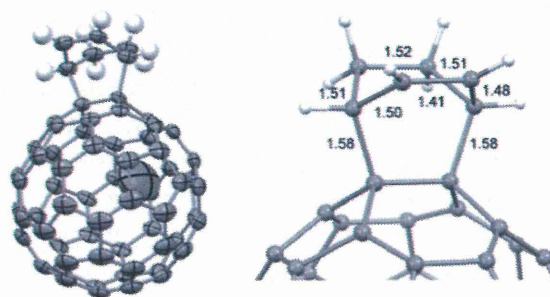


Fig. 7 Crystal structure of  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}(\text{C}_6\text{H}_8)$  cation.

Table 1 Second order rate constants in the DA reaction of  $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$  and empty  $\text{C}_{60}$  with 1,3-cyclohexadiene.

$[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$		empty $\text{C}_{60}$	
Temp. / K	$10^5 k_2 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Temp. / K	$10^5 k_2 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
253	1344	353	1187
263	3129	363	2167
273	6714	373	4302
303	52300 <sup>a)</sup>	303	21.3 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Estimated by extrapolation in Arrhenius plot.

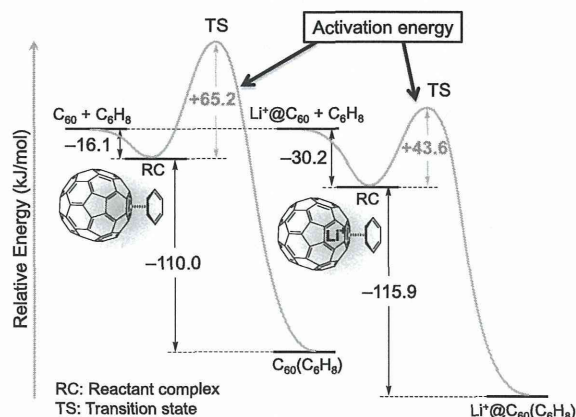


Fig. 8 Energy profiles for the DA reaction of empty  $\text{C}_{60}$  (left) and  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$  (right) with  $\text{C}_6\text{H}_8$  calculated by DFT (M06-2X/6-31G(d)).

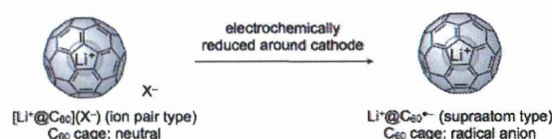
我々の実験では、立体障害の相違や、ルイス酸(リチウムイオン)とジエノフィルとの錯形成定数を考慮する必要がなく、リチウムイオンがもたらす電子的な反応加速効果のみを直接評価できる。さらに、一般的にルイス酸触媒は基質中に配位サイトとなるヘテロ元素が必要であるが、本反応では、触媒が反応サイト近傍に空間的に固定されれば結合しなくとも反応が加速される“分子内封入触媒効果”という新しい触媒設計指針を示すことができた。

### 4.3 リチウム内包フラーレンラジカルアニオン

前述のように、リチウムイオン内包フラーレンは一般的な金属内包フラーレンと異なり、塩化ナトリウムのような通常のイオンペアとしての性質をもつ“金属イオン”内包フラーレンである。このイオンとしての性質は、他の内包フラーレンにはない極めて興味深い性質の1つであるが、この特性に関する知見はほとんど知られていなかった。我々は、リチウムイオン内包フラーレンはどのようなイオンであるかを明らかにするため、有機溶媒中におけるリチウムイオン内包フラーレンヘキサフルオロホスファート塩 $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$ およびピストリフルオロメタンスルフォニルイミド塩 $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{NTf}_2^-)$ のイオン伝導度測定を行った。その結果、リチウムイオン内包フラーレンが有機溶媒中で弱電解質として振る舞うこと、また、有機溶媒に対する汎用支持電解質であるテトラブチルアンモニウムヘキサフルオロホスファート( $\text{TBA}^+\text{PF}_6^-$ )よりも高いイオン伝導度を示すことを明らかにした(表2)<sup>54)</sup>。これは、内包カチオンとそのカウンターアニオンがフラーレンケージによって距離が隔られていることに加え、リチウムイオンの正電荷がフラー

レンケージ上に非局在化されているためと考えられる。

次に、このイオンを支持電解質として用いる電気化学的なプロセスへの応用として、超原子型リチウム内包フラーレン(リチウムイオン内包フラーレンラジカルアニオン $\text{Li}^+\text{@C}_{60}^-$ )の電解合成について検討を行った。本電解プロセスでは、原料が支持電解質としての機能を補うため、原料溶液に電圧をかけるだけという極めてシンプルに電気化学的分子変換を行うことができる利点がある(スキーム14)。



Scheme 14 Electrochemical conversion of  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$  to  $\text{Li@C}_{60}$  supraatom.

原料のリチウムイオン内包フラーレンヘキサフルオロホスファート塩 $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$ を $o$ -ジクロロベンゼン中で電解すると、反応開始数時間後から陰極側の溶液の色が徐々に変化し、この溶液の吸収スペクトルを測定したところ、1,035 nmに原料には見られない新たな吸収が見られた。これは一価のフラーレンラジカルアニオンに帰属され、ESRスペクトルにおいても同化学種に由来するシグナルが得られた<sup>55)</sup>。しかしながら、NMRスペクトルより原料である $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$ が残存していることが確認され、分離を試みたものの汎用精製手法では効果的な単離が不可能であった。一方、汎用有機溶媒に対する溶解性の高いピストリフルオロメチルスルホニルイミド塩 $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{NTf}_2^-)$ を原料に用い、溶媒をジクロロメタンへと変更して電解合成を行うと、陰極上に黒色固体が析出した。この固体を回収して $o$ -ジクロロベンゼンに溶解させ、同様にキャラクタリゼーションを行ったところ、純度の高い超原子型リチウム内包フラーレン $\text{Li}^+\text{@C}_{60}^-$ が得られていることがわかった。生成物は $\text{PF}_6^-$ 塩を用いた場合に得られる化合物と同様と考えられるが、電解生成物のジクロロメタンに対する溶解度が極めて低いため、容易に単離することに成功した。現在、さらなる物性や反応について調査中である。

### おわりに

本稿では、「球面反応場」をキーワードに、平面分子には見られない、フラーレンケージ上で起こる特異な反応例や反応性の違いについて、我々の研究を中心に紹介した。近年、 $\pi$ 共役化合物を扱う有機合成は、スマネンやCPPといった歪んだ $\pi$ 共役平面を有する分子を創りだすことが増えているため、フラーレンで得られた知見

Table 2 Ionic conductivities of  $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$ ,  $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{NTf}_2^-)$ , and  $\text{TBA}^+\text{PF}_6^-$  measured in  $o$ -DCB at 298 K.

$c / \mu\text{M}$	$\kappa / \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\Lambda / \text{mS}\cdot\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$
$[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$		
1.6	0.006	3.75
8	0.023	2.88
40	0.107	2.68
200	0.466	2.33
$[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{NTf}_2^-)$		
1.6	0.005 (0.010) <sup>a)</sup>	3.13 (6.25) <sup>a)</sup>
8	0.022 (0.048) <sup>a)</sup>	2.75 (6.00) <sup>a)</sup>
40	0.106 (0.235) <sup>a)</sup>	2.65 (5.88) <sup>a)</sup>
200	0.480 (1.000) <sup>a)</sup>	2.40 (5.00) <sup>a)</sup>
$\text{TBA}^+\text{PF}_6^-$		
1.6	0.005	3.13
8	0.22	2.75
40	0.078	1.95
200	0.238	1.19
empty $\text{C}_{60}$		
any	0	0

<sup>a)</sup> Values in parentheses are measured in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  at 298 K.

を、新たな分子創製にも役立てることができれば幸いです。

謝 辞 本稿で紹介した研究は、大阪大学大学院工学研究科の大島巧名誉教授のご指導・ご助言を受けながら、多くの学生諸氏ならびに学内外の共同研究者の方々の多大なる貢献によって蓄積されたものであり、心より感謝申し上げます。また、日本学術振興会、NEDO、厚生労働省、科学技術振興機構の研究助成により遂行されたものであり、厚く御礼申し上げます。

(2014年8月21日受理)

## 文 献

- (a) H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature*, **318**, 162(1985); (b) W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, D. R. Huffman, *Nature*, **347**, 354(1990)
- (a) A. Hirsh, M. Brettreich, *Fullerenes, Chemistry and Reactions*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005; (b) 松尾豊(監修), “フラーレン誘導体・内包技術の最前線”, シーエムシー出版, 2014
- S. Iijima, *Nature*, **354**, 56(1991)
- S. Iijima, M. Yudasaka, R. Yamada, S. Bandow, K. Suenaga, F. Kokai, K. Takahashi, *Chem. Phys. Lett.*, **309**, 165(1999)
- H. Sakurai, T. Daiko, T. Hirao, *Science*, **301**, 1878(2003)
- (a) [9]CPP: R. Jasti, J. Bhattacharjee, J. B. Neaton, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 17646(2008); (b) [12]CPP: H. Takaba, H. Omachi, Y. Yamamoto, J. Bouffard, K. Itami, *Angew. Chem.*, **121**, 6228(2009); (c) [8]CPP: S. Yamago, Y. Watanabe, T. Iwamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 757(2010); (d) [5]CPP: P. J. Evans, E. R. Darzi, R. Jasti, *Nature Chem.*, **6**, 404(2014)
- L. T. Scott, M. M. Boorum, B. J. McMahon, S. Hagen, J. Mack, J. Blank, H. Wegner, A. de Meijere, *Science*, **295**, 1500(2002)
- 本誌総説: (a) T. Kitagawa, *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, **61**, 797(2003); (b) Y. Matsuo, E. Nakamura, *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, **65**, 44(2007)
- R. C. Haddon, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1797(1997)
- 小久保研, 生産と技術, **65**, 76(2013)
- Q. Xie, E. Pérez-Cordero, L. Echegoyen, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3978(1992)
- (a) M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9798(1993); (b) C. Bingel, *Chem. Ber.*, **126**, 1957(1993)
- (a) J. Peet, A. J. Heeger, G. C. Bazan, *Acc. Chem. Res.*, **42**, 1700(2009); (b) 松尾豊, “有機薄膜太陽電池の科学”, 化学同人, 2011
- (a) A. Balch, D. A. Costa, B. C. Noll, M. M. Olmstead, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 8926(1995); (b) Y. Tajima, K. Takeuchi, *J. Org. Chem.*, **67**, 1696(2002)
- G. A. Olah, I. Bucsi, C. Lambert, R. Aniszfeld, N. J. Trivedi, D. K. Sensharma, G. K. S. Prakash, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9387(1991)
- (a) J. Li, A. Takeuchi, M. Ozawa, X. Li, K. Saigo, K. Kitazawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1784; (b) L. Y. Chiang, L.-Y. Wang, J. W. Swirczewski, S. Soled, S. Cameron, *J. Org. Chem.*, **59**, 3960(1994); (c) L. O. Husebo, B. Sitharaman, K. Furukawa, T. Kato, L. J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12055(2004); (d) S. Wang, P. He, J.-M. Zhang, H. Jiang, S.-Z. Zhu, *Synth. Commun.*, **35**, 1803(2005)
- K. Kokubo, K. Matsubayashi, H. Tategaki, H. Takada, T. Oshima, *ACS Nano*, **2**, 327(2008)
- K. Matsubayashi, K. Kokubo, H. Tategaki, S. Kawahama, T. Oshima, *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.*, **17**, 440(2009)
- K. Kokubo, S. Shirakawa, N. Kobayashi, H. Aoshima, T. Oshima, *Nano Res.*, **4**, 204(2011)
- Y. Nakamura, H. Ueno, K. Kokubo, N. Ikuma, T. Oshima, *J. Nanoparticle Res.*, **15**(6), 1755(2013)
- Y. Wada, S. Totoki, M. Watanabe, N. Moriya, Y. Tsunazawa, H. Shimaoka, *Opt. Express*, **14**, 5755(2006)
- Y. Takaya, H. Tachika, T. Hayashi, K. Kokubo, K. Suzuki, *CIRP Ann.-Manuf. Techn.*, **58**, 495(2009)
- (a) 田近英之, 高谷裕浩, 林照剛, 田名田祐樹, 小久保研, 鈴木恵友, 精密工学会誌, **75**, 489(2009); (b) Y. Takaya, H. Kishida, T. Hayashi, M. Michihata, K. Kokubo, *CIRP Ann.-Manuf. Techn.*, **60**, 495(2011)
- (a) E. Nakamura, H. Isobe, *Acc. Chem. Res.*, **36**, 807(2003); (b) M. D. Tzirakis, M. Orfanopoulos, *Chem. Rev.*, **113**, 5262(2013)
- (a) H. Takada, K. Kokubo, K. Matsubayashi, T. Oshima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 3088(2006); (b) K. Matsubayashi, T. Goto, K. Togaya, K. Kokubo, T. Oshima, *Nanoscale Res. Lett.*, **3**, 237(2008)
- (a) Y. Saitoh, L. Xiao, H. Mizuno, S. Kato, H. Aoshima, H. Taira, K. Kokubo, N. Miwa, *Free Radic. Res.*, **44**, 1072(2010); (b) Y. Saitoh, A. Miyanishi, H. Mizuno, S. Kato, H. Aoshima, K. Kokubo, N. Miwa, *J. Photoch. Photobiol. B*, **102**, 69(2011); (c) Y. Saitoh, H. Mizuno, L. Xiao, S. Hyoudou, K. Kokubo, N. Miwa, *Mol. Cell. Biochem.*, **366**, 191(2012); (d) H. Ueno, S. Yamakura, R. S. Arastoo, T. Oshima, K. Kokubo, *J. Nanomater.*, **2014**, 802596(2014)
- (a) H. Aoshima, K. Kokubo, S. Shirakawa, M. Ito, S. Yamana, T. Oshima, *Biocontrol Sci.*, **14**, 69(2009); (b) S. Inui, H. Aoshima, M. Ito, K. Kokubo, S. Itami, *J. Cosmet. Sci.*, **63**, 259(2012)
- M. Sawamura, H. Iikura, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 12850(1996)
- E. Nakamura, K. Tahara, Y. Matsuo, M. Sawamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2834(2003)
- A. Iwashita, Y. Matsuo, E. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 3513(2007)
- M. Hashiguchi, K. Watanabe, Y. Matsuo, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 6417(2011)
- (a) Unpublished work applied for patents; 小久保研 他, 特開2009-286761; 特開2012-162506; (b) K. Kokubo, R. Takahashi, M. Kato, A. Harada, T. Noguchi, T. Oshima, *Polym. Compos.*, in press(2014)
- T. Mikie, H. Asahara, K. Nagao, N. Ikuma, K. Kokubo, T. Oshima, *Org. Lett.*, **13**, 4244(2011)
- X. Gao, S. Ma, L. Guo, D. Zhang, S. Wu, H. Wu, Y. Li, *Chem. Lett.*, **1999**, 671
- N. Ikuma, H. Yamamoto, K. Kokubo, T. Oshima, *Chem. Lett.*, in press
- B. R. Weedon, R. C. Haddon, H. P. Spielmann, M. S. Meier, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 335(1999)
- N. Ikuma, Y. Susami, T. Oshima, *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 1394(2010)
- N. Ikuma, Y. Susami, T. Oshima, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 6452
- N. Ikuma, S. Sumioka, H. Asahara, T. Oshima, *Tetrahedron Lett.*, **53**, 3581(2012)
- (a) W. Wirschum, J. C. Jochims, *Synthesis*, **1997**, 233; (b) J. Bouffard, B. K. Keitz, R. Tonner, G. Guisado-Barrios, G. Frenking, R. H. Grubbs, G. Bertrand, *Organometallics*, **30**, 2617(2011)
- N. Ikuma, S. Inaba, K. Kokubo, T. Oshima, *Chem. Commun.*, **50**, 581(2014)
- K. Kokubo, S. Tochika, M. Kato, Y. Sol, T. Oshima, *Org. Lett.*, **10**, 3335(2008)
- Y. Tajima, K. Takeshi, Y. Shigemitsu, Y. Numata, *Molecules*,

- 17, 6395(2012)
- 44) M. Nambo, Y. Segawa, K. Itami, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2402 (2011)
- 45) Y.-Z. An, J. L. Anderson, Y. Rubin, *J. Org. Chem.*, **58**, 4799 (1993)
- 46) K. Kokubo, H. Masuda, N. Ikuma, T. Mikie, T. Oshima, *Tetrahedron Lett.*, **54**, 3510(2013)
- 47) T. Canteenwara, P. A. Padmawar, L. Y. Chiang, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 26(2005)
- 48) K. Kokubo, R. S. Arastoo, T. Oshima, C.-C. Wang, Y. Gao, H.-L. Wang, H. Geng, L. Y. Chiang, *J. Org. Chem.*, **75**, 4574(2010)
- 49) S. Aoyagi, E. Nishibori, H. Sawa, K. Sugimoto, M. Takata, Y. Miyata, R. Kitaura, H. Shinohara, H. Okada, T. Sakai, Y. Ono, K. Kawachi, K. Yokoo, S. Ono, K. Omote, Y. Kasama, S. Ishikawa, T. Komuro, H. Tobita, *Nat. Chem.*, **2**, 678(2010)
- 50) (a) R. D. Johnson, M. S. Vries, J. Salem, D. S. Bethune, C. S. Yannoni, *Nature*, **355**, 239(1992); (b) S. Nagase, K. Kobayashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1837
- 51) (a) H. Ueno, Y. Nakamura, N. Ikuma, K. Kokubo, T. Oshima, *Nano. Res.*, **5**, 558(2012); (b) H. Ueno, K. Kokubo, E. Kwon, Y. Nakamura, N. Ikuma, T. Oshima, *Nanoscale*, **5**, 2317(2013)
- 52) H. Ueno, H. Kawakami, K. Nakagawa, H. Okada, N. Ikuma, S. Aoyagi, K. Kokubo, Y. Matsuo, T. Oshima, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 11162(2014)
- 53) (a) M. A. Forman, W. P. Dailey, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2761 (1991); (b) A. Tsuda, T. Oshima, *New J. Chem.*, **1998**, 1027
- 54) H. Ueno, K. Kokubo, Y. Nakamura, K. Ohkubo, N. Ikuma, H. Moriyama, S. Fukuzumi, T. Oshima, *Chem. Commun.*, **49**, 7376 (2013)
- 55) (a) S. Fukuzumi, K. Ohkubo, Y. Kawashima, D. S. Kim, J. S. Park, A. Jana, V. M. Lynch, D. Kim, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 15938(2011); (b) K. Ohkubo, Y. Kawashima, S. Fukuzumi, *Chem. Commun.*, **48**, 4314(2012)

PROFILE



上野 裕 名古屋大学大学院理学研究科 JST-ERATO 伊丹分子ナノカーボンプロジェクト・博士研究員 博士(工学)  
 [経歴] 2011年東邦大学大学院理学研究科修士課程修了, 2014年大阪大学大学院工学研究科博士課程修了, 同年より現職。2014年フラーレン・ナノチューブ・グラフェン学会若手奨励賞。[専門] ナノ材料化学, 物理有機化学。[連絡先] e-mail: ueno.hiroshi@j.mbox.nagoya-u.ac.jp

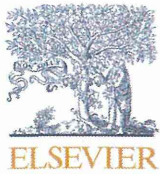


伊熊直彦 大阪大学大学院工学研究科・助教 博士(地球環境学)  
 [経歴] 2006年京都大学大学院地球環境学舎博士課程修了, 同年クイーンズ大学博士研究員, 2007年東北大学工学研究科博士研究員, 2008年より現職。[専門] 反応有機化学, 有機材料化学。[連絡先] e-mail: ikuma@chem.eng.osaka-u.ac.jp



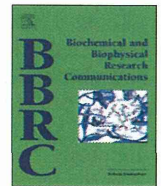
小久保 研 大阪大学大学院工学研究科・准教授 博士(工学)  
 [経歴] 1998年大阪大学大学院工学研究科博士課程修了, 同年大阪大学大学院工学研究科助手, 2007年同講師, 2008-09年米国マサチューセッツ大学客員准教授, 2014年より現職。2010年精密工学会沼田記念論文賞, 2011年 ASPEN President Excellent Award, 2012年フラーレン・ナノチューブ・グラフェン学会大澤奨励賞。[専門] 有機合成化学, 有機ナノ材料化学, 有機光化学。[連絡先] e-mail: kokubo@chem.eng.osaka-u.ac.jp





Contents lists available at ScienceDirect

## Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

# Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma



Tadashi Watanabe<sup>a</sup>, Shigeo Nakamura<sup>b</sup>, Toshiya Ono<sup>c</sup>, Sadaharu Ui<sup>c</sup>, Syota Yagi<sup>a</sup>, Hiroki Kagawa<sup>a</sup>, Hisami Watanabe<sup>d</sup>, Tomoyuki Ohe<sup>e</sup>, Tadahiko Mashino<sup>e</sup>, Masahiro Fujimuro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi-Shichoncho 1, Yamashinaku, Kyoto 607-8412, Japan

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Nippon Medical School, 1-7-1 Kyonan-cho, Musashino, Tokyo 180-0023, Japan

<sup>c</sup> Department of Biotechnology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Kofu 400-8511, Japan

<sup>d</sup> Center of Molecular Biosciences, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara-cho, Okinawa 903-0213, Japan

<sup>e</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 July 2014

Available online 22 July 2014

## Keywords:

Fullerene

PEL

Caspase-9

KSHV

Akt

Apoptosis

## ABSTRACT

Primary effusion lymphoma (PEL) is a subtype of non-Hodgkin's B-cell lymphoma and is an aggressive neoplasm caused by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in immunosuppressed patients. In general, PEL cells are derived from post-germinal center B-cells and are infected with KSHV. To evaluate potential novel anti-tumor compounds against KSHV-associated PEL, seven water-soluble fullerene derivatives were evaluated as potential drug candidates for the treatment of PEL. Herein, we discovered a pyrrolidinium fullerene derivative, 1,1,1',1'-tetramethyl [60]fullerenodipyrrolidinium diiodide, which induced apoptosis of PEL cells via a novel mechanism, the caspase-9 activation by suppressing the caspase-9 phosphorylation, causing caspase-9 inactivation. Pyrrolidinium fullerene treatment reduced significantly the viability of PEL cells compared with KSHV-uninfected lymphoma cells, and induced the apoptosis of PEL cells by activating caspase-9 via procaspase-9 cleavage. Pyrrolidinium fullerene additionally reduced the Ser473 phosphorylation of Akt and Ser196 of procaspase-9. Ser473-phosphorylated Akt (i.e., activated Akt) phosphorylates Ser196 in procaspase-9, causing inactivation of procaspase-9. We also demonstrated that Akt inhibitors suppressed the proliferation of PEL cells compared with KSHV-uninfected cells. Our data therefore suggest that Akt activation is essential for cell survival in PEL and a pyrrolidinium fullerene derivative induced apoptosis by activating caspase-9 via suppression of Akt in PEL cells. In addition, we evaluated whether pyrrolidinium fullerene in combination with the HSP90 inhibitor (geldanamycin; GA) or valproate, potentiated the cytotoxic effects on PEL cells. Compared to treatment with pyrrolidinium fullerene alone, the addition of low-concentration GA or valproate enhanced the cytotoxic activity of pyrrolidinium fullerene. These results indicate that pyrrolidinium fullerene could be used as a novel therapy for the treatment of PEL.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Primary effusion lymphoma (PEL; also called body cavity-based lymphoma) is classified as a non-Hodgkin's B-cell lymphoma developing in immunocompromised patients, such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients or those who have undergone organ transplantation [1,2]. PEL cells are infected with KSHV (also known as human herpesvirus-8) and often with EBV.

KSHV is the causative herpesvirus of Kaposi's sarcoma, PEL and multicentric Castleman's disease [3]. During a latent infection, the KSHV genome circularizes to form a double-stranded episome in the nucleus of PEL cells. KSHV establishes a latent infection in PEL cells and expresses several viral molecules, including LANA, vFLIP, vIRF3 and microRNAs. These molecules dysregulate p53, Wnt, NF- $\kappa$ B, Akt, Erk and interferon signaling to maintain the malignant phenotype and to ensure PEL cell survival, proliferation and immune escape [4–6]. Specifically, KSHV activates Akt signaling, allowing the survival of infected cells and the protection of infected cells from apoptosis [7]. PI3K-PDK1 and mTOR complex2 (mTORC2) induce Akt phosphorylation leading to Akt activation, which facilitates cell survival and anti-apoptosis by inhibiting

**Abbreviations:** KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; HHV-8, human herpes virus-8; PEL, primary effusion lymphoma.

\* Corresponding author. Fax: +81 75 595 4793.

E-mail address: [fujii2@mb.kyoto-phu.ac.jp](mailto:fujii2@mb.kyoto-phu.ac.jp) (M. Fujimuro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.068>

0006-291X/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

GSK-3 $\beta$ , forkhead transcription factors (FoxO), Bad and procaspase-9 [8]. In particular, activated Akt, (Akt phosphorylated at Ser473) can phosphorylate Ser196 of procaspase-9, resulting in suppression of procaspase-9 activation by proteolytic cleavage of procaspase-9 [9,10]. Regarding the cascade of caspase-9-mediated apoptosis, apoptotic stimuli—including DNA damage and mitochondrial disorder—induce the release of cytochrome *c* from mitochondria into the cytosol, where cytochrome *c* interacts with Apaf-1, inducing binding to procaspase-9, resulting in proteolytic cleavage and activation of procaspase-9 [9]. However, Akt inhibits processing and activation of procaspase-9 via Akt-mediated phosphorylation of Ser196-procaspase-9 [10]. Thus, Akt signaling inhibits the caspase cascade at caspase-9 and is essential for the survival of KSHV-infected PEL cells.

The fullerene C<sub>60</sub>, originally named buckminsterfullerene C<sub>60</sub>, is a unique spherical carbon molecule [11]. Since fullerene is poorly soluble in aqueous media, many water-soluble fullerene derivatives have been developed by incorporation of hydrophilic groups into the C<sub>60</sub> core. Interestingly, addition of hydrophilic groups confers upon fullerene biological activities and may facilitate its use in biomedical applications [12] such as gene and drug delivery [13], DNA photocleaving [14], extinction of reactive oxygen species (ROS) [15], generation of ROS [16], and anti-viral activity by inhibiting viral enzymes: HIV-1 protease [17], HIV reverse transcriptase [18], hepatitis C virus RNA polymerase [18] and influenza virus endonuclease [19].

Regarding the pharmacological properties of fullerenes, water-soluble fullerene derivatives could be novel compounds used with molecular target drugs for the treatment of PEL. The anti-cancer effect of water-soluble fullerenes against PEL remains unknown; therefore, we investigated whether seven water-soluble fullerene derivatives could kill PEL cells. In this study, we screened the seven fullerene derivatives (Supplemental Fig. S1) developed by Mashino et al. [15,16,18,19].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Agents and preparation of fullerene derivatives

Akt inhibitor (1L6-hydroxymethyl-chiro-inositol-2-[R]-2-O-methyl-3-O-octadecyl-*sn*-glycerocarbonate), MEK inhibitor (U0126) and geldanamycin (GA) were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). Fullerene derivatives were synthesized and purified according to methods reported previously with small modifications [15,16,18,19]. All of the fullerene derivatives were dissolved in DMSO to 10 mM as stock solutions.

### 2.2. Cell lines and cell viability assay

PEL cells and KSHV-negative B-lymphoma cells were maintained in RPMI 1640 with 10% FCS. Cells were seeded in 96-well plates at  $1 \times 10^4$ /well in 100  $\mu$ L of medium with or without a fullerene derivative at various concentrations and incubated for 24 h. Cell viability was estimated using a Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) [20]. The optical density at 450 nm of each sample was measured using a microplate spectrophotometer (Tecan M200; Tecan, Kanagawa, Japan) and expressed as a percentage of the value of untreated cells (defined as 1.0).

### 2.3. Western blot analysis and antibodies

Western blot analysis and immunofluorescence (IF) were performed as described previously [21]. The primary antibodies, anti-Thr308phospho-Akt (558316), -Thr202/Tyr204phospho-Erk1/2 (612359), -Erk2 (610104) and - $\kappa$ B $\alpha$  (610691), were

purchased from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). Anti-Ser473phospho-Akt (#9271), -Akt (#9272), -caspase-3 (#9662), -caspase-8 (#9746) and -caspase-9 (#9502) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti- $\beta$ -Actin (sc-69879), -p53 (sc-126) and -Ser196phospho-caspase-9 (sc-11755) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

### 2.4. Microscopy

For differential interference contrast (DIC) microscopy, cells were fixed in 4% p-formaldehyde for 30 min and incubated with Hoechst 33342 for 10 min. DIC images were obtained using an inverted microscope (Olympus IX-71; Olympus, Tokyo, Japan). For IF images, cells treated with derivative-2 were fixed with 4% p-formaldehyde and were subsequently fixed with cold methanol. Fixed cells were incubated with an anti-Ser196phospho-procaspase-9 antibody and then incubated with an Alexa594-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Fluorescence images were obtained using an inverted confocal microscopy system (Nikon A1R+; Nikon, Tokyo, Japan).

### 2.5. Caspase assay

Cells ( $4 \times 10^5$ ) were incubated with 25  $\mu$ M derivative-2 for 12 h and the activities of caspase-3/7, -8 and -9 in cell lysates were measured using the Caspase-Glo assay kit according to the manufacturer's protocols (Promega, Madison, WI, USA) [20]. Luminescence was measured using a luminescence microplate reader (Tecan M200). The caspase activities of untreated cells were defined as 1.0 relative light unit.

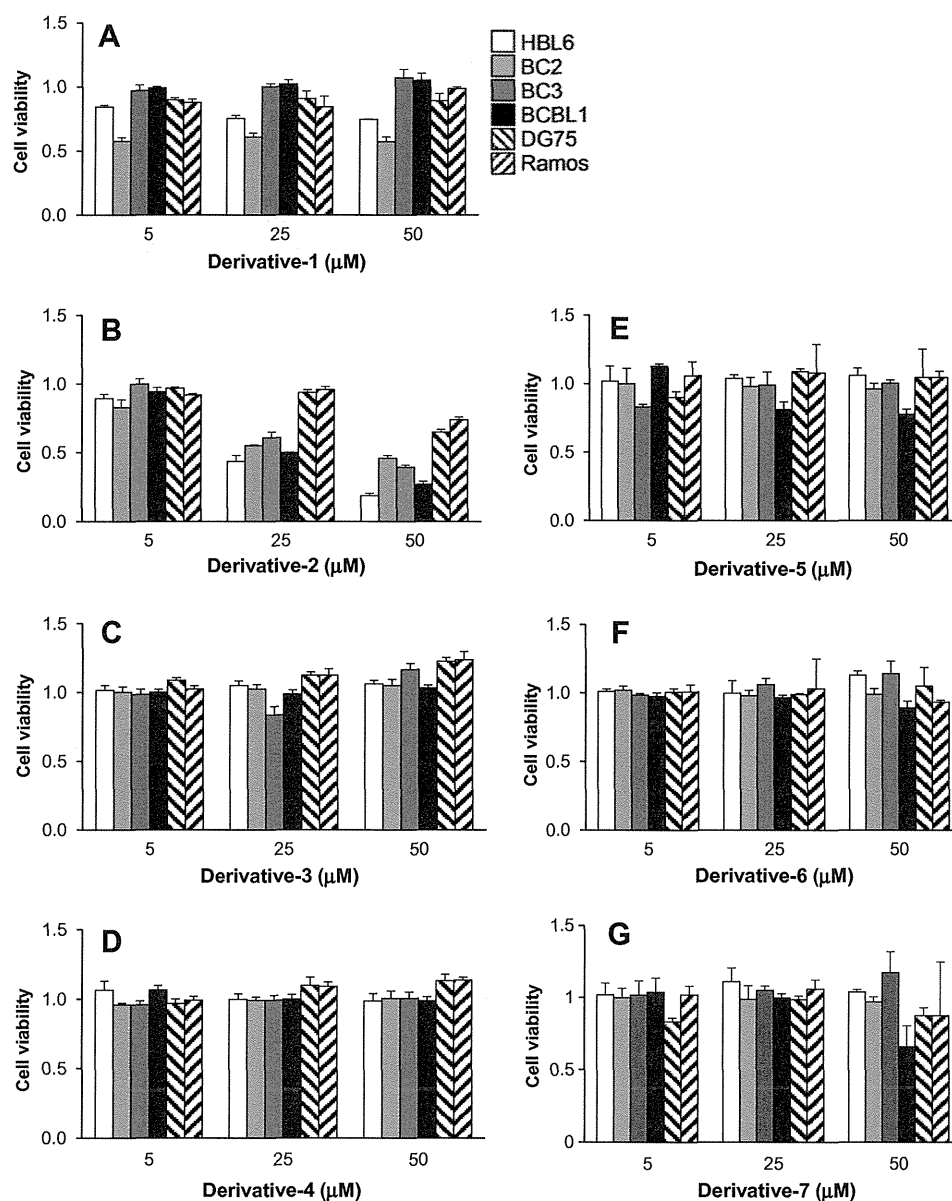
### 2.6. Quantification of KSHV virions

KSHV virions in medium were quantified as previously described [22]. BCBL1 cells ( $2 \times 10^5$ ) were treated with 1.5 mM *n*-butyrate and 25  $\mu$ M derivative-2 for 24 h and then the culture media were collected. To obtain only enveloped and encapsulated viral genomes, 300  $\mu$ L of media were incubated with 4 units of DNase-I for 30 min. Viral DNA was purified and extracted from 200  $\mu$ L of DNase-I-treated media. To quantify viral DNA, SYBR green real-time PCR was performed using specific primers amplifying the KSHV ORF50/RTA gene (sense: 5'-TTCGTCGGCCTCTCGGAC-GAAGTGA-3', antisense: 5'-ATAATCCGAATGCACACA TCT TCCACCA C-3').

## 3. Results and discussion

### 3.1. The cytotoxic effects of fullerene derivatives on PEL cells

First, we evaluated the cytotoxic effect of the following seven water-soluble fullerene derivatives: malonic acid (derivative-1) [15], pyrrolidinium (derivative-2) [16,18,19], proline (derivative-3–6) [18] and piperazine (derivative-7) [18] type on PEL cells (Fig. 1A–G). KSHV-infected B-lymphoma PEL cell lines (HBL6, BC2, BC3, and BCBL1) and KSHV-uninfected B-lymphoma cell lines (DG75 and Ramos) were cultured in the presence (or absence) of fullerene derivative for 24 h and viabilities were assessed using a Cell Counting Kit-8. The pyrrolidinium fullerene (derivative-2), 1,1,1',1'-tetramethyl [60]fullerenodipyrrolidinium diiodide (also designated C<sub>60</sub>-bis (*N,N*-dimethylpyrrolidinium iodide)), decreased the viability of PEL cells compared to KSHV-uninfected cells (Fig. 1B). Only derivative-2 prevented the proliferation of PEL cells and the anionic, proline and amino acid fullerene derivatives did not affect cell proliferation of PEL and KSHV-uninfected cell lines.



**Fig. 1.** The cytotoxic effects of fullerene derivatives on PEL and KSHV-uninfected lymphoma cells. KSHV<sup>+</sup> and EBV<sup>+</sup> PEL cells (HBL6 and BC2), KSHV<sup>+</sup> and EBV<sup>-</sup> PEL cells (BC3 and BCBL1 cells) and herpes-uninfected B-lymphoma cells (Ramos and DG75 cells) were incubated for 24 h with various concentrations of the seven water-soluble fullerenes; structures are illustrated in Supplemental Fig. 1. Fullerene derivatives evaluated for cell viability were classified into malonic acid type (derivative-1; Fig. 1A), pyrrolidinium type (derivative-2; Fig. 1B), proline type (derivative-3–6; Fig. 1C–F) or piperazine type (derivative-7; Fig. 1G). The cell-viability values of the respective untreated cells were defined as 1.0. Standard deviations were determined by analyzing the data from three independent experiments and are indicated by the error bars.

The cytotoxic effects of derivative-2 on B-lymphoma cells are summarized in Table 1. The derivative-2 was active against HBL6 and BCBL1 cells with the  $CC_{50}$  values of 18.6 and 25.0  $\mu$ M, respectively, while DG75 and Ramos cells were insensitive to derivative-2 ( $CC_{50} > 50$   $\mu$ M). The  $CC_{50}$  values of other fullerene derivatives are

over 50.0  $\mu$ M. Since derivative-2 showed strong antiproliferative activities against PEL, we focused on the cytotoxic effects of derivative-2 and analyzed the underlying molecular machinery.

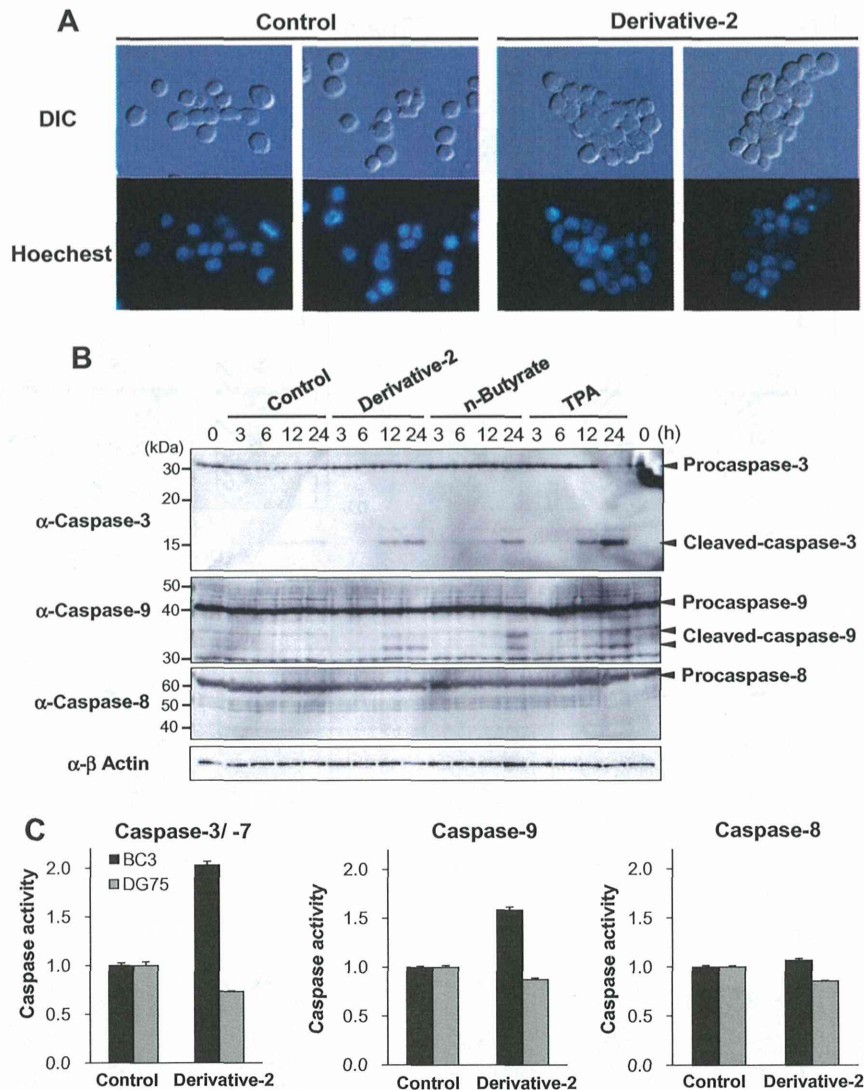
### 3.2. Derivative-2 induces apoptosis of PEL cells by activating caspase-9 via cleavage of procaspase-9

Next we assessed the effects of derivative-2 on PEL cell morphology. Interestingly, treatment with derivative-2 induced cell-cell clumping of BC3 cells (Fig. 2A). The derivative-2 treatment also induced clumps of DG75 cells; however, the DG75 clumps were smaller than those of BC3 cells (data not shown). Because derivative-2 selectively decreased the viability of PEL cells, we investigated whether its cytotoxic effects were due to apoptosis. We

**Table 1**  
Cytotoxic effects of pyrrolidinium fullerene (derivative-2) on B-lymphoma cells.

	HBL6	BC2	BC3	BCBL1	DG75	Ramos
$CC_{50}$ ( $\mu$ M)	18.6	38.9	37.8	25.0	>50	>50

$CC_{50}$ , cytotoxic concentration of pyrrolidinium fullerene that reduces cell viability by 50%.



**Fig. 2.** The pyrrolidinium-type fullerene derivative (derivative-2) induces activation of caspase-9 in PEL cells. (A) Differential interference contrast (DIC) images of cells treated with pyrrolidinium-type fullerene (derivative-2). BC3 cells were cultured with 25  $\mu$ M of derivative-2 or DMSO for 6 h and then incubated with Hoechst 33342 to stain nuclear DNA. DIC images of each cell were obtained using an inverted microscope. (B) Immunoblotting using antibodies against caspase-3, -8 and -9. BC3 cells were cultured with control vehicle (DMSO), 25  $\mu$ M derivative-2, or 1.5 mM *n*-butyrate (or 20 ng/mL TPA) as the positive control for induction of apoptosis. (C) Changes in the proteolytic activities of caspase-3/7, -9 and -8 in PEL cells treated with derivative-2. BC3 cells were incubated with 25  $\mu$ M derivative-2 for 12 h. The caspase activity, represented by relative light units, in untreated cells was defined as 1.0.

monitored the cleavage (i.e., activation) of caspase-3, -9 and -8 in BC3 cells pretreated with derivative-2 and positive controls (*n*-butyrate and TPA). The active large fragment (17 kDa) cleaved from procaspase-3 was detected in BC3 cells treated with derivative-2 (Fig. 2B). Levels of the active caspase-9 subunits (35 and 37 kDa), which are produced by proteolytic processing of procaspase-9 (42 kDa), were also increased in BC3 cells treated with derivative-2. In contrast, cleavage of caspase-8 was not detected. To obtain further evidence of apoptosis induction, we monitored the peptidase activity of caspase-3/7, -9 and -8 in BC3 cells pretreated with derivative-2 using a colorimetric assay (Fig. 2C). Compared to treatment with the DMSO control, treatment with derivative-2 increased caspase-3/7 and -9 activities in BC3 but not DG75 cells.

These results indicate that derivative-2 suppressed the growth of PEL cells by triggering apoptosis, mediated by the activation of procaspase-9 via proteolytic cleavage resulting in activation of executioner caspases such as caspases-3 and -7. Derivative-2

additionally induced cell–cell clumping; however, the mechanism of fullerene-dependent clumping remains unclear. The association between clumping and the antiproliferative effects on PEL cells should be investigated in future studies.

### 3.3. Derivative-2 suppresses Akt signaling and phosphorylation of procaspase-9

Akt [7], Erk [7] and NF- $\kappa$ B [20,23] signaling are activated in PEL and are necessary for the survival and proliferation of PEL cells. Therefore, we investigated whether derivative-2 influenced Akt, Erk and NF- $\kappa$ B signaling. When BC3 cells were treated with derivative-2 for 6 and 12 h, the extent of phosphorylation of Ser473 in Akt (p-Akt) and phosphorylation of Thr202/Tyr204 in Erk1/2 (p-Erk1/2) were decreased compared to treatment with the control vehicle, whereas Ser308 phosphorylation in Akt was unchanged (Fig. 3A and B). The levels of p53 and I $\kappa$ B $\alpha$  protein (an inhibitor