

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13661

研究課題名(和文)メッシュ状細胞膜骨格の金属錯体による機能化

研究課題名(英文)Functionalization of cytoskeletons by metal complexes

研究代表者

越山 友美(Koshiyama, Tomomi)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：30467279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動的な基盤分子である赤血球のメッシュ状細胞膜骨格への部位特異的な金属錯体集積化法の確立を目指した。メッシュ状細胞膜骨格のリシン残基と選択的に反応するNHS基を導入した配位子の大量合成方法の確立、ゴースト赤血球(gRBC)と配位子NHS基との反応条件の最適化、配位子修飾gRBCと金属イオンとの反応によるメッシュ状細胞膜骨格での錯体形成を達成し、gRBCのメッシュ状細胞膜骨格が金属錯体形成の土台として機能することを明らかとした。今後は、金属錯体修飾後のメッシュ状細胞膜骨格の詳細な構造解析と、膜変形に伴う金属錯体の物性変化の評価を進めていく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to modify red blood cell cytoskeletons with metal complexes. We have succeeded in the synthesis of NHS ester derivatives of metal ligands, the optimization of reaction conditions between NHS ester derivatives of metal ligands and ghost Red Blood Cell (gRBC), and the formation of metal complexes on the cytoskeleton of gRBC modified with metal ligands. These results showed that the cytoskeleton of gRBC provided a useful platform for immobilization of metal complexes. Further efforts are in progress to elucidate the detail structure of gRBC cytoskeleton modified with metal complexes, and the physical properties of metal complexes on gRBC cytoskeleton.

研究分野：無機化学

キーワード：細胞膜骨格 赤血球 金属錯体

1. 研究開始当初の背景

「メッシュ状細胞膜骨格」は、細胞膜直下に張り巡らされた二次元網目構造であり、網目の一辺を形成するバネ蛋白質は膜変形に伴い可逆的に伸縮し、かつ金属配位能や化学修飾可能なアミノ酸残基が規則正しく配置した特異な構造体である(図1)。膜変形に伴い二次元網目構造を保ちつつ、バネ蛋白質が収縮状態では70 nm、伸張状態では200 nmの長さで可逆的に伸縮する。このような動的構造体は合成分子によって構築することは困難である。例えば、外部刺激によって構造変化する分子としては、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの刺激応答性高分子が知られているものの、合成高分子の高次構造制御は難しいなどの問題がある。つまり、精密な構造を有するメッシュ状細胞膜骨格は有用な構造体であると考えられるが、細胞生物学の視点からの研究が進められているのみで、金属錯体の配位制御の場として利用する試みは未だに行われていない。一方で、申請者はこれまでに、金属錯体の集積場として認識されていなかったファージ由来の蛋白質集積体や蛋白質結晶、球状の人工脂質二分子膜を用いて、異種金属錯体の精密集積化と反応制御を達成してきた(*Angew* 2011, *Dalton Trans.*, 2013. 他)。つまり、蛋白質と脂質膜からなる「メッシュ状細胞膜骨格」は、金属錯体の集積化と、外部刺激による集積状態や配位構造制御が可能な基盤分子であることが示唆される。「メッシュ状細胞膜骨格」の金属錯体による機能化を達成することで、「金属錯体を固定化した基盤分子の外部刺激による伸縮」と「錯体の集積状態変化」を連動した従来にない錯体物性の制御法を確立できると考えられる。

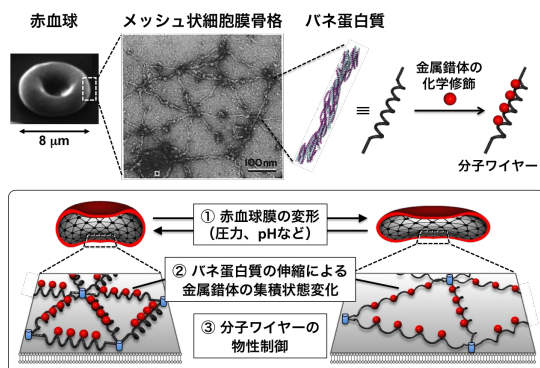


図1. メッシュ状細胞膜骨格への金属錯体の集積化

2. 研究の目的

本研究では、市販の赤血球を「メッシュ状細胞膜骨格」として用い、金属錯体の集積状態に応じて物性が変化する一次元金属錯体である分子ワイヤーの合成を目指す。分子ワイヤーの代表的な作成法として、固体結晶を用いた無限一次元金属錯体の作成、二次元基板表面をテンプレートとした逐次的錯形成法、両親媒性分子やDNAなどの自己組織化分子の集合/解離を利用した超分子的アプローチが挙げられる。近年、分子デバイスへの応用から「外部刺激による分子ワイヤーの物性制御」が注目されているが、従来の手法では、分子ワイヤーを構成する配位子へ外部刺激応答部位を導入するため、煩雑な有機合成を必要とし、加えて設計通りの配列と空間配置を有する分子ワイヤーが組み上がらない場合が多い。一方で、申請者が提案する手法では、配位子に外部刺激応答部位を導入する必要がないため、様々な種類の刺激応答性の分子ワイヤーの構築と物性評価が可能となる。これは従来の超分子的手法とは異なり、「メッシュ状細胞膜骨格」を用いることで初めて実現できる新たな物性制御であると考えられる。そこで、メッシュ状細胞膜骨格のアミノ酸残基への部位特異的な金属錯体修飾による分子ワイヤー作成法の確立に取り組む。

3. 研究の方法

本研究では、市販されているマウス由来の赤血球からヘモグロビン(Hb)等の水溶性内容物を取り除いたゴースト赤血球(ghost Red Blood Cell; gRBC)のメッシュ状赤血球膜骨格を分子ワイヤー作成の基盤分子として用いる。膜骨格を形成するバネ蛋白質(スペクトリン四量体)の単結晶X線構造から、化学修飾可能なリシン(Lys)残基が10~20 Å程度の間隔で配置していることから、NHS基によるLys残基の化学修飾を利用して金属錯体を配列させる(図2(a))。ターゲットとする金属錯体としては、様々な金属との錯形成が可能であり、貝の足系の接着能などに関与するカテコール錯体と、スピנקロスオーバー現象を示すFe(II)トリアゾール錯体とした。膜骨格への金属錯体集積化法の確立を目指し、(1) NHS基を導入した配位子の合成、(2) gRBCと配位子NHS基との反応による膜骨格への

配位子修飾、(3) 配位子修飾 gRBC と金属イオンとの反応によるメッシュ状細胞膜骨上における錯体形成に取り組んだ。

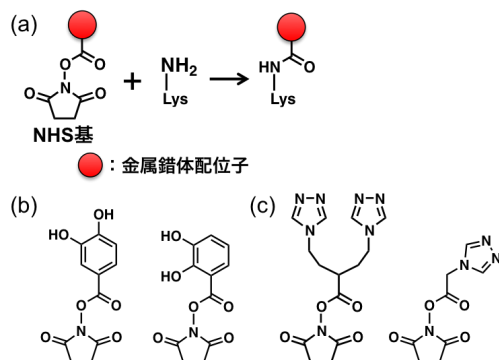


図 2. (a) NHS 基による Lys 残基の修飾 (b) カテコール NHS 基の構造 (c) トリアゾール NHS 基の構造

4. 研究成果

(1) NHS 基を導入した配位子の合成

カテコール NHS 基 (Cat-NHS 基) については、OH 基の置換部位が gRBC のメッシュ状細胞膜骨格上における錯形成反応に影響を及ぼすと考え、図 2(b)に示す OH 基の置換部位の異なる Cat-NHS 基を大量合成し、 $^1\text{H-NMR}$ により同定した。一方、トリアゾール NHS 基 (Trz-NHS 基) については、当初予定していたトリアゾール 2 分子を有する配位子の合成を試みたが (図 2(c)) 様々な合成手順、条件を検討したものの、非常に収率が低い合成ステップを含むことが分かり、トリアゾール 1 分子から成る Trz-NHS 基に変更し、合成経路を決定した。現在、Trz-NHS 基の大量合成を進めている。

(2) gRBC と Cat-NHS 基との反応による膜骨格への配位子修飾

既報の gRBC 作成法に従い、まずは赤血球を低張溶液に懸濁させることで膜に形成する約 20~50 nm の孔からヘモグロビン等を溶血させた。作成した gRBC の UV-vis スペクトルは、270 nm 付近に蛋白質由来の吸収を有し、また顕微鏡観察から球状形状を維持していたことから、膜骨格を保持した gRBC が得られたことを確認した。まず、gRBC と NHS 基の反応により gRBC のどの部分が修飾されるのかを調べるため、蛍光分子であるフルオレセイン分子を修飾した gRBC を作成し、共焦点レーザー顕微鏡による直接観察を行った。反応には

市販のフルオレセイン NHS 基を用い、リン酸バッファー (pH 8) 中で gRBC と 18 °C で 2 時間反応させた後、未反応のフルオレセイン NHS 基は遠心精製により取り除いた。共焦点レーザー顕微鏡より gRBC の内部表面からの蛍光が観察されたことから (図 3)、gRBC 内部の膜骨格が修飾されていることが示唆された。そこで、合成した Cat-NHS 基と gRBC の反応条件 (温度と時間) のスクリーニングを行った。Cat-NHS 基と gRBC をリン酸バッファー (pH 8) 中で反応させ、未反応の Cat-NHS 基は遠心精製により取り除いた後、UV-vis スペクトル測定によりカテコールの修飾を確認した (図 4)。反応時間を 20 時間として、反応温度を 30 °C、12 °C、4 °C で変化させたところ、30 °C で最もカテコールの修飾量が向上した (図 4(a))。また、反応温度を 30 °C として、反応時間を 4 時間と 20 時間で変化させたところ、20 時間の方が修飾率が高いことが分かった (図 4(b))。以上のことから、Cat-NHS 基と gRBC の最適な反応条件は、反応温度 30 °C、反応時間 20 時間とした。この条件で作成したカテコール修飾 gRBC (Cat-gRBC) を共焦点顕微鏡で観察したところ (図 5)、未修飾 gRBC と同等の形状を維持しており、修飾前後で gRBC の崩壊や形状変化が起こらないことが確認され、修飾方法を決定することができた。

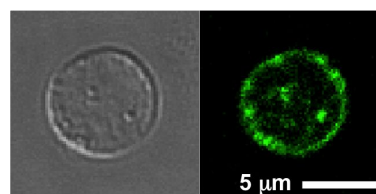


図 3. フルオレセイン修飾 gRBC の共焦点レーザー顕微鏡像、位相差像(左)と蛍光像(右)

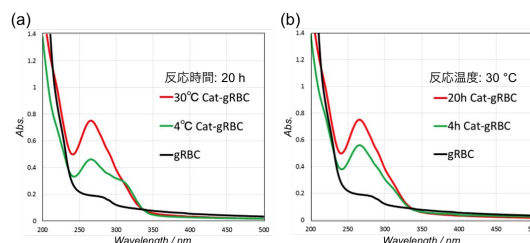


図 4. Cat-gRBC の UV-vis スペクトル、修飾条件: (a) 反応温度 4 °C または 30 °C、反応時間 20 時間、(b) 反応温度 30 °C、反応時間 4 時間 または 20 時間

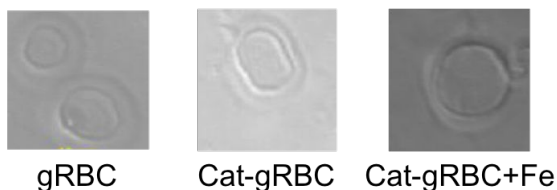


図 5. gRBC、Cat-gRBC、Cat-gRBC+Fe の位相差像

(3) Cat-gRBC と Fe^{3+} イオンとの反応による錯体形成

作成した Cat-gRBC と Fe^{3+} イオンとの錯形成反応を検討した。反応は、Cat-gRBC に $FeCl_3$ 水溶液を添加し、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 20 時間反応させた後、過剰の Fe^{3+} イオンは遠心精製により取り除いた。その結果、白色の gRBC 懸濁液が薄紫色に変化し、鉄カテコール錯体の形成が示唆された。鉄カテコール錯体には、モノ体、ビス体、トリス体があり、吸収スペクトルではモノ体は 700 nm 付近、ビス体は 575 nm 付近、トリス体は 485 nm 付近に吸収があることが報告されている。得られた Cat-gRBC + Fe と Cat-gRBC の UV-vis スペクトルを比較すると (図 6)、Cat-gRBC + Fe では 570 nm 付近に新たな吸収が現れた。加えて、gRBC と Fe^{3+} イオンを反応させた場合は、反応前後で吸収スペクトルに変化はなかった。以上のことから、Cat-gRBC と Fe^{3+} イオンとの反応では、gRBC のメッシュ状細胞膜骨格上に修飾されたカテコール配位子と Fe^{3+} イオンとの錯形成が進行し、ビス体の鉄カテコール錯体が形成することが明らかとなった。

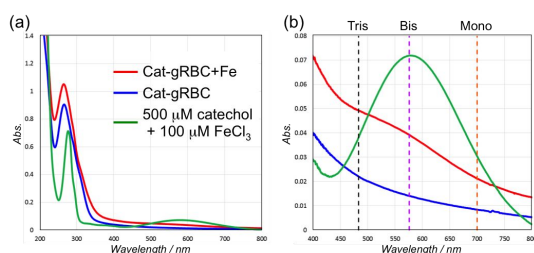


図 6. (a) Cat-gRBC+Fe の UV-vis スペクトル、(b) スペクトル (a) の拡大図

(4) まとめ

今回の研究と通じて、NHS 基を導入した配位子の大量合成方法の確立、gRBC とカテコール NHS 基との反応条件の最適化、カテコール修飾 gRBC と鉄イオンとの反応による鉄カテコール錯体の作成を達成し、gRBC のメッシュ状細胞膜骨格が金属錯体形成の土台とし

て機能することを明らかとした。今後は、金属錯体修飾後のメッシュ状細胞膜骨の詳細な構造解析と、膜変形に伴う金属錯体の物性変化を評価していく。

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 0 件)

[学会発表](計 11 件)

1. 越山友美

「リポソームへの機能性分子の組み込みと機能運動」

分子研研究会「金属錯体の情報制御と機能運動」2017 年 3 月 6-7 日 (岡崎)

2. T. Koshiyama

「Design of Functional Composites based on Liposome and Metal Complex」

Royal Society of Chemistry Inorganic Chemistry Symposium, 2016 年 10 月 24 日 (福岡) 招待講演

3. T. Koshiyama, T. Hatae, N. Kanda,

R. Koganemaru, K. Miyake, M. Ohba

「Functionalization of Liposome Spaces with Metal Complexes using Antibiotic Ion Channels」錯体化学会第 66 回討論会、2016 年 9 月 10-12 日 (福岡)

4. T. Koshiyama and M. Ohba

「Functional Space Based on Composites of Metal Complexes and Liposome」

Japan-Germany Bilateral Symposium, 2015 年 9 月 20-21 日 (奈良) 招待講演

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/Sakutaibussei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越山 友美 (Koshiyama Tomomi)

九州大学大学院理学研究院・化学部門・助教

研究者番号：30467279

(2) 研究分担者：該当なし

(3) 連携研究者：該当なし

(4) 研究協力者：該当なし