

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22260

研究課題名(和文)細胞分化におけるCOのシグナル分子としての役割解明

研究課題名(英文)Study on the role of CO as a signaling molecule in cell differentiation

研究代表者

北岸 宏亮(Kitagishi, Hiroaki)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：60448090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内シグナル分子としての一酸化炭素の機能を理解するため、我々が開発した人工ヘモグロビンモデル錯体hemoCDを用いた検討を行った。まずhemoCDの細胞への作用について検討し、細胞内COの定量をhemoCDをつかって正確に行うアッセイを考案した。このアッセイによって細胞内や動物体内におけるCOを定量できるアッセイを確立した。さらにこのアッセイによりCOの体内動態を明らかにした。hemoCDと膜透過性ペプチドを組み合わせた系による細胞内COノックダウン、膜透過性を向上させたCO徐放分子の開発、代謝されてもCOを発しないヘム誘導体などを合成し、細胞内COの生理機能解明のための化合物群を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は有毒ガスでありながら生体内シグナルメディエーターとして機能する一酸化炭素の生理作用について、より深く理解するためのものである。細胞内では様々なシグナル伝達物質により情報が伝達され、細胞分化などの生命が活動するために必要なプロセスを実施している。本研究では(1)細胞内一酸化炭素を除去する方法、(2)細胞および生体組織内に分布した一酸化炭素を簡単に定量する方法、(3)細胞内に一酸化炭素を効率よくデリバリーする化合物、(4)細胞内で分解されるが一酸化炭素を発しないヘム誘導体などを開発することに成功した。これらの成果は一酸化炭素の生理作用に対する深い理解をもたらすものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, to understand the physiological function of carbon monoxide as an intracellular signal molecule, we investigated utilization of the artificial hemoglobin model complex, hemoCD. hemoCD is a supramolecular complex functions as an in vivo CO scavenger. First, the function of hemoCD on cells was examined. As a result, we have established an assay that accurately quantifies intracellular CO using hemoCD. This assay could also be applied to quantify CO in animal tissues, which has filed a patent application. Using this assay, the pharmacokinetics of CO was clarified. Intracellular CO knockdown by a system combining hemoCD and a cell-permeable peptide (R8-hemoCD), development of CORM401-E, a CO-releasing molecule with improved cell-permeability, a heme derivative that does not emit CO when decomposed intracellularly, have been succeeded in developing a group of chemical tools that can be used to elucidate the physiological function of intracellular CO.

研究分野：ガスバイオロジー，生物無機化学

キーワード：一酸化炭素 細胞分化 ポルフィリン シクロデキストリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内には一酸化炭素(CO)が内在的に存在しており、ガス状シグナルメディエーターとして様々な生理機能を有すると考えられている。しかしその生理機能の全容は明らかではない。解明が難航する理由のひとつとして、内因性 CO を選択的に除去したノックダウン検体の構築が困難であることが挙げられる。内因性 CO はそれのみをターゲットとして生合成されるのではなく、生体内ヘムが代謝分解される際の副産物のひとつとして発生するため、従来の遺伝子工学的なノックダウン法では、CO の発生を止めるだけではとどまらず、ヘムの代謝自体を阻害してしまう。ヘム代謝不全の方が影響が大きく出てしまうため、CO の生理機能研究は難しい。

我々は以前にポルフィリン鉄錯体とシクロデキストリン二量体から成る超分子錯体 hemoCD を用いて、動物体内の CO を選択的に除去する実験系を報告した(Fig. 1)。hemoCD は CO に対する親和性が極めて高く、生体内のあらゆる CO 結合部位から CO を奪うことが可能なツールである。さらに生体毒性が低いために、他の生体機能に影響を与えることなく内因性 CO のみを選択的に除去できる優れたツールである。この化合物を用いると細胞内シグナル伝達を担う CO を捕捉することにより細胞内で起こる CO が関与する様々なイベントを抽出することが可能となる。

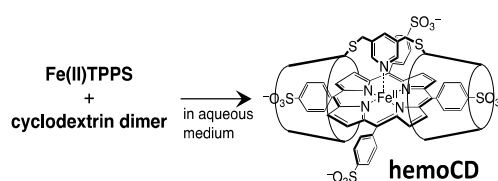


Fig. 1. 生体内 CO レセプター-hemoCD.

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞内および生体内における内因性 CO のシグナル伝達物質としての役割を解明するために、hemoCD を用いた新しい実験系を構築する。さらに CO の生理作用を解明するため、内因性 CO の濃度をコントロールできる新しいケミカルツールの構築を試みた。さらにこれらのケミカルツールをもちいて、細胞分化プロセスにおける CO の役割を解明することについて検討した(Fig. 2)。

### 3. 研究の方法

まず細胞内 CO を除去する系を構築するために、hemoCD を細胞内に導入することを試みた。2017年に我々は(Fig. 2)に示したオリゴアルギニン修飾 hemoCD (R8-hemoCD)を用いた細胞内 CO の除去について報告した。この R8-hemoCD を用いた細胞内 CO のノックダウン実験を構築した。それと並行して、R8-hemoCD は合成収率が低く実験に用いる R8-hemoCD を確保することが困難であったため、膜透過性ペプチドであるペネトラチンと、(Fig. 1)に示した未修飾の hemoCD を混合することにより、静電相互作用により非共有結合的に生成する hemoCD-ペプチドナノ粒子を細胞内導入することについても検討した。

さらに細胞内 CO 濃度を効率的に上昇させるためのケミカルツールとして、膜透過性の高い CO 徐放分子 CORM401-E を新規に設計し合成した(Fig. 3a)。この CORM401-E は従来の CORM と比べて CO 送達量が 5-10 倍向上することを見出した。この化合物については特許申請し、一般研究用試薬として市販することを検討するまでに至った。この CORM401-E を用いた細胞内

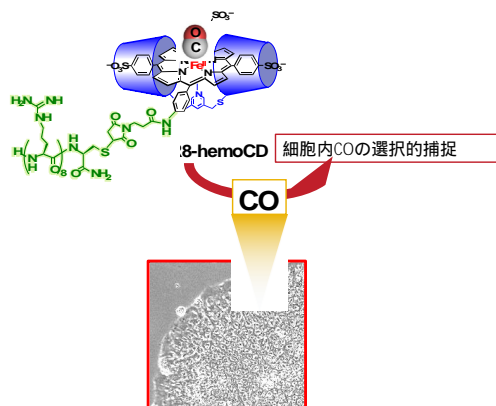


Fig. 2. R8-hemoCD による細胞内 CO 捕捉.

CO のシグナル伝達物質としての機能評価を行い、特に細胞分化プロセスに与える影響についての検討を行った。さらに細胞内でヘムオキシゲナーゼによって代謝分解されても CO を発しない $\alpha$ -メチルヘムの合成および機能評価を行った(Fig. 3b)。この $\alpha$ -メチルヘムを HeLa 細胞に加えることにより、細胞内ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)の発現が誘導される一方で細胞内 CO 濃度の上昇が見られないことを確認した。この化合物を用いることにより、細胞内ヘムおよびそのヘムの代謝により発生する内在性 CO のそれぞれの影響を分離して考察できる系を構築した。

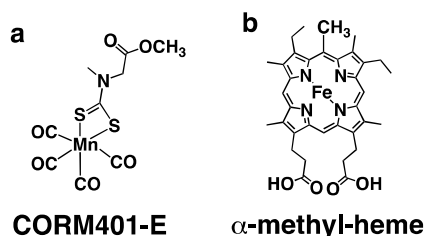


Fig. 3. 細胞内 CO を研究するためのケミカルツール.

#### 4. 研究成果

細胞内 CO の機能を調査するために膜透過性ペプチドによる超分子細胞内導入に関する研究を行い、論文として報告した(*ChemBioChem*, 2021; *ACS Applied Bio Materials*, 2020)。膜透過性ペプチドとしてオクタアルギニン(R8)およびペネトラチンを利用して、hemoCD の基本骨格となるポルフィリン-シクロデキストリン包接錯体の細胞内導入効率の検討を行った。

また細胞および生体組織における CO を鋭敏に定量できるアッセイを hemoCD を用いて確立した(*Communications Biology*, 2021; 特許申請: 一酸化炭素の定量方法(同志社大学))。この CO 定量アッセイを用い、外部から吸入した CO が生体内においてどこにどの程度分散するのかを検討し、CO 中毒のメカニズムについて言及した(同志社大学よりプレスリリース)(Fig. 4)。さらにこの系を発展させ、火災現場等で発生する CO 中毒に対する解毒剤としての hemoCD の利用についての研究も進めた(*Chem. Commun.*, 2021, 特許申請: 解毒剤及び解毒剤用キット(同志社大学))。

(Fig. 3a)に示した膜透過性を付与した CO デリバリーツール CORM401-E の合成を確立し、機能評価を行って特許出願および取得を果たした(特許申請: 新規化合物、炎症性疾患の予防及び/又は治療のための薬剤、又は、一酸化炭素送達物質(同志社大学))。(Fig. 3b)に示した $\alpha$ -メチルヘムに関しては合成が完了し、細胞内に投与してヘムオキシゲナーゼの亢進および CO が発生しないことを確認した。今後これらのツールと hemoCD の系を組み合わせ、細胞内 CO の機能解明に向けた総合的なアプローチを検討する。

以上、本研究期間内において細胞内 CO の生理機能を調査するための化合物(ケミカルツール)の合成および機能評価、実験的手法の確立などを行った。一方で本来の目的であった細胞分化における CO の機能解明についてはやや研究の進行が遅れたため現在も調査を引き続き進めている段階である。ケミカルツールの創成および新規 CO 定量アッセイの確立等、本研究期間において複数の新たな研究手法が生まれ出されたことから一定の成果を還元できたものと考えている。

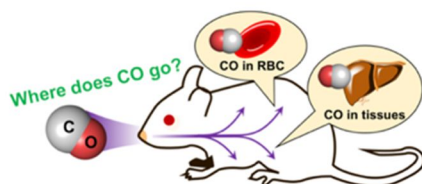


Fig. 4. hemoCD アッセイにより外来性 CO の生体内分布を明らかにした.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mao Qiyue, Kawaguchi Akira T., Mizobata Shun, Motterlini Roberto, Foresti Roberta, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Sensitive quantification of carbon monoxide in vivo?reveals a protective role of circulating hemoglobin in CO?intoxication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01880-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kitagishi Hiroaki, Kano Koji	4. 巻 57
2. 論文標題 Synthetic heme protein models that function in aqueous solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 148 ~ 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CC07044K	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 H. Kitagishi, M. Jiromaru, N. Hasegawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Intracellular Delivery of Adamantane-tagged Small Molecule, Proteins, and Liposomes Using an Octaarginine-conjugated -Cyclodextrin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbm.0c00421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagami Atsuki, Mao Qiyue, Gouhier G?raldine, Arima Hidetoshi, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 FRET Based In Cell Detection of Highly Selective Supramolecular Complexes of <i>meso</i> Tetraarylporphyrin with Peptide/BODIPY Modified Per <i>0</i> Methyl Cyclodextrins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3190 ~ 3198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ueno Kohei, Morstein Johannes, Ofusa Kyoko, Naganos Shintaro, Suzuki-Sawano Ema, Minegishi Saika, Rezgui Samir P., Kitagishi Hiroaki, Michel Brian W., Chang Christopher J., Horiuchi Junjiro, Saitoe Minoru	4. 巻 40
2. 論文標題 Carbon Monoxide, a Retrograde Messenger Generated in Postsynaptic Mushroom Body Neurons, Evokes Noncanonical Dopamine Release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3533 ~ 3548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2378-19.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Qiyue Mao, Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Removal and quantification of biological CO in mammals using a synthetic heme protein model compound.
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会, 2021年3月, オンライン開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Detection and removal of carbon monoxide (CO) in vivo using a highly selective and sensitive CO-scavenger, hemoCD
3. 学会等名 Pacifichem 2021, 2021年12月22日, ホノルル (オンライン開催) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 ヘムとCO; 化学的見地からの理解と展望
3. 学会等名 第19回新生児黄疸管理研究会, 2021年10月2日, 日本大学 (オンライン開催) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Biomedical Application of Iron(II)porphyrin/Cyclodextrin Supramolecular Complexes Working as Artificial Hemoglobin In Vivo
3. 学会等名 Waiting for 20th International Cyclodextrin Symposium, Bridge Virtual Meeting, 2020年6月7日(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 一酸化炭素の定量方法	発明者 北岸 宏亮, 毛 斉悦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-010710	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 新規化合物、炎症性疾患の予防及び/又は治療のための薬剤、又は、一酸化炭素送達物質	発明者 北岸 宏亮, 高橋実花子, 毛 斉悦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-040610	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 解毒剤及び解毒剤用キット	発明者 北岸 宏亮, 毛 斉悦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-170252	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青井 貴之 (Aoi Takashi) (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授  (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------