

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02871

研究課題名(和文)ヘムとCOがクロストークする概日リズム調節機構の分子ツールによる解明

研究課題名(英文)Mechanistic study on circadian clock system regulated by heme/CO crosstalk

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体に存在する内在性COの生理機能解明を目指して、我々が開発した人工ヘモグロビンhemoCDを利用したin vitroおよびin vivoの研究を進めている。今年度はhemoCDを用いた研究の発展型として、hemoCDを用いて生体内COだけでなくHCNも除去する試薬としての利用を試みた。その結果、2種類のhemoCDを混合することで、火災ガス中毒の治療薬として応用できる新たな可能性を示す論文をPNAS誌に公表した。本発表にともないプレスリリースを行い、各メディアに取り上げられ社会に貢献する成果として公表できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は独自に人工ヘモグロビン化合物hemoCDを開発し、それを体内に導入することで生体内COを選択的に除去するシステムを構築した。この系は生体内における概日リズムに代表されるような様々な生理現象について、COの関与を明らかにできる。それだけでなく火災などで頻発するCO中毒の解毒剤としても利用できる道を見出して、研究をすすめて成果を一般に公表することに至った。これまでないCO中毒解毒剤の開発は、多くの人命救助につながることで期待され、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to reveal the biological function of endogenous CO, we investigated in vitro and in vivo on CO using artificial hemoglobin "hemoCD" that was originally developed in our laboratory. In this year, we have developed our hemoCDs as a selective CO and HCN scavenger in vivo. This system has been applicable for fire-gas antidote. The results have been published in PNAS. According to this publication, the research was press-released and seen by many media.

研究分野：生物分子化学

キーワード：一酸化炭素 ヘモグロビン シクロデキストリン ポルフィリン

## 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。

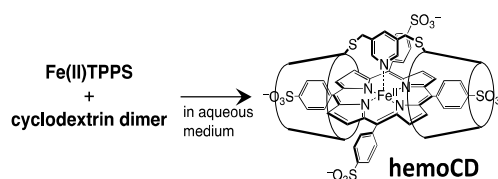


Fig. 1. 生体内 CO レセプター-hemoCD.

### 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。特に CO の生理作用として概日リズム制御における機能を解明するため、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 (Fig. 2)。これらのケミカルツールを用いて、細胞内 CO の濃度変化における概日リズムの観測系の構築を試みた。さらに hemoCD をもちいた CO 中毒解毒剤としての研究にも発展した。

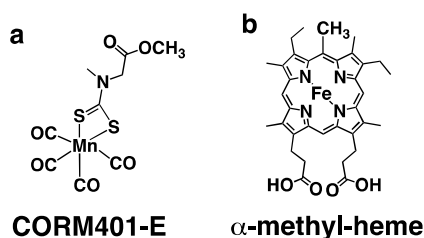


Fig. 2. 細胞内 CO を研究するためのケミカルツール.

### 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. 2a)。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を検討するまでに至った。この CORM401-E を用いた細胞内 CO の濃度上昇を検討し、概日リズム系への発展を試みており、現在なお検討を行っている。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. 2b)。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。

また細胞内 CO を定量するアッセイを hemoCD を用いて構築した。これを hemoCD アッセイと名付け、特許出願を行った。さらに hemoCD を用いて CO および HCN 同時中毒に対する解毒薬を開発し、特許申請および論文発表するに至った。

#### 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)。

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. 3)。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. 2a)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. 2b)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 の概日リズムにおける機能解明に向けた総合的なアプローチを検討する。

さらに当初計画では予期しなかった成果として、(1) CO/HCN 同時解毒システムの構築(*PNAS* 2023)(Fig. 4)、(2) 高分子化 hemoCD のユニークな包接挙動(*Chem. Eur. J.* 2023)、(3) 生体内における hemoCD の尿中還元反応(*Chem. Commun.* 2023)などの目立った成果が本プロジェクト期間内に得られた。特に Fig 4 の成果はプレスリリース後大きく報道され、本プロジェクトの中心となる hemoCD のポテンシャルが新たに引き出された成果となった。

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概日リズムにおける 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。ケミカルツールの創成、新規 CO 定量アッセイの確立、新規ガス中毒解毒システムの構築など、本研究期間において複数の新たな研究手法が生み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。

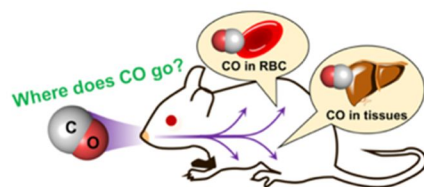


Fig. 3. hemoCD アッセイにより外来性 CO の生体内分布を明らかにした。

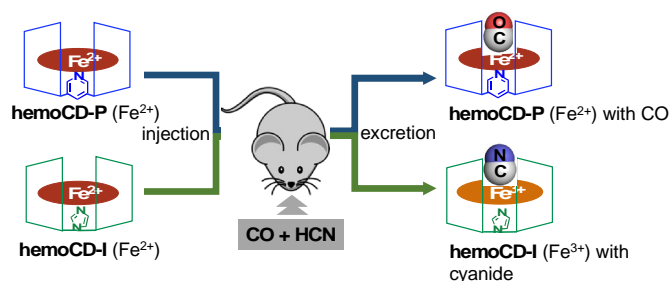


Fig. 4. 2種類の hemoCD を混ぜることで、CO と HCN の同時解毒を可能にした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mao Qiyue, Das Pradip K., Le Gac Stéphane, Boitre Bernard, Dorcet Vincent, Oohora Koji, Hayashi Takashi, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Functional Myoglobin Model Composed of a Strapped Porphyrin/Cyclodextrin Supramolecular Complex with an Overhanging COOH That Increases O <sub>2</sub> /CO Binding Selectivity in Aqueous Solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 12392 ~ 12404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.1c01628	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 Nakagami Atsuki, Mao Qiyue, Gouhier Geraldine, Arima Hidetoshi, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 FRET Based In Cell Detection of Highly Selective Supramolecular Complexes of meso Tetraarylporphyrin with Peptide/BODIPY Modified Per O 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 Kitagishi Hiroaki, Mao Qiyue	4. 巻 54
2. 論文標題 Capture of carbon monoxide using a heme protein model: from biomimetic chemistry of heme proteins to physiological and therapeutic applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 465 ~ 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-021-00591-y	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 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 Mao Qiyue, Zhao Xuansu, Kiriya Akiko, Negi Shigeru, Fukuda Yasutaka, Yoshioka Hideki, Kawaguchi Akira T., Motterlini Roberto, Foresti Roberta, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 120
2. 論文標題 A synthetic porphyrin as an effective dual antidote against carbon monoxide and cyanide poisoning	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2209924120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2209924120	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 Mao Qiyue, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Inclusion Complex Formation with Tetra PEGylated Tetraphenylporphyrin and Face to Face Cyclodextrin Dimer through Unprecedented Molecular Threading	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202300408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202300408	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 Noguchi Masataka, Mao Qiyue, Nakagami Atsuki, Kitagishi Hiroaki	4. 巻 59
2. 論文標題 Spontaneous reduction of iron(iii)porphyrin to iron(ii)porphyrin-CO complex in mouse circulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6211 ~ 6214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CC00420A	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 -

〔学会発表〕 計30件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 火災ガス中毒を治療する人工ヘモグロビン化合物
3. 学会等名 日本中毒学会西日本地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qiyue Mao, Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Sensitive and selective quantification of carbon monoxide (CO) distributed in vivo by an iron(II)porphyrin-cyclodextrin supramolecular complex
3. 学会等名 Pacifichem 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Synthetic Analogs of Heme Proteins in Water
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
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 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 Intracellular delivery of small molecules, proteins, and liposomes using cell-penetrating cyclodextrins
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 毛 斉悦
2. 発表標題 ポルフィリン鉄錯体とシクロデキストリン二量体から構成される人工ヘモグロビンの構築と生体内ガスの吸着試薬としての利用
3. 学会等名 第28回日本血液代替物学会年次大会
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 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 毛 斉悦
2. 発表標題 超分子ヘモグロビンモデル錯体のin vivoにおけるガス結合物質としての応用展開
3. 学会等名 第70回高分子討論会 (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 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 毛 斉悦
2. 発表標題 人工ヘモグロビンモデル錯体による生体内一酸化炭素の定量および除去
3. 学会等名 第18回ホスト・ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 毛 斉悦, 松下 麟太郎, 北岸 宏亮
2. 発表標題 分子Tシャツ:PEG鎖を有するテトラアリアルポルフィリンとメチル化シクロデキストリン二量体との不可逆的な包接錯体形成
3. 学会等名 第18回ホスト・ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口大貴, 毛斉悦, 北岸宏亮
2. 発表標題 マレイミド基を側鎖に有するhemoCDによる動物体内COの選択的除去
3. 学会等名 第37回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 北口 文都, 毛 斉悦, 北岸 宏亮
2. 発表標題 ビリジストラップポルフィリン鉄錯体と銅錯体をリンカーに有するシクロデキストリン二量体を用いたシトクロム c オキシダーゼモデル錯体
3. 学会等名 第37回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井 薫, 毛 斉悦, 北岸 宏亮
2. 発表標題 水中オレフィンメタセシス反応を利用したシクロデキストリン/ポルフィリン超分子カテナン錯体の形成
3. 学会等名 第37回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2021年

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 野口大貴, 毛 斉悦, 北岸宏亮
2. 発表標題 マレイミド修飾hemoCDの投与による動物体内COの選択的除去
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 北口文都, 毛 斉悦, 北岸宏亮
2. 発表標題 ビリジン配位子をストラップ部位に組み込んだ水溶性ポルフィリンの合成とそのメチル化シクロデキストリン超分子錯体
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 Selective Depletion of Endogenous CO In Vitro and In Vivo by Hemoprotein Biomimetic Model Complexes
3. 学会等名 Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 毛 斉悦, 北岸 宏亮
2. 発表標題 分子Tシャツ: PEG修飾テトラアリルポルフィリンとメチル化シクロデキストリン二量体の特異認識
3. 学会等名 第38回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河合菜々子, 毛 斉悦, 北岸宏亮
2. 発表標題 極性空間を有する水溶性ストラップポルフィリン鉄錯体とシクロデキストリン二量体を用いた新規ヘムタンパク質モデルの構築
3. 学会等名 第38回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 毛 斉悦, 趙 玄素, 喜里山 暁子, 根木 滋, 福田 泰孝, 北岸 宏亮
2. 発表標題 火災等で発生するCOおよびHCN同時ガス中毒を即時解毒するバイオミメティック錯体hemoCD-Twins
3. 学会等名 第38回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 毛 斉悦, 喜里山暁子, 根木 滋, 趙 玄素
2. 発表標題 火災ガス有毒成分(CO, HCN)を解毒する人工ヘモグロビン化合物
3. 学会等名 第37回日本救命医療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北岸 宏亮, 毛 斉悦
2. 発表標題 ヘモグロビン・バイオミメティック錯体を利用した火災ガス中毒治療薬の開発
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 有機化学から生体機能解明への挑戦
3. 学会等名 日本化学会ディビジョン講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北岸 宏亮
2. 発表標題 シクロデキストリンを使った人工ヘモグロビンの合成とそれを用いた創薬チャレンジ
3. 学会等名 第19回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qiyue Mao, Hiroaki Kitagishi
2. 発表標題 High affinity threading of porphyrin having polymer arms through a methylated cyclodextrin dimer
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Kitagishi, Qiyue Mao
2. 発表標題 Capture of Carbon Monoxide and Cyanide In Vivo Using Synthetic Hemoglobin Model Complexes
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 毛 斉悦、北岸 宏亮
2. 発表標題 COとHCN同時ガス中毒に対する人工ヘモグロビンモデル錯体の解毒有効性の評価
3. 学会等名 第29回日本血液代替物学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生体で機能するヘモグロビン・バイオミメティック錯体
2. 発表標題 生体で機能するヘモグロビン・バイオミメティック錯体
3. 学会等名 第2回生命金属科学シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中上 敦貴、野口 大貴、毛 斉悦、北岸 宏亮
2. 発表標題 人工ヘムタンパク質モデル「hemoCD」による生体内金属還元反応の定量的評価および酸化状態による内因性CO除去機構に関する研究
3. 学会等名 第2回生命金属科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2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、W02021/153197	出願年 2021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	廣田 毅  (Hirota Tsuyoshi)  (50372412)	名古屋大学・トランスフォーメティブ生命分子研究所・特任 准教授    (13901)	

#### 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
---------	---------