

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620130

研究課題名(和文) 光力学線療法への応用を志向する房状ポルフィリンカプセルの創出

研究課題名(英文) Construction of a porphyrin capsule applicable to a photodynamic therapy

研究代表者

中島 洋 (NAKAJIMA, Hiroshi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00283151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：好熱菌由来チトクロムc552の変異体アポ型を用いて、非水溶性の光増感剤プロトポルフィリンの極めて安定な水溶性カプセル(rC552-PPiX)をつくることに成功した。rC552-PPiXは、水溶液中で高い光増感活性を示した。中でも一重項酸素の発生は、量子収率19%で1時間以上活性を持続した。水中における高い一重項酸素発生効率(52%)を示すメチレンブルー(MB)と比較したところ、MBは当初rC552-PPiXを上回るが、失活が著しいため、分子あたりの総発生量は、rC552-PPiXが上回る結果が得られた。このことは、継続的な一重項酸素の発生でrC552-PPiXがMBよりも優れていることを示す。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome c552 is a thermostable protein deriving from a thermophile. We have successfully prepared a stable composite of a cytochrome c552 mutant in an apo-form with protoporphyrin IX. While protoporphyrin IX is insoluble to water at the neutral pH, the composite showed high solubility to water and high activity as a photosensitizer. The composite produced single oxygen by photo-irradiation for more than 1 hour by a quantum yield of 19% in water. The obtained yield was rather lower than methylene blue (MB), a commercially available photosensitizer, exhibiting the highest quantum yield in the single oxygen production in aqueous solution (52%), while the composite is superior to MB in the functional durability. Under the same experimental conditions, the photosensitizing activity of MB was deprived in 20min and was overtaken by the composite at the 1hr-irradiation. The result indicates that the composite is a potential photosensitizer for the single oxygen production in water

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：チトクロムc ポルフィリン 光力学線療法 一重項酸素発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 光力学線療法 (PDT) とは、「光増感剤であるポルフィリン誘導体 (以後ポルフィリンと略称) を病理細胞や病原性細菌に集積した後、その部分への光照射によって短寿命で拡散性の低い一重項酸素を発生させ、病変に関わる組織を破壊する」ことである。PDT の作用機構では、原理的に正常細胞への攻撃は起こらないとされる。しかし実際には、ポルフィリンが疎水相互作用によって様々な組織に吸着するため、病変部位への選択的集積は難しく、投与されたポルフィリンは、全身に拡散・滞留する。その結果、体表面に残ったポルフィリンは、施術後も外光による PDT (副作用) を引き起こす。

(2) この問題の解決には、組織とポルフィリンの不要な相互作用を抑制し、施術時以外に PDT が誘発されない仕組みを開発する必要がある。従来の研究では、国内外とも中空の脂質膜 (リポソーム) へのポルフィリンの取込みや化学修飾した金属ナノ粒子への吸着を応用したポルフィリン輸送体の開発が主流である。ただし、これらの手法には本質的な問題があった。前者では、リポソーム自体の構造安定性と調製時の有機溶媒の使用、後者では、金属ナノ粒子の生体に対する毒性、また両者とも全体が一様な平均構造であるため、分子内の特定の位置に特定の機能を付与するような分子設計が難しい。新たなポルフィリン輸送分子には、当初の問題に加え、これら超分子系の問題を回避するための新たな発想が必要であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、我々が以前の研究で開発したアポ型シトクロム c_{552} 変異体 (apo-*rC* M69F) がポルフィリンと極めて安定に複合体を形成することを用いて、ポルフィリンの生体組織への非特異な相互作用を抑制した「水溶性ポルフィリン複合体カプセル、*rC* M69F-Por」を創出し、PDT への応用を目指した。Apo-*rC* M69F は、好熱菌由来のタンパク質であるため、分子としての堅牢性と取り扱いやすさに優れる。当然、生体適合性にも問題がなく、生体適合性に優れたポルフィリンカプセルの材料として最適と考えた。

(2) 本研究が目指すポルフィリン輸送分子は、現在主流の超分子系 (リポソーム、金属ナノ粒子) のものとは、設計思想、構成要素が全く異なる。したがってその成功は、PDT に応用可能な第 3 のポルフィリン輸送分子が存在することをアピールし、更なる分子設計が可能な新奇なホストユニットを研究対象として提供する。また本研究の着想が従来研究の刺激となり、これまでに蓄積された知見からは想像もつかない展開につながることを期待した。

3. 研究の方法

本研究で実現を目指す「ポルフィリンカプセル」の概略を図 1 に示す。2 年の助成期間内では、1) 化学修飾した *rC* M69F-Por 調製法

の最適化、2) 複合体の安定性向上、3) 複合体の物性解析、を進め、複合体による一重項酸素の発生効率の最大化を最初の目標とした。続いて、カーボンナノチューブへの固定によるポルフィリンカプセルの集積化を試みた。この課題については、現在も続行中である。

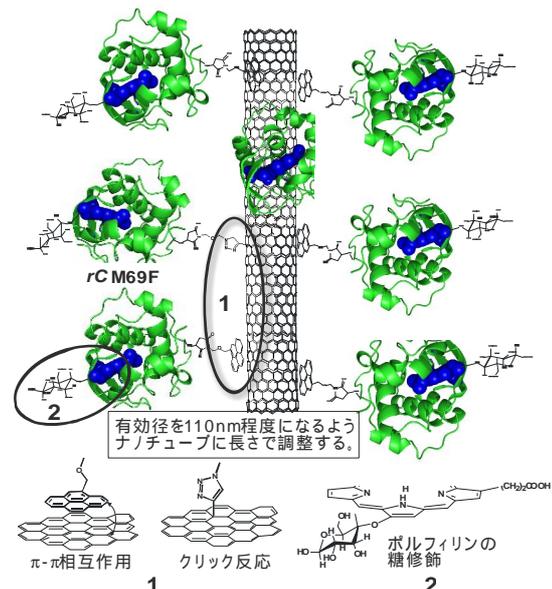


図 1. ポルフィリン輸送タンパク質「ポルフィリンカプセル」の概略。(1) 疎水相互作用、あるいはクリック反応を利用した共有結合で *rC* M69F をナノチューブに固定する。(2) ポルフィリンを糖修飾し、腫瘍細胞による取込み能を上げる。

4. 研究成果

(1) *rC* M69F-Por 複合体調製法を最適化の結果、以下の調製条件が得た。

apo-*rC* M69F 30 μ M / MES-NaOH pH6.0 緩衝液に対し、室温にて終濃度 60 μ M となるよう、2mM ポルフィリン DMSO 溶液を加える。2 時間後、脱塩および陰イオンカラムクロマトグラフィーによる未反応ポルフィリンの分離。その後透析による複合体形成のアニールング。

上記の方法で得た *rC* M69F-Por は、室温で 120 時間以上安定に存在しており、凍結乾燥による粉末化に対してもポルフィリンの脱離、タンパク質部分の変性はみられなかった。

(2) 得られた *rC* M69F-Por 複合体の電子吸収スペクトルを図 2 に示す。同様のスペクトルは、有機溶媒中で観測され、水中やタンパク質の表面に吸着されたもの (図 2B BSA-Por) とは大きく異なる。このことは、複合体中のポルフィリンが、水溶媒分子から隔離されていることを示唆する。水は、励起されたポルフィリンの熱的失活を誘起する。したがって、水から隔離されたポルフィリンでは、励起寿命の延長 三重項状態の増加 一重項酸素発生効率の増大、が見込まれた。実際、蛍光寿命と量子収率および三重項寿命 (表

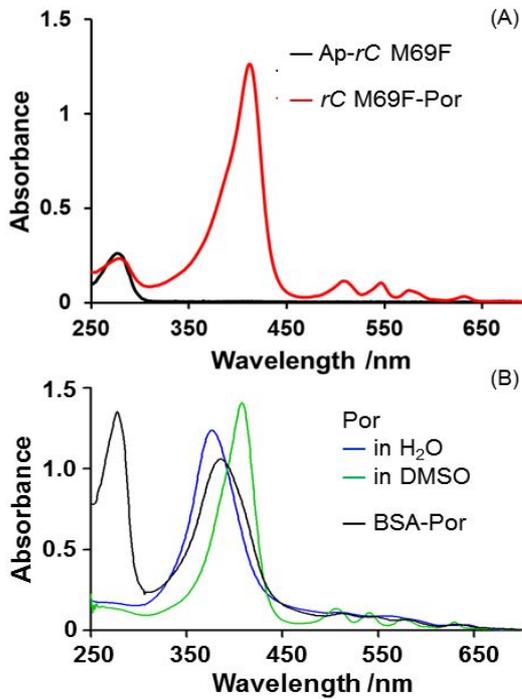


図2. 電子吸収スペクトル(A) Apo-rC M69F (黒線) rC M69F-Por (赤線)、(B) rC M69F-Por のスペクトルは、有機溶媒 (DMSO、緑線) 中のものに類似しており、水中の Por (青線) やタンパク質表面に吸着されたもの (黒線) とは大きく異なる。

1) は、有機溶媒中で測定した値と同程度であった。なお、タンパク質表面に吸着したポルフィリンでは、蛍光および三重項状態の生成がほとんど見られなかった。タンパク質表面のポルフィリンでは、水へのエネルギー移動による失活過程が素早く進行するためと考えられる。

蛍光寿命 (τ_1) および量子収率

	τ_1 /ns	収率/%
rC M69F-Por	18	9.8
Por in DMSO	17	10.5

$\lambda_{Ex} = 400\text{nm}$, $OD_{400} = 0.1$, 20°C

三重項寿命 (τ_3 / μs)

	アルゴン下	大気下
rC M69F-Por	5.5×10^2	9.3
Por in DMSO	1.7×10^2	1.7

$\lambda_{Ex} = 532\text{nm}$, $OD_{400} = 0.3$, 20°C

(3) rC M69F-Por 複合体からの一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の発生を EPR 法を用いて計測した結果、複合体は高い活性を示すことが明らかになった (図3)。対照実験に用いたメチレンブルー (MB) は水中における一重項酸素の発生効率が高いことで知られており (一重項酸素発生量子収率 $\phi(^1\text{O}_2) = 52\%$)、発生させた一重項酸素による水槽の殺菌やカビ繁殖の

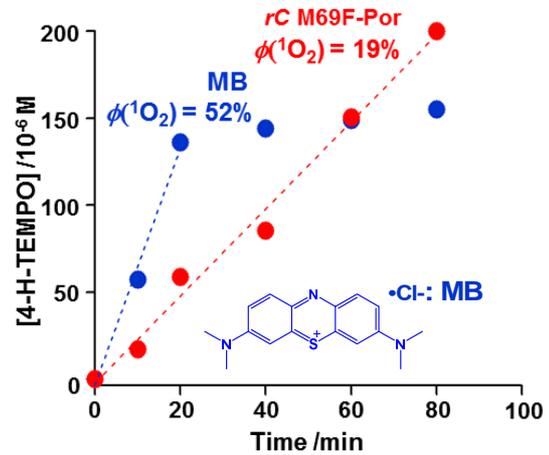
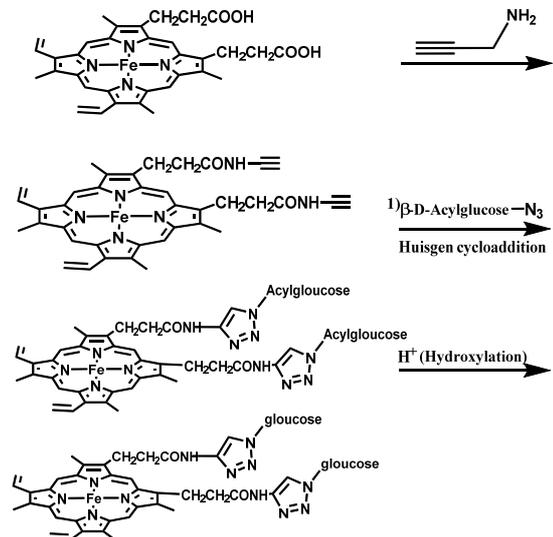


図3. $^1\text{O}_2$ 発生実験。縦軸は、生成した $^1\text{O}_2$ が反応系中に溶存させておいた環状イミン (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ol) との反応で生成するニトロキシラジカルを EPR 測定によって定量した値。 $^1\text{O}_2$ の生成量に比例する (Nakamura et al. Free Radical Res. 2010, 44, 1036.)

抑制などに実用されている。実験では、MB の当初の高活性が 20 分程度で喪失するのに対し、rC M69F-Por 複合体は 80 分以上活性が持続するため、 $^1\text{O}_2$ の発生総量では複合体が上回ることが分かる。MB 初期の $^1\text{O}_2$ 発生量子収率を既報の 52% とすると、今回の複合体量子収率は、19% であった。ここで得られた結果は、複合体が $^1\text{O}_2$ の徐発生性と持続性に優れた水溶性分子であることを示している。MB は電荷を有する多環芳香族であるため、水槽の浄化にを継続的に使用した場合、樹脂材料やガラスなど様々な材料への沈着が生じる。一方、タンパク質で包摂された rC M69F-Por 複合体では、タンパク質で包摂されているため、そうした沈着現象は見られない。生産コストを考慮すれば、今回調製した複合体が MB の現用途を置き換える可能性はない



1) T. Ogawa, S. et al., Agric. Biol. Chem. 1983, 47, 281.

が、より高い¹O₂発生効率を実現できれば、材料への低沈着性を特徴とする水槽の水浄化剤としての用途も考えられる。

(4) 糖鎖修飾された Por と apo-rC M69F との複合体調製。様々な合成経路を試みた結果、スキーム 1 に示す手順に従い、現在グルコース修飾を施した Por の合成を進めている。合成が完了次第、apo-rC M69F との複合化、物性解析をおこなう。また、研究方法でも述べたように、カーボンナノチューブへの固定化についても、Por の糖鎖修飾法と同様、ヒューズゲン反応による手法の開発を進めている。

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 1 件)

Nakajima H., Miyazaki S., Itoh, T, Hayamura M., Watanabe Y., Azurin-DNA conjugate with binding motif of a transcriptional regulator, CooA: CO dependent modulation of electron transfer reaction, *Chem. Lett.* 2014, **43**, 1204-1206. (査読あり) DOI:10.1246/cl.140284 [学会発表](計 6 件)

- 1) 中島 洋、電子伝達タンパク質を素材とする化学の展開、奈良女子大学理学部講演会、2013 年 8 月 8 日、奈良女子大学
- 2) Nakajima H., Miyazaki S., Watanabe Y. Dynamic control of Inter-protein interaction for protein based signal transduction system, Collaborative Conference on 3D & Materials Research 2013, June 24-28, Korea
- 3) 中島 洋、宮崎総司、伊藤誉明、渡辺芳人、電子伝達タンパク質による転写調節因子のシグナル変換、第 41 回生体分子科学討論会、2014 年 6 月 6-7 日、福岡
- 4) 中島 洋、宮崎総司、伊藤誉明、渡辺芳人、中島 洋、宮崎総司、伊藤誉明、渡辺芳人、電子伝達タンパク質による転写調節因子の出力変換、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25-27 日、札幌
- 5) 中島 洋、電子伝達タンパク質チトクロム *c* を化学の視点で使う、第 45 回中部化学協会支部連合秋季大会、2014 年 11 月 29-30 日、春日井市
- 6) Nakajima H., Conversion of readout from transcriptional regulator by electron transfer proteins, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Aug. 24-28th, 2014, Switzerland.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
[http:// bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp](http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 洋 (NAKAJIMA, Hiroshi)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00283151