

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560433

研究課題名(和文)機能化蛋白質針による八工の個体寿命・発生分化制御

研究課題名(英文)Hybrid protein needle for controlling model animal functions

研究代表者

上野 隆史(UENO, Takafumi)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：70332179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、(1)タンパク質複合体のCO輸送体としての有用性、(2)針タンパク質の表面電荷改変による八工幼虫脳への集積制御が達成された。同時に、今後の課題として、ROSやNO研究の前例があるeye discを用いた評価、また、ROSのイメージングに加え、抗体染色によるHOやNOSの発現評価、COの関与する酵素sGCの活性阻害評価によって器官やモデル個体を用いた詳細な検討を進めていく。

研究成果の概要(英文)：This research shows that (1) protein assemblies have advantages as CO releasing molecules, (2) protein needle with optimized surface charge can accumulate on brain of larva. The future challenges, which should be addressed, are (1) ROS and NO assay of eye disc, (2) the ROS imaging, (3) assay for expression of HO and NOS, and (4) inhibitory assay of sGC activation by CO.

研究分野：生体関連化学

キーワード：タンパク質工学 ケミカルバイオロジー 一酸化炭素 フェリチン バクテリオファージ T4

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ材料や機能分子をモデル個体へ導入し、個体の形質を制御する研究が注目されている。従来のモデル個体を用いた形成転換的研究では遺伝子工学的な機能改変による発生分化機構の解明が主流であったが、分析技術が進み、発生機構を分子レベルで解析・制御することが可能となり、より化学的なアプローチによる機能制御手法が求められている。しかしながら、ナノチューブの取り込み、金属錯体による発生分化阻害実験等が試みられているものの、人工的に設計した化学機能分子を個体内で駆動させることは未だに困難である。その理由は、現在用いられている機能分子では、個体への取り込み効率の低さや、高い毒性に課題を残しているからである。特に、本研究で着目する CO の場合は、金属錯体を用いた輸送が必要であり、個体内放出制御の分子設計は遅れている。一方、申請者はこれまで、蛋白質集合体を超分子化学的に精密設計することにより、様々な分子ツールの開発を報告してきた (*Coordination Chemistry in Protein Cages*, 申請者 編集, Wiley, 2013)。特に、生体内の様々な反応で重要な役割を担う金属と蛋白質の相互作用に着目し、人工金属酵素の作成や(申請者、*JACS* 2009, 2009, 2008, *Angew. Chem. Int Ed*, 2006, 2011, *Chem. Commun.* 2011) 高い細胞透過性をもつ蛋白質集合体の作成を実現してきた (*MolBioSyst* 2014)。この材料を用いて、金属錯体・蛋白質複合体による CO の輸送により、細胞レベルで転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化制御が実現できると考えた。さらに、このシステムを個体レベルの研究に展開できれば、発生段階での核内因子の挙動を変化させることによって、幹細胞分化を制御できうる生体機能材料開発につながる。特に、CO は ROS の濃度調節への関与も推定されており、CO により、細胞の寿命、ひいては個体の老化を抑制できると考え、本提案に至った。

## 2. 研究の目的

本件研究では、ショウジョウバエに機能化蛋白質複合体を用いてシグナル分子として知られている一酸化炭素(CO)を導入し、その反応性を利用した老化・発生分化制御法の開発を目指す。具体的には、申請者が開発した針状タンパク質や、球状タンパク質に CO を放出する金属錯体を複合化し、その徐放性や細胞取り込み能を制御しハエ内の局在を制御して老化、発生分化との関係を調べる。CO は活性酸素種(ROS)や一酸化窒素(NO)の関与するシグナル伝達と連動し、老化や幹細胞分化を司ると考えられている。しかしながらその機構は未解明のままである。従って、モデル個体であるハエを用いた CO の作用機構の解明によって、老化や幹細胞制御等、再生医療分野の諸問題を解決する分子操作技術の開発につなげる。

## 3. 研究の方法

本研究では、個体サンプルとして取り扱いが容易で、遺伝子解析が詳細に進められているショウジョウバエを用い、(1) ハエへの取り込みに特化したタンパク質複合体の設計、(2) CO 放出金属・蛋白質針複合体の作成、(3) 各臓器などへの取り込みによる、老化と発生分化への CO の関与の解明を進める。(1),(2) に関しては、申請者が開発した細胞膜透過性のタンパク質針とタンパク質ケージを分子テンプレートとして、蛋白質工学、生物無機化学、構造生物学的手法の融合により推進し、(3)については、研究分担者が中心となって、実験系の確立、サンプル供給とデータの発生学的解析を進め、モデル個体への CO 取り込みと老化の関係を化学的、発生学的立場から総合的に解明する。

## 4. 研究成果

4-1. 金属カルボニル-針タンパク質複合体を用いた効率的な細胞内一酸化炭素輸送に

よる NF- $\kappa$ B 活性制御 (*MolBioSyst* 11, 3111-3118 (2015))

一酸化炭素 (CO) は細胞保護作用、抗炎症作用等を担うシグナル分子として機能することが報告されている。細胞内に CO を輸送するために、主に金属カルボニルからなる CO 輸送分子 (CORM) が従来用いられてきた。しかしながら、細胞内への取り込み効率の低さ、安定性の低さ等が問題視されており、CO を用いたシグナル伝達制御のために、より効率的な細胞内輸送法の確立が求められてきた。

そこで、細胞膜貫通特性を有する針タンパク質のキャリアとしての特性に着目した。筆者らは、バクテリオファージ T4 由来の人工針蛋白質  $\beta$ -helical protein needle ( $\beta$ -PN) が細胞膜を直接貫通して細胞内に取り込まれることを明らかとし、蛋白質輸送への展開を報告してきた (*Mol. BioSyst.*, 10, 2677, 2014, *Chem. Lett.*, 43, 1505, 2014)。そこで、 $\beta$ -PN 両末端の  $3 \times (\text{His})_6$  と金属カルボニルの高い親和性を利用することで、高効率な細胞内 CO 輸送システムが構築できると考えた (図 1a)。

本研究では、CO 放出金属カルボニル錯体である  $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$  と  $\beta$ -PN から  $\beta$ -PN-Ru(CO) $_2$  複合体を作成し、細胞内への CO 輸送法による nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) 活性への影響を評価した (図 1b)。CORM として広く利用されている  $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$  (CORM-3) に比べ、 $\beta$ -PN-Ru(CO) $_2$  複合体は極めて高い効率で HEK293 細胞内へ取り込まれ、また 12 倍の CO 放出の徐放性が見られた。 $\beta$ -PN\_Ru を添加することで、HEK293 細胞内における NF- $\kappa$ B の活性化が見られた。この活性化が細胞内における活性酸素 (ROS) の生産に由来すること、NF- $\kappa$ B が活性化されることで下流の遺伝子である *HO1*、*NQO1*、*IL6* の発現が促進されることを明らかとした。これらの効果は 12 h で観測されるものの、24 h では見られ

なかった。このことは、細胞内に輸送された CO は、NF- $\kappa$ B を介したフィードバック経路を用いて細胞のシグナル応答を制御していることを示している。このシグナル経路は、サイトカイン TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化とは異なる経路によるものと考えられる。CORM-3 では NF- $\kappa$ B 活性への影響は見られなかったことから、 $\beta$ -PN\_Ru を用いて細胞内に効率的に CO を輸送することで、CO と NF- $\kappa$ B 活性の関係の一端を初めて明らかとすることに成功した。

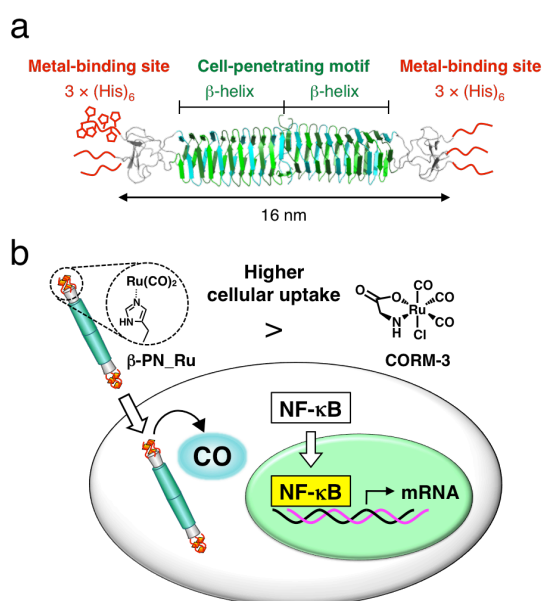


図 1 : (a)  $\beta$ -PN の結晶構造。(c)  $\beta$ -PN-Ru(CO) $_2$  複合体 ( $\beta$ -PN-Ru) による NF- $\kappa$ B 活性化の概略図。

4-2. タンパク質ケージルテニウムカルボニル錯体複合体からの細胞内 CO 放出 (*J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16902-16908 (2014), 日経産業新聞、日刊工業新聞、財經新聞掲載)

生体内において鉄貯蔵の役割を担うフェリチン(Fr)は、蛋白質が自己集合することによって形成されるタンパク質ケージの一種であり、高い構造安定性と生体適合性を有し、その 8 nm の内部空間へ金属分子を安定に保持させることができる (図 2a)。そのため、これまでに様々な薬剤分子やイメージング分子が内包され、細胞内への輸送が行われて

きた。一方で、我々の研究グループでは、有機金属錯体分子の Fr への導入による人工金属酵素の作製手法及び、その複合体の結晶構造解析手法を確立しており、Fr 内部で詳細な化学反応の制御が行えることを報告してきた。本論文では、Fr へ CO ガスを放出可能なルテニウムカルボニル錯体を集積させることで、新規細胞内 CO 放出分子の開発を目指した (図 2b)。

Fr とルテニウムカルボニル錯体の複合体 1 を合成し、X 線結晶構造解析により、Fr 内部の RuCO の配位構造を明らかにした (図 2c)。解析によって得られたこの配位構造を元により多くの Ru を結合させ、配位構造を変換するための変異体を設計・合成した (複合体 2、図 1c)。試験管内での CO 放出追跡実験より、複合体 1、2 は従来利用されてきた RuCO 錯体と比較しておよそ 18 倍ゆっくりと CO を放出する性質をもつことと、複合体 2 が 1 と比較して CO の放出量が 2 倍多いことを見出した。さらに、ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞) へ複合体を導入し、ガンの成長に関与する核転写因子 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の活性への影響を RuCO 錯体のみと比較したところ、複合体 1 が 2.5 倍、複合体 2 が 10 倍活性化していることが分かった (図 2d)。これらの成果から、(1) CO 放出速度を遅くすること、(2) より多くの CO を送り込むことが、NF- $\kappa$ B の効率的な活性化に重要な点であるということを見出した。

### 4-3. タンパク質複合体のショウジョウバエへの取り込み評価

蛍光分子で修飾した針タンパク質とフェリチンのハエの幼虫の種々の器官への取り込みを確認した。脳、目、羽、足などのディスクに分け、それぞれにサンプルを添加した。その結果、コントロールに比べ大きな蛍光強度の増大は観察されなかった。そこで、針タンパク質を正電荷、負電荷をもつ官能基で化学修飾し、異なる表面電荷を有する針タンパク

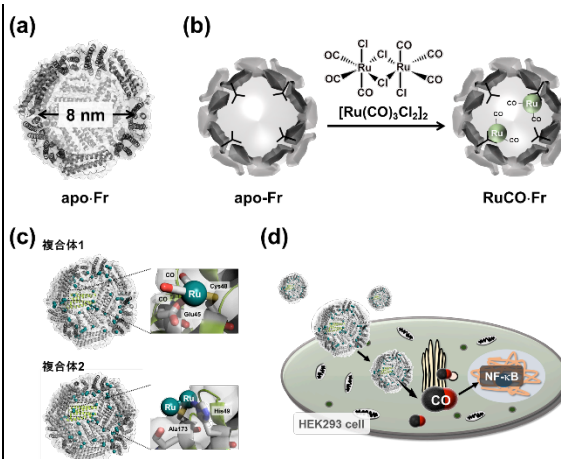


図 2 : (a) アポ Fr の X 線結晶構造。(b) Fr と RuCO 錯体との複合化反応。(c) 複合体 1、2 の X 線結晶構造。(d) 複合体の HEK293 細胞への導入及び CO 放出、NF- $\kappa$ B への作用のイメージ図。

質を幼虫の脳と反応させたところ、正電荷をもつ針タンパク質の蛍光強度が増加していることが明らかとなった。そこで、ROS 染色分子 (DHE) により、CO 放出による ROS の生成を追跡したところ、PN\_pos\_MnCO では ROS 産生はわずかに確認されたものの、PN\_MnCO に比べ大きな違いは観察されなかった。

### 4-4. まとめ

今回の研究により、(1) タンパク質複合体の CO 輸送体としての有用性、(2) 針タンパク質の表面電荷改変によるハエ幼虫脳への集積制御が達成された。同時に、今後の検討課題として、ROS や NO 研究の前例がある eye disc を用いた評価、また、ROS のイメージングに加え、抗体染色による HO や NOS の発現評価、CO の関与する酵素 sGC の活性阻害評価によって器官やモデル個体を用いた詳細な検討を進めていく。

### 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 15 件)

1. H. Inaba, N.J.M. Sanghamitra, K. Fujita, T. Sho, T. Kuchimaru, S. Kitagawa, S. Kizaka-Kondoh, and T. Ueno, A metal carbonyl-protein needle composite designed

for intracellular CO delivery to modulate NF- $\kappa$ B activity

*Mol. BioSyst.*, 11, 3111-3118 (2015).  
(DOI: [10.1039/C5MB00327J](https://doi.org/10.1039/C5MB00327J)) 査読あり

2. K. Fujita, Y. Tanaka, S. Abe and T. Ueno  
A Photoactive CO Releasing Protein Cage for Dose-Regulated Delivery in Living Cells  
*Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 1056-1060 (2016).  
(selected as a Hot Paper).  
DOI: [10.1002/anie.201506738](https://doi.org/10.1002/anie.201506738). 査読あり

3. H. Inaba, K. Fujita and T. Ueno  
Design of Biomaterials for intracellular delivery of carbon monoxide  
*Biomaterials Science*, 3, 1423-1438 (2015).  
DOI: [10.1039/C5BM00210A](https://doi.org/10.1039/C5BM00210A) 査読あり

4. B. Maity, K. Fujita and T. Ueno  
Use of the Confined Spaces of Apo-Ferritin and Virus Capsids as Nanoreactors for Catalytic Reactions  
*Curr. Opin. Chem. Biol.*, 25, 88-97 (2015).  
DOI: [10.1016/j.cbpa.2014.12.026](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.026) 査読あり

5. K. Fujita, Y. Tanaka, T. Sho, S. Ozeki, S. Abe, T. Hikage, T. Kuchimaru, S. Kizaka-Kondoh, and T. Ueno  
Intracellular CO Release from Composite of Ferritin and Ruthenium Carbonyl Complexes  
*J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16902-16908 (2014).  
DOI: [10.1021/ja508938f](https://doi.org/10.1021/ja508938f). 査読あり  
It was featured on The Nikkei-sangyo (Nov. 21, 2014), Zaikai shinbun (Nov. 24, 2014), Nikkan Kogyo shinbun (Nov. 25, 2014), [PHYS.ORG](http://www.phys.org), [nanotechweb.org](http://www.nanotechweb.org), and [nanowerk](http://www.nanowerk.com).

[学会発表] (計 27 件)

1. Takafumi Ueno  
“Protein Crystals for Designing Biohybrid Solid Materials”  
8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, IMS, Okazaki, Feb/17/2016 (Invited lecture)

2. Takafumi Ueno  
“Design of Protein Assemblies toward Biohybrid Solid Materials”  
The 8th WPI-AIMR Joint Seminar AIMR, Tohoku Univ. Sendai, Jan/29/2016 (Invited lecture)

3. Takafumi Ueno  
“CO Releasing Proteins as Bioinorganic Tools for CO Gas Biology”  
Frontiers of Iron Chemistry in Biology (#268) /Pacifichem 2015  
Regency I (Royal Hawaiian), Honolulu, Hawaii, Dec/16/2015 (Invited lecture)

4. Takafumi Ueno

“Designing Protein Crystals for Bioinorganic Nanomaterials”

Functional Nanomaterials Based on Coordination Chemistry (#73) /Pacifichem2015, Hilton Hawaiian Village, Honolulu, Hawaii, Dec/18/2015 (Invited lecture)

5. Takafumi Ueno  
“Metal Carbonyl-Protein Materials for Carbon Monoxide Delivery in Living Cells”  
10<sup>th</sup> China-Japan Joint Symposium on Metal Cluster Compounds  
Fuzhou, China, Oct/25/2015 (Invited lecture)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.ueno.bio.titech.ac.jp/>

プレスリリース

「分子のカゴで毒を薬に」  
(<http://www.titech.ac.jp/news/2014/029198.htm>)

日経産業新聞 (Nov. 21, 2014)

財経新聞 (Nov. 24, 2014)

日刊工業新聞 (Nov. 25, 2014)

[PHYS.ORG](http://www.phys.org)

(<http://www.nanowerk.com/nanotechnology-news/newsid=38163.php>)

[nanotechweb.org](http://www.nanotechweb.org)

(<http://nanotechweb.org/cws/article/yournews/59371>)

[nanowerk](http://www.nanowerk.com).

(<http://www.nanowerk.com/nanotechnology-news/newsid=38163.php>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 隆史 (UENO, Takafumi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：70332179

(2)研究分担者

鈴木 崇之 (SUZUKI, Takashi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：60612760