

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870704

研究課題名(和文) 高CO親和性超分子ヘムタンパク質モデル錯体を用いた細胞内COの機能探索

研究課題名(英文) Investigation of the role of intracellular CO using a supramolecular heme protein model complex showing high CO affinity

研究代表者

北岸 宏亮 (Kitagishi, Hiroaki)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：60448090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：有毒ガスである一酸化炭素(CO)は、生体内においてはヘムの代謝過程において常時産生されており、重要な役割を担うと言われているが、その生理機能の全容は明らかになっていない。本研究では、COを選択的に捕捉できる超分子ヘムタンパク質モデルhemoCDを使って、生体内から選択的にCOを除去し、そのときの生体内反応を見る事によってCOの生理機能を探索することを試みた。その結果、マウス体内から内在性COを除去することに成功し、その際に欠乏したCOを補うようにフィードバック産生機構が働くことを明らかにした(J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 5417-5425)。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide (CO), a well known toxic gas, is continuously produced in the living body. Although the endogenous CO is considered to function in the biological system, the role of CO in biology has not been fully understood. Here, to investigate the biological function of endogenous CO, we utilized a supramolecular heme protein model complex, hemoCD, to remove endogenous CO from the living organisms. HemoCD was capable of quantitatively removing endogenous CO in the mice body due to its extremely high CO affinity. As a result, we succeeded to completely remove CO from the mice body, in which we found a biological feedback mechanism of endogenous CO to compensate the lack of Co in the living organisms (J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 5417-5425).

研究分野：生体内超分子化学

キーワード：内因性一酸化炭素 ポルフィリン シクロデキストリン ヘムタンパク質 超分子化学

1. 研究開始当初の背景

近年、「ガスバイオロジー」と呼ばれるガス分子を介した新しい生体制御機構に関する研究分野が開拓され、国内外の主たる研究機関で積極的に研究が進められている。生体内の代謝過程により産出する低分子ガスの中には、抗炎症作用や抗酸化作用などを示すものがあり、これらの効果に注目が集まり、外部からのガス吸引による薬理効果が医療研究機関において検討されている。特に一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO)および硫化水素(H₂S)の3つのガス分子は、いずれも猛毒性のガスとして知られる一方、200 ppm程度の適度な吸引による生体防護効果が顕著であり、医療応用に関する検討が進められている。しかしながら、これらのガス分子の作用機序には未解明な領域が非常に多い。

NO、CO および H₂S は、それぞれ対応する酵素反応によって細胞内で生産されている。このような内因性分子の生理機能を検討するための有効な手段として、遺伝的にそれぞれの合成酵素をノックアウト(KO)し、その表現型(phenotype)を観察する方法が挙げられる。実際にアルギニンから NO を合成する酵素 NOS や、システインから H₂S を合成する酵素 CBS および CSE を欠乏した KO マウスが作製され、NO および H₂S の生物学的役割が検討されてきた[文献 1]。一方、CO には直接的な合成酵素が存在せず、酵素ヘムオキシゲナーゼ(HO)によるヘム代謝分解の際の副生成物として発生するのが唯一の生体内 CO 源である。HO を遺伝的に KO すると、CO の欠如と同時にヘムの代謝不全となり、有毒なフリーヘム(ヘミン)が細胞内で蓄積してしまい、純粋に CO のみを KO した検体を作ることは困難である。生体内で CO を選択的に除去する手段がないために、CO の生理機能の研究は NO や H₂S と比べて遅れているのが現状である。

2. 研究の目的

申請者は過去の研究において、水中で機能するミオグロビンモデル化合物として、シクロデキストリン二量体と水溶性アニオン性ポルフィリン鉄(II)錯体から成る超分子錯体”hemoCD”を開発した(Fig. 1a)。hemoCD は、Collman らのピケットフェンスタイプのモデル化合物とは異なり、水中・室温で O₂ および CO を可逆的に吸脱着する唯一のモデル化合物である。特に CO に対する親和性が高く、ミオグロビンの約 1000 倍の CO 親和性を示す。さらに hemoCD は NO とは錯体を形成しない特性がある。したがって hemoCD は生理条件で機能する非常に選択性に優れた CO レセプターである。

そこで本研究では、我々が開発した超分子錯体 hemoCD を使って、生体内一酸化炭素を選択的に除去し、そのときに起こる生体内反応を詳細に調べることによって、一酸化炭素の生体における生理機能を探索することを試みた。

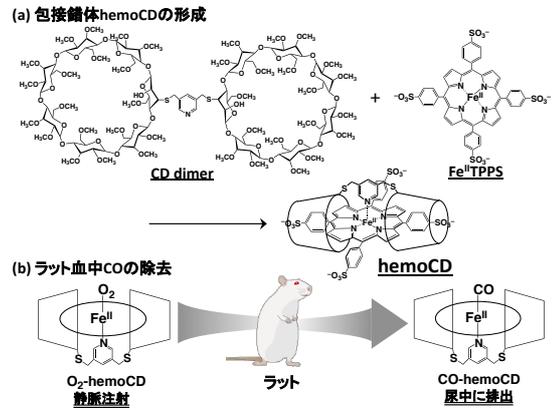


Fig. 1. 超分子錯体 hemoCD による生体内 CO の除去.

3. 研究の方法

マウスを用いた in vivo における実験では、hemoCD の PBS 緩衝溶液をマウス腹腔に投与して、一定時間毎に解剖、肝臓から組織を抽出し、遺伝子およびタンパク質発現状況についてリアルタイム PCR やウエスタンブロットなどにより評価した。また細胞を用いた in vitro の実験では、hemoCD を培地中に添加してその効果を見る実験と並行して、細胞膜透過を可能にするために hemoCD に膜透過性ペプチドを導入した新規 hemoCD の合成に挑戦した。

4. 研究成果

4-1. マウス体内における CO のフィードバック産生機構の発見

hemoCD をマウス腹腔に投与すると、血中における CO-Hb 量が有意に減少することが明らかとなった(Fig. 2)。

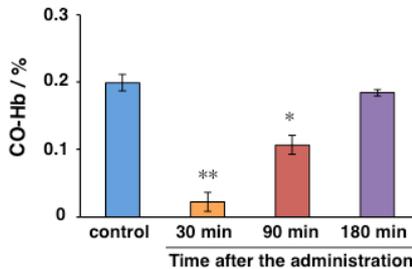


Fig 2. hemoCD 投与後における血中 CO-Hb 量の経時変化.

注目すべきことに、CO-Hb 量は一旦減少するが、非常に速やかに元の定常値へと回復する挙動が観測された。すなわち、一旦減少した CO が恒常性維持のために産生が促されているのではないかと推測された。そこで、hemoCD 投与後における肝臓内の CO 産生酵

素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)の発現量を観測した結果、著しい誘導が観測された(Fig. 3).

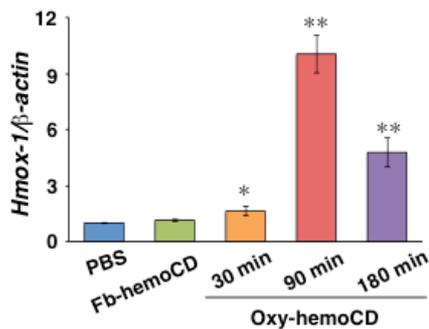


Fig. 3. hemoCD 投与後における肝臓内 HO-1 発現量変化

すなわち、CO が欠乏すると HO-1 の活性が上がり、CO の産生が促されることが明らかとなった。さらにメカニズムを詳しく検討するために、CO 欠乏時における血中のヘミン濃度およびビリルビン濃度を定量した(Fig. 4).

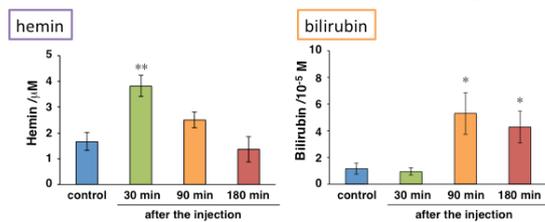


Fig. 4. hemoCD 投与後におけるマウス血中のヘミンおよびビリルビン濃度変化.

両者において有意な上昇が見られた。これらの結果を合わせて、血中 CO の欠乏時における CO 産生のフィードバック機構を次のように考察した (Fig. 5). 血中から CO が除去されると、CO-Hb は血清中で酸化を受けやすいオキシ体(oxy-Hb)になる。ここで赤血球膜内に存在する Hb であれば、簡単に酸化させることはないが、膜外に出たセルフリーの Hb の場合、内在する過酸化化物により容易に酸化することが知られている。酸化された Hb は容易にヘミンを血中に放出し、それがトリガーとなって HO-1 を誘導するものと考えられる。HO-1 によるヘミン代謝によって新たに CO が産生され、CO の恒常性が維持されることが考えられる。

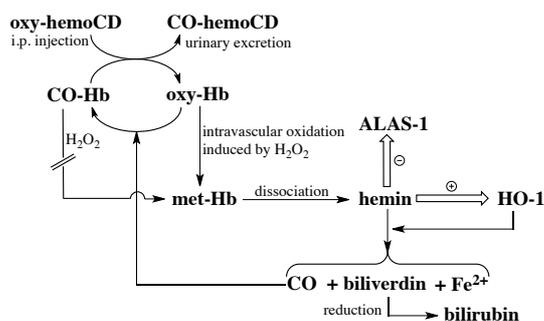


Fig. 5. hemoCD による生体内 CO の除去とそれによるフィードバック機構.

hemoCD の機能を細胞内で発揮させるため、シクロデキストリンの骨格に膜透過性ペプチドであるオクタアルギニンを導入した (Fig. 6).

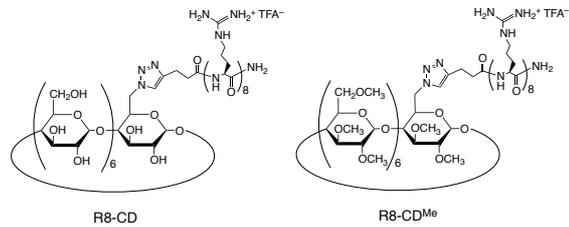


Fig. 6. R8-CD (OH 体および OCH₃ 体)の構造

このシクロデキストリン(R8-CD)はポルフィリンを強く包接し、細胞内へと移行することが共焦点顕微鏡測定により確認された(Fig. 7).

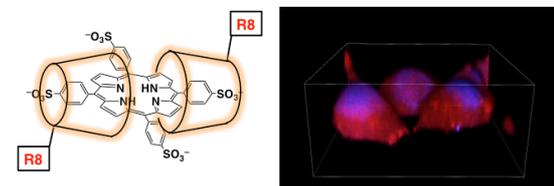


Fig 7. R8-CD/ポルフィリン包接錯体による細胞内導入

今後、この手法を用いて膜透過性 hemoCD を合成し、細胞内シグナル伝達系における内因性 CO の生理機能解明について、着手する予定である。

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 4 件)

① H. Kitagishi, S. Minegishi, A. Yumura, S. Negi, S. Taketani, Y. Amagase, Y. Mizukawa, T. Urushidani, Y. Sugiura, K. Kano

“Feedback Response to Selective Depletion of Endogenous Carbon Monoxide in the Blood”

Journal of the American Chemical Society, 138(16), 5417-5425 (2016).

(DOI: 10.1021/jacs.6b02211) (査読有)

② H. Kitagishi, H. Kawasaki, K. Kano
“Bioconjugation of Serum Albumin to a Maleimide-appended Porphyrin/Cyclodextrin Supramolecular Complex as an Artificial Oxygen Carrier in the Bloodstream”

Chemistry -An Asian Journal, 10, 1768-1775 (2015).

(DOI: 10.1002/asia.201500451) (査読有)

③ H. Kitagishi, F. Chai, S. Negi, Y. Sugiura, K. Kano
“Supramolecular Intracellular Delivery of an Anionic Porphyrin by Octaarginine-conjugated Per-0-methyl- β -Cyclodextrin”
Chemical Communications, 51, 2421-2424 (2015).
(DOI: 10.1039/C4CC09042J) (査読有)

④ H. Kitagishi, K. Minami, K. Kano
“Intracellular Delivery of Anionic meso-Tetraphenylporphyrin-Per-0-methylated β -Cyclodextrin Supramolecular Complex by an Oligoarginine Carrier Peptide”
Chemistry Letters, 43, 1095-1097 (2014).
(DOI: 10.1246/cl.140298) (査読有)

[学会発表] (計15件)

① Oligoarginine-conjugated Cyclodextrin as a Cell-penetrating Host Molecule
H. Kitagishi, A. Nakagami, K. Kano
May 2016, 18th International Cyclodextrin Symposium, Florida, USA

② Intracellular Delivery of Porphyrin-Cyclodextrin Supramolecular Complexes by an Octaarginine Carrier Peptide (invited)
H. Kitagishi, K. Kano
Dec 2015, Pacificchem 2015, Honolulu, USA

③ The effect of polar functional group at the distal side of the myoglobin model complex on its ligand binding property (O_2 and CO) in aqueous solution (invited)
H. Kitagishi, N. Kitamura, K. Kano
Dec 2015, Pacificchem 2015, Honolulu, USA

④ Depletion of Endogenous CO in the Blood of Mice by a Supramolecular Heme Protein Model Complex, HemoCD
H. Kitagishi, S. Minegishi, K. Kano
July 2015, The 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Beijing, China

⑤ Depletion of Endogenous CO in Blood of Mice by a Supramolecular CO Receptor (invited)
H. Kitagishi, S. Minegishi, K. Kano
June 2015, Metals in Biology, Suzuki Umetaro Hall in RIKEN Wako Campus, Saitama, Japan

⑥ Non-covalent Intracellular Delivery by an Oligoarginine-conjugated Cyclodextrin
H. Kitagishi, F. Chai, K. Kano (invited)
May 2015, 8th Asian Cyclodextrin Conference, Kumamoto Prefectural Community Center “PAREA”, Kumamoto, Japan

⑦ A Supramolecular Approach for Delivery of Porphyrins into Living Cells
H. Kitagishi, S. Hatada, F. Chai, K. Kano

June 2014, 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Istanbul, Turkey
他国内学会での発表8件

[その他]
ホームページ等
<http://www1.doshisha.ac.jp/~kkano/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北岸 宏亮 (KITAGISHI, Hiroaki)
同志社大学理工学部・准教授
研究者番号：60448090