

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06551

研究課題名(和文) 超分子化学的手法を用いたヘム高親和性合成分子の創製とケミカルバイオロジーへの展開

研究課題名(英文) Development of synthetic receptors for heme based on a supramolecular chemistry approach and applications toward chemical biology

研究代表者

久松 洋介 (Yosuke, Hisamatsu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師

研究者番号：80587270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で重要な役割を担うヘムの生細胞中での挙動を直接観測できるツールの開発が望まれている。本研究期間において、ホスト・ゲスト化学を基盤とし、ヘムに対して高い結合親和性をもつ新規人工レセプターを設計、合成した。さらに研究を進展させ、中性水溶液中でヘム濃度依存的な蛍光応答を示す人工ヘムレセプターを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子を水中で精密に認識する人工レセプターの開発と応用は、ホスト・ゲスト化学の分野において重要な研究課題の一つである。本研究期間において、生体内で重要な役割を持つヘムに対して高い結合親和性と蛍光応答性をもつ新規人工レセプターを開発した。今後、本研究で得られた知見を活用し改善を加えることで、ヘムの研究に貢献できる実用的なツールへと発展させたい。

研究成果の概要(英文)：Heme plays important roles in a variety of biological systems and the development of tools for the detection of heme in living cells is important for understanding of physiological roles of heme. In this research project, new tweezer-type synthetic receptors that form stable complexes with heme were developed. Moreover, the fluorescent synthetic receptor exhibits a heme-concentration dependent fluorescence response in aqueous solution at neutral pH.

研究分野：ホスト・ゲスト化学

キーワード：ヘム 蛍光 人工レセプター ホスト・ゲスト化学 超分子化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重要な生体分子を水中で精密に認識する人工レセプター(ホスト分子)の開発と生命科学への応用は、ホスト・ゲスト化学の分野において重要な研究課題の一つである。

ヘム(鉄-プロトポルフィリン IX 錯体)は、生命活動に必須な補因子である。また、ヘム自体がシグナル分子として様々な細胞機能調節に関わっていることが知られている (*Free Radic. Biol. Med.*, 2019, 133, 88)。しかし、ヘムの細胞内動態や局在についてはいまだに理解されていないことも多く、細胞内ヘムを認識しその挙動を直接観測できるツールの開発が望まれている。このような背景から、最近、ヘム結合性タンパク質と蛍光タンパク質で構成される蛍光ヘムセンサーが開発された (*ACS Chem. Biol.*, 2015, 10, 1610; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2016, 113, 7539)。一方、ヘムの精密認識に基づく蛍光応答が可能な人工ヘムレセプターを設計、合成できれば、遺伝子工学的手法を用いない簡便なヘム蛍光プローブとして期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ホスト・ゲスト化学を基盤とし、ヘム高親和性ピンセット型人工レセプターの創製を第1の目的とした。さらに、人工レセプターに蛍光応答性を付与し、細胞内ヘム検出を目指した蛍光プローブの創製を第2の目的とし研究を実施した。

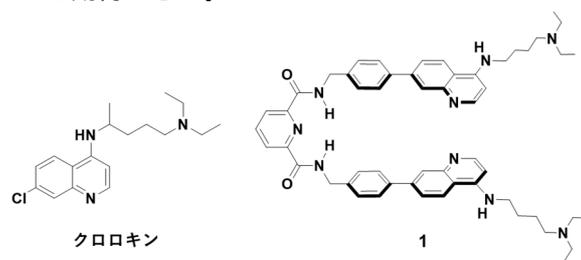


図 1

3. 研究の方法

(1) 抗マラリア薬でありヘム結合親和性をもつことが知られているクロロキンの構造を参考に、ヘム高親和性新規人工レセプターを設計、合成した。具体的には、スペーサー部位の両端に4-アミノキノリン部位を有するピンセット型人工レセプター **1** を設計、合成し、ヘムに対する親和性を評価した。

(2) 合成したヘム高親和性人工レセプター **1** の適切な位置に蛍光色素として sulfo-Cy5 を導入した蛍光性人工ヘムレセプター **2** を設計、合成した。ヘム認識に基づく **2** の蛍光応答を中性水溶液中で評価し、さらにヘム認識に基づく **2** の自己集合挙動についても評価した。

4. 研究成果

(1) ヘムに対して高い結合親和性を持つ新規人工レセプターとして、ピリジン-2,6-ジカルボキサミドスペーサーの両端に認識部位として4-アミノキノリン部位を導入したピンセット型人工レセプター **1** を設計、合成した(図1)。そして、ヘムの前駆体であるプロトポルフィリン IX (PPIX) およびヘム (2.4 μM) に対する **1** の複合体形成能を DMSO/HEPES 緩衝液 (pH 7.4) (2:3, v/v) 中、吸収スペクトル滴定実験により評価した(図2)。

その結果、PPIX の吸収スペクトルは、**1** の濃度依存的に変化した(図2 a)。その吸光度変化から PPIX と **1** の 1:1 複合体の結合定数が $4.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と算出され、比較的安定な複合体を形成した。一方、ヘム(ヘミンを使用)に対して、1:1 複合体だけでなく 2:1 複合体(ヘム:**1**=2:1)の生成も見られたが、1:1 複合体の結合定数が PPIX の場合と比べ 1 桁程度大きい安定な複合体を形成した。これらの結果から、本研究で見出した人工ヘムレセプターがヘムに対して高親和性を示すことを明らかにした。また、4-アミノキノリン部位を一つしか持たない化合物は、PPIX およびヘムに対して結合親和性が低下したため、ピンセット型構造が人工レセプターの分子認識

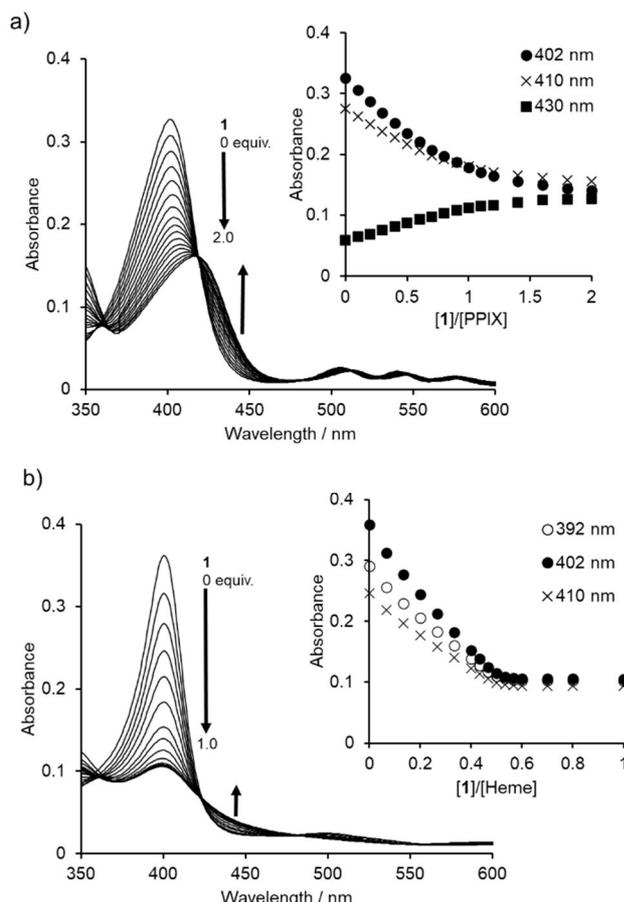


図 2 人工レセプター **1** 存在下での a) PPIX および b) ヘムの吸収スペクトル変化。

能に重要であることを確認した。

低侵襲ながん治療法の一つとして光線力学療法 (PDT) が知られている。PDT は、がん組織に光増感剤を集積させ光照射することにより生成した活性酸素でがん細胞を破壊する治療法である。ヘムの前駆体である PPIX は光増感剤として知られている。そこで、人工レセプター 1 と PPIX の複合体形成が PPIX の PDT 活性に及ぼす効果について調べた。具体的には、ヒト大腸がん細胞である HCT-116 細胞に対して PPIX の光照射 (530-590 nm) による細胞死誘導活性を評価したところ、PPIX 単独の場合と比べ、1 共存下で光照射による細胞死誘導活性が大きく向上することを明らかにした。

(2) 研究成果 (1) に続いて、ヘム認識に基づく蛍光応答が可能な人工レセプターの開発に着手した。ヘム認識能を有する 4-アミノキノリン部位を二つもつピンセット型分子に sulfo-Cy5 を蛍光色素として導入した蛍光性人工レセプター 2 を設計、合成した (図 3)。

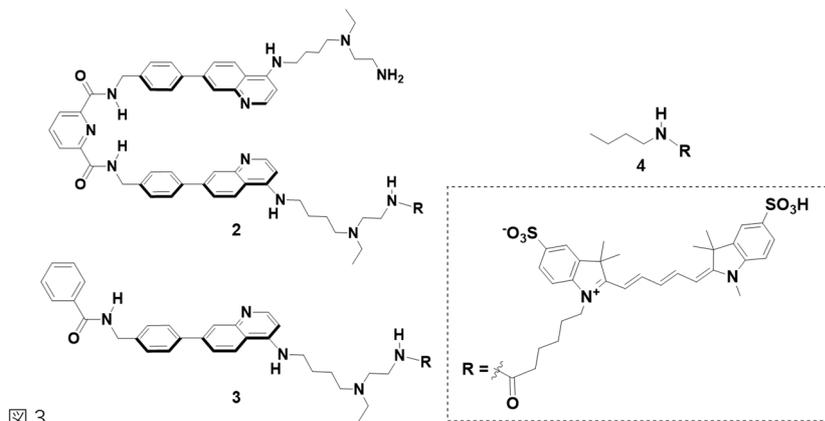


図 3

2 は、HEPES 緩衝液 pH 7.4 (0.10 M NaCl および 1% DMSO を含む) 中でヘムと複合体を形成し、ヘムの濃度依存的に蛍光強度が顕著に減少した (図 4 a)。一方、4-アミノキノリン部位を一つしか持たない 3 は 2 と比べヘムに対する蛍光応答性が低下した。さらに、ヘム認識部位を持たない 4 ではヘムによる蛍光強度変化はほぼ見られなかった (図 4 b)。

人工レセプター 2 とヘムの複合体形成について詳細な検討を行った結果、2 はヘムと複合体形成することで自己集合が促進され、数百ナノメートルの凝集体を生成することを動的光散乱法による粒子径測定および透過型電子顕微鏡観察により明らかにした。種々の検討の結果、疎水性のヘムと 2 の複合体が両親媒性を持つことが自己集合挙動を引き起こす主要な要因であることが示唆された。

次に 2 の蛍光応答のヘム選択性を検討した。その結果、ヘムの分解産物であるビリベルジンやビリルビンに対してヘムと同程度の蛍光応答を示したため、蛍光性人工レセプターのヘム選択性が課題として残った。

今後、本研究で得られた知見を活用し、改善を図ることでヘム高選択的な認識能を有する実用的な新規人工レセプターの開発を進める。

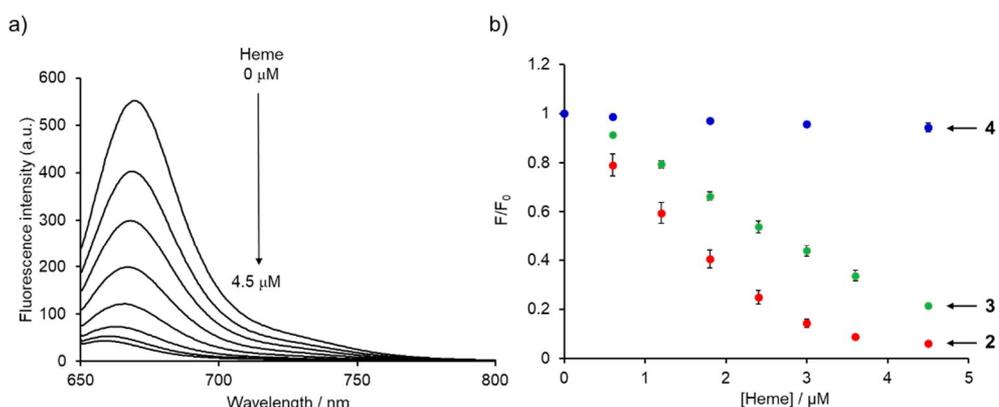


図 4 a) 人工レセプター 2 のヘム存在下での蛍光スペクトル変化。b) 化合物 2-4 のヘム濃度依存的な蛍光強度変化。[2], [3], [4] = 3.0 μM。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hisamatsu Yosuke, Otani Koki, Takase Hiroshi, Umezawa Naoki, Higuchi Tsunehiko	4. 巻 27
2. 論文標題 Fluorescence Response and Self Assembly of a Tweezer Type Synthetic Receptor Triggered by Complexation with Heme and Its Catabolites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 6489 ~ 6499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202003872	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 Hisamatsu Yosuke, Umezawa Naoki, Yagi Hirokazu, Kato Koichi, Higuchi Tsunehiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Design and synthesis of a 4-aminoquinoline-based molecular tweezer that recognizes protoporphyrin IX and iron(III) protoporphyrin IX and its application as a supramolecular photosensitizer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 7455 ~ 7467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8SC02133C	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 -
1. 著者名 Shirakawa Yoshinori, Yano Yuuki, Niwa Yuki, Inabe Kanako, Umezawa Naoki, Kato Nobuki, Hisamatsu Yosuke, Higuchi Tsunehiko	4. 巻 58
2. 論文標題 Stable Iron Porphyrin Intramolecularly Coordinated by Alcoholate Anion: Synthesis and Evaluation of Axial Ligand Effect of Alcoholate on Spectroscopy and Catalytic Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 4268 ~ 4274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.8b03384	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 Hisamatsu Yosuke, Fukiage Takehiro, Honma Kojiro, Balia Andrii G., Umezawa Naoki, Kato Nobuki, Higuchi Tsunehiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of the Acetamido Group on pH-Dependent Light Emission of a 3-Hydroxyphenyl-Substituted Dioxetane Luminophore	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1258 ~ 1262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.8b03913	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 Sakata Yosuke, Yabunaka Kosuke, Kobayashi Yuko, Omiya Hirohisa, Umezawa Naoki, Kim Hye-Sook, Wataya Yusuke, Tomita Yoshimi, Hisamatsu Yosuke, Kato Nobuki, Yagi Hirokazu, Satoh Tadashi, Kato Koichi, Ishikawa Haruto, Higuchi Tsunehiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Potent Antimalarial Activity of Two Arenes Linked with Triamine Designed To Have Multiple Interactions with Heme	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 980 ~ 985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.8b00222	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大谷紘生、久松洋介、梅澤直樹、樋口恒彦
2. 発表標題 ヘム認識能を有する蛍光性分子ピンセットの設計・合成
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久松洋介、大谷紘生、梅澤直樹、樋口恒彦
2. 発表標題 水中でヘムを認識する蛍光性人工レセプターの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisamatsu Yosuke
2. 発表標題 Design, Synthesis and Biological Applications of 4-Aminoquinoline-Based Molecular Tweezers That Recognize Protoporphyrin IX and Heme
3. 学会等名 7th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences (iPoPS2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久松洋介、梅澤直樹、矢木宏和、加藤晃一、樋口恒彦
2. 発表標題 プロトポルフィリンIXと分子ピンセットからなる超分子型光増感剤の光線力学療法への応用
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部 第7回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久松洋介、大谷紘生、梅澤直樹、矢木宏和、加藤晃一、樋口恒彦
2. 発表標題 光線力学療法への応用を指向した超分子型光増感剤の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久松洋介、大谷紘生、梅澤直樹、矢木宏和、加藤晃一、樋口恒彦
2. 発表標題 プロトポルフィリンIX及びその鉄(III)錯体を認識する分子ピンセットの設計・合成と超分子型光増感剤への応用
3. 学会等名 第16回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisamatsu Yosuke, Otani Koki, Takase Hiroshi, Umezawa Naoki, Higuchi Tsunehiko
2. 発表標題 Design, Synthesis and Biological Applications of a Molecular Tweezer That Recognizes Protoporphyrin IX and Iron(III) Protoporphyrin IX
3. 学会等名 14th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷 紘生、久松 洋介、梅澤 直樹、樋口 恒彦
2. 発表標題 ヘム認識能を有する蛍光性分子ピンセットの開発と自己集合挙動
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------