

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13092

研究課題名(和文)ヘム代謝副産物であるCOの生理機能全容解明へのアプローチ

研究課題名(英文)A study on biological function of endogenous CO as a byproduct of heme metabolism

研究代表者

北岸 宏亮(Hiroaki, Kitagishi)

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内においてヘムが代謝される際の副産物として、一酸化炭素(CO)が産生されている。本研究では生体内でCOを選択的に捕捉するヘムタンパク質モデルhemoCDを使って、細胞におけるCOの生理機能を調べた。本研究では錯体を細胞内に送達するためにhemoCDに膜透過ペプチドであるオクタアルギニンを導入した。この新規R8-hemoCDは細胞内に取り込まれ、細胞内の内在性COを捕捉する性質を示した。内在性COを奪われた細胞内では活性酸素の産生が有意に亢進した。さらに別のアプローチとして、ミトコンドリア内に存在するシトクロムcオキシダーゼ(CcO)モデル錯体を新たに合成し、COとの反応性を詳細に調べた。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide (CO) is continuously produced in mammalian cells during heme metabolic reaction. In this study, we investigated the biological function of the endogenous CO using a selective CO removal agent hemoCD. In order to introduce hemoCD into the cells, we conjugated hemoCD with octaarginine peptide. The new hemoCD derivative (R8-hemoCD) was taken by living cells and captured CO in cells, in which reactive oxygen species level was significantly enhanced in the CO-removed cells. In addition, we newly synthesized a water-soluble biomimetic model for cytochrome c oxidase to investigate the reactivity of CO with a Fe/Cu hetero-binuclear structure of CcO.

研究分野：生体関連化学

キーワード：一酸化炭素 ヘム シクロデキストリン ポルフィリン モデル錯体

### 1. 研究開始当初の背景

生体内において一酸化炭素(CO)はヘム代謝の際の副産物として常時産生されており、さまざまな生理機能を有すると考えられてきた(Fig. 1)。実際に外部からガスあるいは徐放試薬によってCOを生体に付与すると、毒性のない範囲では抗炎症作用などの細胞保護作用が観測されており、COの生理機能には注目が集まっていた。しかしながら、生体内において内在性COの産生のみを停止させる有効な手段がないために、COの真の生理機能に迫る研究は非常に限られていた。

生体内COの産生を止める手段として、ヘム代謝の際の酵素であるヘムオキシゲナーゼの活性を阻害する方法が挙げられ、実際に試みられてきた。しかしながら、ヘムオキシゲナーゼの活性阻害は、COの産生をストップさせるだけでなく、ヘムの代謝不全やビリベルディン等のCO以外の副産物の産生を停めてしまうことになるため、COの生理機能に迫ることは困難であった。

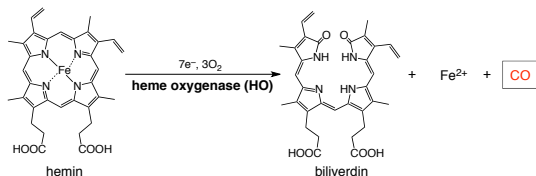


Fig.1. 内在性COの産生機構

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に研究してきたヘムタンパク質モデル錯体hemoCDを使って、内在性COの生理機能探索を行った(Fig. 2a)。hemoCDは、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包接錯体であり、水中で酸素(O<sub>2</sub>)やCOと可逆的に結合する性質を持つ。特にCOに対する親和性が高く、ヘモグロビンの約1000倍であり、これまでに報告されている生体内COレセプターのどれよりもCO親和性が高い。

我々は独自のCOレセプターhemoCDを使って、生体内COを選択的に捕捉し、その際の生体内の状態を調べることで、内在性COの生理機能について研究した。今回はとくに細胞内COに焦点を当て、細胞膜透過能を付与したhemoCDの合成、細胞内COの除去、それによる細胞内環境変化の観測を行った(Fig. 2b)。さらに別のアプローチとして、ミトコンドリア呼吸鎖末端に存在するシトクロムcオキシダーゼ(CcO)の構造と機能に着目し、水溶性のCcOモデル錯体を構築、このモデル錯体とCOとの反応性を調べることで、CcOとCOの反応の本質に迫ることを試みた(Fig. 3)。

### 3. 研究の方法

まず、hemoCDを用いて細胞内COを定量することを試みた。細胞にhemoCDを加えた後、細胞を破碎し、その細胞溶解液をろ過した後、ろ液のUV-visスペクトルを測定した。

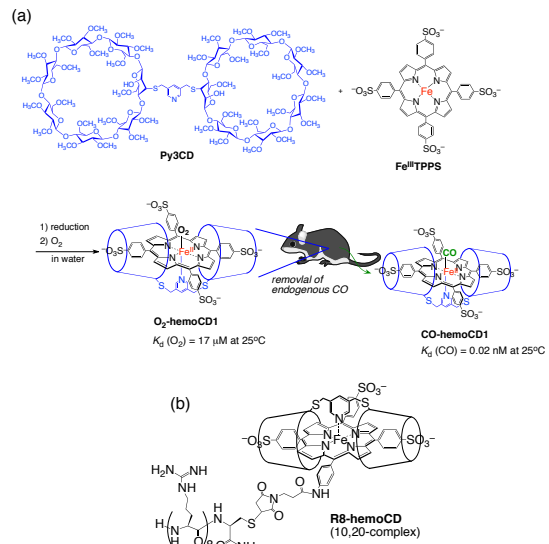


Fig 2. hemoCD および R8-hemoCD の構造

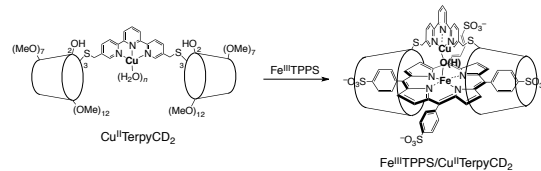


Fig 3. 新規水溶性CcOモデル錯体

つぎに、hemoCDに膜透過性ペプチドを付与した新たな錯体R8-hemoCDを合成した。細胞膜透過に関しては、共焦点顕微鏡により確認した。またCO除去の効果をみるために、LPSによる外部刺激をおこなった。

さらにCcOモデル錯体として、鉄ポルフィリンと銅錯体をリンカーに有する包接錯体を合成した。この錯体の酸素およびCOとの反応性をUV-visスペクトルや共鳴ラマンスペクトル等により検討した。

### 4. 研究成果

各種培養細胞に含まれる内因性CO量を定量した結果をFig. 4に示す。どの細胞においてもおよそ一定量のCOが検出され、がん細胞においては非がん細胞よりも有意にCO量が多いことが明らかとなった。この結果は、培養細胞においてCOを正確に定量したはじめての例であり、hemoCDは非常に簡便かつ正確に微量COを定量できるツールであることが明らかとなった。

つぎにオクタアルギニンを修飾したR8-hemoCDを使って、細胞内COの捕捉を確認した。COの捕捉の確認は、細胞内COプローブであるCOP-1を用いて行った。結果をFig. 5に示す。CO徐放分子CORMによってCOを取り込ませた細胞内では、COP-1による強い蛍光が観測された。一方、CORM導入後にR8-hemoCDを加えた細胞では、COP-1を加えても有意な蛍光は観測されなかった。これは、R8-hemoCDが細胞内に侵入し、細胞内のCOを定量的に捕捉していることを意味している。実際にR8-hemoCDはCOP-1よりも非常に強くCOを捕捉することを溶液中の

実験で確かめており、細胞内 CO は R8-hemoCD によって捕捉可能であることが明らかとなった。

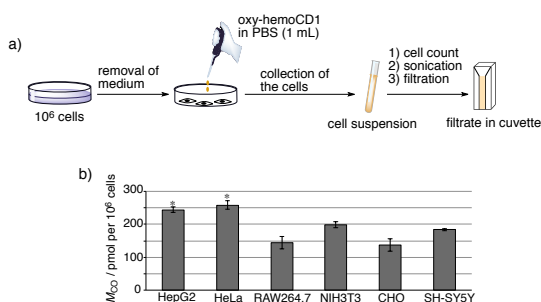


Fig. 4. hemoCD による細胞内 CO の定量

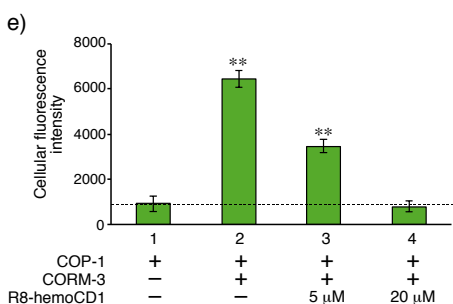
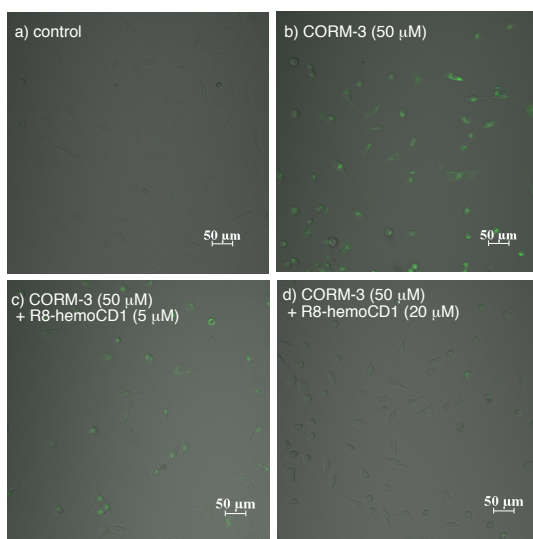


Fig. 5. R8-hemoCD による細胞内 CO の捕捉

さらに細胞内 CO の枯渇による細胞機能への影響を調べるために、炎症系サイトカイン TNF- $\alpha$  および細胞内 ROS の定量を行った。LPS 刺激によってマクロファージからの TNF- $\alpha$  産生が増加し、外部から CO を与えることによって、TNF- $\alpha$  の産生が抑制される、いわゆる CO の抗炎症作用がよく知られている。R8-hemoCD を細胞に予め添加しておくと、CO による抗炎症作用が完全にキャンセルされることが判明し、CO が抗炎症作用に直接的に関わっていることが証明された。さらに内在性 CO 除去の効果を見るために、R8-hemoCD で処理したマクロファージ細胞の ROS 量を ROS プロブで計測したところ、内在性 CO を R8-hemoCD によって除去した細胞では細胞内 ROS レベルが有意に上昇し

ていることが明らかとなった(Fig. 6)。このことは、内在性 CO が細胞内 ROS レベルを調節するはたらきがあることを示唆している。

さらに今回新しいモデル錯体として水溶性 CcO モデルの構築とそのキャラクターゼーションを行った(Fig. 3)。CcO はミトコンドリアの末端酵素であり、酸素還元の際の水分子の関与が提案されているが、実証はされていない。我々は今回初めて水溶性の鉄ポルフィリン・3 配位銅錯体から成る二核錯体の合成に成功した。興味深いことに、酸素錯体から CO 錯体への変化が著しく遅く、完全に置き換わるまでに数十分を要した。これは、2 核構造が CO の配位を著しく阻害することを示す結果であり、生体系においても細胞内 CO はミトコンドリア内の CcO の機能にはあまり関与しないことを示唆している。したがって上述の細胞内 CO 濃度と ROS レベルの関係は、CcO 活性の部分では説明できず、今後さらなる詳細な検討が必要である。現在我々のグループでは、R8-hemoCD による細胞内 CO の除去がおよぼすミトコンドリア機能の変化について、詳細な研究を進めている。

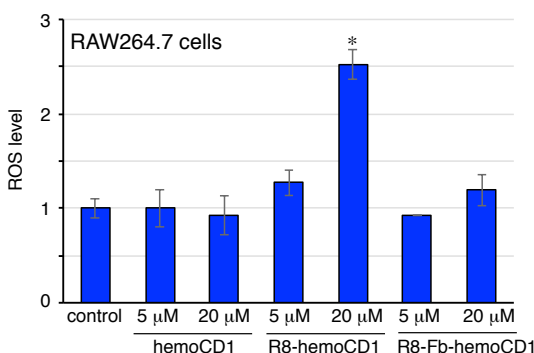


Fig. 6. CO 除去時の細胞内 ROS レベルの定量

## 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 3 件)

1. “A Water-Soluble Supramolecular Complex that Mimics the Heme/Copper Hetero-Binuclear Site of Cytochrome c Oxidase”

H. Kitagishi, D. Shimoji, T. Ohta, R. Kamiya, Y. Kudo, A. Onoda, T. Hayashi, J. Weiss, J. A. Wytko, K. Kano, *Chem. Sci.*, 9, 1989–1995 (2018). (査読有)

2. “Detection and Removal of Endogenous Carbon Monoxide by Selective and Cell-permeable Hemoprotein-model Complexes”  
S. Minegishi, A. Yumura, H. Miyoshi, S. Negi, S. Taketani, R. Motterlini, R. Foresti, K. Kano, H. Kitagishi, *J. Am. Chem. Soc.*, 139, 5984–5991 (2017). (査読有)

3. “Iron(II)porphyrin–Cyclodextrin Supramolecular Complex as a Carbon Monoxide-Depleting Agent in Living Organisms”

H. Kitagishi, S. Minegishi, *Chem. Pharm. Bull.*,

65, 336–340 (2017). (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

国際会議

1. “Selective Detection of Cyclodextrin-Porphyrin Host-Guest Complexation System in the Biological Media (Serum, Urine, and Blood)”

H. Kitagishi, M. Saito, 9th Asian Cyclodextrin Conference, Singapore, 16 Dec, 2017 (Invited).

2. “Selective Removal of Endogenous Carbon Monoxide in vitro and in vivo by Aqueous Hemoprotein Model Complexes”

H. Kitagishi, S. Minegishi, 14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Toulouse, 8 June 2017.

3. “Non-covalent Intracellular Delivery by an Oligoarginine-conjugated Cyclodextrin”

H. Kitagishi, A. Nagkagami, K. Kano, 18th International Cyclodextrin Symposium, Gainesville, 19 May 2016.

4. “Induction of HO-1 Expression by Selective Removal of Endogenous CO”

H. Kitagishi, K. Kano, 9th International Conference on Heme Oxygenase, Prague, 17 Sep 2016.

国内学会

5. “修飾シクロデキストリンを用いた機能性物質の創成”

北岸宏亮, 第 66 回高分子討論会, 松山, 2017 年 9 月 20 日 (依頼講演)

6. “マウス体内 CO の選択的除去によって誘発される体内時計リズム変化”

峯岸彩夏, 北岸宏亮, 根木滋, 加納航治, 日本化学会第 97 春季年会, 神奈川, 2017 年 3 月 18 日

7. “膜透過型シクロデキストリンの合成およびポルフィリンとの包接錯体の細胞内における包接挙動の観測” \*5

中上敦貴, 北岸宏亮, 日本化学会第 97 春季年会, 神奈川, 2017 年 3 月 18 日

8. “水溶性のシトクロム c オキシダーゼ活性中心モデル錯体”

下司大貴, 北岸宏亮, 日本化学会第 97 春季年会, 神奈川, 2017 年 3 月 17 日

9. “血中に存在する内因性 CO の選択的除により引き起こされる生体内反応”

峯岸彩夏, 北岸宏亮, 第 23 回日本血液代替物学会年次大会, 東京, 2016 年 11 月 24 日 (優秀講演賞)

10. “<sup>13</sup>C 標識メチル化シクロデキストリンによる生体内類似環境での包接現象の観測”

北岸宏亮, 齋藤真依, 根木滋, 喜里山暁子, 加納航治, 第 33 回シクロデキストリンシンポジウム, 高松, 2016 年 9 月 9 日

11. “マウス血中 CO の選択的除去によって誘発される生体内リズム変化の観測”

峯岸彩夏, 北岸宏亮, 根木滋, 加納航治, 第 33 回シクロデキストリンシンポジウム, 高松, 2016 年 9 月 9 日

12. “遠位側に機能性部位を導入した新規ヘム

タンパク質モデルの構築”

下司大貴, 北岸宏亮, 第 33 回シクロデキストリンシンポジウム, 高松, 2016 年 9 月 9 日

〔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

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：60448090