

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K04867

研究課題名(和文) タンパク質に内包された単結晶酸化物ナノ粒子の物性と応用研究

研究課題名(英文) Basic and applied studies for the protein encapsulated oxide nano-crystal

研究代表者

吉村 英恭 (Yoshimura, Hideyuki)

明治大学・理工学部・専任教授

研究者番号：70281441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：フェリチン分子に含まれるHとLサブユニットの割合を、プラスミドを変えることで調整できることを示した。HとLの割合は、ある程度の分布をもって発現され、陰イオン交換樹脂MonoQによりある程度分離することができた。フェリチンにより生成したナノ粒子はLサブユニットだけの場合が特に優れていることがわかった。Hサブユニットが含まれるとフェリチンの空洞内部を十分埋めるようなナノ粒子ができにくいことが確認された。Lサブユニットフェリチンで作製したマグネタイトナノ粒子を3.0MHzの交流磁場中(磁場0.5mT)においたところ、2分間で20℃の温度上昇がみられ、温熱療法に使えることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェリチンの殻中にマグネタイトナノ粒子単結晶を成長させるには、鉄酸化部位をもたないLサブユニットだけで構成されるようにして、できるだけ種結晶の生成を抑える必要があることを示した。無機物の単結晶はタンパク質の殻に囲まれており、生体適合性が高く医療への応用が期待できる。一つの応用としてこの粒子を高周波磁場中に置くことで発熱することを示したことは、温熱療法の発展に大きく寄与できると考えられる。特にフェリチンを遺伝子操作することで癌細胞に特異的に結合するようのできることで、磁性体ナノ粒子を集中的に癌細胞に集めることができ発熱効果が大きくなることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Nano-size ferromagnetic particles produce heat in an alternating magnetic field due to magnetic energy dissipation during magnetic dipole relaxation. Apoferritin is known to produce magnetite nanoparticle in its cavity. We aimed to utilize this magnetite nanoparticle for hyperthermia therapy. Magnetite nanoparticles were synthesized using several kinds of apoferritin, homo L-subunit apoferritin (L-ferritin) and hetero-assembly of H-subunit and L-subunits. The crystallinity of magnetite nanoparticles was highest in recombinant L-ferritin. Heat generation by nanoparticles in alternating magnetic field was investigated. We succeeded to increase temperature of 30mg/mL L-ferritin solution up to 20 degree-C from room temperature in alternating magnetic field of 0.5 mT, 3.0 MHz. We also synthesized apoferritin with aptamer which bind to integrin of cancer cell, and confirmed this ferritin bind to HeLa cell. We found deformation of HeLa cell after treated in altering magnetic field.

研究分野：生物物理学

キーワード：フェリチン マグネタイトナノ粒子 マグネタイト 単結晶 温熱療法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フェリチンは、体内では鉄を主に取り込むが、試験管内では鉄以外の様々な無機物を取り込みナノ粒子とすることを我々や他の研究グループが報告してきた。適当な溶液条件にすることで空洞内部に無機物のナノ粒子を形成することができる。ナノ粒子の成長は空洞の大きさで制限され、最終的に粒径のそろった粒子となる。また外側をタンパク質に囲まれているのでナノ粒子同士の凝集を防ぐことができる。我々は、鉄酸化活性部位を持たないサブユニットで構成されたリコンビナントフェリチン(L-ferritin)を利用し、酸化剤の無い条件でゆっくり合成することにより単結晶で粒径の揃った **magneto-ferritin** を作ることができた(科研費基盤研究(C) H25-H27 課題番号 25390020「単結晶ナノ粒子生成容器としてのタンパク質構造の最適化」)。しかしながら、合成時間がかかることや収率が悪いことがあり、改善の必要性があった。

### 2. 研究の目的

当該研究ではフェリチンの空洞中に希土類や磁性ナノ粒子を作製し、磁気共鳴画像のコントラスト造影剤、発光性分子標識、または温熱療法への応用を目指す。特に磁性体ナノ粒子では粒子の結晶性を改善することで造影剤としての効果や高周波による加熱の効率が向上すると考える。また、フェリチンの遺伝子を改変することによりフェリチン外壁に腫瘍細胞に特異的に結合するペプチド(アプタマー)を付加することが可能であるので、患部の可視化と温熱療法の両面から医学的な応用につなげる予定である。

当該研究ではフェリチンを用いて作製した様々なナノ粒子を、タンパク質の外殻を持つ特徴を生かして医療に結びつけるための基礎研究をおこなうことを目的とする。

### 3. 研究の方法

実験に使用したフェリチンのLサブユニット遺伝子(fer0)はウマ肝臓のcDNAより抽出したり、ウマHサブユニット遺伝子(HoHF)は文献による配列<sup>2)</sup>をもとに合成した。

当初はフェリチンで生成した希土類元素と酸化鉄ナノ粒子について応用につなげることを計画していたが、コロナ禍により研究環境が悪化して時間的な問題が生じたので、酸化鉄(マグネタイト)に関連した以下の4テーマに絞って研究を行った。

#### (1) フェリチンの24サブユニットのうち小数のHサブユニットを含む分子を生成する。

これまでの研究でLサブユニットだけで構成されるリコンビナントフェリチンを用いて、ゆっくり自然酸化を行うと結晶性の良いマグネタイトナノ粒子ができることがわかっていった。効率よく生成する方法として24個のうち1個だけHサブユニットを導入することを考えた。単一点から結晶成長が始まるので効率よく単結晶ナノ粒子ができると予想した。このためにプラスミドのマルチクローニングサイトを使ってHL混合フェリチンの作製を行った。HL混合フェリチンは様々なプラスミドを用いて作製したが、以下の4種類の方法を報告する。

- pETDuetのマルチクローニングサイト(MCS1)にLサブユニット(fer0)、マルチクローニングサイト(MCS2)にHサブユニット(HoHF)の遺伝子を導入した(HL-fer1)。
- Lサブユニットの比率を上げるためにpETDuetよりコピー数の多いpRSFDuetにLサブユニットの遺伝子を組み込み、pACYCDuetにHサブユニットを組み込み同時に形質変換にもちいて共発現させた(HL-fer4)。
- pETDuetのMCS1にHサブユニット、MCS2にLサブユニットを入れて形質変換した(HL-fer6)。単一プラスミドでの効果を試した。
- B)でもHサブユニットが多いので、さらにpETDuetに2つのLフェリチン遺伝子を導入し、pACYDuetにHフェリチンとLフェリチンの遺伝子を導入して、これらのプラスミドを共発現させた(HL-fer7)。フェリチンの精製を精密にするため、HサブユニットN端にstrept-tagを付けてアフィニティクロマトグラフィで精製した。

分子の確認はNative-PAGE、電子顕微鏡、超遠心法によった。

#### (2) (1)で作製したフェリチンを使い、マグネタイトナノ粒子を生成させる。これらのナノ粒子を使い鉄の酸化速度を310nmの光の吸収で測定する。またその結果得られたナノ粒子の結晶性を高分解能電子顕微鏡および粉末X線回折で調べる。

- 酸化速度の測定  
硫酸アンモニウム鉄0.8mM、HEPES 100mM (pH 6.8)でのフェリチンによる鉄の酸化を波長310nmにおいて計測する。
- マグネタイトナノ粒子の生成は60°Cにおいてアルゴンガス中で硫酸アンモニウム鉄を徐々に加えて作製した。

#### (3) フェリチンLサブユニット(fer8:fer0のN端8残基を取り除いた)のN端に、インテグリン $\alpha\beta3$ に結合することが知られているRGDペプチド(CDCRGDCFC)を付加する<sup>3)</sup>。N端は分子表面にでるので、アプタマーが24本外に出ることになる。このフェリチンをRGD-ferと呼ぶ。インテグリン $\alpha\beta3$ は特に癌細胞の表面に多く発現することが知られており、マグネタイトナノ粒子を内包したフェリチンを癌細胞に結合させ、高周波磁場のもとで加熱して

温熱療法に応用する。

癌細胞(HeLa細胞)との結合は蛍光抗体法により確認した。1次抗体として anti-ferritin light chain antibody rabbit (Abcam: ab69090, 1mg/mL)、2次抗体として rabbit/IgG fluor488 (Abcam: ab15077, 2mg/mL)を使用した。

- (4) ソレノイド中にマグネタイト微粒子を含む試料を置いて高周波磁場をかけ、温度上昇を確認する。

ソレノイドは直径 11 mm、長さ 44 mm、36 回巻きを自作した。200 kHz から 2MHz でのソレノイドのインダクタンスはほぼ 2  $\mu$ H であった。ファンクションゼネレータ(山脇電子 AFG2105)からの正弦波出力をパワーアンプ(岩通 IM3570)を通して直列共振回路に流した。直列回路のコンデンサが 1 nF のとき共振周波数は 3.04 MHz、92 nF のとき 270 kHz であった。交流での磁場強度は測定器の限界で 20 kHz までしか計測できないが、電流と磁場強度の関係は直流とほぼ同じであったので、電流値で磁場強度を見積もり、1 A 流しとき、1 mT となった。温度は磁場中でも計測できる光ファイバー温度計(安立計器 FL-2000)を用いた。試料は試薬の Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(関東化学)を乳鉢で粉碎した後、53  $\mu$ m のメッシュを通し、100 mg を 1.5 mL の水に懸濁した。また、マグネトフェリチンは L-fer で作製した試料 30 mg/mL を用いた。ガラス管(10  $\phi$ )中に試料 1.5 mL を入れ、ソレノイドに差し込んで温度上昇を測定した。

癌細胞との相互作用は HeLa 細胞  $5 \times 10^5$  /mL 中に 0.11 mg/mL のフェリチン溶液をくわえて 3 MHz で 2 分間交流磁場中においた。細胞の変化を位相差顕微鏡およびフローサイトメトリで検証した。

#### 4. 研究成果

- (1) ① 粗精製した HL-fer1 の高分解能陰イオン交換樹脂 MonoQ からの流出は 2 つのピークを示した。各フラクションの SDS-PAGE では、各サブユニットの含有率は連続的に変化しており、流出が遅いほど H サブユニットが多く含まれていることがわかった。Native 電気泳動では、単一バンドになっており、H と L が混合した 1 分子をなしていることがわかった。SDS-PAGE のバンド濃度測定より L と H の比率が前のピークでは L:H=11:13、後のピークでは L:H=9:15 であり H サブユニットが半分以上含まれることがわかった。さらに HL-fer1 が単一分子であることを確認するために、後のピーク付近のフラクションを超速心法により沈降速度測定をした。沈降速度の測定は有坂文雄博士(JTE バルテック)に依頼した。沈降定数は HL-fer1 は S=18.8 で単一ピークとなった。また、同時に計測した S 値は H-fer で 19.9、L-fer で 17.0 であり文献値と一致していた<sup>4)</sup>。S 値から L と H の比を計算すると L:H=9:15 となった。これは SDS バンドの濃度比から計算した値とほぼ一致しており、超速心法での測定もフェリチンは単一分子の HL 混合体であることが確認された。
- ② 粗精製した HL-fer4 の MonoQ からの流出パターンは 3 つのピークを示したが、各フラクションの SDS-PAGE より L と H の含有量は連続的に変化していることがわかった。1 番目のピークでは L と H の比率は L:H=20:4 であった。HL-fer1 より L サブユニットを多く含むフェリチンが得られた。
- ③ pETDuet の MCS1 に HoHF、MCS2 に fer0 を組み込んだ(HL-fer6)。HL-fer1 のように 2 つのピークが認められるが、H と L の含有率はフラクションごとに連続的に変化していた。SDS-PAGE 濃度測定から 2 番目のピークでは L:H=16:8 であり HL-fer4 より H の含量が多かった。単一のプラスミドでは H の含量を少なくすることが難しいことがわかった。酸化実験には 2 番目のピークを用いた。
- ④ アフィニティークロマトからの流出フラクションを SDS-PAGE で調べたところ H は分子当たり 2 個程度入っていることがわかった。精製した HL-fer1、HL-fer4、HL-fer6、HL-fer7 は電子顕微鏡でフェリチン特有の球殻状の分子が確認された。

以上の結果から H サブユニットの含有率は HL-fer1、HL-fer4、HL-fer6、HL-fer7 それぞれ 63%、17%、33%、8% となった。HL-fer7 では 24 サブユニットのうち 1、2 個が H サブユニットである。また、2 つのプラスミドを共発現させてもフェリチンは H と L が混じった 1 分子を形成することがわかった。

- (2) ① サブユニットの違いによる酸化速度の変化を測定した。精製した HL-fer4、HL-fer6 およびリコンビナント L (L-fer)、H (H-fer) について酸化速度の測定を行った。(1) での実験から H-fer サブユニットの含有量は H-fer、HL-fer6、HL-fer4、L-fer それぞれ 100%、33%、17%、0%と

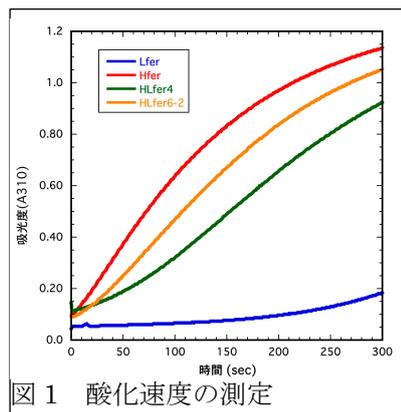


図 1 酸化速度の測定

なっているが、酸化速度もHサブユニットの含有量に対応していることが確認された(図1)。  
 ② Hサブユニットを含むフェリチンHL-fer4, HL-fer6, HL-fer7を用いて、ナノ粒子を形成させ、低倍(50,000倍)の電子顕微鏡像(無染色)を比較するとHL-fer4, HL-fer6, HL-fer7もナノ粒子は形成しているが、フェリチンの空洞を満たしていない小さな粒子が比較的多く見られた(図2)。原因はよくわからないが、空洞内の環境がLサブユニットだけの方が結晶が成長しやすいと考えられる。ナノ粒子の結晶性を高分解能の電子顕微鏡写真と比較したところ図3上段のようにL-ferには単結晶のナノ粒子が多く含まれていた。HL-fer4では単結晶の粒子も見られたが、図3下段のように複数のドメインがある多結晶となっている粒子も見られた。また図2で示したようにHサブユニットを含むフェリチンでは粒子の大きさもバラツキが大きくHサブユニットを含ませるメリットを認めることはできなかった。

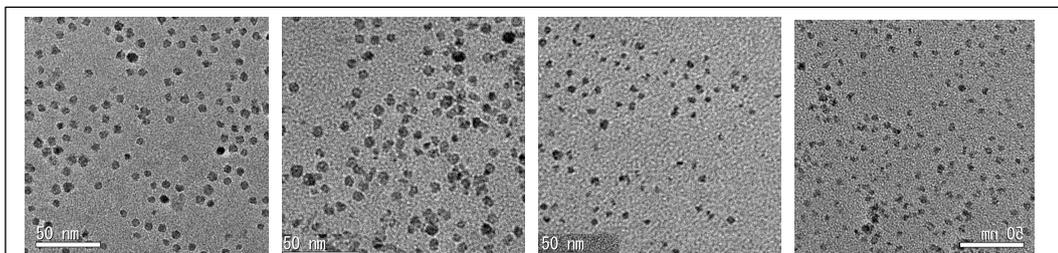


図2 各種フェリチンで合成したマグネタイトナノ粒子の低倍電子顕微鏡像  
 左から L-fer、HL-fer4、HL-fer6、HL-fer7 のフェリチンで合成したナノ粒子

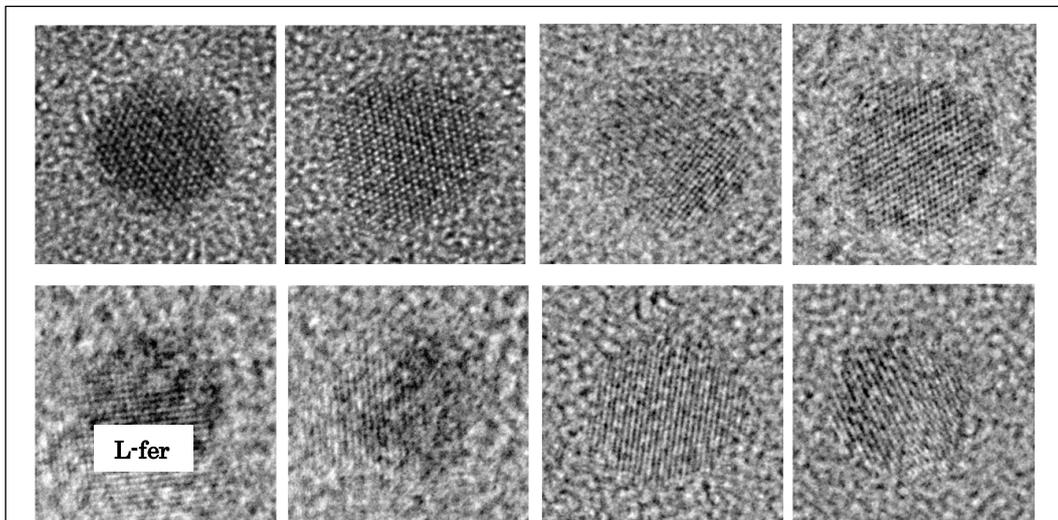


図3 フェリチンにより合成したナノ粒子の高分解能電子顕微鏡像  
 上段は L-fer、下段は HL-fer4 を用いて合成したナノ粒子

- (3) RGD-fer と HeLa 細胞のとの結合性は蛍光抗体法に確認した。RGD-fer を HeLa 細胞に作用させ、フェリチンの蛍光抗体により観察すると HeLa 細胞に RGD-fer が結合していくことが確認された(図4上段)。RGD ペプチドを付加していないフェリチン(L-fer)は細胞に結合しないことも確認された(図4下段)。これにより RGD-fer は HeLa 細胞と特異的に結合することが確認された。

RGD ペプチドはシステインが4残基含まれているため、RGD-fer は凝集しやすく、精製は濃度を薄めて還元剤(DTT5mM 存在下で行った)のためか、他のフェリチンに比較してナノ粒子の形成状態は悪かった。

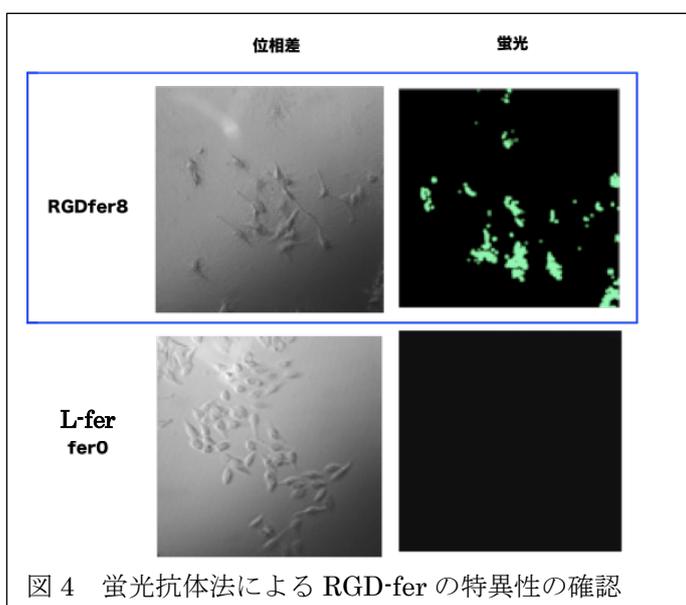


図4 蛍光抗体法による RGD-fer の特異性の確認

(4) マグネタイト微粒子による加熱実験

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、L-fer によるマグネタイトナノ粒子(30 mg/mL)、水、それぞれについて 3 MHz、電流 0.5A で温度変化を測定した。図 5 に示すようにフェリチンで作製したナノ粒子は 2 分間で約 20°C の温度上昇が見られ、濃度を考えればマグネタイト微粒子と同程度の発熱が得られた。マグネタイトフェリチンによる発熱は 3 回独立した実験で測定したが、毎回の結果はバラツキがあったので、実験条件が確かであった 1 例のみを掲載した。発熱の主な原因が粒子自体の回転緩和か磁気モーメントの回転緩和による損失かで最適周波数が決まるはずであるが<sup>5)</sup>、最適周波数を決めることは今後の課題となった。

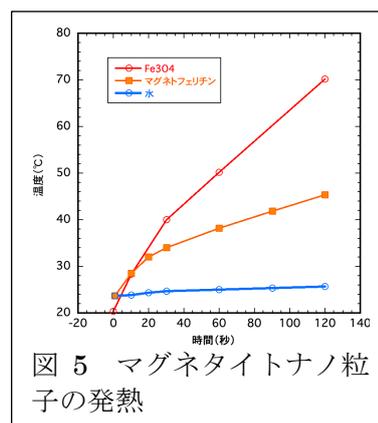


図 5 マグネタイトナノ粒子の発熱

ナノ粒子を RDG-fer に形成させ、HeLa 細胞に作用させて高周波磁場中においてその細胞の形態変化をサイトフローメトリで計測した。HeLa 細胞  $5 \times 10^5/mL$  中に 0.11 mg/mL のフェリチン溶液をくわえて 3 MHz で 2 分間交流磁場中においた。フローサイトメトリは平岡和佳子博士 (明治大学) によった。実験は① HeLa 細胞 (高周波処理なし)、② HeLa 細胞 (高周波処理)、③ HeLa 細胞 + マグネタイトナノ粒子内包 L-fer (高周波処理)、④ HeLa 細胞 + マグネタイトナノ粒子内包 RGD-fer (高周波処理) を比較した。位相差顕微鏡での目視でははっきりした細胞形態変化は見られなかったが、フローサイトメトリの横散乱の割合は①から④がそれぞれ 86.2、83.3、81.3、71.3 となり、RGD-fer を作用させた細胞には横散乱の大きさは優位な変化があった。横散乱の割合は細胞の形状を表しているので、RGD-fer を結合させた HeLa 細胞は 2 分間の高周波磁場照射で形態変化をしたと考えられる。RGD-fer に内包されたナノ粒子は十分な大きさ、結晶性をもっていなかったため、この点を改良すれば温熱療法に十分使えると考えられる。

<引用文献>

- 1) Shigeki Takeda, Hideyuki Yoshimura, Sigeru Endo, Takuya Takahashi, and Kuniaki Nagayama, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **23**, 548-556 (1995).
- 2) Koichi Orino, Tomohiro Miura, Shingo Muto, and Kiyotaka Watamabe, Sequence analysis of canine and equine ferritin H and L subunit cDNAs, *DNA Sequence*, **16**, 58-64, (2005).
- 3) Masaki Uchida, Michelle L. Flenniken, Mark Allen, Deborah A. Willits, Bridgid E. Crowley, Susan Brumfield, Ann F. Willis, Larissa Jackiw, Mark Jutila, Mark J. Young, and Trevor Douglas, Targeting of Cancer Cells with Ferrimagnetic Ferritin Cage Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16626-16633 (2006).
- 4) Maria C. Linder, Glenn M. Nagel, Michael Roboz, and David M. Hungerford, Jr., *J. Biol. Chem.*, **256**, 9104-9110 (1981).
- 5) Sophie Laurent, Silvio Dutz, Urs O. Häfeli, Morteza Mahmoudi, *Adv. Coll. Int. Sci.* **166**, 8-23 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuwata Takumi, Sato Daisuke, Yanagida Yuki, Aoki Eriko, Fujiwara Kazuo, Yoshimura Hideyuki, Ikeguchi Masamichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Morphological difference of Escherichia coli non-heme ferritin iron cores reconstituted in the presence and absence of inorganic phosphate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 583 ~ 594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00775-022-01952-5	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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 桑田巧、佐藤大輔、藤原和夫、吉村英恭、池口雅道
2. 発表標題 腸菌フェリチン内腔に形成される鉄コアのリン酸存在下と非存在下における形態学的な違い
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金丸朋子、金丸周司、吉村英恭
2. 発表標題 Regulation of H/L subunit content in apoferritin and crystallinity of the iron core
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 来、大沼恵里香、亀田優佳、吉村英恭、本田みちよ、相澤 守
2. 発表標題 a面を多く露出した水酸アパタイトセラミックス上での破骨細胞の培養とその評価
3. 学会等名 日本セラミックス協会 第34回秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Kanamaru, Daisuke Katayama, Naoki Takashima, Takeshi Narushima, Hideyuki Yoshimura
2. 発表標題 Synthesis of single crystal magnetite nanoparticles in apoferritin cavity
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Yoshimura
2. 発表標題 Single Crystal Magnetite Nanoparticles Synthesized Using Apoferritin by Controlling the Number of H-chain Subunits
3. 学会等名 Nano/Molecular Medicine and Engineering-2020 (コロナ蔓延により中止) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村英恭
2. 発表標題 Synthesis of Single Crystal Magnetite Nanoparticles encapsulated in Apoferritin
3. 学会等名 International Conference on Magnetism and Magnetic Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山大輔、吉村英恭
2. 発表標題 Heating effect of magnetite nanoparticles synthesized in teh ferritin cavity by altering magnetic field
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高嶋直輝、金丸朋子、吉村英恭
2. 発表標題 Insertion of cancer cell specific binding peptide into ferritin
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山大輔、高嶋直輝、金丸朋子、吉村英恭
2. 発表標題 タンパク質による単結晶マグネタイトナノ粒子の作製
3. 学会等名 日本物理学会 第74 回年次大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	安井 幸夫  (Yasui Yukio)  (80345850)	明治大学・理工学部・専任教授    (32682)	

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