

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19550170
 研究課題名 (和文) 一酸化窒素応答性ペプチド—金属錯体コンジュゲートの創成と応用
 研究課題名 (英文) Development of Nitric Oxide Responsible Peptide-Metal Complex Conjugate and Its Application
 研究代表者
 藤井 敏司 (FUJII SATOSHI)
 甲南大学フロンティアサイエンス学部・准教授
 研究者番号：80271518

研究成果の概要 (和文) : 様々な生理作用を有する一酸化窒素と親和性の高い金属錯体の配位子に、らせん構造をとるペプチドを伸長し、3本のペプチドからなるナノメートルサイズの空洞を形成することに成功した。この空洞の熱安定性はペプチド長により制御可能であり、22残基のペプチドで約37度まで空洞は安定であった。また、金属イオンが一酸化窒素と結合することによりこの空洞は崩壊した。これらの性質により、熱や一酸化窒素により薬物を放出できるドラッグデリバリーシステムのキャリアとしての利用可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : We succeeded in developing an iron complex that can make a three helix bundle structure with helical peptides attached to the dithiocarbamate ligand. This iron complex has high affinity toward nitric oxide. Thermal stability of the bundle structure can be controlled by the peptide length and the bundle is stable at around 37 ° C with 22 amino acid residues. Moreover, the bundle is collapsed with the nitric oxide binding to the iron ion. These results suggest that this complex can be used as a carrier for drug delivery system that responds to inflammation and nitric oxide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生物無機化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境中の酸素、一酸化炭素、一酸化窒素 (NO) などの小分子濃度を感知するセンサー機能を有する金属タンパク質が次々と発見され、精力的に研究が行われていた。これら

のセンサータンパク質の共通の特徴として、金属中心に小分子が結合することでタンパク質全体の構造変化を引き起こし、その構造変化がトリガーとなって下流にシグナルが伝わることで遺伝子発現などの調節を行っ

ていることが挙げられる。

(2) 研究代表者らは、様々な生理作用を有する内因性 NO の捕捉検出試薬として、NO と高い親和性を有する鉄—ジチオカルバメート(Fe-DTC)錯体を用いた研究を行ってきた。この NO 錯体形成反応では、八面体型の Fe(DTC)₃ 錯体は NO と結合することで DTC 一分子が脱離し、四角錐型の NO-Fe(DTC)₂ 錯体へと構造変化することがわかっていた。

(3) 1990 年代初めより、金属イオンと短いペプチドを利用した人工金属タンパク質構築に関する研究が始まっており、近年では金属イオンを利用した自己集積型ペプチド構造体の構築に関する発表が散見されるようになっていた。

(4) (1)~(3)の内容を踏まえ、NO の結合により大きな構造変化を生じるセンサータンパク質のモデルが構築できる、と考えたのが本研究である。タンパク質のモデルとしては、多くの天然のタンパク質にも見られるヘリックスバンドル構造をモチーフとして、錯形成とともに Three-helix bundle 構造を形成するペプチドと Fe-DTC 錯体のコンジュゲートの設計より研究を開始し、DTC の一種である *N*-(Dithiocarboxy)sarcosine(DTCS) のカルボキシル基にペプチドを伸張した DTCS-NH-AEQLLQAEQLLQEL-COOH の配列を有する peptide-DTCS を用いると、鉄イオンの共存下でヘリックスバンドル構造となること、また、このヘリックスバンドル構造は Fe-DTC 錯体への NO の結合による鉄錯体部位の構造変化により崩壊することがわかっていた。さらに、この構造遷移を、バンドル構造内部の疎水性部位に取り込ませた 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (ANS) の蛍光強度により測定したところ、nM オーダーの NO が検出できることがわかっていった。

2. 研究の目的

本研究開始時には、ペプチド部分の合目的デザインにより NO の結合によるスイッチ機能を有する人工タンパク質及び新機能性分子の構築を目指し、基礎・応用のデータを蓄積することを目的とした。具体的には以下の4つのテーマについて検討する予定であった。

- (1) ヘリックスバンドル構造の安定性の検討
- (2) ペプチド部位の機能化
- (3) ペプチド C 末端の機能化
- (4) ドラッグデリバリーシステム(DDS)としての利用

3. 研究の方法

前項で記した4項目を実行する予定であったが進捗状況などにより、実際には以下の2点に絞って研究を行った。

(1) ヘリックスバンドル構造の安定性の検討

本研究の応用面での最終的な目的の1つは、本錯体が作り出すナノサイズのキャビティ (three-helix bundle 構造の内部空間) を DDS のキャリアとして使用することである。そのため、体温付近の約 37°C でもバンドル構造が崩壊 (図1) しないように、熱安定性を上昇させる必要がある。最初に合成した基本となる 15 残基 (AEQLLQAEQLLQEL) の崩壊温度を基に、アミノ酸の繰り返し回数を変えることで、崩壊温度がどのように変化するかを調べた。崩壊温度は、疎水性環境下で蛍光強度が増す ANS をプローブとして、蛍光強度の温度変化をモニターすることにより求めた。

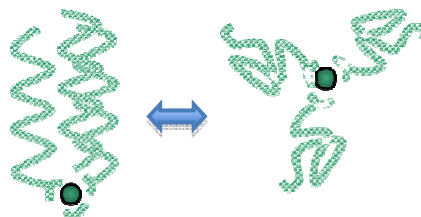


図1 ヘリックスバンドル構造とその崩壊

(2) バンドル構造内部の修飾

バンドル内部のキャビティを機能化する端緒として、アミノ酸配列を変更して、フルオレセインを共有結合により導入し、ペプチド部位の動的特性をフルオレセインの蛍光により評価した。

4. 研究成果

(1) 15 残基ペプチドコンジュゲートの性質

図2に FeCl₃のみ (10 μM; ◆)、15 残基ペプチドジチオカルバメート配位子 (15pep-DTCS)のみ (30 μM; ◆)、FeCl₃ (10 μM) と 15pep-DTCS (30 μM) を混合したとき (◆) の ANS (10 μM) の蛍光強度の時間変化を示す (エタノール中、10°C)。

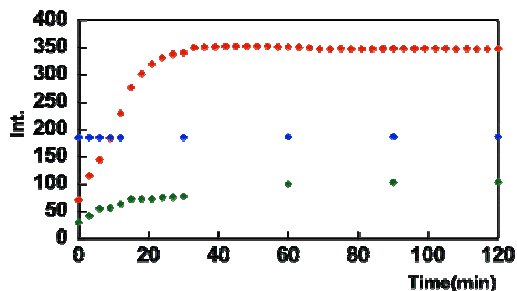


図2 ANS 蛍光強度の時間変化

FeCl₃のみや 15pep-DTCSのみを溶解したときには蛍光強度の時間変化は見られず、鉄3価イオンと配位子を共存させたときのみ蛍光強度が徐々に上昇し、一定値に達することから、錯形成とともに、疎水性ポケットの形成、すなわちバンドル構造の形成が起こっていることがわかる。

また、ANS 蛍光強度の温度依存性を調べたところ、温度の上昇とともに蛍光強度が減少した。一般に、蛍光物質の蛍光強度は温度が上昇すると弱くなるが、観察された結果は単純な温度の上昇による減少以上に、強度が減少していた。このことから、温度の上昇とともにバンドル構造が不安定化していることが示唆された。

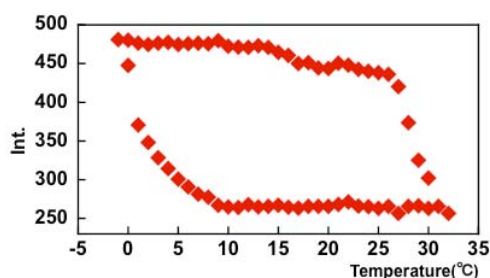


図3 ANS 蛍光強度の温度依存性
エタノール中 Fe(15pep-DTCS)₃ 10 μM,
ANS 10 μM

図3に温度を 30°C から 0°C へ、さらに 30°C へと連続的に変化させたときの ANS 蛍光強度変化を示す。この温度サイクルを複数回行っても、同様のヒステリシス曲線を描いた。この結果は ANS が（バンドル構造は崩壊せず維持されたまま）単なる熱平衡でバンドル構造内部に出入りしているのではなく、高温になるとバンドル構造が崩壊し、低温にすることにより再構成されることを示している（図4）。

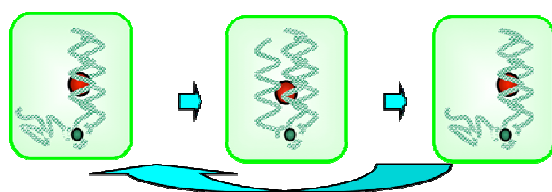


図4 Three helix bundle 構造の
可逆的構造形成-崩壊

また ANS の蛍光強度が半分になる温度を崩壊温度 T_c と定義すると、温度変化の結果より $T_c = 26.8^\circ\text{C}$ であった。

(2) バンドル構造安定性のペプチド長依存性

(1)で記した 15pep-DTCS は 15 残基のペプチドを有しており、最大 4 ターンのヘリックス

スを巻いている可能性がある。バンドル構造の安定性をもたらしている最大の要因は、バンドル構造内部に向けた疎水性アミノ酸側鎖間の疎水性相互作用であると考えられる。そこで、アミノ酸残基数を変えてヘリックスターン数を変更し、同様の方法で T_c を求めた。

AEQLLQEAEQLL の 12pep-DTCS を配位子として用いたときは、 $T_c = 20.5^\circ\text{C}$ 、AEQLLQEAEQLLQEAEQLLQEL の 22pep-DTCS を配位子として用いたときは、 $T_c = 37.7^\circ\text{C}$ となった（図5）。

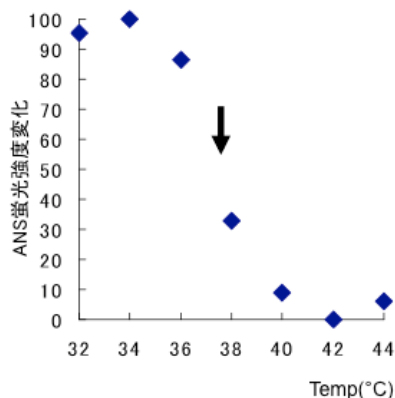


図5 22pep-DTCS を配位子として用いた
ときの ANS 蛍光強度の温度依存性

興味深いことに、AEQLLQEAEQLLQEAEQLL の 19pep-DTCS の T_c は 15pep-DTCS の T_c と同じ 26.8°C であった。この結果は、単純なペプチドの長さではなく、ヘリックスのターン数に応じて T_c が変化することを示唆している。12pep と 15pep の差が約 6 度、15pep と 22pep の差が約 11 度とヘリックス 1 ターン分によるバンドル構造安定化の効果が単純な足し算にならないことについては、今後検討を要する課題である。

(3) バンドル構造内部の修飾

バンドル内部のキャビティへの機能付加の端緒として、錯形成するとキャビティ内に収まるようにアミノ酸配列を変え、蛍光試薬であるフルオレセインを導入した。フルオレセインは親水性環境になると蛍光強度が増す蛍光プローブで、ANS とは逆にバンドル内部にあるときは蛍光を出さず、バンドル構造が崩壊すると蛍光を発する。15 残基のペプチドに 1 分子のフルオレセインを導入した錯体では、 20°C で蛍光が観測されはじめ、 $T_c =$ 約 30°C となった。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

金属イオンとの錯形成を利用した自己集積型ペプチドバンドル錯体はこれまでに

何例か報告がある。しかし、本研究で得られたような、一酸化窒素によるバンドル構造の崩壊、または温度による可逆的構造制御についての報告例は初と思われる。

NO の結合によるペプチド部位の大きな構造変化は、センサータンパク質の良いモデルであり、一分子の結合でどの程度の大きさのタンパク質を動かすことができるのか、今後検討していく。フルオレセイン包埋型を用いれば、NO 検出用蛍光試薬としても用いることが可能である。

脱離していく配位子をシグナル伝達分子と考えると、ペプチド部位を合目的に設計することにより NO 応答性シグナル伝達経路の構築が可能となる。

また、バンドル構造内部に薬剤等を包埋すれば、NO の過剰発生部位や炎症部位で選択的に薬物を放出する DDS のキャリアとしての応用も考えられ、ペプチド部分のさらなる機能化で、ターゲット部位に集積するような性質を付与することも可能であると考えられる。

本研究期間で得られた基礎的な知見を活かして、今後応用面にも研究を進めていく。

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 5 件)

① Jungjoo Yoon, Satoshi Fujii, and Edward I. Solomon

“Geometric and electronic structure difference between the type 3 copper sites of the multicopper oxidases and hemocyanin/tyrosinase”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**, 6585-6590 (2009) 査読有

② Satoshi Fujii, Chiyo Tsueda, Kunio Yamabe, Kohsuke Nakajima, and Hiroshi Sakai

“Reaction of iron(III)-polyamino carboxylate complexes with hydrogen peroxide: Correlation between ligand structure and reactivity.”

Inorg. Chim. Acta, **361**, 1207-1211 (2008) 査読有

③ Anthony J. Augustine, Mads E. Kragh, Ritimukta Sarangi, Satoshi Fujii, Barry Liboiron, Christopher S. Stoj, Daniel J. Kosman, Keith O. Hodgson, Britt Hedman, and Edward I. Solomon

“Spectroscopic Studies of Perturbed T1 Cu Sites in the Multicopper Oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* Laccase: Allosteric Coupling

between the T1 and trinuclear Cu sites”
Biochemistry, **47**, 2036-2045 (2008)
査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 山中敏志, 西村宗十, 藤井敏司, 酒井宏, 杉本直己

Triple Helix Bundle 構造をとるペプチド-ジチオカルバメート鉄錯体においてペプチド長が Bundle 構造安定性に及ぼす影響

第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008 年 9 月 18 日、横浜 (東京工業大学すずかけ台キャンパス)

② 藤井敏司

チトクロム *c'* から内因性 NO の ESR 画像化まで

第 8 回日本 NO 学会学術集会、2008 年 5 月 9 日、仙台 (仙台国際センター)

③ 矢口真弓, 西村宗十, 藤井敏司, 酒井宏, 杉本直己

NanoBioNow(13) 一酸化窒素感受性を有する Three Helix Bundle 型ペプチド-鉄ジチオカルバメート錯体の合成と性質
日本化学会第 88 回春季年会、2008 年 3 月 30 日、東京 (立教大学)

④ Satoshi Fujii

Biological applications of EPR: from in vivo NO detection/imaging to Cu(II) coordination to β -amyloid
Molecular Photoscience Research Center International Workshop: Low Energy Excitation in Condensed Phases, 2007 年 11 月 12 日、神戸 (神戸大学)

[図書] (計 1 件)

櫻井弘編、藤井敏司他、講談社ブルーバックス、「元素 111 の新知識 第 2 版」、2009 年、461

[その他]

ホームページ等

http://www.konan-first.jp/graduate/ti_303_b.html

報道関連情報

日刊工業新聞、2008 年 5 月 11 日記事

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 敏司 (FUJII SATOSHI)

甲南大学フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号 : 80271518

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :