

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05543

研究課題名(和文) プルシアンブルーの振動励起を駆動力とする近赤外光応答性薬剤放出システムの開発

研究課題名(英文) Development of Medicinal Molecules Releasing Mechanism Driven by Vibrationally Excited Prussian Blue by NIR light

研究代表者

中島 洋(Nakajima, Hiroshi)

大阪公立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00283151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、鉄イオン貯蔵タンパク質フェリチンの内部空間にシアノ架橋三次元鉄錯体プルシアンブルーをシップインボトル合成する手法の開発に成功した。既知法で調製したプルシアンブルーは、中性より高いpH溶液中で容易に分解し、水溶液中における利用の制限となっていた。フェリチンに包摂することで分解速度が1/100～1/1000倍程度に低下し、プルシアンブルーのアルカリ溶液への耐性を大幅に改善した。改善したアルカリ耐性をもとに、プルシアンブルー包摂体を触媒とする過酸化水素還元反応の開発、包摂体の電極表面への固定方法の開発を実施し、様々な酸化酵素をバイオセンサーへ応用するための電極材料の創出に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プルシアンブルーは、着色剤、触媒、セシウムイオンの除去剤など現在も様々な分野で用いられる材料であるが、中性以上のアルカリ性溶液中で容易に分解することが課題であった。本研究は、タンパク質にプルシアンブルーを包摂することでこの問題を解決し、今後のプルシアンブルーの応用領域拡大に貢献できると考える。また、包摂体においてプルシアンブルーがアルカリ耐性を示す機構の解明を通して、プルシアンブルーの分解に関する理解の深化、分解を抑制する分子機構の提案をおこなうことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have successfully developed a method for the ship-in-bottle synthesis of Prussian blue, a cyano-bridged three-dimensional iron complex, in the inner space of the iron ion storage protein ferritin. Prussian blue prepared by a known method readily degraded in higher than neutral pH solutions, restricting its utilization in aqueous solutions. The inclusion of the Prussian blue in ferritin reduced the degradation rate by a factor of 1/100 to 1/1000 and greatly improved the alkaline tolerance of Prussian blue. Based on the improved alkali resistance, we developed a hydrogen peroxide reduction reaction catalyzed by the clathrate of Prussian blue and a method for fixing the clathrate to the gold electrode surface, aiming at fabricating electrode materials for the application of various oxidase enzymes to biosensors.

研究分野：生物無機化学

キーワード：フェリチン プルシアンブルー 過酸化水素還元電極 バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

波長 700~900nm の近赤外光は、生体組織や体液による吸収が少ないため生体透過性と生体非侵襲性に優れ、細胞や生体組織の観測、医療における光診断の光源として広く利用されている。同様の理由から、近赤外光を駆動力とする薬剤の放出が、薬剤輸送機構の一つとして期待されるが、近赤外光の電子励起エネルギーは、水素結合数個分相当であり、化学結合の開裂には不十分である。このため従来の研究では 1) 電子スピンの反転、2) 多光子吸収による可視・紫外光への変換、に近赤外光を利用することが主流である。1) は、一重項酸素の発生に利用され、細胞の殺傷に有効性が証明されているが、他の目的への応用は難しい。また 2) は、励起効率が低いため強い近赤外光照射が必要な上、多光子励起状態を得るために希土類ナノ粒子が利用されており、生体適合性に問題が残る。近赤外光を薬剤放出に利用するには、これまでとは異なる方法で光エネルギーを利用する仕組みが必要である。分子が吸収した近赤外光エネルギーのほとんどは、緩和過程で結合の振動励起エネルギー（発熱）に変換される。このエネルギーを分子内に蓄積できれば、比較的弱い配位結合の熱的な開裂に利用できる可能性がある。実際、熱分解性分子と近赤外光吸収分子を混合した固体では、光の照射箇所での熱分解反応の進行が報告されている[1]。ただし振動励起エネルギーは、水溶液中では素早く水分子に拡散し、溶液の温度上昇を招くのみである。振動励起エネルギーによる反応の実現には、「近赤外光吸収部位の発熱が水溶媒へ容易に拡散しない仕組み」を生体適合性に優れた水溶性物質によって創出する必要があった。

2. 研究の目的

本研究は、当初「近赤外光吸収分子のタンパク質内部空腔への包摂、それによる振動励起エネルギーの水溶媒への拡散の抑制、近赤外光吸収分子に結合した薬剤分子の熱反応による解離・放出」の実現を目指した。具体的には、1) 鉄貯蔵タンパク質フェリチン (Fr) の内部空腔に近赤外光を吸収する高分子錯体プルシアンブルー (PB) を内包した包摂体 (PB@Fr、図 1) の合成、2) 包摂した PB に配位する薬剤結合錯体の調製と PB への結合、3) 近赤外光吸収によって発熱した PB からの薬剤分子放出、の実行である。PB は $(\text{Fe}^{\text{III}})_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ の組成で表される不溶性の 3 次元高分子錯体である。近赤外領域 (光波長: 700~800nm 付近) に強い原子価間電荷移動吸収帯を有し、光励起の緩和過程で効果的に振動励起状態が得られる。このため、近赤外光吸収による発熱とその応用が研究されている[2]。Fr は、直径 8nm の空腔を有する中空球状の水溶性タンパク質であり、2~11 の幅広い pH 領域で高い熱安定性 (< 80°C) を示す。水分子は、Fr のイオンチャネル (図 1 参照) のみを介して空腔内部と外部を移動する。このため、PB@Fr では、PB の振動励起エネルギーが、空腔内の水分子を介して素早く溶媒に拡散することを抑制できると考える。

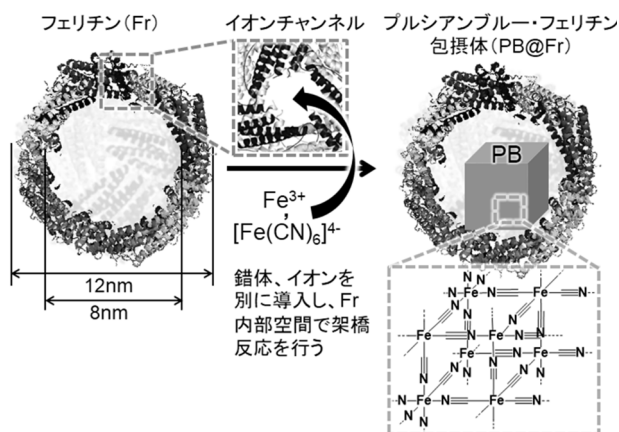


図 1. PB@Fr の概略。

3. 研究の方法

1. PB@Fr の合成

PB@Fr の合成は、磁性材料を目指す海外のグループより報告されていた[3]。しかし、論文に掲載された包摂体は、粒径が不揃いで、PB の粒子が混在している形跡がみられた。また追実験では包摂体を再現できないなど、不可解な点が多くみられた。そこで我々は、独自の PB@Fr 合成法の開発に着手し、再現性の高い合成手法を確立した (図 2)。またこの手法は、 Fe^{2+} による Cu^{2+} の交換反応を他の遷移金属イオンに変更することで、PB 以外のシアノ架橋鉄錯体をフェリチンに包摂可能であることを見出した。

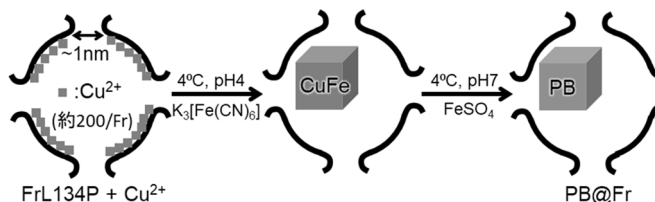


図 2. PB@Fr 合成法の概要。1nm のイオンチャネル径をもつフェリチン変異体 (FrL134P) [4] の内腔に、予め Cu^{2+} イオンを取り込み、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ との反応で $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}\text{-Cu}^{\text{II}}$ 結合を有する高分子錯体 (CuFe) を生成する。その後、 Cu^{2+} と Fe^{2+} の交換反応により、CuFe を PB に変換し、PB@Fr を得る。

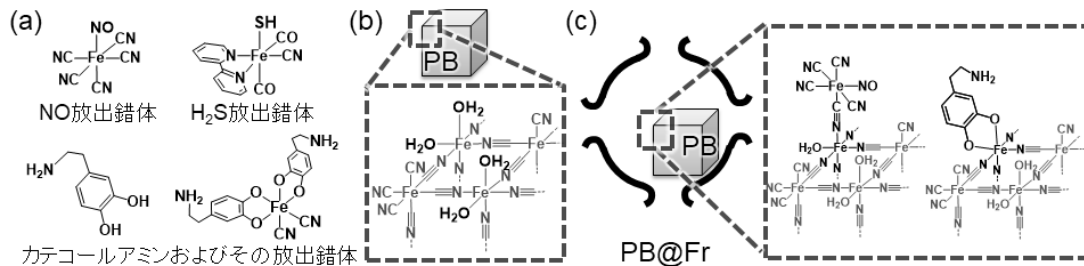


図 3. (a) 本研究に用いる薬剤分子錯体あるいは薬剤分子の例。錯体の中心金属には、生体元素である鉄を中心に、亜鉛、マンガンの利用も念頭に置く。(b) PB 表面には、配位可能な空配位座 (通常は H_2O が配位) が存在する。(c) Fr のイオンチャンネルを介して PB@Fr に薬剤分子を取込み、シアノ基による架橋、あるいは直接に、PB の空配位座に結合する。近赤外光照射によって、薬剤分子固定 PB を振動励起状態とし、振動励起エネルギー (PB の発熱) により結合した薬剤分子を解離・放出する。

2. PB@Fr の薬剤放出分子担体への応用

本研究では、当初図 3 に示す手法により、合成した PB@Fr の近赤外応答性薬剤放出担体としての応用を目指した。しかし、これらの試みは、包摂される PB の鉄イオンを他の金属イオンに置換した類縁体の合成に留まり、薬剤分子の固定と放出には、今のところ成功していない。一方、我々は、この研究の過程で、PB@Fr に包摂された PB のアルカリ性溶液中における寿命が、既報により合成されたものに比較して 100 から 1000 倍程度改善され、pH8 の室温溶液中において、半年以上安定に存在することを見出した。そこで、本来の研究目的とは別に、研究期間の 3 年目以降に PB@Fr のアルカリ耐性を応用した「過酸化水素還元触媒への応用」、およびこの触媒能を利用する「酸化酵素型バイオセンサーの電極材料開発」を目指す研究を実施した。

3. PB@Fr のバイオセンサー電極材料への応用

フェリチンを構成する球殻状のタンパク質は、導電性を示す。そこで、PB@Fr を図 4 に示す手法をもとに、電極表面に固定した PB@Fr 修飾電極を作成し、バイオセンサーで用いられる酸化酵素が基質酸化で生成する過酸化水素を検出する仕組みづくりを目指した。

4. 研究成果

1. PB@Fr の合成

本研究初期の目的である PB@Fr に加え、シアノ架橋コバルト-鉄、ニッケル-鉄、銅-鉄錯体を包摂したフェリチン複合体の合成に成功した (図 5)。これらは、PB@Fr と同様に、包摂された架橋錯体がいずれもアルカリ性水溶液中で高い安定性を示すことが分かった。今後は、触媒等への応用を検討する。

PB@Fr の PB がアルカリ耐性を示す機構を調査した。その結果、フェリチン内部空間に突き出した配位性アミノ酸残基の側鎖 (具体的にはグルタミン酸残基) が PB 表面から解離した Fe^{3+} イオンを配位して結合解離平衡を実現し、不溶性の $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の生成を抑制することで PB のアルカリ耐性を示すことが分かった。これは、タンパク質内部の閉鎖空間において、生成した PB の近傍に鉄の配位子が常に存在するために成り立つ機構であり、PB@Fr ならではの性質といえる。

2. PB@Fr のバイオセンサー電極材料への応用

図 4 の研究計画に基づき、PB@Fr の電極表面への固定に成功した。作成した PB@Fr 修飾電極は、電極電位 0.0 V (vs. SHE) にて、過酸化水素濃度に対応した還元電流を示し、PB@Fr 固定電極が還元反応による過酸化水素濃度の計測に使用可能であることを示すことができた (図 6)。一般に、酸化酵素を用いるバイオセンサーでは、酵素による基質酸化で生じる過酸化水素を白金電極で酸化して計測する。その際の電極電位は +0.8 V 程度に設定する必要がある、測定対象の生体試料に含まれるアスコルビン酸 (酸化電位 = +0.3 V) や尿酸 (+0.4 V) など還元性物質の酸化反応による妨害を受けやすい。この課題を解決するため、PB を触媒に使い、過酸化水素の還元反応による検出が以前より提案されていた。しかし、この反応 ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{OH}^-$) では、生成する水酸化物イオンによる PB の分解を抑制する仕組みが必須である [5]。本研究で合成に

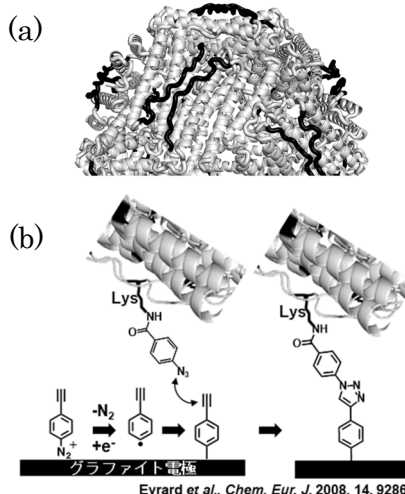


図 4. (a) グラファイト親和性ペプチドを置換挿入するループ領域 (黒)。(b) 共有結合による PB@Fr の電極固定。Fr 表面のリジン残基を介して固定する。

成功した PB@Fr は、高いアルカリ耐性を示し、この問題の解決に寄与できると考える。現在、より低濃度の過酸化水素検出に適した PB@Fr の再設計、電極固定方法の改良研究を継続している。また実際の酸化酵素と組み合わせたバイオセンサーのプロトタイプ作りに着手している。

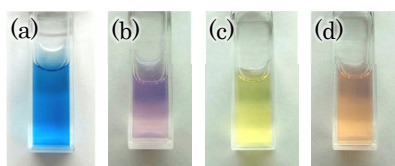


図 5. 本研究で合成に成功した(a) 鉄 (PB@Fr)、(b) コバルト、(c) ニッケル、(d) 銅—シアノ架橋鉄錯体を包摂したフェリチン複合体。

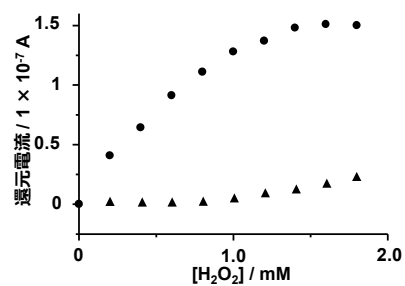


図 6. PB@Fr 修飾電極を用いた過酸化水素の還元反応による計測。(▲) PB@Fr 修飾前; (●) PB@Fr 修飾前。

引用文献

- [1] T. J. Gordon et al., *Chem. Mater.* 2007, **19**, 2155.
- [2] G. Fu et al., *Chem. Commun.* 2012, **48**, 11567.
- [3] J. M. Dominguez et al., *Inorg. Chem.* 2003, **42**, 6983.
- [4] E. C. Theil et al., *Inorg. Chim. Acta.* 2008, **361**, 868.
- [5] F. Ricci et al., *Biosens. Bioelectron.* 2005, **21**, 389.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomura Natsuo, Tanaka Seiya, Hirotsu Masakazu, Nishioka Takanori, Nakajima Hiroshi	4. 巻 984
2. 論文標題 Red-light responsive photoCORM activated in aqueous acid solution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Organometallic Chemistry	6. 最初と最後の頁 122578 ~ 122578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jorganchem.2022.122578	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 Ibrahim Sheikh Muhammad, Ben Aoun Sami, Nakajima Hiroshi, Kooli Fethi, Watanabe Yoshihito	4. 巻 12
2. 論文標題 Radical Mediated Rapid In Vitro Formation of c-Type Cytochrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1329 ~ 1329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12101329	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 該当する
1. 著者名 Ikenoue Yuta, Tahara Yuhei O., Miyata Makoto, Nishioka Takanori, Aono Shigetoshi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Use of a Ferritin L134P Mutant for the Facile Conjugation of Prussian Blue in the Apoferritin Cavity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 4693 ~ 4704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.0c03660	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 Tanaka Seiya, Nomura Natsuo, Nishioka Takanori, Hirotsu Masakazu, Nakajima Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of iron(III)-carbonyl complex with variable wavelength range for CO release depending on protonation and deprotonation of axial phosphorous ligands	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Organometallic Chemistry	6. 最初と最後の頁 121843 ~ 121843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jorganchem.2021.121843	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12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroshi Nakajima
2. 発表標題 Iron-based materials for releasing a physiologically active gas molecule in response to light within the phototherapeutic window
3. 学会等名 International Conference on Modern Trends in Inorganic Chemistry XIX (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Nakajima
2. 発表標題 Iron(III)-based CORM with dynamic variation in responsive wavelengths depending on H ⁺
3. 学会等名 Asian Conference of Coordination Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島 洋
2. 発表標題 生体透過性にする優れた光に応答する鉄() - カルボニル錯体
3. 学会等名 第72回錯体化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Nakajima, Natsuo nomura, Takanori Nishioka
2. 発表標題 An iron-based photoCORM with a protonatable ligand that regulates the wavelength for releasing CO
3. 学会等名 Asia Pacific Society for Materials Research 2021 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上裕太、西岡孝訓、中島洋
2. 発表標題 Properties of Prussian blue encapsulated in the cavity of ferritin L134P mutant
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上裕太、西岡孝訓、中島洋
2. 発表標題 アミノ酸残基の変更がフェリチン・プルシアンブルー複合体に与える影響
3. 学会等名 第71回錯体化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上裕太、西岡孝訓、中島洋
2. 発表標題 フェリチンL134P変異体に内包されたプルシアンブルーの性状
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村夏生、西岡孝訓、中島洋
2. 発表標題 水系溶媒に可溶性近赤外光応答型CO放出錯体：CO放出における溶液pHの影響
3. 学会等名 1. 第101回日本化学会春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村夏生、西岡孝訓、中島洋
2. 発表標題 水溶性を持つ近赤外光応答型CO放出鉄(III)錯体：錯体構造・CO放出能における溶液pHの影響
3. 学会等名 第71回錯体化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Ikenoue, T. Nishioka, H. Nakajima
2. 発表標題 Reactivity of Prussian blue incorporated into ferritin
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Ikenoue, T. Nishioka, H. Nakajima
2. 発表標題 Reactivity and stability of Prussian blue encapsulated in ferritin L134P mutant
3. 学会等名 第70回錯体化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村夏生、西岡孝訓、中島洋
2. 発表標題 水系溶媒に可溶性近赤外光応答型CO放出錯体CO放出における溶液pHの影響
3. 学会等名 第70回錯体化学討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学理学研究科生体分子設計学研究室 研究業績
<https://www.omu.ac.jp/sci/chem-bmd/achievement/index.html>
研究業績
<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/biomol/achievement.html>

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