

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19045

研究課題名(和文)人工メラニンによる細胞の解析と操作

研究課題名(英文) Designer Melanin for Analyzing and Controlling Cells

研究代表者

上杉 志成 (Uesugi, Motonari)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：10402926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：メラニン生合成の仕組みを単純な合成小分子化合物でハイジャックし、人工メラニンを細胞内で合成する手法を見出した。この人工メラニン合成法を応用し、細胞内に磁性メラニンを合成することに成功した。細胞内に磁性メラニンを合成した細胞を外部磁場存在下で培養すると、砂鉄のように磁力線に沿って培養皿に接着した。本手法は、メカノバイオロジーや磁気遺伝学の研究に新たな道を開き、特定の細胞を磁気的に制御する枠組みを提供する可能性がある。本研究の成果はJ. Am. Chem. Soc.に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究で開発された新手法は、細胞を磁気で操ることを可能にし、細胞の基礎研究に磁気を使うという新たな方法を切り拓くと期待されます。将来的には、特定の細胞を磁気で制御することで、細胞治療などの医療に役立つ可能性があります。

研究成果の概要(英文)：This project developed a method to synthesize artificial melanin intracellularly by hijacking the melanin biosynthesis with a synthetic small molecule. This unprecedented allowed intracellular synthesis of magnetic melanin materials. When cultured in the presence of an external magnetic field, the cells were aligned along the magnetic power lines. This method opens new avenues for mechanobiology and magnetogenetics research and may provide a framework for magnetically controlling specific cells. The results of this study were published in J. Am. Chem. Soc. in 2022.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 磁気 メラニン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メラニンとは、植物、微生物、動物などの生物によって作り出される有機材料である。生体高分子でありながら機能性マテリアルのような分子構造や物性を有しており、紫外線やラジカルから細胞を保護する働きがある。通常、哺乳類のメラニンは色素産生細胞内のメラノソームという細胞小器官で生合成される。種々の生体分子がメラノソーム内で協働的に機能することでメラニンの生合成が効率的に進行する。その生合成過程で律速段階となるのが出発物質チロシンの酸化であり、酸化酵素チロシナーゼがこの反応を触媒する。チロシナーゼによりチロシンが酸化されるとメラノソーム内には高反応性のベンゾキノン誘導体が蓄積する。これらの化学種がポリマー化することでメラニンが生合成される。興味深いことに、チロシナーゼが触媒する酸化重合はチロシン含有ペプチドにも適用可能であり、メラニンを模倣した人工ポリマーがこれまでに数多く合成されている。

2. 研究の目的

本研究では、メラニン生合成のメカニズムをハイジャックすることにより、チロシン誘導体で化学修飾された人工メラニンを哺乳類細胞内で合成する。本研究では、任意の機能を有する人工メラニンをテーラーメイドし、細胞の性質を操作することを試みた。

3. 研究の方法

本手法では、メラニン生合成のメカニズムをハイジャックする。色素産生細胞の細胞小器官であるメラノソーム内でメラニンは生合成される。出発物質であるチロシンがチロシナーゼにより酸化され、反応性の高いメラニン前駆体に変換される。メラニン前駆体はメラノソーム内で自然に重合し、メラニンが合成される。メラニンを含んだメラノソームは、細胞外に放出され周りの細胞にも取り込まれる。本新手法では、人工合成したチロシン誘導体を細胞に導入し、チロシン誘導体を組み込ませた(図1)。

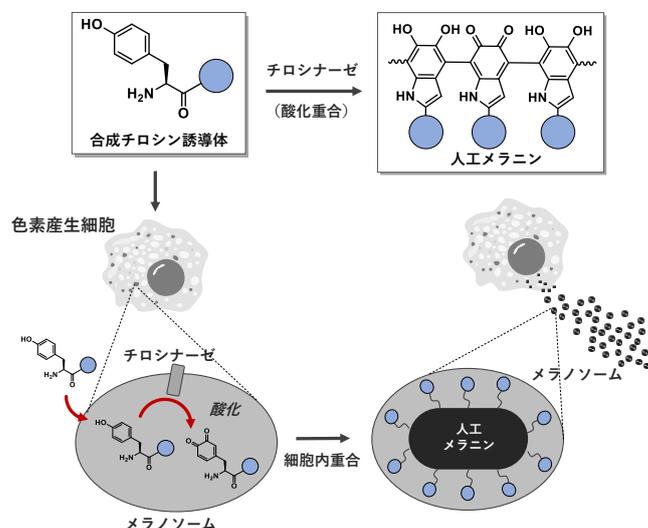


図1 人工メラニンの細胞内合成

4. 研究成果

クリック反応で検出可能なアジドハンドルを結合させたチロシンプローブを有機合成し、メラニンの化学修飾を試みた。試験管内でチロシンプローブとチロシナーゼを混合すると酸化重合により黒色の沈殿物が得られた。細胞内でも同様の酸化重合が起これば、メラニンにチロシンプローブが組み込まれるはずである。そこで、メラニン合成能を有する B16F10 メラノーマ細胞の培養液にチロシンプローブを添加し、細胞内メラニンの化学修飾を試みた。化合物を添加した培養液で細胞を 96 時間インキュベートした後、回収し、細胞破碎液を作製した。ここに赤色蛍光色素が結合したクリック反応試薬である TAMRA-DBCO を加えると、赤色を呈する人工メラニンが得られた。細胞内のメラニンにチロシンプローブが組み込まれていることが示唆された。

次に、機能的チロシン誘導体を用いることで細胞に非天然の機能を付与することを試みた。この概念を実証するための細胞に与える機能として外部磁場に対する磁気応答性を選定した。磁性体は外部磁場に応答し、高速かつ容易に機械的力を発生させることができる魅力的な材料である。チロシン誘導体から磁気応答性メラニンを生合成すれば、磁性細胞を作製するシンプルな手法を提案できる。そこで、チロシン-アルギニンジペプチドと鉄錯体を組み合わせた水溶性の常磁性チロシン誘導体 (m-YR) を設計・合成した。この磁性チロシン誘導体で B16F10 メラノーマ細胞を処理し、外部磁場存在下で培養すると、細胞は磁力線に沿って整列し、引き伸ばされたような形態を示した (図 2)。磁性チロシン誘導体処理により磁気応答性メラニンが細胞内に合成されたことを示唆している。

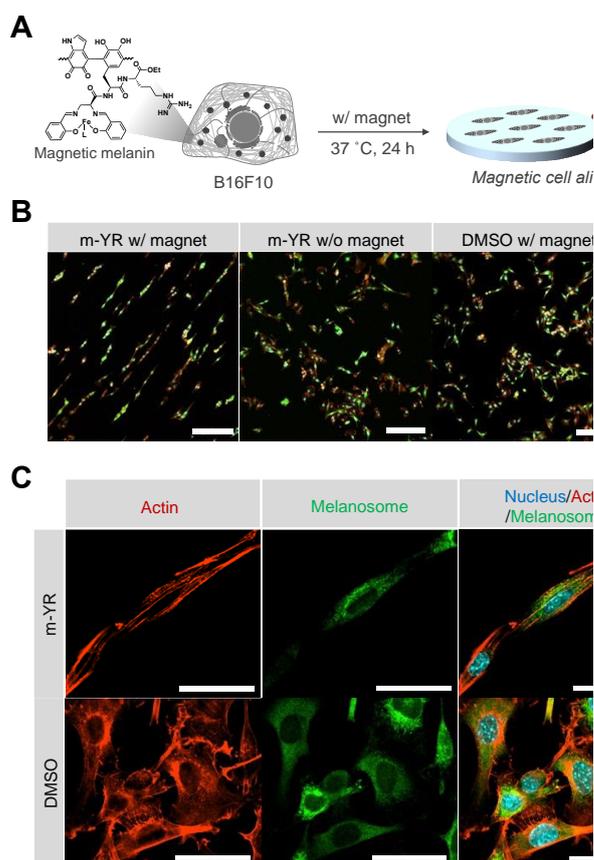


図 2 メラノーマ細胞の磁気制御 (A) 実験の模式図。(B) 磁場存在下での B16F10 メラノーマ細胞の共焦点画像。細胞は磁石の存在下または非存在下で m-YR または DMSO で処理した。アクチン (赤) と核 (シアン) はそれぞれローダミン-ファロイジンおよび Hoechst33258 で染色し、メラノソームは抗メラノーマ gp100 抗体で免疫染色した (緑)。スケールバー : 257 μm 。(C) 細胞の拡大画像。スケールバー : 50 μm : 50 μm 。

次に、外部磁場を形成することで、細胞の磁気配置を操作することを試みた。異なる極または同じ極で向かい合った 2 つの磁石アレイで培養プレートを挟み、磁石の間に引力または斥力の磁力線を形成した。この 2 つの異なる外部磁場は、培養皿の中心にある m-YR 処理したメラノーマ細胞に対して異なる影響を与えた。異なる極から発生した磁場は、 ± 10 度以内で磁力線と平行に 60.6% の細胞を並べた。一方、同じ極から発生した磁場は、培養皿中央の細胞にはほとんど影響しなかった (± 10 度以内の細胞の 7.75%) (図 3)。

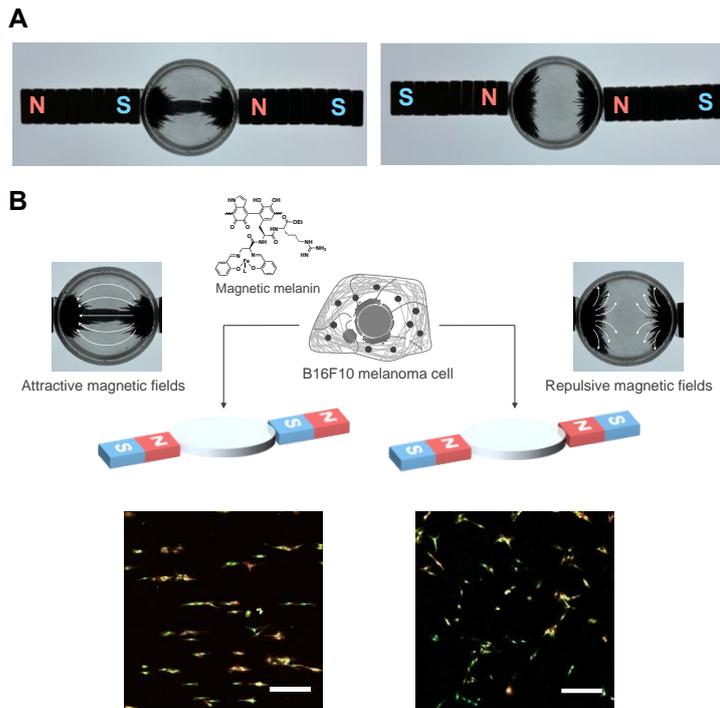


図3 磁場依存的な細胞の整列。(A) 砂鉄の引力磁場(左)または斥力磁場(右)下での磁気整列。(B) 磁場を形成することによる磁気細胞の整列の制御。B16F10メラノーマ細胞をm-YRで処理し、魅力的な磁場(左)または反発する磁場(右)下で処理した。アクチン(赤)と核(シアン)はそれぞれローダミン-ファロイジンおよびHoechst33258で染色し、メラノソームは抗メラノーマgp100抗体(緑)で免疫染色した。スケールバー: 250 μm 。

本手法の限界は、メラニン産生色素細胞にしか適用できないことである。この問題を解決する一つの方法として、色素細胞以外の細胞でチロシナーゼを過剰発現させることが考えられる。実際、我々は、チロシナーゼ発現プラスミドをヒトHEK293細胞にトランスフェクトすると、メラニン生合成能を獲得することを示した。チロシナーゼ過剰発現HEK293細胞をm-YRで処理すると、細胞は黒くなり、磁気メラニンが生成された。さらに、m-YR処理したHEK293細胞を磁石の存在下で培養したところ、チロシナーゼ発現HEK293細胞の35.1%がメラノーマ細胞で観察されたように磁力線に±10度平行に整列した。これらの結果は、本手法が、チロシナーゼを発現するように操作された非色素細胞にも拡張可能であることを示し、この手法の汎用性を示唆している。

本手法は、メカノバイオロジーや磁気遺伝学の研究に新たな道を開き、特定の細胞を磁気的に制御する枠組みを提供する可能性がある。本研究の成果は *J. Am. Chem. Soc.* に発表した。
(<https://doi.org/10.1021/jacs.2c06555>)

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 Nishio Kosuke, Toh Kohei, Perron Amelie, Goto Masato, Abo Masahiro, Shimakawa Yuichi, Uesugi Motonari	4. 巻 144
2. 論文標題 Magnetic Control of Cells by Chemical Fabrication of Melanin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 16720 ~ 16725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.2c06555	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Motonari Uesugi
2. 発表標題 New World of Bioactive Small Molecules
3. 学会等名 Neuro2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学化学研究所上杉研究室 https://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~uesugi/ja/index.php

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