

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月4日現在

機関番号：34310  
研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2012～2013  
課題番号：24750165  
研究課題名 (和文) ヘム代謝副産物であるCOの機能解明をめざした超分子COレセプターの開発  
研究課題名 (英文) Creation of a Supramolecular CO Receptor for Investigation of Biological Roles of Endogenously-Produced Internal CO  
研究代表者  
北岸 宏亮 (KITAGISHI, Hiroaki)  
同志社大学・理工学部・助教  
研究者番号：60448090  
交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要 (和文)：一酸化炭素(CO)は、ヘムオキシゲナーゼ(HO)によるヘム代謝分解の際に副生成物として常に発生しており、生体内におけるシグナル伝達分子として機能すると考えられているが、その詳細な作用機構は明らかになっていない部分が多い。我々が開発した超分子ヘムタンパク質モデルhemoCDは、水中で酸素(O<sub>2</sub>)およびCOと可逆的に結合し、特にCOに対してヘモグロビン(Hb)よりも遥かに高い親和性を示す。本研究では、このhemoCDを用いて生体内からCOを除去し、そのときに起こる遺伝子的な変化を観測した。さらにhemoCDの細胞内導入を検討するため、膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンとhemoCDを組み合わせた系について検討し、フリーベースのポルフィリンを有するhemoCD類似の錯体の細胞内導入を達成した。

研究成果の概要 (英文)：Carbon monoxide (CO) is continuously produced in the eukaryotic organisms during degradation of heme by heme oxygenase (HO). The biological roles of CO in the living organisms have not been fully understood because of lacking of knockdown method for endogenously produced CO. We have shown that a supramolecular complex, hemoCD, strongly binds CO higher than that of hemoglobin. In the present study, hemoCD was used for removal of CO in the living organisms and genetic response upon removal of CO was investigated. Furthermore, for monitoring the depletion effect of CO in the human cells, the hemoCD scaffold was conjugated with an octaarginine peptide that has a strong ability to bring molecules into the cell interior. This conjugate, R8-hemoCD, was smoothly taken by the HeLa cells without significant toxicities.

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：生体機能関連化学・ヘムタンパク質モデル

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)は一般的に有毒ガスとして知られているが、一方で200 ppm程度のCOガスの吸入が肝臓および腎臓の虚血・再灌流時に起こる炎症傷害を著しく抑制することが判明して以来、適量摂取による抗炎症作用、血圧降下作用および抗アポトーシス作用などのCOの『正の効果』が次々と発見され、近年その医療効果に注目が寄せられている。生体内でCOはヘムオキシゲナーゼ(HO)の作用によりヘムが代謝分解される際にビリベルジンと共に発生し、ガス状メディエーターとして細胞内シグナル伝達を行うが、

その詳細な機構は未だ明らかになっていない(Fig. 1)。活性酸素種(ROS)による酸化ストレスを受けた細胞内でHOの誘導型アイソザイムであるHO-1の発現が特異的に亢進することから、ヘム代謝副産物であるビリベルジンとCOが細胞保護に何らかの役割を果たすものと考えられている。ビリベルジンは抗酸化作用を示すビリルビンの前駆体なので、主にROS除去に関与している可能性が高い。一方、細胞保護におけるCOの役割については不明な点が多く、そのメカニズムの解明をめざした研究が医学・分子生物学の分野において行われている。

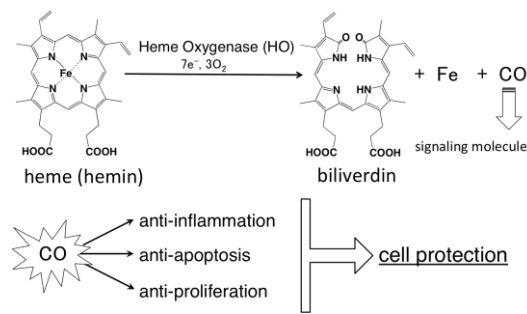


Fig. 1. Endogenous CO in the Biological systems.

CO と同列に扱われるガス状メディエーターに一酸化窒素(NO)と硫化水素(H<sub>2</sub>S)がある。いずれも血圧調節などの血管機能に関わる制御因子である。NOとH<sub>2</sub>Sの作用はそれぞれの発生源となる酵素(NO synthase および cystathionine  $\gamma$ -lyase)をノックアウトしたモデルマウスを作成することによって検討され、そのメカニズムが解明された。ところが CO の場合には発生源である HO をノックアウトするとヘムの代謝不足となるために、CO 欠乏による効果のみを直接観測することができない。生体内で CO のみを選択的に除去する手段がないために、CO の生理現象の研究は NO や H<sub>2</sub>S と比べて遅れているのが研究開始時の現状であった。毒物でありながら細胞保護などの重要な役割を担う CO の毒性と機能のバランスが生体内でいかにして保たれているのかは全くの未解明領域であり、全容解明に近づけるためにも CO の選択的除去法の開発がのぞましい。

我々が開発した超分子ヘムタンパク質モデル錯体 hemoCD (Fig. 2)は、水中で酸素(O<sub>2</sub>)および CO と可逆的に結合し、特に CO に対してヘモグロビン(Hb)よりも遥かに高い親和性を示す。本研究ではこの hemoCD を用いて、生体内において CO のみを選択的に検体から除去することによって擬ノックアウト検体とし、内因性 CO の生理的役割を調べるための分子ツールとして役立てることができるかどうかについて検討を行った。

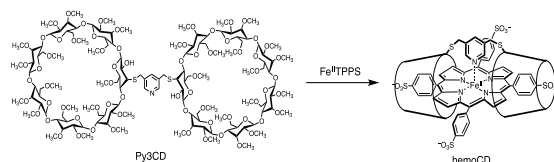


Fig. 2. Structure of hemoCD.

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

- (1) hemoCD を用いた動物体内からの CO 除去時における遺伝子的な変化の探索。
- (2) hemoCD を効率よく細胞内に導入するための手法の開発。

## 3. 研究の方法

hemoCD を投与するための動物実験に関しては、同志社大学が定める倫理規定に従い、法令を遵守して実施した。有機合成およびペプチド合成に関しては、同志社大学加納航治教授研究室において、常法に従い実施した。細胞培養実験に関しては、当時同志社大学理工学部所属していた青山宏教授研究室所有の研究設備を用いて研究を行った。遺伝子解析に関しては、同志社女子大学薬学部の根木滋助教の協力のもとに RT-PCR および DNA マイクロアレイ解析を行った。

## 4. 研究成果

hemoCD の酸素付加体(oxy-hemoCD)の PBS 溶液をラットの静脈中に投与すると、循環中にすみやかに血中の CO を捕捉して尿中へと排出されることが明らかとなった(Fig. 3)。この CO 排出は定量的であり、十分量の hemoCD 量を連続的に投与することによって、体内で常時生産される CO を継続的に除去することが可能である。

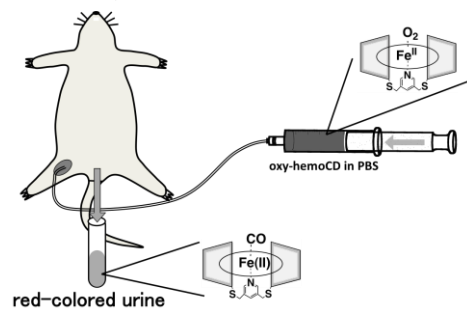


Fig. 3. Infusion of oxy-hemoCD and following excretion of CO-hemoCD in the urine.

hemoCD の酸素付加体(oxy-hemoCD)の PBS 溶液をマウスの腹腔に連続的に投与した。数分後、ラットへの静脈注射時と同様に hemoCD の CO 付加体の尿中排出が確認された。したがって hemoCD はマウスの腸管から吸収されて血液中を循環することが分かった。hemoCD 投与後のマウスの肝臓から RNA を抽出し、これを用いて HO-1 の m-RNA 量を RT-PCR により測定した。その結果、対照実験として行った中心鉄を持たない free-base の hemoCD (Fe-free hemoCD)を投与した場合と比較して、一時的に約 10 倍の HO-1 の m-RNA 量の増加が観測された(Fig. 4a)。これは、hemoCD の投与によって体内の CO が欠乏し、恒常性維持のため CO を供給する方向へと生体が応答した結果であると考えられる。

一方、ヒト肝臓ガン由来の培養細胞 (HepG2)に対し、培養液中に oxy-hemoCD を添加した場合、HO-1 の発現量変化は見られなかった(Fig. 4b)。このことは生体内において CO は間接的に HO-1 の発現制御を行っている



- Per-*O*-methylated  $\beta$ -Cyclodextrin” *Org. Bio. Chem.* 11(19), 3203-3211 (2013).
- 3) T. Ueda, H. Kitagishi, K. Kano, “PEGylation of an Artificial O<sub>2</sub> and CO Receptor: Synthesis, Characterisation and Pharmacokinetic Study” *Org. Biomol. Chem.* 10(22), 4337-4347 (2012).
  - 4) H. Kitagishi, K. Kashiwa, K. Kano, “Functionalization of a Protein Surface with Per-*O*-methylated  $\beta$ -Cyclodextrin” *Biopolymers*, 97(1), 11-20 (2012).

〔学会発表〕(計7件)

- 1) 南景子, 北岸宏亮, 加納航治 “超分子 CO レセプターの細胞内導入法の検討” 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 27 日
- 2) 勇村亜希, 北岸宏亮, 根木 滋, 杉浦幸雄, 加納航治 “超分子 CO レセプターによる生体内 CO の除去効果” 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 27 日
- 3) 北岸宏亮, 勇村亜希, 加納航治 “鉄(II)ポルフィリン/シクロデキストリン超分子錯体による内因性一酸化炭素の除去とそれによる細胞および動物体内における遺伝子発現変化” 錯体化学会第 63 回討論会, 沖縄, 2013 年 11 月 2 日
- 4) 北岸宏亮, 齊藤友紀恵, 菅谷陽輔, 加納航治 “メチル化シクロデキストリン二量体で包接された鉄(III)ポルフィリンによる水中でのアニオン認識” 第 30 回シクロデキストリンシンポジウム, 熊本, 2013 年 9 月 13 日
- 5) H. Kitagishi, S. Negi, Y. Mizukawa, Y. Amagase, A. Yumura, T. Urushidani, Y. Sugiura, K. Kano “Genetic response upon removal of endogenous CO from the blood of mice by administration of a synthetic CO receptor” 16<sup>th</sup> International Conference on Bio-inorganic Chemistry (ICBIC16), Grenoble, July 23, 2013.
- 6) 北岸宏亮, 畠田智史, 加納航治, “オクタアルギニン連結ポルフィリンの細胞内導入におけるシクロデキストリン包接効果” 第 29 回シクロデキストリンシンポジウム, 東京, 2012 年 9 月 6 日
- 7) H. Kitagishi, S. Negi, S. Hatada, Y. Maki, Y. Maeda, Y. Sugiura, K. Kano, “Capture of Endogenous Carbon Monoxide by an Iron(II)porphyrin-Cyclodextrin Supramolecular Complex” 7<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Jeju, Korea, July 1-6, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.doshisha.ac.jp/~kkanou/>

6. 研究組織

研究代表者

北岸 宏亮 (KITAGISHI, Hiroaki)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号 : 60448090