

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620132

研究課題名(和文)プロテアーゼ依存的な薬剤放出機構を有するタンパク質ナノキャリア分子の創出

研究課題名(英文)Creation of protein-base nanocarrier with a protease dependent molecule release mechanism

研究代表者

渡辺 芳人 (Yoshihito, Watanabe)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・教授

研究者番号：10201245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フェリチンチャンネルの3回対称性を活かし、天然に存在する強力な鉄3価キレート分子(エンテロバクチン)模倣の鉄-トリスカテコール錯体をチャンネル入り口に構築することに成功した。結晶構造から、この錯体がチャンネルキャップとして機能することが期待されたが、当初の目的である抗血栓生分子のフェリチンへの封入には至らなかった。一方、申請者らが最近開発した光感受性一酸化炭素放出鉄錯体([Fe-CO])は、内部空間に取り込み可能なことがわかった。近年、生体適合性に優れたCO放出分子の開発が求められている。今後は本研究で得られたフェリチン内包型[Fe-CO]をもとに、生体で光によるCO放出が可能な分子の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：A ferric iron-tris catechol complex, which is a mimicry of enterobactin, a strong chelator for iron(III) ion found in nature was successfully prepared on the entrance of the 3-fold axis channel of ferritin. The X-ray crystal structure of the complex appeared to plug the ferritin channel and confine penetrated molecules into the ferritin cavity, while experimental data revealed that our original target molecules, antithrombotics passed through the channel, irrespective of formation or deformation of the iron catechol complex.

By contrast, the ferritin with the iron catechol complex was competent to capture an iron carbonyl complex, which we recently developed as a photo-dependent CO release molecule ([Fe-CO]). Bio-compatible CO releasers adaptable to organisms have been focused as an important tool to study signal transduction mechanism in the cells. We will develop a novel bio-compatible CO releaser based on the newly obtained composite, ferritin-[Fe-CO].

研究分野：生物無機化学

キーワード：フェリチン 一酸化炭素 鉄チオラト錯体 一酸化炭素放出分子

1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム (DDS) における薬剤キャリアとは、i) 標的部位への選択的な薬剤輸送、ii) 標的部位での効果的な薬剤放出、あるいは、iii) 標的部位による薬剤の吸収促進、を実現する分子である。DDS が必要な薬剤療法は数多い。しかし、現在主流の中空脂質膜 (リポソーム) や化学修飾した金属ナノ粒子を用いる研究では、多くの場合、腫瘍細胞を標的としている。その理由の一つに、腫瘍細胞の EPR 効果 (腫瘍細胞は正常組織に比べて血管透過性が高く、高分子や微粒子が血管から細胞内へ流入しやすい。一方、リンパ系が未発達なため、細胞に到達した物質は蓄積されやすい) によって、上述 i、iii をある程度達成できるため、超分子系キャリア分子の設計に新規なアイデアを導入しやすいことが挙げられる。他方、EPR 効果のない標的に対する DDS 研究は立ち遅れている。例えば、血栓 (心筋梗塞などの原因) を溶かす抗血栓剤は、DDS の重要な対象と考えられるが、これまでほとんど研究例がない。現在の抗血栓剤は、生体全体に拡散・滞留し、血液の凝固作用 (止血作用) を長時間低下させ、出血症の原因となる。血栓には EPR 効果がないため、この副作用を抑制するには、キャリア分子が血栓を認識し、抗血栓剤を血栓周辺に放出する仕組みが必要である。血栓生成の主因は、トロンビンと呼ばれるタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) の過剰発現であるため、この酵素の活性を利用してキャリア分子からの抗血栓剤放出ができれば、血栓応答性の薬剤放出機構として有効なはずである。しかし、超分子系キャリア分子でこれを実現するには、高価なペプチド鎖を大量に用いて、リポソーム構成分子やナノ粒子の修飾分子を合成する必要がある、費用と労力の点で将来の展開に不安がある。そのため、プロテアーゼを直接の標的とする DDS では、従来の超分子系の発想に縛られない、タンパク質を基盤とするキャリア分子の開発が有利といえる。

大きな内部空間 (直径 8nm) を有する球状タンパク質、フェリチン (図 1) は、「生体の状況に応じた鉄イオンの貯蔵と放出」が、生理的機能であるが、「タンパク質外部と内部を結ぶチャンネルを介して、様々な小型有機分子の内部空間への取り込みと放出が可能である」ことが近年報告されている。タンパク質のアミノ酸配列を遺伝子操作によって変更し、プロテアーゼ認識部位を導入する手法は、以前から知られており、フェリチンに対しても同様のことが可能であった。したがって、これらの知見を組み合

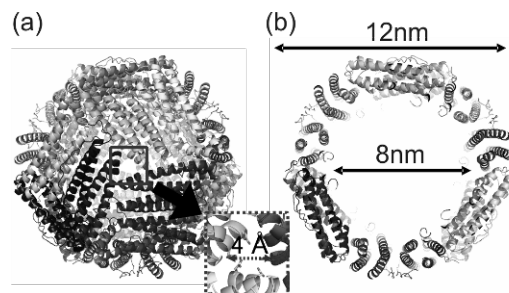


図 1. フェリチンの (a) 全体構造、(b) 断面構造。直径 4Å 程度のチャンネル ((a) 四角囲み) を介して、イオンや有機分子の取込み/放出が可能。

わせ、トロンビンによって分解可能なフェリチンを調製し、その内部空間に抗血栓剤分子を封入することで、血栓生成部位特異的に作用する DDS が可能になると考の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フェリチンをトロンビンによって分解可能なものへと変換し、同時に抗血栓性薬剤分子の封入を実現することである。特定プロテアーゼの過剰発現は、病変部位でしばしばみられる現象であり、本研究で提案するプロテアーゼ依存的な薬剤放出機構は、EPR 効果が望めない広範な病変の DDS 標的化に有効なはずである。このように、本研究で目指したフェリチンキャリア分子は、設計思想、標的対象が従来の超分子系とは全く異なる。本研究の成功は、新たな設計思想 (プロテアーゼ標的型) を有するキャリア素材として中空タンパク質をアピールし、DDS の応用範囲を拡大する。本研究の着想が従来研究の刺激となり、これまでに蓄積された知見からは想像もつかない新たな DDS の開発につながることも本研究の目的である。

3. 研究の方法

フェリチンへのイオンや小分子の取込みには、フェリチン内部表面に存在する金属イオン配位性や有機分子との疎水性相互作用能を有するアミノ酸残基側鎖との相互作用が機能している。上市されている抗血栓性分子は、芳香環を有するクマリン誘導体であるため、この分子についてもアミノ酸側鎖との疎水性相互作用による取込みが可能と考えた。しかし、抗血栓性分子は、チャンネルを通過するものの、内部空間にとどまることなく、外部との濃度平衡に達することが分かった。そこで、本研究では、第一に抗血栓性分子をフェリチン内部空間に封込めるため、外部刺激によってチャンネルを閉じる仕組み (チャンネルゲート) づくりを目指した。ゲートの構造は、チャンネルが三つのフェリチンサブユニットの対称配置で形成されることに着目し、三回対称性の分子構造を有するシデロフォア (エンテロバクチン、図 2) を模

倣し、鉄 (III) イオンの添加、錯形成でチャネル孔を塞ぐこと (図 3) を目標とした。

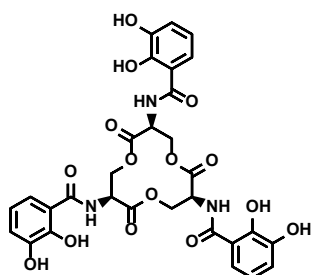


図 2. エンテロバクチン。末端のカテコール基と  $\text{Fe}^{3+}$ -トリスカテコール錯体を形成する。 $\text{Fe}^{3+}$  に対する錯安定度定数は  $10^{45} \text{ M}^{-1}$ 。

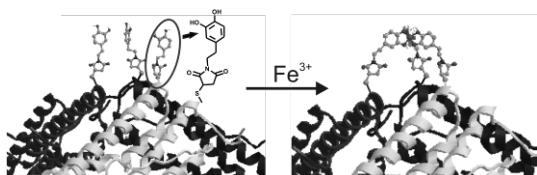


図 3. チャネルは、同一サブユニット 3 つによる 3 回軸構造で構成されている。これをエンテロバクチンのマクロサイクル部 (図 2 参照) に見立て、 $\text{Fe}^{3+}$ -エンテロバクチン錯体を模した  $\text{Fe}^{3+}$ -トリスカテコール錯体をチャネル孔の真上で再現、チャネル孔を塞ぐ。

#### 4. 研究成果

4-1. フェリチン三回軸チャネル孔へのゲート機構の取り付け エンテロバクチンの鉄配位子部分を模したカテコールマレイミド分子 (a-Cat、図 4) を合成し、チャネル孔近傍だけが修飾されるようアミノ酸置換したウマ心筋フェリチン変異体 (A119C/C126A) と反応させ、a-Cat で修飾された A119C/C126A 変異体 (a-Cat-Fr) を得た。a-Cat-Fr は鉄 (III) に対し、エンテロバクチンの錯安定度定数 ( $\sim 10^{45} \text{ M}^{-1}$ ) に迫る ( $1.2 \times 10^{40} \text{ M}^{-1}$ ) を示した。また pH7 における鉄 (III) イオンの錯体からの解離定数は  $\sim 10^{-23} \text{ M}$  であり、生理的 pH においても、チャネル孔をブロックするために十分に安定な錯体を形成することが分かった。a-Cat-Fr が鉄 (III) イオンと錯形成した際の結晶構造を図 5 に示す。鉄錯体は、エンテロバクチンと同様に 3 つのカテコール基からキレート配位を受けた、ト

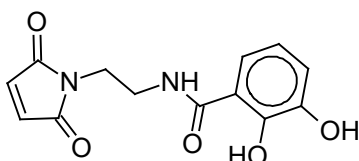


図 4. a-Cat

リスカテコール六配位、八面体構造を有し、さらにチャネル孔をふさぐような

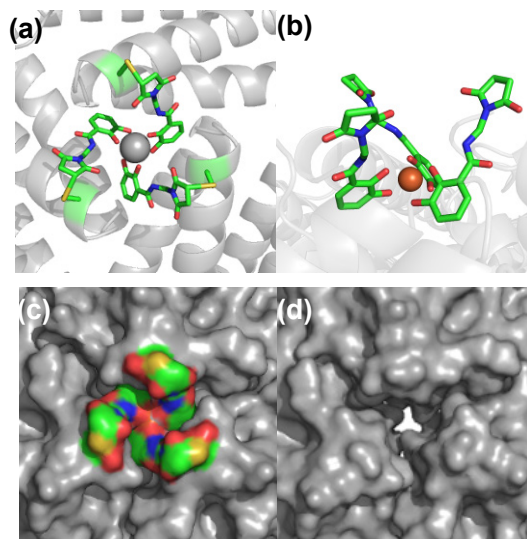


図 5. (a-c)  $\text{Fe(III)}$  と錯形成した a-Cat-Fr の結晶構造 (三回対称軸チャネル付近) (PDB:5CZU)。 (d) チャネルゲートのない元のフェリチンの三回軸チャネル近傍 (PDB:1DAT)。チャネル孔が見える。

配向をとっていることがわかった。この構造は、分子やイオンがフェリチン内部空間と外部間をチャネルを介して移動することを効果的に抑制するようにみえた。

4-2. 抗血栓性分子類縁体の a-Cat-Fr への封入実験 3 回軸チャネルに対するゲート機構が完成したので、改めてフェリチンへの抗血栓剤封入を調査した。初期の研究と同様に、今回もクマリン誘導体を抗血栓剤類似分子として用いた。結果、a-Cat-Fr チャネルゲートが閉じている (鉄 (III) トリスカテコールが形成している) 状態でもクマリン誘導体は、チャネルを通過し、カテコール鉄 (III) 錯体は、チャネルゲートとして機能しないことが分かった。環数の異なる多環芳香族分子に対してゲート効果を検証したところ、いずれもチャネルゲートの開閉状態とは関係なく、環数 3 のアントラセン誘導体はチャネルを通過し、環数 4 のピレン誘導体はチャネルを通過しなかった。この結果は、多環芳香族の 3 回軸チャネル通過は、チャネル径にのみ依存しており、錯形成がゲート機構として機能しないことを示唆している。今後、この原因を解明し、クマリン誘導体のフェリチン内部空間への封込めを実現する。

4-3. a-Cat-Fr への光感応型一酸化炭素放出錯体の封入 クマリン誘導体封入実験の過程で、我々が最近開発した光感応型一酸化炭素 (CO) 放出鉄錯体 ( $[\text{Fe-CO}]$ 、図 6) が、a-Cat-Fr に取り込み可能であることを見出した。CO は近年、細胞内シグナル伝達物質として注目されており、細胞レベルの基礎的な研究、臨床への応用研究ともに盛んである。研究には

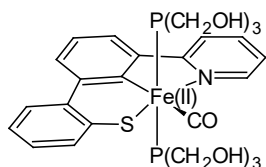


図 6. 開発した光感応型 CO 放出鉄錯体

任意のタイミングで任意の量の CO を放出可能な CO 放出分子が必要であり、細胞レベルで利用可能なものが数多く報告されている。一方、臨床応用を最終的な目標とする生体利用可能な CO 放出分子は、細胞毒性が問題となって開発が遅れている。我々が開発した [Fe-CO] は、蛍光灯程度の光で CO 解離が生じるため、光による CO 放出の制御が可能である。また生体が利用する鉄イオンを中心金属に用いているため、細胞毒性の抑制が期待できる。一方、[Fe-CO] は、生理的条件下の水溶液中では不安定で、数時間で加水分解し、また CO 放出後も錯体が分解する。その際、 $\text{Fe}^{2+}$  の生成→空気酸化が進行し、最終的に  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  の析出することが課題であった。本研究で、a-Cat-Fr に封入することで [Fe-CO] を水溶液中で数日間安定に存在させることに成功し (図 7)、課題であった水溶液中での安定性の問題を解決することが

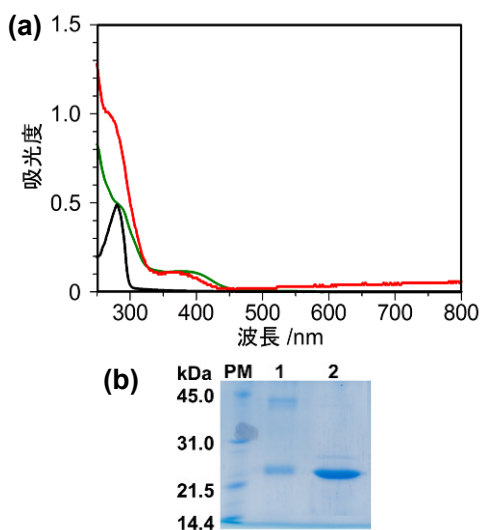


図 7. [Fe-CO] の a-Cat-Fr への取込み反応で得られた生成物 (a) 紫外 - 可視吸収スペクトル。黒: a-Cat-Fr のみ, 緑: [Fe-Co] のみ, 赤: 取込み反応後生成物。このスペクトルは、室温、48 時間静置後も変化しない。(b) SDS-PAGE。1: 取込み反応後生成物、(a) の赤に対応、2: a-Cat-Fr、(a) の黒に対応。22kDa 付近のバンドがフェリチンに対応する。

できた。冒頭で述べたようにフェリチンの生理的機能は、鉄イオンの蓄積と放出であり、蓄積の際には、内部空間で酸化鉄のクラスタを生成する。この仕組みを

利用すれば、[Fe-CO] が CO 放出後の分解で生成する  $\text{Fe}^{2+}$  を酸化鉄のクラスタとしてフェリチン内部に蓄積することが可能となり、課題であった  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  の析出を抑制できると考えている。

以上のように、生体を対象とした研究に CO 放出剤として [Fe-CO] を用いる際の課題は、[Fe-CO] を a-Cat-Fr へ封入すること解決可能であるように思える。ただし、これまでの研究で a-Cat-Fr 一分子に封入できた [Fe-CO] の数は、ICP-AES およびタンパク質量、紫外 - 可視スペクトルの結果から 2-3 分子程度と見積もっている。内部空間の体積から概算される封入可能な [Fe-CO] の分子数は、200 程度であり、実験結果と差が大きく、改善の余地がある。封入される [Fe-CO] 分子数を増大させ、a-Cat-Fr 一分子あたりの CO 放出能を向上させることが目下の課題である。

本研究の成果の一部は、イギリス化学会速報誌 *Chem. Commun.* に掲載され、当該雑誌の Inside from cover にて紹介された (図 8)。

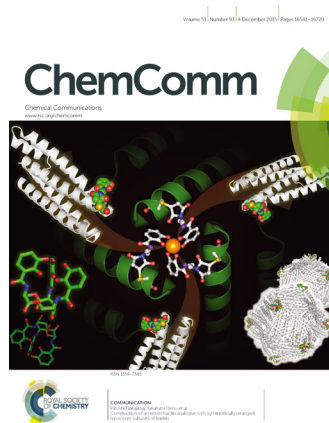


図 8. Chem. Comm. に掲載された Inside front cover picture.

## 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 3 件)

- ① H. Nakajima, M. Kondo, T. Nakane, S. Abe, T. Nakao, Y. Watanabe, T. Ueno, Construction of an enterobactin analogue with symmetrically arranged monomer subunits of ferritin, *Chem. Commun* 2015, **51**, 16609-16612, DOI: 10.1039/c5cc06904a. (査読有)
- ② Y. Miura, K. Yoshimitsu, N. Takatani, Y. Watanabe, H. Nakajima, Effect of Nitric Oxide on VnfA, a transcriptional activator of VFe-nitrogenase in *Azotobacter vinelandii.*, *J. Biochem.* 2015, **157**, 365-375. DOI: 10.1093/jb/mvu083 (査読有)

- ③ H. Nakajima, Y. Watanabe, “Creation of thermally tolerant peroxidase”, *Methods. Enzymol.* 2015 *accepted*.

[学会発表] (計 8 件)

- ① H. Nakajima, S. Miyazaki, T. Itoh, Y. Watanabe, “Conversion of readout from transcriptional regulator by electron transfer protein”, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Aug 24-28, 2014, Zurich(Switzerland)
- ② 中島 洋, 「電子伝達タンパク質を化学の視点で使う」、第 45 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2014 年 11 月 29-30 日、中部大学(春日井)
- ③ 中島 洋, 「非天然機能の賦与はどこまで可能か?」、筑波大学化学系セミナー、2015 年 10 月 20 日、筑波大学(筑波)
- ④ 近藤美緒、中島 洋、渡辺芳人, 「フェリチンへの分子の取込み制御」、第 42 回生体分子科学討論会、2015 年 6 月 12-13 日、群馬大学(高崎)
- ⑤ 近藤美緒、中島 洋、渡辺芳人, 「フェリチン親水性チャネルの 3 回対称性を利用したエンテロバクチン構造の再現」、第 96 回化学会春季年会、2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学(京田辺)
- ⑥ 中江豊崇、廣津昌和、木下 勇、中島 洋, 「N, C, S ピンサー鉄錯体の光誘起配位子置換反応」、2015 年光化学討論会、2015 年 9 月 9-11 日、大阪市立大学(大阪)
- ⑦ 中江豊崇、廣津昌和、木下 勇、中島 洋, ”Property and Reactivity of iron thiolate complexes containing phenyl phosphine moiety、錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 21-23 日、奈良女子大学(奈良)
- ⑧ 中江豊崇、廣津昌和、木下 勇、中島 洋, ”Synthesis of a water soluble carbon monoxide-releasing iron(III) complex responsive to visible light”、第 96 回化学会春季年会、2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学(京田辺)

[その他]

ホームページ等

<http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp/>

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/biomol>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺芳人 (WATANABE, Yoshihito)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・教授

研究者番号：10201245

### (2) 研究分担者

中島 洋 (NAKAJIMA, Hiroshi)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：00283151