

シクロデキストリン包接錯体を利用する 生命科学研究:COの生理機能解明へのアプローチ

Life science research using cyclodextrin inclusion complexes: An approach to elucidation of physiological function of CO.

北岸 宏亮 Hiroaki Kitagishi, Ph.D. (Professor)

同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科 教授
Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Doshisha University

キーワード ... シクロデキストリン, ガスバイオロジー, ヘム

01

はじめに

シクロデキストリン(CD)は、水中や生体内においてさまざまな疎水性物質と包接錯体を形成する特徴が、一般には知られている。しかしCDの面白い点は、それだけではない。ゲスト分子をCD空洞内の疎水環境に隔離することにより、水中では通常見られない特異な性質を発現させることがある。我々の研究グループでは、水酸基をO-メチル基で置換したメチル化CDを用いて、ポルフィリン類をミクロな疎水場に隔離した包接錯体に着目し、この包接錯体の性質を活かす応用研究を行ってきた。この包接錯体は、ヘモグロビンなどの天然ヘムタンパク質が補酵素ヘムを疎水ポケットに取り込む様式と非常に似通っている。すなわちCDはヘムタンパク質のタンパク質部分を模倣する代替物としてのたらしきを示すのである。

本稿では、メチル化CDとポルフィリンから構成される人工ヘムタンパク質モデル化合物を利用した、著者らの最新の研究を紹介する。CDが単なるホスト分子としてではなく、CD/ポルフィリン包接錯体が生命研究の最前線において非常に役に立つはたらしきをしていることを紹介したい。なお研究開始当初から、現在のような展望があったわけではなく、行き当たりばったりしながら

も何とか活路を見出して、生命科学領域へと足を踏み入れた次第である。このような筆者らの研究経緯は、決して一般的に広く役立つものではないかもしれないが、どこか一部分でも読者らに研究のヒントになるような部分があれば、とても幸いである。

02

生体における一酸化炭素の機能と役割

一酸化炭素(CO)は火災事故や練炭自殺の際に登場する悪名高き有毒ガスである一方、生命科学分野においては、内因性シグナルガスとして認知されている。生体内においてCOは、赤血球から漏出した補因子ヘムが細胞内に取り込まれ、酵素ヘモキシゲナーゼ(HO)により代謝分解される際に、ビリベルディン、鉄イオンとともに、産生する(図1)。成人男性(体重60kgと仮定)では1日あたり約10mLのCOが産生すると言われている。内因性COのうち約8割は細胞外へと拡散し、赤血球のヘモグロビン(Hb)に配位して、CO-Hbとして血中を循環する。Hbに配位したCOは徐々に解離し、肺から呼気として排出される。残り2割のCOは細胞内においてヘムタンパク質などの金属イオン補因子に作用することで、様々なシグナル伝達を担う。特に炎症性サイトカインの抑制による抗炎症作用がよく知られている。最近ではCOを除

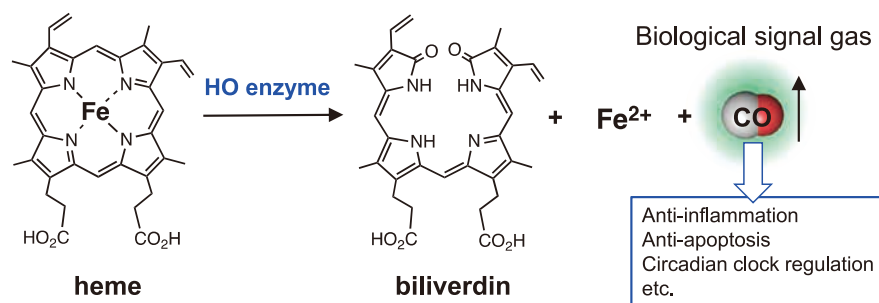


図1 ヘムの分解による内因性COの産生: 内因性COはシグナルガスとして機能する

放する化合物(CO-releasing molecules, CORMs)を用いて微量のCOを生体投与する試みが盛んであり、CORMsによる血管拡張作用、抗炎症作用、細胞死抑制作用など、細胞を保護する効果が数多く報告されている¹⁾。

COのように有毒ガスでありながらも内因性ガスとしてシグナル機能を有する類似のガス分子として、一酸化窒素(NO)と硫化水素(H₂S)が挙げられる。これらのガス分子は、それぞれの合成酵素の発現をノックアウト/ノックダウンすることにより、それぞれの生理機能に関する検討が進められてきた。一方COの場合、生体内では図1に示すヘム代謝の副産物として産生するため、従来の遺伝子工学的な手法では、ヘム代謝に影響を与えずCOのみを選択的に除去することは不可能であり、そのため生理機能の研究が困難であった。生体内COの役割をクリアに検討するためには、高いCO親和性を示す選択的スカベンジャーの開発が必須であった。

03 シクロデキストリン/ポルフィリン超分子錯体

CDの水酸基をO-メチル化した2,3,6-tri-O-methyl-β-CD (TMe-β-CD)は、水中でアニオン性テトラアリアルポルフィリンであるTPPSと非常に安定な2:1包接錯体を形成する(図2)²⁾。この包接錯体は、水中における安定性が異常に高く、低濃度条件(マイクロモル濃度以下)でも定量的に錯体を形成する。この両者

の分子間相互作用における結合定数は大きすぎて正確には決定されていない。最近、同位体ラベル化した¹³C-TMe-β-CDを用いた実験により、TPPSとTMe-β-CDが動物の血液中などの夾雑物が非常に多い生体環境においても、選択的に両者が相互作用して安定な包接錯体を形成することが、NMR測定により示された³⁾。生体内環境ではたらく人工ホスト・ゲストペアの中で、これほど強く相互作用する系は極めて珍しい。したがって、本稿で紹介する利用以外でも、たとえばアビジン・ビオチンペアのように、生体内ホスト・ゲストペアの素材として、様々な応用可能性を秘めている超分子系である。

包接錯体の異常な安定性に加えて、TMe-β-CDは水中においてTPPSをミクロな疎水環境に隔離する。通常、ポルフィリン配位子は酸性水溶液中において内部窒素がプロトン化されて溶液が赤紫色から緑色に変色する。一方、TMe-β-CD存在下においてTPPSは、強酸性水溶液(pH 1以下)においても変色しない⁴⁾。すなわち、TMe-β-CDはポルフィリン環を包接することでプロトン、すなわち水分子の近接を著しく妨げていることを示している。このようなポルフィリン環周囲に対するミクロな強い疎水場の形成は、天然ヘムタンパク質に見られるヘムポケットの環境と類似している。

我々の研究室では、ポルフィリン-TMe-β-CD包接錯体と天然ヘムタンパク質との間に「疎水場形成」という共通項を見出し、この包接錯体をベースとしたヘムタンパク質モデル錯体の構築に取り組んできた(図3)⁵⁾。水溶性TPPS鉄(II)錯体(FeTPPS)と、ピ

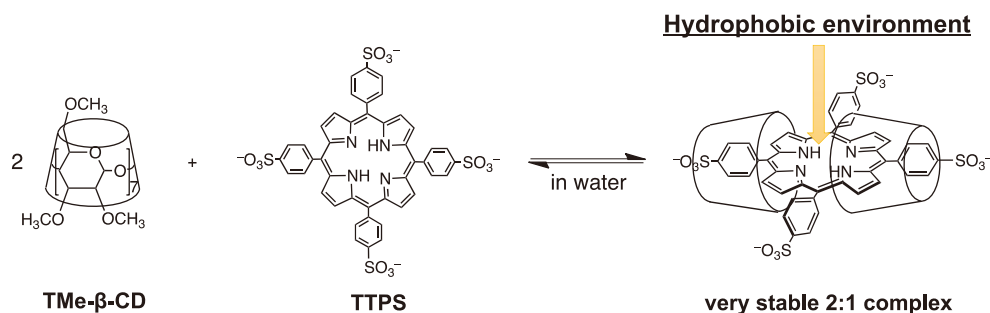


図2 メチル化CDと水溶性ポルフィリンからなる2:1包接錯体

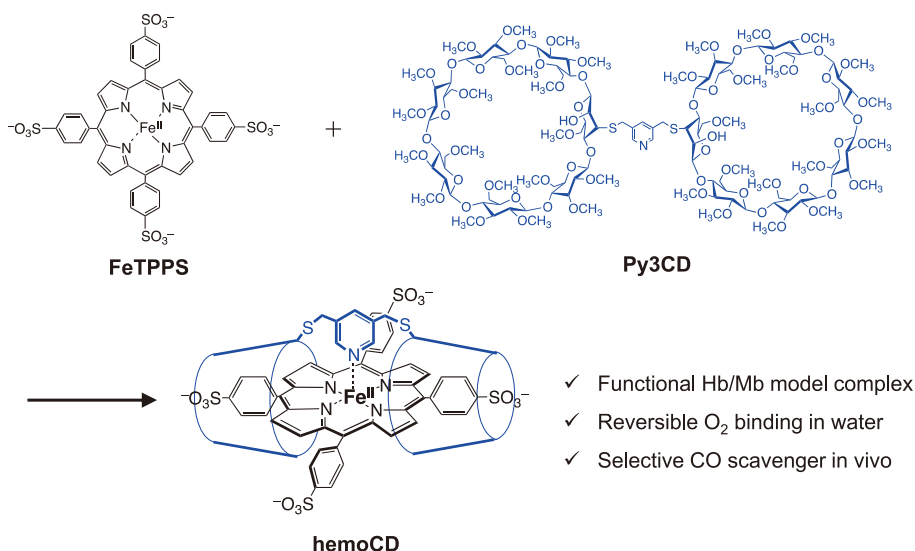


図3 水溶性ポルフィリン鉄錯体(FeTPPS)とメチル化CD二量体(Py3CD)とから成る水溶性ヘムタンパク質モデル錯体(hemoCD)

リジン環を連結部に導入したメチル化CD二量体(Py3CD)からなる包接錯体を、我々はhemoCDと名付けた。hemoCDにおいて鉄(II)ポルフィリンは強固な疎水場に隔離されるため、中心鉄(II)に酸素が結合した際にも、鉄(III)への自動酸化反応が著しく抑えられる。酸素存在下での鉄(II)から鉄(III)への自動酸化には、周囲の水分子からの求核攻撃が関与するためである。「水中にありながら、水分子を排除するミクロな疎水環境」の実現により、hemoCDは水中・室温で可逆的な酸素の吸脱着を実現した。Hbと同等の可逆的な酸素結合能を示す水溶性モデル化合物は、hemoCDの他に報告されておらず、現在のところ生体内でも使える唯一の人工Hbモデル錯体である。

我々はまずhemoCDを人工酸素運搬体の素材としての利用価値があるものと考えた。hemoCDの酸素親和性は、赤血球中のHbと近く、肺で酸素を受け取り、末端組織で酸素を放出するの

にちょうど良い⁶⁾。一方、分子サイズが小さいために、hemoCDそのものでは腎臓による糸球体ろ過を受けやすく、すぐさま尿として体外に排出される。しかしマレイミド基で化学修飾したhemoCD誘導体(Mal-hemoCD, 図4)を用いることで、血液中で血清アルブミンに担持させることに成功し、血中滞留性の問題もすでに解決済みである⁷⁾。現在、Hb代替物としてのhemoCDの利用についての研究をすすめている。

04

動物体内における内因性COの
選択的除去による生理機能探索

筆者らは当初、hemoCDを人工酸素運搬体として利用する目的で動物体内へ導入する実験を開始した。その結果、hemoCDをラット静脈に注射すると、30分程度でhemoCD成分を含む

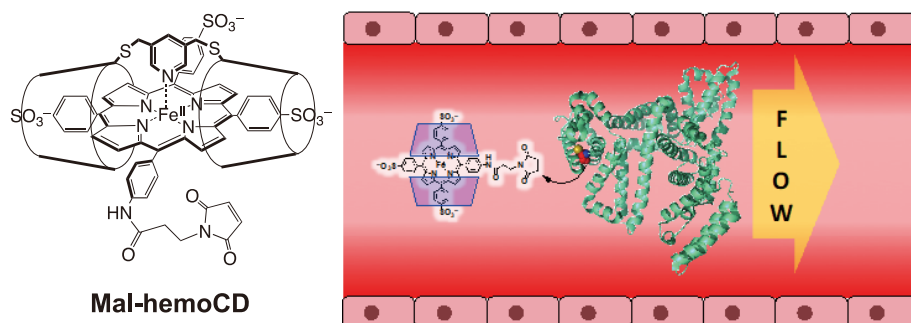


図4 マレイミド修飾hemoCD (Mal-hemoCD)は、血液中に大量に含まれる血清アルブミンの表面システム残基と選択的に結合することで、長期血中滞在を可能にする

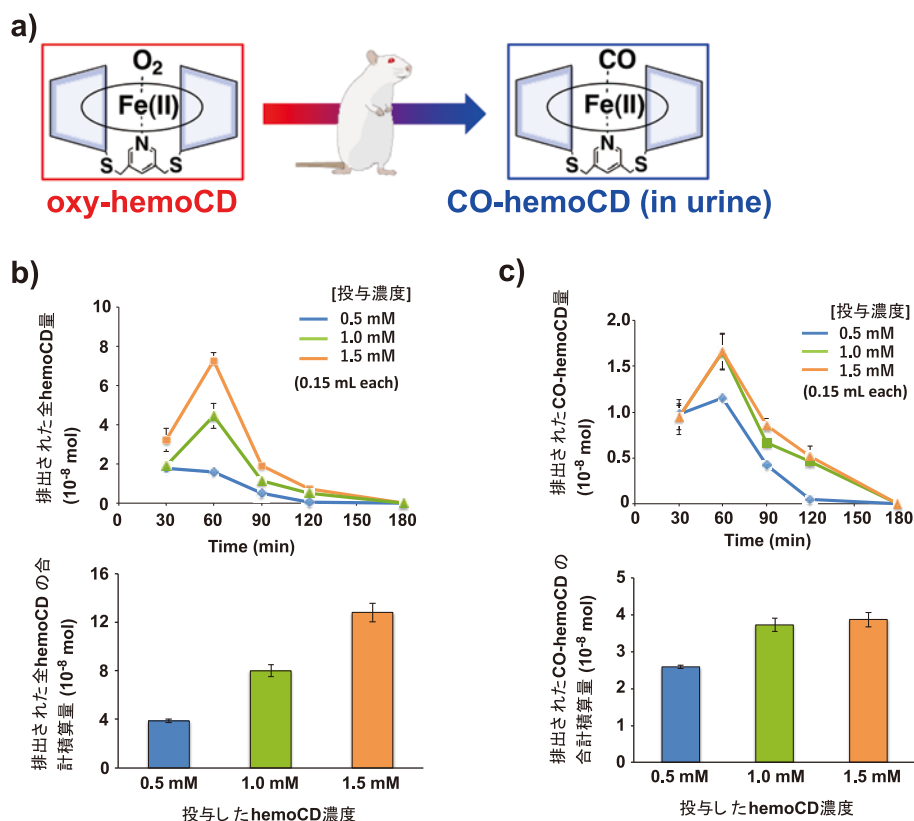


図5 (a) hemoCDを動物に投与すると、COを捕捉して尿として体外排出される。(b) 尿中に排出された全hemoCD量の投与濃度依存性 (上段:時間変化, 下段:積算量), (c) 尿中に排出されたCO-hemoCD量の投与濃度依存性 (上段:時間変化, 下段:積算量)。

尿が排出され、その中にCOを配位したhemoCDが含まれていた⁸⁾。hemoCDは、Hbと比べて同等の酸素親和性を示す一方、Hbよりも約100倍高いCO親和性を示す。これまで報告されている生体内ヘムタンパク質の中でも、最もCO親和性が高い。したがって、静脈に投与されたhemoCDは、血液中に存在するCO-HbからCOを奪い、小さな分子サイズのために定量的に尿中へと排出されることが判明した(図5a)。尿の吸収スペクトルの形状から、排出されたhemoCD量、およびその中に含まれるCO-hemoCD量を算出した。その結果、投与するhemoCD濃度を高くすると、hemoCD排出量が多くなる一方(図5b)、COはある一定量以上排出されないことが判明した(図5c)。このCO量は、推定されている哺乳類の内因性CO量とよく一致している。したがって、hemoCDの投与により、ほぼ全ての内因性CO量が体外へと排出されたことになり、遺伝子ノックアウト法を用いずとも、内因性COを欠乏させた動物検体を容易に作成できることがわかった。

内因性COを一時的に除去したマウスに対して、基礎的な検査(血圧測定、血液検査)を行ったが、特に目立った変化は観測されなかった。一方、血液中のCO-Hb量を観測すると、興味深いことに、hemoCD投与後に一旦減少したCO-Hbが、短時間のうちに

正常値まで回復していた(図6a)⁹⁾。これは、内因性CO欠乏の情報体内で伝達することにより、恒常性を維持しようとするフィードバック型CO産生機構の存在を示している(図6c)。実際に、COを産生する酵素HO-1 (HOのアイソザイムの一種、HOには誘導型のHO-1と定常型のHO-2がよく知られている)の発現が、内因性COの除去により強く誘導されていることがわかった(図6b)。内因性COの恒常性が維持されるしくみの存在は、これまで知られておらず、我々のポルフィリン/CD包接錯体の利用により、はじめてひとつの生理現象が明らかとなった。我々は、恒常的に循環するCO-HbからのCO除去が生体内ヘム濃度のバランスを一時的に崩すことになり、余剰ヘム放出が亢進されることでHOが誘導され、一定量COが補充されるというメカニズムを提案している。

05 COが関与する概日リズム調節機構

高等生物および一部の原核生物の細胞には地球の自転周期に合わせた遺伝子発現リズムが備わっており、これを概日リズムと呼ぶ。この細胞内システムにはPerやCryといった時計遺伝子

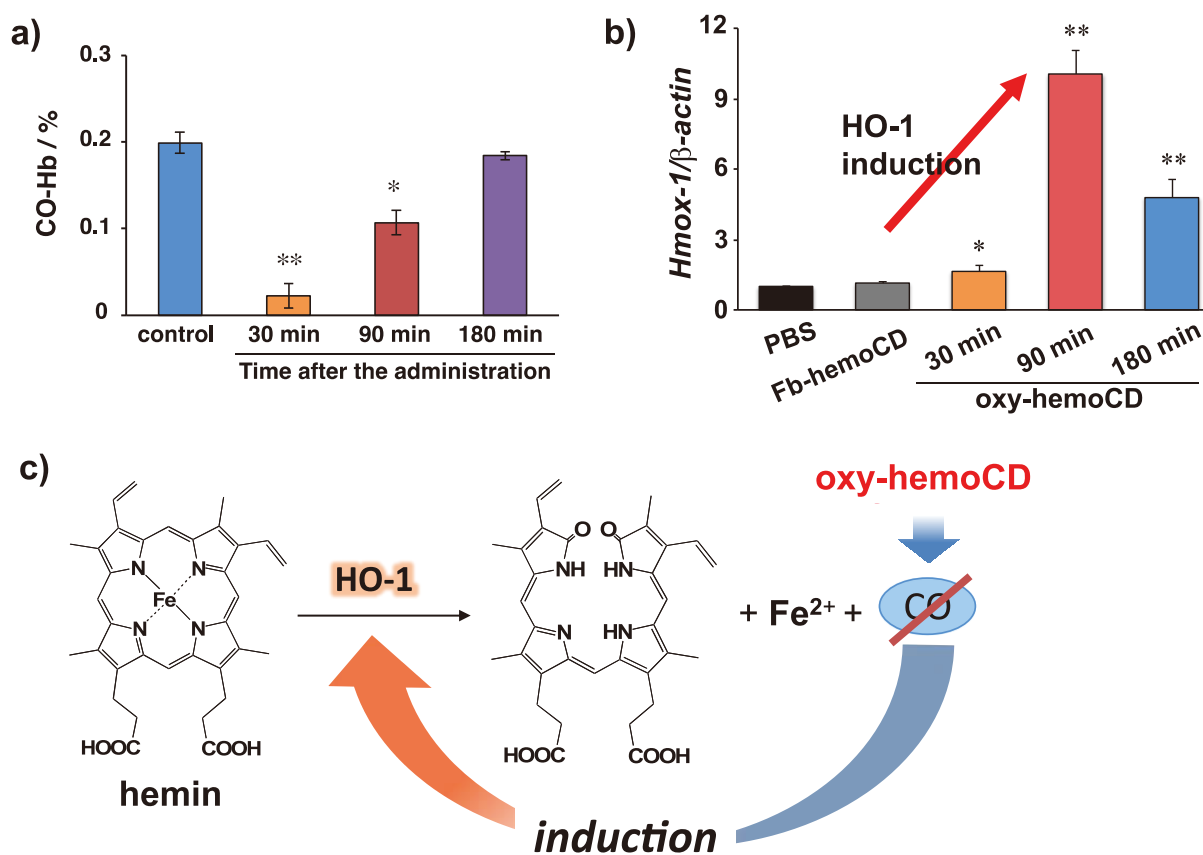


図6 hemoCDによるCO除去が恒常性維持のためのフィードバック型CO産生機構を誘発する。(a) hemoCD投与によるCO-Hbの減少および復元。(b) hemoCD投与によるヘムオキシゲナーゼ(HO)-1遺伝子の発現誘導。(c) フィードバック型CO産生の簡易スキーム

群が関与する。*Per*および*Cry*遺伝子から発現したタンパク質は、自らの発現を制御する転写因子であるBMAL1/CLOCKあるいはBMAL1/NPAS2に作用し、転写を抑制する(図7)。PER/CRY二量体は細胞内で徐々に分解され、再び転写が活性化する。このような24時間周期の転写/翻訳フィードバックループにおいて、中核的な役割をなす転写因子CLOCKおよびNPAS2は、ともにヘムを結合する性質を持ち、さらに結合したヘムにはCOが配位する。そのため内因性COには、概日リズムを調節するシグナル因子としての役割があると考えられてきた。しかしながら、それを直接的に証明した実験系は報告されていなかった。

筆者らはhemoCDをつかってマウス体内の内因性COを枯渇させ、その際の時計遺伝子群の発現リズムを調べることにより、内因性COが概日リズム調節に関わっている直接的な証拠を掴むことを試みた¹⁰⁾。COを捕捉しないコントロール試薬として、中心に鉄イオンを持たないフリーベース(Fb)ポルフィリンであるFb-hemoCD (図8)を使用した。肝臓内に発現する時計遺伝子の発現レベルを調査した結果、CO除去による遺伝子発現リズムの攪乱が明確に示された。内因性COの恒常的な産生が時計遺

伝子のコントロールに必要であることを示した初めての実験的証拠である。しかしCOによる遺伝子発現制御メカニズムは複雑である。上述のCLOCK, NPAS2以外でもBMAL1の発現をコントロールする転写因子REV1にもヘムが結合することが知られており、そのヘムにCOが結合することで機能が変化するのかわくは不明である。内因性COは、ヘムの代謝分解により常時産生し、産生されたCOはヘムに結合することでシグナル伝達を行う。このヘム/COの両者のバランスが概日リズムの制御に重要であることは疑いようがなく、COと概日リズムの関係性について深く理解するためには、今後、ヘムとCOのクロストーク性について十分に考慮しながら研究を進めていく必要があると考えている。

06

細胞内COへのアプローチ

COの細胞内シグナル機能を解明するためには、細胞内に存在するCOを直接捕捉する必要がある。しかしながら一般的にCDは細胞膜透過性に乏しく、hemoCDも例外ではない。そこで

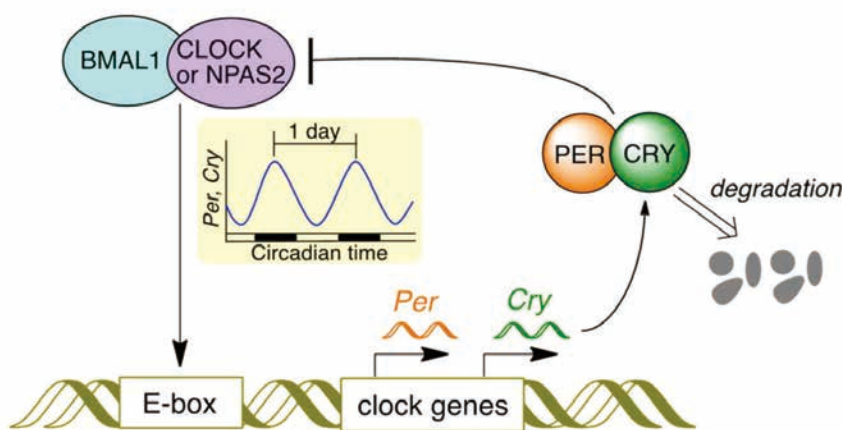


図7 細胞内概日リズムにおけるコア転写-翻訳フィードバックループ、時計遺伝子*Per*/*Cry*は約24時間周期で発現の増減リズムを示す

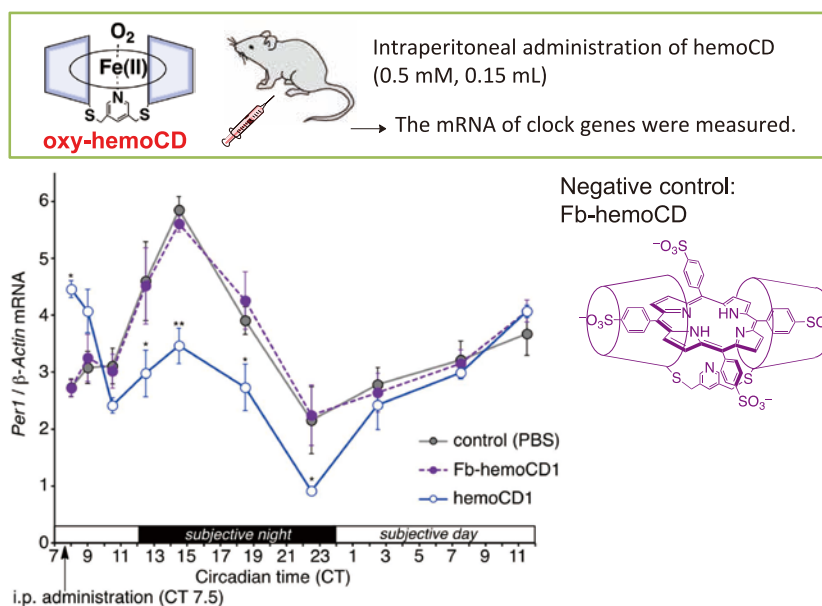


図8 hemoCD投与による時計遺伝子*Per1*の発現リズム攪乱

我々はCD包接錯体を細胞内に届けるため、細胞膜透過性ペプチドとしてオクタアルギニン(R8)を利用した(図9)^{11,12)}。ペプチドを修飾するにあたり、ポルフィリン側およびCD側それぞれにペプチドを修飾する研究を行った。CDにアルギニンを修飾したR8-CDは、ゲスト分子を包接したまま細胞内へと移行する性質を示した。このような膜透過性ホスト分子は、ポルフィリン以外の様々なゲスト分子に対するデリバリーツールとして有用であると考えられ、現在その応用研究に取り組んでいる¹¹⁾。特にR8-CDは抗体などの巨大タンパク質を細胞内にデリバリーするツールとして利用できることが最近になり分かってきている¹²⁾。一方、細胞内CO捕捉剤として、ポルフィリン側にペプチド修飾したR8-hemoCDが良い機能を示した¹³⁾。R8-hemoCDを細胞内に導入すると、内因性CO捕捉効果により、細胞内活性酸素種(ROS)の濃度が優位に上昇することが明らかとなった。したがって、内因性COの欠乏は酸化ストレスの原因であるROSの産生を誘発する。この結果

は、これまでに提唱されていたCOによる抗酸化ストレス効果と矛盾しない。R8-hemoCDを用いて細胞内COを枯渇させた状態の細胞を用いて、未知のCOの生理機能探索を進めている。

さらに我々は細胞や組織に含まれる微量COをhemoCDを用いて正確に定量するアッセイを考案した(図10)¹³⁾。hemoCDはCO結合により吸収スペクトルが鋭敏に変化し、さらに一度結合したCOの解離速度は極めて遅く、実質的に解離しない。hemoCD水溶液を細胞あるいは組織に添加し、そのまま超音波破碎処理することにより、細胞や組織から遊離したCOをhemoCDが捕捉する。その後、遠心分離およびフィルター処理によって透明なる液を得て、そのスペクトルを測定する。すると細胞からは150–250pmol/10⁶cellsほど内因性COが遊離してくることが判明した(図10)。これまで内因性COの計測は主にガスクロマトグラフィーが用いられてきたが、ガスクロマトグ

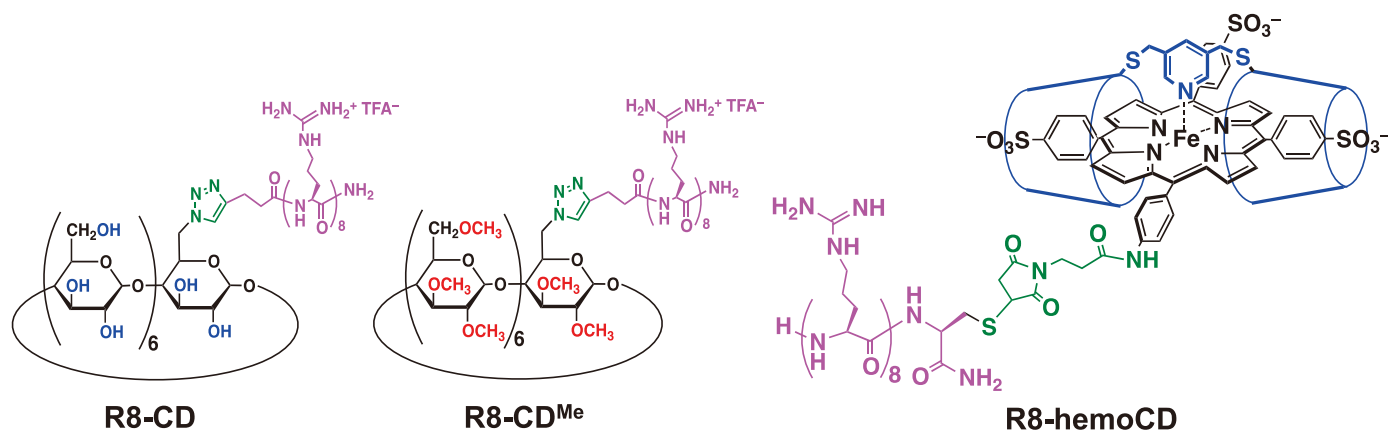


図9 細胞膜透過ペプチドを修飾したシクロデキストリン誘導体(R8-CDおよびR8-CD^{Me})およびhemoCD誘導体(R8-hemoCD)

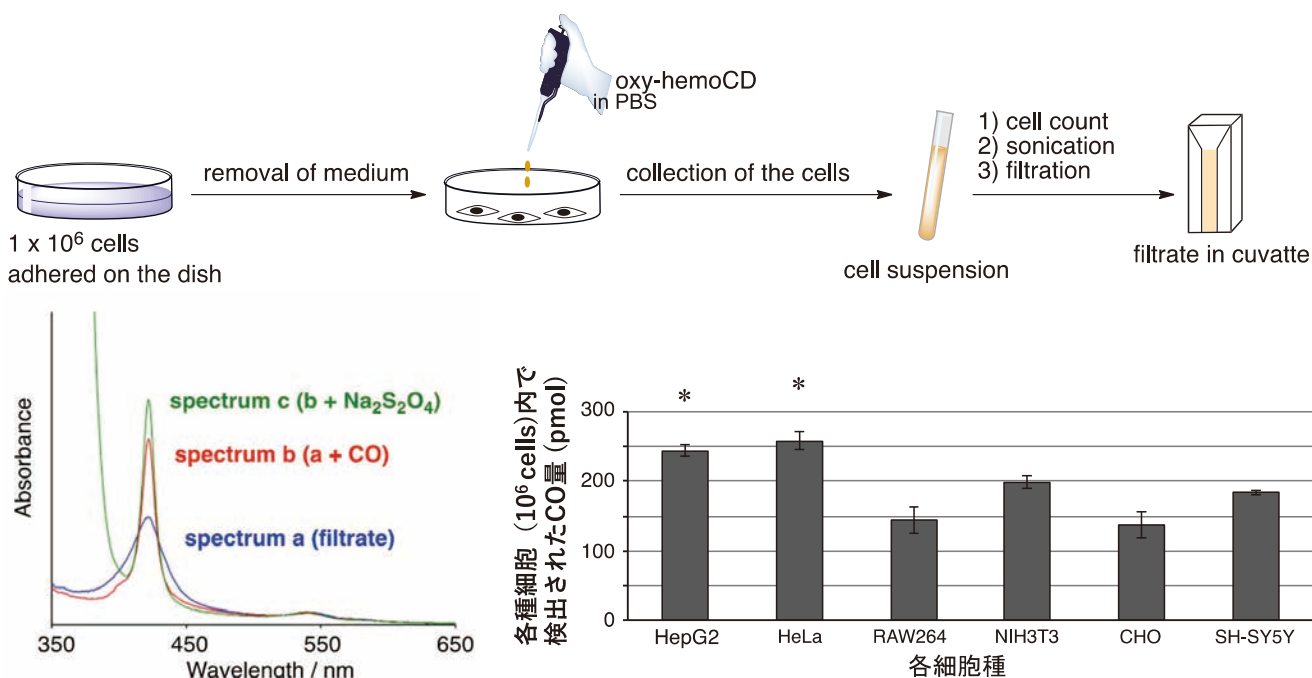


図10 hemoCDを微量CO検出試薬として用い、細胞組織に含まれる内因性COを定量した

ラフィーでは、細胞や組織から気相に遊離したCOを定量するため、実際のCO量よりも少なく見積もってしまう。我々の開発したhemoCDによるCO定量アッセイは、試薬と分光器さえあれば簡単かつもれなく正確にCO量を計測することができる。このアッセイを用いて、現在は細胞活動とCO量の関係性を調べる研究に展開している。さらにCO中毒の際に体内のどの組織へどの程度のCOが拡散するのかについて、脳組織も含めて検討しており、将来的には医学的に役に立つデータを収集することを視野に入れている。さらにhemoCDを用いた体内有毒COの除去に関する研究についても、現在注力している。

07 おわりに

本稿では、シクロデキストリンに包接されたポルフィリン鉄錯体の特性、水溶性ヘムタンパク質モデルとしての機能、およびそれを利用した生命科学領域への展開について、筆者らの現状を紹介した。天然に存在するタンパク質の機能を人工的に合成された化合物により模倣するバイオミメティックケミストリーは、本来、天然酵素の反応メカニズム解析や、役に立つ触媒を開発する目的の学問領域である。一方、筆者らは、水中で機能するヘムタンパク質モデルを独自に構築し、それをさらに生体内にて機能させるというユニークなアプローチで研究を展開してきた。天然のタンパク質といくら同様な機能を示すモデル錯体でも、全く同じ性質を示すことはまずない。どこかは異なる性質を示すはずである。こういった化合物を生体に作用させると、思いがけず興味深い生体内反応が観測され、それが生命科学研究の発展に大きく貢献することもあるだろう。筆者らは、そのような現象を発見する幸運に恵まれたこともあり、これまでに有効な手段のなかったCOの選択的除去法を用いてCOの生命科学に足を踏み入れた。これからの生命科学領域は、化学合成された分子ツールを有効に活用することにより、遺伝子工学の限界を超えた研究が可能になると考えている。COに関して、今後も大学および企業との共同研究により益々学術・社会に役立つ研究へと発展させたいと考えている。

本研究の実施にあたり、同志社大学 加納 航治 名誉教授、同志社女子大学薬学部 根木 滋 准教授、ならびに同志社大学理工学部・機能有機化学研究室の学生諸氏からの多大なるご協力を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**(9), 728–743 (2010).
- 2) K. Kano, R. Nishiyabu, T. Asada, Y. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.* **124**(33), 9937–9944 (2002).
- 3) H. Kitagishi, M. Saito, Q. Mao, A. Kiriya, S. Negi, K. Kano, *Chem. Asian J.* **14**(19), 3320–3328 (2019).
- 4) K. Kano, N. Tanaka, H. Minamizono, Y. Kawakita, *Chem. Lett.* 925–926 (1996).
- 5) K. Kano, H. Kitagishi, M. Kodaera, S. Hirota, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**(3), 435–438 (2005).
- 6) K. Kano, H. Kitagishi, C. Dagallier, M. Kodaera, T. Matsuo, T. Hayashi, Y. Hisaeda, S. Hirota, *Inorg. Chem.* **45**(11), 4448–4460 (2006).
- 7) H. Kitagishi, H. Kawasaki, K. Kano, *Chem. Asian J.* **10**(8), 1768–1775 (2015).
- 8) H. Kitagishi, S. Negi, A. Kiriya, A. Honbo, Y. Sugiura, A. T. Kawaguchi, K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**(7), 1312–1315 (2010).
- 9) H. Kitagishi, S. Minegishi, A. Yumura, S. Negi, S. Taketani, Y. Amagase, Y. Mizukawa, T. Urushidani, Y. Sugiura, K. Kano, *J. Am. Chem. Soc.* **138**(16), 5417–5425 (2016).
- 10) S. Minegishi, I. Sagami, S. Negi, K. Kano, H. Kitagishi, *Sci. Rep.* **8**, 11996 (2018).
- 11) H. Kitagishi, F. Chai, S. Negi, Y. Sugiura, K. Kano, *Chem. Commun.* **51**(12), 2421–2424 (2015).
- 12) H. Kitagishi, M. Jiomaru, N. Hasegawa, *ACS. Appl. Bio Mater.* **3**, 4902–4911 (2020).
- 13) S. Minegishi, A. Yumura, H. Miyoshi, S. Negi, S. Taketani, R. Motterlini, R. Foresti, K. Kano, H. Kitagishi, *J. Am. Chem. Soc.* **139**(16), 5984–5991 (2017).