論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	超分子蛋白質による細胞内一酸化炭素放出材料の設計
Title(English)	Design of Intracellular CO Release Materials Constructed by Supramolecular Proteins
著者(和文)	藤田健太
Author(English)	Kenta Fujita
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9991号, 授与年月日:2015年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上野 隆史,田口 英樹,櫻井 実,近藤 科江,大谷 弘之
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9991号, Conferred date:2015/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

生体分子機能工学専攻 上野研究室 藤田 健太

Design of Intracellular CO Release Materials Constructed by Supramolecular Proteins

(超分子蛋白質による細胞内一酸化炭素放出材料の設計)

【緒言】

本博士論文では、新規細胞内一酸化炭素(carbon monoxide, CO)放出分子の構築を目指し、超分子蛋白質と金属カルボニル錯体の複合体の合成、ならびに複合体の細胞内での機能評価を行った。

近年、生体内に存在するガス分子の一種であるCOが細胞内シグナル伝達分子として機能することが知られ、細胞を癌化や炎症から保護する役割をもつことが明らかにされている。これまでに、COシグナルの作用機構の解明のために、金属カルボニル錯体による細胞外からのCO輸送手法が開発されてきたが、カルボニル錯体の細胞内での不安定さや細胞への取り込み効率の低さが要因となり、詳細なシグナル伝達機構は未だ十分に理解されていない。

【本論文の構成と各章の要旨】

本論文は以下の6章から構成されている。

【第1章 General Introduction】

本研究の背景及び目的を記した。細胞内でのCOの産生機構や生理学的な機能を述べ、細胞外からのCO輸送を可能にする、金属カルボニル錯体の分子設計についてまとめた。さらに、錯体の利用の問題点を挙げ、それを解決するために先行研究で開発されてきた、ミセルやナノ粒子等のカルボニル錯体キャリア分子を示し、それぞれ材料の特を比較した。本研究では特に、金属錯体を安定化し、生体親和性が高く、他のキャリア分子よりも優れたキャリア分子である超分子蛋白質を用いることとした。具体的には、かご型構造をもつフェリチン(Ferritin, Fr)と針状構造をもつ蛋白質針(Protein needle, PN)とカルボニル錯体との複合体と、細胞内での機能評価を行った。

【第2章 Intracellular CO Release from Composite of Ferritin and Ruthenium Carbonyl Complexes】

本章では、ルテニウムカルボニル(RuCO)錯体をFrへ内包させた複合体RuCO-Frを合成した。Frキャリアは、従来のRuCO錯体と比較して、細胞内へのRuの輸送効率を倍向上させ、CO放出速度を遅くする効果を有することが分かった。さらに、RuCO-Fr複合体が、ヒト胎児腎臓細胞(HEK293細胞)内において、サイトカインTNF- α の存在下で、核転写因子の一種であるNF- κ Bを効率的に活性化することも明らかにした。COの放出速度がはやい、従来のRuCO錯体ではこのような効果が見られず、FrへのRuCO錯体の内包が、COの細胞内への高効率な輸送とゆっくりとした放出を可能にしたため、NF- κ B活性化を誘起するのに必要な量のCOを細胞内へ輸送できたと考察した。

【第3章 A Photoactive CO Releasing Protein Cage for Dose-Regulated Delivery in Living Cells】

本章では、第一章で明らかにしたCOのNF- κ B活性化メカニズムをより詳細に議論するために、光刺激によるCO放出のタイミングと量の制御を行った。実際には、光照射に応じてCOを放出させることができるマンガンカルボニル(MnCO)錯体とFrの複合体MnCO·Frを合成した。MnCO·Frは可視光の照射下でのみCOを放出し、その放出量が照射時間に依存して変化することも分かった。上述したRuの系と同様、HEK293細胞へMnCO·Frを導入し、光照射によって細胞内で放出されたCOのNF- κ Bへの作用を評価した。結果、TNF- α が添加されるタイミングよりも早くCOを放出し、さらに、光の照射時間を長く設定してより多くのCOを放出することで、効率的にNF- κ Bを活性化できることを見出した。このように、光刺激とFrキャリアを組み合わせることによって、これまでに明らかにされていなかったTNF- α によるNF- κ B活性化機構へのCOの関与を詳細に明らかにした。

【第4章 Construction of Photoactive CO Release Protein Needle】

上述したFrをキャリアとした系では、細胞内へのCORMの輸送機構がエンドサイトーシス経路に限定され、細胞内でのCOの放出位置をコントロールすることは困難である。そこで、本章では、細胞膜を直接透過し、細胞内での局在を設計できる可能性をもつPNをCORMのキャリアとして用いることとした。光応答性MnCO錯体の配位サイトをPNへ導入するために、PNのC末端部位へヒスチジンタグを挿入し、複合体MnCO·PNを合成した。可視光の光照射により、合成した複合体からCOが放出されることを確認した。

【第5章 Visible Light-induced Intracellular Rapid CO Release from Bipyridyl ligand-modified Protein Needle Carrier】

第三章で構築したMnCO·PNの可視光に対する感度を向上させるために、合成ビピリジン(bpy)配位子を有するMnCO錯体(MnCO·bpy)に着目した。システイン残基を変異導入したPNへ化学修飾によって、MnCO·bpyを結合させ、複合体MnCO·bpy-PNを得た。MnCO·bpy-PNは、上述したMnCO·PNと比較して光刺激によるCO放出速度が向上していることを見出し、さらに、COイメージングプローブを用いて、細胞内においても光照射時に同等の速度でCOが放出されることを観察した。この結果から、PNは合成カルボニル錯体の反応性を維持した状態で細胞内へ輸送できるキャリア分子であることが示唆された。

【第6章 General Conclusion】

2-5の各章で得られた研究成果をまとめると共に、超分子蛋白質をキャリアとすることの意義について述べた。

【博士論文に関する原著論文】

1. **Kenta Fujita**, Yuya Tanaka, Takeya Sho, Shuichi Ozeki, Satoshi Abe, Tatsuo Hikage, Takahiro Kuchimaru, Sinae Kizaka-Kondoh, and Takafumi Ueno
“Intracellular CO Release from Composite of Ferritin and Ruthenium Carbonyl Complexes”
Journal of the American Chemical Society, 136, 16902-16908 (2014).
2. **Kenta Fujita**, Yuya Tanaka, Satoshi Abe, and Takafumi Ueno
“A Photoactive CO Releasing Protein Cage for Dose-Regulated Delivery in Living Cells”
Angewandte Chemie International Edition, *accepted*.

3. Hiroshi Inaba, **Kenta Fujita**, and Takafumi Ueno

“Design of Biomaterials for intracellular delivery of carbon monoxide”

Biomaterials Science, accepted.