

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

# 論文要旨

## THESIS SUMMARY

専攻： 生体分子機能工学 専攻  
Department of  
学生氏名： 藤田 健太  
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (工学)  
Academic Degree Requested Doctor of  
指導教員(主)： 上野 隆史  
Academic Advisor(main)  
指導教員(副)： 田口 英樹  
Academic Advisor(sub)

### 要旨(和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

本論文は「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)」と題し、以下の 6 章から構成される。

第 1 章「General Introduction」では、本研究において注目した一酸化炭素(carbon monoxide, CO)について、その細胞内での産生機構や細胞外からの輸送手法を記した。酵素反応によって細胞内で常時的に産生されている CO は、シグナル伝達反応に関与することによって、我々のからだを種々の病因から保護する性質を有しているが、詳細なメカニズムについては未解明な部分が残されている。これまでに、金属カルボニル錯体を利用した細胞外からの CO 輸送によって、CO の機能に関する議論が進められてきたが、カルボニル錯体には、細胞に取り込まれにくく、細胞内で不安定であるために細胞内での CO 放出速度が非常に速いという問題点があった。そこで、本研究では、金属分子との親和性が高く、細胞内環境下でも安定に構造を保持することができる、超分子蛋白質をカルボニル錯体のキャリア分子として用いることによって、問題点の改善を行った。

第 2 章「Intracellular CO Release from Composite of Ferritin and Ruthenium Carbonyl Complexes」では、かご型超分子蛋白質であるフェリチン(ferritin, Fr)が細胞内カルボニル錯体輸送分子として利用できることを示した。pH 8 に調製した緩衝溶液中でルテニウムカルボニル錯体(RuCO)と Fr を反応させ、複合体 RuCO-Fr を得た。単結晶 X 線結晶構造解析及び赤外吸収分光法によって、Fr 内部の RuCO の集積構造を同定した。さらに、Fr が、RuCO 単体と比較して、ルテニウムの輸送効率の向上と CO 放出速度の徐放化に寄与していることも明らかとし、従来の問題点を解決できるキャリア分子であることが分かった。ヒト胎児腎細胞(HEK293 細胞)に RuCO-Fr を添加したところ、細胞内に存在する核転写因子 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)が活性化され、その活性化は、サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )の存在下でのみ誘起された。RuCO のみでは NF- $\kappa$ B の活性化は起こらず、Fr を用いて CO を輸送することによってはじめて見出すことに成功した。

第 3 章「A Photoactive CO Releasing Protein Cage for Dose-Regulated Delivery in Living Cells」では、細胞内における CO 放出のタイミングと量の制御を行い、2 章で見出した CO と TNF- $\alpha$  の連動による NF- $\kappa$ B 活性化機構の解明を進めた。CO 放出を制御するために、マンガンカルボニル錯体(MnCO)を Fr に導入することとした。MnCO は、可視光の照射によって CO を放出させることができると報告されており、合成した複合体(MnCO-Fr)からも同様に、可視光を照射した時のみ CO が放出されることを確認した。さらにその放出量は光の照射時間に依存して変化することも分かった。2 章と同様の HEK293 細胞評価系を用いて、MnCO-Fr から放出された CO の効果を調べたところ、TNF- $\alpha$ が添加される前に、より多くの CO が放出された場合に、効率的に NF- $\kappa$ B が活性化されることを明らかにした。

第 4 章「Construction of Photoactive CO Release Protein Needle」では、細胞内における CO 放出位置の重要性を見出すことを目的とし、細胞内での動態・局在の制御が可能であると考えられる、人工蛋白質針(protein needle, PN)に注目した。実際には、PN へマンガンカルボニル錯体を修飾するために、PN の末端部位へヒスチジンタグ配列を遺伝子工学的に挿入した。合成した MnCO-PN 複合体は、Fr の系と同様に、可視光の照射によって CO を放出することが分かった。

第 5 章「Visible Light-induced Intracellular Rapid CO Release from Bipyridyl Ligand-Modified Protein Needle Carrier」では、ビピリジン配位子(bpy)に結合したマンガンカルボニル錯体(MnCO-bpy)を、PN へ修飾することによって、4 章で合成した MnCO-PN の可視光に対する反応性の改善、つまり、CO 放出速度の向上を試みた。具体的には、PN にシステイン残基を、bpy にマレイミド基を導入することによって、システイン-マレイミド間での特異的な化学反応を介して、MnCO-bpy-PN を合成した。可視光照射時の MnCO-bpy-PN の CO 放出速度が、MnCO-PN と比べて向上していることが確認された。この放出速度は別途合成した MnCO-bpy とほぼ同じ値を示しており、PN 上へ反応性を維持したまま化学修飾されたことが分かった。さらに、MnCO-bpy のみでは、HeLa 細胞に対して毒性を示したのに対し、MnCO-bpy-PN は示さなかったことから、PN をキャリア分子とすることによって、生体親和性が向上したことも明らかにした。

第 6 章「General Conclusion」では、第 2 章から第 5 章で得られた研究成果とその意義について述べ、超分子蛋白質が細胞内金属カルボニル錯体輸送キャリアとして有用であると結論付けた。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

# 論文要旨

## THESIS SUMMARY

専攻： 生体分子機能工学 専攻  
Department of  
学生氏名： 藤田 健太  
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (工学)  
Academic Degree Requested Doctor of  
指導教員(主)： 上野 隆史  
Academic Advisor(main)  
指導教員(副)： 田口 英樹  
Academic Advisor(sub)

要旨(英文 300 語程度)  
Thesis Summary (approx.300 English Words)

**Chapter 1: General Introduction** In this chapter, the author summarized general functions of carbon monoxide (CO) in living cells and the delivery systems from outside cells. Although the systems has been constructed by using metal carbonyl complexes, there are several shortcomings, such as low uptake efficiency and fast degradation, which have made us difficult to evaluate the cellular functions of CO in detail. To address the problems, it has been thought to be synthesized carrier molecules of the metal carbonyl complexes. The author focused on developing the carriers by using supramolecular proteins.

**Chapter 2: Intracellular CO Release from Composite of Ferritin and Ruthenium Carbonyl Complexes** In this chapter, a ferritin (Fr) protein cage was modified with a ruthenium carbonyl complexes (RuCO). The composite of RuCO and Fr (RuCO-Fr) can activate a nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in a presence of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), while a typical RuCO did not show any effects.

**Chapter 3: A Photoactive CO Releasing Protein Cage for Dose-Regulated Delivery in Living Cells** In this chapter, to modulate dose and timing of CO release, a photoactive manganese carbonyl complex (MnCO) was conjugated with Fr. A designed Fr mutant stabilized a Mn(CO)<sub>3</sub> units in the cage, which can release CO with visible light irradiation. The photoactive CO release system enabled to evaluate an optimized dose and timing for activating NF- $\kappa$ B associated with a stimulation of TNF- $\alpha$ .

**Chapter 4: Construction of Photoactive CO Release Protein Needle** In this chapter, an artificial protein needle (PN) has also been utilized as a carrier of Mn carbonyl complexes. A hexahistidine sequence (His-tag) can serve as specific coordination site of the Mn carbonyl complex. One molecule of CO was released from the composite of Mn carbonyl moieties and PN (MnCO-PN).

**Chapter 5: Visible Light-induced Intracellular Rapid CO Release from Bipyridyl Ligand-Modified Protein Needle Carrier** In this chapter, a bipyridyl (bpy) ligand-modified MnCO complex (MnCO-bpy) was conjugated with PN to improve a responsiveness of MnCO-PN to visible light. A CO release rate of the composite of MnCO-bpy and PN (MnCO-bpy-PN) was faster than that of MnCO-PN. It was confirmed that the rapid CO release property of the MnCO-bpy-PN composite was retained in cellular environment under visible light irradiation. In addition, the MnCO-bpy-PN composite did not show any cytotoxicity in mammalian cells.

**Chapter 6: General Conclusion** In this chapter, concluded that the supramolecular protein-based intracellular CO release system might be available for finding the intracellular functions of CO.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。  
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).