

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05325

研究課題名(和文)ウラニルイオン検出ナノポアシーケンサーの開発

研究課題名(英文)Uranyl binding peptide for nanopore sequencing

研究代表者

津島 悟 (Tsushima, Satoru)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任准教授

研究者番号：80312990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウラニルに対して親和性をより高めた新しいペプチドの提案を行った。そのペプチドのアミノ酸残基の配列はEQIAEFKEAFALCGKDGDDITTKELGTCMRSLである(システイン二つはジスルフィド結合)。MD計算の結果によればこのペプチドはウラニルと4つのアミノ酸残基を通して結合し、その結果ウラニルは赤道面に水を配位しないで極めて強く結合するとともに、疎水性残基同士の相互作用も強く疎水性のコアを形成する。従って、従来提案されてきたCaM-Mxcシリーズよりも強い結合が期待される。この計算結果はFMO計算によっても補強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ウラニルイオンに選択的なペプチドを新たに開発することができた。この成果によりウランとペプチドの分子レベルでの相互作用を系統的に明らかにすることができた上、ウランと生体物質の相互作用の礎となる知識を新たに蓄積できた。この知見を学界で広く共有することにより、この分野の新たな展開と発展への学術的貢献が実現できると考える。

研究成果の概要(英文)：Cyclic peptides as well as a modified EF-hand motif of calmodulin have been newly designed to achieve high affinity towards uranyl(VI). Cyclic peptides may be engineered to bind uranyl(VI) to its backbone under acidic conditions, which may enhance its selectivity. For the modified EF-hand motif of calmodulin, strong electrostatic interactions between uranyl(VI) and negatively charged side chains play an important role in achieving high affinity; however, it is also essential to have a secondary structure element and formation of hydrophobic cores in the metal-bound state of the peptide.

研究分野：アクチノイド化学

キーワード：ウラニルイオン ペプチド

1. 研究開始当初の背景

ウランは核燃料物質であり放射性元素であるが、自然環境中に幅広く存在する。水道水に含まれる平均ウラン濃度は、OECD 加盟国内で 0.9 ng L^{-1} から $0.4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ と大きく幅があり、カナダのある地域ではウラン濃度が 0.7 mg L^{-1} にまで達する例も知られている(世界保健機関 2012 年報告書)。このように、地下水を水資源として利用する国々においては、ウランによる飲料水の汚染は軽視できない問題であり、例えばドイツでは 100 万人以上の国民がウラン濃度が国の基準値を超える水道水を使用している(Smidt ヤコブ大学ブレーメン 2011 年博士論文)。自然環境レベルのウラン濃度を計測するには、誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP)のような高価な分析機器とそれを使用する熟練した技術者が必要とされるため、安価で簡便な新しいウラン濃度測定手法の開発が期待される。

他方、本研究で利用を検討したナノポアシーケンサーは、元来はゲノム配列解析などに使われてきた技術であるが、分子シーケンサー技術に元素分析を絡める研究も散発的に見られるようになってきていた。ナノポアシーケンサーとペプチドを組み合わせるウラン検出に応用した例もあるが(Roozbahani 他, *ACS Sens.* 2017) 使われたペプチドは UO_2^{2+} イオンの検出に特化されたものではなかった。ウランは大気雰囲気下では 6 価のジオキソイオン (UO_2^{2+}) を形成し、ペプチドの配位はウランの赤道面に限定されるというユニークな化学的性質をもつため、他の遷移金属元素の捕捉のために開発されたペプチドをそのまま応用することは実用的ではない。 UO_2^{2+} イオンを選択的に捕捉するペプチドを設計するには、 UO_2^{2+} イオンの錯体化学を正しく理解した上で、ペプチドを分子レベルで最適化することが必要であった。

研究開始当初は、ペプチド・蛋白質・DNA などの生体分子とウランとの相互作用は、その多くが解明されていなかった。本研究においては、これら生体分子とウランとの相互作用を明らかにする目的で、ウランとペプチドの分子レベルでの相互作用を系統的に明らかにすることにより、ウランと生体物質の相互作用の礎となる知識を蓄積し、それを学界で広く共有することにより、この分野の新たな展開と発展への学術的貢献を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、ウランを選択的に捕捉するペプチドを工学的に分子設計し、それをナノポアシーケンサーに実際に応用することを目的とした。特にオリジナルな点として、計算機化学を多用して分子設計を行うこと、また、アクチノイド化学と生物物理学の異分野融合という今までに殆ど検討されてこなかった新分野の開拓を目指すことが、本研究のユニークな点であり創造的な面でもあった。

3. 研究の方法

本研究では計算化学的アプローチと実験化学的アプローチの双方を試みた。計算は比較的小さな系については量子化学計算(密度汎関数法, DFT)を用いて比較的精度の高い計算を行った。量子化学計算でウランのような重い(電子数の多い)元素を扱う際には、相対論効果と電子相関を考慮することが重要となる。本研究では、原子ウランに対して有効内殻ポテンシャル近似を用いることで、相対論効果を採り入れると同時に計算時間の短縮を実現した。また、電子相関は、計算に B3LYP ハイブリッド密度汎関数法を用いることで考慮した。他の元素には基底関数 6-311+G*を使用した。これらの計算は東京工業大学のスーパーコンピューターTSUBAME3.0 上で行った。数十のアミノ酸残基からなる大きな系の計算には古典力学法に基づいた分子動力学計算を行ったのち、フラグメント分子軌道(FMO)計算を行った。前者の計算にはプログラム AMBER を利用し、後者の計算には立教大学の望月教授らが開発した ABINIT-MP を利用した。これらの計算はドイツのドレスデン工科大学のスーパーコンピューター上で行った。実験はウランとペプチドの混合液に対して赤外線吸収分光法(FTIR)を用いて測定を行った。

4. 研究成果

まず、比較的小さな環状ペプチドを用いてウラニルイオン(UO_2^{2+})への親和性を DFT 計算により評価した。最初はウラニルが環状ペプチドの主鎖側へ結合する可能性を検討した。ウラニルの主鎖への結合は一般には親和性が低く、環状ペプチド $c[(PG)_4]$ のような PG 配列の導入による構造的な柔軟性を有したペプチドであっても結合エネルギーは +16.1 kcal/mol であり全く結合しようとしなない。しかし、さまざまなアミノ酸配列のペプチドをランダムに調べた結果、負電荷を有する側鎖を豊富に抱えた環状ペプチド $c[ESESSSES]$ と $c[DSDSSDS]$ の二つについてはウラニルイオンの主鎖への結合が発熱反応で進行することが明らかにされた。それらの反応の結合エネルギーは、-10.9 及び -12.2 kcal/mol である。しかし、これらのペプチドでウラニルが側鎖側に結合した場合、その結合エネルギーはそれぞれ -20.4 及び -25.7 kcal/mol であり、主鎖側に配位するより側鎖に配位した方が安定であることが DFT 計算により明らかになった。すなわち、ウラニルが主鎖側に結合することは理論上起こりうるが側鎖側に付く場合に比べてエネルギー的に競合できないため実際には主鎖側への結合は起きない。実際に、FTIR 分光で調べてみた結果、pH が比較的低く、ペプチド中のアスパラギン酸及びグルタミン酸のカルボキシ基がプロトン化されてウラニルの配位に対してブロックされているような場合には主鎖側への配位が起き、一方 pH が高くこれらのアミノ酸残基が脱プロトン化されるとウラニルは側鎖側すなわちカルボキシ基側に配位することがわかった。すなわち理論計算で予測されたことがおおむね実験で実証された。他方、本研究の究極的な目的はナノポアセンサーへの応用であり、すなわち中性 pH 条件下で応用可能なことが重要であり、酸性条件に特化した技術というのは実用困難な面がある。

そこで次に研究で用いたのはカルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンの EF ハンドにヒントを得た 33 個のアミノ酸残基から構成されるペプチドである。EF ハンドのウラニルイオンへの親和性は既にいくつかの既往の研究で実験的に調べられていたが、本研究ではまず古典 MD 計算によりウラニルを取り込んだ EF ハンドとその変異種の構造について調べた。まずは過去の研究(Le Clainche 他 *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, 8, 334-340)で既に調べられている「CaM-Mxc」(x には数字が入る)と名付けられたペプチドシリーズのウラニルイオンへの結合特性を MD 計算により調べた。その結果、CaM-M1c と名付けられたペプチドに対してウラニルイオンとの高い親和性が MD 計算によっても確認された。ウラニルイオンとの結合に関わるアミノ酸残基の数は 3 つであり特段多いとも言えないが、特徴的なのはウラニルイオンを取り込むと疎水性残基の多くがペプチドの内側に取り込まれ、疎水性残基の核のようなものが形成されることである。このことにより疎水性残基同士が相互作用しあって金属取り込み状態のペプチドを安定化し、更に親水性残基がペプチドの外側を向くことで安定性を高め溶解度の向上にも貢献する。同じ CaM-Mxc シリーズの CaM-M2c については MD 計算によればウラニルイオンとの結合に関わるアミノ酸残基の数は 3 つと CaM-M1c と同じであるが、実験的には両者は全く結合しないことが確認されている。MD 計算の結果、この違いは CaM-M1c と CaM-M2c では後者では 25 番目のアミノ酸がグルタミン酸からアスパラギン酸へ変異されることによって金属結合サイトが大きくなりすぎることによってウラニルを取り込んだペプチドの構造が大きく崩れ、前述の疎水性残基の核が形成されなくなることが原因であると明らかにされた。更に、MD 計算のトラジェクトリーからペプチドの二次構造についても調べ、CaM-M1c ではウラニル取り込みによってペプチドの二次構造が安定化に寄与していることも明らかにした。これらの MD 計算結果を補強するために、更にフラグメント分子軌道法(FMO)による計算を行い、ウラニルと残基間の相互作用や残基間の相互作用エネルギーも調べた。これらのことを考慮した上で、本研究ではウラニルに対して親和性をより高めた新しいペプチドの提案を行った。そのペプチドのアミノ酸残基の配列は EQIAEFKEAFALCGKDGDDITTKELGTCMRSL である(システイン二つはジスルフィド結合)。MD 計算の結果によればこのペプチドはウラニルと 4 つのアミノ酸残基を通して結合し、その結果ウラニルは赤道面に水を配位しないで極めて強く結合するとともに、疎水性残基同士の相互作用も強

く疎水性のコアを形成する。従って、従来提案されてきた CaM-Mxc シリーズよりも強い結合が期待される。この計算結果は FMO 計算によっても補強された。

以上の研究成果は英王立化学会誌 *Physical Chemistry Chemical Physics* の 2022 年 24 巻 4455-4461 頁に Open Access 形式で掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satoru Tsushima, Koichiro Takao	4. 巻 24
2. 論文標題 Hydrophobic core formation and secondary structure elements in uranyl(VI)-binding peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 4455-4461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1cp05401e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Koichiro Takao, Juliane Maerz, Moe Matsuoka, Takanori Mashita, Hiroyuki Kazama, Satoru Tsushima	4. 巻 10
2. 論文標題 Crystallization of colourless hexanitratoneptunate(IV) with anhydrous H ⁺ counteranions trapped in a hydrogen bonded polymer with diamide linkers†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 6082-6087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9ra10090c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鷹尾 康一郎 (Takao Koichiro) (00431990)	東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------