

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20350079

研究課題名 (和文) 自己集積型ヘムタンパク質超分子構造体構築への新しい取り組み

研究課題名 (英文) New Trial toward the Construction of Self-Assembling Supramolecular Hemoproteins

研究代表者

林 高史 (HAYASHI TAKASHI)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：20222226

研究成果の概要 (和文)：

生体内に広く存在するヘムタンパク質は補欠分子ヘムがタンパク質マトリクスに結合した構造である。本研究では、ヘム分子を人工的にヘムタンパク質表面に共有結合で修飾することにより、ヘムとヘムタンパク質が分子間で連続的につながった自己集積型ポリマーを形成することを見だし、その1次元～3次元超分子構造体の構築を行った。さらに、バイオナノマテリアルを指向した金表面へのヘムタンパク質の高次積層手法を確立した。

研究成果の概要 (英文)：

A series of hemoproteins, which are ubiquitous in nature, are holoproteins with a heme molecule as a prosthetic group. In this study, we firstly found that the successive self-assembly structure of hemoproteins is available when we introduced a heme moiety onto the apohemoprotein surface via covalent linkage. Furthermore, we demonstrated that the multilayer of hemoproteins can be immobilized onto the gold surface by same strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：超分子化学、生物無機化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ヘムタンパク質、超分子ポリマー、ヘム、アポタンパク質、金コロイド、タンパク質修飾基板

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では、多種多様な巨大分子が規則的に集合体を形成して、得られた組織体がユニークな機能を発現している例が数多く見られる。たとえば、多数のサブユニットが規則正しく結合して触媒機能を発現する複合酵素や、タンパク質と脂質が巧みに組み合わさった生体膜、整然とタンパク質が集積したウイルスなどはその典型的な例と言える。

このようなナノからマイクロサイズの生体超分子複合体は、生体組織の特殊な構造体形成や酵素機能発現の基盤となり、その分子レベルでの挙動の理解と生体材料への応用研究に対しては非常に興味もたれる分野である。

一方、生体系の自己集積型複合体の模倣として、低分子の規則的集積系が1990年前後から報告されている。特に、Lehnらは、超

分子ポリマー (Supramolecular Polymer) という語句を提案し、ホストゲスト化学の展開として水素結合を利用した長鎖集合体の構築を試みた。さらに多くのグループが、水素結合、配位結合を組み合わせた超分子集合体の形成を提案している。初期の超分子ポリマーは、上記のように単純な小分子の積み重ねが主流であったが、近年糖やタンパク質と基質の組み合わせを利用した自己集合体の報告例がある。例えば、Harada らの数珠繋ぎ状のシクロデキストリン集合体や、Ward らによる、ビオチン-アビジン結合を利用した集合系などがある。これらは、生体分子の特徴を活かした、より巨大な、そして制御された超分子集合体として興味深い系である。

これまで、多くの超分子ポリマーの構築が報告され、適した分子設計によって、一定の秩序を有した超分子集合体の形成が実証された。しかし、ユニット (monomer) の分子量が 1,000 以下の小分子の積層によるモデル研究が主であり、生体系で組織化されたタンパク質や生体膜で見られるような超分子集合体のモデルとしては、まだ初歩的な段階といえる。次の段階としては、さらに巨大な集合系構築への挑戦や、得られた超分子ポリマーの機能化への研究が必須となる。

## 2. 研究の目的

近年、小分子を規則的に並べてナノレベルの分子集合体形成に関する研究は数多く報告されている。しかしながら、生体高分子であるタンパク質そのものを自由自在に組み合わせ、巨大生体分子集合体構築をめざす試みはまだほとんど見られない。本課題研究では、ヘムタンパク質に着目し、ヘム (鉄ポルフィリン) とタンパク質との非共有結合相互作用を介した高次分子組織体の構築を世界に先駆けて構築することが当面の目標であった。これは、分子量 1 万以上のタンパク質単量体をモノマーとするタンパク質ポリマー形成であり、新しい高分子構造体形成への提案となる。さらに、得られる超分子構造体は、非共有結合で結ばれたソフト材料であり、外部刺激に対応した超階層制御が可能である。機能発現 (センサー、電子移動、ガス吸蔵、触媒、医療材料などへの応用) を探索すると共に、水中に可溶性超巨大分子の物性 (ゆらぎ、非平衡過程、散逸過程のダイナミクス) を評価し、タンパク質ナノ集合体の自己組織化のメカニズム解明と新機能の開拓を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、ヘムタンパク質の多くは、ヘム分子がヘムタンパク質の疎水性ポケットに非共有結合及び配位結合でつながっているため、酸処理をすることにより容易にヘムを除去

したアポ体を得ることが可能である。またそのアポ体の溶液に対して中性条件下でヘムを添加することにより、再構成ヘムタンパク質を調製することが可能である。この特性を利用して、我々はまず電子移動ヘムタンパク質であるチトクロム  $b_{562}$  を用いて以下のような工夫を施した (Scheme 1)。

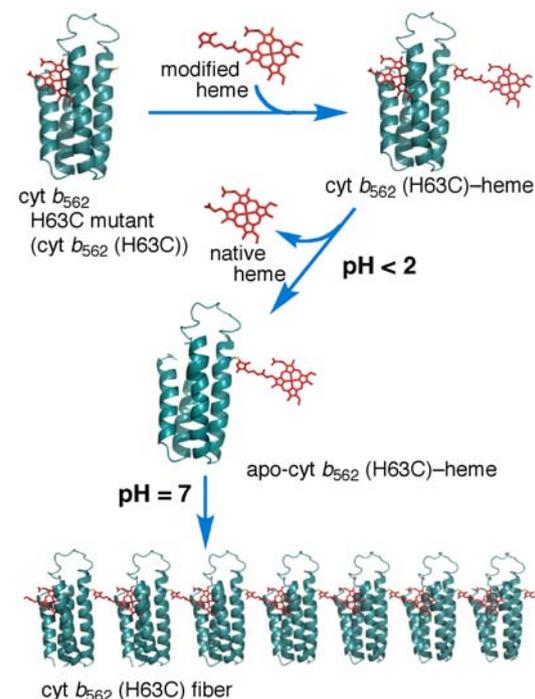
(A) チトクロム  $b_{562}$  のヘムポケットの裏側にある 63 番目のヒスチジンをシステインに置換した変異体 H63C を遺伝子工学的手法で作製する。

(B) 補欠分子ヘムのプロピオン酸側鎖末端の片方にスペーサーを介してマレイミド基を修飾する。

(C) H63C 変異体のシステイン残基のチオール基に対して、マレイミド基を有するヘム誘導体を反応させ、ヘムをタンパク質表面に共有結合で導入する。

(D) 得られたヘム結合チトクロム  $b_{562}$  の天然のヘムを酸処理によって除去し、アポ体を調製する。

(E) 溶液を中性に戻すことにより、タンパク質表面に結合したヘムが分子間のヘム-ヘムタンパク質相互作用を介して、自己集積化クラスター (ポリマー) を形成する。



Scheme 1. 超分子ヘムタンパク質構築手法

以上の手法を用いて、ヘムタンパク質超分子構造体を構築し、その構造と物性、及び機能評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) チトクロム  $b_{562}$  を用いた二次元ネットワークの構築:

上記の方法に従い、チトクロム  $b_{562}$  の 1 次

元ファイバー上ポリマーを構築した後に、ベンゼン環の 1,3,5 位にヘムを有するヘム 3 量体の要 (かなめ) 分子を添加することにより、2 次元に展開したメッシュ状ヘムタンパク質クラスターを得た (Figure 1)。さらに、このモルフォロジーは、ヘム 3 量体とタンパク質の比に依存し、1:40 において、非常に美しい 2 次元ネットワークがグラファイト基板上で形成することを、原子間力顕微鏡 (AFM) で観測した。

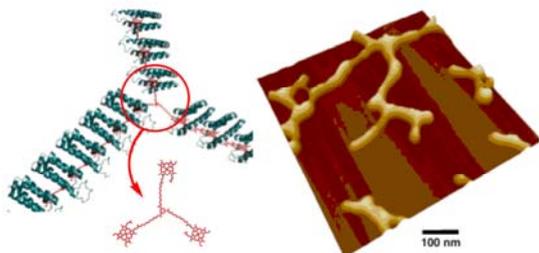


Figure 1. ヘムタンパク質 2 次元構造体 AFM 像

(2) ミオグロビンを用いた超分子タンパク質ポリマーの形成：

酸素貯蔵ヘムタンパク質であるミオグロビンの場合でも、チトクロム  $b_{562}$  と同様に、超分子ポリマー構造が得られた。具体的には、ヘムポケットの裏側の Ala125 を Cys125 に変異させた後に、得られたチオール残基へ同様にヘムを修飾し、ミオグロビンの自己組織化集合体を得た。このミオグロビンポリマーの酸素親和性は、単量体の天然ミオグロビンと遜色なく、タンパク質の機能を保持したままクラスター化していることを示した。さらにミオグロビンポリマーの場合には、過酸化水素処理を施すことにより、ファイバーどうしがクロスリンクしたスポンジ状の 3 次元構造体形成を SEM (走査型電子顕微鏡) で確認した (Figure 2)。

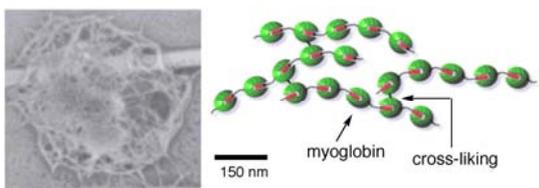


Figure 2. ミオグロビン 3 次元構造体 SEM 像

(3) 金コロイドとヘムタンパク質のコンジュゲート：

金属コロイド (径 10~15 nm 程度) の表面に、通常法方法でチオール基がプロピオン酸末端に修飾したヘムを導入し、さらにアポチトクロム  $b_{562}$  を添加することにより、金属コロイド表面上で、ヘムタンパク質が再構成されることを確認した。次に、前頁でも示したヘムを表面に修飾したアポタンパク質を、金コロイド溶液に加えることにより、金

コロイドの表面から、ヘムタンパク質ポリマーが成長することを、電気泳動と TEM 測定から明らかにした。一方、ヘムを表面に有する金コロイドとチトクロム  $b_{562}$  の 2 量体のアポ体を混合することにより、金コロイドがヘムタンパク質をスペーサーとして一定間隔で拡がった自己集積構造体を形成することを明らかにした (Figure 3)。

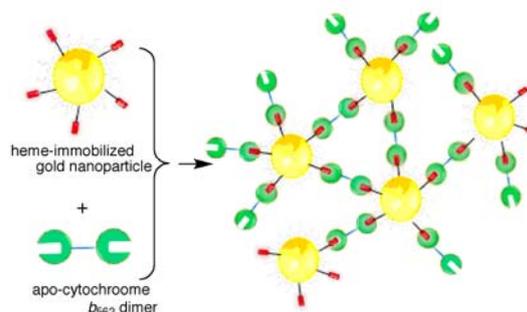


Figure 3. 金コロイドとヘムタンパク質の自己集積体の模式図

(4) 金電極表面上へのヘムタンパク質積層構造体の修飾：

上項の応用として、次に金電極表面にヘムを結合させ、そこにヘムをタンパク質表面に修飾したアポチトクロム  $b_{562}$  を加えることにより、電極表面にヘムタンパク質が積層したタンパク質修飾電極を作成し、その様子を AFM で観測した。さらにヘムの中心鉄を亜鉛に置換した系で、同様にヘムタンパク質修飾電極を作成した場合には、光照射により、効率の良い光電変換が観測された。

## 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 18 件) [全て査読有]

(1) Crystal Structure and Spectroscopic Studies of a Stable Mixed-Valent State of the Hemerythrin-like Domain of a Bacterial Chemotaxis Protein

A. Onoda, Y. Okamoto, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Hayashi

*Inorg. Chem.*, in press (2011).

(2) A Hydrogenase Model System Based on the Sequence of Cytochrome c: Photochemical Hydrogen Evolution in Aqueous Media

Y. Sano, A. Onoda, T. Hayashi

*Chem. Commun.*, in press (2011).

(3) Precise Design of Artificial Cofactors for Enhancing Peroxidase Activity of Myoglobin: Myoglobin Mutant H64D Reconstituted with a Single-winged Cofactor is Equivalent to Native Horseradish Peroxidase in Oxidation Activity

- T. Matsuo, K. Fukumoto, T. Watanabe, T. Hayashi  
*Chem. Asian J.*, in press (2011).
- (4) A Chemically-controlled Supramolecular Protein Polymer Formed by a Myoglobin-based Self-assembly System  
K. Oohora, A. Onoda, H. Kitagishi, H. Yamaguchi, A. Harada, T. Hayashi  
*Chem. Sci.*, in press (2011).
- (5) Thermal Isomerization of N-Bridged Cobalt Corrole Complexes through a Transiently Formed Axial Carbenoid  
P. Chattopadhyay, T. Matsuo, T. Tsuji, J. Ohbayashi, T. Hayashi  
*Organometallics*, 30, 1869–1873 (2011).
- (6) Preparation and Reactivity of a Tetranuclear Fe(II) Core in the Metallothionein alpha-Domain  
Y. Sano, A. Onoda, R. Sakurai, H. Kitagishi, T. Hayashi  
*J. Inorg. Biochem.*, 702–708 (2011).
- (7) Supramolecular Hemoprotein-Gold Nanoparticle Conjugates"  
A. Onoda, Y. Ueya, T. Sakamoto, T. Uematsu, T. Hayashi  
*Chem. Comm.*, 9107–9109 (2010). Front Cover
- (8) DNA-binding Hemoproteins Tethering Polyamine Interface  
A. Onoda, H. Nagai, S. Koga, T. Hayashi  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 4, 375–377 (2010).
- (9) Supramolecular Protein-Protein Complexation via Specific Interaction Between Glycosylated Myoglobin and Sugar-binding Protein  
H. Nagai, A. Onoda, T. Matsuo, T. Hayashi  
*Supramol. Chem.*, 22, 57–64 (2010).
- (10) Meso-Unsubstituted Iron Corrole in Hemoproteins: Remarkable Differences in Effects on Peroxidase Activities between Myoglobin and Horseradish Peroxidase  
T. Matsuo, A. Hayashi, M. Abe, T. Matsuda, Y. Hisaeda, T. Hayashi  
*J. Am. Chem. Soc.*, 131, 15124–15125 (2009).
- (11) A Role of the Heme-7-Propionate Side Chain in Cytochrome P450cam as a Gate for Regulating the Access of Water Molecules to the Substrate-Binding Site  
T. Hayashi, K. Harada, K. Sakurai, H. Shimada, S. Hirota  
*J. Am. Chem. Soc.*, 131, 1398–1400 (2009).
- (12) Self-Assembly of One- and Two-Dimensional Hemoprotein Systems by Polymerization through Heme-Heme Pocket Interactions  
H. Kitagishi, Y. Kakikura, H. Yamaguchi, K. Oohora, A. Harada, T. Hayashi  
*Angew. Chem., Int. Ed.*, 48, 1271–1274 (2009). Inside Cover.
- (13) Thermodynamically Controlled Supramolecular Polymerization of Cytochrome *b*<sub>562</sub>  
H. Kitagishi, K. Oohora, T. Hayashi  
*Biopolymers*, 91, 194–200, (2009). Front Cover.
- (14) Substrate binding induces structural changes in cytochrome P450cam  
K. Sakurai, H. Shimada, T. Hayashi, T. Tsukihara  
*Acta Crystallogr. Sect F*, 80–83 (2009).
- (15) Photocatalytic Hydrogen Generation Using a Protein-Coated Photosensitizer with Anionic Patches and a Monocationic Electron Mediator  
T. Matsuo, A. Asano, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Hayashi  
*Chem. Commun.*, 31, 3684–3686, (2008).
- (16) Evaluation of the Functional Role of the Heme-6-propionate Side Chain in Cytochrome P450cam  
K. Harada, K. Sakurai, K. Ikemura, T. Ogura, S. Hirota, H. Shimada, T. Hayashi  
*J. Am. Chem. Soc.*, 130, 432–433 (2008).
- (17) Isolable Iron(II)-Porphycene Derivative Stabilized by Introduction of Trifluoromethyl Groups on the Ligand Framework  
K. Ito, T. Matsuo, I. Aritome, Y. Hisaeda, T. Hayashi  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 81, 76–83 (2008). BCSJ award
- (18) Effect of Peripheral Trifluoromethyl Groups in Artificial Iron Porphycene Cofactor on Ligand Binding Properties of Myoglobin  
T. Matsuo, K. Ito, Y. Nakashima, Y. Hisaeda, T. Hayashi  
*J. Inorg. Biochem.*, 102, 166-173 (2008).
- 〔学会発表〕 (計 26 件)
- (1) ヘムタンパク質自己組織化集合体の構築  
林 高史  
日本化学会第 91 春季年会特別企画「エキゾチック自己組織化材料」、横浜、2011 年 3 月 26 日
- (2) タンパク質の分子改変を基盤とする新し

い生体触媒の創製

林 高史

日本化学会第 91 春季年会特別企画「機能物質創製を目指す化学空間の設計と制御」、横浜、2011 年 3 月 26 日

(3) Supramolecular Hemoprotein Polymers  
Directed towards Bionanomaterials

T. Hayashi

SeleCa Osaka Univ Mini-Symposium, Aachen (Germany), March 17th, 2011.

(4) Construction and Characterization of  
Supramolecular Hemoprotein Polymer

T. Hayashi

分子研研究会「金属錯体の機能化の現状と将来展望」、岡崎、2011 年 1 月 9 日

(5) Modification of Hemoproteins by  
Heme-substitution

T. Hayashi, T. Matsuo, A. Onoda

Pacificchem2010, Honolulu (USA), December 18th, 2010

(6) Construction and Characterization of  
Supramolecular Hemoprotein Polymers

T. Hayashi.

日台 3 大学合同セミナー、鹿児島、2010 年 11 月 25 日

(7) 高機能ヘムタンパク質の創製

林 高史

第 43 回酸化反応討論会、東京 2010 年 11 月 13 日

(8) Modification of Hemoproteins to Create  
Hemoprotein Polymers

T. Hayashi, K. Oohora, Y. Kakikura, Y. Ueya, A. Onoda

The 5th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC V), Kaohsiung (Taiwan), November 4th, 2010.

(9) ヘムタンパク質の改変を駆使した酸化触媒活性の制御

林 高史

第 106 回触媒討論会、甲府、2010 年 9 月 18 日

(10) Enhancement of Enzymatic Activities of  
Myoglobin and Horseradish Peroxidase by  
Heme-Substitution Methods

T. Hayashi

3rd Aachen-Osaka Joint Symposium, Aachen (Germany), September 7th, 2010.

(11) Preparation and Characterization of

Supramolecular Hemoprotein Polymers Through  
Heme-Heme Pocket Interaction

T. Hayashi

6th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-6), Santa Ana Pueblo (USA), July 8th, 2010.

(12) Supramolecular hemoprotein polymer  
formed by interprotein heme-heme pocket  
interaction

T. Hayashi

Joint Symposium for "Chemistry at the Frontiers of Biology and Physics" Strasbourg (France) July 1st, 2010.

(13) 非天然補欠分子の合成を基盤とする機能性ヘムタンパク質の創製

林 高史

日本化学会第 90 春季年会、東大阪、2010 年 3 月 28 日

(14) 天然の触媒活性を超えるヘムタンパク質の創製をめざして

林 高史

日本化学会第 90 春季年会、東大阪、2010 年 3 月 26 日

(15) ヘム補欠分子の構造と反応性を基盤とするヘムタンパク質の機能化

林 高史

分子研研究討論会、岡崎、2010 年 2 月 20 日

(16) ヘムタンパク質の高機能化：ヘム補欠分子の人工設計・合成を基盤とするタンパク質の機能変換

林 高史

金沢大学薬学シンポジウム 2009、金沢、2010 年 1 月 22 日

(17) A Role of Heme-7-Propionate Side Chain in  
Cytochrome P450cam

T. Hayashi, K. Harada, K. Sakurai, H. Shimada

The 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences-Experiments and Simulations, Nagoya, December 22nd, 2009

(18) Supramolecular Hemoprotein Polymers  
Formed by Heme-Heme Pocket Interaction

T. Hayashi

International Symposium on Bio-Environmental Chemistry, Osaka, December 19th, 2009.

(19) Construction and Characterization of  
Supramolecular Hemoprotein

T. Hayashi, K. Oohora, Y. Kakikura, A. Onoda

The 4th International Symposium on Atomic Technologies, Kobe, November 18th, 2009.

(20) Molecular Design of Prosthetic Group in Hemoproteins

T. Hayashi

14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Nagoya, July 27th, 2009.

(21) Physicochemical Property and Catalytic Activity of Hemoprotein Having a Non-natural Tetrapyrrole Iron Complex as a Prosthetic Group

T. Hayashi, T. Matsuo, A. Hayashi, D. Murata  
The 2nd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC2009), Parry Sound (Canada), May 26th, 2009

(22) Construction of Supramolecular Polymer Formed by Hemoprotein Assembly

T. Hayashi, H. Kitagishi, K. Oohora, Y. Kakikura  
The IUMRS International Conference in Asia 2008, Nagoya, December 9th, 2008.

(23) Evaluation of Functional Role of Heme-Proponate Side Chains in Cytochrome P450cam

T. Hayashi, K. Harada, K. Sakurai, H. Shimada  
The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC IV), Jeju (Korea), November 12th, 2008.

(24) ヘムタンパク質をユニットとする超分子ポリマーの構築

林 高史・大洞 光司・柿倉 泰明・北岸 宏亮  
第 57 回高分子討論会、大阪、2008 年 9 月 26 日

(25) ヘムタンパク質超分子集合体構築  
林 高史

平成 20 年度 (前期) 分子研研究会 配位子場制御に基づく機能性錯体の創成と応用～生体から触媒およびデバイスまで～、岡崎、2008 年 7 月 18 日

(26) Enhancement of Peroxidase Activity for Several Hemoproteins by Reconstitution with Artificially Created Prosthetic Groups

T. Hayashi, M. Abe, M. Fujii, T. Matsuo, D. Murata, T. Watanabe  
Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines(ICPP-5), Moscow (Russia), July 10th, 2008.

〔図書〕 (計 2 件)

(1) Hemoproteins Reconstituted with Artificially Created Hemes

T. Hayashi, In *Handbook of Porphyrin Science*; Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. Eds.; World Scientific Publishing: Singapore, 2010; Vol. 5, pp 1–69.

(2) コファクターの置換による新機能発現  
林 高史

編集：小宮山 眞「酵素利用技術体系」279–288 ページ、NTS、2010 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 4 件)

(1) 名称：複数の金属ナノ粒子とヘムタンパク質 2 量体由来のアポタンパク質との複合体

発明者：林 高史、小野田 晃、植屋 佑一  
権利者：大阪大学

種類：PCT

番号：JP2010/065625

出願年月日：2010 年 9 月 10 日

国内外の別：国外

(2) 名称：タンパク質ポリマーが架橋された構造体

発明者：林 高史、大洞 光司、小野田 晃  
権利者：大阪大学

種類：PCT

番号：JP2010/065536

出願年月日：2010 年 9 月 9 日

国内外の別：国外

(3) 名称：複数の金属ナノ粒子とヘムタンパク質 2 量体由来のアポタンパク質との複合体

発明者：林 高史、小野田 晃、植屋 佑一  
権利者：大阪大学

種類：特願

番号：2009-054960

出願年月日：2009 年 9 月 9 日

国内外の別：国内

(4) 名称：ヘムタンパク質モノマーおよびそのモノマーから得られるヘムタンパク質ポリマー

発明者：林 高史、北岸 宏亮、大洞 光司、小野田 晃、柿倉 泰明

権利者：大阪大学

種類：PCT

番号：JP2009/054569

出願年月日：2009 年 3 月 10 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 高史 (HAYASHI TAKASHI)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：20222226

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし