

平成 2 1 年 4 月 2 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750041

研究課題名（和文） タンパク質を内包する自己集合性金属錯体の合成

研究課題名（英文） Synthesis of Self Assembled Organometallic Complex Encapsulating Protein

研究代表者

氏名 佐藤 宗太 (SATO SOTA)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号 40401129

研究成果の概要：タンパク質をまるごと閉じ込め、かつ分子レベルで単一構造の分子カプセルの開発をめざした。タンパク質を共有結合で連結した有機配位子と、無置換の配位子、および遷移金属錯体を混合することで、タンパク質を内包する自己集合性金属錯体の合成を達成した。また、カプセル状分子内部におけるタンパク質の構造を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：錯体化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ構造科学 A

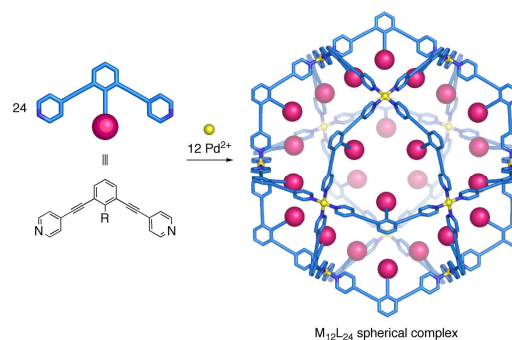
キーワード：自己集合性金属錯体、包接、タンパク質、球状錯体

1. 研究開始当初の背景

小さな空間にタンパク質を閉じ込める検討は、酵素活性を保ったまま担持触媒としての利用を図るなど国内外で盛んに行われており、空孔としてメソ孔シリカや逆ミセルなどが用いられている。しかし、従来の手法では空孔の構造にばらつきがあるために、空孔内でのタンパク質の構造制御は限界がある。

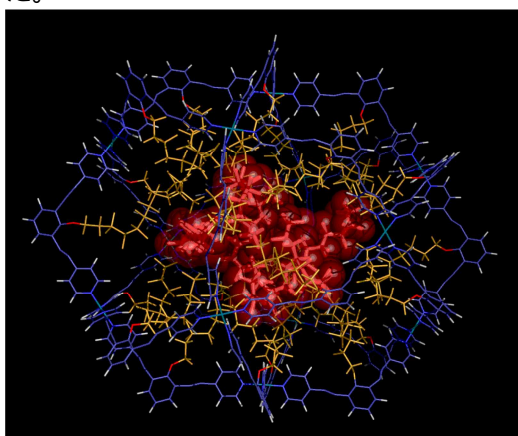
申請者の所属する研究室では、自己集合の現象を使うことで、有機配位子と遷移金属イオンとからなる中空金属錯体の合成手法を確立している。そこで申請者は、これらの中空金属錯体のうち、12個のパラジウムイオン

(M)と24個の折れ曲がった二座の有機配位子(L)とからなる $M_{12}L_{24}$ 球状錯体に着目した。なぜなら、この錯体のみが直径3ナノメートル



を超える巨大構造を有し、また配位子に官能基を導入することで、内部空間にその位置と数を精密に制御して 24 個の官能基を化学修飾できるからである。

申請者は、官能基としてペルフルオロアルキル基を用いれば、カプセル外の有機溶媒とフルオラス性官能基によって、カプセル内外での相分離を達成できることを見いだした (*Science*, 2006, 313, 1249)。この相分離により、ゲスト分子をカプセル内部に溶解させ、逆に抽出もできた。また、カプセル内部の官能基を設計することで、ゲスト分子の数を制御できた。分子量が 2 万を上回る巨大分子であるが、単結晶 X 線結晶構造解析に成功し、詳細な解析から十分に大きな内部空間において官能基鎖が柔軟に動くことがわかった。



また、官能基の柔軟性を活かし、重合性モノマーを化学修飾し、カプセル内部だけで進行する選択的な重合反応を達成した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, in press)。この反応を使えば、ナノメートルスケールの中空構造の内部だけ、物性を変化させることが可能であり、世界最小のメモリ材料など応用的展開が可能であると考えられる。

以上の検討から、原子レベルで一義的な構造を持つ $M_{12}L_{24}$ 球状錯体の内部空間は、導入した官能基によって精密に制御できることがわかった。この錯体は直径が数ナノメートルもあり、小さいタンパク質ならば丸ごと包接できる大きさを持っている稀有な構造を持つ。中空金属錯体は、国内外で研究が盛んであり、ゲスト分子の包接による構造制御を通じて、これまでに多くの特異な物性発現・化学反応が発見されてきている。従って、中空錯体内部にタンパク質を閉じ込めれば、有機小分子の場合と同様に従来法では達成できない高いレベルでタンパク質の構造制御が可能であり、新しい構造生物学的展開につながると考える。

2. 研究の目的

本研究の全体構想：自己集合性球状錯体内部にタンパク質を丸ごと閉じ込めることで、新たな構造生物学的研究を展開する

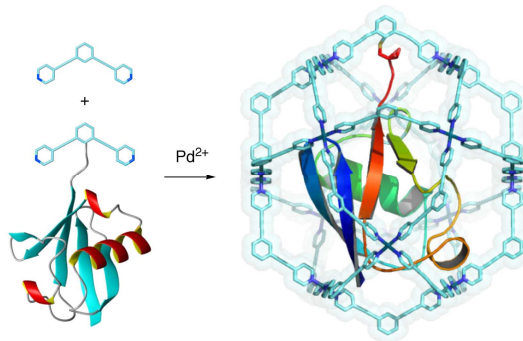
本研究では、遷移金属イオンと有機配位子とからなる球状錯体内部にタンパク質を丸ごと閉じ込める合成手法を探索する。

従来、様々な有機小分子を中空金属錯体に閉じ込めることにより特異な構造を誘起し、特異な物性の発現・特異反応が見いだされてきた。同様にして、金属錯体に包接した生体分子においても、全く新しい構造生物学的知見を見いだすことができると考えられる。

3. 研究の方法

まず始めに、タンパク質を有機配位子を導入する手法の開発を行う。次に、錯体の調製を行うが、タンパク質は大きいので、図 2 に示す、置換配位子一種類のみを用いた従来の調製法を用いることができない。代わりに、2 種類の配位子を混合して用いる調製法を用いる必要がある。

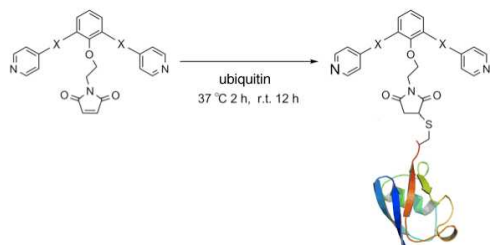
錯体の調製に成功した段階で、タンパク質内包錯体の詳細な構造決定を行う。特に、錯体内部でのタンパク質の立体構造を明らかにする。



4. 研究成果

タンパク質としては、錯体の内部に包接でき、かつ安定で、大腸菌を用いたタンパク質発現系を用いて調製可能なユビキチンを用いることにした。C 末端をシステインへ変異させたユビキチンを調製し、ユビキチンを連結した配位子の合成を行った。一般にタンパク質を扱う際には変性や分解が起こらないように注意が必要であるため、タンパク質は反応の最後の段階で導入することが望ましい。そこで、あらかじめ配位子前駆体中にマレイミド基を導入しておき、最後の段階でユビキチン C 末端のシステインに含まれるチオ

ール基と反応させることにより、配位子へのユビキチンの導入を温和な条件で行うことにした。反応は 37 °C で 2 時間、続いて室温にて 12 時間行うことで良好に進行し、望みのユビキチンを連結した配位子を得ることができた。



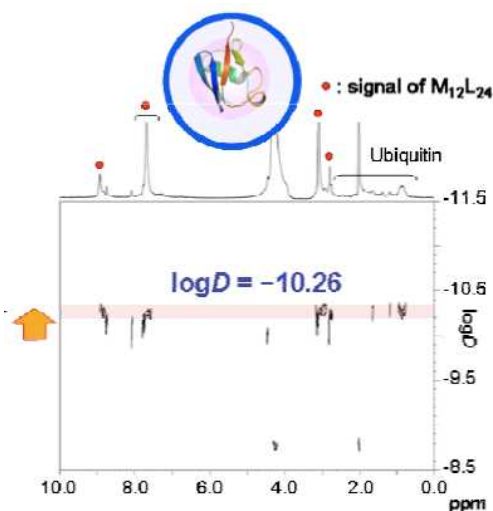
得られた生成物の分子量を決定するため、MALDI-TOF MS 測定を行った。その結果、これらの配位子はすべてナトリウム付加体として観測され、構造決定に至った。

ユビキチン内包錯体の合成検討を行った。水溶性を確保するためにカチオン性有機官能基を導入した折れ曲がり配位子と、ユビキチンを連結した配位子を用いて球状錯体の形成を行った。パラジウム(II)トリフラート (Pd(OTf)₂) の存在下で 30:1 の比率で 2 つの配位子を混合し、重水:重アセトニトリル = 2:1 の溶媒中において 45 °C で 3 時間撹拌した。

得られた反応溶液について ¹H 及び DOSY NMR の測定を行った。DOSY NMR はシグナルを拡散係数によって分離する手法であり、構造の大きさによってシグナルを分離することが可能である。すなわち、形成した球状錯体とユビキチンが同一の拡散係数で運動しているか確かめることにより、ユビキチンが球状錯体内へ内包されているか区別することができると思われる。

錯形成後のスペクトルより、ユビキチン内包錯体の拡散係数は、同じ骨格の錯体の拡散係数とほぼ等しいことがわかった。一方、錯形成反応を行う前の、ユビキチン連結配位子のみの拡散係数はそれよりも大きく、有意な差があることが明らかになった。すなわち、ユビキチンは球状錯体の内部に包接され、溶液中において、一体となって、すなわち、一分子として拡散運動していることがわかった。

また、配位子に剛直なアセチレン Spacer を導入することでユビキチン内包錯体の大きさを、より大きくする検討を行い、観測される拡散係数を比較した。その結果、より大きな錯体は、より遅い拡散運動を示し、内包されたユビキチンに由来するシグナルも同時に遅い拡散係数を示した。このことから、ユビキチンが錯体内部に包接されていることが明らかになった。



得られたユビキチン内包錯体中における、ユビキチンの 3 次元立体構造の評価を行った。今回、NMR (核磁気共鳴分光) の手法を用いて立体構造を明らかにするため、新たに安定同位体を用い、¹⁵N 標識化ユビキチンを導入した配位子を調製した。立体構造の解析は ¹H-¹⁵N HSQC NMR 測定を用いて行なった。¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを用いると、二次元スペクトル上に、共有結合を 1 本介した ¹H-¹⁵N の結合相関が観測され、その ¹H 核および ¹⁵N 核のシグナルの化学シフト値の分散状況から、タンパク質のフォールディング状態を見積もることが可能である。

錯体内部でのユビキチンのスペクトルは、天然状態のスペクトルと比較し、シグナルの分布範囲が狭く変化している事がわかった。これは立体構造が変化したことを意味している。しかし一方で、分布の度合いから、ユビキチンは完全変性 (ランダムコイル状態) もしていないことから、ユビキチンはフォールディング中間体であるモルテン・グロビュール状態に止まっていると予想される。モルテン・グロビュール状態は、天然状態と同じコンパクトな構造を保持しており、溶媒条件の変化などでリフォールディングする可能性が高い。今後、錯体外表面の官能基の種類を検討し、より天然状態に近い完全な水溶性錯体中での、天然構造を保持したユビキチンの包接をめざす。

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)

[学会発表](計 5 件)

(1)

発表者名: 鈴木 康介・佐藤 宗太・山口 芳樹・加藤 晃一・藤田 誠

発表表題: 「PROTEIN ENCAPSULATION

VIA SELF-ASSEMBLY OF $M_{12}L_{24}$
COORDINATION SPHERICAL
COMPLEXES」

学会等名：アジア錯体化学会議
発表年月日：平成19年7月30日
発表場所：岡崎

(2)

発表者名：藤田 大士・鈴木 康介・佐藤 宗太・山口 芳樹・栗本 英治・加藤 晃一・藤田 誠
発表表題：「自己集合性錯体内部への同位体標識化ユビキチンの内包」
学会等名：日本化学会第88春季年会
発表年月日：平成19年3月27日
発表場所：東京

(3)

発表者名：藤田 大士・鈴木 康介・佐藤 宗太・山口 芳樹・栗本 英治・加藤 晃一・藤田 誠
発表表題：「自己集合性錯体へのユビキチンの内包」
学会等名：第3回パイオ関連化学合同シンポジウム
発表年月日：平成20年9月19日
発表場所：東京

(4)

発表者名：佐藤 宗太・鈴木 康介・藤田 大士・山口 芳樹・栗本 英治・加藤 晃一・藤田 誠
発表表題：「タンパク質を丸ごと包接した自己集合性錯体の合成」
学会等名：第58回錯体化学討論会
発表年月日：平成20年9月20日
発表場所：石川

(5)

発表者名：藤田 大士・鈴木 康介・佐藤 宗太・山口 芳樹・栗本 英治・山口 拓実・加藤 晃一・藤田 誠
発表表題：「 $M_{12}L_{24}$ 球状錯体内部への同位体標識化ユビキチンの内包」
学会等名：日本化学会第89春季年会
発表年月日：平成21年3月28日
発表場所：千葉

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

(1)

産業財産権の名称：「蛋白質内包球状遷移金属錯体及びその製造方法」
発明者：藤田 誠、佐藤 宗太、鈴木 康介
権利者：同上
産業財産権の種類：特許

出願番号：特願 2007-40808(P2007-40808)
公開番号：特開 2008-201734(P2008-201734A)
出願年月日：2007年2月21日
公開年月日：2008年9月4日
国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 宗太(SATO SOTA)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：40401129

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し