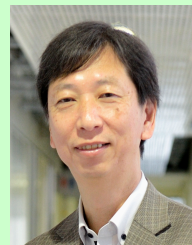


## 空間捕捉によるタンパク質の構造・機能制御および高効率構造解析

### Protein Encapsulation by Synthetic Cages for Functional Control and Structure Determination



課題番号：19H05461

藤田 誠 (FUJITA Makoto)

分子科学研究所・特別研究部門・卓越教授

#### 研究の概要

研究代表者は「配位結合駆動の自己集合」により大きさが数ナノメートルを超える空間を一義構造体としてつくる手法を開発してきた。本研究では、このような場で繰り広げる化学として「タンパク包接」を掲げ、タンパクの機能や構造制御とともに、NMR や X 線技術を組み合わせたタンパク質の新しい構造解析手法の創出をめざす。

研究分野：有機化学・錯体化学・超分子化学・構造解析学

キーワード：タンパク質包接 NMR 構造解析 X線構造解析 自己集合 ケージ化合物

#### 1. 研究開始当初の背景

配位結合を駆動力とする自己集合により、中空構造体を構築する研究を展開してきた。また、内部空間への分子を包接し、「閉じ込め効果」に基づく分子の新しい機能や反応性を引き出す研究を行ってきた。近年になり、数ナノメートル径を超える中空構造体を効率良く合成する手法を開発した。このような巨大中空構造に包接する対象化合物として、タンパク質を標的とする発想に至った。

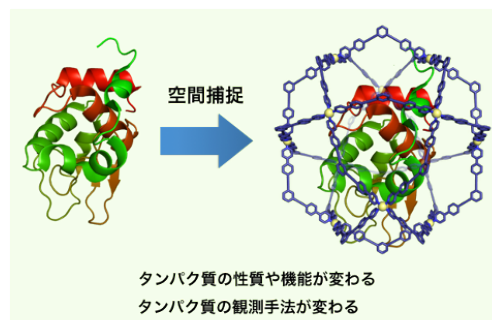
#### 2. 研究の目的

本研究では、巨大中空構造体の内部空間で繰り広げる化学として「タンパク包接」を掲げ、人工空間内でのタンパクの新機能の創出や構造生物学にまで波及する新しいライフサイエンス技術の開拓をめざす。具体的には、タンパクの機能や構造制御とともに、NMR や X 線技術を組み合わせたタンパクの新しい構造解析手法を創出をめざす（図参照）。

#### 3. 研究の方法

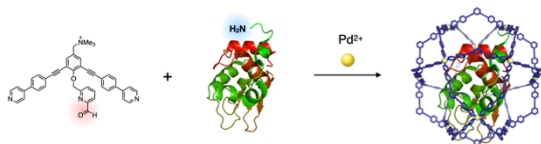
配位子とタンパク質分子を可逆的な縮合させ、自己集合によりワンポットでタンパク包接ケージを合成する。ケージに内包された酵

素タンパクについて、活性評価を行い、捕捉効果による安定性や機能の向上を調べる。また、X線結晶構造解析、低温電顕、3次元 NMR 等の分析技術を駆使し、包接状態でなければ観測できないタンパク質構造の情報取得を行う。



#### 4. これまでの成果

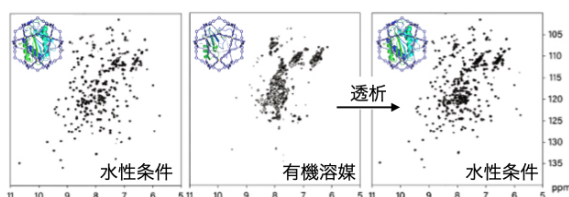
4.1 タンパク包接の新技术開発：タンパク N 末端と 2-ホルミルピリジル基の選択的な縮合反応によってタンパク質を接合し、パラジウム(II)イオンとの自己組織化によって球状錯体を構築することでタンパクを包接することに成功した。タンパク質の改変は不要であり、ワンポットでの包接により、天然構造を保持したタンパク包接が可能となった。



**4.2 包接によるタンパク質の機能制御：** 有機溶媒中で、凝集して失活してしまうタンパク質 (CLE) が、包接によって空間的な隔離により、熱および有機溶媒に対する安定性が飛躍的に向上していることがわかった。活性に低下は見られなかった。

一方、有機溶媒に長時間浸漬した CLE は、徐々に構造が変性し、酵素活性が低下した。しかし、溶媒条件を水系に戻すだけで、元のフォールディング構造と触媒活性復元した (ケージの分子シャペロン機能)。

**4.3 包接したタンパク質の構造解析：** 先に安定化・活性回復が観測された CLE を同位体標識して、錯体ケージへと包接した。これを三次元 NMR で解析すると、得られた構造は過去に報告された X 線結晶構造とほぼ同一であることがわかった。さらに、タンパク質の変性・失活したタンパク質の構造が復元する過程を、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定で観測した。その結果、CLE は有機溶媒中において、完全な変性状態ではなく、高い運動性を持ったモルテングロビュール状態であると結論づけた。これらの観測により、包接タンパク質のリフォールディングを直接的に証明することができた。



## 5. 今後の計画

**5.1. 非生体環境での NMR 測定：** これまでの成果から、有機溶媒系でのタンパク質 NMR 構造解析が可能となった。解像度の向上やタンパク質構造のダイナミクス、更には基質-リガンドの弱い相互作用の観測等を期待し、極低温での NMR 解析を行う。

**5.2. 画一条件測定による X 線構造解析、クライオ電子顕微鏡 (EM) 構造解析の高効率化：** タンパク質の X 線結晶構造解析、クライオ EM 構造解析において、包接による空間捕捉効果によってサンプル調製条件の画

一化 (タンパクの種類・性質によらない結晶化、全方位からの顕微鏡画像の取得) を目指す。

**5.3. タンパクの安定化による不安定なタンパクの構造解析：** 錯体ケージへの包接により、通常は観察不能な過渡的で不安定なタンパクの構造情報を取得する。具体的にはアルツハイマー病の原因とされるアミロイド β の凝集過程の構造解析を行う。

**5.4. 球状錯体の拡張と多様なタンパクの包接・構造解析：** さらに多成分から組み上がる球状錯体を構築することで内部空間を拡張し、さらに多様なタンパク質の包接を実現する。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

### 6.1. 主な発表論文

現時点における本プロジェクトの中心的な成果は、現在論文投稿中である。以下に示す発表論文は、プロジェクトに資する基盤的な成果を報告したものである。

- (1) R. Dubey, K. Yan, T. Kikuchi, S. Sairenji, A. Rossen, S. S. Goh, B. L. Feringa, M. Fujita, "Absolute Configuration Determination from Low ee Compounds by the Crystalline Sponge Method. Unusual Conglomerate Formation in a Pre - Determined Crystalline Lattice," *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, in press
- (2) H. Takezawa, R. Tabuchi, H. Sunohara, M. Fujita, "Confinement of Water-Soluble Cationic Substrates in a Cationic Molecular Cage by Capping the Portals with Tripodal Anions," *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 17919-17922.
- (3) H. Takezawa, K. Shitozawa, M. Fujita, "Enhanced reactivity of twisted amides inside a molecular cage," *Nat. Chem.* **2020**, 12, 574-578.
- (4) Y. Inomata, T. Sawada, M. Fujita, "Metal-Peptide Torus Knots from Flexible Short Peptides," *Chem* **2020**, 6, 294-303.
- (5) T. Sawada, Y. Inomata, K. Shimokawa, M. Fujita, "A Metal-Peptide Capsule by Multiple Ring Threading," *Nat. Commun.* **2019**, 10, 5687.

### 6.2. 研究代表者の主な受賞

- 2019年 Paul Karrer Medal (Zürich 大学)
- 2019年 恩賜賞・日本学士院賞
- 2020年 中日文化賞
- 2020年 クラリベイト引用栄誉賞