

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20350063  
 研究課題名（和文） ウイルス部品蛋白質からなるナノチューブ構造体の分子設計と機能化  
 研究課題名（英文） Molecular Design of Tube Proteins from Bacteriophage T4  
 研究代表者 上野 隆史 (UENO TAKAFUMI)  
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授  
 研究者番号：70332179

研究成果の概要（和文）：生体で精密な構造体を構築するバクテリオファージ T4 に着目し、その部品蛋白質の一つを遺伝子工学的に取り出し、安定なチューブ構造体を作製した。この構造体は高い温度や幅広い pH 領域でも安定に存在し、有機溶媒を含む反応系でもチューブ構造を保持したまま、一度に多くの機能性分子をディスプレイする事が可能である。従って、触媒はもとより、細胞等の成長を促すマトリックス分子として様々な応用展開が可能である。

研究成果の概要（英文）：In nature, there are a large number of protein assemblies with well-defined and robust nanostructures. However, it remains still difficult to artificially prepare and functionalize such assemblies as nanomaterials. We have synthesized a bio-nanotube consisting of the tubular component proteins of bacteriophage T4 by designing its quaternary structure. The results suggest that the construction of protein assemblies from component proteins of biosupramolecules can be a potential approach for development of bionanomaterials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：超分子・ナノチューブ・T4 ファージ・蛋白質工学・光反応

#### 1. 研究開始当初の背景

単純な分子ユニットから超分子的な手法を用いて高次構造体を組み上げる研究が次世代機能材料創成を目指して盛んに行われている。特に、実用性の高いチャンネル、チューブ、ケージ構造体の作成に関しては、金属錯体や、ペプチド、 dendroliamer、高分子等

を使った様々な方法が提案されてきた (Nolte et al. *Chem. Rev.* 105, 1445, 2005)。しかしながら、これらの手法では、複雑な化学反応無しに超分子構造体を作成できる反面、数 nm から数十 nm のスケールでサイズが揃い、かつ安定な構造体を構築することは困難である。そこで、本申請では生体超分子ナノマシーン

であるウィルス構築する部品蛋白質を用いて、形状の揃った安定なナノチューブの作成を実現し、それらを分子基盤とすることによって、従来の手法では達成できなかったサイズ領域の精密物質合成法を確立する。今回ターゲットとするバクテリオファージ T4 は 50 種類以上もの部品蛋白質から構成されており、それぞれが、RNA を貯蔵するカプセル、細胞膜に突き刺さる針、RNA を大腸菌内に送り込むモーター等として機能し、大腸菌へ感染する (図 1)。すなわち、個々の部品蛋白質の特徴をうまく利用すれば、これまで人工的に合成できなかった分子機能を有する望みの分子構造体として用いる事ができる。国内外でも蛋白質超分子を利用した機能分子構築の研究は報告されている。しかしながら、本来の蛋白質の機能を化学的に制御するのみの研究や、チューブ型やカプセル型のウィ

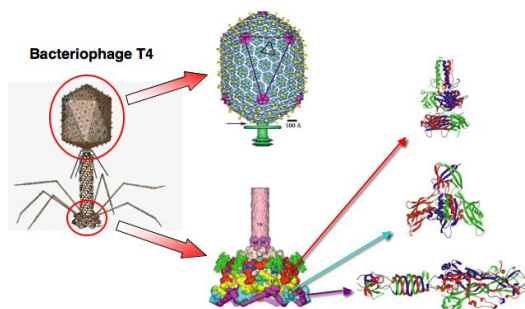


図 1.バクテリオファージ T4 の全体構造とそれらを構成する部位、ならびに部品蛋白質の例 (M. G. Rossmann, et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 171).

ルスに従来のアミノ酸化学修飾法を用いて有機分子を結合する報告等であり、蛋白質を用いて超分子構造体を組み上げる研究は依然として手探りの状況にある。(T. Douglas et al. *Adv. Mater.* *19*, 1025, 2007)。また、生体分子の一つである DNA を用いた超分子構造体作成の試みもいくつか報告されているが、構造の多様性が蛋白質にくらべて少なく、サイズや形状の揃った構造体合成や構造決定はいまだに困難である。すなわち、生体超分子は原子レベルでの分子設計が困難という理由で、触媒反応や電子伝達といった反応の制御や分子デバイスの部品として使用されてこなかったのである。本申請では、既に進めている蛋白質超分子を利用した様々な機能分子の研究から非常に高い熱的安定性と耐有機溶媒性をもつ蛋白質超分子複合体を利用することによって (図 2)、これまでのどの超分子的手法とも異なる精密物質合成法の新しい領域を確立する。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究より見いだしたバクテリオファージ T4 の部品蛋白質 gene product 5 (gp5)三量体を用いて研究を進める (図 2)。この超分子体は、合成分子として作成することが困難であり、分子ブロックとして汎用性が高いと考えられる 10nm のサイズを有し、安定かつ精密なチューブ構造体であ

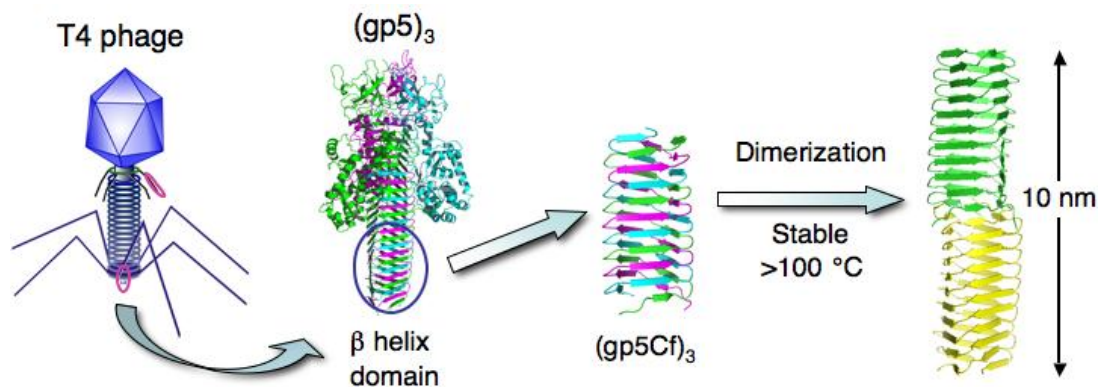


図 2. バクテリオファージ T4 の膜貫通針部分を構成する蛋白質 gp5 三量体より得られたチューブ構造体

る。期間内に無機・有機物質合成法を確立するために、

- (1)異種金属錯体の固定化と触媒機能の制御
- (2)フラビン分子固定化による精密配列効果の検証

- (3)新規アミノ酸修飾法の開発 を達成する。

本申請では、「部品蛋白質」という概念を導入し、さらに、そこから非常に高い対称性をもつチューブ構造領域のみを取り出し、テンプレートとして用いる。この手法は、遺伝子組み替えと合わせることで、本来の骨格をベースにサイズやアミノ酸の自由な並び替えが可能となり、拡張性の高い超分子制御法となりうる。従って、合成分子では達成できない分子ビルディングブロック作成技術として、電子、バイオ産業へインパクトのある基礎概念を与えるものとする。

### 3. 研究の方法

バクテリオファージ T4 の部品蛋白質の一つである gp5 は、自発的な三量体形成によりβヘリックスからなるチューブ構造をとり(図2)、大腸菌の膜貫通時に針の役割を果たす。この構造体を化学合成することは困難であるが、分子ブロックとしては汎用性が高い構造と考えられる。そこで、最も安定な部分であるC末端領域を遺伝子工学的に単離したところ、X線結晶構造解析から、広いpH(3-10)や温度域(>100℃)だけではなく、有機溶媒に対しても極めて高い安定性を示す長さ10nmの2量体チューブ構造[(gp5)<sub>2</sub>]であることがわかった(図3)。特に重要な点は、このチューブ構造体が、3本のペプチド鎖からなるβヘリックスから形成されており、Lys残基の精密な繰り返しによりチューブ表面に規則正しく配列している点である(図3a)。つまり、アミノ酸置換と化学修飾を組み合わせることによって、機能分子のホモ、ヘテロ配列を作り分けることが可能となる(図3b)。

- (1)異種金属錯体の固定化とその触媒機能の制御 (平成20-21年度)

金属錯体の集積をうまく行えば様々な触媒活性を効率よく引き出すことができる。例えば、石谷等によって報告されているRe錯体は、ホスフィン配位子架橋による四核錯体を形成することによって紫外光によるCO<sub>2</sub>還元光触媒となる。しかしながら、四核錯体のCO付加体は単核錯体として容易に遊離し、四核錯体の再配列が反応促進の鍵を握る。そこで、[(gp5)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>上に等間隔に配列しているLys残基を用いて、Re錯体を表面に固定化することにより、円滑な四核錯体の再配置を実現し、活性の向上をはかる(図4)。錯体の合成は、サクシイミド誘導体bpyリガンドを含む錯体を直接固定化する方法によって導入する。さらに、Re-Ruの異種二核錯体は可視光によってCO<sub>2</sub>還元を触媒し、双方の近接効果が触媒活性に重要であることから(Ishitani et al. *Inorg. Chem.* 44, 2326, 2005)、図4に示すように、アミノ酸置換によって、[(gp5)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>の稜線にシステインとリシンを交互に配置し、サクシイミド誘導体の配位子をもつRu錯体と、

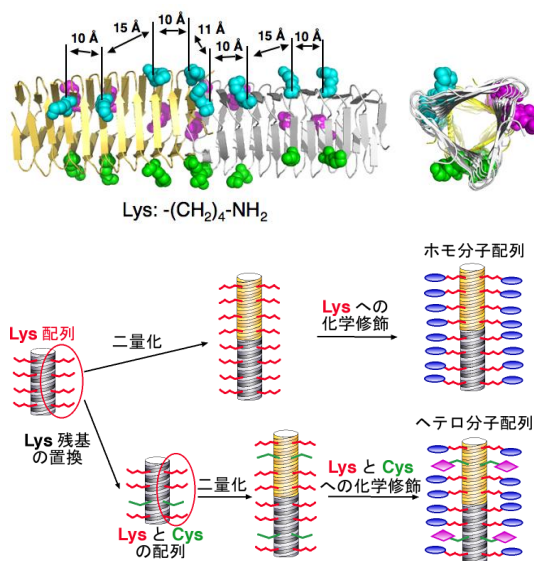


図3. gp5二量体の結晶構造(a)とチューブ上へのホモ、ヘテロ分子配置のためのアミノ酸置換と修飾反応スキーム(b)

マレイミド誘導体の配位子をもつ Re 錯体を、それぞれリシンとシステイン残基に結合させて、複数の異種二核錯体を [(gp5)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> 表面に固定化する。

### (2)フラビン分子の固定化による精密配列効果の検証 (平成 21 年度)

前年度の結果をもとにフラビン分子を固定化し、その精密な配列による協同効果についての検証を行う。フラビンは、光触媒、酸化触媒、電子伝達、金属配位子といった多くの機能を有するため、精密配列によって様々な協同的な機能化が期待できる。そこで、フラビンのサクシイミド誘導体を合成し、[(gp5)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> に固定化する。最初は光反応と銅の還元反応が関わるベンジルアジドの cycloaddition 反応をすすめる (図 5)。ポリリシンなどのフラビン修飾体と活性を比較して犠牲還元試薬のベンジルアルコールや、銅一価の生成量を定量する事により、各ステップでの反応性を比較し、[(gp5)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> 上への配列による協同効果を評価する。

### (3)新規アミノ酸修飾法の開発 (平成 22 年度)

金属イオンの配位子として利用可能なアミノ酸残基の近傍の Lys 残基部位へ配位子を化学修飾し、金属イオンの添加によって錯体形成する、新しいアミノ酸修飾法の開発を行う。

## 4. 研究成果

### (1)異種金属錯体の固定化とその触媒機能の制御

チューブ表面に存在するリシン残基へのアミノ酸置換によってシステイン残基を導入し、Rh 錯体と Re 錯体の二種類の異なる錯体を固定化した。この複合体は光照射によって二酸化炭素の還元反応を触媒することが

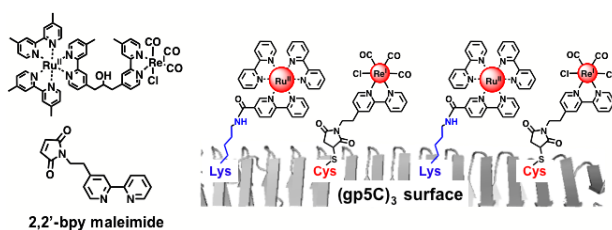


図 4. [(gp5)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> へのシステイン変異体を用いた異種金属錯体固定化

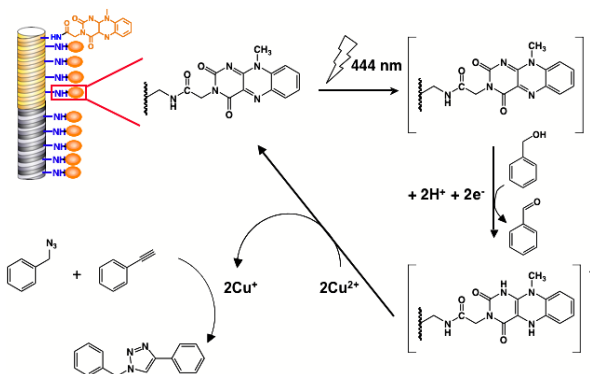


図 5. フラビンによる [(gp5)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> の修飾と Cu-フラビン cycloaddition の反応スキーム (反応は Ritter, S.C. et al. *Chem, Commun.* **2006**, 4694 参照)

わかり、固定化しないときに比べ 3 倍程度の活性向上を示す。これは、安定なチューブ表面を分子テンプレートとすることによる近接場効果によると考えられ、新しい人工生体触媒の分子設計指針を示すものである。

### (2)フラビン分子の固定化による精密配列効果の検証

さらに、チューブ表面に存在するリシンをフラビンのサクシイミド誘導体により化学修飾したところ、チューブ構造を保ったまま、ほぼ 100% の修飾率でフラビンを結合させる事に成功した。また、この複合体存在下、フェニルアセチレンとベンジルアジドのクリック反応を行うと未修飾のチューブやフラビンを修飾したポリリシンに比べ約 30 倍もの高いコンバージョンを示した。フラビンはクリック反応に必要な Cu イオンと配位結合する事が知られており、チューブ上で精密に配置されたフラビンへ銅が配位する事によって、Cu(I)-Cu(II) のレドックス反応とフラビ

ン集積によって形成される疎水場への基質のアクセスが効率よく行われるため、触媒反応が促進されると考えられる。

### (3) 新規アミノ酸修飾法の開発 (平成 22 年度)

本研究では、従来のシステインの化学修飾と蛋白質表面に配列しているアミノ酸残基の配位能を組み合わせる新しい蛋白質表面修飾法を開発した。蛋白質表面のセリン、トレオニン近傍にシステインを変異導入し、ビピリジン配位子を化学修飾することで、導入したビピリジンと蛋白質表面のヒドロキシ基が同一の金属イオンに配位する部位を構築した。アニリンを基質としたエポキシドの開環反応では、特定の位置にビピリジンを導入したときのみ高い活性を示したことから、本法により、特定の位置のセリン、トレオニンのみが有効な補助配位子として機能し、ビピリジンと複合化することで有効な触媒反応場の構築に成功したといえる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件) すべて査読あり

①N. Yokoi, Y. Miura, C.-Y. Huang, N. Takatani, H. Inaba, T. Koshiyama, S. Kanamaru, F. Arisaka, Y. Watanabe, S. Kitagawa, and T. Ueno\* “Dual modification of a triple-stranded b-helix nanotube with Ru and Re metal complexes to promote photocatalytic reduction of CO<sub>2</sub>” *Chem. Commun.*, 47, 2074-2076 (2011)

②N. Yokoi, H. Inaba, M. Terauchi, A. Z. Stieg, N. J. M. Sanghamitra, T. Koshiyama, K. Yutani, S. Kanamaru, F. Arisaka, T. Hikage, A. Suzuki, T. Yamane, J. K. Gimzewski, Y. Watanabe, S. Kitagawa and T. Ueno\* “Construction of Robust Bio-nanotube by Controlled Self-assembly of Component Proteins of Bacteriophage T4” *Small*, 6, 1873-1879 (2010) (selected as an inside cover picture).

③T. Koshiyama, T. Ueno\*, S. Kanamaru, F. Arisaka, and Y. Watanabe\* “2Construction of an Energy Transfer System in the Bio-nanocup Space by Heteromeric Assembly of gp27 and gp5 Proteins Isolated From Bacteriophage T4”

*Org. Biomol. Chem.* 7, 2649-2654 (2009)

[学会発表] (計 32 件)

#### 国際招待講演

① T Ueno, “Bio-hybrid Meso-scale materials for Supramolecular Coordination Chemistry” Session 173 (Molecular Design in Bioinorganic Chemistry), Pacificchem 2010 December 20, 2010, Hawaii, USA

② T Ueno, “Metal Complexes Functionalized on Tubular Protein Architectures”, Session 164 (Self-assembly and Coordination Chemistry), Pacificchem 2010, December 18, 2010, Hawaii, USA

③ T Ueno, “Metal Coordination Designed in Discrete Space of Protein Cages”, The 5<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, November 2-5, 2010, Kaohsiung, Taiwan

④ T Ueno, “Bio-hybrid Meso-scale materials for Supramolecular Coordination Chemistry” UdS-Japanese JEPS Symposium on Supramolecular Nanomaterials Science October 29, 2010, Institut de Science et d’Ingenierie Supramoleculaires (ISIS), France

⑤ T Ueno, “Coordination chemistry of porous protein crystals” 60<sup>th</sup> Anniversary Conference on Coordination Chemistry in Osaka, 28, Sep, 2010, Osaka, Japan

⑥ T Ueno, “Metal Coordination Designed in Discrete Space of Protein Assembly”, 8<sup>th</sup> China-Japan Joint Symposium on Metal Cluster Compounds, August 10-13, 2010, Xi’an, China

⑦ T Ueno, “Catalytic Reactions Designed using Protein Scaffolds from Artificial Enzymes to Protein Nanocage Reactors” NIMS 2010 Conference, July 12-14, 2010, Tsukuba, Japan

⑧ T Ueno, “Nanotube Architectures Designed from Component Proteins of Bacteriophage T4” 5<sup>th</sup> International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry June 6-10, 2010, Nara, Japan

⑨ T Ueno, “Molecular Functions Designed in Protein Nanocage Assemblies” The 3rd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2010) March 21-23, 2010 at Beijing International Convention Center, Beijing, China

⑩ T Ueno, “BIOINORGANIC FUNCTIONS DESIGNED IN NANOCAGED PROTEIN ASSEMBLIES” Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry November 4-7, 2009 at the Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, India

⑪ T Ueno, “Bioinorganic Functions and Structures Designed in Protein Nanocage Assemblies” Symposium: Inorganic Hybrid Materials; What are the young scientists preparing? October 8, 2009 (Kyoto)

⑫ T Ueno, “Redesigning Protein Spaces for Coordination Chemistry”, 14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry,

July 25-30, 2009 (Nagoya)

⑬ T Ueno, “Re-designing protein cage architectures for coordination chemistry”, 2nd International Symposium for Young Organic Chemistry, Mar. 27, 2009, NIMS, Tsukuba, Japan

⑭ T Ueno, “Integration of Metal Complexes into Viral Component Protein Assemblies” The IUMRS International Conference in Asia 2008, Nov. 11, 2008 (Nagoya)

国内招待講演

① 上野隆史 「蛋白質集合体形成を利用した機能プログラミング」新学術領域研究「配位プログラム」第2回公開シンポジウム、平成23年2月4日(名古屋)

② 上野隆史 「材料化学を指向した蛋白質分子設計」分子科学研究所 所長招聘研究会「2020年の物質分子科学を語る」、平成22年12月1日(岡崎)

③ 上野隆史 「蛋白質を駆使した精密無機化学への挑戦」京都大学 化学研究所 講演会、平成22年10月12日(宇治)

④ 上野隆史 「蛋白質集合体を用いたメゾ分子構造体の機能化」第4回バイオ関連化学シンポジウム「明日を拓くバイオ関連化学」、平成22年9月24日(大阪)

⑤ 上野隆史 「巨大蛋白質の合理的反応場設計」第4回日本化学会 関東支部大会、平成22年8月30日(筑波)

⑥ 上野隆史 「巨大蛋白質の配位化学」第23回生物無機化学夏期セミナー、平成22年8月29日(河口湖)

⑦ 上野隆史 「蛋白質微粒子の機能化」第90回日本化学会春季年会 特別企画「ナノ粒子の深化と応用」、平成22年3月26-29日(大阪)

⑧ 上野隆史 「巨大蛋白質を用いた分子機能空間構築への挑戦」神奈川大学学術フロンティア「機能物質創成を目指す化学空間の設計と制御」、平成22年3月13日(横浜)

⑨ 上野隆史 「蛋白質分子フラスコの可能性」新化学発展協会 ライフサイエンス技術部会講演会、平成21年7月21日(東京)

⑩ 上野隆史 「新しいメゾ領域科学を目指す蛋白質空間設計」生体関連サマースクール、平成21年7月14日(京都)

⑪ 上野隆史 「蛋白質集合体のナノ空間を利用した化学反応制御」第25回日本 DDS 学会学術集会、平成21年7月3日(東京)

⑫ 上野隆史 「蛋白質複合体を基盤とするナノ触媒設計」日本化学会 ATP シンポジウム、平成21年3月27日(千葉)

⑬ 上野隆史 「蛋白質をビルディングブロックとする巨大分子集積体の化学」熊本大学講演会、平成21年1月5日(熊本)

⑭ 上野隆史 「精密巨大分子合成を指向した蛋白質の分子設計」東京工業大学 資源化学研究所 講演会、平成20年12月5日(横

浜)

⑮ 上野隆史 「金属イオンを操る蛋白質複合体—その機能と制御」日本生物物理学会第46回年会、平成20年12月3日(福岡)

⑯ 上野隆史 「蛋白質集合体のメゾスケール化学に向けて」第11回生命化学研究会、平成20年11月29日(水上)

⑰ 上野隆史 「蛋白質複合体空間を利用した金属触媒反応」第102回触媒討論会、平成20年9月26日(名古屋)

⑱ 上野隆史 Design of Protein Assembly for Coordination Chemistry、第58回錯体化学討論会、平成20年9月20日(金沢)

〔図書〕(計8件)

① 上野隆史 “配位化学による蛋白質集合体の機能設計” 金属と分子集合 (シーエムシー出版) pp 5-23 (2010)

② 上野隆史 “巨大蛋白質を舞台とする触媒化学” 現代化学 2月号 (東京化学同人) No. 467, pp 54-59 (2010)

③ 渡辺芳人、安部 聡、上野隆史 “蛋白質が提供するナノ空間” ナノ空間材料の創成と応用 (フロンティア出版) pp 72-79 (2009)

④ 安部 聡、上野隆史 “超分子タンパク質内部空間の金属イオン集積” 超分子金属錯体 (錯体化学会選書、三共出版) pp 176-188 (2009)

⑤ 渡辺芳人、上野隆史 “蛋白質空間錯体 Hybrid” 配位空間の化学 (シーエムシー出版) pp 301-311 (2009)

⑥ S. Abe, T. Ueno, and Y. Watanabe, “Artificial Metalloproteins Exploring Vacant Space: Preparation Structures, and Functions” *Top. Organomet. Chem.* 25, pp 25-44 (2009)

⑦ 越山友美、上野隆史 「架橋化蛋白質結晶の不均一触媒への展開」蛋白質結晶の新展開 (シーエムシー出版) pp 276-288 (2008)

⑧ 安部聡、上野隆史 「ナノ構造蛋白質の内部空間利用」バイオナノプロセス (シーエムシー出版) pp 62-69 (2008)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kitagawa.icems.kyoto-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上野 隆史 (UENO TAKAFUMI)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：70332179

### (2) 研究分担者 無し

### (3) 連携研究者 無し