

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24685010

研究課題名(和文)中空錯体をテンプレートとする生体分子クラスター合成

研究課題名(英文)Synthesis of biomolecular clusters on the scaffolds of hollow spherical complexes

研究代表者

佐藤 宗太(Sato, Sota)

東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・准教授

研究者番号：40401129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：数ナノメートルの球状錯体の内面/表面を生体分子で覆い、高度に構造制御された生体分子クラスターを合成し、その特異な相互作用の発現を開拓した。錯体上に整然と、高密度に生体分子が集積した分子を合成し、その構造を詳細に決定した。無機物質や生体高分子を対象に、従来法では到達できない分子スケールでの「面」の分子認識を達成した。個々の弱い相互作用が集積効果によって増幅され、構造と機能が分子レベルで明瞭に相関する新しい分子システムを開発できた。

研究成果の概要(英文)：Well-defined biomolecular clusters were synthesized by the decoration of biomolecules on the inside/outside periphery of several nanometer-sized spherical complexes, and the unique recognition properties of the biomolecular clusters were revealed. The well-defined, dense biomolecular clusters were self-assembled, whose detailed structures were clearly determined. Interface recognition with one of the world's biggest molecular scale was achieved for the target substrates of inorganic materials or biomolecules. The weak recognition ability of each biomolecular substituent was enhanced by the accumulation effect on the spherical complexes, and the distinct structure-function relationship at a molecular level was confirmed on the newly developed molecular systems.

研究分野：有機化学

キーワード：自己組織化 生体分子インターフェース 球状錯体

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスの殻構造に代表される自然界における自己組織化では、数十から時に数千におよぶ多くの構成成分が、単一の三次元骨格を効率的に構築している。一方、人工系における自己集合の多くは、構成成分が十成分に満たず、満足のものではなかった。従って、得られた自己集合体が示す分子認識も、比較的小さな基質を「点」として認識する程度であり、生体系に見うけられる、「面」として基質表面と相互作用する大きなスケールでの分子認識を設計する発想すらなかった。我々の研究グループでは、多成分錯体の自己組織化構築と、他に類を見ない巨大構造の応用的利用をねらい、世界最多の 72 成分錯体の合成や (*Science* 2010, 328, 1144.), 錯体内外の選択的官能基化による分子認識 (*Science* 2006, 313, 1273.) を世界に先駆けて達成してきた。

例えば図 1 に示すように、折れ曲がった二座の配位子(L)と遷移金属イオン(M)との自己組織化により、 $M_{12}L_{24}$  組成の球状錯体が合成できる。この球状錯体は直径が数ナノメートルと非常に大きいにもかかわらず、その構造は一義的であり、すなわち、厳密に定まった単分子であるという特徴を持つ。錯体の外側または内側を向く官能基  $R_{out}$  または  $R_{in}$  を、あらかじめ配位子に導入しておけば、配位子の数に相当する 24 個だけの官能基を錯体に整然と化学修飾できる。

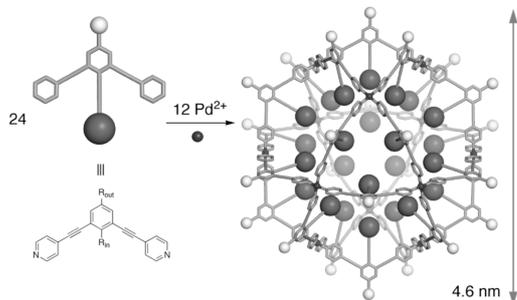


図 1.  $M_{12}L_{24}$  球状錯体の内面／表面の選択的かつ定量的な化学修飾の手法。

また、直径数ナノメートルという巨大な錯体分子の大きさが、生体高分子の大きさに匹敵することに着目し、錯体内部にタンパク質等の生体高分子を丸ごと閉じ込める検討を行った。その結果、本研究の開始直前に、一分子だけのユビキチンを丸ごと包接した錯体の構築を達成した (*Nature Commun.* 2012, 3, 1093.). この成果から、人工系の錯体分子と生体由来分子とを融合利用する着想に至った。錯体内面／表面に生体関連機能を持つ分子をクラスター化して並べれば、思い描く通りに設計できる生体模倣界面、すなわち「生体分子インターフェース」を構築できると考えた。このインターフェースを使えば、従来法では到達できなかった巨大分子システムを使う「面」を認識する、新しいタイプの分子認識を達成できると期待した。

## 2. 研究の目的

本研究では、数ナノメートルの球状錯体の内面／表面を生体分子で覆うことで、高度に構造制御された生体分子クラスターを合成し、その特異な相互作用の発現を探索した。独自に開発してきた、自己組織化球状錯体を基盤骨格としてもちい、選択的な官能基化法を鍵反応として使うことで、生体関連分子を錯体表面に整然と、かつ高密度に集積した錯体を合成した。この分子設計した生体模倣クラスターを自在に使い、独特な構造に由来する特異な分子認識を達成することをめざした。

## 3. 研究の方法

生体分子クラスターを構築する基盤となる自己組織化球状錯体は、多数の構成成分が配位結合という弱い相互作用を通じて構築されている。生体分子を化学修飾した、より複雑な分子システムを自在に扱うためには、自己組織化の過程に対する基礎的な理解が欠かせない。本研究の開始時には、自己組織化はタイムスケールが異なる三段階の過程を経て進行し、最終的に、一分子内に数十もの配位結合が集積される共同効果によって、生成物は共有結合で連結された分子にも匹敵する安定性を示すことが実験的にわかっていた (*J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 6064.). この知見をもとに、自己組織化の途中過程で生じる中間体を実験的に構造決定し、また、分子動力学を活用した理論計算による予測を併用することで、構造に基づく詳細な自己組織化の経路の解明に取り組んだ。

次に、球状錯体の内面／表面の化学修飾を探索した。共有結合または非共有結合をもちいた新しい化学修飾の手法を探索し、構造や機能を損なうことなくねらった官能基を導入する合成法を確立した。官能基によっては自己組織化が阻害される場合もあったが、分子構造に立ち返って問題解決を図り、多段階での自己組織化合成法の開発を行った。得られた生成物は、さまざまな最先端の構造解析法を適用して解析し、設計した通りの分子が得られたことを確認した。その上で、官能基に由来する独自の機能を明らかにし、構造と機能との分子レベルでの明瞭な相関を活用し、互いにフィードバックさせながら研究を展開した。

## 4. 研究成果

折れ曲がった二座の配位子(L)と平面四配位性の遷移金属イオン(M)とが、配位結合の手を余すことなく連結し、対称性の高い構造の分子が熱力学的な生成物として生じることを仮定すると、 $n = 6, 12, 24, 30, 60$  だけに限定された  $M_nL_{2n}$  組成の球状錯体が得られると予測される。これらの球状錯体は、配位子を辺、金属イオンを頂点とみなすと、正多面体または半正多面体に該当する。実際に、配位子の折れ曲がり角度を生成物の多面体

構造に合わせて分子設計することで、 $M_6L_{12}$  錯体、 $M_{12}L_{24}$  錯体、 $M_{24}L_{48}$  錯体の自己組織化合成に成功し、生成物の詳細な構造決定とともに報告してきている。

本研究では、この自己組織化の経路を明らかにするために、配位子の折れ曲がり角度を微調整し、中間体の構造を NMR と質量分析で解析できるように設計した。反応条件の最適化を行うことで、出発物質を混合した後に、 $M_8L_{16}$  錯体と  $M_9L_{18}$  錯体を段階的に経て、最終的に  $M_{12}L_{24}$  錯体へと至ることを観測できた (図 2)。これらの中間体は、予測された  $n$  の値をとらない速度論的な生成物であるが、配位子の分子設計と結晶化条件の最適化を通じて、放射光 X 線をもちいた単結晶構造解析に成功し、詳細な立体構造を明確に決定することができた (*Chem. Commun.* 2015, 51, 2540). 分子動力学をもちいた理論計算を実施し、自己組織化反応の経路を予測したところ、多成分の集合過程の計算は簡単なものではなかったが、 $M_{12}L_{24}$  錯体の生成を予測することに成功した。さらに、実験的に生成を確認できた  $M_8L_{16}$ ,  $M_9L_{18}$  錯体、および、実験的には生成を捕捉できなかった  $M_6L_{12}$  錯体が中間体として生じることを予測できた (*ACS Nano* 2014, 8, 1290).

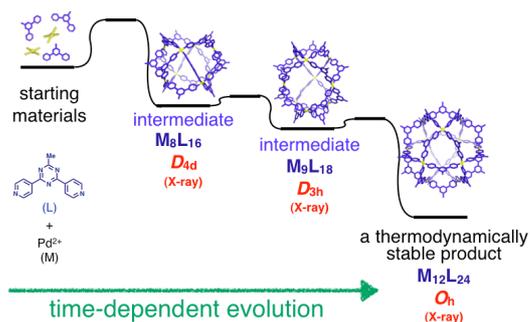


図 2. 多段階を経て自己組織化する  $M_{12}L_{24}$  球状錯体。

球状錯体形成における配位子の設計の重要性を示すもう一例として、大きさが異なる二種類の二座配位子を混合する検討も実施した。折れ曲がり角度は同じであるが、スペーサーを導入することで、二カ所の配位部位の距離が 2 倍以上異なる配位子を分子設計した。これらの配位子  $L^1$  と  $L^2$  とを混合してパラジウム(II)イオンとの錯体合成を検討したところ、二種類の配位子が同じ数だけ混合された  $M_{12}L_{24}$  錯体、すなわち、 $M_{12}(L^1)_{12}(L^2)_{12}$  錯体が得られた。放射光 X 線をもちいた単結晶構造解析に成功し、配位子は乱雑に混ざるわけではなく、定まった位置に配置され、(擬)切頂四面体型の錯体を得られたことがわかった (図 3, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 13510). これまでに、同等の大きさの二種類の配位子を使うと、配位子の位置は定まらずに乱雑に混合される例を報告しているが、配位子の大きさを設計すれば、特定の構造をもつ錯体をつくり出せることを見いだした。

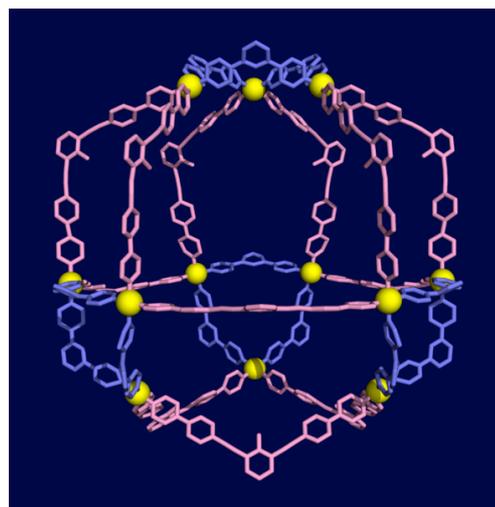


図 3. 大小二種類の配位子 (ピンク色と青色) を混合して得られた  $M_{12}L_{24}$  球状錯体。

これまでに蓄積されてきた自己組織化の知見を活用し、 $M_{12}L_{24}$  錯体の内面/表面の化学構造の変換を探索した。新しい試みとして、配位子が錯体骨格を形成する二箇所の配位部位に加え、錯体の内面または表面に追加の配位部位を導入した。この三座配位子とパラジウム(II)イオンとを混合したところ、 $M_{12}L_{24}$  錯体を得られ、追加の配位部位は錯体骨格形成を妨げないことがわかった。さらに、銀(I)イオンを追加すると、追加した配位部位が銀(I)イオンを認識し、錯体内または錯体表面に異種遷移金属イオンを化学修飾できることを見いだした (*J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 12497).

共有結合を使った化学修飾の例として、生体分子を連結し、その独自の機能発現を探索した。さまざまな構造の糖鎖やペプチド鎖を錯体の内面または表面に選択的に化学修飾した。糖鎖を錯体内面に化学修飾した例としては、錯体内面のグルコースのクラスターがテンプレートとして作用し、 $M_{12}L_{24}$  錯体内部のみで酸化チタンの重合反応が進行することを見いだした (*J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 6786). 錯体骨格の精密構造が糖鎖インターフェースを介して無機ナノ粒子に転写され、構造にばらつきがほとんどない単分散な酸化チタンナノ粒子が調製できた。さらに、パラジウム(II)イオンを除いた後に焼成することによって錯体骨格を除去、酸化チタンナノ粒子の粉体を単離することに成功した。

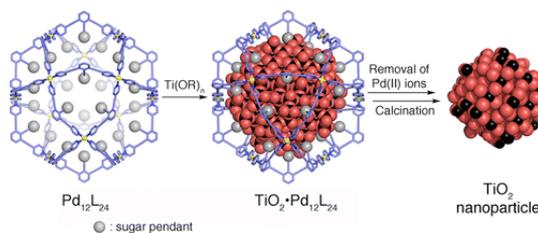


図 4. 糖鎖インターフェースをテンプレートとして調製した酸化チタンナノ粒子。

糖鎖を錯体表面に配置した例として、生体由来のガングリオシド GM1 の糖鎖部位の連結を検討した。GM1 は、アルツハイマー病の原因物質とされる  $\alpha\beta$  タンパク質を認識し、タンパク質の凝集による線維形成を制御することが知られている。生体由来の糖鎖であるために希少であり、配位子への連結にあたっては、構造を損なわない穏和な条件で進行する効率的な反応を達成した。GM1 糖鎖がパラジウム(II)イオンを捕捉することによって、 $M_{12}L_{24}$  球状錯体の形成が阻害されたが、糖鎖と効率的に相互作用するアルカリ土類金属を混合して錯体を調製し、次に、透析によって錯体を精製することで GM1 修飾錯体の合成を達成した (図 4)。さらに、 $\alpha\beta$  タンパク質との相互作用を NMR により観測し、GM1 糖鎖インターフェースが  $\alpha\beta$  の N 末端を選択的に認識することを見いだした (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, in press.)。

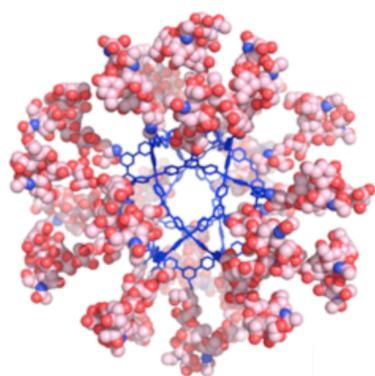


図 4. 表面に GM1 糖鎖インターフェースを有する  $M_{12}L_{24}$  球状錯体の構造。

ペプチド鎖を表面に化学修飾した例として、正電荷を帯びたペプチド鎖を化学修飾し、ヒストン 8 量体の大きさと電荷密度を模倣した  $M_{12}L_{24}$  錯体を合成した。Arg-Lys-Leu-Pro-Asp-Ala の配列をもつ +1 価のペプチド鎖を 24 個、錯体表面に修飾し、錯体骨格の電荷と合わせて +48 価の電荷をもち、直径 8.4 nm の球状錯体を合成した。環状のプラスミド DNA (pBR322) に対して、この球状錯体を加え、その形状を原子間力顕微鏡 (AFM) によって観察した (図 5)。加える錯体分子の量が少なく、DNA 分子の全負電荷 ( $Z_{DNA}$ ) に対して、球状錯体の全正電荷 ( $Z_{sphere}$ ) の比率が  $Z_{sphere}/Z_{DNA} = 0.87$  のとき、DNA に球状錯体が部分的に載り、その場所で DNA が曲がっている beads-on-a-string 構造が観測された。この電荷比を  $Z_{sphere}/Z_{DNA} = 1.7$  まで増やすと、複数の DNA 分子が凝集して、5 nm の均一な高さの構造を形成することがわかった。さらに、 $Z_{sphere}/Z_{DNA} = 8.7$  まで増やした場合には、高さ 16 nm、最大直径で 40 nm 程度のコンパクトな球状構造体へと凝集する様子が明らかになった。この凝集の様子は動的光散乱 (DLS) によっても確認できた。

既往の DNA を凝集する物質と比較すると、この正電荷を帯びたペプチド鎖インターフェースは最も効率的に DNA 凝集を促進できる物質の 1 つであった。

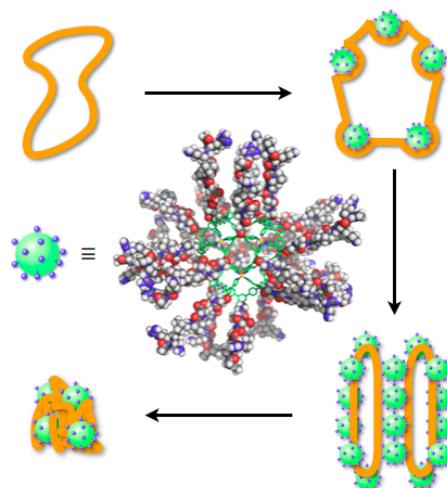


図 5. ヒストン 8 量体の構造を模倣してペプチド鎖を精密配置した球状錯体を持ち、環状 DNA を 3 段階にわたってからめとった。

#### 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 9 件)

- ① "Self-Assembled Spherical Complex Displaying a Gangliosidic Glycan Cluster Capable of Interacting with Amyloidogenic Proteins "  
S. Sato, Y. Yoshimasa, D. Fujita, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, K. Kato, and M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, in press. [10.1002/anie.201501981R1] 査読有
- ② "Self-Assembled,  $\pi$ -Stacked Complex as a Finely-Tunable Magnetic Aligner for Biomolecular NMR Applications"  
S. Sato, R. Takeuchi, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, Y. Yamaguchi, K. Kato, and M. Fujita, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2540-2543. [10.1039/C4CC09354B] 査読有
- ③ "Geometrically Restricted Intermediates in the Self-Assembly of an  $M_{12}L_{24}$  Cuboctahedral Complex"  
D. Fujita, H. Yokoyama, Y. Ueda, S. Sato, and M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 155-158. [10.1002/anie.201409216] 査読有
- ④ "An  $M_{12}(L^1)_{12}(L^2)_{12}$  Cantellated Tetrahedron: A Case Study for Mixed-Ligand Self-Assembly"  
Q.-F. Sun, S. Sato, and M. Fujita,

*Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13510-13513. [10.1002/anie.201408652] 査読有

- ⑤ "Emergent Ion-Gated Binding of Cationic Host-Guest Complexes within Cationic  $M_{12}L_{24}$  Molecular Flasks"  
C. J. Bruns, D. Fujita, M. Hoshino, S. Sato, J. F. Stoddart, and M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12027-12034. [10.1021/ja505296e] 査読有
- ⑥ "Stepwise DNA Condensation by a Histone-mimic Peptide-coated  $M_{12}L_{24}$  Spherical Complex"  
T. Kikuchi, S. Sato, D. Fujita, and M. Fujita, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3257-3260. [10.1039/C4SC00656A] 査読有
- ⑦ "Coordination-Directed Self-Assembly of  $M_{12}L_{24}$  Nanocage: Effects of Kinetic Trapping on the Assembly Process"  
M. Yoneya, S. Tsuzuki, T. Yamaguchi, S. Sato, and M. Fujita, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1290-1296. [10.1021/nn404595j] 査読有
- ⑧ "Size-, Mass-, and Density-Controlled Preparation of  $TiO_2$  Nanoparticles in a Spherical Coordination Template"  
T. Ichijo, S. Sato, and M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6786-6789. [10.1021/ja4019995] 査読有
- ⑨ " $M_{12}L_{24}$  Spheres with Endo and Exo Coordination Sites: Scaffolds for Non-Covalent Functionalization"  
K. Harris, Q.-F. Sun, S. Sato, and M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12497-12499. [10.1021/ja4043609] 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① "磁場配向性錯体の自己組織化合成と NMR 解析への展開"  
佐藤宗太  
分子研研究会「金属イオンをもちいた超構造体の構築と機能発現 -配位化学における境界領域研究の現状と展望-」, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(岡崎市), 15, Mar. 2015.
- ② "巨大な中空球状錯体の自己組織化合成"  
佐藤宗太  
錯体化学若手の会北海道・東北支部第 6 回勉強会, 東北大学(仙台市), 15, Nov. 2014.
- ③ "「巨大な中空球状錯体を骨格として構築した生体分子インターフェースの開発」"

佐藤宗太

錯体化学会第 64 回討論会, 中央大学(東京都), 20, Sep. 2014.

- ④ "Synthesis and Biological Applications of Self-Assembled Huge Molecules"  
S. Sato  
Asian International Symposium (Inorganic Chemistry) - Emerging Science in Inorganic Porous Materials -, Nagoya University (Nagoya City), 29, Mar. 2014.
- ⑤ "Development of dynamical ordering of artificial molecules by mimicking biomolecular systems"  
S. Sato  
Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions The 2nd International Symposium, Campus Plaza Kyoto (Kyoto Prefecture), 11, Jan. 2014.
- ⑥ "生体分子系を模倣した動的秩序をもつ人工分子の開発"  
佐藤宗太  
生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現 第 1 回公開シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター(岡崎市), 2, Oct. 2013.
- ⑦ "多成分からなる巨大球状錯体の動的秩序化"  
佐藤宗太  
国際高等研研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能ネットワークとダイナミクスの解明」第 2 回研究会, 国際高等研究所(木津川市), 9, Aug. 2013.
- ⑧ "高度な最先端分析を武器にした精密分子合成の展開"  
佐藤宗太  
第 2 回 JAIAN ミーティング, 微生物化学研究所(東京都), 31, May. 2013.
- ⑨ "タンパク質オーダーの分子サイズを持つ巨大カプセル状錯体 ~精密な生体分子クラスターの機能をめざして~"  
佐藤宗太  
国際高等研研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能ネットワークとダイナミクスの解明」第 1 回研究会, 国際高等研究所(木津川市), 21, Apr. 2013.
- ⑩ "錯体ナノ空間の生体分子を使った自在修飾"  
佐藤宗太, 藤田 誠  
日本化学会第 93 春季年会 特別企画「有限・無限ナノ空間から創出される物質と機能」, 立命館大学(草津市), 22, Mar. 2013.

- ⑪ "タンパク質と同等の分子サイズを持つ巨大カプセル状錯体の合成 ~生体分子修飾による機能化をめざして~"  
佐藤宗太  
中性子連携研究会, 京都大学東京オフィス (東京都), 13, Mar. 2013.
- ⑫ "生体分子を化学修飾した巨大カプセル分子の合成と精密構造決定への挑戦"  
佐藤宗太  
理研シンポジウム「第13回 分析・解析技術と化学の最先端」, 理化学研究所 (和光市), 12, Dec. 2012.
- ⑬ "磁場配向性を示す錯体分子の合成とNMR解析への応用"  
佐藤宗太  
京都大学大学院工学研究科セミナー, 京都大学 (京都府), 1, Nov. 2012.
- ⑭ "階層的自己組織化による(PdO)<sub>n</sub> およびPd<sub>n</sub> クラスタの中空シリカナノ粒子内合成"  
佐藤宗太, 藤田 誠  
第61回高分子討論会, 名古屋工業大学 (名古屋市), 21, Sep. 2012.

[図書] (計2件)

- ① "Metal-organic Caged Assemblies"  
S. Sato and M. Fujita  
Coordination Chemistry in Protein Cages: Principles, Design, and Applications, 2013, Chap. 14, p.353-374, WILEY.
- ② "MEM によるターゲット構造可視化法の開発:タンパク質を封じ込めた人工カプセルの合成と構造決定"  
水野伸宏 藤田大士 佐藤宗太 熊坂崇 藤田 誠 高田昌樹  
日本結晶学会誌 (最近の研究から欄), 2013, 55 巻, 211-217 頁.

[その他]

ホームページ等

<http://www.jst.go.jp/erato/isobe/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 宗太 (SATO, Sota)

東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・准教授

研究者番号: 40401129