

## 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

多孔性蛋白質結晶のナノ空間化学

## 2. 氏名

上野隆史

## 3. 研究のねらい

蛋白質結晶は蛋白質分子の自己集積によって形成され、全体積の 30-70%が水分子によって満たされている。従って、蛋白質結晶内の細孔は、反応性の高い様々なアミノ酸残基が規則正しく配置した特異な空間といえる。このような分子環境を現在の物質合成化学によって構築する事は困難であるにもかかわらず、蛋白質結晶を固体材料として機能化する試みは未だに行われていない。本研究では、蛋白質結晶を多孔性材料としたビルドアップ型の機能分子作成を目指し、(1) X線結晶構造解析による金属イオン集積過程解明を軸に、(2)様々な形状や組成を持つ無機材料の合成や、(3)蛋白質と協同的に機能する細孔内部の分子設計の達成により、「蛋白質結晶化学」の確立を目指す。

## 4. 研究成果

## 4-1. 反応観察—フェリチン結晶による金属イオン集積過程の可視化と触媒設計

蛋白質表面への金属イオン集積反応は、金属酵素の活性中心合成、生命を維持する為に必要不可欠な骨や歯、貝殻といった生体無機材料や非天然の金属材料の作成にも利用される重要な反応である。しかし、その反応過程を原子レベルで観測する事は不可能であった。そこで、蛋白質表面の反応をかご型蛋白質フェリチンの内部に再現し、単結晶X線構造解析によるPdイオン集積過程のスナップショット解析を試みた。異なる量のPd<sup>II</sup>イオンを含むフェリチン複合体の結晶を作成し(図1a)、金属イオン集積

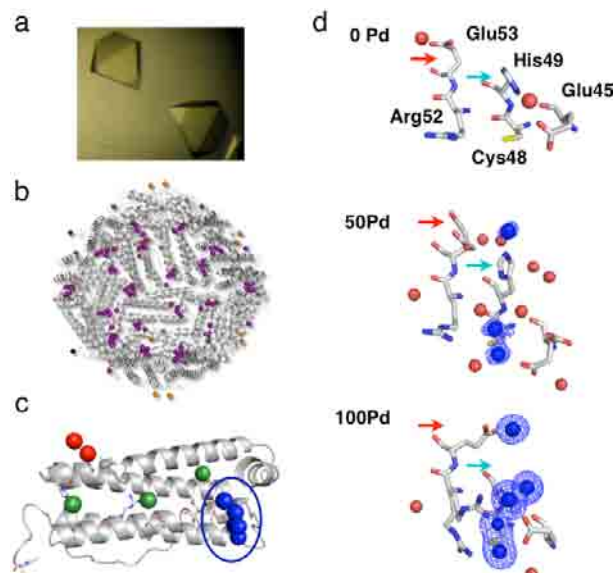


図 1. Pdフェリチン複合体結晶(a)とその構造(c-d)。K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>と反応させた後の構造解析ではフェリチン内部表面にPdイオンが分布している(b)。単量体構造と(c)、0, 50Pd, 100Pdの金属集積サイト(青囲い)の比較(d)。

に連動するアミノ酸のコンホメーションや金属イオンの配位構造の変化を追跡した。その結果、配位残基のHis49 やGlu53 はその構造変化によってPd<sup>II</sup>イオンの結合を安定化させるばかりではなく、金属集積サイトへ結合するPd原子数の増加を促していることがわかった。これらの構造変化は、蛋白質結晶内のナノ空間利用によって初めて観測可能となり、フェリチン内での金属微粒子合成や金属錯体触媒の分子設計へとつながった。例えば、フェリチン内部表面へのPdイオンとAuイオンの配位集積構造の差を結晶構造解析により見出し、アロイ型とコアシェル型Pd/Auバイメタル微粒子の作り分けによって、フェリチン内オレフィン水素化反応の活性向上に成功した。さらに、[Pd(allyl)Cl]<sub>2</sub>の多核配位構造を、フェリチン内部表面のアミノ酸置換により2核3中心クラスターから3核クラスターへと変換し、鈴木-宮浦カップリング反応の制御につなげた。また、Pd(allyl)錯体と類似の配位構造もつRh(nbd)錯体をフェリチン内部の孤立空間表面に固定化すれば、溶液中に比べ分子量分布の狭いポリマーの重合が進む。以上のように、結晶構造の決定によって、フェリチン空間内の触媒反応を設計できるばかりではなく、巨大蛋白質の内部はバルクとは異なる特異な反応制御を可能とする分子空間であることがわかってきた。

#### 4-2. 材料作成—リゾチーム結晶による金属微粒子材料の磁性制御

蛋白質結晶の細孔は配位性のアミノ酸残基が規則正しく並び、特異な金属イオン集積空間を形成する。実際、Rh(III)イオンをリゾチーム結晶に反応させると図 2a に示すように、細孔へ多くの Rh(III)イオン(蛋白質分子当たり 10 箇所)の結合が確認される。特に、安定な高分解能結晶が得られるリゾチーム結晶の利点を生かし、Rh(III)の結合を詳細に追跡したところ、細孔内の水素結合

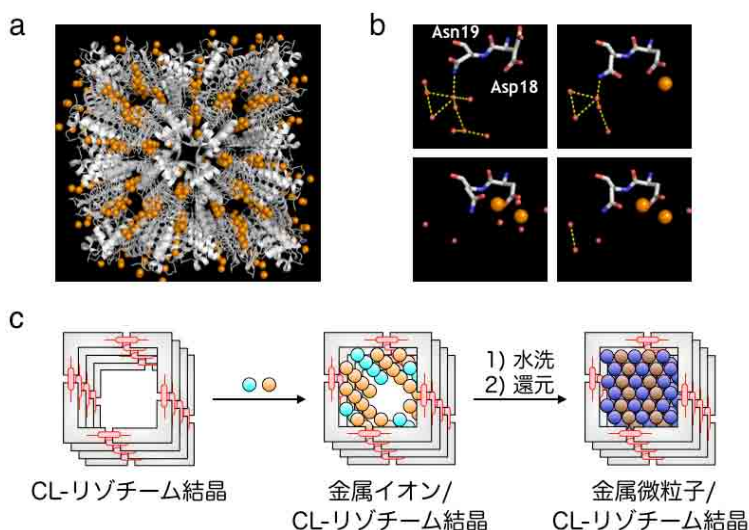


図 2. リゾチーム分子(a)と正方晶(b)、斜方晶(c)の細孔構造細孔と微粒子の合成法

ネットワークにより固定化されていたアミノ酸側鎖のコンホメーションは、Rh(III)イオンの増加に伴う水素結合消失により、多核 Rh(III)構造を安定化する配置へと変化する事が明らかとなった(図 2b)。さらに、同一の蛋白質からなる結晶でも結晶系の違いにより細孔の性質が異なれば、金属イオンの集積にも影響し、形成される金属微粒子の物性も変化すると思われる。そこで、結晶条件の違いにより、リゾチームの正方晶と斜方晶を作り分けし、CoPt 合金の作成を試みた。蛋白質結晶を架橋化(Cross Link, CL)により安定化後、Co イオンと Pt イオンを含む溶液に含浸、還元してリゾチーム結晶内に CoPt 微粒子を作成した(図 2c)。得られた複合体の磁性を測定したところ、正方晶を用いて作成した CoPt 微粒子に比べ、斜方晶を用いた微粒子は、高い保磁力を示す。正方晶

と斜方晶の細孔はその形状やサイズ、表面を構成するアミノ酸残基が全く異なり、TEM 観察からも、結晶系の違いにより、微粒子サイズに差が生じることが明らかとなった。また、バッファーに溶解したリゾチーム存在下、CoPt 微粒子を調製しても、このような保磁力は観測されない。つまり、この磁性変化は、CoPt 微粒子形成へのリゾチーム結晶の特異な空間効果により誘起されたものであり、蛋白質結晶細孔を用いた新しい固体材料作成法の可能性を示唆している。

#### 4-3. 機能集積—ミオグロビン結晶への分子集積と長寿命光励起多段階電子伝達システムの構築

蛋白質結晶へ機能分子を集積できれば、バルクでは実現できない特異な反応や物性挙動の発現が期待できる。そこで、ミオグロビン結晶の持つ直径 40 Å の細孔空間への機能分子集積を試みた。まず、結晶化に必要な蛋白質—蛋白質相互作用に関与せず、細孔表面に露出した残基をシステインに置換後、比較的大きなサイズ(13-17 Å)を有する親水性、疎水性蛍光分子や金属錯体のマレイミド誘導体を固定化することによって、細孔空間に望みの分子を集積化することに成功した。さらに溶液、結晶の可視スペクトルの比較から、溶液中では見られない機能分子同士の会合が見られ、蛋白質結晶細孔の特異な空間が、機能分子の集積に寄与している事を明らかとした(図 3)。さらに、蛋白質

結晶を用いた異種分子機能の統合による、電子伝達システムの構築を試みた。電子伝達に関わる反応を効率よく駆動する為には、電荷分離状態の安定化が重要であり、天然では蛋白質の集積化により、異なるコファクターを適切な位置に固定化し円滑な反応を実現している。本研究では、蛋白質結晶を蛋白質の集積体と考え、内

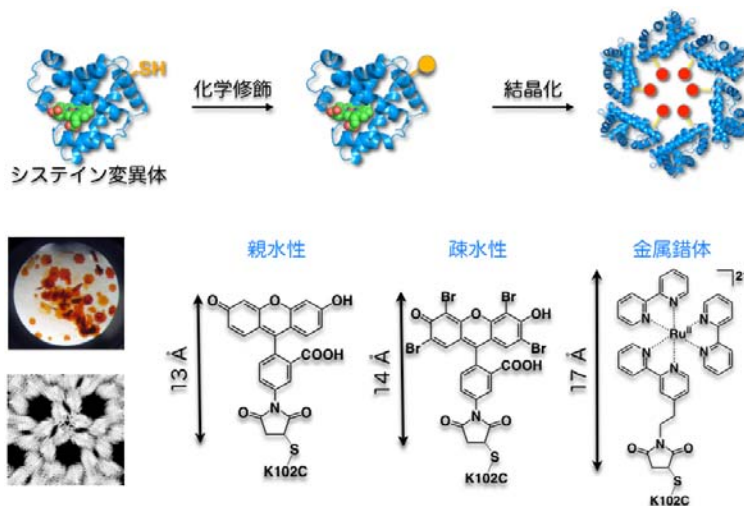


図3. ミオグロビン変異体への化学修飾とその結晶化による分子

部に形成される空間へ異種機能分子を精密に固定化することによって長寿命化を達成した。まず、光受容体としてミオグロビンのヘムを亜鉛ヘムへ置換し、結晶細孔表面へ電子受容体となる Ru3O+クラスターを固定化する。さらに、メディエーターであるメチルビオロゲン結晶細孔空間に添加し光誘起電子伝達場を構築した。その結果、電荷分離状態である Ru3O0 の寿命は蛋白質結晶を用いないときに比べ約 10,000 倍長寿命化する事が明らかとなった(図 4)。従来の多孔性材料では細孔材料中の望みの場所に複数種の機能分子を固定化する事は困難であり、蛋白質結晶細孔を用いる事によって精密な固定化による機能最適化を実現した。

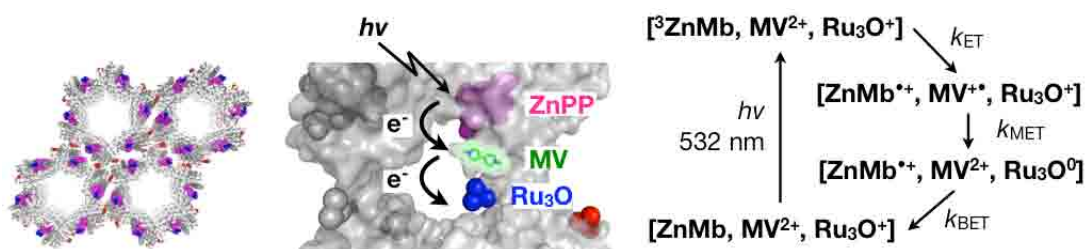


図4. X線結晶構造解析により決定されたミオグロビン結晶細孔と亜鉛置換ヘム、Ru<sub>3</sub>Oの結合部位

ここに示した蛋白質結晶を用いる新しい多孔性材料機能化法は、アミノ酸置換等の分子生物学的的手法や自動結晶化法等の構造生物学的的手法との組み合わせにより、さらなる拡張が可能である。特に、プロテインデータバンク(PDB)には6万件以上の蛋白質結晶構造が登録されており、望みの細孔や機能を持つ材料を既存の蛋白質結晶から見つける事もできる。従って、本研究で得られた基礎的知見は、環境低負荷型の反応分子デバイスや細胞機能制御等、次世代の分子制御法へ発展していくものと確信する。

## 5. 自己評価

本研究のポイントは、これまで化学材料として認識されていなかった蛋白質結晶を如何に分子テンプレートとして利用し、機能化手法を確立できるかの点にある。蛋白質結晶学と化学という全く異なる分野をどう結びつけるかが重要であり、さきがけのテーマにふさわしいチャレンジとして、設定した目的を十分に達成したと考えている。まず、金属イオンの集積追跡では、最初の挑戦であるフェリチン結晶を用いた際に問題となった分解能の低さを、リゾチームの高分解能結晶を用いる事により解決し、アミノ酸残基への金属イオン結合に必要なペプチドコンホメーション変化と水素結合ネットワークの共同効果を解明した。さらに、研究提案の際には蛋白質結晶を用いた金属微粒子やワイヤーの作り分けを反応条件によりコントロールする予定であったが、非晶、結晶の違いばかりではなく、結晶系の違いのみで、調製される金属微粒子の物性に大きな違いを付与する事に成功し、予想を超えた成果を得た。さらに、ミオグロビン結晶へ異種機能分子を集積し、電子伝達システムの構築に成功したばかりでなく、電荷分離状態の安定化を達成したのは、今後の蛋白質結晶を用いた分子デバイス設計に重要な指針を与える結果である。一方、フェリチンの結晶構造解析から触媒反応の設計には成功したが、更なる選択性や活性等の精密制御には至らなかった。特に、固体触媒としての機能の追求を今後も進める必要がある。今回の研究では、金属イオンソーキングや架橋化のような、蛋白質結晶学では古くから知られている技術を利用する事によって蛋白質結晶空間の持つ潜在的な化学的価値を見出すことができた。これらの研究によって、新たな分子集積化学のフィールドを開拓する第一歩を踏み出したと言える。

## 6. 研究総括の見解

蛋白質結晶を多孔性材料として用い、(1) X線結晶構造解析による金属イオン集積過程解明、(2) 様々な形状や組成を持つ無機材料の合成、(3) 蛋白質と協同的に機能する細孔内部の分子設計の達成、等を通じて「蛋白質結晶化学」の確立を目指した研究である。これまで化学材料として十分に認識されていなかった蛋白質結晶を分子テンプレートとして化学的に利用することに成功しており、さきがけのテーマにふさわしい研究であった。今後のさらなる展開を期待する。

## 7. 研究成果リスト

## (1) 論文(原著論文)発表

1. T. Ueno, S. Abe, T. Koshiyama, T. Ohki, T. Hikage, and Y. Watanabe, "Metal Ion Accumulation Induced by Hydrogen Bonds on Protein Surfaces: Mechanistic Insights into the Initiation Steps of Biomineralization Obtained using Porous Lysozyme Crystals Containing Rh(III) Ions"  
*Chem. Eur. J.* **16**, 2730–2740 (2010) (Highlighted paper)
2. T. Koshiyama, N. Kawaba, T. Hikage, M. Shirai, Y. Miura, C.-Y. Huang, K. Tanaka, Y. Watanabe, and T. Ueno, "Modification of Porous Protein Crystals in Development of Bio-hybrid Materials"  
*Bioconjugate Chem.* **21**, 264–269 (2010).
3. S. Abe, K. Hirata, T. Ueno, K. Morino, N. Shimizu, M. Yamamoto, M. Takata, Eiji Yashima, and Y. Watanabe, "Polymerization of Phenylacetylene by Rhodium Complexes within a Discrete Space of apo-Ferritin"  
*J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6958–6960 (2009) (Highlighted in *Nature Chemistry*)
4. T. Ueno, M. Abe, K. Hirata, S. Abe, M. Suzuki, N. Shimizu, M. Yamamoto, M. Takata, Y. Watanabe, "Process of Accumulation of Metal Ions on the Interior Surface of apo-Ferritin: Crystal Structures of a Series of apo-Ferritins Containing Variable Quantities of Pd(II) Ions"  
*J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5094–5100 (2009) (日経産業新聞 他四誌掲載)
5. S. Abe, J. Niemeyer, M. Abe, Y. Takezawa, T. Ueno, T. Hikage, G. Erker, and Y. Watanabe, "Control of the Coordination Structure of Organometallic Palladium Complexes in an apo-Ferritin Cage"  
*J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10512–10514 (2008).

## (2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

1. 発明者: 上野隆史、安部聡、北川進  
発明の名称: タンパク質結晶を用いた複合材料及びその製造方法  
出願人: 国立大学法人京都大学  
出願日: 2010年1月5日
2. 発明者: 小松さと子、福田裕章、渡辺芳人、上野隆史、安部聡  
発明の名称: 金属ナノ粒分散液を製造する方法  
出願人: 財団法人 名古屋産業科学研究所, 株式会社デンソー  
出願日: 2007年7月13日

## (3) 受賞 (4 件)

1. 2008 年 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
2. 2007 年 錯体化学会研究奨励賞
3. 2007 年 第 53 回高分子研究発表会 ヤングサイエンティスト講演賞
4. 2007 年 第 8 回「酵素応用シンポジウム」研究奨励賞

## (4) 総説

1. Satoshi Abe, Takafumi Ueno, and Yoshihito Watanabe, “Artificial Metalloproteins Exploring Vacant Space: Preparation Structures, and Functions”  
*Top. Organomet. Chem.* 25, 25–44 (2009)
2. T. Ueno, “Design of Protein Scaffolds for Chemical Reactions Catalyzed by Metal Complexes and Nanoparticles”  
*Bull. Jpn. Soc. Coord. Chem.* 51, 20–30 (2008) (Award account, Japanese)
3. Y. Watanabe, H. Nakajima, and T. Ueno, “Reactivities of Oxo and Peroxo Intermediates Studied by Hemoprotein Mutants”  
*Acc. Chem. Res.* 40, 554–562 (2007)
4. T. Ueno, S. Abe, N. Yokoi, and Y. Watanabe, “Coordination Design of Artificial Metalloproteins Utilizing Protein Vacant Space”  
*Coord. Chem. Rev.* 251, 2717–2731(2007)
5. T. Ueno, N. Yokoi, S. Abe, and Y. Watanabe, “Crystal Structure Based Design of Functional Metal/Protein Hybrids”  
*J. Inorg. Biochem.* 101, 1667–1675(2007))

## (5) 著書

1. 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)、p72–79 (2009)
2. 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)、p176–188 (2009)
3. 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)、p301–311 (2009)
4. 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)、第 7 章 p276–288 (2008)
5. 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)、第 7 章 p62–69 (2008)

## (6) 招待講演

## 【国際】

1. T. Ueno, “BIOINORGANIC FUNCTIONS DESIGNED IN NANOCAGED PROTEIN ASSEMBLIES”, Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry, November 4–7, 2009, Mumbai, India.
2. T. Ueno, “Redesigning Protein Spaces for Coordination Chemistry”, 14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Jul. 30, 2009, Nagoya.
3. T. Ueno, “Re-designing protein cage architectures for coordination chemistry”, 2nd International Symposium for Young Organic Chemistry, Mar. 27, 2009, NIMS, Tsukuba.

4. T. Ueno, "Integration of Metal Complexes into Viral Component Protein Assemblies", The IUMRS International Conference in Asia 2008, Nov. 11, 2008, Nagoya.
5. T. Ueno, "Nano Metal Architecture using Protein Building Blocks", The 3rd Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-III), Oct. 30th–Nov. 3rd, 2006, Nanjing, China.

## 【国内】

1. 上野隆史「蛋白質複合体を基盤とするナノ触媒設計」、日本化学会第 89 回春季年会 ATP シンポジウム、平成 21 年 3 月 27 日(千葉)
2. T. Ueno, "ACCUMULATION OF METAL IONS IN A PROTEIN NANOCAGE", Third International Symposium on Chemistry of Coordination Space –ISCCS 2007–, Dec. 10, 2007 Awaji, Japan.
3. 上野隆史、「蛋白質複合体を利用した金属錯体活性化」、第 57 回錯体化学討論会 錯体化学会研究奨励賞受賞講演、平成 19 年 9 月 27 日(名古屋)
4. 上野隆史「蛋白質集積カプセルを利用した精密反応設計」、第 53 回高分子研究発表会 ヤングサイエンティスト講演、平成 19 年 7 月 20 日(神戸)
5. 上野隆史「蛋白質超分子・金属錯体触媒複合化による有機金属酵素の構築」、第 8 回酵素応用シンポジウム 受賞講演、平成 19 年 6 月 15 日(名古屋)

## (7) 依頼解説記事

## 【国際】

1. T. Ueno, Highlight "An Engineered Metalloprotein as a Functional and Structural Bioinorganic Model System"  
*Angew. Chem. Int. Ed.* in press
2. T. Ueno, Highlight "Functionalization of viral protein assemblies by self-assembly reactions"  
*J. Mater. Chem.* 18, 3741–3745 (2008).

## 【国内】

1. 上野隆史、「巨大蛋白質を舞台とする触媒化学」  
現代化学(東京化学同人)2月号、2010 年
2. 上野隆史、「メゾ制御を指向した蛋白質分子設計」  
生体機能関連化学部会ニュースレター、24-1、7、2009 年
3. 上野隆史、「巨大蛋白質複合体機能化への化学的アプローチ」  
生命化学研究レター、No. 29、2 月号、2009 年
4. 上野隆史、注目の論文「触媒コピーを細胞内で!？」  
月刊「化学」(化学同人)12 月号、2007 年

## (8) 掲載記事

1. *Chem. Eur. J.* 16 (2010), Highlighted article  
*Chem. Eur. J.* 16, 2730–2740 (2010)
2. *Nature Chemistry* 1, 251 (2009), Research Highlight  
*J. Am. Chem. Soc.* 131, 6958–6960 (2009)
3. 新聞報道(日経産業新聞、中日新聞、京都新聞、日刊工業新聞、化学工業新聞)  
*J. Am. Chem. Soc.* 131, 5094–5100 (2009)
4. *Materials. Views. February*, A1–A8, 2008, Featured topic  
*Small*, 4, 50–54, (2008)