

最近の研究動向

金属錯体を取り込んだタンパク質分子ケージの構造と機能

東京工業大学生命理工学院 安部 聡, Basudev Maity, 上野隆史

Satoshi ABE, Basudev MAITY and Takafumi UENO: Structure and Function of Protein Molecular Cages Incorporating Metal Complexes

近年、タンパク質と金属錯体を複合化したハイブリッド材料の構築が盛んに行われている。タンパク質の生体適合性や高い選択性と金属錯体の高い反応性といった両者の優れた点を組み合わせることにより、新規機能をもつタンパク質材料が創製されてきた。¹⁾例えば、高難度反応を触媒する金属錯体による人工金属酵素や金属錯体と組み合わせた人工金属タンパク質の細胞内輸送による細胞機能制御、抗がん剤活性を有する金属錯体との複合化による医療応用へ向けた研究など、幅広い応用研究が考えられる。このように、タンパク質を用いて金属錯体の機能を最大限に活かすためには、利用するタンパク質や金属錯体の選定だけでなく、X線結晶構造解析により、活性中心となる金属錯体の立体構造を決定し、機能の理解や設計にフィードバックすることが重要となる。

これまで筆者らは、タンパク質集合体と金属錯体との固定化による人工金属酵素の構築を進めてきた。タンパク質の自己組織化反応は、生体内の機能性材料や分子機械を構築する主要な合成手法である。nmから μm 領域まで多彩な化学機能を有するため、ナノバイオテクノロジーの基盤技術として広く研究されている。中でもタンパク質分子ケージは、単一な分子構造、閉じた内部構造、生体適合性を有しているため、内部空間に有機分子から酵素まで多彩な機能分子を取り込み、ドラッグデリバリー、ナノ材料合成テンプレート、触媒材料として広く展開され、化学、生物学の両分野での応用が期待されている。しかしながら、タンパク質モノマーへの金属錯体の固定化は報告されてきたものの、タンパク質集合体を用いた金属錯体の固定化やその構造の理解と制御は困難とされてきた。そこで、筆者らは、タンパク質分子ケージの中でも熱的・化学的に安定なフェリチンに着目した。フェリチンは、24個の単量体が自己集積して形成されるケージ状のタンパク質であり、幅広いpHや温度に対しても高い安定性を有している。われわれは、これまでもフェリチン内部のシステインやヒスチジン残基への配位を利用し、パラジウム(Pd)やロジウム(Rh)錯体を固定化した。これらのタンパク質複合体がカップ

リング反応や重合反応を触媒する人工金属酵素として機能することを示してきた。^{2),3)}また、イリジウム(Ir)とパラジウム錯体を1つのケージの内部に固定化することで、ケージ内でタンデム反応を触媒する人工酵素を合成してきた。⁴⁾さらに、これらの金属錯体・タンパク質複合体のX線結晶構造解析により、フェリチン内部空間で金属錯体が配位固定化されていることを明らかにし、結晶構造を基にした、アミノ酸置換により配位構造の制御も実現してきた。本稿では、金属錯体として、水素移動反応を触媒する IrCp^* ($\text{Cp}^* = \text{pentamethyl cyclopentadienyl}$)錯体を用い、アミノ酸置換による結合サイトの合理設計による人工金属酵素の構築とその構造解析、ならびに反応性を紹介する(図1)。⁵⁾

まず、フェリチン内部に IrCp^* 錯体を効率よく固定化する分子設計を行った。これまで筆者らが構築してきた、フェリチンを使った人工金属酵素では、ヒスチジン(His)残基が側鎖の向きを柔軟に変化させながらPd, Ir,

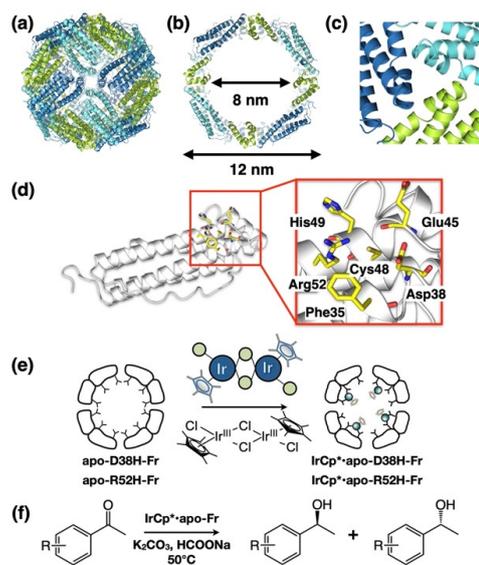


図1 フェリチン内部への金属錯体固定化設計。(Design of metal complex immobilization inside ferritin cage.) (a) フェリチン全体構造, (b) フェリチン内部構造, (c) 3量体構造, (d) フェリチン単量体構造, (e) IrCp^* -apo-Fr複合体の合成, (f) 不斉水素移動反応。

Rhなどの錯体に配位することがわかっている。さらに、IrCp*錯体は、野生型では、フェリチン内部のシステイン48(Cys48)に配位結合することが、X線結晶構造解析から明らかとなっている。そこで、Cys48周辺にHis残基を置換し、IrCp*錯体を複数のアミノ酸で配位させることにより固定化量を増加できると考え、アスパラギン酸38(Asp38)とアルギニン52(Arg52)をHisに置換した、apo-D38H-Frとapo-R52H-Frを設計した。これらのアポフェリチンを単離精製し、IrCp*錯体との複合化を行った。100当量の $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ 錯体を野生型または変異体フェリチンと50℃で混合し、透析とゲルろ過カラムにより単離精製した。タンパク質量と金属定量を行った結果、IrCp*apo-R52H-Frは、フェリチン1分子当たり、53個のIr錯体が内包され、野生型(37個)より固定化量が多いことが示された。一方で、apo-D38H-Frとの複合体では、野生型と固定化量はほとんど変わらなかった。

次に、これらの複合体のX線結晶構造解析を行った。まず、単離精製した複合体をカドミウム(Cd^{2+})イオンを用いハンギングドロップ法により結晶化を行った。SPRING-8でのX線結晶構造解析により、IrCp*apo-D38H-Fr、IrCp*apo-R52H-Frともに分解能1.25 Åの高分解能で構造を決定した(図2)。24量体のフェリチンは、対称性が高く単量体で構造解析される。つまり、フェリチン間や単量体間でIr錯体の配位構造が異なる場合、複数の結合サイトとして観察される。IrCp*apo-D38H-Frの結晶構造では、Cys48に結合したIrCp*が観測でき、変異導入したAsp38Hisと、もともと存在していたHis49がIrCp*の結合にかかわっていることがわかった。一方、IrCp*apo-R52H-Frでは、Cys48のほか、His49がIrCp*の固定化に関与している。Arg52Hisは、直接の結合は観測されなかったが、この変異体において、Irイオンに対応する電子密度が多く観察され、金属集積を促進していることが示唆された。

次に、合成したIrCp*apo-Fr複合体のアセトフェノン誘導体の不斉水素移動反応活性を評価した。IrCp*を固定化したフェリチン複合体は高い触媒活性を示し、特に、IrCp*apo-R52H-Frは、4-ニトロアセトフェノンの水素化反応では、88%の変換率を達成し、IrCp*apo-D38H-Frを用いた場合、4-アセチルビフェニルの触媒反応では、69%のエナンチオ選択性が得られた。いずれの基質を用いた場合でもIrCp*apo-R52H-Frでケージ当たり、高い収率を示した。また、Ir錯体当たりの活性を比較したところ、IrCp*apo-R52H-Fr複合体が最も高い活性を有する。したがって、変異体によりIrCp*錯体が活性化されたことを示している。同様の水中条件でIrCp*錯体のみを触媒として用いるとフェリチン内の反応と比較して活性が低いことが示された。このことは、タンパク質のケージ環境のナノサイズへの閉じ込め効果を意味している。

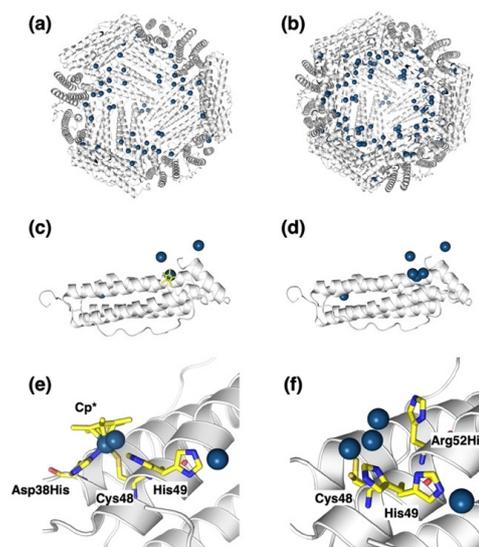


図2 IrCp*apo-D38H-Fr(a, c, e)とIrCp*apo-R52H-Fr(b, d, f)の結晶構造。(X-ray crystal structures of IrCp*apo-D38H-Fr and IrCp*apo-R52H-Fr.) 全体構造(a, b), モノマー構造(c, d), 結合サイト(e, f)。

また、アセトフェノンの置換基によってエナンチオ選択性が異なり、置換基の性質がケージ内部の触媒活性部位で基質の配向を決めていることが示唆された。さらに、変異体によってもエナンチオ選択性が異なるため、IrCp*錯体近傍の特異な変異が重要であること、置換基のサイズや疎水性が大きくなるとエナンチオ選択性が向上する傾向が示された。

最も活性が高いapo-R52H-Fr変異体を用いて、反応させるIrCp*錯体を25当量反応させた、25-IrCp*apo-R52H-Frは、Cys48のみにIrCp*が観察される。また、Ir錯体当たりの反応性は、IrCp*apo-R52H-Frと比べて高い値を示した。このことからCys48に結合しているIrCp*が主要な反応部位であると言える。

本研究では、タンパク質ケージ「フェリチン」に着目し、その内部に水中では反応性が低いIrCp*錯体を集積させ、ケージ内で高活性な触媒として駆動させることに成功した。さらに、ケージ内部表面のアミノ酸によって形成される不斉環境により、高いエナンチオ選択性を示す。今回用いたフェリチンは、pHや温度に対する安定性も高いことが知られている。したがって、今後、生体親和性触媒として体内の分子変換への利用や環境調和型の産業用触媒としてさらなる応用が期待される。

文献

- 1) J. Zhu, *et al.*: *Chem. Rev.* **121**, 13701 (2001).
- 2) S. Abe, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10512 (2008).
- 3) S. Abe, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6958 (2009).
- 4) B. Maity, *et al.*: *Chem. Commun.* **52**, 5463 (2016).
- 5) M. Taher, *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.* **61**, e202116623 (2022).

最近の研究動向 プロフィール

金属-有機構造体：MOFの示す液体構造と相転移



西口大智 Taichi NISHIGUCHI
京都大学大学院工学研究科
Graduate School of Engineering, Kyoto University
〒606-8224 京都市左京区吉田本町
Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501,
Japan
専門分野：錯体化学, 固体化学
現在の研究テーマ：CP/MOF液体・ガラス



堀毛悟史 Satoshi HORIKE
京都大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Kyoto University
〒606-8224 京都市左京区北白川追分町
Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-
8502, Japan
e-mail: horike.satoshi.3r@kyoto-u.ac.jp
専門分野：錯体化学, 固体化学
現在の研究テーマ：CP/MOF液体・ガラス

時分割X線回折を用いた高速酸素脱離反応の可視化



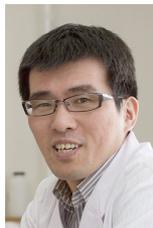
山本隆文 Takafumi YAMAMOTO
東京工業大学科学技術創成研究院フロンティア
材料
Laboratory for Materials and Structures, Institute of
Innovative Research, Tokyo Institute of Technology
〒226-8503 横浜市緑区長津田町4259
4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama,
Kanagawa 226-8503, Japan
e-mail: yama@mssl.titech.ac.jp
最終学歴：京都大学大学院工学研究科, 博士(工学)
専門分野：固体化学
現在の研究テーマ：新物質合成

Au_{1-x}Ag_xTe₂系鉱物の結晶構造・局所構造とAg固溶 による変調構造の形成



北原銀河 Ginga KITAHARA
熊本大学大学院先端科学研究部基礎科学部門
Division of Natural Science, Faculty of Advanced
Science and Technology, Kumamoto University
〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪2-39-1
2-39-1 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto
860-8555, Japan
e-mail: kitahara_sci@kumamoto-u.ac.jp
最終学歴：熊本大学大学院自然科学教育部理学
専攻地球環境科学コース 博士後期課程修了
専門分野：鉱物結晶学, 単結晶XRD, XAFS
現在の研究テーマ：地球物質・地球外物質に関
する原子レベル構造の解析

金属錯体を取り込んだタンパク質分子ケージの構造 と機能



安部 聡 Satoshi ABE
東京工業大学生命理工学院
School of Life Science and Technology, Tokyo
Institute of Technology
〒226-8501 神奈川県横浜市長津田町4259
4259 Nagatuta-cho, Midori-ku, Yokohama-shi,
Kanagawa 226-8501, Japan
e-mail: saabe@bio.titech.ac.jp

最終学歴：名古屋大学大学院理学研究科博士後
期課程修了 博士(理学)
専門分野：生体機能関連化学, タンパク質結晶
工学
現在の研究テーマ：細胞内タンパク質結晶の機
能創出



Basudev MAITY
東京工業大学生命理工学院
School of Life Science and Technology, Tokyo
Institute of Technology
〒226-8501 神奈川県横浜市長津田町4259
4259 Nagatuta-cho, Midori-ku, Yokohama-shi,
Kanagawa 226-8501, Japan
e-mail: basudev@bio.titech.ac.jp

最終学歴：インド科学大学 博士(理学)
専門分野：生物無機化学
現在の研究テーマ：超分子タンパク質の分子設
計と機能化



上野隆史 Takafumi UENO
東京工業大学生命理工学院
School of Life Science and Technology, Tokyo
Institute of Technology
〒226-8501 神奈川県横浜市長津田町4259
4259 Nagatuta-cho, Midori-ku, Yokohama-shi,
Kanagawa 226-8501, Japan
e-mail: tueno@bio.titech.ac.jp

最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士課程
修了 博士(理学)
専門分野：生体関連化学
現在の研究テーマ：生体超分子の分子設計と機
能化