

| | |
|-------------|---|
| Title | Studies on Functionalization of Porous Protein Crystals by Immobilizing Organometallic Complexes(Abstract_要旨) |
| Author(s) | Tabe, Hiroyasu |
| Citation | Kyoto University (京都大学) |
| Issue Date | 2015-05-25 |
| URL | http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k19182 |
| Right | 学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016-03-22に公開; 許諾条件により要旨は2015-06-19に公開 |
| Type | Thesis or Dissertation |
| Textversion | none |

| | | | |
|---|---|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (工 学) | 氏名 | 田部 博康 |
| 論文題目 | Studies on Functionalization of Porous Protein Crystals by Immobilizing Organometallic Complexes (有機金属錯体導入による多孔性蛋白質結晶の機能化に関する研究) | | |
| <p>(論文内容の要旨)</p> <p>本博士論文は、蛋白質結晶内部空間の構造設計に基づく金属錯体反応制御と機能化をテーマとしている。蛋白質を構成要素とする天然の超分子構造としてウイルス、ファイバー、ケージ等がみられ、その多くが金属コファクターと呼ばれる錯体分子を有し活性中心として用いられている。近年蛋白質と金属の配位結合を基にしたフレームワークや、超分子蛋白質への金属分子の融合が報告されているが、配位部位の設計、構造解析や機能制御には発展の余地がある。</p> <p>蛋白質分子は規則的に自己集合することで蛋白質結晶を構築する。既に多くの蛋白質の結晶化法が知られており、様々な蛋白質から容易に安定な集合体を得ることができる。蛋白質結晶は(1)結晶化溶媒で満たされた数十Å径の内部空間を有し、(2)この内部空間に規則的に配列するアミノ酸残基と外来分子との相互作用が期待でき、(3)内部空間の構造およびここでの反応はX線単結晶構造解析でÅオーダーで観察可能である。本研究では、有機金属錯体を蛋白質結晶内部表面のアミノ酸残基に配位結合によって固定し、その構造および反応性について検討を行った。実験においては、大量調製や材料利用における安定性の面から、架橋化リゾチーム結晶とカイコサイポウイルス多角体結晶を利用した。申請者はまず多孔性蛋白質結晶内部への金属錯体の固定化法を開発し、これに基づき複合体の合成と単結晶X線構造解析を進めた。その結果、新しい固体触媒や生理活性ガス放出機能を持つ新規固体材料を創出した。</p> <p>序論では、生物が機能性複合体として利用している超分子蛋白質-金属複合体の特徴である蛋白質内部空間への金属錯体配位と集積について、近年詳細な構造が明らかとなった天然の蛋白質複合体を例に挙げて記述した。続いて結晶状の蛋白質集合体の種類及び特長について述べた。1990年代より報告されている酵素結晶を用いた固体触媒設計、蛋白質結晶と金属分子の複合体作成を例に、蛋白質結晶への金属錯体配位および機能性材料としての可能性を提示した。</p> <p>第一章では、蛋白質結晶への有機金属錯体固定化とその触媒機能について評価を行った。大量調製が可能であり、結晶化条件により正方晶、斜方晶の結晶が調製可能であるリゾチーム(HEWL)結晶をテンプレートとして利用した。X線単結晶構造解析により、正方晶、斜方晶HEWL結晶内部表面に位置するHis残基へのルテニウムベンゼン錯体の配位を確認した。両結晶を架橋安定化処理し、固体触媒としての利用を試みた。ギ酸存在下でアセトフェノン誘導体の水素移動型還元反応を行ったところ、最高53%の収率で触媒反応が進行した。この値はバッファーに溶解したHEWL-ルテニウムベンゼン錯体複合体による収率(12%)を4倍以上上回り、結晶内部空間において触媒反応が加速されたことを示している。さらに正方晶、斜方晶のHEWL結晶を使い分けることにより、反応の不斉選択性に関する興味深い知見を得た。</p> <p>第二章では、生理活性を示す一酸化炭素(CO)ガスを放出することが知られているルテニウムカルボニル錯体のHEWL結晶への固定化について評価を行った。第一章で確立した手法を基に、ルテニウムカルボニル錯体を集積した架橋化HEWL結晶を調製した。単結晶</p> | | | |

| | | | |
|--|----------|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (工 学) | 氏名 | 田部 博康 |
| <p>構造解析により、ヒスチジンおよびアスパラギン酸に単核ルテニウムカルボニル錯体が配位することを確認した。ルテニウムカルボニル錯体—アスパラギン酸間配位結合は HEWL 結晶内部のみで安定化し、配位子交換反応により CO ガスを放出することを確認した。さらに、機能化された HEWL 結晶を HEK293 細胞培養時に添加することにより、CO ガスに応答し転写因子 NF-κB が約 20% 活性化されることを観測した。</p> <p>第三章では、第二章で得られた知見を基に、カイクサイポウイルス多角体結晶を用いた CO 放出細胞外材料の設計と細胞応答観察への利用を検討した。多角体蛋白質にヘキサヒスチジンタグ (His-tag) を遺伝子的に導入し、カルボニル錯体の固定化量および CO 放出量の制御を試みた。His-tag 融合多角体は野生型多角体と比較し、単量体あたり約 2 倍のルテニウムカルボニル錯体を固定化し、約 3 倍の CO ガスを放出することが可能となった。His-tag 融合多角体を HEK293 細胞培養時に添加することにより、転写因子 NF-κB が約 24% 活性化することを確認した。この値は野生型多角体を用いた場合 (4%) と比較し 6 倍大きく、細胞外材料から放出される CO ガス放出量と NF-κB 活性化度に相関関係があることを見出した。</p> <p>第四章では、第二章、第三章で見出した CO ガスによる NF-κB 活性化現象をさらに考察するため、光応答型 CO ガス放出システムの構築を目指した。光照射により Mn-CO 結合が開裂するマンガンカルボニル錯体を His-tag 融合多角体内部に固定した。本多角体は可視光照射下により非照射時と比較し約 3 倍の CO ガスを放出することが可能となった。本多角体を HEK293 細胞培養時に添加し可視光を照射することで、転写因子 NF-κB が約 17% 活性化することを確認した。一方、光照射を行わない場合は NF-κB の活性化は 9% に留まった。これらの結果より、細胞への CO ガスの導入量や速度が NF-κB 活性化に影響を及ぼすことを見出した。</p> <p>第五章では、連続した細孔構造を持たない多角体結晶を利用し、多孔性構造の設計および反応場としての利用を検討した。多角体ユニットセルを構成する三量体部位に位置する直径 5.4 Å のキャビティ部位に着目し、この周囲のアミノ酸を遺伝的に欠損させた。X 線結晶構造解析により、本部位のアミノ酸欠損および周囲のアミノ酸残基との水素結合ネットワークが消失していることを確認した。本多角体に有機蛍光分子を導入したところ、野生型多角体結晶と比較し約 8 倍の取り込み量を示した。また、この取り込み効果は蛍光分子の電荷に依存することを見出した。本手法により、多角体結晶の結晶性を維持したまま外来分子取込み機能を持つ多孔性材料に変換する方法を確立した。</p> | | | |

(論文審査の結果の要旨)

本博士論文では、蛋白質結晶の3次元構造によって得られる多孔性内部空間における金属錯体の配位と反応の設計、および多孔性空間自体の設計に関する研究を行っている。申請者は上記の設計手法に基づき複合体の合成と単結晶 X 線構造解析を進め、新規固体触媒や生理活性ガス放出機能を持つ材料を創出した。得られた結果の概要を以下にまとめる。

1) 多孔性鶏白リゾチーム (HEWL) 結晶内部に有機ルテニウム錯体を固定し、結晶内部を反応場とする水素移動型還元反応を行った。結晶内部に位置するヒスチジン残基への配位により錯体の触媒活性が向上することを見出した。さらに正方晶、斜方晶の HEWL 結晶を使い分けることにより、反応の不斉選択性に関する興味深い知見を得た。

2) シグナルガス分子として機能する一酸化炭素 (CO) を放出する細胞外材料を作成するため、HEWL 結晶内部にルテニウムカルボニル錯体を固定した。ルテニウムカルボニル錯体—アスパラギン酸間配位結合は HEWL 結晶内部でのみ安定化し、CO ガスを放出することを見出した。機能化された HEWL 結晶を HEK293 細胞培養時に添加することで、放出された CO ガスに応答した転写因子 NF- κ B の活性化を観測した。

3) 昆虫細胞のウイルス感染で得られる多角体蛋白質結晶を利用し、生体親和性の高い細胞外材料の設計を行った。多角体結晶にヒスチジンタグを融合することで、野生型結晶と比較し2~3倍のカルボニル錯体が固定可能であることを見出した。さらに、マンガカルボニル錯体の固定化により、光応答型 CO ガス放出部位の設計に成功した。これらの結果より、細胞への CO ガス導入量や導入速度と NF- κ B 活性化に相関があることを見出した。

4) 多角体結晶に変異導入を行い、内部空間の設計を行った。アミノ酸置換および欠損を施すことで、多角体の結晶性を維持したまま内部空間を拡大しうることを確認した。変異体結晶は連続した内部空間を持つ多孔性材料となり、野生型結晶と比較し約8倍の外来分子を取り込むことを確認した。

以上本論文では、蛋白質結晶内部空間での有機金属錯体の集積、反応制御に基づき、従来の人工蛋白質では困難であった安定性や機能性を持つ材料を実現した。これらの結果は蛋白質を用いた生体材料設計に重要な知見を与えるものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年3月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：平成27年6月19日以降