

論文の内容の要旨

論文題目 **The Conformation Control of Biomolecule Fragments
in Self-Assembled Hydrophobic Cavities**
(自己組織化疎水空間を用いた生体分子フラグメント
の構造制御)

氏 名 澤田 知久

核酸やタンパク質は、静電相互作用や水素結合、疎水性相互作用といった弱い相互作用が無数に働くことにより精密に折れ畳まり、高度な立体構造を構築している。さらにその高次構造から生じる疎水場の中で水素結合を精密に誘起することにより、非常に高度な分子認識や物質変換を実現している。今日、その優れた生体機能の解明や制御を目指し、生体高分子の立体構造解析やアッセイ、化学修飾に関する研究が盛んに行われている。一方、本研究では、既存の研究例とは異なり、人工的なナノ空間を用いることで生体分子の構造を精密に制御するという新たな手法を考案した。研究対象として、単独では特定の立体構造をとることが出来ない極めて短いヌクレオチドやペプチド断片（生体分子フラグメント）に着目し、水中でそれらに理想的な人工疎水空間を提供することで生体分子フラグメントの構造制御を実現した。生体分子フラグメントの構造制御には、水中での正確な水素結合形成が不可欠であり、この難しい課題は、人工的な疎水場を効果的に用いて周囲の水分子の障害を防ぐことで、克服することが出来た。このようなモデル研究はこれまでには全く報告例が無く、独自の研究手法を開拓したと言える。さらに本研究では、水中での包接挙動および誘起された生体分子の高次構造の詳細な解析を行うことによって、その安定化のメカニズムについても解明した。

本論文は以下の第7章で構成される。

第1章では、本研究の概要とその研究背景、そして本研究の学問的意義について論じた。

第2章および第3章では、水中で、わずか1,2塩基から成る核酸フラグメントの構造制御を行った。DNA鎖は、核酸塩基の相補的な水素結合と、上下のスタッキングにより安定化され、水中で二重らせんを形成する。しかしながら一般に、3塩基以下の極めて短いヌクレオチドは、それ自身では二重鎖を形成出来ないことが知られている。生体内のポリメラーゼやリボソームの酵素ポケット内では、そのような不安定な3塩基対以下の極小の二重鎖構造が巧みに安定化され、

遺伝情報の発現が行われている。そこで、自己組織化ピラー型かご状錯体の内部空間の持つ大きさや特異な形状、包接能を利用して、人工的にわずか 1、2 塩基対から成る最短の二重鎖構造の誘起を達成した。

まず、第 2 章ではグアノシンモノリン酸 (G) とシチジンモノリン酸 (C) を水中で、自己組織化ピラー型かご状錯体内に包接させることで、わずか 1 塩基対の GC 塩基対を誘起することを試みた。G と C とかご状錯体を水中で 1 対 1 対 1 のモル比で混合したところ、¹H NMR スペクトルにおいて G と C いずれも核酸塩基部位が高磁場シフトし、かご状錯体内に包接されたことが示唆された。また、単結晶 X 線構造解析から、その包接錯体の詳細な構造を決定した。NMR 測定から示唆された通り、G と C がペア選択的にかご状錯体内に包接され、三本の水素結合形成による Watson-Crick 型の水素結合対が形成していることを明らかにした。この時、周囲の溶媒やイオンの水素結合様式にも着目することで、塩基対がかご状錯体の疎水空間で特異的に安定化されるメカニズムも解明した。さらに、この GC 塩基対に対して、別の核酸塩基であるウリジンモノリン酸による阻害実験を行うことで、最小単位の GC 塩基対形成にも選択性があることを検証した。

続いて第 3 章では、アデノシンモノリン酸 (A) とウリジンモノリン酸 (U) からの水素結合対の形成を試みた。A と U とかご状錯体を水中で 1 対 1 対 1 のモル比で混合したところ、¹H NMR 測定より、A と U いずれの核酸塩基部位もかご状錯体内へ包接されることを確認した。この時、かご状錯体由来のシグナルの非対称化挙動は、A や U を単独でかご状錯体内へ包接させた場合と異なり、A と U がかご状錯体内でペアを形成して強く包接されることを見出した。単結晶 X 線構造解析を行うことで、その包接錯体の詳細な構造を決定した。NMR 測定から示唆された通り、かご状錯体内では A と U が二本の水素結合が形成されて特異的に Hoogsteen 型の水素結合対が安定化されていることを明らかにした。一般に、A と U の塩基対形成では Watson-Crick 型および Hoogsteen 型の二種類の幾何構造を取り得るが、本研究ではかご状錯体の内部空間の形状に即して Hoogsteen 型塩基対が選択的に安定化された。さらに、かご状錯体を縦に拡張することにも成功し、これを用いて T-A 配列のジヌクレオチドの二重鎖形成も試みた。各種 NMR 測定と単結晶 X 線構造解析を行うことで、水中でかご状錯体内での AT 塩基対の誘起を確証した。その塩基対は、モノヌクレオチドの場合と同様の Hoogsteen 型であった。さらに、溶液状態のジヌクレオチド二重鎖構造から、結晶状態の無限の水素結合ネットワーク状構造への動的な平衡があることも解明した。

第 4 章では、人工疎水空間を用いることで、水中で極めて短いペプチドフラグメントからの、ヘリックス構造へのフォールディングを達成した。3 枚のポルフィリン配位子から成るポルフィリンプリズム錯体は、アラニン 3 残基の配列のトリペプチドを、水中で強く包接し、特異的に β ターン (3_{10} ヘリックス) 構造へフォールディングすることが NMR 測定により予測されている。本論文では、単結晶 X 線構造解析により、そのペプチド包接錯体の詳細なコンホメーションを解明した。包接錯体の単結晶を作成し構造解析を試みたところ、複数の重原子から成るプリズム錯体由来の強い反射点に支配されたアキラルな空間群による解析と

なり、キラルなペプチドの構造解析は不可能であった。そこで、プリズム錯体にキラルな部位を新規に導入することで、この偽対称問題を解決した。ペプチド包接錯体の構造解析の結果、包接されたペプチドは、N末端のアセチル基 (i) の酸素原子とアラニン (i+3) のアミド窒素原子間で水素結合した 3_{10} ヘリックス構造になることを解明した。その構造は、これまでの NMR 測定による予想構造と良い一致を示し、溶液状態との良い整合性を確認した。さらに、N末端をグリシンで 1 残基伸長した 4 残基のペプチドは、プリズム錯体の内部で 3_{10} ヘリックスと α ヘリックスの両方の特徴を持った構造へと折り畳まれることを見出した。この包接錯体の結晶構造では、 3_{10} ヘリックスに相当する水素結合に加え、アセチル基 (i) のカルボニル酸素原子と 3 番目のアラニン (i+4) のアミド窒素間にも水素結合が観測された。この様な $3_{10}/\alpha$ 混在ヘリックスは、さらにグリシンを 1、2 残基ずつ伸長した 5、6 残基のペプチド鎖からも同様に形成した。これらの知見から、極めて短いペプチド断片では構造の自由度が高いため、純粋な α ヘリックス構造や 3_{10} ヘリックス構造のみが支配的ではなく、 $3_{10}/\alpha$ 混在ヘリックス構造へとフォールディングされることを発見した。

第 5 章では、ボウル型錯体を利用し、ペプチド鎖の二つの芳香族側鎖を同時に認識することで、ペプチド鎖を α ヘリックス構造へとフォールディングさせることを試みた。4 残基間隔や 7 残基間隔にある芳香族側鎖の包接が、 α ヘリックス構造の周期性に対応して、ボウル型錯体に強く包接されることを、様々なペプチド配列についての滴定実験から明らかにした。また、円偏光二色性スペクトル測定を行うことで、 α ヘリックス構造由来の吸収の増大と、ペプチドヘリックスからアキラルなボウル型錯体への誘起 CD を観測し、ボウル型錯体による特異的なフォールディングであることを検証した。

第 6 章では、より巨大な生体分子認識場の構築に向け、大環状構造の効率的な合成法を見出した。ナノメートルサイズの巨大な反応点である可逆的カテナン化を用いることで、柔軟なオリゴエチレンオキシド鎖から、骨格 200 原子を超す超巨大環状構造の定量的な構築を達成した。

最後に第 7 章では、本研究の総括を行い、さらに本研究の波及効果および将来展望に関して論じた。

以上の様に、本論文では自己組織化中空錯体の有する特異な疎水性空間を利用して、水中でヌクレオチドやペプチド断片の水素結合を効率的に誘起し、その構造制御を実現した。生体分子の構造を化学的に制御することは、近い将来の生物学や医療の分野において重要な研究課題であるが、本研究の様に生体分子に対してナノメートルサイズの人工空間を与え、精密に構造制御を行った研究例は極めて少なく、新たな手法を開拓したと言える。また本論文で新たに明らかにした、核酸塩基対やペプチドヘリックス構造のとり幾何構造の優先傾向や、その安定化に寄与する水分子やイオンに関する知見は、生体内の DNA やタンパク質の中で働く複雑な仕組みに対しても、大きな考察を与えるものと考えられる。今後、本研究を基にして高度に設計されたナノ空間を用いて生体機能を精密に制御するテクノロジーへの発展が期待される。