

審査の結果の要旨

氏名 藤田大士

本学位論文は、タンパク質分子の新規カプセル化手法に関する報告である。古典的には、タンパク質のカプセル化は、シリカゲル中への吸着するもの、ポリマー中に閉じ込めるものなど、バルク系で取り扱われるものが主だった。しかし、近年、タンパク質の構造や機能の安定化を目的として、個々のタンパク質分子に着目した、より精密なカプセル化への需要が高まっている。

個々のタンパク質分子に着目したカプセル化手法として、近年、逆ミセルを活用し、その内部にタンパク質を閉じ込めた報告、タンパク質表面にモノマーを導入し、タンパク質表面で高分子重合を行った例などが報告されている。しかしいくつかの試みが検討されてきた中、未だ「一分子」のタンパク質を「正確な構造」中に閉じ込めることができた報告例はない。

第2章から第4章にかけては、ユビキチンを $M_{12}L_{24}$ 錯体に閉じ込める検討について論じられている。本論文においては、76 残基から構成されるユビキチンを共有結合を介して配位子に直接導入し、これを非修飾配位子、 Pd^{2+} イオンと共に混合することで、一分子のユビキチンが内部に包接された錯体が合成できたことを報告している。具体的には、 1H DOSY NMR による拡散係数の測定において、(1)ユビキチンは $M_{12}L_{24}$ 錯体と同速度で拡散運動し、(2)その拡散係数は $M_{12}L_{24}$ 錯体の骨格サイズに応じて変化したことを報告した。これら結果は、ユビキチン包接錯体の生成を支持している。また $[^{15}N]$ ユビキチンを用いた 1H - ^{15}N HSQC NMR から、ユビキチンは錯体中で球状構造を保っていることが明らかになっている。

また、ユビキチン内包錯体の DMSO 溶液に、 AcO *i*Pr を気相拡散させることによってユビキチン包接錯体の結晶を得ることに成功している。放射光を用いた単結晶 X 線回折実験の結果、ユビキチン包接錯体の骨格構造、および内部に存在する電子密度が明らかになった。

第5章、6章においては、将来的なタンパク質の機能評価を見据えて、 $M_{12}L_{24}$

錯体骨格の改良を行っている。

第5章においては、親水性を高める工夫として、アンモニウムカチオンの代わりに多数のヒドロキシ基を有し、生体適合性の高いオリゴ糖を導入した配位子を合成した。新たに設計した配位子は、中心の芳香環上にアミノ基を有する二座配位子に対し、安価なオリゴ糖であるマルトペンタオースを還元的アミノ化により導入することで合成する事に成功した。このオリゴ糖修飾配位子は、当初の狙い通り配位子単独でも100%水中に溶解した。

オリゴ糖連結配位子はDMSO溶媒中Pd(NO₃)₂と混合する条件下で錯形成反応を行なった。¹H NMRでは配位に伴う化学シフト値の変化が観測され、また¹H DOSY NMRによって直径の大きな錯体の形成に伴う拡散係数の減少が観測された。これらの結果から、M₁₂L₂₄型の球状錯体が得られたと考えられる。本錯体は透析により、溶媒を完全に水に置換しても安定であることがわかった。M₁₂L₂₄型錯体を水溶性にできたのは本研究が初めてであり、これは生体分子を対象として研究を展開する上で非常に有用な知見である。

第6章では、より広いpH範囲で取り扱うことのできる強固なM₁₂L₂₄錯体骨格の合成検討を行った。

Pt(II)-Py結合はPd(II)-Py結合と比較して10²倍程度強い結合を持つ。そこでPd(II)の代わりにPt(II)を用いることを考えた。しかしPt(II)-Py間の結合が強すぎるため、単純にPdをPtに置換するだけでは目的の生成物は得られない。これに対し本研究では、弱いルイス酸をピリジル基と相互作用させ、錯形成反応時のみ「一時的」にPt(II)-Py間の結合を活性化する手法を考案した。

弱いルイス酸として、水素結合供与体であるトリフルオロエタノール(TFE)を用いた。DMSOのみを溶媒とする条件では速度論支配のオリゴマーを与えるのみであったが、TFEの添加により反応速度は劇的に向上し、熱力学支配のM₁₂L₂₄生成物を選択的に与えた。新規Pt(II)-M₁₂L₂₄錯体の構造は、NMR、X線結晶解析、ESI-MSにより完全に決定した。添加したTFEは、減圧条件により容易に取り除く事ができ、TFE除去後の錯体は、Pd(II)錯体と比較し、高い酸安定性を示した。

以上のように、本論文では精密構造中へのタンパク質の単分子包接に成功している。一義的に定まった人工構造中へタンパク質を閉じ込めた例はこれまでになく、本論文は、極めて革新的な研究成果であると言える。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。