

## 論文の内容の要旨

論文題目     Studies on highly entwining metal-linked peptide strands (高度に絡まり合う金属連結ペプチド鎖に関する研究)

氏     名     猪俣 祐貴

生体におけるナノ構造の形成や高度機能発現を担う代表的な化合物はタンパク質である。天然の酵素に匹敵する機能の人工的な創出を目指すにあたり、天然タンパク質の改変にとどまらず、人工タンパク質や人工酵素を *de novo* で創出する挑戦は重要である。天然タンパク質にみられる柔軟なポリペプチド鎖の折り畳み (フォールディング) を模倣するのが一般的な人工タンパク質合成のアプローチであるが、本研究において、柔軟な分子鎖の絡まりや編み込みを利用した新しい方法論によるナノ構造形成の着想に至った。自然界では、HK97 カプシドタンパク質のように、ポリペプチド鎖のフォールディングの過程で分子鎖に絡まりをつくるものが近年発見されてきており、人工タンパク質合成における絡まりの有用性を示唆している。しかし、一般に数百残基ものペプチド鎖を人工的に絡ませるのは、空間的・幾何的な制約があり難しい。そこで、数残基の短鎖ペプチド断片を可逆な配位結合によって連結させることができれば、そのような制約を越えて複雑な絡まり構造を構築できると考えた。

本博士論文では、金属イオンと有機分子間の配位結合に着目し、配位部位を有する短鎖ペプチド断片と金属イオンの自己集合 (フォールディング集合法) に基づく高度な絡まりナノ構造群を創出した (図 1)。一般に、短鎖ペプチド断片は柔軟であり溶液中で特定の配座をとらないが、金属イオンと混合すると、短鎖ペプチドの特定配座へのフォールディングと金属イオンとの自己集合が同時に起こり、生成した金属連結ペプチド鎖がタンパク質様のナノ構造を形成する。フォールディング集合法と呼ばれるこの手法は絡まりを利用したナノ構造構築に広く有利であると考えた。本博士論文では、金属連結ペプチド鎖が高度な絡まりを生む性質の検証を起点として、短鎖ペプチド断片の配列設計を通じてタンパク質に匹敵する球殻構造の構築にまで発展させた。

本博士論文は以下に示す全 9 章から構成されている。第 1 章では、本研究の背景、目的、および概要を論じた。天然の絡まりタンパク質の例やその意義を概説した後、絡まり構造の人工合成のアプローチと現状の到達点、今後の展開可能性について論じた。



図 1：フォールディング集合法による高度に絡み合う金属連結ペプチドナノ構造の構築。

第 2 章では、「金属イオンと短鎖ペプチド断片の組み合わせ」の絡まり性質について検証するために、最も単純なアミノ酸であるグリシン 3 残基からなる配位子 **L1** を合成し、金属イオンとの自己集合を検討した (図 2)。ニトロメタン中で配位子 **L1** と  $\text{AgNTf}_2$  を混合すると、分子鎖が 7 回交差した  $\text{Ag}_7(\text{L1})_7$  組成のトーラス結び目と、8 回交差した  $\text{Ag}_8(\text{L1})_8$  組成のトーラス絡み目が平衡混合物として得られ、単結晶 X 線構造解析によってその構造を明らかにした。特有の絡まり部分構造を有する金属連結ペプチド鎖の組数の違いによって、これらの全体構造が作り分けられていた。さらに、配位子 **L1** の側鎖にアルキル基を導入することで、その炭素鎖長のわずかな違いによる構造制御にも成功し、9 交点結び目への拡張や、結晶化過程での結び目分子の開環による 10 交点トーラス超らせんへの展開を示した。以上のように、単純なペプチド配列であっても、金属連結ペプチド鎖は高度に絡まりを生じる性質があることを検証した。

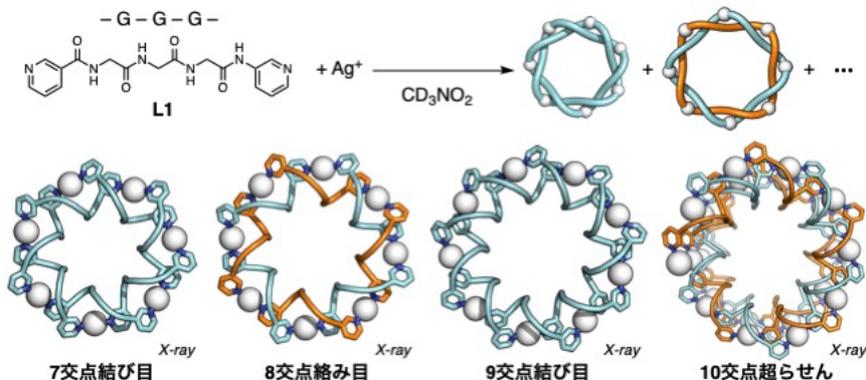


図 2：グリシン 3 残基からなる配位子 **L1** と銀イオンの自己集合によるトーラス結び目分子群の合成スキームおよび 7-10 交点のトーラス結び目、絡み目、超らせん分子の結晶構造。

第 3 章では、ウイルスカプシドに見られるような複雑な絡まり多面体を金属連結ペプチド鎖からなるリングの絡み合いにより合成した。7 残基より長いペプチド断片は組成の小さい閉環構造へ集合しやすいことが本章における検討の過程で判明したため、より短い 5 残基配位子 **L2** と銀イオンの自己集合を検討した (図 3a)。その結果、対称性の高い巨大構造の定量的な形成が溶液中で確認され、 $\text{Ag}_{24}(\text{L2})_{24}$  組成をもつ直径 3.7 nm のカプセル構造の生成を見出した (図 3b)。この分子は、 $\text{Ag}_4(\text{L2})_4$  組成の大員環 6 つの絡まり合いにより立方体状の構造を形成した [6] カテナン分子であり (図 3a)、分子鎖が絡み合い多面体をなす物体群の一種であるポリヘドラルリンクに分類される (図 3d)。絡まり分子の複雑さを示す指標である交点数は 24 に達し、従来の

合成絡まり分子を大幅に上回る複雑さを有していた。さらに、構造内部には約  $3,200 \text{ \AA}^3$  の巨大空間を有していた。第 6 章では、アミノ酸側鎖の変更でこの巨大空間の内部を自由に化学修飾し、有機分子を包接する機能をも付与することが可能であることも明らかにした (図 3c)。

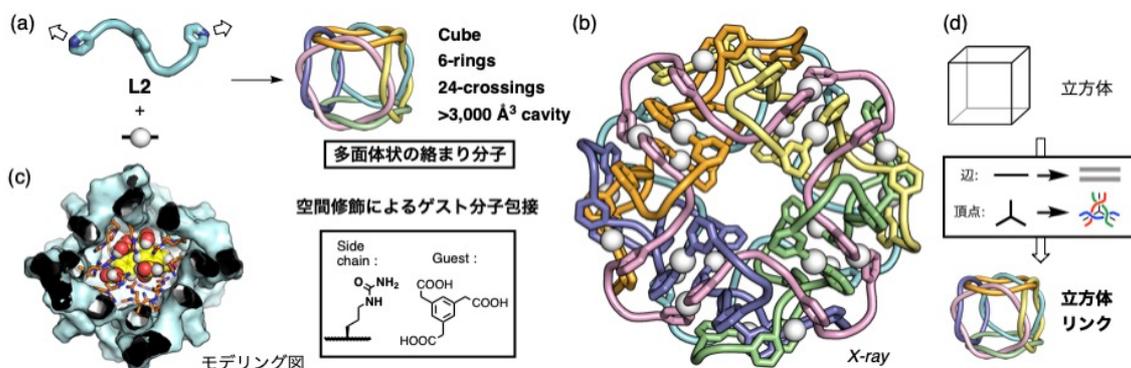


図 3 : (a) 二座配位子と直線二配位金属の自己集合による絡まり多面体の合成。(b) 立方体型 [6]カテナンの結晶構造。(c) 水素結合性側鎖の修飾による内部空間へのゲスト分子包接。(d) [6]カテナンの絡まりトポロジーおよび立方体からの構築方法の説明。

正多面体の系列を考えると、次の階層の分子として正十二面体が考えられる。第 4 章では、三座配位子と三配位金属を用いることで、絡まりネット (グラフ) が球殻状に自己集合したナノ構造を構築できることを見出した (図 4a)。配位部位としてアルキン側鎖を有する配位子 **L3** と Cu(I)イオンを混合すると、[6]カテナンよりさらに巨大な自己集合構造の生成が溶液中で確認され、X 線構造解析により  $\text{Cu}_{60}(\text{L3})_{60}$  組成をもつ直径 6.3 nm のペプチド十二面体の構造が明らかとなった (図 4d)。 $\text{Cu}_3(\text{L3})_3$  組成の三葉結び目構造 20 個が球殻状に自己集合して形成しており、全体として 60 もの交点数を有している (図 4c)。五角形の面には直径約 1 nm の窓があり、内部空間は  $30,000 \text{ \AA}^3$  を超えていた。三座配位子と三配位金属からなる自己集合体は、ポリヘドラルリンクのトポロジー記述方法と同様に、グラフ理論を用いて三辺三交差型空間グラフと記述することができる (図 4b)。ウイルスカプシドと同様の多面体構築原理に従うと、 $\text{M}_{180}\text{L}_{180}$  や  $\text{M}_{240}\text{L}_{240}$  サイズの多面体モデルがさらに構築可能である。すなわち、側鎖への配位部位の導入によってトポロジー分子の複雑さにおける階層を一段階上げることが成功した。

第 5 章では、ペプチドの柔軟性に由来する絡まり構造の動的性質を示した。剛直なプロリン残基はアミドのシス-トランス異性化を起こし、タンパク質構造のスイッチング等に関与することが知られている。そこで、プロリン豊富なペプチド断片を利用した絡まり構造の形成を検討した。剛直な芳香環スペーサーを中央に有する 7 残基配位子 **L4** と Ag(I)イオンからは、 $\text{Ag}_1(\text{L4})_1$  組成の大員環 2 つが絡み合った [2]カテナン分子がニトロメタン中で定量的に構築した。さらに、 $\text{Na}^+$ への配位が駆動力となり、 $\text{Ag}_2(\text{L4})_2\text{Na}$  組成のねじれた大員環へ構造変換を起こすことが見出された。スペーサー位置の異なる配位子 **L5** と Ag(I)イオンからは、 $\text{Ag}_2(\text{L5})_2$  組成の大員環 3 つによる [3]カテナン分子が得られた。この [3]カテナン分子は、プロリン残基のシス-トランス異性化が大

員環内で連動して生じ、 $D_3$  対称の構造と  $C_2$  対称の構造間での局所構造変換を起こすことが明らかとなった。すなわち、金属連結ペプチド鎖による絡まり構造は、アミド結合の異性化により全体の構造変換も局所構造変換も可能であることを見出した。

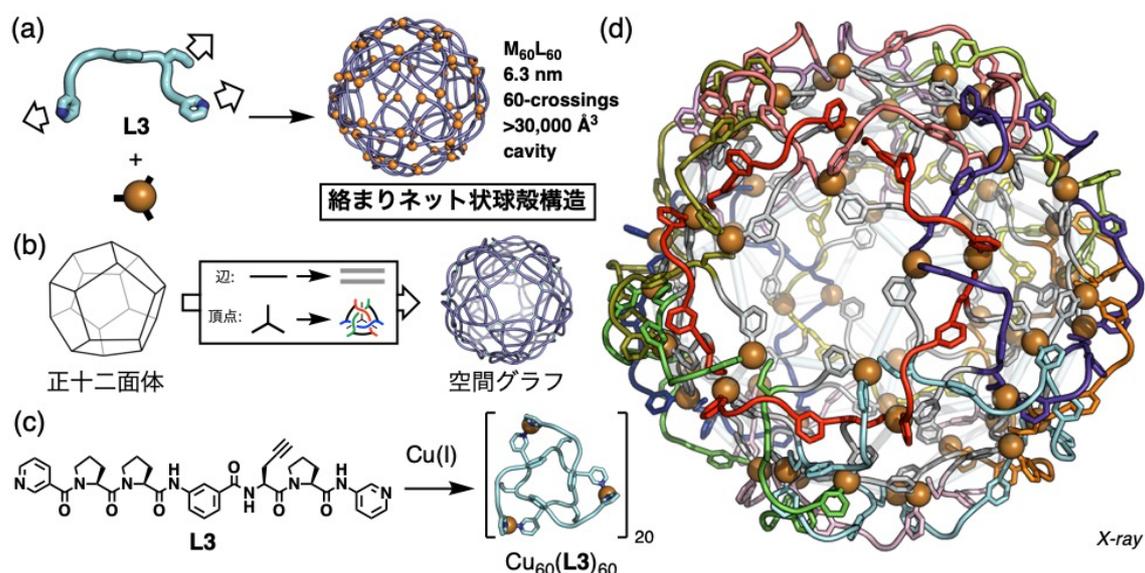


図 4 : (a) 三座配位子と平面三配位金属による絡まり三次元グラフ型多面体の形成。(b) ペプチド十二面体のトポロジーおよび正十二面体からの構築方法の説明。(c) ペプチド十二面体の合成スキームおよび三葉結び目部分構造の図。(d) ペプチド十二面体の結晶構造。

第 7 章では、ペプチドの配位部位をハロゲン置換基で修飾することで、金属連結ペプチド鎖の連結方向にランダム性を加え、対称性の低い 4,6,8 交点結び目構造が得られることを示した。これまでに示した絡まり錯体群は、金属連結ペプチド鎖の連結が全て頭-尾結合からなる有限の構造体であり、その対称性は高いものが殆どであったが、自己集合では達成が難しい低対称の結び目構造もペプチド断片の柔軟性を利用することで構築可能であることを示した。

第 8 章では、これまで示した有限構造を与える短鎖ペプチド断片に構造的な変異を加えることで、有限から無限構造へ変換可能であることを明らかにした。

以上の結果を踏まえ、第 9 章では本論文を総括し、展望を示した。本博士論文では、金属連結ペプチド鎖の絡まりやすい性質を検証し、既存の合成手法では到達できなかった複雑なトポロジー分子の合成とその構造制御を達成した。中でも特に、巨大ナノ空間を有する絡まり多面体群は、人工ウイルスカプシドのプロトタイプともいえる特筆すべき成果である。本博士論文は、わずか数残基のペプチド断片と金属の混合という簡便な手法から、タンパク質に匹敵する複雑さのナノ構造が構築可能であることを示しただけではなく、柔軟な分子鎖におけるナノ構造形成における「絡まり構造」の重要性をも示した。さらに、柔軟なペプチドならではの動的性質や、側鎖の設計自由度を活かした分子認識などの機能化が可能であることから、分子鎖の絡まりに基づくナノ構造形成がタンパク質人工合成の新たな手法となることが期待される。