巨大な中空球状錯体を骨格として構築した生体分子インターフェースの開発

Development of Biomolecular Interfaces Constructed on the Frameworks of Huge, Hollow Spherical Complexes

東北大学原子分子材料科学高等研究機構 (WPI-AIMR); JST, ERATO, 磯部縮退 π 集積プロジェクト 佐藤 宗太*

WPI-AIMR, Tohoku University; JST, ERATO, Isobe Degenerate π -Integration Project

Sota Sato*

Received March 5, 2015; E-mail: satosota@m.tohoku.ac.jp

The clusters of biomolecules have an important role as recognition interface in living systems, where the weak molecular recognition of each biomolecular unit is efficiently enhanced by the dense assembly of the units to realize strong affinity. The mimic of these molecular designs has been explored, but the structural deviations or small number of clustered units are not satisfactory as the model of natural interfaces. In our recent projects, we synthesized biomolecular clusters by anchoring a biomolecular unit to an organic ligand followed by assembling the ligands with transition metal ions to obtain self-assembled spherical complexes. Owing to the self-assembly nature of the coordination complexes, the number of introduced biomolecular units is strictly defined, the molecular sizes are huge with the diameter of several to ten nanometers, and the synthesis is quite simple and quantitative. With the variety of sugar, DNA, or peptide clusters, we demonstrated that the huge clusters work as functional interfaces and realized the application to biomolecular or inorganic recognition and further extended to the template synthesis exploiting the recognition functions and the unique three-dimensional shape.

■ ■ 1. はじめに

生命現象においては、たとえば、酵素がその認識ポケットに小分子をとりこむことで非共有結合による分子認識が発現し、選択的かつ高効率な化学反応が制御される現象が知られている。このような、ホスト分子がゲストとなる基質を包み込んで独特の構造を構築し、物性や反応が制御されるシステムは、ホスト-ゲスト化学として人工系においても模倣されてきた。他の手法では実現が困難な、あるいは実現不可能な興味深い知見がホスト-ゲスト化学の手法を使って多数報告されてきているが、それらの報告例のほとんどは3ナノメートル以下の分子スケールでの現象であり、認識サイトが基質を「点」として認識するタイプのものであった。

一方で生命現象においては、たとえば、細胞表面において糖鎖がよりあつまってクラスターをなす構造が「面=インターフェース」としてはたらき、重要な認識信号

として作用することが知られている。このような、非常に多くの数の認識官能基がよりあつまることで、初めて機能が発現する「面」の分子認識のシステムを、構造と機能との相関を明確に示しながら展開した研究例は極めて限られる。その理由は明確であり、機能が発現する状況において、三次元構造も考慮した全体の構造が分子レベルで整っており、人工合成によって自在に設計して調製できる分子システムそのものが無かったからである。個々の認識能は弱いものの、高密度な集積化によって機能が発現する複雑なシステムを合理的に開発するためには、構造-機能の相関が明瞭に定められたシステムを対象とし、実験的にその相関を明らかにすることを通じて、ねらった機能を分子設計にフィードバックできる必要がある。

本研究においては、自己組織化により構造にばらつきがない単分散な中空球状錯体を基本骨格として用い、定量的な生体分子の官能基化による生体分子クラスターの開発をおこなった。研究をはじめた当初、このような構造が分子レベルで一義的に定まり、かつ直径が数ナノメートルを超える巨大な錯体分子の合成そのものが挑戦的な課題であった。合成法の改善と構造決定法の開発、さらに、研究の進捗とオンタイムで開発された新しい装置・施設の利用を一体となって探求したことで、世界最大の単一構造分子の調製法を確立できた。さらに、標的にし

連絡先著者名: 佐藤 宗太

連絡先: 980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1

東北大学原子分子材料科学高等研究機構 (WPI-AIMR)

Tel: 022-217-6160 Fax: 022-217-6176

Corresponding Author: Sota Sato

Address: 2-1-1, Katahira, Aoba-ku, Sendai, 980-8578, JAPAN

Keywords: biomolecular interface, sugar cluster, DNA, protein encapsulation, host-guest chemistry, self-assembly, spherical complex

た機能に対応する生体分子を選びだし、あくまで一義構造を有する生体分子修飾錯体をうみだすことで、数～十ナノメートルオーダーの生体分子クラスターがインターフェースとしてはたらく人工分子の開発を達成できた。その独自の機能は、分子生物学的な手法あるいは無機材料の手法など、多岐にわたる分野横断的な科学の手法によって明瞭に描き出すことができ、個性豊かな生体分子インターフェースの特徴を魅力的に示すことができたと考えている。ホスト-ゲスト化学において、新たに「面」で機能する一義構造の分子群をうみだし、従来法では手の届かない巨大な分子スケールで実現された新しい認識化学に関して、本稿ではその一端を紹介したい。

■ 2. 球状錯体の自己組織化合成

生体分子インターフェースを構築する土台となる錯体骨格の構築に関する研究展開を紹介する。精密な一義構造をもつ生体分子インターフェースをうみだすためには、生体分子を化学修飾する骨格構造が一義構造であり、かつ高効率な合成法である必要がある。さらに、分子設計した通りに生成物が得られたことを、構造決定により確認する必要があるが、世界最大級に大きな分子構造を、「粒子」としてではなく「分子」として高分解能に解析することは困難を極め、多くのブレイクスルーを経て、球状錯体の自在な合成法の確立に至った。

2.1. 幾何学的に構造制御された対称性の高い M_nL_{2n} 錯体

藤田グループでは、自己組織化合成に適する中程度の強さの配位結合が得られることから、ピリジル基とパラジウム (II) イオンを鍵とする錯体合成を検討してきている。最も単純な分子設計として、2つのピリジル基を一定の角度に固定した剛直な二座配位子とパラジウム (II) イオンとの自己組織化錯体の合成が考えられる。1994年、2つの配位方向のなす角が 180° の直線型配位子を用い、平面四配位型の配位様式をとる遷移金属イオンとの自己組織化をおこなうと、二次元の格子状シート

図 1. 24 個の 127° にまがった二座配位子と 12 個のパラジウム (II) イオンとから構築された $M_{12}L_{24}$ 球状錯体の合成スキーム。

構造をもつ無限ネットワークが得られることが報告された¹⁾。さらに、2004 年になって配位子に角度をつけると、このネットワーク構造に曲率が生まれ、三次元に閉じた球状の錯体が定量的に得られることがみいだされた²⁾。この球状錯体は金属イオン (M: metal ion) が 12 個と配位子 (L: ligand) が 24 個からなる $M_{12}L_{24}$ 組成の錯体であり、金属イオンを頂点、配位子を辺とすると、対称性が高い立方八面体型の多面体構造をもつとみなせる。各頂点には 4 つの辺が集まり、8 枚の正三角形と 6 枚の正方形の面を有する (図 1)。

このような系をより一般化し、折れ曲がった二座配位子とパラジウム (II) イオンとの自己組織化による生成物の構造を考察する。配位結合の手が余らないモル比を考えると M_nL_{2n} 組成の錯体が生成すると予測される。さらに、ウイルスの球殻構造のように、多成分の自己組織化においては対称性が高い構造が構築されるので、正多面体 (プラトンの立体) または半正多面体 (アルキメデスの立体) 型の錯体が構築されると仮定すると、 n の値は $n = 6, 12, 24, 30, 60$ のたった 5 種類に限定される (図 2)。一見すると、多様な、無限に近い数の構造が生成する印象があるが、自己組織化がうまく進めば、このマジックナンバー n で規定された、一義構造を有する生成物だけが選択的に得られると期待される。この予測の通り、2009 年には $n = 6$ の合成例が示された³⁾。筆者は藤田グループに助教として参画し、より大きな構成成分数からなる巨大錯体の合成研究にとりくんだ。

図 2. 二座配位子と平面四配位型の遷移金属イオンとから構築されると考察された、対称性の高い M_nL_{2n} 組成の球状錯体。たった 5 種類の候補 ($n = 6, 12, 24, 30$, and 60) のみが予測された。

2.2. 世界最多の構成成分数からなる $M_{24}L_{48}$ 錯体の構築

多面体の幾何学を考えると、 n の値が大きな錯体を構築するためには、配位子の角度を広げればよい。 $M_{12}L_{24}$ 錯体では、 $120 \sim 127^\circ$ に曲がった配位子が用いられたので、より大きな角度で曲がった配位子を使った検討をおこなった。ただし、実際の分子においては単純な多面体モデルでは考慮しきれない点がある。たとえば、立方八面体型の $M_{12}L_{24}$ 錯体では、各頂点に 2 枚の正三角形と 2 枚の正方形が交互に並ぶため、パラジウム (II) イオンまわりの配位様式は理想的な平面四配位型とは異なる。また、出発物質や生成物の溶解度の問題から、自己組織化が思い通りに進行しない場合もあり、実際の検討

は(合成化学では言わずもがなであるが)トライ & エラーによるところが大きかった。

多様な配位子を設計・合成して自己組織化を検討した結果、チオフエンを中心骨格とした 149° に曲がった配位子をパラジウム (II) イオンと混合した系において有望な結果が得られた (図 3)。得られた錯体溶液に対して、非常にブロードな ^1H NMR 信号が得られ、すなわち、大きな構造の錯体の生成が示唆された。この錯体の拡散係数 D 、すなわち、分子が溶媒中を泳ぐ速度を DOSY NMR で見積もれば分子の大きさを推察できる。溶解度の限界とブロード化によって信号強度が弱く、さらに巨大構造に由来して拡散係数が小さいために、長い拡散待ち時間による緩和減衰を補完する必要がある、高感度な極低温 NMR プローブの利用と強い磁場勾配を用いた測定条件の最適化が必須であった。最終的に、対流によるみかけの D 値の変化を試料管形状の変更によって排除できた。得られた錯体の D 値は $D = 3.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ($\log D = -10.49$) であり、 $\text{M}_{12}\text{L}_{24}$ の D 値 ($\log D = -10.30$) よりも有意に小さく、より大きな構造が生成したことが裏付けられた。

錯体の分子量を質量分析により決定することで、 M と L の組成決定を検討した。配位結合からなる錯体はイオン化条件で分解しやすく、コールドスプレーイオン化法質量分析 (CSI MS)⁴⁾ が適する。錯体骨格は中性の配位子と +2 価のパラジウムイオンからなるので、CSI 法のソフトな条件でカウンターアニオンと溶媒和した溶媒分子が脱離すれば、錯体骨格のカチオンが容易に生成するものと期待される。しかし、 $\text{M}_{12}\text{L}_{24}$ 球状錯体の解析に用いられたセクター型装置ではマススペクトルが得られなかった。錯体骨格の化学修飾やカウンターアニオン・溶媒の変更などスクリーニングしたが生成物のマススペクトルを取得できなかった。国内外の十機種を超える主要装置を使って検討を進めた結果、イオン化には問題ないものの、生成した多価イオンを分解させずに検出器まで導く過程に問題があり、さらにトラップを用いた装置ではスペースチャージ効果によってスペクトルが歪むことがわかった。最終的に、イオンを導く電位差を最小に抑えるように条件設定し、電位差により加速されて上昇した分子内エネルギーを取り除く機構を備えたブルカー・ダルトニクス社の maXis^{TM} により、カウンターアニオンとして用いた BF_4^- が 15 ~ 28 個脱離した $[\text{M} - (\text{BF}_4)_m]^{m+}$ ($m = 15 \sim 28$) で示される一連の多価イオンが検出できた。分解能 3.5 ppm 以下、分解能 $R > 45,000$ の満足のいくデータが得られ、錯体の分子量は 21,946.73 であり、その組成は $\text{M}_{24}\text{L}_{48}$ であることが決定できた。検討当時としては、唯一 maXis^{TM} から納得できるデータが得られたが、後に Waters 社の $\text{SYNAPT}^{\text{TM}}$ G2-S でも同程度のスペクトルが得られた。

図 3. $\text{M}_{24}\text{L}_{48}$ 錯体の合成スキーム。

球状錯体の立体構造を明らかにするために、単結晶 X 線構造解析を検討した。DMSO とアセトニトリルを 1:1 の容量比で混合した溶媒を用いた錯体溶液に対し、貧溶媒である酢酸エチルをゆっくりと蒸気拡散することで 150 μm 程度のきれいな単結晶が得られた。ループマウントするために結晶を溶媒ごとガラス板の上に取り出した瞬間に溶媒の気化によって結晶性が損なわれ、各種のクライオプロテクタントのスクリーニングや凍結温度の最適化をおこなったが構造解析できるデータは得られなかった。放射光施設を利用し、高輝度で平行性の高い X 線源を用いることで回折点を初めて観測でき、また大面積・高感度 CCD 検出器によって結晶の照射損傷を最小限に抑えることで、キャピラリー封入した結晶試料を室温で測定することが可能となり、満足のいくデータ取得に至った。構造解析の結果、外直径が 5.0 nm、内直径が 3.6 nm の $\text{M}_{24}\text{L}_{48}$ 中空錯体であることがわかり、パラジウム (II) イオンを頂点とし配位子を辺とすると、斜方立方八面体型であることがわかった。モデル化できた錯体骨格は単位格子中の 20% の体積を占めるに過ぎず、80% 以上の空間は激しくディスオーダーした溶媒とカウンターアニオンで占められた。解析精度の指標となる R_1 は 22% と悪い数値であるが、構造を考慮すると「理にかなって悪い」数値であると考えている。なお、その後、更なる試料調製技術の向上と PAD 検出器を駆使した測定ノウハウの蓄積、さらに、解析においても、擬対称問題の解決や、場合によっては非対称ユニットに一千を超える非水素原子が含まれる巨大構造に対する解析法の高度化を経て、解析精度が格段に向上し、より複雑で困難な球状錯体の結晶構造解析の手法確立を達成した。

図 4. 放射光 X 線構造解析によって明らかになった、斜方立方八面体型の $\text{M}_{24}\text{L}_{48}$ 錯体の構造。

以上のように、最初の合成反応から足かけ4年となったが、世界最多の72成分からなる一義構造の錯体を定量的に合成できることがわかった⁵⁾。有機合成反応における構造を制御する要因は、立体効果と電子効果が有名であるが、球状錯体の自己組織化においては、幾何学的制御の効果が支配的であり、 M_nL_{2n} ($n = 6, 12, 24, 30, 60$) 組成におけるマジックナンバー n が存在することを明らかにできた。各種の最先端機器と測定や解析における工夫によって困難な問題を解決し、分子レベルで構造が制御されていることをくまなく明らかにできた。後述する研究においても、合成化合物はあくまで一義構造を有するように分子設計し、個々の構造を詳細に決定することで研究成果につながるようこだわりをもって研究をおこなった。

2.3. 幾何学的制御を利用した球状錯体の合成

幾何学制御によって合成できた様々な形状の錯体合成について、紙面の都合上簡単に紹介する。

$M_{24}L_{48}$ 錯体は 149° に曲がった配位子を使い、また、 $M_{12}L_{24}$ 錯体は $120 \sim 127^\circ$ に曲がった配位子を使ってパラジウム (II) イオンと自己組織化することで得られた。このことから、 $127^\circ \sim 149^\circ$ の間に、構造が切り替わる閾値があると考えた。そこで、それぞれ 149° と 127° に折れ曲がった配位子を混合して用いて錯体合成の検討をおこなった。混合比に応じて配位子の平均角度を算出したところ、 $127 \sim 131.4^\circ$ では $M_{12}L_{24}$ 錯体が、 $133.6 \sim 149^\circ$ では $M_{24}L_{48}$ 錯体得られ、質量分析の結果、それぞれの錯体において配位子はランダムに混合されていることがわかった⁵⁾。また、この角度の知見に基づいて、 $M_{24}L_{48}$ 錯体得られると期待される、それぞれ 135° , 143° , 147° に折れ曲がった配位子を分子設計したところ、予想通りにすべての場合で $M_{24}L_{48}$ 錯体得られることがわかった⁶⁾。

ごく最近になって、 $M_{12}L_{24}$ 錯体の自己組織化の過程を NMR と質量分析で追跡したところ、中間体として M_8L_{16} 錯体と M_6L_{18} 錯体が生じることがわかってきた(図5)^{7,8,9)}。中間体の構造は、 112° に曲がった配位子を用いて NMR と X 線構造解析によって明瞭に決定できた。中間体構造も生成物と同様に、すべての配位サイトが結

合に使われた一義構造であることがわかった。 M_nL_{2n} ($n = 6, 12, 24, 30, 60$) 組成というマジックナンバー n の規則に当てはまらない錯体が速度論的に生成することをみだし、動的な自己組織化過程に対する新しい知見を得た。

配位子の折れ曲がり角度によって幾何学的制御が厳格にはたらく、 M_nL_{2n} 球状錯体が定量的に得られることを利用し、分子設計によって自由自在に錯体骨格を制御できることをみいだした。たとえば、大きさが2倍程度異なる2つの配位子を連結すれば二重球構造の錯体が得られ¹⁾、連結せずに配位子を混合すれば(擬)切頂四面体得られた²⁾。また、配位子に対して追加の配位部位となるピリジル基を導入しても、球状錯体の骨格形成は阻害されなかった。柔軟なリンカーを介して配位部位を連結すると、初の報告例となる星型多面体骨格得られ¹²⁾、また、配位部位を配位子の剛直な骨格に埋め込んだ場合は、追加された配位部位が異種金属イオンに配位した錯体得られた¹³⁾。

パラジウム (II) イオンと同様に平面四配位型である白金 (II) イオンを用いた場合には、配位結合がより強くなるために十分な平衡条件を達成できず、同じ条件では自己組織化が進まなかった。しかし、トリフルオロエタノールを添加して反応条件における配位力を弱め、反応後に減圧下でトリフルオロエタノールを除去する手法によって球状錯体得ることができ、酸性条件下で安定な錯体得られた¹⁴⁾。

■ 3. 一義構造を堅持した錯体の化学修飾

自己組織化によって構築した球状錯体は、数十～百におよぶ配位結合が分子の骨格を支えている。個々のピリジル基とパラジウム (II) イオンとの配位結合は弱い、多数の配位結合が一分子に集積されることで、錯体の安定性は共有結合に匹敵するほど強くなることをみいだしており¹⁵⁾、錯体骨格を基盤に分子設計して化学修飾すればねらった通りの機能付与が可能である。

官能基化した生成物も一義構造であるためには、官能基の導入効率が定量的でなければならない。たとえば $M_{12}L_{24}$ 錯体では、24個の等価な配位サイトが一分子内に含まれるため、錯体を構築した後で配位子部位を化学修飾すると、各々の収率が95%であったとしても $(0.95)^{24} = 0.29$ と、完全に化学修飾された錯体は30%程度しか得られない。そこで、あらかじめ化学修飾を施した配位子を用いて錯体を構築することで、一義構造の生成物を得ることにした。湾曲した配位子の内側に官能基を導入すると、中空の球状錯体の内表面に官能基が配置されることになり¹⁶⁾、また、配位子の頂点部分に官能基を導入すると球状錯体の表面に官能基が配置されることになる²⁾。

図5. 時間展開する自己組織化の過程を実験的に捕らえた。

錯体の内部と外部は、トポロジーとしては異なるものの、実際の分子認識の様相を分子構造に基づいて考えると、区別がつかない。球状錯体そのものは、表面におよそ1ナノメートルの正三角形や正方形の空孔があいたメッシュ状の構造であり、また錯体構造が巨大であるために、錯体の内外が化学的に同じ環境にあるためである。しかし、官能基を導入すれば、特徴的な化学的な環境をうみだすことができる。たとえば、内部に24本のフルオラス鎖を導入した $M_{12}L_{24}$ 錯体は、有機溶媒中において、ナノメートルサイズの超微小なフッ素性溶媒の環境をうみだし、複数のフッ素性の有機小分子を溶かし込むことがわかった(図6)¹⁷⁾。同様に、アルキル鎖を内部集積することで疎水性小分子を溶かし込む親油性のナノ溶媒空間を構築でき³⁾、また、芳香族分子を内部集積することでフラレンを溶かし込むナノ溶媒空間を構築できた¹⁹⁾。また、内部での官能基の異性化反応²¹⁾や共有結合の生成反応²²⁾、さらに、とりこんだモノマーユニットの重合反応も可能であり²³⁾、内部には十分に大きな包接空間があり、反応場としての活用が可能である。錯体表面の修飾においては、配位子間の間隔がおおよそ2 nm程度あいているために十分な空間があり、デンドロンのような巨大な官能基も導入できた²³⁾。

図6. 内部にフルオロアルキル鎖を化学修飾することで、6分子のパーフルオロオクタンを錯体内に溶かし込むことができた。

3.1. 糖鎖インターフェースでタンパク質を丸ごと包み込んだ錯体

このように他に類を見ない巨大で精緻な球状錯体に、生体分子を定量的に化学修飾することで、一義構造の生体分子クラスターがなすインターフェースを構築し、独自構造に由来する特異な機能発現を検討した。

錯体内部にペプチドを修飾する検討をおこない、酵素ポケットのようなキラル空間をうみだす試みにおいて、 $M_{12}L_{24}$ 球状錯体の内部には4残基のペプチド鎖を集積できることがわかった⁴⁾。配位子は24個あるので、錯体内部には合計で96残基のペプチド鎖が内包されており、小さめのタンパク質であれば丸ごと包接できるのではないかと示唆された。タンパク質の構造安定化や酵素活性利用をめざして、タンパク質をカプセル状物質に包み込む検討は興味を引いてきているが、人工的に合成した

一義構造の中空分子内に、タンパク質を丸ごと閉じ込める試みは、そのような中空分子がなかったために実現できず、初めての試みであった。

包接するタンパク質として、比較的安定性が高く、分子シミュレーションによって内包できると見込まれる大きさをもつことが確認できたユビキチンを選択した。C末端を変異させてシステインとし、この残基上のチオール基を使って位置選択的に配位子の内側にユビキチンを連結した²⁵⁾。一方、親水性のタンパク質を錯体内に安定に包み込むために、グルコースを内側に連結した配位子を合成した。これら2種類の配位子を混合して、パラジウム(II)イオンと自己組織化をおこなった(図7)。タンパク質を分解・変性させないように穏和な反応条件・精製条件を用いるよう配慮した。得られた溶液のNMRを解析した結果、錯体由来の信号とユビキチン由来の信号は、同じ拡散係数を示し、一体化して運動していることがわかった。残念ながら質量分析において良好なスペクトルは得られなかったが、分子量を見積もる代替手法として、超遠心分析を適用した。沈降速度法により、空の錯体とユビキチン内包錯体は、それぞれ高い単分散性を有することがわかった。さらに、沈降平衡法により重量平均分子量を見積もると、空の錯体に比べて、ユビキチン内包錯体では、ユビキチンに相当する分だけ分子量が増加したことがわかった。一義的な構造をもつ、ユビキチンを一分子だけ内包した錯体が、定量的に生成したことが明らかになった。

図7. 錯体内面において24本の糖鎖インターフェースがつくり出す親水性空間に、ユビキチンを丸ごと包接することができた。

一義構造を有するために単結晶を調製することができ、ユビキチン内包錯体の放射光X線構造解析をおこなうことができた。通常の解析においては、錯体骨格は分子設計通りに $M_{12}L_{24}$ 球状錯体であることがわかったが、タンパク質の構造をモデル化することはできなかった。しかし、単結晶を電気泳動により解析すると、結晶中にユビキチンが含まれていることがわかり、また、結晶のパッキング構造を考慮すると、錯体内部以外にユビキチンが存在する空隙がないこともわかった。そこで、空の錯体の結晶データとユビキチン内包錯体の結晶データに対して、弱い電子密度を精密化できるマキシマムエ

ントロピー (MEM) 法を適用し、電子密度のヒストグラムの差分解析をおこなった。その結果、ユビキチンの占める体積に相当する分だけ、空の錯体における溶媒分子に対応する電子が、ユビキチンに対応する電子に置き換わったことが明らかになった。さらに、ユビキチンに対応する平均電子密度を分子構造にマッピングすると、錯体分子の中央部分に電子雲が浮かび上がった。シミュレーションモデルとの比較を通じて、錯体内表面の糖鎖がなすインターフェースに包まれる形で、錯体中央部分にユビキチンが丸ごと包接されている様相が明らかになった²⁶⁾。

3.2. 糖鎖インターフェースによる無機ナノ粒子のテンプレート合成

ユビキチンを包む糖鎖インターフェースは、ぴったり24分子だけの糖鎖が球状の中空ナノ空間に均等に配置された一義構造であるという構造的な特徴をもつ。この糖鎖を三次元のテンプレートとして無機ナノ粒子を合成すれば、糖鎖のなす精密構造が転写されて、構造が精密制御されたナノ粒子が得られると考えた²⁷⁾。糖鎖はシリカ重合反応のテンプレートとなることが知られていることから、糖鎖を内部に化学修飾した球状錯体を合成し、次にシリカゲル前駆体であるテトラメトキシシランを加えてゾル-ゲル反応をおこなったところ、錯体内部でのみ重合反応が進行してシリカナノ粒子が得られた (図8)。分子レベルで構造が制御されたことによって、質量分析による分子量の決定や透過型電子顕微鏡 (TEM) によるシリカナノ粒子の観察による粒径の決定ができ、高分解能な構造決定が達成された。ESI-MS では錯体骨格が保持されて糖鎖インターフェースに包まれたシリカナノ粒子全体の分子量が決定でき、またレーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (LDI-TOF-MS) ではイオン化条件で錯体骨格が分解してシリカナノ粒子の分子量が決定できた。加える前駆体の当量や錯体骨格の大きさに応じて、5千から3万1千の範囲で定量的に重合反応が進行し、いずれも多分散度が1.01以下という高い単分散性のシリカナノ粒子が得られた²⁸⁾。この手法は酸化チタンナノ粒子合成や²⁹⁾、シリカナノ粒子を構築したあとで

酸化チタン前駆体や酸化ジルコニウム前駆体を加えることでコア-シェルタイプのナノ粒子の合成にも応用することができ³⁰⁾、構造が精密制御された無機ナノ粒子合成として高い汎用性をもつことが示された。

3.3. 分子を超えた巨大なスケールで分子認識する錯体表面の生体分子インターフェース

中空錯体内の生体分子インターフェースはタンパク質や無機ナノ粒子といった、1桁代のナノメートルスケールの分子・物質を認識できることがわかった。錯体の表面の生体分子インターフェースを使えば、より大きなスケールでの分子認識にも適用できると考えた。たとえば糖鎖インターフェースを表面に有する錯体を合成し、糖鎖認識サイトを複数もつタンパク質であるレクチンとの相互作用を検討したところ、導入した糖鎖の種類に応じた選択認識が発現して凝集がおこなうことがわかった⁷⁾。また、DNA 鎖インターフェースを構築した錯体では、相補的塩基対の選択認識が発現して凝集することがわかった⁸⁾。無機物に対しても応用可能であり、シリカゲルの重合反応を表面でおこなうと錯体を包むシリカの殻が得られ、この特異な構造は焼成・還元の手順を経て錯体由来する酸化パラジウム (II) やパラジウム (0) ナノクラスタの合成に応用できた⁹⁾。錯体内部には入りきらない巨大な分子スケールでの生体分子や無機物に対する分子認識を、分子設計された一義構造分子を用いて展開することがわかってきた。

さらに認識対象を究極的に大きく、無限の表面にまで拡張する検討をおこなった。無限表面の認識に必要な化学修飾を分子設計し、特定の無機物を認識する配列のペプチドアダプターの導入による無機基板の表面認識を標的とした。酸化チタンを認識する6残基からなるペプチドである minTBP-1 (Arg-Lys-Leu-Pro-Asp-Ala)¹⁰⁾ を錯体表面に化学修飾した。この錯体溶液を酸化チタン表面に接触させ、その相互作用を水晶振動子マイクロバランス (QCM) によって解析したところ、不可逆的に強く錯体が表面吸着されたことがわかった。minTBP-1 単体での吸着は可逆的で弱いことが知られており、錯体表面に密にペプチドアダプターを集積したことで複数のペプチドアダプターが共同的に作用できるようになり、その認識能が強化されたことを明らかにできた。さらに、酸化チタンの単結晶を用い、原子間力顕微鏡 (AFM) で錯体吸着の様子を観察したところ、非常に高密度に吸着された様子がわかった (図9)¹¹⁾。なおごく最近、この minTBP-1 修飾錯体の大きさが DNA を巻き取るヒストンに近く、minTBP-1 に由来する正電荷を活用することで DNA を多段階で巻き取っていく様相も AFM により明らかにすることができた¹³⁾。

図8. 錯体内面の糖鎖インターフェースを三次元のテンプレートとなる反応場として用い、単分散の無機ナノ粒子を合成した。

図9. AFM 観察によってみだされた、酸化チタン表面に高密度吸着されたペプチドアプタマーインターフェースを有する錯体分子。

■ 4. おわりに

本研究では、中空球状錯体を母核に用い、錯体内外に精密に生体分子を化学修飾することで、分子生物学的な応用や生命現象に関連する分子認識の発現、さらに無機材料合成や無機基板認識への応用展開を達成した。自己組織化を駆使することで、巨大な中空球状錯体を定量的かつ精密な構造をとるように自在に合成し、分子レベルの高分解能で興味のある構造や機能を明瞭に決定することを通じて、独特の構造に由来する特異な機能を開発した。従来法では達成困難な～十ナノメートルの巨大な分子スケールにおける、二次元的な「認識面」を活用した新たな分子認識化学を開拓できたと考えている。今後、この方法論が有機合成化学と分子生物学、材料科学とを橋渡しすることを夢見ている。

■ 謝辞

本研究は東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻の藤田 誠 教授のご指導のもとでおこなったものであり、同教授に深く感謝申し上げます。同研究室の河野正規博士（現ポハノ工科大学）、吉沢道人博士（現東京工業大学）、村瀬隆史博士（現山形大学）、猪熊泰英博士、澤田知久博士、藤田大士博士には、この研究に関する様々な助言をいただき、共同研究者としても研究を進めさせていただいたことを厚く御礼申し上げます。本研究の先駆けとなる $M_{12}L_{24}$ 球状錯体合成の研究を展開された、徳島文理大学の富永昌英博士には貴重なご助言をいただき大変感謝しております。生体関連の応用に関しては、名古屋市立大学・分子研の加藤晃一博士、矢木内海真穂博士、山口拓実博士、名城大学の栗本英治博士、理研の山口芳樹博士、がん研究所の芝清隆博士、松村幸子博士、大阪大学の内山 進博士、野田勝紀博士、京都大学の杉山正明博士と共同で研究させていただきました。単結晶 X 線構造解析に関しては、日本大学の尾関智二博士、高輝度光科学研究センターの熊坂 崇博士、水野伸宏博士、

理研の高田昌樹博士、Jyväskylä 大学の Kari Rissanen 博士、Jens Bunzen 博士と共同で研究させていただきました。質量分析に関しては、徳島文理大学の山口健太郎博士、清 悦久博士、理研の越野広雪博士、本郷やよい博士と共同で研究させていただきました。無機ナノ材料の解析に関しては、京都大学の寺村謙太郎博士、朝倉博行博士、千葉大学の大場友則博士、森田 剛博士と共同で研究させていただきました。計算シミュレーションに関しては、米谷 慎博士、山口智彦博士と共同で研究させていただきました。錯体の高次集積に関しては、Lehigh 大学の Tianbo Liu 博士と共同で研究させていただきました。末尾ながら特筆すべきこととして、本研究成果が得られたことは熱心に研究に励んでくださった学生諸氏の努力によるものです。一人一人のお名前を挙げるのがスペース上でできず申し訳ありませんが、改めて心より感謝申し上げます。

実験の実施にあたっては、SPring-8 BL01B1, BL02B1, BL26B1, BL26B2, BL38B1, BL40XU, BL41XU, BL45XU ビームライン、KEK PF BL1A, PF BL10C, PF BL17A, PF-AR, NW2A, PF-AR NW12A, PF-AR NE3A ビームライン、AS MX1, MX2 ビームライン、J-PARC MLF BL15 TAIKAN ビームライン、ILL HFR D22 ビームライン、分子研ナノテクノロジープラットホーム (920 MHz NMR)、理研横浜 NMR 施設、徳島文理大学香川薬学部中央機器室、千葉大学共用機器センター、東京大学超微細リソグラフィ・ナノ計測拠点、東京大学大学院理学系研究科化学専攻有機元素分析室にて、貴重な測定時間を使用させていただきました。また、日本電子(株)、ブルカー・バイオスピン(株)、ブルカー・ダルトニクス(株)、日本ウォーターズ(株)、アジレント・テクノロジー(株)、サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)、(株)島津製作所、日本分光(株)、(株)アサイラムテクノロジー、(株)アントンパール・ジャパン、日本シイベルヘグナー(株)にて、最新鋭の測定装置を使用させていただきました。研究の促進にご高配賜りありがとうございました。

世界最大級の一義構造の分子の合成、構造決定、分子生物学や無機材料への応用への展開は、とても一つの研究グループだけで実施できるものではありませんでした。お名前をご紹介できなかった方々も含め、沢山の研究者・学生の方々に助けられ、また数え切れないほどの装置から得られた実験結果を総合的に考察することで初めて成果につながりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

■ 文献

- 1) M. Fujita, Y. J. Kwon, S. Washizu, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1151-1152 (1994).

- 2) M. Tominaga, K. Suzuki, M. Kawano, T. Kusakawa, T. Ozeki, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5621-5625 (2004).
- 3) K. Suzuki, M. Tominaga, M. Kawano, M. Fujita, *Chem. Commun.*, 1638-1640 (2009).
- 4) K. Yamaguchi, *J. Mass Spectrom.*, **38**, 473-490 (2003).
- 5) Q.-F. Sun, J. Iwasa, D. Ogawa, Y. Ishido, S. Sato, T. Ozeki, Y. Sei, K. Yamaguchi, M. Fujita, *Science*, **328**, 1144-1147 (2010).
- 6) J. Bunzen, J. Iwasa, P. Bonakdarzadeh, E. Numata, K. Rissanen, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 3161-3163 (2012).
- 7) D. Fujita, H. Yokoyama, Y. Ueda, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 155-158 (2015).
- 8) M. Yoneya, T. Yamaguchi, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 14401-14407 (2012).
- 9) M. Yoneya, S. Tsuzuki, T. Yamaguchi, S. Sato, M. Fujita, *ACS Nano*, **8**, 1290-1296 (2014).
- 10) Q.-F. Sun, T. Murase, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 10318-10321 (2011).
- 11) Q.-F. Sun, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 13510-13513 (2014).
- 12) Q.-F. Sun, S. Sato, M. Fujita, *Nature Chem.*, **4**, 330-333 (2012).
- 13) K. Harris, Q.-F. Sun, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12497-12499 (2013).
- 14) D. Fujita, A. Takahashi, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 13317-13319 (2011).
- 15) S. Sato, Y. Ishido, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6064-6065 (2009).
- 16) M. Tominaga, K. Suzuki, T. Murase, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11950-11951 (2005).
- 17) S. Sato, J. Iida, K. Suzuki, M. Kawano, T. Ozeki, M. Fujita, *Science*, **313**, 1273-1276 (2006).
- 18) K. Suzuki, J. Iida, S. Sato, M. Kawano, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 5780-5782 (2008).
- 19) K. Suzuki, K. Takao, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 2544-2545 (2010).
- 20) T. Murase, S. Sato, and M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 5133-5136 (2007).
- 21) T. Murase, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1083-1085 (2007).
- 22) T. Kikuchi, T. Murase, S. Sato, M. Fujita, *Supramol. Chem.*, **20**, 81-94 (2008).
- 23) Q.-F. Sun, S. Sato, M. Fujita, *Chem. Lett.*, **40**, 726-727 (2011).
- 24) K. Suzuki, M. Kawano, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 10652-10653 (2007).
- 25) D. Fujita, K. Suzuki, S. Sato, M. Yagi-Utsumi, E. Kurimoto, Y. Yamaguchi, K. Kato, M. Fujita, *Chem. Lett.*, **41**, 313-315 (2012).
- 26) D. Fujita, K. Suzuki, S. Sato, M. Yagi-Utsumi, Y. Yamaguchi, N. Mizuno, T. Kumasaka, M. Takata, M. Noda, S. Uchiyama, K. Kato, M. Fujita, *Nature Commun.*, **3**, 1093 (2012).
- 27) K. J. C. Van Bommel, A. Friggeri, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 980-999 (2003).
- 28) K. Suzuki, S. Sato, M. Fujita, *Nature Chem.*, **2**, 25-29 (2010).
- 29) T. Ichijo, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 6786-6789 (2013).
- 30) K. Suzuki, K. Takao, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 4858-4861 (2011).
- 31) N. Kamiya, M. Tominaga, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3816-3817 (2007).
- 32) T. Kikuchi, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 15930-15932 (2010).
- 33) K. Takao, K. Suzuki, T. Ichijo, S. Sato, H. Asakura, K. Teramura, K. Kato, T. Ohba, T. Morita, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 5893-5896 (2012).
- 34) K. Sano, K. Shiba, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14234-14235 (2003).
- 35) M. Ikemi, T. Kikuchi, S. Matsumura, K. Shiba, S. Sato, M. Fujita, *Chem. Sci.*, **1**, 68-71 (2010).
- 36) T. Kikuchi, S. Sato, D. Fujita, M. Fujita, *Chem. Sci.*, **5**, 3257-3260 (2014).

Profile

佐藤 宗太

東北大学原子分子材料科学高等研究機構 (WPI-AIMR) 准教授 博士 (理学)

[経歴] 2000 年東京大学理学部卒業、2005 年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了、同年東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻・助手、2007 年同助教、2010 年同講師、2013 年東北大学原子分子材料科学高等研究機構・准教授、同年 JST, ERATO, 磯部縮退 π 集積プロジェクト・グループリーダー (兼任)

[専門] 錯体化学、有機化学