

(1) 多様なモノマー配列や形を有するリビングポリマーの合成

(阪大院理) 青島 貞人、金澤 有紘

「目的」

我々はこれまで、新しいリビングカチオン重合系やビニル付加・開環同時カチオン共重合系を検討し、生成ポリマーの分子量や末端構造の精密制御を行ってきた。本年度は、多様なモノマー配列や形を有するリビングポリマーの合成を、モノマーの種類や重合手法を拡げて試み、それらが同時に制御された系の構築を検討した。具体的には、多官能性開始剤を用いた多分岐型温度応答性ポリマーの合成、光開始によるリビング配列制御カチオン三元共重合、糖由来環状アセタールを用いたビニル付加・開環カチオン共重合、ビニルエステルとアルコキシフタリドの交互カチオン共重合などを試みた。

「結果と考察」

(1) カリックスアレーンから合成した四官能性・八官能性開始剤や、数十個の開始点をもつグラフトポリマー型マクロ開始剤を用いたリビングカチオン重合により、種々の多分岐型ポリビニルエーテル (VE) の合成を試みた。最適な条件下では各開始点からリビング重合が定量的に進行し、長さの揃った多様な分岐鎖を有するポリマーが得られた。水中で温度応答性を示す VE を用いた場合には、分岐数により異なる応答挙動を示すことがわかった。

(2) 当研究室で過去に報告した VE・オキシラン・ケトンの配列制御カチオン三元共重合系に、シクロヘキセンオキシドのリビングカチオン重合系とジアリールヨードニウム塩光開始剤を組み合わせることにより、光開始により分子量とモノマー配列を同時に制御する新しい重合法を構築した。さらに、重合条件の適切な設計により、長寿命生長種の生成を伴う重合が進行し ABC 型周期に近いモノマー配列のポリマーが生成するようになった。

(3) 再生可能で構造や立体に多様性を持つ糖由来の環状アセタールと VE がカチオン共重合することを見いだした。また、環状アセタールの立体的かさ高さや置換基の種類、開始剤/触媒が共重合に及ぼす影響が明らかになった。

酢酸ビニルなどのビニルエステル類が、環状ヘミアセタールエステル構造をもつ 3-アルコキシフタリドとカチオン共重合し、交互共重合体が効率的に得られることを見いだした。また、光二量化反応性の側鎖をもつ桂皮酸ビニルとの交互共重合体も得られ、その分子内架橋反応により、酸分解性を示す一分子鎖ナノ粒子の合成も行った。

(2) 金属蛋白質活性部位の特異な疎水的環境に関する研究

(阪大院理) 鬼塚 清孝、岡村 高明、神林 直哉

「目的」

高機能高分子錯体である金属蛋白質は、水中であっても、その活性中心を疎水的環境にすることで、水素結合のような弱い相互作用を効果的に保ち、活性な準安定構造を維持している。このような疎水的環境（疎水空間）が、基質の取り込み、認識や活性化を行う特異な反応場を創り出している。活性中心のみを再現した低分子モデル錯体の反応性は酵素に遠く及ばず、周辺の蛋白質が創り出す反応場が重要である事は言うまでもない。本研究は、金属蛋白質活性部位の疎水空間、配位子、立体障害、水素結合などの要素を抽出し、緻密な設計により再現したモデル錯体を合成し、金属蛋白質の高機能の起源や活性制御機構を明らかにする事を目的とする。

「結果と考察」

非常に嵩高いアシルアミノ基を持つアレーンチオラート配位子を合成し、疎水空間で立体障害が配位構造に与える影響を系統的に調べた。具体的には、非常に嵩高いアシルアミノ基[Arⁿ₃CCONH: Ar¹ = 4-*t*-BuC₆H₄, Ar² = 3,5-*i*Pr₂C₆H₃, Ar³ = 3,5-(Me₃Si)₂C₆H₃]を持つ対称な 2,6-(Arⁿ₃CCONH)₂C₆H₃S⁻ (L2⁻~L4⁻; *n* = 1~3)、非対称な 2-Arⁿ₃CCONH-6-*t*-BuCONHC₆H₃S⁻ (L5⁻~L7⁻; *n* = 1~3)、比較として 2,6-(*t*-BuCONH)₂C₆H₃S⁻ (L1⁻)を用い、分光学的情報が得やすいコバルト(II)錯体を合成した。一般的にコバルトイオンには 4 つのチオラートが配位するが、L1⁻は 3 つ、L2⁻、L3⁻、L5⁻~L7⁻は 2 つ、L4⁻は 1 つのみが配位した。2 つの場合は空き配位座にカルボニル酸素が配位した歪んだ正四面体構造となった。1 つの場合はチオラート、脱プロトン化したアミド窒素、置換基の 1 つの Ar³ が π 配位した中性の単核錯体を与えた。非対称な L5⁻~L7⁻では 2 種類のカルボニル酸素の配位により、3 種の異性体 (*t*-BuCO/*t*-BuCO、*t*-BuCO/Arⁿ₃CCO、Arⁿ₃CCO/Arⁿ₃CCO) が考えられる。溶液中では、これらの平衡混合物となるが L7⁻では嵩高さのために *t*-BuCO/*t*-BuCO が優先的に存在した。また、金属イオン周りについて配位子の空間占有率を可視化することで立体障害の定量的な議論にも成功した¹⁾。

「文献」

- 1) Tomita, Y.; Okamura, T.; Umeda, Y.; Nishimoto, K.; Yamashita, S.; Onitsuka, K. *Inorg. Chem.* **2023**, 62, 8678–8691.

(3) 分子認識に基づく機能性超分子の合成とその機能解析

(阪大院理) 山口 浩靖、小林 裕一郎

【目的】

グリーンエネルギーである太陽光の効率的な開発利用は、持続可能な発展目標の実現に繋がる。生体系光合成システムは光エネルギーから化学エネルギーへの変換を効率良く実現している。紅色光合成細菌の反応中心における初期過程では電子ドナー (D) から電子アクセプター (A) への電子移動により長寿命の電荷分離状態が生成する。DA 間の距離の制御は、光合成において電子移動を効率良く進めるために重要である。高分子マトリックスと D あるいは A との超分子的相互作用を利用することにより、人工系でも高効率光誘起電子移動が実現できると期待される。本研究では超分子的相互作用で D と相互作用する合成高分子を利用することで DA 間の光誘起電子移動制御を目指した。

【結果と考察】

テトラフェニルポルフィレンテトラスルホン酸 (TPPS) とその亜鉛錯体 (ZnTPPS) を D に、メチルビオローゲン (MV^{2+}) を A、ポリ (N-メチル-4-ビニルピリジニウム) (P4VPM_e) を高分子マトリックスとして用いた。TPPS と ZnTPPS は共に P4VPM_e と静電相互作用で錯体を形成した。過剰量の P4VPM_e の存在下では、TPPS は自己凝集体を形成するが、ZnTPPS は凝集せず単一分子として P4VPM_e 高分子マトリックス中に分散されることが励起分光法並びに蛍光寿命測定によりわかった。TPPS または ZnTPPS と MV^{2+} 間の基底状態の電荷移動錯体の形成は、P4VPM_e との静電相互作用により制限可能であった。P4VPM_e 高分子マトリックス中で単一分子として分散される ZnTPPS は、P4VPM_e が存在しない場合と比較して、光誘起電子移動生成物の量が 10 倍以上増大した。過度吸収スペクトルにより、過剰量の P4VPM_e の存在下では、ZnTPPS から MV^{2+} への主要な電子移動プロセスが三重項経路であるがわかった。高分子マトリックス中に色素を集積させたとき、その色素の分散度の違いにより全く異なるエネルギー変換挙動を示した¹。

【文献】

1. Cao, Y.; Sotome, H.; Kobayashi, Y.; Ito, S.; Yamaguchi, H. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2024**, 452, 115593.

(4) 非整数階微積分と粘弾性測定

(阪大院理) 井上正志、浦川 理

「目的」Maxwell モデルでは、粘弾性は粘性と弾性の力学的な結合で表され、その緩和弾性率は、単一指数関数となる。緩和時間は、弾性から粘性の移行時間の目安として理解される。一方、実在系の緩和弾性率は、単一指数関数で表されることは稀で、しばしば冪乗型の緩和が観測され、時間域に応じて弾性と粘性を区別することは困難である。

非整数階微分による時間微分は、その定義に時間履歴の積分を含むため、粘弾性の記述に適している。本研究では非整数階微分を用いて、粘性、弾性、そして緩和時間の概念に縛られない粘弾性の記述法を開拓し、その有効性を探る。

「結果と考察」

ナノ誘電プローブ用いたマイクロレオロジーの測定方法を開発した。マトリクスポリマーの粘弾性を粘性力の遅延効果として考慮し、一般化Lanvegin方程式を導いた。さらにこれを用いて、マトリクスの複素弾性率とプローブの複素誘電率の普遍的関係を導いた。マトリクスが純粘性体の場合、誘電緩和スペクトルはDebye関数で表されるが、べき乗則型緩和特性を示す場合にはCole-Cole関数で表現されることがわかった。さらに、非整数階微分Lanvegin方程式を用いても、等価な結果が得られることがわかった。この手法をポリスチレンマトリクス内の低分子量プローブに適用したところ、推定されたポリスチレンの実効複素弾性率がべき乗則型に近いことをわかった。プローブサイズがマトリクス高分子のモノマーサイズに近い場合連続体近似が成立せず、代替手法として非整数階微分の利用が有用であることがわかった。

[1] “Viscoelastic Effects on Molecular Dynamics of Dielectric Probes in Polymer Matrices”, Urakawa, O.; Nobukawa, S.; Inoue, T. *Nihon Reoroji Gakkaishi*, 2023, **51**, 9-17.

[2] “マイクロレオロジーの測定技術杉森 建哉”, 浦川 理; 井上 正志 *オレオサイエンス* 2023, **23**, 477-482.

(5) 新規高密度トリアゾールポリマーの合成と機能

(阪大院理) 橋爪 章仁・中畑 雅樹

「目的」

われわれは、高分子が重要な役割を担っている理由を詳細に解明することを目的とし、独自に設計、合成した精密高分子を用いて高分子性の理解を目指している。また、高分子性を利用した高性能高分子の開発も目指している。特に、われわれは、クリックケミストリーの中心的な反応である銅 (I) 触媒アジドアルキン環化付加 (CuAAC) に着目し、アジドとアルキンを有するポリマーから高密度トリアゾールポリマーの合成を行っている。2023 年度は、CuAAC 重合によって高密度トリアゾール骨格を有する立体規則性ポリマーを合成し、得られたポリマーの溶液中における温度応答性を評価した。

「結果と考察」

当研究室で独自に設計した 3-アジド-1-プロピン酸誘導体である *N*-エチル-*N*-メチル 4-アジド-5-ヘキシナムイド (ME) の R/R-ダイマーと R/S-ダイマーを合成し、そのダイマーをモノマーとして CuAAC 重合することにより、立体規則性 (イソタクチックおよびシンジオタクチック) poly(ME) (*iso*-poly(ME)、*syndio*-poly(ME)) を合成した。*iso*-poly(ME) とジメチルスルホキシド (DMSO) および *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) との二元混合物は、温度を上げるとある温度でゲルからゾルに変化する熱応答性ゲル・ゾル転移を起こした。一方、*syndio*-poly(ME) の水溶液は下限臨界溶液温度 (LCST) 型の相転移を起こし、低温では透明であった溶液が、温度が上がるとある温度で濁った状態になった。注目すべきことに、残留銅イオンの量が少なく分子量が低い *syndio*-poly(ME) 試料では、遅い温度変化速度において、昇温過程で透過率が低下する温度領域よりも高い温度領域で降温過程での透過率の回復が観察された (逆のヒステリシス)。逆のヒステリシスがおこる昇温過程では、相分離が起こった後、高温領域で透過率の増加が観測された。透過率が増加する際に、*syndio*-poly(ME) 鎖がポリマー凝集体中で再配列され、より容易に再水和されるポリマー凝集体が形成されたものと考えられる。

「文献」

1) Okuno, K.; Miura, J.; Yamasaki, S.; Nakahata, M.; Kamon, Y.; Hashidzume, A. *Polym. Chem.* **2023**, *14*, 1488-1496.

(6) べん毛モーター固定子の回転機構の解明

(阪大院理) 今田勝巳、金子文俊、川口辰也、竹川宜宏

【目的】

細菌べん毛モーターは、細胞内外のプロトンまたはナトリウムイオンの濃度差を利用して回転する。固定子ユニット中をイオンが通過すると固定子 A サブユニットリングが B サブユニットを中心軸として回転し、A サブユニットと回転子の相互作用により回転子が回転する。これまでに、数種の固定子ユニットの構造がわかっているがイオンの通過経路や回転の証明はされていない。そこで、ナトリウムイオン駆動型モーターの固定子およびその変異体の構造解析を行い、イオンの通過経路の解明に取り組んだ。

【結果と考察】

海洋性細菌由来のナトリウムイオン駆動型モーター固定子 PomAB 複合体およびナトリウムイオンが結合する残基に変異が入った PomAB(D24N)変異体を発現・精製し、それらの構造をクライオ電子顕微鏡を用いてそれぞれナトリウムイオン存在下および非存在下で解析した。PomAB 複合体中にはイオン透過経路と考えられる長いトンネルが存在した。野生型 PomAB 複合体と PomAB(D24N)変異体の構造に大きな差は見られなかったが、長いトンネル中にはナトリウムイオン存在下でのみ現れる強い密度が2か所あった。このうち1か所は完全に疎水的なキャビティ内にあり、水和ナトリウムイオンをちょうど収容できる大きさであることから、ナトリウムイオンを選択するサイズフィルターの役割を果たしていると考えられた。もう1か所は親水的なキャビティ内にあり、疎水的なキャビティと親水的なキャビティの間をつなぐ細い領域から伸びる残基と相互作用することから、親水的なキャビティに入るとナトリウムイオンの水和水の脱水が一部で起こり、長いトンネル中の親水性残基がナトリウムイオンをリレーすると考えられる。この発見に基づいて固定子の回転に伴うイオン透過モデルを提案した。現在、この成果について論文作成中であり、近々投稿する予定である。また、以前より取り組んでいるべん毛形成を観測する方法に関する論文が掲載された¹。

1. In Vitro Flagellar Type III Protein Transport Assay Using Inverted Membrane Vesicles. Imada K.; Terashima, H. *Methods Mol Biol.* **2023**, 2646, 17-26.

(7) 水溶液中におけるナノ微粒子と多重らせん高分子の複合体形成挙動

(阪大院理) 寺尾 憲

「目的」

金ナノ粒子 (AuNP) やシリカナノ粒子 (SiNP) などのナノ粒子と多重らせん高分子の複合体形成には、その多重らせん構造の融解および再形成がナノ粒子の集合体挙動に影響を及ぼすため、ナノ粒子の集合体の構造形成に利用できる可能性がある。そこで、我々は小角 X 線散乱や紫外可視吸収測定などの手法を用いて、ナノスケールでの相互作用や複合体構造の特性を調査している。ここでは、AuNP とアテロコラーゲン (AC) またはゼンサンの間での複合体形成についての研究結果を述べる。

「結果と考察」

1. ゼンサンとシリカナノ粒子 (SiNP) の複合体形成

本研究では、ゼンサンとシリカナノ粒子 (SiNP) について、pH 5.0 の酢酸緩衝液中における複合体形成について調査した。ゼンサンと SiNP の質量濃度比 c_x/c_{SiNP} が 0.056 から 0.58 の範囲で、沈殿が観察された。また、混合溶液の ζ 電位の符号が、測定した c_x/c_{SiNP} の範囲で反転することから静電引力による複合体形成であることがわかった。さらに、SiNP は、前報における AC と SiNP との複合体とは幾分異なり、ゼンサンが二重らせんおよび一本鎖の場合ともに、複合体内で比較的粗に集合していることが、小角 X 線散乱によって明らかにされた。

2. アテロコラーゲン (AC) と金ナノ粒子 (AuNP) の複合体形成

金ナノ粒子 (AuNP) とアテロコラーゲン (AC) の間での複合体形成も同様の手法で研究した。pH 4 の酢酸緩衝液中、異なる温度条件下で、小角 X 線散乱および紫外可視吸収測定を行った。AuNP は AC よりもはるかに高い電子密度を持つため、AuNP の散乱強度から AuNP の構造因子 $S(q)$ を容易に推定することができる。このデータを解析し混合溶液において特に小さい AuNP に対して、AuNP 間に著しい引力相互作用がみられた。また、吸収スペクトルからも複合体形成が検出された。

「文献」

(1) Tomofuji, Y.; Terao, K. *Macromol. Symp.* **2023**, 408, 2200025.

(8) 可逆性・可動性架橋に基づいた高分子材料の創製

(高分子材料設計学研究室) 高島 義徳

【目的】本研究では、高分子材料内部の分子レベルの架橋設計とマイクロ構造設計に着目し、新たな高分子材料の創製を目的としている。架橋設計には可逆性架橋、もしくは可動性架橋を高分子鎖間に導入し、各架橋点の分子運動性や熱力学的安定性について調査した。2023 年度は(1) 可動性架橋を有する無機高分子材料または有機-無機複合材料の作製、(2) 特異な架橋構造をもった高分子材料とセルロースとの複合化、などについて取り組み、一軸延伸測定を行いながら分光分析やX線散乱解析、などについて試みた。

【経過】(1) ポリジメチルシロキサン(PDMS)などの無機高分子は、有機高分子と比べて力学特性が乏しい。可動性架橋の導入による靱性の向上を試みた。チオール変性 PDMS にアクリルアミド修飾全アセチル化 γ -シクロデキストリン(TAc γ CD)をチオール-エン反応で修飾し、可動性架橋 PDMS(PDMS-TAc γ CD)を作製した。可動性架橋がない材料よりも高い靱性を示した。TAc γ CD 導入率が 2 mol%のとき最大の靱性を示し、化学架橋 PDMS の 100 倍の値を示した。¹⁻²⁾

(2) セルロース複合材料中の高分子に独自の架橋設計を導入することで強靱化を達成した。 β -シクロデキストリン(β CD)とアダマンタン(Ad)からなる可逆性架橋を有する一次ポリマーと二次直鎖ポリマーの混合物(SCP)に、クエン酸変性セルロース(CAC)を複合することで、セルロース複合材料(SCP/CAC(w))を作製した。CAC の添加量 w (wt%)が増加すると、SCP/CAC(w)の破断ひずみが増加した。特に、 $w = 5$ wt%および 10 wt%のとき高い靱性を維持した。一般に、高分子へセルロースを添加すると脆くなってしまうが、高分子の架橋設計とセルロースの表面修飾によって、靱性向上を達成した³⁾。

1. Yoshida, D.; Park, J.; Yamashita, N.; Ikura, R.; Kato, N.; Kamei, M.; Ogura, K.; Igarashi, M.; Nakagawa, H.; Takashima, Y. *Polym. Chem.* **2023**, *14*, 3277-3285.
2. Yamashita, N.; Yamaoka, K.; Ikura, R.; Yoshida, D.; Park, J.; Kato, N.; Kamei, M.; Ogura, K.; Igarashi, M.; Nakagawa, H.; Takashima, Y. *Soft Matter* **2023**, *19*, 9074-9081.
3. Wada, T.; Park, J.; Yamaoka, K.; Asaki, Y.; Sugawara, A.; Ikura, R.; Uetsuji, Y.; Uyama, H.; Takashima, Y. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2023**, *5*, 10334-10341.

(9) 糖と金属イオンの錯形成を利用した自己修復ゲル

(阪大院工) 宇山 浩、徐 于懿、菅原章秀

「目的」

ハイドロゲルは三次元網目構造の内部に水を取り込んだ高分子材料である。柔軟性や生体適合性に優れており、人体に類似した特徴を持つことから組織工学への応用が期待される。しかし、従来のハイドロゲルは外部刺激による損傷を受けやすく、長期使用における安定性が低いとされている。そこで、損傷を自律的に修復するハイドロゲルの開発が行われてきた。本研究では糖と一価金属イオンとの金属配位結合を架橋点に利用することで、多種の金属イオンの存在下において安定に自己修復性を示すゲルの開発を目指す。

「結果と考察」

3-グルコノアミドプロピルメタクリルアミド (GAPMA) を水中でラジカル重合することで糖を側鎖に有するポリ(3-グルコノアミドプロピルメタクリルアミド) (PGAPMA) を合成した。PGAPMA とポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム) (PSS) の水溶液を混合したところ凝集物の形成が認められた。これは PGAPMA 側鎖の糖の水酸基と PSS の対イオンである Na^+ が多点で錯形成したことにより水に不溶なポリマーコンプレックスを形成したためであると考えられる。このコンプレックス形成を利用することでゲルを作製した。 NaCl 水溶液中でポリマーを混合することで得られた PGAPMA/PSS コンプレックスを遠心分離により回収し、凍結乾燥した後、粉碎し粉末を作製した。この粉末を少量の水とともにモールドに入れることで一塊のゲルを成形可能であった。また、作製したゲルは水中において形状を維持したまま膨潤した。このことから、PGAPMA/PSS コンプレックスの可逆的な形成能を利用することで粉末状態から任意の形状の安定なゲルを容易に作製できることが明らかになった。

PGAPMA/PSS- Na ゲルを NaCl 水溶液に浸漬した後、2 つに切断し、切断面を接触させたところ、即座に接着した。これは接触面のイオン結合および金属配位結合において交換反応が起こり、PGAPMA/PSS コンプレックスを再形成することでゲルのネットワーク構造が修復されたためであると考えられる。さらに、自己修復後のゲルの強度は接触後 1 時間で切断前と同程度まで回復した。 Li^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} といった金属イオンについても同様の評価を行ったところ、すべての金属イオンにおいて数時間程度でゲルの強度が復元する高い自己修復性を示した。

(10) 超分子有機多孔質材料の高機能化

(阪大院工) 藤内 謙光、岡 弘樹

【目的】無機系の多孔質材料は古くから貯蔵、分離、精製、触媒など様々な用途で広く利用されてきた。一方でこの20年余り、高機能化の観点から有機分子をその構成要素に用いた有機多孔質材料の研究開発が精力的に行われている。さらに我々はそこに分解性、再生性を組み込むために超分子化学的なアプローチによって多孔質材料を設計構築している。本研究では、温室効果ガスである二酸化炭素を選択的に吸着分離することのできる多孔質有機塩の構築を目指す。さらに空孔表面を様々な元素や置換基で修飾することによって、ガス分子をはじめとする化学種への選択性の制御とそのメカニズムを解明する。

【結果と考察】トリフェニルメチルアミン (TPMA) にメチル基、およびハロゲンを導入した誘導体 (TPMA-X) を合成し、アダマントランに4つのフェニルスルホン酸を置換した4,4',4'',4'''-(adamantane-1,3,5,7-tetrayl) tetrabenzenesulfonic acid (AdPS)と組み合わせると、メチル、塩素、臭素、ヨウ素を導入した TPMA-Me, -Cl, -Br, -I ではソーダライト型の籠状空間を持つ多孔質構造が得られた。¹⁾ 空孔内では、導入したハロゲンが表面に露出しており、空孔環境を修飾することが可能であることを実証した。臭素、ヨウ素を用いたものでは、籠状空間が重原子に囲まれていることに着目し、空孔内に発光性分子を閉じ込めることでりん光を誘導できると着想した。再結晶時にピレンを加えておくと、空孔内にピレンを一定量導入できることが分かった。それぞれ得られた結晶材料について蛍光測定を行うと、すべての結晶材料で蛍光が観測された。一方りん光測定では、メチル基を導入したものではりん光は観測されなかったが、ハロゲンを導入したものでは、Cl<Br<I の順で室温りん光効率が向上した。ピレンはりん光発光効率が極めて低い物質と知られており、今回効率よく室温りん光現象が観測されたのは①重原子効果によるスピン-軌道相互作用の増大、②空孔内閉じ込め効果による振動失活の抑制、③多孔質材料の選択的ガス吸着特性による一重項酸素の遮断、の3つの特徴によるものである。さらに、重水素化ロコネンを用いてりん光誘導の特性を精査した。²⁾

1) H. Sei, K. Oka, H. Sotome, H. Miyasaka, N. Tohnai, *Small* 19, 2301887, **2023**

2) H. Sei, K. Oka, T. Furuta, N. Tohnai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 97, uoad023, **2024**

(1 1) 巨大な生体超分子複合体の原子構造決定に関する研究

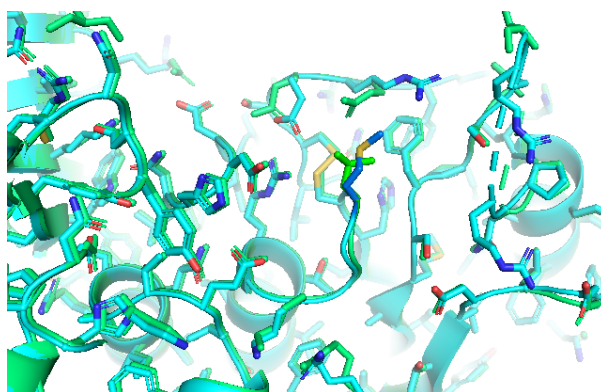
(阪大蛋白研) 中川敦史、鈴木守、山下栄樹

[目的]

X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析は、蛋白質などの生体高分子やウイルスなどの巨大な生体超分子複合体の構造解析のための強力な手法である。本研究では、X線結晶構造解析のための SPring-8 の蛋白研ビームライン (BL44XU) の高度化とビームラインを利用した技術開発を行う。さらに、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、蛋白質や生体超分子複合体の原子構造を解明し、それに基づく機能解明を目指す。

「結果と考察」

電位依存性脱リン酸化酵素 (Voltage-sensing phosphatase: VSP) は、ウニからヒトにいたる幅広い生物種に保存されていることが知られている。VSP の酵素活性に直接関与する C363 の隣の残基 K364 もほとんどの生物種で保存されているが、オポッサムなどの有袋類ではロイシンやメチオニンに置換されている。これら K364L、K364M 変異体の酵素活性は野生型に比べて同程度もしくは上昇し、また *Xenopus Oocyte* に K364M 変異体を発現させたところ電位依存性酵素活性は向上していたが、酵素領域のみの K364M 変異体を用いた活性測定では野生型に比べて脱リン酸化活性に変化が見られなかったことなどが明らかになった。そこで、364 位の変異の構造変化を知るために、X線結晶構造解析を行い、K364L 変異体 2.05Å、K364M 変異体 2.10Å 分解能の構造決定に成功した。その結果、これら変異体の活性中心付近の構造は野生型と比較してわずかな違いがみられた。



Ci-VSP の K364L および K364M 変異体の
酵素領域の重ね合わせ

(緑：K364L, 水色：K475M)

「文献」

Paixao, I. C.; Mizutani, N.; Matsuda, M.; Andriani, R. T.; Kawai, T.; Nakagawa, A.; Okochi, Y.; Okamura, Y. Role of K364 next to the active site cysteine in voltage-dependent phosphatase activity of Ci-VSP. *Biophysical Journal*, 2023, 122, 2267-2284.

(12) 新型コロナウイルス感染増強抗体の構造解析

(蛋白質研究所) 加藤貴之、高崎寛子、大出真央

[目的]

ヒスタミンは生体アミンであり、Gタンパク質共役受容体（GPCR）スーパーファミリーに属するヒスタミン受容体を刺激することで、中枢神経系と末梢組織で病態生理学的な機能を発揮する。ヒトにはH1RからH4Rまでの4つのヒスタミン受容体があり、それぞれ異なる細胞内シグナル伝達機構を持っている。これらの受容体の拮抗薬は、アレルギー性疾患や胃酸分泌の治療に開発され、現在も薬として使用されている。このうち、H4Rはヒトのヘマトポエーシス細胞に主に発現し、サイトカインの放出に参加し、抗炎症および免疫調節活性に重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では内在性ヒスタミンと結合したH4R及び、H4R選択的アゴニストであるイメチットと結合したH4Rの構造を比較することによりH4R特異的なリガンド認識機構を明らかにすることを目的に、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。

[結果と考察]

ヒスタミンは4種類のヒスタミン受容体全てと結合するが、イメチットはH4R選択的に結合することが知られている。そこで、ヒト由来H4Rを精製し、ヒスタミン及びH4R選択的作動薬であるイメチットを添加することで、それぞれの複合体を作成し、クライオ電子顕微鏡によって構造解析を行なった。その結果それぞれ3.0Å、3.1Åでの構造解析に成功した。両者の構造を比較すると、リガンド結合部位であるTry319、Phe344、Gln347、Trp348で形成される4つのアミノ酸残基においてイメチットが結合する時にPhe344の向きが約90度回転しており、その結果ヒスタミンよりもイメチットの結合を安定化していることが明らかとなった。4種類のヒスタミン受容体はそれぞれ機能が大きく異なる。例えばH2Rは胃酸分泌に関与し、H4Rは免疫調節に関わる。そのため、治療薬の開発のためには特異性が極めて重要となる。今回の構造解析から得られた知見はヒスタミン受容体が生体アミンと結合する際の特異性に関わる重要な情報であり、今後の治療薬開発の基礎的な情報として有用である。

[文献]

Im D, Kishikawa J, Shiimura Y, Hisano H, Ito A, Fujita-Fujiharu Y, Sugita Y, Noda T, Kato T, Asada H, Iwata S

Structural insights into the agonists binding and receptor selectivity of human histamine H4 receptor. *Nat. Commun.* **14**(1), 6538 (2023)

(13) 軸系ダイニンの微小管結合領域の精密構造解析

(阪大蛋白研) 栗栖源嗣、田中秀明、川本晃大

[目的]

ダイニンは ATP 依存的に微小管上を滑り運動するモーター蛋白質で、重鎖・中間鎖・軽鎖から構成される 1000kDa を超える生体超分子複合体である。鞭毛運動や繊毛運動、さらに蛋白質輸送や染色体分離運動を担う蛋白質で、その生物学的重要性は極めて高い。我々は、鞭毛・繊毛運動を駆動する軸系ダイニンの多様性に着目し、8 種類ある内腕ダイニンのうち立体構造が明らかになっていない dynein-d がもつ特徴的な微小管結合領域の構造と機能の相関を解明することを目的とした。

[結果と考察]

ヒト軸系ダイニンの dynein-d は DNAH1 遺伝子にコードされており、他の 10 種類の軸系ダイニンのなかでも特に微小管結合領域の配列相同性が低い。そこで DNAH1 の微小管結合領域を含むストーク領域を組換え体として発現・精製し、構造解析のための結晶化を行なった。結晶の再現性が低く十分な大きさの結晶を得るのに苦労したものの、DNAH1 組換え体の結晶構造を 2.7 Å 分解能で解析することに成功した。微小管結合領域のコイルドコイル領域に対する角度が他のダイニンとは大きく異なっており、フラップと呼ばれる挿入配列が靴底にあるスパイクのように突き出ていることも発見した。構造既知の他ダイニンの微小管結合領域との構造比較を実施する事で、内腕ダイニンに特有の構造・機能相関を明らかにすることができた¹⁾。

[文献]

1. S. Ko, A. Toda, H. Tanaka, G. Kurisu*, Crystal structure of the stalk region of axonemal inner-arm dynein-d reveals unique features in the coiled-coil and microtubule-binding domain. *FEBS Lett.*, **597**, 2149-2160 (2023)