

博士論文概要

論文題目

マイクロデバイスを用いた金属錯体含有
蛋白質の合成及び結晶化に関する研究

Synthesis and crystallization of metal
complex-containing proteins using micro
devices

申請者

田中	大器
Daiki	TANAKA

ナノ理工学専攻 マイクロシステム研究

2017年12月

本論文は、従来法では合成、精製および結晶化が複雑かつ困難であった「金属錯体含有蛋白質」について、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術により作製された「マイクロ化学合成デバイス」を応用することにより、世界で初めて合成と結晶化の簡便な工程を確立した成果について述べたものである。近年「金属錯体含有蛋白質」の特異な性質（電氣的性質、触媒能、光学活性等）が注目を浴び、電気化学や創薬等様々な研究分野への応用が期待されている。しかし、現在の合成手法は反応時間が長く熱攪拌が必要であり、また中和反応に用いられる試薬の濃度が高く副生成物の生成が避けられない。さらに、複雑な化学合成操作を伴うため、再現良く目的生成物質が得られない等の問題を抱えており、従来のピーカーワークに代わる簡便かつ制御が容易な新たな合成手段が求められていた。著者は、微小領域中での化学反応が、ピーカーワークと比較して化学種の拡散速度が速く、かつ熱拡散効率が高い特徴を有する点に着目し、微細加工技術により新規に開発した「マイクロ化学合成デバイス」を用いて化学合成を行うことにより、これらの問題点の解決を試みた。このような試みは、過去に基礎的な有機化学合成については検討されてきたが、「金属錯体含有蛋白質」のような複雑な化学合成スキームに対して適用された例は無い。

本論文は、マイクロ化学合成デバイスを用いた「金属錯体含有蛋白質」合成の成果について述べたものであり、全4章から構成される。

第1章「序論」では、金属錯体含有蛋白質がどのような分野への応用が期待されているのか、その社会的波及効果について具体例を挙げながら述べている。また、従来法による「金属錯体含有蛋白質」の合成法について論述しその問題点について言及している。さらに「マイクロ化学合成デバイス」を使った化学合成や蛋白質の結晶化の先行研究についても言及している。

第2章「金属錯体の合成」では、合成工程の難易度に応じて3節に分けて論述した。第1節では、金属錯体の基本骨格であるサレン型のMn(II), Co(II)錯体の合成を取り上げ、Y字型のマイクロ化学合成デバイスを用いて単純化合物から配位子、金属錯体の合成を行った結果について述べた。この時のマイクロ化学合成デバイスの材質としては、水やアルコールに対して耐薬品性が高くサレン型金属錯体の合成に適しているpolydimethylsiloxane (PDMS) とガラスを用いた。合成実験の結果から、微小領域中での化学合成は、従来法（ピーカーワーク）と比較して合成時間が大幅に短縮（4時間→1秒以下）されることを確認した。さらに、加熱操作が不要（40℃→室温）となり、従来法ではMn(II)やCo(II)等中心金属の酸化防止のため閉鎖環境下の窒素雰囲気中での合成が必須であったが、本研究ではマイクロ化学合成デバイス中の閉じられた系での化学合成のため雰囲気制御が不要となった。これらの結果により、従来の合成方法よりも迅速かつ容易な化学合成法の確立に初めて成功した。

第 2 節では、第 1 節で行った研究を基盤として、さらに複雑な合成操作が必要なアゾ金属錯体の合成について論述した。アゾ金属錯体とは配位子に光応答性のあるアゾ基(-N=N-)を付加させたものである。この金属錯体を様々な蛋白質に付加させることで偏光により化合物の方向性を制御することが可能となる。この金属錯体含有蛋白質を燃料電池や太陽光発電パネルに応用すると、偏光の利用により化合物内部で効率的な電子の授受が可能となると考えられている。しかし、従来のアゾ金属錯体の合成法は高濃度の塩酸と水酸化ナトリウムを利用した pH コントロールや温度制御、雰囲気制御など合成操作が複雑で熟練研究者でも困難な合成スキームであった。著者は第 1 節で行ったマイクロ化学合成デバイスによるサレン型金属錯体の合成時の利点をアゾ化合物の合成に適応できないかと考え、これまでに実現不可能とされていた低濃度での塩酸と水酸化ナトリウムを使用した中和反応によるアゾ化合物の合成工程を世界で初めて確立した。具体的には塩酸と水酸化ナトリウムの濃度を従来法と比較して 1/15 にすることに成功し、強酸、強塩基が引き起こす副生成物の抑制を可能とした。また、従来法では中和操作の際に pH 測定装置でビーカー内の pH を常に監視して行う必要があったが、マイクロ化学合成デバイスを利用することにより、pH の常時監視を不要とした。さらにジアゾ化反応は発熱反応であり従来法では冷却 (5℃以下) が必須であったが、微小領域中では熱拡散効率が高く、室温での合成が可能となった。これらの結果により、従来では不可能とされていた塩酸、水酸化ナトリウムの低濃度下での中和および室温でのアゾ化合物の合成手法の確立に世界で初めて成功した。

第 3 節では金属錯体の配位子に Br 基を付加させる化学反応について、マイクロ化学合成デバイスを用いて行った研究に関して論じた。配位子に Br 基を付加させた金属錯体は長波長の光を吸収する性質を有している。この Br 付加化合物をさらに蛋白質に組み込むことにより吸収波長領域の広い特徴を有する金属錯体含有蛋白質の作製が可能となる。この特徴を生かし太陽光パネルや有機 EL 等幅広い分野への応用が期待されている。しかし、従来法で配位子に Br を付加させるには長時間の攪拌が必要であり反応性が低い化学合成スキームであった。さらに、Br を用いた化学反応は合成実験に用いられる臭素 (Br₂) が猛毒であり実験には閉鎖環境が必須であった。そこで著者は、これらの問題点をマイクロ化学合成デバイスを利用することにより解決を試みた。本実験では溶媒としてクロロホルムが使用されるためマイクロ化学合成デバイスの材質は有機溶媒に対して耐性の高いガラスとシリコンを用いた。この Br 付加反応に対しても前節同様に微小領域中の化学反応の利点が適用でき、従来法では合成困難であった配位子に Br 基を付加させる化学合成について、より高効率 (4 時間→5 秒以下) な反応とすること、マイクロ化学合成デバイスはあらかじめ閉じられた系内で化学合成が全て完結するため大気下で合成操作が可能となることを確認した。これにより従来で

は不可能であった室温大気中での Br の付加合成工程を世界で初めて確立した。

第 3 章「金属錯体含有蛋白質の結晶化と単離」では、これまでに合成した各種金属錯体と蛋白質（リゾチーム）から成る金属錯体含有蛋白質の結晶化について論述した。現在、金属錯体含有蛋白質の合成は様々な分野で研究が盛んに行われているが、蛋白質に金属錯体が付加した合成物の化学構造を知るには目的蛋白質を結晶化した後に X-ray diffraction (XRD) を用いて結晶構造解析を行う必要がある。また、金属錯体含有蛋白質を電極等に応用する場合、蛋白質の結晶化技術は必須となる。このような理由から、再現性の良い安定した結晶化技術の確立が喫緊の課題となっている。現在の金属錯体含有蛋白質の結晶化方法はサンプルチューブを用いる方法が一般的である。しかし、従来法では蛋白質溶液や金属錯体溶液の濃度勾配が起こり良質で大きな結晶を得ることが困難であった。そこで近年、マイクロドロップレットを用いた蛋白質の結晶化が試みられている。ドロップレット中で結晶化を行う場合、微小領域特有の「迅速な拡散」により蛋白質や金属錯体がドロップレット内で効率的に拡散され良質な金属錯体含有蛋白質の結晶が生成する。しかし、マイクロドロップレットによる蛋白質の結晶化は、効率的に結晶を成長させることは可能であったが、閉じられた系での結晶生成のため壊れやすい蛋白質結晶を外部に取り出すことが困難であった。そこで著者はこの問題点を解決すべく超撥水性ピラーアレイデバイスを応用した新しい結晶化法を世界で初めて確立した。超撥水性ピラーアレイデバイスとは微細な傘型のアレイが形成された基板で、この上に水やアルコールが滴下されると液体自身の表面張力により基板底面に溶液が触れることなくピラーアレイ表面で液滴状態を維持することにより撥水性能を発揮するデバイスである。超撥水性ピラーアレイデバイスは、ソフト MEMS 技術により Si 基板上に SU-8 を使用して形成した。結晶化実験は Zn(II)錯体とリゾチームの溶液を使用して行った。従来法の場合、マイクロドロップレットによる蛋白質の結晶化を行った場合でも、蛋白質の結晶化に掛かる時間は 2~3 日であったが、超撥水性ピラーアレイデバイス上の結晶化法では 90 分程度で結晶が生成された。また、開かれた系での結晶生成となるため目的蛋白質結晶の取り出しが容易となった。さらに外気と遮断することも容易で様々な金属錯体や蛋白質の結晶化条件に対応することが可能となった。これらの結果により、超撥水性ピラーアレイデバイスを用いて金属錯体含有蛋白質の結晶化および単離に世界で初めて成功した。

第 4 章「結言と今後の展望」では、以上の内容をまとめ、結言を述べるとともに今後の展望について具体的に述べた。

以上のように、著者は本論文において「マイクロ化学合成デバイス」を応用することにより、世界で初めて「金属錯体含有蛋白質」の合成と結晶化の簡便な工程を確立した事を具体的に実証した。

早稲田大学 博士 (工学) 学位申請 研究業績書

氏名 田中 大器 印

(2018年 2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文 (査読有)	<ol style="list-style-type: none"> 1. D. H. Yoon, D. Tanaka, T. Sekiguchi and S. Shoji, "Mechanical Reinforcement of Low-Concentration Alginate Fibers by Microfluidic Embedding of Multiple Cores", <i>Macromol. Mater. Eng.</i> (2018), DOI: 10.1002/mame.201700516 2. ○D. Tanaka, S. Sawai, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, "Synthesis of azo Mn(II) complex with mild pH control using microfluidic device", <i>RSC Advances</i> (2017), Vol. 7, pp. 39576–39582, DOI: 10.1039/c7ra06089k 3. D. H. Yoon, Z. Xie, D. Tanaka, T. Sekiguchi and S. Shoji, "A high-resolution passive droplet-phase sample sorter using multi-stage droplet transfer", <i>RSC Advances</i>, (2017), Vol. 7, pp. 36750–36754, DOI: 10.1039/c7ra05556k 4. Y. Kamata, T. Sekiguchi, T. Nakajima, T. Sasaki, D. H. Yoon, D. Tanaka and S. Shoji, "Analysis of vinylidene fluoride–trifluoroethylene copolymer film for nonpolarized energy harvester", <i>Japanese Journal of Applied Physics</i> (2017), Vol. 56, pp. 0703011–073013 5. D. H. Yoon, K. Kobayashi, D. Tanaka, T. Sekiguchi and S. Shoji, "Simple microfluidic formation of highly heterogeneous microfibers using a combination of sheath units", <i>Lab on a Chip</i>, (2017), Vol. 17, pp. 1481–1486, DOI: 10.1039/C7LC00157F 6. ○D. Tanaka, W. Kawakubo, E. Tsuda, Y. Mitsumoto, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, "Microfluidic synthesis of chiral salen Mn(II) and Co(II) complexes containing lysozyme", <i>RSC Advances</i> (2016), Vol. 6, pp. 81862–81868, DOI: 10.1039/c6ra09975k 7. D. H. Yoon, D. Tanaka, T. Sekiguchi and S. Shoji, "Microfluidic Stamping on Sheath Flow", <i>small</i> (2016), Vol. 12, pp. 3224–3228, DOI: 10.1002/smll.201600552 8. ○D. Tanaka, Y. Murakoshi, E. Tsuda, Y. Mitsumoto, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, "High efficient synthesis of manganese(ii), cobalt(ii) complexes containing lysozyme using reaction area separated micro fluidic device", 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2015), Anchorage, USA, 2015.06.21-25, pp.243-246, DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2015.7180907, (Oral) 9. D. H. Yoon, A. Jamshaid, J. Ito, A. Nakahara, D. Tanaka, T. Akitsu, T. Sekiguchi and S. Shoji, "Active microdroplet merging by hydrodynamic flow control using a pneumatic actuator-assisted pillar structure", <i>Lab on a Chip</i> (2014), Vol. 14, pp. 3050-3055, DOI: 10.1039/c4lc00378k
国際学会 (査読有)	<ol style="list-style-type: none"> 1. ○D. Tanaka, W. Kawakubo, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, "Crystallization of Zinc(II) complex containing lysozyme by super water repellent doubly reentrant structure pillar array device", The 3rd Conference on Microfluidic Handling Systems (MFHS 2017), 2017.10.04-06, Enschede, Nederland, (Oral) 2. W. Kawakubo, D. Tanaka, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, K. Takahashi, T. Akitsu and S. Shoji, "Extremely Efficient and non-hazardous bromo group addition reaction using simple microfluidic devices", The 3rd Conference on Microfluidic Handling Systems (MFHS 2017), 2017.10.04-06, Enschede, Nederland, (Poster)

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
国内学会 (査読有)	3. R. Isshiki, H. Fujitani, D. Tanaka , T. Sekiguchi and S. Tuneda, "Growth heterogeneity in pure cultures of nitrifiers", Fifth International Conference on Nitrification and Related Processes (ICoN5), 2017.07.23-27, Vienna, Austria, pp.10, (Poster)
	4. Y. Nozaki, T. Kanai, A. Matsuo, D. Tanaka , I. Yuito, T. Takeuchi, T. Sekiguchi and S. Shoji, "Fabrication process of fluidic devices for producing fine droplets using a focused ion beam system", Proceedings of the 16th International Conference on Nanotechnology Sendai, Japan, 2016.8.22-25, Sendai, Japan, pp.795-798, (Oral)
	5. D. H. Yoon, L. Ariyoshi, D. Tanaka , T. Sekiguchi and S. Shoji, "All-round micro sheath flow formation to realize complex cross sections by simply stacked PDMS structures", The 29st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2016), 2016.01.24-28, China, pp.141-144, (Poster)
	6. D. Tanaka , D. H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji and T. Akitsu, "High yield micro Fluidic synthesis of metal complex containing proteins", The 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2014), Singapore, pp.39-40, (Oral)
	1. 田中 大器 , 川久保 渉, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 秋津 貴城, 庄子 習一, "超撥水製二重凹型ピラーアレイデバイスによる Zn(II)錯体含有リゾチームの結晶化", 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017年10月31日(火)~11月2日(木), 広島国際会議場, (ポスター)
	2. 川久保 渉, 田中 大器 , 尹 棟鉉, 関口 哲志, 高橋 啓太, 秋津 貴城, 庄子 習一, "マイクロ流体デバイスによる高効率かつ安全なブロモ基付加操作", 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017年10月31日(火)~11月2日(木), 広島国際会議場, (ポスター)
	3. 一色 理乃, 藤谷 拓嗣, 田中 大器 , 関口 哲志, 常田 聡, "硝化菌単一菌株集団でみられる形態と増殖能の不均一性", 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017年8月29日(火)~8月31日, 東北大学川内北キャンパス 講義棟, (ポスター)
	4. 一色 理乃, 藤谷 拓嗣, 田中 大器 , 関口 哲志, 常田 聡, "なぜ, 難培養性微生物の増殖は不均一なのか?—シングルセル観察から見たクローナル集団の実態—", 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日(日)~21日(火), 仙台国際センター, (ポスター)
	5. 山本 尚輝, 一色 理乃, 河合 祐人, 田中 大器 , 関口 哲志, 松本 慎也, 常田 聡, "好気呼吸と発酵のバランスが崩れると persister が形成される", 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日(日)~21日(火), 仙台国際センター, (ポスター)
	6. 一色 理乃, 藤谷 拓嗣, 田中 大器 , 関口 哲志, 常田 聡, "クローナルな硝化菌集団における細胞増殖活性の不均一性の評価と機構解明", 日本微生物生態学会第31回横須賀大会, 2016年10月22日(土)~25日(火), 横須賀市文化会館, (ポスター)

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>7. 山本 尚輝, 一色 理乃, 河合 祐人, 田中 大器, 関口 哲志, 松本 慎也, 常田 聡, "ldhA の確率的な発現による persister 形成と制御", 日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会, 2016 年 10 月 22 日(土)~25 日(火), 横須賀市文化会館, (ポスター)</p> <p>8. 一色 理乃, 河合 祐人, 田中 大器, 関口 哲志, 松本 慎也, 常田 聡, “細菌集団中の確率的な ldhA 発現による休止細菌形成”, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日(水)~25 日(金), 大阪国際交流センター, (ポスター)</p> <p>9. 田中 大器, 村越 弓莉, 津田 恵梨香, 光本 雄哉, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 秋津貴城, ” マイクロ流体デバイスを用いたキラルサレン型 Mn(II), Co(II)錯体含有リゾチームの高効率合成”, 日本化学会 第 95 春季年会 (2015), 2015 年 3 月 26 日(木)~29 日(日)日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部, (口頭発表)</p> <p>10. 田中 大器, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 秋津貴城, “マイクロ流体デバイスを用いた金属錯体含有蛋白質の合成”, 日本化学会第 94 春季年会 (2014), 2014 年 3 月 27 日(木)~30 日(日), 名古屋大学 東山キャンパス, (口頭発表)</p>
招待講演	<p>1. 関口 哲志, 尹 棟鉉, 田中 大器, 庄子 習一, “MEMSによるマイクロ流体コントロール” (独)日本学術振興会 先端ナノデバイス・材料テクノロジー第151委員会 (2015), 2015年12月17日, 早稲田大学西早稲田キャンパス</p>
その他	<p>1. S. Sawai, D. Tanaka, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu, S. Shoji, “Fabrication of the Microfluidic Device for Chemical Reaction”, 4 大学ナノ・マイクロファブリケーションコンソーシアム・シンポジウム (2017), 川崎, 2017年3月13日, (ポスター)</p> <p>2. D. Tanaka, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji. " Fabrication of the Microfluidic Device for Chemical Reaction ", マイクロ・ナノテクノロジーに関する日仏ワークショップ (2017), 京都大学, 2016年11月8日, (ポスター)</p>