

博士論文審査報告書

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

2018年2月

本論文は、合成、精製および結晶化の工程が複雑で制御が困難であった「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」を用いることにより、簡便な合成と結晶化手法を実現した研究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）が注目され、電気化学素子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、現状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濃く副生成物の生成が起こりやすい。さらに、複雑な化学合成工程を必要とするため、再現性良く目的生成物質が得にくい等の問題を抱えており、現状のビ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待望されている。著者は、微小領域中での化学反応が、ビ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持つ点に着目し、「マイクロ化学反応デバイス」を用いて化学合成を行うことにより、従来の問題点の解決を試みた。

本論文は、著者が初めて試みた「金属錯体含有蛋白質」合成法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か、その社会的波及効果について具体例を挙げて説明している。また、現状の「金属錯体含有蛋白質」の合成手法について述べ、問題点について纏めている。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に関する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節に分けて論述している。第1節では、まず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字型の流路を持つマイクロ化学合成デバイスを用いて原料化合物から配位子、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流路の材質としては、水やアルコールに対して耐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（ビーカーワーク）と比較して合成時間が大幅に短縮（4時間→1秒以下）され、加熱操作も不要（40℃→23℃：室温）となることが確認された。また、従来法ではMn(II)とCo(II)の酸化を防止する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、マイクロ化学合成デバイス中の閉じられた系で行うため雰囲気制御が不要となった。以上、金属錯体の合成に関して従来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礎として、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述べている。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り、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分子配向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バイオ燃料電池の電極に応用すると、偏光の利用により電極-蛋白質間の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温度や雰囲気、高濃度の塩酸と水酸化ナトリウムを利用した pH などの精密な制御が要求され、合成操作が複雑で熟練者でも困難な合成スキームであった。著者はこれまでに実現不可能とされていた少量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必要量が従来法と比較して 1/15 になり強酸、強塩基が引き起こす副生成物の抑制に成功した。また、従来法で必要であった pH の常時監視・制御を不要とした。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、熱拡散効率が高いマイクロ化学合成デバイスを用いることで室温での合成が可能となった。以上、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反応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ブロモ(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ている。配位子に Br 基を付加させた金属錯体は赤外寄りの光を吸収する性質を有している。この特徴を生かすことにより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。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金属錯体含有蛋白質の合成が可能となる。しかし、従来法で配位子に Br を付加させるには鉄触媒を用い長時間の攪拌を必要とするなど反応性が低い化学合成スキームであった。また、実験に用いられる臭素 (Br₂) が猛毒であり Br を用いた化学反応は合成実験には閉鎖環境が必須であった。本実験では溶媒としてクロロホルムを用い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 付加反応に関しても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）化を実現した。また、大気下かつ鉄触媒不要で合成が可能であることを確認した。これにより従来は不可能であった室温大気中での Br の簡便な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述べている。蛋白質に金属錯体が内包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上で X-ray diffraction (XRD) による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には蛋白質の結晶化技術が不可欠となる。これらの理由で、再現性の良い安定した金属錯体含有蛋白質結晶化技術の確立が求められている。従来の金属錯体含有蛋白質の結晶化はサン

プルプレートを用いる方法が一般的であるが、蛋白質溶液や金属錯体溶液の濃度勾配が生じて均一で大きな結晶を得ることが困難である。そこで近年、微小な流路内で操作する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。この場合、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・混合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、微小流路内の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の取り出しが困難であった。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提案した。超撥水性ピラーアレイデバイスとは微小な傘型の構造体がアレー状に形成されたデバイスである。この上に水やアルコールを滴下すると液体自身の表面張力によりピラーアレイ表面で液滴状態が維持され超撥水性能を発揮する。ピラーアレイ構造体はソフトMEMS技術によりSi基板上にSU-8フォトレジストを用いて形成した。結晶化実験はサレン型のZn(II)錯体とリゾチームの溶液を使用して行った。マイクロドロップレット中での蛋白質の結晶化を行った場合、要する時間は2~3日であったが、超撥水性ピラーアレイデバイス上での結晶化法では90分程度で結晶が生成できた。また、ピラーアレイ上の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が可能となった。以上、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「結論と今後の展望」では、以上の内容をまとめ、結論を述べるとともに今後の展望について具体的に述べている。

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ことを実証した。本研究で得られた成果は、汎用性が高く、合成化学、薬学、電気化学、分析化学分野の発展に多大な貢献が期待され、高速・高効率化学合成の実現に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2018年1月

審査員（主査） 早稲田大学教授 工学博士（東北大学） 庄子 習一

早稲田大学教授 工学博士（早稲田大学） 川原田 洋

早稲田大学教授 博士（工学）早稲田大学 谷井 孝至

東京理科大学教授 博士（理学）大阪大学 秋津 貴城