

論文の内容の要旨

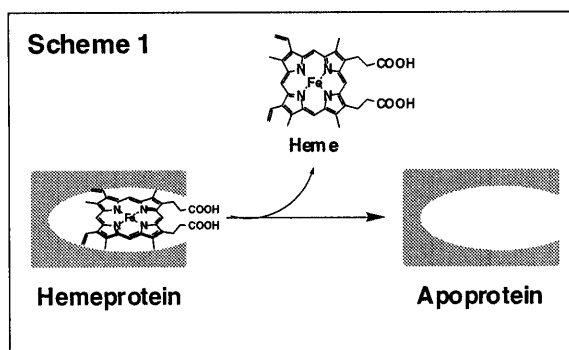
論文題目 **Proteins and Synthetic Peptides for Molecular Recognition and Catalysis**

(タンパク質と合成ペプチドの分子認識と触媒作用)

氏名 石田 康博

天然タンパクの示す基質捕捉・物質変換・自己組織化を、非天然の系で実現することは、科学の長年の目標の一つである。その高い選択性と効率の鍵を握るのは、複数の非共有結合性相互作用点の適切な配置であるが、従来の合成化学的手法でこれを目指しても、十分な性能を示す例は限られている。本研究では、相互作用点の配置がよく分かっているタンパク質・合成ペプチドを土台に、基質捕捉・物質変換・自己組織化において特異な機能を示す分子の開拓を行った。

分子認識・物質変換に適したポリペプチドとして、ヘムタンパク由来のアポタンパクに注目した。アポタンパクは、空間特異的に配置された複数の官能基が協同的に働くことにより、ヘムの配向を特定の方向に規定している。タンパクが、ヘムを除去した後も類似



のコンフォメーションを保つことができる場合は、ヘムの入っていた空孔は、まさにヘムを鑄型とする三次元的反応場として利用できる可能性がある（

Scheme 1）。このような対称性の低い空間は合成分子では構築することが難しい。このよう

な観点から、本研究では、(1) 構造が明確（4 α ヘリックスバンドル構造）で熱安定性が高いアポシトクロム b_{562} 、(2) 最も手に入りやすいアポタンパクの一つであるアポミオグロビンを用いた。

アポタンパクのホストとしての機能を調べるに当たり、元来この空孔には、ポルフィリン鉄錯体を取り込まれていたことを考慮し、アポシトクロム b_{562} とポルフィリン金属錯体との複合化（再構成反応）を調べた。

アポシトクロム b_{562} はゲストの構造を高度に認識し、不斉なストラップポルフィリン亜鉛錯体 (**1**) の捕捉において高い不斉選択性を示すことが明らかとなった。例えば、ラセミ体の**1**とアポシトクロム b_{562} との反応 ($[\text{racemic } \mathbf{1}]_0$:

$[\text{apoprotein}]_0 = 2 : 1$) から再構成タンパクを調製し、その複合体から取り込まれた**1**を回収

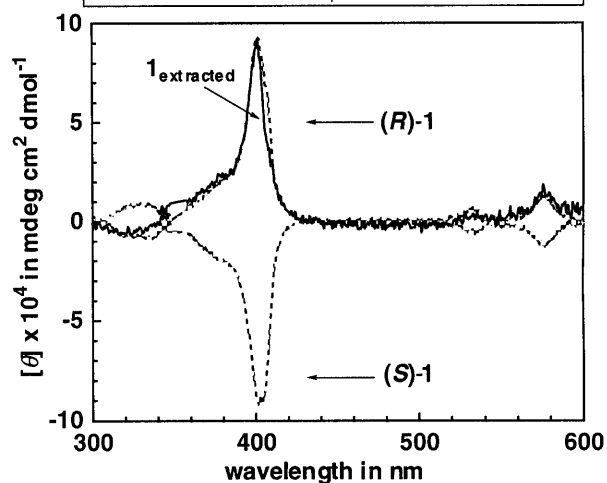
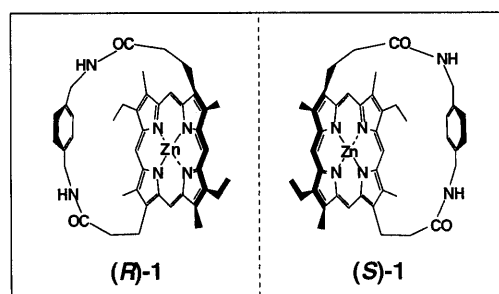
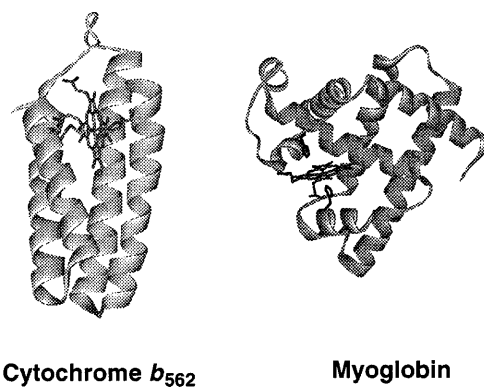
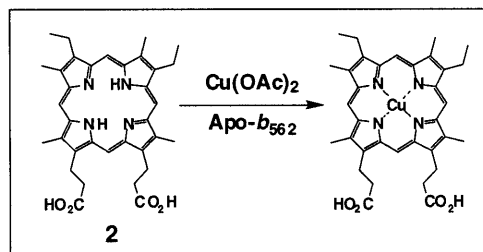


Figure 1. Circular dichroism spectrum (CHCl_3) of **1** extracted from cytochrome b_{562} reconstituted with racemic **1** ($\mathbf{1}_{\text{extracted}}$, solid curve), and those of (R)- and (S)-**1** (dotted curves) as optically pure authentic references.

したところ、光学的に純粋な(*R*)-**1**と全く同一の強度を有する円偏光二色性スペクトルが観察された (**Figure 1**)。以上のように、1ポッドの処理により、**1**の完全な光学分割が達成され、「キラルなホスト」としてのアポシトクロム b_{562} の高いポテンシャルが示された。

アポシトクロム b_{562} の空孔が疎水性の基質 (ポルフィリン) と金属イオンを同時に取り込む可能性があることに着目し、アポシトクロム b_{562} を触媒とするポルフィリンへの金属イオン挿入反応を検討した。その結果、



反応が著しく促進されることが分かった。例えば、触媒がない条件でのプロトポルフィリンIX (**2**) の銅イオン挿入反応は、60分かけてもほとんど進行しないが、ここにアポシトクロム b_{562} を共存させたところ、反応がわずか30分で完結した。この反応をミカエリス-メンテン型の速度論に従って解析したところ、反応速度定数はアポシトクロム b_{562} が存在しない条件の290倍であった。この触媒作用は、ポル

フィリンを捕捉する疎水性

アミノ酸、メタルイオンを捕捉する配位性アミノ酸、ポルフィリンのプロトンを引き抜く塩基性アミノ酸が協同的に働くことにより、達成されていることが分かった。

骨格置換基の異なる種々のポルフィリンを基質として同様の反応を行ったところ、興味深いことに、本来のゲストであるプロトヘム

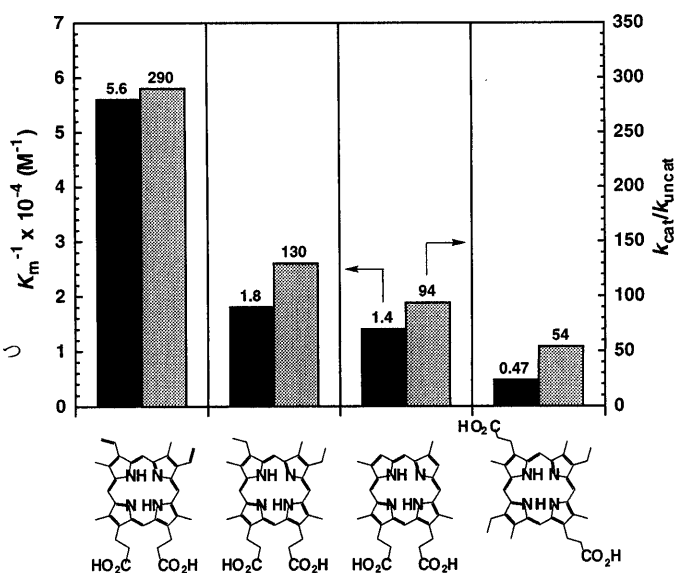
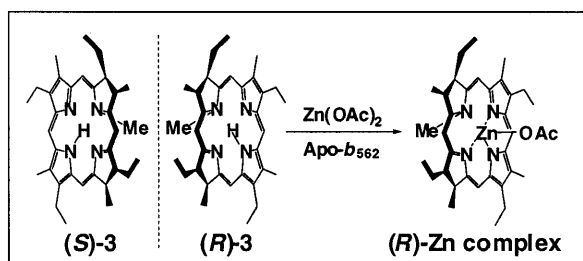


Figure 2. Metalation of porphyrins (1.0 μM) with $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (200 μM) in the presence of apocytochrome b_{562} : Association constants of the Michaelis complexes (K_m^{-1}) and acceleration factors ($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$).

のフリーベース (2) が最も効率的に反応した。詳しい検討から、2は空孔に最も効率よく取り込まれ、かつ、取り込まれた後の反応性も高いことが明らかになった (Figure 2)。即ち、アポシトクロム b_{562} の空孔が「本来の鑄型の構造を記憶」しているために、鑄型と同じ基本骨格を有する基質ほど、触媒作用を効率よく受けたものと解釈される。これはアポタンパクの鑄型触媒作用を実現したはじめての例である。

上記で示されたアポシトクロム b_{562} の不斉識別能と触媒反応とをつなげられないかと考え、不斉なN置換ポルフィリン (3) のメタル化反応を行った。アポシトクロム b_{562} の存在下、3



のメタル化反応は不斉選択的に進行し、アポシトクロム b_{562} が「不斉認識能と触媒能を併せ持つ宿主」として働くことが示された。例えば、3の亜鉛イオン挿入反応において、(R)-3の反応速度は(S)-3に比べて3.0倍大きかった (Figure 3)。

この反応速度の差は、3の速度論的光学分割に応用可能であり、例えば、ラセミ体の3をアポシトクロム b_{562} 存在下

で亜鉛イオンと反応させ、変換率が68%になった時点で回収したところ、未反応物としてS体過剰の3 ((R):(S)=33:67)を得ることができた。以上のように、アポシトクロム b_{562} が基質の不斉を識別しながら反応を触媒することが明らかとなり、天然酵素に近い系を実現することに成功した。

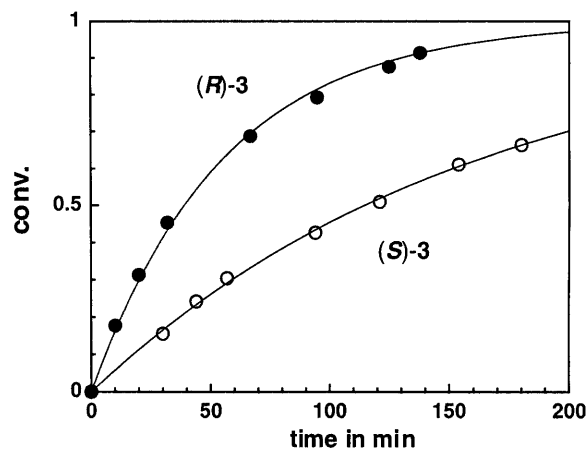
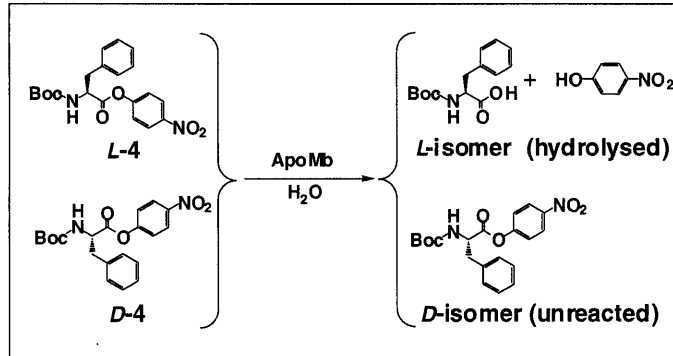


Figure 3. Reactions of (R)- (●) and (S)-3 (○) (3.4 μM) with Zn(OAc)₂ (100 μM) in the presence of apocytochrome b_{562} (13.6 μM).

次に、この概念をより一般的な物質変換反応へ展開できないかと考えた。アポ

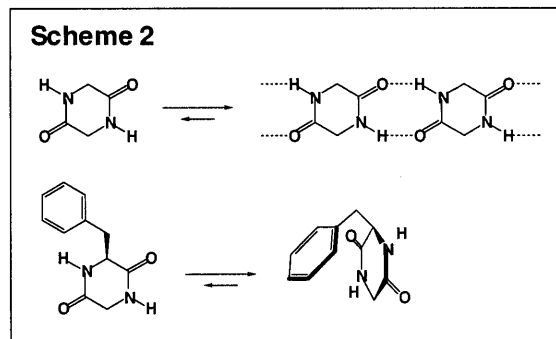
タンパクの空孔にイミ
ダゾール残基が存在す
ることに着目し、アミ
ノ酸エステルの加水分
解反応を検討したとこ
ろ、アポミオグロビン
が反応を著しく加速し、
さらにその際、高い不



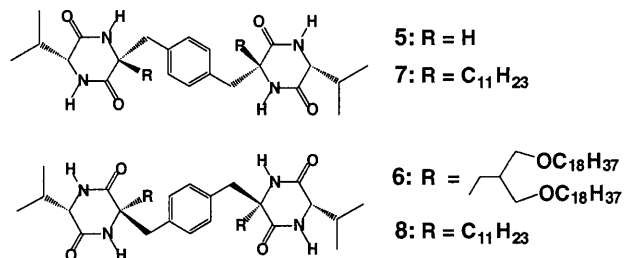
斉選択性を発現することを見出した。例えば、フェニルアラニンエステル (4) のラセミ体の加水分解をアポミオグロビン存在下で行い、変換率が60%の時点で反応を停止したところ、未反応の基質として、97% eeのD-4が回収され、アミノ酸の速度論的光学分割が極めて効率良く達成された。

この反応をミカエリス-メンテン型の速度論で解析したところ、4のそれぞれのエナンチオマーは、同程度の効率でアポミオグロビンに取り込まれるが、取り込まれた後の反応性において、L-4はD-4に比べ、16倍有利であることが分かった。

自発的に構造を作る系のコン
ポーネントとして、環状ジペプ
チドを選んだ。環状ジペプチド
は、アミド部位が水素結合を介
して一次元テープ状に会合しや
すいという特徴を有する。また、



古くから単量体自身の構造
に関する研究が行われてお
り、一定のコンフォメーショ
ンを取ることが知られてい
る (Scheme 2)。単量
体の分子設計が容易、かつ



会合様式が一義的であるという特徴は、結合点の配置をチューニングし、それを

会合体の構造に反映させるのに適した性質と言える。ここでは、環状ジペプチドをリンカーで連結することにより、環状ジペプチド二量体を合成し、その自己集合における組織化を検討した。

環状ジペプチドとこれに隣接する芳香環とは、アミド π 電子と芳香環 π 電子との相互作用により、重なり合ったコンフォメーションを取る。このことを利用し、4つの水素結合点を二次元的に配置することを目指し、環状ジペプチドを

-キシリレンで架橋した**5**を設計・合成した。その構

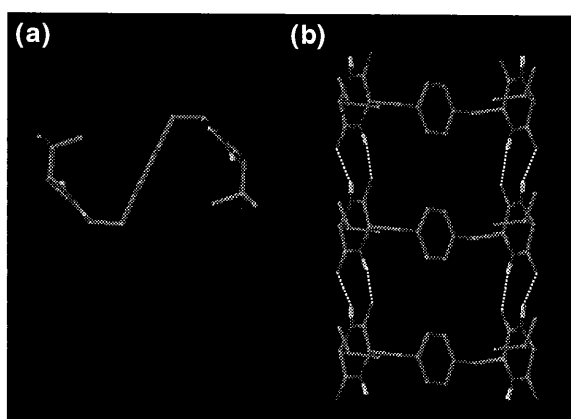
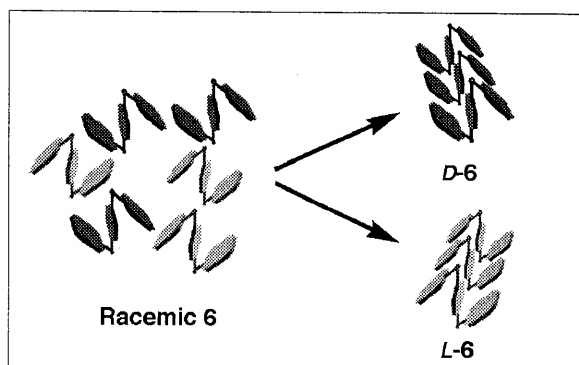


Figure 4. X-ray structure of **5** viewed along the (a) *b*-axis and (a) *a*-axis. Non-amide hydrogen atoms and incorporated molecules are omitted for clarity.

造をX線結晶構造解析により調べたところ、個々の分子がS字型のコンフォメーションを取っており、また、分子間の位置関係に注目すると、S字型の分子がカラム状に重なった構造を取っており、その際、4点の水素結合が協同的に働いていることが明らかになった (**Figure 4**)。¹H NMRのケミカルシフト値から、溶液中においても、**5**がS字型のコンフォメーションを取っていることが示唆された。多点水素結合の協同作用に関しては、ドナー/アクセプターの一次元的な配列について議論した報告例があるにすぎないが、ここでは、「二次元平面上での水素結合点の配置」を達成することができた。

上記で合成した**5**は、ほとんどの有機溶媒に対し不溶であった。そこで、結晶構造解析で観察されるS字型カラム一本と同等の構造を溶液中で形成させること（超分子ポリマー）を目指し、4本のオクタデシル基を導入した**6**を合成した。非プロトン性溶媒中において**6**が安定な会合体を形成していることが、NMRおよびGPCから明らかになった。水素結合点を2つしか持たない分子では、このような会合体が観察されないことから、4つの水素結合点が協同的に働くことで「一次元カラム状の超分子ポリマー」が形成されていることが示された。

上記の結果より、**6**の2つのエナンチオマーについて、ヘテロキラルな会合を考えた場合、4つの水素結合点の二次元的な配置が異なるため、これらが協同的に働き得ないことが予想される。実際、**L-6**と**D-6**とが共存する場合、興



味深いことにホモキラルな会合が優先することが示唆された。**6**のクロロホルム溶液について、光学純度の異なるものを調製し、GPCで解析したところ、光学純度に依存して会合体のサイズが変化し、会合が不斉選択的に進行することが分かった。**L-6**、**D-6**の非等量混合物 (**L-6** : **D-6** = 76 : 24) は二山のGPCチャートを与え、これを分画して個々の光学純度を調べたところ、保持時間の短い部分において、光学的な偏りが増幅していた (**L-6** : **D-6** = 97 : 3)。

以上より、単量体のキラリティーが会合様式に大きく影響することが分かったが、次にこれをマクロなレベルに増幅することを目指した。**5**と同様の骨格に2本のウンデシル基を導入した**7**、**8**を合成し、その固体状態での組織を観察したところ、**7**が、巨大ならせん構造を形成することを見出した。即ち、**7**をトリフルオロ酢酸/酢酸より再沈することにより、白色の不溶物が得られ、これを電子顕微鏡で観察したところ、ピッチが10 μM で太さが2~

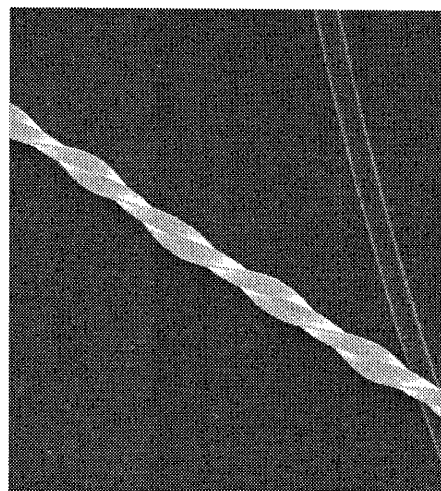


Figure 4. Scanning electron microscopy image of **7** (x 3000).

3 μM のらせん構造が観察された。これとは対照的に、**7**の2つの不斉炭素の立体配置を反転させた**8**では、直線テープ状の会合体のみが観察され、「不斉炭素のキラリティーにより集合体の形状を制御」できることが分かった。