

## 学位論文題名

亜鉛ペプチダーゼ酵素モデルの設計・合成，  
構造と触媒機能に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ペプチド結合を加水分解する亜鉛含有ペプチダーゼは活性中心にひとつの亜鉛を含む単核型とふたつの亜鉛を含む複核型とに分けられる。亜鉛の役割はルイス酸として機能し配位水の酸解離定数を下げることによって求核剤である  $\text{Zn-OH}$  を生成することと考えられている。ペプチド(アミド)結合は酵素が存在しなければ生理温度/pH において容易に加水分解を受けない。そのためか過去に報告された人工モデルによる研究には以下の問題点が見られた: (1) ヒスチジンに対応するイミダゾールを配位子として用いておらず活性中心の配位構造を忠実に再現していない、(2) 亜鉛を用いずの場合によっては生体に必須ではない金属を用いている、(3) 基質となるアミド基を分子内に導入しており分子間での加水分解反応を行っていない。本研究ではこれらの問題点を取り除く為に単核型亜鉛ペプチダーゼの活性中心の配位構造を忠実に再現する酵素モデルを構築し、*in vitro* で酵素様反応を再現することを目的としている。特にこれまでほとんど議論されてこなかった単核型の活性中心で共通して見られるカルボキシラト配位子と疎水的環境の効果について検討を行った。また多核亜鉛錯体による加水分解反応も行い単核モデルによる活性と比較し検討を行った。

分子設計においては、(1) 単核型亜鉛ペプチダーゼの活性中心で共通して見られるヒスチジンに由来するふたつのイミダゾール、グルタミン酸またはアスパラギン酸に由来するひとつのカルボキシル基による配位を再現すること、(2) 触媒反応に重要な水分子がひとつ配位すること、(3) 加水分解反応に対して不活性な 6 配位八面体構造を防ぐために配位子に立体障害を持たせること、を指針とし新規配位子である N, N-ビス(2-ベンズイミダゾリルメチル)アミノアセテート L1 とその亜鉛錯体を合成した。L1 は既知法で合成した N, N-ビス(2-ベンズイミダゾリルメチル)アミンとプロモ酢酸を塩基性条件下で反応させることによってナトリウム塩である NaL1 と酸型 HL1 としてそれぞれ合成・単離した。NaL1 からは単核型の酵素モデル  $[\text{ZnL1}(\text{OH}_2)]^+$  を、また HL1 からは四核錯体  $[\text{Zn}_4\text{L1}_4]^{4+}$  をそれぞれ  $\text{ClO}_4^-$ 、 $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ 、 $\text{BF}_4^-$  の塩として単離した。

$[\text{ZnL1}(\text{OH}_2)]^+$  及び  $[\text{Zn}_4\text{L1}_4]^{4+}$  の構造は X 線結晶構造解析により決定した。 $[\text{ZnL1}(\text{OH}_2)]^+$  の亜鉛は四面体で L1 のふたつのベンズイミダゾールとひとつのカルボキシレートおよびひとつの水分子による配位を受けている。この配位構造は単核型亜鉛ペプチダーゼの活性中心で共通して見られ良く再現した酵素モデルである。 $[\text{Zn}_4\text{L1}_4]^{4+}$  は L1 のカルボキシラト架橋によって四核構造を構築しており、四つのうちのふたつの Zn-L1 ユニットから成る安定な複核構造を形成している。HL1 を原料とした場合には L1 のカルボキシル基が酸解離

平衡の影響を受けるためカルボキシラト架橋を生じ、安定な複核ユニットを含む四核錯体が生成したものと考えられる。この複核ユニットにおける亜鉛間距離 3.435 Å は複核型亜鉛ペプチダーゼの活性中心における 3.0~3.5 Å と一致し求核剤 OH<sup>-</sup>が架橋できる適度な距離である。

単核型酵素モデル[ZnL1(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>のペプチダーゼ様活性はペプチドと同じくアミド結合を持つβ-ラクタムを基質として<sup>1</sup>H NMR を用いて反応を追跡した。但し、β-ラクタムは4員環のアミドで立体的な歪みを持つために比較的加水分解を受けやすい。反応温度は生体と同じ37 °Cとし、溶媒はアセトン-d<sub>6</sub>とアセトン-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v)を使用した。水を含まないアセトン-d<sub>6</sub>を溶媒とした場合には生成物β-アラニンが亜鉛に配位する[ZnL1(OOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>が時間とともに増加した。これに対してアセトン-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v)を溶媒とした場合には[ZnL1(OOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>に由来するピークは観測されず遊離のβ-アラニンが時間とともに増加した。溶媒のアセトン分子は亜鉛に配位しないため亜鉛の4番目の配位サイトを埋めることができず生成したβ-アラニンを遊離することができない。しかし過剰の水([ZnL1(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>に対して約100倍の濃度)をアセトンに加えることによって[ZnL1(OOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>中のβ-アラニンが水分子と置換し遊離することが可能となる。生成物の脱離過程において水分子の存在が重要であることが示された。加水分解反応はルイス酸である亜鉛の配位水が脱プロトン化した Zn-OH<sup>-</sup>による求核攻撃により進行しているものと考えられる。初速度法で決定した2次の速度定数で比較するとアセトン-d<sub>6</sub>中で1.1 × 10<sup>-4</sup> アセトン-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 中で5.9 × 10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>であり、疎水的なアセトン中の方が約2倍高い活性を示した。求核反応は静電的相互作用に基づくため疎水的環境中の方が効果的に進行するものと考えられる。このことから酵素活性中心の近傍で見られる疎水的環境はペプチドの加水分解を促進するために構築されているものと推察される。

次にカルボキシラト配位子の効果を検討するため三つのイミダゾールが亜鉛に配位する[ZnTBA(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup> (TBA = トリス(2-ベンズイミダゾリルメチル)アミン)による加水分解反応を行った。[ZnTBA(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup>は当研究室で合成されたカルボニックアンハイドラーゼの酵素モデルである。二次の速度定数はアセトン-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 中で1.2 × 10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>でありペプチダーゼモデル[ZnL1(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>の方が5倍高い活性である。この結果は以前報告された非経験的分子軌道計算による予測と一致しており、単核型亜鉛ペプチダーゼで共通して見られるカルボキシラト配位子は亜鉛を活性中心に固定する役割だけではなくペプチドの加水分解反応を促進する役割も持つことが示された。

四核錯体[Zn<sub>4</sub>L<sub>1</sub>]<sup>4+</sup>を用いてβ-ラクタムの加水分解反応を行ったところ、単核型酵素モデルとは異なる結果が得られた。水を含まないアセトン-d<sub>6</sub> 中では単核型酵素モデル[ZnL1(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>の方がおよそ2倍高い活性であるのに対してアセトン-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O (9:1)中では逆に四核錯体を用いた方が7倍も高い活性となった。エレクトロスプレイイオン化法によるマスペクトル(ESI-MS)を測定したところ四核錯体はいずれの溶媒中においても複核錯体と単核錯体として存在し、この両者が加水分解反応を起こしているものと考えられる。水を含むアセトン中で活性が著しく高くなったのは複核錯体のふたつの亜鉛を水分子が架橋することによって求核剤の OH<sup>-</sup>を単核型モデルよりも多く生成したため、逆に水を含まないアセトン中で活性が低かったのは四核錯体は単核型モデルのような配位水を持たないためと考えられる。

以上、本研究で得られた知見は今後のより高活性な酵素モデルを設計するうえで新たな指針となるものであり、環境に配慮した触媒へ発展できるものと期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 川 和 彦  
副 査 教 授 中 村 博  
副 査 教 授 奥 原 敏 夫  
副 査 教 授 今 野 巧 (群馬大工学部)

学 位 論 文 題 名

## 亜鉛ペプチダーゼ酵素モデルの設計・合成、 構造と触媒機能に関する研究

ペプチド加水分解反応を触媒する単核型亜鉛ペプチダーゼは共通した活性中心を持ち、亜鉛がふたつのイミダゾール、ひとつのカルボキシレートおよびひとつの水分子による配位を受けている。亜鉛はルイス酸として機能し、配位水の酸解離定数を下げることによって求核剤である Zn-OH を生成する役割を果たしていると考えられている。本研究では、単核型亜鉛ペプチダーゼの触媒機能を *in vitro* で再現することを目的として、活性中心の構造を模倣した酵素モデルを用いて検討を行った。特に過去の単核型亜鉛ペプチダーゼモデルの研究で報告されていない構造モデル且つ機能モデルとなる錯体の実現と、活性中心のカルボキシラト配位子の役割について検討を行った。

本論文は七章からなり、第一章では亜鉛ペプチダーゼの構造と機能について言及した。第二章ではモデル錯体の分子設計と合成を行った。モデル錯体の分子設計においては、1) 活性中心で見られるヒスチジンに由来するふたつのイミダゾール、グルタミン酸またはアスパラギン酸に由来するひとつのカルボキシル基による配位を再現すること、2) 加水分解反応に不活性な 6 配位八面体構造を防ぐために立体障害を持たせること、3) 加水分解反応に重要な水分子がひとつ配位することを指針とし、新規なビスベンズイミダゾール-カルボン酸系配位子 L1、L2<sup>3</sup> を合成した。NaL1 から [ZnL1(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> 1 を、HL1 からは四核錯体 [Zn<sub>4</sub>L1<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> 2 をそれぞれ合成した。ベンズイミダゾールにスルホ基を導入した L2<sup>3</sup> は水溶液中における錯形成反応および触媒機能の発現を目的として設計した。

第三章では単結晶 X 線結晶構造解析により 1 および 2 の構造を決定した。1 の亜鉛はふたつのベンズイミダゾールと単座のカルボキシレートおよび水分子がひとつ配位した四面体であり、亜鉛と配位水との距離は 1.947(7) Å である。1

は単核型亜鉛ペプチダーゼ活性中心を忠実に模倣したモデル錯体である。2 は L1 のカルボキシラト架橋によって四核構造を形成し、複核型ペプチダーゼの酵素モデルの前駆体となる安定な複核ユニットを持つ。

第四章では 1 のペプチダーゼ様活性を、 $\beta$ -ラクタムをペプチドのモデル基質として  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにより検討した。アセトン- $d_6$  中では  $[\text{ZnL1}(\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3)]^+$  (P1) が生成物であるのに対して、アセトン- $d_6/\text{D}_2\text{O}$  (9:1, v/v) 中ではフリーの $\beta$ -アラニン(P2)が生成物であった。これは過剰の水を加えることによって P1 の $\beta$ -アラニンが水分子と置換したためである。また加えた錯体量以上の $\beta$ -アラニンが生成しており、1 はアセトン/水中において触媒的に機能することが示された。37 °C における 2 次の速度定数は疎水的なアセトン- $d_6$  中の方がアセトン- $d_6/\text{D}_2\text{O}$  中の約 2 倍の活性であった。このことから、酵素活性中心で見られる疎水的環境が加水分解反応を促進しているものと示唆される。1 による $\beta$ -ラクタム加水分解反応の速度定数はカルボキシラト配位子を含まない  $[\text{ZnL3}(\text{OH}_2)]^{2+}$  (L3 = トリス(2-ベンズイミダゾリルメチル)アミン) の約 5 倍であった。これは非経験的分子軌道計算による予測と一致し、単核型亜鉛ペプチダーゼの活性中心で見られるカルボキシラト配位子がペプチド加水分解反応を促進する役割を果たしているとは結論づけられた。アセトン- $d_6/\text{D}_2\text{O}$  中での四核錯体 2 による活性は 1 よりも高く、2 の結晶構造および ESI-MS の結果から溶液中で複核錯体を生成することが示され OH が架橋することによって高活性を示したものと結論づけた。

第五章では水溶液中における L2 錯体の錯形成反応を電位差滴定と  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを用いて検討を行い、 $[\text{ZnL2}]$  の安定度が  $\log K=8.02$ 、配位水の  $\text{pK}_a$  が 7.82 と決定した。

第六章では L2 錯体のペプチダーゼ様活性の検討をロイシン-4-ニトロアニリドを基質として紫外・可視吸収スペクトルにより行った。活性の pH 依存性と第五章での滴定実験の結果から亜鉛に配位する OH が基質への求核種であることを明らかにした。

第七章では以上の結果から単核亜鉛ペプチダーゼで共通して見られる活性中心の構造がペプチド加水分解反応を促進させ、また人工の酵素モデルに関しては複核型を設計した方が活性に有利であると結論づけた。

以上、本研究で得られた知見は今後のより高活性な酵素モデルを設計するうえでの新たな指針となり、汚水処理などの環境問題の改善に貢献できるものと期待される。

審査委員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における取得単位なども併せて申請者が博士 (地球環境科学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。