

学位論文題名

Design and Syntheses of Peptide Zinc Complexes and their Catalytic Function on Phosphoesters

(ペプチド亜鉛錯体の設計と合成およびリン酸エステルに対する触媒機能)

学位論文内容の要旨

Three different peptides were designed, among them two peptides are *N,N'*-dihistidylethylenediamine **L1** and im-bzl-*N,N''*-dihistidyl-diethylenetriamine **L2**: another is L-His-L-His-L-His-L-Tyr-L-His-L-His-L-His **L3**. Ligands **L1**, **L2** and **L3** were synthesized by using solution phase method. **L3** was purified by HPLC (reverse-phase ODS 20×250 mm) and the purity of **L1** and **L2** were checked by HPLC (ODS reverse-phase 4.6×250 mm) and finally assigned by ¹H NMR. The complexation with zinc and the function of the complexes **1**, **2**, and **3** about hydrolysis reaction of phosphoesters such as bis(p-nitrophenyl) phosphate BNPP and p-nitrophenyl phosphate NPP were investigated using pH titration, ¹H NMR and UV-visible method.

From the pH dependence of coordination sites, the pK_a values of **L2** were obtained by simulation of pH titration method. The pK_a values of **L2** are 4.3, 4.9 from imidazoliums, 6.8 from secondary aliphatic ammonium and 7.4, 8.8 from terminal primary aliphatic ammoniums. The estimated pK_a values of **L1** are 4, 6 from imidazoliums and 8, 9 from terminal primary aliphatic ammoniums and the pK_a values of **L3** are 3 from carboxylic acid, 5~7 from imidazoliums, 9 from N-terminal ammonium and 10 from tyrosine phenolic group. The stability constants K_{st} and pK_a values of coordinated water molecule were determined by pH titration of equimolar zinc complex with **L2** in aqueous solution. Both K_{st} and pK_a of the coordinated water molecule of HL2Zn(OH₂) are 6.15 and 8.26, respectively. Species distribution diagram for equimolar zinc complex of **L2** in aqueous solution showed that the total distribution of HL2Zn +

H₂L₂Zn(OH) were a maximum peak around pH 7.

Zinc-titration curves using ¹H NMR technique as a function of $R = [Zn]/[L]$ where L is L1, L2 or L3 showed that complexations took place between zinc and L1, L2 and L3 at pH 7 in a ratio 1 : 2, 1 : 1 and 1 : 1, respectively. Zn complexes 1, 2 and 3 were synthesized from ligand L1, L2 and L3, respectively. The compositions of Zn complexes 2 and 3 were obtained by atomic absorption analysis of zinc and ¹H NMR technique. The ratio of zinc and L2 in complex is 1 : 1 and L3 is 1 : 1.

Finally, the catalytic functions of Zn complexes were investigated about the hydrolysis reaction of phosphoesters such as bis(p-nitrophenyl) phosphate BNPP and p-nitrophenyl phosphate NPP. The hydrolysis reaction of BNPP and NPP was monitored by the UV appearance of p-nitrophenolate around 400 nm. The Zn complexes 1 and 3 were inactive. The Zn complex 2 hydrolyzes efficiently BNPP and NPP: their pseudo-first-order rate constants are $1.1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and $2.1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, respectively. The pH dependence of rate constants of BNPP hydrolyzed by complex 2 showed a bell-shaped profile around pH 7. The profile of k_{obsd} for BNPP showed similar to that of pH-dependence of the distribution for the sum of HL₂Zn + H₂L₂Zn(OH). The kinetic parameters activation Gibbs free energy ΔG^\ddagger 180 kJmol⁻¹, activation enthalpy ΔH^\ddagger 127 kJmol⁻¹ and activation entropy ΔS^\ddagger -165 JK⁻¹mol⁻¹ were obtained from the temperature dependence hydrolysis rate constants. The fact that entropy of activation showed very high negative value shows the probability for phosphorus of phosphoester to gain the higher coordination number. The Zn complex 2 may be served as catalyst for cleavage of phosphodiester backbone of RNA/DNA and as well as of organophosphate bond of agricultural insecticides to save the environment from the hazard of toxic pesticides.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 川 和 彦
副 査 教 授 西 則 雄
副 査 教 授 高 杉 光 雄
副 査 助 教 授 吉 田 登

学 位 論 文 題 名

Design and Syntheses of Peptide Zinc Complexes and their Catalytic Function on Phosphoesters

(ペプチド亜鉛錯体の設計と合成およびリン酸エステルに対する触媒機能)

本研究は、酵素反応をモデルとしたリン酸エステル加水分解およびその機構、反応活性化学種の解明を目的として、3つの人工的なペプチド、*N, N'*-dihistidylethylenediamine **L1**, *im-bzl-N, N'*-dihistidyl-diethylenetriamine **L2**, *L*-His-*L*-His-*L*-His-*L*-Tyr-*L*-His-*L*-His-*L*-His **L3** と亜鉛との錯形成能および亜鉛錯体[**L1**]₂Zn **1**, 錯体[**L2**Zn] **2**, 錯体[**L3**Zn] **3**のリン酸エステルbis(*p*-nitrophenyl)phosphate BNPP, *p*-nitrophenylphosphate NPPの加水分解機能について、pH滴定、¹H NMR、紫外可視吸収スペクトル法を用いて溶液化学の立場から検討したものである。

本論文は6章からなり、第1章では、加水分解の機能をもつ酵素*Escherichia coli* alkaline phosphatase (AP)の複核活性中心の構造、モデル錯体を用いたこれまでの研究について述べた。第2章では、3つの異なる人工的なペプチド**L1**, **L2**, **L3**の設計と液相法による合成について述べた。第3章では、**L1**, **L2** および **L3**のpKa、亜鉛との錯生成定数について述べた。pH滴定の結果から、**L2**のpKaは、イミダゾールからは4.3と4.9、二級脂肪族アミンからは6.8、両端の一級アミンからは7.4と8.8であった。**L1**のpKaは、イミダゾールからは4.6、両端の一級アミンからは8.9であった。**L3**のpKaは、カルボキシル基からは3、イミダゾールからは5-7、末端の一級アミンからは9、チロシンのOHからは10であると予想された。**HL2Zn(OH)₂**の生成定数 (*K*_{st}) および配位水の pKa はそれぞれ6.15, 8.26であることを明らかにした。また、distribution diagram から Zn:L = 1:1の条件下では **HL2Zn** + **H2L2Zn(OH)** の濃度はpH 7付近で極大となることを示した。第4章では、¹H NMR を用いた亜鉛滴定によって、pH 7における溶存錯体のZn:L (L = **L1**, **L2**, **L3**) の比を明らかにした。その結果pH 7の水溶液中では、**L1**については1:2の錯体が形成するが、**L2**と**L3**

については1:1の錯体が形成することを明らかにした。第5章では、合成したペプチドと亜鉛との錯体の合成、原子吸光による亜鉛と配位子の比の決定について述べた。

第6章では、リン酸エステル bis(p-nitrophenyl)phosphate BNPP, p-nitrophenylphosphate NPPの加水分解に関する亜鉛錯体の触媒機能、反応機構について検討した。BNPP, NPPの加水分解は400 nm付近に現れるp-nitrophenolateの吸収を追跡することによって調べた。亜鉛錯体 1および 3は不活性であった。亜鉛錯体 2は効果的にBNPP, NPPを加水分解し、その擬一次速度定数はそれぞれ $1.1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $2.1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ であった。錯体2によるBNPPの加水分解速度定数のpH依存性は、pH7付近でbell-shapeのプロファイルを示した。これは $\text{HL2Zn} + \text{HL2Zn(OH)}$ の濃度分布のpH依存性と類似していた。これらの結果から、反応活性化学種は $\text{HL2Zn} + \text{HL2Zn(OH)}$ であると結論づけた。

加水分解速度定数の温度依存性から、活性化Gibbsの自由エネルギー ΔG^\ddagger 180 kJmol⁻¹, 活性化エンタルピー ΔH^\ddagger 127 kJmol⁻¹, 活性化エントロピー ΔS^\ddagger -165 J K⁻¹ mol⁻¹が得られた。活性化エントロピーにおける負の大きな値は、加水分解の際、リン酸エステルによる亜鉛の配位数の増大の可能性を示している。錯体2は、農業用殺虫剤の無毒化のための有機リン酸エステル結合開裂やRNA/DNAのリン酸ジエステル骨格の開裂の触媒となりうると期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、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。