

溶液中の金属を除去する新規光応答性ペプチドの開発

研究代表者 奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 教授 廣田俊
(申請時 京都薬科大学 助教授)

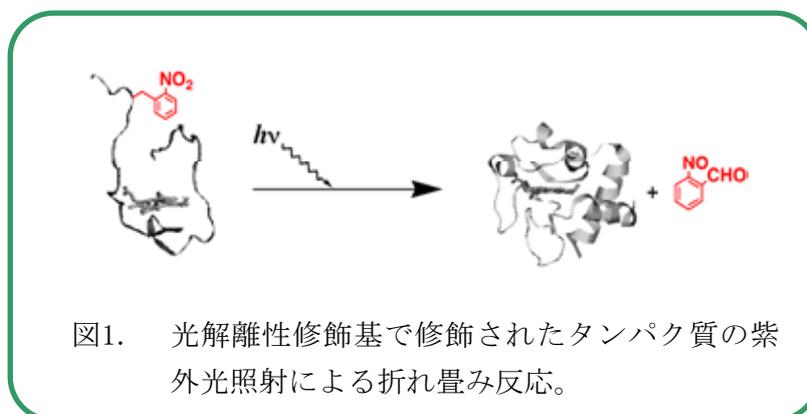
1. 緒言

工業的には重要でも有毒である金属も少なくない。代表的なものに水銀があり、過去に水俣病など深刻な公害が引き起こされた。また、生命の営みには、様々な金属がかかわっており、体内で金属が不足すると発病する。しかし、体内の金属濃度が高ければ高いほど良いという訳ではなく、生体内に銅やアルミニウムなどが蓄積するとアルツハイマー病が発症すると報告されている。以上のことから、金属で汚染された溶液から、より有効に金属を除去する技術の開発は非常に重要な課題であり、取り出された金属を有効に保管する技術の開発も大事である。

一方、タンパク質やペプチドは生体内の様々な所で機能性物質として働いており、これらの生体分子の立体構造を制御できれば、その技術は様々な分野に利用できる。しかし、タンパク質やペプチドの構造を生体内で高い空間分解能と時間分解能で制御する有効な技術はない。そこで本研究では、生体内で行われている金属結合の反応に着目し、人工的にこの反応を制御することを考えた。そして、ペプチドの構造変化を光と熱で制御し、この構造変化を利用して可逆的に金属を結合する新しい技術を開発するための基礎技術の基盤研究を行い、金属の結合環境を光で制御できる新規修飾ペプチドを作製した。

申請者はこれまで、光解離性修飾基をタンパク質に導入して、その修飾基の光解離能を利用して、タンパク質の構造変化を制御する新しい技術を開発してきた^[1]。この手法では、タンパク質の折れ畳み反応を追跡するために、化学修飾により光解離性修飾基をタンパク質の特定のアミノ酸残基の側鎖に導入し、タンパク質の立体構造構造を不安定化させることによって、タンパク質を変性状態にした。変性状態の修飾タンパク質にパルス光を照射して、タンパク質から修飾基を瞬時に外すことにより、タンパク質のフォールディング反応を一斉に開始させ、タンパク質の構造形成反応の初期段階を観測した(図1)。

本研究では、申請者が考案した上記の方法をさらに発展させて、光や熱で可逆的に構造が変化し、その構造変化が制御可能なペプチドを新規に開発した。最初に、



ペプチドに修飾可能で、可逆的に構造変化するアゾベンゼン誘導体を合成した (図 2)。次に、合成したアゾベンゼン誘導体でジペプチド 2 分子を連結した。その際、修飾を受けたペプチドが、アゾベン

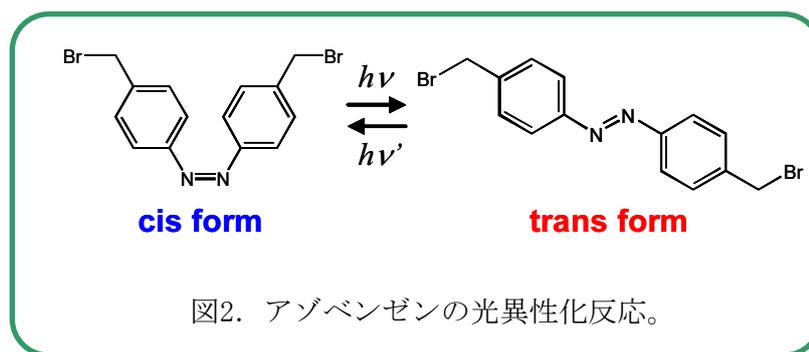


図2. アゾベンゼンの光異性化反応。

ゼン誘導体がトランス構造を取るときとシス構造を取るときとで金属の配位構造が変化するように分子設計した。作製したアゾベンゼン連結ペプチドの立体構造をアゾベンゼン骨格の光異性化を利用して制御することにより、金属の可逆結合制御を試みた。

2. 実験方法

架橋修飾試薬として、4,4'-ジヒドロキシルメチルアゾベンゼンと四臭化炭素から図 2 の 4,4'-ジブロモメチルアゾベンゼンを暗室で合成した。合成した化合物の構造は $^1\text{H-NMR}$ および MALDI-TOF マススペクトルで確認した。

ペプチドの修飾は GlyCys または CysGly のジペプチドをそれぞれ 2 分子、システイン残基の硫黄原子を介して上記で合成したアゾベンゼン誘導体で連結した (図 3)。GlyCys または CysGly をリン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、合成したアゾベンゼン架橋試薬を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶かした。調製した GlyCys または CysGly 溶液とアゾベンゼン架橋試薬溶液をそれぞれ窒素雰囲気下に置き、酸素を除いた。GlyCys または CysGly とアゾベンゼン架橋試薬の比が 1:10 になるように、ペプチド溶液にアゾベンゼン架橋

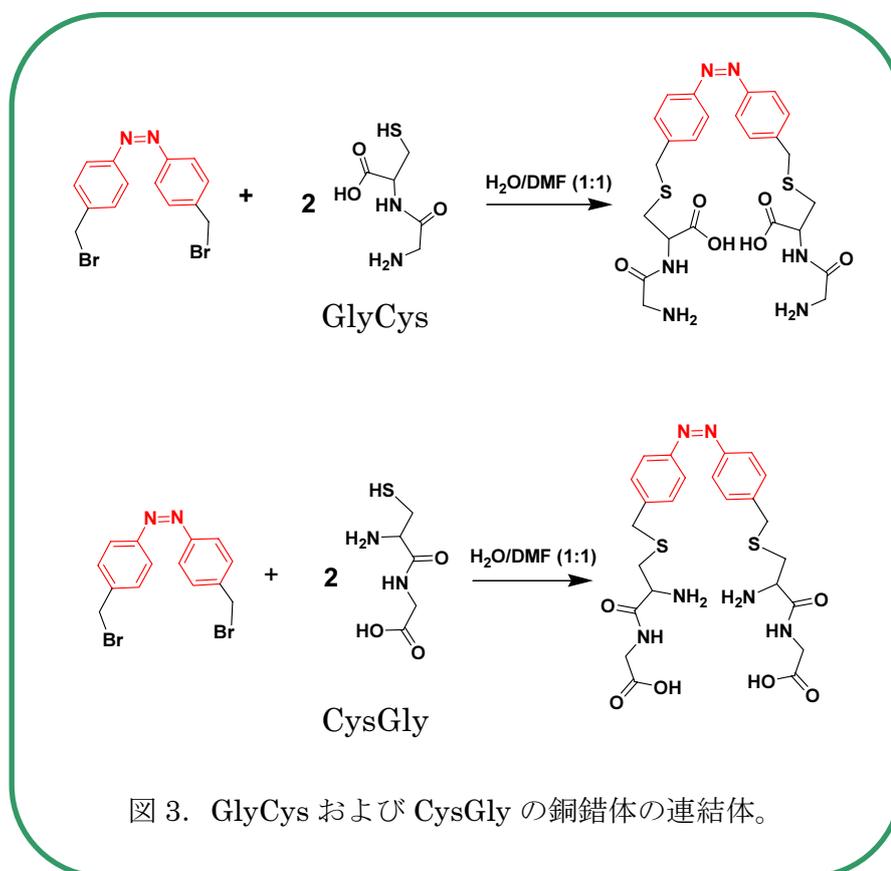


図 3. GlyCys および CysGly の銅錯体の連結体。

試薬溶液を嫌氣的に加えた後、混合溶液を 10 分間室温で攪拌した。得られた反応物は H P L C を用いて精製した。これらの操作は全て暗室で行った。

GlyCys または CysGly のアゾベンゼン連結体を銅イオンと反応させて銅錯体を合成した。得られた銅錯体の錯体形成は 600 nm 付近の銅イオンの d-d 遷移に由来する吸収を測定することで確認した。また、銅の配位構造は ESR スペクトルにより調べた。

アゾベンゼン誘導体およびペプチドのアゾベンゼン連結体のトランス体からシス体への光異性化は 355 nm のレーザー光 (YAG レーザーの 3 倍波) 照射、シス体からトランス体への光異性化は 430.6 nm のレーザー光 (半導体レーザー) 照射により行った。それぞれの異性化反応は吸収および ¹H-NMR スペクトルにより調べた。

3. 結果および考察

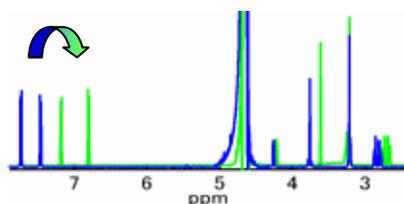
3.1 修飾基の合成

ペプチドのシステインの硫黄原子を介してアゾベンゼンのベンゼン環をペプチドと直接結合させたところ、得られたアゾベンゼン架橋ペプチドに 355 nm のレーザー光を照射するとチルラジカルが生成し、ペプチドが分解してしまった。そこで、ペプチドに紫外光を照射しても分解せず、可逆的に構造変化が繰り返せるように、アゾ基に結合させるベンゼン環とペプチドのシステイン残基の硫黄原子との間に CH₂ 基を導入した。

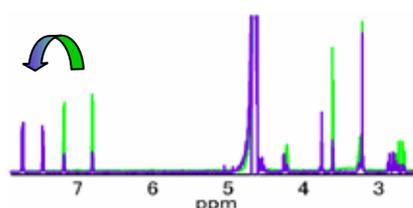
得られた 4,4'-ジブロモメチルアゾベンゼンのトランス体の吸収スペクトルでは 355 nm 付近に極大吸収波長が観測され、シス体は 300 と 430 nm 付近に吸収帯を有していた。4,4'-ジブロモメチルアゾベンゼンのトランス体に 355 nm のレーザー光を照射すると 355 nm 付近の吸収帯が消失し、300 と 430 nm 付近に吸収帯が現れ、シス体に構造異性化することが吸収スペクトルより確かめられた。さらに、得られたシス体に 430.6 nm のレーザー光を照射すると 355 nm 付近に吸収帯が再び観測され、トランス体に構造異性化したことが解かった。

3.2 ペプチドの修飾

ペプチドの修飾では、アゾ基に結合しているベンゼン環とペプチドのシステイン残基の硫



a) トランス体への 355 nm レーザー光照射



b) シス体への 430.6 nm レーザー光照射

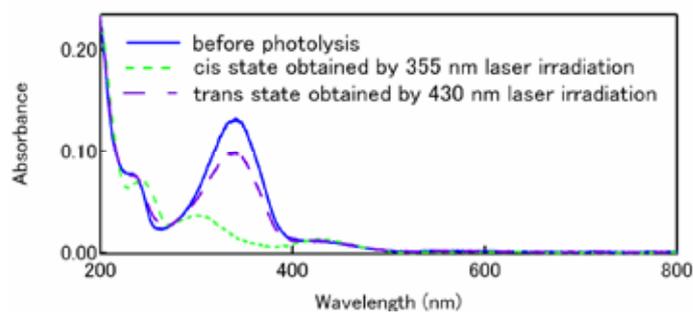
図 4. 光照射 (355 および 430 nm) による GlyCys アゾベンゼン連結体の NMR スペクトル変化。

黄原子との間に CH₂ 基を導入したため、架橋修飾基の長さが長くなり、当初設計していた銅を捕捉する GlyGlyHis ペプチドの両端にシステイン残基を付加した CysGlyGlyHisCys ペプチドを分子内でアゾベンゼン誘導体で架橋することができなくなった。そこで、1つのペプチド内をアゾベンゼン基で架橋するのではなく、代わりにシステインを有するペプチド GlyCys または CylsGly をアゾベンゼンの誘導体でそれぞれ連結した化合物を作製した (図 3)。得られた GlyCys および

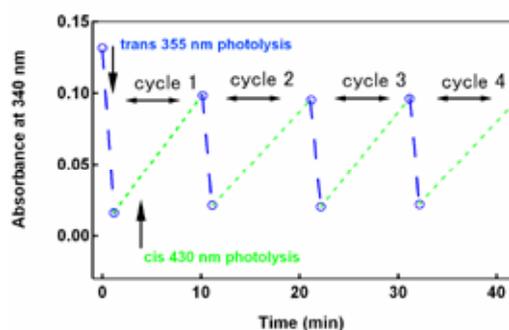
CylsGly のアゾベンゼン連結体は暗室で合成したため、355 nm 付近に吸収帯を有し、両方ともトランス構造であることが確認できた。

得られた GlyCys アゾベンゼン連結体のトランス体に 355 nm のレーザー光照射すると、トランス体の芳香環由来の 2 本の ¹H-NMR ピークがほぼ完全に消失し、代わりにシス体の芳香環由来の新しい 2 本の ¹H-NMR ピークが高磁場側に観測された。この結果より、GlyCys アゾベンゼン連結体のトランス体に 355 nm のレーザー光照射すると、トランス体からシス体へほぼ 100%変換することが確認できた (図 4a)。また逆に、シス体に 430.6 nm のレーザー光を照射すると、シス体で観測された芳香環由来の 2 本の ¹H-NMR ピークの強度が減少し、トランス体で観測された芳香環由来の 2 本の ¹H-NMR ピークが再び観測された。観測されたトランス体のピーク強度から、430.6 nm のレーザー光照射によりシス体からトランス体へ約 70—80%変換すると見積もられた (図 4b)。

GlyCys アゾベンゼン連結体のトランス体に 355 nm のレーザー光を照射すると、吸収スペクトルでの 350 nm 付近の吸収帯の強度が減少し、代わりに 300 と 430 nm 付近の吸収帯が生じた。この結果は、355 nm のレーザー光照射によりシス体に変化されることを支持した (図 5a)。また、生じた GlyCys のアゾベンゼン連結体のシス体に 430.6 nm のレーザー光を照射すると、300 と 430 nm 付近の吸収帯の強度が減少し、355 nm 付近の吸収帯の強度が増大した



a) 吸収スペクトル



b) 430 nm の吸光度変化

図 5. 光照射 (355 および 430 nm) による GlyCys アゾベンゼン連結体の吸収スペクトル変化。

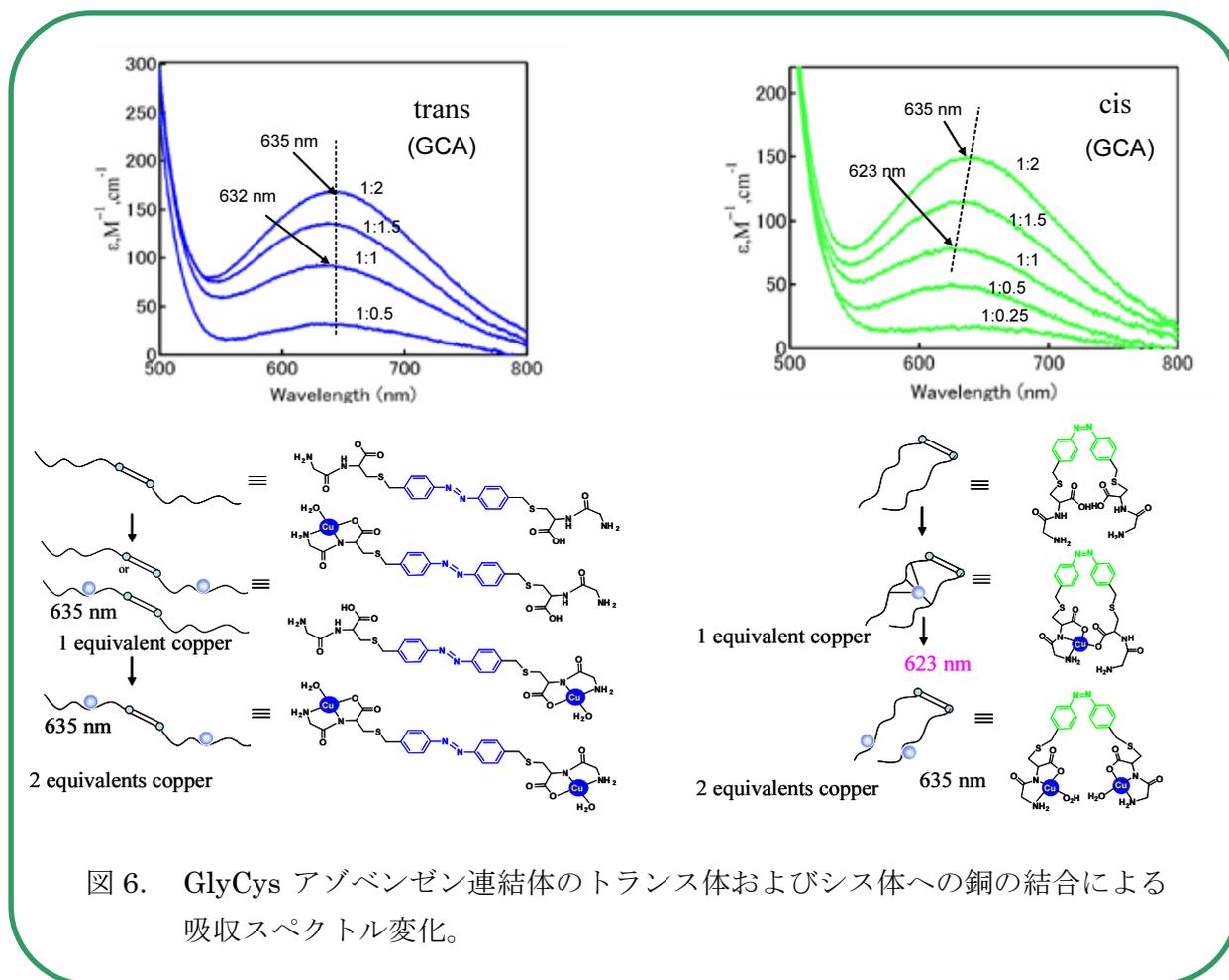


図 6. GlyCys アゾベンゼン連結体のトランス体およびシス体への銅の結合による吸収スペクトル変化。

(図 5a)。この吸収帯の強度変化から、シス→トランス異性化を見積もると、NMR と同様の比率得られた。さらに、355 と 430.6 nm のレーザー光をペプチドのアゾベンゼン連結体に交互に照射した場合、355 nm と 300、430 nm の吸光度の減少、増大が繰り返し起こり、シス→トランス異性化が可逆的に起こることが確認できた (図 5b) [2],[3]。

3.3 ペプチドと銅の結合

得られた GlyCys ペプチドのアゾベンゼン連結体に銅を配位子 (アゾベンゼン連結体) : 銅 = 1 : 1 の割合で結合させた。このアゾベンゼン連結体の 1 : 1 銅錯体は、トランス構造で吸収極大波長が 632 nm の吸収帯が観測された (図 6)。この結果より、銅イオンは N_2O_2 の配位構造を有することが示唆され、ESR スペクトルより N_2O_2 の配位構造が確かめられた。また、このアゾベンゼン連結体の 1 : 1 銅錯体のシス構造では、吸収極大波長が 623 nm の吸収帯が観測され (図 6)、ESR スペクトルより N_2O_2 の配位構造をとることが確認できた。このアゾベンゼン連結体の 1 : 1 銅錯体への 355 および 430.6 nm の光照射により吸収帯が変化したことより、銅の配位構造を可逆的に変換できることが確認できた。

この配位変化を確かめるため、CysGly ペプチドのアゾベンゼン連結体に銅を配位子 (アゾ

ベンゼン連結体) : 銅 = 1 : 1 の割合で結合させた。このアゾベンゼン連結体の 1 : 1 銅錯体では、GlyCys ペプチドのアゾベンゼン連結体と同様、トランス構造で吸収極大波長が 632 nm の吸収帯が観測された。一方、GlyCys のアゾベンゼン連結体の 1 : 1 銅錯体のシス構造では、吸収極大波長が 610 nm の吸収帯が観測され (図 7)、ESR スペクトルより N_3O の配位構造が確認できた。GlyCys ペプチドのアゾベンゼン連結体と CysGly ペプチドのアゾベンゼン連結体の 1 : 1 銅錯体の配位構造の違いは、それぞれのペプチドの末端基の違いに由来し、GlyCys のアゾベンゼン連結体ではカルボキシ基がペプチドの末端にあり銅に配位し、CysGly のアゾベンゼン連結体ではアミノ基が末端にあり銅に配位するためと解釈した。以上の結果より、GlyCys や CysGly ペプチドの連結体による銅の配位構造を制御することができた。

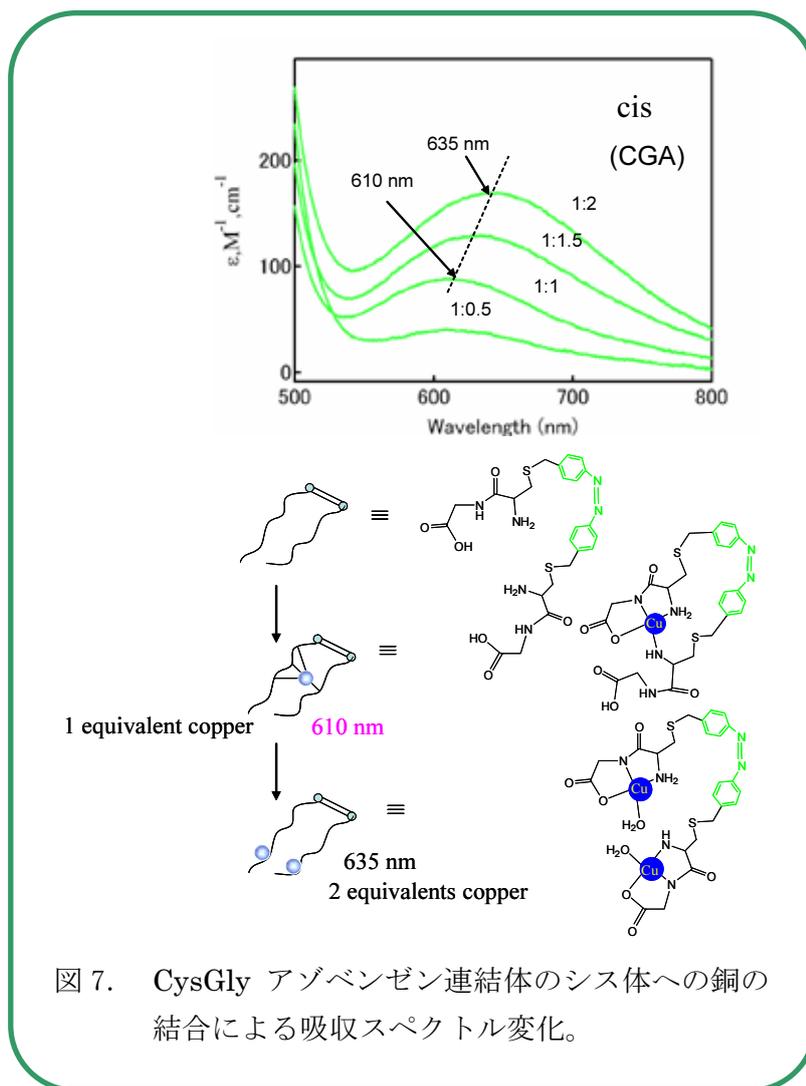


図 7. CysGly アゾベンゼン連結体のシス体への銅の結合による吸収スペクトル変化。

4. 結論

本研究では、ペプチドを連結するアゾベンゼン誘導体を合成し、合成したアゾベンゼン誘導体を用いて GlyCys ペプチドの連結体および CysGly ペプチドの連結体を作製した。これらのペプチドのアゾベンゼン連結体でシス・トランス異性化が可逆的に起こることが確認できた。作製したペプチドのアゾベンゼン連結体の銅錯体を作製し、吸収および ESR スペクトルにより銅の配位構造を特定し、銅の結合様式がシス体とトランス体で変化することが明らかになった。以上より、銅の配位構造を可逆的にある程度変化させることが可能となった。しかし、金属の可逆補足あるいは金属の選択性を引き出すには、配位子をさらに工夫する必要がある、今後の課題である。

参考文献

- [1] S. Hirota, Y. Fujimoto, J. Choi, N. Baden, N. Katagiri, M. Akiyama, R. Hulsker, M. Ubbink, T. Okajima, T. Takabe, N. Funasaki, Y. Watanabe, and M. Terazima, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7551-7558 (2006).
- [2] H. Prakash, A. Shodai, H. Yasui, H. Sakurai, and S. Hirota, *J. Inorg. Biol. Chem. (JBIC)* **12**, S149 (2007).
- [3] プラカシュ ハラン、小代明美、安井裕之、櫻井弘、泉翔、廣田俊、第22回生体機能関連化学シンポジウム講演要旨集, 50-51 (2007).