

氏 名	平 山 佳 伸 ひら やま よし のぶ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 189 号
学位授与の日付	昭和 55 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻
学位論文題目	モデル錯体を用いたブルー銅活性部位の生物無機化学的研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 田 中 久 教 授 宇 野 豊 三 教 授 大 崎 健 次

論 文 内 容 の 要 旨

銅タンパク質は、酸素運搬・酸化還元・電子伝達等の重要な生物学的機能をはたしている。これらの銅タンパク質中の銅結合部位は、それぞれの機能に必須不可欠の部位であるとともに、銅イオンの配位環境によって特徴的な物理化学的特性を示す。銅タンパク質中の銅イオンは分光学的および磁氣的性質に基づき、3つのタイプに大別されている。すなわち、青色で電子スピン共鳴（以後、ESR と略）活性な Type 1、無色で ESR 活性な Type 2、そして ESR 不活性な Type 3 の3種である。

これらのうちで特に、Type 1 銅はその特徴的な色によりブルー銅イオン、これを含むタンパク質はブルー銅タンパク質と呼ばれ、通常の銅錯体にはみられない次の様な特異な性質を示す。

- (i) 可視部吸収スペクトルにおいて、600 nm 付近に観測される吸収帯は異常に高いモル吸光係数 ($\epsilon = 1,000 \sim 5,000$) を示す。
- (ii) ESR スペクトルにおいて、非常に小さい銅超微細結合定数 ($A_{11} = 30 \sim 100$ G) を示す。
- (iii) 著しく高い酸化還元電位 ($E_0' = 0.2 \sim 0.8$ V) を示す。

このため、ブルー銅タンパク質は銅タンパク質のうちで最も早くから興味をもたれ、最もよく研究されているが、ブルー銅活性部位の配位環境は不明のままに残されていた。そこで、ブルー銅タンパク質の銅活性中心の構造と機能を理解するためには、好適なモデル錯体を通じての生物無機化学的アプローチが重要と考え、ブルー銅の特徴をもつと予想されるモデル錯体を考案・合成し、その銅錯体を詳細に検討した。

なお、一般にチオールと銅(II)イオンとの反応においては酸化還元反応がおこりやすいため、銅(II)錯体を単離することが困難な場合が多いので、銅(II)イオンと類似の配位構造をとり、酸化還元を受けにくいニッケル(II)錯体を銅(II)錯体との比較対照に用いた。

このような研究から以下に詳述するように、本研究に用いたモデル錯体は多くの点においてブルー銅タンパク質の特徴的な性質に極めて近い性質を示し、これらのモデル錯体の構造はブルー銅タンパク質の活性部位の構造を有していることがわかり、ブルー銅タンパク質の構造と機能の理解に有意義な新しい知見

を得ることができた。

(1) α -mercaptopropionylglycine (α -MPG) は、中性域で緑色の 1:1 α -MPG-銅(II)錯体を生成し、その錯体においてはチオール硫黄、脱プロトン化ペプチド窒素及び末端カルボキシル基酸素が銅(II)イオンに配位していることを IR スペクトル及び電位差滴定により確認した。可視部及び ESR スペクトルより、本錯体の可視部吸収極大位置、ESR パラメータ、及び ESR パラメータを用いて計算された結合パラメータがブルー銅イオンのそれらと類似することが示された。さらに、glycylglycine-銅(II)錯体との比較から、配位原子として硫黄原子を導入すると 600 nm 付近の吸収強度が増大し、銅超微細結合定数が減少することが明らかにされた。結合パラメータの値より、Cu-S 結合の強い共有結合性が銅(II)イオン上の不対電子密度を減じ、結果として銅超微細結合定数の減少を引き起こすということが推論された。

(2) 上記 α -MPG の種々の誘導体を合成し、電位差滴定の結果から計算された錯生成定数と可視部吸収極大位置とにより、銅(II)錯体の安定性に及ぼす配位子の構造的・電子的影響を検討し、次の結果を得た。

- (i) 可視部吸収帯は錯生成定数が増大するに従い短波長シフトする。
- (ii) $6-6 < 6-5 < 5-6 < 5-5$ 員縮合キレート環の順に安定度は増大し、6員環を5員環に置換すると可視部吸収帯は 10~15 nm 短波長シフトする。
- (iii) $\text{NNO} < \text{SNO} < \text{SNS}$ ドナーセットの順に安定度は増大し、NまたはOをSで置換すると、可視部吸収帯は 25~30 nm 短波長シフトする。
- (iv) チオール基に対して、より電子吸引性の置換基をもつ錯体ほど安定度が増大し、Taft の置換基定数が 0.4 増加する毎に可視部吸収帯は 10 nm 短波長シフトする。

(3) チオール及びイミダゾール基を含有する N-mercaptoacetyl-L-histidine (MAH) の銅(II)錯体を合成し、可視部円偏光二色性、プロトン核磁気共鳴 (^1H NMR) 及び ESR スペクトルにより検討した。この錯体は可視部スペクトルにおいて 600 nm 付近に異常に大きなモル吸光係数 ($\epsilon=830$) を、ESR スペクトルにおいて小さな銅超微細結合定数 ($A_{\text{H}}=93$ G) を示し、ブルー銅イオンの特徴的な性質と極めて類似した性質をもつことが認められた。また、チオール硫黄、脱プロトン化ペプチド窒素、及びヒスチジンイミダゾール窒素が銅(II)イオンに配位していることが確認された。これらの知見より、ブルー銅部位へのシステインチオール硫黄とヒスチジンイミダゾール窒素の関与が強く示唆された。

一方、ブルー銅タンパク質の機能に関連して重要と考えられる銅(I)錯体についても検討した。一般に銅(I)錯体に関する情報は極めて少ないが、チオールおよびイミダゾール基を含むトリペプチドの銅(II)錯体を還元して得られる銅(I)錯体の ^1H NMR スペクトルから、チオール基及びイミダゾール基は銅(I)に対しても効果的な配位ドナーであることがわかった。この点からもこれらの錯体はブルー銅タンパク質のモデル錯体として有意義なものであると考えられる。

(4) ブルー銅タンパク質の 1 種である plastocyanin や azurin 中の銅結合部位のアミノ酸配列において、システイン残基とヒスチジン残基との間にプロリン残基が存在している。このプロリン残基の役割を明らかにするため、N-mercaptoacetyl-glycyl-L-prolyl-L-histidine (MAGPH)-銅(II)錯体と N-mercaptoacetyl-glycylglycyl-L-histidine (MAGGH)-銅(II)錯体とを可視部及び ESR スペクトルにより比較検討した。3 位のグリシン残基をプロリン残基に変えることにより可視部吸収極大位置は 80 nm 長波

長シフトし、銅超微細結合定数は減少した。また銅配位幾何学では D_{4h} から T_d 対称への変化がみられた。

以上のようなモデル錯体を用いたブルー銅活性部位の生物無機化学的研究から、

(i) ブルー銅タンパク質の活性部位は、少なくとも 1 個のシステインチオール基とヒスチジンイミダゾール基とが配位した SN_3 、あるいは S_2N_2 ドナーセットの歪んだ四面体構造を有すること、

(ii) ブルー銅イオンに特徴的な 600 nm 吸収帯は、主として硫黄→銅電荷移動遷移に由来すること、そして、(iii) システイン残基とヒスチジン残基との間に存在するプロリン残基は、ブルー銅配位幾何学を四面体に規制する役割を持っていること、

を示すことができた。

また、従来少数しか知られていなかったチオール銅(Ⅱ)錯体の安定性に影響するいくつかの因子を定量的に明らかにすることもできた。

本研究を通じて得られた情報は、ブルー銅タンパク質の活性部位の構造と機能に関する理解を深めるために役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は生体にとって重要な機能を果しているブルー銅たんぱく質の活性部位における銅配位環境について、適当なモデル錯体を用いて検討し、得られた知見をまとめたものである。

ブルー銅たんぱく質が示す特徴的な可視部吸収スペクトル、ESR スペクトルに着目し、種々のチオール基含有ペプチドを合成し、その銅(Ⅱ)錯体の性質を調べ、ブルー銅たんぱく質の性質に類似した性質を有する錯体を得た。従来チオールの銅(Ⅱ)錯体は少数しか知られておらず、その安定性に影響する諸因子については定量的取扱いがなされていなかったが、著者はチオール基、イミダゾール基を含むペプチドを中心とする数種のペプチドの銅(Ⅱ)錯体を得て、その性質を調べることにより、ブルー銅たんぱく質に類似した性質を示し、かつ安定な銅(Ⅱ)錯体を生成する配位子を見出し、その安定性に影響する因子を定量的に評価した。その結果現在のところブルー銅たんぱく質の性質をもっともよく反映する銅錯体として N-メルカプトアセチルグリシル-L-プロリル-L-ヒスチジンの銅(Ⅱ)錯体を得た。このモデル錯体において得られた知見をもとにして、ブルー銅たんぱく質の活性部位における銅に対するチオール基、イミダゾール基の配位、それらを含む硫黄 1 窒素 3 又は硫黄 2 窒素 2 ドナーセットの歪んだ四面体構造が示され、また、その四面体構造の維持にはチオール基とイミダゾール基との間にあるプロリン残基が寄与していることを明らかにし、さらにブルー銅たんぱく質に特有な可視部吸収帯 (600 nm) が硫黄→銅電荷移動遷移に由来することなどを明らかにすることができた。

以上の業績は従来不明であったブルー銅たんぱく質の活性中心である銅配位部位の環境の解明に対して新しく合成したモデル錯体を通して多くの知見を加えたものであり、生体にとって重要なブルー銅たんぱく質の構造と機能に関し新しい知見をもたらした点で評価される。

よって、本研究は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。