

氏 名	饗 場 弘 二 あい ば ひろ じ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 127 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 9 月 24 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	ヒスチジンおよびヒスチジン含有ペプチドと銅 (II) との 錯生成反応に関する研究

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

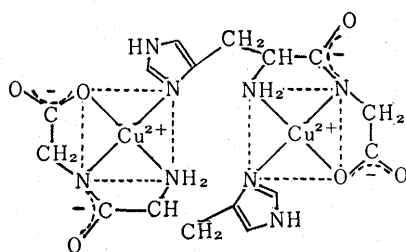
たんぱく質と金属イオンとの相互作用は生体内での金属の挙動や金属酵素の構造、機能に關しての重要な基礎的研究課題であり、それに対してアミノ酸、ペプチドの金属錯体の研究は多くの資料を提供し得ると考えられる。アミノ酸の中でヒスチジンはシステインとともに金属との結合において最も重要な位置をしめるにもかかわらず、ヒスチジンを含むペプチドの金属錯体については2、3の研究が行われているにすぎない。それはイミダゾール基の存在のために錯生成反応が複雑になり、生成する錯体種の種類、構造が多様となる結果、それらの生成反応の定量的取扱いが困難となることを基因している。そこで著者はヒスチジン含有ペプチドの重要性を考慮し、その関連物質を含めてそれらの金属イオンとの錯生成反応を、生体にとって重要であるばかりでなく配位化学的にも多くの研究課題を残している Cu(II)イオンとの反応を中心として、種々の物理化学的方法により検討した。以下に得られた結果および知見を列挙する。

(1) L—Histidylglycine (His—Gly), glycyl—L—histidine (Gly—His), L—histidylglycylglycine (His—Gly—Gly), glycyl—L—histidylglycine (Gly—His—Gly), およびglycylglycyl—L—histidine (Gly—Gly—His) をアジド法に従い合成した。

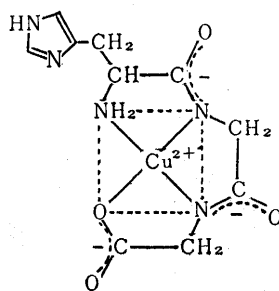
(2) 上記のペプチドおよび関連化合物について電位差滴定を行い、カルボキシル基、イミダゾール基、アミノ基の解離による複雑な滴定曲線を解析し酸解離定数を求めた。近接する2つの解離に対する定数の計算には最小自乗法を適用し良好な結果を得た。これらのペプチドにおける酸解離定数の相違はペプチドの構造から説明された。

(3) L—histidine (His), 3—benzyl—L—histidine (3—Bzl—His), His—Gly, および His—Gly—Gly と第一遷移金属イオンとの錯生成反応を電位差滴定法により検討し、1:1および2:1 (配位子: 金属イオン) 錯体の生成定数を, Irving—Rossotti の方法に従い計算した。これらの生成定数と酸解離定数との関連性から、上記の配位子としてアミノ基およびイミダゾール基を介して金属イオンに配位することが示された。

(4) His—Gly および His—Gly—Gly と Cu(II) との錯生成平衡を電位差滴定法により定量的に解析し、その結果および IR スペクトル、電子スペクトルより、酸性領域では Cu(II) 平面の配位座をアミノ基とイミダゾール基が占めるカチオン錯体、 CuL^+ が生成し、中性領域ではペプチドアミノ基のプロトンの解離によって 2 量体 Cu_2X_2 が生成することがわかった。His—Gly—Gly—Cu(II) 系では弱アルカリ性領域で第 2 のアミド基が解離し、アニオン錯体 CuY^- の生成が認められた。各錯体種の構造を Fig. 1 に示す。

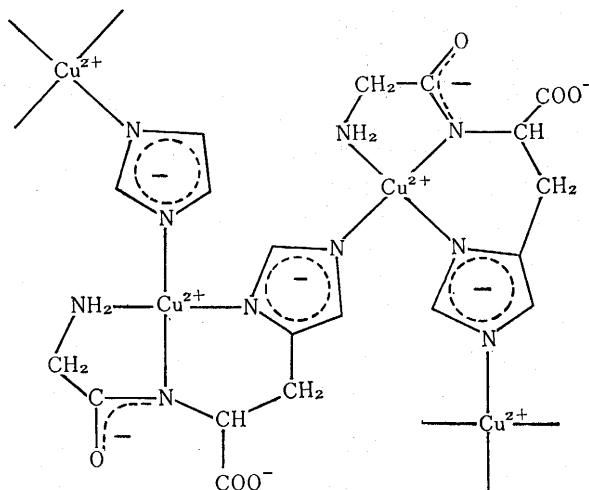


(I), Cu_2X_2 (His—Gly—Cu(II))



(II), $\text{CuY}^-(\text{His—Gly—Gly—Cu(II)})$

(5) Gly—His, Gly—His—Gly, および Gly—Gly—His と Cu(II) との錯生成平衡を電位差滴定法により定量的に解析した。電位差滴定の結果および電子スペクトルより、滴定初期段階ではイミダゾール基が主に配位したカチオン錯体 CuLH^{2+} が生成するが、弱酸性～中性領域ではアミノ基、ペプチドアミノ基およびイミダゾール基の配位した縮合キレート、 CuX または CuY^- が最も安定に存在することがわかった。Gly—His—Cu(II) 系および Gly—His—Gly—Cu(II) 系においては、弱アルカリ性領域でピロール性イミノ基の解離が認められ、その結果生成する錯体はⅢのようなイミダゾール基で架橋された多量体であることがわかった。



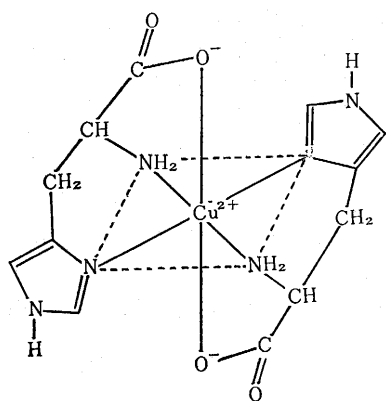
(III), $\text{Cu}_n\text{Y}_n^{n-}(\text{Gly—His—Cu(II)})$

(6) 上記のペプチドの NMR スペクトルを測定し、メチンおよびメチレン基のシグナルの帰属を行った。Cu(II) 存在下における NMR スペクトルのシグナル巾の広がりを追跡することにより、ペプチドに対する Cu(II) の結合部位を明らかにした。これらの結果は、電位差滴定、赤外吸収スペクトル、電子スペクトルの結果とも良く対応した。Gly—Gly—His—Cu(II) 系ではアルカリ性領域でシグナル巾の広がり効果が大きく緩和されるが、これは生成する錯体 CuY^- が非常に安定で、配位子と Cu(II) との交換速度が低下するためと推定された。

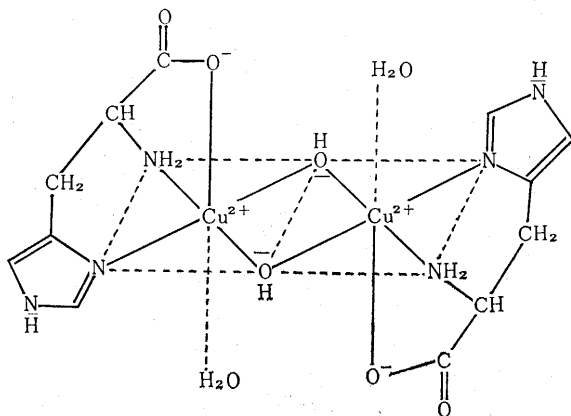
(7) ヒスチジン—Cu(II) 錯体において問題となるアピカル配位に関する基礎的検討として、diethylene-

triamine—Cu(II) 系に種々の第2の配位子を添加した際の電子スペクトルの変化を検討した結果、添加配位子が5または6員環キレート生成能を有する場合、キレート効果が Jahn-Teller 効果と拮抗して Cu(II) の軸方向の配位が強まり、square pyramid 型5配位混合配位子 Cu(II) 錯体が生成することが結論できた。この結論は d-d スペクトルの変化についての配位子場理論に基づく考察からも支持された。

(8) ヒスチジンおよび関連化合物の Cu(II) 錯体の性質と構造を、電位差滴定、電子スペクトル、磁化率測定により検討した。一連の関連化合物 Cu(II) 錯体についての電子スペクトルの比較から、His—Cu(II) 2 : 1 normal 錯体はアミノ基とイミダゾール基が平面に、カルボキシル基がアピカル位に弱く配位した2核 tetragonal 構造(IV)をとることが明らかになった。histamine—Cu(II) 1 : 1 系では、中性領域でhydroxo 錯体が生成することが、滴定曲線の定量的解析、電子スペクトル、磁化率の諸結果から導かれた。His—Cu(II) 1 : 1 系および 3—Bzl—His—Cu(II) 1 : 1 系においても、電位差滴定および電子スペクトルより同様の2核 hydroxo 体(V)の生成が推定され、磁化率の測定からこの構造が確められた。



(IV), $\text{CuL}_2(\text{His-Cu(II)})$



(V), $\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{OH})_2$

(9) 本研究を含め、アミノ酸、ペプチド Cu(II) 錯体についての研究方法、成果をもとに、錯体化学の立場から、銅たんぱくの構造と機能の解明へのアプローチの可能性について考察した。

論文審査の結果の要旨

従来よりアミノ酸、ペプチドの金属錯体は、たんぱく質と金属イオンとの相互作用、金属の生体内での挙動に関して、基礎的資料を得る目的で盛んに研究されてきたが、ヒスチジンを含むペプチドは、ヒスチジンがアミノ酸の中で金属との結合において最も重要であることから、上記目的に最も適した研究素材であるにもかかわらず、余り研究されていなかった。それはイミダゾール基の存在のために錯生成反応が複雑となり、その定量的解析が困難となることによっている。著者はこの点に着目し、まずヒスチジンを種々の位置に含む五種のジおよびトリペプチドを合成し、それらの酸解離平衡を解析し、ついで Cu(II) との錯生成平衡を電位差滴定法、分光化学的方法により定量的に解析し、その結果を用いて、種々の pH 領域でイミダゾール基の存在により生成する特徴的な種々の錯体種の構造を推定し、また NMR スペクト

ルの測定結果からペプチドに対する Cu(II) の結合部位を明らかにした。さらに著者はヒスチジンおよびその関連化合物についても同様に検討し、磁化率測定の結果をも加えて考察し、生成錯体種の構造を推定した。以上の研究の結果ヒスチジンおよびそのペプチドと Cu(II) との錯生成反応の全貌がほぼ明らかとなった。

本研究の成果は生体内での金属の挙動の研究に対し、ひとつの興味ある資料を提供したもので、薬学と深い関連を有する生物無機化学の領域に寄与あるものと考えられる。よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。