

ペプチドモデル錯体と分子シミュレーションを使った 金属酵素の活性中心の研究



技術解説

上山 憲一*

Study of Metal Center in Metalloenzymes
Using Peptide Model Complexes and Molecular Simulation

Key Words : metalloenzyme; synthetic peptide;
molecular simulation; hydrogen bond

1. はじめに

昨年秋のノーベル化学賞が分子動力学ソフト開発の基礎をつくってきた M. Karplus, A. Warshel および M. Levitt の 3 人に贈られた。彼らの弟子たちが開発し、市販してきたソフトを使って、金属酵素のモデル錯体の合成を行ってきた筆者にとって、非常に感慨深いものがある。特に、1970 年代中頃に Levitt 教授のグループが製作した 8 ミリ映画で、ヘリックス構造をもつペプチドがバネのごとく動き、時には伸びきった動きを見せる分子運動のシミュレーション映像を見せてもらったときは驚いた。

プラスチック産業分野において、高性能な重合触媒の開発には、彼らの弟子たちによる分子設計ソフトが大いに役立ってきたことは知られている。重合反応で錯体に配位したモノマーに他の配位子が攻撃するステップを重合の唯一の遷移状態として考えれば良いために、分子設計が容易であり、高価なソフトが企業で利用され、大きな成果を挙げてきたという。

多電子的に酸化還元を行う金属酵素は、地球上の化学物質によってエネルギー循環を司る重要な役割を担っている。金属酵素の活性中心の周辺構造が明らかになった今も、反応のからくりは合成研究者を納得させていないほどに複雑である。筆者は金属酵素の活性部位の人工モデル合成から特異な反応性の

からくりを一部でも明らかにしたいと長年研究を続けてきた。

この複雑さは金属酵素に限らず、アミド基の加水分解を行うセリンプロテアーゼ酵素のような研究の進んだ酵素のメカニズムにも当てはまる。明らかになっているカルボニル炭素の四面体遷移状態のみであれば、重合触媒と同じ様に人工の加水分解触媒の合成は、これらの分子設計ソフトの利用で大きく進んできたはずである。しかし、この四面体遷移状態になる前にアルコール基が脱プロトン化する遷移状態も存在するはずであり、二つの遷移状態はリレーとして一まとめにされている。アルコール基の脱プロトン化の容易さとアルコラートアニオンの求核反応性は相矛盾する状態であり、温和な条件でアミノ酸側鎖のみで作られるところが不思議である。この二つの遷移状態は非可逆的に精密な機械によって導かれていることになる。タンパク質の構造変化がこの反応性の変化をスイッチすると思われるが、明確ではない。

2. 分子設計ソフトを使った金属酵素、金属蛋白質のペプチドモデル錯体の合成

窒素固定、炭酸ガス固定、メタン酸化を行う金属酵素がこれらの魅力ある反応性をつくりだすからくりは、さらに複雑であろう。例えば、触媒反応の前段階で電子を供給する [2Fe-2S] フェレドキシンから P450 酸化酵素への電子伝達において、図 1 に模式的に示すような両者が複合体を作る構造が電子伝達の遷移状態である。その伝達が終われば両者は離れるようにタンパク質の構造と鉄イオン周りを変える。その後、酸素分子の配位と解裂、基質の配位、酸素原子の付加などそれぞれ連続した複数の遷移状態を経て、鉄イオンの価数変化を伴いながら反応は進む。



* Norikazu UEYAMA

1942年1月生
大阪大学大学院 理学研究科 高分子科学専攻博士課程 (1970年)
現在、大阪大学名誉教授 理学博士 高分子金属錯体
TEL : 06-6461-4612
FAX : 06-6461-4712
E-mail : bfayu508@cwo.zaq.ne.jp

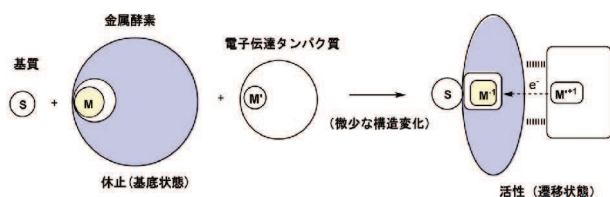


図1. 酸化還元酵素の複合体形成と構造変化の概念図。

配位を伴う金属錯体の反応場では、立体障害の導入で金属イオン周りに歪と配位の立体規制を起こす。数々の新しい錯体触媒が開発され、有機合成の分野で重要な役割を担ってきている。金属酵素の活性中心においても、立体障害は金属中心の歪や中間体の安定化を行うとされている。筆者らは、電子伝達を行うタンパク質の [1Fe] ルブレドキシン、[2Fe-2S] および [4Fe-4S] フェレドキシンや Mo, W-酸化酵素のモデル錯体に嵩高い硫黄配位子を導入してきた。始めの頃、分子設計にはナイロン製の CPK 模型を使用してきたが、その後、ファンデルワールス半径や電荷、電気陰性度などに優れた近似解を導入して発展してきた Goddard III の Biograf ソフトや Cerius2、Kollman の Amber などに加え、Fe(III) 周りのパラメーターを導入して錯体の構造と歪を予想し、実際に合成した錯体を結晶構造解析して、検証してきた (図2)。¹⁾ しかし、天然の金属タンパクが持つ錯体的に特異な機能は殆んど再現できなかった。

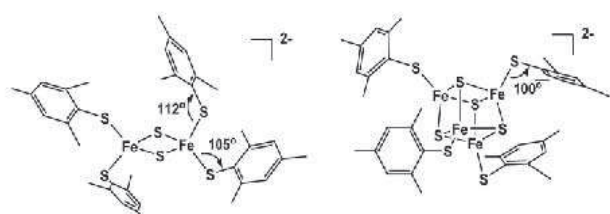


図2. 分子設計より予想して合成した嵩高い配位子をもつフェレドキシン錯体のX線結晶構造。

金属酵素の配位子であるペプチド鎖にそのからくりがあるのは自明であるが、原因を特定できない。そこで、酵素の金属中心の周りのアミノ酸配列をもつペプチドモデル錯体の合成を行う方法で明らかにすることができないかと考えた。天然の鉄硫黄クラスターの特徴的な機能は酸化還元電位が合成錯体に比べて著しく正方向にシフトしていることであり、これは外部から検出し易い物性でもある。先ず、ト

リペプチドを4個配位させた [4Fe-4S] ペプチド錯体を合成したところ (図3 a)、²⁾ 低誘電率溶媒中でもしかも低温で酸化還元電位をシフトさせ、生理条件の範囲までのシフトを実現した。また、ペプタペプチドを2個配位させた [1Fe] ルブレドキシンのモデル錯体や、この2個をつないだデカペプチド錯体を合成した (図3 b) と、³⁾ これらの錯体も天然のルブレドキシンに近い酸化還元電位を示した。このアミノ酸10残基は、丁度、1個の鉄イオン全体を覆う嵩高さである。

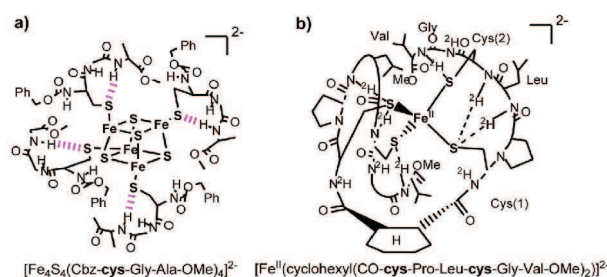


図3. a) アミノ酸残基3×4個のペプチドモデル錯体。
b) アミノ酸残基10個のペプチドモデル錯体。

分光学的研究から、低極性溶媒中ではペプチド鎖がヘアピンターン構造をとり、配位硫黄原子にペプチドアミド基のNHからのNH...S水素結合が形成されることが、酸化還元電位のシフトの原因であることがわかった。Fe-S-H(2H)の結合を経たコンタクトシフトが²H-NMRスペクトルで観測され、ペプチド鎖の水素結合形成が構造的に有利であることがBiografによる分子設計シミュレーションからも支持された。酸化還元電位が低極性溶媒中ほど正方向へシフトするという錯体の常識から外れた現象を見出した。同じ頃、前述のWarshel教授は酵素の活性中心の反応性が、低極性溶媒中にある静電相互作用により生まれるという「超溶媒和」説を提唱していた。⁴⁾ また、金属酵素の金属中心が極性配位子に囲まれ、これに対する種々の静電相互作用層で取り囲まれ、その周りを疎水性アミノ酸側鎖からなる疎水性層、さらにその外側に水に溶けるための親水性層の3層からなるという金属酵素の構造の概念が提唱されていたが、まさにこれに一致する。筆者は合成的にこの3層構造が構築できないかと考え、疎水性部分をもつ水溶性人工ポリマーの末端にキレート型のミニペプチド配位子を結合した錯体の合成

や、金属タンパク質の活性部位のあるドメインをモデル化したミニタンパク質の合成を行った。しかし、これらの人工錯体は水中ではことごとく加水分解してしまうことがわかり、錯形成そのものも成功には到らなかった。

当時、蛋白質研究所の月原教授が植物型フェレドキシンのX線結晶構造解析に成功し、図4に示すように [2Fe-2S] 活性部位をもつドメインがタンパク質の孤立した部分にあることを見出していた。⁵⁾ 筆者らは共同で20-残基のペプチドを合成し、タンパク質の一部を切り取ったペプチド鎖の部分部分がモザイク的に機能しているかどうかを調べた。この20-残基のペプチドモデル錯体は、やはり水中では [2Fe-2S] クラスターを保持した構造はつくりませんが、有機溶媒であるジメチルホルムアミド (DMF) 中では天然と同等の構造をもつ異性体が半分存在し、残りの半分は酸化還元電位が負に偏った異性体が混合して存在していることがわかった (図5)。人工ペプチド鎖と [2Fe-2S] クラスターが特異的な物性を持つ錯体を形成することから、ペプチド鎖が機能を決定していることがわかった。⁶⁾ それぞれの異性体の分離は困難であり、たとえ20-残基のミニタ

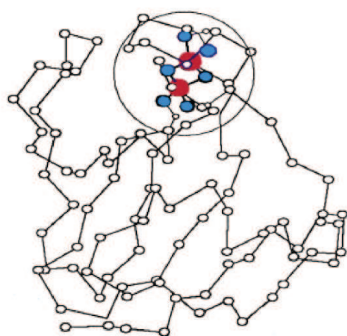


図4. Plant-type [2Fe-2S] ferredoxin のX線結晶構造：
-0.64 V SCE (aq. solution).

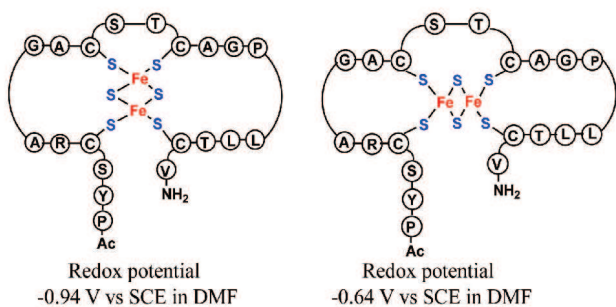


図5. 人工の20-ペプチド [2Fe-2S] 錯体。

ンパク質でもパラメーターが多すぎて、構造の相違がどのように機能の差をつくるのかは不明であった。

今振り返ってみれば、Goddard IIIらがその当時のコンピュータの最大計算能に合わせた近似解を組み込んだソフトを開発し、実測値に近いファンデルワールス半径、電荷、電気陰性度を使ったソフトを利用できるようにして発展させてくれたお陰で、筆者らは分子シミュレーションを使い、オリゴペプチド錯体の構造的な評価と予測ができるようになったと感謝している。

3. P450のペプチド鎖がつくる NH...S 水素結合

ペプチド鎖の硫黄原子が金属イオンに配位するときに、NH...S 水素結合がどのように働くかを調べるために、1個の Cys 残基チオラートをもつ P450 酸化酵素のモデル錯体として、図6aのような簡単な人工錯体や、⁷⁾ 図6bのテトラペプチドモデル錯体を合成した。⁸⁾ これらのモデル錯体によって、酸化還元電位のシフトのみならず、Fe(III)の錯体としての安定性を増し、空気酸化を受けにくい性質も NH...S 水素結合に由来することがわかった。

これらの NH...S 水素結合をもつ人工錯体は Fe(III) から Fe(II) に還元すると、不安定化して分解することがわかった。天然の P450 酵素では、還元時にタンパク質部の構造変化が伴うことが報告されている。そこで天然の P450 酵素の X線構造解析 Data Bank にあるこのチオラート配位子の周りの構造を提供してもらい、Biograf を使った分子設計シミュレーションで、ペプチド鎖上の NH...S 水素結合の形成と切断を予測してみた。

天然の P450 は、Fe(III) 状態で NH...S 水素結合を形成し、Fe(II) 状態ではペプチド鎖のコンホメー

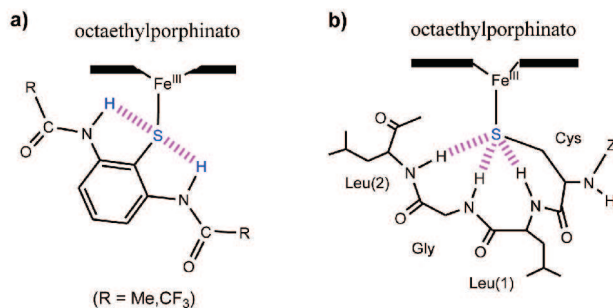
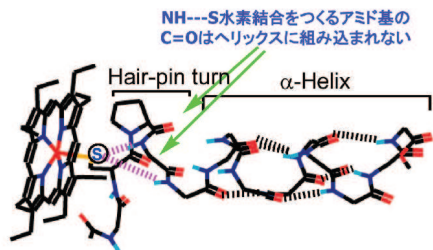


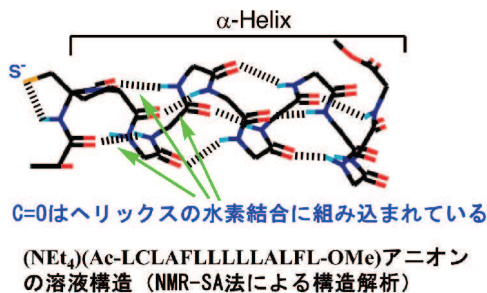
図6. a) NH...S水素結合をもつ簡単な人工P450モデル錯体。
b) テトラペプチドP460モデル錯体。

ション変化で水素結合を切断させていると推定できる。ヘリックス-ヘアピンターン構造変化を起こしうる14残基のペプチド配位子を分子設計し、実際に合成して、その配位子をもつFe(III)と同形置換し得るGa(III)錯体を合成した。Fe(III)は常磁性であり、NMRによる溶液構造を決定できない。反磁性のGa(III)置換体の溶液構造をNMRのSA (simulated annealing) 法を用いて決定した。⁹⁾ この14残基のペプチドは図7のように、Gaヘム核に配位しているとき、ペプチド鎖の前のCysを先頭に4残基がヘアピンターン構造をつくり、NH...S水素結合を形成している。5残基目からは α -ヘリックスをとり、途中で水素結合ネットワークは切れている。しかし、ヘム核の無いチオラートアニオンの14残基ペプチドでは、図8のように弱いNH...S水素結合が先端で形成されるのみで、14残基が全て α -ヘリックスに組み込まれ、全てのアミド基は α -ヘリックスの水素結合ネットワークに使われている。この合成ペプチド配位子は、ヘム核の周りでNH...S水素結合をもつ構造と、もたない構造をとることが判明した。当時、米国化学会誌の審査員からSA法でR値を向上させるのにDiscover/Insight IIを使



[Ga^{III}(OEP)(Ac-LCLAFLLLLLLALFL-OMe)]錯体の溶液構造(NMR-SA法による構造解析)

図7. Fe(III)錯体と同形のGa(III)ペプチド錯体のNMR法により決定された溶液構造。



(NEt₄)(Ac-LCLAFLLLLLLALFL-OMe)アニオンの溶液構造(NMR-SA法による構造解析)

図8. 配位子のアニオンのみのNMR法により決定された溶液構造。

うように指示され、導入に苦労した。ソフト開発が米国に押さえられていることが深刻な問題になると思い、抗議をしたが、結局は従ってしまった。

天然のP450ではこのヘリックス部分のペプチド鎖の構造がどのようになっているかを調べた。大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻の倉光教授が研究する好熱菌 *Thermus thermophilus* HB-8が合成した14残基のペプチドとよく似たアミノ酸配列を持つP450をもつことを知り、このタンパク質を遺伝子操作法で合成し、そのX線結晶構造を調べた。得られた休止状態の構造では、水分子が配位してFe(III)は6配位構造をとり、アミノ酸残基の側鎖による外部水素結合が優先し、NH...S水素結合は1本が形成されているのみであった。¹⁰⁾ テトラペプチドFe(III)モデル錯体のような多くのNH...S水素結合を形成できる構造はモデル合成上でのみ作りうる極限の構造であり、還元され易いために、生理条件下では逆に電気化学的に不安定であると考えられる。P450のスイッチ機構は、図9のように酸化還元電位の調節とFe(II)状態を安定にする環境をつくりだすが、水素結合の無いチオラート錯体はFeの酸化数によっては不安定である。天然のタンパク質では、休止状態としていずれの極限構造にも変換できるような中間の構造をとり安定化していると説明できる。

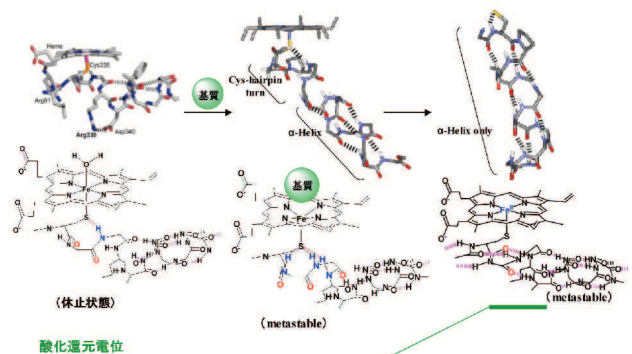


図9. P450のNH...S水素結合の数の変化を伴うペプチド鎖の構造変化と酸化還元電位の変化。

4. 金属-硫黄結合とNH...S水素結合

NH...S水素結合により金属-硫黄(M-S)結合の共有結合性を変化させることがMo(IV)、Fe(II)、Cu(I)、Zn(II)、Cd(II)錯体の精密な構造解析からわかった。¹¹⁾ NH...S水素結合をもつ四面体型チオラート錯体は、水素結合をもたない類似錯体と比較

して、M-S 結合距離が短くなり、ポルフィリン Fe(III) やポルフィリン Ga(III)^{8,12)} 錯体では、NH…S 水素結合で M-S 結合距離が長くなる。オキソ配位子のトランス位に硫黄配位子が存在すると共に活性化され、この硫黄配位子に NH…S 水素結合を導入すると錯体の M-S 結合の電子状態が大きく変化することが XEAFS からわかった。¹³⁾ 金属酵素の構造構築や金属イオンの捕獲で、M-S 結合の $d\pi-p\pi$ 共有結合性を変化させ、M-S 結合の強弱を導入している。

NH…S 水素結合の形成と切断による反応中間体の安定化と活性化は Mo(VI) および W(VI) 酸化酵素の活性部位でも見られる。酵素の Mo コファクターは、ペプチド配位子ではなくジチオレン骨格を持つ有機配位子が Mo イオンと結合した補酵素である。簡単な硫黄モデル配位子をもつジチオレンジオキソ Mo(VI) 錯体は極めて不安定であり、トランス位の硫黄配位子により Mo-O がトランス影響を受けて活性化されている。^{11d)} 対応する W(VI) 酸化酵素は陸上に存在せず海底のみに存在することから、一般に W(VI) 錯体は酸化状態が極めて安定であると考えられてきた。しかし、ジチオレンジオキソ W(VI) 錯体でも Mo(VI) 錯体とおなじく活性であり、配位子で反応性を制御していることが示唆されてきた。^{11e)} この補酵素のジチオレン配位子の周りも NH…S 水素結合が形成されていることから、アミド基で NH…S 水素結合をつくる人工モデル錯体を合成したところ、酸化還元電位のシフトや空気に対する安定性、酸化反応性もコントロールされていることがわかった。¹⁴⁾ ここでもこの水素結合の形成と切断で休止状態と活性状態がつけられていると思われる。

さらに、錯体化学の領域から離れ、チオール/チオラートの化学に NH…S 水素結合が関与するという興味深い事実も見つかった。チオールの硫黄原子に前もって近傍に水素結合を形成しうる位置にアミド基の NH 基が存在する (プレ配置) と、脱プロトン化の励起状態で水素結合により脱プロトンは容易になる。すなわち、チオールの pK_a は近傍に前もってアミド NH 基が存在すると低下する。チオラートアニオン形成で初めて水素結合が働くが、プレ配置のない化合物では pK_a は変化しない。このプレ配置したアミド基の存在はペプチド鎖の構造変化により導入することができることから、 pK_a のスイッチをつ

くることが可能であることを示す。¹⁵⁾

以上のような NH…S 水素結合の形成とその機能を、チオール、チオラート、電子伝達金属タンパク質の M-S 結合、酸化酵素の M-S に対するトランス影響による配位子の活性化の関係を図 10 のようにまとめた。

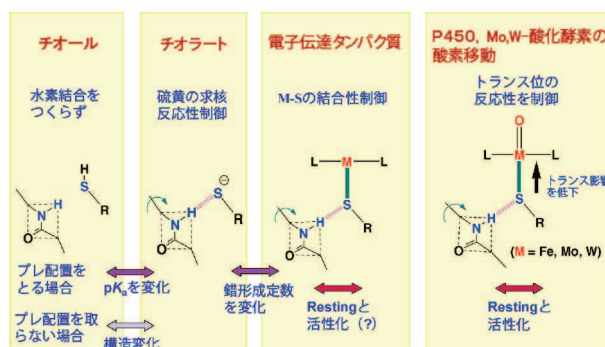


図10. NH…S水素結合がコントロールできる配位子や錯体の性質。

5. まとめ

以上のように、筆者らは金属酵素の金属中心の反応を従来の電子状態で理解するための簡単なモデル錯体の合成と、大きなタンパク質へのつながりを知るためのオリゴペプチド錯体を合成し、両者の関連を分子シミュレーションの助けを借りながら研究してきた。かろうじて、その間をつなぐ NH…S 水素結合の存在を見出したが、ペプチド鎖と連動して金属中心の電子状態を変化させる静電相互作用は、他に多数存在することが予想される。その特定には、休止状態と活性状態の構造的なつながりを理解できなければ触媒としての本質が見えないため、分子計算法によるペプチド部分の構造と運動の軌跡の予測が必須である。現状のコンピュータの計算能力ではこれを超えることは困難であってもいずれは達成できる時がくると思う。コンホメーションでたどる分子運動の軌跡と電子状態の変化が、それぞれの化学種の寿命も含めて、合成と計算科学で取り扱えるようになれば、人工金属酵素として新しい触媒科学が始まると思う。大阪大学蛋白質研究所の赤堀四郎教授が開拓したペプチド化学、大阪大学理学研究科の中村晃教授が開拓してきたソフトな硫黄配位子をもつ金属錯体化学の両領域の研究が結びつき、さらに若い世代の研究者がこの複雑な金属酵素に興味を持

ち、反応のメカニズムと人工金属酵素の実現に向かって研究が引き継がれていくことを筆者は望んでやまない。それは、今の地球上で金属酵素が司る物質とエネルギーの循環システムを理解することになり、地上に溢れ始めた人工物質をも含めて低エネルギーで触媒的に物質変換ができるようになり、これを幹にした新しい地球型化学産業への転換が可能になる時代が来るものと思う。

引用文献

- 1) a) Ueyama, N. et al., *Chem. Lett.*, **1985**, 175-178.
b) Ueyama, N. et al., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1991**, 2723-2727.
- 2) Ueyama, N. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7098-7102.
- 3) Ueyama, N. et al., *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 4700-4704.
- 4) Warshel, A., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 27035-27038.
- 5) Fukuyama, K. et al., *Nature* **1980**, 286, 552.
- 6) Ueyama, N. et al., *Biopolymers* **1992**, 32, 1535-1544.
- 7) Ueyama, N. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12826-12827.
- 8) Ueno, T. et al., *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 1199-1210.
- 9) Ueno, T. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12264-12273.
- 10) Kousumi, Y. et al. *Protein Data Bank*, **2006**.
- 11) a) Ueyama, N. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8129-8137. b) Ueyama, N. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1685-1660. c) Okamura, T. *J. M., J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1685-1660. d) Yoshinaga, N. et al., *Chem. Lett.* **1990**, 1655-1656. e) Ueyama, N. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7310-7311.
- 12) Okamura, T. et al., *Chem. Lett.* **1998**, 199-200.
- 13) Dey, A. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 12046-12053.
- 14) Baba, K et al., *Chem. Lett.* **2005**, 34, 44-45.
- 15) Okamura, T. et al., "Conformational Switching Between Acids and Their Anions by Hydrogen Bonding" in *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State*, **2011**, eds Han, K. - L; Zhao, Q. - J.

