

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 9 日現在

機関番号： 32607
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2009 ～ 2011
 課題番号： 21550163
 研究課題名（和文） ペプチド折り紙を基体とする亜硝酸還元酵素様光触媒の開発
 研究課題名（英文） Molecular Design of Photocatalysts Based on 'Peptide Origami'
 toward Nitrite Reductase Mimics

研究代表者
 石田 齊 (ISHIDA HITOSHI)
 北里大学・理学部・准教授
 研究者番号： 30203003

研究成果の概要（和文）：

「ペプチド折り紙」とは、金属イオンに配位できる非天然アミノ酸を含むペプチドが金属錯体を形成する際に折り畳まれることによって、機能性金属-ペプチド錯体を得る手法である。本研究では、この手法を用いて光増感部位と触媒部位を接続した光触媒の合成を目指す。ここでは、(1) 光増感部位であるルテニウム錯体の光物性の再評価、(2) 合成前駆体であるルテニウム錯体の連鎖異性化反応、(3) ルテニウム-ペプチド錯体による光電荷分離系の合成、(4) 金属-ペプチド錯体の立体構造制御、(5) ヒスチジンとビピリジン型非天然アミノ酸を含むペプチドの合成について報告する。

研究成果の概要（英文）：

The 'Peptide Origami' is a synthetic strategy of functional metal-peptide complexes. In this strategy, the peptides containing unnatural amino acids capable of coordinating to metal ions fold by coordination to produce functional molecules. This study aims at synthesis of photocatalysts, in which the photo-sensitizing part attaches to the catalytic one, by using the 'Peptide Origami' strategy. This reports (1) reevaluation of the emission quantum yield of $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipyridine), (2) the chain reaction for isomerization from *trans* to *cis*(Cl)-Ru(bpy)(CO)₂Cl₂, (3) synthesis of the photo-induced charge separation system which consists of a ruthenium-peptide complex, (4) stereoselective formation of chiral metallopeptides, and (5) synthesis of the peptide containing histidine and the unnatural bipyridyl-type amino acid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学・生体関連化学

キーワード： 人工タンパク質・ペプチド・非天然アミノ酸・ビピリジン・ルテニウム・光触媒・光電子移動

1. 研究開始当初の背景

近年、資源・エネルギー問題に関連して光エネルギー変換に注目が集まるとともに、新しい光触媒の開発に興味もたれている。特に金属錯体を基体とする光触媒は分子レベルでの設計が可能であることから、魅力ある研究対象である。しかし低分子の単核金属錯体に光吸収と触媒作用の両方を担わせることは難しく、光吸収を行う光増感部位と触媒作用を担う触媒部位の二つを別分子に分担させる場合が一般的である。金属錯体を用いる光触媒反応では、光増感分子と触媒分子の“混合系”がよく用いられるが、これらは光増感分子と触媒分子が反応中、相互作用あるいは衝突する必要がある。そのため近年、これらの効率を高めるために両者を接続した“接続系”に期待が集まっている（図1）。1990年代にこのような接続系が活発に合成され、その触媒活性が調べられたが、光増感部位と触媒部位の電子的相互作用が強過ぎたり、用いるリンカーの構造によって各部位の軌道レベルが変化するなどの問題のために、成功例は限られていた。活性を損なわないリンカー構造の探索のためには、系統的にリンカー構造が異なる分子を多数合成し、その活性を調べる必要があるが、光増感部位と触媒部位間の距離やスペーサー構造などを系統的に変化させて合成することは一般的に困難であり、それを可能とする新しい合成方法の開発が望まれている。

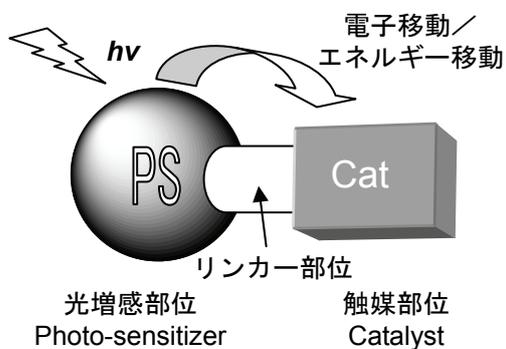


図1. 光触媒（接続系）の分子設計。

研究代表者はこれまでに、金属配位能を有する非天然アミノ酸として、5'-アミノ-2,2'-ビピリジン-5-カルボン酸(5Bpy)を3残基導入したペプチドの分子設計を考案しており、そのルテニウム-ペプチド錯体を光機能性人工タンパク質として報告し、「ペプチド折り紙」と名付けられている（図2）。この方法を用いると、金属錯体に自在に官能基を導入することが可能となり、光増感部位と触媒部位を接続した光触媒の合成方法に応用できると考えられる。特に、ペプチド鎖長の変更やアミノ酸配列の選択などによって、光増感部位と

触媒部位を接続するリンカー部位の構造を系統的に変化させることが可能になると期待される。

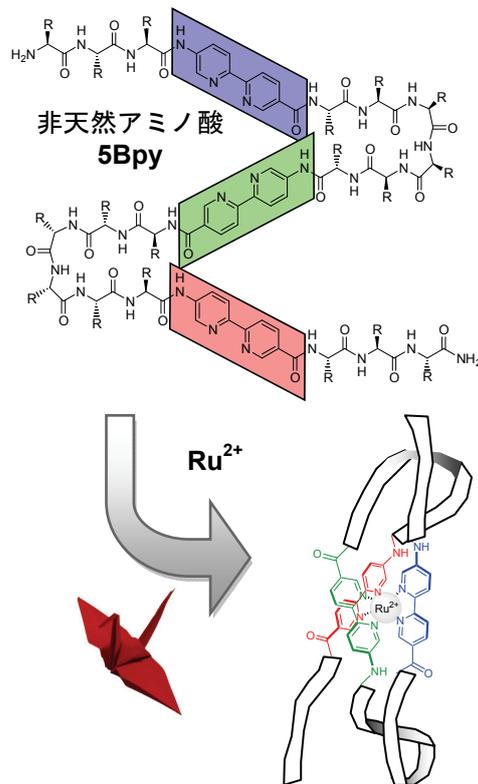


図2. ペプチド折り紙の概念図。

本研究では、光増感部位としてルテニウムトリス（ビピリジン）錯体、触媒部位として亜硝酸還元酵素の活性中心である銅-ヒスチジン錯体を選択した。ルテニウムトリス（ビピリジン）錯体は、金属錯体の光触媒反応においてよく用いられる光増感分子であり、長波長側に比較的強い吸収帯をもち可視光吸収能に優れ、励起状態はマイクロ秒スケールの比較的長い寿命を示すなど、光増感部位として優れた特性を有している。一方、亜硝酸還元酵素はその結晶構造が明らかとされており、触媒活性部位は3残基のヒスチジンと溶媒の水分子が配位したタイプII銅であることがわかっている。また、亜硝酸還元に必要な電子はタイプI銅を含むタンパク質ドメインから供給されることから、その役割を光増感部位であるルテニウム錯体に担わせることで、光電子移動反応により反応を駆動する光触媒の開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、光増感部位と触媒部位を接続した光触媒の新しい合成方法として、ペプチド折り紙の手法による方法を確立することを最終目標とする。そのため、光増感分子の

光物性や触媒部位の合成方法は十分に理解されている必要がある。そこで本研究では、(1) 光増感部位として用いるルテニウムトリス(ビピリジン)錯体の光物性、特に発光量子収率について長波長領域における感度が高い back-thin CCD 検出器を用いて再測定を行った。また、(2) ルテニウム錯体合成の前駆体として *trnas(Cl)-Ru(bpy)(CO)₂Cl₂* についてその反応性を検討した。本研究で目指す光触媒は、光増感部位の光励起状態から触媒部位への光電子移動が起こる必要があることから、ペプチド鎖に様々な官能基が導入できる利点を生かして、(3) ペプチド鎖で接続したジオローゲンルテニウムトリス(ビピリジン)一チロシン三元錯体を合成し、その光電子移動反応について検討した。また、ペプチド折り紙では、金属錯体形成時にペプチド鎖の折り畳み構造をどのように制御するかが重要であり、スペインの研究グループとの共同研究により、(4) 二残基のビピリジン型非天然アミノ酸(**5Bpy**)を含むペプチドの亜鉛錯体のキラリティーが、リンカー配列中のプロリンの立体構造によって制御されることを見出した。最後に、(5) ビピリジン型非天然アミノ酸(**5Bpy**)三残基とヒスチジン残基三残基を含むペプチド配位子の合成とその錯体化について検討した。

3. 研究の方法

ビピリジン型非天然アミノ酸(**5Bpy**)は5,5'-ジメチル-2,2'-ビピリジンから7段階の反応を経て合成した。**5Bpy**のアミノ基の反応性が低いことから、ロイシン酸塩化物との反応によりジペプチドを合成し、Fmoc 化することでジペプチドユニット **Fmoc-Leu-5Bpy-OH** を得、ペプチド固相合成法に用いた。ペプチドは、HBTU/HOBt/DIEA をカップリング試薬とする Fmoc 法により合成し、逆相 HPLC により分取、精製を行った。

ルテニウムトリス(ビピリジン)錯体 ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$) は、塩化ルテニウム(III) を出発原料として合成し、ヘキサフルオロホスフェート塩として得た。*trnas(Cl)-Ru(bpy)(CO)₂Cl₂* は、別途合成したルテニウムカルボニルポリマー $[Ru(CO)_2Cl_2]_n$ とビピリジン配位子との反応により合成した。ルテニウム-ペプチド錯体は、ルテニウムソースとペプチド配位子をエタノール中、加熱することにより合成した。

同定および合成確認は、NMR および MS スペクトルにより行った。発光スペクトルならびに発光量子収率測定は浜松ホトニクス C9920-02 により行った。ルテニウム錯体からの光電子移動反応は、レーザー分光法により発光寿命ならびに過渡吸収スペクトルを測定することにより追跡した。

4. 研究成果

ここでは、本研究で得られた成果を各項目ごとに報告する。

(1) ルテニウムトリス(ビピリジン)錯体の発光量子収率再評価(論文④、⑤)

本研究で光増感部位として用いるルテニウムトリス(ビピリジン)錯体は、450 nm 付近に Metal-to-Ligand Charge Transfer (MLCT) に基づく吸収帯を示し、その励起により 550-900 nm にブロードなりん光発光を示す(図3)。

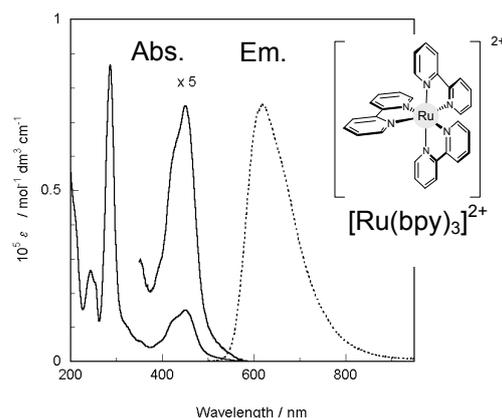


図3. ルテニウムトリス(ビピリジン)錯体の発光吸収スペクトル(CH₃CN 中).

同錯体の発光量子収率はこれまで脱気条件下、水中で0.042、アセトニトリル中で0.062とされており、この値が他の発光性金属錯体の相対量子収率を決める基準値となってきた。しかしながら、従来、測定に検出器として用いられてきた光電子増倍管(ホトマル)は、紫外領域に比べて可視光領域における感度が大変低く感度補正が難しい。近年、紫外線領域から可視光領域までの広い範囲で高い感度を有する back-thin CCD 検出器が開発されたことを受けて、群馬大学と浜松ホトニクス(株)との共同研究により発光量子収率を再評価したところ、従来値より高い値が得られた。すなわち脱気条件下では、水中で0.063、アセトニトリル中で0.095であり、空気飽和条件下ではこれまで水中で0.028とされてきたが、0.040であることを見出した。これらの値は発光量子収率を求める際の基準値となっており、特に空気飽和条件下、水中における発光量子収率はバイオ系の研究者が基準値として用いていたことから、その影響は大きく IUPAC Technical Report (Pure Appl. Chem., Vol. 83, No. 12, pp. 2213–2228, 2011)に取り上げられた。また、金属錯体の光化学分野の研究者への啓もう活動を行うために、研究代表者が Chairperson となり IUPAC (Inorganic Chemistry Div.)において Guidelines for Measurement of Luminescence Spectra and

Quantum Yields of Inorganic Compounds, Metal Complexes and Materials” (2009-045-1-200)というプロジェクトを立ち上げた。

(2) *trans*(Cl)-Ru(bpy)(CO)₂Cl₂の *trans*→*cis*連鎖異性化反応 (論文②)

ルテニウム錯体合成にはいくつかの合成前駆体が利用されている。本研究でもその一つとして Ru(bpy)(CO)₂Cl₂を調製した。この錯体は一般的に *trans*(Cl)体として得られるが、還元剤として少量の NaBH₄を反応させると、効率よく *cis*(Cl)体へ異性化することを見出した (図 4)。還元剤は触媒量で反応が進行し、還元反応がトリガーとなる連鎖異性化反応として珍しい例であることを見出した。

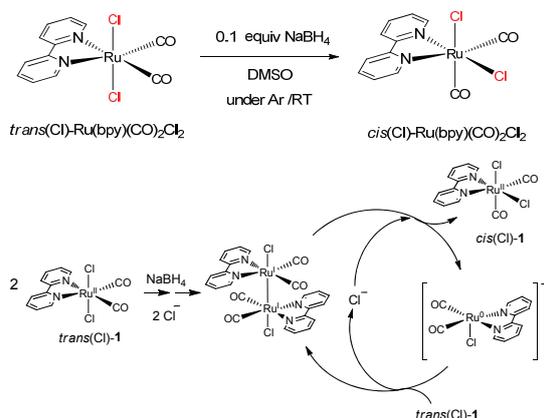


図 4. *trans*(Cl)-Ru(bpy)₂(CO)₂Cl₂の異性化反応と連鎖反応機構。

本研究の成果は、ビピリジン型非天然アミノ酸(5Bpy)のような非対称ビピリジンを用いる際に生成する *cis*(Cl)体の立体構造を制御できる可能性を含んでいる点にあり、今後、さらに条件検討を行うことによって、ルテニウム錯体合成前駆体として利用することが期待される。

(3) ペプチド鎖で接続したビオローゲン-ルテニウムトリス(ビピリジン)-チロシン三元錯体の合成と光電子移動反応 (論文①)

光還元触媒を開発するために、光増感部位であるルテニウムトリス(ビピリジン)錯体と電子受容部位が接続した分子を得る必要がある。本研究では、このような分子がペプチドを利用して合成できることを証明するため、ビピリジン型非天然アミノ酸(5Bpy)を含むペプチドのN末端側にビオローゲンユニットを接続したペプチドを合成した。このような分子は、タンパク質を介する電子移動反応のモデル系として興味もたれるが、そのような研究対象の一つに光化学系IIにおける電子移動経路制御の問題がある。光化学系IIにはほぼ同じような配列をもつAブランチとBブランチの2つの電子移動経路が存在

するが、実際に電子移動が起こるのはAブランチであり、電子移動経路に存在するチロシン残基の環境の違いが電子移動経路を決定しているのではないかと考えられている。そこで本研究では、5Bpyの2残基C端側にチロシン残基を配したペプチドのルテニウムトリス(ビピリジン)型錯体を合成した(図5)。また比較のために、ビオローゲンを接続せず、チロシンをフェニルアラニンに置換したペプチド錯体も併せて合成した。

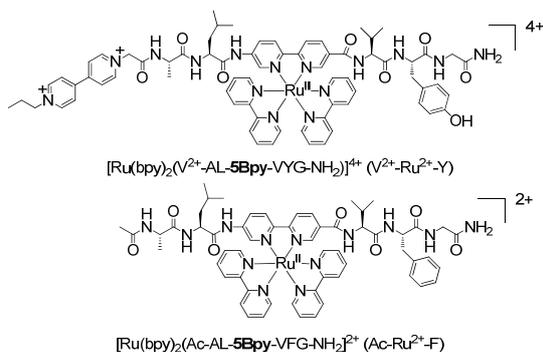


図 5. 電子受容部位(V²⁺)および電子供与部位(Tyr(Y))を有するルテニウムトリス(ビピリジン)錯体とその参照錯体。

得られたルテニウム-ペプチド錯体における光電子移動反応を検討するために、これらのペプチド錯体のアセトニトリル中における励起状態寿命ならびに数百ナノ秒スケールの過渡吸収スペクトルを測定した。励起状態寿命は、参照錯体が 667 ns であるのに対し、ビオローゲンが接続した錯体では 35 ns と短くなり、効率よくルテニウム錯体の励起状態からビオローゲンユニットへ電子移動が起こっていることが示唆された。このことは、発光スペクトルが大きく減衰し、参照錯体の発光量子収率 0.056 が、ビオローゲン接続錯体では 0.007 にまで減少していることから確認された。酸化されたルテニウム錯体へチロシンから電子移動することにより生じる電荷分離状態の形成に興味もたれたが、過渡吸収スペクトルからは明瞭な電荷分離状態は確認されず、アセトニトリル中では逆電子移動が速いことが示唆され、現在、異なる溶媒系で測定を行っている。

本研究の成果により、ルテニウムトリス(ビピリジン)錯体に様々な機能性部位を接続できることが証明されたと考えられる。

(4) 金属ペプチド錯体のキラリティー制御 (論文③)

二残基のビピリジン型非天然アミノ酸(5Bpy)を導入したペプチドを金属錯体化すると、ペプチド鎖は折り畳まれるが、一般的に異なる折り畳み構造が存在するために複数の立体構造が異なる金属錯体が生成する。研

究代表者はスペインのグループとの共同研究により、2 残基の **5Bpy** をつなぐリンカー部位にキラルなプロリン残基を導入することによって、その亜鉛錯体の立体構造（キラリティー）を制御できることを見出した。この成果は、金属-ペプチド錯体をベースとする機能性分子を設計する上で有用な知見であり、今後の分子設計への応用が期待される。

(5) ヒスチジン残基とビピリジン型非天然アミノ酸を含むペプチド配位子の合成と金属錯体化（論文準備中）

亜硝酸還元酵素の活性中心が 3 残基のヒスチジン側鎖と溶媒の水分子が配位した銅錯体であることから、光増感部位であるルテニウムトリス（ビピリジン）錯体と接続するために、ビピリジン型配位子(**5Bpy**)とヒスチジンをそれぞれ 3 残基ずつ導入したペプチドを合成する必要がある。当初、これらのアミノ酸を含むペプチドの合成を検討したが、合成上の問題があり、金属錯体を得ることができなかった。そのため、分子設計を変更し、**5Bpy** とヒスチジンを 1 残基ずつ含む短鎖のペプチドを、トリエタノールアミンをテンプレートとして接続し、ルテニウムトリス（ビピリジン）型錯体を合成した後に、テンプレート部分を加水分解により切断することとした（図 6）。ペプチドの合成に成功したが、ルテニウム錯体形成後のヒスチジン側鎖脱保護は容易ではなく、さらに条件を検討する必要がある。しかし、ヒスチジン側鎖保護の状態においても鉄イオンとの反応により鉄二核錯体を形成することを見出した。

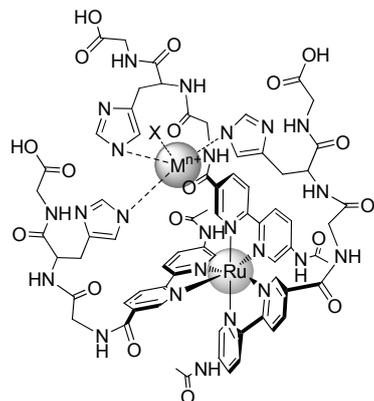


図 6. ヒスチジン残基を接続することによるルテニウムトリス（ビピリジン）-金属ヒスチジン二核錯体の分子設計。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件 全て査読有）

- ① Yoshimi Shiina, Shigero Oishi, and Hitoshi Ishida, "Synthesis of ruthenium

tris(2,2'-bipyridine)-type complexes tethered to peptides at 5,5'-positions", *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 1249–1252. (Doi:10.1016/j.tetlet.2011.12.117)

- ② Yusuke Kuramochi, Yasuhiro Ito, and Hitoshi Ishida, "Chain Reaction for Isomerization from *trans*(Cl) to *cis*(Cl)-Ru(bpy)(CO)₂Cl₂ (bpy = 2,2'-Bipyridine) Induced by NaBH₄", *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 1167–1170. (DOI: 10.1002/ejic.201200090)
- ③ Gustavo Rama, Ana Ardá, Jean-Didier Maréchal, Ilaria Gamba, Hitoshi Ishida, Jesús Jiménez-Barbero, M. Eugenio Vázquez and Miguel Vázquez López, "Stereoselective formation of chiral metallopeptides" accepted in *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 7030–7035. (DOI: 10.1002/chem.201201036)
- ④ Hitoshi Ishida, Seiji Tobita, Yasuchika Hasegawa, Ryuji Katoh, and Koichi Nozaki, "Recent Advances in Instrumentation for Absolute Emission Quantum Yield Measurements", *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, *254*, 2449–2458. (DOI: 10.1016/j.ccr.2010.04.006)
- ⑤ Kengo Suzuki, Atsushi Kobayashi, Shigeo Kaneko, Kazuyuki Takehira, Toshitada Yoshihara, Hitoshi Ishida, Yoshimi Shiina, Shigero Oishi and Seiji Tobita, "Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, 9850–9860. (DOI: 10.1039/B912178A)

〔学会発表〕（計 44 件）

- ① 石田 亶, "光機能性ルテニウム-ペプチド錯体：光電子移動から CO₂ 還元" 日本化学会第 92 春季年会 1S7-15（依頼講演： 特別企画 52-無機-有機複合系光機能の最前線、日本化学会第 92 春季年会(2012)、慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス、2012 年 3 月 25 日(日)～28 日(水)
- ② Hitoshi Ishida, Yoshimi Shiina, Yu-ya Takasugi, and Shigero Oishi, "Photofunctions of Novel Ruthenium Complexes Synthesized Based on 'Peptide Origami'" (invited) The Construction of Photofunctional Supramolecular Metal Complexes (#94) in 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2010), Rainbow III (Hilton), Honolulu, Hawaii, USA (December 15 – 20, 2010)

- ③ Yoshimi Shiina, Shigero Oishi, and Hitoshi Ishida, “Synthesis of Artificial Protein (Peptide Origami) Bearing a Ruthenium Complex as the Core and its Photo-induced Electron Transfer” (Oral, selected) Second International Symposium on the Photofunctional Chemistry of Complex Systems (2nd ISPPCCS), Keauhou Beach Resort, Kona, Hawaii, USA (December 12–14, 2010)
- ④ Hitoshi Ishida, “Peptide Origami: Molecular Design, Synthesis and their Application” (Oral, selected) 5th International Peptide Symposium (5th IPS), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan (December 4 – 9, 2010)
- ⑤ Hitoshi Ishida, “Peptide Origami: A New Category in Coordination Chemistry” (invited) 16th Malaysian Chemical Congress (16MCC) 2010, Putra World Trade Centre, Kuala Lumpur, Malaysia (October 12 – 14, 2010)
- ⑥ Hitoshi Ishida, Yoshimi Shiina, Yuya Takasugi, and Shigero Oishi, “Artificial Protein (Peptide Origami) Bearing a Ruthenium Complex as the Core: Molecular Design and Photo-Functions” (Oral, selected) 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry in OSAKA, JAPAN (60CCCO), International House, Osaka, Japan, (September 27 – 30, 2010).
- ⑦ Hitoshi Ishida, “Peptide origami: synthesis and its application in cell imaging” (招待講演) 1st Asian Chemical Biology Conference (第1回アジアケミカルバイオロジー会議 (ACBC2010)), Seoul National University, Seoul, Korea, June 25 – 27, 2010.
- ⑧ Hitoshi Ishida, Yuya Takasugi, Yoshio Kodera, Michihiko Ito, and Shigero Oishi, “Peptide Origami: Synthesis, Structure and Photo-Functions of Artificial Proteins Bearing a Ruthenium Complex as the Core” (Selected Oral), 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14), Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2009, 14, S47, July 25-30, 2009, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan
- ⑨ Hitoshi Ishida, “Photo-functions and Application of New Ruthenium Complexes Built on “Peptide Origami”” (依頼講演), 18th ISPPCC Satellite Symposium on Photochemistry and Photobiology of Supramolecular Systems and Coordination Compounds (PPC2009), Abstract p. 18, July 9-11, 2009, Ritsumeikan University,

Kusatsu, Shiga, Japan

- ⑩ Hitoshi Ishida, “Reevaluation of Phosphorescence Quantum Yields of Ruthenium(II) Tris(Bipyridine) Complex” (依頼講演), 18th International Symposium on the Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds (ISPPCC), The Book of Abstracts, p. 103, July 4th-9th, 2009, Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo, Japan

他 34 件

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 石田 斉、「2. ペプチド折り紙：金属医薬品への可能性」、遺伝子医学 MOOK21 号 『最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用』(木曾良明編)、メディカルドゥ刊 (2012 年 3 月)
- ② 石田 斉、「ペプチド折り紙で創る二酸化炭素多電子還元触媒」、化学経済 2011 年 9 月号 新エネルギーへの挑戦：人工光合成をめざして第 1 回 化学工業日報刊 (2011/9/1)
- ③ 石田 斉、「4 光機能性人工タンパク質」、『超分子サイエンス&テクノロジー』第 4 章 バイオ超分子、第 3 節 タンパク質の超分子化学、エヌ・ディー・エス刊、pp. 1009-1017 (2009).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/kagaku/HP_kikou/indexA.html

および

<http://kerid-web.kitasato-u.ac.jp/Profiles/35/0003489/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 斉 (ISHIDA HITOSHI)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号： 30203003

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者