

トリス(アミノアシダト)コバルト(III)の タンパクリガンドとしての可能性

古原正康*¹ 八代盛夫*²

Tris(amino acidato)cobalt(III) as a Promising Ligand of a Protein

FURUHARA Masayasu*¹ YASHIRO Morio*²

Abstract: Novel type of ligands were prepared and their binding to a protein was investigated. [Co(Tyr)₃], [Co(Phe)₃], and [Co(Trp)₃] were prepared as ligands, and their stereoisomers were separated. Their binding to bovine serum albumin (BSA) was studied by using frontal affinity chromatography (FAC). The dissociation constants (K_d) were 10^{-6} - 10^{-8} M. The K_d values differ between stereoisomers. Three amino acid molecules are accumulated on a metal complex, and such complex is promising in designing effective ligands of a protein.

1. はじめに

タンパク分子に選択的に結合する分子やイオンを総称してリガンドという。リガンド-タンパク結合は、タンパク分子がその機能を発揮する上で重要な役割をもつ。

¹⁾ 生体が本来もつ天然のリガンドではなく、人工的なリガンドを用いれば、タンパクの機能を人為的に制御することができる。これまでに、タンパクの機能制御(典型的な事例は医薬品開発)、あるいは目的のタンパク分子の分離精製、などの応用を目指して種々のタンパク固有のリガンドが研究されてきている。

筆者らはこれまで人工ペプチダーゼの開発研究を行ってきた。ペプチド加水分解活性をもつ分子にアルデヒド基を導入すると、ターゲットタンパク分子のアミノ基部分に共有結合して、人工ペプチダーゼ機能を実現させることができた。²⁾ この研究では、アルデヒド基がターゲットタンパクへの結合部位として機能する。より高度なターゲット認識を行うためには、ターゲットタンパクに選択的に結合する分子、すなわちリガンドを設計することが有効である。適切なリガンドを設計することにより、ターゲットタンパクに対する選択性だけでなく、結合の強さに関しても望ましい強度に調整することも可能になる。

アミノ酸は、遷移金属イオンに対して、アミノ基(-NH₂)とカルボキシ基(-COO⁻)で2座のキレート配位子として結合することが知られている。遷移金属イオンがCo(III)の場合、6配位正八面体型の金属錯体を形成するので、3分子のアミノ酸と結合して、トリス(アミノアシダト)コバルト(III)錯体([Co(aa)₃], aa = amino acidato)を形成する。Fig. 1 に構造を示したが、可能な立体異性体が4種類ある。Co(III)-アミノ酸キレートはきわめて安定であり、極度に希薄な水溶液中でも配位結

合が切断することなく保たれる。このことは、もし、結合が一度切断されて再結合すれば、立体異性体間の異性化が起こるはずだが、実際には異性化がみられない事実から確かめられる。一方、他の大多数の遷移金属イオンのアミノ酸キレートでは配位結合の切断と再結合の平衡が起こる。すなわち、Co(III)-アミノ酸キレートは、共有結合に匹敵する安定性があるというユニークな性質を持っている。

アミノ酸キレート錯体ではアミノ酸の側鎖部分が金属錯体の外側に向けて突き出している。側鎖は、アミノ酸の個性を示す部分であり、それが完全に錯体の外面に露出しているわけである。このような観点から、[Co(aa)₃]は、3個のアミノ酸の特徴ある部分を完全に表面に露出させた、特殊なトリペプチド様分子とみなすことができる。そこで、この特殊なトリペプチド様分子である[Co(aa)₃]は、タンパクのリガンドとして有望であると考えた。

本研究では、ターゲットタンパク分子として、基礎的な研究が特に進んでいる、ウシ血清アルブミン(BSA)³⁾を用いて、[Co(aa)₃]のリガンドとしての可能性を検討することにした。田浦は、[Co(ox)₃]³⁻(ox = oxalato)の異性化が起こる条件で、BSAからの不斉誘導によって[Co(ox)₃]³⁻の鏡像異性体の一方が優先的に生成することを見出し、[Co(ox)₃]³⁻とBSAとの結合を詳細に調べている。⁴⁾ 血清アルブミンは、血液中に存在し、種々の分子を結合して運搬する機能を持っている。多くの動物に存在し、生物が異なるとアミノ酸残基が少しずつ異なる。本研究で用いたウシの血清アルブミンBSAは、アミノ酸残基数583、分子量約66,500の分子である。

予備的な実験の結果、基本的な20種類のアミノ酸のうち、疎水性の側鎖をもつアミノ酸の[Co(aa)₃]がBSAに強く結合することがわかった。そこで、本研究では、

*¹ 東京工芸大学 工学部 工学科 化学・材料コース 4年生

*² 東京工芸大学 工学部 工学科 化学・材料コース 教授

バンドに分離した（これらを溶出順に C1D1、C1D2 と呼ぶ）。すべての着色成分を溶出させるのに約 15 時間要し、溶出に必要な水の量は約 3 L であった。

2-3. [Co(Phe)₃]の合成と異性体の分離

[Co(Tyr)₃]の合成と同様な方法で、Tyr のかわりに Phe を用いて合成した。反応混合物を CM Sephadex C-25 (Na⁺型) カラムに流し水で溶出させると、2つの着色バンドに分かれた。これらを溶出順に C1 および C2 とした。すべて溶出させるのに、約 4 時間要し、流した水の量は約 1 L であった。次に C1 を Dowex 50W-X4 (H⁺型) カラムに流し水で溶出させると、2つのバンドに分かれた。溶出順に、C1D1 および C1D2 とした。すべての着色成分を溶出させるのに約 30 時間要し、流した水の量は約 5 L であった。

2-4. [Co(Trp)₃]の合成と異性体の分離

[Co(Tyr)₃]の合成と同様な方法で、Tyr のかわりに Trp を用いて合成した。生成物の溶解度が低く、不溶部分がかなりあった。ろ液部分を CM Sephadex C-25 (Na⁺型) カラムに流し水で溶出させると、2つの着色バンドに分かれた。溶出順に C1、C2 とした。すべての着色成分を溶出させるのに約 16 時間要し、流した水の量は約 4 L であった。これは、[Co(Tyr)₃]や[Co(Phe)₃]の場合に比べてきわめて遅い。もし、次に Dowex 50W-X4 (H⁺型) カラムで分離すると、溶出させるのに極端に長い時間が予想され、着色成分の色も見て判別できなくなるほど希薄になることが予想されたので、Dowex 50W-X4 (H⁺型) カラムでの分離は行わなかった。

2-5. フロントアフィニティークロマトグラフィー (FAC) による BSA-錯体リガンド解離定数 K_d の測定

FAC 測定は、^{6,7)} Fig. 2 に示した様に HPLC 用装置を利用して行なった。送液ポンプ: Jasco PU-980、カラム: TSKgel TOYOPEARL AF-Tresyl-650M に BSA を結合させ⁸⁾ ステンレスカラム (6.0 mm φ × 8 mm) に充填して使用、検出: Jasco UV-2070 (260 nm)、記録 (インテグレータ): Jasco 807-IT。

分析試料は、260 nm における吸光度 Abs が 0.1 にな

るように HEPES 0.1 M (pH 7.2) を溶媒として調製した。[Co(aa)₃]は紫外領域に巨大な吸収をもつため、Abs = 0.1 は極稀薄な溶液である。試料溶液を連続して一定速度 (0.25 mL/min) で流し (例えば 135 min 間)、試料が溶出されるまでの時間または体積 (溶出のフロント) を測定した。実際には、飽和の半分の強度になる時点を出出の「重心」として測定する。測定は室温で行った。[Co(Trp)₃]の C1 成分以外は、すべて複数回測定を行い再現性を確かめた。

2-6. メチルレッドを用いる有効リガンド量 B_t の決定

(1) および (2) 式の B_t を決定するために、BSA との結合定数が知られているメチルレッドを用いて、^{3,9)} FAC の濃度依存性を調べた。10.0, 5.0, 2.5, 2.0, 1.25, および 1.0 μM 各濃度のメチルレッド (溶媒として HEPES 0.1 M 緩衝液を使用) を調整して測定した。

3. 結果と考察

3-1. 合成と異性体の分離

[Co(Tyr)₃]について、文献に従って合成し、異性体の分離を行ったところ、CM-Sephadex C-25 を充填したカラムによって、溶出順に赤紫色の成分 C1 と赤色の成分 C2 に分離され、赤紫色の成分 C1 はさらに Dowex 50W-X4 を充填したカラムによって2つの赤紫色の成分 (C1D1 および C1D2) に分離できた。参考文献 5) によって、C2 は Δ-fac、C1D1 は Λ-mer、C1D2 は Δ-mer と同定されている。

[Co(Phe)₃]の場合も、同様に CM-Sephadex C-25 カラムによって2つの成分 (C1 および C2) に分離し、前の成分 C1 はさらに Dowex 50W-X4 カラムによって2つの成分 (C1D1 および C1D2) に分離した。

[Co(Trp)₃]の場合も、CM-Sephadex C-25 カラムによって2つの成分 (C1 および C2) に分離した。しかし、[Co(Tyr)₃]や[Co(Phe)₃]の場合よりも、溶出速度が非常に遅く、溶出液の濃度が極薄くなった。もし次に Dowex 50W-X4 を通すと、極端に長時間が必要で、濃度も検出できないほどに低くなってしまふことが予想されたために、2段目の分離は行わなかった。C1 は2成分の混合物であ

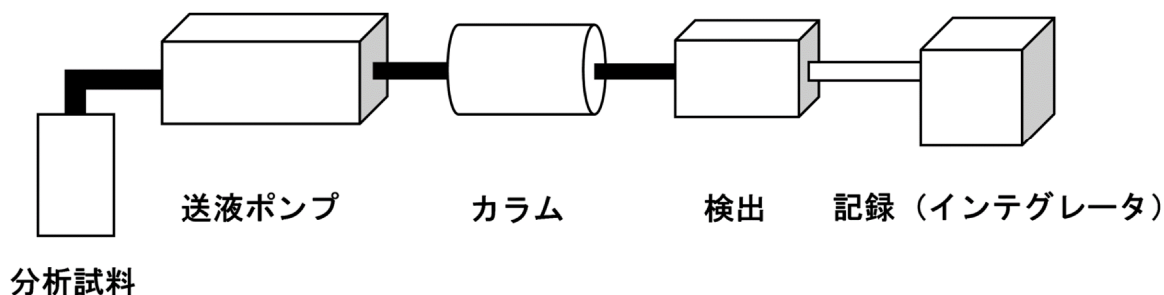


Fig. 2 The apparatus for frontal affinity chromatography (FAC).

Table 1 Absorption maxima in the visible region for each isomers of tris(amino acidato)cobalt(III).

complex	fraction	The 1st d-d band	The 2nd d-d band	identification of stereoisomers ⁵⁾
		λ_{\max} (nm) (Abs)	λ_{\max} (nm) (Abs)	
[Co(Tyr) ₃]	C2	520 (0.007)	370sh ^{a)}	Δ -fac
	C1D1	528 (0.010)	370sh ^{a)}	Δ -mer
	C1D2	533 (0.006)	370sh ^{a)}	Δ -mer
[Co(Phe) ₃]	C2	520 (0.004)	374 (0.004)	
	C1D1	525 (0.003)	370 (0.005)	
	C1D2	525 (0.0005)	361 (0.003)	
[Co(Trp) ₃]	C2	520 (0.007)	365sh ^{a)}	
	C1	510 (0.030)	- ^{b)}	

a) sh = shoulder

b) Peak was not observed due to a huge absorption band in the ultraviolet region.

ることが予想されるが、特にこのことを検証する実験は行わなかった。

各錯体ともに、色は赤～赤紫であり、カラムによる異性体の分離の様子も同様であった。各分離成分のUV-visスペクトルの吸収極大を測定した結果をTable 1に示す。溶出液を濃縮すると析出してしまうため、溶出した溶液をそのまま測定した。かなり濃度が低いために吸収極大の波長はおおよその値である。いずれも、トリス(アミノアシダト)コバルト(III)錯体であることを示している。¹⁰⁾

3-2. FACによるトリス(アミノアシダト)コバルト(III)錯体とBSAとの結合の測定

リガンド-タンパク結合の強さを測定する方法の一つとしてフロントアルフィニティークロマトグラフィー(FAC)が知られている。^{6,7)} リガンドまたはタンパクのどちらかを固定相に結合させるアフィニティークロマトグラフィーで(本研究の場合はタンパクであるBSAを固定)、低濃度の試料を一定速度で連続的に流し、溶出するまでの時間あるいは体積(V)を測定する。すると

$$K_d = B_t / (V - V_0) - [A]_0 \quad (1)$$

の関係が成り立つ。ここで、 K_d は解離定数、 B_t は有効リガンド量(カラム内に固定化されているBSAの量)、 V は測定対象の溶出のフロントまでの体積、 V_0 は相互作用がない場合の溶出のフロントまでの体積、 $[A]_0$ は測定対象の初濃度、である。 V および V_0 ともに、実際には飽和の半分になる位置を溶出の「重心」として測定する。もし $[A]_0$ が十分に小さい場合は、近似的に

$$K_d = B_t / (V - V_0) \quad (2)$$

となる。つまり、この方法を用いれば結合の強さに応じ

て生じる溶出の遅れが、 K_d と単純な逆比例の関係となるために K_d 値を容易に求めることができる。溶出のフロントに注目するので、この測定は、フロントアルフィニティークロマトグラフィー(FAC)と呼ばれる。代表的な例として[Co(Phe)₃]のC1D1成分の測定結果をFig. 3に示す。各試料について測定した結果をTable 2にまとめた。

[Co(Trp)₃]のC2成分が特に大きな溶出の遅れを示した。C1成分に関しては、300 mLの試料溶液を準備して、約18時間流し続けた後、HEPES溶液に切り替えて、測定を続けた。しかし、用いたインテグレータの連続記録の上限が999分であるために、約1000分ごとに記録を一時中断し、再スタートさせる方法で記録した。その結果、約2000分付近に試料の溶出が見られた。以上のような状況で正確な溶出時間(体積)は求めることができない

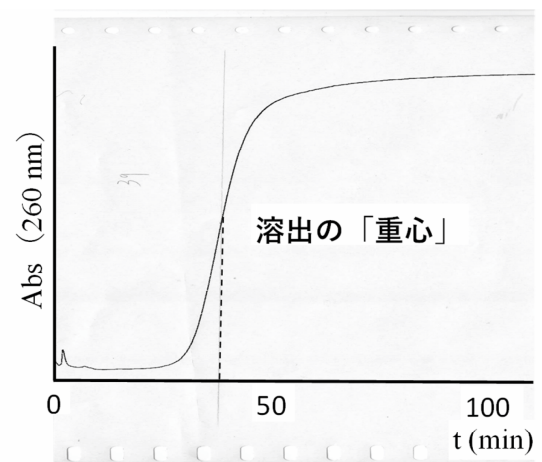


Fig. 3 A typical FAC result for the C1D1 portion of [Co(Phe)₃]. Flow rate : 0.25 mL/min.

Table 2 FAC results for each isomers of tris(amino acidato)cobalt(III).

complex	fraction	t (min)	V (mL) ^{a)}	K_d (M)	
[Co(Tyr) ₃]	C2	36.0	9.00	3.0×10^{-6}	Δ -fac
	C1D1	53.5	13.4	1.8×10^{-6}	Δ -mer
	C1D2	63.0	15.8	1.5×10^{-6}	Δ -mer
[Co(Phe) ₃]	C2	30.0	7.50	4.0×10^{-6}	
	C1D1	38.5	9.63	2.8×10^{-6}	
	C1D2	41.5	10.4	2.5×10^{-6}	
[Co(Trp) ₃]	C2	493	123	1.6×10^{-7}	
	C1	(2000)	(500)	(3.8×10^{-8})	
Methyl Orange ^{b)}		11.0	2.75 ^{b)}		$K_d = 4.5 \times 10^{-4}$ 3,11) c)
Methyl Red		16.2	4.05	1.4×10^{-5}	$K_d = 4.5 \times 10^{-6}$ 3,9) c)

a) Because flow rate was 0.25 mL/min, $t = 1$ min corresponds to $V = 0.25$ mL.

b) The V value of methyl orange (2.75 mL) was adopted for the V_0 value.

c) The reported values were taken from studies around 1960, which were determined by measuring the concentration of unbound ligands using such as dialysis.

が、[Co(Trp)₃] C1成分は、C2成分よりもさらに強く結合することがわかった。

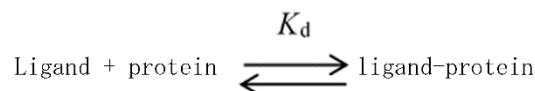
また、BSAとの結合が弱いことが知られているメチルオレンジ($K_d = 4.5 \times 10^{-4}$ M)^{3, 11)}についてFACで測定したところ、溶出時間が11分(溶出体積2.75 mL)であり、これを V_0 とした。

3-3. B_t 値および錯体リガンド-BSA 解離定数 K_d の決定

(2)式から、解離定数 K_d を求めるためには、 B_t の値が必要である。 B_t の求め方には、(1)式に基づいて、横軸に $1/[A]_0$ (μM^{-1})、縦軸に $1/[A]_0 \cdot (V - V_0)$ (μmol^{-1}) をプロットすると、縦軸の切片が $1/B_t$ 、横軸の切片が $-1/K_d$ を表すことから、 B_t を求める方法。⁷⁾ あるいは、横軸に $V - V_0$ (μL)、縦軸に $(V - V_0) \cdot [A]_0$ (nmol) をプロットすると、縦軸切片が B_t 、直線の傾きが $-K_d$ を表すことから、縦軸切片から B_t を求める方法がある。¹²⁾

BSAとの結合定数が報告されているメチルレッドを用いて、FACの濃度依存性を調べることにより、 B_t 値を求めた。メチルレッドのFACの濃度依存性を調べた結果をTable 3に示す。また、 B_t を求めるための上記2種類のプロットを行った結果を、Fig. 4およびFig. 5に示す。両者それぞれから B_t 値および K_d 値を求めると、Fig. 4のプロットからは $B_t = 0.019 \mu\text{mol}$ 、 $K_d = 14 \mu\text{M}$ が得られ、Fig. 5のプロットからは $B_t = 0.024 \mu\text{mol}$ 、 $K_d = 18 \mu\text{M}$ が得られた。文献に報告されているメチルレッド-BSAの K_d 値は 4.5×10^{-6} Mであり、^{3,9)} 本研究で求めた値と近い値であった。Fig. 4のプロットから得られた B_t の値 ($0.019 \mu\text{mol}$) を用いて、(2)式から K_d 値を求め

た。結果をTable 2にまとめた。



の平衡の場合、

$$K_d = \frac{[\text{ligand}][\text{protein}]}{[\text{ligand-protein}]}$$

であり、単位は濃度Mで表される。 K_d 値付近の濃度で、結合した形と、結合していない形が同程度の量になる。したがって、 K_d 値は、結合し始める濃度の下限のめやすとなる。 K_d 値が小さいほど、より低濃度で結合する、すなわち結合が強いことを意味する。

本研究で合成した[Co(aa)₃]の K_d 値は、 10^{-6} から 10^{-7} Mの範囲にあり、非常に強く結合することを示している。各アミノ酸錯体の異性体間で K_d 値が異り、異性体間の差は、1.6~2.0倍程度であった。また、[Co(Phe)₃]よりも、[Co(Tyr)₃]の方が若干強く結合することがわかった。

Table 3 FAC Results of Methyl Red of Various Concentrations.

concentration (μM)	t (min)	V (mL)
10.0	14.6	3.65
5.0	15.0	3.75
2.5	15.4	3.85
2.0	15.8	3.95
1.25	16.0	4.00
1.0	16.2	4.05

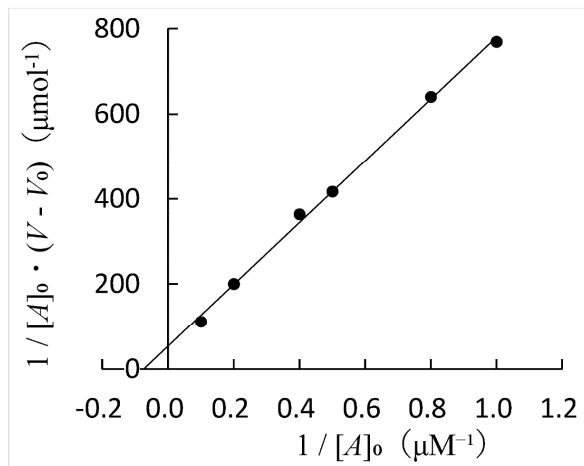


Fig. 4 $1/[A]_0 \cdot (V - V_0)$ versus $1/[A]_0$ plot of methyl red. The intercept of the y axis indicate $1/B_t$, and the intercept of the x axis indicate $-1/K_d$.

[Co(Trp)₃]は、[Co(Tyr)₃] や[Co(Phe)₃]よりもさらに約一桁小さな値で、結合がきわめて強いことが分かった。金属錯体を形成していない遊離の Trp の文献値は $K_d = 1.0 \times 10^{-4}$ M であるので、^{3, 13)} トリスアミノアシダト錯体を形成することにより、約 600 倍、あるいは C1 成分の参考値までを考慮すれば、数千倍強く結合しうることがわかった。[Co(Trp)₃]の 10^{-7} あるいは 10^{-8} M という桁の K_d 値は、血清アルブミンに結合することが知られているものの中でも、最大クラスの結合の強さである。すなわち、アミノ酸を 3 個金属錯体上に集積することによりアミノ酸単独よりも桁違いに強く結合することがわかった。

3 個のアミノ酸を組み合わせると、単純計算で $20 \times 20 \times 20 = 8,000$ 種類の多様なリガンドを作ることが可能である。トリス(アミノアシダト)コバルト(III)錯体は、タンパクに結合するリガンドを作る上で、有望な系であると考えられる。

4. 参考文献

- 1) B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, 監訳:中村桂子, 藤山秋佐夫, 松原謙一, "細胞の分子生物学 第3版," Newton Press, Tokyo (1995), chap. 3-5.
- 2) M. Yashiro, Y. Kawakami, J. Taya, S. Arai, and Y. Fujii, *Chem. Commun.*, **2009**, 1544-1546.
- 3) T. Peters, Jr., "All about Albumin, Biochemistry, Genetics, and Medical Applications," Academic Press, San Diego (1996), chap. 3.
- 4) T. Taura, *Inorg. Chim. Acta*, **252**, 1-3 (1996). T. Taura, *Inorg. Chem. Commun.*, **1**, 77-79 (1998).
- 5) M. J. Malinar, D. U. Miodragović, M. B. Čelap, D. Vuković,

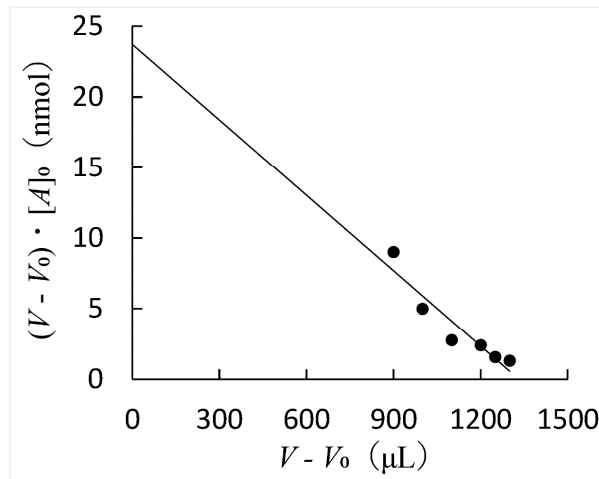


Fig. 5 $(V - V_0) \cdot [A]_0$ versus $V - V_0$ plot of methyl red. The intercept of the vertical axis indicate B_t , and the slope indicate $-K_d$.

J. S. Zakrzewska, and D. Vučelić, *J. Coord. Chem.*, **42**, 343-351 (1997).

6) J. Hirabayashi, *Seibutukougaku*, **89**, 394-397 (2011).

7) K. Kasai, Y. Oda, M. Nishikata, and S. Ishii, *J. Chromatogr.*, **376**, 33-47 (1986).

8) TOSOH Separation Report No.67, TSKgel Tresyl-5PW を用いる免疫吸着体の調整法.

9) R. K. Burkhard, F. A. Moore, and S. J. Louloudes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 291-300 (1961).

10) 新村陽一, "配位立体化学 改訂版," 培風館 (1981),

11) I. M. Klotz, F. M. Walker, and R. B. Pivan, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1486-1490 (1946).

12) Y. Itakura, S. Nakamura-Tsuruta, J. Kominami, H. Tateno, and J. Hirabayashi, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1160-1182 (2017).

13) R. H. McMenamy and J. L. Oncley, *J. Biol. Chem.*, **233**, 1436-1447 (1958).