脂質系ハイブリッド分子集合体系での 人工酵素による立体制御機能

(1992 年 11 月 10 日 受理)

上 岡 龍 一*・山 田 栄 一**・後 藤 浩 一・松 本 陽 子・加 藤 康 夫

単独ではベシクルを形成する分子, L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とミセルを形成する分子, α -[*p*-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェニル]- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレン) (Triton X 100) を混合したハイブリッド型分子集合体は組成や温度を変えることにより, 活性トリペプチド (*N*-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-ヒスチジル-L-ロイシン) 触媒による長鎖アミノ酸エステル基質 (*N*-ドデカノイル-D(L)-フェニルアラニン=*p*-ニトロフェニルエステル) の L 体優位の不斉加水分解を制御できることが明確になった。これらリン脂質系ハイブリッド分子集合体を用いることにより, 相転移に非常に近い温度で特異的に高い不斉選択性が発現できた。この事はハイブリッド型分子集合体の直径や疎水性領域の流動性などの種々の物理的特性が相転移温度付近で鋭く変化することと関連していると考えられる。

1 緒 言

酵素の触媒作用を解明するために構造的により単純で安定なモデル系による研究が行われている。ミセルは球状タンパク質と構造的に類似していることから活性ペプチドを加えたミセルは球状タンパク質酵素モデルとして考えることができ, ベシクルは生体膜と類似していることからペプチド触媒を加えたベシクルは膜酵素モデルとして考えられる。著者らは酵素反応の持つ基質特異性に焦点を合わせ, 高い不斉識別機能の発現とその機構解明へのアプローチとしてこれら酵素モデル系による不斉選択的加水分解反応に関する研究を展開している。

すでに, 合成ベシクル分子と合成ミセル分子より構築されるハイブリッド分子集合体を反応場マトリックスとしたペプチド触媒を含む酵素モデル系では, 分子集合体の組成を制御^{1)~4)}することにより不斉識別機能を著しく向上させ, さらにイオン強度⁵⁾や温度⁶⁾⁷⁾でマイクロ環境を微調整することにより酵素-基質間の適合を最適化できることを報告している。とくに組成比を変えることに

より, 分子集合体のサイズに不斉選択性が比例するという興味深い結果が得られている⁴⁾。さらに, 最近リン脂質とミセル界面活性剤から成るハイブリッド分子集合体についても不斉加水分解の立体制御反応場として有効である可能性を報告している⁸⁾⁹⁾。

極性脂質や界面活性剤などの両親媒性物質の分子集合体の構造は分子中の親水性と疎水性のバランス¹⁰⁾や分子の配向性¹¹⁾に強く依存すると考えられる。とくに二本の疎水性鎖を持った界面活性剤はリポソームと呼ばれる二分子膜を基本構造を持った閉鎖小水胞体 (ベシクル) を形成し, これら分子集合体は温度やその他の条件で存在状態が変化する。

本稿ではベシクル形成性分子である L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とミセル形成性分子である α -[*p*-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェニル]- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレン) (Triton X 100) から成る脂質系ハイブリッド分子集合体を反応場とし, トリペプチドである *N*-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-ヒスチジル-L-ロイシン (Z-Phe-His-Leu) 触媒による長鎖アミノ酸エステル, *N*-ドデカノイル-D(L)-フェニルアラニン=*p*-ニトロフェニルエステル (C₁₂-D(L)-Phe-PNP) 不斉加水分解に関する分子集合体組成と温度

熊本工業大学工業化学科, 860 熊本市池田

** 日本油脂株式会社筑波研究所, 300-26 つくば市東光台

- 1) R. Ueoka, Y. Matsumoto, Y. Ihara, *Chem. Lett.*, **1984**, 1807.
- 2) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, T. Hirose, J. Kikuchi, Y. Murakami, *ibid.*, **1986**, 127.
- 3) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, N. Watanabe, K. Omura, Y. Murakami, *ibid.*, **1986**, 1743.
- 4) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588(1988).
- 5) R. Ueoka, M. Cho, Y. Matsumoto, K. Goto, Y. Kato, K. Harada, A. Sugii, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5335 (1990).

6) 上岡龍一, 松本陽子, 有合化, **42**, 1088(1984).7) Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **55**, 5797 (1990).8) R. Ueoka, H. Dozono, Y. Matsumoto, M. Cho, K. Kitahara, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219 (1990).9) R. Ueoka, E. Yamada, O. Yamashita, Y. Matsumoto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597(1991).10) P. R. Cullis, B. De Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta.*, **559**, 399(1979).

11) 中島直敏, 国武豊喜, “化学増刊 98”, 化学同人, p.15 (1983).

に対する反応特異性について検討した。さらに膜表面近傍に取り込まれると予測されるトリペプチドのマイクロ環境を評価するのに、蛍光プローブとして膜表面近傍に取り込まれる 1-[(4-トリメチルアンモニオ)フェニル]-6-フェニル-1, 3, 5-ヘキサトリエン=ヨウ化物 (tma-DPH) を用いた蛍光偏光度 (P) の測定から膜表面流動性を評価し、相転移温度や集合体の直径、さらに不斉選択性との関連についても検討したので報告する。

以下に用いたアミノ酸エステル基質、活性トリペプチド触媒、および人工細胞膜モデルを形成するリン脂質と非イオン性界面活性剤の化学構造を示す。

2 実験

2.1 試料

N -ドデカノイル-D(L)-フェニルアラニン- p -ニトロフェニルエステル (C_{12} -D(L)-Phe-PNP) は, Ingles ら¹²⁾ のラセミ化を避ける方法に従い合成した。合成物の元素分析値, 融点および旋光度を以下に示す。

C_{12} -D-Phe-PNP ($\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_5$)

mp = 107.0–108.5 °C

分析値 C 69.07%, H 7.67%, N 5.96%

計算値 C 69.21%, H 7.74%, N 5.98%

$[\alpha]_D^{25} + 10.8^\circ$ ($c=2$, CHCl_3)

C_{12} -L-Phe-PNP ($\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_5$)

mp = 106.5–108.0 °C

分析値 C 68.98%, H 7.77%, N 5.96%

計算値 C 69.21%, H 7.74%, N 5.98%

$[\alpha]_D^{25} - 10.8^\circ$ ($c=2$, CHCl_3)

N -ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニン-L-ヒスチジル-L-ロイシン (Z-Phe-His-Leu) は市販品 (Bachem) をそのまま使用した。L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) は市販品 (日本油脂) をそのまま使用した。 α -[p -(1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェニル]- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレン) (Triton X 100) は, 市販品 (ナカライテクス) をそのまま使用した。

2.2 ハイブリッド型分子集合体の調製

ハイブリッド型分子集合体は, pH 7.4, 0.01 M リン酸塩緩衝液 (0.01 M KCl) 中で 50 °C, 20 分間, 超音波照射 (Bransonic Model B 2200 apparatus, 80 W) することによって調製した。なお, DPPC は 1×10^{-3} M, Triton X 100 は $0.54 \sim 4.0 \times 10^{-3}$ M である。

2.3 相転移温度の測定

DPPC と Triton X 100 から成るハイブリッド型分子集合体の結晶ゲル $\rightleftharpoons$ 液晶相転移温度 (T_c) は走査型示差熱量計 (SEIKO SSC 5200 DSC 120) を用いて測定した。試料溶液およびリファレンスとして 0.01 M リン酸塩緩衝液 (0.01 M KCl) 50 mg をそれぞれ Ag 製容器 (容量 70 μ l) に密封したものを用い, 液体窒素で冷却後, 0–55 °C の温度範囲, 昇温速度 1 °C/min の条件で行った。試料溶液は, DPPC と Triton X 100 を同リン酸塩緩衝液中で超音波照射 (2.2 と同一装置) を 50 °C で 30 分間行い均一な溶液が得られたことを確認し, 1 日室温放置後, 孔径 0.45 μ m のアドバンテック製フィルターで濾過し, T_c の測定に使用した。

2.4 蛍光偏光度の測定

蛍光偏光度 (P) は, tma-DPH を蛍光プローブとして, 蛍光偏光度計 (日立分光光度計 F-2000) により測定, 算出した。検体溶液は, 加水分解反応速度の測定と同一条件のハイブリッド型分子集合体の緩衝液 (2 ml) に tma-DPH テトラヒドロフラン溶液 (2 μ l) を加え, tma-DPH 濃度が 1×10^{-6} M となるよう調製した。励起波長 361 nm にて 431 nm の蛍光偏光強度成分を測定し, 式 (1) に従い P を求めた。

$$P = (I_{vv} - C_f I_{vh}) / (I_{vv} + C_f I_{vh}) \quad (1)$$

ここで, I_{vv} および I_{vh} はそれぞれ垂直直線偏光励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度成分および直角に振動する偏光強度成分である。 C_f は補正係数であり全光学系の偏光特性を補正するために試料セルに水平直線偏光を照射して式 (2) より求めた。

$$C_f = I_{hv} / I_{hh} \quad (2)$$

ここで, I_{hv} および I_{hh} は, それぞれ水平直線偏光励起光の振動方向と直角に振動する偏光強度成分および平行に振動する偏光強度成分である。

2.5 加水分解反応速度の測定

加水分解反応は図 1 に示す様に, トリペプチドのイミダゾール触媒基のアシル化過程, およびその後続く脱アシル化過程が考

12) D. W. Ingles, J. R. Knowles, *Biochem. J.*, 104, 369 (1967).

Fig. 1 Reaction mechanism of hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters

えられる。本実験では Z-Phe-His-Leu を DPPC と Triton X 100 から成るハイブリッド型分子集合体に超音波照射することによって組み込み、膜酵素モデルとした。アミノ酸エステルである C₁₂-D(L)-Phe-PNP を基質とし、加水分解速度は生成物として遊離する *p*-ニトロフェノラートイオン量を、400 nm で分光光度計 (日立 150-20, U-2000 および島津 UV-200) を用いて追跡し求めた。

これらの反応は触媒過剰の条件で変化率約 80% 以上まで擬一次速度式 (3) を満足した。

$$\log(A_{\infty} - A_t) = -k \cdot t / 2.303 + \log A_{\infty} \quad (3)$$

ここで A_{∞} は、無限反応時間における、 A_t は時間 t における *p*-ニトロフェノラートイオンの吸光度である。加水分解 (基質の脱アシル化) 二次速度定数, $k_{a, \text{obsd}}$, は式 (4) から求めた。

$$k_{a, \text{obsd}} = (k_t - k_s) / [\text{Cat}] \quad (4)$$

k_t は、触媒存在下の、 k_s は、緩衝液のみによる擬一次速度定数であり、 $[\text{Cat}]$ は触媒の濃度である。

活性化エネルギー (ΔG^*) は式 (5) から求めた。

$$\Delta G^* = 2.303 RT \log (kT / h k_{a, \text{obsd}}) \quad (5)$$

k は Boltzmann 定数, h は Planck 定数である。

2.6 集合体の直径の測定

ハイブリッド型分子集合体の直径は動的光散乱法により測定した。Brookhaven BI-90 を使い、出力 35 mW, He-Ne レーザーの 632.8 nm の発振線を光源とし、散乱角 90° で測定を行い、得られた拡散係数 (D) から式 (6) (Stokes-Einstein の式) に従い見かけの直径 (d_{hy}) を求めた。

$$d_{hy} = KT / 6\pi\eta D \quad (6)$$

ここで、 k は Boltzmann 定数, T は絶対温度, η は溶媒の粘度である。試料溶液は、相転移温度の測定と同様の超音波処理を行ったのち 1 日室温放置後、直径の測定に使用した。

3 結果と考察

3.1 相転移温度および流動性におよぼすハイブリッド型分子集合体の組成の影響

DPPC および DPPC/Triton X 100 ハイブリッド分子集合

Fig. 2 DSC curves of coaggregates composed of DPPC and Triton X 100 in 0.01 M phosphate buffer (0.01 M KCl) at pH 7.4

体の結晶ゲル $\rightleftharpoons$ 液晶相転移温度 (T_m) を走査型示差熱量計 (DSC) を用いて求めた際の DSC 曲線を図 2 に示した。 T_m 値は、0~80 mol% Triton X 100 の範囲で、Triton X 100 濃度の増大にともない、40.7 (0), 38.9 (35), 34.6 (68), 31 °C (80 mol%) と徐々に下がった。さらに、Triton X 100 濃度が 68 mol% 以上ではピークがブロードになった。また、転移エンタルピー (ΔH) は 7.3 (0), 3.6 (35), 1.6 (68), 0.8 kcal/mol (80 mol%) と順次減少することが明確になった。転移エンタルピーの減少は分子集合体を構成する分子間の相互作用 (疎水性相互作用が主と考えられる) が弱くなっているため¹³⁾と考えられる。

蛍光プローブを用いた蛍光偏光 (P) の測定から、プローブのマイクロ環境の流動性を知ることができる。そこで、膜表面近くの

Fig. 3 Correlation between P and composition of coaggregates composed of DPPC and Triton X 100 at 25 °C

13) 児玉美智子, 油化学, 39, 530(1990).

疎水性領域に位置する tma-DPH^{14)~16)} をプローブとして用いた P 値の分子集合体組成比依存性を検討した。図 3 から明らかなように、 P 値は Triton X 100 濃度の増大にともない減少しており、集合体の流動性が大きくなっていることを示している。とくに、70~80 mol% Triton X 100 付近で P 値が急激に減少している。Triton X 100 が高濃度存在すると二分子膜の炭化水素鎖の規則的高次配列を変化させ、結果的には疎水性や流動性などの膜特性に変化をおよぼす可能性が十分考えられる。

3.2 不斉加水分解におよぼすハイブリッド型分子集合体の組成の影響

速度定数および不斉選択性におよぼすハイブリッド型分子集合体の組成の影響を図 4 に示した。なお、加水分解反応液は 3.1 で調整したものと同一のものをを用いた。Triton X 100 濃度が 0~34 mol% では、水に対する溶解度が極めて小さく相分離領域であるため透明な均一溶液が得られず、均一系の得られた Triton X 100 濃度が 34 mol% 以上のハイブリッド型分子集合体について不斉加水分解速度を得た。 C_{12} -D-Phe-PNP の加水分解速度は、試験した全組成範囲においてほとんど一定であるが、 C_{12} -L-Phe-PNP の加水分解速度は Triton X 100 濃度が 68 mol% で最大値を示すベル型であった。結果として、不斉選択性は 68 mol% Triton X 100 濃度で最大 ($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D=28$) であった。3.1 で明らかなように、流動性が急激に増大する組成付近で、最も不斉選択性を高めることができた。生体膜構成成分は、活性時の酵

Fig. 4 Rate constants ($k_{a,obsd} M^{-1} s^{-1}$) (left-hand ordinate) and enantioselectivity ($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$) (left-hand ordinate) versus coaggregate composition. pH 7.4, 25 °C, 0.01 M Phosphate buffer, 0.01 M KCl, 3% (v/v) CH_3CN-H_2O , $[C_{12}-D(L)-Phe-PNP]=1 \times 10^{-5} M$, $[Z-Phe-His-Leu]=1 \times 10^{-4} M$, $[DPPC]=1 \times 10^{-3} M$

The enantioselectivity has maximum errors of $\pm 4\%$.

- 14) F. G. Prendergast, R. P. Haugland, P. J. Callahan, *Biochemistry*, **20**, 7333(1981).
- 15) J. Sunamoto, K. Iwamoto, K. Inoue, T. Endo, S. Nojima, *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 283(1982).
- 16) A. Carlsson, T. Sato, J. Sunamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 791(1989).

素の立体構造を維持したり、膜-水境界面で活性化に都合の良い配向をさせたり、特定の基質との相互作用に適する疎水性環境を与えるのに重要であると考えられているが¹⁷⁾、合成界面活性剤系と同様にリン脂質含有ハイブリッド分子集合体においても活性トリペプチドの立体識別能を高める最適組成が存在することが明らかとなった。

3.3 不斉加水分解におよぼす温度の影響

明らかな相転移を持つ 65 mol% DPPC/35 mol% Triton X 100 から成るハイブリッド型分子集合体における、Z-Phe-His-Leu 触媒による、 C_{12} -D(L)-Phe-PNP の加水分解反応に関する温度依存性を検討した。図 5 (A) に示した様に、不斉選択性の温度依存性が T_c 付近の 37.5 °C で極大となるベル型であったことは注目に値する。さらに、Arrhenius プロット (図 5 (B)) も、 C_{12} -L-Phe-PNP および C_{12} -D-Phe-PNP とともに T_c 付近で屈曲

Fig. 5 Temperature dependence of enantioselectivity ($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$) (A) and free energy of activation ($\Delta G^\ddagger$) (B) in the hydrolysis of C_{12} -D-Phe-PNP (●) and C_{12} -L-Phe-PNP (○) catalyzed by Z-Phe-His-Leu in the coaggregates composed of 65 mol% DPPC and 35 mol% Triton X 100 and its DSC curve

- 17) J. B. Finean, R. Coleman, R. H. Michell 共著/佐藤了, 日野幸伸共訳, “生体膜と細胞活動”, 第 3 版, 培風館, p. 57 (1987).

Fig. 6 Temperature dependence of fluorescence polarization (P) (right-hand ordinate) and apparent hydrodynamic diameter (d_{hy}) (left-hand ordinate) in the coaggregates composed of 65 mol% DPPC and 35 mol% Triton X 100 in 0.01 M phosphate buffer (0.01 M KCl) at pH 7.4

点が観測された。65 mol% DPPC/35 mol% Triton X 100 から成るハイブリッド型分子集合体は、図 4 (A) の DSC ピークから、38.5 °C の T_c を持つ混合分子集合体と考えられる。興味深いことに、これらリン脂質含有ハイブリッド分子集合体は、合成界面活性剤型分子集合体の場合⁷⁾と同様に、相転移に非常に近い温度で、不斉選択性の最大値を有することが明らかとなった。分子集合体を形成するベシクル分子とミセル分子の配向性が温度変化にともない変化し、分子集合体に含まれるペプチド触媒の立体配座が調節されたものと思われる。すなわち、 T_c 付近で不斉識別加水分解にとって最適となる立体制御を可能にしたことになる。このことは天然に存在する膜タンパク質の機能性発現には膜組成変化や濃度変化にともなうペプチド鎖の立体配座変化が関連していることを示唆している。

3.4 膜表面流動性および集合体の直径におよぼす温度の影響

65 mol% DPPC/35 mol% Triton X 100 から成るハイブリッド型分子集合体に関して、 P 値および集合体の直径の温度依存性を検討した。図 6 から明らかなように P 値および直径は T_c 付近で急激に変化している。すなわち、 T_c 以上では流動性および直径ともに著しい増大が観測された。このことから、膜表面近傍に取

り込まれると推測される⁷⁾ペプチド触媒 (Z-Phe-His-Leu) の立体配座が T_c 付近で調節され、 C_{12} -L-Phe-PNP 基質との反応に都合の良い「鍵と鍵穴」のような空間的適合を可能にしていると考えられる。一般に、天然酵素の最大活性発現が安定および不安定領域の境界付近で起こっていることに鑑み、今回の人工膜酵素における相転移付近での顕著に大きな立体識別反応はモデル系での貴重な実験結果と思われる。すなわち、酵素活性を高める境界領域を分子集合体の相転移付近 (ゆらぎ) で人工的に構築できたことになる。

4 総 括

本研究の注目すべき点を要約すると次の通りである：

(a) DPPC/Triton X 100 から成るハイブリッド型分子集合体における、Z-Phe-His-Leu 触媒による、 C_{12} -D(L)-Phe-PNP の加水分解に対する不斉選択性の組成依存性を検討したところ、最適組成 (32 mol% DPPC/68 mol% Triton X 100) において、最大の不斉選択性が発現した。蛍光偏光度の測定から流動性が急激に変化する反応場において最も不斉選択性を高めることができた。

(b) 65 mol% DPPC/35 mol% Triton X 100 から成るハイブリッド型分子集合体における、Z-Phe-His-Leu 触媒による、 C_{12} -D(L)-Phe-PNP の加水分解反応の温度依存性を検討したところ、相転移温度 (T_c) 付近で不斉選択性の極大が得られた。動的光散乱法から T_c で集合体の直径が顕著に増大しており、分子集合体を構成する分子のパッキング状態が大きく変化していることは明らかである。

これら脂質系ハイブリッド型分子集合体は、合成のベシクル分子とミセル界面活性剤から成る分子集合体の場合⁷⁾と同様に、相転移に非常に近い温度で流動性などの物性が大きく変化し、結果的に高い不斉選択性を発現できたことは意義深いと思われる。

本研究にあたり、審査員の有益な御意見ならびに論議に心より感謝申し上げます。蛍光偏光度の測定で協力いただいた今村主悦君および山本慎一君に御礼申し上げます。なお、本研究の一部は文部省平成 4 年度科学研究費 (No. 04650789) の補助によるものであることを付記します。

Composition- and Temperature-Sensitive Stereoselectivity of
Catalytic Hydrolysis at Hybrid Aggregates Composed of
Phosphatidylcholine and Triton X 100

Ryuichi UEOKA*, Eiichi YAMADA**, Koichi GOTO, Yōko MATSUMOTO
and Yasuo KATO

*Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kumamoto Institute
of Technology; Ikeda, Kumamoto-shi 860 Japan*

*** Tsukuba Research Laboratory, Nippon Oil & Co. Ltd., Tokodai, Tsukuba-shi 300-26 Japan*

The stereoselective hydrolysis of the long-chain substrate (*N*-dodecanoyl-D(L)-phenylalanine *p*-nitrophenyl ester) catalyzed by the active tripeptide (*N*-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucine) was found to be controlled by changing the reaction field (temperature and the composition of coaggregates) in the hybrid aggregates composed of the nonionic micellar surfactant, α -[*p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]- ω -hydroxypoly(oxyethylene) Triton X 100, and the vesicular surfactants, L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). The optimum composition (32 mol% DPPC/68 mol% Triton X 100) hybrid-assemblies presented the highest enantioselectivity. The markedly enhanced enantioselectivity was also observed at the phase transition of coaggregates composed of 65 mol% DPPC and 35 mol% Triton X 100.

~~~~~