

1 生物無機化学の概説

はじめに 生物無機化学は、無機化学、有機化学、生化学、物理化学の研究者の関心が共通テーマとしての「生命現象における金属イオンの役割」に高まった1970年代に、境界領域として立ち上げられた。そのころ大きな手法となりつつあったX線結晶構造解析や種々の分光学の貢献は目覚ましく、金属タンパク質をはじめとする生体系金属錯体の構造と機能を中心に躍進的に研究が進められた。今日では、人類の直面する環境・エネルギー・医療問題にまで貢献する学問となりつつある。

1.1 生物無機化学とは

生体内には、生化学的・生理学的反応において、微量ではあるが生命活動に重要な役割（機能）を演じる金属イオンや無機元素が存在し、その濃度が精密に維持・制御されている。例えば、(i) K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 等はタンパク質の構造の維持・安定化に、(ii) K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 等は神経伝達や筋収縮などの誘起・制御・調節機能に、(iii) Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} 等はルイス酸として触媒機能に、(iv) V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Mo 等は酸化還元反応や電子伝達機能に、そして、(v) Fe, Cu は酸素の貯蔵・運搬に関わるなど、それら金属イオンの性質を反映した機能を発現している。これら機能の中心的役割を果たす金属の電子状態やその周辺構造とそれら機能との関係を解明しようとする学問分野を生物無機化学という。さらに、これら生理機能の解明・探求研究の過程で人工的な金属錯体を用いた研究や、金属に関わる医薬・医療分野も多くあり、この分野に含めている^{1,2)}。また、本書では、主として微量金属イオンを中心として述べるが、 I^- や Cl^- , HPO_4^{2-} 等の無機系陰イオンも生体の電解質のバラ

ンスの維持に重要であり，生物無機化学の分野に含まれる。

1.2 生体必須元素とその役割

生命機能を維持する必須元素には，生体を構成するアミノ酸，タンパク質，核酸，脂肪，糖などに代表されるように，酸素，炭素，水素，窒素，カルシウム，リンは，生体濃度が極めて高く，これらだけで生体内の99%近い存在量を示し，多量元素（O, C, H, N, Ca, P）と呼ばれる。また，硫黄，カリウム，ナトリウム，塩素，マグネシウムなどは次に多く，微量元素（S, K, Na, Cl, Mg）と呼ばれる。しかし，これらだけでは生命を維持することはできず，微量ではあるが，生命を維持する上で極めて重要な元素として，ppm オーダーで存在する微量元素（Fe, Zn, Mn, Cu, F, Si, Rb, Sr, Br, Pb）と，ppb オーダーで存在する超微量元素（Al, Mo, Ni, Cr, Co, V, Cd, Sn, Hg, Ba, Se, I, B, As）がある。これら生命が必要とする元素および何らかの形で関与する元素は，図 1-1 に示すように周期表の約 1/4～1/3 を占める。本書で取り扱う元素は，ヒトにとって生命の維持，生体の発育・成長，正常な生理機能に不可欠な微量元素および超微量元素であり，これらは特に生命必須微量元素（Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, Cr, Co, Se, I）と呼ばれる。主たる微量元素を含む生体分子の所在をタンパク質・酵素・非タンパク質に区別して図 1-2 に³⁾，またその役割（機能）は 1.4 で紹介する。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn

 主要元素(多量元素, 少量元素)	 微量元素
 超微量元素	 プローブ, 医療, 薬剤として利用

図 1-1 生体反応に関連し重要な機能を発現する元素

2 O₂ の運搬・貯蔵・活性化

はじめに 呼吸によって体内に込まれた酸素分子は、鉄や銅を含むタンパク質によって貯蔵・運搬される。取り込まれた酸素分子は、銅や鉄を含む酸化酵素によって活性化され、各種基質の酸化反応や酸素化反応における酸化活性種として利用されている。このような反応は生命活動を維持するために必要なエネルギー代謝や物質代謝に必要な不可欠なものである。本章では、このような酸素分子の運搬、貯蔵、活性化に関わる鉄および銅含有タンパク質（酵素）の構造と機能について解説する。

2.1 運搬・貯蔵

2.1.1 ミオグロビン

(1) 構造と機能

ミオグロビン (Mb : myoglobin) は酸素貯蔵タンパク質で、脊椎動物の筋肉組織中に多く存在する。クジラは長い時間水中に潜っているので、酸素分子を長時間保持する必要がある。クジラの筋肉中には Mb 分子が多い。クジラの肉から Mb が多く採取できることから、クジラ由来の Mb は初期の研究によく使われ、1958 年には X 線結晶構造解析により立体構造が解かれた最初のタンパク質となった。これにより、タンパク質研究は原子レベルの新しい時代を迎えることとなった。Mb の全体構造を図 2-1 に示した。Mb はグロビンと呼ばれる球状タンパク質の 1 つで、153 個のアミノ酸から成る 1 本のポリペプチド鎖と補欠分子族のヘム (ヘム b, プロトポルフィリン IX 鉄錯体 (図 2-2)) から構成される。Mb のポリペプチド鎖は 8 本の α ヘリックスを形成する。また、Mb のヘムは溶液を酸性にすることによってポリペプチド鎖から切り離すことができる。

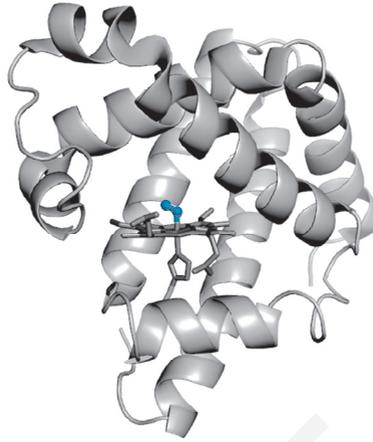


図 2-1 酸素化型マッコウクジラ Mb の立体構造 (PDB: 1MBO)

ヘムおよびヘムに配位しているヒスチジンを棒モデル，酸素分子を青色の球と棒で示した。PDB は protein data bank の略でタンパク質の立体構造のデータベースを表す。

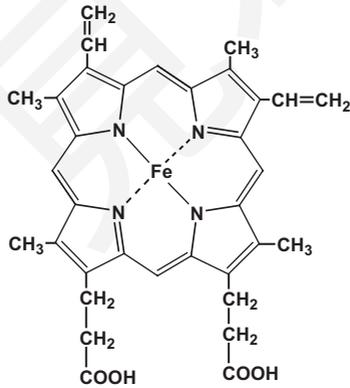


図 2-2 ヘム *b* の構造

Mb のヘムは，ヒスチジン残基の側鎖イミダゾール環の窒素原子からヘム鉄への配位により，ポリペプチド鎖に固定されており，ヘムに配位しているヒスチジンは近位ヒスチジン（近位 His）と呼ばれている（図 2-3）。O₂ は近位 His

3 窒素・硫黄循環

はじめに 窒素と硫黄は、生体物質の基本要素としてだけでなく、生体エネルギー獲得や物質合成にも必要な元素である。地球上における、これらの循環は、基本的には電子のやり取りを伴う酸化還元が主な反応であり、鉄、銅、モリブデン等を含む金属酵素が関与している。本章では、窒素循環および硫黄循環に関係する金属酵素について、微生物学、化学、構造生物学の観点から述べる。

3.1 地球における窒素と硫黄の循環

窒素は、我々の生命維持に必須の元素の1つである。地球上においては、その大部分は大気中の窒素分子 (N_2) として存在している。 N_2 は窒素-窒素三重結合 (結合解離エネルギー 943 kJ/mol) により、非常に安定で不活性な分子である。したがってこの状態のままでは、 N_2 を様々な化合物の窒素源として利用できない。そこで、1906年に Fritz Haber と Carl Bosch は鉄触媒を用いて、200 ~ 1000 気圧、400 ~ 600 °C で、 N_2 をアンモニア NH_3 に変換する手法を開発した。これは、ハーバー・ボッシュ法と呼ばれ、当時のドイツの産業発展に大きく貢献した。現在では、大気中の N_2 から NH_3 への変換の約 2 割にこの手法が活用され、窒素肥料の原料等として利用されている。この功績に関連して、Fritz Haber は 1918 年に、Carl Bosch は 1931 年にノーベル化学賞を受賞している。

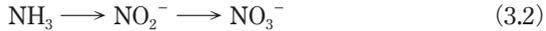
一方、豆科の植物の根に共生する根粒菌は、 N_2 から NH_3 への変換 (窒素固定 nitrogen fixation とよぶ) を、常温、常圧で行っている (式(3.1))。



根粒菌による窒素固定は、地球全体の N_2 から NH_3 への変換の約 7 割におよぶ。根粒菌による窒素固定の主役となる酵素はニトロゲナーゼであり、モリブデン

(Mo) と鉄 (Fe) を活性中心に含む金属酵素である。ニトロゲナーゼの詳細は、6章で解説する。

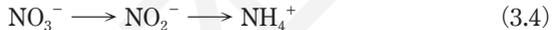
ニトロゲナーゼにより変換されたアンモニアは、グルタミン合成酵素によりグルタミン酸やグルタミンに取り込まれ、アミノ酸など生理活性物質の生合成における窒素源となる。また、土壌中のアンモニアは、微生物による硝化 (nitrification) によって、硝酸塩 (NO_3^-) や亜硝酸塩 (NO_2^-) へと変換される (式(3.2))。



さらに、 NO_3^- と NO_2^- は微生物による脱窒 (denitrification) によって、 N_2 に変換され、大気中に戻される (式(3.3))。



脱窒は、エネルギー獲得系と共役した異化型硝酸還元の1つである。他にも異化型硝酸還元として、カビのアンモニア発酵であるアンモニア化 (ammonification) が知られている (式(3.4))。



植物、藻類、真核・原核微生物による同化型硝酸還元も、反応過程は式(3.4)と同じであるが、生成したアンモニウム塩 NH_4^+ はグルタミン合成酵素などにより細胞成分として取り込まれる。したがってこれは硝酸塩 NO_3^- の窒素を、生体物質の窒素源とする過程である。さらに、最近では、嫌氣的アンモニア酸化細菌 (アナモックス細菌) による、亜硝酸 NO_2^- とアンモニア NH_4^+ からの

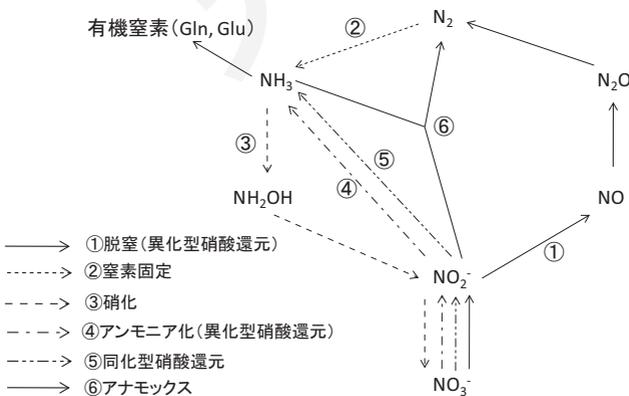


図 3-1 地球上の窒素循環

4 呼吸系

はじめに 地球上での生物による O_2 と H_2O の循環は、呼吸系 (O_2 の H_2O への還元) と光合成 (H_2O から O_2 の発生) が担う生理的に重要な化学反応である。ともに巨大かつ複雑な膜タンパク質複合体が触媒する反応であり、そのメカニズムを解明することは、長い間、研究者を楽しませるとともに苦しめてもきた。長い間の生化学者の苦闘の末、これらのタンパク質の原子レベル分解能の立体構造を決定することができるような結晶が調製可能になった。いつの時代も分光学者と結晶学者は、彼らの最先端の物理的測定の技をこれら難関タンパク質の構造決定のために磨いてきた。私たちは、最近ようやく反応メカニズムを化学の言葉で話せるようになってきた。

4.1 シトクロム c 酸化酵素

地球ができてから 46 億年経つが、はじめは酸素が存在せず、25 億年前にできはじめ、現在は酸素濃度が 21% になっている。酸素呼吸を行う生物は、同じ食物を摂っても、より多くのエネルギーが得られるので有利である。それは酸素の酸化還元電位が高いためである。酸素呼吸とは、食物を酸素で酸化するときに放出されるエネルギーを細胞内で使いやすい ATP の形に変換するしくみであり、多くの素過程からなり、多くの酵素が反応を触媒することによって成り立っている。酸素呼吸の主要経路は



であるが、 $C_6H_{12}O_6$ (グルコース) は細胞質の解糖系で 2 分子のピルビン酸となり、ミトコンドリア内膜を透過してマトリクスに至り、アセチル-CoA に変換されてクエン酸回路の基質となる。クエン酸回路は CO_2 を発生すると

もに、 NAD^+ や FAD を還元する。 NADH や FADH_2 は、ミトコンドリア内膜の呼吸鎖電子伝達系に電子を供与する。呼吸鎖電子伝達系は、複合体 I ~ IV からなり、I, III, IV は NADH より電子を受け取ってプロトンポンプとして働く。II は FADH_2 より電子を受け取るがプロトンポンプとしての機能を持たない。複合体 V (ATP 合成酵素) は Fe や Cu は持たず、酸化還元反応は行わないが、I, III, IV によって形成されたプロトン濃度勾配に基づくプロトン駆動力により ADP をリン酸化して ATP を合成する。電荷は ADP^{3-} , ATP^{4-} であり、 ATP と ADP はミトコンドリア内膜に存在するタンパク質 $\text{ATP-ADP translocator}$ により、すみやかに交換される。この反応には、膜電位の存在が必要である。解糖系においても ADP のリン酸化により ATP がわずかに生じる。この過程を基質レベルのリン酸化と呼ぶ。一方、呼吸鎖電子伝達系において電子移動に共役して働くプロトンポンプの結果生じたプロトン駆動力が複合体 V を駆動することにより生成される ATP は、はるかに量が多い。この過程は、酸化的リン酸化と呼ばれる。本章で取扱う呼吸は、複合体 IV (シトクロム *c* 酸化酵素、以下 CcO と呼ぶ。E. C. 1. 9. 3. 1) によって触媒される酸化的リン酸化のための酸素還元反応と、それに共役したプロトンポンプ反応である。ヒトが肺から取り込んだ O_2 の 9 割以上が、 CcO によって還元される。 CcO は酸素呼吸の鍵酵素である。

4.1.1 CcO 研究の歴史

マックマン (MacMunn) は 1884 年に筋肉および腎臓中にある色素ミオヘマチンとヒストヘマチンを報告した¹⁾。ケイリン (Keilin) は直視分光器で細胞懸濁液を観察し、酸化状態や CO の結合によって吸収帯の波長が変化することを観察し、Cytochrome (細胞色素) と呼ぶことを提案した²⁾ (1925 年)。吸収帯を長波長に持つものから順に、シトクロム *a*, *b*, *c* と名付けられた。

1928 年ワールブルク (Warburg) は、いわゆるワールブルク検圧計によって細胞の酸素吸収速度すなわち呼吸速度を調べた。呼吸が CO によって阻害されること、その阻害が光照射によって解かれることを観測した。さらに、光照射により解かれる呼吸阻害の大きさの波長依存性、すなわち光化学作用スペクトルを測定した。作用スペクトルは 430 nm 付近に大きな極大を、590 nm 付近に

5 光合成系

はじめに 光合成では、光の吸収に始まり、その励起エネルギーの伝達（集光）と光エネルギーの電気化学エネルギーへの変換（電荷分離）・電子伝達を経て、二酸化炭素の還元（炭水化物の合成）を含む高エネルギー物質の生産が行われる。この際に、水を電子源とした場合には、酸素発生を伴うことになる（水の酸化）。このようなプロセスには、様々な錯体分子（種）が重要な役割を果たしている。以下では、光合成における「錯体化学」の重要性を、集光系・電子伝達系（電荷分離系）・水の酸化系に注目して説明する。

5.1 集光系

5.1.1 太陽エネルギー

光合成プロセスは、光合成を行う生き物（光合成生物）が光を吸収することで開始される。自然界で光を与える光源は、太陽からの光であることがほとんどである（ごく一部に地球内部の熱源に伴う発光もあり、それを利用している光合成生物も存在していると言われている。例えば海底熱水鉱床近辺で生息する光合成細菌など）。太陽は強力な光源であり（毎秒約 4×10^{23} kJ つまり約 4

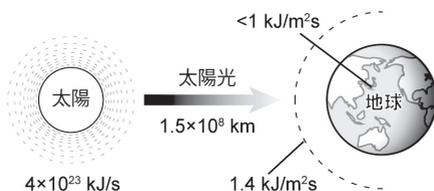


図 5-1 太陽から地球への光エネルギー

$\times 10^{23}$ kW の光エネルギーを発している：この値はほぼアボガドロ数の 2/3 に対応する kJ あるいは kW 数），その光エネルギーを全方位に向けて放出している（図 5-1）。地球は太陽から約 1.5 億 km (8.3 光分) も離れているために，地球（大気圏外）にまで到達するときにはそのエネルギーは，一平方メートル当たり毎秒 1.4 kJ にまで低下している。大気を通る間にその光はさらに散乱や吸収を受けて，地表面ではたかだか 1 kJ/m²s になる（中緯度の日本では夏の昼間でもそれ以下になる）。

太陽の表面温度は約 5,500°C であり，放射される光のスペクトル（太陽スペクトル）は，約 5,800 K の黒体放射によるものに近い。黒体放射は物理学的現象なので，太陽スペクトルも通常は，横軸を波長にして縦軸を物理量のエネルギー単位で表されるている。しかし，光合成における光エネルギーの化学エネルギーへの変換は光化学反応であるので，「光の吸収は光量子単位で起こる」という光化学第二法則に則って，縦軸は光子数で表すのが望ましい（図 5-2）¹⁾。400 nm の光は 800 nm の光の 2 倍のエネルギーを持っているので，縦軸をエネルギー単位で表した太陽スペクトルは，短波長側で過大評価を受けることになる。太陽の光は地表面では，波長が 500 nm あたりの光がエネルギー

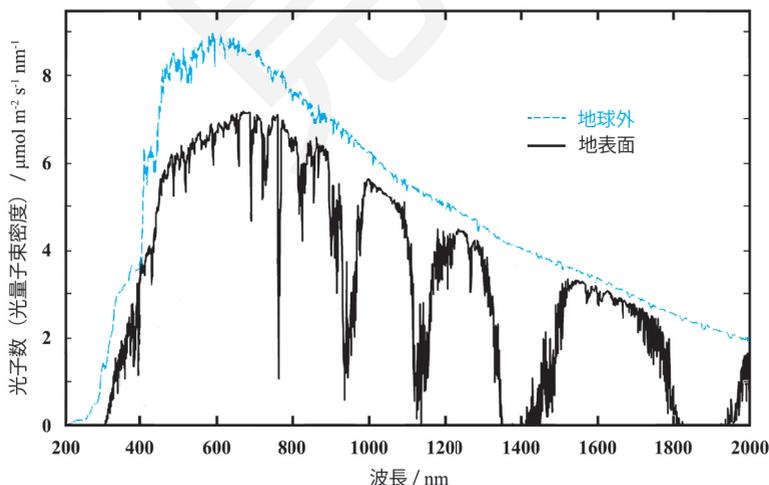


図 5-2 太陽スペクトル

6 物質変換（生物有機金属化学）

はじめに 酵素が行う種々の物質変換において、有機金属化合物（本章では、狭義の金属-炭素結合を有する化合物の他、広義の金属ヒドリド化合物や窒素分子が配位した化合物も含める）が重要な役割を果たしているものが多く知られている。例えば、水素分子の酸化を触媒するヒドロゲナーゼの活性中心に存在する鉄原子には一酸化炭素が配位しており、その反応活性種として金属ヒドリド化合物が提案されている。また、コバルト-炭素結合を有するビタミン B₁₂ はメチルコバラミン依存のメチル基転移反応、種々の酵素反応に関与している。このような研究分野は、生物有機金属化学 (Bioorganometallic Chemistry) と呼ばれ、近年著しい発展を遂げている。本章では、その中でも特に進歩の速い、ヒドロゲナーゼ、ニトロゲナーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、およびビタミン B₁₂ とそのモデル研究に焦点を絞って解説する。

6.1 ヒドロゲナーゼ、ニトロゲナーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ

水素分子 (H₂)、窒素分子 (N₂)、および一酸化炭素分子 (CO) は、生物学的にも化学工業的にも重要な化合物である。これらの小分子は、酸化還元を伴う活性化により、エネルギー源として、また有用物質の原材料として利用可能となる。地球の誕生以来、高度に洗練された自然界は、ヒドロゲナーゼ、ニトロゲナーゼ、および一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (CODH : carbon monoxide dehydrogenase) に、これら小分子の活性化を託し、地球上の物質変換システムの一部を担わせてきた。これら 3 つの酵素はいずれも鉄と硫黄を含む特異な活性中心を持ち、その構造および電子状態を巧みに制御して特異的な機能を発現している。6.2 から 6.4 項では、これら 3 つの酵素に着目し、その構造と機

能発現機構，およびこれら酵素の機能モデル研究について概説する。

(1) ヒドロゲナーゼとそのモデル

1) ヒドロゲナーゼの構造と機能

ヒドロゲナーゼは水素分子の酸化，水素分子の発生，および水素化反応を触媒する酵素である¹⁾。ヒドロゲナーゼは，活性中心にある金属原子の種類により，[NiFe]，[FeFe]，および[Fe]ヒドロゲナーゼの3種に分類される（図6-1）¹⁻⁴⁾。これらの活性中心構造はその機能にも影響を与え，[NiFe]ヒドロゲナーゼは水素分子の酸化，[FeFe]ヒドロゲナーゼは水素分子の発生を主に触媒する傾向にあり，

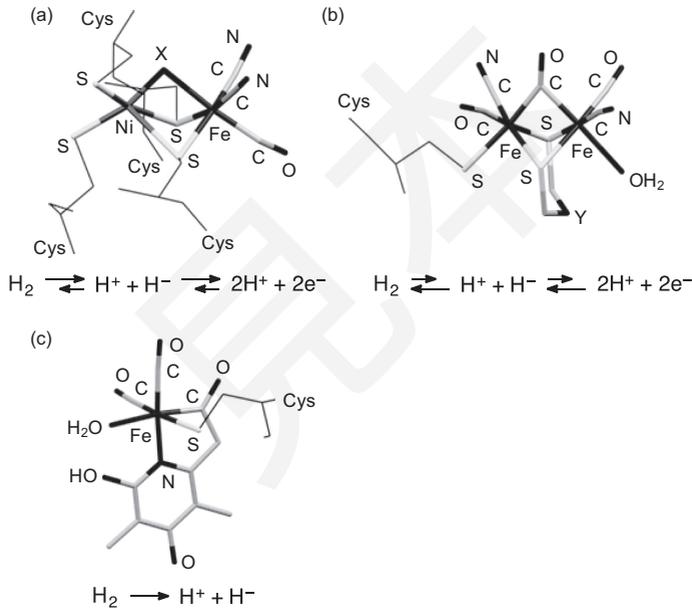


図6-1 [NiFe]，[FeFe]，および[Fe]ヒドロゲナーゼの活性中心構造と触媒する反応

- (a) [NiFe]ヒドロゲナーゼ (X = H, OH, O²⁻ など) の活性中心の構造と触媒する反応²⁾。[NiFe]ヒドロゲナーゼは水素分子の酸化 (右向きの反応) を主に触媒する。
- (b) [FeFe]ヒドロゲナーゼ (Y = CH₂, NH, O) の活性中心の構造と触媒する反応³⁾。[FeFe]ヒドロゲナーゼは水素分子の発生 (左向きの反応) を主に触媒する。
- (c) [Fe]ヒドロゲナーゼの活性中心の構造と触媒する反応⁴⁾。[Fe]ヒドロゲナーゼは水素化反応を触媒する。

細線はアミノ酸残基を示す。Cys: システイン。

7 加水分解

はじめに タンパク質（ポリペプチド）と核酸（ポリヌクレオチド）は、アミノ酸やヌクレオチド（またはデオキシヌクレオチド）を基本単位（モノマー）とする生体高分子であり、それ自体で生体を構成する重要な成分となるほか、オリゴペプチドが生体内での情報伝達物質として作用し、またオリゴヌクレオチドがリボザイムとして酵素活性を示すなど、幅広い分子量において生物活性を示す化合物として、生命活動の根底を担っている。

タンパク質や核酸、糖鎖、脂質などの生体高分子の分解反応は、生体にとって重要な化学反応である（図 7-1）。その反応を触媒するのが、アミド、カルボン酸エステル、リン酸エステルなどを加水分解する加水分解酵素である。例

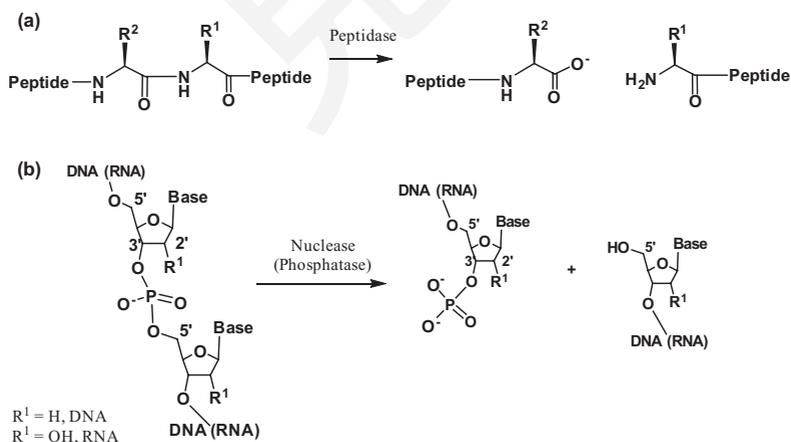


図 7-1 ペプチド (a) と核酸 (DNA と RNA) (b) の加水分解反応

えば、タンパク質やペプチドを加水分解するプロテアーゼは、主にセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、そして金属プロテアーゼ（メタロプロテアーゼ）の4つに分類される。また、DNAやRNAのリン酸ジエステル（ホスホジエステル結合）の加水分解は、デオキシリボヌクレアーゼ（またはDNase）やリボヌクレアーゼ（RNase）によって触媒される。本章では、これらの中で金属を含む加水分解酵素を中心に解説する。

7.1 亜鉛酵素とモデル

7.1.1 亜鉛酵素の活性中心構造

金属プロテアーゼは、亜鉛、マグネシウム、鉄などの金属イオンが活性中心として機能しており、その中でも亜鉛がよく使われている。亜鉛は、自然界で鉄の次に多い必須元素であり、人体に体重60 kgあたり約2 g存在し、全ての生体の成長や発達に必要である。生体内における亜鉛は+2価イオンとして存在し、その比較的小さい半径（0.65 Å）に比べて電荷が集中しており、カルボン酸やリン酸などのアニオンと結合する。また、銅やニッケルと同様強いルイス酸性を示し、また亜鉛(II) (Zn^{2+}) イオンが酸化還元的に不活性であり、ラジカル反応を起こさないという特徴がある。さらに Zn^{2+} イオンは電子配置が d^{10} であるために $d-d$ 遷移に由来する吸収がない。また、亜鉛錯体は結晶場理論による支配が弱く、決まった配位構造がないので、配位数と幾何学的配位構造の自由度が大きい。酵素中の亜鉛イオンは四面体構造をもつことが多く、わずかに歪んでいるので、亜鉛のルイス酸性が強くなり、その結果として亜鉛イオンの配位水の酸性度も高くなっている。HSAB (Hard and Soft Acid and Base) 則によると、亜鉛の酸性は、硬い酸と軟らかい酸の境界にあるため、酸素 (Asp, Glu, H_2O)、窒素 (His)、硫黄 (Cys) と結合できる。また、配位子交換速度が速いため、触媒回転効率が高い、という特徴もある。さらに、亜鉛酵素の選択的阻害剤は、薬剤としてだけでなく亜鉛酵素の機能解析のためにも非常に重要なツールである¹⁻³⁾。

亜鉛加水分解酵素には、アミドを加水分解するサーモリシンやカルボキシペプチダーゼのようなペプチダーゼ、ペニシリンの四員環 β -ラクタム構造を分解する β -ラクタマーゼ、コラーゲンのような細胞外マトリクスを分解するメ

8 人工金属酵素

はじめに 生体内の化学反応の大半は、酵素が介在し、反応速度、基質選択性、生成物の立体等が制御されている。既知の酵素の約30%は金属が関与し、その多くは活性中心に位置し、反応の主人公として振る舞っている。かつてはブラックボックスであった酵素のしくみも、近年の機器分析の飛躍的な進歩によって、次々に明らかとなり、従来の有機化学や錯体化学の知識を動員することによって、酵素の構造と反応性の相関も理解可能な時代を迎えている。実際、これまでに数多くの金属酵素の精巧な機能が解き明かされ、生物無機化学はある意味、円熟期に達している。したがって、次の生物無機化学の目標の1つは、これまでに得られた天然の金属酵素の知見をもとに、我々が手を加えて酵素の改変を実施し、高活性・高選択性を有する生体触媒の創製、あるいは天然の機能とは異なる反応を司る酵素への変換を試みることである。さらに最近では、単に既存のタンパク質の化学変換（化学修飾や遺伝子工学による変異導入）だけでなく、生体内には存在しない金属錯体を有する人工生体触媒の設計と創製の試みも始まっている。本章では、単に遺伝子工学的技術のみを用いた金属酵素のアミノ酸変異導入に基づいた研究例は省略し、非天然の金属錯体とタンパク質との組み合わせによるハイブリッド型の人工金属酵素に焦点をあてて紹介する。¹⁻³⁾

8.1 金属錯体とタンパク質のハイブリッド化

天然に存在する金属酵素は、大きく分けて2種類存在する。1つは金属イオンが直接タンパク質のアミノ酸残基と配位結合を形成し、金属酵素として機能するタンパク質である。もう1つは、補欠分子族(以下この章では補因子と記す)

と呼ばれる非アミノ酸からなる配位子によって形成される金属錯体（例えばヘムやコバラミン）がタンパク質内に結合し、酵素活性を示すタンパク質である。これらはいずれも、金属イオンあるいは金属錯体だけでは、水中での活性は全く示さないか、あるいは非常に活性が低く、タンパク質との共同効果によって、初めて酵素としての高い活性を獲得する。したがって、タンパク質が形成する反応場の提供は触媒反応の進行に必須であり、金属錯体が反応の中心を演じるとしても、周囲のタンパク質が形成する環境がどのように反応に寄与しているかは、極めて重要な事項である。特に補因子とタンパク質の複合化（ハイブリッド）によって得られる金属酵素（ホロ酵素）の場合には、金属錯体が第一配位圏、それを取り囲むタンパク質のキャビティーを第二配位圏と見なすことが可能である（図 8-1）。それぞれの構造とお互いの相互作用の様式が、触媒反応の反応性のみならず、基質の選択性や生成物の立体制御に大きな影響を及ぼしている。また、タンパク質キャビティーの中への金属錯体の挿入方法も人工金属酵素の設計上、重要なポイントとなる。

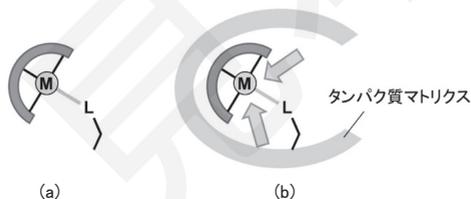


図 8-1 金属酵素の模式的構造

(a) 金属錯体を含む第一配位圏, (b) タンパク質のキャビティーが提供する第二配位圏と金属錯体

次に、金属錯体とタンパク質のハイブリッド化には、大きく分けると3つの方法がある（図 8-2）。以下に、それぞれの特徴を簡単に記す。

1) 天然の補因子が結合する部位への非天然金属錯体の挿入

該当する代表的な例の1つはヘムタンパク質である。ポルフィリン環を配位子として有するヘム（ポルフィリン鉄錯体）が、ヘムポケットと呼ばれるタンパク質のキャビティー内に固定化されている。特に、図 8-3 に示すヘム *b* は、非共有結合・配位結合でヘムポケットに固定化されているため、天然のヘムを

9 センシング

はじめに 生物無機化学の主要な研究対象の1つである金属タンパク質は、生物の物質代謝、エネルギー代謝に重要な役割を果たしているのみならず、情報伝達においても欠くことのできない役割を担っている。本章では、シグナルセンシング、ならびにシグナル伝達反応に関与する代表的な金属タンパク質を紹介し、それらの構造と機能について解説する。

9.1 センサータンパク質による生物の外部環境応答

様々な外部環境の変化に曝された中で、生物が恒常性を保って生育していくためには、外部環境の変化を感知し、その変化に応答して様々な生理機能を制御する必要がある。そのためには、外部環境変化（外部環境シグナル）を感知するためのセンサーと、センサーが感知した外部シグナルに応答して生理機能を制御するレギュレーターが存在が必要不可欠である。生物におけるこのような外部シグナル応答系には、センサーとレギュレーターが異なる分子から構成されているもの、同一分子がセンサーとレギュレーター双方の機能を有しているもの、どちらのシステムも存在している。

生物においては、遺伝子レベル（転写レベル、あるいは翻訳レベル）、タンパク質レベル（タンパク質の活性・機能制御）、細胞レベル（細胞の運動性（走化性）等の制御）といった、それぞれ異なった階層レベルで機能する外部シグナル応答系が存在している。代表的な外部シグナル応答系の概略を下記に示す。

9.1.1 外部シグナルに応答した遺伝子発現制御

遺伝子レベルでの外部シグナル応答系の代表的なものとして、外部シグナル

応答型の転写調節因子（転写を活性化するアクチベーター（転写活性化因子）、転写を抑制するリプレッサー（転写抑制因子）の二種に大別される）がある。外部シグナルのセンシングと転写制御を同一分子で行っているセンサー型転写調節因子では、外部シグナルを感知するためのセンサードメインと、標的 DNA の認識・結合に関与する DNA 結合ドメインが同一分子中に存在している。センサー型転写調節因子とは異なり、外部シグナルのセンシングと転写制御が別々の分子で行われている例も多い。その場合は、外部シグナルを感知するセンサータンパク質から、転写調節因子として機能するタンパク質への分子間シグナル伝達反応により転写調節因子の機能が制御され、外部シグナルに応答した遺伝子発現制御が達成される。

外部シグナルに応答した翻訳反応（メッセンジャー RNA (mRNA) を鋳型とするタンパク質合成反応）制御系の存在も報告されている。本系では、センサー機能を有する mRNA 結合タンパク質の RNA 結合活性が、外部シグナルの有無により制御されることにより、外部シグナルに応答した翻訳反応制御が達成されている。

9.1.2 二成分情報伝達系^{1,2)}

二成分情報伝達系（two-component signal transduction system）は、原核生物である細菌をはじめ、真核生物であるカビや高等植物にも存在している代表的な生物の細胞内情報伝達システムの1つである。基本的な二成分情報伝達系は、外部シグナルに対するセンサーとして機能するヒスチジンキナーゼ（HK）と、シグナルに対応した応答反応制御に関与するレスポンスレギュレーター（RR）の二種類のタンパク質から構成される。HK が感知する外部シグナルは、非常に多岐に亘っており、酸素、アミノ酸、糖、金属イオンなどの化学的シグナル（分子性シグナル）に対するセンサーとして機能する HK、および浸透圧、光などの物理的シグナルのセンサーとして機能する HK など、多種多様な HK の存在が知られている。一方、RR は外部シグナルに応答した生理機能制御に直接関わっているタンパク質であり、RR が転写調節因子として機能する場合が多い。RR が転写調節因子である場合には、HK が感知した外部シグナルに応答した遺伝子発現の制御により、外部環境変化への応答に必要な一連のタンパク質の

10 イメージング

はじめに 2008年および2014年のノーベル化学賞は蛍光イメージングに関する内容であった。双方の研究内容ともに1990年代に発展したイメージング技術に関するものである。これらの研究以前の1970年代および1980年代に、細胞内イメージングが Ca^{2+} 蛍光プローブの開発によって生物学研究に用いられるようになった。現在では蛍光イメージングは生物学研究においてどこの研究室でも使われる技術となっている。この、技術発展の経緯を簡単にひもとき、この分野における生物無機科学研究（特に Ca^{2+} 研究）が与えたインパクトを紹介したい。特に、 Ca^{2+} のキレート現象を読み取り可能な分光情報に置き換える分子プローブの設計により、イメージング研究の端緒が拓かれた。この研究は特異的分子認識を生物応用した最初の研究例である。

10.1 染色法 (Staining) からイメージング (Imaging) への発展

可視化解析の有用性を示す研究は、19世紀末にスペインの神経解剖医学者の Santiago Ramon y Cajal によって、固定化脳を用いた脳神経細胞の染色によるネットワーク解剖解析によって端緒が開かれた¹⁾。当時、ヨーロッパではドイツを中心に藍染を目的とした合成染料の開発が盛んに行われていた。この化学材料である色素の神経細胞ごとの染まりやすさを指標に各神経の染め分けを行い、当時ドイツやオランダで発展してきた顕微鏡技術を用いて、固定化した組織を観察し、詳細なスケッチとして描写される研究が展開された。この結果は現在でも受入れられる精度の解析であり、神経細胞の分類が初めて行われ、神経細胞のかたちと神経ネットワークの構造が初めて可視化して示された。この結果、脳内における神経機能について、はじめて生物試料としての研究素

材が提供されるようになった。Ramon y Cajalはこの顕微鏡観察結果をもとに、神経細胞接合部におけるニューロン説を提言し、現在の神経科学の基を確立した(1906年ノーベル賞受賞)。特にC. Golgi(同じく1906年ノーベル賞受賞)とのニューロン説における論争(Golgiは網状説を主張)は有名であるが、後にニューロン説に軍配が上がり、可視化解析の有効性が実証された。

20世紀半ば頃からは、放射性同位体を用いた可視化手法が汎用されるようになり、主に細胞生物学研究に貢献するようになった。特に、George Paladeらによるゴルジ体や小胞体などの細胞内小器官の機能特定の研究が有名である²⁾。

染色法の発展型として、生きた状態での機能解析手法である蛍光バイオイメージングがはじまったのは1960年代後半以降である。蛍光色素と当時発達してきた初期の蛍光顕微鏡とカメラを用いて、より感度の良い可視化技術が開発されたのである。この時代、Amiram Grinvaldらによる電位感受性色素を用いて細胞膜電位のバイオイメージングを行った例³⁾が有名であるが、色素ロードが難しく汎用技術にはならなかった。

10.2 無機イオンの蛍光イメージング

10.2.1 Ca^{2+} 蛍光プローブ

細胞膜電位の測定は古くから研究されている分野であるが、1970年代に観測ノイズの低減に革新的な進歩があり、特にErwin NeherとBert Sakmannらによるパッチクランプ法によってチャンネル1分子の開閉を詳細に解析可能となった⁴⁾。この技術はチャンネルの開閉だけでなく、反転電位の測定を行うことで、イオン種の区別を解析可能である。このために、1分子のイオンチャンネルタンパク質やその生理機能あるいは1細胞の電位変化を調べることを可能とし、パッチクランプ法へのノーベル賞授与(1991年)のみならず、他のノーベル賞受賞対象研究にも貢献した(例えば、2003年のイオンチャンネル機能解析⁵⁾)。

Ca^{2+} は受精や細胞増殖を始めとする広範な細胞機能の調節に関わっているセカンドメッセンジャーであり、その生理的な機能の解明には細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定し、様々な刺激に対する細胞応答と比較することが必要である。そこで、Roger Y. Tsienは1972年より Ca^{2+} キレーターであるEGTA(O,O'-Bis(2-

11

金属錯体による細胞機能制御

はじめに 生体で機能する多くの金属イオンは、タンパク質の形成する特異な反応場に結合することによって、様々な機能を発現する。それらの反応は、細胞周辺や内部で厳密に管理されている pH や基質濃度などに最適化されることによって、高活性、高選択性が達成される。一方、人工的に合成された金属錯体は、溶液中で天然の酵素が不可能な多くの反応を触媒する。このような人工的に設計された反応を細胞環境で実現できると、基質の恒常性制御、プロドランクの活性化、細胞表面修飾、細胞内タンパク質修飾、刺激応答型イメージング等、金属錯体のバイオテクノロジー分野への応用がますます広がると期待される。特に、これらの反応は生体直交型反応 (11.2.1 参照) のトリガーとして幅広く使われている光反応の使用が難しい場合や、副作用の多い医薬品の代替反応として威力を発揮すると考えられる。しかしながら、多くの人工金属錯体にとって、細胞環境は触媒毒として働く求核性の高い生体分子など様々な夾雑物が高濃度で存在するため、フラスコ内の理想的な環境で発揮される優れた触媒性能をそのまま維持することは極めて困難である。つまり、金属錯体の反応を細胞機能制御へと展開するためには、生理条件下で安定、かつ高活性であり、ターゲット以外の基質と反応しない高い選択性を有する触媒の設計指針を確立する必要がある。本章では、近年注目されている金属ナノ粒子や金属錯体触媒による細胞内の生体直交型反応と細胞機能制御に関する最新の研究について紹介する。

11.1 金属ナノ粒子

金属ナノ粒子の細胞輸送は多数報告されており、ミセルやペプチド、タンパク質複合体の利用が知られている^{1,2)}。しかし、溶液中で駆動される触媒反応

の活性を維持したまま細胞内へ送り込み、それらの触媒反応を駆動することは、触媒毒となるシステインやグルタチオン (Glutathione, GSH) などが求核剤として高濃度で存在しているために難しい。Bradley らは、ポリスチレンのマイクロ微粒子 (MP) へ Pd^0 ナノ粒子を複合化することによりその問題を解決し、細胞内の固体触媒反応を実現した (図 11-1)³⁾。アミノ基で表面を修飾された MP には Pd^0 ナノ粒子の原料となる $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ が配位可能となる。次に、MP 表面に集積した $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ を架橋剤によって固定化後、還元することによって Pd^0 ナノ粒子がその表面で安定化される (図 11-1)。MP は約 500 nm の直径を有し、細胞内への薬物輸送などでも利用されている⁴⁾。実際に、 Pd^0 ナノ粒子を担持したマイクロ微粒子 (Pd-MP) を HeLa 細胞と反応させると、75%の細胞へ複数の Pd-MP が取り込まれ、細胞毒性も低いことがわかった。細胞内に Pd-MP とアリルカルバメートで保護されたローダミン 110 を共存させると、脱保護反応が促進されることを蛍光強度の増大により確認した。この Pd-MP を用いると、 Pd^0 の代表的な触媒反応である鈴木-宮浦カップリング反応も細胞内で進行する。MP の高い生体適合性の利用により、Pd-MP をゼブラフィッシュの胚に埋め込むと、個体中でも毒性を示すことなく触媒反応を促進することもわかった。

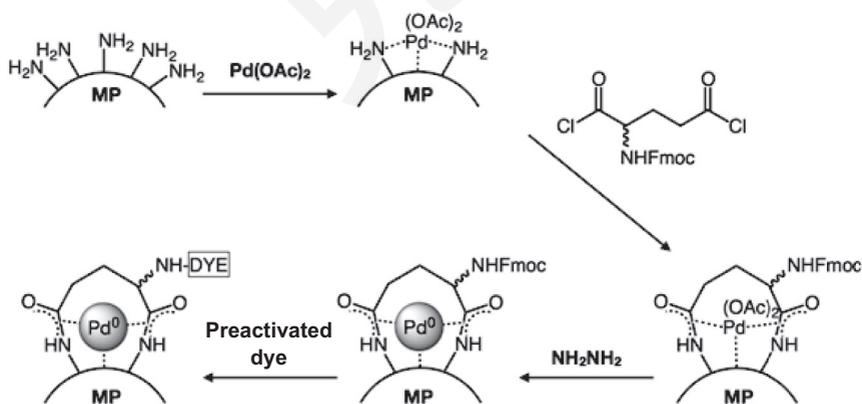


図 11-1 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ を用いた Pd-MP の合成

12 医薬品

はじめに 薬として紀元前の古代(6000年前)から生薬が使われてきたが、この中には鉱物(金属酸化物・硫化物等)も含まれていた。古代メソポタミアや古代エジプトでは水銀、マグネシウム、鉄化合物を梅毒、胃腸障害、貧血の治療に使っていた。中国では3世紀に著された神農本草経の12%は鉱物薬が使われていた。金属塩を薬として使用したのは、16世紀初めに化学を医学に持ち込んだ錬金術師パラケルススが水銀、アンチモン、ヒ素、銅等の金属塩を治療薬として用いたのが最初であり、この潮流は1910年エールリッヒの世界で最初の薬(化学療法剤)サルバルサン(アルスフェナミン)の発見につながっている。薬開発実験を担当したのは日本人(秦)であった。ちょうどスイスの化学者ウェルナーが配位化学を提案した頃である。サルバルサンはアゾ色素のN=Nをヒ素Asに変えたAs=As化合物と考えられていたが、約100年後の2005年にAs-Asの環状構造の混合物であることが判明した¹⁾。

薬と毒は紙一重と言われるように無機元素の毒性も古くから知られており、古代ローマやギリシアではヒ素が毒薬として使われた。1968年のメチル水銀による水俣病、同年カドミウムによるイタイイタイ病と、金属塩の高い生体への作用は、公害問題として強く認識され、有機水銀薬の禁止、水銀濃度の規制、水銀の使用禁止、カドミウム減少米の開発等人々が安全に健康に暮らしていけるよう努力がなされている。これらの金属は、有害元素として扱われることが多いが、生物無機化学的には超微量生体必須元素と考えるほうが理にかなっている。すなわち、超微量でよい元素の過剰摂取のために起こった過剰症が公害である。薬害として1970年の薬害スモンは忘れてはならない事件であるが、尿中に排泄された緑色の鉄(III)錯体の同定をきっかけに原因となった薬(キ

ノホルム)が発見された²⁾ことは印象深い。

様々な金属イオンに生理活性が見られることを理解するためには、生命と金属イオンとの関係を知る必要がある。生命は、海あるいは近年提唱された熱泥泉で溶媒である水に溶けた金属イオンの触媒反応によって形成された有機無機高分子を基に生まれたと考えられている³⁾。100年前には生命には関係のないものとされた無機が実は大活躍だったわけである。生命システムは誕生当時の環境(金属イオン濃度)を保持していると考えられ、細胞内は生命発生当時の嫌氣的(CO₂) 雰囲気には有利なMgが、細胞外は植物発生以降の好氣的雰囲気には有利なCaが多い⁴⁾。このため細胞核で働く遺伝子操作に必要な金属はMgであり、Caは逆に阻害剤となる。生命はすべての金属を正確無比に区別できないために、金属イオンを制御して環境を維持するために多大の努力ををらっている。

Fe, Cu, Zn等の遷移金属は微量(mg/kgオーダー以下)しかないにも関わらず、生体機能に大きく関与していることが認識されたのは、1961年にイラン、イラクのZn欠乏に伴う小人病がZn投与で劇的な改善が報告(図12-1)⁵⁾されてからである。

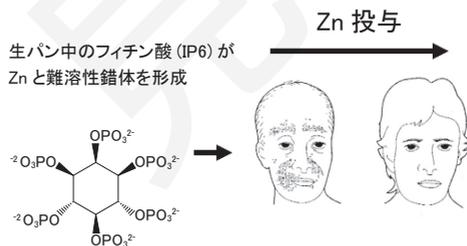


図12-1 最初に見出された亜鉛欠乏症

これは金属イオンが単独で作用するのではなく、タンパク質に結合して数オーダー以上触媒活性が上がるために、微量で事足りることによる。遷移金属と配位子の安定度定数は典型金属のそれと比べても数オーダー以上高く、遷移金属がタンパク質と、さらには基質とも結合できることが微量でも十分な活性を発揮することにつながっている。これに対し、Mg, Caの安定度定数は低く、