



金属イオンが生み出すちから

蒲池 利章 研究室～生物プロセス専攻



蒲池 利章 准教授

金属イオンは化合物と結合することによって、その化合物に特異的な性質を生じさせることがある。たとえば、私たちの血液中中に存在するヘモグロビンというタンパク質は鉄イオンを含み、酸素と結合したり、解離したりするという性質をもっている。蒲池研究室では、このような金属イオンを含む化合物を主に研究している。

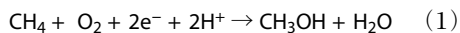
蒲池研究室では、メタノール合成の効率化と酸素濃度の測定法を、金属イオンを含む化合物を用いることで実現することを目標としている。本稿では、この二つの研究について紹介する。



メタノール合成の効率化を目指して

現在、石油は燃料として広く社会で使われている。ただ、原油価格の高騰に伴って、最近では石油に代わる燃料が必要となってきた。その一つとしてメタノールが挙げられる。メタノールは燃料だけでなく、数多くの化合物の合成原料としても使用することができるからだ。

現在、メタノールの合成には、メタンから高温下および高压下での二段階の反応が必要であるため、メタノールを合成するには多くの費用がかかる。蒲池先生はこの問題を解決するために、メタンからメタノールを合成する反応の効率化を目指す研究を行っている。この研究では、



の反応に用いられる触媒、メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) に注目している。

MMOは、メタン由来の炭素を利用して生きるメタン酸化細菌という微生物の中に、酵素として存在しているタンパク質である。一般的に、酵素は生体内のさまざまな化学反応の触媒として機能している。MMOには、メタン酸化細菌の細胞内に存在する可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) と、細胞内膜に存在する膜結合型メタンモノオキ

シゲナーゼ (pMMO) の二種類がある。sMMOについての研究はすでに構造と反応過程のどちらの研究も進んでいる。一方、複雑な構造をもつとされるpMMOについての研究はあまり進んでいない。そこで、メタノールを効率的に合成することを目指すと同時に、pMMOについての構造および反応過程についても先生は研究することにした。

これまでに、先生はpMMOについてさまざまな研究成果を出してきた。その過程で、pMMOをもとに独自の触媒を作成することは現在の段階では非常に難しいことが判明した。しかし、pMMOは式(1)の触媒として効率的に機能するため、未だ不明点の多いpMMOについての研究が将来のメタノール合成の効率化につながると先生は考えている。そこで現在は、pMMOの構造および反応過程について研究するだけでなく、pMMOを利用しつつ電子供給源を改善することによって、メタノールを効率的に合成するための研究も行っている。

先生がどのようにしてpMMOの構造および反応過程についての研究を進めているか、そして、その研究と並行して行っている研究についてこれから説明していくことにする。



膜結合型のMMO

はじめに、先生がどのようにしてpMMOの構造を解析したのかを説明する。タンパク質の構造を調べる際には、X線結晶構造解析という手法が多く用いられる。この手法では、タンパク質を結晶化した後にX線を照射し、X線の散乱や回折の様子からタンパク質の構造を特定していく。しかし、結晶化の段階でpMMOの触媒機能が無くなってしまふことが判明したため、触媒機能を有したままのpMMOの構造解析にX線結晶構造解析を利用することはできていない。そこで、さまざまな分析の過程からpMMOは金属イオンを含むタンパク質であることが判明していたので、先生は電子スピン共鳴法(ESR)と呼ばれる手法を用いて解析を行った。ESRとは、分子中の不対電子をもつ金属イオンとその周辺構造を解析する手法である。

一般に、磁場の影響下では、試料中の金属イオンの不対電子は特定の周波数のマイクロ波を吸収する性質をもち、同じ金属イオンでも磁場の強さの変化に応じて、吸収するマイクロ波の周波数が変化する。ESRでは、一定の周波数のマイクロ波を試料に照射し、磁場の強さを連続的に変化させながらマイクロ波の吸収量を測定した後、その変化率をグラフにする(図1)。金属イオンの種類によってグラフの形に違いが表れるため、グラフから金属イオンの種類を特定できる。

また、ESRでは、タンパク質内に同じ金属イオンが含まれている場合でも、その金属イオンの周囲の構造の違いによって、得られるグラフの形が異なってくる。したがって、グラフから金属イオンとその周囲の構造を同時に特定できる。

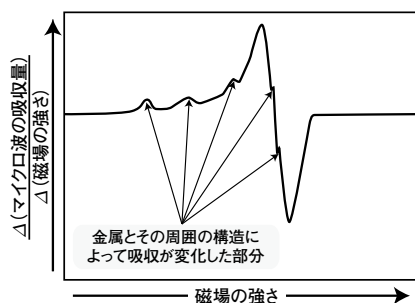


図1 ESRによって得られたグラフの例

ESRによる解析の結果、複数の銅イオンがクラスターとしてpMMO内に存在していることが判明した。クラスターとは金属イオンの集まりのことである。そして同時に、銅イオン二つからなるクラスターによってpMMOの触媒としての機能が促されていることも判明した。

さらに、先生はESRの結果から窒素原子が銅イオンのクラスターの周りに多く存在していることを発見した。この発見により、銅イオンのクラスターには、側鎖に窒素原子を含むアミノ酸であるヒスチジンが配位しているのではないかと先生は推測している。

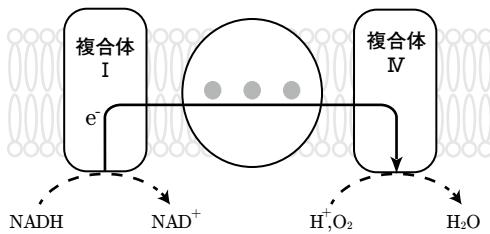
次に、どのようにして先生がpMMOに関する反応過程の研究を行ったのかについて説明する。式(1)の反応は電子のやりとりが行われる酸化還元反応である。先生はこのことに注目して、pMMOに関する反応の一部である電子の流れについて調べることにした。

生体に関する反応において、電子がタンパク質などの分子を介して伝達される一連の流れを電子伝達系と呼ぶ。先生は、pMMOに関する電子伝達系を研究する際に、すでに研究が進んでいて、資料が豊富にあるミトコンドリアの電子伝達系を参考にした。

ミトコンドリアやメタン酸化細菌は、電子伝達系の電子供給源としてNADHと呼ばれる化学物質をもっている。ミトコンドリアの電子伝達系では、NADHから直接電子を受け取る複合体Iというタンパク質をはじめとして、細胞膜内のさまざまなタンパク質を介して電子が伝達される(図2)。その際に、ミトコンドリアの内膜の内外に生じる水素イオンの濃度の差により、水素イオンがあるタンパク質を通して膜の内側に移動する。この移動した水素イオンを用いて、生物のエネルギーに関わるATPという化学物質が合成される。

先生は、ミトコンドリアの電子伝達系を参考にして、メタン酸化細菌の細胞膜内における電子伝達系に、複合体Iに類似するタンパク質が関わっていることを発見した。このタンパク質はNADHから電子を直接受け取るという点で複合体Iと類似している。また、メタン酸化細菌

ミトコンドリアの場合



電子は、NADHから複合体Iを経由して複合体IVに伝達され、水を合成する。

図2 ミトコンドリアの電子伝達系

の細胞膜に埋め込まれている pMMO だけを取り出して、それに NADH を加えた場合、pMMO は NADH から直接電子を受け取れないということを見つけた。

これらの発見から、先生は、複合体 I に類似するタンパク質が細胞膜内に存在し、電子を NADH から pMMO へ伝達する系の一つを担っていることを示した(図3)。複合体 I に類似するタンパク質からどのようにして pMMO に電子が伝達されていくのかを解明することが、これからの課題として挙げられる。最近では、先生はメタノールの合成の効率化を目指す過程で、新たな電子供給源の開発に向けての研究も行っている。

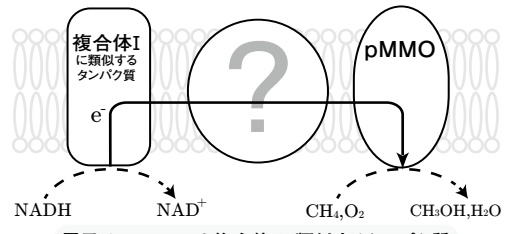
式(1)で表される、メタンからメタノールを

酸素センシング

先生は先ほど述べたような、メタノールの合成の効率化に関する研究以外にも、さまざまな研究を行っている。その一つに酸素濃度の測定に関する研究がある。一般に、酸素濃度の測定法は酸素センシングと呼ばれ、さまざまな種類の手法がある。先生が行った酸素センシングは、試料に塗布した色素に光を当てたときに発する光の明暗から酸素濃度を測定する手法である。この手法は細胞内の酸素濃度の測定などに利用される。

先生が行った酸素センシングの特徴は、対象物のある一点のみの酸素濃度を測定するのではなく、対象物の表面全体にわたって酸素濃度を同時に測定することである。つまり、酸素濃度を点ではなく面で測定することができるのである。

pMMOの場合



電子は、NADHから複合体Iに類似するタンパク質を経由する何らかの経路でpMMOまで伝達され、メタンからメタノールを合成する反応に使用される。

図3 pMMOに関する電子伝達系

合成する際の酸化還元反応では、触媒として MMO を利用している。反応物である酸素は空気中から供給でき、水素イオンは水から供給できる。この場合、水素イオンは副生成した水からも再供給できる。NADH が生物の体内で電子伝達系の電子供給源として存在していることは先ほど説明したが、現在では工業的にメタンからメタノールを合成する際にも同じ用途で用いられている。

しかし、NADH は高価であるため、工業的に使用するには多くの費用がかかる。そこで先生は、NADH に代わる安価な電子供給剤を開発することを目標としている。先生はこれまでも、ギ酸などの安価な有機化合物でも電子供給剤として利用できることを示しているが、現在ではさらに安価な電子供給源について研究している。

先生が行った酸素センシングでは、ポルフィリンと呼ばれる色素を特殊な励起状態にして用いる。ポルフィリンとは環状構造をもつ化合物であり、置換基が異なる複数の種類が存在する(図4)。ポルフィリンは、中心の窒素原子が金属に配位することで錯体を形成する性質をもつ。励起状態とは、ある化学物質が、エネルギーが最も低い状態である基底状態よりも高いエネルギーをもつ状態のことを指す。励起状態となった物質はすぐに基底状態に戻ってしまうのが一般的であり、ポルフィリンも例外ではない。しかし、ポルフィリンは金属に配位して錯体を形成することで、励起状態になってから、特殊な励起状態を経由して基底状態に戻るようになる。

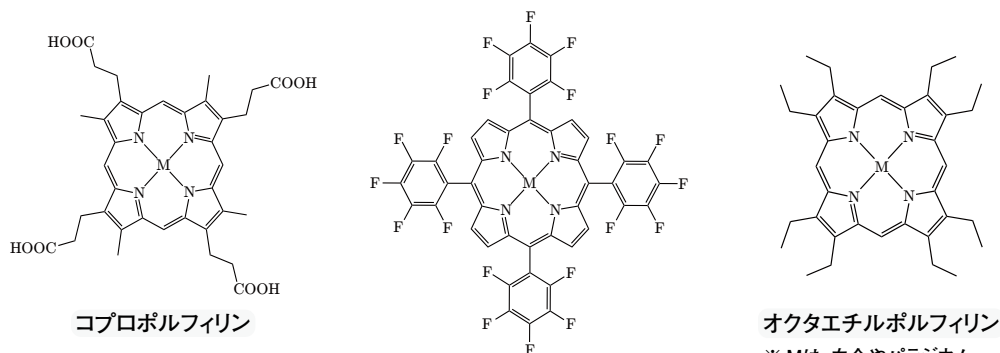


図4 ポルフィリンの構造例

※ Mは、白金やパラジウム、亜鉛などの金属イオンを指す。

ポルフィリンは特殊な励起状態のときの方が通常の励起状態のときよりも、より長い間励起状態を保つことが知られている。一般に、励起状態にある化学物質は基底状態にあるときよりも他の物質と相互作用を起こしやすく、空気中では酸素と相互作用する。ここでの相互作用とは、異なる物質間でのエネルギーの受け渡しのことである。しかし、通常の励起状態ではポルフィリンはすぐに基底状態に戻ってしまうため、酸素と相互作用を起こすことは難しい。一方、特殊な励起状態のときにはポルフィリンが長時間励起状態に留まるので、酸素との相互作用は通常の励起状態のときに比べて格段に起こりやすい。このことから、酸素センシングでポルフィリンを用いる場合、ポルフィリンを特殊な励起状態にする必要がある。

先生の酸素センシングの手法において、ポルフィリンには二つの注目すべき性質がある。一つは、金属と錯体を形成することにより、先ほど述べたような、特殊な励起状態を作り出せるという性質である。特に白金やパラジウムに配位したポルフィリンの場合、室温で特殊な励起状態から基底状態に戻るときにリン光と呼ばれる光を発する。リン光は、通常の励起状態から基底状態に戻るときに発する光である蛍光に比べ、発光する時間が長いという特徴をもっている。もう一つの性質は、特殊な励起状態にあるポルフィリンが特定の波長の光を吸収することである。この性質は特殊な励起状態にあるポルフィリンの変化量を吸光度の変化量として測定する際に利用される。

ポルフィリンを用いる酸素センシングの手法には大きく分けて二つの手法がある。一つは室温でリン光を発するポルフィリンを用いる手法で、も

う一つはリン光を発しないポルフィリンと二種類の光を併用する手法である。いずれの手法も特殊な励起状態にあるポルフィリンを利用するが、その利用法と手順は異なる。

まず、リン光を発するポルフィリンを用いる手法について説明する。はじめに試料の表面に、白金やパラジウムに配位したポルフィリンを散布、あるいは塗布する。次に光を照射してポルフィリンを通常の励起状態にまで引き上げると、ポルフィリンは特殊な励起状態を経由して基底状態に戻る。この間、光が照射され続けるので、周囲に酸素が存在しなければ、ポルフィリンはこの一連の流れを繰り返す。

一方、ポルフィリンの周囲に酸素が存在すると特殊な励起状態にあるポルフィリンは酸素と相互作用を起こすので、ポルフィリンがもっていたエネルギーは酸素に移動し、エネルギーを失ったポルフィリンは特殊な励起状態から基底状態に戻る。それと同時に、酸素と相互作用を起こさなかったポルフィリンはリン光を発しながら基底状態に戻る。一つのポルフィリンを観察すればリン光を発するか発しないかの二択が確認できるが、ポルフィリンを集合として観察すればリン光の明暗が確認できる。ポルフィリンの周囲に存在する酸素が多いほど移動するエネルギーは大きくなり、特殊な励起状態にあるポルフィリンの量が減るので、リン光の強度は小さくなる。つまり、リン光の強度を測定することで、その強度の大小から酸素濃度を測定できるのである。

リン光を利用する手法は多くの機器を用いる必要がないため手軽に行うことができる。しかし、室温でリン光を発するポルフィリンは、白金やパ

ラジウムなど現時点で確認されている種類が少ない。一種類のポルフィリンのみを用いて、あらゆる環境下で酸素濃度を測定することはできない。また、同じ環境下でもポルフィリンの種類や、それに含まれる金属の種類によって精度が異なる。よって、多種多様な環境下で、より高い精度の酸素濃度の測定を行うためには、より多くの種類のポルフィリンが使用可能な状態にあることが望ましいのである。

そこで、先生は室温でリン光を発しないポルフィリンを用いても酸素センシングができるような手法を開発した。これが二つ目の手法である。この手法には、より多くの種類のポルフィリンから状況に応じて酸素センシングに用いるポルフィリンを選べるという利点がある。

室温でリン光を発しないポルフィリンを用いる手法では、レーザー光を併用する。一定時間ごとに精確な量のポルフィリンを基底状態から励起状態まで引き上げるためには高密度のエネルギーをもつレーザー光が必要だからである。

酸素センシングにレーザー光を利用する手法は二つある。一つは、大型の機器を用いて短い時間で高出力のパルスレーザーを照射する手法である。この手法は、Pulse Laser法と呼ばれる。手順としてはじめに、レーザー光をポルフィリンが散布あるいは塗布された試料に一度だけ照射する。すると、ポルフィリンは通常の励起状態にまで引き上げられ、その後特殊な励起状態になる。次に、特殊な励起状態にあるポルフィリンの量が減少する過程で、特殊な励起状態のときのみ吸収される波長の光を照射し、その吸光する度合いを時間ごとに測定していく。吸光する度合いが減少して、ある値に収束するまでの時間から酸素濃度を測定していく。特殊な励起状態にあるポルフィリンのエネルギーが酸素に移動すると、特殊な励起状態のポルフィリンの量の減少速度が大きくなるため、収束までの時間が短いほど酸素濃度は大きく、反対に、収束までの時間が長いほど酸素濃度は小さいといえる。

もう一つはStationary quenching法と呼ばれる、CW(Continuous Wave)レーザーを利用する手法だ。CWレーザーは継続的にレーザー光を放つという点でパルスレーザーと大きく異なる。この手法は先生が新たに開発したもので、用いるCWレーザーの機器は小型であるため、大型機器のパルスレーザーに比べ、機器の持ち運びが容易であるという利点がある。CWレーザーを継続してポルフィリンに照射すると、酸素が存在しないところでは、ポルフィリンが通常の励起状態にまで励起され、特殊な励起状態を経由して基底状態に戻るといった一連の流れを繰り返す。一方、酸素が存在するところでは、酸素にエネルギーが移動するため、その分だけ特殊な励起状態のポルフィリンの量が減少する。その状態で、特定の波長をもつ光を試料上のポルフィリンに照射し、吸光度を測定する。酸素濃度が大きいところほど特殊な励起状態にあるポルフィリンの量は少なくなるので、特定の波長をもつ光の吸光度は小さくなる。

これまでは、リン光の明暗を利用する手法と、Pulse Laser法とStationary quenching法の手順やメカニズムについて説明してきた。リン光の明暗を利用する手法は、使用できるポルフィリンの種類は少ないが、手軽に測定を行うことができる。一方、Pulse Laser法とStationary quenching法は、レーザー機器の他に特定の波長をもつ光を照射する機器も使用するため、測定にはさまざまな準備が必要となるが、使用できるポルフィリンの種類は多い。この二つの手法の長所を生かしあって、細胞内など、特別な条件下の環境に対応した酸素センシングが可能になるのである。酸素センシングの研究は医学などさまざまな研究に応用できるため、非常に有用な研究だといえる。

先生は、これまで説明してきたような金属タンパク質や金属錯体の応用の他にも、さまざまな研究を行っている。たとえば、がんの治療についての研究や光を用いて水から水素を発生させる研究も行っている。これらの、先生が興味をもって行っている研究の今後に期待したい。

この度、蒲池先生から伺ったお話は私にとって、大変興味深いものでした。大変お忙しい中、度重なる取材や質問に快く応じてくださった蒲池先生

に、この場をお借りして心よりお礼申し上げます。蒲池先生のより一層のご活躍をお祈り致します。
(若林 優太)