

TAMRA/TAMRA 複合体形成を利用した
亜鉛酵素阻害剤の親和性解析

博士論文

2020年

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科

博士課程後期 薬科学専攻

医薬分子機能科学研究室

草本 寛

目次

略語一覧

1. 要約	1
2. 序論	5
3. 試薬・機器	9
3.1. 試薬	9
3.2. 装置	10
4. 本論	12
4.1. TAMRA 標識誘導体の調製と物性評価	12
4.2. TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の複合体の特性	15
4.3. Job's plot 法による錯生成定数の決定	17
4.4. TAMRA-ZnL に対するリガンドの親和性の決定	19
4.5. 亜鉛サイクレンに結合したチオレートの大気雰囲気下での安定性の測定	22
5. 結論	25
6. 実験項	26
6.1. TAMRA 標識サイクレンの調製	26
6.2. 可視吸収分析	31
6.3. 蛍光分析	36
6.4. 高速液体クロマトグラフィー分析	38
6.5. Job's plot の算出	48
6.6. TAMRA-ZnL/TAMRA-Cys 複合体に対する競合リガンドの親和性解析	49
7. 補足	51
8. 参考文献	65

謝辞

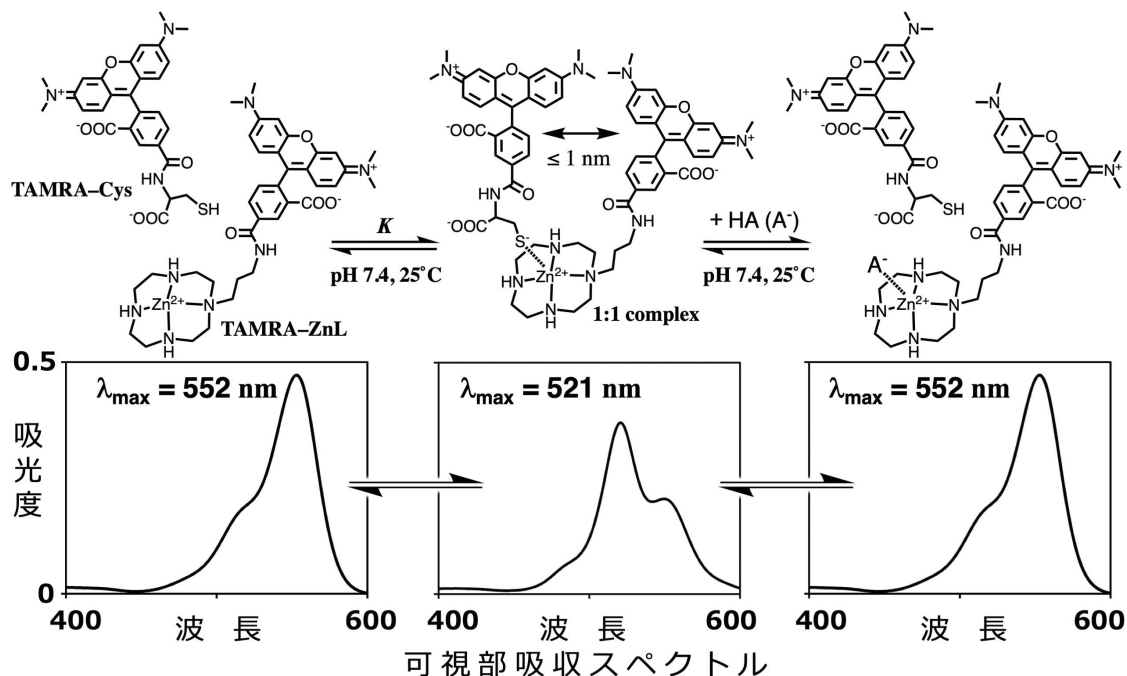
略語一覧

cyclen	サイクレン [1,4,7,10-tetraazacyclododecane]
L	リガンド, Ligand
ZnL	Zinc-binding cyclen Ligand
TAMRA	テトラメチルローダミン, Tetramethylrhodamine
NHS	<i>N</i> -ヒドロキシスクシンイミド, <i>N</i> -Hydroxysuccinimide
Cys	システイン, Cysteine
ACE	アンジオテンシン変換酵素, Angiotensin-Converting Enzyme
<i>K</i>	錯生成定数, Complex formation constant
<i>pK_a</i>	酸解離定数, Acid dissociation constant
λ_{\max}	吸収極大波長, Absorption maximum
λ_{em}	蛍光波長, Fluorescence spectrum
λ_{ex}	励起波長, Emission spectrum
TCEP	Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine
MF	モル分率, Mole Fraction
EDTA	エチレンジアミン四酢酸, EthyleneDiamineTetraAcetic acid
ECP	エノラーゼシステインペプチド, Enolase Cysteine Peptide
HPLC	高速液体クロマトグラフィー, High Performance Liquid Chromatography
TLC	薄層クロマトグラフィー, Thin-Layer Chromatography
<i>R_f</i>	移動比, 移動率, Flow Rate
NMR	核磁気共鳴, Nuclear Magnetic Resonance
IR	赤外分光分析, Infrared Spectroscopy
MS	質量分析, Mass Spectrometry
SOD	スーパーオキシドジスムターゼ, 超酸化物不均化酵素, SuperOxide Dismutase
DNA	デオキシリボ核酸, DeoxyriboNucleic Acid
RNA	リボ核酸, RiboNucleic Acid
CA	炭酸脱水酵素, Carbonic Anhydrase
ADH	アルコールデヒドロゲナーゼ, アルコール脱水素酵素, Alcohol DeHydrogenase

NAD ⁺ /NADH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド, Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADP ⁺ /NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
ALDH	アルデヒドデヒドロゲナーゼ, アルデヒド脱水素酵素, ALdehyde DeHydrogenase
HIV	ヒト免疫不全ウイルス, Human Immunodeficiency Virus
mRNA	メッセンジャーRNA, 伝令 RNA, messenger RNA
FRET	蛍光共鳴エネルギー移動, Fluorescence Resonance Energy Transfer
DTT	ジチオスレイトール, DiThioThreitol
2-ME	2-メルカプトエタノール, 2-MercaptoEthanol

1. 要約

【はじめに】 酵素は、酸化還元、転移、加水分解、除去付加、異性化、化学合成の6つに大別される化学反応の生体触媒である。酵素には金属イオンを活性発現に利用するものがあり、それらは金属酵素と呼ばれている。亜鉛イオンを必須因子とする亜鉛酵素は、上記6種類の酵素群すべてに存在している。それら亜鉛酵素に保持された4～5配位の亜鉛イオンは、水溶液中の亜鉛水和イオン（6～7配位）よりも強いルイス酸としての性質をもっており、活性中心に取り込まれた基質分子の分極を高めて、酵素反応を促進している。亜鉛イオンは、生体系では常に2+の酸化状態が維持されるため、酸化数の変化を伴う電子の授受は行わない。このような亜鉛イオンの特性が、シンプルなルイス酸触媒として幅広い種類の酵素に利用されている理由である。現在、亜鉛酵素の機能を抑制する配位性の阻害剤（錯体医薬）は、利尿薬、降圧薬、向精神薬、嫌酒薬、緑内障治療薬として使用されている。それら阻害剤の化学構造のデザインは、酵素反応の阻害率など分子全体のマクロ的な生化学的性質や既知の低分子亜鉛錯体の安定性順位などを基礎として進められてきた。本研究では、配位数の少ない亜鉛イオンと酵素阻害剤の相互作用の強さを配位結合の観点から比較検討することを目的として、亜鉛酵素の活性中心モデルである亜鉛サイクレン（ZnL：4配位亜鉛錯体）誘導体と阻害剤の親和性順位を比較検討する簡便な分析手法を開発した。



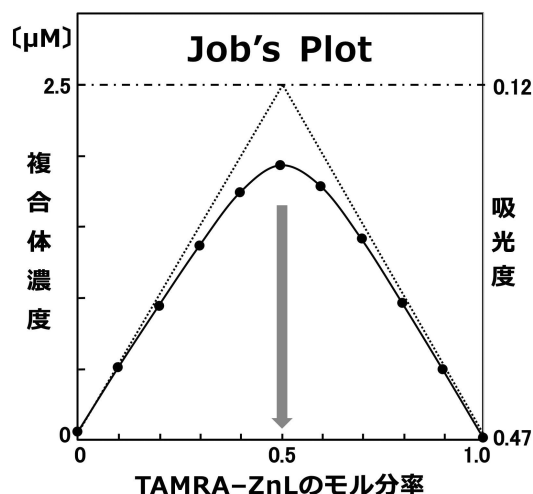
【実験方法】 カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA) の NHS エステルとアミノ基を持つサイクレン誘導体を CHCl_3 中で縮合反応させた後、アミノシリカゲルを担

体としたカラムクロマトグラフィーで精製し、TAMRA をもつ 4 座配位子 (L:TAMRA-cyclen) を合成した。TAMRA-cyclen の水溶液に 1 当量の塩化亜鉛を加えて亜鉛サイクレン誘導体 (TAMRA-ZnL) を調製した。受託合成した TAMRA 標識システイン (TAMRA-Cys) と TAMRA-cyclen を用いて、モル分率に依存した吸光度変化を pH 7.4 の水溶液中、25°C、0.10 M NaCl の条件下で測定し 1:1 TAMRA/TAMRA 複合体 (前頁図中央) の安定度定数: K [M^{-1}] を決定した。さらに、同条件下で阻害剤 (HA) を添加する競合実験を行い、阻害剤結合型亜鉛酵素モデル: TAMRA-ZnL-A⁻ (前頁図右) の安定度定数を検討した。

【結果と考察】

1) 1:1 TAMRA/TAMRA 複合体形成反応

赤紫色のテトラメチルローダミンを結合した亜鉛サイクレン (2.5 μ M TAMRA-ZnL) とアミノ基を TAMRA でラベル化したシステイン (2.5 μ M TAMRA-Cys) を生理 pH の水溶液中で混合すると、TAMRA の吸収極大波長が 552 nm から 521 nm (暗紫色) に大きく移動した (前頁図)。TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の吸収極大波長のモル吸光係数は、等しく $94,000 M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (pH 7.4, 0.10 M NaCl, 25°C) である。チオール化合物と亜鉛サイクレンが 1:1 錯体を形成



することは、以前の酵素モデル研究により明らかにしているため、この可視光吸収の変化は TAMRA 基の近接によるものと推測される。TAMRA 基の全濃度を 5 μ M とし、TAMRA-ZnL のモル分率 $\{[TAMRA-ZnL]/([TAMRA-Cys]+[TAMRA-ZnL])\}$ に対応した 552 nm の吸光度の Job's plot を上図に示す。吸光度が最も小さいとき、すなわち TAMRA/TAMRA 複合体の割合が最も大きいときのモル分率は 0.5 であった。この事実は、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys が 1:1 錯体を形成することを示している。また、その錯体の安定度定数 K ($= [TAMRA-ZnL]\cdot[TAMRA-Cys]/[TAMRA-ZnL][free TAMRA-Cys]$) は、 $(4.8 \pm 0.1) \times 10^6 [M^{-1}]$ である。すなわち、亜鉛イオンとチオレートは μ M 濃度以下でも配位結合を形成している。

2) アニオン性リガンド (第五配位子) の親和性

TAMRA-ZnL の第五配位座に競合的に結合するリガンドを上記と同様の分析試料に過剰量添加し TAMRA-Cys の解離にともなう吸光度を測定した。それらの吸光度変化から TAMRA-ZnL に対する各種リガンドの安定度定数を決定した。使用したアニオン性リガンドの種類とそれらの化学構造を次頁に示す。システイン、グルタチオン、カプ

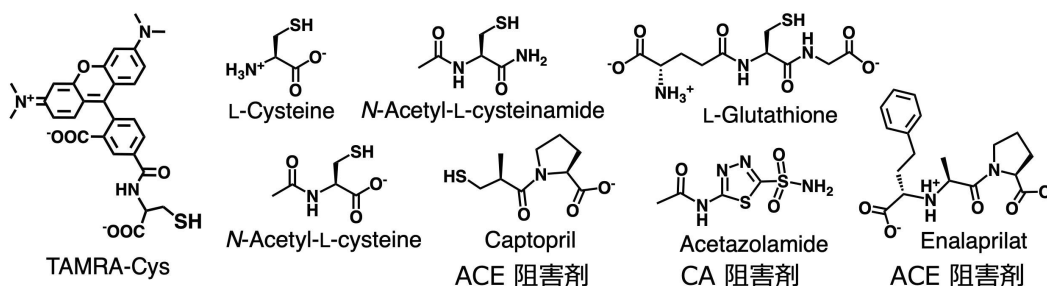
トプリルなどチオール基含有リガンドの安定度定数は、約 10^4 M^{-1} であった。一方、スルホンアミド系リガンドのアセタゾラミドとカルボン酸系リガンドのエナラプリラトは、チオール化合物に比べ顕著に低い $1/10 \sim 1/100$ の親和性を示した。

亜鉛に配位しないフリーのチオール化合物は、生理 pH の水溶液中で一部が酸解離型のチオレートになり、溶存酸素によりジスルフィドやスルフィン酸に酸化されることが知られている。TAMRA-Cys も同様に pH 7.4 の水溶液中 24 時間後には 62% がジスルフィド体へ酸化された。一方、溶液に過剰の亜鉛サイクレン (2 mM ZnL) を添加しておく、TAMRA-Cys のジスルフィド体の割合は、24 時間後でも 17% に抑えられた。この事実は、チオレートの強い亜鉛配位結合 ($\text{RS}^- \text{-ZnL}$) はイオン性が小さく共有結合性が大きいこと、すなわちチオレートの電荷は亜鉛イオンに強く引きつけられていることを示している。亜鉛サイクレンのこの性質は、チオールの酸化防止剤として利用できる。

阻害剤結合型亜鉛酵素モデルの安定度定数

第五配位子 (HA)	予測される亜鉛結合部位	安定度定数 K [M^{-1}]
TAMRA-Cys	S^- , O^-	4.8×10^6
L-Cysteine	S^- , O^- , NH_2	1.8×10^4
N-Acetyl-L-cysteinamide	S^-	1.2×10^4
L-Glutathione	S^- , O^- , O^- , NH_2	1.2×10^4
N-Acetyl-L-cysteine	S^- , O^-	1.0×10^4
Captopril	S^- , O^-	0.8×10^4
Acetazolamide	$\text{SO}_2\text{N}^-\text{H}$, $=\text{N}-$	2.4×10^3
Enalaprilat	O^- , O^- , NH	2.0×10^2

$$K = [\text{TAMRA-ZnL-A}^-] / [\text{TAMRA-ZnL}][\text{HA} + \text{A}^-]; 25^\circ\text{C}, \text{pH } 7.4, 0.10 \text{ M NaCl}$$



【結論】 本研究では、亜鉛酵素モデルに対する低分子リガンド（阻害剤の配位性官能基）の親和性を検討する簡便な可視吸光分析法を開発した。TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の 1:1 複合体の形成反応を利用して、配位性官能基の亜鉛酵素親和性を推定することができる。アニオン性官能基の中では、カルボン酸イオン < スルホンアミドイオン < チオレートイオンの順に亜鉛に対する親和性が高いことが明らかとなった。一般的に、酵素阻害剤には 10^6 M^{-1} より強い酵素親和性（解離定数 $K_d < 1 \text{ } \mu\text{M}$ ）が必要であ

る。しかし、上記アニオン性官能基は、いずれも $10^6 \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$ の親和性しかない。したがって、亜鉛酵素阻害剤の化学構造のデザインでは、亜鉛配位結合以外の分子間相互作用（疎水性相互作用や水素結合など）を持つ官能基の導入が不可欠である。それらの官能基は、ターゲットとなる亜鉛酵素に対する特異性にも寄与しなければならない。今後、本分析システムを利用して他の配位性官能基（ヒドロキサム酸やカルバミン酸など）の親和性を検討することで、亜鉛イオンへの親和性の系統的なデータが蓄積できると考えている。本研究成果は、亜鉛酵素活性中心の亜鉛イオンとリガンドとの配位結合を利用した次世代の錯体医薬のデザイン開発に役立つ化学情報を提供するものである。

【原著論文】 [Hiroshi Kusamoto, A. Shiba, M. Tsunehiro, H. Fujioka, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita and T. Koike, "A simple method for determining the ligand affinity toward a zinc-enzyme model by using a TAMRA/TAMRA interaction", *Dalton Transactions*, 47, 1841–1848 \(2018\).](#)

2. 序 論

亜鉛は周期表の第4周期12族に位置する、生体内で最も広汎に利用されているdブロック元素である。体重60kgの成人には約2g含まれ、O, C, H, N, Ca, P, S, K, Na, Cl, Mg, Fe, F, Siに次いで15番目の存在量を示す必須微量元素としてよく知られている。生体内では主に骨格筋、骨、皮膚、肝臓、脳、腎臓等に分布し、ほとんどがタンパク質をはじめとする高分子と結合して膨大な数の生理的機能を果たしている[1]。ヒトゲノムにコードされているタンパク質の約10%は亜鉛と複合体を形成すると考えられている。事実、細胞内亜鉛濃度はミリモルオーダーであるが、そのほとんどがタンパク質複合体であり、遊離亜鉛イオンとしてはナノモルレベルである[2]。亜鉛-タンパク質複合体が果たす生理的機能は、大きく4つに分けられる。①触媒機能（酵素の活性中心部位として、多くの酵素の活性に関与して様々な代謝反応に関わる）、②構造機能（ジンクフィンガータンパク質等、人体を構成するタンパク質の構造維持因子として働く）、③調節機能（免疫制御、 Zn^{2+} シグナル等、細胞内外でのシグナル因子として生体内での情報伝達に関わる）、④解毒機能（生体内に侵入した有害物質の除去に関わる）の4つである[3]。

酵素は生体内の化学反応に対し特異的な触媒として作用するタンパク質である。酵素には金属イオンを活性発現に利用するものがあり、それらは金属酵素と呼ばれている。亜鉛イオンを必須因子とする亜鉛酵素は、酸化還元酵素（オキシドレダクターゼ）、転移酵素（トランスフェラーゼ）、加水分解酵素（ヒドロラーゼ）、脱離酵素（リアーゼ）、異性化酵素（イソメラーゼ）、合成酵素（リガーゼ）の6種類に大別される酵素群のすべてに存在している[4,5]。これまでに3000種類以上の亜鉛含有タンパク質が同定されており、300種類以上の亜鉛酵素が知られている。生体内ではマグネシウムや鉄、銅等の様々な金属元素が酵素反応に利用されているが、上記の6種類全ての酵素群に含まれるのは亜鉛のみであり、他の金属元素にはない亜鉛の大きな特徴であると言える。亜鉛は生体系では常に2+の酸化状態が維持されるため、酸化数の変化を伴う電子の授受は行わない。亜鉛酵素に保持された4～5配位の亜鉛イオンは、水溶液中の亜鉛水和イオン（6～7配位）よりも強いルイス酸としての性質を持っており、活性中心に取り込まれた基質分子の分極を高めて、酵素反応を促進

している。このような亜鉛イオンの特性が、シンプルなルイス酸触媒として幅広い種類の酵素に利用されている理由である。

現在、亜鉛酵素の機能を抑制する配位性の阻害剤（錯体医薬）は、降圧薬、利尿薬、向精神薬、嫌酒薬、緑内障治療薬等として使用されている。ドラッグデザインの観点においては、亜鉛酵素に配位するリガンドとしてチオール基が古くから利用されてきた。チオール基含有薬物であるカプトプリル（1-[(2*S*)-2-methyl-3-sulfanylpropanoyl]-L-proline, 図1）は、メタロ- β -ラクタマーゼやアンジオテンシン変換酵素（ACE）のような亜鉛酵素の阻害剤としてよく知られている[6]。この他にも多様な機能を有する亜鉛酵素をターゲットとして、様々な疾患治療薬が開発されている。しかし、創薬の現場では活性中心の亜鉛イオンに関してはほとんど考慮されていないのが現実である。亜鉛酵素阻害剤の化学構造のデザインは、酵素反応の阻害率等の分子全体のマクロ的な生化学的性質や既知の低分子亜鉛錯体の安定性順位などを基礎として進められてきた。これからの低分子亜鉛酵素阻害剤の創薬においては、既存のマクロ的視点からだけでなく、化合物と亜鉛イオンそのものとの相互作用も考慮したドラッグデザインを行うことが大切になってくると考えられる。そこで、本研究では、配位数の少ない亜鉛イオンと酵素阻害剤の相互作用の強さを配位結合の観点から比較検討することを目的として、亜鉛酵素の活性中心モデルである亜鉛サイクレン（サイクレン= 1,4,7,10-tetraazacyclododecane, 図2）誘導体と阻害剤の親和性順位を比較検討する簡便な分析手法を開発した。

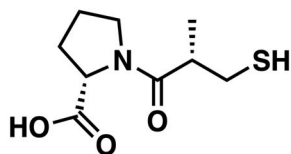


図1. カプトプリルの構造。

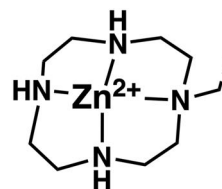


図2. 亜鉛サイクレンの構造。

著者の所属する研究室では、大環状テトラアミン亜鉛錯体である亜鉛サイクレン (ZnL: 四配位亜鉛錯体) が生理条件下でメタロ- β -ラクタマーゼ[7]や炭酸脱水酵素[8,9]のような亜鉛酵素の活性中心モデルとして機能することを報告した。このモデル研究において、チオレートおよびスルホンアミドアニオンを有するアニオン性亜鉛酵素阻害剤は、 CH_3COO^- および Cl^- アニオンと比較して亜鉛サイクレンの第五配位座に優先的に結合することを明らかにした。例えば、カプトプリル (R-SH) と ZnL の 1:1 錯体の錯生成定数

$$\left(K = \frac{[\text{R-S}^- \text{-ZnL}]}{[\text{フリーの R-SH}][\text{フリーの ZnL}]} \right) \text{ は pH 7.4, } 25^\circ\text{C} \text{ で } 10^{4.3} \text{ M}^{-1} \text{ であり, 一}$$

方, *N*-アセチルプロリンのカルボキシレート O^- アニオン (カプトプリルのチオールを含まない類似体, 図3), CH_3COO^- , Cl^- の K 値はそれぞれ $10^{2.0}$, $10^{1.7}$, $10^{1.3} \text{ M}^{-1}$ であった[7]。亜鉛サイクレン錯体のこれらの K 値は、炭酸脱水酵素に対する各種アニオンの錯生成定数の測定結果と同様の傾向を示した [10]。アニオンが結合した ZnL 錯体の K 値の計算は, ZnL とアニオン性配位子 (両者とも mM 濃度) を含む水溶液 (50mL) を用いた電位差 pH 滴定により行われた。pH 滴定法はチオール基の pK_a および K 値を決定する優れた技術であるが, 実験には数時間を要し, 超純粋窒素雰囲気下で行う必要がある。

核酸やペプチドといった生体分子の定量分析法として, 2つの蛍光色素を用いた蛍光/消光システムが多く開発されている[11,12]。これらのクエンチングシステムの中で, 一対の tetramethylrhodamine (TAMRA, 図4) を利用したプロテアーゼやレダクターゼの活性測定に応用されている[13,14]。TAMRA は可視領域に吸収波長ならびに蛍光波長を持つ蛍光分子であるが, TAMRA 二分子

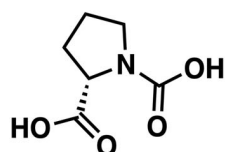


図3. *N*-Acetylproline の構造。

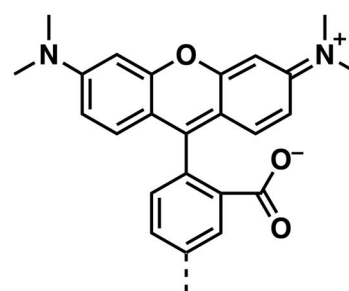


図4. TAMRA の構造。

が近接すると基底状態の TAMRA/TAMRA 複合体が形成され、可視吸収および蛍光スペクトルが大きく変化する。TAMRA を分析に用いる利点として、pH 5~9 の範囲で量子収率が一定していること、光退色に対する安定性が高いこと、可視光により励起できるため安全性が高いこと、および生理学的条件下で化学的に安定であり場の影響を受けにくいこと、といった点が挙げられる。

本研究では、分子間 TAMRA/TAMRA 複合体形成システムを利用して、亜鉛酵素モデルである TAMRA 標識亜鉛サイクレン (TAMRA-ZnL) に対するリガンドの親和性を検討する手法を開発した。本手法では、TAMRA-ZnL および TAMRA 標識 L-システイン (TAMRA-Cys) の基底状態複合体形成反応を利用して、亜鉛酵素阻害剤などの他のリガンドの結合定数を決定することができる。さらに、非標識亜鉛サイクレン (ZnL) は、生理的条件下でチオレート結合型 ZnL 複合体を形成することで空気酸化に対してチオール基を有意に安定化させることを見出した。

3. 試薬・機器

3.1. 試薬

N-Acetyl-L-cysteine, *N*-acetyl-L-cysteinamide, *N*-(3',6'-bis(di-methylamino)-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5- carbonyl)-L-cysteine (TAMRA-Cys)

trifluoroacetic acid salt : 渡辺化学工業株式会社 (広島)

Rhodamine B {[9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-

diethylammonium chloride}, captopril : 東京化成工業株式会社 (東京)

Acetazolamide {*N*-[5-(aminosulfonyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]acetamide}, L-glutathione (reduced form), L-glutathione (oxidized form), TCEP hydrochloride solution :

Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)

Enalaprilat {(1*S*)-1-[*N*-(1-carboxy-3-phenylpropyl)-L-alanyl]-L-proline dihydrate}, L-cysteine : 富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪)

5-Carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (TAMRA-NHS) : ChemPep Inc. (Wellington, FL, USA)

Zinc(II) chloride (99.999%) : Alfa Aesar (Heysham, Lancashire, UK)

Trifluoroacetic acid (TFA), 2,2'-{ethane-1,2-diylbis[(carboxymethyl)azanediyl]}diacetate disodium salt (EDTA), sodium perchlorate (NaClO₄), 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid (HEPES) : ナカライテスク株式会社 (京都)

An enolase cysteine peptide (Ile-Gly-Leu-Asp-Cys-Ala-Ser-Ser-Glu- Phe-Phe-Lys) : AnaSpec, Inc. (San Jose, CA, USA)

The dichloride salt of nonlabeled zinc(II)-cyclen (ZnL; 1,4,7,10-tetraazacyclododecane zinc(II) complex; Thio-tagTM chloride) : 株式会社ナード研究所 (尼崎)

薄層クロマトグラフィーにはシリカゲルプレート 60 NH₂ F₂₅₄S (no. 5533; Merck, Darmstadt, Germany)を使用した。カラムクロマトグラフィーにはアミノシリカ NH-DM 1020 (富士シリシア化学株式会社; 春日井) を使用した。

3.2. 装置

^1H (500 MHz) NMR スペクトル, ^{13}C (125 MHz) NMR スペクトル:

LA500 spectrometer (日本電子株式会社; 東京) を用いた。CDCl₃ 溶媒中, 25°C で測定を行った。内部標準には tetramethylsilane を用いた。

IR スペクトル:

FT/IR-4600 spectrophotometer (日本分光株式会社; 東京) を用い, 室温下で測定を行った。

質量分析 (positive mode):

UPLC mass spectrometer, ACQUITY UPLC H-Class system SQD2 (日本ウォータース株式会社; 東京) を用いた。m/z scan range は 50–1000 に設定した。

pH 測定:

pH メーター・LAQUA F-72 と pH 電極 9618-10 (株式会社堀場製作所; 京都) を用いた。pH 標準液 (pH 4.01 ならびに 6.86) を使用し, 25°C で校正を行った。

可視吸収スペクトル:

V-750 spectrophotometer (日本分光株式会社; 東京) を用いた。使い捨て 1 cm 角セル (Art.1961, Kartell; Milano, Italy) を使用し, 25.0 ± 0.1°C で測定した。

蛍光スペクトル:

FP-8300 fluorescence spectrophotometer (日本分光株式会社; 東京) を用いた。使い捨て 1 cm 角セル (Art.1961, Kartell; Milano, Italy) を使用し, 25.0 ± 0.1°C で測定した。

高速液体クロマトグラフィー：

JASCO Extrema システム（日本分光株式会社；東京）を使用した。RHPLC ポンプ（PU-4180），カラムオーブン（CO-4061）および UV 検出器（UV-4075）で構成される。カラムは逆相型カラム（CAPCELL PAK C18 ACR, 内径 4.6 mm × 150 mm）（株式会社資生堂，横浜）を使用した[15]。

4. 本 論

4.1. TAMRA 標識誘導体の調製と物性評価

TAMRA 標識サイクレンリガンド (TAMRA-L) は、アミノプロピル基を有するサイクレンとアミン反応性の NHS エステル誘導体化 TAMRA とのカップリング反応により合成した (実験項参照)。収率は 66% であった。室温下, 20 μM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl (pH 7.4) を含むバッファー溶液中, 等モル量の塩化亜鉛(II)と TAMRA-L を混合して, 50 μM の TAMRA 標識亜鉛サイクレン錯体 (TAMRA-ZnL) のストック溶液を調製した。ストック溶液は遮光し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。TAMRA-ZnL 複合体の溶液は, pH 5~11 の広い範囲で鮮やかな赤紫色を呈する。調製から 6 か月後でも TAMRA-ZnL の可視吸収スペクトルに変化はなく, TAMRA-ZnL は非常に安定な化合物である。チオレート結合亜鉛サイクレン錯体 ($R-S^-ZnL : L = 1,4,7,10\text{-tetraazacyclododecane}$) に関する以前の報告[16]を元に, 類似の構造を持つ TAMRA 結合亜鉛サイクレンの五配位構造 $\cdot R-S^-(TAMRA-ZnL)$ は図 5 のように考えられる。TAMRA-ZnL の水への溶解度は室温で約 100 μM であり, 一般的に使用されている分析機器で分析を行うことができる。20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl (pH 7.4) バッファー中の 5.0 μM TAMRA-ZnL の可視吸収スペクトルを図 6 に示す (実線 a)。吸収極大

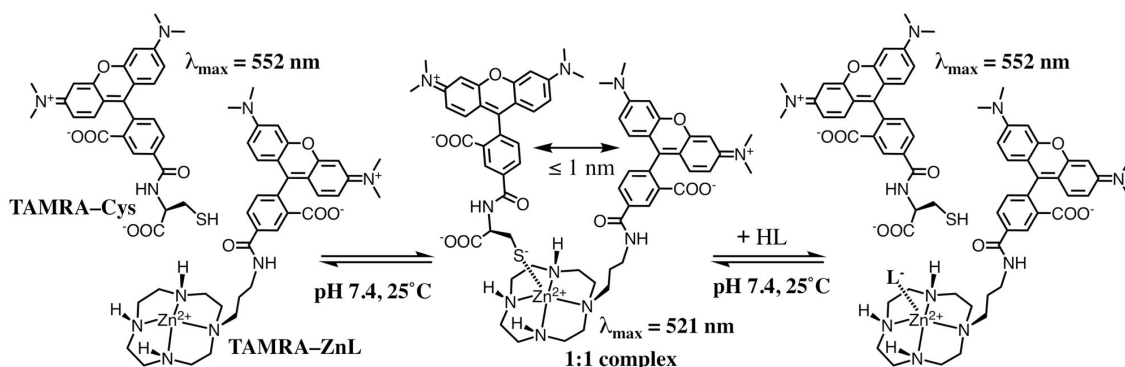


図 5. (左) TAMRA-ZnL, TAMRA-Cys 単体の構造。(中央) TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys は TAMRA / TAMRA 基底状態複合体を形成する。(右) リガンド HL は TAMRA-Cys と競合し, 亜鉛サイクレンの第五座配位子の交換反応が起こる。

波長 (λ_{\max}) は 552 nm に観察され、520 nm 付近に吸収の肩を示した。 [$\epsilon = (9.4 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]。 0~5.0 μM の濃度範囲において、TAMRA-ZnL の吸光度は濃度に比例した。同じバッファー溶液中の 5.0 μM TAMRA-ZnL の蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 521 \text{ nm}$) は、一般的なアミン結合 5-TAMRA 誘導体の蛍光スペクトルと似ており、580 nm 付近に蛍光のピークを示した (図 7, 実線 a) [17]。TAMRA-ZnL の蛍光強度も、0~5.0 μM の範囲において、濃度に比例した。同じバッファー溶液 (pH 7.4) 中、25°C、励起波長 542 nm での TAMRA-ZnL (5.0 μM) の量子収率は 0.37 ± 0.02 と求められた。

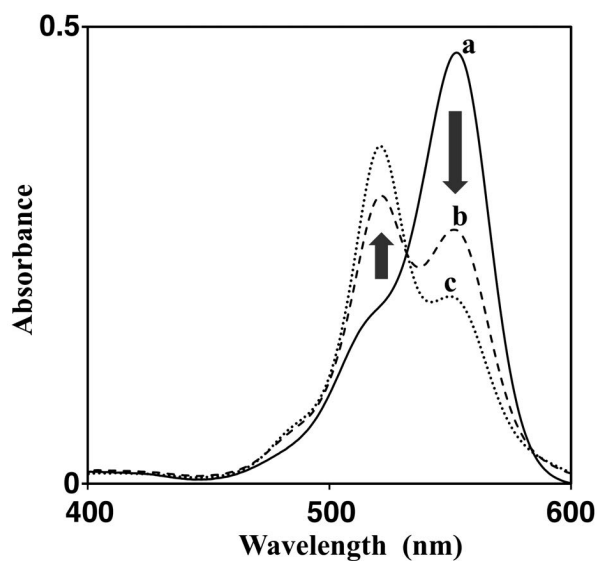


図 6. pH 7.4 (20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl), 25°Cでの可視吸収スペクトル。(a) 5.0 μM TAMRA-ZnL (実線), $\lambda_{\max} = 552 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。 (b) 3.5 μM TAMRA-ZnL と 1.5 μM TAMRA-Cys の 7 : 3 混合物 (破線)。 (c) 2.5 μM TAMRA-ZnL と 2.5 μM TAMRA-Cys の 1 : 1 混合物 (点線), $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$ (Abs. = 0.37)。

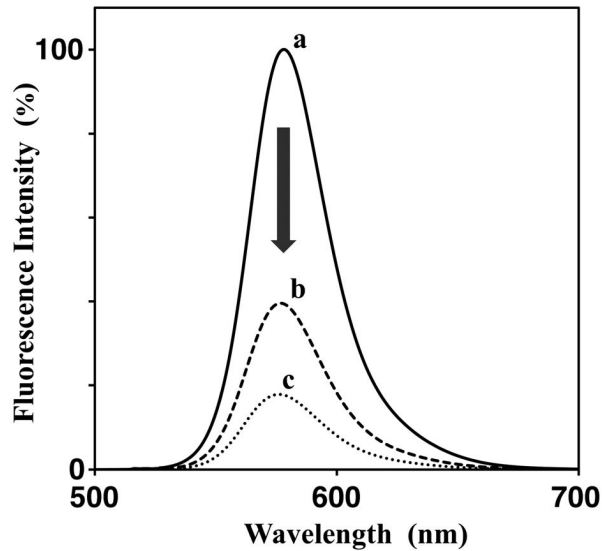


図 7. pH 7.4 (20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl), 25°Cでの蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 521 \text{ nm}$)。 (a) 5.0 μM TAMRA-ZnL (実線), $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$ 。 (b) 3.5 μM TAMRA-ZnL と 1.5 μM TAMRA-Cys の 7 : 3 混合物 (破線)。 (c) 2.5 μM TAMRA-ZnL と 2.5 μM TAMRA-Cys の 1 : 1 混合物 (点線), $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$ 。

市販の TAMRA 標識 L-システイン (TAMRA-Cys, 図 5 参照) の光学的特性についても, TAMRA-ZnL と同様に 20 μM HEPES-NaOH (pH 7.4), 0.10 M NaCl を含むバッファーを用いて測定した。還元型 L-システイン (SH 型) は空気酸化を受けて主にジスルフィド結合を形成するため[18], 50 μM TAMRA-Cys のストック溶液は測定の直前に調製した。5.0 μM TAMRA-Cys の可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルは, TAMRA-ZnL と同じ形状と強度を示した。吸収極大 (λ_{max}) は 552 nm に観察された。モル吸光係数 $\epsilon = (9.4 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。521 nm で励起した際の最大蛍光波長は 578 nm のままであった。励起波長 542 nm での TAMRA-Cys (5.0 μM) の量子収率は 0.37 ± 0.02 と求められた。したがって, TAMRA-Cys の光学的特性は同じ実験条件下において TAMRA-ZnL の特性と同一であった。

4.2. TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の複合体の特性

TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の混合サンプルの分光光度分析を、pH 7.4 のバッファ溶液を使用し、25°Cで行った。20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl (pH 7.4) のバッファ溶液を使用し、50 μ M TAMRA-ZnL と 50 μ M TAMRA-Cys のストック溶液をそれぞれ調製した。TAMRA-Cys 溶液には 0.50 mM TCEP も添加した。それらストック溶液は 4°Cで保存した。分析用の各濃度溶液は、ストック溶液を 20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl (pH 7.4) バッファで希釈して調製した。希釈には重量法を利用した。TCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine] は還元剤であり、TAMRA-Cys の空気酸化を防ぐ安定化作用を持つ[19]。TCEP を添加すると、室温下、空気中で 10 日経過後であっても TAMRA-Cys ならびに TAMRA-ZnL の可視吸収スペクトルと蛍光スペクトルには変化がなかった。分析サンプル溶液 (3.0 mL, pH 7.4) は、TAMRA 総濃度が 5.0 μ M となるように TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys を混合した。

TAMRA-ZnL のモル分率 ($MF = \frac{[TAMRA-ZnL]}{[TAMRA-ZnL] + [TAMRA-Cys]}$) が 0 または 1.0 から 0.50 に近づくと、TAMRA-ZnL の 552 nm の吸光度は減少し、520 nm 付近の吸収の肩部分の吸光度が増加した (図 6 参照)。MF = 0.50 のとき (TAMRA-ZnL および TAMRA-Cys それぞれ 2.5 μ M) に最も大きなスペクトルの変化が観察された。図 6 の点線 c は 1 : 1 混合溶液の可視吸収スペクトルを示している。図 6 c では 521 nm に吸収極大が観察され、TAMRA-ZnL のみの吸収ピーク (図 6, 実線 a) から短波長側へブルーシフトした。可視吸収スペクトルの顕著な変化は、チオレート結合複合体の形成と一貫性がある。サイクレン誘導体の亜鉛錯体の三次元構造に関する以前の研究から、サイクレンの窒素原子から伸びる側鎖は亜鉛イオンの第五座配位子と同じ方向に位置することがわかっている[8-10]。その結果を元に、TAMRA-Cys と TAMRA-ZnL は図 5 に示した構造をとっていると考えられる。TAMRA-Cys と TAMRA-ZnL の 1 : 1 複合体の分子モデルから、TAMRA 部位同士は 1 nm の程度まで近接していると推定した。

さらに、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys が複合体を形成した際の TAMRA/TAMRA 蛍光クエンチングの効率を調べた。吸収スペクトルの場合と同様に、521 nm で励起した際、578 nm における蛍光スペクトルの変化が最も大きくなったのは MF = 0.50 のときであった。TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の 1 : 1 混合物の蛍光強度 (図 7, 点線 c, 各 2.5 μ M) は、5.0 μ M TAMRA-ZnL (図 7, 実線 a) または 5.0 μ M TAMRA-Cys の蛍光強度の 18% であった。同じ実験条件下では、グルタチオンやカプトプリルなどの蛍光を持たないチオール性リガンド (5.0 μ M) は、TAMRA-ZnL (5.0 μ M) の可視吸収スペクトルや蛍光スペクトルに影響を与えない。

2つの TAMRA 基を持つペプチド[13]およびビス(TAMRA)ジスルフィド誘導体[14]を用いて、同様のスペクトル変化が以前に測定されている。本系においても、2分子の TAMRA が互いに近接し、TAMRA/TAMRA 基底状態複合体を形成する。その結果、TAMRA 部分の蛍光クエンチングにより、大幅にブルーシフトした吸収が観察された。したがって、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の 1 : 1 複合体形成による吸光度の変化は、以前に報告された TAMRA/TAMRA 基底状態複合体と同じメカニズムによって起こるといえる[13,14]。

対照実験として、2.5 μ M TAMRA-ZnL, 2.5 μ M TAMRA-Cys の共存下、2.0 mM EDTA (強力な亜鉛キレート剤) を添加して TAMRA-ZnL から亜鉛イオンを除去した。EDTA の添加後すぐに、521 nm の吸光度 (図 6, 点線 c) は減少し始め、552 nm の吸光度は増大した。EDTA 添加 3 時間後には、最終的にはスペクトルは 5.0 μ M TAMRA-ZnL 単独のスペクトル (図 6, 実線 a) とほぼ一致した。このときの蛍光に関しても、578 nm の蛍光 ($\lambda_{ex} = 521$ nm) は 5.0 μ M TAMRA-ZnL 単独で観測される蛍光強度のほぼ 100% に回復した (図 7, 実線 a)。これらの結果は、TAMRA 結合サイクレンリガンドが実験条件下で TAMRA-Cys に対し親和性を持たないことを示している。したがって、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の錯体形成には TAMRA 部位は影響を及ぼさず、亜鉛-チオレート間の配位のみが関与する 1 : 1 錯体を形成する。そして、錯体を形成すると大きなスペクトルの変化が観察される。

4.3. Job's plot 法による錯生成定数の決定

TAMRA-ZnL / TAMRA-Cys の錯生成平衡を解析するために、総 TAMRA 濃度 ($= [\text{TAMRA-ZnL}] + [\text{TAMRA-Cys}]$) を $5.0 \mu\text{M}$ として、Job's plot 法として知られるドットプロットを作成した[20]。実験は分光分析と同じ条件とし、3回繰り返した。図8に 552 nm での吸光度のプロットを示す (黒丸)。TAMRA-ZnL のモル分率を 0 から 1.0 まで 0.1 ずつ変えて、計 11 点の吸光度を測定した。MF = 0 および MF = 1.0 での吸光度は 0.47 となった。この結果は、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys は複合体を形成していないことを表している。MF = 0.50 で吸光度は 0.20 と最小となり、MF = 0.50 を頂点に対称な曲線を描いた。すなわち、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys は 1 : 1 の化学量論で反応するということがわかる。理論的に、全ての TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys が 1 : 1 錯体を形成すると、その濃度は $2.5 \mu\text{M}$ となる (図8, 左軸)。そのときの吸光度は、MF = 0 および 1.0 でのグラフの接線の交点から 0.12 と求められた (図8, 点線ならびに右軸)。1 : 1 複合体の平衡定数を決定する手法である Job's plot[20]に従い、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys の 1 : 1 錯体の錯生成定数を算出した。

$$K = \frac{[1 : 1 \text{ 錯体}]}{[\text{非結合型 TAMRA-ZnL}][\text{非結合型 TAMRA-Cys}]} = 10^{6.7} \text{ M}^{-1}$$

となり、この計算結果 (図8, 実線) は各 MF の実験データ (黒丸) と合致した。3回の吸光度測定結果を用い、curve-fitting 法により、本実験条件下での錯生成定数 K を算出した。

$$K = (4.8 \pm 0.3) \times 10^6 (= 10^{6.7}) \text{ M}^{-1}$$

pH 7.4, 25°C での亜鉛サイクレン (ZnL) とチオール基含有薬物であるカプトプリルの 1 : 1 錯生成定数は $10^{4.3} \text{ M}^{-1}$ と報告されている[7]。カプトプリル-

ZnL 錯体の K 値は TAMRA-Cys / TAMRA-ZnL 錯体の K 値に比べ 2 桁以上小さい。これらの K 値の大きな違いは、隣接する TAMRA 部位同士の相互作用によるものである。TAMRA-Cys と TAMRA-ZnL の錯生成平衡は可視吸収分光法によりマイクロモル濃度で分析できるため、TAMRA-Cys と非標識リガンド間で競合実験を行い、TAMRA 標識亜鉛酵素モデルに対する親和性を測定した（次項参照）。

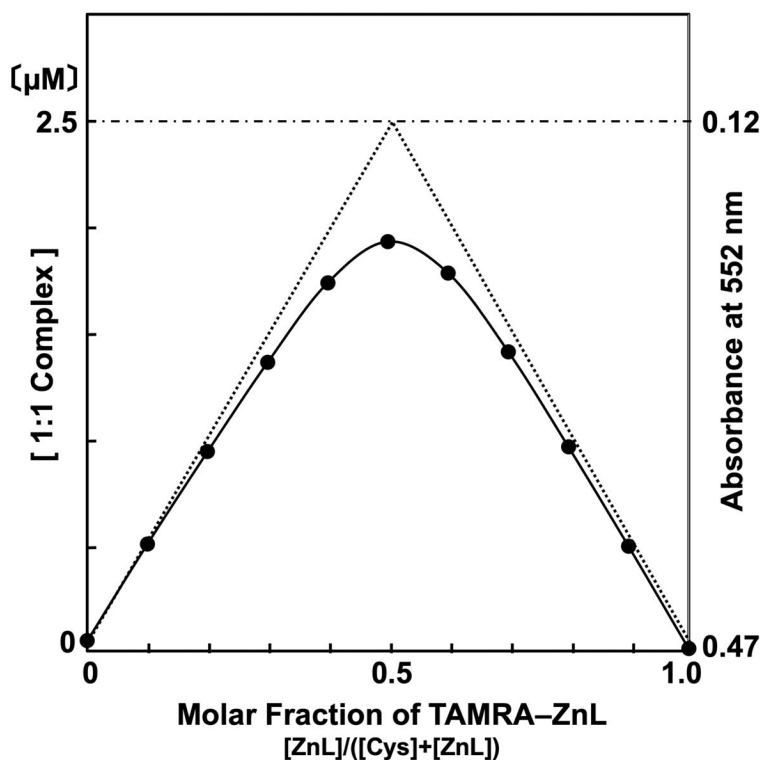


図 8. (黒丸) TAMRA-ZnL のモル分率 (MF) と 552 nm における吸光度の Job's plot。溶液：20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl (pH7.4), 25°C。MF = $[TAMRA-ZnL] / ([TAMRA-ZnL] + [TAMRA-Cys])$, TAMRA の総濃度 5.0 μ M。

(実線) 錯生成定数 $K = [1:1 \text{ 錯体}] / [\text{フリーの TAMRA-ZnL}] [\text{フリーの TAMRA-Cys}]$ の理論値 ($10^{6.7} \text{ M}^{-1}$)。

4.4. TAMRA-ZnL に対するリガンドの親和性の決定

TAMRA-ZnL / TAMRA-Cys 複合体形成の系を利用し, TAMRA-Cys に競合するリガンドを添加して, TAMRA-ZnL に対するリガンドの親和性測定を行った (図5参照)。サンプルリガンド (HL) には, L-システイン, *N*-アセチル-L-システイン, *N*-アセチル-L-システインアミド, L-グルタチオン, カプトプリル (チオール基を持つアンジオテンシン変換酵素阻害剤), アセタゾラミド (スルホンアミド基を持つ炭酸脱水酵素阻害剤), エナラプリラト (カルボニル基を持つアンジオテンシン変換酵素阻害剤) の7種類を選択した (図9) [21]。測定溶液は以下の組成とした。2.5 μ M TAMRA-ZnL, 2.5 μ M TAMRA-Cys, 20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl, 25 μ M TCEP, HL (HL濃度は, L-システイン, *N*-アセチル-L-システイン, *N*-アセチル-L-システインアミド, L-グルタチオン, カプトプリルは 0.20, 0.50, 1.0 mM の3種類, アセタゾラミドは 1.0, 2.0, 3.0 mM の3種類, エナラプリラトは 3.0, 5.0 mM の2種類とした)。全てのリガンドは本実験条件下で 2.5 μ M TAMRA-ZnL ($\lambda_{\max} = 552$ nm) の可視吸収スペクトルに影響しなかった。亜鉛サイクレンの第五座配位子のリガンド交換の平衡は全ての化合物で5分以内に定常状態に達した。Job's plot (図8) を元に, 552 nm の吸光度と 1 : 1 錯体の濃度との関係から, 各濃度のリガンド存

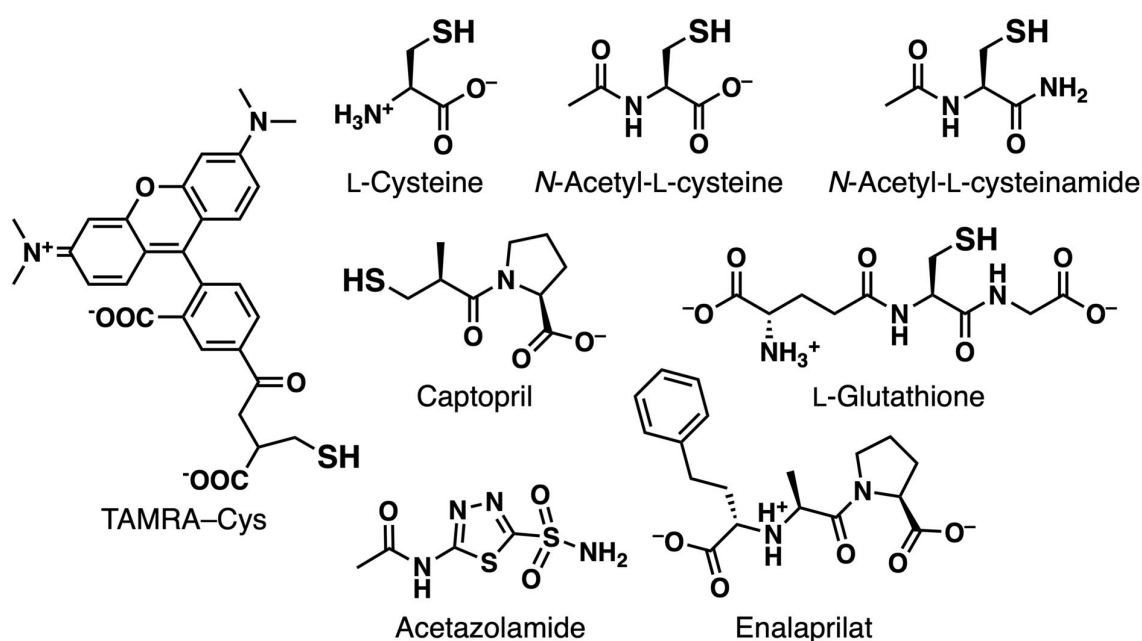


図9. TAMRA-Cys と添加したリガンドの構造。

在下での(TAMRA-ZnL)-TAMRA-Cys 1 : 1 錯体の濃度 (C_{TT}) を算出した。
 フリーの TAMRA-Cys, フリーの TAMRA-ZnL, リガンドが結合した TAMRA-ZnL の濃度をそれぞれ C_{TS} , C_{TZ} , C_{LZ} と表すと, 次式

$$C_{TZ} = \frac{C_{TT}}{C_{TS} \times 10^{6.7}}$$

および

$$C_{LZ} = 2.5 \times 10^{-6} - C_{TT} - C_{TZ}$$

が成り立つ。TAMRA-ZnL の量と比較して大過剰の HL を添加したため, 錯体を作っていないフリーのリガンドの濃度は全リガンド (C_{HL}) の濃度とほぼ同じであるとみなせる。測定溶液中の化学種の物質収支から, 式

$$K = \frac{C_{LZ}}{C_{TZ} \times C_{HL}}$$

を用いて, リガンドの結合定数 K ($= \frac{[L^- - \text{TAMRA-ZnL}]}{[\text{フリーの TAMRA-ZnL}][\text{フリーの HL}]}$ M^{-1}) を計算できる。算出した結合定数の結果を表 1 に示す。チオール基含有リガンドの結合定数は全て $10^4 M^{-1}$ 程度と似通った値を示した。一方, 非チオール性リガンドであるアセタゾラミドとエナラプリラトはチオール基含有リガンドに比べ有意に低い親和性 (それぞれ $K = 2.4 \times 10^3$, $2.0 \times 10^2 M^{-1}$) を示した。カプトプリルとエナラプリラトはアンジオテンシン変換酵素の競合阻害剤としてよく知られている血圧降下剤であり, いずれも触媒機能を果たしている酵素の活性中心の亜鉛イオンに配位する[21]。同じアンジオテンシン変換酵素阻害剤であっても, カプトプリルとエナラプリラトでは亜鉛イオンへの親和性は大きく異なる。エナラプリラトでは, フェニル基や二級アミン基などの非配

位性の官能基の寄与が亜鉛酵素への効果的な結合に重要であることを示している。したがって、TAMRA-Cys と亜鉛酵素モデルである TAMRA-ZnL の 1 : 1 錯体形成平衡は、亜鉛酵素の活性中心の亜鉛イオンに対するリガンドの親和性を測定する簡便な手法として有用である。

Fifth Ligand (HA)	Expected zinc(II)-binding atoms	K^a (M^{-1})
TAMRA-Cys	S ⁻ , O ⁻	4.8×10^6
L-Cysteine ^b	S ⁻ , O ⁻ , NH ₂	1.8×10^4
N-Acetyl-L-cysteinamide ^b	S ⁻	1.2×10^4
L-Glutathione ^b	S ⁻ , O ⁻ , O ⁻ , NH ₂	1.2×10^4
N-Acetyl-L-cysteine ^b	S ⁻ , O ⁻	1.0×10^4
Captopril ^b	S ⁻ , O ⁻	0.8×10^4
Acetazolamide ^c	SO ₂ N-H, =N-	2.4×10^3
Enalaprilat ^d	O ⁻ , O ⁻ , NH	2.0×10^2

表 1. 種々のリガンドの TAMRA-ZnL との結合定数 (K)。

^a 錯生成定数 $K = [L^-TAMRA-ZnL]/[uncomplexed TAMRA-ZnL][uncomplexed ligand] M^{-1}$ 。20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl バッファー (pH 7.4), TAMRA-ZnL / TAMRA-Cys それぞれ 2.5 μ M, 25°C で測定した。

^b チオール含有リガンドの濃度はそれぞれ 0.20, 0.50, 1.0 mM とした。

^c アセタゾラミドの濃度は 1.0, 2.0, 3.0 mM とした。

^d エナラプリラトの濃度は 3.0, 5.0 mM とした。

4.5. 亜鉛サイクレンに結合したチオレートの大気雰囲気下での安定性の測定

一般的に、水溶液中のチオール化合物は空気中の酸素に非常に敏感に反応する。ジスルフィド結合体を形成したり、酸素が直接付加したりする酸化が競合的に起きる[18,22]。図10にチオールの酸素酸化について示す。生理 pH の水溶液では、チオール分子は一部が酸解離型のチオレート・S⁻の状態が存在する。チオレートが溶液に溶け込んだ酸素分子にアタックすることで、最終的に1分子の酸素分子から2分子のS-S体が形成される。上記の分光分析実験では、還元剤であるTCEPを使用してシステイン含有分子の還元状態を保った。20mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl (pH 7.4) のバッファ溶液中、25°C, 大気雰囲気下での可視吸収スペクトルの時間依存性変化から読み取れるように、TAMRA-Cys (4.7 μM) はTCEP非存在下では不安定で、速やかに酸化体へと変化した。4.7 μM TAMRA-Cysの時間依存的なスペクトルの変化を図11Aに示す。インキュベーション時間は0時間(実線a), 6時間(破線b), 24時間(点線c)である。この分光分析の結果は、1:1 TAMRA-Cys/TAMRA-ZnL錯体形成のスペクトルと似通っている(図6参照)。さらに、このスペクトル変化はTAMRA結合型2-アミノエタンチオールの酸化によるジスルフィド型TAMRA/TAMRA基底状態複合体の形成とほとんど一致している[14]。これらの結果は、図11Aに示すように、緩衝液中のTAMRA-Cysが大気雰囲気下で

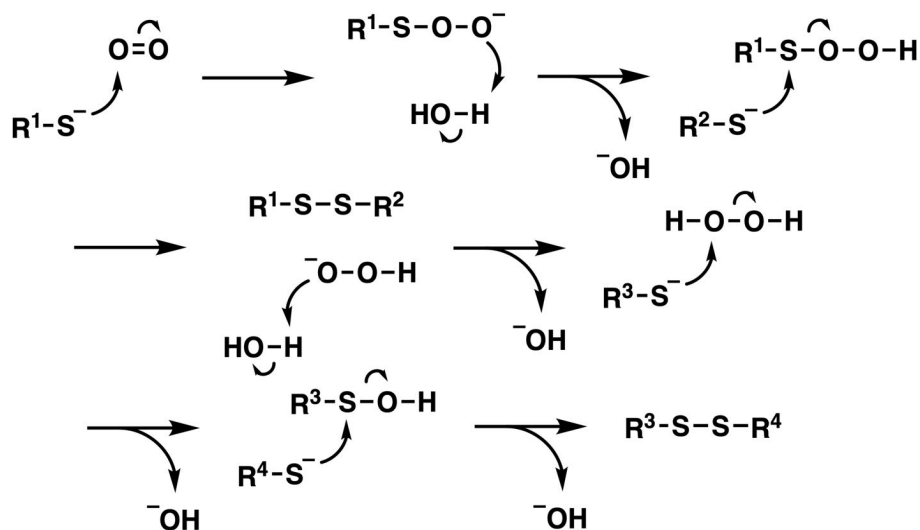


図10. チオール(チオレート)の酸素酸化修飾。

徐々に酸化され、二量体の TAMRA/TAMRA 複合体を形成することを示している。次に、同じ条件の下で非標識亜鉛サイクレンが還元型 TAMRA-Cys (4.7 μM) に及ぼす影響を調べた。図 11B は、過剰量の非標識亜鉛サイクレン (2.0 mM) 存在下での 0 時間 (実線 a), 6 時間 (破線 b), 24 時間 (点線 c) の各インキュベーション時間における可視吸収スペクトルを示している。亜鉛サイクレン非存在時 (図 11A) に比べ、可視吸収スペクトルの変化は明らかに小さかった。チオール含有分子の TAMRA-ZnL に対する安定度定数 ($K \approx 10^4 \text{ M}^{-1}$) から考えると、大気雰囲気、過剰量の亜鉛サイクレンが存在する pH 7.4 の水溶液中で、亜鉛イオンへのチオレートの配位は TAMRA-Cys を効果的に安定化する。

亜鉛サイクレン (ZnL) のチオール安定化剤としての応用を目的に、システイン含有生体分子である L-グルタチオン (0.50 mM, 還元型) とエノラーゼシステインペプチド (ECP, 0.38 mM, Ile-Gly-Leu-Asp-Cys-Ala-Ser-Ser-Glu-Phe-Phe-Lys) を用いて、空気酸化に対する ZnL の影響を検討した。サンプル溶液

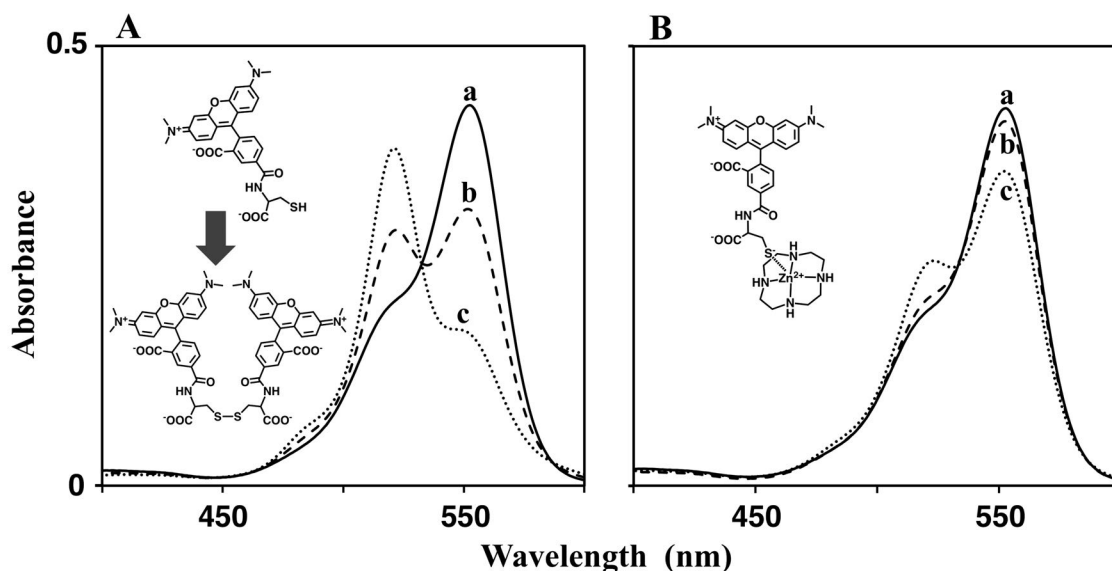


図 11. 20 mM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl (pH 7.4) バッファー中、25°Cでの 4.7 μM TAMRA-Cys の空気酸化。2.0 mM 亜鉛サイクレン (ZnL) の非存在下 (A) および存在下 (B), 0 時間 (実線), 6 時間 (破線), 24 時間 (点線) の各時間における可視吸収スペクトル。

(pH 7.4) には 20 mM HEPES–NaOH, 0.10 M NaCl バッファーを用い, 10 倍量の ZnL (それぞれ 5.0 mM および 3.8 mM) も添加した。対照実験は ZnL を加えないバッファー溶液を用いて行った。大気雰囲気下, 25°C で攪拌しながら 6, 24, 48 時間インキュベートし, 各時間経過後のサンプル溶液を HPLC で測定した (実験項参照)。6, 24, 48 時間攪拌後の還元型 L-グルタチオンの残存量は, 5.0 mM ZnL 存在下ではそれぞれ 99%, 97%, 94% であった。一方で, ZnL 非存在下ではそれぞれ 96%, 73%, 45% であった。空気酸化を受けた L-グルタチオンは主にジスルフィド体となっており, TCEP を加えることでチオール型に可逆的に還元できる。同様に, 6, 24, 48 時間攪拌後の還元型 ECP の残存量は, 3.8 mM ZnL 存在下ではそれぞれ 96%, 93%, 86% であった。また, 非存在下ではそれぞれ 82%, 42%, 23% であった。この結果から, 過剰量の亜鉛サイクレンの添加は生理 pH の水溶液中のシステイン含有化合物の還元状態を維持する安定化効果を示した。亜鉛サイクレンはチオール, ジスルフィド, S-ニトロソ, またはアミド基といった官能基に対して化学反応性を持たず, メチオニンやヒスチジンなどのその他のアミノ酸残基との親和性ははるかに低い [15]。生体内の生理条件下では, システイン残基の化学修飾状態の様々な変化が起こっている [23,24]。そのため, これらの変化を知ることはタンパク質の機能そのものや機能調節を理解する上で重要である。チオールバイオロジーにおいて, 亜鉛サイクレンはミリモル濃度の生理 pH バッファー中でシステイン含有生体分子の酸化を防ぎ, 還元型分子をインタクトな状態で分析する助けとなる [25]。

5. 結 論

本研究では、生理的条件下で TAMRA 結合型亜鉛酵素モデルに対するリガンドの親和性を解析するための簡単な手法を開発した。この方法は、TAMRA-ZnL と TAMRA-Cys (チオール基含有リガンド) の 1 : 1 複合体の可視吸収分光法に基づきリガンド競合法に分類される。外部リガンドと TAMRA-ZnL の交換反応は非常に速い。その結果、25°C のバッファー溶液中の TAMRA-ZnL のリガンド交換反応は 5 分以内に平衡に達する。リガンド競合反応により平衡が移動し、TAMRA 部分の 552 nm の吸光度が増加する。平衡の定常状態の吸光度から、亜鉛酵素モデルに対する外部リガンドの親和定数を測定することができる。

亜鉛酵素阻害剤は今日でも医薬品分野で多くの関心を集めている[26]。したがって、今回開発した簡便な手法は、特定のリガンドと亜鉛酵素の活性中心の亜鉛イオンとの間の配位結合の熱力学的な寄与を推定するのに役立つ。さらに、亜鉛サイクレン結合型チオレートは、大気雰囲気下でも、非結合型チオールに比してはるかに安定していることが明らかとなった。

チオレート・S⁻ と亜鉛サイクレン間の配位結合は pH 3 程度の酸性条件にする、または pH 7.4 の EDTA で亜鉛イオンを捕捉することで簡単に解離する[15]。したがって、亜鉛サイクレンは生体試料中のインタクトなチオール基含有分子の分析において、空気酸化に対するチオールの新規安定剤としても有用である。

6. 実験項

6.1. TAMRA 標識サイクレンの調製

アミノプロピル修飾サイクレン (サイクレンリガンド) [3-(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)propan-1-amine] は、以前に報告されている方法により合成した[27]。無色透明な液体である。サイクレンの1つの窒素原子から C3 のプロピルスパーサーが伸び、末端は一級アミンとなっている。

サイクレンリガンド (54 mg, 0.23 mmol) と TAMRA-NHS (0.10 g, 0.19 mmol) をクロロホルム溶媒 (10 mL) 中、室温で3時間攪拌してカップリング反応を行った。

溶媒を減圧除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーで精製して TAMRA 標識サイクレン [N-[3-(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)propyl]-3',6'-bis(dimethylamino)-3-oxo-3H-spiro(isobenzofuran-1,9'-xanthene)-5-carboxamide] を赤紫色の粉体として得た (80 mg, 0.12 mmol, 収率 66%)。クロマト担体にはアミノシリカゲル (NH-DM 1020) を使用し、展開溶媒には 1%~5% MeOH/CHCl₃ を用いた。TLC は Merck 105533 (アミノシリカ) を使用し、展開溶媒は CHCl₃/MeOH = 10:1 を用いた。TAMRA 標識サイクレンは $R_f = 0.24$ に 1 スポットで検出された。アミノシリカを用いることで、原料の TAMRA-NHS, 加水分解物の TAMRA-COOH, NHS-NH₂ は原点付近に留まる。サイクレンリガンドは移動速度が遅く、TAMRA 標識サイクレンのみが単離できる。一連の合成の流れを図 12 に示す。

¹H NMR, ¹³C NMR, IR, MS の解析結果は以下の通りである。図 13, 14, 15 にそれぞれ ¹H NMR, ¹³C NMR, IR の結果を示す。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.80 (2 H, quint, J = 6.6 Hz, CCH₂C), 2.44–2.73 (21 H, m, NCH₂ and NH), 2.91 (12 H, s, CH₃), 3.49 (2 H, dt, J = 6.2 and 6.6 Hz, CH₂NCO), 6.31 (2 H, dd, J = 2.5 and 8.9 Hz, ArH), 6.41 (2 H, d, J = 2.5 Hz, ArH), 6.51 (2 H, d, J = 8.9 Hz, ArH), 7.15 (1 H, d, J = 8.0 Hz, ArH), 8.03 (1 H, t, J = 6.2 Hz, NHCO), 8.17 (1 H, dd, J = 1.4 and 8.0 Hz, ArH), 8.45 (1 H, d, J = 1.4 Hz, ArH).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 27.1, 38.2, 40.3$ (CH_3), 45.0, 45.8, 46.9, 51.5, 87.2, 98.5, 106.3, 108.8, 123.3, 124.4, 128.0, 128.8, 134.4, 136.6, 152.2, 153.0, 155.1, 166.1 (CO), 169.4 (CO).

IR (KCl): 3274, 2930, 2816, 1754 (COO), 1635 (CONH), 1615, 1594, 1548, 1522, 1464, 1443, 1430, 1367, 1348, 1327, 1304, 1254, 1228, 1120, 752 cm^{-1} .

UPLC-MS: m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_4^+$: 642.8; found: 642.6.

图 12. TAMRA-cyclen 合成 Scheme

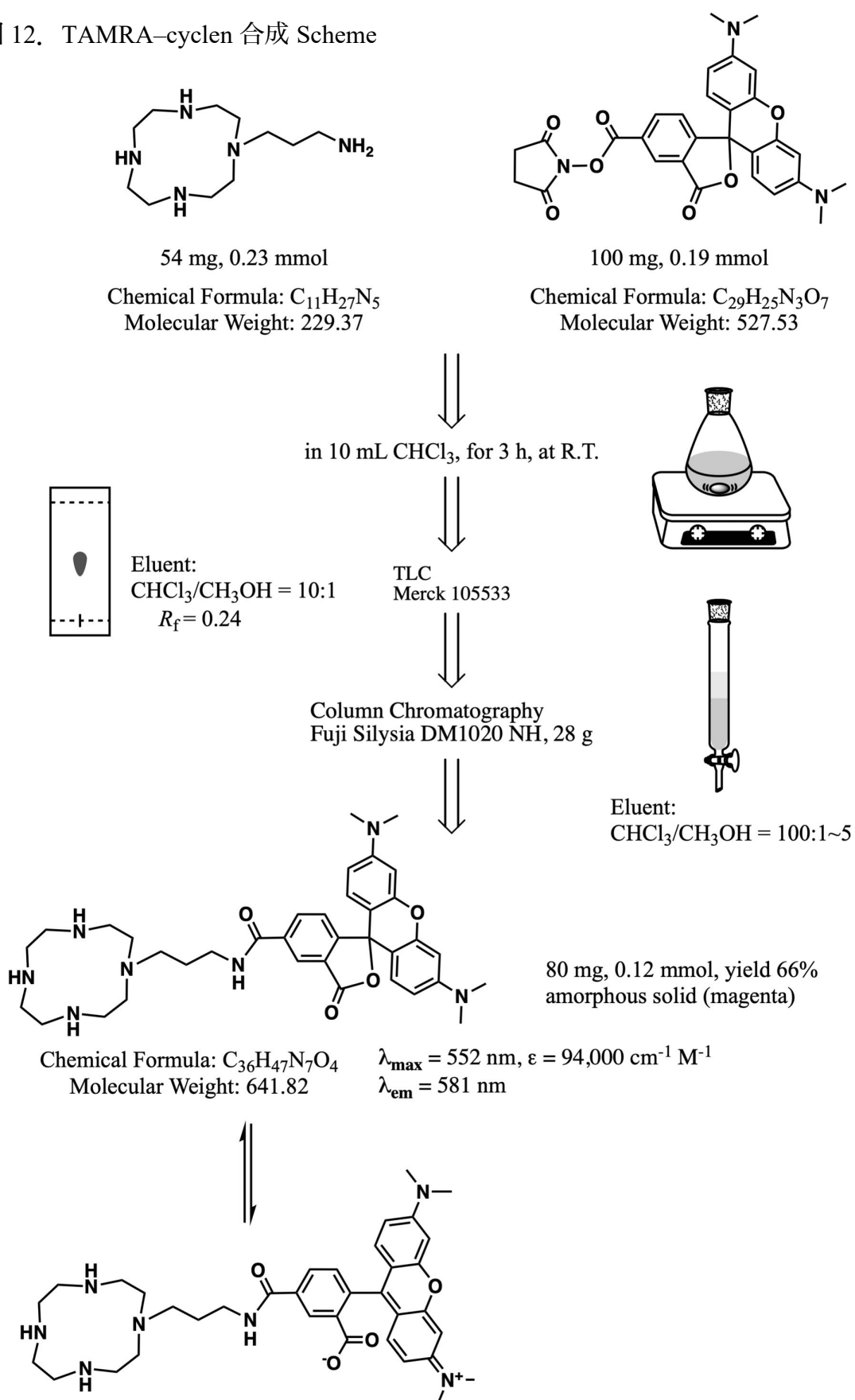
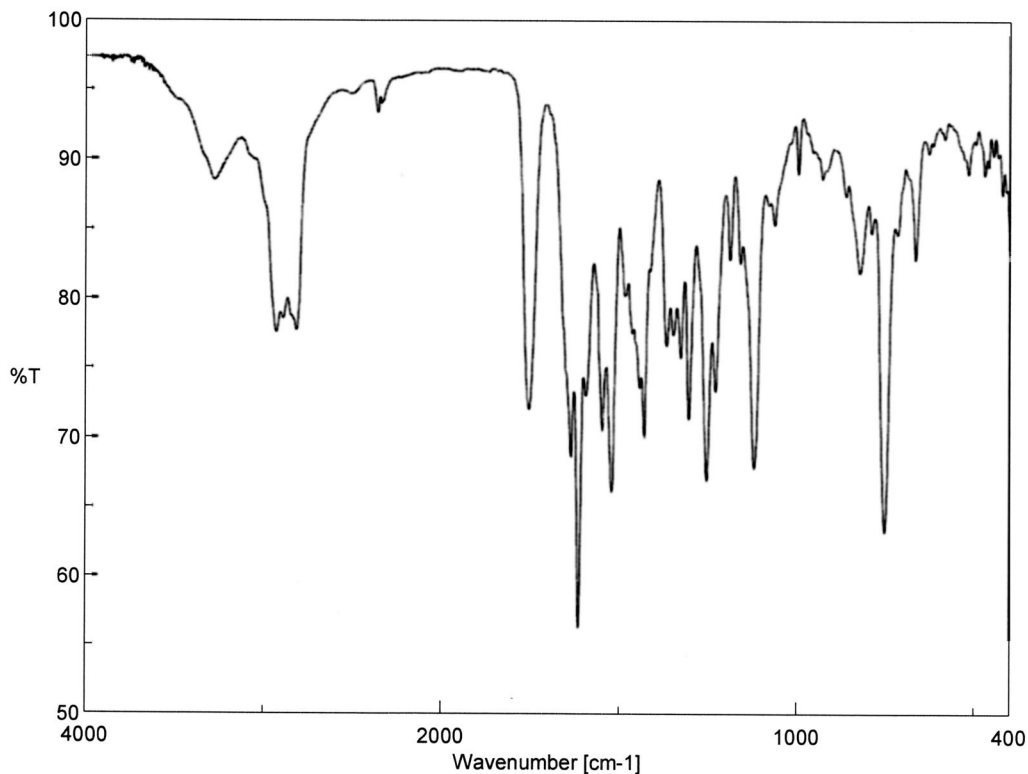


図 15. TAMRA-ZnL の IR スペクトル



[コメント情報]

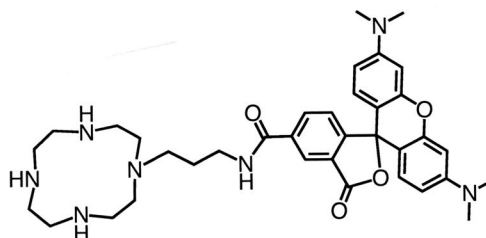
試料名
コメント
測定者
所属
会社
HU

[測定情報]

機種名 FT/IR-4600typeA
シリアル番号 D015461786
測定日時 2016/11/26 12:55
光源 標準光源
検出器 TGS
積算回数 Auto (12)
分解 4 cm⁻¹
ゼロフィリング On
アポダイゼーション Cosine
ゲイン Auto (1)
アパーチャー Auto (7.1 mm)
スキャンスピード Auto (2 mm/sec)
フィルタ Auto (30000 Hz)

[データ情報]

作成日時 2016/11/26 12:55
データタイプ 等間隔データ
横軸 Wavenumber [cm⁻¹]
縦軸 %T
スタート 349.053 cm⁻¹
エンド 7800.65 cm⁻¹
データ間隔 0.964233 cm⁻¹
データ数 7729



6.2. 可視吸収分析

TAMRA-ZnL の吸光度測定は、20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) , 0.10 M NaCl バッファー溶液を用い、3 回繰り返した。1 cm 角セルにサンプル溶液 (3.0 mL) を入れ、テフロンコーティングされたマグネチックスターラー (長さ 3 mm) で攪拌した。温度は $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で一定にセットした。スリット幅は 2 nm とし、400~600 nm の範囲の吸光度を測定した。Job's plot 法の実験では、

TAMRA-ZnL のモル分率 (MF, $= \frac{[\text{TAMRA-ZnL}]}{[\text{TAMRA-ZnL}] + [\text{TAMRA-Cys}]}$) が 0~1.0

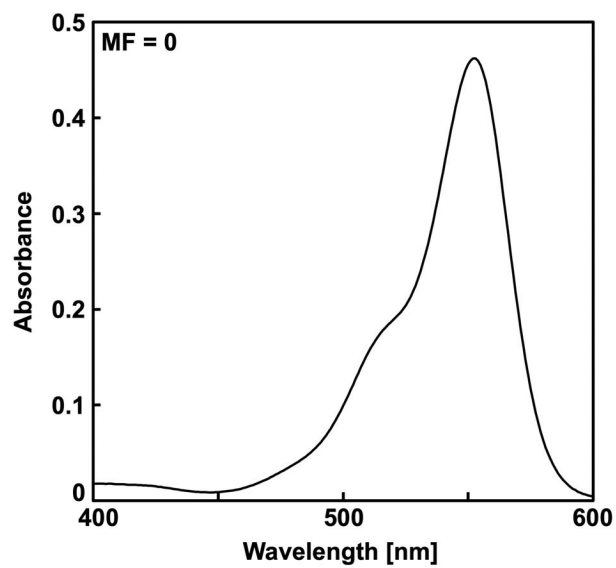
の 11 点において吸光度を測定した。TAMRA の総濃度 ($[\text{TAMRA-ZnL}] + [\text{TAMRA-Cys}]$) は $5.0 \mu\text{M}$ で一定とした (表 2)。体積法でなく重量法を用いて測定溶液を調製することにより、非常に正確な溶液の調整を行うことができる。今回は、ストック溶液として $50 \mu\text{M}$ TAMRA-ZnL と $50 \mu\text{M}$ TAMRA-Cys (それぞれ、20 μM HEPES-NaOH, 0.10 M NaCl, pH 7.4) を調製し、目的濃度に希釈して測定した。図 16 に各 MF における吸収スペクトルを示す。1 : 1 錯体生成の平衡定数 K は、以前に報告されている手法を用いて理論的に算出した[20]。

MF	TAMRA-ZnL (g)	TAMRA-Cys (g)	Total Solution (g)	TAMRA-ZnL (μM)	TAMRA-Cys (μM)	Total TAMRA (μM)
0	0	0.30	3.0	0	5.0	5.0
0.1	0.03	0.27	3.0	0.5	4.5	5.0
0.2	0.06	0.24	3.0	1.0	4.0	5.0
0.3	0.09	0.21	3.0	1.5	3.5	5.0
0.4	0.12	0.18	3.0	2.0	3.0	5.0
0.5	0.15	0.15	3.0	2.5	2.5	5.0
0.6	0.18	0.12	3.0	3.0	2.0	5.0
0.7	0.21	0.09	3.0	3.5	1.5	5.0
0.8	0.24	0.06	3.0	4.0	1.0	5.0
0.9	0.27	0.03	3.0	4.5	0.5	5.0
1.0	0.30	0	3.0	5.0	0	5.0

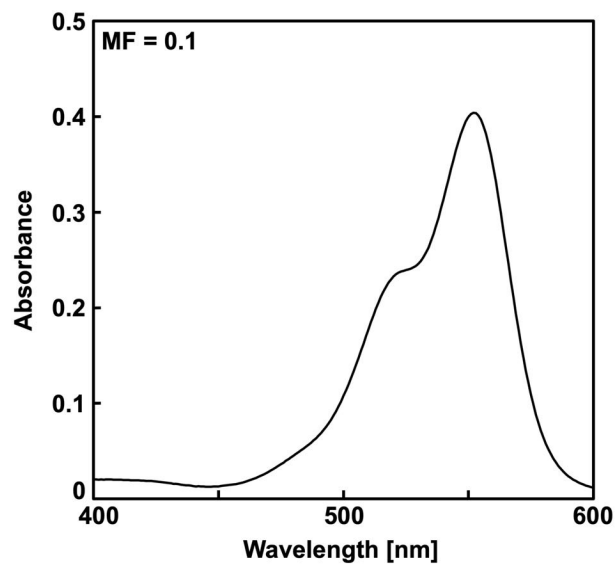
表 2. 各 MF 溶液の調製。TAMRA 溶液を量りとったのちに TAMRA を含まないバッファーを加えて 3.0 g とした。

図 16. 各 MF における可視吸収スペクトル

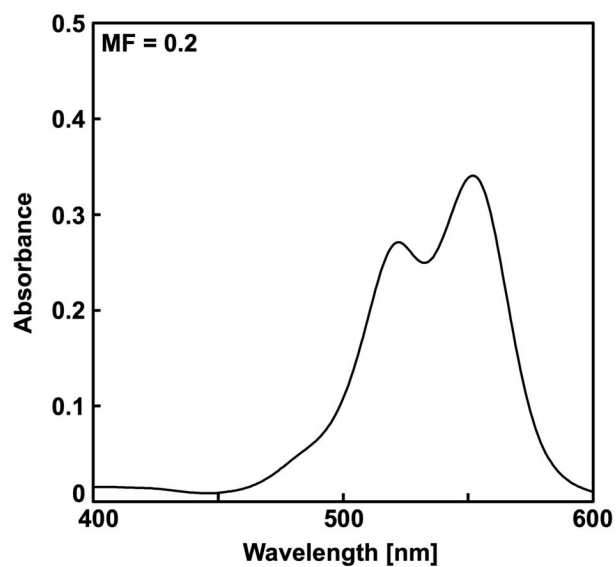
MF = 0



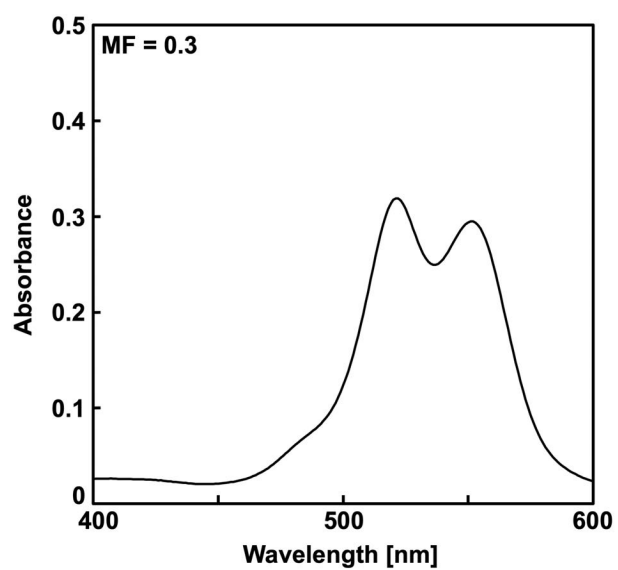
MF = 0.1



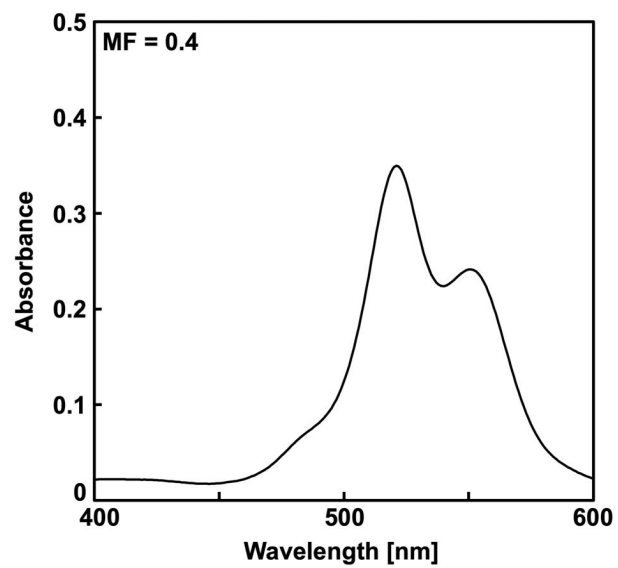
MF = 0.2



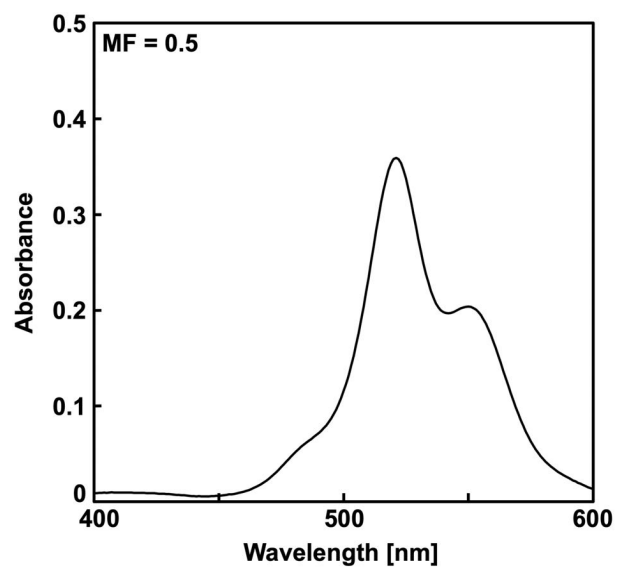
MF = 0.3



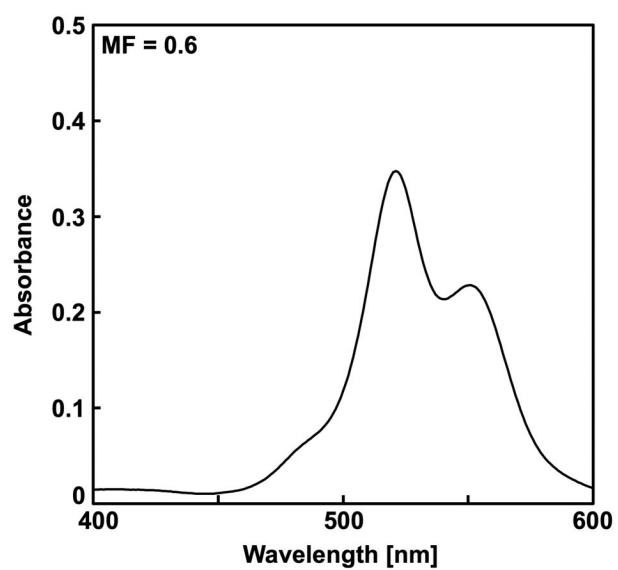
MF = 0.4



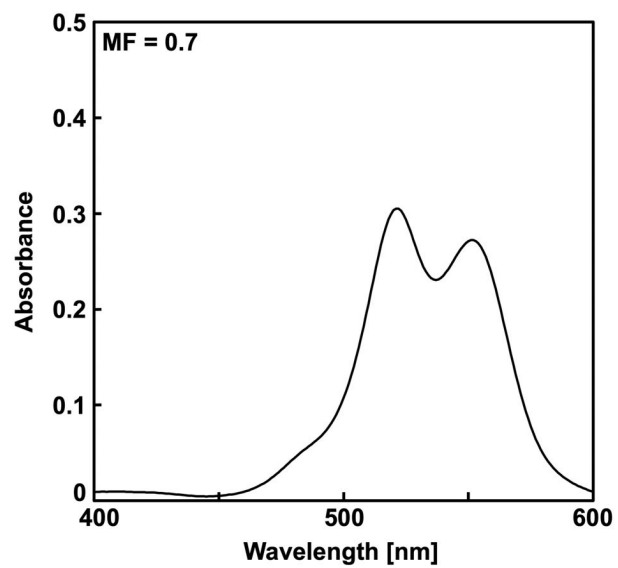
MF = 0.5



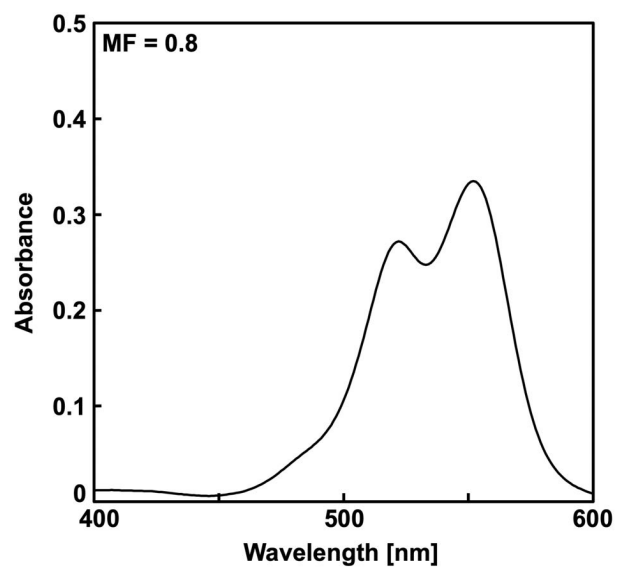
MF = 0.6



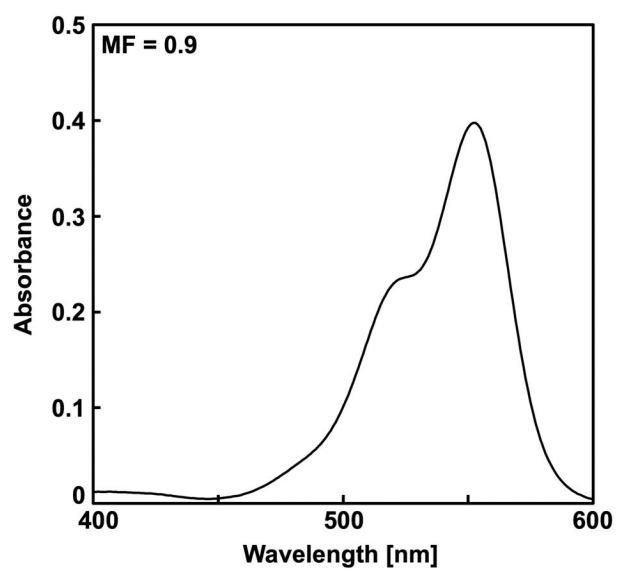
MF = 0.7



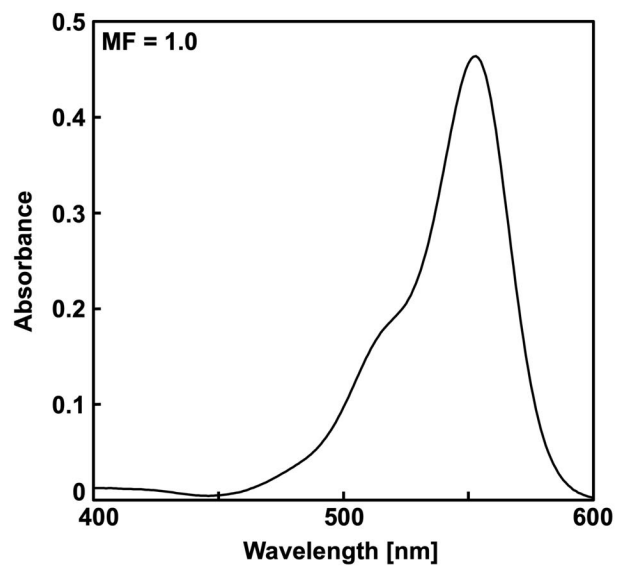
MF = 0.8



MF = 0.9



MF = 1.0

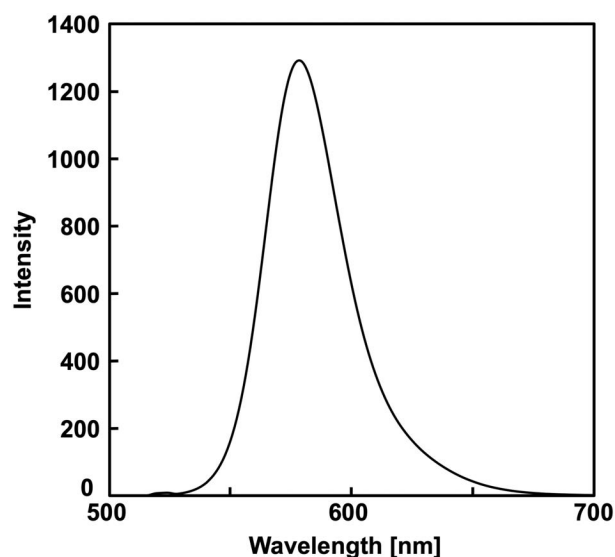


6.3. 蛍光分析

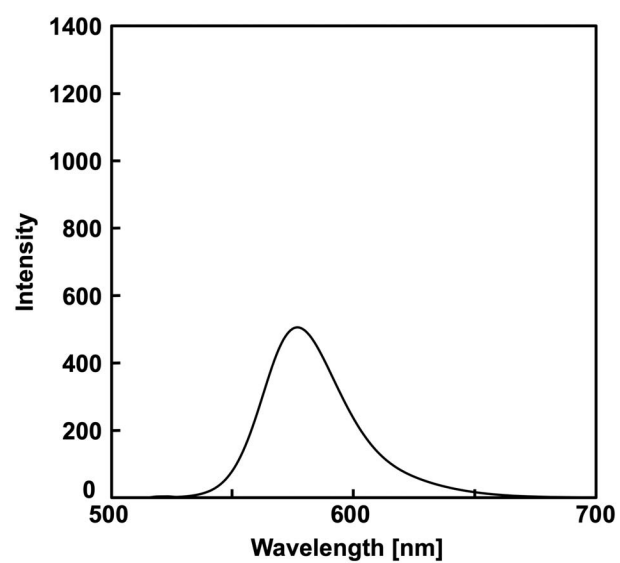
TAMRA-ZnL の蛍光測定は、20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) , 0.10 M NaCl バッファー溶液を用い、すべて3回行った。1 cm 角セルにサンプル溶液 (3.0 mL) を入れ、テフロンコーティングされたマグネチックスターラー (長さ 3 mm) で攪拌した。温度は $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で一定にセットした。スリット幅は 2.5 nm, 励起波長は 521 nm とし、500~700 nm の範囲の蛍光を測定した。その結果を図 17 に示す。TAMRA-ZnL の量子収率は、ローダミン B (5 μM) を標準物質として、20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 20 μL を含むエタノール溶液 (4.0 mL) の蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 542 \text{ nm}$) を基準として決定した。542 nm での励起によるローダミン B の量子収率は、過去に報告された値 0.65 を用いた[28]。

図 17. 各 MF における可視吸収スペクトル

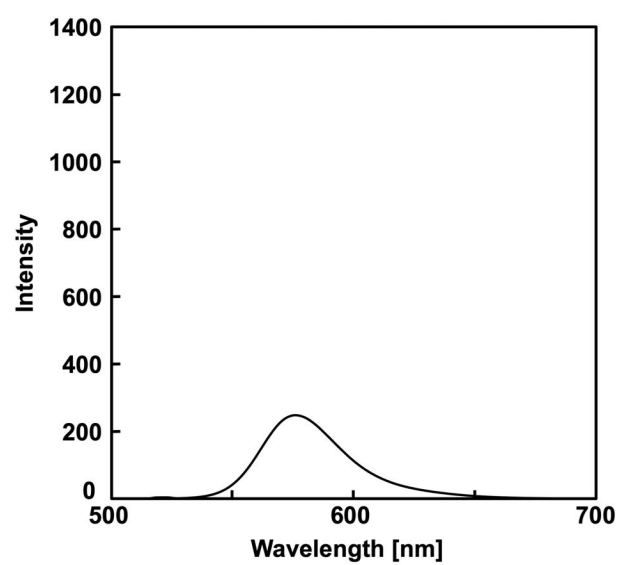
TAMRA-ZnL 5 μM (MF = 1.0)



TAMRA-ZnL 3.5 μM + TAMRA-Cys 1.5 μM (MF = 0.7)



TAMRA-ZnL 2.5 μM + TAMRA-Cys 2.5 μM (MF = 0.5)



6.4. 高速液体クロマトグラフィー分析

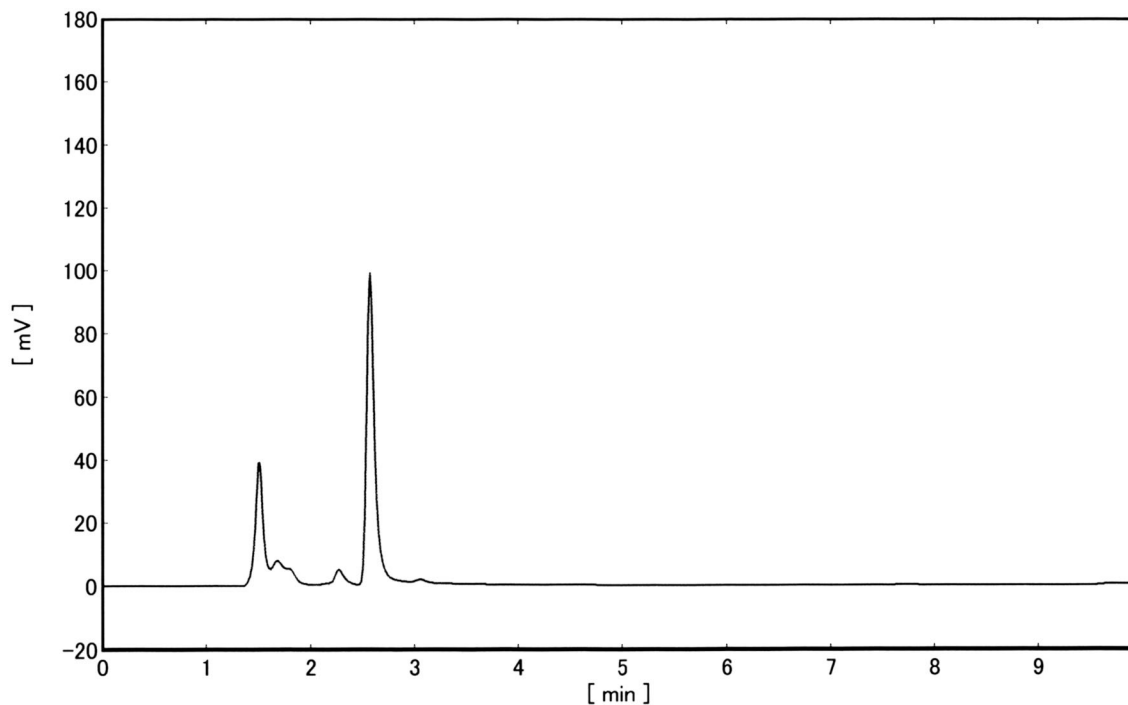
6.4.1. L-Glutathione の酸化防止作用の検討

還元型 (SH) および酸化型 (SS) の L-グルタチオンは以下のイソクラティック条件で分析した (図 18)。溶離液は [20 mM aqueous H₃PO₄, 0.10 M sodium perchlorate / acetonitrile (20:1)] とした。移動相の流速は 1.0 mL/min とし、カラム温度は 40°C に設定した。サンプル注入量は 20 μL とし、検出は 215 nm の波長で行った。保持時間は, SH 型は 2.6 分, SS 型は 3.1 分であった。

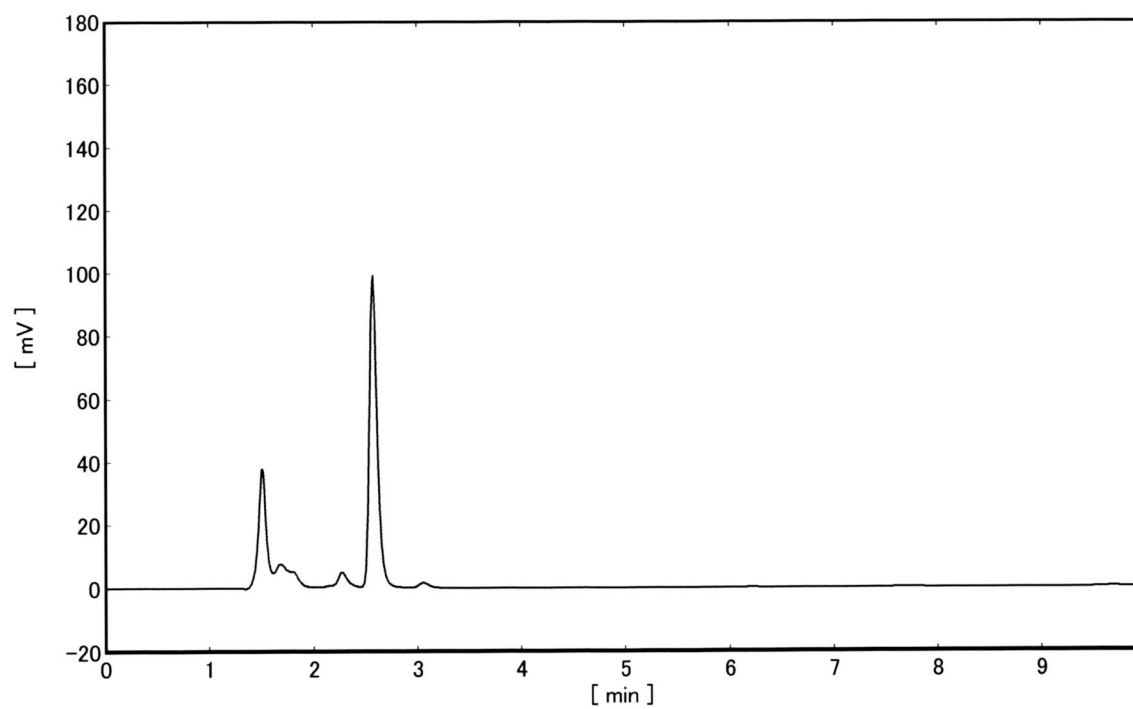
図 18. L-Glutathione の HPLC クロマトグラム

L-Glutathione (0.50 mM) + ZnL (5.0 mM)

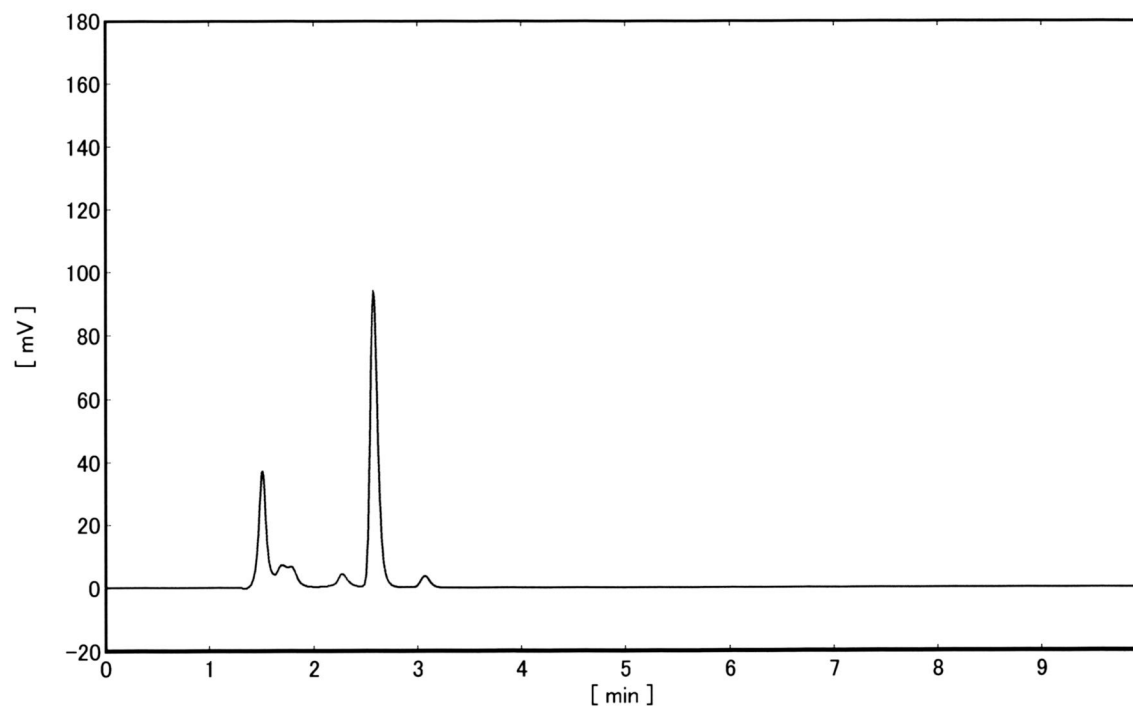
0 h



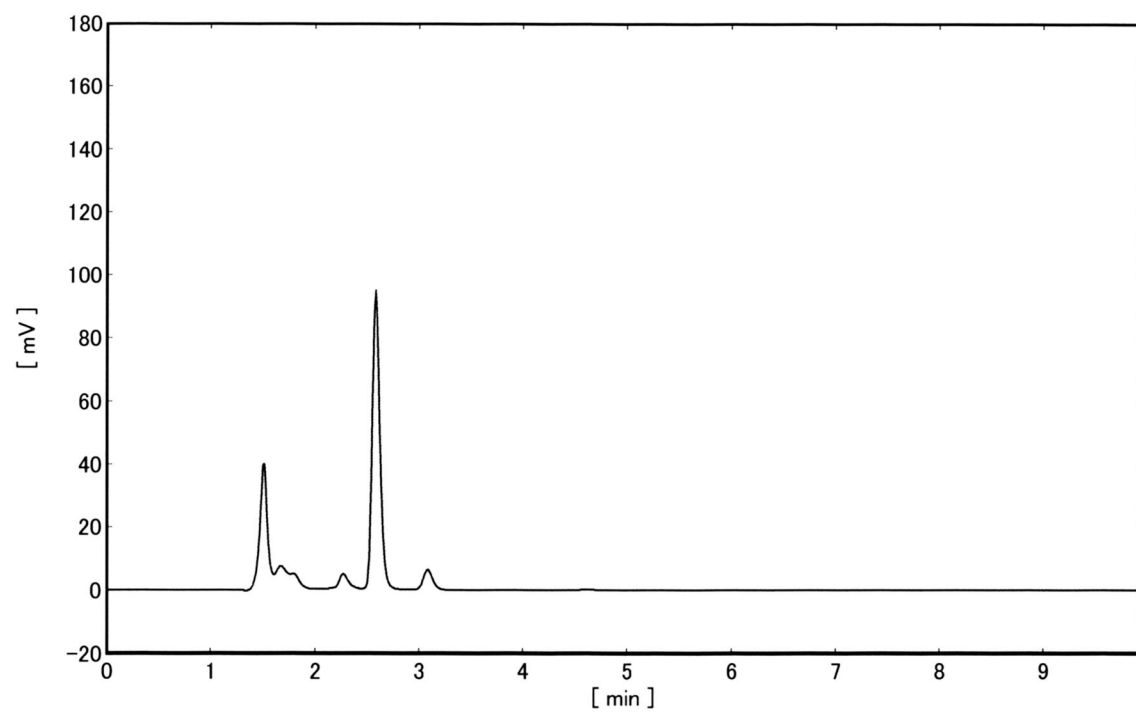
6 h : 還元型 L-グルタチオン残存率 = 99%



24 h : 還元型 L-グルタチオン残存率 = 97%

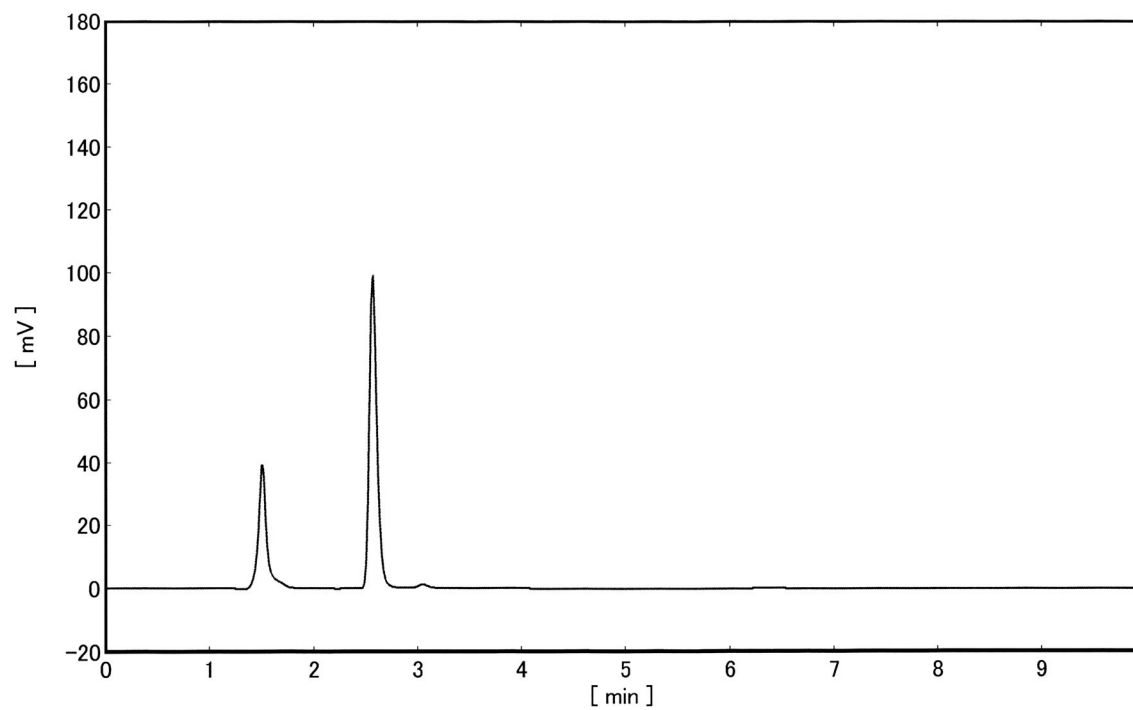


48 h : 還元型 L-グルタチオン残存率 = 94%

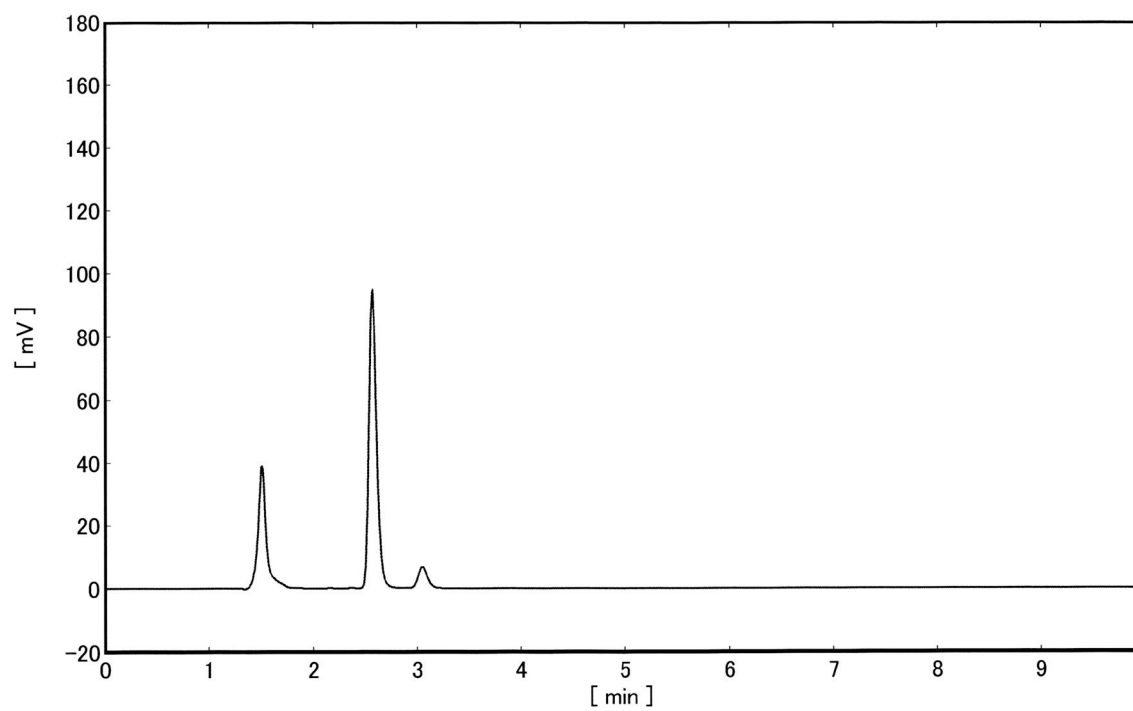


Glutathione (0.50 mM), ZnL 非存在下

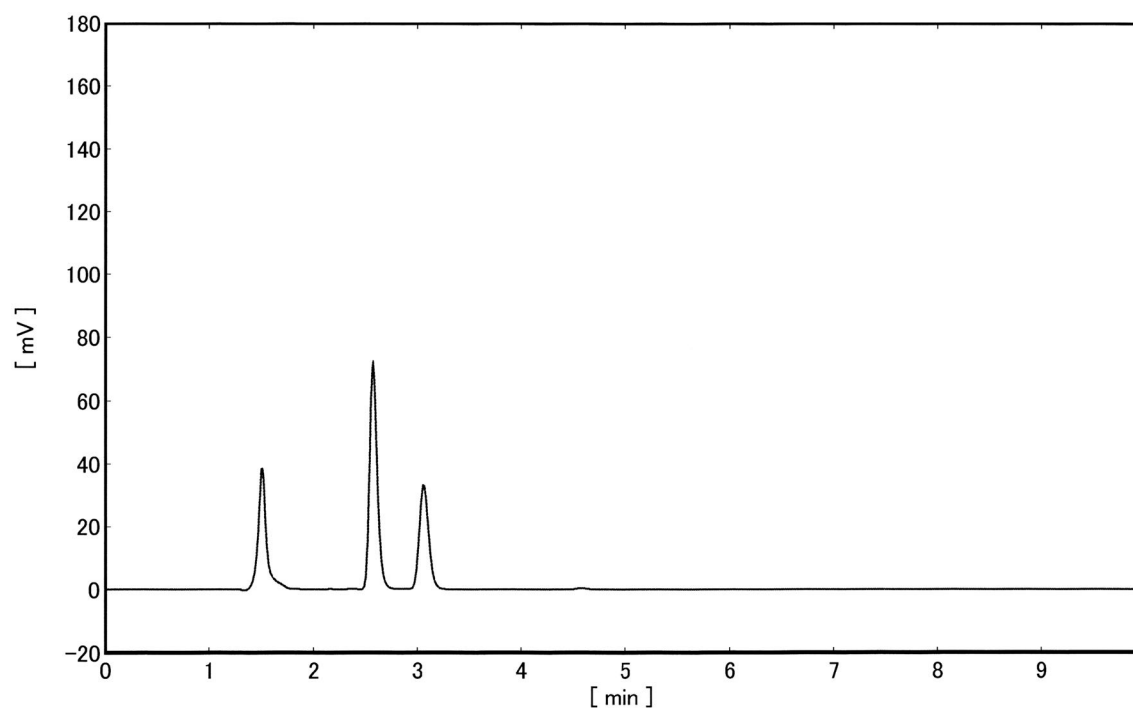
0 h



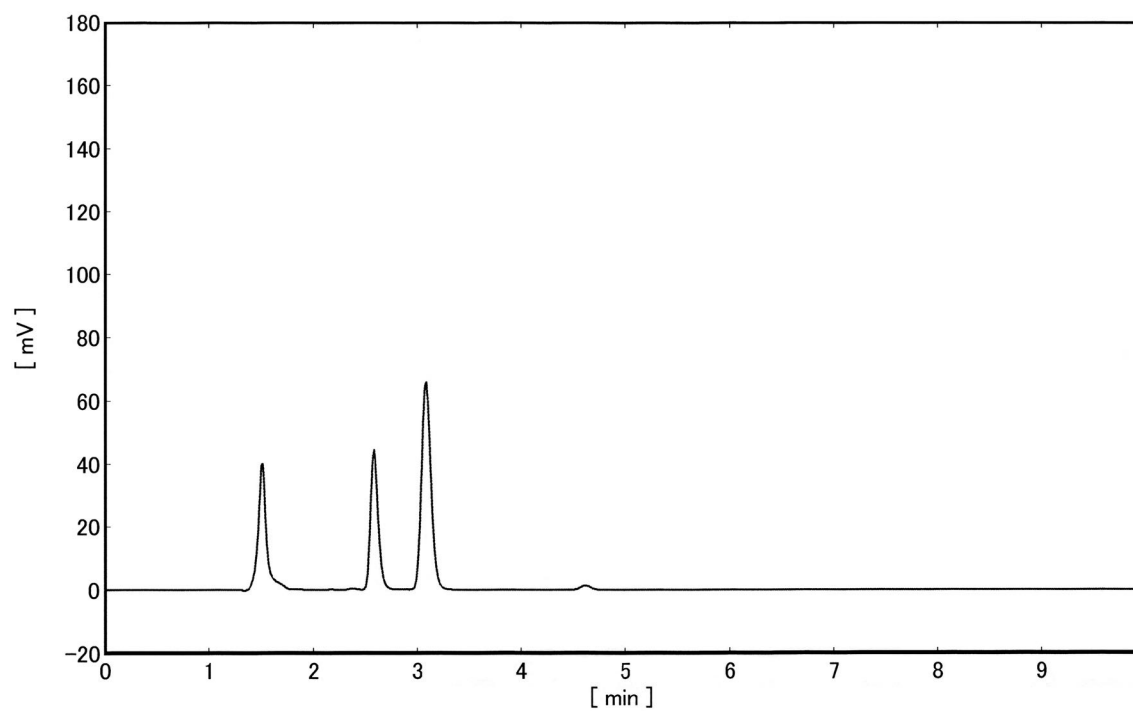
6 h : 還元型 L-グルタチオン残存率 = 96%



24 h : 還元型 L-グルタチオン残存率 = 73%



48 h : 還元型 L-グルタチオン残存率 = 45%



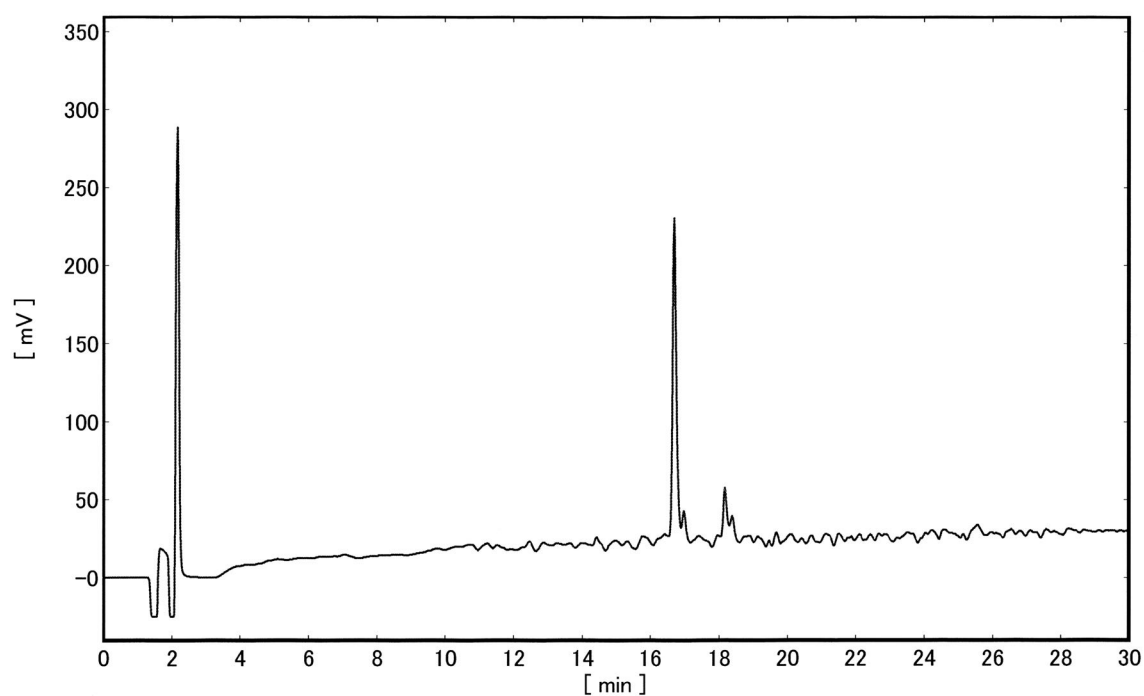
6.4.2. システイン含有ペプチドの酸化防止作用の検討

システイン含有エノラーゼペプチド (ECP) は以下のグラジエント条件で分析した (図 19)。溶離液は [A: 0.10% (v/v) TFA, 10% (v/v) acetonitrile-H₂O / B: 0.10% (v/v) TFA, 70% (v/v) acetonitrile-H₂O, from 1:0 to 0:1 over 40 min] とした。保持時間は, SH 型は 16.7 分, SS 型は 18.1 分であった。

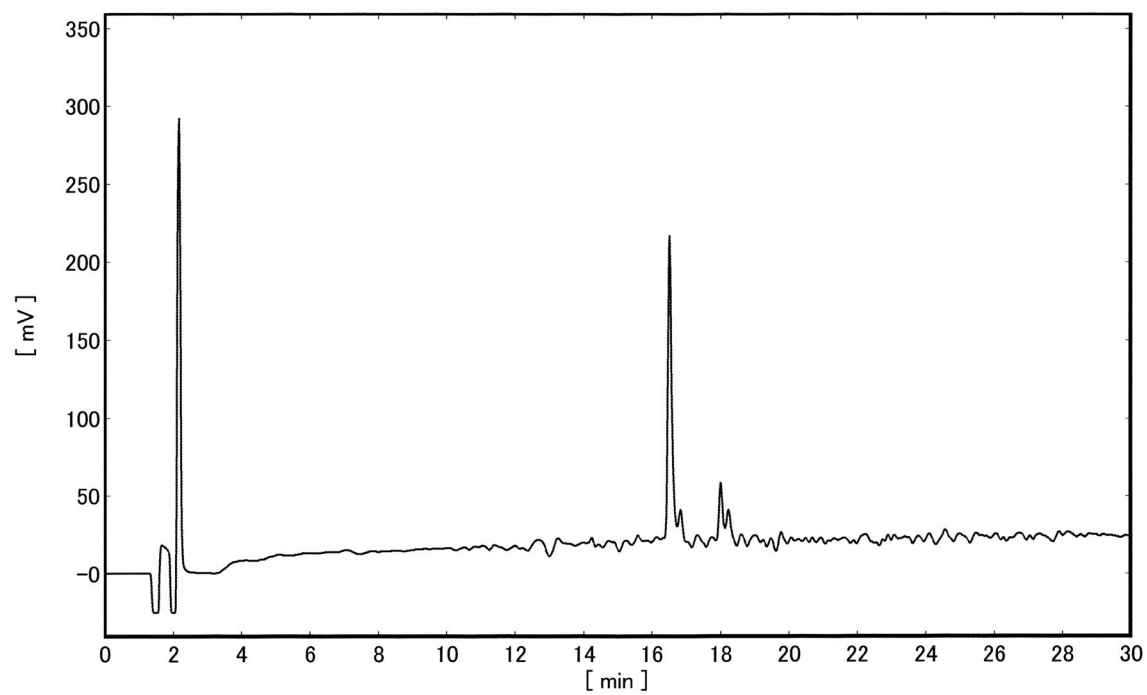
図 19. ECP の HPLC クロマトグラム

ECP (0.38 mM) + ZnL 3.8 mM)

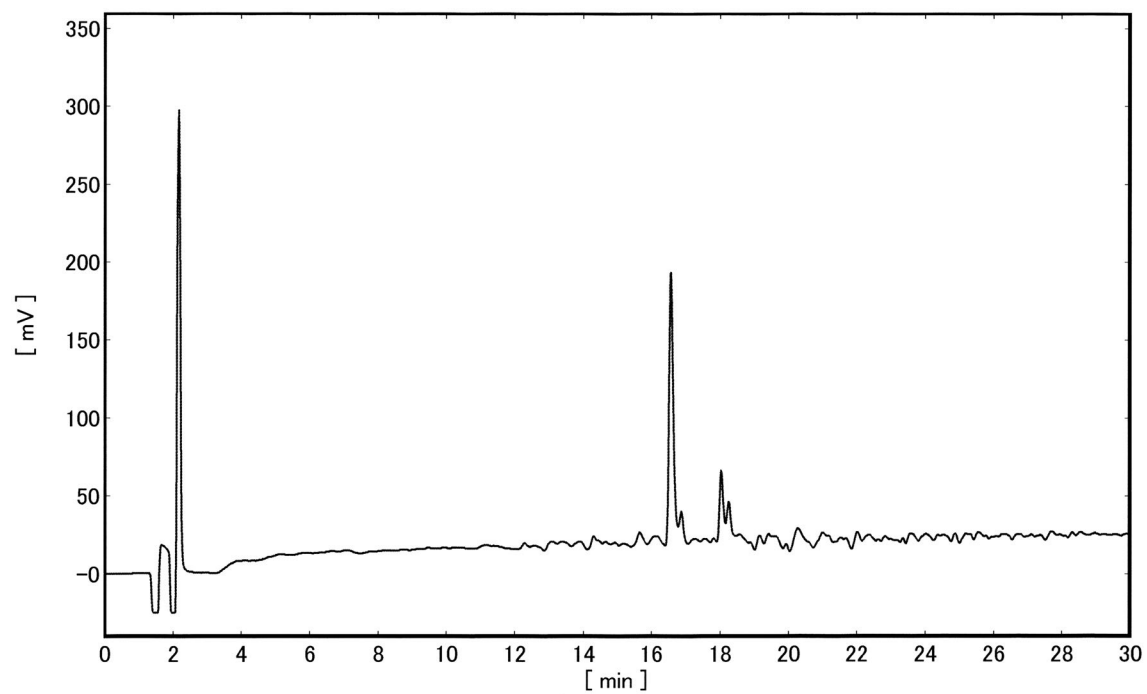
0 h



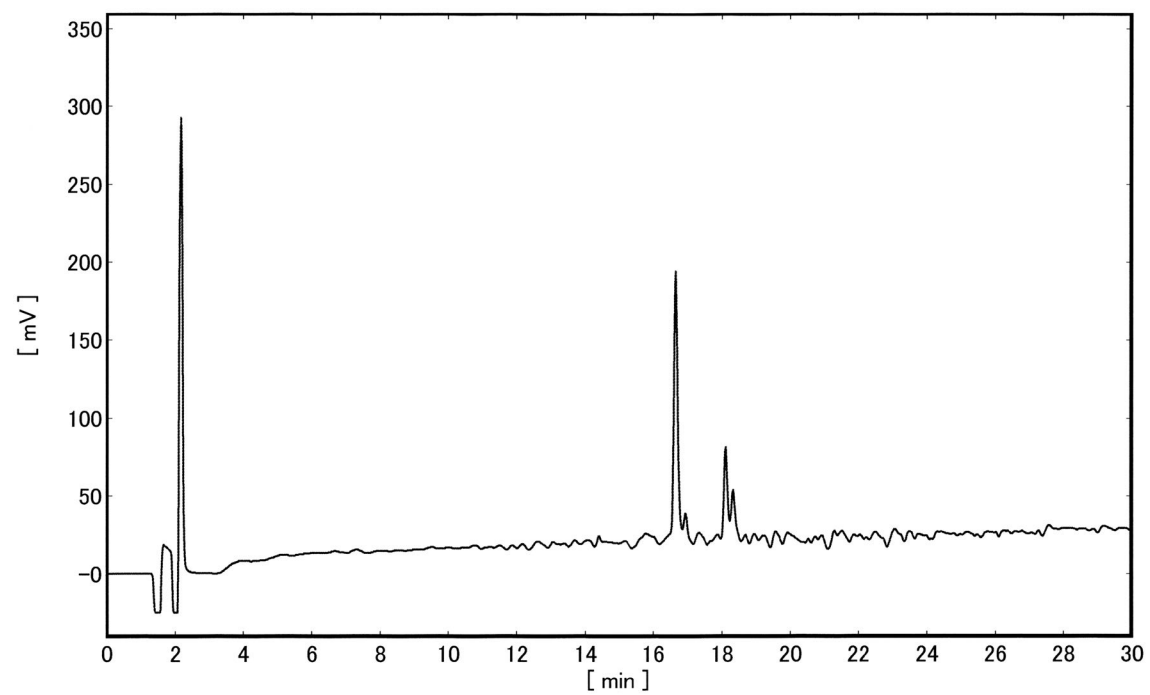
6 h : 還元型 ECP 残存率 = 96%



24 h : 還元型 ECP 残存率 = 93%

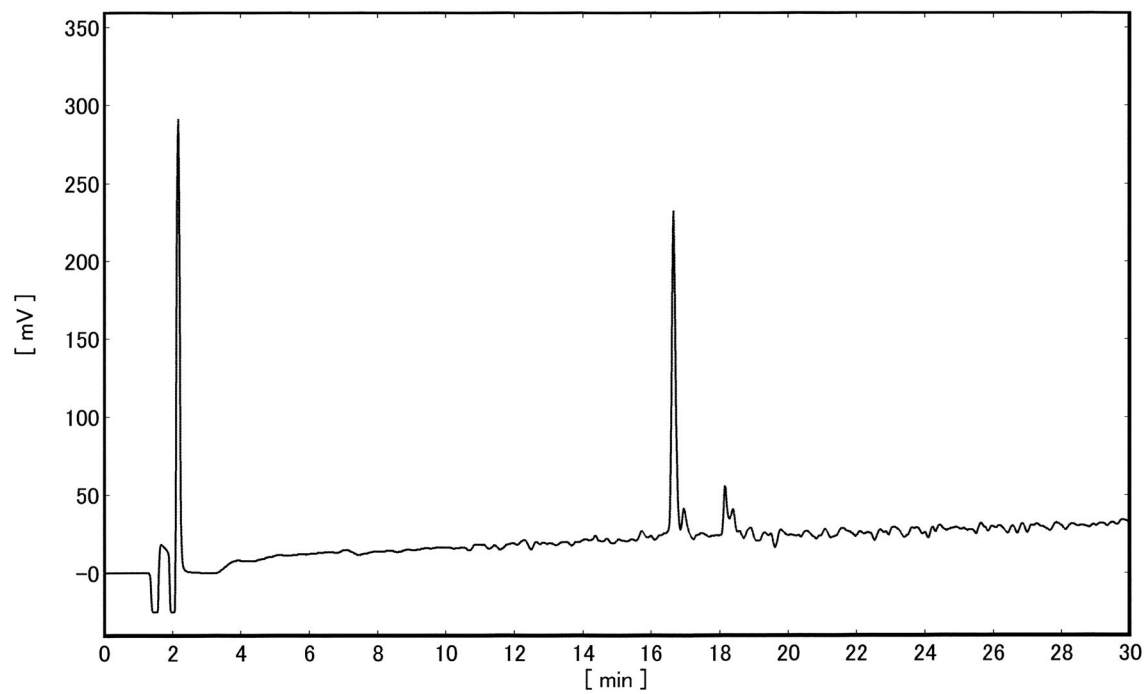


48 h : 還元型 ECP 残存率 = 86%

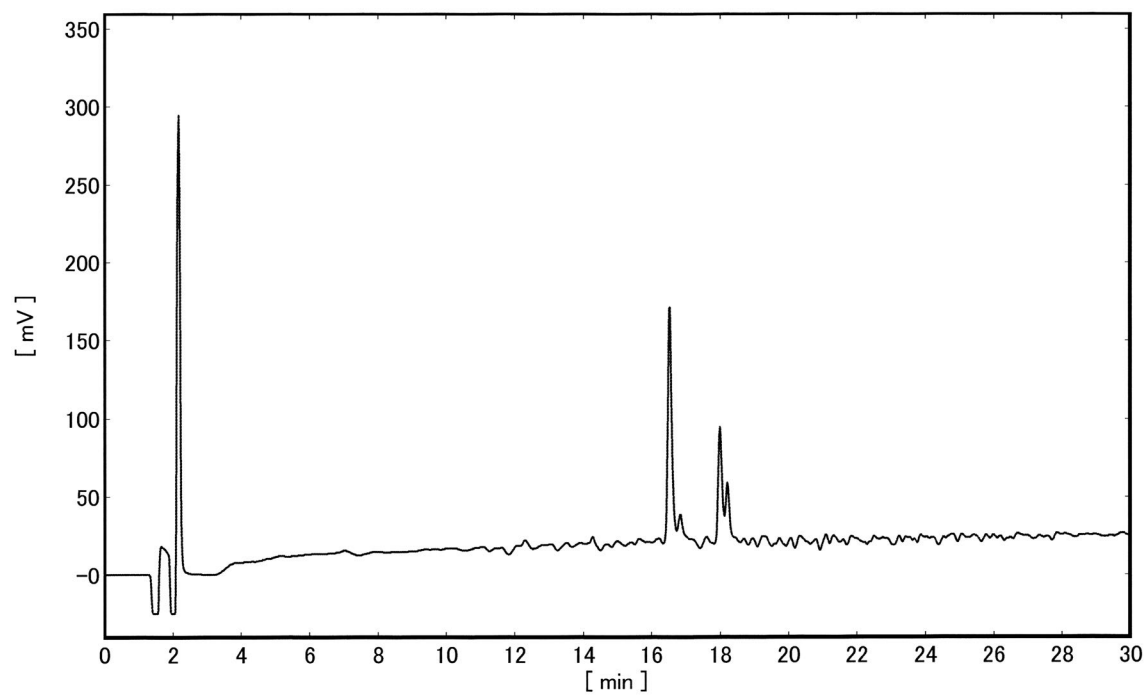


ECP (0.38 mM), ZnL 非存在下

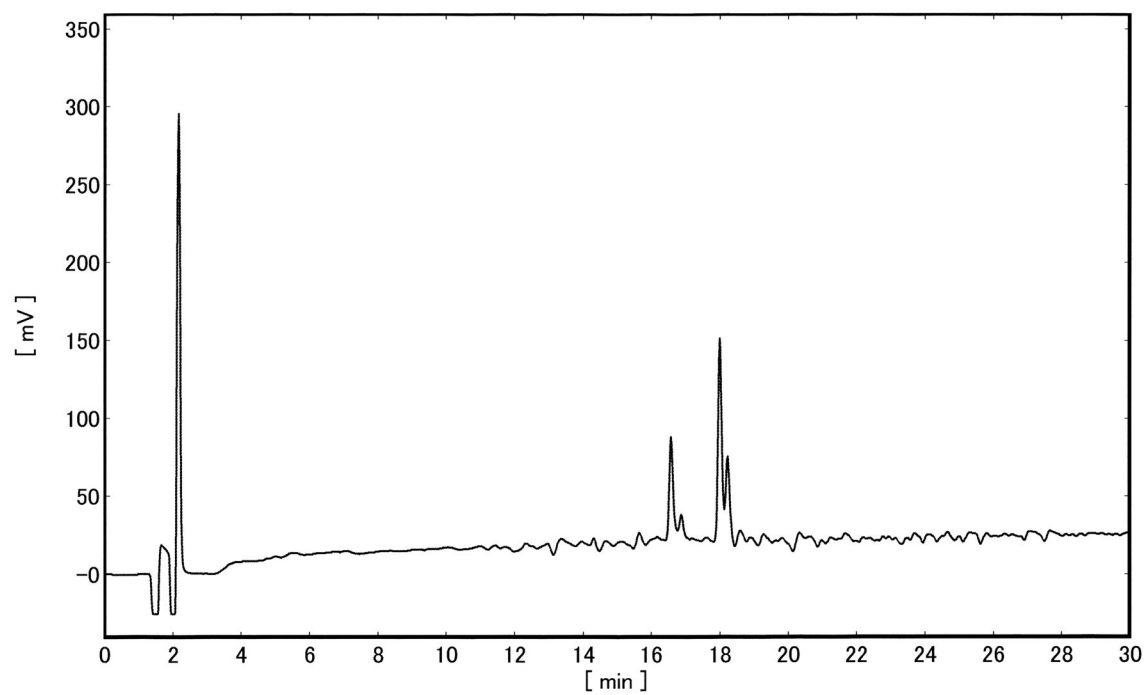
0 h



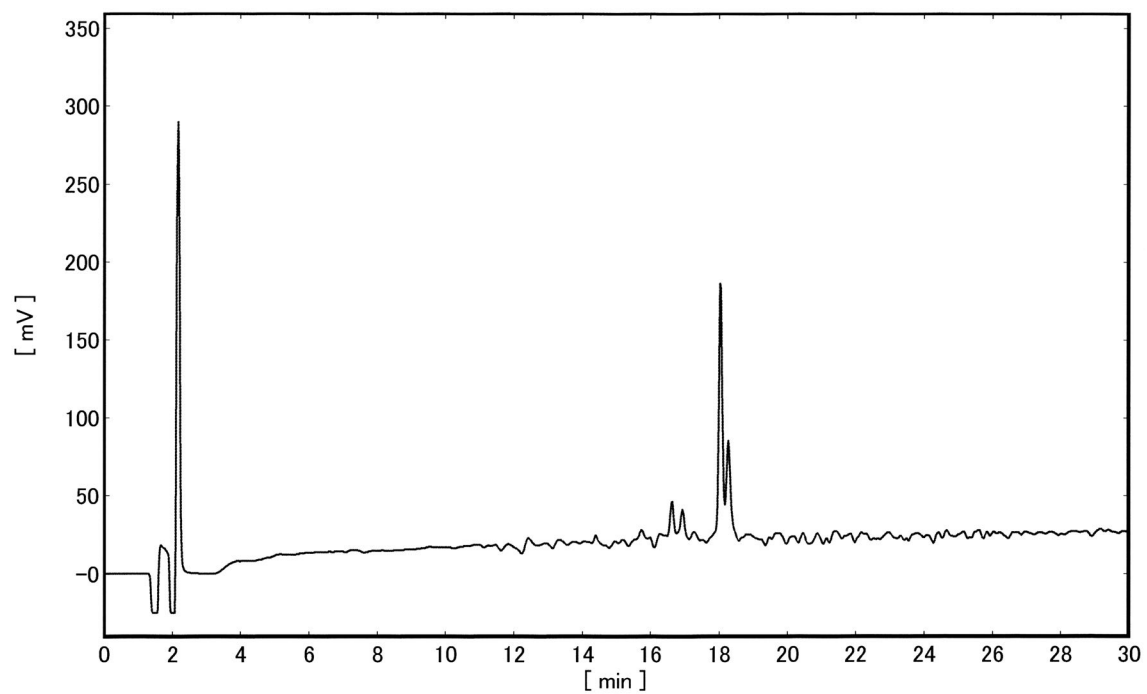
6 h : 還元型 ECP 残存率 = 82%



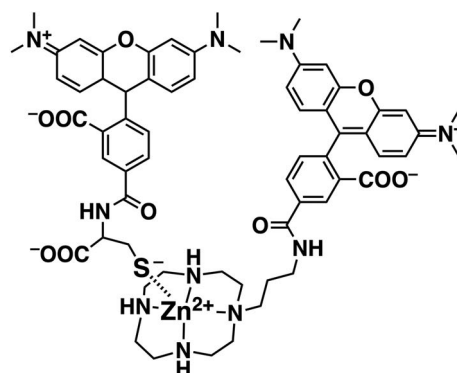
24 h : 還元型 ECP 残存率 = 42%



48 h : 還元型 ECP 残存率 = 23%



6.5. Job's plot の算出



$$C_{zc} = [1:1 \text{ Complex}] < 2.5 \times 10^{-6} \text{ [M]}$$

$$C_t = [\text{TAMRA}] = [(\text{TAMRA-ZnL})_{\text{total}}] + [(\text{TAMRA-Cys})_{\text{total}}] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ [M]}$$

$$f = \frac{[(\text{TAMRA-ZnL})_{\text{total}}]}{[(\text{TAMRA-ZnL})_{\text{total}}] + [(\text{TAMRA-Cys})_{\text{total}}]}$$

$$1-f = \frac{[(\text{TAMRA-Cys})_{\text{total}}]}{[(\text{TAMRA-ZnL})_{\text{total}}] + [(\text{TAMRA-Cys})_{\text{total}}]}$$

$$f = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0$$

$$[\text{uncomplexed TAMRA-ZnL}] = f \cdot C_t - C_{zc}$$

$$[\text{uncomplexed TAMRA-Cys}] = (1-f) \cdot C_t - C_{zc}$$

$$K = \frac{[1:1 \text{ Complex}]}{[\text{uncomplexed TAMRA-ZnL}] [\text{uncomplexed TAMRA-Cys}]}$$

$$= \frac{C_{zc}}{(f \cdot C_t - C_{zc})(C_t - f \cdot C_t - C_{zc})}$$

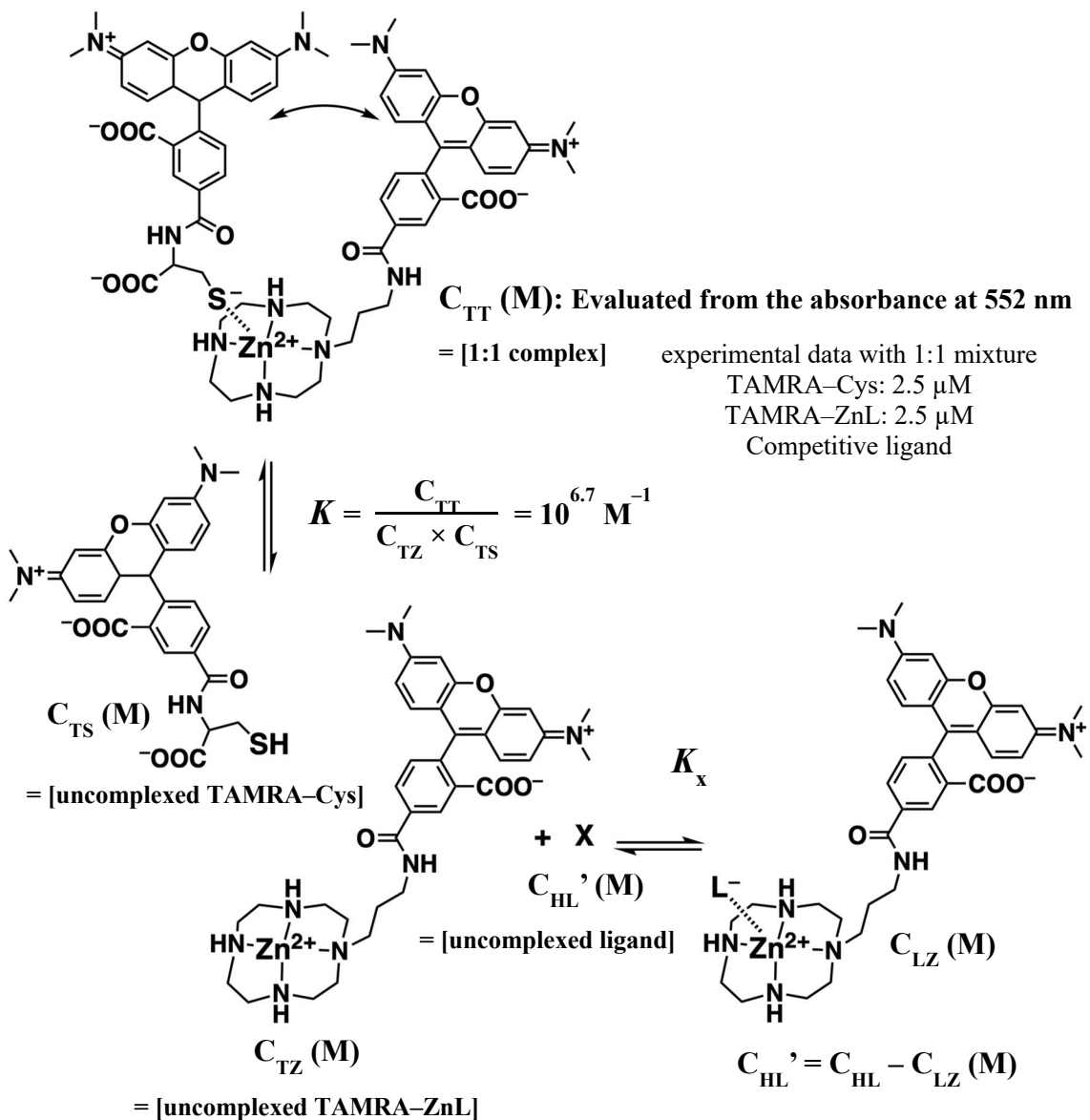
$$C_{zc}/K = (f \cdot C_t - C_{zc})(C_t - f \cdot C_t - C_{zc}) = f \cdot C_t^2 - f^2 \cdot C_t^2 - C_t \cdot C_{zc} + C_{zc}^2$$

$$C_{zc}^2 - (C_t + 1/K)C_{zc} + fC_t^2 - f^2 \cdot C_t^2 = 0$$

$$C_{zc} = \frac{(C_t + 1/K) - \sqrt{(C_t + 1/K)^2 - 4(f \cdot C_t^2 - f^2 \cdot C_t^2)}}{2}$$

6.6. TAMRA-ZnL/TAMRA-Cys 複合体に対する競合リガンドの親和性解析

Ligand Competition Method



$$C_{TS} = 2.5 \times 10^{-6} - C_{TT} \text{ (M)}$$

$$C_{HL} \approx C_{HL}' \gg 2.5 \times 10^{-6} \text{ (M)}$$

$$C_{TZ} = \frac{C_{TT}}{C_{TS} \times 10^{6.7}} \text{ (M)}$$

$$C_{LZ} = 2.5 \times 10^{-6} - C_{TT} - C_{TZ} \text{ (M)}$$

$$K = \frac{C_{LZ}}{C_{TZ} \times C_{HL}} \text{ (M}^{-1}\text{)}$$

Competitive ligand として

L-Cysteine

N-Acetyl-L-cysteine

N-acetyl-L-cysteinamide

L-Glutathione

Captopril

Acetazolamide

Enalaprilat

を選択した。

7. 補 足

7.1. 亜鉛について	52
7.2. 生物と亜鉛	52
7.3. 亜鉛酵素	53
7.4. 亜鉛酵素阻害剤	54
7.5. 亜鉛欠乏症と亜鉛酵素	57
7.6. 亜鉛イオン以外の錯体医薬	58
7.7. テトラメチルローダミン (TAMRA)	60
7.8. チオール基の酸化と還元剤	62

7.1. 亜鉛について

亜鉛元素は周期表の第4周期12族に属する。亜鉛原子の電子配置は $[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$ であり、亜鉛(II)イオン (Zn^{2+}) になると $[\text{Ar}]3d^{10}$ となる。このように亜鉛(II)イオンはd軌道が10個の電子で満たされており、閉殻で安定である。したがって、第4周期の他の金属イオン (Sc^{2+} , Ti^{2+} , V^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) とは異なる挙動を示す。例えば、酸化還元反応に関与しない、磁性や可視光の吸収性がない、といった点である。それゆえ、dブロック元素の中でも、他の金属元素を遷移金属と呼ぶのに対し、亜鉛は一般的に典型金属と呼ばれ、区別されている。上記の通り、亜鉛(II)イオン自体は酸化還元反応を起こさず、酵素反応の触媒となり、他方、鉄や銅はその酸化数の変化 ($\text{Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$, $\text{Cu}^{2+} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^+$) によって広く生体内の酸化還元反応に関わり、生体内の代謝に重要な役割を果たしている。

7.2. 生物と亜鉛

亜鉛が生物にとって必須の元素であると世界で最初に知られたのは、1869年に Raulin がクロコウジカビ・*Aspergillus niger* の成長に亜鉛が必要であると発見したことだと言われている[29]。その後、20世紀に入り、亜鉛はあらゆる動植物中に存在することが明らかになった。

ヒトにおける亜鉛の研究では、1940年に Keilin と Mann は亜鉛が赤血球中の炭酸脱水酵素に必須であることを示した[30]。この発見をきっかけに、その後300種類以上にも及ぶ亜鉛酵素が知られることとなった。

また、種々の機能を有するメタロチオネインは、1957年に Margoshes と Vallee によって発見され[31]、1960年に Kagi と Vallee によって精製と命名が行われた[32]。メタロチオネインは金属元素（亜鉛、銅、カドミウムなど）を包含し、多くのシステイン残基を持つ分子量およそ6000~7000の低分子量のタンパク質である。メタロチオネインに結合する金属種は18種類といわれているが、通常、生体内では亜鉛を結合した形で存在しており、メタロチオネインは主に生体内亜鉛の恒常性の維持に関わっている。

1969年には McCord と Fridovich によって超酸化物不均化酵素、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が発見された[33]。活性中心の金属イオンの種類により、銅亜鉛 SOD (CuZn-SOD)、鉄 SOD (Fe-SOD)、マンガン SOD

(Mn-SOD) , ニッケル SOD (Ni-SOD) の各アイソザイムが知られている。CuZn-SOD においては、銅イオンが酵素反応の活性中心として機能し、亜鉛イオンは構造の維持に関与している。SOD はスーパーオキシド (O_2^-) を酸素と過酸化水素へと変換する反応を触媒する。 O_2^- 濃度を低下させ、活性酸素障害から細胞を保護する。各種疾患の発生機序の 90% 以上に活性酸素が関与しているとも言われており、メタロチオネインや SOD は活性酸素やフリーラジカルを除去する役割を担っており、抗酸化作用は亜鉛の重要な機能のひとつである。

ジンクフィンガーはタンパク質の折り畳みに寄与する分子構造である。1985 年に Klug らによってアフリカツメガエルの卵母細胞から発見された[34-36]。システイン残基とヒスチジン残基で亜鉛イオンを掴み、タンパク質のアミノ酸鎖をコンパクトに折り畳んでいる。最もよく知られているものは 2 つのシステイン残基と 2 つのヒスチジン残基が配位した Cys₂-His₂ 型で、それ以外にも Cys₃-His 型や Cys₄ 型等も知られている。ジンクフィンガーの重要な役割のひとつは、DNA の認識である。ジンクフィンガーという名の通り、まるで指のようにして分子を掴み、分子認識を果たしている。DNA や RNA に沿って亜鉛の指を曲げ、アミノ酸を溝の中に伸ばして塩基配列を読み取っている。

7.3. 亜鉛酵素

活性中心に金属イオンを持つ酵素は金属酵素として知られており、その中でも亜鉛イオンを有するものは亜鉛酵素と呼ばれている。例として、アンジオテンシン変換酵素、炭酸脱水酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アルカリフォスファターゼを挙げる。

アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) は血圧の調節に関与する酵素である[37,38]。血管内皮細胞表面に存在しており、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系において、アンジオテンシン I からアンジオテンシン II への変換を行う。活性中心の亜鉛イオンに 2 つのヒスチジン窒素と 1 つのアスパラギン酸のカルボキシル基、1 つの水分子が配位している。

炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase, CA) は二酸化炭素と炭酸水素イオンの相互変換 ($H_2O + CO_2 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$) を触媒し、血液や組織中の酸塩基平衡を維持する働きをしている[39]。この反応は CA 存在時には非存在時に比べおよ

そ一万倍にまで加速される。活性中心の亜鉛イオンは3つのヒスチジン窒素が配位している。

アルコール脱水素酵素, アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) は補酵素 NAD^+ または NADP^+ を利用してアルコールの酸化およびアルデヒドの還元 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD(P)}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CH}=\text{O} + \text{NADH} + \text{H}^+$) を触媒する酵素である。多くは肝臓に存在し, その他胃, 腸, 腎臓, 網膜, 脳にも存在している。

アルデヒド脱水素酵素, アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) は補酵素 NAD^+ または NADP^+ を利用してアルデヒドをカルボン酸へ酸化 ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{O} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+$) する酵素である。人体に摂取されたアルコールは肝臓において ADH によりアセトアルデヒドへ, さらに ALDH により酢酸へと代謝される。ALDH には複数のアイソザイムが存在し, そのうち ALDH2 がヒト肝細胞内でのアルコール代謝に関わっている。

アルカリフォスファターゼはリン酸モノエステルのリン酸基転移反応を触媒する酵素である。特に, 水分子へリン酸基を転移する反応は加水分解反応と呼ばれる。血清中のアルカリフォスファターゼ濃度の変化はガンや肝機能障害等様々な疾患の臨床指標として利用されている[40,41]。タンパク質構造中に2個の亜鉛イオンを持ち, それぞれにヒスチジン窒素やカルボキシル基が配位している。

7.4. 亜鉛酵素阻害剤

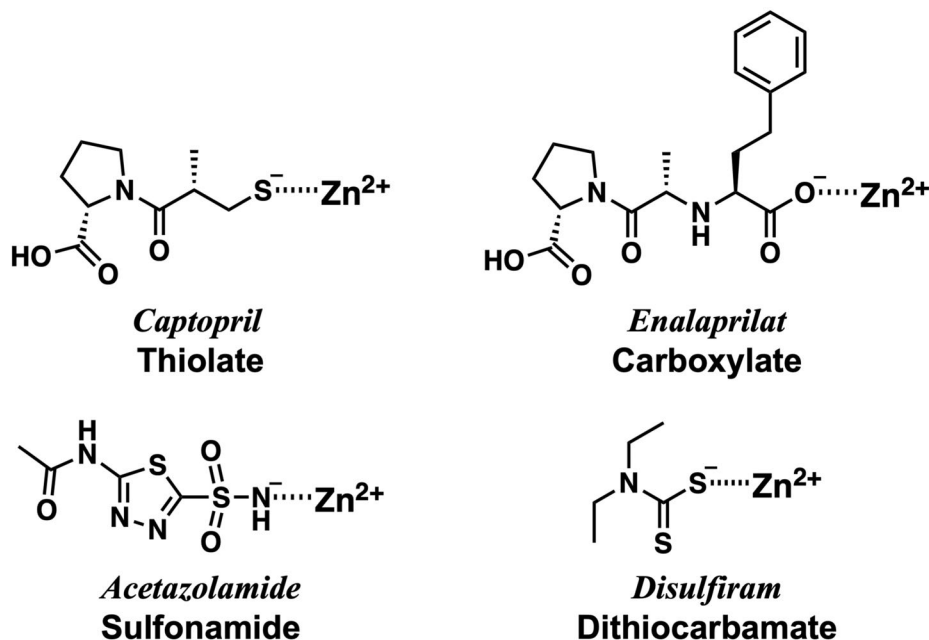
様々な配位子を持つ化合物が亜鉛酵素の機能を抑制する医薬品 (亜鉛酵素阻害剤) として利用されている。

ACE 阻害剤であるカプトプリルは, 初めて開発された降圧薬である。チオール基の S- が亜鉛イオンにアタックし, 第五配位座の水分子と入れ替わって配位することで阻害作用を示す (図 20)。一方で, チオール基に起因する副作用やバイオアベイラビリティの低さが問題点として挙げられた[42]。チオール基に起因する副作用としては, アレルギー反応や味覚障害が広く知られている。チオール分子は生体内のタンパク質チオール基と SS 交換反応を起こし, タンパク質に結合してタンパク質-低分子複合体を形成する。これが抗原となり, アレルギー反応を引き起こす。また, チオール分子が生体内金属と結合することで

金属欠乏状態となる。その代表例が亜鉛欠乏症の味覚障害である（次項参照）。

その後、それらを改善した薬剤が次々と開発され、現在ではカプトプリルを含め 12 種類の化合物が ACE 阻害剤として上市されている（図 21）[43]。エナラプリルはカプトプリルに次いで 2 番目に開発された ACE 阻害剤である。ACE の活性中心亜鉛イオンへの配位部位は表記の構造式右側のカルボン酸である（エステル化された構造を示している）。エナラプリルはプロドラッグであり、生体内のエステラーゼによってエステル部分が加水分解を受けて活性代謝物のエナラプリラトへと変換され、カルボン酸の O が亜鉛イオンにアタックして阻害作用を示す（図 20）[44]。本論（p.19）で示したように、カルボキシレート・O はチオレート・S に比べ亜鉛イオンへの親和性は低い。亜鉛イオンそのものとの親和性の低下を分子全体として補うために、フェニル基や二級アミン等のカプトプリルにない新たな官能基を導入するというドラッグデザインがなされていると考えられる。

アセタゾラミドはスルホンアミド部位が CA 活性中心の亜鉛イオンに配位する（図 20）。眼においては CA は眼圧をコントロールする房水産生に関与して



いる。眼圧が異常に高くなり、視神経が障害を受ける疾患が緑内障である。CA 阻害剤は毛様体上皮細胞で CA を阻害し、房水産生を抑制すると考えられてい

図 20. 亜鉛イオンに配位し得る配位子。
上段は化合物名、下段は官能基名である。

る[45]。したがって、点眼薬は緑内障治療剤として使用されている。また、近位尿細管のCAを阻害することで、 $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ のような HCO_3^- と H^+ の生成を抑制する。それにより $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交換系が抑制され、 Na^+ の再吸収が減少して利尿作用を示す。その他、てんかん、特発性頭蓋内圧亢進症、

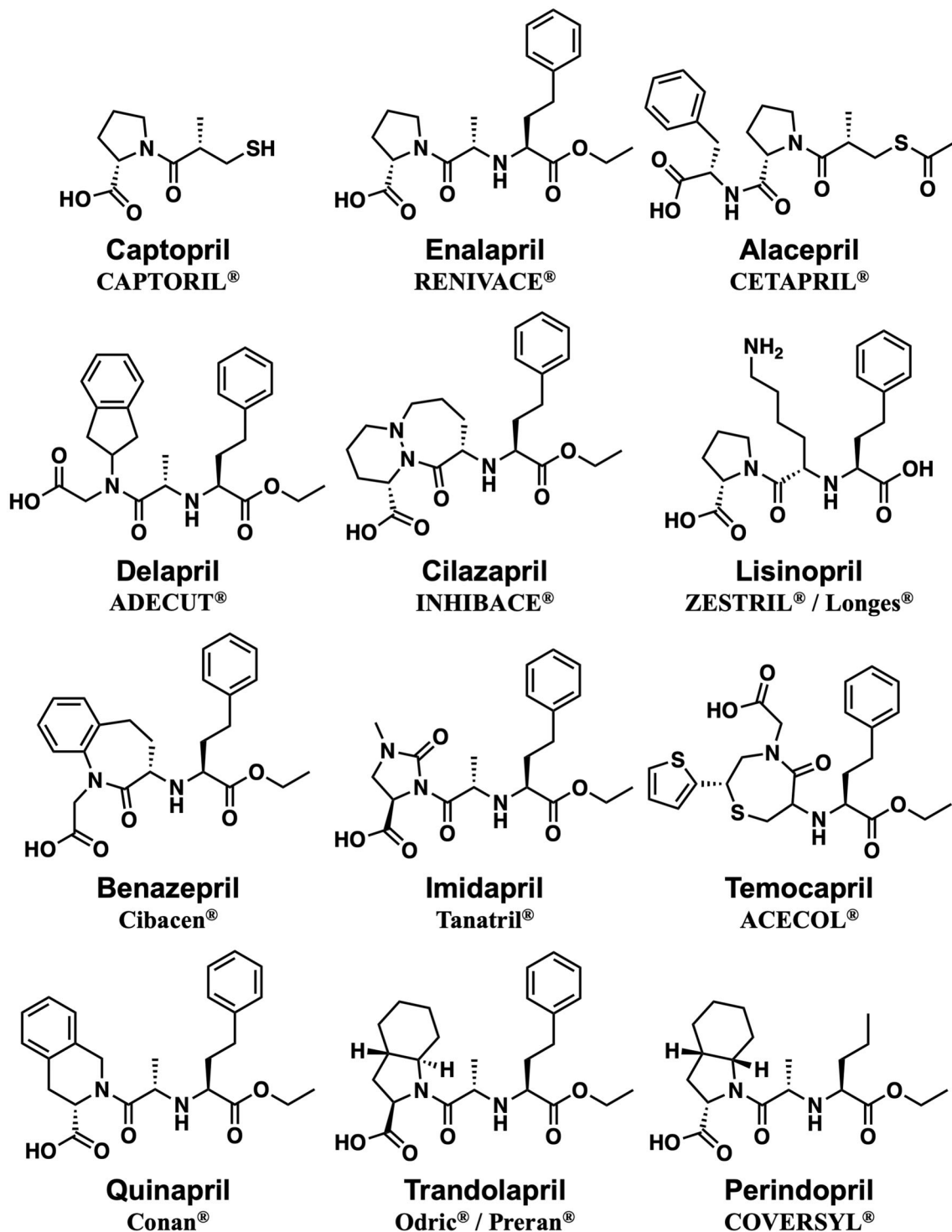


図 21. 現在上市されている ACE 阻害剤。

高山病等の治療にも利用されている。アセタゾラミドの他、ドルゾラミド、ブリンゾラミド、メタゾラミド、ジクロフェナミドが知られており、これらはいずれもスルホンアミド化合物である（図 22）。

ジチオカルバメート部位を持つジスルフィラムはアルデヒドデヒドロゲナーゼを阻害するため、嫌酒薬として利用されている（図 20）。嫌酒薬を服用中に飲酒をすると、血中アセトアルデヒド濃度が上昇し、頭痛、動悸、顔面紅潮、悪心、嘔吐、呼吸困難といった悪酔い状態を引き起こす。

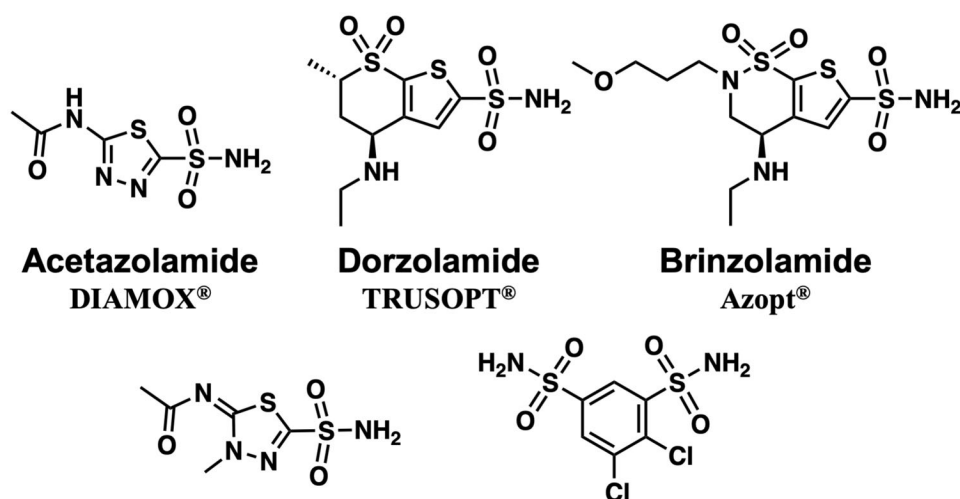


図 22. 現在上市されている CA 阻害剤。

※Neptazane, KEVEYIS は日本国内では販売されていない。

7.5. 亜鉛欠乏症と亜鉛酵素

亜鉛欠乏状態になると、皮膚病変、粘膜病変、性的発育障害、脱毛、成長遅延、免疫機能の低下、創傷治癒の遅延、夜盲症、味覚障害などといった多様な亜鉛欠乏症を生じる。亜鉛酵素の活性低下が欠乏症発症のひとつの要因である。亜鉛欠乏によって CA 活性が低下し、舌での刺激に対する神経応答が低下していく [46-48]。したがって、味覚障害は CA の活性低下に起因する部分が多いと考えられている。

7.6. 亜鉛イオン以外の錯体医薬

近年では、亜鉛イオン以外の金属イオンとの配位結合を利用した医薬品（錯体医薬）が実用化されている。

HIV インテグラーゼ（HIV ウイルス DNA をヒト DNA に組み込む働きをする酵素）は活性中心に2つのマグネシウムイオンを有する。その阻害剤（抗 HIV 薬）である Dolutegravir は、酸素原子が連なった分子構造（タンデム型酸素配位子）となっており、酸素原子がマグネシウムイオンに配位して阻害作用を示す（図 23）。図 23 に示した HIV インテグラーゼ阻害剤は塩野義製薬株式会社とグラクソ・スミスクライン株式会社（後にヴィーブヘルスケア株式会社）の合弁会社により開発された。同様の構造を持つ HIV インテグラーゼ阻害剤が他に3化合物上市されている（図 24）。

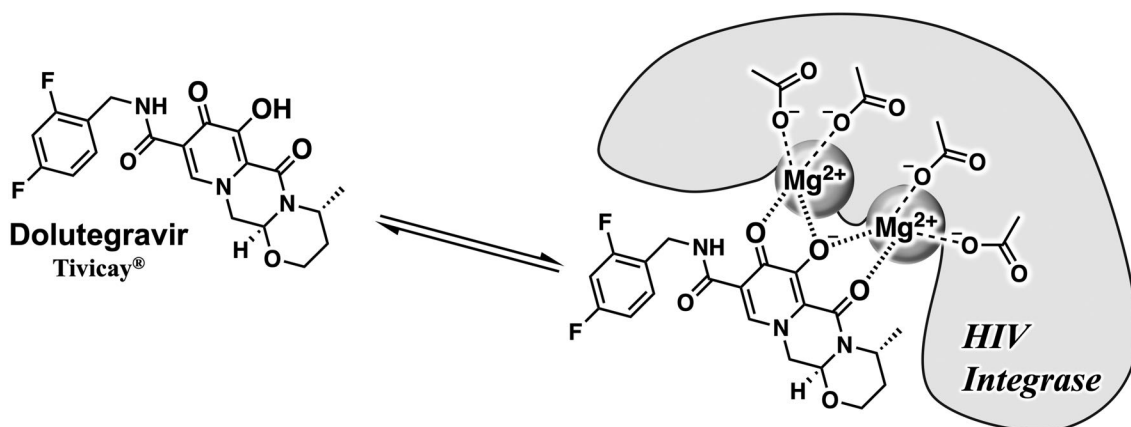


図 23. Dolutegravir の HIV インテグラーゼ阻害機構。

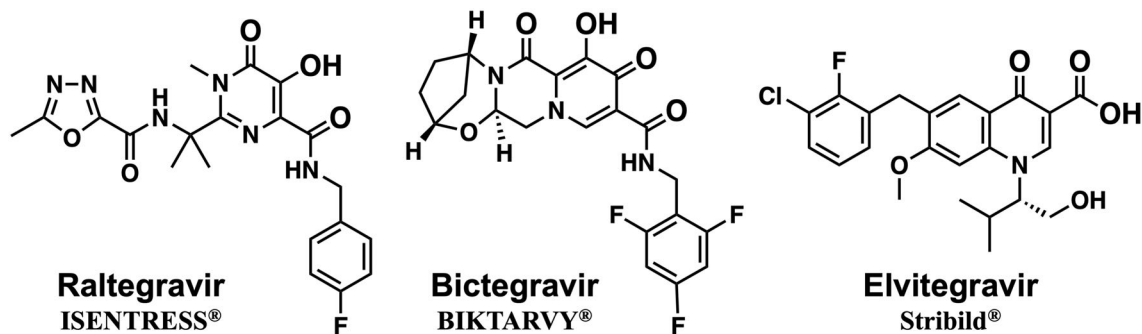


図 24. Dolutegravir 以外の現在上市されている HIV インテグラーゼ阻害薬。

2018年に、既存薬とは異なる新たな作用機序を持つインフルエンザ治療薬が登場した。塩野義製薬が創製したバロキサビル マルボキシル（商品名：ゾフルーザ）である（図25）。この化合物はインフルエンザウイルス特有の酵素であるキャップ依存性エンドヌクレアーゼを選択的に阻害し、インフルエンザウイルスの mRNA 合成を阻害することでウイルスの増殖を抑制する。エンドヌクレアーゼも HIV インテグラーゼと同様に活性中心に2つのマグネシウムイオンを有する。バロキサビル マルボキシルは細胞内で図25右側のようにタンデム型酸素配位子となり、マグネシウムイオンに配位して阻害作用を示す。この種の酵素阻害剤は塩野義製薬が以前より研究を進めてきた分野であり、今後も新たな錯体医薬の創出が期待される。

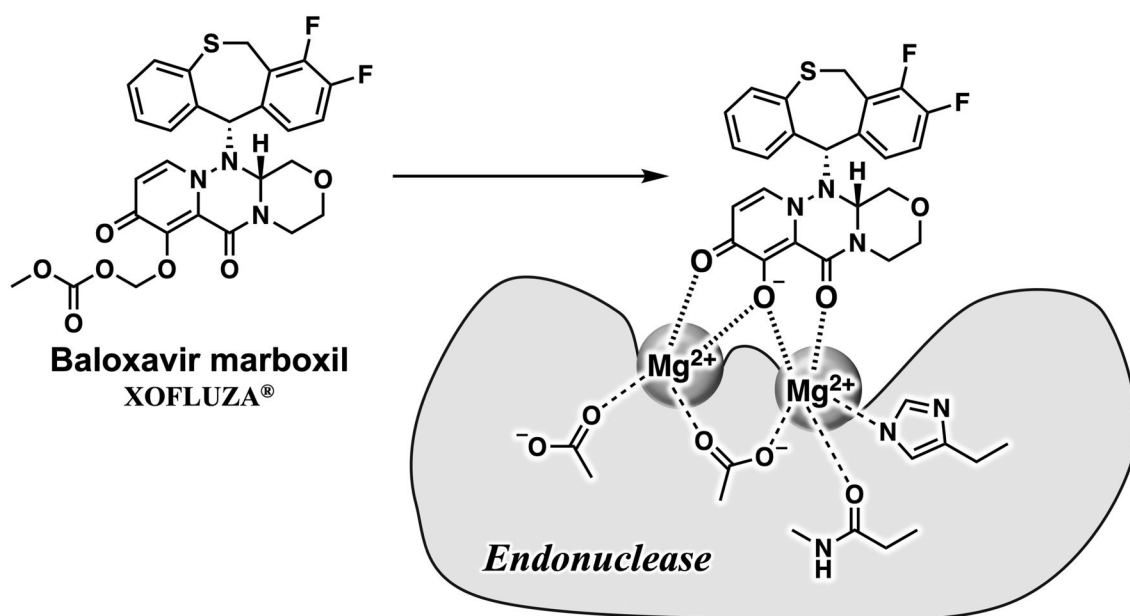


図25. Baloxavir marboxil のインフルエンザ エンドヌクレアーゼ阻害機構。

古くから利用され続けているキノロン系抗菌薬（図 26）も、錯体医薬のひとつである。細菌は DNA 複製に必須な酵素である DNA ジャイレーズを持つ。DNA ジャイレーズは、2 本鎖 DNA を同時に切断・再結合することにより DNA の高次構造を変化させ、DNA の複製・転写・組み換え・修復等に重要な役割を果たしている。キノロン系抗菌薬は DNA-DNA ジャイレーズ-キノロンの複合体を形成し、DNA ジャイレーズによる DNA 鎖の再結合を阻害することによって細菌の増殖を妨げる。このとき、キノロンの 3 位カルボン酸と 4 位カルボニル基が DNA ジャイレーズが持つマグネシウムイオンに配位する [49]。

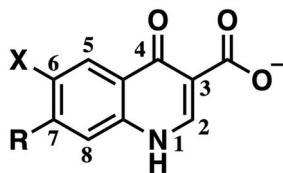


図 26. キノロン系抗菌薬の基本骨格。

X = H: キノロン, X = F: フルオロキノロン (ニューキノロン)

7.7. テトラメチルローダミン (TAMRA)

テトラメチルローダミン・TAMRA（図 4 参照）は、一般的によく用いられている蛍光色素である。安価で入手できる、安定性が高い（光退色がほとんどない、溶液状態で長期保存可能である）、pH の影響をほとんど受けないといった特徴がある。後述のフルオレセインに比べ若干蛍光が弱いものの、扱いやすい化合物である。また、蛍光バックグラウンドが小さいという利点もある。

TAMRA と同じくキサンテン骨格を持ち、一般的に利用されている色素にフルオレセインがある。フルオレセインはおそらく最も頻繁に用いられている蛍光色素である。TAMRA を含むローダミン類よりも低波長側に蛍光を有する。現在使われている色素の中では最も明るいですが、pH の影響を大きく受ける。高 pH で蛍光が増大する一方、低 pH ではプロトン化とカルボン酸部位が環構造を

作ることから蛍光は消失する（図 27。TAMRA は幅広い pH の水溶液中でも吸光度や蛍光にほとんど変化がない）。また、強い光にさらされるとフォトブリーチングを受けることから、取扱時や保存時には注意が必要である。

本実験系では、安定で扱いが容易な TAMRA を使用した。蛍光分子である TAMRA は蛍光を消光する性質を持つクエンチャー分子でもあり、TAMRA 2 分子が相互作用する。TAMRA/TAMRA 相互作用により、静的消光 (Static Quenching) と動的消光 (Dynamic Quenching) が起こる。静的消光とは、蛍光分子と消光分子がおおよそ 1 nm 以下の極めて近い距離に接近して非蛍光性の基底状態複合体を形成し消光を示す現象である。この基底状態複合体には、芳香環部位の π - π 相互作用によるスタッキングの形成や電荷移動相互作用による電荷移動錯体の形成が関与している。一方、動的消光とは、蛍光分子と消光分子がおおよそ 10 nm 以下のやや離れた距離に位置し、互いの励起エネルギーを交換し合うことで消光を示す現象である。FRET (Fluorescence resonance energy transfer) 現象等に代表される。TAMRA は蛍光分子であり、励起された単分子 TAMRA は基底状態に戻る際に余分なエネルギーの一部を蛍光や熱エネルギーといった形で分子外へ放出する。しかし、クエンチャー分子でもある TAMRA の特徴として、TAMRA 2 分子が近接している場合、TAMRA の芳香環部位で

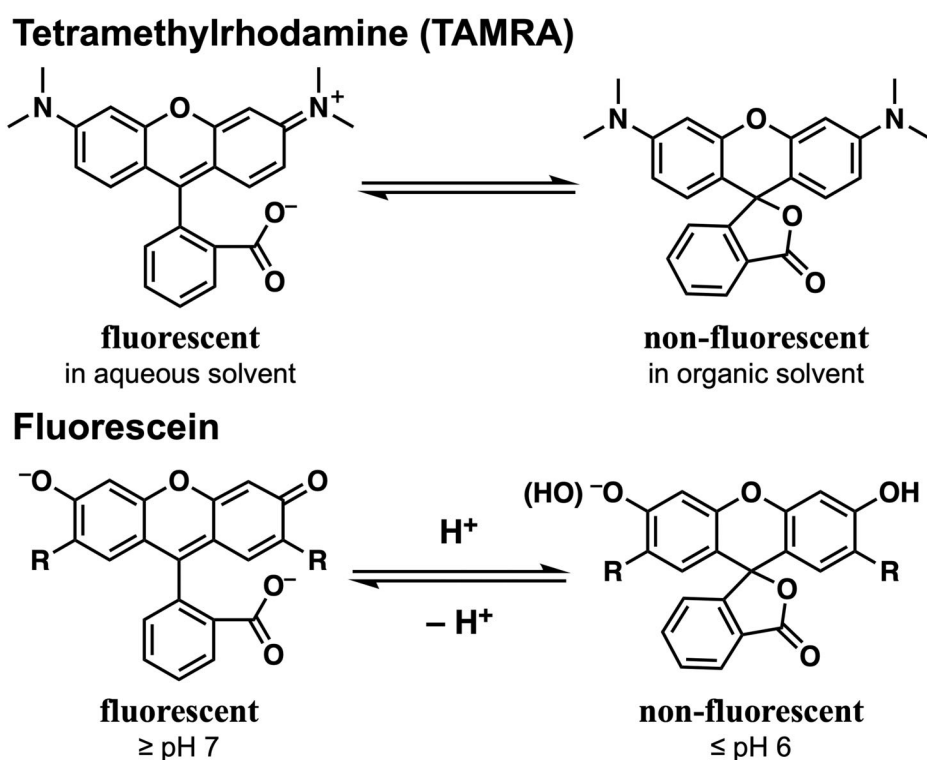


図 27. TAMRA と Fluorescein。

スタッキングを生じ、基底状態複合体を形成することによる静的消光や、TAMRA 2 分子間で励起エネルギーを交換する動的消光により、蛍光を消光することができる[50]。

そして、TAMRA 2 分子が基底状態複合体を形成する際に、蛍光の変化だけでなく、吸収波長も大きく変化した。そのため、本研究では吸光度の変化を利用して測定を行った。蛍光法ではなく吸光度法を採用するメリットとしては、高い定量性が得られることが挙げられる。蛍光はセル依存性があるが、吸光度はほぼセル依存性なく測定ができる。TAMRA はガラスに吸着してしまうため、本実験ではガラスセルは使用できなかった。そのため、アクリル（ポリメタクリル酸メチル）製のディスポセル（ディスポーザブルセル）を使用した。蛍光・吸収波長を測定する際は、多少なりともセルに依存したばらつきが出てしまう。吸収波長測定ではセル毎の反射等の誤差は修正できる一方、蛍光波長ではできない。そのため、吸光度の方がより定量性のある実験ができる。今回は 450 nm の吸光度が濃度非依存的に一定になることを利用してセル間の差異を調整した。

7.8. チオール基の酸化と還元剤

タンパク質中の亜鉛イオン (II) には、主にヒスチジンの N、グルタミン酸やアスパラギン酸の O、システインの S が配位する。タンパク質リガンドの配位数は 3～6 である[51]。ヒスチジンのイミダゾール基およびグルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシル基は大気雰囲気下、生理的条件下で安定であるが、システインのチオール基は空気酸化されて主にジスルフィド結合 (S-S) を作り、それ以外にも様々な硫黄酸化物 (-SOH, -SNO など) を形成する (図 28) [18,52]。生体内では、チオール分子は酸化還元レベルに応答し、種々の細胞外刺激やストレスに対する細胞内シグナル伝達の酸化還元スイッチとして機能している[22,53]。それらチオール分子の機能や局在、修飾状態等に関する研究はチオールバイオロジーと呼ばれ、近年大きな注目を集めている。チオール酸化の問題は生体試料中の亜鉛-チオール化合物をインタクトな形で定量分析する際に特に難しい課題となる。

したがってチオレート結合型亜鉛錯体の分析では、チオールの還元状態を維持するために、無酸素雰囲気下であったり、例えば tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) [19]のような還元剤を用いたりして実験が行われている。TCEPは他の還元剤（ジチオスレイトール・DTT や2-メルカプトエタノール・2-ME）と比べると高価であるが、還元力が強い、安定性が高い、不可逆的反応である、無臭である（不快臭がない）、といった性質を有しており、有用な還元剤として知られている。また、還元されるタンパク質とジスルフィド結合を形成しない、金属アフィニティークロマトグラフィーで使用される金属を還元しない、等の特徴も持つ。TCEPとDTTの還元機構を図29に記す。DTTはチオール化合物であるため、タンパク質とS-S結合を形成したり、水溶液中で自身でS-S結合を作り還元力が弱まったりする。それに対し、TCEPは分子内にS原子を持たず、また吸光度や蛍光も示さないため、還元後に溶液中に残存したままでも悪影響を及ぼさない。

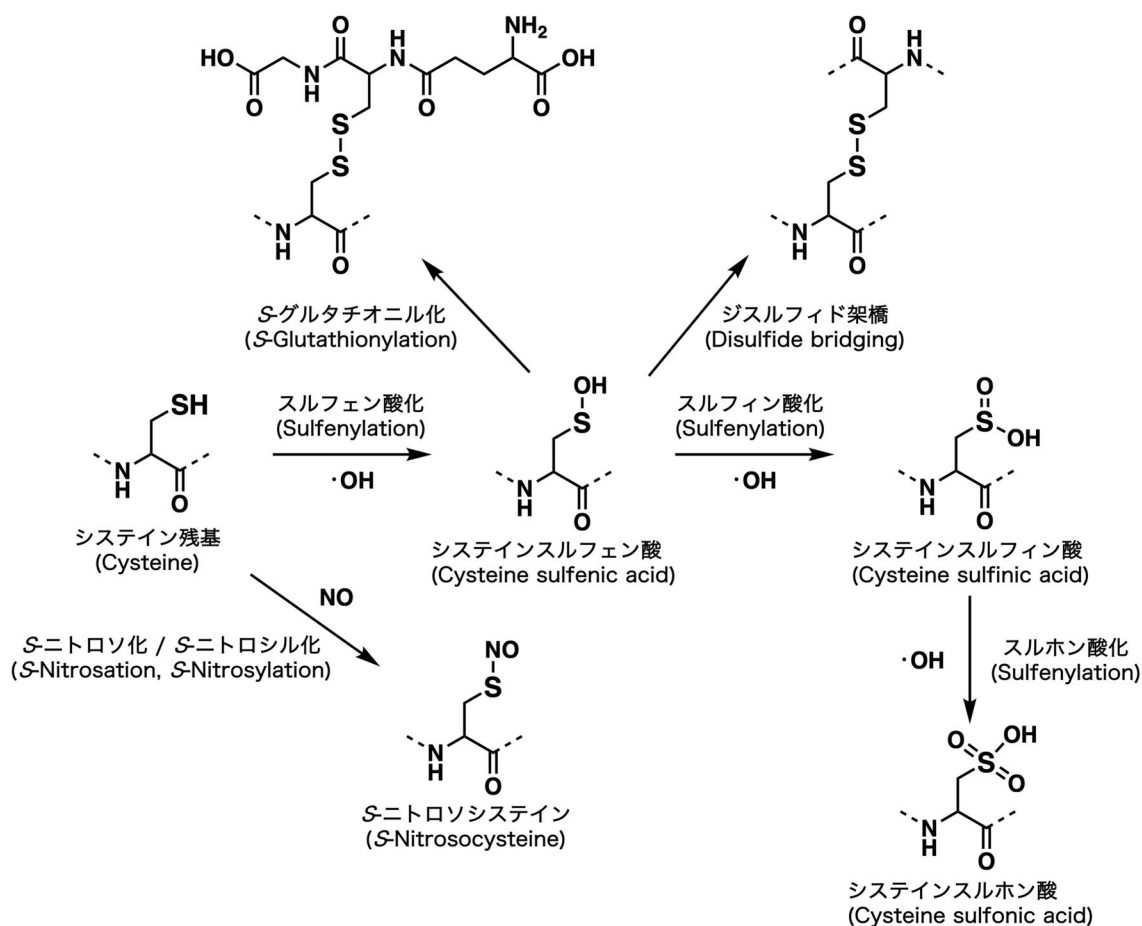
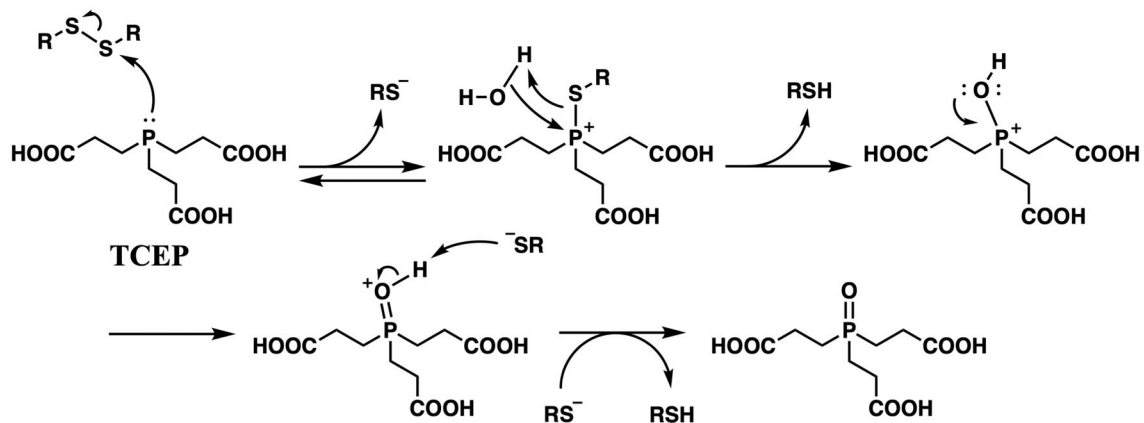


図 28. チオール基と種々の酸化物。参考文献[52]より引用，改変。

Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)



Dithiothreitol (DTT)

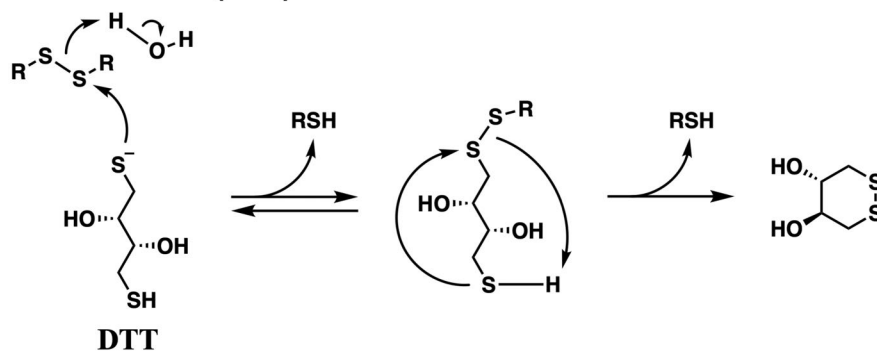


図 29. TCEP と DTT の還元反応機構。

8. 参考文献

- [1] W. Maret and Y. Li, Coordination Dynamics of Zinc in Proteins, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4682–4707.
- [2] A. Kocyla, J. Adamczyka and A. Kręzel, Interdependence of free zinc changes and protein complex assembly – insights into zinc signal regulation, *Metallomics*, 2018, **10**, 120–131.
- [3] 駒井三千夫, 神戸大朋, 亜鉛の機能と健康：新たにわかった多彩な機能, 建帛社, 2013, 239 p.
- [4] K. A. McCall, C.-c. Huang and C. A. Fierke, Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes, *J. Nutr.*, 2000, **130**, 1437S–1446S.
- [5] W. Maret, Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life, *Adv. Nutr.*, 2013, **4**, 82–91.
- [6] F.-M. Klingler, T. A. Wichelhaus, D. Frank, J. Cuesta-Bernal, J. El-Delik, H. F. Müller, H. Sjuts, S. Göttig, A. Koenigs, K. M. Pos, D. Pogoryelov and E. Proschak, Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo- β -lactamases: Strategy To Combat Multidrug-Resistant Bacteria, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 3626–3630.
- [7] T. Koike, M. Takamura and E. Kimura, Role of Zinc(II) in β -Lactamase II: A Model Study with a Zinc(II)-Macrocyclic Tetraamine (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane, Cyclen) Complex, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 8443–8449: The reported dissociation constant, K_d of the captopril anion ($R-S^-$)-bound zinc(II)-cyclen complex ($K_d = [ZnL][R-S^-]/[1:1 \text{ complex}]$) is $10^{-7.0}$ M at 25 °C and $I = 0.10$ M. The deprotonation constants (pK_a) of H_2O-ZnL (to form HO^-ZnL) and the SH group of captopril (to form $R-S^-$) are 7.9 and 10.0, respectively. From these equilibrium constants, a 1:1 complex formation constant, K ($= [1:1 \text{ complex}]/[\text{uncomplexed ZnL}][\text{uncomplexed captopril}]$) can be evaluated to be $10^{4.3} \text{ M}^{-1}$ at pH 7.4 and 25 °C.
- [8] T. Koike, S. Kajitani, I. Nakamura, E. Kimura and M. Shiro, The catalytic carboxyester hydrolysis by a new zinc(II) complex with an alcohol-pendant cyclen (1-(2-hydroxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane): A novel model for indirect activation of the serine nucleophile by zinc(II) in zinc enzymes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1210–1219.

- [9] T. Koike, T. Watanabe, S. Aoki, E. Kimura and M. Shiro, A Novel Biomimetic Zinc(II)–Fluorophore, Dansylamidoethyl–Pendant Macrocyclic Tetraamine 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen), *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12696–12703.
- [10] E. Kimura, T. Koike and S. Aoki, *Macrocyclic and Supramolecular Chemistry: How Izatt–Christensen Award Winners Shaped the Field*, R. M. Izatt/Wiley, Hoboken, NJ, 2016, 415–443.
- [11] K. E. Sapsford, L. Berti and I. L. Medintz, Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 4562–4589.
- [12] M. Somura, K. Takiyama, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita and T. Koike, A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the kinase reaction of a substrate peptide, *Anal. Methods*, 2011, **3**, 1303–1309.
- [13] B. Z. Packard, D. D. Toptygin, A. Komoriya and L. Brand, Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 11640–11645.
- [14] R. J. Christie, C. J. Tadiello, L. M. Chamberlain and D. W. Grainger, Optical Properties and Application of a Reactive and Bioreducible Thiol-Containing Tetramethylrhodamine Dimer, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 476–480.
- [15] H. Kusamoto, A. Shiba, N. Koretake, H. Fujioka, Y. Hieda, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita and T. Koike, A novel thiol-affinity micropipette tip method using zinc(II)–cyclen-attached agarose beads for enrichment of cysteine-containing molecules, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2016, **1031**, 195–201.
- [16] J. Notni, H. Görls and E. Anders, Zinc Thiolate Complexes $[\text{ZnL}_n(\text{SR})]^+$ with Azamacrocyclic Ligands: Synthesis and Structural Properties, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 1444–1455.
- [17] A. Vaasa, I. Viil, E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina and A. Uri, High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK, *Anal. Biochem.*, 2009, **385**, 85–93.

- [18] E. Calce, R. M. Vitale, A. Scaloni, P. Amodeo and S. De Luca, Air oxidation method employed for the disulfide bond formation of natural and synthetic peptides, *Amino Acids*, 2015, **47**, 1507–1515.
- [19] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran and G. M. Whitesides, Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 2648–2650.
- [20] E. J. Olson and P. Bühlmann, Getting More out of a Job Plot: Determination of Reactant to Product Stoichiometry in Cases of Displacement Reactions and n:n Complex Formation, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 8406–8412.
- [21] R. Natesh, S. L. U. Schwager, H. R. Evans, E. D. Sturrock and K. R. Acharya, Structural Details on the Binding of Antihypertensive Drugs Captopril and Enalaprilat to Human Testicular Angiotensin I-Converting Enzyme, *Biochemistry*, 2004, **43**, 8718–8724.
- [22] M. S. B. Paget and M. J. Buttner, Thiol-Based Regulatory Switches, *Annu. Rev. Genet.*, 2003, **37**, 91–121.
- [23] N. J. Pace and E. Weerapana, Diverse Functional Roles of Reactive Cysteines, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 283–296.
- [24] M.L. Conte, K.S. Carroll, The chemistry of thiol oxidation and detection, in: U. Jakob, D. Reichmann (Eds.), *Oxidative Stress and Redox Regulation*, Springer, Netherlands, 2013, pp. 1–51.
- [25] E. T. Chouchani, A. M. James, I. M. Fearnley, K. S. Lilley and M. P. Murphy, Proteomic approaches to the characterization of protein thiol modification, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 120–128.
- [26] P. K. Chrysanthopoulos, P. Mujumdar, L. A. Woods, O. Dolezal, B. Ren, T. S. Peat and S.-A. Poulsen, Identification of a New Zinc Binding Chemotype by Fragment Screening, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 7333–7349.
- [27] H. Fujioka, M. Tsunehiro, M. Kawaguchi, Y. Kuramoto, H. Kurosaki, Y. Hieda, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita and T. Koike, Simple enrichment of thiol-containing biomolecules by using zinc(II)-cyclen-functionalized magnetic beads, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 1601–1609.

- [28] R. F. Kubin and A. N. Fletcher, Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes, *J. Lumin.*, 1982, **27**, 455–462.
- [29] J. Raulin, Etudes chimiques sur la végétation. *Ann. Sci. Nat. Ser. V. Bot.*, 1869, **11**, 93–299.
- [30] D. Keilin and T. Mann, Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme, *Biochem. J.*, 1940, **34**, 1163–1176.
- [31] M. Margoshes and B. L. Vallee, A CADMIUM PROTEIN FROM EQUINE KIDNEY CORTEX, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4813–4814.
- [32] J. H. Kagi and B. L. Vallee, The role of zinc in alcohol dehydrogenase. V. The effect of metal-binding agents on the structure of the yeast alcohol dehydrogenase molecule, *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 3188–3192.
- [33] J. M. McCord and I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 6049–6055.
- [34] J. Miller, A. D. McLachlan and A. Klug, Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes, *EMBO J.*, 1985, **4**, 1609–1614.
- [35] G. P. Diakun, L. Fairall and A. Klug, EXAFS study of the zinc-binding sites in the protein transcription factor IIIA, *Nature*, 1986, **324**, 698–699.
- [36] A. Klug and D. Rhodes, Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1987, **52**, 473–482.
- [37] L. T. Skeggs, JR, J. R. Kahn and N. P. Shumway, THE PREPARATION AND FUNCTION OF THE HYPERTENSIN-CONVERTING ENZYME, *J. Exp. Med.*, 1956, **103**, 295–299.
- [38] D. Coates, The angiotensin converting enzyme (ACE), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003, **35**, 769–773.
- [39] B. C. Tripp, K. Smith and J. G. Ferry, Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 48615–48618.
- [40] E. G. Giannini, R. Testa, V. Savarino, Liver enzyme alteration: a guide for clinicians, *Can. Med. Assoc. J.*, 2005, **172**, 367–379.
- [41] S. T. Stingham, J. F. Moura, P. Zancanella, G. A. Rodrigues, M. A. Pianovski, E. Lalli, D. L. Arnold, J. C. Minozzo, L. G. Calfe, R. C. Ribeiro and B. C. Figueiredo, Specific Immunoassays for Placental Alkaline Phosphatase as a Tumor Marker, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2006, Article ID 56087, 1-8.

- [42] A. B. Atkinson and J. I. S. Robertson, CAPTOPRIL IN THE TREATMENT OF CLINICAL HYPERTENSION AND CARDIAC FAILURE, *THE LANCET*, 1979, **2**, 836–839.
- [43] A. A. Patchett, E. Harris, E. W. Tristram, M. J. Wyvratt, M. T. Wu, D. Taub, E. R. Peterson, T. J. Ikeler, J. ten Broeke, L. G. Payne, D. L. Ondeyka, E. D. Thorsett, W. J. Greenlee, N. S. Lohr, R. D. Hoffsommer, H. Joshua, W. V. Ruyle, J. W. Rothrock, S. D. Aster, A. L. Maycock, F. M. Robinson, R. Hirschmann, C. S. Sweet, E. H. Ulm, D. M. Gross, T. C. Vassil and C. A. Stone, A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Nature*, 1980, **288**, 280–283.
- [44] X. Wanga, S. Wua, D. Xua, D. Xieb and H. Guo, Inhibitor and Substrate Binding by Angiotensin-converting Enzyme: Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Molecular Dynamics Studies, *J. Chem. Inf. Model*, 2011, **51**, 1074–1082.
- [45] A. Bar-Ilan, N. I. Pessah and T. H. Maren, The Effects of Carbonic Anhydrase Inhibitors on Aqueous Humor Chemistry and Dynamics, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1984, **25**, 1198–1205.
- [46] M. Komai and B. P. Bryant, Acetazolamide specifically inhibits lingual trigeminal nerve responses to carbon dioxide, *Brain Res.*, 1993, **612**, 122–129.
- [47] T. H. Maren, A. Bar-Ilan, C. W. Conroy, W. F. Brechue, Chemical and pharmacological properties of MK-927, a sulfonamide carbonic anhydrase inhibitor that lowers intraocular pressure by the topical route, *Exp. Eye Res.*, 1990, **50**, 27–36.
- [48] J. Chandrashekar, D. Yarmolinsky, L. v. Buchholtz, Y. Oka, W. Sly, N. J. P. Ryba and C. S. Zuker, The Taste of Carbonation, *Science*, 2009, **326**, 443–445.
- [49] A. Mustaev, M. Malik, X. Zhao, N. Kurepina, G. Luan, L. M. Oppgaard, H. Hiasa, K. R. Marks, R. J. Kerns, J. M. Berger and K. Drlica, Fluoroquinolone-Gyrase-DNA Complexes TWO MODES OF DRUG BINDING, *J. Biol. Chem.*, 2014, **289**, 12300–12312.
- [50] A. Shiba, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita and T. Koike, TAMRA/TAMRA Fluorescence Quenching Systems for the Activity Assay of Alkaline Phosphatase, *Sensors*, 2017, **17**, 1877.
- [51] A. Krężel and W. Maret, The biological inorganic chemistry of zinc ions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2016, **611**, 3–19.
- [52] 戸田年総, タンパク質の酸化修飾と老化, *基礎老化研究*, 2011, **35**, 17–22.
- [53] B. Groitl, U. Jakob, Thiol-based redox switches, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1844**, 1335–1343.

謝 辞

本研究に際し、終始、教育的かつ科学的なご指導ならびにご鞭撻を賜りました広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 医薬分子機能科学研究室 小池 透 教授に謹んで心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、細部に渡り有益なるご指導ならびにご助言を賜りました、医薬分子機能科学研究室 木下 英司 准教授，木下 恵美子 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、格別のご高配を賜りました広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 熊谷 孝則 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において、審査ならびに数々の有益なご助言を賜りました審査委員の広島大学大学院医歯薬保健学研究科 松浪 勝義 教授，熊本 卓哉 教授，山野 幸子 准教授に厚く感謝申し上げます。

研究活動はもとより、私生活におきましても親身に接していただき、学生生活を充実したものにしてくださいました医薬分子機能科学研究室卒業生の芝 晃生 博士，河口 真歩 修士に深く感謝いたします。

最後に、大学院で学ぶ機会を与え、私の長きにわたる学生生活を温かく見守り、励ましていただきました家族に深く感謝の意を表します。

2020年3月

草本 寛