

— Invited review —

鉄といのち

三野芳紀

Iron and Life

Yoshiki Mino

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received November 29, 2016)

Abstract The X-ray crystallographic analysis of single-crystal mugineic acid-Cu(II) complex showed that the mugineic acid acts as a hexadentate ligand. The coordination of Cu(II) involved the azetidine nitrogen, N(1), secondary amine nitrogen, N(2), and both terminal carboxylate oxygens, O(1) and O(5), in an approximate planar coordination, while hydroxyl oxygen, O(8), and intermediate carboxylate oxygen, O(4), are bonded axially. Mugineic acid is one of the low molecular weight naturally occurring hexadentate chelators. Mugineic acid, a typical phytosiderophore, shows a remarkably stimulating effect on ^{59}Fe -uptake and chlorophyll synthesis in the rice plant. A salient feature is the higher reduction potential ($E_{1/2} = -102\text{mV}$ vs. NHE) of the mugineic acid-Fe(III) than those of bacterial siderophores. The X-ray diffraction study for the structurally analogous Co(III) complex of the mugineic acid-Fe(III) complex demonstrates that the azetidine nitrogen and secondary amine nitrogen, and both terminal carboxylate oxygens, coordinate as basal planar donors, and the hydroxyl oxygen, intermediate carboxylate oxygen bind as axial donors in a nearly octahedral configuration. The iron-transport mechanism in gramineous plants appears to involve the excretion of mugineic acid from the roots which aids Fe(III)-solubilization and reduction of Fe(III) to Fe(II).

Manganese peroxidase (MnP) is a component of the lignin degradation system of the basidiomycetous fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. This novel Mn(II)-dependent extracellular enzyme contains a single protoporphyrin IX prosthetic group and oxidizes phenolic lignin model compounds. To elucidate the heme environment of this enzyme, we have studied its electron paramagnetic resonance and resonance Raman spectroscopic properties. Consequently, it is most likely that the heme environment of MnP resembles those of HRP, cytochrome c peroxidase, and lignin peroxidase. In addition, the degradation methods using basidiomycetous fungi or Fe^{3+} - H_2O_2 mixed reagent were developed for dioxins and PCBs.

The resonance Raman spectroscopic studies were undertaken for iron-sulfur proteins (chloroplast-type ferredoxins (Fds), [4Fe-4S] Fds, and high-potential iron proteins). The information about the environment of each cluster was described. Furthermore, the complete amino acid sequence of respective [2Fe-2S] Fds from mainly solanaceous plants were determined and compared with the primary structures of Fds of other higher plants. The taxonomic relationship was also discussed. Finally, the toxic effect of iron on our health and the development for novel antibacterial drugs capable of inhibiting the iron transport system of *Vibrio vulnificus* were described.

Key words — mugineic acid; siderophore; iron transport; ferredoxin; amino acid sequence; resonance Raman spectroscopy; manganese peroxidase

<退職に当たって>

2017年3月末日をもって、大阪薬科大学を定年退職することになりました（嘱託の2年間を含む）。無事退職の日を迎えられたのは、教職員の

先生方始め、事務職員の皆さまのご協力とご理解があったお蔭であり、この紙面を借りて、心から皆様にお礼を申し上げる次第です。

さて、私の研究生活を振り返ってみると、常に金属、いわゆる無機成分に関する研究に従事してきた。本学を昭和47年に卒業した後、物理化学教室の助手に就任し、井上正敏先生の指導の下、「グリセロリン酸カルシウムに関する研究」をさせて頂いた。徳島大学大学院では、「原子吸光分析法による植物中のゲルマニウムの定量に関する研究」を行った。大学院修了後、本学生薬学教室助手として戻ることができ、太田長世先生とともに、蛍光X線分析装置を用いて、各種生薬中に含まれる無機元素の分析を中心に研究を進めてきた。一方では、京都大学薬学部の杉浦幸雄先生との共同研究で生体の鉄取り込みに関する研究を進めて行き、このテーマで薬学博士の学位を取得した。その後も、色々な方面で鉄に関する研究を進めてきたので、ここでは、「鉄といのち」の題目で私が研究してきた内容を中心にまとめてみたい。

鉄は必須金属の一つである。「なぜ、鉄が必須金属になったか？」と学生に尋ねると、「ヘモグロビンなどのタンパク質に含まれているから」と答える。もちろん、この答で間違っていないが、私は、あえて満点は与えず、「生命が地球上に誕生したときの周りの環境に鉄分が豊富にあった。特に、2価鉄のイオンとして溶けており、生命体はその鉄を利用して、進化を遂げてきたから」そして、「その鉄を重要な生命反応の一員として、利用するようになったから」と答えさせている。

鉄は、有機化合物では難しい反応を容易に行なえる特技をもっている。その特技とは、酸化還元反応であり、もう一つは酸素分子に親和性を持つということである。鉄は2価と3価の状態をとるので、電子の移動を伴う酸化還元反応を得意とする（銅は1価と2価の状態をとるので鉄同様酸化還元酵素に含まれるが、2価の状態しかとらない亜鉛は縮合や加水分解反応を担う酵素に含まれる）。シトクロム類、鉄硫黄タンパク質は、電子伝達系に関与する。また、2価鉄は酸素分子との親和性が高く、ヘモグロビン中の鉄が酸素分子と結合するのも、この性質に由来する。このように

多くのタンパク質や酵素に鉄原子が利用されているが、実は、生物が鉄を利用するのは容易ではなく、多くの生物は常に鉄欠乏の状態にある。これは、30億年前に起こった地球上の大気環境の変化に起因している。海洋においてラン藻類の先祖に当たる、光合成を行うシアノバクテリアが大増殖を遂げたのである。彼らは光合成の副産物として酸素分子を環境に放出し始めた。最初に海洋中の可溶性の2価鉄を3価に酸化した。その結果3価鉄は、不溶性の水酸化鉄として、海底に沈降していった。時を経て、それは赤色の二三酸化鉄に変化していく。これらは数億年後海底の隆起によって地上に現れ、これらを含む赤鉄鉱は近代文明の礎となった（オーストラリアの大地の色は赤鉄鉱を含むため赤褐色）。海洋中の2価鉄を酸化し終えた酸素は、大気中に放出され、大気の成分を今とほとんど同じ酸素濃度（約20%）に変えていった。そして、地球上は酸素の溢れる酸化状態になっていった。このような大気に接する水中では鉄は3価として存在するので、不溶性の状態が存在し、生物がそれを利用するにはあまりにも低い濃度でしか溶けていない。そのような理由により、多くの生物（微生物）は絶滅したと考えられる。しかしながら、一部の生物は突然変異を繰り返すことで、不溶性の鉄を溶かして、体内に取り込むという素晴らしい技を手に入れた。このとき、微生物が鉄欠乏状態で鉄を溶かすために分泌する、3価鉄に親和性の高いキレーターがシデロホアである。大気と接する環境に生育する微生物はこのようなシデロホアを介する独自の鉄取り込み機構を備えている。微生物の鉄取り込みはJ. Neilandらによる精力的な研究により有用な知見が得られており、分子レベルでの考察が可能になってきた。一方、植物の鉄取り込みはほとんど分っていなかった。私は、幸運にも植物の鉄取り込みに関する研究を行う機会を得た。そこで、1. では、植物の鉄取り込み機構について説明したい。このテーマで学位を取得後、米国に留学しOregon Graduate Center (Portland, Oregon) にて、共鳴ラマン分光法による鉄含有タンパク質の研究を行う機会を得た。2. では、リグニン分解酵素

の一種であるマンガンペルオキシダーゼと、それをヒントに帰国後に行ったダイオキシンの分解に関する研究を簡単に述べる。3. では、共鳴ラマン分光法で検討したフェレドキシンなどの鉄硫黄タンパク質について紹介する。4. では、フェレドキシンの研究をヒントに、帰国後研究を開始したフェレドキシンの一次構造を利用する植物の分類法と同定法について述べる。5. では、生体に必須である鉄の“もろ刃の剣”の一面、すなわち毒作用について述べたい。6. では、病原菌の鉄獲得系を阻害することで抗菌活性を示す化合物の探索について述べる。

＜はじめに＞

地球が誕生して約 45 億年、生命が発生してからも 35 億年の長い年月がたっている。その間、生命は地球という無機環境にさらされてきた。したがって無機環境に存在する 100 種ほどの元素の有用性を試してみるには十分な時間があつた。生物は自らのいのちをよりよく存続させるために貪欲なものである。100 種ほどの元素の中からおよそその 3 分の 1 に当たる 30 種ほどの元素の有用性を認めて、それらを利用してきた。いったん利用しだすと、それらに依存性ができて、それらの元素は生物にとって必須となる。ここでは、ほとんど全ての生物に必須で、様々な機能を果たしている鉄を取り上げ、いのちとの関わりについて考えてみたい。生物が鉄を取り込むため、どのように巧妙な手段を発展させてきたのか、また体内に取り込まれた鉄はどのような構造の分子として存在し、如何なる機能を果たしているのか、そして、このような生体に不可欠な鉄含有分子が、逆に生体に障害作用を及ぼす可能性についても紹介できれば幸いである。

1. ムギネ酸鉄錯体と植物の鉄取り込み機構

一歪み少ない八面体構造を形成。動物に対する生理活性にも興味—

鉄は、好気性条件下では 3 価イオンとして存在し、中性付近の pH において極めて難溶性の水酸

化鉄 (III) を形成する。この不溶性の必須金属を利用するために、微生物はシデロホアと呼ばれる強力な鉄キレーター（その構造からヒドロキサム酸型とカテコール型に大別される）を分泌することが知られている。

植物もまた、正常な成長を維持するために、絶えず鉄の供給を必要としている。もし、鉄欠乏状態になれば、クロロフィルの生合成が抑制され、鉄クロロシス（萎黄病）が起こってくる。普通、土壌それ自体が鉄欠乏になることはないが、アルカリ土壌の多くでは利用可能な鉄イオンが不足する場合がある。しかし、アルカリ土壌に生育する植物すべての植物が鉄クロロシスを起こすのではなく、そのうちの多くの植物は不溶性の鉄を効率よく吸収することが可能である。鉄欠乏耐性と呼ばれるこの種の植物は鉄ストレスに対して、①根からの水素イオンの放出、②根からの還元剤の放出、③根における鉄 (III) の還元、④根における有機酸の増加などの適応機構をもっていることが、Brown によって示されている。しかし、これらの説を裏付ける物質はまだ同定されておらず、また、著者らが研究を始めるまでは、植物界のシデロホアも見出されていなかった。

著者らの研究によって、イネ科植物の鉄取り込みがムギネ酸と呼ぶ新アミノ酸を介して行われていることが示され、注目を集めてきた。このアミノ酸の発見は、高城が行った鉄欠乏耐性のエンバク（燕麦）と非耐性であるイネの水耕実験に始まった。彼はこの実験の過程で、中性付近の pH で鉄溶解能をもつ物質がイネの根から殆ど分泌されないのに対し、エンバクの根から多量に分泌されること、さらにその分泌量が鉄欠乏時に著しく増加することを見出した。次いで、竹本らは、鉄欠乏耐性の大麦 (*Hordeum vulgare* L. var. *Minorimugi*) の根の洗液から、ムギネ酸と命名された新アミノ酸を単離し、そのユニークな構造を解明した (Fig. 1)。その後、大麦以外のイネ科植物からムギネ酸様活性物質が次々と単離されており、これらのアミノ酸がイネ科植物の鉄の吸収と移動に重要な役割を果たしていることが推定された。

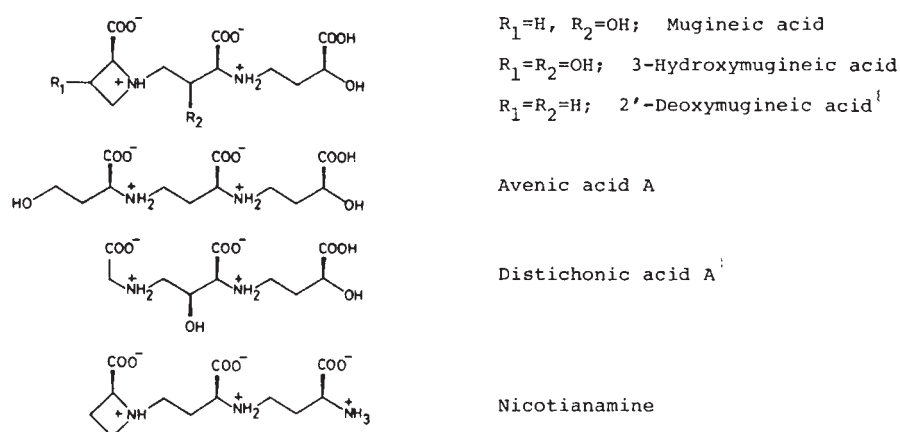


Fig. 1. Iron Chelators of Plant Origin

著者らは、植物界のシデロホアと考えられるムギネ酸の鉄錯体の構造と性質を明らかにする目的で種々検討を重ね、イネ科植物の鉄取り込み機構に関して有力な知見を得ることができたので、以下に紹介する。

著者らの最大の関心は、低分子（分子量 320）で、しかも鎖状のムギネ酸分子が鉄（III）などの金属イオンとどのような構造の錯体を形成するかにあった。そこでムギネ酸の安定な金属錯体の 1 つである銅（II）錯体の結晶解析を試み、ムギネ酸が銅（II）イオンに六座配位子として機能し、1 分子で歪んだ八面体構造を有することを明らかにすることができたとき、植物の分子設計の巧みさに驚かすにはいられなかった（Fig. 2）。^{1,2)} なぜなら、今まで X 線結晶解析で明らかにされた多くのアミノ酸およびペプチドの銅（II）錯体にお

いて、六座配位子として機能する例は皆無だったからである。銅（II）錯体に引き続いて、鉄（III）錯体と構造上類似性を有するコバルト（III）錯体の結晶解析および溶液中のコンフォメーション解析を行い、より歪みの少ない八面体構造をとることが明らかとなった（Fig. 3, 4）。³⁻⁶⁾ また、鉄（III）錯体に関しても、電位差滴定、電子スピン共鳴などの結果から、コバルト（III）錯体に類似の構造であることが確認できた。ムギネ酸の金属錯体において、中間にあるアルコール性水酸基以外のすべての官能基が金属イオンへの配位に関与していたが、事実、この水酸基 O(7)H の欠如したデオキシ型とアゼチジン環の C(3)-C(4) の欠如したグリシン型のムギネ酸様活性物質が小麦とビール麦からそれぞれ単離されている（Fig. 1）。

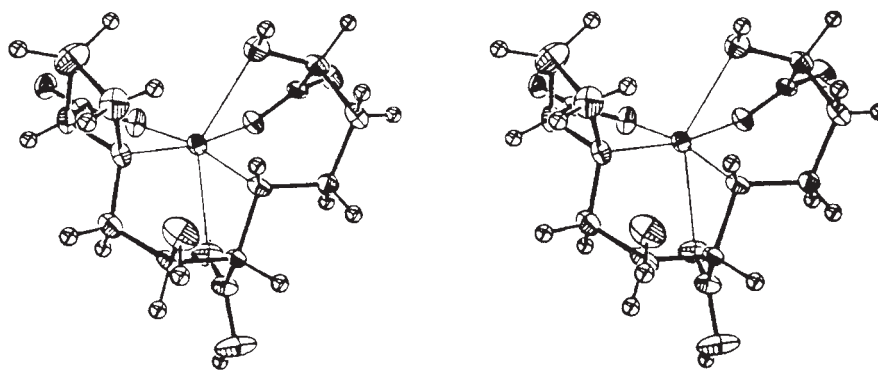


Fig. 2-1. Stereoscopic Drawing of the Mugineic Acid-Cu(II) Complex

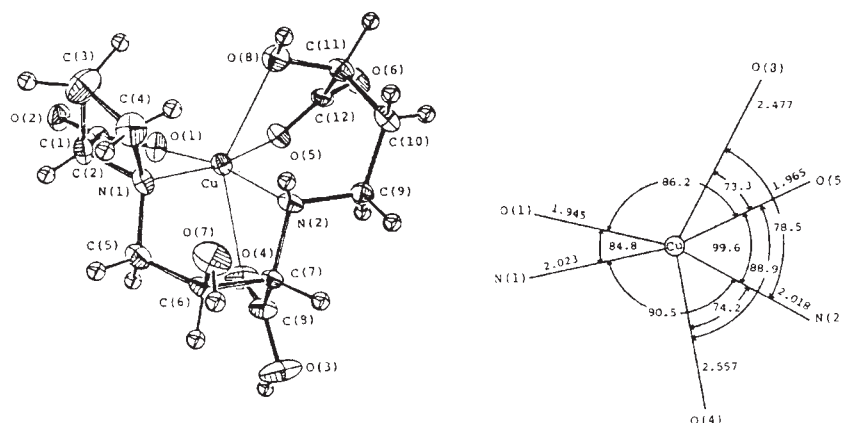


Fig. 2-2. Bond Lengths and Angles of the Cu(II) Coordination Site in the Mugineic Acid-Cu(II) Complex

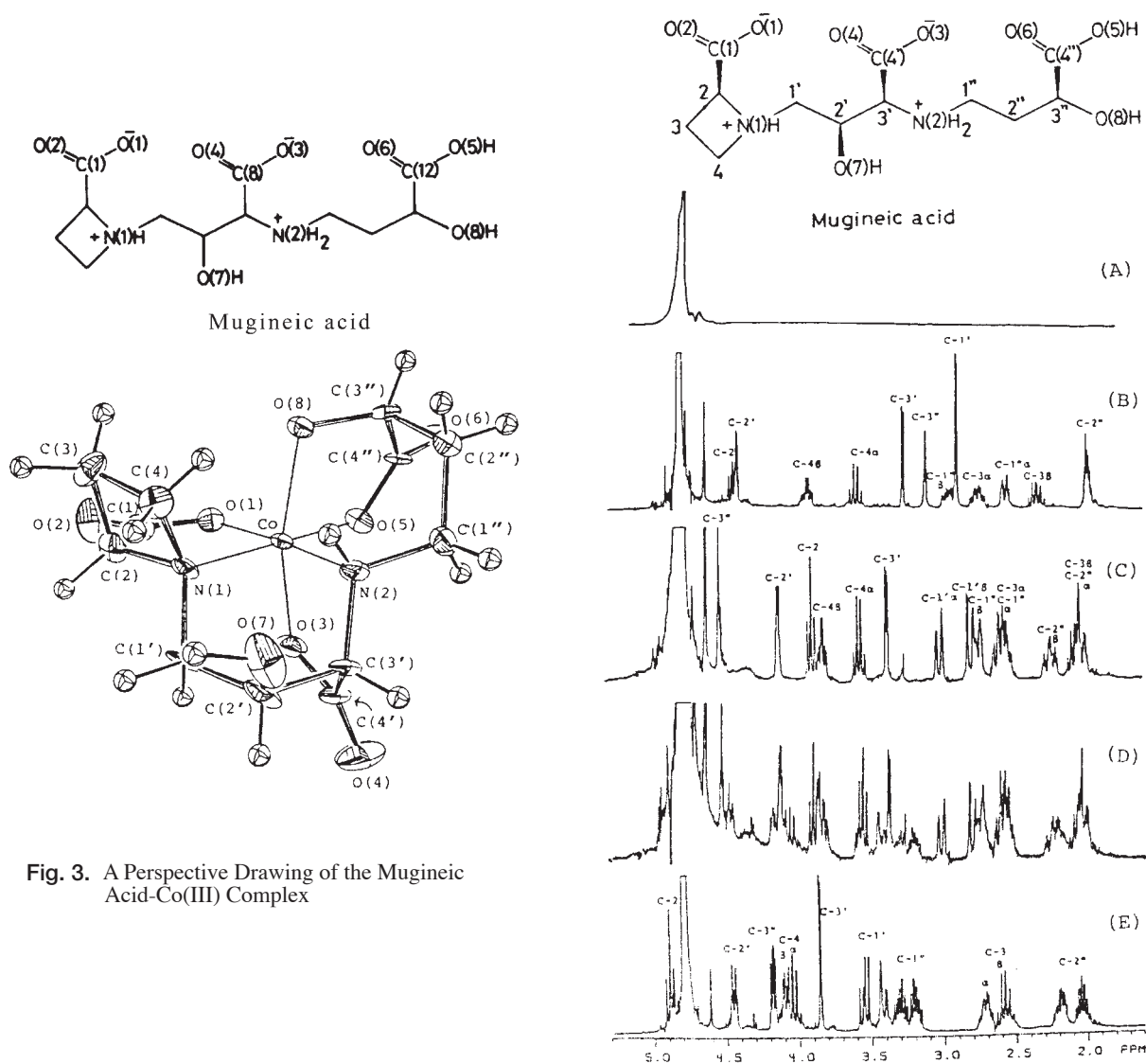


Fig. 3. A Perspective Drawing of the Mugineic Acid-Co(III) Complex

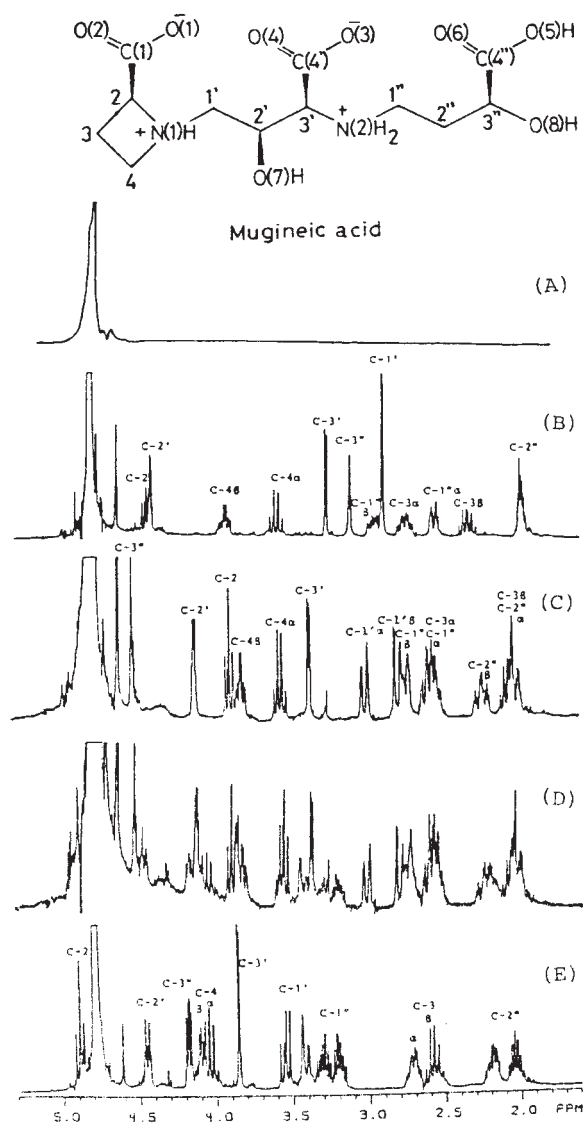


Fig. 4. 360 MHz FT-¹H NMR Spectra of 1:1 Mugineic Acid-Fe(III) Complex (A), 1:1 Mugineic Acid-Co(III) Complex (B), 1:1 Mugineic Acid-Zn(II) Complex (C), 2:1 Mugineic Acid-Zn(II) Complex (D), and Ligand Only (E) at pD 4.5

ムギネ酸の生理活性で特筆すべきことは、水耕栽培中のイネの培養液に、エチレンジアミン四酢酸（以下 EDTA と略す）などの合成キレート剤あるいは微生物由来のシデロホアの 1 種であるデスフェリオキサミン（以下 DF と略す）を添加してもイネの鉄取り込みは増加しないのに対し、ムギネ酸をはじめとする植物由来のキレーターは顕著に鉄取り込みを促進し、その結果として植物の鉄クロロシスを改善できる点である (Fig. 5). 当然、EDTA と DF は中性溶液中で鉄を溶解でき、その程度はそれらの鉄 (III) 錯体の安定度定数 (EDTA 25.1, DF 30.6) からムギネ酸の溶解能力を上回ると推定される。事実、緩衝液のみを含む溶

液中での鉄溶解能は、DF>EDTA>ムギネ酸の順で大きいという結果が得られた。しかし、栄養素を含む培養液中でのそれは、DF>ムギネ酸>EDTA であった (Table 1). したがって、自然界においては、ムギネ酸の方が鉄を選択的に溶解する能力においても EDTA より優れていると言える。一方、最も大きな鉄溶解能を有する DF に鉄取り込み促進作用が見られないのは、その鉄錯体が根の生体膜をうまく通過できないためと思われる。この点に関して、今までに単離されたムギネ酸様活性物質が 6 個の配位基を有し非常に類似した構造であるという事実も興味深い。

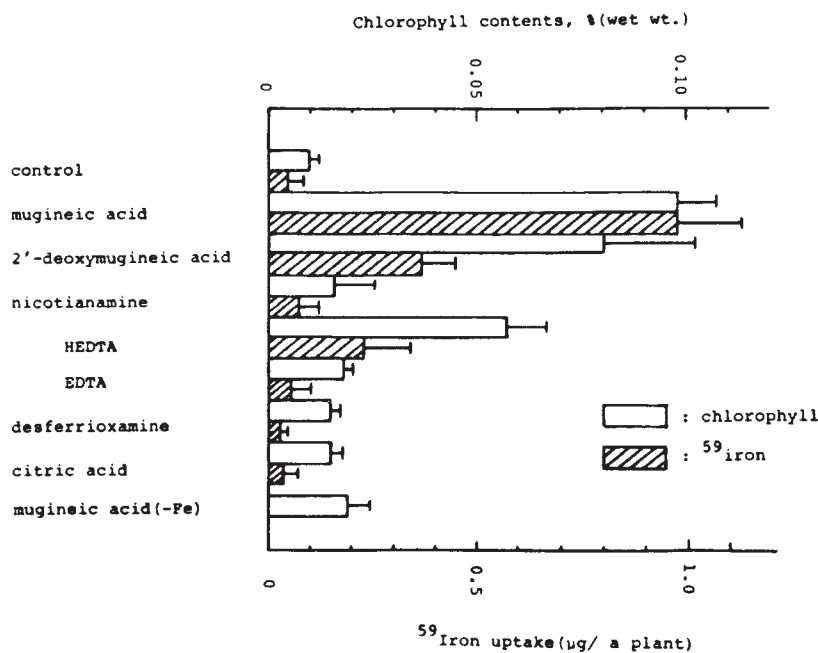


Fig. 5. Effect of Some Chelators on Iron-Uptake and Chlorophyll Synthesis in a Water-Cultured Rice Plant

Table 1 Iron-Solubilizing Abilities of Mugineic Acid and Its Related Compounds

chelators	iron concentration (ppm) of filtered solutions						
	buffer only	+ all nutrients	+ CaCl ₂ (0.5 mM)	+ MgSO ₄ (0.8 mM)	+ NaH ₂ PO ₄ (0.5 mM)	three nutrients	the other
control	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
mugineic acid	3.9	2.0	3.0	2.9	3.0	2.3	3.0
2'-deoxymugineic acid	3.7	1.6	^a				
nicotianamine	0.4	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
HEDTA	4.8	<0.3	0.5	1.3	3.1	<0.3	4.7
EDTA	7.5	<0.3	<0.3	0.4	3.3	<0.3	6.0
desferrioxamine	9.3	7.9	8.1	8.2	8.4	7.9	9.3
citric acid	0.4	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3

^a The experiment was not done.

さて、このようにムギネ酸-鉄(III)錯体の種々の性質が明らかになったが、特に注目すべき点は、ムギネ酸-鉄(III)錯体が安定(安定度定数 18.1)であるのに対し、鉄(II)錯体は不安定(8.1)であること、および鉄(III)錯体の還元電位が生体内の還元剤(たとえば NAD(P)H)によって容易に還元され得るような高い値(-102mV vs NHE)を示す点である(Table 2)。これらの結果から、イネ科植物の鉄取り込み機構は、次のように考えられる;①根からムギネ酸を分泌し錯形成によって土壤中の鉄を可溶化し、体内に取り込む、②その錯体を適当な部位に輸送した後、不安定な鉄(II)錯体へ還元しクロロフィ

ル合成に必要な酵素などに引き渡す、③フリーになったムギネ酸は再利用或いは代謝される(Fig. 6, 7)。実際、ある種の微生物においても類似の機構で鉄を取り込み、利用することが知られている。また、著者らは構造特異的な鉄取り込み機構が植物にも存在することを、ムギネ酸のエナンチオマーを使った⁵⁹Fe取り込み実験から明らかにした(Fig. 8)。⁷⁾さらに、大麦根からのムギネ酸分泌と光(照度)の関連についても興味深い知見を得た(Fig. 9)。⁸⁾現在のところ、ムギネ酸様活性物質の検出はイネ科植物に限られるが、他の植物においても同様の機構で鉄取り込みがなされている可能性は否定できない。

Table 2 Reduction Potentials of Some Iron Transport Compounds

Complex	E (pH 7.0) vs. NE, mV
Mugineic acid-Fe(III)	-102
Nicotianamine-Fe(III)	-181
Ferric aerobactin	-336
Ferric rhodotorulic acid	-359
Ferrichrome A	-448
Ferrioxamine B	-468
Ferric enterobactin	~-750

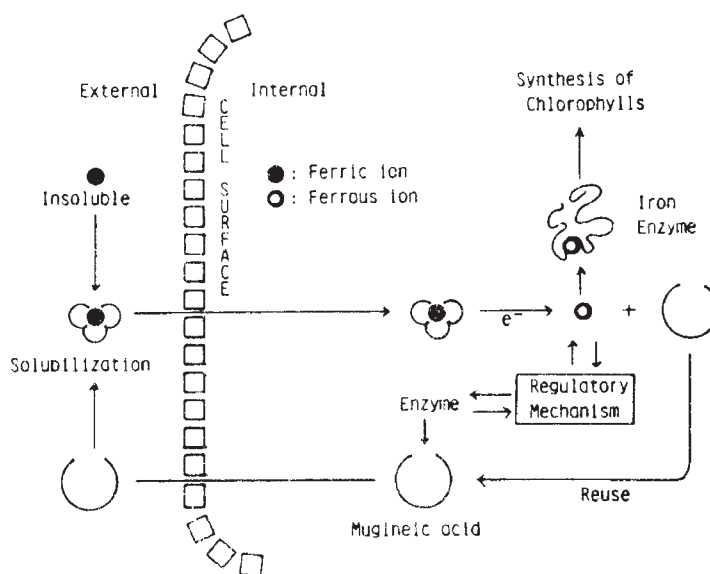


Fig. 6-1. Proposed Mechanism for the Iron Transport in Gramineous Plants

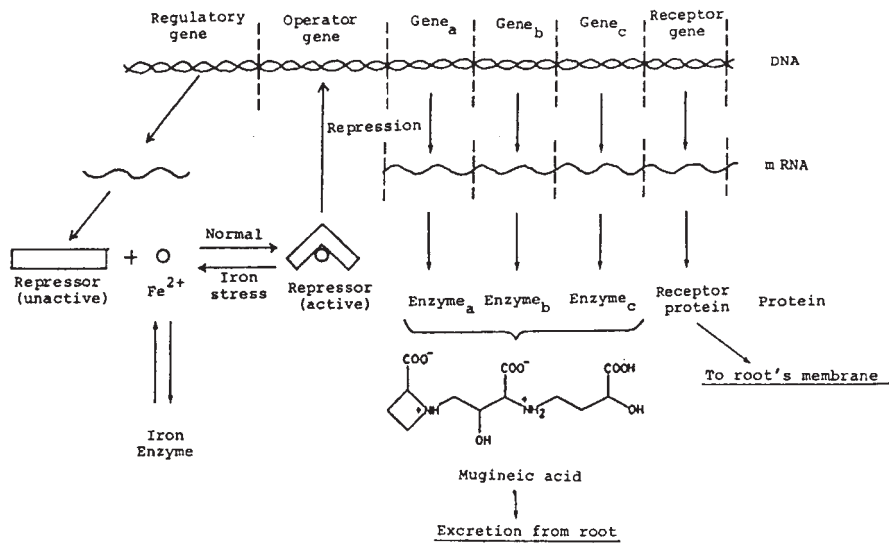


Fig. 6-1. Regulatory Mechanism (Hypothesis)

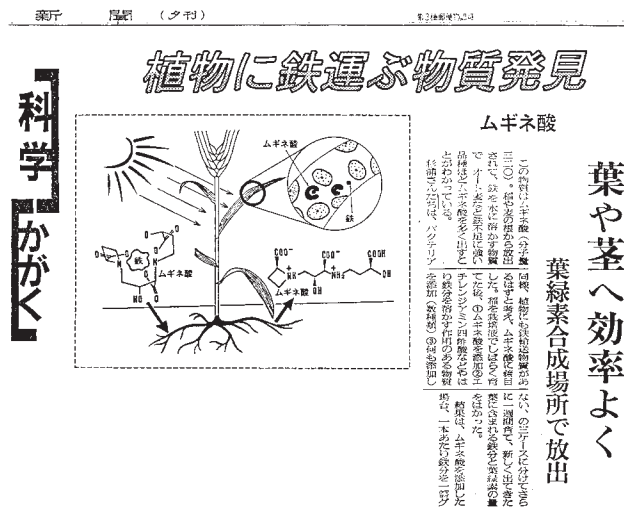


Fig. 7. 朝日新聞(夕刊)1986年10月1日(水)掲載の記事

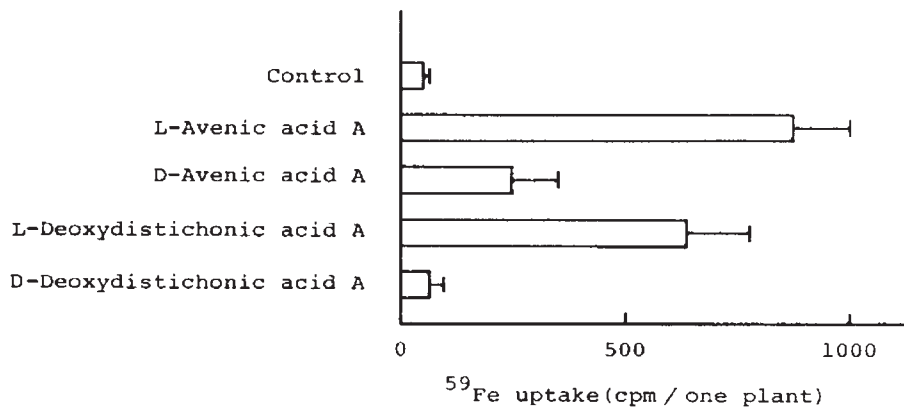


Fig. 8. Effect of the Optical Isomers of Phytosiderophore on Iron-Uptake in Water-Cultured Rice Plant

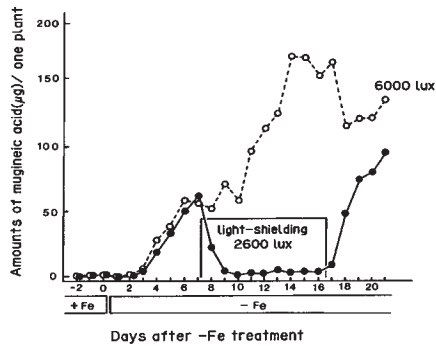


Fig. 9. Effects of Light on the Amounts of Mugineic Acid Secreted from Barley Roots

○: 6000 lux,
●: 2600 lux for the period from 7th to 16th day after -Fe treatment and 6000 lux for the other period

世界の陸地の25~30%はアルカリ土壌であると言われていることから、植物の鉄欠乏症は世界的に重要な問題である。イネ科植物の中でも特に食料として重要なイネ、トウモロコシなどが鉄欠乏非耐性であることを考え合わせると、ムギネ酸が将来、鉄クロロシス改善剤として広く利用される可能性は大きい。実際、ムギネ酸合成酵素の遺伝子を組み込んだイネが開発され、実用化されつつある。また、微生物由来のシデロホアが医薬品(鉄排泄剤)になり得たように、植物界のシデロホアであるムギネ酸についても、ヒトあるいは哺乳動物に対してどのような生理活性をもつか、今後の研究が大いに期待される。なお、ムギネ酸の

鉄排泄剤としての活性に関しては著者らの報告を参照されたい。⁹⁾

2. マンガンペルオキシダーゼの構造とダイオキシンの分解

生体に取り込まれた鉄は様々な構造の分子として存在し、多彩な機能を果たしている。ここでは、ヘムタンパク質の一種マンガンペルオキシダーゼを取り上げた。

製紙工業において、木材に多量に含まれるリグニンは厄介なものであり、その分解法の開発が望まれている。興味深いことに、細菌でさえ難しいこの分解をキノコの一つ(白色腐朽菌)は成し遂げることができる。オレゴンに留学中、私はキノコ(*Phanerochaete chrysosporium*)の分泌するリグニン分解酵素の一種、マンガンペルオキシダーゼの構造解析を行う機会を得た。共鳴ラマン分光法とESRで検討した結果、その活性中心は高スピン型のFe(III)を含むヘムで、5番目の配位子としてHisが結合しており、HRP、シトクロムcペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼの活性中心と類似の構造であることを明らかにした(Fig. 10).¹⁰⁾ また、この研究をヒントに、身近な白色腐朽菌によるダイオキシンなど難分解性汚染物質の分解法及び Fe^{3+} - H_2O_2 の混合試薬による環境汚染物質の分解法などを開発している(Fig. 11-13).¹¹⁻²⁰⁾

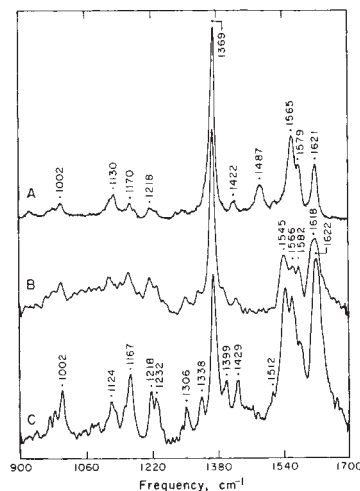


Fig. 10-1. Resonance Raman Spectra of Native Manganese Peroxidase
A, 413.1-nm excitation, B, 488.0-nm excitation, C, 514.5-nm excitation

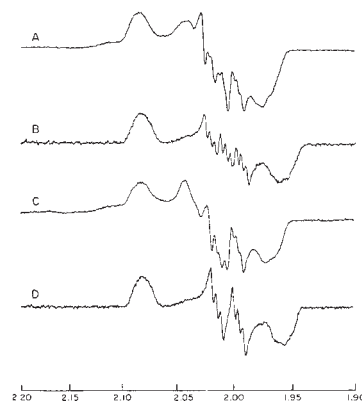
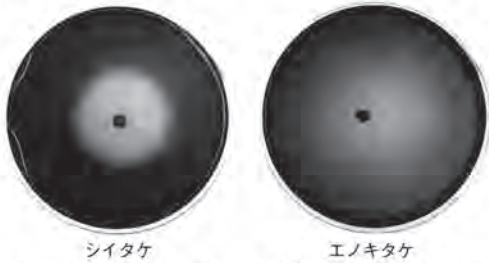


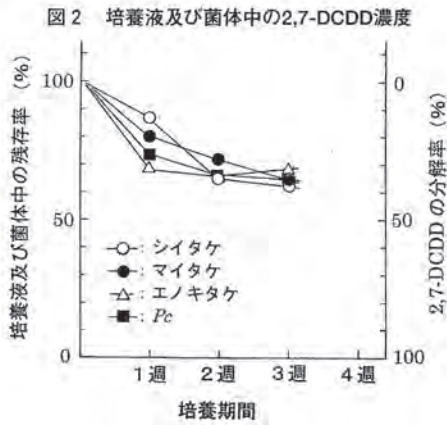
Fig. 10-2. EPR Spectra of the ^{14}NO - and ^{15}NO -Adducts of Ferrous Manganese Peroxidase and Ferrous Horseradish Peroxidase
A, ^{14}NO -MnP; B, ^{14}NO -HRP; C, ^{15}NO -MnP; D, ^{15}NO -HRP. All spectra recorded at ~14K.

特産情報きのこ etc. 1999.7

写真1
色素 (Remazol brilliant blue R) の脱色能によるダイオキシン分解能の予測



(方法) Czapek-Dox培地 (下層)、色素1%を含む麦芽-寒天培地 (上層) に各菌を移植し、25℃、10日間培養した。



培養条件：静置培養、酸素 100%、pH = 5.5、リグニン添加 (20mg/10ml)

Fig. 11. “特産情報” の掲載記事から引用

シイタケ、エノキにダイオキシン分解能力

シイタケなど国産のキノコ類の菌に、ダイオキシンを分解する能力があることが、大阪薬科大の三野芳紀助教授(生薬学専攻)らの研究で分かった。米大陸産キノコのフアナロキエーテ・クリンスポリウムの菌に分解能力があることは知られているが、輸入有害菌に指定され、利用は研究目的に限られている。三野助教授は「身近なキノコの菌を使い、将来的にはダイオキシンで汚染された土壌を浄化する施設への応用が期待できる」と話している。徳島市で開かれている日本

大阪薬科大グループ

土壌浄化の 応用に期待

薬学会で30日発表された。キノコなどの菌類は、固形の有機物を酵素で分解し、栄養分を取り入れている。三野助教授らは、フアナロキエーテ・クリンスポリウムに分類に近いシイタケ、エノキタケ、マイタケに注目。10¹¹CFUの培養液にこれら

らの菌とダイオキシン0.5μgを入れ、2週間置いたところ、フアナロキエーテ・クリンスポリウムとほぼ同様に、ダイオキシンの30~40%が分解していることが認められた。

三野助教授は「土壌中で菌を使った場合、どれだけ分解能力があるか今後、実験で確かめていきたい」と語った。【江見洋】

Fig. 12. 毎日新聞(朝刊) 1999年3月31日(水)掲載の記事

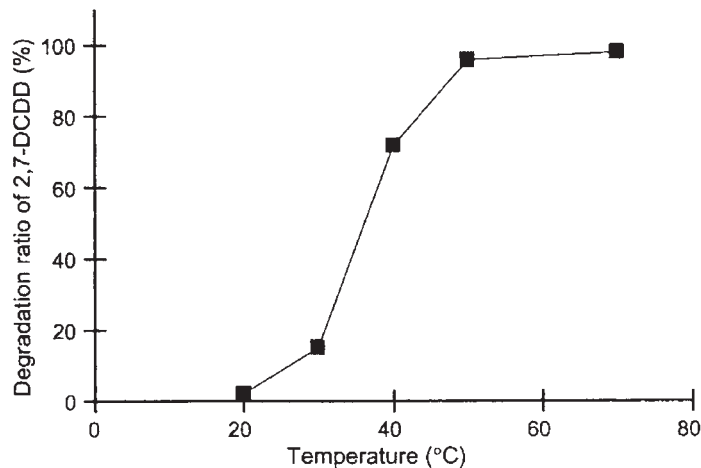


Fig. 13. Effects of Temperature on the Degradation of 2, 7-Dichlorodibenzo-p-Dioxn (DCDD) DCDD(5μg/mL) was incubated in Fe³⁺ (8mM) – H₂O₂ (1%) mixed reagent for 15 min at 50°C, unless otherwise noted.

3. 共鳴ラマン分光法による鉄硫黄タンパク質中の水素結合の検出とその重要性

代表的なブルー銅タンパク質と鉄硫黄タンパク質のラマンスペクトルにおいて同程度の重水素同位体シフトを観察したことから、ブルー銅タンパク質におけるシフトがイミダゾール窒素 (His)

の水素原子ではなく、硫黄配位子に水素結合している OH (Ser) やアミドの水素原子に起因することを明らかにした (Fig. 14, 15).²¹⁾ また、フェレドキシンと高電位鉄硫黄タンパク質 (HiPIP) の Fe_4S_4 クラスター構造の違いを共鳴ラマン分光法と X 線結晶解析により明らかにした (Fig. 16, 17).²²⁾

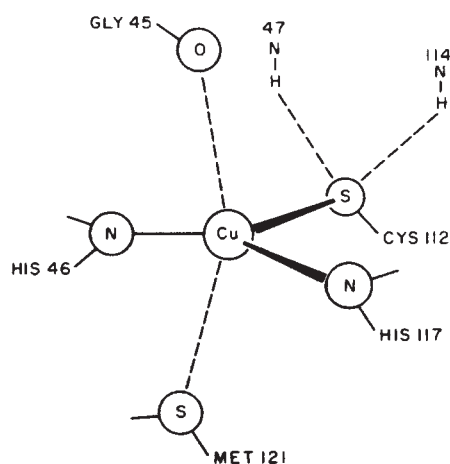


Fig. 14-1. Blue Copper Center of Azurin from *Alcaligenes denitrificans*

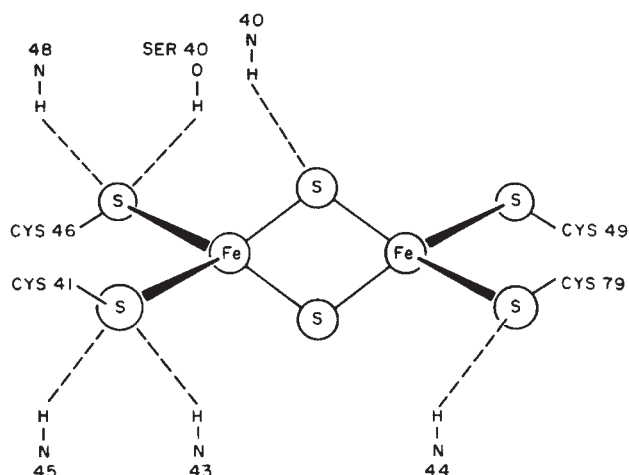


Fig. 14-2. Binuclear Iron-Sulfur Cluster of ferredoxin from *Spirulina platensis*

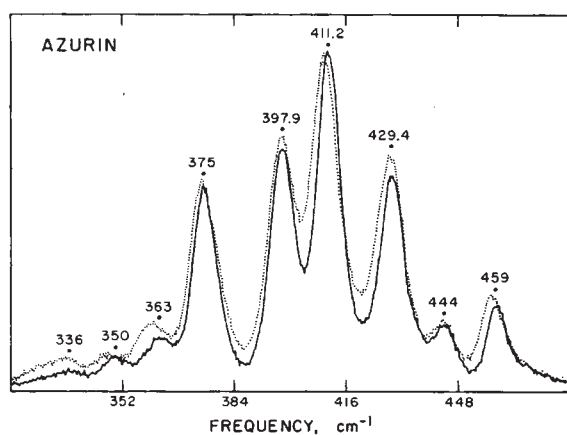


Fig. 15-1. Resonance Raman Spectra of *A. denitrificans* Azurin in H_2O (—) and D_2O (---)

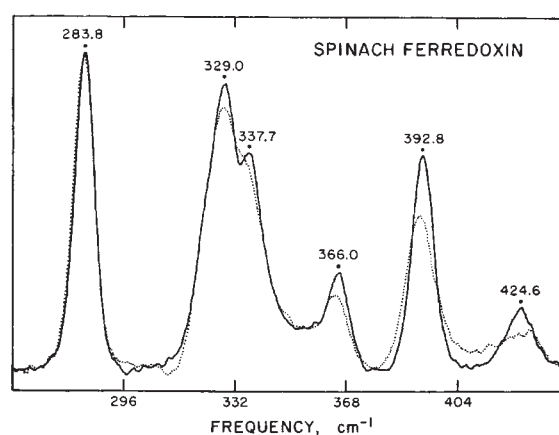
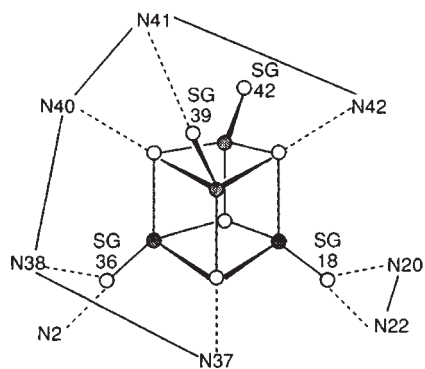
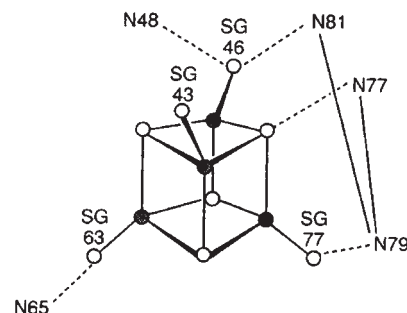
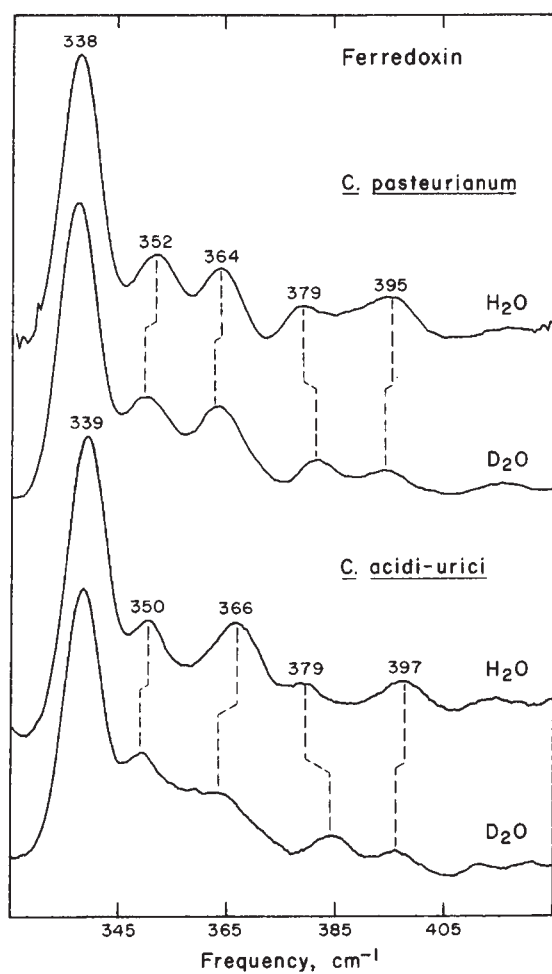
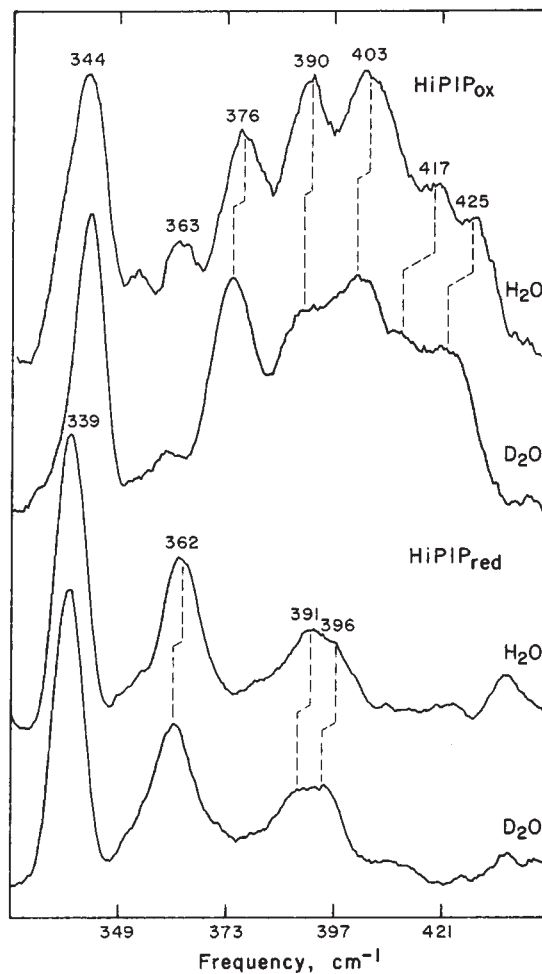


Fig. 15-2. Resonance Raman Spectra of Oxidized Spinach Ferredoxin in H_2O (—) and D_2O (---)

Fd_{ox} Cluster IIFig. 16-1. Schematic Drawing of Cluster II of *Peptococcus aerogenes*HiPIP_{red}Fig. 16-2. Schematic Drawing of Fe₄S₄ Cluster in Reduced *Chromatium vinosum*

Iron atoms (●), sulfur atoms (○), and hydrogen bonds (---).

Fig. 17-1. Resonance Raman Spectra of Oxidized Ferredoxins from *Clostridium pasteurianum* and *C. acidi-urici* in H₂O (—) and D₂O (---)Fig. 17-2. Resonance Raman Spectra of Oxidized and Reduced C_γ HiPIP in H₂O (—) and D₂O (---)

4. 植物フェレドキシンの一次構造を用いるプロ テインケモタキシノミー

植物フェレドキシンは光合成の電子伝達系に深く関与し、全ての植物に含まれる鉄硫黄タンパク質である。このタンパク質の一次構造を解析する

ことで植物の類縁関係を考察したり、これを利用して重要な植物の化学的同定法の開発を目指してきた。なお、詳細な一次構造の比較から、ナス科に特徴的な配列や各属 (species) に特徴的な配列も明らかにした (Fig. 18, 19).²³⁻³⁷⁾

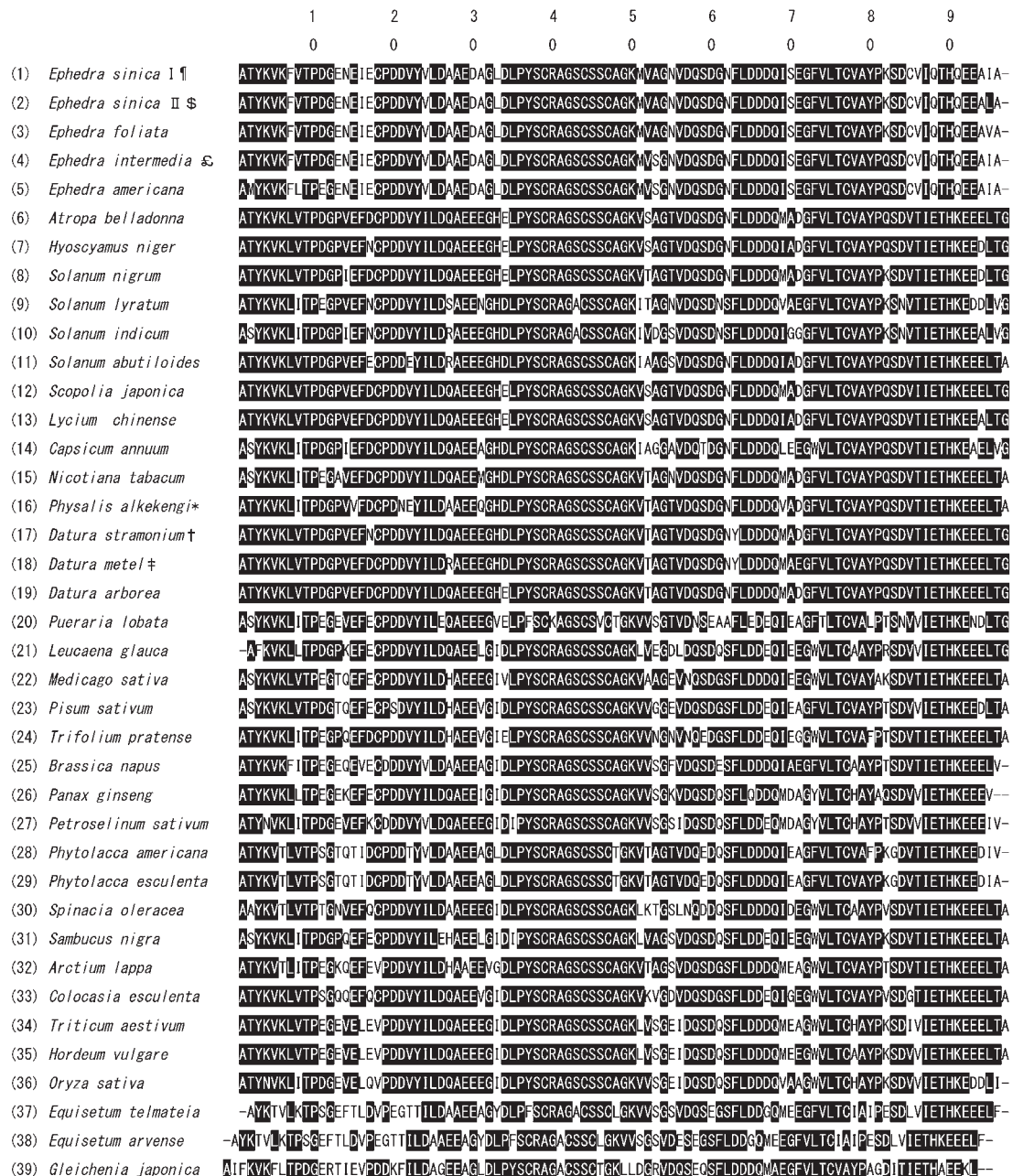


Fig. 18. Comparison of the Sequences of [2Fe-2S] Ferredoxins from Higher plants

Amino acids are represented by one-letter abbreviations. †, *E. distachya* I, *E. equisetina* I, *E. viridis*, and *E. intermedia*; \$, *E. distachya* II and *E. equisetina* II; £, minor Fd from *E. intermedia*; *, *Physalis alkekengi* var. *francheti*; †, var. *stramonium* and var. *tatula*, and *D. quercifolia*, ‡, *D. metel*, *D. innoxia*, and *D. fastuosa*.

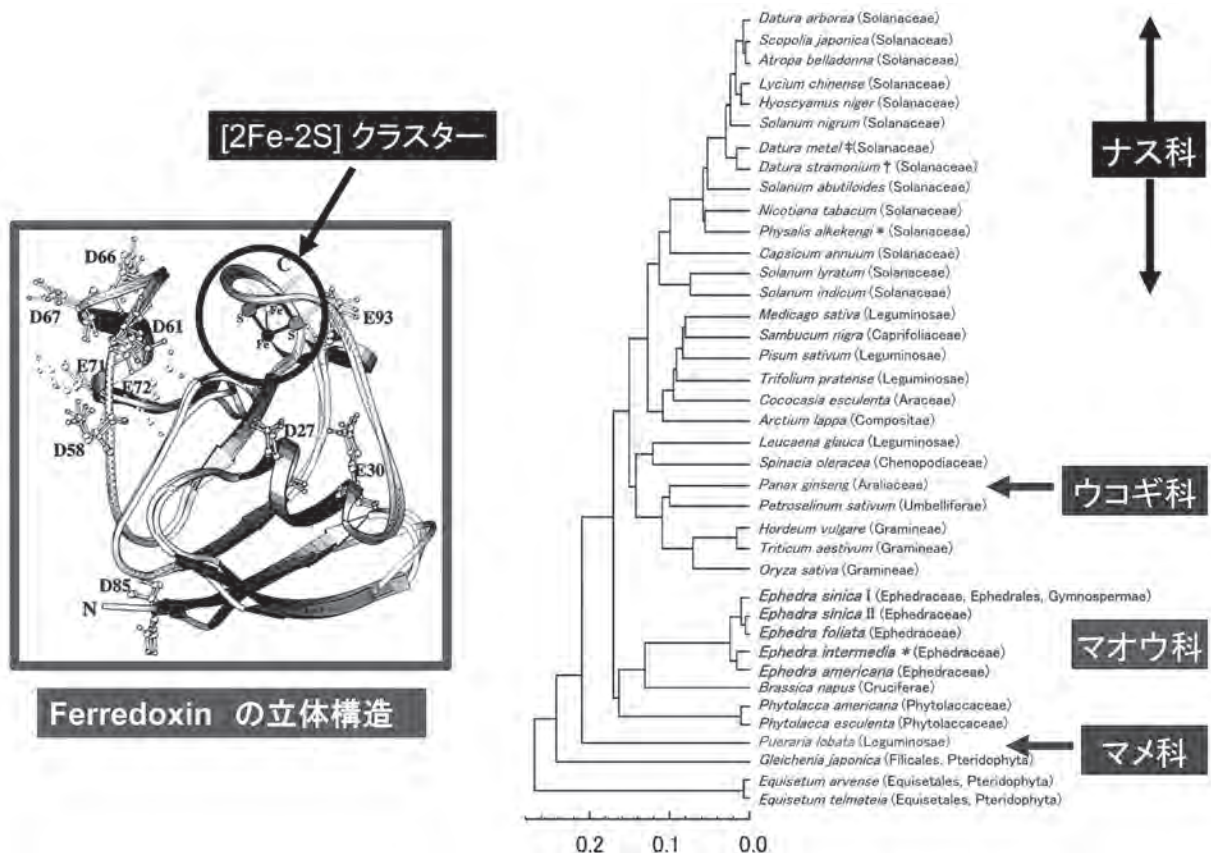


Fig. 19. Phylogenetic Tree Based on the Amino Acid Sequences of Ferredoxins from Higher Plants

The phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method of Nei (1987) (GENETYX software). Genetic distances are represented by the proportion of amino acid differences between each *taxon* (1.0 = 100%).

5. 鉄含有生体分子の DNA に及ぼす影響

鉄を含有する生体分子には多彩な機能を有するものが多い。これは、鉄原子の酸化還元作用や酸素原子との親和性に主に起因している。このような反応性を有する鉄含有分子が核酸の構造に何らかの影響を及ぼすことは十分に考えられる。そこで、代表的な鉄含有生体分子が DNA の構造に及

ぼす影響について検討した。その結果、①数種の鉄含有タンパク質は、 H_2O_2 ($26 \mu\text{M} \sim 260\text{mM}$) 存在下、DNA の分解を引き起こす、②カタラーゼとペルオキシダーゼにはそのような分解活性は認められない、③鉄含有生体分子の DNA 分解活性は、強力なキレート剤の共存で抑制される、などの知見を得た (Fig. 20)。



Fig. 20-1. DNA Degradation in Myoglobin(Mb)- H_2O_2 (Low Concentration) System

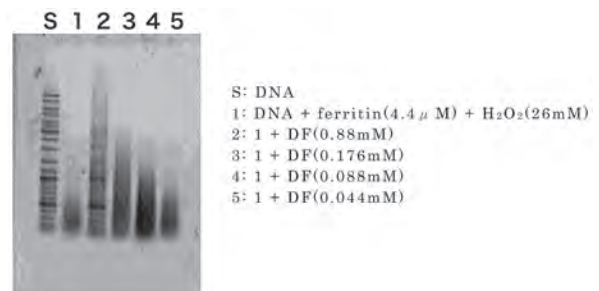


Fig. 20-2. Effect of Deferoxamine (DF) on DNA Degradation in Ferritin- H_2O_2 System

生体中の H_2O_2 濃度レベルで、鉄含有生体分子による DNA 分解が起これば、生体に少なからず障害をもたらすと推測される。この点に関して、デフェロキサミンなどの鉄キレーターが DNA 分解活性を抑制する事実は、生体内で有効なキレーター (bio-chelator と呼ぶ) の医薬品としての可能性を示唆するものであり、興味深い。また、鉄含有生体分子の DNA に対する酸化ストレス作用についても、今後、検討されるべきである。

6. 微生物の鉄獲得系に作用する新規抗菌剤の開発

病原菌もまた宿主の体の中で鉄を利用して増殖する。生体の中の鉄分はヘモグロビンやトランスフェリン、フェリチンの形で強固に結合しており、簡単に細菌に鉄を奪われることは少ないが、強力なシデロホアを分泌する病原菌はそれらの鉄を奪って増殖する。その結果、宿主である人は敗血症などの重篤な病気を引き起こす。この病原菌の鉄獲得系を阻害することで新規な抗菌剤の開発が可能である (Fig. 21)。例えば、病原菌のシデロホアより強力な鉄キレーターと競合させることで、病原菌の増殖を抑制することが期待できる。

我々は、多くの市販のキレート剤はじめ、種々のシデロホアなど天然のキレート剤について、人食いバクテリアの一種、*Vibrio vulnificus* における増殖阻害活性を調べたところ、ヒノキチオールに極めて高い阻害活性があることを突き止めた (Fig. 22)。その活性の程度は、強い増殖阻害活性を有することで著名な ethylenediamine-N, N'-bis(2-hydroxyphenylacetic acid) (EDDHA) より明らかに強かった。ヒノキチオール分子のトロポロン骨格が鉄との結合に関与していると推定できる。また、鉄との親和性が比較的強いデスフェリオキサミン (DF) に活性が認められなかったことから、この鉄錯体は、この細菌が取り込み利用することが可能であると推測された。そこで、取り込まれ難い化合物として、DF-デキストリンのハイブリッド体を合成し、その活性を調べている。多糖と結合することで毒性が極端に軽減させることが報告されており、大量投与できるメリットもあると考えられる。さらに、血液中で分解されにくいイヌリンとのハイブリッド体も興味ある化合物であり、その合成を計画している。これらの化合物は、*Vibrio vulnificus* 感染による敗血症を抑える効果が期待できる。

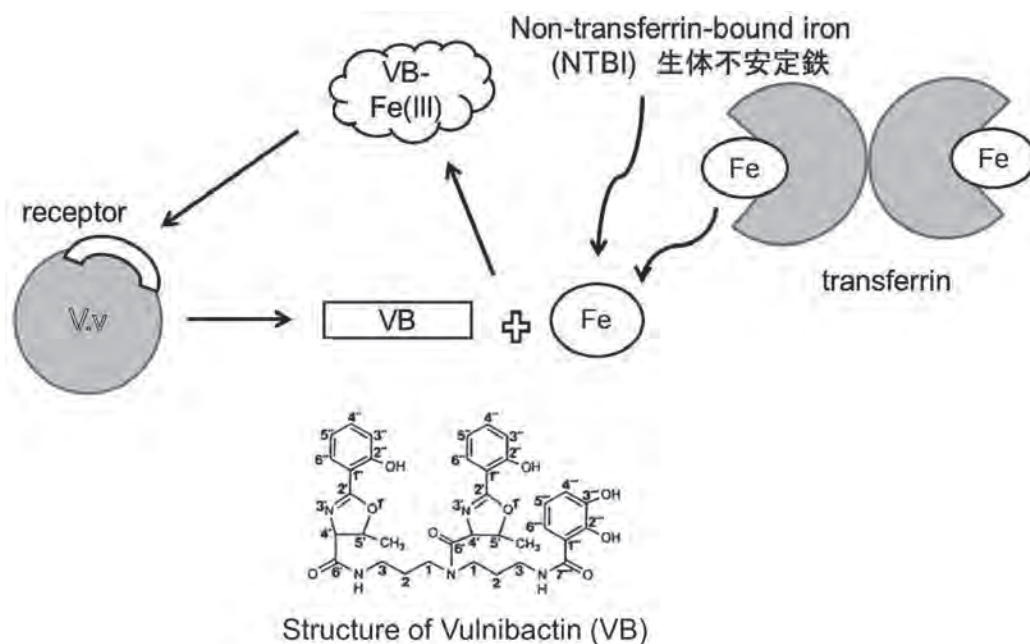


Fig. 21. Biological Iron Transport System in *Vibrio vulnificus* (V.v) and the Structure of Vulnibactin

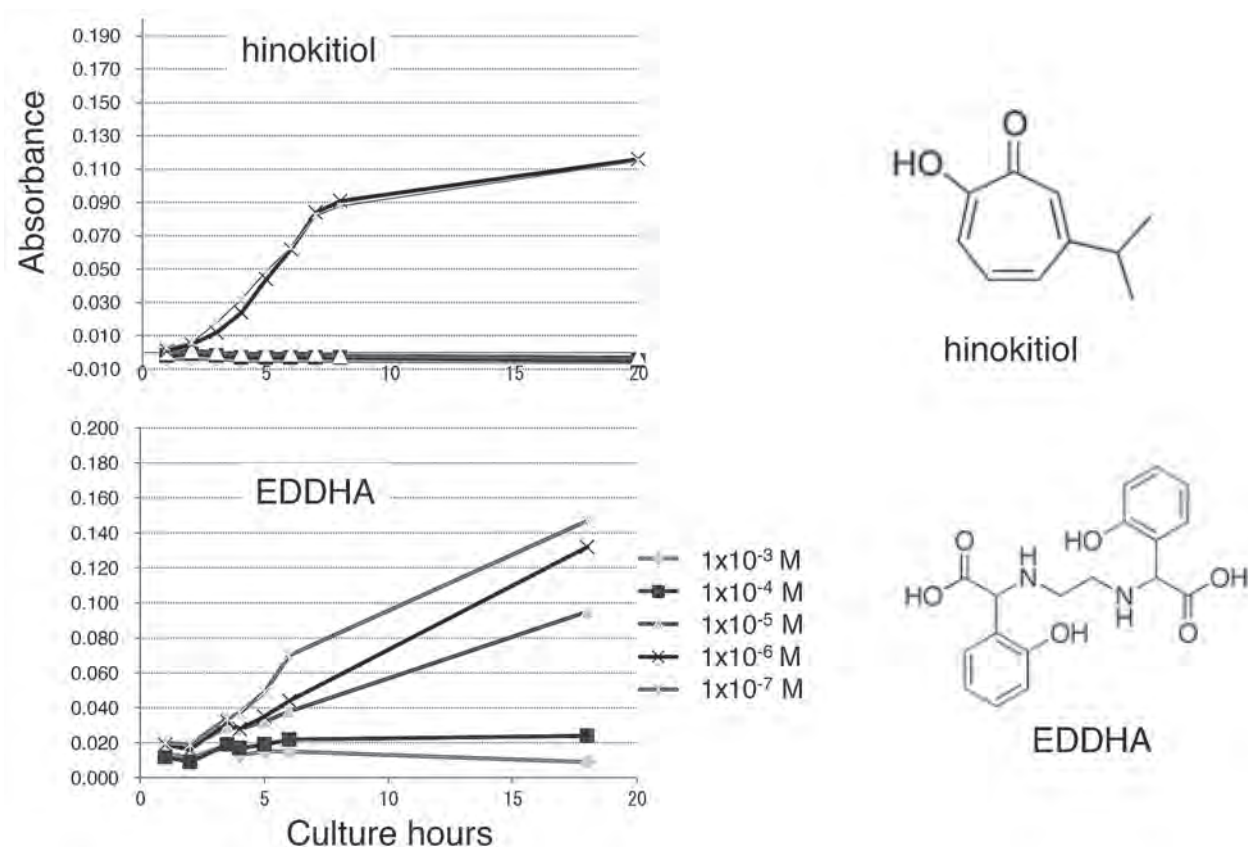


Fig. 22. Effect of Hinokitiol on Growth of *V. vulnificus*

<終わりに>

鉄は必須金属であるが、過剰の鉄は体内の臓器などに沈着し、フェントン反応を介して活性酸素種を生じさせ、これらが様々な病気の原因になることが知られている。特に、トランスフェリンと結合していない non transferrin-bound iron (生体不安定鉄)の、毒作用における重要性が最近指摘されている。このような観点から、鉄を効果的に排出させるキレート剤 (bio-chelator) は新しいタイプの医薬品として有用であろう。日本の男女の平均寿命は約6歳の差がある。いかなる理由でその差が現れるのか、現在のところ不明であるが、女性の場合は鉄欠乏気味であることを考えると、男性と比べ鉄の毒作用の影響を受け難いことも確かである。男女の平均寿命の差と鉄との関係も今後明らかになっていくと思われる。本学において、鉄に関する多彩な研究が精力的に進められることを期待したい。

References

1. Nomoto K., Mino Y., Ishida T., Yoshioka H., Ota N., Inoue M., Takagi S., Takemoto T., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 338-339 (1981).
2. Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Takemoto T., Sugiura Y., Tanaka H., *Inorg. Chem.*, **20**, 3440-3444 (1981).
3. Sugiura Y., Tanaka H., Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Yoshioka H., Takemoto T., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6979-6982 (1981).
4. Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Takemoto T., Tanaka H., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4671-4676 (1983).
5. Iwashita T., Mino Y., Naoki H., Sugiura Y., Nomoto K., *Biochemistry*, **22**, 4842-4845 (1983).
6. Sugiura Y., Mino Y., Iwashita T., Nomoto K., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4667-4669 (1985).
7. Oida F., Ota N., Mino Y., Nomoto K., Sugiura Y.,

- J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3436-3437 (1989).
8. 三野芳紀, 大阪薬科大学紀要, **1**, 119-1124 (2007).
 9. 三野芳紀, 井尻章悟, 内田浩司, 氏田国恵, 安田正秀, 大阪薬科大学紀要, **1**, 113-117 (2007).
 10. Mino Y., Wariishi H., Blackburn N. J., Loehr T. M., Gold M. H., *J. Biol. Chem.*, **263**, 7029-7036 (1989).
 11. 三野芳紀, 特産情報, **20**, 58-59 (1999).
 12. 「ダイオキシンの分解: 食用キノコが有効」日本経済新聞 (朝刊) 1999年3月20日(土) 掲載
 13. 「シイタケ, エノキにダイオキシン分解能力: 土壌浄化の応用に期待」, 毎日新聞 (朝刊) 1999年3月31日(水) 掲載
 14. 「ダイオキシン, きのが分解: 汚染土壌を浄化」, 農業新聞 (朝刊) 1999年3月31日(水) 掲載
 15. 「汚染土壌はキノコパワーが浄化する」, 日経ECO21, **9**, 28-29 (1999).
 16. 「バイオレメディエーション」, ハイベスト教科事典: 生物と環境, 学習研究社, 222-224 (1999).
 17. Mino Y., Moriyama Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1050-1051 (2002).
 18. Mino Y., Moriyama Y., Nakatake Y., *Chemosphere*, **57**, 365-372 (2004).
 19. Azuma T., Mino Y., *J. Health Sci.*, **57**, 442-447 (2011).
 20. 東 剛志, 三野芳紀, 環境衛生工学研究, **25**, 14-21 (2011).
 21. Mino Y., Loehr T. M., Wada K., Matsubara H., Sanders-Loehr J., *Biochemistry*, **26**, 8059-8065 (1987).
 22. Backes G., Mino Y., Loehr T. M., Meyer T. E., Cusanovich M. A., Sweeney W. V., Adman E. T., Sanders-Loehr J., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2055-2064 (1991).
 23. Mino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1585-1587 (1991).
 24. Mino Y., Inoue S., Ikeda S., Ota N., *Phytochemistry*, **33**, 601-605 (1993).
 25. Mino Y., *Phytochemistry*, **35**, 385-387 (1994).
 26. Mino Y., *Phytochemistry*, **37**, 429-431 (1994).
 27. Mino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1186-1189 (1995).
 28. Mino Y., Yasuda K., *Phytochemistry*, **49**, 1631-1636 (1998).
 29. Mino Y., Iwao M., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 96-99 (1999).
 30. Mino Y., Iwao M., *Natural Med.*, **53**, 37-41 (2002).
 31. Mino Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1367-1369 (2002).
 32. Mino Y., Hazama T., Machida Y., *Phytochemistry*, **62**, 657-662 (2004).
 33. Mino Y., Shirakawa M., Harada Y., Kuroda K., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 2038-2041 (2004).
 34. Mino Y., Yukita M., Hiratsuka N., Wariishi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1535-1538 (2005).
 35. Mino Y., Machida Y., Wariishi H., *Natural Med.*, **59**, 181-185 (2005).
 36. Mino Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1771-1774 (2008).
 37. Mino Y., Azuma T., Sato T., *Bull. Osaka Univ. Pharm. Sci.*, **9**, 53-60 (2015).
 38. 三野芳紀, 大阪薬科大学ハイテク・リサーチ・センター開発研究プロジェクト, 平成19年度~平成21年度研究報告書, 145-150 (2000).
 39. 三野芳紀, 大阪薬科大学文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成27年度ハイテク・リサーチ・センター・シンポジウム, 12月5日(2015).

履 歴



三野 芳紀 (みの よしき)
大阪薬科大学 教授

1950年1月 香川県生まれ
 1972年3月 大阪薬科大学 薬学部薬学科卒業
 1972年4月 同 薬品物理化学教室助手
 1974年3月 退職
 1975年4月 徳島大学大学院修士課程入学(薬品
 分析化学講座)
 1977年3月 同 修了
 1977年4月 京都大学薬学部研修員(放射性薬品
 化学講座)
 1977年8月 大阪薬科大学生薬学教室助手
 1982年4月 同 講師
 1984年1月 薬学博士(京都大学)
 1986年8月 海外留学(Oregon Graduate Center
 [Bioinorganic Chemistry], USAにて1
 年間)
 1989年4月 同 助教授

2001年4月 同 環境分析学研究室助教授
 (組織改革)
 2006年10月 同 教授
 2010年4月 同 薬品分析化学研究室 教授
 2015年3月 同 定年退職
 2015年4月 同 嘱託教授

研究内容

- 1) 生体の鉄取り込み機構に関する研究
- 2) 生薬(食品)の無機化学的研究
- 3) フェレドキシンの一次構造を用いる植物の分
類と同定に関する研究
- 4) 環境汚染物質の分解・無毒化に関する研究

所属学会および役職

日本薬学会会員
 日本薬学会編集委員
 「衛生試験法・注解」食品成分試験法専門委員
 会委員長
 日本分析化学会会員
 日本分析化学会近畿支部幹事
 日本環境化学会会員
 日本生薬学会会員
 日本光合成学会会員