

Literature Seminar Q&A

B6 渥美 渉

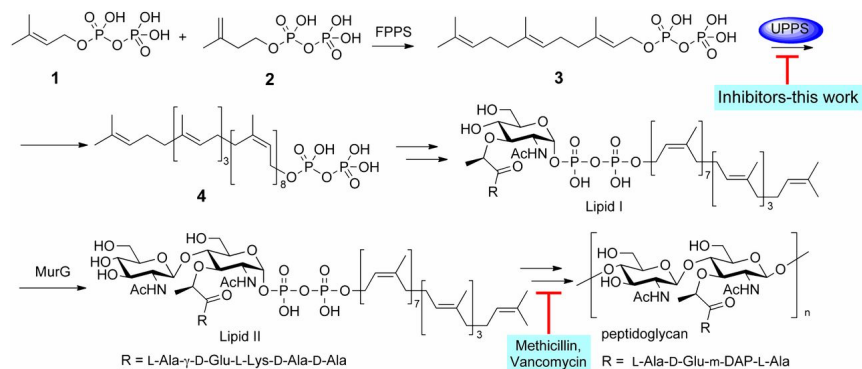
今回のセミナーは、遷移金属触媒の生体内環境及び生体内への応用、というテーマで発表させていただきました。発表後、皆様からたくさんの質問、意見を寄せていただきました。以下ではいただいた質問への回答をいたします。十分ではない部分もあるとは思いますが、参考にいただければ幸いです。

【スライドに関する質問について】

Q. P7の Bisamidine について、どうして原料の方は活性を示さないのか？ CuAAC によって新たに生じるトリアゾールが活性に効いているのか？

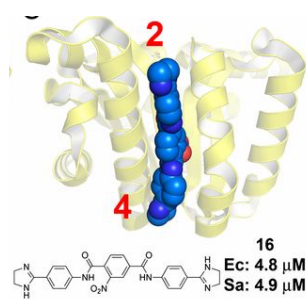
A. 答えとしては、原料の方では分子認識に必要な骨格を有しておらず、CuAAC によってできた分子が pharmacophore を獲得するからである、とすることができます。具体的に以下で説明します。

Bisamidine は多剤耐性菌に対しての抗菌作用が期待されている抗菌薬であり、その作用機序はイソプレノイド経路に関与している Undecaprenyl diphosphate synthase (UDD) に対する阻害作用にあります (以下の図参照)。

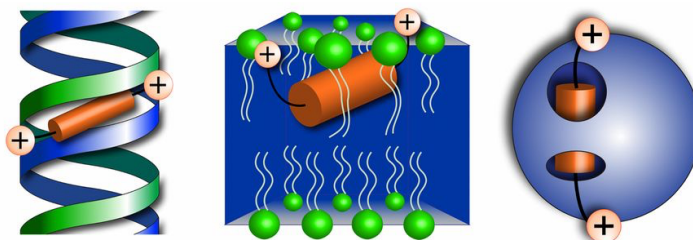


イソプレノイド経路の概略図

Bisamidine は以下の図 (次のページ) のように UDD の結合ポケットに入り込み、その活性を阻害します。これには pharmacophore が提唱されています。具体的には両端のカチオン性の官能基に疎水性の骨格が挟まれているような構造が良いとされているようです。



Bisamidine の UDD への結合



pharmacophore のモデル図

以上のことから、CuAAC によって生じた Bisamidine には、カチオン性官能基に挟まれた長細い疎水骨格が存在しており、またそれは反応前の分子には存在しないために、前者のみが UDD 阻害作用、すなわち抗菌作用を示すことになります。また、このことから、CuAAC の結果生じたトリアゾールは活性にそこまで影響しないと推測されます（他の骨格でも良い）。

（補足：上で述べた骨格は、他にも細胞膜や DNA の副溝にも結合するとされています。これにより、細菌の細胞内の様々なところで作用することになるので、多剤耐性菌にも使用できるのだと考えられます。）

Wei Zhu, *et al. PNAS*, 2013, 110, 123–128.

Q. P10、Cu が良い理由は？これは Cu というより配位子の効果？

A. そうなのではないかと自分も考えています。他の金属種については比較的単純な塩を使用しているので、若干フェアじゃない感じもしますが...ただ論文での書き方として、初めから Cu(I) を使用する方向性が定まっていたのではないかと考えています。というのも、Cu(I) 自体 CuAAC のように生体直交反応として利用されてきたことと、生体適合性を高めるようにリガンドが多く開発されてきた背景があり、使用するには都合が良いと考えられたためです。他の金属種についても水溶性などを配慮する必要があるので、そのせいであるようなスクリーニングとなったのかもしれないです。

Q. P32 について、アルブミン型の人工触媒は基質を積極的に取り込んでいるのか？生体内の他のタンパク質にも疎水性ポケットはあるはずで、そこにも基質がベタベタ張り付いてしまっているのではないか？

A. アルブミンが積極的に基質を取り込んでいるという言い方は正しくないと考えてはいます。（もしかしたら語弊があったのかもしれないです。すみません。）発表でお話した通りある程度アルブミンの疎水ポケットに親和性を有するように基質の検討を行っていますが、

おっしゃる通り他のタンパク（特に豊富に存在する血漿中のアルブミン）の疎水ポケットにも入り込んでしまうということは実際に起きているはずですが、この話は今回の基質に限った話ではなく、実際の医薬品でも同様のことが言えますので、そこまで問題視することではないと考えています。（実際、抗凝固薬であるワルファリンは 90–99 %が血漿中のタンパクに結合していますが、残り 1-10 %の遊離型薬物が薬効を発揮しています）。これを議論するには、いわゆる薬物動態学的なパラメーターである血症蛋白結合率の情報が必要ですが、論文中では調べられていないので実際のことはわかりません。ただ、蛋白への結合は可逆的であり、もし触媒によって基質が消費されればその分平衡が偏り、遊離型の薬物が新たに生じることになるため、蛋白結合率が高くても問題はないと解釈しています。

Q. 32 ページ、反応は細胞外で行うことを考えているのに、なぜ GSH 耐性を気にしているのか？

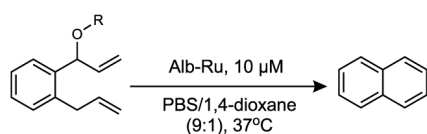
A. 確かに 2022 年の Nature Communications のケースでは細胞外での反応を想定していますが、32 ページで示した 2019 年の Nature Catalysis の報告では細胞内での応用も念頭に置いているようでした。なので、GSH によるクエンチをケアすることを考えているのだと考えています。また、GSH によるクエンチに耐えうるということは、その分生体分子へのアクセスがしにくいということになるので、その他の不活化や余計な反応を起こさないと捉えることも可能です。ですので、大きいに越したことはないとは捉えています。

ただ、今回の発表の文脈ではかえって混乱を招くものだったかもしれないです。データの選択、提示が適切ではなかったです、すみません。

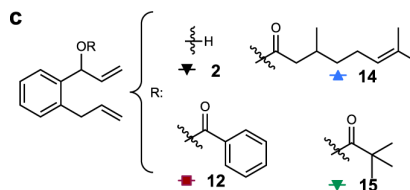
Q. P33 で、化合物 14 が速度が速いと言っているが、12 も速く見えるし、14 は頭打ちになっている。なぜか？

A. これについては完全に伝え方が悪かったです、すみませんでした。ここで言いたかったのは、ミカエリスメンテンの式の話で出てくる触媒効率 k_{cat}/K_m についてです。触媒効率（特異性定数）は、同一の酵素において異なる基質を議論する際に使用される指標であり、それが高いほどその基質への特異性が高く、良い基質であると言えます。

今回の場合でも同じことが言えます。下の表（次のページ）より、prodrug 14 が一番高い k_{cat}/K_m を持つということがわかり、その触媒反応が一番効率がよいと言えます（下の表も一緒に示せばよかったですね）。



Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	TON
2	N/A	N/A	N/A	11.2±1.8
12	0.28±0.01	0.20±0.04	1383.6	36.3±3.7
14	0.09±0.01	0.05±0.03	1763.9	45.3±8.0
15	0.30±0.02	0.38±0.08	786.9	44.3±6.5



Q. P33 で、D-MEM でみている理由は？

A. 論文中には、生体適合性をより調べるために、というような記載のみで、具体的な理由までは述べられていませんでした。おそらく、より系が複雑な場合での検討をして、それでも反応がいくかどうかを確認しておきたかったのだと私は考えています。

Q. P38 のマウスへの投与の具体的な手順は？投与量は？基質と触媒の間はどれぐらい空けているのか？

A. Method を確認してみたところ、順番はやはり触媒→基質の順番であり、基質は 44.1 mg/kg、人工触媒は 116.4 mg/kg で投与されています。しかし、それらの投与間隔についての具体的な記載はありませんでした。

アルブミンの分子量が約 66,000 であり、Ru の原子量は 101.07 であることから、金属としての投与量は大体その 1/600 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 以下には抑えられていそうです。ただ、日米 EU 医薬品規制調和国際会議の中で定められた 34 種類の元素に関する 1 日許容曝露量(PDE)の中で、Ru の注射投与による PDE は 10 $\mu\text{g}/\text{day}$ とされているので、投与量としては依然高いと想定されます (メタロエンザイムとしているので一概には言えなさそうですが)。投与量を抑えるには活性の向上、特にこの研究では基質に対する親和性や drug 自体の抗腫瘍作用の増大などが必要になると考えています。

Q. P38. 正常な組織に対して毒性は出ていないのか？血中で反応が起きてしまって副作用が出てしまうのではないかと思った。

A. 論文を見直してみたところ、off target に対する影響については時に述べられてはいませんでした。上の質問の回答になるように、投与する順番を触媒→prodrug としているので、メタロエンザイムによる pre-targeting の後に基質が加えられることになり、他の組織への影

響はあまりないと考えているのではないのでしょうか。確かに、質問にある通りのことが起きてしまう可能性は否定できません。ただ、(指標になるかわかりませんが) 体重の減少などは確認されていないようだったので、それほど強い副作用は起きていないと推測されます。

Q. P38. 後半の研究について、抗腫瘍効果は実際に確認することができたものの、実際に生体内で望みの反応が起きているということは示されているのか？

A. 論文を読み返してみたものの、生体内で実際に prodrug の変換反応が起きていることをサポートするデータはありませんでした。実際に血中薬物濃度を測定することで変換効率を算出することが可能だとは思いますが、薬物分子自体がもし受動拡散によって変換後そのまま腫瘍細胞に取り込まれてしまうのであるならば、血中での測定も難しいかもしれません。

【全体的な質問に関して】

Q. なんだかんだ言っても、やはり金属触媒の毒性が気になるが、これは分子メカニズムとしてどのように毒性を発揮するのか？これは配位子設計などで回避できるもの？

A. 金属の毒性については色々ところで議論されることですが、具体的な分子メカニズムは提唱されているものの全体的にはまだ不明な部分が多い印象です。そうしてしまっている一つの原因として、金属の毒性に関する一般的な理論がまだ確立されていないというところにあるのではないかと考えています。Appendix の 46-48 ページにも示しているのですが、金属の毒性は溶解性や酸化度、そのリガンドに大きく左右されてしまうため、同じ金属種であってもその毒性は化合物によって大きく異なると考えられています (以下の例参照)。

Rating	Description	LD ₅₀ , mg×kg ⁻¹
1	Extremely toxic	≤1
2	Highly toxic	1-50
3	Moderately toxic	50-500
4	Slightly toxic	500-5000
5	Practically non-toxic	5000-15000
6	Relatively harmless	>15000

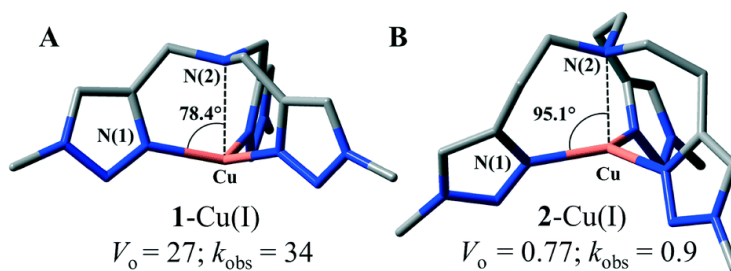
Compound	Oral LD ₅₀ , mg×kg ⁻¹ (rat)
CrO ₃	52
CrCl ₃	440
CrCl ₂	1870
Cr(NO ₃) ₃ ×9H ₂ O	3250
Cr(acac) ₃	3360
Cr ₂ O ₃	>15000

また、生体内環境に曝露した金属種は非常に多くの生体内変換を経ることになり、その過程で生じたどの状態が毒性に関与するのかを同定することは非常に難しいと考えられます。そのため、分子メカニズムを説明することもなかなかできないのではないのでしょうか。

このような一般論はあるものの、実際にその毒性を金属種ごとに考察している報告はいくつもあります。セミナー前半で登場した Cu(I) については、Fe(II) と同じように Fenton 反

応によって毒性を発揮すると考えられているようです。その他にも、(これは他の金属種でも言えることですが) タンパク質とキレートを形成し、変性を誘導すると言う点も毒性に関与している可能性があります。

また、セミナーでも少し言及したのですが、TBAAのような4方向から配位するタイプのアミン錯体について、その性質を考察する報告もありました。例えば下の図のようにCuとN(1),N(2)のなす角度、すなわち活性中心がどれだけ遮蔽されているかによって、その反応性を議論しています。具体的には、上記の角度に加え、CuAACの速度定数 k_{obs} と酸化の速度 V_o をパラメーターに、リガンドを変更した時の各銅錯体の活性や失活速度を評価しています。例えば、AのようにN(1)-C-N(2)の角度が小さい場合には、反応性が向上するものの酸化による失活も受けやすくなります。それに対して、BのようにN(1)-C-N(2)の角度が大きく活性中心を遮蔽している場合には、失活速度は小さくなるものの、触媒活性自体も小さくなってしまいます。このように、触媒の活性向上と失活の防止は部分的にトレードオフの関係性にあるのですが、その他にもリガンドであるアミンのドナー性や活性中心と窒素原子の距離などもその活性に関与しているので一概には言えません。ですが、ある程度は配位子設計ができるのではないかと考えています。(Appendix 48 ページも参照)



Zhu Z. et al. Catal. Sci. Technol. 2017, 7, 2474–2485.

※なお、金属の毒性に関しては、以下の Review で詳細に議論されているので、参考にいただければと思います。

Toxicity of Metal Compounds: Knowledge and Myths” Egorova, K. S.; Ananikov, V.
P. *Organometallics* 2017, 36, 4071.

Q. 抗がん作用以外のアプリケーションあるのか？がんのようなある程度体を痛めてでも治療するアプリケーション以外で毒性の高い金属触媒を利用しに行くメリットってあるのか？将来的には？

A. 準備の時に文献調査を進めていた時の感触で言うと、特に生体内に応用するという文脈では抗がん剤以外のものはなかったと記憶しています。おっしゃる通りで、そのメリットと

デメリットを天秤にかけてなお金属触媒を使おうというような場面は、がんというような生命を脅かす疾患の治療などに限られると私も考えています。将来的には、後半の田中先生の研究のように、触媒の活性を維持しつつ、糖鎖などのターゲティングを用いて腫瘍組織選択性を付与するというような形式が今のところは有望なのかなと考えています。

Q. 山梨の最後の質問にあるように細胞内触媒だと細胞を殺しに行く戦略以外で用いられているものありますか？生きたまま触媒を機能させる系だと金属触媒の蓄積や排出機構の有無が大事な気がするがそこは原理的に解決できるものなのか？

A. Vitro の系に限って言えば、bioimaging などの手法が一つ考えられるのですが、vivo となるとやはり細胞を殺しに行くような戦略がメインだという認識です（今回紹介したのは細胞外での反応ではありますが...）。今回紹介した例でも、金属の蓄積や排泄機構については言及されていませんでした。調べてみてもそれらしい情報は見つからなかったもので、それほど研究されていないのだと推測されます。（やはりそのような理由から、細胞を殺すというような使い道の方が都合が良いのだと考えられます。）

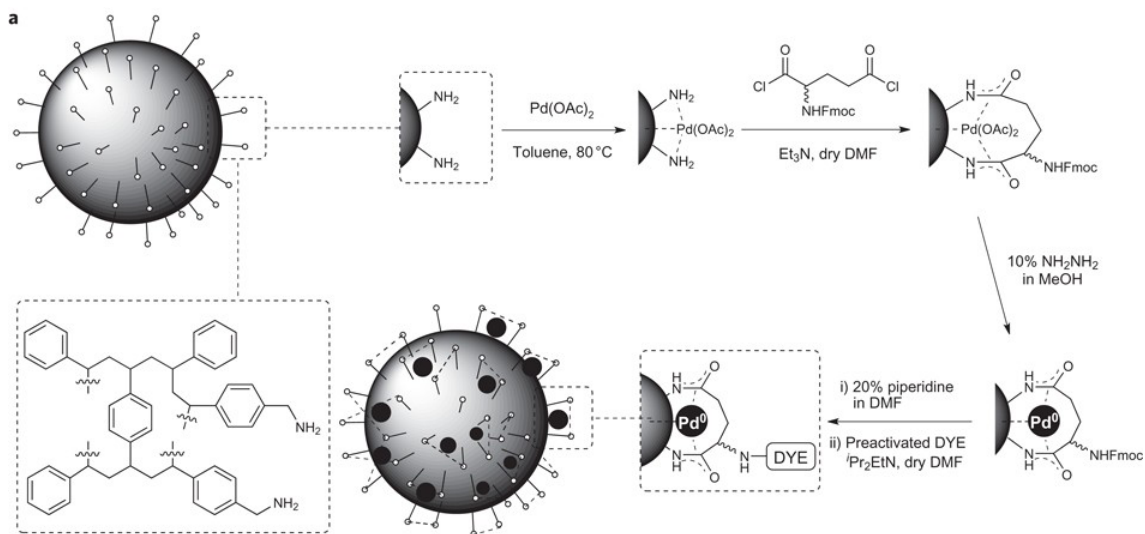
Q. 生体内で（比較的）用いてもよい金属種、価数は？

A. セミナー内で言及した通り、メタロエンザイムや nanoparticle にすることによって、ある程度までは許容されると考えており、そのような意味では適用できる金属種は多いと考えられます。ただ、あまりにも毒性が高いと知られている金属種（Hg, Cd など）は使用を避けるべきなのかもしれません。価数についても、あまり一般的なことは言えないのですが、1-3 価あたりがよく見るものだと認識しています。

Q. 他の金属とかでも生体内での触媒反応が行われていると思うのですが、生体内での失活を防いだり、臓器特異性などを出すためにも、メタロエンザイムにするという考えはやはりファーストチョイスになりやすいのでしょうか。他の手法などもあればまた教えて頂けると嬉しいです。

A. 確かに、メタロエンザイムにすることの利点はそのようなところにあると思います。ですが、必ずしもそれが第一選択となると言われるとそうでもないと考えています。

9 ページにも示しましたが、生体内に金属触媒を導入する手段として、メタロエンザイムの他に不均一系の nanoparticle や gel というようなナノデバイスとする方法もあります。以下に一例をお示しします。この報告では、Pd⁰ をアミノ基で修飾したポリスチレンの microsphere にトラップさせて、Pd⁰ の nanoparticle を安定化させることによって生体内での Pd⁰ による触媒反応を実現しています（下図参照）。



このような不均一系の nanoparticle にする利点としては、

- Pd⁰ の周りの嵩高さによって触媒の失活を防ぐことができる
- Pd⁰ が溶け出さないことによって、金属自身の持つ毒性発現を抑えられる
- nanoparticle 自体に修飾を施すことによって機能付与ができる

というところにあり、これはメタロエンザイムにおける利点と共通するところもあります。こういうこともあるせいか、比較的 nanoparticle などの不均一系触媒についても多く報告されている印象があり、どちらが第一選択、と言うわけではなさそうです。

Yusop, T *et al. Nat Chem.* **2011**, *3*, 239–243.

Q. 上に関連して、細胞内で起こしている触媒反応について、細胞内で反応が起きているという証明はどのようにされているのか？

A. 質疑応答の際には詳しくお答えできませんでしたが、実際に細胞内で反応を起していることを示している報告があります。今回は例として、上の質問でも取り上げた Pd⁰ nanoparticle の報告をご紹介します。構造は上に示した通りであり、nanoparticle にすることによって細胞内でも Pd⁰ による反応(allylcarbamate の脱保護や鈴木-宮浦カップリングなど)を起こすことが可能になります。

この Pd⁰ microsphere は細胞内に入ることが、flow cytometry と 共焦点顕微鏡による観察によって確かめられています。また、このことを踏まえて、実際に細胞内で反応が起きているのかどうかを、Alloc の脱保護反応をモデルに実証しています (下の図参照)。

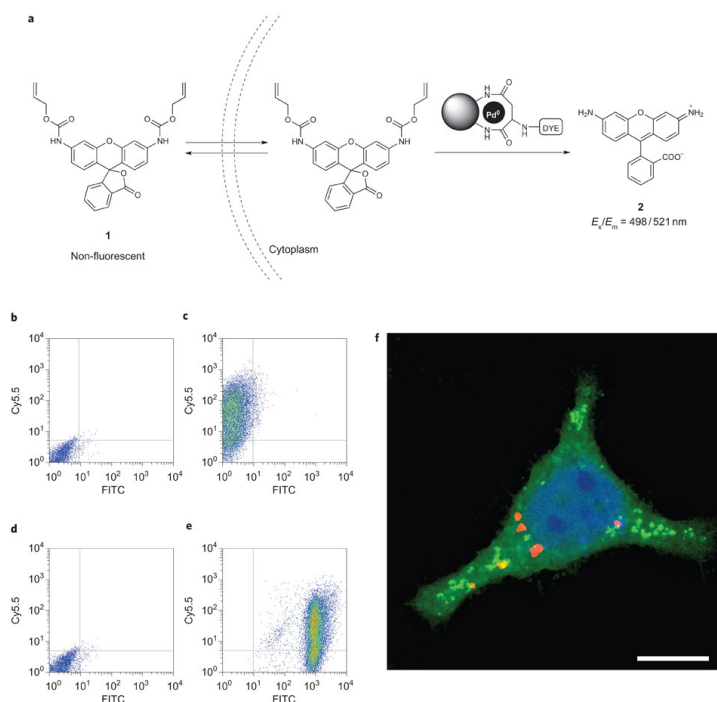
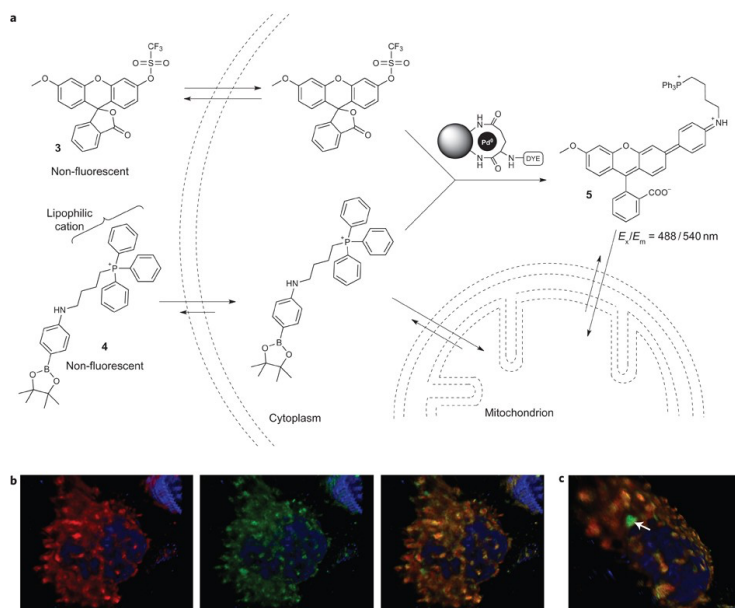


Figure 2 | Pd⁰-mediated allylcarbamate cleavage within HeLa cells. **a**, Pd⁰-catalysed intracellular deprotection of reagent **1** generates fluorescent compound **2**. **b–e**, Flow cytometry analysis of HeLa cells showing intracellular Pd⁰ catalysis of allylcarbamate cleavage. The y-axis represents Cy5.5 fluorescence intensity due to the Cy5.5-labelled Pd⁰ microspheres (bandpass emission filter, 780/60 nm) and the x-axis the FITC-like intensity of the cell due to compound **2** (bandpass emission filter, 530/30 nm). **b**, Untreated cell control (no fluorescence emission). **c**, Cells after 24 h incubation with Cy5.5-labelled Pd⁰ microspheres (positive fluorescence emission from Cy5.5 channel). **d**, Cells after 24 h incubation with reagent **1** (no fluorescence emission). **e**, Cy5.5-labelled Pd⁰ microsphere-loaded cells after 24 h incubation with reagent **1**, showing fluorescence emission under both Cy5.5 (indicating the presence of the Pd⁰ microspheres) and FITC-like bandpass filters (confirming the synthesis of deprotected dye **2**). **f**, Merged confocal image of a single HeLa cell (fixed with paraformaldehyde) showing a Hoechst 33342-stained nucleus (blue) with Texas Red-labelled Pd⁰ microspheres (red) and deprotected compound **2** (green). Scale bar, 10 μm.

さらに、C-C 結合形成反応として、鈴木宮浦カップリングを行うことによって、ミトコンドリアのイメージングを達成しています。



Yusop, T *et al. Nat Chem.* **2011**, *3*, 239–243.

【補足】

ちなみに、過去の文献セミナーで今回の内容と同じようなテーマを扱っているものがありました（2013年12月2日発表「Metal complex catalysis in Biological conditions」新谷さんのものです）。金井研のホームページに掲載されていますので、興味があればそちらも参考にしていただければと思います。特に Q&A の方は、今回の内容に関する質問も多いので、非常に勉強になりました。