

# 博士學位論文審査要旨

2012年1月10日

論文題目： 水溶性ポルフィリンの分子錯体—基礎および医薬化学への展開—

学位申請者： 渡辺 賢司

審査委員：

主 査： 工学研究科 教授 加納 航治

副 査： 工学研究科 教授 東 信行

副 査： 工学研究科 教授 小寺 政人

要 旨：

タンパク質と人工レセプターとの分子錯体形成についての基礎的研究は、生命現象を高度に制御する上で極めて重要である。特にガン、HIV 感染症、インフルエンザなどに代表される難治療疾患に対する医薬品開発には、高度に選択性の高いタンパク質レセプターの開発が必要不可欠である。本研究ではこのような観点から、分子錯体形成能が大きい大環状芳香族化合物であるアニオン性ポルフィリンを選び、タンパク質との相互作用およびその機能制御につき研究している。論文は六つの章から構成されている。

第1章では、研究の背景、意義および結果の概要が書かれている。

第2章の研究では、酸性水溶液中で形成されるアニオン性ポルフィリン (tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin (TPPS)) の J 型会合体が、メトミオグロビン (metMb) が系中に存在すると中性水溶液中でも著しく安定化されることを初めて見出した。TPPS J-会合体と metMb との結合には、静電相互作用以外に van der Waals 力あるいはまた疎水性効果が関与することも明らかにした。

第3章では、第2章の結果に基づき、TPPS J-会合体を利用する時間依存型酵素活性の発現を試みている。これまでに、酵素活性を時間とともに変化させる手法はわずかながら開発されているが、一端酵素活性を消滅させた後に、再び活性を回復させるという研究例はほとんどない。本研究では $\alpha$ -キモトリプシン (ChT) を酵素として選び、そのペプチド加水分解反応の TPPS J-会合体による時間依存型制御に成功している。J-会合体は ChT と結合することにより安定化され、その結果 ChT の酵素活性を消失させるが、時間とともに J-会合体がモノマーへと解離するにつれ、ChT の酵素活性が回復するという興味ある結果を得た。

第4章では、アニオン性ポルフィリンがタンパク質の塩基性部位に結合するというこれまでの結果を踏まえて、HIV の正常細胞への侵入をアニオン性ポルフィリンによりブロックすることができると予想し、HIV の V3 ループタンパク質とアニオン性ポルフィリンおよびその Fe(III) 錯体との相互作用を *in vitro* で検討している。また、その結果を *in vivo* へ適応した。*in vitro* の結果が *in vivo* に 100%反映されることはなかったが、従来の抗 HIV 剤と同等かそれ以上の効果のある種のポルフィリン Fe(III) 錯体が有することを見出した。

第5章では、青酸中毒解毒剤として有用とされているヒドロキシコバラミン(OHCbl)よりも優れたシアンレセプターを開発するために、これまでの研究成果を総合的に応用している。タンパク質と結合していない OHCbl は *in vivo* の血清中では、血清タンパク質と結合し、そのシアンレセプターとしての性能を著しく低下させることを実験的に確かめた。一方、イミダゾールをリンカー部に有するパーメチル化シクロデキストリン二量体の Fe(III)TPPS 超分子錯体は、

血清タンパクとの結合能は極めて弱く、かつ青酸レセプター能は非常に高いことを見出した。さらに、Fe(III)TPPS 超分子を注入したラットに致死量の青酸ソーダを投与しても、ラットは100%生存することを見出している。よって、OHCb1 よりもすぐれた青酸レセプターの開発に成功したと結論することができる。

第6章では、結果の総括と今後の展望につき述べている。

以上、本研究では、水溶性ポルフィリンおよびその Fe(III)錯体とタンパク質との相互作用を基礎的に明らかにすると同時に、その結果を実用に応用することができる程度まで医薬化学へ応用した。よって、本論文は、博士（工学）（同志社大学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる

## 総合試験結果の要旨

2012年1月10日

論文題目： 水溶性ポルフィリンの分子錯体—基礎および医薬化学への展開—

学位申請者： 渡辺 賢司

審査委員：

主査： 工学研究科 教授 加納 航治

副査： 工学研究科 教授 東 信行

副査： 工学研究科 教授 小寺 政人

要 旨：

論文提出者は、現在、工学研究科工業化学専攻博士課程（後期課程）3年次に在学中である。本論文の主たる内容は、J. Phys. Chem. (1編), Chem. -Asian J. (1編), Bioconjugate Chem. (1編) および ACS Med. Chem. Lett. (1編) にすでに印刷公表され、十分な評価を得ている。2011年12月24日午後1時30分より約1時間半にわたって、提出論文に対する学術講演会（博士論文公聴会）が開かれ活発な質疑応答がなされたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。さらに講演終了後、審査委員により論文に関連した諸問題につき口頭試問を実施した結果、いずれも十分な学力を有することが確認された。

論文提出者は、英語の語学試験に合格しており、ドイツ語についても十分な能力を有すると認定されている。よって、総合試験の結果は合格であると認める。

# 博士学位論文要旨

論文題目：水溶性ポルフィリンの分子錯体－基礎および医薬化学への展開－

氏名：渡辺 賢司

## 要旨：

水中で様々な生体分子を含む複雑系において、特定の生体分子を高い選択性で認識可能な人工分子を開発するには多くの困難がつきまとう。このことを踏まえた上で、生体分子と人工分子のそれぞれが持つ特徴を引き出すには、両分子の相互作用の基礎をしっかりと理解することが大変重要である。本論文では、生体分子に対する人工エフェクター分子として水溶性ポルフィリンを選び、生体内で様々な役割を担うタンパク質との相互作用の基礎を、分光学や熱力学といった物理化学的手法により解明することから研究を開始した。そして、水溶性ポルフィリンとその自己集合体が、タンパク質と安定な分子錯体を形成し、タンパク質の集積や解離、機能制御および抗ウイルス効果を引き起こす有用なエフェクター分子となることを示した。一方、時には人工エフェクター分子とタンパク質との錯形成が、エフェクター分子の持つ内在的な機能を損ねる場合もある。このような場合、エフェクター分子を周辺の生体分子から孤立化させる必要がある。メチル化 $\beta$ -シクロデキストリン二量体は、鉄(III)ポルフィリンを様々な生体分子を含む複雑系から孤立させ、鉄(III)ポルフィリンのシアン捕捉能を維持させる上で有用であることが示された。以下に各章の要旨を述べる。

第一章では、本研究の背景、意義、結果の概要および今後の展望について述べた。

第二章では、水溶性ポルフィリン 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin ( $H_2TPPS^4$ )の内部窒素がジプロトン化された  $H_4TPPS^2$  の J 型自己会合体とメトミオグロビンとの相互作用について検討を行った。本研究では、本来ならば酸性水溶液中でのみ形成される  $H_4TPPS^2$  J 型会合体が metMb と強く錯形成することにより、中性水溶液中でも比較的安定に存在できることを明らかにした。metMb と結合した  $H_4TPPS^2$  J 型会合体は時間経過とともに自発的に単量体の  $H_2TPPS^4$  へと解離した。pH 7.0 のリン酸緩衝水溶液 ( $5.0 \times 10^{-3}$  M) 中の  $H_4TPPS^2$  J 型会合体の解離の半減期  $t_{1/2}$  は metMb の存在量の増加に伴い長くなり、 $H_2TPPS^4$  に対して 2 当量以上の metMb が存在するとき約 3 時間となって飽和した。 $H_4TPPS^2$  J 型会合体と metMb との錯形成は、クーロン相互作用および van der Waals 相互作用/疎水性効果の両方が関与することが等温滴定熱量 (ITC) 測定から示された。つぎに、過剰量の  $H_4TPPS^2$  J 型会合体存在下の metMb はアジ化物イオン ( $N_3^-$ ) と高い親和性を示すことが明らかとなった。metMb の  $N_3^-$  親和性は J 型会合体の解離に伴い減少することから、J 型会合体による metMb

の  $\text{N}_3^-$  親和性の時間依存性という新しい現象が見出された。本研究は  $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体とタンパク質との相互作用を中性水溶液下で観測した初めての例であるだけでなく、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体がタンパク質に対して構造および機能を変化させるエフェクターとして機能した後、その効果が次第に消失する時間依存性のある自己回復型エフェクターとして働く可能性を示した。

第三章では、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体とセリンプロテアーゼの一種である  $\alpha$ -キモトリプシン (ChT) との相互作用および ChT の基質加水分解反応の触媒活性におよぼす影響について調べ、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体のより積極的な応用法について検討を行った。第二章で検討を行った metMb と同様に、ChT でも  $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体の中性水溶液中での安定化が認められた。 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体は ChT の活性部位を覆うことで酵素活性を完全に阻害した。その後、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体のタンパク質表面からの解離により ChT の酵素活性は次第に回復し、最終的には完全に回復した。このことから、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体は ChT の酵素活性を完全阻害から完全回復まで経時変化出来ることが明らかとなった。円二色性 (CD) スペクトルから、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体との錯形成により ChT の酵素活性に関係する活性中心近傍の構造はほとんど変化しないが、タンパク質全体ではランダムコイル構造の含有量が増すことが分かった。このことから、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体による ChT の活性の阻害は、J 型会合体による ChT の変性が原因ではなく、 $\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$ -J 型会合体による酵素の活性部位の被覆効果に起因することが示された。本系は酵素工学や生体材料の分野において、時間依存的に酵素活性およびタンパク質構造を制御するツールを開発する基礎になりうると考えられ、今後より自由自在に酵素の触媒活性、基質特異性およびタンパク質構造を時間の関数として制御する手法の開発が進められるものと期待される。

第四章では、各種アニオン性ポルフィリン化合物とカチオン性の V3 loop ペプチドとの相互作用について分光学および熱力学的手法により詳細に調べた。V3 loop はヒト免疫不全ウイルス (HIV) の細胞内侵入に関与する gp120 タンパク質中の正常細胞を認識する部位である。本研究では、多価アニオン性ポルフィリンである P1 およびその鉄(III)錯体  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P1}$  が、クーロン相互作用と van der Waals 相互作用の協同効果により V3 ペプチドと安定な錯体を形成することが ITC 測定により示された。また、HIV-1<sub>Ba-L</sub> 株由来の V3<sub>Ba-L</sub> ペプチドの His 残基の  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P1}$  への配位も錯体の安定化に重要であった。一方、HIV-1<sub>IIIb</sub> 株由来の V3<sub>IIIb</sub> ペプチドでは  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P1}$  がペプチドと配位結合を形成しないことを示唆する結果が EPR スペクトルから得られ、錯形成における主要な駆動力はクーロン相互作用であることが ITC 測定より分かった。つぎに、これらのポルフィリン化合物の抗 HIV 活性を細胞実験により検討した。in vivo での検討の結果、これらのポルフィリン化合物の中でも  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P2}$  が特に高い抗ウイルス効果を示すことが明らかとなった。また、鉄(III)のポルフィリンへの導入は細胞毒性の低下および抗ウイルス活性の向上に効果的であることが分かった。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P2}$  の抗ウイルス活性は対照実験と

して用いた既存の抗ウイルス剤と匹敵する活性を示した。しかし、化合物の V3 部位への錯形成能と抗 HIV 活性には明確な相関は認められなかった。エフェクター分子の V3 部位への錯形成能よりもその分子サイズが抗 HIV 活性に大きく関与することが示唆された。最後に、特に高い抗 HIV 活性と低い細胞毒性を示した  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P1}$  および  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P2}$  についてラット体内での薬物動態を調べた。ラットの血流中でのこれら鉄(III)ポルフィリンの滞在時間の半減期は約 4-6 時間と長かった。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P1}$  は腸管吸収性を示し、わずかながら血流中へ移行するが、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P2}$  はほとんど腸管吸収性を示さなかった。

第五章では、鉄(III)ポルフィリン/シクロデキストリン超分子錯体を用いて、血液中のタンパク質と非特異的な相互作用を起こしにくく、その性能が損なわれにくいシアン化物イオン ( $\text{CN}^-$ ) レセプターの開発を試みた。まず、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}^3$  と各種メチル化シクロデキストリンとの包接錯体のシアン結合挙動を、結合定数  $K_{\text{ass}}$  および結合速度定数  $k_{\text{on}}$  の両面から系統的に検討した。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}^3$  それ自体および 2,3,6-tri-*O*-methyl- $\beta$ -cyclodextrin (TMe- $\beta$ -CD) との 1:2 包接錯体 [ $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}^3/\text{TMe-}\beta\text{-CD}$ ]<sub>2</sub> のシアン結合能はシアンレセプターとして不適切であった。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}^3$  と窒素配位子をリンカー部位に含むメチル化 $\beta$ -シクロデキストリンとの包接錯体のシアン結合定数  $K_{\text{ass}}$  は  $10^6 \text{ M}^{-1}$  以上であった。このことから、鉄(III)ポルフィリンへの第五窒素配位子の導入は、 $K_{\text{ass}}$  を大きく向上させることが分かった。また、シアン結合速度定数  $k_{\text{on}}$  は錯体の配位水の  $\text{p}K_{\text{a}}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ ) に大きく依存し、 $\text{p}K_{\text{a}}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ ) の大きなレセプターほど大きな  $k_{\text{on}}$  を示すことが明らかとなった。 $K_{\text{ass}}$  および  $k_{\text{on}}$  の検討結果から、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}^3$  とイミダゾール基をリンカー部位に有するメチル化 $\beta$ -シクロデキストリン二量体 Im3CD との包接錯体  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$  がシアンレセプターとして最適であることが分かった。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$  の血清中でのシアン結合定数  $K_{\text{ass}}$  および結合速度定数  $k_{\text{on}}$  はそれぞれ  $1.34 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  および  $104 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と得られ、既存のシアン中毒解毒剤であるヒドロキシコバラミンに比べ、それぞれ 103 倍および 16 倍大きかった。つぎに、ラットを用いた動物実験により、ラット体内に投与した  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$  は鉄(III)状態のまま尿中に排泄されることが分かった。また、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$  を前投与したラットは、致死量の NaCN を投与しても生存した。これらのことから、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$  はシアンレセプターとして生体内において十分機能することが示された。今後、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{PIm3CD}$  のシアン中毒解毒剤としての実用的応用が期待される。一方、本研究で得られた基礎的な知見は、より優れたシアン結合能を有するレセプターの開発にもつながると考えられる。

第六章では、本研究の総括として、今回得られた知見ならびに今後の改良点、展望について述べ、結論とした。