

水中で機能する超分子ペルオキシダーゼモデル
に関する研究

(博士論文)

2014 年

同志社大学大学院工学研究科工業化学専攻

博士課程(後期)

2011 年度 1506 番

上田 卓典

目次

第一章 緒論	1
1. バイオミメティックケミストリー	1
2. ヘム酵素による酸化反応	1
3. 酸化酵素モデル化合物	4
4. シクロデキストリン/ポルフィリン包接錯体を基盤とした ヘムタンパク質モデル	4
5. 本研究の意義と要旨	6
6. 参考文献	10
第二章 超分子ヘム酵素モデルを用いた酸化反応不安定中間体の捕捉および 水中における安定な鉄(IV)オキソポルフィリンの生成	14
1. 緒言	14
2. 実験	19
2-1. 測定機器	19
2-2. 試薬および合成	19
2-2-1. 過酸化水素の濃度決定	20
2-2-2. ^{18}O ラベル化過酸化水素の合成	20
3. 結果および考察	20
3-1. met-hemoCD1 と過酸化水素との反応	20
3-2. 共鳴ラマン分光法による 1^{H} の錯体構造の検討	25
3-3. EPR スペクトルによる不安定反応中間体の確認	28
4. 結言	30
5. 参考文献	31
第三章 met-hemoCD1 と過酸化水素との反応機構および 高分子修飾酵素モデルによる不安定中間体の安定化	34

1. 緒言	34
2. 実験	35
2-1. 測定機器	35
2-2. 試薬および合成	36
2-2-1. P-PEG5k の合成	36
2-2-2. Fe ^{III} P-PEG5k の合成	37
3. 結果および考察	38
3-1. hemoCD と過酸化水素との反応のメカニズムの検討	38
3-1-1. •OH ラジカルの検出	38
3-1-2. O=Fe ^{IV} P 生成の反応速度	42
3-2. PEG 修飾鉄ポルフィリンの合成	43
3-3. PEG 修飾による機能の変化	44
3-3-1. メチル化 β -シクロデキストリン二量体の包接錯体形成	44
3-3-2. PEG 修飾 hemoCD1 の酸素結合挙動	48
3-4. 不安定反応中間体の安定化	53
4. 結言	56
5. 参考文献	56
第四章 鉄(IV)オキソポルフィリンからの分子内酸素移動反応	59
1. 緒言	59
2. 実験	62
2-1. 測定機器	62
2-2. 試薬および合成	63
2-2-1. クメンヒドロペルオキシド(CHPO)の濃度決定	63
2-2-2. 反応後のシクロデキストリン成分の分析	63
2-2-3. ¹⁸ O ラベル化クメンヒドロペルオキシド(CHPO)の合成	64
2-2-4. スルホン化 Py3CD (Py3CD-SO ₂)の合成	64
3. 結果および考察	65
3-1. 内部基質としてのシクロデキストリンダイマー	65
3-2. 鉄(IV)オキソポルフィリン(O=Fe ^{IV} P)の調整	66
3-3. 鉄(IV)オキソポルフィリン(O=Fe ^{IV} P)による酸素移動反応	70

3-4. スルフィドへの酸素移動反応の速度論	78
3-5. oxoferryl-hemoCD1 の錯体構造	80
4. 結言	82
5. 参考文献.....	82
第五章 過酸との反応による鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカルの生成と 分子内 O-脱メチル化反応	85
1. 緒言	85
2. 実験	88
2-1. 測定機器	88
2-2. 試薬および合成	88
2-2-1. モノヒドロキシル化 Py2CD (Py2CD ^{OH})の合成	89
2-2-2. ホルムアルデヒドの検出	89
3. 結果および考察.....	90
3-1. met-hemoCD1 および met-hemoCD2 と mCPBA の反応	90
3-2. Cpd X における鉄中心周辺の配位環境の変化	96
3-3. met-hemoCD2 における酸化的脱メチル化反応の機構	101
3-4. hemoCD2 のモノヒドロキシル化による超分子機能の変化.....	104
3-4-1. Py2CD ^{OH} /Fe ^{III} TPPS 包接錯体のアクア配位子の pK _a の決定	105
3-4-2. Py2CD ^{OH} /Fe ^{II} TPPS の酸素結合挙動	107
3-4-3. Py2CD ^{OH} /Fe ^{II} TPPS の酸素親和性.....	108
3-4-4. Py2CD ^{OH} /Fe ^{II} TPPS の自動酸化速度	111
4. 結言	112
5. 参考文献.....	114
第六章 結論	116

第一章 緒論

1. バイオミメティックケミストリー¹⁾

生体内ではさまざまな化学反応が行われることによって生命活動を行っている。これらの化学反応はタンパク質、核酸、脂質、糖鎖などの生体分子によって構築される高度なシステムにより達成されている。生体内で行われる反応は主にタンパク質によって行われるが、タンパク質などの生体分子はその分子単体では機能を発現することができないことが多く、さまざまな補欠分子族や補酵素などの小分子を利用することで複雑な化学反応を行っている。またこれらの生体内反応は水中、室温、大気圧下といった生体内の穏やかな反応条件で進行している。一方、同じような反応をフラスコ内で行う場合には高温、高圧などの厳しい条件で行わなければならないことが多い。さらに生体内反応の選択性や効率とともに非常に高いが、同じ選択性や効率をフラスコ内で再現することは容易ではない。そこでバイオミメティックケミストリー(生体模倣化学)ではこれら高度な生体内反応に注目して、その反応のエッセンスのみを抽出し人工的に再現することにより、人類に有用な化学を開発する試みが行われる。バイオミメティックケミストリーでは生体内反応を再現するだけでなく、そのメカニズムを解明することで生体内現象を凌駕する新たな機能を生み出すことも可能である。これからの化学工業は環境への負荷の低減が必要とされている。そのような観点からも水中、室温、大気圧下でのバイオミメティックケミストリーがもつ可能性は非常に大きいといえる。

2. ヘム酵素による酸化反応²⁾

生体内において行われる酸化反応には生命維持に必要な呼吸鎖での一連の反応以外にもホルモンなどの小分子の合成や体内に入った薬物などの代謝を行う。これらの反応を行うのは鉄や銅などの金属元素を持つ酵素である。金属元素として鉄を用いるタンパク質は、ポルフィリン骨格を持つヘムタンパク質・ヘム酵素とポルフィリン骨格を持たない非ヘム酵素に分類される。ヘムタンパク質やヘム酵素はヘム(プロトポルフィリン IX 鉄錯体, Figure 1-1) と呼ばれる補欠分子族を有するタンパク質である。このタンパク質の代表的な機能には酸素運

搬・貯蔵(ヘモグロビン、ミオグロビン)、基質酸化(ペルオキシダーゼ、シトクロム P450)、電子伝達(シトクロム類)、過酸化水素分解(カタラーゼ)などさまざまなものがある。ヘムタンパク質・ヘム酵素はヘムを補欠分子族として利用し種々の反応を行うが、ヘム単体ではこのような反応を一切起こすことができない。反応を起こすためにはヘムがタンパク質マトリックスに取り込まれる必要があり、タンパク質がつくり出す環境に置かれることで

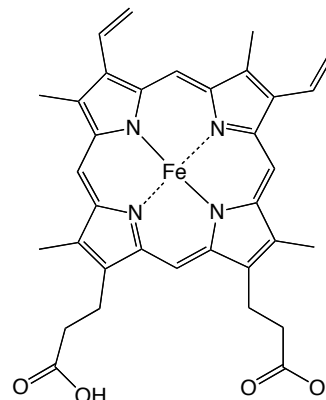


Figure 1-1. Structure of heme.

はじめて機能を発現する。タンパク質マトリックス中に取り込まれた鉄ポルフィリンは2価から4価までさまざまな原子価を取ることに加え多様なアキシャル配位子と結合できるため、同じヘムを活性中心にもつタンパク質でもさまざまな異なる機能を発現することができる。

酸化反応を行う代表的なヘム酵素としてシトクロム P450 (Cyt P450)やペルオキシダーゼが知られている。Cyt P450 は酸素を還元的に活性化することで基質の水酸化反応を触媒する酵素である。シトクロム P450 の酸化活性種やその酸化反応メカニズムはペルオキシダーゼなどの他のヘム酵素と共通の点が多い。ペルオキシダーゼは過酸化水素を用いて酸化反応を触媒するヘム酵素で、研究には西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)がよく用いられており、その反応が広く調べられている³⁾。Figure 1-2 に HRP の休止状態の結晶構造と活性中心であるヘム周辺の構造を示す。HRP は通常鉄(III)の休止状態で存在し、鉄中心には第5配位子として His170 のイミダゾールが配位している。HRP が過酸化水素を用いて触媒する反応メカニズムは Figure 1-3 ように考えられている⁴⁾。過酸化水素が遠位側の配位サイトに近づくると His42 のイミダゾールにより脱プロトン化され、生じた HOO が鉄(III)に配位して鉄(III)ヒドロペルオキシ種(Cpd 0, HOO-Fe^{III}P, P: porphyrin dianion)を生成する。Cpd 0 は、近位 His の push 効果およびプロトン化された遠位側 His の pull 効果によって、酸素-酸素間の結合のヘテロリシスが誘発され水が脱離することで、酸化活性種である鉄(IV)オキシポルフィリン π -カチオンラジカル(Cpd I, O=Fe^{IV}P⁺)を生じる。Cpd I は二電子酸化当量を有しており、基質を一電子酸化することで鉄(IV)オキシポルフィリン(Cpd II, O=Fe^{IV}P)へと変化する。Cpd II はさらに一電子酸化をすることで自身は元の鉄(III)の休止状態へ

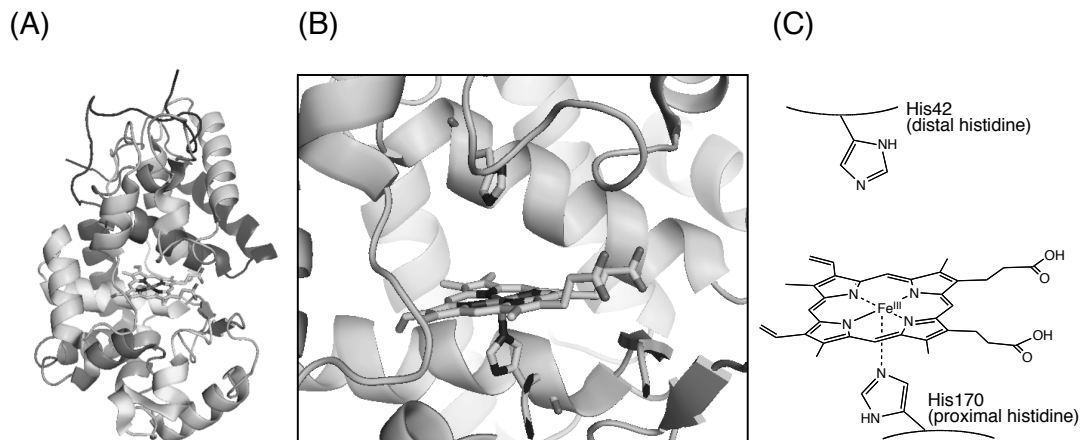


Figure 1-2. Crystal structure of horseradish peroxidase (HRP, PDB code: 1W4W). A: a ribbon model; B: an active site around heme; C: schematic representation of the active site.

と戻る。酸化活性種の生成において重要となるステップは Cpd 0 のヘテロリシスで、近位配位子(イミダゾール(His170))の電子供与(push)と遠位側(プロトン化したイミダゾール(His42))による電子求引(pull)の push-pull 効果により酸素-酸素結合のヘテロリシスが実現されている⁵⁾。これらの仕組みにより Cpd 0 のラジカル的な酸素間の結合の解離を防ぎ、ホモリシスによって生じるヒドロキシルラジカル($\bullet\text{OH}$)による非特異的な酸化反応やヘムの分解が起こらないようにしている。酸化活性種である Cpd I の反応についてはよく研究されており、アルカンの水酸化、アルケンのエポキシ化などを行うがその詳しいメカニズムについては未だにはっきりしていない⁵⁻⁶⁾。そのため、シトクロム P450 やペルオキシダーゼなどの酸化反応のメカニズムの解明は多くの科学者を惹きつけるテーマとなっている。

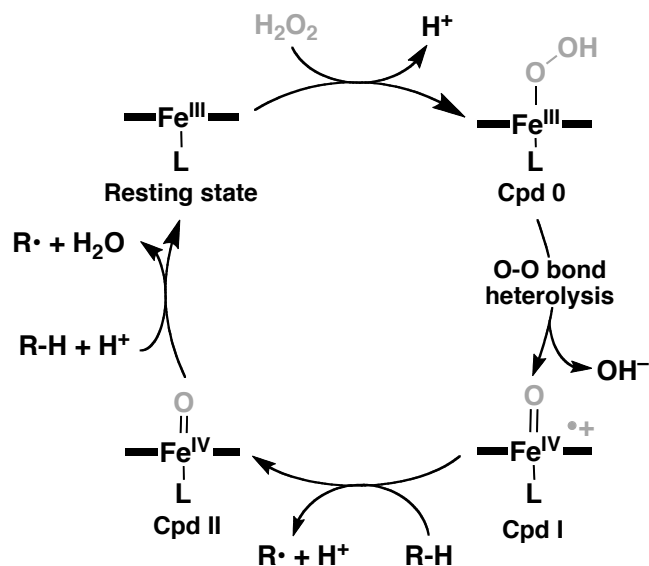


Figure 1-3. Catalytic cycle of HRP-catalyzed oxidation reaction.

3. 酸化酵素モデル化合物

タンパク質や酵素を用いた系では活性中心付近にさまざまなアミノ酸残基が存在し、それらが複雑に関与して酸化反応のメカニズムの検討を困難にしている。このような系はバイオメティックケミストリーに基づいた研究を行うことでその詳細な反応メカニズムの検討が容易になると思われる。さらに酸化酵素の反応を人工の分子で模倣することは酸化酵素の反応機構の解明に役立つばかりではなく、新たな酸化触媒の開発による合成化学や工業化学への寄与の面での期待が持たれる。そのため人工的に合成されたポルフィリンを用いたヘム酵素のモデル化合物の研究は古くから行われてきた。しかし鉄ポルフィリンを酵素モデルとして用いる際に大きな問題があった。鉄ポルフィリンに過酸化水素などの酸化剤を反応させるとラジカル反応に由来するポルフィリン環の開裂が起こる。そのため鉄ポルフィリンを対象としたヘム酵素モデルの研究ではポルフィリンの分解を防ぐことが非常に重要な課題となっている。1981年にGrovesらによって初めてCpd Iのモデル化合物の合成が報告された⁷⁾。Grovesらは $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TMP}$ (TMP: tetramesitylporphyrin dianion)を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ の低温のジクロロメタン中で*m*-クロロ過安息香酸(mCPBA)を反応させることでCpd Iのモデル錯体である $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{TMP}^{2-}$ の合成に成功した。低温にすることでヘムの分解反応を抑制し、さらに過酸を用いることで酸素-酸素間の結合のヘテロリシスを可能とした。この研究をきっかけとして酸化酵素モデルの研究が進み、他のCpd I⁸⁾、Cpd II⁹⁾やCpd 0¹⁰⁾に対応するモデル錯体の合成も行われた。現在にいたるまでさまざまな置換基を持つポルフィリンを用いて酸化酵素モデルの研究が行われている。

4. シクロデキストリン/ポルフィリン包接錯体を基盤としたヘムタンパク質モデル

生体内における反応はすべて水を媒体としていることから、より生体に近い人工モデル系を構築し、その水中における化学現象を理解する必要がある。ヘムタンパク質はヘムをタンパク質マトリックスで取り囲むことにより、水中でありながら活性中心周辺を疎水的な雰囲気になっている。ヘムタンパク質のモデルを構築するためにはポルフィリン周辺に疎水的な環境を作る必要があると思われる。

水中において疎水的な環境を作る材料としてシクロデキストリン(CD)が知られている。CDは、6から8個のグルコピラノースが α -1,4 グルコシド結合でつながった環状オリゴ糖である。CDはグルコピラノースユニットの数により α -(6)、 β -(7)および γ -CD(8)と呼ばれる。CDは極性の高い水酸基が外側に配列しているため水溶性であるが、その内部空洞はC-H結合に囲まれるため疎水的な環境となる。この構造はまさにタンパク質を連想させる構造で、CDを用いた酵素モデルの研究は1960年代からBenderらによって始められた¹¹⁾。

CD/ポルフィリンの系をヘムタンパク質モデルに応用する試みも行われている。Kurodaら¹²⁾およびBreslowら¹³⁾は金属ポルフィリンにCDを結合し、CDを基質結合部位として用いることで酸化反応における基質や反応部位の選択性を向上させている。またLawrenceらは2つの β -シクロデキストリンをピリジンで連結した化合物を合成¹⁴⁾し、種々の金属ポルフィリンとの包接錯体形成を観察している¹⁵⁾。一方で、Carofiglioら¹⁶⁾およびKanoら¹⁷⁾は、全ての水酸基をO-メチル化した β -シクロデキストリン(TMe- β -CD)がアニオン性のテトラアリルポルフィリンを水中で非常に強く包接することを見だし、結合定数が測定できないくらい極めて安定な1:2包接錯体が生成することを報告している(Figure 1-4)。さらにKanoらは2分子のTMe- β -CDが水溶性ポルフィリンを包接した際にポルフィリン環内部窒素へのプロトン化が著しく抑制されることを見だし、TMe- β -CDの包接によってポルフィリン周辺に疎水的な空間を作り出すことができることを明らかにした^{17b)}。

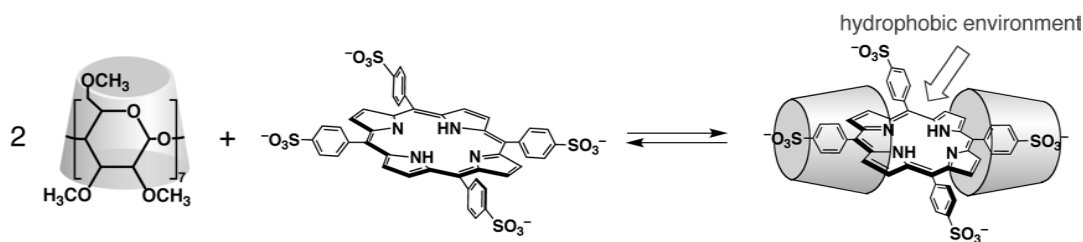


Figure 1-4. A schematic representation for the 1:2 complexation of water-soluble porphyrin with TMe- β -CD.

これらの経緯を踏まえてKanoらはさらにこの系を発展させ、2分子のTMe- β -CDをピリジン配位子で連結したパーO-メチル化 β -シクロデキストリン二量体(Py3CD)を合成し、アニオン性鉄(II)ポルフィリンである5,10,15,20-テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン鉄(II)錯体(Fe^{II} TPPS)との包接錯体

(hemoCD1, Figure 1-5)の合成に成功した¹⁸⁾。hemoCD1 は水中でミオグロビンモデルとして機能し、可逆的に酸素錯体を形成する¹⁸⁻¹⁹⁾。さらにシクロデキストリンの連結位置が異なる hemoCD1 の類縁体(hemoCD2, Figure 1-5)を合成し、水中におけるミオグロビンモデルに関する研究を行っている²⁰⁾。hemoCD1 において Py3CD の環状オリゴ糖がポルフィリンを取り囲んでいる構造はペルオキシダーゼなどのヘム周辺の活性中心の構造を連想させる。そのため鉄(III)の met-hemoCD1 の系を用いた水中におけるヘム酵素モデルの研究に興味を持たれる。

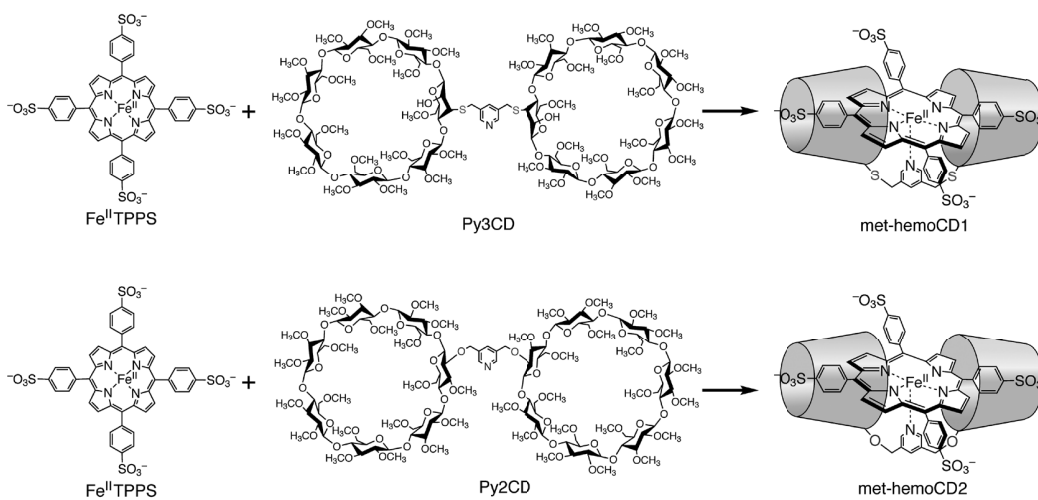


Figure 1-5. Functional model compounds (hemoCD1 and hemoCD2) of myoglobin.

5. 本研究の意義と要旨

本論文では、水中における酸化酵素モデルとしての met-hemoCD1 およびその類縁体を用い、それらと過酸化水素との反応における反応中間体の検索と酸化活性種の反応性について検討した。hemoCD1 の系は水中で機能する唯一のミオグロビンモデル化合物で、シクロデキストリンが鉄ポルフィリンを強く包接することでシクロデキストリンが作るカプセル内への水の浸入を防ぎ安定な酸素錯体の形成を可能としている。また hemoCD1 の構造はヘムタンパク質やヘム酵素の活性中心の構造を抽出した構造となっているので、ペルオキシダーゼやシトクロム P450 のような酸化酵素のモデルとしての機能が期待できる。また hemoCD1 は水中において鉄ポルフィリンをカプセル化するため、不安定中間体

の検出や酸化活性種の水中における構造や反応性を検討することができる可能性がある。

第二章では、 Fe^{III} TPPS と Py3CD の包接錯体である met-hemoCD1 を用いて酸化酵素の 1 つである HRP のモデル反応について検討を行った。第三章では、met-hemoCD1 と過酸化水素の反応で生じた酸化活性種の生成機構の検討および高分子修飾による不安定反応中間体の安定化を試みた。第四章では、水中における Cpd II に対応する酸化活性種による分子内直接酸素移動について検討を行った。第五章では、met-hemoCD2 と過酸の反応から Cpd I に対応する化学種の生成を試みた。以下に各章の要旨を述べる。

第二章では、中心鉄が 3 価の met-hemoCD1 と過酸化水素との反応について検討を行った(Figure 1-6)。Py3CD が存在しない水溶液中では鉄(III)ポルフィリン(Fe^{III} TPPS)は過酸化水素と反応することでポルフィリン環開裂が速やかに起こることとは対照的に、met-hemoCD1 と過酸化水素との反応ではポルフィリンの分解が顕著に抑制された。met-hemoCD1 は過酸化水素と反応すると Cpd 0 に対応する不安定中間体の鉄(III)ヒドロペルオキシ錯体($\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$)を形成し、この中間体を EPR スペクトルにより検出することに成功した。met-hemoCD1 のヒドロペルオキシ種は第五配位子の違いにより $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{Py})\text{P}$ および $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{P}$ の 2 種類が存在することを明らかにした。met-hemoCD1 のヒドロペルオキシ種は速やかに分解して、Cpd II に対応する鉄(IV)オキソポルフィリン($\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$, oxoferryl-hemoCD1)に変化することを分光学的に明らかにした。ここで観測に成功した鉄(III)ヒドロペルオキシ種は完全な水中のモデル系において観測されたという報告例はなく、シクロデキストリン/鉄ポルフィリン包接錯体によるヘムタンパク質モデルは酵素反応の中間体や活性種の反応性を探る有用なモデル系であることが示された。

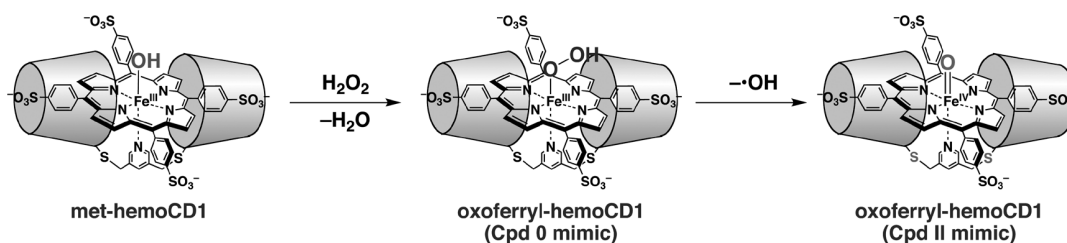


Figure 1-6. Schematic representation for the reaction of met-hemoCD1 with H_2O_2 (Chapter 2).

第三章では、met-hemoCD1 と過酸化水素との反応により生成する O=Fe^{IV}P の生成メカニズムについて検討を行った。ラジカルスピントラップ法を用いた EPR スペクトルの測定結果から、HOO-Fe^{III}P の酸素-酸素結合がラジカル開裂することがわかった。HOO-Fe^{III}P のホモリシスにより生じる・OH ラジカルは、メチル化シクロデキストリンが作るカプセルの中において O=Fe^{IV}P と再結合する平衡によって安定化されるものと考えた(Figure 1-7, 平衡 B)。この平衡により・OH ラジカルによるポルフィリン環の分解反応が抑制されるものと考えられる。カプセル内で安定化された・OH ラジカルはラジカル同士のカップリングにより H₂O₂ を生じて消失する((Figure 1-7, 反応 C))と考えられる。高分子を修飾して hemoCD1 の分子間の反応を制限すると HOO-Fe^{III}P が安定化されることが EPR スペクトルの測定結果から明らかとなった。高分子修飾で分子間反応を制御することによる不安定中間体の安定化は、hemoCD1 以外の他の錯体においても適用できる可能性のある方法であると思われる。

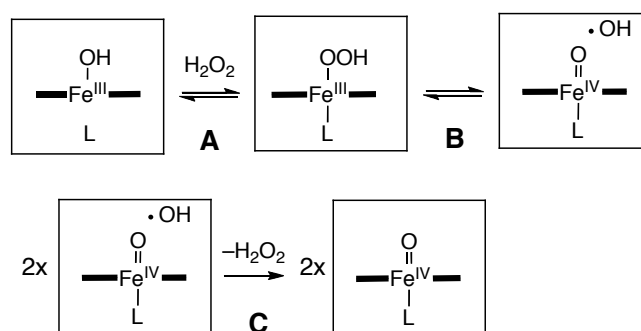


Figure 1-7. Schematic representation for the reaction mechanism of met-hemoCD1 with H₂O₂ (Chapter 3).

第四章では、Cpd II のモデルとしての oxoferryl-hemoCD1 の反応性につき検討を行った。クメンヒドロペルオキシド(CHPO)と met-hemoCD1 との反応から oxoferryl-hemoCD1 を調整した後、ゲルろ過による精製を行うことで過剰の酸化剤およびその分解物を除去した oxoferryl-hemoCD1 の溶液を調整した。oxoferryl-hemoCD1 は2種類存在すると考えられ、met-hemoCD1 とヒドロペルオキシド(R-OOH; R = H, cumyl)が反応する段階でポルフィリン平面のピリジン側で反応する錯体とその反対側で反応する錯体の2種類が生じるものと考えた。それぞれが反応することで、ヒドロペルオキシ錯体を経て2種類の鉄(IV)オキソ

種($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$ および $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$)を生成し、それぞれ異なる後続反応を起こした(Figure 1-8)。 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$ はリンカー部位に存在するスルフィド結合に直接酸素原子移動することで鉄(II)錯体($\text{Fe}^{\text{II}}\text{PCD}$)を生成した。 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$ は hemoCD1 周囲を一電子酸化することで、met-hemoCD1 へと戻った。鉄(IV)オキソポルフィリンからの酸素移動反応を直接観測した例は有機溶媒中での 1 例²¹⁾以外にない。鉄(IV)オキソポルフィリンを酸化剤から分離し精製することができる鉄ポルフィリン/シクロデキストリン(*met*-hemoCD1)の系は酸化活性種の反応性を研究する有用なモデル系といえる。

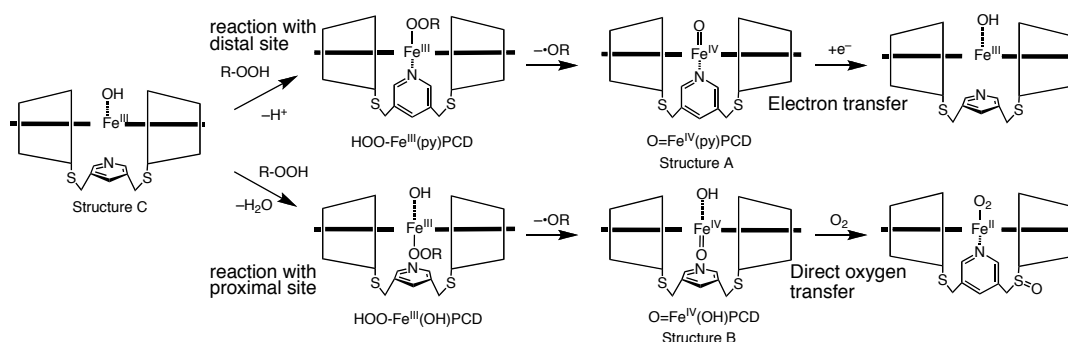


Figure 1-8. Schematic representation for the plausible reaction mechanism of formation and spontaneous reaction of oxoferryl-hemoCD1 (Chapter 4).

第五章では、*met*-hemoCD2 を用いてヘムタンパク質で触媒される生体内酸化反応において重要な活性種である Cpd I (鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル、 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}^{\bullet+}$)の観測を試みた。鉄(III)ペルオキシ錯体の酸素-酸素間の結合のヘテロリシスを誘発する酸化剤として、mCPBA および過酢酸(PAA)を用いた。*met*-hemoCD2 は過酸との反応により Cpd I に対応する化学種($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}^{\bullet+}$)を生成した。生成した $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}^{\bullet+}$ は近くに位置するシクロデキストリンダイマーの 3 位の *O*-メチル基に酸素添加することで脱 *O*-メチル化反応を起こした。この反応は鉄オキソの近くで進行するため、鉄オキソの近くにある 2 つの *O*-メチル基のみが脱メチル化反応を起こす。その著しい酸化活性から $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}^{\bullet+}$ の生成は間違いないと言える(Figure 1-9)。また、1 つの *O*-メチル基を脱 *O*-メチル化した Py2CD ($\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}$)を単離し、その $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ との包接錯体の機能を hemoCD2 と比較した。 $\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ の鉄中心のアクア配位子の $\text{p}K_{\text{a}}$ は *met*-hemoCD2 の $\text{p}K_{\text{a}}$ よりも 1 $\text{p}K_{\text{a}}$ 単位高い値となった。中心鉄を還元した $\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}$ の酸素結合挙動

は、hemoCD2 と異なる挙動を示した。Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の酸素親和性は met-hemoCD2 よりも 10 倍高いことがわかった。Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の自動酸化反応の半減期は 4 時間となり、水による自動酸化が加速された。pK_a や酸素親和性の変化は鉄に配位した水や酸素に Py2CD^{OH} のヒドロキシ基が相互作用(水素結合相互作用)すると考えることで理解でき、ヘムタンパク質における遠位側のヒスチジンの役割を果たしていると考えられる。

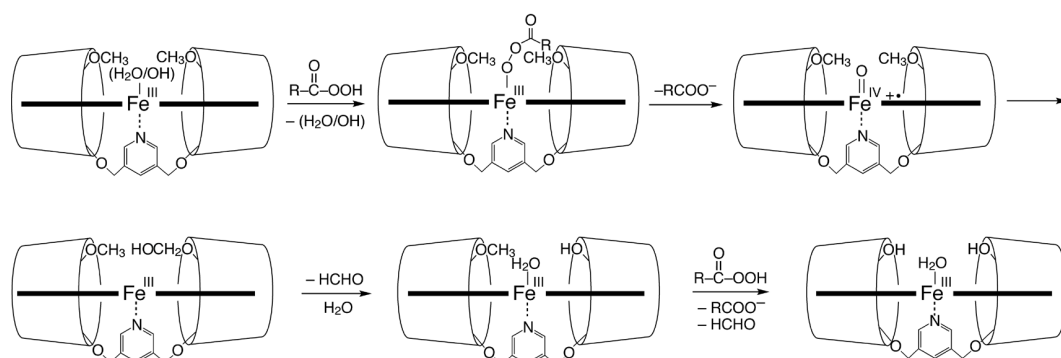


Figure 1-9. Schematic representation for the reaction of met-hemoCD2 with peracid. (Chapter 5).

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

6. 参考文献

- (a) 日本化学会, バイオミメティック・ケミストリー: 生体に学ぶ新しい化学. 学会出版センター: 1982; (b) 黒田裕久; 西谷孝子, バイオミメティクス概論. コロナ社: 東京, 1994.
- 増田秀明; 福住俊一, 生物無機化学. 三共出版: 東京, 2005.
- (a) Dunford, H. B., *Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology*. Wiley-VCH: 2010; (b) Veitch, N. C., *Phytochemistry* **2004**, 65, 249-259.
- (a) Watanabe, Y.; Ueno, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, 76, 1309-1322; (b) Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szöke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J., *Nature* **2002**, 417, 463-468; (c) Hiner, A. N. P.; Raven, E. L.; Thorneley, R. N. F.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J. N., *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 91, 27-34.

5. Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H., *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2888.
6. (a) Lane, B. S.; Burgess, K., *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2457-2474; (b) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253-2278; (c) Ortiz de Montellano, P. R., *Chem. Rev.* **2009**, *110*, 932-948; (d) Fukuzumi, S., *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 1564-1575.
7. Groves, J. T.; Haushalter, R. C.; Nakamura, M.; Nemo, T. E.; Evans, B. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2884-2886.
8. (a) Groves, J. T.; Watanabe, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8443-8452; (b) Fujii, H.; Yoshimura, T.; Kamada, H., *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2373-2377; (c) Urano, Y.; Higuchi, T.; Hirobe, M.; Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12008-12009; (d) Goh, Y. M.; Nam, W., *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 914-920; (e) Nam, W.; Han, H. J.; Oh, S.-Y.; Lee, Y. J.; Choi, M.-H.; Han, S.-Y.; Kim, C.; Woo, S. K.; Shin, W., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8677-8684; (f) Pan, Z.; Zhang, R.; Newcomb, M., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 524-532; (g) Han, A.-R.; Jeong, Y. J.; Kang, Y.; Lee, J. Y.; Seo, M. S.; Nam, W., *Chem. Commun.* **2008**, 1076-1078; (h) Bell, S. R.; Groves, J. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9640-9641; (i) Takahashi, A.; Kurahashi, T.; Fujii, H., *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 2614-2625; (j) Cong, Z.; Kurahashi, T.; Fujii, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9935-9939; (k) Fertinger, C.; Franke, A.; van Eldik, R., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 27-36; (l) Franke, A.; Fertinger, C.; van Eldik, R., *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6935-6949.
9. (a) Calderwood, T. S.; Bruice, T. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8272-8273; (b) Calderwood, T. S.; Bruice, T. C., *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 3722-3724; (c) Penner-Hahn, J. E.; Smith E., K.; McMurry, T. J.; Renner, M.; Balch, A. L.; Groves, J. T.; Dawson, J. H.; Hodgson, K. O., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7819-7825; (d) Shin, K.; Goff, H. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3140-3142; (e) Shedbalkar, V. P.; Modi, S.; Mitra, S., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1238-1239; (f) Gold, A.; Jayaraj, K.; Doppelt, P.; Weiss, R.; Chottard, G.; Bill, E.; Ding, X.; Trautwein, A. X., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5756-5761; (g) Balasubramanian, P. N.; Smith, J. R. L.; Davies, M. J.; Kaaret, T. W.; Bruice, T. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1477-1483; (h) Chen, S.-M.; Su, Y. O., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 491-493; (i) Bell, S. E. J.; Cooke, P. R.; Inchley, P.; Leanord, D. R.; Smith, J. R. L.; Robbins, A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, 549-559; (j) Groves, J. T.; Gross, Z.; Stern, M. K., *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 5065-5072; (k) Nam, W.; Lim, M. H.; Moon, S. K.; Kim, C., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*,

10805-10809; (l) Nam, W.; Lim, M. H.; Oh, S.; Lee, J. H.; Lee, H. J.; Woo, S. K.; Kim, C.; Shin, W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3646-3649; (m) Pan, Z.; Newcomb, M., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6767-6774.

10. (a) Tajima, K.; Oka, S.; Edo, T.; Miyake, S.; Mano, H.; Mukai, K.; Sakurai, H.; Ishizu, K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1507-1508; (b) Tajima, K.; Tada, K.; Shigematsu, M.; Kanaori, K.; Azuma, N.; Makino, K., *Chem. Commun.* **1997**, 1069-1070; (c) Liu, J.-G.; Ohta, T.; Yamaguchi, S.; Ogura, T.; Sakamoto, S.; Maeda, Y.; Naruta, Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 9426-9431; (d) Liu, J.-G.; Shimizu, Y.; Ohta, T.; Naruta, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3672-3673; (e) Franke, A.; Fertinger, C.; van Eldik, R., *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6935-6949; (f) Ohta, T.; Liu, J.-G.; Naruta, Y., *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 407-413.

11. VanEtten, R. L.; Sebastian, J. F.; Clowes, G. A.; Bender, M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3242-3253.

12. (a) Kuroda, Y.; Hiroshige, T.; Sera, T.; Shiroya, Y.; Tanaka, H.; Ogoshi, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1912-1913; (b) Kuroda, Y.; Hiroshige, T.; Ogoshi, H., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1594-1595.

13. (a) Yang, J.; Breslow, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2692-2695; (b) Yang, J.; Gabriele, B.; Belvedere, S.; Huang, Y.; Breslow, R., *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5057-5067; (c) Breslow, R.; Yang, J.; Yan, J., *Tetrahedron* **2002**, *58*, 653-659; (d) Breslow, R.; Yan, J.; Belvedere, S., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 363-365; (e) Fang, Z.; Breslow, R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5463-5466.

14. Jiang, T.; Sukumaran, D. K.; Soni, S.-D.; Lawrence, D. S., *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5149-5155.

15. Jiang, T.; Lawrence, D. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1857-1858.

16. Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Lucchini, V.; Rosso, C.; Tonellato, U., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8019-8022.

17. (a) Kano, K.; Tanaka, N.; Minamizono, H.; Kawakita, Y., *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 925-926; (b) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9937-9944.

18. Kano, K.; Kitagishi, H.; Koderu, M.; Hirota, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435-438.

19. Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Koderu, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448-4460.

20. (a) Kano, K.; Kitagishi, H.; Mabuchi, T.; Kodera, M.; Hirota, S., *Chem. Asian J.* **2006**, *1*, 358-366; (b) Kano, K.; Itoh, Y.; Kitagishi, H.; Hayashi, T.; Hirota, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8006-8015; (c) Kano, K.; Chimoto, S.; Tamaki, M.; Itoh, Y.; Kitagishi, H., *Dalton. Trans.* **2012**, *41*, 453-461; (d) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894-6897.
21. Chin, D.; La Mar, G. N.; Balch, A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5945-5947.

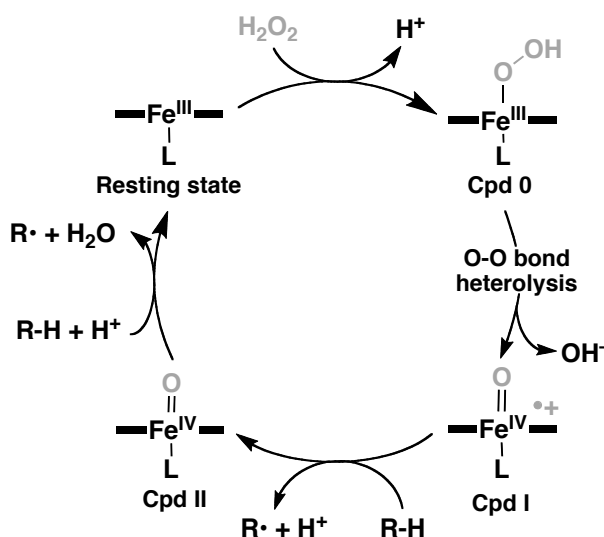
第二章 超分子ヘム酵素モデルを用いた酸化反応不安定中間体の捕捉および水中における安定な鉄(IV)オキソポルフィリンの生成

1. 緒言

ペルオキシダーゼは、過酸化水素を用いて酸化反応を触媒するヘム酵素である¹⁾。ペルオキシダーゼには機能が異なるさまざまなファミリーが確認されているが、研究には西洋ワサビペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase, HRP)がよく用いられ、その反応が広く調べられている。HRPの結晶構造を Figure 2-1 に示す。HRPは通常鉄(III)の休止状態として存在し、ヘムの中心鉄に第5配位子としてHis170のイミダゾールが配位している。HRPによる過酸化水素を用いた酸化触媒機構は Scheme 2-1 のように考えられている。まず、過酸化水素は中心鉄に第6配位子として配位し、鉄(III)ヒドロペルオキシ種(Cpd 0, HOO-Fe^{III}P, P: porphyrin dianion)を生成する。この鉄(III)ヒドロペルオキシ種は、遠位側に存在するプロトン化されたイミダゾール(His42)により酸素-酸素間の結合のヘテロリシスが誘発される。このヘテロリシスにより酸化活性種である鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル(Cpd I, O=Fe^{IV}P^{•+})が生じる。Cpd Iは、基質を一電子酸化することで鉄(IV)オキソポルフィリン(Cpd II, O=Fe^{IV}P)へと変化する。Cpd IIも酸化活性を持ち、基質を一電子酸化することで自身は元の鉄(III)の休止状態に戻る。HRPは1分子の過酸化水素を用いて2回の一電子酸化を行う²⁾。

ペルオキシダーゼのように酸

Scheme 2-1. Catalytic cycle of HRP-catalyzed oxidation reaction.



Kitagishi, H.; Tamaki, M.; Ueda, T.; Hirota, S.; Ohta, T.; Naruta, Y.; Kano, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16730-16732.

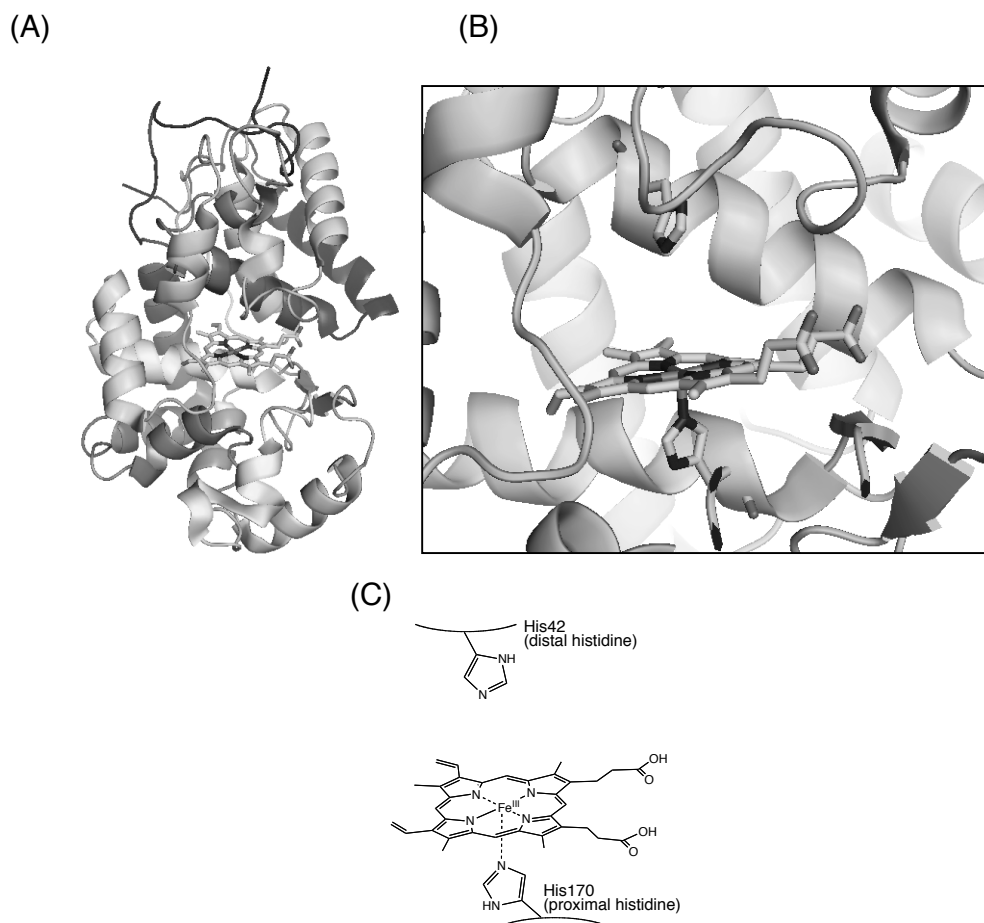


Figure 2-1. Crystal structure of horseradish peroxidase (HRP, PDB code: 1W4W). A: a ribbon model; B: an active site around heme; C: schematic representation of the active site.

化反応行うヘム酵素のモデル化合物の合成は古くから行われている。鉄ポルフィリンによる最初の Cpd I の合成は Groves らによって 1981 年に報告された³⁾。Fe^{III}TMP (TMP: 5,10,15,20-tetramesitylporphyrine dianion)と *m*-クロロ過安息香酸 (mCPBA)を-78 °Cにおいてジクロロメタン中で反応させることで、Cpd I に対応する O=Fe^{IV}TMP⁺の生成に成功している。この研究をきっかけにさまざまな鉄ポルフィリンを用いたヘム酵素モデルの研究が行われてきた⁴⁾。反応機構の解明のためには、各段階における中間体の構造を明らかにする必要があり、さまざまな分光学的手法を用いて分析が行われている。酸化活性種の Cpd I の前駆体である Cpd 0 は、ペルオキシダーゼのみでなくシトクロム P450 やカタラーゼなどの

他のヘム酵素でも生成すると考えられている中間体である⁵⁾。そのためヘム酵素の反応機構の解明には Cpd 0 の構造や酸素-酸素間の結合が切断されるメカニズムを知ることが重要となる。まずは Cpd 0 の錯体構造を知る必要があり、タンパク系やモデル系においてヒドロペルオキシ種の観測が試みられている。

Hoffman ら⁶⁾および Ikeda-Saito ら⁷⁾は極低温での γ 線照射(クライオラジオリシス)により、ヘムオキシゲナーゼおよびヘモグロビンの酸素錯体を一電子還元することで生じるヒドロペルオキシ種の EPR スペクトルによる観測に成功している。Sligar らも、HRP の酸素錯体をクライオラジオリシスの手法を用いることでヒドロペルオキシ種とし、その吸収スペクトル、EPR スペクトルや共鳴ラマンスペクトルを測定している⁸⁾。Brittain ら⁹⁾や Svistunenko ら¹⁰⁾は、ミオグロビンを用いて、過酸化水素との反応により Cpd 0 を生成し、その EPR スペクトルを測定している。また、Watanabe らは、シトクロム c552 (Cyt c552)変異体を用いて過酸化水素との反応によりヒドロペルオキシ錯体の観測に成功した。Cyt c552 はヘムの上下に His 15 と Met 69 が配位したヘムタンパク質で Met 69 周辺は疎水性の高いアミノ酸残基に取り囲まれている。この研究では Met 69 を配位性のないアラニン(Ala)に変換することでヘムに配位サイトを持つ変異体 Cyt c552 (M69A)を作製し、過酸化水素との反応によりヒドロペルオキシ種を観測している^{5c,11)}。これらの結果からヘム周辺の疎水性がヒドロペルオキシ種の安定性に影響することが示唆された。ヒドロペルオキシ錯体は非常に不安定であるので水中のように極性の高い溶媒中では酸素-酸素の結合が切断され、速やかに分解してしまう。そのためモデル錯体を用いた研究などでは極低温の有機溶媒中において観測が行われている¹²⁾。従来、主として EPR によりヒドロペルオキシ錯体の観測が行われていたが、ヘムのモデル系においてヒドロペルオキシ錯体の共鳴ラマンスペクトルは測定されていなかった。2009 年に Naruta らは有機溶媒中で Cpd 0 類似の化学種の観測に成功し、初めて共鳴ラマン分光法による詳細なキャラクター化に成功している¹³⁾。水中においては、鉄ポルフィリンと過酸化水素を反応させると速やかにポルフィリン環が分解されてしまう¹⁴⁾。モデル系において鉄(III)ポルフィリンと過酸化水素が反応することで生じるヒドロペルオキシ種($\text{PFe}^{\text{III}}\text{-OOH}$)の酸素-酸素間の結合がラジカル的に切断されるためヒドロキシルラジカル($\bullet\text{OH}$)が生成してポルフィリンのメソ位の炭素を攻撃することで分解すると考えられる。天然の系では第 5 配位子からの電子の押し出し(push effect)と遠位側に存在するアミノ酸残基(pull effect)が協同的に働く

ため Cpd 0 のイオンの解裂が誘起される⁵⁰⁾。酸素-酸素間の結合の切断には遠位側の効果は大きく、その影響はシトクロム *c* ペルオキシダーゼ(CcP)の変異体を用いて調べられている¹⁵⁾。Erman らは CcP の遠位側に存在する His52 を非極性アミノ酸残基のロイシン(Leu)に変えた変異体 CcP (H52L)を作製し、過酸化水素との反応から Cpd I が生成する速度を検討している¹⁵⁾。遠位側のヒスチジンをロイシンに変えることで Cpd I の生成速度は $3.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $2.9 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ へと低下する。これらのことから水中のモデル系で鉄ポルフィリンの分解を抑制し、かつ不安定な Cpd 0 類似のヒドロペルオキシ種を観測するためにはポルフィリンの鉄周辺を疎水的環境にする必要があると思われる。

Kano らは水溶性ポルフィリンとすべての水酸基を *O*-メチル化した β -シクロデキストリン(TMe- β -CD)が水中において極めて安定な 1:2 の包接錯体を形成することを見出し報告している¹⁶⁾。この包接錯体はポルフィリン周辺を外部の水分子から隔離している。この構造はヘムタンパク質のグロビンがヘム周辺を外部から隔離していることに類似している。さらに Kano らはこれまでに鉄ポルフィリン/シクロデキストリン超分子錯体にピリジン配位子のリンカーを導入したミオグロビンモデル化合物 hemoCD1 (Figure 2-2)の開発に成功している¹⁷⁾。hemoCD1 は全ての水酸基を *O*-メチル化した β -シクロデキストリンの1つのグルコピラノースの3位からチオエーテル結合を介してピリジン配位子を連結したパー-*O*-メチル化 β -シクロデキストリン二量体である Py3CD とアニオン性の鉄ポルフィリンである Fe^{II}TPPS (TPPS: 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-porphyrin hexa-anion)との包接により形成される超分子錯体である。hemoCD1 は水中で可逆的な酸素の結合を行う。Py3CD が Fe^{II}TPPS を包接することによりミオグロビンのヘム周辺の疎水環境を模倣し、1) ポルフィリン同士の自己会合の阻止、2) 水分子による O₂- hemoCD1 の自動酸化の抑制、3) ピリジン配位子からの逆電子供与により、水中において鉄(II)の状態の安定化を可能にし、長時間安定な酸素錯体を作ることに成功している。hemoCD1 はヘムタンパク質の活性中心を模倣した構造を持ち、水中においてポルフィリンの鉄周辺を疎水的な環境にするができる。

Figure 2-3 に MM3 計算によって推定される鉄(III)の met-hemoCD1 の構造を示す。hemoCD1 の活性中心である鉄中心周辺はメチル化シクロデキストリンによって覆われているためバルク水相からは完全に隔離されている。このようなヘム周辺を外部から隔離した環境は HRP やその他のヘム酵素のそれに類似してい

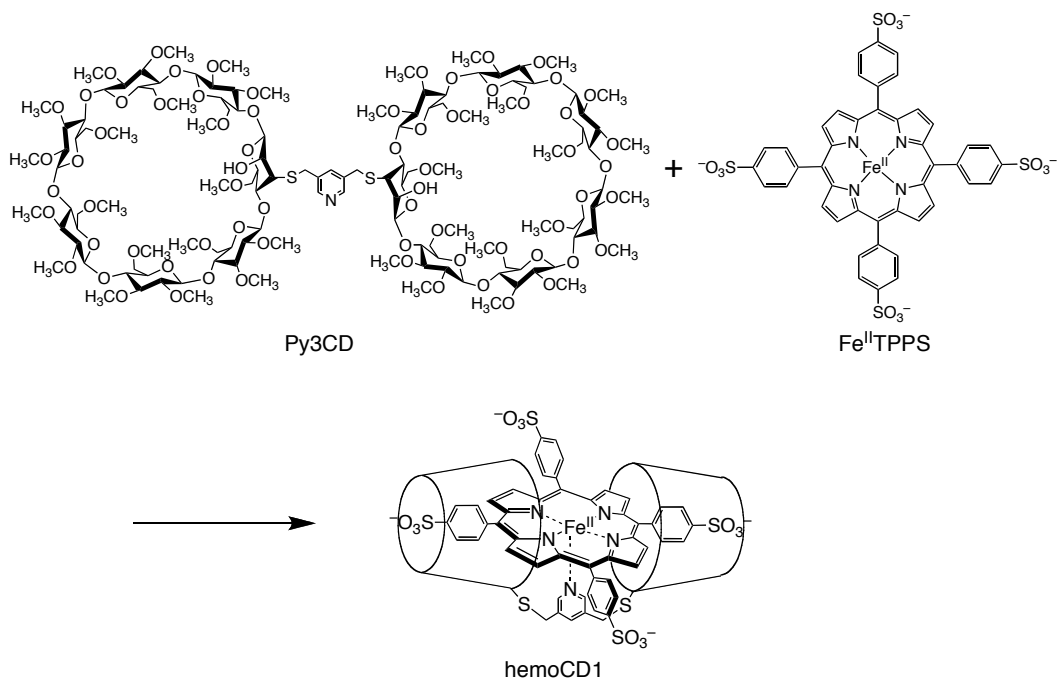


Figure 2-2. A functional model compound (hemoCD1) of myoglobin.

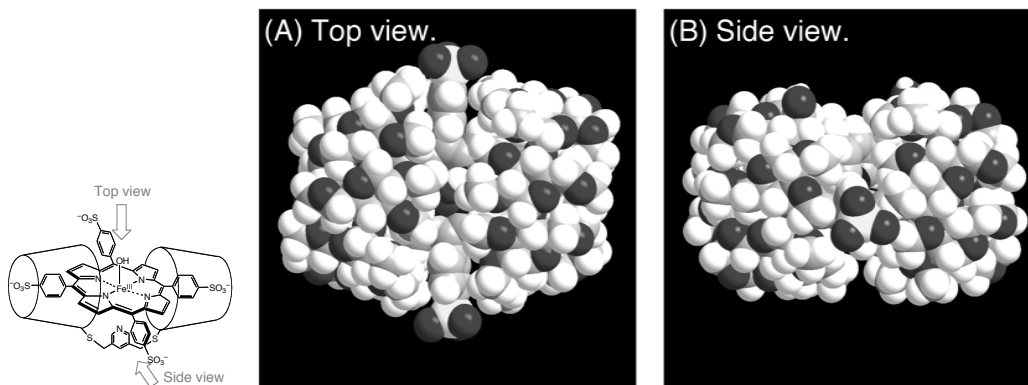


Figure 2-3. Energy-minimized structure of met-hemoCD1 obtained from MM3 calculation using a SCIGRESS 2.2.

る。そのため hemoCD1 は水中でヘム酵素モデルとして機能することが期待され、反応中間体や活性種の観測に利用できる可能性がある。そこで本研究では hemoCD1 をペルオキシダーゼのモデルとして用い、過酸化水素との反応の検討を行って、反応中間体の捕捉やその反応機構の解明を試みた。

2. 実験

2-1. 測定機器

紫外可視吸収スペクトルは島津製作所製ホトダイオードアレイ分光光度計 MultiSpec-1500 を用いて測定した。水溶液の pH は堀場製作所製 pH メータ F52 を用いて測定した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は和光純薬工業製逆相シリカゲルカラム Wakosil-II 5C18AR (7.6 × 250 mm)を取り付けた GE Healthcare HPLC システム ÄKTApurifier を用いて分析および分取を行った。核磁気共鳴(NMR)スペクトルは日本電子製フーリエ変換核磁気共鳴装置 JNM-ECA500 (500 MHz)を用いて測定し、テトラメチルシラン(TMS)を内部基準として用いた。エレクトロスプレーイオン化(ESI)法による質量分析は日本電子製飛行時間型質量分析計 JMS-T100CS を用いた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法による質量分析は Bruker Daltonics 製飛行時間型質量分析計 autoflex speed を用いて、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして測定した。赤外(IR)スペクトルは島津製作所製フーリエ変換赤外分光光度計 IR Prestige-21 を用いて測定した。電子スピン共鳴(EPR)スペクトルの測定は RCM 製ヘリウムフロー型クライオスタット CT-470-ESR を取り付けた日本電子製 ESR 分光器 JES-TE200 (X-band)を用いて測定した。共鳴ラマンスペクトルは奈良先端大学院大学 廣田 俊 教授のご厚意により Kr⁺イオンレーザー Coherent Innova 90C-K を取り付けた日本分光製 NRS-2100 を用い、九州大学先導物質化学研究所 成田 吉徳 教授ならびに太田 雄大 助教のご厚意により Spectra Physics 製 Kr⁺イオンレーザー Beamlok 2060、Kaiser Optical Systems 製 holographic Supernotch filter および Princeton Instruments 製 CCD 検出器 LN-1100PB を取り付けた Acton Research 製ラマン分光器 SpectraPro-300i を用いて測定した。

2-2. 試薬および合成

Py3CD¹⁷⁾および Fe^{III}TPPS¹⁸⁾は文献記載の方法に従って合成した。その他の試薬は市販品をそのまま用いた。¹⁸O ラベル酸素ガスは ISOTECH 製(99 atom% ¹⁸O)をそのまま用いた。過酸化水素は和光純薬製精密分析用試薬をそのまま用いた。Py3CD および Fe^{III}TPPS は pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝溶液に溶かしストック溶

液を調整した。met-hemoCD1 の溶液は、Py3CD を Fe^{III}TPPS に対して 1.2 当量となるよう混合して調整した。過酸化水素は以下に示す方法により濃度決定を行い測定に用いた。

2-2-1. 過酸化水素の濃度決定

過酸化水素は、市販の過酸化水素水を Milli-Q 水で希釈して、その吸収スペクトルを測定し 240 nm における吸光度($\epsilon_{240\text{nm}} = 39.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)から濃度を決定した¹⁹⁾。

2-2-2. ¹⁸O ラベル化過酸化水素の合成²⁰⁾

50 mL のシュレンク型反応容器にカリウム *tert*-ブトキシド 0.42 g (3.74 mmol) を加えて酸素(¹⁸O₂)置換し、アルゴン雰囲気下でベンズヒドロール(ジフェニルメタノール) 0.69 g (3.75 mmol)を溶かした無水ベンゼン 10 mL を加え、室温で 30 分かき混ぜた。反応終了後、生じた沈殿にベンゼンを加えて遠心分離し、この操作を 2 回繰り返すことで洗浄した。ベンゼンを取り除いた後、1 mM EDTA を含む 1 M HCl 水溶液を 3.75 mL 加え、生じた沈殿をろ過し得られた溶液を減圧留去により溶液中に含まれるベンゼンおよび HCl を取り除き、過酸化水素水溶液を得た。得られた過酸化水素水溶液の濃度は 2-2-1 の方法により決定した。

収量 0.039 g (1.14 mmol)、収率 30.5%

3. 結果および考察

3-1. met-hemoCD1 と過酸化水素との反応

ヘム酵素やそのモデルの鉄ポルフィリンを用いた酸化反応に関する研究では酸化剤として過酸化水素やアルキルヒドロペルオキシドなどの過酸化物および *m*-クロロ過安息香酸などの過酸が用いられている。はじめに、met-hemoCD1 と過酸化水素の反応を吸収スペクトルにより追跡した。pH 7.0 のリン酸緩衝液中で met-hemoCD1 ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) の溶液に対して 20 当量の過酸化水素を加えてその反応を吸収スペクトルから追跡した。met-hemoCD1 の結果とその比較として Py3CD 非存在下 Fe^{III}TPPS の溶液に対して過酸化水素を加えた時の反応の結果を Figure 2-4 に示す。Py3CD 非存在下の Fe^{III}TPPS は、pH 7.0 の水溶液中において

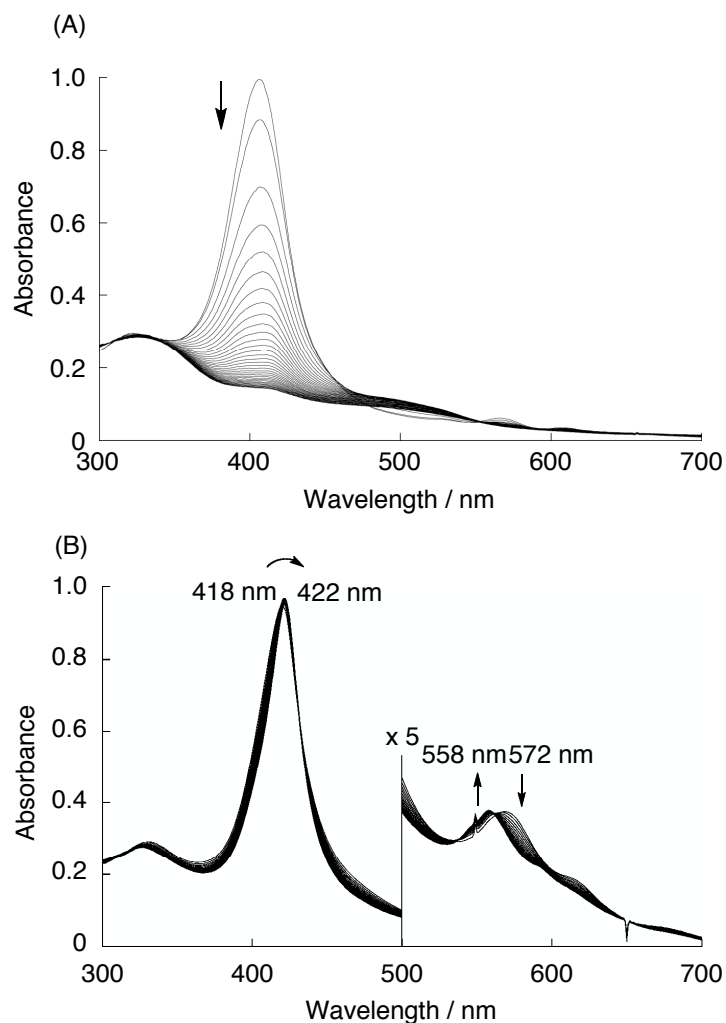


Figure 2-4. UV-vis spectral changes of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ (1×10^{-5} M) during the reaction with H_2O_2 (2×10^{-4} M) in 0.05 M phosphate buffer (A) in the absence and (B) the presence of Py3CD (1.2×10^{-5} M) at pH 7.0 and 25 °C. The spectra were recorded at time intervals of 30 s. The final spectrum was measured 20 min after the start of the reaction.

分子の鉄ポルフィリンが酸素で架橋された μ -オキシダイマー ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}-\text{O}-\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]^8$, $\lambda_{\text{max}} = 408$ nm)を形成している。この状態の鉄ポルフィリンに過酸化水素を加えたところポルフィリン由来の Soret 帯の吸光度の減少が起こり、最終的に特徴のない吸収帯へと変化したことから、ポルフィリン環の分解反応が起こっていることが示された。これまでに Lente らによって pH 4 における $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ のジアクア体 ($[(\text{H}_2\text{O})_2-\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]^3$) と過酸化水素との反応につい

て調べられており、その分解生成物について Scheme 2-2 の **5** に示した構造が報告されている¹⁴⁾。Figure 2-4 (A)の Fe^{III}TPPS と過酸化水素の反応で得られた分解生成物について確認するために、反応後の溶液に対して塩酸を加え溶液の pH を 1.5 以下にすることで、配位している鉄を取り除いた。その吸収スペクトルを Figure 2-5 に示す。鉄非配位型のポルフィリン分解物は 514 および 589 nm 付近に特徴的な吸収極大を持つことがわかった。その分解生成物について HPLC により分析を行った(Figure 2-6)。複数のフラクションが確認され、それぞれについて質量分析を行い観測された質量から推定された構造を Scheme 2-2 に示す。

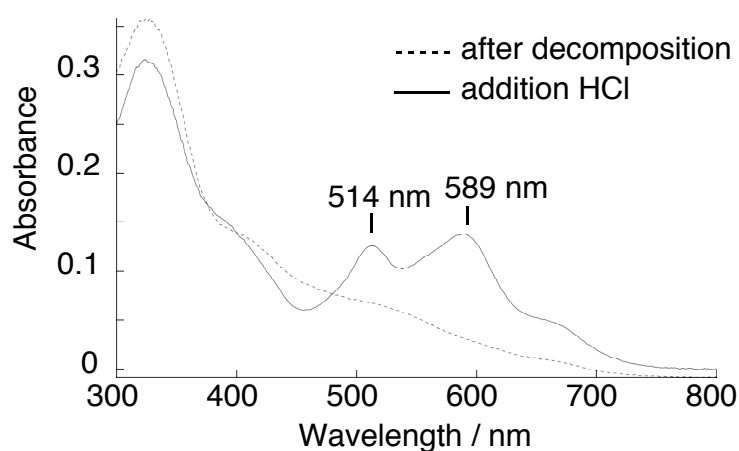


Figure 2-5. UV-vis spectra of a reaction mixture of Fe^{III}TPPS (1×10^{-5} M) with H₂O₂ (2×10^{-4} M)(dashed line) and the final product decomposed in an acidic solution at pH 1.5 (adjusted by HCl) (solid line).

その結果Lenteらが報告したビリベルジン型の分解生成物 **5** も確認することができたが、ポルフィリン分解物は **5** 以外にもさまざまな構造の生成物が存在することが明らかとなり、ヒドロキシルラジカル(\bullet OH)による分解反応が示唆される結果となった。

過酸化水素との反応で Fe^{III}TPPS は速やかに分解するのとは対照的に met-hemoCD1 と過酸化水素の反応は鉄(III)に OH が配位した met-hemoCD1 に由来する 418 および 572 nm の吸収スペクトルが 20 当量の過酸化水素を加えることで等吸収点を通りながら変化しおよそ 20 分後に 422 および 558 nm に吸収極

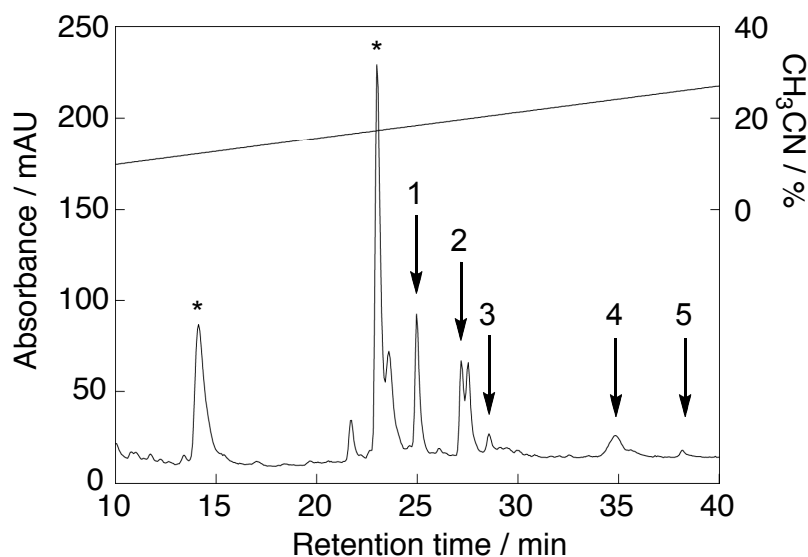
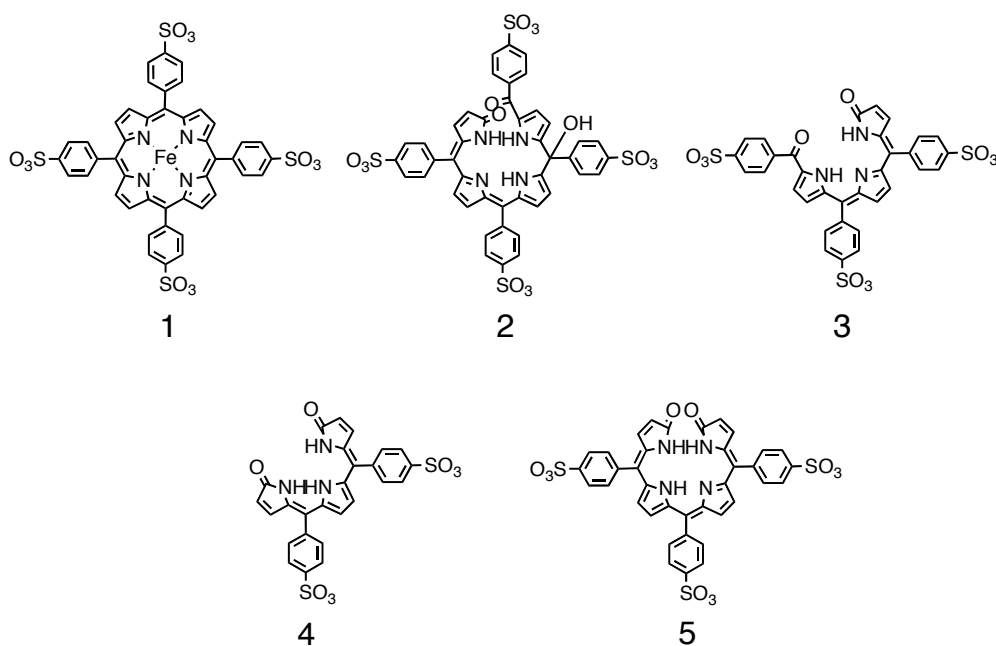


Figure 2-6. HPLC chromatogram of the ring-opening products produced in the reaction of Fe^{III}TPPS (1×10^{-5} M) with H₂O₂ (2×10^{-4} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. The sample was eluted with water-acetonitrile (linear gradient) containing 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The chromatogram was monitored at 254 nm. Each peak was analyzed by MALDI-TOF MS. The plausible structures estimated from MALDI-TOF MS are shown in Scheme 2-2.

Scheme 2-2. Structure of porphyrin ring-opening reaction product.



大を持つ化学種($\mathbf{1}^H$)へと変化した Figure 2-4 (B)。生成した $\mathbf{1}^H$ の吸収スペクトルは、Newcomb らにより報告されたアセトニトリル中で $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TDCPP}$ (TDCPP: 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorophenyl) porphyrin dianion) と mCPBA との反応で合成された鉄(IV)オキシ種とよく似た吸収スペクトルとなった²¹⁾。この結果から $\mathbf{1}^H$ は 4 価オキシ種($\text{PFe}^{\text{IV}}=\text{O}$)であると推定される。さらにその後、 $\mathbf{1}^H$ は徐々に分解しおよそ 1 時間の半減期で特徴のない吸収スペクトルへと変化した。その吸収スペクトル変化を Figure 2-7(A)に示す。また、分解生成物について確認するために変化後の溶液に過剰量の塩酸を加えて配位した鉄を取り除いたところ、514 および 596 nm に特徴的な吸収が見られた(Figure 2-7 (B))。得られた吸収スペクトルは $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ と過酸化水素との反応で得られた Figure 2-5 のポルフィリン環の

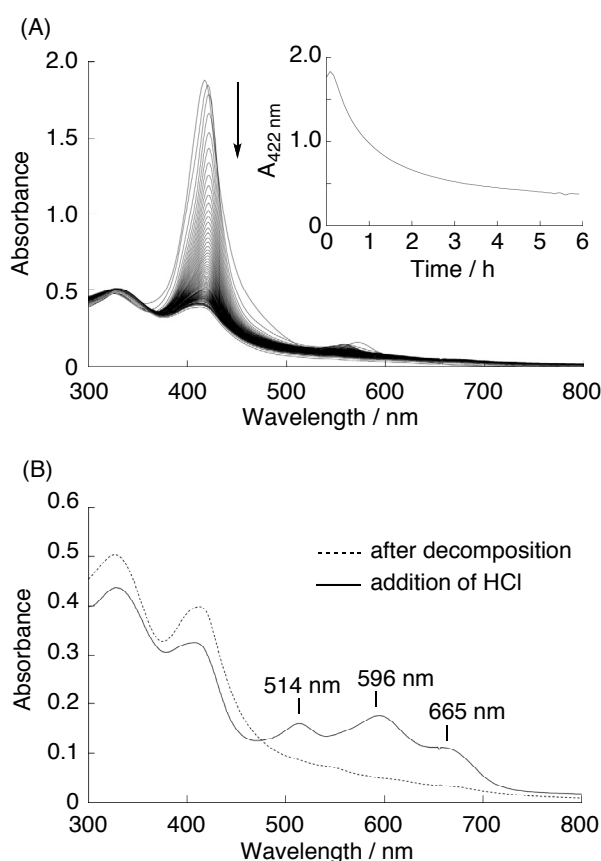
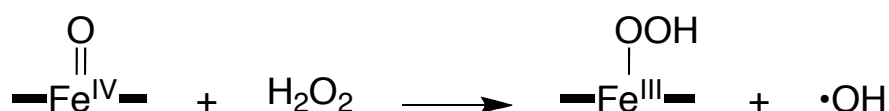


Figure 2-7. (A): UV-vis spectral changes of met-hemoCD1 (1.6×10^{-5} M) before and after the addition of H_2O_2 (3.2×10^{-4} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C; met-hemoCD1 before the reaction and at 6 h after the addition of H_2O_2 . Spectra were recorded at 5 min intervals. (B): UV-vis spectrum of the final product decomposed in an acidic solution at pH 1.45 (adjusted by HCl) (solid line).

環開裂生成物の吸収と類似の吸収スペクトルを示した。この結果より **1^H** は過剰に存在する過酸化水素により発生したラジカルにより分解されることでポルフィリン環の開裂反応が進行したものと考えられる。**•OH** ラジカルは次のような反応式で生じるものと思われる。



しかし、Py3CD 非存在下において、Fe^{III}TPPS は 10 分以内で速やかに分解しているため、**1^H** の生成、安定化には Py3CD による Fe^{III}TPPS の包接が重要であることが明らかとなった。

3-2. 共鳴ラマン分光法による **1^H** の錯体構造の検討

共鳴ラマン分光法を用いて **1^H** の構造解析を行った。met-hemoCD1 の溶液に過酸化水素(H₂¹⁶O₂, D₂O₂および H₂¹⁸O₂)を加えて **1^H** をそれぞれ調整し、**1^H** の溶液を液体窒素により凍結させた後、407 nm の Kr レーザーを照射しながら 77 K における共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果を Figure 2-8 に示す。

H₂¹⁶O₂を加えると 815 cm⁻¹にラマンバンドが観測された。このバンドは、H₂¹⁸O₂を加えると 779 cm⁻¹にシフトした。ここで観測された同位体シフトの値は Δν = -36 cm⁻¹であり、Fe=O の伸縮振動の同位体シフト (Δν = -37 cm⁻¹)と一致した²²⁾。また重水素置換した D₂O₂を重水中で反応させた測定では同位体シフトが観測されなかったことから、**1^H** の共鳴ラマンスペクトルの 815 cm⁻¹のラマンバンドはヒドロペルオキシ種ではなく、鉄(IV)オキソポルフィリン(O=Fe^{IV}P)の ν_{Fe(IV)=O} と帰属した。以後、**1^H** を oxoferryl-hemoCD1 とする。これまでにヘムタンパク質やモデル錯体に対して報告されている鉄(IV)オキソ種の Fe=O 伸縮振動(ν_{Fe=O})の値を Table 2-1 に示す。

水中で測定された Cpd II の ν_{Fe=O} の値は、第 5 配位子がヒスチジンのイミダゾールの HRP では 775~790 cm⁻¹、Mb では 797~807 cm⁻¹に観測されている。モデル系のテトラフェニルポルフィリンにおける鉄(IV)オキソポルフィリンの ν_{Fe=O} の値は、六配位錯体の場合に 810~830 cm⁻¹で、五配位錯体では 840~860 cm⁻¹に観測されている。これらの結果から met-hemoCD1 の系で観測された 815 cm⁻¹のバンドはピリジンが第 5 配位子として配位した鉄(IV)オキソ種と思われる。

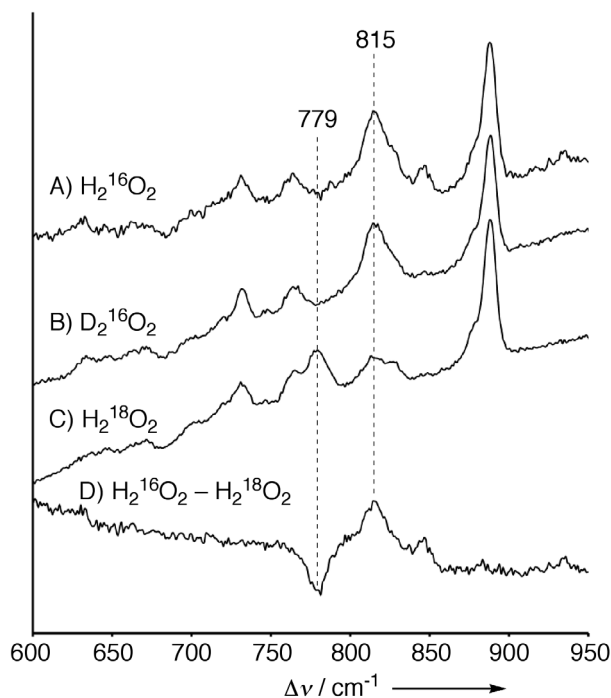


Figure 2-8. Resonance Raman spectra of met-hemoCD (4×10^{-4} M) reacted with $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (2×10^{-3} M) (A), $\text{D}_2^{16}\text{O}_2$ (2×10^{-3} M) (B), and $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (2×10^{-3} M) (C) in 0.05 M phosphate buffer at 77 K, and the $\text{H}_2^{16}\text{O} - \text{H}_2^{18}\text{O}$ differential spectrum (D). The samples were irradiated by a 407 nm laser light at a 10 mW power.

Table 2-1. Fe(IV)=O stretching frequencies ($\nu_{\text{Fe(IV)=O}} / \text{cm}^{-1}$) of oxoferryl porphyrin of HRP, myoglobin (Mb), and model complexes.

Complex	$\nu_{\text{Fe=O}} / \text{cm}^{-1}$ (^{18}O isotope shift)	Measured conditions	Reference
HRP-II (isozyme C)	787 (34)	pH 12, r.t.	24
HRP-II (isozyme C)	774 (34)	pH 7, r.t.	25
HRP-II (isozyme C)	786	pH 11.2, r.t.	25
HRP-II (isozyme A)	775 (34)	pH 5.3, r.t.	26
HRP-II (isozyme A)	779 (36)	pH 7, r.t.	27
HRP-II (isozyme B, C)	775 (28)	pH 6.9, r.t.	28
HRP-II (isozyme B, C)	788 (31)	pH 10.0, r.t.	28
HRP-II (isozyme I-C)	787 (31)	pH 10.6	29

Mb-II (sperm whale)	797 (26)	pH 8.6, 20 °C	30
Mb-II (horse heart)	805 (35)	pH 8.5	23a
Mb-II (horse heart)	807 (35)	pH 5.0	23a
CAT-II	775 (29)	pH 7.5, 4 °C	31
CAT-II	786 (30)	pH 8.9, 4 °C	31
O=Fe(T _{piv} PP)(THF)	829 (37)	THF, -50 °C	32
O=Fe(T _{piv} PP)(<i>N</i> -MeIm)	807	THF, -50 °C	32
O=Fe(TPP)(<i>N</i> -MeIm)	820	Toluene, -120 °C	33
O=Fe(TEP)(<i>N</i> -MeIm)	820	Toluene, -120 °C	33
O=Fe(PPIXDME)(<i>N</i> -MeIm)	820 (36)	Toluene, -120 °C	33, 34
O=Fe(TDCPP)(THF)	841	THF, -50 °C	35
O=Fe(TDCPP)(DMF)	828	DMF, -50 °C	35
O=Fe(TDCPP) (<i>N</i> -MeIm)	818	THF, -50 °C	35
[O=Fe(2-TMPyP)(OH)] ³⁺	763 (29)	pH 12, 0 °C	36
O= FeTMTMP(DMF)	826 (35)	DMF, -44 °C	37
O=FeOEP(<i>N</i> -MeIm)	820	Toluene, -120 °C	33, 34
[O=Fe(4-TMPyP)(OH ₂)] ³⁺	818	pH 9.6, 20 °C	36
O=FeTPFPP	861 (36)	O ₂ matrix, 30 K	38
O=FeTPP	852 (34)	O ₂ matrix, 30 K	38, 39
O=FeOEP	852 (34)	O ₂ matrix, 30 K	39
O=FeTMTMP	845 (36)	Toluene, -70 °C	37
O=FeTMP	843 (24)	Toluene, -80 °C	40
O=FeTMP	841 (36)	CH ₂ Cl ₂ , -40 °C	41
O=TPP	843	Micelle, r.t.	42
1^H	815 (36)	pH 7.0, 77 K	This work

Abbreviations: HRP-II = horseradish peroxidase Cpd II; Mb-II = myoglobin Cpd II; CAT-II = catalase Cpd II; T_{piv}PP = tetrakis(pivaloylphenyl)porphyrin; TPP = tetraphenylporphyrin; TEP = tetraethylporphyrin; PPIXDME = protoporphyrin IX dimethyl-ester; TDCPP = tetrakis(2,6-dichlorophenyl)porphyrin; 2-TMPyP = tetrakis(2-*N*-methylpyridyl)porphyrin; TPFPP = tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin; OEP = octaethylporphyrin; TMP = tetramesitylporphyrin; TMTMP = 2,7,12,17-tetramethyl-3,8,13,18-tetramesitylporphyrin; 4-TMPyP = tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin; *N*-MeIm = 1-methyl imidazole.

3-3. EPR スペクトルによる不安定反応中間体の確認

次に、反応中間体として鉄(III)ヒドロペルオキシ錯体が生成していることを確かめるために中心鉄の電子状態を電子スピン共鳴 (EPR) 分光法により検討した。測定は met-hemoCD1 と過酸化水素を混合した後の溶液を所定時間後に液体窒素で凍結させ、EPR スペクトルを 15 K で測定した。その結果を Figure 2-9 に示す。met-hemoCD1 と過酸化水素を混合した直後に凍結させた試料の EPR スペクトルを測定すると met-hemoCD1 由来の鉄(III)高スピンのシグナル($g = 6.03, 1.99$)の減少が見られた。鉄(IV)オキソポルフィリンは EPR サイレントであるが

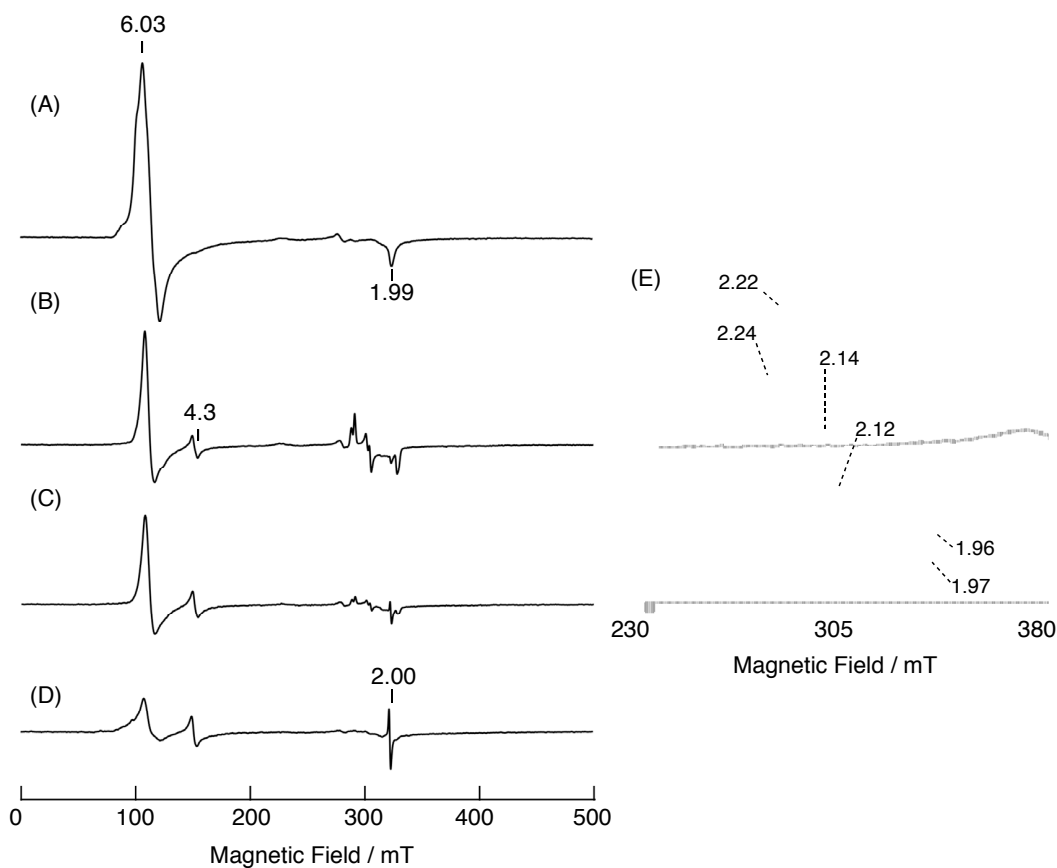
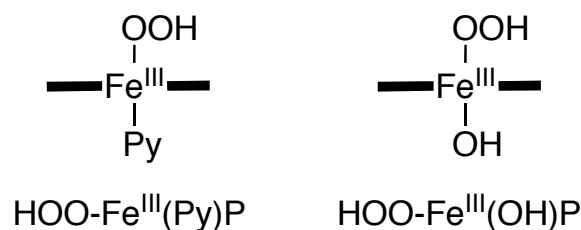


Figure 2-9. EPR spectra of met-hemoCD1 (4×10^{-4} M) without (A) and with H_2O_2 (8×10^{-3} M) in (B-E) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 15 K. The solution of met-hemoCD1 with H_2O_2 were frozen immediately (B, E), at 60 sec (C), and 120 sec (D) after mixing met-hemoCD with H_2O_2 . The signal at $g = 4.3$ is assigned to free iron(III) generated from decomposition of met-hemoCD1 by H_2O_2 .

met-hemoCD1 と過酸化水素を混合して freeze-quench した溶液では、高磁場側に低スピン鉄(III)錯体に基づく複雑な EPR シグナルが観測された(Figure 2-9 (B, E))。EPR から観測された低スピン鉄(III)種は $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ と H_2O_2 との反応で生じるヒドロペルオキシ鉄(III)錯体($\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$)と考えるのが最も妥当である。過酸化水素の存在下では 2 組の鉄(III)低スピンの rhombic シグナル ($g_1 = 2.24, 2.14, 1.96$; $g_2 = 2.22, 2.12, 1.97$)が観測された。さらに過酸化水素を混合後、凍結までの時間を変化させて EPR スペクトルを測定したところ、この 2 組の鉄(III)低スピンのシグナルは時間とともに減少し、それと同時に有機ラジカル由来の $g = 2.00$ のシグナルの増大が見られ、鉄ポルフィリンの EPR シグナルは最終的には観測されなくなった。鉄(III)ヒドロペルオキシポルフィリンの EPR スペクトルは特徴的な rhombic シグナルが狭い磁場領域に観測される^{13a, 42)}。水中における Cpd 0 の EPR スペクトルの測定結果が報告され、2 組観測される Cpd 0 の EPR シグナルについて議論されている^{6a, 8a, 11, 12b, 43)}。Sligar らは HRP の酸素錯体(oxy-HRP)のクライオラジオリシスにより Cpd 0 を生成し、その EPR スペクトルを測定している^{8a)}。ここで観測された 2 組の低スピン種は $\text{PFe}^{\text{III}}\text{-OO}^2$ と $\text{PFe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ とに帰属している。一方、Watanabe らは、シトクロム *c*552 (Cyt *c*552)の変異体と過酸化水素との反応により観測された g 値 2.0 付近の 2 組の rhombic シグナルを、鉄に配位したヒドロペルオキシ配位子のタンパク質中での配向の違いによると提案している。Watanabe らが指摘しているように過酸化水素からの 1 つめのプロトンが外れる pK_a が 11.6 付近であるので、2 つめのプロトンが外れる pK_a はもっと高い値であることが推定され、ヒドロペルオキシ錯体からの脱プロトン化が pH 7.0 の条件で起こるとは考えにくい。また Py3CD が作る中心鉄周辺の疎水空間において複数の立体配座をとった場合、単純な 2 組の EPR シグナルではなく、さらに複雑な EPR シグナルになるはずである。hemoCD1 の系では Tajima らによって提案されている第 5 配位子の違いによって 2 組の EPR シグナルが観測されたと考えるのが妥当である。すなわち彼らは DMF-メタノール-トルエンの混合溶媒中、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TMP}$ (TMP: tetramesitylporphyrin dianion)の第 5 配位子にヒドロキシ配位を持つヒドロペルオキシ錯体($\text{Fe}^{\text{III}}\text{TMP}(\text{OH})(\text{OOH})$, $g = 2.257, 2.156, 1.963$)と第 5 配位子にイミダゾールを持つヒドロペルオキシ錯体($\text{Fe}^{\text{III}}\text{TMP}(\text{Im})(\text{OOH})$, $g = 2.320, 2.191, 1.943$)を EPR により帰属している^{12b)}。今回の系では Tajima らが提案しているように第 5 配位子を考慮すると鉄に配位する第 5 配位子には Py3CD のピリジン(Py)と水酸化物イオン(OH)の 2 種類が考えられる(Scheme 2-3)。

Scheme 2-3.



4. 結言

本章では水中で機能するヘムタンパク質モデルhemoCD1を用いて酸化酵素の1つであるHRPのモデルの反応ができるかについて検討した。鉄(III)のmet-hemoCD1は水中で過酸化水素と反応することでペルオキシダーゼにおけるCpd 0に対応する不安定中間体ヒドロペルオキシ錯体($\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$)を形成し、その中間体をEPRスペクトルにより検出することに成功した。このhemoCD1のヒドロペルオキシ種は第5配位子の違いにより2種類存在することがわかった。このヒドロペルオキシ種はEPRスペクトルによる分析の結果、第5配位子がピリジンの錯体($\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{Py})\text{P}$)と水酸化物イオンの錯体($\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{P}$)であることが明らかとなった。また過酸化水素との反応により生成したhemoCD1のヒドロペルオキシ錯体は速やかに分解して、ペルオキシダーゼ反応におけるCpd IIに対応する鉄(IV)オキソポルフィリン($\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$)に変化することを分光学的に明らかとした。シクロデキストリンの包接がない状態で $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ を過酸化水素と反応させると環開裂が進行しポルフィリンは分解するが、シクロデキストリンダイマー(Py_3CD)の存在下ではポルフィリン環の分解は顕著に抑制された。鉄(III)ヒドロペルオキシ錯体のホモリシスにより鉄(IV)オキソポルフィリンが生成する際に発生するヒドロキシルラジカル($\bullet\text{OH}$)によるポルフィリンのメソ位への攻撃を防いでいると考えられる。 $\bullet\text{OH}$ ラジカルによるポルフィリン環分解の抑制メカニズムは第三章で詳細に検討を行う。

5. 参考文献

1. (a) Dunford, H. B., *Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology*. Wiley-VCH: 2010; (b) Veitch, N. C., *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249-259.
2. (a) Watanabe, Y.; Ueno, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, *76*, 1309-1322; (b) Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szöke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J., *Nature* **2002**, *417*, 463-468; (c) 増田秀明; 福住俊一, *生物無機化学*. 三共出版: 2005; (d) Hiner, A. N. P.; Raven, E. L.; Thorneley, R. N. F.; Garcí'a-Cánovas, F.; Rodrí'guez-López, J. N., *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 27-34.
3. Groves, J. T.; Haushalter, R. C.; Nakamura, M.; Nemo, T. E.; Evans, B. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2884-2886.
4. (a) Hohenberger, J.; Ray, K.; Meyer, K., *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 720; (b) Pan, Z.; Zhang, R.; Newcomb, M., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 524-532.
5. (a) Nam, W., *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 522-531; (b) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253-2278; (c) Watanabe, Y.; Nakajima, H.; Ueno, T., *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 554-562.
6. (a) Davydov, R. M.; Yoshida, T.; Ikeda-Saito, M.; Hoffman, B. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10656-10657; (b) Garcia-Serres, R.; Davydov, R. M.; Matsui, T.; Ikeda-Saito, M.; Hoffman, B. M.; Huynh, B. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1402-1412.
7. Unno, M.; Chen, H.; Kusama, S.; Shaik, S.; Ikeda-Saito, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (44), 13394-13395.
8. (a) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 42706-42710; (b) Ibrahim, M.; Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Kincaid, J. R.; Sligar, S. G., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13714-13718; (c) Mak, P. J.; Denisov, I. G.; Victoria, D.; Makris, T. M.; Deng, T.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6382-6383.
9. Brittain, T.; Baker, A. R.; Butler, C. S.; Little, R. H.; Lowe, D. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. J., *Biochem. J.* **1997**, *326* (1), 109-115.
10. Svistunenko, D. A.; Reeder, B. J.; Wankasi, M. M.; Silaghi-Dumitrescu, R.-L.; Cooper, C. E.; Rinaldo, S.; Cutruzzola, F.; Wilson, M. T., *Dalton Trans.* **2007**, 840-850.
11. Ichikawa, Y.; Nakajima, H.; Watanabe, Y., *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1582-1589.

12. (a) Franke, A.; Fertinger, C.; van Eldik, R., *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6935-6949; (b) Tajima, K.; Oka, S.; Edo, T.; Miyake, S.; Mano, H.; Mukai, K.; Sakurai, H.; Ishizu, K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1507-1508; (c) Tajima, K.; Tada, K.; Shigematsu, M.; Kanaori, K.; Azuma, N.; Makino, K., *Chem. Commun.* **1997**, 1069-1070.
13. (a) Liu, J.-G.; Ohta, T.; Yamaguchi, S.; Ogura, T.; Sakamoto, S.; Maeda, Y.; Naruta, Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 9426-9431; (b) Ohta, T.; Liu, J.-G.; Naruta, Y., *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 407-413.
14. Lente, G.; Fabian, I., *Dalton. Trans.* **2007**, 4268-4275.
15. Erman, J. E.; Vitello, L. B.; Miller, M. A.; Kraut, J., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6592-6593.
16. (a) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9937-9944; (b) Kano, K.; Kitagishi, H.; Tamura, S.; Yamada, A., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202-15210.
17. Kano, K.; Kitagishi, H.; Koder, M.; Hirota, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435-438.
18. (a) Fleischer, E. B.; Palmer, J. M.; Srivastava, T. S.; Chatterjee, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3162-3167; (b) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Kampas, F.; Kim, J., *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 2443-2445.
19. (a) Sato, H.; Hayashi, T.; Ando, T.; Hisaeda, Y.; Ueno, T.; Watanabe, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 436-437; (b) Nelson, D. P.; Kiesow, L. A., *Anal. Biochem.* **1972**, *49*, 474-478.
20. Sawaki, Y.; Foote, C. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6292-6296.
21. Pan, Z.; Newcomb, M., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6767-6774.
22. (a) Behan, R. K.; Green, M. T., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 448-459; (b) Nakamoto, K., *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *226*, 153-165; (c) Turner, J.; Palaniappan, V.; Gold, A.; Weiss, R.; Fitzgerald, M. M.; Sullivan, A. M.; Hosten, C. M., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 480-501.
23. Hashimoto, S.; Tatsuno, Y.; kitagawa, T., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1984**, *60*, 345-348.
24. Hashimoto, S.; Tatsuno, Y.; kitagawa, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2417-2421.
25. Hashimoto, S.; Nakajima, R.; Yamazaki, I.; Tatsuno, Y.; kitagawa, T., *FEBS Lett.* **1986**, *208*, 305-307.

26. Terner, J.; Sitter, A. J.; Reczek, C. M., *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 828, 73-80.
27. Sitter, A. J.; Reczek, C. M.; Terner, J., *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 7515-7522.
28. Ikemura, K.; Mukai, M.; Shimada, H.; Tsukihara, T.; Yamaguchi, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Ogura, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14384–14385.
29. Sitter, A. J.; Reczek, C. M.; Terner, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 828, 229-235.
30. Chuang, W.-J.; Heldt, J.; Wart, H. E. V., *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 14209-14215.
31. Schappacher, M.; Chottard, G.; Weiss, R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 93-94.
32. Kean, R. T.; Oertling, W. A.; Babcock, G. T., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2185-2187.
33. Oertling, W. A.; Kean, R. T.; Weber, R.; Babcock, G. T., *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 2633-2645.
34. Gold, A.; Jayaraj, K.; Doppelt, P.; Weiss, R.; Chottard, G.; Bill, E.; Ding, X.; Trautwein, A. X., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5756-5761.
35. Rodgers, K. R.; Reed, C. A.; Su, Y. O.; Spiro, T. G., *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 2688-2700.
36. Czarnecki, K.; Proniewicz, L. M.; Fujii, H.; Ji, D.; Kincaid, R. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4680-4685.
37. Proniewicz, L. M.; Paeng, I. R.; Nakamoto, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3293-3303.
38. (a) Proniewicz, L. M.; Bajdor, K.; Nakamoto, K., *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 1760-1766; (b) Bajdor, K.; Nakamoto, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3045-3046.
39. (a) Hashimoto, S.; Mizutani, Y.; Tatsuno, Y.; Kitagawa, T., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 8096-8097; (b) Paeng, I. R.; Shiwaku, H.; Nakamoto, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1995-1996; (c) Mizutani, Y.; Hashimoto, S.; Tatsuno, Y.; Kitagawa, T., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6809-6814.
40. Czernuszewicz, R. S.; Macor, K. A., *J. Raman Spectros.* **1988**, 19, 553-557.
41. Shantha, P. K.; Verma, A. L., *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2723-2725.
42. Liu, J.-G.; Shimizu, Y.; Ohta, T.; Naruta, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3672-3673.
43. Davydov, R.; Osborne, R. L.; Shanmugam, M.; Du, J.; Dawson, J. H.; Hoffman, B. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 14995-15004.

第三章 met-hemoCD1 と過酸化水素との反応機構および高分子修飾酵素モデルによる不安定中間体の安定化

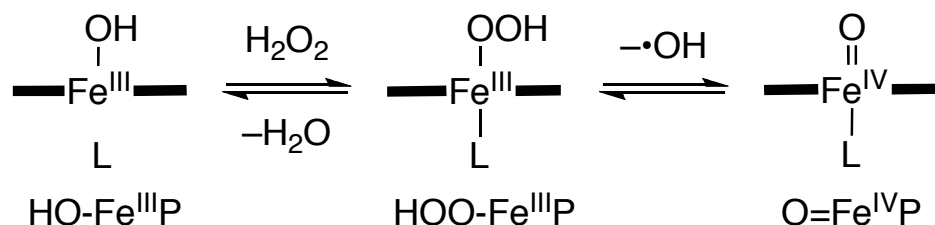
1. 緒言

第二章において、全ての水酸基を *O*-メチル化した β -シクロデキストリンをピリジン配位子で連結した二量体の Py3CD と水溶性鉄(III)ポルフィリンである Fe^{III}TPPS (TPPS: 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin hexaanion)との包接錯体”met-hemoCD1”をペルオキシダーゼのモデルとして用い、その過酸化水素との反応について検討を行った。その結果、met-hemoCD1 は過酸化水素との反応によりペルオキシダーゼの酵素反応における不安定中間体の Cpd 0 に対応するヒドロペルオキシ鉄(III)錯体(HOO-Fe^{III}P)を経て、Cpd II に対応する酸化活性種の鉄(IV)オキシ錯体(O=Fe^{IV}P)を生成することを報告した。ヘム酵素の系ではクライオラジオリシスなどの手法を用いることで HOO-Fe^{III}P を観測をすることができる¹⁾。しかし酵素の系ではさまざまなアミノ酸残基がヘム周辺を取り囲むため、その構造や反応に影響を与える²⁾。そのため反応機構を検討する上ではこれらの影響についても考慮する必要がある。厳密な反応機構の議論のためにはタンパク質の反応系を単純化する必要があり、活性中心の構造を模倣したモデル化合物による反応の検討が望まれる。しかし、これまでに水中のモデル系において、過酸化水素との反応により HOO-Fe^{III}P を観測した例は hemoCD1 の系の他になく、多くのモデル系は極低温の有機溶媒中という条件で反応させることで Cpd 0 に対応する鉄(III)ヒドロペルオキシ種を観測している³⁾。そのため不安定中間体である HOO-Fe^{III}P の反応については不明な点が多く、最近では HOO-Fe^{III}P が酸化活性種として反応に関与するという報告もあり⁴⁾、その反応について興味を持たれている。met-hemoCD1 は水中で機能し、不安定中間体を観測できる数少ないモデル系としてその反応のメカニズムを検討することで酵素反応における新たな知見を得ることができると考えられる。本章では、酸化活性種の生成において重要なステップとなる HOO-Fe^{III}P の酸素-酸素間の結合の切断および HOO-Fe^{III}P の安定化に対するシクロデキストリンの包接効果の検討を行った。

met-hemoCD1 と過酸化水素から O=Fe^{IV}P が生成する反応について Scheme 3-1

Ueda, T.; Kitagishi, H.; Kano, K. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4337-4347.

Scheme 3-1. Schematic representation of the reaction of hemoCD1 with H₂O₂.



に示す。HOO-Fe^{III}P から O=Fe^{IV}P を生成する場合、酸素-酸素間の結合のホモリシスが起こりラジカル的に開裂する。HOO-Fe^{III}P のホモリシスが起こると・OH ラジカルが脱離する。・OH ラジカルは非常に活性が高くポルフィリンのメソ位を攻撃することでポルフィリンの環開裂を伴う分解反応を引き起こす⁵⁾。しかし、Py3CD が存在する条件では、ポルフィリン環の分解が Py3CD 非存在下と比較して顕著に抑制された。この結果はシクロデキストリンの包接が・OH ラジカルの反応性に影響を与えていることを示唆している。そこで本章では met-hemoCD1 と過酸化水素から O=Fe^{IV}P が生成するメカニズムについてスピントラップおよび反応速度から検討を行った。さらに考えられるメカニズムから hemoCD1 に高分子(ポリエチレングリコール, PEG)を修飾することで、分子間の反応を制限し、・OH ラジカルおよび不安定中間体(HOO-Fe^{III}P)の安定化について検討した。

2. 実験

2-1. 測定機器

紫外可視吸収スペクトルは島津製作所製ホトダイオードアレイ分光光度計 MultiSpec-1500 および島津製作所製分光光度計 UV-2450 および UV-2100 を用いて測定した。ストップドフロー測定はユニソク製分光光度計 RSP-1000 を用いて測定した。水溶液の pH は堀場製作所製 pH メータ F52 を用いて測定した。電子スピン共鳴(EPR)スペクトルは日本電子製電子スピン共鳴装置 JES-TE200 (X-band)を用いて測定した。77 K での EPR スペクトル測定は石英製デュワーを取り付けて液体窒素で冷却して行った。室温での EPR スペクトル測定は石英製扁平セルを用いて行った。エレクトロスプレーイオン化(ESI)法による質量分析

は日本電子製飛行時間型質量分析計 JMS-T100CS を用いた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法による質量分析は Bruker Daltonics 製飛行時間型質量分析計 autoflex speed および島津製作所製飛行時間型質量分析計 AXIMA CFR plus を用いて、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして用いて測定した。核磁気共鳴(NMR)スペクトルは日本電子製フーリエ変換核磁気共鳴装置 JNM-ECA500 (500 MHz)を用いて測定し、テトラメチルシラン(TMS)を内部基準として用いた。微量熱量測定は Microcal 製等温滴定型熱量計 VP-ITC を用いて測定し、結果は ORIGIN に付属したソフトウェアを用いて解析を行った。酸素分圧は KOFLOC 製ガス混合装置 GM-4B を用いて調整した。

2-2. 試薬および合成

Py3CD⁶⁾、Fe^{III}TPPS⁷⁾ および 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tris (4-sulfonatophenyl) porphyrin tetrabutylammonium salt (NH₂-TPPS(TBA)₃)⁸⁾ は文献記載の方法に従って合成した。 α -PEG モノカルボン酸 (HOOC(CH₂)₃(CO)O-PEG5k-OCH₃) は市販の PEG モノメチルエーテル(mw = 5k)から文献記載の方法で合成した⁹⁾。過酸化水素は和光純薬製精密分析用試薬、5,5-demethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) は Sigma-Aldrich 製試薬(97%)をそのまま用いた。その他の試薬は市販品をそのまま用いた。Py3CD および Fe^{III}TPPS は pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝溶液に溶かしストック溶液を調整した。過酸化水素は第二章に記した方法により濃度決定を行い測定に用いた。

2-2-1.P-PEG5k の合成 (Scheme 3-2)

200 mL のナス型フラスコに NH₂-TPPS(TBA)₃ 0.3 g をジクロロメタン 360 mL に溶かした。HOOC(CH₂)₃(CO)O-PEG5k-OCH₃ 9.1 g (1.8 mmol)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 360 mg (1.8 mmol) および 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 230 mg (1.8 mmol) を加えて、室温で 12 時間かき混ぜた。反応溶液を 5%塩酸および飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥させた後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 10:1 → 6:1 (v/v))で精製することにより、紫色固体の生成物を得た(0.85 mg, 72%)。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.98–8.73 (m, 8H), 8.31–8.04 (m, 16H), 4.35 (bs, 2H), 3.79–3.49 (m, PEG backbone), 3.40–3.37 (m, 24H), 2.72–2.66 (m, 2H), 2.62–2.60 (m, 2H), 2.22–2.20 (m, 2H), 1.75–1.68 (m, 24H), 1.52–1.45 (m, 24H), 1.02 (t, 36H, *J* = 7.2

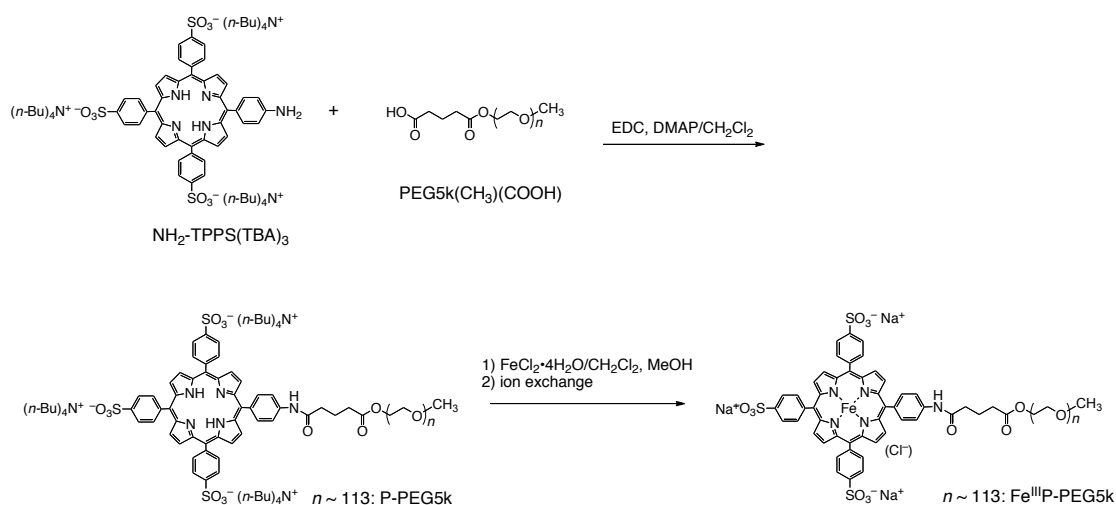
Hz), -2.80 (s, 2H); UV-Vis (0.05 M phosphate buffer at pH 7.0) λ_{\max} /nm 418, 516, 551, 588 and 644; MS (MALDI-TOF, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z $[M+2Na]^+$: calcd for 5924 ($n = 111$), found 5931.

2-2-2. Fe^{III}P-PEG5k の合成 (Scheme 3-2)

還流冷却管を取り付けた 200 mL のナス型フラスコに P-PEG5k 0.3 g をクロロホルム 150 mL に溶かし、20 分間加熱還流した。塩化鉄四水水和物 660 mg (3.3 mmol)の飽和メタノール溶液 5 mL を加えて、3 時間加熱還流した。蛍光スペクトルにより鉄錯体の生成を確認した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を蒸留水に溶かし、クロロホルムで抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥させ減圧留去した。得られた固体を蒸留水に溶かしイオン交換カラム (DOWEX MARATHON C Na form)を通して精製した。得られた水溶液を減圧留去して、最小量のメタノールに溶かしてゲルろ過カラム (Sephadex LH-20, メタノール)で精製し、溶媒を減圧留去して紫色固体の生成物を得た。最小量のメタノールに溶かしてアセトンで再沈殿させることで紫色固体生成物を得た(185 mg, 54%)。

UV-vis (0.1 M NaClO₄ aqueous solution at pH 3.0) λ_{\max} /nm 396, 533, 693. ($[(H_2O)_2-Fe^{III}P-PEG5k]^2-$); MS (MALDI-TOF, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z $[M+2Na]^+$: calcd for 5978 ($n = 111$), found 5984.

Scheme 3-2. Synthesis of Fe^{III}P-PEG5k.



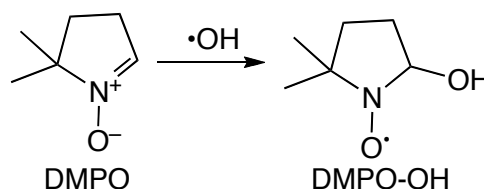
3. 結果および考察

3-1. hemoCD と過酸化水素との反応のメカニズムの検討

3-1-1. $\bullet\text{OH}$ ラジカルの検出

Scheme 3-1 に示したように $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P}$ に過酸化水素を反応させて生じるヒドロペルオキシ鉄(III)錯体の酸素-酸素間の結合にホモリシスが起これりヒドロキシルラジカル($\bullet\text{OH}$)が生成することを確認するためにスピントラップ法による $\bullet\text{OH}$ ラジカルの検出を試みた。スピントラップ法は反応の過程で発生する不安定で検出の難しいフリーラジカル種($\bullet\text{OH}$ 、 $\bullet\text{OOH}$ および $\text{O}_2^{\bullet-}$ など)を不飽和結合に付加させることにより安定なラジカル付加体に変換して EPR スペクトルを測定する方法である。スピントラップ法で生成したラジカル付加体は付加したラジカルの構造により特徴的な EPR スペクトルを示すため、元のラジカルの構造を推定することができる¹⁰⁾。水系の反応では 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO)がよく用いられ、そのラジカル付加体についても多くの報告例があるため、ラジカルの帰属を行いやすい¹⁰⁻¹¹⁾。 $\bullet\text{OH}$ ラジカルを DMPO スピントラップすると Scheme 3-3 に示す反応により $\bullet\text{OH}$ ラジカル付加体(DMPO-OH)を生成する。生成した DMPO-OH は特徴的な 4 本線の EPR シグナルを示す。ここでは例としてフェントン反応により生成した $\bullet\text{OH}$ ラジカルの付

Scheme 3-3. The structure of an adduct of DMPO and $\bullet\text{OH}$ radical.



加体を示す。pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中で硫酸鉄(II)(50 μM)および DMPO(25 mM)に過酸化水素(0.3 mM)を加え、すばやく石英製扁平セルに移し EPR スペクトルを測定した。このフェントン反応により生じた $\bullet\text{OH}$ ラジカルを DMPO によりトラップした EPR シグナルを Figure 3-1 に示す。met-hemoCD1 の反応におけるスピントラップの実験は、あらかじめ met-hemoCD (2 mM)と DMPO (0.5 M)を pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中に溶かした溶液を調整し、そこへ過酸化水素(10 mM)を加えて、速やかに扁平セルに移して密閉した後に EPR スペクトルを測定した。EPR スペクトルの測定結果を Figure 3-2 に示す。観測された EPR シグナルは Figure 3-1 に示した DMPO-OH 由来の 4 本線ではなく、比

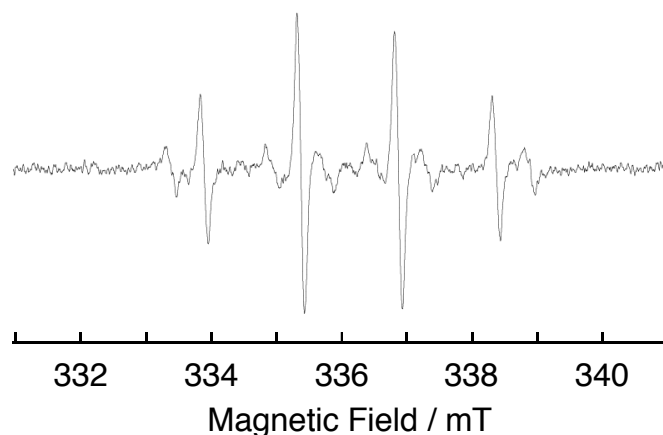


Figure 3-1. EPR spectrum of the $\bullet\text{OH}$ radical adduct of DMPO (DMPO-OH). DMPO-OH was obtained from the reaction of fenton reagent with H_2O_2 . Conditions: $[\text{DMPO}] = 25\text{mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.3\text{ mM}$, $[\text{FeSO}_4] = 50\ \mu\text{M}$, in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and room temperature).

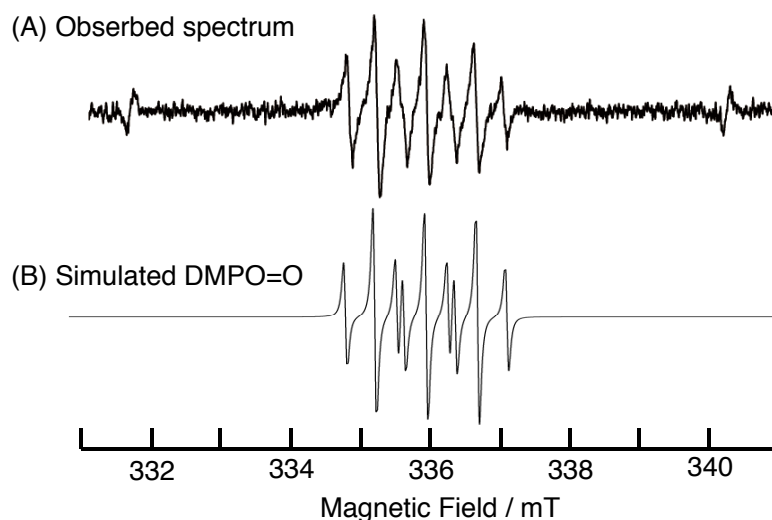
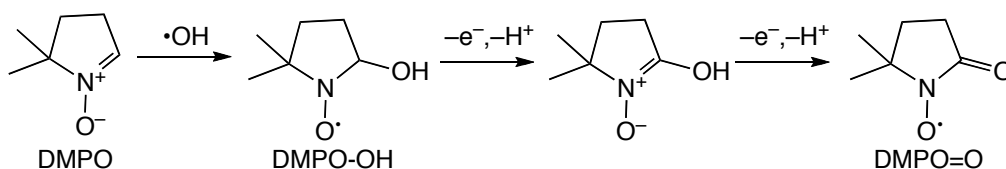


Figure 3-2. EPR spectrum measured in the reaction of met-hemoCD ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = [\text{Py3CD}] = 2 \times 10^{-3}\text{ M}$) with H_2O_2 ($1 \times 10^{-2}\text{ M}$) in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) containing DMPO (0.5 M) at r. t. (A) and the computer-simulated spectrum of DMPO=O ($a_{\text{H}} = 0.41\text{ T}$, $a_{\text{N}} = 0.72\text{ T}$) (B). The spectrum was recorded 1 min after mixing met-hemoCD, H_2O_2 , and DMPO. Microwave power: 1.0 mW, modulation width : 50 μT , time constant: 0.03 s.

較的狭い領域に7本線のEPRシグナルが観測された。この7本線のEPRシグナルはこれまでに報告されているDMPOのラジカル付加体の二電子酸化体であるDMPO=O (Figure 3-2)のEPRシグナル^{11a,12)}と一致した。DMPO-OHを直接観測することはできなかった。しかし、BurkittらはDMPO=OはDMPO-OHが酸化されて生成すると報告している(Scheme 3-4)^{11c,13)}。そのためスピントラップにより検出したDMPO=Oはヒドロペルオキシ種の酸素-酸素結合のホモリシスを経て、 $\bullet\text{OH}$ ラジカルが生成することを示唆する。

Scheme 3-4. Reaction mechanism for the formation of DMPO=O.



第二章でも述べた様にシクロデキストリン非存在下の鉄ポルフィリン(Fe^{III} TPPS)と過酸化水素を反応させると $\bullet\text{OH}$ ラジカルが生じ、その $\bullet\text{OH}$ ラジカルがポルフィリンのメソ位の炭素を攻撃することで環開裂反応を起こす。しかし、Py3CDが存在する条件では、このような分解反応が抑制される。Py3CDはスルフィド結合やO-メチル化グルコース部位を持ち、それらがラジカルスカベンジャーとして働くことが考えられる。そこでO= Fe^{IV} Pを生成した直後のhemoCD1からPy3CDを抽出して分析することでPy3CDがラジカルスカベンジャーとして働いているかについて調べた。pH 7の0.05 Mリン酸緩衝液中のmet-hemoCD1(5×10^{-4} M)に過酸化水素(5×10^{-3} M)を加え反応させた。30秒後にO= Fe^{IV} Pの生成を558 nmの吸収体から確認した(Figure 3-3 (A))。その後、速やかに反応混合物から CHCl_3 を用いてPy3CDを抽出してESI-TOF MS法により分析した。抽出物のESI-TOF MSスペクトルをFigure 3-3 (B)に示す。観測された主な質量ピークである m/z 2959は $[\text{Py3CD}+\text{Na}]^+$ に帰属される。 m/z 2975にわずかに $[\text{Py3CD}+16+\text{Na}]^+$ のピークが見られた。しかし、Figure 3-3 (A)の吸収スペクトルから、ほぼ全てのmet-hemoCDがO= Fe^{IV} Pに変化していると考えられるにもかかわらず、Py3CDには大きな変化が観測されなかった。O-メチル化されたグルコピラノースは $\bullet\text{OH}$ ラジカルを捕捉しないことが明らかとなった。したがって $\bullet\text{OH}$ ラジカルが消去される経路としてラジカル同士のカップリングで $\bullet\text{OH}$ ラジカル

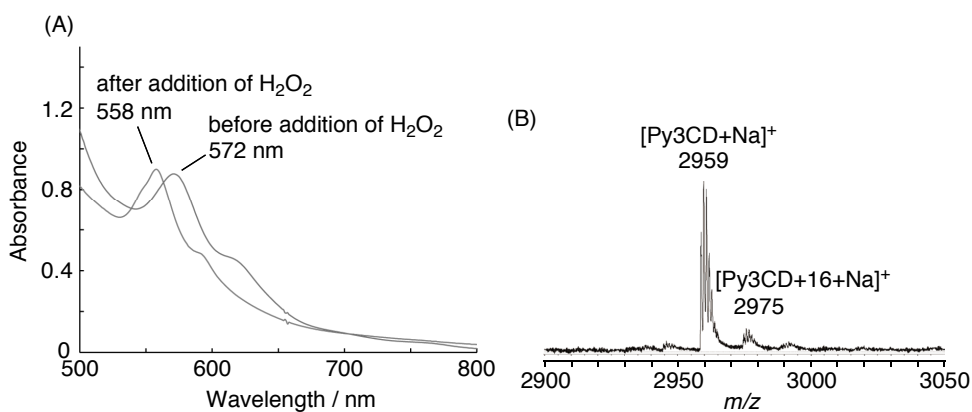
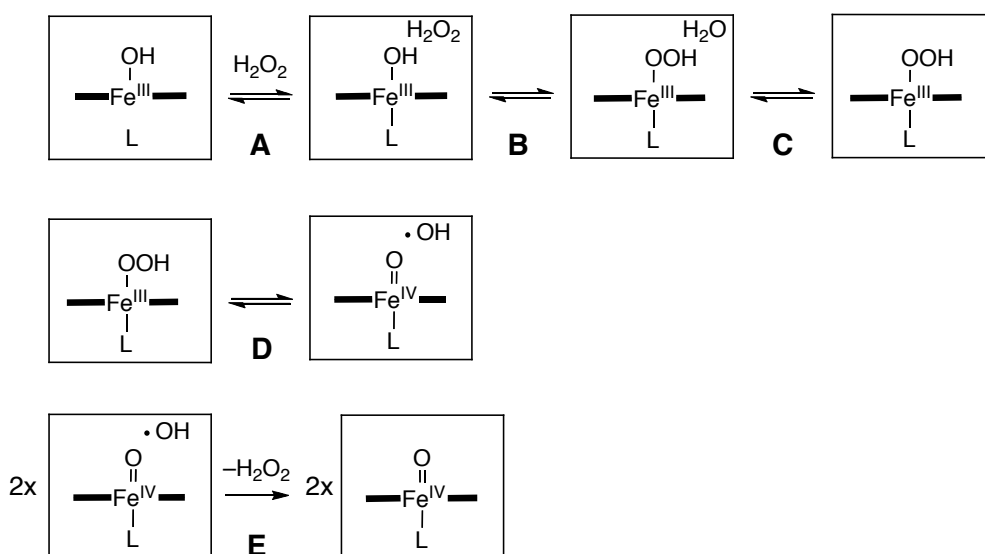


Figure 3-3. (A) UV-vis spectra of met-hemoCD (5×10^{-4} M) and a reaction mixture of met-hemoCD1 with H_2O_2 (5×10^{-3} M). (B) ESI-TOF MS spectrum of the CHCl_3 extract of the mixture obtained by reacting met-hemoCD ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = [\text{Py3CD}] = 5 \times 10^{-4}$ M) with H_2O_2 (5×10^{-3} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 for 30 s.

より反応性の低い過酸化水素へ戻る経路を考える必要がある。*O*-メチル化シクロデキストリンや Py3CD はフリーベースの TPPS やその鉄錯体の $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ を包接してカプセル化する¹⁴。Py3CD のカプセル内での $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ の生成および $\cdot\text{OH}$ ラジカルの安定化の推定メカニズムを Scheme 3-5 に示す。この仮説では活性の

Scheme 3-5. Proposed mechanism for the reaction of hemoCD1 with H_2O_2 . Squares in the scheme represent the cyclodextrin cage.



高い $\bullet\text{OH}$ ラジカルはシクロデキストリンのカプセル内で $\bullet\text{OH}$ ラジカルと $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が再結合することで生じるヒドロペルオキシ種との平衡 **D** により安定化されると考える。平衡 **D** の状態から 2 分子が衝突することで $\bullet\text{OH}$ ラジカルがカップリングして過酸化水素を生成する(反応 **E**)。もしこの仮説が正しければ反応 **E** の hemoCD1 同士の衝突を阻害することでヒドロペルオキシ種の状態を安定化できる可能性がある。

3-1-2. $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ 生成の反応速度

第二章において met-hemoCD1 と過酸化水素の反応からヘム酵素の Cpd II に対応する $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が生成することについて報告した。ここでは hemoCD1 と過酸化水素の反応における速度論から反応の解析を行った。25 °C において pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中で met-hemoCD1 の濃度を 1×10^{-5} M に固定し、加える過酸化水素の当量数を 20-2500 当量まで変えて $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が生成する速度を測定した。反応速度は $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ の $\lambda_{\text{max}} = 558$ nm における吸光度の変化 をストップドフローを用いて測定した。解析は反応初期(0~5 s)における吸光度変化から初速度 v を求めた。得られた初速度の対数($\log v$)を加えた過酸化水素の濃度の対数($\log [\text{H}_2\text{O}_2]$)に対してプロットした。その結果を Figure 3-4 に示す。過酸化水素濃度を増やすに従い $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が生成する速度が速くなっている。この結果は hemoCD1 と過酸

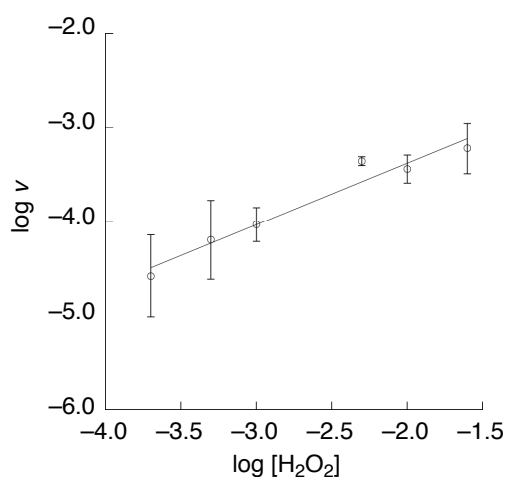


Figure 3-4. Log-log plot of initial rate for the formation of $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ v versus H_2O_2 concentration $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

化水素の反応において律速段階が Scheme 3-5 の過程 A のシクロデキストリンのケージ内に過酸化水素が入る過程であることを示している。それに続く過程 B~D および過程 E の速度は過程 A に比べると速い反応であることが示唆される。

3-2. PEG 修飾鉄ポルフィリンの合成

前節ではヒドロペルオキシ種ホモリシスによる $\bullet\text{OH}$ ラジカルの生成について検討を行い、Scheme 3-5 の過程 E を遅くすることによりヒドロペルオキシ種を安定化できる可能性について述べた。この仮説について検証するために hemoCD1 同士の衝突が起こりにくい分子を設計し合成した。hemoCD1 同士の衝突を防ぐ方法として、hemoCD1 の反応に影響を与えないと考えられる非イオン性の高分子を hemoCD1 に修飾した。修飾する高分子にはポリエチレングリコール(PEG)を用いた。PEG はエチレングリコール($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$)を繰り返し単位とする非イオン性高分子である。PEG はエーテル結合が水和されるために水溶性が高い。PEG 修飾は PEG 化(PEGylation)と呼ばれ、化合物の水溶性向上、薬物とタンパク質との相互作用の阻害や分子量の増大などの目的で用いられる。hemoCD1 の PEG 修飾は、hemoCD1 の構成分子の一つである $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ のスルホ基を PEG に置換することで合成した(Scheme 3-2)。Py3CD がポルフィリンを包接する上でスルホナトフェニル基は重要な役割を持っている^{14b)}。まず文献⁸⁾を参考にして TPPS の 1 つのスルホ基をアミノ基に置換した $\text{NH}_2\text{-TPPS}(\text{TBA})_3$ を合成した。 α -PEG モノカルボン酸 ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_5(\text{CO})\text{O-PEG5k-OCH}_3$, mw = 5000 (5k)) と $\text{NH}_2\text{-TPPS}(\text{TBA})_3$ をジクロロメタン中で 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide (EDC)を用いて縮合することでフリーベースのポルフィリンを合成した(Scheme 3-2)。鉄錯体の合成は FeCl_2 を用いて行い、PEG 鎖を有する鉄ポルフィリン($\text{Fe}^{\text{III}}\text{P-PEG5k}$)を合成した。合成した鉄ポルフィリンは UV-vis スペクトルおよび MALDI-TOF MS を用いてキャラクタリゼーションを行った。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P-PEG5k}$ の吸収スペクトルは同じ条件下で測定した $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ と同じスペクトルとなったため、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P-PEG5k}$ のモル吸光係数は同じ波長における $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ のジアクア体のモル吸光係数^{14c)}(0.1 M NaClO_4 at pH 3, $\epsilon_{393\text{nm}} = 150,000$)と同じと仮定して濃度決定に用いた。

3-3. PEG 修飾による機能の変化

3-3-1. メチル化 β -シクロデキストリン二量体の包接錯体形成

はじめに合成した PEG を修飾した鉄ポルフィリン($\text{Fe}^{\text{III}}\text{P-PEG5k}$)のシクロデキストリンダイマー(Py3CD)との包接錯体の形成について吸収スペクトルから検討した。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ とシクロデキストリンダイマーとの包接錯体形成挙動については詳細な研究が行われている^{14a)}。水溶液中での $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ は pH によって状態が異なり、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ に 2 分子の水分子が配位した単量体($[(\text{H}_2\text{O})_2\text{-Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]^3$)で存在する pH < 6 よりも高い pH (pH > 6)では、ポルフィリン 2 分子が酸素で架橋された μ -オキソダイマー($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS-O-Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]^8$)として存在する¹⁵⁾。Py3CD は $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ が単量体および二量体を形成している両方の条件において非常に安定 ($K > 10^7 \text{ M}^{-1}$)な 1:1 の包接錯体を形成することができる⁶⁾。pH 7 の条件下では $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ は μ -オキソダイマーとして存在するが、Py3CD が存在すると μ -オキソダイマーは消失し、中心鉄に水酸化物イオンが配位したモノヒドロキソ体の 1:1 包接錯体(met-hemoCD1)となる。PEG を修飾した鉄ポルフィリンの Py3CD との包接錯体の形成は pH 7.0 に調整したリン酸緩衝液中を用い、鉄ポルフィリン濃度を一定に保ちながら Py3CD の濃度を変化させて吸収スペクトルを測定して観

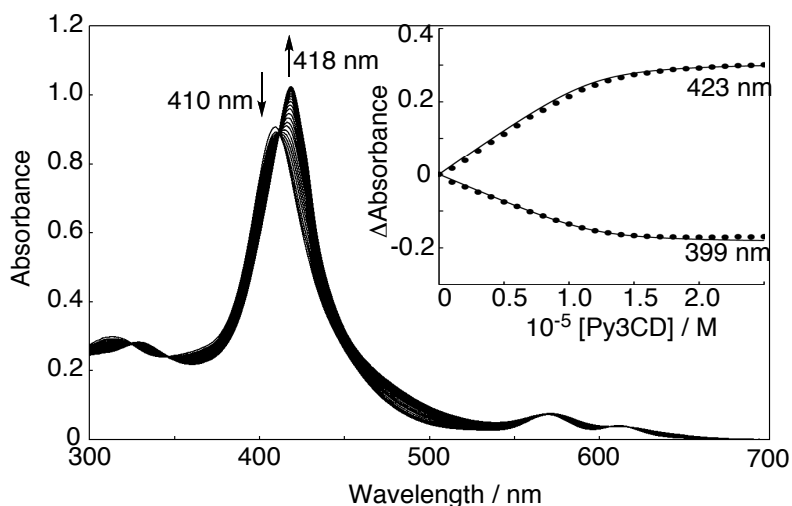
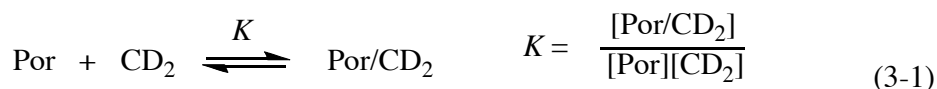


Figure 3-5. UV-vis spectral changes of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P-PEG5k}$ ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) upon addition of Py3CD in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. The inset shows plots of the changes in absorbances of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P-PEG5k}$ versus $[\text{Py3CD}]$. The solid lines indicate the theoretical curves for the 1:1 complexation to give the binding constant (K).

測した。PEG 修飾 Fe^{III}TPPS の Py3CD を添加していったときの吸収スペクトル変化を Figure 3-5 に示す。μ-オキソダイマーの形成を示す 410 nm のソーレー帯は Py3CD の添加によりそれぞれ等吸収点を通りながら、包接錯体のモノヒドロキソ体を示唆する 418 nm の吸収へと長波長シフトした。この結果から PEG 修飾 Fe^{III}TPPS も Fe^{III}TPPS と同様に包接錯体を形成できることが明らかとなった。次に 1:1 の錯形成に基づく解析を行った。シクロデキストリンダイマー(CD₂)とポルフィリン(Por)が 1:1 の包接錯体を形成における平衡定数 K は次式によって表される¹⁶⁾。



[Por]、[CD₂]および[Por/CD₂]はそれぞれ溶液中のポルフィリン、シクロデキストリンダイマーおよび包接錯体の濃度を表す。ポルフィリンの初濃度[Por]₀を一定にして[CD₂]を連続的に変化させたときのポルフィリンのある波長における吸光度変化は(ΔA = A - A₀)は次のように表すことができる。

$$\Delta A = \frac{bK\Delta\epsilon[\text{Por}]_0[\text{CD}_2]}{1 + K[\text{CD}_2]} \quad (3-2)$$

ここで Δεは包接錯体のモル吸光係数からフリーのポルフィリンのモル吸光係数を差し引いた値で、 b は光路長である。(2-2)を変形すると次式のように表される。

$$\Delta A = \frac{bK\Delta\epsilon}{2K} [1 + K[\text{CD}_2] + K[\text{Por}]_0 + \{(1 + K[\text{CD}_2] + K[\text{Por}]_0)^2 - 4K^2 [\text{CD}_2][\text{Por}]_0\}^{1/2}] \quad (3-3)$$

結合定数 K は、[CD₂]を変化させて測定した吸光度変化 ΔA を[CD₂]に対してプロットした滴定曲線を(3-3)に基づくカーブフィッティングにより求めることができる。

結合定数 K は、[CD₂]を変化させて測定した吸光度変化 ΔA を[CD₂]に対してプロットした滴定曲線を(3-3)に基づくカーブフィッティングにより求めることができる。(2-3)に基づく滴定曲線のカーブフィッティングの結果を Figure 3-5 の挿入図に示す。さらにカーブフィットすることにより得られた結合定数 K は $2.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。 10^7 M^{-1} 以上の結合定数を持つ Py3CD と Fe^{III}TPPS の系と比較すると PEG 修飾によって結合定数の低下が見られた。ポルフィリンの 1 カ所を PEG 化したことにより Fe^{III}TPPS/Py3CD 包接錯体の安定性が低下することがわかった。

次に Fe^{III}P-PEG5k と Py3CD との錯体形成における熱力学的な検討を行った。Fe^{III}P-PEG5k と Py3CD の相互作用について、等温滴定カロリメトリー(ITC)法による錯形成時における熱量測定から結合定数 K 、エンタルピー変化 ΔH およびエントロピー変化 ΔS を決定し、熱力学的な考察を行った。

ホスト M とゲスト X との 1:1 の錯形成において平衡定数 K は錯形成率 α を用いて次のように表すことができる。

$$K = \frac{\alpha}{(1-\alpha)[X]} \quad (3-4)$$

$$M_t = [X] + n\alpha M_t \quad (3-5)$$

n は結合サイトの数を表す。(3-4)および(3-5)から次式が導かれる。

$$\alpha^2 - \alpha \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad (3-6)$$

体積 V_0 のセル中のホストにゲストをシリンジから添加したときの熱量 Q は次式で表すことができる。

$$Q = n\alpha M_t \Delta H V_0 \quad (3-7)$$

(3-6)の二次方程式を α についてを解いて、(3-7)に代入すると次式を導くことができる。

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \left\{ \left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t} \right\}^{1/2} \right] \quad (3-8)$$

(3-8)の Q はゲストの i 番目の添加後の熱量 $Q(i)$ を表している。しかし実際の測定では、 $i-1$ 番目の添加後から i 番目の添加後までの熱量変化 $\Delta Q(i)$ として観測される。(3-8)の Q は容量 V_0 に含まれる溶液のみに適用される。 i 番目の添加後には dV_i (1回の添加量)が $i-1$ 番目の添加後の V_0 から置換されている。そのため、置換された容量 dV_i の補正が必要となり、 dV_i の補正をした熱量変化 $\Delta Q(i)$ は次式のように表される。

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (3-9)$$

(3-8)および(3-9)に対して実測値をカーブフィットすることで結合定数 K を求められる。さらに滴定の際の発熱ピークもしくは吸熱ピークの面積の総和からエ

エンタルピー変化 ΔH が得られる。 K および ΔH から次式により熱力学的パラメータ ΔG および ΔS を決定することができる。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (3-10)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (3-11)$$

測定データの解析はグラフソフト ORIGIN に付属している解析プログラム”One Set Site of Sites Model”を使用した。

測定は測定セル内に PEG 修飾 Fe^{III}TPPS 水溶液(0.23 mM)を充填し、そこへ Py3CD 水溶液(2 mM)を付属のシリンジを用いて段階的に添加した。測定は pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中で 25.0 °C の条件で行った。測定結果を Figure 3-6 に示す。PEG 修飾 Fe^{III}TPPS 濃度はポルフィリンの吸光度から濃度を決定し解析した。セル中の PEG 修飾 Fe^{III}TPPS に対して Py3CD を添加すると発熱のピークが観測された(Figure 3-6 上段)。このときの発熱量から Py3CD の水溶液を PEG 修飾 Fe^{III}TPPS を含まないリン酸緩衝液に添加して測定した希釈熱を差し引き、加えた Py3CD のモル比([Py3CD]/[Fe^{III}P-PEG5k])に対してプロットした(Figure 3-6 下段)。得られた滴定曲線はそれぞれモル比 1 のところに変曲点を持つシグモイド状の曲線を描いた。滴定曲線を 1:1 の錯体形成に基づく解析(One Set Site of Sites Model)を行うと理論曲線と良い一致が見られ、 K 、 ΔH および ΔS を決定することができた。得られた結合定数および熱力学的パラメータを Table 3-1 に示す。錯体形成における結合定数 K は吸収スペクトルによる測定と ITC による測定で得られた値と良い一致が見られた。PEG 修飾により見られた結合定数の低下は主にエンタルピー変化の寄与によるものと思われる。Fe^{III}P-PEG5k が Py3CD に包接されると、それまで自由にゆらぐことができた PEG 鎖の運動が著しく抑制され、その結果負に大きなエンタルピー変化を導いたものと考えられる。

Table 3-1. Biding constants and thermaldynamic parameters for the complexation of PEGylated iron(III)porphyrin (Fe^{III}P-PEG5k) with Py3CD in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C^a.

	K / M^{-1}		$\Delta H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
	UV-vis	ITC		
Fe ^{III} P-PEG5k	2.1×10^6	2.8×10^6	-90	-178

^a Errors were within 10%. ^b The parameters were calculated based on 1:1 complexation of Fe^{III}P-PEG5k with Py3CD.

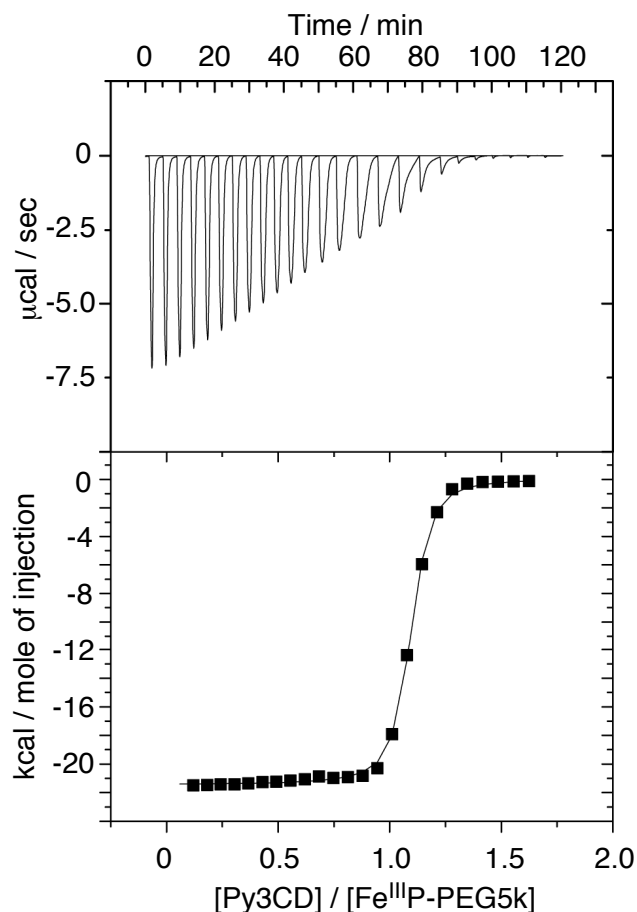


Figure 3-6. Calorimetric titration of PEGylated iron(III)porphyrins ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{P-PEG5k}] = 0.23 \text{ mM}$) with 25 aliquots ($10 \mu\text{L}$ each) of Py3CD (2 mM) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 298.15 K .

3-3-2.PEG 修飾 hemoCD1 の酸素結合挙動

PEG-修飾 hemoCD1(PEG5k-hemoCD1)の PEG 修飾による鉄周辺の配位環境への影響を調べるために、鉄(II)錯体の酸素親和性や酸素錯体の安定性などの酸素結合挙動について検討を行った。酸素親和性は酸素レセプター分子の半分が酸素化される酸素分圧 $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ で評価を行った。酸素錯体の安定性は自動酸化反応の半減期から評価した。鉄(II)錯体の調整は hemoCD1 と同様の方法で行った^{14b)}。鉄(III)の met-PEG5k-hemoCD1(0.5 mM)の溶液に過剰量の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加え、中心鉄

を鉄(II)へと還元した。鉄(II)の PEG5k-hemoCD1 の溶液をゲルろ過カラム (Sephadex G25 Superfine, HiTrap™ Desalting 5 mL, GE Healthcare)に充填して、pH 7.0 のリン酸緩衝溶液で溶出することで、過剰に含まれる $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ およびその分解物を取り除いて、oxy-PEG5k-hemoCD1 のストック溶液を調整した。

得られた oxy-PEG5k-hemoCD1 のストック溶液を窒素をあらかじめ 10 分間バブリングした pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液で希釈し、さらに 1 分間窒素バブリングすることで deoxy 体($\lambda_{\text{max}} = 433 \text{ nm}$)のスペクトルを測定した(Figure 3-7)。続いてその溶液に酸素を 1 分間バブリングして oxy 体($\lambda_{\text{max}} = 422 \text{ nm}$)の吸収スペクトルへの変化を確認した。鉄(II)錯体にのみ強く配位する一酸化炭素を 30 秒バブリングすると吸収スペクトルは速やかに CO 体($\lambda_{\text{max}} = 423 \text{ nm}$)のスペクトルへと変化した。この変化はこれまでに hemoCD1 や他のモデル錯体において報告されている変化と一致する^{14a, 17)}。以上の一連の操作における吸収スペクトル変化(Figure 3-7)より PEG5k-hemoCD1 が酸素錯体を形成することを確認した。

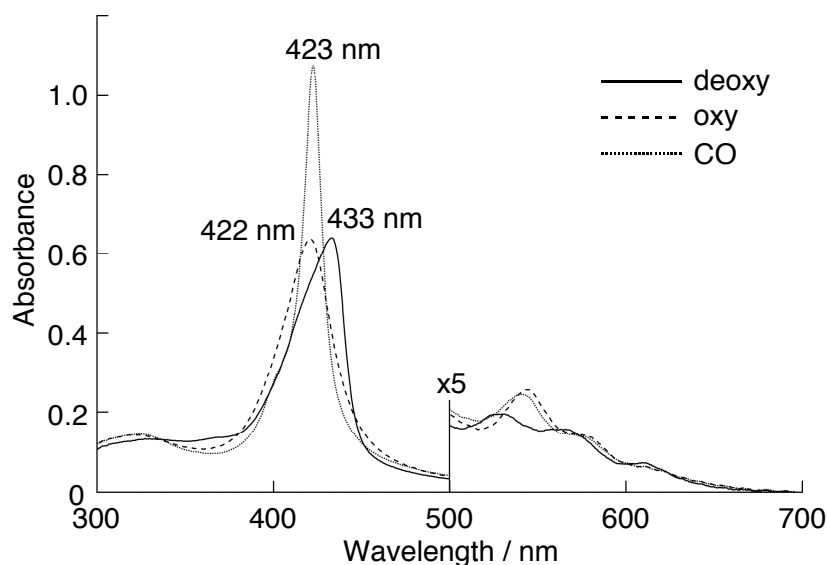


Figure 3-7. UV-vis spectra of PEG5k-hemoCD($[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P-PEG5k}] = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{Py3CD}] = 4.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) in the deoxy (solid line), oxy (dashed line) and CO-bound forms (dotted line) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

次に得られた PEG5k-hemoCD1 の酸素錯体の安定性について検討を行った。鉄(II)酸素錯体は次第に自動酸化され鉄(III)錯体を生成する¹⁸⁾。ゲルろ過精製により得られた oxy-PEG5k-hemoCD1 のストック溶液を空気飽和の pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液で希釈し、その吸収スペクトルの経時変化を測定した。はじめの

吸収スペクトルでは鉄(II)酸素錯体の形成を示す $\lambda_{\max} = 422 \text{ nm}$ のスペクトルが観測された。この溶液を $25 \text{ }^\circ\text{C}$ の条件で静置して経時的に吸収スペクトルの変化を測定した。その吸収スペクトルの変化を Figure 3-8 に示す。それぞれの分子量の PEG5k-hemoCD1 において鉄(II)酸素錯体に由来する吸収スペクトルは時間の経過とともに鉄(III)錯体の生成を示す $\lambda_{\max} = 418 \text{ nm}$ のスペクトルへと変化した。 422 nm における吸光度変化を一次速度式で解析し、擬一次速度定数 k_{obs} を求めた。

$$A = \Delta A (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) + A_0 \quad (3-12)$$

得られた k_{obs} から自動酸化反応の半減期 $t_{1/2}$ を次式から算出した。

$$t_{1/2} = \ln(2) / k_{\text{obs}} \quad (3-13)$$

酸素錯体の半減期は 27 時間であった。PEG 未修飾の hemoCD1 の半減期である 30 時間と近い値であった。

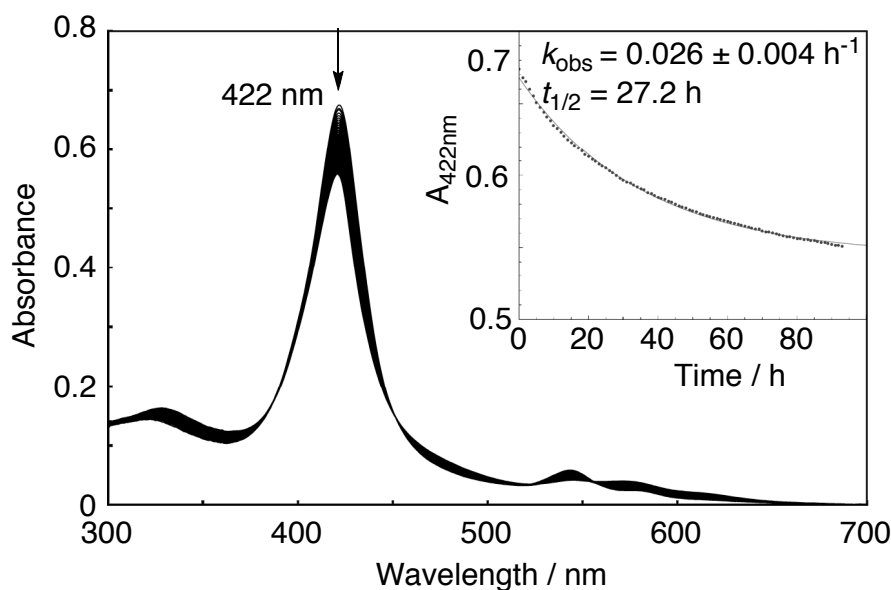


Figure 3-8. UV-vis spectral changes of dioxygen adduct of PEG5k-hemoCD1 ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$) under air in 0.05 M phosphate buffer at $\text{pH } 7.0$ and $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Scans were made at 1.0 hour intervals. Inset: first-order plot of based on the absorption changes at 422 nm .

次に酸素親和性についての検討を行った。ここで、ミオグロビンやそのモデル化合物などの酸素分子レセプター ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}$) と酸素の結合の平衡は次のように定義される¹⁹⁾。



$$P_{1/2}^{\text{O}_2} = \frac{[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}] P^{\text{O}_2}}{[\text{O}_2\text{-Fe}^{\text{II}}\text{P}]} \quad (3-15)$$

ここで、 P^{O_2} は系中の酸素分圧、 $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ は酸素レセプターの半分が酸素化される酸素分圧を表す。そのため $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ の値が小さいほど酸素親和性が高いことを表す。測定は酸素分圧を変化させてその吸収スペクトルを測定し解析を行う。ある波長における吸光度 A は次の式のように表すことができる。

$$A = \varepsilon_1 [\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}] + \varepsilon_2 [\text{O}_2\text{-Fe}^{\text{II}}\text{P}] \quad (3-16)$$

ただし、 ε_1 は $\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}$ のモル吸光係数、 ε_2 は $\text{O}_2\text{-Fe}^{\text{II}}\text{P}$ のモル吸光係数をそれぞれ表す。

酸素レセプターの全濃度を $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_t$ とすると次のように表すことができる。

$$[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_t = [\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}] + [\text{O}_2\text{-Fe}^{\text{II}}\text{P}] \quad (3-17)$$

(3-13)は(3-14)により次のように表すことができる。

$$A = \varepsilon_1 [\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_t + \Delta\varepsilon [\text{O}_2\text{-Fe}^{\text{II}}\text{P}] \quad (3-18)$$

ここで、 $\Delta\varepsilon = \varepsilon_1 - \varepsilon_2$ を表し、錯形成における吸光度変化(ΔA)は次式のように表すことができる。

$$\Delta A = \Delta\varepsilon [\text{O}_2\text{-Fe}^{\text{II}}\text{P}] \quad (3-19)$$

(3-12)、(3-14)および(3-16)から ΔA を P^{O_2} の関数で表すことができる。

$$\Delta A = \frac{\Delta\varepsilon[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_t P^{\text{O}_2}}{P^{\text{O}_2} + P_{1/2}^{\text{O}_2}} \quad (3-20)$$

(3-17)を変形すると次式が導かれる。

$$P^{\text{O}_2} = \frac{\Delta\varepsilon[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_t P^{\text{O}_2}}{\Delta A} - P_{1/2}^{\text{O}_2} \quad (3-21)$$

(3-18)において実際の解析では、 $\Delta\varepsilon$ および $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_t$ は定数となるので、種々の酸素分圧において吸収スペクトルを測定し、得られた吸光度変化と酸素分圧の比($P^{\text{O}_2} / \Delta A$)を酸素分圧(P^{O_2})に対してプロットすることで得られる直線の y 切片から $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ を見積もることができる。

測定は所定の酸素分圧になるように窒素および酸素の流量を調整して混合したガスを 10 分間バブリングして飽和させた pH 7.0 のリン酸緩衝液を調整した。この緩衝液を用いて上記の方法で調整した oxy-PEG5k-hemoCD1 のストック溶

液を希釈した。さらに 1 分間所定の酸素分圧の混合ガスをバブリングさせた後にセルを密封して吸収スペクトルを測定した。また、酸素分圧 P^{O_2} はガス混合装置に流す窒素流量 V^{N_2} および酸素流量 V^{O_2} から次式により求めた。

$$P^{O_2} \text{ (Torr)} = \frac{V^{O_2} \text{ (mL min}^{-1}) \times 760 \text{ (Torr)}}{V^{N_2} \text{ (mL min}^{-1}) + V^{O_2} \text{ (mL min}^{-1})} \quad (3-22)$$

PEG5k-hemoCD1 の種々の酸素分圧における吸収スペクトルを Figure 3-9(A)に示す。酸素分圧が上がるとともに 433 nm の deoxy 体の由来のソーレー帯は 422 nm の oxy 体の吸収スペクトルへと変化した。433 nm における吸光度変化と酸素分圧の比を酸素分圧に対してプロットした結果を Figure 3-9(B)に示す。得られた直線の y 切片から $P_{1/2}^{O_2}$ を見積もった。酸素の滴定曲線を Figure 3-9 (C)に示す。得られた $P_{1/2}^{O_2}$ を Table 3-2 に示す。

$P_{1/2}^{O_2}$ の値は hemoCD1 の 10 Torr¹⁷⁾と比較するとわずかに親和性が向上した。

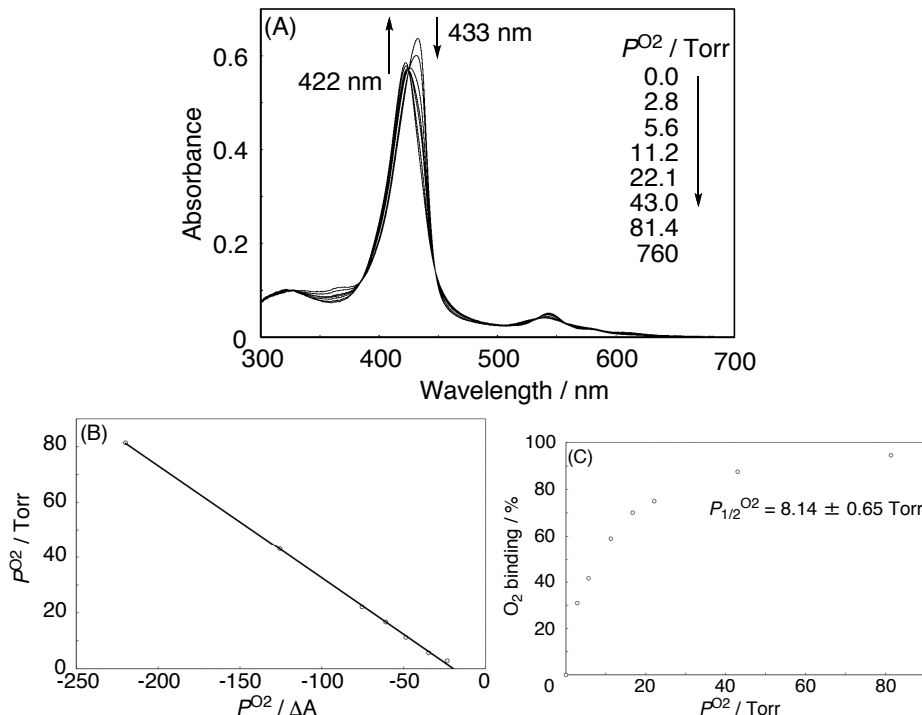


Figure 3-9. UV-vis spectral changes of PEG5k-hemoCD1 (5.0×10^{-6} M) as a function of the O₂ partial pressure (P^{O_2}) in N₂ in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C (A), plot of $P^{O_2} / \Delta A_{433nm}$ versus P^{O_2} for determining $P_{1/2}^{O_2}$ (B), and the titration curve for O₂ binding to PEG5k-hemoCD1 (C).

Table 3-2. Half-lives ($t_{1/2}$) for autoxidation of the O₂-adducts and dioxygen affinities ($P_{1/2}^{O_2}$) of hemoCD1 and PEG5k-hemoCD1 in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

	$t_{1/2} / \text{h}$	$P_{1/2}^{O_2} / \text{Torr}$	Reference
hemoCD1	30.1	10.0	17, 20
PEG5k-hemoCD1	27.2 ± 4.2	8.1 ± 0.6	This work

以上の結果から PEG5k-hemoCD1 は、hemoCD1 と同様に酸素付加体を形成し、その安定性も高いことより、この超分子の鉄(II)ポルフィリン中心は、2 つのシクロデキストリンにより強くカプセル化されていることが明らかとなった。

3-4. 不安定反応中間体の安定化

PEG5k-hemoCD1 の鉄(III)錯体は met-hemoCD1 と同等の機能を有することがわかったので、次に PEG5k-hemoCD1 と過酸化水素との反応についての検討を行った。25 °C の pH 7.0 で 0.05 M リン酸緩衝液中で PEG を修飾した met-PEG5k-hemoCD1 に過酸化水素を 20 当量反応させたところ、吸収スペクトルは met-hemoCD1 の場合と同様の変化を示した。この反応のスペクトル変化を Figure 3-10 に示す。吸収スペクトルの変化は met-hemoCD1 と過酸化水素の反応と同様の変化を示し、鉄(III)モノヒドロキソ体 ($\lambda_{\text{max}} = 418$ および 572 nm) の met-PEG5k-hemoCD1 の吸収スペクトルは、過酸化水素の添加により鉄(IV)オキシソ種 ($\lambda_{\text{max}} = 422$ および 558 nm) のスペクトルへと変化した。しかし hemoCD1 と過酸化水素の反応よりも PEG5k-hemoCD1 と過酸化水素の反応の方がポルフィリン環の分解と見られる 558 nm における吸光度の減少が顕著となった。吸収スペクトルから PEG5k-hemoCD1 は過酸化水素との反応により鉄(IV)オキシソ種を生成することが明らかとなった。次に PEG 修飾が hemoCD1 分子間の反応を制限し Scheme 3-5 の過程 E を遅くすることによるヒドロペルオキシ種の安定性を向

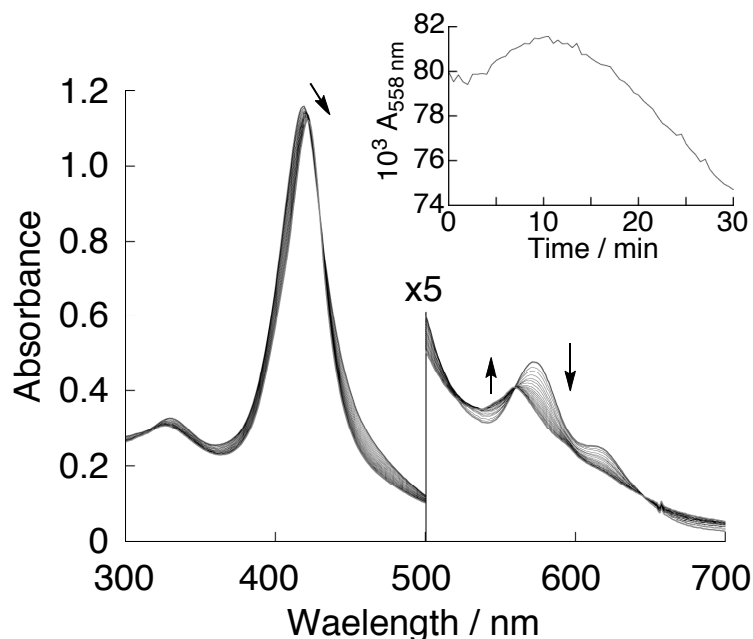


Figure 3-10. UV-vis spectral changes in the reaction of PEG5k-hemoCD (1×10^{-5} M) with H_2O_2 (2×10^{-4} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. Scans were made at 30 s intervals. Inset: absorption changes at 558 nm.

上させるかについて EPR スペクトルから検討を行った。第二章では液体ヘリウムを用いた 15 K で EPR スペクトルを測定したが、本章では液体窒素温度である 77 K での測定を行った。met-PEG5k-hemoCD (5×10^{-4} M) と過酸化水素 (2.5×10^{-3} M) を混合して凍結させるまでの時間を変化させて EPR スペクトルを測定した。その EPR スペクトルの測定結果を Figure 3-11(A) に示す。観測された EPR スペクトルは 15 K で測定したスペクトルと比較するとブロードなスペクトルとなった。これは EPR 分光法の測定原理による現象で、EPR 分光法は不対電子を磁場中に置いてゼーマン分裂させ、スピンを励起するためにその分裂のエネルギー幅に対応するマイクロ波を吸収させる。ある磁場中における α スピンおよび β スピンの分布はボルツマンの法則に従うので、2つのスピンの比は $(\alpha/\beta = -\Delta E/RT)$ と表される。吸収の大きさは両スピン数の差 $(\beta - \alpha)$ に比例する。そのため測定温度が低いほど吸収が大きくなり、感度が増大するので 15 K と比べて 77 K では感度が低下して線幅がブロードとなる¹⁰⁾。同じ条件で met-hemoCD1 を用いて測定した EPR スペクトルを Figure 3-11(B) に示す。両方の EPR スペクトルにおいて 2 種類の鉄(III)ヒドロペルオキシ種に由来する 2 組の rhombic シグナル

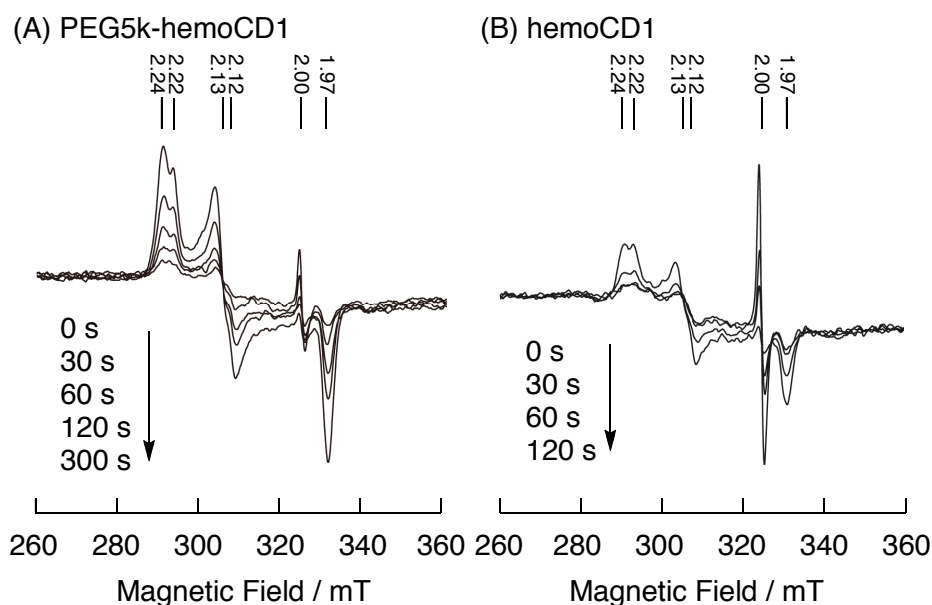


Figure 3-11. EPR spectra of the reaction mixtures of H_2O_2 (2.5×10^{-3} M) (a) $\text{Fe}^{\text{III}}\text{P}$ -PEG5k (5×10^{-4} M) complexed with Py3CD (7.5×10^{-4} M) and met-hemoCD1 (5×10^{-4} M) (b) with H_2O_2 in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 77 K. Each solution was frozen by liq N_2 at the appropriate time after mixing H_2O_2 .

を観測することができた。この2種類の rhombic シグナルは第二章において測定したヒドロペルオキシ種の rhombic シグナルの g 値と一致したため、それぞれ $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{Py})\text{P}$ ($g = 2.24, 2.13$ および 1.97) および $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{P}$ ($g = 2.24, 2.13$ および 1.97) であると帰属される。PEG5k-hemoCD1 と hemoCD1 の EPR スペクトルを比較するとヒドロペルオキシ種由来の rhombic シグナルの強度に違いが見られ、同じ条件で比較すると PEG5k-hemoCD1 の rhombic シグナルの方が強度が大きい。また鉄(III)ヒドロペルオキシ種の rhombic シグナルは hemoCD1 では半減期30秒ほどで減衰したのに対して PEG5k-hemoCD1 では半減期60秒ほどとなり、PEG修飾による鉄(III)ヒドロペルオキシ種の安定化の効果が見られた。この結果は PEG5k-hemoCD1 の持つ長い PEG 鎖が立体障害となって Scheme 3-5 の過程 E を防いだことによると考えられる。 $\bullet\text{OH}$ ラジカルが Scheme 3-5 の過程 D によって安定化されることを支持する結果となった。

4. 結言

本章では、met-hemoCD1 と過酸化水素との反応により生成する $O=Fe^{IV}P$ の生成メカニズムと反応中間体として生成する $HOO-Fe^{III}P$ の高分子修飾による安定化について検討を行った。ラジカルのスピントラップの EPR スペクトルの測定結果から、 $HOO-Fe^{III}P$ の酸素-酸素結合がラジカル解裂することを明らかにした。 $HOO-Fe^{III}P$ のホモリスにより生じた $\bullet OH$ ラジカルは、メチル化シクロデキストリンが作るカプセルの中において $O=Fe^{IV}P$ と再結合する平衡によって安定化される ($HOO-Fe^{III}P \rightleftharpoons HO\bullet + O=Fe^{IV}P$, Scheme 3-5 過程 D)。この平衡により $\bullet OH$ ラジカルによるポルフィリン環の分解反応が抑制されるものと考えられる。カプセル内で安定化された $\bullet OH$ ラジカルはラジカル同士のカップリングにより消失する ($2HO\bullet + 2O=Fe^{IV}P \rightarrow 2O=Fe^{IV}P + H_2O_2$, Scheme 3-5 過程 E) と考えられる。その速度は $O=Fe^{IV}P$ が生成する反応の速度論から非常に速いことがわかった。高分子を修飾して hemoCD1 の分子間の反応を制限すると Scheme 3-5 の過程 E が抑制されるため $HOO-Fe^{III}P$ の状態が安定化されることが EPR スペクトルで測定結果から明らかとなった。高分子修飾で分子間反応を制御することによる不安定中間体の安定化は hemoCD1 以外の他の錯体においても適用できる可能性のある方法であろう。

5. 参考文献

1. (a) Davydov, R. M.; Yoshida, T.; Ikeda-Saito, M.; Hoffman, B. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10656-10657; (b) Garcia-Serres, R.; Davydov, R. M.; Matsui, T.; Ikeda-Saito, M.; Hoffman, B. M.; Huynh, B. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1402-1412; (c) Unno, M.; Chen, H.; Kusama, S.; Shaik, S.; Ikeda-Saito, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (44), 13394-13395; (d) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 42706-42710; (e) Ibrahim, M.; Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Kincaid, J. R.; Sligar, S. G., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13714-13718; (f) Mak, P. J.; Denisov, I. G.; Victoria, D.; Makris, T. M.; Deng, T.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6382-6383.
2. Watanabe, Y.; Nakajima, H.; Ueno, T., *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 554-562.
3. (a) Liu, J.-G.; Ohta, T.; Yamaguchi, S.; Ogura, T.; Sakamoto, S.; Maeda, Y.; Naruta,

- Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 9426-9431; (b) Tajima, K.; Tada, K.; Shigematsu, M.; Kanaori, K.; Azuma, N.; Makino, K., *Chem. Commun.* **1997**, 1069-1070; (c) Tajima, K.; Oka, S.; Edo, T.; Miyake, S.; Mano, H.; Mukai, K.; Sakurai, H.; Ishizu, K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1507-1508.
4. (a) Vaz, A. D. N.; McGinnity, D. F.; Coon, M. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3555-3560; (b) Ogliaro, F.; de Visser, S. P.; Cohen, S.; Sharma, P. K.; Shaik, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2806-2817; (c) Nakano, T.; Kakuda, H.; Shinoda, H.; Moriyama, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2013**, *86*, 620-627; (d) Boersma, M. G.; Primus, J.-L.; Koerts, J.; Veeger, C.; Rietjens, I. M. C. M., *Eur. J. Biochem* **2000**, *267*, 6673-6678.
5. Lente, G.; Fabian, I., *Dalton. Trans.* **2007**, 4268-4275.
6. Kano, K.; Kitagishi, H.; Kodera, M.; Hirota, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435-438.
7. (a) Fleischer, E. B.; Palmer, J. M.; Srivastava, T. S.; Chatterjee, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3162-3167; (b) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Kampas, F.; Kim, J., *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 2443-2445.
8. (a) Kruper, W. J.; Chamberlin, T. A.; Kochanny, M., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2753-2756; (b) Endo, M.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8660-8666.
9. Li, J.; Kao, W. J., *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1055-1067.
10. 桜井弘, *ESR スペクトルの実際*. 廣川書店: 東京, 1989.
11. (a) Verstraeten, S. V.; Lucangioli, S.; Galleano, M., *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 2305-2310; (b) Bilski, P.; Reszka, K.; Bilska, M.; Chignell, C. F., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1330-1338; (c) Jones, C. M.; Burkitt, M. J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 2044-2051.
12. (a) Leonard, S.; Gannett, P. M.; Rojanasakul, Y.; Schwegler-Berry, D.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; Shi, X., *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *70*, 239-244; (b) Stan, S. D.; Daeschel, M. A., *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4906-4910.
13. Lawrence, A.; Jones, C. M.; Wardman, P.; Burkitt, M. J., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29410-29419.
14. (a) Kano, K.; Kitagishi, H.; Kodera, M.; Hirota, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435-438; (b) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Kodera, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448-4460; (c) Kano, K.; Kitagishi,

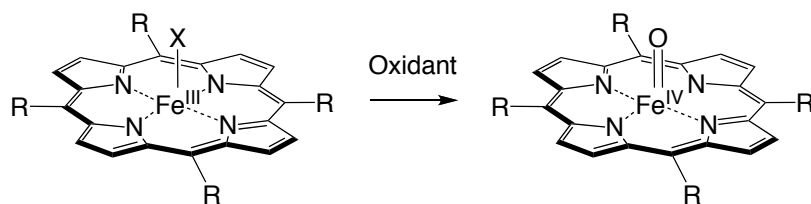
- H.; Tamura, S.; Yamada, A., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202-15210.
15. Harris, F. L.; Toppen, D. L., *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 71-73.
16. 日本化学会生体機能関連化学部会編, *生体機能関連化学実験法*. 化学同人: 京都, 2003.
17. Kano, K.; Ochi, T.; Okunaka, S.; Ota, Y.; Karasugi, K.; Ueda, T.; Kitagishi, H., *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2946-2955.
18. Shikama, K., *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1357-1374.
19. (a) Collman, J. P.; Zhang, X.; Wong, K.; Brauman, J. I., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6245-6251; (b) Zingg, A.; Felber, B.; Gramlich, V.; Fu, L.; Collman, J. P.; Diederich, F., *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 333-351.
20. Kano, K.; Kitagishi, H.; Kodera, M.; Hirota, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435-438.

第四章 鉄(IV)オキソポルフィリンからの分子内酸素移動反応

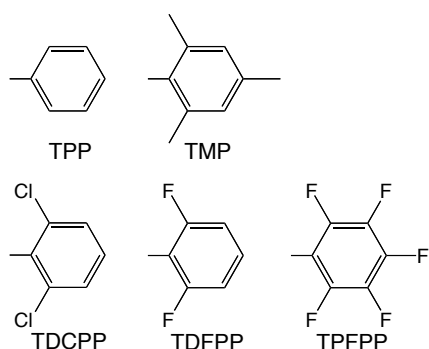
1. 緒言

高原子価鉄オキシ種は生体内酸化反応において非常に重要な酸化活性種で、ペルオキシダーゼ、シトクロム P450、カタラーゼなどさまざまなヘム酵素において見られる活性種である。ヘム酵素において高原子価鉄オキシ種は 2 種類存在しており、Cpd I と呼ばれる鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル ($O=Fe^{IV}P^+$)と Cpd I が一電子還元された状態の Cpd II と呼ばれる鉄 4 価オキソポルフィリン ($O=Fe^{IV}P$)である。生体内においてはシトクロム P450 やペルオキシダーゼの Cpd I が C-H 結合の水酸化反応やアルケンのエポキシド化などの酸化反応を行う¹⁾。Cpd I が行う酸化反応は合成化学的にも重要な反応であることから、これまでにペルオキシダーゼやシトクロム P450 の Cpd I に関する研究や Cpd I に類似した高原子価鉄ポルフィリン π -カチオンラジカルを中間に経る酸化触媒の研究が行われてきた²⁾。一方でもう一つの高原子価鉄オキシ種の Cpd II やそのモデルの $O=Fe^{IV}P$ は Cpd I よりも酸化力が弱く酸化酵素のモデル系の研究において Cpd I ほど注目されることが少なかった。Cpd II のモデルである $O=Fe^{IV}P$ に注目した研究について以下に紹介する。用いられたポルフィリンの構造を Scheme 4-1 に示す。Bruce らは水中において μ -オキソダイマーを形成しない *meso*-tetrakis(2,6-dimethyl-3-sulfonatophenyl)porphyrinatoiron(III) と *t*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) との反応により $O=Fe^{IV}P$ を合成し、一電子酸化基質である ABTS(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))との反応について検討を行っている³⁾。Smith らは水中においてさまざまな水溶性アリルポルフィリン鉄(III)錯体と *t*-BuOOH や過硫酸カリウム(MPS)との反応により $O=Fe^{IV}P$ を合成している⁴⁾。また、Groves らはジクロロメタン中で $Fe^{III}TMP(TMP: 5,10,15,20-tetramesitylporphyrine dianion)$ と過塩素酸鉄(III)との反応により $(ClO_4)_2Fe^{III}(TMP^+)$ を調整し、水を含んだアルミナカラムを通すことにより、 $O=Fe^{IV}TMP$ を単離し、単離した $O=Fe^{IV}TMP$ とスチレンの反応について検討を行っている⁵⁾。他にも、様々な電子求引性置換基を修飾したポルフィリン誘導体の Cpd II が合成されている⁶⁾。水中の系ではメソ位にメチルピリジニウム基やハロゲン化フェニル基の

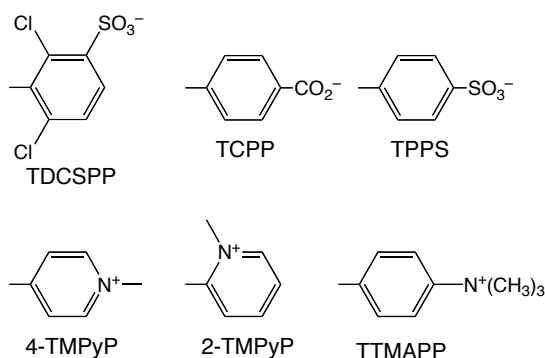
Ueda, T.; Kitagishi, H.; Kano, K. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 543-551.



in organic solvent



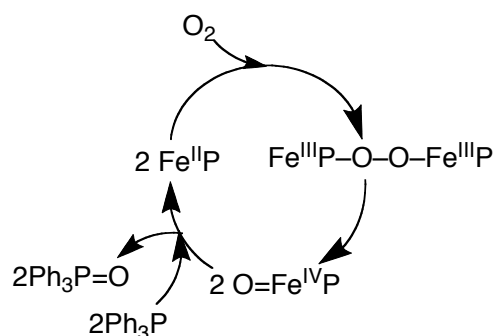
in aqueous solution



Scheme 4-1. Structures of Cpd II models, oxoferryl porphyrins.

ような電子欠乏性の置換基を持つ水溶性ポルフィリンに対し、 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ の生成が確認されている^{4,7}。一般的に Cpd II は、一電子酸化することで最安定な酸化状態である鉄(III)の休止状態へと戻る。Cpd II による反応で知られた反応は主に電子移動による一電子酸化が多い^{1d,8}。Cpd II からの酸素移動はスルフィドのカチオンラジカルへの Oxygen rebound のみである^{1d,2d}。 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ から直接酸素移動のような二電子酸化を行った場合、鉄(IV)ポルフィリン自身は二電子還元されるため鉄(II)ポルフィリン($\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}$)を生成するはずである。

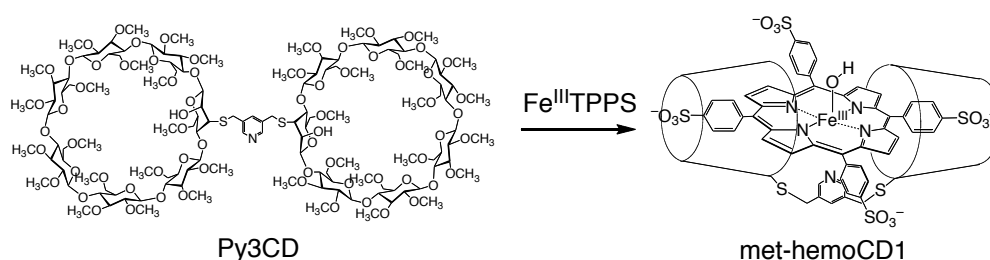
Cpd II や $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ からの直接酸素移動に関する報告は数例しかない。Balch ら⁹は $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPP}$ (TPP: 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin dianion) を用いて酸素を酸化剤としてトリフェニルホスフィン (Ph_3P) をトリフェニルホスフィンオキシド ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$) に触媒的に酸化している (Scheme 4-2)。この反応では 2 分子の鉄(II)ポルフィリン($\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}$) が酸素と反応す



Scheme 4-2. Proposed mechanism of direct oxygen transfer from oxo-iron(IV) porphyrin⁹.

ることで μ -パーオキシダイマー($\text{PFe}^{\text{III}}\text{-O-O-Fe}^{\text{III}}\text{P}$)を形成し、この酸素-酸素間の結合がホモリティックに切断されることで2分子の $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が生成すると考えられている。 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が Ph_3P に直接酸素移動することで $\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}$ を形成して触媒的に反応が進行する。他には、Nam らによるオレフィンのエポキシ化の報告例がある¹⁰⁾。Newcomb らは、2分子の $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が不均化することで $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}^+$ と鉄(III)ポルフィリン($\text{Fe}^{\text{III}}\text{P}$)が生じ、この $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}^+$ が酸素添加などの酸化反応を行うという新しい説を提唱している¹¹⁾。さらに *m*-クロロ安息香酸(*m*CBA)などの酸触媒により $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ の不均化が加速されることを報告している¹²⁾。もし Newcomb らの説が正しければ、 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ の反応における真の酸化活性種は $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}^+$ であるため、 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ による酸素添加反応例は全くないことになる。上述の Groves らは単離した $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{TMP}$ の反応も不均化により $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{TMP}^+$ が生成するメカニズムについて言及している⁵⁾。また、これまでの多くのモデル系の反応は酸化活性種を作るために用いた酸化剤が過剰に存在する条件で行われている。このような反応条件では、酸化活性種のための反応ではなく酸化剤と活性中間体の反応に由来する副反応も起こるため、同じ鉄ポルフィリンを用いても酸化剤によって基質との反応性や生成物が異なる可能性を排除できない¹³⁾。酸化活性種そのものの反応性を見るためには、Groves らが行ったようにカラムクロマトグラフィなどの方法で活性種を作るために用いた過剰の酸化剤を取り除く必要がある。

Kano らによって開発された超分子ヘムタンパク質モデルの hemoCD1 (Scheme 4-3)は水溶性鉄ポルフィリン($\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}$)とパー-*O*-メチル化- β -シクロデキストリンをピリジンリンカーで連結した二量体(Py3CD)の超分子包接錯体である¹⁴⁾。



Scheme 4-3. Structures of Py3CD and met-hemoCD1.

第二章で鉄(III)の met-hemoCD1 と過酸化水素を反応させるとヘム酵素の Cpd 0 に対応する鉄(III)ヒドロペルオキシ種($\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$)を経て、Cpd II に対応する $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ が生成することを明らかにした。生成した $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ は比較的長時間安定に存在することがわかっている。また hemoCD1 の構成分子である Py3CD は分

子内にスルフィド結合や *O*-メチル基が存在しており、これらの置換基は酸化酵素モデル反応において基質とされる。そのため hemoCD1 の分子内に存在するスルフィド結合は hemoCD1 が触媒する酸化反応を研究するための有用な内部基質になると考えられる。そこで本研究では、酸化活性種としての $O=Fe^{IV}P$ の反応性について検討するために、まず oxoferryl-hemoCD1 ($O=Fe^{IV}P$) の精製を試みた。さらに精製した oxoferryl-hemoCD1 の安定性や分子内のスルフィド結合との反応性について検討を行った。

2. 実験

2-1. 測定機器

紫外可視吸収スペクトルは島津製作所製ホトダイオードアレイ分光光度計 MultiSpec-1500 を用いて測定した。水溶液の pH は堀場製作所製 pH メータ F52 を用いて測定した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は和光純薬工業製逆相シリカゲルカラム Wakosil-II 5C18AR (4.6 × 250 mm)を取り付けた GE Healthcare HPLC システム ÄKTApurifier を用いて分析および分取を行った。ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)は日本分析工業製 GPC カラム JAIGEL GS-310 を取り付けた日本分析工業製リサイクル分取 HPLC システム LC-9201 を用いて分取を行った。核磁気共鳴(NMR)スペクトルは日本電子製フーリエ変換核磁気共鳴装置 JNM-ECA500 (500 MHz)を用いて測定し、テトラメチルシラン(TMS)を内部基準として用いた。高速原子衝撃イオン化(FAB)法による質量分析は日本電子製二重収束質量分析計 JMS-700 を用いて測定した。エレクトロスプレーイオン化(ESI)法による質量分析は日本電子製飛行時間型質量分析計 JMS-T100CS を用いた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法による質量分析は Bruker Daltonics 製飛行時間型質量分析計 autoflex speed を用いて、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして測定した。赤外(IR)スペクトルは島津製作所製フーリエ変換赤外分光光度計 IR Prestige-21 を用いて測定した。電子スピン共鳴(EPR)スペクトルは RCM 製ヘリウムフロー型クライオスタット CT-470-ESR を取り付けた日本電子製 ESR 分光器 JES-TE200 (X-band)を用いて測定した。

2-2. 試薬および合成

Py3CD^{14a)}およびFe^{III}TPPS¹⁵⁾は文献記載の方法に従って合成した。その他の試薬は市販品をそのまま用いた。¹⁸Oラベル酸素ガスはISOTEC製(99 atom% ¹⁸O)をそのまま用いた。過酸化水素は和光純薬製精密分析用試薬、クメンヒドロペルオキシド(CHPO)はAlfa Aesar製試薬をそれぞれそのまま用いた。¹⁸O-ラベルCHPOの合成は本章2-2-3に示す方法で行った。Py3CDおよびFe^{III}TPPSはpH 7.0の0.05 Mリン酸緩衝溶液に溶かしストック溶液を調整した。met-hemoCD1の溶液は、Py3CDとFe^{III}TPPSを1:1となるよう混合して調整した。過酸化水素は第二章に記した方法で、CHPOは本章2-2-1に示す方法によりそれぞれ濃度決定を行い測定に用いた。

2-2-1.クメンヒドロペルオキシド(CHPO)の濃度決定

ヨウ素滴定により濃度決定した¹⁶⁾。ヨウ素滴定は、100 mLのナス型フラスコに30 mLの2-メチル-2-プロパノール、ヨウ化ナトリウム200 mg、酢酸1 mLおよび濃度未知のCHPO 10 μLを加え5分間加熱還流した。反応後、遊離したヨウ素を0.01 Mのチオ硫酸ナトリウム水溶液を用いて滴定した。過酸化物の濃度C (M)は次式により求めた。ここで、V (mL)は滴定に用いたチオ硫酸ナトリウム水溶液の量を表す。

$$C \text{ (M)} = 0.01 \text{ (M)} \times V \text{ (mL)} / (2 \times 10 \text{ (}\mu\text{L)}) \quad (4-1)$$

2-2-2.反応後のシクロデキストリン成分の分析

過酸化水素やCHPOとmet-hemoCDとの反応後の溶液に対し、CHCl₃を加えPy3CD成分の抽出を行った。有機層を減圧留去して得られた残渣を質量分析およびHPLC分析を行った。ESI-TOF MSの分析に用いるサンプルは0.1 mMの酢酸ナトリウムを含む水/メタノール(1:1)の溶液に溶かして、シリンジフィルター(0.45 μm, hydrophilic cellulose acetate, DISMIC-25CS, Advantec)によりろ過して作製した。ESI-TOF MSはポジティブモードで測定した。HPLCの分析に用いるサンプルはMilli-Q水に溶かしシリンジフィルター(0.45 μm, hydrophilic cellulose acetate, DISMIC-25CS, Advantec)によりろ過して作製した。HPLCは逆相HPLC用カラム(Wakosil 5C18AR 4.6 × 250 mm, Wako)を用いて、0.1%TFAを含む水/アセトニトリルのグラジエント溶出により分析した。検出波長を254 nmとしてクロマトグラムを記録した。

2-2-3. ^{18}O ラベル化クメンヒドロペルオキシド(CHPO)の合成¹⁷⁾

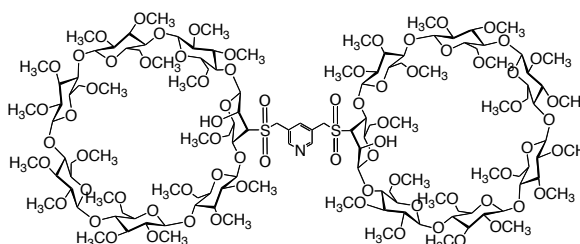
50 mL のシュレンク型反応容器にクメン 1.0 g (8.3 mmol)を加え、反応容器内を酸素($^{18}\text{O}_2$)置換し、88 °C で 48 時間かき混ぜた。反応後、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル 1:0 → 10:1)により精製し、無色透明の油状生成物を得た。得られた CHPO の濃度は本章 2-2-1 の方法により決定した。

収量 0.29 g (1.9 mmol)、収率 22%

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48-7.46 (m, 2H), 7.40-7.37 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.32-7.29 (m, 1H), 1.62 (s, 6H). IR 3396, 806 cm^{-1} . MS (FAB, glycerol) m/z 137 (calcd for $[\text{M}-\text{OH}]^+$: 137).

2-2-4.スルホニル化 Py3CD (Py3CD-SO₂)の合成 (Scheme 4-4)

50 mL のナス型フラスコに Py3CD 100 mg (34 μmol)および水/メタノール(1:1)の混合溶液 20 mL を加えた。反応容器を氷浴で冷却し、Oxone[®] 124 mg (0.2 mmol)を加えた。室温に戻して、30 分間溶液をかき混ぜた。反応後、反応溶液



Scheme 4-4. Structure of Py3CD-SO₂.

を分液ロートに移し、水を 10 mL 加えた。生成物をジクロロメタン(30 mL × 3)で抽出した。有機層をまとめて無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥させた。溶媒を減圧留去して得られた残渣をメタノールを溶出溶媒とする GPC (JAIGEL GS-310)を行い、単離精製することで無色固体生成物を得た。

収量 83 mg、収率 81%

^1H NMR(500 MHz, CDCl_3): δ 8.76 (s, 2H), 8.09 (s, 1H), 5.41 – 5.07 (m, 14H), 4.80 – 3.20 (m, 206). MS (MALDI-TOF, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 3023.3; found 3023.3. Elemental analysis (%) for $\text{C}_{129}\text{H}_{221}\text{NO}_{72}\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 50.10; H, 7.53; N, 0.45; found: C, 49.93; H, 7.26; N, 0.53.

3. 結果および考察

3-1. 内部基質としてのシクロデキストリンダイマー

met-hemoCD1 を構成するシクロデキストリン成分の Py3CD は分子内にスルフィド結合や *O*-メチル基を有する。これらの官能基はヘム酵素モデル反応において用いられる基質の酸化される部分である。それぞれ酸化されることでスルフィド結合はスルホキシド化、*O*-メチル基は脱メチル化することが知られている⁸⁾。そこでまず met-hemoCD1 と過酸化水素との反応により $O=Fe^{IV}P$ が生成した後のシクロデキストリン成分の Py3CD の構造の変化を調べることで Py3CD のスルフィド結合や *O*-メチル基が内部基質として働くか検討を行った。pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中の met-hemoCD1 (5×10^{-4} M) に過酸化水素を 5 当量および 20 当量加え、3 時間後、クロロホルムを用いてシクロデキストリン成分を抽出した。抽出したシクロデキストリン成分はそれぞれ ESI-TOF MS により質量分析を行った。その結果を Figure 4-1 に示す。過酸化水素と反応した後の hemoCD1 の溶

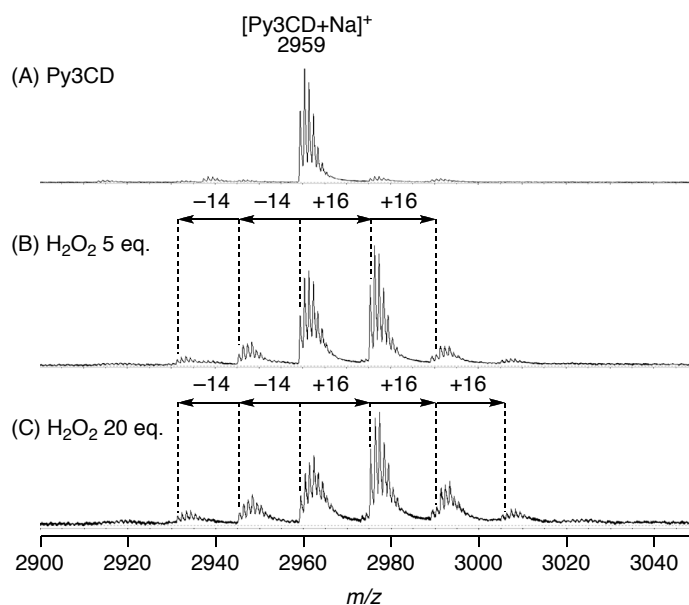


Figure 4-1. ESI-TOF MS spectra of the sample before (A) and after the reaction of met-hemoCD1 (5×10^{-4} M) with H_2O_2 (B, C) under air for ca. 3 h. The Py3CD components were extracted with $CHCl_3$ from the met-hemoCD buffer solution without H_2O_2 (A) and from the reaction mixture (B, C).

液から抽出した Py3CD は元のナトリウム付加体の質量(m/z 2959, [Py3CD+Na]⁺)から+16ずつシフトしたところおよび-14シフトずつしたところに質量ピークが観測された。 $\Delta m/z$ +16のシフトは酸素原子1つ分の質量に対応することから、Py3CDに対して1つの酸素原子が挿入されたことを示唆する。また $\Delta m/z$ -14のシフトはO-メチル基(-OCH₃)が水酸基(-OH)へ置き換わったことに対応する質量差であることから、脱メチル化が進行したことを示唆する。これらの結果はPy3CDに存在する官能基が酸化反応の基質として機能していることを示す。しかし、この反応においては酸化剤を過剰に加えた状態で反応を観察しているため、O=Fe^{IV}Pの反応のみではなく、O=Fe^{IV}Pと過酸化水素との反応で生じるヒドロキシラジカル(\bullet OH, 第二章参照)が関与した反応も起こり得る。酸化活性種としてのO=Fe^{IV}Pの反応を観測するためにはO=Fe^{IV}Pを過剰の酸化剤から分離してその反応を調べる必要がある。

3-2. 鉄(IV)オキソポルフィリン(O=Fe^{IV}P)の調整

第二章において、過酸化水素を酸化剤として用いることで、O=Fe^{IV}Pであるoxoferryl-hemoCD1が生成することを明らかにしている。シクロデキストリンダイマー(Py3CD)で鉄(III)ポルフィリンを包接することによりO=Fe^{IV}Pを生成する時に生じる高活性なヒドロキシラジカル(\bullet OH)によるポルフィリンの分解反応が抑制されると推論した。しかし、 \bullet OHは反応性が高いため、Py3CDで包接した状態であってもわずかにポルフィリン環の分解が進行してしまう(第二章Figure 2-7)。met-hemoCD1濃度の違いによる分解の起こりやすさを比較した。室温のpH 7.0リン酸緩衝液中での低濃度(1×10^{-5} M)および高濃度(5×10^{-4} M)のmet-hemoCD1と過酸化水素との反応における吸光度変化を測定した。O=Fe^{IV}Pの生成を示す558 nmにおける吸光度変化をFigure 4-2に示す。低濃度のmet-hemoCD1の反応において反応開始後500秒の間では、ほとんど見られなかったポルフィリン環の分解反応がhemoCD1の濃度が高い条件では分解に起因する吸光度の減少が顕著に見られた。

そこで鉄(III)ペルオキシ錯体(ROO-Fe^{III}P)の酸素-酸素間の結合のホモリシスにより、高活性な \bullet OHを生じないアルキルヒドロペルオキシドを用いてO=Fe^{IV}Pの生成を試みた。室温のpH 7.0の0.05 Mリン酸緩衝液中でmet-hemoCD1(1×10^{-5} M)に20当量のクメンヒドロペルオキシド(CHPO)を加えて、その吸収スペクト

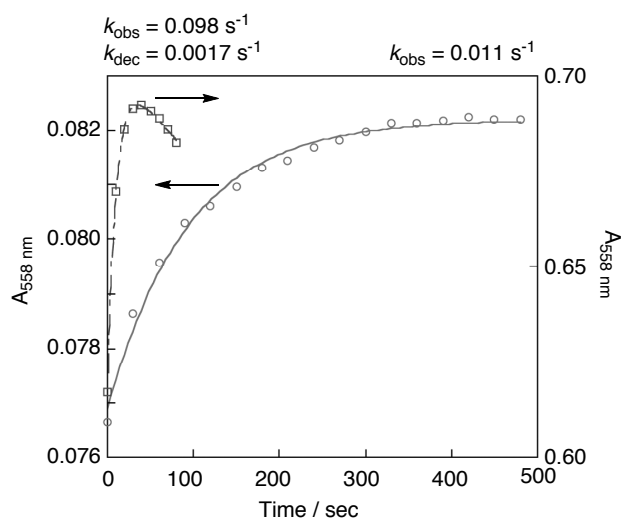


Figure 4-2. Changes of the absorbance at 558 nm due to oxoferryl-hemoCD1 in the reactions of met-hemoCD1 with H_2O_2 ; round plot: $[\text{met-hemoCD1}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, square plot: $[\text{met-hemoCD1}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$. The data were analyzed using the single-exponential (solid line) and double-exponential equations (broken line).

ルの変化を観測した。CHPO を酸化剤に用いた met-hemoCD1 の反応の経時変化を Figure 4-3 に示す。met-hemoCD1 に由来する 416 および 572 nm の吸収スペクトルはアルキルヒドロペルオキシドを加えると吸光度の上昇を伴い $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ の生成を示唆する 422 および 558 nm の吸収スペクトルへと変化した。この結果より met-hemoCD1 から生じる $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ の安定性は用いる酸化剤によりわずかに異なり、アルキルヒドロペルオキシドを用いることでポルフィリンの分解が顕著に抑制された。そこで以下の実験では酸化剤として CHPO を主として用いた。

次に、oxoferryl-hemoCD1 を過剰の酸化剤やその分解物から分離することを試みた。ここでミオグロビン¹⁸⁾や hemoCD^{14b, 19)}などの鉄(II)錯体を単離精製する際に用いるゲルろ過法を参考にした。ゲルろ過の担体は架橋デキストランで構成されており、水などの溶媒で膨潤させると分子サイズの空洞ができる。分子サイズの異なる化合物が含まれる混合物をゲルろ過カラムに流した場合、排除限界を超える大きなサイズの分子はカラムを素通りして溶出する。しかし、小さい分子サイズの化合物の場合はゲルろ過担体の空洞内を分子が拡散しながら溶出するため、分子のサイズにより化合物の溶出容量に差が生じる²⁰⁾。それによ

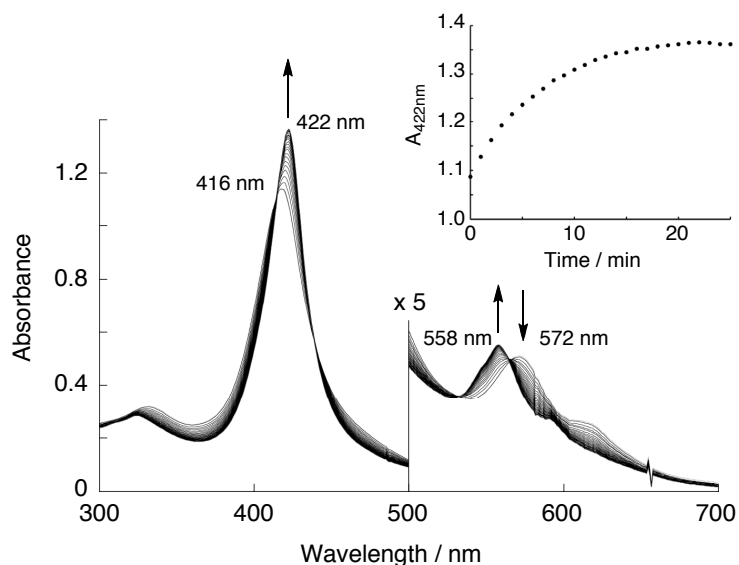


Figure 4-3. UV-vis spectral changes in the reaction of met-hemoCD ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TTPPS}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Py3CD}] = 1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) with CHPO ($2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. Spectra were recorded at time intervals of 1 min. The inset is the progressive absorbance change at 422 nm.

ってタンパクなどの大きい分子と還元剤などの小さい分子を分離することができる。

従来、hemoCD1 の鉄(II)錯体の調整は次の手順で行っている。すなわち鉄(III)錯体の met-hemoCD1 溶液に過剰量の還元剤 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加えて鉄(III)から鉄(II)の hemoCD1 へと還元する。鉄(II)錯体の溶液を Sephadex G25 を充填したゲルろ過カラム(Sephadex G25, HiTrap™ Desalting 5 mL, GE Healthcare)にすばやく通すことで過剰に存在する $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ およびその分解物を取り除くことができ、鉄(II)錯体のみを含む溶液を分離している。

この方法を参考にして、次に示す方法により過剰に加えた酸化剤を直ちに取り除いた。まず、met-hemoCD1 ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TTPPS}] = [\text{Py3CD}] = 0.5 \text{ mM}$)の pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝溶液 0.1 mL に 20 当量の CHPO のメタノール溶液(0.5 M, 2 μL)を加えた。10 秒以内に溶液の色は茶色から赤色に変化した。この溶液をゲルろ過カラム(Sephadex G25, HiTrap™ Desalting 5 mL, GE Healthcare)に充填し、pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液で溶出し、色をついた溶液(約 1 mL)を集めた。O=Fe^{IV}P と CHPO およびその分解物の分離はカラムを HPLC システムに接続してそのクロマトグラムから確認した(Figure 4-4)。なおゲルろ過カラムにより精製されたこの

溶液を **Sample A** とする。得られた **Sample A** を希釈して吸収スペクトルを測定したところ 422 および 558 nm の oxoferryl-hemoCD1 に特徴的な吸収が観測されたことから O=Fe^{IV}P の状態で精製・分離できたことを確認した(Figure 4-5)。また oxoferryl-hemoCD1 の濃度は 422 nm における吸光度($\epsilon_{\max} = 1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)から決定した。

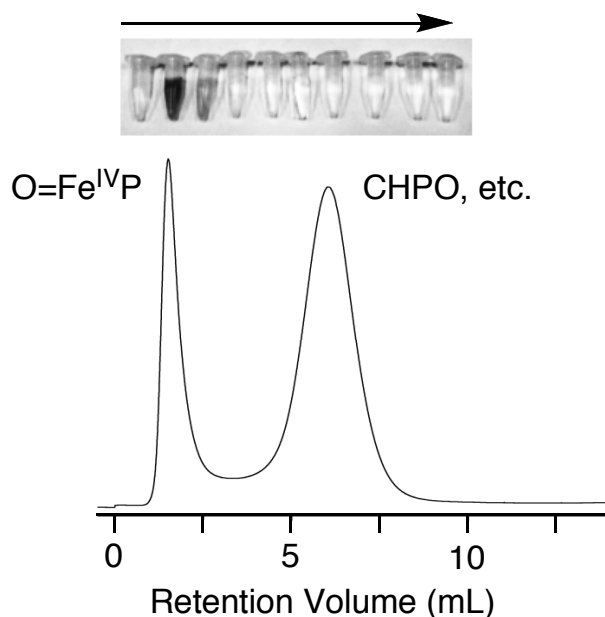


Figure 4-4. Gel-filtration trace of Sample A. The sample was eluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Chromatogram was monitored at 254 nm.

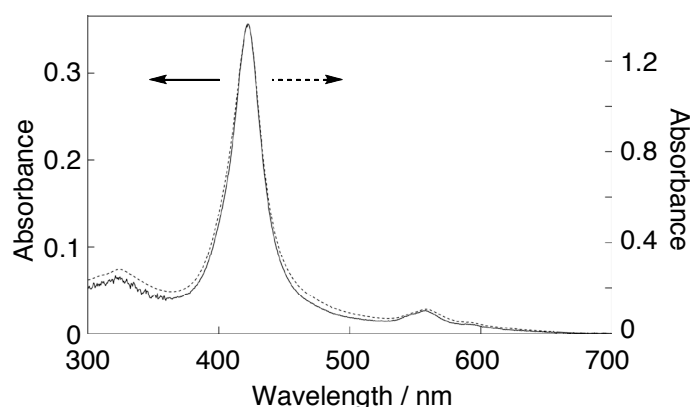


Figure 4-5. UV-vis spectra of oxoferryl-hemoCD1 purified by gel-filtration column (solid line) and a reaction mixture of met-hemoCD1 with CHPO (dashed line).

3-3. 鉄(IV)オキソポルフィリン($O=Fe^{IV}P$)による酸素移動反応

酸化剤を分離し、精製した $O=Fe^{IV}P$ の溶液 **Sample A** を空気飽和の pH 7 のリン酸緩衝液で希釈し室温における $O=Fe^{IV}P$ の安定性を吸収スペクトルの変化から検討した。その結果を Figure 4-6(A)に示す。 $O=Fe^{IV}P$ 由来の吸収スペクトルは徐々に変化し、約 1 時間で 422 および 544 nm に極大吸収を持つ化学種に変化した。ここで、この 422 および 544 nm に吸収を持つ溶液を **Sample B** とする。これまでに報告されている hemoCD1 の極大吸収波長^{14a, 19)}から、**Sample B** は鉄(II)酸素錯体($O_2-Fe^{II}P$, oxy-hemoCD1)であることが示唆された。生成した化学種が鉄(II)錯体であることを確認するために、鉄(II)錯体にのみ強く配位する一酸化炭素(CO)を加えてその吸収スペクトルの変化を観測した。鉄(II)の hemoCD1 の CO 親和性は非常に高く、CO 錯体($CO-Fe^{II}P$)を生成すると 422 nm に特徴的な鋭い吸収を示す¹⁴⁾。**Sample B** のスペクトルは、CO を加えたことにより速やかに $CO-Fe^{II}P$ の生成を示す鋭いスペクトルへと変化した(Figure 4-6(B))。この変化から $O=Fe^{IV}P$ の反応で観測された化学種が $O_2-Fe^{II}P$ であることが明らかとなった。しかし、 $O=Fe^{IV}P$ の全てが $CO-Fe^{II}P$ に変化したのであれば CO を導入した時のスペクトル変化はもっと大きくなると考えられ、副生成物として鉄(III)錯体が生じていると推定される。そこで全ての鉄錯体を CO 雰囲気下で還元剤である $Na_2S_2O_4$ により処理し、全鉄ポルフィリンを鉄(II)の $CO-Fe^{II}P$ へと変換することにより、その吸光度変化から全鉄ポルフィリン量を決定し、その結果から $O=Fe^{IV}P$ の自発的反応での鉄(II)錯体と鉄(III)錯体の生成割合を見積もった。 $O=Fe^{IV}P$ から鉄(II)錯体に変化した割合は 49%であった。残りの 51%が鉄(III)錯体の met-hemoCD1 ($HO-Fe^{III}P$)であることを確認するために、 $O_2-Fe^{II}P$ と $HO-Fe^{III}P$ のスペクトルを 49:51 の割合で足し合わせたスペクトルと **Sample B** の吸収スペクトルを比較した(Figure 4-7)。その結果、2 つのスペクトルが一致したため **Sample B** 中には $O_2-Fe^{II}P$ と $HO-Fe^{III}P$ がほぼ 1:1 の比で存在していることがわかった。

oxoferryl-hemoCD1 の反応で観測された反応は、 $O=Fe^{IV}P$ から $O_2-Fe^{II}P$ へと変化する反応であった。これまでに $O=Fe^{IV}P$ から $O_2-Fe^{II}P$ が生成する反応としては、HRP の Cpd II が過剰に存在する過酸化水素と反応することで Cpd III ($O_2-Fe^{II}P$)を生成することが報告されている²¹⁾。しかし、今回の系では過剰の過酸化水素による影響を取り除いているために、HRP について報告されているような Cpd III が生成するメカニズムは考えられない。

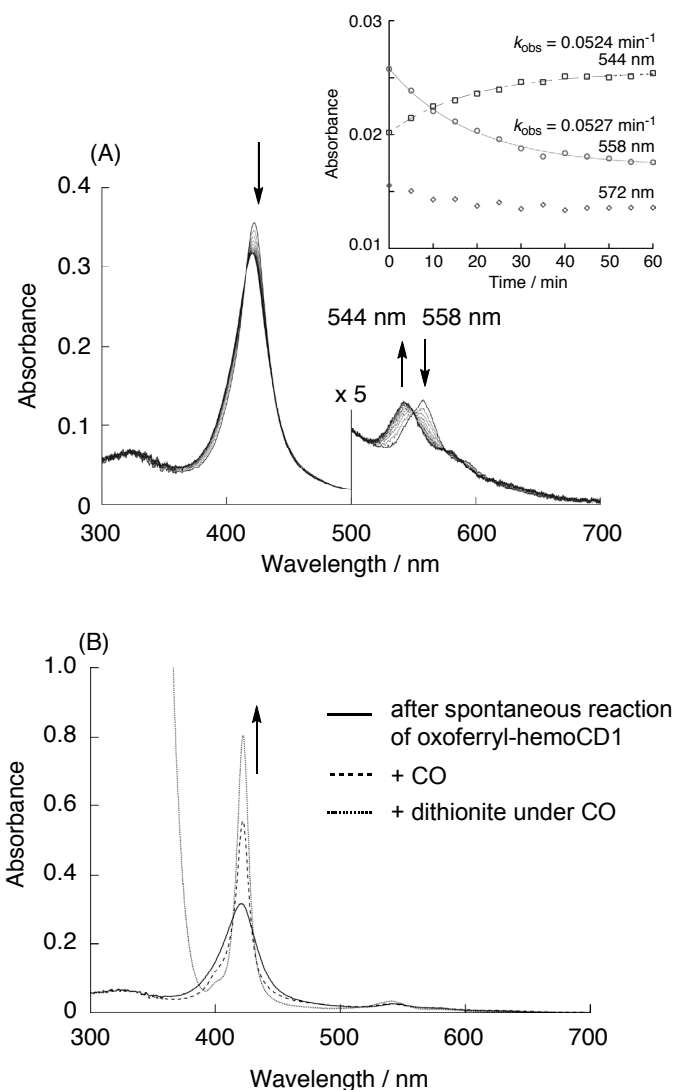


Figure 4-6. UV-vis spectral changes in the spontaneous reaction of oxoferryl-hemoCD1 (2×10^{-6} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C (A) and UV-vis spectral changes of the reaction mixture of oxoferryl-hemoCD1 upon changing the atmosphere from air to CO (B). Spectra in (A) were recorded at time intervals of 5 min. The inset is the progressive changes in absorbance at 542 nm (oxy-ferrous complex), 558 nm (oxo-ferryl complex), and 572 nm (ferric complex). The solid lines are the theoretical curves for the first-order kinetics. The dashed line spectrum in (B) was taken after standing the oxoferryl-hemoCD1 solution for 1 h and then introducing CO gas into the reaction mixture. The dotted line spectrum in (B) was measured by adding excess $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ into the sample showing the dashed line spectrum under a CO atmosphere.

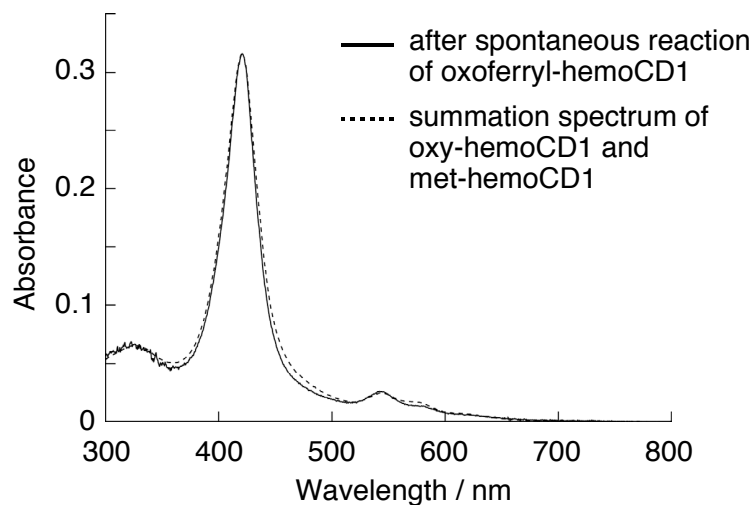


Figure 4-7. UV-vis spectra of the sample after spontaneous reaction of oxoferryl-hemoCD1 (solid line), and the summation spectrum of oxy-hemoCD1 and met-hemoCD1 (49:51) (dashed line).

oxoferryl-hemoCD1 の反応は中心鉄が 4 価から 2 価へと二電子還元されていることから、系中 $O=Fe^{IV}P$ による二電子酸化が進行していると考えられる。この反応では外部基質を加えていないため hemoCD1 の分子内で二電子酸化反応が起こっている可能性がある。そこで反応の前後における hemoCD1 の構造の変化を調べるために **Sample A** および **Sample B** の溶液をそれぞれクロロホルムにより抽出を行い、シクロデキストリン成分とポルフィリン成分に分離して分析を行った。ポルフィリン成分は $Fe^{III}TPPS$ の吸収スペクトルや質量ピークが観測されたので、 $O=Fe^{IV}P$ の自発的反応において、ポルフィリン配位子が変化するという反応は見られなかった。シクロデキストリン成分を ESI-TOF MS により分析を行った。その結果を Figure 4-8(A), (B) に示す。反応直後にゲルろ過により精製した **Sample A** ではシクロデキストリン成分である Py3CD ($m/z = 2959$) に大きな変化は見られなかったが、 $O=Fe^{IV}P$ を 1 時間反応させた後の **Sample B** の質量スペクトルは元の Py3CD のピークから +16 シフトしたピーク ($m/z = 2975$) のピーク強度の増加が観測された。この結果から $O=Fe^{IV}P$ から $O_2-Fe^{II}P$ が生成する反応においてシクロデキストリン成分(Py3CD)への酸素化が起こっていることが示された。次にこの酸素の酸素源について検討するために ^{18}O -ラベル CHPO を用いて反応の検討を行った。met-hemoCD1 ($[Fe^{III}TPPS] = [Py3CD] = 0.5 \text{ mM}$) の pH 7.0 のリン酸緩衝溶液(0.05 M) 0.1 mL に 20 当量の ^{18}O -CHPO のメタノール溶液(0.5 M,

2 μL)を加えた。溶液の色の変化(10秒以内)を確認し、この溶液を直ちにゲルろ過カラム(Sephadex G25, HiTrap™ Desalting 5mL, GE Healthcare)に充填し、pH 7.0のリン酸緩衝液(0.05 M)で溶出し、色のついた溶液(1 mL)を集めた。ゲルろ過精製により得られた溶液を **Sample A(^{18}O)**とする。この **Sample A(^{18}O)**をそのまま1時間室温で静置することで **Sample B(^{18}O)**を得た。**Sample A(^{18}O)**および **Sample B(^{18}O)**からクロロホルムにより抽出を行い、シクロデキストリン成分の質量分析を行った。その結果を Figure 4-8(C), (D)に示す。元の Py3CD の質量ピークから +18 シフトした($m/z = 2977$)にピークが観測された。この結果は鉄(IV)オキシの酸素原子が Py3CD に移動したことを示している。ここでも過剰の酸化剤は取り除いているので酸化剤が直接反応したことに由来する ^{18}O である可能性はない。ま

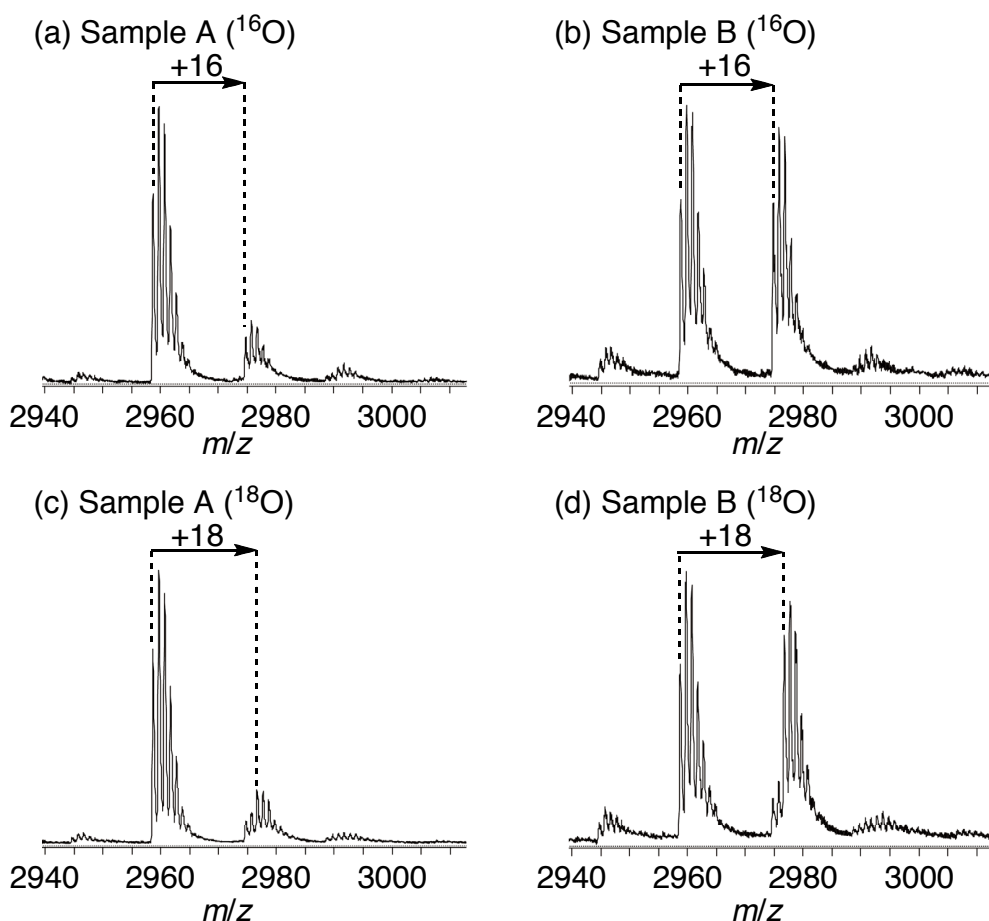


Figure 4-8. ESI-TOF MS spectra of the CHCl_3 extracts of Samples A (a, b) and B (c, d) obtained from the reactions of met-hemoCD1 with ^{16}O -CHPO and ^{18}O -CHPO.

た、 $O=Fe^{IV}P$ の鉄オキシの酸素は系中の水と置き換わることが知られている^{13a,22)}。今回の系で、 ^{18}O の導入率を酸素化されたピークの同位体分布から見積もったところ74%であった(Figure 4-9)。用いた CHPO の ^{18}O の導入率が86.7%であるので、Py3CD に導入された酸素原子の85%が鉄オキシ由来の酸素であることがわかった。この結果から系中の水分子との酸素原子の交換はほとんど起こっていないことが明らかとなった。鉄オキシの酸素原子が Py3CD に移動することで oxoferryl-hemoCD 自身は二電子還元されていると考えられる。

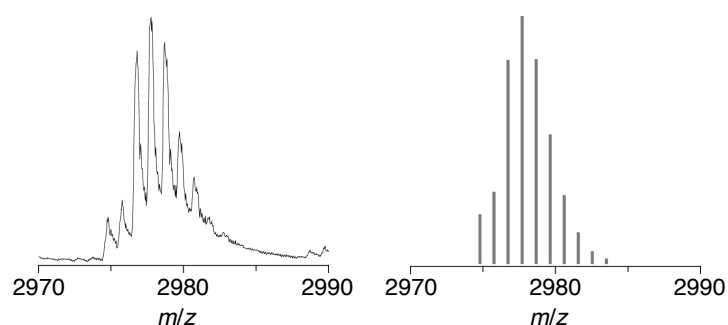


Figure 4-9. Simulated isotope mass spectrum of Figure 4-8. Simulated spectrum was obtained by assuming 26% ^{16}O and 74% ^{18}O for O-introduced Py3CD.

Py3CD の酸素化位置はリンカーに存在するスルフィド結合である可能性が最も高い。他の位置が酸素化されることは考えにくい。例えば、シクロデキストリンの *O*-メチル基($-OCH_3$)が水酸化された場合アセタール($-OCH_2OH$)となる。アセタールは不安定でホルムアルデヒドとして脱離するので脱メチル化が起こる。観測されるピークは-14 シフトしたピークとして観測されるはずである。ほかに酸素化が考えられる位置は配位子のピリジンの窒素が *N*-オキシド化されることであるが、この場合には鉄ポルフィリンへの配位能が変化してしまうため酸素錯体ができなくなる。また質量分析の結果から Py3CD への酸素化は最大二箇所で行われることがわかっているため、酸素化の位置がピリジンの窒素である可能性は低い。スルフィドが酸化されたことを直接確認するために IR スペクトルを測定して $S=O$ 伸縮振動($\nu_{S=O}$)の確認を試みたが、 $\nu_{S=O}$ は $1060 \sim 1040 \text{ cm}^{-1}$ の指紋領域にピークが現れる²³⁾。しかし、この領域にはアルコールの $C-OH$ 伸縮振動(ν_{C-OH})が $1250 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 、エーテルの $C-O-C$ 伸縮振動(ν_{C-O-C})が $1150 \sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ にピークが現れる²³⁾。そのため、ピークが複雑に重なり $\nu_{S=O}$ のピークを確認することができなかった。

そこで、Py3CD のスルフィド結合をスルホンに酸化した Py3CD-SO₂(Scheme 4-4)を用いて、oxoferryl-hemoCD1 の反応の違いからスルフィド結合の役割を調べた。Fe^{III}TPPS/Py3CD-SO₂包接錯体([Fe^{III}TPPS] = 1 × 10⁻⁵ M, [Py3CD-SO₂] = 1.2 × 10⁻⁵ M)と CHPO (2.0 × 10⁻⁴ M)を反応させて、3-1 に示した方法で O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO₂ を調整した。ゲルろ過による精製を行った後の O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO₂ の吸収スペクトルの変化を Figure 4-10 に示す。O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO₂は、Figure 4-6 に示した oxoferryl-hemoCD1 の吸収スペクトル変化とは異なる変化が見られ、558 nm の鉄(IV)錯体を示す吸収スペクトルは 576 nm の鉄(III)錯体を示す吸収スペクトルへと変化し、一電子還元を示唆する結果となった。

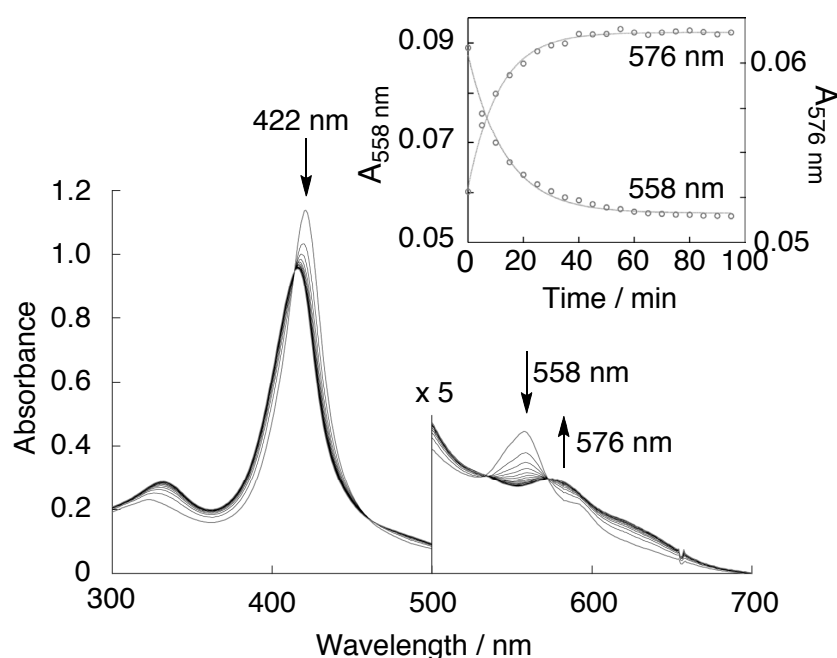


Figure 4-10. UV-vis spectral changes in spontaneous reaction of the O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO₂ complex in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. Inset is the progressive change in absorbance at 558 nm (O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO₂) and 576 nm (HO-Fe^{III}TPPS/Py3CD-SO₂).

Py3CD-SO₂の包接錯体と hemoCD1 との機能を比較した結果を Table 4-1 に示す。TPPS/Py3CD-SO₂のピロールのジプロトン化体の pK_aが Py3CD の包接錯体と比較して高くなっている。このことより、Py3CD-SO₂によりフリーベースポルフィリンが包接された場合、ポルフィリン中心部分の疎水性が Py3CD の場合に

比べ弱くなっているものと思われる。2つのリンカー部のスルホン基が、シクロデキストリン環同士のパッキングを悪くしているものと考えられる。そのため鉄中心に水分子が侵入しやすくなり、酸素錯体の自動酸化が加速される。酸素錯体の半減期は3時間あるので、 $O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO_2$ の反応で鉄(II)錯体が生成していればCOを吹き込んだときに鉄(II)CO錯体が観測されるはずである。しかし、 $O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO_2$ は、自発的反応が終わった後に一酸化炭素を導入しても鉄(II)CO錯体の生成は全く見られなかった。つまり $O=Fe^{IV}TPPS/Py3CD-SO_2$ の自発的反応においては、最終的に $Fe^{III}TPPS/Py3CD-SO_2$ へと還元されており、鉄(II)錯体は全く生じていないものと思われる。このことは、oxoferryl-hemoCD1から鉄(II)酸素錯体が生成する反応においてスルフィド結合が重要な役割を持つことを示している。

Table 4-1. pK_a value of diprotonated TPPS ($(H^+)_2TPPS$) and monoqua $Fe^{III}TPPS$ ($(H_2O)Fe^{III}TPPS$) complexed with Py3CD and Py3CD- SO_2 , $P_{1/2}$ values for formation of dioxygen adducts of $Fe^{II}TPPS/cyclodextrin$ dimer complexes and half-lives ($t_{1/2}$) of dioxygen adducts in phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

dimer	pK_a of $(H^+)_2TPPS$	pK_a of $(H_2O)Fe^{III}TPPS$	$P_{1/2}$ / Torr	$t_{1/2}$ / h	Reference
Py3CD	< 0.3	5.5	10 ± 0.5	30	14a, 24
Py3CD- SO_2	3.0	5.8	55.4 ± 2.9	3.3	This work

スルホキシドやスルホン基はメタノール中で金属マグネシウム(Mg)と反応させることでスルフィドへ還元されることが報告されている²⁵⁾。この反応をoxoferryl-hemoCD1によるスルホキシド化の確認に利用した。**Sample B**から抽出したシクロデキストリン成分を脱水メタノール 1 mLに溶かし、削り状の金属マグネシウム 10.2 mg およびヨウ素結晶 1.2 mgを加えて、反応容器をアルゴン置換した。室温で2時間かき混ぜた。反応後、蒸留水 3 mLを加え、クロロホルムで抽出した。有機層を濃縮してMALDI-TOF MSにより分析した。その結果をFigure 4-11に示す。**Sample B**の抽出物で見られた m/z 2975の酸素化されたピークが、Mgで処理した後のマススペクトルでは、完全に消失し、Py3CD (m/z 2959)のピークのみが観測された。この結果はoxoferryl-hemoCD1の反応で生成した m/z 2975に観測される酸素化されたPy3CDのピークはスルフィド結合がスルホ

キシド化された生成物によることを示している。スルホキシド化された Py3CD を Py3CD-SO とする。

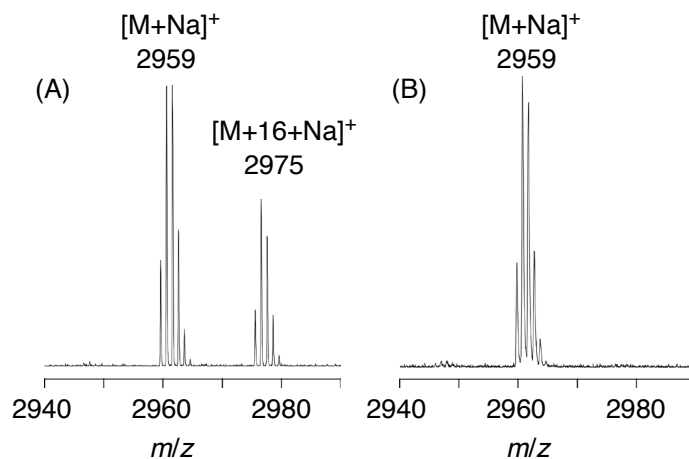


Figure 4-11. MALDI-TOF mass spectra of the CHCl₃ extracts of Sample C (A) and the reaction mixture obtained from the treatment of the CHCl₃ extract of Sample C with Mg in methanol (B).

スルホキシドの生成を定量するためにシクロデキストリン成分を HPLC により分析した。**Sample A** および **Sample B** から抽出したシクロデキストリン成分を HPLC で分析した結果を Figure 4-12 に示す。HPLC で観測された 3 つのピークをそれぞれ質量分析したところ、Peak 1 が Py3CD-SO、Peak 2 が Py3CD、Peak 3 がモノ脱メチル化した Py3CD であることがわかった。**Sample B** の抽出物のクロマトグラムは oxoferryl-hemoCD1 の反応で Py3CD の約半量がスルホキシド化されたことを示している。これは Figure 4-8 の質量分析で観測された Py3CD および Py3CD-SO のピーク強度の比とも一致する結果である。さらに Figure 4-6 で観測された結果とも一致し、oxoferryl-hemoCD1 の半分はスルフィドに酸素原子移動することで鉄(II)錯体へと変化し、残りは met-hemoCD1(HO-Fe^{III}P)に変化したことを示している。従って鉄(II)錯体(O₂-Fe^{II}P)は、O=Fe^{IV}P がスルフィドを二電子酸化することによって生成し、鉄(III)錯体(met-hemoCD1)は O=Fe^{IV}P がその周りの雰囲気(特定できていない)を一電子酸化することにより生成すると考えられる。met-hemoCD1 に戻る O=Fe^{IV}P の一電子還元の詳細なメカニズムは不明であるが、溶媒などが電子源になると考えられる。例えば O=Fe^{IV}P の水溶液にアセトニトリルを加えると、O=Fe^{IV}P から HO-Fe^{III}P への還元が直ちに起こることを観察している。

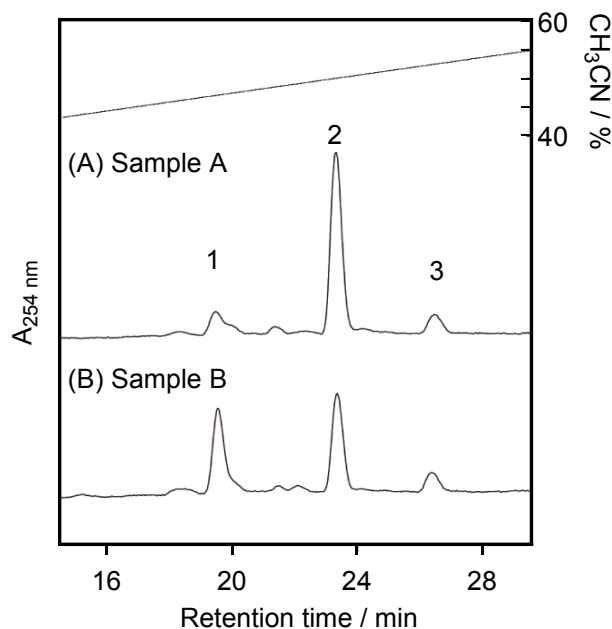


Figure 4-12. HPLC chromatograms of CHCl_3 extracts of Sample A (A) and Sample B (B). Each sample was eluted at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} using $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ linear gradient (0.1% TFA). HPLC trace were monitored at 254 nm. Eluted fractions were analyzed by ESI-TOF MS and/ or MALDI-TOF MS; Fraction 1: Py3CD-SO, Fraction 2: Py3CD, Fraction 3: demethylated Py3CD.

3-4. スルフィドへの酸素移動反応の速度論

oxoferryl-hemoCD1 は Py3CD のリンカー部位に存在するスルフィド結合に直接酸素移動することで鉄(II)錯体を生成することが明らかとなった。ここで、oxoferryl-hemoCD1 による反応が分子内反応か分子間反応かを確認するために反応速度論からの解析を行った。

ここで仮に分子間反応($2 \text{ A} \rightarrow \text{B} + \text{C}$)であると仮定した場合、反応速度は次のように定義される²⁶⁾。

$$-d[\text{A}]/dt = k_2[\text{A}]^2 \quad (4-2)$$

ここで、 k_2 は二次速度定数を表す。oxoferryl-hemoCD1 の反応が分子間反応である場合はスルホキンドが生成する速度が oxoferryl-hemoCD1 の初濃度に依存し

て速くなると考えられる。そこでスルホキシドが生成する速度 k を oxoferryl-hemoCD1 の初濃度を変えて測定した。

反応速度の測定は次の手順で行った。まず、**Sample A** を所定の濃度に希釈した溶液を調整し、25 °C の恒温槽内に静置した。10 分おきに溶液を一定量採取しクロロホルムによりシクロデキストリン成分の抽出操作を行った。抽出したシクロデキストリン成分は HPLC により定量を行いそのピーク面積から各成分の割合を算出した。その結果得られた各成分の割合の変化を Figure 4-13(A)に示す。スルホキシドが生成する速度と Py3CD が減少する速度のそれぞれを一次速度式に基づいて解析を行った。その結果スルホキシドの生成速度と Py3CD の減少する速度は一致した。脱メチル化した Py3CD の割合の経時変化はほとんど見られない。脱メチル化の進行は *O*-メチル基に水酸化が起こり、アセタールを形成した後ホルムアルデヒドとして脱離するメカニズムが考えられる。

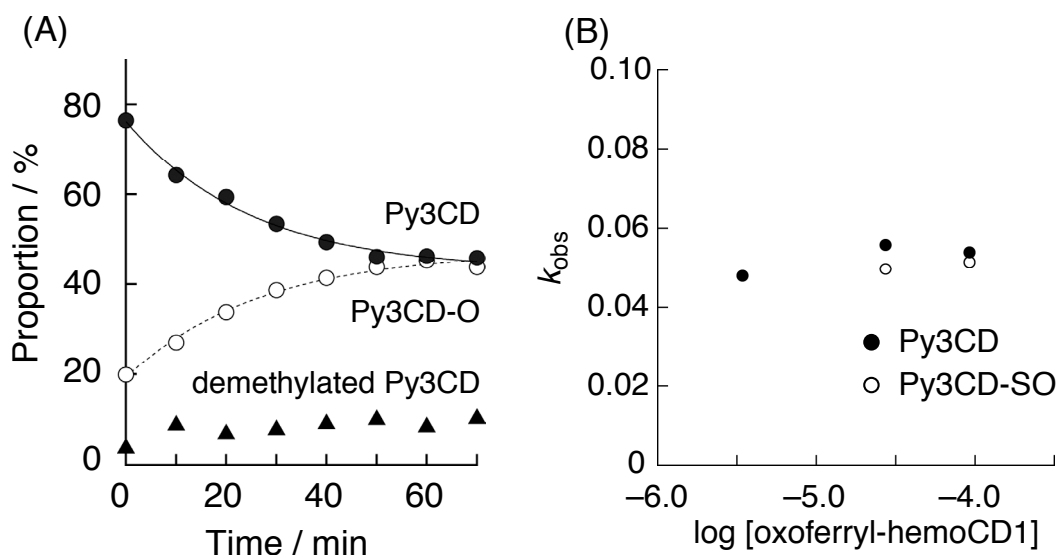


Figure 4-13. Time-courses of the CHCl_3 extracts of the reaction mixture of Sample A (3.4×10^{-6} M) followed by HPLC (A) and the plot of the first-order rate constants (k_{obs}) for the formation of Py3CD-SO and decrease of Py3CD versus [oxoferryl-hemoCD1] (B). The solid lines in (A) are the theoretical curves for the first-order kinetics.

単離精製した oxoferryl-hemoCD1 からの脱メチル化が起こっていないことから、 $O=Fe^{IV}P$ からメチル基への酸素移動は起こっていないと考えられる。HPLC で観測された脱メチル化した Py3CD は、 $O=Fe^{IV}P$ を調整する際に、一部酸素-酸素間の結合がヘテロに切れてわずかに $O=Fe^{IV}P^+$ が生成し、水酸化が起こったと考えられる(第五章参照)。

oxoferryl-hemoCD1 の濃度を変えてスルホキシドが生成する速度を求めた。得られた速度定数 k を Table 4-2 に示す。さらに oxoferryl-hemoCD1 の初濃度に対してプロットした結果を Figure 4-13(B)に示す。スルホキシドが生成する速度と Py3CD が減少する速度は一致し、その速度は oxoferryl-hemoCD1 の濃度に依存せず一定の速度を示した。スルホキシド化の反応速度は oxoferryl-hemoCD1 の濃度に依存しないことから、この反応は分子内反応であることを示す結果となった。

Table 4-2. The first-order rate constants (k_{obs}) for formation of Py3CD-SO and decrease of Py3CD.

[oxoferryl-hemoCD1] / M	Formation of Py3CD-SO $k_{Py3CD-SO} / \text{min}^{-1}$	Decrease of Py3CD $k_{Py3CD} / \text{min}^{-1}$
9.2×10^{-5}	0.052	0.054
2.7×10^{-5}	0.050	0.056
3.4×10^{-6}	0.048	0.048

3-5. oxoferryl-hemoCD1 の錯体構造

oxoferryl-hemoCD1 の考えられる構造の一つを Figure 4-14 の(Structure A)に示す。この構造はオキシの酸素とスルフィドがポルフィリンの平面を挟んで反対側に位置している。ポルフィリンのメソ位に存在するスルホナトフェニル基とリンカー部位との立体障害のため、包接されたポルフィリン平面の自由回転は不可能である。そのため Structure A からの酸素移動は起こらないと考えられる。もう一つの oxoferryl-hemoCD1 の考えられる構造を Figure 4-14 の(Structure B)に示す。直接酸素移動を起こすためには鉄オキシの酸素がスルフィド結合と同じ側に位置する構造である必要があり、Structure B の構造であれば立体的に酸素

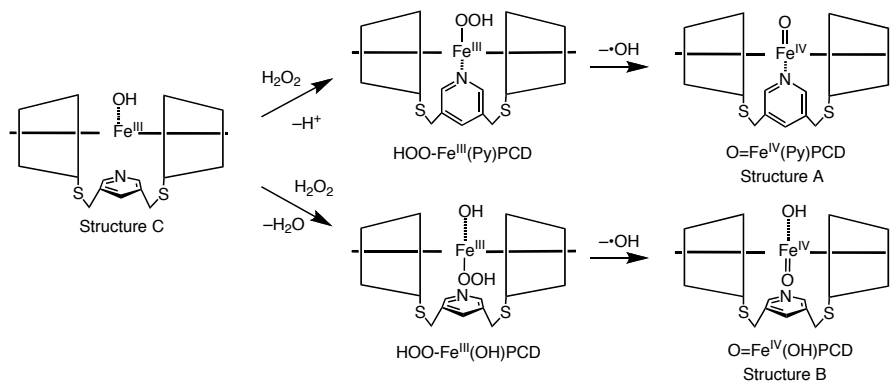


Figure 4-14. Plausible structures of $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$ (Structure A) and $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$ (Structure B) and their precursor (Structure C).

移動が可能な構造である。ここで、*met*-hemoCD の軸配位子の H_2O の $\text{p}K_a$ は 5.5 である¹⁹⁾。pH 7 において *met*-hemoCD1 は電子供与性の強いヒドロキソ配位であるため、ピリジン-鉄(III)の結合は弱くなる。pH 7.0 における 15 K で測定した EPR スペクトルは $g = 6.03$ に観測された(Figure 4-15(A))。また、pD 7.0 の D_2O 中での ^1H NMR スペクトルはピロールの β -プロトンが 83 ppm にブロードなシングレットピークとして観測された(Figure 4-15(B))。これらの結果は 5 配位高スピンの Figure 4-14 の **Structure C** の構造を示唆している²⁷⁾。第二章において *met*-hemoCD1 と過酸化水素の反応直後の EPR スペクトルで 2 組の rhombic シグ

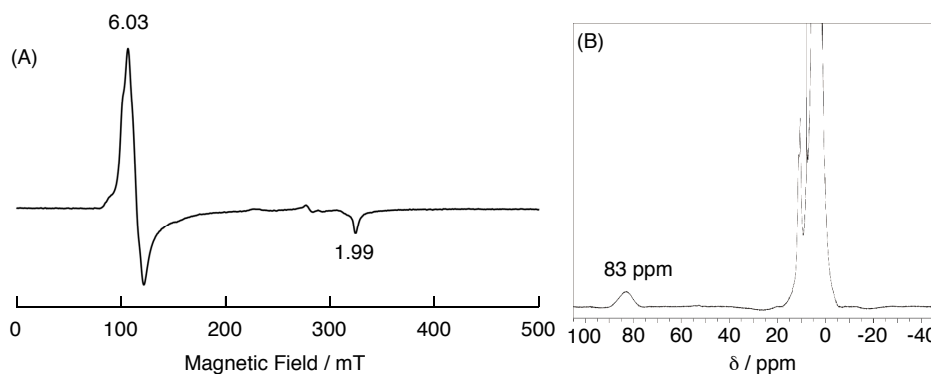


Figure 4-15. (A) EPR spectrum of *met*-hemoCD1 (4×10^{-4} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 15 K. (B) ^1H NMR spectrum of *met*-hemoCD1 ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = [\text{Py}_3\text{CD}] = 3 \times 10^{-3}$ M) in 0.1 M phosphate buffer at pD 7.0 and 25 °C.

ナルが観測されることを報告した。**Structure C** に過酸化水素が反応することで $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{PCD}$ と $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{Py})\text{PCD}$ が生成すると考えられる(Figure 4-14)。 $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{PCD}$ から **Structure B** の $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$ が生成して、スルフィド結合に酸素移動反応したと考えられる。また、 $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{Py})\text{PCD}$ から生成する $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$ は hemoCD1 分子の周囲を酸化することで met-hemoCD1 へと戻ると考えられる。

4. 結言

本章では、Cpd II のモデルとしての oxoferryl-hemoCD1 の反応を検討した。クメンヒドロペルオキシド(CHPO)と met-hemoCD1 の反応から oxoferryl-hemoCD1 を調整しゲルろ過による精製を行うことで過剰の酸化剤を除去した oxoferryl-hemoCD1 の溶液を調整した。調整した oxoferryl-hemoCD1 は 2 種類存在し、met-hemoCD1 とヒドロペルオキシド(R-OOH ; $\text{R} = \text{H, cumyl}$)が反応する段階でポルフィリン平面のピリジン側で反応する錯体($\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$)とその反対側で反応する錯体($\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$)の 2 種類が生じた。それぞれは異なった反応を起こした。 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$ はリンカー部位に存在するスルフィド結合に直接酸素原子移動することで鉄(II)錯体($\text{Fe}^{\text{II}}\text{PCD}$)を生成した。 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$ は hemoCD1 周囲を一電子酸化することで、met-hemoCD1 へと戻った。鉄(IV)オキソポルフィリンからの酸素移動反応を直接観測した例は有機溶媒中での 1 例⁹⁾以外にない。鉄(IV)オキソポルフィリンを酸化剤から分離し精製することができる鉄ポルフィリン/シクロデキストリン(met-hemoCD1)の系は酸化活性種の反応を研究する有用なモデル系といえる。

5. 参考文献

1. (a) Dawson, J. H., *Science* **1988**, *240*, 433-439; (b) Hiner, A. N.; Raven, E. L.; Thorneley, R. N.; Garcia-Canovas, F.; Rodriguez-Lopez, J. N., *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 27-34; (c) Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H., *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2888; (d) Dunford, H. B., *Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology*. Wiley-VCH: 2010.

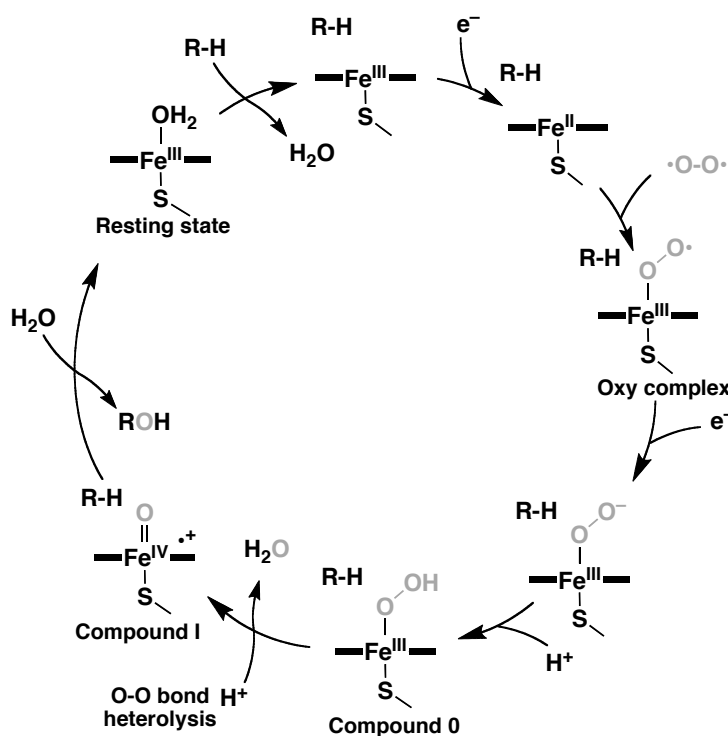
2. (a) Groves, J. T.; Haushalter, R. C.; Nakamura, M.; Nemo, T. E.; Evans, B., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2884-2886; (b) Pan, Z.; Zhang, R.; Newcomb, M., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 524-532; (c) Newcomb, M.; Hollenberg, P. F.; Coon, M. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *409*, 72-79; (d) Goto, Y.; Matsui, T.; Ozaki, S.; Watanabe, Y.; Fukuzumi, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9497-9502.
3. Balasubramanian, P. N.; Smith, J. R. L.; Davies, M. J.; Kaaret, T. W.; Bruice, T. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1477-1483.
4. (a) Bell, S. E. J.; Cooke, P. R.; Inchley, P.; Leanord, D. R.; Smith, J. R. L.; Robbins, A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, 549-559; (b) R. Hodges, G.; Smith, J. R. L.; Oakes, J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 617-628.
5. Groves, J. T.; Gross, Z.; Stern, M. K., *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 5065-5072.
6. (a) Nam, W.; Lim, M. H.; Moon, S. K.; Kim, C., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10805-10809; (b) Nam, W.; Lim, M. H.; Oh, S.; Lee, J. H.; Lee, H. J.; Woo, S. K.; Kim, C.; Shin, W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3646-3649.
7. Bell, S. R.; Groves, J. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9640-9641.
8. 増田秀明; 福住俊一, *生物無機化学*. 三共出版: 2005.
9. Chin, D.; La Mar, G. N.; Balch, A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5945-5947.
10. Nam, W.; Park, S. E.; Lim, I. K.; Lim, M. H.; Hong, J.; Kim, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14674-14675.
11. Pan, Z.; Newcomb, M., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6767-6774.
12. Pan, Z.; Newcomb, M., *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14*, 968-970.
13. (a) Goh, Y. M.; Nam, W., *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 914-920; (b) Pan, Z.; Zhang, R.; Newcomb, M., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 524-532.
14. (a) Kano, K.; Kitagishi, H.; Kodera, M.; Hirota, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435-438; (b) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Kodera, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448-4460.
15. (a) Fleischer, E. B.; Palmer, J. M.; Srivastava, T. S.; Chatterjee, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3162-3167; (b) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Kampas, F.; Kim, J., *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 2443-2445.
16. Kokatnur, V. R.; Jelling, M., *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1432-1433.
17. Finn, M. G.; Sharpless, K. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 113-126.
18. (a) Shikama, K., *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *83*, 73-91; (b) Sato, H.; Watanabe, M.; Hisaeda, Y.; Hayashi, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 56-57.

19. Kano, K.; Chimoto, S.; Tamaki, M.; Itoh, Y.; Kitagishi, H., *Dalton. Trans.* **2012**, *41*, 453-461.
20. *Gel Filtration: Principles and Methods*. GE Healthcare: 2007.
21. (a) Nakajima, R.; Yamazaki, I., *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 2576; (b) Yamada, H.; Yamazaki, I., *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 728-738.
22. Han, A.-R.; Jeong, Y. J.; Kang, Y.; Lee, J. Y.; Seo, M. S.; Nam, W., *Chem. Commun.* **2008**, 1076-1078.
23. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *有機化学のためのスペクトル解析法 –UV, IR, NMR, MS の解説と演習–*. 化学同人: 京都, 2000.
24. Kano, K.; Ochi, T.; Okunaka, S.; Ota, Y.; Karasugi, K.; Ueda, T.; Kitagishi, H., *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2946-2955.
25. Khurana, J. M.; Sharma, V.; Chacko, S. A., *Tetrahedron* **2007**, *63*, 966-969.
26. 齊藤勝裕, *反応速度論–化学を理解するためのエッセンス*. 三共出版: 東京, 1998.
27. (a) Adediran, S. A.; Lambeir, A.-M., *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 571-576; (b) Keilin, D.; Mann, T., *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **1937**, *122*, 119-133; (c) Tuynman, A.; Schoemaker, H. E.; Wever, R., *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 687-695.

第五章 過酸との反応による鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカルの生成と分子内 O-脱メチル化反応

1. 緒言

生体内における酸化反応は多岐にわたるが、その中でもシトクロム P450 (Cyt P450)が触媒する C-H 結合の水酸化は重要な反応である¹⁾。Cyt P450 による水酸化反応は薬物の代謝や生理活性物質の生合成など重要な役割を担っている。Cyt P450 が触媒する酸化反応において、鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル($O=Fe^{IV}P^+$, Cpd I)は酸化活性種として知られている¹⁻²⁾。Cyt P450 の触媒メカニズムは Scheme 5-1 のように考えられている。Cyt P450 における酸化活性種生成のメカニズムはペルオキシダーゼやヘムオキシゲナーゼなどの他のヘム酵素と共通点が多い。鉄(III)の休止状態($Fe^{III}P$)の Cyt P450 は NADH や NADPH から電子を受け取り鉄(II)の還元型($Fe^{II}P$)を形成する。さらに鉄(II)に酸素分子が配位することで酸素錯体($O_2-Fe^{II}P$)を形成する²⁻³⁾。生成した酸素錯体が 1 電子還元およびプロトン化されることで鉄(III)ヒドロペルオキシ錯体($HOO-Fe^{III}P$, Cpd 0)を形成する。Cpd 0 の酸素-酸素間の結合がヘテロに切れることにより酸化活性種である Cpd I を生成する²⁾。鉄(III)の第 5 配位子であ



Scheme 5-1. Catalytic cycle of Cyt P450.

Ueda, T.; Kumeda, S.; Kitagishi, H.; Kano, K. *Chem. Lett.* **2013**, 42, 1366–1368.

るチオラートからの強い電子供与が Cpd 0 のヘテロリシスにおいて重要であると考えられている。これまでのモデル系の研究により⁴⁾、酸素-酸素間の結合のヘテロリシスは push-pull 効果が考えられており、Figure 5-1 に示すようなメカニズムが提案されている。このメカニズムでは軸配位子からの電子供与(push)の他に、酸素-酸素間の結合がイオンの的に切れやすくするために脱離する側の電子求引(pull)が重要と考えられている。Cyt P450 やペルオキシダーゼでは Figure 5-1 のように遠位側のアミノ酸がヘテロリシスを誘起している^{2a)}。

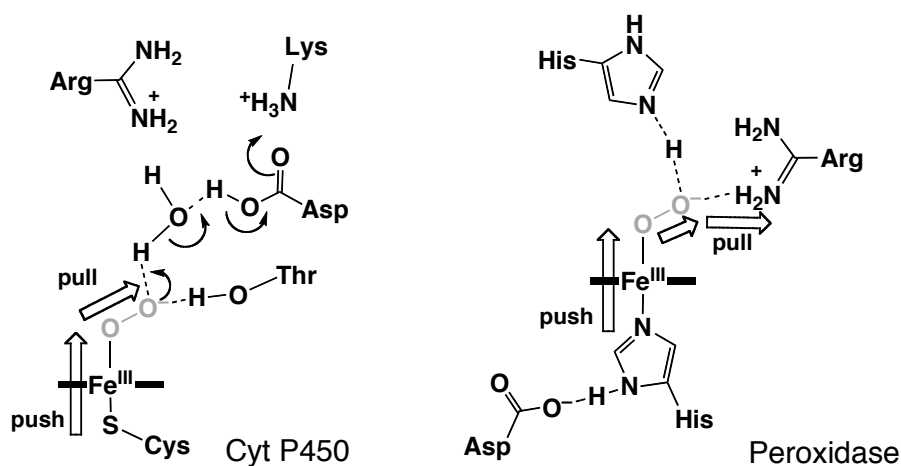


Figure 5-1. Schematic representations of push and pull mechanisms of Cyt P450 and horseradish peroxidase^{2a)}.

数多くのモデル反応が研究されており、その中で *m*-クロロ過安息香酸 (mCPBA) が Cpd I 類似の酸化活性種(鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル)を作るための酸化剤として用いられている。mCPBA などの過酸はアシル基(RCO-)が電子求引性であるので pull 効果が働くため、軸配位子による電子供与無しに酸素-酸素間の結合のヘテロリシスを誘起できる^{3,5)}。アシルペルオキソ錯体(RC(O)OO-Fe^{III}P)はヘテロリシスによりカルボキシラート(RCOO-)を脱離できる。過酸化水素やアルキルヒドロペルオキシドと比較して、過酸はヘテロリシスを起しやすい分子構造を有していると言える(Figure 5-2)。これまでのモデル研究では、鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカルが酸化活性種として作用しアルカンの水酸化^{5d)}、エーテルおよびアミンの *O*-および *N*-脱メチル化^{5b, 6)}の反応が進行することが報告されている。

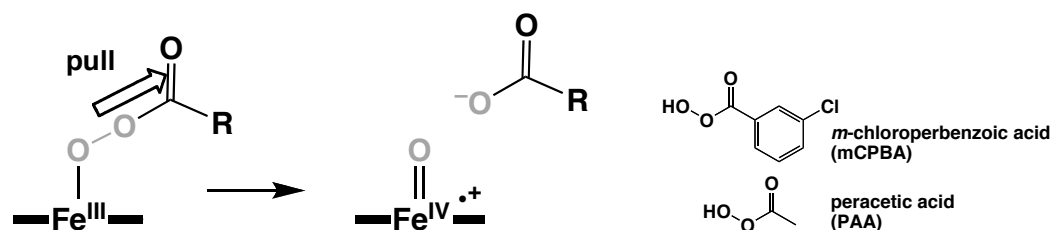


Figure 5-2. A schematic representation for heterolytic cleavage of O-O bond in acylperoxoferric porphyrin.

第二章においては *O*-メチル化 β -シクロデキストリンをピリジンリンカー (-SCH₂PyCH₂S-, Py: pyridin-3,5-diyl) で連結した二量体(Py3CD)と水溶性鉄ポルフィリンの(Fe^{III}TPPS)の包接錯体である met-hemoCD1 (Figure 5-3)を用いて、過酸化水素やアルキルヒドロペルオキシドとの反応により、シクロデキストリンの疎水性空洞内部で Cpd II に対応する酸化活性種(oxoferryl-hemoCD1)を生成させることに成功した。oxoferryl-hemoCD1 の生成は Cpd 0 に対応する化学種(ROO-Fe^{III}PCD)の酸素-酸素間の結合のホモリシスにより進行する。そこで本章においては、過酸化水素やアルキルヒドロペルオキシドよりも酸素-酸素間の結合がヘテロに切れやすい過酸を用いて Cpd I に対応する鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル(O=Fe^{IV}P^{•+}CD)の観測を試みた。第四章において oxoferryl-hemoCD1 が分子内的に Py3CD のリンカー部のスルフィド結合に酸素添加することを述べた。met-hemoCD1 を用いた場合、過酸がスルフィドを直接酸化したり、Cpd I に対応する化学種が生成しても分子内のスルフィドと反応す

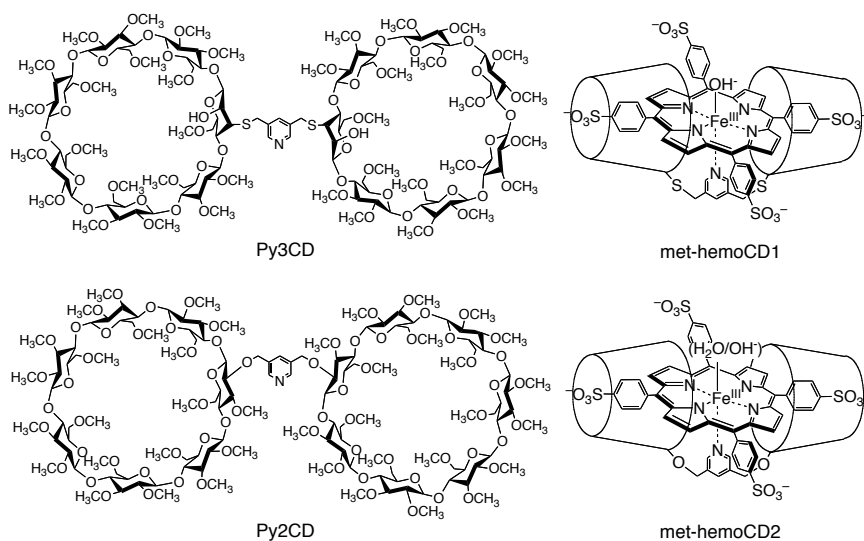


Figure 5-3. Structures of Py3CD, Py2CD, met-hemoCD1, and met-hemoCD2.

ることが考えられる。そこで2つのメチル化シクロデキストリンの2位でエーテル結合を含むリンカー(-OCH₂PyCH₂O-, Py: pyridin-3,5-diyl)で連結した二量体(Py2CD)とFe^{III}TPPSの包接錯体(met-hemoCD2, Figure 5-3)を用いて過酸との反応を行い、水中におけるO=Fe^{IV}P⁺CDの観測を試みた。

2. 実験

2-1. 測定機器

紫外可視吸収スペクトルは島津製作所製ホトダイオードアレイ分光光度計 MultiSpec-1500 および島津製作所製分光光度計 UV-2450 を用いて測定した。ストロップドフロー測定はユニソク製分光光度計 RSP-1000 を用いて測定した。水溶液のpHは堀場製作所製pHメータF52を用いて測定した。電子常磁性共鳴(EPR)スペクトルは石英製デュワーを取り付けた日本電子製電子スピン共鳴装置 JES-TE200 (X-band)を用いて、液体窒素温度 (77 K)で測定した。エレクトロスプレーイオン化(ESI)法による質量分析は日本電子製飛行時間型質量分析計 JMS-T100CS を用いた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法による質量分析は Bruker Daltonics 製飛行時間型質量分析計 autoflex speed を用いて、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして用いて測定した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は和光純薬工業 逆相シリカゲルカラム Wakosil-II 5C18AR (4.6 × 250 mm(分析用), 7.6 × 250 mm (分取用))を取り付けた GE Healthcare HPLC システム ÄKTApurifier を用いて分析および分取を行った。核磁気共鳴(NMR)スペクトルは日本電子製フーリエ変換核磁気共鳴装置 JNM-ECA500 (500 MHz)を用いて測定し、テトラメチルシラン(TMS)を内部基準として用いた。酸素分圧は KOFLOC 製ガス混合装置 GM-4B を用いて調整した

2-2. 試薬および合成

Py3CD⁷⁾、Py2CD⁸⁾およびFe^{III}TPPS⁹⁾は文献記載の方法に従って合成した。*m*-クロロ過安息香酸(mCPBA)は和光純薬製化学用試薬 60%水分含有を、過酢酸(PAA)は Sigma-Aldrich 製一級試薬 9%酢酸溶液をそれぞれ使用した。その他の試薬は市販品をそのまま用いた。Py3CD、Py2CD および Fe^{III}TPPS は pH 7.0 の

0.05 M リン酸緩衝液に溶かしストック溶液を調整した。met-hemoCD1 および met-hemoCD2 の溶液はそれぞれ Py3CD および Py2CD と Fe^{III}TPPS を 1:1 で混合して調整した。mCPBA はメタノール溶液を調整し、PAA は酢酸溶液で反応に用いた。mCPBA および PAA は第四章に示したヨウ素滴定法により濃度決定を行った後に測定に用いた。

2-2-1. モノヒドロキシル化 Py2CD (Py2CD^{OH})の合成(3-2 参照)

100 mL の分液ロートに Py2CD 10.1 mg (3.4 μ mol)および Fe^{III}TPPS 4.3 mg (3.4 μ mol)を加え、pH 7 の 0.05 M リン酸緩衝液 30 mL に溶かした。28.5 mM PAA 水溶液 178 μ L (5.1 μ mol, 1.5 eq)を加え室温で 5 分間穏やかにかき混ぜた。反応溶液に CHCl₃ 30 mL を加え、3 回抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥させエバポレータで濃縮した。Py2CD^{OH}と未反応の Py2CD は分取用カラム(逆相シリカゲル Wakosil-II 5C18AR、4.6 \times 250mm、H₂O/CH₃CN 60/40 \rightarrow 45/55(v/v) 0.1% TFA 含有)を用いて HPLC で精製した。Py2CD^{OH}の含まれるフラクションを凍結乾燥することで無色固体生成物を得た。

収量 1.5 mg 収率 15%

MS (MALDI, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z 2941, 2957 (calcd for C₁₃₀H₂₂₃NO₇₀, [M+Na]⁺ = 2941, [M+K]⁺ = 2957).

2-2-2. ホルムアルデヒドの検出¹⁰⁾

脱メチル化の反応によって生じるホルムアルデヒドは次の方法に確認を行った。pH 7 リン酸緩衝溶液で調整した 0.1 mM met-hemoCD2 の 0.5 mL に 28.5 mM 過酢酸水溶液 3.5 μ L (2 eq)を加えた。5 分間後、反応溶液に 4 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 100 μ L 加え、10 分間室温で静置した。溶液を 0.5 μ m シリンジフィルター(hydrophobic PTFE, DISMIC-13JP, Advantec)でろ過し、分析用カラム(Wakosil-II 5C18AR, 4.6 \times 250mm, H₂O/CH₃CN 40/60(v/v))を用いて HPLC で分析した。

3. 結果および考察

3-1. met-hemoCD1 および met-hemoCD2 と mCPBA の反応

ヘム酵素やそのモデル系の反応では Cpd I ($O=Fe^{IV}P^{+}$) を調整するために、酸素-酸素間の結合のヘテロリシスを誘起する酸化剤として *m*-クロロ過安息香酸 (mCPBA) や過酢酸 (PAA) などが用いられる。過酸は酸素-酸素間の結合がヘテロに切れることでカルボキシレートアニオンとして脱離することができるため過酸化水素やアルキルヒドロペルオキシドと比較して酸素-酸素間の結合がヘテロに切れやすい構造となっている。hemoCD の系において Cpd I に対応する化学種 ($O=Fe^{IV}P^{+}$) を観測するために過酸との反応について検討を行った。まず、これまで用いてきた met-hemoCD1 と mCPBA の反応について検討した。室温の pH 7.0 リン酸緩衝液中で met-hemoCD1 の溶液に対して 20 当量の mCPBA を加えてその反応を吸収スペクトル変化から追跡した。その結果を Figure 5-4 に示す。mCPBA を加えることでポルフィリン環の分解に基づく吸収スペクトル変化が観測された。hemoCD1 の構成分子の 1 つである、Py3CD はチオエーテル結合を含むため、第四章で述べたように鉄(IV)オキシ種から酸素添加されたり、mCPBA が直接反応したりすることでスルフィド結合がスルホキシドやスルホンへと酸化される

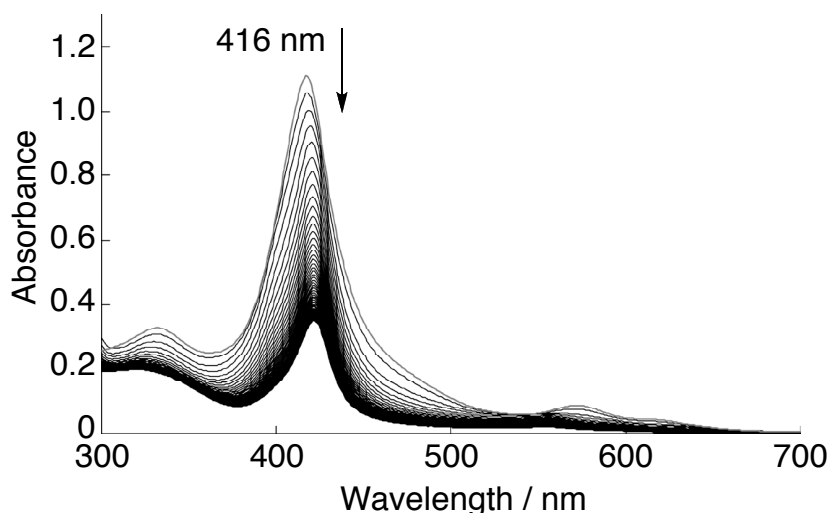


Figure 5-4. UV-vis spectra of met-hemoCD1 (1×10^{-5} M) before and after addition of mCPBA (2×10^{-4} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. The spectra after addition of mCPBA were recorded at time intervals of 20 sec.

可能性がある。Py3CD の 2 つのスルフィド結合をスルホンへと酸化した Py3CD-SO₂ では鉄ポルフィリンの包接が弱くなることがわかっている(第四章参照)。シクロデキストリンの包接が弱くなったために mCPBA が Fe^{III}TPPS に対して直接反応してポルフィリンの分解が進行したものと考えられる。そのため過酸を用いる系ではスルフィド結合を含む hemoCD1 は研究対象として適さないことがわかった。

そこでエーテル結合で 2 つのシクロデキストリンを連結した Py2CD と Fe^{III}TPPS の包接錯体である hemoCD2 を用いて過酸との反応を観測した。その吸収スペクトルの変化を Figure 5-5 に示す。met-hemoCD1 の場合とは異なり明らか

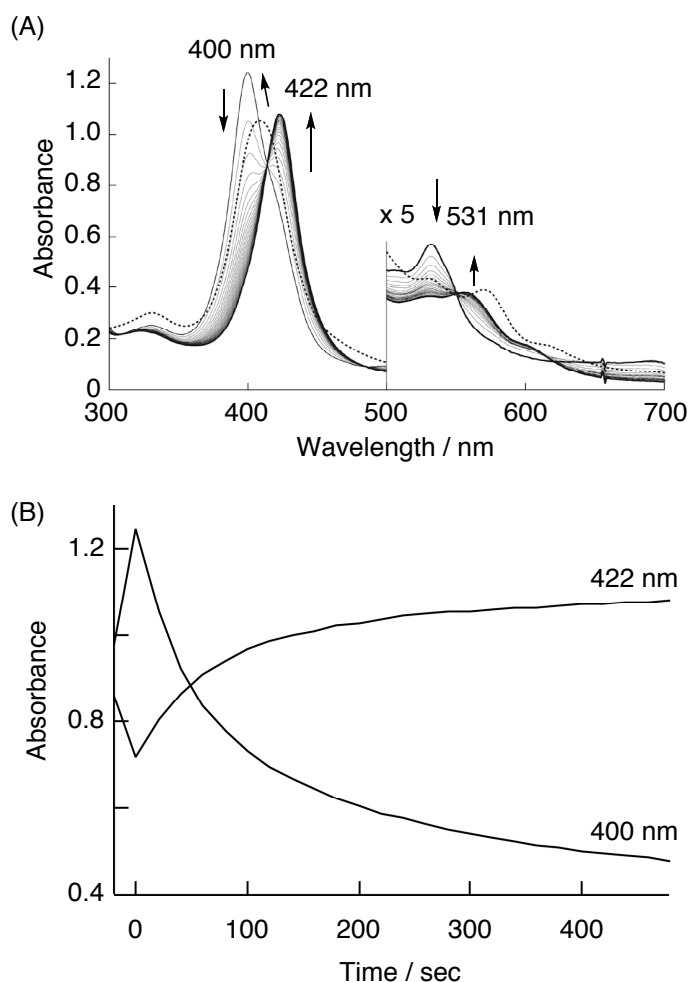


Figure 5-5. (A) UV-vis spectra of met-hemoCD2 (1×10^{-5} M) before (dashed line) and after addition of mCPBA (2×10^{-4} M, solid line) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. The spectra after addition of mCPBA were recorded at time intervals of 20 sec. (B) Time course absorption changes at 400 and 422 nm.

なポルフィリン環の分解反応の進行は見られず、met-hemoCD2 は mCPBA と反応することで特徴的な 2 種のスペクトル変化を示した。まず第一に met-hemoCD2 に mCPBA を加えるとすぐに 400, 531 および 700 nm に吸収極大を持つ中間体(Cpd X)が生成した。生成した Cpd X は徐々に、422 および 558 nm に吸収極大を持つ化学種へと変化した。この極大吸収波長の値は met-hemoCD2 とクメンヒドロペルオキシド(CHPO)の反応で生成した oxoferryl-hemoCD2 ($O=Fe^{IV}P$, $\lambda_{max} = 422, 558 \text{ nm}$)と一致する吸収スペクトルである(Figure 5-6)。2つ目の変化で $O=Fe^{IV}P$ が生成したと考えられる。Cpd X は $O=Fe^{IV}P$ の前駆体として生成していることから Cpd I に対応する $O=Fe^{IV}P^+$ の可能性がある。

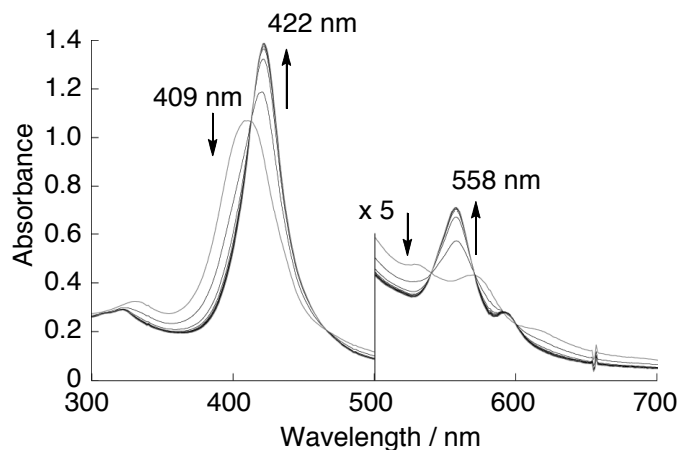


Figure 5-6. UV-vis spectral changes in the reaction of met-hemoCD2 (1×10^{-5} M) with cumene hydroperoxide (1×10^{-5} M). The spectra were recorded at time intervals of 10 s.

しかし、mCPBA との反応により比較的ゆっくりと生成した $O=Fe^{IV}P$ は、その後さらに遅い速度で変化し、およそ 30 時間かけて Cpd X と同じ吸収極大(400, 531 および 700 nm)を示す化合物へと変化した(Figure 5-7)。 $O=Fe^{IV}P$ から Cpd X へ戻る反応が進行したことより、Cpd X は $O=Fe^{IV}P^+$ のような酸化活性種ではないことが明らかとなった。Cpd X は鉄ポルフィリンの安定な酸化状態である鉄(III)錯体と考えるのが妥当である。

met-hemoCD2 の鉄に配位する水の pK_a は $6.9^8)$ であるので、pH 7.0 の水溶液中では met-hemoCD2 の第 6 配位子はモノヒドロキソ配位とモノアクア配位がほぼ 1:1 存在している。pH 7 における Cpd X の吸収スペクトルは、pH 5 で測定した

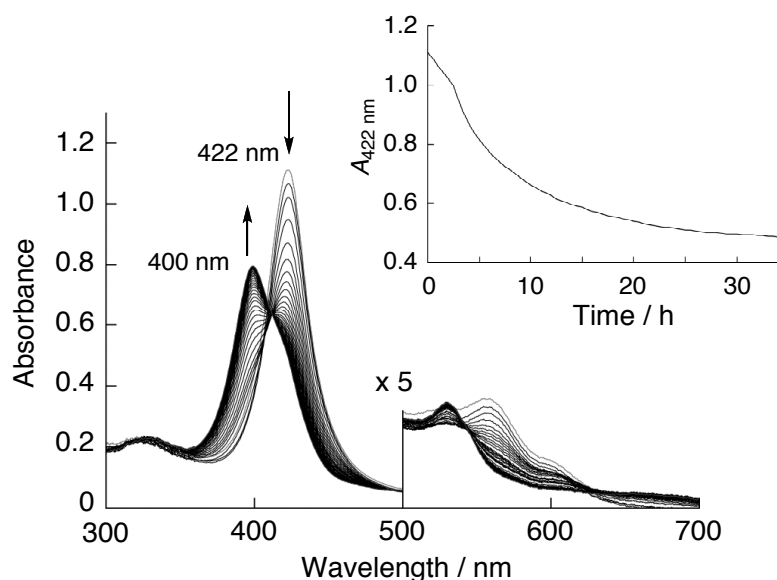


Figure 5-7. UV-vis spectral changes for the returning reaction of the oxoferryl complex to Cpd X in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. The spectral changes for the conversion of Cpd X to the oxoferryl complex is shown in Figure 5-5. The returning reaction started after the formation of the oxoferryl complex ceased (30 min). The repeat scan was performed at time intervals of 2h. Inset shows the time course of the absorbance at 400 nm.

モノアクア体の met-hemoCD2 ($\text{H}_2\text{O}-\text{Fe}^{\text{III}}\text{P}$, $\text{p}K_{\text{a}}$ 6.9)とよく似た吸収スペクトルを示す(Figure 5-8)。したがって、Cpd X は pH 5 における met-hemoCD2 と類似した錯体構造(モノアクア鉄(III)錯体)をとっていると考えられる。その場合、Cpd X の軸配位の水の $\text{p}K_{\text{a}}$ は met-hemoCD2 の $\text{p}K_{\text{a}}$ よりも高い値となるはずである。

Cpd X の軸配位子について EPR スペクトルから検討を行った。pH 7 の条件で測定した Cpd X の EPR スペクトルと pH 5 および 7 の条件で測定した met-hemoCD2 の EPR スペクトルを Figure 5-9 に示す。77 K において測定した pH 5 における met-hemoCD2 の EPR スペクトルは特徴的な高スピン鉄(III)ポルフィリンを示す $g_{\perp} = 6$ 付近のシグナルを与えた。pH 7 の条件で、met-hemoCD2 の EPR スペクトルは $g_{\perp} = 6.09$ および 6.34 に分裂したピークが観測された。これらの結果から met-hemoCD2 で観測された EPR スペクトルの $g_{\perp} = 6.09$ および 6.34 の高スピン鉄(III)のシグナルは、それぞれモノアクア配位およびモノヒドロキソ配位の met-hemoCD2 と帰属することができる。pH 7 における Cpd X の EPR スペク

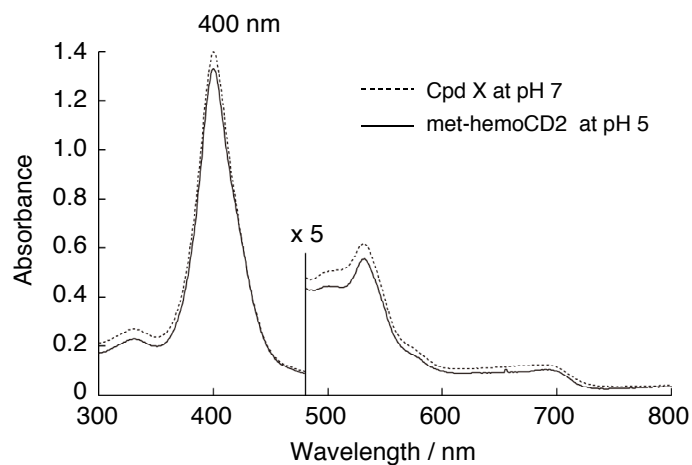


Figure 5-8. UV-vis spectra of met-hemoCD2 at pH 5 (solid line) and Cpd X at pH 7 (dashed line) in the phosphate buffer at 25 °C.

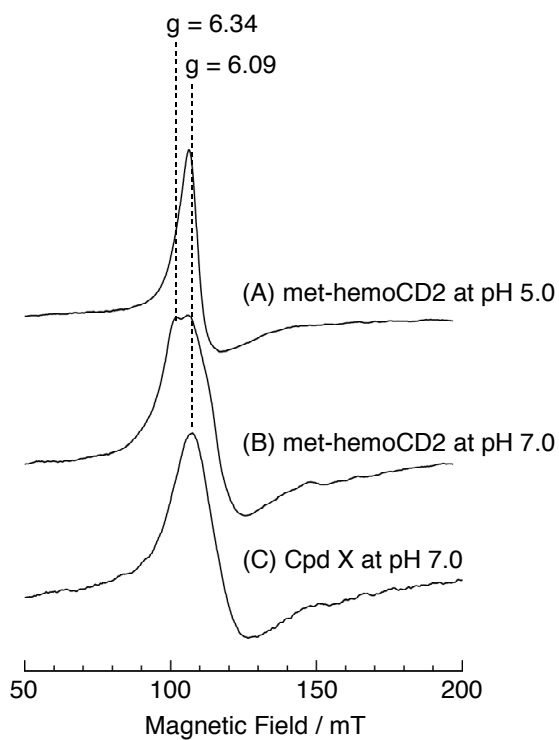


Figure 5-9. EPR spectra of met-hemoCD2 (5×10^{-4} M) at pH 5 (A), met-hemoCD2 (5×10^{-4} M) at pH 7 (B), and Cpd X (5×10^{-4} M) at pH 7 (C) in 0.05 M phosphate buffer and 77 K. Measurement conditions: microwave frequency, 9.13 GHz; microwave power, 1.0 mW; modulation width, 0.63 mT; modulation frequency, 100 KHz; time constant, 0.03 s; scan time, 2 min.

トルは $g_{\perp} = 6.09$ に単一のピークとして観測された。この EPR スペクトルは pH 5 で測定した met-hemoCD2 の EPR スペクトルと一致することから、Cpd X はモノアクア鉄(III)錯体の構造であることが示唆される。

次に Cpd X の軸配位子について検討を行うために軸配位子の水の pH 滴定を行った。測定は、pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中で met-hemoCD2 (5×10^{-4} M) と 15 当量の mCPBA (7.5×10^{-3} M) を反応させて、吸収スペクトル変化から Cpd II に対応する $O=Fe^{IV}P$ から Cpd X に戻る反応を確認した後、0.1 M の過塩素酸ナトリウム水溶液で希釈した。この Cpd X の溶液の pH を水酸化ナトリウムおよび過塩素酸を用いて段階的に変化させて、その吸収スペクトルを測定した(Figure 5-10)。その結果 pH 7 から 10 にかけて軸配位水の酸-塩基平衡に基づく吸収スペクトルの変化が観測された。pH に対する吸光度の変化から Cpd X の pK_a はおよそ 8 付近と見積もられる。Cpd X の軸配位水の pK_a が met-hemoCD2 (pK_a 6.9) と比べて上昇したことから、鉄ポルフィリン周辺の配位環境が大きく変化したことが示唆される。Cpd X の pK_a の正確な測定については後述(第五章 3-4-1)する。

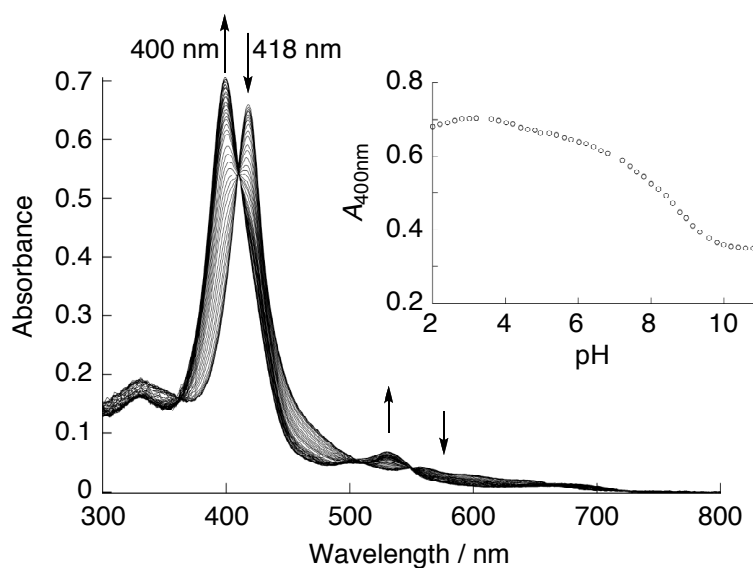


Figure 5-10. UV-vis spectral changes of Cpd X as a function of pH in 0.1 M aqueous $NaClO_4$ at 25 °C. Cpd X was obtained as the final product in the returning reaction of the oxoferryl complex. The accurate pK_a of Cpd X was determined for the 1:1 complex of the $Fe^{III}TPPS$ and $Py2CD^{OH}$ (see Figure 5-19).

3-2. Cpd X における鉄中心周辺の配位環境の変化

前節の検討において met-hemoCD2 は mCPBA と反応することで鉄周辺の配位環境が変化することが示唆された。ここでは Cpd X におけるシクロデキストリン成分である Py2CD の構造の変化について検討を行った。シクロデキストリンは *O*-メチル化することで水と有機溶媒の両方に可溶となる。そのため Py2CD はクロロホルムなどの有機溶媒を用いることで met-hemoCD2 の水溶液から抽出を行うことができ、ポルフィリン成分である Fe^{III}TPPS と容易に分離することができる。そこで反応による Cpd X の構造変化を調べるために、過酸と反応後の Cpd X の水溶液からシクロデキストリン成分を CHCl₃ により抽出することで分離して分析を行った。ここでは CHCl₃ によって抽出される mCPBA の代わりに水溶性の過酸である過酢酸(PAA)を用いることで、抽出操作においてシクロデキストリン成分と未反応の PAA および PAA の分解物との分離を容易にした。

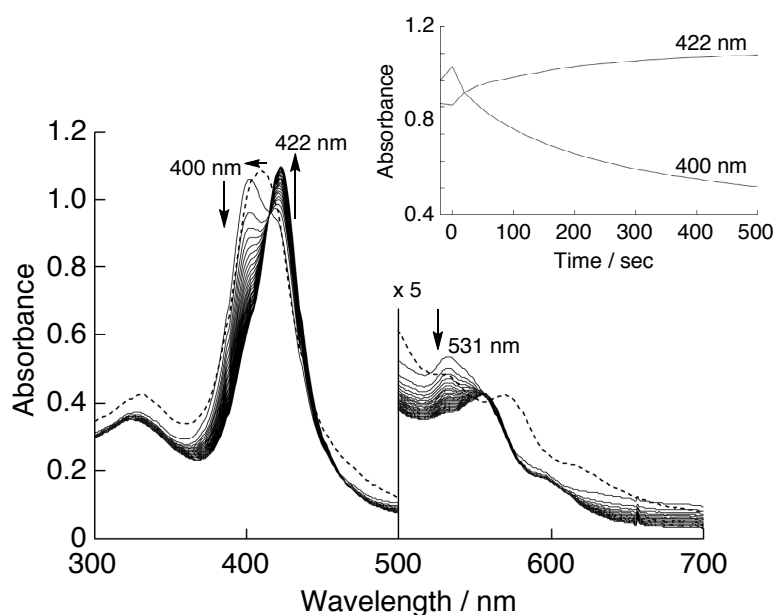


Figure 5-11. UV-vis spectra of met-hemoCD2 (1×10^{-5} M) before (dashed line) and after addition of PAA (2×10^{-4} M, solid line) in the 0.05 M phosphate buffer at pH 7 and 25 °C. The spectra after the addition of PAA were recorded at time intervals of 20 s. Inset shows time courses of the absorbances at 400 and 422 nm.

まず、met-hemoCD2 と PAA の反応を吸収スペクトルにより検討した。met-hemoCD2 に PAA を 20 当量加えたところ、PAA も mCPBA と同様に

met-hemoCD2 と反応して Cpd X を生成することが明らかとなった(Figure 5-11)。

次に Cpd X のシクロデキストリン成分の調整は以下の通り行った。pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中で met-hemoCD2 (1.1×10^{-4} M) に対して 1.5 当量の PAA を加え、室温で 5 分間静置した。その後、 CHCl_3 を用いて抽出を行い、有機層を留去して得られた残渣を分取 HPLC で分離した。得られたフラクションはそれぞれ質量分析により分析した。逆相 HPLC により Cpd X 抽出物を分析した結果を Figure 5-12 (A) に示す。HPLC では大きく分けて 2 つのフラクションが確認され、フラクション A および B について MALDI-TOF MS により分析を行った(Figure 5-12 (B))。フラクション A の MALDI-TOF MS スペクトルは m/z 2941 および 2957 に質量ピークが観測された。それぞれのピークは Py2CD の質量 (exact mass 2932) から -14 シフトしたもののナトリウム付加体 ($[\text{Py2CD}-14+\text{Na}]^+$) およびカリウム付加体 ($[\text{Py2CD}-14+\text{K}]^+$) に一致した。 $\Delta m/z = -14$ のシフトに一致する変化は Py2CD の 1 つの *O*-メチル基が水酸基に置き換わったことを示唆する結果である。フラクション B の MALDI-TOF MS スペクトルは 2955 および 2971 にピークが観測され、それぞれ Py2CD のナトリウム付加体 ($[\text{Py2CD}+\text{Na}]^+$) およびカリウム付加体 ($[\text{Py2CD}+\text{K}]^+$) に一致した。フラクション B は変化していない Py2CD と帰属される。質量分析の結果から HPLC において観測されたフラクション A は *O*-メチル基が脱メチル化して水酸基に置き換わった Py2CD (Py2CD^{OH}) で、フラクション

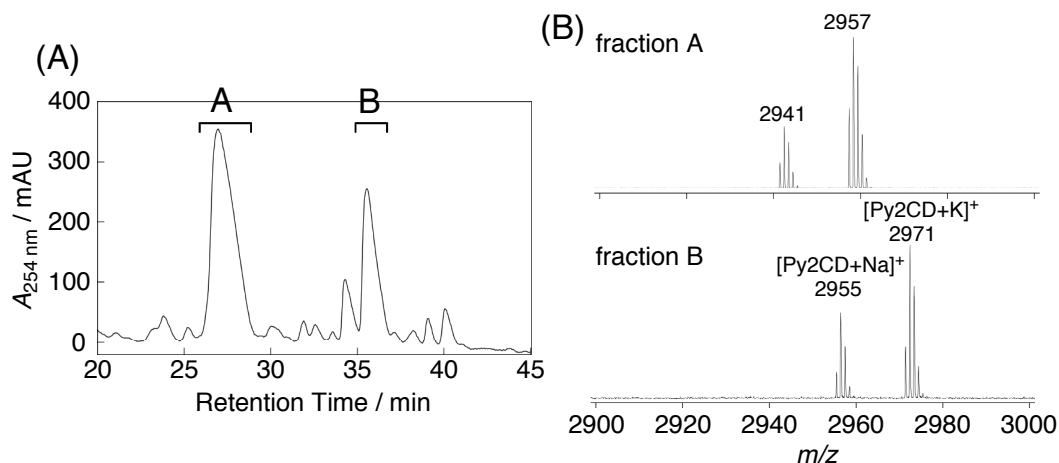


Figure 5-12. (A) HPLC trace for the cyclodextrin components extracted from the aqueous solution containing Cpd X. (B) MALDI-TOF mass spectra of fractions A and B. The calculated mass number of Py2CD ($\text{C}_{131}\text{H}_{225}\text{NO}_{70}$) is 2932.

B が Py2CD であることがわかった。

次に、met-hemoCD2 と反応させる PAA の当量数を 1 から 5 当量まで変化させて、それぞれの生成物を分析した。それぞれの溶液からシクロデキストリン成分を抽出して、定量性のある ESI-TOF MS および分析用の逆相 HPLC により分析を行った。その結果を Figure 5-13 に示す。加える PAA の量に対応して未反応の Py2CD($m/z = 2955$, $[\text{Py}3\text{CD}+\text{Na}]^+$)が減少し、それとともに *O*-メチル基が 1 つ水酸基に置き換わった生成物($\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}$, $m/z = 2941$, $[\text{Py}3\text{CD}-\text{CH}_2+\text{Na}]^+$)および

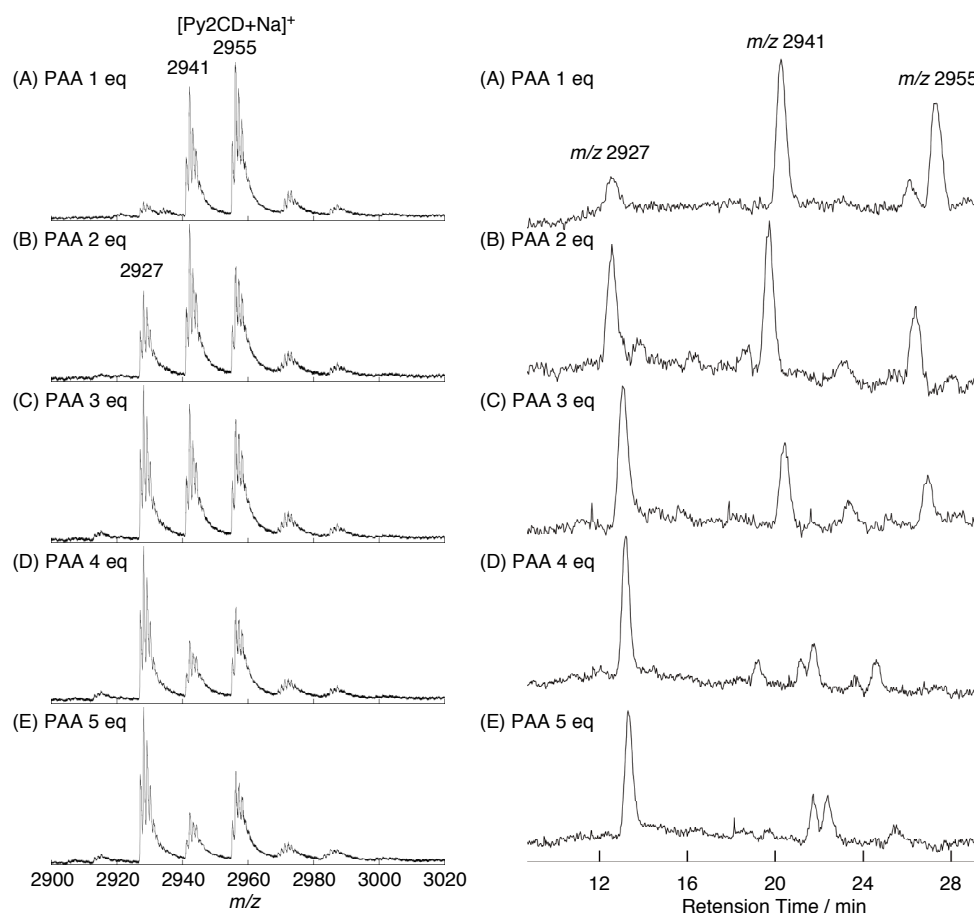


Figure 5-13. ESI-TOF mass spectra (A – E) and HPLC traces (F – J) of the CHCl_3 extracts of the reaction of mixtures of met-hemoCD2 (1×10^{-4} M) with various amounts of PAA. The calculated mass number of Py2CD, mono-*O*-demethylated Py2CD ($\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}$), and di-*O*-demethylated Py2CD ($\text{Py}2\text{CD}^{2\text{OH}}$) are 2955 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 2941 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), and 2927 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), respectively.

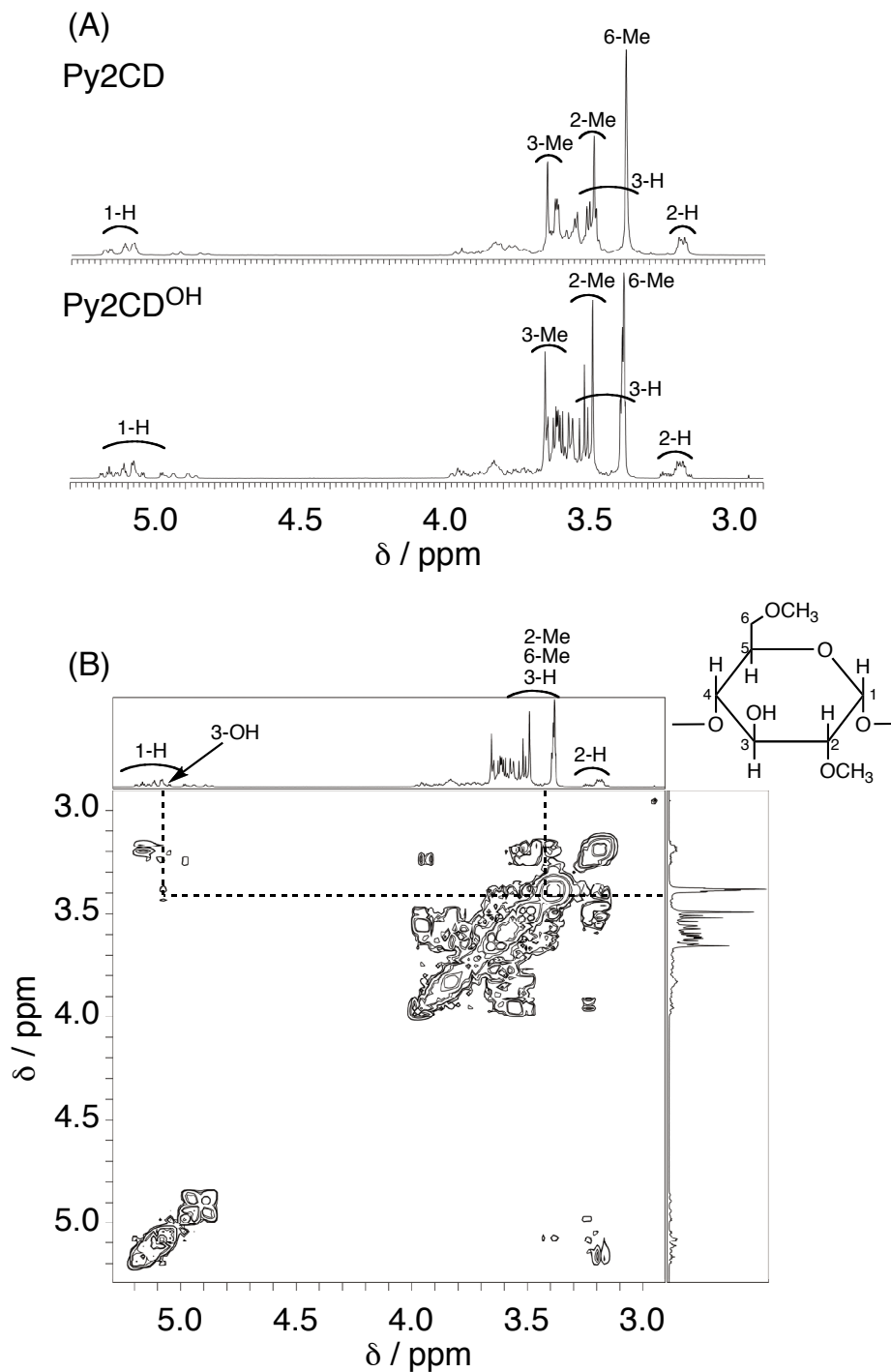


Figure 5-14. ^1H NMR spectra of Py2CD (Ca. 1 mM) and Py2CD^{OH} (Ca. 1 mM) in CDCl_3 (A) and H-H COSY spectrum of Py2CD^{OH} in CDCl_3 (B) at 25 °C.

2つ水酸基に置き換わった生成物(Py2CD^{2OH}, $m/z = 2927$, [Py3CD-2CH₂+Na]⁺)が観測された。興味深いことに、Py2CDには14個の6位の第一級O-メチル基と26個の2位、3位の第二級O-メチル基が存在するにもかかわらず、PAAの当量数を増やしても2つまでは脱メチル化が進行したが3つ以上脱メチル化したPy2CDの生成は観測されなかった。過酸との反応により脱メチル化された位置を調べるためにHPLCにより分取したPy2CD^{OH}の¹H NMRスペクトルを測定した。CDCl₃中で測定したPy2CD^{OH}の¹H NMRスペクトルおよびH-H COSYをFigure 5-14に示す。Py2CD^{OH}の¹H NMRスペクトルは、1つのメチル基が水酸基に置き換わったことで元のPy2CDの対称性が崩れるため複雑なスペクトルとなった。Py2CDの¹H NMRスペクトルとPy2CD^{OH}の¹H NMRスペクトルを比較すると二級側の(2位、3位)の-OCH₃は複雑に分裂しているのに対して、一級側(6位)の-OCH₃は大きな変化が見られなかった。この結果は鉄中心に近いシクロデキストリンの第二級側の-OCH₃で脱メチル化が起こっていることを示唆している。H-H COSYにおいて5.07 ppm付近に観測されたピークがシクロデキストリン3位のC-Hと考えられるピークと相関が見られた。シクロデキストリンの3位のC-Hと相関が考えられるピークは2位および4位のC-Hと3位の-OHである。2位のC-Hは3.2 ppm付近に観測されており4位のC-Hも3.5~4.0 ppm付近に観測されていることから、5.07 ppm付近のピークは3位の-OHであると考えられる。これまでにシクロデキストリン2位および3位の-OHは次のよう化合物につき、CDCl₃中で測定されている。6位をシリル化したper-6-silyl-β-CDはCDCl₃中で2位-OHが6.74 ppmおよび3位-OHが5.27 ppmに観測されている(Figure 5-15)¹¹⁾。2,6-ジメチル-β-シクロデキストリンの二量体では3位の-OHがCDCl₃中で4.92~5.18 ppmに観測されている¹²⁾。これらのことからPy2CD^{OH}の5.07 ppm付近のピークは3位の-OHと帰属される。Py2CDは元々全ての水酸基が

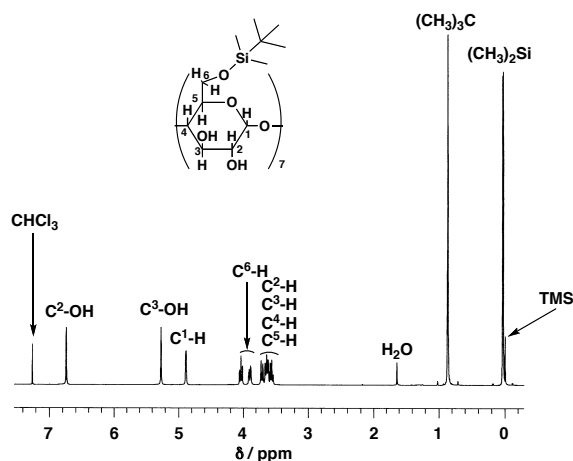


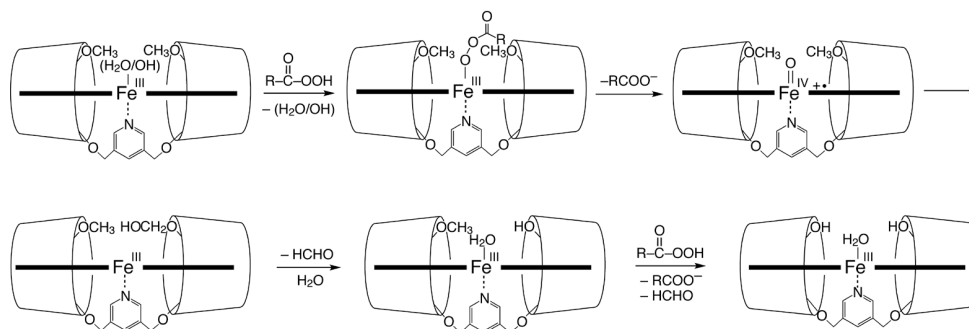
Figure 5-15. ¹H NMR spectrum of per-6-silyl-β-CD in CDCl₃. Per-6-silyl-β-CD was prepared by according to the literature¹¹⁾.

O-メチル化されているため 5.07 ppm のピークは PAA との反応で脱メチル化して現れた -OH のピークであると考えられる。met-hemoCD2 は mCPBA や PAA のような過酸と反応することで met-hemoCD2 の構成分子である Py2CD の 1 または 2 カ所の 3 位 *O*-メチル基が酸化的脱メチル化されることがわかった。

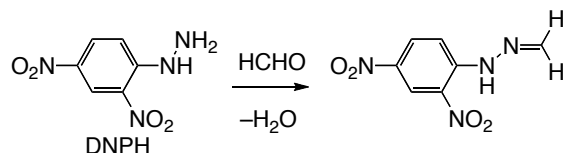
3-3. met-hemoCD2 における酸化的脱メチル化反応の機構

酸化的 *N*-および *O*-脱メチル化反応は Cpd I¹³ やそのモデルの鉄(IV)オキソポルフィリンπ-カチオンラジカル(O=Fe^{IV}P⁺)^{5b, 6}により触媒されることが知られている。met-hemoCD2 における酸化的脱メチル化反応のメカニズムを Scheme 5-2 に示す。酸化的脱 *O*-メチル化反応は、O=Fe^{IV}P⁺によるメチル基への水酸化に続

Scheme 5-2. Schematic representation for the reaction of met-hemoCD2 with peracid.



いて、生成したアセタールがホルムアルデヒドとして脱離する反応を経て進行する。メチル基が脱離することで発生するホルムアルデヒドの検出を行った。アルデヒドの検出は(2,4-dinitrophenyl)hydrazine (DNPH)法を用いた。ヒドラジンはカルボニルと反応することでヒドラゾンを形成する。



この方法では DNPH とアルデヒドが反応して生成したヒドラゾンを逆相 HPLC で検出することによりアルデヒドの定性分析を行った。また過酸も DNPH と反応すると考えられる。そのため、アルデヒドの分析ではまず met-hemoCD2 と 2 当量の過酢酸(PAA)を加え、5 分間静置して PAA を全て消費させた。その

後 DNPH を加え、アルデヒドと DNPH を反応させた。生成物を HPLC により分析した結果を Figure 5-16 に示す。met-hemoCD2 と PAA の反応後のサンプルも標品の DNPH-ホルムアルデヒド付加体と同じ溶出位置にピークが確認できた。これにより脱メチル化の反応においてホルムアルデヒドが発生していることを確認した。

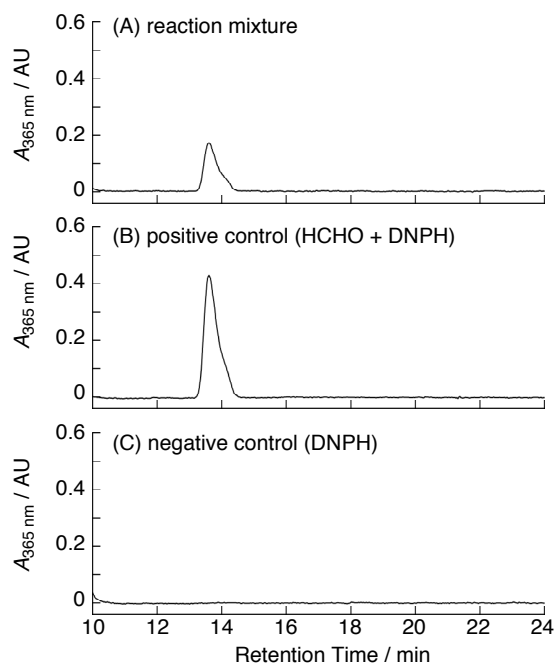


Figure 5-16. Detection of formaldehyde formed in the reaction of met-hemoCD2 (1×10^{-4} M) with PAA (2×10^{-4} M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7 and 25 °C for 5 min. After the reaction, (2,4-dinitrophenyl)hydrazine (DNPH) was added to the reaction mixture and the solution was then analyzed by HPLC (A). The eluted solution was monitored at 365 nm to detect formaldehyde (2,4-dinitrophenyl)-hydrazone. The HPLC traces (B and C) are shown as the controls.

さらに Zn^{II}TPPS/Py2CD 包接錯体および Py2CD そのものに PAA を加えても *O*-脱メチル化の反応は起こらないことを確認した。これらの結果は met-hemoCD2 の鉄中心が *O*-脱メチル化に重要な役割をしていることを示している。第四章においてクメンヒドロペルオキシド(CHPO)との反応により調整した oxoferryl-hemoCD1 (O=Fe^{IV}P)の反応では脱メチル化の反応は進行しないことを確かめている。また、CHPO を用いて調整し、ゲルろ過を用いて単離した oxoferryl-hemoCD2 (O=Fe^{IV}P)は Cpd X が生成する数秒のタイムスケールにおい

てはほとんど変化していない(Figure 5-17)。これらの結果から過酸と met-hemoCD2 との反応による Cpd X の生成には $O=Fe^{IV}P^{+}$ が関与していると考えられる。

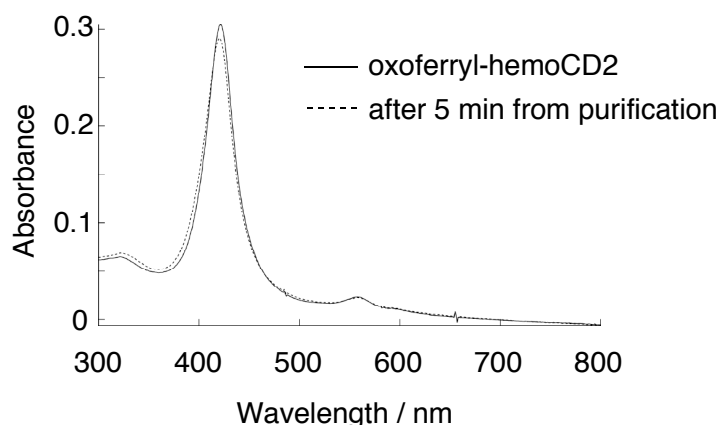


Figure 5-17. UV-vis spectra of oxoferryl-hemoCD2 (3×10^{-6} M) prepared by the reaction of met-hemoCD2 with CHPO and purified by Sephadex G25 (solid line) and the sample after 5 min from purification (dashed line) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

ストップフロー測定により反応中間体である $O=Fe^{IV}P^{+}$ 生成の確認を試みたが、 $O=Fe^{IV}P^{+}$ を示す中間体のスペクトルを測定することはできなかった(Figure 5-18(A))。ストップフロー分光法により met-hemoCD2 は mCPBA を加えると等吸収点を通して Cpd X の吸収スペクトルへと変化することが観測された。Cpd X が生成する速度を一次の速度式を用いて吸収スペクトル変化から解析し、次式により擬一次速度定数(k_{obs})を求めた¹⁴⁾。

$$A = \Delta A (1 - e^{-k_{obs}t}) - A_0 \quad (5-1)$$

さらに加える mCPBA の濃度を変えて Cpd X が生成する速度を求め、得られた k_{obs} を mCPBA 濃度に対してプロットしたところよい直線関係が得られた(Figure 5-18(B))。この結果は met-hemoCD2 と mCPBA が反応して鉄(III)アシルペルオキソ錯体($RC(O)OO-Fe^{III}P$)が生成する反応が律速段階であることを示している。生成した鉄(III)アシルペルオキソ錯体は、非常に速い速度で酸素-酸素間の結合のヘテロリシスが起こり、 $O=Fe^{IV}P^{+}$ を生じる。 $O=Fe^{IV}P^{+}$ は近くに存在する $-OCH_3$ 基を酸化することでアセタール($-OCH_2OH$)を生成し、自身は鉄(III)ポルフィリン($Fe^{III}P$)へと変化する。アセタールは分解してアルコールへと変化しホルムアルデ

ヒドを生成する。過剰に過酸が存在する条件ではさらに 2 つ目の 3 位の $-OCH_3$ が脱メチル化される。3 つ目以上の脱メチル化は $O=Fe^{IV}P^{*}$ の酸素と $-OCH_3$ 基の距離が遠くなり、 $-OCH_3$ 基を直接酸化することができなくなるために起こらないと考えられる。近くに酸化することができる $-OCH_3$ 基がない場合は、mCPBA との反応で生成する $O=Fe^{IV}P^{*}$ は速やかに周りから一電子を受け取り $O=Fe^{IV}P$ へと還元される。この $O=Fe^{IV}P^{*}$ の一電子還元は非常に速く進行するために Cpd X から $O=Fe^{IV}P$ が生成する間に $O=Fe^{IV}P^{*}$ を観測できなかったと考えられる。

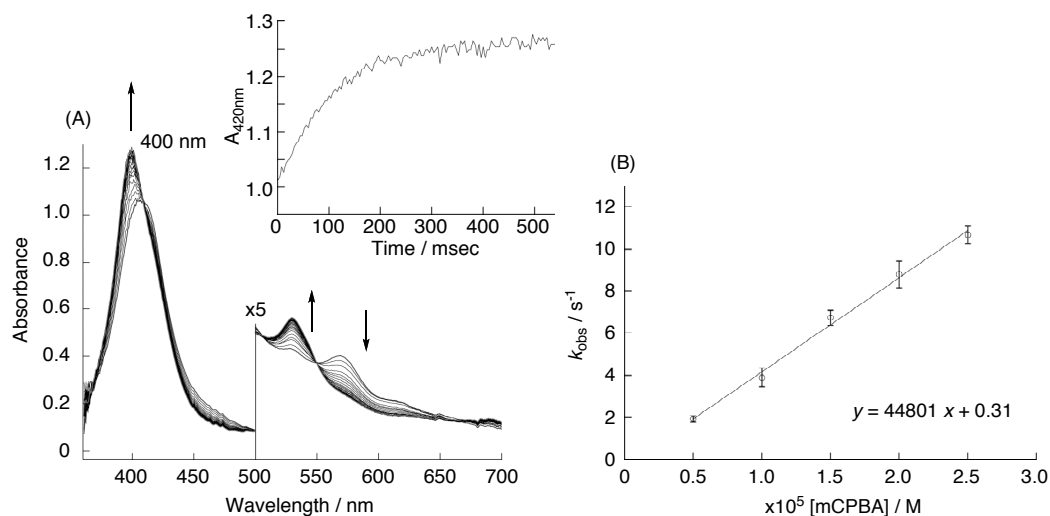


Figure 5-18. Kinetic analysis for the formation of Cpd X in the reaction of met-hemoCD2 with mCPBA. (A) UV-vis spectral changes measured by a stopped-flow technique. The spectra were recorded at time intervals of 20 msec after rapid mixing of met-hemoCD2 (1×10^{-5} M) with mCPBA (2×10^{-4} M). (B) Plot of k_{obs} versus [mCPBA] for the transformation of met-hemoCD2 to Cpd X.

3-4. hemoCD2 のモノヒドロキシル化による超分子機能の変化

met-hemoCD2 と過酸の反応により Py2CD の一つの $-OCH_3$ を $-OH$ に変換した $Py2CD^{OH}$ を HPLC により単離精製した。単離した $Py2CD^{OH}$ に $Fe^{III}TPPS$ 包接させて $Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS$ 包接錯体を調整した。 $Fe^{III}TPPS$ に対して段階的に $Py2CD^{OH}$ を加えたところ、 $Py2CD^{OH}$ は $Py2CD$ と同様に $Fe^{III}TPPS$ と 1:1 の包接錯体を形成した。再構成した $Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS$ の酸素結合挙動などのヘムタンパク質モデルとしての機能の変化について検討を行った。

3-4-1. Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS 包接錯体のアクア配位子の pK_a の決定

3-1 において Cpd X のアクア配位子のおよその pK_a を約 8 と求めたが、このときの Cpd X の試料には Py2CD/Fe^{III}TPPS、Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS および Py2CD^{2OH}/Fe^{III}TPPS の 3 種類の成分が混在した状態であるので、Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS の正確な pK_a を決定することができてなかった。ここでは単離した Py2CD^{OH} を用い、その Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS 1:1 包接錯体の pH 滴定を行うことで軸配位子であるアクア配位子の pK_a を正確に決定した。酸解離の平衡 (H_nA ⇌ n H⁺ + Aⁿ⁻) において、酸解離定数 K_a は次のように定義される^{9a, 14b, 15}。

$$K_a = [\text{H}^+]^n [\text{A}^{n-}] / [\text{H}_n\text{A}] \quad (5-2)$$

(5-1) の辺々の対数をとると次のように表すことができる。

$$\log K_a = n \log[\text{H}^+] + \log[\text{A}^{n-}] - \log[\text{H}_n\text{A}] \quad (5-3)$$

pK_a = -log K_a および pH = -log[H⁺] と定義すると(5-3)は次のように表される。

$$\text{p}K_a = n \text{pH} + \log([\text{H}_n\text{A}] / [\text{A}^{n-}]) \quad (5-4)$$

吸収スペクトルを測定したときに、測定範囲内に吸収を持つ化学種が H_nA および Aⁿ⁻ のみである場合、[H_nA] および [Aⁿ⁻] を C_a および C_b とすると吸光度は Lambert-Beer の式から、次のように表すことができる。

$$A = \varepsilon_a C_a l + \varepsilon_b C_b l \quad (5-5)$$

$$A_a = \varepsilon_a (C_a + C_b) l \quad (5-6)$$

$$A_b = \varepsilon_b (C_a + C_b) l \quad (5-7)$$

ここで、ある pH において実際に測定される吸光度 A、低い pH 条件で H_nA のみが存在する状態の吸光度 A_a、高い pH 条件で Aⁿ⁻ のみが存在する状態の吸光度 A_b、光路長 l をそれぞれ表す。(5-5) から(5-6)、(5-7) から(5-5) をそれぞれ引くと次のようになる。

$$A - A_a = (\varepsilon_b - \varepsilon_a) C_b l \quad (5-8)$$

$$A_b - A = (\varepsilon_b - \varepsilon_a) C_a l \quad (5-9)$$

(5-8) および(5-9) から次の関係が得られる。

$$A - A_a / A_b - A = C_b / C_a = [\text{A}^{n-}] / [\text{H}_n\text{A}] \quad (5-10)$$

(5-4) および(5-10) から次式が導かれる。

$$\log(A - A_a) / (A_b - A) = n \text{pH} - \text{p}K_a \quad (5-11)$$

よって、pH を変化させてその吸光度 A を測定し、低い pH での吸光度を A_a、高い pH での吸光度 A_b として、pH に対して log(A - A_a)/(A_b - A) をプロットする。直線の y 切片が -pK_a となり、直線の傾き n が反応に関与するプロトン数となる。

まず $\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ の pH 滴定を行い鉄(III)の軸配位子であるアクア配位子の $\text{p}K_{\text{a}}$ を求めた。0.1 M の過塩素酸ナトリウム水溶液に溶かした $\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ 包接錯体水溶液の pH を水酸化ナトリウムおよび過塩素酸を用いて段階的に変化させて、その吸収スペクトルを測定した。その吸収スペクトル変化を Figure 5-19 に示す。溶液の pH を段階的に下げることで $\text{Py}2\text{CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ のモノヒド

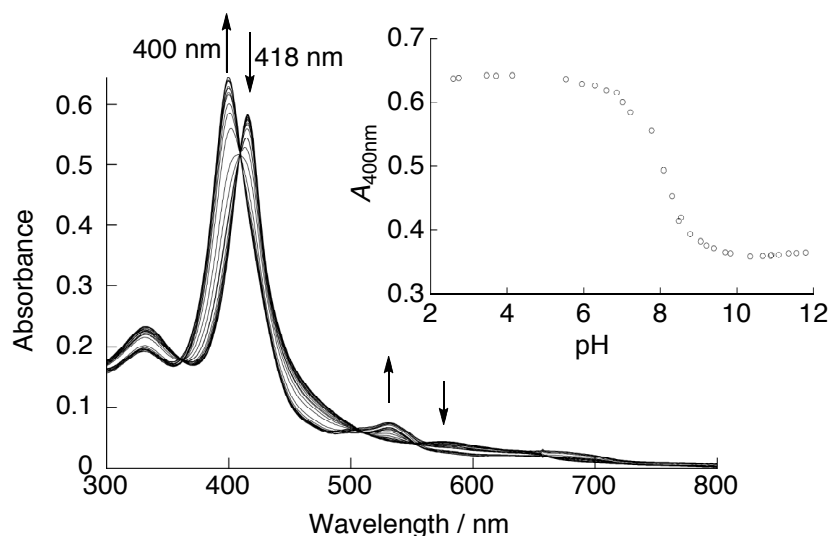


Figure 5-19. UV-vis spectral changes of the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}/\text{Py}3\text{CD}^{\text{OH}}$ complex (1×10^{-5} M) as a function of pH. The pH of the solution was adjusted by NaOH and HClO_4 . Inset shows the plot of the absorbance at 400 nm versus pH.

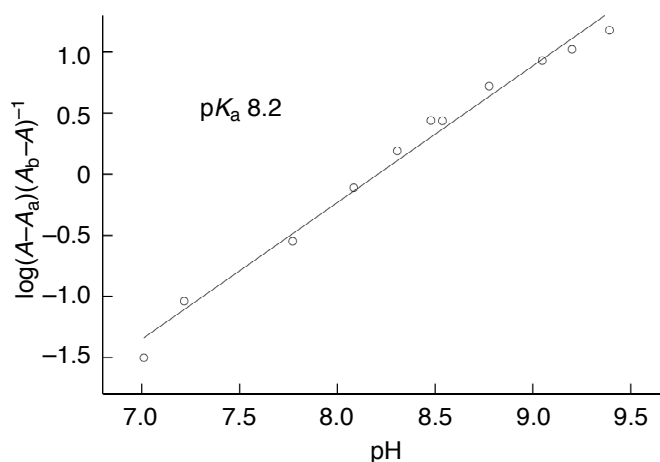


Figure 5-20. Plot of $\log(A - A_{\text{a}})(A_{\text{b}} - A)^{-1}$ at 398 nm of the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}/\text{Py}3\text{CD}^{\text{OH}}$ complex (1×10^{-5} M) versus pH for determining the $\text{p}K_{\text{a}}$.

ロキソ錯体($\lambda_{\max} = 418 \text{ nm}$)の吸収はモノアクア錯体($\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$)の吸収へと変化した。Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS モノアクア錯体の $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$ における吸光度の変化 $\log(A - A_a)/(A_b - A)$ を pH に対してプロットして、得られた直線から $pK_a = 8.2$ と決定した (Figure 5-20)。met-hemoCD2 の軸配位した H₂O の pK_a は 6.9⁸⁾ であるので、Py2CD の 1 つの -OCH₃ 基が -OH 基に置き換わるだけで pK_a が顕著に上昇するという興味深い結果が得られた。O-メチル基の脱メチル化によって pK_a が上昇した原因はヒドロキシ基と軸配位子の水との水素結合により、アキシアルの H₂O の酸解離が抑えられたためと考えられる (Figure 5-21)。

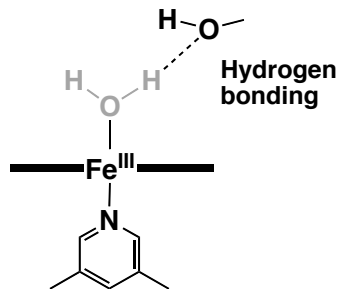


Figure 5-21. Plausible structure of monoqua met-hemoCD2 stabilized by hydrogen bonding between an axial H₂O and a hydroxy group in the cyclodextrin dimer.

3-4-2. Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の酸素結合挙動

これまでに Kano らによってシクロデキストリンダイマー/鉄(II)ポルフィリン (hemoCD1) による水中で機能するミオグロビンモデルに関する研究が行われている^{7-8,16)}。hemoCD1 の系において遠位側に置換基を修飾した例はなく、遠位側の置換基による酸素錯体形成への影響はまだ調べられていない。Py2CD^{OH} は包接錯体を形成した際に遠位側に 1 つヒドロキシ基が存在することで、鉄(III)の状態でアクア錯体の pK_a が大きく上昇することが明らかとなり、遠位側に存在するヒドロキシ基の影響が顕著であることがわかった。ここでは、遠位ヒドロキシ基が鉄(II)酸素錯体に与える影響を調べた。

Py2CD^{OH}/Fe^{III}TPPS 錯体 ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 0.1 \text{ mM}$, $[\text{Py2CD}^{\text{OH}}] = 0.12 \text{ mM}$, 0.3 mL) の pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液に過剰量の Na₂S₂O₄ を加え中心鉄を鉄(II)へと還元した。Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS 溶液をゲルろ過カラム (Sephadex G25, HiTrapTM Desalting 5 mL, GE Healthcare) に充填して、pH 7.0 のリン酸緩衝溶液で溶出し、赤色のフラクションを集めた。ゲルろ過カラムを通すことにより過剰に含まれる Na₂S₂O₄ およびその分解物を取り除いた Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS のストック溶液を調整した。あらかじめ 10 分間窒素ガスを通気した pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝溶液を用いて Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS のストック溶液を希釈し、さらに 1 分間窒素バブリングし、

溶存酸素を追い出した後に吸収スペクトルを測定した(Figure 5-22(solid line))。434 および 534 nm に吸収極大を持つ鉄(II)デオキシ錯体(Fe^{II}P)を示すスペクトルが観測された。この溶液に対して酸素を 1 分間バブリングすることで鉄(II)酸素錯体(O₂-Fe^{II}P)の形成を示すスペクトル(Figure 5-22 (dashed line))へと変化した。ここで観測されたスペクトルが鉄(II)錯体であることを確認するために鉄(II)錯体にのみ配位する CO を溶液にバブリングした。吸収スペクトルは鉄(II)CO 錯体(CO-Fe^{II}P)を示す鋭いスペクトルへと変化した(Figure 5-22 (dotted line))。この一連のスペクトル変化から Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS が酸素錯体を形成することを確認した⁷⁾。

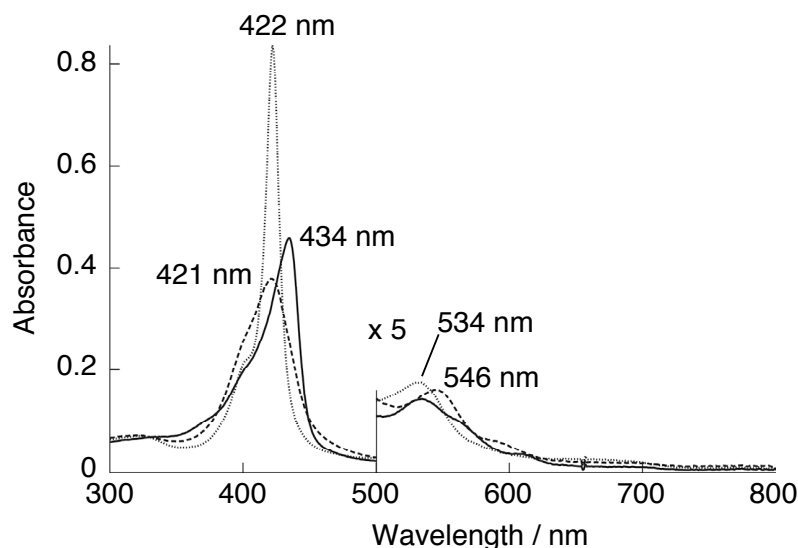


Figure 5-22. UV-vis spectra of the Fe^{II}TPPS/Py2CD^{OH} complex under N₂ (solid line), O₂ (dashed line), and CO atmospheres (dotted line) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7 and 25 °C.

3-4-3. Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の酸素親和性

Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS が酸素錯体を形成することが明らかとなったので、その酸素親和性の検討を行った。第三章に記した方法により解析を行うことで酸素レセプター分子の半分が酸素化される酸素分圧 $P_{1/2}^{O_2}$ を求めた¹⁷⁾。 $P_{1/2}^{O_2}$ の算出は次式を用いて行った。

$$P^{O_2} = \frac{\Delta\varepsilon[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_t P^{O_2}}{\Delta A} - P_{1/2}^{O_2} \quad (5-12)$$

(5-12)において実際の解析では、 $\Delta\epsilon$ および $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}]_i$ は定数となるので、種々の酸素分圧において吸収スペクトルを測定し、得られた吸光度変化と酸素分圧の比($P^{\text{O}_2} / \Delta A$)を酸素分圧(P^{O_2})に対してプロットすることで得られる直線の y 切片から $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ を見積もった。

測定においては所定の酸素分圧になるように窒素および酸素の流量を調整して混合したガスを 10 分間バブリングして飽和させた pH 7.0 のリン酸緩衝液を調整した。この緩衝液を用いて 3-4-2 の方法で調整した $\text{Py2CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}$ のストック溶液を約 25 倍に希釈した。さらに 1 分間所定の酸素分圧の混合ガスをバブリングさせた後にセルを密封して吸収スペクトルを測定した。また、酸素分圧 P^{O_2} はガス混合装置に流す窒素流量 V^{N_2} および酸素流量 V^{O_2} から次式により求めた。

$$P^{\text{O}_2} (\text{Torr}) = \frac{V^{\text{O}_2} (\text{mL min}^{-1}) \times 760 (\text{Torr})}{V^{\text{N}_2} (\text{mL min}^{-1}) + V^{\text{O}_2} (\text{mL min}^{-1})} \quad (5-13)$$

種々の酸素分圧での吸収スペクトルの測定結果を Figure 5-23(A)に示す。酸素分圧が上がるとともに 434 nm の $\text{Fe}^{\text{II}}\text{P}$ 由来のソーレー帯は 422 nm の $\text{O}_2\text{-Fe}^{\text{II}}\text{P}$ のスペクトルへと変化した。434 nm における吸光度変化と酸素分圧の比を酸素分圧に対してプロットした結果を Figure 5-23 (B)に示す。得られた直線の y 切片から $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ を見積もったところ 17 Torr と求めることができた。 hemoCD2 の $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ は 176 Torr であるので、 $\text{Py2CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}$ はヒドロキシ基の存在によって酸素親和性が著しく向上したことを示している。これは Figure 5-24 に示した構造のように鉄に配位した酸素分子がヒドロキシ基と水素結合することで、酸素の解離速度 k_{off} が遅くなったことにより酸素親和性が上昇したと考えられる¹⁸⁾。この点についてはレーザーフラッシュホトリシスにより確認を行う必要がある。さらに、酸素の滴定曲線を Figure 5-23 (C)に示す。 $\text{Py2CD}^{\text{OH}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}$ の滴定曲線はミオグロビンや hemoCD2 と同じ飽和型の滴定曲線となり、包接錯体の分子間におけるアロステリック効果などが無いことを確認した。

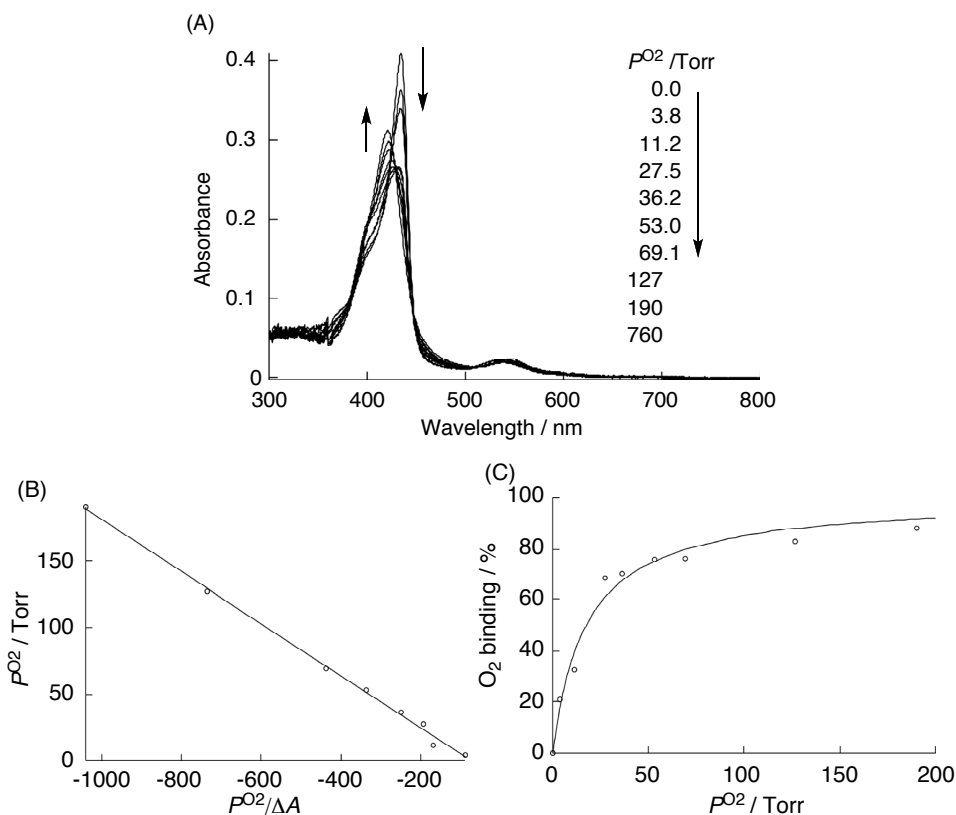


Figure 5-23. UV-vis spectral changes of Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS (2×10^{-6} M) as a function of the O₂ partial pressure (P^{O_2}) in N₂ in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C (A), plot of $P^{O_2} / \Delta A_{433\text{nm}}$ versus P^{O_2} for determining $P_{1/2}^{O_2}$ (B), and the titration curve for O₂ binding to hemoCD (C).

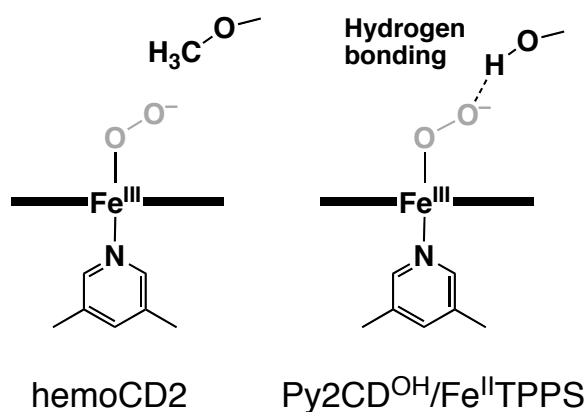


Figure 5-24. Plausible structure of O₂ adduct of Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS.

3-4-4. Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の自動酸化速度

Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の酸素錯体の安定性について検討した。鉄(II)酸素錯体の自動酸化はミオグロビン¹⁹⁾やそのモデル系^{16a)}を用いてメカニズムが調べられている。Shikama らによって提案された自動酸化のメカニズムは、鉄(II)酸素錯体が水分子により求核置換されることで鉄(III)錯体とスーパーオキシドアニオンラジカルを生成するというものである^{19b)}。



水は溶媒として大過剰に存在しているため、自動酸化反応は擬一次反応となり、一次の速度式で解析できる。3-4-2の方法で調整した Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の溶液を空気飽和の pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝溶液で希釈しその吸収スペクトルの経時変化を測定した。空気飽和のリン酸緩衝液中での Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の吸収スペクトルは鉄(II)酸素錯体形成を示す $\lambda_{\text{max}} = 422 \text{ nm}$ のスペクトルが観測された。この溶液を 25 °C の条件で静置して吸収スペクトルの変化を測定した。鉄(II)酸素錯体形成を示す $\lambda_{\text{max}} = 422 \text{ nm}$ のスペクトルは時間とともに鉄(II)酸素錯体 ($\lambda_{\text{max}} = 422 \text{ nm}$) から鉄(III)モノアクア錯体 ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$) のスペクトルへと変化した (Figure 5-25)。このスペクトル変化において等吸収点が見られないことから単純

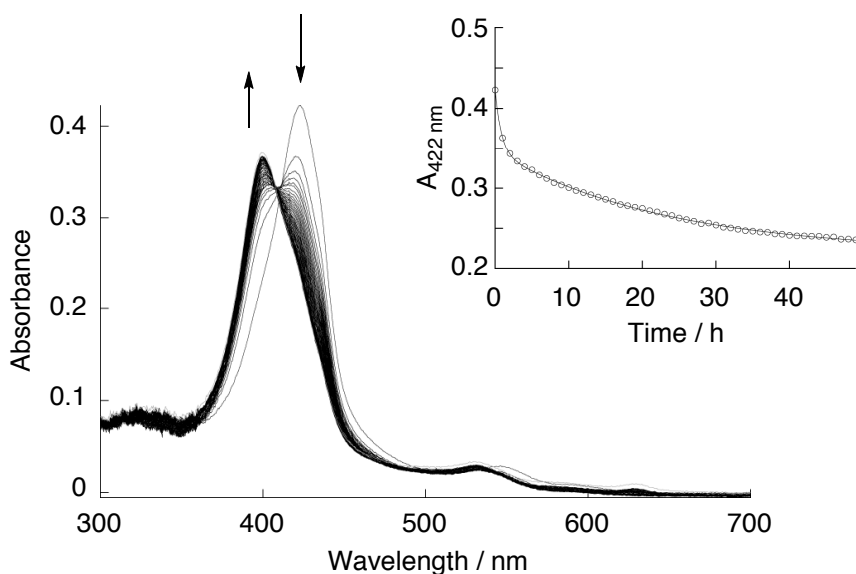


Figure 5-25. UV-vis spectral changes of during autoxidation of O₂-Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS (2 × 10⁻⁶ M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. Spectra were measured at time intervals of 30 min.

な鉄(II)から鉄(III)への変化ではないことが考えられる。さらに酸素錯体由来の 422 nm における吸光度変化を時間に対してプロットしたところ単純な一次の速度式で解析することができなかった。そこで吸光度の半分が変化した時間を半減期として、酸素付加体の安定性を見積もった。Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の酸素錯体の半減期はおよそ 4 時間と求められた。hemoCD2 は *O*-メチル化シクロデキストリンのパッキングが非常に良く、鉄中心に水分子が近づくことができないため、室温、pH 7.0 の条件では自動酸化が全く起こらないと報告されている⁸⁾。さらに半減期が 30 時間の hemoCD1 の酸素付加体と比較しても Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の酸素付加体は非常に自動酸化され易いことがわかる。MM3 計算により推定される Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS の構造を Figure 5-26 に示す。hemoCD2 の鉄に最も近い 3 位の *O*-メチル基をヒドロキシ基に置換して計算を行った。Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS と hemoCD2 を比較すると、1 カ所の *O*-メチル基がヒドロキシ基に置き換わったことで 2 つの *O*-メチル化シクロデキストリンの間に隙間できている(Figure 5-26 (A)丸部分)。この部分から鉄中心に水分子が進入することによって自動酸化が加速されたものと考えられる。

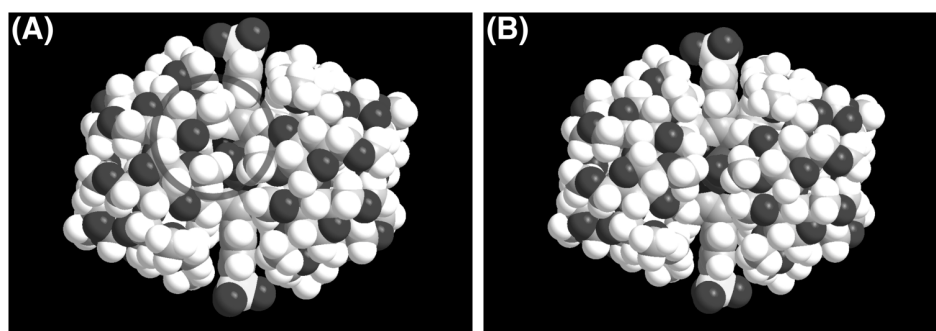


Figure 5-26. Energy-minimized structures of oxy-Py2CD^{OH}/Fe^{II}TPPS complex (A) and oxy-hemoCD2 (B) obtained from MM3 calculations using a SCIGRESS 2.2.

4. 結言

本章では水中で機能するヘムタンパク質モデル hemoCD1 および hemoCD2 を用いてヘムタンパク質で触媒される生体内酸化反応において重要な活性種であ

る Cpd I (鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル、 $O=Fe^{IV}P^{+}$)の観測を試みた。鉄(III)ペルオキソ錯体の酸素-酸素間の結合のヘテロリシスを誘発する酸化剤として、*m*-クロロ過安息香酸(mCPBA)および過酢酸(PAA)を用いた。鉄(III)の met-hemoCD1 に mCPBA を反応させたところポルフィリン環の分解が進行した。hemoCD1 を構成する Py3CD は 2 つのシクロデキストリンの連結にスルフィド結合を用いているため、過酸によってこのリンカー部位が直接酸化される。第四章においてリンカーのスルフィド結合を酸化すると $Fe^{III}TPPS$ の包接が弱くなることがわかっている。met-hemoCD1 と mCPBA との反応においては、met-hemoCD1 のスルフィド結合が mCPBA によりスルホキシド化あるいはスルホニル化されることにより、2 つのシクロデキストリンによる $Fe^{III}TPPS$ のパッキングがゆるみ、そのため過酸との反応によりポルフィリン環が分解したものと考えられる。そこでエーテル結合で連結した met-hemoCD2 を用いて過酸との反応を検討した。met-hemoCD2 は過酸との反応により Cpd I に対応する化学種 ($O=Fe^{IV}P^{+}$)を生成した。生成した $O=Fe^{IV}P^{+}$ が近くに位置するシクロデキストリンダイマーの *O*-メチル基に酸素添加することで脱 *O*-メチル化反応を起こした。脱メチル化反応によってシクロデキストリン 3 位の *O*-メチル基がヒドロキシ基に変換された。この反応は鉄オキソの近くで進行するため、鉄オキソの近くにある 2 つの *O*-メチル基のみが脱メチル化反応を起こした。 $O=Fe^{IV}P^{+}$ の生成を分光学的に観測することはできなかったが、その著しい酸化活性から $O=Fe^{IV}P^{+}$ が生成することは間違いないと言える。また、1 つの *O*-メチル基を脱 *O*-メチル化した Py2CD (Py2CD^{OH})を単離し、その $Fe^{III}TPPS$ との包接錯体の機能を hemoCD2 と比較した。Py2CD^{OH}/ $Fe^{III}TPPS$ の鉄中心のアクア配位子の pK_a は 8.2 となり、元の met-hemoCD2 の pK_a の 6.9 と比較して高い値となった。中心鉄を還元した Py2CD^{OH}/ $Fe^{II}TPPS$ の酸素結合挙動は、hemoCD2 と異なる挙動を示した。Py2CD^{OH}/ $Fe^{II}TPPS$ の酸素親和性は $P_{1/2}^{O_2} = 17 \text{ Torr}$ となり、met-hemoCD2 の $P_{1/2}^{O_2} = 176 \text{ Torr}$ よりも 10 倍酸素親和性が上昇した。Py2CD^{OH}/ $Fe^{II}TPPS$ の鉄(II)から鉄(III)の自動酸化反応の半減期は 4 時間となり、水による自動酸化が加速された。 pK_a や酸素親和性の変化は、鉄に配位した水や酸素に Py2CD^{OH} のヒドロキシ基が相互作用(水素結合相互作用)することでヘムタンパク質における遠位側のヒスチジンの役割を果たしていると考えられることと説明できる。

5. 参考文献

1. (a) Ortiz de Montellano, P. R., *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 932-948; (b) 増田秀明; 福住俊一, *生物無機化学*. 三共出版: 2005.
2. (a) Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H., *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2888; (b) Rittle, J.; Green, M. T., *Science* **2010**, *330*, 933-937; (c) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253-2277.
3. (a) Watanabe, Y.; Nakajima, H.; Ueno, T., *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 554-562; (b) Nam, W., *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 522-531.
4. (a) Spolidakis, T.; Dawson, J. H.; Ballou, D. P., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 2034-2044; (b) Groves, J. T.; Haushalter, R. C.; Nakamura, M.; Nemo, T. E.; Evans, B. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2884-2886; (c) Groves, J. T.; Watanabe, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8443-8452.
5. (a) Yamaguchi, K.; Watanabe, Y.; Morishima, I., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4058-4065; (b) Urano, Y.; Higuchi, T.; Hirobe, M.; Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12008-12009; (c) Goh, Y. M.; Nam, W., *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 914-920; (d) Bell, S. R.; Groves, J. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9640-9641.
6. Nehru, K.; Seo, M. S.; Kim, J.; Nam, W., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 293-298.
7. Kano, K.; Kitagishi, H.; Koderia, M.; Hirota, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435-438.
8. Kano, K.; Itoh, Y.; Kitagishi, H.; Hayashi, T.; Hirota, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8006-8015.
9. (a) Fleischer, E. B.; Palmer, J. M.; Srivastava, T. S.; Chatterjee, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3162-3167; (b) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Kampas, F.; Kim, J., *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 2443-2445.
10. Bellec, G.; Dréano, Y.; Lozach, P.; Ménez, J. F.; Berthou, F., *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2029-2034.
11. Ashton, P. R.; Königer, R.; Stoddart, J. F.; Alker, D.; Harding, V. D., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 903-908.
12. Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894-6897.
13. (a) Meunier, G.; Meunier, B., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 10576-10582; (b) Goto, Y.; Matsui, T.; Ozaki, S.; Watanabe, Y.; Fukuzumi, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9497-9502.

14. (a) 齊藤勝裕, *反応速度論-化学を理解するためのエッセンス*. 三共出版: 東京, 1998; (b) 日本化学会生体機能関連化学部会編, *生体機能関連化学実験法*. 化学同人: 京都, 2003.
15. (a) El-Awady, A. A.; Wilkins, P. C.; Wilkins, R. G., *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2053-2057; (b) Mosseri, S.; Mialocq, J. C.; Perly, B.; Hambright, P., *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4659-4663.
16. (a) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Kodera, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448-4460; (b) Kano, K.; Chimoto, S.; Tamaki, M.; Itoh, Y.; Kitagishi, H., *Dalton. Trans.* **2012**, *41*, 453-461.
17. (a) Collman, J. P.; Zhang, X.; Wong, K.; Brauman, J. I., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6245-6251; (b) Zingg, A.; Felber, B.; Gramlich, V.; Fu, L.; Collman, J. P.; Diederich, F., *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 333-351.
18. Tani, F.; Matsu-ura, M.; Ariyama, K.; Setoyama, T.; Shimada, T.; Kobayashi, S.; Hayashi, T.; Matsuo, T.; Hisaeda, Y.; Naruta, Y., *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 862-870.
19. (a) Springer, B. A.; Sligar, S. G.; Olson, J. S.; Phillips, G. N., Jr., *Chem. Rev.* **1994**, *94* (3), 699-714; (b) Shikama, K., *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1357-1374.

第六章 結論

生体内においては酸化、還元、重合、官能基変換、炭素-炭素結合形成などの有機化学反応が高い選択性と効率で行われている。これらの反応は酵素が担っており、酵素-基質複合体を経ることにより高選択性と高効率を実現している。学問としての化学やその応用としての化学工業はここ 100 年の間に大きく進歩して非常に多くの新しい化合物を作れるようになったが、その効率や選択性は生体内で行われる反応には及ばないものが多い。生命が長年の時間をかけて獲得した高度に組織化されたシステムの中には多くの学ぶべき点が存在している。そのためバイオメティックケミストリーの中でも特に超分子化学および生物無機化学の分野ではそれらの生命現象を解明し、理解することにより、人類に役立てることを目指した研究が行われている。生体内で起こる化学反応は非常に魅力的で多くの化学者たちを惹きつけているが、その中でも金属ポルフィリンのヘムが関与するヘム酵素・ヘムタンパク質の反応は特に魅力的であり、盛んに研究が行われている。Groves ら¹⁾によって酸化活性種である鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカルの生成がモデル系で達成されて以来、さまざまな研究グループにより鉄ポルフィリンを用いた酵素モデル系が構築され、多くの知見が得られてきた。それらの研究成果により生体内ヘム酵素反応やそのモデル反応における酸化活性種や反応機構が解明されつつある。しかし、これまでの酵素モデルの研究は有機溶媒系で行われることが多く完全水中におけるヘム酵素モデルの構築は報告例が非常に少ない。ヘム酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼ, HRP)において、水分子が活性中心に存在することが酵素の X 線結晶構造解析により明らかになり²⁾反応への関与も考えられる。このような経緯からもこれからの酵素モデルは水中で研究されるべきであると言える。そのためにはまず水中で機能するモデル系の構築が必要となるが、酸化剤を反応させるとラジカルが生じ、ポルフィリン環の分解などが起こるため反応場の制御が重要となる。生体系では反応中心のヘムがタンパク質で取り囲まれており、バルク水層からヘムを隔離すると同時に、ヘムの機能性を引き出す作用をしている。しかし、従来のモデル研究ではタンパク質の働きを考慮した系は全くといってよい程構築されていない。本研究では超分子の概念を生体モデル系に導入し、タンパク質をのモデル化も考慮して、鉄ポルフィリン/シクロデキストリンの系を用いて水中で機能するヘム酵素モデルに関する研究を行った。以下に本研究を遂

行する過程で得られた知見および今後の展望について述べる。

第二章では、パー-O-メチル化 β -シクロデキストリンをピリジン配位子 (-SCH₂PyCH₂S-) で連結した二量体(Py3CD)と水溶性鉄(III)ポルフィリン Fe^{III}TPPS で構成されるヘムタンパク質モデル met-hemoCD1 を用いて、ペルオキシダーゼのモデル反応について検討した。Py3CD の包接がない裸の Fe^{III}TPPS に過酸化水素を反応させるとポルフィリン環の分解が起こり、ヒドロキシルラジカル(\bullet OH)によるポルフィリン環の開裂反応の進行が質量分析の結果から確認された。対照的に Py3CD が Fe^{III}TPPS を包接した met-hemoCD1 と過酸化水素の反応では、ポルフィリンの分解が顕著に抑制された。分光学的な解析の結果、met-hemoCD1 の鉄(III)中心に過酸化水素が配位して、ペルオキシダーゼにおける Cpd 0 に対応した化学種である鉄(III)ヒドロペルオキシ錯体(HOO-Fe^{III}P)を経て、速やかに Cpd II に対応する鉄(IV)オキソポルフィリン(O=Fe^{IV}P, oxoferryl-hemoCD1)が生じることを明らかとした。EPR スペクトルで観測されたヒドロペルオキシ種は 2 種類存在し、これらのヒドロペルオキシ種の錯体構造をそれぞれ第 5 配位子がピリジン配位(HOO-Fe^{III}(Py)P)とヒドロキソ配位(HOO-Fe^{III}(OH)P)であることを明らかとした。これまでヘム酵素の系で観測された EPR においても 2 組のヒドロペルオキシ種が観測されたという報告例³⁾が有り、その構造についてこれまでさまざまな議論が行われている。しかしタンパク質を用いた系ではヘム周辺にはさまざまなアミノ酸残基が存在し、それらが影響するために反応や構造の議論が複雑になる。タンパク質の系では、これらの影響をなくすためにアミノ酸の一部に変異を加えることがあるが、変異することによってタンパク質が正しくフォールディングしなくなってしまうなどその扱いが非常に難しい。一方で、met-hemoCD1 の系では、ポルフィリン周辺は O-メチル基のみに覆われているため構造が単純であり、さらには近位配位子の置換も容易に行うことができる。これらのモデル系の強みを活かすことで長年にわたる議論の対象であった 2 種類のヒドロペルオキシ種の構造を決定することができた。今後は met-hemoCD1 のヒドロペルオキシ種の反応について検討を行うことで、水中でのヒドロペルオキシ種の反応機構に関する知見が得られるものと期待される。

第三章では過酸化水素と met-hemoCD1 から oxoferryl-hemoCD1 が生成するメカニズムについて検討を行った。スピントラップ法による実験の結果から HOO-Fe^{III}P の酸素-酸素間の結合のラジカル的な開裂を経て O=Fe^{IV}P を生じることが明らかとなった。この反応で生成する \bullet OH ラジカルはシクロデキストリン

のカプセル内で $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ と再結合することで安定化される ($[\text{HOO}-\text{Fe}^{\text{III}}\text{P}] \rightleftharpoons [\bullet\text{OH} + \text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}]$, $[\]$ はシクロデキストリンの包接を示す)。この安定化によりポルフィリンの分解が抑制されたものと考えられる。カプセル内で安定化された $\bullet\text{OH}$ ラジカルはラジカル同士のカップリングにより H_2O_2 を生じて消失するものと考えられる ($2[\bullet\text{OH} + \text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}] \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + 2[\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}]$)。met-hemoCD1 に高分子(ポリエチレングリコール, PEG)を修飾し分子間の反応を抑制することで、 $\text{HOO}-\text{Fe}^{\text{III}}\text{P}$ をさらに安定化することに成功した。これまで PEG 修飾は薬物動態の改善などに使われることが多かったが、高分子修飾で分子間反応を制御することによる不安定中間体を安定化するという手法は、hemoCD1 以外の他の錯体においても適用できると思われる。水中のモデル系において Cpd 0 に対応するヒドロペルオキシ種を観測したという報告例は今までに無く、この化学種については未だに未解明な点が多い。本研究においてヒドロペルオキシ種がシクロデキストリンダイマーがポルフィリン周辺に作る疎水空間によって安定化されことを明らかとし、さらにヒドロペルオキシ種と鉄(IV)オキシ種と $\bullet\text{OH}$ ラジカルとの間の平衡が存在することを提案した。これまでのヘム酵素モデル系では活性な $\bullet\text{OH}$ ラジカルの安定化は全く考慮されていない。モデル系において鉄(III)ヒドロペルオキソポルフィリン錯体の反応性や錯体構造についてさらに詳細に調べることで生体系における Cpd 0 の反応に関して新たな知見が得られる可能性がある。

第四章では、oxoferryl-hemoCD1 の分子内二電子酸化反応について検討した。過剰の酸化剤の影響をなくするためにゲルろ過カラムを用いて過剰に含まれる酸化剤を取り除いて鉄(IV)オキソポルフィリン錯体を精製した。oxoferryl-hemoCD1 には、その前駆体である 2 種類のヒドロペルオキシ種に由来して 2 種類の鉄(IV)オキソ錯体 ($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{P}$) および ($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{P}$) が生成する。それぞれの錯体は異なる反応性を示し、 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{P}$ はその周辺の環境を一電子酸化することで自身は鉄(III)の met-hemoCD1 へと変化する。 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{P}$ は分子内でスルフィド結合に直接酸素移動することで自身は鉄(II)錯体を生成した。 $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ からの酸素移動反応を直接観測した例は有機溶媒中での 1 例⁴⁾しかない。他の鉄ポルフィリンを用いたモデル系においても $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ からの二電子酸化を伴う酸素移動が検討されているが、二電子酸化により生成する鉄(II)錯体を観測した例は報告されていない。スルフィド結合は比較的酸化されやすい結合であるので、この酸素移動反応が観測できたと考えられる。oxoferryl-hemoCD1 は分子内で反応してしまうため外部基質との反応を調べるのは難しいが、hemoCD1 の類縁体を用い

ることで外部基質との反応を詳細に検討することができると考えられる。シクロデキストリンでカプセル化された $O=Fe^{IV}P$ は安定性が高いためにゲルろ過による生成ができた。これまでの酵素モデルの鉄ポルフィリンの反応は過剰の酸化剤が存在する条件でその反応を見ているため、反応中間体と酸化剤のさらなる反応によって生じる活性種による反応を除外することができない。しかし、oxoferryl-hemoCD1 の系では酸化活性種を過剰の酸化剤から分離できるので、鉄(IV)オキソポルフィリンのみの反応を検討することができた。今後はより酸化されにくいアルケンやアルカンなどへの $O=Fe^{IV}P$ からの酸素移動について検討ができればさらに合成化学や錯体化学における新たな知見が得られる可能性がある。

第五章では、2つのパー-O-メチル化 β -シクロデキストリンをエーテルリンカー(-OCH₂PyCH₂O-)でつないだ二量体である met-hemoCD2 を用いて、ヘムタンパク質で触媒される生体内酸化反応において重要な活性種である Cpd I (鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル、 $O=Fe^{IV}P^{\bullet+}$)の観測を試みた。鉄(III)ペルオキソ錯体の酸素-酸素間の結合のヘテロリシスを誘発する酸化剤として、mCPBA および過酢酸(PAA)を用いた。met-hemoCD2 は過酸との反応により Cpd I に対応する化学種($O=Fe^{IV}P^{\bullet+}$)を生成した。生成した $O=Fe^{IV}P^{\bullet+}$ が近くに位置するシクロデキストリンダイマーの3位の O-メチル基に酸素添加することで脱 O-メチル化反応を起こした。この反応は鉄オキソの近くで進行するため、鉄オキソの近くにある2つの O-メチル基のみが選択的に脱 O-メチル化反応を起こす。また、1つの O-メチル基を脱 O-メチル化した Py2CD (Py2CD^{OH})を単離し、その Fe^{III}TPPS との包接錯体の機能を hemoCD2 と比較したところ、この2つの超分子で大きく異なる挙動を示した。すなわち Py2CD^{OH} の Fe^{III}TPPS 錯体のアキシアル配位子である水分子の pK_a(8.2)は、met-hemoCD2(6.9)のそれよりも大きく、さらにその鉄(II)体の酸素親和性は約 10 倍高くなった。pK_a や酸素親和性の変化は鉄に配位した水や酸素に、Py2CD^{OH} のヒドロキシ基が相互作用(水素結合相互作用)することで、これらの第 6 配位子を安定化し、ヘムタンパク質における遠位側のヒスチジンの役割を果たしたものと考えられる。有機溶媒中のミオグロビンのモデル錯体において遠位側配位子による酸素親和性などへの影響が研究されているが、水中のモデル系における遠位側配位子の効果については全く研究されておらず、興味を持たれていた。これまで遠位側の配位子が導入できなかったため、hemoCD1 の系では遠位側の配位子の影響の検討が行われていなかった

が、Py₂CD^{OH}/Fe^{III}TPPS は遠位側配位子をもつヘムタンパク質モデルとして機能していると考えられ、ここで得られた選択的脱 O-メチル化の概念を利用して、新たな超分子系を作ることができれば、ヘモグロビンあるいはミオグロビンモデルの酸素親和性や一酸化炭素親和性について新たな知見が得られるものと期待される。

参考文献

1. Groves, J. T.; Haushalter, R. C.; Nakamura, M.; Nemo, T. E.; Evans, B. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2884-2886.
2. Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szoke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J., *Nature* **2002**, *417*, 463-468.
3. (a) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 42706-42710; (b) Ichikawa, Y.; Nakajima, H.; Watanabe, Y., *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1582-1589; (c) Davydov, R. M.; Yoshida, T.; Ikeda-Saito, M.; Hoffman, B. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10656-10657; (d) Davydov, R.; Osborne, R. L.; Shanmugam, M.; Du, J.; Dawson, J. H.; Hoffman, B. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14995-15004.
4. Chin, D.; La Mar, G. N.; Balch, A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5945-5947.

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の計画と遂行に懇切丁寧なる御指導と御鞭撻を賜りました同志社大学 理工学部 加納 航治 教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始的確かつ温かいご指導を賜りました同志社大学 理工学部 北岸 宏亮 助教に心より厚く御礼申し上げます。

本論文を審査にあたり有益な御助言とご指導を賜りました同志社大学 理工学部 小寺 政人 教授および東 信行 教授に心より感謝の意を表します。

研究を行う多くの場面で多大な助言をいただきました同志社大学 理工学部 水谷 義 教授、古賀 智之 准教授および人見 穰 准教授ならびに同志社女子大学 薬学部 根木 滋 助教には心から深謝いたします。

共鳴ラマン測定に関して装置を快く貸していただき、測定に関して多大なるご協力をいただきました奈良先端大学院大学 廣田 俊 教授ならびに九州大学 先導物質化学研究所 成田 吉徳 教授および太田 雄大 助教に厚く御礼申し上げます。

研究室において終始活発な議論や御指導、御協力をいただきました渡辺 賢司 博士、唐杉 慶一 博士、玉置 まり子 氏および糸田 紗規 氏をはじめとする機能有機化学研究室の先輩、同期および後輩の皆様には深く感謝いたします。

研究など多くの場面で活発な議論を行いました掛谷 和久 氏をはじめとする友人の皆様には深く感謝いたします。

最後に研究活動におけるさまざまな面で支援していただきました両親や家族に心より感謝します。