

# 博士学位論文審査要旨

2021年1月30日

論文題目： 超分子ヘムタンパク質モデルの機能改善および医学・生理学分野への応用に関する研究

学位申請者： 毛 齊悦

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 小寺 政人

副査： 理工学研究科 教授 水谷 義

副査： 理工学研究科 教授 古賀 智之

要 旨：

生体に学ぶバイオミメティック化学の研究は、生体内化学反応の本質的理解を促すとともに、様々な分野での実用が可能な素材の開発に繋がり、基礎と応用の両面から重要である。本論文では、水中で酸素( $O_2$ )および一酸化炭素(CO)の受容体として機能する超分子ヘムタンパク質モデル錯体 hemoCD1 と hemoCD3 に着目し、これらの機能改善および医学・生理学分野への応用研究を実施した。最初に、hemoCD3 の素材となるシクロデキストリン二量体 Py3OCD を合成する際に問題となっていた副生成物の同定およびその抑制方法について検討し、Py3OCD の効率的な合成方法を確立した。次に、hemoCD1 と hemoCD3 の  $O_2$  結合部位の近傍に新たにカルボキシ基を導入することにより、CO の結合抑制とともに、 $O_2$  結合の選択性の向上に成功し、これを実現するカルボキシ基の作用機構について詳細に検討した。また、元来の hemoCD1 が示す極めて高い CO 結合親和性に着目し、この性質に基づいた生体内 CO の検出と除去試薬としての利用法を提案し、動物の体内に拡散した CO ガスの臓器分布について hemoCD1 を用いて計測した。さらに CO 中毒状態における動物に対する hemoCD1 の投与効果についても検討し、将来的に CO 中毒の解毒剤の開発へとつながる有益な研究成果を示した。以上のように本論文では、水中で機能するバイオミメティック錯体である hemoCD1 と hemoCD3 を基盤とし、医学・生理学分野への実用を視野に入れた基礎および応用研究を実施し、その成果は基礎および応用研究の両面から高く評価されるものである。よって、本論文は、博士(工学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

## 総合試験結果の要旨

2021年1月30日

論文題目： 超分子ヘムタンパク質モデルの機能改善および医学・生理学分野への応用に関する研究

学位申請者： 毛 齊悦

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 小寺 政人

副査： 理工学研究科 教授 水谷 義

副査： 理工学研究科 教授 古賀 智之

要 旨：

論文提出者は現在、本学大学院理工学研究科応用化学専攻博士課程（後期課程）3年次に在学中である。本論文の主たる内容は、*Artificial Organs*, Vol. 41, pp. 372–380 (2017), *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, Vol. 93, pp. 67–76 (2019)に掲載され、さらに *Communications Biology* 誌にて査読中の論文1編が bioRxiv にプレプリント(DOI: 10.1101/2020.10.12.336735)として公開されており、十分な評価を得ている。2021年1月30日午後1時30分より約1時間30分にわたって提出論文に対する学術講演会（博士論文公聴会）が開催され、活発な質疑応答がなされたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。さらに講演会終了後、審査委員により論文に関する諸問題につき口頭試問を実施した結果、十分な学力を確認できた。また論文提出者は、英語の語学試験に合格しており、十分な語学能力を有すると認められる。よって総合試験の結果は合格であると認める。

# 博士學位論文要旨

論文題目： 超分子ヘムタンパク質モデルの機能改善および医学・生理学分野への応用に関する研究

氏名： 毛 齊悦

要旨：

自然と生体に学ぶ学問として、1950年代後半に提唱されたバイオミメティクス研究は基礎科学と応用科学との「橋渡し translational」として、化学、機械学およびマテリアルなどの分野で盛んに研究が行われている。生体内における材料や化学反応を模倣することにより創り出した生体材料は、予想もしなかった新たな機能を発揮する可能性が十分に考えられる。さらに人工的に創り出した素材を生命に取り込ませた際、これらの物質がどのように機能するのかを調べることで、生命現象の解明につながる成果が得られるとも考えられる。

本博士論文研究では、水中で機能する一連のヘムタンパク質モデル化合物群に着目し、これらに対するさらなる機能改善を試みた。さらにこれらの化合物を用いた医学・生理学分野への応用研究を実施した。水中において、水溶性鉄ポルフィリン錯体とメチル化シクロデキストリン二量体を混合すると、ヘモグロビン等の天然のヘムタンパク質と同等の機能を発揮する素材が得られることが、過去の先行研究により明らかとなっている。しかし、それらの素材にはまだ機能改善の余地があるとともに、上記のような分野で実際に役立つ素材としての利用価値が十分に考えられた。そこで本研究では、既存のモデル化合物を基盤として、上記のバイオミメティクス研究の目標を達成すべく、種々の検討を行った。

本博士論文は全六章の構成となっている。以下にそれぞれの概要を述べる。まず第一章では、序論としてバイオミメティクス研究についての研究背景を述べるとともに、本研究の意義ならびに各章の要旨について概説した。ヘムタンパク質は、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体と、グロビンと呼ばれるポリペプチド鎖であるタンパク質より構成されている。ヘムは、近位配位子からの配位結合、ヘムのプロピオン酸側鎖と周辺のアミノ酸残基との静電相互作用、および周辺の疎水性アミノ酸残基との疎水相互作用によって固定されている。この疎水ポケット内で機能を果たしている。ヘムタンパク質はバイオミメティクス研究において広く研究されてきた。超分子化学を用いたバイオミメティクス研究では、ポルフィリン-シクロデキストリン(FePor/CD)超分子錯体が有用な化合物である。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)がアニオン性鉄(III)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<sup>III</sup>TPPS)と水中で極めて安定な 2:1 包接錯体を形成し、ポルフィリンに疎水的な環境を提供する。過去に Kano らは水中で機能するヘムタンパク質モデルである hemoCD1 を創出した。hemoCD1 はピリジン配位子をリンカーとして有するパー-*O*-メチル化β-CD 二量体(Py3CD)と Fe<sup>III</sup>TPPS の 1:1 包接錯体である。hemoCD1 は Hb の T 状態(Hb-T)と近い酸素親和性( $P_{1/2}^{O_2} = 10$  Torr at pH 7.0 and 25°C)を示し、さらに非常に高い CO 親和性( $P_{1/2}^{CO} = 1.5 \times 10^{-5}$  Torr at pH 7.0 and 25°C)を示す。Kitagishi らは hemoCD1 の極めて高い CO 親和性を示す特徴に着目し、内因性 CO の生理機能について研究を発展してきた。またシクロデキストリン二量体である Py3OCD と Fe<sup>III</sup>TPPS の 1:1 包接錯体である hemoCD3 においては、hemoCD1 と同じような物性を示し、さらに中心が鉄三価の met-hemoCD3 をシアン中毒モデルのラット大腿静脈に注入すると、met-

hemoCD3 がシアン化物イオン(CN<sup>-</sup>)を捕捉し、CN<sup>-</sup>-hemoCD3 として尿中に排出されることが報告された。著者は FePor/CD 超分子錯体 hemoCD1 および hemoCD3 のこれまでに報告されている物性に着目し、これらの化合物の機能改善および医学・生理学への応用を可能にするための基礎研究を実施した。

第二章では、超分子ヘムタンパク質モデルである hemoCD3 の素材となるシクロデキストリン二量体である Py3OCD の合成方法の最適化を行った。これまでに Kano らは hemoCD を用いて生体内で機能する人工レセプターについての研究を進めてきた。その研究結果を踏まえて、hemoCD3 は生体内における O<sub>2</sub>、CO およびシアン化物イオンの人工レセプターとして有望であることがわかった。しかし、当研究室では 2013 年に報告されている hemoCD3 構成分子である Py3OCD の合成方法に従って何度も合成しようと試みたが、最終生成物である Py3OCD の収率が低く、さらに Py3OCD の代わりに Py3OCD と同じ分子量を持つが、全く機能の異なる副生成物が度々得られていた。第二章ではこの問題の解決をめざし、hemoCD3 の更なる応用研究に向け、Py3OCD の合成方法を検討し、合成方法を最適化することを試みた。まず、hemoCD3 を合成する際に用いた原料である 2,6-di-*O*-methyl-β-CD の合成を検討した。次に、合成の効率化をめざして、各種 NMR スペクトルおよび UV-vis スペクトルを用いて副生成物(6,6'-dimer)の構造を決定した。また、実際に様々な反応を試すことで調査し、その副生成物の生成を抑えるための反応条件について検討した。最後に、合成した Py3OCD を用いて、hemoCD3 の O<sub>2</sub>、CO およびシアン化物イオンの水中における結合挙動について検討を行った。

第三章では、超分子ヘムタンパク質モデルである hemoCD1 の遠位側にカルボキシ基を極性基として導入し、その O<sub>2</sub>/CO 選択性について評価した。まず、水溶性鉄ポルフィリンのフェニル基のオルト位にアミド結合で連結した側鎖の末端にカルボキシ基を導入した Glu-FeTPPS を合成し、Py3CD との 1 : 1 包接錯体である Glu-hemoCD を構築した。Glu-hemoCD の酸素/一酸化炭素結合挙動の観測を UV-vis スペクトル測定により評価したところ、Glu-hemoCD の酸素親和性( $P_{1/2}^{O_2}$ )は hemoCD1 (カルボキシル基なし)と同等の結果となったが、一酸化炭素親和性( $P_{1/2}^{CO}$ )は hemoCD1 と比較すると 300 倍ほど低下した。この原因を調べるために、O<sub>2</sub> / CO 結合における速度解析を行った。その結果、Glu-hemoCD の酸素および一酸化炭素の結合速度( $k_{on}^{O_2/CO}$ )はともに低下した一方、酸素の解離速度( $k_{off}^{O_2}$ )は低下し、逆に一酸化炭素の解離速度( $k_{off}^{CO}$ )は速くなったことがわかった。さらに、IR スペクトルより CO-Glu-hemoCD の CO の伸縮振動を観測したところ、CO-Glu-hemoCD の波数は CO-hemoCD1 より高波数側にシフトした。このことから遠位側のカルボキシ基が CO に対する負の極性効果(Negative polar effect)を示し、Fe-CO 結合を不安定化させ、CO の解離速度は速くなったと考察した。従って、遠位側のカルボキシ基が hemoCD の O<sub>2</sub> 選択性を向上させるに有用であると判断した。

第四章では、第三章においてカルボキシ基が遠位極性基として hemoCD の O<sub>2</sub> 選択性を向上させるに有用であるとわかったため、さらなる最適化をめざし、カルボキシ基をストラップにより固定してポルフィリンの鉄中心に対してカルボキシ基を垂直位置に固定したストラップポルフィリン(Fe-Por1)を設計した。Fe-Por1 を用いて、シクロデキストリン二量体(Py3OCD)との包接錯体(Fe-Por1/Py3OCD)を構築した。Fe-Por1/Py3OCD の酸素親和性( $P_{1/2}^{O_2}$ )、一酸化炭素親和性を UV-vis スペクトルにより評価した。Fe-Por1/Py3OCD の  $P_{1/2}^{O_2}$  は僅かだが増加することが観測された。一方で、CO に対する親和性は大幅に低下した。その結果、O<sub>2</sub> / CO 選択性を示す  $M$  値は 300 となった。hemoCD3 ( $M=32100$ )よりも極めて高い O<sub>2</sub> 選択性となっている。この現象に関してレーザーフラッシュフォトリシス法により O<sub>2</sub> および CO 結合における速度論的解析を行った。遠位ストラップのない hemoCD3 と比べて、Fe-Por1/Py3OCD の  $k_{on}^{O_2/CO}$  の値は低下しており、これは遠位ストラップの立体障害が原因であると考えられる。また、 $k_{off}^{O_2}$  が遅くなった原因として、中心鉄(II)に結合した O<sub>2</sub> は周りの双極子-双極子相互作用によるものと考えられる。一方、CO の解離速度  $k_{off}^{CO}$  が大きくなった。CO-Fe-Por1/Py3OCD の IR 測定を行うことによって CO の伸縮振

動の変化を観測したところ、CO-Fe-Por1/Py3OCD の CO 伸縮振動( $\nu_{C-O}$ )の周波数は hemoCD と比べて、著しく低波数側にシフトしたことが明らかになった。これは Fe<sup>II</sup> に結合した CO の O 原子の近くに正の極性効果(Positive polar effect)が働く為であると考察した。

第五章では、超分子ヘムタンパク質モデルである hemoCD1 の生理条件下において極めて高い CO 親和性を示す特徴を活かし、hemoCD1 の吸収スペクトルを用いて生体内における簡便な CO の定量法(hemoCD アッセイ)を開発した。次に、ラットに CO ガスを吸入した時の血中 CO-Hb % および各組織内の CO 量の経時変化を追跡した。CO 吸入に伴い、血中 CO-Hb % は直線的に増えていくが、組織内の CO 量があるところで飽和することが観測された。この結果は、Hb が生体内での酸素を運搬する役割を担っているだけでなく、生体内における主たる CO 貯蔵ヘムタンパク質であり、組織内に過剰な CO の蓄積を防ぐ役割を果たしていることを表している。さらに、CO 吸入後、従来の治療法である酸素換気により各組織の CO 量の変化を hemoCD アッセイで評価した。その結果、CO が脳組織に蓄積し、除去され難いことがわかった。最後に、CO 中毒における解毒剤としての hemoCD1 の投与効果について評価した。hemoCD1 を投与すると、酸素換気のみよりも効率的に脳組織に蓄積した CO を体外へと追い出せることが明らかとなった。hemoCD1 は CO 中毒時において、組織に蓄積された CO を除去するため有用な試薬であると考えられる。

第六章では、総括として本研究より得られた知見を述べた。水中で機能する鉄ポルフィリン/シクロデキストリン超分子錯体 hemoCD の合成最適化(第二章)、機能改善(第三・四章)、および医学・生理学への応用研究(第五章)について検討した。第三・四章における hemoCD の O<sub>2</sub> 選択性を向上した研究成果は、今後、機能改善した hemoCD の人工酸素運搬体への応用が期待される。また、第五章では、hemoCD1 の CO 定量試薬および CO 解毒剤としての実用性を見出した。本研究における研究成果は、今後、hemoCD を用いた機能する人工レセプターの実現に繋がると期待される。