



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

(博士論文)

2021 年

同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻

博士課程(後期)

2018 年度 1703 番

毛 齐悦

## 目次

### 第一章 緒論

1. 生体機能とバイオミメティックス	-1-
2. ガス分子	-1-
3. ヘムタンパク質について	-2-
4. ポルフィリン/シクロデキストリン超分子錯体を基盤とした ヘムタンパク質モデル	-5-
5. 本研究の意義と要旨	-8-
6. 参考文献	-12-

### 第二章 超分子ヘムタンパク質の素材となるシクロデキストリン二量体 合成方法の最適化

1. 緒言	-18-
2. 実験	-22-
2-1. 測定機器	-22-
2-2. 試薬および合成	-23-
2-2-1. 2,6-di- <i>O</i> -methyl- $\beta$ -CD の合成	-23-
2-2-2. Py3OCD <sup>OH</sup> の合成 (最適化前の方法)	-24-
2-2-3. Py3OCD の合成 (最適化前の方法)	-25-
2-2-4. Py3OCD <sup>OH</sup> ( <b>1OH</b> ) の合成 (最適化した方法)	-26-
2-2-5. Py3OCD ( <b>1</b> ) の合成 (最適化した方法)	-27-
3. 結果および考察	-28-
3-1. Py3OCD 合成の最適化	-28-
3-2. シクロデキストリン二量体 <b>2</b> と Fe <sup>III</sup> TPPS との錯形成	-32-
3-3. <b>2</b> および <b>1</b> の NMR スペクトル測定における構造の解析	-36-
3-4. Py3OCD <sup>OH</sup> ( <b>1OH</b> ) の合成条件の検討	-47-
3-5. hemoCD3 のシアン化物イオン、O <sub>2</sub> および CO 結合挙動	-49-
4. 結言	-55-
5. 参考文献	-56-

第三章 遠位側にカルボキシ基を導入した超分子ヘムタンパク質モデル  
の O<sub>2</sub> / CO 選択性評価

1. 緒言	-60-
2. 実験	-66-
2-1. 測定機器	-66-
2-2. 試薬および合成	-67-
2-2-1. Glu-TPPS の合成	-67-
2-2-2. Glu-Fe(III)TPPS の合成	-68-
2-3. 測定方法および試料調整	-69-
2-3-1. O <sub>2</sub> 親和性および CO 親和性測定	-69-
2-3-2. レーザーフラッシュフォトリシス測定	-69-
3. 結果および考察	-70-
3-1. Glu-Fe(III)TPPS の合成	-70-
3-2. Glu-Fe(III)TPPS と Py3CD との包接挙動	-71-
3-3. Glu-Fe(III)TPPS / Py3CD 包接錯体(met-Glu-hemoCD)の軸配位挙動	-72-
3-4. Glu-Fe(III)TPPS / Py3CD 包接錯体(met-Glu-hemoCD) の EPR 測定による配位状態の確認	-73-
3-5. Glu-hemoCD の O <sub>2</sub> および CO 結合挙動	-74-
3-6. Glu-hemoCD の O <sub>2</sub> および CO 結合速度	-81-
3-7. CO-Glu-hemoCD の IR 測定における極性効果の検討	-86-
4. 結言	-87-
5. 参考文献	-88-

第四章 水溶性ストラップポルフィリン鉄(II)錯体/シクロデキストリン  
二量体による超分子ヘムタンパク質モデルの構築

1. 緒言	-93-
2. 実験	-99-
2-1. 測定機器	-99-
2-2. 試薬および合成	-100-

2-3. 測定方法および試料調製	-100-
2-3-1. O <sub>2</sub> 親和性および CO 親和性測定	-100-
2-3-2. レーザーフラッシュフォトリス測定	-101-
2-3-3. 赤外分光(IR)測定	-101-
3. 結果および考察	-102-
3-1. $\alpha$ -5,15-bis-({{2,2-(3,3-[2-(monocarboxylate)]-dibenzoyl-amido]-diphenyl)-10,20 -bis-(4-{3-pyridiniumbromidepropoxyphenyl})-Fe(III)porphyrin (Fe-Por1)の合成	-102-
3-2. Fe-Por1 と Py3OCD との錯形成	-103-
3-3. Fe-Por1/Py3OCD および Fe-Por2/Py3OCD の O <sub>2</sub> および CO 結合挙動	-104-
3-4. Fe-Por1/Py3OCD, Fe-Por2/Py3OCD および hemoCD3 の O <sub>2</sub> および CO 結合速度	-114-
4. 結言	-123-
5. 参考文献	-124-

## 第五章 超分子ヘムタンパク質モデルを用いた体内における CO 局在分布の定量的解析

1. 緒言	-128-
2. 実験	-133-
2-1. 測定機器	-133-
2-2. 試薬	-134-
2-2-1. hemoCD1 溶液の調製	-134-
2-3. 実験動物の準備	-135-
2-4. 血中 CO-Hb %測定	-135-
2-5. 組織サンプルの準備	-135-
2-6. hemoCD1 による動物の組織中の CO 定量	-136-
2-7. 生体外( <i>ex vivo</i> )での組織サンプルへの CO 投与	-138-
2-8. ガスクロマトグラフィーによる肝臓内の CO 量測定	-138-
2-9. CO ガスの吸入実験	-139-
2-10. CO ガスの吸入後の空気または酸素による換気実験	-139-
2-11. CO ガスの吸入後の oxy-hemoCD1 の投与実験	-140-
2-12. ラット尿サンプルの吸収スペクトル測定	-142-

2-13. 細胞実験に用いた細胞および試薬	-142-
2-14. hemoCD1 による細胞内 CO 定量	-143-
2-15. MTT による hemoCD1 および Py3CD の細胞毒性測定	-143-
2-16. 統計解析	-143-
3. 結果および考察	-144-
3-1. hemoCD1 を用いた高感度 CO 定量法の開発	-144-
3-2. hemoCD1 を用いた生体内における CO 定量	-146-
3-3. hemoCD1 の CO 定量試薬および CO 除去剤としての物性評価	-152-
3-4. CO ガス(400 ppm)投与による生体内の血液および組織 における CO 局在分布の経時変化	-165-
3-5. CO 中毒の解毒剤として hemoCD1 の機能評価	-174-
4. 結言	-180-
5. 参考文献	-181-
第六章 結言	-189-
謝辞	

## 第一章 緒論

### 1. 生体機能とバイオミメティクス<sup>1,2)</sup>

生命は炭素、酸素、窒素などの元素を主に使って DNA やタンパク質のように情報を持つ分子を作り、それらは膜やオルガネラなどの構造を形成し、さらに階層的に構造化して細胞、組織、器官を造り上げている。生物は、石油および天然ガスなどのエネルギー源を使わずに、複雑な化学反応プロセスを組み上げて、多様な機能を発現している。自然と生体に学ぶ学問として、バイオミメティクス研究は 1950 年代後半に神経生理学者である Otto Schmitt によって提唱された<sup>3)</sup>。それ以降、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。バイオミメティクス研究は、生物学の発見を人工的に作り出し、その原理を理解するためだけに機能を再現するだけではなく、その成果は、生物学的な機能発現の機構解明に新たな知見をフィードバックすることができる。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」としての意義がある。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。

### 2. ガス分子

生命活動を行う上でガス分子の存在は必要不可欠である。酸素(O<sub>2</sub>)は動物が呼吸によって取り入れ、肺胞で赤血球へ渡され、血液により体の隅々まで運ばれて、生きるためのエネルギーを得ている。また、一酸化炭素(CO)、一酸化窒素(NO)、および硫化水素(H<sub>2</sub>S)は、人間や動物に強い毒性を示すにもかかわらず、私たちの体内では常に微量ながら生産されている。酸素は赤血球に存在するヘモグロビンより運搬され、ヘモグロビンから筋肉中の酸素貯蔵ヘムタンパク質であるミオグロビンと渡される。細胞内に運ばれた酸素はミトコンドリア内の呼吸鎖に存在するシトクロムより水へと還元され、生体内のエネルギー源であるアデノシン三リン酸(ATP)を作り出す<sup>2,4,5)</sup>。また、O<sub>2</sub>、NO、および H<sub>2</sub>S は非常

に高い反応性を示し、体内でヘム鉄などの金属補酵素、タンパク質、脂質、および核酸といった生体分子に対してさまざまな反応性を示す<sup>6-8)</sup>。一方、CO は比較的低い反応性を示し、生体系での CO の反応はヘモグロビンなどのヘム鉄(II)への結合が主であると考えられる。内因性一酸化炭素は主に古くなった赤血球から漏出したヘムが、ヘム分解酵素であるヘモオキシゲナーゼ(HO)の作用によって分解される際に副生成物として生成される<sup>9,10)</sup>。その約 8 割がヘモグロビンと結合して血中を循環し、呼吸により体外に排出される。残りの 2 割はシグナル伝達物質として働く<sup>11,12)</sup>。しかし、過剰な CO ガスを外部から吸入すると、O<sub>2</sub> の代わりに、CO がヘムタンパク質の Fe<sup>II</sup> に強く結合するため、ヘモグロビン(Hb)、ミオグロビン(Mb)、シトクローム c オキシダーゼ(CcO)といったヘムタンパク質の中心 Fe<sup>II</sup> に強く結合する。これらのタンパク質の機能が妨害され、生きるためのエネルギーが生産できなくなると、CO 中毒の状態になることが考えられる<sup>13-15)</sup>。

### 3. ヘムタンパク質について

前項で挙げた酸素や一酸化炭素のようなガス分子は主にヘムタンパク質と呼ばれる鉄ポルフィリン錯体であるヘムを含有するタンパク質と結合する。ヘムタンパク質はヘムと呼ばれるプロトポルフィリン IX 鉄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(Figure 1-1)<sup>9)</sup>。その代表的な機能として酸素運搬・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)、ガスセンサー(CooA)などが挙げられる。こういったヘムタンパク質による小分子の認識は、ヘムの近くに存在するアミノ酸残基によって制御されている。従って、ヘムタンパク質は同じヘムを活性中心にもつにもかかわらず、さまざまな異なる機能を発現することができる。

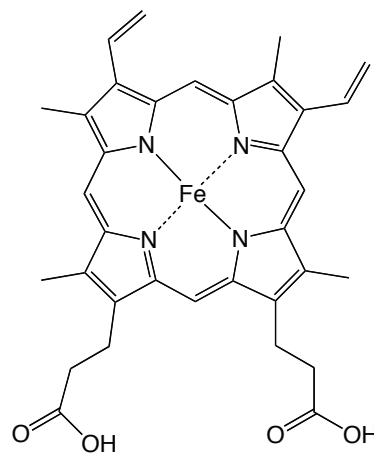
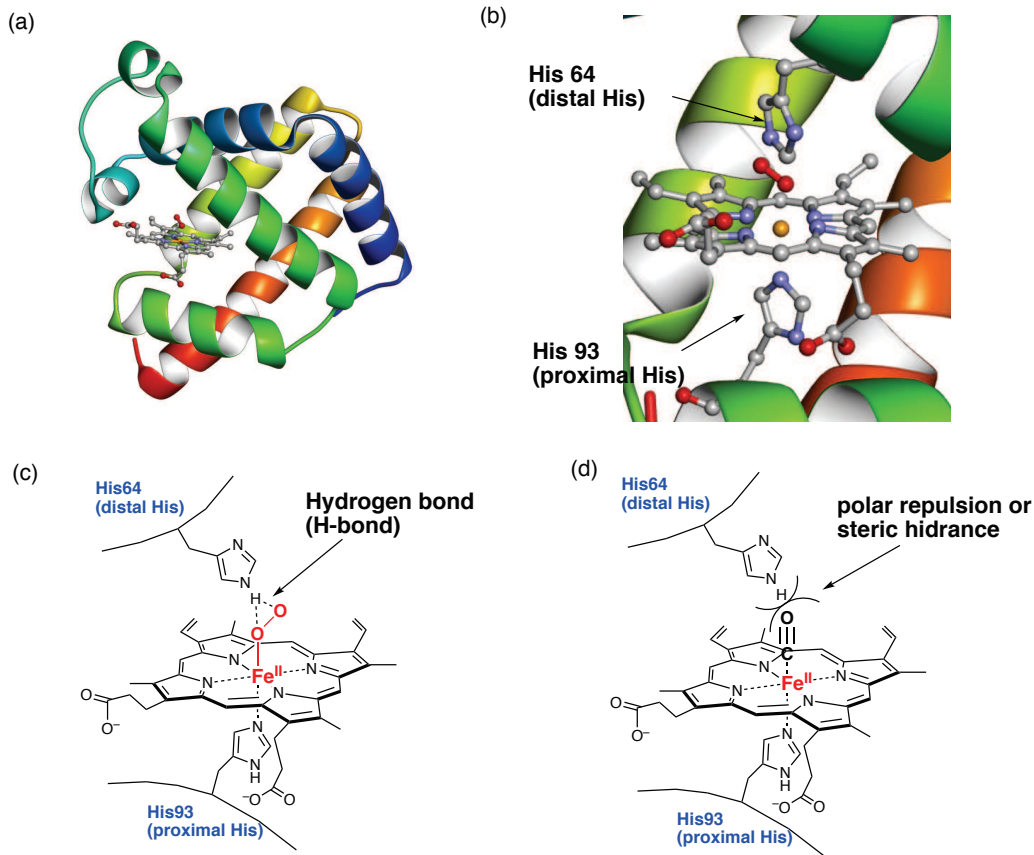
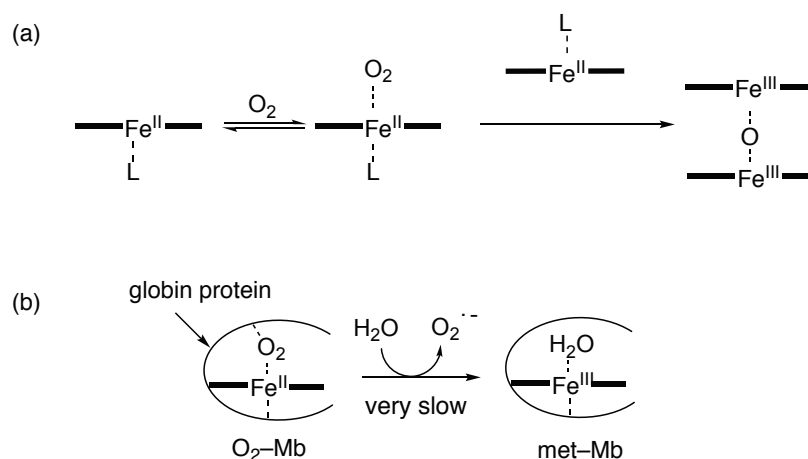


Figure 1-1. Structure of heme.





**Figure 1–2.** (a) Crystal structure of sperm whale oxy-myoglobin was quoted from PDB ID: 1A6M). (b) Oxygen-binding site of myoglobin. (c) A schematic representation of the dioxygen binding site. (d) a schematic representation of the carbon monoxide binding site.

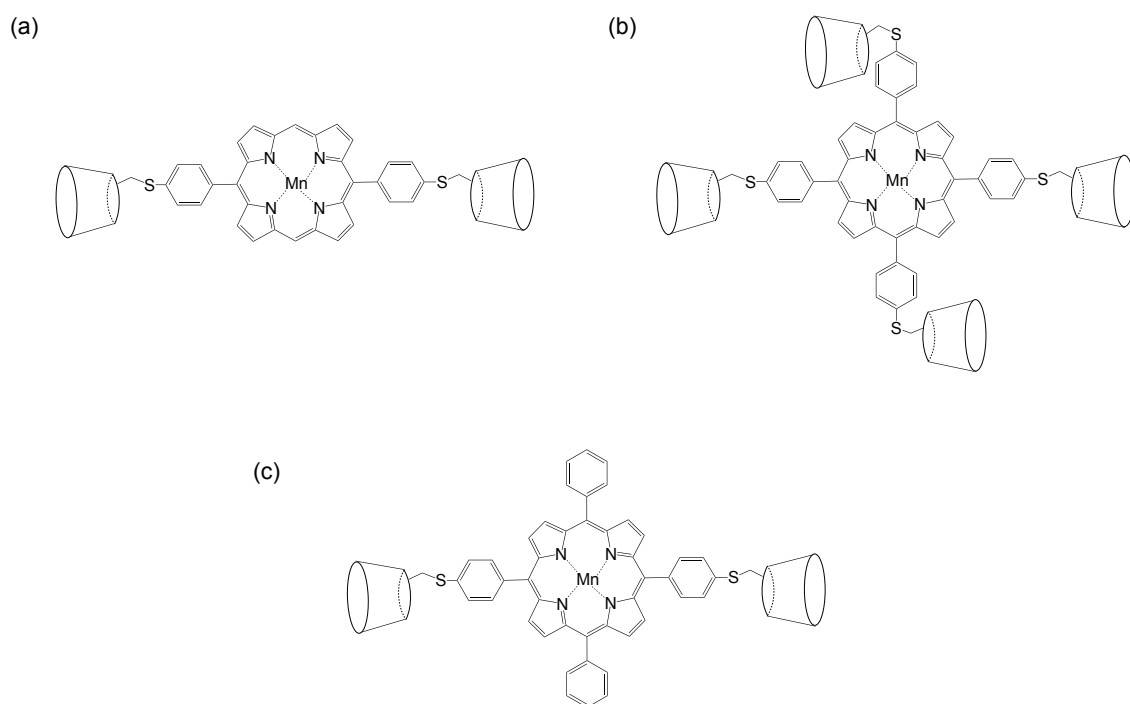


**Figure 1–3.** (a) A plausible mechanism for oxidation of iron(II) porphyrin to iron(III) porphyrin ( $\mu$ -oxo-dimer) induced by dioxygen. (b) Mechanism for autoxidation of  $\text{O}_2$  adduct Mb.

酸素貯蔵物質として機能するヘムタンパク質であるミオグロビン(Mb)は最初に X 線結晶構造解析(Figure 1-2a)が行われたタンパク質でもあり、これにより活性中心ヘムと周りのアミノ酸の構造が明らかとなった<sup>16)</sup>。それ以来、ミオグロビンの機能は合成化学、結晶学、計算モデルなどのさまざまな手法によって研究されてきた<sup>17-29)</sup>。Mb の反応中心であるヘムを抽出し、裸のヘムに酸素を結合させると、不可逆的に二分子間の会合による $\mu$ -オキソ錯体が生成し、それに伴う鉄(II)から鉄(III)への酸化反応が起こって酸素結合能を失ってしまう(Figure 1-3a)<sup>28)</sup>。一方で、Mb は生体内で酸素と可逆的に結合することができ、水中で安定な酸素錯体を形成する(Figure 1-3b)。これは、グロビタンパク質の疎水ポケットに覆われることによってヘムはバルク水層から隔離されているためであり<sup>29,30)</sup>、水分子が侵入しにくくなり、水中で安定な酸素錯体を形成することが可能となる。Mb のガス分子認識は主にヘム鉄(II)中心に直接配位した近位配位子と呼ばれる His93 に加えて、中心鉄に直接に配位しない遠位配位子と呼ばれる His64 より行われている(Figure 1-2b)<sup>29)</sup>。ヘム鉄(II)中心に直接配位した近位配位子 His93 はイミダゾールからの電子の押し出しにより鉄から O<sub>2</sub> への逆電子供与性を強め、これにより O<sub>2</sub>-Fe(II)結合を安定化している<sup>26,29-31)</sup>。His64 は、Fe(II)に結合した O<sub>2</sub> と水素結合を形成し、その結合状態を安定化させる(Figure 1-2c)<sup>30-34)</sup>。一方、裸のヘムの CO に対する親和性は O<sub>2</sub> 親和性よりも約  $2 \times 10^4$  倍高くなるが、ヘムが天然グロビタンパク質に覆われていることにより約 200 倍抑制される。すなわち、グロビタンパク質はヘムの CO 親和性を 1 / 100 まで減少させるのである。これは Mb の遠位配位子 His64 が CO-Fe(II)の近くに存在するため、立体障害、あるいは CO との極性反発により CO 親和性を低下させると提案されている<sup>35-37)</sup>。したがって、生体系と全く同じ環境で機能するヘムタンパクモデル化合物を構築するには、(1) グロビタンパク質のようにバルク水から隔離されたマイクロな疎水場を構築し、鉄(II)ポルフィリンを水が誘発する自動酸化から保護する必要があり、(2) ヘムタンパク質の反応中心であるヘムの周りのアミノ酸残基の機能を模倣する必要がある。

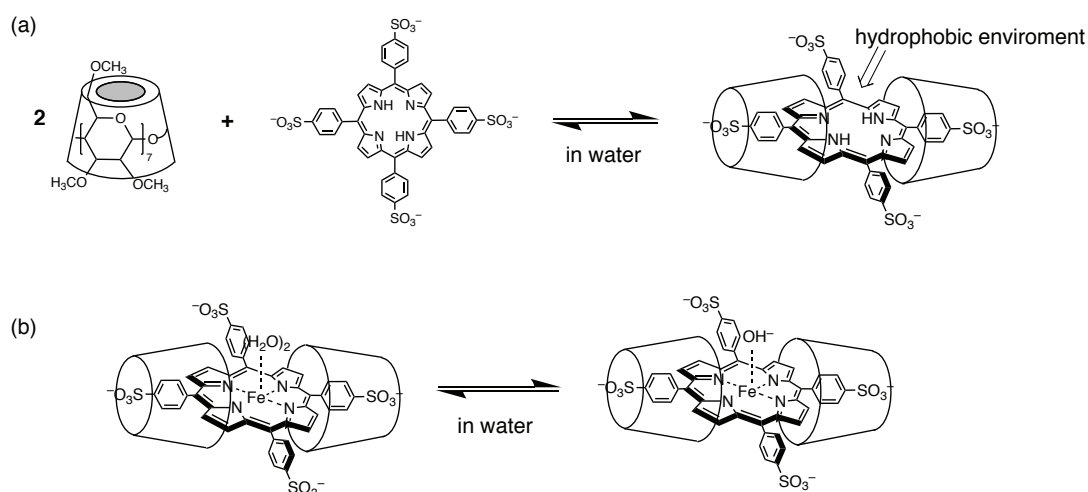
#### 4. ポルフィリン/シクロデキストリン超分子錯体を基盤としたヘムタンパク質モデル

水溶液中において酵素の機能および反応を模倣するために、最も利用されているシステムの1つは、ポルフィリン-シクロデキストリン(FePor/CD)超分子錯体である<sup>38,39</sup>。シクロデキストリン(CD)とポルフィリン(Por)を組み合わせるために、大きく2つのアプローチに分かれており、(1)共有結合でCDとPorを繋ぐものと、(2)非共有結合でのCDの内部疎水空洞とPorの相互作用を利用するものがある。共有結合でCDとPorを繋いだの例として、マンガンテトラアリルポルフィリン(MnTPP)のフェニル基のパラ位に共有結合により $\beta$ -CDを導入したモデルが挙げられる(Figure 1-4)<sup>40-43</sup>。天然ヘムタンパク質では、ヘム鉄は近位配位子より固定されているが、これらのモデルにおいては近位配位子の影響をなくし、さらに金属中心の反応性を高めるために、金属中心を鉄からマンガンを置換した。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たと報告されている<sup>40-43</sup>。



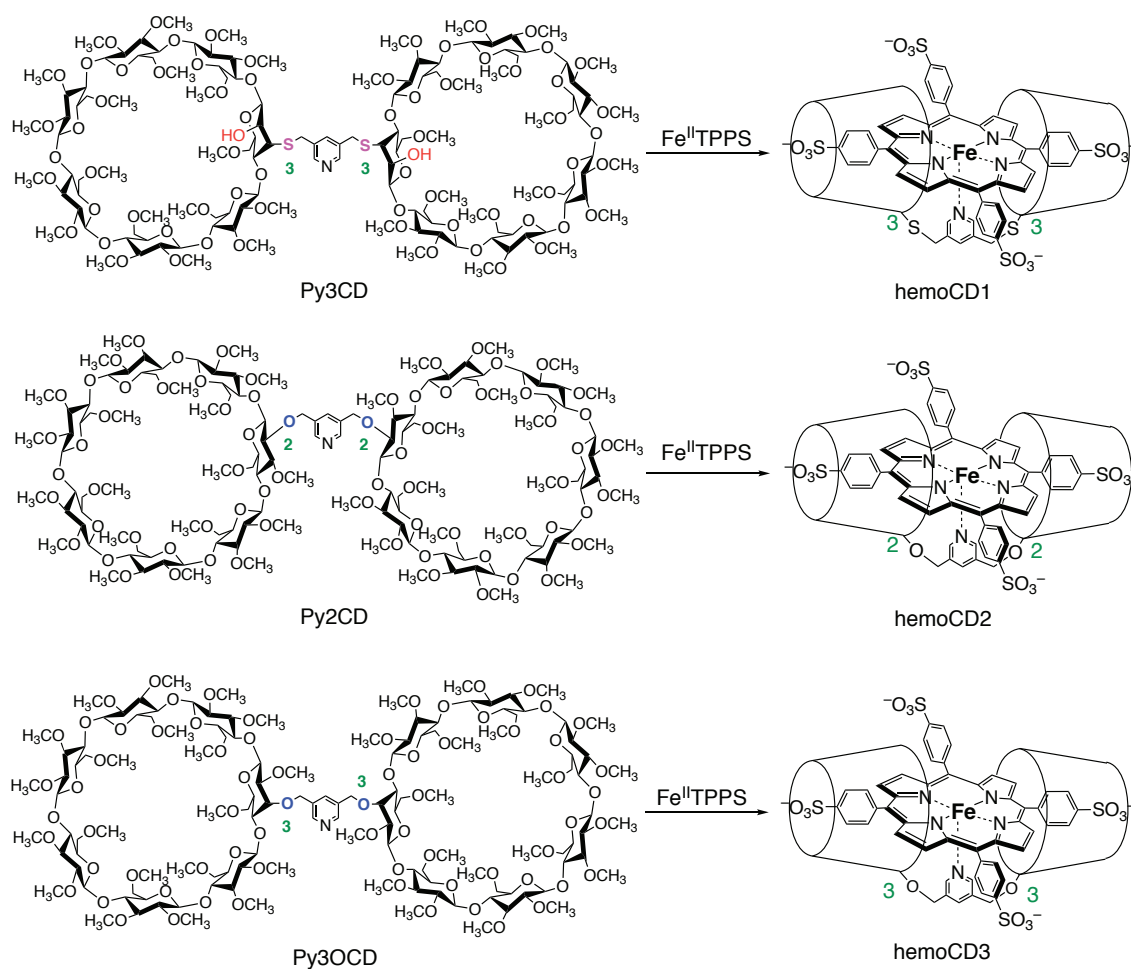
**Figure 1-4.** Manganese porphyrin- $\beta$ -CD conjugate that mimics oxo-transfer reaction of cytochrome P450.

共有結合で繋いだ CD/Por 超分子は、CD により Por の水への溶解性を改善したが、天然ヘムタンパク質のヘム周辺的环境を模倣することが困難であった。一方で、CD の内部疎水空洞と Por の非共有結合相互作用を利用した研究では、天然ヘムタンパク質のアミノ酸残基を模倣することを可能にした。Lawrence らは最初に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した<sup>44)</sup>。彼は、この CD ダイマーは 5,15-ビス (4-カルボキシフェニル) ポルフィリンと非常に安定した 1 : 1 包接錯体を形成し、ピリジンリンカーが中心金属に配位することを見出した<sup>45)</sup>。Carofiglio<sup>46)</sup>および Kano ら<sup>47,48)</sup>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)がアニオン性テトラアリア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 1-5a)。また、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出した<sup>47,48)</sup>。さらに TMe-β-CD とアニオン性鉄(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)との 2:1 包接錯体について評価したところ、包接錯体のアニオン配位選択性は酸化型(鉄(III))のメトミオグロビンが示す性質と類似していることがわかった(Figure 1-5b)<sup>49)</sup>。したがって、TMe-β-CD と Fe<sup>III</sup>TPPS との 2:1 包接錯体は水中で機能するヘムタンパク質モデルとして見なされている。



**Figure 1-5.** (a) A schematic representation for the 1:2 complexation of water-soluble porphyrin with TMe-β-CD. (b) Anion binding to Fe<sup>III</sup>TPPS-TMe-β-CD complex in aqueous solution.

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、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( $\text{Fe}^{\text{II}}$ TPPS)とパー-O-メチル化  $\beta$ -シクロデキストリン(Per-O-Me- $\beta$ -CD) をピリジンでつないだシクロデキストリン二量体の 1:1 包接錯体である hemoCD1 (Figure 1-6)の合成に成功した<sup>50,51</sup>。hemoCD1 は水中で可逆的に酸素錯体を形成し、生理条件下で安定な酸素付加体を形成する。さらに hemoCD1 の類縁体である hemoCD2 および hemoCD3 を開発した(Figure 1-6)<sup>52,53</sup>。



**Figure 1-6.** Structures of the previously reported CD dimers used to form water-soluble heme protein model complexes (hemoCD1, hemoCD2 and hemoCD3).

これまでの知見により、hemoCD1 および hemoCD3 は生体内で機能する人工酸素レセプターとして機能することがわかった。したがって、超分子ヘムタンパク質モデルである hemoCD のさらなる応用研究が期待されている。

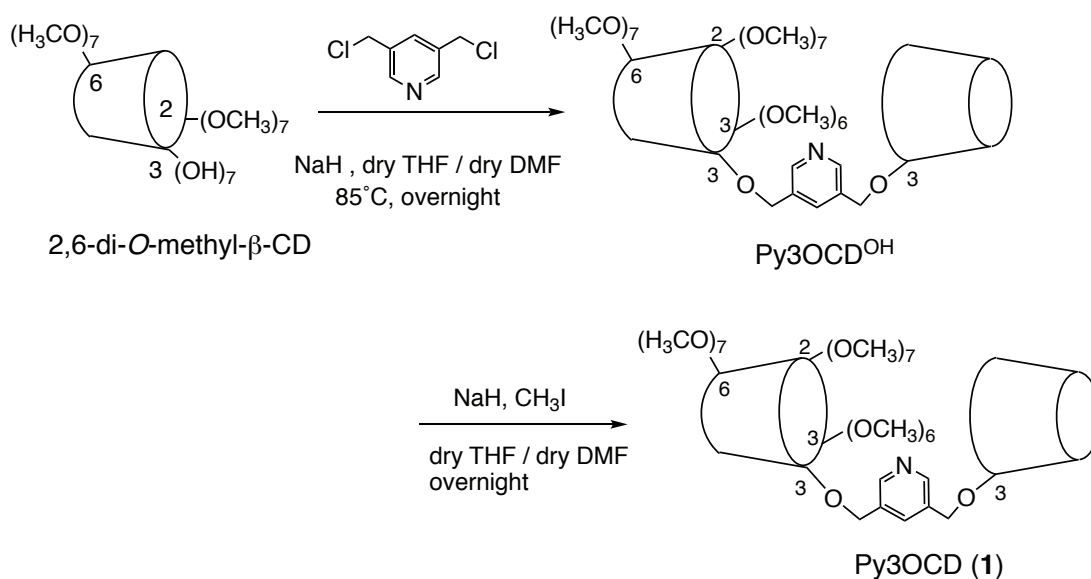
## 5. 本研究の意義と要旨

本論文では、鉄ポルフィリン / シクロデキストリン超分子錯体 hemoCD1 および hemoCD3 を基盤とし、これらの化合物の機能改善および医学・生理学への応用研究を試みた。

第一章では、序論としてヘムタンパク質の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述べた。

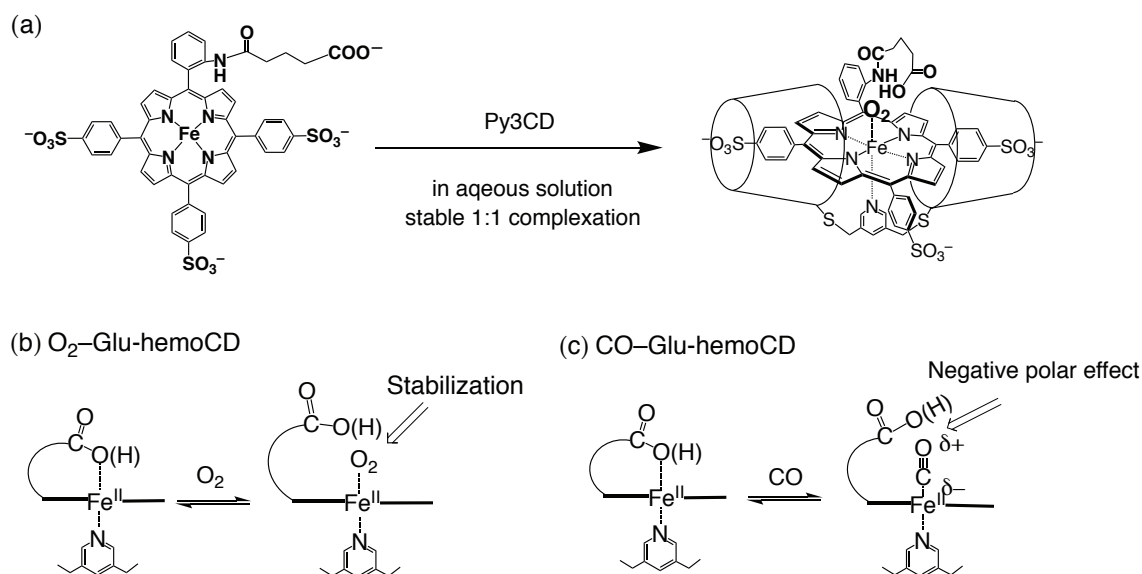
第二章では、超分子ヘムタンパク質モデルである hemoCD3 の素材となるシクロデキストリン二量体である Py3OCD の合成方法の最適化を行った。これまでに Kano らは hemoCD を用いて生体内で機能する人工レセプターについての研究を進めてきた<sup>52-60</sup>。その研究結果を踏まえて、hemoCD3 は生体内における O<sub>2</sub>、CO およびシアン化物イオンの人工レセプターとして有望であることがわかった<sup>53,58</sup>。

### Scheme 1-1. Synthesis of Py3OCD (Chapter 2).



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(Scheme 1-1)<sup>53)</sup>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 の更なるの応用研究に向け、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- $\beta$ -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。

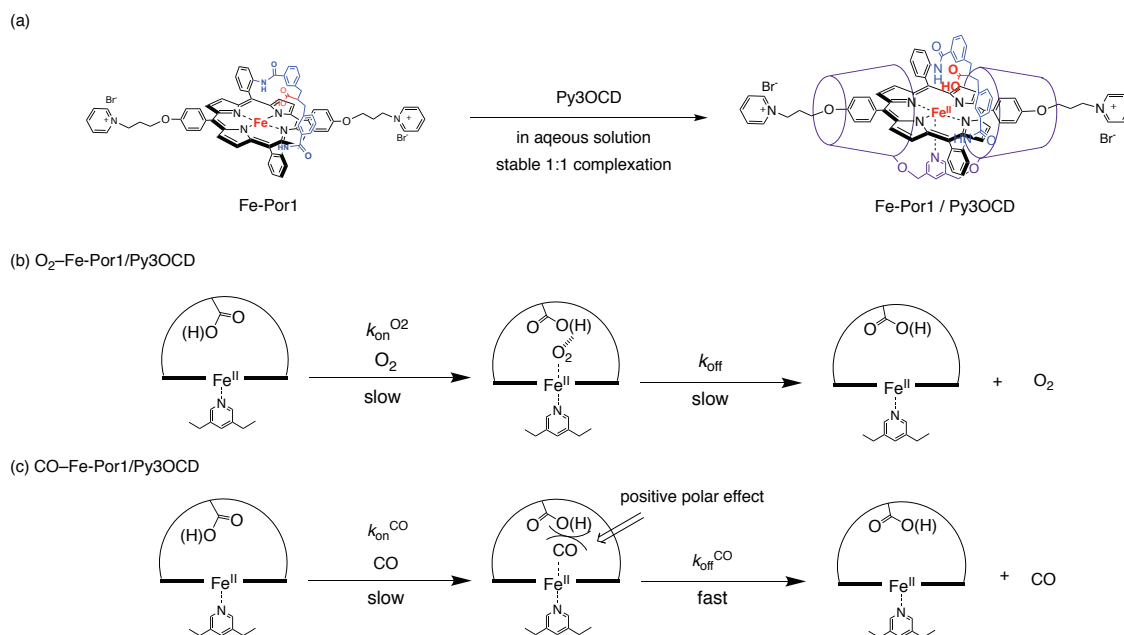
第三章では、超分子ヘムタンパク質モデルである hemoCD の遠位側にカルボキシ基を極性基として導入し、その O<sub>2</sub>/CO 選択性について評価した。まず、水溶性鉄ポルフィリンのフェニル基のオルト位にアミド結合で連結した側鎖の末端にカルボキシ基を導入した Glu-FeTPPS を合成し、Py3CD との 1 : 1 包接錯体である Glu-hemoCD (Figure 1-7a)を構築した。



**Figure 1-7.** (a) Structures of Glu-FeTPPS and Glu-hemoCD. (b,c) Schematic representation for the O<sub>2</sub> or CO adducts Glu-hemoCD (Chapter 3).

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、 $O_2/CO$  結合における速度解析を行った。その結果、Glu-hemoCD の酸素、一酸化炭素の結合速度はともに低下した一方、酸素の解離速度は低下し、逆に一酸化炭素の解離速度は速くなったことがわかった(Figure 1-7b,c)。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-hemoCD 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(Figure 1-7c)。従って、遠位側のカルボキシ基が hemoCD の  $O_2$  選択性を向上させるの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  $O_2$  選択性を向上させるの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設置したストラップポルフィリン(Fe-Por1)を設計した(Figure 1-8a)。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。

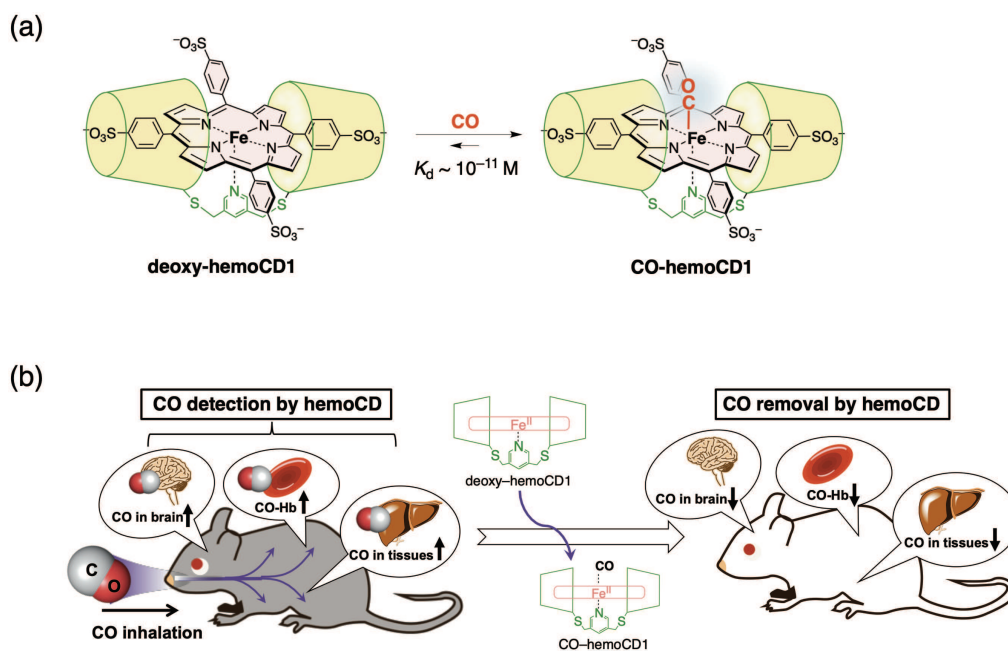


**Figure 1-8.** (a) Structures of FePor1 and FePor1 / Py3OCD. (b,c) Schematic representation for mechanism of the  $O_2$  or CO adducts FePor1 / Py3OCD (Chapter 4).



Fe-Por1/Py3OCD の酸素親和性、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、 $O_2/CO$  選択性を示す  $M$  値は 300 となった。これは今まで報告された hemoCD3 ( $M=32100$ ) よりも極めて高い  $O_2$  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ス法により  $O_2$  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 FePor/CD 錯体と比べて、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(Figure 1-8b)。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  $O_2$  がカルボキシ基と双極子-双極子相互作用を起こしたことによるものと考えられる。一方、 $k_{off}^{CO}$  が大きくなったが、CO-Fe-Por1 / Py3OCD の IR 測定を行うことによって C-O 結合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、著しく負にシフトしたことが明らかになった。これは Fe(II)に結合した CO の O 原子の近くに正の極性効果が働く為であると考察した(Figure 1-8c)。第四章では水中において完全な人工合成物 hemoCD を用いて天然ミオグロビンおよびヘモグロビンの  $O_2$  選択性を模倣し、それについて詳しく議論した。

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(Figure 1-9a)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 の定量法を開発した(Figure 1-9b)。確立した定量法を用いて、ラットに CO ガスを吸入した時の各組織内の 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が示唆された。最後に、CO 中毒の際における解毒剤としての hemoCD1 の効果について評価した。酸素換気と hemoCD1 の酸素錯体(oxy-hemoCD1)の組み合わせでは、従来の治療法である酸素換気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 を除去するために医療現場でも使えるのではないかと考えられる。



**Figure 1–9.** (a) High affinity CO receptor, hemoCD1. (b) HemoCD1 used for CO detection and removal in vivo after inhalation of CO gas to rats (Chapter 5).

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

## 6. 参考文献

- 1) 科学技術・学術政策研究所, *科学技術動向*, 2010年5月.
- 2) 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.
- 3) Vincent, J. F. V.; Bogatyreva, O. A.; Bogatyrev, A. B.; Pahl, A.-K., Biomimetics: its practice and theory. *J. R. Soc. Interface*. **2006**, *3*, 471–482.
- 4) 増田秀明; 福住俊一, *生物無機化学*. 三共出版: 東京, 2005.
- 5) 小夫家 芳明, *生理現象の有機化学*. 丸善: 東京, 1998.
- 6) Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtíková, V.; Martínková, M., Gaseous O<sub>2</sub>, NO, and CO in signal transduction: structure and function relationships of heme-based gas sensors and heme-redox sensors. *Chem. Rev*. **2015**, *115*, 6491–6533.

- 7) Szabo, C., Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15*, 185–203.
- 8) Fukuto, J. M.; Carrington, S. J.; Tantillo, D. J.; Harrison, J. G.; Ignarro, L. J.; Freeman, B. A.; Chen, A.; Wink, D. A., Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 769–793.
- 9) Tenhunen, R.; Marver, H. S.; Schmid, R., The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *61*, 748–755.
- 10) Tenhunen, R.; Marver, H. S.; Schmid, R., Microsomal heme oxygenase characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6388–6394.
- 11) Piantadosi, C. A., Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid. Redox Signal.* **2002**, *4*, 259–270.
- 12) Coburn, R. F., The carbon monoxide body stores. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1970**, *174*, 11–22.
- 13) Weaver, L. K., Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med.* **2009**, *360*, 1217–1225.
- 14) Rose, J. J.; Wang, L.; Xu, Q.; McTiernan, C. F.; Shiva, S.; Tejero, J.; Gladwin, M. T., Carbon monoxide poisoning: pathogenesis, management, and future directions of therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2017**, *195*, 596–606.
- 15) US-EPA, Pharmacokinetics and Mechanisms of Action of Carbon Monoxide. In: *Air Quality Criteria for Carbon Monoxide*, Chapter 5, pp. 5-1–5-30 (2000).
- 16) Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C., A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-Ray analysis. *Nature (London)* **1958**, *181*, 662–666.
- 17) Jameson, G. B.; Ibers, J. A., Biological and synthetic dioxygen carriers. In *Bioinorganic Chemistry*; Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., Valentine, J. S., Eds.; University Science Books: Mill Valley, CA, **1994**; pp 167–251.
- 18) Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L., Functional analogues of cytochrome *c* oxidase, myoglobin, and hemoglobin. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561–588.
- 19) Vojtěchovský, J.; Chu, K.; Berendzen, J.; Sweet, R. M.; Schlichting, I., Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2153–2174.

- 20) Powers, L.; Chance, B.; Chance, M.; Campbell, B.; Friedman, J.; Khalid, S.; Kumar, C.; Naqui, A.; Reddy, K.S.; Zhou, Y., Kinetic, structural, and spectroscopic identification of geminate states of myoglobin: a ligand binding site on the reaction pathway. *Biochemistry*. **1987**, *26*, 4785–4796.
- 21) Chu, K.; Vojtěchovský, J.; McMahon, B. H.; Sweet, R. M.; Berendzen, J.; Schlichting, I., Structure of a ligand-binding intermediate in wild-type carbonmonoxy myoglobin. *Nature*. **2000**, *403*, 921–923.
- 22) Li, T.; Quillin, M. L.; Phillips, Jr, G. N.; Olson, J. S., Structural determinants of the stretching frequency of CO bound to myoglobin. *Biochemistry*. **1994**, *33*, 1433–1446.
- 23) Olson, J. S.; Phillips, Jr, G. N., Myoglobin discriminates between O<sub>2</sub>, NO, and CO by electrostatic interactions with the bound ligand. *JBIC*. **1997**, *2*, 544–552.
- 24) Salzmann, R.; McMahon, M. T.; Godbout, N.; Sanders, L. K.; Wojdelski, M.; Oldfield, E., Solid-state NMR, crystallographic and density functional theory investigation of Fe–CO and Fe–CO analogue metalloporphyrins and metalloproteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3818–3828.
- 25) Rovira, C.; Schulze, B.; Eichinger, M.; Evanseck, J. D.; Parrinello, M., Influence of the heme pocket conformation on the structure and vibrations of the Fe–CO bond in myoglobin: a QM/MM density functional study. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 435–445.
- 26) Capece, L.; Marti, M. A.; Crespo, A.; Doctorovich, F.; Estrin, D. A., Heme protein oxygen affinity regulation exerted by proximal effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12455–12461.
- 27) Yu, T. Q.; Lapelosa, M.; Vanden-Eijnden, E.; Abrams, C. F., Full kinetics of Co entry, internal diffusion, and exit in myoglobin from transition-path theory simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3041–3050.
- 28) Cohen, I. A.; Caughey, W. S., Substituted deuteroporphyrins. IV. Kinetics and mechanism of reactions of iron(II) porphyrins with oxygen. *Biochemistry* **1968**, *7*, 636–641.
- 29) Antonini, E.; Brunori, M., *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands*; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1971.
- 30) Hargrove, M. S.; Barrick, D.; Olson, J. S., The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11293–11299.

- 31) Springer, B. A.; Sliger, S. G.; Olson, J. S.; Phillips, G. N. Jr., Mechanisms of ligand recognition in myoglobin. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699–714.
- 32) Pauling, L., Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature.* **1964**, *203*, 182–183.
- 33) Kitagawa, T.; Ohfrias, M. R.; Rousseau, D. L.; Ikeda-Saito, M.; Yonetani, T., Evidence for hydrogen bonding of bound dioxygen to the distal histidine of oxycobalt myoglobin and haemoglobin. *Nature.* **1982**, *298*, 869–871.
- 34) Phillips, S. E. V.; Schoenborn, B. P., Neutron diffraction reveals oxygen–histidine hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature.* **1981**, *292*, 81–82.
- 35) Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Halbert, T. R.; Suslick, K. S., Nature of O<sub>2</sub> and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 3333–3337.
- 36) Tani, F.; Matsu-ura, M.; Ariyama, K.; Setoyama, T.; Shimada, T.; Kobayashi, S.; Hayashi, T.; Matsuo, T.; Hisaeda, Y.; Naruta, Y., Iron twin-coronet porphyrins as models of myoglobin and hemoglobin: amphibious electrostatic effects of overhanging hydroxyl groups for successful CO/O<sub>2</sub> discrimination. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 862–870.
- 37) Li, T.; Quillin, M. L.; Phillips, Jr, G. N.; Olson, J. S., Structural determinants of the stretching frequency of CO bound to myoglobin. *Biochemistry* **1994**, *33*, 1433–1446.
- 38) Vonesch, M.; Wytko, J. A.; Kitagishi, H.; Kano, K.; Weiss, J., Modelling haemoproteins: porphyrins and cyclodextrins as sources of inspiration. *Chem. Commun.* **2019**, *27*, 44–52.
- 39) Mavridis, I. M.; Yannakopoulou, K., Porphyrinoid–cyclodextrin assemblies in biomedical research: an update. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3391–3424.
- 40) Kuroda, Y.; Hiroshige, T.; Sera, T.; Shiroiwa, Y.; Tanaka, H.; Ogoshi, H., Cyclodextrin-sandwiched porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1912–1913.
- 41) Breslow, R.; Huang, Y.; Zhang, X.; Yang, J., An artificial cytochrome P450 that hydroxylates unactivated carbons with regio- and stereoselectivity and useful catalytic turnovers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 11156–11158.
- 42) Breslow, R.; Zhang, X.; Xu, R.; Maletic, M.; Merger, R. Selective catalytic oxidation of substrates that bind to metalloporphyrin enzyme mimics carrying two or four cyclodextrin groups and related metallosalens. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11678–11679.

- 43) Yang, J.; Gabriele, B.; Belvedere, S.; Huang, Y.; Breslow, R., Catalytic oxidations of steroid substrates by artificial cytochrome P-450 enzymes. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5057–5067.
- 44) Jiang, T.; Sukumaran, D. K.; Soni, S.-D.; Lawrence, D. S., The synthesis and characterization of a pyridine-linked cyclodextrin dimer. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5149–5155.
- 45) Jiang, T.; Lawrence, D. S., Sugar-coated metalated macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1857–1858.
- 46) Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Lucchini, V.; Rosso, C.; Tonellato, U., Very strong binding and mode of complexation of water-soluble porphyrins with a permethylated  $\beta$ -cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8019–8022.
- 47) Kano, K.; Tanaka, N.; Minamizono, H.; Kawakita, Y., Tetraarylporphyrins as probes for studying mechanism of inclusion-complex formation of cyclodextrins. Effect of microscopic environment on inclusion of ionic guests. *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 925–926.
- 48) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y., Static and dynamic behavior of 2:1 inclusion complexes of cyclodextrins and charged porphyrins in aqueous organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9937–9944.
- 49) Kano, K.; Kitagishi, H.; Tamara, S.; Yamada, A., Anion binding to a ferric porphyrin complexed with per-*O*-methylated  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202–15210.
- 50) Kano, K.; Kitagishi, H.; Koderu, M.; Hirota, S., Dioxygen binding to a simple myoglobin model in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435–438.
- 51) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Koderu, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., Iron porphyrin-cyclodextrin supramolecular complex as a functional model of myoglobin in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448–4460.
- 52) Kano, K.; Itoh, Y.; Kitagishi, H.; Hayashi, T.; Hirota, S., A supramolecular receptor of diatomic molecules (O<sub>2</sub>, CO, NO) in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8006–8015.
- 53) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894–6897.

- 54) Kitagishi, H.; Negi, S.; Kiriya, A.; Honbo, A.; Sugiura, Y.; Kawaguchi, A. T.; Kano, K., A diatomic molecule receptor that removes CO in a living organism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1312–1315.
- 55) Ueda, T.; Kitagishi, H.; Kano, K., PEGylation of an artificial O<sub>2</sub> and CO receptor: synthesis, characterisation and pharmacokinetic study. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4337–4347.
- 56) Karasugi, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Modification of a dioxygen carrier, hemoCD, with PEGylated dendrons for extension of circulation time in the bloodstream. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2365–2376.
- 57) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Supramolecular ferric porphyrins as cyanide receptors in aqueous solution. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 943–947.
- 58) Kitagishi, H.; Minegishi, S.; Yumura, A.; Negi, S.; Taketani, S.; Amagase, Y.; Mizukawa, Y.; Urushidani, T.; Sugiura, Y.; Kano, K., Feedback response to selective depletion of endogenous carbon monoxide in the blood. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5417–5425.
- 59) Kitagishi, H.; Minegishi, S., Iron(II)porphyrin–cyclodextrin supramolecular complex as a carbon monoxide-depleting agent in living organisms. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, *65*, 336–340.
- 60) Kitagishi, H.; Mao, Q.; Kitamura, N.; Kita, T., HemoCD as a totally synthetic artificial oxygen carrier: improvements in the synthesis and O<sub>2</sub>/CO discrimination. *Artif. Organs.* **2017**, *41*, 372–380.





## 第二章 超分子ヘムタンパク質の素材となるシクロデキストリン二量体合成方法の最適化

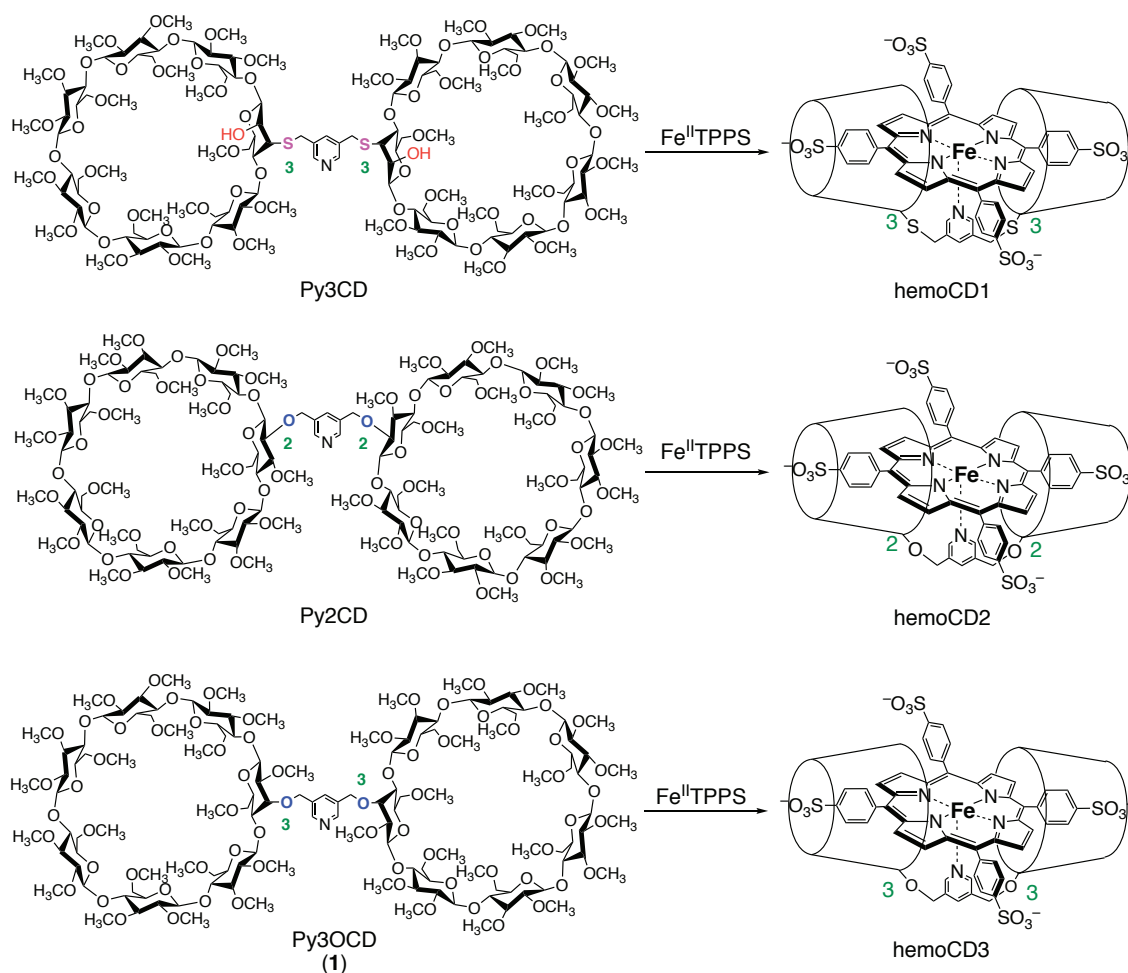
### 1. 緒言

ヘムタンパク質は様々な分子を中心鉄に配位させることのできる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、生物が生命活動を維持するための必要なエネルギーを生産している<sup>1)</sup>。その代表例として赤血球内で酸素分子と結合するタンパク質であるヘモグロビン(Hb)や筋肉に存在する酸素を貯蔵するタンパク質であるミオグロビン(Mb)、ミトコンドリア内膜に存在する酸素の4電子還元を行うシトクロムcオキシダーゼ(CcO)等が挙げられる。このような天然ヘムタンパク質の機能を完全な人工化合物で再現することは、タンパク質の機能をよりよく理解するだけでなく、新しいバイオに触発された材料を開発することを目的として、新しい薬物の開発、バイオインスパイアード材料などへの応用が期待できる。

生理条件下で機能するモデル化合物を開発するための試みも行われている<sup>2-6)</sup>。その中で、シクロデキストリン(CD)の特異な疎水空洞を利用し、水中におけるタンパク質モデルの構築が古くから研究されてきた<sup>7-9)</sup>。Carofiglioら<sup>10)</sup>およびKanoら<sup>11,12)</sup>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シ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2:1包接錯体が生成することを報告している。Kanoらは2分子のTMe-β-CDが中心金属を持たないフリーベース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いだした<sup>11,12)</sup>。さらにTMe-β-CDとアニオン性鉄(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)との2:1包接錯体について評価したところ、TMe-β-CDが水中において鉄ポルフィリンに疎水的な環境を提供することから、TMe-β-CDとFe<sup>III</sup>TPPSとの2:1包接錯体は水中で機能するヘムタンパク質モデルとしての可能性を見いだした<sup>13)</sup>。これらの経緯を踏まえてKanoらはさらにこ

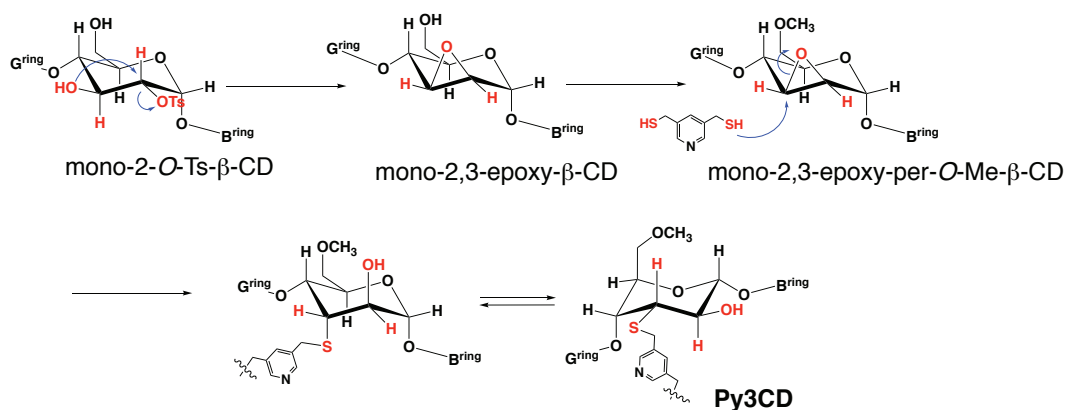
---

Mao, Q.; Kitagishi, H., Optimized synthesis of a per-O-methylated β-cyclodextrin dimer linked at the secondary face by a pyridine ligand. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2019**, *93*, 67–76.



**Figure 2–1.** Structures of the previously reported CD dimers used to form water-soluble heme protein model complexes (hemoCDs).

**Scheme 2–1. Synthesis of Py3CD.**



の系を發展させ、Fe<sup>II</sup>TPPS とパー-O-メチル化 β-シクロデキストリン(Per-O-Me-β-CD) をピリジンでつないだシクロデキストリン二量体の 1:1 包接錯体である hemoCD (Figure 2-1)が生理条件下で酸素(O<sub>2</sub>)および一酸化炭素(CO)を可逆的に吸脱着し、Mb モデルとしての研究を進めてきた<sup>14-17</sup>。hemoCD1 のシクロデキストリン二量体である Py3CD は CD の 3 位をチオエーテル結合を含むピリジンリンカーで連結している。これは第二級水酸基側の 1 つにエポキシ結合を有する O-メチル化 β-CD (mono-2,3-epoxy-per-O-Me-β-CD)への 3, 5-ジメルカプトメチルピリジンによる求核置換反応によって合成された(Scheme 2-1)<sup>14</sup>。したがって、Py3CD では、ピリジン環に結合しているグルコピラノース環(A 環)の 2 位と 3 位は、Walden 反転によって反転される<sup>18</sup>。hemoCD1 は生理条件下で安定な酸素付加体を形成し、さらに Hb の T 状態と近い酸素親和性と特異的に大きな一酸化炭素親和性を示している(Table 2-1)ことから、Kano らは hemoCD1 を用いて生体内

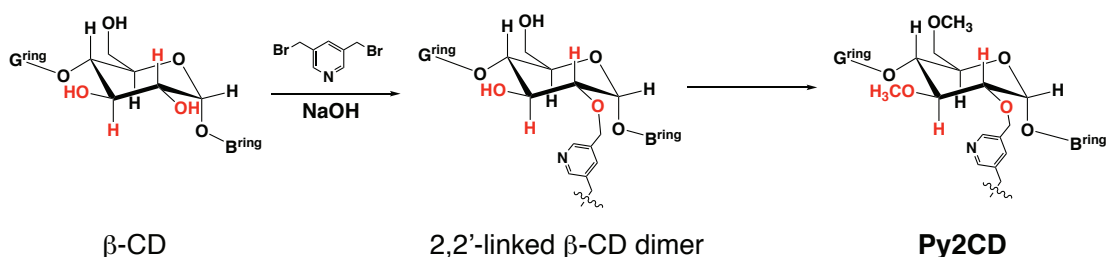
**Table 2-1.** The O<sub>2</sub>-adducts and O<sub>2</sub> and CO binding affinities ( $P_{1/2}$ L, L = O<sub>2</sub> or CO, Torr), the O<sub>2</sub>/CO selectivity ( $M$ ), and half-lives ( $t_{50}$ ) for the autoxidation of Hb, Mb and hemoCDs at 25°C.

	$P_{1/2}^{O_2}$ / Torr	$P_{1/2}^{CO}$ / Torr	$M (= P_{1/2}^{O_2} / P_{1/2}^{CO})$	$t_{50}$ / h
hemoCD1 <sup>a</sup>	10	$1.5 \times 10^{-5}$	1100000	30
hemoCD2 <sup>b</sup>	176	$1.6 \times 10^{-2}$	11000	—
hemoCD3 <sup>c</sup>	18	$5.6 \times 10^{-4}$	80358	50
Hb (R-state) <sup>d</sup>	0.22	$1.4 \times 10^{-3}$	150	13
Hb (T-state) <sup>e</sup>	12-140	0.3	40 - 460	—
Mb <sup>f</sup>	0.69	$1.4 \times 10^{-2} - 2.5 \times 10^{-2}$	20 - 40	6 ~ 138

<sup>a</sup>Ref (15), <sup>b</sup>Ref (16), <sup>c</sup>Ref (17), <sup>d</sup>Ref (25), <sup>e</sup>Ref (26, 27), <sup>f</sup>Ref (28).

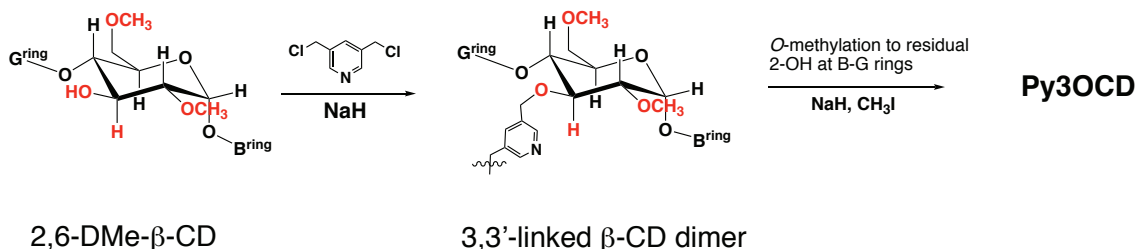
で機能する人工酸素運搬体および一酸化炭素中毒解毒薬としての研究を行なっている<sup>19-23</sup>。hemoCD2 のシクロデキストリン二量体である Py2CD は CD の 2 位をエーテル結合を含むピリジンリンカーで連結し、Py3CD と異なり A 環の立体構造がそのまま維持されている(Scheme 2-2)<sup>16</sup>。

### Scheme 2–2. Synthesis of Py2CD.



さらに、2013年に報告された hemoCD3 は CD の A 環の立体構造を維持させたまま、3 位をエーテル結合を含むピリジンリンカーで連結しているシクロデキストリン二量体である Py3OCD (1) と Fe<sup>II</sup>TPPS の 1:1 包接錯体である<sup>17)</sup>。Py3OCD (1) は出発物である 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD と 3,5-ビスクロロメチルピリジンの S<sub>N</sub>2 反応による二量化により Py3OCD<sup>OH</sup> が合成され、さらに Py3OCD<sup>OH</sup> の 3 位の残りのヒドロキシ基をメチル化剤を加えることで *O*-メチル化することにより合成された(Scheme 2–3)<sup>17)</sup>。Py3OCD は 2 ステップかつ高収率で合成することが

### Scheme 2–3. Synthesis of Py3OCD (1).



できると報告されている。hemoCD3 は hemoCD1 と同程度の酸素親和性を持ち、酸素錯体の安定性が約 1.5 倍高くなっていることから (Table 2–1)、hemoCD3 が人工酸素運搬体としてより有用であることを示している。Kitagishi らは hemoCD3 の酸素付加体(O<sub>2</sub>-hemoCD3)をマウスに腹投与すると、内因性 CO を捕まえ、尿中に一酸化炭素付加体(CO-hemoCD3)として排出されることを確認した<sup>24)</sup>。さらに、Kano らは hemoCD3 の中心鉄(III)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(CN<sup>-</sup>)を捕捉し、CN<sup>-</sup>-hemoCD3 として尿中に排出されることを報告した<sup>17)</sup>。これらの結果から、hemoCD3 が人工酸素運搬体、一酸化炭素解毒剤およびシアン解毒剤として有望であることが示唆された。しかし、Kano らは 2013 年に hemoCD3 の合成方法<sup>17)</sup>

を報告して以来、hemoCD3 のさらなる応用研究を行うために、当研究室では Py3OCD (1) を Scheme 2-3 に従って合成しようとしたが、Py3OCD (1) の合成に失敗することが度々あった。そこで本章では、hemoCD3 のシクロデキストリン二量体である 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- $\beta$ -CD の合成を検討した。次に、合成の効率化をめざして、NMR スペクトルおよび UV-vis スペクトルを用いて副生成物の構造を決定した。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 (1) を用いて、hemoCD3 の O<sub>2</sub>、CO およびシアン化物イオンの結合挙動について検討を行ったのでその結果について報告する。

## 2. 実験

### 2-1. 測定機器

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは日本電子 JNM-ECA500 フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を用いて測定し、CDCl<sub>3</sub> および DMSO-*d*<sub>6</sub> 中での測定においては、テトラメチルシラン(TMS)を内部基準として用いた。直接質量分析(DART)法による質量スペクトルは AMR(株)社製 DART-SVP を用いて測定した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF)法による質量スペクトルは BRUKER autoflex speed を用いて測定し、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして、2,3,6-トリ-*O*-メチル- $\beta$ -シクロデキストリン([M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* = 1451.68)、Py3CD ([M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* = 2959.31)のモノアイソトピック質量を用いて質量校正を行った。紫外可視吸収スペクトル(UV-vis スペクトル)は島津製作所製自記分光光度計 UV-2100、UV-2450 および島津製作所製フォトダイオードアレイ分光光度計 MultiSpec-1500 を用いて測定した。吸収スペクトルの測定に際しては、島津製作所電子冷熱式セルポジショナーTCC-260 型により温度制御し、温度が安定してから 5 分後に測定した。水溶液の pH は堀場製作所製 pH メーター M-12 および F-52 を用いて測定した。一酸化炭素の分圧調製は KOFLOC 社製 GM-4B ガス混合装置を用いて行った。ゲルろ過クロマトグラフィーは Superdex™ 75 10/300 GL column (1 × 30 cm)を取り付けた GE ヘルスケア社製 AKTÄ purifier

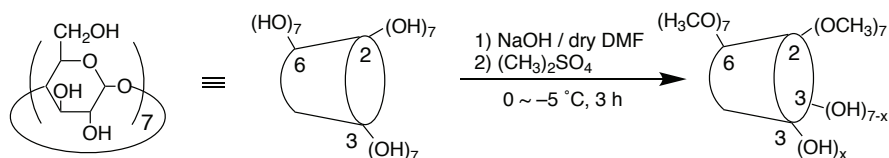
FPLC (GE Healthcare)により行なった。

## 2-2. 試薬および合成

Fe<sup>III</sup>TPPS<sup>29)</sup>, 3,5-bis(bromomethyl)pyridine hydrobromide<sup>16)</sup> および 3,5-bis(chloromethyl)pyridine hydrobromide<sup>18)</sup>は文献記載の方法に従って合成した。合成した化合物については <sup>1</sup>H NMR、DART-MS および MALDI-TOF MS スペクトル測定によりその構造を確認した。その他の試薬および溶媒は市販のものをそのまま使用した。測定に用いた水は Yamato Auto Still Glass Model WG 250 により蒸留後、Simplicity Water Purification System にて精製したものをを用いた。酸素(99.999%)、窒素(99.999%)、一酸化炭素ガス(1000 ppm)および一酸化炭素ガス(99.999%)は住友精化株式会社から購入したものをそのまま使用した。

### 2-2-1. 2,6-di-O-methyl-β-CD の合成<sup>30)</sup>

#### Scheme 2-4. Synthesis of 2,6-di-O-methyl-β-CD.



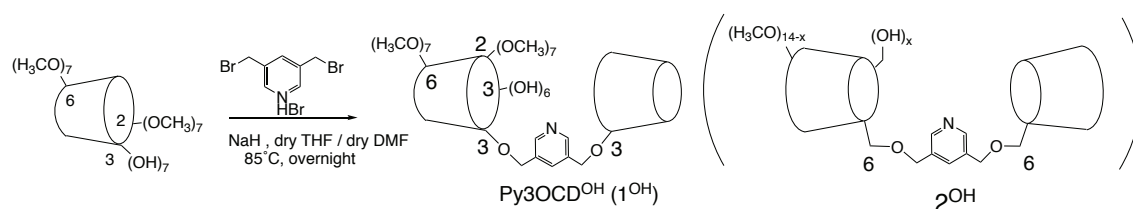
アルゴン雰囲気下、滴下ロートを取り付けた 200 mL 反応容器にβ-CD 6.0 g (5 mmol) を加え無水 DMF 50 mL に完全に溶かした。次に、水酸化ナトリウム 4.0 g (100 mmol)を反応容器に加えた。その後、反応容器を -5 °C の氷浴に移し、30 分以内に硫酸ジメチル 9.5 mL (100 mmol)と無水 DMF 20 mL を滴下ロートに加え、反応系に 15 分かけて滴下し、3 時間かき混ぜた。反応終了後、反応溶液に 25 %アンモニア水 10 mL を加え、2 時間かき混ぜ、硫酸ジメチルを失活させた。その後、反応溶液に 50 mL 蒸留水を加え、分液ロートを用いて、100 mL のジクロロメタンで 5 回抽出し、有機層を 200 mL の蒸留水で 2 回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧留去した。残さを最小限のクロロホルムに溶かし、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム/アセトン混合溶液(1/1, v/v)により、目的物を含む分画を得た。溶媒を減圧留去し、白色の生成物が得られた(6.6 g, 94%)。目的物の生成は MALDI-TOF MS および

$^1\text{H}$  NMR スペクトルにより確認した。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.07 (s, 5H), 4.98 (d, 5H), 3.94 (m, 5H), 3.86–3.53 (m, 31H), 3.53–3.40 (m, 31H), 3.28 (dd, 7H); MS (MALDI-TOF,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, positive mode)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1353, found 1353,  $[\text{M}+\text{CH}_2+\text{Na}]^+$ : 1367, found 1367,  $[\text{M}+2\text{CH}_2+\text{Na}]^+$ : 1381, found 1381,  $[\text{M}+3\text{CH}_2+\text{Na}]^+$ : 1395, found 1395.

## 2-2-2. Py3OCD<sup>OH</sup> の合成 (最適化前の方法)<sup>17)</sup>

### Scheme 2-5. Synthesis of Py3OCD<sup>OH</sup> ①.

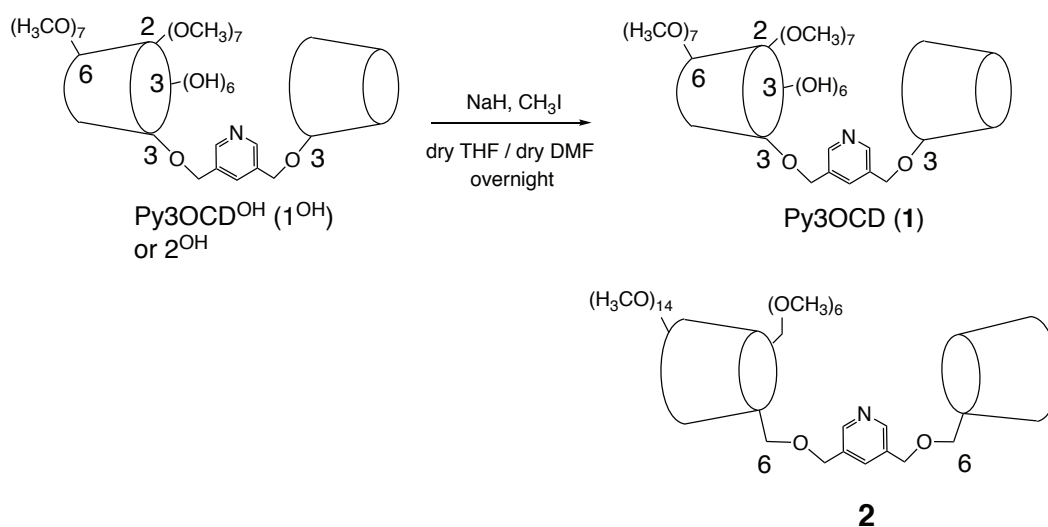


アルゴン雰囲気下、還流冷却器と滴下ロートを取り付けた 300 mL 反応容器に 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD 5.0 g (3.75 mmol) を加え無水 THF 32 mL に完全に溶かした。次に、18-クラウン-6 0.5 g (1.89 mmol) を反応容器に加えた。続いて、ヘキサンでデカンテーションし、真空乾燥させた水素化ナトリウム NaH 0.35 g (14.5 mmol) を反応容器に加えた。反応容器からの泡の発生が収まった後、反応容器を 85 °C の油浴に移し、1 時間加熱還流した。次に、3,5-bis(bromomethyl)pyridine hydrobromide 0.20 g (0.58 mmol) を 20 mL の無水 DMF に溶かして、1 時間をかけて反応系にゆっくり滴下し、18 時間加熱還流した。反応終了後、反応溶液の濁りが消えるまでメタノールを加え、NaH を失活させ、溶媒を減圧留去した。その後、生成した固体を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 60 mL に溶かして、クロロホルム(100 mL  $\times$  6 回)で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧留去した。残さを最小限のクロロホルムに溶かし、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム/アセトン混合溶液(1/1, v/v)にて原料を溶出後、クロロホルム/メタノール混合溶液(15/1, v/v)により、目的物を含む分画を得た。溶媒を減圧留去し、黄色の生成物が得られた(1.2 g, 72%)。目的物の生成は MALDI-TOF MS により確認した。

MS (MALDI-TOF,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)  $m/z$   $[M+Na]^+$ : 2787, found 2787,  $[M+CH_3+Na]^+$ : 2801, found 2801,  $[M+2CH_3+Na]^+$ : 2815, found 2815,  $[M+3CH_3+Na]^+$ : 2829, found 2829.

### 2-2-3. Py3OCD の合成 (最適化前の方法) <sup>17)</sup>

#### Scheme 2-6. Synthesis of Py3OCD ①.



アルゴン雰囲気下、滴下ロートを取り付けた 200 mL 反応容器に、**1<sup>OH</sup>** (**2<sup>OH</sup>**) 1.21 g (0.44 mmol)、無水 DMF 55 mL および無水 THF 25 mL を加えた。次に、ヘキサンでデカンテーションし、真空乾燥させた水素化ナトリウム 0.89 g (0.04 mol) を加え、3 時間かき混ぜた。無水 DMF 15 mL に溶かしたヨウ化メチル CH<sub>3</sub>I 1.14 g (8.0 mmol)をゆっくり滴下し、その後 18 時間かき混ぜた。反応終了後、反応溶液の濁りがなくなるまでメタノールを加え、NaH を失活させ、反応溶液を減圧留去した。そして、生成した固体を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に溶かした後、クロロホルム(60 mL × 6 回)で抽出し、さらに硫酸ナトリウムを加えて水を完全に取り除いた後、減圧留去し、黄色固体を得た。残さを最小限のクロロホルムに溶かし、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム/メタノール混合溶媒 (40/1, v/v) により、生成物である Py3OCD (**1**) or (**2**)を含む分画を得た。溶媒を減圧留去し、黄色固体を得た。得られた粗精製物をさらに日本分析工業社製 LC9201 リサイクル分取 HPLC システム(カラム : JAIGEL GS310、

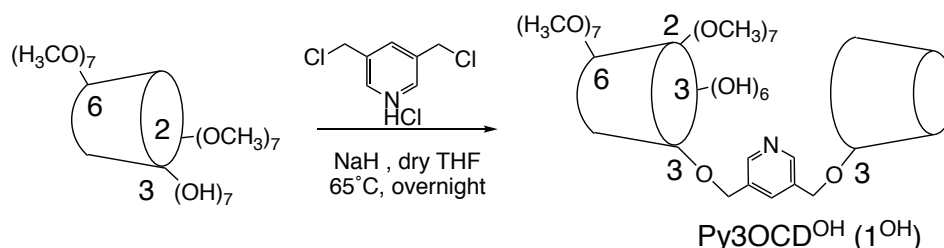


展開溶媒：メタノール)により精製することで白色の固体として得た(0.7 g, 53%)。目的物の生成は MALDI-TOF MS、<sup>1</sup>H NMR スペクトル、<sup>13</sup>C NMR スペクトルにより確認した。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.12–3.24 (m, 14H), 3.24–3.74 (m, 162H), 3.74–3.91 (m, 28H), 4.01 (d, 2H), 4.15 (d, 2H), 4.61 (d, 2H), 5.09–5.20 (m, 14H), 7.6 (s, 1H), 8.53 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 58.45, 58.51, 58.66, 58.73, 58.88, 59.06, 61.44, 61.58, 69.46, 70.67, 70.74, 70.88, 71.05, 71.54, 80.12, 80.26, 80.46, 80.53, 81.81, 81.93, 82.11, 82.19, 99.05, 135.17, 148.24; MS (MALDI-TOF, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, positive mode) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup>: 2955.4, found 2955.1, [M+K]<sup>+</sup>: 2971.4, found 2971.1. Elemental analysis (%) calcd. For C<sub>131</sub>H<sub>225</sub>NO<sub>70</sub>·6H<sub>2</sub>O: C, 51.72; H, 7.85; N, 0.46. Found: C, 51.92; H, 7.74; N, 0.36.

#### 2-2-4. Py3OCD<sup>OH</sup> (1<sup>OH</sup>)の合成 (最適化した方法)<sup>17)</sup>

##### Scheme 2-7. Synthesis of Py3OCD<sup>OH</sup> ②.



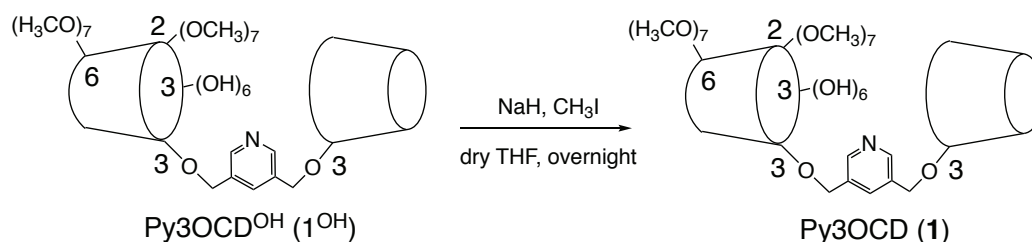
アルゴン雰囲気下、還流冷却器を取り付けた 100 mL 反応容器に 2,6-di-O-methyl-β-CD 2.0 g (1.5 mmol) を加え無水 THF 40 mL に完全に溶かした。次に、ヘキサンでデカンテーションし、真空乾燥させた水素化ナトリウム NaH 0.28 g (11.6 mmol) を反応容器に加えた。反応容器からの泡の発生が収まった後、反応容器を 65 °C の油浴に移し、すぐに、3,5-bis(chloromethyl)pyridine hydrobromide 0.08 g (0.38 mmol) を 3 回分けて反応系に加えて、その後一晩加熱還流した。反応終了後、反応溶液の濁りが消えるまでメタノールを加え、NaH を失活させ、溶媒を減圧留去した。その後、生成した固体を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 40 mL に溶かして、クロロホルム(30 mL×6 回)で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧留去した。残さを最小限のクロロホルムに溶かし、シリ

カゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム/アセトン混合溶液(1/1, v/v)にて原料を溶出後、クロロホルム/メタノール混合溶液(15/1, v/v)により、目的物を含む分画を得た(0.45 g, 43%)。溶媒を減圧留去し、白色の生成物が得られた。目的物の生成は MALDI-TOF MS により確認した。

MS (MALDI-TOF,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)  $m/z$   $[M+Na]^+$ : 2787, found 2787,  $[M-CH_3+Na]^+$ : 2773, found 2773,  $[M+CH_3+Na]^+$ : 2801, found 2801,  $[M+2CH_3+Na]^+$ : 2815, found 2815.

## 2-2-5. Py3OCD (1)の合成 (最適化した方法)

### Scheme 2-8. Synthesis of Py3OCD (1).



アルゴン雰囲気下、滴下ロートを取り付けた 50 mL 反応容器に、**1<sup>OH</sup>** 0.20 g (0.07 mmol)、無水 THF 20 mL を加えた。次に、ヘキサンでデカンテーションし、真空乾燥させた水素化ナトリウム 0.25 g (10.4 mol) を加え、3 時間かき混ぜた。無水 THF 7 mL に溶かしたヨウ化メチル 0.31 g (2.2 mmol) をゆっくり滴下し、その後一晩かき混ぜた。反応終了後、反応溶液の濁りがなくなるまでメタノールを加え、NaH を失活させ、反応溶液を減圧留去した。そして、生成した固体を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に溶かした後、クロロホルム(40 mL × 6 回)で抽出し、さらに硫酸ナトリウムを加えて水を完全に除去した後、減圧留去し、黄色固体を得た。残さを最小限のクロロホルムに溶かし、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム/メタノール混合溶媒 (40/1, v/v) により、目的物である Py3OCD (**1**)を含む分画を得た。溶媒を減圧留去し、淡黄色固体を得た。これを JAIGLE-GS310 GPC カラムを取り付けた分取 HPLC 装置にかけ、メタノールにより溶出し、精密に分画した。溶出液を減圧留去し、白色固体を得た(0.12 g, 56%)。目的物の生成は MALDI-TOF MS、<sup>1</sup>H NMR スペクトル、<sup>13</sup>C NMR ス

ペクトルにより確認した。

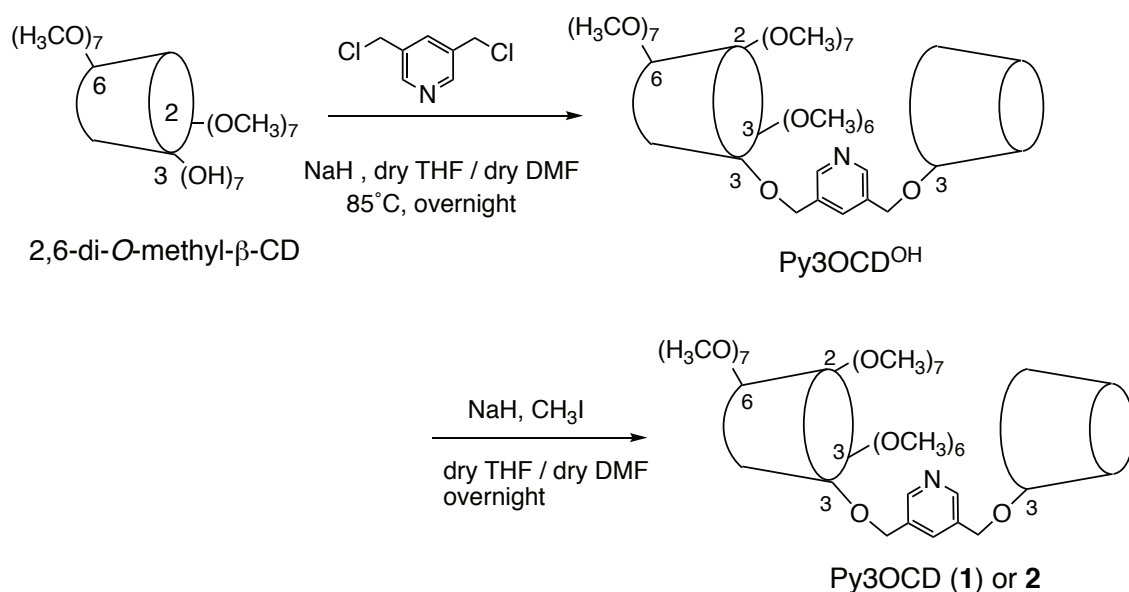
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.12–3.26 (m, 14H), 3.26–3.72 (m, 162H), 3.72–3.91 (m, 28H), 4.01 (d, 2H), 4.78 (d, 2H), 5.13 (m, 14H), 7.86 (s, 1H), 8.59 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  59, 71, 72, 73, 80, 81, 82, 99, 134; MS (MALDI-TOF,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, positive mode)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 2955.4, found 2955.1,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ : 2971.4, found 2971.1.

### 3. 結果および考察

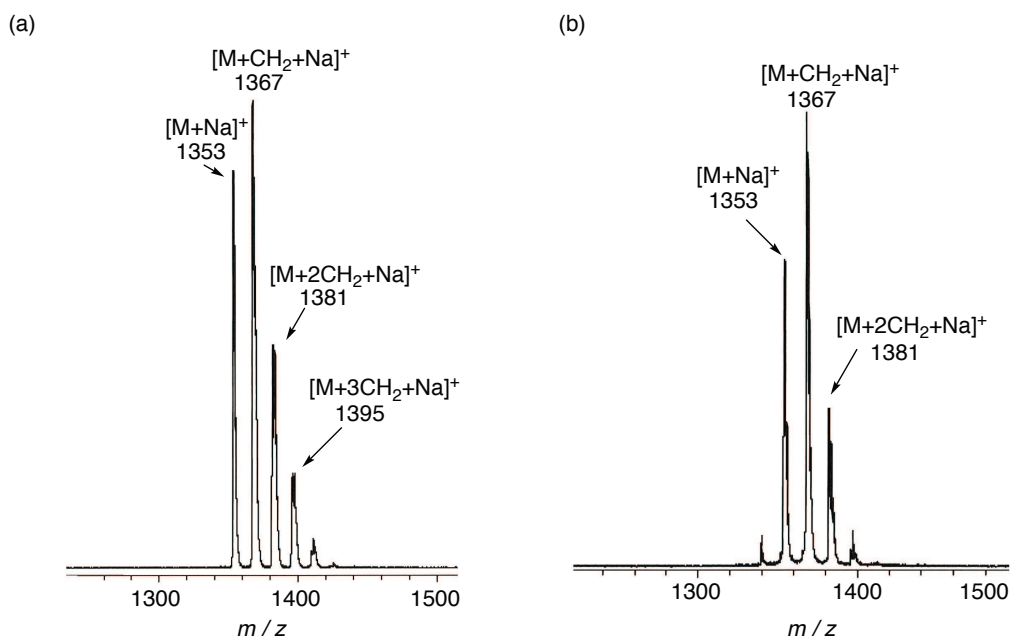
#### 3-1. Py3OCD 合成の最適化

2013 年に Kano らはシクロデキストリン二量体である Py3OCD (**1**) (以下 Py3OCD を **1** とする)は 2 ステップかつ高収率で合成できると報告している<sup>17)</sup>。Py3OCD (**1**) は出発物である 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD とリンカー分子の  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応による二量化により Py3OCD<sup>OH</sup> が合成され、さらに Py3OCD<sup>OH</sup> の 3 位の残りのヒドロキシ基をメチル化剤を加えることで *O*-メチル化することにより合成されたが(Scheme 2-9)、当研究室では **1** を Scheme 2-9 に従って合成しようとしたが、**1** の代わりに **1** と同じ分子量を持つ副生成物(以下この副生成物を **2** とする) が度々得られていた。hemoCD3 を人工レセプターとして応用研究するためにはコストを考慮し、再現性が高く大量合成できる方法を開発しなければならない。本研究では、以前の合成条件において度々得られていた **2** の分子構造を各種 NMR を用いて決定した。**2** の生成メカニズムを基に、**2** の生成を抑えながら **1** を合成する条件を新たに考案した。

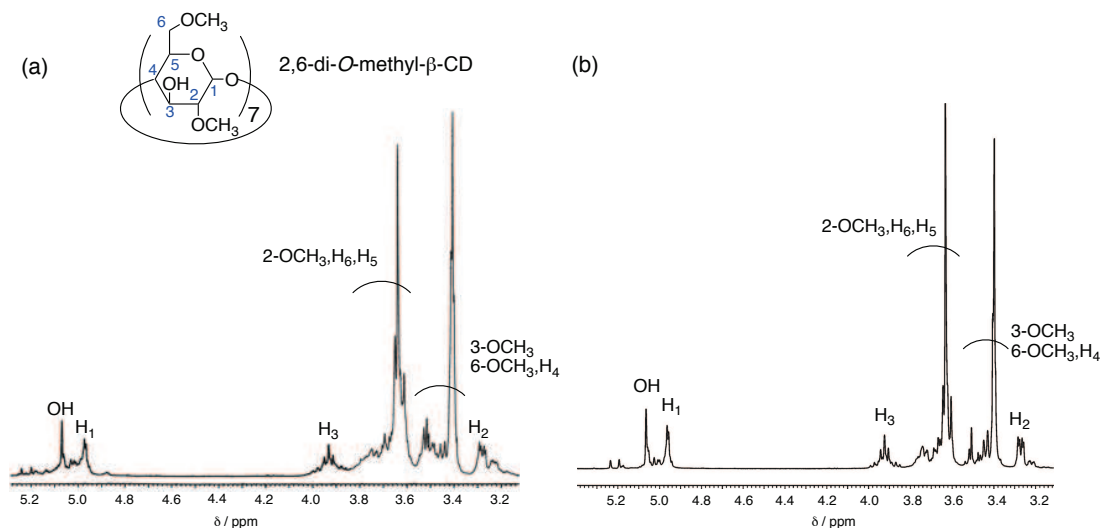
**Scheme 2–9. Synthesis of Py3OCD (1).**<sup>17)</sup>



まず、hemoCD3 を安価な原料から大量に合成するために、**1** を合成するための原料である 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の合成を試みた。 $\beta$ -CD の 2 位、6 位および 3 位のヒドロキシ基の反応性(6 位 > 2 位 > 3 位)により、6 位および 2 位が先に硫酸ジメチルよりメチル化されると考えられる<sup>30,31)</sup>。MALDI-TOF MS スペクトルの解析結果(Figure 2–2a)より、生成物以外のピークが現れ、これは 3 位の一部がメチル化されたものに由来するスペクトルと考えられる。また、市販品(Nacalai Tesque)の 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD を用いて、MALDI-TOF MS (Figure 2–2b)および<sup>1</sup>H NMR スペクトル(Figure 2–3b)の測定を行った。自分で合成した 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD (Figure 2–3a)と比較すると、その測定結果がよく一致することから、2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の合成が完了したと考えられる。

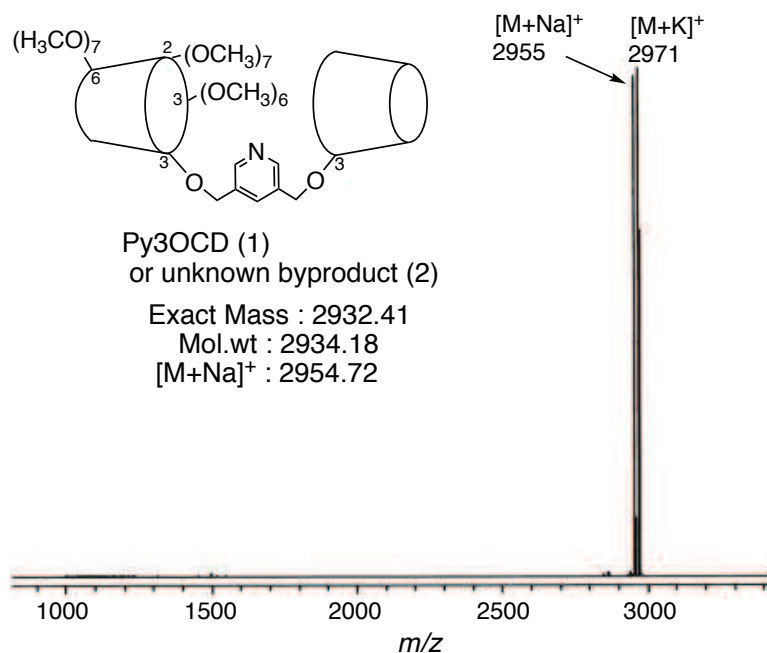


**Figure 2–2.** (a) MALDI-TOF MS spectrum of 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD synthesized in scheme 2–4 with a subsequent addition of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (positive mode). (b) MALDI-TOF MS spectrum of 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD (nacalai tesque) with a subsequent addition of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (positive mode).



**Figure 2–3.** (a)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD synthesized in scheme 2–4 in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz, standard: TMS). (b)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD (nacalai tesque) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz, standard: TMS).

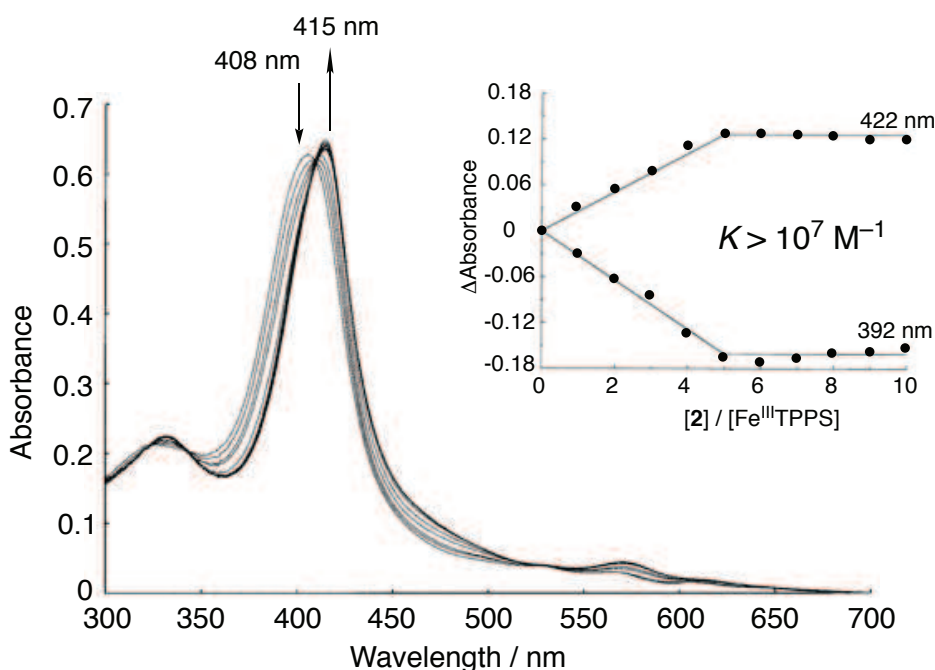
次に、過去に当研究室で報告している **1**<sup>OH</sup> の合成方法(Scheme 2-9)<sup>17)</sup>に従って合成を行った。反応収率を向上するため、18-crown-6 を相間移動触媒として用いた。18-crown-6 は強塩基である水素化ナトリウム (NaH) のナトリウムイオンをイオン-双極子相互作用により環状構造の内部に包接することで、ヒドリドイオン(H<sup>-</sup>)の反応性を上げ、S<sub>N</sub>2 反応効率を向上させることを期待した<sup>32)</sup>。その結果、目的物の収率が 36% から 72% と向上した。その後、ヨウ化メチルより 3 位の残りのヒドロキシ基をメチル化した。GPC 単離を行った後の MALDI-TOF MS スペクトル(Figure 2-4)から **1** と相当するピーク ( $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup>: 2955, [M+K]<sup>+</sup>: 2971) が観測されたことから、シクロデキストリン二量体の単離を確認した。続いて合成したシクロデキストリン二量体を用いて、Fe<sup>III</sup>TPPS との包接挙動を調べた。しかし 3-2 で記述するようにこの生成物は **1** ではなく **2** であることが後に判明した。



**Figure 2-4.** MALDI-TOF MS spectrum of the CD dimer **2** with a subsequent addition of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (positive mode).

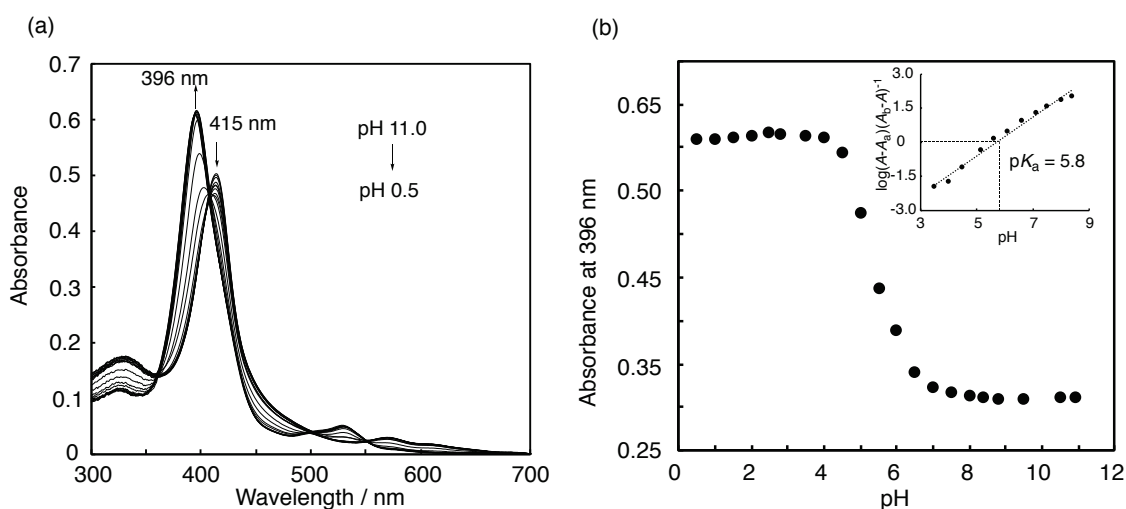
### 3-2. シクロデキストリン二量体 **2** と Fe<sup>III</sup>TPPS との錯形成

合成したシクロデキストリン二量体が Fe<sup>III</sup>TPPS との包接錯体を形成するの  
かについて検討を行った。角形セル内の Fe<sup>III</sup>TPPS 濃度( $5.0 \times 10^{-6}$  M)を一定に保  
ち、**2**の濃度を変化させて 25 °C において吸収スペクトルを測定した。この時の  
吸収スペクトル変化および観測された Fe<sup>III</sup>TPPS の吸光度変化を **2**の濃度に対  
してプロットした滴定曲線を Figure 2-5 に示す。Fe<sup>III</sup>TPPS の $\mu$ -オキソダイマーに  
帰属される 408 nm の吸収が等吸収点を通りながら 415 nm へとシフトし、その  
ソーレー帯のスペクトル変化は Fe<sup>III</sup>TPPS に対してちょうど 1 当量の合成したシ  
クロデキストリン二量体を加えた時点で飽和した。滴定曲線は[Fe<sup>III</sup>TPPS] : [**2**]  
= 1:1 のところで明瞭な変曲点が認められ、シクロデキストリン二量体は Fe<sup>III</sup>TPPS  
と非常に安定な 1:1 の包接錯体を形成することが明らかとなった。しかし、過去  
に当研究室で報告している結果より、Py3OCD (**1**)/ Fe<sup>III</sup>TPPS 包接錯体(met-  
hemoCD3)のソーレー帯の $\lambda_{\max}$ は pH 7.0 において 399 nm に見られることが分か  
っており、UV-vis スペクトルの測定結果より今回の包接錯体は過去に報告され  
ている met-hemoCD3 とは異なることが分かった。



**Figure 2-5.** UV-vis spectral changes of Fe<sup>III</sup>TPPS ( $5.0 \times 10^{-6}$  M) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C upon addition of **2** and plots of the changes in absorbances at 392 and 422 nm versus **2**.

上記の結果の原因を調べるために、今回得られた **2** / Fe<sup>III</sup>TPPS 包接錯体(以下 **2'**とする)のアクア配位子の酸解離平衡定数(p*K*<sub>a</sub>)を調べた。測定は Fe<sup>III</sup>TPPS と 1.2 当量の **2** を共存させた 0.1 M NaClO<sub>4</sub> 水溶液に対して過塩素酸水溶液を加えて pH を 11.0 から 0.5 まで段階的に下げていったときの吸収スペクトル変化を観測した。結果を Figure 2-6a に示す。アルカリ性条件下におけるソーレー帯の極大吸収波長は 415 nm であり、この値は鉄(III)ポルフィリンの中心鉄に OH<sup>-</sup>が配位したモノヒドロキソ体([Fe<sup>III</sup>TPPS(OH)]<sup>4+</sup>)として報告されているモノマーのスペクトル(λ<sub>max</sub> = 415 nm)と一致した。また pH の変化に従って、吸収スペクトルのソーレー帯はモノヒドロキソ体を示す 415 nm からジアクア体([Fe<sup>III</sup>TPPS(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>)を示す 397 nm へと短波長側にシフトした。変化の最も大きかった 396 nm における吸光度変化を pH に対してプロットした。その結果を Figure 2-6b に示す。また 396 nm において最も変化の大きかった pH 3.5 から 8.5 において、横軸を pH、



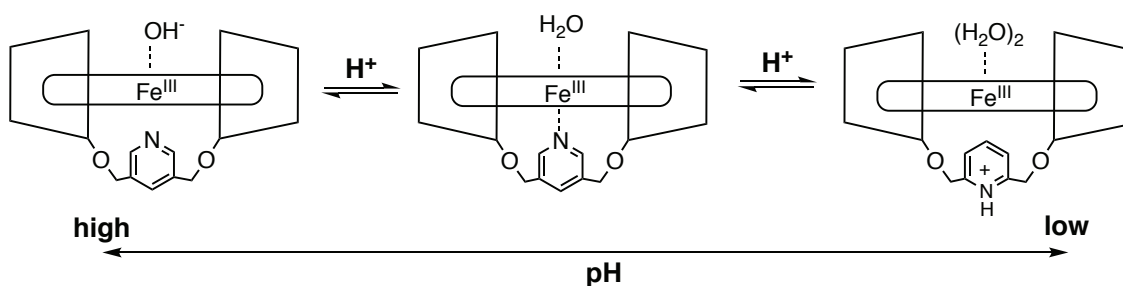
**Figure 2-6.** UV-vis spectral changes of **2** / Fe<sup>III</sup>TPPS (3.9 μM) in aqueous solution (0.1M NaClO<sub>4</sub>) as a function of pH: pH change from 11.0 to 0.5 (a). Absorbance change at 395 nm of **2** / Fe<sup>III</sup>TPPS (3.9 mM) in aqueous solution (0.1M NaClO<sub>4</sub>) as a function of pH (pH change from 11.0 to 0.5). Inset: Plot of  $\log\{(A - A_a)/(A_b - A)\}^{-1}$  at 395 nm versus pH for determining p*K*<sub>a</sub> (b).

縦軸を  $\log(A - A_0)(A_\infty - A)^{-1}$  とし、プロットしたものを Figure 2-6b に示す。このプロットの近似直線からアクア配位子酸解離平衡定数(p*K*<sub>a</sub>)は 5.8 となった。これ



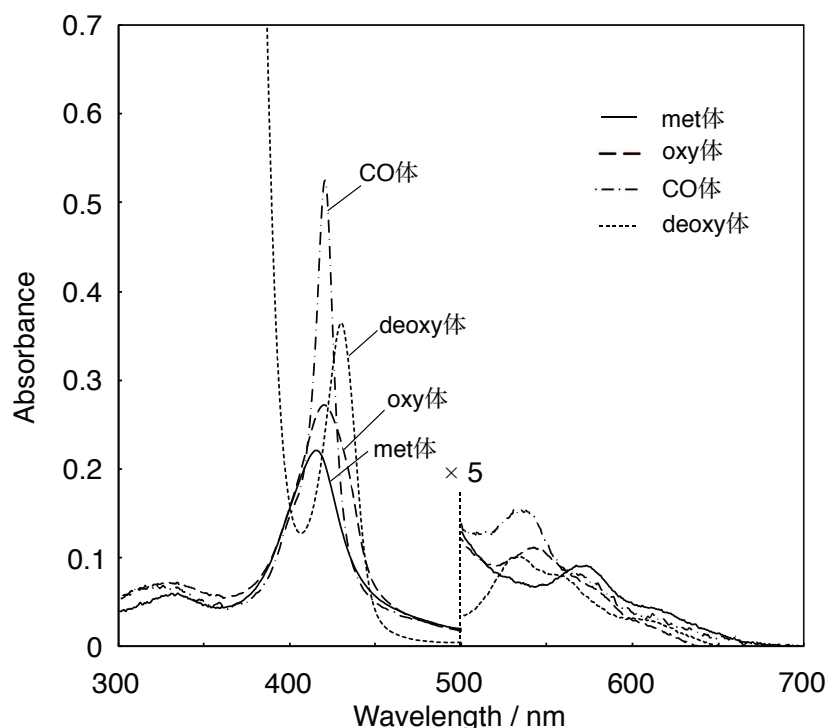
は met-hemoCD3 の  $pK_a$  8.0 よりも約 2.0 小さい。このことから **2'**におけるピリジンの軸配位が本来の met-hemoCD3 よりも著しく弱くなっている可能性がある。さらに当研究室におけるこれまでの知見から、ピリジンの軸配位子が中心鉄に配位する場合、強酸性条件において配位結合がプロトン化によって解離する平衡が報告されている(Scheme 2-10)<sup>14-17)</sup>。met-hemoCD3 においては強酸性条件にするとピリジンへのプロトン化が起これ、中心鉄とピリジンとの結合が切断される。それに対し、**2'**においては pH を 0.5 以下としてもそのようなスペクトル変化は観測されなかった。したがって **2'**においてはそもそもピリジンの軸配位自体が起こっていない可能性が高い。これらのことから、**2**は  $Fe^{III}$ TPPS と包接錯体を形成した際に **1**とは全く異なる物性を示すことが明らかとなった。

**Scheme 2-10.** Equilibria for the hemoCD system in aqueous solution.



hemoCD の特徴として水中で  $O_2$  を可逆的に吸脱着し、安定な  $O_2$  錯体を形成することが挙げられる<sup>14-17)</sup>。Kano らは oxy-hemoCD1 の半減期( $t_{1/2}$ )は 30 h、oxy-hemoCD3 の半減期( $t_{1/2}$ )は 50 h であると報告している<sup>14,15,17)</sup>。Figure 2-6 の  $pK_a$  測定結果より、**2'**が本来の met-hemoCD3 の軸配位子であるピリジンの配位環境とは異なることが明らかになった。次に、**2'**において  $O_2$  および CO 錯体がそれぞれ形成可能かどうかを検討した。**2'**に過剰の  $Na_2S_2O_4$  を加えることによって、 $Fe^{II}$  イオンを有する状態である deoxy 体( $\lambda_{max}$  : 430 nm, Q 帯: 530 nm)へと変換した(Figure 2-7)。 $Na_2S_2O_4$  は pH 7 の水溶液中で非常に強力な還元剤であることから<sup>16)</sup>、**2'**に  $Na_2S_2O_4$  を加えることによって deoxy 体が生成したと判断した。次に、その deoxy 体の溶液を Sephadex G-25 脱塩カラムを用いて精製することで過剰の  $Na_2S_2O_4$  を取り除き、空気中の酸素に触れさせることによって、新たな吸収帯( $\lambda_{max}$  : 420 nm, Q 帯: 545 nm)を持つ化学種を得た(Figure 2-7)。さらにその溶液に CO を 1 分間バブリング後に UV-vis スペクトルを測定したところ、ソーレー帯

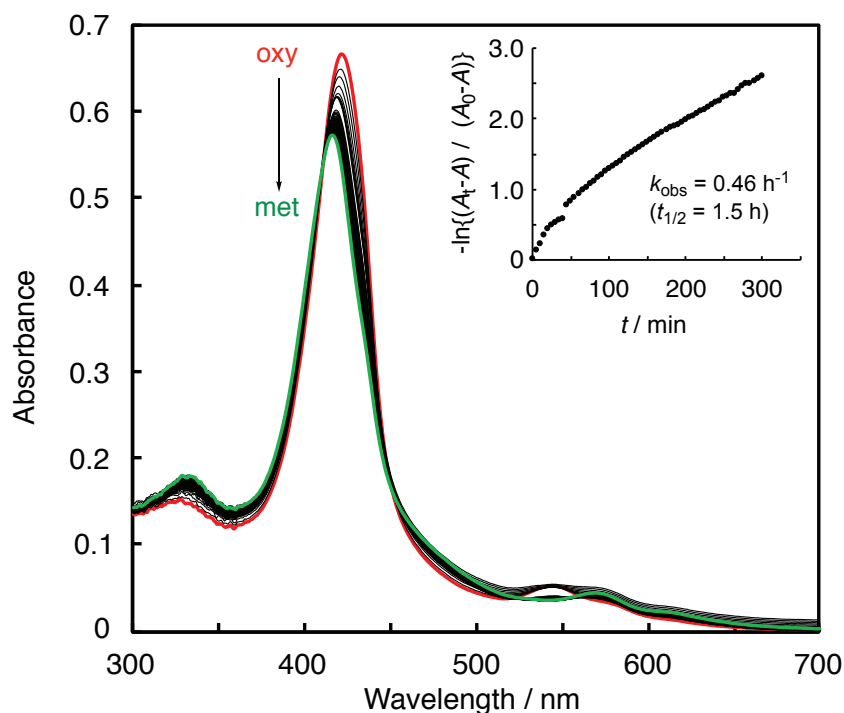
の強度は大きくなり、 $\lambda_{\max}$  は 421 nm に観測された(Figure 2-7)。CO は  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ポルフィリンにのみ配位し、そのソーレー帯の吸収は非常にシャープであるということが知られている<sup>14)</sup>。そのため CO をバブリングすることによって得られた化学種は、oxy 体の酸素分子が一酸化炭素分子に置き換わった CO 体のものであることが示唆された。



**Figure 2-7.** UV-vis spectra of **2'** as met-form, deoxy-form, oxy-form and CO-form in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

次に、**2'**が安定な酸素錯体を形成するかどうかを調べるために、25 °C において pH 7.0 で **2'**の oxy 体の自動酸化速度測定を行った(Figure 2-8)。時間の経過とともにスペクトルは等吸収点を通りながら変化し、ソーレー帯の $\lambda_{\max}$ は 420 nm から 415 nm へと変化した。最終のスペクトルは **2'**の met 体のスペクトルとほぼ一致したことから、観測されたスペクトル変化は  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$  錯体から  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}^-$  錯体への自動酸化によるものと考えられる。433 nm における吸光度変化に対し、一次の反応速度式に基づく解析を行った結果、その半減期  $t_{1/2}$  ( $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}}$ )は 1.5 h となった。本来の hemoCD3 の酸素錯体の半減期  $t_{1/2}$  は 50 h (25 °C) と報告されており、 $\text{O}_2$  錯体においても **2'**が hemoCD3 と全く異なることが明ら

かになった。**2'**が水中で不安定な酸素錯体を形成していることから、**1**のピリジンリンカーが中心  $\text{Fe}^{\text{II}}$  への配位が非常に弱いあるいは配位していない可能性が考えられる。

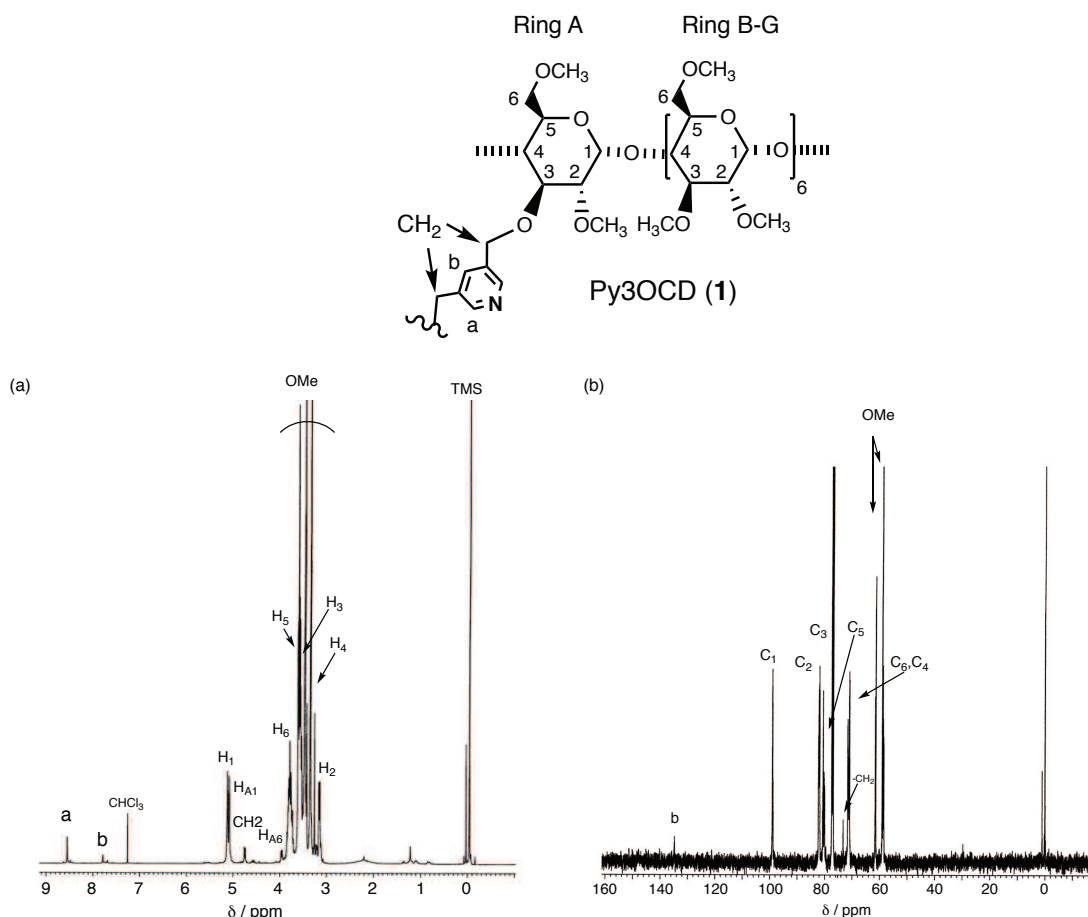


**Figure 2-8.** Time-course spectral change of the **2'** complex under aerobic conditions in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. The spectra were recorded at 5 min intervals. Inset shows the first-order plot of the autoxidation reaction of the oxy-**2'** complex to determine the rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ).

### 3-3.2 および **1** の NMR スペクトル測定における構造の解析

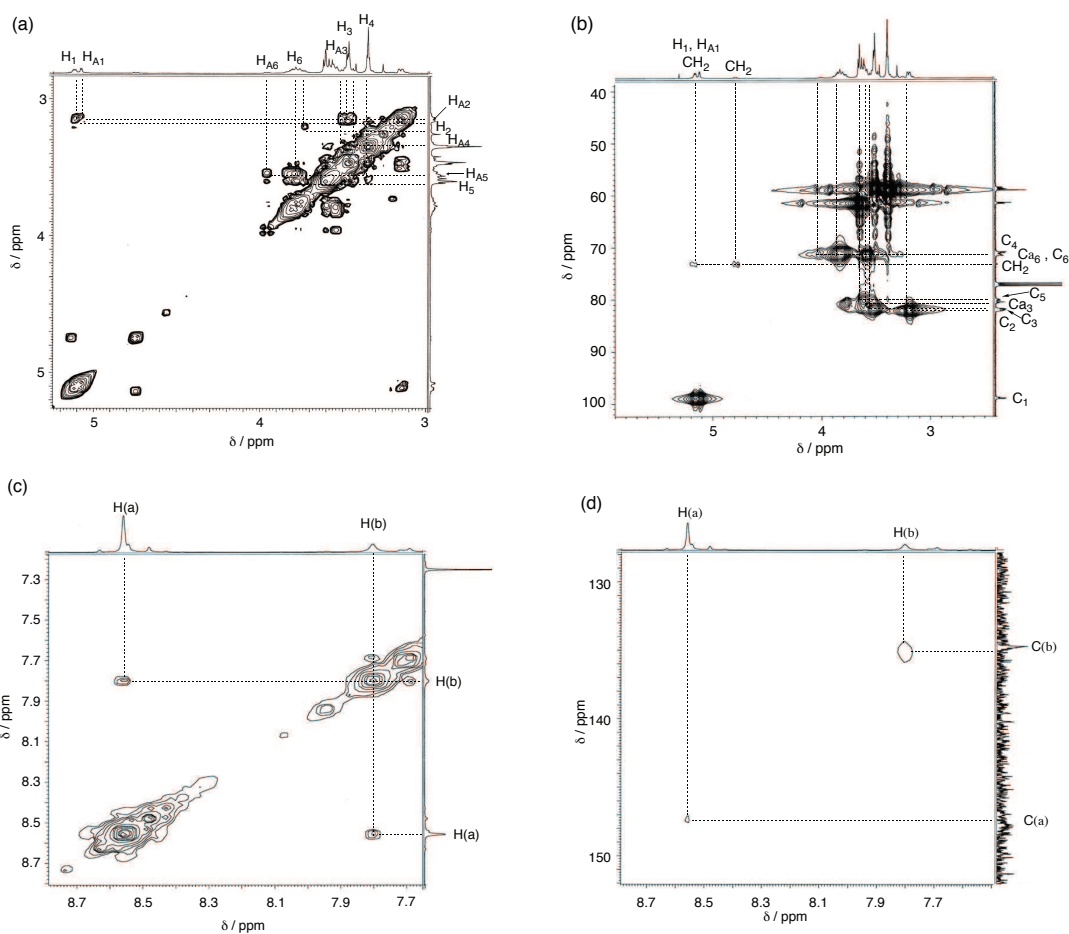
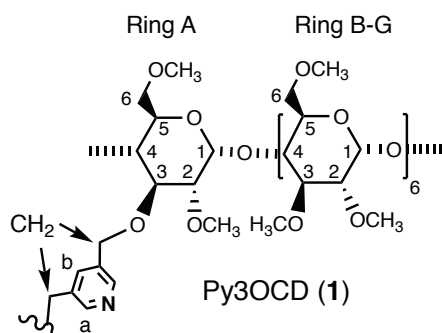
MALDI-TOF MS (Figure 2-4)より今回生成した Py3OCD (**2**)はこれまでの Py3OCD (**1**)と同じ分子量であることが確認できたが、**2**は**1**と全く異なる配位環境を FeTPPS に提供することが明らかとなった。したがって、従来の合成方法に従って合成した **2**と過去に報告されている **1**では分子構造が異なることが考えられる。これは二量化反応において何らかの副反応が起こり、構造が異なる **2**が生成したと考えられる。 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは **1**と **2**のスペクトルが類似し、完全に区別できる情報が得られないため、実験方法の 2-2-5 に従

って合成した **1** を各種 NMR を用いて、**1** の構造を詳しく帰属した。次に、今回得られた副生成物 **2** の構造を各種 NMR を用いて **1** と比較することで、構造決定を試みた。



**Figure 2–9.** <sup>1</sup>H NMR spectrum of Py3OCD (**1**) in CDCl<sub>3</sub> at 25 °C (a). <sup>13</sup>C NMR spectrum of Py3OCD (**1**) in CDCl<sub>3</sub> at 25 °C (b).

重クロロホルム(CDCl<sub>3</sub>)中の Py3OCD (**1**)の <sup>1</sup>H NMR および <sup>13</sup>C NMR スペクトルを Figure 2–9 に示す。ピリジンリンカーが結合する CD のグルコピラノース環を A 環とし、その他の環を B–G 環とする。以前も **1** の <sup>1</sup>H NMR スペクトルが報告されており<sup>17)</sup>、積分値および化学シフトから、**1** のリンカー部分であるピリジン環の 2 位の <sup>1</sup>H (a) および 4 位の <sup>1</sup>H (b) は 8.59 ppm および 7.86 ppm のピークにそれぞれ帰属した(Figure 2–9a)。ピリジン環の 4 位の <sup>13</sup>C (b) は <sup>13</sup>C NMR スペクトル(Figure 2–9b)において 134 ppm に観測された。次に、各シグナルを詳しく帰属するために、Py3OCD (**1**)の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY および HMQC スペクトルを測定した。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY を Figure 2–10(a, c)、HMQC を Figure 2–10(b, d)に示す。

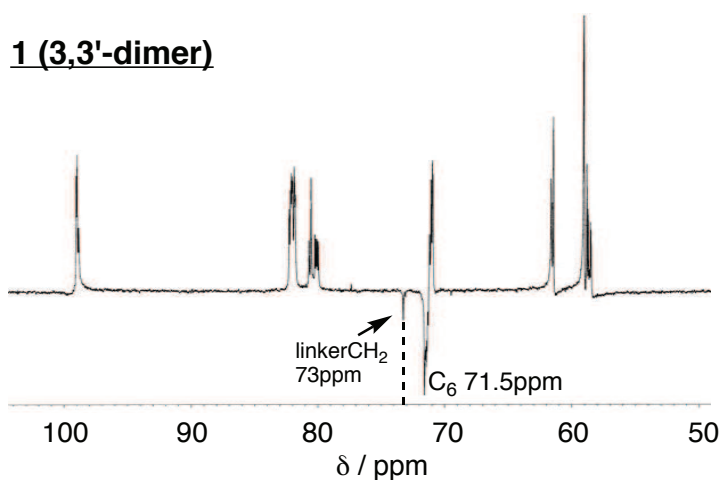


**Figure 2-10.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum of **1** in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C (a, c). HMQC NMR spectrum of Py3OCD (**1**) in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C (b, d).

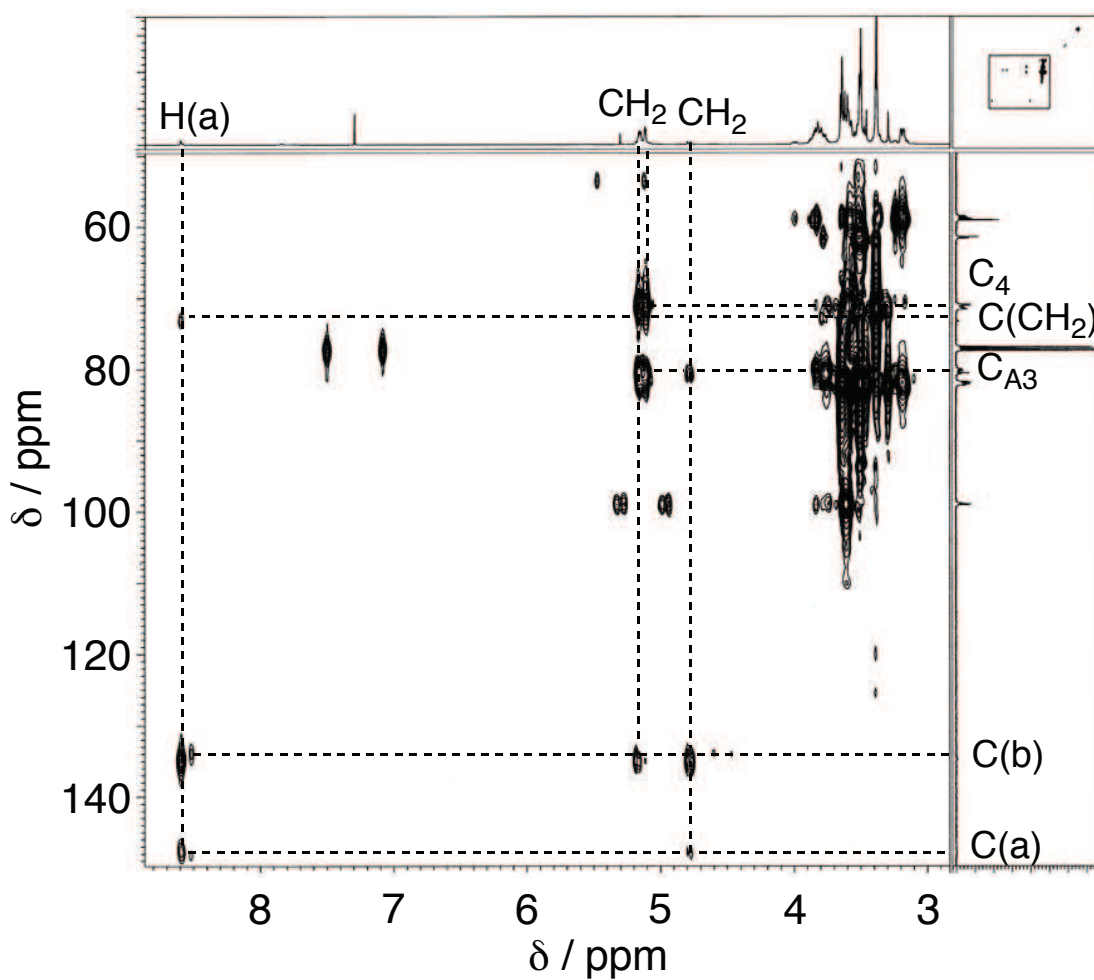
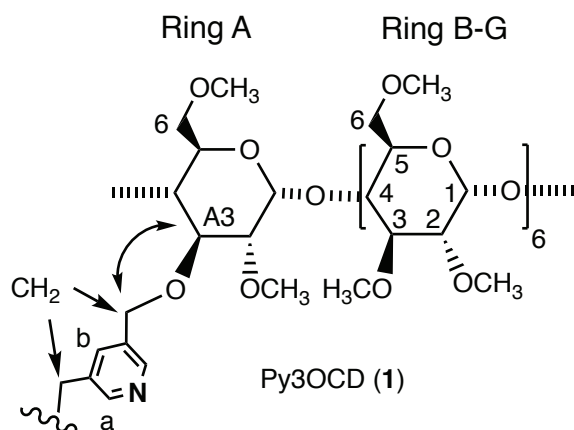
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル(Figure 2-10c)においても、**1** のピリジン環 2 位の  $^1\text{H}$  (a)と 4 位の  $^1\text{H}$  (b) 間にロングレンジの相関が確認された。ピリジン環の  $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  のシグナルの相関を HMQC スペクトルにより観測したところ(Figure 2-10d)、

**1** のピリジン環 2 位の  $^1\text{H}$  (a)- $^{13}\text{C}$ (a)および 4 位の  $^1\text{H}$  (b)- $^{13}\text{C}$ (b)に相関が見られた。シクロデキストリン 1 位のプロトン( $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_{A1}$ )を観測されている 5.13 ppm のシグナルは(Figure 2-9a)、 $^{13}\text{C}$  スペクトルで 99 ppm に相関が見られたのでそのように帰属した(Figure 2-10b)。1 位のシグナルから、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figure 2-10a)および HMQC スペクトル(Figure 2-10b)によって、シクロデキストリンの各シグナルの帰属を行った。リンカーの  $\text{CH}_2$  基はジアステレオトピックな環境にあるため、メチレンプロトンはそれぞれ 4.78 ppm および 5.13 ppm に観測された(Figure 2-10b)。なお、5.13 ppm のシグナルは 1 位のシグナルと重なっている。過去に報告されている Py3OCD の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル<sup>17)</sup>と一致し、今回観測されたそれぞれのシグナルの化学シフトは妥当である。

次に、リンカー部分の  $\text{CH}_2$  基に着目した。リンカーの  $\text{CH}_2$  基を  $^{13}\text{C}$  DEPT135 NMR により観測したところ(Figure 11)、リンカー部分の  $\text{CH}_2$  基は 2 級炭素であるため、下向きのシグナル(73.0 ppm)として確認された。さらに、HMQC スペクトル(Figure 2-10b)においても、 $^1\text{H}(\text{CH}_2)$ - $^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$ に相関が見られた。続いて **1** のリンカーの  $\text{CH}_2$  基が *O*-メチル化 $\beta$ -シクロデキストリンのグルコピラノース A 環の何位と連結しているかを決定するために、 $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  とのロングレンジカップリングを HMBC スペクトルから検出した(Figure 2-12)。その結果、リンカー部分の  $\text{CH}_2$  基の  $^1\text{H}$  シグナルはピリジン環の  $^{13}\text{C}$  (135.0 ppm と 148.0 ppm)と強く相関するとともに、グルコピラノース A 環の 3 位の  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_{A3}$ , 81.0 ppm)と強い相関ピークを示した。これらの結果から、Py3OCD (**1**)においてはリンカーがエーテル結合を介して CD の 3 位で連結していることが明らかとなった。



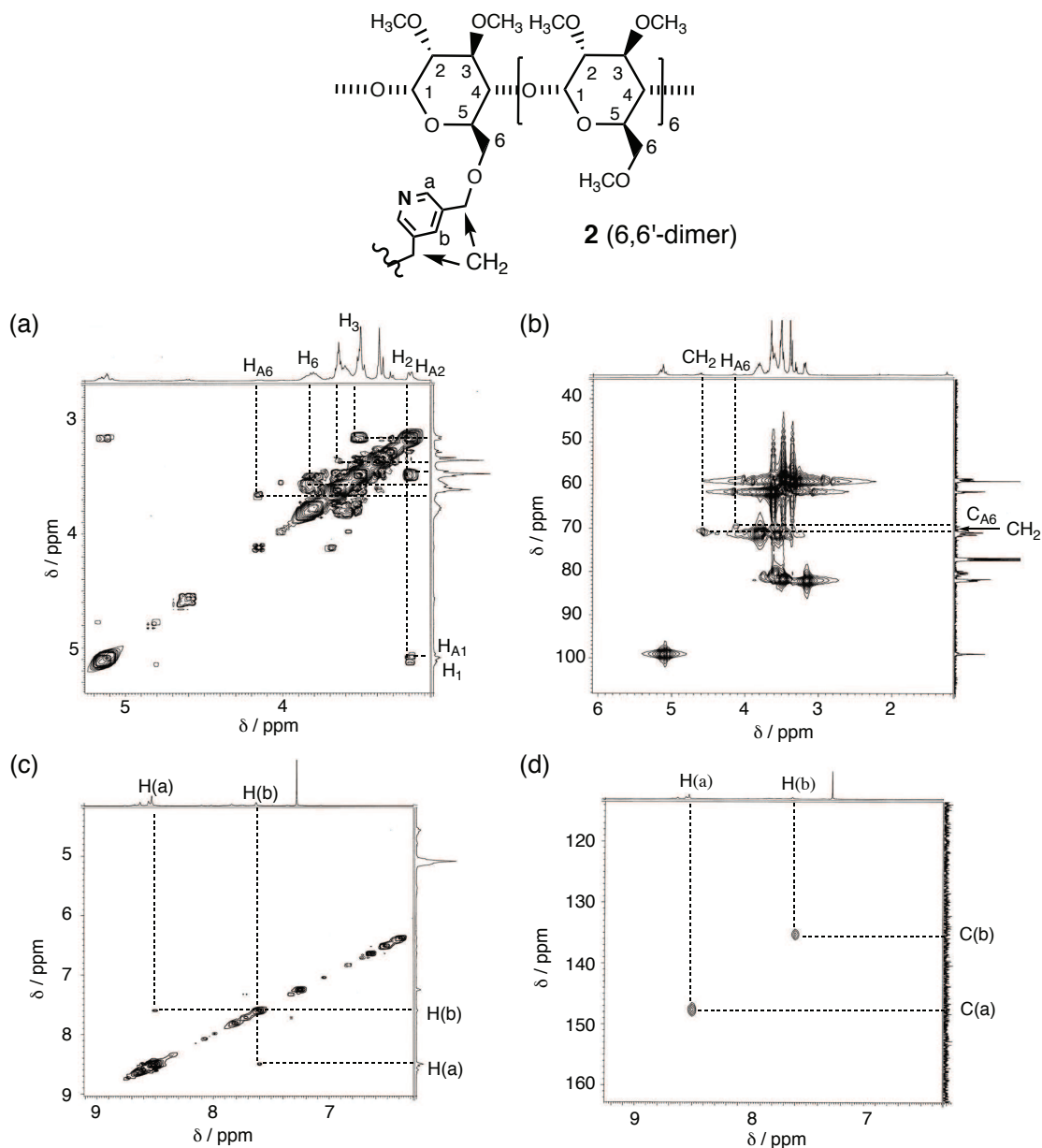
**Figure 2-11.**  $^{13}\text{C}$  DEPT135 NMR spectrum of Py3OCD (**1**) in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C.



**Figure 2–12.** HMBC spectrum of Py3OCD (1) in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C.

次に、**2** のピリジン環は **1** の帰属と同じ手順で  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR、HMQC スペクトルより帰属した(Figure 2–13)。**1** と比較すると、**2** のピリジン環の化学シ

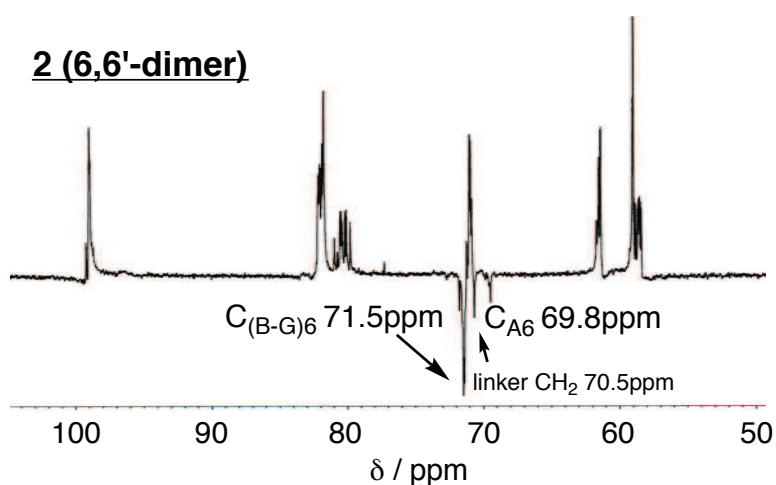
フトは  $^1\text{H}$  (a) : 8.50 ppm、 $^1\text{H}$  (b) : 7.59 ppm に観測された(Figure 2-13c)。積分値およびピリジンの  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR の文献値<sup>17)</sup> ( $^1\text{H}$  (a) : 8.59 ppm、 $^1\text{H}$  (b) : 7.62 ppm、C(a) : 149 ppm、C(b) : 135 ppm)より、今回観測されたそれぞれのシグナルはピリジン由来であると考えられる。HMQC スペクトル(Figure 2-13d)によりピリジン環 2 位の  $^1\text{H}$  (a)- $^{13}\text{C}$ (a)および 4 位の  $^1\text{H}$  (b)- $^{13}\text{C}$ (b)に相関が見られた。



**Figure 2-13.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum of **2** in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C (a, b). HMQC NMR spectrum of **2** in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C (c, d).

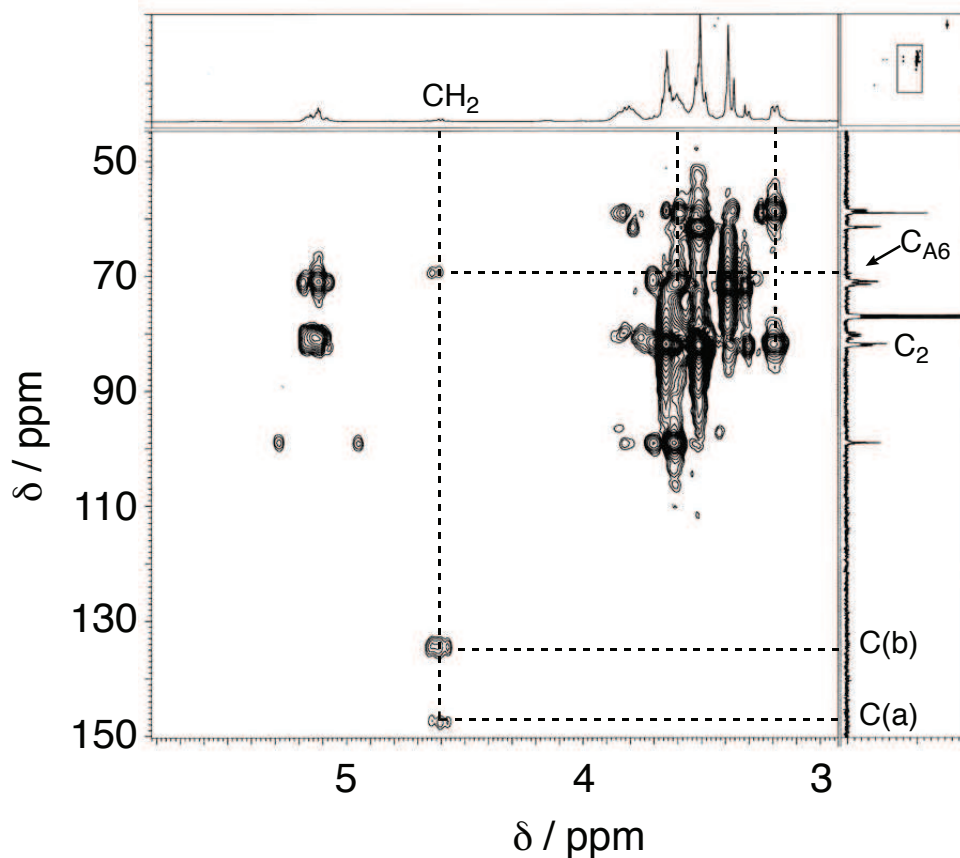
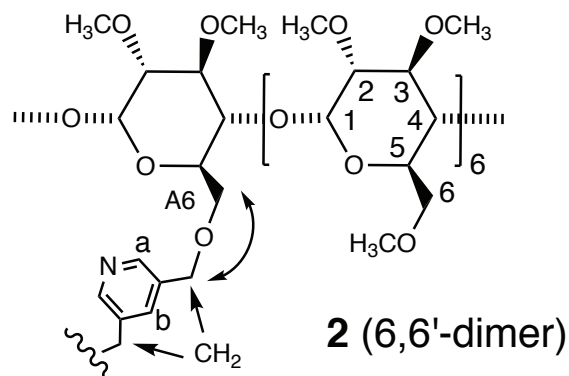


次に、リンカー部分の CH<sub>2</sub> 基を <sup>13</sup>C DEPT135 および HMQC スペクトル(Figure 2-13)を用いて帰属を行った。Figure 2-14 に <sup>13</sup>C DEPT135 NMR スペクトルの結果を示す。**1** の <sup>13</sup>C DEPT135 NMR スペクトル(Figure 2-11)と比較すると、下向きのピーク位置に明らかな変化が見られた。Figure 2-11 においてはリンカー部分の CH<sub>2</sub> (73.0 ppm) および、シクロデキストリン A-G 環 6 位は(71.5 ppm)が下向きのシグナルとして確認されたが、**2** の測定結果では、69.8、70.5 および 71.5 ppm で 3 つの下向きシグナルが観測された。



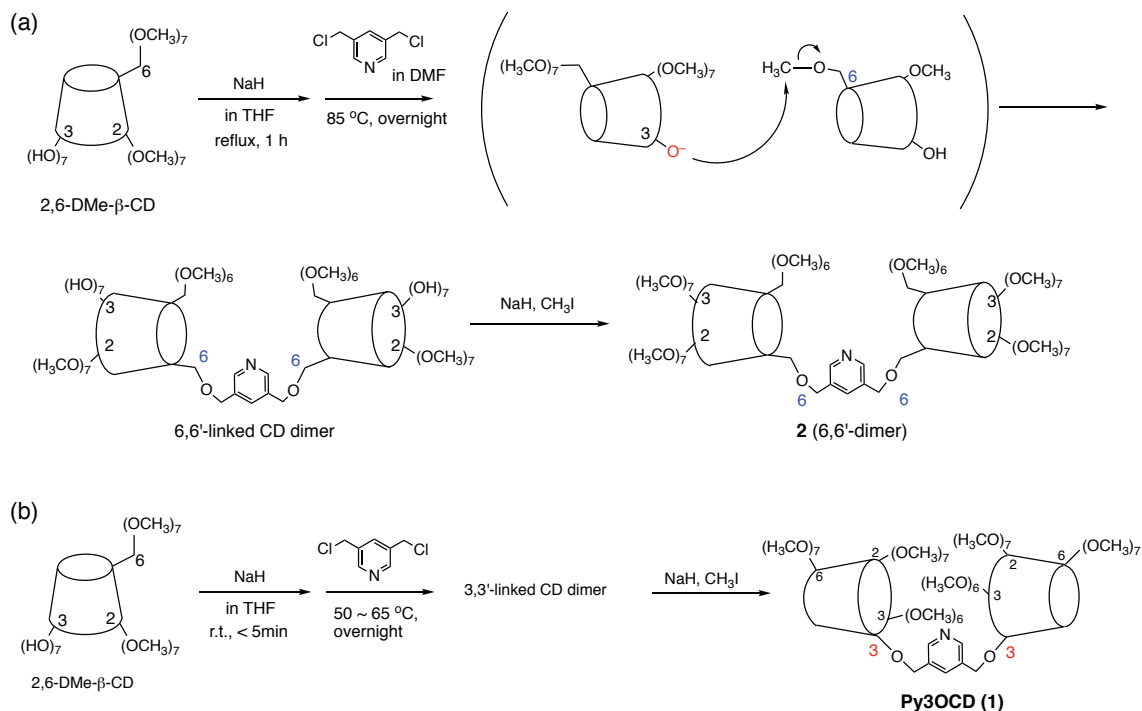
**Figure 2-14.** <sup>13</sup>C DEPT135 NMR spectrum of **2** in CDCl<sub>3</sub> at 25 °C.

これらのピークがシクロデキストリン二量体のどの部分由来の CH<sub>2</sub> 基なのかを決定するために、HMQC (Figure 2-13) および HMBC (Figure 2-15) スペクトルにより帰属を行った。Figure 2-13 において帰属された 2 つの CH<sub>2</sub> 基はそれぞれ 4.1 および 4.6 ppm のプロトンと HMQC において相関しており、さらに 4.6 ppm のシグナルは HMBC においてピリジン環と相関していることから、4.6 ppm の <sup>1</sup>H シグナルをリンカーの CH<sub>2</sub> 基であると帰属した。続いて **2** のリンカー部分が *O*-メチル化β-シクロデキストリンのグルコピラノース A 環の何位と連結しているかを決定するために、HMBC スペクトルを測ると(Figure 2-15)、リンカー部分の CH<sub>2</sub> 基の <sup>1</sup>H シグナルは C<sub>A6</sub> と強い相関ピークを示した。一方でリンカー部分の CH<sub>2</sub> 基 <sup>1</sup>H シグナルは C<sub>A3</sub> との相関が観測されなかったことから、**2** はピリジンリンカーを CD の 3 位ではなく 6 位で連結していることが明らかとなった。



**Figure 2-15.** HMBC NMR spectrum of **2** in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C.

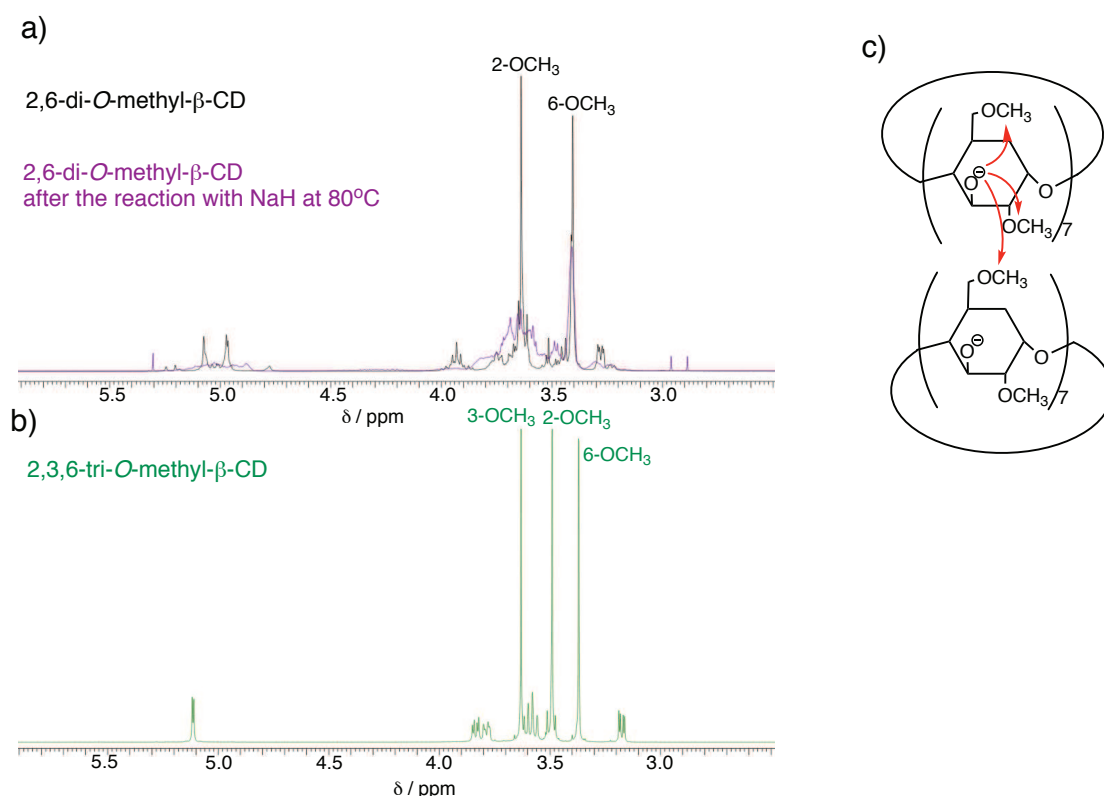
これらの結果を考慮し、**2**の生成メカニズムについて考えた(Figure 2-16)。従来の合成方法(Scheme 2-3)では、2,6-di-O-methyl- $\beta$ -CDを無水 THF / DMF 混合溶媒に溶かした後、真空乾燥させた NaH (4 当量)を加え、反応容器を 80 °Cの油浴に移し、1 時間加熱還流した。この後、リンカーをゆっくり滴下してから、80 °C



**Figure 2–16.** A reaction mechanism for the formation of the 6,6'-dimer (**2**) (a) and the optimized synthesis of the 3,3'-dimer (**1**) (b).

で一晩加熱還流した。本来、Py3OCD<sup>OH</sup> の二量化反応は NaH より 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の 3 位のヒドロキシ基のプロトンを引き抜きアルコキシドが生成し、それがリンカーのアルキル基に求核攻撃を行う S<sub>N</sub>2 反応である。しかしながら、NaH を加えて 80 °C の油浴で 1 時間加熱還流している間、2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の 3 位で生成したアルコキシドが 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD 同士の分子間反応により 6 位のメチル基に求核攻撃することで、メチル基交換反応が進行していることが考えられる。この後にリンカーを滴下しているので、 $\beta$ -CD の立体障害および反応性により、2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の 6 位のアルコキシドが先にリンカーと二量化反応し、6,6'-dimer が主生成物として得られることが考えられる。この 6,6'-dimer の構造は **2** の NMR スペクトルが示す結果とよく合致している。このメカニズムを確かめるために、2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD を無水 THF / DMF 混合溶媒に溶かした後、真空乾燥させた NaH を加え、反応容器を 80 °C の油浴に移し、1 時間加熱還流した。その生成物の <sup>1</sup>H NMR スペクトル結果を Figure 2–17 に示す。Figure 2–17a 紫色のスペクトルは加熱還流した生成物の測定結果であり、黒色のスペクトルは反応前の 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の測定結果である。Figure 2–17b は 2,3,6-tri-

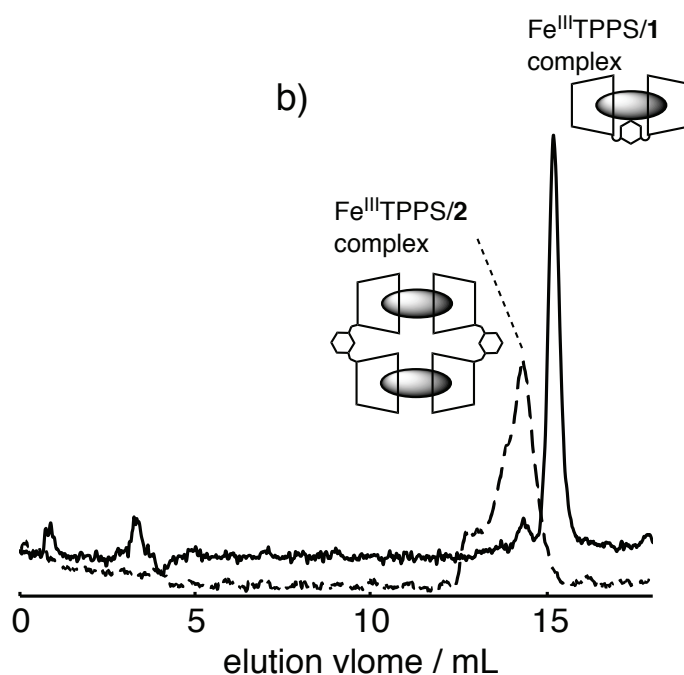
*O*-methyl- $\beta$ -CD の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルになっている。3.63 および 3.40 ppm で観測された 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の 2 位および 6 位のメチル基のシグナルは、NaH との反応後に乱れた。これは、ランダムなメチル基転移反応が分子内または分子間で起こったためと考えられる(Figure 2-17c)。更に、2,3,6-tri-*O*-methyl- $\beta$ -CD の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルと比較すると、3.63 ppm で観測された 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の 2 位メチル基のシグナルが 3.53 ppm にシフトすることから、メチル基転位反応がこのような大きなスペクトルの混乱を引き起こすことが考えられる。



**Figure 2-17.** Overlaid  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD in  $\text{CDCl}_3$  before (black) and after the reaction with NaH (purple) (a).  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 2,3,6-tri-*O*-methyl- $\beta$ -CD in  $\text{CDCl}_3$  (b). Schematic representation for the random transmethylation reaction occurred in 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD in the presence of NaH over 80 °C (c).

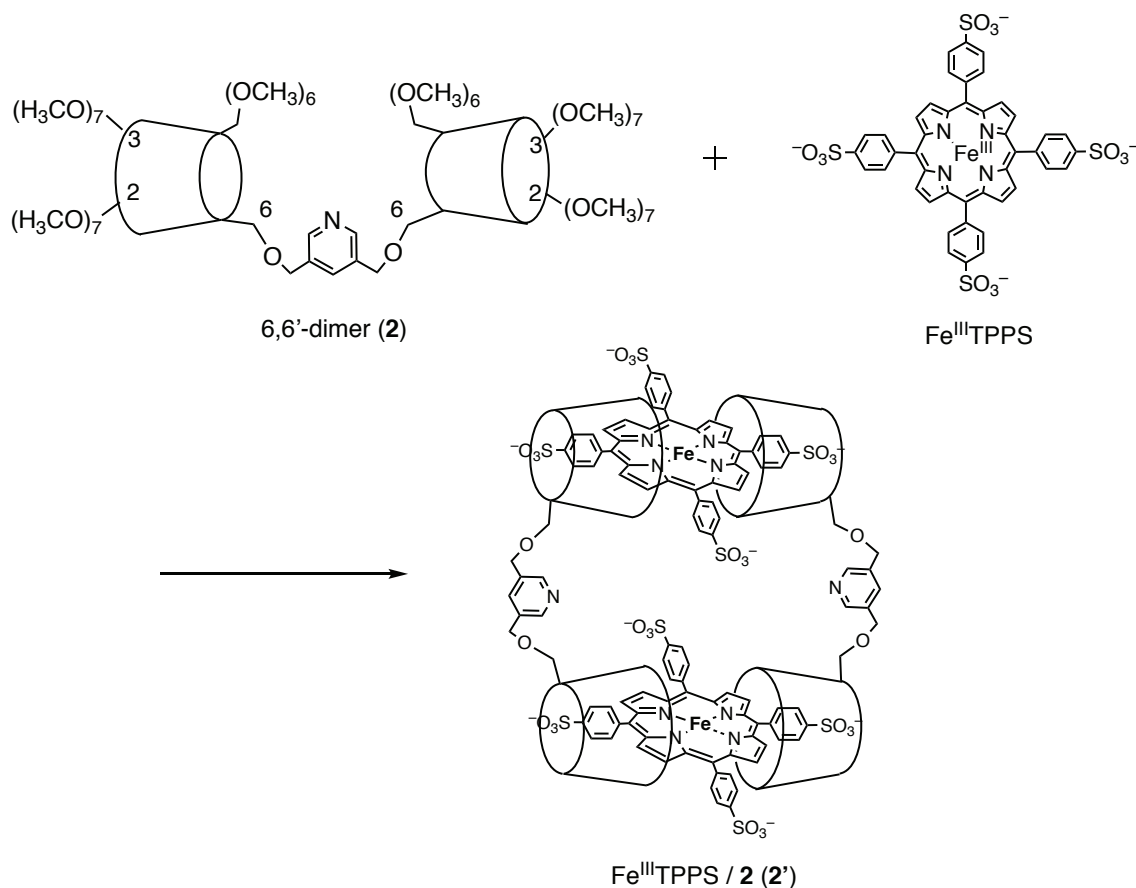
これらのことから、従来の合成方法において 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD 同士がメチル基交換反応を起こし、それが原因となって Py3OCD (**1**)が生成しないことが示唆された。

以上の検討により、**2**は6,6'-dimerであると考え、UV-vis スペクトル測定の結果を再度考察する。Figure 2-5 に示した UV-vis 滴定より、**2**は Fe<sup>III</sup>TPPS と 1:1 包接錯体を形成可能であった。しかしながら、**2'**の pK<sub>a</sub> は 5.8 であり、これは met-hemoCD3 の pK<sub>a</sub> 8.0 よりも 2.0 小さいことから、**2'**におけるピリジンの軸配位が弱いもしくは中心鉄に配位していない可能性がある。次に、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて、**2**は Fe<sup>III</sup>TPPS とどのような包接錯体を形成しているかどうかを調べた。その結果を Figure 2-18 に示す。**2'**は met-hemoCD3



**Figure 2-18.** Size exclusion chromatograms of the inclusion complexes of Fe<sup>III</sup>TPPS/1 and Fe<sup>III</sup>TPPS/2. A Superdex 200 10/300GL column was used and elution was performed at a flow rate of 0.5 mL/min with phosphate buffer at pH 7.0 and 4 °C. Elution was monitored by measuring the absorbance at 280 nm.

より早く溶出することがわかった。これは**2**が Fe<sup>III</sup>TPPS とオリゴマー錯体を形成していることを示しており、さらに **2'**の溶出ピークが比較的シャープであることから、**2**は Fe<sup>III</sup>TPPS と 2:2 包接錯体(Figure 2-19)を形成することが示唆された。そのため、**2**のピリジンが中心鉄に配位していないことから、安定な O<sub>2</sub> 錯体が形成できなかつたと考えられる。



**Figure 2–19.** Structures of the Fe<sup>III</sup>TPPS/2 (**2'**).

### 3–4. Py3OCD<sup>OH</sup> (**1<sup>OH</sup>**)の合成条件の検討

上記の検討より、望ましくない生成物 **2** の正体は 6,6'-dimer であることが分かった。Figure 2–16 に示した生成メカニズムが正しければ、2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD に NaH を加えてからリンカーを加えるまでの反応温度と時間の制御が 6,6'-dimer の生成を抑えるカギになると考えられる。そこで、6,6'-dimer の生成を抑えて Py3OCD の収率を向上させるために、以下の検討を行った。今回試した合成条件をまとめて Table 2–2 に示す。まず、自分で合成した 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD が原因であるかどうかを調べるため、市販品を用いて従来の合成方法にしたがって合成を行った(entry 1)。その結果、得られた生成物と Fe<sup>III</sup>TPPS の包接錯体のソーレー帯の $\lambda_{\max}$  が 415 nm に見られ、その包接錯体の軸配位挙動を調べた結果、pK<sub>a</sub> 値(6.0)となったことから、得られた生成物が **2** と同じ 6,6'-dimer であること

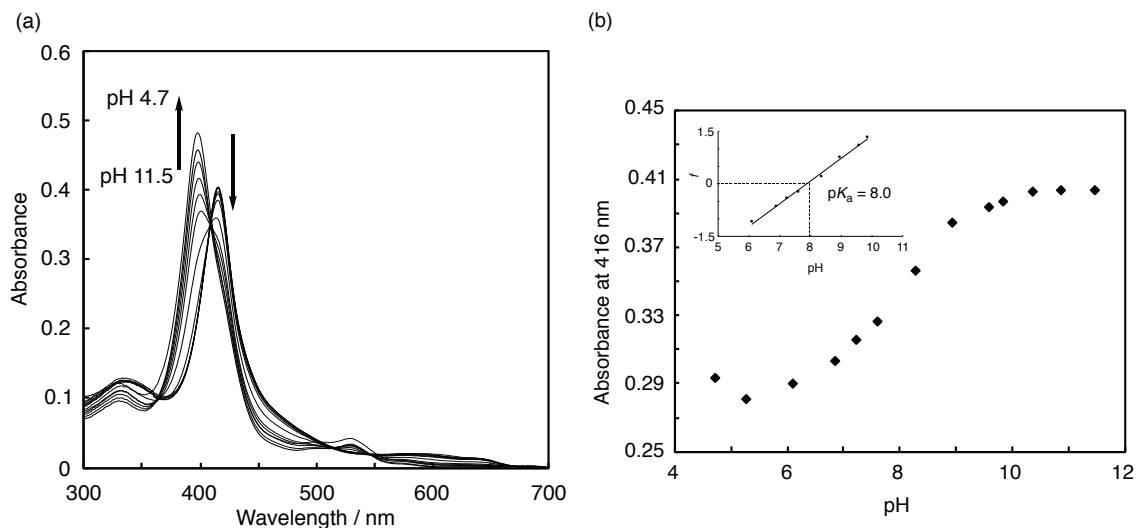
が考えられる。このことから 2-2-2 の合成方法で用いた合成した原料である 2,6-di-O-methyl- $\beta$ -CD が反応には影響がないと考えられる。次に、**1<sup>OH</sup>** を合成する際の反応温度を室温まで下げたが(entry 2)、ほとんどダイマー化は進行しなかった。entry 2 から、室温では二量化反応が進行しないことがわかった。**1<sup>OH</sup>** を合成する際に、リンカーを滴下している間の加熱温度を 85 °C にし、その後反応温度を室温まで下げてから一晩攪拌した結果(entry 3)、得られた生成物が **2** と同じ 6,6'-dimer であることを Fe<sup>III</sup>TPPS との包接錯体の pK<sub>a</sub> 値(6.0)より判明した。反応温度を 40 °C にした時の反応終了後の MALDI-TOF MS スペクトル結果では、2712 付近に CD ダイマーに相当するピークがわずかに観測されたが、**1<sup>OH</sup>** のナトリウムイオン付加体の分子量は 2787 であり、今回観測されたピークは原料の 2,6-di-O-methyl- $\beta$ -CD が NaH より脱メチル後ダイマー化した生成物であると考えられる(entry 4)。また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した後、得られた収率は 10% と低い。これらのことから、加熱温度が低い場合、 $\beta$ -CD 同士のメチル基交換反応が主に進行していると考えられる。さらに種々の条件を検討した結果、反応溶媒を無水 THF / DMF 混合溶媒から無水 THF のみにすることで、加熱還流温度を 65 °C とし、さらにリンカーを加えるタイミングを NaH を加えてからすぐにした(entry 5)。その結果、24% で Py3OCD が得られた。上記の条件で得られた Py3OCD は、3 位同士で連結されていることを各種 NMR スペクトル測定により確認した。entry 5 の実験条件については、2-2-4 に詳しく記した。

**Table 2-2.** Synthesis of Py3OCD<sup>OH</sup> (**1<sup>OH</sup>**)

entry	DMe- $\beta$ -CD	NaH	Solutions	Temperature	pK <sub>a</sub>	Result
1	1.0g	3 eq	dry THF / dry DMF	85°C	6.0	6,6'-dimer
2	1.0g	3 eq	dry THF / dry DMF	room temperature	—	×
3	1.0g	3 eq	dry THF / dry DMF	85°C-room temperature	6.0	6,6'-dimer
4	1.0g	6 eq	dry THF	40°C	—	×
5	1.0g	6 eq	dry THF	65°C	8.0	⊙

また、Fe<sup>III</sup>TPPS との包接錯体における pH 滴定(Figure 2-20)では、過去に報告された met-hemoCD3 のものとよく一致するスペクトル変化および pK<sub>a</sub> 値(8.0)が得られた。これらの反応条件から、**1<sup>OH</sup>** を合成する際、THF 沸点(66 °C)の付近 60 ~ 70 °C は最適な加熱還流温度範囲であると考えられる。以上の検討により、6,6'-dimer の生成を抑えて、正しく Py3OCD を合成できる条件を確立し、それが過去に報告された化合物と一致する物性を示すことを確認した。次項では、今回得ら

れた Py3OCD を用いた hemoCD3 の O<sub>2</sub>、CO およびシアン化物イオンの結合挙動について検討を行ったので、その結果について報告する。

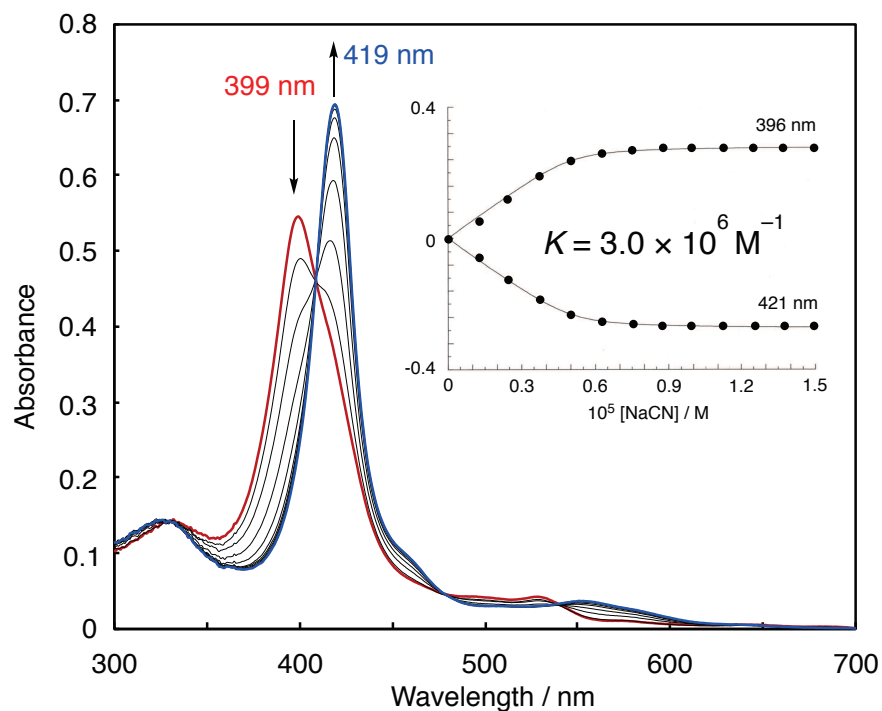


**Figure 2-20.** UV-vis absorption spectral changes of Fe<sup>III</sup>TPPS complexed with Py3OCD as a function of pH in aqueous 0.1 M NaClO<sub>4</sub> solution at 25 °C. The pH values were adjusted by NaOH and HClO<sub>4</sub>. Inset: Plot of  $\log \{ (A - A_a)(A_b - A)^{-1} \}$  at 416 nm versus pH for determining pK<sub>a</sub>.

### 3-5. hemoCD3 のシアン化物イオン、O<sub>2</sub> および CO 結合挙動

Kano らは met-hemoCD3 は生理条件下で CN<sup>-</sup>が強く配位することを報告している<sup>17)</sup>。2-2-5 の実験方法で合成した Py3OCD を用いて、met-hemoCD3 に様々な濃度のシアン化ナトリウム(NaCN)を加えた時の吸収スペクトル変化を測定した。その結果を Figure 2-21 に示す。met-hemoCD3 の 399 nm の吸収が等吸収点を通りながら 419 nm へとシフトし、met-hemoCD3 の吸光度変化( $\Delta A$ )を NaCN 濃度に対して解析を行なったところ、滴定曲線は 1:1 の錯形成に基づく理論曲線と良く一致することがわかった(Figure 2-21 挿入図)。結合定数  $K$  は  $3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  と求まった。これは過去に報告されている met-hemoCD3 の結果と良く一致することがわかった。





**Figure 2–21.** UV–vis absorption spectral changes of met–hemoCD3 ( $4.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) upon addition of various amounts of NaCN in phosphate buffer (pH 7.0,  $5.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) at 37 °C. Inset: Plots of absorbance changes at 396 and 421 nm. The black solid lines represent the best fit of data to the theoretical equation for 1:1 complexation, which determined the  $K_{\text{ass}}$ .

次に、2-2-5 の実験方法で合成した Py3OCD を用いて調整した hemoCD3 の  $\text{O}_2$  親和性および CO 親和性についての検討を行った。 $\text{O}_2$  錯体および CO 錯体の生成における平衡反応は次式によって定義される。



$$P_{1/2}^{\text{L}} = \frac{[\text{hemoCD3}] P^{\text{L}}}{[\text{L-hemoCD3}]} \quad (2-2)$$

ここで  $P^L$  は系の  $O_2$  および  $CO$  分圧、  $P_{1/2}^L$  は 50 % の hemoCD3 に  $O_2$  および  $CO$  が配位するときの  $O_2$  および  $CO$  分圧を表す。測定は hemoCD3 および L-hemoCD3 が吸収を示す波長で解析を行うため、実際に観測される一定波長での吸光度 ( $A$ ) は次式で表される。

$$A = \varepsilon_l [\text{hemoCD3}] + \varepsilon [\text{L-hemoCD3}] \quad (2-3)$$

この反応系において、hemoCD3 の全濃度  $[\text{hemoCD3}]_t$  は次のように表される。

$$[\text{hemoCD3}]_t = [\text{hemoCD3}] + [\text{L-hemoCD3}] \quad (2-4)$$

式(2-4)を用いて式(2-3)は次のように表される。

$$A = \varepsilon_l [\text{hemoCD3}]_t + \Delta \varepsilon [\text{L-hemoCD3}] \quad (2-5)$$

ここで  $\Delta \varepsilon = \varepsilon_2 - \varepsilon_1$  である。従って、錯形成における吸光度変化 ( $\Delta A$ ) は次式のよう  
に表される。

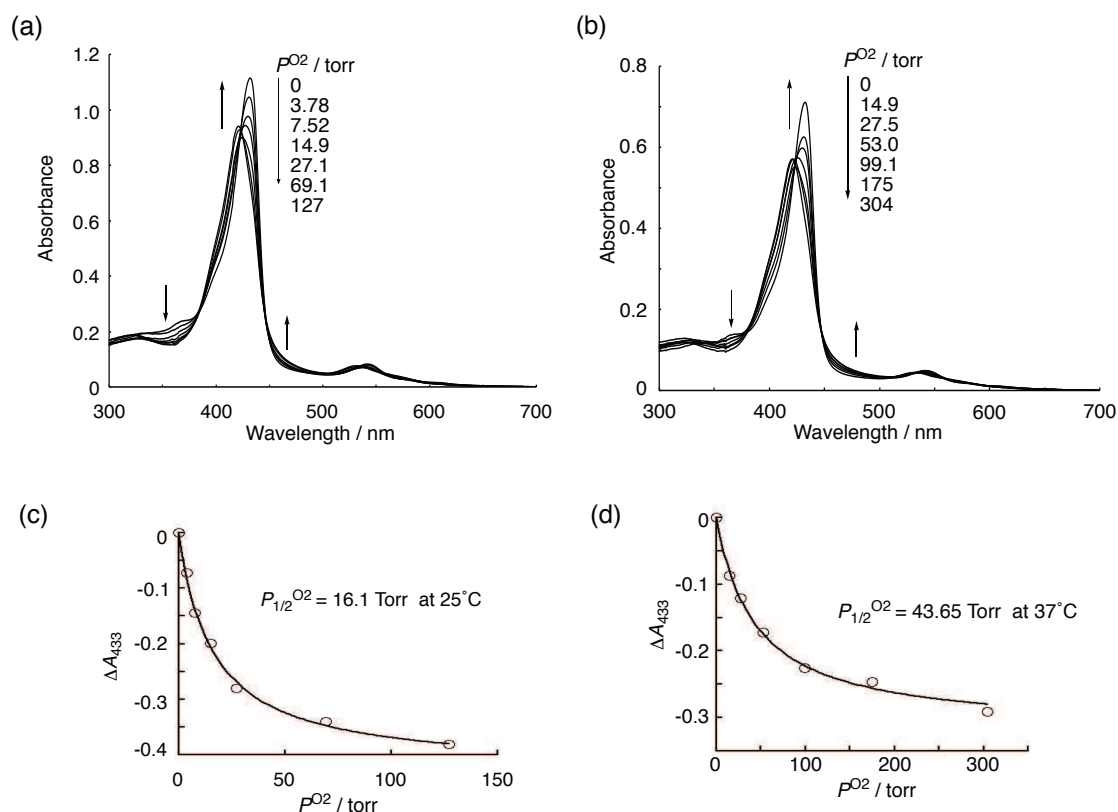
$$\Delta A = \Delta \varepsilon [\text{L-hemoCD3}] \quad (2-6)$$

式(2-2)、(2-4)および(2-6)から  $\Delta A$  を  $P_{1/2}^{O_2}$  および  $P_{1/2}^{CO}$  の関数で表すことができる。

$$\Delta A = \frac{\Delta \varepsilon [\text{hemoCD3}]_t P^L}{P^L + P_{1/2}^L} \quad (2-7)$$

様々な  $O_2$  および  $CO$  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 ( $\Delta A$ ) を  $O_2$  および  $CO$  分圧 ( $P^{O_2}$  および  $P^{CO}$ ) に対してプロットした。得られた曲線から  $P_{1/2}^{O_2}$  を見積もることができる。 $P_{1/2}^{CO}$  を求める際については後述する。pH 7.0 リン酸緩衝溶液中 25 °C と 37 °C の 2 つの温度で種々の酸素分圧において吸収スペクトルを測定した結果を Figure 2-22 に示し、その吸収スペクトル変化を各 Figure 2-22 の(a)と(b)に示す。吸光度変化 ( $\Delta A_{433}$ ) を  $O_2$  分圧に対してプロッ

トした結果を各 Figure 2-22 の(c)と(d)に示す。(c)と(d)の滴定曲線をカレイダグラフによって(2-9)式に基づくカーブフィッティングを行うことにより、



**Figure 2-22.** UV-vis spectral changes of hemoCD3 as a function of the O<sub>2</sub> partial pressure ( $P^{O_2}$ ) in N<sub>2</sub> in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0, 25 °C (a) and pH 7.0, 37 °C (b). Changes in absorbance at 433 nm as a function of  $P^{O_2}$ . The solid line indicates the theoretical curve to determine  $P_{1/2}^{O_2}$  (c) and (d).

$P_{1/2}^{O_2}$  の値を決定した。その結果、hemoCD3 の酸素親和性  $P_{1/2}^{O_2}$  は、25 °Cにおいて 16.1 torr、37 °Cにおいて  $P_{1/2}^{O_2} = 43.65$  torr であることが分かった。このことから、過去に報告されている hemoCD3 の  $P_{1/2}^{O_2}$  が再現することができた。ヘモグロビンの T 状態では、25 °Cにける  $P_{1/2}^{O_2}$  は 26 torr であり、37 °Cにおける  $P_{1/2}^{O_2}$  は 40 torr であることは既に分かっている<sup>33,34)</sup>。したがって hemoCD3 の酸素親和性は、ヘモグロビンの T 状態の  $P_{1/2}^{O_2}$  と近い値を示すことが分かった。hemoCD3 は、生体内の酸素運搬体として有用であることが明らかになった。

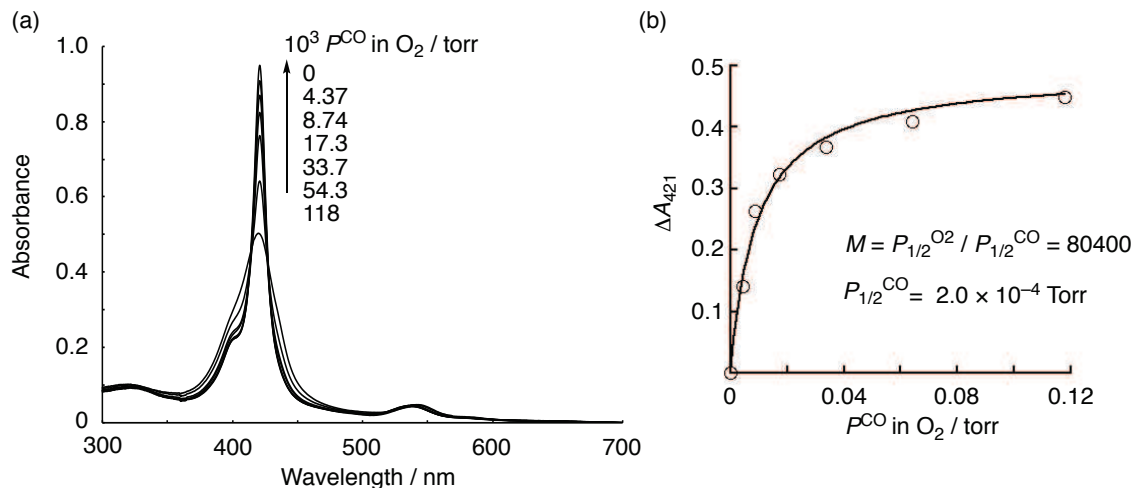
また CO 親和性の測定結果を Figure 2-23 に示し、その吸収スペクトル変化を

Figure 2-23 の(a)に示す。hemoCD3 の oxy 体由来する吸収スペクトルは CO 分圧の上昇に伴って等吸収点を通りながら CO 体の生成を示すスペクトルへと変化していった。吸光度変化( $\Delta A_{422}$ )を CO 分圧に対してプロットした結果を Figure 2-23 の(b)に示す。(b)の曲線から直接  $P_{1/2}^{CO}$  の値を見積もることはできない。 $P_{1/2}^{CO}$  の定義は deoxy 体と CO 体が同量存在する際の CO 分圧である。しかし今回の測定では CO に対する親和性が非常に高いために、oxy 体から CO 体への変化を観測し、 $P_{1/2}^{O_2}$  の値を用いることにより、 $P_{1/2}^{CO}$  の値を決定した。その算出式を次式に示す。

$$M = \frac{P_{1/2}^{O_2}}{P_{1/2}^{CO}} = \frac{[\text{CO-Fe}^{II}\text{Por}] P^{O_2}}{[\text{O}_2\text{-Fe}^{II}\text{Por}] P^{CO}} \quad (2-8)$$

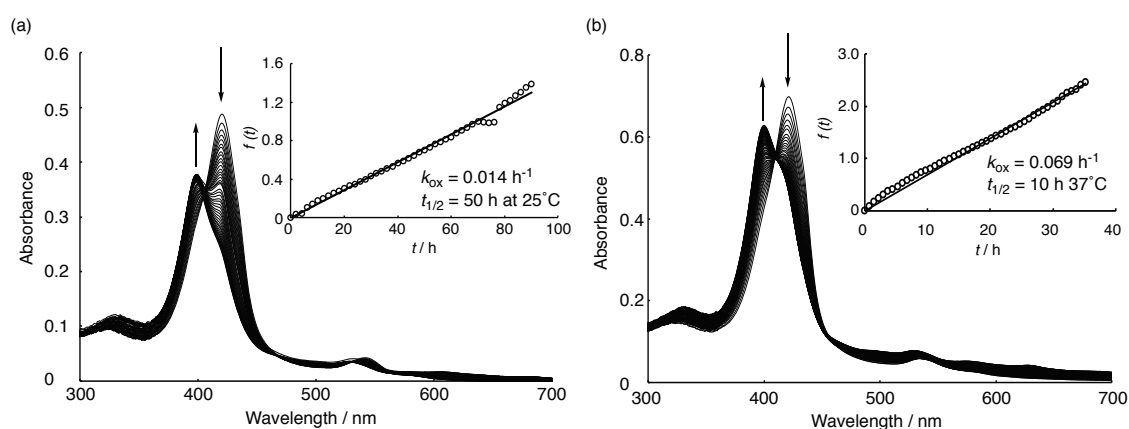
$M$  値は  $O_2 / CO$  選択性の指標であり、 $P_{1/2}^{O_2}$  の値と  $P_{1/2}^{CO}$  の値を用いて上記のように表される。式(2-8)を  $P_{1/2}^{CO}$  を求める式に変形すると、次式が導かれる。

$$P_{1/2}^{CO} = \frac{[\text{Fe}^{II}\text{Por}] P^{CO}}{[\text{CO-Fe}^{II}\text{Por}]} = \frac{P_{1/2}^{O_2}}{M} \quad (2-9)$$



**Figure 2-23.** UV-vis spectral changes of hemoCD3 as a function of the CO partial pressure ( $P^{CO}$ ) in  $N_2$  in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0, 25 °C (a). Changes in absorbance at 421 nm as a function of  $P^{CO}$ . The solid line indicates the theoretical curve to determine  $P_{1/2}^{CO}$  (b).

ここで今回の CO 親和性の測定は oxy 体から CO 体の変化を観測したために、Figure 2-23 の(b)の曲線より式(2-7)を用いて求められる  $P_{1/2}^L$  の値は、oxy 体と CO 体が同量存在する際の CO 分圧となる。まずこの CO 分圧とその時の O<sub>2</sub> 分圧から  $M$  値を式(2-8)より、求めることができる。 $M$  値は 80400 と求めた。なお、反応系においてセル内は O<sub>2</sub> および CO ガスで満たされているために、この時の O<sub>2</sub> 分圧は標準気圧から CO 分圧を引いたものと考えた。また式(2-6)に  $M$  値および求めた  $P_{1/2}^{O_2}$  の結果を代入することにより、 $P_{1/2}^{CO}$  の結果を算出した。25 °C において  $P_{1/2}^{CO} = 2.0 \times 10^{-4}$  torr と決定した。



**Figure 2-24.** UV-vis spectral changes in autoxidation of the O<sub>2</sub> adduct of hemoCD3 in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C Inset: first-order plot based on the absorbance changes at 433 nm. Scans were made at 2 h intervals (a). UV-vis spectral changes in autoxidation of the O<sub>2</sub> adduct of hemoCD3 in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 37 °C. Inset: first-order plot based on the absorbance changes at 433 nm. Scans were made at 50 minute intervals (b).

次に oxy-hemoCD3 の自動酸化反応の測定を行なった。oxy-hemoCD3 の吸収スペクトル変化を pH 7.0 リン酸緩衝溶液中、25 °C および 37 °C のそれぞれの条件下において測定を行った。その吸収スペクトル変化を Figure 2-24 に示す。時間の経過とともにスペクトルは等吸収点を通りながら変化し、ソーレー帯の  $\lambda_{max}$  は 420 nm から 398 nm へと変化した。最終のスペクトルは met-hemoCD3 のスペクトルとほぼ一致したことから、観測されたスペクトル変化は Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> 錯体から Fe<sup>III</sup>-H<sub>2</sub>O 錯体への自動酸化によるものであると考えられる。hemoCD3 については 433 nm における吸光度変化に対し、一次の反応速度式に基づいて解析

を行い、その結果、oxy-hemoCD3 の自動酸化反応における 1 次速度定数  $k_{\text{obs}}$  は  $1.40 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  であり、その半減期  $t_{1/2}$  ( $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}}$ ) は 50 h であることが分かった (pH 7.0, 25 °C)。その解析結果を Figure 2-24a の挿入図に示す。hemoCD1 の場合、25 °C の pH 7.0 リン酸緩衝溶液中における  $t_{1/2}$  の値は 30 h と報告されており、ヘモグロビンの  $t_{1/2}$  は 60 h であることが報告されている。一方 hemoCD3 の場合、25 °C、pH 7.0 リン酸緩衝溶液中において  $t_{1/2}$  の値は 50 h となった。hemoCD と比較すると、oxy-hemoCD3 の  $t_{1/2}$  は oxy-hemoCD1 の  $t_{1/2}$  よりも 1.5 倍長いこと、すなわち酸素錯体がより安定していることが分かった。37 °C 場合も同様の測定および解析を行った結果、oxy-hemoCD3 の自動酸化反応における 1 次速度定数  $k_{\text{obs}}$  は  $6.91 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  であり、その半減期  $t_{1/2}$  ( $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}}$ ) は 10 h であることが分かった。これらの結果から、過去に報告されている hemoCD3 の機能を再現性することができ、中心鉄(II)の oxy-hemoCD3 は生体内の人工酸素、一酸化炭素レセプター、中心鉄(III)の met-hemoCD3 は生体内のシアンレセプターとして有用であることが明らかになった。

#### 4. 結言

これまで当研究室では、水中で機能するミオグロビンモデル化合物として様々なシクロデキストリン二量体と水溶性鉄(II)ポルフィリン( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}$ )の包接錯体 (hemoCD) を報告してきた<sup>14-17)</sup>。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。さらに当研究室におけるこれまでの知見から、hemoCD3 は hemoCD の中で一酸化炭素およびシアンの同時解毒剤として有望であると考えられる。しかし、当研究室では 2013 年に報告されている hemoCD3 構成分子であるシクロデキストリン二量体(Py3OCD)の合成方法<sup>17)</sup>に従って合成しようとしたが、最終生成物である Py3OCD の収率が低いと Py3OCD の代わりに Py3OCD と同じ分子量を持つ副生成物 **2** が度々得られていた問題が挙げられる。本章では Py3OCD の合成方法を検討し、合成方法を最適化することを目的とした。まず、Scheme 2-9 に従って Py3OCD を合成した。MALDI-TOF MS より生成物の確認ができた。しかし、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$  との包接錯体 **2'** における  $\text{pK}_a$  値(5.8)および  $\text{O}_2$  結合挙動では、**2** は過去に報告された Py3OCD との分子量が同じであるが、分子構造が大きく異なることが明らかになった。つづいて **2** およ

び Py3OCD の各種 NMR スペクトル測定結果を用いて、**2** の構造を決定した。**2** はピリジンがエーテル結合を介して CD の 6 位で連結している 6,6'-dimer であることが明らかになった。以上検討した結果から、**2** が生成するメカニズムを考案した。考案したメカニズムより 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD に NaH を加えてからリンカーを加えるまでの反応温度と時間の制御が 6,6'-dimer の生成を抑えるカギになると考えられ、6,6'-dimer の生成を抑えて Py3OCD の収率を向上させるために、Py3OCD<sup>OH</sup> の反応条件について検討を行なった。その結果、反応温度およびリンカーを反応系に入れるタイミングが反応系に大きく影響することが明らかになった。確立した反応条件で合成した Py3OCD は MALDI-TOF MS、NMR スペクトルおよび UV-vis スペクトルより確認でき、過去に報告している Py3OCD の文献値とよく一致した。最後に合成した Py3OCD の機能を確認するため、hemoCD3 のシアン、O<sub>2</sub> および CO 結合挙動について検討を行った。met-hemoCD3 は生理条件下で CN<sup>-</sup> と強く結合し、hemoCD3 が安定な酸素錯体を形成することが再現することができた。以前 Kano らは、ラットの体内に投与した met-hemoCD が一部の鉄(III)が鉄(II)に還元され、CO-hemoCD として排出することが報告している<sup>35)</sup>。CO 中毒、HCN 中毒が主因となるガス中毒が火災における主な死亡原因の一つとなっている<sup>36)</sup>。met-hemoCD3 が体内に投与すると、CO-hemoCD3 と CN<sup>-</sup>-hemoCD3 として尿中に排出されることが考えられる。従って、hemoCD3 が CO とシアンの同時解毒剤として応用できると考えられる。本章で得られた結果では、hemoCD3 の実用化につながると考えられる。

## 5. 参考文献

- 1) 増田 秀樹; 福住 俊一 編 *生物無機化学*, 三共出版; 東京, **2005**.
- 2) Vonesch, M.; Wytko, J. A.; Kitagishi, H.; Kano, K.; Weiss, J., Modelling haemoproteins: porphyrins and cyclodextrins as sources of inspiration. *Chem. Commun.* **2019**, 27, 44–52.
- 3) Mavridis, I. M.; Yannakopoulou, K., Porphyrinoid-cyclodextrin assemblies in biomedical research: an update. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 3391–3424.
- 4) Raynal, M.; Ballester, P.; Vidal-Ferran, A.; Leeuwen, P. W. N. M., Supramolecular catalysis. Part 2: artificial enzyme mimics. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1734–1787.
- 5) Palma, A.; Artelsmair, M.; Wu, G.; Lu, X.; Barrow, S. J.; Uddin, N.; Rosta, E.;

- Masson, E.; Scherman, O. A., Cucurbit[7]uril as a supramolecular artificial enzyme for diels–alder reactions. *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 15894–15898.
- 6) Gharibi, H.; Moosavi-Movahedi, Z.; Javadian, S.; Nazari, K.; Moosavi-Movahedi, A. A., Vesicular mixed gemini–SDS–hemin–imidazole complex as a peroxidase-like nano artificial enzyme. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 4671–4679.
  - 7) VanEtten, R. L.; Sebastian, J. F.; Clowes, G. A.; Bender, M. L., Acceleration of phenyl ester cleavage by cycloamyloses. A model for enzymic specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3242–3253.
  - 8) Kuroda, Y.; Hiroshige, T.; Sera, T.; Shiroya, Y.; Tanaka, H.; Ogoshi, H., Cyclodextrin-sandwiched porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1912–1913.
  - 9) Breslow, R.; Dong, S. D., Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1997–2011.
  - 10) Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Lucchini, V.; Rosso, C.; Tonellato, U., Very strong binding and mode of complexation of water-soluble porphyrins with a permethylated  $\beta$ -cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8019–8022.
  - 11) Kano, K.; Tanaka, N.; Minamizono, H.; Kawakita, Y., Tetraarylporphyrins as probes for studying mechanism of inclusion-complex formation of cyclodextrins. Effect of microscopic environment on inclusion of ionic guests. *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 925–926.
  - 12) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y., Static and dynamic behavior of 2:1 inclusion complexes of cyclodextrins and charged porphyrins in aqueous organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9937–9944.
  - 13) Kano, K.; Kitagishi, H.; Tamara, S.; Yamada, A., Anion binding to a ferric porphyrin complexed with per-*O*-methylated  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202–15210.
  - 14) Kano, K.; Kitagishi, H.; Koderu, M.; Hirota, S., Dioxygen binding to a simple myoglobin model in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435–438.
  - 15) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Koderu, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., Iron porphyrin-cyclodextrin supramolecular complex as a functional model of myoglobin in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448–4460.
  - 16) Kano, K.; Itoh, Y.; Kitagishi, H.; Hayashi, T.; Hirota, S., A supramolecular receptor of diatomic molecules (O<sub>2</sub>, CO, NO) in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8006–8015.



- 17) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894–6897.
- 18) Jiang, T.; Sukumaran, D. K.; Soni, S.-D.; Lawrence, D. S., The synthesis and characterization of a pyridine-linked cyclodextrin dimer. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5149–5155.
- 19) Karasugi, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Gold nanoparticles carrying diatomic molecules (O<sub>2</sub> and CO) in aqueous solution. *Chem. Asian. J.* **2011**, *6*, 825–833.
- 20) Karasugi, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Modification of a dioxygen carrier, hemoCD, with PEGylated dendrons for extension of circulation time in the bloodstream. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 2365–2376.
- 21) Ueda, T.; Kitagishi, H.; Kano, K., PEGylation of an artificial O<sub>2</sub> and CO receptor: synthesis, characterisation and pharmacokinetic study. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4337–4347.
- 22) Kitagishi, H.; Kawasaki, H.; Kano, K., Bioconjugation of serum albumin to a maleimide-appended porphyrin/cyclodextrin supramolecular complex as an artificial oxygen carrier in the bloodstream. *Chem. Asian. J.* **2015**, *10*, 1768–1775.
- 23) Kitagishi, H.; Mao, Q.; Kitamura, N.; Kita, T., HemoCD as a totally synthetic artificial oxygen carrier: improvements in the synthesis and O<sub>2</sub>/CO discrimination. *Artif. Organs.* **2017**, *41*, 372–380.
- 24) Kitagishi, H.; Minegishi, S.; Yumura, A.; Negi, S.; Taketani, S.; Amagase, Y.; Mizukawa, Y.; Urushidani, T.; Sugiura, Y.; Kano, K., Feedback response to selective depletion of endogenous carbon monoxide in the blood. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5417–5425.
- 25) Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L. Functional analogues of cytochrome *c* oxidase, myoglobin, and hemoglobin. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561–588.
- 26) Collman, J. P.; Fu, L., Synthetic models for hemoglobin and myoglobin. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 455–463.
- 27) Bruno, S.; Banaccio, M.; Bettati, S.; Rivetti, C.; Viappiani, C.; Abbruzzetti, S.; Mozzarelli, A., High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2401–2407.
- 28) Springer, B. A.; Sliger, S. G.; Olson, J. S.; Phillips, G. N. Jr., Mechanisms of ligand recognition in myoglobin. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699–714.

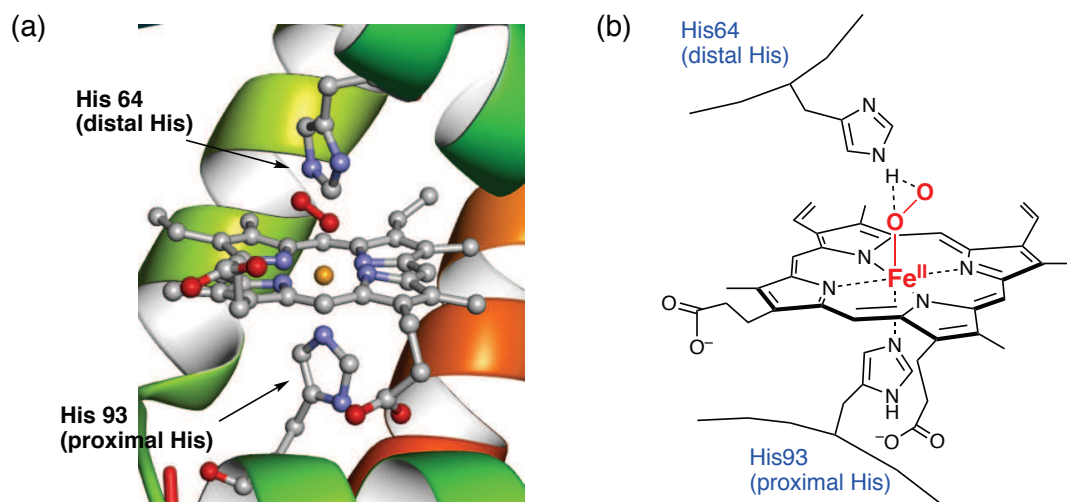
- 29) Fleisher, E. B.; Palmer, J. M.; Srivastava, T. S.; Chatterjee, A. J., Thermodynamic and kinetic properties of an iron-porphyrin system. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3162–3167.
- 30) Catriona M.; Spencer, J.; Fraser Stoddart.; Ryszard Zarzycki., Structural mapping of an unsymmetrical chemically modified cyclodextrin by high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Perkintrans. II.* **1987**, 1323–1336.
- 31) Menger, F. M.; Williams, D. Y., Synthesis and properties of a surfactant-cyclodextrin conjugate. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2579–2582.
- 32) Taggi, A. E.; Wack, H.; Hafez, A.M.; France, S.; Lectka, T., Generation of ketenes from acid chlorides using NaH/crown ether shuttle-deprotonation for use in asymmetric catalysis. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 627–629.
- 33) 北岸 宏亮; 加納 航治;人工血液; **2009**, *17*, 160–168.
- 34) 小松晃之; 石原星児; 土田英俊人; 人工血液; **2003**, 11 卷, 167–172.
- 35) Kitagishi, H.; Negi, S.; Kiriyama, A.; Honbo, A.; Sugiura, Y.; Kawaguchi, A. T.; Kano, K., A diatomic molecule receptor that removes CO in a living organism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1312–1315.
- 36) 平成 30 年版 消防白書; **2019**.



### 第三章 遠位側にカルボキシ基を導入した超分子ヘムタンパク質モデルの O<sub>2</sub> / CO 選択性評価

#### 1. 緒言

ヘモグロビン(Hb)およびミオグロビン(Mb)は生体内においてそれぞれ酸素の運搬および貯蔵を担うヘムタンパク質として知られている<sup>1-4)</sup>。こういったヘムタンパク質の活性中心はヘムと周りのグロビンタンパク質から構成されている。ヘムタンパク質は O<sub>2</sub> と結合するだけでなく、内因性の一酸化炭素(CO)と一酸化窒素(NO)にも結合し、これらの小分子の認識は、合成化学、結晶学、計算モデルなどのさまざまな手法によって研究されてきた<sup>1-14)</sup>。O<sub>2</sub> と他の小分子との識別は、近くに存在するアミノ酸残基により制御されていることが明らかになった。Mb のガス分子への認識は主にヘム鉄(II)中心に直接配位した近位配位子と呼ばれる His93 および中心鉄に直接に配位しない遠位配位子と呼ばれる



**Figure 3-1.** (a) Oxygen-binding site of myoglobin (the crystal structure of sperm whale oxy-myoglobin was quoted from PDB ID: 1A6M). (b) a schematic representation of the dioxygen binding site.

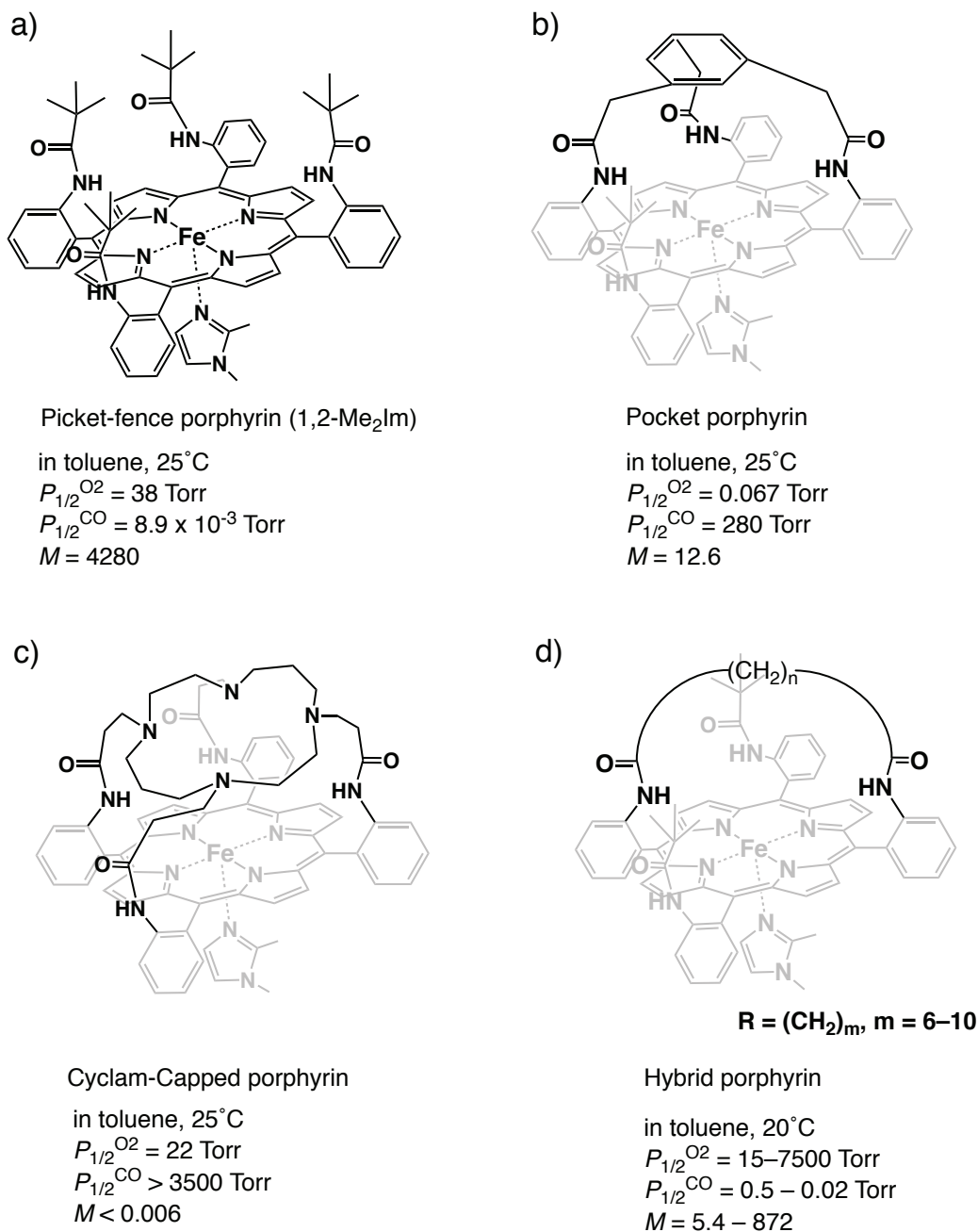
---

Kitagishi, H.; Mao, Q.; Kitamura, N.; Kita, T., HemoCD as a Totally Synthetic Artificial Oxygen Carrier: Improvements in the Synthesis and O<sub>2</sub>/CO Discrimination. *Artif. Organs.* **2017**, *41*, 372–380.

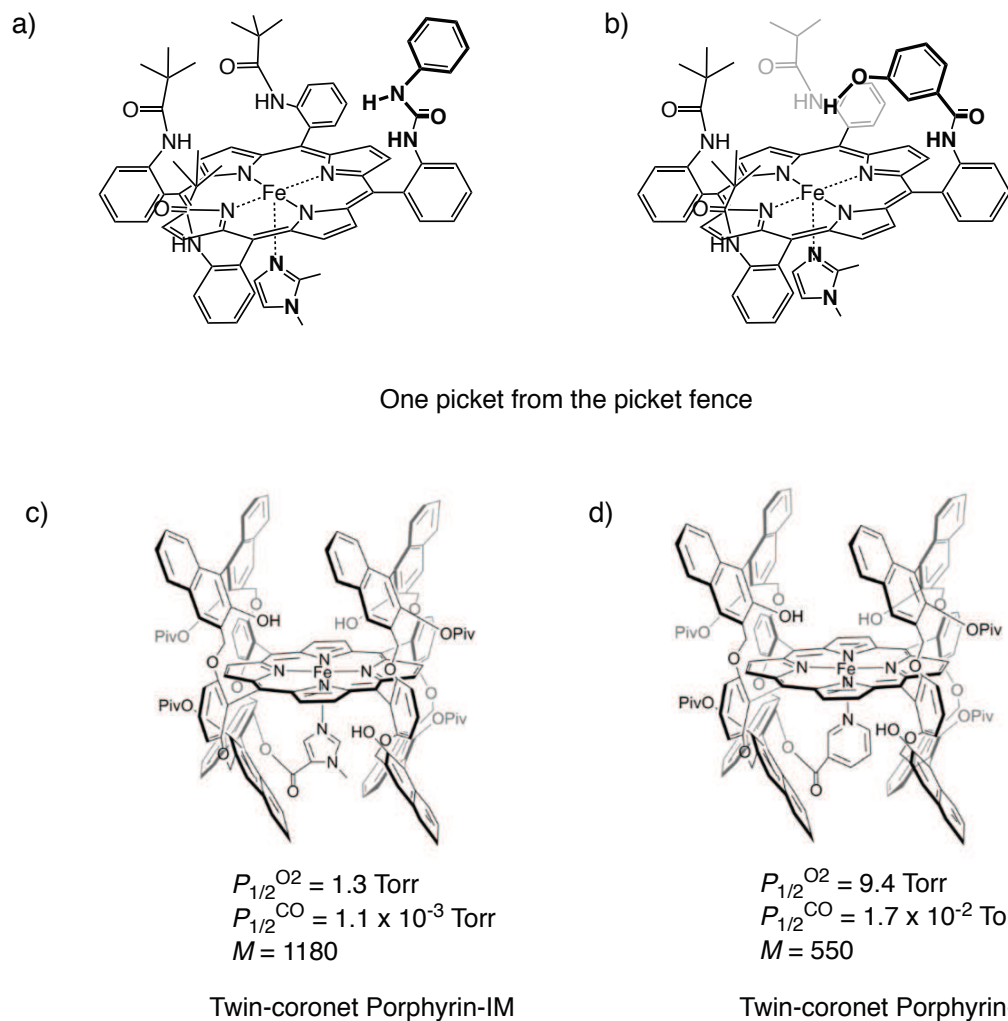
His64 より行われている(Figure 3-1a)。ヘム鉄(II)中心に直接配位した近位配位子 His93 はイミダゾールからの電子の押し出しにより鉄から O<sub>2</sub> への逆電子供与性を強め、これにより O<sub>2</sub>-Fe(II)結合を安定化している。His64 は、Fe(II)に結合した O<sub>2</sub> と水素結合を形成し、その結合状態を安定化させる(Figure 3-1b)<sup>15)</sup>。一方、裸のヘムの CO に対する親和性は O<sub>2</sub> 親和性よりも約 2 × 10<sup>4</sup> 倍高くなるが、ヘムが天然グロビンタンパク質に覆われていることにより約 200 倍抑制された。すなわち、グロビンタンパク質はヘムの CO 親和性を 1 / 100 まで減少させた。Collman らは Mb の遠位配位子 His64 が CO-Fe(II)の近くに存在するため、立体障害により CO 親和性を低下させることを提案している<sup>16)</sup>。

これらのヘムタンパク質の機能を人工的に再現するため、その活性中心の周辺環境を模倣することが非常に有効な手段と考えられ、合成化学においては数多くのモデルが開発された。均一溶液中において O<sub>2</sub> を可逆的に結合した最初の Mb モデル化合物は、1973 年に Collman らが開発したピケットフェンスポルフィリン(Figure 3-2a)が挙げられる<sup>17)</sup>。鉄(II)ポルフィリンに立体的にかさ高いピバールアミド基を導入することにより、二分子間の会合によるμ-オキシダイマーの生成を阻害し、脱水有機溶媒中、25 °C において安定かつ可逆的に O<sub>2</sub> を吸脱着することを報告した<sup>16)</sup>。Mb の遠位サイトの機能を模倣するために、ピケットフェンスポルフィリンを基盤にした鉄ポルフィリンが数多く報告された(Figure 3-2)<sup>3,17-23)</sup>。ピケットフェンスポルフィリンの遠位側に立体的にベンゼン環(Figure 3-2b)もしくはサイクラム環(Figure 3-2c)を導入することで、CO 親和性を抑制することに成功した<sup>20,21)</sup>。また、ハイブリッドポルフィリン(Figure 3-2d)においては、遠位サイトのアルキル鎖が短いほど、モデル錯体の CO 親和性が低くなる傾向が観測された<sup>22)</sup>。これらの結果は、Collman が提案している遠位サイトの立体障害により CO 親和性を低下させる仮説を支持している。一方で、遠位サイトの極性効果についての議論もいくつかの研究について報告されている<sup>23-25)</sup>。Reed らはピケットフェンスポルフィリンの側面に極性基を導入した(Figure 3-3a, 3b)ところ、いずれも O<sub>2</sub> 親和性の向上が観測された<sup>23)</sup>。Naruta らは、ポルフィリンの遠位側サイトが立体障害を示さず、両側にヒドロキシ基を導入したツインコロネットポルフィリン(TCPs)を設計した(Figure 3-3c, 3d)<sup>24,25)</sup>。その結果、ヒドロキシ基のプロトンが O<sub>2</sub> と水素結合を形成することで O<sub>2</sub>-Fe(II)結合を安定化させた。また、ヒドロキシ基の酸素原子が CO に対して負の極性効果が働くことにより、CO-Fe(II)結合を不安定化させ、CO 親和性が著しく減少した。Naruta らは、こ

の大幅に減少した CO 親和性は、遠位サイトのヒドロキシ基の極性効果由来であると提案した。しかし、これらのモデル錯体は脱水条件でのみ機能するものであり、水中においては水分子が誘発する酸素錯体の分解が瞬時に起こるため、酸素錯体の生成は確認されていない。天然ヘムタンパク質では、中心鉄に結合



**Figure 3-2.** Structures of synthetic myoglobin models in organic solvents that synthesized by Collman et. al.

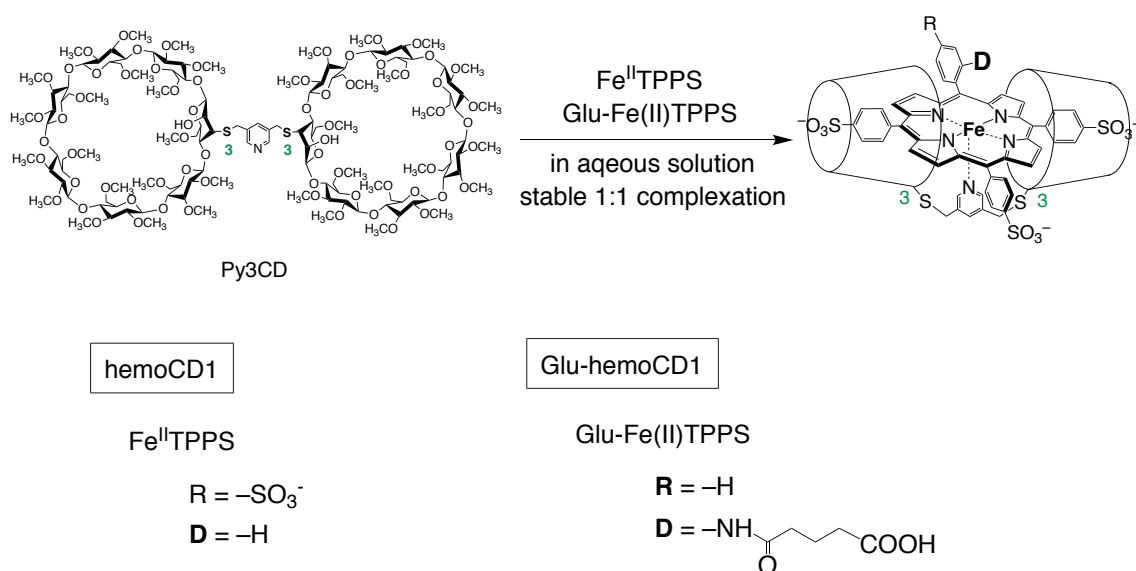


**Figure 3-3.** Structures of synthetic myoglobin models in organic solvents. (a, b) synthesized by Reed et. al. (c, d) synthesized by Naruta et. al.

する小分子の分析で水の影響を考慮する必要があり、水は天然ヘムタンパク質で重要な役割を果たすことがすでに示されている<sup>26-29</sup>。

水溶液中において酵素の機能および反応を模倣するために、最も利用されているシステムの1つとして、ポルフィリン-シクロデキストリン(FePor / CD)超分子錯体が挙げられる<sup>30,31</sup>。β-シクロデキストリン(β-CD)の疎水性空洞がアニオン性のテトラアシルポルフィリンと強い相互作用し<sup>32</sup>、特に全ての水酸基を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(III)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

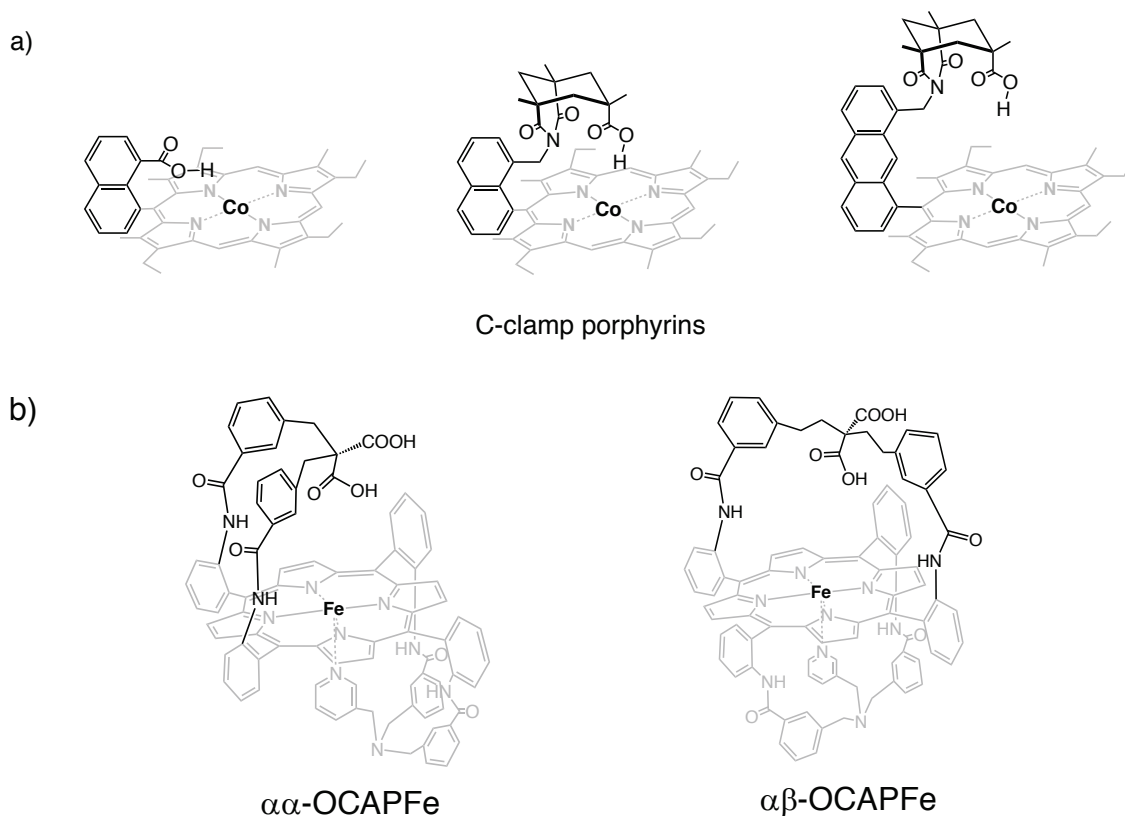
水的な環境を提供する<sup>33)</sup>。さらに、Kano らは  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$  の近位側にリガンド配位子を導入し、水中で機能するヘムタンパク質モデルである hemoCD を創出した<sup>34-37)</sup>。hemoCD1 (Figure 3-4) はピリジン配位子をリンカーとして有するパー-O-メチル化  $\beta$ -CD 二量体である Py3CD と水溶性ポルフィリンである 5,10,15,20-テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン鉄錯体( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}$ )の 1 : 1 包接錯体であり、水中・室温での可逆的な  $\text{O}_2$  および CO 捕捉が報告されている<sup>34,35)</sup>さらに、hemoCD1 は生理条件下で安定な酸素付加体( $\text{O}_2$ -hemoCD1,  $t_{1/2} = 30 \text{ h}$ )を形成することから、FePor/CD 超分子錯体は水中でヘムタンパク質の近位および遠位サイトが模倣できる唯一な人工化合物であると考えられる。Kano らは hemoCD1 の酸素付加体( $\text{O}_2$ -hemoCD1)および一酸化炭素付加体( $\text{CO}$ -hemoCD1)について詳しく解析を行ったところ、hemoCD1 は CO に対する親和性が非常に高いことが明らかになり、 $\text{O}_2/\text{CO}$  の選択性を示す値である  $M$  値はこれまで報告されているモデルの中でも最も大きな値<sup>35)</sup> ( $8.9 \times 10^5$ )となった<sup>35)</sup>。その原因を追究したところ、hemoCD1 は異常に遅い CO 解離速度を示すことがレーザーフラッシュフォトリシス測定により判明した<sup>35)</sup>。Kano らは、疎水的な分子である CO は、水中のモデルである hemoCD1 においては O-メチル化 $\beta$ -シクロデキストリンによって構築されるマイクロな疎水場に留まろうとし、バルク水層へ拡散しにくいと結論付けた<sup>35)</sup>。



**Figure 3-4.** Structures of Py3CD, hemoCD1 and Glu-hemoCD1.



本章では、CD により構築された疎水場にカルボキシ基を極性基としてを導入した場合(Figure 3-4)、hemoCD1 の O<sub>2</sub> および CO への結合能力がどのように変化するかを調べた。有機溶媒中において、遠位サイトにカルボキシ基を導入したモデル化合物はすでにいくつかの報告例がある(Figure 3-5)。



**Figure 3-5.** Structures of synthetic myoglobin models in organic solvents. (a) synthesized by Chang et. al. (b) synthesized by Boitrel et. al.

Chang らはケンプ酸を用いてカルボキシ基を遠位サイトのプロトン供与体として設置し、C-clamp ポルフィリン(Figure 3-5a)を合成した。このシリーズのモデル錯体は低温でしか O<sub>2</sub> と結合しなく、またはその O<sub>2</sub> 付加体は不安定であるが、遠位のメチルエステルをカルボキシ基に変更することによって、錯体の O<sub>2</sub> 親和性は 10<sup>4</sup> 倍以上向上したことを報告した<sup>38)</sup>。2010 年に、Boitrel らは遠位側にカルボキシ基を導入したストラップポルフィリン(OCAPFe) (Figure 3-5b)を合成した<sup>39-41)</sup>。その結果、カルボキシ基が中心 Fe<sup>II</sup> に結合した O<sub>2</sub> と水素結合を形成することで、高い O<sub>2</sub> 親和性を示したことがわかった。これらの知見を踏まえて、

本章では、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 O<sub>2</sub>/CO 結合能力について紫外可視吸収スペクトル、赤外吸収(IR)スペクトルおよびレーザーフラッシュフォトリス測定を用いて検討を行ったのでその詳細な結果について報告する。

## 2. 実験

### 2-1. 測定機器

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは日本電子 JNM-ECA500 フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を用いて測定し、CDCl<sub>3</sub> および DMSO-*d*<sub>6</sub> 中での測定においては、テトラメチルシラン(TMS)を内部基準として用いた。直接質量分析(DART)法による質量スペクトルは AMR(株)社製 DART-SVP を用いて測定した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF)法による質量スペクトルは BRUKER autoflex speed を用いて測定し、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして、2,3,6-トリ-*O*-メチル- $\beta$ -シクロデキストリン([M+Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  = 1451.68)および 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([M-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  = 933.07)のモノアイソトピック質量を用いて質量校正を行った。蛍光スペクトルは島津製作所製 RF-5300PC を用いて測定した。赤外吸収(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 JET-TE200(X-band)を用いて測定を行った。紫外可視吸収スペクトル(UV-vis スペクトル)は島津製作所製自記分光光度計 UV-2100、UV-2450 および島津製作所製フォトダイオードアレイ分光高度計 MultiSpec-1500 を用いて測定した。吸収スペクトルの測定に際しては、島津製作所電子冷熱式セルポジショナーTCC-260 型により温度制御し、温度が安定してから 5 分後に測定した。水溶液の pH は堀場製作所製 pH メーターM-12 および F-52 を用いて測定した。一酸化炭素の分圧調製は KOFLOC 社製 GM-

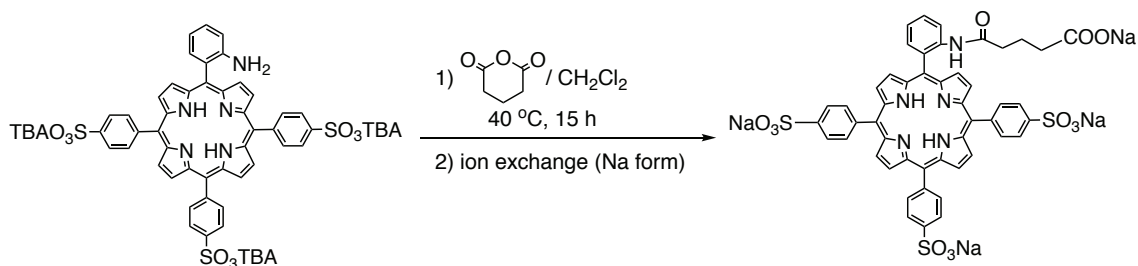
4B ガス混合装置を用いて行った。レーザーフラッシュフォトリシス測定は大阪大学 工学研究科 林 高史 教授ならびに大洞 光司 准教授のご厚意により Q-switched Nd: YAG レーザー(Surelite I, Continuum)を用い、Unisoku 社製レーザーフラッシュフォトリシスシステムを用いて測定を行った。

## 2-2. 試薬および合成

Py3CD<sup>30)</sup> および 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tris(4-sulfonatophenyl)porphyrin tris(tetrabutylammonium) salt (NH<sub>2</sub>-TPPS · TBA)<sup>30)</sup>は文献記載の方法に従って合成した。合成した化合物については <sup>1</sup>H NMR、DART-MS および MALDI-TOF MS スペクトル測定によりその構造を確認した。合成に用いた試薬は市販品をそのまま使用し、無水溶媒が必要な場合は常法に従って予備乾燥後、蒸留したものを使用した。測定に用いた水は Yamato Auto Still Glass Model WG 250 により蒸留後、Simplicity Water Purification System にて精製したものを用いた。酸素(99.999%)、窒素(99.999%)、一酸化炭素ガス(1000 ppm)および一酸化炭素ガス(99.999%)は住友精化株式会社から購入したものをそのまま使用した。

### 2-2-1. Glu-TPPS の合成<sup>42,43)</sup>

#### Scheme 3-1. Synthesis of Glu-TPPS.



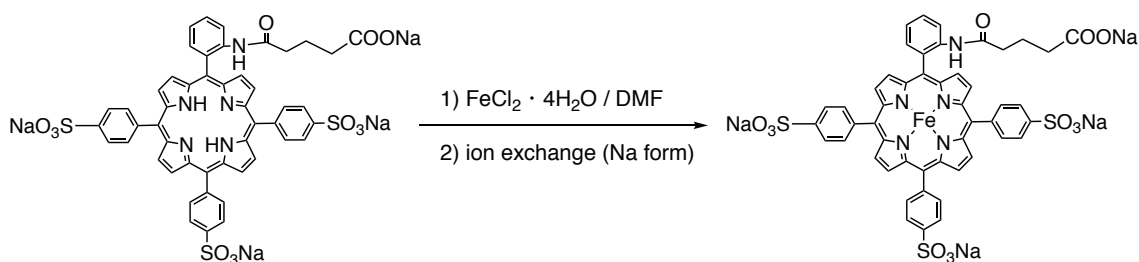
還流冷却管を取り付けた 100 mL ナスフラスコに、ジクロロメタン 20 mL を加え、そこに *o*-monoaminoTPPS TBA salt (0.075 g, 0.068 mmol)、グルタル酸無水物(0.22 g, 2.0 mmol)を加え、反応系を 40 °C に保ち、15 時間かき混ぜた。15 時間後、反応系を室温に戻し、減圧留去した。少量のメタノールで溶解させ、ジエチルエーテルにより再沈殿させ、紫色固体の生成物を得た。その後、少量の蒸留水に溶解させ、イオン交換クロマトグラフィー(DOWEX MARATHON 陽イオン交

換樹脂 Na 形) (展開溶媒 : 蒸留水) により、精製することで紫色固体の生成物を得た(収量 25 mg、収率 74 %)。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.91 (bs, 1H, amidoNH), 8.84 (bs, 4H,  $\beta$ -pyrrole), 8.79 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H,  $\beta$ -pyrrole), 8.73 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H,  $\beta$ -pyrrole), 8.16 (m, 6H, phenyl), 8.13 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, phenyl), 8.07–8.03 (m, 6H, phenyl), 8.01 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, phenyl), 7.80 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, phenyl), 7.56 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, phenyl), 1.43 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.31 (m, 2H), 1.08–1.04 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $-2.87$  (bs, 2H, inner NH); MS (MALDI-TOF,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, negative mode)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 982.1, found  $[\text{M}-3\text{Na}+2\text{H}]^+$ : 982.1. Elemental analysis (%) calcd. For  $\text{C}_{49}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{Na}_3\text{O}_{17}\text{S}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : C, 51.62; H, 3.89; N, 6.14 %; found: C, 51.71; H, 4.28; N, 6.03 %.

## 2-2-2. Glu-Fe(III)TPPS の合成<sup>42,43)</sup>

### Scheme 3-2. Synthesis of Glu-Fe(III)TPPS.



還流冷却管を取り付けた 100 mL ナスフラスコに、DMF 20 mL を加え、そこに Glu-TPPS Na salt (25.5 mg, 0.024 mmol) を加え、反応系を室温に保ち、30 分間かき混ぜた。その後、反応系を 110 °C に保ち、FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O をポルフィリンに対し 30 当量加え、1 時間加熱還流した。反応溶液の一部を取り、メタノールで希釈し、蛍光スペクトルを測定し、フリーベースポルフィリン由来の蛍光が消光したことを確認した。その後、溶媒を減圧留去し、少量の蒸留水に溶解させ、イオン交換クロマトグラフィー(DOWEX MARATHON 陽イオン交換樹脂 Na 形) (展開溶媒 : 蒸留水) により、精製することで褐色固体の生成物を得た。その生成物を少量のメタノールで溶解させ、アセトンにより再沈殿させ、褐色固体を得た(収量 26 mg、収率 69 %)。

MS (MALDI-TOF,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, negative mode)  $m/z$  1057.0 (calcd for  $[M-Cl-2Na]^-$ : 1057.1). UV-vis (pH 3.0)  $\lambda_{\max}$  395 nm (Soret), 527 nm (Q-band).

### 2-3. 測定方法および試料調整

#### 2-3-1. O<sub>2</sub> 親和性および CO 親和性測定

Glu-hemoCD の酸素付加体(O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD)を以下のように調製した。中心鉄(III)の Glu-Fe(III)TPPS に対して Py3CD を 1.2 当量加え、met-Glu-hemoCD ストック溶液を調製した。met-Glu-hemoCD 溶液に過剰量のヒドロサルファイトナトリウム(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)を加え、中心鉄を二価へと還元した。過剰の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> およびその分解物を Sephadex G-25 を充填したゲルろ過カラムによって取り除き、これらのろ液を測定に用いるストック溶液とした。なお、この一連の操作は常温常圧大気下において行ったため、精製後の溶液は空気中の酸素と結合した O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD であった。O<sub>2</sub> 親和性測定の場合、一定の比で混合した O<sub>2</sub> と N<sub>2</sub> の混合ガスを光路長 1 cm のガラス角形セル中に入れた 3 mL PBS 溶液(pH 7.4)へ 10 分間バブリングし、そこへ O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD を加え、さらに 1 分間混合ガスをバブリングした後、吸収スペクトルを測定した。CO 親和性測定の場合、一定の比で混合した CO と O<sub>2</sub> の混合ガスを O<sub>2</sub> の場合と同様の手法で測定を行った。

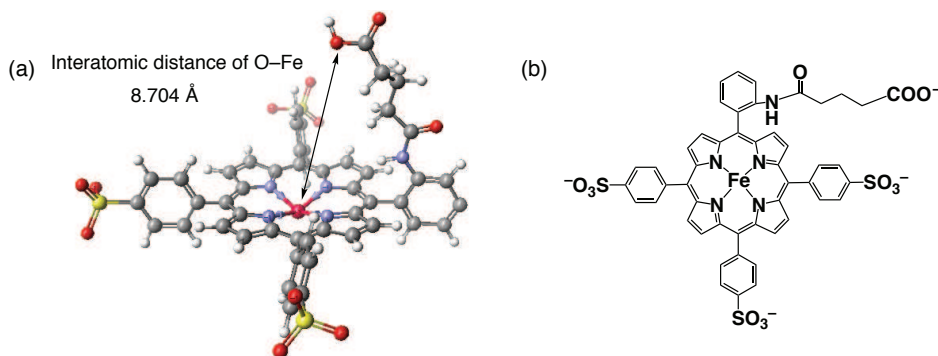
#### 2-3-2. レーザーフラッシュフォトリス測定

O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD 溶液に O<sub>2</sub> もしくは CO バブリングし、O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD および Glu-hemoCD の CO 付加体(CO-Glu-hemoCD)を得た。光路長 1 cm のセルに加えた 2.5 mL の O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD および CO-Glu-hemoCD の PBS 溶液(pH 7.4)に対してレーザー(532 nm、パルス幅 5 ns)を照射後、O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD では 525 nm、CO-Glu-hemoCD では 422 nm の吸光度の時間変化を観測した。レーザーによる O<sub>2</sub> および CO 解離後の再結合過程における吸光度の時間変化に対し、一次の反応速度式に従うカーブフィッティングを行い、擬一次速度定数  $k_{\text{obs}}^{\text{L}}$  を算出した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1. Glu-Fe(III)TPPS の合成

過去に報告された有機溶媒中におけるいくつかの先行研究より、遠位サイトにカルボキシ基を導入したことにより、モデル錯体の酸素選択性が向上させた<sup>38-41</sup>。従って、カルボキシ基が遠位側の極性基として機能することが示唆された。本研究では、カルボキシ基導入したポルフィリンを分子設計した。合成を簡便化するために、ポルフィリンのメソ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。分子計算ソフト SCIGRESS により、Glu-Fe(III)TPPS の構造モデルを構築した(Figure 3-6)。Glu-Fe(III)TPPS において、側鎖のカルボキシ基末端にある O 原子から中心鉄への距離は 8.704 Å であり、中心鉄(II)に結合した O<sub>2</sub> もしくは CO へ十分に相互作用できる距離であると考えられる。

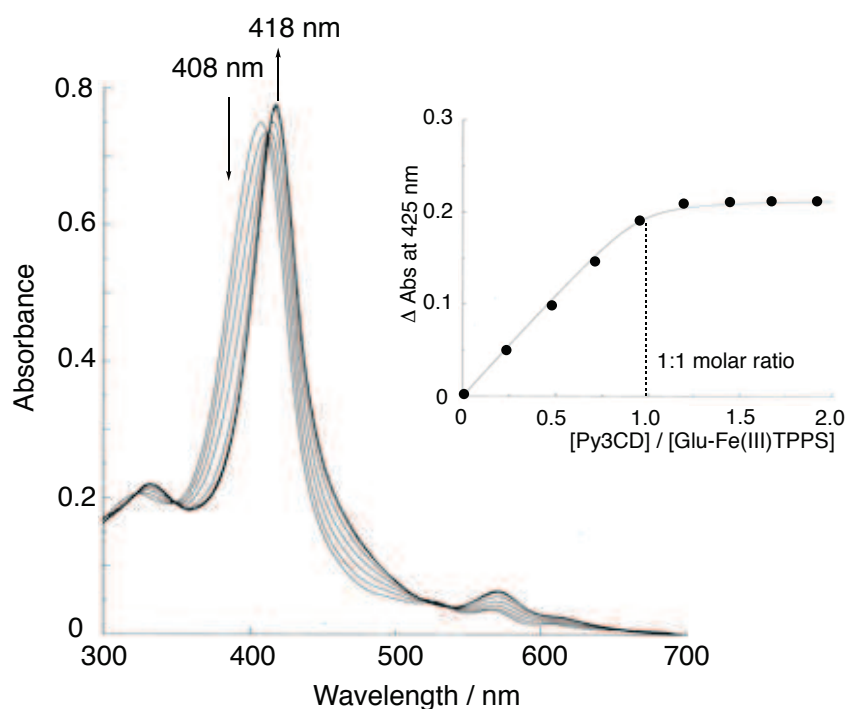


**Figure 3-6.** (a) The 3D model structure of Glu-FeTPPS was obtained using CONFLEX/MM3 (extensive search) calculations in the Scigress version 2.2.1 software program (Fujitsu, Japan). (b) Structures of Glu-hemoCD.

Scheme 3-1 に従って、ジクロロメタン中でグルタル酸無水物は *o*-monoaminoTPPS のアミノ基の求核攻撃反応により開環し、Glu-TPPS の合成を行った。鉄錯体である Glu-Fe(III)TPPS は Glu-TPPS と FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O を DMF 中で反応させることにより得た(Scheme 3-2)。精製は陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより行った。

### 3-2. Glu-Fe(III)TPPS と Py3CD との包接挙動

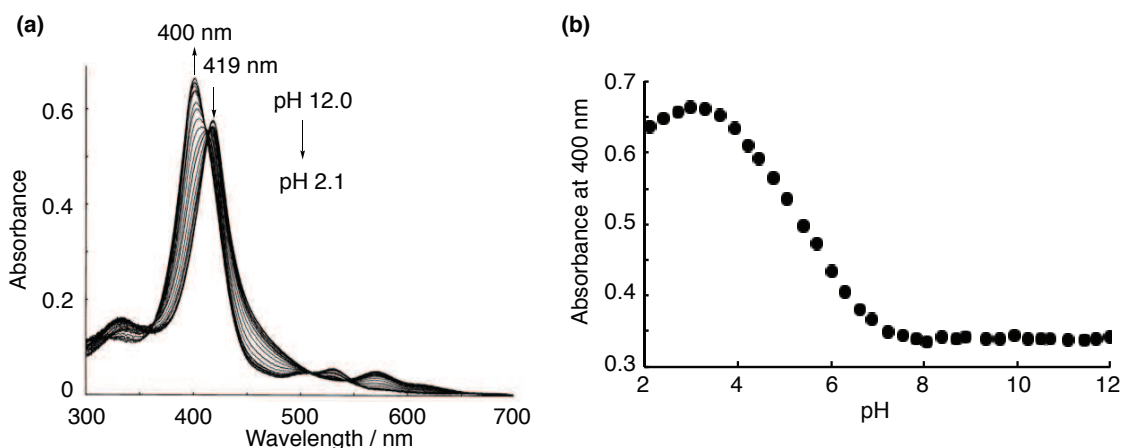
Glu-Fe(III)TPPSがシクロデキストリン二量体であるPy3CDとの包接錯体(met-Glu-hemoCD)を形成するののかについて検討を行った。セル内のGlu-Fe(III)TPPS濃度( $6.4 \times 10^{-6}$  M)を一定に保ち、Py3CDの濃度を変化させて25 °Cにおいて吸収スペクトルを測定した。測定結果をFigure 3-7に示す。ソーレー帯の $\lambda_{\max}$ は408 nmから418 nmへ、Q帯は568 nm、610 nmから571 nmへと等吸収点(413 nm)を通りながらシフトした。これらのスペクトル変化はpH 8.0のリン酸緩衝溶液中、25 °CにおけるFe(III)TPPSとPy3CDとの包接錯体(met-hemoCD1)のスペクトル変化とよく一致した<sup>34)</sup>。またこのスペクトル変化は鉄ポルフィリンに対してPy3CDを等モル量加えた時に飽和し、その後変化は見られなかった。このことからGlu-Fe(III)TPPSはPy3CDと非常に安定な1:1の包接錯体(met-Glu-hemoCD)を形成することが明らかとなり、スペクトルの形状もよく一致していることから、その構造はmet-hemoCDと類似することが示唆された。



**Figure 3-7.** UV-vis spectral changes of Glu-Fe(III)TPPS ( $6.4 \times 10^{-6}$  M) upon addition of Py3CD in PBS at pH 7.4 and 25 °C. The inset shows a plot of the changes in absorbance of Glu-Fe(III)TPPS at 425 nm versus [Py3CD].

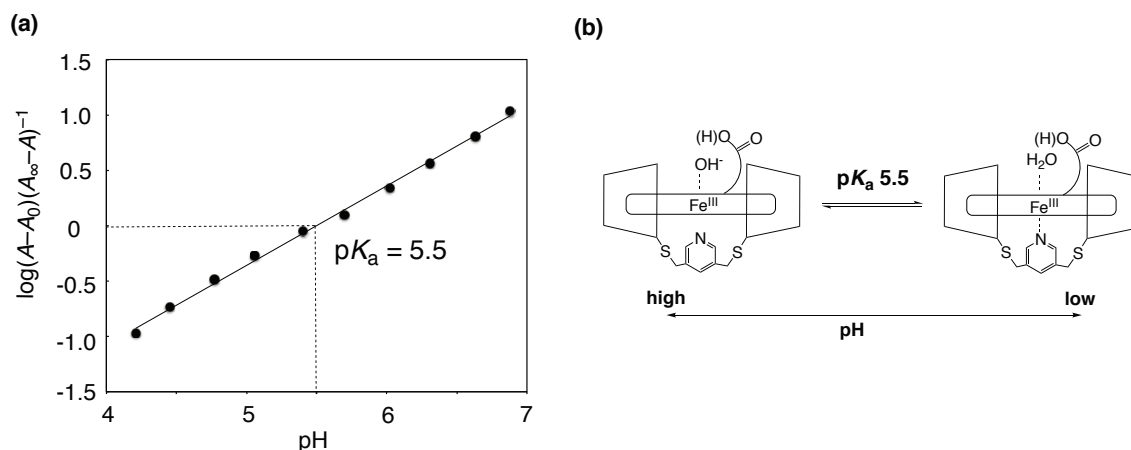
### 3-3. Glu-Fe(III)TPPS / Py3CD 包接錯体(met-Glu-hemoCD)の軸配位挙動

pH を変化させながら吸収スペクトルを観測することによって、Glu-Fe(III)TPPS / Py3CD 包接錯体(met-Glu-hemoCD)の軸配位挙動について検討を行った。測定は Glu-Fe(III)TPPS とその 1.2 当量の Py3CD を共存させた 0.1 M NaClO<sub>4</sub> 水溶液に対して過塩素酸水溶液を加えて pH を 12 から 2 まで段階的に下げていったときの吸収スペクトル変化を観測した。結果を Figure 3-8a に示す。pH の変化に伴って、吸収スペクトルは等吸収点(412 nm)を通りながら中心鉄に OH<sup>-</sup>が配位したモノヒドロキソ体を示す 419 nm からアクア体を示す 400 nm へとシフトした。変化の最も大きかった 400 nm における吸光度変化を pH に対してプロットした。その結果を Figure 3-8b に示す。また 400 nm において最も変化の大きかった pH 4 から 7 において、横軸を pH、縦軸を  $\log(A-A_0)/(A_\infty-A)^{-1}$  とし、プロットしたものを Figure 3-9a に示す。この時のプロットは直線となり、傾き  $n$  は酸解離平衡に関与するプロトン数を示す。また、酸解離平衡定数( $pK_a$ )の値は  $\log(A-A_0)/(A_\infty-A)=0$  の時の pH 値として求めた。その結果、met-Glu-hemoCD は Figure 3-9a からアクア配位子の  $pK_a$  は 5.5 と算出した。これは報告されている met-hemoCD の結果( $pK_a=5.5$ )<sup>34)</sup>と相違がほとんどないため、今回観測された変化は、met-Glu-hemoCD のカルボキシ基の  $pK_a$  ではなく、Glu-Fe(III)TPPS のモノヒドロキソ体からアクア体への変化と考えられる(Figure 3-9b)。



**Figure 3-8.** UV-vis spectral changes of met-Glu-hemoCD (3.8 μM) in aqueous solution (0.1M NaClO<sub>4</sub>) as a function of pH: pH change from 12.0 to 2.1 (a). Absorbance change at 400 nm of met-Glu-hemoCD (3.8 μM) in aqueous solution (0.1M NaClO<sub>4</sub>) as a function of pH (pH change from 12.0 to 2.1) (b).

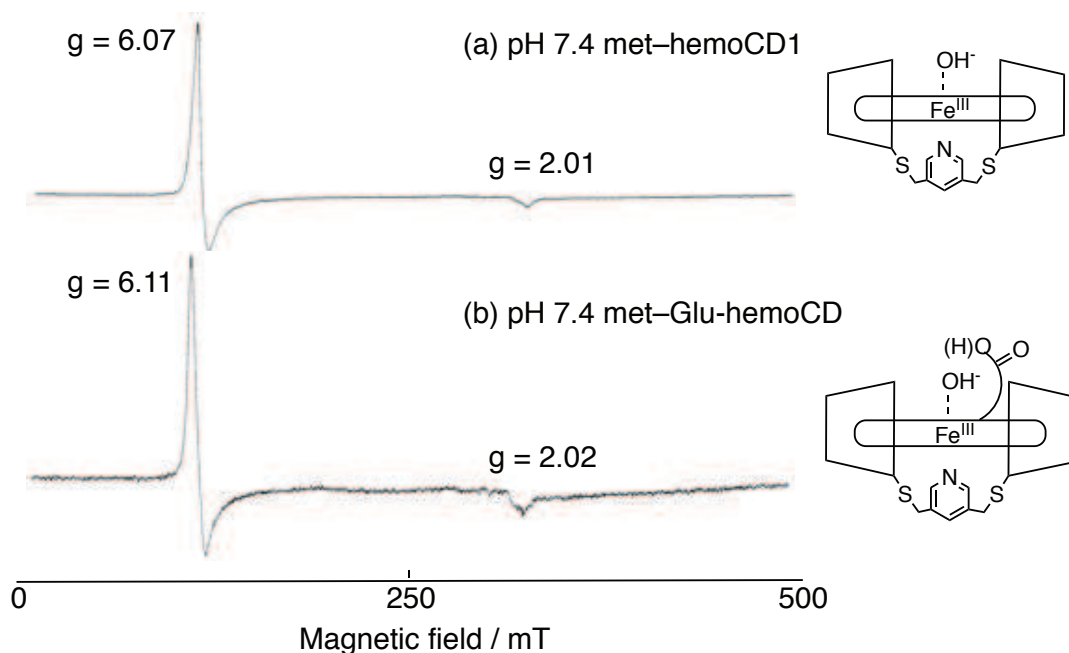




**Figure 3-9.** Plot of  $\log \{ (A-A_0)(A_\infty-A)^{-1} \}$  at 400 nm versus pH for determining  $pK_a$  (a). Equilibria for the met-Glu-hemoCD in aqueous solution (b).

### 3-4. Glu-Fe(III)TPPS / Py3CD 包接錯体(met-Glu-hemoCD) の EPR 測定による配位状態の確認

Boitrel らは遠位側にカルボキシ基を導入したストラップポルフィリンである  $\alpha$ -OCAPFe (Figure 3-5)では、ストラップが柔軟であるため、カルボキシ基が中心鉄に配位していることが X 線構造解析より明らかとなった<sup>40)</sup>。さらに、Fe(II)では、近位配位子およびカルボキシ基が Fe(II)に配位し、6 配位高スピン錯体であることを NMR スペクトルおよび X 線構造解析より確認した。met-Glu-hemoCD 中心鉄の電子状態を確認するために、電子スピン共鳴(EPR)測定を行った。測定は pH 7.4 において met-Glu-hemoCD および対照実験として met-hemoCD の溶液を液体窒素により凍結させ、77 K にて行った。その結果を Figure 3-10 に示す。met-hemoCD と比較すると、スペクトルが非常によく一致していることから中心鉄は鉄(III)高スピン状態( $g = 6.11, 2.02$ )をとっていることが示された (Figure 3-10b)。したがって pH 7.4 で met-Glu-hemoCD は met-hemoCD と同じく OH<sup>-</sup>が配位している 5 配位高スピン錯体であると考えられる。EPR および上述の  $pK_a$  測定の結果が met-hemoCD と良く一致していることから、中性領域では側鎖に導入したカルボキシラートが鉄(III)に作用していることはなさそうである。

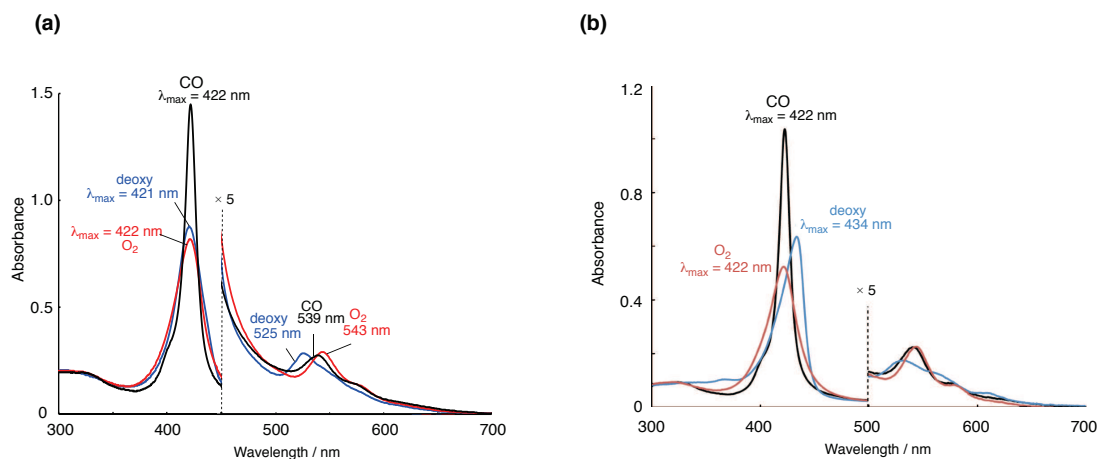


**Figure 3-10.** EPR spectra of (a) met-hemoCD and (b) met-Glu-hemoCD. Solvent and temperature: 0.05 M phosphate buffer saline at pH 7.4 and 77 K. [Fe(III)TPPS] = 0.47  $\mu$ M, [Py3CD] = 0.58  $\mu$ M, [Glu-Fe(III)TPPS] = 0.29  $\mu$ M, [Py3CD] = 0.4  $\mu$ M.

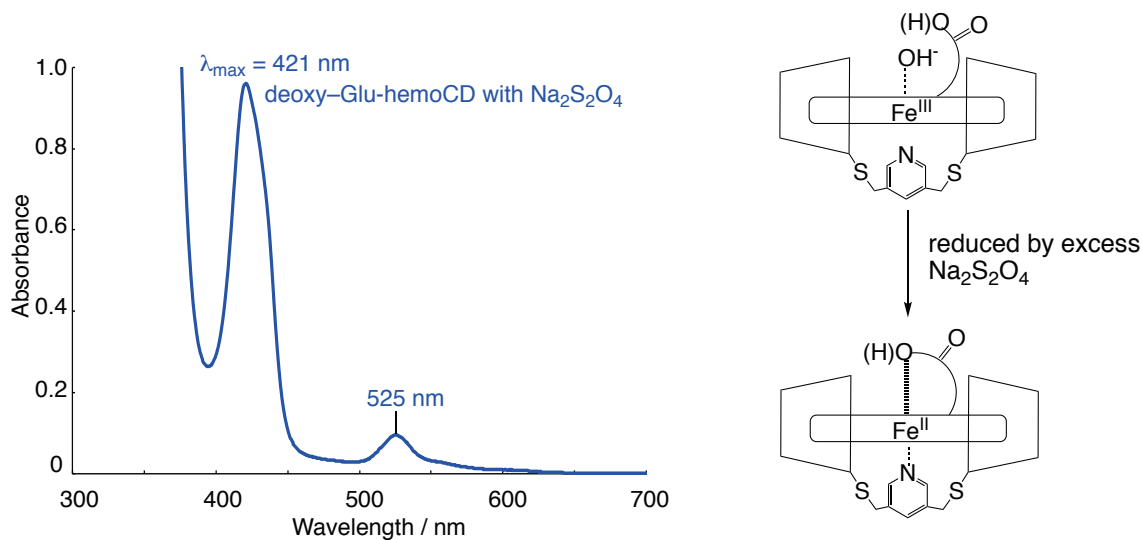
### 3-5. Glu-hemoCD の O<sub>2</sub> および CO 結合挙動

O<sub>2</sub> および CO を結合させるために met-Glu-hemoCD に対して還元剤であるハイドロサルファイトナトリウム(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)を加えて中心鉄を三価から二価へと還元、Sephadex G-25 のゲルろ過カラムによって精製し、O<sub>2</sub> および CO 錯体がそれぞれ形成可能かどうかを検討した。空気飽和の pH 7.4、PBS 3 mL で鉄二価に還元し、精製後の Glu-hemoCD のストック溶液を希釈し、25 °C の条件において吸収スペクトルを測定すると、ソーレー帯の $\lambda_{\max}$ は 422 nm、Q 帯の波長は 543 nm に観測された(Figure 3-11a)。測定後の空気飽和の溶液に 5 分間窒素(N<sub>2</sub>)ガスをバブリングし、ソーレー帯 $\lambda_{\max}$ は 421 nm、Q 帯の波長は 525 nm へと変化した。さらに同じ溶液へ 5 分間 CO ガスをバブリング後に吸収スペクトルを測定したところ、ソーレー帯の強度は大きくなり、 $\lambda_{\max}$ は 422 nm に観測された。これらのスペクトルの $\lambda_{\max}$  およびソーレー帯の波形は、これまでに報告されている hemoCD1 の pH 7.0 リン酸緩衝溶液中における O<sub>2</sub> 付加体(O<sub>2</sub>-hemoCD1,  $\lambda_{\max}$  = 423 nm) および CO 付加体(CO-hemoCD1,  $\lambda_{\max}$  = 422 nm)のスペクトルとよく一致した

が、鉄二価のポルフィリンが Py3CD に包接された状態(deoxy-hemoCD1,  $\lambda_{\max} = 434 \text{ nm}$ )のスペクトルにおいてはソーレー帯の吸収極大波長が大きく異なった (Figure 3-11b)。

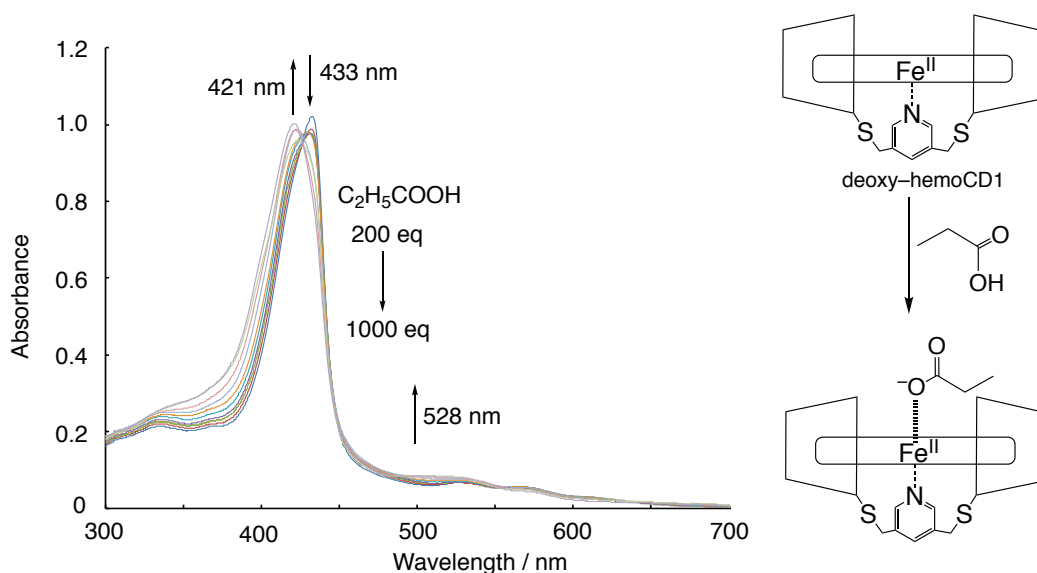


**Figure 3-11.** (a) UV-vis spectra of Glu-hemoCD ( $[\text{Glu-Fe(II)TPPS}] = 5.5 \times 10^{-6} \text{ mM}$ ,  $[\text{Py3CD}] = 6.6 \times 10^{-5} \text{ mM}$ ) under air (red),  $\text{N}_2$  (blue), and CO (black) atmospheres in PBS at pH 7.4 and  $25^\circ\text{C}$ . (b) UV-vis spectra of hemoCD1 under air (red),  $\text{N}_2$  (blue), and CO (black) atmospheres in PBS at pH 7.4 and  $25^\circ\text{C}$ .



**Figure 3-12.** UV-vis spectra of Glu-hemoCD with excess  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  in PBS at pH 7.4 and  $25^\circ\text{C}$ . ( $[\text{Py3CD}] = 6.0 \times 10^{-6} \text{ mM}$ ,  $[\text{Glu-Fe(III)TPPS}] = 4.9 \times 10^{-6} \text{ mM}$ )

$N_2$  ガスをバブリングした後の吸収スペクトルは deoxy 体かどうかを調べるために、 $Na_2S_2O_4$  存在下において、中心鉄二価の deoxy-hemoCD の吸収スペクトルを測定した(Figure 3-12)。 $Na_2S_2O_4$  過剰存在下での Glu-hemoCD のスペクトルは  $N_2$  バブリング後のものと同様になった。従って、 $N_2$  バブリング後の Glu-hemoCD のスペクトルは deoxy 体であると考えられるが、ソーレー帯の $\lambda_{max}$  は deoxy-hemoCD1 とは異なることが明らかとなった。このことは以下のように考えられる。ポルフィリンの側鎖に導入したカルボキシラートは前述した軸配位挙動の結果から中心鉄(III)には影響しないが、中心鉄(II)には影響を及ぼしており、deoxy 体のスペクトルが  $O_2$  付加体類似であることからカルボキシラートが中心鉄(II)に対して配位して六配位状態となっている可能性が考えられる(Figure 3-12)。側鎖のカルボキシ基が中心鉄(III)には影響しないが、Glu-hemoCD の側鎖が柔軟であるため、deoxy 体においては中心鉄(II)と相互作用することが示唆された。この仮定を証明するために deoxy-hemoCD1 に対してカルボン酸を加え、カルボン酸が中心鉄(II)に配位するのかについて検討を行った。角形セルに pH 7.4 の PBS 2.5 mL を入れ、そこに  $Na_2S_2O_4$  により還元し、精製した hemoCD1 濃度( $0.84 \times 10^{-6}$  M)を一定に保ち、プロピオン酸の濃度を変化させる毎に 15 分間  $N_2$  バブリングし、十分に脱酸素を行った上で 25 °C において吸収スペクトルを測定した(Figure 3-13)。



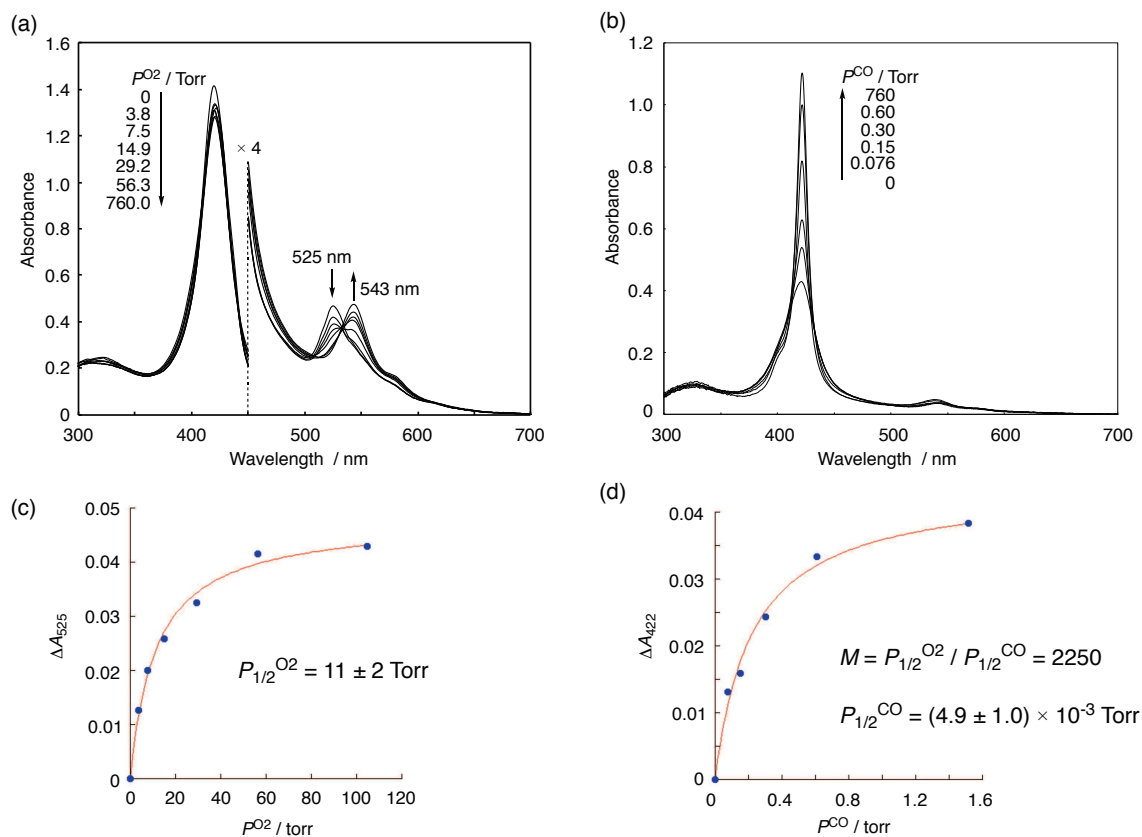
**Figure 3-13.** UV-vis spectra of deoxy-hemoCD1 ( $0.84 \mu\text{M}$ ) upon addition of propionic acid in PBS at pH 7.4 and 25 °C.

deoxy-hemoCD の $\lambda_{\max}$ である 433 nm のピークがプロピオン酸を加える毎に、徐々に短波長側へシフトし、最終的に 421 nm へと変化した。この際の Q 帯の波長は 528 nm であり、報告されている deoxy-hemoCD<sup>34)</sup>と一致しているため、この結果から加えたプロピオン酸のカルボキシラートが hemoCD の中心鉄(II)に対して配位していると考えられる。このことから、Figure 3-11a に示している N<sub>2</sub> バブリング後の Glu-hemoCD において側鎖のカルボキシラートが中心鉄(II)に配位し、6 配位であることが明らかとなった。

次に、Glu-hemoCD の O<sub>2</sub> 親和性および CO 親和性についての検討を行った。酸素親和性の目安となる  $P_{1/2}^{O_2}$ 、 $P_{1/2}^{CO}$  は 50% の Glu-hemoCD 分子に O<sub>2</sub> もしくは CO が配位するときの分圧( $P^{O_2}$ ,  $P^{CO}$ )を表す。pH 7.4、25 °C の PBS 中で、様々な O<sub>2</sub> および CO 分圧において中心鉄が二価の状態での Glu-hemoCD の吸収スペクトルを測定し、得られた吸光度変化( $\Delta A$ )を O<sub>2</sub> および CO 分圧( $P^{O_2}$  および  $P^{CO}$ )に対してプロットした。得られた曲線から  $P_{1/2}^{O_2}$  を見積もることができる。 $P_{1/2}^{CO}$  を求める際には後述する。

O<sub>2</sub> 親和性測定は一定の比で O<sub>2</sub> と N<sub>2</sub> を混合したガスを 10 分間吹き込んで飽和させた pH 7.4 の PBS 中で Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> により還元し、ゲルろ過カラムにより精製した Glu-hemoCD のストック溶液を希釈した後、セルを密封し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 3-14a に示す。hemoCD1 の場合と異なり、deoxy 体と O<sub>2</sub> 付加体のソーレー帯の $\lambda_{\max}$  の変化が小さいために、変化の大きい Q 帯のスペクトル変化を観測した。Glu-hemoCD の deoxy 体由来する吸収スペクトルは O<sub>2</sub> 分圧の上昇に伴って等吸収点を通りながら O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD の生成を示すスペクトルへと変化していった。吸光度変化( $\Delta A$ )を用いて計算した錯形成率  $\{[O_2\text{-Glu-hemoCD}] / [deoxy\text{-Glu-hemoCD}] + [O_2\text{-Glu-hemoCD}]\}$  を O<sub>2</sub> 分圧に対してプロットしたもの(酸素解離曲線)を Figure 3-14c に示す。Figure 3-14c から Glu-hemoCD の pH 7.4 の PBS 中、25 °C における  $P_{1/2}^{O_2}$  の値は  $11 \pm 2$  Torr となった(Table 3-1)。

CO 親和性測定のために一定の比で O<sub>2</sub> と CO を混合したガスを 10 分間吹き込んで飽和させた pH 7.4 の PBS 中で Glu-hemoCD のストック溶液を希釈した後、セルを密封し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 3-14b に示す。O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD の吸収スペクトルは CO 分圧の上昇に伴って等吸収点を通りながら CO 付加体の生成を示すスペクトルへと変化していった。吸光度変化( $\Delta A$ )を CO 分圧に対してプロットした結果を Figure 3-14d に示す。



**Figure 3–14.** (a) UV-vis spectral changes of Glu-hemoCD ( $[\text{Glu-Fe(II)TPPS}] = 1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{Py3CD}] = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) as a function of the  $\text{O}_2$  partial pressure ( $P^{\text{O}_2}$ ) in  $\text{N}_2$  in PBS at pH 7.4 and  $25^\circ\text{C}$ . (c) Changes in absorbance at 525 nm as a function of  $P^{\text{O}_2}$ . The solid line indicates the theoretical curve to determine  $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ . (b) UV-vis spectral changes of Glu-hemoCD ( $[\text{Glu-Fe(II)TPPS}] = 4.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{Py3CD}] = 5.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) as a function of the CO partial pressure ( $P^{\text{CO}}$ ) in  $\text{O}_2$  in PBS at pH 7.4 and  $25^\circ\text{C}$ . (d) Changes in absorbance at 422 nm as a function of  $P^{\text{CO}}$ . The solid line indicates the theoretical curve to determine  $P_{1/2}^{\text{CO}}$ .

Figure 3–14d の曲線から直接  $P_{1/2}^{\text{CO}}$  の値を見積もることはできない。 $P_{1/2}^{\text{CO}}$  の定義は deoxy-Glu-hemoCD と CO-Glu-hemoCD が同量存在する際の CO 分圧である。しかし今回の測定では CO に対する親和性が非常に高いために、 $\text{O}_2$ -Glu-hemoCD から CO-Glu-hemoCD への変化を観測し、 $P_{1/2}^{\text{O}_2}$  の値を用いることにより、 $P_{1/2}^{\text{CO}}$  の値を  $M$  値( $P_{1/2}^{\text{O}_2} / P_{1/2}^{\text{CO}}$ )および  $P_{1/2}^{\text{O}_2}$  を用いて算出した。今回の CO 親和性の測定は  $\text{O}_2$ -Glu-hemoCD から CO-Glu-hemoCD の変化を観測したために、

Figure 3-14d の曲線より求められた  $M$  値は、 $O_2$ -Glu-hemoCD 体と CO-Glu-hemoCD が同量存在する際の CO 分圧となる。まずこの CO 分圧とその時の  $O_2$  分圧から  $M$  値を 2250 と求めた。なお、反応系においてセル内は  $O_2$  および CO ガスで満たされているために、この時の  $O_2$  分圧は標準気圧から CO 分圧を引いたものと考えた。また、 $M$  値および  $P_{1/2}^{O_2}$  (11 Torr)の結果を用いて、 $P_{1/2}^{CO}$  ( $P_{1/2}^{O_2} / M$ ) を算出した。その結果、Glu-hemoCD の pH 7.4 の PBS 中、25 °C における  $P_{1/2}^{CO}$  の値は  $(4.9 \pm 1) \times 10^{-3}$  Torr となった(Table 3-1)。

Glu-hemoCD の  $P_{1/2}^{O_2,CO}$ 、 $M$  値の測定結果および報告されている hemoCD1 の  $P_{1/2}^{O_2,CO}$ 、 $M$  値<sup>34)</sup>を Table 3-1 にまとめる。 $P_{1/2}^{O_2}$  では、遠位側にカルボキシ基の導入を行った際において hemoCD1 と比べて Glu-hemoCD については  $P_{1/2}^{O_2}$  の値の大きな変化は見られなかった。しかし、遠位側にカルボキシ基の導入を行うことで  $P_{1/2}^{CO}$  の値は約 300 倍低下したことがわかった。 $P_{1/2}^{CO}$  が低下したことから、酸素選択性を表す  $M$  値( $P_{1/2}^{O_2} / P_{1/2}^{CO}$ )の大幅な減少が観測された。CO 親和性が著しく低下したことは前述した中心鉄へのカルボキシラートの影響に依ると推測されるが、詳細は Glu-hemoCD の  $O_2$  および CO 結合速度とともに 3-1-6 項にて考察する。

**Table 3-1.** The  $O_2$  and CO binding affinities ( $P_{1/2}L$ , L =  $O_2$  or CO, Torr) and the  $O_2/CO$  selectivity ( $M$ ) of Glu-hemoCD and hemoCD1 at 25 °C.

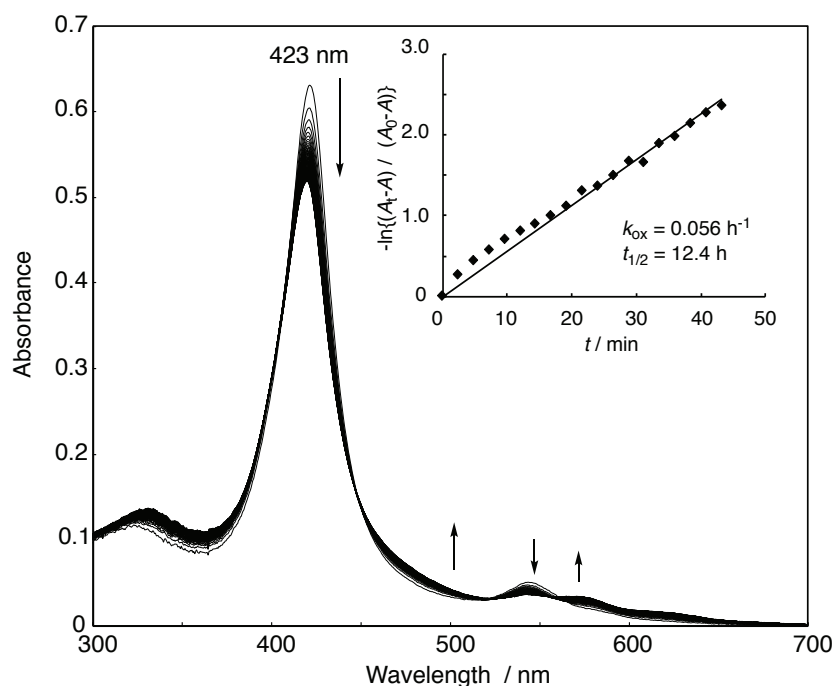
	$P_{1/2}^{O_2}/Torr$	$P_{1/2}^{CO}/Torr$	$M$	conditions
Glu-hemoCD	11 ± 2	$(4.9 \pm 1) \times 10^{-3}$	2250	phosphate buffer saline (pH 7.4), 25 °C.
hemoCD1	10 ± 2	$1.5 \times 10^{-5}$	$6.7 \times 10^{-5}$	phosphate buffer (pH 7.0), 25 °C.

次に  $O_2$ -Glu-hemoCD の自動酸化反応の測定を行なった。 $O_2$ -Glu-hemoCD の吸収スペクトル変化を pH 7.4 の PBS 中、25 °C の条件下において測定を行った。その吸収スペクトル変化を Figure 3-15 に示す。時間の経過とともにスペクトルは等吸収点を通りながら変化し、ソーレー帯の  $\lambda_{max}$  は 423 nm から 420 nm へと変化した。最終のスペクトルは met-hemoCD1 のスペクトルとほぼ一致したことから、観測されたスペクトル変化は  $Fe^{II}-O_2$  錯体から  $Fe^{III}-OH$  錯体への自動酸化によるものであると考えられる。Glu-hemoCD については 423 nm における吸光度変化に対し、次式に示す一次の反応速度式に基づいて解析を行った。



$$\ln \{(A_t - A_\infty) / (A_0 - A_\infty)\} = -k_{\text{obs}} t \quad (3-2)$$

ここで  $A_0$  は測定開始時、 $A_\infty$  は met-Glu-hemoCD、 $A_t$  は時間  $t$  における 422 nm の吸光度を示し、 $k_{\text{obs}}$  は自動酸化反応における擬一次速度定数である。式(3-2)に従い、 $\ln \{(A_t - A_\infty) / (A_0 - A_\infty)\} = -k_{\text{obs}} t$  を時間  $t$  に対してプロットしたものを Figure 3-15 の挿入図に示す。この近似線の傾きにより得られた擬一次速度定数から求めた半減期( $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}}$ )は 12.4 h であることが分かった(pH 7.4, 25 °C)。O<sub>2</sub>-hemoCD1 ( $t_{1/2} = 30$  h, in phosphate buffer at pH 7 and 25°C)<sup>34)</sup>と比較すると、遠位側にカルボキシ基を導入したことで自動酸化反応に対する速度が 2 倍以上大きくなる結果となった。カルボキシ基は極性官能基で水分子との親和性が高く、シクロデキストリンによって形成される疎水場近傍に存在すると思われるために、水の侵入が容易になり、酸素錯体が不安定化されたことが考えられる。



**Figure 3-15.** UV-vis spectral changes in autoxidation of the O<sub>2</sub> adduct of Glu-hemoCD in PBS at pH 7.0 and 25 °C Inset: first-order plot based on the absorbance changes at 423 nm. Scans were made at 144 min intervals.



### 3-6. Glu-hemoCD の O<sub>2</sub> および CO 結合速度

met-Glu-hemoCD 溶液に過剰量の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を加え、中心鉄を二価へと還元した。過剰の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> およびその分解物を Sephadex G-25 を充填したゲルろ過カラムによって取り除き、このろ液を測定に用いるストック溶液とした。なお、この一連の操作は常温常圧下において行ったため、精製後の溶液は空気中の酸素と結合した O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD であった。このように得られた O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD のストック溶液を希釈してレーザーフラッシュフォトリシス測定に用い、pH 7.4 の PBS 中、25 °C の条件において測定を行った。O<sub>2</sub> および CO の結合( $k_{on}$ )および解離速度定数( $k_{off}$ )を決定した。レーザー照射における O<sub>2</sub> 付加体および CO 付加体の反応過程は次式で表される。



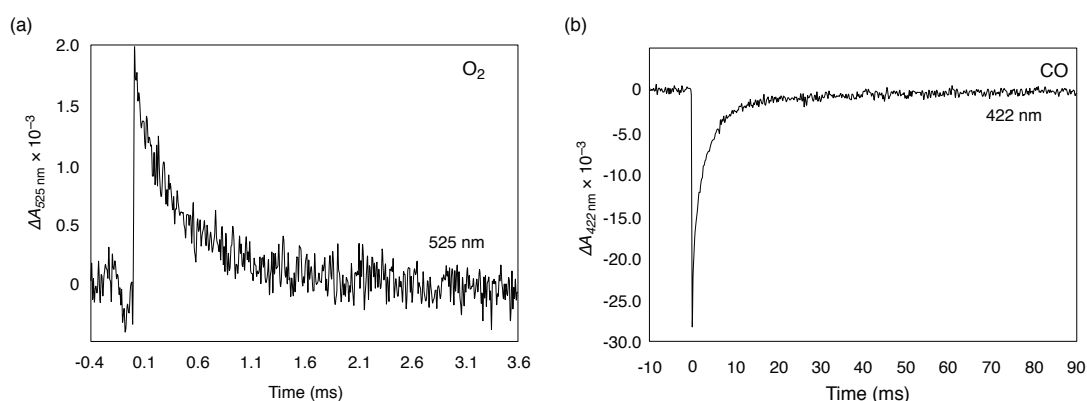
ここで L はリガンド(O<sub>2</sub> または CO)を表す。Glu-hemoCD の濃度に対してリガンドの濃度が過剰となる条件で、レーザー照射後に観測される Glu-hemoCD の吸光度の時間変化を記録し、それに対して一次の反応速度式に基づく解析を行った。このときの擬一次速度定数  $k_{obs}^{\text{L}}$  は  $k_{on}$  および  $k_{off}$  を用いて次式で表される。

$$k_{obs}^{\text{L}} = k_{on}^{\text{L}} [\text{L}] + k_{off}^{\text{L}} \quad (3-5)$$

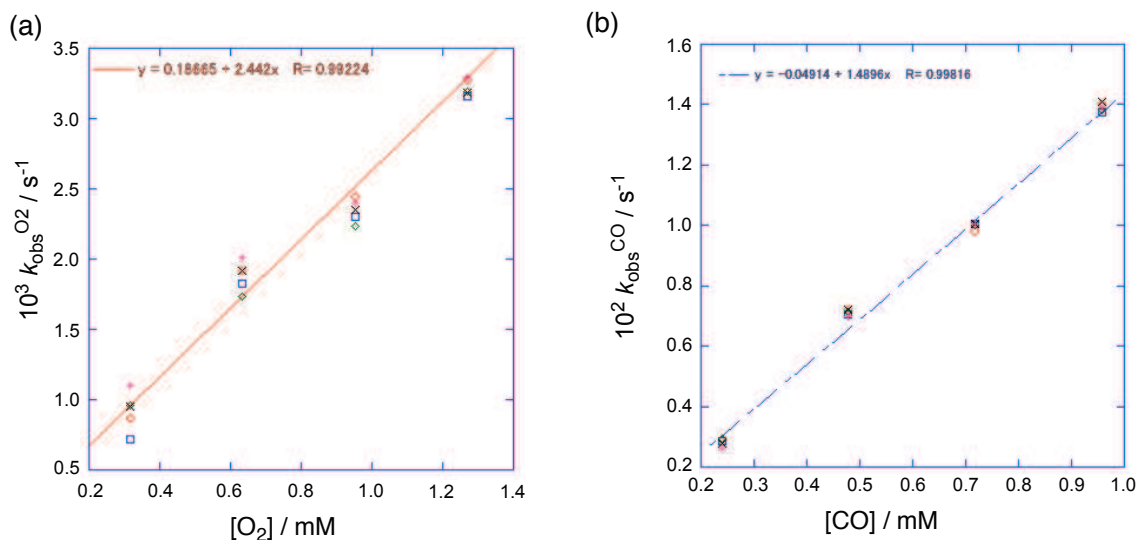
O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD および CO-Glu-hemoCD を含む pH 7.4 の PBS 溶液に対し、532 nm のレーザーを照射した時の 525 および 422 nm の吸光度の時間変化を Figure 3-16a および 3-16b に示す。レーザー照射後の吸光度の時間変化に対して一次の反応速度式に基づく非線形最小自乗法によるカーブフィッティングにより、リガンドの結合に対する擬一次速度定数  $k_{obs}^{\text{L}}$  を求めた。式(3-5)より、溶液の O<sub>2</sub> 濃度を変化させてそれぞれの O<sub>2</sub> 濃度における  $k_{obs}^{\text{O}_2}$  を決定し、 $k_{obs}^{\text{O}_2}$  対[O<sub>2</sub>]プロット(Figure 3-17)における近似曲線の傾きから  $k_{on}^{\text{O}_2}$  を決定した。 $k_{off}^{\text{O}_2}$  は次式から算出した。

$$K^L = (C^L P_{1/2}^L)^{-1} = k_{\text{on}}^L / k_{\text{off}}^L \quad (3-6)$$

ここで  $K^L$  はリガンドの Glu-hemoCD への配位における結合定数、 $C^L$  はリガンドの 25 °C における水に対する溶解度 ( $\text{O}_2$  の場合、 $C^{\text{O}_2} = 1.67 \times 10^{-6} \text{ M Torr}^{-1}$ ) である。以上の解析の結果、 $k_{\text{on}}^{\text{O}_2}$  および  $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  はそれぞれ  $2.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  および  $42.1 \text{ s}^{-1}$  と決定した。 $\text{CO}$  の解析においては  $K^{\text{CO}}$  が非常に大きいため、式(3-4)において  $k_{\text{obs}}^{\text{CO}} = k_{\text{on}}^{\text{CO}}[\text{CO}]$  と近似することができる。従って、 $k_{\text{on}}^{\text{CO}}$  は  $\text{CO}$  の飽和溶液 ( $[\text{CO}] = 9.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) における  $k_{\text{obs}}^{\text{CO}}$  を決定し、それを  $[\text{CO}]$  で割ることによって算出した。 $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  は式(11)から算出した ( $C^{\text{CO}} = 1.26 \times 10^{-6} \text{ M Torr}^{-1}$ )。  $k_{\text{obs}}^{\text{CO}}$  対  $[\text{CO}]$  プロットを Figure 3-17 に示す。これらの解析の結果、 $k_{\text{on}}^{\text{CO}}$  および  $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  はそれぞれ  $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  および  $9.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  と決定した。



**Figure 3-16.** (a) The time courses for  $\text{O}_2$  association with Glu-hemoCD generated by laser flash photolysis of  $\text{O}_2$ -Glu-hemoCD in PBS at pH 7.4 and 25 °C. (b) The time courses for  $\text{CO}$  association with Glu-hemoCD generated by laser flash photolysis of  $\text{CO}$ -Glu-hemoCD in PBS at pH 7.4 and 25 °C. The reaction were carried out by using a laser flash photolysis system with Nd : YAG laser (532 nm).

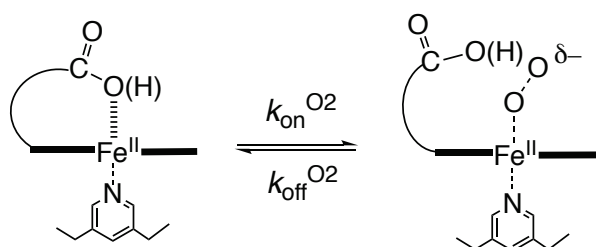


**Figure 3–17.** (a) Plot of the observed rate constant,  $k_{\text{obs}}^{\text{O}_2}$ , for dioxygen association with Glu-hemoCD versus  $[\text{O}_2]$ . Each rate was followed after  $\text{O}_2$ –Glu-hemoCD was dissociated by laser flash photolysis. (b) Plot of the observed rate constant,  $k_{\text{obs}}^{\text{CO}}$ , for dioxygen association with Glu-hemoCD versus  $[\text{CO}]$ . Each rate was followed after  $\text{CO}$ –Glu-hemoCD was dissociated by laser flash photolysis.

**Table 3–2.** Kinetic and thermodynamic parameters for  $\text{O}_2$  binding of Glu-hemoCD and hemoCD1 at 25°C.

	$k_{\text{on}}^{\text{O}_2} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}}^{\text{O}_2} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{O}_2} / \text{M}^{-1}$	$P_{1/2}^{\text{O}_2} / \text{Torr}$
Glu-hemoCD	$2.3 \times 10^6$	42.1	$5.46 \times 10^4$	$11 \pm 2$
hemoCD1	$4.7 \times 10^7$	$1.3 \times 10^3$	$3.62 \times 10^4$	$10 \pm 2$

**Scheme 3–3.** The mechanism of  $\text{O}_2$ –bound Glu-hemoCD1.



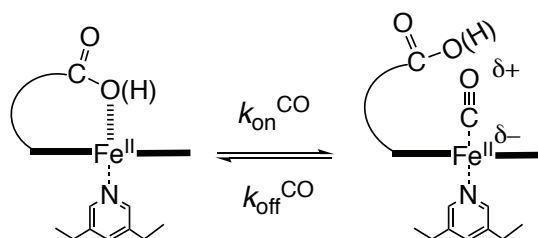
hemoCD1 の結果と比較すると、O<sub>2</sub> の場合、Glu-hemoCD の  $k_{\text{on}}^{\text{O}_2}$  ( $2.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) は hemoCD1 の値 ( $4.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) の 20 分の 1 程度に低下した (Table 3-2)。これは側鎖に導入したカルボキシ基が Fe(II) に配位しているために、酸素の配位が遅くなったことが考えられる (Scheme 3-3)。O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD からの解離速度 ( $k_{\text{off}}^{\text{O}_2} = 42.1 \text{ s}^{-1}$ ) は hemoCD1 ( $1.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ) と比べて著しく低下している (Table 3-2)。これは中心鉄(II)へ結合している酸素と側鎖のカルボキシ基との双極子/双極子相互作用より酸素を安定化させたことが考えられる (Scheme 3-3)。O<sub>2</sub> 結合および解離速度両方が同程度低下したことにより、結果として hemoCD1 と Glu-hemoCD はあまり O<sub>2</sub> 親和性に違いがなくなっている。

CO の場合においても、カルボキシ基が中心 Fe(II) に配位しているために、 $k_{\text{on}}^{\text{CO}}$  ( $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) は hemoCD1 ( $1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) よりも 100 倍程低下した (Table 3-3) (Scheme 3-4)。CO-Glu-hemoCD からの解離速度 ( $k_{\text{off}}^{\text{CO}} = 9.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) は hemoCD1 ( $2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) よりも少し増加している。その結果、CO 結合速度が著しく低下し、CO 解離速度が上昇したことにより、hemoCD1 に比べて Glu-hemoCD の CO 親和性は著しく低下している。

**Table 3-3.** Kinetic and thermodynamic parameters for CO binding of Glu-hemoCD and hemoCD1 at 25°C.

	$k_{\text{on}}^{\text{CO}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}}^{\text{CO}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{CO}} / \text{M}^{-1}$	$P_{1/2}^{\text{CO}} / \text{Torr}$
Glu-hemoCD	$1.5 \times 10^5$	$9.3 \times 10^{-4}$	$1.61 \times 10^8$	$(4.9 \pm 1) \times 10^{-3}$
hemoCD1	$1.3 \times 10^7$	$2.5 \times 10^{-4}$	$5.20 \times 10^{10}$	$1.5 \times 10^{-5}$

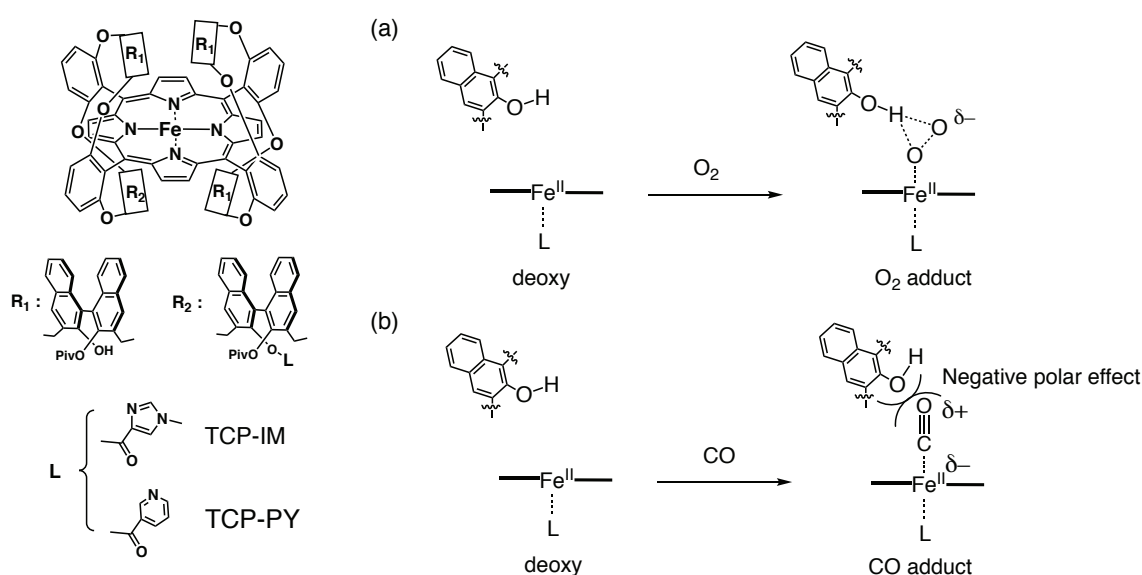
**Scheme 3-4.** The mechanism of CO-bound Glu-hemoCD1.



CO に関しては Glu-hemoCD のカルボキシ基の二重結合の O 原子が持つ孤立電子対と CO の O 原子の間で電子反発が生じることが考えられる (Scheme 3-4)。Naruta らは、ポルフィリンの両側にヒドロキシ基を導入したツインコロネット

ポルフィリン(TCPs) (Figure 3-3c)を設計した<sup>24,25</sup>。彼らはツインコロネットポルフィリンはピケットフェンスポルフィリンと比較すると O<sub>2</sub>/CO の選択性を大きく向上したことを報告した。ポルフィリンの両側に導入したヒドロキシ基のプロトンが O<sub>2</sub> と水素結合を形成することで O<sub>2</sub>-Fe(II)結合を安定化させた(Scheme 3-5a)。また、ラマンスペクトルの測定結果より、弱い CO-Fe(II)結合および高波数側に CO の伸縮振動が観測された<sup>24,25</sup>。彼らはヒドロキシ基の酸素原子が持つ孤立電子対と CO の O 原子の間で電子反発が生じ、CO に対して負の極性効果が働くことにより、その反発に伴い、CO の O 原子が電子不足、C 原子が電子充足状態になり、中心鉄からの逆電子供与が弱まる。CO-Fe(II)結合を不安定化させ、CO 親和性が著しく減少したことを考察した(Scheme 3-5b)。

**Scheme 3-5.** Negative polar effect and hydrogen bonding in CO and O<sub>2</sub> adducts TCP-IM and TCP-PY synthesized by Naruta et al.<sup>24,25</sup>

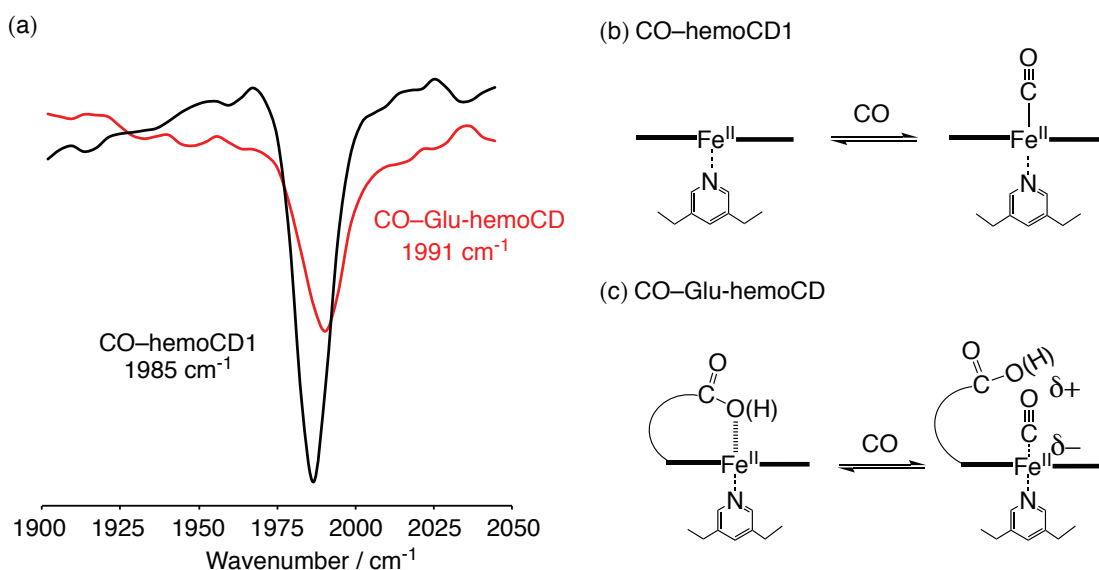


水中ではカルボン酸の酸解離平衡定数(pK<sub>a</sub>)の値は約 5.0 であるため、今回の実験では pH 7.4 の PBS を用いることで、Glu-hemoCD 側鎖のカルボキシ基は解離していると推測される。しかし、カルボキシ基が解離している場合、カルボキシラートイオン(-COO<sup>-</sup>)は O<sub>2</sub> の O 原子と静電反発が生じるため、O<sub>2</sub> の解離速度(k<sub>off</sub><sup>O2</sup>)は早くなることが考えられる。これは O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD の k<sub>off</sub><sup>O2</sup> 測定結果と矛盾する。Glu-hemoCD の側鎖が柔軟であるため、カルボキシ基が Fe(II)に配位していることが前述の 3-1-5 項で明らかとなった。このことから、カルボキシ基

はシクロデキストリン二量体(Py3CD)により構築された疎水場の深い位置に存在すると考えられる。従って、カルボキシ基は Py3CD によって作成された疎水性ポケットより保護されたために、非解離型で存在することが推測される。次に、赤外吸収分光法(IR)により、CO-Glu-hemoCD の CO 伸縮振動( $\nu_{C-O}$ )を調べた。

### 3-7. CO-Glu-hemoCD の IR 測定における極性効果の検討

met-Glu-hemoCD を  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  で還元し、この溶液に CO ガスを 5 分間バブリングすることで CO-Glu-hemoCD 溶液を得た。この溶液を液体気密セルを用いてそのまま IR 測定を行った。測定においては 25 °C、PBS 溶液中で行い、バックグラウンド測定として PBS を用いた。その後、ストック溶液を入れ、サンプル測定を行った。その結果を Figure 3-18a に示す。



**Figure 3-18.** (a) IR spectra of CO-hemoCD1 and CO-Glu-hemoCD (liquid cell). (b, c) Negative polar effects on the back-donation from Fe(II) to CO of the CO-bound hemoCD1 and Glu-hemoCD.

なお、比較として CO-hemoCD1 のスペクトルも同様に測定した。CO-hemoCD1 の CO の伸縮振動に帰属されるバンドは  $1985\text{ cm}^{-1}$  に、鋭いピークとして観測され、共鳴ラマンを用いた文献値と良い一致( $1985\text{ cm}^{-1}$ )<sup>34</sup>を示した。一方、CO-Glu-hemoCD の場合  $1991\text{ cm}^{-1}$  に若干ブロード化して観測された(Figure 3-18a)。CO-

Glu-hemoCD の CO の伸縮振動が CO-hemoCD1 よりも高波数側にシフトしたことから、カルボキシ基は CO に対して負の極性効果が働くことがわかった(Figure 3-18c)。Naruta らが開発した TCP-IM の CO の伸縮振動( $\nu_{\text{C-O}} = 1994 \text{ cm}^{-1}$ )は遠位側に極性基を持たないピケットフェンスポルフィリン(FeTPivP(1-MeIm),  $\nu_{\text{C-O}} = 1969 \text{ cm}^{-1}$ )より大幅に高波数側にシフトした<sup>24)</sup>。CO-Glu-hemoCD は Naruta らの系<sup>24,25)</sup>とよく一致しているが、彼らの系と比較してもその効果はあまり大きくないと考えられる。しかしながら、この CO-Glu-hemoCD における高波数シフトは、CO 親和性の低下と矛盾しない結果であり、いくらかの寄与はあるものと考えられる。したがって、遠位側のカルボキシ基鉄原子への CO 分子の配位を抑制されることが明らかとなった。

#### 4. 結言

本章ではミオグロビンの遠位側の機能を hemoCD に付与し、合成が容易であるミオグロビンモデルを構築し、その酸素/一酸化炭素結合挙動を観測することが目的であった。そこで遠位側にカルボキシ基を導入した Glu-Fe(III)TPPS の合成を行った。次に Glu-Fe(III)TPPS と Py3CD との包接錯体(met-Glu-hemoCD)の形成挙動について UV-vis スペクトル滴定から検討を行った。Glu-Fe(III)TPPS も Fe(III)TPPS と同様に Py3CD と 1 : 1 の包接錯体を形成することが明らかとなった。次に Glu-Fe(III)TPPS の中心鉄を二価へと還元し、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行い、oxy 体、CO 体については hemoCD1 と同様な結果を得られたが、deoxy 体については異なる結果となった。ソーレー帯の $\lambda_{\text{max}}$ が hemoCD1 では 434 nm であることに對し、Glu-hemoCD では 421 nm となったが、Q 帯の $\lambda$ が類似であったため、deoxy 体は形成されているが、側鎖のカルボキシ基の影響が示唆された。また形成した酸素錯体の安定性について O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD の自動酸化反応を UV-vis スペクトルの経時変化から検討した。hemoCD1 の酸素錯体の寿命( $t_{1/2} = 30.1 \text{ h}$ )と比較すると、Glu-hemoCD の酸素錯体の寿命は 14 時間程度となり、不安定化されたことが示唆された。次に Glu-hemoCD の酸素親和性、一酸化炭素親和性測定を行った。Glu-hemoCD の  $P_{1/2}^{\text{O}_2}$  は hemoCD1 と同等の結果となったが、 $P_{1/2}^{\text{CO}}$  は hemoCD1 と比較すると、300 倍

ほど上昇した。このことから、hemoCD1 側鎖に導入した極性官能基であるカルボキシ基が酸素親和性には影響をほとんど与えないが、一酸化炭素親和性には大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。次に酸素/一酸化炭素結合、解離速度測定において hemoCD1 と比較すると、Glu-hemoCD の酸素、一酸化炭素の結合速度はともに低下し、酸素の解離速度は低下したが、一酸化炭素の解離速度は低下した。これらのことから、側鎖に導入したカルボキシ基が中心鉄(Fe(II))に配位しているために酸素および一酸化炭素の結合速度は低下した。また酸素の解離速度はカルボキシ基と酸素分子が水素結合することにより低下し、一酸化炭素の解離速度はカルボキシ基の極性効果により上昇したことが示唆された。最後に CO-Glu-hemoCD の極性効果の検討について CO-Glu-hemoCD の IR 測定を行うことによって CO の三重結合の伸縮振動の変化を観測した。CO-hemoCD1 の波数( $1985\text{ cm}^{-1}$ )と比較すると、CO-Glu-hemoCD の波数は  $1991\text{ cm}^{-1}$  となり、高波数側にシフトした。また CO-hemoCD のスペクトルはシャープなピークであったが、CO-Glu-hemoCD のピークは比較すると、ブロードなピークになった。このことから CO-Glu-hemoCD の中心鉄から一酸化炭素原子への逆電子供与が弱まったことが明らかとなった。

## 5. 参考文献

- 1) Perutz, M. F., Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Annu. Rev. Physiol.* **1990**, *52*, 1–25.
- 2) Jameson, G. B.; Ibers, J. A., Biological and synthetic dioxygen carriers. In *Bioinorganic Chemistry*; Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., Valentine, J. S., Eds.; University Science Books: Mill Valley, CA, **1994**; pp 167–251.
- 3) Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L., Functional analogues of cytochrome *c* oxidase, myoglobin, and hemoglobin. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561–588.
- 4) Momenteau, M.; Reed, CA., Synthetic heme dioxygen complexes. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 659–698.
- 5) Vojtěchovský, J.; Chu, K.; Berendzen, J.; Sweet, R. M.; Schlichting, I., Crystal Structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2153–2174.



- 6) Powers, L.; Chance, B.; Chance, M.; Campbell, B.; Friedman, J.; Khalid, S.; Kumar, C.; Naqui, A.; Reddy, K. S.; Zhou, Y., Kinetic, structural, and spectroscopic identification of geminate states of myoglobin: a ligand binding site on the reaction pathway. *Biochemistry*. **1987**, *26*, 4785–4796.
- 7) Chu, K.; Vojtěchovský, J.; McMahon, B. H.; Sweet, R. M.; Berendzen, J.; Schlichting, I., Structure of a ligand-binding intermediate in wild-type carbonmonoxy myoglobin. *Nature*. **2000**, *403*, 921 – 923.
- 8) Li, T.; Quillin, M. L.; Phillips, Jr, G. N.; Olson, J. S., Structural determinants of the stretching frequency of CO bound to myoglobin. *Biochemistry*. **1994**, *33*, 1433–1446.
- 9) Olson, J. S.; Phillips, Jr, G. N., Myoglobin discriminates between O<sub>2</sub>, NO, and CO by electrostatic interactions with the bound ligand. *JBIC*. **1997**, *2*, 544–552.
- 10) Salzmann, R.; McMahon, M. T.; Godbout, N.; Sanders, L. K.; Wojdelski, M.; Oldfield, E., Solid-State NMR, crystallographic and density functional theory investigation of Fe–CO and Fe–CO analogue metalloporphyrins and metalloproteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3818–3828.
- 11) Rovira, C.; Schulze, B.; Eichinger, M.; Evanseck, J. D.; Parrinello, M., Influence of the heme pocket conformation on the structure and vibrations of the Fe–CO Bond in myoglobin: a QM/MM density functional study. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 435–445.
- 12) Capece, L.; Marti, M. A.; Crespo, A.; Doctorovich, F.; Estrin, D. A., Heme protein oxygen affinity regulation exerted by proximal effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12455–12461.
- 13) Yu, T. Q.; Lapelosa, M.; Vanden-Eijnden, E.; Abrams, C. F., Full Kinetics of Co Entry, internal diffusion, and exit in myoglobin from transition-path theory simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3041–3050.
- 14) Pauling, L., Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature*. **1964**, *203*, 182–183.
- 15) Kitagawa, T.; Ohfrias, M. R.; Rousseau, D. L.; Ikeda-Saito, M.; Yonetani, T., Evidence for hydrogen bonding of bound dioxygen to the distal histidine of oxycobalt myoglobin and haemoglobin. *Nature*. **1982**, *298*, 869–871.
- 16) Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Halbert, T. R.; Suslick, K. S., Nature of O<sub>2</sub> and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 3333–3337.

- 17) Collman, J. P.; Gagne, R. R.; Halbert, T. R.; Marchon, J. C.; Reed, C. A., Reversible oxygen adduct formation in ferrous complexes derived from a picket fence porphyrin. Model for oxymyoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7868–7870.
- 18) Collman, J. P., Functional analogs of heme protein active sites. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5145–5155.
- 19) Collman, J. P.; Fu, L., Synthetic models for hemoglobin and myoglobin. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 455–463.
- 20) Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Iverson, B. L.; Sessler, J. L.; Morris, R. M.; Gibson, Q. H., Dioxygen and carbonyl binding to iron(II) porphyrins: a comparison of the "picket fence" and "pocket" porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3052–3056.
- 21) Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Collins, T. J.; Iverson, B.; Sessler, J. L.; Morris, R. M.; Gibson, Q. H.; (1983)., The ‘pocket’porphyrins: Hemoprotein models with lowered CO affinities. *Inorg Chim.Acta.* **1983**, *79*, 101–102.
- 22) Tetreau, C.; Lavalette, D.; Momenteau, M.; Fischer, J.; Weiss, R., Structure - reactivity relationship in oxygen and carbon monoxide binding with some heme models. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11840–11848.
- 23) Wuenschell, G. E.; Tétreau, C.; Lavalette, D.; Reed, C. A., H-bonded oxyhemoglobin models with substituted picket-fence porphyrins: the model compound equivalent of site-directed mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3346–3355.
- 24) Tani, F.; Matsu-ura, M.; Ariyama, K.; Setoyama, T.; Shimada, T.; Kobayashi, S.; Hayashi, T.; Matsuo, T.; Hisaeda, Y.; Naruta, Y., Iron twin-coronet porphyrins as models of myoglobin and hemoglobin: amphibious electrostatic effects of overhanging hydroxyl groups for successful CO/O<sub>2</sub> discrimination. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 862–870.
- 25) Matsu-ra, M.; Tani, F.; Naruta, Y., Formation and characterization of carbon monoxide adducts of iron “twin coronet” porphyrins. Extremely low CO affinity and a strong negative polar effect on bound CO. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1941–1950.
- 26) Schaefer, A. W.; Roveda Jr. A. C.; Jose, A.; Solomon, E. I., Geometric and electronic structure contributions to O–O cleavage and the resultant intermediate generated in heme-copper oxidases. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 10068–10081.
- 27) Cao, W.; Christian, J. F.; Champion, P. M.; Rosca, F.; Timothy Sage, F., Water penetration and binding to ferric myoglobin. *Biochemistry.* **2001**, *40*, 5728–5737.

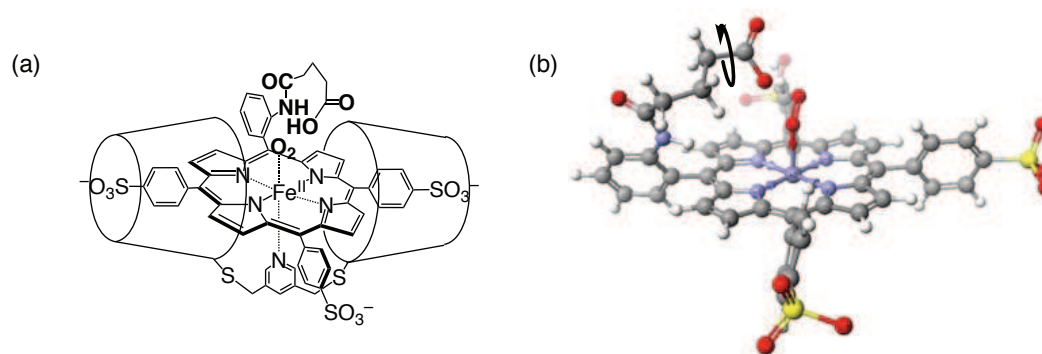
- 28) Shibata, T.; Matsumoto, D.; Nishimura, R.; Tai, H.; Matsuoka, A.; Nagao, S.; Matsuo, T.; Hirota, S.; Imai, K.; Neya, S.; Suzuki, A.; Yamamoto, Y., Relationship between oxygen affinity and autoxidation of myoglobin. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 11955–11960.
- 29) Yoshikawa, S.; Shimada, A., Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1936–1989.
- 30) Vonesch, M.; Wytko, J. A.; Kitagishi, H.; Kano, K.; Weiss, J., Modelling haemoproteins: Porphyrins and cyclodextrins as sources of inspiration. *Chem. Commun.* **2019**, *27*, 44–52.
- 31) Mavridis, I. M.; Yannakopoulou, K., Porphyrinoid–cyclodextrin assemblies in biomedical research: an update. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3391–3424.
- 32) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y., Static and dynamic behavior of 2:1 inclusion complexes of cyclodextrins and charged porphyrins in aqueous organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9937–9944.
- 33) Kano, K.; Kitagishi, H.; Tamara, S.; Yamada, A., Anion binding to a ferric porphyrin complexed with per-*O*-methylated  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202–15210.
- 34) Kano, K.; Kitagishi, H.; Koderu, M.; Hirota, S., Dioxygen binding to a simple myoglobin model in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435–438.
- 35) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Koderu, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., Iron porphyrin-cyclodextrin supramolecular complex as a functional model of myoglobin in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448–4460.
- 36) Kano, K.; Itoh, Y.; Kitagishi, H.; Hayashi, T.; Hirota, S., A supramolecular receptor of diatomic molecules ( $O_2$ , CO, NO) in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8006–8015.
- 37) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894–6897.
- 38) Chang, C. K.; Liang, Y.; Aviles, G.; Peng, S.-M., Conformational control of intramolecular hydrogen bonding in heme models: maximal  $Co^{II}$ - $O_2$  binding in a c-clamp porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4191–4192.
- 39) Hijazi, I.; Roisnel, T.; Fourmigué, M.; Weiss, J.; Boitrel, B., Coordination studies of bis-strapped-hanging-carboxylate porphyrins. X-ray characterization of a five-

- coordinate iron(II) complex with a built-in axial base. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 3098–3100.
- 40) Hijazi, I.; Roisnel, T.; Even-Hernandez, P.; Furet, E.; Halet, J.-F.; Cador, O.; Boitrel, B., Characterization of a six-coordinate ferrous high-spin heme with both intramolecular axial carboxylic acid and pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10652–10653.
- 41) Boitrel, B.; Hijazi, I.; Roisnel, T.; Oohora, K.; Hayashi, T., Iron-strapped porphyrins with carboxylic acid groups hanging over the coordination site: synthesis, x-ray characterization, and dioxygen binding. *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 7373–7383.
- 42) Ueda, T.; Kitagishi, H.; Kano, K., PEGylation of an artificial O<sub>2</sub> and CO receptor: synthesis, characterisation and pharmacokinetic study. *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 4337–4347.
- 43) Karasugi, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Modification of a dioxygen carrier, hemoCD, with PEGylated dendrons for extension of circulation time in the bloodstream. *Bioconjugate Chem* **2012**, *23*, 2365–2376.

## 第四章 水溶性ストラップポルフィリン鉄(II)錯体/シクロデキストリン二量体による超分子ヘムタンパク質モデルの構築

### 1. 緒言

第三章では、側鎖にカルボキシ基を有する水溶性鉄ポルフィリン(Glu-Fe<sup>III</sup>TPPS)を合成し、シクロデキストリン二量体である Py3CD と水中で 1:1 包接錯体(Glu-hemoCD) (Figure 4-1a)を形成し、酸素(O<sub>2</sub>)および一酸化炭素(CO)を可逆的に結合することを明らかにしたり。さらに、Glu-hemoCD の O<sub>2</sub> および CO との結合挙動を検討したところ、Glu-hemoCD の O<sub>2</sub> 付加体(O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD)は hemoCD と同等の O<sub>2</sub> 親和性を示し、一方で CO 親和性は hemoCD よりも、約 300 倍低いことが明らかとなった。Glu-hemoCD の CO 付加体(CO-Glu-hemoCD)の CO の伸縮振動を IR 測定より観測したところ、CO-hemoCD の波数(1985 cm<sup>-1</sup>)と比べて、CO-Glu-hemoCD の波数は 1991 cm<sup>-1</sup> となり、高波数側に有意にシフトした。このことから Glu-hemoCD に存在する遠位側のカルボキシ基が極性基



**Figure 4-1.** (a) Structures of Glu-hemoCD1. (b) The 3D model structure of Glu-FeTPPS was obtained using CONFLEX/MM3 (extensive search) calculations in the Scigress version 2.2.1 software program (Fujitsu, Japan).

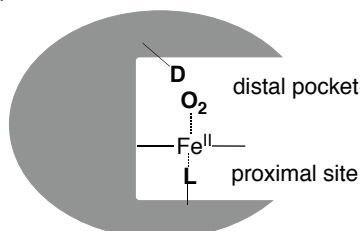
---

Mao, Q.; Boitrel, B.; Hijazi, I.; Le Gac, S.; Oohora, K.; Hayashi, T.; Kitagishi, H. Iron-strapped porphyrin with an overhanging carboxylic acid/cyclodextrin supramolecular complex as an artificial heme protein. 投稿準備中

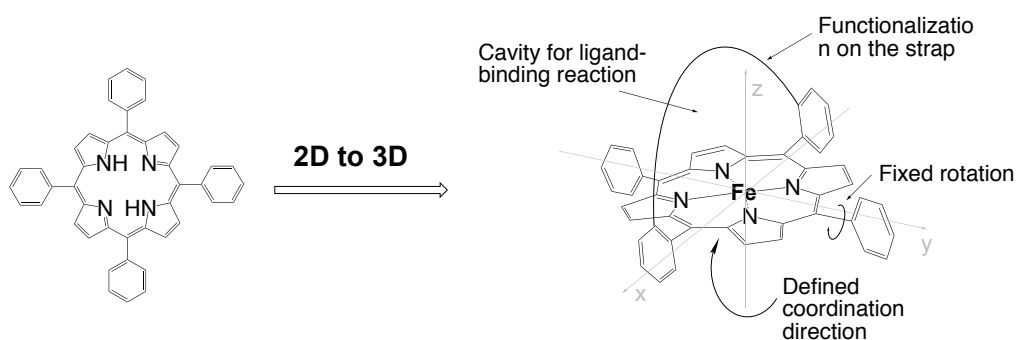
として働き、CO-Glu-hemoCD の中心鉄から一酸化炭素原子への逆電子供与を弱  
 まらせることが CO 親和性低下の原因であることが示唆された。以上の第三章  
 の結果から、hemoCD の遠位側にカルボキシ基を導入することで、中心鉄への  
 CO の結合を制御できることがわかった。Glu-Fe<sup>III</sup>TPPS のカルボキシ基は側鎖の  
 末端に付いており、自由回転ができる(Figure 4-1b)ため、位置制御が難しく、分  
 子設計には改善の余地があった。また、第三章で考察したように、カルボキシ基  
 が作用して逆電子供与を弱めるかどうかについては、他の系とも比較してさら  
 に検討する必要があった。そこで本章では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するために、遠位側のカルボキシ基をストラップ構  
 造により固定した新しいストラップポルフィリンの検討を行った。

ストラップポルフィリンは、ストラップ部位がメソフェニル基の回転運動よ  
 り固定されているため、特有な三次元構造をとる(Figure 4-2b)<sup>2)</sup>。ストラップ部  
 分に機能性官能基を付与すれば、ポルフィリン分子とストラップによって形成  
 された空間は、ヘムタンパク質の活性中心と類似したものとなる(Figure 4-2a)。  
 この特有な立体構造を利用し、これまでにヘムタンパク質の活性中心を模倣し  
 たストラップポルフィリンが多く開発された<sup>3)</sup>。

(a)

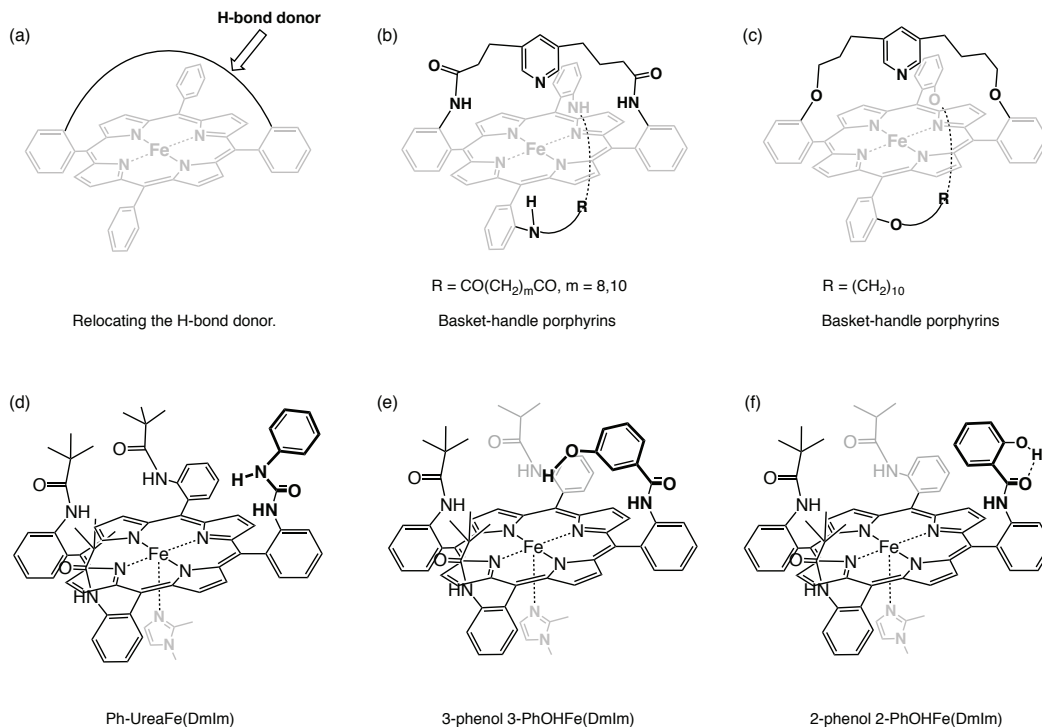


(b)



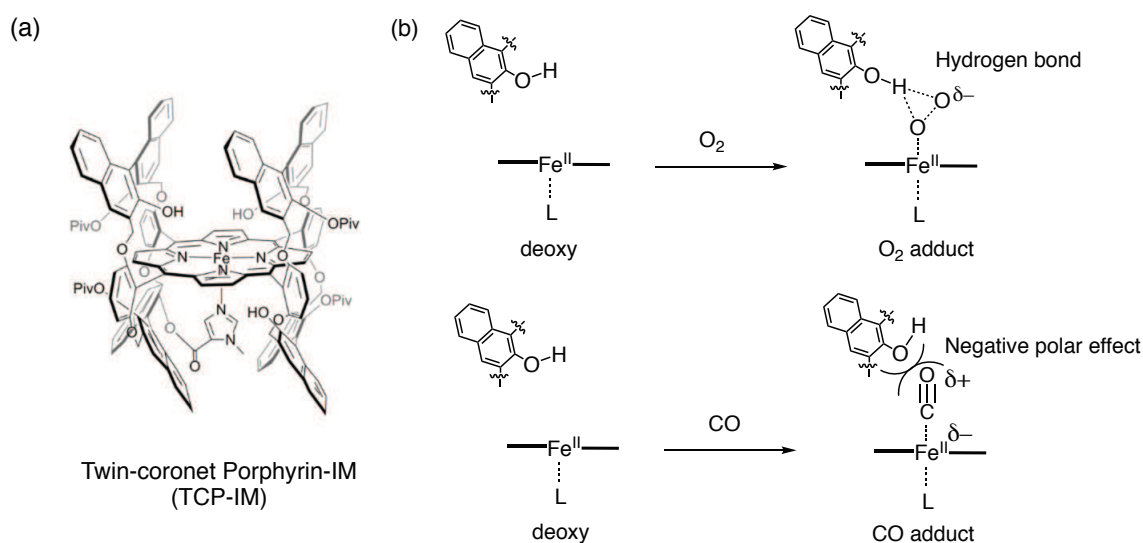
**Figure 4-2.** (a) Diagrammatic sketch of a heme enzyme, which has served as a model for designing an artificial enzyme. (b) Designing a three-dimensional (3D) strapped porphyrin from a two-dimensional (2D) porphyrin molecule. The concept conveys the unique structural features exhibited by the porphyrin molecule.

いくつかのストラップポルフィリンは、ミオグロビン(Mb)の遠位ヒスチジンの機能を模倣するために、ヘム鉄に配位している  $O_2$  への水素結合供与体(H-bond ドナー)として設計されている(Figure 4-3a)<sup>3,4)</sup>。Momenteau らは、フェニル基のメソ位にアミド結合を導入し、アルキル鎖で連結したストラップポルフィリンを合成した(Figure 4-3b)。このストラップポルフィリンでは、フェニル基のメソ位のアミド結合をエーテル結合にしたストラップポルフィリン(Figure 4-3c)より  $O_2$  親和性が約 10 倍向上した。この高い  $O_2$  親和性はおそらく遠位サイトの双極子相互作用によるものであることを示している<sup>5-7)</sup>。また、ヒドロキシ基あるいはアミノ基を H-bond ドナーとして利用する研究も行われきた。Reed らはピケットポルフィリンを基盤にして、H-bond ドナーの位置について検討を行った(Figure 4-3d-f)<sup>8)</sup>。Ph-UreaFe(DmIm) (Figure 4-3d)および 3-PhOHFe(DmIm) (Figure 4-3e)においてはピケットポルフィリンの  $O_2$  親和性を 10 倍向上させたが、2-PhOHFe(DmIm) (Figure 4-3f)では、exo コンフォメーションの安定化により、ピケットフェンスポルフィリンとほぼ同様な結果になった。この3つのモデルは、H-bond ドナーを導入する位置を正確に調整することで、 $O_2$  親和性に大きな影響を与えることを示した。



**Figure 4-3.** Structures of synthetic myoglobin models in organic solvents. (a) Relocating the H-bond donor. These models were synthesized by Momenteau et al. (b-c)<sup>5-7)</sup> and by Reed et al. (d-f)<sup>8)</sup>

Naruta らは、両側に H-bond ドナーとしてヒドロキシ基を導入したツインコロネットポルフィリン(TCP) (Figure 4-4a)を設計した<sup>9,10</sup>。その結果、ヒドロキシ基のプロトンが O<sub>2</sub> と水素結合を形成することで O<sub>2</sub>-Fe(II)結合を安定化させた(Figure 4-4b)。また、ヒドロキシ基の酸素原子が CO に対して負の極性効果が働くことにより、CO-Fe(II)結合を不安定化させ(Figure 4-4b)、CO 親和性が著しく減少した。

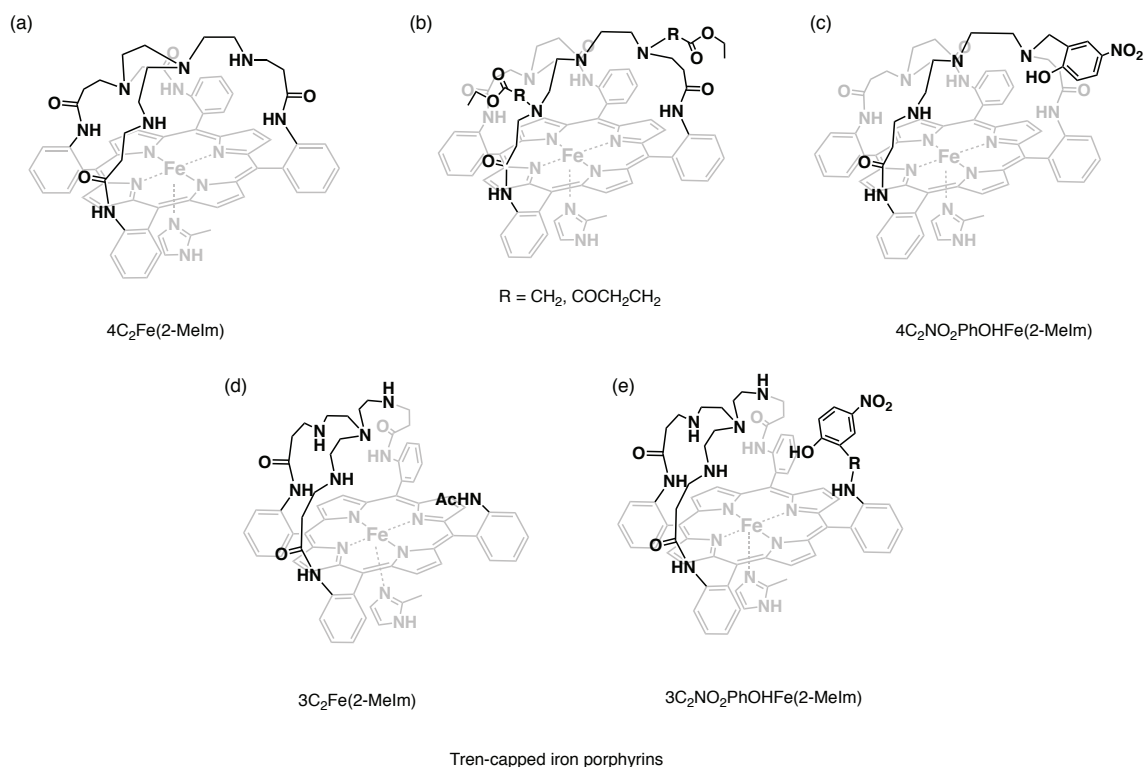


**Figure 4-4.** (a) Structures of Twin-coronet porphyrin-IM synthesized by Naruta et al.<sup>9,10</sup> (b) Hydroxy group as a H-bond donor in O<sub>2</sub> adducts of TCP-IM and a negative polar effect in CO adducts of TCP-IM.

Boitrel らはポルフィリンの遠位側にキャップを取り付けたトレンキャップポルフィリンを報告した(Figure 4-5)<sup>11</sup>。H-bond ドナーとして第二級アミン基を導入した(Figure 4-5a)結果、脱水トルエン中非常に高い O<sub>2</sub> 親和性を持つことがわかった。しかし、側鎖にニトロフェノール基を導入した 4C<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>PhOHFe(2-MeIm) (Figure 4-5c)では、その O<sub>2</sub> および CO 親和性の著しい低下が観測された。彼らは、フェノールのヒドロキシ基のプロトンが遊離することで、ヒドロキシ基の酸素原子が負の極性効果として働くことにより、O<sub>2</sub>-Fe(II)および CO-Fe(II)結合を不安定化させたことを結論づけた。また、3C<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>PhOHFe(2-MeIm) (Figure 4-5e) は 3C<sub>2</sub>Fe(2-MeIm) (Figure 4-5d)とほぼ同じ O<sub>2</sub> 親和性を表すことから、導入したフェノール基が鉄に配位している O<sub>2</sub> と遠い位置にあり、あまり影響を与えない

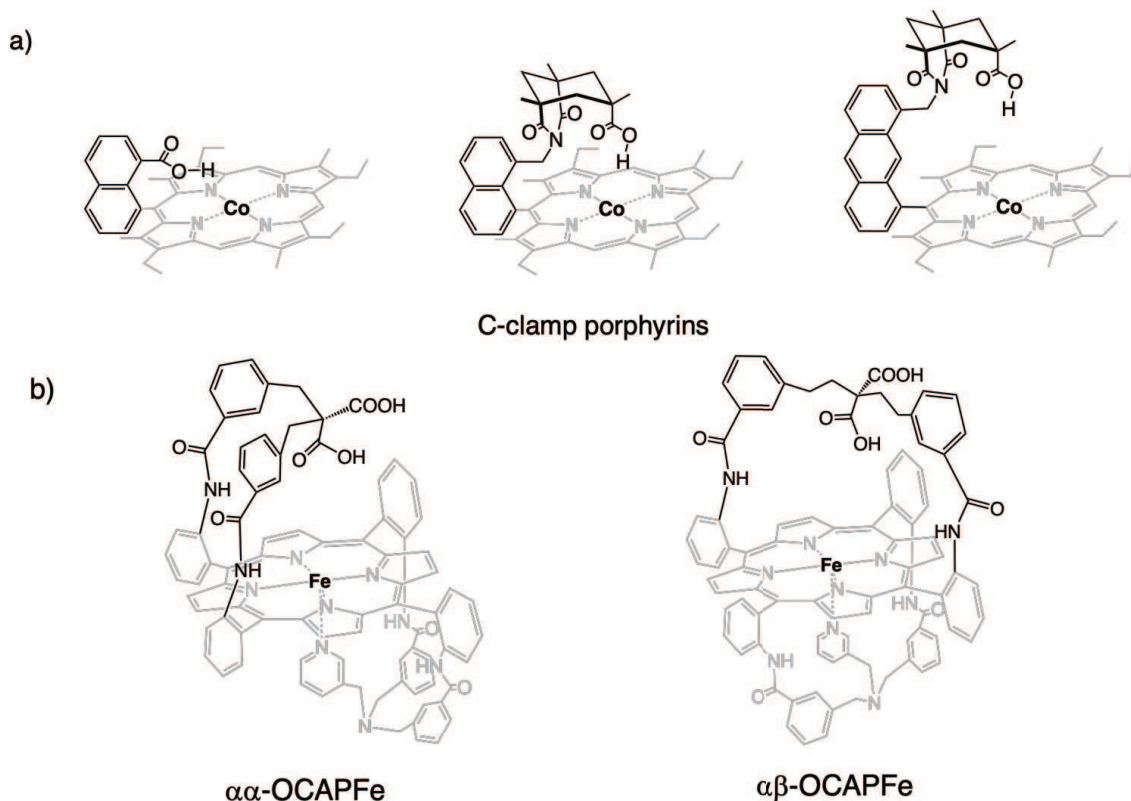


と報告した。これらの結果からも、H-bond ドナーと中心鉄の位置関係により、 $O_2$  および CO 親和性に大きな影響が与えられることが分かる。



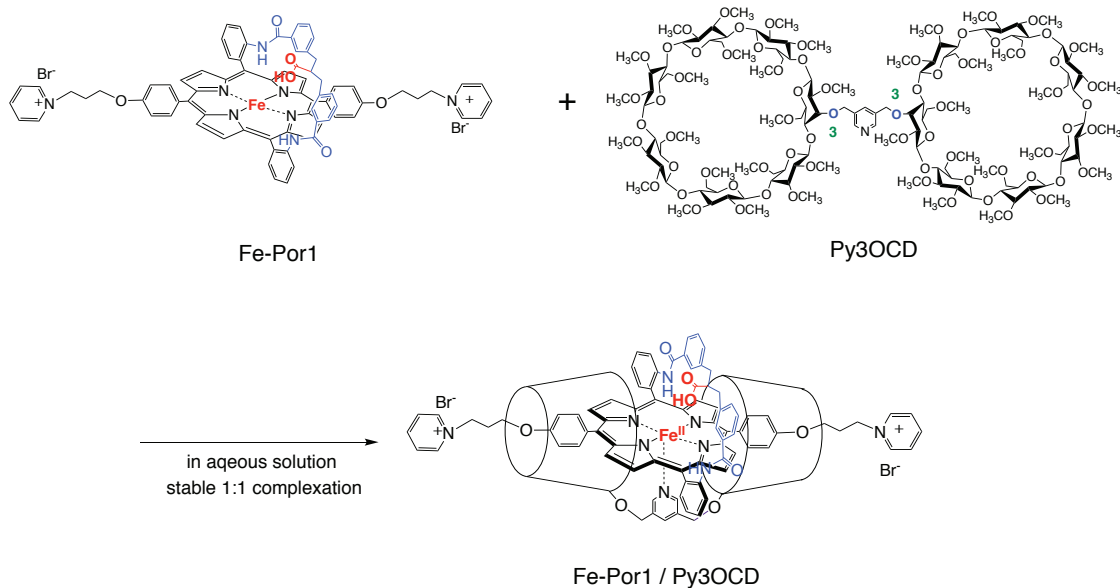
**Figure 4-5.** Structures of Tren-capped iron porphyrins synthesized by Boitrel et al.<sup>11)</sup>

Chang らはケンプ酸を用いて C-clamp ポルフィリンを設計し、遠位結合部位の H-bond ドナーとしてカルボン酸を張り出す位置に持ってきた(Figure 4-6a)<sup>12)</sup>。さらに、Boitrel らは、カルボン酸の適応性に焦点を当て、2つのシリーズのビスストラップポルフィリン(OCAPFe)を設計した(Figure 4-6b)。X線結晶構造解析の結果、分子内カルボン酸が鉄の頂点付近の位置におり、カルボン酸が H-bond ドナーとして働くことを強く支持した。また、カルボン酸が鉄(II)に配位した  $O_2$  と水素結合を形成することも、高い  $O_2$  親和性の結果によって裏付けられた<sup>13-17)</sup>。



**Figure 4–6.** (a) Structures of C-clamp porphyrins synthesized by Chang et al.<sup>12)</sup> (b) Structures of OCAPFe porphyrins synthesized by Boitrel et al.<sup>13–17)</sup>

以上の背景のように様々なストラップポルフィリンによる Mb モデル系が設計・合成されてきた。しかしこれらは全て禁水溶媒での検討であり、ストラップポルフィリンによる Mb モデル化を水系で実施した例はこれまでにない。本章では、ストラップ構造により遠位側に H-bond ドナーを構築することに焦点を当て、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) (Figure 4–7)を構築した。シクロデキストリン二量体と遠位ストラップによって作成された疎水性環境での突出したカルボン酸の機能について紫外可視吸収スペクトル、赤外吸収(IR)スペクトルおよびレーザーフラッシュフォトリス測定を用いて、O<sub>2</sub>/CO 結合に関する検討を行ったので、その詳細な結果について報告する。



**Figure 4-7.** Structure of Fe-Por1, Py3OCD, and the supramolecular complex Fe-Por1/Py3OCD.

## 2. 実験

### 2-1. 測定機器

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは日本電子 JNM-ECA500 フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を用いて測定し、 $\text{CDCl}_3$  および  $\text{DMSO}-d_6$  中での測定においては、テトラメチルシラン(TMS)を内部基準として用いた。直接質量分析(DART)法による質量スペクトルは AMR(株)社製 DART-SVP を用いて測定した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF)法による質量スペクトルは BRUKER autoflex speed を用いて測定し、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして、2,3,6-トリ-O-メチル- $\beta$ -シクロデキストリン( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z = 1451.68$ )および 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( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $m/z = 933.07$ )のモノアイソトピック質量を用いて質量校正を行った。蛍光スペクトルは島津製作所製 RF-5300PC を用いて測定した。赤外吸収(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。紫外可視吸収スペクトル(UV-vis スペクトル)は島津製作所製自記分光光度計 UV-2100、UV-2450 および島津製作所製フォトダイオードアレイ分光光度計 MultiSpec-1500 を用いて測定した。吸収スペクトルの測定に際しては、島津製作所電子冷熱式セルポジショナーTCC-260 型により温度制御し、温度が安定してから 5 分後に測定した。水溶液の pH は堀場製作所製 pH メーターM-12 および F-52 を用いて測定した。一酸化炭素の分圧調製は KOFLOC 社製 GM-4B ガス混合装置を用いて行った。レーザーフラッシュフォトリシス測定は Q-switched Nd:YAG レーザー(Surelite I, Continuum)を用い、Unisoku 社製レーザーフラッシュフォトリシスシステムを用いて測定を行った。

## 2-2. 試薬および合成

ストラップ鉄ポルフィリン(Fe-Por1)はフランスレンヌ第 1 大学の Boitrel 教授の研究室で合成されたものを使用した。Py3OCD<sup>18)</sup>およびカチオン性テトラアルキル鉄ポルフィリン FePC3Py (Fe-Por2)<sup>19)</sup>は文献記載の方法に従って合成した。合成した化合物については <sup>1</sup>H NMR、DART-MS および MALDI-TOF MS スペクトル測定によりその構造を確認した。合成に用いた試薬は市販品をそのまま使用し、無水溶媒が必要な場合は常法に従って予備乾燥後、蒸留したものを使用した。測定に用いた水は Yamato Auto Still Glass Model WG 250 により蒸留後、Simplicity Water Purification System にて精製したものを用いた。酸素(99.999%)、窒素(99.999%)、一酸化炭素ガス(1000 ppm)および一酸化炭素ガス(99.999%)は住友精化株式会社から購入したものをそのまま使用した。

## 2-3. 測定方法および試料調整

### 2-3-1. O<sub>2</sub> 親和性および CO 親和性測定

各包接錯体の酸素付加体を以下のように調整した。中心鉄(III)の各種ポルフィリンに対して Py3OCD を 1.2 当量加え、中心鉄(III)の met 体のストック溶液を調製した。met 体に過剰量のヒドロサルファイトナトリウム(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)を加え、中心鉄を二価へと還元した。過剰の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> およびその分解物を Sephadex G-25 を充填したゲルろ過カラムによって取り除き、これらのろ液を測定に用いるスト

ック溶液とした。なお、この一連の操作は常温常圧大気下において行ったため、精製後の溶液は空気中の酸素と結合した  $O_2$  体であった。 $O_2$  親和性測定の場合、一定の比で混合した  $CO$  と  $O_2$  の混合ガスを光路長 1 cm のガラス角形セル中に入れた 3 mL リン酸緩衝液 (pH 7.0)へ 10 分間バブリングし、そこへ  $O_2$  体を加え、さらに 1 分間混合ガスをバブリングした後、吸収スペクトルを測定した。 $Fe-Por1 / Py3OCD$  の  $CO$  親和性測定は、一定の比で混合した  $CO$  と  $N_2$  の混合ガスを光路長 1 cm のガラス角形セル中に入れた 3 mL リン酸緩衝液 (pH 7.0)へ 10 分間バブリングし、そこへ  $Na_2S_2O_4$  で還元した deoxy 体を加え、さらに 1 分間混合ガスをバブリングした後、吸収スペクトルを測定した。 $O_2$  親和性測定の場合、一定の比で混合した  $CO$  と  $O_2$  の混合ガスを  $O_2$  の場合と同様の手法で測定を行った。

### 2-3-2. レーザーフラッシュフォトリス測定

$O_2-Fe-Por1 / Py3OCD$  溶液に  $O_2$  もしくは  $CO$  バブリングし、 $O_2-Fe-Por1 / Py3OCD$  および  $Fe-Por1 / Py3OCD$  の  $CO$  付加体( $CO-Fe-Por1 / Py3OCD$ )を得た。光路長 1 cm のセルに加えた 2.5 mL の  $O_2-Fe-Por1 / Py3OCD$  および  $CO-Fe-Por1 / Py3OCD$  のリン酸緩衝液 (pH 7.0)に対してレーザー(532 nm、パルス幅 5 ns)を照射後、 $O_2-Fe-Por1 / Py3OCD$  および  $CO-Fe-Por1 / Py3OCD$  の 435 nm の吸光度の時間変化を観測した。レーザーによる  $O_2$  および  $CO$  解離後の再結合過程における吸光度の時間変化に対し、一次の反応速度式に従うカーブフィッティングを行い、擬一次速度定数  $k_{obs}^L$  を算出した。

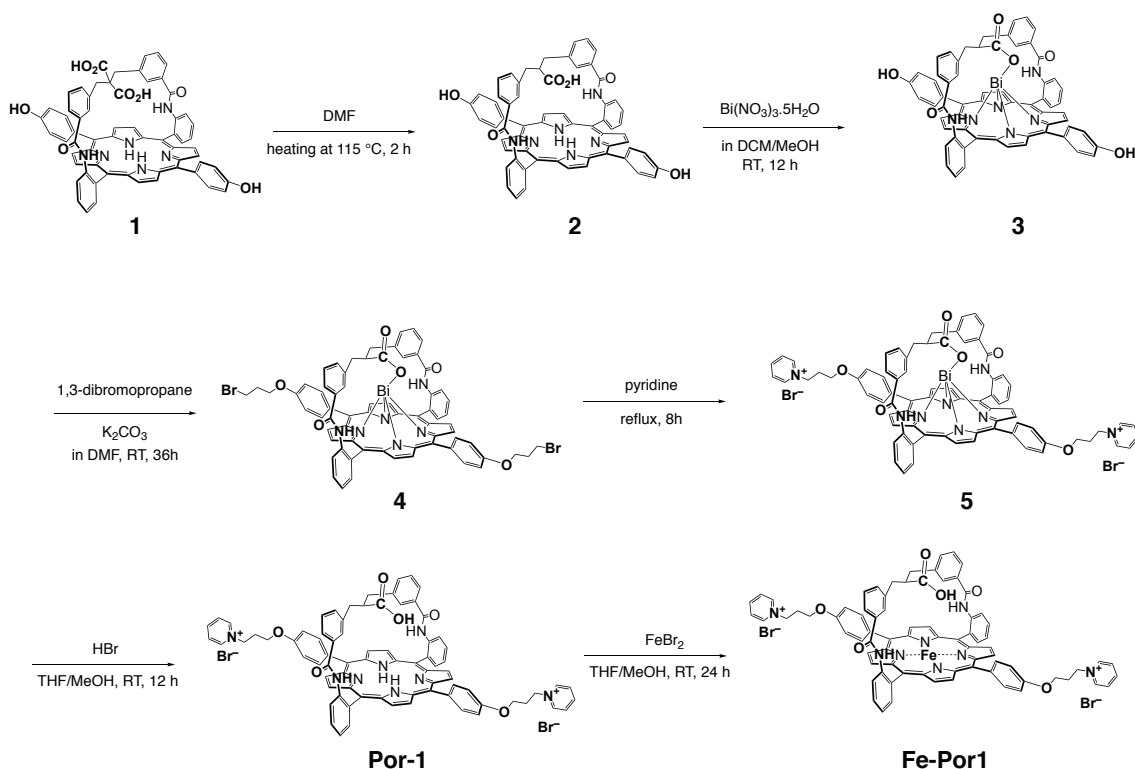
### 2-3-3. 赤外分光(IR)測定

met- $Fe-Por1 / Py3OCD$  溶液に過剰な還元剤  $Na_2S_2O_4$  で還元した後、得たストック溶液に  $CO$  ガスを 5 分間バブリングすることで  $CO-Fe-Por1 / Py3OCD$  溶液を得た。この溶液を液体気密セル(PIKE Technologies)を用いてそのまま IR 測定を行った。測定においては 25 °C、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)中で行い、バックグラウンド測定として 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)を用いた。その後、ストック溶液を入れ、サンプル測定を行った。

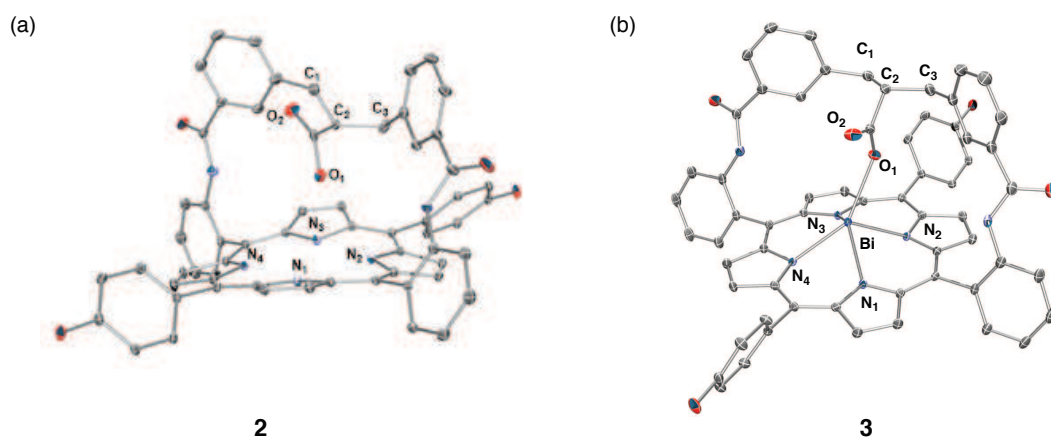
### 3. 結果および考察

#### 3-1. $\alpha$ -5,15-bis-({{2,2-(3,3-[2-(monocarboxylate)]-dibenzoyl-amido)-diphenyl}-10,20-bis-(4-{3-pyridiniumbromidepropoxyphenyl})-Fe(III)porphyrin (Fe-Por1) の合成

##### Scheme 4-1. Synthesis of Fe-Por1.



Fe-Por1 は Scheme 4-1 に従って合成を行った。化合物 **1** は Boitrel らによって以前に設計および合成された<sup>20)</sup>。化合物 **1** のジカルボン酸は DMF 中での加熱により脱炭酸反応が起こり、化合物 **2** を得た。次に、ビスマス配位させ、末端を 1,3-ジブロモプロパンによりブロモ化、その後ピリジニウム化を行った。最後に、臭化水素酸により脱金属することで、フリーベース体の Por1 を得た。臭化鉄により鉄を配位させ、最終生成物 Fe-Por1 を得た。



**Figure 4-8.** X-ray structure of complex **2** (a) and complex **3** (b).

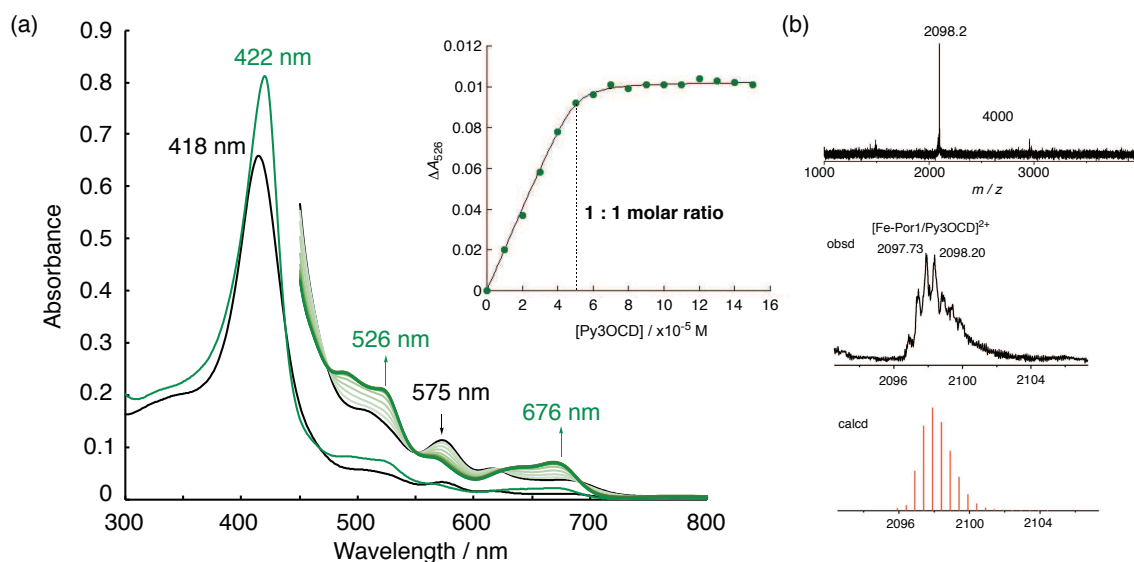
Figure 4-8 に化合物 **2** および化合物 **3** の X 線結晶解析の結果を示す。化合物 **2** (Figure 4-8a)により、ストラップに 1 つのカルボキシル基のみが存在することを確認した。Figure 4-8a ではポルフィリン平面の多少の歪みやストラップのねじれが見られたが、これは金属の配位により、そのコンフォメーションが変化した。化合物 **2** にビスマスを配位した化合物 **3** (Figure 4-8b)においてはストラップがポルフィリン平面に垂直に近い位置を維持していることが示した。さらに金属の配位により、ストラップのコンフォメーションが W-shape<sup>17)</sup>をとり、張り出したカルボキシル基をストラップにより構成された空洞内に配向させることで、カルボキシル基が金属に相互作用できる距離に存在することが明らかとなった。

### 3-2. Fe-Por1 と Py3OCD との錯形成

Fe-Por1 がシクロデキストリン二量体である Py3OCD との包接錯体(met-Fe-Por1/Py3OCD)を形成するののかについて検討を行った。セル内の Fe-Por1 濃度(0.05 mM)を一定に保ち、Py3OCD の濃度を変化させて 25 °C において吸収スペクトルを測定した。測定結果を Figure 4-9a に示す。ソーレー帯の $\lambda_{\max}$  は 418 nm から 422 nm へ、Q 帯は等吸収点を通りながら 526 nm、575 nm から 676 nm へとシフトした。このスペクトル変化は Fe-Por に対して Py3OCD を等モル量加えた時に飽和し、その後変化は見られなかった。また Figure 4-9a に示している 526 nm における滴定曲線から、結合定数は  $K = 1.35 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  と非常に大きいことが明らか

かとなった。このことから Fe-Por1 は Py3OCD と非常に安定な 1:1 の包接錯体 (met-Fe-Por1/Py3OCD) を形成することが明らかとなった。

さらに、Fe-Por1 と Py3OCD による 1:1 包接錯体の形成を ESI-MS スペクトル測定により確認した。Fe-Por1 に対して 1 当量の Py3OCD を加えた水溶液の ESI-MS スペクトル測定の結果を Figure 4-9b に示す。質量電荷比( $m/z$ ) 2098.2 に強いシグナルが観測された。このシグナルは 2 価の分子イオンに相当するものであった。同位体パターンも同位体パターンのシミュレーション結果とよく一致した。この結果からも Fe-Por1 と Py3OCD が水溶液中において非常に安定な 1:1 包接錯体 (met-Fe-Por1/Py3OCD) を形成することを示唆する結果となった。



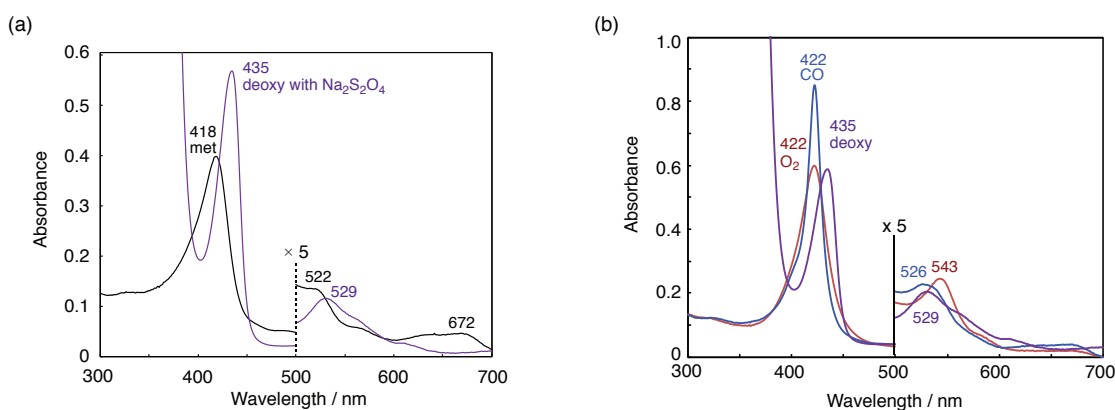
**Figure 4-9.** (a) UV-vis spectral changes of Fe-Por1 (0.05 mM) upon addition of Py3OCD in H<sub>2</sub>O at 25 °C. The inset shows a plot of the changes in absorbance of Fe-Por1 at 526 nm versus [Py3OCD]. (b) ESI-MS spectrum (positive mode) of met-Fe-Por1/Py3OCD in water and 25 °C.

### 3-3. Fe-Por1/Py3OCD および Fe-Por2/Py3OCD の O<sub>2</sub> および CO 結合挙動

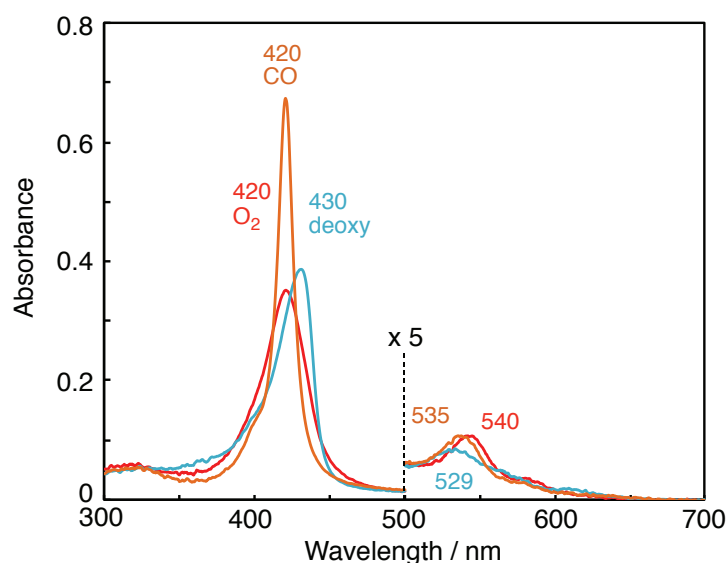
Fe-Por1/Py3OCD の鉄(III)の met 体(Figure 4-10a, black line)に対して還元剤である Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を加えて中心鉄を三価から二価へと還元した。この時の deoxy 体の吸収スペクトルはソーレー帯の $\lambda_{\max}$  は 435 nm、Q 帯の波長は 529 nm に観測された (Figure 4-10a, purple line)。その deoxy 体の溶液を Sephadex G-25 脱塩カラムを用



いて精製することで過剰の  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  を取り除き、空気中の  $\text{O}_2$  に触れさせることによって、新たな吸収帯( $\lambda_{\text{max}}$  : 422 nm, Q 帯: 543 nm)を持つ化学種を得た(Figure 4-10b, red line)。さらに同じ溶液へ CO を 1 分間バブリング後に吸収スペクトルを測定したとソーレー帯の強度は大きくなり、 $\lambda_{\text{max}}$  は 422 nm、Q 帯の波長は 530 nm に観測された(Figure 4-10b, blue line)。CO は  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ポルフィリンにのみ配位し、そのソーレー帯の吸収は非常にシャープであるということが知られている<sup>21)</sup>。したがって、CO をバブリングすることによって得られた化学種は、oxy 体の  $\text{O}_2$  が CO に置き換わった CO 体のものであることが示された。Fe-Por2/Py3OCD においても同様な実験を行い、そのスペクトルの  $\lambda_{\text{max}}$  およびソーレー帯の波形は、これまでに報告されている hemoCD3 の pH 7.0 リン酸緩衝溶液中における oxy 体、deoxy 体および CO 付加体のスペクトルとはよく一致している(Figure 4-11)。

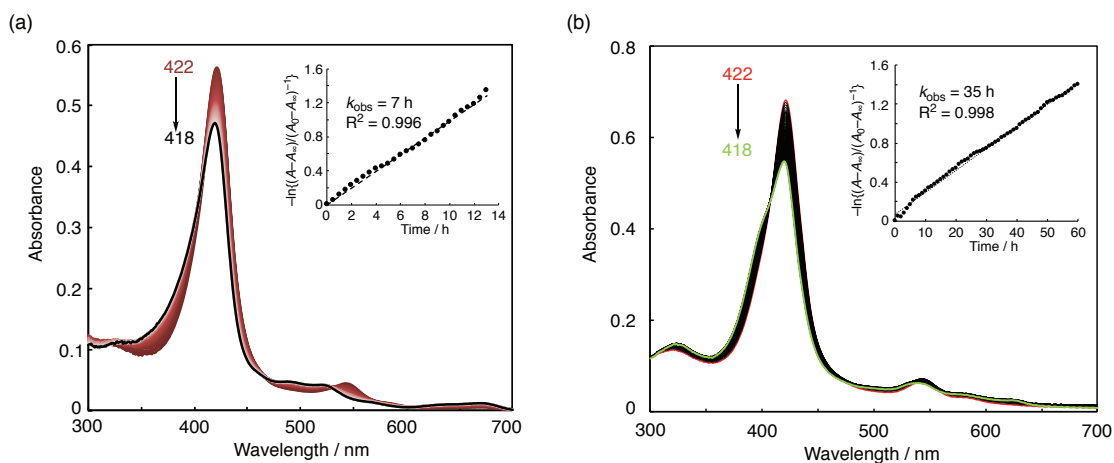


**Figure 4-10.** (a) UV-vis spectra of the  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Por1/Py3OCD complex in the met (black) and deoxy (purple) forms in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. (b) UV-vis spectra of the  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Por1/Py3OCD complex in the deoxy (purple), oxy (red) and CO (blue) forms in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.



**Figure 4–11.** UV-vis spectra of the Fe<sup>II</sup>-Por2 / Py3OCD complex in the deoxy (purple), oxy (red) and CO (blue) forms in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

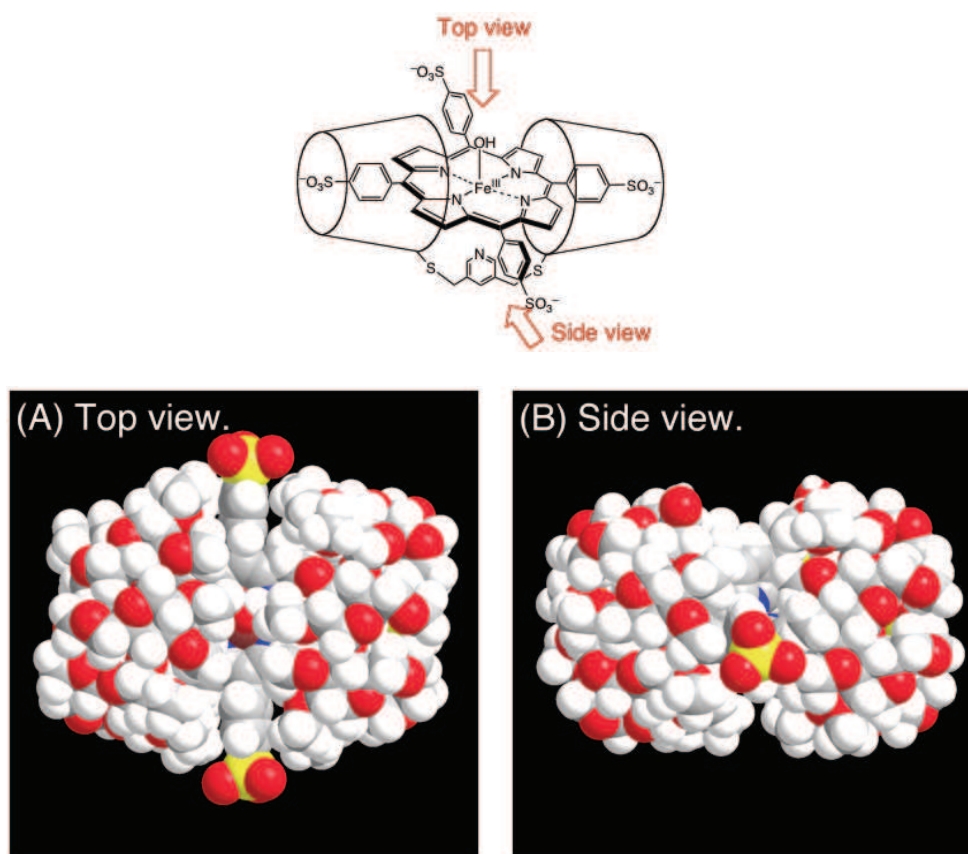
次に、Fe-Por1 / Py3OCD および Fe-Por2 / Py3OCD が安定な酸素錯体を形成するかどうかを調べるために、25 °C において pH 7.0 でそれぞれの oxy 体の自動酸化速度測定を行った(Figure 4–12)。時間の経過とともにスペクトルは等吸収点を通りながら変化し、ソーレー帯の $\lambda_{\max}$ は 422 nm から 418 nm へと変化した。422 nm における吸光度変化に対し、一次の反応速度式に基づく解析を行った結果、oxy-Fe-Por1 / Py3OCD の半減期  $t_{1/2}$  ( $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}}$ )は 7 h、oxy-Fe-Por2 / Py3OCD の半減期は 35 h と求めた。この一連の操作で、Py3OCD のピリジンが中心鉄に配位し、中心鉄が酸化されることなく、O<sub>2</sub> および CO に可逆的に結合できることが示唆された。



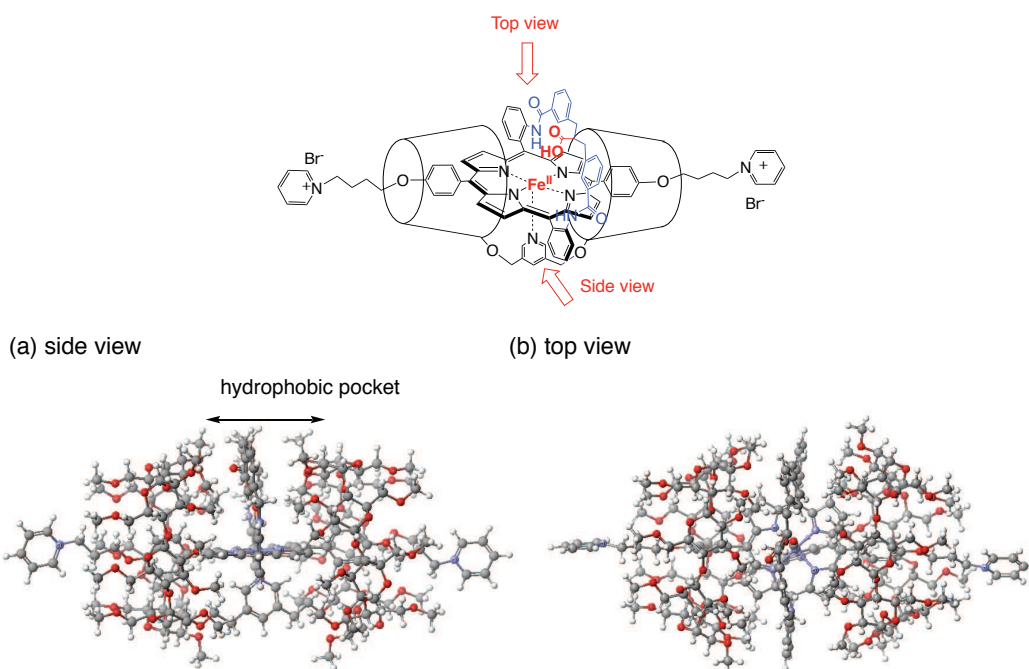
**Figure 4–12.** (a) UV-vis spectral changes in autoxidation of the oxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD complex in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. Scans were made at 30min intervals. The first-order plot for the absorbance change at 422 nm. (b) UV-vis spectral changes in autoxidation of the oxy-Fe<sup>II</sup>-Por2/Py3OCD complex in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. Scans were made at 60min intervals. The first-order plot for the absorbance change at 422 nm.

oxy-hemoCD3 は水溶液中で非常に安定な酸素錯体を形成している ( $t_{1/2} = 50$  h, 25 °C, in pH 7.0 リン酸緩衝液、第二章に参照)。Kano らは、全ての水酸基を *O*-メチル化した  $\beta$ -シクロデキストリン (TMe- $\beta$ -CD) がアニオン性鉄ポルフィリンである FeTPPS と水中で極めて安定な 2:1 包接錯体が生成し、FeTPPS 末端のスルホナト基 ( $\text{SO}_3^-$ ) が重要な役割を果たしていることを報告した<sup>22-24</sup>。さらに、シクロデキストリン二量体である Py3CD と Fe<sup>III</sup>TPPS の 1 : 1 包接錯体の分子構造を解析したところ (Figure 4–13)、hemoCD 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外部の水との接触が著しく妨げられていることがわかった<sup>24</sup>。したがって、水分子がシクロデキストリンにより構築された疎水ポケット内に侵入しにくく、自動酸化時間が長いと明らかになった。しかし、oxy-Fe-Por2/Py3OCD は oxy-hemoCD3 よりは不安定であった。hemoCD3 の場合では、*O*-メチル化 $\beta$ -シクロデキストリンの疎水性空洞は Fe<sup>III</sup>TPPS の  $\text{SO}_3^-$  を貫通して包接するため、親水基である  $\text{SO}_3^-$  が *O*-メチル化 $\beta$ -シクロデキストリンの解離を抑えるストッパーとなってその包接を強固に保ち、中心鉄近傍に極めて安定な疎水場を構築する<sup>24</sup>。一方、Fe-Por2 の側鎖のアルキ

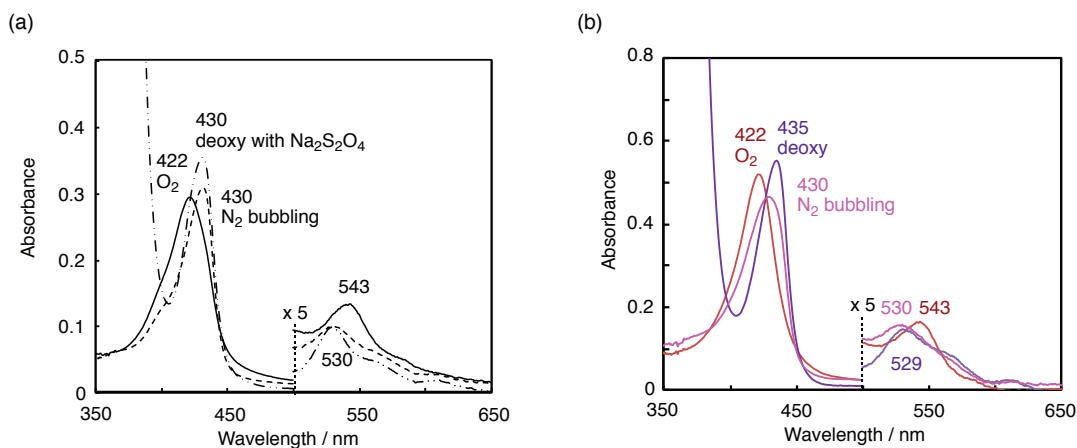
ルピリジニウムは *O*-メチル化 $\beta$ -シクロデキストリンの疎水性空洞を貫通して包接し、アルキル鎖は  $\text{SO}_3^-$  のストッパー機能ができないため、oxy-Fe-Por2/Py3OCD の疎水ポケットの隙間が広がることを考えられる。oxy-Fe-Por1/Py3OCD では、末端のアルキルピリジニウムと Fe-Por1 の遠位ストラップにより、疎水ポケットの隙間が oxy-hemoCD よりも広がる可能性がある。実際 Fe-Por1/Py3OCD の構造を MM3 計算によって推測したところ、遠位ストラップにより、疎水ポケットの隙間が広まり、水分子からの求核攻撃を受けやすくなっていることが示唆された(Figure 4-13 および Figure 4-14)。また、Fe-Por1/Py3OCD の親水性カルボキシ基も水分子をバルク相から中心鉄(II)に引き寄せ、そのことでも oxy 体の自動酸化を促進することも考えられる。oxy-Fe-Por1/Py3OCD は、遠位ストラップのない他の  $\text{O}_2$  付加体よりも速く自動酸化されることが判明した。しかしながら、水溶液中の  $\text{O}_2$  および  $\text{CO}$  結合親和性を決定するためには十分な寿命を有する。



**Figure 4-13.** Energy-minimized structure of met-hemoCD1 obtained from MM3 calculation using a SCIGRESS 2.2.

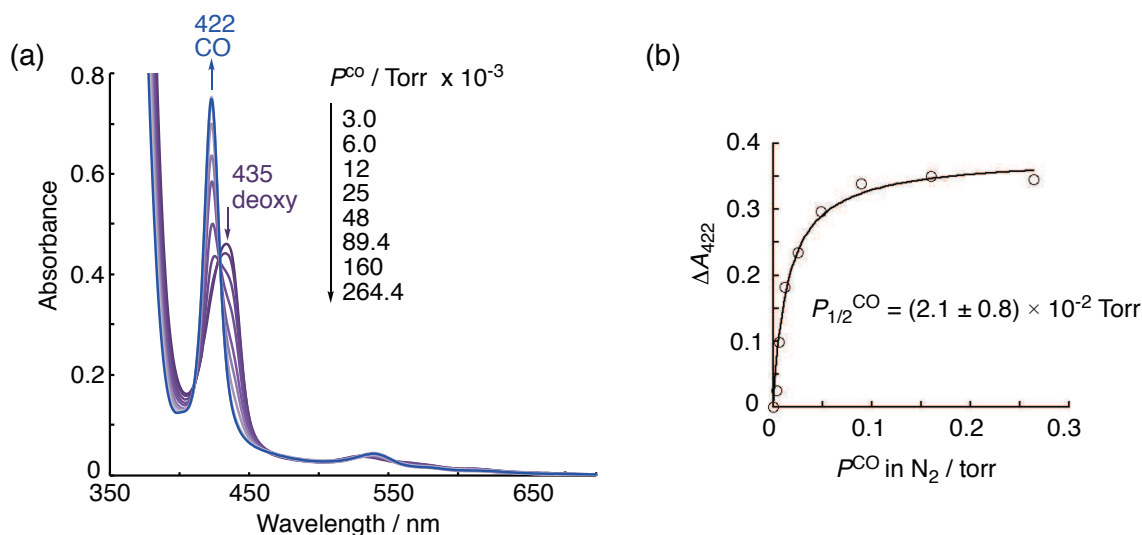


**Figure 4-14.** The 3D model structure of CO-FePor1/Py3OCD was obtained using CONFLEX/MM3 (extensive search) calculations in the Scigress version 2.2.1 software program (Fujitsu, Japan).



**Figure 4-15.** (a) UV-vis spectra of the hemoCD3 complex in the deoxy with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , oxy forms and the oxy-hemoCD3 change to the line of  $\text{N}_2$  bubbling after bubbling  $\text{N}_2$  gas into the oxy-form solution in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. (b) UV-vis spectra of the  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Por1/Py3OCD complex in the deoxy (purple), oxy (red) forms and the oxy- $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Por1/Py3OCD (red) change to the pink line after bubbling  $\text{N}_2$  gas into the oxy-form solution in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

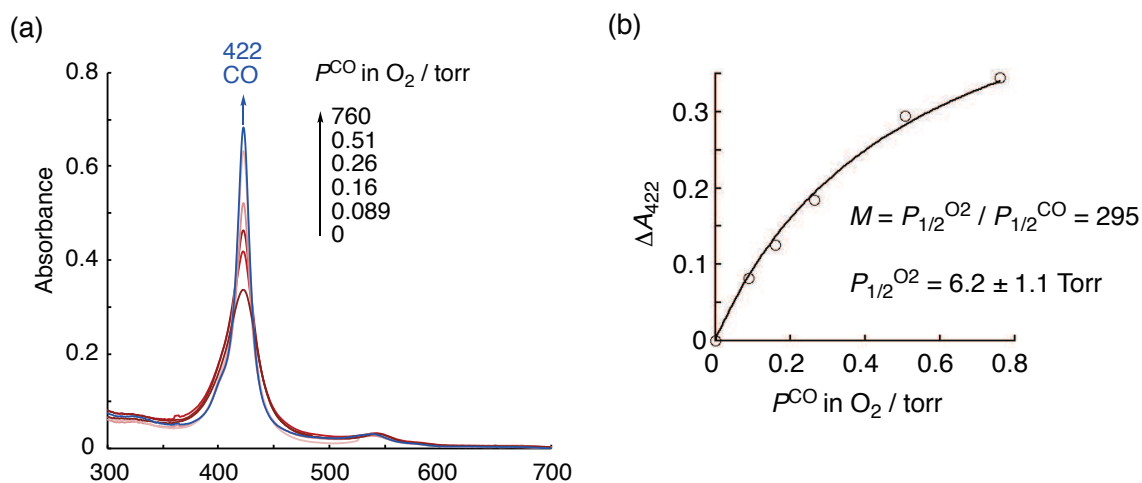
また、ガス交換の実験において hemoCD3 の吸収スペクトルは、N<sub>2</sub> ガスにバブリングした後、速やかに deoxy 体( $\lambda_{\max} = 430 \text{ nm}$ )に変化した(Figure 4-15a)。しかし oxy-Fe-Por1/Py3OCD の場合、N<sub>2</sub> ガスバブリングによって疎水ポケットから O<sub>2</sub> を完全に除去することができなかった(Figure 4-15b)。oxy-Fe-Por1/Py3OCD の溶液に N<sub>2</sub> ガスをバブリングすると、oxy 体の 422nm での吸収極大は 430nm へと変化した。これは、過剰な Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を含む deoxy 体とは異なる波長であった( $\lambda_{\max} = 435 \text{ nm}$ ) (Figure 4-15b)。中心鉄(II)に配位した O<sub>2</sub> は、疎水ポケット内の配位した O<sub>2</sub> への水素結合もしくは極性相互作用によって O<sub>2</sub> が疎水ポケット内にトラップされていると考えられる。この違いは、後述する oxy-Fe-Por1/Py3OCD の低い酸素解離速度  $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  と一致している。



**Figure 4-16.** (a) UV-vis spectral changes of deoxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD as a function of the CO partial pressure ( $P^{\text{CO}}$ ) in N<sub>2</sub> with an excess amount of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. (b) the equilibrium curves for CO binding to deoxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD.

Fe-Por1/Py3OCD の CO 親和性( $P_{1/2}^{\text{CO}}$ )は、還元剤である Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 存在下において測定した(Figure 4-16a)。一定の比で CO と N<sub>2</sub> を混合したガスを導入して飽和させた pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液に Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> で還元した deoxy-Fe-Por1/Py3OCD を添加し、添加後さらに 3 分間混合ガスを吹き込んだ後にセルを密封して吸収スペクトルを測定した。CO 分圧の上昇に伴って等吸収点を通りな

がら deoxy 体のソーレー帯( $\lambda_{\max} = 435 \text{ nm}$ )から CO 体のソーレー帯( $\lambda_{\max} = 422 \text{ nm}$ )へと変化した(Figure 4-16a)。種々の CO 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( $\Delta A$ )を用いて計算した錯形成率を CO 分圧に対してプロットしたものを Figure 4-16b に示す。Figure 4-16b において得られた CO の滴定曲線から、 $P_{1/2}^{\text{CO}}$ を求めたところ、 $P_{1/2}^{\text{CO}} = (2.1 \pm 0.8) \times 10^{-2} \text{ Torr}$ となった。 $M$  値および酸素親和性 ( $P_{1/2}^{\text{O}_2}$ )は一定の比で CO と  $\text{O}_2$  を混合したガスを導入して飽和させた pH 7.0 の 0.05 M リン酸緩衝液で  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  により還元し、ゲルろ過カラムにより精製した Fe-Por1/Py3OCD のストック溶液を希釈した後、さらに 3 分間混合ガスを吹き込んだ後にセルを密封して吸収スペクトルを測定した。CO 分圧の上昇に伴って等吸収点を通りながら oxy 体のソーレー帯( $\lambda_{\max} = 422 \text{ nm}$ )から CO 体のソーレー帯( $\lambda_{\max} = 422 \text{ nm}$ )へと変化した(Figure 4-17a)。種々の CO 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( $\Delta A$ )を用いて計算した錯形成率を CO 分圧に対してプロットしたものを Figure 4-17b に示す。



**Figure 4-17.** (a) UV-vis spectral changes of oxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD as a function of the CO partial pressure ( $P^{\text{CO}}$ ) in in  $\text{O}_2\text{-N}_2$ . (b) the equilibrium curves for CO binding to oxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD.

O<sub>2</sub>/CO の相対親和性( $P_{1/2}^{O_2}/P_{1/2}^{CO}$ )を表す  $M$  値は、次のように  $P_{1/2}^{O_2}$  と  $P_{1/2}^{CO}$  から得られた  $M$  値で表される。

$$P_{1/2}^{O_2} = \{[\text{deoxy-form}] P^{O_2}\}/[\text{oxy-form}] \quad (4-1)$$

$$P_{1/2}^{CO} = \{[\text{deoxy-form}] P^{CO}\}/[\text{CO-form}] \quad (4-2)$$

$$M = P_{1/2}^{O_2}/P_{1/2}^{CO} = \{[\text{CO-form}] P^{O_2}\}/\{[\text{oxy-form}] P^{CO}\} \quad (4-3)$$

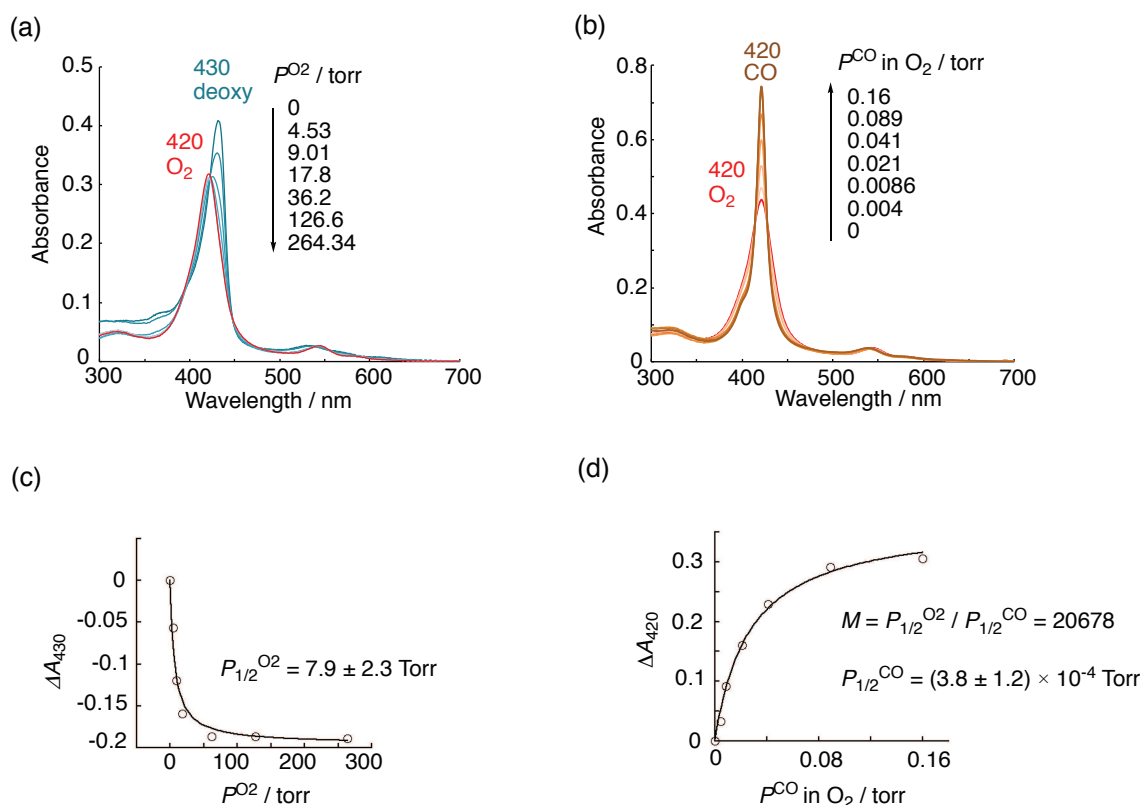
$P_{1/2}^{CO}$  の定義は deoxy 体と CO 体が同量存在する際の CO 分圧である。しかし今回の測定では CO に対する親和性が高いために、oxy 体から CO 体への変化を観測し、 $P_{1/2}^{CO}$  の値を用いることにより、 $P_{1/2}^{O_2}$  の値を決定した。ここで今回の O<sub>2</sub> 親和性の測定は oxy 体から CO 体の変化を観測したために、Figure 4-17 の(b) の曲線より式(4-1)を用いて求められる  $P_{1/2}^{O_2}$  の値は、oxy 体と CO 体が同量存在する際の CO 分圧となる。まずこの CO 分圧とその時の O<sub>2</sub> 分圧から  $M$  値を式(4-3)より、求めることができる。 $M$  値は 295 と求まった。なお、反応系においてセル内は O<sub>2</sub> および CO ガスで満たされているために、この時の O<sub>2</sub> 分圧は標準気圧から CO 分圧を引いたものと考えた。また式(4-3)に  $M$  値および求めた  $P_{1/2}^{CO}$  の結果を代入することにより、 $P_{1/2}^{O_2}$  の結果を算出した。25 °Cにおいて  $P_{1/2}^{O_2} = 6.3 \pm 1.1$  torr と決定した。Fe-Por2/Py3OCD の酸素および一酸化炭素親和性測定は第二章 3-4 項で行った実験と同様な手順で測定を行った。様々な O<sub>2</sub> および CO 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( $\Delta A$ )を O<sub>2</sub> および CO 分圧( $P^{O_2}$  および  $P^{CO}$ )に対してプロットした。pH 7.0 リン酸緩衝溶液中 25 °Cで種々の O<sub>2</sub> および CO 分圧において吸収スペクトルを測定した結果を Figure 4-18 に示す。その結果、Fe-Por2 / Py3OCD の酸素親和性  $P_{1/2}^{O_2}$  を  $7.9 \pm 2.3$  torr、 $P_{1/2}^{CO}$  を  $(3.8 \pm 1.2) \times 10^{-4}$  torr と決定した。得られた Fe-Por1 / Py3OCD および Fe-Por2 / Py3OCD の  $P_{1/2}^{CO}$ 、 $P_{1/2}^{O_2}$  および  $M$  値を Table 4-1 に示す。



**Table 4–1.** The O<sub>2</sub> and CO binding affinities ( $P_{1/2}L$ , L = O<sub>2</sub> or CO, Torr) and the O<sub>2</sub>/CO selectivity ( $M$ ) of Fe-Por / CD complexes at 25 °C.

	$P_{1/2}^{O_2}$ Torr	$P_{1/2}^{CO}$ Torr	$M$
FeP-1/Py3OCD <sup>a,c</sup>	$6.3 \pm 1.1$	$(2.1 \pm 0.8) \times 10^{-2}$	300
FeP-2/Py3OCD <sup>a,c</sup>	$7.9 \pm 2.3$	$(3.8 \pm 1.2) \times 10^{-4}$	20700
hemoCD3 <sup>a,d</sup>	18	$5.6 \times 10^{-4}$	32100
Glu-hemoCD <sup>b,e</sup>	$11 \pm 2$	$(4.9 \pm 1.0) \times 10^{-3}$	2300

<sup>a</sup>phosphate buffer (pH 7.0), 25 °C, <sup>b</sup>phosphate buffer saline (pH 7.4), 25 °C, <sup>c</sup>this work, <sup>d</sup>Ref (29), <sup>e</sup>Ref (1)

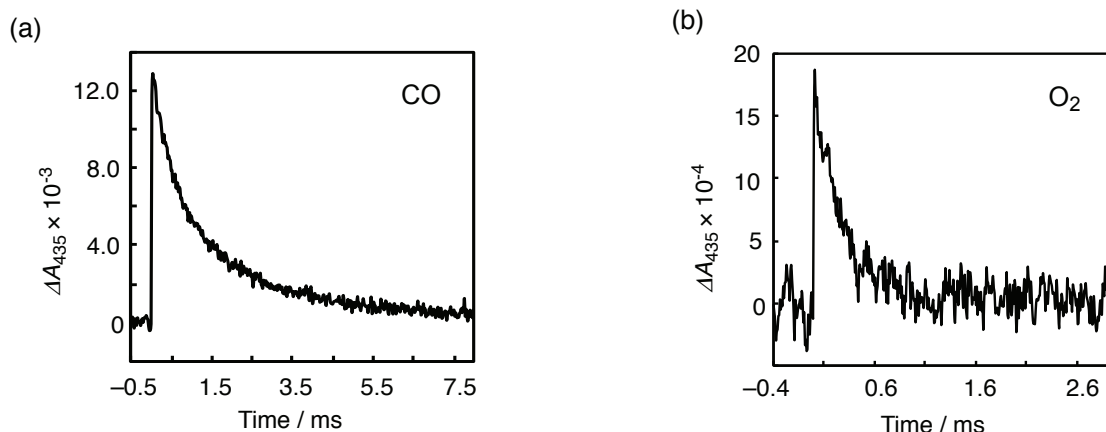


**Figure 4–18.** (a) UV-vis spectral changes of deoxy-Fe<sup>II</sup>-Por2/Py3OCD as a function of the CO partial pressure ( $P^{CO}$ ) in N<sub>2</sub> with an excess amount of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (a) and of oxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD as a function of the CO partial pressure ( $P^{CO}$ ) in O<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> (b) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C and the equilibrium curves for CO binding to deoxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD (c) and for CO binding to oxy-Fe<sup>II</sup>-Por1/Py3OCD (d).

Fe-Por1/Py3OCD の  $P_{1/2}^{O_2}$  の値は 6.3 Torr であり、遠位ストラップのない hemoCD3 および Fe-Por2/Py3OCD よりも  $O_2$  親和性が高い。以前の研究により、カルボキシ基を持つストラップポルフィリンである  $\alpha\beta$ -OCAPFe カルボン酸をジエチルエステル( $\alpha\beta$ -OCAEPFe)に変化したところ、その  $O_2$  親和性は約 100 倍低下したことが報告された<sup>17)</sup>。Boitrel らは、分子内でカルボン酸が鉄(II)に配位している  $O_2$  と水素結合を形成することで、高い  $O_2$  親和性を示すと主張している<sup>17)</sup>。しかし、彼らは OCAPFe の CO 親和性に関する検討を行なわれなかった。一方、Fe-Por1 / Py3OCD の  $P_{1/2}^{CO}$  は、今まで報告した Fe-Por/CD 超分子錯体よりも大幅に低くなっている。遠位ストラップのない Fe-Por2 / Py3OCD と比較すると、 $P_{1/2}^{CO}$  が約 50 倍となった。これらの結果に対する考察は、次項における Fe-Por2/Py3OCD の  $O_2$  および CO 結合( $k_{on}$ )および解離速度定数( $k_{off}$ )測定の結果とその考察を共に 3-3 項にて述べる。

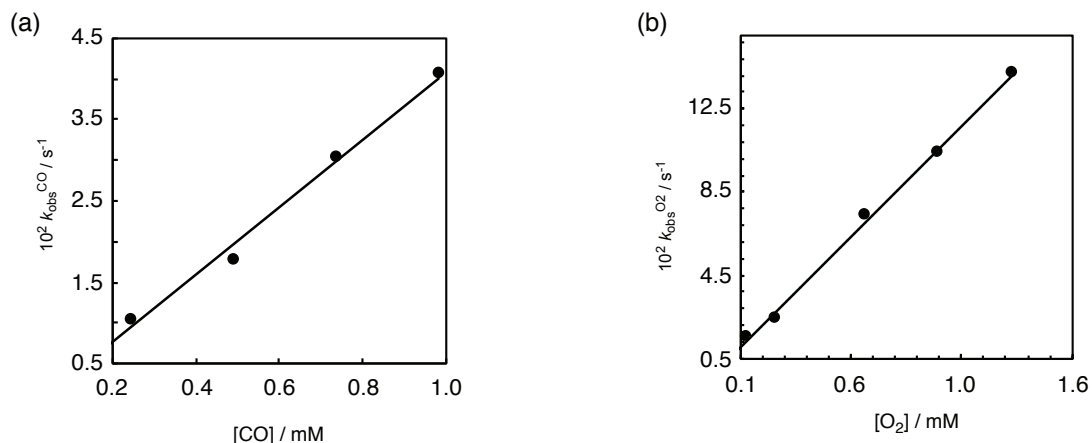
#### 3-4. Fe-Por1/Py3OCD, Fe-Por2/Py3OCD および hemoCD3 の $O_2$ および CO 結合速度

Fe-Por1/Py3OCD, Fe-Por2/Py3OCD および hemoCD3 の  $O_2$  および CO 結合( $k_{on}$ )および解離速度定数( $k_{off}$ )をレーザーフラッシュフォトリス法によって決定した。実験手順および解析方法は第三章 3-1-4 項で示した実験と同様に行った。CO-Fe-Por1/Py3OCD および oxy-Fe-Por1 / Py3OCD を含む pH 7.0 のリン酸緩衝液に対し、532 nm のレーザーを照射した時の 435 nm の吸光度の時間変化を Figure 4-19a および 4-19b に示す。



**Figure 4-19.** (a) The time courses for CO association with Fe-Por1 / Py3OCD generated by laser flash photolysis of CO-Fe-Por1 / Py3OCD in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. (b) The time courses for O<sub>2</sub> association with Fe-Por1 / Py3OCD generated by laser flash photolysis of O<sub>2</sub>-Fe-Por1 / Py3OCD in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. The reaction were carried out by using a laser flash photolysis system with Nd : YAG laser (532 nm).

レーザー照射後の吸光度の時間変化に対して一次の反応速度式に基づく非線形最小自乗法によるカーブフィッティングにより、リガンドの結合に対する擬一次速度定数  $k_{\text{obs}}^{\text{L}}$  を求めた。第3章の式(3-4)より、溶液のCOもしくはO<sub>2</sub>濃度を変化させてそれぞれのCOもしくはO<sub>2</sub>濃度における  $k_{\text{obs}}^{\text{L}}$  を決定し、 $k_{\text{obs}}^{\text{O}_2}$  対[CO]プロット(Figure 4-20a)における近似曲線の傾きから  $k_{\text{on}}^{\text{CO}}$  を決定し、 $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  は式(3-5)から算出した。同様に  $k_{\text{obs}}^{\text{O}_2}$  対[O<sub>2</sub>]プロット(Figure 4-20b)における近似曲線の傾きから  $k_{\text{on}}^{\text{O}_2}$  を決定し、 $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  は式(3-5)よりから算出した。以上の解析の結果、 $k_{\text{on}}^{\text{O}_2}$  および  $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  はそれぞれ  $1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  および  $1.15 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$  と決定することができた。また、 $k_{\text{on}}^{\text{CO}}$  および  $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  はそれぞれ  $4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  および  $0.11 \text{ s}^{-1}$  と決定することができた。



**Figure 4–20.** (a) Plot of the observed rate constant,  $k_{\text{obs}}^{\text{CO}}$ , for dioxygen association with Fe-Por1/Py3OCD versus [CO]. Each rate was followed after CO–Fe-Por1/Py3OCD was dissociated by laser flash photolysis. (b) Plot of the observed rate constant,  $k_{\text{obs}}^{\text{O}_2}$ , for dioxygen association with Fe-Por1/Py3OCD versus [O<sub>2</sub>]. Each rate was followed after oxy–Fe-Por1 / Py3OCD was dissociated by laser flash photolysis.

Fe-Por2/Py3OCD および hemoCD3 についても、同様な測定を行い、解析を行った結果を Table 4–2 に示す。Fe-Por1 / Py3OCD の  $k_{\text{on}}^{\text{O}_2, \text{CO}}$  の値は、遠位ストラップのない Fe-Por/CD よりも小さい値となった。これは、ストラップの立体障害が原因である可能性が考えられる。Collman らはピケットフェンスポルフィリンの遠位側に立体的にベンゼン環を導入したポケットポルフィリンおよび遠位サイトに立体障害としてアルキル鎖ストラップを導入したハイブリッドポルフィリンの  $k_{\text{on}}^{\text{O}_2, \text{CO}}$  を測定した結果、ポケットポルフィリンおよびハイブリッドポルフィリンの  $k_{\text{on}}^{\text{O}_2, \text{CO}}$  はピケットフェンスポルフィリンより低下したことがわかった<sup>25–27</sup>。単純なアルキル鎖でも、ガス分子の結合に対して立体障害を示すことから、今回の遠位ストラップもガス分子に立体障害を示すことが十分に考えられる。

**Table 4–2.** Kinetic and thermodynamic parameters for O<sub>2</sub> and CO bindings of Fe-Por / CD complexes at 25 °C.

	$k_{\text{on}}^{\text{O}_2}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{O}_2}$ (M <sup>-1</sup> )	$P_{1/2}^{\text{O}_2}$ (Torr)	$k_{\text{on}}^{\text{CO}}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{off}}^{\text{CO}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{CO}}$ (M <sup>-1</sup> )	$P_{1/2}^{\text{CO}}$ Torr
FeP-1/Py3OCD <sup>a,b</sup>	$1.1 \times 10^7$	115	$9.6 \times 10^5$	$6.3 \pm 1.1$	$4.2 \times 10^6$	0.11	$3.8 \times 10^7$	$(2.1 \pm 0.8) \times 10^{-2}$
FeP-2/Py3OCD <sup>a,b</sup>	$9.8 \times 10^7$	$1.3 \times 10^3$	$7.5 \times 10^4$	$7.9 \pm 2.3$	$3.4 \times 10^7$	0.016	$2.1 \times 10^9$	$(3.8 \pm 1.2) \times 10^{-4}$
hemoCD3 <sup>a,b,c</sup>	$2.0 \times 10^8$	$5.3 \times 10^3$	$3.8 \times 10^4$	18	$2.6 \times 10^7$	0.018	$1.4 \times 10^9$	$5.6 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup>phosphate buffer (pH 7.0), 25 °C, <sup>b</sup>this work, <sup>c</sup>Ref (29).

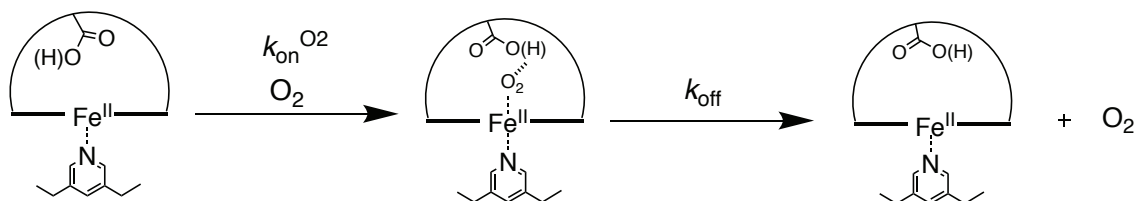
また Fe-Por1/Py3OCD での O<sub>2</sub> の解離速度( $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$ )は遠位ストラップのない Fe-Por/CD と比べて著しく低下した。天然 Mb の場合は、遠位ヒスチジン(His64)を非水素結合残基(mutant H64L)に変更すると、O<sub>2</sub> の解離速度定数( $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$ )が 100 倍以上大きくなることから、天然型の小さな  $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  は遠位 HisE7 による O<sub>2</sub> への水素結合に起因するものと考えられる(Table 4–3)<sup>30</sup>。

**Table 4–3.** Kinetic and thermodynamic parameters for O<sub>2</sub> and CO bindings of hemoproteins and model compounds.

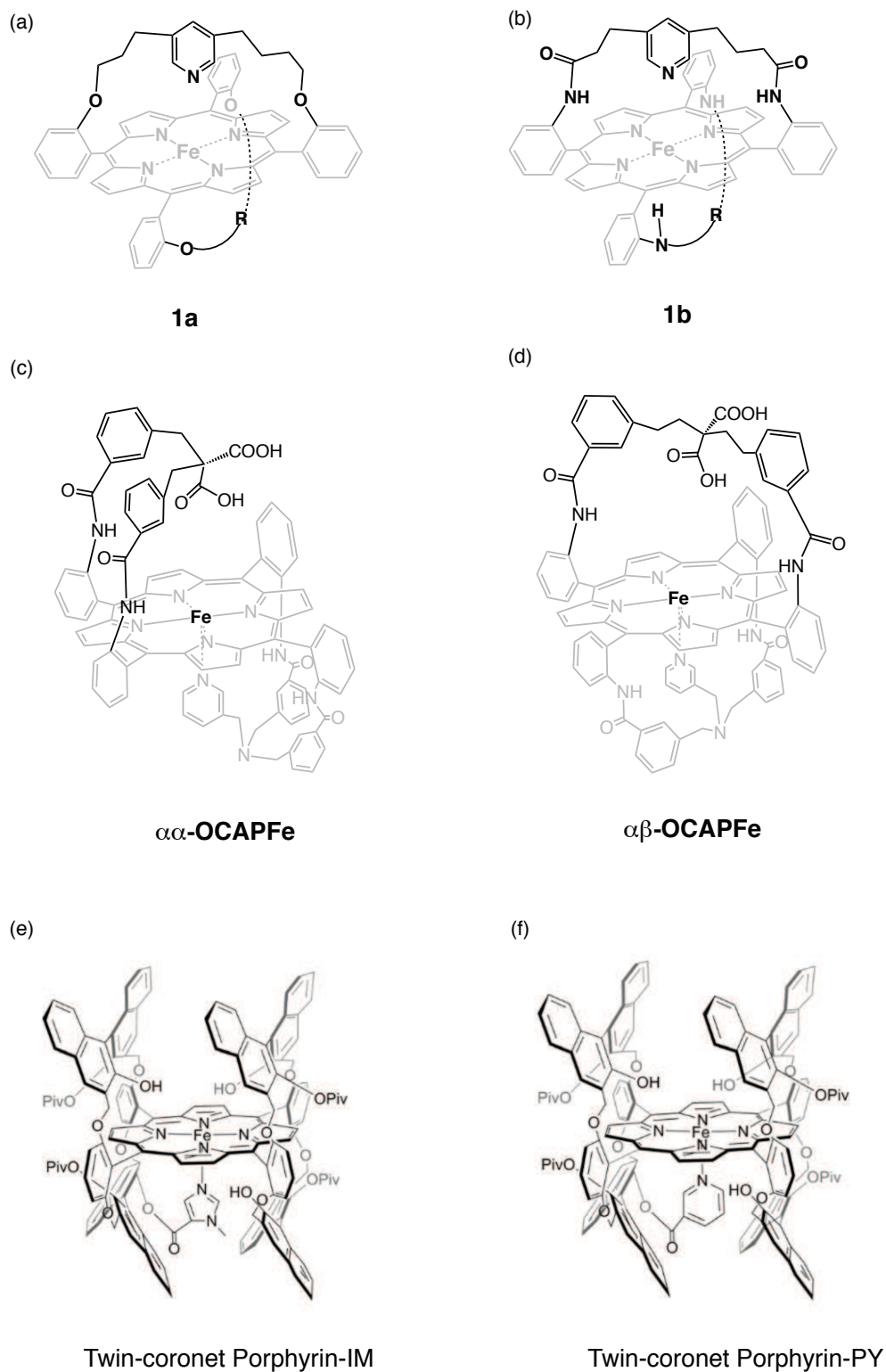
	$k_{\text{on}}^{\text{O}_2}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{on}}^{\text{CO}}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{off}}^{\text{CO}}$ (s <sup>-1</sup> )	conditions
Mb (sperm whale)	$1.4 \times 10^7$	12	$5.1 \times 10^5$	0.019	phosphate buffer (pH 7.0), 25 °C
mutant H64L	$2.28 \times 10^8$	$3.2 \times 10^3$	$3.0 \times 10^7$	0.061	PBS (pH 7.4), 25 °C
mutant L29F	$2.6 \times 10^7$	1.5	$2.3 \times 10^5$	0.016	PBS (pH 7.4), 25 °C
1a	$3.0 \times 10^8$	$4.0 \times 10^4$	$6.8 \times 10^7$	0.069	toluene, 25 °C
1b	$3.6 \times 10^8$	$5.0 \times 10^3$	$3.5 \times 10^7$	0.03	toluene, 25 °C
$\alpha\alpha$ -OCAPFe	$9.0 \times 10^6$	$< 1 \times 10^3$			benzene, 25 °C
$\alpha\beta$ -OCAPFe	$> 1.0 \times 10^8$	$> 1.3$			benzene, 25 °C
TCP-IM	$4.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^3$	$2.1 \times 10^7$	0.23	toluene, 25 °C
TCP-PY	$2.7 \times 10^7$	$2.5 \times 10^3$	$1.6 \times 10^7$	3.2	toluene, 25 °C
hemoCD1	$4.7 \times 10^7$	800	$1.3 \times 10^7$	$2.5 \times 10^{-4}$	phosphate buffer (pH 7.0), 25 °C
FeP-1/Py3OCD	$1.1 \times 10^7$	115	$4.2 \times 10^6$	0.11	phosphate buffer (pH 7.0), 25 °C

いくつかのグループがマッコウクジラのみオグロビンの遠位ロイシン 29 (Leu29)がフェニルアラニン(Phe)に置き換えられたみオグロビンの L29F 変異体 (mutant L29F)について研究を行った結果、中心鉄(II)へ結合している酸素は HisE7 との水素結合に加えて、Phe からの静電相互作用によって安定化されることを明らかにした(Table 4-3)<sup>31-33</sup>。また、合成モデルにおいても、中心鉄(II)へ結合している酸素に対する遠位ストラップ内の H-bond ドナーの位置または遠位双極子/双極子相互作用の影響について説明した。Momenteau らは、バスケットハンドル鉄-ポルフィリン(Figure 4-21a, b)について、遠位極性相互作用による O<sub>2</sub> の結合解離速度を比較した<sup>6,7</sup>。ストラップがアミド結合を含む場合、モデル錯体(1b) (Figure 4-21b)の  $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  がエーテル結合で連結したストラップポルフィリン(1a) (Figure 4-21a)の 1/10 であることを示し、その O<sub>2</sub> 親和性は 18 Torr (1a)から 2 Torr (1b)へと約 10 倍向上したと報告している(Table 4-3)<sup>3</sup>。Reed らはピケットフェンスポルフィリンから 1 つのピケットに H-bond ドナーを導入した一連のピケットフェンスポルフィリン(Figure 4-3d-f)を合成した<sup>8</sup>。彼らは H-bond ドナーの位置をより先端の位置にシフトしたことにより、O<sub>2</sub> 親和性が大きくなる傾向が観測された。また、Boitrel ら設計した 2 つのシリーズのビスストラップポルフィリン(OCAPFe) (Figure 4-21c,d)では、分子内カルボン酸が鉄の頂点位置に持ってきた( $\alpha\beta$ -OCAPFe)ことで、O<sub>2</sub> 親和性は 9.3 Torr ( $\alpha\alpha$ -OCAPFe)から 10<sup>-3</sup> Torr ( $\alpha\beta$ -OCAPFe)へ向上させたと報告した(Table 4-3)<sup>13-17</sup>。Fe-Por1 のフリーベースの X 線結晶解析(Figure 4-8a)により、ストラップに張り出しているカルボン酸がポルフィリン平面の頂端位置にあることが示唆された。すなわち、Fe-Por1/Py3OCD の分子内カルボン酸が中心鉄と結合している酸素に対して、水素結合供与体として機能する可能性がある。前項では、中心鉄に結合した O<sub>2</sub> は N<sub>2</sub> バブリングでは解離しにくいと述べた。この小さい  $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  が、Fe(II)に結合した O<sub>2</sub> の解離が困難となった理由である可能性が考えられる(Scheme 4-2)。これらの結果は、結合した O<sub>2</sub> と遠位カルボン酸の間に水素結合が形成される可能性があることを示唆している。遠位カルボン酸は、ストラップの周りのシクロデキストリン二量体(Py3OCD)によって作成された疎水性ポケットより保護されたために、非解離型で存在する可能性が考えられる。

**Scheme 4-2.** The mechanism of O<sub>2</sub>-bound Fe-Por1 / Py3OCD.



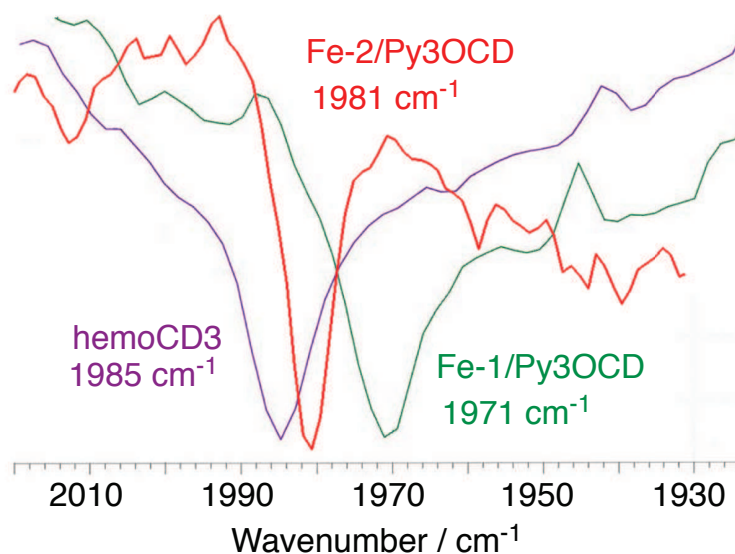
次に CO の解離速度( $k_{off}^{CO}$ )に着目すると、CO-Fe-Por1 / Py3OCD からの解離速度定数( $k_{off}^{CO} = 0.11 \text{ s}^{-1}$ )は、ストラップのない Fe-Por / CD と比べて( $k_{off}^{CO} = 0.16 - 0.18 \text{ s}^{-1}$ )著しく大きくなっている。Fe-Por / CD は天然タンパク質および合成モデルよりも大きい  $k_{off}^{CO}$  を示している (Table 4-3)。Olson らは種々のミオグロビンのミュータントを用いて  $k_{off}^{CO}$  および  $\nu_{C-O}$  を測定し、 $\log(k_{off}^{CO})$  と  $\nu_{C-O}$  との間に正の直線関係が成立することを見出している<sup>34)</sup>。彼らは C-O 結合が強いほど、 $\nu_{C-O}$  と  $k_{off}^{CO}$  が大きくなることを報告した。Naruta らがポルフィリンの両側にヒドロキシ基(OH)を導入したツインコロネットポルフィリン(TCPs)は、無水トルエン中で低い CO 親和性を示すことを報告した。CO-TCP はラマンスペクトルによって測定された結果、低い  $\nu_{Fe-CO}$  と高い  $\nu_{C-O}$  波数を表したことがわかった。彼らは、ポルフィリン平面に張り出した OH 基が CO 近傍にあることで、OH 基の酸素原子が **negative polar effect** として作用するために、Fe-CO 結合を減少させることによって CO 結合を不安定化させたと解釈している (Figure 4-4)<sup>9,10)</sup> CO-hemoCD1 は水溶液中で異常に低い  $\nu_{Fe-CO}$  と高い  $\nu_{C-O}$  周波数( $1987 \text{ cm}^{-1}$ )を示しているにもかかわらず、CO-hemoCD1 の  $k_{off}^{CO}$  値は Table 4-1 で最小である。Kano らは、疎水的な分子である CO にとって、バルク水よりもシクロデキストリン二量体により構築された疎水的なポケットがより快適な環境を提供していることを考察した<sup>23)</sup>。従って、hemoCD の中心鉄から解離した CO は *O*-メチル化 $\beta$ -シクロデキストリンによって形成される疎水環境に留まろうとするため、バルク水中へは極めて拡散しにくいのではないかと考えられる。



**Figure 4–21.** Structures of synthetic myoglobin models that work in organic solvents and their abbreviations.



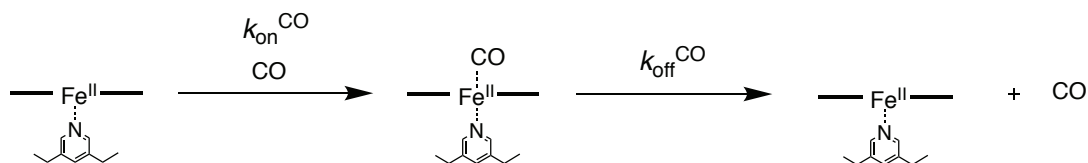
CO-Fe-Por1/Py3OCD の CO 伸縮振動( $\nu_{C-O}$ )を赤外吸収分光法(IR)より測定した (Figure 4-22, green line)。比較として CO-Fe-Por2/Py3OCD (Figure 4-22, red line)および CO-hemoCD3 (Figure 4-22, purple line)の測定も同様に行った。CO-Fe-Por1/Py3OCD の $\nu_{C-O}$ は  $1971\text{ cm}^{-1}$  で観測され、これは CO-Fe-Por2/Py3OCD ( $\nu_{C-O} = 1981\text{ cm}^{-1}$ )および CO-hemoCD3 ( $\nu_{C-O} = 1985\text{ cm}^{-1}$ )よりも低くなっている。CO-Fe-Por1/Py3OCD の CO の伸縮振動が CO-hemoCD3 よりも低波数側にシフトしたことから、遠位カルボン酸が Fe(II)に結合した CO の O 原子の近くに正の静電ポテンシャル(positive polar effect)を提供することが示唆された(Scheme 4-3)。Suzuki らはミオグロビンのヘムであるプロトポルフィリン IX を各種ヘムに変えることで、Fe 原子の電子密度( $\rho_{Fe}$ )を変化させ、Fe 原子の電子密度と CO 伸縮振動の関係を分析した<sup>35)</sup>。彼らは、 $\nu_{C-O}$ 周波数が  $\rho_{Fe}$ の減少とともに増加することを見出した。従って、CO-Fe-Por2 / Py3OCD と CO-hemoCD3 の $\nu_{C-O}$ 周波数の違いは、アニオン性ポルフィリンとカチオン性ポルフィリンの Fe 原子の電子密度( $\rho_{Fe}$ )が異なるためであると考えられる。



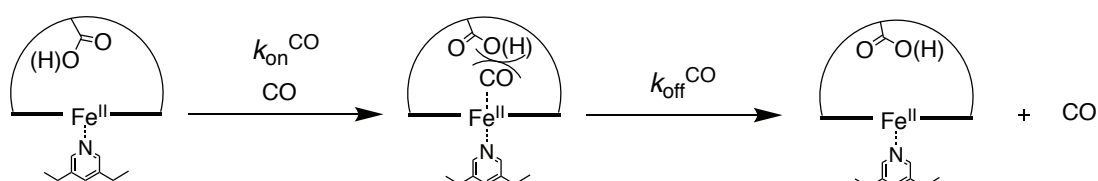
**Figure 4-22.** (a) IR spectra of CO-Fe-Por1/Py3OCD (green line), CO-Fe-Por2/Py3OCD (red line), CO-hemoCD3 (purple line) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

**Scheme 4-3.** The mechanism of CO-bound Fe-Por2/Py3OCD (a) and CO-bound Fe-Por1 / Py3OCD (b).

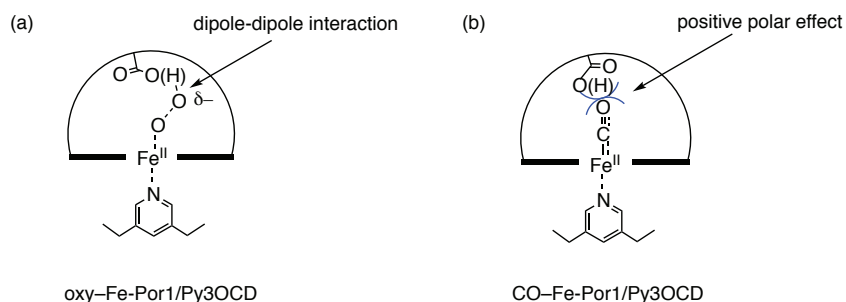
(a) CO-Fe-Por2/Py3OCD



(b) CO-Fe-Por1/Py3OCD



Fe-Por1/Py3OCD の  $k_{\text{on}}^{\text{O}_2, \text{CO}}$  の値から、遠位ストラップの立体障害により、ガス分子が疎水ポケットに入りにくくなっていることが考えられる。CO-Fe-Por1/Py3OCD の CO 解離速度( $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$ )は Fe-Por2/Py3OCD および hemoCD3 よりも速くなっていることから、遠位ストラップのない hemoCD に比べて、Fe-Por1/Py3OCD の CO 親和性は著しく低下した。一方で、Fe-Por1/Py3OCD の  $k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$  が小さくなったことにより、Fe-Por1/Py3OCD の  $\text{O}_2$  親和性は僅かだが、増加することが観測された。また、IR 測定の結果により、Fe(II)に結合した CO の O 原子の近くに正の極性効果(positive polar effect)を提供することが示唆された(Figure 4-23b)。この正の極性効果は、酸素の解離速度が遅くなる原因であると考えられる(Figure 4-23a)。このことから、遠位ストラップに張り出しているカルボキシル基はシクロデキストリン二量体(Py3OCD)によって形成された疎水性ポケットより保護され、非解離型(-COOH)で存在することが推測される。しかし、直接的にカルボキシル基の状態を観測できていないため、さらに詳細かつ実験的な確証が必要である。



**Figure 4-23.** (a) dipole-dipole interaction on the O<sub>2</sub>-bound Fe-Por1/Py3OCD . (b) Positive polar effects on CO-bound Fe-Por1/Py3OCD.

#### 4. 結言

本章においては、遠位側にカルボキシル基をストラップにより固定し、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。水中で機能するミオグロビンモデルとしての物性評価を行った。比較実験として、Fe-Por1と同じく末端にピリジニウムを有するカチオン性ポルフィリンを合成し、シクロデキストリン二量体(Py3OCD)との包接錯体(Fe-Por2/Py3OCD)を構築した。Fe-Por1/Py3OCD および Fe-Por2/Py3OCD の酸素付加体の安定性を評価したところ、oxy-Fe-Por1/Py3OCD の半減期( $t_{1/2}^{O_2}$ )は 7 h、O<sub>2</sub>-Fe-Por2/Py3OCD の半減期( $t_{1/2}^{O_2}$ )は 35 h と求めた。本来の oxy-hemoCD3 の半減期( $t_{1/2}^{O_2} = 50$  h)よりは短くなった。これはアニオン性ポルフィリンである Fe<sup>III</sup>TPPS のスルホナト基によって Py3OCD の包接を強固に保つことが重要であると示唆された。次に Fe-Por1/Py3OCD の酸素親和性、一酸化炭素親和性測定を行った。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 320 となった。これは今まで報告された FePor/CD よりも高い O<sub>2</sub> 選択性を示している。この現象に関してレーザーフラッシュフォトリス法により 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 Fe-Por2/Py3OCD および 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、

$k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$ が遅くなった原因として、中心鉄(II)に結合した  $\text{O}_2$  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  $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  が大きくなった。CO-Fe-Por1/Py3OCD の IR 測定を行うことによって C-O 伸縮振動の変化を観測した。CO-Fe-Por1/Py3OCD の CO 伸縮振動( $\nu_{\text{C-O}}$ )の周波数は hemoCD と比べて、負にシフトした。したがって、Fe(II)に結合した CO の O 原子の近くに正の極性効果が働くことが示唆された。本章で水中において完全な人工合成物 hemoCD を用いて天然ミオグロビンおよびヘモグロビンの  $\text{O}_2$  選択性を模倣した。さらに、末端にピリジニウムを有する長い側鎖を持つカチオン性ポルフィリンはシクロデキストリン二量体と安定な酸素錯体を形成することから、このような側鎖長いポルフィリンはシクロデキストリン二量体と水中で 1 : 1 包接錯体を形成するという興味深い超分子包接現象を見出した。

## 5. 参考文献

- 1) Kitagishi, H.; Mao, Q.; Kitamura, N.; Kita, T., HemoCD as a totally synthetic artificial oxygen carrier: improvements in the synthesis and  $\text{O}_2/\text{CO}$  discrimination. *Artif. Organs.* **2017**, *41*, 372–380.
- 2) Sugiyasu, K.; Ogi, S.; Takeuchi, M., Strapped porphyrin-based polymeric systems. *Polym. J.* **2014**, *46*, 674–681.
- 3) Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L., Functional analogues of cytochrome *c* oxidase, myoglobin, and hemoglobin. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561–588.
- 4) Boitrel, B.; Le Gac, S., Stabilization of synthetic heme-superoxo complexes by hydrogen bonding: a still on-going quest. *New. J. Chem.* **2018**, *42*, 7516–7521.
- 5) Momenteau, M.; Reed, C. A., Synthetic heme dioxygen complexes. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 659–698.
- 6) Momenteau, M.; Lavalette, D., Kinetic evidence for dioxygen stabilization in oxygenated iron(II)-porphyrins by distal polar interactions. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 341–343.
- 7) Mispelter, J.; Momenteau, M.; Lavalette, D.; Lhoste, J.-M., Hydrogen-bond stabilization of oxygen in hemoprotein models *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5165–5166.
- 8) Wuenschell, G. E.; Tétreau, C.; Lavalette, D.; Reed, C. A., H-Bonded

oxyhemoglobin models with substituted picket-fence porphyrins: the model compound equivalent of site-directed mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3346–3355.

- 9) Tani, F.; Matsu-ura, M.; Ariyama, K.; Setoyama, T.; Shimada, T.; Kobayashi, S.; Hayashi, T.; Matsuo, T.; Hisaeda, Y.; Naruta, Y., Iron twin-coronet porphyrins as models of myoglobin and hemoglobin: amphibious electrostatic effects of overhanging hydroxyl groups for successful CO/O<sub>2</sub> discrimination. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 862–870.
- 10) Matsu-ura, M.; Tani, F.; Naruta, Y., Formation and characterization of carbon monoxide adducts of iron “Twin Coronet” porphyrins. Extremely low CO affinity and a strong negative polar effect on bound CO. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1941–1950.
- 11) Ruzié, C.; Even, P.; Ricard, D.; Roisnel, T.; Boitrel, B., O<sub>2</sub> and CO binding to tetraaza-tripodal-capped iron(II) porphyrins. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1338–1348.
- 12) Chang, C. K.; Liang, Y.; Aviles, G.; Peng, S.-M., Conformational control of intramolecular hydrogen bonding in heme models: maximal Co<sup>II</sup>–O<sub>2</sub> binding in a c-clamp porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4191–4192.
- 13) Balieu, S.; Hijazi, I.; Motreff, N.; Lachaud, F.; Even-Hernandez, P.; Boitrel, B., Steric decompression of picket-strapped porphyrins for the synthesis of side-differentiated chelates. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 8–11.
- 14) Hijazi, I.; Roisnel, T.; Fourmigué, M.; Weiss, J.; Boitrel, B., Coordination studies of bis-strapped-hanging-carboxylate porphyrins. X-ray characterization of a five-coordinate iron(II) complex with a built-in axial base. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 3098–3100.
- 15) Hijazi, I.; Roisnel, T.; Even-Hernandez, P.; Furet, E.; Halet, J.-F.; Cador, O.; Boitrel, B., Characterization of a six-coordinate ferrous high-spin heme with both intramolecular axial carboxylic acid and pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10652–10653.
- 16) Barakat, W.; Hijazi, I.; Roisnel, T.; Dorcet, T.; Boitrel, B.; Le Gac, S., Adaptable overhanging carboxylic acid porphyrins: towards molecular assemblies through unusual coordination modes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2019**, 3005–3014.
- 17) Boitrel, B.; Hijazi, I.; Roisnel, T.; Oohora, K.; Hayashi, T., Iron-strapped porphyrins with carboxylic acid groups hanging over the coordination Site: synthesis, X-ray

- characterization, and dioxygen binding. *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 7373–7383.
- 18) Mao, Q.; Kitagishi, H., Optimized synthesis of a per-*O*-methylated  $\beta$ -cyclodextrin dimer linked at the secondary face by a pyridine ligand. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2019**, *93*, 67–76.
- 19) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y., Static and dynamic behavior of 2:1 inclusion complexes of cyclodextrins and charged porphyrins in aqueous organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9937–9944.
- 20) Hanana, M.; Arcostanzo, H.; Das, P. K.; Bouget, M.; Le\_Gac, S.; Okuno, H.; Cornut, R.; Joussetme, B.; Dorcet, V.; Boitrel, B.; Campidelli, S., Synergic effect on oxygen reduction reaction of strapped iron porphyrins polymerized around carbon nanotubes. *New. J. Chem.* **2018**, *42*, 19749-19754.
- 21) Kano, K.; Kitagishi, H.; Kodera, M.; Hirota, S., Dioxygen binding to a simple myoglobin model in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435–438.
- 22) Kano, K.; Kitagishi, H.; Tamara, S.; Yamada, A., Anion binding to a ferric porphyrin complexed with per-*O*-methylated  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202–15210.
- 23) Kano, K.; Tanaka, N.; Minamizono, H.; Kawakita, Y., Tetraarylporphyrins as probes for studying mechanism of inclusion-complex formation of cyclodextrins. Effect of microscopic environment on inclusion of ionic guests. *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 925–926.
- 24) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Kodera, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., Iron porphyrin-cyclodextrin supramolecular complex as a functional model of myoglobin in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448–4460.
- 25) Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Iverson, B. L.; Sessler, J. L.; Morris, R. M.; Gibson, Q. H., Dioxygen and carbonyl binding to iron(II) porphyrins: a comparison of the "picket fence" and "pocket" porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3052–3056.
- 26) Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Collins, T. J.; Iverson, B.; Sessler, J. L.; Morris, R. M.; Gibson, Q. H., The 'pocket' porphyrins: hemoprotein models with lowered CO affinities. *Inorg. Chim. Acta.* **1983**, *79*, 101–102.
- 27) Tetreau, C.; Lavalette, D.; Momenteau, M.; Fischer, J.; Weiss, R., Structure - reactivity relationship in oxygen and carbon monoxide binding with some heme models. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11840–11848.
- 28) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin

- dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894–6897.
- 29) Kundu, S.; Trent, J. T., III; Hargrove, M. S., Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 387-393.
- 30) Carver, T. E.; Brantley, R. E., Jr.; Singleton, E. W.; Arduini, R. M.; Quillin, M. L.; Phillips, G. N., Jr.; Olson, J. S., A novel site-directed mutant of myoglobin with an unusually high O<sub>2</sub> affinity and low autooxidation rate. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14443–14450.
- 31) Nishimura, R.; Matsumoto, D.; Shibata, T.; Yanagisawa, S.; Ogura, T.; Tai, H.; Matsuo, T.; Hirota, S.; Neya, S.; Suzuki, A.; Yamamoto, Y., Electronic control of ligand-binding preference of a myoglobin mutant. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 9156–9165.
- 32) Watanabe, M.; Kanai, Y.; Nakamura, S.; Nishimura, R.; Shibata, T.; Momotake, S.; Ogura, T.; Matsuo, T.; Hirota, S.; Neya, S.; Suzuki, A.; Yamamoto, Y., Synergistic effect of distal polar interactions in myoglobin and their structural Consequences. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 14269–14279.
- 33) Li, T.; Quillin, M. L.; Phillips, Jr, G. N.; Olson, J. S., Structural determinants of the stretching frequency of CO bound to myoglobin. *Biochemistry.* **1994**, *33*, 1433–1446.
- 34) Nishimura, R.; Shibata, T.; Tai, H.; Ishigami, I.; Ogura, T.; Nagao, S.; Matsuo, T.; Hirota, S.; Imai, K.; Neya, S.; Suzuki, A.; Yamamoto, Y., Relationship between the electron density of the heme Fe atom and the vibrational frequencies of the Fe-bound carbon monoxide in myoglobin. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 3349–3355.





## 第五章 超分子ヘムタンパク質モデルを用いた体内における CO 局在分布の定量的解析

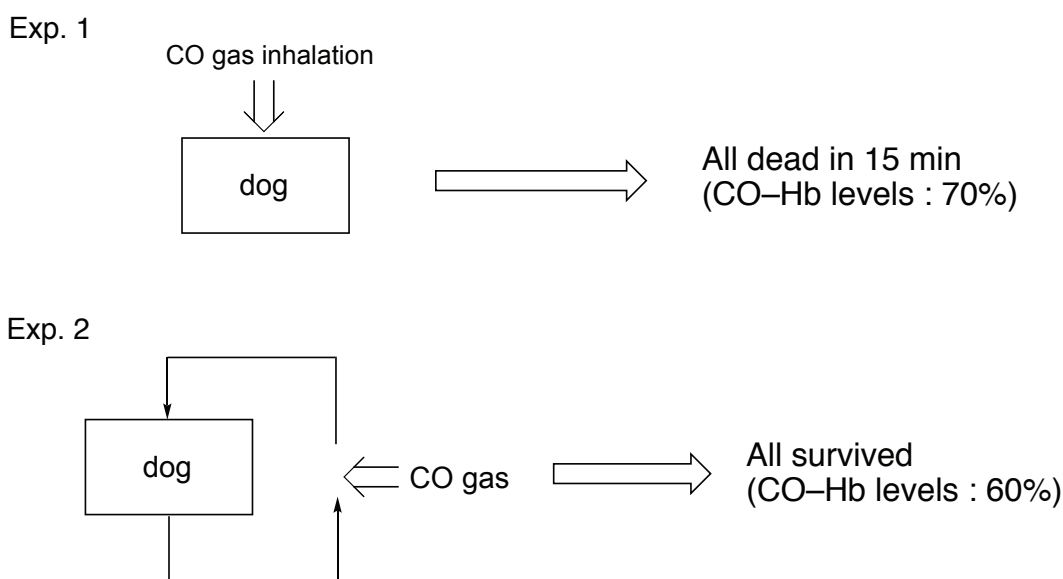
### 1. 緒言

一酸化炭素(CO)は、不完全燃焼によって生成される有毒ガスとして知られており、CO 中毒は化学物質中毒死の最も多い原因となっている<sup>1,2)</sup>。CO は、動物に対して強い毒性を示すにもかかわらず、体内では常に微量ながら生産されている<sup>3,4)</sup>。酸素(O<sub>2</sub>)、一酸化窒素(NO)、硫化水素(H<sub>2</sub>S)、および活性酸素種(ROS)と呼ばれるスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、ヒドロキシルラジカル(•OH)、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)などの小分子は、非常に反応性が高く、体内でヘム鉄などの金属補酵素、タンパク質、脂質、および核酸といった生体分子に対してさまざまな反応性を示す。一方、CO は比較的低い反応性を示し、生体内ではCO は遷移金属、主にヘム鉄(II)への結合のみが認識されている<sup>5-8)</sup>。CO はヘム鉄(II)への親和性が高く、逆電子供与と呼ばれる CO と鉄イオン(Fe<sup>II</sup>)の軌道間相互作用により、安定な CO 錯体を形成する<sup>9,10)</sup>。過剰な CO ガスを吸入すると、O<sub>2</sub>の代わりに、CO がヘムタンパク質の中心 Fe<sup>II</sup>に強く結合することにより、ヘモグロビン(Hb)、ミオグロビン(Mb)、シトクローム c オキシダーゼ(CcO)といったヘムタンパク質の機能が妨害され、生きるためのエネルギーが生産できなくなる<sup>11-13)</sup>。安定な CO 錯体の生成は CO 中毒の原因となる。医療現場において、CO 中毒は血中 CO-Hb レベルに基づいて診断される<sup>1,14,15)</sup>。通常では血中 CO-Hb は 10 %未満であり、CO ガスの吸入により血中 CO-Hb が 20-40 %に達すると、めまい、頭痛および吐き気などの症状が現れ始め、40%以上になると、死亡のリスクが非常に高くなることが知られている。一方、急性 CO 中毒の際は血中 CO-Hb レベルが 30 %未満であっても、CO 中毒による死亡また嚴重な後遺障害が残されることが報告されている<sup>16,17)</sup>。

---

Mao, Q.; Kawaguchi, A. T.; Mizobata, S.; Motterlini, R.; Foresti, R.; Kitagishi, H., Sensitive quantification of carbon monoxide (CO) *in vivo* reveals a protective role of circulating hemoglobin in CO intoxication. *Commun. Biol.*, in press.

1975年にCO-HbがCO中毒の原因かどうかを調べるために、Goldbaumらは犬を用いた臨床実験を行なった(Figure 5-1)<sup>18)</sup>。実験1(Exp. 1)では、犬に13%のCOガスを吸入させると、すべての動物は15min以内に死亡した。この時の血中CO-Hb%は平均70%であった。対照的に、実験2(Exp. 2)では、動物を脱血させた後、COで飽和させた赤血球(RBC)を輸血した。その結果、すべての動物はCO-Hb%が60%に達したにもかかわらず、動物の生存率は100%であった<sup>18)</sup>。実験1および実験2の結果から、血中のCO-Hbレベルが同じように致死量を示しているにもかかわらず、COを投与した経路の違いで毒性が大きく異なることが示された。これはHbに結合したCOは毒性を示さない一方で、臓器や組織に直接拡散したCOガスが強い毒性を示すことを示している。したがって、CO中毒患者の臓器や組織にどれだけのCOが蓄積されているかを調べることは、非常に重要である。



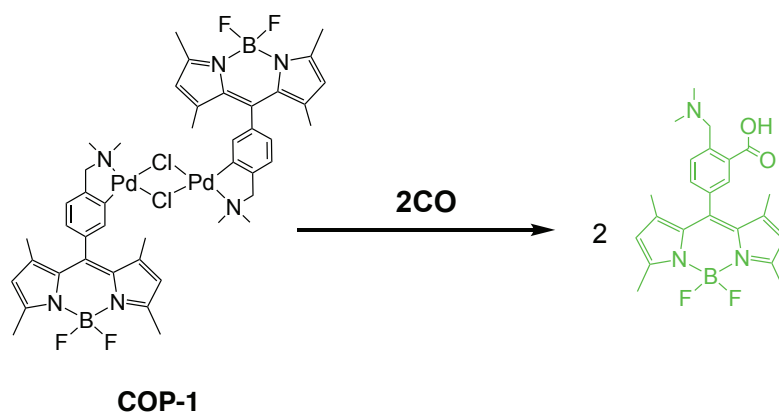
**Figure 5-1.** Animal experiments on CO intoxication reported in 1975.<sup>18)</sup>

これまでに生体組織内におけるCOの検出と定量手法の開発が盛んに行われてきた。血中CO-Hbレベルは、主にオキシメーターおよびガスクロマトグラフィー(GC)法により測定されている<sup>14,19-21)</sup>。臓器や組織のCO量の検出手法として、GC法が挙げられる。VremanらはGC法を用いて、マウスおよびラットの血液および各臓器のCO量を測定した(Table 5-1)<sup>19)</sup>。

**Table 5–1.** CO concentration (pmol/mg Formula Weight) in tissues from adult control rats and mice.<sup>19)</sup>

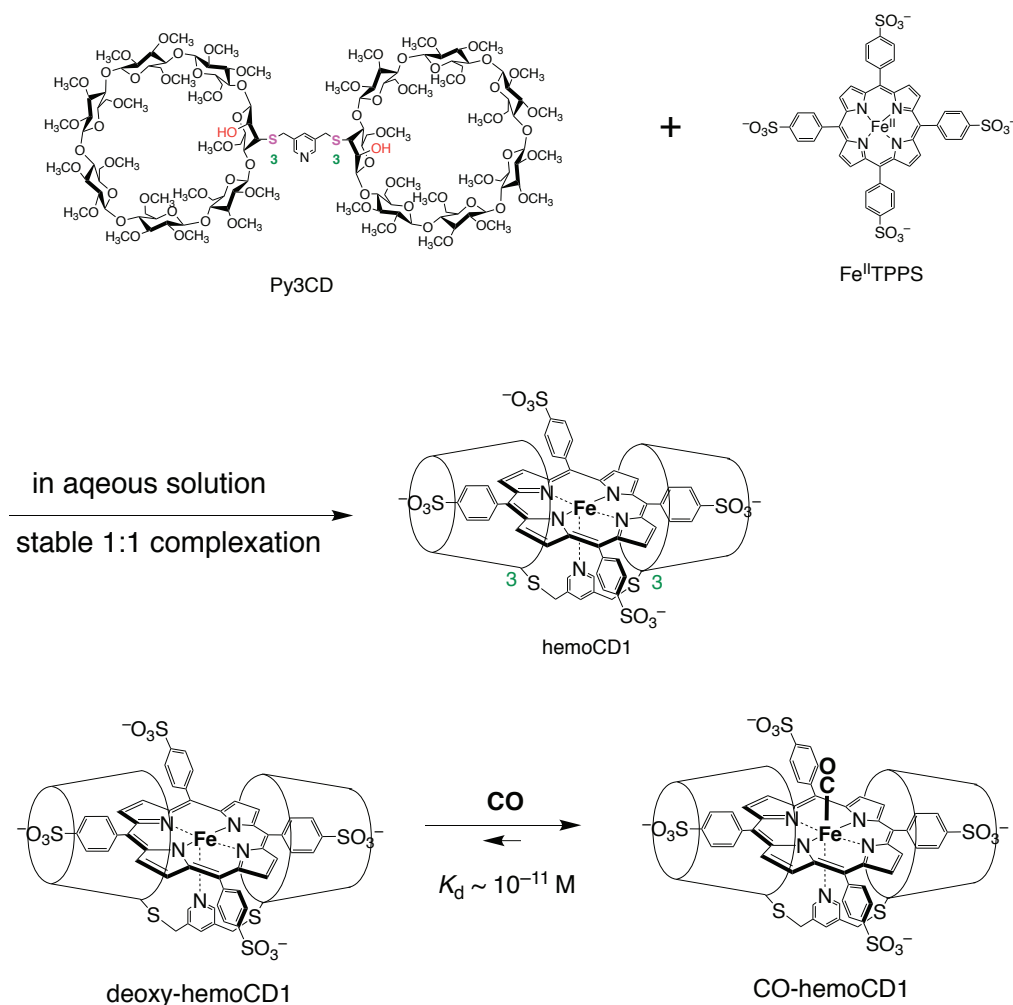
Condition	CO concentration (pmol/mg Formula Weight)										
	VeCO ( $\mu\text{L/h/kg}$ )	Blood	Muscle	Kidney	Heart	Spleen	Liver	Intestine	Lung	Testes	Brain
Native											
Rat (n = 3)	12.5 $\pm$ 0.3	47 $\pm$ 10	4 $\pm$ 4	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Mouse (n = 5)	33.4 $\pm$ 1.5	45 $\pm$ 5	10 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0

さらに、Vreman らと Coburn らは GC 法を用いてヒトの各臓器における CO 量を測定した<sup>20,21)</sup>。GC 法は血液あるいは組織の CO と結合したヘムを酸化剤により酸化して、気相に遊離した CO の分析を行う方法である。汎用性が高く広く利用されているが、気相に遊離した CO を計測するために十分な定量性があるかどうかは不明である。Chang らによって開発された CO 検出プローブ(COP-1)では、生体内における CO の検出やイメージングに関する研究が実施された(Figure 5–2)<sup>22)</sup>。このようなプローブ<sup>22–30)</sup>では、蛍光により細胞および臓器内の CO 分布を検出できるが、定量的に CO 量を評価することは難しいと考えられる。他に、レーザー分光法や放射性同位元素法<sup>31–33)</sup>が報告されているが、いずれも特殊な装置やテクニックが要求される。したがって、臓器内 CO 量を調べるためには、簡便でかつ高感度に CO を検出する CO 定量法が必要であった。



**Figure 5–2.** COP-1, a reaction-based fluorescent CO probe.<sup>22)</sup>

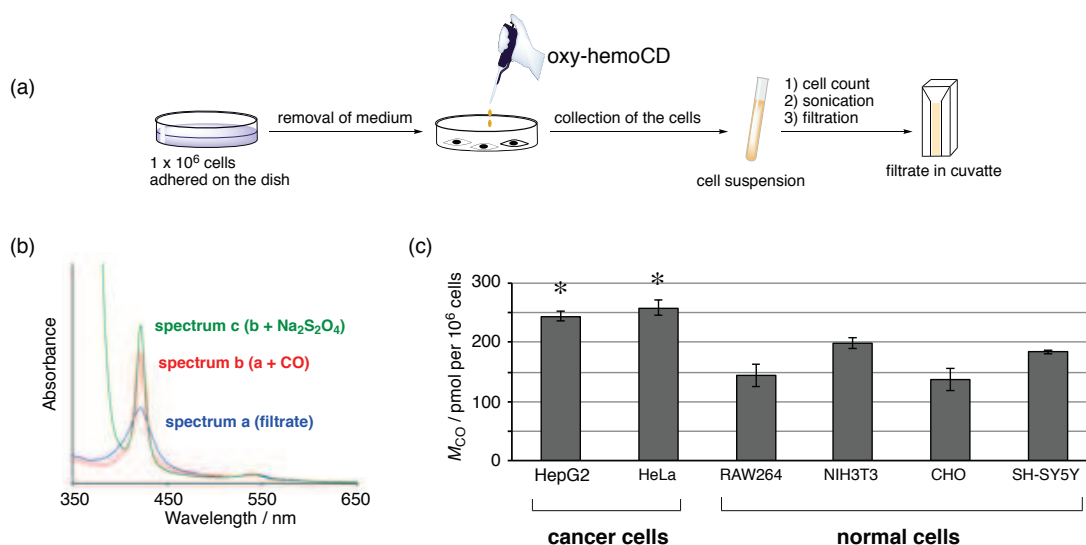
2004年にKanoらは生理条件下でO<sub>2</sub>を可逆的に吸脱着するMbモデルであるhemoCD1を開発した<sup>34)</sup>。hemoCD1は5,10,15,20-テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン鉄(II)錯体(Fe<sup>II</sup>TPPS)とパー-O-メチル化β-シクロデキストリンをピリジンでつないだシクロデキストリン二量体(Py3CD)の1:1包接錯体である



**Figure 5–3.** HemoCD1, a CO detecting agent. (a) HemoCD1 is composed of 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinatoiron(II) (Fe<sup>II</sup>TPPS) and a per-*O*-methyl-β-cyclodextrin dimer having a pyridine linker (Py3CD). The structure of deoxy-hemoCD1 and CO-hemoCD1 complexes is shown.

(Figure 5–3)<sup>34)</sup>。hemoCD1はHbのT状態(Hb-T)と近い酸素親和性( $P_{1/2}^{O_2} = 10 \text{ Torr}$ ,  $K_d = 17 \mu\text{M}$  in phosphate buffer at pH 7 and 25 °C)を示し、さらに非常に高いCO親

和性( $P_{1/2}^{\text{CO}} = 1.5 \times 10^{-5}$  Torr,  $K_d = 19.2$  pM in phosphate buffer at pH 7 and 25 °C)を示す(Figure 5-3)<sup>34,35</sup>。この極めて高いCO 親和性はR 状態のHb (Hb-R)の100倍になっており、これは今まで報告されている天然ヘムタンパク質よりも高いCO 親和性を示している<sup>35,36</sup>。KanoらはhemoCD1の酸素付加体(oxy-hemoCD1)を動物に静脈投与したところ、動物に副作用を示さず、投与されたoxy-hemoCD1のほとんどは1時間以内にCO付加体(CO-hemoCD1)として尿中に排泄されたことを報告している<sup>37</sup>。さらに、KitagishiらはhemoCD1を用いて、内因性COの生理機能について研究を発展してきた<sup>37-40</sup>。2017年にoxy-hemoCD1を用いて細胞内の微量なCOを測定することに成功した(Figure 5-4)<sup>41</sup>。処理後に得られたろ液(Figure 5-4b, spectrum a)にCOガス(Figure 5-4b, spectrum b)および還元剤である亜ジチオン酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (Figure 5-4b, spectrum c)を添加し、それぞれの422nmでの吸光度とoxy-, deoxy-, CO-, およびmet-hemoCD1の422nmにおけるモル吸光係数を用いて、各種細胞の内因性COを定量することに成功した(Figure 5-4c)。これらの結果から、hemoCD1は生理条件下で機能する非常に優れたCO検出および除去剤であることが示された。



**Figure 5-4.** Detection and quantification of CO in the biological samples by oxy-hemoCD1. (a) A procedure for CO detection in cultured cells. (b) Raw spectra of the filtrate solution of the cells treated with oxy-hemoCD1 before and after the additions of CO and  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  to determine the amount of CO in the solution. (c) The amount of endogenous CO in the various types of the cells.

本章では、以上の知見を活かして、まず 2017 に報告した oxy-hemoCD1 を用いた CO 定量法(hemoCD アッセイ)<sup>4)</sup>をより簡単な操作で正確に定量できるように改善した。確立した hemoCD アッセイを用いてラット各組織(肺、肝臓、心臓、大脳、小脳および骨格筋)の内因性 CO を定量した。次に 400 ppm の CO ガスをラットにそれぞれ 5、10、20、および 80 分吸引させた後、血中 CO-Hb レベルおよび各組織の CO 量がどのように変化するかをそれぞれ血液ガス測定および hemoCD1 を用いて定量し、追跡した。CO ガスをラットに吸引させた後、空気および O<sub>2</sub> 換気により各組織の CO 量がどのように減少するかを hemoCD アッセイを用いて定量した。最後に、CO 中毒解毒剤としての hemoCD1 の投与効果について評価をした。これらの結果について報告する。

## 2. 実験

### 2-1. 測定機器

紫外可視吸収スペクトル(UV-vis スペクトル)は島津製作所製自記分光光度計 UV-2100、UV-2450 および Implen 社製の NanoPhotometer<sup>®</sup> C40 を用いて測定した。吸収スペクトルの測定に際しては、島津製作所電子冷熱式セルポジショナー TCC-260 型により温度制御し、温度が安定してから 5 分後に測定した。水溶液の pH は堀場製作所製 pH メーター M-12 および F-52 を用いて測定した。MTT アッセイは、Thermo Fisher Scientific 社製 96 well UV 対応プレートを Multiskan<sup>™</sup> FC Microplate Photometer にセットして行なった。ガスクロマトグラフィー測定は、島津製作所製 GC-2014 を用いて行なった。ラットの血中 CO-Hb %は Radiometer Co. Ltd.社製の ABL825 を用いて測定を行なった。

## 2-2. 試薬

Fe<sup>III</sup>TPPS<sup>42)</sup>および Py3CD<sup>34)</sup>は文献記載の方法に従って合成した。一酸化窒素発生剤 NOC5 (1-hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene)は同仁化学研究所より購入し、0.1 M NaOH 水溶液に溶解し、これを NOC のストック溶液として用時調製した。過酸化水素(富士フイルム和光純薬株式会社)は 240 nm におけるモル吸光係数( $\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )から濃度を算出した。その他の試薬は市販のものをそのまま使用した。測定に用いた水は Yamato Auto Still Glass Model WG 250 により蒸留後、Simplicity Water Purification System にて精製したものをを用いた。

### 2-2-1. hemoCD1 溶液の調製

各組織の CO 量を定量した際に使用した hemoCD1 ストック溶液は以下のよう  
に調製した。Fe<sup>III</sup>TPPS (1.10 mg, 1.0  $\mu\text{mol}$ )および Py3CD (3.53 mg, 1.2  $\mu\text{mol}$ )を  
PBS (pH 7.4, 1mL)に溶かして中心鉄(III)の met-hemoCD1 (1 mM)を調製した。met-  
hemoCD1 (1-5  $\mu\text{L}$ )のストック溶液を PBS で適切に希釈し、組織の CO 定量用 met-  
hemoCD1 (2-10  $\mu\text{M}$ , 0.5 mL)溶液を調製した。鉄(II)の deoxy-hemoCD1 は、過剰の  
ジチオナイト( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (*ca.* 1-2 mg)を met-hemoCD1 溶液 (2-10 $\mu\text{M}$ , 0.5 mL) に加  
えることで得られた。

動物実験で使用した hemoCD1 溶液は以下のように調製した。Fe<sup>III</sup>TPPS (6.60  
mg, 1.0  $\mu\text{mol}$ )および Py3CD (21.15 mg, 7.2  $\mu\text{mol}$ )を PBS (pH 7.4, 2mL)に溶かして  
met-hemoCD1 (3 mM)を調製した。また、Fe<sup>III</sup>TPPS (66.0 mg, 60.0  $\mu\text{mol}$ )および  
Py3CD (211.15 mg, 72.0  $\mu\text{mol}$ )を PBS (pH 7.4, 10mL)に溶かして met-hemoCD1 (6  
mM)を調製した。met-hemoCD1 溶液に  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (*ca.* 10-20 mg)を加えて中心鉄を  
三価から二価へ還元した後、Sephadex G25 を充填したゲルろ過カラム(Sephadex  
G25, HiTrap<sup>TM</sup> Desalting 5 mL, GE Healthcare Life Sciences)に通すことで、過剰な  
を  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  除去した。得られた oxy-hemoCD1 溶液の濃度は 422 nm における吸光  
度およびモル吸光係数( $\epsilon_{422}^{\text{oxy}} = 1.64 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )から決定した。

### 2-3. 実験動物の準備

すべての動物実験は東海大学の施設内審査委員会および同志社大学が定める動物実験規定と倫理規定を遵守して行なった。実験動物は、日本チャールス・リバー株式会社より購入した Lewis および Sprague-Dawley ラット(5 週齢)を使用した。

3%のセボフルランでラットを麻酔した。その後、経口挿管し、人工呼吸器(Rodent Ventilator, Ugo Basile)により換気(速度 55/min、流量 15 mL/kg)を行なった。尾静脈に生理食塩水を 3 mL/h の速度で留置針、カニューレおよび輸液ポンプを用いて投与した。体温は直腸プローブ(MEDI-Therm II, Gaymer Industries Inc.)でモニターし、ウォーターブランケットで  $36.5 \pm 0.5$  °C に維持した。第四肋間腔で胸を開いた後、セボフルランの投与量を 2 %に減らし、ペントバルビタール(PB)(腹腔内投与)でラットを麻酔した。5 分後、セボフルラン麻酔を止め、CO ガス吸入による動物実験の準備が完了した。

### 2-4. 血中 CO-Hb %測定

ラットの動脈血および静脈血サンプル(0.1 mL)は、左右の心室(LV および RV)から採集した。血液サンプルは、血液ガス分析装置 ABL825 を用いて直ちに分析した。

### 2-5. 組織サンプルの準備

腹を開いた直後に、肝臓、肺、大脳、小脳、心臓(心筋)および骨格筋の組織標本を採取した。臓器から血液を除去するために、以下のように組織を採取する前に生理食塩水でフラッシング操作を行なった。16 G テルモ注射針で左心室に挿入し、血液循環を生理食塩水(50 mL)で肺動脈に灌流を行なった。次に、ペリスタルティックポンプを用いて残りの 150 mL 生理食塩水を続けて注入した(速度 0.25 mL/s)。フラッシュされた組織を採取し、すぐに液体窒素で凍結した。その後、-80 °C で冷凍保存した。



## 2-6. hemoCD1 による動物の組織中の CO 定量

ラットの臓器から採取した組織サンプル(5-20 mg)を秤量し、PBS 0.5 mL を加え、Power MasherII (nippi)でホモジナイズした。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ca. 1-2 mg)を含む deoxy-hemoCD1 (2-10 μM) を組織の破碎液に添加した。さらに、氷の上で超音波ホモジナイザー(QSONICA)により破碎した。破碎液のサンプルを 14000 G で 15 分間の遠心分離を行った。上清をフィルター(DISMIC 13CP, 0.45 μm pore; ADVANTEC)ろ過した。ろ液に Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ca. 1-2 mg)を加えた後、吸収スペクトルを測定した。ろ液のすべての hemoCD1 濃度( $C_{total}$ )は、deoxy-hemoCD1 と CO-hemoCD1 の等吸収点 427 nm におけるモル吸光係数( $\epsilon_{427} = 1.95 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )を用いて、以下の式(5-1)に従って求めた。

$$A_{427 \text{ nm}} = \epsilon_{427} \cdot C_{total} \cdot l \quad (5-1)$$

$l$  は光路長 1 cm となり、還元剤である Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> が存在することで、得られた hemoCD1 溶液には、CO-hemoCD1 ( $C_{co}$ )と deoxy-hemoCD1 ( $C_{deoxy}$ )が含まれている。

$$C_{total} = C_{co} + C_{deoxy} \quad (5-2)$$

ろ液のすべての hemoCD1 に対する CO-hemoCD1 の割合( $R_{co}$ )は式(5-3)のように算出できる。

$$R_{co} = C_{co} / C_{total} \quad (5-3)$$

422 nm および 434 nm における吸光度は以下の式(5-4)と式(5-5)で表すことができる。

$$A_{422} = \epsilon_{deoxy}^{422} \cdot C_{deoxy} + \epsilon_{co}^{422} \cdot C_{co} \quad (5-4)$$

$$A_{434} = \epsilon_{deoxy}^{434} \cdot C_{deoxy} + \epsilon_{co}^{434} \cdot C_{co} \quad (5-5)$$

従って、 $A_{422} / A_{434}$  は以下の式(5-6)で表すことができる。

$$A_{422} / A_{434} = \frac{\varepsilon_{\text{deoxy}}^{422} \cdot C_{\text{deoxy}} + \varepsilon_{\text{co}}^{422} \cdot C_{\text{co}}}{\varepsilon_{\text{deoxy}}^{434} \cdot C_{\text{deoxy}} + \varepsilon_{\text{co}}^{434} \cdot C_{\text{co}}} \quad (5-6)$$

式(5-2)から式(5-6)を用いて、 $R_{\text{CO}}$ は以下の式(5-7)で表すことができる。

$$R_{\text{CO}} = \frac{\varepsilon_{\text{deoxy}}^{422} - A_{422} / A_{434} \cdot \varepsilon_{\text{deoxy}}^{434}}{A_{422} / A_{434} (\varepsilon_{\text{co}}^{434} - \varepsilon_{\text{deoxy}}^{434}) - \varepsilon_{\text{co}}^{422} + \varepsilon_{\text{deoxy}}^{422}} \quad (5-7)$$

422 nm および 434 nm における CO-hemoCD1 と deoxy-hemoCD1 のモル吸光係数( $\varepsilon_{\text{co}}^{422} = 3.71 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon_{\text{co}}^{434} = 6.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon_{\text{deoxy}}^{422} = 1.52 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  および  $\varepsilon_{\text{deoxy}}^{434} = 2.13 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )を用いて  $R_{\text{CO}}$  を算出した。

ろ液中に含まれる CO-hemoCD1 量( $M_{\text{CO}}$ )は、 $R_{\text{CO}}$ 、 $C_{\text{total}}$  およびろ液の体積  $V$  ( $1 \times 10^{-3} \text{ L}$ )を式(5-8)に代入することで算出した。

$$M_{\text{CO}} (\text{mol}) = R_{\text{CO}} \cdot C_{\text{total}} \cdot V \quad (5-8)$$

ただし、式(5-7)の  $R_{\text{CO}}$  と  $A_{422} / A_{434}$  の関係は非線形であるため、 $A_{422} / A_{434}$  が 0.8 未満( $R_{\text{CO}} = 0.055$ )または 3.0 ( $R_{\text{CO}} = 0.743$ )を超える場合、 $R_{\text{CO}}$  の再現性は低くなることが考えられる。したがって、正確な CO 定量を行うために、組織のサンプルの重さを適切に調整、または hemoCD1 の初期濃度を変化させることにより、 $A_{422} / A_{434}$  値を 0.8 から 3.0 の間になるように調整した。計算に用いて 422 nm および 434 nm における CO-hemoCD1 と deoxy-hemoCD1 のモル吸光係数( $\varepsilon_{\text{co}}^{422}$ ,  $\varepsilon_{\text{co}}^{434}$ ,  $\varepsilon_{\text{deoxy}}^{422}$  および  $\varepsilon_{\text{deoxy}}^{434}$ )を Table 5-2 にまとめた。

**Table 5-2.** Molar absorption coefficients ( $\varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) of hemoCD1 used in this study.

	422 nm	427 nm	434 nm
Deoxy-hemoCD1	152 000 <sup>b</sup>	195 000 <sup>b</sup>	213 000 <sup>a</sup>
CO-hemoCD1	371 000 <sup>a</sup>	195 000 <sup>b</sup>	67 500 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ref (41). <sup>b</sup>This work.

## 2-7. 生体外(ex vivo)での組織サンプルへの CO 投与

組織サンプルをセプタムキャップ(天然ゴム、7 mm 試験管用)で密封した 5 mL の 25 G テルモシリンジに入れた。セプタムキャップに 25 G テルモ注射針を刺し、シリンジ内の空気を追い出した。シリンジ内に CO ガス(99.999%) (4mL)をシリンジ内に吸入した。この操作を 3 回行った。次に、組織サンプルを CO 雰囲気下で 4 °C で 1 時間インキュベートした。1 時間後、シリンジからサンプルを取り出し、CO 量を hemoCD1 によって測定した。

## 2-8. ガスクロマトグラフィーによる肝臓内の CO 量測定<sup>19, 38)</sup>

肝臓のサンプルを 100 mg 秤量し、PBS 0.3 mL を加え、Power MasherII (nippi) でホモジナイズした。さらに、氷の上で超音波ホモジナイザー(QSONICA)により破碎した。ガラス球(直径 5 mm)を 1 個、30 %サリチル酸メチル(SSA)を 3 滴加え、プランジャーを挿入し、注射筒内の空気を追い出した。注射器を逆さにし、注射針をセプタム取り付け位置までぬいた後、プランジャーを押して完全に脱気した。ガスタイトシリンジを用いてヘリウムガスをスプレー缶より 1 mL 採取し、シリンジ内に吸入した。そしてマイクロシリンジを用いてメタンガスをスプレー缶より 50 μL 採取し、シリンジ内に吸入して 30 分振盪した後、ガスタイトシリンジでシリンジ内の気相を 0.5 mL 採取し、GC 装置内に注入した。検出器は TCD、カラムは SHINCARBONT、キャリアガスはヘリウムガスを用いた。そしてカラム温度を 40 °C、気化室温度および検出器温度を 120 °C、キャリアガス流量を 50 mL / min に設定して分析を行った。また、内部標準物質としてメタンガスを用いた。得られたガスクロマトグラムの CO およびメタンのピーク面積から肝臓サンプル中に含まれる CO ガス量を算出した。

$$\text{肝臓CO量 (mol / mg)} = \frac{\text{COのピーク面積} \times \text{CH}_4 \text{量} (\mu\text{L})}{\text{CH}_4\text{のピーク面積} \times 22.4 \times A}$$

22.4 : モル体積(L/mol、1 molの原子が標準状態で占める体積)

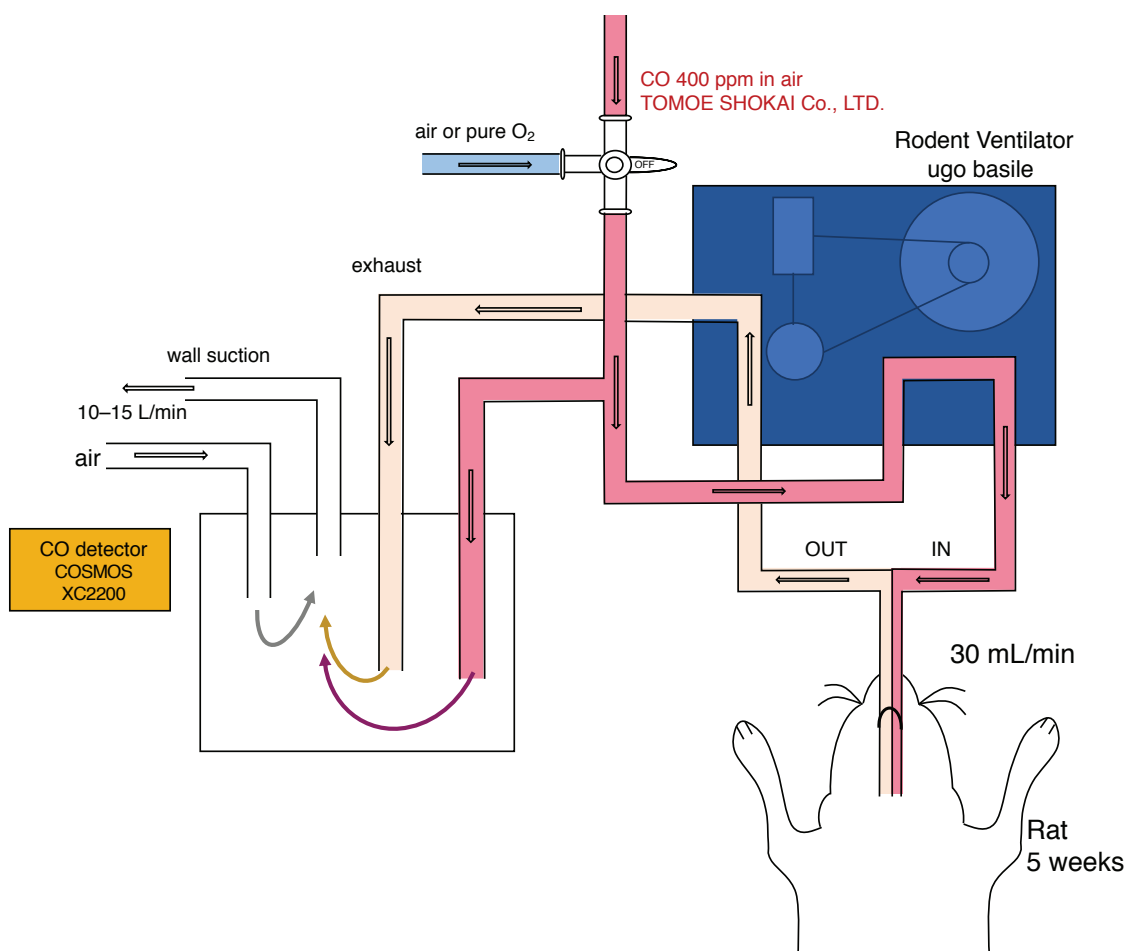
A : 肝臓の重量(mg)

## 2-9. CO ガスの吸入実験

*in vivo* での CO ガス吸入実験のセットアップを Figure 5-5 に示す。ペントバルビタールでラットを麻酔させた後、経口挿管し、人工呼吸器により空気で平衡された 400 ppm の CO ガス(流量 1 L/min, TOMOE SHOKAI Co., LTD.)をラットに各時間(5 min, 10 min, 20 min)に吸入させた。ラットに吸入させた CO ガス濃度は、CO 検出器(COSMOS XC2200)でモニターした。さらに、人体に害がないように排気ガスは空気で希釈され、CO 検出器(COSMOS XC2200)でモニターした。CO-Hb %は、右心室および左心室からそれぞれ静脈血と動脈血(RV と LV、それぞれ 0.1 mL)を採血し、直ちに ABL825 を用いて分析した。5 分、10 分、20 分、90 分後に、2-5 のフラッシング操作を行い、臓器中の血液を洗い流し、各臓器を採取してからすぐに液体窒素で凍結した。凍結した組織サンプルを-80 °C で冷凍保存した。

## 2-10. CO ガスの吸入後の空気または酸素による換気実験

2-9 と同様に実験のセットアップ(Figure 5-5)を行った。ペントバルビタールでラットを麻酔させた後、経口挿管し、人工呼吸器により空気で平衡された 400 ppm の CO ガス(流量 1 L/min, TOMOE SHOKAI Co., LTD.)をラットに 5 分間吸入させた後、吸入ガスを空気または O<sub>2</sub> ガス(99.999%, TOMOE SHOKAI Co., LTD)に切り替えた。RV および LV の血液サンプル(0.1 mL)をそれぞれ採取し、CO-Hb %を分析した。各時点毎に(10 min, 30 min, 60 min)、2-5 のフラッシング操作を行い、臓器中の血液を洗い流し、各臓器を採取してからすぐに液体窒素で凍結した。凍結した組織サンプルを-80 °C で冷凍保存した。



**Figure 5-5.** Schematic representation of the experimental setup for CO gas inhalation in rats. The apparatus allowed a rapid switch from inhaled CO gas (400 ppm) to air or O<sub>2</sub> by handling the three-way stop cock. The rate of inhalation was controlled by the rodent ventilator. The exhaled gas was mixed with air before exiting. For safety reasons, a CO detector was used for monitoring the atmospheric concentrations of CO.

## 2-11. CO ガスの吸入後の oxy-hemoCD1 の投与実験

oxy-hemoCD1 の自動酸化反応を避けるために、各実験の前に oxy-hemoCD1 溶液(1.4–3.0 mM in PBS, 2.5 mL)を新たに調製した。oxy-hemoCD1 溶液(1.4–3.0 mM in PBS, 2.5 mL)を調製し、テルモシリンジに入れ、テルモシリンジポンプにセットして動物への投与準備をした。

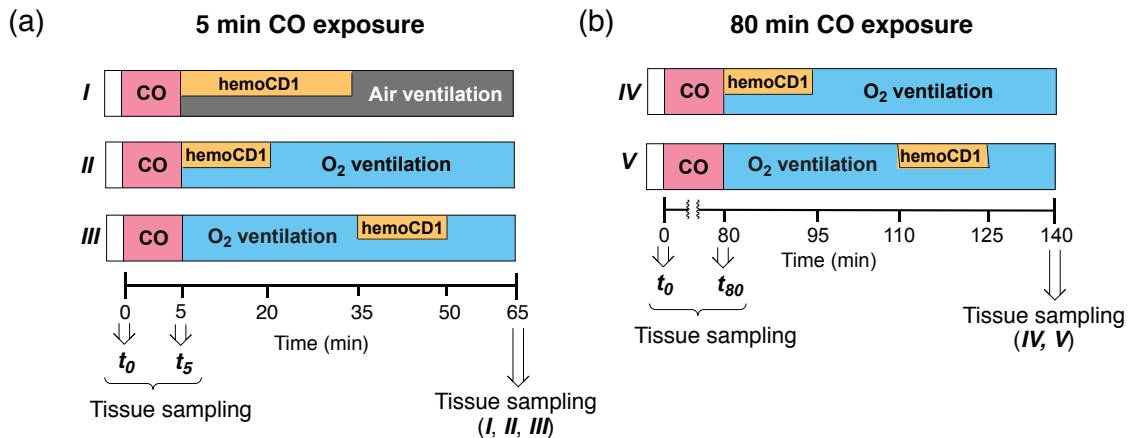
実験 I (Figure 5-6a)では、400 ppm の CO ガスをラットに吸入させた 5 分後、

吸入ガスを空気に切り替えたと共に、1mL oxy-hemoCD1 を尾静脈からすばやく注入した。次に、残りの oxy-hemoCD1 溶液(1.5 mL)を 4.5 mL/h の速度で尾静脈から注入した(総注入時間: 30 min)。その後、ラットはさらに空気で 30 分間換気続けた。0、5、15、35、および 65 分の時点( $t_0$ 、 $t_5$ 、 $t_{15}$ 、 $t_{35}$ 、 $t_{65}$ )で RV および LV から採血(0.1 mL)した。同時に、膀胱から尿を回収し、尿を PBS で適当に希釈して、吸収スペクトルを測定した。各時点で実験終了後にラットを開腹し、2-5 のフラッシング操作を行い、臓器中の血液を洗い流し、各臓器を採取してからすぐに液体窒素で凍結した。凍結した組織サンプルを $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

実験 II (Figure 5-6a)では、400 ppm の CO ガスをラットに吸入させた 5 分後、吸入ガスを  $\text{O}_2$  ガスに切り替えたと共に、1mL oxy-hemoCD1 を尾静脈からすばやく注入した。次に、残りの oxy-hemoCD1 溶液(1.5 mL)を 9.0 mL/h の速度で尾静脈から注入した(総注入時間: 15 min)。その後、ラットはさらに  $\text{O}_2$  ガスで 45 分間換気続けた。実験 I と同じ手順で、RV および LV の血液サンプルと組織を採取した。

実験 III (Figure 5-6a)では、400 ppm の CO ガスをラットに吸入させた 5 分後、吸入ガスを  $\text{O}_2$  ガスに切り替え、30 分  $\text{O}_2$  ガスによる換気を行なった。30 分後、1mL oxy-hemoCD1 を尾静脈からすばやく注入した。次に、残りの oxy-hemoCD1 溶液(1.5 mL)を 9.0 mL/h の速度で尾静脈から注入した(総注入時間: 15 min)。その後、ラットはさらに  $\text{O}_2$  ガスで 15 分間換気続けた。実験 I と同じ手順で、RV および LV の血液サンプルと組織を採取した。

実験 IV および V (Figure 5-6b)では、400 ppm の CO ガスをラットに吸入させた 80 分後、吸入ガスを  $\text{O}_2$  ガスに切り替えた。実験 IV および V においては、3.0 mM oxy-hemoCD1 溶液(2.5 mL)を静脈内注射に使用した。その後の手順は、それぞれ実験 II および III と同様に行った。



**Figure 5-6.** Anesthetized rats were exposed to CO inhalation (400 ppm) for 5 min (a) and 80 min (b) followed by either air or pure O<sub>2</sub> ventilation in combination with intravenous hemoCD1 infusion.

## 2-12. ラット尿サンプルの吸収スペクトル測定

実験 I-V において採集した尿サンプルを PBS で適当に希釈して、吸収スペクトルを測定した。測定後のセルに過剰な Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を添加し、その後吸収スペクトルを測定した。

## 2-13. 細胞実験に用いた細胞および試薬

ヒト肝癌細胞(HepG2 細胞)は理化学研究所セルバンクより購入し、3 世代以上継代したものを使用した。細胞の培養には、液体培地として D-MEM (低グルコース、L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム含有)を Gibco™ より購入し使用した。Fetal Bovine Serum (FBS)は Biowest (France)より購入し、あらかじめ 57 °C、30 分間加熱処理を行ったものを使用した。抗生物質は PS (ペニシリン-シトレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液)および 0.25 w/v % トリプシン 1 mmol/L EDTA・4Na 溶液を富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。HepG2 細胞は D-10 培地(D-MEM / 10 % FBS / 1 % PS 含有)を用いて培養した。培養は、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気で行った。

## 2-14. hemoCD1 による細胞内 CO 定量

HepG2 細胞( $1 \times 10^6$ )に CORM401-E (25  $\mu$ M in D-10)を添加し、2 時間インキュベートした。2 時間後、培地を除去し、細胞を PBS で洗浄し、oxy-Hb (15  $\mu$ M in D-10)を添加し、さらに 1 時間インキュベートした。その後細胞を PBS で洗浄し、細胞をセルスクレイパーで剥離した。細胞懸濁液中の細胞数をカウントし、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (ca. 1-2 mg)および met-hemoCD1 (2  $\mu$ M)を加え、その後超音波破碎機 (QSONICA)を用いて細胞破碎を行った。破碎液のサンプルを 14000 G で 10 分間の遠心分離を行った。上清に  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (ca. 1-2 mg)を加えた後、吸収スペクトルを測定した。

## 2-15. MTT による hemoCD1 および Py3CD の細胞毒性測定

96 well マイクロプレートに  $10 \times 10^4$  cells/mL に調製した HepG2 細胞懸濁液を各スポットにつき 100  $\mu$ L ずつ加え、37 °C、5 %  $\text{CO}_2$  条件下で 24 時間培養した。培養した HepG2 細胞から培地を除去、PBS で洗浄後、化合物の培地溶液 100  $\mu$ L (D-10)を加えた。各試料(met-hemoCD1, Py3CD)を 3 時間培養後、培地溶液を除去し、PBS で洗浄した。各スポットを D-10 培地 90  $\mu$ L で置換した後、MTT 溶液を各スポットにつき 10  $\mu$ L ずつ添加し、さらに 3 時間培養した。培養後、培地は除去し、結晶溶解液(DMSO)で沈殿物を完全に溶解した。Multiskan™ FC マイクロプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific)で求めた各スポットの吸光度(励起波長: 570 nm)から細胞の生存率を算出した。

## 2-16. 統計解析

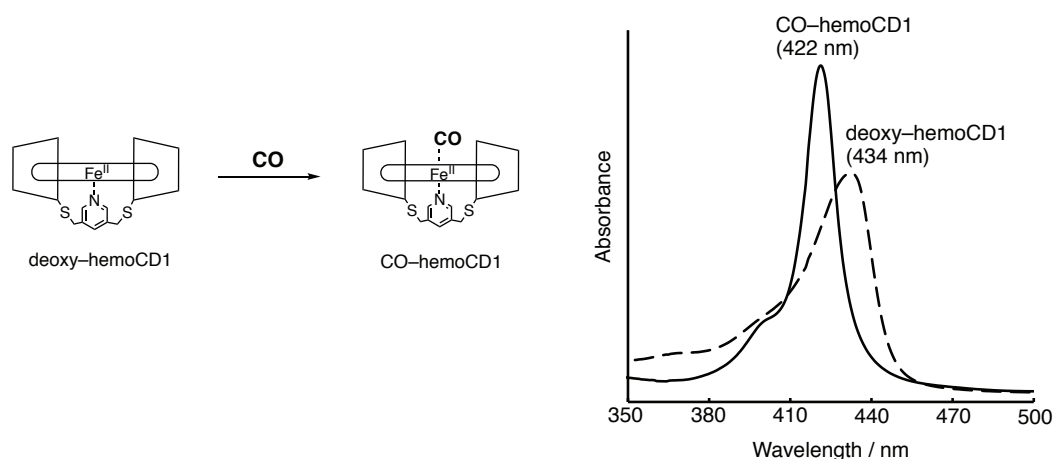
すべてのデータは少なくとも 3 回の独立した実験の平均値 $\pm$  SE あるいは $\pm$  SD として示した。Student の  $t$  検定を行い、 $p < 0.05$  で統計的に有意な差があると判断した。



### 3. 結果および考察

#### 3-1. hemoCD1 を用いた高感度 CO 定量法の開発

CO 定量に用いた CO-hemoCD1 および deoxy-hemoCD1 の吸収スペクトルを (Figure 5-7) に示す。還元剤である  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  より、鉄(III)の met-hemoCD1 が鉄(II)の deoxy-hemoCD1 ( $\lambda_{\text{max}} = 434 \text{ nm}$ ) に還元され、CO ガスをバブリングすると、CO が中心鉄(II)に配位し、CO-hemoCD1 ( $\lambda_{\text{max}} = 422 \text{ nm}$ ) が形成され、非常にシャープなソーレー帯が観測される。



**Figure 5-7.** UV-vis spectra of hemoCD1 showing the Soret bands typical of deoxy-hemoCD1 (434 nm) and CO-hemoCD1 (422 nm) in PBS at pH 7.4 and 25 °C.

水溶液中に溶解した CO を hemoCD1 によって正確に検出できるかどうかを検討した。異なる CO 濃度に調整した水溶液を deoxy-hemoCD1 と混合し、その吸収スペクトルを測定した (Figure 5-8a)。CO 濃度の増加に伴って、deoxy-hemoCD1 の吸収スペクトルは等吸収点 (427 nm) を通りながら CO-hemoCD1 へとシフトした。実験項の 2-6 項に示した計算方法を用いて、422 および 434 nm での吸光度比 ( $A_{422}/A_{434}$ ) および 422 nm および 434 nm における CO-hemoCD1 と deoxy-hemoCD1 のモル吸光係数 ( $\epsilon_{\text{co}}^{422}$ ,  $\epsilon_{\text{co}}^{434}$ ,  $\epsilon_{\text{deoxy}}^{422}$  および  $\epsilon_{\text{deoxy}}^{434}$ ) (Table 5-2) を用いて、溶液中の hemoCD1 に対して CO-hemoCD1 の割合 ( $R_{\text{CO}}$ ) を以下の式より算出した。

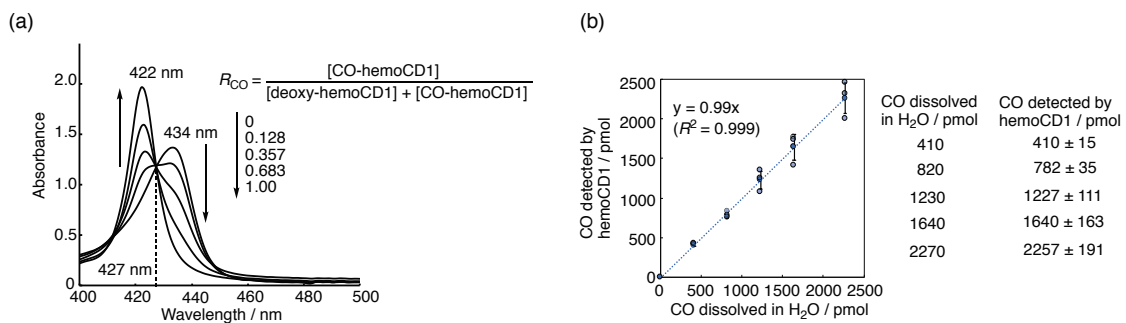
$$R_{CO} = \frac{[\text{CO-hemoCD1}]}{[\text{deoxy-hemoCD1}] + [\text{CO-hemoCD1}]}$$

$$= \frac{\varepsilon_{\text{deoxy}}^{422} - A_{422} / A_{434} \cdot \varepsilon_{\text{deoxy}}^{434}}{A_{422} / A_{434} (\varepsilon_{\text{CO}}^{434} - \varepsilon_{\text{deoxy}}^{434}) - \varepsilon_{\text{CO}}^{422} + \varepsilon_{\text{deoxy}}^{422}} \quad (5-9)$$

溶液中 hemoCD1 の総濃度( $C_{\text{total}}$ )は、deoxy-hemoCD1 と CO-hemoCD1 の等吸収点 427 nm におけるモル吸光係数( $\varepsilon_{427}$ )を用いて算出した(Table 5-2)。溶液中の CO ( $M_{\text{CO}}$ )の量は、 $R_{\text{CO}}$ 、 $C_{\text{total}}$  およびろ液の体積  $V$  を以下の式に代入することで算出した。

$$M_{\text{CO}} (\text{mol}) = R_{\text{CO}} \cdot C_{\text{total}} \cdot V \quad (5-10)$$

脱気した水に CO ガス(99.999%)を注入して調整した各 CO 濃度水溶液における CO 濃度と hemoCD1 を用いて 2-6 項に示した計算方法で算出した  $M_{\text{CO}}$  値とは直線関係が得られた(Figure 5-8b,  $y = 0.99x$ ,  $R^2 = 0.999$ )。最小で約 400 pmol の CO を検出することができ、さらに Figure 5-8b に示している検量線の傾きは 1 で切片が 0 であることから、溶液中の CO 量は、式(5-7)を用いて直接決定できることがわかった。

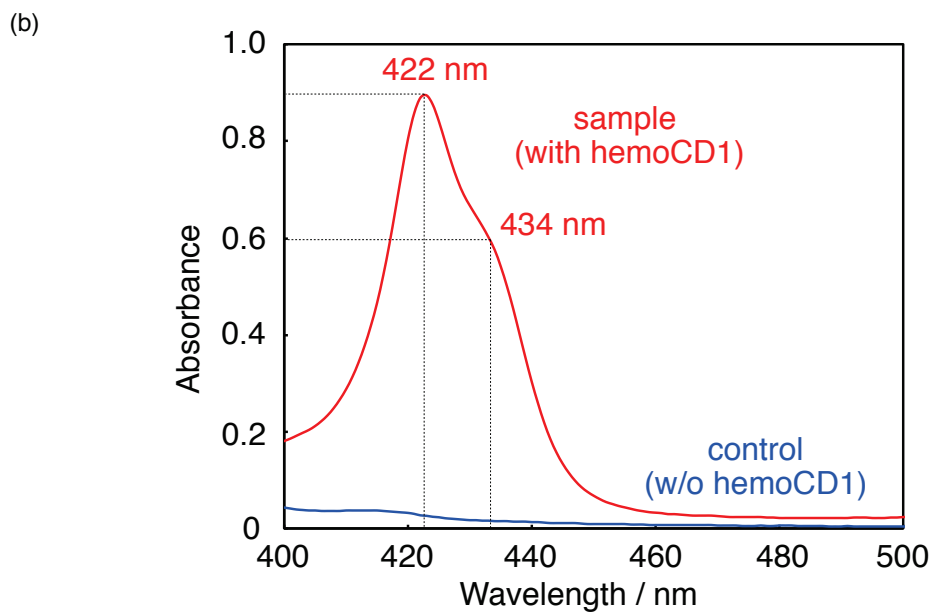
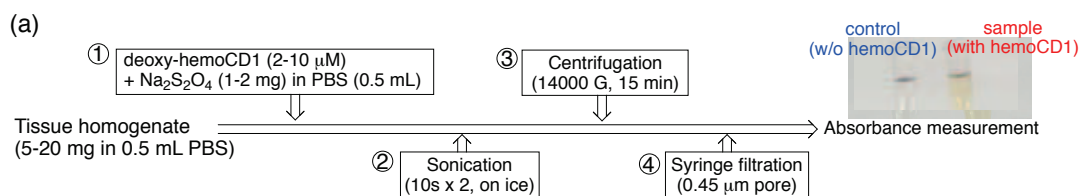


**Figure 5-8.** Spectroscopic quantification of CO in aqueous solution using hemoCD1. (a) UV-vis spectra of hemoCD1 (6.0  $\mu\text{M}$ ) after exposure to various amounts of CO in PBS (1 mL) at pH 7.4 and 25  $^{\circ}\text{C}$ .  $R_{\text{CO}}$  values were calculated using eq (5-7). (b) The plot of known amounts of CO dissolved in water versus the quantified values of CO determined by the hemoCD1 assay. Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

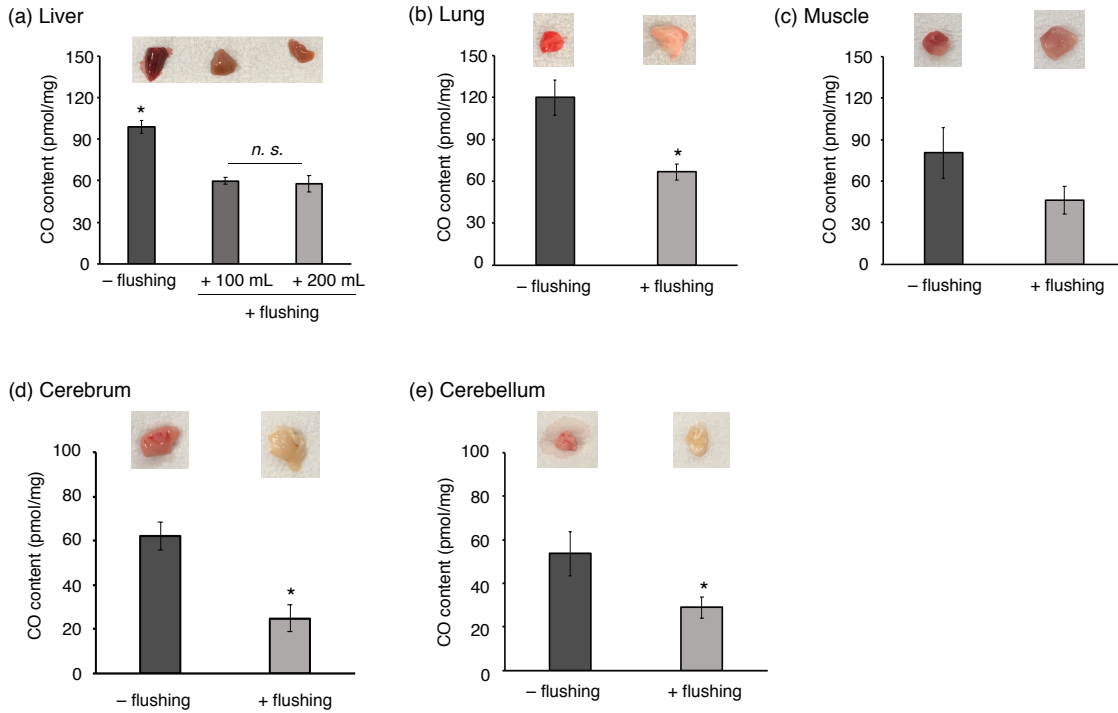
### 3-2. 生体組織における CO の hemoCD1 による定量

hemoCD1 を用いて、2-6 項で示した実験手順(Figure 5-9a)に従って、ラット各組織に含まれる内因性 CO 量を測定した。組織に deoxy-hemoCD1 を加えて、超音波で破碎した破碎液を遠心した後、透明な上澄み(Figure 5-9a 写真)が得られ、それを 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過した。次に、得られたろ液の吸収スペクトルを測定した(Figure 5-9b)。hemoCD1 の CO 体と deoxy 体のソーレー帯が観測された。コントロールとして、deoxy-hemoCD1 を添加せずに同じ手順で処理したサンプル(w/o hemoCD1)の吸収スペクトルを測定した(Figure 5-9b)。CO 量の算出に用いた 422 および 434 nm における吸光度は、deoxy-hemoCD1 を添加したサンプル(with hemoCD1)の吸光度から deoxy-hemoCD1 を添加していないサンプル(w/o hemoCD1) の吸光度差し引いた値とした。これらの吸光度を式(5-7)に代入し、 $R_{\text{CO}}$  を算出した。また、等吸収点 427 nm における吸光度から決定された  $C_{\text{total}}$  は、サンプルに最初に添加された deoxy-hemoCD1 の濃度とよく一致した。したがって、超音波破碎、遠心分離、およびろ過などの操作によって hemoCD1 が減少しなかったことを示している。以上の手順より、 $R_{\text{CO}}$  および  $C_{\text{total}}$  を式(5-8)に代入し、組織に含まれる CO 量( $M_{\text{CO}}$ )を算出した。

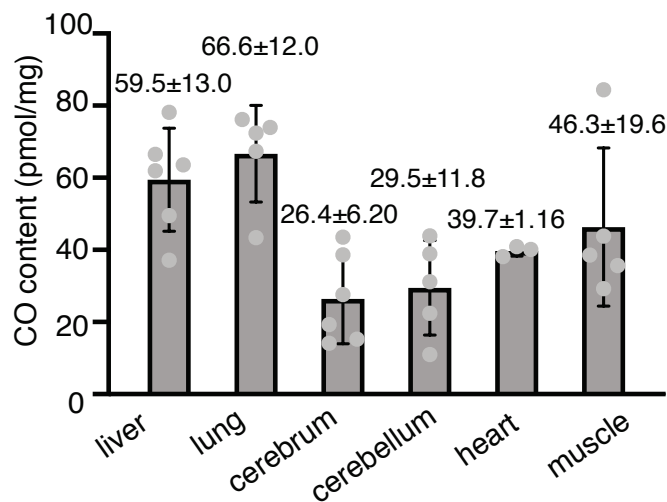
CO は血液中の Hb と結合することから、各組織サンプルには血液が含まれているため、サンプルに CO-Hb が残っている場合、多く見積もる可能性がある。従って、組織中に含有している血液量によって CO 量が大きく左右される。各組織内に含まれる CO-Hb の影響を最小にするために、生理食塩水を用いて血液除去操作であるフラッシングを行った。フラッシング前後における各組織(肝臓 liver、肺 lung、筋肉 muscle、大脳 cerebrum、および小脳 cerebellum)の写真とその CO 定量結果を Figure 5-10 にまとめた。各組織の写真から血液の除去により各組織の血液由来の赤色が抜けたことが観測された。フラッシングされた組織では、検出された CO 量も血液を含む臓器に比べて減少した。100 または 200 mL の生理食塩水でフラッシュした後(Figure 5-10a)、肝臓の CO 量は変化しなかったことから、これからの実験において 200 mL の生理食塩水を用いてフラッシングを行った後、CO 定量することとした。



**Figure 5–9.** Quantification of CO in rat tissues. (a) Experimental procedure describing the various steps of the hemoCD1 assay for measuring CO in tissue samples collected from different rat organs. (b) Typical representative spectra of supernatant solutions of liver sample and control obtained at the end of the hemoCD1 assay.

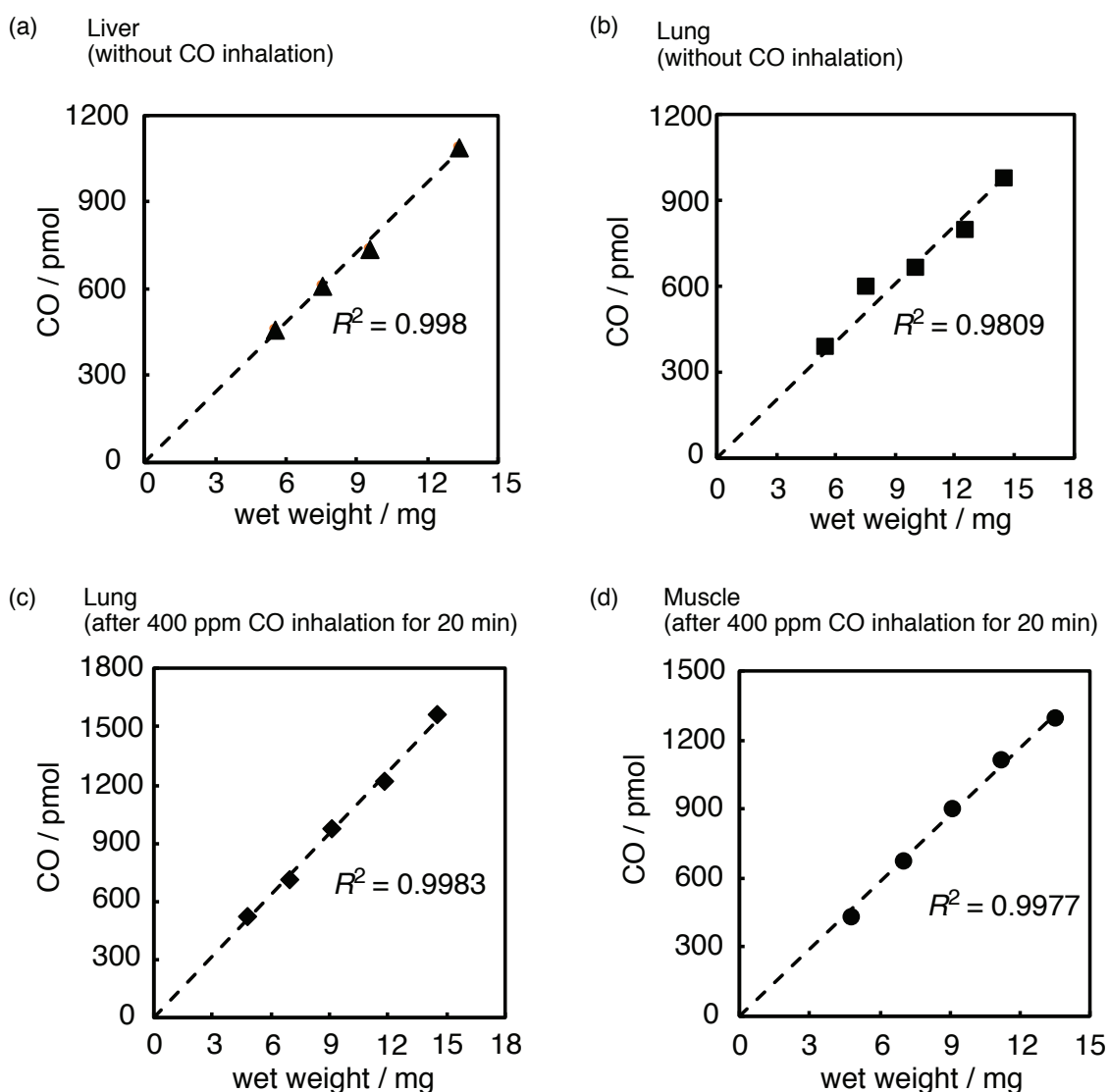


**Figure 5–10.** Quantification of endogenous CO in tissues. The amounts of CO contained in the liver, lung, muscle, cerebrum, and cerebellum without (–) and with flushing (+) the organs with saline (100–200 mL) to remove residual blood. The amounts of CO were quantified by the hemoCD1 assay. Each bar represents the means  $\pm$  SE ( $n = 3–6$  rats per group). \* $p < 0.05$  vs –flushing, not significant, *n.s.*



**Figure 5–11.** Quantification of endogenous CO (pmol/mg, wet weight) in tissues using the hemoCD assay. Each bar represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3–6$ ).

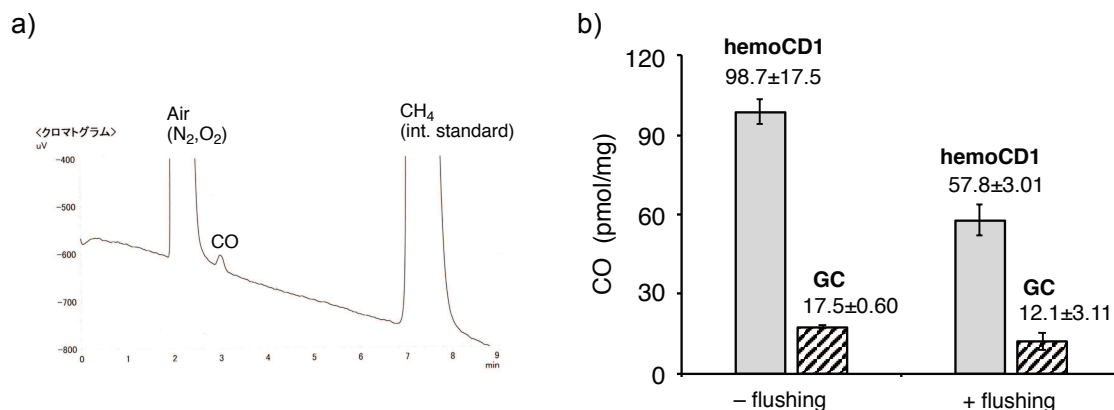
次に、各組織(肝臓 liver、肺 lung、筋肉 muscle、大脳 cerebrum、および小脳 cerebellum)における内因性 CO の定量を hemoCD assay によって行った。その結果を Figure 5-11 に示す。内因性 CO はヘムタンパク質のヘムが、ヘム分解酵素であるヘモオキシゲナーゼ(HO)の作用によって分解される際に副生成物として生成される<sup>3,43)</sup>。そのほとんどは赤血球の分解により生産されるが、ミオグロビン(Mb)、シトクロム、ペルオキシダーゼやカタラーゼなどの他のヘムタンパク質の分解により発生する CO は、総量の約 20-25%を占めている<sup>44-47)</sup>。ヘムオキシゲナーゼ(HO)によりヘム分解反応は体内に広く存在し、肝臓は特に主要な臓器として知られている<sup>1,4,13)</sup>。また、Booke らは動脈の CO-Hb%は中心静脈の CO-Hb%よりも高く、それは肺で作られた CO がすぐに循環するためであると報告した<sup>48)</sup>。脳内 CO は主に構成型ヘムオキシゲナーゼ-2 (HO-2)により生産される<sup>49,50)</sup>。ヘムオキシゲナーゼにより生産された CO のほとんどは Hb と結合するが、そのほか、ミオグロビン(Mb)、シトクロムオキシダーゼ、シトクロム P450 などのヘムタンパク質にも配位することができる<sup>4,13,51)</sup>。Coburn らは、心臓および骨格筋に存在する Mb は、心臓で 2%未満、骨格筋で 1%未満の CO-Hb レベルでも CO と結合することを実証した<sup>52-54)</sup>。脾臓は赤血球の生産や古くなった赤血球の破壊を行う臓器として知られている<sup>4)</sup>。従って、脾臓には内因性 CO が多く存在することが考えられる<sup>4)</sup>。脾臓にはヘムが多く存在するため、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>による処理では十分に除去できず、hemoCD1 のスペクトルに影響を与えるため、CO の量を正確に定量できなかった。また、測定した各組織の CO 量は組織の重量と良好な直線関係(Figure 5-12)を示し、deoxy-hemoCD1 による臓器の CO 定量結果は、高い再現性を有することが示された。



**Figure 5-12.** Plot of the wet weight of tissues (liver (a), lung with or without CO inhalation (b, c) and muscle (d)) versus the amount of CO detected. The linearity ensures accuracy of the CO quantification assay.

hemoCD アッセイと従来の GC 法を比較するために、2-8 項の実験方法<sup>19,38)</sup>に従って、GC 法を用いて肝臓内の CO 量を測定した。GC 法により CO 定量を行った結果(Figure 5-13a)および hemoCD assay と比較したグラフを Figure 5-13b に示す。破碎した組織をスルホサリチル酸で酸化し、ヘム鉄に結合している CO を遊離させてから、気相のガス状 CO を測定した<sup>19-21,76,77)</sup>。Figure 5-13b に示しているように  $17.5 \pm 0.6$  および  $12.1 \pm 3.1$  pmol/mg の CO が、生理食塩水でフラッシング前後の肝臓組織で検出された。GC 法によって肝臓で検出された CO 量

は、以前に報告されたデータとよく一致していた<sup>77)</sup>。一方、hemoCD1 はより多くの CO が検出された( $98.7 \pm 17.5$ 、 $57.8 \pm 3.0$  pmol/mg)。GC 法による CO の過小評価は、おそらく組織に強く結合し、スルホサリチル酸によって放出されない残留 CO によるものと考えられる。hemoCD アッセイでは GC 法よりも多くの CO を組織内から検出できることが明らかとなった。



**Figure 5-13.** Comparison between the hemoCD1 assay and the gas chromatography (GC) method for CO quantification in tissues. (a) A typical gas chromatogram recording the amount of CO from a liver sample. (b) The amounts of CO in the liver tissues (- or + flushing) quantified by the hemoCD1 assay and the GC method. Each bar represents mean  $\pm$  SE ( $n = 3-6$ ).

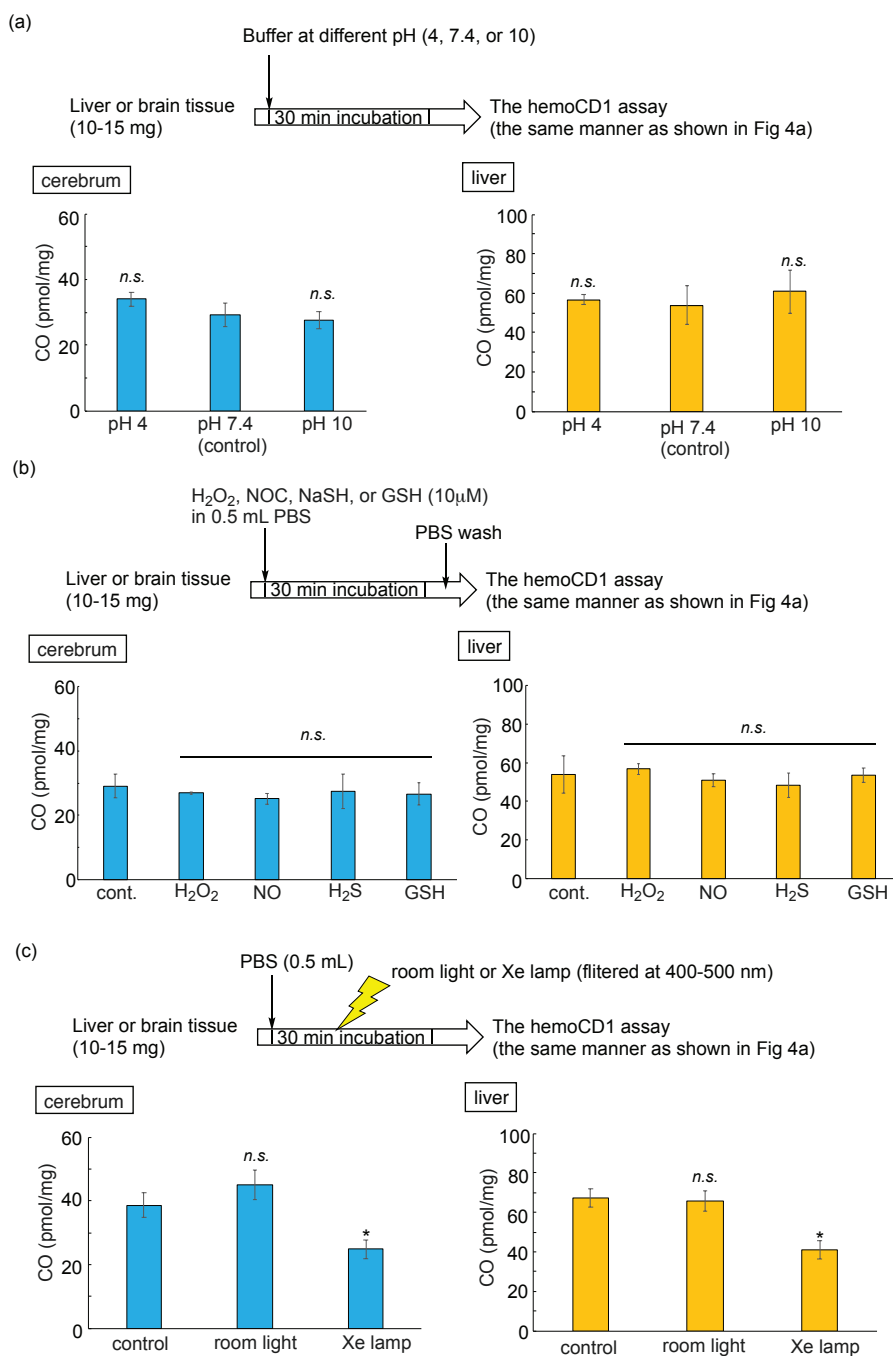
上記の方法では、2017年に Kitagishi らが報告した hemoCD アッセイ (Figure 5-4)<sup>41)</sup> を下記の点において改良した。前の方法のように oxy-hemoCD1 を用いて CO 定量を行う場合、oxy-hemoCD1 を調製する度に過剰な Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を除去する必要があり、そのためゲルろ過カラム (Sephadex G25) に通す前処理必要がある。さらに組織から分離したろ液中の hemoCD1 の最終濃度 ( $C_{total}$ ) を決定するために、すべての hemoCD1 を CO-hemoCD1 に変換しており、CO ガスバブリングを行っていた。また、臓器や組織を測定する場合には、タンパク質成分から hemoCD1 を分離するために高価な限外ろ過フィルターを使用していた。本実験において改良した hemoCD アッセイでは、過剰な Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> の存在下での 422 および 434 nm での吸光度比に基づいて組織内の CO 量を決定するため、oxy-hemoCD1 を作るためのゲルろ過ステップを省略することができた。さらに Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> は組織のタンパク質などの生体成分の沈殿を促し、限外ろ過を行わなくても遠心分離後に



透明な溶液(Figure 5-9a)を得ることができた。従って、限外ろ過フィルターも必要なくなった。CO 定量には  $A_{422} / A_{434}$  および  $A_{427}$  の吸光度を用いるため、一本のスペクトル測定で  $C_{total}$  および  $R_{CO}$  を決定することができるため、最終的な CO バブリングも不要となった。また、改良した hemoCD アッセイが *in vitro* で培養細胞にも適用できることを確認し、以前に報告した結果と同じ量の内因性 CO を定量することができた<sup>41)</sup>。したがって、新たに改良した hemoCD アッセイは正確かつ簡便に、細胞および臓器などの生体試料に含まれる CO を定量することが可能である優れた方法であることが示された。

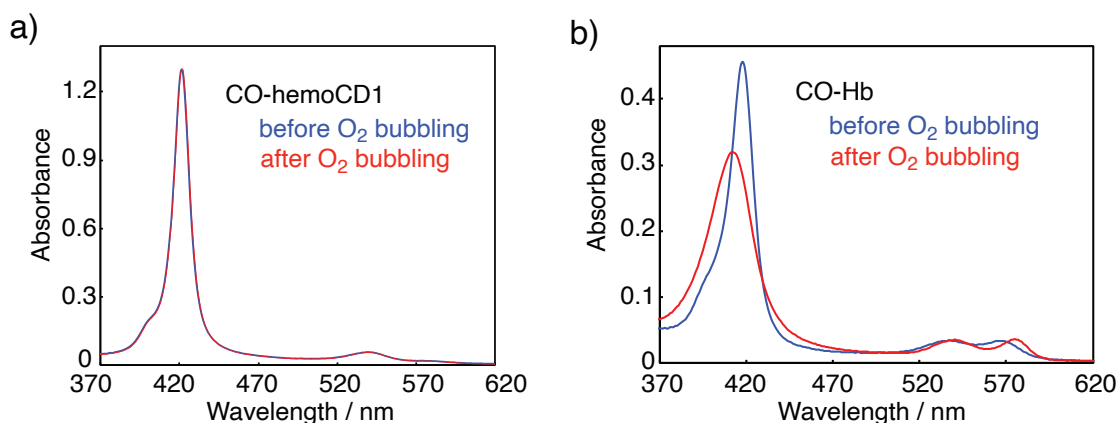
### 3-3. hemoCD1 の CO 定量試薬および CO 除去剤としての物性評価

さまざまな条件において正確に CO 量を測定できるかどうかを評価した。pH、光(室内光、Xe lamp)、ROS、NO、 $H_2S$ 、グルタチオン(GSH)などの生物学的反応種の存在下で脳および肝臓内の CO 量を測定した。pH 7.4 の PBS で行なった CO 定量をコントロール実験とした。hemoCD1 は pH 4-10 において安定している<sup>35)</sup>ため、Figure 5-14a に示しているように、hemoCD1 によって定量した各組織内の CO 量は pH 変化の影響を受けないことがわかった。また、 $H_2O_2$  (10  $\mu$ M)、NOC5 (10  $\mu$ M)、NaSH (10  $\mu$ M) および GSH (10  $\mu$ M) で組織を 30 分インキュベートした後、PBS で洗浄してから hemoCD assay によって CO 量を測定した結果(Figure 5-14b)、コントロール実験と CO 量の有意差が観測されなかったため、hemoCD1 によって定量した各組織内の CO 量は上記のような生体内小分子の影響を受けないことがわかった。また、室内光および Xe ランプで同様な実験を行ったが、Xe ランプ照射後 CO 量の減少が観測された(Figure 5-14c)。これは、Xe ランプ照射により、CO-hemoCD1 の鉄(II)-CO 結合が強い光で一部切断され、鉄(II)から CO が解離されたことが考えられる。



**Figure 5–14.** pH (a), Effects of external reactive species (b), and light (c) on quantification of endogenous CO in the liver and brain tissues by hemoCD1. The data indicate that the assay using hemoCD1 was unaffected by the reactive species, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S and GSH, pH (from 4 to 10), and room light. The data in c indicate that the strong irradiation by Xe lamp reduced CO due to dissociation of the CO-Fe complex. Statistical significance, \* $p < 0.05$  vs control; not significant, *n.s.*

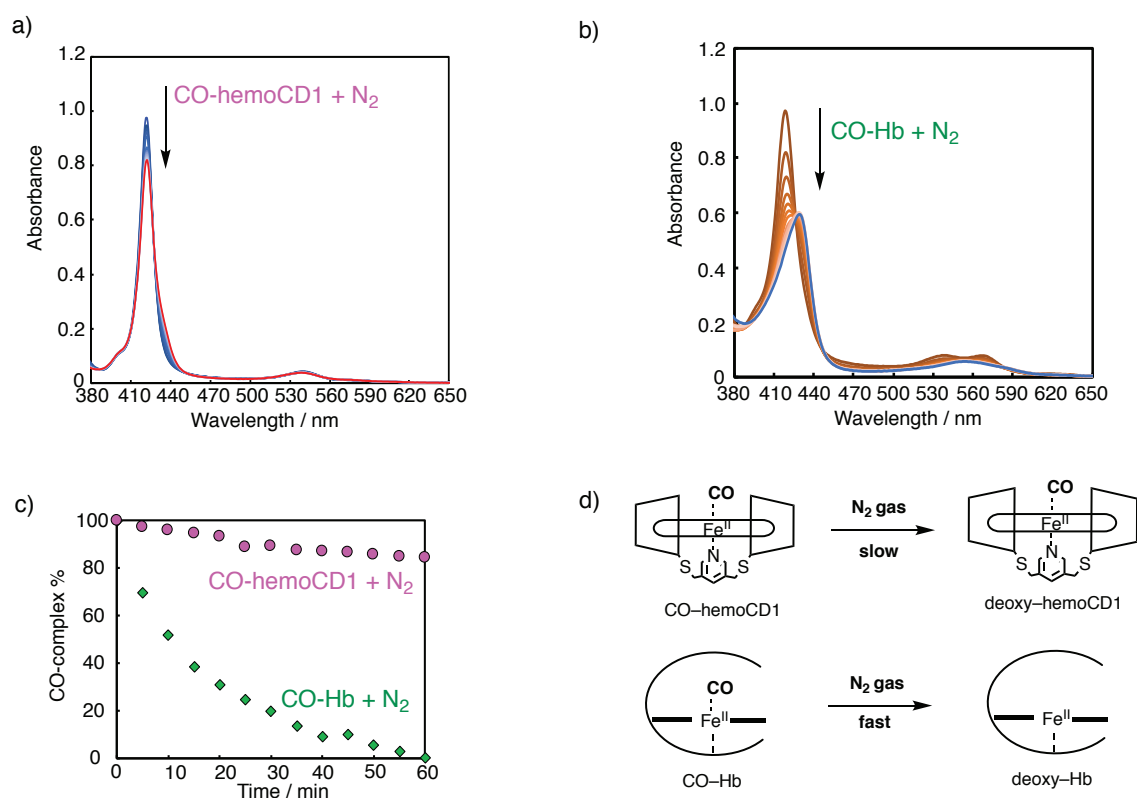
CO-hemoCD1 が様々な条件で安定に存在するかどうかを調べるために、CO-Hb を用いて比較実験を行った。CO-hemoCD1 溶液に O<sub>2</sub> ガス(99.999 %, 住友精化株式会社)を 5 分間バブリングしても、吸収スペクトル変化しない(Figure 5-15a)ことに対し、CO-Hb は、O<sub>2</sub> ガスを 5 分間バブリングすると、その吸収スペクトルは CO-Hb から Hb の O<sub>2</sub> 付加体 O<sub>2</sub>-Hb へと変化した(Figure 5-15b)。hemoCD1 の CO に対する親和性は O<sub>2</sub> よりはるかに高く、CO が hemoCD1 の中心鉄に配位すると、CO 付加体として安定に存在する。一方、Hb の中心鉄(II)に配位している CO は容易に O<sub>2</sub> により置換されることがわかった。



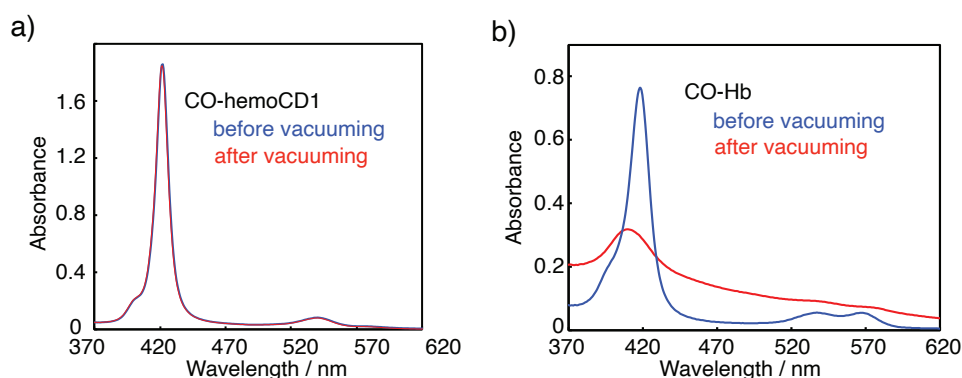
**Figure 5-15.** Stabilities of CO-hemoCD1 and CO-Hb upon O<sub>2</sub> bubbling. (a,b) UV-vis spectra of CO-hemoCD1 (a) and CO-Hb (b) in PBS at pH 7.4 and 25°C before (blue) and after (red) bubbling O<sub>2</sub> into the solutions for 5 min.

次に、CO-hemoCD1 溶液および CO-Hb 溶液にそれぞれ N<sub>2</sub> ガス(99.999 %, 住友精化株式会社) をバブリングし、一定時間毎の吸収スペクトル変化を観測した(Figure 5-16)。CO-hemoCD1 の吸収スペクトルは 60 分間も N<sub>2</sub> バブリングにもかかわらず、その吸収スペクトルは deoxy-hemoCD1 に戻らなかった(Figure 5-16a)。それに対して、CO-Hb の吸収スペクトルは等吸収点を通りながら deoxy-Hb へ戻った(Figure 5-16b)ことがわかった。さらに、CO-hemoCD1 溶液を 2 時間減圧(<10 Torr)させて、常圧に戻して再び PBS より溶かした結果、減圧前と同様の CO-hemoCD1 のシャープなスペクトルを示した(Figure 5-17a)。対照的に、CO-Hb 溶液に対して同じ実験を行った結果、CO-Hb はほぼ変性し分解したことがわかった(Figure 5-17b)。また、CO-hemoCD1 溶液および CO-Hb 溶液それぞれに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

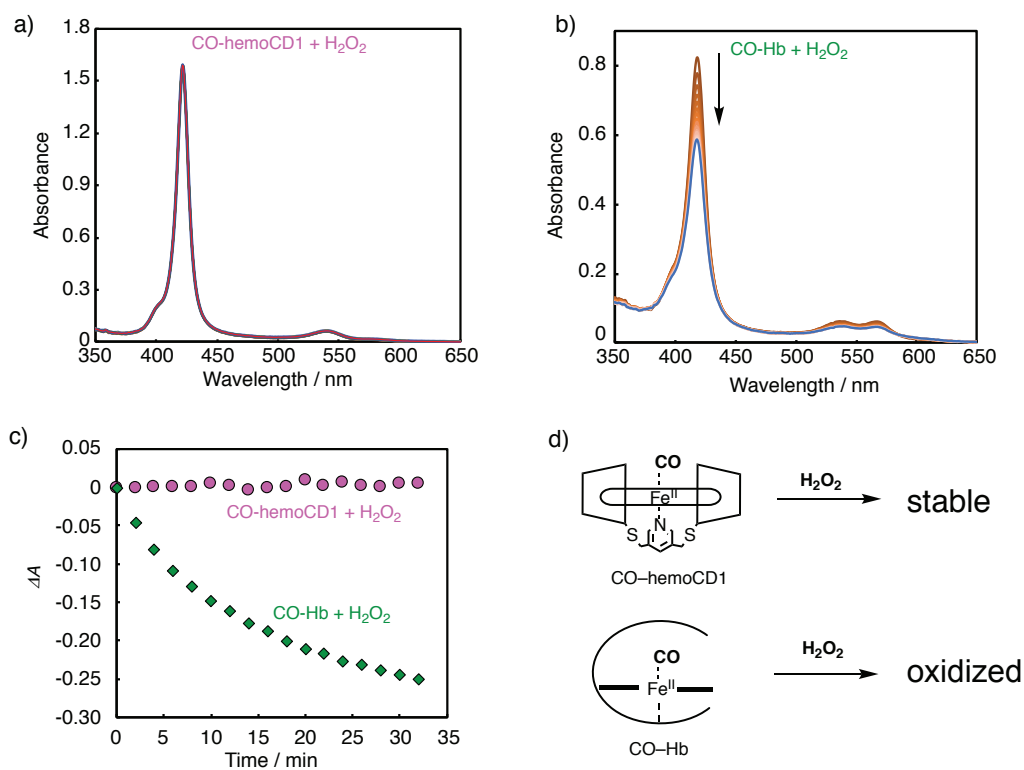
を加え、その吸収スペクトル変化を観測した(Figure 5-18)。CO-hemoCD1 の吸収スペクトルはシャープなスペクトルのままに対して、CO-Hb は同じ条件下で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって分解された。さらに、細胞破碎液に CO-hemoCD1、oxy-hemoCD1 および deoxy-hemoCD1 をそれぞれ加え、24 時間後の吸収スペクトル変化を測定した。その結果を Figure 5-19 に示す。CO-hemoCD1(Figure 5-19a)および deoxy-hemoCD1 (Figure 5-19b)の吸収スペクトルがほぼ変化しなく、これは CO-hemoCD1 が生体成分存在下でも長時間にわたっても非常に安定であることを示している。oxy-hemoCD1 (Figure 5-19c)は時間経過とともに自動酸化反応が進み、24 時間後には鉄(III)の met-hemoCD1 に変化した。



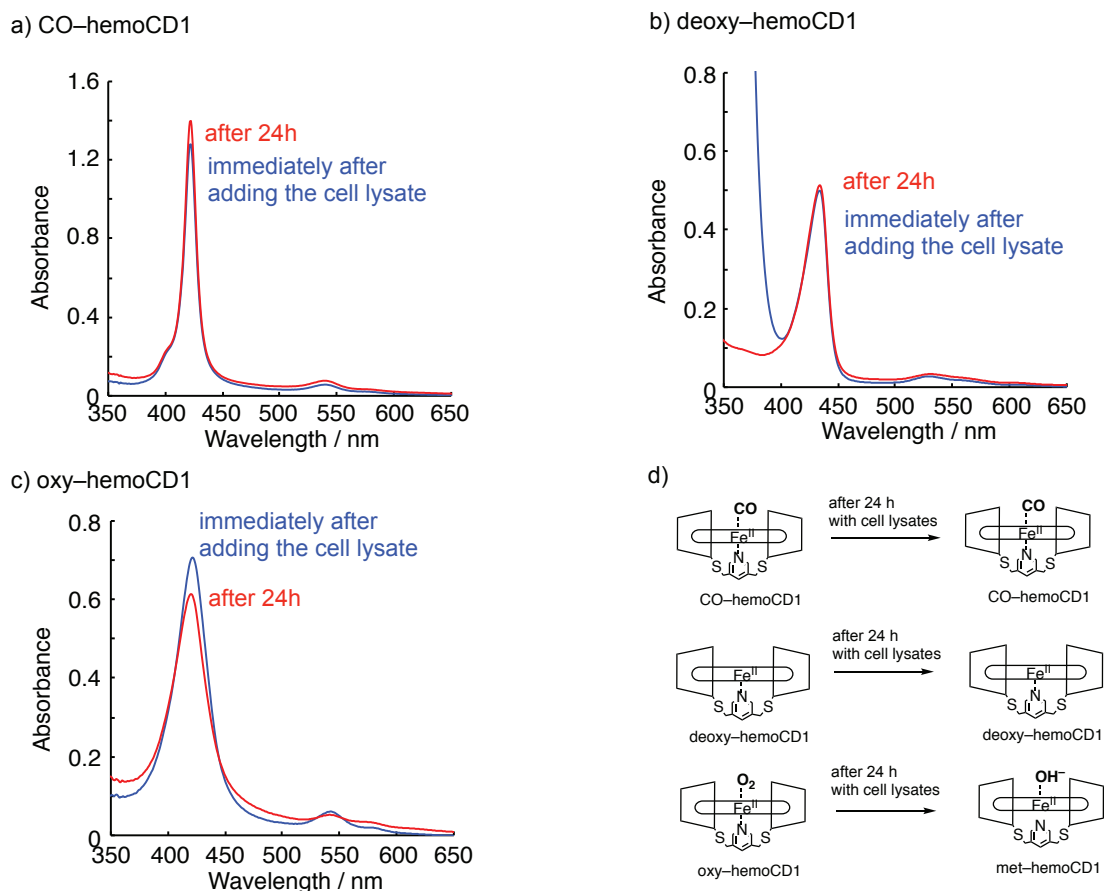
**Figure 5-16.** Stabilities of CO-hemoCD1 and CO-Hb upon N<sub>2</sub> bubbling. (a,b) UV-vis spectral changes of CO-hemoCD1 (a) and CO-Hb (b) in phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4 and 25°C after N<sub>2</sub> bubbling. (c) The plot of the residual CO-complexes (%) of Hb and hemoCD1 during N<sub>2</sub> bubbling. (d) The data indicate that CO-Hb was converted to its deoxy-form by reducing CO partial pressure, while CO-hemoCD1 was hardly affected due to its high CO binding affinity and stability.



**Figure 5-17.** Stabilities of CO-hemoCD1 and CO-Hb upon vacuuming. (a,b) UV-vis spectra of CO-hemoCD1 (a) and CO-Hb (b) before (blue) and after (red) vacuuming under 10 Torr for 2 h followed by re-solubilization of the residues.



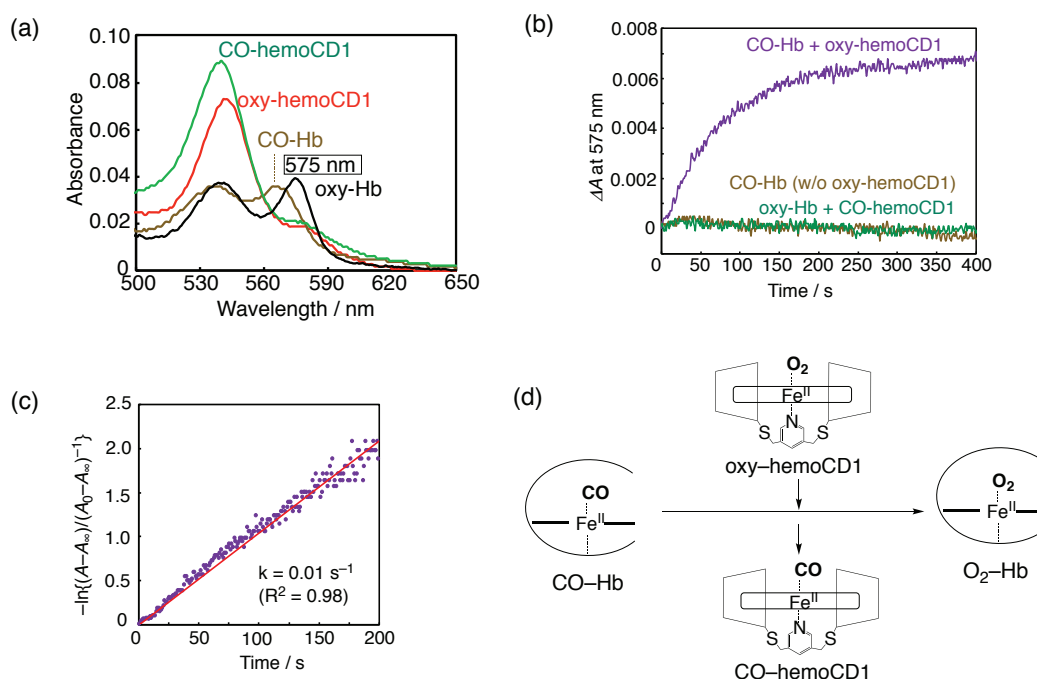
**Figure 5-18.** Stabilities of CO-hemoCD1 and CO-Hb against oxidation. (a,b) UV-vis spectra of CO-Hb (a) and CO-hemoCD1 (b) in phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4 and 25°C after the addition of 20 eq of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 2 min recording time intervals. (c) The plot of the changes in absorbances at  $\lambda_{\max}$  of CO-Hb (418 nm) and CO-hemoCD1 (422 nm). (d) The data indicate that CO-Hb was gradually oxidized and decomposed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while CO-hemoCD1 was resistant to oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figure 5-19.** Stabilities of CO-, deoxy-hemoCD1 and oxy-hemoCD1 in the solution containing biocomponents from cell lysates ( $10^6$  cells). The spectra were measured at 25°C immediately after adding the cell lysate and after 24 h. (d) Deoxy- and CO-hemoCD1 were quite stable over 24 h while oxy-hemoCD1 was gradually autoxidized to ferric met-form in the same manner as in the absence of cell lysates.

hemoCD1 の CO 除去能力を検証するために、oxy-hemoCD1 が CO-Hb から CO を捕捉することを観測する実験を行った。まず、oxy-hemoCD1、CO-hemoCD1、oxy-Hb および CO-Hb の各 Q band の吸収スペクトルを Figure 5-20a に示す。hemoCD1 と Hb の各錯体の吸収スペクトルは非常に似ているが、oxy-Hb の 575 nm における吸収では、CO-hemoCD1 および oxy-hemoCD1 とほとんど被ることなく、oxy-Hb の吸収における吸光度変化が測定できる。角形セルに PBS 3 mL を入れ、そこに調製した CO-Hb のストック溶液<sup>55)</sup> (0.72 mM in PBS, 25 °C) から 10  $\mu$ L 取り、セルに加えた。次に、調製した oxy-hemoCD1 のストック溶液(0.75 mM in PBS, 25 °C)から 20  $\mu$ L 取り、セルに加えた。oxy-Hb の 575 nm の吸収に

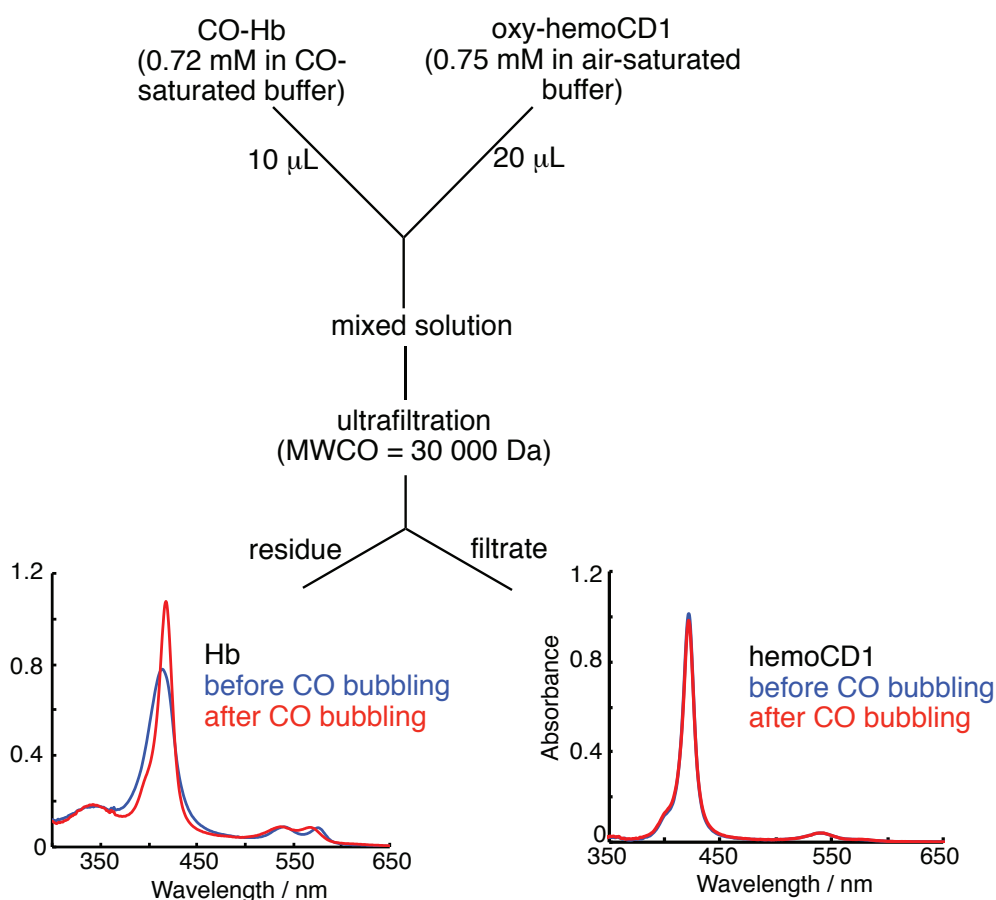
おける吸光度変化を測定した。その結果を Figure 5-20(b, 紫)に示す。575 nm における吸光度変化に対し、一次の反応速度式に基づいて解析を行った結果、1 次速度定数  $k_{\text{obs}}$  は  $0.01 \text{ s}^{-1}$  であった(Figure 5-20c)。これは報告されている CO-Hb の  $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  とよく一致している<sup>56)</sup>。hemoCD1 の  $k_{\text{on}}^{\text{CO}}$  ( $4.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )は CO-Hb の  $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  より大きいので、CO-Hb からの CO の解離が律速段階として観測されていることがわかった。対照実験として、oxy-Hb に CO-hemoCD1 を加えて、同様な実験を行った結果(Figure 5-20b, 緑)および CO-Hb のみ(Figure 5-20b, 茶色)の 575 nm の吸収における吸光度変化を測定した。吸光度変化は見られなかった<sup>35)</sup>。したがって、hemoCD1 は Hb よりも CO 親和性が高く、両者を混合すると hemoCD1 の方に優先的に CO が結合することがわかった。(Figure 5-20d)



**Figure 5-20.** Competition between hemoCD1 and Hb for CO binding. (a) UV-vis spectra of oxy-, and CO-hemoCD1 (5.0  $\mu\text{M}$  each), and oxy- (575 nm absorbance peak) and CO-Hb (2.4  $\mu\text{M}$  each). (b) Time-course for changes in absorbance at 575 nm, indicative of formation of  $\text{O}_2\text{-Hb}$ , after mixing stock solutions of oxy-hemoCD1 (0.75 mM, 20  $\mu\text{L}$  in air-saturated PBS) and CO-Hb (0.72 mM, 10  $\mu\text{L}$  in CO-saturated PBS) in air-saturated PBS (3 mL) at pH 7.4 and 25  $^\circ\text{C}$ . Controls are represented by solutions of CO-Hb without (w/o) oxy-hemoCD1, and oxy-Hb mixed with CO-hemoCD1. (c) First-order rate plot for changes in absorbance at 575 nm over time. The linear regression analysis gave a rate constant of  $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$ .

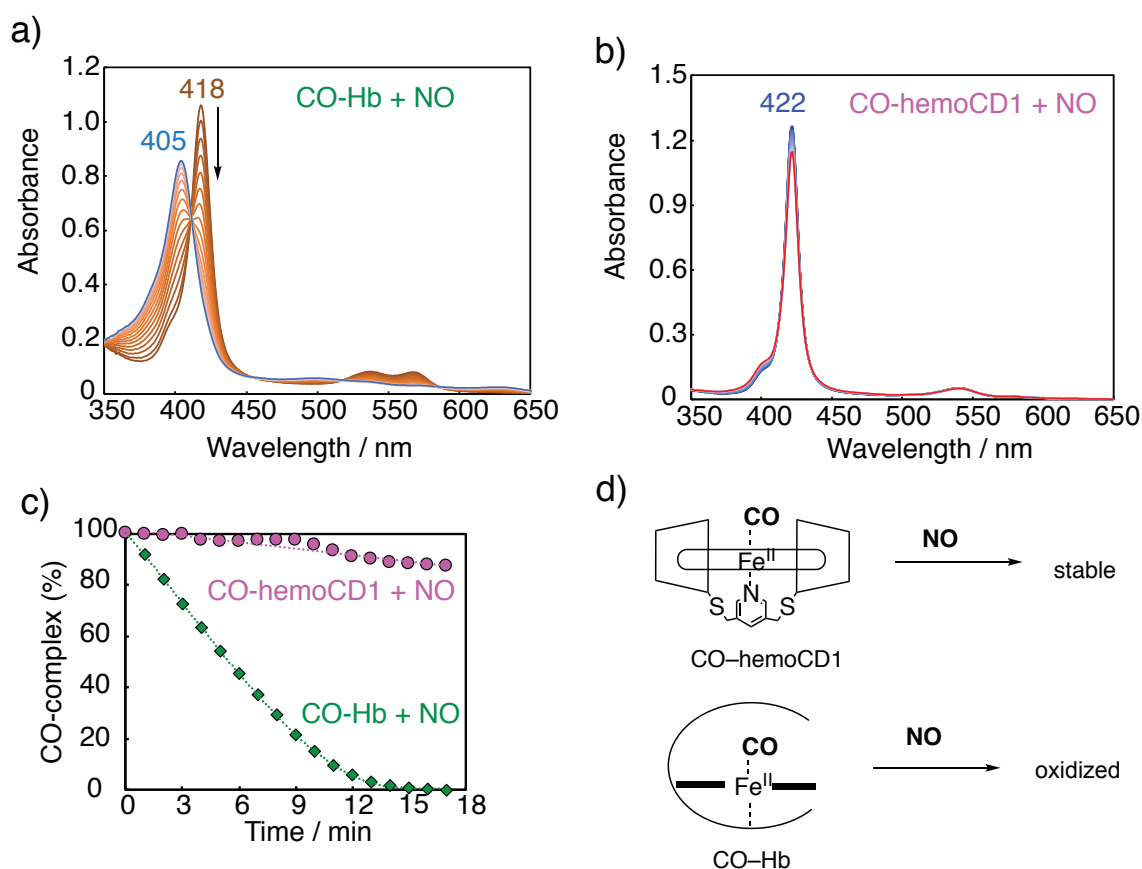


CO-Hb と oxy-hemoCD1 の混合溶液を遠心式限外ろ過フィルター(MWCO. 30 kDa, Amicon Ultra)に添加し、30 kDa 以上の Hb (Mw. 64,000)を含む残留溶液と 30 kDa 以下の hemoCD1 を含む透過溶液を分離した(Figure 5-21)。残留した Hb 溶液とろ液中の hemoCD1 溶液のそれぞれの吸収スペクトルを測定した(Figure 5-21)。その後、残留した Hb 溶液に CO ガスをバブリングすると、CO-Hb の吸収スペクトルが現れたことから、CO-Hb が oxy-hemoCD1 によって CO が奪われ、oxy-Hb に戻ったことがわかった。ろ液中の hemoCD1 溶液では、CO-hemoCD1 の吸収スペクトルが現れ、oxy-hemoCD1 は CO-Hb から CO を奪い、CO-hemoCD1 になっていることがわかった。



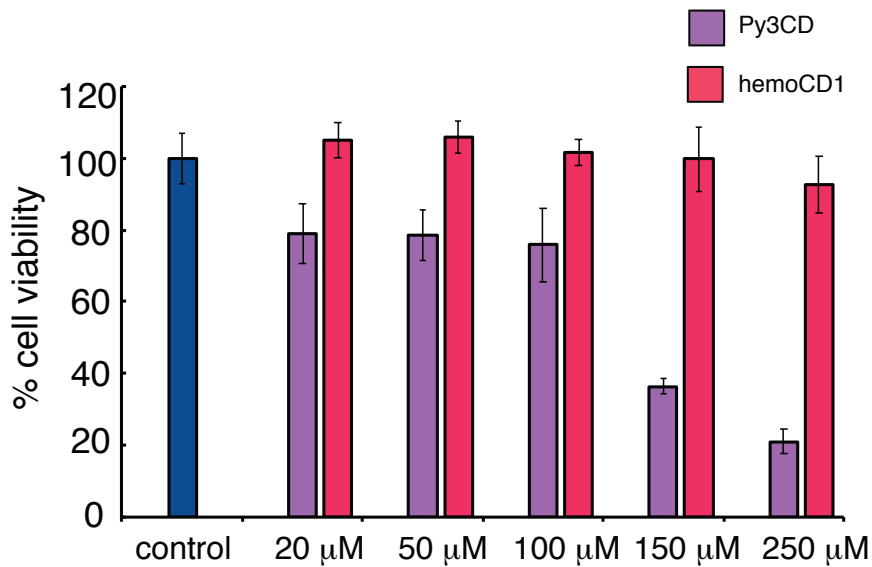
**Figure 5-21.** An experiment for ligand exchange of CO-Hb and oxy-hemoCD1 using an ultrafilter unit. Two solutions contained CO-Hb (0.72 mM in CO-saturated buffer) and oxy-hemoCD1 (0.75 mM in air-saturated buffer) were mixed then filtered using an ultrafilter with molecular weight cut off = 30 000 Da (Amicon Ultra). The resulting residue and filtrate were appropriately diluted with PBS for UV-vis measurement. CO gas was bubbled to each solution after the measurement.

また、生体内において微量に生産されるガスとして NO および H<sub>2</sub>S が挙げられる。NO に関しては、血中で NO は Hb と極めて強く結合し、NO-Hb を形成し、直ちに Hb をへム鉄(III)の met-Hb へ酸化するという挙動を示す<sup>57,58</sup>。実際に CO-Hb および CO-hemoCD1 に対する NO の効果を検討するために、pH 7.4 の PBS 中で CO-Hb もしくは CO-hemoCD1 に対して、それぞれ NO 放出試薬 NOC5 (1-hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene, Dojin Chemicals) を 2.5 等量添加した際の吸収スペクトルの変化を測定した(Figure 5-22)。



**Figure 5-22.** Stabilities of the CO-complexes of Hb and hemoCD1 against NO. (a,b) UV-vis spectra of CO-Hb (a) and CO-hemoCD1 (b) after addition of NO (2.5 eq). NO was added as NOC (1-hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene), a NO donor purchased from Dojin Chemicals. (c) The plot of the residual CO-complexes (%) of Hb and hemoCD1 during the reaction with NO.

その結果、CO-hemoCD1 は吸収スペクトルがあまり変化しないことに対し、CO-Hb 由来の 418 nm における吸光度が等吸収点を通りながら met-Hb を示す 405 nm へとシフトした(Figure 5-22)。極大吸収波長である 422 nm および 418 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(Figure 5-22c)、CO-hemoCD1 は NO の添加により分解されず、一方で、CO-Hb は約 15 分で met-Hb へと酸化されることがわかった。以前の研究により、hemoCD1 は Hb 存在下では NO を捕捉しないことを報告している<sup>38)</sup>。そのため、hemoCD1 による CO 定量は、NO により阻害されないことが示された。H<sub>2</sub>S に関しては、以前 Kano らは hemoCD1 の中心鉄(III)に対して H<sub>2</sub>S の配位が比較的弱く、CO が存在すると、SH が CO により容易に置き換えられることを報告している<sup>59)</sup>。また、Kitagishi らは hemoCD1 は細胞膜透過性を示さないことを報告している<sup>41)</sup>。hemoCD1 が細胞毒性を示すかどうかを調べるために、HepG2 細胞に各濃度の met-hemoCD1 およびシクロデキストリン二量体である Py3CD をそれぞれ添加して 3 時間培養した。その後 MTT assay を用いて細胞の生存率を決定した(Figure 5-23)。Py3CD の場合、細胞の生存率は Py3CD の濃度の増加とともに減少していく傾向が観測され、Py3CD の濃度を 250 μM に増やしたところ、生存細胞が 20 %前後にまで減少した。これに対して、met-hemoCD1 においては 250 μM でも、生存細胞が 90 %前後となった。シクロデキストリン二量体 Py3CD の毒性はメチル化 β-CD は細胞膜上の脂質マイクロドメインであるラフトからシグナル伝達に関与する蛋白質やコレステロールを引き抜いて細胞死を誘発することが考えられる<sup>60)</sup>。この CD 空洞が hemoCD1 の Fe<sup>III</sup>TPPS によって占められ、ほとんど細胞毒性を示さないことが明らかとなった。



**Figure 5–23.** Effect of Py3CD and hemoCD1 on cell viability. Hepatocytes were incubated with different concentrations of Py3CD or met-hemoCD1 for 3 h. Cell viability was measured using an MTT assay. Each bar represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 6$ ).

以上の実験結果から、CO-hemoCD1 は CO-Hb と異なり、様々な条件においても非常に安定していることが明らかとなった。また、hemoCD1 は O<sub>2</sub>、NO および H<sub>2</sub>S よりも高い CO 結合親和性を示す。さらに、以前の研究により hemoCD1 をラットに投与すると、ラットの心拍数および血圧に影響を与えないことが報告された<sup>37,61)</sup>。hemoCD1 の FeTPPS は生体内においてヘム補因子として認識されないため<sup>62,63)</sup>、hemoCD1 はヘムオキシゲナーゼによって代謝されず、ラットの静脈に oxy-hemoCD1 を投与すると、内因性 CO と結合して速やかに CO-hemoCD1 として尿中に排泄される<sup>37)</sup>。これは oxy-hemoCD1 から CO-Hb の CO を奪うという実験結果とよく一致している。hemoCD1 は、Hb、Mb、CcO、および今まで報告されているヘムタンパク質よりもはるかに強い親和性で CO と結合する(Table 5–3)。したがって、生体内においても、hemoCD1 は CO を選択的に捕捉し、CO 錯体のまま非常に安定に存在することが考えられる。Table 5–3 に示しているように、ニューログロビン(Ngb)、NPAS2、CooA、および RcoM などの CO センサータンパク質の CO 親和性は高くなる傾向があるが、hemoCD1 の CO 親和性はこれらの CO センサータンパク質よりもおよそ 1 桁以上高くなっている。これは、以前に報告された hemoCD1 の非常に遅い  $k_{\text{off}}^{\text{CO}}$  ( $2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) が原

因であると考えられる<sup>35)</sup>。また鉄(III)の hemoCD 誘導体がシアン化物解毒剤として機能することを報告している<sup>64-66)</sup>。これらの結果を踏まえて、hemoCD1 は生体内における CO 定量試薬および CO の解毒剤として諸条件を満たしていることが明らかとなった。

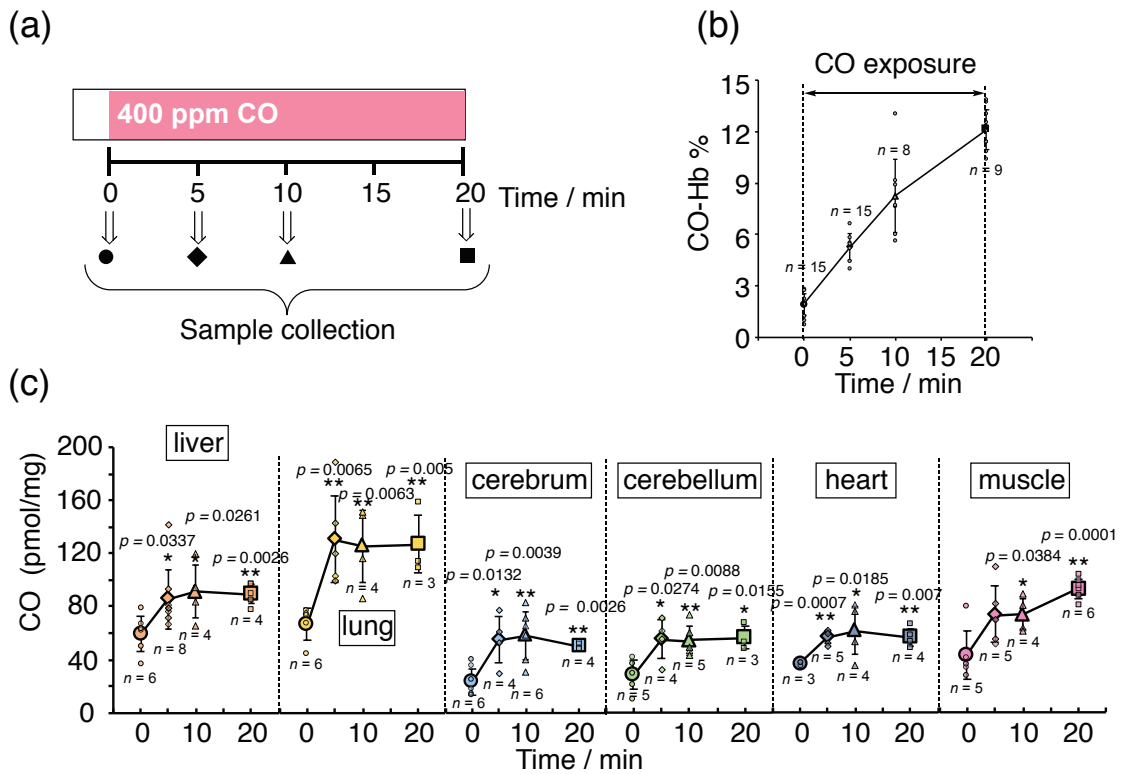
**Table 5–3.** Kinetic and thermodynamic parameters for O<sub>2</sub> and CO bindings of hemoCD1 and related hemoproteins and model compounds.<sup>a</sup>

	$k_{\text{on}}^{\text{CO}}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{off}}^{\text{CO}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{d}}^{\text{CO}}$ (M)	$k_{\text{on}}^{\text{O}_2}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{off}}^{\text{O}_2}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{d}}^{\text{O}_2}$ (M)	$K_{\text{d}}^{\text{O}_2}/K_{\text{d}}^{\text{CO}}$ (= M)
Hb-R <sup>b,c</sup>	(4.6-6.0) × 10 <sup>6</sup>	(0.9-1.9) × 10 <sup>-2</sup>	(1.7-4.1) × 10 <sup>-9</sup>	(3.3-5.0) × 10 <sup>7</sup>	15-22	(3.0-6.7) × 10 <sup>-7</sup>	150–400
Hb-T <sup>b</sup>	8.3 × 10 <sup>4</sup>	9.0 × 10 <sup>-2</sup>	1.1 × 10 <sup>-6</sup>	4.5 × 10 <sup>6</sup>	1.9 × 10 <sup>3</sup>	4.2 × 10 <sup>-4</sup>	380
Mb <sup>d</sup>	5.1 × 10 <sup>5</sup>	1.9 × 10 <sup>-2</sup>	3.7 × 10 <sup>-8</sup>	1.7 × 10 <sup>7</sup>	15	8.8 × 10 <sup>-7</sup>	25
CcO <sup>e</sup>	(7.0-12) × 10 <sup>4</sup>	2.2 × 10 <sup>-2</sup>	(1.8-3.1) × 10 <sup>-7</sup>	(1.0-6.0) × 10 <sup>8</sup>	10	(1.7-10) × 10 <sup>-8</sup>	0.1 – 0.6
Cyt P450 <sub>sec</sub> <sup>f</sup>	2.2 × 10 <sup>4</sup>	0.15	7.0 × 10 <sup>-7</sup>	5.3 × 10 <sup>6</sup>	120	2.3 × 10 <sup>-5</sup>	33
NPAS2 (PASA domain) <sup>g</sup>	3.7 × 10 <sup>5</sup>	0.37-0.74	(1-2) × 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-
hNgb <sup>h</sup>	6.5 × 10 <sup>7</sup>	1.4 × 10 <sup>-2</sup>	2.2 × 10 <sup>-10</sup>	2.5 × 10 <sup>8</sup>	0.8	3.2 × 10 <sup>-9</sup>	15
CooA <sub>5c-heme</sub> <sup>i</sup>	3.2 × 10 <sup>7</sup>	0.02	6.3 × 10 <sup>-10</sup>	-	-	-	-
RcoM-2 <sup>j</sup>	> 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>-6</sup>	< 10 <sup>-10</sup>	-	-	-	-
Mb <sub>H64G</sub> <sup>d</sup>	5.8 × 10 <sup>6</sup>	3.8 × 10 <sup>-2</sup>	6.6 × 10 <sup>-9</sup>	1.4 × 10 <sup>8</sup>	1.6 × 10 <sup>3</sup>	1.1 × 10 <sup>-5</sup>	1.3 × 10 <sup>3</sup>
Mb <sub>H64L</sub> <sup>d</sup>	2.6 × 10 <sup>7</sup>	2.4 × 10 <sup>-2</sup>	9.1 × 10 <sup>-10</sup>	9.8 × 10 <sup>7</sup>	4.1 × 10 <sup>3</sup>	4.3 × 10 <sup>-5</sup>	4.8 × 10 <sup>4</sup>
FePiv <sub>3</sub> 5Cim <sup>k</sup>	3.6 × 10 <sup>7</sup>	7.8 × 10 <sup>-3</sup>	2.2 × 10 <sup>-10</sup>	4.3 × 10 <sup>8</sup>	2.9 × 10 <sup>3</sup>	6.7 × 10 <sup>-6</sup>	2.7 × 10 <sup>4</sup>
hNgb <sub>H64Q-CCC</sub> <sup>h</sup>	1.6 × 10 <sup>8</sup>	4.2 × 10 <sup>-4</sup>	2.6 × 10 <sup>-12</sup>	7.2 × 10 <sup>8</sup>	18	2.5 × 10 <sup>-8</sup>	9.7 × 10 <sup>3</sup>
hemoCD1	1.3 × 10 <sup>7</sup>	2.5 × 10 <sup>-4</sup>	1.9 × 10 <sup>-11</sup>	4.7 × 10 <sup>7</sup>	800	1.7 × 10 <sup>-5</sup>	8.9 × 10 <sup>5</sup>

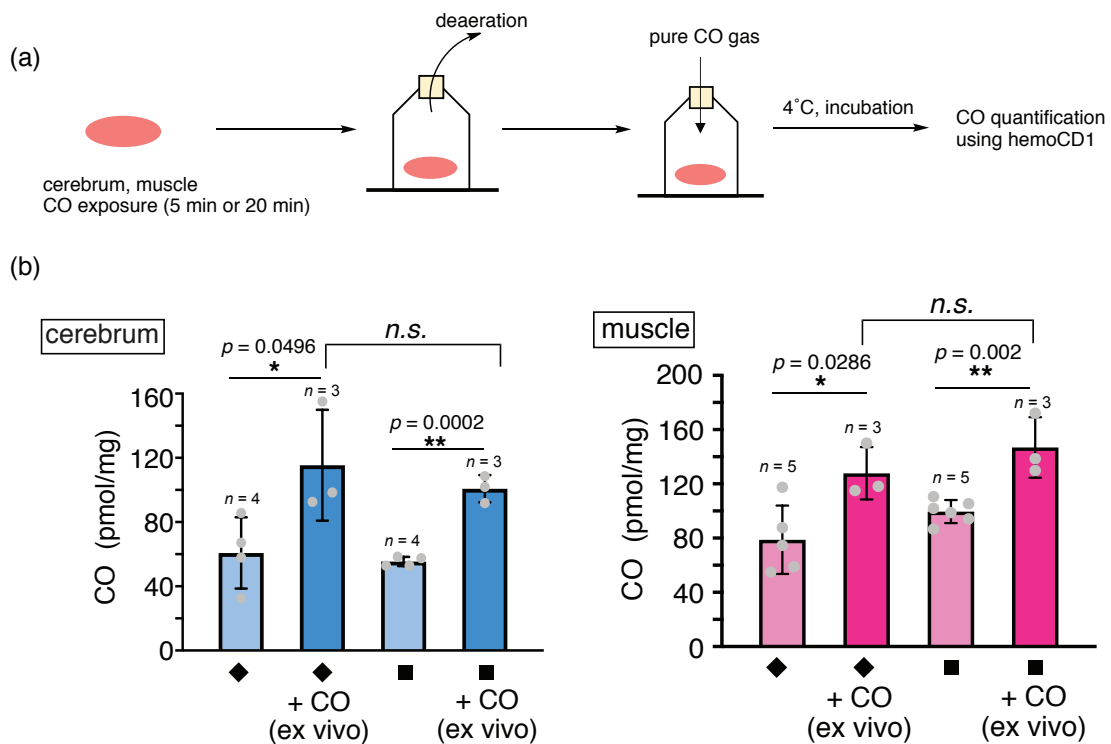
<sup>a</sup>These parameters were determined in aqueous solutions at ambient temperatures (20–25°C), except for FePiv<sub>3</sub>5Cim, which parameters were determined in absolute toluene. <sup>b</sup>Ref (56). <sup>c</sup>Ref (67). <sup>d</sup>Ref (68). <sup>e</sup>Ref (69). <sup>f</sup>Ref (70). <sup>g</sup>Ref (71). <sup>h</sup>Ref (72). <sup>i</sup>Ref (64), where the CO-binding site in CooA is blocked by a distal proline residue in the native form (6-coordinated heme), thus the actual CO-binding affinity of CooA is smaller ( $K_{\text{d}}^{\text{CO}} \sim 10^{-6}$  M). <sup>j</sup>Ref (74). <sup>k</sup>Ref (67,75), where FePiv<sub>3</sub>5Cim is a picket-fence porphyrin whose iron center is intramolecularly coordinated by an imidazole.

### 3-4. CO ガス(400 ppm)投与による生体内の血液および組織における CO 局在分布の経時変化

CO ガス(400 ppm)をラットにそれぞれ 5、10、15 および 20 分吸入させた場合、血液および各臓器内の CO 量はどのように変化するかを検討した(Figure 5-24a)。血中 CO-Hb レベルは血液ガス装置 ABL825 を用いて測定を行なった<sup>66)</sup>。その結果を Figure 5-24b に示す。各臓器(肝臓、肺、大脳、小脳、心筋および骨格筋)の CO 量は hemoCD assay を用いて評価した。その結果を Figure 5-24c に示す。CO ガス吸入の 20 分間において、血液中の CO-Hb は、左心室(LV) の動脈血では 4.1 から 15.3%、右心室(RV) の静脈血では 1.9 から 12.1%に直線的に増加した(Figure 5-24b)。組織内の CO 量では、CO ガス吸引の 5 分後に有意な増加が観測されたが、CO 吸引 10 分、20 分後においては、各臓器の CO 量は増加しない結果が得られ、プラトー状態に達した(Figure 5-24c)。血中 Hb と同様に臓器内 CO もガス吸引にともなって増加すると予想していたので、予想外の結果となった。この原因を調べるために、CO を外部から臓器に直接投与し、臓器内の CO 量がこれ以上増えるかどうかを調べた。大脳および骨格筋の CO 吸引 5 分、20 分後の組織サンプルを CO 雰囲気下に 1 時間インキュベートし、その後の組織サンプルの CO 量を hemoCD アッセイより定量した(Figure 5-25a)。Figure 5-25b に示す生体外で CO を臓器に直接投与することにより、CO 量の増加が観測された。したがって、臓器の CO 貯蔵能力は血中 Hb 存在下においては飽和し、生体外では組織内により多くの CO が貯蔵できることが示唆された。すなわち、Hb が存在すると、継続的に CO を吸入させても組織内は CO 貯蔵の最大量に達しなかったことがわかった。これらの結果は、生体内で高い CO 親和性を持つ Hb は、肺胞から拡散されたほとんどの CO を捕まえ、そのまま CO-Hb として体内を循環し、CO の毒性から組織の保護をもたらす可能性があることが示唆された。また、組織内の CO が Hb に徐々に移行していることが考えられる(後述)。



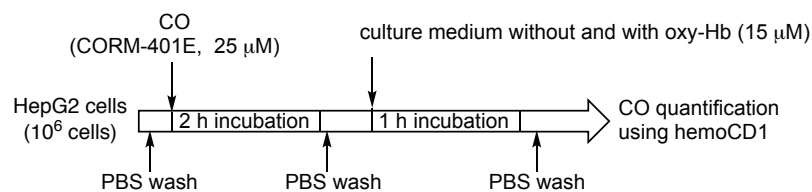
**Figure 5-24.** Kinetic studies of CO levels in blood and tissues after exposure to CO in rats. (a) Anesthetized rats were exposed to CO inhalation (400 ppm) and samples collected at different times as shown. (b) Changes in CO-Hb (%) in the venous blood as a function of time. (c) Tissue CO contents as a function of time. Each plot represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3-8$ ). Statistical significance,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  versus  $t = 0$ .



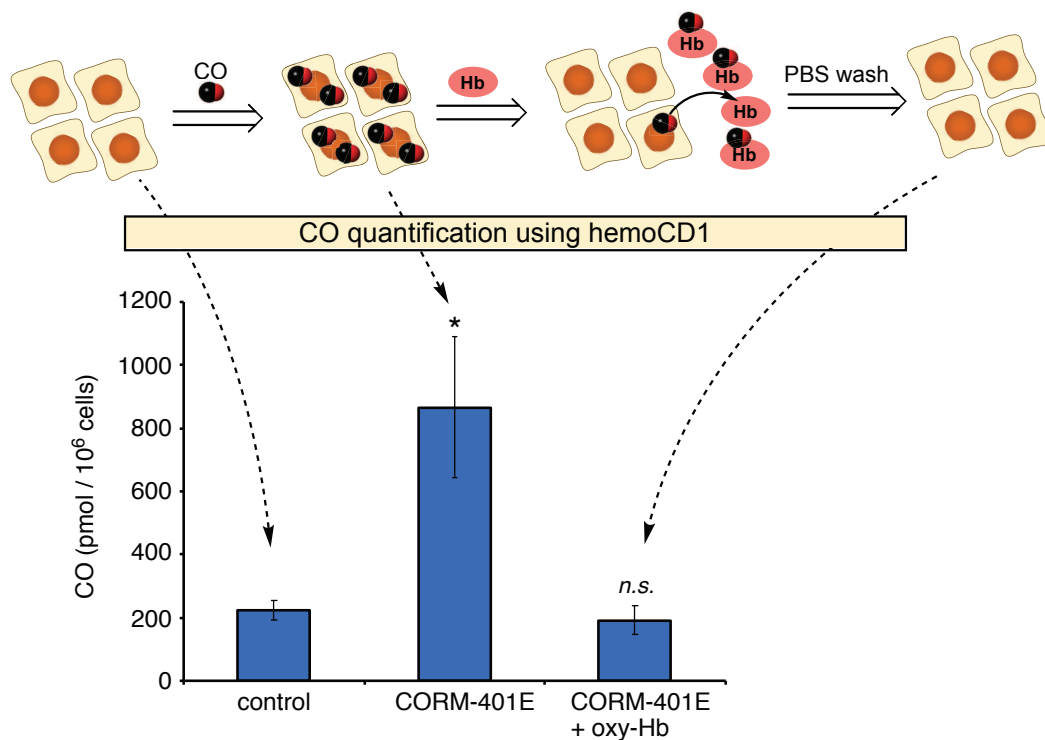
**Figure 5–25.** Amount of CO in muscle and cerebrum before and after purging CO gas *ex vivo*. Samples collected at 5 or 20 min were placed under CO atmosphere for 1 h and then assayed for CO content. Each bar represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ –6). Statistical significance, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; not significant, *n.s.*

Hb の臓器内 CO を抑えるという役割を実証するために、当研究室で開発した CO 放出分子である CORM-401E<sup>78)</sup>を用いて検討を行った。HepG2 細胞( $1 \times 10^6$  cell)に CORM-401E (25  $\mu$ M)を投与し、2 時間インキュベートした。その後、PBS で洗浄してから培地交換を行い、oxy-Hb (15  $\mu$ M)を培地に混合した。1 時間インキュベートした後、PBS で洗浄してから hemoCD assay を用いて細胞の CO 量を定量した(Scheme 5–1)。定量結果を Figure 5–26 に示す。

**Scheme 5–1.** Protocol of *in vitro* experiments to demonstrate CO transfer from tissues to Hb.

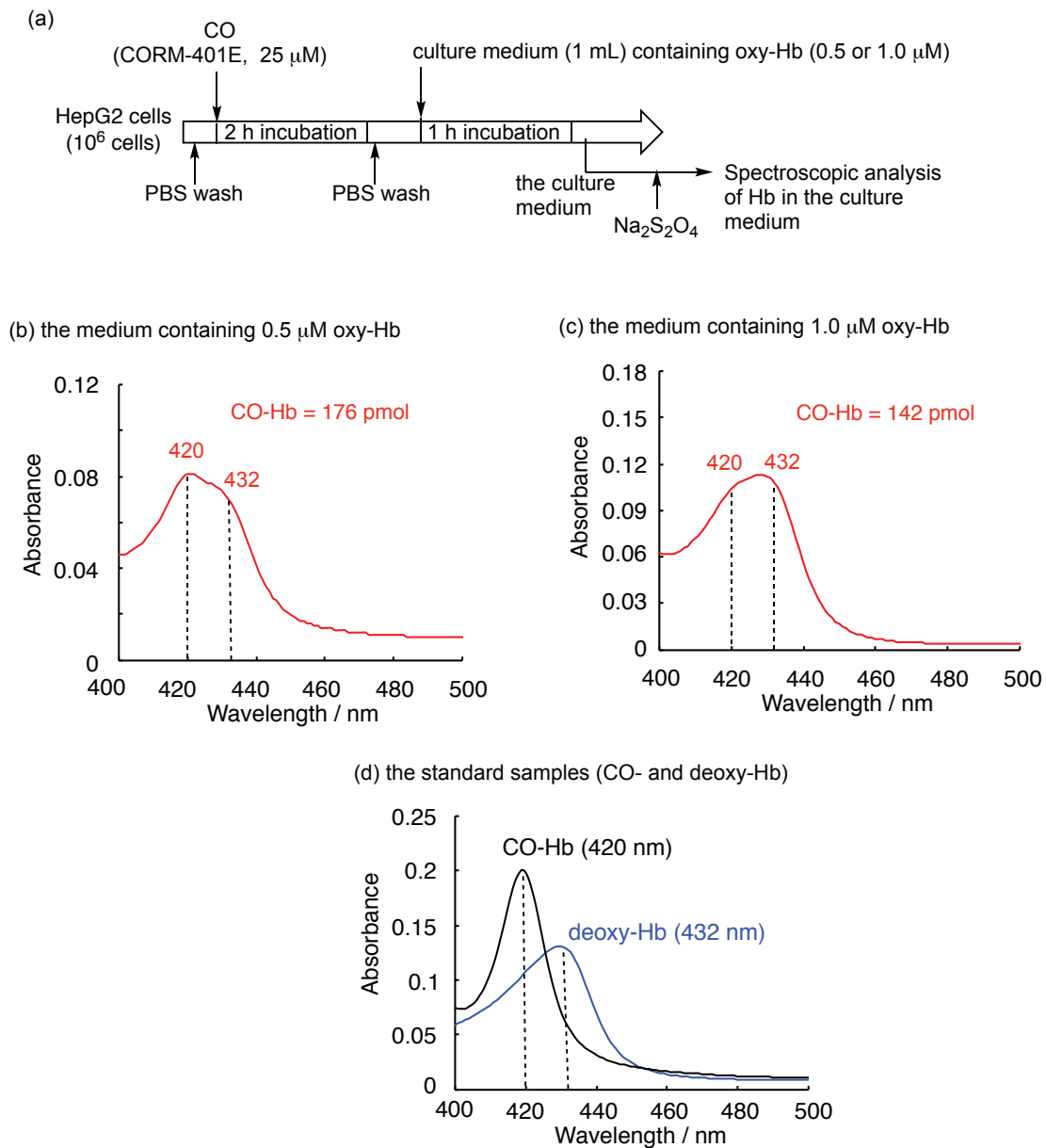






**Figure 5–26.** *In vitro* experiments to demonstrate CO transfer from tissues to Hb. The amounts of CO in cells determined by the assay using hemoCD1 at each step. The results show that cells incubated with CORM401-E stored CO inside, which was then transferred when incubated with oxy-Hb. Each bar represents mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Statistical significance, \* $p < 0.05$ ; not significant, *n.s.* versus control.

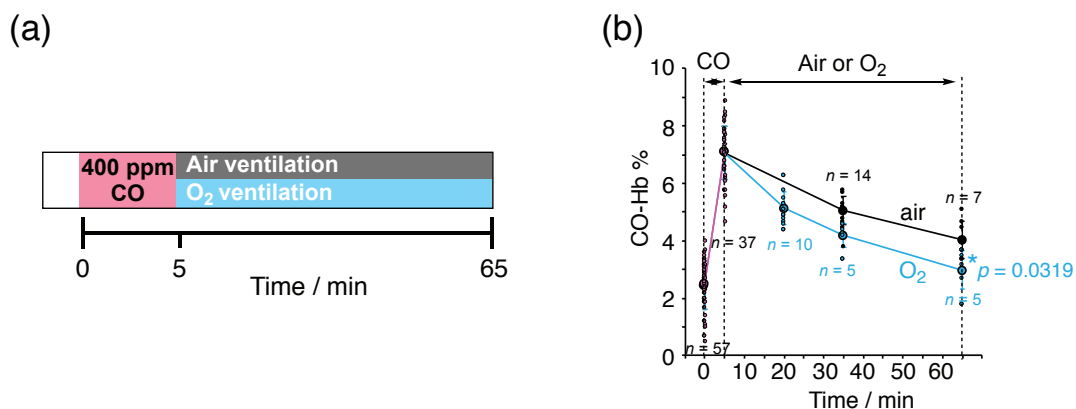
CORM-401E だけで処理した HepG2 細胞では、細胞内 CO 量が定常状態のコントロール実験と比べて、有意な増加が観測された。一方で、CORM401-E で 2 時間インキュベートした後、oxy-Hb を添加することにより、CO 量は定常状態にまで戻ったことがわかった(Figure 5–26)。この結果は、最初に CORM401-E の添加により増えた細胞内 CO は、細胞外から加えた Hb へと移行可能であることを示唆している。また、細胞内 CO が培地中の oxy-Hb への移行をモニターするために、培地中の oxy-Hb の吸収スペクトルを測定した。HepG2 細胞( $1 \times 10^6$  cell) に CORM-401E (25  $\mu$ M)を投与し、2 時間インキュベートした。その後、PBS で洗浄してから培地交換を行い、oxy-Hb (0.1 or 1.0  $\mu$ M)を培地に混合した。1 時間インキュベートした後、oxy-Hb を回収し、還元剤である  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  を加えてからその吸収スペクトルを測定した(Figure 5–27a)。測定結果を Figure 5–27 に示す。



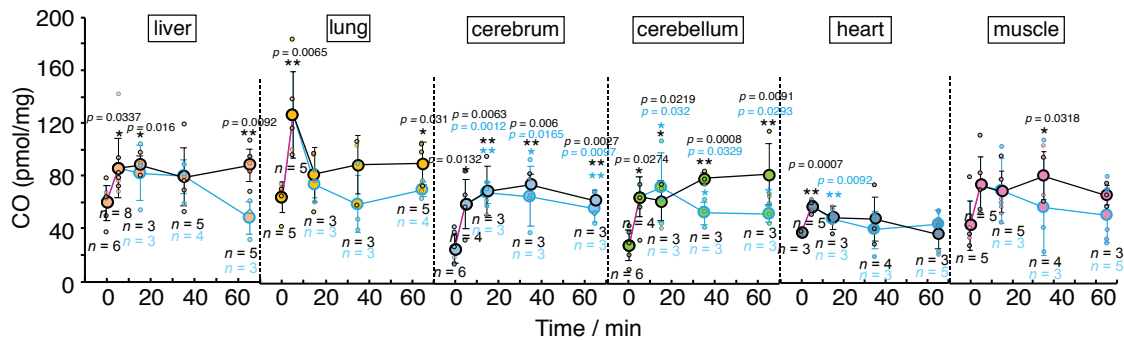
**Figure 5–27.** *In vitro* experiments to monitor CO transfer from cells to Hb in medium. (a) The protocol of *in vitro* experiments to monitor CO transfer from cells to Hb in medium. (b,c) The UV-vis spectra of the culture medium containing Hb where  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  was added before the measurements. (d) The standard spectra of CO- and deoxy-Hb (1  $\mu\text{M}$  each).

吸収スペクトル(Figure 5-27b, c)から、420 nm において CO-Hb 由来の吸収が観測された。CO-Hb および deoxy-Hb の 420 および 432 nm におけるモル吸光係数を用いて、その CO 量を算出した。この結果からも、CORM401-E の添加により増えた細胞内 CO は、細胞外から加えた oxy-Hb へと移行したことを示唆している。

次に、ラットに CO ガス(400 ppm) 5 分間吸入させた後、空気または O<sub>2</sub> ガス(99.999%, TOMOE SHOKAI Co., LTD)で 60 分間換気し、その際の血液および組織中の CO 量変化を検討した(Figure 5-28a)。血中 CO-Hb %変化を Figure 5-28b に示し、各組織内(肝臓 liver、肺 lung、筋肉 muscle、大脳 cerebrum、および小脳 cerebellum)の CO 量変化を Figure 5-29 に示す。



**Figure 5-28.** Effect of normobaric air/O<sub>2</sub> ventilation on CO levels in blood and tissues after exposure to CO in rats. (a) Anesthetized rats were exposed to CO inhalation (400 ppm) for 5 min followed by either air or O<sub>2</sub> ventilation as indicated. (b) Changes in CO-Hb (%) in the venous blood as a function of time. Each plot represents mean  $\pm$  SD ( $n = 5-57$ ). Statistical significance,  $*p < 0.05$ , versus air ventilation.



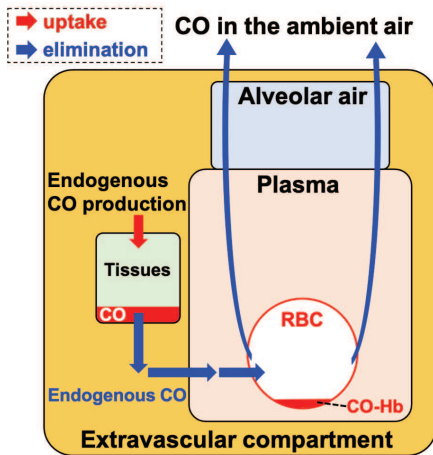
**Figure 5-29.** Amounts of CO measured under the experimental conditions described in (a). The plots connected by black and blue lines represent the data obtained under air and O<sub>2</sub> ventilation, respectively. Each bar represents mean ± SD (*n* = 3–8). Statistical significance, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01; not significant, *n.s.* versus *t* = 0.

静脈血(RV)の CO-Hb %は、徐々に減少して通常レベルまで回復した。O<sub>2</sub> 換気は空気換気よりも効果的であることがわかった(Figure 5-28b)。しかし、O<sub>2</sub> で 1 時間換気した後でも、かなりの量の CO がいくつかの組織、特に脳(大脳 cerebrum と小脳 cerebellum)に残っていることが観測された(Figure 5-29)。この結果は組織の CO 量の減少速度は血中 CO-Hb よりも遅く、組織に蓄積した CO が毒性を示していることが示唆された。

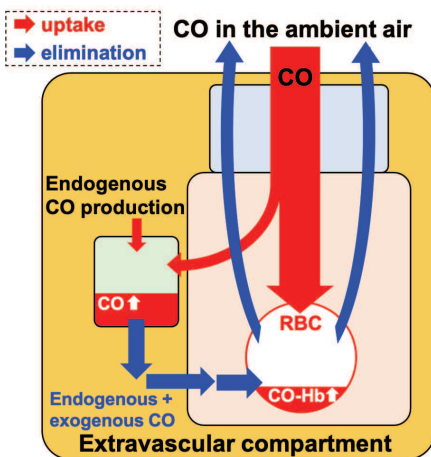
以上の CO 投与実験結果から、動物が CO ガスを吸入した後、CO ガスの動きのメカニズムについて考察した。定常状態では、ヘムの分解より生成された内因性 CO は、そのうちの一部は組織に保存され、そのほとんどは RBC の Hb と結合してから徐々に細胞や組織から除去される。CO-Hb として血中を循環し、最終的にはゆっくりと呼気中に排出されることが考えられる(Figure 5-30a)。CO ガス吸入後、その 95%が RBC の Hb により捕まえられ<sup>15)</sup>、RBC の Hb によって捕捉されなかった CO は速やかに組織に拡散すると考えられる(Figure 5-30b)。従って、Figure 5-24 の実験結果に示したように、CO ガスが生体内に入ると、血中の CO-Hb および組織内の CO 量が増加することが観測された。さらに、継続的な CO 吸入(Figure 5-24)によって、血中 CO-Hb %は増え続けるが、組織内の CO 量はプラトー状態に達し、つまり平衡状態になっていることが Figure 5-24 の実験結果でわかった。また、CO を 80 分間ラットに吸入させると、CO-Hb%は 30% にまで達したにもかかわらず、組織内に蓄積された CO の量は 5 分間 CO 吸入

(CO-Hb% = 10%)と比べても有意な増加は観測されなかった(Figure 5-31)。これは、組織内では、Mb および CcO などのヘムタンパク質は CO と結合できるが、Hb はこれらのヘムタンパク質よりも高い CO 結合親和性(Table 5-3)を持っているため、組織内の CO は Hb により除去されることが考えられる(Figure 5-30c)。Figure 5-30 に提案したメカニズムのように、Hb が組織を CO 毒性から保護する役割を果たしていることが示唆された。犬の研究<sup>18)</sup>で示されているように、CO-Hb 自身には動物に毒性がなく、組織に拡散した CO、すなわち Hb と結合していない CO が一酸化炭素中毒の主な原因なのではないかと考えられる<sup>11,18,72)</sup>。CO 吸入後における空気もしくは O<sub>2</sub> 換気実験では、O<sub>2</sub> 換気が空気換気よりも CO-Hb を減少させるのに効果的であることがわかったが、組織に蓄積された CO は完全には除けないことが hemoCD assay よりわかった(Figure 5-29)。CO 中毒の患者において、O<sub>2</sub> 換気による治療で血中 CO-Hb 濃度が定常値に戻っていたとしても、CO 中毒による遅発性神経障害(DNS)が後遺症として発症するケースが多い<sup>11,12,79)</sup>。特に脳内の残存 CO は、中毒患者の意識障害にもつながるのではないかと考えられる<sup>11,12,79)</sup>。CO 中毒により誘発された DNS の原因に関する議論<sup>11-13,79-82)</sup>は様々に行われており、CO によって誘発されるミトコンドリアの機能障害が脳損傷の原因ではないかと主張されている<sup>11-13,79-85)</sup>。今回の CO 定量の結果でも、いったん CO が脳に到達すると、それを除去するのは比較的難しく、常圧での O<sub>2</sub> 換気が脳組織から CO を完全に除去するには不十分であることが示唆された。

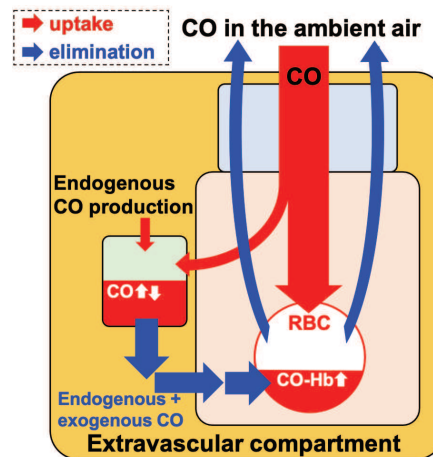
A) Normal conditions



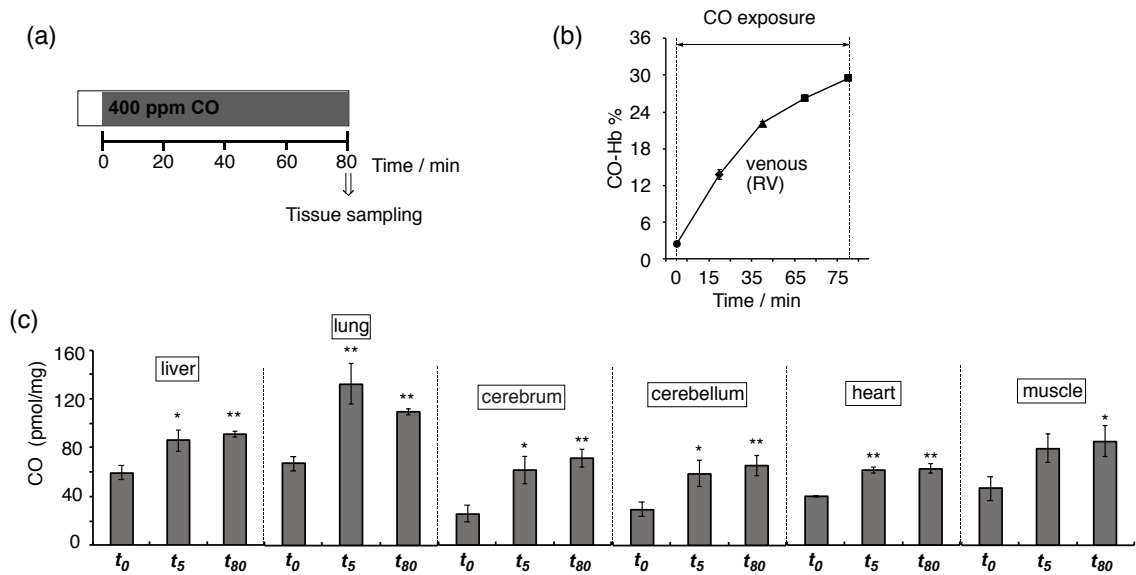
B) CO inhalation; initial stage (5 min)



C) CO inhalation; a steady state



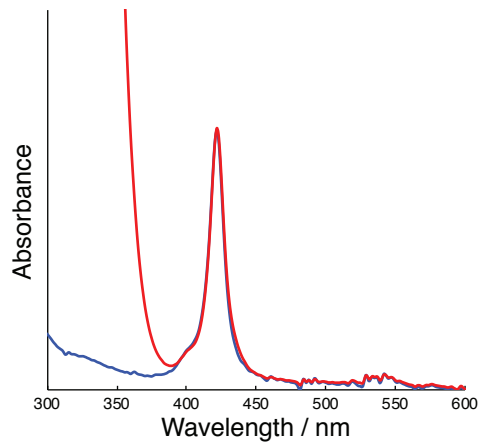
**Figure 5–30.** Proposed mechanism of CO compartmentalization under normal conditions and during CO inhalation. (a) Normal conditions. Endogenous CO continuously produced in cells is stored in tissues, diffuses to Hb, and is exhaled. (b) Initial stage of CO inhalation. Inhaled CO forms CO-Hb in RBC and diffused to tissues. (c) Equilibrium state during CO inhalation. CO accumulated in tissues gradually transfers to Hb in RBC based on the higher CO affinity of Hb versus intracellular CO targets (see Table 1 and text for details). The compartment models are based on our data and Refs (13) and (20).



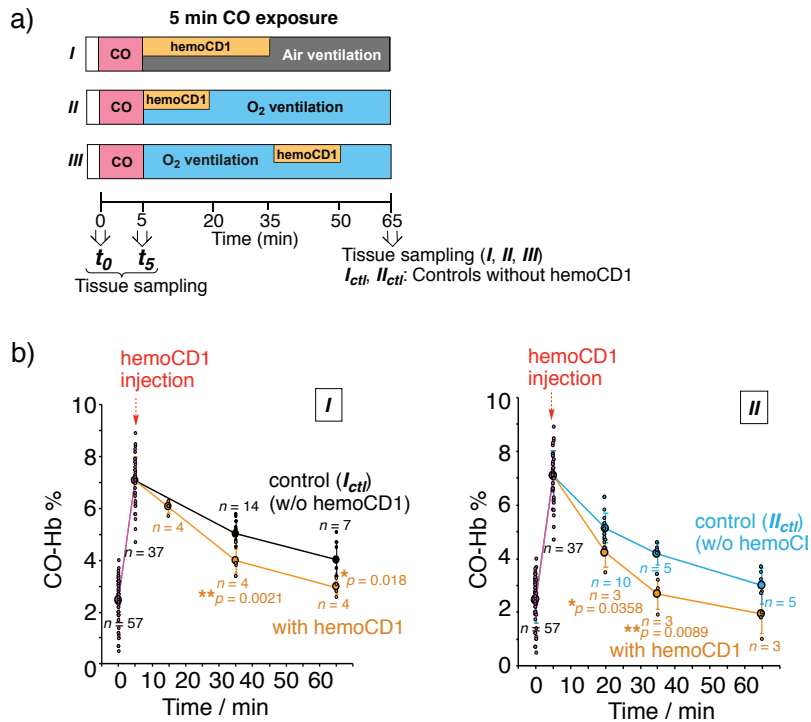
**Figure 5-31.** Kinetic studies of CO levels in blood and tissues after exposure to CO in rats. (a) Anesthetized rats were exposed to CO inhalation (400 ppm) and samples collected at different times as shown. (b) Changes in CO-Hb (%) in the venous blood as a function of time. (c) Tissue CO contents as a function of time. Each plot represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 3-8$ ). Statistical significance, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus  $t = 0$ .

### 3-5. CO中毒の解毒剤として hemoCD1 の機能評価

oxy-hemoCD1 が CO 中毒の際に組織内 CO 除去剤として使えるかどうかを検討した(Figure 5-6)。実験 **I** および **II** では、ラットに 5 分間の CO 吸入を行った後、空気(**I**)または O<sub>2</sub> 換気(**II**)とともに、oxy-hemoCD1 を尾静脈に注射(i.v.)した。実験 **III** では、5 分間の CO 吸入を行った後、30 分間の O<sub>2</sub> 換気を行い、30 分後に oxy-hemoCD1 を静注した(Figure 5-33a)。以前に報告されたように<sup>37,38</sup>、oxy-hemoCD1 は CO-hemoCD1 として尿中に排泄された(Figure 5-32)。



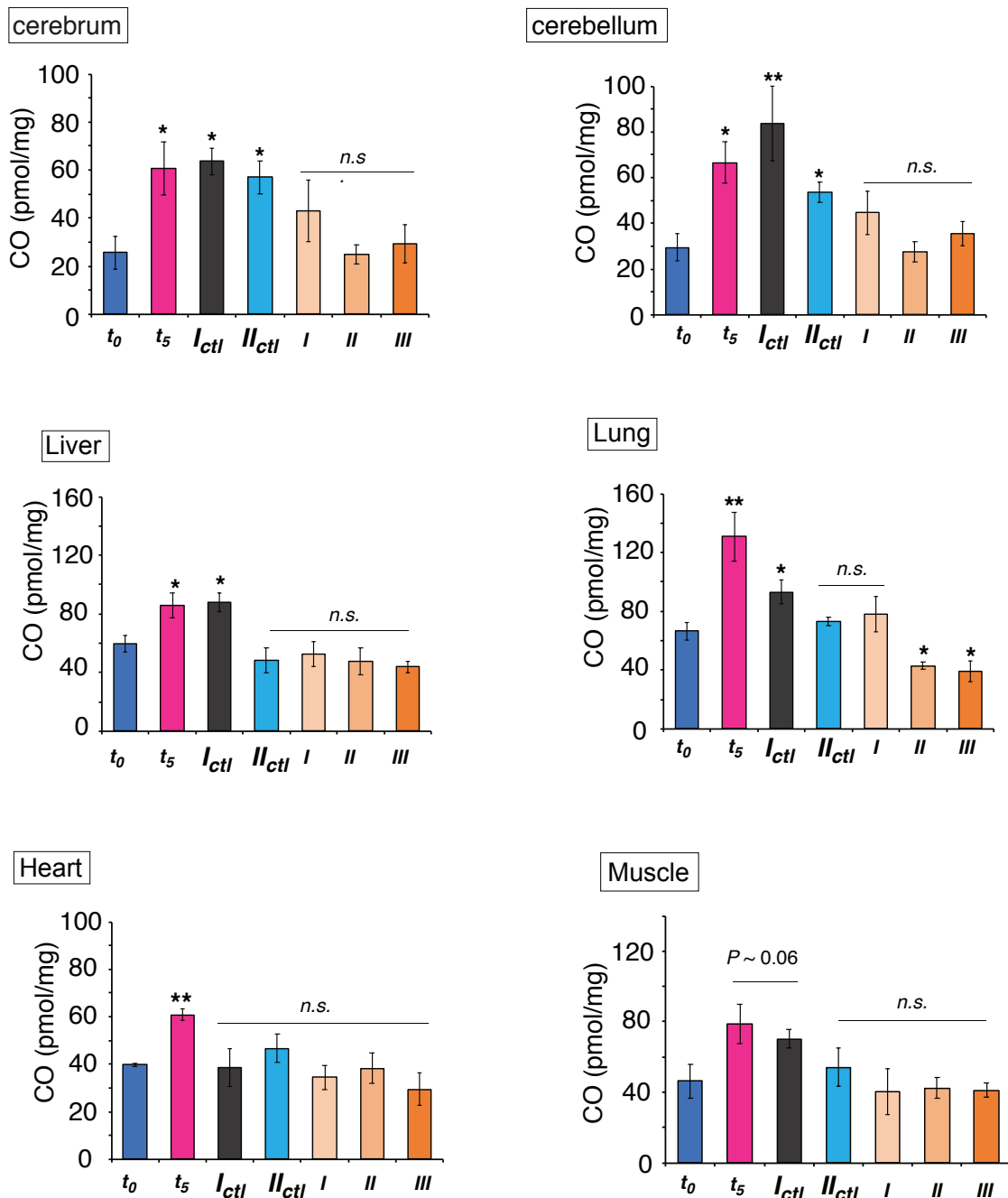
**Figure 5–32.** UV-vis spectra of rat urine collected after i.v. infusion of oxy-hemoCD1 to CO-treated rats before (blue) and after the addition of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (red).



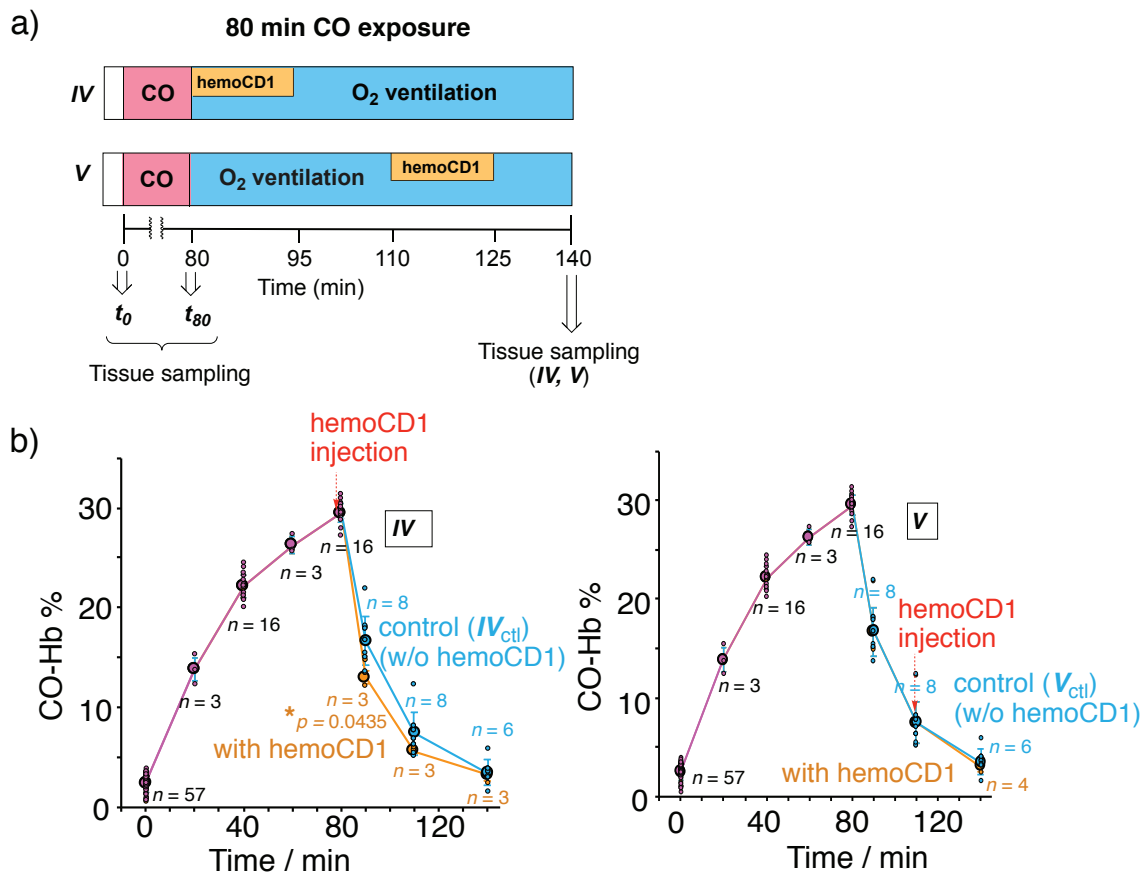
**Figure 5–33.** Effect of normobaric air/O<sub>2</sub> ventilation in combination with hemoCD1 injection on CO levels in blood after exposure to exogenous CO in rats. (a) The protocol of air or pure O<sub>2</sub> ventilation in combination with intravenous hemoCD1 infusion (1.4 ± 0.2 mM, 2.5 mL in PBS) after exposure to exogenous CO 5 min. (b) The right panels show the changes in CO-Hb (%) in the venous (RV) blood. Each plot for CO-Hb (%) represents mean ± SD (n = 3–57). Statistical significance, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; not significant, *n.s.* versus t<sub>0</sub>.



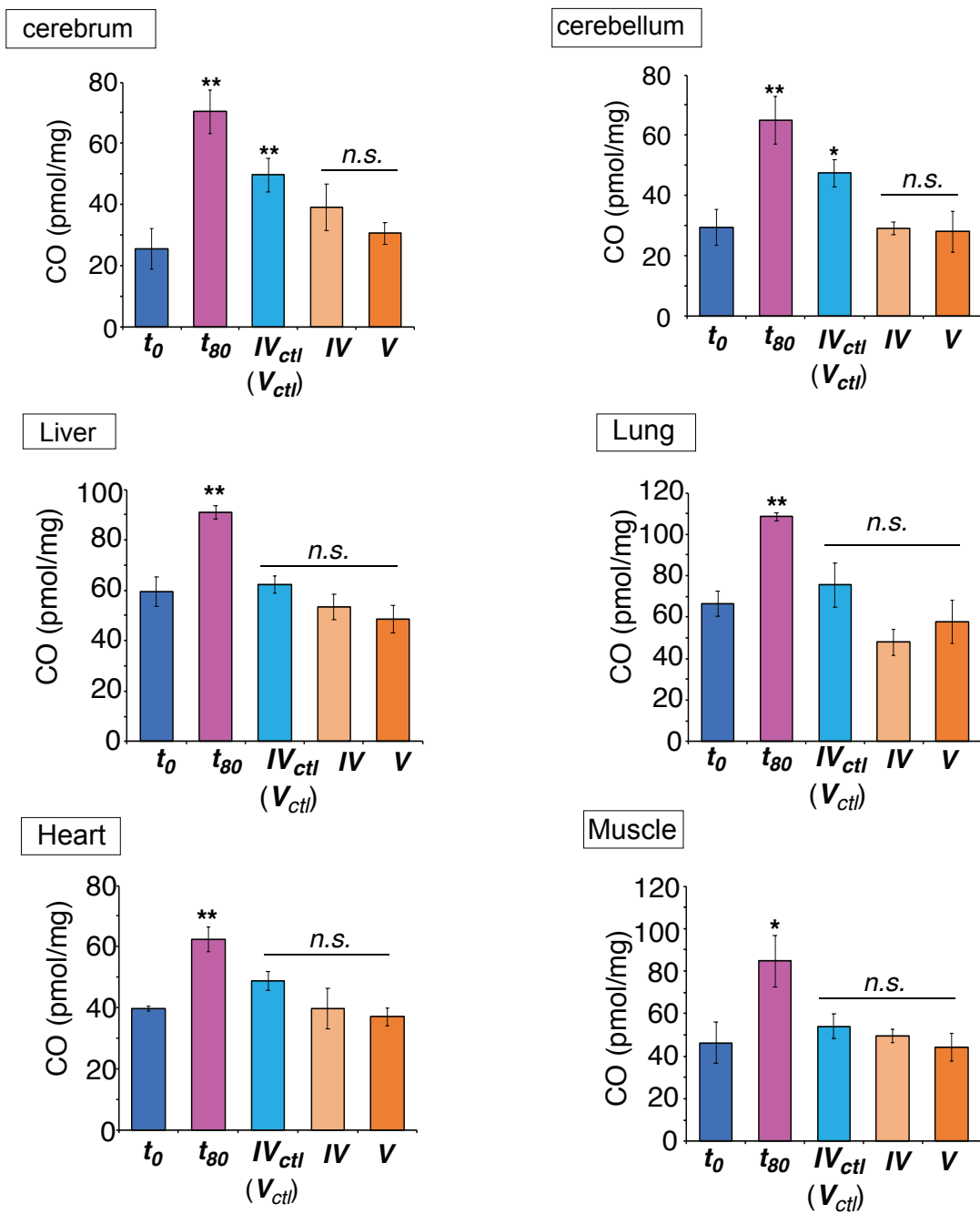
血中 CO-Hb%に関しては、実験 *I* の CO-Hb %が空気換気のコントロール実験 *I<sub>ctl</sub>* より oxy-hemoCD1 投与群が有意に減少し、1 時間後には定常状態に戻った (Figure 5-33b)。一方、O<sub>2</sub> 換気の実験(実験 *I*, 実験 *II<sub>ctl</sub>*)においては、hemoCD1 投与による影響はそれほど顕著ではなかった。組織内 CO 量は、oxy-hemoCD1 の投与(実験 *I*)において、全ての組織に蓄積している CO 量が減少し、定常状態の CO 量に戻ったことが観測された(Figure 5-34)。特に、O<sub>2</sub> 換気(実験 *II<sub>ctl</sub>*)で除けなかった脳内の残存 CO は、oxy-hemoCD1 と O<sub>2</sub> 換気の組み合わせ(実験 *II*)により減少し、定常状態に戻った (Figure 5-34)。さらに、ラットに 400 ppm CO を 80 分間吸入させた後、同様に oxy-hemoCD1 の投与実験を行った(Figure 5-35a)。80 分後、ラットの血中 CO-Hb %は 30%に達した(Figure 5-35b)。また、60 分間の O<sub>2</sub> 換気(*IV<sub>ctl</sub>* / *V<sub>ctl</sub>*)後に、脳内で検出されたかなりの量の残留 CO は、oxy-hemoCD1 の静脈投与(*IV* / *V*)によって有意に減少した(Figure 5-36 大脳 cerebrum と小脳 cerebellum)。2016 年に、Gladwin らは Hb および hemoCD1 よりも高い CO 結合親和性を示すニューログロビン変異体(Ngb-H64Q-CCC) (Table 5-3)を用いて、CO 中毒モデルのマウスに静脈注射すると、8 割のマウスが生き延びたことを報告した<sup>69,72</sup>。Ngb-H64Q-CCC は注射可能なタイプの CO 解毒剤としてとして提案された。hemoCD1 は Ngb-H64Q-CCC と比べて CO 親和性は低いものの、Hb などよりは十分に高く、また CO/O<sub>2</sub> 選択性は Ngb-H64Q-CCC よりも高い。さらに尿中に定量的に排出される点や、生体毒性が低いなどの利点もある。今回の実験結果では、oxy-hemoCD1 の注射と O<sub>2</sub> 換気の組み合わせでは、CO 吸入後の脳内残存 CO 量を効果的に除けるデータを示した。oxy-hemoCD1 は脳内に到達するかどうかは不明であるが<sup>40</sup>、脳内の CO が血漿中の hemoCD1 と拡散平衡により脳内の CO を効果的に減少させるメカニズムは十分に考えられる。また、速やかに CO-hemoCD1 として体外に排出される<sup>39</sup>ことは、Hb が全身に循環することによって組織内 CO の除去を促進する可能性が十分に考えられる。



**Figure 5–34.** Effect of normobaric air/O<sub>2</sub> ventilation in combination with hemoCD1 injection on CO levels in tissues after exposure to exogenous CO in rats. Amounts of CO detected in liver, heart, lung, muscle, cerebrum and cerebellum tissues collected as indicated in (I–III). Each bar represents the mean ± SE ( $n = 3–8$ ). Statistical significance, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; not significant, *n.s.* versus  $t_0$ .



**Figure 5–35.** Effect of normobaric air/O<sub>2</sub> ventilation in combination with hemoCD1 injection on CO levels in blood after exposure to exogenous CO in rats. (a) The protocol of air or pure O<sub>2</sub> ventilation in combination with intravenous hemoCD1 infusion ( $3.0 \pm 0.2$  mM, 2.5 mL in PBS) after exposure to exogenous CO 80 min. (b) The right panels show the changes in CO-Hb (%) in the venous (RV) blood. Each plot for CO-Hb (%) represents mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ –57). Statistical significance, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; not significant, *n.s.* versus  $t_0$ .



**Figure 5–36.** Effect of normobaric air/O<sub>2</sub> ventilation in combination with hemoCD1 injection on CO levels in tissues after exposure to exogenous CO in rats. Amounts of CO detected in liver, heart, lung, muscle, cerebrum and cerebellum tissues collected as indicated in ( $IV$ – $V$ ). Each bar represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ – $8$ ). Statistical significance, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; not significant, *n.s.* versus  $t_0$ .

#### 4. 結言

本章では、2017 に報告した oxy-hemoCD1 を用いた CO 定量法(hemoCD アッセイ)<sup>41)</sup>をより簡単な操作で正確に定量できるように改善した。hemoCD1 は水溶液中の微量な CO を高感度で検出することができ、さらに、ガスクロマトグラフィー法よりも多くの CO 量を検出することができる。確立した hemoCD アッセイを用いて、ラットに CO ガスを吸入した時の各組織内の CO 量の経時変化を追跡したところ、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。この一連の実験結果は、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はなく、主な CO 貯蔵ヘムタンパク質であり、組織内の過剰な CO の蓄積を防ぐ役割も果たしていることを示唆している。さらに、CO 吸入後、従来の治療法である酸素換気を行った後の各組織の 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。この発見は、CO 中毒のメカニズムの解明や後遺症の治療に役立つことができると考えられる。次に、CO 中毒の際における CO 中毒解毒剤として hemoCD1 の効果について評価をした。hemoCD1 はヘモグロビンの R 状態よりも CO 親和性が高く、CO-Hb から hemoCD1 へと CO が定量的に移行することを確認した。実際に hemoCD1 を CO 吸入後のラットに静脈投与すると、酸素換気と hemoCD1 の酸素錯体の組み合わせにより、酸素換気のみでは除去が難しい脳組織に蓄積した 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。Ngb-H64Q-CCC<sup>69,72)</sup>も CO 解毒剤として挙げられるが、Ngb-H64Q-CCC の酸素付加体<sup>72)</sup>が非常に不安定であるため、還元剤存在下で生体に投与する必要がある。また、Ngb-H64Q-CC はヘムタンパク質であるため、100%体外に排出されることが難しいと考えられる。一方、hemoCD1 の酸素付加体である oxy-hemoCD1 は生理条件下で安定に存在している<sup>35)</sup>。oxy-hemoCD1 が体内に投与されると、速やかに CO を捕まえてから 1 時間以内に CO-hemoCD1 として体外に排出され<sup>37,61)</sup>、生体に対する副作用<sup>37)</sup>および細胞毒性を示さない<sup>61)</sup>ことから、hemoCD1 は CO 解毒剤として非常に有力な候補であることが考えられる。

## 5. 参考文献

- 1) Dydek, T. M., Investigating carbon monoxide poisonings. In: Carbon Monoxide Poisoning, Penney, D. G. Ed., CRC-Taylor and Francis Press, NY, **2007**, Chapter 12.
- 2) Hampson, N. B.; Piantadosi, C. A.; Thom, S. R.; Weaver, L. K., Practice recommendations in the diagnosis, management, and prevention of carbon monoxide poisoning. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *186*, 1095–1101.
- 3) Tenhunen, R.; Marver, H. S.; Schmid, R., The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *61*, 748–755.
- 4) Wu, L.; Wang, R., Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 585–630.
- 5) Motterlini, R.; Foresti, R., Biological signaling by carbon monoxide and carbon monoxide-releasing molecules. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2017**, *312*, C302–C313.
- 6) Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtíková, V.; Martínková, M., Gaseous O<sub>2</sub>, NO, and CO in signal transduction: Structure and function relationships of heme-based gas sensors and heme-redox sensors. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 6491–6533.
- 7) Szabo, C., Gasotransmitters in cancer: from pathphysiology to experimental therapy. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15*, 185–203.
- 8) Fukuto, J. M.; Carrington, S. J.; Tantillo, D. J.; Harrison, J. G.; Ignarro, L. J.; Freeman, B. A.; Chen, A.; Wink, D. A., Small molecule signaling agents: The integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 769–793.
- 9) Ray, G. B.; Li, X.-Y.; Ibers, J. A.; Sessler, J. L.; Spiro, T. G., How far can proteins bend the FeCO unit? Distal polar and steric effects in heme proteins and models. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 162–176.
- 10) Matsu-ura, M.; Tani, F.; Naruta, Y.; Formation and characterization of carbon monoxide adducts of iron “twin coronet” porphyrins. extremely low CO affinity and a strong negative polar effect on bound CO. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1941–1950.
- 11) Weaver, L. K., Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med.* **2009**, *360*, 1217–1225.

- 12) Rose, J. J.; Wang, L.; Xu, Q.; McTiernan, C. F.; Shiva, S.; Tejero, J.; Gladwin, M. T., Carbon monoxide poisoning: pathogenesis, management, and future directions of therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2017**, *195*, 596–606.
- 13) US-EPA, Pharmacokinetics and Mechanisms of Action of Carbon Monoxide. In: *Air Quality Criteria for Carbon Monoxide*, Chapter 5, pp. 5-1–5-30 (2000).
- 14) Widdop, B., Analysis of carbon monoxide. *Ann. Clin. Biochem.* **2002**, *39*, 378–391.
- 15) Flachsbart, P. G., Exposure to ambient and microenvironmental concentrations of carbon monoxide, In: *Carbon Monoxide Poisoning*, D. G. Penney, Ed., CRC-Taylor and Francis Press, NY, 2007, Chapter 2.
- 16) Tomaszewski, C., “The case for the use of hyperbaric oxygen therapy in carbon monoxide poisoning” in carbon monoxide poisoning, D. G. Penney, Ed. (CRC-Taylor and Francis Press, NY, 2007), Chapter 2.
- 17) Hampson, N. B.; Hauff, N. M., Risk factors for short-term mortality from carbon monoxide poisoning treated with hyperbaric oxygen. *Crit. Care Med.* **36**, 2523–2527 (2008).
- 18) Goldbaum, L. R.; Ramirez, R. G.; Absalon, K. B., What is the mechanism of carbon monoxide toxicity? *Aviat. Space Environ. Med.* **1975**, *46*, 1289–1291.
- 19) Vreman, H. J.; Wong, R. J.; Kadotani, T.; Stevenson, T. K., Determination of carbon monoxide (CO) in rodent tissue: Effect of heme administration and environmental CO exposure. *Anal. Biochem.* **2005**, *341*, 280–289.
- 20) Coburn, R. F., Endogenous carbon monoxide production and body CO stores. *Acta Med. Scand. Suppl.* **1967**, *472*, 269–282.
- 21) Vreman, H. J.; Wong, R. J.; Stevenson, D. K.; Smialek, J. E.; Fowler, D. R.; Li, L.; Vigorito, R. D.; Zielke, H. R., Concentration of carbon monoxide (CO) in postmortem human tissues: effect of environmental CO exposure. *J. Forensic. Sci.* **2006**, *51*, 1182–1190.
- 22) Michel, B. W.; Lippert, A. R.; Chang, C., A Reaction-based fluorescent probe for selective imaging of carbon monoxide in living cells using a palladium-mediated carbonylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15668–15671.
- 23) Wang, J.; Karpus, J.; Zhao, B. S.; Luo, Z.; Chen, P. R.; He, C., A selective fluorescent probe for carbon monoxide imaging in living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9652–9656.
- 24) Madea, D.; Martínek, M.; Muchová, L.; Váňa, J.; Vítek, L.; Klán P., Structural

- modifications of nile red carbon monoxide fluorescent probe: sensing mechanism and applications. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 3473–3489.
- 25) Gong, S.; Hong, J.; Zhou, E.; Feng G., A near-infrared fluorescent probe for imaging endogenous carbon monoxide in living systems with a large Stokes shift. *Talanta* **2019**, *201*, 40–45.
- 26) Li, Y.; Wang, X.; Yang, J.; Xie, X.; Li, M.; Niu, J.; Tong, L.; Tang, B., Fluorescent probe based on azobenzene-cyclopalladium for the selective imaging of endogenous carbon monoxide under hypoxia conditions. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11154–11159.
- 27) Morstein, J.; Höfler, D.; Ueno, K.; Jurss, JW.; Walvoord, RR.; Bruemmer, KJ.; Rezgui, SP.; Brewer, TF.; Saitoe, M.; Michel, BW.; Chang, C., Ligand-directed approach to activity-based sensing: developing palladacycle fluorescent probes that enable endogenous carbon monoxide detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15917–15930.
- 28) Liu, K.; Kong, X.; Ma, Y.; Lin, W., Rational design of a robust fluorescent probe for the detection of endogenous carbon monoxide in living zebrafish embryos and mouse tissue. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 13489–13492.
- 29) Tang, Z.; Song, B.; Luo, T.; Yuan, J., Mitochondria-targetable ratiometric time-gated luminescence probe for carbon monoxide based on lanthanide complexes. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2939–2946.
- 30) Kumar, N.; Bhalla, V.; Kumar M., Recent developments of fluorescent probes for the detection of gasotransmitters (NO, CO and H<sub>2</sub>S). *Coord Chem Rev.* **2013**, *257*, 2335–2347.
- 31) Morimoto, Y.; Durante, W.; Lancaster, D. G.; Klattenhoff, J.; Tittel, F. K., Real-time measurements of endogenous CO production from vascular cells using an ultrasensitive laser sensor. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **2001**, *280*, H483 – H488.
- 32) Marks, G. S.; Vreman, H. J.; McLaughlin, B. E.; Brien, J. F.; Nakatsu, K., Measurement of endogenous carbon monoxide formation in biological systems. *Antioxid. Redox Signaling* **2002**, *4*, 271 – 277.
- 33) Deloar, H. M.; Watabe, H.; Nakamura, T.; Narita, Y.; Yamadera, A.; Fujiwara, T.; Itoh, M., Internal dose estimation including the nasal cavity and major airway for continuous inhalation of C<sup>15</sup>O<sub>2</sub>, <sup>15</sup>O<sub>2</sub> and C<sup>15</sup>O using the thermoluminescent dosimeter method. *J. Nucl. Med.* **1997**, *38*, 1603–1613.



- 34) Kano, K.; Kitagishi, H.; Kodera, M.; Hirota, S., Dioxygen binding to a simple myoglobin model in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435–438.
- 35) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Kodera, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S., Iron porphyrin-cyclodextrin supramolecular complex as a functional model of myoglobin in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448–4460.
- 36) Kano, K.; Ochi, T.; Okunaka, S.; Ota, Y.; Karasugi, K.; Ueda, T.; Kitagishi, H., Preparation and function of poly(acrylic acid)s modified by supramolecular complex composed of porphyrinatoiron and a cyclodextrin dimer that bind diatomic molecules (O<sub>2</sub> and CO) in aqueous solution. *Chem. Asian. J.* **2011**, *6*, 2946–2955.
- 37) Kitagishi, H.; Negi, S.; Kiriya, A.; Honbo, A.; Sugiura, Y.; Kawaguchi, A. T.; Kano, K., A diatomic molecule receptor that removes CO in a living organism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1312–1315.
- 38) Kitagishi, H.; Minegishi, S.; Yumura, A.; Negi, S.; Taketani, S.; Amagase, Y.; Mizukawa, Y.; Urushidani, T.; Sugiura, Y.; Kano, K., Feedback response to selective depletion of endogenous carbon monoxide in the blood. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5417–5425.
- 39) Kitagishi, H.; Minegishi, S., Iron(II)porphyrin–cyclodextrin supramolecular complex as a carbon monoxide-depleting agent in living organisms. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, *65*, 336–340.
- 40) Minegishi, S.; Sagami, I.; Negi, S.; Kano, K.; Kitagishi, H., Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11996.
- 41) Minegishi, S.; Yumura, A.; Miyoshi, H.; Negi, S.; Taketani, S.; Motterlini, R.; Foresti, R.; Kano, K.; Kitagishi, H., Detection and removal of endogenous carbon monoxide by selective and cell-permeable hemoprotein-model complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5984–5991.
- 42) Fleisher, E. B.; Palmer, J. M.; Srivastava, T. S.; Chatterjee, A. J., Thermodynamic and kinetic properties of an iron-porphyrin system. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3162–3167.
- 43) Tenhunen, R.; Marver, H. S.; Schmid, R., Microsomal heme oxygenase characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6388–6394.
- 44) Berk, P. D.; Blaschke, T. F.; Scharschmidt, B. F.; Waggoner, J. G.; Berlin, N. I., A new approach to quantitation of the various sources of bilirubin in man. *J. Lab. Clin.*

*Med.* **1976**, *87*, 767–780.

- 45) Coburn, R. F.; Blakemore, W. S.; Forster, R. E., Endogenous carbon monoxide production in man. *J. Clin. Invest.* **1963**, *42*, 1172–1178.
- 46) Coburn, R. F.; Williams, W. J.; Forster, R. E., Effect of erythrocyte destruction on carbon monoxide production in man. *J. Clin. Invest.* **1964**, *43*, 1098–1103.
- 47) Coburn, R. F.; Forster, R. E.; Kane, P. B., Considerations of the physiological variables that determine the blood carboxyhemoglobin concentration in man. *J. Clin. Invest.* **1965**, *44*, 1899–1910.
- 48) Meyer, J.; Prien, T.; Van Aken, H.; Bone, H.-G.; Waurick, R.; Theilmeyer, G.; Booke, M., Arterio-venous carboxyhemoglobin difference suggests carbonmonoxide production by human lungs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244*, 230–232.
- 49) Ewing, J. F.; Maines, M. D., In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyme 1 and 2. *Mol Cell Neurosci.* **1992**, *3*, 559–570.
- 50) Scapagnini, G.; D'Agata, V.; Calabrese, V.; Pascale, A.; Colombrita, C.; Alkon, D.; Cavallaro, S., Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* **2002**, *954*, 51–59.
- 51) Piantadosi, C. A., Toxicity of carbon monoxide: hemoglobin vs. histotoxic mechanisms, In: *Carbon Monoxide*, D. G. Penney, Ed., CRC-Taylor and Francis Press, NY, 2007, Chapter 8.
- 52) Luomanmäki, K.; Coburn, R. F., Effects of metabolism and distribution of carbon monoxide on blood and body stores. *Am. J. Physiol.* **1969**, *217*, 354–363.
- 53) Coburn, R. F., Mean myoglobin oxygen tension in skeletal and cardiac muscle. In: *Oxygen transport to tissue: instrumentation, methods, and physiology*. Bicher, H. I.; Bruley, D. F. Eds. Plenum Press, NY, **1973**, pp. 571–577.
- 54) Coburn, R. F.; Mayers, L. B., Myoglobin O<sub>2</sub> tension determined from measurements of carboxymyoglobin in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **1971**, *220*, 66–74.
- 55) Wilhelm, E.; Battino, R.; Wilcock, R. J., Low-pressure solubility of gases in liquid water, *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 219–262.
- 56) Cooper, C. E., Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1411*, 290–309.
- 57) Kim, H. P.; Wang, X.; Galbiati, F.; Ryster, S. W.; Choi, A. M. K., Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J.* **2004**, *18*,

1080–1089.

- 58) Yi, L.; Morgan, J. T.; Ragsdale, S. W., Identification of a thiol/disulfide redox switch in the human BK channel that controls its affinity for heme and CO. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 20117–20127.
- 59) Watanabe, K.; Suzuki, T.; Kitagishi, H.; Kano, K., Reaction between a haemoglobin model compound and hydrosulphide in aqueous solution. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4059–4061.
- 60) Motoyama, K.; Arima, H.; Hirayama, F.; Uekama, K., Inhibitory effects of 2,6-Di-O-methyl-3-O-acetyl- $\beta$ -cyclodextrins with various degrees of substitution of acetyl group on macrophage activation and endotoxin shock induced by lipopolysaccharide. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, *56*, 75–79.
- 61) Karasugi, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Modification of a dioxygen carrier, hemoCD, with PEGylated dendrons for extension of circulation time in the bloodstream. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2365–2376.
- 62) Mitrione, S. M.; Villalon, P.; Lutton, J. D.; Levere, R. D.; Abraham, N. G., Inhibition of human adult and fetal heme oxygenase by new synthetic heme analogues. *Am. J. Med. Sci.* **1988**, *296*, 180–186.
- 63) Shirataki, C.; Shoji, O.; Terada, M.; Ozaki, S.-i.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Inhibition of heme uptake in pseudomonas aeruginosa by its hemophore (HasA<sub>p</sub>) bound to synthetic metal complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2862–2866.
- 64) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894–6897.
- 65) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K., Supramolecular ferric porphyrins as cyanide receptors in aqueous solution. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 943–947.
- 66) Kawaguchi, A. T.; Salybekov, A. A.; Yamano, M.; Kitagishi, H.; Sekine, K.; Tamaki, T., PEGylated carboxyhemoglobin bovine (SANGUINATE) ameliorates myocardial infarction in a rat model. *Artif. Organs* **2018**, *42*, 1174–1184.
- 67) Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L., Functional analogues of cytochrome *c* oxidase, myoglobin, and hemoglobin. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561–588.
- 68) Springer, B. A.; Sligar, S. G.; Olson, J. S.; Phillips, Jr., G. N., Mechanisms of ligand recognition in myoglobin. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699–714.
- 69) Rose, J. J.; Bocian, K. A.; Xu, Q.; Wang, L.; DeMartino, A. W.; Chen, X.; Corey, C.

- G.; Guimarães, D. A.; Azarov, I.; Huang, X. N.; Tong, Q.; Guo, L.; Nouraie, M.; McTiernan, C. F.; O'Donnell, C. P.; Tejero, J.; Shiva, S.; Gladwin, M., A neuroglobin-based high-affinity ligand trap reverses carbon monoxide-induced mitochondrial poisoning. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 6357–6371.
- 70) Tuckey, R. C.; Kamin, H., Kinetics of O<sub>2</sub> and CO binding to adrenal cytochrome P-450<sub>sec</sub>. Effect of cholesterol, intermediates, and phosphatidylcholine vesicles. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 4232–4237.
- 71) Dioum, E. M.; Rutter, J.; Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A.; McKnight, S. L., NPAS2: A gas-responsive transcription factor. *Science* **2003**, *298*, 2385–2387.
- 72) Azarov, I.; Wang, L.; Rose, J. J.; Xu, Q.; Huang, X. N.; Belanger, A.; Wang, Y.; Guo, L.; Liu, C.; Ucer, K. B.; McTiernan, C. F.; O'Donnell, C. P.; Shiva, S.; Tejero, J.; Kim-Shapiro, D. B.; Gladwin, M. T., Five-coordinate H64Q neuroglobin as a ligand-trap antidote for carbon monoxide poisoning. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 368ra173.
- 73) Puranika, M.; Nielsena, S. B.; Yound, H.; Hvitvede, A. N.; Bourassaa, J. L.; Casea, M. A.; Tengrotha, C.; Balakrishnana, G.; Thorsteinssond, M. V.; Groves, J. T.; McLendona, G. L.; Robertsd, G. P.; Olson, J. S.; Spiro, T. G., Dynamics of carbon monoxide binding to CooA, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21096–21108.
- 74) Bouzahir-Sima, L.; Motterlini, R.; Gross, J.; Vos, M. H.; Liebl, U., Unusual dynamics of ligand binding to the heme domain of the bacterial CO sensor protein RcoM-2. *J. Phys. Chem. B.* **2016**, *120*, 10686–10694.
- 75) Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Iverson, B. L.; Sessler, J. L.; Morris, R. M.; Gibson, Q. H., Dioxygen and carbonyl binding to iron(II) porphyrins: a comparison of the "picket fence" and "pocket" porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3052–2064.
- 76) Cronje, F. J.; Carraway, M. S.; Freiburger, J. J.; Suliman, H. B.; Piantadosi, C. A., Carbon monoxide actuates O<sub>2</sub>-limited heme degradation in the rat brain. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 1802–1812.
- 77) Chaves-Ferreira, M.; Albuquerque, I. S.; Matak-Vinkovic, D.; Coelho, A. C.; Carvalho, S. M.; Saraiva, L. M.; Romão, C. C.; Bernardes, G. J. L., Spontaneous CO Release from Ru<sup>II</sup>(CO)<sub>2</sub>-Protein Complexes in Aqueous Solution, Cells, and Mice. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1172–1175.
- 78) unpublished data, patent pending: PCT/JP2020/006033.

- 79) Choi, IS., Delayed neurological sequelae in carbon monoxide intoxication. *Arch Neurol* **1983**, *40*, 433–435.
- 80) Uemura, K.; Harada, K.; Sadamitsu, D.; Tsutura, R.; Takahashi, M.; Aki, T.; Yasuhara, M.; Maekawa, T.; Yoshida, K., Apoptotic and necrotic brain lesions in a fatal case of carbon monoxide poisoning. *Forensic Sci Int.* **2001**, *116*, 213–219.
- 81) Piantadosi, C. A.; Zhang, J.; Levin, E. D.; Folz, R. J.; Schmechel, D. E., Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat. *Exp Neurol.* **1997**, *147*, 103–114.
- 82) Oh , S.; Choi, S.-C., Acute carbon monoxide poisoning and delayed neurological sequelae: a potential neuroprotection bundle therapy. *Neural. Regen. Res.* **2015**, *10*, 36–38.
- 83) Brown, S. D.; Piantadosi, C. A., In vivo binding of carbon monoxide to cytochrome c oxidase in rat brain. *J. Appl. Physiol.* **1985**, *68*, 604–610.
- 84) Zhang, J.; Piantadosi, C. A., Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 1193–1199.
- 85) Brown, S. D.; Piantadosi, C. A., Recovery of energy metabolism in rat brain after carbon monoxide hypoxia. *J. Clin. Invest.* **1992**, *89*, 666–672.

## 第六章 結言

本研究では、鉄ポルフィリン-シクロデキストリン(FePor/CD)超分子錯体を基盤にした超分子ヘムタンパク質モデル錯体の基礎研究および医学・生理学分野への応用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。

第一章で述べたように、バイオミメティクス研究は 1950 年代後半に神経生理学者である Otto Schmitt によって提唱されて以来、基礎科学と応用科学との「橋渡し translational」として研究が盛んに行われてきた。生体内における物質や機能を人工系で再現するためには、生体系と同じ環境で機能するモデル化合物を構築する必要がある。この目的のためには、ポルフィリン-シクロデキストリン(FePor/CD)超分子錯体は有望な候補であった。Kano らは全ての水酸基を *O*-メチル化した  $\beta$ -シクロデキストリン(TMe- $\beta$ -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(III)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ことを見出した。さらに、Fe<sup>III</sup>TPPS の近位側にリガンド配位子を導入し、水中で機能するヘムタンパク質モデルである hemoCD を創出した<sup>1)</sup>。hemoCD は生理条件下で酸素(O<sub>2</sub>)を可逆的に捕まえ、安定な酸素付加体を形成し、さらに極めて高い一酸化炭素(CO)親和性を示している。本研究では、hemoCD の合成や極めて高い一酸化炭素(CO)親和性着目し、その機能改善や応用研究を行った。

第二章では、超分子ヘムタンパク質モデルの素材となるシクロデキストリン二量体である Py3OCD の合成方法最適化を行った。hemoCD1 の構成部分であるシクロデキストリン二量体 Py3CD は 4 ステップの反応より合成された。2013 年に報告された hemoCD3 は、生体内において hemoCD1 と同じ機能を示し、鉄(III)の met-hemoCD3 がシアン(CN<sup>-</sup>)と強く結合することを報告した。hemoCD3 のシクロデキストリン二量体 Py3OCD は 2 ステップかつ高収率で合成することができると報告されている。したがって、Py3OCD は hemoCD の実用化向けの合成法の改善に有望である。しかし、報告されている Py3OCD の合成方法<sup>2)</sup>に従って合成したところ、最終生成物である Py3OCD の代わりに Py3OCD と同じ分子量を持ち、全く違う物性を示す副生成物(2)が度々得られること、および原料である 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の市販品の入手が困難になっている等の問題があっ

た。そのため、hemoCD3 を用いた生体内での薬物動態に関する研究成果が少ない現状である。本研究では、原料である 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD の合成を $\beta$ -CD から 94%の収率で合成することに成功した。次に、副生成物(**2**)および Py3OCD の構造を各種 NMR スペクトルを用いて、**2** の構造は CD の 6 位で連結している 6,6'-dimer であることを明らかにした。さらに、6,6'-dimer の生成メカニズムを考案した上で、Py3OCD の反応条件を再検討した。その結果、総収率 23%で Py3OCD の合成を確立した。確立した反応条件で合成した Py3OCD を用いて、hemoCD3 の O<sub>2</sub>、CO、およびシアン化物イオン(CN<sup>-</sup>)の結合挙動を再現した。これらの結果は、hemoCD3 を用いて生体内で機能し得る人工レセプターへの応用に貢献できると考えられる。

第三章では、水中で遠位側に極性基を持つ超分子ヘムタンパク質モデルを構築した。hemoCD1 は水中でヘモグロビン(Hb)の T 状態に近い酸素親和性を示すが、CO 親和性は Hb の約 100 倍となる。水中でミオグロビン(Mb)やヘモグロビン(Hb)の機能を再現するために、まだ不十分とも言える。したがって、hemoCD1 のさらなる高機能化を目指すには、天然 Mb の遠位ヒスチジンと同じ役目を果たす官能基をシクロデキストリンあるいはポルフィリン側鎖として導入することが必要と考えられる。有機溶媒中における Mb モデル錯体の先行研究から得られた知見<sup>3,4)</sup>を活かし、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た。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 を合成した。Glu-FeTPPS は Py3CD と水中で安定な 1 : 1 包接錯体 (Glu-hemoCD) を形成し、その O<sub>2</sub>/CO 選択性について評価したところ、Glu-hemoCD の  $P_{1/2}^{O_2}$  は hemoCD1 と同等である一方、 $P_{1/2}^{CO}$  は hemoCD1 と比較すると約 300 倍ほど低下した。その結果、hemoCD1 の O<sub>2</sub> 選択性( $M$  値)を向上させることに成功した。さらに、deoxy-Glu-hemoCD の UV-vis スペクトルから側鎖のカルボキシ基が中心鉄(II)に配位することがわかった。Glu-hemoCD の酸素、一酸化炭素の結合速度を検討したところ、カルボキシ基の導入により  $k_{on}^{O_2,CO}$  が低下し、 $k_{off}^{O_2}$  は低下した一方、 $k_{off}^{CO}$  は大きくなることがわかった。この原因は、遠位側のカルボキシ基が CO に対して負の極性効果(Negative polar effect)を示し、Fe-CO 結合を不安定化させることが考えられる。O<sub>2</sub>-Glu-hemoCD は pH 7.0 のリン酸緩衝溶液中において比較的安定な酸素錯体( $t_{1/2}^{O_2} = 12.4$  h)を形成することが明らかとなった。しかしその安定性は従来の O<sub>2</sub>-hemoCD1 ( $t_{1/2}^{O_2} = 30$  h)<sup>1)</sup>に比べ

て低いことが分かった。これはカルボキシ基が水分子との親和性が高く、シクロデキストリンによって形成される疎水場近傍に存在するために、水の侵入が容易になり、酸素錯体が不安定化されたことが理由と考えられる。もう一つの理由として、側鎖のカルボキシ基が中心鉄(II)に近いこと、酸素錯体を形成するのに十分なスペースが確保できず、酸素錯体が不安定化したためとも考えられる。

第四章では、有機溶媒中においてカルボキシ基が酸素への水素結合供与体としての機能することを参考し<sup>4)</sup>、カルボキシ基のさらなる最適化をめざして、ポルフィリンの鉄中心に対して垂直位置にカルボキシ基を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O<sub>2</sub>親和性、CO親和性測定を行った結果、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、COに対する親和性は大幅に低下した。その結果、CO/O<sub>2</sub>選択性を示すM値は320となった。これは今まで報告されたFePor/CDよりも高いO<sub>2</sub>選択性を示している。Fe-Por1/Py3OCDのO<sub>2</sub>およびCO結合における速度論的解析を行ったところ、遠位ストラップのないFe-Por2/Py3OCDおよびhemoCD3と比べて、Fe-Por1/Py3OCDの $k_{on}^{O_2, CO}$ の値は低下し、 $k_{off}^{O_2}$ も低下することが観測された。その原因として、中心鉄(II)に結合したO<sub>2</sub>と周りの双極子-双極子相互作用によるものと考えられる。一方、 $k_{off}^{CO}$ は大きくなった。CO-Fe-Por1/Py3OCDのIR測定を行うことによってCOの三重結合の伸縮振動の変化を観測した。CO-Fe-Por1/Py3OCDのCO伸縮振動( $\nu_{C-O}$ )の周波数はhemoCDと比べて負にシフトした。したがって、Fe(II)に結合したCOのO原子の近くに正の極性効果が働くことが示唆された。Fe-Por1/Py3OCD酸素錯体の安定性を示す半減期( $t_{1/2}^{O_2}$ )は7hとなり、本来のO<sub>2</sub>-hemoCD3の半減期( $t_{1/2}^{O_2} = 50$ h)より短くなった。アニオン性ポルフィリンであるFe<sup>III</sup>TPPSのスルホナト基によってPy3OCDの包接を強固に保つことが重要であると示唆された。

第三章および第四章における検討から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ことがわかった。第三章では、側鎖のカルボキシ基がCOに対する負の極性効果として働く一方、第四章では、カルボキシ基をポルフィリンの鉄中心に対して垂直位置に持ってくることにより、遠位カルボキシ基がCOに対する正の極性効果として働くことが明らかになった。これは、カルボキシル基の疎水ポケット内におけるの酸解離状態に原因があると考えて



いる。しかし、第三章および第四章では、直接的にカルボキシル基の状態を観測できていないため、さらに詳細かつ実験的な確証が必要である。また、Glu-hemoCD と Fe-Por1/Py3OCD の酸素錯体が遠位極性基を持たない hemoCD3 と比べると不安定になった。遠位基を導入することにより、シクロデキストリンにより構築した疎水ポケットのガス配位部位に水が侵入しやすくなり、水分子からの求核攻撃を受けやすくなっていることが示唆された。したがって、自動酸化を抑制するためには中心鉄への求核種の接近を防ぐことが有効であると考えられる。今後、hemoCD を用いて完全な Mb モデル錯体を設計した時、遠位極性基を導入する際に酸素への水素結合供与体としての機能を重視しつつ、シクロデキストリンにより構築した疎水ポケットを持たせる必要がある。

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利用し、hemoCD1 の吸収スペクトルを用いて生体内における簡便な CO の定量法を開発した。hemoCD1 は水溶液中の微量な CO を高感度で検出することができ、さらに、ガスクロマトグラフィー法よりも多くの CO 量を検出することができる。確立した hemoCD アッセイを用いて、ラットに CO ガスを吸入した時の各組織内の CO 量の経時変化を追跡したところ、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。この一連の実験結果は、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、主な CO 貯蔵ヘムタンパク質であり、組織内の過剰な CO の蓄積を防ぐ役割も果たしていることを示唆している。さらに、CO 吸入後、従来の治療法である酸素換気を行った後の各組織の 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、除去されることがわかった。この発見は、CO 中毒のメカニズムの解明や後遺症の治療に役立つことができると考えられる。次に、CO 中毒の際における CO 中毒解毒剤として hemoCD1 の効果について評価をした。hemoCD1 はヘモグロビンの R 状態よりも CO 親和性が高く、CO-Hb から hemoCD1 へと CO が定量的に移行することを確認した。実際に hemoCD1 を CO 吸入後のラットに静脈投与すると、酸素換気と hemoCD1 の酸素錯体の組み合わせにより、酸素換気のみでは除去が難しい脳組織に蓄積した 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。

2005 年、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 が報告されて以来、当研究室では hemoCD のさらなる機能改善や応用を目指して研究を行ってきた。本研究は、数多くの先行研究の知見を活かし、hemoCD の基礎および応用研究を展開した。本論文における研究成果は、hemoCD を基盤とする、水中で完全なヘムタンパク質モデルを創り出すための基礎的な知見を与えた。この知見は、生理条件下でヘムタンパク質の反応メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられる。さらに、今後これらの発見に基づいて、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、hemoCD1 の CO 定量試薬としての実用性を見出した。CO 解毒剤として組織に蓄積された CO を除去する手法の可能性を見出し、今後、CO 中毒の後遺症治療の実現に繋がると期待される。

## 参考文献

- 1) Kano, K.; Kitagishi, H.; Kodera, M.; Hirota, S. Dioxygen binding to a simple myoglobin model in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 435–438.
- 2) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K. Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6894–6897.
- 3) Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L. Functional analogues of cytochrome *c* oxidase, myoglobin, and hemoglobin. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 561–588.
- 4) Boitrel, B.; Le Gac, S. Stabilization of synthetic heme-superoxo complexes by hydrogen bonding: a still on-going quest. *New. J. Chem.* **2018**, 42, 7516–7521.



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究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 北岸 宏亮 教授に心より厚く御礼申し上げます。

本論文を提出するにあたって、主査を務めてくださいました同志社大学理工学部 小寺 政人教授に心より厚く御礼申し上げます。

お忙しい中本論文の審査ならびに有益な御助言を頂きました同志社大学理工学部 水谷 義 教授ならびに 古賀 智之 教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を行う上で多くの場面で、活発な議論やご指導を頂きましたフランス INSERM Roberto Motterlini 博士、Roberta Foresti 博士ならびに同志社大学理工学部 人見 穰 教授に心より厚く御礼申し上げます。

ラットを用いた一酸化炭素解毒剤実験を行うために多大なるご協力をしてくださった東海大学医学部 川口 章 客員教授に深く感謝いたします。

ストラップポルフィリンの提供ならびに有益な御助言を頂きましたフランス レンヌ第1大学の Bernard Boitrel 教授に深く感謝申し上げます。

レーザーフラッシュフォトリシス測定にあたって大阪大学 工学研究科 林高史 教授ならびに 大洞 光司 准教授に心より感謝の意を表します。

研究室において、多大なる御指導と御協力を頂きました機能有機化学研究室の先輩方ならびに後輩の皆様に深く感謝致します。

また、多くの励ましや数々の協力をもって支えて下さいました同級生の藤井香里 氏、角谷 優樹 氏本当にありがとうございました。

最後に、日々の生活をはじめ、これまでの学業、研究活動を終始励まし支えてくれた家族に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、実験動物として多くのラットを使用しました。動物実験は同志社大学が定める動物実験規定を遵守して行い、可能な限りラットに苦痛を与えないよう細心の注意を払い、その使用数は最小限に抑えました。しかし、彼らの尊い命が失われたことは事実です。本研究を遂行する中で犠牲となった実験動物たちの冥福をお祈りいたします。

