

生物化学研究に必要な十分量のコルフィセンを確保するために、大量合成技術を確認することを第1の研究目的とした。

ヘムたんぱく質補欠分子としてのコルフィセンを調べることは興味深いことである。なぜ自然は対称性の良いテトラピロールだけを補欠分子に選んだのだろうか。ポルフィリンのテトラピロール配列が変わるとたんぱく質機能にどんな影響があるのか。これらの問に対する答は未だない。コルフィセンを含んだミオグロビンをつくることができるなら、こうした疑問が解けるはずである。また、ポルフィリンとコルフィセンの基本的な差違を解明することより、たんぱく質内部で酸素結合を支配する因子が浮かび上がるはずである。残念ながら、たんぱく質内部にあるポルフィリンの基本骨格を変える試みは今までまったくなかった。コルフィセンの性質を解明することは、酸素結合たんぱく質の分子設計に向けた基礎的知見を蓄積するためにも重要である。第2の研究目的は、新しいポルフィリン構造異性体であるコルフィセンをミオグロビンに導入し、酸素や一酸化炭素との結合特性を機能解析や分光測定から配位子結合を制御する構造因子を追求し、新しい人工酸素運搬体の分子設計の基本概念を確立することにある。

### 1. 6,7-ジカルボキシルヘミン再構成ミオグロビンの研究

図1のコルフィセンには分子周辺にカルボキシル基が直接結合している。一方、ミオグロビンのヘムにはプロピオン酸残基が存在し、グロビンと特異的な水素結合のネットワークを形成している。カルボキシル基はプロピオン酸基を炭素2原

子分短くしたもので(図1)、まずミオグロビンがカルボキシル基をもつポルフィリン類を受け入れるかどうかを調べる必要がある。もしも、ミオグロビンにジカルボキシルヘミンが結合するならば、次に調べようとするコルフィセンも補欠分子として使える可能性が高い。そこで予備実験として、分担研究者は6,7-ジカルボキシルヘミンでミオグロビンを再構成し、プロピオン酸基からカルボキシル基への短縮にともなうミオグロビン分子構造変化を核磁気共鳴法とX線結晶構造解析で調べた。

### 2. コルフィセンの大量合成戦略

コルフィセンには2種類の代表的な合成経路が知られていた。ひとつは1994年に Sessler らのグループと Aukauloo と Guillard により同時に報告された経路で、ビピロールから線形テトラピロールを誘導し、分子両端をホルミル化してできるジアルデヒドを分子内 McMurry 反応で環化する方法である(図2)。もうひとつの方法は、1996年に Falk と Chen が報告した方法である。この方法ではジピロールエタンを初めに合成し、ここにヨウ素化したピロールアルデヒドを反応させて線形テトラピロールに変換し、最後に Ullmann 反応で分子を環化する方法である(図2)。上記の2方法は簡単に実行しづらいものである。Sessler 法では出発原料のビピロールの合成収率が低く、線形テトラピロールのジホルミル化も難しく、最後の McMurry 反応も湿気や酸素を厳密に排除した条件で実行する必要がある。さらに、その反応収率は2%と低い。Falk と Chen の方法では、使用するジピロールエタンとヨウ素化したピロールア

ルデヒドの合成がともに極めて難しく、しかもジメチルホルムアミド（沸点 153 度）中で 72 時間も還流しなければならず、大変時間がかかる。分担研究者は上記 2 方法の難点を克服するために、できるかぎり容易に入手可能なピロール類を利用すること、しかも短時間で反応させる目的で新規合成法を開発することを試みた。

### 3. ミオグロビン内部のヘムを変形する試み

鉄ポルフィリンはミオグロビン内部で酸素結合部位となる重要分子である。ポルフィリンは 4 回対称軸をもち、この基本構造はミオグロビンだけでなくペルオキシダーゼ、カタラーゼ、あるいはクロロフィルなどにも共通している。この基本構造を変えるとヘムたんぱく質機能がどのように変化するか極めて興味深い問題である。しかし、この問に対しては今まで対応しようがなかった。それは、ポルフィリンの基本骨格を変更が思いもよらなかった出来事だけでなく、難しい合成化学技術が要求されたからである。しかし、上記 A2 項で述べたように、分担研究者はコルフィセンを容易に大量合成する技術を開発した。コルフィセンはポルフィリンのメソ位炭素原子を通常の (1, 1, 1, 1) 配列から、(2, 1, 0, 1) 配列へと並べ替えた構造異性分子である。この変化により、ヘム鉄原子の配位環境は大きく変わり、鉄は台形の配位子場に置かれることとなる。そのため、鉄原子の反応性に影響がおよび、最終的にはミオグロビンそのものの生理機能が変わる可能性がある。この可能性を追求するために、分担研究者はジカルボキシル基が

ついたコルフィセンでミオグロビンを再構成した。これは、ミオグロビン内部のヘムを変形した初めての試みである。

## B. 研究方法

### 1. 6,7-ジカルボキシルヘミン再構成ミオグロビン

ミオグロビンにコルフィセンを導入するための予備実験として、構造が類似した 6,7-ジカルボキシルヘミンがミオグロビンに導入できるかをまず検討した。6,7-ジカルボキシルヘミンは今までに合成されたことがなかった新規ヘミンである。合成には 2 種類のジピロールメタンを結合する方法を採用した。4,4'-dimethyl-3,3'-(diethoxy carbonyl)-dipyrromethane-5,5'-dialdehyde と 3,3',4,4'-tetramethyldipyrromethane-5,5'-dicarboxylic acid を 1% 濃硫酸がはいったエタノール中で 5 時間還流して目的物質 6,7-diethoxycarbonyl-1,2,3,4,5,8-hexamethylporphyrin を収率 27% で合成した。元素分析、核磁気共鳴スペクトルによる分析から、合成物質の構造を確認した。このポルフィリンを塩化第 2 鉄とともにジメチルホルムアミド中で還流して鉄錯体とし、さらにアルカリ加水分解でエステル側鎖を加水分解してヘミンに変えた。シグマ社から購入したクジラのみオグロビンはメチルエチルケトン法によりヘミン除去し、合成した 6,7-ジカルボキシルヘミンと混ぜた。カルボキシルメチルセルロースカラムによる精製後、高純度の再構成ミオグロビンを得た。たんぱく質を濃縮後、飽和量の硫酸アンモニウムを加えて低温放置し、4 週間後に  $0.7 \times 0.7 \times 0.2 \text{ mm}^3$  の P6 結晶を得た。結晶の格子パラメータは  $a = b = 91.02$ ,  $c = 45.68 \text{ \AA}$  であった。構造は理

学電機 R-AXIS IIc で得られた反射を XPLOR プログラムで解析して得た。R 値は 0.283 まで収束し、最終的な分解能は 1.9 Å であった。なお、結晶データはプロテインデータバンク PDB に番号 1IOP で登録した。再構成ミオグロビンの可視分光データは島津 MPS-2000 で記録した。核磁気共鳴スペクトルは Varian 社 XL-300 (300 MHz) で測定し、化学シフトの基準物質には sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate を用いた。酸素平衡曲線は今井装置により測定した。

## 2. コルフィセンの有機合成

出発物質には 1,2-bis(3-ethoxycarbonyl-4-methylpyrrol-2-yl)ethane (**1**) を利用した。これは Fischer と Scheyer が 1924 年に報告した物質である。ホルミル化してジアルデヒドに変換後、2 当量の 3,4-dimethylpyrrole を加えて  $\alpha, \epsilon$ -ピラジエン類似物質へと誘導した。この線形テトラピロールを Cu(II) イオンで環化して、目的物質を収率 19% で合成した。開発したコルフィセンの合成スキームを図 3 に記す。それぞれの中間化合物の合成法詳細は次に記す。

**2,2'-Dipyrroethane-5,5'-dicarboxylic acid (2) の合成** ジピロールエタン (**1**) 1.82 g をエタノール 50 mL に加熱溶解し、水酸化ナトリウム 2 g を含む水 20 mL を還流させた反応液に 10 分間にわたり加えた。その後、60 分間還流を続けて室温まで冷却し、水 100 mL を加え、希塩酸を滴下した。凝集した沈殿 (**2**) を集め、大量の水で水洗し、乾燥した。1.10 g (収率 87%) の白色沈殿 (**2**) を得た。生成物は真空ポンプで 2 日間吸引乾燥し

た。

## **5,5'-Diiodo-2,2'-dipyrroethane (3) の合成**

化合物 (**2**) 1.73 g を、炭酸水素ナトリウム 2.5 g をふくむエタノール：水 = 1 : 1 (体積比) 混合液 50 mL に加熱溶解した。ヨウ素 1.1 g とヨウ化カリウム 2.0 g を溶かした水 20 mL を 45 °C で 15 分間にわたり攪拌しつつ滴下した。その後 90 分間、同じ温度で攪拌をつづけ、生成した沈殿 (**3**) を集め、水洗し乾燥した。収量 2.84 g (収率 85%)。質量スペクトル、 $m/z$  586。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 9.03 (br s, 2H, NH), 4.32 (q, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.30 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.18 (s, 6H, ring -CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, 6H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

## **2,2'-dipyrroethane (4) の合成**

化合物 (**3**) 5.0 g をテトラヒドロフラン 100 mL に溶かし、トリエチルアミン 10 滴、10% パラジウム炭素 0.7 g を加えた。1 気圧の水素雰囲気下で一晩攪拌し、触媒をろ過して除去した。ろ液を濃縮乾燥し、残渣をエタノール/水から結晶化し、化合物 (**4**) を得た。収量 2.60 g (収率 92%)。C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> に対する元素分析理論値；C, 65.04; H 7.28; N, 8.43。分析値；C, 64.88; H, 7.55; N, 8.15。質量分析値； $m/z$  332。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 8.72 (br s, 2H, NH), 6.33 (m, 2H, ring -H), 4.28 (q, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.26 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.20 (s, 6H, ring -CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, 6H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

## **5,5'-Diformyl-2,2'-dipyrroethane**

### **(5) の合成**

化合物 (**4**) 10.0 g を *N,N*-ジメチルホルムアミド 100 mL に溶かし、オキシ塩化リンを 5 °C 以下で、窒素気流中で加えた。その後、湿気を防ぎつつ室温で一晩攪拌してから、水 500 mL に注ぎ込んだ。そのあと、アンモニア臭が

するまで 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液をくわえて生じた黄土色沈殿 (5) をエタノール/水から結晶化すると、淡黄色針状結晶 10.1 g を得た (収率 86 %)。質量分析値 ; m/z 388。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) 10.48 (br s, 2H, NH), 9.38 (s, 2H, -CHO), 4.35 (q, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.36 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.58 (s, 6H, ring -CH<sub>3</sub>), 1.41 (t, 6H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

**a,c-ピラジエン類似直鎖テトラピロール (6) の合成** ジアルデヒド (5) 10.0 g を酢酸 90 mL に溶解し、3,4-ジメチルピロール 4.9 g と 30 % 臭化水素酢酸溶液 20 mL を 60 °C で添加した。1 時間 60 °C で加熱後、放冷し、さらに氷浴中で放置すると黒褐色結晶 (6) が沈殿した。水洗後、乾燥して 11.12 g の目的物を得た (収率 61 %)。C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> に対する元素分析理論値 ; C, 54.55; H 5.72; N, 7.95。分析値 ; C, 54.38; H, 5.50; N, 8.15。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) 13.46, 13.02 (each br s, 2H, NH), 7.72 (m, 2H, ring -H), 7.37 (s, 2H, =CH-), 4.30 (q, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.61, 2.30, 2.07 (each s, 6H, ring -CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, 6H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

**コルフィセン (8) の合成** 化合物 (6) 2.70 g と塩化第 2 銅・2 水和物 5.70 g を N,N-ジメチルホルムアミド 230 mL 中で 1 時間還流した。冷ました溶液にクロロホルム 500 mL を混ぜ、水で洗った (500 mL, 4 回)。溶液を蒸発させた残査を、シリカゲルカラムで、クロロホルムを用いて精製した。化合物 (7) を含む、暗緑色分画を集めて、エバポレータで乾燥した。残った 470 mg の固体を硫酸/エタノール 1 : 1 (体積比) 混合物 100 mL に溶かして一晩攪拌後、クロロホルム

300 mL と混ぜた。混合物を水 (400 mL, 2 回)、0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (400 mL, 2 回)、水 (400 mL) で洗浄してから、エバポレート乾燥した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィーでクロロホルムをもちいて精製した。クロロホルム/メタノールから結晶化してコルフィセン (8) 402 mg を得た ((6) を基準として収率 19 %)。C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> に対する元素分析理論値 ; C, 71.35; H 6.36; N, 10.40。分析値 ; C, 71.15; H, 6.50; N, 10.15。質量分析値 ; m/z 539 (M+1)。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) 10.54 (s, 2H, -CH=CH-), 9.54 (s, 2H, =CH-), 4.86 (q, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.67, 3.30, 3.21 (each s, 6H, ring -CH<sub>3</sub>), 1.76 (t, 6H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -1.41 (br s, 2H, NH)。可視吸収 (ジクロロメタン) λ<sub>max</sub>, nm (ε): 416 (102,000), 516 (6,450), 551 (4,650), 577 (4,650), 628 (2,500) (図 4)。

### 3. コルフィセン再構成ミオグロビン

B1 項によれば、6,7-ジカルボキシルヘミンがミオグロビンに組み込めることが明らかになった。この結果は、B2 項で合成したコルフィセンがミオグロビンの補欠分子となり得ることを示唆するものである。

そこで、分担研究者はジカルボキシコルフィセンによるミオグロビン再構成を試みた。コルフィセンは塩化第 1 鉄の共存下、ジメチルホルムアミド中での還流により鉄 (III) 錯体とした。シグマ社から購入したクジラのみオグロビンはメチルエチルケトン法によりヘミン除去し、合成したジカルボキシルコルフィセンと混ぜた。カルボキシルメチルセルロースカ

ラムによる精製後、高純度の再構成ミオグロビンを得た。ミオグロビンの濃度はピリジンヘモクロモゲンスペクトル法により、411 nmでのミリモル吸光係数  $87 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いて決定した。電子スピン共鳴スペクトルは Varian E-12 (X-バンド) で測定した。ヘリウム温度での測定にはクライオスタット (Oxford, ESR-900) を用いた。赤外線吸収スペクトルはフーリエ変換分光器 (島津, 8100-A, 分解能  $2 \text{ cm}^{-1}$ ) を使用した。赤外測定セルは厚み  $7 \mu\text{m}$  で、ミオグロビン濃度は  $1 \text{ mM}$  であった。400回の信号積算後に得られた、鉄に配位した一酸化炭素の振動解析は Igor-Pro 社のソフトウェア Wavematrix (第 3.1 版) で行った。共鳴ラマンスペクトルは Princeton Instruments 社の分光器 (Model LN/CCD-1340 x 400 PB) により、波長  $441.6 \text{ nm}$  のヘリウム-カドミウムレーザー (金門エレクトロニクス, Model CD4805R) で測定した。サンプルでのレーザーパワーは  $5.4 \text{ mW}$  であり、ピークの位置は  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$  の精度があった。配位子結合定数の決定は固体配位子の場合、分光滴定法により行った。還元型ミオグロビンへの酸素親和力は今井の自動装置で求めた。一酸化炭素の結合定数はストップフロー装置 (OLIS 社, RMS-1000) で決めた。

## C. 研究結果

### 1. 6,7-ジカルボキシルヘミン再構成ミオグロビン

1-1 分光学的手段による予備的観察  
再構成ミオグロビンは 80% の高収率で得られ、光吸収スペクトルでみた試料純度は良好であった。その配位構造を可視吸収スペクトルで調べると、天然型たん

ぱく質同様、ヘム鉄に近位ヒスチジンと水分子が配位するアコメト錯体であった。プロトン核磁気共鳴 (NMR) によると、ヘム周辺メチル基シグナルは 6 本ひと組だけ ( $78.7, 74.0, 70.2, 64.9, 61.6, 57.7 \text{ ppm}$ ) 観測されたので、合成ヘミンは単一の方向でヘムポケットに入り高スピン錯体を形成すると判明した。また、近位ヒスチジン由来の信号が  $81.0 \text{ ppm}$  にあり、ヘムとグロビンが特異的に結合することが判明した (図 5)。

電子吸引性が強いカルボキシル基が分子周辺に結合する 6,7-ジカルボキシルヘミンを含む再構成ミオグロビンでは、天然ミオグロビンと比較して、次のような異常が見られた。ヘム鉄に配位する水分子はアルカリ領域で水酸イオンに変化するが、その転移点が低い pH で起こりやすくなっていた。また、アコメト型ミオグロビンでは  $600 \text{ nm}$  に出現すべき可視吸収バンドが  $630 \text{ nm}$  にみられた。 $400 \text{ nm}$  付近のソーレ帯が  $5 \text{ nm}$  の赤色シフトした。こうした影響は他の配位子誘導体にもすべて観測され、電子吸引基であるカルボキシル基がポルフィリン環に直接結合するためと考えられる (表 1)。

1-2 酸素結合能の変化  
6,7-ジカルボキシルヘミンで再構成したミオグロビンには酸素結合能力があり、オキシ型錯体を形成した (ヒル係数は 1.04)。しかし、酸素親和性は天然ミオグロビンの  $1/3$  まで低下し、50% 飽和度での酸素分圧は  $1.5 \text{ mmHg}$  であった。さらに目立つ性質として、オキシ型ミオグロビンが極めて不安定であったことが挙げられる。天然ミオグロビンの酸素錯体にくらべて自動酸化速度が  $1.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  (pH 7.0、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) と 13 倍あまりも増加した。この

結果は、ヘムプロピオン酸残基を縮めたジカルボキシヘムでは、天然たんぱく質に構築されていた水素結合ネットワークが再編成されていることを示している。

**1-3 X線結晶構造解析** 構造変化を具体的に知るためにX線で結晶構造を解析した。その結果は大変興味深いものである。分子はP6型の結晶構造であり、天然たんぱく質のP2<sub>1</sub>結晶とは異なり、格子内部での分子パッキングがより緩やかになっていた。結晶学的データは表2にまとめる。

再構成ミオグロビンと天然ミオグロビンを比べると、グロビン骨格中の全 $\alpha$ 炭素原子座標の標準偏差は0.47 Åにすぎず、分子構造はお互いによく似ていた(図6)。しかし、ポリペプチド鎖のNおよびC末端領域では0.6~1.6 ÅのC $\alpha$ 原子の移動がみられた(図7)。この結果は、ヘムとグロビンとの分子接触がホロたんぱく質の立体構造維持にあまり影響を与えないことを例証している。

合成ヘミンである6,7-ジカルボキシヘムは天然のプロトヘミンに置き換わって、ミオグロビンのヘムポケットとよばれる空間に収まっていた。ヘムの方向はプロトヘムと全く同様で、親水性のカルボキシル基は溶媒側を向き、疎水性のポルフィリン環はポケット内部に挿入されていた。ジカルボキシルヘミンの周辺置換基は分子体積が小さいメチル基6個である。このため、ポルフィリン環とグロビンの4 Å以内の分子接触数は天然たんぱく質の88%にまで減少している(図8)。

また、ヘム酸側鎖とグロビンとの局所的な相互作用には大きな変化がおきた。炭素原子2個分の短縮により、プロピオン酸残基がもともと形成していたArg45、

Ser92、His97残基との水素結合は破壊されていた。これは上述のオキシ型ミオグロビンの自動酸化速度の増大結果と合致する。しかし、Ser92とHis97の側鎖は水素結合消失にもかかわらず、天然ミオグロビンにおけるのと同じ立体配置を維持していた。それは、これらの残基と7位カルボキシル基との間にそれぞれ水1分子があり、合計2分子の水が介在して弱い水素結合のネットワークが新たに形成されていたからである。2つの水分子の位置は、7位プロピオン酸残基の末端酸素原子の位置と同じであった。注目すべきことに、Arg45のグアニジン側鎖は大きなコンフォメーション変化をしめし、6位カルボキシル基と新しい水素結合を形成していた。すなわち、炭素原子2個分のカルボキシル基の短縮に追従してグアニジン側鎖は2.5 Åもヘムポケット内部に移動した。また、6,7位カルボキシル基には合計5分子の水分子が結合していた。すなわち、水分子はヘムのカルボキシル基を通して、ヘムポケットに侵入しやすくなっている。ヘム鉄に結合する酸素分子は水分子による求核攻撃を受けやすい状況にあり、このために酸素錯体が不安定になり自動酸化が促進されると考えられる(図9)。

6位カルボキシル基はポルフィリン環とほぼ平行に並んでいるが、7位カルボキシル基はねじれていた。6位カルボキシル基のこのような立体配置はカルボキシル基とポルフィリン環が電子的共役をする可能性を示唆している。

**1-4 鉄原子の配位構造** シアンメト型ミオグロビン結晶をみると、近位ヒスチジンと鉄原子間距離は2.02 Åで鉄-CN結合距離は1.88 Åであった。鉄原子は

ポルフィリン環平面内部におさまっており、鉄-N（ピロール）結合距離は 2.0 Å である。このような配位構造は、鉄が酸化型低スピン状態にあることを結晶学的にしめしている。人工ヘムは周辺メチル基の分子体積が小さいため、天然ヘムにくらべて、0.5 Å あまり奥深くヘムポケットに挿入されている。この影響は CN の配位構造にもおよび、Fe-C-N 結合角は 165 度と天然型たんぱく質とくらべて 15 度大きくなった。CN の窒素原子は遠位ヒスチジンと 2.65 Å の距離にあり、両者間には水素結合が形成されていることも判明した（図 9）。

**1-5 ミオグロビン内部のヘムの運動性** 6,7-ジカルボキシルヘミンでは酸側鎖が短く、周辺メチル基も分子体積が小さい。そのために、溶液中のミオグロビンでは、ヘムが鉄-近位ヒスチジン結合まわりに揺らぐ可能性がある。その可能性を調べるために、核磁気共鳴法により再構成ミオグロビンを調べた。ヘム鉄の常磁性により、ヘムメチル基は 10-25 ppm 領域に低磁場シフトする。ヘムメチル基のシグナルの温度変化を詳しく解析した（図 10）。

図 10 が示すように、温度上昇とともに、ヘムのメチルシグナル位置はキュリー則による高磁場シフトをしめす。しかし、シグナルパターン変化や吸収線の広がりなどは溶液温度を 55 °C に上げてみられず、ヘムの揺らぎを反映した核磁気共鳴スペクトルの変化は認められなかった。この結果は、合成ヘミンがミオグロビン内部でしっかり固定されていることをしめしている。

**2. コルフィセンの新規合成法の開発結果**

コルフィセンはポルフィリン異性体分子であり、分子内部のピロール配列が天然ヘムとは異なっている。この分子は 1994 年に有機合成で創出されたもので、天然には存在しない。分担研究者は生化学研究のための大量合成法を開発した。具体法を「方法」B2 項でのべたが、その骨子は必要な合成中間体の簡単な大量合成、最終段階での環化反応条件の簡略化。これらの改変により、コルフィセンは容易に合成できる化合物となった。この意義については「考察」D2 項で述べる。

**3. ヘムのテトラピロール再配列によるミオグロビンの機能制御**

**3-1 コルフィセンと鉄コルフィセン** コルフィセン（図 1）は変形したポルフィリンである。自然には存在しないこの異性体分子をミオグロビンが認識してヘムポケットに収容するかは興味深い問題であろう。もしも、ミオグロビンに結合するなら、その生理機能はどのようなものであろうか。コルフィセンは興味が尽きない物質である。分担研究者はミオグロビンに導入する準備として、はじめにコルフィセンの鉄錯体の特性を調べた。鉄(III)コルフィセン塩素化物はソーレ帯を 399 nm に電荷移動帯を 630 nm にもつ（図 11）。電子スピン共鳴スペクトルでは g 値が 6.61、5.51、1.99 にみられ、異方性が大きい。還元型の鉄(II)ピリジンヘモクロモーゲン は 421 と 561 nm に鋭い光吸収帯をしめす（図 11）。ヘモクロモーゲンのスペクトルから、酸化型コルフィセン再構成ミオグロビンを吸光係数  $87 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (411 nm) で定量した。

**3-2 コルフィセン置換ミオグロビ**

**ンの分光特性** 分光滴定によると、418 nm で調べた吸光度増加が明瞭な屈曲点をしめし、アポミオグロビンと鉄コルフィセンは 1 : 1 の化学量論比で結合した。クロマトグラフィーで精製した試料はグロビン由来 280 nm 帯よりも 2.1 倍高いソーレ帯を 411 nm にもつ。また、大きな可視吸収が 560 nm にみられ、小さなピークが 495、530、620、700 nm に現われた。光吸収スペクトルは天然ミオグロビンとはまったく似ていない (図 12)。しかし、天然ミオグロビンと同様、光吸収スペクトルは pH に依存していた。ソーレ帯は pH 上昇とともに減少し、362 と 428 nm に等吸収点がみられた (図 12)。

吸光度変化の解析から、pH 変化の転移点は 7.9 になった。この結果は、コルフィセン置換したミオグロビンが天然ミオグロビンと同じアコメト錯体であることを示している。コルフィセンミオグロビンには CN<sup>-</sup> や F<sup>-</sup> などのイオンが、それぞれ親和力  $1.1 \times 10^6$  と  $16 M^{-1}$  で配位した。酸化型ミオグロビンをジチオナイトで還元するとデオキシミオグロビンへと変化した。ここに酸素や一酸化炭素を加えると、オキシまたはカルボニル誘導体となった。これらのミオグロビン化合物の可視吸収スペクトルを図 13 に示す。また、表 3 にはコルフィセンミオグロビン誘導体の光吸収スペクトルをまとめた。

**3-3 コルフィセンミオグロビンの機能** コルフィセンはミオグロビン内部に取り込まれ、補欠分子として働くことが判明した。酸素結合能を定量的に評価するために、精密な酸素平衡曲線を測定した (図 14)。

図 14 の酸素平衡曲線からヒル係数 1.02 と飽和度 50 % での酸素分圧 37.2

mmHg が得られた。これは平衡定数に換算すると  $0.015 \mu M^{-1}$  に相当し、天然ミオグロビンよりも酸素親和性が 1/70 しかないことを示している。一酸化炭素の結合はストップフロー法で求めた。結合速度は  $0.12 \mu M^{-1} s^{-1}$  で解離速度は  $2 s^{-1}$  となった。これは平衡定数  $0.060 \mu M^{-1}$  に相当し、一酸化炭素結合能力も天然ミオグロビンの 1/450 までに低下している。

**3-4 コルフィセン置換ミオグロビンの物理化学測定** 機能測定の結果から、コルフィセンをふくむミオグロビンの機能は異常であると判明した。これは、ヘム鉄周辺の構造異常を反映したものと考えられる。そこで、分担研究者はいくつかの分光法でヘム鉄の配位環境を調べた。図 15 には酸化型ミオグロビンの電子スピン共鳴スペクトルをしめす。

アコメト化合物には、異方性の大きな高スピンシグナル ( $g=6.75$ 、 $5.36$ 、 $1.98$ ) と少量の低スピン成分に由来する信号 ( $g=2.59$ 、 $2.29$ 、 $1.79$ ) が共存する。後者は一部分の遠位ヒスチジンがヘム鉄に結合してできるヘミクロームに由来すると考えられる。一方、高スピン成分は天然ミオグロビンのものとは異なり、軸配位子としてチロシン残基をもつ異常ミオグロビンのものに近い。高スピン成分の異常性はフッ素化合物でもみられた、低磁場側のシグナルは  $g=6.83$  と  $5.26$  に分裂し、斜方性の大きなものであった。同様な異常は低スピン錯体でもみられ、シアン錯体では低スピン信号が  $g=2.58$ 、 $2.29$ 、 $1.79$  にある。これは、ふつうポルフィリン環が一部還元されたクロリンをふくむヘムたんぱく質に観測されるタイプの信号である。クロリンではピロール窒素原子と鉄イオンの間にある 4 本の結



合長が非等価である。この結果を考えれば、コルフィセン面内の配位子場はポルフィリンにくらべて、歪んでいると考えられる。ヘム鉄軸配位子についての情報を得るために、共鳴ラマンスペクトルも測定した。図 16 にはアコメトおよびデオキシ誘導体のスペクトルを示す。ポルフィリン環の変形の影響は顕著である。通常見られる  $\nu_2$ 、 $\nu_3$ 、 $\nu_{10}$  などポルフィリンのコアサイズを目安となるバンドは消失している。また、ピロール環の非対称的な分子振動を反映して、きわめて強く現われる  $1355\text{ cm}^{-1}$  付近の  $\nu_4$  ピークもきわめて小さくなっている。これらの結果はコルフィセンを歪んだポルフィリン分子とする電子スピン共鳴の観察と対応する。一方、デオキシミオグロビンでは、鉄-ヒスチジン結合に由来する信号が  $223\text{ cm}^{-1}$  に観測された。この値は天然ミオグロビンでの  $220\text{ cm}^{-1}$  と対応するが、コルフィセンミオグロビンではわずかに鉄-ヒスチジン結合が強い。では、鉄-ヒスチジン結合のトランス位にある外部配位子と鉄の結合はどうであろうか。そこで、一酸化炭素をもつカルボニル誘導体で赤外線吸収を調べた。

図 17 には一酸化炭素誘導体の C-O 伸縮振動をしめす。  $1970\text{ cm}^{-1}$  に大きな信号がみられたが、吸収ピークは非対称であった。そこでカーブ解析から、信号を  $1970$ 、 $1952$ 、 $1937\text{ cm}^{-1}$  の 3 成分に分離した。それぞれの強度比は  $86:8:6$  であった。3 成分が見られることは、コルフィセン結合した一酸化炭素が 3 種類の状態で存在し得ることをしめす。同様な結果は天然ミオグロビンでもよく知られている。主なピークである  $1970\text{ cm}^{-1}$  シグナルは天然ミオグロビンでの相応シグナル

( $1945\text{ cm}^{-1}$ ) よりも波数が  $25\text{ cm}^{-1}$  多い。これはコルフィセンミオグロビンの C-O 結合のほうがより強いことを示すものである。また、吸収曲線の線幅 ( $14\text{ cm}^{-1}$ ) も天然ミオグロビンとくらべて 1.5 倍大きく、コルフィセン鉄に結合した CO の電子状態はポルフィリン鉄のものとは違う。

## D. 考察

### 1. 6,7-ジカルボキシルヘミン再構成ミオグロビンに関する考察

1-1 安定したホロたんぱく質の形成とヘム電子状態制御 ヘムがアポたんぱく質に取り込まれる原動力は、ヘムとグロビンとの疎水相互作用、鉄-ヒスチジンの配位結合、およびヘムプロピオン酸とアポグロビンとの水素結合の 3 種類である。それぞれの寄与は 25、50、25% ずつと半定量的に見積もられている。6,7-ジカルボキシルヘミンでは、ヘム周辺部の疎水相互作用はかなりの程度まで維持され、鉄-ヒスチジン結合も形成されており、プロピオン酸側鎖を短縮しても安定した再構成ミオグロビンができることも理解できる。アポミオグロビンには、さまざまなポルフィリン類が取り込む能力があることはすでに知られている。また、ヘムポケット内部のアミノ酸残基を改変して局所構造を変えてもプロトヘムが変性により解離する速度が変わらないこともわかっている。こうした観察や 6,7-ジカルボキシルヘミンが安定した複合体を形成する実験結果は、ヘムプロピオン酸側鎖がホロたんぱく質形成に必須ではないことをしめすものである。6,7-ジカルボキシルヘムで再構成したミオグロビンの結晶構造は、ミオグロビン

の分子構造についてさらに詳細を提供する。ポリペプチド全体の折れたたみが天然ミオグロビンと酷似することは注目値する。これは、ヘムが結合する疎水空間の局所構造は変わらないだけでなく、分子全体の構造が保持されることを示している。すなわち、ホロたんぱく質の構造は一般に考えられている以上に、一次構造で規定されること、またヘムとグロビンと多数の疎水的分子接触はグロビン立体構造形成にほとんど影響しないことを今回の研究結果は示している。電子吸引基であるカルボキシル基がヘム周辺に直接結合する影響は、グロビン立体構造だけでなくヘムの電子状態にも強く現われる。電子スペクトルでは吸収極大値の一樣な赤色シフトがみられ、酸素結合能も1/3まで低下する。カルボキシル基は電子吸引効果を共有結合経路でポルフィリン環に及ぼすだけではない。ポルフィリン環とほぼ平行に並んでいる6位カルボキシル基は、 $\pi$ 結合を通じてポルフィリン環と電子的共役をする可能性を示唆している。7位カルボキシル基はねじれているので、このような可能性は考えにくい。しかし、7位カルボキシル基先端の酸素原子には水分子が水素結合している。このことは、溶液のpHを変えれば7位カルボキシル基の立体構造が変化し、 $\pi$ 結合を通じた電子的摂動が加わる可能性を示唆する。

**1-2 結晶型の変化について** 6,7-ジカルボキシルヘムをミオグロビンに入れると、結晶はP6型にかわり、天然たんぱく質のP2<sub>1</sub>型にはならない。一方、遺伝工学で大腸菌を用いて発現した天然ミオグロビンはP6型である。天然ミオグロビンのP6およびP2<sub>1</sub>型結晶を比べる

と、第40-60番のアミノ酸残基の熱振動因子がP6結晶では20-30 Å<sup>2</sup>だけ大きいことがわかっている。P6型に結晶化する6,7-ジカルボキシルヘム再構成ミオグロビンでも同様の傾向がみられた。このことから、ヘムの違いがC、DヘリックスおよびCDループの熱的揺らぎに影響を与えるという考えは否定される。そのため、6,7-ジカルボキシルヘム再構成ミオグロビンがもつユニークな結晶型の起源を特定のセグメントに帰属するのは難しい。たんぱく質全体の立体構造も酷似することを考えれば、ジカルボキシヘミンで誘導された結晶型の変化は個々のアミノ酸残基の微少な構造変化の蓄積により生れると考えるのが妥当である。

**1-3 ヘム-グロビン相互作用変化**  
ジカルボキシヘミンのヘムポケットへの導入により、誘導されるヘム近傍の構造には特長がある。顕著な結果は、配位したCNイオンの結合様式に見られる。CNは鉄を通るヘム法線に対して14度傾き、天然たんぱく質での3度よりも大きな値となる。さらに、鉄-CNの結合角度は165度であり、他のシアン結合たんぱく質での値102-127度に比べて有意に大きい。これはCNと水素結合する遠位ヒスチジン残基が、ヘム法線に近づいたためである。そのために、イミダゾール環がシアンのN原子を法線に近づけCNはヘム面にほぼ垂直に立つように配位する。これは予想外のできごとで、ヘムの分子形変化が軸配位子の配位様式におよんだ稀有な例である。また、ヘムプロピオン酸残基が形成する水素結合ネットワークは、予想通り激変している。溶媒分子が2つのカルボキシル基末端酸素原子に付着している。これは、ヘム鉄に配位し

た酸素への求核攻撃が起こりやすいことをしめし、酸素錯体が自動酸化されやすいという結果と一致する。注目すべきことは、7位カルボキシル基につく水分子の位置である。2つの水分子の酸素原子は、もとの7位プロピオン酸残基の酸素原子と同じところに位置する。これは、7位プロピオン酸の酸素原子が水分子のヘムポケットへの侵入を防ぐことを意味する。

もうひとつの注目点は、ヘムがポケット内部でしっかりと固定されていることである。6,7-ジカルボキシルヘムを合成するとき、ヘムの分子体積をできるだけ減らして、疎水空間内部で鉄-ヒスチジン結合のまわりでの運動を誘起するため、分子体積の小さいメチル基を分子周辺にとりつけた。すべての周辺置換基がメチル基であるオクタメチルヘミンでは、ヘムはミオグロビン内部で回転運動することがわかっているからである。ところが、期待に反して高温の溶液中でもジカルボキシルヘムは動かない。結晶構造解析からは、ヘム周辺とグロビンとの有意な相互作用は6位カルボキシル基とArg45側鎖との水素結合だけである。すなわち、この1本の水素結合だけで、ヘム回転は阻止されている。

**1-4 6,7-ジカルボキシルヘミン構造解明の意義** 6,7-ジカルボキシルヘミンでミグロビンを再構成することは意義深いことである。ひとつは、ヘムプロピオン酸残基の水素結合ネットワーク再編成の様子が具体的に浮かび上がったことである。水素結合の相手であるArg45側鎖の動きにかなりの自由度があること、Ser92、His97は水素結合消失しても側鎖の立体配座はかわらないことが明らかに

なった。この結果に基づき、酸素錯体が不安定化される理由を原子レベルで説明できた。また、分子体積が小さい6,7-ジカルボキシルヘミンがミオグロビン内部で揺らぐと予想されたにもかかわらず、単一の配向性で固定される理由も、6位カルボキシル基とArg45との水素結合によると判明した。このように、ミオグロビンはかなり分子形を変えたヘムでも取込めることがわかった。この知見は、ヘムがコルフィセンとよばれるポルフィリン異性体分子を収納しうる可能性を示す点で重要である。ここ10年あまりの間、ポルフィリン構造異性体として、ポルフィセン、コルフィセン、ヘミポルフィセンなどが初めて合成されている。これらの物質はポルフィリンとは異なるユニークな特徴をしめすが、その生化学的応用はほとんどされていない。今回、ミオグロビンが従来のヘムとは構造が大きくことなる6,7-ジカルボキシルヘミンを取り込み得ることをしめしたが、その結果は、ポルフィセンなどの新規ポルフィリン異性体の生化学的利用にむけての布石となるものである。

## 2. コルフィセン有機合成法の改良に関する考察

コルフィセンはポルフィリン異性体分子であり、4分子のピロール配列が天然ヘムとは異なっている。出発物質であるジピロールエタン (**1**) (図3参照) はクノールピロールの臭素化により容易に導ける。モノ臭素化ピロールは銅アンモニア水溶液中で、加熱するだけでジピロールエタン (**1**) になる。この反応は1924年にすでに報告されていたが、当時には全く使い道のない反応であった。1990年

以降に新しいポルフィリン類の合成化学が発展するなかで、分担研究者らはその用途をようやく見つけた。この物質(1)を「近代的な」McMurry法で合成するには、前駆体ピロールアルデヒドを準備し、酸素や湿気を排除しつつ、そのアルデヒドを塩化チタン/亜鉛から調製する試薬で、処理しなければならない。その後、生成したジピロールエテンに水素添加してジピロールエタンを得る。そのためにヨウ素化したピロールアルデヒドの合成も不必要となった。こうした、改良によりコルフィセンは20% (Sessler法の10倍収率、Falk法の1/72反応時間)で合成できた。反応時間は60分と短く、必要なピロール類も容易に入手できるものばかりである。分担者の開発した方法ではグラム単位でのコルフィセンが容易に合成できる。忘れ去られていた古典的な反応は「近代的反応」の煩わしさを避ける福音である。コルフィセンが入手できることから、今までは実験できなかった、ミオグロビンにふくまれるポルフィリン環ピロールの並べ替えが可能になった。これはミオグロビンにとって初めての「体験」である。再構成ミオグロビンの評価は以下にのべる。

### 3. コルフィセン再構成ミオグロビンに関する考察

**3-1 コルフィセンを組込むためのコメント** 分担研究者は鉄コルフィセンをミオグロビンに組込むときに、コルフィセンにつくエステル置換基を加水分解しなかった。エステル基をカルボン酸にするために、高温のアルカリ水溶液で加水分解すると、再構成ミオグロビンの収率は極端に低下し、可視スペクトルも

再現性が悪かったからである。このことは、コルフィセン環がエステル側鎖加水分解中に壊れることをしめしている。コルフィセンは18 $\pi$ 電子系をもつ芳香族分子であるが、理論解析によるとポルフィリン環よりも不安定であることが分かっている。このため、鉄コルフィセンを再構成するにあたり、エチルエステルのままでアポミオグロビンと結合させた。酸側鎖のない鉄ポルフィリン類でもミオグロビンが再構成できることは、オクタメチルヘミンやプロトヘミンジメチルエステルですでに知られており、今回も同様の方法で鉄コルフィセンをミオグロビンに入れることができた。

**3-2 コルフィセン置換ミオグロビンの構造** コルフィセンはポルフィリン同様に平面性の大きな芳香族環である。また、「考察」D1項でのべたジカルボキシヘムと類似構造をもつ。ジカルボキシヘムはアポミオグロビンにうまく挿入できることが分かっているため、鉄コルフィセンもミオグロビンの疎水ポケットに結合すると考えられる。鉄コルフィセンはアポミオグロビンと1:1の量比で結合すること、精製したミオグロビンの光吸収スペクトルが再現できることは、この予想を支持している。酸化型のコルフィセンミオグロビンに酸アルカリ転移がみられたことは、コルフィセン導入後も天然ミオグロビンのように、鉄原子に水が配位し、その水分子が遠位ヒスチジンと水素結合していることをしめす。共鳴ラマンスペクトルでは鉄-ヒスチジン結合由来のバンドが223 $\text{cm}^{-1}$ にみられ、天然たんぱく質と同等に近位ヒスチジンが鉄に配位することが判明した。以上の結果はコルフィセンがミオグロビンに入

ることを示す、より具体的な証拠として、酸素結合性があげられる。コルフィセン置換ミオグロビンは可逆的に1分子の酸素を結合することが挙げられる。

### 3-3 歪んだ平面配位子場の効果

一般に、鉄-N (ピロール) 結合距離はヘム鉄の磁気的状態を決める重要因子のひとつである。ポルフィセンとよばれる別種ポルフィリン異性体では、鉄-N (ピロール) 結合が短いので、鉄原子が収まるキャビティ ( $7.65 \text{ \AA}^2$ ) がポルフィリン ( $8.35 \text{ \AA}^2$ ) よりも狭い。このため、ポルフィセンの鉄(III)は異常な中間スピン ( $S=3/2$ ) 状態にある。同様な現象は狭い金属キャビティをもつモノアザポルフィリン鉄(III)錯体でも観察されている。

結晶学的な観察によると、コルフィセンの金属キャビティは  $8.20 \text{ \AA}^2$  でありポルフィリンのキャビティよりも狭い。そこで、鉄(III)に中間スピン状態が混入する可能性がある。しかし、電子スピン共鳴スペクトルによれば、アコメト型コルフィセンミオグロビンは高スピン ( $S=5/2$ ) 状態にある。すなわち、コルフィセンとポルフィリンの鉄(III)は磁気的性質が同じである。コルフィセンの金属キャビティの形は台形であり、ポルフィリンでの正方形とは異なる。このため面内にある4本の鉄-N (ピロール) 結合は直交できない。共鳴ラマンスペクトルや斜方性の大きい高スピン型の電子スピン共鳴は、たんぱく質内部でも面内配位子場の歪みが起きていることを例証している。すなわち、コルフィセンの台形キャビティは鉄イオン面に歪みをかけている点で、ポルフィリンとは大きな違いがある。すなわち、鉄(III)のスピン状態は変わらずとも、鉄の反応性が大きく変化するこ

とは可能である。

### 3-4 ミオグロビン機能への影響

コルフィセン再構成ミオグロビンの特長は酸素親和性が天然ミオグロビンの1/70と極めて低いことである。用いたコルフィセンには電子吸引性のエステル基があり、そのため酸素親和性が低下すると考えられる。しかし、その影響は少ない。なぜなら、エステル基による酸素親和性低下の程度はせいぜい1/3程度であり、1/70もの減少はありえないからである。いっぽう、鉄-ヒスチジン結合が歪んでいるとの指摘もできよう。しかし、コルフィセンミオグロビンの共鳴ラマンスペクトルでみても鉄-ヒスチジン結合に歪みはない。より妥当な考えは、鉄-外部配位子の結合がそもそも弱いとすることである。酸素親和性の低下(1/70)よりも一酸化炭素親和性の低下(1/450)が顕著であることに注目しよう。一酸化炭素分子は酸素分子よりも $\pi$ 電子受容体としての能力が勝っているといわれる。このことを考えれば、コルフィセンミオグロビンでは鉄-外部配位子の結合の $\pi$ 結合性が弱まっていると考えられる。すなわち、鉄のd電子と一酸化炭素の反結合性 $\pi$ 軌道の重なりが減ると考えられる。この解釈は赤外線吸収スペクトルの結果から支持される。コルフィセンミオグロビンに配位した一酸化炭素のC-O伸縮振動数は、天然ミオグロビンに比べて  $25 \text{ cm}^{-1}$  多い。これはコルフィセンミオグロビンで、鉄-CO結合の $\pi$ 結合性がより弱いことをしめしている。つまり、COの親和力の激減と赤外吸収の結果はうまく対応する。

コルフィセンの金属キャビティが台形であるため、鉄イオンの  $d_{xz}$  と  $d_{yz}$  軌道がCOの $\pi^*$ 軌道とうまく重なりえない

と考えられる。さらにまた、直交性の $\sigma$ 結合性である $d_{x^2-y^2}$ 軌道もコルフィセンの台形金属キャビティ中では、4個のピロールN原子とうまく軌道が重ならない可能性が高い。そのため、鉄原子は平面から近位ヒスチジン側に浮き上がりやすくなり、外部配位子との結合性が弱まると考えられる。このことは一酸化炭素の解離速度の極端な増加とも一致する。

**3-5 コルフィセン再構成ミオグロビンの意義** 上記の結果から鉄コルフィセンはミオグロビンに結合し、生理機能を示すことがわかった。これはたんぱく質内部でヘムを極端に変形した最初の成功例である。極端に低い酸素親和性は、たんぱく質工学で造った変異ミオグロビンで報告された値と並ぶ。一方、どのような変異ミオグロビンでも、コルフィセンミオグロビンの極端に低い一酸化炭素親和性は再現できない。この点で、コルフィセンはポルフィリンの対称的分子形の背後に潜んでいた、新しい配位子結合メカニズムを浮かび上がらせた分子である。

極度に歪んだポルフィリンであるコルフィセンには、ヘムの歪みとヘムたんぱく質機能との関連でも興味深い応用が考えられる。ヘムたんぱく質内部のポルフィリン環の歪みはアポたんぱく質との過密な接触に起因するとされている。ヘムの歪みの生化学的影響を調べるには、かさ高いアミノ酸側鎖をもった変異たんぱく質やヘムポケットが極端に狭い特殊なたんぱく質が必要であった。もともと歪んだポルフィリンであるコルフィセンを使えば、グロビンへの立体障害なしに、異常に歪んだ金属族配位構造をたんぱく質内部で容易につくりだすことができる。

コルフィセンは、さまざまなヘムたんぱく質のヘム歪みと生理機能の関係を調べる新しいプローブになる物質である。コルフィセンがミオグロビンに結合することを考えれば、ペルオキシダーゼ、シトクロム P450 など、ほかのヘムたんぱく質にもコルフィセンが結合する可能性が高い。

古くなったミオグロビンのヘムはやがて、ヘムオキシゲナーゼとよばれるヘム分解酵素と結合して代謝され排泄される。ヘムオキシゲナーゼは、プロトヘムの $\alpha$ メソ位だけに選択的に酸素原子を挿入しポルフィリン環を開裂する。ヘムオキシゲナーゼの反応機構を考えるうえで、メソ位炭素原子が(2, 1, 0, 1)で配列するコルフィセンへの振舞いは興味深い。コルフィセンがミオグロビンに結合する結果を考慮すれば、同様な軸配位子構造をもち、しかもヘムポケットが広いといわれるヘムオキシゲナーゼの基質になることが考えられる。

コルフィセンをペルオキシダーゼ、シトクロム P450、ヘムオキシゲナーゼに結合させれば、たんぱく質機能に新しい擾動を加えることができ、反応機構の理解に役立つにちがいない。コルフィセン再構成ミオグロビンが安定に存在することを例証した分担研究の結果は、コルフィセンのさらなる生化学的応用を示唆する。

## E. 結論

### 1. 6,7-ジカルボキシルヘミン再構成ミオグロビンの研究からの結論

ミオグロビンにあるヘムが必ずしもプロトヘムである必要はないことはすでに知られている。この知見を利用して、分担研究者はまったくの合成物質である

6,7-ジカルボキシルヘミンをミオグロビンに組み込んだ。これは変形したポルフィリンであるコルフィセンを導入する予備的実験であった。今まで結晶構造研究がなかったヘムプロピオン酸残基の短縮効果をしらべた。カルボキシル基はミオグロビンの結晶型を変化させたが、分子全体の立体構造はほとんど影響を受けなかった。天然ミオグロビンでプロピオン酸残基がつくる水素結合ネットワークを破壊しても、ネイティブ構造が保持されることを原子レベルで説明した。しかし、酸素親和性低下や酸素錯体の不安定化などポルフィリン酸側鎖の短縮効果も明瞭に現われた。以上の知見から導かれる結論はつぎのとおりである。1) ヘムとグロビンとの分子接触変化はミオグロビン立体構造にほとんど影響しない。2) ヘムプロピオン酸側鎖の短縮により、水素結合ネットワークを破壊しても酸素結合能は保持される。3) ミオグロビンにはヘム以外の環状テトラピロールを収納する可能性がある。第3番目の結論は重要で、鉄コルフィセンミオグロビンに関する研究を進める保証が得られた。

## 2. コルフィセンの有機合成からの結論

ジカルボキシヘムがミオグロビンに結合する結果からコルフィセン合成を促した。しかし、従来法ではサンプル供給に難点があり、生化学研究に必要な量のコルフィセン確保は難しかった。合成法を改良して得られた結論はつぎのようである。1) ジピロールエタン合成はビピロール合成よりも容易であるので、前駆体にジピロールエタン合成経路がよい。2) コルフィセン合成反応では、反応時間が

3日から1時間へと短縮できるので、金属銅よりも銅(II)イオンを使うほうがよい。これらの改良は重要である。3) 生化学者がコルフィセンを利用する道がようやく拓かれた。

## 3. コルフィセンをミオグロビンに導入して得られた結論

コルフィセンは台形の金属配位キャビティをもつきわめてユニークな環状テトラピロールである。まったくの人工物質であり、ユニークな分子形ゆえにヘムたんぱく質補欠分子になり得るかは、きわめて興味深い問題である。今回、分担研究者はコルフィセンがミオグロビンと結合することを明らかにし、酸素結合特性を解析した。その結果、ミオグロビンの酸素親和性がヘムの形状を変えるだけで2桁あまりも減少することが判明した。従来は、グロビンにアミノ酸残基の変異を誘起したり、ヘム周辺置換基を変えたりする手法でミオグロビンの酸素結合能を変化させることが研究の主流であった。ヘムの分子形そのものを変えることで、ミオグロビンの酸素親和性を制御できることを示した研究は新しいものである。分担研究者らは、ポルフィリン環に窒素原子を導入し、鉄配位子場をわずかに変形するとミオグロビンの酸素親和性が100倍増加することをすでに報告している。この結果を考え合わせれば、天然ミオグロビンのヘムの酸素親和性はヘムの化学修飾して1万倍もの範囲で調節できることになる。ヘム周辺置換基の化学修飾によるミオグロビン酸素親和性はたかだか10倍に過ぎない。今回えられた知見は、ヘムを利用する人工的酸素運搬物質の分子設計に重要な指針となる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Saburo Neya, Noriaki Funasaki, Noriyuki Igarashi, Akira Ikezaki, Takao Sato, Kiyohiro Imai, and Nobuo Tanaka  
Structure and function of 6,7-dicarboxyheme-substituted myoglobin  
*Biochemistry* **37**, 5487-5493 (1998)
- Seiji Ishikawa, Saburo Neya, and Noriaki Funasaki  
Conformation-dependent binding of dipheptanoylphosphatidylcholines as revealed by proton nuclear magnetic resonance  
*J. Phys. Chem.* **102**, 2502-2510 (1998)
- Saburo Neya, Kouichi Nishinaga, Kaori Ohyama, and Noriaki Funasaki  
Synthesis of functionalized corphycene by copper(II)-promoted cyclization  
*Tetrahedron Lett.* **38**, 4113-4116 (1998)
- Yasuhiro Mie, Kumiko Sonoda, Saburo Neya, Noriaki Funasaki, and Isao Taniguchi  
Electrochemistry of myoglobins reconstituted with azahemes and mesohemes  
*Bioelectrochem. Bioenerg.* **46**, 175-184 (1998)
- 根矢三郎  
解明された一酸化窒素合成酵素の立体構造  
*ファルマシア* **34**, 915-916 (1998)

### 2. 学会発表

- 根矢三郎、舟崎紀昭  
カルボン酸側鎖がついたヘムをふくむミオグロビンの結晶構造解析  
日本薬学会第 118 年会 1998 年 4 月
- 石川誠司、秦さかえ、根矢三郎、舟崎紀昭  
シクロデキストリン包接系における複合体構造と疎水性相互作用  
日本薬学第 118 年会 1998 年 4 月
- 根矢三郎、舟崎紀昭、五十嵐教之、池崎章、佐藤孝雄、今井清博、田中信夫  
ジカルボキシヘミンによるミオグロビンのプロピオン酸側鎖の水素結合ネットワーク再編成  
第 9 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 1998 年 5 月
- 根矢三郎、舟崎紀昭  
官能基をもつ鉄コルフィセンの合成と生物化学機能  
日本化学会第 75 秋季年会 1998 年 9 月
- Saburo Neya, Noriaki Funasaki, Noriyuki Igarashi, Akira Ikezaki, Kiyohiro Imai, and Nobuo Tanaka  
Intensive rearrangement of hydrogen bonding networks of heme propionates by 6,7-dicarboxyheme in myoglobin  
International Conference on Oxygen Binding and Oxygen



Activating/Sensing Heme Proteins 1998年9月

- ・西永公一、根矢三郎、舟崎紀昭

官能基のついたコルフィセンの新しい合成法

第48回錯体化学討論会 1998年9月

- ・Saburo Neya, Noriaki Funasaki, Kiyohiro Imai, Hiroshi Hori, and Takashi Yonetani

Structural and functional anomaly of the myoglobin reconstituted with iron corrphycene

生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学

第3回ワークショップ 1998年11月

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表 1 Visible Absorption of the Myoglobin Reconstituted with 6,7-Dicarboxyhemin.

Ligand	Peak position in nm (extinction coefficient in mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )			
	<i>Ferric</i>			
H <sub>2</sub> O	397(163)	500(6.4)	574(2.7)	627(3.1)
CN <sup>-</sup>	416(124)	540(8.9)		
<i>Ferrous</i>				
Deoxy	427(122)	550(10.0)		
O <sub>2</sub>	406(91)	537(9.2)	573(6.7)	
CO	415(173)	536(11.7)	562(8.5)	

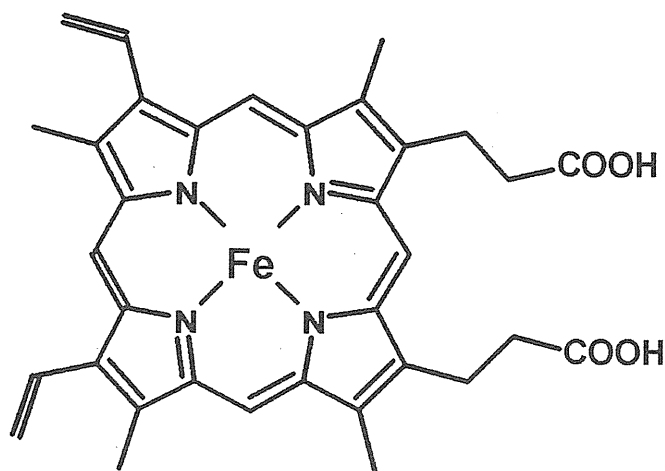
表 2 Statistics of X-ray Data Collection and Refinement for 6,7-Dicarboxylheme Myoglobin.

Space Group	<i>P6</i>
Cell parameters	a = b = 91.02, c = 45.68 Å
Total reflections	185,449
Independent reflections	17,073
Reflns used in refinement	16,116
R(merge)	0.067
R(crystal)	0.195
Completeness	0.963
Resolution range	10.0-1.9 Å
No. of atoms	
peptide	1217
heme group	39
water molecules	136
sulfate ion	1
Root-mean-squares	
in bond length	0.007 Å
in bond angles	1.645 (deg)
Average temp. factors (Å <sup>2</sup> )	
overall structure	24.25
main chain	20.29
side chain	24.15
heme	15.33
solvent	44.35

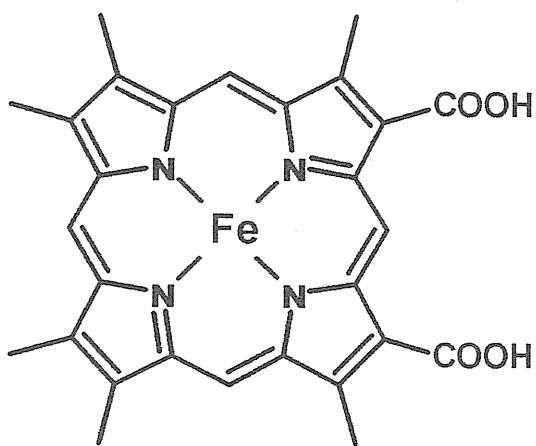
表3 Visible Absorption Spectra of the Myoglobin Reconstituted with Corrphycene

Ligand	Peak position in nm (extinction coefficient in mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )				
	<i>Ferric</i>				
H <sub>2</sub> O	411(87)	526(6.3)	562(9.1)	620(2.4)	700(0.5)
F <sup>-</sup>	422(86)	553(8.4)	630(3.8)		
CN <sup>-</sup>	418(97)	569(6.8)	700(0.5)		
	<i>Ferrous</i>				
Deoxy	436(101)	520(9.2)	558(12.9)	594(14.0)	
O <sub>2</sub>	409(67)	557(10.9)	595(8.7)		
CO	411(111)	417(114)	488(15.0)	523(12.9)	620(5.5)

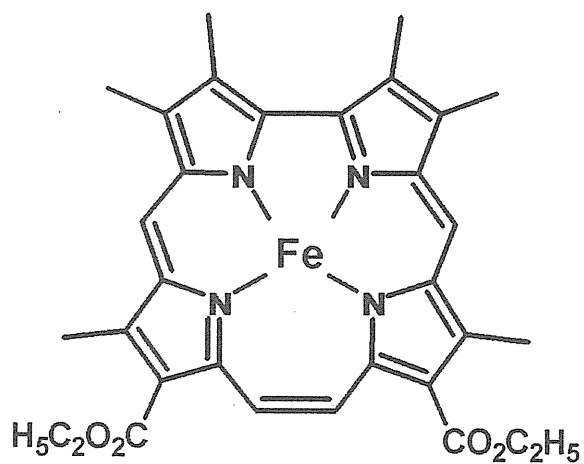
0.1M Tris pH 7.0 and room temperature



protoheme



6,7-dicarboxyheme



corrphycene

図1 天然ヘム、ジカルボキシヘム、コルフィセンの分子構造