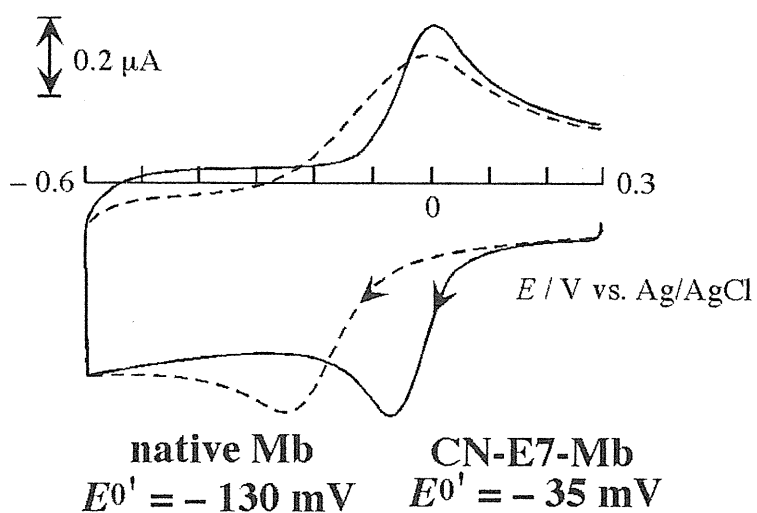


Fig. 14 Scheme of the modification of distal histidine (His-64, E7) by BrCN and by N_3^- .

(a)



(b)

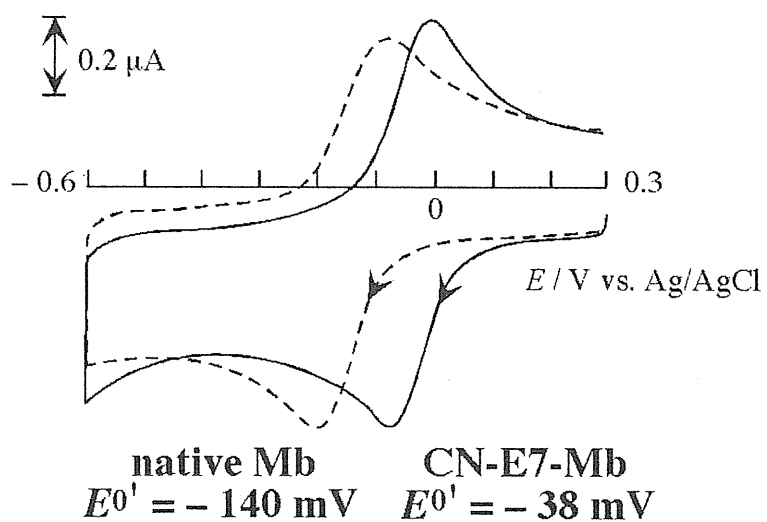


Fig. 15 Cyclic voltammograms of 50 μM CN-E7-myoglobin (—) and native myoglobin (---) for (a) sperm whale Mb and (b) horse heart Mb in a 50 mM Tris-HCl buffer solution (pH 6.5) at an In_2O_3 electrode at a scan rate of 20 mV s^{-1} , 25 $^\circ\text{C}$.

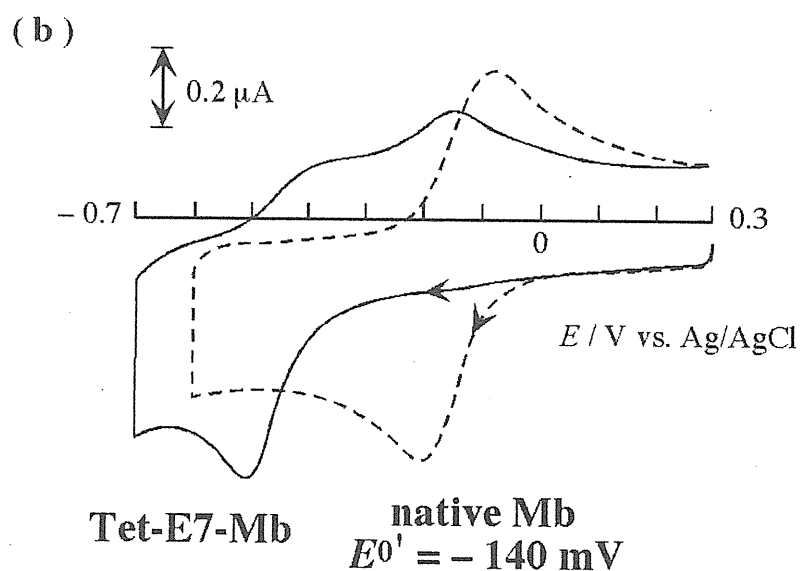
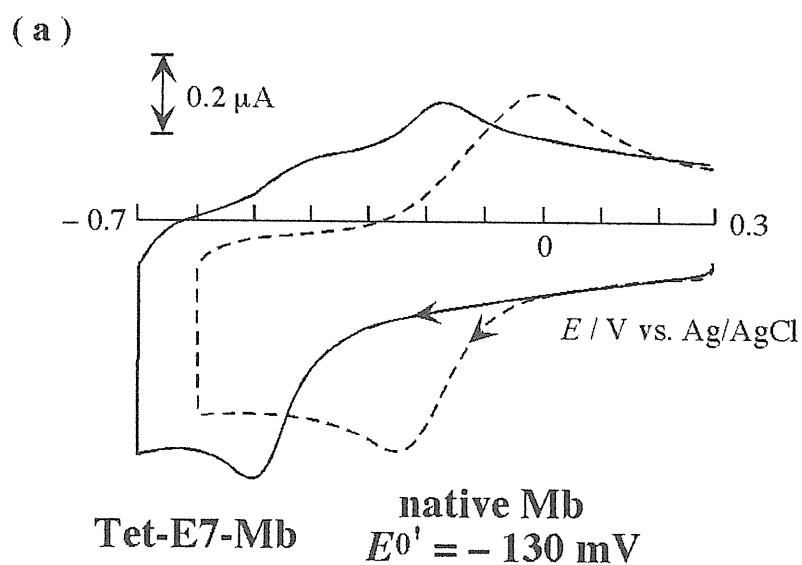
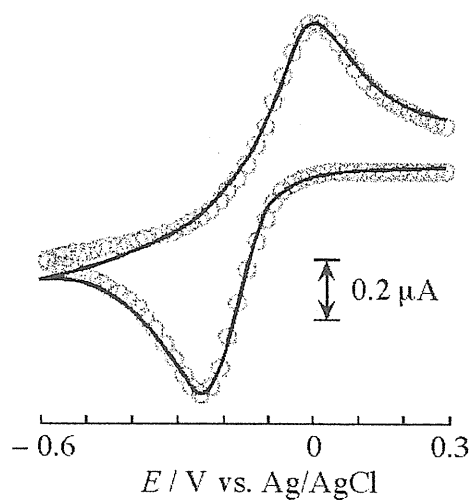
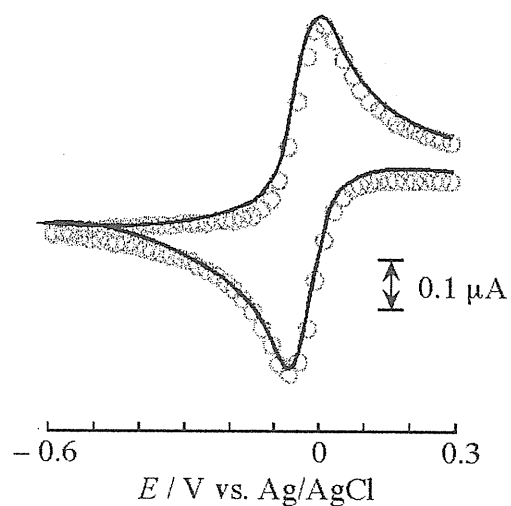


Fig. 16 Cyclic voltammograms of 50 μ M Tet-E7-myoglobin (—) and native myoglobin (----) for (a) sperm whale Mb and (b) horse heart Mb in a 50 mM Tris-HCl buffer solution (pH 6.5) at an In_2O_3 electrode at a scan rate of 20 mV s^{-1} , 25 $^\circ\text{C}$.

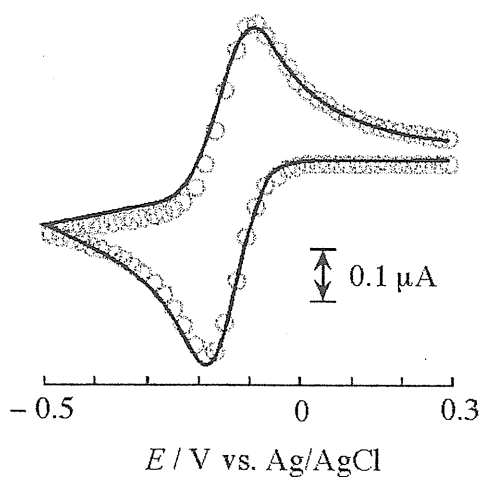
(a) native Mb (SW)



(b) CN-E7-Mb (SW)



(c) native Mb (HH)



(d) CN-E7-Mb (HH)

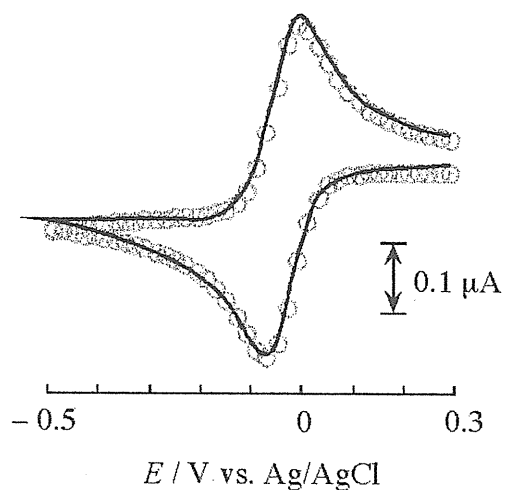


Fig. 17 Background-subtracted cyclic voltammograms of $50 \mu\text{M}$ (a) native, (b) CN-E7-myoglobins for sperm whale and (c) native, (d) CN-E7-myoglobins for horse heart in a 50 mM Tris-HCl buffer solution (pH 6.5) at an In_2O_3 electrode at 25°C , together with simulated data shown by circles at a scan rate of 20 mV s^{-1} .

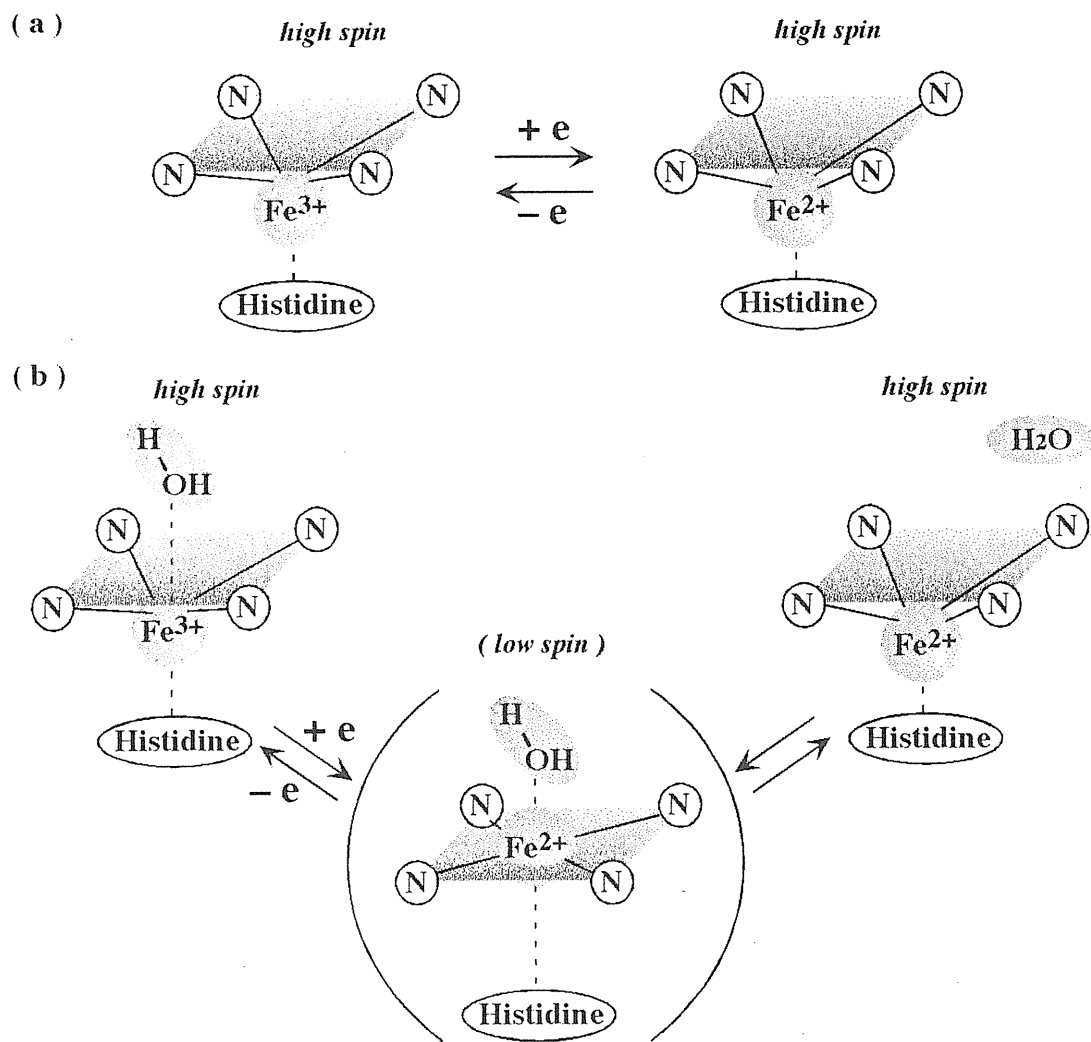


Fig. 18-(a) Scheme for the spin-state and coordination structures of (a) CN-E7-myoglobin and (b) native myoglobin.

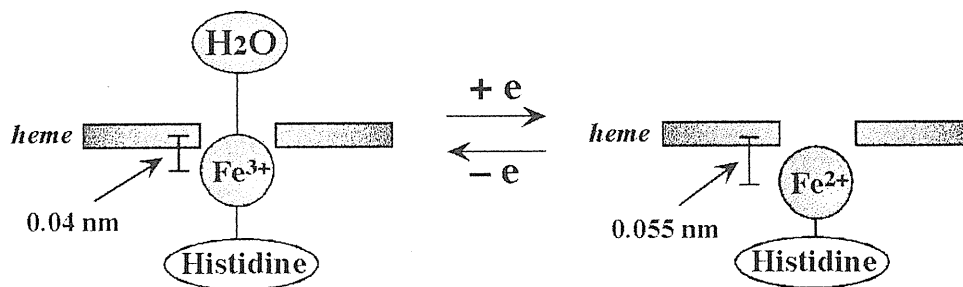


Fig. 18-(b) Coordination structures of oxidized form and reduced form.

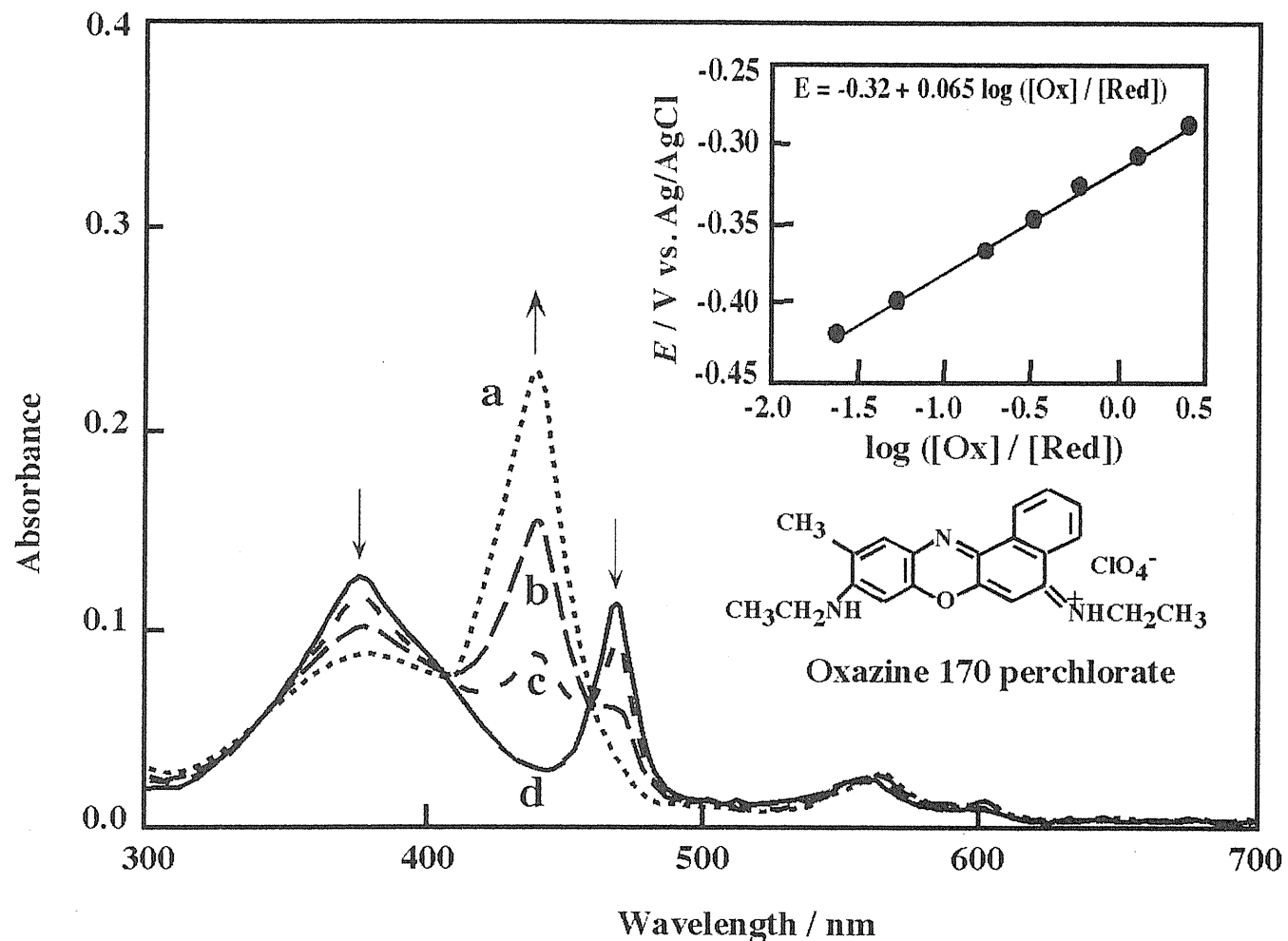


Fig. 19 Typical visible spectra obtained for ca. 50 μM Mn-Mb in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH=6.8) using an optically transparent thin layer spectroelectrochemical cell (optical pathlength of ca. 300 μm) with an In_2O_3 working electrode at applied potentials of: (a) -0.60; (b) -0.33; (c) -0.29; (d) -0.20 V vs. Ag/AgCl (Sat. KCl) after subtraction of background spectra of 27 μM Oxazine-170 perchlorate as an electron transfer mediator. The Nernst plot based on the absorbance at 440 nm using additional data (not shown) is given as an inset.

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書ミオグロビンの部位特異的変異による酸素結合機能の改変に関する研究
－ミオグロビン変異体の自動酸化性の評価－

分担研究者 長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨

酸素化型ミオグロビンは、酸素の放出によってスーパーオキシドやその副生成物である過酸化水素を発生する可能性がある。これらの活性酸素種は、様々な生体分子を酸化してしまう結果、生体に障害を及ぼす恐れがある。そこで、ミオグロビンの自動酸化性を評価するため、過酸化水素による酸化反応を追跡した。92位変異ミオグロビンを用いて調べた結果、過酸化水素により鉄4価ミオグロビンが生成し、野生型標品と同様な構造をとることが示唆された。しかしながら、S92A変異体では過酸化水素との反応性が低く、酸化に対する抵抗性を有していることがわかった。鉄4価ミオグロビンは、薬物代謝やホルモンの生合成に関与するシトクロム P450 の推定活性構造と同一である。そこで、シトクロム P450 と同様な活性を示すルテニウムポルフィリン錯体を用い、ステロイドの酸化反応を調べた。その結果、基質の不斉中心の立体配座を保持したまま水酸化反応を行えることが明らかとなった。

A. 研究目的

ミオグロビンは、単一のポリペプチドと1分子のヘムからなる酸素結合性タンパク質である。一般に、酸素分子は2価のヘム鉄に対して高い親和性を持つため、野生型のミオグロビンは酸素と非常に結合しやすいという性質を持つ。したがって、ヘモグロビンと同等の酸素放出を起こさせるためには、何らかの部位特異的変異をほどこす必要がある。2価鉄-酸素分子の複合体は、しかしながら、酸素分子を放出する際に部分的に自動酸化して3価鉄となり、酸素結合能を失ってしまう。それだけでなく、3価鉄を生じる際にヘム鉄から酸素分子へと電子が移動するため、電子がひとつ余分な活性酸素

種、スーパーオキシドを発生する。このスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) はラジカル分子であるため、生体分子と反応して生体にさまざまな障害を引き起こす心配がある。また、生体中に含まれるスーパーオキシドディスムターゼの作用により、スーパーオキシドは酸素分子ともうひとつの活性酸素種である過酸化水素へと変換される。特に、ミオグロビンで形成されている近位水素結合網を破壊することによって、タンパク質外部からヘムへの求核反応の頻度が増し、ヘムの自動酸化が促進されることがわかった（根矢の項参照）。したがって、この活性酸素種とミオグロビンとの反応性を検討することは、ミオグロビンを人工血液とする際の安全性を

調べるといふ点で重要である。そこでまず、本分担研究では、ミオグロビン変異体と過酸化水素との反応性を検討し、野生型との比較を行った。また、活性酸素が生体分子に与える知見を得るため、ルテニウムポルフィリンとステロイドとの反応性について調べた。

B. 研究方法

1. ミオグロビンと過酸化水素との反応

ミオグロビンの試料として、主任研究者である宇野が調製した 92 位変異体を用いた。0.1 M NaCl を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で適当な濃度の過酸化水素を滴下し、吸収スペクトル変化を追跡した。後述のように、すべてのミオグロビン変異体は野生型標品と同様にフェリル (鉄 4 価) 型となった。これは、薬物代謝の中心となっている酵素、シトクロム P450 の推定活性化状態と同一である。シトクロム P450 はいくつかの段階を経て分子状酸素を還元的に活性化し、その酸素原子を基質に移行させる反応 (酸素添加反応) を行っている。その際の基質酸化の活性種は、鉄ポルフィリン-オキソ型錯体であるといわれている。したがって、このフェリルミオグロビンもシトクロム P450 と同様な酸素添加反応を引き起こす可能性が考えられた。そこで、モデル系としてルテニウムポルフィリン錯体とピリジン *N*-オキソドを用いた生体分子酸化反応について調べ、活性酸素種と生体分子との反応に関する知見を得た。

2. ルテニウムポルフィリンとステロイドとの反応

ピリジン *N*-オキソド類をはじめとする含窒素複素環 *N*-オキソド類は、脂肪族アミン *N*-オキソド類とは性質が異なり、極めて安定な化合物である。だが、酸素供与力も低いため、今までこの種の *N*-オキソド類が、金属ポルフィリン錯体による触媒系の酸化剤として用いられた例はなかった。しかし、いくつかの金属ポルフィリンを用いてオレフィンの触媒的エポキシ化反応を試みた結果、ルテニウムポルフィリン錯体が極めて優れた触媒になることがわかった。鉄、あるいはマンガンポルフィリンと通常の酸化剤を用いる系でアルカンの酸化を行うためにはポルフィリン環やメソ位のフェニル基に多くのハロゲンを導入し、自己酸化に耐えうるものを用いなければならなかった。しかし、ルテニウムポルフィリンの場合、酸化分解しやすいと考えられる無置換のテトラフェニルポルフィリンなどのルテニウム錯体でも十分に機能した。すなわち、温和な条件かつ容易に得られる錯体を触媒に用いることによって、極めて効率よくアルカンや芳香族の酸化をすることができた。本研究では複雑な構造を有した天然化合物に対し、本反応系が元来持つ位置、立体選択性を明らかにするために検討を行った。まず初めに本反応系を天然化合物に適用するにあたり、必須となるルテニウム (Ru) ポルフィリン触媒の合成を行った。触媒には配位子であるポルフィリンのメソ位に芳香環を導入したものをを用いることとし、無置換のフェニル基、電子求引性基の塩素が置換されたもの、電子供与性基のメチルやメトキシ基が導入されたものをを用いることにした。合成方法はリンゼー法により、ピロールとベンズアルデヒドから一段階

でテトラキスフェニルポルフィリンを合成した。そこにトリルテニウムドデカカルボニルを用いて Ru をポルフィリンに挿入した。同様の方法で他の Ru ポルフィリン錯体を合成した。これらの錯体はいずれも短いステップで容易に合成することができ、長期保存に対しても安定であった。

2-1 5 α -コレスタン-3-オンの酸化反応 5 α -コレスタン-3-オン (1.0 mol, 386 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (3.0 mmol, 492 mg)、及び Ru(T_{2,4,6}TMPP)(CO) (1.0 μ mol, 0.99 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (100 mg) と 47% 臭化水素酸 (64 μ L) を添加し、これを Ar 雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH₂Cl₂ / *n*-hexane = 2:3) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒: 酢酸エチル/*n*-hexane = 7:3) を行い生成物を単離した。5 α -コレスタン-3-オン (1.0 mol, 386 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (3.0 mmol, 492 mg)、及び Ru(TPP)(CO) (0.45 μ mol, 0.39 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (96 μ L) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH₂Cl₂ / *n*-hexane = 2:3) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒:

酢酸エチル/*n*-hexane = 7:3) を行い生成物を単離した。5 α -コレスタン-3-オン (1.0 mol, 386 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (4.5 mmol, 738 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (3.4 μ mol, 3.23 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (96 μ L) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH₂Cl₂ / *n*-hexane = 2:3) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒: 酢酸エチル/*n*-hexane = 7:3) を行い生成物を単離した。5 α -コレスタン-3-オン (1.0 mol, 386 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (3.0 mmol, 492 mg)、及び Ru(T_{2,6}DCIPP)(CO) (0.15 μ mol, 1.44 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (96 μ L) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH₂Cl₂ / *n*-hexane = 2:3) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒: 酢酸エチル/*n*-hexane = 7:3) を行い生成物を単離した。

2-2 25-ヒドロキシコレスタン-3-オンの酸化反応 25-ヒドロキシコレスタン-3-オン (1.5 mol, 603 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (4.5 mmol, 738 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (1.1

μmol , 0.99 mg) をベンゼン (9 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (200 mg) と 47% 臭化水素酸 (96 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH_2Cl_2 / *n*-hexane = 3:7) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒: 酢酸エチル / *n*-hexane = 7:3) を行い生成物を単離した。

2-3 5 α -コレスタンの酸化反応

5 α -コレスタン (1.0 mol, 372 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (1.5 mmol, 246 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (0.20 μmol , 1.90 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (96 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH_2Cl_2 / *n*-hexane = 3:7) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒: 酢酸エチル / *n*-hexane = 7:3) を行い生成物を単離した。5 α -コレスタン (1.0 mol, 372 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (3.0 mmol, 492 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (0.20 μmol , 1.90 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (96 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマ

トグラフィー (カラム溶媒: CH_2Cl_2 / *n*-hexane = 3:7) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒: 酢酸エチル / *n*-hexane = 7:3) を行い生成物を単離した。

2-4 5 α -プレグナン-3,20-ジオンの酸化反応

5 α -プレグナン-3,20-ジオン (1.0 mol, 316 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (1.5 mmol, 246 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (3.0 μmol , 2.70 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (64 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 15 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH_2Cl_2 / *n*-hexane = 3:7) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒: 酢酸エチル / *n*-hexane = 2:8) を行い生成物を単離した。

2-5 5 α -アンドロステン-3,17-ジオンの酸化反応

5 α -アンドロステン-3,17-ジオン (1.0 mol, 288 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (1.5 mmol, 246 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (2.0 μmol , 1.90 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (64 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 16 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒: CH_2Cl_2 / *n*-hexane = 3:7) を行い生成物を単離した。

2-6 5 β -コラン酸の酸化反応 5 β -コラニック酸 (1.0 mol, 360 mg)、2,6

-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (1.5 mmol, 246 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (1.0 μmol, 0.90 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (64 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒：酢酸エチル/*n*-hexane = 65:35) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒：CH₂Cl₂/酢酸エチル = 9:1) を行い、2 つの分画を得た。分画の一つをシリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒：CH₂Cl₂) にて精製し、生成物 5β-OH 体及び (20*S*)5β, 20-diOH 体を単離した。また他方の分画はシリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒：酢酸エチル/*n*-hexane = 1:9) を行い、生成物 3-oxo-4-ene 体を単離精製した。5β-コラン酸 (1.0 mol, 360 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (1.2 mmol, 197 mg)、及び Ru(T_{2,6}DCIPP)(CO) (1.0 μmol, 1.10 mg) をベンゼン (6 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (64 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 20 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒：酢酸エチル/*n*-hexane = 65:35) を行い、単離されていないものに関しては再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒：CH₂Cl₂/酢酸エチル = 9:1) を行った後、シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒：CH₂Cl₂) にて精製し、生成物 5β-OH 体を

単離した。

2-7 5β- コレスタンの酸化反応

5β-コレスタン (0.25 mol, 94.4 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (0.3 mmol, 50.0 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (1.5 μmol, 1.39 mg) をベンゼン (3 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (150 mg) と 47% 臭化水素酸 (64 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 13 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒：酢酸エチル/*n*-hexane = 0:10-1:9) を行い原料を除いた後、再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒：CH₂Cl₂/*n*-hexane = 2:8) を行い生成物 5β-OH 体を単離した。

2-8 5α- コレスタンの酸化反応

5α-コレスタン (0.25 mol, 94.4 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (0.30 mmol, 50.0 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (1.5 μmol, 1.39 mg) をベンゼン (3 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (200 mg) と 47% 臭化水素酸 (15 μL) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 °C で 13 時間攪拌した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒：酢酸エチル/*n*-hexane = 0:10-1:9) を行い原料を除いた後、再度シリカゲルクロマトグラフィー (カラム溶媒：CH₂Cl₂/*n*-hexane = 2:8) を行い生成物を単離した。

2-9 5β- コレスタン-3- オンの酸化反応

5β-コレスタン-3-オン (0.13 mol, 48.7 mg)、2,6-ジクロロピリジン-*N*-オキシド (1.8 mmol, 29.5 mg)、及び Ru(TMP)(CO) (0.13 μmol, 0.13 mg) をベンゼン (1 mL) に溶かし、これにモレキュラーシーブ 4A (25 mg) と 47% 臭化水

素酸 (10 μ L) を添加し、これをアルゴン雰囲気下、40 $^{\circ}$ C で 14 時間攪拌した。反応液をガラスフィルター (G4) にて濾過した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (カラム溶媒 : CH_2Cl_2 / *n*-hexane = 2:3) を行い生成物を単離した。

C. 研究結果

1. ミオグロビンと過酸化水素との反応

図 1 に、野生型ミオグロビンへ過酸化水素を滴下したときの吸収スペクトル変化を示す。図から明らかなように、滴下によって一組の等吸収点が出現している。このことから、ミオグロビンと過酸化水素との反応は一段階で進行していることがわかる。400 nm 付近のソーレー帯は最終的にその吸光度が半減し、550 nm 及び 590 nm 付近に新たな吸収極大が現れている。このスペクトルは鉄 4 価の高酸化ミオグロビンのものと一致している。408 nm における吸光度を過酸化水素濃度に対してプロットし、図に示した (図 1 下)。加えた過酸化水素濃度に対して直線的に吸光度が減少し、あるところで飽和に達していることがわかる。図中の屈曲点から、ミオグロビン 1 分子を鉄 3 価から 4 価にするのに要した過酸化水素の当量数を見積もり、表 1 に示した。ミオグロビンの 92 位変異体についても同様に吸収スペクトル変化を追跡し (図 2 ~ 5)、当量数を計算した (表 1) その結果、ミオグロビン変異体は野生型と同じく 420、550、590 nm 付近に吸収極大を示し、約 1.6 当量の過酸化水素と反応することがわかった。しかしながら、S92A 変異体については当量数が 2.62 と他のミオグ

ロビンに比べて有意に大きく、異常性を示した。逆に言えば、S92A 変異体は過酸化水素との反応性が低く、酸化されにくいと解釈できる。したがって、自酸化性も低くなっているものと思われる。

2. ルテニウムポルフィリンと 5 α 型ステロイドとの反応

ステロイドは動植物中に極めて広く分布し、生体内においてコレステロールに見られるように膜成分として分布する他、ホルモンとして細胞間の情報伝達、特に増殖、分化の制御を司っていることが知られている。これらステロイドはそれ自身が生理活性を有しているが、その酸化代謝物の方がより強い活性を有している場合もある。例えば、ビタミン D₃ は 25 位が水酸化されることにより活性化され、血中カルシウム濃度をコントロールすることが知られている。このように、ステロイドの酸化的代謝生成物の生理活性の検討は重要である。ステロイドの酸化生成物の合成において最も効率の良い方法は、不活性な炭素-水素結合に単段階で酸素原子を導入することである。この方法ならば原料として大量に存在する安価な化合物を用いることができ、経済的にも望ましい方法である。しかし、通常の酸化系においては目的化合物を選択的に得ることは極めて困難であり、十分に応用可能な触媒系は開発されていないのが現状である。その理由として、アルカンの水酸化のように高い反応性を必要とする反応の場合、天然化合物のような基質が同程度の反応性を有する部位を多数存在する基質に対しては、そのすべての部位で反応するため選択性が低下し、酸化生成物の生成が非常に困難になることが

挙げられる。そのため反応性を制御することが大きな課題となる。生体内においてはこの問題点を基質の接近を制御することで克服している。一例を示すと P450 はステロイド類など多数の重要な生理活性物質を極めて短段階で生合成していることが知られている。この選択的酸化システムを化学反応系に取り入れれば有用な合成中間体の短段階での合成、及び天然化合物を修飾することによる良好な生理活性を有する物質の創製が可能となる。高い反応性を有しつつ選択性の高い酸化反応系を開発することは、複雑な構造を有した天然化合物へ適用にあたり大変意義深いことである。ルテニウムポルフィリン類はアルカン類の酸化において非常に高い反応効率を示すことは前述の通りである。したがって、本反応系を用いたステロイドへの酸化の適用性を検討することによって、本反応系の有する位置選択性及び立体選択性について研究を行った。

ステロイド類は化学的には骨格が安定していることから、通常の酸化系においては酸化されにくい化合物である。化学的にはステロイドの骨格は安定していることから、通常の酸化系においては酸化されにくい化合物である。その中で 5α -コレスタン-3-オンは、ひとつカルボニル基を有するのみであり、特に活性化された部位を有していない。また比較的安価に入手できることから、この化合物は本反応系の適用性の検討に適していると考え、ルテニウムポルフィリン-複素環 *N*-オキシド系によるステロイドへの適用性に対する第一の試みとして、 5α -コレスタン-3-オンを基質として反応を行った。反応はベンゼン溶液中、基質及び酸化剤

である 2,6-ジクロロピリジン *N*-オキシド（以下 DCIPy-O と略す）の他に微量の触媒を加え、少量の臭化水素酸、そして臭化水素酸中に含まれる水を取り除くためにモレキュラーシーブ 4A を添加しアルゴン雰囲気下で行った。また酸化剤の量については、基質が酸化を受けると予想される部位が多数存在するため、高次酸化等が考えられ、酸化剤が基質に対し過剰に消費されると予想された。そこで基質が充分酸化されるように、基質に対し酸化剤を多めに用いて反応を行った。その結果、図 6 に示すように 4 種類の酸化生成物を単離することができた。これら酸化生成物のうち 25-OH 体については NMR、質量分析、赤外線吸収スペクトルなどの機器データが文献値と一致していることから構造を決定した。しかし、それ以外の (20*S*)-20-OH 体、(20*S*)-20,25-diOH 体、15-oxo-25-OH 体については、新規化合物であったため、以下のようにして構造を決定した。

まず、15-oxo-25-OH 体については $^1\text{H-NMR}$ の結果から 25 位の水素と 26、27 位の水素とのカップリングが消失していることから、25 位が水酸化されたことが示された。またマススペクトルから分子量が基質と比べ 30 増大していたこと、 $^{13}\text{C-NMR}$ からカルボニル領域のピークが 2 本に増えていたことから、他の部位が酸化を受けケトンになっていることが明らかとなった。ケトンになった部位については赤外線吸収スペクトルの結果から、5員環の部位であることが示された。この結果により 15 位または 16 位が酸化を受けたものと考えられる。そして、15 位にカルボニル基を有する化合物と 16 位にカルボニル基を有する化合物では、

$^1\text{H-NMR}$ において18位のメチル基の化学シフトが異なることを利用し、本酸化生成物と3 β ,5 α ,6 β -トリアセトキシ-コレスタン-15-オン(15-oxo)、及び3 β ,5 α ,6 β -トリアセトキシ-コレスタン-16-オン(16-oxo)とで18位のメチル基の $^1\text{H-NMR}$ の化学シフトの比較検討を行った。その結果、酸化生成物の化学シフトは0.71であり、15-oxoの0.76と近い値であった。一方、16-oxoの場合は0.85であり、かなり大きな差が認められることから、本酸化生成物は15位が酸化を受けたものと決定した。

次に、(20*S*)-20,25-diOH体については $^1\text{H-NMR}$ により21、26、27位のメチル基のダブルットが消失していることから、20位及び25位が水酸化されたことが明らかとなった。また $^{13}\text{C-NMR}$ においては水酸基領域に2本のピークが認められたこと、マススペクトルの結果からも、この酸化生成物が2カ所が水酸化を受けたものであるということが支持された。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ の結果からはステロイド骨格が保持されていることも示唆された。しかし、20位の水酸基の立体的な配置についてはこれらの結果からでは判別できないため、X線結晶構造解析を用いることで決定を行った。

X線結晶解析の結果を図7に示す。この結果から20位の水酸化に関しては*S*配置になっていることが明らかとなった。また、(20*S*)-20-OH体については $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、質量分析の結果から先の化合物と同様の議論により20位水酸化体であることが明らかとなった。立体配置については先の(20*S*)-20,25-diOH体のX線結晶構造解析の結果から、*S*配置になっていることが示唆された。これら

の結果から、本反応系においては不斉中心の立体を保持したまま水酸化を行うという興味深い知見が得られた。

これらの酸化生成物の構造を決定できたので、5 α -コレスタン-3-オンを基質として触媒の種類を変えて反応を試みたところ、表2に示すような結果が得られた。まずRu(TMP)(CO)錯体を用いた場合、25-OH体、(20*S*)-20,25-diOH体、15-oxo-25-OH体の三種類の酸化生成物が得られてきた。これら酸化生成物のうち(20*S*)-20,25-diOH体、15-oxo-25-OH体は、図8に示されるように25-OH体を基質として用いた際にも得られていることから、25-OH体を中間体として生成している高次酸化生成物であることが示唆された。次にRu(T_{2,6}DCIPP)(CO)錯体を用いて反応を試みた場合、20位、25位に酸素が導入され酸化生成物として25-OH体、(20*S*)-20-OH体、(20*S*)-20,25-diOH体の三種類が得られてきた。そしてRu(T_{2,4,6}TMPP)(CO)錯体を用いた場合、25-OH体が収率4%で得られた。最後にRu(TPP)(CO)錯体を用いたところ、25-OH体が収率11%で得られ、先の触媒と比べて若干収率の上昇がみられた。後の2錯体においては25-OH体のみが酸化生成物として得られたものの反応性は低い。この原因として、Ru(TPP)(CO)錯体の場合においては μ -oxo dimerを形成する事により活性を失うことが知られており、この触媒の失活により十分に反応が進行しなかったと考えられる。またRu(T_{2,4,6}TMPP)(CO)錯体の場合において反応性が低い原因としては、本反応系はトリメトキシベンゼンを酸化することが知見として既に得られていることから、触媒のトリメトキシ基が自己酸化を受けて分解され

てしまい、基質が酸化されず収率が低くなっているものと考えられる。

このように用いる触媒の種類を変えることにより、得られる酸化生成物が異なることが明らかとなった。この理由としては触媒のポルフィリンのメソ位のフェニル基にある置換基により生ずる触媒の立体障害による効果、及び置換基の電子吸引・供与性によるメタルオキシの電子密度の変化によるものと考えられる。

本反応系の適用性を広げるため、基質を変えてステロイドの酸化を試みた。まず始めに、5 α -コレスタン-3-オンと類似の構造を有する5 α -コレスタンを基質として反応を行った。その結果を表3に示す。酸化剤はいずれの条件においても消失しており、酸化生成物として5 α -OH体が最大28%の収率で得られてきている。また残りの部分についてはカラムによりいくつかの混合物を回収した。NMR等の機器データによりこれらの混合物は酸化生成物が数種類混ざっているものと思われる。しかしながら、単離することはできなかつたため酸化された位置については特定することができなかつた。次に、側鎖部分を有していない基質として、5 α -プレグナン-3,20-ジオンを基質として用いた場合、図9に示すように5 α -OH体と14 α -OH体の2種類の酸化生成物が得られてきた。14 α -OH体に関してはX線結晶構造解析を用いてその立体配置を決定した。これら酸化生成物はいずれも三級炭素に酸素が導入された化合物であることから、本反応系においては一級炭素、二級炭素よりも三級炭素のほうが酸化されやすいと考えられる。5 α -アンドロスタン-3,17-ジオンを基質として用いた場合、図10に示すように14 α -OH体2

%の収率で得られるのみであった。そして原料がほぼ回収されたことにより酸化がほとんど進行していないことが示された。

本反応系において基質は5位または14位に酸素が導入されており、8位、9位に酸素が導入された化合物が得られなかつたが、これらの部分は立体的に込み合っておりポルフィリンが接近できないためこのような位置選択性が生じるものと考えられる。

3. ルテニウムポルフィリンと5 β 型ステロイドとの反応

5 β 型ステロイドは高等生物においては胆汁酸中に多く見られ、代表的なものとしてコール酸、ケノデオキシコール酸がある。これら5 β 型ステロイドは、生体内において肝臓で5 β -水素添加酵素によりコレステロールから生合成され、胆嚢に蓄えられる。その後、小腸に胆汁酸として排出され、食物中のコレステロールをミセル化して体内に取り込まれやすい形にする。また、細菌類においても腸内細菌によって生合成されることが知られている。これら5 β 型ステロイドの生理活性については今まであまり着目されていなかったが、これらの中には突然変異を引き起こす物質もあることから、5 β 型のステロイドの代謝には興味を持たれるところである。そこでまず、基質となる5 β 型ステロイドとして、活性化された部位を特に有していない化合物である5 β -コラン酸を用いて反応を試みた。その結果を表4に示す。いずれの場合においても酸化剤は消失しており反応は完全に進行した。

酸化生成物として5 β -OH体、(20S)-

5 β ,20-diOH 体、3-oxo-4-ene 体の 3 種の化合物が単離されてきた。そのうちの (20S)-5 β ,20-diOH 体は新規化合物だったため、NMR、質量分析、赤外線吸収スペクトルなどを用いて構造を決定した。酸化生成物のうち 5 β -OH 体は最高 70 % もの収率で得られてきており 5 β 型ステロイドに対する本反応系の反応性の高さが明らかにされた。この反応性の高さは、5 β 位の水素が 5 α 位の水素と比べて立体的に混んでいないため触媒が接近しやすいからであると考えられる。

先の反応において 5 β 位が位置選択的に酸化が行われていたので、この位置選択性の一般性を調べるために 5 β -コレステランを基質として反応を試みた。その結果を図 11 に示す。酸化生成物として、5 β -OH 体が 64 % の収率で単離された。それ以外には原料が回収されているため、5 β 位が選択的に酸化を受けたことが明らかとなった。続いて同様の条件で 5 α -コレステランの酸化を試みたところ、5 β -OH 体が 14 % の収率で生成した。この結果から、本反応系においては 5 β 型ステロイドの方が 5 α 型のステロイドよりも 5 位の酸化に関して選択的に行われることが示された。この理由として 5 β 型ステロイドにおいては A 環と B 環の接合部がシス型になっているため 5 位の部分が混み合っておらず、触媒が接近しやすいためであると考えられる。これと同様の結果が、*cis*-, *trans*-Decaline の競争反応において得られてきており、本反応系においてシス型に対する選択性は一般性を有していると考えられる。また、いずれの基質においても水酸化物は基質の立体を保持したのみが得られてきており、立体が反転したも

のは生成してこないことを GC などで確認した。このことからこれら基質に対しても、本反応系において不斉中心の立体を保持し酸化が進行していることが明らかとなった。

この他に 5 β -コレスタン-3-オンを基質として用いたところ、図 12 に示すように 5 β -水酸化体が 42 % の収率で得られてきた。また残りは原料として回収されてきていることから本反応において 5 β 位が選択的に酸化されていることが明らかとなった。このように本反応系において 5 β 型ステロイドを適用した際、5 位に優先的に反応が進行し、高い位置選択性を有することが明らかとなった。

D. 考察

ミオグロビンの 92 位変異体を用いて、酸素化型の自動酸化によって生ずる活性酸素種である過酸化水素との反応について検討した。これら変異体は吸収スペクトル的に野生型標品と同様な、フェリル-オキソ型高酸化状態をとることが判明した。すなわち、ヘム鉄が 4 価で軸配位子が酸素原子となっている中間体を形成すると考えられる。しかしながら、S92A 変異体では、同様な高酸化状態を形成するものの、より高濃度の過酸化水素を添加する必要があった。これは、ひとつの原因として、ヘムポケットの入り口が他の変異体に比べて狭くなっていることが考えられる。しかしながら、宇野の項で明らかのように、同じ小分子であるシアニオンの結合性には S92A 変異による異常性は認められなかった。したがって、ヘム入口の構造は、S92A 変異でもほとんど変化していないことがわかる。S92A 変異体は、用いた変異体の中で一番小さ

な側鎖を持つ。その結果、隣接する軸配位子 93 位ヒスチジンとのコンタクトが最小になると思われる。このヒスチジンの配位性が変化したために、酸化されにくくなった可能性がある。

これらフェリル型ヘムはシトクロム P450 の活性中間体と同様の構造を持つため、種々の生体分子を酸化する可能性がある。そこで、ルテニウムポルフィリンを用いた反応系を用いて、ステロイドの水酸化反応に適応した。その結果、本反応系が基質の不斉中心の立体を保持し水酸化反応を行うことが明らかとなった。本反応系を合成反応系として用いる際、不斉点を保っていただけるかどうかということは高選択的に生成物を得る上で重要なポイントの一つであるが、本反応系はその点、望ましい選択性を有していることを明らかにした。この知見をもとにさらに本反応系を合成反応系として応用していきたいと考えている。また本反応系により新規化合物を 4 種類得ることができた。これは本反応系が高い反応性を有

していることに着目し、多数の反応点を有するステロイド類を基質とすることで、従来の化学反応系にはない本反応系の特異的な反応性を明らかにすることに成功した。

E. 結論

92 位変異ミオグロビンを用いて、過酸化水素との反応を追跡した。その結果、これら変異体は野生型と同様の高酸化状態を形成することがわかった。しかし、S92A 変異体では過酸化水素との反応性が他と比べて有意に低く、酸化に対して安定であることがわかった。これは、近位側軸配位子ヒスチジンとの接触が変化したためであると思われた。また、高酸化ヘムによる生体分子の酸化反応を調べるために、各種ステロイドを対照として実験を行った。その結果、ルテニウムポルフィリンによって、基質の不斉中心の立体配座を保持したまま水酸化反応を行えることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 長野哲雄、廣部雅昭
活性酸素増産剤としての超原子価化合物のデザイン・合成・生物活性評価
季刊化学総説 日本化学会刊行 有機超原子価化合物 pp. 195-205 (1998)
- Hirotatsu Kojima, Kuniko Sakurai, Kazuya Kikuchi, Shigenori Kawahara, Yataka Kirino, Hiroshi Nagashi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano
Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore
Biol. Pharm. Bull., **46**, 373-375 (1998)
- Jeon-Ok Moon, Su-Kyung Park and Tetsuo Nagano
Hepatoprotective Effect of Fe-TPEN on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats
Biol. Pharm. Bull., **21**, 284-288 (1998)
- Hirotatsu Kojima, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Shigenori Kawahara, Yataka Kirino, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano
Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins
Anal. Chem., **70**, 2446-2453 (1998)
- Naoki Nakatsubo, Hirotatsu Kojima, Kazuya Kikuchi, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata, Daisuke Maeda, Yasuyuki Imai, Tatsuro Irimura and Tetsuo Nagano
Detection of Nitric Oxide from Bovine Aortic Endothelial Cells with New Fluorescence Indicators: Diaminofluoresceins
FEBS Lett., **427**, 263-266 (1998)
- Naoki Nakatsubo, Hirotatsu Kojima, Kuniko Sakurai, Kazuya Kikuchi, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata Takaaki Akaike, Hiroshi Maeda, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano
Improvement of Nitric Oxide Detection Method Using 2,3-Diaminonaphthalene and Its Application to Evaluation of Novel Nitric Oxide Synthase Inhibitors
Biol. Pharm. Bull., **21**, 1247-1250 (1998)
- Hirotatsu Kojima, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Junji Tanaka, Yoshihisa Kudo and Tetsuo Nagano
Direct Evidence of Nitric Oxide Production in Rat Hippocampus Using a New Fluorescent Indicator: DAF-2DA
Neuroreport, **9**, 3345-3348 (1998)
- Hiroshi Nakagawa, Tsunehiko Higuchi, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano
Selective Deoxygenation of Heteroaromatic N-oxides with Olefins Catalyzed by Ruthenium Porphyrin
Chem. Pharm. Bull., **46**, 1656-1657 (1998)

- Hajimu Kurumatani, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Masaaki Hirobe, Jun Yamazaki and Taku Nagao
Real Time Measurement of Nitric Oxide Release from Cultured Endothelial Cells
Biol. Pharm. Bull., **21**, 1286-1289 (1998)
- 長野哲雄、小島宏建
一酸化窒素のバイオイメーシングを目的とした生体プローブの分子設計
日本化学会誌、11月号、721-729 (1998)
- 小島宏建、菊地和也、長野哲雄
一酸化窒素 (NO) のバイオイメーシング
バイオイメーシング, **6**, 159-160 (1998)
- 小島宏建、長野哲雄
一酸化窒素 (NO) の測定法
呼吸, **17**, 1308-1313 (1998)
- 小島宏建、長野哲雄
一酸化窒素の分析法
ぶんせき, **291**, 239-245 (1999)
- Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M
Effects of Hypertension, Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia on Endothelin Type B Receptor-Mediated Nitric Oxide Release From Rat Kidney
Circulation, **99**, 1242-1248 (1999)
- Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M
Role of Nitric Oxide-cGMP Pathway in Adrenomedullin-induced Vasodilation in the Rat
Hypertension, **33**, 689-693 (1999)
- Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Omata M
Effects of Vasodilatory β -Adrenoceptor Antagonists on Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Rat Kidney
Hypertension, **33**, 467-471 (1999)
- 小島宏建、長野哲雄
生理活性解明へ向けた NO 測定法
脳の科学, **21**, 303-307 (1999)

2. 学会発表

- 鈴木紀行、樋口恒彦、長野哲雄、向井政博、北川禎三
NO 合成酵素及び NO 還元酵素のモデルとしてのヘム-チオレート錯体
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29日

- ・高田則雄、木本哲也、高橋泰城、小島宏建、長野哲雄、川戸佳
 培養脳神経細胞での NO 信号の蛍光顕微イメージング
 日本生物物理学会第 36 回年会 1998 年 10 月 3 日
- ・浦野泰照、樋口恒彦、長野哲雄
 チオレート配位合成鉄ポルフィリン錯体 (SR) を用いた、シトクロム P450 の
 高酸化能要因の解析
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・新垣知輝、樋口恒彦、長野哲雄
 ルテニウムポルフィリン/2,6-ジクロロピリジン *N*-オキシド系に基づいた位置
 選択的酸化反応系の構築
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・鈴木紀行、樋口恒彦、長野哲雄、植草秀裕、大橋裕二
 シトクロム P450、NO 合成酵素のモデルとしてのヘム-チオレート錯体：
 NH \cdots S 水素結合を有する新規錯体の構築と触媒反応性
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・平野智也、菊地和也、長野哲雄
 フルオレセイン類縁体を蛍光団として用いた可視光励起性新規亜鉛蛍光プロー
 ブの開発
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・岩井美和子、浦野泰照、長野哲雄
 リン原子の酸化を利用した蛍光性酸化還元プローブの開発
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・梅澤直樹、浦野泰照、長野哲雄
 新規一重項酸素検出プローブの開発
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・小島宏建、菊地和也、樋口恒彦、長野哲雄
 一酸化窒素感受性蛍光色素 DAF の改良
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日

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