

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19550172  
 研究課題名 (和文) ヘムタンパク質へのフッ素の導入とフッ素の利点を用いた構造・機能解析の研究  
 研究課題名 (英文) Studies on the structure and function of hemeproteins that use advantage of introduction of fluoroalkyl groups  
 研究代表者  
 鈴木 秋弘 (SUZUKI AKIHIRO)  
 長岡工業高等専門学校・物質工学科・教授  
 研究者番号：60179190

研究成果の概要 (和文)：ヘムタンパク質の機能は、ヘムの電子構造とヘム周辺アミノ酸との相互作用により決定されているが、ヘムの電子状態と機能との詳細はあまり検討されていない。そこで、本研究では、ヘムの電子構造に着目し、ピロール、ポルフィリン、ヘムへのフッ素基 (F 基、CF<sub>3</sub> 基) の導入を行った。そして、フッ素の利点を用いた構造と機能の関係を <sup>19</sup>F-NMR と酸塩基平衡定数の測定を用いて解析した。そして、ヘム鉄の電子密度の低下が酸素親和力を低下させることを確認した。

研究成果の概要 (英文)：Functional regulation of hemeprotein is thought to be achieved through electronic structure of heme, and heme environment furnished by nearby amino acid residues. In this study, I have performed substitution of electron-withdrawing fluoro (F) and perfluoromethyl (CF<sub>3</sub>) group(s) as pyrrole, porphyrin and heme side chain(s) to obtain large alteration of the heme electronic structure in order to elucidate the relationship between the structure and function. I have measured the <sup>19</sup>F-NMR, and the equilibrium constant (pK<sub>a</sub>) of the “acid-alkaline transition” in metmyoglobin in order to quantitatively assess the effects of the F and CF<sub>3</sub> substitutions for the electron density of heme Fe atom of the hemeprotein. I have confirmed that the introduction of F or CF<sub>3</sub> group(s) to the heme side chain(s) leads to a decrease in the electron density of the heme Fe atom, which in turn decreases the O<sub>2</sub> affinity of hemeprotein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生物有機化学

1. 研究開始当初の背景

| (1) ヘムタンパク質と呼ばれる一群のタン

パク質は、酸素の運搬や貯蔵に関わるヘモグロビンやミオグロビンのように生体内で重要な役割を果たしている。このヘムタンパク質の生理活性解明には構造と機能の関係を明らかにすることが重要である。申請者はこれまでに、ヘムタンパク質の活性中心であるプロトヘム（ポルフィリン鉄錯体）の対照化合物を種々合成し、ヘムタンパク質内における位相とヘム周辺置換基の構造の関係を明らかにしてきた。そして、新たに導入したフッ素基を有するポルフィリン、ヘムが<sup>19</sup>F-NMR のプローブとしてヘムタンパク質の構造・機能解析にも応用できることを呈示した。

(2) フッ素化ポルフィリン、ヘムの合成において、一番重要なポイントはその原料となるピロールのフッ素化であり、これまでに独自、或いは文献の改良によりフッ素化の手法を提案してきた（改良 knorr 反応、Balz-Schiemann 光反応、イソニトリルの環化、ピロリジニウム塩の還元）。フッ素の種類としては、モノフルオロ基(F)、トリフルオロメチル基(CF<sub>3</sub>)を選択した。これは、一番単純な置換基で、導入化合物の構造変化と機能変化の相関を得るためである。それぞれ、F基は立体的因子、CF<sub>3</sub>基は電子的因子による機能変換を狙ったものである。ポルフィリンまでの誘導も有機合成的に価値があるが、海洋天然物には臭素を含むピロールが数種類存在し、抗菌性を示すことが知られており、そのアナログとしてフッ素化ピロールも生理活性を示す可能性があり興味深い。

## 2. 研究の目的

大きな目的としては、フッ素の利点を用いた構造解析手法の開発と、導入するフッ素の特徴による生体関連化合物の機能変換、特にピロールやポルフィリン色素の特性を生かした抗腫瘍活性やバイオミメティック触媒としての可能性も明らかにすることである。

(1) ピロール、ポルフィリン、ヘムのフッ素化による機能変換：これまでに合成した種々のフッ素化ピロールを原料に、これまでに例のない F 基、CF<sub>3</sub> 基が混在したモデル化合物による機能変換。また、「歪み」効果は、電子効果に並んでヘムタンパク質の性質に影響を与えていることが示唆されている。周辺置換基間の立体反発による「歪み」をもった再構成可能なフッ素化ヘムも合成する。

(2) フッ素ヘムの物性評価（酸化・還元電位及び<sup>19</sup>F-NMR の測定）：フッ素化ポルフィリンおよびその鉄錯体の酸化・還元電位を測定して、フッ素置換基の種類・数・位置がヘムや中心鉄イオンの構造に及ぼす電子的効果を評価し定量化する。

(3) <sup>19</sup>F-NMR による Mb の酸素化過程とヘムの電子構造の解明：これまで扱ったミオグロビン(Mb, Mw=17K)の他にも、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP, 42K)、ヘモグロビン(Hb, 64K)とフッ素化ヘムとの再構成を行い、それぞれのヘム活性部位の構造化学的比較を行い、ヘムの電子構造や外部配位子の配位様式などについて考察する。そして、フッ素の化学シフト異方性と分子構造との関係を明らかにする。

(4) 生体関連化合物のフッ素化による生理活性、触媒活性を明らかにする：これまでに合成したフッ素化合物（ピロール、ポルフィリン、ヘム）の生理活性の有無を調べるとともに、フッ素化による特徴を生かした生体触媒としての可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) アポタンパク質と再構成した際に、タンパク質活性中心のアミノ酸残基と重要な接触が指摘されている、プロトヘムタイプの上部ユニット（A, B ピロール環）へのフッ素基の導入およびモノフルオロ基（F 基）とトリフルオロメチル基（CF<sub>3</sub> 基）の混在モデルの合成を検討した。

① 既合成ヘムの対照モデルとなる新規フッ素化ヘムとして、F 基と CF<sub>3</sub> 基のそれぞれの性質・組合せを考慮し、機能変換のために図1のようなフッ素基多置換および歪みモデルの合成を行った。

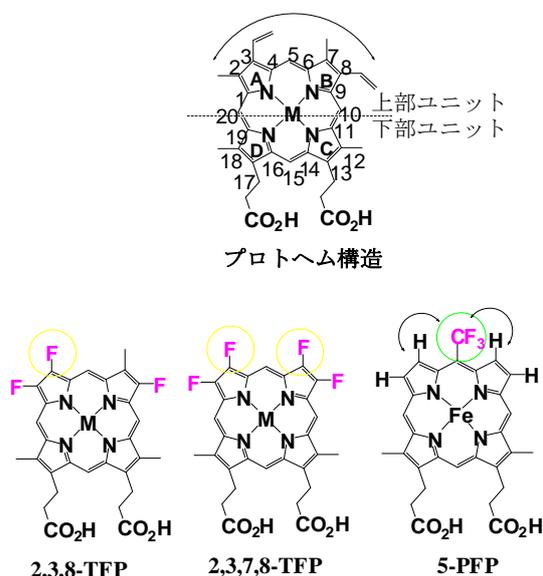


図1 新規フッ素基置換ヘム誘導体

② F 基と CF<sub>3</sub> 基のフッ素基混在モデルとして、合成が報告されている TTFP を参考に OFTTFP の合成を行った (図 2)。

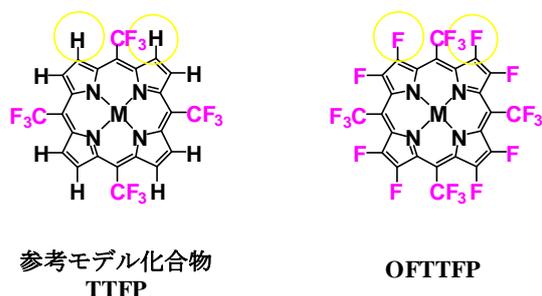


図 2 フッ素基混在モデル

(2) 合成フッ素化ヘムの物性評価と酸化過程とヘムの電子構造の解析を行った。物性評価としては、酸-塩基平衡定数 (pKa) と <sup>19</sup>F-NMR を中心に測定を行った。また、酸化過程は、合成フッ素化ヘム (2,8-DPPF ヘム) とアポミオグロビンを再構成手法し、<sup>1</sup>H-NMR および <sup>19</sup>F-NMR 測定を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 文献に従い合成した 3,4-ジモノフルオロピロールを原料に、F 基多置換ポルフィリンとして、目的物の一つである 2,3,8-TFP を微量であるが合成した。また、2,3,7,8-TFP は、その前駆体となる 5 位に t-ブチル基が置換した誘導体を合成した (図 3-1 および 2)。

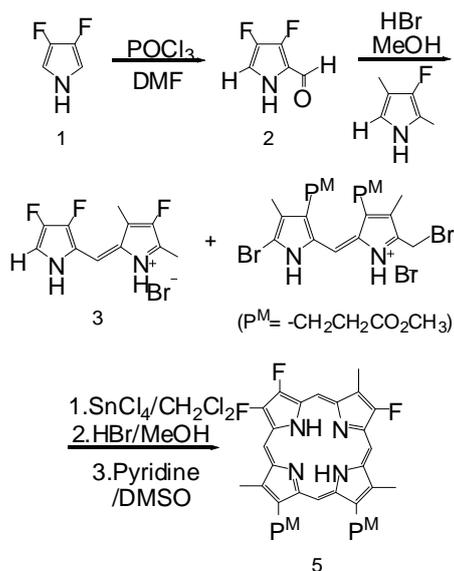


図 3-1 2,3,8-TFP の合成経路

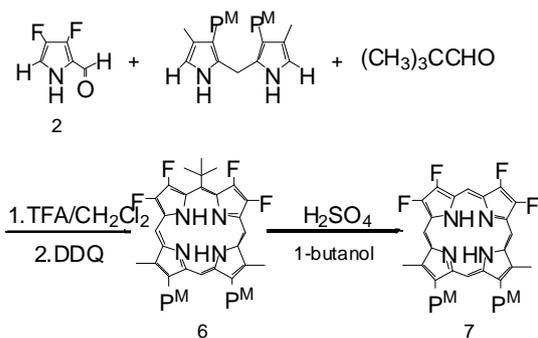


図 3-2 2,3,7,8-TFP の合成経路

2,3,8-TFP の合成では、ポルフィリンの環化収率が 1.2% と低いこと、2,3,7,8-TFP の合成では、前駆体 6 から 7 への脱アルキル化が進行しないことから、ピロール β 位の立体効果、環化条件などをさらに検討する必要がある。

また、歪みモデル (5-PFP) の合成では、CF<sub>3</sub> 基をもつ上部ユニット (ジピロメタン) の合成がうまく進行せず、目的物は得られていない (図 4)。

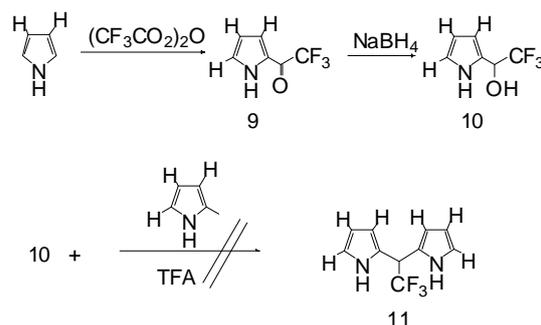


図 4 歪みモデルの上部ユニット合成経路

さらに、F 基と CF<sub>3</sub> 基が混在したモデル化合物として、ポルフィリン環構成ピロールの β 位 8 箇所にも F 基、ポルフィリン環メソ位 4 箇所にも CF<sub>3</sub> 基が置換したモデルを考え、トリフルオロメチル基をメソ位にもつ TTFP の合成を参考に反応経路を設計した。まず、3,4-ジモノフルオロピロールを原料に、その α 位に CF<sub>3</sub> 基を導入するため、トリフルオロアセチル化を行った。そして、メソ位の活性化としてトリフルオロアセチル基のカルボニル基をヒドロキシ基に還元した。その後、TTFP と同様の反応条件で、ポルフィリンの環化反応を行った (図 5)。しかし、TTFP の文献収率が 20% 前後なのに対して、ピロール β 位に F 基が置換した OFTTFP の反応では、蛍光性分はであるものの、黒色重合物が主成分となった。

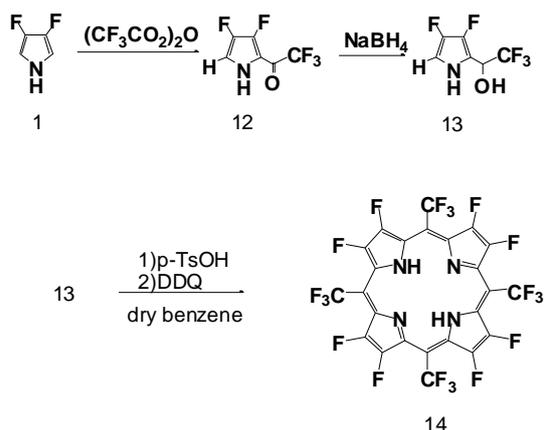


図5 OFTFPの合成経路

ピロールβ位にF基が置換したことにより溶媒に対する溶解性等が大きく変化しており、反応に使用する溶媒をはじめ酸触媒、配位性金属の組合せ等をさらに検討する必要がある。

(2) これまでに合成したフッ素置換ヘムを用いたヘムタンパク質の<sup>19</sup>F-NMR測定によるヘムの電子構造の解析から、ミオグロビン(Mb)における酸素親和性は、ヘム鉄の電子密度の減少に伴い低下することをCF<sub>3</sub>基を置換ヘムで示した。

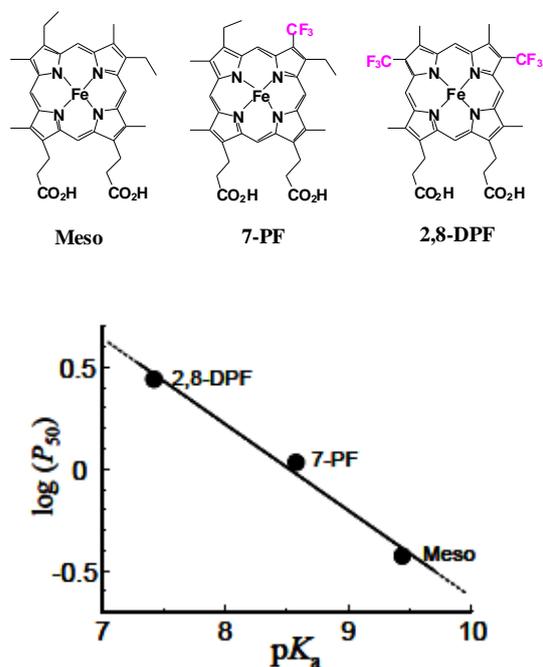


図6 酸塩基平衡と酸素親和力の関係

メソヘム、7-PF、2,8-DPFを組み込んだ再構成Mbにおける比較から、pKaはCF<sub>3</sub>基1つの導入に伴い約1低下することが明らかとなった。一方、Mbの酸素親和力P<sub>50</sub>は、CF<sub>3</sub>基

1つの導入に伴い約2.7倍大きくなる(すなわち酸素親和性が低下する)ことが示された。pKaに対してlog(P<sub>50</sub>)をプロットすると直線の関係が得られた。この結果は、Mbの酸素親和性はヘム鉄の電子密度の減少に伴い低下することがわかった。

また、ヘモグロビン(Hb A)におけるアロステリック効果の解明に重要なサブユニット間相互作用の新規検出法を、フッ素置換ヘムを含む酸化型Hb A、ヒト胎児ヘモグロビン(Hb F, α<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>)を使った酸-アルカリ平衡(pKa)から評価できることがわかった。

表1 酸化型HbのpKa(25°C)

		Isolated subunit	Hybrid Hb	Native Hb
Hb A	α	8.17 ± 0.05	8.27 ± 0.10	8.32 ± 0.05
	β	7.75 ± 0.05	7.61 ± 0.10	7.48 ± 0.05
Hb F	α	8.17 ± 0.05	8.27 ± 0.10	8.48 ± 0.05
	γ	8.26 ± 0.05	7.89 ± 0.10	7.76 ± 0.05

Hb A および Hb F の各サブユニットのpKaを、単離鎖、ハイブリッドHb、天然Hbの3種類の状態で求めた(表1)。得られたpKaの比較から、サブユニット間相互作用により、αサブユニットのpKaは上昇し、β(γ)サブユニットのpKaは低下することが明らかになった。Hb AやHb Fでαとβ(γ)の構造化学的環境の非等価性の大きさが、サブユニット間相互作用により保持されていることが示され、この非等価性の大きさが、アロステリック効果に重要であることが示唆された。

以上、フッ素基の置換において、電子的效果の大きなCF<sub>3</sub>基は、その置換数によりヘムの中心鉄の電子密度に直接影響を与え、酸素と一酸化炭素の識別能など、電子的要因によって調節されている機能が徐々に明らかになりつつある。今後も、継続してこれまでに合成したフッ素置換ヘムの対照化合物の合成収率を上げ、より詳細なヘムタンパク質の構造・活性相関を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

① T. Shibata, S. Nagao, M. Fukaya, H. Tai, S. Nagatomo, K. Morihashi, T. Matsuo, S. Hirota, A. Suzuki, K. Imai, and Y. Yamamoto, Effect of Heme Modification on Oxygen Affinity of Myoglobin and Equilibrium of the Acid-Alkaline Transition in Metmyoglobin, *Journal of the*

*American Chemical Society*, 査読有り, **132**, (2010), 6091-6098

〔学会発表〕(計 13 件)

①深谷昌史、柴田友和、太虎林、長友重紀、山本泰彦、鈴木秋弘、「ミオグロビンにおけるヘム側鎖の電子的性質とヘム鉄の電子密度及び反応性との関係」日本化学会第 90 春季年会, 2010, 3, 28 (近畿大学)

②高橋香織、坂井優介、鈴木秋弘、「フッ素置換基導入によるポルフィリン環の化学修飾」第 15 回高専シンポジウム in いわき, 2010, 1, 23 (いわき市文化センター)

③ T. Shibata, S. Nagao, H. Tai, S. Nagatomo, H. Hamada, H. Yoshikawa, A. Suzuki, and Y. Yamamoto, Analysis of Subunit 「Interaction in Human Adult and Fetal Hemoglobins through the characterization of the Acid-Alkaline Transition」, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009, 7, 27 (名古屋国際会議場)

④水関和哉、宮崎泰斗、柴田友和、古市英資、長友重紀、河野慎、山本泰彦、鈴木秋弘、「 $C_2$  対称フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質における Fe-His 配位結合の  $^{19}F$  NMR による解析」日本化学会第 88 春季年会 2C5-10, 2008, 3, 27 (立教大学池袋キャンパス)

⑤水関和哉、太虎林、長友重紀、山本泰彦、鈴木秋弘、「フッ素化ヘム再構成ヘモグロビン(Hb)の  $^{19}F$  NMR による機能解析」第 47 回 NMR 討論会 P040、2008, 11, 14 (筑波大学)

⑥宮崎泰斗、太虎林、長友重紀、山本泰彦、鈴木秋弘、「フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質の  $^{19}F$  NMR シグナルの磁場依存性の解析」第 47 回 NMR 討論会 P041、2008, 11, 12 (筑波大学)

⑦山本泰彦、長尾 聡、水関和哉、河野 慎、長友重紀、鈴木秋弘、「ヘム側鎖にフッ素をもつヘムタンパク質の  $^{19}F$  NMR」第 46 回 NMR 討論会, 2007, 9, 12 (札幌コンベンションセンター)

⑧長友重紀、長尾聡、水関和哉、河野慎、山本泰彦、鈴木秋弘、今井清博、「フッ素化ヘム再構成酸化型ヘモグロビンにおける酸塩基平衡の  $^{19}F$  NMR 研究」第 34 回生体分子科学討論会, 2007, 6, 22 (東北大学)

⑨鈴木秋弘、「NMR 測定用フッ素核プローブの開発とその応用」第 6 回産官学連携推進会議、

2007, 06, 16-17 (国立京都国際会館)

〔図書〕(計 1 件)

加藤正直、内山一美、鈴木秋弘、物質工学入門シリーズ「基礎からわかる機器分析」, 森北出版, (2010)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nagaoka-ct.ac.jp/mb/index.files/Page1144.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 秋弘 (SUZUKI AKIHIRO)

長岡工業高等専門学校・物質工学科・教授  
研究者番号：60179190