

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590040

研究課題名(和文) 超分子複合体を用いる人工酸素運搬体の創製

研究課題名(英文) Creation of Artificial Oxygen Carrier Using Supramolecular Complex

研究代表者

根矢 三郎 (Neya, Saburo)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10156169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： 安定した血液供給を維持するために人工酸素運搬体の開発は不可欠である。人工血液には血液型や感染症の問題がなく、長時間保存できるなどの利点がある。ミオグロビンはヘモグロビンと違い、酸素親和性はアロステリック因子や溶液pHの影響を受けない。また、単量体タンパク質なのでヘモグロビンに比べて安定である。しかし、人工血液材料として用いられることはなかった。これはミオグロビンの酸素結合が強すぎるためである。申請者はミオグロビンに適度な酸素放出能を付与して人工酸素運搬体として利用する研究を行った。その結果、コルフィセンという台形ヘム異性体をもつミオグロビンが優れた酸素運搬能をもつことが判明した。

研究成果の概要(英文)： The development of artificial oxygen carrier is essential to support the stable blood transfusion. Artificial oxygen carrier is free from problem of blood type or blood infection, and it is preserved for longer period than blood itself. The blood substitutes so far developed are mainly from hemoglobin and related materials. Myoglobin has an advantage over hemoglobin because it is free from the influence of allosteric effector of solution pH. However, myoglobin has not been used as the blood substitute because of the extremely high oxygen affinity. We have developed a research to donate appropriate oxygen-transporting ability to myoglobin, and to utilize it as an efficient oxygen carrier. The rearrangement of the tetrapyrrole array in the porphyrin ring was quite effective to control the oxygen delivery. We found that the myoglobin reconstituted iron corrphycene, a trapezoidal heme, exhibits sufficient ability for oxygen delivery.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：人工血液 ミオグロビン ポルフィリン 非平面性ヘム ピロール再配列 酸素親和性低下 超分子複合体

1. 研究開始当時の背景

医療現場での血液供給はすべて献血に依存している。しかし、わが国では少子化による若年層の減少により、献血者が減り続けている。一方、人口高齢化にともない血液需要は増加している。人工血液開発は急務である。献血液の保存期間は3週間と短く、血液型不適合や感染症の問題もある。こうした問題を解決する切り札が人工血液である。人工血液は人類の夢であり、開発の歴史は長い。

現在、人工血液として最も有望なものは、保存期限切れのヒト血液や動物血液を化学修飾して適切な酸素運搬能をもたせた「ヘモグロビンに基づく酸素運搬体」である。たとえば、Baxter 社（アメリカ）は分子内架橋したヘモグロビン（HemeAssist）を、Hemosol 社（カナダ）は糖鎖をとり付けたヘモグロビン（Hemolink）を発表している。わが国では、早稲田大学と慶応大学が共同でリポソーム封入ヘモグロビンがつくられ、動物を用いた前臨床試験中である。しかし、ヘモグロビンを利用する人工血液には問題がある。2008年4月に米国国立衛生研究所NIHで開催された食品医薬局FDAのワークショップ「Workshop on hemoglobin-based oxygen carriers」では、化学修飾ヘモグロビンは血管収縮、血圧亢進のほか、心筋損傷などの重篤な副作用があると判明した。この報告を受けて、ヘモグロビン以外の素材を開発する動きが急速に高まっている。

2. 研究の目的

ミオグロビンは筋肉中の酸素貯蔵タンパク質である。ヘモグロビンと同様に酸素を可逆的に脱着するタンパク質で、ヘモグロビンのサブユニットと類似した分子構造をもつ。しかし、ヘモグロビンよりも酸素親和性は高く酸素放出能力が劣るため、酸素運搬物質として着目されてこなかった。ミオグロビンは単量体分子でヘモグロビンよりも安定である。しかも、動物筋肉から大量に抽出できる。その酸素親和性はヘモグロビンとは違い、pHや有機リン酸による変動がない。抗原性はヘモグロビンよりもずっと少ない。遺伝子工学などでの発現量もヘモグロビン

に比べて相当多い。このようにミオグロビンは人工酸素運搬体素材として有望である。しかし、その酸素親和性を下げるのは容易ではなかった。

申請者は今まで、天然ミオグロビンの酸素結合部位であるポルフィリンの分子構造を改変すれば、ミオグロビンの酸素親和性がヘモグロビンなみに低下することを報告してきた（*Chem. Lett.* **1999**, 28, 989; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, 73, 2759; *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 345; *Inorg. Chem.* **2005**, 45, 4238; *Artif. Organs* **2009**, 33, 189）。この方法は天然のグロビン構造を保持したまま、ヘムの分子形を変えるだけでミオグロビンに酸素運搬能を付与できることを示し、廉価な新規酸素運搬物質の創出に向けた新たな糸口を切り拓くものである。本申請はこの考えを発展させた内容で、申請者は非平面ヘムを利用する新たな方法論を展開した。ミオグロビンに酸素運搬能をもたせてつくる人工酸素運搬物質は世界的にも申請者以外の研究室では報告例がない。さらに有機ナノチューブという分子カプセルにミオグロビンを封入する試みは今回が初めてである。カプセル化ミオグロビンは体内動態を大きく改善するため、赤血球と同様の酸素運搬機能をもつ人工酸素運搬体の創製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 酸素運搬能を高める非平面性ヘムの合成

申請者は非平面ヘム **1** (図 1) を導入すると酸素親和性は 1/25 に、一酸化炭素親和性は 1/500 まで低下することを過去に報告した（*Biochemistry* **2010**, 49, 5642）。すなわち、このヘムはミオグロビンの酸素放出能力を飛躍的に向上させる。そこで、申請者はさらに非平面化したヘム **2** と **3** をもつ新たな人工ミオグロビンをつくり、ミオグロビンの酸素運搬能のさ

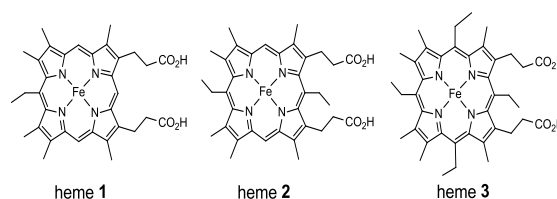


Fig. 1 Structure of nonplanar hemes **1** (moderate), **2** (intermediate) and **3** (strong).
らなる向上をねらった。

(2) 有機ナノチューブの合成法確立

本申請の第2の特徴は有機ナノチューブという分子容器の利用である。有機ナノチューブは筒状分子で内径は十分大きく、内部にはタンパク質を封入できる(図2)。有機ナノチューブとミオグロビンの超分子複合体はちょうど赤血球に似る。ナノチューブへの封入によりミオグロビンの体内動態が改善されるだけでなく、肝臓や腎臓へのミオグロビン集積を抑制して臓器への障害を著しく低減する。しかし、既報の文献には合成法の詳細が明記されていないので、動物実験に利用できるだけの大量合成法を開発する。

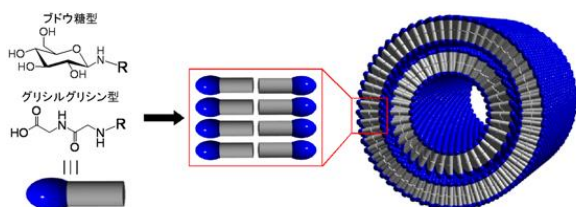


Fig. 2 The monomer and organic nanotube

(3) 超分子複合体の創成と機能評価

ミオグロビンの有機ナノチューブへの封入にあたり、温度、pH、緩衝液、ミオグロビン濃度などの封入条件を検討する。また、出来上がった超分子複合体の長期安定性や酸素運搬能を評価計画をたてた。マウスなどの小動物を用いて体内滞留時間や肝臓・腎臓への集積などを計画した。この実験には東海大学医学部教授の川口章博士との共同研究を予定した。川口博士は日本における人工血液(カプセル化したヘモグロビン)の動物実験について豊富な知識と経験をもつ研究者である。

4. 研究成果

研究補助により平成23-25(西暦2011-2013)年度に発表した論文からその概略を以下に報告する。

(1) 非平面性ヘムによるミオグロビンの酸素親和性制御機構の解明

図1にあるヘム1は α メソ位にエチル基がついている。このエチル基は両側にあるメチル基と立体的に反発するため、ポルフィリンは非平面化する。分

子科学計算により求めた非平面化の様子を図3に示す。エチル基のない参照ヘム2に比べ構成原子のヘム平均平面からの変移は2倍以上にも増加した。非平面ヘム1をミオグロビンに組み込んだところ、

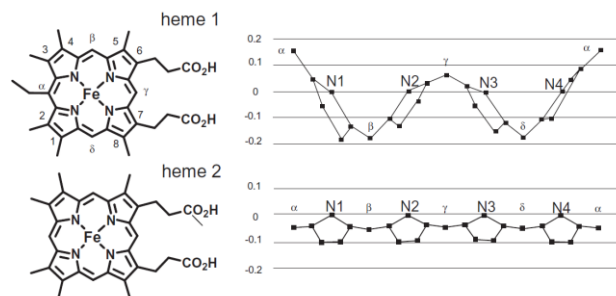


図3 非平面ヘム(上)と平面ヘム(下)の分子構造比較

酸素放出能の目安である P_{50} 値はヘム1とヘム2の場合、それぞれ1.79 mmHgと0.07 mmHgとなった。この結果は、ヘム2の非平面化によりミオグロビンの酸素放出能力が約25倍向上したことを示している。非平面ヘム2をふくむミオグロビン内部での構造変化を探るために、 $^1\text{H-NMR}$ 法を用いて、ヘム鉄に結合する近位ヒスチジンのNHプロトン信号位置を解析した。ヘム1とヘム2をもつミオグロビンで、その信号はそれぞれ82.0および78.8 ppmに観測された。この観測から、ヘム1の鉄原子は近位ヒスチジンに引き寄せられていることが判明した。さらに、一酸化窒素NOを結合したミオグロビン中のヘム1とヘム2を電子スピン共鳴法で比べたところ、ヘム1では鉄とヒスチジンの結合が切断しているという結果を得た。一連の分光学的測定結果より、ヘム1の非平面化により、鉄-近位ヒスチジン結合が強まることが判明した。すなわち、ヘム鉄がヒスチジンに引き寄せられるために、酸素分子との結合は形成しにくくなり、ミオグロビンの酸素親和性低下(=酸素放出能増加)が起きると説明できた。

(*Artif. Organs* 2012, 36, 220-223 に発表)

(2) 新規ポルフィリン類縁化合物ピリコロールの開発

ポルフィリンの分子形の改変はミオグロビンの酸

素親和性を制御する有力な方法である。なぜなら、ヘム鉄の原子軌道とポルフィリン環分子軌道の相互作用により鉄の電子構造を制御して、酸素親和性を変えられるからである。このことを念頭において、申請者は新しいポルフィリン類縁化合物であるピリコロールの合成を行った。通常のポルフィリンではピロール分子が正方形に配位されて、その間をメソ位炭素原子4個が架橋した構造をもつ。一方、ピリコロールではピロールをつなぐメソ位炭素1個をピロール環に挿入した分子である。この変化により、ピロール環は六員環のピリジン分子に変換される。メソ位炭素を欠くポルフィリン類縁体はコロールとよばれるので、申請者は新規分子をピリコロールと命名した。



図4 ピリジン環をもつ新規ポルフィリノイド、ピリコロール

ピリコロールの有機合成は6段階の合成ステップを含む複雑な反応を使うものであった。最終的にはピリジン環とピロール3分子をもつ線形分子をニッケル塩の共存化で環化する鑄型合成法を使うことにより、ニッケル錯体として目的物を得た。

その分子構造をX線結晶構造解析により解くと、ピリジン窒素と鉄原子の距離はピロール窒素と鉄原子の結合よりも0.2Åあまり伸びていた。この距離は鉄の電子状態を変えるには十分な距離である。しかも、分子体積の大きいピリジン環を導入したために、ポルフィリンの鉄配位構造は正方形から西洋だのような菱型に大きく変形していた。申請者は鉄錯体を得る目的で、中心金属であるニッケルイオンを取り除く試みを行った。具体的には、硫酸や鉄の共存化で加熱処理などをしたが、ニッケルイオンは強く結合しているために取り除くことができなかった。現在、他の方法でニッケルを含まないマクロサイク

ルの合成を試みており、そこに鉄イオンを挿入して鉄錯体にする実験を行っている。鉄錯体をアポミオグロビンと結合させると、新規ミオグロビンができる可能性が高い。

(*Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3891-3895 に発表)

(3) ヘムのゆらぎと多様なヘム分子形によるミオグロビンの酸素親和性制御

ミオグロビンの酸素親和性をヘモグロビンなみに抑えるさらなる試みとして、申請者はヘム-グロビン相互作用を弱める試みを実施した。天然ミオグロビンの立体構造をみると、ヘムは複数のグロビン残基で取り囲まれており、100か所あまりの弱い分子間接触が存在する。この接触を取り除く目的で、申請者は分子体積が小さい人工ヘムをミオグロビンに導入した。NMR分光法で解析したところ、人工ヘムは鉄-ヒスチジン結合軸まわりに回転することをみつけた。今までに、ヘムタンパク質内部でヘムが動的回転する例は全く知られておらず、この現象はタンパク質の構造ゆらぎの新しい典型例としても注目を集めた。動くヘムと静止するヘムで酸素親和性を比較したところ、酸素親和性に大差はなく、酸素の結合速度や解離速度もほとんど変わらないことが判明した。すなわち、ヘム-グロビン接触を弱めても酸素親和性が変動しないことが明らかになった。

次に、ポルフィリン環を構成する4分子のピロール環を並べ替える試みを行った。ポルフィリンはピロール環4つが正方形に並んでいるか、メソ位炭素を移動すると、長方形や台形の類縁分子をつくることができる。これらの分子が実在することはすでに知られている。申請者は図5に示した多様な分子形をもつポルフィリン類縁分子を合成し、その鉄錯体をミオグロビンに組み込んだ。その結果、ミオグロビンの酸素親和性は大きく変動した。分子16の場合、酸素親和性は天然ミオグロビンに比べて50倍増加した。また、補欠分子を分子12に変えたところ、酸素親和性は完全に消失した。一方、コルフィセンとよばれる台形分子10bや10cでは $P_{50} = 37 \text{ mmHg}$ および 300 mmHg が得られ、ヘモグロビンの 10 mmHg よ

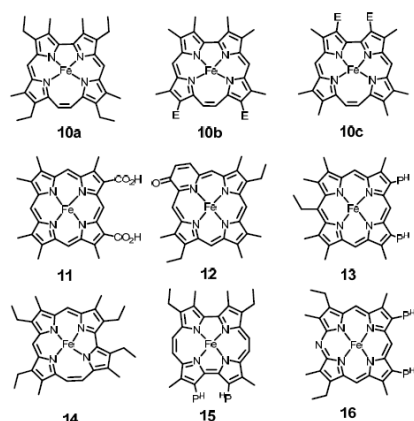


図 5 ミオグロビンの補欠分子としたポルフィリン類縁分子類

りも低い酸素親和性となった。つまり、ヘモグロビン以上の酸素運搬能をもつミオグロビンが見つかった。これらの結果から、ミオグロビンに 10a や 10b を組み込めば、十分な酸素運搬能をもつ人工酸素運搬物質が創製できることが示された。

(*Molecules* **2013**, *18*, 3168-3182 に発表)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① R. Nishimura, T. Shibata, I. Ishigami, T. Ogura, S. Neaya, Y. Yamamoto. “Electronic control of discrimination between O₂ and CO in myoglobin lacking distal histidine” *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1091-1099. 査読有 <http://pubs.acs.org/journal/inocaj>
- ② S. Neaya, M. Suzuki, T. Hoshino. “Relaxation analysis of ligand binding to the myoglobin reconstituted with cobaltic heme” *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 7383-7392. 査読有 <http://pubs.acs.org/journal/inocaj>
- ③ S. Neaya “Dynamic motion and rearranged molecular shape of heme in myoglobin: Structural and functional consequences” *Molecules* **2013**, *18*, 3168-3182. 査読有 <http://www.mdpi.com/journal/molecules>
- ④ R. Nishimura, T. Nishimura, H. Tai, T. Ogura, S. Neaya, A. Suzuki, Y. Yamamoto. “Relationship between the electron density of the Fe atom and the vibrational frequencies of the Fe-bound CO in myoglobin” *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 3349-3355. 査読有 <http://pubs.acs.org/journal/inocaj>
- ⑤ T. Shibata, D. Matsumoto, S. Hirota, K. Imai, S. Neaya, Y. Yamamoto. “Relationship between oxygen affinity and

autoxidation of myoglobin” *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 11955-11960. 査読有 <http://pubs.acs.org/journal/inocaj>

⑥ S. Neaya, A. T. Kawaguchi. “Inherently distorted heme as a novel tool for myoglobin-based oxygen carrier” *Artif. Organs* **2012**, *23*, 220-223. 査読有 <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111>

⑦ S. Neaya, M. Suzuki, T. Mastugae, T. Hoshino. “Synthesis, structure, and aromaticity of the nickel(II) complex of pyricorrole” *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3891-3895. 査読有 <http://pubs.acs.org/journal/inocaj>

⑧ K. Kanaori, T. Ogura, K. Tajima, S. Neaya, T. Yonetani. “T-quaternary structure of human adult hemoglobin in the presence of allosteric effectors” *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1807*, 1253-1261. 査読有 <http://www.elsevier.com/life-sciences/bba>

⑨ C. He, S. Neaya, M. Knipp. “Breaking of the proximal Fe(II)-histidine bond in heme proteins through local structural tension” *Biochemistry* **2011**, *50*, 8559-8575. 査読有 <http://pubs.acs.org/journal/bichaw>

[学会発表] (計 49 件)

- ① 根矢 三郎・鈴木 優章・星野 忠次「人工酸素運搬体としてのミオグロビンの分子設計」日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27 日
- ② 根矢 三郎・鈴木 優章・星野 忠次「酸化型コバルトミオグロビンへの配位子結合速度解析」錯体化学会第 63 回討論会、那覇市、2013 年 10 月 28 日
- ③ S. Neaya “Ligand binding properties of the myoglobin containing cobalt heme cofactor” The 4th International Symposium on Artificial Oxygen Carriers. Yokohama, Japan. September 28, 2013.

[その他]

ホームページ : <http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bukka/>

[研究組織]

総計 1 名

(1) 研究代表者

根矢 三郎 (NEYA, Saburo)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号 : 1 0 1 5 6 1 6 9