

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810106

研究課題名(和文)シアン化水素および硫化水素レセプターの開発

研究課題名(英文)Development of Hydrogen Cyanide and Hydrogen Sulfide Receptors

研究代表者

渡辺 賢司(Watanabe, Kenji)

九州大学・薬学研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90631937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：水溶性鉄(III)ポルフィリン及び0-メチル化シクロデキストリン二量体(Py30CD)から成る超分子錯体(met-hemoCD3)は、メトヘモグロビンと類似した機能を示し、シアン中毒の解毒に有効であった。次に、met-hemoCD3と硫化水素イオン(SH-)との反応を検討した。脱酸素水溶液中においてmet-hemoCD3はSH-と安定な(SH-)-met-hemoCD3錯体を形成するのに対し、空気飽和水溶液中においては鉄(III)の(SH-)-met-hemoCD3は酸素分子と速やかな配位子交換を起こし、鉄(II)のO2-hemoCD3錯体を生成した。

研究成果の概要(英文)：A supramolecule (met-hemoCD3) was prepared by including a water-soluble porphinato iron(III) in a capsule of a 0-methylated cyclodextrin dimer (Py30CD), which was synthesized in only two steps. Ferric met-hemoCD3 showed functions similar to methemoglobin and also functioned as an antidote for cyanide poisoning. We then studied the reaction between hydrosulfide (SH-) and met-hemoCD3. Met-hemoCD3 formed a stable (SH-)-met-hemoCD3 complex in oxygen-free neutral aqueous solution, while reversible ligand exchange between (SH-)-met-hemoCD3 (Fe(III)) and O2-hemoCD3 (Fe(II)) occurred under O2 atmosphere.

研究分野：有機化学

キーワード：ポルフィリン シクロデキストリン シアン化水素 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

シアン化水素 (HCN) および硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は水溶性のガス分子であり、水溶液の pH によっては酸解離し、CN<sup>-</sup>アニオンと SH<sup>-</sup>アニオンとなる。HCN と H<sub>2</sub>S の酸解離の pK<sub>a</sub> はそれぞれ 9.2 および 7.0 と高いが、共役塩基の CN<sup>-</sup>と SH<sup>-</sup>は強い求核性と金属配位性を持つ。これらの性質から、CN<sup>-</sup>及び SH<sup>-</sup>は有機合成や金属精錬など産業分野で広く用いられ、産業排水や環境中の HCN 及び H<sub>2</sub>S を検出するレセプター分子や蛍光プローブが開発されてきた<sup>1)</sup>。これらの分子は CN<sup>-</sup>や SH<sup>-</sup>と結合する求電子部位や金属部位を持つ。

しかし、生体内において CN<sup>-</sup>や SH<sup>-</sup>を捕捉するには様々な障害を乗り越える必要がある。生体内は恒常的に中性 pH に保たれているため、大部分の CN<sup>-</sup>と SH<sup>-</sup>はプロトン化によって求核性と金属配位性を失う。このため、酸解離平衡により生じた CN<sup>-</sup>と SH<sup>-</sup>のみがレセプターと結合する。また、生体内には様々なタンパク質や金属イオンが存在し、レセプターの HCN との相互作用を阻害する。例えば、ビタミン B<sub>12</sub> の一種であるヒドロキソコバラミン (OHCbl) は、血清タンパク質との錯形成により、シアン結合速度  $k_{on}$  と結合定数  $K$  が著しく低下する<sup>2)</sup>。一方、Fe(III)ポルフィリンのヘミンがグロビンのヒスチジン (His) 残基に配位し、タンパク質に取込まれた構造をしたメトヘモグロビン (metHb) は、血清中でも高い  $k_{on}$  を示す。しかし、metHb は体内の還元的環境において常に Fe(II)の Hb として存在し、人為的に Hb を亜硝酸化合物で酸化して生成する必要がある<sup>3)</sup>。Hb の酸化は血液の酸素運搬を阻害する問題があるだけでなく、(CN<sup>-</sup>)metHb の還元によって遊離する CN<sup>-</sup>を配位性の低い SCN<sup>-</sup>に変えるための硫黄源 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を投与する必要がある。H<sub>2</sub>S に至っては生体中から H<sub>2</sub>S を除去する明確な方法が確立されていない。

我々の研究グループは、水溶性鉄ポルフィリンと全ての水酸基を *O*-メチル化したβ-シクロデキストリン二量体から成る超分子包接錯体(hemoCD)が水中で良好なヘムタンパク質モデルとして機能し、種々の無機アニオン<sup>4)</sup>、酸素分子<sup>5)</sup>、一酸化炭素<sup>5)</sup>及び一酸化窒素<sup>6)</sup>を結合することを報告している。このため、hemoCD は類似のアニオンである CN<sup>-</sup>や SH<sup>-</sup>を結合する可能性があった。

2. 研究の目的

本研究では、hemoCD を用いて生体内でシトクロム *c* オキシダーゼの酵素活性阻害、神経調節及び血管弛緩を行う重要な生理活性ガス分子であるシアン化水素 (HCN) 及び硫化水素 (H<sub>2</sub>S) の捕捉を検討する。

また、hemoCD と H<sub>2</sub>S との結合様式について各種分光法を用いて明らかにすることで、ヘムタンパク質モデルと H<sub>2</sub>S との反応に関する基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

3 位に equatorial 水酸基を持つ 2,6-di-*O*-methyl-β-cyclodextrin (2,6-*O*-Me-β-CD) を出発原料に用い、3,5-bis(chloromethyl)pyridine との SN<sub>2</sub> 反応による CD の二量化とそれに続く残余水酸基の完全 *O*-メチル化の2段階の反応によって新規 CD 二量体 (Py3OCD) を合成した (図 1)。

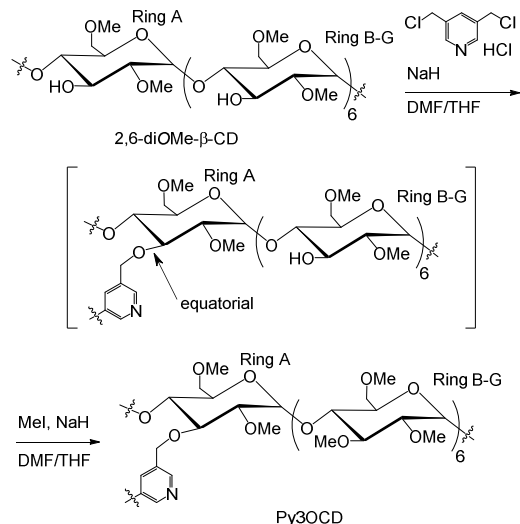


図 1. Py3OCD の合成スキーム。

Py3OCD と水溶性鉄(III)ポルフィリン tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato iron (III) は水中で安定な 1:1 包接錯体 (met-hemoCD3) を形成した。各種アニオンと met-hemoCD3 との結合は紫外可視吸収 (UV-vis) スペクトル及び電子スピン共鳴 (EPR) スペクトルを用いて評価した。鉄(II)の hemoCD3 は既報の手法に従い Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を還元剤に用いて鉄(III)の met-hemoCD3 から調製した<sup>4)</sup>。NaSH 溶液の濃度はヨウ素滴定によって決定した。

4. 研究成果

1) ヘムモデルとしての hemoCD3 の評価

鉄(III)の met-hemoCD3 を構成する Py3OCD は入手容易な出発原料から 2 段階で 34 %の収率にてグラムスケールで合成することができ、各種生物学的試験や分光学的測定に十分な量を供給することができた。

Py3OCD の鉄(III)ポルフィリン包接錯体の構造は、Py3OCD と tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin との錯体の単結晶を用いて X 線構造解析を行った。得られた錯体の ORTEP 図を図 2 に示す。

鉄(II)の hemoCD3 は安定に酸素分子及び一酸化炭素分子と結合でき、それぞれの親和性は  $p_{1/2}(\text{O}_2) = 18 \text{ Torr}$  及び  $p_{1/2}(\text{CO}) = 5.6 \times 10^{-4} \text{ torr}$  と求まり、天然の Hb の Tense 状態と近い値を示した。また、中性緩衝水溶液中における鉄(II)hemoCD3 の鉄(III)への自動酸化の半減時間は  $t_{1/2} = 51 \text{ h}$  と得られ、水中においても安定に鉄(II)状態を保たれ、Hb やミオグロビンの良好な機能モデルであることが分かった。

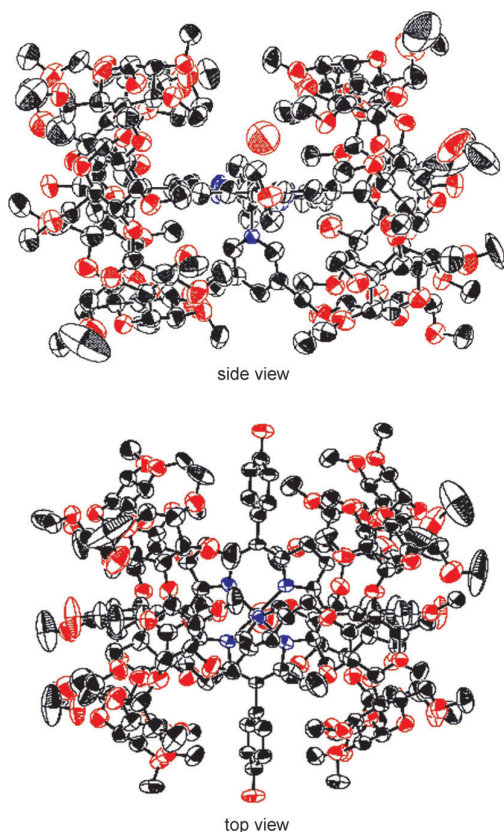


図 2. Py3OCD/Fe(III)ポルフィリンの ORTEP 図.

つぎに、鉄(III)の met-hemoCD3 と CN<sup>-</sup>との結合を検討した。met-hemoCD3 の pH 7 緩衝水溶液中における CN<sup>-</sup>の結合定数及び結合速度定数はそれぞれ  $K = 2.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  及び  $k_{\text{on}} = 736 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であった。他のレセプターとの CN<sup>-</sup>結合能の差異は、ウシ血清中において顕著に表れた (表 1)。

表 1. ウシ血清中における CN<sup>-</sup>結合能.

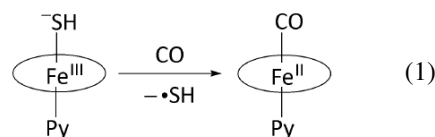
|                   | $K \times 10^{-6}$<br>/ $\text{M}^{-1}$ | $k_{\text{on}}$<br>/ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ |
|-------------------|---|---|
| met-hemoCD3       | 1.72                                    | 514   |
| Fe(III)TPPS/Im3CD | 1.34                                    | 104   |
| metHb             | 0.323                                   | 208   |
| HOCbl             | 0.013                                   | 6.5   |

met-hemoCD3 は、我々の研究グループで開発された全ての hemoCD 類の中で最も高い CN<sup>-</sup>結合能を示しただけでなく<sup>2)</sup>、シアン中毒の解毒に臨床利用されている OHCbl と比較しても 132 倍及び 79 倍大きな CN<sup>-</sup>結合定数及び結合速度定数を示した (表 1)。血清中において OHCbl は血清タンパク質に取込まれ、CN<sup>-</sup>結合能を低下するのに対し、シクロデキストリン孔に包接された met-hemoCD3 は高い CN<sup>-</sup>結合能を維持することが分かった。

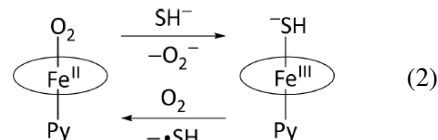
さらに、致死量の NaCN の投与により呼吸停止したラットに met-hemoCD3 を静脈内注射するとラットが生存し、本化合物が生体内でシアンを除去・解毒することが示された。

## 2) ヘムモデルと SH<sup>-</sup>との反応.

NaSH を H<sub>2</sub>S (pKa = 6.8) の等価体として用い、脱酸素された中性酸緩衝水溶液中での SH<sup>-</sup>と met-hemoCD3 との反応を UV-vis 及び EPR スペクトルを用いて詳細に検討した。EPR 測定から met-hemoCD3 に NaSH を添加して生じる化学種を Fe(III)ポルフィリンに SH<sup>-</sup> が axial 配位した 6 配位低スピン錯体と同定した。興味深いことに (SH<sup>-</sup>)-met-hemoCD3 錯体に対して、鉄(II)に強配位する一酸化炭素 (CO) を導入すると、421 nm に鋭い  $\lambda_{\text{max}}$  を示す CO 錯体への速やかな変換が UV-vis スペクトルより観測され、Fe-S 結合のホモリシス及び CO の配位が協奏的に起こることを示唆する結果が得られた (式 1)。



また、鉄(II)の hemoCD3 に NaSH を添加した場合には、有意な EPR スペクトル変化が見られないのに対して、酸素錯体の O<sub>2</sub>-hemoCD3 に NaSH を添加した系では、(SH<sup>-</sup>)-met-hemoCD3 錯体由来するシグナルが新たに観測された。これらの結果は、SH<sup>-</sup>が鉄(II)の hemoCD3 とは反応性を示さないのに対し、O<sub>2</sub>-hemoCD とはスーパーオキシドアニオン (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)との配位子交換により、(SH<sup>-</sup>)-met-hemoCD3 錯体を生成することを示唆している (式 2)。



次に、脱酸素下 10 当量の SH<sup>-</sup>を met-hemoCD3 に加えて調製した (SH<sup>-</sup>)-met-hemoCD3 錯体を空気飽和のリン酸緩衝水溶液に希釈すると、422 nm に O<sub>2</sub>-hemoCD3 の  $\lambda_{\text{max}}$  が観測され、溶媒中の O<sub>2</sub> によって、(SH<sup>-</sup>)-met-hemoCD3 が O<sub>2</sub>-hemoCD3 へと速やかに変換されることが分かった (式 2)。その後、met-hemoCD3 由来の 398 nm への経時的な  $\lambda_{\text{max}}$  の遷移と鉄ポルフィリン全体の吸収の減衰が見られた。O<sub>2</sub>-hemoCD3 が SH<sup>-</sup>と反応性を示すことから、SH<sup>-</sup>と O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)との配位子交換が繰り返されることにより生成する  $\cdot\text{SH}$  及び活性酸素種によって鉄ポルフィリンへの S 原子の挿入及び鉄(III)への自動酸化の加速が起これると考えられる (図 4)。

以上の検討から、ヘムタンパク質モデルとして機能する hemoCD3 は O<sub>2</sub> 存在下において H<sub>2</sub>S を  $\cdot\text{SH}$  に触媒的に変換することが明らかとなった。一方、反応の進行に伴って生成する  $\cdot\text{SH}$  及び活性酸素種によって鉄ポルフィリンの分解が引き起こされることから、 $\cdot\text{SH}$  をトラップする担体が必要であることが本研究より明らかとなった。

〈引用文献〉

- 1) Gale, P. A. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 82-86; Xu, Z.; Chen, X.; Kim, H. N.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 127-137.
  - 2) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 943-947.
  - 3) Hall, A. H.; Sainersb, J.; Baudc, F. *Crit. Rev. Toxicol.* **2009**, 39, 541-552.
  - 4) Kano, K.; Kitagishi, H.; Dagallier, C.; Koder, M.; Matsuo, T.; Hayashi, T.; Hisaeda, Y.; Hirota, S. *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 4448-4460.
  - 5) Kano, K.; Kitagishi, H.; Koder, M.; Hirota, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 435-438; Kano, K.; Kitagishi, H.; Mabuchi, T.; Koder, M.; Hirota, S. *Chem. -Asian J.*, **2006**, 1, 358-366; Kano, K.; Chimoto, S.; Tamaki, M.; Itoh Y.; Kitagishi, H. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 453-461.
  - 6) Kano, K.; Itoh, Y.; Kitagishi, H.; Hayashi, T. Hirota, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8006-8015.
- 3) 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕 (計 3 件)
- 1) 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.  
DOI: 10.1039/c5cc00057b
  - 2) Yamagiwa, T.; Kawaguchi, A. K.; Saito, T.; Inoue, S.; Morita, S.; Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K.; Inokuchi, S. "Supramolecular ferric porphyrins and a cyclodextrin dimer as antidotes for cyanide poisoning" *Human Exp. Toxicol.* **2014**, 33, 360-368.  
DOI: 10.1177/0960327113499041

- 3) 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.  
DOI: 10.1002/anie.201302470

〔学会発表〕 (計 2 件)

- 1) 渡辺 賢司、北岸 宏亮、大嶋 孝志、加納 航治 "水溶性ポルフィリン超分子によるシアン化物イオンの捕捉" 日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日、熊本。
- 2) Koji, Kano, Hiroaki Kitagishi, Kenji Watanabe "Binding of inorganic anions to supramolecular complexes of an anionic porphyrin and per-O-methylated  $\beta$ -cyclodextrins" The 7<sup>th</sup> Asian Cyclodextrin Conference, 28, September, 2013, Bangkok, Thailand.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ :

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004936/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 賢司 (WATANABE, Kenji)

九州大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号 : 90631937