

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350097

研究課題名（和文） 超分子ヘムタンパク質モデルによる二原子分子の捕捉とその医薬品化学への応用

研究課題名（英文） Capture of diatomic molecules by supramolecular heme protein models and application to development to medicinal chemistry

研究代表者

加納 航治 (KANO KOJI)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：60038031

研究成果の概要（和文）：水溶性鉄ポルフィリン(FeTPPS)とパーメチル化β-シクロデキストリン二量体(Py3CD)からなる超分子(hemoCD)をポリアクリル酸や金ナノ粒子へ修飾することにより、糸球体ろ過されないヘモグロビン(Hb)あるいはミオグロビン(Mb)モデルの創製を行った。これらのサイズを大きくしたhemoCDは糸球体ろ過されにくいことを見出し、体内に長く留まるHb/Mbモデルとなることを明らかにした。さらに超分子系の医薬品化学への応用として、hemoCDの高い一酸化炭素捕捉能が、ラット血液中の内因性一酸化炭素除去剤として機能することを見出した。一方、火災時にCO中毒と同時に問題となる青酸の除去にはhemoCDは不向きであったため、新たな青酸イオン除去剤としてIm3CD/Fe(III)TPPS超分子系を開発した。この超分子は血液中の血清タンパク質との相互作用が弱いこと、ヒドロキソコバラミンよりも優れた青酸イオン除去能力を示した。

研究成果の概要（英文）：HemoCD, which is composed of a water-soluble iron porphyrin (FeTPPS) and a per-methylated β-cyclodextrin dimer (Py3CD), was attached to poly(acrylic acid)s or gold nano-particles to inhibit glomerular filtration of hemoCD. These modified hemoCDs, which were regarded as the hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb) models, were not excluded in the urine of a rat, suggesting that the modified hemoCDs stay in the blood for a long time. We also tried to apply the present supramolecular system to medicinal chemistry. At first, the removal of endogenous carbon monoxide of a rat was examined by infusing hemoCD solution into the femoral vein. Injected hemoCD was rapidly excreted in the urine in the form of a carbon monoxide adduct, indicating that hemoCD can be used as an antidote of CO poisoning. Meanwhile, hemoCD was unfavorable for the cyanide poisoning. Then we prepared a supramolecule, Im3CD/Fe(III)TPPS complex, which strongly captured the cyanide anion in a rat's body. Since this cyanide remover did not interact with bovine proteins, the Im3CD/Fe(III)TPPS complex was assumed to be better antidote than hydroxocobalamin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

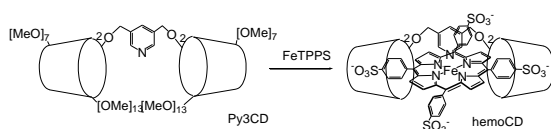
研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：超分子化学・ナノバイオ・ヘムタンパク質

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに水溶性ポルフィリン (Por) の分子会合に関する基礎的な研究を実施してきた。Por は多様な自己会合性とヘテロ会合性を示し、有機溶媒中では生成し得ない分子錯体を容易に与えるという性質があることを明らかにしてきた。この研究と平行し、環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CD) 空洞への包接現象に関する研究も実施しており、この中で CD を構成するグルコピラノースの全ての水酸基を OCH₃ 基に変換したパーメチル化β-CD (TMe-β-CD) が特徴的な包接挙動を示すことを見出した。特にアニオン性 Por である TPPS とは異常に安定な 1:2 TPPS-TMe-β-CD 錯体を形成する。本研究の基本となる実験結果はこの TPPS-TMe-β-CD 包接現象にある。我々はこの事実に基づき、これまで誰もなし得なかった水中で機能するヘモグロビン (Hb) あるいはミオグロビン (Mb) モデル (hemoCD) の構築に成功した。hemoCD は下図に示すように2つのパーメチ



ル化β-CD 単位を、ピリジンを含むリンカーで結合させた Py3CD と、入手容易な Fe^{II}TPPS との複合体である。この組み合わせにより、五配位ポルフィリン鉄(II)錯体の生成を容易にし、かつ、鉄中心をシクロデキストリンの筒で完全にバルク水層から隔離することにより、Fe(II)-O₂ 錯体を水の求核攻撃から防御したことが、水中でも非常に安定 ($t_{1/2} = 30$ 時間) な酸素錯体を形成する世界初の完全人工 Hb (Mb) 機能モデル開発の成功につながった。

2. 研究の目的

hemoCD を人工赤血球として応用するには、分子サイズが小さ過ぎるという大きな問題点がある。体内で酸素を運搬する赤血球のサイズは 7-8 μm とかなり大きい。これにはそれなりの理由があり、糸球体や毛細血管の穴から赤血球が漏れ出ないような赤血球サイズとなっている。それゆえ、hemoCD を人工血液として使用するためには、hemoCD の高分子化がどうしても必要となるため、本研究ではこの問題を解決する研究を実施した。

hemoCD の酸素親和性 ($P_{1/2}$: 酸素レセプター分子の半数が酸素を結合するために要する酸素分圧) は 10 Torr であり、人工血液として使用するには適した親和性を示す。一方、

hemoCD の一酸化炭素親和性は 1.5×10^{-5} Torr であり、天然の Hb の約 100 倍の非常に高い親和性を示す。hemoCD は、おそらくこれまでに知られている CO レセプターの内では最も高い親和性を有するものと思われる。この hemoCD の特徴は人工血液としては好ましくないものである。血管内で酸素を運搬する前に、血中の一酸化炭素と結合してしまうことが予想される。しかし観点を変えれば、一酸化炭素捕捉剤としての応用が大いに期待される。血中の一酸化炭素濃度は、CO 中毒患者を高圧酸素室に入れることで、急激に下げることができる。しかし、一酸化炭素は脂肪や脳細胞に蓄積されるため、その後遺症がきわめて深刻となる。hemoCD は分子サイズが小さく、かつ親水性と疎水性を兼ね備えているため、脂肪や脳細胞に蓄積された一酸化炭素を除去できる可能性がある。本研究では、hemoCD の一酸化炭素中毒解毒剤としての有効性につき、基礎的研究を実施した。

体内ではヘムオキシゲナーゼの作用により、常に一酸化炭素が生産されている。しかし、一酸化炭素の生命化学上の役割についてはほとんど知られていないのが現状である。本研究では、将来 hemoCD を体内の一酸化炭素除去剤として使用することにより、これまでほとんど詳細な研究がなされてこなかった一酸化炭素の生理現象に関する生命化学的研究も実施する。

火災時には、一酸化炭素中毒と同時に、青酸ガス中毒が問題となる。現在は亜硝酸アミル法が我が国では主に用いられているが、この方法はヘモグロビンを犠牲にする方法であるため、火災時の解毒剤としては不向きである。そこで新たな青酸ガス除去剤を、我々の超分子系を用いて開発した。

金属ポルフィリンとシクロデキストリン二量体からなる超分子系は優れたヘムタンパク質モデルとなるので、この系を用いるヘムタンパク質モデル反応の基礎的研究を土台にして、その医薬品化学への展開を実現することを、研究の目的とする。

3. 研究の方法

1) hemoCD の高分子化: ポリアクリル酸に3つのカルボキシル基をペリフェリに有する水溶性 Por をペンダントに結合させ、これと Py3CD との包接錯体を作ることにより、高分子化した hemoCD を合成した。高分子化 hemoCD の合成後、その酸素および一酸化炭素親和性を分光学的に測定した。

2) 金ナノ粒子を基盤とする人工血液の開発: 金ナノ粒子を用いる人工赤血球の研究を行った。金ナノ粒子は種々の有機化合物 (特

にチオール化合物)を強く吸着する性質がある。この性質を応用すると、金ナノ粒子表面にhemoCDを修飾することが可能だと思われる。本研究では、メソ位にメルカプト基を有するポルフィリンを合成し、このものとPy3CDとの包接錯体を用意して、酸素運搬体としての機能を検討した。

3) 一酸化炭素解毒剤としてのhemoCDの評価:hemoCDは天然のHbに比べて約100倍の一酸化炭素親和性を持っている。本研究では、主にラットを用いて、hemoCDの内因性および外因性一酸化炭素除去効果について研究した。

4) 青酸除去剤の開発:hemoCDはFe(II)の錯体であるが、Fe(II)ポルフィリンはシアンアニオンをほとんど結合しない。met-hemoCD(Fe(III)のhemoCD)は血液中に投与すると、生体内の還元剤によりFe(II)のhemoCDとなり、シアンアニオン除去剤としては不向きであった。本研究では、新たな超分子青酸解毒剤を見出し、その機能を、ラットを用いて検証した。

4. 研究成果

我々はこれまでに鉄(II)ポルフィリン(Fe(II)TPPS)をシクロデキストリン二量体で包接したhemoCDが水中においても安定な酸素付加体を形成し、ヘモグロビン代替物質として使えるということを主張してきた。しかし、ラットの静脈に注入されたhemoCDは比較的速やかに尿中に排泄されてしまう。そこで本研究においてはhemoCDを高分子化することを試みた。まずポリアクリル酸(PAA)にアミド結合でhemoCDを化学結合させその酸素錯体につき検討した。hemoCDと同様に高分子化hemoCDも酸素および一酸化炭素を結合した。しかし、酸素錯体の安定性はかなり低下することが分かった。高分子鎖にhemoCDが濃縮されるために、hemoCD酸素付加体の自己触媒的自動酸化が進行し、hemoCDをmet体へと不活性化することが酸素付加体の安定性の低下の原因であることを明らかにした。この自動酸化はカタラーゼで抑制できた。一方、当初の目的通りPAAに結合させたhemoCDは糸球体ろ過されにくかった。この研究では生体内成分と相互作用しにくく、かつ細胞膜透過性の全くないPAAに酸素運搬体を化学結合させたことにより、糸球体ろ過や血管壁からの漏出の少ないHbモデルを創製できた。このことは人工血液の開発に1つの方向性を与えるものであり、その意義は大きいと言える。

次に、金ナノ粒子にhemoCDを化学結合させる試みを実施した。チオール基を側鎖に持つhemoCDを合成し、それを金ナノ粒子に化学結合させた。同時に生体適合性を向上させるためにポリエチレングリコール(PEG)も

チオール化して金ナノ粒子に同時に結合させた。hemoCD金ナノ粒子も酸素および一酸化炭素を捕捉するが、酸素付加体の安定性は著しく低下した。高分子化hemoCDと同様にhemoCDの局所濃度の増大による酸素付加体の自己触媒的自動酸化が進行し、酸素付加体の不安定化をもたらしたと思われる。この金ナノ粒子をラットに静注すると、hemoCDは全く尿中には排泄されなくなった。しかしラット組織を取り出し、組織中の金ナノ粒子の濃度をICP発光分光分析法で決定したところ、金ナノ粒子は血中に留まるよりも肝臓や脾臓等の臓器に蓄積されることが明らかになった。今後は金ナノ粒子の粒径と血液からのもれについてさらに詳細な研究が必要と思われる。最近、金ナノ粒子が生体適合性材料として注目されているが、本研究結果は、金ナノ粒子のin vivoでの利用はかなり限定されるものであることを示すものであり、多分野の今後の研究開発指針に貴重な情報を提供するものである。

PAAや金ナノ粒子に結合させたhemoCDには、その酸素付加体の自動酸化による不安定化や、血流に留まるよりも臓器に蓄積されるという欠点があることが分かった。そこでPEG化した水溶性鉄ポルフィリンを合成し、そのPy3CD錯体(PEG-hemoCD)について、その酸素結合挙動を検討した。PEG-hemoCDはhemoCD単独とほぼ同じ挙動を示した。酸素親和性は逆にhemoCDよりも高くなった。ただし、高分子量のPEGを結合させても血中滞在時間が僅かに延長された。PAAや金ナノ粒子への修飾とは異なり、hemoCDの性質はPEG化によりほとんど変わらないという特徴は非常に貴重であり、今後、目的に応じた超分子の創製の基礎概念として使うことができる。

hemoCDの化学修飾による血中滞留時間の延長の検討と並行して、hemoCDによる一酸化炭素(CO)捕捉に関する研究も行った。hemoCDはHbよりも約100倍のCO親和性を有している。この特徴を利用すると外因性(火災等)の一酸化炭素中毒解毒剤の開発や内因性COの生体シグナリングの研究用ツールとしての応用が可能となる。そこで、hemoCDの酸素錯体をラットの静脈に注入し、排出される尿の分析を分光学的に行った。その結果、注入された70%前後のhemoCDは内因性一酸化炭素を捕捉して尿中に排出されることが分かった。勿論、外因性COも捕捉するため、新たなCO除去剤としての利用の可能性が示された。この研究から、新しい一酸化炭素除去剤が開発されたという意義以外に、現在非常に注目されているCOの生体シグナリング用の研究ツールを世界に提供できたという意義は極めて大きい。

hemoCDは基本的にHbやMbと同じ機能

を發揮するため、人工の酸素運搬体や一酸化炭素除去剤としての作用があることが分かっている。本研究では新たに、青酸中毒解毒作用のある超分子の開発を試みた。青酸アニオン(CN⁻)は鉄(III)ポルフィリンに結合する性質がある。そのため我が国では、青酸中毒解毒は、Hbを亜硝酸アミルで一部酸化してFe(III)のmet-Hbとし、この酸化型Hbへの青酸アニオンの配位を利用して行っている。しかしこの方法は大きな危険性を含んでおり望ましい方法とは言えない。一方、ヒドロキソコバラミン(ビタミンB₁₂)を用いる方法も開発されている。我々は、まずmet-hemoCDと青酸アニオンとの結合について詳細に検討した。フラスコ内ではmet-hemoCDはCN⁻と強く結合するが、ラットの血液中にはmet-hemoCDは生体内にある還元剤によりhemoCDとなりCN⁻結合能が消失し、代わって内因性一酸化炭素を捕捉して尿中に排出されることが明らかとなった。そこで、新たなCN⁻捕捉超分子として、イミダゾールをリンカー中央部に有し、2つのシクロデキストリン単位がアミド結合で結ばれたシクロデキストリン二量体(Im3CD)のFe(III)TPPS錯体を用いた。この超分子は血液中でも還元されず、かつCN⁻結合能はmet-hemoCDよりも優れていた。ビタミンB₁₂は解毒剤として血中に投与されると血清タンパク質に取り込まれCN⁻結合能が著しく減少するが、Fe(III)TPPS/Im3CDの血清タンパク質との結合は非常に弱く、血液中でもCN⁻捕捉能の著しい低下は認められなかった。さらに、CN⁻を捕捉したFe(III)TPPS/Im3CD錯体は速やかに尿中へ排出されるため、血清タンパク質と結合することにより長時間体内に留まるビタミンB₁₂よりも、解毒剤としての優れた性能を保有していることが分かった。火災時には一酸化炭素中毒と同時に青酸ガス中毒も患うことになる。我々が開発したhemoCDとIm3CD/Fe(III)TPPS錯体の2つの超分子を同時に注入すると、体内でそれぞれCOおよびCN⁻に結合し、これらの2種の毒を解毒する効果が期待される。化学の基礎的研究が医薬品化学へ応用できた貴重な例であり、学術および応用の両面から、その意義は高く評価されるものと思われる。

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 14 件)

- ① K. Kano, S. Chimoto, M. Tamaki, Y. Itoh, H. Kitagishi, Supramolecular dioxygen receptors composed of an anionic water-soluble porphyrinatoiron(II) and cyclodextrin dimers, 査読有, Dalton Trans.,

Vol. 41, 2012, 453-461.

- ② K. Watanabe, H. Kitagishi, K. Kano, Supramolecular Ferric Porphyrins as Cyanide Receptors in Aqueous Solution, ACS Med. Chem. Lett., 査読有, Vol. 2, 2011, 943-947.
- ③ K. Kano, T. Ochi, S. Okunaka, Y. Ota, K. Karasugi, T. Ueda, H. Kitagishi, Preparation and Function of Poly(acrylic acid)s Modified by Supramolecular Complex Composed of Porphinatoiron and a Cyclodextrin Dimer That Binds Diatomic Molecules (O₂ and CO) in Aqueous Solution, Chem. Asian J., Vol. 6, 2011, 査読有, 2946-2955.
- ④ K. Karasugi, H. Kitagishi, K. Kano, Gold Nanoparticles Carrying Diatomic Molecules (O₂ and CO) in Aqueous Solution, Chem. Asian J., 査読有, Vol. 6, 2011, 825-833.
- ⑤ K. Watanabe, K. Kano, Time-Dependent Enzyme Activity Dominated by Dissociation of J-Aggregates Bound to Protein Surface, Bioconjugate Chemistry, 査読有, Vol. 21, 2010, 2332-2338.
- ⑥ H. Kitagishi, M. Tamaki, T. Ueda, S. Hirota, T. Ohta, Y. Naruta, K. Kano, Oxoferryl Porphyrin/Hydrogen Peroxide System Whose Behavior is Equivalent to Hydroperoxoferric Porphyrin, J. Am. Chem. Soc., 査読有, Vol. 132, 2010, 16730-16732.
- ⑦ H. Kitagishi, S. Negi, A. Kiriya, A. Honbo, Y. Sugiura, A. T. Kawaguchi, K. Kano, A Diatomic Molecule Receptor That Removes CO in a Living Organism, Angew. Chem. Int. Ed. 査読有, Vol. 49, 2010, 1312-1315.
- ⑧ K. Kano, H. Kitagishi, HemoCD as an artificial oxygen carrier: oxygen binding and autoxidation, Artif. Organs, 査読有, Vol. 33, 2009, 177-182.

[学会発表] (計 56 件)

- ① K. Kano, Cyclodextrin/iron porphyrin supramolecules as heme protein models, II European Conference on Cyclodextrins, Asti, Italy, October 4, 2011. (Plenary)
- ② K. Kano, H. Kitagishi, T. Ueda, T. Ohta, Y. Naruta, Reactions of Ferric Porphyrin Encapsulated by Cyclodextrin Dimers with Hydrogen Peroxide, International Symposium on Activation of Dioxygen and Homogeneous Catalytic Oxidation, Okinawa, July 5, 2011 (Invited)
- ③ K. Kano, H. Kitagishi, Unique properties of heme-protein models composed of iron porphyrins and cyclodextrin dimers,

Pacificchem, Honolulu, December 17, 2010 (Invited)

- ④ K. Kano, H. Kitagishi, M. Tamaki, T. Ueda, S. Hirota, T. Ohta, Y. Naruta, Alkylperoxo- and Hydroperoxo-Ferric Porphyrins in Aqueous Solution, Sixth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP6), New Mexico, July 6, 2010 (Invited)
- ⑤ K. Kano, What can we do if intramolecular hydrogen bonding of a cyclodextrin is eliminated?, 10th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, Florianopolis, Brazil, October 14, 2009 (Plenary).

〔図書〕(計1件)

- ① 加納航治、三共出版、基本有機化学、2009年12月1日、318頁

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：一酸化炭素除去剤
発明者：加納航治ら
権利者：学校法人同志社
種類：特許
番号：13/218,100
出願年月日：2011年8月25日
国内外の別：国外

○取得状況(計1件)

名称：人工血液酸素輸液
発明者：加納航治・北岸宏亮
権利者：学校法人同志社
種類：特許
番号：特願2004-181125
取得年月日：2011年8月19日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.doshisha.ac.jp/~kkano/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加納 航治 (KANO KOJI)
同志社大学・理工学部・教授
研究者番号：60038031

(2)研究分担者

根木 滋 (NEGI SHIGERU)
同志社女子大学・薬学部・助手
研究者番号：50378866
(H21のみ)

川口 章 (KAWAGUCHI AKIRA)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30195052

(H21のみ)

(3)連携研究者

なし