

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460031

研究課題名(和文) 酸素運搬能の高いミオグロビンによる人工酸素運搬体の創出

研究課題名(英文) Creation of efficient artificial oxygen carriers based on the myoglobin exhibiting high-oxygen deliverability.

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：10156169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：人工血液は血液型や感染症の問題がなく、長期間の保存ができる。本申請では、今まで顧みられることが少なかった、ヘモグロビン類似物質であるミオグロビンを利用した人工酸素運搬体の開発を目的とした。成果の骨子は、酸素結合部位にある鉄ポルフィリンの骨格構造を変換してミオグロビンの酸素親和性を適度に下げたこと、ヘム中心金属を鉄からコバルトにした人工ミオグロビンをつくり酸素結合特性を調べたこと、および人工ヘムで再構成したミオグロビンを赤血球膜を模した有機ナノチューブに封入した超分子複合体を開発したことである。これらを追求する過程で、溶液のpHなどの浮かび上がる問題点も検討した。

研究成果の概要(英文)：Artificial blood is free from the blood-type and infection disease, and stored in long period. In our research we attempted the preparation of a hemoglobin-like blood-substitute based on myoglobin which has been scarcely developed as the oxygen carrier. The main results of our research are as follows. First, we could reduce the high oxygen affinity of myoglobin using the skeletal modification of iron porphyrin. Second, the influence of metal substitution of central iron in porphyrin to cobalt was found very effective to lower the oxygen affinity of myoglobin. Third, we have developed the method to make complex of the artificial myoglobins with the organic nanotubes. In the series of experiments, we found the critical problems to be improved, and pointed out the method to improve the technical problems. These critical points include the solvent pH, ionic strength, and temperature of the incubation to prepare the sealed myoglobin.

研究分野：薬品物理化学

キーワード：人工酸素運搬体 ミオグロビン 人工ヘム コバルトイオン 有機ナノチューブ 鉄原子

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、わが国では急速な少子化による若年層減少のため、献血者が減り続けている。一方で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。献血血液の保存期間は3週間と短く、血液型不適合や感染リスクの問題もある。最近では、大規模災害時に予想される輸血液の大量需要への懸念から、臨床応用可能な人工酸素運搬体の創製がますます期待されている。輸血不足問題を解決する切り札が人工酸素運搬体である。

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。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で開催された米国食品医薬局FDAの報告「Workshop on hemoglobin-based oxygen carriers」によると、化学修飾ヘモグロビンには血管収縮、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模索する動きが高まっている。

(2) 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。ところが、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、動物筋肉から廉価で大量精製が可能である。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する場合でも、発現量は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が、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並みに低下することを報告してきた(引用文献)。

一連の結果は、天然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事実を示し、廉価で新規酸素運搬物質の創出に向けて新たな手掛かり与えるものである。本申請はこの考えを発展させた内容で、申請者はコバ

ルトヘムを用いて予備検討を重ねてきた(引用文献)。その結果、再構成ミオグロビンの酸素放出能は大きく酸素運搬体になる見込みがあると判明した。

ミオグロビンに酸素運搬能を付与した人工酸素運搬物質は世界的に見ても報告例が稀有である。さらに、今回の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も新規である。カプセル化ミオグロビンは体内動態を大きく改善すると予想され、赤血球と同様の機能をもつ人工酸素運搬体が生まれる可能性が大きい。

2. 研究の目的

(1) **酸素運搬能を高める工夫；コバルトヘムの利用** ミオグロビンのヘム鉄をコバルト Co に置換できることが知られている(図1)。しかし、酸化型 Co(III)ヘムをもつミオグロビンではその配位構造は不明であった。最近、申請者は配位子結合の速度論解析から、第6配位座に水分子があることをつきとめた(引用文献)。一方、還元型 Co(II)をもつミオグロビンの酸素親和性は低く、酸素運搬能力を持たせることが見込める。

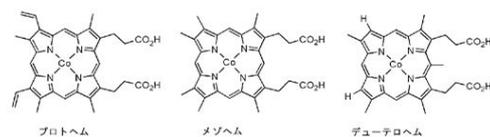


図1 さまざまな電子求引置換基をもつコバルトポルフィリン類の分子構造

申請研究では、Co(II)ミオグロビンを人工酸素運搬物質として実用化するために、酸素結合能に対するヘム置換基効果、自動酸化速度の測定、有機ナノチューブとの複合化による総合的機能評価を行う。

(2) 化学修飾ヘムによる酸素親和性制御

ミオグロビンに電子求引性置換基を導入した人工ヘムを入れ、その影響が酸素親和性に及ぼす効果を調べる。

(3) 有機ナノチューブによる超分子構造作成

研究の第3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可能性がある。しかし、既報の文献には合成法の詳細が明記されず、動物実験に利用できるだけの大量合成法を行う。

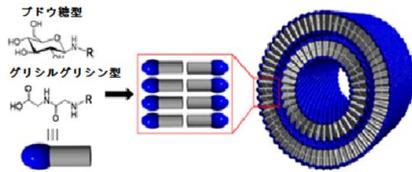


図2 有機ナノチューブの分子構造

(4) 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する。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解析する。この実験は、小動物の取り扱いに慣れた東海大学医学部教授の川口 章博士（連携研究者）と共同で実施する。

3. 研究の方法

ミオグロビンは酸素親和力が強く、酸素を放出しにくいいため、今まで酸素運搬物質として利用されなかった。ミオグロビンの酸素親和性を低下させるために次の方法を設定した。第1に、活性中心に酸素親和性を低めるコバルトイオンを組み込み、酸素放出能を向上させる。第2に、ヘム周辺置換基により、コバルトの電子構造を変える。第3に、体内滞留性向上と腎臓・肝臓への毒性を解消するため、有機ナノチューブとよばれるペプチド性脂質からなる分子容器にミオグロビンを封入した超分子複合体を設計する。

具体的な方法は次のとおりである。

(1) **コバルトヘム類の合成** コバルトイオン錯体の酸素親和性は、対応する鉄イオン錯体に比べて低い。そこで、ミオグロビンの高すぎる酸素親和性を下げるためには、天然ヘムの鉄原子をコバルト原子に入れ替える。使用するヘムを図1に示したプロトヘム、メソヘム、デューテロヘムである。これらのヘムの2,4位にあるビニル基、エチル基、水素原子は電子求引性が異なる。ヘム置換基の電子求引性はヘム中心金属に波及し、究極的にはコバルトミオグロビンの酸素親和性を制御できる可能性がある。

(2) **再構成コバルトミオグロビンの機能測定とNMRでの構造解析** コバルト置換ミオグロビンの酸素親和性はすでに報告されている。しかし、使われたミオグロビンはクジラ由来のものである。最近捕鯨禁止のため、クジラミオグロビンは市販されず、ウマ由来のものしか入手できない。ウマとクジラでは一次構造が違うため、酸素親和性も異なると思われる。そのため、ウマミオグロビンの酸素親和性を測定する必要がある。反応速度定数測定は、ストップフロー装置を利用する。

(3) **ミオグロビンのヘム-グロビン相互作用の改変**

ヘムの周辺置換基を化学修飾した誘体分子を合成し、ミオグロビンの酸素親和性や分光学的特性に与える効果を解明する。

(4) 有機ナノチューブの大量合成

動物に投与したミオグロビンは腎臓や肝臓に集積して、代謝され排泄される。過剰なミオグロビン集積はこれらの臓器の機能を大きく低下させる。ミオグロビンを体内で安定に存在させるためミオグロビンを分子カプセルに封入する。その分子カプセルとなる有機ナノチューブを合成する(図2)。しかし、既報文献(引用文献)には合成法詳細が記述されていない。そのためは、合成方法の検討が必要である。有機ナノチューブの素材としては、グルコースのアミン誘導体であるアミノグルコースと長鎖脂肪酸であるオレイン酸を結合したN-グリコシド型糖脂質、グリシルグリシンとラウリル酸を結合したアミノ酸型脂質、およびグリシルグリシンとミスチリン酸を結合したアミノ酸型脂質の3種類を合成する。脂質の原料であるグリシルグリシンとアミノグルコースはグリシンとグルコースから誘導する。合成した3種類のナノチューブの分子形状を走査型および透過型電子顕微鏡により観察し、合成試料の確認を行う。

(5) 有機ナノチューブへのミオグロビン封入条件の確立

有機ナノチューブは内径50-100 nmの大きさなのでミオグロビン分子(直径約3から4 nm)を取り込める。しかしミオグロビンを封入した報告例はなく、実験条件は不明である。申請者は天然ミオグロビンを用いて、pH、温度、イオン強度、タンパク質とナノチューブの物質質量比率などの詳細な予備検討を行う。3種類の有機ナノチューブに封入して封入効率を比較検討する。

(6) 有機ナノチューブ封入ミオグロビンの安定性と機能の解析

3種類の有機ナノチューブに酸素運搬能を高めた人工ミオグロビンを封入する。封入したミオグロビンの酸素および一酸化炭素の結合能を光吸収スペクトル変化から求める。また、ストップフロー装置を用いて、配位子の結合速度と解離速度を調べる。カプセル中のミオグロビンの熱や光に対する影響を評価して長期保存での安定性を調べる。温度は10-40℃、光源は200ワット紫外線ランプで、照射時間10-180分間の範囲を予定。吸光度法による濁度測定をする。さらに、カプセル化ミオグロビンの生体への適合性と人工血液としての性能を評価するため、マウスへの投与を行う。投与後の脈拍、血圧変化の他に体内滞留時間、腎臓と肝臓への集積性を調べる。

4. 研究成果

(1) コバルトヘムを含んだミオグロビンの機能評価

まず、酸化型コバルトイオンCo(III)を含むミオグロビンの性質を予備試験として解析した。従来、このミオグロビンには青酸イオン、アジドイオン、イミダゾール等の低分子配位子が結合しないと考えられていた。しか

し、私たちはきわめて遅い結合過程が存在することを示した。また、これらの配位子の結合定数がかかなり大きいことを速度論的解析から明らかにした。

さらに、還元型コバルトイオン Co(II)を含むミオグロビンについて、酸素親和性を比較したところ、酸素親和力は 20-50 mmHg の範囲にあり、プロトヘム、メソヘム、デューテロヘムをもつミオグロビンに十分な酸素放出能があることが判明した。(引用文献)

(2)ヘム分子形の考察 ヘムの分子形を改変してミオグロビン内部でのヘム-グロビン相互作用を改変する試みを行った。具体的には、ヘムのプロピオン酸基の長さを人為的に短くした人工ヘムをつくりミオグロビンに組み込んだ。その結果、従来は全く考慮されてこなかったプロピオン酸基とグロビンの相互作用が、ミオグロビンの円二色性を誘起する重要因子であることが明らかにされた。(引用文献)

(3)ヘム-グロビン相互作用評価 ヘムとグロビンの原子間接触を改変するために、ミオグロビン内部で鉄-ヒスチジン結合軸まわりに回転する人工ヘムをつくりミオグロビンと結合させた。ヘムの回転速度は毎秒 1000 回余りと速かったが、ミオグロビンの立体構造は天然のものと同様であった。また、酸素親和性とヘム回転運動との明確な相関関係は見られなかった。(引用文献)

(4)ミオグロビンの有機ナノチューブへの取り込み評価 図 2 に示した有機ナノチューブの大量合成に成功した。これを pH 7 の 100 mM リン酸緩衝溶液に懸濁させ(10 mg/ 5 mL)、ミオグロビン 10 mg を加えて一晩低温でかくはんした。その後、ナノチューブを遠心分離器で沈殿させ、同一緩衝液で洗浄した。ナノチューブ懸濁液を分光光度計で測定して、ミオグロビンの取り込み量を見積もった。当初は、赤血球類似の濃い赤色を期待したが、有機ナノチューブのミオグロビンによる赤色の着色度は低かった。ミオグロビン濃度は懸濁液中で 10-20 μM と見積もられた。そこで、72 時間の低温かくはんを行うと、ミオグロビンの取り込み率は 3-4 倍向上することが判明した。

(5)有機ナノチューブに組み込んだミオグロビンのマウスへの投与実験 ミオグロビンを取り込んだ有機ナノチューブ(比較的赤色の濃いもの)に還元酵素系を加えて、酸素結合能のある状態にした。脱血(20 mL)したマウスの尾静脈から 5 mL の生理食塩水に懸濁したナノチューブ・ミオグロビン複合体を投与した。その後、心拍数と血圧の変化を調べた。心拍数は 1.3 倍余り増加し、血圧は 1.2 倍余りも上昇した。これらの予備検討結果から、マウスへの投与は予想外の生理的影響をもたらすと判断した。一方、肝臓への有意な集積は見られなかった。

一連のマウスへの投与実験から、有機ナノ

チューブへのミオグロビン取り込み率を、pH やイオン強度の検討から、さらに向上させる必要があるとの指摘を連携研究者から受けた。さらに、有機ナノチューブを使うのではなく、ミオグロビン表面のポリエチレングリコールなどによる化学修飾で、体内動態を改善する従来法の応用も可能ではないかとの議論も行った。

<引用文献>

- Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 345
Inorg. Chem. **2005**, 45, 4238;
Artificial Organs **2009**, 33, 189
Artificial Organs **2012**, 36, 220
Molecules **2013**, 18, 3168
Inorg. Chem. **2013**, 52, 7387.
J. Ploy. Sci. **2006**, 44, 5137.
Artificial Organs **2014**, 38, 715-719
J. Phys. Chem. B. **2015**, 119, 1275-1287.
Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics **2016**, 1857, 582-588.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 15 件)

T. Shibata, Y. Kanai, R. Nishimura, L. Xu., Y. Moritaka, A. Suzuki, S. Neya, M. Nakamura, and T. Yamamoto. "Characterization of Ground State Electron Configurations of High-Spin Quintet Ferrous Heme Iron in Deoxy Myoglobin Reconstituted with Trifluoromethyl Group-Substituted Heme Cofactors"
Inorg. Chem. **2016**, 55, 12128-12136.

S. Neya, M. Nagai, S. Nagatomo, T. Hoshino, T. Yoneda, and A.T. Kawaguchi. "Utility of Heme Analogues to Intentionally Modify Heme-Globin Interactions in Myoglobin"
Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics **2016**, 1857, 582-588.

Neaya, T. Yoneda, T. Hoshino, A. T. Kawaguchi, and M. Suzuki. "Synthesis of Type III Isomers of Diacetyldeutero-, Hemato-, and Protoporphyrins with the Use of Knorr's Pyrrole"
Tetrahedron **2016**, 72, 4022-4026.

M. Suzuki, S. Neya, and Y. Nishigaichi. "Synthesis of 5,10-Bistrifluoromethyl Substituted β -Octamethylporphyrin and Central-metal Dependent Solvolysis of Their *meso*-Trifluoromethyl Groups."
Molecules **2016**, 21, 52/1-52/8.

Y. Kanai, R. Nishimura, K. Nishiyama, T. Shibata, S. Yanagisawa, T. Ogura, T. Matsuo, S. Hirota, S. Neya, A. Suzuki, and Y. Yamamoto. "Effects of Heme Electronic Structure and Distal Polar Interaction on Functional and Vibrational Properties of Myoglobin"
Inorg. Chem. **2016**, 55, 1613-1622.

Y. Yamamoto, M. Kinoshita, Y. Katahira, H. Shimizu, Y. Di, T. Shibata, H. Tai, A. Suzuki, and S. Neya. "Characterization of Heme-DNA Complex Composed of Some Chemically

Modified Hemes and Parallel G-quadruplex DNAs.” *Biochemistry* **2015**, *54*, 7168-7177.

S. Neya, M. Suzuki, T. Mochizuki, T. Hoshino, and A. T. Kawaguchi. “Porphyrinoid Aromaticity Induced by the Interaction between Oxidized and Reduced Pyridine Subunits” *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 3824-3829.

M. Nagai, C. Kobayashi, Y. Nagai, K. Imai, N. Mizusawa, H. Sakurai, S. Neya, M. Kayanuma, M. Shoji, and S. Nagatomo. “Involvement of Propionate Side Chains of the Heme in Circular Dichroism of Myoglobin: Experimental and Theoretical Analyses”

J. Phys. Chem. B **2015**, *119*, 1275-1287.

M. Suzuki, S. Ishii, T. Hoshino, and S. Neya. “Synthesis of Highly Distorted *meso*-Trifluoromethyl-Substituted β -Octaalkylporphyrins” *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 1563-1565.

R. Nishimura, D. Matsumoto, T. Shibata, I. Ishigami, T. Ogura, H. Tai, T. Matsuo, S. Hirota, S. Neya, A. Suzuki, and Y. Yamamoto. “Electric Control of Ligand Binding Preference in a Myoglobin Mutant”

Inorg. Chem. **2014**, *53*, 9156-9165.

S. Neya, T. Yonetani, and A. T. Kawaguchi. “Usefulness of the Myoglobin Containing Cobalt Heme Cofactor in Designing Myoglobin-Based Artificial Oxygen Carrier”

Artificial Organs **2014**, *38*, 715-719.

M. Suzuki, T. Hoshino, and S. Neya. “Skeletal Recombination Reaction of *N*-Fused Pentaphyrin(1,1,1,1,1) via Bromination”

Org. Lett. **2014**, *16*, 327-329.

Nishimura, T. Shibata, I. Ishigami, T. Ogura, H. Tai, S. Nagao, T. Matsuo, S. Hirota, O. Shoji, Y. Watanabe, K. Imai, S. Neya, A. Suzuki, and Y. Yamamoto. “Electronic Control of Discrimination between O₂ and CO in Myoglobin Lacking Distal Histidine Residue”

Inorg. Chem. **2014**, *53*, 1091-1099.

M. Nagai, Y. Nagai, K. Imai, and S. Neya. “Circular Dichroism of Hemoglobin and Myoglobin” *Chirality* **2014**, *26*, 78-82.

Nishimura, T. Shibata, H. Tai, I. Ishigami, S. Yanagisawa, T. Ogura, S. Neya, A. Suzuki, and Y. Yamamoto. “Effect of the Electron Density of the Heme Fe atom on the Fe-Histidine Coordination Bond in Deoxy Myoglobin”

Bull. Chem. Soc. Jpn. **2014**, *87*, 905-911.

〔学会発表〕(計 7 件)

根矢 三郎。第 24 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム。2014/6/14-15 京都市。「ミオグロビンの酸素結合を支配するヘム構造因子の解明 人工酸素運搬体への応用」

S. Neya, T. Hoshino, and M. Suzuki. 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines. 2014/6/22-27 Istanbul, Turkey “Porphyrin with a terpyridine coordination unit as the imaging probe for SPECT ”

根矢三郎、川口章、Takashi Yonetani.

第 21 回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 東京。「ミオグロビンを用いた人工酸素運搬体の開発戦略」

根矢三郎・鈴木優章・星野忠次。日本薬学会第 135 回年会 2015/03/25-28、神戸市。「人工酸素運搬体への応用をめざす環拡張ポルフィリノイド」

S. Neya, M. Suzuki, and T. Hoshino. 第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム。2015/05/30-31、長崎市。“Synthesis and Application of Novel Aromatic Porphyrinoid with Oxidized and Reduced Pyridine Rings”

S. Neya, A. T. Kawaguchi, and T. Yonetani. The 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry. 2015/07/20-24 Beijing, China. “Evaluation of myoglobin containing Co(II) or Co(III) heme to design myoglobin-based artificial oxygen carrier”

S. Neya, and A. T. Kawaguchi. 第 8 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム 2016/01/21-22. 大阪市. “Design of heme-protein interactions in myoglobin to develop myoglobin-based artificial oxygen carriers.”

〔図書〕(計 1 件)

根矢三郎 「クライトン生物無機化学」(塩谷光彦監訳)(2016) 東京化学同人、東京。第 22 章を翻訳担当

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bukka/>

6 . 研究組織

(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

(2) 連携研究者：

川口 章 (KAWAGUCHI, Akira T.)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：3 0 1 9 5 0 5 2