Synthesis of Reconstituted Hemoglobins Containing Metalloporphyrin Derivatives and SOD Activity

Makoto YUASA^{1,2*}, Aritomo YAMAGUCHI¹, Satoshi MIKAMI¹,
Uichi MIDORIKAWA¹, Yoshihiro KAWAKAMI³ and Shoji NAGAOKA³

¹ Department of Pure and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science
(2641 Yamazaki, Noda 278-8510, JAPAN)

² Institute of Colloid and Interface Science, Tokyo University of Science
(1-3 Kagurazaka, Shinjyuku, Tokyo 162-8601, JAPAN)

³ Department of Applied Chemistry, Tokyo Metropolitan University
(1-1 Minami-osawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, JAPAN)

Edited by H. Shimasaki, Teikyo Univ., and accepted November 14, 2002 (received for review October 8, 2002)

Abstract: To establish a method for the effective mimicking superoxide dismutase (SOD) which accerelate scavenging of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), reconstituted hemoglobins each possessing the apoprotein of hemoglobins as carriers and various metalloporphyrins as active sites were synthesized and their SOD activity was determined in each case. The hemoglobins containing iron- and manganese-protoporphyrin IX (**2–4**) had no significant SOD activity but did so when containing cationic iron- and manganese-porphyrins (**5–7**). Minimum IC_{50} as indicator of SOD activity was 1.8. t_d as indicator of hydrogen peroxide resistance was always nearly 10 times that cationic metalloporphyrins as an SOD mimic. The reconstituted hemoglobins with cationic metalloporphyrins (**5–7**) are shown by the present results to be potentially capable of functioning as SOD mimics.

Key words: superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutase (SOD) activity, SOD mimic, reconstituted hemoglobin, cationic metalloporphyrin

1 緒 言

生体においてスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) のような活性酸素種は生命機構を支える不可欠な因子として機能しており、また、過剰な活性酸素種の生成に対してはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ等のラジカル消去系酵素を備えることによりバランスを保っている。しかしながら、生体内で活性酸素種の生成と消去の恒常性が崩れて酸化ストレス状態になると、大量の活性酸素種が生成されて強いラジカル毒性が生じ、引いては、炎症疾患、神経疾患、動脈硬化、

癌、糖尿病、虚血再灌流障害、加齢促進等の多くの病態に陥るとも考えられている (1, 2)。このため、生体内の過剰な活性酸素種の消去や代謝を促進する検討が必要となる。最近、このような検討の一つとして、 $O_2^{\cdot-}$ の消去・代謝反応 [(1) 式] を促進する SOD モデル化合物や SOD 様抗酸化剤の検討が行われている (2–12)。特に、生体内に存在するヘムタンパク質の活性部位 (ヘム) である金属ポルフィリンの低分子系や高分子系の化合物による検討が行われている (3–5, 10, 12)。本報では、生体適合性を踏まえた新規な SOD モデル化合物の検討として、ヘモグロビン (**Fig. 1, 1**) のアポタンパク質 (4 個のグロビン鎖ユニットの集合体)

*Correspondence to: Makoto YUASA, Department of Pure and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda 278-8510, JAPAN
E-mail: yuasa@ci.noda.sut.ac.jp

を担体とし、その活性部位を SOD 活性を有する金属ポルフィリン誘導体に置き換えた再構成ヘモグロビン (**Fig. 1, 2 ~ 7**) を各種合成し、それらについて SOD 活性等の機能評価を行った。

2 実 験

2.1 試料

活性部位となる鉄 {5, 10, 15, 20-テトラキス (2-N-メチルピリジル) ポルフィリン} (FeT2MPyP), マンガン {5, 10, 15, 20-テトラキス (2-N-メチルピリジル) ポルフィリン} (MnT2MPyP) およびマンガン {5, 10, 15, 20-テトラ

キス (4-N-メチルピリジル) ポルフィリン} (MnT4MPyP) は、既報 (13-17) を参考に合成した。鉄プロトポルフィリン IX (FePPIX) およびマンガンプロトポルフィリン IX (MnPPIX) は、市販品特級のプロトポルフィリン IX (和光純薬工業) に、各々、鉄イオンおよびマンガニオンを導入して合成した (16, 17)。なお、これらの化合物の構造確認は、 ^1H -NMR, FAB-Mass, UV-vis 等より行った。

ヘモグロビン (**1**) として成人ヒトヘモグロビン [ヘモグロビン A, 和光純薬工業] を使用した。

他の試薬は市販品特級および純水はイオン交換水を使用した。

Abbreviation	P_α	P_β
<u>1</u>	FePPIX	FePPIX
<u>2</u>	FePPIX	MnPPIX
<u>3</u>	MnPPIX	FePPIX
<u>4</u>	MnPPIX	MnPPIX
<u>5</u>	FeT2MPyP	FeT2MPyP
<u>6</u>	MnT2MPyP	MnT2MPyP
<u>7</u>	MnT4MPyP	MnT4MPyP

Fig. 1 Hemoglobin (**1**) and Various Reconstituted Hemoglobins (**2** to **7**). P_α and P_β are active sites of α - and β -subunits, respectively. MPPIX, MT2MPyP and MT4MPyP are metalloprotoporphyrin IX, metallo{5, 10, 15, 20-tetrakis (2-N-methylpyridyl)porphyrin} and metallo{5, 10, 15, 20-tetrakis (4-N-methylpyridyl)porphyrin}, respectively {M are iron (Fe) and manganese (Mn)}. **1** is hemoglobin (referred sample).

2.2 再構成ヘモグロビンの合成

Fig. 1 に示した 6 種類の再構成ヘモグロビン (**2** ~ **7**) は既報 (18-25) を参考に合成した (**Fig. 2**)。

2.2.1 **2** および **3** の合成

(1) **2** の合成

(I-①) 常圧, 5℃以下の条件において, 酸素化したヘモグロビン [**1g**, UV-vis: 吸収極大 ($\lambda_{\max}$) 413, 540, 576 nm] の 10% 水溶液 (10 ml) に 20 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (1 ml) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (0.15 ml) を加えた後, p-クロロ水銀安息香酸ナトリウム (50 mg) が飽和した塩化ナトリウム水溶液を加えた。さらに, この水溶液に 1M 酢酸水溶液を加えて pH 5.8 に調整し, 常圧, 5℃以下で一晩放置した。次に, この水溶液を透析 [Viskase Sales Corp (VSC), Seamless Cellulose Tubing (SCT) UC8-32-25 / pH 7.4, 50 mM リン酸緩衝水溶液 / 12 時間] し, 変性物をろ過して α - および β -サブユニットを含む水溶液を得た。 α - および β -サブユニットを等電点電気泳動法 (BIO-RAD, 分取用電気泳動装置ロトフォア) により単離, 精製した。具体的には, 上記の α - および β -サブユニットを含む水溶液に pH 勾配 (pH 5.8 ~ 8.2) を形成する両性担体の水溶液 (2 ml) を加え, さらに, 純水を加えて全量を 58 ml とした。この水溶液を 1200 W で 4 時間, 電気泳動した。均一であった水溶液は二つの領域に分かれ, α -サブユニット (pH 7.2 ~ 7.3) および β -サブユニット (pH 6.4 ~ 6.8) を分取し, 透析 (12 時間) を

行ってこれらを得た (α -サブユニット 25% および β -サブユニット 15%)。

(I-②) β -サブユニットを含む pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液に 1N 塩酸を加えて pH を 2.3 ~ 2.5 に調整した後, 2-ブタノンを加えて分液漏斗で抽出した。水層 (下層) にアポ化した β -サブユニットおよび 2-ブタノン層 (上層) に FePPIX を得た。アポ化 β -サブユニットの確認は UV-vis を用い, 水層に FePPIX 由来の吸収ピークがなくなるまで操作を繰り返した。次に, このアポ化 β -サブユニットを含むリン酸緩衝水溶液を透析 (VSC, SCTUC8-32-25 / pH 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液 / 12 時間) してアポ化 β -サブユニットを得た (90%)。

(I-③) アポ化 β -サブユニットを含む pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液に 1.2 倍 mol 量の MnPPIX を含む 1N 水酸化ナトリウム水溶液を混合し, 放置した (室温, 数分間)。この水溶液をろ過し, さらに, GPC (Sephadex G-25 / 3 cm ϕ $\times$ 50 cm / pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液) により精製して MnPPIX を活性部位とする β -サブユニット (MnPPIX 化 β -サブユニット) を得た (90%, UV-vis: $\lambda_{\max}$ 467, 552 nm)。

(I-④) MnPPIX 化 β -サブユニットを含む水溶液に 2-メルカプトエタノールを過剰に加え, 放置した (室温, 30 分間)。この混合溶液を GPC (Sephadex G-25 / 3 cm ϕ $\times$ 50 cm / pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液) に通した。上記 I-① で得られた α -サブユニット

Fig. 2 Schematic Diagrams of Syntheses of Various Reconstituted Hemoglobins (**2** to **7**). Compound **1** and compounds **2** to **7** are hemoglobin and reconstituted hemoglobin, respectively, as shown in Fig. 1.

(FePPIX 含有) についても同様の処理を行った。処理した MnPPIX 化 β -サブユニットを含むリン酸緩衝水溶液 (pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM) と同様に処理した β -サブユニットを含むリン酸緩衝水溶液 (この場合、常に β -サブユニットは α -サブユニットに対して少過剰量添加) を混合し、放置した (8 時間)。この後、この水溶液をイオン交換クロマトグラフィー (陰イオン交換樹脂 DEAE-セルロース / 3 cm ϕ $\times$ 30 cm / pH 7.0 リン酸緩衝水溶液) にかけて分取し、さらに、透析 (12 時間) して目的物質である **2** を得た [75%, 全収率 9.1%, UV-vis (還元体): $\lambda_{\max}$ 433, 555, 587 nm]。

(2) **3** の合成

(1) の I-①で得られた α -サブユニットについて、(1) の I-②と同様に行ってアポ化 α -サブユニット (92%) を、さらに、(1) の I-③と同様に行って MnPPIX 化 α -サブユニットを得た (90%, UV-vis : $\lambda_{\max}$ 467, 552 nm)。次に、(1) の I-④と同様に行い、目的物質である **3** を得た [全収率 15%, UV-vis (還元体): $\lambda_{\max}$ 433, 555, 588 nm]。

2.2.2 **4** ~ **7** の合成

(1) **4** の合成

(II-①) ヘモグロビン (1g) を含む pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液に 1N 塩酸を加えて pH を 2.3 ~ 2.5 に調整した後、2-ブタノンを加えて分液漏斗で抽出した。水層 (下層) にアポ化したヘモグロビンおよび 2-ブタノン層 (上層) に FePPIX を得た。アポ化ヘモグロビンの確認は UV-vis を用い、水層に FePPIX 由来の吸収ピークがなくなるまで操作を繰り返した。次に、このアポ化ヘモグロビンを含むリン酸緩衝水溶液を透析 (VSC, SCTUC8-32-25 / pH 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液 / 12 時間) でアポ化ヘモグロビンを得た (90%)。

(II-②) アポ化ヘモグロビンを含む pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液に 4.2 倍モル量の MnPPIX を含む 1N 水酸化ナトリウム水溶液を混合し、放置した (室温, 数分間)。この水溶液をろ過し、さらに、GPC (Sephadex G-25 / 3 cm ϕ $\times$ 50 cm / pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液) により精製して目的物質である **4** を得た (90%, 全収率 81%, UV-vis : $\lambda_{\max}$ 467, 552 nm)。

(2) **5** の合成

(1) の II-①で得られたアポ化ヘモグロビン含む pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液に 4.2 倍モル量の FeT2MPyP を含む水溶液を混合し、超音波照射 (15 W) 下で放置した (室温, 12 時間)。この水溶液を GPC (Sephadex G-25 / 3 cm ϕ $\times$ 50 cm / pH 7.0 ~ 7.2, 50 mM リン酸緩衝水溶液) で精製し、目的物質である **5** を得た (全収率 81%, UV-vis : $\lambda_{\max}$ 396, 515 nm)。

(3) **6** の合成

(1) の II-①で得られたアポ化ヘモグロビンと MnT2MPyP を用いて (2) と同様な操作を行い、目的物質である **6** を得た (全収率 81%, UV-vis : $\lambda_{\max}$ 456, 558 nm)。

(4) **7** の合成

(1) の II-①で得られたアポ化ヘモグロビンと MnT4MPyP を用いて (2) と同様な操作を行い、目的物質である **7** を得た (全収率 79%, UV-vis : $\lambda_{\max}$ 453, 558 nm)。

2.3 測定

2.3.1 SOD 活性評価

各種再構成ヘモグロビン (**2** ~ **7**) の SOD 活性をチトクローム c 法 (26, 27) により評価した。金属ポルフィリン濃度で 0 ~ 300 μ M の再構成ヘモグロビン水溶液 (A 溶液) を 5 水準以上調製した。次に、0.3 mM キサンチン (Aldrich/Sigma) 水溶液, 60 μ M チトクローム c (Aldrich/Sigma) 水溶液および pH 7.8, 30 mM リン酸緩衝水溶液を各 20 ml 加え、さらに、純水 24 ml を加えて混合溶液 (B 溶液) を得た。この B 溶液 2.1 ml に A 溶液 0.3 ml と純水 0.2 ml を加えて放置 (25°C, 10 分) した。放置後の混合溶液に 7 μ g/ml カタラーゼ (Aldrich/Sigma) 水溶液 0.1 ml, 25 U/ml キサンチンオキシダーゼ (XOD, Aldrich/Sigma) 水溶液 0.3 ml をすばやく混合して 550 nm における UV-vis の経時測定を行った (島津製作所, 分光光度計 UV-2100)。最終的な試験溶液の各成分の濃度は、再構成ヘモグロビン 0 ~ 30 μ M, キサンチン 0.05 mM, XOD 2.5 U/ml, チトクローム c 10 μ M およびカタラーゼ 0.23 μ g/ml である。なお、参照としてヘモグロビン (**1**) についても同様に SOD 活性評価を行った。

2.3.2 非 XOD 活性阻害性評価

SOD 活性評価に伴い、再構成ヘモグロビン活性部位の非 XOD 活性阻害性について既報 (28-30) を参考に検討した。0.56 mM キサンチン水溶液 (2.7 ml) と 25 U/ml XOD 水溶液 (0.3 ml) をすばやく混合し、尿酸に基づく $\lambda_{\max}$ 290 nm における UV-vis の経時測定を行った (島津製作所, 分光光度計 UV-2100)。さらに、活性部位である 0.3 mM カチオン性金属ポルフィリン溶液 (30 μ l) を微量後添加し、上記と同様の測定を継続して行った。

2.3.3 $O_2^{\cdot-}$ 消去反応性評価

SOD 活性評価に伴い、再構成ヘモグロビン活性部位の $O_2^{\cdot-}$ 消去反応性について既報 (28-30) を参考に検討した。22 nM 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) および 2.0 μ M スコポレチンを含むリン酸緩衝水溶液 (1 ml) と 0.1 ~ 2.0 μ M の過酸化水素 (H_2O_2) 水溶液 (1 ml) を混合した溶液のけい光スペクトルを測定した

(島津製作所, 分光蛍光光度計 RF-5300PC, 励起波長 366 nm, 蛍光波長 460 nm)。なお, ブランクとして H_2O_2 を含まない溶液も測定し, その蛍光強度を 100 % とした。

2.3.4 H_2O_2 に対する安定性評価

再構成ヘモグロビンの H_2O_2 に対する安定性を既報 (31–33) を参考に評価した。金属ポルフィリン濃度で 100 μM の再構成ヘモグロビン水溶液 (試料溶液) に 30 mM H_2O_2 水溶液を添加 (金属ポルフィリン錯体に対して 300 倍 mol の H_2O_2 量) し, 金属ポルフィリン錯体の λ_{max} (400 nm 付近) および H_2O_2 の λ_{max} (240 nm) における UV-vis の経時測定を行った (島津製作所, 分光光度計 UV-2100)。なお, 参照として低分子系 SOD モデル化合物であるカチオン性金属ポルフィリン (FeT2MPyP, MnT2MPyP および MnT4MPyP) についても同様に評価した。

3 結果および考察

3.1 再構成ヘモグロビンの SOD 活性

再構成ヘモグロビン (2 ~ 7) の SOD 活性, すなわち, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 消去活性をチトクローム c 法 (26, 27) より検討した。一般に, $\text{O}_2^{\cdot -}$ [(2) 式の反応で生成] によりフェリチトクローム c [$\text{Cyt.c}(\text{Fe}^{3+})$] がフェロチトクローム c [$\text{Cyt.c}(\text{Fe}^{2+})$, λ_{max} 550 nm] に還元される [(3) 式] が, SOD や SOD 活性を有する物質の存在により (1) 式が促進され, この還元が阻害される。この阻害の度合を分光学的手法 (フェロチトクローム c 生成に起因する 550 nm 付近での吸光度測定) により求める方法である (26, 27)。

一例として, **Fig. 3** に各種濃度の **7** を添加したチトク

[XOD : xanthine oxidase, Cyt.c(Fe^{3+}) :
ferric-cytochrome c, Cyt.c(Fe^{2+}) :
ferro-cytochrome c]

ローム c の還元 of 初期の経時変化を示す。**7** を添加していない系 (ブランク, **Fig. 3** の a) に比べ, **7** を添加した系 (**Fig. 3** の b ~ e) における傾きは低下し, 添加濃度の増大と共にその度合も増している。また, 本反応において $\text{Cyt.c}(\text{Fe}^{2+})$ (λ_{max} 550 nm) の形成も UV-vis より確認した。なお, 他の再構成ヘモグロビン添加系においても同傾向の結果となった。次に, **Fig. 3** の関係

Fig. 3 Absorbance Versus Time Relations at 550 nm and at Initial Period Based on the Formation of Ferro-Cytochrome c in Phosphate Buffer Solution Containing 0.05 mM Xanthine, 2.5 U/ml XOD, 10 μM Cytochrome c and 0.23 $\mu\text{g/ml}$ Catalase without (Blank) and with **7** at Room Temperature. MnT4MPyP conc. (μM) of **7**, a: 0, b: 1.0, c: 2.5, d: 4.0 and e: 5.5.

より **7** の無添加系および添加系での $\text{Cyt.c}(\text{Fe}^{2+})$ の生成速度 (v_i および v_o) を求めた。さらに, (4) 式を用いて阻害率を算出した。他の再構成ヘモグロビン系についても同様に行った。各種再構成ヘモグロビン添加系における阻害率と金属ポルフィリン濃度の関係の一例を **Fig. 4** に示す。これより, 阻害率 50% における金属ポルフィリン濃度 (IC_{50}) を求め, これを SOD 活性の指標とした。各種再構成ヘモグロビンの IC_{50} を **Table 1** にまとめて示す。なお, 参照として再構成していないヘモグロビン (**1**), 活性部位のみである低分子系のカチオン性金属ポルフィリン (FeT4MPyP, MnT2MPyP および MnT4MPyP), SOD 等の IC_{50} も合わせて示す。

サブユニットの影響を考慮した再構成ヘモグロビン (2 および 3) や活性部位の金属イオンの影響を考慮した再構成ヘモグロビン (4) の IC_{50} は, 参照として用いた再構成していないヘモグロビン (**1**) のそれと差がなく, 単純なサブユニット, 金属イオン種等の制御のみでは効果的な SOD モデル化合物は得られなかった。次に, 活性部位に $\text{O}_2^{\cdot -}$ (アニオン性) を導き易い反対電荷 (カチオン性) を活性部位周囲に構築したカチオン性金属ポルフィリンを含む再構成ヘモグロビン (5, 6 および 7) では, それらの IC_{50} は大きく低下している。特に, Fe イオンよりも Mn イオンの系 (IC_{50} で **5** > **6**) が, および, カチオン性基の 4 位置換よりも 2 位置換

Fig. 4 Relationship between Inhibition Efficiency (%) and Metallo-Porphyrin Concentration (μM) of Reconstituted Hemoglobin. ----; 1, ●; 3, ▲; 4, ■; 6 and ◆; 7.

Table 1 IC_{50} Values of Various Reconstituted Hemoglobins by Cytchrome c Method.

Compounds	IC_{50} (μM)	Refs.
Reconstituted hemoglobin		
2 [P_α : FePPIX, P_β : MnPPIX]	23	This work
3 [P_α : MnPPIX, P_β : FePPIX]	23	〃
4 [P_α and P_β : MnPPIX]	20	〃
5 [P_α and P_β : FeT2MPyP]	5.1	〃
6 [P_α and P_β : MnT2MPyP]	1.8	〃
7 [P_α and P_β : MnT4MPyP]	2.0	〃
Hemoglobin		
1 [$\text{P}_\alpha = \text{P}_\beta = \text{FePPIX}$]	25	〃
FeT4MPyP*	0.90	34
MnT4MPyP	0.70	5
MnTM ₃ APP*	21	34

*FeT4MPyP: iron{5, 10, 15, 20-tetrakis(4-N-methylpyridyl)-porphyrin} and MnTM₃APP: manganese{5, 10, 15, 20-tetrakis(4-trimethylaminophenyl)porphyrin}.

の系 (IC_{50} で $7 > 6$) が、効果的であり、低分子系のもの (34) とその傾向は類似であった。しかしながら、カチオン性金属ポルフィリンを含む再構成ヘモグロビン (5, 6 および 7) の

$$\text{Inhibition efficiency} = 1 - (v_i/v_o) \quad (4)$$

[v_o and v_i are formation rates of ferro-cytchrome c with-

out and with the compound having SOD activity, respectively]

IC_{50} は低分子系のそれに比べ約数倍大きく、やや SOD 活性は低下している。これは、活性部位周囲に存在するグロビン鎖の立体障害の影響に基づくと考えられる。

3.2 非 XOD 活性阻害性および $\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去反応性

再構成ヘモグロビン活性部位であるカチオン性金属ポルフィリンの非 XOD 活性阻害性および $\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去反応性について既報 (28–30) を参考に検討した。非 XOD 活性阻害性を $\text{O}_2^{\cdot-}$ 生成反応 [(2) 式] において $\text{O}_2^{\cdot-}$ と並行して生成する尿酸 (キサンチン～尿酸系) に基づく UV-vis 測定より行った。XOD 添加前では、キサンチンに基づく吸収ピーク (主に、 λ_{max} 256, 263, 271 nm) が観測され、XOD を添加するとこれらのピークは減少し、等吸収点 (250, 278 nm) を通って尿酸に基づく吸収ピーク (主に、 λ_{max} 233, 239, 290 nm) が発現した。このキサンチン～尿酸系の変化の最も大きい吸収ピーク (λ_{max} 290 nm) に基づく経時測定を行った (Fig. 5)。XOD 添加後、尿酸生成に基づく単位時間当たりの吸光度変化 (見かけの生成速度) は一定であり、さらに、活性部位である MnT2MPyP を添加してもその単位時間当たりの吸光度変化 (見かけの生成速度) は一定となった。他の系についても同様の結果が得られた。これより、尿酸は再構成ヘモグロビン活性部位の存在の有無によらず一定に生成しており、再構成ヘモグロビンの活性部位による反応阻害はないことが確認された。

再構成ヘモグロビンの活性部位が SOD の $\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去反応 [(1) 式] と同様な反応で進行していることを $\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去の際に生成される H_2O_2 の検出により検討した。 H_2O_2 の検出にはスコポレチン酸化法 (スコポレチンは H_2O_2 存在下 HRP により酸化されて非蛍光物質に変化するため蛍光が消光する) による蛍光スペクトル測定より行った。再構成ヘモグロビンの活性部位 (MnT2MPyP) を添加していない場合、蛍光波長 460nm に基づく蛍光強度の減少は小さかった (減少割合 5.3%) が、活性部位添加の場合では、蛍光強度は急激に減少した (減少割合 88.8%)。蛍光強度～ H_2O_2 濃度の検量線より H_2O_2 生成は無添加の場合で 0.12 nmol/ml および添加の場合で 1.57 nmol/ml となり、添加により H_2O_2 生成が促進されていることが確認された。これより、再構成ヘモグロビン活性部位は効果的に $\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去反応 [(1) 式] を触媒していることが示唆された。

3.3 H_2O_2 に対する安定性

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去反応によって生成された H_2O_2 が低分子系の SOD モデル化合物の劣化、分解等を生じること (触媒

Fig. 5 Absorbance Versus Time Relation at 290 nm for the Formation of Uric Acid from Xanthine Based on Eq. (1). The arrow in figure indicates the addition of MnT2MPyP.

毒となること)がPasternackらにより報告されている(3)。そこで、再構成ヘモグロビンの H_2O_2 に対する安定性をUV-vis測定より評価した。参照として低分子系のカチオン性金属ポルフィリンも同様に評価した。例えば、MnT2MPyPを含む溶液に H_2O_2 を添加してSoret帯の λ_{max} での経時変化を測定すると急激な吸光度の減少が見られたが、再構成ヘモグロビン、**6**を含む溶液に H_2O_2 を添加した場合では緩やかに減少した。この安定性を定量的に評価するために次のような解析を行った。これらの劣化、分解等に基づく減衰曲線は一相性の双曲線であったので、減衰が終了して定常状態となる時間をSODモデル化合物の分解・消失時間(t_d)として算出し、**Fig. 6**にまとめて示す。再構成ヘモグロビンの t_d はFeT2MPyPやMnT2MPyPのそれに比べて十数倍以上となり、効果的な H_2O_2 耐性を有する。これは、再構成ヘモグロビンでは劣化、分解等の主な機構である H_2O_2 によるポルフィリン環の開環反応がグロビン鎖により抑制されているためである。また、予備的ではあるが、本再構成ヘモグロビンの若干のカタラーゼ活性も部分的に影響しているものと考えられる。

また、一般に、血液中に薬剤を投与した場合、低分子系のカチオン性化合物では腎臓による尿中排泄、肝臓への取り込みによるクリアランス等が生じるが、高分子系ではその影響は少なく、このような点でも低分子系のカチオン性金属ポルフィリンに比べて本再構成ヘモグロビンは優位となる。この評価については、今後、検討したい。いずれにせよ、カチオン性金属ポルフィリンを含む再構成ヘモグロビン(**5**～**7**)は、SOD活性を示し、 H_2O_2 耐性を有する興味深いSODモデル化合物であることが示唆された。

Fig. 6 Disappearance Times (t_d) of Reconstituted Hemoglobins and Cationic Metalloporphyrins by H_2O_2 .

4 結 論

$\text{O}_2^{\cdot -}$ の消去・代謝反応を促進するSODモデル化合物の設計指針を得るため、ヘモグロビンのアポタンパク質を担体とし、その活性部位を各種金属ポルフィリン誘導体で置き換えた再構成ヘモグロビンを合成し、それらのSOD活性を評価したところ、次のような結論が得られた。

(1) 各種の再構成ヘモグロビンにおいて、サブユニットの影響や活性部位の金属イオンの影響を考慮した再構成ヘモグロビン(**2**～**4**)では良好なSOD活性は得られず、カチオン性金属ポルフィリンを含む再構成ヘモグロビン(**5**～**7**)で、興味深いSOD活性が得られ、その指標である IC_{50} は最高で3.93である。

(2) 再構成ヘモグロビンの活性部位によるXOD活性阻害はなく、さらに、効果的に $\text{O}_2^{\cdot -}$ 消去反応を触媒しており、SODと同様に $\text{O}_2^{\cdot -}$ を消去するモデル化合物である。

(3) 再構成ヘモグロビンの t_d は低分子系のFeT2MPyPやMnT2MPyPのそれに比べて十数倍以上となり、効果的な H_2O_2 耐性を有する。

(4) (1)～(3)をまとめると、カチオン性金属ポルフィリンを含む再構成ヘモグロビン(**5**～**7**)は、SOD活性を示し、 H_2O_2 耐性を有する興味深いSODモデル化合物であることが示唆された。

References

1. M. YUASA, Biomimetic Technologies of Heme Protein Systems, *Oleoscience*, Vol. 1, 131-137 (2001).

2. H. KAWAKAMI, Control of Reactive Oxygen Species by Water-soluble Cationic Metalloporphyrin, *Oleoscience*, Vol. **1**, 157-165 (2001).
3. R.F. PASTERNAK and B. HALLIWELL, Superoxide Dismutase Activities of An Iron Porphyrin and Other Iron Complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. **101**, 1026-1031 (1979).
4. D. SOLOMON, P. PERETZ and M. FARAGGI, Chemical Properties of Water-soluble Porphyrins. 2. The Reaction of Iron(III) tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin with the Superoxide Radical Dioxide Couple, *J. Phys. Chem.*, Vol. **86**, 1842-1849 (1982).
5. K.M. FAULKNER, S.I. LIOCHEV and I. FRIDOVICH, Stable Mn(III) Porphyrins Mimic Superoxide Dismutase *in vitro* and Substitute for it *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, Vol. **269**, 23471-23476 (1994).
6. D.P. RILEY and R.H. WEISS, Manganese Macrocyclic Ligand Complexes as Mimics of Superoxide Dismutase, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. **116**, 387-388 (1994).
7. K. WADA, Y. KOBAYASHI and A. YOKOYAMA, Copper(II) [2, 3butanedione-bis(*N*-4-methylthiosemicarbazone)], a Stable Superoxide Dismutase-like Copper Complex with High Membrane Penetrability, *Arch. Biophys. Biochem.*, Vol. **310**, 1-5 (1994).
8. Z.X. LIU, G.B. ROBINSON and E.M. GREGORY, Preparation and Characterization of Mn-salophen Complex with Superoxide Scavenging Activity, *Arch. Biophys. Biochem.*, Vol. **315**, 74-81 (1994).
9. J.L. PIERRE, P. CHAITEMPS, S. REFAF, C. BEGUIN, A.E. MARZOUKI, G. SERRATRIE, E. SAINT-AMAN and P. RAY, Imidazolate-bridged Dicopper(II) and Copper-zinc Complexes of a Macrocyclic Ligand (Cryptand). A Possible Model for the Chemistry of Cu-Zn Superoxide Dismutase, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. **117**, 1965-1973 (1995).
10. H. KAWAKAMI, T. OHSE and S. NAGAOKA, SOD Activity Water-soluble Metalloporphyrins, *Porphyreins*, Vol. **4**, 23-27 (1995).
11. A. DEROCHE, I. MORGENSTERN-BADARAU, M. CESARIO, J. GUILHEM, B. KEITA, L. NADJO and C. HOUÉE-LEVIN, A Seven Coordinate Manganese(II) Complex Formed with a Single Tripodal Heptadentate Ligand as a New Superoxide Scavenger, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. **118**, 4567-4573 (1996).
12. H. KAWAKAMI, T. NAKAJIMA, T. MORI, S. ASAYAMA, S. NAGAOKA, T. OHIRA, U. MIDOIKAWA and M. YUASA, SOD Activity of Cationic-Porphyrin Having a Cationic Channel, *Inter. Symp. Biomater. DDS, Proc.*, p.176 (2000).
13. K. KALYANASUNDARAM, Photochemistry of Water-soluble Porphyrins: Comparative Study of Isomeric Tetrapyrrolyl- and Tetrakis(*N*-methylpyridiniumyl)porphyrins, *Inorg. Chem.*, Vol. **23**, 2453-2459 (1984).
14. R.F. PASTERNECK, L. FRANCESCONI, D. RAFF and E. SPIRO, Aggregation of Nickel(II), Copper(II), and Zinc(II) Derivatives of Water-soluble Porphyrins, *Inorg. Chem.*, Vol. **12**, 2606-2611 (1973).
15. P. HAMBRIGHT, T. GORE and M. BURTON, Synthesis and Characterization of New Isomeric Water-soluble Porphyrins. Tetra(2-*N*-methylpyridyl)porphine and Tetra(3-*N*-methylpyridyl)porphine, *Inorg. Chem.*, Vol. **15**, 2314-2315 (1976).
16. A.D. ADLER, F.R. LONGO, F. KAMPAS and J. KIM, On the Preparation of Metalloporphyrins, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, Vol. **32**, 2443-2445 (1970).
17. T. YONETANI, H.R. DROTT, J.S. LEIGH, G. REED, M.R. WATERMAN and T. ASAKURA, Electromagnetic Properties of Hemoproteins. 3. Electron Paramagnetic Resonance Characteristics of Iron(II) and Manganese(II) ProtoporphyrinIX and their Apohemoprotein Complexes in High Spin States, *J. Biol. Chem.*, Vol. **245**, 2988-3003 (1970).
18. E. BUCCI and C. FRONTICELLI, A New Method for the Preparation of Alpha and Beta Subunits of Human Hemoglobin, *J. Biol. Chem.*, Vol. **240**, 551-552 (1965).
19. T. ASAKURA, Studies in Haem-globin Linkage (I). Some Properties of Globin, and Combination of Haem Derivatives and the Globin, *Seikagaku*, Vol. **36**, 35-42 (1965).
20. T. YONETANI and T. ASAKURA, Studies on Cytochrome c Peroxidase. XV. Comparison of Manganese Porphyrin-containing Cytochrome c Peroxidase, Horseradish Peroxidase, and Myoglobin, *J. Biol. Chem.*, Vol. **244**, 4580-4588 (1969).
21. M.R. WATERMAN and T. YONETANI, Studies on Modified Hemoglobins. I. Properties of Hybrid Hemoglobins Containing Manganese ProtoporphyrinIX, *J. Biol. Chem.*, Vol. **245**, 5847-5852 (1970).
22. F. ASCOLI, M. ROSARIA, R. FANELLI and E. ANTONINI, Preparation and Properties of Apohemoglobin and Reconstituted Hemoglobin, in *Method in Enzymology* (E. ANTONINI, L.R. BERNARDI and E. CHIANCONE, eds.), Vol. **91**, Academic Press, New York, pp. 72-87 (1981).
23. T. INUBUSHI and T. YONETANI, Synthesis of Modified Porphyrins and Metalloporphyrins, in *Method in Enzymology* (E. ANTONINI, L.R. BERNARDI and E. CHIANCONE, eds.), Vol. **91**, Academic Press, New York, pp. 88-94 (1981).
24. E. BUCCI, Preparation of Isolated Chains of Human Hemoglobin, in *Method in Enzymology* (E. ANTONINI, L.R. BERNARDI and E. CHIANCONE, eds.), Vol. **91**, Academic Press, New York, pp. 97-106 (1981).
25. M. FERRELLA and L. ROSSI-BERNARDI, Detection of Hemoglobin Hybrid Formation at Subzero Temperature, in *Method in Enzymology* (E. ANTONINI, L.R. BERNARDI and E. CHIANCONE, eds.), Vol. **91**, Academic Press, New York, pp. 133-143 (1981).
26. J.M. MCCORD and I. FRIDOVICH, Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, Vol. **244**, 6049-6055 (1969).
27. J. BUTLER, W.H. KOPENOL and E. MARGOLIASH, Kinetics and Mechanism of the Reduction of Ferricytochrome c by the Superoxide Anion, *J. Biol. Chem.*, Vol. **257**, 10747-10750 (1982).
28. K. YAGI and M. NAKANO, *Active Oxygen*, Ishiyaku-shuppan, Tokyo, pp. 86-90 (1987).
29. M. NAKANO, M. ASADA and Y. OYANAGI, *Active Oxygen. Molecular Mechanism of its Productions, Scavenging and Effect*

- in Organisms*, Ishiyaku-shuppan, Tokyo, pp. 32-46 (1988).
30. M. NAKANO, M. ASADA and Y. OYANAGI, *Active Oxygen. Molecular Mechanism of its Productions, Scavenging and Effect in Organisms*, Ishiyaku-shuppan, Tokyo, pp. 254-261(1988).
31. R.K. ROOT and J.A. METCALF, H₂O₂ Release from Human Granulocytes during Phagocytosis. Elationship to Superoxide Anion Formation and Cellular Catabolism of H₂O₂: Studies with Normal and Cytchalasin B-treated Cells, *J. Clin. Invest.*, Vol. **60**, 1266-1279 (1977).
32. L.A. RIO, M.G. ORTEGA and A.L. LOPEZ, A More Sensitive Modification of the Catalase Assay with the Clark Oxygen Electrode. Application to the Kinetic Study of the Pea Leat Enzyme, *Anal. Biochem.*, Vol. **80**, 409-415 (1977).
33. E.E. DI IORIO, Preparatiob Derivatives of Ferrous and Ferric Hemoglobin, in *Method in Enzymology* (E. ANTONINI, L.R. BERNARDI and E. CHIANCONE, eds.), Vol. **91**, Academic Press, New York, pp. 57-72 (1981).
34. R.H. WEISS, A.G. FLICKINGER, W.J. RIVERS, M.M. HARDY, K.W. ASTON, U. RYAN and D.P. RILEY, Evaluation of Activity of Putative Superoxide Dismutase Mimics. Direct Analysis by Stopped-flow Kinetics, *J. Biol. Chem.*, Vol. **268**, 23049-23054 (1993).
-