Surface Modification of Reconstituted Hemoglobins Containing SOD-Active Metalloporphyrins

Makoto YUASA^{1*,2}, Kenichi OYAIZU², Aritomo YAMAGUCHI¹, Takamitsu HAYASHI¹
and Uichi MIDORIKAWA¹

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

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

Edited by T. Itoh, Kitasato Univ., and accepted October 6, 2004 (received for review August 10, 2004)

Abstract: Reconstituted hemoglobins modified with polyethylene glycol (PEG) containing iron(III) and manganese(III) complexes of *meso*-tetra(*N*-methylpyridinium-*x*-yl)porphyrin ([MT_xMePyP]-Hb-PEG, M = Fe and Mn, *x* = 2 and 4) were found to serve as excellent superoxide dismutase (SOD) mimics under physiological conditions. IC₅₀ was 2.3 μM and the pseudo-first order rate constant was $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for reaction of MnT2MePyP-Hb-PEG with a superoxide anion radical as determined by conventional cytochrome *c* assay and stopped flow analysis, respectively. Stability toward H₂O₂ by surface modification of reconstituted hemoglobins with PEG chains helped prevent aggregation with other proteins such as albumin.

Key words: superoxide anion radical, superoxide dismutase, SOD mimic, reconstituted hemoglobin, cationic metalloporphyrin

1 緒 言

生体に取り込まれた酸素 (O₂) は、紫外線や放射線との相互作用、酵素反応などの影響を受けると、スーパーオキシドアニオンラジカル (O₂^{•-}) に変化する。O₂^{•-} はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により過酸化水素 (H₂O₂) と O₂ へと不均化され、さらに H₂O₂ は、カタラーゼ (Cat)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH) などの酵素により、水 (H₂O) にまで代謝される。しかし、炎症や疾患のときは、これらの活性酸素の生成と消去のバランスが崩れ、酸化ストレス状態となり、O₂^{•-} が過剰に発生することが知られている。この結果、特に有害な (反応性が高い) 活性酸素であるヒドロキシラジカル (OH[•]) やペルオキシナイトライイトイオン (ONOO⁻) が発生し、DNA、タンパ

ク質、糖、脂質、血管などを攻撃し、合併症や細胞死を引き起こすと考えられている (1, 2)。このため、生体内の活性酸素種の消去・代謝に関する研究が行われ、O₂^{•-} の消去・代謝反応 [(1) 式] を促進する人工 SOD モデル化合物が提案された (2-14)。人工 SOD モデルの研究によって体内の O₂^{•-} を消去する薬剤が開発されれば、活性酸素から細胞を守ることが可能になる。近年、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に注目した研究が多く報告されている (3-5, 10, 13)。著者らは、生体適合性や安定性を考慮した新規 SOD モデル化合物として、ヘモグロビンのアポタンパク質 (4 個のグロビン鎖サブユニットの集合体) を担体とし、その活性部位として SOD 活性を有する金属ポルフィリン誘導体を導入した再構成ヘモグロビン (**Fig. 1, 2 ~ 5**) について調べた (14)。本報

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

では、安定性の向上を目指してポリエチレングリコール (PEG) を修飾した再構成ヘモグロビン (**Fig. 1, 6 ~ 9**) を合成し、それらの SOD 活性などについて調べた。

2 実 験

2.1 試 料

活性部位に相当する各種金属ポルフィリン錯体である鉄 {5, 10, 15, 20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-2-イル) ポルフィリン} (FeT2MePyP), 鉄 {5, 10, 15, 20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-4-イル) ポルフィリン} (FeT4MePyP), マンガン {5, 10, 15, 20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-2-イル) ポルフィリン} (MnT2MePyP) およびマンガン {5, 10, 15, 20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-4-イル) ポルフィリン}

(MnT4MePyP) は、既報 (15-19) により合成した。なお、これらの化合物の構造確認は $^1\text{H-NMR}$ (JEOL JNM-AL300), FAB-Mass (JEOL JMS-SX102A), UV-vis. (SHIMADZU UV-2100) スペクトル等により行った。

ヘモグロビン (**1**) は成人ヒトヘモグロビン [ヘモグロビン A, 和光純薬] を使用した。他の試薬は市販特級を用いた。

2.2 再構成ヘモグロビンの合成

Fig. 1 に示した 8 種類の再構成ヘモグロビン (**2 ~ 9**) は既に報告された方法 (14, 19-24) により合成した (**Fig. 2**)。

2.2.1 2 ~ 5 の合成

再構成ヘモグロビン (**2 ~ 5**) のそれぞれの収率は次の通りであった。**2** : 収率 83%, UV-vis. (λ_{max} , nm, H_2O) : 411, 587. **3** : 収率 83%, UV-vis. (λ_{max} , nm, H_2O) : 424, 598. **4** : 収率 83%, UV-vis. (λ_{max} , nm,

Abbreviation	Compound
1	Hb
2	FeT2MePyP-Hb
3	FeT4MePyP-Hb
4	MnT2MePyP-Hb
5	MnT4MePyP-Hb
6	FeT2MePyP-Hb-PEG
7	FeT4MePyP-Hb-PEG
8	MnT2MePyP-Hb-PEG
9	MnT4MePyP-Hb-PEG

Fig. 1 Hemoglobin (**1**), Various Reconstituted Hemoglobins (**2 to 7**) and Reconstituted Hemoglobins Modified with Polyethylene Glycol (PEG) (**6 to 9**).

Fig. 2 Syntheses of Various Reconstituted Hemoglobins (**2** to **5**) (Ref. 14) and Various Reconstituted Hemoglobins Modified with PEG (**6** to **9**). Compounds **1**, **2** to **5** and **6** to **9** are hemoglobin, reconstituted hemoglobins and reconstituted hemoglobins modified with PEG, respectively, as shown in **Fig. 1**. MTxMePyP = FeT2MePyP, FeT4MePyP, MnT2MePyP or MnT4MePyP.

H₂O): 455, 560. **5**: 収率 83%, UV-vis. (λ_{max} , nm, H₂O): 454, 555.

2.2.2 活性化ポリエチレングリコール (Activated-PEG) の合成

Activated-PEG の合成は既報 (22-24) の方法を工夫して行った。数平均分子量 7500 の PEG (100 g) をジメチルホルムアミド (DMF) (100 ml) に溶解させ、無水コハク酸 (3 g) を加えて 100°C で 3 時間攪拌し、その後、室温になるまで放置し、ガラスフィルターを用いて吸引ろ過した。さらに、未反応の無水コハク酸を除去するため、ジエチルエーテル (500 ml) を用いて洗浄した。この後、室温で 6 時間減圧乾燥することにより、末端にカルボキシル基を有する PEG-COOH が得られた (収率 90%)。得られた PGE-COOH (98.5 g) を DMF (100 ml) に溶解させ、*N*-ヒドロキシコハク酸 (2.95 g) とジシクロヘキシルカルボジイミド (5.29 g) を加え 30°C で 24 時間攪拌し、ガラスフィルターを用いて吸引ろ過した。さらに、未反応の *N*-ヒドロキシコハク酸イミドとジシクロヘキシルカルボジイミドを除去するため、ジエチルエーテル (500 ml) を用いて洗浄した。この後、室温で 6 時間減圧乾燥することにより、末端にコハク酸イミドエステルを持つ Activated-PEG が得られた (収率 86%)。化合物の構造確認は ¹H-NMR

(JEOL JNM-AL300), IR (SHIMADZU FTIR-8200PC) スペクトルなどにより行った。

2.2.3 6 ~ 9 の合成

PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**6** ~ **9**) は下記のように合成した。

(1) 6 の合成

2 を氷浴中で 1 時間アルゴン脱気し、ピリドキサル-5-リン酸 1 水和物 (PLP) (2.46 mg) と水素化ホウ素ナトリウム (1.7 mg) を加え、30 分間攪拌し、前項で得られた Activated-PEG (0.4 g) を加え、1 時間攪拌した。反応後、氷浴中で 2 時間放置し、沈殿した未反応の PEG をろ過した。未反応の PLP と水素化ホウ素ナトリウムを除去するため、透析 (VSC, SCT UC8-32-25/pH 7.0/0.3 M/12 時間) を行った。さらに GPC (東ソー、トヨパール HW-55F) を用いて、未反応の PEG を除去することにより、目的物質である **6** が得られた (収率 75%)。

(2) 7, 8 および 9 の合成

3, **4** および **5** を用いて **2** と同様の操作を行うことにより、それぞれ **7** (収率 75%), **8** (収率 75%) および **9** (収率 75%) が得られた。

2.3 測定

2.3.1 ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) による分子量の測定

各種 PEG 修飾再構成ヘモグロビン (6～9) の分子量を GPC によって測定した。測定は高速液体クロマトグラフ (SHIMADZU, LC-10AT), UV 検出器 (SHIMADZU, SPD10A), 分離カラム (Shodex, OHpak SB-803HQ) を用いて行った。GPC の検量線は, 分子量既知の PEG とヘモグロビンを用いて作成した。溶離液には pH 7.0 の 0.1 M リン酸緩衝溶液を使用し, 30℃で流速 0.6 ml/min にて測定した。また, 参照物質として, ヘモグロビン (1) の GPC 測定も行った。

2.3.2 SOD 活性測定

2.3.2.1 シトクローム *c* 法による SOD 活性測定

各種 PEG 修飾再構成ヘモグロビン (6～9) の SOD 活性を, シトクローム *c* 法 (14, 25, 26) により測定した。また, 参照物質として, ヘモグロビン (1), 各種再構成ヘモグロビン (2～5) および低分子系 SOD モデル化合物であるカチオン性金属ポルフィリン (FeT2MePyP, FeT4MePyP, MnT2MePyP および MnT4MePyP) についても同様に SOD 活性を測定した。

2.3.2.2 ストップフロー法による SOD 活性測定

PEG 修飾再構成ヘモグロビン (8) の SOD 活性を, ストップフロー法 (27) により測定した。混合装置には UNISOKU 製自動コック付ミキシング装置を用いた。分光測定装置には UNISOKU 製ラピッドスキャン分光測定装置を用いた。ストップフロー法により, 2 種類以上の溶液を迅速に混合し, 溶液の吸光度を経時的に測定した。金属ポルフィリン濃度で 0～24 μ M の各種 PEG 修飾再構成ヘモグロビン溶液を pH 7.8 の 300 mM リン酸緩衝溶液で希釈し, 4 水準以上調製した (A 溶液)。超酸化カリウム (1 g) をジメチルスルホキシド (DMSO) に分散させて飽和溶液を調整し, さらに 30 分間攪拌した (B 溶液)。一方のシリンダーに A 溶液を, 他方のシリンダーに B 溶液を入れ, セルの温度を 36℃に設定した。体積比 A : B = 20 : 1 にて混合した後, 270 nm における吸光度の経時変化を測定した。また, 参照物質として, 再構成ヘモグロビン (2 および 4), 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 (MnT2MePyP および MnT4MePyP) についても同様に SOD 活性を測定した。

2.3.3 H₂O₂ に対する安定性評価

既報の方法 (14, 28-30) にて 8 の H₂O₂ に対する安定性を評価した。金属ポルフィリン濃度で 1 μ M の各種 PEG 修飾再構成ヘモグロビン溶液 (試料溶液) に, 1 mM の H₂O₂ 水溶液 (金属ポルフィリンに対して 1000 倍モル量) を添加した後に, 金属ポルフィリン錯体

($\lambda_{\max}$ = 450 nm 付近) における吸光度の経時変化を測定した。また, 参照物質として, ヘモグロビン (1) ($\lambda_{\max}$ = 400 nm 付近), 再構成ヘモグロビン (4) および低分子系 SOD モデル化合物であるカチオン性金属ポルフィリン (MnT2MePyP) についても同様に H₂O₂ に対する安定性を評価した。

2.3.4 アルブミンとの凝集能の測定

MnT2MePyP 系の再構成ヘモグロビンとアルブミン (和光純薬) との凝集能を測定した。0.096 g/ml のアルブミン溶液 1 ml とシトクローム *c* 法における IC₅₀ 濃度の 2 倍に相当する 8 (1 ml) をそれぞれ 36℃で 10 分間放置した後に混合し, 金属ポルフィリン錯体 ($\lambda_{\max}$ = 450 nm 付近) における吸光度の経時変化を測定した。また, 参照物質として, ヘモグロビン (1) ($\lambda_{\max}$ = 400 nm 付近) および低分子系 SOD モデル化合物であるカチオン性金属ポルフィリン (MnT2MePyP) についても同様にアルブミンとの凝集能を測定した。

3 結果および考察

3.1 GPC 測定

GPC により算出される数平均分子量 (M_n), 多分散度 (M_w/M_n) および (2) 式から修飾された PEG の本数を求めた (Table 1)。また, 代表例として, PEG 修飾再構成ヘモグロビン (8) とヘモグロビン (1) の流出クロマトグラムを Fig. 3 に示す。

人工血液の分野では, 酸素運搬体として PEG 修飾ヘモグロビンの代用が研究されており, ラット血液の 60% を PEG 修飾ヘモグロビン溶液に置き換えたものは, その半減期が約 12.8 時間であることが報告されている (ストローマフリーヘモグロビンでは約 2.2 時間) (22)。また, ヘモグロビンは血中において, サブユニット間での解離 (分子量が 64500 から 32250 に減少) が進行し, 腎臓の糸球体を通って排出されてしまうが, 一般に分子量 50000 以上であればこの排出が抑止

Table 1 Molecular Weights of Hemoglobin (1) and Various Reconstituted Hemoglobins Modified with PEG (6 to 9).

Abbreviation	$10^5 \times M_n$	M_w / M_n	Number of PEG
1	0.645	1.05	0
6	1.27	1.26	7.9
7	1.33	1.28	8.5
8	1.29	1.28	8.1
9	1.36	1.13	9.0

Fig. 3 GPC Elution Curves for Hemoglobin (1) and Reconstituted Hemoglobin Modified with PEG (8).

されることが知られている。そこで本研究では Activated-PEG を用いることにより、分子量 100000 以上の PEG 修飾ヘモグロビンを得ることを目指した。Table 1 に示したように、ヘモグロビンは 1 分子当り 7.9 本～9.0 本（平均 8.24 本）の PEG によって修飾され、分子量 100000 を超える PEG 修飾再構成ヘモグロビンが得られた。なお、修飾された PEG の本数は、以下の (2) 式を用いて算出した。

$$\frac{M_n - 64500(\text{Hb}) - 229.1(\text{PLP})}{7894.3(\text{Activated-PEG})} = \text{修飾された PEG の本数} \quad (2)$$

3.2 SOD 活性評価

3.2.1 シトクローム *c* 法

各種 PEG 修飾再構成ヘモグロビン (6～9) の SOD 活性を、シトクローム *c* 法 (14, 25, 26) により測定した。一般に、(3) 式によって生成した $\text{O}_2^{\cdot-}$ は、フェリシトクローム *c* [$\text{Cyt. } c(\text{Fe}^{3+})$] をフェロシトクローム *c* [$\text{Cyt. } c(\text{Fe}^{2+})$] λ_{max} 550 nm] へ還元 [(4) 式] するが、SOD 活性を有する物質の介在により (1) 式が促進され、この還元反応が阻害される。この阻害の度合いを分光学的手法 [$\text{Cyt. } c(\text{Fe}^{2+})$ に由来する 550 nm での吸光度測定] により求めることができる。

cytochrome *c*, Cyt. *c* (Fe^{2+}): ferro-cytochrome *c*]

各種再構成ヘモグロビンの金属ポルフィリン濃度と阻害率 (式 (5)) の関係を Fig. 4 に示した。図より阻害率 50% における金属ポルフィリン濃度 (IC_{50}) を求め、この IC_{50} を SOD 活性の指標とし、各種 PEG 修飾再構成ヘモグロビンの IC_{50} を Table 2 にまとめた。また、参照物質として、ヘモグロビン (1)、各種再構成ヘモグロビン (2～5) および低分子 SOD モデル化合物であるカチオン性金属ポルフィリン (FeT2MePyP , FeT4MePyP , MnT2MePyP および MnT4MePyP) についても併せて示した。PEG 修飾再構成ヘモグロビンの IC_{50} 値は $\text{MnT2MePyP-Hb-PEG (8)} < \text{MnT4MePyP-Hb-PEG (9)} < \text{FeT2MePyP-Hb-PEG (6)} < \text{FeT4MePyP-Hb-PEG (7)}$ の順となり、中心金属とカチオン基の距離よりも中心金属の違いが SOD 活性に影響を与える結果となった。これは Mn 錯体と Fe 錯体の $\text{O}_2^{\cdot-}$ との反応機構が異なることに由来すると考えられる。内圏機構で反応すると考えられている Fe 錯体は、Mn 錯体に比べてグロビン鎖の立体障害の影響でより $\text{O}_2^{\cdot-}$ が配位しにくくなることが報告されており (31)、本研究においても同様に SOD 活性が低下したことが示された。また、再構成ヘモグロビン (2)～(5) と比較して PEG を修飾することによって SOD 活性はやや低下した。しかしながら、活性低下は若干であり、安定性を考慮すれば PEG 修飾再構成ヘモグロビンは優れた SOD モデル化合物であると言える。

$$\text{Inhibition efficiency} = 1 - (v_i / v_0) \quad (5)$$

[v_0 and v_i are formation rates of ferro-cytochrome *c* in the absence and the presence of the compounds having

Fig. 4 Relationship between Inhibition Efficiency (%) and Metalloporphyrin Concentration (μM) of Reconstituted Hemoglobins 4 ($\blacktriangle$) (Ref. 14), 6 ($\bullet$) and 8 ($\blacksquare$).

Table 2 IC₅₀ Values of Various Reconstituted Hemoglobins.

Compounds	IC ₅₀ (Mm)	Ref.
2	5.1	14
3	3.2	This work
4	1.8	14
5	2.0	〃
6	2.7	This work
7	4.2	〃
8	2.3	〃
9	2.6	〃
1	25	14
FeT2MePyP	0.60	This work
FeT4MePyP	0.90	32
MnT2MePyP	0.23	5
MnT4MePyP	0.71	〃

SOD activity, respectively.]

3.2.2 ストップフロー法

PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**8**) の SOD 活性をストップフロー法 (27) により測定した。SOD モデルの水溶液と KO₂ の DMSO 飽和溶液を混合し、KO₂ により発生した O₂^{•-} の λ_{max} (270 nm 付近) における吸光度の経時変化から反応速度を求めた。SOD モデルと O₂^{•-} の反応は、金属の還元反応が律速であるので、自己不均化の速度定数を k_{self} 、SOD モデルによる O₂^{•-} の消失の二次反応速度定数を k_{cat} とすると (6) 式が成り立つ。SOD 活性は、O₂^{•-} の消失が自己不均化よりも速くなったときに有効となるので、 k_{cat} が k_{self} より十分大きいものとする、(6) 式の $k_{\text{self}} [\text{O}_2^{\bullet-}]^2$ の項は無視できる。従って O₂^{•-} の消失速度は (7) 式ようになる。

$$-d[\text{O}_2^{\bullet-}]/dt = k_{\text{self}}[\text{O}_2^{\bullet-}]^2 + k_{\text{cat}}[\text{O}_2^{\bullet-}][\text{SOD model}] \quad (6)$$

$$-d[\text{O}_2^{\bullet-}]/dt = k_{\text{cat}}[\text{O}_2^{\bullet-}][\text{SOD model}] \quad (7)$$

また、触媒である SOD モデルの濃度は一定と考え、O₂^{•-} の消失速度は見かけの反応速度定数 k_{obs} を用いて表すと、(8) 式ようになる。

$$-d[\text{O}_2^{\bullet-}]/dt = k_{\text{cat}}[\text{O}_2^{\bullet-}][\text{SOD model}] = k_{\text{obs}}[\text{O}_2^{\bullet-}] \quad (8)$$

$$(k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}}[\text{SOD model}])$$

(8) 式を t について解くと (9) 式が得られ ($\ln [\text{O}_2^{\bullet-}]_{t=0}$ は積分定数)、(9) 式がストップフロー法における O₂^{•-} の消失速度の算出式に相当する。

$$\Delta \ln [\text{O}_2^{\bullet-}] = k_{\text{obs}} \cdot t \quad (9)$$

$$(\Delta \ln [\text{O}_2^{\bullet-}] = \ln [\text{O}_2^{\bullet-}]_{t=0} - \ln [\text{O}_2^{\bullet-}]_{t=t})$$

O₂^{•-} の濃度は吸光度 (Abs) で置き換えられるので、

(10) 式が得られ、

$$\Delta \ln \text{Abs} = k_{\text{obs}} \cdot t = k_{\text{cat}}[\text{SOD model}] \cdot t \quad (10)$$

この式を用いて PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**8**) の O₂^{•-} 濃度の経時変化を調べた (**Fig. 5**)。一般に高分子は分散性が低いので、DMSO と緩衝溶液のミキシングを行うストップフロー法ではうまく測定できないことがある。PEG 修飾後の分子量は 10 万を超えるが、**8** は問題なく O₂^{•-} の減衰曲線が得られた。これは PEG (非イオン性界面活性剤) が両親媒性であることに由来し、PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**8**) は分散性の面でも優れた SOD モデルとして期待できることが示唆された。次に **Fig. 5** の吸光度 (縦軸) を自然対数に変換し、得られる擬一次直線の傾きから、**8** の金属ポルフィリン濃度 (0, 8, 16 μM) に対する k_{obs} を算出した (**Fig. 6**)。さらに金属ポルフィリン濃度に対して k_{obs} をプロット (**Fig. 7**) し、その直線の傾きから k_{cat} を求め、この k_{cat} を SOD 活性の指標とした。**8**、再構成ヘモグロビン (**2** および **4**) および低分子系 SOD モデル化合物であるカチオン性金属ポルフィリン (MnT2MePyP および MnT4MePyP) の k_{cat} を **Table 3** に示した。 k_{cat} 値は MnT2MePyP-Hb (**4**) > MnT2MePyP-Hb-PEG (**8**) > FeT2MePyP-Hb (**4**) の順となり、**8** を **4** と比較すると PEG 修飾型は若干の活性低下がみられたが、Fe 系の **2** と同等の活性を示した。

3.3 H₂O₂ に対する安定性評価

SOD 活性を有する物質は、O₂^{•-} を不均化させることにより H₂O₂ を生成する。この H₂O₂ が低分子系の SOD モデル化合物の劣化・分解を誘発することが報告されている (3)。そこで、PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**8**) の H₂O₂ に対する安定性を、既報 (14, 28-30) を参考にして調べた。具体的には、SOD モデル化合物に H₂O₂ 添加後、Soret 帯の減衰曲線が定常状態に達する時間を SOD モデル化合物の分解・消失時間 (t_d) とし

Fig. 5 Absorbance Changes at 270nm during the Reaction of **8** and KO₂ in Phosphate Buffer Solution at 37°C. MnT2MPyP conc. (μM) of **8**: a, 0; b, 8; c, 16.

Fig. 6 Relationship between $\ln(\text{Abs})$ at 270 nm and Time for the Reaction of **8** with KO_2 . MnT2MPyP conc. (μM) of **8**: a, 0; b, 8; c, 16.

て求めた。**8**、ヘモグロビン (**1**)、再構成ヘモグロビン (**4**) および低分子のカチオン性金属ポルフィリン (MnT2MePyP) の t_d を **Fig. 8** に示す。**8** の t_d は MnT2MePyP に比較して著しく増加した。これは、再構成されたポルフィリンは周辺がグロビン鎖に取り囲まれているため、 H_2O_2 による直接的な開環反応が抑制されたと考えられる。また、**8** の H_2O_2 に対する安定性は **4** に比べ2倍であった。従って、 H_2O_2 に対する PEG 修飾は、安定性を効果的に向上させることが明らかとなった。

Fig. 7 Relationship between k_{obs} and Metall-porphyrin Concentrations (μM) in **8**.

Table 3 k_{cat} Values of Various Reconstituted Hemoglobins.

Compound	$k_{\text{cat}} (\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	Ref.
2	2.1	This work
4	3.6	〃
8	2.2	〃
MnT2MePyP	60	33
MnT4MePyP	14	This work

Fig. 8 Disappearance times (t_d) of Reconstituted Hemoglobins Modified with PEG (**8**), Hemoglobin (**1**), Reconstituted Hemoglobins (**4**), and MnT2MPyP under Conditions of H_2O_2 : Por (molar ratio) = 1000 : 1. (See Ref. 14 for data obtained under conditions of H_2O_2 : Por (molar ratio) = 300 : 1 for **4** and **1**.)

3.4 アルブミンとの凝集性評価

血漿には、アルブミンが約 50 ~ 60% 含まれており、浸透圧維持と栄養物質や薬物輸送の仲介を担っている。PEG で修飾されたヘモグロビンは、非自己タンパクとして認識されないため、白血球により代謝されることはなく、極めて安定に存在することが知られている。そこで、血漿の主成分であるアルブミンと PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**8**) との凝集能を、UV-vis. スペクトルにより測定した。具体的には、SOD モデル化合物にヒト血清アルブミンを添加後、Soret 帯の吸光度が増加した時間を、SOD モデル化合物の凝集時間 (t_a) として求めた。**8**、**1**、MnT2MePyP およびモデル化合物を添加しない場合 t_a を **Fig. 9** に示す。**8**、**1** および MnT2MePyP は、いずれもモデル化合物を添加しない場合より若干 t_a が減少したが、低分子モデル化合物 (MnT2MePyP) と高分子モデル化合物 (**8**, **1**) は、ほぼ同程度の安定性を有することが明らかとなった。

4 結 論

O_2^- を不均化して代謝を促進する SOD モデル化合物を設計するに当たり、アポヘモグロビンをキャリアー

Fig. 9 Apperance Times (t_a) of Reconstituted Hemoglobin Modified with PEG (**8**), Hemoglobin (**1**) and MnT2MPyP.

とし、活性部位として金属ポルフィリン錯体を導入した再構成ヘモグロビンを合成し、さらなる安定性向上を図るため PEG 修飾再構成ヘモグロビンを合成した。その結果、次の結論が得られた。

(1) PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**6** ~ **9**) は良好な SOD 活性を示し、中でも **8** は顕著な SOD 活性を示した。その指標である IC_{50} , k_{cat} はそれぞれ 2.3, 2.2×10^6 であった。

(2) **8** の t_d は、低分子モデル化合物 (MnT2MePyP) のそれと比較すると数倍向上し、効果的な H_2O_2 耐性を有することが明らかになった。

(3) **8** の t_a は MnT2MePyP と比較して同等であり、アルブミンとの凝集能はほとんど促進されなかった。

(4) 本研究によって、カチオン性マンガンポルフィリンを含む PEG 修飾再構成ヘモグロビン (**8**) は、 H_2O_2 耐性を有し、また、アルブミンとの凝集性の低い有効な長期血中滞留型 SOD モデル化合物であることが明らかになった。

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. Biol. 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 (4-N-methyltiosemicarbazone)], 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. DEROCHÉ, I. MORGENSTERN-BADARAU, M. CESAR-RIO, J. GUIKHEM, B. KEITA, L. NADJO and C. HOUEK-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. MIDORIKAWA and M. YUASA, SOD Activity of Cationic-porphyrin Having a Cationic Channel, *Inter. Symp. Biomater. DDS, Proc.*, p.176 (2000).
13. A. YAMAGUCHI, T. ISHINO, N. MATSUKURA, H. KAWAKAMI, S. ASAYAMA, S. NAGAOKA and M. YUASA, Superoxide Dismutase Activities of Iron- porphyrins Modified with Poly(L-lysine), *J. Oleo Sci.*, Vol. **52**, 269-276 (2003).
14. M. YUASA, A. YAMAGUCHI, S. MIKAMI, U. MIDORIKAWA, H. KAWAKAMI, S. NAGAOKA, Synthesis of Reconstituted Hemoglobins Containing Metallo- porphyrin Derivatives and SOD Activity, *J. Oleo Sci.*, Vol. **52**, 149-157 (2003).
15. K. KALYANASUNDARAM, Photochemistry of Water-soluble Porphyrins : Comparative Study of Isomeric Tetrapyrrolyl- and Tetrakis(N-methylpyridiniumyl) Porphyrins, *Inorg. Chem.*, Vol. **23**, 2353-2459 (1984).
16. 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).
17. 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).
18. A.D. ADLER, F.R. LOMGO, F. KAMOAS and J. KIM, On the

- Preparaion of Metalloporphyrins, *Nucl. Chem.*, Vol. **32**, 2443-2445 (1970).
19. 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).
20. F. ASCOLI, M. ROSARIA, R. FANELLI and E. ANTONINI, Preparation and Properties of Apohemoglobin and Reconstituted Hemoglobins, *Methods in Enzymology*, Vol. **76**, 72-87 (1981).
21. M.R. WATERMAN and T. YONETANI, Studies on Modified Hemoglobins. I. Properties of Hybrid Hemoglobins Containing Manganese ProtoporphyrinIX, *J. Biol. Chem.*, Vol. **245**, 21, 5847-5852 (1970).
22. P.E. KEIPERT and T.M. CHANG, Preparation and *in vitro* Characteristics of a Blood Substitute Based on Pridoxylated Polyhemoglobin, *Applied Biochem. Biotec.*, Vol. **10**, 133-141 (1984).
23. K. IWASAKI and K. AJISAKA and Y. IWASHITA, Hemoglobin-inulin Conjugate as an Oxygen Carrying Blood Substitutes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. **113**, 513-518 (1986).
24. Y. IWASHITA, Prydoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene Conjugate (PHP) as an Oxygen Carrier, *Artificial Organs Today*, Vol. **1**, 89-114 (1991).
25. J.M. MCCORD and I. FRIDOVICH, Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, Vol. **244**, 6049-6055 (1969).
26. 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).
27. D.P. RILEY, W.J. RIVERS and R.H. WEISS, Stopped-flow Kinetic Analysis for Monitoring Superoxide Decay in Aqueous Systems, *Anal. Biochem.*, Vol. **196**, 344-349 (1991).
28. R.K. ROOT and J.A. METCALF, H₂O₂ Release from Human Granulocytes during Phagocytosis. Relationship to Superoxide Anion Formation and Cellular Catabolism of H₂O₂ : Studies with Normal and Cytochalasin B-treated Cells, *J. Clin. Invest.*, Vol. **60**, 1266-1279 (1977).
29. 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 Let Enzyme, *Anal. Biochem.*, Vol. **80**, 409-415 (1977).
30. E.E. DI IORIO, Preparatiob Derivatives of Ferrous and Ferric Hemoglobin, in *Methods in Enzymology*, Vol. **99**, 57-72 (1981).
31. D. ZHANG, H. BUSCH, P.L. LENNON, R.H. WEISS, W.L. NEUMANN and D.P. RILEY, Iron(III) Complexes as Superoxide Dismutase Mimics: Synthesis, Characterization, Crystal Structure, and Superoxide Dismutase (SOD) Activity of Iron(III) Complexes Containing Pentaaza Macrocyclic Ligand, *Inorg. Chem.*, Vol. **37**, 956-963 (1998).
32. R.H. WEISS, A.G. FLICLINGER, 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 Kinitics, *J. Biol. Chem.*, Vol. **268**, 23049-23054 (1993).
33. R. KACHADOURIAN, I.B. HABERLE, I. FRIDOVICH, Synteses and Superoxide Dismuting Activities of Partially (1-4) β -Chlorinated Derivatives of Manganese(III) meso-Tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin, *Inorg. Chem.*, Vol. **38**, 391-396 (1999).