— 総合論文 —

(日本化学会誌, 1988, (6), p. 845~852)

© 1988 The Chemical Society of Japan

高分子ポルフィリン錯体の酸素配位反応

(1988年2月15日受理)

土 田 英 俊

高分子に結合したポルフィリン錯体は、広い条件範囲で酸素を可逆的に配位する。固相高分子中に分散して密度高く固定されたコバルトポルフィリンでは、濃度勾配にしたがって酸素が配位結合をくり返し移行する結果、いわゆる促進輸送の現象が観測される。鉄ポルフィリンは水相系において直ちに不可逆酸化を受けるが、高分子に結合し特定環境に取り込まれた状態では安定で、容易に可逆的な酸素錯体を形成する。リン脂質と構造を類似させたポルフィリンの新しい誘導体(略称: リビドヘム)は、リン脂質と相溶性の高い分子集合体を形成、生理条件下(生理塩水溶液, pH 7.4, 温度 37~40°C, 大気下)で酸素運搬体として機能する。ポルフィリン錯体への酸素配位の観測は、高分子が形成する錯体部周辺の分子環境解明の手がかりにもなる。

1 緒 言

有機高分子にポルフィリンが結合した高分子ポルフィリン錯体では、高分子マトリックスが錯体を固定するとともに錯体部周辺の分子環境を形成している。たとえば、ポルフィリンにイオンや酸素など小分子が結合するさいの平衡反応では、平衡定数や配位反応の動的挙動が高分子の環境効果や導入錯体部の連続度、密度および配向度などの因子に強く影響される。

高分子にポルフィリンを組み合わせた場合の利点は(i)ポルフィリン化学の膨大な蓄積情報が利用できる、(ii)生体反応の場合にみられる電子伝達過程、酵素活性、酸素輸送など、高分子化にともなう広範囲の機能発現、(iii)各種分光法に対して活性なポルフィリンは、高分子ドメインの強力な標識となる、また、(iv)比較的構築が容易な溶媒可溶で構造明確な錯体である、などを特徴として挙げることができる。

脊椎動物における呼吸や生体反応に関与して、酸素分子の運搬や貯蔵に携わっているヘモグロビン(以下 Hb と略記する)、ミオグロビン(以下 Mb と略記する)は、酸素の結合席としての鉄ポルフィリンを含む複合タンパク質(高分子ポルフィリン錯体)である。Hb と同じように選択的に酸素を配位結合して効率高く運搬できる物質系が化学的に構成できるならば、酸素の分離、輸送、反応の新しいシステムが可能となり、直接広汎な応用にもつながるので強い関心が集まっているのである^{1)~6)}。

Hb や Mb から単離された鉄ポルフィリンは酸素に接触する

と、水中はもちろん有機溶媒中であっても中心鉄が不可逆酸化[Fe(II)→Fe(III)]されるため、Hb, Mb にみられる可逆的な酸素配位はまったく認められなくなる。この事実は錯体周辺に高分子鎖(グロビン)が構築している、ドメインの効果によるものと考えてよい。ところで、Hb などにおける鉄ポルフィリンの酸素結合反応は、簡単には次式のようにまとめられている¹⁾。

(P: ポルフィリン, L: 塩基配位子)

すなわち可逆的な酸素配位を可能とするためには、(i)デオキシ鉄ポルフィリンが五配位構造をとり、酸素結合席が空であること(式(1))、(ii)酸素錯体にもう一つの鉄ポルフィリンが結合して橋かけされたμ-オキシ2量体を生成する不可逆反応(式(2))を禁止すること、(iii)鉄ポルフィリンに結合した酸素にプロトン(水)が付加する反応(式(3))を抑制すること、の3条件が満足されなければならない。

この考え方に沿って数多くのポルフィリン誘導体が合成されてきている。たとえば、ポルフィリン環へ導入する修飾置換基をみても、最近では手が込んでますます高度になり、分子量が1500を越える多数のポルフィリン誘導体⁷⁾が報告されている⁵⁾⁶⁾。しかし、修飾にともないポルフィリン面に撓みやひずみが発生するため、可逆的な酸素結合という点からみた場合のポルフィリン環修飾は、限界に達している状況にあるといつてよい。

可逆的な酸素結合をもつポルフィリン錯体の展開を目指した

早稲田大学理工学部応用化学科, 160 東京都新宿区大久保

- 1) 日本化学会編, 土田英俊, “錯体化学からみた生体系とそのモデル, 化学総説 No. 20”, 学会出版センター (1978) p. 30.
- 2) R. D. Jones, D. A. Summerville, F. Basolo, *Chem. Rev.*, **79**, 139(1979).
- 3) J. P. Collman, *Acc. Chem. Res.*, **10**, 265(1977).
- 4) T. G. Traylor, *ibid.*, **14**, 102(1981).
- 5) J. E. Baldwin, P. Perlmutter, *Top. Curr. Chem.*, **121**, 181(1984).

- 6) E. Tsuchida, H. Nishide, “Biomimetic and Bioorganic Chemistry(II),” Chapt. 2 Hemoglobin Model.: Springer-Verlag (Berlin, New York 1986) pp. 63~99.
- 7) 例: リビドヘムの分子量 2304.

もう一つの方法は、グロビン (Hb のタンパク質部分) を合成高分子に置き換えた高分子錯体である⁸⁾⁹⁾。この場合にはポルフィリンを疎水的な高分子ドメインに、分子分散させて固定することが要点となる。著者らは通常の雰囲気、つまり常温大気圧下で酸素運搬能をもつ、高分子ポルフィリン錯体を目指して合成化学的な研究を展開してきた結果、固相、有機溶媒中、さらには水溶液においても、可逆的な酸素配位が可能となる系をいくつも明らかにして来ているので、その考え方と最近の結果を紹介し、あわせてそれらを利用した酸素運搬システムについても述べておきたい。

2 固相系ポルフィリン錯体の酸素配位

固相状態では錯体の中心金属の不可逆酸化 (式(2)) が抑制されるため、錯体部への酸素配位が容易となる。さらに、錯体部を固相の高分子マトリックスに固定して、錯体周囲環境が水分子などの接近を防ぐことになれば、配位酸素との反応による劣化 (式(3)) を制御できることになる。このような考えは比較的古くからあり、実際には成功しなかったのであるが、ポルフィリンの酸素配位が観測できるのではないかと期待から、高分子への固定が有効ではないかと考えられ、検討結果が報告された例もある⁸⁾⁹⁾。

ところで、酸素配位ポルフィリン錯体の特徴は、結合と解離がきわめて迅速な点にある。いわば動的な相互作用とみることのできるものである。高分子ポルフィリン錯体では、この動的作用を連続系として構成することも原理的には可能である。しかし、調製法の難しさから、溶液系にみられるような高速反応は、固相では従来必ずしも観測されていなかった。

最近、著者らはある構造のポルフィリン錯体を特定条件下に成膜すると、錯体の酸素配位が均一溶液系と同じように迅速に進むことを見だしている¹⁰⁾。この場合、錯体をいわば生きたまま固定することが不可欠である。たとえば、コバルトポルフィリン [I] をポリ(メタクリル酸アルキル)に分散した系は、赤色透明のゴム状膜として得られるが、酸素の配位と解離の反応をこの色調を標識としてフラッシュホトリシス法で *in situ* 観測 (図1) することができる¹¹⁾。ミリ秒の範囲で酸素配位は完了し、錯体を固相高分子中に固定した後でも、溶液系と同じ動力学式が当てはまる。

酸素の配位と脱着は雰囲気中の酸素分圧に対応して生起するため、錯体膜の色調は暗赤 (deoxy) ~ 鮮赤 (oxy) の間で可逆的に変化し、酸素分圧と酸素配位量の関係は Langmuir 型の等温吸着曲線になる (図2)¹²⁾。式(4)から求めた酸素配位の飽和量は、膜に仕込みの [錯体量] にはほぼ一致するので、平衡論的にみても定量的な酸素配位 (式(1)) が成り立っていることがわかる。

8) E. Tsuchida, H. Nishide, *Adv. Polym. Chem.*, **24**, 1 (1977).

9) E. Tsuchida, *J. Macromol. Sci.*, **A 13**, 545(1979).

10) H. Nishide, M. Ohyanagi, O. Okada, E. Tsuchida, *Macromolecules*, **19**, 494(1986).

11) H. Nishide, M. Ohyanagi, O. Okada, E. Tsuchida, *ibid.*, **20**, 417(1987).

12) M. Ohyanagi, H. Nishide, K. Suenaga, E. Tsuchida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 305(1987).

Fig. 1 Flash photolysis of the Co-porphyrin [I]-Im/poly(butyl methacrylate) (PBMA) membrane under air and approximation to pseudo-first-order kinetics for the membrane at 25°C ([I]=2.5 wt%)

Fig. 2 O₂-binding and -dissociation equilibrium for Co-porphyrin membranes at 25°C

○: Poly(dimethylsiloxane) (PDMS), ●: PBMA, ●: Poly(methyl methacrylate) (PMMA)

この高分子ポルフィリン錯体を圧力隔膜としたとき、高圧側 (つまり高濃度側) から溶解した酸素は膜 (高分子錯体) 内を拡散して低圧側へ透過する。たとえば錯体 [I] を固定したポリ(メタクリル酸アルキル)膜での酸素透過は、酸素透過係数 (P) で 3×10^9 (cm³ (STP) cm/cm²·s·cmHg), 透過係数比 (酸素/窒素) は低圧側で約 10 となる。この値は高分子に固定した錯体の濃度増加にともなって大きくなり、濃度 (wt%) 0, 2.5, 4.5, 25.0 に対し、それぞれ 3.3, 5.7, 12, 32 の数値が得られている¹¹⁾。要するに、選択的に酸素を結合する錯体の濃度を増加すれば、膜を経由する酸素の促進輸送が観測されることになる。

同じような酸素促進透過は、ポリ(メタクリル酸オクチル)-(N,N'-ジサリチリデンエチレンジアミン)コバルト系でも観測されており¹³⁾¹⁴⁾、たとえば、錯体含量 12 wt% の膜で透過係数 10, 酸素供給圧 10 mmHg で (酸素/窒素) 比 15 が測定されている。最近、コバルト Schiff 塩基をポリスチレンに共有結合で導入した高分子膜でも、同様な酸素透過が報告されている¹⁵⁾。

3 高分子ポルフィリン錯体膜での酸素促進輸送

ポルフィリン錯体膜での酸素透過の様子を図3に示した¹¹⁾¹³⁾が、

13) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Ohyanagi, K. Kawakami, *Macromolecules*, **20**, 1907(1987).

14) H. Nishide, M. Ohyanagi, H. Kawakami, E. Tsuchida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 3213(1986).

15) R. S. Drago, K. J. Bulkus, *Inorg. Chem.*, **25**, 716 (1986).

Fig. 3 Illustration of O_2 transport in a fixed carrier membrane

図中で膜の左側から供給された気体は、減圧側（右側）へ拡散してくる。気体透過は Henry 則にしたがう物理溶解と、膜内の酸素濃度勾配に対応した拡散による透過である。ゴム状の高分子均質膜にみられる一般的な酸素透過では、透過係数 (P_D) は高分子への溶解度係数 (k_D) と酸素の拡散係数 (D_D) の積で表わされる。これとは別の機構として、膜内にある錯体部（ポルフィリン錯体）への選択的かつ可逆的な酸素配位にともなう膜への溶け込みと、錯体部を経由する拡散に基づく透過がある。酸素の配位は図2に示したように、典型的な Langmuir 型吸着等温式にしたがう。この錯体の寄与による酸素の透過係数 (P_0) は、Langmuir 式で表わされる酸素の溶解項と、錯体を経由する酸素分子の拡散定数 (D_0) の積で表わされることになる。

高分子錯体膜の酸素透過では、この二つの機構の間でつねに平衡が成立している。すなわち、ポルフィリン錯体への酸素配位の動力学定数は、前に述べた酸素の配位挙動からも明らかのように、マトリックス中を酸素が移行する速度に比較して十分大きい。よって全体の酸素透過係数 P は、次式の物理的な酸素透過係数 P_D (第1項) と、錯体への配位による酸素透過係数 P_0 (第2項) の和で表わされる。

$$P = P_D + P_0 \\ = k_D D_D + D_0 C'_0 K / (1 + K p_2) \quad (5)$$

ここで p_2 は高分子錯体への酸素供給圧、 C'_0 は錯体への酸素配位飽和量（膜中の錯体濃度に対応）、 K は錯体への酸素配位平衡定数〔(式4)に示した K で図2からも求められる〕である。したがって、錯体膜での酸素の透過は単なる高分子膜に比較して、ポルフィリン錯体による輸送分（第2項）だけ促進されることになる。

式(5)から酸素分圧の低い領域では、第2項の透過係数 (P) への寄与が増大するはずであるが、実際、透過係数 (P) は p_2 が低いところで増加（図4）しており、錯体による促進輸送効果はきわめて顕著である。同じ錯体膜について窒素透過係数をみると、窒素分圧にまったく関係なく一定値を示すので、高分子マトリックスにおける促進輸送は、酸素の物理的な拡散に基づく Henry 型（第1項）と錯体への配位による Langmuir 型（第2項）の和として式(5)のように表現できるのである。

酸素透過量と時間の関係は、初期に非定常状態がみられるが、これは酸素が膜内にある錯体部と相互作用をくり返すだけ遅延が認められるためであり、透過係数 (P) と同じように p_2 分圧の低い側でこの遅れ時間 (θ) が大きくなる（図5）。この θ と

Fig. 4 Effect of upstream gas pressure on permeation coefficient for the [I]-Im/PBMA membrane

Fig. 5 Effect of upstream gas pressure on induction period for [I]-Im/PBMA membrane

P に関し (式5) の取り扱い¹⁶⁾ を適用し、これを同じ試料膜について、別途の分光学的算出から得た定数と比較検討して、式(5)に示す各定数値を決定することができる（表1）。このようにして透過ガス量から算定された高分子内の錯体濃度 (C'_0) は、錯体種あるいは温度に関係なく一定値となるが、これはさきに述べた輸送機構の取り扱いを支持する結論である。

錯体の種類が酸素の促進輸送に与える影響は表1から明らかであるが、錯体構造が酸素親和力（平衡定数 K ）を大きく変動させている。配位子を変えるだけで配位平衡定数 K は 10^8 倍も変化する¹¹⁾。イミダゾール錯体では式(5)第2項の数字が大きくなるため、きわめて大きな P 値を与えることになるのである。酸素親和力が高いほど (K が大きいほど)、結果として高分子膜へ溶け込む酸素量が増すからである。

もちろん、錯体と酸素の結合および解離の速度定数 (式(4)に

16) D. R. Pual, W. J. Koros, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, 14, 675(1976).

Table 1 Oxygen-binding and permeation parameters in Co-porphyrin membrane

Ligand	Temp (°C)	Spectroscopy		Permeation			
		$K \cdot 10^2$	k_{off}	$P \cdot 10^{-10}$	$D_G \cdot 10^8$	D_O/D_D	C_G'
MIm	20	8.4	—	8.5	1.2	0.02	0.2
	25	5.6	0.28	12	1.4	0.02	0.2
	30	3.8	—	14	2.0	0.02	0.2
M ₂ Im	25	2.0	0.42	9.2	2.0	0.03	0.2
Py	25	1.4	1.1	10	3.9	0.06	0.2
MAPy	25	3.5	0.21	8.8	0.65	0.01	0.2
APy	25	2.5	0.15	8.5	0.35	0.005	0.2

* D_D (25°C) = $7.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; k_D (25°C) = $1.0 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$ (STP) $\text{cm}^{-3} \cdot \text{cmHg}^{-1}$.
 K : cmHg^{-1} , k_{off} : s^{-1} , P : cm^3 (STP) $\text{cm} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{cmHg}^{-1}$, D_G : $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, C_G' :
 cm^3 (STP).

[I] = 2.5 wt%; thickness of membranes = 55 μm .

Abbreviation: MIm; 1-Methylimidazole, M₂Im; 1,2-Dimethylimidazole, Py; Pyridine, MAPy; 4-(Dimethylamino)pyridine, APy; 4-Aminopyridine.

おける定数 k_{on} , k_{off} も酸素透過に影響する。同族の軸配位子錯体について、配位酸素が解離するときの速度定数値 k_{off} を観測すると、たとえばビリジン、4-(ジメチルアミノ)ビリジン、4-アミノビリジンの順に小さくなっている(表1)。酸素分子の拡散定数(D_O)にもこれが敏感に反映して同じ順序で減少するし、対応して P も同様の傾向で減少する。すなわち、酸素促進輸送に適したポルフィリン錯体は、平衡論的な酸素結合定数(K)が大きだけでなく、結合と解離の速度定数(k_{on} , k_{off})も大きくなければならない。錯体のもつ酸素配位特性が、高分子錯体系では強調されて発現してくるのである。

4 水相系における高分子錯体の酸素配位

修飾鉄ポルフィリンの酸素結合機能の観察は従来、有機溶媒系の研究にかぎられてきたが、これはこの種の錯体がいずれも水中で直ちに不可逆酸化されてしまうため、酸素錯体形成をまったく観測できないことによるのである。著者らの高分子鉄ポルフィリン錯体が、実ははじめて水中での可逆的な酸素配位結合に成功した例なのである。

もっとも単純な例は、ポリ(1-ビニル-2-メチルイミダゾール)に結合した水溶性の鉄プロトポルフィリン錯体である([2])¹⁷⁾。この系は無酸素下で五配位型[第六配位座(酸素結合席)が空座]の鉄ポルフィリン錯体を形成する。エチレングリコールなどの凍結防止剤を加え系を氷点下に冷却し酸素を吹き込むと、水溶液の色調は暗赤色から鮮赤色に変化して酸素錯体が生成してくるが、その寿命はそれほど長くはない。ポリ(ビニルメチルイミダゾール)の分子量と酸素錯体寿命の関係は図6となるが、酸素錯体生成の要件は、この例で少なくとも分子量数万が不可欠である。

ポリ(*N*-ビニルピロリドン)に鉄ポルフィリン単位を共有結合で導入した系([3])¹⁸⁾では、高分子の効果はもっと明確でやはり冷却した水溶液中で酸素錯体が生成する。酸素錯体の Mössbauer パラメーターを表2に示したが、オキシヘモグロビンに近似した数値となっている。高分子に結合されていない鉄ポルフィリン誘導体では、条件にかかわらず不可逆酸化が観測されるのみで

Fig. 6 Relationship between molecular weight of polymer and the life-time of the oxygen adduct in cold aqueous medium

Table 2 Mössbauer parameters of oxygen adducts of heme systems (at 77°K)

Heme ^{a)}	δ (mm·s ⁻¹)	ΔE_Q (mm·s ⁻¹)
[3a]	0.25	2.11
Lipid-heme/ liposome	0.28	2.15
hemoglobin	0.26	2.19

a) [3a] PVP-bound iron(II)-protoporphyrin IX mono[*N*-[3-(1-imidazolyl)propyl]amide].

あるのに対比して、この場合では水溶性のポリ(*N*-ビニルピロリドン)が形成する比較的疎水性の場に錯体部が分散固定される、いわば特徴ある錯体周囲環境が構成されていることが要点となっている。[3]への酸素配位の速度定数と酸素親和性(p_{50}) (錯体の半量が酸素と結合するときの酸素分圧。平衡定数($K = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$)の逆数)を表3に示した。高分子ポルフィリンでは錯体部を取り囲む高分子環境の立体因子のためか、 k_{off} 値が減少するのに対応して、酸素親和力も低下し Hb の p_{50} に近い値になっている。

水中で生成する酸素錯体の寿命延長は式(3)からもわかるように、錯体部の周囲環境を強い疎水場にしたことが必要となる。親疎水両性のブロック共重合体である、ポリ(オキシエチレン)-

17) E. Tsuchida, H. Nishide, H. Yokoyama, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1984, 2383.

18) H. Nishide, M. Yuasa, E. Hasegawa, E. Tsuchida, *Macromolecules*, 20, 1913(1987).

Table 3 O₂-binding parameters of polymer-bound heme

Heme	$10^{-7} k_{on}$ (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	P_{50} (M ⁻¹)
[3a] ^{a)}	0.079	5.0	3.8
[3b] ^{b)}	0.015	4.2	17
Heme ^{c)}	2.6	47	1.0
Hemoglobin (R) ^{d)}	3.3	12~13	0.22~0.36
Hemoglobin (T) ^{e)}	0.29~1.2	180~2500	40~140
Myoglobin	1.0~2.0	10~30	0.46~0.72

a) [3a]; Poly(1-vinyl-2-pyrrolidone)(PVP)-bound iron (II)-protoporphyrin IX mono[N-[3-(1-imidazolyl)propyl]amide].

b) [3b]; PVP-bound iron(II)-protoporphyrin IX mono [N-[5-(2-methyl-1-imidazolyl)pentyl]amide].

c) Heme; Iron(II)-protoporphyrin IX mono[N-[3-(1-imidazolyl)propyl]amide].

d) Hemoglobin (R); Relaxed-state hemoglobin.

e) Hemoglobin (T); Tense-state hemoglobin.

Fig. 7 Illustration of the lipid-heme embedded in liposome (lipid-heme/liposome)

オリゴスチレン-ポリ(オキシエチレン)構造の、中央ブロックを構成している(オリゴスチレン)部分に、鉄ポルフィリンを導入([4])¹⁹⁾することができる。この場合、錯体部はちょうど高分子ミセルの疎水コアに保護されるため、水中、室温の条件でも鉄ポルフィリンに酸素が可逆的に配位可能となるのである。

5 リピドヘムへの酸素配位

生体由来のリン脂質が分子集合して形成する小胞体は、水に容易に溶解、しかも疎水環境を提供できることがよく知られている。リン脂質構造に類似した誘導基(アルキルホスホコリン基)を導入した、両親媒性鉄ポルフィリン(5, 10, 15, 20-tetrakis[α, α, α-[o-[2, 2-dimethyl-20-[2-(trimethylammonio)ethyl]phosphonatoxy]eicosanamido]phenyl]]porphinatoiron, 略称: リピドヘム)を合成し、これを小胞体二分子膜の層間に包埋する(図7)ときわめて興味深いことに、生理条件下(生理塩水溶液, pH 7.4, 温度 37~40°C)で可逆的な酸素配位が観測される。しかも、長時間にわたって安定に酸素の結合と脱着のくり返しが可能であり、水相系で酸素を可逆的に吸脱着できるまきにはじめて構築に成功²⁰⁾²¹⁾した長寿命酸素錯体の系なのである。

ポルフィリンの同じ側にリン脂質分子と類似構造の置換基4基を導入した、鉄ポルフィリン(リピドヘム)の合成経路を図8に示している²²⁾。リピドヘムは脂質二分子層の層間に相溶性よく分子分散して、安定な脂質集合体を形成する²³⁾。この系は透過型電子顕微鏡観察から直径約 400 Åφ の一枚膜小胞体(SUV)(図9)である。この小胞体1個あたりリピドヘムが500個から1000個を担持されているので、小胞体1個あたり酸素分子500~1000個

Fig. 8 Synthetic scheme of lipid-heme

Fig. 9 Electron microscopic photograph of lipid-heme/liposome

を結合することができ、赤血球に似た赤い色調の溶液となるのである。

このリピドヘムを含む小胞体の系(リピドヘム/リポソーム)は、可逆的に酸素結合できる。この水溶液(ヘム濃度: 10 mmol・

19) K. Shigehara, K. Shinohara, Y. Sato, E. Tsuchida, *Macromolecules*, **14**, 1153(1981).

20) E. Tsuchida, *ACS-Chem. Eng. News*, p. 42 (14th, Jan. 1985).

21) E. Tsuchida, *Ann. New York Acad. Sci.*, **446**, 429 (1985).

22) Y. Matsushita, E. Hasegawa, K. Eshima, E. Tsuchida, *Chem. Lett.*, **1983**, 1387.

23) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa, E. Hasegawa, Y. Matsushita, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1984**, 1147.

Fig. 10 O_2 -binding and -dissociation equilibrium of lipid-heme/liposome

a : Lipid-heme/liposome, b : Hemoglobin in blood, c : Myoglobin

dm^{-3}) 100 ml あたりの酸素溶解量は 23 ml を示し、たとえば人血の例 [ヘム濃度: $9.7 \text{ mmol} \cdot dm^{-3}$ で酸素溶解量: 23 (ml/dl blood)] と比較して、酸素輸送量において全く遜色がないのである²⁴⁾。酸素の結合と解離の速度定数はそれぞれ $10^4 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$, $1.0 \text{ (s}^{-1})$ であり、人血の例と比較しても十分迅速である²⁵⁾。酸素結合平衡曲線 (図 10) から求めた酸素親和力 (p_{50}) は約 50 Torr で、肺における酸素分圧 (約 110 Torr) と末梢組織における酸素分圧 (約 40 Torr) との間で、結合酸素の 30% を放出することができ、有効に作動し得る酸素運搬系であることが実証された²⁴⁾。

(リポドヘム/リポソーム) は、きわめて高い濃度でも均一水溶液となり、赤外吸収スペクトルからも酸素配位が観測できる²⁶⁾。 $^{16}O_2$ - $^{18}O_2$ を吹き込んだ水溶液系の赤外吸収差スペクトルから、鉄ポルフィリンを配位した酸素の伸縮振動 $\nu_{15C-16C}$ 1161 cm^{-1} は、気体酸素 (1556 cm^{-1}) よりもスーパーオキシド型 O_2^- (1145 cm^{-1}) の吸収に近く、Hb (1107 cm^{-1}) や、5, 10, 15, 20-tetrakis ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -pivalamidophenyl)porphyrinatoiron の酸素錯体 (1159 cm^{-1}) に見られる例と同じ配位形式にあると結論することができる。

^{57}Fe -(リポドヘム/リポソーム) の Mössbauer パラメーター (表 3) は、Hb の数値とよく一致している²⁷⁾。酸素錯体を構成しているときの鉄イオンはオキシヘモグロビンと同様に、低スピン 3 価 ($Fe(III)-O_2^-$) であることを示している。

6 分子集合体の構造と酸素運搬機能

リン脂質分子の集合体にリポドヘムがどのような形態で包埋されているかは、酸素の吸脱着をはじめ錯体部の機能発現に関連して重要である。分子集合で構成される二分子配向層に対し、包埋リポドヘムのポルフィリン面がどのような角度 (ϕ) で配位されるかは、系の電気二色性測定から解析できる²⁸⁾。電気複屈折の観

Table 4 Orientation of the heme plane in bilayer

System (Heme/lipid=1/50)	$p_{7.5}$ (—)	p_{∞} (—)	ϕ (E) (—)	ϕ (°)
Heme/liposome	0.28	0.52	0.55	18.7
Lipid-heme/liposome	0.65	0.74	0.88	3.8

測結果から電場下での二分子層の分子配向を確認した後、ポルフィリン面の紫外可視部吸収に基づく電気二色性測定から算出した配向角度 (表 4) から、リポドヘムが膜面に対し平行配向して包埋され、二分子層膜の層間に位置している様子が明らかにされた。

(リポドヘム/リポソーム) の高感度示差走査熱分析から、小胞体の脂質二分子膜の相状態の観測 (図 8) ができる²⁹⁾。リン脂質分子と構造類似性が乏しいポルフィリン誘導体 (たとえば、鉄テトラキス(ビバルアミドフェニル)ポルフィリン) を、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) に包埋した系では、単独系に比較してゲル~液晶相転移温度 (T_0) が低下、相転移点にみられるピーク幅も広がる。しかしながら、リン脂質類似構造をもつ誘導体であるリポドヘムを包埋した系では、転移温度が DMPC のみから成る小胞体系と完全一致し、分子間相容性のきわめて高い集合体が構成されていることが確認された。これはジラウロイルホスファチジルコリン (DLPC)、およびジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) などの系における観測でもまったく同様な結果であった。

酸素親和力 p_{50} (結合平衡定数の逆数) と温度 ($10 \sim 45^\circ C$) の関係 (図 9)³⁰⁾ をみると、たとえば、卵黄レシチン (EYL) 系では直線であるのに対し DMPC 系では折れ点を認め、これを境に酸素親和力が変化する。この不連続点はリン脂質の相転移点 (T_0) に一致し、リン脂質相がゲル状態 ($T < T_0$) では、リン脂質分子の配向性が高いため錯体の配位構造にひずみが生じ、有機溶媒系や液晶状態の脂質二分子層環境に配置されている場合と比較して酸素親和力が低下しているものと推定できる。グロビンタンパク質の高次構造に基づく Hb のそれとは異なるが、ヘム錯体が一種の T 状態³¹⁾ (緊張状態 Tense-state) におがれているものと考えられる。

系の pH が低いと Hb の酸素親和力が低下するいわゆる Bohr 効果が知られているが、この pH 効果はグロビンの高次構造変化が結果としてヘムの酸素結合を調節するため、とくに生体内では組織末梢において代謝物蓄積などによる pH 低下から、酸素解離が促進されることになる。これは生理的に重要な役割を果たしているのである。

特定の脂質から成る (リポドヘム/リポソーム) の酸素親和力と pH の関係 (図 10) をみると、Hb の Bohr 効果とは逆の現象を観測する場合がある³²⁾⁻³⁴⁾。これは小過剰に添加した配位子 (アルキルイミダゾール) の中で配位に関与しない分子が、親水

24) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa, E. Hasegawa, Y. Matsushita, K. Eshima, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985, 275.

25) M. Yuasa, H. Nishide, E. Tsuchida, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1987, 2493.

26) M. Yuasa, K. Yamamoto, H. Nishide, E. Tsuchida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61, 313(1988).

27) E. Tsuchida, H. Maeda, M. Yuasa, H. Nishide, H. Inoue, T. Shirai, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1987, 2455.

28) M. Yuasa, H. Nishide, E. Tsuchida, A. Yamagishi, *J. Phys. Chem.*, in press (1988).

29) M. Yuasa, K. Aiba, Y. Ogata, H. Nishide, E. Tsuchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 860, 558(1986).

30) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa, M. Sekine, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 57, 776(1984).

31) グロビンの立体配置によって起こる構造的束縛に基づくヘム部分の酸素親和性の変化。

32) E. Tsuchida, M. Yuasa, H. Nishide, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1986, 1107.

Table 5 Oxygen-transporting ability

System	Coeff.					
	Total conc. (wt%)	Heme conc. (mmol/l)	Met Hb (%)	p_{50} (mmHg)	Hill No. n (-)	a-v O_2 delivery (ml/dl)
Human blood	—	9.6	<1	27	2.6	7.5
Stroma-free hemoglobin	—	4.4	1	6~13	1.7~2.4	0.3~1.1
Hemosome	25	2.3	2~30	24	2.1	1.7
lipid-heme/liposome	20	10	<1	50	1.0	6.4

Fig. 11 O_2 -uptake and -evolution induced by pH of lipid-heme/liposome solutiona : Equilibrium curve, b : O_2 -uptake and -evolution

部を水相側に向けリン脂質層に配向して溶存しているため、酸性側ではプロトン化 ($pK_a=7.20$) が生じリン脂質の分子配向に乱れを生じさせる。これが原因となって集合分子層の層間に取り込まれたリポドヘムが、見かけ上 R 状態 (Relaxed state) を生じ、酸素親和力が増加すると考えられる。酸素親和力が pH 変化に敏感であることの証明 (図 11) として、pH 変化に応答した酸素の放出と吸収が観測されている。

特定の組成の (リポドヘム/リポソーム) 系は、生理条件下で長時間 (数日以上) にわたって酸素錯体を可逆的に生成することができる³⁵⁾³⁶⁾。また、人血と混合しても、溶血あるいは血小板や血清凝集をまったく惹起せず、リン脂質分解酵素 (ホスホリパー

ゼ A, D) に対しても安定である³⁷⁾³⁸⁾。ex vivo, および pseudo vivo における酸素運搬量の測定から、動静脈の酸素分圧差から酸素供給効率を算出したのが表 5 である³⁹⁾⁴⁰⁾。酸素輸送系を目的とした他の系に比較して、人血と同じ成績が得られている。比重、粒径、粘度、コロイド浸透圧もヒト血液と同じ値に調製できるし、長期保存も可能、また興味あることに粉末にして貯蔵もできる⁴⁰⁾。全合成型の人工赤血球のもつ科学的社会的意義はきわめて大きいと考えられており、現在 in vivo 試験での酸素の運搬効率や組織体への供給も確認されはじめている。

7 おわりに

高分子ポルフィリンを用いる酸素配位系の考え方を簡単に表現すれば、有機高分子に金属錯体の機能を付与方法論の一つである。新しい物質系としての高分子錯体の出現とその機能への期待を示唆するもので、分子量が比較的小さい錯体にはみられない特徴、たとえば動的な弱い配位系、協同的に働く多重相互作用、高分子性に基づく多電子過程や連続ポテンシャル場などに関連して広くこれら分野の基礎科学の確立が要望されるとともに、新しく観測されている現象の解明が強く望まれてきているのである。

この研究は 10 年近い年月にわたり共同研究者西出宏之、大野弘幸、湯浅 真、大柳満之ほかの各博士の献身と大学院生諸君多数の協力を得て推進された。ここに記して謝意を表する。また、研究費の一部は文部省科学研究費補助金 (一般、試験、特定、および重点領域の各研究) によった、御支援に心より感謝する。

- 36) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa, *J. Macromol. Sci.-Chem.*, A 24, 333(1987).
- 37) E. Hasegawa, K. Eshima, Y. Matsushita, H. Nishide, E. Tsuchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 862, 235 (1986).
- 38) Y. Matsushita, E. Hasegawa, K. Eshima, T. Shindo, Y. Yamamoto, H. Nishide, E. Tsuchida, *ibid.*, 901, 166 (1987).
- 39) M. Yuasa, E. Hasegawa, H. Nishide, E. Tsuchida, *J. Macromol. Sci.-Chem.*, A 24, 661(1987).
- 40) E. Tsuchida, H. Nishide, "Liposome as Drug Carriers," ed. by G. Gregoriadis, John Wiley New York (1988) p. 569.

- 33) M. Yuasa, Y. Tani, H. Nishide, E. Tsuchida, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1987, 1219.
- 34) E. Tsuchida, S.-G. Wang, M. Yuasa, H. Nishide, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1986, 179.
- 35) M. Yuasa, Y. Tani, H. Nishide, E. Tsuchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 900, 160(1987).

Oxygen Ligation of Macromolecule-Porphyrin Complexes

Eishun TSUCHIDA

Department Polymer Chemistry, Waseda University; Tokyo 160 Japan

Porphyrin complexes covalently bound to macromolecules bind oxygen reversibly under various conditions. Cobalt porphyrin, fixed to disperse homogeneously and densely in solid polymer matrix, enables the facilitated oxygen transport through successive ligation in a series of complexes with the oxygen concentration gradient. Iron(II) porphyrin is oxidized immediately in an aqueous medium, but ligates oxygen molecule reversibly when it is bound to a macromolecule and accordingly incorporated in hydrophobic environment. A novel iron (II) porphyrin derivative having phospholipid-like substituents (lipid-heme) forms molecular assembly with phospholipids (lipid-heme/liposome), and acts as an oxygen carrier in physiological aqueous salt solution, pH 7.4, 37~40°C, under air. The analyses of oxygen ligation to porphyrin complex is a potential methodology to clarify the molecular environment surrounding the metal complexes.