

ヘムの異常代謝におけるグリーンピグメントのモデル錯体 -N-アルキルプロトポルフィリン-IX-コバルト(II)錯体を有する再構成ミオグロビン-

Model Complexes for Green Pigment in Abnormal Heme Metabolism. - Reconstituted Myoglobins with Cobalt(II) Complexes of *N*-Alkylprotoporphyrin IX -
(平成19年9月受理)

青柳克弘* (AOYAGI Katsuhiko)
芳賀俊彦* (HAGA Takahiko)

Abstract

Cobalt(II) complexes of *N*-methyl and *N*-ethylprotoporphyrin IX dimethyl ester ((*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAc and (*N*-C₂H₅ProtoDME)Co(II)OAc, OAc, acetate) have been prepared and characterized by ¹H-NMR measurements. Reconstitution of sperm whale apomyoglobin with the cobalt(II) complexes of *N*-methyl and *N*-ethylprotoporphyrin IX ((*N*-CH₃Proto)Co(II) and (*N*-C₂H₅Proto)Co(II)) afforded stable myoglobins ((*N*-CH₃Proto)Co(II)-Mb and (*N*-C₂H₅Proto)Co(II)-Mb). The ¹H-NMR spectrum of (*N*-C₂H₅Proto)Co(II)-Mb indicated that proton signals assigned to the methyl group of *N*-ethyl group showed only two sharp signals of line width similar to that of the proton signals of peripheral methyl groups. This is suggestive that only two of the eight isomers of the complex were incorporated into the apomyoglobin. (*N*-CH₃Proto)Co(II)-Mb was reduced by dithionite under anaerobic condition. Electronic absorption spectrum of reduced product showed characteristic feature of organocobalt(III) porphyrin. This fact supports validity of intramolecularity of migration of *N*-substituent from pyrrolic nitrogen to the central metal ion in the cavity of protein.

1. 緒言

N-置換金属ポルフィリンおよび有機金属ポルフィリンの化学は、多くの化学者と生化学者の注目を集めている。シトクロム P-450 を始めその他のヘム蛋白質において、ヘムとラジカル¹⁾やカルベン²⁾のような活性有機種との反応により有機ヘムが得られる。その有機ヘムを酸化すると、有機基がピロールの窒素原子に分子内転移して、*N*-置換ヘムを与える³⁾。ヘムの異常代謝物として発見されたグリーンピグメントは、この *N*-置換ヘムであることが解明され⁴⁾、ミトコンドリア内で行われるフェロケラターゼによる鉄挿入の阻害剤として働き、ヘムの生合成を調節する⁵⁾。

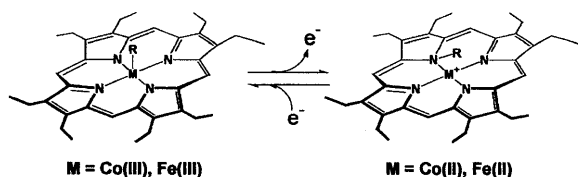
1974年、生越等は *N*-アルキルポルフィリンのコバルト(II)錯体を NaBH₄ で還元すると *N*-アルキル基の分子内転移反応が起き、アルキルコバルト(III)ポルフィリンが生成することを報告した⁶⁾ (Scheme 1)。コバルト(III)に共有結合したアルキル基のピロール窒素原子への可逆的転移反応については、Dolphin によって報告された⁷⁾。そして、これら酸化還元的転移反応が分子内で起こることの妥当性を Callot 等が証明した⁸⁾。また、Mansuy と Ortiz de Montellano はポル

フィリン鉄錯体の酸化還元によって、アルキルおよびアリール基が窒素原子から鉄へ転移することをそれぞれ見出した⁹⁾。*N*-アルキルポルフィリン鉄(II)錯体の自動酸化速度は、鉄(II)ポルフィリンのそれよりも遅いが¹⁰⁾、空気の下有機溶媒中で酸化すると速くなる¹¹⁾。*N*-アルキルポルフィリン鉄(III)錯体は、求核試薬との反応によって容易に脱アルキル化が起き、通常の鉄(III)ポルフィリンとなる¹⁰⁾。ヘムの鉄をコバルトに置換したものは、ヘム蛋白質およびヘム酵素の構造や反応を理解するための有用なモデル錯体となる¹²⁾。*N*-アルキルポルフィリンコバルト(II)錯体は、酸素や求核試薬に対して高い安定性を示す。我々は、*N*-アルキルオクタエチルポルフィリンコバルト(II)錯体(*N*-AlkyIOEP)Co(II)OAc をグリーンピグメントのモデルとしてとらえ、それらの磁化率、ESR¹³⁾、常磁性¹H-NMR¹⁴⁾ および共鳴 Raman¹⁵⁾ を測定し報告した。

今回は、*N*-アルキルプロトポルフィリン-IX、*N*-重水素化アルキルプロトポルフィリン-IXのコバルト(II)錯体とそれらの再構成マッコウクジラミオグロビンの¹H-NMR スペクトル¹⁶⁾ および再構成ミオグロビンの一電子還元によって蛋白質内で起こる *N*-置換基の中心金属への分子内転移反応について報告する。

* 福島工業高等専門学校 物質工学科 (いわき市平上荒川字長尾 30)

Scheme 1



2. 実験

電子吸収、IR、Mass、通常の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、それぞれ、Hitachi 320 spectrophotometer、Hitachi 260-10 IR spectrometer あるいは JASCO FT/IR 7300 FT-IR spectrometer、Hitachi M-60 mass spectrometer および JEOL JNM-FX60Q NMR spectrometer を用いて測定した。*N*-アルキルプロトポルフィリン-IX-コバルト(II) 錯体が結合した再構成ミオグロビン ((*N*-AlkylProto)Co(II)-Mb) の 270MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定のために、((*N*-AlkylProto)Co(II)-Mb) の水溶液をミリポアフィルター (Immersible CX-10) を用いて $1\text{--}2\text{mmoldm}^{-3}$ (約 1mL) に濃縮した。さらに、残りの水のほとんどを KOKUSAN MODEL H-251 高速遠心分離機にメンブランコーン (Amicon, CF-25) を取り付け、 2°C の下、遠心ろ過 (3000rpm, 15min) で除去した。pD7 の重水置換 50mmoldm^{-3} リン酸緩衝液を加え混合し、同様の方法でろ過した。これを 5 回繰り返して、ほとんどの水を重水置換した。この溶液と *N*-アルキルプロトポルフィリン-IX-ジメチルエステルコバルト(II) 錯体 ((*N*-AlkylProtoDME)Co(II)OAc) の NMR スペクトルは、 25°C で JEOL GX 270 NMR spectrometer を用いて測定した。

2-1. *N*-アルキルプロトポルフィリン-IX-コバルト(II) 錯体 ((*N*-AlkylProto)Co(II)) の合成

プロトポルフィリン-IX-ジメチルエステル (ProtoDME) の *N*-アルキル化は、Jackson 等によって報告された方法で行った¹⁷⁾。ProtoDME (500mg) を 5% の酢酸を含む 30mL のクロロホルムに溶解し、ヨウ化メチル (5mL) を加え、その混合物を 5 時間還流した。反応の進行状況は、薄層クロマトグラフィー (TLC) によってモニターした。その溶液を飽和 NaHCO_3 水溶液、次いで水で洗浄した後 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を減圧除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーで精製 (溶出剤: クロロホルム、充填剤: アルミナ (Brockman, activity grade II-III)) した。このようにして得られた *N*-メチルプロトポルフィリン-IX-ジメチルエステル (*N*-CH₃ProtoDME) を再度のカラムク

ロマトグラフィーでさらに精製 (溶出剤: クロロホルム、充填剤: シリカゲル (Wakogel C-200)) し、メタノール-クロロホルムから再結晶して、濃紫色の結晶 98mg (収率 19.1%) を得た^{17,18)}。同様の方法で、ProtoDME (500mg) とヨウ化エチル (5mL) から *N*-エチルプロトポルフィリン-IX-ジメチルエステル (*N*-C₂H₅ProtoDME) (102mg, 収率 19.5%) の合成および精製を行った。*N*-CH₃ProtoDME (50mg) をクロロホルム (50mL) に溶解し、還流させながら酢酸コバルトの飽和メタノール溶液 (10mL) を加えた⁶⁾。その溶液を 2 時間還流した後、水洗し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を減圧除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーで精製 (溶出剤: クロロホルム→メタノール、充填剤: アルミナ) した。得られた緑色のフラクションを少量の酢酸を含んだクロロホルムで処理して、酢酸イオンの軸配位を完全なものとした。その溶液を水洗し、 Na_2SO_4 で乾燥した後、溶媒を減圧除去した。ヘキサノール-クロロホルムから再結晶して、濃緑色の結晶、*N*-メチルプロトポルフィリン-IX-ジメチルエステルコバルト(II) 錯体 ((*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAc) 45mg (収率 75.4%) を得た。Vis (CHCl₃) λ_{max} nm (ϵ_{mM}) 434 (58.6), 549 (6.33), 595 (8.30); Anal. Calcd for C₃₉H₄₂N₄O₆Co·H₂O: C, 61.82; H, 6.12; N, 7.40. Found: C, 63.32; H, 6.00; N, 7.58. 同様の方法で、*N*-C₂H₅ProtoDME (50mg) から *N*-エチルプロトポルフィリン-IX-ジメチルエステルコバルト(II) 錯体 ((*N*-C₂H₅ProtoDME)Co(II)OAc) (42mg, 収率 70.6%) を合成した。Vis (CHCl₃) λ_{max} nm (ϵ_{mM}) 433 (52.9), 549 (6.37), 592 (7.27); Anal. Calcd for C₄₀H₄₄N₄O₆Co·H₂O: C, 63.74; H, 6.15; N, 7.44. Found: C, 63.21; H, 6.00; N, 7.43.

N-メチル-*d*₃-プロトポルフィリン-IX-ジメチルエステル (*N*-CD₃ProtoDME) は、ProtoDME とヨウ化メチル-*d*₃ から得た。同様に、*N*-エチル-*d*₅-プロトポルフィリン-IX-ジメチルエステル (*N*-C₂D₅ProtoDME) は、ProtoDME とヨウ化エチル-*d*₅ から合成した。*N*-CD₃ProtoDME と *N*-C₂D₅ProtoDME は、通常の方法 (上記参照) で、対応するコバルト(II) 錯体 ((*N*-CD₃ProtoDME)Co(II)OAc) と ((*N*-C₂D₅ProtoDME)Co(II)OAc) に変換した。これらの操作の間に重水素のロスは起きなかった。

このようにして得られた (*N*-AlkylProtoDME)Co(II)OAc を 1% KOH を含むメタノール中で 1 時間還流して、対応するジカルボン酸 ((*N*-CH₃Proto)Co(II), (*N*-C₂H₅Proto)Co(II), (*N*-CD₃Proto)Co(II), (*N*-C₂D₅-Proto)Co(II)) に加水分解した。

2-2. (N-AlkylProto)Co(II)-Mbの再構成

マッコウジアラポミオグロビンは、Tealeの方法¹⁹⁾を改良し、メトミオグロビンをHCl-メチルエチルケトンで処理して得た²⁰⁾。(N-AlkylProto)Co(II)を少量の0.1mol dm^{-3} NaOHに溶解し、ただちに純水で薄め約1mmol dm^{-3} の溶液にした。この溶液をアポミオグロビン10mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH7.0)溶液に攪拌しながら滴下した。過剰の(N-AlkylProto)Co(II)は、前もって10mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH6.0)で平衡にしたSephadex G-25のカラムを通して除去した。再構成ミオグロビン(N-AlkylProto)Co(II)-Mbは、CM-52のカラムを通し、50mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH7.0)で溶出させて精製した。すべての操作は低温室(0-5°C)で行った。(N-CH₃Proto)Co(II)-Mb. Vis (50mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH7.0)) λ_{max} nm(Ratios) 280(4.15), 424(10.0), 543(1.0), 598(1.46). (N-C₂H₅Proto)Co(II)-Mb. Vis (50mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH7.0)) λ_{max} nm(Ratios) 280(3.78), 424(8.42), 545(1.0), 598(1.20).

2-3. 補欠分子族の交換

(N-CH₃Proto)Co(II)-Mbとプロトヘムの等モル混合物を50mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH7.0)中、35°Cで24時間処理した。その混合物を10mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH6.0)で一昼夜透析し、CM-52のカラムで処理した。(N-CH₃Proto)Co(II)-Mbとメトミオグロビン((Proto)Fe(III)-Mb)を含む蛋白質のフラクションは、50mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH7.0)で溶出させた。その混合比は、(Proto)Fe(III)-Mbは酵素系において還元できるが²¹⁾、(N-CH₃Proto)Co(II)-Mbはできないという事実を利用して分光測定により決定した。酵素で処理する前と後の598nmにおける吸光度(A_0)および(A_∞)は、次の式で示すように、関係する物質の濃度と関連付けることが出来る。 $\epsilon_{\text{Co(II)}}$ 、 $\epsilon_{\text{Fe(III)}}$ 、 $\epsilon_{\text{Fe(II)}}$ は、それぞれ(N-CH₃Proto)Co(II)-Mb、(Proto)-Fe(III)-Mb、(Proto)Fe(II)-Mbの598nmにおけるモル吸光係数で、[(Proto)Fe(III)-Mb] = [(Proto)-Fe(II)-Mb]である。

$$A_0 = \epsilon_{\text{Co(II)}} [(N\text{-CH}_3\text{Proto)Co(II)-Mb}] + \epsilon_{\text{Fe(III)}} [(Proto)Fe(III)-Mb]$$

$$A_\infty = \epsilon_{\text{Co(II)}} [(N\text{-CH}_3\text{Proto)Co(II)-Mb}] + \epsilon_{\text{Fe(II)}} [(Proto)Fe(II)-Mb]$$

2-4. コバルト原子への分子内アルキル転移

(N-CH₃Proto)Co(II)-Mbの50mmol dm^{-3} リン酸緩衝液(pH 7.0)溶液(5mL)をアルゴンガスで置換し、酵素系での還元を試みたが、反応は進行しなかった。

そこで我々は、ジチオナイトでの処理に切り替えた。過剰のジチオナイトをその溶液に加え、35°Cで100時間加熱した。起こった反応は、電子吸収分光法によりモニターした。

3. 結果と考察

3-1. (N-AlkylProto)Co(II)と(N-AlkylProto)-Co(II)-Mbの合成

ProtoDMEのN-アルキル化は、Jackson等によって報告されたヨウ化アルキルを用いる方法で行った。そのコバルト(II)錯体は、N-AlkylProtoDMEのクロロホルム溶液に酢酸コバルト(II)のメタノール溶液を加えることにより得た。この条件下では、N-アルキル基に影響を与えることはなく、これらの錯体の電子吸収スペクトルはすでに報告されている(N-AlkylOEP)Co(II)OAcのそれに類似していた⁶⁾。それぞれのピロールの窒素へのアルキル化によって、4つの位置異性体とそれらのエナンチオマー合わせて8つの異性体混合物(Fig. 1, 2)が得られるが、これら異性体の分離はできなかった。このようにして得られた(N-AlkylProtoDME)Co(II)OAcを1%KOHを含むメタノール中で加水分解して、対応するジカルボン酸((N-AlkylProto)Co(II))にした。再構成はマッコウ

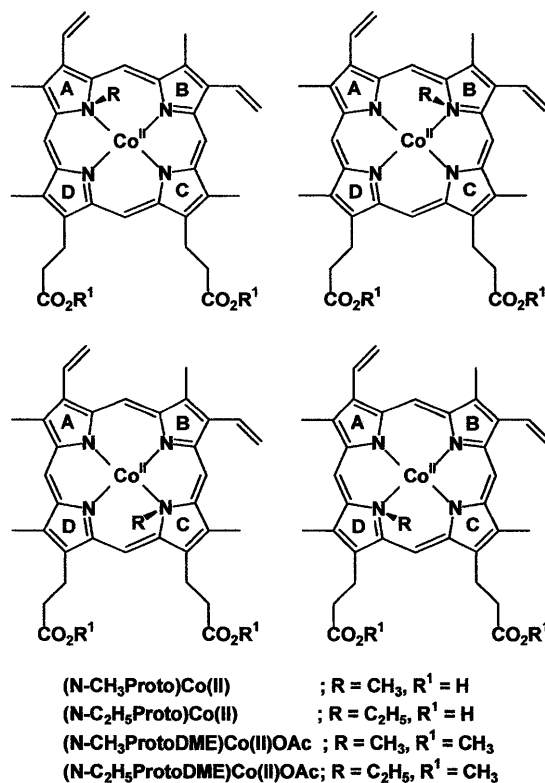


Fig. 1. Four regioisomers of (N-CH₃Proto)Co(II), (N-C₂H₅Proto)Co(II), (N-CH₃ProtoDME)Co(II)OAc, and (N-C₂H₅ProtoDME)Co(II)OAc.

クジリアポミオグロビンと(*N*-AlkylProto)Co(II)を緩衝液中ゆっくり攪拌することにより行い、通常の方法で精製した。これらの蛋白質は、天然^{16f, g)}および鉄^{16h-k, n, o)}、コバルト再構成蛋白質^{16a-e)}の場合よりも高い安定性を示した。

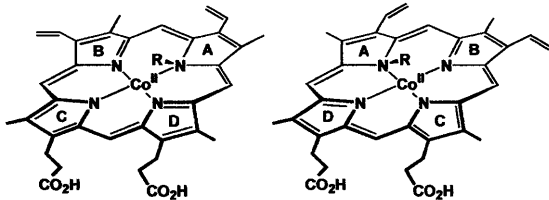


Fig. 2. Two enantiomers of (*N*-AlkylProto)Co(II). N_A denotes the alkylated nitrogen of A-ring of protoporphyrin IX.

3-2. (*N*-AlkylProtoDME)Co(II)OAc と (*N*-Alkyl-Proto)Co(II)-Mb の¹H-NMR 研究

すでに我々は、スピン状態が高スピン($s = 3/2$)である*N*-メチルオクタエチルポルフィリンコバルト(II)錯体((*N*-CH₃OEP)Co(II)OAc)の常磁性¹H-NMRスペクトルについて報告している¹⁴⁾。*N*-メチル、メソ位、周辺置換基エチルのメチレン、軸配位子イミダゾールのプロトンのシグナルは、位置選択的な重水素化によって明確に帰属された。

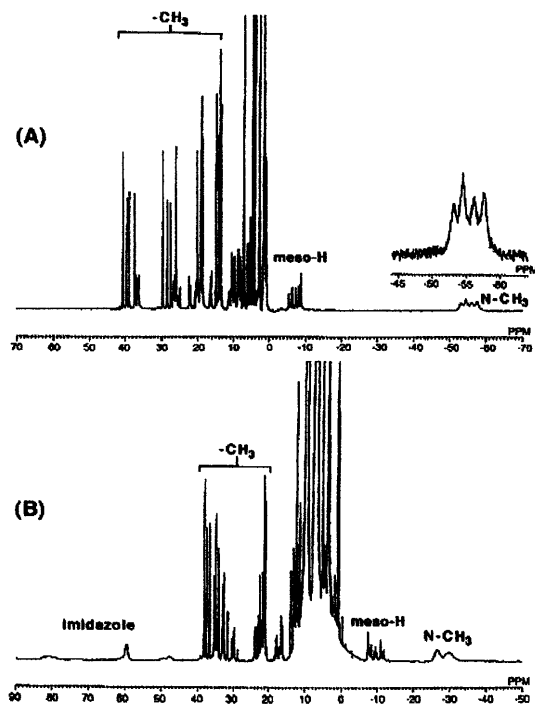


Fig. 3. 270 MHz ¹H-NMR spectra of (A) (*N*-CH₃ProtoDME)-Co(II)OAc and (B) (*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)(Im) (Im = imidazole, Im/(*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAc = 15/1) in CDCl₃ at 25 °C.

Fig. 3 と 4 に (*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAc と (*N*-C₂H₅-ProtoDME)Co(II)OAc の CDCl₃ 中およびイミダゾールを含む CDCl₃ 中におけるそれぞれの¹H-NMR スペクトルを示した。(*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAc の CDCl₃ 中のスペクトルにおいて、4つのブロードな*N*-CH₃シグナルが-55ppmに現れた。(*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAcへのイミダゾールの軸配位により、*N*-CH₃シグナルは低磁場にシフトし、-28ppmに2つのブロードなシグナルとして現れた。(*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAcよりも対象性の高い(*N*-CH₃OEP)Co(II)OAcにおいても、同様の傾向が見られた。高磁場における(*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAcの4つのブロードなシグナルは、ポルフィリンの異なる窒素に結合した4つの*N*-メチル基の存在によるものである。軸配位子のイミダゾールによる4つのブロードなシグナルは、低磁場の48から83ppmの領域に現れた。(*N*-C₂H₅ProtoDME)-

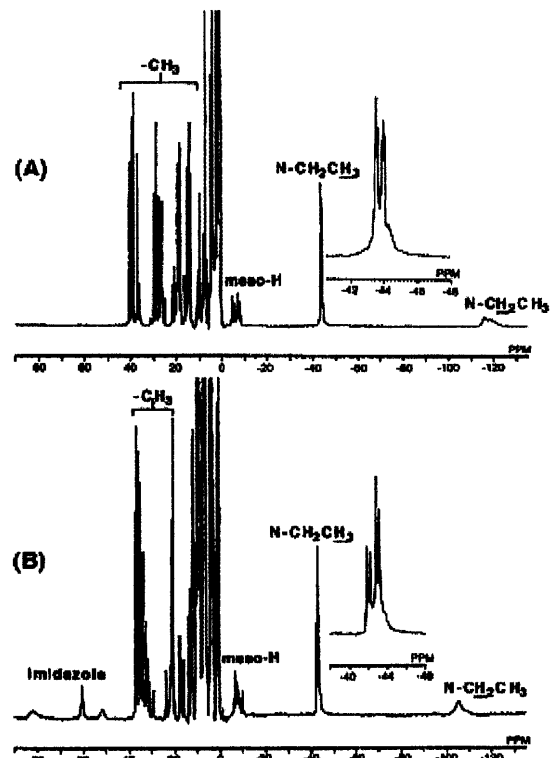


Fig. 4. 270 MHz ¹H-NMR spectra of (A) (*N*-C₂H₅ProtoDME)-Co(II)OAc and (B) (*N*-C₂H₅ProtoDME)Co(II)(Im) (Im/(*N*-C₂H₅ProtoDME)Co(II)OAc = 15/1) in CDCl₃ at 25 °C.

Co(II)OAcの¹H-NMRスペクトルにおいては、*N*-C₂H₅基のCH₃およびCH₂のプロトンと帰属される-44ppmの4つのシャープなシグナルと-120ppmのブロードなシグナルがそれぞれ現れた。これら(*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAcと(*N*-C₂H₅ProtoDME)Co(II)OAcの*N*-アルキル基の帰属は、*N*-メチルおよび*N*-エチル基の重

水素化によって確かめられた。N-アルキル基の大きなシフトやブロードなシグナルは、高スピン状態のコバルト(II)イオンのスピン占有率を反映するものである。窒素に直接結合している炭素の α -プロトンの共鳴は、明らかにスピン密度の影響を受けている。 β -プロトンの化学シフトは、蛋白質の数多くのプロトンが現れる反磁性領域から遠い磁場領域にあるため、($N-C_2H_5$ Proto)Co(II)の結合した再構成ミオグロビンの場合、これらのシグナルを見ることが出来る。

ヘムやヘム蛋白質の常磁性 1H -NMRスペクトルは、蛋白質構造を明らかにするための核プローブとして確立されている^{16f, g, k}。

非対称なプロトポルフィリン-IXの4つの異なるピロールの窒素 (Fig. 1 の N_A, N_B, N_C, N_D) へのアルキル化によって、N-アルキルプロトポルフィリン-IXの4つの位置異性体とそれらのエナンチオマー合わせて8つの異性体が得られた。Fig. 3A に示すように ($N-CH_3$ -ProtoDME)Co(II)OAc は、4つの位置異性体のシグナルが現れる。非対称な蛋白質空間においては、蛋白質と位置異性体錯体とのジアステレオメリックな相互作用により、4つの位置異性体とそれらのエナンチオマー合わせた最大8つのシグナルが得られるはずである。例えば、有機溶媒中、A環の窒素(N_A)にポルフィリン面の上と下からアルキル化した場合、Fig 2 に示すように1:1の割合で2つのエナンチオマーが生成すると考えられる。

ヘムの配向性は、蛋白質とヘムの周辺置換基間の特異的な相互作用によってコントロールされている。プロトヘムは、 α -、 γ -軸を通る C_2 軸が無いために、正常型と反転型の2つの配向が存在する。正常型は蛋白質中における主な配向で、ヘム蛋白質の結晶構造解析²²や常磁性 1H -NMR²³によって決定された。反転型の配向は、ヘムを α -と γ -炭素を通る軸を中心に 180° 回転させたものである。したがって、N-アルキル化によるエナンチオマーは、蛋白質空間において2つの配向をとることができる。プロトヘム平面の上と下の空間はそれぞれ遠位および近位とよばれ、酸素は遠位空間でヘムに結合し、ヒスチジンのイミダゾール基は、軸配位子として近位からヘムに配位している。 $(N-C_2H_5$ -Proto)Co(II)へのイミダゾールの軸配位は、 D_2O 緩衝液中の($N-C_2H_5$ Proto)Co(II)-Mb に H_2O を加えたときに70ppmに現れるヒスチジンのイミダゾール基プロトンの新しいシグナルによって確かめられた。近位にN-置換基があると、大きな立体障害のためヘムへのイミダゾール基の配位を抑制する。したがって、ミオグロビンやシトクロムP-450等の蛋白質空間に

おける正常型配向のヘム鉄へのアルキル化および4つのポルフィリン窒素の1つへのアルキル基の酸化的転移は、遠位で進行する。

($N-C_2H_5$ ProtoDME)Co(II)Imの 1H -NMRスペクトルは、-41.8、-42.1、-42.8、-43.1ppmにN-エチルの CH_3 のシグナルを示した (Fig. 4B)。低磁場側の2つのシ

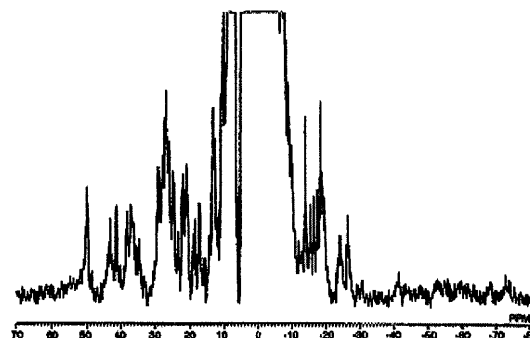


Fig. 5. 270 MHz 1H -NMR spectrum of ($N-CH_3$ Proto)Co(II)-Mb in 50 mmoldm⁻³ potassium phosphate buffer (pD 7.0) at 25 °C.

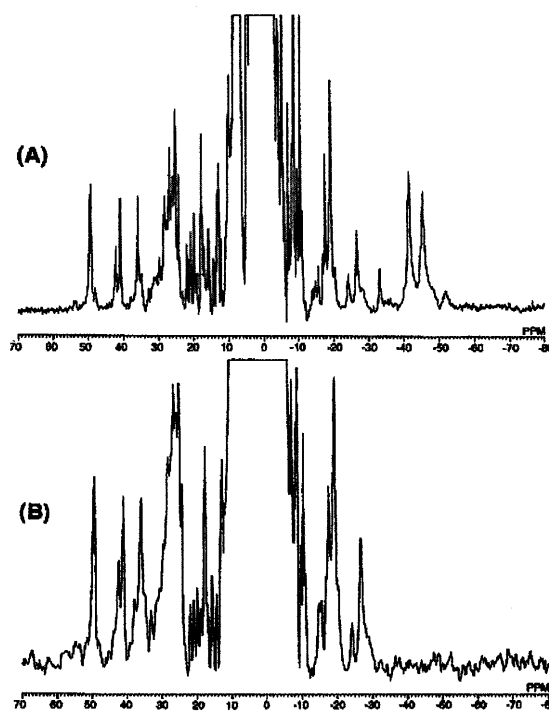


Fig. 6. 270 MHz 1H -NMR spectra of (A) ($N-C_2H_5$ Proto)-Co(II)-Mb and (B) ($N-C_2D_5$ Proto)Co(II)-Mb in 50 mmoldm⁻³ potassium phosphate buffer (pD 7.0) at 25 °C.

グナルおよび高磁場側の2つのシグナルはそれぞれ、遠位におけるA環かB環およびC環かD環のN-エチルのメチルプロトンに帰属される。Fig. 6Aの-41.5と-45.5ppmの2つのシグナルは、蛋白質中における

これらのメチルプロトンに帰属される。遠位空間での蛋白質残基と *N*-エチル基の相互作用により、(*N*-C₂H₅Proto)Co(II)-Mb の2つのシグナルは、(*N*-C₂H₅-ProtoDME)Co(II)Im のそれらと比べて大きく分かれる。*(N*-CH₃Proto)Co(II)-Mb の *N*-CH₃ プロトンの化学シフトは、弱くてブロードなシグナルのために確認できなかった (Fig. 5)。*N*-メチルポルフィリン鉄(II) 錯体 (高スピン, *s*=2) の ¹H-NMR スペクトルは、きわめて低磁場(130ppm)に *N*-CH₃ のブロードなシグナルを示す²⁴⁾。空気存在下、有機溶媒中の鉄(II) 錯体の酸化反応は、非常に速いことが報告されている¹¹⁾。一方、*N*-アルキルポルフィリンコバルト(II) 錯体は、空気中で十分に安定である。

3-3. (*N*-AlkylProto)Co(II)とアポミオグロビンとの結合親和力

ヘム蛋白質の補欠分子族は、いくつかの非天然ヘムと置き換えることが出来る。同様に、再構成ヘム蛋白質中のヘムもまた違う種類のヘムと置き換えられる。平衡状態における2つの異なるヘムの割合は、ヘムポケット内で結合しているヘムの相対的な安定性を示している。再構成ミオグロビン内のメソヘムとプロトヘムの交換反応は既に知られていて、天然のプロトヘムが最も安定なミオグロビンを構成するといわれている²⁵⁾。*(N*-CH₃Proto)Co(II)-Mb と等モル量のプロトヘム (プロトポルフィリン-IX-鉄(III) 錯体) を混合し、35°Cで24時間インキュベートしたところ、そのミオグロビンの58%は(*N*-CH₃Proto)Co(II)を、42%はプロトヘムを含むことが分かった。*(N*-CH₃Proto)Co(II) は安定で、最も安定といわれるプロトヘムに42%しか交換されなかった。これは、(*N*-CH₃Proto)Co(II)の *N*-CH₃ は、遠位におけるCo(II)への水の軸配位を阻害するが、正に荷電している(*N*-CH₃Proto)Co(II)が、近位からのCo(II)へのイミダゾール基の結合を強めるためと考えられる。我々は、有機金属ポルフィリン (メチルロジウム(III) メソポルフィリン-IX) の再構成について最初に報告している²⁶⁾。メトミオグロビンのメチルロジウム錯体による交換実験では15%のプロトヘムが置き換わっただけであった。Rh(III)に結合した遠位の疎水性のメチル基が、極性配位子である水の配位をブロックする。有機金属ポルフィリンを有する再構成ミオグロビンは、その低い安定性のために徐々に変性した。この結果は、有機ヘムの生成により酵素や蛋白質が変性し、有機基のポルフィリン窒素への酸化的転移が起きることを示している。

3-4. コバルト原子への分子内アルキル基転移

生越等は、(*N*-CH₃OEP)Co(II)OAc をNaBH₄で還元するとメチルコバルト(III)ポルフィリンが生成することを報告し、メチル基が窒素からコバルトに分子内転移して有機金属ポルフィリンを与える機構を提案した⁶⁾。Dolphin等はアルキルコバルト(III)ポルフィリンから*N*-アルキルポルフィリンコバルト(II)錯体への一電子酸化による可逆的転移反応を行った⁷⁾。その可逆的酸化還元転移反応の様子をScheme 1に示した。彼らは、このタイプの転移が分子間反応機構で進行する可能性を排除できなかった。しかし、Callot等は、重水素化ポルフィリンと質量分析を使用することによって分子内転移反応の妥当性を証明した⁸⁾。

蛋白質内におけるNからCoへのアルキル基の分子内転移を証明するために、(*N*-CH₃Proto)Co(II)-Mb を50mmoldm⁻³リン酸緩衝液(pH7.0)中、嫌気性条件下、35°Cでジチオナイトによって還元した。反応の進行状況は、電子吸収スペクトルでモニターした。この条件における還元反応は、有機溶媒中のNaBH₄による(*N*-CH₃ProtoDME)Co(II)OAcのそれと比較して非常にゆっくり進行した。100時間後の電子吸収は、402、520、553nmに最大吸収がある有機コバルト(III)ポルフィリンの吸収を示した。還元生成物の吸収は、メチルコバルト(III)オクタエチルポルフィリンのそれに類似している。この結果は、蛋白質空間内における*N*-メチル基のコバルトへの分子内転移の証拠となる。我々が示したように、メチルロジウム(III)メソポルフィリン-IXを有する再構成ミオグロビンは、変性しやすく不安定である²⁶⁾。同じような再構

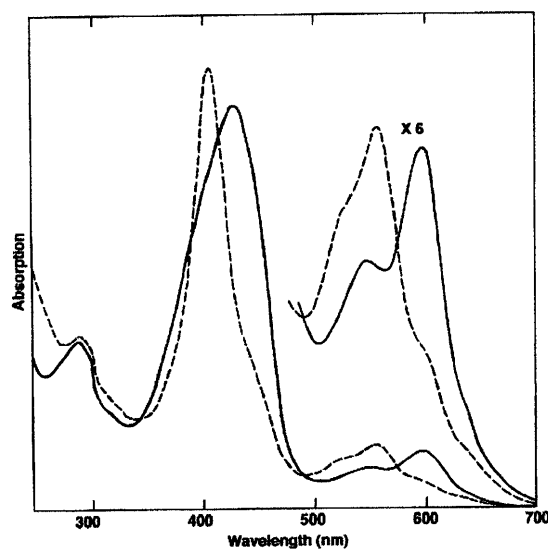


Fig. 7. Electronic absorption spectra of (*N*-CH₃Proto)-Co(II)-Mb in 50 mmoldm⁻³ potassium phosphate buffer (pH 7.0) (—) and the complex reduced by Na₂S₂O₄ (---) at 35 °C.

青柳・芳賀：ヘムの異常代謝におけるグリーンピグメントのモデル錯体-N-アルキルプロトポルフィリン-IX-コバルト(II)錯体を有する再構成ミオグロビン-

成ミオグロビンの変性が、蛋白質内において有機コバルト(III)ポルフィリンが生成した還元反応によっても起きた。それとは逆に、(N-CH₃Proto)Co(II)-Mbは還元剤がなければ変性しなかった。

参考文献

- 1) a) Hill, H. A. O.; Thornalley, P. J. *FEBS Lett.* **1981**, *125*, 235. b) Augusto, O.; Ortiz de Montellano, P. R.; Quintanilha, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *101*, 1324.
- 2) a) Mansuy, D.; Lange, M.; Chottard, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6437. b) Battioni, J. P.; Chottard, J. C.; Mansuy, D. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 2056. c) Artaud, I.; Gregoire, N.; Battioni, J. P.; Dupre, D.; Mansuy, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8714. d) Artaud, I.; Gregoire, N.; Leduc, P.; Mansuy, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6899. e) Chevrier, B.; Weiss, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2899. f) Wisnieff, T. J.; Gold, A.; Evans, S. A. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5616.
- 3) a) Ortiz de Montellano, P. R.; Kunze, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6534. b) Kunze, K. L.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1380. c) Lancon, D.; Cocolios, P.; Guilard, R.; Kadish, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4473. d) Balch, A. L.; Renner, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2603.
- 4) a) Lavallee, D. K. *The Chemistry and Biochemistry of N-Substituted Porphyrins*; VCH Publishers: New York, 1987. b) Ortiz de Montellano, P. R.; Kunze, K. L.; Mico, B. A. *Mol. Pharmacol.* **1980**, *18*, 602. c) Kunze, K. L.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4225. d) Raag, R.; Swanson, B. A.; Poulos, T. L.; Ortiz de Montellano, P. R. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8119. e) Jonen, H. G.; Werringloer, J.; Prough, R. A.; Estabrook, R. W. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4404. f) Delaforge, M.; Battioni, P.; Mahy, J. P.; Mansuy, D. *Chem. Biol. Interact.* **1986**, *60*, 101.
- 5) a) Tephly, T. R.; Gibbs, A. H.; De Matteis, F. *Biochem. J.* **1979**, *180*, 241. b) De Matteis, F.; Gibbs, A. H.; Tephly, T. R. *Biochem. J.* **1980**, *188*, 145. c) Tephly, T. R.; Gibbs, A. H.; Ingall, G.; De Matteis, F. *Int. J. Biochem.* **1980**, *12*, 993. d) De Matteis, F.; Gibbs, A. H. *Biochem. J.* **1980**, *187*, 285. e) De Matteis, F.; Gibbs, A. H.; Jackson, A. H.; Weerasinghe, S. *FEBS Lett.* **1980**, *119*, 109. f) Ortiz de Montellano, P. R.; Beilan, H. S.; Kunze, K. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 1490.
- 6) a) Ogashi, H.; Watanabe, E.; Koketsu, N.; Yoshida, Z. *J. Chem. Soc. Chem., Commun.* **1974**, 943. b) Ogashi, H.; Watanabe, E.; Koketsu, N.; Yoshida, Z. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 2529.
- 7) Dolphin, D.; Halko, D. J.; Johnson, E. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 4348.
- 8) Callot, H. J.; Metz, F.; Cromer, R. *Nouv. J. Chim.* **1984**, *8*, 759.
- 9) a) Ortiz de Montellano, P. R.; Kunze, K. L.; Augusto, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3545. b) Mansuy, D.; Battioni, J. P.; Dupre, D.; Sartori, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6159. c) Battioni, J. P.; Mahy, J. P.; Gillet, G.; Mansuy, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1399.
- 10) Balch, A. L.; La mar, G. N.; Latos-Grazynski, L.; Renner, M. W. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2432.
- 11) Ogoshi, H.; Kitamura, S.; Toi, H.; Aoyama, Y. *Chem. Lett.* **1982**, 495.
- 12) Hoffman, B. M. *Porphyrins* 1979; Vol. 7, pp 403-444 and references cited therein.
- 13) Fukui, K.; Ohya-Nishiguchi, H.; Hirota, N.; Aoyagi, K.; Ogoshi, H. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *140*, 15.
- 14) Aoyagi, K.; Toi, H.; Aoyama, Y.; Ogoshi, H. *Chem. Lett.* **1987**, 467.
- 15) Ozaki, Y.; Aoyagi, K.; Iriyama, K.; Ogoshi, H.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 3842.
- 16) For examples of reconstituted semisynthetic myoglobin, cf.: a) Holden, H. F. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **1941**, *19*, 1, 89. b) Hsu, G. C.; Spilburg, C. A.; Bull, C.; Hoffman, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, *69*, 2122. c) Yonetani, T.; Yamamoto, H.; Woodrow, G. V., III. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 682. d) Padlan, E. A.; Eaton, W. A.; Yonetani, T. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 7069. e) Hoffman, B. M. *Porphyrins* 1979; Vol. 7, pp 403 and references cited

- therein. f) La Mar, G. N.; Toi, H.; Krishnamoorthi, T. J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6395. g) Livingston, D. J.; Davis, N. L.; La Mar, G. N.; Brown, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3025. h) Ogoshi, H.; Kawabe, K.; Mitachi, S.; Yoshida, Z.; Imai, K.; Tyuma, I. *Biochem. Biophys. Acta* **1979**, *581*, 266. i) Kawabe, K.; Imaizumi, K.; Imai, K.; Tyuma, I.; Ogoshi, H.; Iwahara, T.; Yoshida, Z. *J. Biochem.* **1982**, *92*, 1703. j) Suzuki, A.; Okuda, K.; Kawagoe, K.; Toi, H.; Aoyama, Y.; Ogoshi, H. *Chem. Lett.* **1985**, 1169. k) Hayashi, T.; Hitomi, Y.; Suzuki, A.; Takimura, T.; Ogoshi, H. *Chem. Lett.* **1995**, 911. l) Hayashi, T.; Takimura, T.; Ohara, T.; Hitomi, Y.; Ogoshi, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2503. m) Hayashi, T.; Takimura, T.; Ogoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11606. n) Hamachi, I.; Tajiri, Y.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7437. o) Willner, I.; Zahavy, E.; Heleg-Shabtai, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 542.
- 17) Cavaleiro, J. A. S.; Condesso, M. F. P. N.; Jackson, A. H.; Neves, M. G. P. M. S.; Nagaraja, K. R.; Sadashiva, B. K. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 6047.
- 18) a) Falk, J. E. *BBA Letters* **1964**, *2*, 204. b) Jackson, A. H.; Dearden, G. R. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1973**, *206*, 151. c) De Matteis, F.; Jackson, A. H.; Dibbs, A. H.; Rao, K. R. N.; Atton, J.; Weerasinghe, S.; Hollands, C. *FEBS Lett.* **1982**, *142*, 44. d) Tephly, T. R.; Coffman, B. L.; Ingall, G.; Abou Zeit-Har, M. S.; Goff, H. M.; Tabba, H. D.; Smith, K. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *212*, 120. e) Smith, K. M.; Pandey, R. K. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2717.
- 19) Yonetani, T.; Asakura, T. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 4580.
- 20) Teale, F. W. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *35*, 543.
- 21) Hayashi, A.; Suzuki, T.; Kaneda, M.; Shin, W. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *310*, 309.
- 22) a) Miki, K.; Ii, Y.; Yukawa, M.; Owatari, A.; Hato, Y.; Harada, S.; Kai, Y.; Kasai, N.; Hata, Y.; Tanaka, N.; Kakubo, N.; Katsube, Y.; Kawabe, K.; Yoshida, Z.; Ogoshi, H. *J. Biochem.* **1986**, *100*, 269. b) Miki, K.; Ii, Y.; Yukawa, M.; Owatari, A.; Hato, Y.; Harada, S.; Kai, Y.; Kasai, N.; Hata, Y.; Tanaka, N.; Kakubo, N.; Katsube, Y.; Kawabe, K.; Yoshida, Z.; Ogoshi, H. *J. Biochem.* **1986**, *100*, 277.
- 23) a) Lecomte, J. T. J.; La Mar, G. N. *Biochemistry* **1985**, *24*, 7388. b) La Mar, G. N.; Emerson, S. D.; Lecomte, J. T. J.; Pande, U.; Smith, K. M.; Craig, G. W.; Kehres, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5568. c) La Mar, G. N.; Pande, U.; Hauksson, J. B.; Pandey, R. K.; Smith, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 485. d) Hauksson, J. B.; La Mar, G. N.; Pandey, R. K.; Rezzano, I. N.; Smith, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6198.
- 24) a) Balch, A. L.; Chan, Y. W.; La mar, G. N.; Latos-Grazynski, L.; Renner, M. W. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 1437. b) Balch, A. L.; Renner, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2603.
- 25) Rossi-Fanelli, A.; Antonini, E. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, PC4.
- 26) Aoyama, Y.; Aoyagi, K.; Toi, H.; Ogoshi, H. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 3046.