

# メソ位にトリフルオロメチル基を有する新規ポルフィリン、ヘムおよび再構成ミオグロビンの合成と構造

Synthesis and structure of new porphyrin with trifluoromethyl group at the meso-position and reconstititional myoglobin with its iron complex.

青柳克弘・松井田香・大林 洵・須田達仁・大平雅人

福島工業高等専門学校物質工学科

Katsuhiko Aoyagi, Kaori Matsuida, Jun Obayashi, Tatsuhito Suda and Masato Ohira

National Institute of Technology, Fukushima College, Department of Chemistry and Biochemistry

(2015年9月30日受理)

meso-(Trifluoromethyl)mesoporphyrin IX dimethyl esters were readily prepared by photochemical reaction of mesoporphyrin IX dimethyl ester with trifluoromethyl iodide in DMF.  $^1\text{H}$ - and  $^{19}\text{F}$ -NMR spectra of the products indicated formation of the four regioisomers, **1** - **4** ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ -trifluoromethyl-substituted products). These compounds showed a variety of unusual properties due to steric constrain and electronic effect of the meso-trifluoromethyl group. The product **1** is isolated by column chromatography on silica gel from the mixture. Reconstitution of sperm whale apomyoglobin with the dicarboxylic acid iron(III) complex **6** of **1** afforded stable myoglobin **6-Mb**. The heme orientation and stability in a cavity of the protein were determined by paramagnetic  $^1\text{H}$ - and  $^{19}\text{F}$ -NMR studies. In the **6-Mb**, the normal orientation is coexistent with the reverse form.

**Key words:** porphyrin, heme, meso-trifluoromethyl group, reconstituted myoglobin, paramagnetic NMR

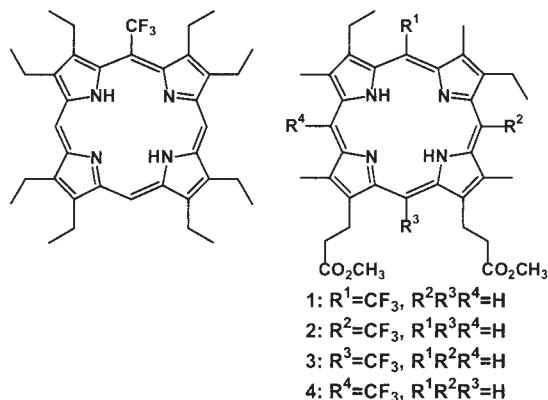
## 1. 緒言

ヘム蛋白質、ヘム酵素において補欠分子、酵素および有機基質へのフッ素の導入は、以下の3つの点で興味深い。第一に、酵素の構造や反応の研究における $^{19}\text{F}$ -NMRのための核プローブとしての有用性である。補欠分子や酵素へ導入されたフッ素やペルフルオロアルキル基の $^{19}\text{F}$ -NMRは、核プローブ周辺に環境に敏感で、広い磁場領域に現れる<sup>1)</sup>。第二に、周辺に化学的に不活性な置換基を有する電子欠乏ポルフィリンは、バイオミメティック触媒や新しい材料等広い分野での応用の可能性が高いことである。これまでに報告された周辺置換基修飾電子欠乏ポルフィリンのほとんどが、化学的に活性な置換基によって機能化されていた。ペルフルオロアルキル基は、不活性でかつ高い電子求引性を持つ<sup>2)</sup>。最後は、フッ素化複素環化合物の持つ抗腫瘍活性である。以上のような点をふまえ、これまで $\beta$ 位にペルフルオロアルキル基を有するポルフィリン、ヘムおよび再構成ヘム蛋白質の合成を行ってきた。そして、それらについてはすでに種々報告し<sup>3)</sup>、ペルフルオロアルキル基の持つ強い電子求引性がもたらす特殊な物理化学的性質についても明らかにした<sup>4)</sup>。また、ヘムおよび再構成ミオグロビンのスピン状態を明らかにするためには、常磁性 $^{19}\text{F}$ -NMRが有効であることも報告している<sup>5)</sup>。

しかし、メソ位にペルフルオロアルキル基を有するポ

ルフィリンに関する報告は少ない<sup>5)</sup>。そこで、メソ位に目を向けて研究を進めている。すでに、メソ位にトリフルオロメチル基を1つ有する部分的に歪んだポルフィリン、メソ-(トリフルオロメチル)オクタエチルポルフィリンの合成と性質については報告している<sup>6)</sup>。

一方、脊椎動物の血液中に含まれるヘモグロビンやミオグロビンに代表されるヘム蛋白質、ヘム酵素の機能発現のメカニズムの解明、および機能変換のための手段として、再構成ヘム蛋白質、ヘム酵素の合成と評価も行ってきた<sup>1-4), 7)</sup>。



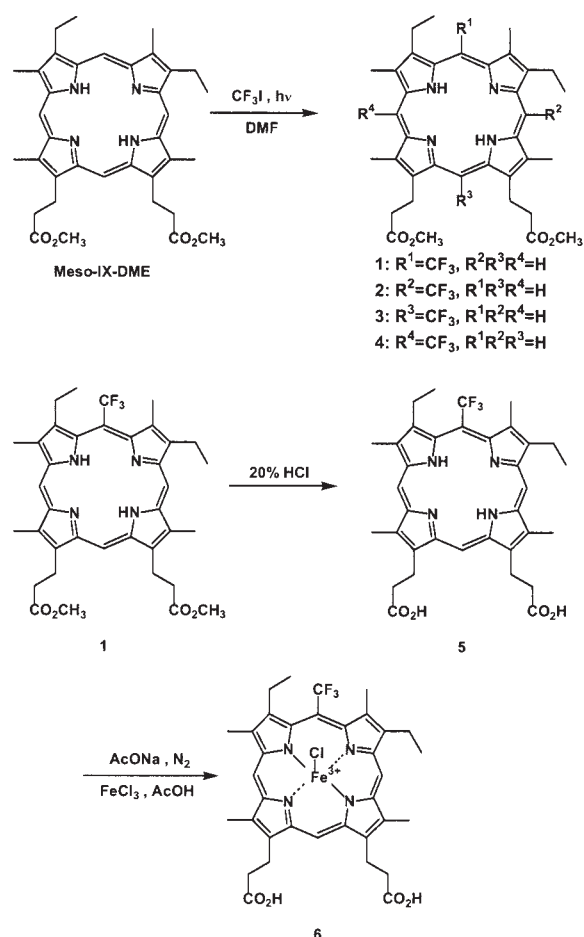
**Fig. 1** meso-(Trifluoromethyl)octaethylporphyrin and meso-(trifluoromethyl)mesoporphyrin-IX-dimethyl ester **1**~**4**.

そこで、今回我々はメソ位にトリフルオロメチル基を位置選択的に有する部分的に歪んだ天然型ポルフィリン 1 の合成を行い、それをヘムに誘導し、アポミオグロビンと結合させ再構成ミオグロビンを得た。構造に関する興味ある知見が得られたので報告する。

## 2. 実験

NMRスペクトルは、VARIAN MERCURY-300 A NMR Spectrometerを用いて測定した。ケミカルシフトは、<sup>1</sup>Hの場合はTMSを内部標準として、<sup>19</sup>Fの場合はCFCl<sub>3</sub>を外部標準としてppmで表した。IRスペクトルは、JASCO FT/IR 7300 FT-IR Spectrometerを用いて、KBr錠剤法で測定した。電子スペクトルは、JASCO V-520 UV/VIS Spectrophotometerを用いて測定した。

Scheme 1



### 2.1 メソー（トリフルオロメチル）メソポルフィリンーIX-ジメチルエステル 1 の合成

メソポルフィリンーIX-ジメチルエステル (Meso-IX-DME) 100 mgをジメチルホルムアミド (DMF) 150 mLに溶解し、低圧水銀灯と気体導入管を取り付けた光化学反応装置に入れ、室温で攪拌した<sup>9)</sup>。

真空ポンプを用いて装置内の空気を吸引除去した後、過剰のトリフルオロヨードメタンを挿入して、2時間光化学反応させた。

溶媒を減圧除去した後、残渣をジクロロメタン 30 mLに溶解し、DDQ 130 mgを加えて 30 分間、室温で攪拌した。

溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィー精製（溶出剤：ジクロロメタン、充填剤：シリカゲル (Wakogel C-200) 使用）したところ、1 ~ 4の異性体混合物が収量 26 mg、収率 24 %で得られた。

IR(KBr) 3224 (ν(NH)), 1737 (ν(CO<sub>2</sub>)), 1263, 1207, 1169, 1104 cm<sup>-1</sup> (ν(CF<sub>3</sub>)); <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ = 9.98, 9.97, 9.90, 9.89, 9.88, 9.86, 9.83 and 9.82 (3H, meso-H), 4.29 (4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.94 (4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.70, 3.69, 3.67, 3.66, 3.64 and 3.63 (6H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.51, 3.50, 3.49, 3.48, 3.47 and 3.46 (12H, CH<sub>3</sub>), 3.24 and 3.13 (4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.79 and 1.31 (6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>19</sup>F-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ = -31.4, -32.6 and -33.5(CF<sub>3</sub>); UV-vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) λ max/nm (relative ratios) 404(15.3), 515(1.0), 556(1.44), 589(0.77), 644(1.15).

1 ~ 4の異性体混合物 26 mgをさらにカラムクロマトグラフィー（充填剤：乾燥シリカゲル、展開溶媒：ジクロロメタン-ベンゼン 1 : 1 溶液）により分離・精製したところ、2つの区分に分けることができ、それらは 1と 2 ~ 4の混合物であることが分かった。1の収量は 5.2 mg、収率は 4.8 %であった。構造解析結果を次に示す。

IR(KBr) 3225 (ν(NH)), 1737 (ν(CO<sub>2</sub>)), 1263, 1206, 1169, 1103 cm<sup>-1</sup> (ν(CF<sub>3</sub>)); <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ = 9.91 and 9.88 (s, 1H, and 2H, meso-H), 4.29 (t, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.97 (q, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.64 (s, 6H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.54, 3.49 and 3.48 (s, 6H, 3H and 3H, CH<sub>3</sub>), 3.22(t, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.72 and 1.60 (t, 3H and 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -2.15 and -2.50 (s, 1H and 1H, NH); <sup>19</sup>F-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ = -32.5 (s, CF<sub>3</sub>); UV-vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) λ max/nm (relative ratios) 402(17.2), 514(1.0), 555(1.52), 588(0.75), 645(1.31).

### 2.2 メソー（トリフルオロメチル）メソポルフィリンーIX 5 の合成

1 5.2 mgを 20 %塩酸 5 mLに溶解させ、暗所へ 48 時間放置した。

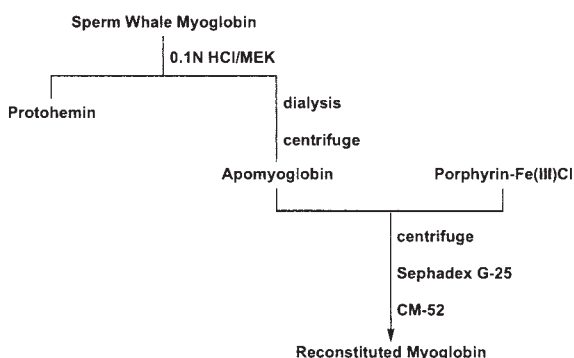
水酸化ナトリウム水溶液でpH 4~5とし、生じた沈殿を遠心分離で回収し、乾燥したところ、5が収量 4.9 mg、収率 95 %で得られた。

### 2.3 メソー (トリフルオロメチル) メソポルフィリン IX 鉄 (III) 錯体 6 の合成

5 4.9 mgに、酢酸ナトリウム 8.0 mg、無水塩化鉄 (III) 8.0 mg、酢酸 2 mLを加えた。これを窒素置換しながら 2 時間還流した。冷暗所で放置し、生じた沈殿を集め、水洗した後、乾燥したところ、6が収量 2.8 mg、収率 50 %で得られた。

### 2.4 再構成ミオグロビン6-Mbの合成

#### Scheme 2



6 1 mgを0.1mol/dm<sup>3</sup> 水酸化ナトリウム 1 滴に溶解し、イオン交換水 1 mLを加え、アポミオグロビン 20 mgを50mmol/dm<sup>3</sup> リン酸緩衝液(KPB) pH7.0 に溶解したものと混合し、冷所に30分間放置した。

充填剤SephadexG-25、溶出液10mmol/dm<sup>3</sup> KPB pH6.0のカラムクロマトグラフィー (分子ふるい) により未反応ヘムを除去し分離・精製を行った後、充填剤CM52、溶出液10mmol/dm<sup>3</sup> KPB pH6.0→50mmol/dm<sup>3</sup> KPB pH7.0のカラムクロマトグラフィー (イオン交換) で精製したところ、再構成ミオグロビン6-Mbが得られた。

これを濃縮し、重水置換を行い、常磁性<sup>1</sup>H-NMRを測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 1 の合成

Meso-IX-DMEとトリフルオロヨードメタンとの光化学反応によって、メソ位に1つだけトリフルオロメチル

基を有する 1 ~ 4の異性体混合物を合成することができた (収率24%)。多置換体は確認できなかった。それは、β位のエチル基による立体障害と、置換したトリフルオロメチル基の電子的効果によるものと思われる。また、1の分離にも成功した。

### 3.2 1 のNMRスペクトル

1 ~ 4の異性体混合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルでは、メソ位の水素のシグナルが数多く現れた。Fig. 2 に<sup>19</sup>F-NMRスペクトルを示した。大きく3本のシグナルが確認できた。位置異性体の生成割合はトリフルオロメチル基がひとつだけ置換したメソ位の場所の立体障害の大きさによって異なる。メチル基とメチル基に挟まれたR<sup>4</sup>が最も立体障害が小さく、メチル基とエチル基に挟まれたR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が同じ環境であり、プロピオン酸残基に挟まれたR<sup>3</sup>が最も立体障害が大きいと考えられる。このため、高磁場側よりR<sup>4</sup>、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>がひとつだけ置換したトリフルオロメチル基のシグナルと帰属することができる。

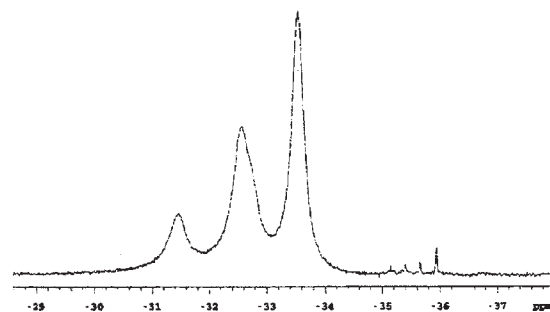


Fig. 2 300MHz <sup>19</sup>F-NMR spectrum of 1~4 mixture in CDCl<sub>3</sub> at 25 °C.

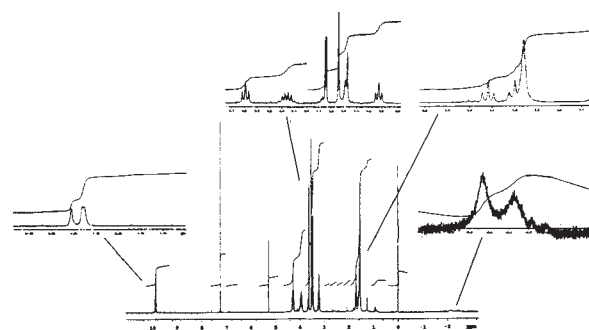


Fig. 3 300MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of 1 in CDCl<sub>3</sub> at 25 °C.

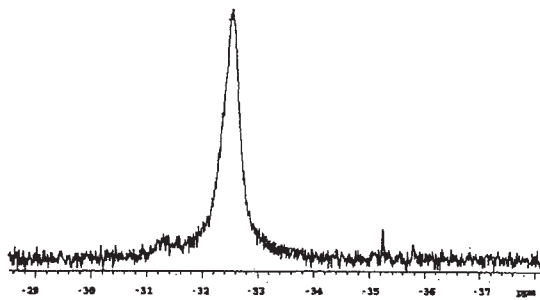


Fig. 4 300MHz  $^{19}\text{F}$ -NMR spectrum of **1** in  $\text{CDCl}_3$  at  $25^\circ\text{C}$ .

Fig. 3, Fig. 4 に **1** の  $^1\text{H}$ -NMR、 $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルを示した。 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルではメソ位の水素のシグナルが3本現れていることから、4箇所あるメソ位のうち1箇所にとリフルオロメチル基が導入されたことがわかる。また、メソ位の水素のシグナルおよびプロピオン酸残基のメチレンの水素のシグナルに対称性が見られる。このことから  $\text{R}^1$  もしくは  $\text{R}^3$  にとリフルオロメチル基が置換されたポルフィリンであると考えられる。 $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルからはシグナルが1本確認できる。このシグナルを **1**~**4** の異性体混合物の  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルと比較すると、シグナルの化学シフトより、 $\text{R}^1$  もしくは  $\text{R}^2$  にとリフルオロメチル基が置換されたポルフィリンであると考えられる。これにより、 $\text{R}^1$  にとリフルオロメチル基が置換した **1** の構造が示唆された。

### 3.3 再構成ミオグロビン **6-Mb** のNMRスペクトル

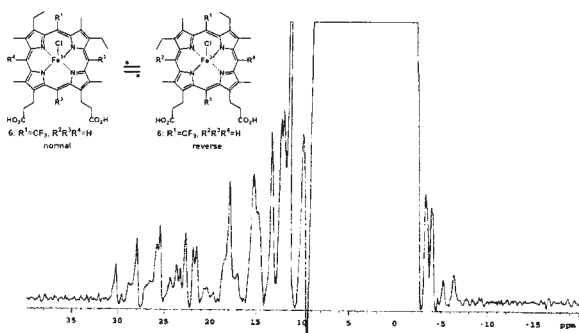


Fig. 5 Low-field portion of 300MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of **6-Mb** with  $\text{KCN}$ (low spin) in  $50\text{mmol/dm}^3$  phosphate buffer at  $25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}7.0$ .

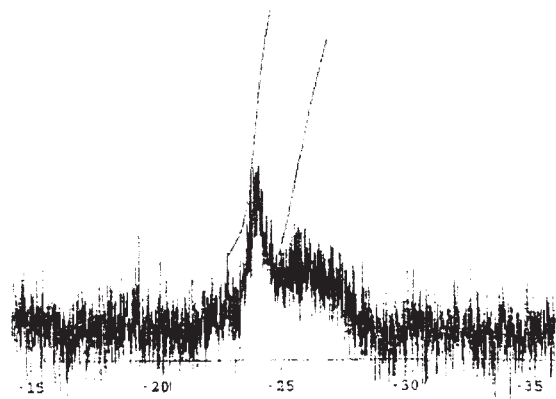


Fig. 6 Low-field portion of 300MHz  $^{19}\text{F}$ -NMR spectrum of **6-Mb** with  $\text{KCN}$ (low spin) in  $50\text{mmol/dm}^3$  phosphate buffer at  $25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}7.0$ .

La Mar らは、常磁性  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて  $-10\text{ppm}$  付近に表れるヘム近傍の Ile99 の  $\text{C}_\gamma\text{-H}$  シグナルは、ポルフィリン鉄錯体の種類にかかわらずほぼ同位置で、ヘムが正常型の場合は高磁場側に、反転型の場合は低磁場側になることを報告している<sup>9)</sup>。

再構成ミオグロビン **6-Mb** の場合は、Ile99 の  $\gamma$  炭素に結合している水素のシグナルが高磁場側と低磁場側にほぼ1:1で表れており、ミオグロビン内でのヘムの正常型と反転型の配向がほぼ1:1の割合であることがわかった。また  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルにおいても積分値がほぼ同じシグナルが2つ表れており、正常型と反転型に対応していると思われ、この配向を示唆した。通常、ミオグロビン内でのヘムの配向は、正常型に傾いているが、メソ位、それも疎水場であるヘムポケットの最も狭い位置に面した  $\alpha$  位にとリフルオロメチル基が存在する **6-Mb** の場合は、その立体障害により、ヘムの配向を認識できなくなってしまったものと思われる。

### 4. 結論

- (1) メソ位に1つだけトリフルオロメチル基を有する **1** ~ **4** の異性体混合物の合成、および **1** の分離に成功した。
- (2) ヘム **6** を合成し、アポミオグロビンと結合させ、精製したところ、再構成ミオグロビン **6-Mb** を得ることができた。
- (3) 常磁性  $^1\text{H}$ -NMR および  $^{19}\text{F}$ -NMR の結果から **6-Mb** の場合は、ヘムポケット内でのヘムの正常型と反転型の配向の割合がほぼ1:1であることがわかった。これは、ミオグロビンがトリフルオロメチル基の立体障

害により、ヘムの配向を認識できなくなってしまうためと思われる。

#### 参考文献

- 1) a) H. Toi, M. Homma, A. Suzuki, and H. Ogoshi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1985, 1791; b) A. Suzuki, H. Toi, Y. Aoyama, and H. Ogoshi, *Heterocycles*, 33, 87 (1992); c) A. Suzuki, T. Tomizawa, T. Hayashi, T. Mizutani, and H. Ogoshi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, 2923 (1996).
- 2) a) H. Ogoshi, Y. Suzuki, and Y. Kuroda, *Chem. Lett.*, 1991, 1574; b) Y. Kuroda, Y. Suzuki, and H. Ogoshi, *Tetrahedron Lett.*, 35, 749 (1994).
- 3) a) M. Homma, K. Aoyagi, Y. Aoyama, and H. Ogoshi, *Tetrahedron Lett.*, 24, 4343 (1983); b) K. Aoyagi, H. Toi, Y. Aoyama, and H. Ogoshi, *Chem. Lett.*, 1988, 1981; c) K. Aoyagi, T. Haga, H. Toi, Y. Aoyama, T. Mizutani, and H. Ogoshi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 70, 937 (1997); d) J. Crusats, A. Suzuki, T. Mizutani, and H. Ogoshi, *J. Org. Chem.*, 63, 602 (1998).
- 4) a) T. Yoshimura, H. Toi, S. Inaba, and H. Ogoshi, *Inorg. Chem.*, 30, 4315 (1991); b) T. Yoshimura, H. Toi, S. Inaba, and H. Ogoshi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 65, 1915 (1992); c) T. Yoshimura, H. Kamada, H. Toi, S. Inaba, and H. Ogoshi, *Inorg. Chim. Acta*, 208, 9 (1993).
- 5) a) S. G. DiMugno, R. A. Williams, and M. J. Therien, *J. Org. Chem.*, 59, 6943 (1994); b) 青柳克弘, 芳賀俊彦: 福島工業高等専門学校研究紀要, 40, 55(2001).
- 6) 青柳克弘, 芳賀俊彦: 福島工業高等専門学校研究紀要, 54, 79(2013).
- 7) a) M. Takeda, K. Aoyagi, Y. Aoyama, and H. Ogoshi, *Chem. Lett.*, 1393(1983); b) 青柳克弘, 芳賀俊彦: 福島工業高等専門学校研究紀要, 48, 29(2007); c) T. Hayashi, Y. Morita, E. Mizohata, K. Oohora, J. Ohbayashi, T. Inoue, and Y. Hisaeda, *Chem. Commun.*, 2014, 12560; d) K. Oohora, T. Mashima, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, and T. Hayashi, *Chem. Commun.*, 2015, 11138.
- 8) Y. Kobayashi, I. Kumadaki, A. Ohsawa, S. Murakami, and T. Nakano, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 1247 (1978).
- 9) J. B. Hauksson, G. N. La Mar, R. K. Pandey, I. N. Rezzano, K. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 6198, (1990).