

ヘムモデル錯体の電子状態に関する研究

—東邦大学での35年間の研究生活を振り返って—

中村 幹夫

東邦大学医学部化学研究室教授

要約：ヘム蛋白質の機能は活性中心に存在するヘムの電子的、磁氣的、および立体的構造により精密に制御されている。私はヘム蛋白質の触媒反応機構を理解するため、多様なヘムモデル錯体を合成し、それらを ultraviolet-visible (UV-Vis), infrared (IR), proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), ^{13}C NMR, electron paramagnetic resonance (EPR), Mössbauer, X線結晶解析, および superconducting quantum interference device (SQUID) などにより詳細に検討した。その結果、下記に示すいくつかの新しい知見を得ることができた。1) ポルフィリン環がラッフル変形すると低スピン-鉄(III)の電子状態が通常の $(d_{xy})^2(d_{xz}, d_{yz})^3$ から異常な $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ に変化する。2) 電子状態の変化に伴いポルフィリン環はラジカルの性質を示す。3) 非平面ポルフィリン環は中間スピンを安定化する。4) 中間スピン錯体には2種類の電子状態が存在する。5) いくつかのサドル型ポルフィリン錯体では前例のないスピントスオーバー現象が観測される。ヘムモデル錯体の研究により明らかになった上記の現象のいくつかは生体中のヘム蛋白質の機能に深く関わっていることが指摘されている。

東邦医学会誌 59(4): 166-173, 2012

索引用語：ヘム蛋白質, ポルフィリン, 電子配置, スピン状態, スピントスオーバー

私は1974年に東京大学大学院理学研究科化学専攻を修了し物理有機化学の分野で理学博士の学位を取得し、1977年に東邦大学医学部の化学研究室に助手として着任した。着任当初は研究に必要な装置がなかったため、大学院生当時の指導教官であった大木道則先生(現東京大学名誉教授)にお願いし、東大の装置を使用して以前からの研究を継続した。着任して2年後の1979年、私にとって大きな転機が訪れた。上司の相川嘉正教授(現東邦大学名誉教授)から2年間の海外留学の許可を得て、1980年4月からの留学が可能になったことである。海外留学を契機に物理有機化学から生体中の金属イオンの働きなどを研究対象とする生物無機化学へのシフトを試みた。以前から生物に関連する化学の分野に興味を持っていたが、やはり医学部に職を得たことが研究分野の変更を決意させた最大の理由であった。生物無機化学の中でもヘム(ポルフィリンの鉄錯体)に対して特に興味を持った。ヘモグロビン、ミオグロビン、カタラーゼ、シトクロームなどのヘム蛋白質はいずれも活

性中心にヘムという共通の補欠分子を持っているが、その機能が全く異なるからである。ヘムが高い対称性を持つポルフィリンを母核に持つことも、物理有機化学出身で分子の形に興味を持っていた私にとって魅力的であった。約3カ月間、当時1号館の8階にあった図書室でアメリカ化学会誌(Journal of the American Chemical Society: JACS)に目を通し、どの教授の下で研究をするかを検討した。そのとき特に注目した論文が、ミシガン大学のGroves JT教授(現プリンストン大学教授)が発表したシトクロームP450の化学モデルに関する論文であった。早速、Groves教授に手紙でpostdoctoral fellow(ポスドク)の申請をしたところ、分野がかなり異なっているにもかかわらず採用していただき、1980年4月からミシガン大学で2年間の研究生活を始めることができた。私にとってさらに幸運だったことは、その年に発足した医学部給費海外留学生制度への申請が採択され、医学部の第1回給費海外留学生として2年間の留学生活を送れたことである。

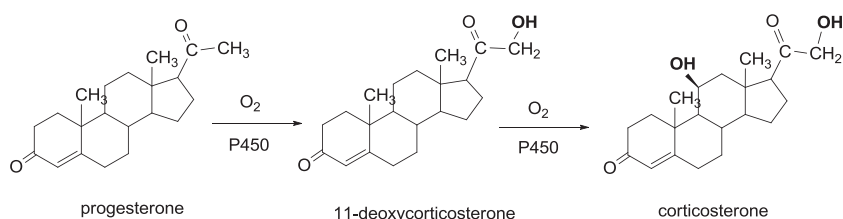


Fig. 1 Examples of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450.

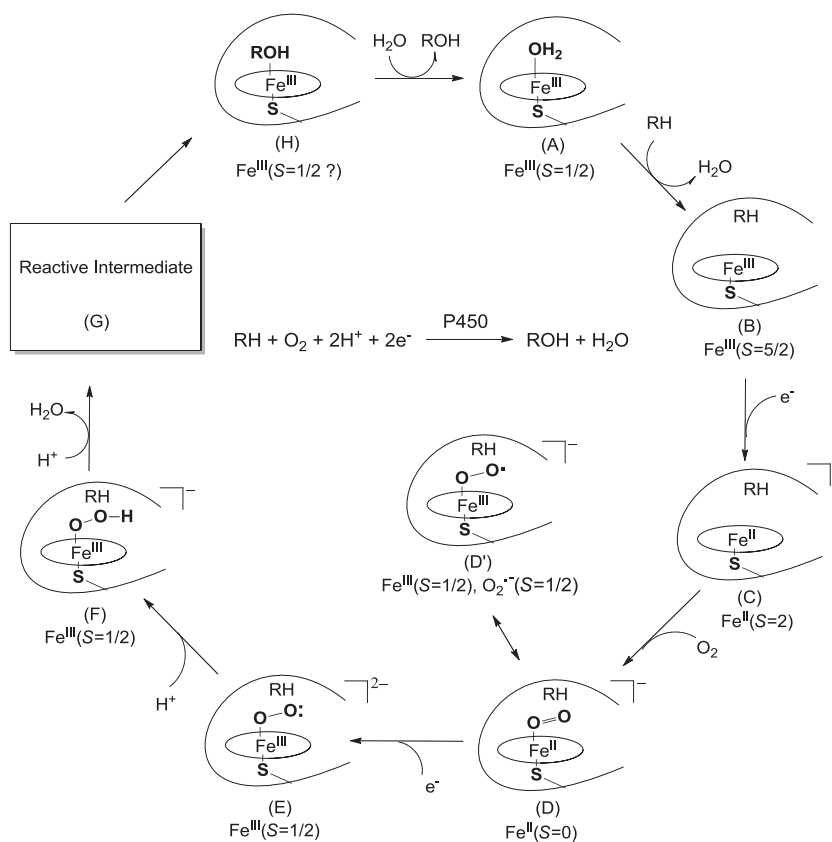


Fig. 2 Possible reaction mechanism for cytochrome P450.¹⁾

ミシガン大学での2年間 (1980-1982) シトクローム P450 活性中間体の研究

シトクローム P450 は酸素分子を酸化剤に用い、さまざまな有機基質に酸素原子を付加しアルコールやエポキシドを生成する酵素である。この酵素は Fig. 1 に示すように全く活性化されていない C-H を C-O-H に変換するため、その反応がどのように進行するかについては生化学者のみならず酸化触媒の開発を目指す多くの化学者や化学技術者にとっても興味深い酵素であり、酸化反応機構の解明と P450 類似触媒の開発に向けて活発な研究がなされていた。

Fig. 2 にシトクローム P450 の当時推定されていた反応機構を示す¹⁾。休止状態は A で、鉄 (III) は 6 配位-低ス

ピン ($S=1/2$) の状態にある。有機基質が活性中心に取り込まれると鉄 (III) に配位していた水分子が脱離し鉄 (III) は 5 配位-高スピン状態 ($S=5/2$, B) に変化する。このスピン状態の変化が引き金となって酵素反応が回転する。Fig. 2 で A~D の各分子種は確認されていたが、その先の段階で生成する分子種についてはきわめて迅速な反応のため存在は確認されていなかった。ただ、化学量論的な観点から E, F を経由して G が生成し、この G が有機基質を酸化する直接の活性中間体と考えられていた。活性中間体 (G) は休止状態 (A) の 2 電子酸化体であることから、その条件を満足するいくつかの構造が推定されていた。私に与えられたテーマは P450 の活性中間体と類似の 2 電子酸化体をモデル系で合成し、その反応性を P450 と比較

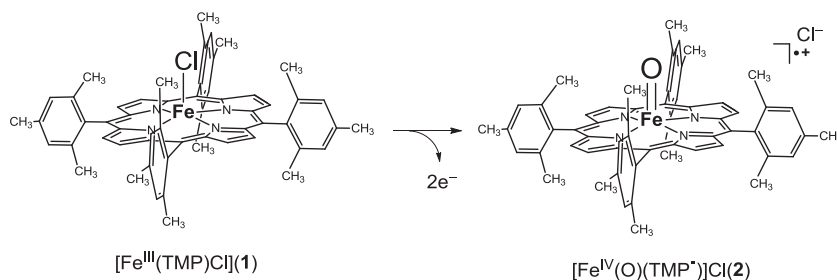
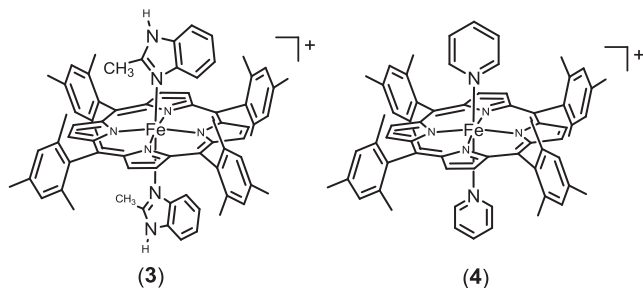


Fig. 3 Formation of reactive intermediate model (2) for cytochrome P450.

Fig. 4 Low-spin complexes 3 and 4, which adopt the less common $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ ground state.

し、電子状態や分子構造を明らかにすることであった。

私はポルフィリンの4つの meso-位に嵩高いメシチル基を導入し、ヘムを立体的に保護している蛋白質の役割を持たせた。このような鉄(III)錯体(1)を2電子酸化剤と -78°C で反応させたところ、きわめて反応性の高い緑色の錯体(2)を得た。種々の分光学的測定から2がFig. 3のような鉄(IV)ポルフィリンラジカルカチオンであることを明らかにした。また、2は -50°C でもP450と類似の反応性を示した。このような結果に基づき、P450の活性中間体は2と同様の構造を持つことを示した²⁾。

その後もP450およびその化学モデルについての研究が活発になされてきたが、私たちが30年前に提唱した2はP450活性中間体の構造として現在も大多数の研究者に認められている。“beginner’s luck”ではあったが、Groves教授の下での研究を通して、この分野の発展に多少の貢献ができたと考えている。

独自のテーマを求めて (1986-1994)

1982年に帰国したが、研究を始めるための環境が依然として整っていなかったため、再び大木道則先生にお願いし物理有機化学の研究に戻った。しかし1986年に念願の nuclear magnetic resonance (NMR) 分光器が総研に設置され、合成から測定までのほぼすべての実験を医学部で行うことが可能になった。NMR装置の設置に伴い医学部内のいくつかのグループとNMRを用いた共同研究ができるようになった。特に大橋病院小児科の青木継稔先生、水谷

正興先生、生理学の平野修助先生、免疫学の本間啓伸先生、大森病院薬剤部の酒井正博先生らとの共同研究はとても充実したものであった³⁻⁵⁾。

NMR分光器の設置を契機に中断していた生物無機化学の研究、特にヘムに関連する研究を再開することにした。P450の反応機構の研究には依然として興味を持っていた。しかし、今後一人で研究することを考えると、多数の研究者が競っている popular な分野より、もう少し基礎的な研究分野を専攻した方が周囲に惑わされず研究を進めることができると考え、ヘムの電子状態に関する研究を行うことにした。実際にはさまざまなヘムモデル錯体を合成し、分光学的測定を駆使して新規な電子状態を示す錯体を見だし、それがヘム蛋白質の機能発現に関わっているかどうかを検討することにした。

研究を開始してから3年ほど経過したとき興味深い事実を見出した。鉄の軸配位子として立体的に嵩高い2-メチルベンズイミダゾールを用いたとき、低スピン錯体でありながら従来とは全く異なるNMRやelectron paramagnetic resonance (EPR) スペクトルを示す錯体(3)が得られた(Fig. 4)。この結果に基づき、低スピン鉄(III)ポルフィリン錯体には電子状態の異なる2種類の錯体が存在する可能性があることを指摘した⁶⁾。翌1992年にWalker et al.は4-シアノピリジンに軸配位子として持つ錯体(4)が3とほぼ同じスペクトルを示すこと、その理由が電子状態の差異によることを明らかにした⁷⁾。すなわち、通常の高スピン錯体が $(d_{xz}, d_{yz})^3(d_{xy})^2$ を示すのに対して、4のように軸配位子が低い π^* 軌道を持つ場合には異常な $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ の電子状態を示すことを明らかにした(Fig. 5)。私としては異常な性質を示す新規錯体を最初に発見したにもかかわらず、その解釈にまで至らなかったことをとても残念に思った。ただ、3と4は軸配位子の性質が全く異なるにもかかわらず同じ性質を示すため、異常な電子状態を安定化させる要因は軸配位子の電子的性質以外にも存在するのではないかと考えた。特に3では、ポルフィリン環が嵩高い軸配位子との立体反発によりラッフル型に非平面化し、それが異常な電子配置を安定化する要因ではないかと考えるに至った。Fig. 6にポルフィリン環の典型的な

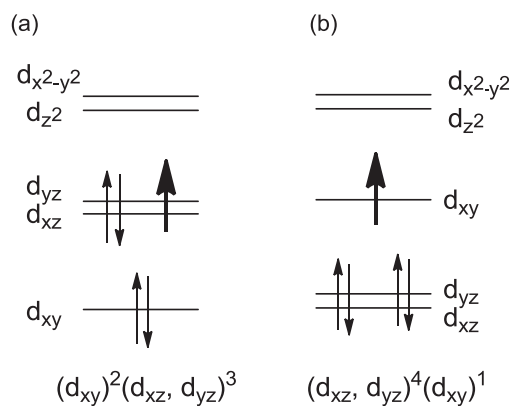


Fig. 5 Two types of electronic ground states in low-spin iron (III) porphyrinates. (a) The common $(d_{xy})^2(d_{xz}, d_{yz})^3$ and (b) less common $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ ground states.

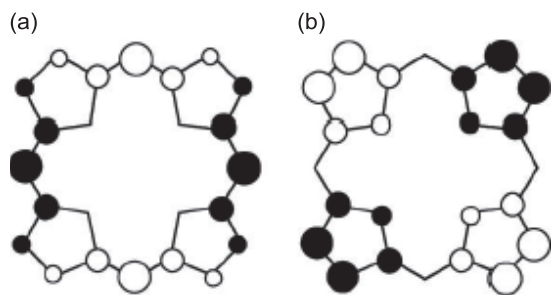


Fig. 6 Typical deformation modes of porphyrin ring, observed both in synthetic porphyrins and naturally occurring heme proteins. (a) Ruffled and (b) saddled deformation. Open circles represent atoms above the least-squares plane; filled circles correspond to atoms below the plane.

2つの非平面様式，ラッフル型とサドル型，を示す。

ヘム電子状態の研究 (1994-2012)

1) ラッフル変形が低スピン-鉄 (III) 錯体の電子状態を制御する

1993年に大学院理学研究科の教授を兼任することになり1994年から卒業研究生や大学院生が研究に加わるようになった。さらに1996年に大胡恵樹氏(現准教授)が、1997年には池崎章氏(現講師)が助手として着任し、研究室としての体制が整った。そこでまず着手したことは、ラッフル化(非平面様式の1つ)の程度が異なるいくつかのヘムモデル錯体を合成し、ラッフル化に伴う分光学的、磁気的性質の変化を検討した。Fig. 7に示すように meso-位に水素(5)、メチル(6)、エチル(7)、イソプロピル(8)と嵩高い置換基を順次導入してゆきポルフィリン環のラッフル変形を増加させると、それに伴い低スピン錯体のEPRやNMRが大きく変化し、鉄(III)の電子状態が通常の $(d_{xy})^2$

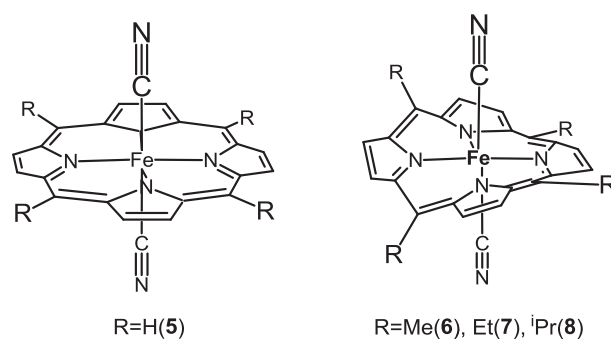


Fig. 7 A series of $[\text{Fe}(\text{TRP})(\text{CN})_2]^-$ that exhibits planar (4) and ruffled (5-7) porphyrin rings.

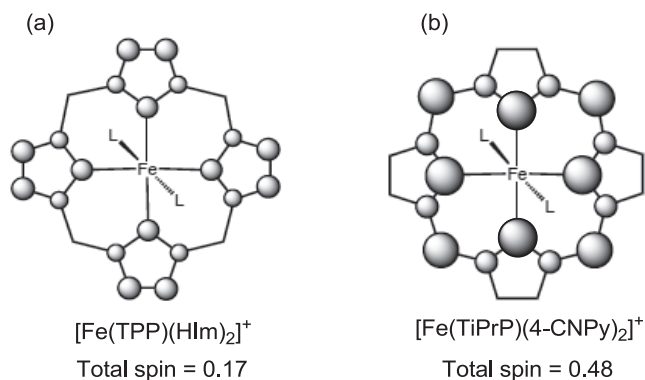


Fig. 8 Spin densities on the carbon and nitrogen atoms in (a) $[\text{Fe}(\text{TPP})(\text{HIm})_2]^+$ and (b) $[\text{Fe}(\text{TiPrP})(4\text{-CNPy})_2]^+$, which adopt the $(d_{xy})^2(d_{xz}, d_{yz})^3$ and $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ ground state, respectively.⁹⁾

$(d_{xz}, d_{yz})^3$ から異常な $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ に変化することを明らかにした⁸⁾。また、電子状態の変化に伴い、ポルフィリン環のスピン密度も大きく増加し、ラッフル変形がポルフィリン環にラジカル的な性質を付与することを明らかにした⁹⁾。Fig. 8に $(d_{xy})^2(d_{xz}, d_{yz})^3$ と $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ の電子状態を示す代表的な化合物におけるポルフィリン環のスピン密度を示す。 $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ の電子状態を示す錯体では meso-炭素とピロール窒素原子が大きなスピン密度もちポルフィリン環がラジカル的な性質を持つことがわかる。

ヘム蛋白質中でヘムが $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ 電子状態を示す例は確認されていない。しかし Rivera et al.はヘムオキシゲナーゼによるヘムの代謝過程でヘムが過渡的に $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ に変化すると考えている。その結果、鉄に配位している酸素がラジカル的な meso-炭素を容易に攻撃し、そのためビリベルジンへの変換がスムーズに進行するとの仮説をわれわれの結果に基づき提唱した (Fig. 9)¹⁰⁾。

2) ヘムの非平面化が鉄 (III) の中間スピン状態を安定化する

鉄 (III) ヘムには低スピン ($S=1/2$)、中間スピン ($S=$

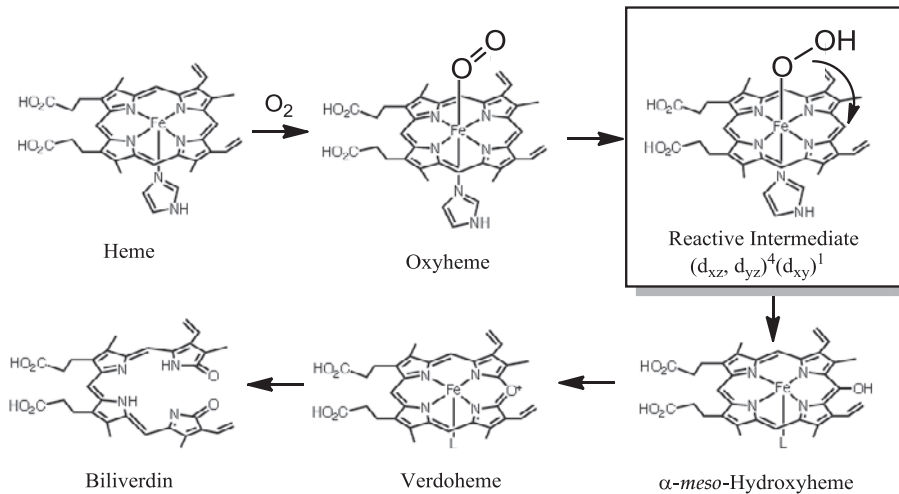
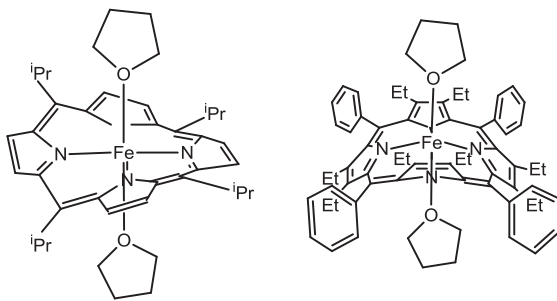


Fig. 9 Reaction mechanism of heme oxygenase. Low-spin iron (III) in the reactive intermediate is supposed to adopt the less common $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ ground state. The sizable amount of spin density at the meso carbon promotes the hydroxylation reaction to form α -meso-hydroxyheme.¹⁰⁾



(a) $[\text{Fe}(\text{T}^i\text{PrP})(\text{THF})_2]^+$ (9) (b) $[\text{Fe}(\text{OETPP})(\text{THF})_2]^+$ (10)

Fig. 10 Essentially pure intermediate-spin complexes. (a) Ruffled $[\text{Fe}(\text{T}^i\text{PrP})(\text{THF})_2]^+$ (9) and (b) saddled $[\text{Fe}(\text{OETPP})(\text{THF})_2]^+$ (10).

3/2) および高スピン ($S=5/2$) の3種類のスピン状態が存在する。高スピンや低スピンに比べ中間スピンは不安定である。しかし細菌類の持つシトクローム c' 中でヘムは中間スピンと高スピンの混合した状態で存在していることが知られているが、純粋な中間スピン錯体の合成がきわめて困難なため、その詳細な研究はなされていなかった。私はポルフィリン環が非平面になると鉄 (III) イオンの d_{xz} - d_{yz} 軌道が不安定化し中間スピン状態が安定化すると考えた。そこで非平面ポルフィリン鉄 (III) 錯体に配位子場の弱い配位子が結合した錯体を合成し、その電子的、磁気的性質を詳細に検討した。その結果、軸配位子としてテトラヒドロフラン (tetrahydrofuran: THF) を持つラッフル型およびサドル型に変形した6配位錯体(9, 10) (Fig. 10) がいずれもきわめて純粋な中間スピン錯体であることを明

らかにした¹¹⁾。また、中間スピン錯体にも2種類の異なる電子状態が存在することを初めて明らかにした¹²⁾。

3) 新規なスピントスオーバー現象を示す鉄(III)錯体

サドル型ヘムに N, N-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP) (11), pyridine (Py) (12), 4-cyanopyridine (4-CNPy) (13) などのピリジン系軸配位子を持つ錯体 (Fig. 11a) を合成し、各錯体の meso-¹³C シグナルの Curie plots を検討した。その結果、温度の低下に伴いピリジン錯体 (12) のみが中間スピンから低スピンに変化することが明らかになった (Fig. 11b)。これは $S=1/2$ と $S=3/2$ 間のスピントスオーバーとしては最初の例である^{13, 14)}。

大胡ほかはサドル型錯体に水分子が配位した5配位錯体 (14) (Fig. 12a) が温度の低下に伴って中間スピンから高スピンに変化する新規な錯体であることを EPR スペクトルなどから明らかにした¹⁵⁾。一方、室素系配位子が1分子配位した5配位錯体はシトクローム c' のモデルとして興味が持たれていたが、その合成は困難であった。池崎ほかはサドル型錯体にイミダゾールを1当量加え5配位錯体 (15) (Fig. 12b) を合成し、その分子構造を X 線結晶解析により明らかにした。この錯体は鉄 (III) イオンの持つ3種類のスピン状態間をスピントスオーバーする新規な錯体であることが明らかになった¹⁶⁾。

以上記載してきたように、私は東邦大学での35年間の研究を通してヘムの電子状態や電子状態に影響を与える要因を明らかにしてきた。そのいくつかが生体中のヘム蛋白質の機能に深く関わっていることも報告されつつある。今後、私の後継者らが高原子価鉄のスピン状態と酸化反応性との関連性という、より困難な問題に挑戦していくもの

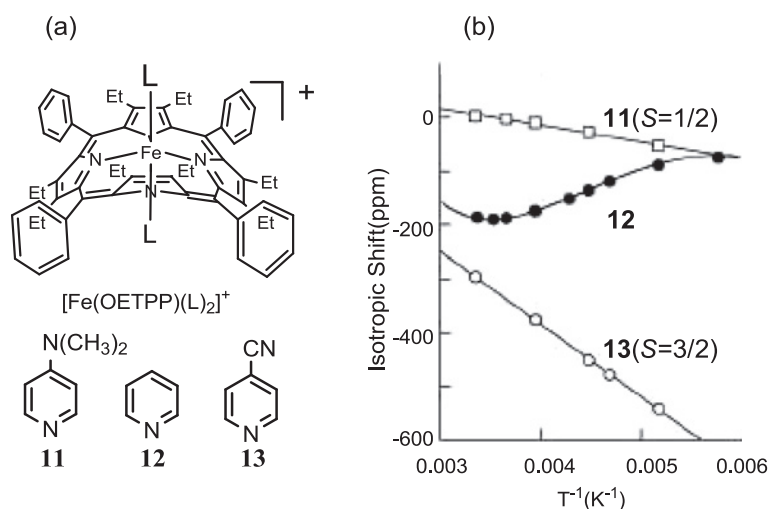


Fig. 11 (a) Saddle shaped complexes $[\text{Fe}(\text{OETPP})(\text{L})_2]^+$ where $\text{L} = \text{DMAP}$ (**11**), Py (**12**), and 4-CNPy (**13**). (b) Curie plots of the *meso*- ^{13}C signals in $[\text{Fe}(\text{OETPP})(\text{L})_2]^+$. Only the pyridine complex (**12**) exhibits spin crossover between $S = 1/2$ and $S = 3/2$.

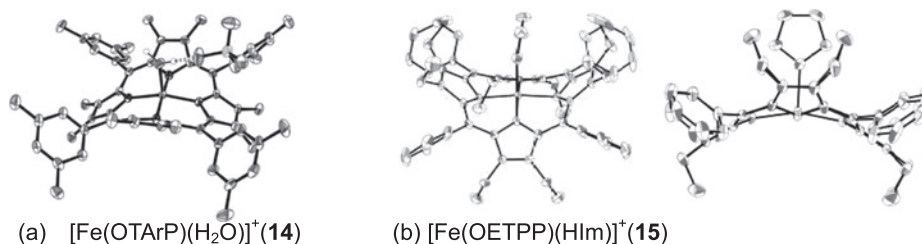


Fig. 12 Molecular structures of 5-coordinate saddle-shaped complexes **14** and **15**, which exhibit novel spin crossover phenomena. (a) $[\text{Fe}(\text{OMTArP})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (**14**) exhibits spin crossover between $S = 5/2$ and $S = 3/2$. (b) $[\text{Fe}(\text{OETPP})(\text{HIm})]^+$ (**15**) shows spin crossover among $S = 5/2$, $S = 3/2$, and $S = 1/2$.^{15, 16)}

と思っている。

本最終講義は2011年11月11日に生体有機化学を受講している1年生に行った内容をもとに書き加えました。当日は悪天候にもかかわらず学内外から多数の先生方にご出席いただいたことを深く感謝申し上げます。また、出席していただいた多くの上級生にも感謝いたします。このような成果をあげることができたのも、化学研究室のスタッフおよび大学院生、卒業研究生のたゆまぬ努力によるものです。改めて研究に関わったすべての方々に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nakamura M, Ohgo Y, Ikezaki A: Electronic and magnetic structures of iron porphyrin complexes. *Handbook of Porphyrin Science: with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine vol.7 Physicochemical Characterization*, Kadish KM, Smith KM, Guillard R (Eds) p1-146. World Scientific, Singapore, 2010
- 2) Groves JT, Haushalter RC, Nakamura M, et al.: High-valent iron-

porphyrin complexes related to peroxidase and cytochrome P-450. *J Am Chem Soc* **103**: 2884-2886, 1981

- 3) 水谷正興, 中村幹夫, 青木継稔: Wilson 病の胆汁中への銅排泄. *Biomed Res Trace Elements* **1**: 179-180, 1990
- 4) Honma K, Nakamura M, Ishikawa Y: Acetylsalicylate-human serum albumin interaction as studied by NMR spectroscopy—antigenicity-producing mechanism of acetylsalicylic acid. *Mol Immunol* **28**: 107-113, 1991
- 5) Sakai M, Hara A, Anjo S, et al.: Comparison of the complexation of fluoroquinolone antimicrobials with metal ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* **18**: 1057-1067, 1999
- 6) Nakamura M, Nakamura N: Spin state and rotational orientation of iron porphyrin complexes with hindered 2-methylbenzimidazole as axial ligands. *Chem Lett* **20**: 1885-1888, 1991
- 7) Safo MK, Gupta GP, Watson CT, et al.: Models of the cytochromes b. Low-spin bis-ligated (porphinato) iron (III) complexes with “unusual” molecular structures and NMR, EPR, and Mössbauer spectra. *J Am Chem Soc* **114**: 7066-7075, 1992
- 8) Nakamura M, Ikeue T, Fujii H, et al.: Change in electron configuration of ferric ion in bis (cyanide) (*meso* tetraalky-

- lporphyrinatoiron (III), [Fe (TRP) (CN)₂]⁻, caused by the non-planarity of the porphyrin ring. *J Am Chem Soc* **119**: 6284–6291, 1997
- 9) Ikeue T, Ohgo Y, Saitoh T, et al: Spin distribution in low-spin (meso-tetraalkylporphyrinato) iron (III) complexes with (d_{xz}, d_{yz})⁴ (d_{xy})¹ configuration. Studies by ¹H NMR, ¹³C NMR, and EPR spectroscopies. *J Am Chem Soc* **122**: 4068–4076, 2000
 - 10) Rivera M, Caignan GA, Astashkin AV, et al: Models of the low-spin iron (III) hydroperoxide intermediate of heme oxygenase: Magnetic resonance evidence for thermodynamic stabilization of the d_{xy} electronic state at ambient temperatures. *J Am Chem Soc* **124**: 6077–6089, 2002
 - 11) Ikeue T, Saitoh T, Yamaguchi T, et al: Formation of pure intermediate spin complexes in highly nonplanar iron (III) porphyrins. *Chem Commun*: 1989–1990, 2000
 - 12) Sakai T, Ohgo Y, Ikeue T, et al: Formation of the intermediate-spin iron (III) porphyrin complexes with (d_{xz}, d_{yz})³(d_{xy})¹(d_{z2})¹ electron configuration. *J Am Chem Soc* **125**: 13028–13029, 2003
 - 13) Ikeue T, Ohgo Y, Yamaguchi T, et al: Saddle-shaped six-coordinate iron (III) porphyrin complexes showing a novel spin crossover between S = 1/2 and S = 3/2 spin states. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**: 2617–2620, 2001
 - 14) Nakamura M: Electronic structures of highly deformed iron (III) porphyrin complexes. *Coord Chem Rev* **250**: 2271–2294, 2006
 - 15) Ohgo M, Chiba Y, Hashizume D, et al: Novel spin transition between S = 5/2 and S = 3/2 in highly saddled iron (III) porphyrin complexes at extremely low temperatures. *Chem Commun*: 1935–1937, 2006
 - 16) Ikezaki A, Takahashi M, Nakamura M: Models for cytochromes c': Observation of an extremely labile spin state in monoimidazole complexes of saddle-shaped iron (III) porphyrinates. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 6300–6303, 2009

Electronic Structure of Heme Model Complexes: Looking Back at a 35-Year Research Career at Toho University

Mikio Nakamura

Professor, Department of Chemistry, School of Medicine, Faculty of Medicine, Toho University

Abstract: To elucidate the reaction mechanisms of heme proteins, we examined the physicochemical properties of a wide variety of iron porphyrin complexes by means of ultraviolet-visible, infrared, proton nuclear magnetic resonance, carbon-13 nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance, and Mössbauer spectroscopy, as well as X-ray crystallography and superconducting quantum interference device magnetometry. We found that some complexes exhibit previously unobserved properties both in naturally occurring heme proteins and synthetic model heme complexes. These properties were as follows: (1) the electronic ground state of low-spin complexes changes from the common $(d_{xz}, d_{yz})^3(d_{xy})^2$ to the less common $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ if the porphyrin ring is ruffled, (2) the porphyrin ring of such low-spin complexes shows a strong radical character, (3) the deformed porphyrin ring greatly stabilizes in the intermediate-spin state, which is usually quite unstable, (4) 2 types of electronic ground state exist in the intermediate-spin state, and (5) some saddled complexes exhibit novel spin crossover phenomena involving the intermediate-spin state. Some of these properties have crucial roles in the enzymatic process of heme proteins.

J Med Soc Toho 59 (4): 166–173, 2012

KEYWORDS: heme protein, porphyrin, electron configuration, spin state, spin crossover