

蛋白質フラスコを用いた高効率酵素型触媒

「変換と制御」領域 林 高史

要 旨

本研究では補欠分子ヘムを有するヘム蛋白質に焦点をあて、蛋白質内の天然のヘムを非天然の機能化ヘムに置換することにより、新しい機能の発現、あるいは機能の向上をめざした。具体的には、酸素保持蛋白質であるミオグロビンに基質結合部位を導入し、酸化触媒（酵素）としての機能を付与し、天然ミオグロビンの300倍以上の活性を示す新しい生体触媒を得た。また、電子メディエータをヘムに修飾することにより、ミオグロビンにおいて初めて分子状酸素の還元的活性化を達成した。一方、ヘムそのものの骨格を異性体であるポルフィレン鉄錯体に変換することにより、ミオグロビンの酸素分子結合能を天然の2600倍に向上させ、一酸化炭素よりも安定に酸素錯体を形成する超酸素親和性ミオグロビンを創製した。得られた成果は、水中での錯体・触媒化学の新展開ならびに有機合成を駆使した蛋白質工学への新しいアプローチを提唱し、環境に配慮した生体材料（触媒・センサー・医薬等）の開発手法に有意義な指針を与えるものと期待される。

1. はじめに

近年、分子生物学、構造生物学の飛躍的な進歩により、複雑な生体分子の挙動が次第に明らかになり、その情報を利用した蛋白質の機能変換が次世代のターゲットの一つとして注目されている。特に、天然の蛋白質のユニークな構造や特性を活かしながら、蛋白質に新しい機能を付与したり、従来の機能を制御・向上することによって、斬新な生体材料を開発することが可能であると期待される。

本研究では、機能変換を施す素材としてヘム蛋白質に着目した。ヘム蛋白質は、広く生体内に分布し、電子移動、触媒、酸素保持・運搬、センサー等の様々な機能を発揮する生体分子として知られている。その構造的な特徴は、補欠分子としてヘム（ポルフィリン鉄錯体(1)）を有することにある。この魅力的なヘム蛋白質については、20世紀の後半、様々な角度から研究がなされ、得られた知見をもとにヘム蛋白質の機能を制御する試みも実施されているが、その大半は遺伝子工学的手法を用いて特定のアミノ酸を変換した変異体による機能評価である（Figure 1のI）。しかしながら、このような手法では、蛋白質の改変は限定

されたものであり、大胆な機能変換には結びつきにくいのが現状である。また、蛋白質表面のアミノ酸残基を化学修飾する方法も検討されているが、特定のアミノ酸残基だけを修飾することは極めて困難であり、現実的ではない (Figure 1 の II)。一方、補欠分子であるヘムは通常、蛋白質マトリクス (フラスコ) と非共有結合相互作用を介して安定化しているため、天然のヘムを除去して、非天然の機能化金属

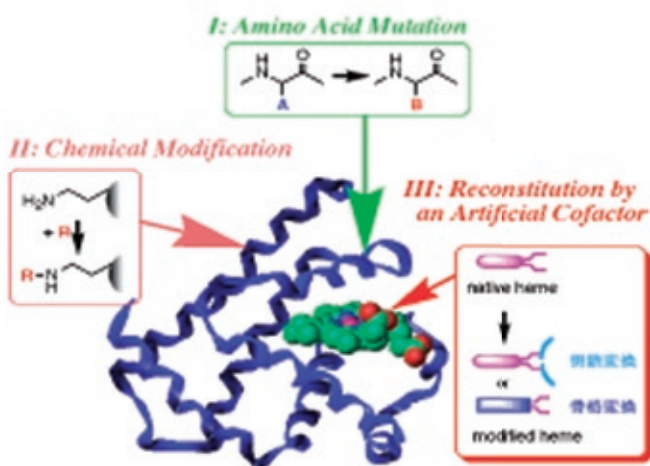
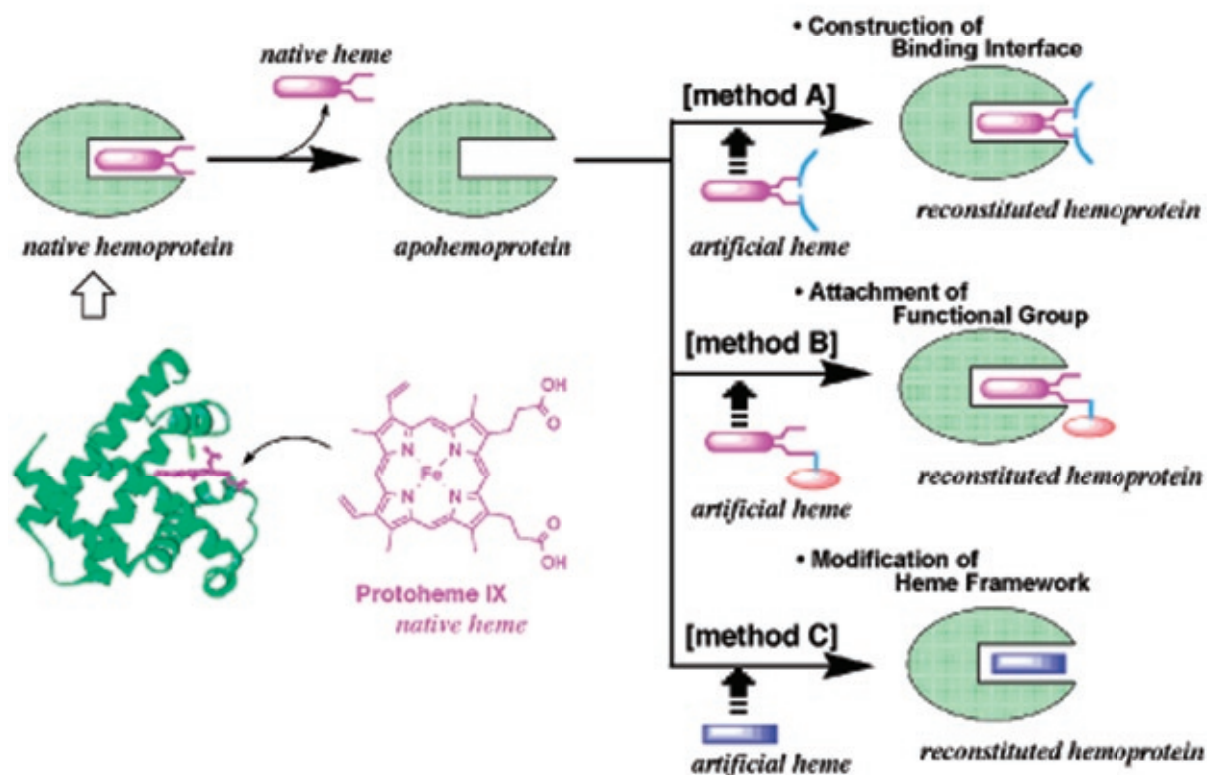


Figure 1. ミオグロビンの機能化の3つの手法

錯体を挿入することが可能である (Figure 1 の III)。本研究ではこの点に着目し、酸素保持・貯蔵の働きを行うミオグロビンにおいて、従来の遺伝子工学的手法にとらわれない斬新な再構成手法を駆使して蛋白質の機能改変・機能向上をめざした。



Scheme 1. ヘム蛋白質再構成手法

2. 研究内容と考察

2.1. 再構成ミオグロビンの合成

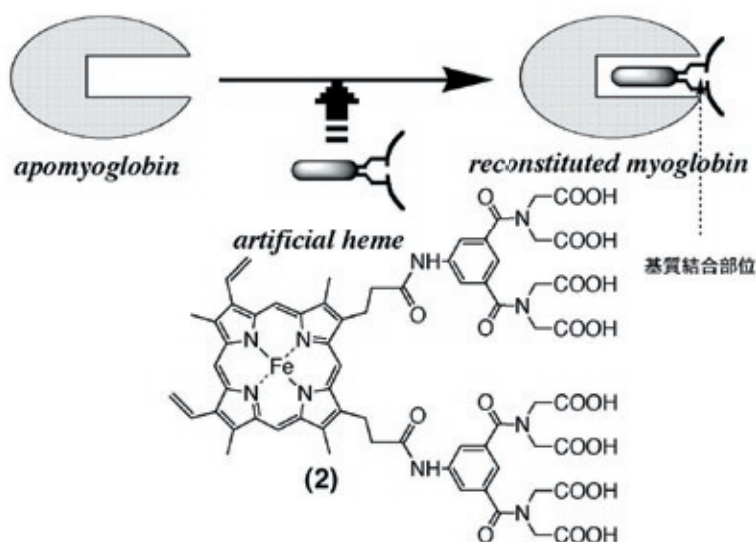
ミオグロビンの補欠分子であるヘムは、蛋白質マトリクス内に非共有結合（配位結合、水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用等）で安定化されているために、溶液を塩酸酸性にすることによって容易に除去することが可能である。この操作によって得られたアポ蛋白質（ヘムを除去した蛋白質）を常法に従って精製した後に、別途合成した人工ヘム分子の溶液を滴下することによって再構成ミオグロビンを得た。人工ヘムとしては、Scheme 1 に示すように、3つのタイプを設計、合成した。

- (A) ヘムプロピオン酸末端の化学修飾によるヘムポケット出口への基質結合部位の構築
- (B) ヘムプロピオン酸末端にヘム分子への電子メディエーターを導入
- (C) ヘム（ポルフィリン鉄錯体）骨格を非天然のものに変換

以下、それぞれの再構成蛋白質について、その合成、物性、機能評価について説明する。

2.2. ミオグロビン表面への基質結合部位の導入と高効率酸化酵素活性発現

ミオグロビンは生体内で酸素を保持する役割を果たしているが、その補欠分子であるヘムは様々なヘムペルオキシダーゼ（酸化酵素）のヘムと同一分子である。しかしながら、ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性（酸化触媒能）は極めて低い。一方、天然酵素の活性は基質結合部位と反応活性中心の巧みな構造に支配されている。そこで、本研究ではミオグロビンに人工基質結合部位を導入するために、ヘムプロピオン酸側鎖末端に基質結合部位を化学修飾し、ミオグロビンの酸化酵素としての機能を評価した。具体的にはScheme 2 に示すように、2つのヘム側鎖プロピオン酸末端にベンゼン環を結合させた修飾ヘム(2)を合成し、ヘムポケット出口に疎水性のドメイン、即ち疎水性基質の結合部位を構築す



Scheme 2. 基質結合部位を有する再構成ミオグロビンの構築

る試みを実施した。まず過酸化水素存在下でミオグロビンが高酸化状態（フェリル種：PFe(IV)=O）になることを利用して、基質結合部位に結合した小分子の酸化を試みた結果、フェノール誘導体の1電子酸化（ペルオキシダーゼ活性）では天然ミオグロビンの10～30倍の加速が観測された。実際に、グアイアコール（2-methoxyphenol）を再構成ミオグロビンの溶液に滴下しながらUV-visスペクトルを測定すると、ヘムのSoret帯の吸収に天然のミオグロビンの場合では観測されない明らかなSoret帯の吸収変化が見られ、基質が結合した証拠を得た（ $K_d = 0.083$ mM）。この知見をもとに、実際にグアイアコールの過酸化水素存在下での触媒的酸化反応を観測した。酵素反応の速度解析を行い、ミカエリス–メンテン定数と触媒反応速度定数（ K_m 、 k_{cat} ）を求めると、 K_m 値で4.3倍、 k_{cat} 値で3.1倍、それぞれ再構成ミオグロビンの方が向上しており、触媒効率 k_{cat}/K_m で評価すると、再構成ミオグロビンは14倍天然のミオグロビンに比べて優れていることが示された（pH7, 100 mM phosphate buffer, at 25 °C）。特に、 K_m 値の減少は基質を選択的に取り込んでいることを表しており、 k_{cat} の増加は基質がヘムポケットに補捉され、基質と活性中心のフェリル種の距離が短縮された結果、電子移動の加速が実現したと考えられる（Figure 2）。

次に、同様の再構成ミオグロビンについて、ペルオキシゲナーゼ活性の評価を行った。上記のペルオキシダーゼ活性は基質の一電子酸化であるが、ペルオキシゲナーゼ反応は、2電子酸化（Compound Iからの直接的酸素化）反応である。実際に、チオアニソールを過酸化水素存在下で再構成ミオグロビンを用いて酸化すると、極めて効率よくスルホキシドが得られた。 ^{18}O でラベルした過酸化水素存在下では、95%以上が ^{18}O でラベルされた生成物が得られることから、オキソフェリル種（ $\text{P}^+\text{Fe(IV)=O}$ ）の酸素原子が硫黄原子上に移動したことが示された。また、天然のミオグロビンでは進行しにくいスチレンのエポキシ化も、再構成ミオグロビンを用いると対応するエポキシドが得られた。

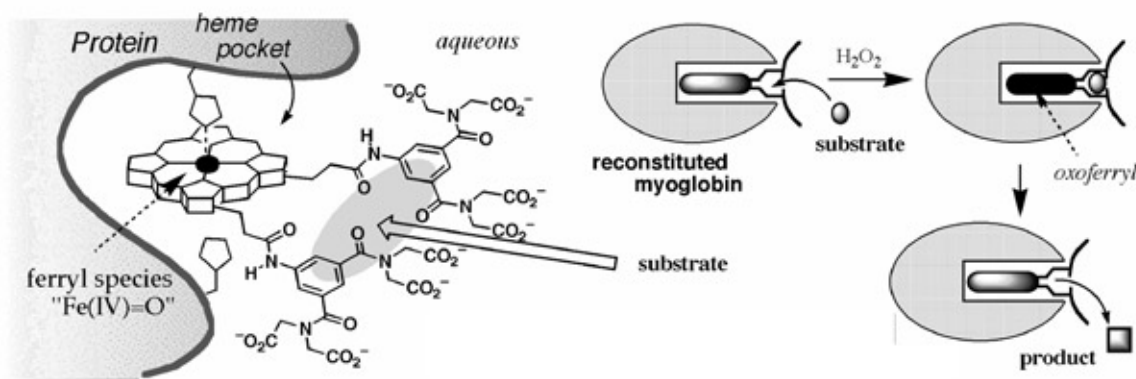


Figure 2. 再構成ミオグロビンrMb(2)のヘムポケット及び触媒サイクルの模式図

2.3. ハイブリッド蛋白質の構築

しかしながら、天然のミオグロビンに比べて10倍程度の活性の上昇では、実用化にはまだ十分とは言えない。そこで次のアプローチとして、上述の基質結合部位を有するミオグロビンにさらに反応活性種（高酸化状態）をスムーズに与える適切なヘムポケットを組み合わせたハイブリッド蛋白質の構築に挑戦した。具体的にはミオグロビンの distal 部位を天然のペルオキシダーゼ（たとえば、西洋わさびペルオキシダーゼ）に似た構造にするために、His64をAps64に置換した変異体を合成し、そのアポ蛋白質に修飾ヘム(2)を挿入した。得られた変異体再構成ミオグロビンについて、グアイアコールを基質として過酸化水素存在下での触媒活性を求めたところ天然のミオグロビンに比べ初速度で300倍、触媒効率 k_{cat}/K_m で430倍向上した (Table 1 参照)。これは、天然のシトクロムcオキシダーゼと比較しても約100倍程度優れており、西洋わさびペルオキシダーゼにほぼ匹敵する活性が得られた。

さらに、今回開発したハイブリッド蛋白質 rMb (H64D•2) の生体触媒としての有用性を検証するために、内分泌攪乱物質（環境ホルモン）として問題になっているビスフェノールAの酸化的分解を試みた。Figure 3 に示すように、過酸化水素存在下でのビスフェノールAの分解は、天然のミオグロビンに比べ rMb (H64D•2) を触媒として用いることによって、40倍以上の速度で進行することが明らかとなった。こ

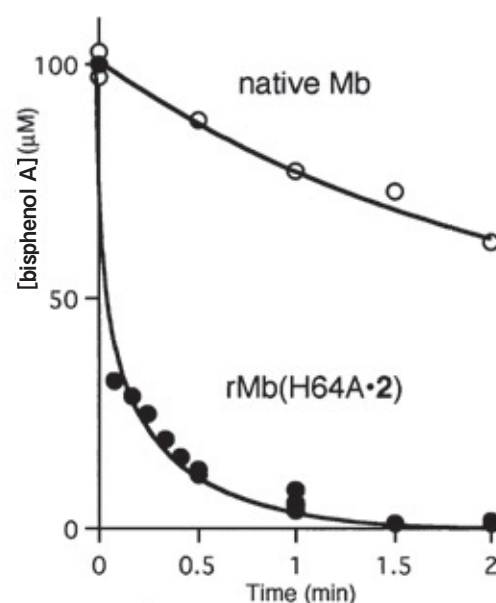


Figure 3. 過酸化水素存在下、ミオグロビンによるビスフェノールAの分解反応追跡

Table 1. ミオグロビンのグアイアコール酸化における活性評価^a

Myoglobin	rel. rate ^b	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Mb (native•1)	1	2.8 ± 0.6	54 ± 15	53
rMb (native•2)	9.5	6.2 ± 0.6	3.4 ± 0.6	1800
Mb (H64D•1)	68	9.0 ± 1.2	1.8 ± 0.4	5100
rMb (H64D•2)	295	1.2 ± 0.1	0.052 ± 0.016	23000

^a20 mM sodium malonate (pH6.0), 25 °C. native = native protein, H64D = mutant (His64Asp)
rMb = reconstituted myoglobin, 1 = native heme, 2 = artificial heme. ^binitial turnover number.

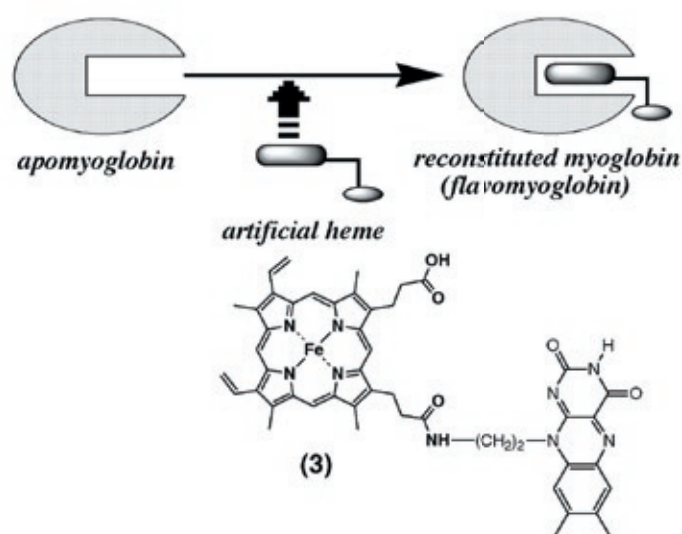
れは、ハイブリッドミオグロビンにおける人工的に構築した基質結合部位と優れた反応場設計の相乗的な効果と見なされる。

以上、ミオグロビンに適切な基質結合部位と反応場を与える手法によって、実用的な生体触媒即ち人工酵素を創製することが可能であることを実証した。

2.4. フラボミオグロビンによる酸素の還元的活性化

酸素分子を酸素源とする生体内の触媒的酸化反応のプロセスは必ずしも簡単ではない。例えば、シトクロムP450の場合、還元的条件下で分子状酸素を活性化し、高酸化状態を獲得する。そのために、別の還元酵素（フラボレドキシシンやプチダレドキシシン）から電子を授受して反応が進行する。ミオグロビンはP450と同じヘムを補欠分子として有しているが、ミオグロビンはP450の様に他の蛋白質から電子を授受するための仕組みがないため、酸素分子を還元的に活性化する能力を持たない。そこで、我々はミオグロビン内のヘムが外部からスムーズに電子を受け取ることができるように、ヘム末端に電子メディエーターとして働くフラビンユニットを修飾し、得られたフラボヘム(3)をアポミオグロビンに挿入したフラボミオグロビンを調製し、P450活性発現をめざした (Scheme 3)。まず溶液に電子源（還元剤）としてNADHを添加すると、天然のミオグロビンに比べてフラボミオグロビンの方が迅速にデオキシ体が生成することを確認した。さらに空気下、基質として2-phenylpropion-

aldehydeを添加すると、フラボミオグロビンの方が優先的に基質の脱ホルミル化を触媒し、Figure 4に示す様にアセトフェノンの生成が加速されることが明らかとなった。この反応は、NADHからフラビンを介して2電子がヘムに流れることにより、メト体が PFe(II)-O_2^- (ペルオキシアニオン種) になり、強い求核剤としてアルデヒドのカルボニルを攻撃すると考えられる。さらにO—O結合の解離を経



Scheme 3. 電子メディエーターを有する再構成ミオグロビンの構築

て得られたベンジルラジカルが溶液中の酸素分子と反応し、最終的にアセトフェノンが生成する。以上の結果より、ミオグロビンを用いて、今まで困難とされた分子状酸素による基質の還元的酸化反応が初めて実現した。

2.5. 「青い」ミオグロビンの構築

前項までは、ミオグロビンのヘムの側鎖プロピオン酸を修飾して、蛋白質の機能を評価したが、ヘム骨格を非天然のものに変換し、錯体化学の見地から蛋白質の機能変換や機能向上を試みる手法も考えられる。そこで、今回はScheme 4に示すポルフィリンの異性体であるポルフィセンを配位子とする鉄錯体4を補欠分子として設計・合成した。

ポルフィセン骨格そのものは1980年代Vogelらによって合成されたものである。今回はアポミオグロビンに挿入させるため、ポルフィセンの2つのピロールにそれぞれプロピオン酸側鎖を導入する分子設計を行い、4の合成ルートをScheme 4のように確立した。得られたポルフィセン鉄錯体4は、常法の再構成手法によって、クジラ及び馬由来アポミオグロビンに挿入し、再構成蛋白質rMb(4)を得た。この再構成ミオグロビンのマスペクトルをFigure 5に示す。アポミオグロビンと4はそれぞれ分子量が16953、620であるが、再構成蛋白質をESI-TOF-Massで分析した結果、計算通りのホロ蛋白質の質量に相当するピークが得

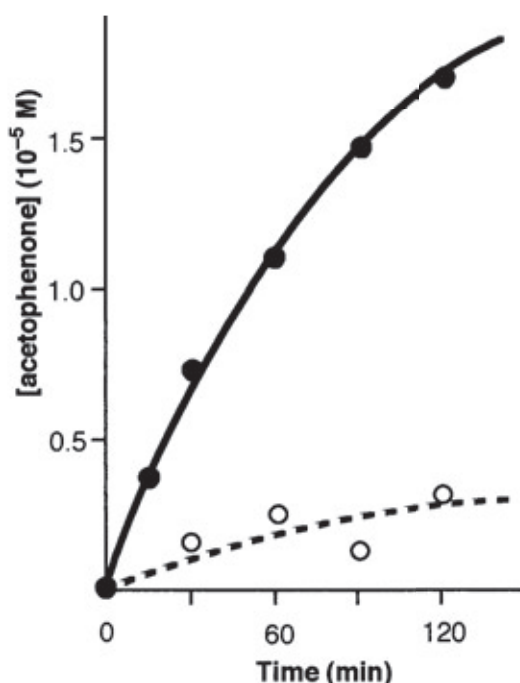
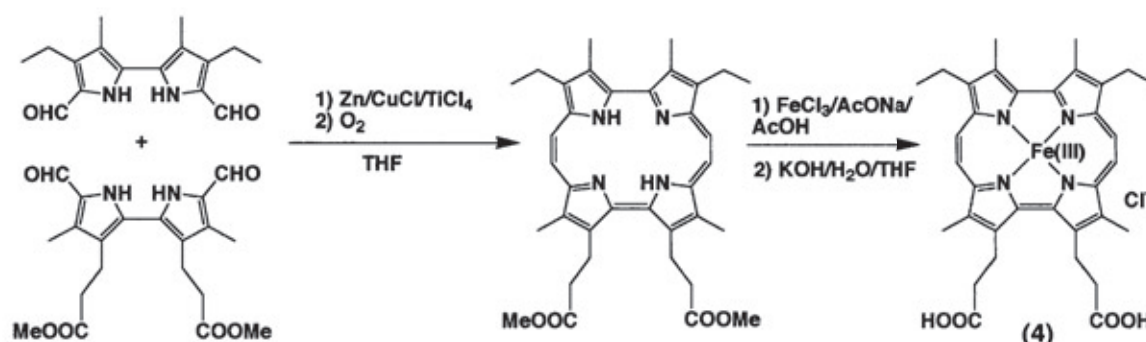


Figure 4. ミオグロビンを触媒とする2-phenylpropionaldehydeのdeformylation.
(●) rMb(3)、(○) native Mb+flavin



Scheme 4. 鉄ポルフィセン4の合成スキーム

れられた。またミオグロビンを含む天然のヘム蛋白質は通常メト体 (PFe(III)) では褐色であるが、rMb(4) は4本来の色を反映して鮮やかなライトブルーを呈し、電子スペクトルの極大波長は、387, 563, 624nmであった。まずrMb(4)の安定性を評価するために、酸変性の実験を実施した。通常のヘム蛋白質は酸性下では蛋白質マトリクスからのヘム解離が進行するが、天然のミオグロビンでもpH4.1で50%のヘムが解離した。一方rMb(4)ではpH3.0の酸性側まで安定に存在することが明らかとなった。また、Fe(III)/Fe(II)の酸化還元ポテンシャルを測定した結果、天然のミオグロビンが+52mV(Ag/AgCl)に対して、rMb(4)は-193mVと大きく負側にシフトしており、rMb(4)は極めて酸化されやすい状態にあることが判明した。さらにESRでメト体のrMb(4)を測定すると、典型的な低スピン錯体であることも天然のミオグロビンと異なるポイントである。以上の結果からrMb(4)は天然のミオグロビンに比べて、軸配位子である93番目のヒスチジン(His93)と強い配位結合を形成していることが示唆された。

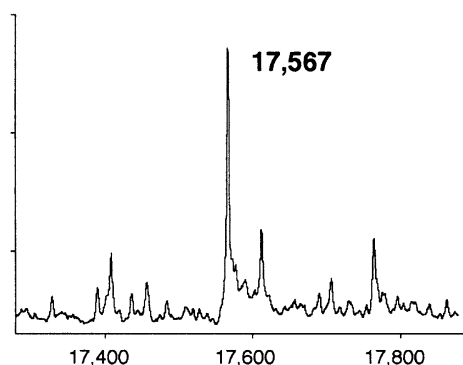


Figure 5. deconvolution後のrMb(4)のESI-TOF Massスペクトル

2.6. ブルーミオグロビンの機能評価

得られたメト体のrMb(4)は天然のミオグロビンと同様に、ジチオナイトの添加により、デオキシミオグロビンに還元された。さらにこのデオキシ体の溶液に酸素、一酸化炭素をそれぞれ吹き込むと酸素錯体、一酸化炭素錯体が可逆的に形成された。この知見をもとに、酸素の結合速度定数をレーザーフラッシュホトリシスで、また酸素の解離速度定数をフェリシアン化カリウム添加によるストップドフローでの追跡により算出した。Table 2に示すように、天然のミオグロビンに比べrMb(4)は酸素の結合定数は5.4倍上昇し、一方、解離定数は490分の1に減少している。それぞれのパラメータの比から、rMb(4)の酸素結合定数は

Table 2. ミオグロビンの酸素結合能評価^a

Myoglobin	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{auto} (h^{-1})	K_{O_2} (M^{-1})	$M(=K_{CO}/K_{O_2})$
Mb(native•1)	17	28	0.10	6.1×10^5	13
rMb(native•4)	91	0.057	0.024	1.6×10^9	0.10

^apH7.0, 100 mM phosphate buffer, 25 °C.

$K_a = 1.6 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ となり、天然のミオグロビンに比べて酸素親和性が2600倍向上したことが示された。特にこの主たる要因は酸素分子の解離速度の抑制、即ち酸素錯体の安定性によるものである。さらに、酸素錯体からメト体への自動酸化過程（生理学的には好ましくない反応）も、天然のミオグロビンに比べて4分の1に抑制されていることが実験的に証明され、rMb(4)の酸素錯体が熱力学的に極めて安定であることが判明した。これは主に、補欠分子骨格のポルフィリンがポルフィセンに変化することにより対称性が低下し、それに付随して安定化された鉄 dz^2 軌道が酸素分子の $p\pi^*$ 軌道と安定なMOを形成することに由来すると考えられる。さらに、近位His93からポルフィセン鉄への強い配位結合に基づき、鉄から結合した酸素へのback-donationが強まり、酸素分子の電子密度がより増加するため、遠位His64との水素結合が安定に形成され、酸素の解離が抑制される要因も考えられる。

さらに、一酸化炭素の結合についても検討した結果、rMb(4)は天然のミオグロビンに比べてさほど一酸化炭素親和性の向上は認められなかった。Table 2に、酸素と一酸化炭素の親和性の比較をM値で表記した。一般にポルフィリン鉄錯体は、酸素よりも一酸化炭素との親和性の方が圧倒的に大きい。ちなみに、ミオグロビンの同類であるヘモグロビンも酸素分子より一酸化炭素の方が親和性が数十倍程度大きいため、一酸化炭素中毒が起こる。一方、本研究では合成したポルフィセン鉄錯体を有するミオグロビンrMb(4)では、本来のヘム蛋白質とは逆に酸素分子を10倍程度選択的に結合する極めて興味深い結果を得た。

3. 結言及び今後の方針

3年間のさきがけ研究を通じて得られた成果は、補欠分子を有するヘム蛋白質において、従来の遺伝子工学的手法に基づくアミノ酸の変換ではなく、合成化学的にヘムの修飾・変換を行い、ミオグロビンの機能化を可能とした点にある。非天然のヘムをアポ蛋白質に挿入する研究はこれまでも幾つかの例があったが、そのほとんどは蛋白質とヘムとの相互作用解明や、ヘム蛋白質のメカニズムを探ることが目的であった。従って、今回のミオグロビンの機能化に関する研究では、その独創性と有用性の観点から世界的にも高い評価を受け、さきがけ研究の実施中に幾つかの国際会議で招待講演をすることにもつながった。以下に、代表的な成果を総括し、今後の方針を付記する。

3.1. 蛋白質フラスコとしての有用性

ミオグロビンに基質結合部位を構築するために、簡単なヘムプロピオン酸の修飾を実施するだけで、基質に対する K_m , K_d , k_{cat} 値が顕著に向上し、ペルオキシダーゼ・ペルオキシゲナー

ゼ活性が獲得でき、ミオグロビンを酸化触媒として利用する道筋の開拓を行った。また、反応場の修飾を同時に実施することで、天然のペルオキシダーゼに匹敵する反応活性（天然ミオグロビンの430倍以上）を示し、生体触媒（人工酵素）創製の新しいアプローチを提案した。

さらに最近、環境ホルモンとして注目されているビスフェノールAの分解に対しても有効な触媒として働くことが明らかとなってきた。今後は、さらなる活性の向上をめざすとともに、基質の選択性の向上等についても図りたい。

3.2. スーパーミオグロビンをめざして

蛋白質の機能を向上させることは、長年多くの研究者によって試みられているが、化学的摂動を加えると、むしろ活性が低下してしまう例が大半であった。今回、本研究でミオグロビン内のヘムを非天然の金属錯体に置換することにより天然の機能に比べ2600倍も酸素親和性が飛躍的に向上し、かつ選択的に酸素分子と結合する結果も得られたことは極めて意義深い。また、蛋白質の安定性も天然の蛋白質に比べ大幅に向上している点も付記したい。これは、将来的には水溶液や生体組織中における超高感度酸素センサーあるいは酸素除去剤、酸素保持剤として利用可能であると予想される。また、蛋白質というフラスコの中での新しい錯体化学の発展にも大きく寄与するものと期待する。

3.3. 最後に

本研究を通じて、ヘム蛋白質の新しい機能化への指針を示し、生体触媒の開発の新技术を提案した。これまでは、主にミオグロビンを用いたが、様々なヘム蛋白質の機能改変への可能性も広がっている。また、今回示した「ヘム再構成法」は蛋白質工学に対する新しいアプローチとしても有用と確信している。これまでに得られた数々の知見をもとに、今後は機能化蛋白質の実用化に向けた研究にも積極的に着手したい。最後に、本研究を支援していただいた科学技術振興事業団及び統括の合志先生、アドバイザーの先生方、阿部参事、加藤参事、大野参事及び領域の事務の方々に深く感謝したい。また私とともに研究の遂行に日夜努力をしてくれたグループメンバーの佐藤君、松尾君、及び研究室の学生諸君、ならびに本研究を応援して下さった九州大学大学院工学研究院の久枝教授にこの場を借りて感謝の意を表したい。

4. 成果発表

4.1. 特許

- (1) 特願2001-243968 発明者：林 高史, 久枝良雄, 出島裕久
発明の名称：ポルフィセン金属錯体
出願人：科学技術振興事業団, 出願日：平成13年 8月10日
- (2) 特願2002-147344 発明者：林 高史, 松尾貴史, 久枝良雄, 出島裕久
発明の名称：半人工ヘム蛋白質から成る酸素センサー
出願人：科学技術振興事業団, 出願日：平成14年 5月22日

4.2. 主な発表論文

- (1) Chemical Properties of Reconstituted Myoglobins with Functionalized Hemin Derivatives
Takashi Hayashi, Tsutomu Ando, Takaaki Matsuda, Hideaki Sato, Takashi Matsuo, Yoshio Hisaeda
J. Inorg. Biochem. **86**, 57 (2001).
- (2) New Functionalization of Myoglobin by Chemical Modification of Heme-Propionates
Takashi Hayashi, Yoshio Hisaeda
Acc. Chem. Res. **35**, 35 (2002).
- (3) Contribution of Heme-Propionate Side Chains to Structure and Function of Myoglobin:
Chemical Approach by Artificially Created Prosthetic Groups
Takashi Hayashi, Takashi Matsuo, Yutaka Hitomi, Kazufumi Okawa, Akihiro Suzuki,
Yoshitsugu Shiro, Tetsutaro Iizuka, Yoshio Hisaeda, Hisanobu Ogoshi
J. Inorg. Biochem. **91**, 94 (2002).
- (4) Conversion of Hemoprotein Function by Chemical Modification
Takashi Hayashi
J. Synth. Org. Chem. Jpn. **60**, 573 (2002).
- (5) Reductive Activation of Dioxygen by Myoglobin: Reactivity of Myoglobin Reconstituted with
Flavoheemin
Takashi Matsuo, Takashi Hayashi, Yoshio Hisaeda
J. Am. Chem. Soc. **124**, 11234 (2002).
- (6) Blue Myoglobin Reconstituted with an Iron Porphycene Shows Extremely High Oxygen Affinity
Takashi Hayashi, Hirohisa Dejima, Takashi Matsuo, Hideaki Sato, Yoshio Hisaeda
J. Am. Chem. Soc. **124**, 11226 (2002).
- (7) Enhancement of Peroxygenase Activity of Horse Heart Myoglobin by Modification of Heme-propionate
Side Chains
Takashi Hayashi, Takaaki Matsuda, Yoshio Hisaeda
Chem. Lett. **32**, 496 (2003).

- (8) Synthesis, Structure and Chemical Property of a First Fluorine-Containing Porphycene
Takashi Hayashi, Yuji Nakashima, Isao Aritome, Akihiro Suzuki, Yoshio Hisaeda
Org. Lett. **5**, 2845 (2003).
- (9) Synthesis, Characterization and Autoreduction of a Highly Electron-Deficient Porphycenatoiron (III) with Trifluoromethyl Substituents
Takashi Hayashi, Yuji Nakashima, Kazuyuki Ito, Takahiro Ikegami, Isao Aritome, Katsuhiko Aoyagi, Tsutomu Ando, Yoshio Hisaeda
Inorg. Chem. **42**, 7345 (2003).
- (10) Zinc Enzyme and Their Models
Takashi Hayashi
 In *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, J. Atwood and J. Steed, Eds., Marcel Dekker, New York, in press.
- (11) Hybridization of Modified-Heme Reconstitution and Distal Histidine Mutation to Functionalize Sperm Whale Myoglobin
 Hideaki Sato, Takashi Hayashi, Tsutomu Ando, Yoshio Hisaeda, Takafumi Ueno, Yoshihiko Watanabe
J. Am. Chem. Soc. **126**, 436 (2004).
- (12) Ligand Binding Properties of Myoglobin Reconstituted with an Iron Porphycene
 Takashi Matsuo, Hirohisa Dejima, Shun Hirota, Dai Murata, Hideaki Sato, Takahiro Ikegami, Hiroshi Hori, Yoshio Hisaeda, Takashi Hayashi
 Submitted for publication

4. 3. 主な口頭発表 (国際会議招待講演のみ限定して掲載)

- (1) The 26th ISMC Satellite-Symposium “Dreaming Supramolecular Chemistry for New Millennium”, Hiroshima, July, 2001.
 “Supramolecular Composite via Protein-Protein Recognition. Architecture of Artificial Binding Domain on the Protein Surface”
- (2) 10th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-10), Florence, Italy, August, 2001.
 “Functionalization of Hemoproteins by Heme-Propionates Modification”
- (3) 2nd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP- 2), Kyoto, June, 2002.
 “Functionalized Hemoproteins Reconstituted with Artificially Created Iron Porphyrin Derivatives”
- (4) 11th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-11), Cairns, Australia, July, 2003.
 “Role of Heme-Propionate Side Chains in Myoglobin Function”
- (5) Singapore International Chemical Conference III: Frontiers in Physical and Analytical Chemistry (SICC- 3), Singapore, December, 2003.

“Functionalization of Myoglobin by Chemical Modification”

- (6) 3rd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP- 3), New Orleans, USA, July, 2004.

“Modification of Hemoproteins by Reconstititional Methods”