

氏 名	あき 秋 やま 山 たい 泰 しん 身
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 323 号
学位授与の日付	平成 4 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	機能性フラビン誘導体の合成と反応に関する研究

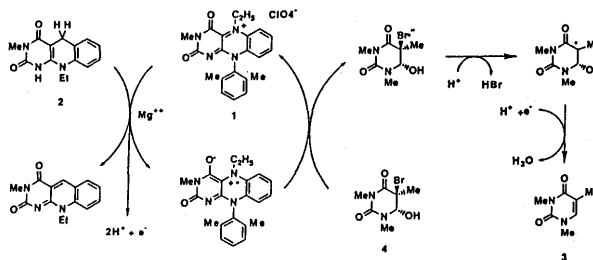
論文調査委員 (主 査) 教授 米田文郎 教授 杉浦幸雄 教授 富士 薫

論 文 内 容 の 要 旨

フラビン補酵素は生体内に広く分布し、脱水素、電子伝達、酸素活性化、化学発光等の多彩な生体酸化還元反応に関与している。フラビン補酵素がこのように多様な機能を発現できるのは、酸化型、セミキノン型、完全還元型という3種類の形態をとり得るからである。酸化型は高い平面性と特徴的な可視光吸収及び蛍光を持ち、脱水素反応に大きな役割を果たす。セミキノン型は、有機ラジカル体であり、NADHのような2電子酸化還元剤とヘム鉄のような1電子酸化還元剤との橋渡しにおいて中心的役割を担う。完全還元型は、酸素を活性化することによって、種々の基質への酸素添加や化学発光を行う。また、フラビン酵素において、特に、セミキノン型と完全還元型では、アポタンパク部分がフラビン補酵素の反応性に大きな影響を与えていると考えられ、実際にタンパク部分を除いた補酵素のみでは、反応性は酵素に比べて著しく低下する。今回、著者は種々の新しい機能性フラビン誘導体を設計合成し、よりフラビン酵素に近い反応性の実現を計るとともに、まだ観察されていない全く新しい機能の発現を意図して研究を実施した。

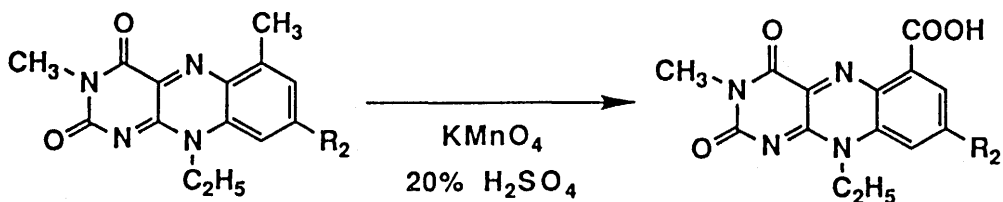
第1章 フラビニウム塩を用いた1電子伝達系の構造。

1,3-ジメチルチミンプロモヒドリン(4)は核酸塩基の酸化的損傷体のモデル化合物と考えられ、光あるいは熱により1電子的な還元を受け、1,3-ジメチルチミン(3)となることが報告された。著者はフラビン補酵素の1電子酸化還元能を用いて4の還元反応を試みた。フラビン補酵素モデルであるフラビニウム塩(1)を用い、NADHモデル化合物の5-デアザフラビン誘導体(2)やNa₂S₂O₄によりin vitroにおける1電子伝達系を構築することで4の還元反応に成功した。5-デアザフラビンを用いる電子伝達の系にはMg⁺⁺の存在が必須であった。

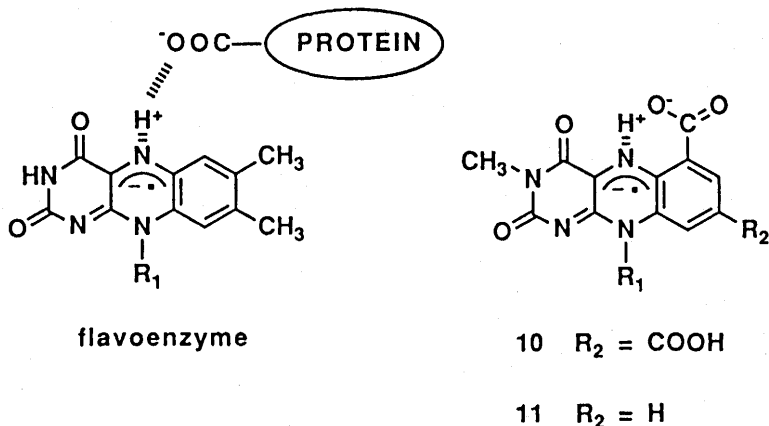


第2章 5位に水素結合し得るフラビンカルボン酸類の合成と性質。

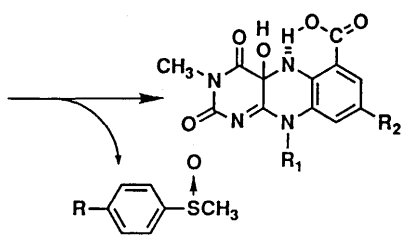
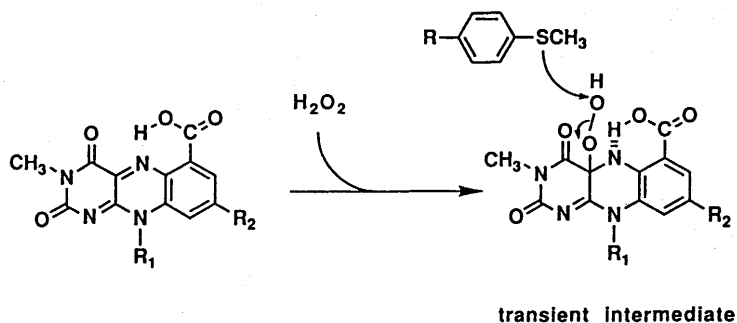
フラビン補酵素はアポタンパクのアミノ酸残基と水素結合などを通じて相互作用をしている。著者は5位に水素結合可能なフラビン補酵素モデルとして、フラビン-6-カルボン酸類(10), (11)を設計した。合成はまず6位にメチル基を持つフラビン誘導体を合成後、メチル基を過マンガン酸カリウムにより酸化して、カルボン酸へ導く方法に依った。



フラビン-6-カルボン酸類(10), (11)を0.1Mリン酸緩衝液(pH6.89)中、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元したところ、極めて安定なセミキノラジカルを生じ、これをESR(電子スピン共鳴)スペクトルで確認、解析した。6位にカルボキシル基を持たないフラビンではESRシグナルは微弱、短命であるか測定できなかった。フラビン-6-カルボン酸類はアニオンラジカルを生成した際、アニオンラジカルとカルボキシレートとの二つのアニオンによる強い相互作用によりプロトンを捕獲し、このプロトン化がラジカルを安定化させていると結論した。この結果は、水素結合によるフラビンセミキノラジカル安定化を化学的に証明した最初の例である。

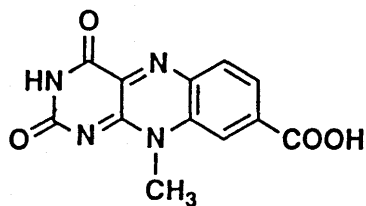


更に、フラビンカルボン酸類により、過酸化水素の活性化を検討した。6位にカルボキシル基を持つフラビンは過酸化水素を活性化することで、チオアニソールをスルホキシドへと変換した。本反応は、5位に対する分子内水素結合に依って、フラビンC4a位が活性化され、過酸化水素が付加することでパーオキシ中間体を生成し、これが、アニソールを酸化していると結論した。これは、5位にアルキルを持たないフラビン誘導体による過酸化水素活性化の初めての例である。



第3章 フラビン誘導体による DNA 切断反応

フラビン骨格にカルボキシル基を導入することによって、高い水溶性をもたせ、DNA 切断反応を検討した。光照射下、1 時間で、フラビン誘導体(12) (100 μ M) は ccc plasmid DNA を完全に ocDNA へと変換した。 $^1\text{O}_2$ の阻害剤であるアジ化ナトリウムは上記 DNA 切断を完全には抑制できないため、この反応には、ラジカル性フラビン励起体による直接の酸化反応が考えられる。切断の塩基配列特異性はそれほど高くないが、グアニン残基に対してより高い反応性を示した。本反応はフラビン誘導体による DNA 切断の初めての例である。

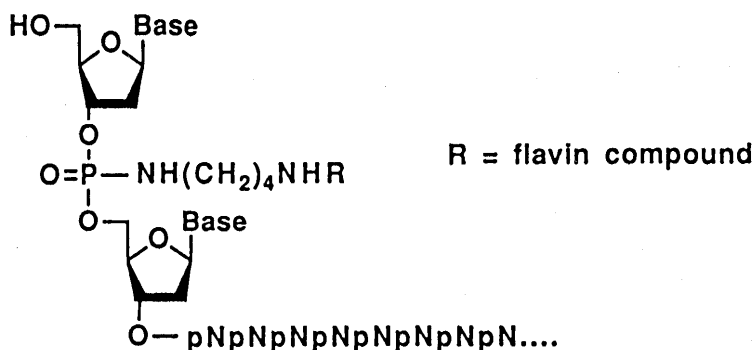


12

第4章 フラビン誘導体を共有結合させたオリゴデオキシシクロオチドの合成

フラビン機能性とアンチセンス DNA との複合化を目的として、フラビン誘導体を共有結合させたオリゴデオキシシクロオチドを合成し、その性質を調べた。合成は、固相ハイドロジェンホスホネート法を用いて 9mer (19mer) を合成後、ヌクレオシド H-ホスホネートを反応させ、ジアミン存在下、四塩化炭素酸化を行う方法に依った。ここに得られた 5'-インターヌクレオチド間にホスホロアミデートでリンカーを結合させたオリゴデオキシヌクレオチドに、トリエチルアミン存在下、別途合成したフラビンの活性エステルを反応させ、目的とするフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドを合成した。天然型オリゴデオキシヌクレオチドと同様にフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドは相補鎖とヘリックスを形成でき、結合

させたフラビンにより、若干、ヘリックスの熱的安定性は変化した。蛍光スペクトルはヘリックス形成に伴い強度が増加し、蛍光性プローブとしての可能性を示した。またフラビンのDNA切断機能を利用して、塩基配列特異的DNA切断に成功した。



論文審査の結果の要旨

本論文は生体内で多様多彩な酸化還元機能を発揮するフラビン酵素の新規モデル化合物の設計と合成並びにその反応性の検討によるフラビン機能の解明、あるいは本モデル化合物を用いた新しい反応の開発に関するものである。

先ず著者はN(5)位に分子内水素結合可能な新しいフラビン酵素モデルとしてフラビン-6-カルボン酸類を設計・合成した。これらの化合物を用いることによって、従来アポタンパクの非存在下では不安定であったフラビンセミキノラジカル類の安定化に成功し、これらのラジカル構造を明らかにした。この結果はフラビンのN(5)位への水素結合がフラビンラジカルを安定化するという従来の仮説を化学的に初めて証明したものである。また上記フラビン酵素モデルを用いて、フラビン含有モノオキシナーゼ反応のモデル化に成功した。これはN(5)位が置換されていないフラビン誘導体による過酸化水素活性化の初めての例である。

つぎに、著者はフラビンによってDNA切断反応が照射下に起こることを発見した。本反応は部分的に一重項酸素によって起こるが、フラビン励起状態によって起こることが判明した。この際グアニン残基に対してや、高い反応性が観察された。

さらに、著者はフラビン反応性をオリゴデオキシヌクレオチドに付与させたフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドを設計・合成し、これを用いて塩基配列特異的DNA光切断反応に成功した。すなわちフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドによるDNA切断に比してはるかに低濃度で起こるだけでなく、高い塩基配列特異性を示した。また他のDNA切断分子を共有結合させたオリゴデオキシヌクレオチド類による切断と比較して、異なった位置選択性を示した。

以上の研究はフラビンの有機化学と生化学の分野のみならず、複素環化学や医薬化学の分野においてその進展に寄与するところ極めて大であると考えられる。従って本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認めた次第である。

さらに平成4年6月28日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果優秀と認定した。