

氏 名	森 家 章 雄 もり や ふみ お
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 664 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	γ 線照射によってアミノ酸およびジペプチド水溶液中に生成するフリーラジカルのスピントラップラジカルクロマトグラフィによる研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 波 多 野 博 行 教 授 丸 山 和 博 教 授 広 田 襄

### 論 文 内 容 の 要 旨

たんぱく質を構成するアミノ酸として最も基本的なグリシンと L-アラニン、およびそれらより構成されるジペプチド、すなわちグリシルグリシン、グリシル-L-アラニン、L-アラニルグリシン、L-アラニル-L-アラニン、について、それらの水溶液中でγ線照射によって生成する短寿命のラジカルを、スピントラップ剤 2-メチル-2-ニトロソプロパンを用いて捕捉し、得られたそれぞれのスピニアダクトの混合物を高速液体クロマトグラフィにより分離し、各アダクトの電子スピン共鳴吸収スペクトルを測定してその構造を決定し、それに基づいてもとのラジカルの構造を明らかにする研究を行った。

周到なる用意の下に、2-メチル-2-ニトロソプロパンが共存するグリシン、および L-アラニンの水溶液に約  $3 \times 10^6$  rad の γ 線を照射して、本研究によりアミノ酸に由来する 4 種類のスピニアダクトが検出・同定された。グリシンから得られたスピニアダクトは  $(\text{CH}_3)_3\text{C-N}(\text{O}\cdot)\text{-CH}_2\text{COO}^-$  と  $(\text{CH}_3)_3\text{C-N}(\text{O}\cdot)\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$  であり、L-アラニンから得られたものは  $(\text{CH}_3)_3\text{C-N}(\text{O}\cdot)\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$  と  $(\text{CH}_3)_3\text{C-N}(\text{O}\cdot)\text{-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{-COO}^-$  である。アラニンのスピニアダクトの前者のものの酸解離定数  $\text{pK}_a$  は 3.2 と決定された。後者のものの ESR スペクトルは 2 個の β 水素の超微細構造が非等価であり、かつこれらによる 4 本線シグナルの内部対が線幅交代によって広幅になる特異的なものであった。このアダクトのアミノ基の  $\text{pK}_a$  は 8.9 と決定された。

同様な実験をジペプチドについて行い、グリシルグリシンから  $(\text{CH}_3)_3\text{C-N}(\text{O}\cdot)\text{-CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$  および  $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CONHCH}(\text{COO}^-)\text{-N}(\text{O}\cdot)\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ , またグリシル-L-アラニンから  $(\text{CH}_3)_3\text{C-N}(\text{O}\cdot)\text{-CH}_2\text{CONHCH}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$ ,  $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CONHC}(\text{CH}_3)(\text{COO}^-)\text{-N}(\text{O}\cdot)\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  および  $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CONH-CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{-N}(\text{O}\cdot)\text{-C}(\text{CH}_3)_3$  が見出された。グリシルグリシンから生成したラジカルのスピニアダクトの前者のものでは 2 個の β 水素の超微細構造が等価であるのに対して、これに対応するグリシル-L-アラニンのそれは非等価であることが見出された。両者の構造のちがいは不斉炭素の存否のみであり、δ 位の不斉炭素でさえ 2 個の β 水素を非等価にすることが明らかになった。tert-ブチル基の γ 水素の超微細構造

は観測されないのが普通であるが、グリシル-L-アラニンから得られた2番目のスピアダクトにおいてはスピントラップ剤に由来する *tert*-ブチル基を含むすべての $\gamma$ 水素の超微細構造が観測された。グリシル-L-アラニンについて最後に測定されたラジカルは $\alpha$ 位にメチレン基を持ち、かつ $\beta$ 位に不斉炭素を持つニトロキソラジカルであるが、pH 2 付近では線幅交代を保持しつつ2個の $\beta$ 水素の超微細構造が等価になった。またこれらのアダクトのうちいくつかの酸解離定数が決定された。

L-アラニルグリシンと L-アラニル-L-アラニンから得られたものは  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{N}(\text{O}\cdot)-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$ ,  $\text{H}_3\overset{+}{\text{N}}\overset{*}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\text{CONH}\overset{*}{\text{C}}\text{H}(\text{COO}^-)-\text{N}(\text{O}\cdot)-(\text{CH}_3)_3$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{N}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)-\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{N}(\text{O}\cdot)-\overset{*}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\text{CONH}\overset{*}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$ ,  $\text{H}_3\overset{+}{\text{N}}\overset{*}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\text{CONH}\overset{*}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)(\text{COO}^-)-\text{N}(\text{O}\cdot)-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{N}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{CONHCH}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$ , および  $\text{H}_3\overset{+}{\text{N}}\overset{*}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\text{CONH}-\text{CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2-\text{N}(\text{O}\cdot)-\text{C}(\text{CH}_3)_3$  である。これらのうち\*印を付した不斉炭素を同一ラジカル内に2個有するアダクトはそれぞれ1対のジアステレオマーラジカルであり、各対の ESR スペクトルの間の僅かな相違を明瞭に区別、確認することができた。例えば  $\text{H}_3\overset{+}{\text{N}}-\overset{*1}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\text{CONH}\overset{*2}{\text{C}}\text{H}(\text{COO}^-)-\text{N}(\text{O}\cdot)-\text{C}(\text{CH}_3)_3$  の場合にはこれの生成過程におけるスピントラップ反応によって新たに生じた不斉炭素  $\overset{*2}{\text{C}}$  と N 末端の L-アラニンの不斉炭素  $\overset{*1}{\text{C}}$  とによって、L-L 型と L-D 型の異性体アダクトが生成した。

以上の結果から(1)水和電子の攻撃によって生成する脱アミノラジカル、(2)ヒドロキシルラジカルによる脱水素反応が $\alpha$ 炭素上で起って生成する主鎖ラジカル、および(3)ヒドロキシルラジカルによる脱水素反応が側鎖の炭素上で起って生成する側鎖ラジカルを、いずれもこれら4種のジペプチドについて証明した。

### 論文審査の結果の要旨

生体分子に対する放射線の化学的作用の初期過程において、フリーラジカルが重要な反応中間体として生成することはよく知られている。従ってこれらのフリーラジカルを捕捉してその構造を明らかにしその生成機構や反応機構を解明することは、生物に対する放射線の影響を化学的に解明するに当って基本的に重要なことである。ところが、これらの反応中間体ラジカルはいずれも極めて不安定で、その寿命は僅かに数 $\mu$ 秒～数m秒にすぎないものが多い。従来このような短寿命のフリーラジカルを検出測定するには反応系を極低温に凍結するか、高速反応測定法が用いられてきた。

申請者はこれらの短寿命のラジカルを捕捉するためにスピントラップ法を用い、これによって不安定ラジカルを安定なスピアダクトラジカルに誘導し、しかる後に種々のスピアダクトラジカルの混合物を高速液体クロマトグラフィーによって個々の単一スピアダクトに分離し、そのそれぞれについて ESR スペクトルを測定解析することによってスピアダクトラジカルの構造を決定し、もとの不安定ラジカルの構造を明らかにする方法を用いている。

対象とした生体分子は、たんぱく質を構成するアミノ酸として最も基本的なグリシンと L-アラニンで、これらから構成される4種のジペプチドについて詳細な研究を行った。まず周到な注意の下にスピントラップ剤自身の分解を防ぐ考慮を払った後、得られたラジカルの ESR スペクトルを詳しく解析して新しいラジカルを数多く証明している。特に注目されることは、スピントラップの反応過程で新たに生成した不斉炭素と基質分子に由来する不斉炭素との共存に起因するジアステレオマーラジカルの分離に成功し、

L-L 型および L-D 型の異性体をそれぞれ分離証明している。さらに種々の pH におけるスペクトルの解析から酸解離定数を多くの新しいラジカルについて測定している。

これらの詳しい研究の結果、これらのジペプチド水溶液においては、 $\gamma$ 線照射によって生成した水和電子とペプチド分子が反応して脱アミノしたラジカルと、同じく $\gamma$ 線照射によって生成したヒドロキシルラジカルによりペプチド分子の主鎖の $\alpha$ 炭素から水素原子が離脱して生成した主鎖ラジカルと側鎖の炭素から水素原子が離脱して生成した側鎖ラジカルが存在することが明らかとなった。

このような新しい方法による研究の成果は単に放射線化学や放射線生物学の分野で重要な基礎的知見を加えたばかりでなく、この方法は有機化学、光化学、物理化学、さらに医学的応用に至る極めて広い分野で用いられて方法論的な貢献をすること多大なものがある。また参考論文はこの方法の開発やアミノ酸に関する先駆的成果であり、これらを併せて本論文は理学博士の学位を授与されるに十分な価値があるものと認められる。