

氏 名	牧 野 圭 祐 まぎ の けい すけ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	論 理 博 第 697 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ESR Studies on Spin Trapped Radicals of Amino Acids in Aqueous Solutions (スピントラッピング法による水溶液中のアミノ酸のフリーラジカルの ESR 分光学的研究)

(主 査)
論文調査委員 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

γ線照射により生体構成分子から生成する短寿命のフリーラジカルに関する基礎的研究として、アミノ酸の水溶液中に生成する短寿命フリーラジカルをスピントラップ法で捕捉し、ESR 分光法で測定する研究を行った。

スピントラップ剤としては多少の水溶性を有し、生成したスピニアダクトの構造決定に有利な ESR スペクトルを与える 2-メチル-2-ニトロソプロパン (MNP) を用いた。この試薬は水溶液中で単量体と二量体の平衡が存在し、また比較的不安定なため調製法が難しいのでまず調製法を確立した(参考論文4)。次に本研究においては水溶液中に試料のアミノ酸とスピントラップ剤が共存する状態でγ線照射するが、この際アミノ酸のラジカルのほかにトラップ剤のラジカルも生成しこれがトラップ剤自身に捕捉される結果、両方のスピニアダクトが共存し分離や測定を複雑なものとする。

まずこの問題を解決するために主論文第2部において、γ線照射によって MNP 水溶液中に生成するスピニアダクトの分析結果を示した。得られた個々のスピニアダクトの ESR スペクトルは5種でそのうち次の4種の構造を決定した。 ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{N}(\text{NO})-\text{OH}$, ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_3$, ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{N}=\text{O}$, あるいは ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{N}^+(\text{O}^-)=\text{N}^+(\text{O}^-)-{}^t\text{Bu}$, および ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-{}^t\text{Bu}$ 。

主論文第1部は生成直後の短寿命ラジカルを MNP で捕捉し、そのスピニアダクトを高性能イオン交換クロマトグラフィーで分離し、分離された個々のスピニアダクトについて ESR スペクトルを測定してこれを解析してもとのラジカルの構造を決定する方法を DL-メチオニンに適用し、その有用性を明らかにした。

スピニアダクトは比較的不安定なものが多く、短い 10 cm のカラムを用い、高性能分離にはポリスチレン系カチオン交換樹脂を充填したカラムが最適であった。この研究で生成が確かめられたスピニアダクトは次の4種でありそのうち前二者が DL-メチオニンに由来するものである。

${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$, ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-\text{CH}_3$, ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)-{}^t\text{Bu}$ 。

主論文第3部はL-バリンについて行った研究で、次の3種のスピニアダクトの生成が証明された。 ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)\text{--CH}(\text{COO}^-)\text{--CH}(\text{CH}_3)_2$, ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)\text{--CH}_2\text{C}^*\text{H}(\text{CH}_3)\text{--C}^*\text{H}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$, ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)\text{--C}(\text{CH}_3)_2\text{--CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ このうち第2のスピニアダクトには*印を付した隣接する二つの不斉炭素の存在に由来するジアステレオマーが個々に分離され、その各々のESRスペクトルの相違を比較することに成功した。またそれらのESRスペクトルのpH依存性を調べ、アミノ基およびカルボキシル基の解離平衡定数を決定した。

主論文第4部はL-ロイシンとL-イソロイシンについて行った研究である。本論文では水和電子の攻撃によって生じる脱アミノラジカルを同定し、ヒドロキシラジカルによる脱水素反応がすべての炭素上で起きている事を確認した。L-イソロイシンではpHによるアミノ基の構造の変化がアミノ基の γ 位の炭素上の水素のカップリング定数に影響を与えるが、 δ 位のそれには影響しないことが解った。ニトロキシドラジカルにおいて β メチレン水素が非等価になる現象は β および γ メチレン水素と γ 位の不斉炭素を有する場合にも観測された。この場合にはline width alternationは付随しない。L-ロイシンでは γ 線の直接作用によるC-C開裂により生じるラジカルのスピニアダクト ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)\text{--CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ のスペクトルが観測された。また、 ${}^t\text{BuN}(\text{O}\cdot)\text{--CH}_2\text{C}^*\text{H}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}^*\text{H}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ のスペクトル解析によりメチレン基をはさむ二つの不斉炭素(*印)に由来するジアステレオマーの存在が見出された。このスペクトルでは、隣接する不斉炭素によるジアステレオマーに比べて、非常に接近したカップリング定数を与えた。

以上第1, 2, 4部の論文で決定されたスピニアダクトのカップリング定数を用いニトロキシド基の窒素原子の対電子の軌道軸と β メチレン水素によって作られる二面角の値を求めた。

論文審査の結果の要旨

化学的および生物学的に重要な意味をもつフリーラジカルの比較的安定なものについては報告があるが、 γ 線照射によって生じる極めて短寿命の不安定ラジカルについては直接これらを取り出して実験的に証明した例は甚だ少ない。これは特殊な装置と特殊な条件下で実験を行う必要があるためである。本論文は短寿命不安定ラジカルをスピントラップ剤で捕捉して安定化し、これらを高速液体クロマトグラフィーによって個々に分離し、それらの各々についてESR分光学的測定を行うことによりまずそのスピニアダクトの構造を決定し、これによってもとの不安定ラジカルの構造を明らかにすることができる、いわゆるスピントラップラジカルクロマトグラフィーなる手法を用いることによって、4種のアミノ酸について多くのラジカルの構造を決定したものである。

この方法を用いるために申請者はまず高速液体クロマトグラフィーの条件を決定し、短いカラムと、高性能充填剤を用いることによって迅速にかつ効率よく分離することに成功している。つぎに本研究に用いるスピントラップ剤についての基礎的条件を検討し、参考論文において試薬の調製法を確立し、主論文においてトラップ剤自身から生じるラジカルを明らかにしている。これらの基礎的研究の成果に基づいて、主論文ではイオウ原子を含むDL-メチオニンと、複雑な側鎖をもつL-バリン、L-ロイシンおよびL-イソロイシンに生じる数多くのラジカルを証明した。まずメチオニンについては2種のラジカルが証明さ

れ、用いた方法の有用性が示されている。バリンについては3種のラジカルが証明され、そのうちの一つについては隣接する不斉炭素に基づくジアステレオマーを分離しそれぞれの ESR スペクトルを比較することに成功している。この結果はニトロキシドラジカルの性質を知る上からも重要な知見である。ロイシンとイソロイシンについては脱アミノラジカルとすべての炭素ラジカルの存在を実証している。とくにバリンでは観測されていない α 炭素ラジカルがロイシンやイソロイシンで観測されたことは興味深いことである。イソロイシンにおいて pH によるアミノ基の構造の変化がアミノ基の γ 位炭素上の水素のカップリング定数には影響するが δ 位のそれには影響しないことが報告されている。さらに、通常のニトロキシドラジカルがニトロキシド基の β 位に不斉炭素を有する場合に β メチレン水素が非等価になるという特徴があるが、 β および γ メチレン水素と γ 位の不斉炭素を有する場合にもこれが観測されるという事実が見出されている。この場合 line width alternation は付随しないのが特徴である。次にロイシンについて γ 線の直接効果によるC—C開裂のラジカルが証明されているが、これは γ 線の直接効果が水溶液中で観測され得たことと併せて複雑なスピニアダクト混合系に対する分析手段としての本法の優位性を立証したものである。また分離されたスピニアダクトの ESR スペクトルの解析からメチレン基をはさむ二つの不斉炭素の存在に由来するジアステレオマーの存在が見出されている。このスペクトルは隣接不斉炭素のそれに比べてカップリング定数が非常に接近した値を示している。さらにこれらの種々のスピニアダクトのカップリング定数を用いてニトロキシド基の窒素電子の対電子の軌道軸と β メチレン水素によって作られる二面角の値も求められている。

これらの成果はいずれも生体関連分子の放射線化学の研究に一つの典型的方法論を提示したもので、その分野の研究にとってはもちろん、ラジカルの物理化学にとっても極めて重要な貢献をしたものと判断される。参考論文はいずれもこれに関連したもので、併せて、放射線化学、物理化学、放射線生物学など関連分野の進歩に資する処少なくない。よって本論文は理学博士の学位を授与されるに値するものと判定する。