

氏 名	えん とう のぶ ゆき 遠 藤 伸 之
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学 位 記 番 号	エ ネ 博 第 41 号
学位授与の日付	平成 13 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	エ ネ ル ギ ー 科 学 研 究 科 エ ネ ル ギ ー 基 礎 科 学 専 攻
学位論文題目	生物フリーラジカルの検出・制御に関する分子論的研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 牧 野 圭 裕 教 授 坂 志 朗 教 授 吉 川 暹

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生体内エネルギー生産系で生じる酸素原子を中心にもつフリーラジカルの検出法確立と制御に関し、フリーラジカル検出の重要な手法であるスピントラッピング-ESR 法の未解決課題解明と、電子伝達系と競合してユニークな生理活性を示すプテリン系フリーラジカル反応制御試薬の作用機序および生体内動態についてまとめており、第1章の緒言、第2章、第3章、および第4章の総括よりなりたっている。

第1章には、グルコース酸素酸化で生成するエネルギーを生命活動源とする好気性生物のエネルギー生産メカニズムと、これを司る高度に制御された電子伝達系の秩序の乱れに起因して無秩序な酸化還元反応から生成する酸素中心ラジカルの生成メカニズムについて述べ、生体エネルギー研究における生体内フリーラジカル検出法確立および制御法確立の重要性を述べることで、本研究の目的を示している。

第2章では、生体内フリーラジカル唯一の検出法である 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) をトラップ剤とするスピントラッピング-ESR 法の未解決課題の解決に関する検討結果をまとめている。

生体試料中には DMPO をニトロキシドラジカル化する酸化還元系が共存し、ヒドロキシルラジカルのスピニアダクト (DMPO-OH) とその酸化物である DMPOX は生体試料中に含まれる微量酸化剤によって非フリーラジカル過程でも生成する。2-1 では、in situ 型電解 ESR セルを使用した ESR 測定を行い、DMPO の酸化メカニズムを素過程ごとに解析し、DMPO は比較的低い酸化電位で DMPO-OH へ酸化され、引き続きより低い電位で DMPOX へ酸化されることを明らかにし、生体試料への DMPO 応用の留意点および指針を提案している。2-2 では、アルカリ性ジメチルスルホキシド系を用い、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) の定量実験系を確立している。2-3 では、in situ 型電解 ESR セルを用い、水素原子 DMPO アダクト単独の ESR スペクトルを得ることに成功し、重水中での測定を併用し、これがフリーラジカル反応機構で生成することを証明している。2-4 では、5 種類の DMPO 誘導体を合成し、同様の実験により、DMPO より水素原子検出に優れたスピントラップ剤の存在を明らかにしている。

第3章では、プテリン類の酸化還元能に着目し、6-formylpterin の生体内フリーラジカル反応制御試薬としての優秀性、作用機序、生体内動態解析をまとめている。

3-1 では、酸化型ネオプテリンの光分解反応で生じる化合物中に 6-formylpterin を見出し、これが酵素反応系および化学反応系で生成する $\cdot\text{O}_2^-$ を効果的に捕捉消去することを見出している。また、6-formylpterin 類縁体がこのような効果を持たないことも証明している。3-2 では、スナネズミを用いて脳虚血再灌流傷害への 6-formylpterin の応用を試み、この化合物が酸素中心ラジカル等によって最も重篤な傷害を受けやすい脳幹部細胞の損傷に対して顕著な抑制効果を持つことを確認し、6-formylpterin が生体試料中でも強い $\cdot\text{O}_2^-$ 捕捉消去作用を持つことを証明している。3-3 では、6-formylpterin の組織中での動態に関してより詳細な検討を行っている。酸素電極を用いた酸素消費量測定および反応生成物解析により、6-formylpterin が還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドと共存することによって、特異的に $\cdot\text{O}_2^-$ 生成

を経て過酸化水素を生成することを明らかにし、さらには、細胞への投与を行い、フローサイトメトリー解析法によって細胞内でも過酸化水素を生成することを証明している。すなわち、生体内反応に時折みられることであるが、6-formylpterin が $\cdot\text{O}_2^-$ -捕捉消去作用によって生体防御を行うと同時に、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド共存下では逆に $\cdot\text{O}_2^-$ を生成して過酸化水素を生じるプロオキシダントとしての効果を併せ持つ、極めて特徴ある性質を持った化合物であることを明らかにしている。さらに、過酸化水素がシグナル伝達物質としての機能をもつことによって、アポトーシス誘導および抑制、細胞増殖抑制などの生物学的な応答作用を引き起こすことも明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生体内エネルギー生産系で生成するフリーラジカルの検出法と制御法の確立に関して、生物物理学的手法と生化学的手法を駆使して得た成果をまとめており、得られた成果は次のとおりである。

- 1) スピントラッピング-ESR 法でトラップ剤として用いられる 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) の生体試料中での非ラジカル過程によるニトロキシドラジカル化が三電子酸化で進行し、一段目の DMPO の一電子酸化が最も低い酸化電位で進行することを明らかにし、酸化剤を含む生体試料への DMPO 応用の留意点および指針を明らかにした。また、新規スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$ 、定量法を確立し、さらには、DMPO およびその誘導体を用いる生体内で生成する水素原子の検出法を確立した。
- 2) 6-formylpterin が、類縁体化合物とは全く異なり、酵素反応系および化学反応系で生成する $\cdot\text{O}_2^-$ を効果的に捕捉消去することを見出し、さらには、脳虚血再灌流傷害において酸素中心ラジカルによって最も重篤な障害を受けやすい脳幹部細胞に対して顕著な保護効果を持つことを明らかにし、生体試料中でも強い $\cdot\text{O}_2^-$ -捕捉消去作用を持つことを証明した。
- 3) 6-formylpterin の細胞内動態に関して詳細な検討を行い、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドと共存することによって、細胞内で特異的に $\cdot\text{O}_2^-$ -生成を経て過酸化水素を生成することを証明し、6-formylpterin がアンチオキシダントおよびプロオキシダントとしての機能を併せ持つことを証明した。さらに、過酸化水素がシグナル伝達物質としての機能をもつことによって、アポトーシス誘導および抑制、細胞増殖抑制などの生物学的な応答作用を引き起こすことも明らかにした。

これらの研究は、生体エネルギー生産系の電子伝達系から漏洩する電子によって生成する酸素中心ラジカルの生物機能妨害機構を解明し、さらにはこれを制御することの可能性を基礎的立場から探るものであり、エネルギー科学分野に大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（エネルギー科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成13年6月6日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。