氏　名	西（にし）　正敏（まさとし）
学位(専攻分野)	博　士　（学　術）
学位記番号	博　乙　第　3　号
学位授与の日付	平成 4 年 11 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	**ニトロン系トラップ剤 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide の鉄存在下における反応機構**
審査委員	（主査）教授 牧野圭祐 教授 板谷　明　教授 切刀　滋

論文内容の要旨

今日の生化学では、分子遺伝学に加え、無秩序な生体内反応によって疾病の原因になるフリーラジカル反応が注目されている。フリーラジカル検出には、5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide（DMPO）をトラップ剤としたスピントラッピング法と電子スピン共鳴（ESR）法を組み合わせた検出法が多用されているが、DMPO は鉄イオン存在下では解析の不可能な ESR シグナルを与える。本研究では、DMPO の鉄イオン存在下での種々の反応を明らかにし、妨害 ESR シグナルを与える化学種を明らかにした。また妨害シグナルの生成しないトラップ剤の構造についても提案を行った。

生体試料中では、バックグラウンド 6 本線が現れる。本研究では、この 6 本線を与える化合物が DMPO 中に微量含まれる不純物であることを見出し、逆相 HPLC、質量分析、核磁気共鳴（NMR）法を駆使して、エポキシ環を有する DMPO 誘導体と同定した。

次に鉄を含む系で得られるスペクトルの解析を行った。室温で DMPO を含む Fenton 系から得られた ESR スペクトル中には、ヒドロキシルラジカル（·OH）とスーパーオキシドアニオンラジカルを DMPO が捕捉して生成したスピンアダクトである DMPO-OH と DMPO-OOH のスペクトルの他に、未同定の 3 本線と 9 本線を与えるアミノキシルラジカルが生じた。この 2 種類のアミノキシルラジカルについて検討した。

77 K での ESR 測定で高スピン型ノンヘム鉄の生成が明らかになり、Fenton 系では DMPO は鉄（Ⅲ）に配位し DMPO-鉄（Ⅲ）錯体を形成することがわかった。また同一試料の吸収スペクトル測定では、DMPO-鉄（Ⅲ）錯体形成よりも遅い速度で 520 nm に吸収極大を持つ化合物が生成した。この化合物と上で示した未同定 ESR シグナルを与えるアミノキシルラジカルとの関係を調べた。DMPO と鉄（Ⅲ）を混合したところ、520 nm に吸収極大をもつ錯体が得られた。この試料を逆相 HPLC で分離し、^{13}C-NMR、IR、^{1}H-NMR 測定の結果を総合して、この錯体を形成している化合物を 1-hydroxy-5,5-dimethyl-1-pyrrolid-2-one（HDMPN）と同定した。さらに低温での ^{1}H-NMR 測定を行い、系中には HDMPN の互変異性体である 2-hydroxy-5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide（HDMPO）が共存することを明らかにした。詳細な検討の結果、未同定のバックグラウンド ESR シグナルは ·OH との反応によって HDMPN と HDMPO から生成するアミノキシルラジカルに由来すると決定した。また鉄（Ⅲ）存在下では、·OH との反応がなくとも水の求核付加反応で DMPO-OH が生成し、この DMPO—OH に鉄（Ⅲ）が配位することによって 2 位の水素が脱離し、HDMPN ならびに HDMPO が生成することを明らかにした。

以上の一連の反応は 2 位に水素が存在するために起きるので、3 位に立体的な影響を与える 2 つのメチル基を持った 3,3,5,5-tetramethyl-1-pyrroline-N-oxide（M_4PO）ならびに 2 位がメチル基で置換された

2, 5, 5-trimethyl-1-pyrroline-N-oxide（M_3PO）についても同様の解析を行った。その結果、M_3PO については、鉄（Ⅲ）存在下で M_3PO-OH は生成するが、それ以降の反応は進行しないことが明らかになった。また M_4PO については、DMPO と同様の反応が起きるが DMPO に比べて遅い速度で進行することが分かった。

以上の研究結果から、生体試料中のフリーラジカル捕捉に適したニトロン系のトラップ剤として、2位にメチル基を持つかあるいは3位を嵩高い基で置換したものを提案するに至った。

論文審査の結果の要旨

西正敏の博士学位論文について詳細な審査を行った。論文は詳細かつ論理的にまとめられており、高い評価を与える。また以下に示すように、本論文には重要な結果が多く含まれている。(1)生体内フリーラジカルの捕捉・検出・同定に用いられるスピントラップ剤 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide（DMPO）が、酸化によって容易にアミノキシルラジカルに変化する DMPO 誘導体を含んでおり、これが電子スピン共鳴（ESR）法による正確な同定を妨げることを明らかにした。(2)鉄イオンが存在するときに DMPO を用いると強いバックグラウンド ESR シグナルが現われ、これが生体試料への DMPO スピントラッピング法の適用を妨げてきたが、本研究では鉄（Ⅲ）との相互作用によって DMPO が 1-hydroxy-5, 5-dimethyl-1-pyrrolid-2-one（HDMPN）ならびにその互変異性体である 2-hydroxy-5, 5-dimethy-1-pyrroline-N-oxide（HDMPO）に変化し、これらの化合物からバックグラウンドシグナルを与えるアミノキシルラジカルが生成することを明らかにしている。(3) HDMPN ならびに HDMPO の DMPO からの生成の機構を明らかにし、中間体が DMPO のヒドロキシルラジカルアダクト DMPO-OH であることを証明した。(4) DMPO-OH は、鉄（Ⅲ）存在下では水の求核付加反応でも生じることを明らかにしている。(5) このようなバックグラウンドシグナル生成反応が 3, 3, 5, 5-tetramethyl-1-pyrroline-N-oxide では遅く、2, 5, 5-trimethyl-1-pyrroline-N-oxide では生じないことを見出し、改良されたスピントラップ剤としての DMPO 誘導体の構造を提唱している。

以上、本研究では DMPO を用いるスピントラッピング反応に関する基本的な問題点が初めて明らかにされ、詳細かつ論理的に記述されている。学位論文に記載されている内容は、有機合成、反応化学、機器分析化学、物理化学、生化学の総合的知識と方法論の上に成り立っており、高い水準にある。記載内容は5編の国際的学術雑誌と1編の国際会議 proceedings に報告されており、本学の博士号（学術）を授与するに十分値するものと結論する。