

氏名	玖村直紀
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3753号
学位授与の日付	平成20年9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	新規エンドペルオキシ化合物の合成とリン脂質に対する酸化誘導
論文審査委員	教授 馬場直道 教授 中島修平 教授 神崎浩 教授 木村吉伸

学位論文内容の要旨

過酸化脂質やエンドペルオキシ種は、遷移金属などによる分解過程で活性酸素種(ROS)が生じ、それらが核酸、タンパク、多価不飽和脂質を修飾するほか、それらと酸化還元反応を起こし障害を与える。マラリア原虫は抗酸化的解毒機構が脆弱であり、ROSによる酸化ストレスに非常に弱いことが知られている。マラリア原虫は赤血球中でヘモグロビンを代謝しアミノ酸を得るが、その過程で二価鉄であるヘムが生じる。ヘムは細胞膜中の脂質過酸化物を分解し、ROSを産生するため、マラリア原虫はヘムを重合し無害化することでROSによる酸化ストレスに対応している。抗マラリア薬剤であるキニーネはヘムの重合を阻害することで原虫に酸化ストレスを与えており、この化合物を薬剤透過性を亢進するなどの生理活性を有する多価不飽和脂質で修飾したところ、抗マラリア活性は低下したが、マウス乳癌細胞に対する増殖抑制能が向上した。これは脂質で修飾することによりキニーネの細胞内への透過性が向上したため、キニーネの毒性がマウス乳癌細胞において顕著に現れた一方で、キニーネの構造が変化を受けたためにヘムの重合を阻害することができず、原虫に酸化ストレスを与えることができなかったためだと考えられる。したがって、ヘムと直接反応しROSを産生するエンドペルオキシ化合物に着目し、その不飽和脂肪酸結合リン脂質に対する作用を解析することにした。

アルテミシニンなどのエンドペルオキシ化合物はマラリア原虫のヘムと直接反応し、自身のエンドペルオキシ結合の開裂過程でラジカル種を産生する。このラジカル種がタンパク、核酸、細胞膜を構成する脂質に作用することで原虫を死に至らしめていると考えられているが、正確な作用機構は明らかとなっていない。本研究では細胞膜主要構成成分であるリン脂質に着目し、エンドペルオキシ化合物がどのように作用するかをESI-MS、¹H NMRを用いて検討した。アルテミシニン、テトラオキサンを用いて二価鉄存在下での合成リン脂質への影響を試験したところ、アルテミシニンはリン脂質に直接作用しないことが示唆された。一方で、テトラオキサンは二価鉄と反応し、ラジカル反応でリン脂質を酸化分解することが明らかとなった。これはテトラオキサンが自身のエンドペルオキシ結合中の酸素原子を脂質酸化における酸素源として供与していることを強く示唆している。また、テトラオキサンの水溶性を高めることにより二価鉄との接触確立が高まり、脂質酸化反応がより進行するのではないかと考え、テトラオキサンをビス四級アンモニウム塩で修飾した新規水溶性テトラオキサンを4段階で合成した。得られた水溶性テトラオキサンも同様にリン脂質を酸化することが認められたが、水溶性を高めたことによる脂質酸化の促進は認められなかった。一方で、反応溶媒を変更することにより、分解生成物の生成比が変化することが明らかとなった。また、水溶性テトラオキサンの抗マラリア活性を測定したところ、活性が認められなかった。これはテトラオキサンの水溶性を高めすぎたため、細胞膜との親和性が低下し、原虫内への薬剤の導入が成されなかったためであると推測される。現在、水溶性を低減したテトラオキサンを合成し、その生理活性を測定している。

本研究により、アルテミシニンとテトラオキサンにおける脂質酸化機構が異なり、アルテミシニンは膜脂質と直接反応せず、ヘムの重合を妨げることでマラリア原虫に酸化ストレスを与えるという仮説を支持する結果が得られた。一方でテトラオキサンは自身のエンドペルオキシ結合中の酸素原子を脂質酸化における酸素源として提供し、直接脂質を酸化することが明らかとなった。この結果は、エンドペルオキシ化合物による抗マラリア作用機構の解明につながると考えられ、社会的、学術的に大変意義のあるものであると考える。

論文審査結果の要旨

食品は感染症を含む病気や健康と深い関係がある事は周知の通りである。特殊な例ではあるが、脂質過酸化物がマラリア症状を改善するという事実が報告されている。このような背景の基に、玖村氏は抗マラリア剤として使用されているキニーネに不飽和脂肪酸を結合する新規誘導体類を合成した。キニーネの抗マラリア作用メカニズムには酸化ストレスが関与していると言われ、また、DHA や EPA もそのような作用がある事が報告されている。今回玖村氏が合成した誘導体の抗マラリア作用はキニーネと比較して低下したが、培養白血病細胞に対しては有意に高い増殖抑制活性を示した。マラリアの特効薬である植物由来アルテミシニン分子内にはエンドパーオキサイド構造が存在し、この構造をミミックした種々のエンドパーオキサイド類が合成され、その幾つかの抗マラリア活性はアルテミシニンに匹敵する。しかし、その活性メカニズムは依然明らかにされていない。幾つかの説があり、その一つとしてエンドパーオキサイド構造が分解する時にラジカルが発生し、それがイニシエーターとなって膜脂質の酸化を誘導する事によりマラリア寄生虫を抑制するというものである。このような背景の基に玖村氏は、遊離酸素濃度の低い生体内でアルテミシニンや合成エンドパーオキサイドが本当に脂質を酸化すのかという疑問を抱き、それを確かめるために、以下のような *in vitro* モデル実験を行った。エンドパーオキサイドとしては市販のアルテミシニンに加えて水溶性の低いテトラオキサンとそれをビス型アンモニウム塩にして水溶性にした新規テトラオキサン誘導体を合成し、これら3種類の化合物を用いて、リノール酸を結合するホスファチジルコリンの酸化実験を行った。脂質酸化生成物の検出を ESI MS で行った。その結果、非常に興味ある事実が明らかになった。アルテミシニンには二価鉄の存在下にもかかわらず予想に反してそのリン脂質を全く酸化しなかった。一方、テトラオキサン誘導体の場合は何れも同じ条件下で有意にリン脂質を酸化した。酸素の無い条件で行っているのに、この結果はテトラオキサン分子中の酸素原子が脂質の酸化を行っていると考えざるを得ない。さらにこれらの酸化が抗酸化剤によって完全に抑制された事実はラジカル反応である事を示している。以上の結果は全ては新事実であり、アルテミシニンを含むエンドパーオキサイド類の抗マラリア作用メカニズムの解明に重要な知見を与えるものと期待できる。以上のような研究内容から判断して、玖村氏の研究成果は博士学位論文に十分値するものと判断した。