

Title	蛋白質の酸化的修飾に関する基礎的研究 : トリプトファンのオゾン酸化反応
Author(s)	升田, 喜士
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32170">https://hdl.handle.net/11094/32170</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	井 田 喜 士
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 4 5 4 3 号
学位授与の日付	昭和 54 年 3 月 24 日
学位授与の要件	理学研究科 有機化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	蛋白質の酸化的修飾に関する基礎的研究 ——トリプトファンのオゾン酸化反応——
論文審査委員	(主査) 教授 成田 耕造 教授 芝 哲夫 教授 池中 徳治 助教授 崎山 文夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

著者は、トリプトファンのオゾン酸化反応に着目し、その反応に定量性と選択性および単一誘導体への変換能を付与することにより、蛋白質の酸化的化学修飾反応の一つとして、意義ある方法として確立させることを究極の目的として本研究を行なった。本論文では、低分子トリプトファン化合物を用いてインドール環とオゾンとの反応を詳細に検討し、その反応機構を明らかにするとともに、その機構に立脚して、前述の反応の定量性および単一生成物への誘導について検討してこれらの目的を達成できたこと、および、この反応の蛋白質への応用について述べる。

低分子トリプトファン化合物をメタノール中低温でオゾン酸化し、生じた安定な中間体をジメチルスルフィドで還元することにより、対応するN'-ホルミルキヌレニンまたはキヌレニンに変換することができた(第I部第一章)。この際、中性のトリプトファン化合物はN'-ホルミルキヌレニンを、酸性のものはキヌレニンを主として生成するが、いずれの場合も酸化反応は定量的であった。また、トリプトファン化合物のオゾン化中間体は、反応条件の酸性、中性に拘わらず、同じ様式のインドール環の開裂により生成するが、酸性条件における還元または強酸による分解により、キヌレニンを生成する(第二章)。

トリプトファン化合物のオゾン化中間体として二種類のメトキシヒドロパーオキシドが想定されるが、この中間体の低温における $^{13}\text{C}$ および $^1\text{H}$ -NMRスペクトルの解析により、インドール環のオゾン化中間体は唯一種類であること、ベンゼン環に共役するカルボニル基をもつことおよびインドール環C-2位炭素原子が四中心型のメトキシヒドロパーオキシド構造をしていることが明らかとなった。この構造はキヌレニン型の構造で、オゾン化中間体がキヌレニンと類似の発色団をもち、紫外吸収スペ

クトルの類似性が理解できる。(第三章)。

.低分子トリプトファン化合物について得られた以上の知見にもとづき、卵白リゾチーム(ニワトリ)の6残基のトリプトファンおよび62位残基の選択的酸化反応につき考察した。その結果、この蛋白質ではギ酸により完全変性した条件では、トリプトファン残基の定量的酸化が可能であり(第四章)、生の蛋白質に対しては62位トリプトファン残基の反応性が高いため、この残基の選択的酸化が行われることが判明した。また、酸化生成物としてのキヌレニンの意義をその構造から考察した。

### 論文の審査結果の要旨

タンパク質中のトリプトファン残基(Trp)の機能を解析する手段の一つとして、Trp残基を化学修飾する方法がある。修飾反応のうち、オゾンによってN'-ホルミルキヌレニン(NFK)残基に酸化する反応は、他の化学修飾法とは異なって大きな基を導入するのではなくインドール核の開環反応であるため、タンパク質中のTrp残基周辺のマイクロ環境を大きく破壊する恐れは極めて低い反応である。升田君はこのオゾン酸化法をタンパク質に適用するための基礎を確立する目的で多くのTrp誘導体を合成し、定量的に酸化するための条件を確立し、また反応中間体の構造を解明した。さらに確立した条件を参考にしてタンパク質中のTrp残基の定量的酸化条件を確立した。

すなわち、アシル化したTrpをメタノール中-78℃でオゾン酸化し、生ずる中間体をジメチルスルフィドで還元するとキヌレニン(Kyr)誘導体が主成分として得られるのが、アシルTrpの遊離カルボキシル基をエステル、アミドあるいはアルカリ塩にして上記条件下で酸化すると、定量的にNFK誘導体が得られることを明らかにした。さらに中間体の還元時に、有機酸のようなプロトン供与体が存在すれば定量的にKyn誘導体へ、不在下に還元すれば定量的にNFK誘導体に導き得ることを明らかにし、反応中間体のUVスペクトル、低塩における<sup>13</sup>Cおよび<sup>1</sup>H NMR測定結果から、この中間体はN'-メトキシヒドロパーオキシメチルキヌレニン誘導体であることを明らかにして、TrpからNFKあるいはKynへのオゾンによる酸化反応の機作を解明した。

上記知識を基礎にタンパク質中のTrp残基を定量的に酸化することを試み、Trp 6残基含有するニワトリ卵白リゾチームを採りあげた。まず還元カルボキシメチル化したリゾチームをギ酸・メタノール(1:4, v/v)に溶解して-78℃でオゾン酸化し、中間体をジメチルスルフィドで還元して、6個のTrp残基を完全に酸化し、NFKおよびKyn誘導体に導き得ることを明らかにした。しかし生のリゾチームでは完全には酸化できず、完全酸化するためにはタンパク質の立体構造を完全に破壊する必要のあることを明らかにした。

以上の升田君の研究は、タンパク質中のTrp残基の機能を解析するためのオゾンによる酸化反応の基礎を確立したもので、今後の研究発展に寄与するところ大である。よって同君の論文は理学博士の学位論文として充分価値あるものと判定する。