

氏名	シマダ ヤスヒロ 島田 康弘
本籍（国籍）	北海道
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 671 号
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学
学位論文題目	有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 と生体成分との相互作用に関する研究（Study of the interaction between organogermanium compound, Ge-132 and biogenic substance）
学位審査委員	主査 帯広畜産大学 准教授 得字 圭彦 副査 木下 幹朗(帯広 教授),前多 隼人(弘前 助教),木村 賢一(岩手 教授),塩野 義人(山形 教授)

論文の内容の要旨

Ge-132 (poly-*trans*-[(2-carboxyethyl)germassequioxane) は、食品や化粧品素材として安全性が確認されている水溶性有機ゲルマニウム化合物であり、これまでに様々な生理作用を表すことが報告されている。Ge-132 は水に溶解して 3-(trihydroxygermyl)propanoic acid (THGP) を生成するため、Ge-132 を摂取すると生体内では THGP として存在すると考えられる。Ge-132 の生理作用は THGP が生体成分と相互作用することで生じていると考えられるが、THGP がどのような構造の化合物と、どの濃度域で相互作用可能かは詳しく調べられていない。生体内における THGP の作用点を解明する事は様々な生理作用メカニズムの解明や、効果的な摂取法の提案などに役立つ。本研究では生体内で重要な役割を持つ分子と THGP との相互作用について検討した。

1. THGP は水溶液中で糖類のジオール構造と相互作用することが知られているが、立体構造や濃度の違いによる相互作用への影響は詳しく調べられていない。そこで、THGP と糖類との反応特性を明らかにするため、1,4-アンヒドロエリスリトール、グルコース、およびフルクトースとの相互作用を ^1H 、 ^{13}C NMR により評価した。その結果、THGP は糖構造のシスジオール部位を介して錯体を形成すること、ピラノース型より二面角が狭いシスジオール構造を有するフラノース型との錯体形成が優位であることを明らかにした。

2. ^1H NMR を用いた THGP-糖類間相互作用の測定では、THGP 構造中のメチレン基同士のカップリングが原因で定量化が困難であった。そこで、THGP ジメチル誘導体を合成してカップリングを解消し分析したところ、様々な糖類との相互作用が定量可能になった。THGP と糖の錯体形成率を算出し糖構造との相関を考察した結果、還元末端を含むピラノース型のシスジオール構造と錯体形成が可能であること、アルドースよりケトースの方が高い錯体形成率を示すこと、シスジオール部位が構造中に増えると錯体形成率が向上することが示唆された。

3. 多糖類との相互作用を分析する場合、 ^1H や ^{13}C NMR ではシグナルが複雑になり解析が困難になる。そこで、THGP フッ素誘導体を合成し、 ^{19}F NMR による評価を試みた。その結果、フッ素誘導体の ^{19}F NMR はシンプルな1本のピークを示し、THGPと同様に糖構造中のシスジオール部位を介して錯体を形成することを確認した。さらに、多糖類であるムチン2との相互作用を示唆するシグナルを観測した。

4. 核酸成分(ヌクレオシド、ヌクレオチド)やカテコールアミンは、糖類と同様に生体にとって重要なジオール化合物である。THGPとこれらの化合物との錯体形成を ^1H NMRを用いて分析・評価した。その結果、核酸成分は構造中の塩基およびリン酸基ではなく、シスジオール部位のみを介してTHGPと錯体を形成することが明らかになった。また、構造中のリン酸基が増えるにつれ、錯体形成率が減少したが(Ado > AMP > ADP > ATP)、塩基の違いでは大きな差は見られなかった(Ado \approx m5U \approx Cyt \approx Uri)。カテコールアミンの場合もジオール部位を介して錯体を形成し、錯体形成能は核酸成分より高いことが示された。これはTHGPの錯体形成はジオールの二面角に依存しており、カテコールアミンの有するジオールの二面角が核酸成分に比べ極めて小さいためであると考えられる。

5. THGPと生体分子が錯体形成することにより、生体内の反応系に影響しうる事を実証するため、アデノシン脱アミノ化酵素ADAの酵素反応にTHGPを添加し、その影響を評価した。THGPと錯体形成するアデノシンを反応基質とした場合、THGP濃度依存的に酵素反応が抑制されたが、錯体形成しないデオキシアデノシンを基質とした場合、酵素反応に対して影響を与えなかった。このことから、THGPが基質のアデノシンと錯体を作り酵素反応を抑制することが示された。

6. NMRでは様々な物質が混在している生体成分(例えば血漿や細胞質)からTHGPと相互作用する物質を同定する事は困難である。そこで、THGPを固定化したアフィニティーカラムを開発し、相互作用の検出や物質分取のための条件検討を行った。放射線グラフト重合技術を利用し、PEビーズにTHGPを固定化したアフィニティーカラムの性能試験では、これまでの実験結果と同様、核酸成分に比べカテコールアミンの方が高い親和性を示した。一方、相互作用物質の分離には保持の強い移動相が必要であったため、 ^1H NMRによる検討を行い、水溶液中のメタノール濃度が上がると錯体形成能が向上することを明らかにした。この結果をもとに移動相のメタノール濃度を変えて測定を試みたが保持時間に変化は見られず、今後さらなる検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

本論文では、有機ゲルマニウム化合物Ge-132の生理作用のメカニズム解明のために、Ge-132が溶解したときに生成するTHGPおよびこの誘導体を用いて、各種生体成分との相互作用について研究した。

1. THGPは水溶液中で糖類のジオール構造と相互作用することが知られている。THGPと糖類との反応特性解明のため、単純な構造を有する1,4-アンヒドロエリスリトールとTHGP間の相互作用についてNMRにより確認した。また、グルコース、およびフルクトースとの親和性についても比較した。その結果、THGPは糖構造のシスジオール部位を介して錯体を形成す

ること、ピラノース型よりシスジオールの二面角（結合をもつ4つの連続する原子が作る二つの面の角度）が狭いフラノース型との錯体形成が優位であることを明らかにした。

2. THGP 構造中のメチレン基同士のカップリングが原因で定量は困難であったため、THGP ジメチル誘導体を合成して使用したところ、相互作用の定量的評価が可能になった。THGP と糖の錯体形成率を測定した結果、還元末端を含むピラノースのシスジオール構造と錯体形成すること、アルドースよりケトースの方が錯体形成しやすいことが示唆された。

3. 高分子と THGP との相互作用を評価するために、生体分子には存在しないフッ素誘導体を合成した。NMR による相互作用の評価を試みた結果、糖タンパク質 Mucin2 との錯体形成を検出できた。

4. シスジオール構造を持つ核酸成分やカテコールアミン類と THGP との錯体形成を分析・評価した。核酸は、構造中のリン酸基が増えるにつれ THGP との錯体形成が減少し、塩基の違いでは大きな差は見られなかった。カテコールアミンの錯体形成能は核酸成分に比べて高かった。これはカテコールアミンのシスジオールの二面角が核酸に比べ極めて狭いためであると考えられる。

5. アデノシン脱アミノ化酵素の反応に THGP を添加しその影響を評価した。THGP と錯体形成するアデノシンを基質とした場合、反応が抑制されたが、錯体形成しないデオキシアデノシンを基質とした場合、影響を与えなかった。これは THGP-アデノシンの錯体形成により酵素反応が抑制されたためと考えられる。

6. 血漿や細胞質などの生体試料成分と THGP と相互作用する物質の同定をめざし、THGP を固定化したアフィニティーカラムを開発し、分析条件の検討を行った。核酸成分およびカテコールアミンとの錯体形成は確認されたが、分離・溶出には移動相の検討が必要であることがわかった。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Shimada Y, Sato K, Tokuji Y, Nakamura T. (2015)

Nuclear magnetic resonance studies of the interactions between the organic germanium compound Ge-132 and saccharides. Carbohydrate Research 407:10-15.