

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

2016

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(帯広畜産大学)

島田 康弘

目次

第1章	研究の背景と Ge-132 の特徴	1
第2章	NMR を用いた THGP-糖類間相互作用の評価検討	9
2-1.	実験方法	9
2-1-1.	試薬	9
2-1-2.	NMR 分析	10
2-2.	結果	10
2-2-1.	THGP と AHET との相互作用	10
2-2-2.	THGP と糖異性体との相互作用	12
2-3.	考察	13
第3章	THGP ジメチル誘導体と糖類との相互作用の定量的評価	24
3-1.	実験方法	25
3-1-1.	試薬	25
3-1-2.	DM-THGP の合成	25
3-1-3.	NMR 分析	26
3-1-4.	錯体形成率の算出	26
3-1-5.	糖のジオール構造の二面角の計算	27
3-2.	結果	27
3-3.	考察	30
第4章	THGP フッ素誘導体を用いた糖類との相互作用の評価法	40
4-1.	実験方法	41
4-1-1.	試薬	41
4-1-2.	THGPF の合成	42
4-1-3.	NMR 分析	42

4-2.	結果	43
4-3.	考察	44
第5章	THGPと核酸成分との相互作用の定量的評価	51
5-1.	実験方法	51
5-1-1.	試薬	51
5-1-2.	NMR分析	52
5-2.	結果	53
5-3.	考察	56
第6章	アデノシンデアミナーゼの酵素反応に対するTHGPの影響	65
6-1.	実験方法	66
6-1-1.	試薬	66
6-1-2.	酵素活性の測定	66
6-2.	結果	67
6-3.	考察	68
第7章	THGPとカテコールアミンとの相互作用の定量的評価	73
7-1.	実験方法	74
7-1-1.	試薬	74
7-1-2.	NMR分析	74
7-2.	結果	75
7-3.	考察	76
第8章	THGPアフィニティーカラムの開発および性能評価	82
8-1.	実験方法	83
8-1-1.	試薬	83
8-1-2.	アフィニティーカラム作製	83
8-1-2-1.	THGP固定化試薬の合成	83
8-1-2-2.	THGPビーズの作製	84

8-1-2-3. カラム性能試験.....	85
8-1-2-4. NMR を用いた移動相の検討	86
8-2. 結果.....	86
8-3. 考察.....	88
第9章 本研究の総括および今後の展望.....	96
9-1. 本研究の要点.....	96
9-2. 総合考察.....	99
9-3. 今後の展望.....	103
引用文献	105
謝辞	117

第1章 研究の背景と Ge-132 の特徴

ゲルマニウム（原子番号 32）は光沢のある銀灰色の半金属であり、亜鉛鉱石などの不純物としてわずかに産出される希少元素である [1]。周期律表において炭素やケイ素と同じ第 14 族のグループに属する元素であり、半導体の性質を有する。この性質を利用し、過去にはトランジスターやダイオードが発明され、ゲルマニウムに関わる研究は半導体を主とした研究が中心となった。その後、半導体需要はシリコンに移り変わり、現在のゲルマニウムの主要な工業的用途としては、PET 樹脂の重合開始触媒、光ファイバードープ材、太陽電池パネルや赤外線光学レンズ材料などに利用されている [2]。

ゲルマニウム化合物は大きく分けて、無機ゲルマニウムと有機ゲルマニウムに分けられる。無機ゲルマニウム（ゲルマニウム、二酸化ゲルマニウム、四塩化ゲルマニウムなど）は炭素鎖との結合を持たないゲルマニウム化合物のことであり、先述した工業的用途に用いられている。加えて、二酸化ゲルマニウムは少量の摂取であれば生理活性を示し、生体に対して有用に機能することが知られている。しかし、この物質の多量摂取は腎臓に蓄積され、腎不全さらには死亡事故に繋がることが明らかとなっている [3, 4]。

無機ゲルマニウムに対し、有機ゲルマニウムとは、ゲルマニウム原子と炭素原子が共有結合している化合物一般のことを指す。化学的には、有機ゲルマニウム化合物は何百何千と考えられ、実際に多くの化合物が合成されてきた。化合物の構造が異なると、物理化学的性質や毒性、生理活性も異なる。

Poly-trans-[(2-carboxyethyl)germasiquioxane] (Ge-132) は、ゲルマニウム原子と炭素鎖が共有結合した水溶性の有機ゲルマニウム化合物である。1967 年に浅井、及川らによって合成され [5]、Tsutsui らによって単結晶 X 線構造解析による構造解析が行われ

た [6]。開発時の名称である Ge-132 として一般的に知られているほか、化粧品素材としてレパゲルマニウムと呼ばれる事もある。本論文では、以後 Ge-132 の名称に統一する。

Ge-132 の開発者である浅井は、石炭研究の中で石炭中にゲルマニウムが存在する事を見出した [7,8]。また、特に地中より吸い上げた養分を運ぶ髄管を含む部分に多く含まれていることに注目し、植物が生育の必要上から組織中にゲルマニウムを有機体として取り込んだ結果ではないかと考えた。その後の調査により、漢方生薬や薬草類に比較的多くのゲルマニウムが含まれていることが確認され、ゲルマニウムがこれら植物の薬理効果に関係すると推察した。これらの考えのもと、水溶性を持った有機ゲルマニウム化合物の合成が試みられ、水溶性有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 の合成に至った。

当初、Ge-132 はがんへの治療目的に開発が行われた [9-15]。医薬品として認可を得るには至らなかったが、様々な安全性試験の結果、非常に高い安全性を有することが確認されている [3,4,16-27]。現在、食品としての安全性が確認されている有機ゲルマニウム化合物は Ge-132 のみであり [28]、健康食品素材や化粧品の原料として利用されている。

マウスやラット、ヒトに対し Ge-132 の体内分布および動態について行われた試験では、特定の器官や組織への蓄積性は認められなかった [29]。経口投与による人体での体内動態を調べた結果、約 20%が吸収され、2 時間程度で最大血中濃度に達することが確認されている。投与後 24 時間では 15~18%が尿中に排出され、残りは便中に排泄され则认为られている。また、吸収・排出された Ge-132 は代謝されることなく、元の構造のままであることも確認されている。さらに、様々な医療機関および研究機関による臨床・検討の結果、種々の疾病に対する有効性を示す結果が数多く報告されている [30-43]。Ge-132 の生理作用は多岐にわたっており、インターフェロン- γ

(INF- γ) 誘起活性 [44]、免疫調整作用 [45]およびそれに伴う抗腫瘍性 [46]、抗ウイルス作用 [47]、抗酸化作用 [37]、抗炎症作用 [41]、血圧降下作用 [48, 49]、骨代謝改善作用 [33, 34]、鎮痛作用 [39, 40, 50]などが報告されている。

代表的な Ge-132 の合成法を Fig. 1-1 に示す。まず、金属ゲルマニウムと塩化水素を高温で反応させて、トリクロロゲルマン (HGeCl_3) を得る。次にトリクロロゲルマンをアクリル酸に付加反応させることで、トリクロロゲルミルプロパン酸 ($\text{Cl}_3\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) が得られる。さらに、トリクロロゲルミルプロパン酸を加水分解し、脱水縮合を経る事で Ge-132 が得られる [51]。

Ge-132 の構造は X 線結晶解析によって決定された [6] (Fig. 1-2)。特徴的な点として、ゲルマニウム原子と酸素原子からなる 12 員環の平面構造を母核とすること、カルボキシエチル基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) が 12 員環が広がる平面の上下に交互で (トランス配座) 位置すること、前述の 12 員環が網目状に平面に広がり、この平面がカルボキシエチル基の作る水素結合で三次元網目構造をとることなどが挙げられる。化学的性質として、水に対し、室温において約 1% の溶解度を持ち、結晶状態では高分子 (ポリマー) だが、水に溶解させると、加水分解を受けることで単量体 (モノマー) である 3-(trihydroxygermyl)propanoic acid (THGP) を生成する (Fig. 1-3)。

THGP は、2 つの隣り合った水酸基を有するジオール構造と錯体を形成する事が知られている [52]。生体内には、ジオール構造を有する化合物が数多く存在する。例えば、糖鎖や糖タンパク質、RNA の基本構造であるヌクレオチドやヌクレオシド、ホルモンや神経伝達物質の基本骨格であるカテコールアミンなど、生体にとって重要な役割を持つ分子が存在する (Fig. 1-4)。Ge-132 摂取による多岐にわたる生理作用は、Ge-132 の水解物である THGP が生体成分と相互作用する事で生じていると考えられるが、THGP がどのような化学構造の化合物と、どの程度の濃度域で相互作用するのは詳しく調べられていない。

本研究では Ge-132 の多彩な生理作用の根拠となる化学的な機構を解明するために、THGP と生体成分（糖類、核酸成分、カテコールアミンなど）との親和性について検討した。生体内における THGP の作用点を解明する事により、様々な生理作用メカニズムの解明や、より効果的な摂取方法や摂取形態の提案に役立つと考えられる。

第 1 章では、本研究の背景や Ge-132 の理化学的特徴と生理作用について解説し、研究の目的を示した。第 2 章では、 ^1H 、 ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) を用いてシンプルな構造の糖類と THGP との相互作用を評価し、THGP が糖類のシスジオール構造と相互作用することを明らかにした。第 3 章では、THGP 誘導体を用いて ^1H NMR による糖類（単糖～オリゴ糖）との相互作用を定量化し、糖の構造と比較することで、糖との錯体形成における THGP の反応特性を明らかにした。第 4 章では、THGP フッ素誘導体を用いて ^{19}F NMR による相互作用の評価法を検討し、 ^1H NMR では解析困難であった多糖類との相互作用の評価法として有効であることを示した。第 5 章では、 ^1H NMR を用いて THGP とヌクレオシドおよびヌクレオチドとの相互作用を定量化し、構造との相関を評価することで、塩基やリン酸基の違いによる相互作用への影響を明らかにした。第 6 章では、THGP との錯体形成能を有するアデノシンと、アデノシンデアミナーゼとの酵素反応系における THGP の影響を評価し、THGP 濃度依存的な反応抑制効果を明らかにした。第 7 章では、 ^1H NMR を用いて THGP とカテコールアミンとの相互作用を定量化し、第 3 章、第 5 章の結果と比較することで、糖や核酸成分より高い錯体形成能を有することを明らかにした。第 8 章では THGP を固定化したアフィニティーカラムの開発を検討し、放射線グラフト重合技術を利用して作製した PE ビーズへの固定化方法を見出し、アフィニティーカラムの性能について評価した。第 9 章では、本研究の成果を総括し、今後の展望について述べた。

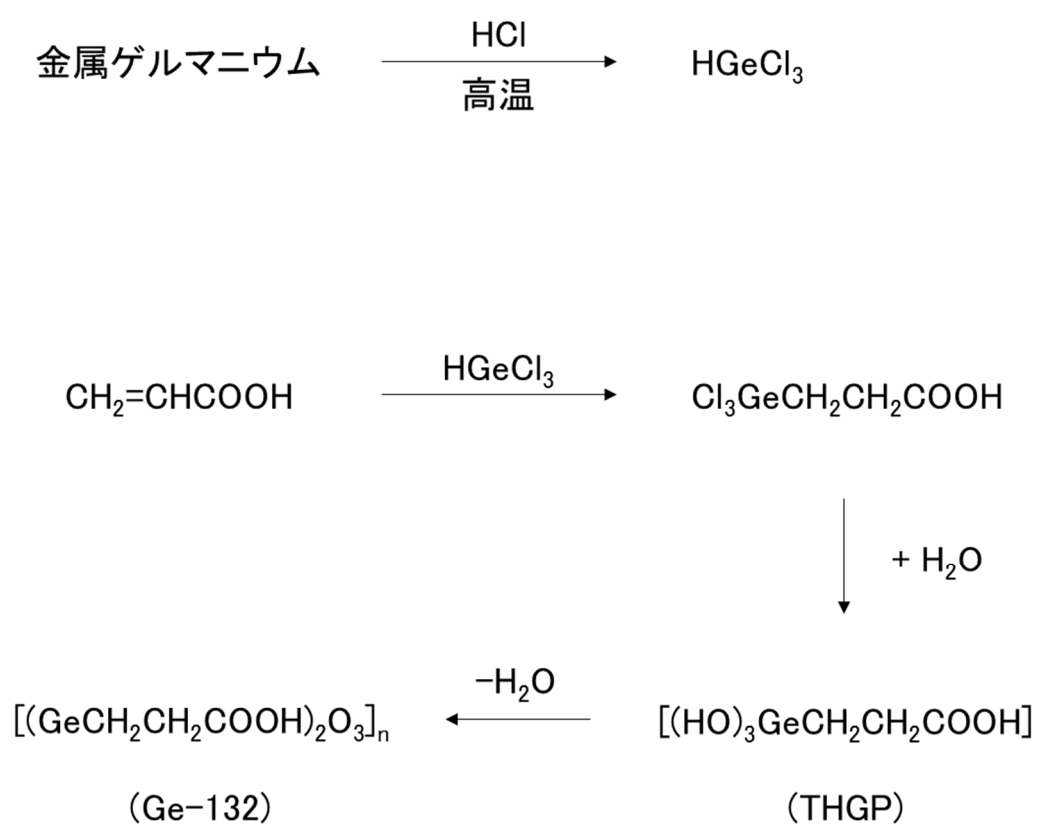
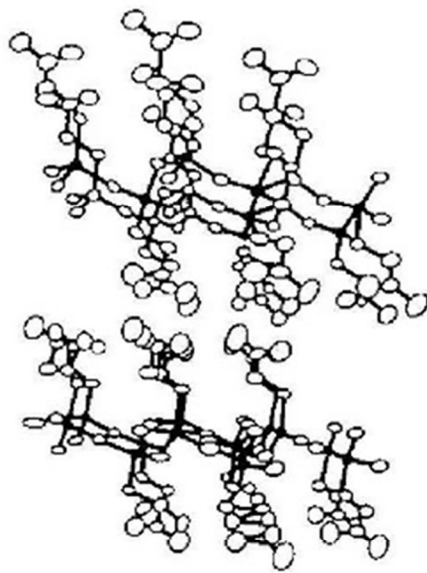


Fig. 1-1 代表的な Ge-132 の合成法

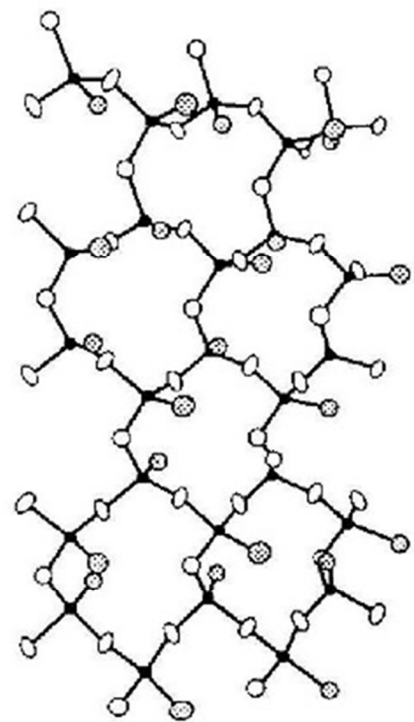
[A]



A : Ge-132の立体構造

B : Ge-132の平面構造

[B]



(● : Ge, ● : C, ○ : O)

Fig. 1-2 Ge-132 の結晶構造

石田名香雄、木村郁郎監修 『有機ゲルマニウムの科学』 より引用 [51]

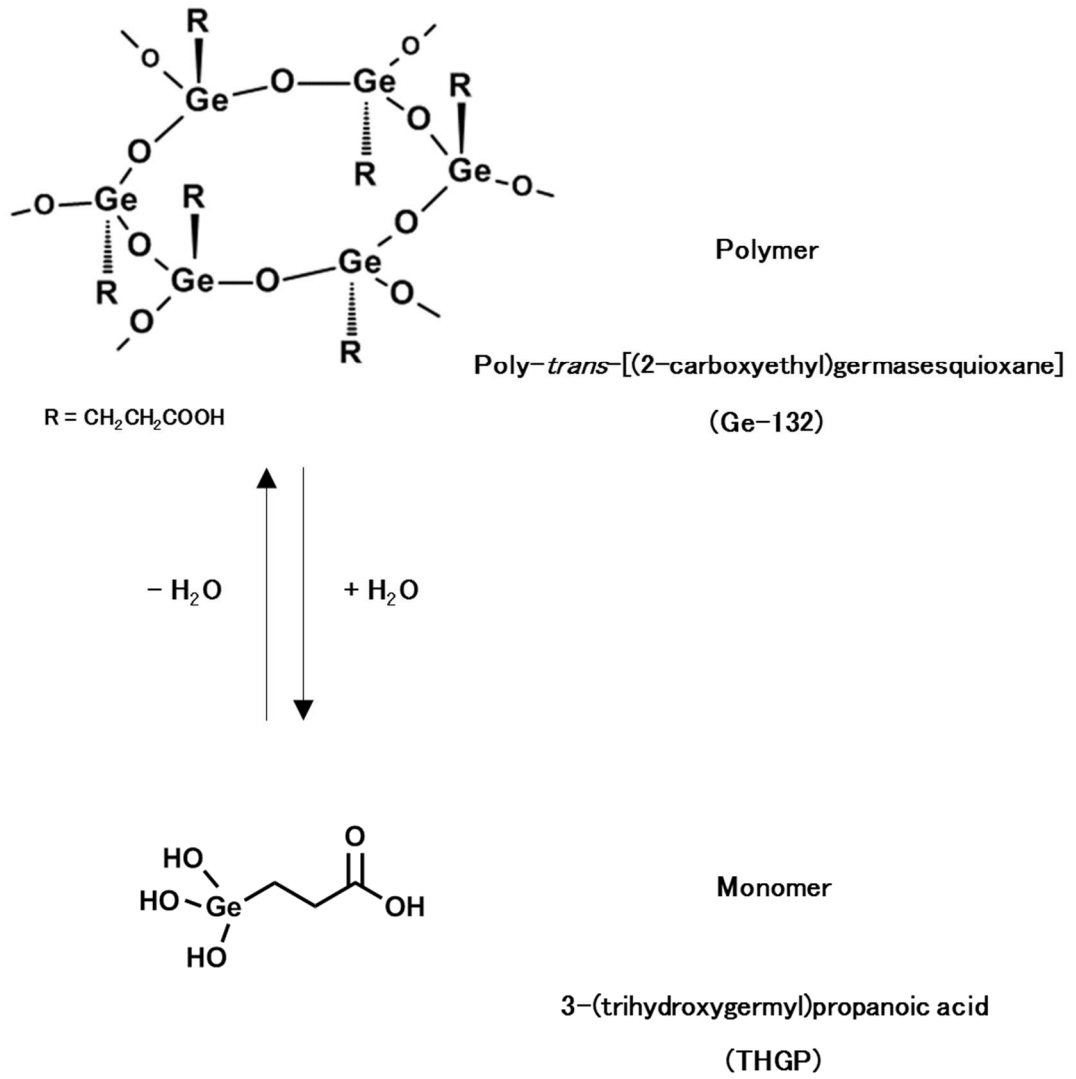


Fig. 1-3 Ge-132 のポリマー構造と水溶液におけるモノマー構造 (THGP)

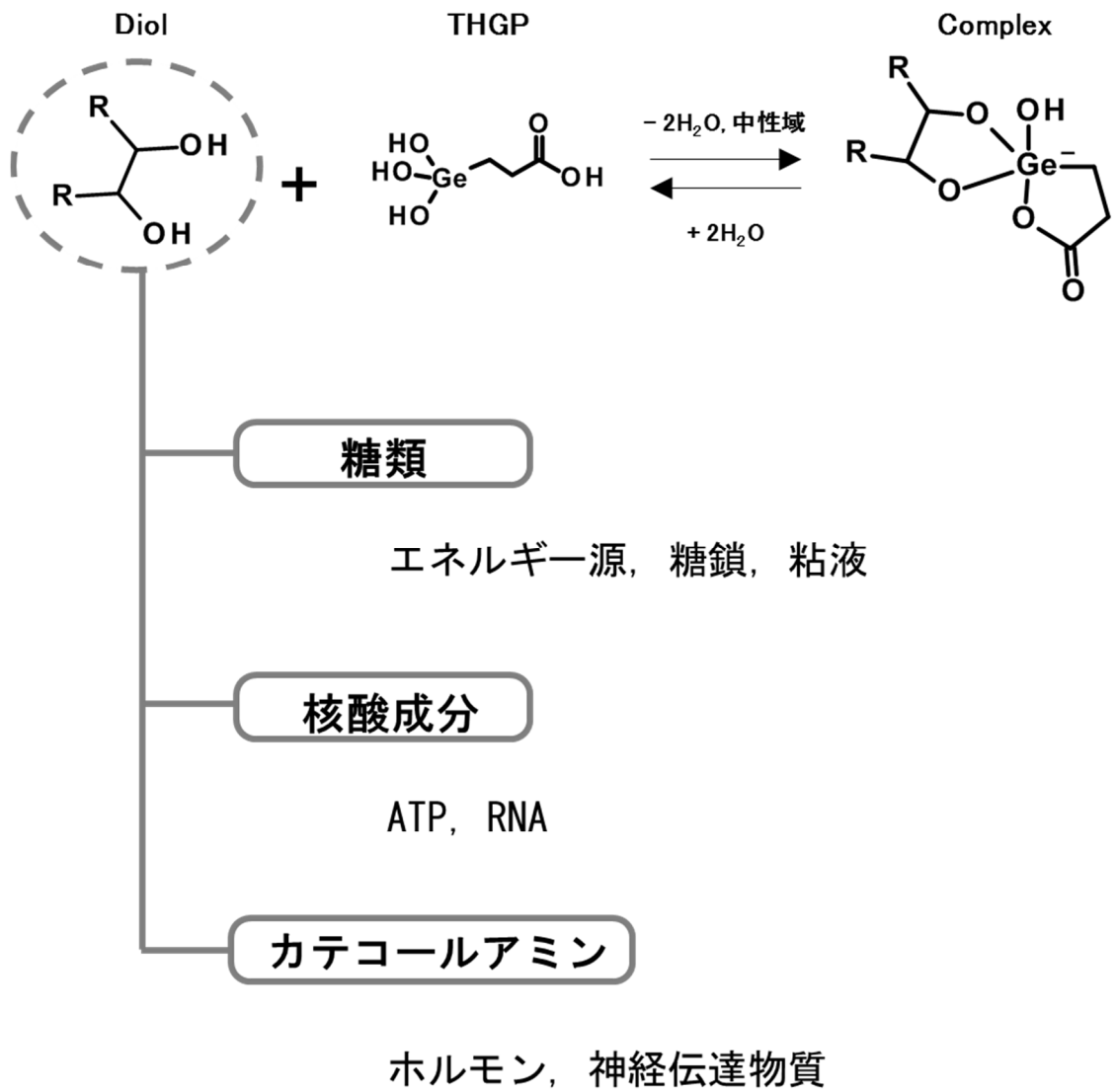


Fig. 1-4 ジオール構造との錯体形成反応および
生体内の主なジオール化合物

第2章 NMR を用いた THGP-糖類間相互作用の評価検討

Ge-132 は水に溶解することで加水分解され、THGP モノマーを生成する。Ge-132 を摂取および吸収した際、生体内では加水分解を受け、THGP として存在するものと考えられる。THGP は水溶液中でジオール構造と相互作用することが知られている。具体的には、生理的条件に近い水溶液中において、THGP はグルコフラノースの 1, 2-ジオールと錯体を形成することが NMR 解析により明らかとなっている [52]。ところで、Ge-132 の摂取により、例えば、糖尿病合併症の抑制 [52] や抗白内障 [53] などの生理作用が報告されている。これら疾病の要因の一つとして、糖のグリケーション（メイラード反応）が関連していることが知られている。中村らはメイラード反応系における Ge-132 の添加は、AGEs (advanced glycation endproducts: 糖化最終産物) の形成を抑制すると報告しており [52]、その反応機構は、Ge-132 と糖類との錯体形成によるものである可能性を示している。

本章では、Ge-132 の水解物である THGP と糖類との水溶液中でのより詳しい反応特性を明らかにするため、 ^1H 、 ^{13}C NMR を用いて検討した。また、グルコースおよびフルクトースの糖異性体を用い、THGP-糖錯体の最も安定な構造について検討を行った。

2-1. 実験方法

2-1-1. 試薬

1,4-アンヒドロエリスリトール (AHET) はシグマアルドリッチから購入した。D-グルコースは和光純薬工業から購入した。3-ヒドロキシテトラヒドロフラン (dAHET)、D-フルクトースは関東化学から購入した。重水および重水酸化ナトリウム溶液はメル

クから購入した。これら全ての試薬は特級または NMR 分析用を用いた。Ge-132 は浅井ゲルマニウム研究所で製造されたものを使用した (Lot. 006316A)。実験には、Ge-132 を一度精製水に溶解し、水酸化ナトリウムで中和後、減圧濃縮および加熱乾燥して得た THGP (Na 塩) を使用した。

2-1-2. NMR 分析

各サンプルの ^1H 、 ^{13}C NMR は Gemini 300 (バリアン) を用いて測定した。サンプルの pH は HM-25R (東亜ディーケーケー) を用いて調整した。サンプルの調製条件は、THGP および糖類の混合モル比 1 : 1、各溶質終濃度 0.5 M、pH 7.0 ~ 7.5 とした。溶媒は全て重水を用いた。化学シフトの標準として、重水溶媒中に残存する軽水 (HOD : 4.80 ppm) を内部標準とした。測定温度は 25°C とした。全てのサンプルについて、 ^1H NMR (300 MHz) および ^{13}C NMR (75 MHz) を測定した。 ^1H NMR および ^{13}C NMR の積算回数は、それぞれ 32 回および 2560 回とした。構造の同定のために、二次元 NMR 測定 (H-H COSY、C-H COSY) および Distortionless Enhanced by Polarization Transfer (DEPT) 測定を行った。

2-2. 結果

2-2-1. THGP と AHET との相互作用

THGP と各糖類との相互作用は NMR 分光法を用いて評価した。まず最初に、シンプルな構造の糖である AHET と THGP との混合溶液について実験を行った。THGP 0.5 M 溶液、AHET 0.5 M 溶液、および THGP-AHET 0.5 M 混合溶液の ^1H NMR スペクトルを Fig. 2-1 に示す。THGP の ^1H NMR スペクトルにおいて、1.5 ppm および 2.5 ppm に

それぞれトリプレットのシグナルが観測された。これらは THGP の隣接する 2 つのメチレン基に由来するシグナルである。 ^1H NMR の化学シフト値は H の電子密度の影響を受ける。カルボニル基は電子求引性であるため、低磁場側の 2.5 ppm に観測されたシグナルはカルボニル基に隣接するメチレン基由来のシグナルである。したがって、1.5 ppm に観測されたシグナルはゲルマニウムに隣接するメチレン基由来のシグナルである。AHET は 3.7、3.9、および 4.3 ppm の 3 箇所にシグナルが観測された。4.3 ppm のシグナルは C2 位のメチン基由来、3.7 ppm および 3.9 ppm のシグナルは C1 位のメチレン基由来のシグナルである。THGP-AHET 混合溶液の ^1H NMR スペクトルでは、AHET 単独で測定した際には見られなかった新たなシグナルが 4.5 ppm に出現した。また、3.9 ppm および 4.3 ppm のシグナルにおいては、ブロードニングが確認された。さらに、3.7 ppm のシグナルはブロードニング、および低磁場側へのシフトが確認された。これらのスペクトルに変化が見られたのは、溶液中において THGP と AHET との間で錯体が形成された結果、電子密度が変化したためである。

THGP 0.5 M 溶液、AHET 0.5 M 溶液、および THGP-AHET 0.5 M 混合溶液の ^{13}C NMR スペクトルを Fig. 2-2 に示す。THGP の ^{13}C NMR スペクトルでは 23、37 および 189 ppm にシグナルが観測された。まず、DEPT 測定により 189 ppm のシグナルはカルボキシル基由来であることが認められた。 ^1H NMR 同様に、電子求引基であるカルボニル基に隣接するメチレン基由来のシグナルは他方のメチレン基より低磁場に現れる。よって、低磁場である 37 ppm はカルボニル基に隣接するメチレン基由来、23 ppm はゲルマニウムに隣接するメチレン基由来のシグナルであると帰属された。AHET の ^{13}C NMR スペクトルは、78 ppm 付近に 2 つのシグナルが観測された。AHET は 4 つの炭素を持つが、対称構造のため 2 つのシグナルのみが観測された。二次元 NMR 測定の結果、2 つのシグナルのうち、低磁場側が C1、高磁場側が C2 のシグナルであると帰属された。THGP-AHET 混合溶液の ^{13}C NMR スペクトルでは、80 ppm および 82 ppm

に新たなシグナルが出現し、AHET 由来のシグナル強度は減少した。また、THGP 由来の 37 ppm シグナルよりやや高磁場側にも、新規のシグナルが出現した。これらのシグナルの変化は、 ^1H NMR の時と同様、THGP と AHET 間で錯体が形成されたことで生じたものである。

一方、ジオール構造を持たない、AHET のデオキシ体である dAHET との混合溶液の ^1H NMR では、錯体に由来する新規のシグナルは観測されなかった (Fig. 2-3)。したがって、THGP は dAHET と相互作用しないことが示された。

2-2-2. THGP と糖異性体との相互作用

植物や動物が生命活動のエネルギー源として利用しているグルコースは、最もよく知られる単糖 (アルドース) である。一方、甘味料として広く食品に利用されている糖であるフルクトースは、グルコースのケトース型異性体である。アルドースとは鎖状構造内部にアルデヒド基を、ケトースとはケト基を含む単糖類の総称である。分子式は同じでありながら構造の異なる糖異性体に対し、THGP の反応性に違いが見られるか確認するため、本実験ではこれら生理学的に重要な 2 種類の糖異性体と THGP との相互作用について比較した。

グルコース 0.5 M 溶液、THGP 0.5 M 溶液、および THGP-グルコース 0.5 M 混合溶液の ^1H NMR スペクトルを Fig. 2-4 に示す。混合溶液の ^1H NMR スペクトルでは、グルコース由来シグナルのブロードニングが確認された。また、4.1、4.2、および 5.8 ppm に新規のシグナルが出現した。4.6、5.2 および 5.8 ppm のシグナルは、全てグルコースの C1 プロトン由来のシグナルであり、積分比はそれぞれ 56%、29%、および 15%であった。

フルクトース 0.5 M 溶液、THGP 0.5 M 溶液、および THGP-フルクトース 0.5 M 混

合溶液の ^1H NMR スペクトルを Fig. 2-5 に示す。フルクトース単独の ^1H NMR スペクトルと比較し、混合溶液のスペクトルでは 3.5 ppm から 4.7 ppm にかけて顕著なブロードニングが見られたことから、THGP-フルクトース間で相互作用していることが予想された。また、THGP 由来の 1.5 ppm のトリプレットのシグナルも顕著にブロードニングした。THGP シグナルのブロードニングは、THGP-グルコース混合溶液の測定時には観測されていない現象である。このことから、THGP はグルコースに比べ、フルクトースとより強い相互作用を示すことが予想された。

アルドースおよびケトースの糖異性体の関係にあるグルコース、およびフルクトースと THGP との相互作用の強さを比較するため、これら 3 種類の化合物の混合溶液を調製し、NMR 分光法を用いて検討した。THGP-グルコース 0.5 M 混合溶液、および THGP-グルコース-フルクトース 0.5 M 混合溶液の ^1H NMR スペクトルを Fig. 2-6 に示す。まず、フルクトースを添加した事で、1.5 ppm のトリプレットのシグナルが著しくブロードニングすることを確認した。この様子は THGP-フルクトース混合溶液の ^1H NMR スペクトル (Fig. 2-5) でも見られた。

次に、THGP-グルコース混合溶液で観測された 3 つのシグナルの比率について、フルクトース添加により変化したことを確認した (Table 2-1)。4.6 ppm、5.2 ppm、および 5.8 ppm に観測されていたシグナルの比率は、それぞれ 56% から 67%、29% から 30%、15% から 3% に変化した。THGP-グルコース錯体由来の 5.8 ppm のシグナルが減少したことから、より親和性の高いフルクトースとの錯体形成へとシフトしていることが示唆された。

2-3. 考察

Ge-132 のモノマー構造である THGP は、グルコースと相互作用することが知られて

いる。中村らはこの作用により、メイラード反応を抑制し、糖尿病の合併症予防に効果がある可能性を示している [52]。また、中村らは THGP はグルコースの全ての立体配座のうち、 α -フラノース型のシスジオール構造と強い親和性を示し、5.7 ppm に α -フラノース型との錯体由来のシグナルが出現することを報告している。

本実験では、まず、単純な構造を持つ AHET を用いて、糖類のシスジオール構造と THGP との相互作用について NMR 分光法により評価した。その結果、相互作用した事で新たなシグナルの出現や既存のシグナルのブロードニングなど、NMR スペクトルに変化が現れる事を確認した。これらのシグナルに変化が見られた理由は、溶液中の THGP と AHET との間で錯体が形成されることで、電子密度の環境が変わったためである。一方で、AHET のデオキシ体である dAHET と、THGP との混合溶液を測定した結果、AHET で見られたようなシグナルの変化は全く見られなかった。このことから、THGP との錯体形成はシスジオール部位を介して行われている事が示された。

グルコースと THGP との混合溶液では、 ^1H NMR スペクトルの 5.8 ppm に錯体由来のシグナルが新たに出現した。これは、中村らが報告した α -フラノース型グルコースと THGP との錯体由来のシグナルと一致する。水中におけるグルコースの平衡状態の各配座の割合は、Angyal らの報告によると、 α -ピラノース型が 38%、 β -ピラノース型が 62%の割合で存在しており、他の異性体（フラノース型、直鎖型）は合わせても 1%に満たないとされている [54]。THGP を加える事で、通常存在し難い α -フラノース型グルコースを安定化させた (15%) ことから、ピラノース型シスジオール構造よりも、フラノース型シスジオール構造と THGP が優先的に錯体形成する事が示唆された。

フルクトースと THGP との混合溶液では、全てのシグナルにおいてブロードニングが観測された。そのため、グルコースとの混合溶液で観測されたような錯体由来のシグナルを帰属する事は困難であった。フルクトースとの混合溶液の ^1H NMR スペクトルの特徴として、特に 1.5 ppm に見られる THGP の GeCH_2 のシグナルの顕著なブロー

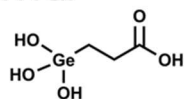
ドニングを受けることが挙げられる。

異性体の関係にあるグルコース、フルクトースと THGP との混合溶液では、1) グルコース-THGP 錯体に由来する 5.8 ppm のシグナルが減少したこと、2) フルクトース-THGP 混合時に特徴的だった 1.5 ppm シグナルの顕著なブロードニングが観測されたことから、THGP はグルコースとの錯体から、より親和性の高いフルクトースとの錯体へとシフトしていることが示唆された。

水中におけるフルクトースの平衡状態の配座割合は、Barclay らによって報告されている [55]。THGP と優先的に錯体形成するシスジオール構造を有するフラノース型は、グルコースとは異なり、フルクトースでは通常の平衡状態においても 22% の割合で存在する。このため THGP は、平衡状態においてシスジオール構造を有するフラノース型が不安定なグルコースより、安定に存在するフルクトースとのほうが高い錯体形成割合を示したものと考えられる (Fig. 2-7)。

^1H NMR

THGP



AHET



mixture

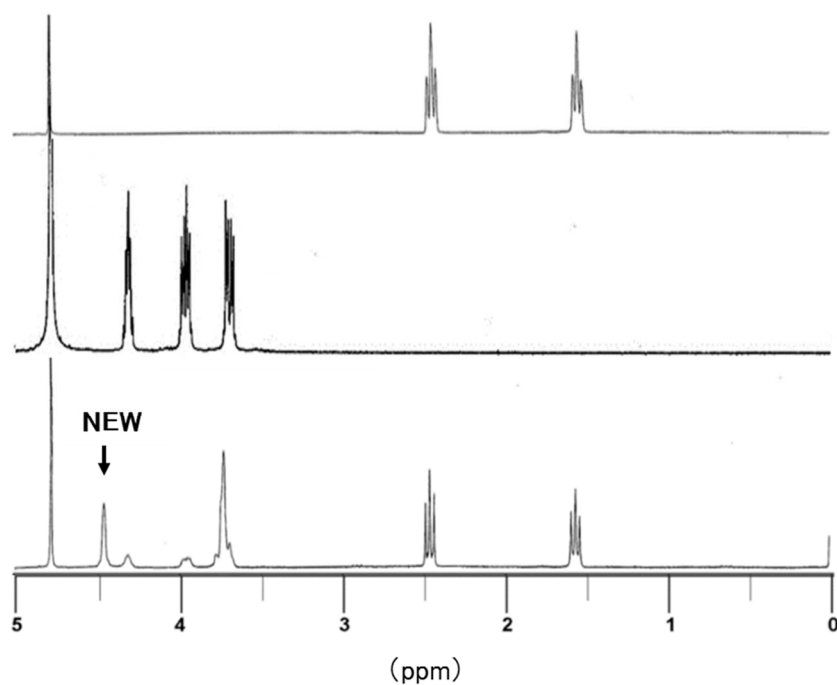


Fig. 2-1 THGP, AHET, および THGP-AHET 混合溶液の ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

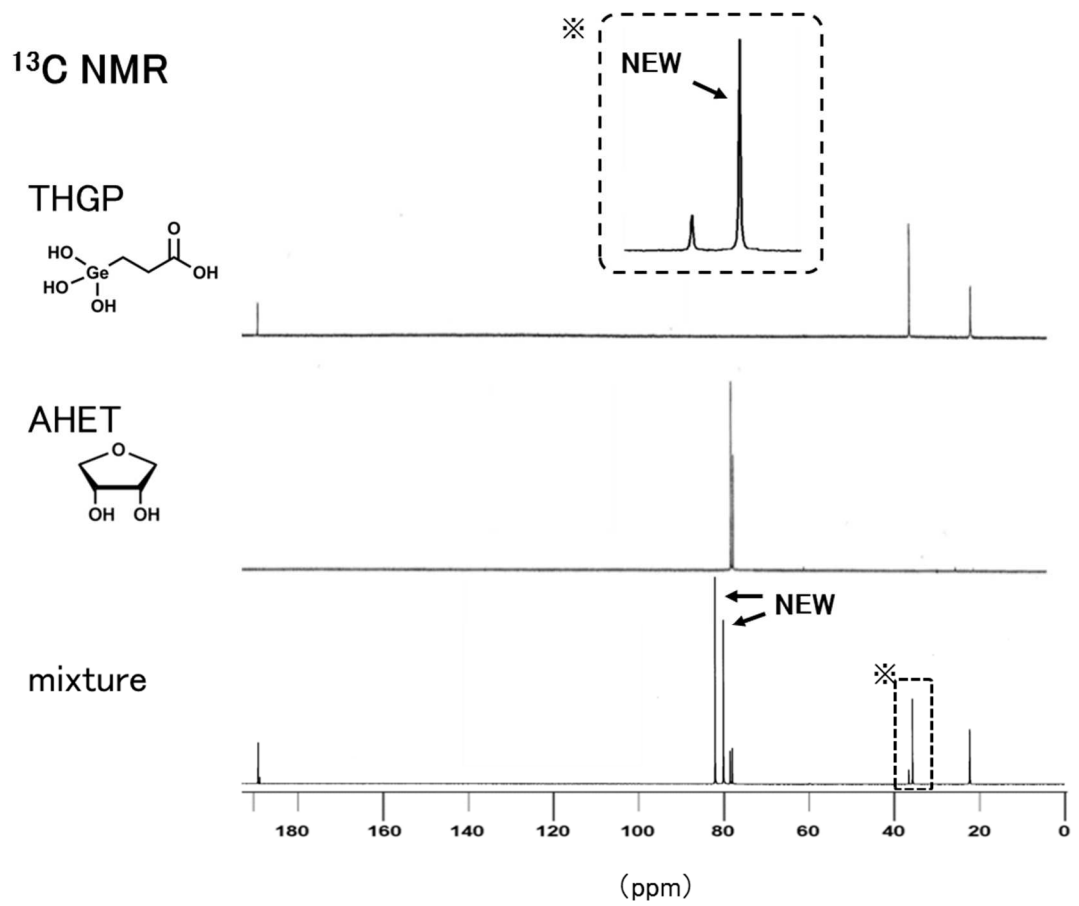


Fig. 2-2 THGP, AHET, および THGP-AHET 混合溶液の¹³C NMR スペクトル (75 MHz, D₂O)

^1H NMR

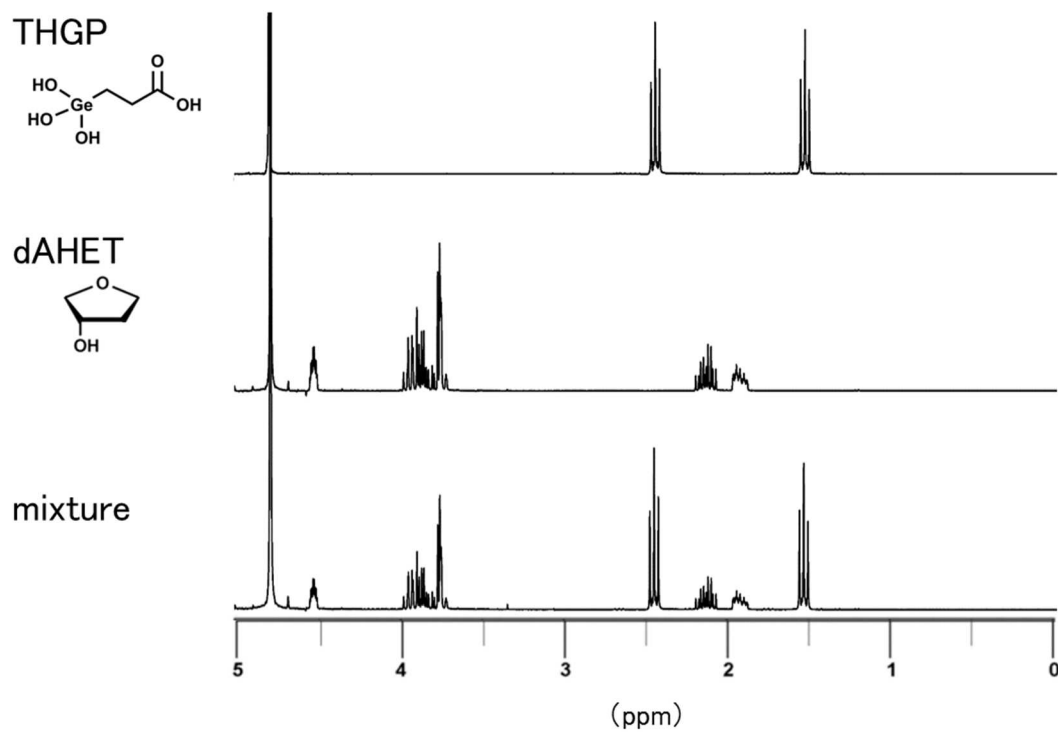


Fig. 2-3 THGP, dAHET, および THGP-dAHET 混合溶液の ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

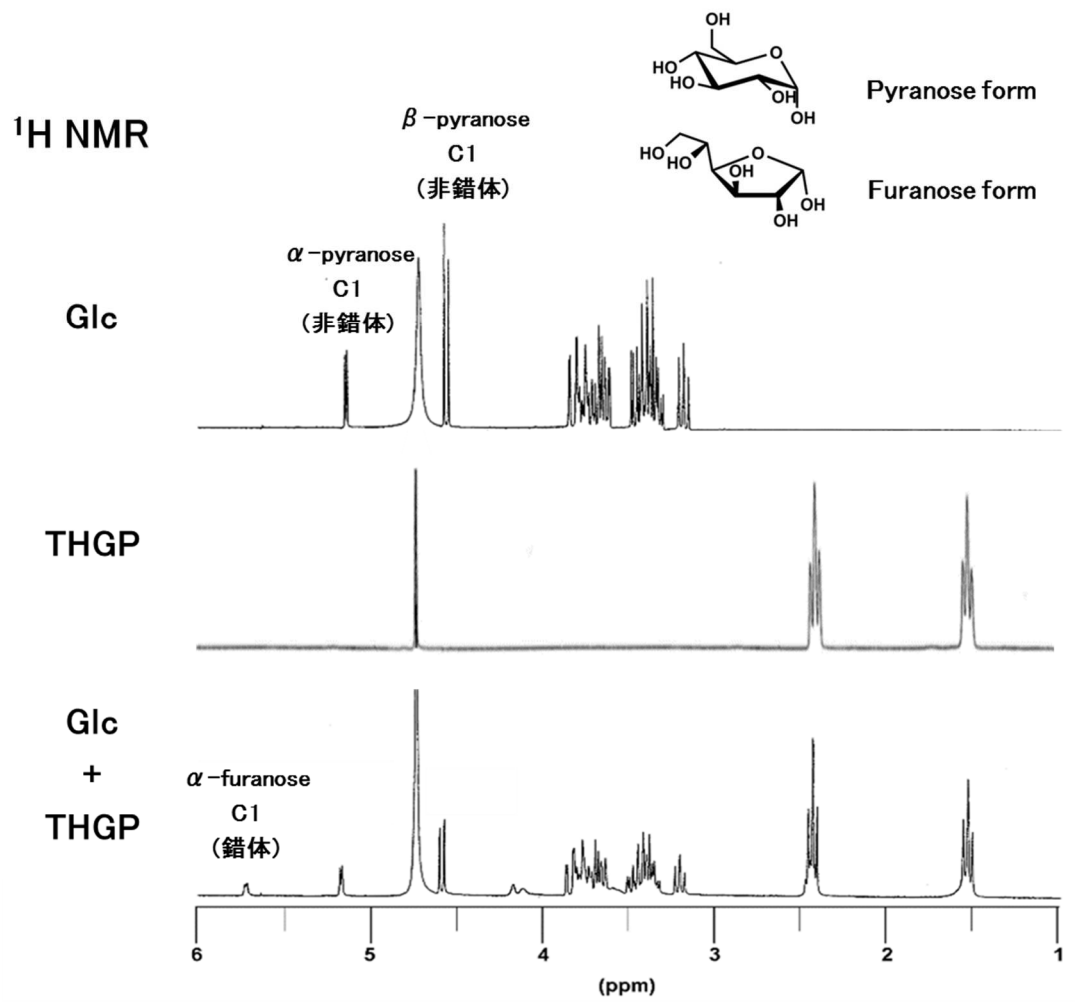


Fig. 2-4 グルコース, THGP, および THGP-グルコース混合溶液の ¹H NMR スペクトル (300 MHz, D₂O)

^1H NMR

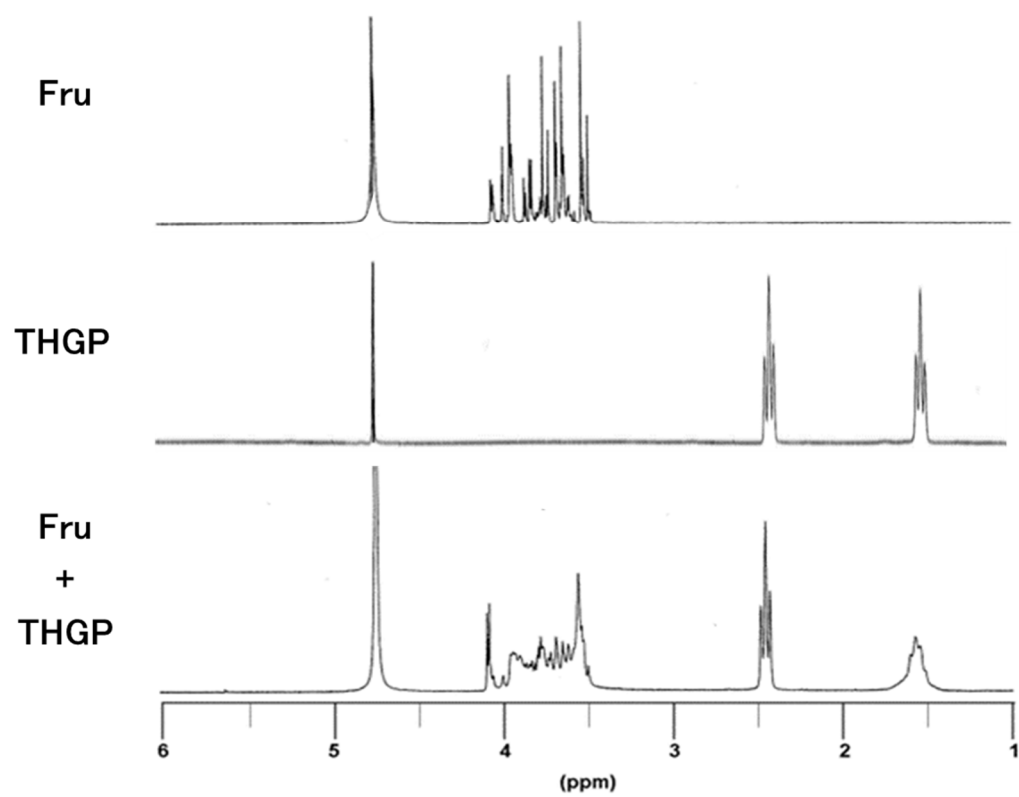


Fig. 2-5 フルクトース, THGP, および THGP-フルクトース混合
溶液の ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

^1H NMR

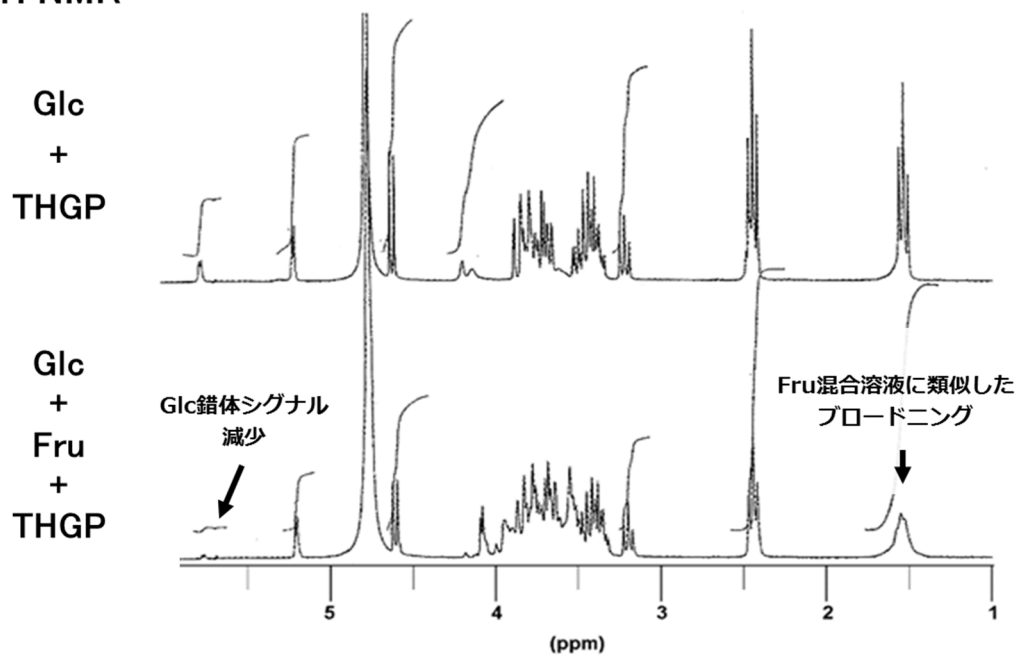


Fig. 2-6 THGP-グルコース混合溶液, および
THGP-グルコース-フルクトース混合溶液の
 ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

Table 2-1 フルクトース添加による各シグナル積分比の変化

Signal position	Chemical shift (ppm)	Ratio of signal strength (%)	
		D-fructose	
		-	+
β -D-glucopyranose C1	4.6	56	67
α -D-glucopyranose C1	5.2	29	30
D-glucose-THGPNa complex C1	5.8	15	3

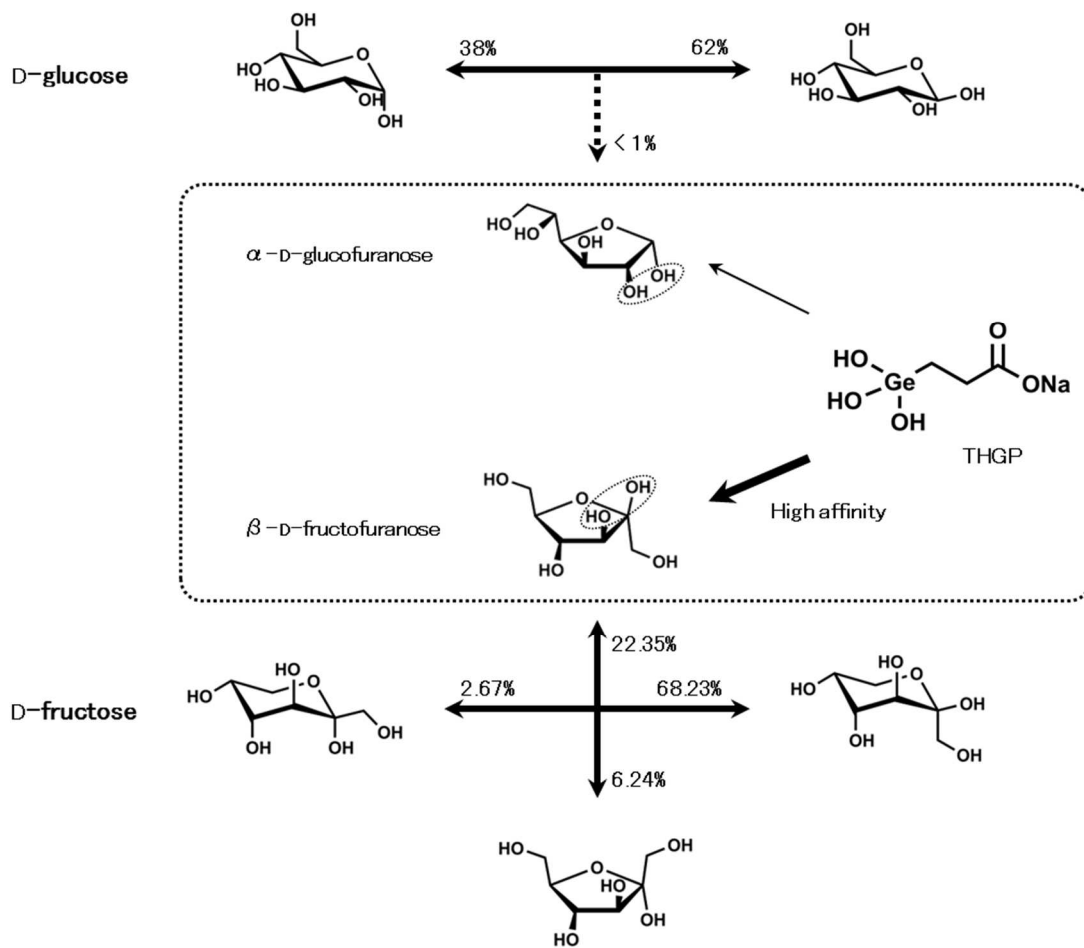


Fig. 2-7 THGP, グルコース, およびフルクトース間の
反応スキーム

第3章 THGP ジメチル誘導体と糖類との相互作用の定量的評価

核磁気共鳴 (NMR) スペクトル分析は、有機化合物の構造解析を行う代表的な分析法として広く使用されている。また、NMR スペクトルのピーク面積比 (積分比) は、化合物中の原子核の数の比に対応する特性を持つため、定量性が確保できる条件で測定することで、化合物の純度や濃度を求めることが出来る [56]。NMR は、磁場中における核スピンの共鳴現象であり、スピン量子数が 0 以外の原子核で観測される [57]。NMR 核種の中では ^1H が最も高い感度を持っており、 ^1H NMR 法による定量化が最も実用化されている [58]。第 2 章では、THGP と糖類との混合溶液の ^1H NMR スペクトルを測定し、それぞれ単独の溶液における ^1H NMR スペクトルには観測されない、錯体由来の新たなシグナルが出現することを確認した [59]。このとき、THGP および糖の濃度は既知であるため、錯体・非錯体シグナルの積分比から、溶液中における錯体の濃度割合 (錯体形成率) を求めることが出来る。一方、THGP の ^1H NMR スペクトルは、2 箇所幅の広いトリプレットのシグナルとして観測される。錯体を形成すると分子中の原子の電子密度は変化するので、錯体のシグナルは原料 (非錯体) の近傍にシフトして出現する。このため、THGP の幅の広いトリプレットのシグナルでは、錯体シグナルと非錯体シグナルが重なってしまい、区別することは困難であった。また、糖側のスペクトルはさらに複雑であり、これらが定量化の問題点であった (Fig. 3-1)。

本章ではこの問題点を解決するために、THGP の NMR レポーター分子として、構造中のプロトンカップリングを解消した誘導体を合成し、糖類との錯体形成率の数値化を検討した。また、計算化学の手法を用いて錯体形成率と糖構造との関係を考察した。

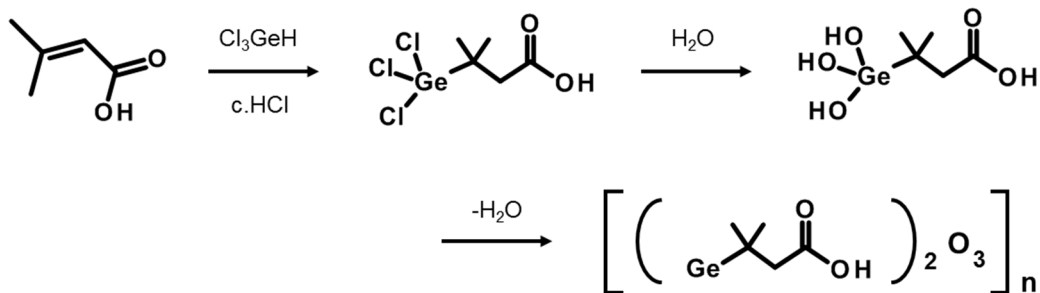
3-1. 実験方法

3-1-1. 試薬

メチル- α -D-グルコシド、メチル- α -D-マンノシド、メチル- α -D-ガラクトシド、D-タガトース、2-デオキシ-D-グルコース、トレハロース、スクロース、マルトース、マルツロース、メレジトースは東京化成工業から購入した。D-グルコース、D-フルクトース、 α -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンは純正化学から購入した。D-ガラクトース、D-マンノース、ラクトース、ラクツロース、ラフィノース、エチレングリコールは和光純薬工業から購入した。スタキオースは関東化学から購入した。マルトトリオースはシグマアルドリッチから購入した。重水、重水酸化ナトリウム溶液はメルクから購入した。これら全ての試薬は、特級または NMR 分析用を用いた。DM-THGP の合成に用いた 3-メチルクルトン酸は東京化成工業から購入した。トリクロロゲルマンは浅井ゲルマニウム研究所で製造されたものを使用した。

3-1-2. DM-THGP の合成

濃塩酸を溶媒として、3-メチルクルトン酸と 1.2 当量のトリクロロゲルマンを 6 時間室温下で反応し、3,3-ジメチル-3-トリクロロゲルミルプロパン酸を得た。精製水による加水分解および脱水縮合を経て、DM-THGP の白色結晶（収率 80%、純度 98%）を得た。実験には DM-THGP を一度精製水に溶解し、水酸化ナトリウムで中和後、減圧濃縮および加熱乾燥して得た DM-THGP (Na 塩) を使用した。合成スキームおよび重水中における ^1H および ^{13}C NMR 化学シフト値は、以下の通りである。



^1H NMR の化学シフト値 (D_2O , $\text{HOD} = 4.80$ ppm) :

$$\delta \text{ (ppm)} = 2.33 \text{ (s, 2H)}, 1.21 \text{ (s, 6H)}.$$

^{13}C NMR の化学シフト値 (D_2O) :

$$\delta \text{ (ppm)} = 180.19, 47.37, 33.77, 23.28$$

3-1-3. NMR 分析

各サンプルの ^1H 、 ^{13}C NMR は、JNM-ECA500 (日本電子) および Gemini 300 を用いて測定した。サンプルの pH は HM-25R を用いて調整した。サンプルの調製条件は、DM-THGP および糖類の混合モル比 1 : 1、各溶質終濃度 0.1 M、pH 7.0 ~ 7.5 とした。溶媒は全て重水を用いた。化学シフトの標準として、重水溶媒中に残存する軽水 ($\text{HOD} : 4.80$ ppm) を内部標準とした。測定温度は 25°C とした。全てのサンプルの ^1H NMR (500 MHz または 300 MHz) を測定した。 ^1H NMR の積算回数は 32 回とした。構造の同定のため、二次元 NMR 測定および DEPT 測定を行った。

3-1-4. 錯体形成率の算出

得られた ^1H NMR スペクトルチャートにおいて、錯体および非錯体のシグナルを帰属した後、それぞれの積分値の比から錯体形成率を(1)式に従って算出した。

$$\text{錯体形成率 (\%)} = \frac{(I_c)}{(I_f + I_c)} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 I_c および I_f はそれぞれ、DM-THGP 錯体のメチル基シグナルの積分値および非錯体のメチル基シグナルの積分値である。

3-1-5. 糖のジオール構造の二面角の計算

α -D-グルコピラノース、および α -D-グルコフラノースの初期構造を Chem3D Pro Ver. 11.0 (Cambridge Software) により作製し、MM2 法で分子力場計算を行った。その後、MOPAC 2012 Ver. 15.347W (Stewart Computational Chemistry)により構造最適化を行い、Chem3D Pro で各構造中のシスジオールの二面角を求めた。

3-2. 結果

THGP の ^1H NMR スペクトルは、2つのメチレン基に由来するシグナルが観測される。これらのシグナルは第2章で述べたように、メチレン基同士のカップリングによりトリプレットで観測される (Fig. 3-2A)。そこで、THGP のゲルマニウム原子に隣接した炭素にジメチル基を導入した DM-THGP を合成した。ジメチル基を導入したことでカップリングが解消され、1.2 ppm および 2.3 ppm の2箇所それぞれシングレットが現れるシンプルなスペクトルを与えた (Fig. 3-2B)。

第2章にて、THGP を用いてフルクトースとの混合溶液の ^1H NMR を測定した時、錯体由来の新たなシグナルが観測されたが、THGP のシグナルが幅の広いトリプレットであることに加えて、錯体・非錯体シグナルの出現する化学シフトが近いためにシグナル同士が重なり、錯体と非錯体を区別する事は困難であった (Fig. 3-2A)。これに

対し、DM-THGP を用いてフルクトースとの混合溶液を測定した場合には、DM-THGP の $^1\text{H NMR}$ スペクトルはシンプルなシングレットとなるため、新たに出現したフルクトースとの錯体のシグナルと非錯体のシグナルを区別することが出来た (Fig. 3-2B)。同様にフルクトース以外の糖についても錯体と非錯体を区別することができたので、シグナルの積分比から錯体形成率を算出することが可能となった。

DM-THGP と各糖類との錯体形成率は、 $^1\text{H NMR}$ スペクトルから錯体・非錯体シグナルの積分値を求め、式(1)に従い算出した。DM-THGP および各糖類の混合モル比 1 : 1、0.1 M 混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルから求めた錯体形成率を Table 3-1 に示す。本実験で得られた錯体形成率と糖構造とを照らし合わせた結果、DM-THGP と糖類との反応性について以下の特徴を有することが明らかとなった。

DM-THGP とメチル- α -D-グルコシド、メチル- α -D-マンノシド、およびメチル- α -D-ガラクトシドとの相互作用を調べた (Fig. 3-3)。これらの糖類は還元末端を持たないため、開環反応することは無く、ピラノース構造の反応性のみを評価することが出来る。相互作用を調べた結果、メチル- α -D-グルコシドとは錯体を形成せず、それ以外では錯体形成することを確認した。それぞれの構造を比較すると、DM-THGP と錯体を形成しないメチル- α -D-グルコシドは、構造中のジオールが全てトランス配置であるのに対し、錯体を形成したメチル- α -D-マンノシド、およびメチル- α -D-ガラクトシドはそれぞれシスジオール構造を有していることが明らかである。このことから、DM-THGP は糖類のシスジオール構造と錯体を形成することが示された。

DM-THGP-グルコース混合溶液の $^1\text{H NMR}$ を測定した結果、5.8 ppm に錯体由来の新たなシグナルが出現した。これは、第 2 章で確認した THGP-グルコース (フラノース型) 錯体由来のシグナルと化学シフトが一致している。THGP は、ピラノース型よりシスジオールの二面角が小さいフラノース型と優先的に錯体を形成すると第 2 章で推察した。そこで、ピラノース型およびフラノース型のシスジオールの二面角を計算

した結果、それぞれ 54° および 15° であった (Fig. 3-4)。このことから、二面角の狭いシスジオール構造ほど DM-THGP との親和性は強いことが推定された。

2-デオキシグルコース、トレハロース、マルトースとの反応性を比較した。これらは全てグルコース、またはそれに類似した構造を有している糖類である (Fig. 3-5)。DM-THGP とそれぞれの糖類との相互作用を調べた結果、マルトースと錯体形成することを確認した。2-デオキシグルコースは還元末端を持つため開環し、ピラノース型およびフラノース型を形成することが出来る。トレハロースは、2 分子のグルコースが 1, 1-グリコシド結合して出来た二糖であり、開環することが出来ない。2-デオキシグルコースとトレハロースは、ともに構造中にシスジオールを持たない糖で、両者とも DM-THGP と錯体形成しなかった。

マルトースは、DM-THGP と錯体を形成することが $^1\text{H NMR}$ スペクトルから明らかとなった。マルトースは 2 分子のグルコースが 1,4-グリコシド結合して出来た二糖である。1 位が結合したグルコース構造は、トレハロースの持つグルコースと同様の環境であり、シスジオール構造を持たないため、THGP と錯体を形成することは無い。4 位が結合したグルコース構造は還元末端を持つため開環することが出来る。一方、4 位に水酸基を持たないため、フラノース型になることは出来ず、ピラノース型のみが形成される。その中で、THGP と錯体形成することが出来るシスジオール構造は、還元末端を含む 1, 2 位のジオールのみである。以上のことから、THGP は、フラノース型だけではなく還元末端を含むピラノース型のシスジオール構造ともある程度錯体を形成することが示された。

DM-THGP-単糖混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルから算出した錯体形成率を、Fig. 3-6 に示す。錯体形成率を比較した結果、グルコースを始めとしたアルドースより、フルクトースやタガトースといったケトースの方が高い錯体形成率を示した。この結果は、第 2 章で報告した THGP で行った実験結果と一致している。

Fig. 3-7 にメチル- α -D-ガラクトシド、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースの構造式と DM-THGP との錯体形成率を示す。メチル- α -D-ガラクトシドはシスジオール構造を持っており、DM-THGP と錯体形成することが確認された。スクロースはシスジオール構造を持っておらず、DM-THGP との錯体形成は確認されなかった。このスクロースにメチル- α -D-ガラクトシドが 1 分子結合したラフィノースでは、9%の錯体形成率が得られた。さらに、メチル- α -D-ガラクトシドが 2 分子結合したスタキオースでは、ラフィノースの 2 倍近い錯体形成率が得られた。この結果より、シスジオール構造が増えるほど錯体形成率は向上することが示された。

3-3. 考察

第 3 章では、THGP の NMR レポーター分子としてゲルマニウム原子に隣接した炭素にジメチル基を導入した DM-THGP を合成し、糖類との親和性を、同じ濃度における錯体形成率を求めることで数値化した。また、糖の構造と錯体形成率を比較することで、糖との錯体形成における THGP の反応特性を推測した。

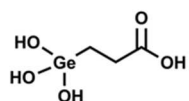
すなわち、THGP は糖構造中のシスジオール部位を介して錯体を形成し、二面角の小さいシスジオール構造を持つフラノース型との親和性が高いことが、本実験で示唆された。本実験で用いた各単糖は、水溶液中の平衡状態におけるシスジオール構造を持つフラノース型の割合で比較すると、アルドースのグルコースおよびマンノースでは 1%未満、ガラクトースでは 2.5% (α 型, 31°C) であるのに対し、ケトースのタガトースでは 10% (α 型 : 2.5%, β 型 : 7.5%, 31°C)、フルクトースでは 25% (β 型 : 25%, 31°C) である [54]。したがって、ケトース糖のフラノース存在率が高いので、THGP はケトースとの錯体形成能が高いと考えられる (Fig. 2-6)。ゲルマニウムの反応性と類似している化合物としてボロン酸が知られている。ボロン酸を用いた糖類との相互作用

用の研究でも、本実験結果同様、構造中のシスジオール構造と錯体を形成し、アルドースに比べ、ケトースとの錯体形成が安定であることが報告されている [60]。この反応特性を利用し、ボロン酸を固定化した機能性材料によるケトースの選択分離 [61]や、アルドースからケトースへの糖異性化促進 [62]などの応用研究が行われている。糖異性化反応には、酵素を用いて特定の反応を進める酵素異性化反応と、アルカリ条件下で行うアルカリ異性化反応がある。アルカリ異性化反応は、酵素が未だ見出されていない糖の変換反応に有用である。最近、グルコース-フルクトース糖異性化反応における THGP の添加は、非添加の反応に比べ、酵素異性化反応では 1.7 倍（変換率 50%→80%）、アルカリ異性化反応では 2.4 倍（変換率 30%→73%）促進することが明らかとなった [63]。この理由として、THGP はグルコースよりフルクトースの方が親和性が強く、異性化反応で生成したフルクトースと強く錯体を形成するため、逆反応を抑え、収率が向上したと述べている。THGP の縮合物である Ge-132 は高い安全性が確認されており、食品や化粧品素材の糖異性化反応への利用や、異性化酵素が知られていない新たなオリゴ糖の開発へと今後進展することが期待される。

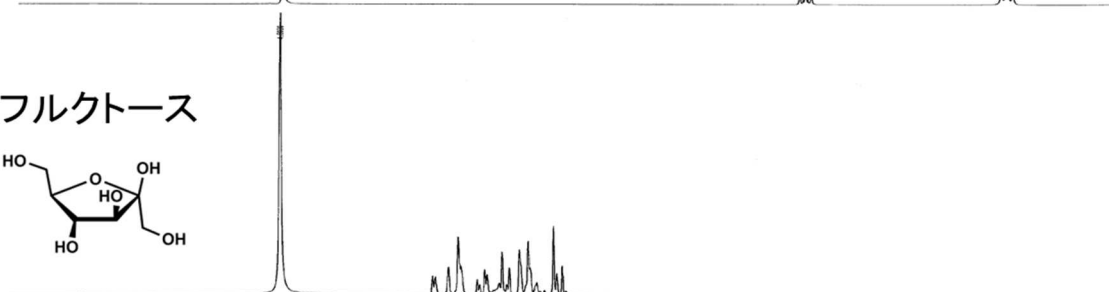
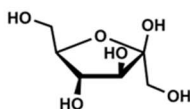
スクロース、ラフィノースおよびスタキオースの錯体形成率は、スクロース < ラフィノース < スタキオースとなったことから (Fig. 3-7)、THGP と錯体形成可能なジオール構造の作用点が増えることで、錯体形成率が向上することが示唆された。つまり、作用点が複数存在するオリゴ糖や糖鎖などは、単糖と比較して THGP とより強く相互作用することが考えられる。インフルエンザ [64, 65]や HIV ウィルス [66]の表面には高マンノース糖鎖が多数存在することが知られており、この糖鎖と特異的に結合する抗ウィルス薬の開発を目指した研究が報告されている [64, 66]。本実験結果では、THGP とマンノースが錯体形成することが示され、高マンノース糖鎖とも相互作用すると考えられる。したがって、THGP は高マンノース糖鎖との相互作用を介して、抗ウィルス効果を示すかもしれない。

^1H NMR

THGP



フルクトース



mixture

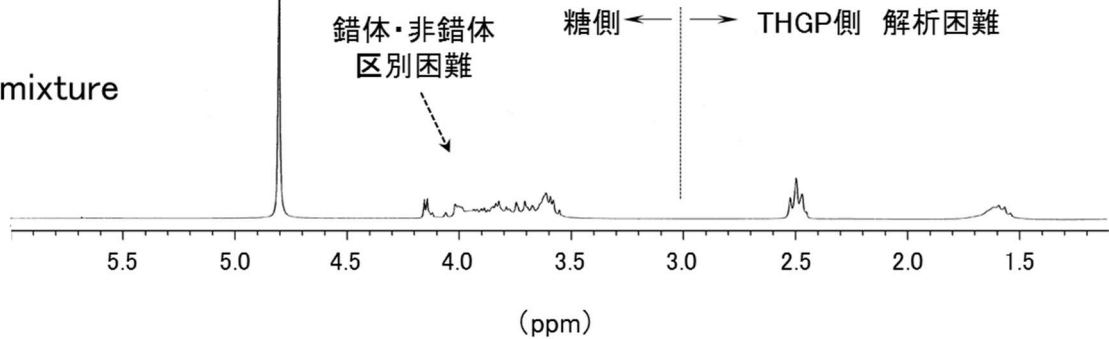


Fig. 3-1 THGP, フルクトース, および THGP-フルクトース混合溶液の ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

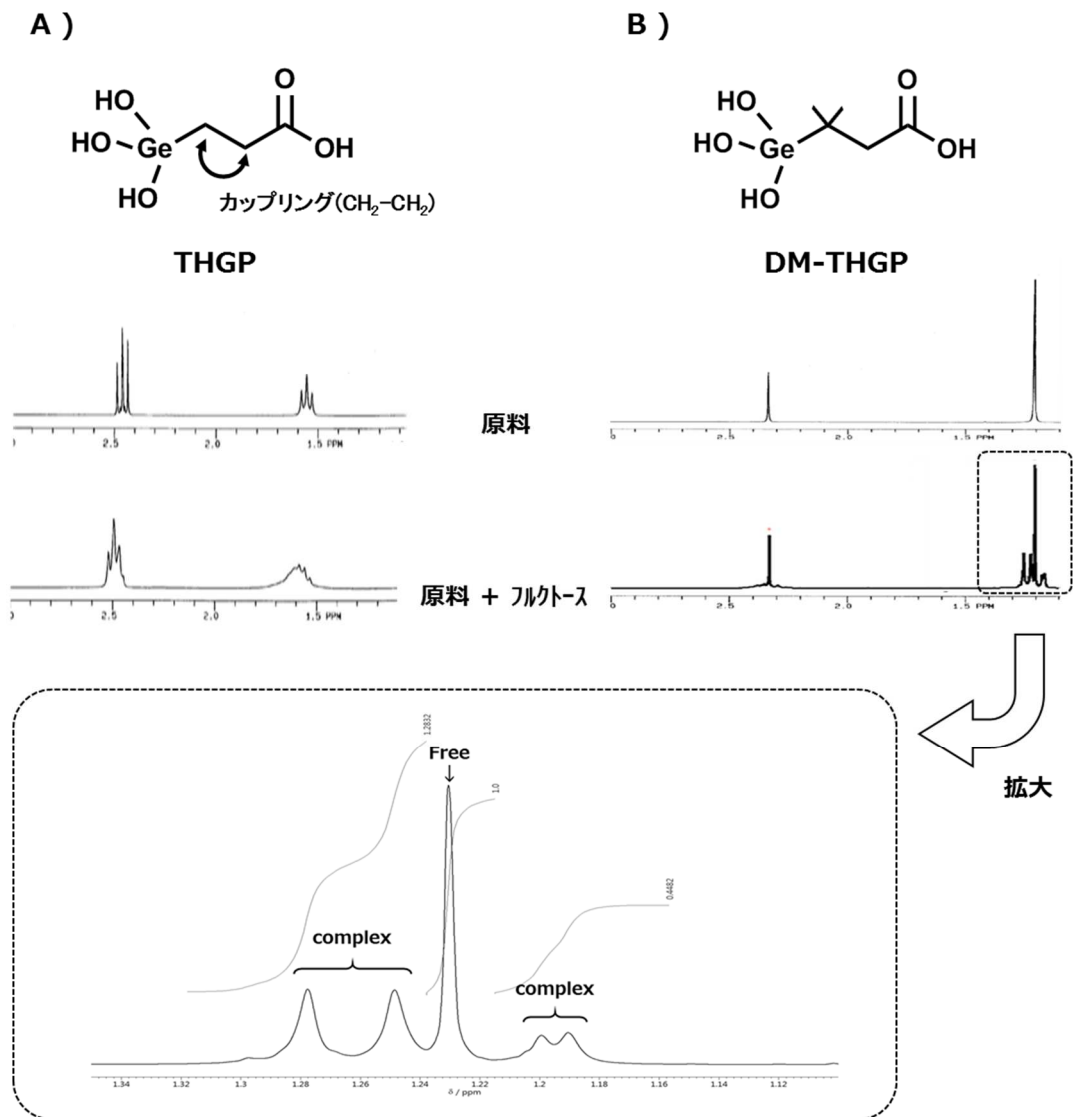


Fig. 3-2 THGP, DM-THGP それぞれの糖混合溶液の
¹H NMR スペクトル (500 MHz, D₂O)

Table 3-1 各糖類とDM-THGP の 0.1 M 混合溶液の錯体形成率

単糖類	%	三糖類以上	%
Methyl- α -D-Glucoside	—	α -Cyclodextrin	—
Methyl- α -D-Galactoside	12	γ -Cyclodextrin	—
Methyl- α -D-Mannoside	18	Melezitose	—
D-Glucose	12	Raffinose	9
D-Galactose	17	Stachyose	19
D-Mannose	29	Maltotriose	10
2-Deoxy-D-glucose	—		
D-Fructose	64	その他	%
D-Tagatose	62	Ethylene glycol	—
二糖類	%		
Trehalose	—		
Sucrose	—		
Maltose	8		
Maltulose	69		
Lactose	16		
Lactulose	68		

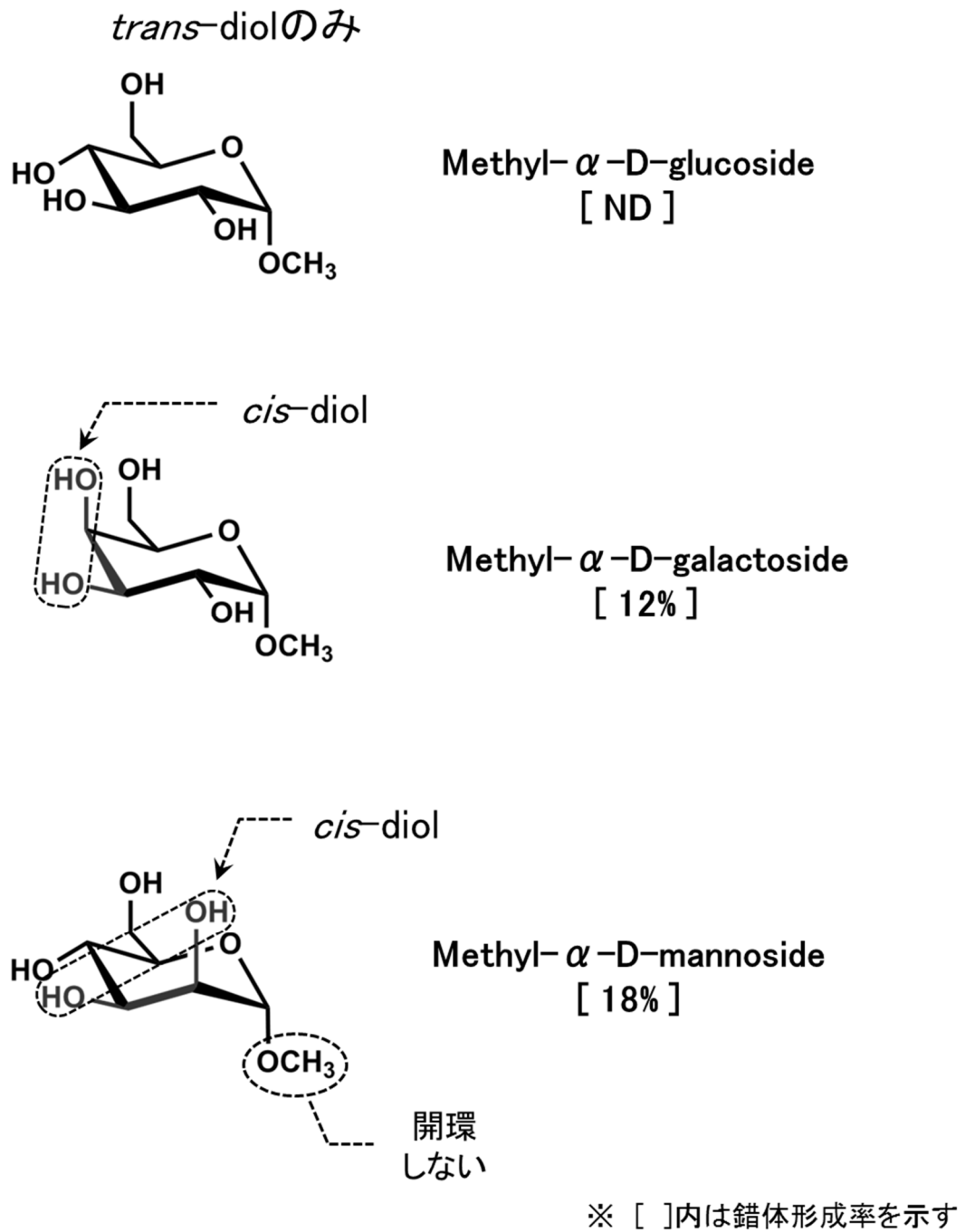


Fig. 3-3 還元末端を持たない糖類との錯体形成率と糖構造の比較

D-glucose [12%]

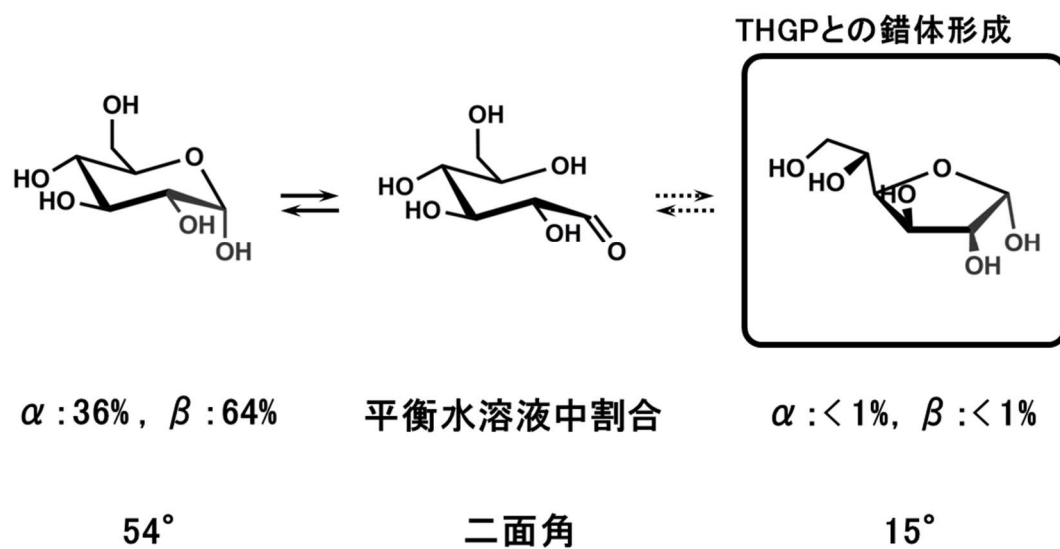


Fig. 3-4 グルコース水溶液中の平衡とシスジオールの二面角

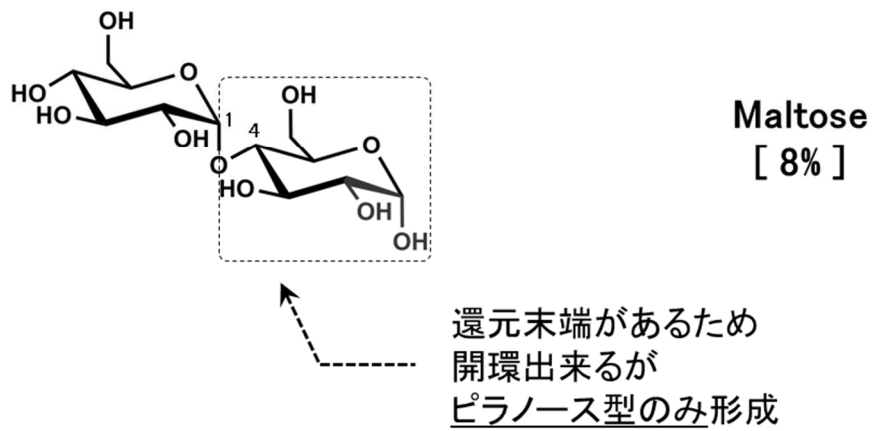
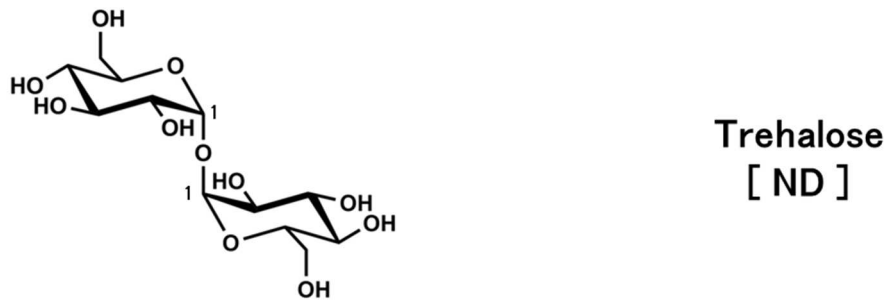
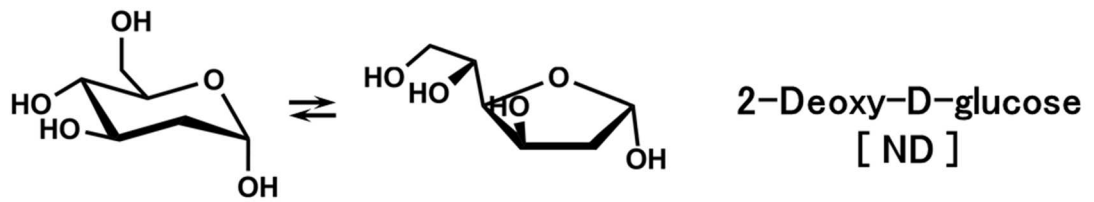


Fig. 3-5 グルコースに関連する糖類との錯体形成率

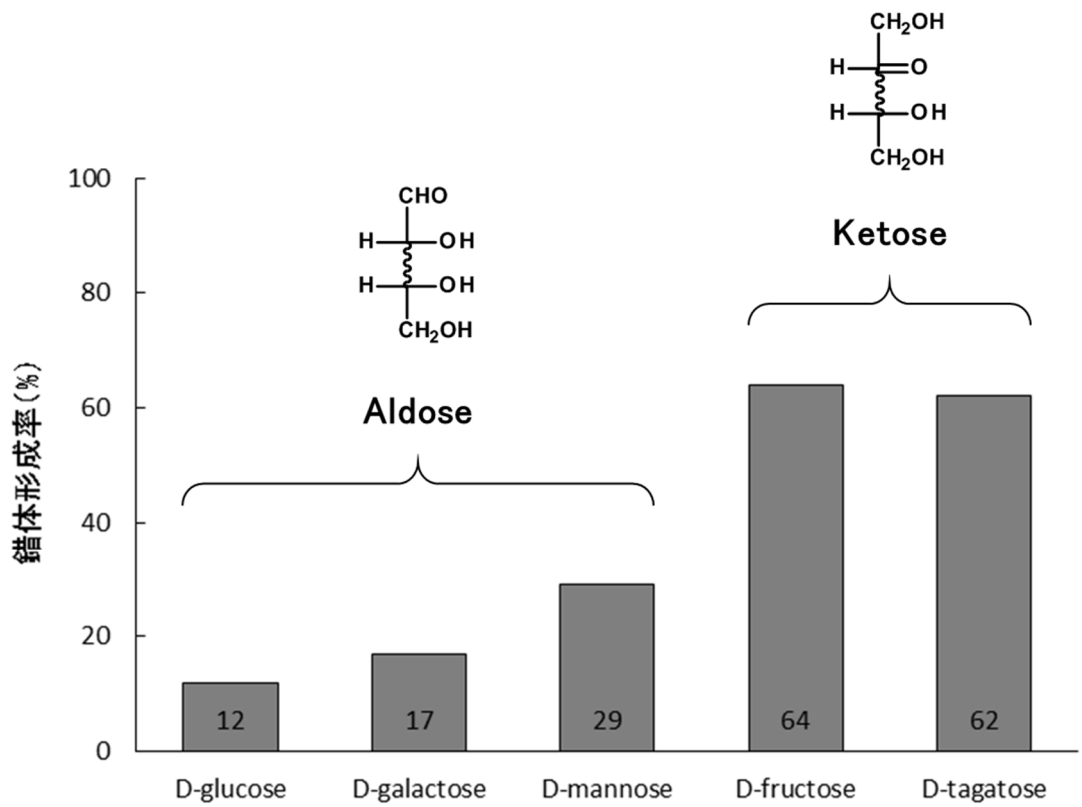
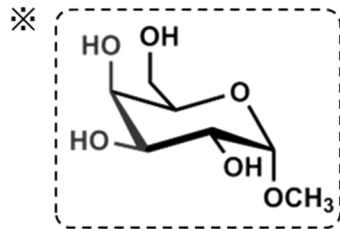
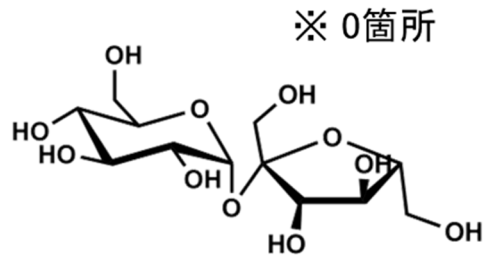


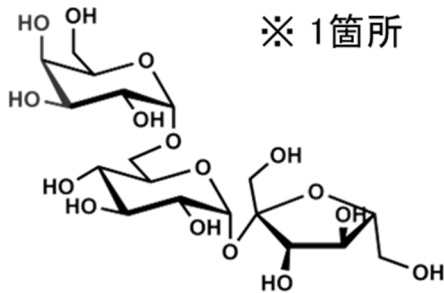
Fig. 3-6 各単糖との錯体形成率の比較



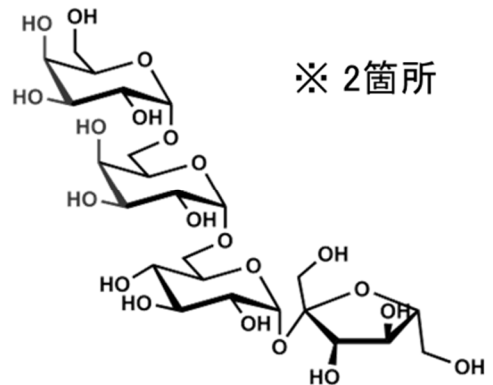
Methyl- α -D-galactoside
[12%]



Sucrose
[ND]



Raffinose
[9%]



Stachyose
[19%]

Fig. 3-7 シスジオール部位の数と錯体形成率

第4章 THGP フッ素誘導体を用いた糖類との相互作用の評価法

糖は生命体が活動するためのエネルギー源として、あらゆる生物が重要な分子の位置付けで利用している。また、この他にも、糖を含む分子が、生体内でさまざまな役割を果たしていることが数多くの研究報告で明らかになっている。生体内における糖類は、独立した個々の糖分子そのものでは普通は特別な機能を示さないが、いくつかの糖が、決まった順序に結合した糖鎖構造になると、特有の働きを示すことが知られている [67]。具体的には、糖鎖は細胞同士の認識や接着、またはタンパク質の安定化や機能の調節に関与していることが明らかとなっている [68–70]。有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 のモノマーである THGP は、水溶液中において糖類のシスジオール構造と錯体を形成することを第2章、第3章で明らかにした。したがって、糖鎖のシスジオール構造とも錯体形成することが十分に考えられる。

ところで、経口摂取した Ge-132 は、約 20% が消化管吸収され、2 時間程度の後に血中濃度が最大になることが鹿児島らの研究により明らかにされている [71]。また、鹿児島らは経口摂取した Ge-132 は小腸、特に上部消化管で吸収されていると述べている。消化器官である胃や腸の表面は、ムチンと呼ばれるさまざまな糖鎖が結合したタンパク質を主成分とする粘液に覆われている。粘液の主成分であるムチンと THGP との相互作用を知ることは、THGP の生体内への吸収を考える上で重要な知見となることが期待される。そこで、第3章で用いた THGP の NMR レポーター分子 DM-THGP を用いて、ムチンとの相互作用を検討した。ムチンは幾つか種類が知られているが、本実験では主に小腸、大腸に存在する分泌型ムチン (MUC2) を使用した。MUC2 は構造中に 3, 4 位にシスジオールを有するガラクトースが含まれており、THGP と相互作用することが予想される [72]。Fig. 4-1 は DM-THGP 単独、MUC2 単独および DM-THGP- MUC2 混合溶液の ^1H NMR スペクトルである。MUC2 の ^1H NMR スペクトル

は高磁場まで複雑なシグナルが観測され、DM-THGP のシグナルが埋もれてしまった。このように、高分子になると ^1H や ^{13}C ではシグナルが複雑になり、錯体・非錯体のシグナルを見分ける事は困難になることが分かった。

そこで、新たな評価方法として THGP のフッ素誘導体を用いた ^{19}F NMR スペクトルの測定を考えた。フッ素は水素に次ぐ高感度な NMR 核種であり、加えて、生体成分中にフッ素は含まれないので、どんなに複雑な生体成分との相互作用も、THGP 誘導体の ^{19}F シグナルで評価することが出来る。本章では新たな THGP の NMR レポーター分子として、構造中にフッ素を導入した誘導体を合成し、 ^{19}F NMR を用いた糖類との錯体形成の評価方法を検討した。

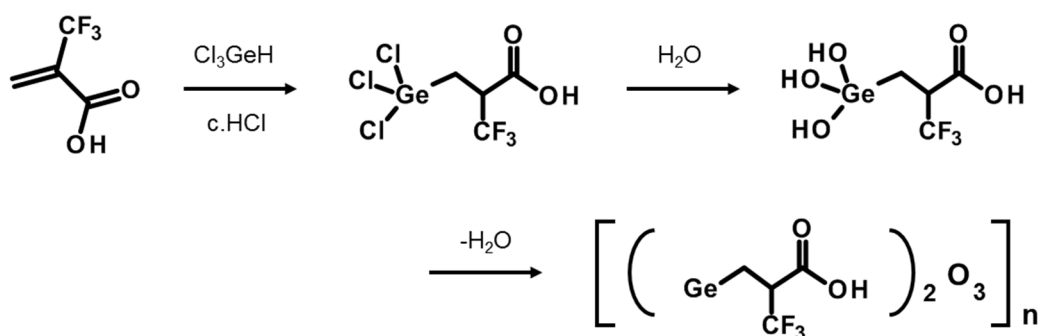
4-1. 実験方法

4-1-1. 試薬

1,4-アンヒドロエリスリトール (AHET)、メチル- α -D-ガラクトシド (Me-Gal) は東京化成工業から購入した。3-ヒドロキシテトラヒドロフラン (dAHET) は関東化学から購入した。ガラクトース (Gal)、トリフルオロ酢酸は和光純薬工業から購入した。MUC2 (ブタ胃由来) はシグマアルドリッチから購入した。重水、重水酸化ナトリウム溶液はメルクから購入した。これら全ての試薬は特級または NMR 分析用を用いた。THGP フッ素誘導体 (THGPF) の合成に用いた 2-(トリフルオロメチル)アクリル酸は東京化成工業から購入した。トリクロロゲルマンは浅井ゲルマニウム研究所で製造されたものを使用した。

4-1-2. THGPF の合成

濃塩酸を溶媒として 2-(トリフルオロメチル)アクリル酸と 1.2 当量のトリクロロゲルマンを室温、かくはん下で反応を行った。反応液は 2 層となった。12 時間かくはんした後、上層（塩酸層）を除き、過剰のトリクロロゲルマンを除去した。さらに、クロロホルムおよび濃塩酸を加えてかくはんし、上層（塩酸層）を除いて反応液の洗浄を行った。クロロホルム層に無水硫酸マグネシウムを加えてかくはん、脱水をした後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、無色オイル状の 2-トリフルオロメチル-3-トリクロロゲルミルプロパン酸を得た。精製水 50 mL に 2-トリフルオロメチル-3-トリクロロゲルミルプロパン酸 5 g を室温、かくはん下で滴下し、12 時間かくはんした。脱水縮合により結晶が析出し始めたらかくはんを止め、24 時間静置した。結晶をろ集、乾燥し、2-トリフルオロメチル-3-トリヒドロキシゲルミルプロパン酸 (THGPF) の白色結晶を得た (収率 45%、純度 97%)。実験には THGPF を一度精製水に溶解し、水酸化ナトリウムで中和後、減圧濃縮乾固および減圧加熱乾燥して得た THGPF (Na 塩) を使用した。合成スキームは以下の通りである。



4-1-3. NMR 分析

各サンプルの ^1H 、 ^{19}F NMR は、それぞれ Gemini 300 および JNM-ECA500 を用いて

測定した。サンプルの pH は HM-25R を用いて調整した。サンプルの調製条件は、単糖 (AHET、dAHET、Gal および Me-Gal) の場合、THGPF および単糖の混合モル比 1 : 1、各溶質終濃度 0.1 M、pH 7.0~7.5 とした。MUC2 の場合、2% MUC2 溶液に THGPF を 0.1 M になるよう加え、pH 7.0~7.5 とした。溶媒は全て重水を用いた。化学シフトの標準として、 ^1H NMR では重水溶媒中に残存する軽水 (HOD : 4.80 ppm) を内部標準に、 ^{19}F NMR では CF_3COOH (-76.5 ppm) を外部標準に用いた。測定温度は 25°C とした。 ^1H および ^{19}F NMR の積算回数は 16 回とした。 ^{19}F NMR 測定においては ^1H デカップリングを行った。

4-2. 結果

THGPF と各糖類との相互作用を ^{19}F NMR を用いて評価した。まず最初に、シンプルな構造の糖である AHET と THGPF との混合溶液について実験を行った。AHET の比較対象としてデオキシ誘導体である dAHET を用い、THGPF のジオール構造への反応性を評価した。THGPF 溶液、THGPF-AHET 混合溶液、THGPF-dAHET 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルを Fig. 4-2 に示す。THGPF の ^{19}F NMR スペクトルにおいて、-69.2 ppm にシグナルが観測された。これは、THGPF の CF_3 基に由来するシグナルである。デカップリング処理前のシグナルは先端が若干割れたシグナルが観測されたが、デカップリング処理を行うことで、シンプルなシングレットのシグナルが観測された。

THGPF-AHET 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルでは、THGPF 単独で測定した際には見られなかった新たなシグナルが -68.8 ppm に出現した。スペクトルに変化が見られたのは、溶液中の THGPF と AHET との間で錯体が形成され、電子密度の環境が変わったためである。一方、ジオール構造を持たない dAHET と THGPF との混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルでは、新たなシグナルは観測されなかった。以上のことから、THGPF

の反応性は THGP 同様、シスジオール部位を介して錯体を形成することが示された。

次に、第 3 章で DM-THGP と錯体形成を示したヘキソースである Gal および Me-Gal と、THGPF との混合溶液について実験を行った。THGPF 溶液、THGPF-Gal 混合溶液、および THGPF-Me-Gal 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルを Fig. 4-3 に示す。THGPF-Gal 混合溶液、および THGPF-Me-Gal 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルでは、THGPF 単独で測定した際には見られなかった新たなシグナルが出現した。また、このシグナルの化学シフトは、THGPF-AHET 錯体由来のシグナルとほぼ同位置であったことから、Gal および Me-Gal との錯体に起因するシグナルであることが示された。THGPF-Gal 錯体のシグナルは THGPF-AHET 錯体のシグナルと若干異なり、幅の広いマルチプレットが観測され、その範囲は $-69.0\text{ ppm} \sim -68.6\text{ ppm}$ であった。

最後に、高分子量の糖タンパクである MUC2 と THGPF との混合溶液について実験を行った。THGPF 溶液、および THGPF-MUC2 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルを Fig. 4-4 に示す。THGPF-MUC2 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルは、一見、THGPF 単独で測定したスペクトルと変わらないように見えるが、シグナルを拡大したところ、THGPF 単独のスペクトルには見られないブロードのシグナルが低磁場傍 (-68.8 ppm 付近) に観測された。THGPF-Gal 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトルと比較すると、錯体由来シグナルの出現する化学シフトが一致した。以上の結果より、THGPF と MUC2 との間での相互作用が推測された。

4-3. 考察

第 4 章では THGP の NMR レポーター分子として、カルボニル基に隣接した炭素に CF_3 基を導入した THGPF を合成し、 ^{19}F NMR による相互作用の評価法の検討を行った。その結果、THGPF の ^{19}F NMR スペクトルはシンプルな一本線のシグナルを観測

し、THGP 同様、糖のシスジオール構造と錯体を形成することを明らかにした。また、 ^1H NMR ではスペクトルが複雑であった糖との混合溶液においても、 ^{19}F NMR では THGPF のスペクトルのみが観測されるため、相互作用の評価が容易となった。以上のことから、 ^1H NMR では解析困難な化合物との相互作用の評価方法として、THGPF を用いた ^{19}F NMR による評価法は有用となる可能性が示された。

NMR 核種である ^{19}F は天然存在比 100% であり、 ^1H に次ぐ高感度な核種である [73]。加えて、生体成分にはフッ素は存在しないため、生体成分との相互作用の評価に ^{19}F NMR を用いた実験報告が多数存在する。例えば、ある種の糖にフッ素を導入し、糖と糖結合タンパク質との相互作用評価に ^{19}F NMR を用いた実験報告がある [74, 75]。Braitsch らの実験では、糖のフッ素誘導体と、糖結合タンパク質が相互作用すると、 ^{19}F NMR スペクトルに新たに、相互作用した糖由来のシグナルが出現することを確認し、アノマー (α , β) のシグナルの変化を観測することで、糖結合タンパク質のアノマー選択性を評価している [75]。本実験では、高分子量の糖タンパクである MUC2 と THGPF との相互作用を評価した。その結果、MUC2-THGPF 混合溶液のスペクトルで、THGPF 単独の測定時には見られない新たなシグナルが出現した。また、そのシグナルの化学シフトが、糖との錯体形成由来のシグナルの化学シフトと一致したことから、THGPF と MUC2 との錯体由来のシグナルである可能性が示唆された。一方、錯体由来と思われるシグナルは、スペクトルを拡大することではじめて確認できるほど小さなものであり、比較検討するデータも少ないことから、今回の ^{19}F NMR の結果だけでは MUC2 との相互作用を決定付けるのは難しい。そのため、例えばマスマスペクトルや蛍光相関分光法など、他の分析法を併用し、複合的に検討する必要があると思われる。また、THGP と相互作用しない構造の高分子化合物を用いた比較実験も課題として挙げられる。

栄養素の吸収部位である腸管の表面は、ムチンを含む粘液で覆われている [76]。本

実験の結果より、THGP は腸管の分泌型ムチンである MUC2 と相互作用する可能性が示唆された。しかしながら、MUC2 と相互作用することが THGP の吸収にどのような影響を与えているかは、現状のデータだけでは議論できない。Satchithanandam らは、食物繊維の摂取は小腸内ムチン量を増加させることを明らかにしている [76]。今後、食物繊維を摂取させた動物を用い、小腸内ムチン量と THGP の吸収との関係性を動物実験で明らかにしたいと考えている。

^1H NMR

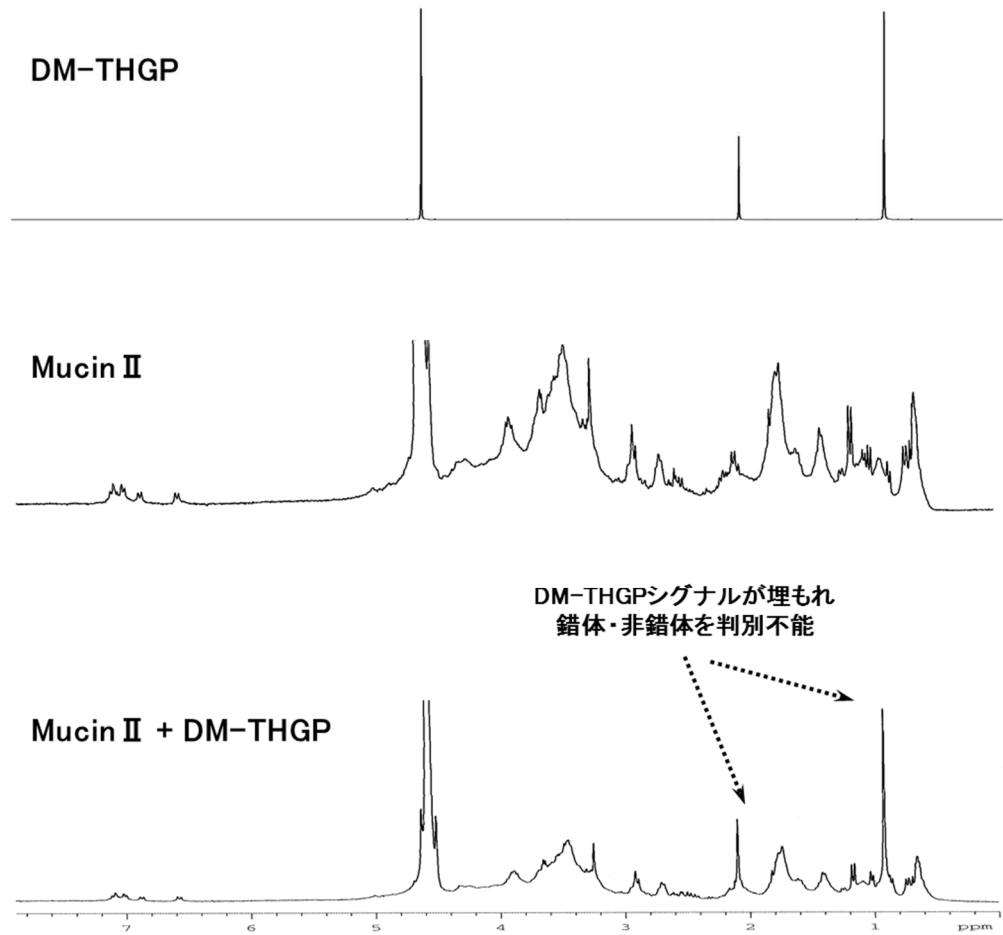


Fig. 4-1 DM-THGP を用いた ^1H NMR による MUC2 との
相互作用確認 (300 MHz, D_2O)

^{19}F NMR

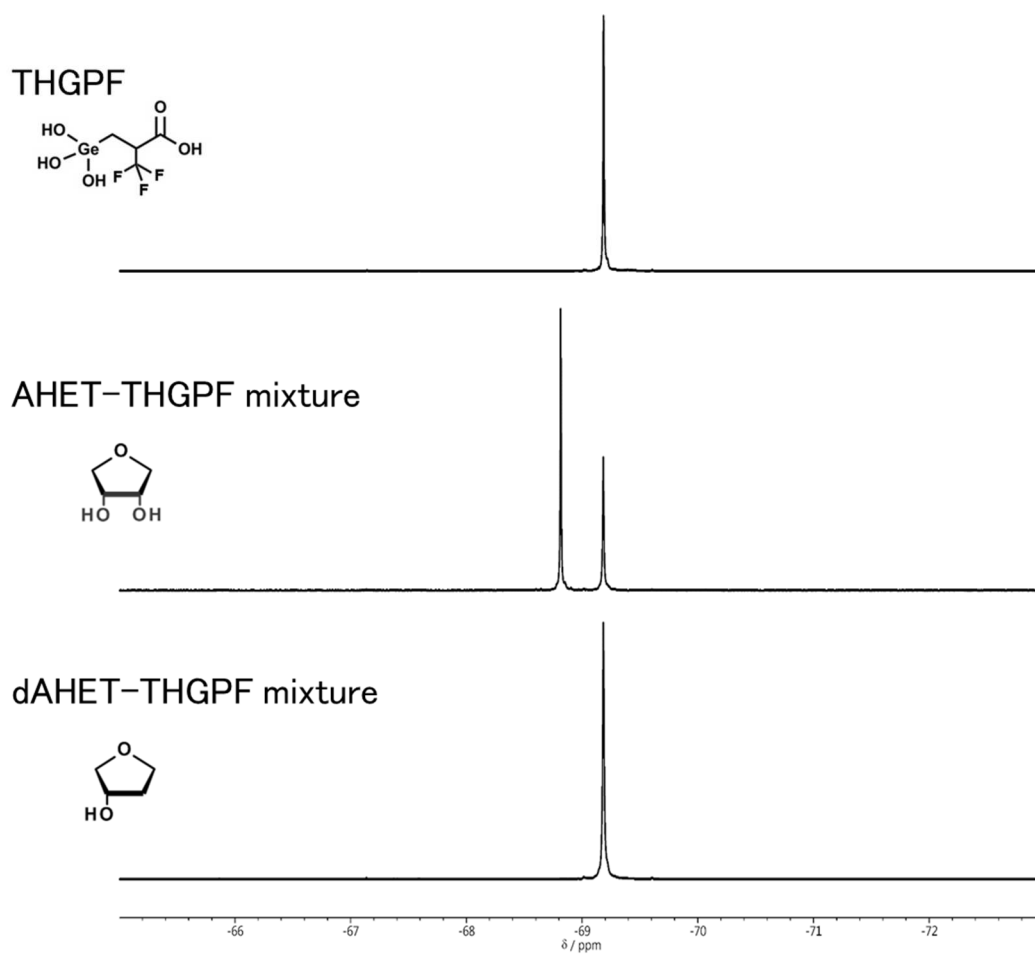


Fig. 4-2 THGPF, AHET-THGPF 混合溶液, および
dAHET-THGPF 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトル
(470 MHz, D_2O)

^{19}F NMR

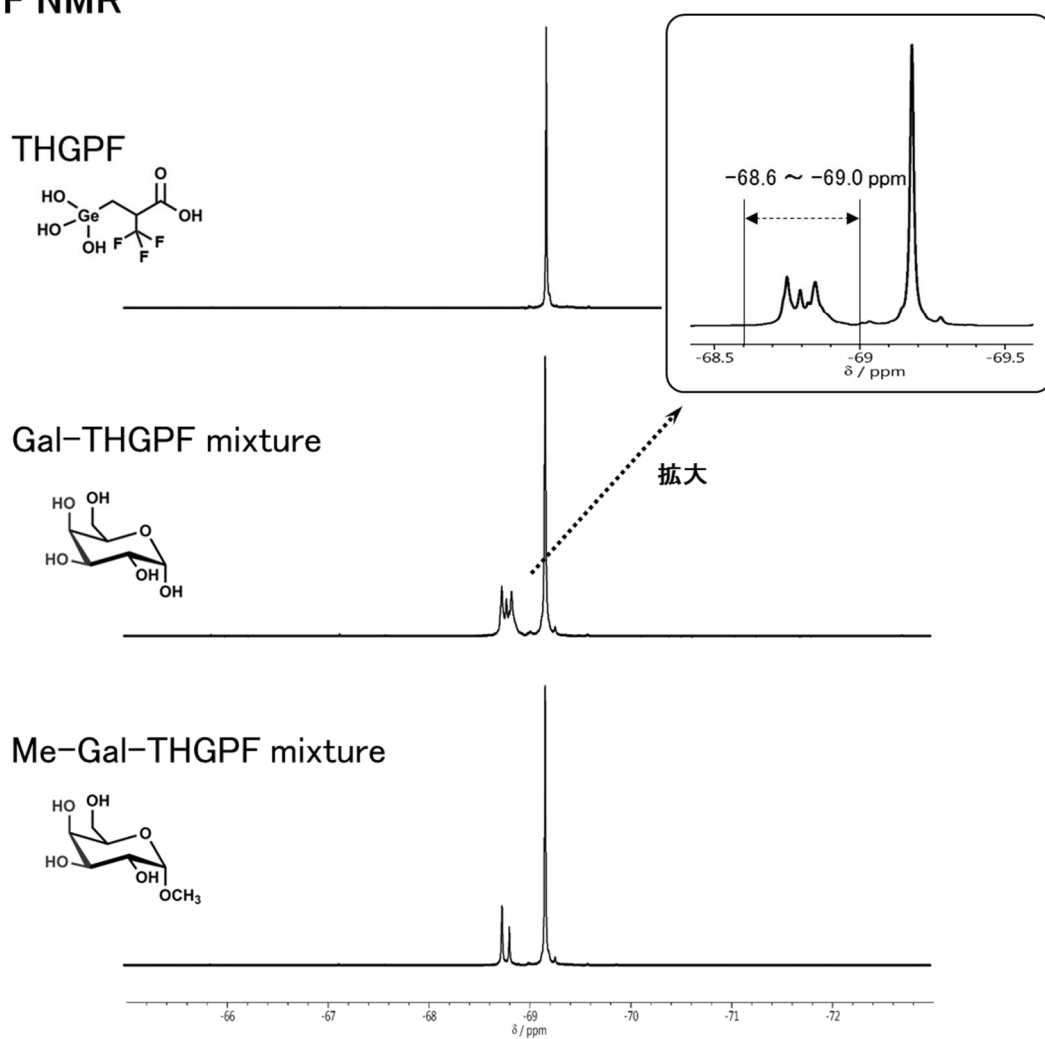


Fig. 4-3 THGPF, Gal-THGPF 混合溶液, および Me-Gal-THGPF 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトル (470 MHz, D_2O)

^{19}F NMR

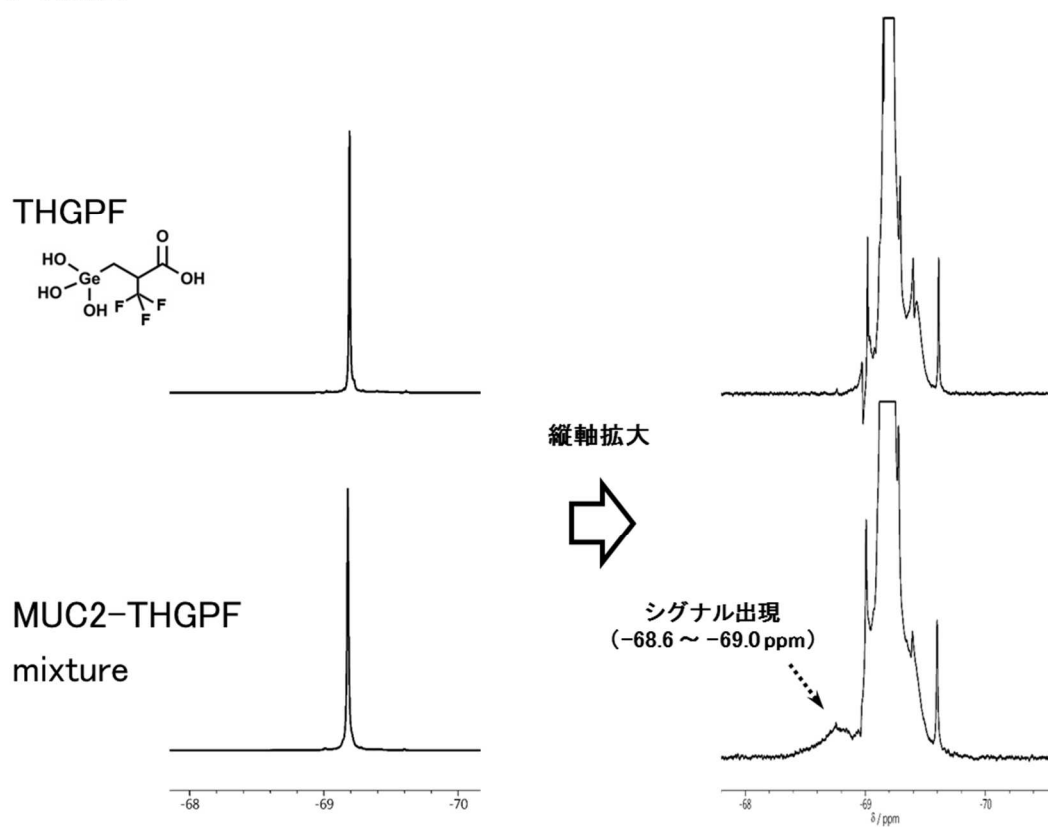


Fig. 4-4 THGPF, および MUC2-THGPF 混合溶液の ^{19}F NMR スペクトル (470 MHz, D_2O)

第5章 THGP と核酸成分との相互作用の定量的評価

ヌクレオシドは、リボースの1位にプリン塩基またはピリミジン塩基がグリコシド結合したものであり、RNAの構成成分でもある。ヌクレオシドのリボースにリン酸が結合したものをヌクレオチドと呼ぶ。ヌクレオチドは核酸の最小単位である。このようにヌクレオシドおよびヌクレオチドは、遺伝子の本体である核酸合成の前駆体として利用されるほか、エネルギーの放出や貯蔵、痛みのシグナル [77]や鎮痛作用 [78]を持つことなどが知られている。

本研究では第2章から第4章にかけて、 $^1\text{H NMR}$ を用いて糖類とTHGPとの相互作用について調査し、THGPが糖構造のシスジオール構造と錯体形成すること、ピラノース型(6員環)のシスジオール構造より、二面角の小さいフラノース型(5員環)のシスジオール構造との錯体形成が優位であることを明らかにしてきた。従って、5員環の糖構造であるリボース骨格を持つヌクレオシドやヌクレオチドといった核酸成分は、THGPと錯体形成する条件に合致している。

本章ではこれら生体にとって重要な役割を担うヌクレオシドおよびヌクレオチドとTHGPとの相互作用を定量・評価するために、 $^1\text{H NMR}$ を用いた錯体形成率の算出、および構造相関について調べた。

5-1. 実験方法

5-1-1. 試薬

本実験に使用した試薬の構造式を、Fig. 5-1に示す。アデノシン(Ado)、デオキシアデノシン(dAdo)は和光純薬工業から購入した。アデノシンモノ-、ジ-、トリ-リン酸(AMP、ADP、ATP)、グアノシン(Gua)、5メチルウリジン(m5U)、シチジン(Cyt)、

ウリジン (Uri)、および環状アデノシンモノリン酸 (cAMP) は東京化成工業から購入した。2'-デオキシアデノシン 5'-モノリン酸 (dAMP) はシグマアルドリッチから購入した。重水、重水酸化ナトリウム溶液はメルクから購入した。これら全ての試薬は、特級または NMR 分析用を用いた。Ge-132 は浅井ゲルマニウム研究所で製造されたものを使用した (Lot. 006316A)。実験には、Ge-132 を一度精製水に溶解し、水酸化ナトリウムで中和後、減圧濃縮および加熱乾燥して得た THGP (Na 塩) を使用した。

5-1-2. NMR 分析

各サンプルの ^1H NMR は Gemini 300 を用いて測定した。サンプルの pH は HM-25R を用いて調整した。サンプルは、まず THGP および核酸成分 (アデニンヌクレオチドまたはヌクレオシド) の混合モル比 1 : 1、各溶質終濃度 100 mM、pH 7.0 ~ 7.5 を調製した。100 mM 溶液を希釈して、10、20、40、60、80 mM の各溶液を調製した。溶媒は全て重水を用いた。測定温度を 30°C、積算回数を 16 回以上とし、 ^1H NMR を測定した。化学シフトの標準には、重水溶媒中の余剰の HOD (4.80 ppm) を内部標準に用いた。得られた ^1H NMR スペクトルにおいて、錯体および非錯体のシグナルを帰属した後、それぞれの積分値の比から錯体形成率を(1)式に、および解離定数を(2)式に従って算出した。

$$\text{錯体形成率 (\%)} = \frac{(I_c)}{(I_f + I_c)} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 I_c および I_f はそれぞれ、錯体由来シグナルの積分値および非錯体シグナルの積分値である。

$$\text{解離定数 } K_D = \frac{[M][L]}{[ML]} \quad (2)$$

ここで、[M]、[L]、および[ML]はそれぞれ THGP、核酸成分、および錯体のモル濃度である。

5-2. 結果

THGP と各核酸成分との相互作用は $^1\text{H NMR}$ を用いて評価した。まず最初に、THGP と AMP および AMP 誘導体との相互作用を確認した。THGP 溶液、AMP 溶液、THGP-AMP 混合溶液、THGP-dAMP 混合溶液、および THGP-cAMP 混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを Fig. 5-2 に示す。THGP の $^1\text{H NMR}$ スペクトルにおいて、1.5 ppm および 2.5 ppm にそれぞれトリプレットのシグナルを観測した。第 2 章でも示したとおり、これらのシグナルはそれぞれ、ゲルマニウム原子に隣接するメチレン基由来、およびカルボニル基に隣接するメチレン基由来のシグナルである。THGP-AMP 混合溶液の $^1\text{H NMR}$ を測定した結果、THGP シグナルの低磁場側に、THGP および AMP 単独のスペクトルには見られない新たなシグナル (1.7、2.6 ppm) を観測した (Fig. 5-2 A ~ C)。これは、THGP-AMP 間の錯体に起因するシグナルである。一方で、THGP-dAMP 混合溶液、および THGP-cAMP 混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルには、錯体由来のシグナルは現れなかった (Fig. 5-2 D, E)。構造を比較すると、AMP はシスジオール構造を有するが、dAMP および cAMP はジオール構造を有していない。以上の事から、THGP と核酸成分はリン酸基や塩基ではなく、リボースのシスジオール部位でのみ錯体形成することが示された。

THGP-AMP 混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルでは、THGP 側だけでなく、AMP 側の

シグナルの傍にも錯体由来の新たなシグナル (4.3、4.6、6.0、8.2 および 8.5 ppm) を観測した (Fig. 5-2 C)。6.2 ppm のダブルットのシグナルは、AMP の C1'プロトンに由来するシグナルである。THGP との混合溶液では 6.2 ppm シグナルのやや高磁場側 (5.9 ~ 6.1 ppm) に、新たなブロードニングのシグナルが観測された。この新たなシグナルは、THGP-AMP 錯体に由来する C1'プロトンのシグナルである。加えて、他のアデニンヌクレオチドを用いた測定においても、錯体に由来する C1'プロトンが、ほぼ同じ位置に現れた。そこで、錯体および非錯体の C1'プロトンシグナルの積分比から、錯体形成率を算出した。THGP と Ado およびアデニンヌクレオチドとの各濃度混合溶液の ^1H NMR スペクトルから求めた錯体形成率を Fig. 5-3 に示す。縦軸は錯体形成率を示し、横軸は THGP および各配位子 (Ado およびアデニンヌクレオチド) 濃度を対数表示で示している。まず、THGP は dAdo、dAMP および cAMP とは錯体を形成しなかった。先述の通り、THGP はシスジオール部位でのみ錯体を形成するため、シスジオール構造を持たないこれらの化合物とは錯体を形成することはなかった。

THGP と Ado およびアデニンヌクレオチドの混合溶液では、錯体形成由来の C1'プロトンのシグナルを観測し、錯体形成率を求めることが出来た。まず、どの化合物も希釈とともに錯体形成率が減少するのが見られた。このことから、これらの化合物との錯体形成は強固な結合ではなく、水中で可逆的な相互作用であることが示された。また、グラフより、錯体形成率の高さが Ado > AMP > ADP > ATP の順になっていることが判明した。この並びは構造中のリン酸基の数に応じた順番であった。つまり、THGP と Ado およびアデニンヌクレオチドとの相互作用は、リン酸基の数が増加すると錯体形成率が減少することが示唆された。

グラフの横軸 (濃度) を対数表示にしたことで、直線性のあるグラフが得られた。近似直線を求めた結果、Ado では約 2 mM、ATP では約 10 mM のところで横軸と交点を結んだ。また、Ado、AMP、ADP および ATP との解離定数 K_D を求めた結果、それ

ぞれ 29、51、70 および 91 mM であった (Table 5-1)。

THGP と各ヌクレオシド (Ado、Gua、m5U、Uri、Cyt) との混合溶液を $^1\text{H NMR}$ で測定した結果、ヌクレオチドを用いた先の実験結果同様、シグナルのブロードニングや原料のシグナルの近傍に新たなシグナルを観測した。各混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルの 6 ppm 付近に、ダブルットのシグナルが見られる。これは各ヌクレオシドの非錯体の C1'プロトンに由来するシグナルである。THGP と混合することで、非錯体の C1'プロトンシグナルのやや高磁場側に錯体に由来する新たなシグナルが出現した。一方、Uri および Cyt を用いた場合、塩基の C5 プロトンのシグナルが 6 ppm 近傍に現れるため、C1'プロトンシグナルと重なってしまい、錯体形成率を求める事は困難であった (Fig. 5-4)。したがって、Uri および Cyt との混合溶液の場合、塩基の C6 プロトン由来の錯体・非錯体シグナル (非錯体 : 7.9 ppm (ダブルット)、錯体 : 7.8 ppm (ダブルット)) から錯体形成率を求めた。各ヌクレオシド混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルから算出した錯体形成率を Fig. 5-5 に示す。縦軸は錯体形成率を示し、横軸は THGP および各ヌクレオシド濃度を対数表示で示している。Gua との混合溶液は難溶であったため、混合モル比 1:1 条件下での錯体形成率を求める事は出来なかった。THGP-Gua 混合溶液の上澄み液を $^1\text{H NMR}$ で測定した結果、Gua 単独では見られない、錯体由来の新たなシグナルを観測した。したがって、THGP は Gua と錯体形成可能であることが示された。また、この時の THGP および Gua の濃度は、 $^1\text{H NMR}$ のシグナルの積分比より、10 mM および 9 mM であると推定された。他のヌクレオシドを用いた結果、錯体形成率を求めることが出来た。グラフの横軸 (濃度) を対数表示することで、直線性のあるグラフを得た。近似直線を求めた結果、ヌクレオシドの違いで大きな差は見られず、全ての近似直線が約 2 mM のところで横軸と交点を結ぶのを確認した。各ヌクレオシドとの解離定数 K_D は全て 25 ± 5 mM であった。

5-3. 考察

第5章では、THGPと核酸成分との相互作用を¹H NMRを用いて測定した。その結果、THGPとの錯体はリン酸基でも、塩基でもなくシスジオール部位で形成されることを確認した。

AdoおよびATPとTHGP間の解離定数 K_D はそれぞれ29および91 mMであり、リン酸基が増えることで錯体形成率が減少することを示した。一方、塩基の異なるヌクレオシドとTHGP間の解離定数 K_D は 25 ± 5 mM程度であり、アデニンヌクレオチドと比較し、顕著な差は見られなかった。ゲルマニウムと類似の反応性を示すことが知られているボロン酸でも、ヌクレオチドのシスジオール部位との相互作用について研究が行われている。Kimらは、エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)を用いて、ヌクレオチドのリン酸基と錯体形成との関係性を報告した[79]。その結果、ヌクレオチドのリン酸基の数が増えることでボロン酸錯体の相対的存在量が反比例する(AMP > ADP > ATP)ことを実証した。一方、リン酸基の数と同じヌクレオチド同士であれば、存在量に違いは見られなかった(AMP \approx GMP \approx CMP \approx UMP)。これらボロン酸での結果は、本実験の結果と一致している。

ヌクレオチドのリン酸基が増えることで与えるTHGPとの錯体形成への影響として、2点考えられる。1点目は電荷による反発である。リン酸基は中性条件では負電荷を持つ。一方、THGPはジオールと錯体形成する際、Fig. 5-6に示すとおりラクトン構造を取ることが知られており[80]、ゲルマニウムは5配位となるため負電荷を持つ。そのため、これらの電荷同士の反発が起こることが予想され、リン酸基が増えることで反発は強まり、錯体形成に負の影響を与えると考えられる(Fig. 5-6A)。2点目はジオールの二面角である。ヌクレオチドのリン酸基と塩基は立体的に干渉する可能性があり、リン酸基が増えるほどその影響は増すことが予想される。それによりリボースに歪みが生じ、結果として二面角に影響を与えることが考えられる(Fig. 5-6B)。THGPとヌ

クレオシドとの錯体形成率で、若干ではあるが Ado より他のヌクレオシドの方が高い値を示したのは、塩基の違いによるジオール二面角への影響によるものかもしれない。

ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、生体にとって重要な役割を担うシスジオール構造を有する化合物である。例えば、ATP は生命維持に欠かせないエネルギー通貨として知られているほか、細胞外 ATP は痛みのシグナル物質として知られている [77]。また、ATP の代謝物である Ado は鎮痛作用を持つことが知られている [78]。

本実験において、THGP と Ado およびアデニンヌクレオチドとの相互作用を確認した結果、THGP は、ATP から Ado にかけての代謝系の全ての産物と錯体を形成することが示された。この結果は、ヌクレオチドの代謝系において THGP が多点で働く可能性があることを示している。Ge-132 の持つ生理作用の一つとして、鎮痛効果が報告されている [40, 50]。THGP がアデニンヌクレオチドの代謝過程において多点で錯体形成することで、細胞外 Ado の代謝抑制を介した鎮痛作用や、細胞外 ATP の受容体認識抑制による痛みのシグナル伝達の緩和など、複合的に働くことが考えられる。Ge-132 の鎮痛作用の要因はこの複合的な働きの結果によるものかもしれない。

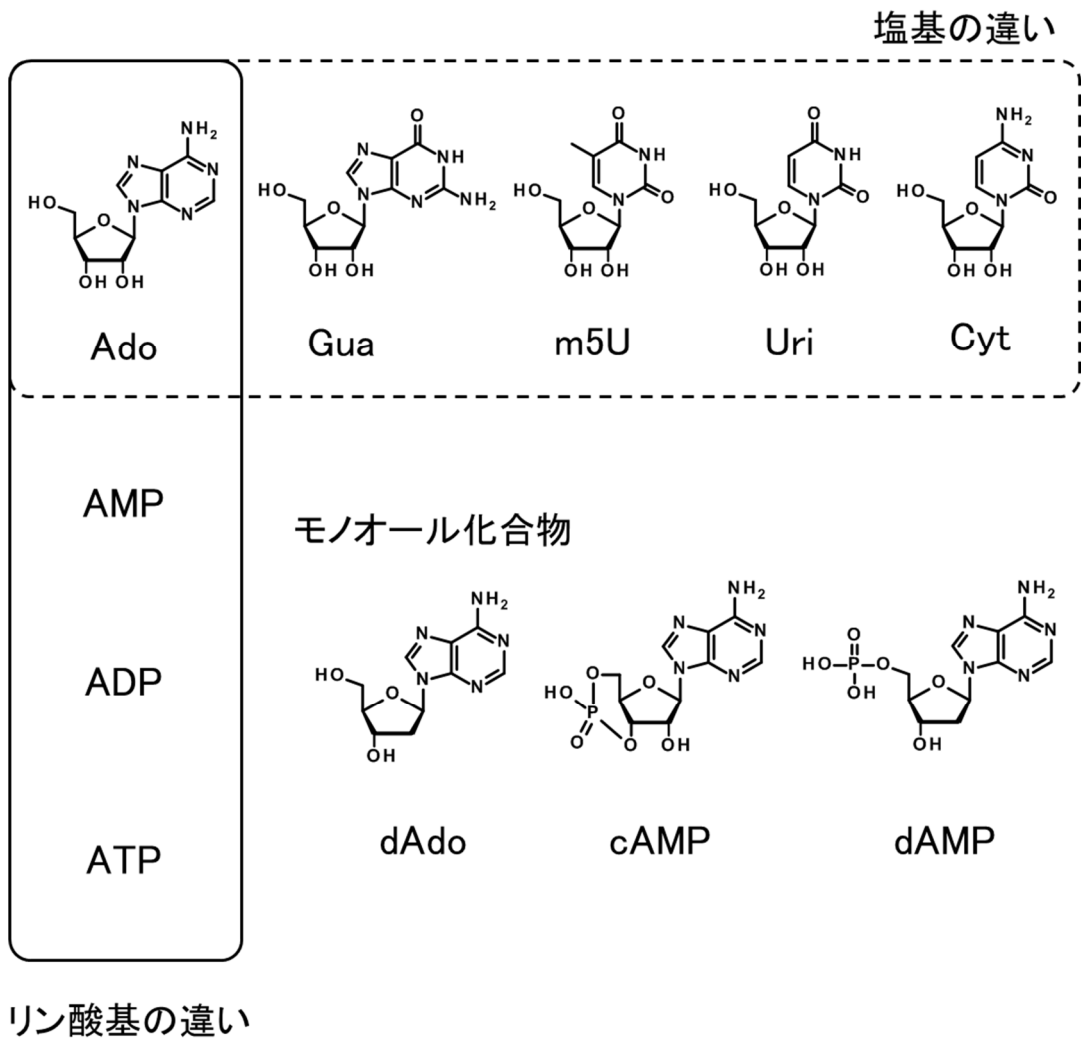


Fig. 5-1 使用した化合物一覧

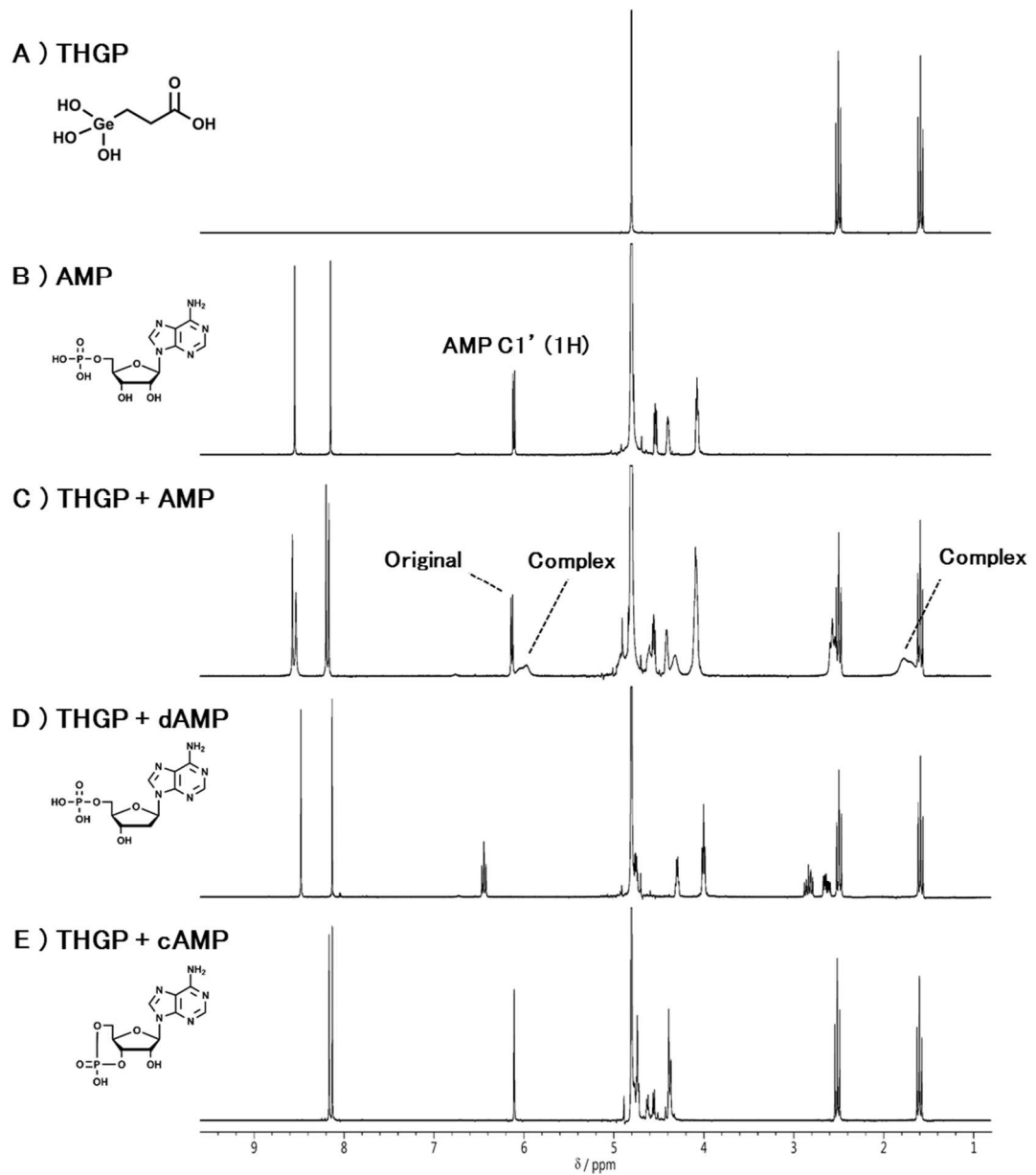


Fig. 5-2 THGP, AMP および AMP 誘導体との混合溶液の ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

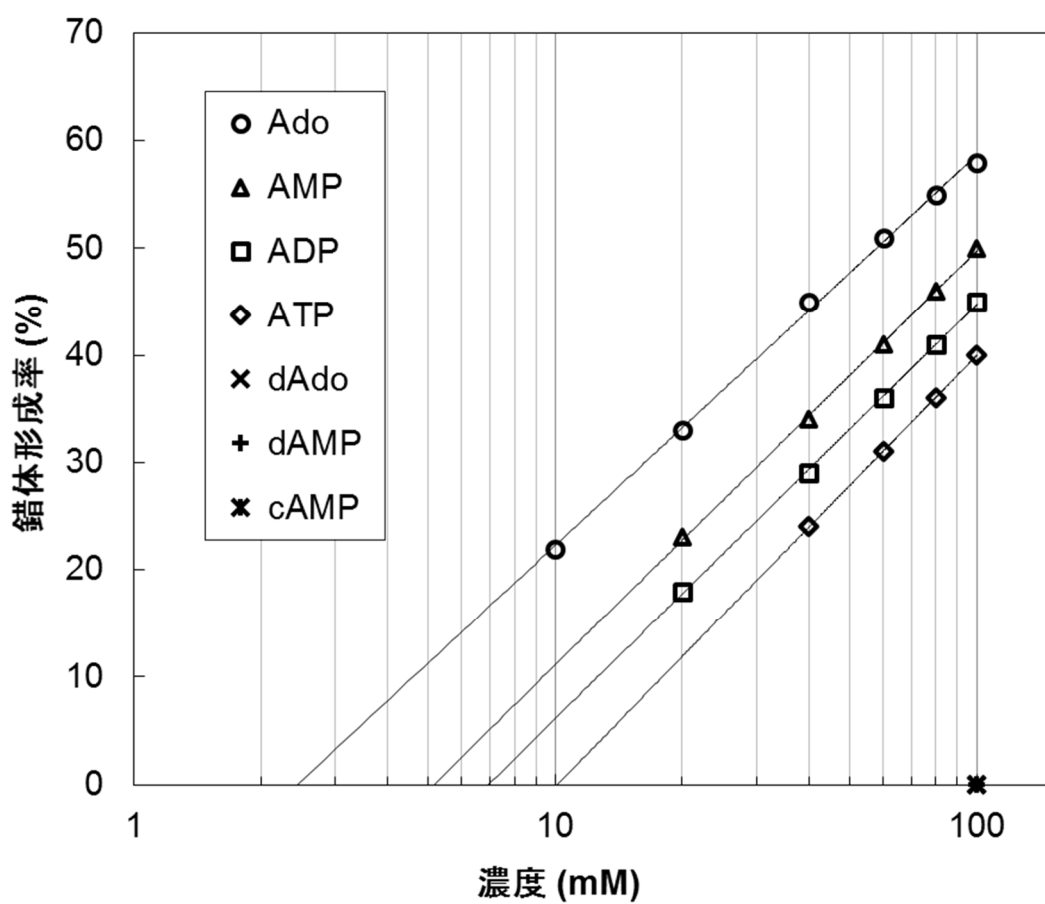
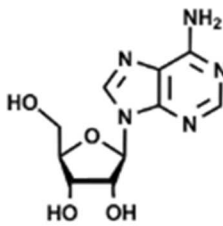
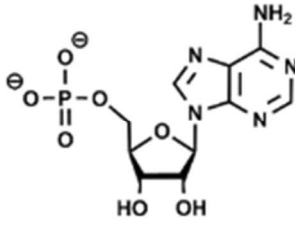
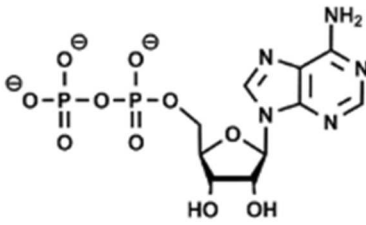
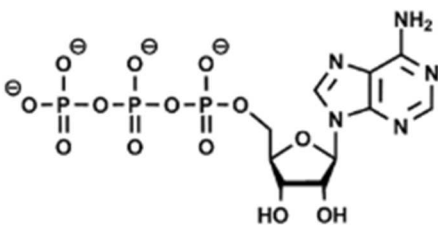
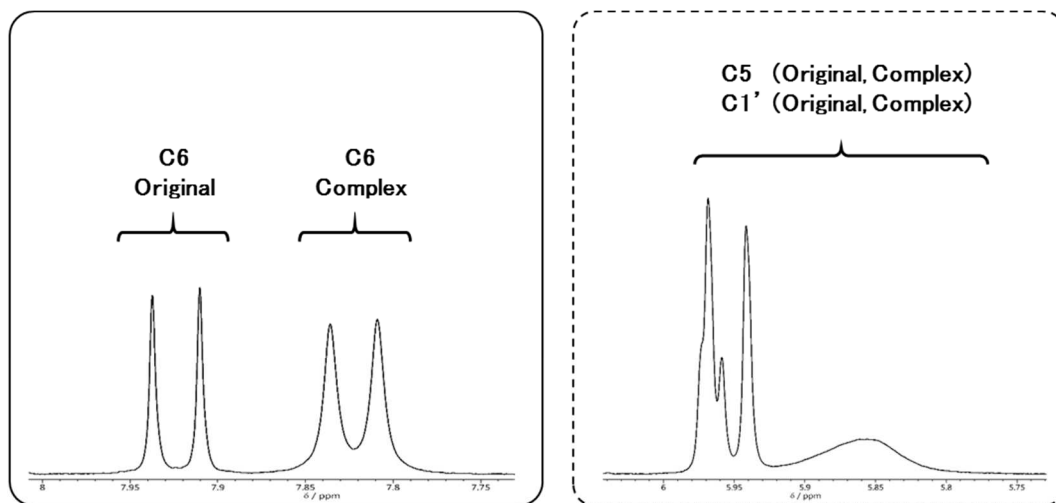


Fig. 5-3 各混合溶液の錯体形成率

Table. 5-1 アデノシン, アデノシンヌクレオチドの構造と
解離定数 K_D

Name	Structure	K_D (mM)
Ado		29
AMP		51
ADP		70
ATP		91



THGP + Uri

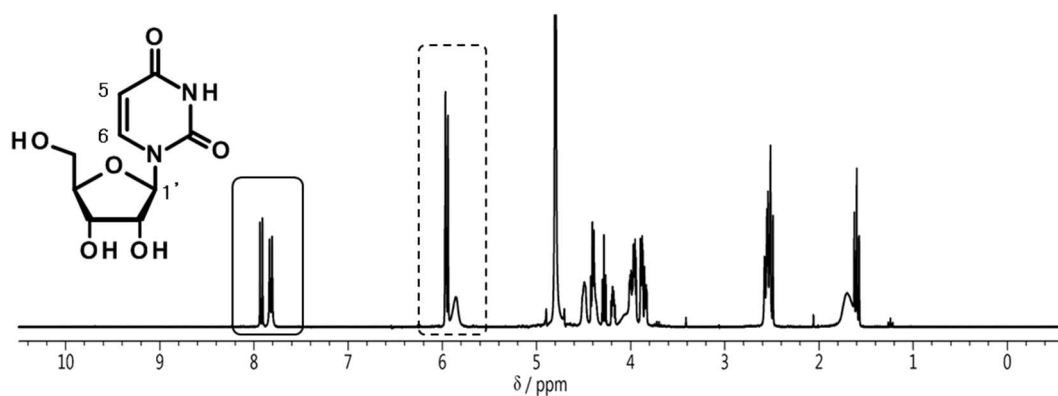


Fig. 5-4 THGP-Uri 混合溶液の ^1H NMR スペクトル
(300 MHz, D_2O)

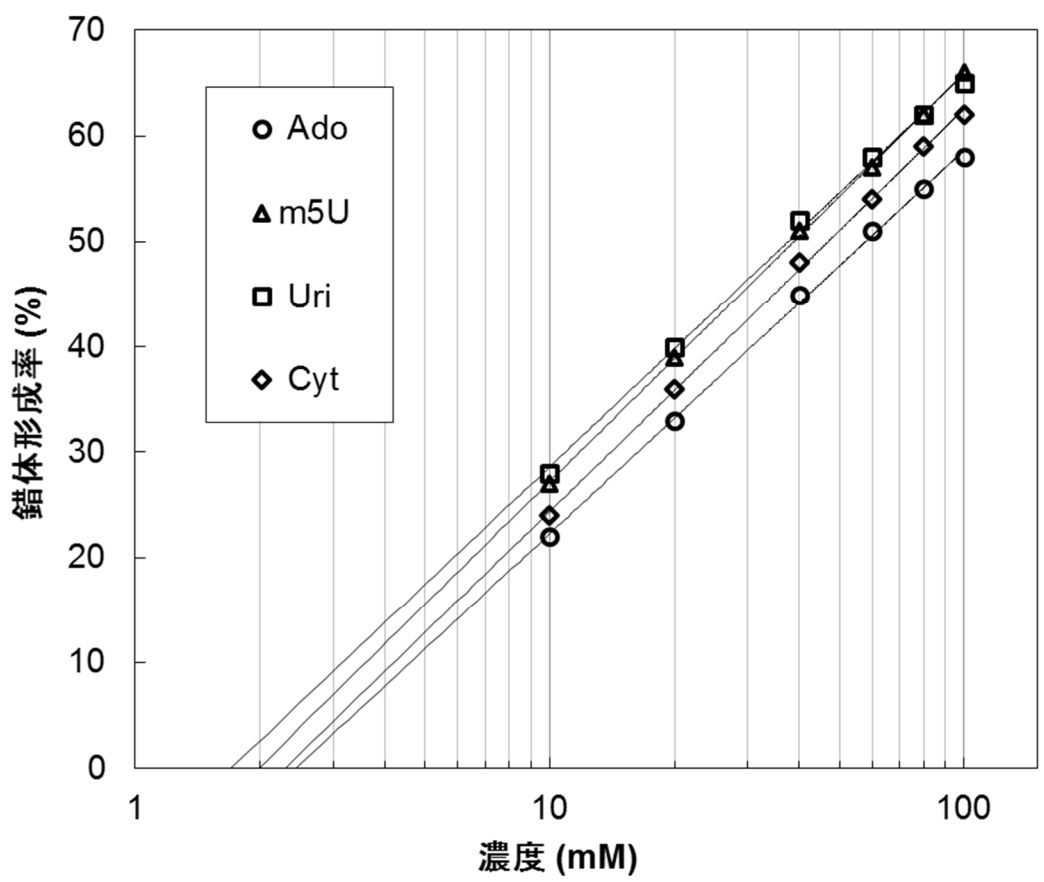


Fig. 5-5 各ヌクレオシドとの錯体形成率

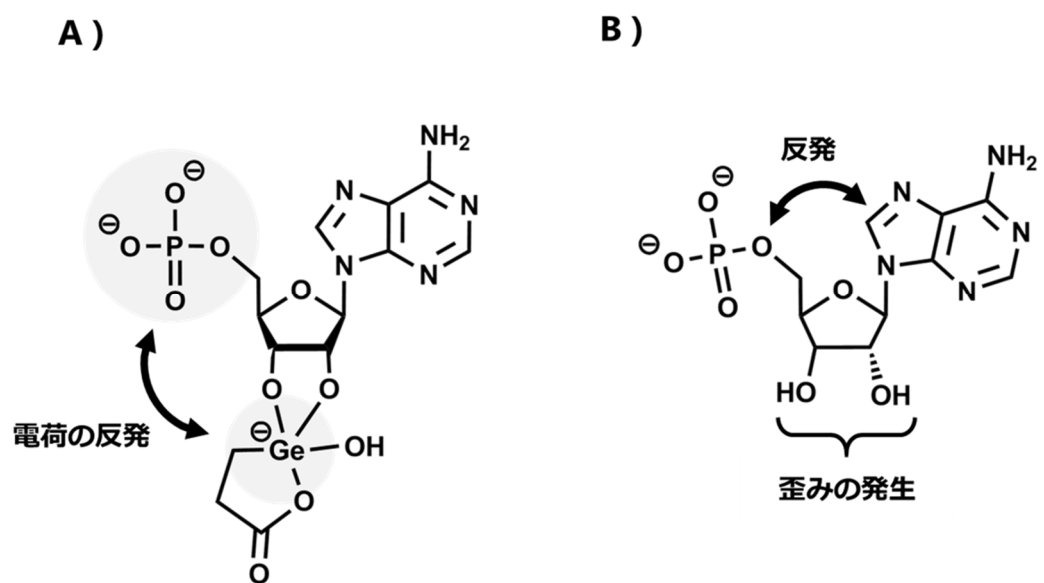


Fig. 5-6 予想されるリン酸基の数と錯体形成率の関係

第6章 アデノシンデアミナーゼの酵素反応に対する THGP の影響

有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 は、水に溶解することでモノマーである THGP を生成する。また、THGP は水溶液中で、生体にとって重要な役割を担う生体物質のシスジオール部位を介して錯体を形成することが本研究で明らかとなった。一方、THGP が生体成分と錯体を形成することで、生体内の反応系に対しどのような影響を与えるかはまだ調べられていない。そこで、THGP による生体への影響を理解するために、酵素反応に及ぼす影響を検討した。

タンパク質である酵素は、複雑な形状や性質を有する表面にうまく合致する基質に対してのみ、その酵素特有の反応を触媒する [81]。プリン体分解や再利用に関わる酵素の一つにアデノシンデアミナーゼ (ADA) がある。ADA はアデノシン (Ado) やデオキシアデノシン (dAdo) を脱アミノ化し、それぞれイノシン (Ino) やデオキシイノシン (dIno) へと不可逆変換する働きを持つ。また、ADA は人のほぼ全ての組織に分布しており、免疫系の維持に重要な役割を果たしている。先天的に ADA を欠損していると、リンパ球の分化および成熟障害により重症複合免疫不全症となることが知られている [82]。一方で、Ado の抗炎症や免疫抑制作用が知られており、Ado を分解する ADA の酵素阻害剤に関する研究が盛んに行われている。これまでに、ペントスタチンや Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) など多くの ADA 阻害剤が報告されているが、代謝安定性や重篤な毒性などの問題があり、現在、ペントスタチンのみが抗悪性腫瘍剤として臨床に用いられている [83]。

酵素反応は、酵素の活性部位に基質が結合することで反応が進む。ADA 阻害剤の多くはプリンヌクレオシドまたはアルキルアデニン類縁体であり、ADA の活性部位に結合することで Ado や dAdo などの基質が反応できずに、酵素反応が阻害される。一方、THGP は ADA の基質である Ado と錯体を形成することが先の実験で実証されている。

THGP が Ado と錯体を形成することで、ADA 酵素が基質である Ado を認識できなくなるのが予想される。加えて、THGP はシスジオール構造を持たない dAdo とは錯体を形成せずにこれを基質として認識して反応を行い、Ado を基質とした酵素反応のみを選択的に抑制することが考えられる。本章では Ado と dAdo それぞれを基質とした ADA 酵素の反応に対する THGP 添加の影響を比較検討した。

6-1. 実験方法

6-1-1. 試薬

Ado および dAdo は和光純薬工業から購入した。これらの試薬は特級を用いた。ADA (EC 3.5.4.4, 5 mg/mL、比活性 200 U/mg) はロシュ・ライフサイエンスから購入した。リン酸緩衝液はリン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素ナトリウム（ともに和光純薬工業）を用いて調製した。Ge-132 は浅井ゲルマニウム研究所で製造されたものを使用した (Lot. 006316A)。実験には、Ge-132 を一度精製水に溶解し、水酸化ナトリウムで中和後、減圧濃縮および加熱乾燥して得た THGP (Na 塩) を使用した。

6-1-2. 酵素活性の測定

ADA 活性の測定は紫外可視吸光度測定法により行った。紫外可視分光光度計 UV-2450 (島津製作所) を用い、Ado から Ino、dAdo から dIno に代謝された際の 265 nm の吸光度の減少を測定した (Fig. 6-1)。本実験での Ado および dAdo のミリモル吸光係数は、それぞれ 8.1 および 8.33 を使用した [84, 85]。測定温度は 25°C とし、THGP 溶液 280 μ L、基質 (Ado または dAdo) 溶液 280 μ L、および 0.1 U/mL ADA 溶液 40 μ L の混合溶液 600 μ L を試料溶液として測定した。THGP 溶液および基質溶液は、終濃度が

それぞれ 0 ~ 100 mM および 7.5 ~ 50 μ M になるよう調製した。ADA を添加してから 1 分間の吸光度を測定し、初期反応速度を求めた。その後、酵素 1 mg あたりの反応速度を求め、ミカエリス・メンテンプロット、およびラインウェーバー・バークプロットにより Ado と dAdo の反応性を比較した。ミカエリス定数 K_m 、および最大反応速度 V_{max} はラインウェーバー・バークプロットの傾きおよび y 切片から求めた。

6-2. 結果

まず、THGP の添加による各 Ado 基質濃度における脱アミノ化反応速度への影響を調べた。酵素実験は一般的な酵素活性試験の手順 [86] に従って行い、7.5 ~ 50 μ M の Ado 濃度に対して試験を行った。試験結果を、横軸に基質濃度、縦軸に反応速度を取りプロットした結果、シンプルなミカエリス・メンテン式のプロットが得られた (Fig. 6-2)。

横軸に基質濃度の逆数、縦軸に反応速度の逆数を取るプロットをラインウェーバー・バークプロットと呼び、y 切片に $1/V_{max}$ 、傾きに K_m/V_{max} を持つ直線が得られる。Fig. 6-2 のデータを元に引いたラインウェーバー・バークプロットを Fig. 6-3A に示す。これらのグラフより、THGP 濃度が濃くなるに連れ、Ado-ADA 間の反応速度が遅くなっているのが見られる。つまり、Ado-ADA 酵素反応に対し、THGP は濃度依存的に Ado の脱アミノ化反応を抑制することが示された。ラインウェーバー・バークプロットから得られた THGP 濃度 0 mM および 100 mM における K_m 値は、それぞれ 16 および 41 μ M、 V_{max} はそれぞれ 139 および 79 μ M/min であった。

Ado-ADA 酵素実験と同様、7.5 ~ 50 μ M の dAdo 濃度に対して試験を行った。横軸に dAdo 濃度の逆数、縦軸に反応速度の逆数を取ったラインウェーバー・バークプロットを Fig. 6-3B に示す。基質として dAdo を用いた場合、THGP 濃度を変えても大きな変

化は観測されなかった。ラインウェーバー・バークプロットから得られたミカエリス定数 K_m 、および最大反応速度 V_{max} は、全ての THGP 濃度においてそれぞれ約 $9 \mu\text{M}$ および $135 \pm 10 \mu\text{M}/\text{min}$ の範囲であった。従って、THGP は dAdo の脱アミノ化反応に対し、ほぼ影響を与えなかった。

6-3. 考察

第 5 章の結果より、THGP はシスジオール構造を有する Ado と錯体を形成し、デオキシ体の dAdo とは錯体を形成しないことが示されている。本章では、Ado または dAdo と ADA との酵素反応に及ぼす THGP 添加による影響が確認され、基質が Ado の時のみ、THGP 濃度依存的に反応抑制効果を示した。酵素の作用機構モデルの一つに、『鍵と鍵穴モデル』がある。これは、ちょうど鍵穴（酵素）に合致する鍵（基質）だけが反応するという考え方である [87]。THGP が Ado の酵素反応を抑制した理由として、Ado のシスジオール構造と錯体を形成することで基質の立体構造が変化し、酵素の活性部位に合致しなくなったと予想される。同様に、基質に作用することで酵素反応を抑制する例として、ボロン酸誘導体によるロイシン tRNA 合成酵素阻害が報告されている [88]。これはボロン酸誘導体が、tRNA の 3'末端リボースのシスジオール構造と錯体を形成することで起きる酵素阻害であり、THGP の酵素反応抑制機構と類似している。

Ado の生理作用として、抗炎症 [89]、鎮痛効果 [78]などが報告されている。しかし、Ado を外から投与しても生体内ですぐに分解されてしまうため、Ado の分解抑制研究が盛んに行われている [90]。これまで報告されている ADA 阻害剤の多くがヌクレオシド類縁体である [90]。これらヌクレオシド類縁体を用いて ADA を阻害すると、Ado の代謝のみならず、dAdo の代謝も阻害される。例えば、成人 T 細胞白血病リンパ腫や

ヘアリーセル白血病の薬剤として利用されている ADA 阻害剤のペントスタチンは、抗腫瘍効果を有する dAdo などの Ado 誘導体の濃度増加を目的とした ADA 阻害剤である [91]。しかし、ADA を阻害すると、増加した dAdo は体内に蓄積され、リン酸化されて dATP となる。細胞内の dATP 濃度の増加は、DNA 合成阻害をもたらすことが報告されている [92, 93]。一方、本実験により THGP は、ADA に対して Ado の分解を抑制するが dAdo の分解には影響を与えないことが明らかとなった。注目すべきは、THGP の Ado 分解抑制効果は、従来の阻害剤のように酵素側を阻害する方法ではなく、基質である Ado に働きかける方法で得られている点である。THGP と相互作用しない dAdo から dIno への代謝は阻害しないため、Ado 分解抑制を目的とした、従来の ADA 阻害薬の問題点である dAdo の蓄積が起こらない。今後は、Ge-132 と併用することで、既存の ADA 阻害剤の使用量を低減し、副作用を少なくするための研究へと進めたい。

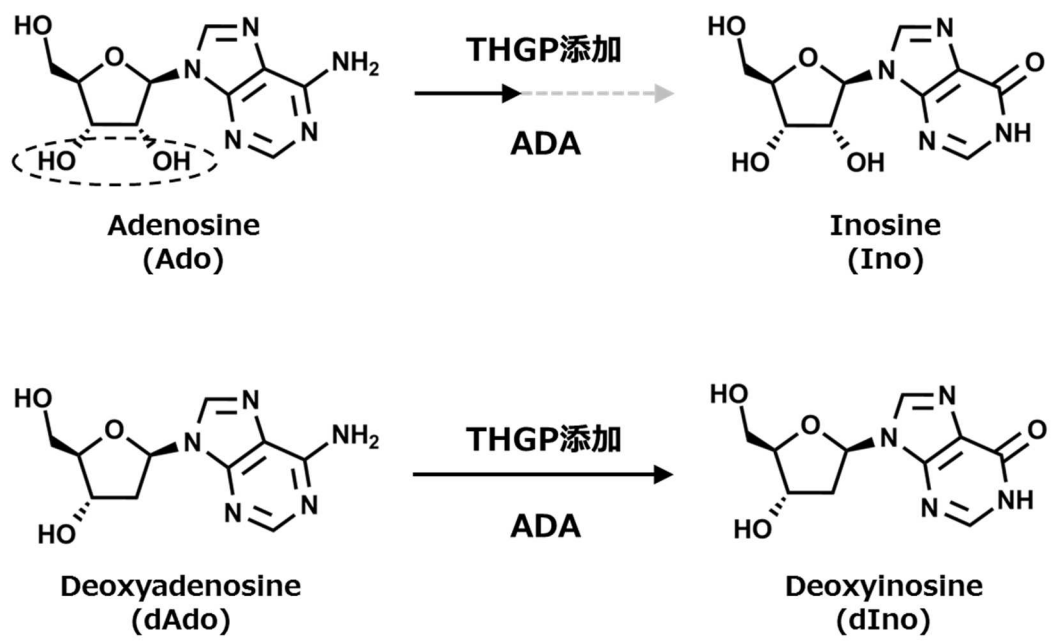


Fig. 6-1 ADA 酵素反応スキームと THGP 添加による影響予想

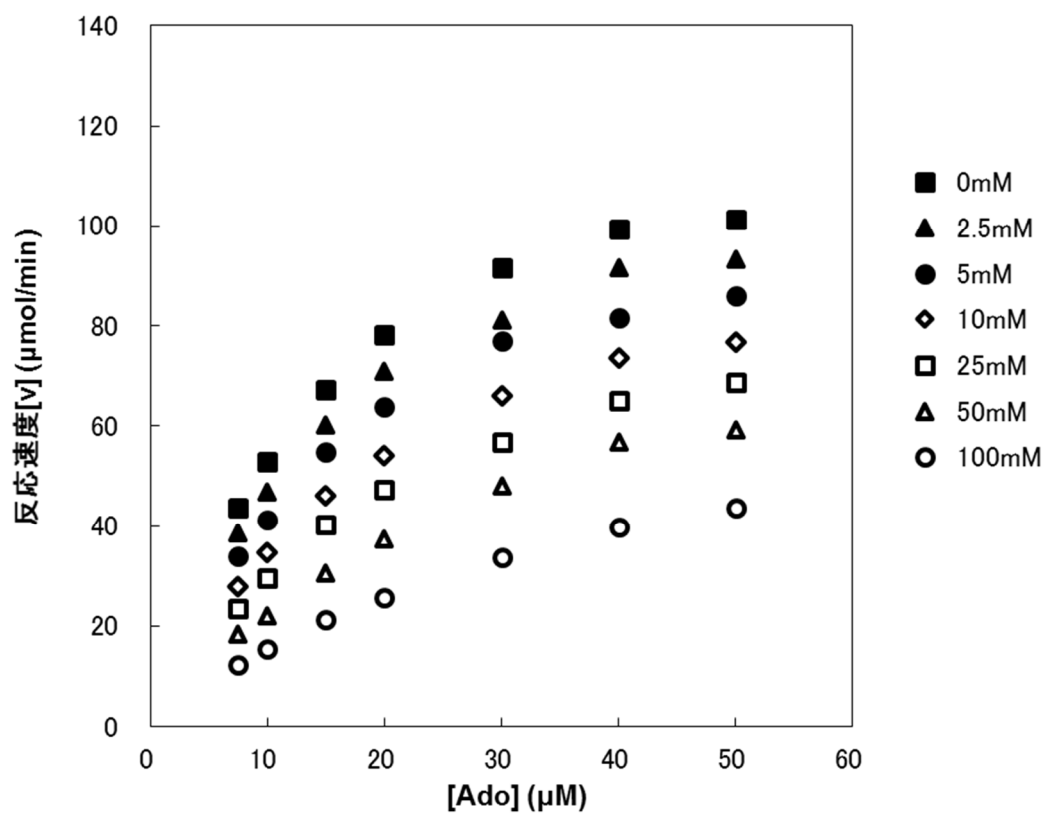


Fig. 6-2 各 THGP 濃度における Michaelis-Menten プロット

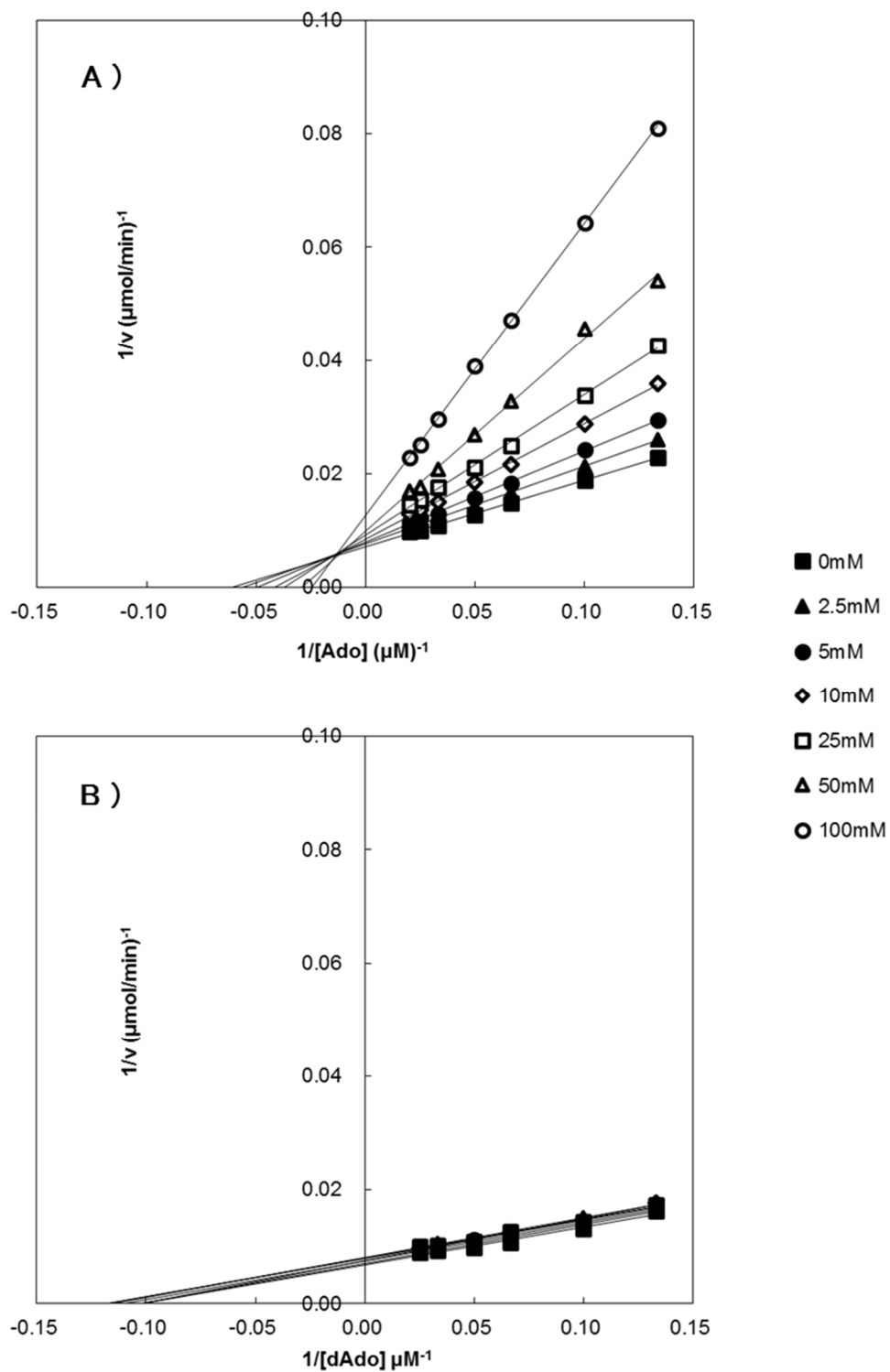


Fig. 6-3 Ado(A)および dAdo(B)の酵素反応における Lineweaver-Burk プロット

第7章 THGP とカテコールアミンとの相互作用の定量的評価

生体内には数多くのジオール化合物が存在し、それぞれ生体にとって非常に重要な役割を担っている。カテコールアミンも、数多くの生理作用が報告されている生体内ジオール化合物のひとつである。カテコールアミンとは、カテコール骨格を有する生体アミンの総称である。中でも、チロシンを前駆物質として生合成される L-ドーパ、ドーパミン、ノルアドレナリン、およびアドレナリンはホルモンや神経伝達物質として機能する (Fig. 7-1)。その他に、L-ドーパはメラニン合成の中間体として知られている [94]。メラニンとは、紫外線から皮膚を守る防御因子として重要な役割を担う色素である。一方で、メラニンはシミ、そばかす、黒ずみの原因となることが知られている。生体内におけるメラニンの生成は、まず、血中から供給されたチロシンが、酸化酵素であるチロシナーゼにより L-ドーパへ代謝される。さらに、L-ドーパもチロシナーゼにより酸化されてドーパキノンになり、その後酸化、重合反応が進むとメラニン色素となる。メラニン合成の阻害物質として、例えばグルタチオンが報告されており、基質である L-ドーパと相互作用することで、チロシナーゼとの酵素反応を阻害していることが明らかにされている [94]。メラニン合成の中間体である L-ドーパはジオール構造を持つため、THGP と相互作用することが予想される。第 6 章で示した酵素実験と同様に、THGP が基質である L-ドーパと相互作用することが出来れば、チロシナーゼによる酵素反応を抑制し、メラニン産生の抑制効果を示す可能性が考えられる。

これまでに糖類や核酸成分を用いて、ジオール部位に対する THGP の反応性について調べてきた。その結果、THGP は二面角の狭いシスジオール構造を持つ化合物ほど優位に錯体を形成することが示された。カテコールアミンは平面構造を取るベンゼン環上にジオールを有することから、二面角が狭くなり THGP と強く錯体を形成することが予想される。本章では生体にとって重要な役割を担うカテコールアミンと THGP

との錯体形成率を $^1\text{H NMR}$ を用いて算出し、その相互作用性を評価した。

7-1. 実験方法

7-1-1. 試薬

チロシン、L-ドーパ、ドーパミン、ノルアドレナリンおよびアドレナリンは和光純薬工業から購入した。重水、重水酸化ナトリウム溶液はメルクから購入した。これら全ての試薬は特級または NMR 分析用を用いた。Ge-132 は浅井ゲルマニウム研究所で製造されたものを使用した (Lot. 006316A)。実験には、Ge-132 を一度精製水に溶解し、水酸化ナトリウムで中和後、減圧濃縮および加熱乾燥して得た THGP (Na 塩) を使用した。

7-1-2. NMR 分析

各サンプルの $^1\text{H NMR}$ は Gemini 300 を用いて測定した。サンプルの pH は HM-25R を用いて調整した。サンプルは、まず THGP および各カテコールアミンの混合モル比 1 : 1、各溶質終濃度 100 mM、pH 7.0 ~ 7.5 を調製した。100 mM 溶液を順次希釈し、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50 mM の各溶液を調製した。溶媒は全て重水を用いた。測定温度を 25°C、積算回数を 16 回以上とし、 $^1\text{H NMR}$ を測定した。化学シフトの標準には、重水溶媒中の余剰の HOD (4.80 ppm) を内部標準に用いた。10 mM 以下の測定では S/N 比の向上を目的とし、HOD シグナルのホモデカップリングを行った。得られた $^1\text{H NMR}$ スペクトルにおいて、錯体および非錯体のシグナルを帰属した後、それぞれの積分値の比から錯体形成率を(1)式に従って算出した。

$$\text{錯体形成率 (\%)} = \frac{(I_c)}{(I_f + I_c)} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 I_c および I_f はそれぞれ、錯体に由来するシグナルの積分値および非錯体のシグナルの積分値である。

7-2. 結果

THGP と各カテコールアミンとの相互作用は $^1\text{H NMR}$ を用いて評価した。まず最初に、THGP と L-ドーパおよびチロシンとの相互作用を確認した。THGP 溶液、THGP-L-ドーパ混合溶液、および THGP-チロシン混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを Fig. 7-2 に示す。THGP の $^1\text{H NMR}$ スペクトルにおいて、1.5 ppm および 2.5 ppm にそれぞれトリプレットのシグナルを観測した (Fig. 7-2A)。第2章でも示したとおり、これらのシグナルはそれぞれ、ゲルマニウム原子に隣接するメチレン基由来、およびカルボニル基に隣接するメチレン基由来のシグナルである。THGP-L-ドーパ混合溶液の $^1\text{H NMR}$ を測定した結果、THGP シグナルの近傍に、THGP のみのスペクトルには見られない新たなシグナルを観測した (Fig. 7-2B)。これらは THGP-L-ドーパ間の錯体に起因するシグナルである。解析の結果、1.3 ppm および 1.8 ppm に出現したシグナルは、錯体由来の THGP のゲルマニウム原子に隣接するメチレン基のシグナルであることを確認した。

一方、THGP-チロシン混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルでは何ら変化は無く、錯体由来のシグナルは現れなかった (Fig. 7-2C)。構造を見ると、L-ドーパはジオール構造を有するが、チロシンはジオール構造を有していない。以上の事から、カテコールアミンと THGP との錯体形成はジオール部位を介して行われることが示された。

先の実験で、THGP のゲルマニウム原子に隣接するメチレン基シグナル (1.5 ppm)

の両端に出現した 1.3 ppm および 1.8 ppm のシグナルは、錯体由来のシグナルであることを示した (Fig. 7-2B)。他のカテコールアミンとの混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを測定した結果、ほぼ同様のパターンで錯体由来のシグナルが出現した。そこで、これらの錯体および非錯体シグナルの積分比から錯体形成率を算出した。THGP とカテコールアミンとの各濃度混合溶液の $^1\text{H NMR}$ スペクトルから求めた錯体形成率を Fig. 7-3 に示す。縦軸は錯体形成率を示し、横軸は THGP およびカテコールアミン濃度を対数表示で示している。まず、THGP はチロシンとは錯体を形成しなかった。これは先述の通り、THGP はジオール部位でのみ錯体を形成するために、ジオール構造を持たないチロシンとは錯体を形成しないためである。チロシン以外のカテコールアミンとの混合溶液では錯体由来のシグナルを観測し、錯体形成率を求めることが出来た。各カテコールアミンの錯体形成率を比較すると、大きな違いは見られなかった。

グラフの横軸 (濃度) を対数表示したことで、低濃度側で直線性のあるグラフが得られた。低濃度側で近似直線を求めた結果、ノルアドレナリンでは約 $10\ \mu\text{M}$ のところで横軸と交点を結んだ。第 5 章で示した核酸成分、例えばアデノシンの結果と比較すると、カテコールアミンの方が低濃度でも錯体を形成していることが分かる。従って、核酸成分と比較し、カテコールアミンの方が高い錯体形成能を有することを示した。

7-3. 考察

第 7 章では、THGP とカテコールアミンとの相互作用を $^1\text{H NMR}$ を用いて確認した。その結果、THGP との錯体はジオール部位で形成されることを確認した。また、今回求めた錯体形成率と第 5 章で求めた核酸成分の結果とを比較すると、カテコールアミンの方が低濃度でも錯体形成率が高く、高い親和性を有することを示した。この理由として、ジオールの二面角の違いが挙げられる。カテコールは平面構造を取るため、

ジオールの二面角は 0° である。一方、核酸成分の基本骨格であるリボースを構成するフラノース 5 員環は平面構造ではなく、ひずんだ形 (パッカリング) となっている。そのため、リボースが持つジオールの二面角は 0° ではない。この二面角の違いが錯体の形成能に影響を与えたものと考えられる。

田村らはウサギの回腸を用い、ノルアドレナリンやアドレナリンによる腸の蠕動運動抑制効果に対する、Ge-132 を添加した際の影響を調べた [95]。その結果、各カテコールアミンによって生じる律動数、収縮力、緊張性の低下に対し、Ge-132 は拮抗作用を示した。アドレナリンやノルアドレナリンを受容するアドレナリン受容体のうち、消化管の β_3 受容体への刺激は弛緩作用を示す [96]。THGP は、カテコールアミンのジオール部位と錯体を形成ことが本実験結果から示された。したがって、Ge-132 添加によるカテコールアミンの腸の蠕動運動抑制効果に対する拮抗作用は、THGP との錯体形成により、カテコールアミンの受容体認識を抑制した結果であると推察される。今後、錯体形成することが生体内の反応系に対し、どのような影響を与えるのかを理解するため、カテコールアミン受容体の認識や、カテコールアミン代謝酵素反応に対する影響を調べたいと考えている。例えば、メラニン合成に対する THGP の影響が考えられる。メラニン合成は酸化酵素であるチロシナーゼにより、出発物質であるチロシンから L-ドーパへ、さらに L-ドーパからドーパキノンへと酸化されることで合成が進んでいく [94]。THGP と L-ドーパの錯体形成が示された本実験結果より、THGP が L-ドーパと錯体を形成することで、L-ドーパからドーパキノンへの代謝反応を抑制し、最終的にメラニン産生の抑制へと働くことが期待される。

THGP とカテコールアミンとの錯体形成能は、これまで確認してきた糖類や核酸成分より強いことが示された。THGP と等モルの混合比で行った実験条件において、核酸成分の Ado では 2 mM 以上の濃度域で相互作用が可能であると予測されたのに対し、ノルアドレナリンでは 200 倍薄い 10 μ M 程度で相互作用が可能であると予想され

た。生体内のカテコールアミン濃度は、極めて薄いことが知られている。例えば、アドレナリンの正常な血漿濃度は 590 pM、ノルアドレナリンでは 590-3240 pM 未満とされている [97]。今回の実験結果からは、この濃度域での相互作用は推測できない。加えて、この濃度域での相互作用を NMR で観測するのは極めて困難である。最近、筆者らは LC/MS/MS を用いた THGP の微量分析法を開発し、報告した [98]。今後、この LC/MS/MS 分析法を用い、低濃度条件下での THGP とジオール化合物との相互作用の可能性について明らかにしていきたい。

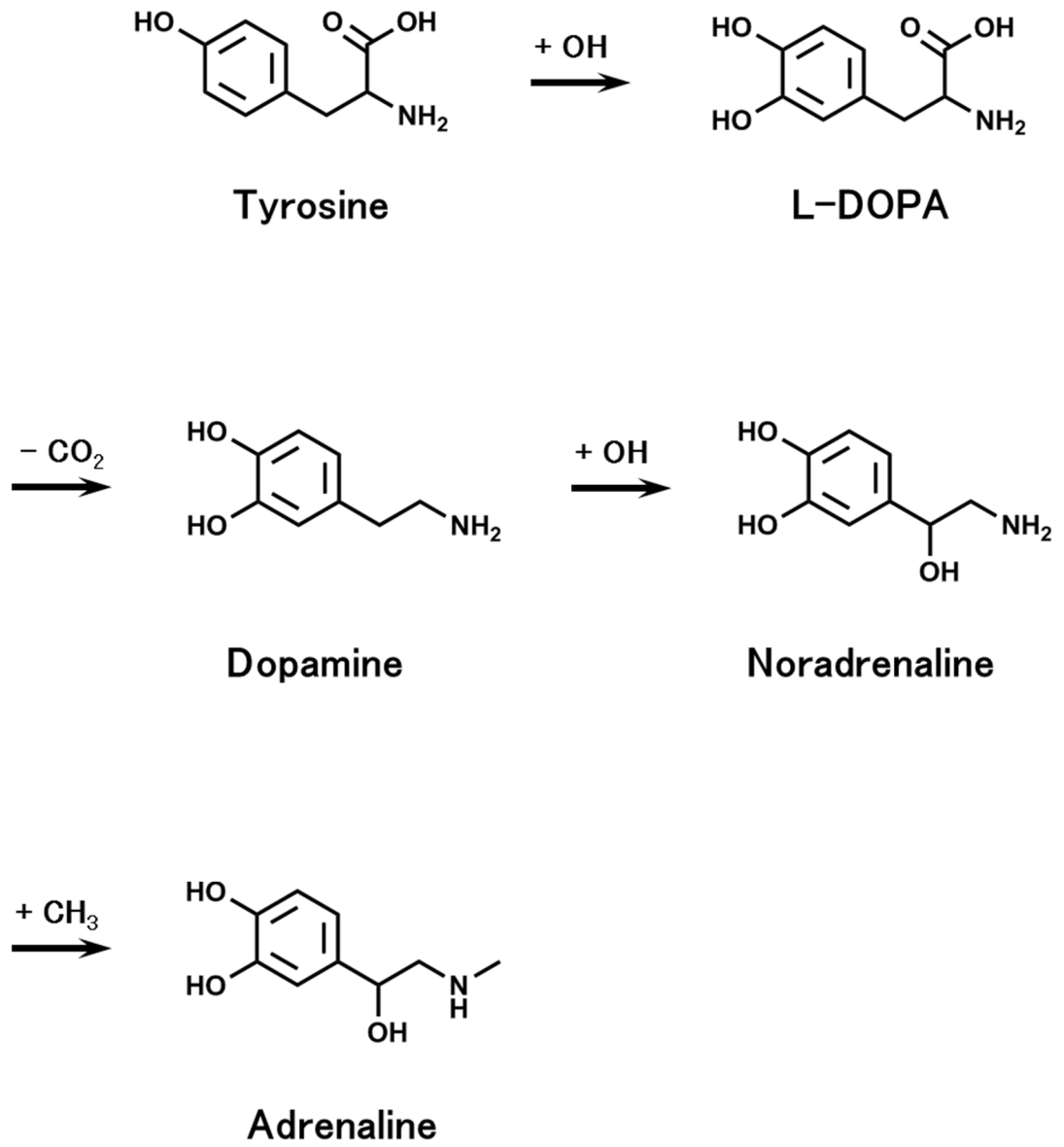
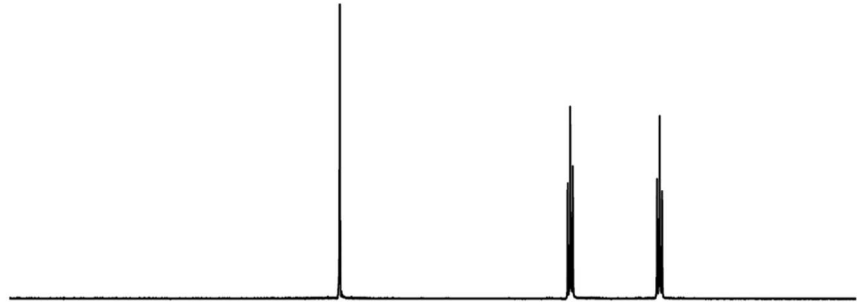
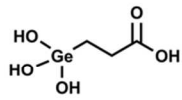


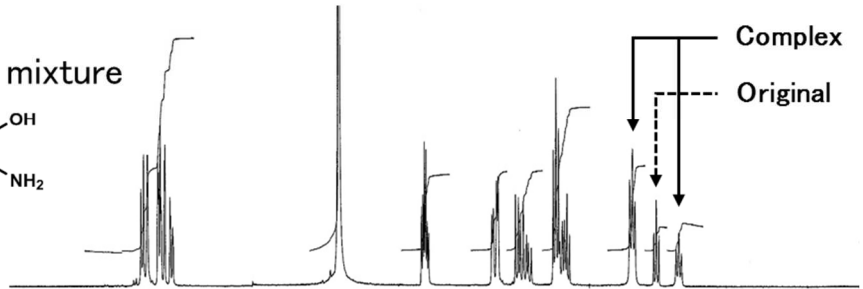
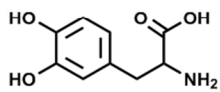
Fig. 7-1 カテコールアミン生合成経路

^1H NMR

A) THGP



B) L-DOPA mixture



C) Tyrosine mixture

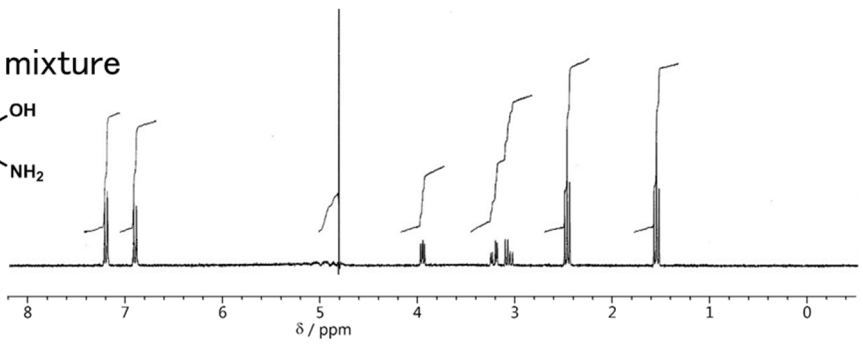
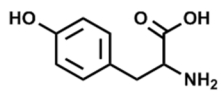


Fig. 7-2 THGP, L-ドーパ混合溶液およびチロシン混合溶液の ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

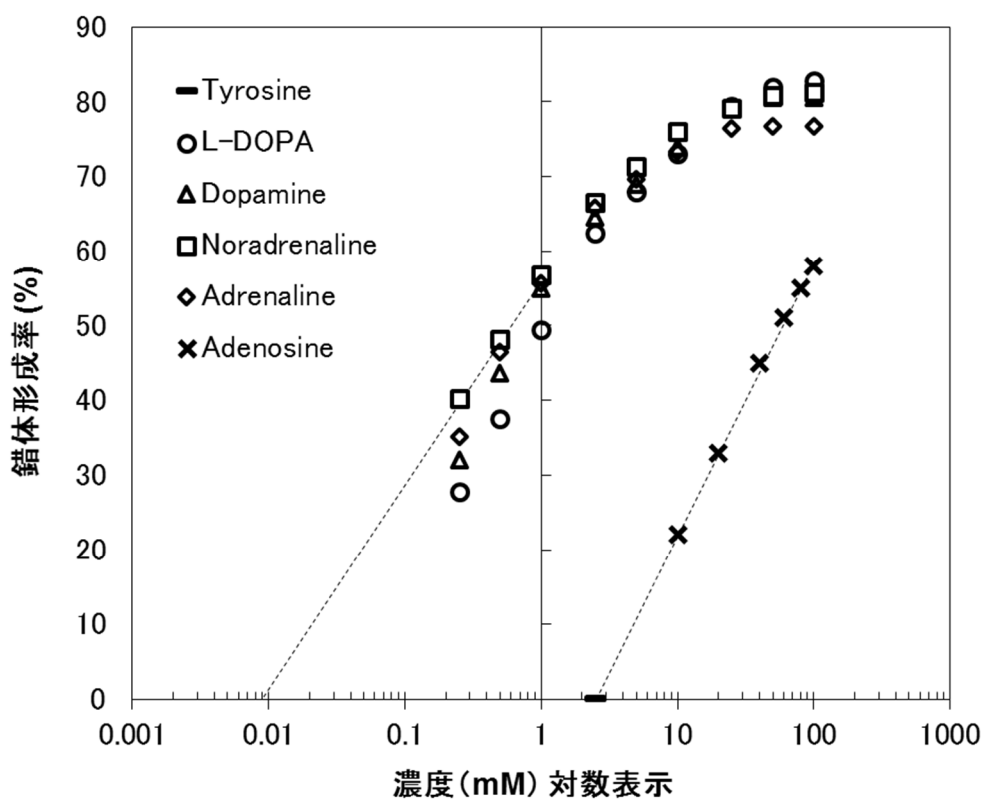


Fig. 7-3 各混合溶液の錯体形成率

第8章 THGP アフィニティーカラムの開発および性能評価

これまで、THGP と配位子（糖類、核酸成分、カテコールアミン）との相互作用について、1対1または1対2などの単純な系で NMR を用いて評価してきた。具体的には、まず、THGP と生体成分との混合溶液の NMR を測定し、錯体由来のシグナルが出現するかを確認することで、錯体形成能の有無を評価した。次に、錯体由来および原料由来のシグナルの積分比を求めることで、錯体形成率を算出した。NMR を用いて実験を行う利点として、構造や濃度の違いによる錯体形成能を細かく調べられることが挙げられる。一方で、あらかじめ配位子を用意して測定を行うため、生体内で相互作用を示す配位子を新たに発見することは困難である。加えて、配位子が複数混在している試料、例えば血液や細胞質などの生体試料と THGP との混合溶液を NMR で測定しても、スペクトルは複雑であり、THGP が相互作用しているか評価することも困難となることが予想される。

生化学分野において、生体成分との親和性や特異的結合性を調べる方法として、アフィニティークロマトグラフィー法が盛んに用いられている。これはある化合物を担体に固定化し、分離すべき物質が含まれる溶液を流し込むことで、親和性を有する物質のみを分離する手法である。有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 のモノマー分子である THGP が固定化された材料が開発できれば、生体成分との相互作用の研究にとって有用なツールとなることが期待できる。そこで、THGP を固定したアフィニティークラムの開発を試みた。THGP アフィニティークラムに生体成分を流すことで、相互作用の有無や作用の強弱を知ることが出来ると考えられる (Fig. 8-1)。また、相互作用物質の分取により、作用機構の解明や新たな相互作用物質の発見が期待される。本章では THGP を固定したアフィニティークラムを作製し、アフィニティークラムの性能試験、および相互作用物質分取のための条件検討を行った。

8-1. 実験方法

8-1-1. 試薬

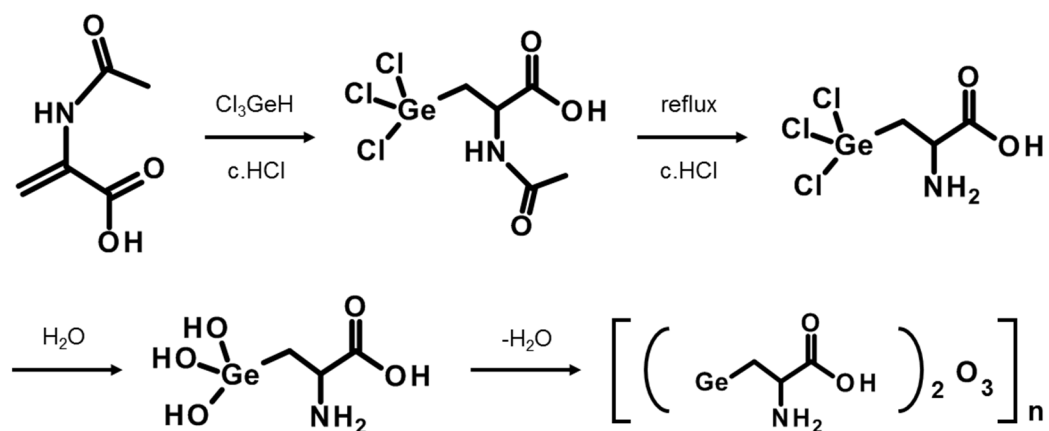
HPLC で使用した対象物質の核酸成分アデノシン (Ado) およびデオキシアデノシン (dAdo) は和光純薬工業から購入した。また、カテコールアミンのチロシン、L-ドーパは東京化成工業から購入した。リン酸緩衝液はリン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素ナトリウム (ともに和光純薬工業から購入) を用いて調製した。重水、重水酸化ナトリウム溶液はメルクから購入した。重メタノール溶液は関東化学から購入した。これら全ての試薬は特級または NMR 分析用を用いた。THGP 固定化試薬の合成に用いた 2-アセトアミドアクリル酸は和光純薬から購入した。トリクロロゲルマンは浅井ゲルマニウム研究所で製造されたものを使用した。DM-THGP (THGP 誘導体) は合成したものを使用した。合成方法は第 3 章で記載したとおりである。

8-1-2. アフィニティーカラム作製

8-1-2-1. THGP 固定化試薬の合成

濃塩酸を溶媒として 2-アセトアミドアクリル酸と 1.2 当量のトリクロロゲルマンを 6 時間、室温下で反応し、2-アセトアミド-3-トリクロロゲルミルプロパン酸を得た。続いて 3 時間加熱還流し、2-アミノ-3-トリクロロゲルミルプロパン酸塩酸塩の白色結晶を得た。ろ集し、少量の濃塩酸で洗浄後、精製水に溶解し、カートリッジ AC-110 を装着したマイクロアシライザー S3 (アストム) で電気透析を行い、脱塩酸した。少量サンプリングし、硝酸銀水溶液で塩素イオンが反応しないことを確認後、減圧濃縮および加熱乾燥して 2-アミノ-3-トリヒドロキシゲルミルプロパン酸 (以下 THGP 固定化試薬と記す) の白色結晶を得た (収率 65%、純度 98%)。合成スキームおよび重水中に

における ^1H および ^{13}C NMR 化学シフト値は、以下の通りである。



^1H NMR の化学シフト値 (D_2O 、 $\text{HOD} = 4.80$ ppm) :

$$\delta \text{ (ppm)} = 4.09 \text{ (dd, } J = 2.3 \text{ and } 6.3 \text{ Hz, } 1\text{H}), 1.75\text{-}1.93 \text{ (m, } 2\text{H)}.$$

^{13}C NMR の化学シフト値 (D_2O) :

$$\delta \text{ (ppm)} = 173.14, 50.11, 20.43$$

8-1-2-2. THGP ビーズの作製

THGP 構造を固定化したビーズの作製経路を Fig. 8-2 に示す。担体には $60 \mu\text{m}$ ポリエチレン製非多孔性ビーズ (Ticona) に、放射線グラフト重合によりエポキシ基をもつグリシジルメタクリレート (GMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CHOCH}_2$ 、ナカライテスク) が接ぎ木重合した GMA ビーズを使用した。グラフト重合に伴う重量増加率を、グラフト率として次式によって定義した。

$$\text{グラフト率 (\%)} = \frac{(W_1 - W_0)}{(W_0)} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 W_0 および W_1 は、それぞれポリエチレンビーズおよびグラフト重合後の GMA ビーズの重量(g)である。本実験では、グラフト率 113%のものを使用した。5% THGP 固定化試薬水溶液にトリエチルアミン（和光純薬）を加えて pH 11 程度に調整した後、GMA ビーズを添加し、攪拌下、70°Cで3日間反応した。ビーズをろ集、水洗した後、1 mol/L エタノールアミン水溶液に加えてかくはん下、70°Cで加熱し、未反応のエポキシ基を水酸基に転化した。作製したビーズを THGP ビーズと呼ぶ。作製したビーズの THGP 固定化量はゲルマニウム標準液（和光純薬）を用いて、原子吸光光度計 4100ZL（Perkin Elmer）により測定した。すなわち、乾燥したビーズの一定量をろつぼにはかり取り、電気炉で 800°C、3 時間加熱分解後、過酸化水素水（和光純薬）および 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液（和光純薬）の混合液に加えて加熱・溶解し、精製水で 100 mL にメスアップしたものを検体とし、原子吸光値を波長 265.1 nm で測定してゲルマニウム量を定量した。

8-1-2-3. カラム性能試験

THGP ビーズを空カラム Tricorn 5/20（断面積：0.20 cm²、GE ヘルスケア）および Tricorn 5/200（断面積：0.20 cm²、GE ヘルスケア）に充填して、THGP アフィニティーカラムを作製した。作製したカラムをそれぞれ THGP20 カラム、および THGP 200 カラムと呼ぶ。HPLC では供試物質として核酸成分の Ado と dAdo、カテコールアミンの L-ドーパとチロシンを使用した。HPLC は JASCO 880-PU（日本分光）を使用した。検出器は UV-970（日本分光）を用い、核酸成分は 265 nm、カテコールアミンは 280 nm の吸収値をモニターした。データはクロマトパック C-R5A および LC 用ワークステーション LCsolution（島津製作所）を用いて処理した。移動相は 20 mM リン酸水溶液（pH 6~12）、20 mM 酢酸緩衝液（pH 4）、メタノールを用いた。

8-1-2-4. NMR を用いた移動相の検討

移動相の検討として、水溶媒に対するメタノール添加比率を加えた場合の吸着強度に及ぼす影響を調べた。まず、DM-THGP と Ado との混合モル比 1 : 1、0.1 M 重水溶液 (pH 7) を調製した。調製した溶液を重水または重メタノールで 2 倍希釈して、メタノール 0%、25%、50% 溶液を調製し、¹H NMR を測定した。6 ppm 付近にみられる Ado の C1' プロトンシグナルから錯体および非錯体のシグナルを判別し、それぞれの積分比より錯体形成能を比較した。

8-2. 結果

THGP ビーズ作製後、原子吸光光度計を用いてビーズ中のゲルマニウム量を測定した結果、ビーズ 1 g あたり約 0.6 mmol のゲルマニウムが固定化されていることを確認した。これは、THGP に換算するとおおよそ 120 mg であり、固定化ビーズ自重の約 1/10 が THGP 分子ということになる。断面積 0.20 cm² の THGP20 カラムには高さ 25 mm、THGP200 カラムには高さ 200 mm になるよう THGP ビーズを充填した。

供試する核酸成分試料として、THGP と錯体を形成することが出来る Ado と、その対照物質として dAdo を用いた。それぞれの 5 ppm 水溶液を調製し、注入量は 10 μL とした。カラムは THGP20 を使用した。まず、20 mM リン酸緩衝液 (pH 2) を移動相とし、流速 0.5 mL/min で測定を行った。実験結果を Fig. 8-3A に示す。酸性の移動相で測定した結果、Ado、dAdo とともにサンプル注入後直ちに鋭いシグナルを観測した。次に 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7) を移動相とし、流速 0.5 mL/min で測定を行った。実験結果を Fig. 8-3B に示す。中性条件で測定した結果、Ado は dAdo と異なり、シグナルのブロードニングが見られた。NMR を用いた実験により、THGP の錯体形成は中性条

件下で起こり、酸性になると錯体を形成しないことが既に確認されている。本実験の結果より、pH7で行った Ado のスペクトルでシグナルがブロードニングしたのは、カラム内の THGP 構造と Ado が相互作用したことによる影響であることが示唆される。一方、Ado と dAdo の間では保持時間に差が無く、この条件で分取する事は困難であると思われる。

移動相の検討を、 ^1H NMR を用いて行った。DM-THGP と Ado との混合溶液の重メタノール濃度を変えての ^1H NMR の測定結果を Fig. 8-4 に示す。5.8 ~ 6.0 ppm 付近にダブルットのシグナルが3箇所を観測された。これらは、錯体および非錯体に由来する Ado の C1'プロトンのシグナルである。Ado 単独の溶液を測定した結果、一番低磁場にあるシグナルが非錯体由来のシグナルであることを確認した。錯体形成能を比較すると、メタノール濃度が上がるにつれて、錯体形成能が向上することが判明した。

そこで、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7) にメタノールを加えて 0 ~ 50% のメタノール-リン酸緩衝液を調製し、HPLC の移動相として用いて、流速 0.5 mL/min で Ado の測定を行った。注入量は 10 μL とし、カラムは THGP20 を使用した。HPLC の結果を Fig. 8-5 に示す。HPLC の結果、メタノールを加えても保持時間に大きな変化は見られなかった。また、固定相を増やす (THGP200 の使用)、移動相のリン酸緩衝液の pH を変える、移動相をリン酸緩衝液から精製水に変えるなどの方法を検討した。しかしながら、保持時間を長くする条件にならなかった。

核酸成分よりも低濃度で THGP と錯体を形成するカテコールアミンについても、アフィニティー・クロマトグラフィーを試みた。供試するカテコールアミン類として、THGP と錯体を形成することが出来る L-ドーパと、その対照物質としてチロシンを用いた。それぞれの 5 ppm 水溶液を調製し、注入量は 50 μL とした。カラムは THGP20 を使用した。まず、20 mM リン酸緩衝液 (pH 2) を移動相とし、流速 1.0 mL/min で測定を行った。実験結果を Fig. 8-6A に示す。酸性の移動相で測定した結果、L-ドーパ、チ

ロシンとともにサンプル注入後直ちに鋭いピークを観測した。次に、20 mM リン酸緩衝液(pH7)を移動相とし、流速 1.0 mL/min で測定を行った。実験結果を Fig. 8-6B に示す。中性条件で測定した結果、L-ドーパはチロシンと異なり、ピークが消失した。NMR を用いた第7章での実験結果より、核酸成分に比べ、カテコールアミンの方が THGP との錯体形成能が高いことが示されている。本実験の結果より、pH7で行ったL-ドーパのスペクトルでピークが消失したのは、カラム内の THGP 構造とL-ドーパが相互作用したことによる影響であると考えられる。加えて、中性域ではカラムに保持され、酸性域では相互作用しないことから、相互作用の有無による分離が期待できる結果となった。

8-3. 考察

第8章では、THGPを固定化したアフィニティーカラムを作製し、THGPとの相互作用が確認されているジオール化合物とその対照物質を用いて、アフィニティーカラムの性能をHPLCにより評価した。その結果、移動相が酸性条件の場合ほどの化合物も注入後、速やかに非錯体のピークが観測され、カラムと相互作用している様子は見られなかった。一方、中性条件ではジオール構造を有するAdoやL-ドーパのスペクトルは、デオキシ体であるdAdoおよびチロシンとは異なり、シグナルのブロードニングや消失が確認された。この変化は、カラムに固定化されたTHGP分子とジオール化合物との相互作用によるものと示唆される。同様の作用が、ゲルマニウムと類似の反応性を示すボロン酸のアフィニティーカラムを用いた実験でも報告されている[99]。また、核酸成分のAdoよりも、カテコールアミンのL-ドーパの方がカラムに強く保持されることが示された。つまり、THGPとの相互作用は核酸成分よりカテコールアミンの方が強いことを示している。これらの結果は、NMRで確認されてきた結果と一致

している。

移動相にリン酸緩衝液 (pH7) を用いた先の実験では、THGP と相互作用可能な Ado と、相互作用しない dAdo とを分離する事は困難であった。THGP との相互作用物質をカラムに強く保持することが出来れば、相互作用しない物質と分離することが可能と思われる。そこで、錯体形成能に対するメタノール濃度の影響を、NMR を用いて評価した。その結果、水溶液中のメタノール濃度が上がるにつれて、錯体形成能が向上した。水溶液中における THGP とジオール化合物の反応は、脱水縮合反応と加水分解反応との平衡状態にある [80]。したがって、メタノール濃度が上がることで水の割合が減ることは、加水分解反応が起こりにくい環境になったことになり、錯体形成能が向上したと考えられる。

一方で、HPLC を用い移動相のメタノール濃度を変えて Ado を通液したが、保持時間に大きな影響は見られず、むしろ溶出ピークはシャープになり、アフィニティーカラムとの親和性がやや低下したようにも考えられた。目的物がうまく吸着されていない場合、吸着のための最適条件を選んでいない可能性がある。アフィニティーカラム上のリガンドは固定化されているため、厳密には固定前のリガンドの構造と異なっており、固定化されていないリガンドと最適条件が同じであるとは限らないためである [100]。笠井らは、相互作用を高める条件として低温での通液や、通液を止めて試料とカラムとの接触時間を長く取る方法を例に挙げている [100]。今後、移動相の pH やカラム温度、流速などの条件を変え、保持力の強い実験条件を検討する必要がある。

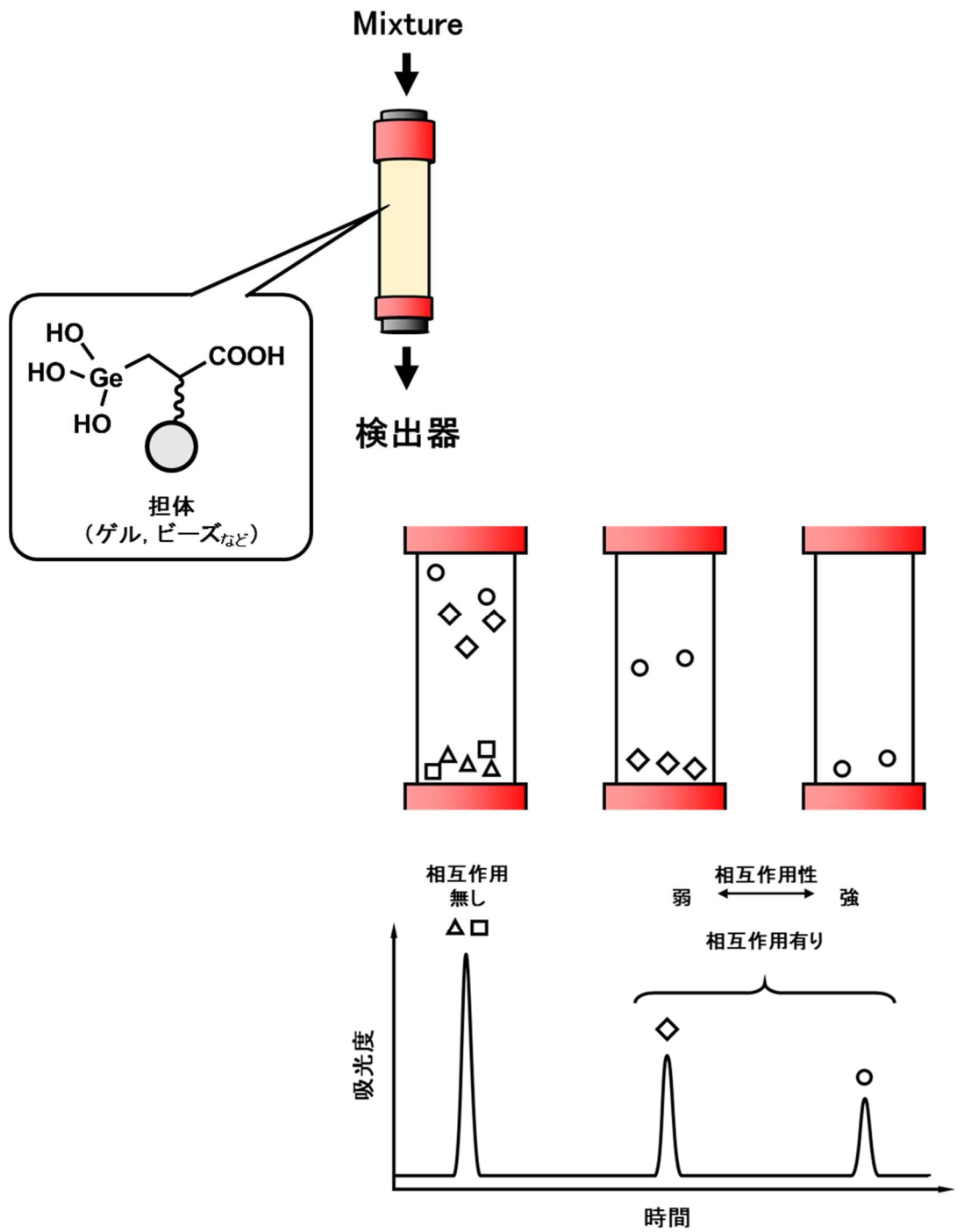


Fig. 8-1 THGP 固定化アフィニティーカラム法

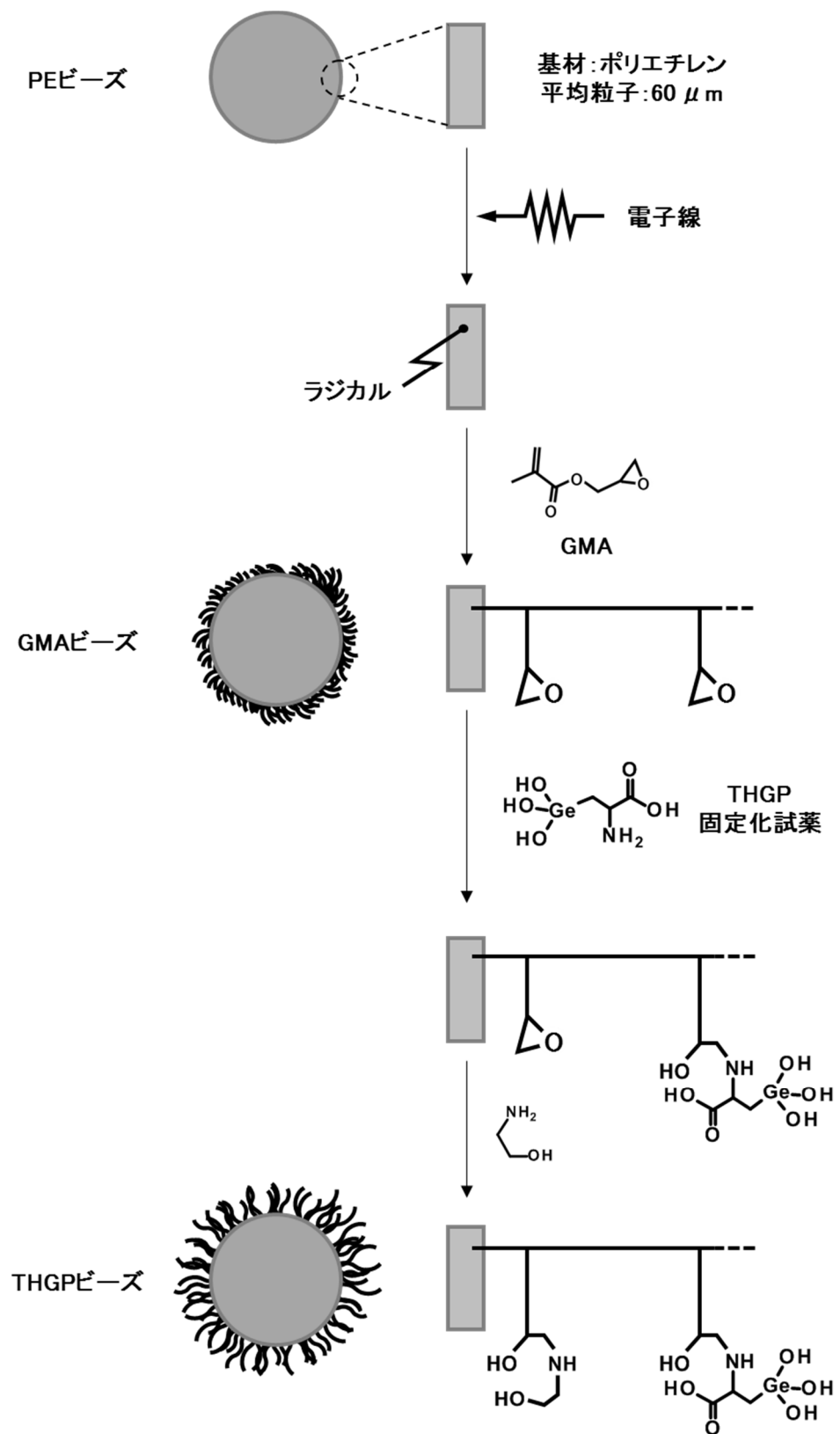


Fig. 8-2 THGP ビーズの作製経路

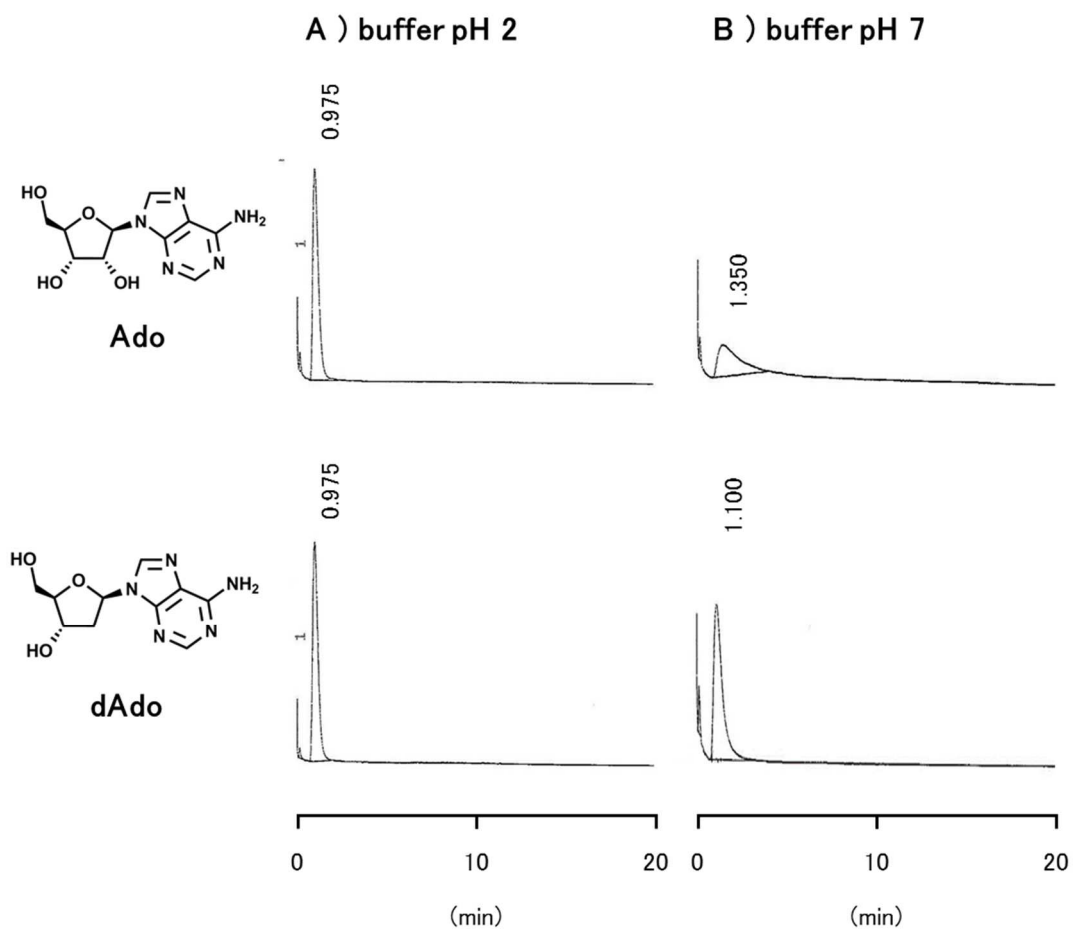


Fig. 8-3 移動相 pH 条件の異なる Ado および dAdo の
クロマトグラム

(Column : Tricorn 5/20, Flow rate : 0.5 mL/min,
Detector : UV (265 nm), Sample volume: 10 μ L,
Solvent : 20 mM Phosphate buffer)

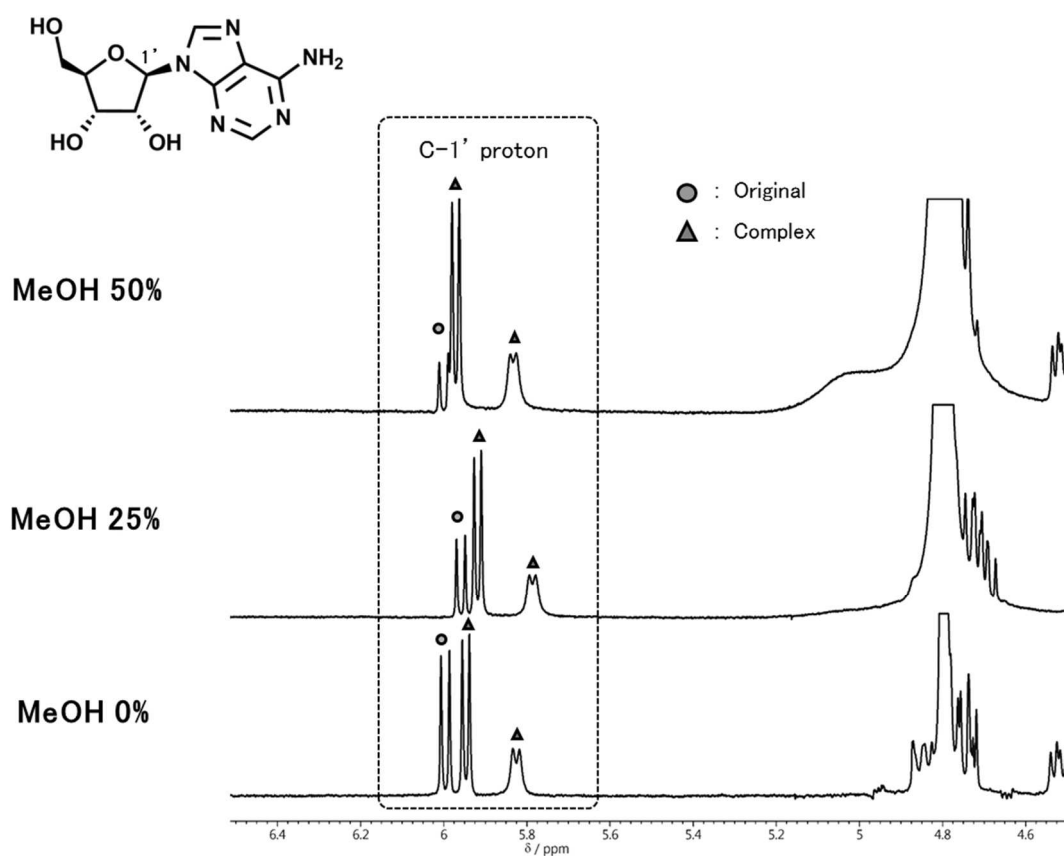


Fig. 8-4 メタノール濃度の違いによる 50 mM DM-THGP-Ado 混合溶液の ^1H NMR スペクトル (300 MHz, D_2O)

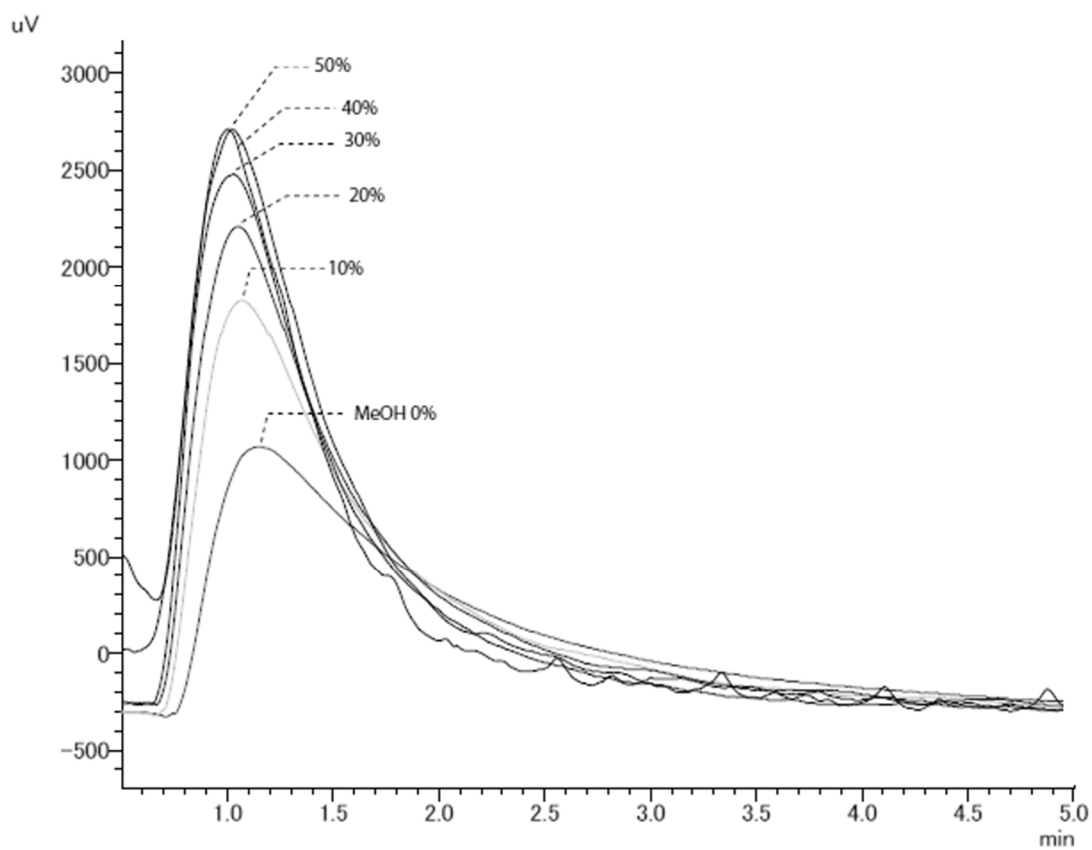


Fig. 8-5 各メタノール濃度の移動相による Ado のクロマトグラム
(Column : Tricorn 5/20, Flow rate : 0.5 mL/min,
Detector : UV (265 nm), Sample volume: 10 μ L,
Solvent : 20 mM Phosphate buffer/MeOH)

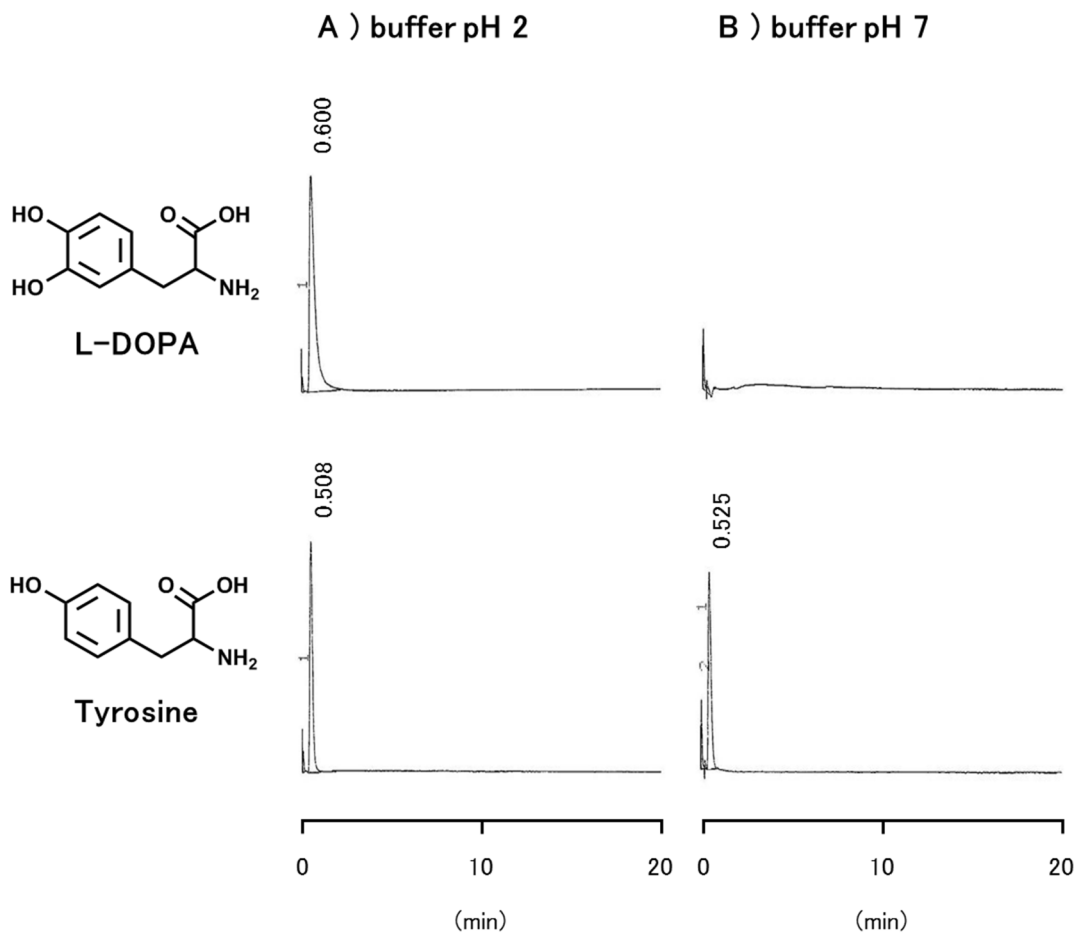


Fig. 8-6 移動相 pH 条件の異なる L-ドーパおよびチロシンのクロマトグラム

(Column : Tricorn 5/20, Flow rate : 1 mL/min,
 Detector : UV (280 nm), Sample volume: 50 μ L,
 Solvent : 20 mM Phosphate buffer)

第9章 本研究の総括および今後の展望

9-1. 本研究の要点

第2章 NMRを用いた THGP-糖類間相互作用の評価検討

Ge-132 の水解物である THGP と、ジオール構造を有する糖類との水溶液中での反応特性を明らかにするため、 ^1H 、 ^{13}C NMR を用いて評価した。まず、シンプルな構造を有するジオール化合物 1,4-アンヒドロエリスリトール (AHET) に着目し、THGP との錯体形成による ^1H 、 ^{13}C NMR スペクトルへの影響を確認した。また、一般に知られている糖類のグルコース、フルクトースを用いて、それぞれの糖との親和性について検討した。その結果、THGP は糖構造中のシスジオール部位を介して錯体を形成し、さらに、ピラノース型より二面角が小さ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が示された。以上のことから、グルコースに比べ、フラノース型が安定に存在するフルクトースの方が THGP と高い親和性を示したと考えられる。

第3章 THGP ジメチル誘導体と糖類との相互作用の定量的評価

THGP 構造中のメチレン基同士のカップリングが原因で、 ^1H NMR を用いた THGP-糖類間相互作用の定量化が困難であった。そこで、THGP 構造中のカップリングを解消した誘導体 “DM-THGP” を NMR レポーター分子として合成し、様々な糖類との錯体形成率の数値化を検討した。また、得られた錯体形成率と糖構造との相関を考察した。実験の結果、まず、DM-THGP を用いる事で錯体・非錯体シグナルの判別が容易となり、錯体形成率を算出することが可能となった。反応性も THGP と同様、糖類のシスジオール構造を介して錯体を形成することが示された。錯体形成率と糖構造との相関を考察した結果、シスジオールの二面角が小さい糖構造ほど錯体形成率が高いこ

と、還元末端を含むピラノース型のシスジオール構造とも錯体を形成することが可能なこと、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、並びにシスジオール構造が増えるほど DM-THGP との錯体形成率が向上することが示唆された。

第4章 THGP フッ素誘導体を用いた糖類との相互作用の評価法

多糖になると ^1H や ^{13}C NMR ではシグナルが複雑になり、錯体・非錯体のシグナルを見分ける事は困難であった。そこで、新たな評価方法として、フッ素を導入した THGP 誘導体 “THGPF” を用いた ^{19}F NMR による評価法を検討した。フッ素は水素に次ぐ高感度な NMR 核種であり、生体成分中にフッ素は無いため、THGPF のシグナルのみで評価することが可能となることが考えられた。測定した結果、合成した THGP フッ素誘導体 “THGPF” の ^{19}F NMR は、シンプルなシングレットのシグナルを与えた。THGPF の反応性は THGP 同様、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、多糖類である分泌型ムチン (MUC2) との相互作用を示唆するシグナルを観測した。

第5章 THGP と核酸成分との相互作用の定量的評価

THGP の作用部位であるシスジオール構造を有する、生体にとって重要な役割を担う化合物として、核酸構成成分のヌクレオシドやヌクレオチドがある。そこで、THGP と核酸成分との相互作用を定量・評価するため、 ^1H NMR による錯体形成率の算出を行い、構造との相関を考察した。その結果、THGP との錯体は、核酸成分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形成することが明らかとなった。また、興味深いことに、構造中のリン酸基が増えるにつれ、THGP との錯体形成率が減少することが示された (Ado > AMP > ADP > ATP)。一方で、構造中の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)。

第6章 アデノシンデアミナーゼの酵素反応に対する THGP の影響

THGP と錯体形成することが生体内の反応系に対し、どのような影響を与えるかを明らかにするため、THGP との錯体形成が確認された Ado を用い、脱アミノ化酵素 ADA との酵素反応に及ぼす THGP 添加による影響を、THGP と相互作用しない dAdo を対照として検討した。その結果、Ado-ADA 酵素反応に対し、THGP 濃度依存的に酵素反応を抑制したが、dAdo-ADA 酵素反応に対し、THGP の添加はほぼ影響を与えなかった。このことから、THGP による反応抑制は、酵素ではなく基質に働きかけることで起こることが示された。

第7章 THGP とカテコールアミンとの相互作用の定量的評価

カテコールアミンが有するジオール構造は平面上に存在するため、THGP と強く錯体を形成することが予想される。そこで、カテコールアミンと THGP との錯体形成率を $^1\text{H NMR}$ を用いて算出し、その相互作用性を評価した。その結果、THGP との錯体はカテコールアミンのジオール部位を介して形成し、核酸成分に比べてカテコールアミンの方が高い錯体形成能を示した。

第8章 THGP アフィニティーカラムの開発および性能評価

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、新たな手法として THGP 分子を固定化したアフィニティーカラムによる相互作用物質の分取および同定を考えた。本章では、THGP を固定化したアフィニティーカラムの開発、アフィニティーカラムの性能試験、および相互作用物質分取のための条件検討を行った。まず、エポキシ基の開環付加反応を利用して GMA ビーズに THGP 分子を導入した THGP 固定化アフィ

ニティーカラムを開発した。本カラムの性能試験では、NMR を用いた実験結果と同様、シスジオール化合物との相互作用を示し、核酸成分に比べて、カテコールアミンの方が高い錯体形成能を示した。一方で、相互作用物質の分離には、より強くカラムに保持される移動相の検討が必要であることがわかり、検討の結果、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 $^1\text{H NMR}$ で明らかにした。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なかった。

9-2. 総合考察

有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 は第 1 章で述べたとおり、様々な生理作用を有することが明らかになっている。これら多岐にわたる Ge-132 の生理作用は、Ge-132 の加水分解物である THGP が、生体成分と相互作用する事で生じていると考えられる。本論文では、THGP と生体成分との相互作用について検討を行った。これまでに、THGP が水溶液中において糖類のジオール構造と錯体を形成することが知られていたが、THGP との錯体形成におけるジオール化合物の分子構造や濃度の違いによる影響は、詳しく調べられていない。そこで、生体にとって重要な役割を担うジオール化合物を用い、生体内における THGP の反応性について評価した。

まず、NMR を用いて糖類、核酸成分、およびカテコールアミンと THGP との相互作用について検討した。過去にゲルマニウムと糖との相互作用について、濾紙電気泳動法を用いた検討がなされている [101]。これは、アルカリ条件下においてゲルマニウムが電荷を持つため、糖はゲルマニウムと錯体を形成することで電荷を持ち、その複合体の移動度を測るという手法である。しかしながら、この分析法では電荷を持つ化合物、例えば核酸成分では錯体形成に関係無く移動するため、相互作用を調べるには

不向きである。また、錯体研究には X 線結晶構造解析がよく用いられており、構造情報を得るのに優れているが、結晶化が必須であり、生体内に近い環境での相互作用を観察することは出来ない [102]。その点、NMR による分析は、水溶液中での分子間反応を原子レベルで観察できるうえ、温度調節が可能であり、測定核種によっては定量性もあるため、生体内により近い環境下での定量的な相互作用の分析手法として優れている。錯体を形成した場合、NMR スペクトル上に錯体由来のシグナルが新たに出現する。また、¹H NMR スペクトルでは、錯体シグナルと原料シグナルとの積分比から錯体形成率を求めることができ、構造および濃度の違いによる親和性を比較することができる。実験の結果、THGP は構造中のシスジオール部位を介して錯体を形成し、シスジオールの二面角が小さい化合物ほど優位に錯体形成することが示された。また、第 5 章、第 7 章で示したとおり、希釈することで錯体形成率が減少することから、ジオール化合物との錯体形成は強固な結合ではなく、加水分解および脱水縮合の可逆的な結合であることも示された。THGP の縮合物である Ge-132 は、多様な生理作用を示すことが多くの研究から明らかにされており、なかにはジオール化合物との相互作用が直接関与していると予想される作用もある。わかりやすい例として鎮痛効果が挙げられる。THGP との錯体形成が示された ATP は生体の活動エネルギーとして知られており、全ての生細胞内に存在する。一方、細胞外にはほとんど ATP は存在せず、細胞外へ放出あるいは漏出した場合は、細胞外の ATP 分解酵素によって速やかに分解される。細胞外 ATP は、痛みのシグナルとして細胞破損の情報を脳に伝える働きを持つことが明らかにされている [77]。Ge-132 の痛みに対する効果を検討するため、過去にマウスを用いたメチレン ATP (痛みを誘発する ATP 誘導体) 誘発疼痛行動モデル実験が行われた [28]。その結果、THGP 投与により痛みに対する耐性増加が認められ、ATP 受容体 (P2X3) を介した痛みに対する THGP の抑制効果が示された。一方、THGP のゲルマニウムと結合している 3 つの水酸基をメチル基に置換した誘導体では、抑制効果

は見られなかった。以上の結果は、THGP とジオール化合物との錯体形成が関与する生理作用メカニズムの一例であり、THGP が生体内の様々な重要分子と相互作用することを示した本研究結果は、Ge-132 の多機能性について解明するための重要な知見であると言える。

^1H NMR による分析は先述のとおり、生体成分との相互作用を観察する上で優れた分析手法である。一方、 ^1H NMR は、化学シフトの取り得る値の範囲が他の核種に比べて狭く、一般的に-1 ppm ~ 12 ppm 程度 (^{13}C の場合は-5 ppm ~ 230 ppm 程度) の範囲にはほぼすべての有機化合物の核が現れる。また、隣接する核同士ではカップリングが生じるため、シグナルが複雑に分離し、シグナル同士が重なることがよく見られる。THGP の ^1H NMR スペクトルはメチレン基同士のカップリングがあるため、特徴的な幅の広いトリプレットのシグナルを持ち、化合物によってはシグナルが重なり、解析が困難となる問題が生じた。特に、高分子を用いた解析では顕著であった。このように、THGP では解析困難なジオール化合物の場合は、シンプルなシグナルを有する THGP 誘導体 “DM-THGP” を利用し、それでも ^1H NMR では解析困難な場合は、フッ素誘導体 “THGPF” を用いた ^{19}F NMR 測定を行うことで評価可能であることを示した。特に、 ^{19}F は ^1H に次いで高感度な NMR 核種であり、生体内に ^{19}F は存在しないことから、生体成分との相互作用研究において ^{19}F 核を利用した NMR 分析手法が注目されている [103]。また、 ^{19}F の感度の良さと内在性バックグラウンド (生体成分) が無いことから、*in vivo* での ^{19}F MRI の研究も盛んに行われている。例えば、フッ素化合物を動物に投与し、 ^{19}F MRI 画像と、形態情報を与える ^1H MRI 画像を重ねることで、フッ素化合物の体内局在を見ることが出来る [104]。今後の研究で、今回合成した THGP フッ素誘導体が、タンパクおよび細胞レベルでの相互作用研究や、イメージングによる吸収動態解明への強力な分析ツールとなることが期待される。

生体成分との錯体形成が生体内の反応系に対し、どのような影響を与えるかを評価

するため、本研究では THGP 添加による Ado 脱アミノ化酵素 ADA の酵素反応への影響を確認した。Ado は抗炎症 [89]や鎮痛効果 [78]などの生理作用を有することが知られており、Ado の作用に着目した Ado 分解抑制技術が求められている。本研究の結果、THGP は Ado と錯体を形成し、ADA との酵素反応を THGP 濃度依存的に抑制することを見出した。また、この Ado 代謝抑制効果は、THGP が酵素ではなく基質に働きかけて生じる抑制効果であり、従来の酵素阻害剤とは異なる阻害様式であることを明らかにした。THGP は糖異性化における酵素反応にも影響を与え、グルコース（アルドース）からフルクトース（ケトース）への異性化収率を向上する働きを示すことが報告されている [63]。また、THGP との結合定数がグルコースに比べ、フルクトースは約 45 倍高いことを示し、酵素異性化反応で生成したフルクトースが、グルコースに比べて優位に THGP と錯体を形成し、酵素による逆反応を抑制したのではないかと推察している。このような THGP との錯体形成による酵素反応への影響は、カテコールアミンでも十分に考えられる。例えば、L-ドーパは本研究で THGP との錯体形成が確認されたカテコールアミンの一つであり、メラニン合成に関与する化合物として知られている。メラニンは、紫外線から皮膚を守る防御因子として重要な役割を示す一方、しみ、そばかす、黒ずみの原因となる。L-ドーパは酸化酵素であるチロシナーゼによりドーパキノンに代謝され、その後酸化、重合反応が進むとメラニン色素となる。メラニン合成の阻害物質として、例えばグルタチオンが報告されており、基質である L-ドーパに作用することでチロシナーゼとの酵素反応を阻害していることが明らかにされている [94]。THGP は L-ドーパと錯体を形成することから、L-ドーパのチロシナーゼによる酵素反応を抑制し、メラニン産生を抑制する働きを示す可能性が考えられる。今後、メラニン産生に対しての THGP の影響を酵素実験、さらには細胞実験で明らかにしていきたい。

最後に、NMR 法以外の実験手法として、THGP 分子を固定化したアフィニティーカ

ラムの開発、および HPLC を用いた THGP 相互作用分子の分取条件の検討を試みた。性能評価の結果、NMR 実験と同様、シスジオール構造を有する化合物のみ相互作用を示唆するクロマトグラムが得られたが、相互作用は弱く、分取には至らなかった。アフィニティークロマトグラフィーが成功するためには、固定化する試薬（リガンド）の選択と固定化方法が重要である。まず、リガンドの選択に際し、固定化しようとするリガンドと相互作用を検討する目的物質との親和性が重要である。その目安として解離定数 K_D がある。一般に、固定化によって K_D は変化するものと考えなければならないが、固定化する以前の K_D は 1 mM ~ 0.1 mM を限界値と考えて、リガンドを選択することが望ましいとされている [100]。THGP の場合、例えば Ado との解離定数 K_D は約 30 mM であり、上記の限界値よりも弱い親和性であった。また、固定化されたときの分子の方向によっては、立体障害を受けている可能性も考えられる。そのため、リガンドが低分子の場合、適当な長さのスペーサーを必要とする場合がある [105]。今回作製した THGP ビーズの場合、PE ビーズと THGP 分子の間に、GMA 分子と THGP 固定化試薬中のアミノ基を含め 6 原子のスペーサーが含まれているが、今後、検討が必要かもしれない。さらに、通液温度や、試料とカラムの接触時間など、引き続き実験条件の最適化の検討が必要である。本実験は生体成分からの相互作用分子の分取を目的に挙げていたため、THGP との親和性が低い Ado でも分取可能な条件の検討に注力した。一方、核酸成分より親和性の高いカテコールアミンでは分取が期待され、カテコールアミンの分離実験は今後進める計画である。

9-3. 今後の展望

本研究の結果より、THGP はシスジオール構造を有する生体分子と水溶液中で錯体を形成し、酵素反応にも影響を与えうることが示された。今後は、細胞や動物個体な

どを用いた実験系を用いて、その生理作用の分子メカニズムを解明したい。すなわち、THGP と生体成分との錯体形成と細胞内で引き起こす現象との間の直接的な関係性を証明する必要がある。特に、THGP との錯体形成が確認された L-ドーパが関与する、メラニン産生との関係を明らかにしたい。具体的には *in vitro* の酵素反応系に対する THGP 添加の抑制効果の検討をはじめ、マウス黒色腫細胞株 (B16 メラノーマ細胞) やメラノサイトを含む三次元皮膚モデルを用いた評価、さらには動物実験によりその効果を明らかにし、人々の関心の高いシミやくすみの軽減といったニーズに繋げたい。

今回開発した THGP 固定化アフィニティーカラムは、相互作用分子との親和性が弱く、カラム法によるアフィニティー分離のためにはリガンドのデザインを含め、十分な条件検討が必要であることが分かった。この問題を解決するため、移動相の pH やカラム温度、流速などの条件を変え、保持力の強い実験条件を検討する。最終的には THGP との相互作用可能な生体内分子を同定したい。

本研究の成果を基に、今後、THGP 分子の生理作用の作用点を解明し、より効率よく、より効果的な摂取方法や摂取形態を提案するため、研究を発展させることが望まれる。さらに、Ge-132 の有する多機能性のメカニズムを分子レベルで明らかにし、各機能に対する研究分野において、リード化合物としてその分野の発展に寄与できるよう、さらに研究を進めていく必要があると考えている。

引用文献

- [1] 斎藤一夫, 無機化学全書X-2, 355 (1965).
- [2] 独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構, 鉱物資源マテリアルフロー 2015 ゲルマニウム(Ge), (2015).
- [3] T. Sanai, S. Okuda, K. Onoyama, N. Oochi, Y. Oh, K. Kobayashi, K. Shimamatsu, S. Fujimi, and M. Fujishima, Germanium Dioxide-Induced Nephropathy: A New Type of Renal Disease, *Nephron*, **54**, 53–60 (1990).
- [4] 佐内透, 奥田誠也, 大地信彰, 王幸則, 小林和夫, 島松和正, 小野山薫, 藤見惺, 藤島正敏, 二酸化ゲルマニウムおよびカルボキシエチルゲルマニウム三二酸化物の亜急性腎毒性の検討, 腎と透析, **26**, 228–232 (1989).
- [5] R. R. Brutkiewicz and F. Suzuki, Biological Activities and Antitumor Mechanism of an Immunopotentiating Organogermanium Compound, Ge-132, *In Vivo*, **1**, 189–203 (1987).
- [6] M. Tsutsui, N. Kakimoto, D. D. Axtell, H. Oikawa, and K. Asai, Crystal Structure Of ‘Carboxyethylgermanium Sesquioxide’, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 8287–8289 (1976).
- [7] K. Asai, *Miracle Cure: Organic Germanium*, *New York Japan Publ. Inc.*, (1980).
- [8] 浅井一彦, ゲルマニウムと私: 驚異の元素, 玄同社, (1979).
- [9] 佐藤博, 岩口孝雄, 新規有機ゲルマニウム化合物Ge-132の抗腫瘍性, 癌と化学療法, **6**, 79–83 (1979).
- [10] N. Kumano, T. Ishikawa, S. Koinumaru, T. Kikumoto, S. Suzuki, Y. Nakai, and K. Konno, Antitumor Effect of the Organogermanium Compound Ge-132 on the Lewis Lung Carcinoma (3LL) in C57BL/6 (B6) Mice, *Tohoku J. Exp. Med.*, **146**, 97–104 (1985).

- [11] 有森茂, 竹内俊二, Ge-132によるL1210白血病細胞からの熱発生, 医学と生物学, **103**, 499–502 (1981).
- [12] 竹内俊二, 有森茂, L1210細胞のin vitroのDNA合成におよぼす免疫調節剤の影響, 医学と生物学, **105**, 203–205 (1982).
- [13] I. Sato, B. D. Yuan, T. Nishimura, and N. Tanaka, Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Association with Modification of Immune Response by Novel Organic Germanium Compounds, *J. Biol. Response Mod.*, **4**, 159–168 (1985).
- [14] 麻生久, 渋谷恵美, 鈴木富士夫, 中村武彦, 井上英男, 海老名卓三郎, 石田名香雄, 有機ゲルマニウム化合物Ge-132の抗腫瘍効果：投与経路別効果の比較, 癌と化学療法, **12**, 2345–2351 (1985).
- [15] 小林弘行, 小室朝子, 古江尚, Lewis肺癌マウスに対するGe-132と制癌剤の併用効果, 癌と化学療法, **13**, 2594–2599 (1986).
- [16] 中山貞男, 辻泰喜, 宇佐美研一, 有機ゲルマニウム (Ge-132) の急性毒性試験, 昭和医学会雑誌, **46**, 227–235 (1986).
- [17] 杉谷幸男, 坂巻政次, 杉田利志子, 阿保義種, 佐藤博, Carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge - 132)のラット経口投与による亜急性毒性試験, 応用薬理, **31**, 1181–1190 (1986).
- [18] 杉谷幸男, 坂巻政次, 佐藤博, Carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge-132)のラット経口投与による2ヵ月間亜急性毒性試験, 応用薬理, **31**, 1181–1190 (1986).
- [19] 永井浩, 長谷川一秋, 新保幸太郎, Carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge-132)の腹腔内投与によるラットの繁殖試験, 応用薬理, **20**, 271–280 (1980).
- [20] 永田次雄, 永田貴久, 荒蒔義知, 榎本真, 井坂英彦, 大塚潤一, Carboxyethyl-Germanium Sesquioxideの静脈内投与によるビ-グル犬の6ヶ月間の慢性毒性試験, 応用薬理, **16**, 613–636 (1987).

- [21] 新保幸太郎, 森規子, Carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge-132)のウサギにおける器官形成期投与試験, 応用薬理, **20**, 675–679 (1980).
- [22] 杉谷幸男, 吉田和彦, 坂巻政次, 江田君子, 佐藤博, Carboxyethylgermaniumsesequioxide(Ge-132)の生殖試験(第2報) ラットにおける胎仔器官形成期投与試験, 応用薬理, **32**, 123–138 (1986).
- [23] 杉谷幸男, 江田君子, 吉田和彦, 坂巻政次, 佐藤博, Carboxyethylgermaniumsesequioxide(Ge-132)の生殖試験(第1報) ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験, 応用薬理, **32**, 113–121 (1986).
- [24] 杉谷幸男, 杉田利志子, 坂巻政次, 阿保義種, 佐藤博, Carboxyethylgermaniumsesequi oxide(Ge-132)のラット腹腔内投与による亜急性毒性ならびに慢性毒性試験, 応用薬理, **32**, 93–111 (1986).
- [25] 鹿児島正豊, 鈴木光江, 2-Carboxyethylgermanium Sesquioxideの抗原性試験に関する検討, 医学と薬学, **15**, 1497–1501 (1986).
- [26] 杉谷幸男, 吉田和彦, 江田君子, 坂巻政次, 佐藤博, Carboxyethylgermaniumsesequioxide(Ge-132)の生殖試験(第3報) ラットにおける周産期および授乳期投与試験, 応用薬理, **32**, 139–152 (1986).
- [27] T. Sanai, S. Okuda, K. Onoyama, N. Oochi, S. Takaichi, V. Mizuhira, and M. Fujishima, Chronic Tubulointerstitial Changes Induced by Germanium Dioxide in Comparison with Carboxyethylgermanium Sesquioxide, *Kidney Int.*, **40**, 882–890 (1991).
- [28] 中村宜司, 島田康弘, 機能性研究レポート 有機ゲルマニウムの食品機能性と生体への作用性, *Food style 21*, **19**, 20–26 (2015).
- [29] 藤田浩, 免疫療法剤の体内動態, *Pharma Medica*, **1**, 407–419 (1983).
- [30] T. Nakamura, M. Saito, and H. Aso, Effects of a Lactobacilli, Oligosaccharide and

- Organic Germanium Intake on the Immune Responses of Mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 375–377 (2012).
- [31] 麻生久, 小林弘行, 杉山京子, 齋藤健一, 千代谷慶三, 海老名卓三郎, 石田名香雄, じん肺症患者での2-carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) 経口投与によるINF誘起とNK細胞活性及びADCC活性増強, 日本災害医学会誌, **36**, 233–237 (1988).
- [32] 麻生久, 鈴木富士夫, 山口高弘, 林芳郎, 海老名卓三郎, 石田名香雄, 有機ゲルマニウム化合物Ge-132のマウスにおけるIFN誘起能とNK細胞, マクロファージ活性化作用, 癌と化学療法, **9**, 1976–1980 (1982).
- [33] A. Fujii, N. Kuboyama, J. Yamane, S. Nakao, and Y. Furukawa, Effect of Organic Germanium compound (Ge-132) on Experimental Osteoporosis in Rats, *Gen. Pharmacol.*, **24**, 1527–1532 (1993).
- [34] H. Matsumoto, G. Z. Jiang, T. Hashimoto, N. Kuboyama, J. Yamane, K. Nonaka, and A. Fujii, Effect of Organic Germanium Compound (Ge-132) on Experimental Osteoporosis in Rats: The Relationship Between Transverse Strength and Bone Mineral Density (BMD) or Bone Mineral Content (BMC), *Int. J. Oral-Medical Sci.*, **1**, 10–16 (2002).
- [35] 折茂肇, 秋口格, 老人性骨粗鬆症に対するGe-132の効果について, 医学と薬学, **9**, 1507–1509 (1983).
- [36] 有森茂, 吉田美代子, 慢性関節リウマチに対するGe-132の効果, 医学と生物学, **104**, 211–213 (1982).
- [37] 有森茂, L. Pronai, 免疫性疾患のスーパーオキシド消去活性に対するGe-132の効果, *Biotherapy*, **5**, 708–712 (1991).
- [38] 古沢忍, 藤村務, 橋本岩夫, 北川由美, 佐々木健一, 高柳義一, 炎症性肉芽

- 腫の増殖に及ぼす2-Carboxyethyl-Germanium Sesquioxide(Ge-132)の効果, 東北薬科大学研究年報, **34**, 263–268 (1987).
- [39] 高木博司, 佐藤公道, 中山泰一, 川口幸子, 有機ゲルマニウム化合物Ge-132の鎮痛活性 -単独作用およびモルヒネ増強作用-, 医学と薬学, **10**, 153–157 (1983).
- [40] 鈴木幸子, 田口恭治, Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) の薬理学的研究 (1) 鎮痛効果, 応用薬理, **26**, 803–810 (1983).
- [41] 佐々木健一, 石川正明, 門馬恵子, 高柳義一, 免疫調節物質有機ゲルマニウム化合物Ge-132のラットアジュバント関節炎に及ぼす影響, 東北薬科大学研究年報, **30**, 143–147 (1983).
- [42] 佐々木健一, 石川正明, 門馬恵子, 高柳義一, 有機ゲルマニウム化合物 (Ge-132) のマウスにおける実験的急性炎症および四塩化炭素肝障害に及ぼす影響, 応用薬理, **27**, 1119–1131 (1984).
- [43] 麻生久, 海老名卓三郎, 石田名香雄, 鈴木富士夫, 有機ゲルマニウム化合物Ge-132のマウスインフルエンザウイルス感染症に対する防御効果, *Chemotherapy*, **34**, 665–671 (1986).
- [44] H. Aso, F. Suzuki, T. Ebina, and N. Ishida, Antiviral Activity of Carboxyethylgermanium Sesquioxide (Ge-132) in Mice Infected with Influenza Virus, *J. Biol. Response Mod.*, **8**, 180–189 (1989).
- [45] 水島裕, 東海林洋子, ゲルマニウムの免疫調節作用, 医学のあゆみ, **114**, 1055–1056 (1980).
- [46] T. Satoh and H. Iwaguchi, Antitumor Activity of New Novel Organogermanium Compound, Ge-132, *Cancer Chemother*, **6**, 79–83 (1979).
- [47] Y. Mizushima, Y. Shoji, and K. Kaneko, Restoration of Impaired Immunoresponse

- by Germanium in Mice, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **63**, 338–339 (1980).
- [48] 佐藤隆一, 石川明, カルボキシエチルゲルマニウム三二酸化物の高血圧自然発症ラット(SHR)の血圧に及ぼす影響, *基礎と臨床*, **7**, 105–112 (1973).
- [49] C. C. Ho, Y. F. Chern, and M. T. Lin, Effects of Organogermanium Compound 2-Carboxyethyl Germanium Sesquioxide on Cardiovascular Function and Motor Activity in Rats, *Pharmacology*, **41**, 286–291 (1990).
- [50] M. Ishikawa, T. Aoki, Y. Takayanagi, and K. Sasaki, The Effect of Carboxyethylgermanium Sesquioxide (Ge-132), an Immuno Modulator, on Nociception in Mice, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **66**, 481–484 (1989).
- [51] 石田名香雄, 木村郁朗, 有機ゲルマニウムの科学, 東洋医学舎, (2001).
- [52] 中村國衛, 野元けい子, 大沢俊彦, 高橋幸男, 秋葉光雄, 柿本紀博, 有機ゲルマニウム化合物の生理活性 - 有機ゲルマニウム化合物による Maillard 反応の調節 -, *日本化学会誌: 化学と工業化学*, 307–316 (1994).
- [53] N. J. Unakar, M. Johnson, J. Tsui, M. Cherian, and E. C. Abraham, Effect of Germanium-132 on Galactose Cataracts and Glycation in Rats, *Exp. Eye Res.*, **61**, 155–164 (1995).
- [54] S. J. Angyal, The Composition of Reducing Sugars in Solution, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **42**, 15–68 (1984).
- [55] T. Barclay, M. Ginic-Markovic, M. R. Johnston, P. Cooper, and N. Petrovsky, Observation of the Keto Tautomer of D-Fructose in D₂O Using ¹H NMR Spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, **347**, 136–141 (2012).
- [56] 日本電子株式会社, qNMR (Quantitative NMR : 定量NMR)とは, JEOLアプリケーションノート, (2013).
- [57] T. Shimizu, A. Goto, K. Hashi, and S. Ohki, Trial Measurement of NMR in a Bitter

- Magnet of NIMS, *Chem. Lett.*, **33**, 1502–1503 (2004).
- [58] 斎藤直樹, 核磁気共鳴 (NMR) 分光法による有機化合物の定量分析法に関する調査研究, 産総研計量標準報告, **9**, 117–133 (2014).
- [59] Y. Shimada, K. Sato, Y. Tokuji, and T. Nakamura, Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Interactions between the Organic Germanium Compound Ge-132 and Saccharides, *Carbohydr. Res.*, **407**, 10–15 (2015).
- [60] J. P. Lorand and J. O. Edwards, Polyol Complexes and Structure of the Benzeneboronate Ion, *J. Org. Chem.*, **24**, 769–774 (1959).
- [61] A. Dukler and A. Freeman, In Situ Product Removal of Ketoses by Immobilized 3-Amino Phenyl Boronic Acid: Effect of Immobilization Method on pH Profile, *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 25–28 (2001).
- [62] K. B. Hicks and F. W. Parrish, A New Method for the Preparation of Lactulose from Lactose, *Carbohydr. Res.*, **82**, 393–397 (1980).
- [63] T. Nagasawa, K. Sato, Y. Shimada, and T. Kasumi, Efficient Conversion of D-Glucose to D-Fructose in the Presence of Organogermanium Compounds, *J. Appl. Glycosci.*, **63**, 39–45 (2016).
- [64] 鈴木康夫, ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用, 平成15年度 戦略的創造研究推進事業 C R E S T 研究年報, (2004).
- [65] S. Y. Mir-Shekari, D. A. Ashford, D. J. Harvey, R. A. Dwek, and I. T. Schulze, The Glycosylation of the Influenza A Virus Hemagglutinin by Mammalian Cells. A Site-Specific Study, *J. Biol. Chem.*, **272**, 4027–4036 (1997).
- [66] H. Tanaka, H. Chiba, J. Inokoshi, A. Kuno, T. Sugai, A. Takahashi, Y. Ito, M. Tsunoda, K. Suzuki, A. Takénaka, T. Sekiguchi, H. Umeyama, J. Hirabayashi, and S. Omura, Mechanism by Which the Lectin Actinohivin Blocks HIV Infection of

- Target Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 15633–15638 (2009).
- [67] 楠本正一, 糖鎖の構造生物学と機能, 平成9年度開始未来開拓学術研究推進事業研究プロジェクト, (1997).
- [68] N. Kojima and S. Hakomori, Specific Interaction between Gangliosylceramide (Gg3) and Sialosylceramide (GM3) as a Basis for Specific Cellular Recognition between Lymphoma and Melanoma Cells, *J. Biol. Chem.*, **264**, 20159–20162 (1989).
- [69] J. B. Lowe, L. M. Stoolman, R. P. Nair, R. D. Larsen, T. L. Berhend, and R. M. Marks, ELAM-1-Dependent Cell Adhesion to Vascular Endothelium Determined by a Transfected Human Fucosyltransferase cDNA, *Cell*, **63**, 475–484 (1990).
- [70] M. Takeuchi, N. Inoue, T. W. Strickland, M. Kubota, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozutsumi, S. Takasaki, and A. Kobata, Relationship between Sugar Chain Structure and Biological Activity of Recombinant Human Erythropoietin Produced in Chinese Hamster Ovary Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 7819–7822 (1989).
- [71] 鹿児島正豊, 大西勉, 勝呂信雄, 富澤攝夫, 2-Carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge-132)の体内動態(第1報) 経口投与, *応用薬理*, **32**, 71–79 (1986).
- [72] M. E. V Johansson, H. Sjövall, and G. C. Hansson, The Gastrointestinal Mucus System in Health and Disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **10**, 352–361 (2013).
- [73] B. Michael and W. Michael, Isotopic Compositions of the Elements 2009 (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **83**, 397–410 (2011).
- [74] J. P. Ribeiro, T. Diercks, J. Jiménez-Barbero, S. André, H.-J. Gabius, and F. J. Cañada, Fluorinated Carbohydrates as Lectin Ligands: ¹⁹F-Based Direct STD

- Monitoring for Detection of Anomeric Selectivity, *Biomolecules*, **5**, 3177–3192 (2015).
- [75] M. Braitsch, H. Kählig, G. Kontaxis, M. Fischer, T. Kawada, R. Konrat, and W. Schmid, Synthesis of Fluorinated Maltose Derivatives for Monitoring Protein Interaction by ¹⁹F NMR, *Beilstein J. Org. Chem.*, **8**, 448–455 (2012).
- [76] S. Satchithanandam, M. Vargofcak-Apker, R. J. Calvert, A. R. Leeds, and M. M. Cassidy, Alteration of Gastrointestinal Mucin by Fiber Feeding in Rats, *J. Nutr.*, **120**, 1179–1184 (1990).
- [77] K. Inoue, M. Tsuda, and S. Koizumi, ATP Receptors in Pain Sensation: Involvement of Spinal Microglia and P2X(4) Receptors, *Purinergic Signal.*, **1**, 95–100 (2005).
- [78] N. Goldman, M. Chen, T. Fujita, Q. Xu, W. Peng, W. Liu, T. K. Jensen, Y. Pei, F. Wang, X. Han, J.-F. Chen, J. Schnermann, T. Takano, L. Bekar, K. Tieu, and M. Nedergaard, Adenosine A1 Receptors Mediate Local Anti-Nociceptive Effects of Acupuncture, *Nat. Neurosci.*, **13**, 883–888 (2010).
- [79] D. H. Kim, K. F. Faull, A. J. Norris, and C. D. Eckhert, Borate-Nucleotide Complex Formation Depends on Charge and Phosphorylation State, *J. Mass Spectrom.*, **39**, 743–751 (2004).
- [80] T. Nakamura, Y. Shimada, T. Takeda, K. Sato, M. Akiba, and H. Fukaya, Organogermanium Compound, Ge-132, Forms Complexes with Adrenaline, ATP and Other Physiological Cis-Diol Compounds, *Future Med. Chem.*, **7**, 1233–1246 (2015).
- [81] 木下誉富, SBDDに基づく毒性回避—パラレルSBDD—, *SAR News*, **21**, 7–12 (2011).
- [82] 鎌谷直之, 遺伝的酵素欠損症による免疫不全症, *日本臨床免疫学会会誌*, **9**,

- 423–432 (1986).
- [83] T. Terasaka, K. Tsuji, T. Kato, I. Nakanishi, T. Kinoshita, Y. Kato, M. Kuno, T. Inoue, K. Tanaka, and K. Nakamura, Rational Design of Non-Nucleoside, Potent, and Orally Bioavailable Adenosine Deaminase Inhibitors: Predicting Enzyme Conformational Change and Metabolism, *J. Med. Chem.*, **48**, 4750–4753 (2005).
- [84] W. N. Valentine, D. E. Paglia, S. Clarke, B. H. Morimoto, M. Nakatani, and R. Brockway, Adenine Ribo- and Deoxyribonucleotide Metabolism in Human Erythrocytes, B- and T-Lymphocyte Cell Lines, and Monocyte-Macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 6682–6686 (1985).
- [85] P. P. Trotta and M. E. Balis, Structural and Kinetic Alterations in Adenosine Deaminase Associated with the Differentiation of Rat Intestinal Cells, *Cancer Res.*, **37**, 2297–2305 (1977).
- [86] Sigma-Aldrich, Enzymatic Assay of ADENOSINE DEAMINASE, (1995).
- [87] D. E. Koshland, The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, **33**, 2375–2378 (1995).
- [88] H. Zhao, A. Palencia, E. Seiradake, Z. Ghaemi, S. Cusack, Z. Luthey-Schulten, and S. Martinis, Analysis of the Resistance Mechanism of a Benzoxaborole Inhibitor Reveals Insight into the Leucyl-tRNA Synthetase Editing Mechanism, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2277–2285 (2015).
- [89] B. N. Cronstein, The Mechanism of Action of Methotrexate, *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **23**, 739–755 (1997).
- [90] 寺坂忠嗣, 仲西功, Structure-Based Drug Design による新規非ヌクレオシド体 アデノシンデアミナーゼ阻害剤の創出研究, *SAR News*, **7**, 6–9 (2004).
- [91] 日本病院薬剤師会, 抗悪性腫瘍剤コホリン静注用, 医薬品インタビューフォ

- 一△, **7**, (2012).
- [92] A. V. Sauer, I. Brigida, N. Carriglio, and A. Aiuti, Autoimmune Dysregulation and Purine Metabolism in Adenosine Deaminase Deficiency, *Front. Immunol.*, **3**, 265 (2012).
- [93] S. Seto, C. J. Carrera, D. B. Wasson, and D. A. Carson, Inhibition of DNA Repair by Deoxyadenosine in Resting Human Lymphocytes, *J. Immunol.*, **136**, 2839–2843 (1986).
- [94] 松本光雄, 渡部俊彦, 小笠原綾子, 三上健, 松本達二, グルタチオンのメラニン合成阻害機構, *薬学雑誌*, **128**, 1203–1207 (2008).
- [95] 田村豊幸, 藤井彰, 大西勉, Carboxyethylgermanium Sesquioxide (Ge-132) の一般薬理学的研究, *薬理と治療*, **14**, 3209–3218 (1986).
- [96] Y. Tanaka, T. Horinouchi, and K. Koike, New Insights into β -Adrenoceptors in Smooth Muscle: Distribution of Receptor Subtypes and Molecular Mechanisms Triggering Muscle Relaxation, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **32**, 503–514 (2005).
- [97] T. De Marco, P. A. Daly, M. Liu, S. Kayser, W. W. Parmley, and K. Chatterjee, Enalaprilat, a New Parenteral Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor: Rapid Changes in Systemic and Coronary Hemodynamics and Humoral Profile in Chronic Heart Failure, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **9**, 1131–1138 (1987).
- [98] H. Yamaguchi, Y. Shimada, T. Takeda, T. Nakamura, and N. Mano, A Novel Extraction Method Based on a Reversible Chemical Conversion for the LC/MS/MS Analysis of the Stable Organic Germanium Compound Ge-132, *Anal. Chem.*, **87**, 2042–2047 (2015).
- [99] Y. Liu, L. Ren, and Z. Liu, A Unique Boronic Acid Functionalized Monolithic Capillary for Specific Capture, Separation and Immobilization of Cis-Diol

- Biomolecules, *Chem. Commun.*, **47**, 5067–5069 (2011).
- [100] 笠井献一, 松本勲武, 別府正敏, アフィニティークロマトグラフィー, 東京化学同人, (1991).
- [101] B. Lindberg and B. Swan, Paper Electrophoresis of Carbohydrates in Germanate Buffer, *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1043–1050 (1960).
- [102] 廣明秀一, NMRで見るタンパク質-低分子相互作用, 生化学, **85**, 679–686 (2013).
- [103] G. F. Wang, C. Li, and G. J. Pielak, ¹⁹F NMR Studies of α -Synuclein-Membrane Interactions, *Protein Sci.*, **19**, 1686–1691 (2010).
- [104] E. T. Ahrens, R. Flores, H. Xu, and P. A. Morel, In Vivo Imaging Platform for Tracking Immunotherapeutic Cells, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 983–987 (2005).
- [105] 千畑一郎, 土佐哲也, 松尾雄志, 実験と応用 アフィニティークロマトグラフィー, 講談社サイエンティフィック, (1976).

謝辞

本研究は帯広畜産大学畜産科学科准教授・得字圭彦先生のご指導のもとに行われました。本論文作成にあたり、テーマの決定、研究の考え方、論文作成からプレゼンテーションの方法まで事細かに、親切で丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。誠にありがとうございました。

本研究を推進するにあたり、ご指導ご鞭撻頂きました帯広畜産大学畜産科学科教授・木下幹朗先生、ならびに弘前大学農学生命科学部食料資源学科助教・前多隼人先生に厚く御礼申し上げます。NMR 測定を行うにあたりご指導頂きました弘前大学理工学部物質創成科学科教授・伊東俊司先生、弘前大学理工学研究科・荒木宏孝先生、ならびに帯広畜産大学畜産科学科准教授・中村正先生に深く感謝申し上げます。酵素実験を遂行するにあたり、貴重なご助言を賜りました弘前大学農学生命科学部分子生命科学科准教授・坂元君年先生に心より御礼申し上げます。アフィニティーカラムの開発において、基材である GMA ビーズのご提供と的確なご助言を賜りました千葉大学工学部共生応用化学科教授・斎藤恭一先生に厚く御礼申し上げます。

また本論文の審査を引き受けて下さいました、岩手大学農学部応用生物化学科教授・木村賢一先生、山形大学農学部食品生命環境学科教授・塩野義人先生に謹んで感謝の意を表す次第であります。

本研究を遂行する機会を与えてくださり、ご支援頂いた株式会社浅井ゲルマニウム研究所、特に会社業務と博士課程の両立をご支援下さいました函館研究所の皆様に感謝申し上げます。私に有機化学を教えて下さり、本研究の共同研究者、さらにはアドバイザーとして多大なご支援を頂きました研究部・佐藤克行研究員に深謝申し上げます。博士号取得を奨めてくださり、生化学分野について多くのご指導を頂きました中村宜司取締役様に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、多方面でお世話

になりました研究部の皆様に感謝申し上げます。

最後に、これまで私をあたたく応援してくれた両親と祖母、そして、絶えず明るく励まし支えてくれた妻と娘に心から感謝申し上げます。

2016年8月1日

島田 康弘