

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 フィルマン

フィルマンは「Development of Bicyclic *N*-Nitrosamines as Small Molecule NOS Mimics: Featuring Controllable NO Release Concentration and High Cellular Retention Ability (NO 放出濃度の調節可能な細胞内保持性二環性ニトロソアミンの創製)」を論文題目とし、以下の研究をおこなった。

内皮由来弛緩因子 (EDRF) の本体である一酸化窒素 (NO, nitric oxide) は、生体内において一酸化窒素合成酵素 (NO-Synthase, NOS) により L-アルギニンと分子状酸素を基質として産生される。NOS には 3 種類知られており、e-NOS と n-NOS は低濃度の NO を刺激応答的にパルス状に生成し、i-NOS は高濃度の NO を連続的に産生すると考えられている。NOS で考えられている様に NO 発生を刺激依存的に量的時間的にコントロールできる小分子の創製は、様々な生理的、病理的条件下での NO の挙動を人工的に模倣する方法になり得え、また NO 供与のメディシナル化学的な活用にもつながると考えた。そこで細胞障害性の低い可視光照射をトリガーとして NO を放出する低分子ケージド NO 化合物の設計と合成、細胞内保持性の付加、生細胞への適応性評価を本研究の目的とした。

二環性骨格を持つニトロソアミンの化学的特性を調査した結果、二環性構造に由来するニトロソアミン構造の非平面化によって可視光領域まで広がる吸収を持ち、また光励起した際、ニトロソアミンの N-NO 結合の反結合性空軌道に 1 電子収容されるため結合切断が起き NO (ラジカル) が生成することが判明した。特殊な装置や付属分子の結合を必要とせず物質本来の構造特性に由来する反応特性を発見・活用することにより可視光照射トリガー型ケージド NO 分子が創製可能である。様々な周辺置換基を検討することでニトロソアミンの軌道準位を調節して NO 放出効率を制御することが出来ると考えられる。NO のより効率の良い放出を起こす置換基を見つけるとともに、生細胞への応用を考え、化合物の細胞内保持特性を付与した。

細胞内保持評価ならびに生細胞への適応性を評価するため Piccell 細胞系を利用した。すなわち Piccell は生細胞 NO プローブであると共に、モデル細胞として利用した。Piccell は PK-15 に由来する細胞株であり、sGC (グアニールサイクラーゼ) の α 、 β -サブユニット

を発現する。また、GFP (green fluorescent protein) に由来する蛍光標タンパク質部位を2つもち、細胞内に NO が生じると sGC に増幅され蛍光共鳴エネルギー移動により緑色を発する。この色の変化が Piccell の中にある YFP (yellow fluorescent protein) と CFP (cyan fluorescent protein) の放出比 (emission ratio) の変化である。この放出比の変化により細胞内に NO の有無がわかる。また標準物質と比較することで細胞内 NO 濃度も推定可能である。

Piccell をニトロソアミンとインキュベーションして光照射すると Piccell 内での NO 産生が見られた。光照射時間を変化させると時間依存的に放出される NO の量も多くなることがわかった。可視光照射により生細胞中 (Piccell) でも NO が放出することを確認した。合成したニトロソアミン誘導体は無細胞の条件 (キュベット内) で可視光照射により NO を放出することも確認し、キュベット中と細胞中の NO 放出能には一定の相関が見出されたが細胞内で予想外の挙動の化合物も見出された。

化合物はその疎水性のため、細胞から漏出する。そのため細胞保持のためにアセトキシメチルエステル (AM エステル) 置換基を導入することで化合物の細胞保持力の向上を目指した。AM エステルは細胞内のエステラーゼにより加水分解され、カルボン酸になり、生理条件 (pH 7.4) 下で、カルボン酸アニオンになって、細胞膜から漏出しにくくなることが既に確立されており本化合物群に応用した。

分子内の AM エステルの数を変えて、また AM エステルの導入部位を分子の左半分と右半分に二分し、AM エステル誘導体を合成した。合成した化合物を Piccell で評価した結果 AM エステル導入によって細胞保持活性が観測されたが、AM エステルの数を多くすると NO 発生濃度が減少した。また導入する AM エステルの数ではなくむしろ位置により NO 発生効率に大きな差が生じた。このように AM エステル法は確立されているものの、数、位置を変更した一連の誘導体を用いた AM エステルの効果の比較研究が行われた例は少ない。

以上フィルマンは、生体に害の少ない可視光によって NO をアンケージできる生細胞に適応可能なケージド NO 分子を開発することに成功した。NO 発生を量的時間的にコントロールできる小分子の創製は、生体内の NO の作用を精査するためのケミカルツールとして、また、その作用を応用した新たなメディシナル化学としての応用が期待される。

以上の業績は、薬学分野における有機化学の進展に貢献し、またメディシナル化学に利用可能な機能性分子の進歩にも有意に貢献するものであり、博士 (薬科学) の授与に値するものである。