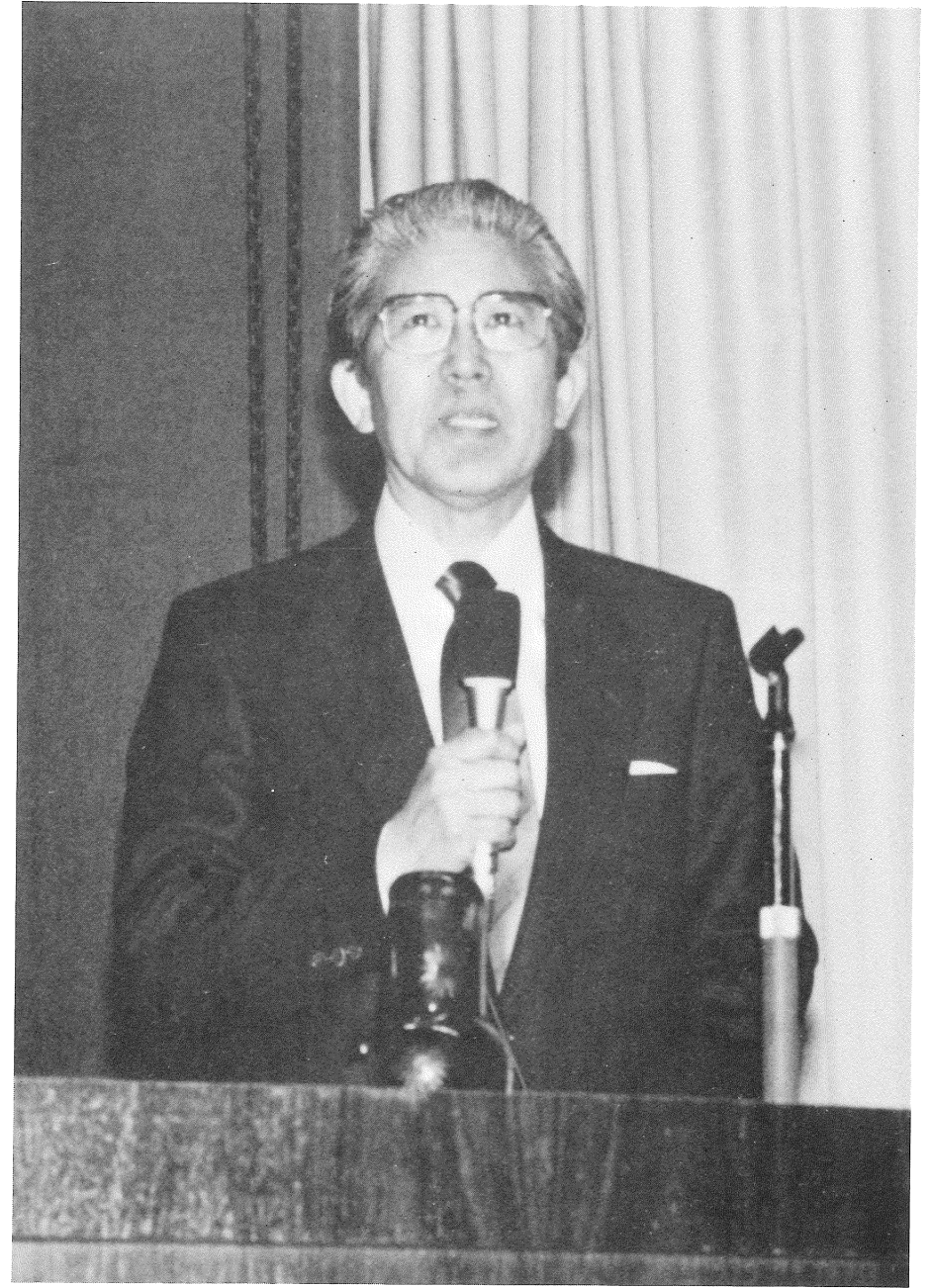


木村道也教授退官記念

業 績 集

(1985年10月)

北海道大学薬学部
薬品分析化学講座



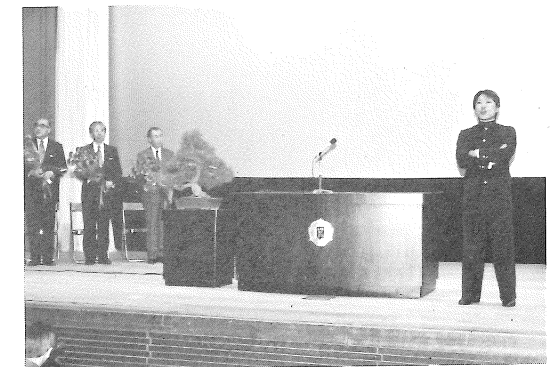
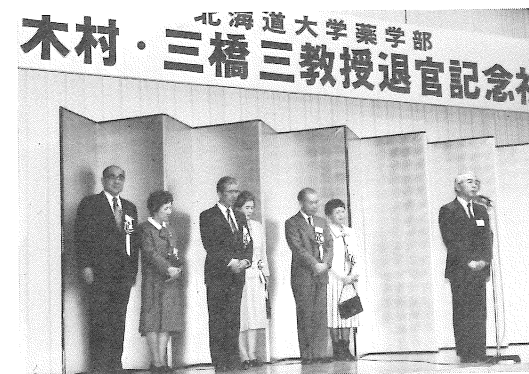
木村道也教授近影

木村道也教授経歴

- 1921年 島根県松江市に生まれる
- 1943年 東京帝国大学医学部薬学科卒業
同大学院特別研究生
- 1951年 千葉大学薬学部講師
- 1955年 北海道大学医学部薬学科助教授 (薬品分析化学)
- 1956年 同教授
- 1962年 連合王国チェスター・ピティン研究所に留学 (一年間)
- 1964年 北海道大学医学部附属病院薬剤部長 (一年三ヶ月)
- 1965年 北海道大学薬学部創立, 同学部教授となる
- 1966年 北海道大学評議員 (1971年まで)
- 1973年 北海道大学薬学部長 (二年間)
日本分析化学会学会賞受賞
- 1976年 日本薬学会北海道支部長
- 1977年 日本分析化学会副会長
- 1985年 北海道大学を定年退官
北海道大学名誉教授



退官記念行事スナップ





目 次

木村道也教授近影
 木村道也教授経歴
 退官記念行事スナップ
 最 終 講 義…………… 1
 研 究 の 流 れ……………21
 研 究 業 績……………29
 編 集 後 記

最 終 講 義

1985年2月23日
於：クラーク会館

最終講義

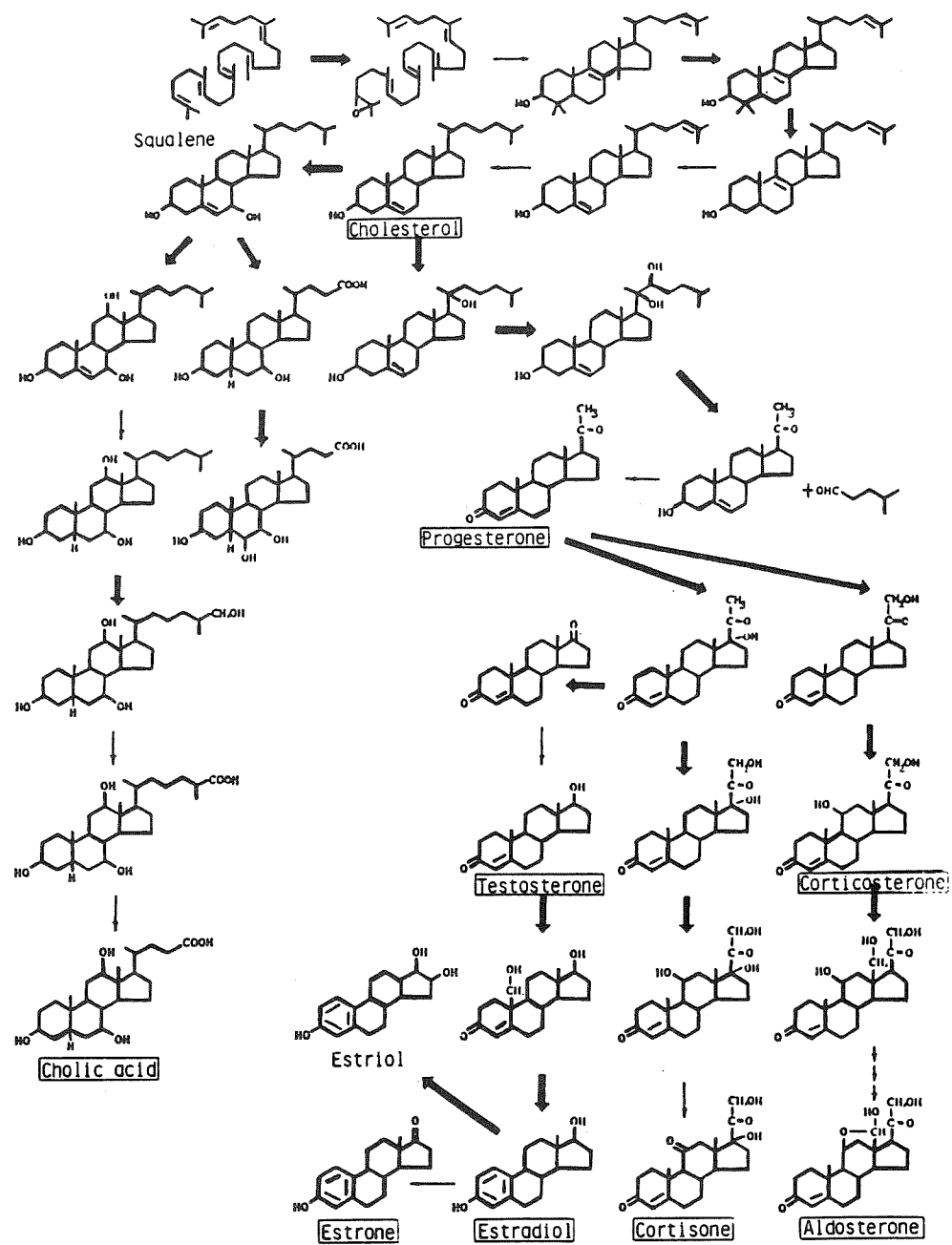
「ステロイド・鉄・酸素」

木村 道也

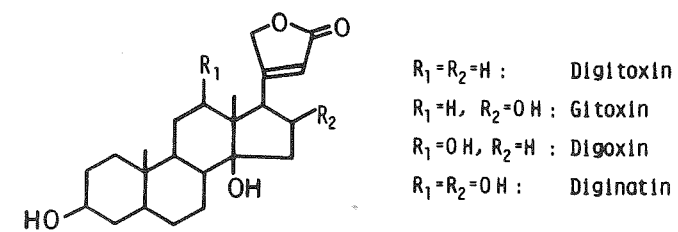
大変、おいそがしい中を全国から多数の方々がお集まりいただきまして、私、大変感激しております。厚く御礼を申し上げる次第でございます。演題に掲げましたのは、「ステロイド・鉄・酸素」と、落語の三題噺のようなこととなりますが、私が日頃非常に興味をもちますのは、この三者が、生体の中で、いろいろと相互作用をしているということが大変興味深く思えるのでございまして、本日はそれに関します2, 3の私共の研究室で行いました仕事につきまして、むしろその背景にウェイトをおいて、お話をさせていただきたいと思っております。

— Cholesterol in the Body —

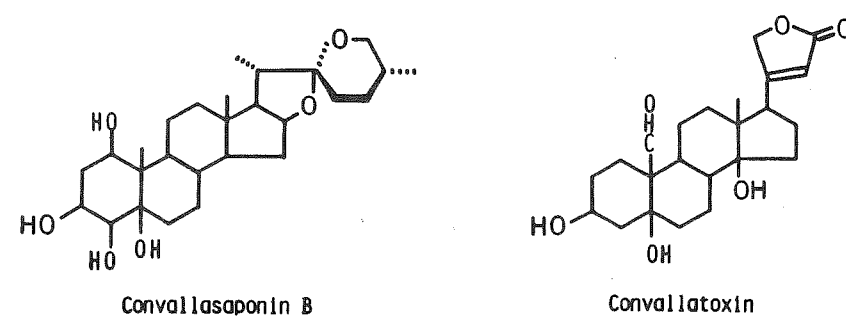
我々がもっともなじみ深いステロイドはコレステロールでございまして、体重の0.3%ぐらいを占めています。コレステロールは性ホルモン、胆汁酸、副腎皮質ホルモンなどの生合成の出発物質でございまして、かたやプロゲステロンを通りまして、副腎皮質ホルモンあるいは男性ホルモン、更には男性ホルモンから女性ホルモンへ至る経路、かたや胆汁酸ができる経路があります。ステロイドの metabolic map (第1図) 中の矢印が太い所では酸素添加酵素 (oxygenase) が空気中から取り込みました酸素を使いまして酸素官能基導入反応をやっていきます。例えば、コレステロールからプロゲステロンにいたります時には側鎖が切れて水酸基が入っております。また男性ホルモンからは、angular の19-メチル基の水酸化、更にカルボン酸となった後で、脱炭酸を経てステロイドA環を aromatize するという形で女性ホルモンができております。動物界だけではなく、植物成分でもこのようにステロイドに水酸基の入ったもの、例えばジギタリスの強心成分があります (第2図)。私どもはかつて北海道産スズランの花のステロイド成分の研究に従事いたしまして、同じく強心配糖体であるところの、コンバトキシシン、それからコンバラサポニン (ステロイダルサポニン) を取りました。コンバトキシシンの場合は、19-angular メチル基が酸素化されてアルデヒドになっております。またジギトキシシンと同じように、C(14)が水酸化され、更にC(5)の位置も水酸化されています。一方、コンバラサポニンではA環に異常に水酸基が集まっております (第3図)。また、化学構造からおわかりのように、コレステロールがほとんどそのままの形でこういうものを作っております。私共はこのようなステロイダルサポニンを7種類ほど取りましたが、水酸基を非常にたくさんもっているのが特徴的であり、今一つは、C(5)の3級のOHに、場合によっては糖がついてくる



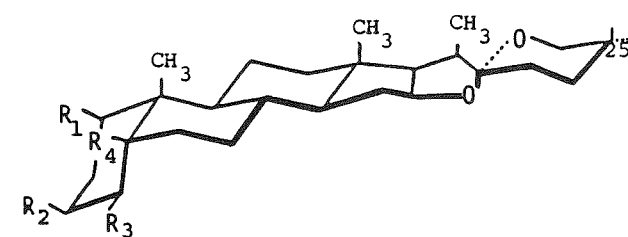
第1图



第2图



CONVALLASAPONIN



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	25-CH ₃
(I)	OH	O-ara	H	OH	L
(II)	OH	OH	OH	O-ara	L
(III)	OH	O-ara-rha-rha	H	H	D
(IV)	O-glu	O-rha-xyl-rha	H	H	L
(V)	H	O-ara-ara-ara	H	H	D
(VI)	OH	O-ara-glu	H	OH	L
(VII)	OH	O-glu	OH	O-ara	L

第3图

というような、ちょっとめずらしい形のものもありました。

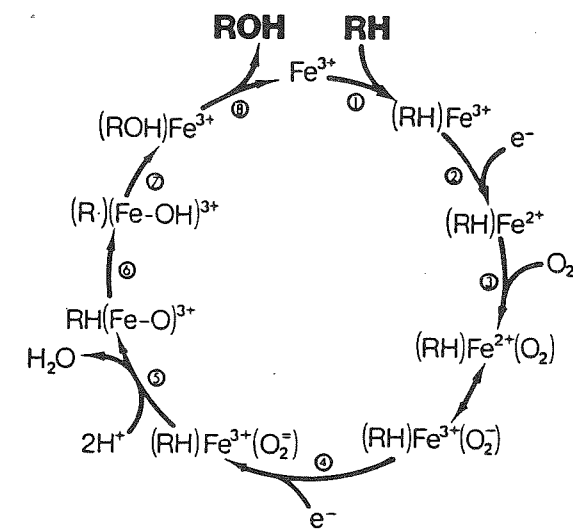
こういう水酸化を行いますのは、一般的には oxygenase であり、その中で特に monooxygenase は空気から取り入れました酸素分子の内の一方の酸素原子を基質に導入します (第 I 表)。Monooxygenase の代表的なものがヘム酵素 cytochrome P-450 でございますが、もともと

第 I 表 Reactions Effected by Monooxygenases

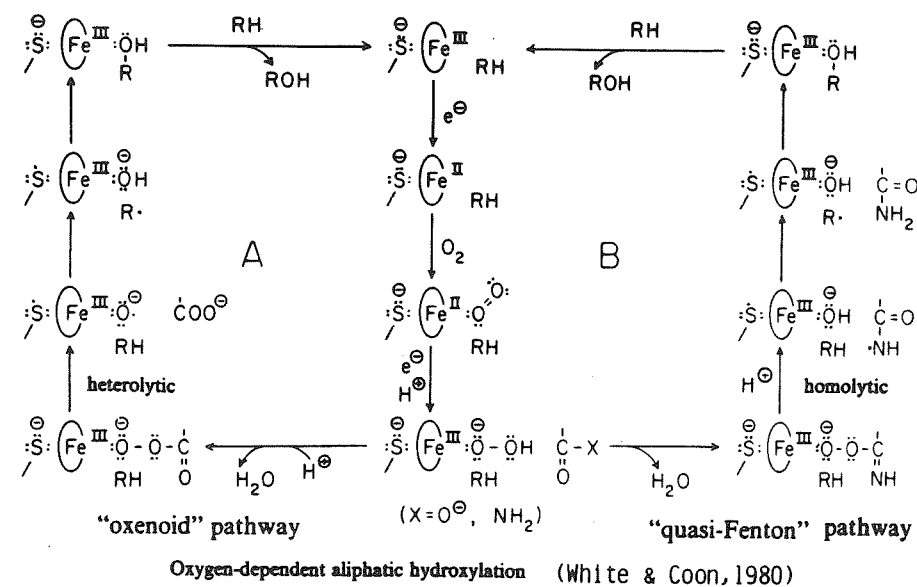
Type of reaction	Substrate	Product
Saturated C—H hydroxylation	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{matrix} \text{C—H}$	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{matrix} \text{C—OH}$
Aromatic hydroxylation	ArH	ArOH
Epoxidation of a double bond	$R_1\text{CH=CHR}_2$	$\begin{matrix} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ R_1\text{CH—CHR}_2 \end{matrix}$
Lactonization	$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ R_1\text{CR}_2 \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ R_1\text{COR}_2 \end{matrix}$
Hydroxylation of a nitrogen atom	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} \text{NH}$	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} \text{N—OH}$
Formation of an amine oxide	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{matrix} \text{N}$	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{matrix} \text{N—O}$
Formation of a sulfoxide	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} \text{S}$	$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} \text{S=O}$
Deamination	$\begin{matrix} \text{RCHCH}_3 \\ \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	$\text{RCOCH}_3 + \text{NH}_3$
N-Dealkylation	$R_1\text{NHCH}_2R_2$	$R_1\text{NH}_2 + R_2\text{CHO}$
O-Dealkylation	ROCH_3	$\text{ROH} + \text{CH}_2\text{O}$
S-Dealkylation	RSCH_3	$\text{RSH} + \text{CH}_2\text{O}$

これは3価のヘム鉄でございますが、これが基質をとらえますと、電子伝達系から electron を1個もらいまして鉄は2価になります。鉄が2価になりますと分子状酸素と結合しますが、次いで鉄と酸素との間に electron の移動が生じまして鉄は再び3価になる一方で、酸素は superoxide anion O_2^- になります。続いて、前と同じような NADPH あるいは NADH 依存性の還元系から、あるいは cytochrome b_5 から第2の電子をもらいまして、これで酵素内ではいわば過酸化水素が解離した形になります。次いで peroxide anion の開裂とプロトンの取り込みとによっ

て、一方の酸素原子は水になり、もう一方がいわゆる活性酸素となって水酸化を行なっていくという機構が知られております (第4図)。化学的にももしろいのは、取り込まれた酸素が結局一つは水になり、一つは基質に入っていくために、酸素分子が二つの酸素原子にわかれる所で説も二つにわかれていることであります。Effector というようなものを考えまして、heterolytic にいくのか、homolytic にいくのか、名付けて “oxenoid” pathway か “quasi-Fenton” pathway かどちらかのメカニズムで、第5図のAかBかのサイクルを形成するというようなことが提案されております。

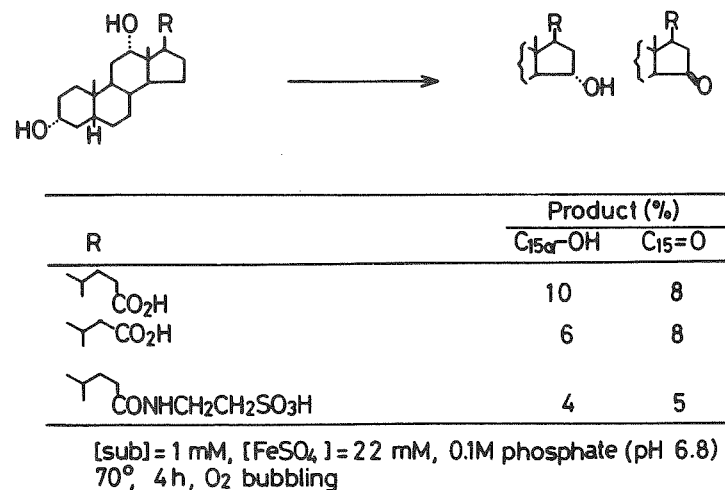


第4図 Oxygen Activation by Cytochrome P-450

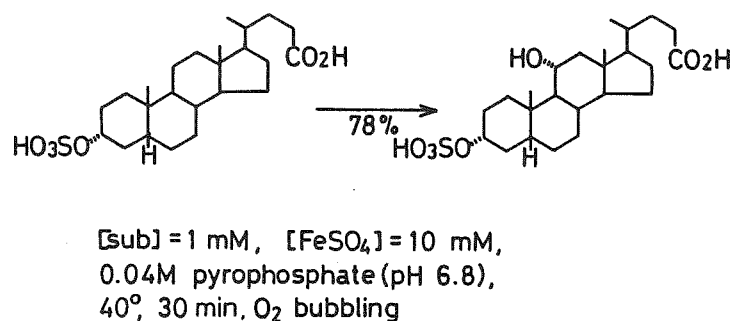


第5図 Oxygen Activation by Cytochrome P-450

酸素添加酵素 cytochrome P-450 は、また薬物代謝酵素という名前でも呼ばれる場合もあります。私は今まで、申し上げたようなことをバックにいたしまして、この cytochrome P-450 の行います反応原理というものをうまく利用して、薬物の酸素化的代謝のモデルとして、スクリーニングに使えないだろうかというようなことを考えました。従いまして、この cytochrome P-450 の重要な要素であります2価の鉄および当然のことながら酸素、それから酵



第6図 Oxygenation of Deoxycholic Acid by Fe²⁺-O₂



第7図 Oxygenation of Lithocholic Acid 3α-Sulfate in Aqueous Solution

素反応でございますから有機溶媒ではなくて、水性溶媒、具体的には pH が中性に近い phosphate buffer とから成る系を設定して、この反応を試みました。尚、この種のいわゆるモデル反応につきましては、以前から多くの研究者がいろいろな実験を試み、既に多数の報文がでております。2 価の鉄には硫酸第一鉄を用い、phosphate buffer は pH 6.8、70°C で 4 時間酸素を bubbling しておりますと、ステロイドは水酸化を受けます (第 6 図)。Pyrophosphate にいたしますと、鉄の量をもっと少なくすみ、時間も 30 分、温度も 40°C とより緩和な条件でも水酸化が進行します (第 7 図)。

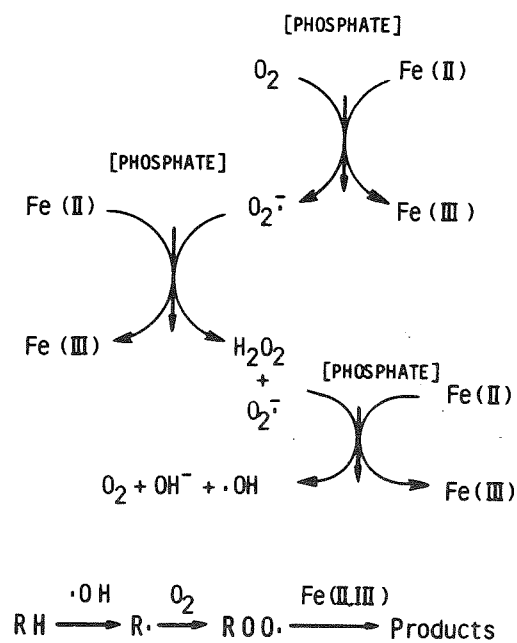
お話がウルトラ・マクロ・スケールになりまして恐縮でございますけれども、酸素というものに焦点をあてて見たいと思います。地球誕生は 45 億年前と言われておりますが、最初から酸素が分子状であったわけではないということございまして、第 II 表は京都大学工学部の松浦

第 II 表 大気中の酸素の起源

地球の大気の変遷と生物進化				
地球の年齢 [億年]	0	5	20	45
大気圏	還元的 CH ₄ , H ₂ , NH ₃ H ₂ O, N ₂ , H ₂ S	中間的 N ₂ , H ₂ O CO ₂	酸化的 N ₂ , O ₂ , H ₂ O CO ₂	
生物圏		嫌気性生物	好気性生物	
		化学進化	光合成生物	

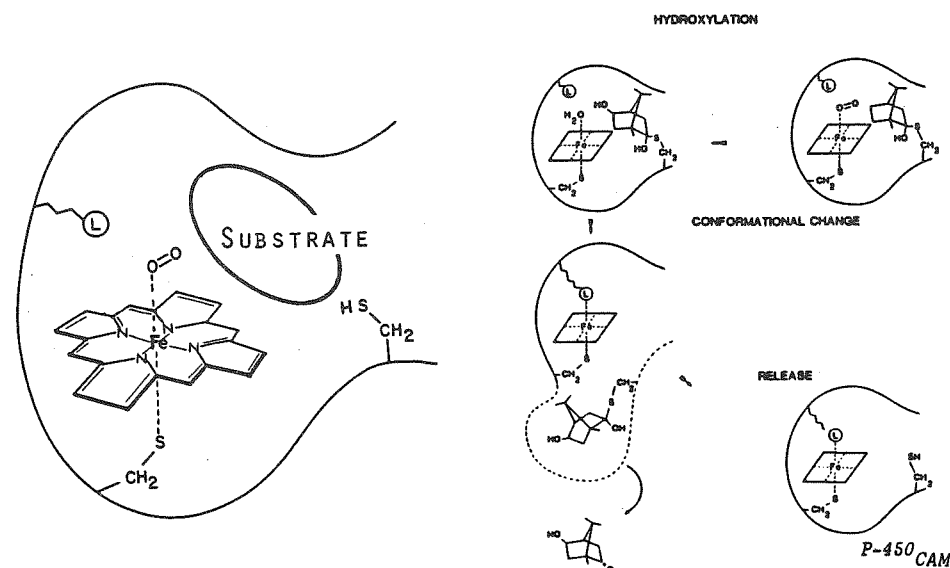
先生の著書 (1977年) によるもので、最初の大気組成が示されておりますが、丁度その頃に実は惑星生成理論が発展したそうでございまして、それによりまして表中にありますが「中間的」組成の方がより確からしいということになっておるようございまして。化学進化がある程度進みまして、最初に嫌気性生物が出てまいります。そして光合成生物がやがて出てまいります。その結果として、大気組成中に初めて分子状の酸素が加わってきたというような経過をたどっております。ものの本によりまして 38 億年位前までは、原始の海の中の 2 価の鉄の濃度は非常に高かった。それがその頃から酸素分子ができてまいりますので、大気中の酸素をとって、いわゆるマグネタイト、2 価の酸化鉄にある程度 3 価の酸化鉄が混ざったような、そのようなものがだんだんできてきて、それが 20 億年ぐらい前でピークに達し、それ以後 18 億年前からはもっぱら、いわゆるベンガラ、3 価の酸化鉄、ヘマタイトだけになってきておるとい

ようなところが一つの裏付けになると言われております。従いまして、そういう酸素分子と 2 価の鉄とが原始の海水の中で相互作用を行い、先程、私共の仕事として御紹介しました様な酸素官能基導入反応が進行する可能性があったわけでございます。教科書的な反応機構といたしましてはまず、OH ラジカルができて、それが基質の水素を引きぬき、酸素分子と結合してペルオキシラジカルができます。次いで、いわゆる鉄の redox 分解を受けましていろいろな product ができてくる (第 8 図) というように理解しておりますけれども、実は phosphate, 鉄, 酸素は相互に interact しやすいものでございまして、あるいは三元錯体というようなものが介在しているのではないかと今後の展開を楽しみにしておるわけでございます。この系はフリーラジカルを生じますので、当然に大変野



第 8 図 Fe(II)/O₂/Phosphate buffer System

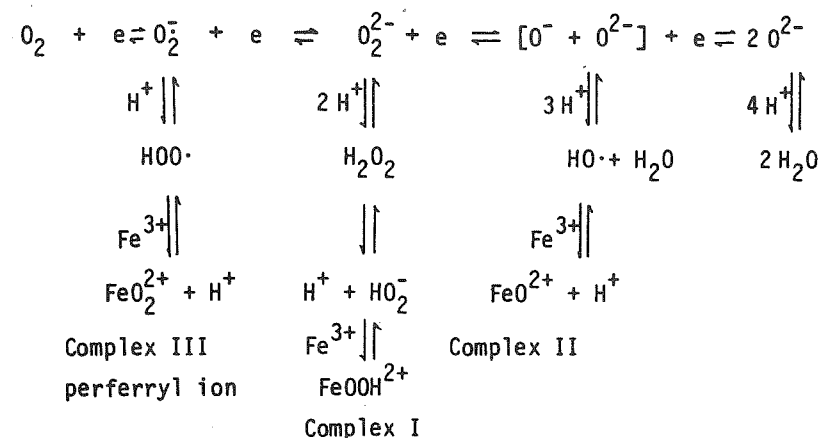
生的で荒々しくて反応のコントロールがきかない系でございます。おそらく、原始の大昔においても化学進化なり、あるいは生物の進化に伴って、たくさんできてきた有機化合物についてそのころ蓄積してきた酸素分子を使いました鉄触媒性の酸素化反応がめったやたらに進んでいたのじゃないかと思われまます。第9図は cytochrome P-450の略図でございますが、まず鉄



第9図

はポルフィリンと結合いたしましてへム鉄になっております。そしてそういうものが蛋白の中に取り込まれて、第5番目の配位子として蛋白のシステイン残基のSと結合しています。第6配位子は蛋白中のリガンド原子と結合しているか水分子と結合しているかと言われておりますけれども、基質が入ってまいりますと、先程お話ししたように酸素分子が結合します。そして、酸素官能基導入反応がいわゆる疎水場で行われます。これは、カンファーが水酸化を受ける例ですが、基質1対試薬1の割合でこういう場で酸素がわたっております。そして、ひとたび product ができますと、蛋白の conformation に変化を生じまして、product は外部へ放り出され、酵素は再び元の姿に帰っていくという非常に巧みな仕掛けを何十億年かの間に生物が取り入れているということでございます。

最近、酸素毒性ということがやかましくいわれてきております。我々は酸素なくしては生命を維持し得ないわけでございますが、反面またこの酸素は非常に毒性を発揮するというところでございます。例えば、キサントシンオキシダーゼとか NADPH oxidase などが働きますと分子状酸素は電子1個を受け取りまして、いわゆる superoxide anion O₂⁻ができます (第10図)。Oxidase の中でも glucose oxidase 等は非常に有名ですけれども、これが酵素反応を行いますと過酸化水素が出てまいります。それから酸素、過酸化水素、O₂⁻、HO₂⁻、HO₂[·]等は相互に反応したり、また不均化を行うものもあります。あるいは2価の鉄などが過酸化水素と反応いたしま



第10図 Active Species from Molecular Oxygen

すと、OH ラジカルができてまいります。それから、例えば lipoxygenase というような酵素はオレフィンと分子状の酸素とでいわゆる過酸化脂質を作っております。それぞれはいわゆる active species と言われておるもので、反応性に富んでおります。そのために、いろいろ悪いことをしてまいりますので、我々の体はちゃんと防衛機構を備えておまして (第III表)、例えば superoxide dismutase が存在します。しかしこれはまだ充分な防衛にはなっておりません、過酸化水素がでてまいりますので、カタラーゼ、パーオキシダーゼがこれに備えてあります。OH ラジカルを作る酵素系はないと言われておりますが、これらの防衛反応において副次的に

第III表 Oxygen Toxicity and Defence Systems

Active species	Donor	Scavenger
O ₂ ⁻	Oxidase (xanthine oxidase NADPH oxidase etc.)	Oxygen carrier (oxyhemoglobin oxymyoglobin)
H ₂ O ₂	Oxidase (glucose oxidase etc.)	Superoxide Dismutase (2 O ₂ ⁻ + 2 H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂)
·OH	H ₂ O ₂ + Fe ²⁺ → ·OH + OH ⁻ + Fe ³⁺ H ₂ O ₂ + O ₂ ⁻ → ·OH + OH ⁻ + O ₂ (Haber-Weiss Reaction)	Catalase Peroxidase
ROOH	Autoxidation of unsaturated fatty acid	Carbohydrate (?) Glutathione peroxidase Vitamin E

きてまいります。それに対しては、carbohydrateが防衛にあっているのではないかというように言われております。それから、過酸化脂質などのヒドロペルオキシドにつきましては、glutathione peroxidaseとか、あるいは、抗酸化剤としてのビタミンE、 α -トコフェロールというようなものが備えられて、おのずとそこに毒物、毒性を発揮するものと、それを防ぐものとのバランスが我々の体の中に常に進行しているということでございます。

第IV表 Iron in the Body

HEME IRON:	hemoglobin (2/3 of total iron) cytochrome P-450 catalase superoxide dismutase
NON-HEME IRON:	ferritin transferrin hemosiderin adrenodoxin
DECONTROLLED IRON:	an accumulation of endogeneous hydrolyzed iron that is out of the controll of ferritin (HYPOTHESIS BY S.H.KON, 1978)

次は鉄に注目いたします。体の中ではヘム鉄とノンヘム鉄等、みなさんよくごぞんじのものが存在いたしますが、本日申し上げたいのは、むしろデコントロールドアイロン(第IV表)、これは、Konという人がMedical Hypothesis誌上で主張していたものでありますけれども、最近になりましてイギリスのHalliwell-Gutteridgeは、たしかに蛋白結合していない鉄がある、そうして、その濃度はだいたい 10^{-6} Mのオーダーでございまして、血液、とくに血清とかプラズマの中にはないが脊髄液の中にはあって、リウマチの患者ですと、がぜん増える。ま

第V表 Concentration of Non-proten-bound Iron Salts

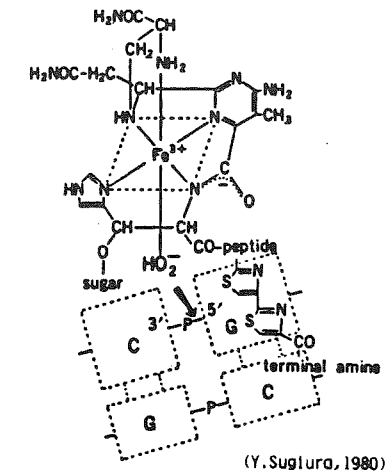
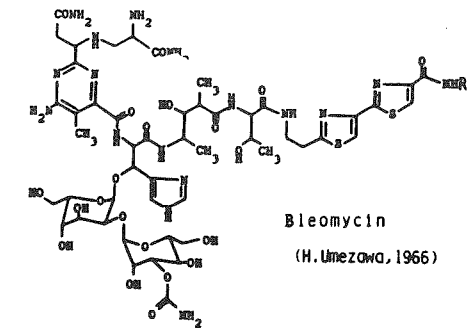
	10^{-6} M (mean \pm S.D.)
Human blood serum or plasma	0
Human cerebrospinal fluid (normal)	2.2 ± 1.3
(rheumatoid patients)	9.4 ± 6.6
Human synovial fluid (rheumatoid patients)	2.8 ± 1.2

B.HALLIWELL & J.M.C.GUTTERIDGE

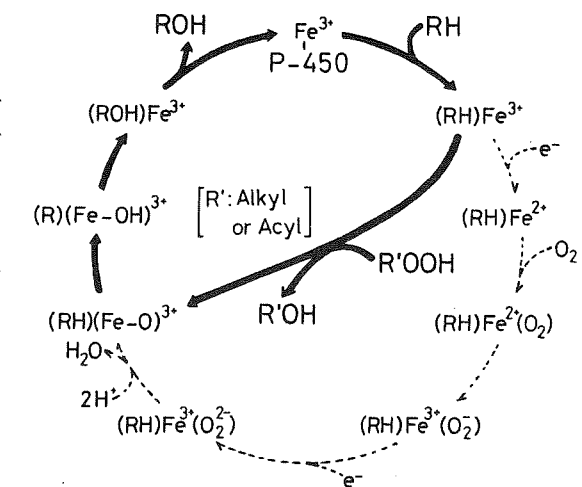
BIOCHEM.J. 219 1 (1984)

た、リウマチの患者の関節液の中にもあるなどと、それぞれの測定値が提示されるようになってまいりました(第V表)。ところで、梅沢先生の発見したブレオマイシン(第11図)は抗ガン作用を持っておりますが、これが何故抗ガン性を持つかというところ、これは京都大学の杉浦助教授の仕事でございますけれども、先程申し上げましたデロカライズ即ちフリーランサーの鉄をひろいまして、鉄錯体を形成いたします。この図はちょうど、もう酸素が結合してまして、電子が渡った形になっておりますが、なんらかの機構で酸素分子と結合いたします。鉄が2価ならば分子状の酸素と結合いたします。そして、結果的にOHラジカルを生じてくることとなりますが、もう一点、大事な事は化学構造式の右上の所にありますピチアゾールグループが、DNAのグアニンを認識いたしまして相互作用を行い、いわば、ぴったりと密着することあります。つまり、ブレオマイシン-鉄-酸素三元錯体がDNAに密着しながら、酸素の活性化を行い、結果的に生成したOHラジカルがデオキシリボースの、例えば4'と3'の間あたりを切断して生ずるラジカルへの酸素分子の付加、分子内転位、開裂などを経て、DNAの連鎖が切断されていくという機構が提示されております。

ヒドロペルオキシド生成のお話を先ほどいたしました。これが生体にとって好ましくない場合もありますけれども、そうでない場合もあります。例えば、依然として酸素の供与体として使える例があります。その場合は先ほど提示いたしましたP-450の反応サイクル(第4図)をショート・カ



第11図

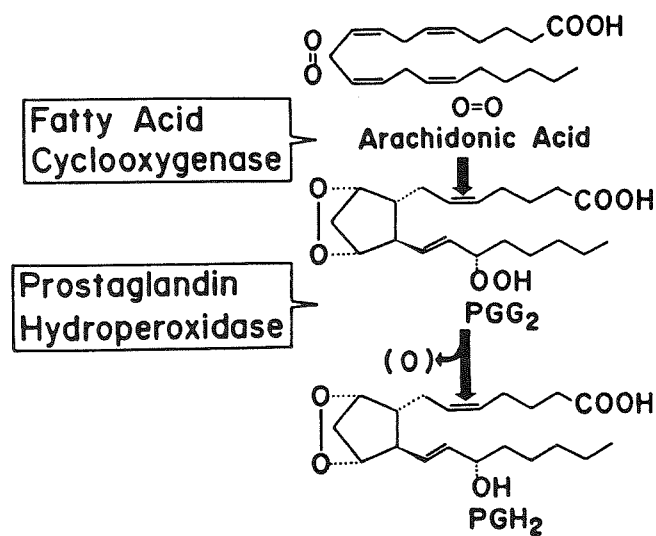


ットいたしまして、第一電子と第二電子との供与を受けることなく、いきなり水酸化を行うというケースがございます(第12図)。本学の応用電気研究所の山崎教授は peroxygenase という、ヒドロペルオキシドを酸素の donor といたしまして水酸化反応を行うような酵素も見つけておられます(第VI表)。したがって、アルキルヒドロペルオキシドはまた、ある見

第VI表 Hydroperoxide in the Body

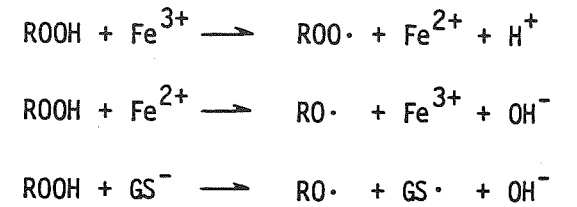
Oxygen donor:	Hydroperoxide-dependent hydroxylation and demethylation by P-450 (Coon,1976)
	$\begin{array}{c} \text{RH} \quad \text{R}'\text{OOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{X} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{ROH} \quad \text{R}'\text{OH} \end{array}$
	Peroxygenase (Yamazaki,1977)
Intermediate:	Hydroxylation via hydroperoxide (O'Brien,1972) P-450 as a microsomal peroxidase
Lipid peroxidation:	Oxygenation of olefin (unsaturated fatty acid) NADPH-dependent peroxidation of microsomal lipid (Aust,1975) one of the several types of microsomal oxidation

方からしますと水酸化反応の中間体にもなります。これからお話したいのは、lipid peroxidation, どちらかといいますと悪い事をやっていることが多い、いわゆる脂質過酸化についてでございますが、その前に好ましい今ひとつの例に触れておきます。これも皆さん良くごぞんじのプロスタグランジンであります。アラキドン酸が酸素分子を2つ取りますと、endo-peroxide 部分構造をもつ



第13図

ヒドロペルオキシド体プロスタグランジン G₂が生成し、それが酸素を1つ失いましたのがプロスタグランジン H₂です(第13図)。プロスタグランジンのように生体にとって非常に大事なヒドロペルオキシドもありますけれども、過酸化脂質にはやはり、こういう可能性もござい



第14図 Radical Formation

ます。即ち、アルキルヒドロペルオキシドの鉄イオンによるいわゆる redox 分解あるいはグルタチオンのアニオン、あるいは他の SH アニオンによってペルオキシラジカルやオキシラジカルを生じてくるということでございます(第14図)。そういうことのためでございましょうか、lipid peroxide が enzyme を denature するというようなこと、あるいは核酸を壊していく、あるいはビタミン・ホルモンを分解する、あるいは生体膜の損傷、あるいは組織を傷つける、あるいは、この老化をもたらす。こういう酸素の毒性とその防御機構との間には絶えずバランスがあって、そのバランスがだんだん崩れて行くのが、老化であり、完全に崩れていって死を迎えるに至る、というようなことございましょうか。脂質過酸化についてはこういう可能性があるわけでございます。

— Effects of Lipid Peroxide —

ここで再びコレステロールに帰ってくるわけですが、コレステロールは生体膜の主要要素でございます。しかしながらコレステロールが酸素化を受けましたものに毒性をもつものがあることが知られています。動脈硬化性、発ガン性、心臓毒性、細胞毒性、あるいは変異原性というような性質を示すことが知られております(第Ⅶ表)。ですからコレステロールも

第Ⅶ表 Toxicity of Oxygenated Cholesterols

Atherogenic:	C(5,6)-(OH) ₂ , C(25)-OH (Imai, 1980)
Carcinogenic:	autoxidation products (Bischoff, 1977)
Cardiotoxic:	C(7)-OOH (Peters, 1978)
Cytotoxic:	autoxidation products (Peng, 1978; Tham, 1978) C(5,6)-epoxide (Chan, 1980) C(25)-OH (Chen, 1974)
Mutagenic:	polar autoxidation products (Smith, 1979)

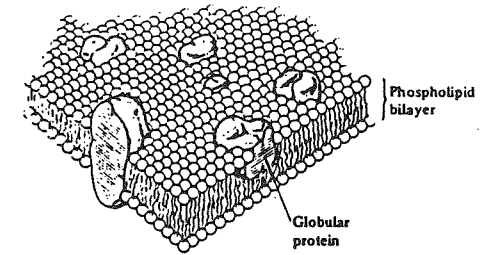
ENDOGENEOUS STEROLS:

C(24)-, C(25)-, C(26)-hydroxides and
C(7)-ketone from human aortas
(Smith, 1970; Brooks, 1971)

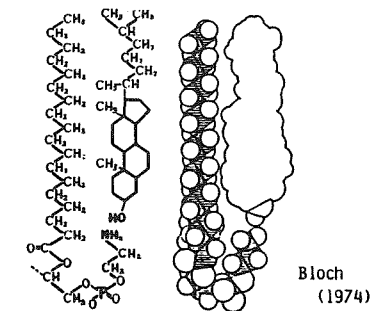
C(5,6)-epoxide from atherosclerotic
serum (Brooks, 1971)

なかなか油断がならない脂質だという思いにかられるのでございます。第15図に示すものは有名なシンガー-ニコルソンのいわゆる流動モザイクモデルでございます。私のようにステロイドに興味を持っております者は、この有名な生体膜モデルの中にコレステロールがちっとも出てまいりませんので、物足りなく思っております。北大百年祭の時に Bloch 教授がちょうどこのホールでお話されました時に出てまいりました絵を第15図の中でお借りしているのですが、例えば、赤血球膜あたりですとコレステロールとリン脂質とは1対1あるいはそれに近い比率で存在しております。リン脂質ではグリセリン残基の一番端にリン酸が1つついております。また反対側の端には飽和の長鎖脂肪酸が結合しております。それから真ん中には不飽

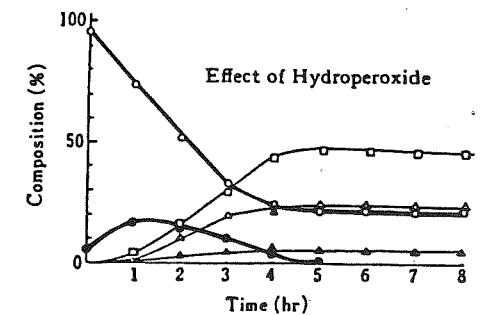
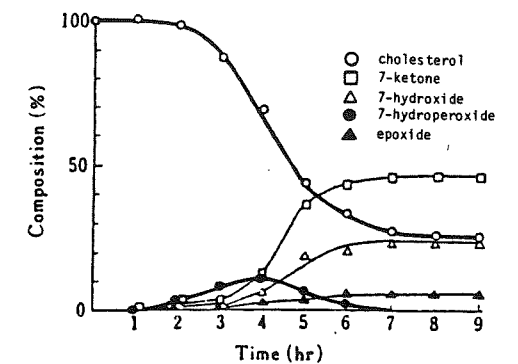
和の長鎖脂肪酸がついています。飽和脂肪酸の方は、ちょうどコレステロールのステロイド核の部分とファン・デル・ワールス力によるのでしょうか、ぴったり密着する関係になるのだそうです。このような相互作用が見られる反面、他方ではコレステロールに運動の制約を受けないブラブラした不飽和の脂肪酸残基がつながっておるということでございます。生体膜の研究においてコレステロールはもちろん無視されているわけではありません。コレステロールの生体膜の中における含量が、膜の流動性をコントロールしておくことは今や定説となっております。しかしながら、リン脂質がその不飽和脂肪酸部分において、いわゆる脂質過酸化を受けるとされているのと対照的に、コレステロールに関してはそういうことはないというのがあたかも通説になっているかのごとく、どうもコレステロールの過酸化に焦点をおいた生体膜の研究はあまり報文の上に出てまいりません。ところが、コレステロールの単分子膜というのは簡単に空気酸化を受けるというようなことは古くから知られており、従いまして、これが膜の中で常に intact であると考えよりは、必ずしもそうではないと考える方がいいのではないかと思います。そこでまずミセルの状態の水溶液で空気酸化をやってみました。80℃ぐらいの温度で行いました。明らかにコレステロールは変化しております(第16図)。コレステロールも二重結合を持っておりますのでアリル位があり、当然、ヒドロペルオキシドができやすいわけでございます。そして、おもしろいのは、コレステロールヒドロペルオキシドが反応の途中にできて、やがて減少し、遂にはなくなっていくこと、そしてコレステロールの空気酸化に誘導期がみられることでございます。そ



Fluid mosaic model: Schematic 3-dimensional cross-section. (Singer & Nicholson, 1972)



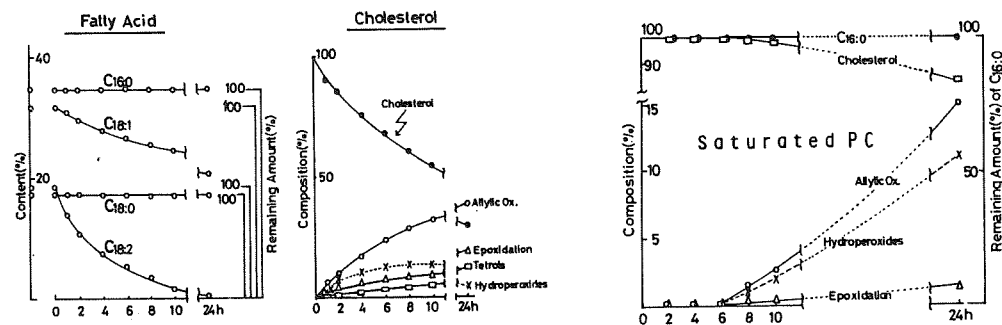
第15図



第16図 Autoxidation of Cholesterol in Micellar Solution

ここであらかじめコレステロールのヒドロペルオキシドを入れておきますと、誘導期がなくなって、初めから反応が進行しておりますし、ヒドロペルオキシドもいずれ消滅するに至っております。

ですから、lipid peroxidation という場合には普通、phospholipid の不飽和脂肪酸側の peroxidation およびそのサイクルというものがあると考えられているわけですが、やはりコレステロールについても、この脂肪酸ヒドロペルオキシラジカルで水素を引きぬかれた後、酸素を取ってコレステロールヒドロペルオキシドを作り、そしてそれは共存するラジカルとまたお互いに co-oxidation のスタイルと申しますか、相互に反応しあって種々の酸化生成物を作っていくことが考えられます。尚、コレステロールの α -epoxide は mutagenic と言われ、AMES テスト陽性ということが知られておりますが β -epoxide はそうでもないらしいです。こういうわけでコレステロールもやはり、生体内で生起するいわゆる脂質過酸化なるものにかかわっているのではないかと思ひまして、さらに一歩進めて卵黄のレシチンとコレステロールで作ったリポソームの形にしてから反応させた後、脂肪酸の部分がどうなっているか、コレステロールの部分がどうなっているかを調べて、経時変化をとって見たわけです (第17図)。不飽和結

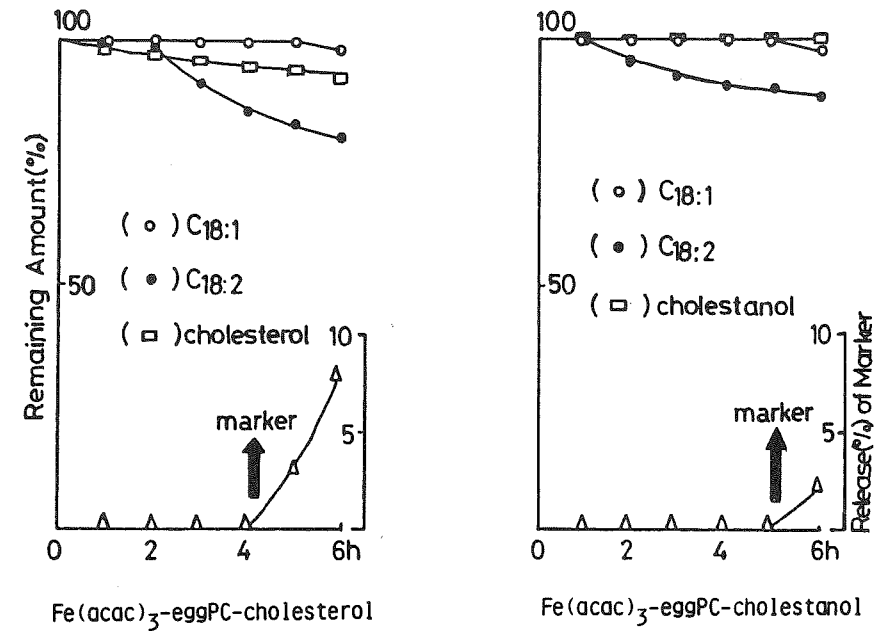


第17図 Oxidation of Liposome

合を持っていないパルミチン酸とかステアリン酸部分は24時間後も intact のままでございます。ところが二重結合がありますと、1つよりは2つ持っている方というように不飽和結合に平行しまして、スピードが上がっております。コレステロールにつきましては誘導期がない形になっておりまして、ここに実はそれなりの問題、実験的な、方法論的な問題が含まれておりますが、とにかく、コレステロールも壊れていきます。そして、グラフがちょっと解かりにくいのですが、ヒドロペルオキシドの生成は8時間くらいの所がピークになりまして、やがて消滅していくという傾向になっております。

— Iron-catalyzed Autoxidation of Liposomal Cholesterol —

最後にそれでは膜はいったいどうなっているんだろうかということでございます。膜の中にマーカーといたしまして、カルボキシデキストランを入れまして、インキュベートしてみますという、4時間ぐらいの所でマーカーが出てまいります (第18図)。その出てくる前、膜の



第18図 Impairment of Liposomal Membrane

中では既に酸素化反応が進んでおりまして、コレステロールもやられてますが、おもしろいのはコレステロールよりもオレイン酸の方がやられ方が少ない、スピードが遅いのでございます。また、コレステロールの二重結合を塞ぎましたコレスタノールで作ったリポソームの場合でございますけれども、コレステロールとの大きな差は期待した程には現れなかったのですが、それでもやはりアタックのされ方は当然ながら遅れてくるということがわかります。なお、申し遅れましたが、リポソーム実験では脂溶性の鉄アセチルアセトン錯体 $Fe(acac)_3$ を添加しています。普通の硫酸第二鉄とか第一鉄を使いますと、リポソームの中に入れてできませんので、こういうものを使っております。また、その濃度は先ほどお話いたしました Halliwell-Gutteridge が報告いたしました生体内のフリーの鉄のそれとほぼ同じ程度にしてあります。なお、彼等のいうフリーの鉄といっても鉄イオンそのものではないかもしれません。ただ蛋白とは結合していない、従ってアポフェリチン等を持ってきますとすぐそ

こちらの方にくっついてしまうような、いわばそういう意味でのフリーの鉄であるとの理解のもとで、同じオーダーの鉄濃度に致しまして、実験をしているわけでございます。それで先ほども御紹介いたしましたように、生体は防衛機構をちゃんととのえておりますが、ビタミンE、あるいはBHTといったような抗酸化剤を使いますと、確かに酸化は防止されるということが、リポソームの中でも同じように見られております(第Ⅷ表)。もちろん、これはモデル実験のまたモデル、生物学の側から見ますと、「生体ってのは、そんな簡単なものじゃないよ」とおっしゃるそのやり玉にあがるような仕事になりますけれども、しかし何か実際に生体の問題に直面していらっしゃる方々に何か御参考になりうるんじゃないかという風に考えております。

第Ⅷ表 Effect of Antioxidant

antioxidant	mol% to cholesterol	oxidation(%) of cholesterol	degradation(%)			
			16:0	18:0	18:1	18:2
α-tocopherol	0.2	7	0	0	1	11
	1	4	0	0	0	5
	2	0	0	0	0	0
BHT	0.2	3	0	0	0	5
	1	0	0	0	0	0
none	—	6	0	0	3	20

$\text{Fe}(\text{acac})_3 = 7.75\mu\text{M}$

これで私のお話は終わるんですが、コレステロールなどというものは、まったく有機化学的には陳腐なありきたりのものがございます。しかし、これは生体にとっては非常に大切な、基本的な物質の1つでございます。最近の生命化学の進歩というものはたいへんなものでございますが、こういう生体成分に取り組んでおりますというと、そういう生命化学のたいへんな進歩に impact を受ける、それに啓発されるというようなことで、意外とこのありきたりの成分のいままで知られなかったような側面、役割というようなことを掘り出してくる、見つけだしてくるというような楽しみがあるという風に痛感している次第でございます。

どうもお話がヘタでありまして興味をもって聞いていただけたかどうかすこぶる疑問でございますけれども、御静聴を感謝申し上げる次第でございます。

研究の流れ

- 第1期 — 東京大学・千葉大学時代 —
- 第2期 — 北海道大学(昭和30~40年) —
- 第3期 — 北海道大学(昭和40~50年) —
- 第4期 — 北海道大学(昭和50~60年) —

第1期 — 東京大学・千葉大学時代 —

東京帝国大学医学部薬学科薬品分析化学講座（石館守三教授）における卒論テーマは、可逆的に炭酸ガスを吸脱着する化合物を探索する目的で、塩基性の強い脂肪族アミン類を調製することであり、主としてカンファーやメントン等のオキシムを Ladenburg 還元によって第一アミンに導くものであった（昭和17～18年）。

大学院に進学した後は、ジギタリス葉中の有効成分ジギコリンの研究に参加したが、これらのカルデノライドを定量する必要に迫られたので、 γ -不飽和ラクトン側鎖の活性メチレン基に着目した比色定量法を確立するための研究を行ない、更にこの分析反応の機構を追及した（昭和19～25年）。この研究は千葉大学へ移ってからでも続行し、学位請求論文としてまとめることができた（昭和26～30年）。

また、この研究と併行して、北海道産鈴蘭成分中の強心配糖体に関する研究も始めていたが、昭和30年8月、北大の薬品分析化学講座の開設を任されることになった。

第2期 — 北海道大学時代（昭和30～40年） —

昭和30年8月、北海道大学医学部薬学科に薬品分析化学講座が設置され、翌年には木村（教授）、南原（助教授、現・東北大学薬学部教授）、河田（助手、現・環境庁公害研究所主任研究員）、藤間（助手、現・東日本学園大学薬学部教授）、高野（教務職員、現・塩野義製薬(株)研究所勤務）のスタッフが出揃った。

発足に当って掲げることにしたのは「臨床分析化学の基礎的研究」であった。薬学における分析化学研究の在り方として、医療に密接した生体成分にかかわる課題に取組む意義の大きいことを考えたからである。取り上げる対象としてはステロイドを中心に置きながらも、各スタッフのそれまでの研究上の事情を反映させることによって、当面は自由な模索を試行することとした。

南原は抗酸性菌に対する化学療法剤の研究を続けるかたわら、アンチピリン類の呈色反応を取り上げた。ニトロソ化後S酸との縮合で、安定なアゾ色素の生成を認め、さらに Emerson 試薬によるインドフェノール型色素の生成条件を検討するなどによって、生体内全体水分量の測定法を導いた。

また、平山、前島（現・恒川）らは種々の呈色反応に関する試行を繰り返す中で、ジピクリルアミンによる尿中カリウムの測定法を導くなど、臨床分析化学を志向する研究はようやくにして緒に着くに至った。

分析原理の研究についてはまた、藤間、高野らによって「アルカリ存在下の m-ジニトロベンゼン化合物および関連化合物による活性メチレンの呈色反応」として展開が行われ、モノニトロ体やニトロピリジンによる同様の呈色反応を見出して反応機構解明の一助とした。中館は

Janovsky 反応の呈色本体である Meisenheimer 型シグマ錯体を単離し、また、測定波長を長波長領域に持つ新しい2,2',4,4'-テトラニトロビフェニル試薬を開発し、その Janovsky 反応を検討して尿中クレアチニン定量法を導いた。ニトロベンゼン系試薬を利用するステロイドの測定については、仁科によってジニトロフェニルヒドラゾンのアルカリ呈色が検討され、コレステロールおよびケトステロイドの微量定量法が考案された。他方では、秋山（昭和36年助手、現・東京都衛生研究所医薬品研究科長）、針田らによって、「強酸によるステロイドの呈色反応」のひとつであり、エストロゲンの定量に繁用される Kober 反応の機構研究が開始された。

ステロイドの臨床分析化学的研究を発足させるに当り、今ひとつの当面の進路として、生体成分の取扱いに習熟しステロイド化学を深める意図のもとに、立地条件にも適した「鈴蘭のステロイド成分」を探索することとした。河田、藤間、菊池（昭和33年教務職員、現・藤間）吉沢らは花部よりコンバラトキシシ、デスグルコケイロトキシシなどの既知強心配糖体を得て、それぞれの構造証明を行った。

その他の生体成分に関するものとしては、南原、神力らによってグルクロン酸の比色定量法が導かれ、また、河田、中川（現・水谷）らによってグルクロノラク톤のアルカリ処理で得られるレダクトンの研究が行われた。

この期における研究活動は下記の諸君の協力によって支えられたものである。

大学院生

博士課程

中館正弘、仁科甫啓、吉沢逸雄

修士課程

平山忠允、水谷(中川)由紀子、服部保次、針田和明
藤野明治

研究生

栄井清、神力就子、水野雅夫、恒川(前島)富美子
長野継久、林洋子、岩田治平

特別研究実習生

岡本(佐藤)セツ子、堺沢節子、竹森義男、藤間(菊地)登代子
細田順一、故西藤洋、秋山和幸、阿部(伊藤)雅枝
亀田(鎌塚)裕子、長縄博、西田聖、平野正
宮島俊輔、相沢勝彦、山岸(浦川)多賀子、岡元賢二
景浦暁、石川(松久)暢子、横山幸男、平尾健一
瓦木威久、竹本(松山)智郁子、遠藤俊一、岡田晋
河村忠男、故河井保人、江端(堺)康子、乃生勲
小島武、種村邦子、吉沢(針谷)郁子、平位和博
真木孝常、森崎(山本)百合子、大坂時子、坂本嵩

藤野(尾野)美智

() 内は旧姓

第3期 — 北海道大学時代(昭和40~50年) —

ニトロベンゼン系試薬による呈色反応の機構研究は、小尾（昭和37年教務職員、現・北海道勤労者医療協会中央病院薬剤科長）、川添らにより引継がれることによって、反応中間体である Meisenheimer 型シグマ錯体の分離、構造、性状、反応速度、平衡定数等の測定を経て、反応機構が解明されるに至った。また、既に p-ニトロフェニルヒドラジン試薬によるケトステロイドの定量法を案出していた仁科は、溶媒を極性非プロトン溶媒に変えることによって測定波長のレッドシフトおよび過剰試薬の自動酸化的分解によるブランク値の減少などの好条件が得られることを見出し、これによって高感度微量定量法を導くに至った。

他方、「強酸によるステロイドの呈色反応」の機構研究については、秋山、針田、三浦らが約90種類のステロイドおよび関連化合物について観察した結果、Kober 反応がステロイドエストロゲンに極めて特異的であることを認めた。また、反応生成物の分離、構造解析、各種スペクトルデータ等より、呈色の本体がカルボカチオンであることを立証し、これによって反応機構は次第に明らかになりだしてきた。針田、三浦らは更にテストステロンについても検討を行い、同様にして反応過程の解明と吸収スペクトルの帰属とを行った。針田はまた、硫酸の他にも過塩素酸、弱酸、金属塩化物などによる反応を試み、プレンステッド酸とルイス酸との反応内容について比較検討を行なった。強酸による呈色を追究するこれらの研究は、同時に生起する蛍光体の追究に進み、それが上記カルボカチオンに基くことを立証すると共に、高感度にして迅速簡易な実用的微量蛍光定量法を導く可能性を見出すに至った。

「鈴蘭のステロイド成分」研究については、既に前期において強心配糖体を分離しその構造証明を行ったが、今期では藤間、吉沢（昭和47年教務職員、現・北海道薬科大学教授）、藤野、服部、山崎らが7種の新ステロイドサポニン（コンバラサポニン-A, B, C, D, E, グルココンバラサポニン-A, B）を分離し、スピロスタン母核を持つ非糖部分の構造を証明した。更に GLC により至適水解条件の定量的検討と各種の部分メチル化糖の一斉分析法を確立することにより、これらのサポニンの持つ化学構造の全貌が明らかになった。

ステロイドの臨床化学において、その異常代謝は大きな課題となるべきものであるが、ステロイド水酸化酵素の営む反応は最も基本的な関連を持つもののひとつである。活性化された分子状酸素によるステロイドの反応を生理的条件下で追究するために、河田、藤間、沢谷らはコレステロールの自動酸化をほぼ中性の水溶液中で試み、5種類の生成物についてその酸素化位置を証明し、さらに新しいテトラオール体を得てその立体構造を決めた。藤間、藤野、山崎、沢谷らはデオキシコール酸および関連化合物の Fe(II)/O₂水溶液系による反応を試み、いずれも C_{15α} 位への水酸基の立体特異的導入を認めた。藤間、富田、山本らはまた、アセトニトリ

ルなどの有機溶媒中において Fenton 試薬あるいは Fe(III)アセチルアセトネート-過酸化水素系によりコレステロールは立体選択的にβ-エポキシドを与えることを見出した。吉沢は代謝によるエストロゲンのカテコール型水酸化に着目し、動物実験によってその抱合体を単離して構造の確認を行ない、カテコールエストロゲン水酸基の反応性を検討した。また、三浦と共にプレグナンジオール-20-サルフェートの熱酸水解によって生成する転位生成物の構造を決定し、更に尿中プレグナンジオールの測定について検討を行った。

講座におけるこれらの研究は下記の大学院生の諸君、ならびに特別実習を行った諸君など数多くの方々によって強く支えられてきたものである。

大学院学生

博士課程

中 館 正 弘, 仁 科 甫 啓, 吉 沢 逸 雄, 針 田 和 明
 藤 野 明 治, 富 田 勤, 川 添 政 彦, 三 浦 敏 明

修士課程

服 部 保 次, 山 崎 克 彦, 沢 谷 拓 治, 故 山 本 敏 夫
 高 木 英 利

特別研究実習生

秋 山 宏 敏, 北 川 広, 山内(白石)裕子, 奥 山 修 策
 奥山(杉山)正子, 桑 原 理, 清水(佐々木)瓊子, 郷司(伊藤)由起子
 松本(柿崎)弘子, 山崎(広瀬)禎子, 谷川(向田)孝子, 鈴木(川畑)清子
 池崎(藤沢)寛子, 榎本(渡辺)信子, 岡 誠, 曾 田 孝 志
 山口(稲井)弘子, 木村(斉藤)景子, 水野(斉藤)じゅん子, 中 山 忠 弘
 印藤(服部)俊子, 勝 山 真 吉, 原 田 博, 加 藤 修
 山下(小林)久美子, 山 岡 あ い 子, 川 野 孝 道, 高 西 利 武
 野口(菅野)美恵子, 清 水 洋 二, 佐藤(田村)美穂子, 松崎(萩原)真理子
 長谷川(阿部)容子, 本 田 (奥山)陽子, 田 村 寛 夫, 田 村 (今)厚 子
 橋本(渡部)喜久子, 永 沢 光 一, 駒 勇 次, 狩 原 孝 行
 羽 賀 健 一, 小 野 正 一, 竹 内 悠 紀 子, 竹 谷 通 義
 芳 賀 昭 久, 島 田 (中園)郁子, 斉 藤 宗 男, 篠 原 栄 一
 蒲原(千葉)真理子, 南 達, 武 藤 俊 樹, 田内(大内)涼子

第4期 — 北海道大学(昭和50~60年) —

1. ステロイド分析反応の機構に関する研究

エストロゲンの硫酸による発色・発蛍光反応が三浦(昭和50年助手,現・助教授)を中心に検討された。ステロイドカルボカチオンの生成を明らかにした前期の研究に続いて,定量分析用

に設定された Kober 反応条件の第1段階および第2段階における反応機構を解明し,発色・発蛍光体の生成に反応溶媒の酸強度や酸化力がどのように関与しているかを明らかにした。又,これを指導原理として, Kober 反応第1段階反応を利用した妊婦尿中総エストロゲンの蛍光測定法を確立し,数ナノモルオーダーのエストロゲンの定量を可能とした。三浦,高木(昭和50年教務職員,現・北海道薬科大学講師)らはテストステロンについても硫酸中の¹H-NMR および¹³C-NMR や生成物分析より3種の発色・発蛍光体がステロイドカルボカチオンであることを証明し,その反応機構を解明した。さらに,プロゲステロン,17α-ヒドロキシプロゲステロン,デオキシコルチコステロンおよびコルチコステロンの硫酸による発色・発蛍光反応機構も解明し,ステロイド化合物と強酸の相互作用を発色・発蛍光現象との関連で整理・体系化しつつある。

2. 生体アミンの微量分析法の開発と反応機構に関する研究

三浦を中心に行なっている。かつて,第一アミンの定量試薬であるオルトフタルアルデヒド(OPA)とグルタチオンペルオキシダーゼを用いる過酸化脂質の蛍光定量法を導いたが,柏村は更にグルタチオンに特異的で高感度な試薬を模索する中で,ナフタレンジカルバルデヒド(NA)がアルギニンと反応して発蛍光することを見出し,これを利用し血清アルギニン,アルギニノコハク酸およびアルギニノコハク酸リアーゼの特異的微量定量法を確立した。また金内によってその発蛍光反応機構が明らかにされた。これらの成果に基づき,更に各種の OPA 関連試薬がデザインされ,種々のアミンやアミノ酸に対する特異試薬の開発研究が扇谷,吉村らによって展開されている。

3. 生体内ステロイド酸素化反応のモデル系に関する研究

藤間,沢谷(昭和50年助手)らは生体膜主要成分のひとつであるコレステロールについて,その自動酸化をミセル溶液中で検討を重ね,神によって生成物の経時変化とコレステロールヒドロペルオキシドの消長との関連性が明らかになった。第一鉄・分子状酸素・リン酸緩衝液系による不活性炭素原子への酸素官能基導入反応は沢谷を中心に胆汁酸基質を用いて検討され,攻撃種の実体を追求するために,紫田,安達らは,更に芳香族化合物や脂肪族および脂環式カルボン酸の反応を観察した。沢谷は更に電気化学的および放射線化学的手法をも加えて検討を続行したが,Fe(II)-O₂-Phosphate系に生成する酸素活性種は,OHラジカルまたはそれに類似の反応性をもつ化学種あるいはそれらの混合物などを推定するに至っている。

「ステロイドへの金属錯体を触媒とする酸素官能基導入反応」研究の一環としての遷移金属-ヒドロペルオキシド系によるコレステロールの反応は武藤(昭和55年助手)が中心となって検討した。この系ではアリル位酸化とエポキシ化とが起るが,後者はラット肝NADPH依存性脂質過酸化系の場合と同様,高いβ-立体選択性を示した。この反応の機構をFe(acac)₃-t-BuOOH系によって追究し,攻撃種がオキシおよびペルオキシラジカルの酸素化反応であることを明らかにした。舂森は更に触媒を鉄ポルフィリンに替えて検討したところ,条件によっては,非ラジカルのエポキシ化も進行することを認めた。武藤,田中らはまた,不飽和脂肪酸共

存下のコレステロールの自動酸化、鉄錯体-脂肪酸ヒドロペルオキシド系によるコレステロール酸素化反応等の検討を行った上で、リン脂質とコレステロールより成るリポソームに鉄錯体を共存させたところ、不飽和脂肪酸部位の分解に呼応してコレステロールの酸素化が進行し、やがてリポソーム膜が崩壊することを示した。生体膜損傷にコレステロールの酸化的変性の関与する可能性を示唆するものである。

この他、山本晴彦（昭和51年助教授、現・厚生省薬務局麻薬課長）らは、鉄による過酸化水素のアセトニトリル水溶液中の分解率がアセトニトリル濃度に依存することを見出した。山本敏夫（昭和54年助手、同年死去）は、 $\text{Fe}(\text{acac})_3\text{-H}_2\text{O}_2$ 系によるステロイドオレフィンのエポキシ化の立体化学を検討し、高度に立体選択的な反応が進行することを示した。また武藤、林らは、3種類のマーカー基質を用いることによって、アセトニトリル中でのこの系の反応様式を明らかにした。

この期の研究活動は下記の諸君らの協力によって強く支えられてきたものである。

大学院学生

博士過程

故山本敏夫、武藤俊樹、斉藤（高山）伸之、柏村めぐみ

修士過程

神義容、柴田邦彦、田中順、安藤健一
林透、金内徹、舛森弘明、扇谷悟
吉村昭毅

特別研究実習生

福田（林）裕子、福瀧（原）昌子、飯田秀文、菊地（中田）祐子
石川光宏、小西剛、棚橋（河合）憲子、武藤（清水）真澄
土屋誠、浅見（保村）道子、上野（上水）淑子、西村（高平）裕子
武井仁、白石隆久、横山（八百）克子、小野寺昭範
高橋（真屋）篤代、坂上正子、成田英理子、福井（長谷川）篤子
平泉潤一、渡部聡、海老原（菊田）亮子、阿部（国領）みゆき
後藤雅史、明戸孝夫、武下弘美、山口（大槻）敦子
佐々木康祐、大西陽子、山北ひろみ、森（浦野）千津子
小田井英陽、勝浦（菊地）美枝子、大野みゆき、早川達
寺田（山北）祥子、渡辺真美子、近藤宏子、笹山辰之
曾根田智子、五十嵐和恵、梅原順子、大沼恵子
菊池加奈子、佐藤邦子、高野和子、渡辺孝治
嶋田齊、福岡英喜

研究生

宇佐見まゆみ・マリネーズ

研 究 業 績

I. 臨床分析化学の基礎的研究

1. 生体成分の発色・発蛍光反応機構の解明および分析法の開発
 - (1) ニトロベンゼン化合物によるステロイドの反応
 - (2) 強酸によるステロイドの反応
 - (3) オルトフタルアルデヒド関連試薬による生体アミンの反応
2. カテコールエストロゲンおよび関連化合物の分析化学的研究
3. 生体内ステロイド酸素化反応のモデル系に関する研究
 - (1) コレステロールの自動酸化
 - (2) 第一鉄-分子状酸素系による反応
 - (3) 第二鉄-過酸化物系による反応
 - (4) ステロイド酸素化体の定量
4. グルクロノラク톤の反応

II. 植物成分の構造解析および分析法の開発

1. 北海道産スズラン花部ステロイドサポニンの研究
2. その他

III. 総説および著書

編 集 後 記

薬学部薬品分析化学講座教授木村道也先生は本年3月31日北海道大学を定年退官されました。

木村先生は、1943年東京帝国大学医学部薬学科を卒業され、千葉大学薬学部講師を経て、約30年間、北海道大学に奉職されました。

先生の主たる研究分野は、生体成分の分析化学であり、特にステロイドの化学分析の領域で数多くの業績を挙げてこられました。この小冊子は、約40年間にわたる先生の研究活動をふりかえり、その成果をまとめたものです。

木村道也先生の最終講義および記念祝賀会は、去る2月23日、本学部関係者をはじめ、多数の方々の参加の下盛大に行われました。ここに改めて、御協力下さいました皆様に心から御礼申し上げます。

最後に木村先生をはじめ皆様方のご健康とご活躍をお祈りし、ごあいさついたします。

1985年10月31日

木村研究室 同 窓 会

木村道也教授退官記念 業 績 集

昭和60年10月31日発行

発行者 札幌市北区北12条西6丁目
北海道大学薬学部薬品分析化学講座

印刷 北海道大学生協同組合「北大印刷」