

	やなぎ なおき
氏 名	柳 直樹
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 5 8 9 号
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	近紫外光照射で生成するヒト毛髪 $\alpha$ ケラチン由来ジスルフィドおよびトリスルフィド中性ラジカルの構造と反応性
審 査 委 員	(主査)教授 田嶋邦彦 教授 黒田裕久 教授 柄谷 肇 教授 浦川 宏 准教授 金折賢二

### 論文内容の要旨

本論文の主目的は、タンパク質の構造と生理活性を制御する重要な作用を有するジスルフィド結合が切断、形成および交換する反応過程に存在するジスルフィド由来ラジカルの ESR 信号を直接検出し、その電子状態と構造を明らかにすることである。目的達成のために、分子内に多数のジスルフィド結合を含む  $\alpha$  ケラチン（ヒト毛髪）を試料として、ジスルフィド結合に由来する常磁性種の定量的な ESR 測定を実施した。余剰の水分を完全に除去したヒト白髪（水分量 5%）に 77K で近紫外光を照射し、その後に 296K で約 30 分間保持することで、 $\alpha$  ケラチンのジスルフィド結合に由来する陰イオンラジカル(RSSR $^{-}$ ,  $g=2.005$ )およびプロトン付加体である中性ラジカル (RS·SHR ;  $g_1=2.061$ ,  $g_2=2.025$ ,  $g_3=2.000$ ,  $A_2=0.8$  mT) が混在する ESR スペクトルを得た。紫外線照射で生成するジスルフィド由来ラジカル種の ESR 信号を記録した観測例は本論文が初めてである。これらのラジカル種は 300K 以下では比較的安定に存在するが、313K から 373K までの温度範囲で段階的に昇温すると、これらのラジカル種のスピノ濃度は非可逆的に減衰し、その過程で新規常磁性種の ESR 信号が検出された。この未知成分の ESR 信号は、373K で紫外線照射したヒト毛髪では主成分として観測され、その  $g$  値を ( $g_1=2.055$ ,  $g_2=2.036$ ,  $g_3=2.000$ ) と評価した。未知成分の  $g$  値の平均値 (2.0029) は前述のジスルフィドラジカル (2.0030) とほぼ一致している。さらに、未知成分の  $g$  値はゼオライトなどの空孔内部で存在する  $S_3$ -ラジカル ( $g_1=2.051$ ,  $g_2=2.038$ ,  $g_3=2.002$  平均値 2.0033) とも類似性が認められた。これらの結果から、未知成分の可能な構造としてトリスルフィドラジカル (RS·S(R)SR) を推定し、その生成機構としてジスルフィドラジカルの熱分解で生成した RS·ラジカルが近接するジスルフィド結合に付加する反応機構を提案した。本論文では、ヒト毛髪  $\alpha$  ケラチンのジスルフィド結合に由来するジスルフィドおよびトリスルフィド中性ラジカルの構造、電子状態および化学反応性から、一電子還元過程で進行するジスルフィド結合の切断と交換反応の可能な機構を提案した。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は、近紫外線を照射したヒト毛髪のマトリックス内部では、 $\alpha$  ケラチンのジスルフィド

結合の一電子還元体であるジスルフィド陰イオンラジカル(RSSR<sup>-</sup>)およびそのプロトン付加体であるジスルフィド中性ラジカル (RS<sup>.</sup>SHR) に由来する常磁性種が生成することを、液体窒素温度(77K)における ESR 測定によって初めて見出した。得られた ESR パラメーターから、これら 2 種類のジスルフィド由来ラジカルの分子構造と電子状態として、不対電子は硫黄原子間の  $\sigma^*$  軌道に占有する可能性を提案した。さらに、光照射後のヒト毛髪を加熱処理することで、トリスルフィドラジカル (RS<sup>.</sup>S(R)SR) と推定される新規の常磁性種の ESR 信号を検出した。ジスルフィド由来ラジカルとの対比から、このトリスルフィドラジカルの可能な電子状態として、両端の硫黄原子の  $\sigma^*$  軌道に不対電子が局在化する構造を推定した。このラジカルの生成機構としてジスルフィド由来ラジカルの SS 結合が切断して生成するチイルラジカルが、近傍に存在するジスルフィド結合の硫黄原子に付加する反応経路を提案した。さらに、トリスルフィドラジカルは、その特異な分子構造と電子状態から、ジスルフィド結合の交換過程における常磁性反応中間体として推定した。このような分光学的な知見に基づいて、タンパク質内部で進行する、ジスルフィド結合の切断、形成および交換反応は、ジスルフィド結合の一電子還元反応を発端とするラジカル反応経路で進行する可能性を初めて提案した。この研究成果は、近年、注目されているジスルフィド結合の形成、切断および交換反応によって、タンパク質あるいは酵素の生理活性が制御される機構を分子論的に理解するために重要な指針を提供する内容である。

本博士論文の内容は、申請者を筆頭とする 2 編の論文として既に発表されたか、もしくは投稿準備中（1 編）である。

#### 公表論文

1. ESR Study of Disulfide Neutral Radical of  $\alpha$ -Keratin Present in Dried White Human Hair Exposed to Near-UV Radiation, Naoki Yanagi, Masanao Niwa, Yasuhiro Sakurai, Akira Nakajima, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, *Chemistry Letters*, **39**, 340-341 (2010)
2. ESR Spectrum Attributed to Trisulfide Neutral Radical [RSS(R)S<sup>.</sup>R] of Protein Observed for  $\alpha$ -Keratin Present in White Human Hair, Naoki Yanagi, Masanao Niwa, Yasuhiro Sakurai, Akira Nakajima, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, *Chemistry Letters*, **39**, 756-757 (2010)
3. ESR Study of Formation and Decay Process of Disulfide and Trisulfide Neutral Radicals Formed by Near-UV Irradiation to Dried Human White Hair, Naoki Yanagi, Masanao Niwa, Yasuhiro Sakurai, Akira Nakajima, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, preparing for submission.