

学 位 論 文 題 名

生体脂質の酸化障害とその防御機構の解明

学位論文内容の要旨

不飽和脂肪酸を有する膜リン脂質は活性酸素やフリーラジカルによる過酸化を受けやすいと考えられる。生体の酸化的障害が老化やアテローム性動脈硬化症、癌などの種々の疾病に関与している可能性が示唆され多くの注目を集めている。

近年、酸化的障害の指標のひとつである生体内の脂質ヒドロペルオキシドを機器分析によって定量しようとする試みが、HPLC-化学発光検出および蛍光検出法を用いて検討されている。これらの方法は高感度である反面、複雑な操作を必要とし、また直接的にヒドロペルオキシド基を検出するものではない。そこで、脂質ヒドロペルオキシドを特異的かつ簡便に検出することを目的としてHPLC-クーロメトリック電気化学検出（HPLC-CmEC）法の開発を試みた。コレステロールエステルヒドロペルオキシド（CE-OOH）はヒト血漿における脂質ヒドロペルオキシド蓄積の指標となる。HPLC-CmEC法によるCE-OOH標準物質の検出限界は2 pmolであった。これはCE-OOHの定量においてこれまで最も高感度であるHPLC-蛍光検出法に匹敵する感度であった。ヒト血漿中のCE-OOH濃度は、HPLC-CmEC法の検出限界から27 nM以下であることが推察された。一方、HPLC-CmEC法によるリン脂質ヒドロペルオキシドの検出限界は20 pmolであった。HPLC-CmEC法は高感度、特異的かつ簡便な定量法として有用であると結論された。

生体内脂質過酸化の反応機構には不明な点が多い。近年、リポキシゲナーゼ (LOX) 反応が生体脂質過酸化の開始反応に関与する可能性が示唆され、注目されている。ダイズ由来の LOX はデオキシコール酸の存在下ではリン脂質を直接酸化する。また、ウサギ網状赤血球由来の LOX は生体膜脂質や血漿リポ蛋白質をホスホリパーゼ群の作用なくして酸化する。一方、生体は酸素障害に対する巧妙な防御機構を備えている。 α -Tocopherol (α -Toc) は生体膜脂質やリポ蛋白質に存在する抗酸化物質として重要である。 α -Toc 分子はクロマン環およびフィチル側鎖から構成され、クロマン環からの水素供与によってラジカルを捕捉する。フィチル側鎖は α -Toc の生体膜への取り込みや保持に寄与していると考えられているが、生体膜における α -Toc の抗酸化活性との関連性については明らかではない。そこで、生体膜モデルとして PC ミセルおよび PC リポソームを用い、これらの LOX 反応に対して α -Toc がどのような抗酸化活性を示すかを α -Toc 関連化合物および他の脂溶性抗酸化物質と比較することにより検討した。リン脂質ミセルの LOX 反応では α -Toc のフィチル側鎖をメチル基で置換した化合物である 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman (PMC) が α -Toc よりも強い抗酸化活性を示した。この活性の強さは LOX 阻害剤として知られる quercetin に匹敵するものであった。これに対し、 α -Toc のフィチル側鎖をカルボキシル基で置換した化合物である 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox C) は高濃度の添加でも抗酸化活性を示さなかった。均一溶液中での α -Toc、PMC および Trolox C のペルオキシラジカル消去能ほぼ同じであり、フィチル側鎖の影響がなかったことから、不均一な状態で基質が存在するリン脂質ミセルにおいては抗酸化物質の局在性が抗酸化活性に影響することが示唆された。抗酸化物質の局在性はその極性や電荷に左右される。Trolox C は電氣的斥力のために PC ミセルに近づけず、抗酸化活性を示さなかったものと考えられる。

リン脂質ミセルよりも生体膜に近似する系であるリン脂質 1 枚膜リボソーム (LUV) の LOX 反応において、 α -Toc、PMC、Trolox C および quercetin がどのような抗酸化活性を示すのか比較した。その結果、PC LUV の LOX 反応に対する α -Toc、PMC および Trolox C の効果に大きな違いはみられなかった。これは PC LUV においては α -Toc、PMC および Trolox C が LOX と膜脂質の反応部位に同じように近づくことができることを示している。一方、高濃度の α -Toc、PMC、Trolox C および quercetin の添加によっても PC LUV の LOX 反応を完全には抑制することができなかった。したがって、LOX による酵素的な生体膜脂質の過酸化は生体酸素障害の不可避的な原因となり得ることが示唆された。

生体膜脂質は食事摂取の脂肪酸組成を少なからず反映する。ヒトは n-6 系のリノール酸および n-3 系の α -リノレン酸を体内で合成することはできず、食事から摂取する必要がある。ドコサヘキサエン酸 (DHA) は魚油に多く含まれる n-3 系高度不飽和脂肪酸であり、摂取することにより循環器系疾病に対する予防効果を示すことが示唆されているが、その一方で不飽和脂肪酸はその不飽和度が増加するほど酸化されやすいため、生体膜脂質に取り込まれた場合には酸化に対する感受性を高める可能性があることが示唆されている。そこで、生体膜モデルの酵素的脂質過酸化においてリン脂質の構成脂肪酸が酸化難易度に及ぼす影響を動力学的手法によって調べた。リノール酸、アラキドン酸または DHA を 2 位に有する PC (LA-PC、AA-PC および DHA-PC) の LUV にウサギ網状赤血球由来の LOX を作用させ、反応速度を測定した。LA-PC、AA-PC および DHA-PC の LUV の LOX 反応におけるミカエリス定数 (K_m) はほぼ同じであった (1.0-1.2 mM) が、DHA-PC の最大速度 (V_{max}) は LA-PC および AA-PC よりも有意に低い値を示した。一方、LUV のラジカル連鎖反応による過酸化反応において、不飽和脂肪酸のビス-アリル水素 1 分子当たりの PC の酸化難易度はその不飽和度

が増加するほど低い値を示した (LA-PC>AA-PC>DHA-PC)。これらの結果から、生体膜へ取り込まれた DHA は、その不飽和度から予想されるよりは、酵素のおよび非酵素的酸化を受けにくいということが明らかとなった。DHA は立体的に螺旋構造を取っていることで酵素あるいはラジカルの攻撃を受けにくいのかもしれない。以上のことはリン脂質二重層への DHA の導入が生体膜酸化障害の促進因子にならないことを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 間 浩 蔵

副 査 教 授 鈴 木 鐵 也

副 査 研究室長 寺 尾 純 二

(農林水産省食品総合研究所脂質研究室)

学 位 論 文 題 名

生体脂質の酸化障害とその防御機構の解明

生体内脂質のヒドロペルオキシド・レベルが生体の酸化的障害の指標の一つとされることから、そのレベルを正確に把握できる分析法の開発が求められている。最近、生体内の脂質ヒドロペルオキシドの機器分析法としてHPLC-化学発光検出法やHPLC-蛍光検出法が検討されている。しかし、これらの方法は高感度ではあるが、複雑な操作が要求されることの他、ヒドロペルオキシドを直接検出するものではない。

一方、生体内脂質過酸化の引き金となる反応機構と抗酸化性物質の係わりについては不明の点が多い。

本研究では、これらの諸点の解明の重要性に鑑み、各種モデル実験系を用いて基礎的知見を得ることを目的とした。

本研究で得られた成果について審査員一同が評価した点は、概略以下の通りである。

(1)脂質ヒドロペルオキシドの直接的測定法に関しては、HPLC-クーロメトリック電気化学検出 (HPLC-CmEC) 法の特異性・簡便性に注目し、さらにヒト血漿における脂質ヒドロペルオキシド蓄積の指標としてコレステロールエステルヒドロペルオキシド (CE-OOH) に着目した。CE-OOH 標準物質の分析から、該分析法の感度が極めて高いことを明らかにし、正常人の血漿中のCE-OOH レベルは27nM 以下であることを推定した。また、本法によるリン脂質ヒドロペルオキシドの検出限界は20pmol であることを示した。結果的に、本分析法が脂質ヒドロペルオキシドに対し、高感度、特異的であり、かつ簡便な定量法であるものとして確立された。

(2)生体膜脂質やリポタンパク質において α -トコフェロール (α -Toc) は重要な抗酸化性物質である。本分子中のクロマン環はラジカル捕捉に関与し、フィチル側鎖は α -Toc の生体膜への取り込みや保持に寄与しているとされる。一方、

ウサギ網状赤血球由来のリボキシゲナーゼ (LOX) はホスホリパーゼ群の作用を伴うことなく活性を示すことが知られているが、これに対する α -Toc の関与については知見がない。このことから、生体膜モデルのホスファチジルコリン (PC) ミセル、PCリポソームを用い、LOX反応と α -Toc の関連性を検討した。

その結果、均一溶液中での α -Toc、PMC (α -Toc のフィチル側鎖をメチル基で置換した化合物)、および Trolox C (α -Toc のフィチル基をカルボキシル基で置換した化合物) のペルオキシラジカル消去能はほぼ同程度であり、基質が不均一な状態で存在するリン脂質ミセルの場合と明らかに異なったことから、抗酸化物質の局在性が抗酸化活性に影響することを明らかにした。さらには、より生体膜に近いリン脂質 1 枚膜リポソーム (LUV) の実験結果、すなわち、高濃度の α -Toc、および関連誘導物質を添加しても PC LUV の LOX 反応が完全に抑制されないことをも踏まえ、LOX による酵素的な生体膜脂質の過酸化は生体酸素障害の不可避的な原因となり得ることを指摘した。

(3)水産油脂を特徴づけているイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) のような多価不飽和脂肪酸の摂取により、それらが生体膜に取り込まれた場合には、膜脂質の酸化に対する感受性を高めることが危惧されている。

このことから、LOX の反応によって引き起こされる生体内過酸化と膜リン脂質構成脂肪酸の関係を LUV をモデルとして、過酸化反応に関して動力学的解析手法によって検討した。すなわち、グリセロール骨格の 2 位に多価不飽和脂肪酸を有する PC の LUV にウサギ網状赤血球由来 LOX を作用させ、反応速度を測定し、ミカエリス定数 (Km)、最大速度 (Vmax) を導き、前者は多価不飽和脂肪酸による差異ないが、後者については DHA-PC のそれがリノール酸やアラキドン酸を結合する PC のそれよりも明らかに低値であることを認めた。また、不飽和脂肪酸のビス-アリル水素 1 分子当たりの PC の酸化難易度は脂肪酸の不飽和度が増大するほど低値を示すことを認めた。これらの結果から、たとえば DHA のような多価不飽和脂肪酸が生体膜へ取り込まれても、その不飽和度から予想されるほど酸化に対して不安定ではないことを指摘した。換言すれば、生体膜に取り込まれた DHA は、酵素的および非酵素的酸化を受けにくいことを明らかにした。すなわち、水産油脂のような多価不飽和脂質を摂取しても、必ずしも生体膜酸化障害の促進因子とはならないことを指摘した。

以上の成果は、水産油脂の摂取をはじめ、健康機能性を有する多価不飽和脂肪酸の摂取による膜脂質過酸化安定性に関して重要な示唆を与えるものとして、その意義は大きい。よって、審査員一同は、本論文は、博士の学位を授与されるに値するものと判定した。