

博士（水産科学） 菊地数晃

学位論文題名

生体膜過酸化に及ぼすプラズマローゲンの影響

学位論文内容の要旨

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質の中で、アルケニルアシル型（プラズマローゲン）はグリセロール骨格の1位にビニルエーテル結合、2位に高比率の高度不飽和脂肪酸（PUFA）を結合するユニークな構造のリン脂質である。プラズマローゲンの動物組織における分布の特徴は、酸素消費量の高い組織に偏在することであり、生体膜中の抗酸化性脂質としての機能が予測されている。プラズマローゲンの抗酸化性に焦点をあてた研究については、リポソーム、LDL（低密度リポプロティン）、あるいは培養細胞を用いた *in vitro* での検討が多く、*in vivo* での研究はほとんどみあたらない。

そこで著者は、酸素消費が高い心臓組織にプラズマローゲンが特異的に分布すること、また、生息環境が違えば心臓機能にも影響を及ぼす可能性があることから心臓組織に着目して、生体膜成分の酸化という観点から、プラズマローゲンの生理機能を明らかにしようとした。

第1章では、生息環境や行動様式の違いにより酸素消費量も異なっていると推測される動物（回遊魚、底生魚、および陸上哺乳類）について、それらの心臓リン脂質サブクラスの分布と脂肪酸組成にどのような違いがあるかを検討した。その結果、ホスファチジルコリン（PC）およびホスファチジルエタノールアミン（PE）におけるプラズマローゲンの割合が、陸上動物（ウシ、ブタ）よりも魚類で低く、また魚類間で比較すると、回遊魚（マグロ、カツオ）と底生魚（スケトウダラ、カジカ）では差は認められなかった。一方、心臓プラズマローゲンを構成する脂肪酸組成は、動物種を問わず PUFA が主要成分であることが確認された。すなわち、陸上動物の心臓プラズマローゲンの主要脂肪酸は n-6 系のリノール酸（18 : 2）およびアラキドン酸（20 : 4）であるのに対し、魚類心臓のそれは n-3 系の DHA（22 : 6）であった。これらのことから、動物種やリン脂質クラスの違いにかかわらず、心臓プラズマローゲンを構成する主要脂肪酸は PUFA であり、プラズマローゲンの生理機能に PUFA が大きく関係していることが推察された。

そこで第2章では、生体膜成分の酸化という観点から、心臓プラズマローゲンに対する酸化ストレスの影響について検討した。魚油を 4% 含む餌料を給餌したラットでは、その心臓のリン脂質、とりわけプラズマローゲンへの明らかな n-3 系 PUFA の反映が認められ、その反面、酸化ストレス負荷により α -トコフェロール含量の低下あるいは TBARS 値の上昇に示されるような脂質過酸化が起こりやすいことも認められた。この際、n-3 系 PUFA が最も高濃度に反映した PE プラズマローゲンの減少が顕著であった。一方、大豆油に富む餌料を給餌したラットでは、酸化ストレスを負荷しても魚油給餌群ほどの脂質過酸化は起こらなかつたが、逆に酸化タンパク質の増

大が認められた。すなわち、魚油の摂取によって膜タンパク質の酸化に対しては抑制的に作用することが示された。このことから、プラズマローゲン、とくに PE プラズマローゲンが積極的に酸化を受けることにより、近傍のタンパク質成分に対して抗酸化的機能するという機序が考えられた。

第3章では、意図的にプラズマローゲンを摂取した場合、すなわち“外因性プラズマローゲン”の影響を抗酸化作用との関連でラットを用いて検討した。はじめに、プラズマローゲンの人工胃液中での分解性について検討した。その結果、乳化系 (pH2-pH4) におけるプラズマローゲンはジアシル型と同様、ほとんど水解されず、高い安定性を有していることが認められ、食餌性リン脂質は少なくとも胃酸では分解されずに腸管へ移行することが示唆された。そこで、プラズマローゲン含量の異なる餌料、すなわちジアシル型リン脂質、あるいはプラズマローゲンに富む餌料をラットに4週間給餌し、血漿脂質成分および心臓脂質成分へのプラズマローゲンの反映について検討した。その結果、プラズマローゲン給餌はわずかながら血漿および心臓のプラズマローゲン量を増大させることを認めた。さらに、プラズマローゲンが心臓の被酸化性に及ぼす影響について検討した結果、プラズマローゲン餌料群のラット心臓 TBARS 値がジアシル型リン脂質給餌群に比し、より低いレベルで維持されることも認められた。これらの結果から、臓器組織の酸化的安定性はプラズマローゲン含量の多寡に關係することが推測された。事実、プラズマローゲン含量の高い心臓組織ホモジネートは鉄依存性脂質過酸化反応が明らかに低いことを認めた。以上のように、プラズマローゲンは組織過酸化の進行を抑制する抗酸化作用に深く関与していることはジアシル型リン脂質との化学構造の違いを考慮すると、アルケニル基の関与に基づくものと考えられた。

そこで、第4章では、プラズマローゲンのビニルエーテル結合が膜脂質の抗酸化性の発現にどのように寄与しているかを明らかにするために、リポソームによる酸化実験を行った。この場合、プラズマローゲン分子中のアルケニル基の関与を明確にするためには分子内の構成脂肪酸をあらかじめ規定したものを供試することが必須である。そこで2位の脂肪酸を改変したプラズマローゲンを合成し、被酸化性指標である PI index が同一で、かつアルケニル基含量のみが異なるリポソームを調製し、それらの酸化安定性を比較検討した。その結果、1-alkenyl-2-arachidonoyl-PC と 1-acyl-2-arachidonoyl-PC をそれぞれ組込んだリポソームの過酸化反応では 1-alkenyl-2-arachidonoyl-PC によって顕著に抑制されることが示された。さらに、1-alkenyl-2-docosahexaenoyl-PC と 1-acyl-2-docosahexaenoyl-PC をそれぞれ組込んだリポソームの過酸化反応においても 1-alkenyl-2-docosahexaenoyl-PC を組込んだリポソームの過酸化がジアシル型のそれに比してより強く抑制されることが示された。これらの結果から、プラズマローゲンのアルケニル基は、その同一分子内にある PUFA の酸化を防止し、かつ、それを組込んだリポソームの過酸化を抑制し、しかもアラキドン酸と比べ不飽和度の高い DHA を結合したプラズマローゲンの酸化抑制作用が、より効果的であることが明らかとなった。第4章で得られた知見は、内因性、あるいは外因性プラズマローゲンが心臓組織における過酸化反応の抑制と密接に関連するものであろうとした第2章および第3章の推定（仮定）をプラズマローゲン分子のアルケニル基の機能として説明できるものであることを明確にした。併せて、本研究の結果は、PUFA を高比率で構成成分とするプラズマローゲンの特異性とその抗酸化作用発現の関係を明確に示したものとなった。

本研究で得られた知見から、我々の日常生活において回避できない酸化的ストレスの暴露からの健康維持のために、 α -トコフェロールの摂取はもとより、プラズマローゲンの積極的な摂取はむしろ望ましいものであると結論された。

学位論文審査の要旨

主査教授 高間浩藏
副査教授 宮下和夫
副査教授 鈴木鐵也
副査教授 高橋是太郎

学位論文題名

生体膜過酸化に及ぼすプラズマローゲンの影響

プラズマローゲンは1-アルケニル-2-アシル・グリセロリン脂質であり、2位に結合する脂肪酸は一般に高度不飽和脂肪酸(PUFA)であることが知られている。しかし、このような特異な構造を有する膜構成脂質の生理的意義については必ずしも十分に解明されてるとはいえない。本研究は、プラズマローゲンが動物では酸素消費の激しい臓器に多く存在することに鑑み、その生理的意義を抗酸化機能の面から明らかにしようとしたものである。そのために、心臓に着目し、生息環境が明らかに異なる動物間のリン脂質サブクラスの組成と脂肪酸組成の分析比較、高度不飽和油脂あるいはプラズマローゲンの経口摂取による心臓脂質、とくにリン脂質サブクラスやPUFA分布への影響の他、心臓組織の過酸化反応との関係等について検討した。それらの知見から導かれた仮説について、所定の脂肪酸を結合させたプラズマローゲンおよびジアシル型リン脂質を合成し、それらを組み込んだリポソーム実験から検証している。

先ず、家畜(ウシ、ブタ)および回遊魚(マグロ、カツオ)と底生魚(スケット、ウダラ、カジカ)について、ホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)のプラズマローゲン分布を分析し、PCにおけるプラズマローゲンの分布は、ウシ(47.0 mol%)はブタ(8.2 mol%)よりも多く、魚類の心臓でのそれは魚種にかかわらず約7 mol%であり、家畜心臓よりも魚類の心臓で低い分布であることを示した。また、PE-プラズマローゲンの分布も、家畜(45.0-57.9 mol%)と魚類(26.1-29.7 mol%)とで明らかに異なることを認め、生息環境や習性を一にする動物間で特徴的なプラズマローゲン分布を示すことを指摘した。また、家畜プラズマローゲンはリノール酸とアラキドン酸、魚類のそれではドコサヘキサエン酸(DHA)が主要な構成脂肪酸であり、プラズマローゲンの生理機能に

PUFAの構成が大きく関与しているものと推察した。

次いで、4%の魚油、あるいは大豆油を含有する飼料を調製し、食餌性PUFAの心臓プラズマローゲンへの反映についてラットを用いて検討した。4週間の給餌実験の結果、魚油含有飼料の摂取によりラット心臓プラズマローゲンにn-3系PUFAが反映することを明らかにした。この際、酸化ストレスの負荷は、魚油摂取群の心臓組織過酸化を促進し、PE-プラズマローゲンの減少を伴うこと、しかし酸化タンパク質の蓄積を抑制することを大豆油摂取群との比較から明らかにした。

一方、あらかじめプラズマローゲンもジアシル型脂質も胃内での分解がほとんど起こらないことを人工胃液処理法を用いて確認し、これらの脂質を直接経口摂取した際の心臓脂質への反映についてラットを用いた4週間の給餌実験によって検討した。その結果、プラズマローゲン給餌はわずかながらラットの血漿脂質および心臓のプラズマローゲン含量を増大させることを認め、組織過酸化度も低く維持されることを明らかにした。さらに、心臓組織ホモジネートの鉄イオン誘導過酸化反応についても検討し、プラズマローゲン含量の高い組織ホモジネートで過酸化レベルが低いことを明らかにした。これらのこととは、心臓組織の過酸化抑制にプラズマローゲンが大きく関与していることを示したものであり、その機能発現にはプラズマローゲン分子を構成する脂肪酸がPUFAであることのみならず、アルケニル基の存在が必須であるものと推察した。

そこで、sn-2位にアラキドン酸やDHAなどのPUFAをはじめ、各種脂肪酸を結合させたPCおよびPC-プラズマローゲンをウシ心臓由来のPC標品から合成し、P-index(被過酸化指標)を同一にしたPCあるいはPC-プラズマローゲンをそれぞれに組み込んだリポソームを調製してそれらの酸化安定性を比較検討した。その結果、ジアシル型であるPCを組み込んだリポソームよりもプラズマローゲンを組み込んだリポソームでより高い酸化安定性のあることを明らかにした。この場合、構成脂肪酸がより高度な不飽和酸である方がプラズマローゲンとしての抗酸化効果を高めることをも明確にした。

以上の結果を踏まえ、プラズマローゲンの膜脂質過酸化抑制作用は分子中のアルケニル基の存在に基づくものであり、DHAのようなより不飽和度の高い脂肪酸の構成がアルケニル基の抗酸化作用を増大させる要因の一つであるとする機序を提起した。これらの成果は食餌性水産プラズマローゲンの意義についても有益な示唆をもたらしたものとして高く評価される。よって、審査員一同は申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。