

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580153

研究課題名（和文） 膜脂質のアシンメトリーと酸化安定性に関する研究

研究課題名（英文） Research on the asymmetry of phospholipid bilayer and the oxidation stability

研究代表者

久保 和弘 (KUBO KAZUHIRO)

岐阜大学・教育学部・准教授

研究者番号：40360705

研究成果の概要（和文）：

生体膜リン脂質二重層の内外層の脂質分子種は大きく異なるが、多くの研究は膜リン脂質のアシンメトリー（非対称分布）の影響について考慮していない。本研究では *in vitro* 系において、コレステロール（Cho）が生理的濃度においてビタミン E（VE）に比べて同等かそれ以上の抗酸化能を有すること、また、Cho の抗酸化能は膜リン脂質のアシンメトリーのみならず、共存するリン脂質の分子形状の影響を受けることが分かった。しかし *in vivo* 系において整合性を得ることはできなかった。

概要（英文）：

Although the lipid molecular species of inside-and-outside layer in biomembrane phospholipid bilayer differ extremely, influence of the asymmetric distribution for lipid peroxidation in the phospholipid bilayer is disregarded in most of studies. In the present study, it was observed that cholesterol showed the antioxidation ability more than equivalent compared with vitamin E at physiological concentrations, and not only the asymmetry of phospholipid bilayer but also the molecular shape of coexistence phospholipid affected the antioxidation ability of cholesterol. However, the both results of *in vitro* system and *in vivo* system were not in agreement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養生化学

1. 研究開始当初の背景

申請者は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が組織中のホスファチジルエタノールアミン (PE) に優先的に取り込まれるだけでなく、ラット肝臓の PE 量を 30~40%程度増加することを見出した (J Nutr 130: 1749-1759 (2000))。in vitro では、VE の酸化防止効果に対する PE 等のアミノリン脂質の相乗作用 (JAOCS 61: 1042 (1984), JAOCS 68: 119(1991), JAOCS 68: 47 (1991)) が報告されていることから、DHA は自らその酸化に対する防御機構を発現させると共に、生体の抗酸化能を増強させる可能性が考えられた。しかし、in vitro における膜リン脂質のアシンメトリーとその酸化感受性との関係は不明である。

細胞膜のリン脂質二重層のアシンメトリーの構築に関与する複数のリン脂質輸送体 (ATP 結合カセット輸送体等) が同定されており、ATP 結合カセット輸送体の一つである Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1: P-糖タンパク質) は、単鎖脂肪酸を持つホスファチジルコリン(PC) やPEなどを内層から外層へ輸送する。また、Multidrug Resistance associated Protein 2 (MRP2: 多剤耐性関連タンパク質 2) は、PC を特異的に膜リン脂質の内層から外層へ輸送する。MRP2 欠損に伴う代償機能として発現することが知られている MRP3 は、MRP2 とよく似た基質特異性を示す。申請者は、MRP3 の発現が DHA 摂取によって促進

することを明らかにした (Biosci Biotechnol Biochem 70: 1672-1680 (2006), Biosci Biotechnol Biochem 73:2432-2438 (2009))。これらの知見と DHA 摂取時に観察される PE への DHA の優先的な取り込み、及び、組織 PE 量の増加を考え合わせると、DHA 摂取による MRP3 発現の増加は、膜アミノリン脂質のアシンメトリー変化と、これに伴う抗酸化能の発現に関係している可能性が推察される。しかし、in vivo における過酸化脂質生成において、膜リン脂質のアシンメトリーの観点から検討した研究は見当たらない。

2. 研究の目的

in vitro 及び in vivo における膜の酸化安定性を考えるとき、それを構成するリン脂質の種類やその脂肪酸組成のみならず、膜リン脂質のアシンメトリーについて当然考慮すべきである。さらに、VE の酸化防止効果に対するアミノリン脂質の相乗作用 (JAOCS 61: 1042 (1984), JAOCS 68: 119(1991), JAOCS 68: 47 (1991))、および、Cho の膜安定化効果 (Fragrance J 28: 32 (2000), J Soc Cosmet Chem Japan25: 171 (1991)) についても考慮する必要がある。本研究の目的は、膜におけるアミノリン脂質のアシンメトリーを中心に、in vitro において VE や Cho の抗酸化効果に対するアミノリン脂質 (特に PE) の相乗作用について解明し、さらに、細胞小器官のない比較的単純な生体膜である

赤血球を用いて *in vitro* で観察された現象との整合性について検討することである。*in vivo* で当該メカニズムを認めた場合には、さらにリン脂質輸送体についても検討し、膜の酸化安定性のメカニズムとの関係を明らかにする。

3. 研究の方法

【リポソーム作成】改良ミニエクストルーダー (Avanti Polar Lipids 社製) 及び大容量タイプの装置 (Northern Lipids 社製) を使用し、ポアサイズの異なるポリカーボネートフィルターを用いて一定の粒子径のリポソームを作成した。

【粒子径測定】サブミクロン粒子分析装置を用いて粒子径を測定した。

【アミノリン脂質分布測定】アミノ基のプロープとして 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic Acid (TNBS) を用い、吸光度の変化から膜の外層 (External) と全体 (Total) のアミノリン脂質を測定し、アミノリン脂質のアシメトリーを算出した。

【酸化反応】酸化開始速度を一定にするために、酸化開始剤として AAPH

(2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride) を用い、リポソームの脂質過酸化反応を誘起させた。

【安定性評価】過酸化反応の総合的な指標としてチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) を測定した。

【抗酸化物質測定】HPLC を用いて VE 同族体を測定した。

【赤血球膜 Ghost の調製】高 Cho 食を摂取

すると赤血球膜中の Cho 量が増加すると共に、その非対称性分布も変化することが報告されていることから、高 Cho 食を与えたマウスから血液を採取し、赤血球を分離後、低張溶液 (5mM リン酸ナトリウム溶液、pH8.0) を用いて溶血させ内容物を除去し、White Ghost を得た。この White Ghost は膜の一部が突出して小胞化した構造をとる。一方、低張液に 0.1mM 硫酸マグネシウムを加えた溶液で処理して溶血させ、間もなく膜が再封した Resealed Ghost (right-side-out vesicle) を得た。対照として、通常のマウスから採取した血液も同様に処理した。

4. 研究成果

Cho はリポソーム非対称膜において抗酸化作用を発現することが分かった。リポソーム非対称膜は、生体膜の構成脂質のモル比率 (PE : PC : VE : Cho = 1 : 1 : 0.005 : 1) と同じ比率に調製したことから、Cho は生理的濃度において VE に比べて同等かそれ以上の抗酸化能を有すると推察された。また、Cho の抗酸化作用は共存する PC の分子形状の影響を受けることが分かった。

そこで、Cho の膜安定化効果に対する PE の共存効果について検討を行うために、エクストルーダーを用いて、脂肪酸組成の異なるホスファチジルコリン (PC16:0、PC18:0、PC18:1) と牛脳由来 PE からなるリポソーム、および、これらに Cho を含むリポソームを作成した。PC/PE/Cho の比率はヒト赤血球の組成に準じた。粒子径がおよそ 200nm 以下において、PC18:1 は、PC18:0 および PC16:0

に比べて、脂肪酸側鎖の占有容積が大きいために、リポソーム膜の内層に分布しやすいと考えられる。すなわち、PE は PC18:1 と共存する場合には外層へ押し出される（外層 PE の割合が増加する）。結果は予想した通り、脂肪酸側鎖の占有容積が低い PC16:0 と Cho が共存する場合、PE が外層により多く配向することが観察された（PC16:0/PE/Cho > PC18:0/PE/Cho）。これらのリポソームのリン脂質二重層の外層側から、水溶性ラジカル発生剤 AAPH を用いて酸化させ、生成する過酸化物を測定したところ、対照（Cho を含まない）と +Cho（Cho を含む）のいずれも、経時的に有意に増加した。同じ PC 種で比較すると、酸化時間が経過するほど、+Cho において有意に抑制された。対照は、4 時間後に PC18:0/PE が PC16:0/PE と PC18:1/PE に比べ、増加した。+Cho も、4 時間後に PC18:0/PE > PC16:0/PE > PC18:1/PE の順に有意に増加した。以上のことから、Cho は膜において抗酸化作用を発揮するが、その作用は、膜におけるリン脂質分布のみならず、リン脂質分子中の脂肪酸組成の影響を受けることが示唆された。

これら *in vitro* で得られた知見について *in vivo* での整合性を確認するため、赤血球を用いて検討した。通常の赤血球膜および Cho リッチな赤血球膜からそれぞれ作成した White Ghost と Resealed Ghost について、全てのモデル間で非対称性に差が認められなかった。水溶性ラジカル発生剤 AAPH を用いて外層側からラジカルをアタックさせて過酸化反応を誘起させた結果、全てのモデル

間で過酸化物生成量に差が認められなかった。*in vitro* と *in vivo* で得られた結果について整合性が得られなかったことから、生体内の膜リン脂質の非対称分布と酸化感受性との関係についてはさらに検討の余地がある。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）
投稿準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 和弘 (KUBO KAZUHIRO)
岐阜大学・教育学部・准教授
研究者番号：40360705

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし