

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32425

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790053

研究課題名(和文) 脂質過酸化反応における脂質ラジカルと生体内分子の反応産物の検討

研究課題名(英文) Examination of reaction products the lipid radical and biomolecule.

研究代表者

高城 徳子 (Takajo, Tokuko)

日本薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80424068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：脂質過酸化反応において、産生される反応産物は酵素による生体反応とラジカルや活性酸素による酸化ストレスで生じる反応産物も同じものとして測定している。そこで、これらを区別することが、抗酸化剤による酸化ストレス防止には重要であると考えられる。リポキシゲナーゼによる酵素的反応と、ラジカル発生剤による化学的反応、紫外線照射による物理的反応において産生される物質と生体内のアミノ酸等との反応で産生される反応産物に相違があるか検討を行った。結果としては、酵素反応、化学的反応および物理的反応で生じる反応中間体、反応産物に相違は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In lipid peroxidation reaction, it is measured without distinguishing these reaction products, which oxidative stress caused by reactive oxygen species or radicals reaction products and the biological enzymatic reaction products. Therefore, it is considered to be important for oxidative stress prevention by an antioxidant agent to distinguish these reaction products. I investigated whether there are differences in the reaction products produced by the reaction with biomolecular substances and enzymatic reaction by lipoxygenase, a chemical reaction by the radical generator, the physical reaction by UV irradiation. As a result, the reaction intermediates generated in the physical reaction and enzymatic reactions and chemical reactions, no difference was observed in the reaction product.

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：脂質過酸化 酵素反応 非酵素反応

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレス疾患において、活性酸素種やラジカルの関与が提唱されているが、これらの分子種が何時、何処で、どのように関与しているのか詳細について不明な点が多い。活性酸素種やラジカルが疾患や炎症が生じた結果として産生されるのか、あるいは産生されたことにより炎症や疾患が惹起されるのかは定かではない。即ち活性酸素・ラジカルが酸化ストレス疾患の原因物質であるのか、起因物質であるのかは明らかではない。

活性酸素・ラジカルは反応性が高く、生体の構成成分である脂質、蛋白質、糖質、核酸などを標的として反応し、本来の機能を破壊させる。特に細胞膜の構成成分である脂質は、何らかの原因により水素が引き抜かれ、一度、過酸化反応が開始されると連鎖的に脂質の過酸化が生じて、膜障害が起こる。現在までに、活性酸素・ラジカルによる障害を抑制する目的で、酸化ストレス疾患に対する抗酸化剤の効果について検討が行なわれているが、有効なのか無効なのか明白な結果は得られていない。その原因の一つに、炎症や疾患が生じた結果として活性酸素・ラジカルが産生されているのであれば、これらを抑制する抗酸化剤を処置したとしても、根本的な原因を排除したことにならず、顕著な抑制効果が認められない可能性が考えられる。従って、抗酸化剤を治療に用いるためには、活性酸素・ラジカルの産生が炎症・疾患の原因なのか結果なのかを区別し、原因物質の消去能を有する抗酸化剤が必要である。また、原因物質なのか、結果として生じた物質なのかを区別することにより、ストレスが関与する疾患の病態解明、創薬の手がかりとなり得ると考えている。

酸化ストレスを評価する方法として、様々なマーカーが利用されており、その一つに脂質過酸化が挙げられる。脂質過酸化を評価する一般的な方法として、脂質過酸化により産生されるマロンジアルデヒドやヒドロペルオキシドなどを測定対象としたチオバルビツール酸塩(TBARs)や酸化により生成する共役ジエンを230~235 nmの紫外吸収を測定する方法などが繁用されており、特定の過酸化物を測定するというよりは非特異的に過酸化物の総量として測定している。しかし、実際は様々な反応物が産生されており、脂質過酸化の原因物質により反応産物が異なる可能性が考えられる。そこで、脂質過酸化において産生される過酸化物の中間体である脂質ラジカルが生体内の糖質や蛋白質と反応すると考えられる。そこで本研究課題では、脂質過酸化反応の中間体である脂質ラジカルと生体内分子の反応産物の酵素的酸化と非酵素的酸化における構造の違いを検討する。これらで違いが認められれば、炎症や疾患により生じる脂質過酸化が酵素によるものであるか、活性酸素・ラジカルによるものであるか区別可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究においては、脂質の過酸化過程において酵素的反応と非酵素的(化学的、物理的)反応において、産生される脂質ラジカルをはじめとした中間体あるいは反応産物と生体内分子の反応で生じる反応産物の構造の違いがあるか否か検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

リノール酸、アラキドン酸、リノレン酸の3種類の不飽和脂肪酸を用いた。また脂質過酸化を行うため、酵素としてリポキシゲナーゼの数種類のアイソザイムを使用した。また、化学的反応としてラジカル発生剤AMVN(2,2-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile))を使用、また物理的過酸化法として紫外線ファイバースポット照射装置(SUPERCURE-203S)を用いて紫外線照射を行った。

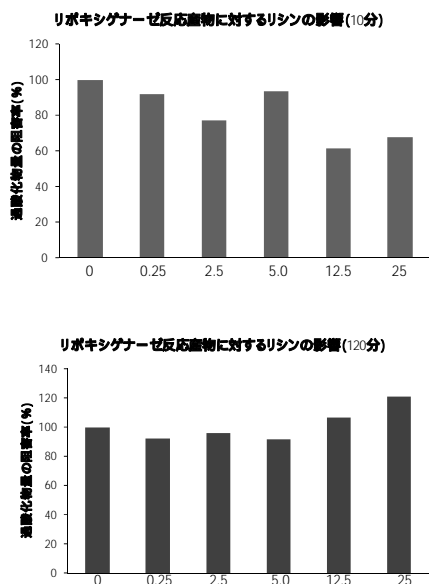
反応産物の検出は、HPLC(HPLCポンプPU-2080;Jasco、サンプルインジェクター7725;Rheodyne、紫外/可視分光光度計L-2420;Hitachi)を用いて行った。カラムはTSKgel ODS 80Ts QA や TSKgel Octyl-80Ts などを用い、溶出液はメタノール水系やアセトニトリル水系などを使用した。

また、反応溶液をTLCに供し、反応産物の比較を行った。

## 4. 研究成果

まず、はじめにラジカル発生剤AMVNによる化学的反応と、リポキシゲナーゼによる酵素的反応で産生される脂質ラジカルなどの中間体とアミノ酸の反応産物に相違があるか検討を行った。リシン残基と脂質ラジカルの反応を示唆する報告があったため、リシンとの反応を行ったが、今回のHPLCの条件ではリシンとの反応産物は検出されなかった。リシンとの反応産物は、リポキシゲナーゼによる酵素的過酸化、ラジカル発生剤AMVNによる化学的過酸化いずれの条件でも検出できなかった。しかし、脂質ヒドロパーオキシドの産生量は、リシンを共存することにより抑制されることが確認された。これはリシンによる抗酸化作用によるものであると考えられ、このリシンの作用は酵素的反応でも化学的反応でも同様の結果が認められた。また、反応時間を変化させ、リシンの添加による脂質ヒドロパーオキシド産生量に変化があるか否か検討を行った。その結果、反応時間が10分であれば、リシンの濃度依存的に脂質ヒドロパーオキシドの産生が抑制されるが、反応時間を120分に延長すると、脂質ヒドロパーオキシドの産生抑制作用が消滅した。脂質過酸化反応の脂質ラジカルをはじめとした中間体もしくは脂質ヒドロパーオキシドとリシンが反応することにより、反応時間10分では脂質ヒドロパーオキシドの産生量が抑制された

と考えられる。反応時間を延長することにより、次々と連鎖反応が生じ、脂質ラジカル・中間体、脂質ヒドロパーオキサイドが過剰に産生されたことで、リシンの反応が追い付かなくなったと考えられる。



酵素的反応と非酵素的反応での反応産物の相違を検討するには、本反応系では反応産物のピークが検出されなかったことから、検討不可能であるため、次にリシンではなく、Hippuryl-Lys を用いた。反応溶液に Hippuryl-Lys を共存させると、リポキシゲナーゼによる過酸化が抑制され、Hippuryl-Lys 無添加の場合に比較して未反応のリノール酸が多く残っていた。また、リポキシゲナーゼの反応でもラジカル発生剤 AMVN での反応でも、反応産物の検出に HPLC のピークパターンに相違は認められなかった。

脂質ラジカルをはじめとした脂質過酸化反応中間体あるいは過酸化反応産物である脂質ヒドロパーオキサイドとアミノ酸との反応では、酵素的反応と非酵素的(化学的)反応で、アミノ酸との反応産物に相違が認められなかった。そこで、脂質過酸化反応の中間体であるカルボニル化合物において相違があるか検討を行うため、生体内分子ではないが、カルボニル検出試薬である 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いて検討を行った。

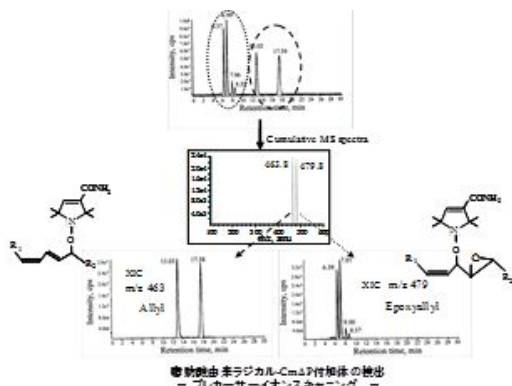
リノール酸をリポキシゲナーゼ(大豆由来 15-リポキシゲナーゼ、網状赤血球由来 15-リポキシゲナーゼ、ポテト由来 5-リポキシゲナーゼ)およびラジカル発生剤 AMVN で過酸化を行い、産生されるカルボニル化合物と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの反応により産生されるヒドラゾンの検出を行った。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをリポキシゲナーゼと同時に添加した場合と、リポキ

シゲナーゼ反応開始 5 分後(過酸化反応が開始されカルボニル化合物が既に存在していると考えられる状況)で、反応産物に相違が認められなかったことから、リポキシゲナーゼ反応開始 5 分後に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを添加することとした。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを添加し、37 で 1 時間、2 時間、20 時間反応させた後に測定を行った。反応時間 20 時間では、反応時間 1 時間で検出された反応産物のピークが減少したことから、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応時間は 1 時間として検討を行った。大豆由来 15-リポキシゲナーゼによるリノール酸の過酸化による反応産物と、ラジカル発生剤 AMVN による過酸化での反応産物のピーク出現パターンに相違は認められなかった。さらに、非酵素的反応としてラジカル発生剤 AMVN を用いた場合、AMVN 由来のピークが邪魔であるため、紫外線照射による過酸化を行った。紫外線照射時間は、紫外線照射によりリノール酸ヒドロパーオキサイドの産生が確認された 10 分間で実験を行った。紫外線照射により生じるリノール酸過酸化過程の中間体あるいは過酸化物質と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応産物は、大豆由来 15-リポキシゲナーゼによる反応産物のピーク出現に相違は認められなかった。リノール酸の過酸化において、リポキシゲナーゼを網状赤血球由来 15-リポキシゲナーゼおよびポテト由来 5-リポキシゲナーゼで反応を行ったが、AMVN で産生される反応物のピーク出現と相違は認められなかった。15-リポキシゲナーゼと 5-リポキシゲナーゼでは、不飽和脂肪酸の水素引抜位置が異なるため、産生される脂質ヒドロパーオキサイドも異なる。従って、脂質過酸化の中間体も酵素のアイソザイムにより異なると考えられる。即ち、中間体あるいは反応産物と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンが反応すれば、異なる反応産物が検出できると考えられるが、どの酵素を用いてもピークの出現時間に相違が認められなかった。このことから、完全に分離できていない可能性も考えられる。アラキドン酸についても同様に、大豆由来 15-リポキシゲナーゼ、ラジカル発生剤 AMVN、紫外線照射による過酸化反応を行い、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応産物を比較したが、過酸化方法による反応産物のピーク出現に相違は認められなかった。

以上のことから、今回検討を試みた反応系および検出系では、脂質過酸化において産生される中間体もしくは反応産物が、過酸化の方法により異なるという結果は得られなかった。しかし、前述したように今回用いた HPLC 条件において、分離が十分でなかった可能性は否定できない。

以前の研究において、ニトロキシルラジカルと過酸化反応の中間体である脂質アリルラジカルが付加体を形成し、この付加体は酵素反応と非酵素反応(ラジカル発生剤による

過酸化)では、付加体のピーク保持時間が異なることから、酵素反応と非酵素反応では産生される脂質ラジカルの構造が異なる可能性を報告している。



今回の結果ではヒドロパーオキサイドや脂質ラジカル、カルボニル体などの中間体を含めて、酵素と非酵素反応で脂質過酸化反応の中間体およびヒドロパーオキサイドの構造に相違が認められなかった。不飽和脂肪酸の共役二重結合の活性メチレンから水素が引き抜かれ、脂質アリルラジカルの産生時には、酵素と非酵素的反応で異なっているにもかかわらず、カルボニル化合物あるいは脂質ヒドロパーオキサイドでは相違が認められなかったので、脂質ラジカルとニトロキシラジカルとの反応が速いので検出可能であったが、脂質ラジカルは他の中間体や脂質ヒドロパーオキサイドへ反応する間に構造が変化し、酵素的反応でも非酵素的反応でも同じ反応産物が産生された可能性も考えられる。

#### 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1件)

Yang HL, Huang PJ, Liu YR, Kumar KJ, Hsu LS, Lu TL, Chia YC, Takajo T, Kazunori A, Hseu YC. YC.

Oxid Med Cell Longev. 査読有 2014; doi: 10.1155/2014/901315

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/901315>

〔学会発表〕(計1件)

高城徳子、抗酸化評価のためのスピントラップ法における Fenton 反応の検討”、第 52 回電子サイエンス学会年会 (SEST2013) (2013.10.24-26) さいたま市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高城 徳子 (TAKAJO, Tokuko)  
日本薬科大学 講師  
研究者番号：80424068

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：