The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ergothioneineの過酸化脂質抑制機作に関する研究
Author(s)	川野, 博子
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33654
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【8】

氏名・(本籍)	川(かわ)　野(の)　博(ひろ)　子(こ)
学位の種類	薬　学　博　士
学位記番号	第　6234　号
学位授与の日付	昭和 58 年 12 月 2 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**Ergothioneine の過酸化脂質抑制機作に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教 授 青沼　繁 (副査) 教 授 近藤 雅臣　教 授 鎌田　皎　教 授 岩田平太郎

論文内容の要旨

(緒　論)

酸素は生体内では活性酸素として生体膜不飽和脂肪酸の過酸化をおこし，その結果膜の破壊，代謝機能の低下を来たし種々疾患を引きおこすにいたることが知られている。これに対し生体にはGSH Peroxidase(GSH－px)，super oxide dismutase(SOD)，catalase，vit.Eなどの酸素毒防禦機構が存在する。

生体内常存物質Ergothioneine(2－mercaptohistidine trimethyl betaine：Erg)は哺乳動物では生合成されず食餌性に取り込まれ，各組織に広く分布蓄積する。しかし本物質はErg freeの合成飼料で長期間飼育したratでも欠損症状も認められず，いまだに生理化学的な作用が解明されずに残された生体内物質の一つである。もし基本的な作用が解明されればビタミン的な物質である。この問題に取り組むに当ってその原因の一つとして精度よい定量法が確立されていなかったためと考え，まず高速液クロによる感度よいErgの定量を確立した。その結果，肝に最も含量が高いことから肝機能に及ぼす影響について種々検討を加え，いくつかの新しい知見を得た。本研究はその過程でErgが脂質の過酸化防禦機構の一環を荷っている事実を見出し，その作用形式及び機作を明らかにしたものである。

基礎的検討と研究経過

1）高速液体クロマトグラフィーによるErgの定量

高速液クロおよびthiopropyl sepharose 6Bを用いて，生体試料中のErgの特異分別定量法を確立した。既知のいずれの定量法とも原理的に異なり，精度，再現性，簡便性，迅速性にすぐれている。感度は絶対値としてpmole単位の検出定量ができる。

2）生体内Ergの動態及び存在型

^{3}H－Erg投与後，24 hr 後には90％が赤血球中にとり込まれることが示唆された。肝細胞内では 10^{-4} M含有されるが，その60％が cytosol 中に存在した。aging によって肝，血中ともErg 含量は増加するが，Erg欠乏飼料飼育による欠損症状は認められなかった。高分子Erg特異的な binding物質が血漿中に存在した。

3）rat 赤血球解糖系に及ぼすErgの影響

in vivo，in vitro投与により，ともに乳酸生成が促進された。

（本　論）

第一章　Erg in vivo投与による肝機能への影響

Erg i.p. 1週間前投与によってratの性差，週令，薬物代謝酵素系の induction の有無にかかわらず pentobarbital の睡眠時間を短縮した。しかし肝 P－450，pentobarbital の水酸化活性，aminopyrineの脱メチル活性には変化を認めなかった。Erg free の精製飼料で飼育したErg 欠乏rat及びErg添加飼料によるErg過剰 rat での検討の結果でもP－450，pentobarbitalの代謝活性の変化はなかったが，肝脂質過酸化はErg欠乏 rat で有意に大きいことを見出した。

肝障害に対するErgの保護効果を検討する目的で，ethionine肝障害 rat を用いた。Erg の前投与により肝障害 rat のGOT，GPT，過酸化脂質は有意に減少することを認め，Ergは過酸化脂質を抑制することにより肝を障害から保護することが考えられた。

第二章　in vitroにおける過酸化脂質抑制機作

mouse 肝 homogenate 及び microsome 過酸化脂質形成系へのErgの添加は著明な抑制作用を示した。加熱処理microsome ではErgのこの抑制効果があらわれないことからErgの過酸化脂質抑制効果は少なくとも enzymatic な系と関連していることが示唆された。事実，Ergはmouse 肝 cytosol GSH－px, Mn－SOD活性の促進，rat NADPH cytochrome c reductase 活性の抑制など過酸化脂質含有レベルを抑制的に作用している事実を認めた。

第三章　過酸化物により形成される酸化型ErgのGSH－px系へのカップリング

各酵素活性に対する影響のうち，最も著明な見掛け上のGSH－px活性上昇機作について，さらに検討を進めた。リン酸buffer中，Ergと過酸化合物（H_2O_2，Cumenehydroperoxide）との反応により，Ergの極大吸収は減少すると同時に新たに 310 nm に吸収を生じるが，GSHを添加するとこの吸収は瞬間的に消失した。この際 310 nm の吸収の大きさに比例して定量的にGSSGを生成していた。この結果よりErgは過酸化物と反応して 310 nm に吸収を有する－S－S－に結合をもつ酸化型Erg（ox－Erg）を生成し，これはGSHを酸化すると同時にもとの環元型Erg にもどることを見出した。この事実はGSH－px活性測定系でGSH－pxを含まない条件下確認した。

第四章　ox－Ergの調製及びそのGSH－px様作用の証明

化学的な方法により ox－Erg を別途に調製，単離して ox－Ergが GSH－pxサイクルにカップリングしてGSH-px 様の作用を示すことを確認した。なお ox－Erg はErg の dimer であることをFAB法によるMasで確認した。すなわちGSH－px活性測定系に ox－Ergを添加すると定量的に

GSSGを生成することを確認した。しかしox－Ergに対するGSSG生成比は10：1となった。ox－Ergがdimerであるとすると，stoichiometricには問題は残るが，この点Erg－GSHの酸化還元potential，ox－Ergの純度，進行した副反応などの詳細な検討を必要とする。しかしErgの過酸化脂質形成抑制作用機作は過酸化物により生じたox－ErgがGSH－px様作用をあらわすためであることを証明するものである。

以上，Ergの生理的役割を追求する目的で，まず高感度定量法を確立し，肝が生体で最も高濃度にErgを含有することを認めた。この肝における作用をin vivo，in vitroの実験で検討し，いずれもErgは過酸化脂質形成抑制作用のあることを見出した。この作用機作としてenzymaticな系を介した作用であることを認めるとともに，とくに見掛け上著しいGSH－px活性の上昇はErgが過酸化物を還元分解することによりErg自身－S－S－酸化体となり，生じたox－ErgがGSH－pxサイクルにカップリングした非酵素的な作用に基づくものであることを証明した。これらの機作によりErgは過酸化物を分解して含有レベルを減少抑制するものである。

論文の審査結果の要旨

Ergothioneineの高感度定量法を確立し，肝が生体中で最も高濃度にErgothioneineを含有することを認め，これが過酸化脂質形成抑制作用のあることを見出し，その作用機作を検討し，過酸化物により酸化体となり，また非酵素的により安定な還元型にもどること，過酸化脂質消去のSH化合物として特異な物質であることをその作用機作とともに明らかにした。よって，本論文が薬学博士の価値があるものと認める。