

Title	脂質過酸化物によるリポフスチン様蛍光物質の生成に関する研究
Author(s)	余田, 和明
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33765
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	よ 余	でん 田	かず 和	あき 明
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	6 2 3 5	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	脂質過酸化物によるリポフスチン様蛍光物質の生成に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授	近藤	雅臣	
	(副査)			
	教授	鎌田	皎	教授 岩田平太郎 教授 青沼 繁

論 文 内 容 の 要 旨

(緒 論)

生体膜に存在する不飽和脂肪酸は、conjugated diene hydroperoxide (CDHP) を経て、種々のアルデヒドやケトン化合物を含む secondary products (SP) を形成し、これはさらに重合や分解をくり返して malondialdehyde (MDA) などを生成すると考えられている。

このような一連の脂質過酸化物は、各組織において酵素活性の低下をひきおこし、毒性を発現するだけでなく、突然変異原性を示すなど、生体に対して多くの影響をおよぼすことが知られており、動脈硬化症など各種の疾病の誘因とされている。

一方、生体の老化に伴い各組織に沈着する lipofuscin と呼ばれる老化色素は、脂質と蛋白質成分から成る脂溶性の高い蛍光物質であり、生体組織において脂質過酸化物とアミノ化合物から形成されるものと考えられている。

Tappel らは、lipofuscin は MDA とアミノ化合物がシッフの塩基を形成した 1-amino-3-imino-propene 化合物 ($R-N=CH-CH=CH-NH-R$) であると報告しているが、生体における MDA の存在は明らかでなく、lipofuscin 生成については多くの問題点を残している。

本研究では lipofuscin 生成機序を解明するモデルとして、不飽和脂肪酸の過酸化物とアミノ化合物から得られる蛍光物質を単離し、その理化学的性質および生成機序について検討した。

(本 論)

第 1 章 microsome における lipofuscin の生成

ラット肝 microsome における脂質過酸化物と lipofuscin 生成の関連性について検討した。

young rat からの microsome にくらべ、adult rat や鉄とアスコルビン酸を腹腔内投与して脂質過酸化反応を促進させた young rat からの microsome では、TBA 値が数倍に増加するとともに、クロロホルム・メタノール (2:1) 混液で抽出される蛍光物質も 2.5 - 3.0 倍に増加しており、蛍光物質の生成が脂質過酸化物質に依存していることが示唆された。

この蛍光物質をセファデックス LH20 カラムクロマトグラフィーで分画したところ、lipofuscin を含む蛍光 peak 1 のみが著しく増加しており、脂質過酸化物質の増加に伴って生成する蛍光物質が lipofuscin であることが示された。

第2章 Secondary products によるヘム化合物の分解

自動酸化したリノール酸メチルエステルから分離した SP は、rat 肝 microsome の Cytochrome P-450 や市販のプロトヘムを分解し、この作用は SP のもつアルデヒド化合物によるものと推察された。

第3章 Malondialdehyde とアミノ化合物による蛍光物質の生成

Tappel らの報告に基づいて、MDA とアミノ化合物による蛍光物質の生成条件などを詳細に検討した。MDA とアミノ化合物を 3 対 1 のモル比で加え、pH 4.0 - 4.5 の時最も強い蛍光物質の生成が認められ、HPLC によって 1 本の強い蛍光 peak が検出された。

単離した蛍光物質は、3 位と 5 位にアルデヒド基、4 位にメチル基を持つ 1,4-dihydropyridine 化合物であり、アミノ化合物によらず 388 nm に特徴ある極大吸収波長を持ち、また励起波長 390 nm、蛍光波長 450 nm 付近の共通した蛍光スペクトルを示すとともに、それらの蛍光強度などが同じ値を示したことから、1,4-dihydropyridine 化合物に共通した性質であると思われた。

第4章 脂質過酸化物質とアミノ化合物による蛍光物質の生成

自動酸化したリノール酸メチルエステルから CDHP と SP を分離し、これにアミノ化合物を加えて保温したところ SP とアミノ化合物から励起波長 350 nm、蛍光波長 415 nm 付近に蛍光スペクトルを示す蛍光物質の生成が認められ、さらに SP 画分中のアルデヒド化合物の関与が示された。用いるアミノ化合物の種類により蛍光物質の生成量は異なり、リジンや脂肪族アミン化合物で高い生成量を示した。

第5章 Secondary products とアミノ化合物による蛍光物質の生成

リノール酸メチルエステルの SP とアミノ化合物から生成する蛍光物質は HPLC で 2 つの強い蛍光 peak に分離された。この蛍光物質は、自動酸化過程において TBA 値が最高となる時期よりも、その後 TBA 値が減少しはじめる頃から生成することが認められ、自動酸化の初期に生成する SP 化合物よりも、これらが重合や分解をして新たに生じる化合物が蛍光物質の生成に関与することが示唆された。

HPLC により SP を 3 画分に分離し、各画分の蛍光物質生成能を比較したところ、SP III 画分において著しく強い蛍光物質生成が認められ、SP I 画分では全く生成しなかった。

一方、ヘム化合物分解能は SP III 画分が最も弱く、蛍光物質の生成とヘム化合物の分解に関する SP 化合物は異なったものであることが示唆された。

SP とアミノ化合物から生成した蛍光物質は、345 nm 付近に極大吸収波長を有し、その蛍光スペクトルや NMR、マススペクトルの分析結果から、1,4-dihydropyridine 化合物であると思われた。

SPやMDAから得られた蛍光物質の蛍光スペクトルを比較すると、lipofuscinの蛍光スペクトルはSPのそれと類似しており、またpH領域における安定性もlipofuscinとSPによる蛍光物質が類似していることから、生体におけるlipofuscinは、脂質過酸化反応におけるSPとアミノ化合物から生成するものと考えられる。

(結 論)

脂質過酸化物とアミノ化合物から生成する蛍光物質の理化学的性質などを検討し、次の結論を得た。

- 1) 老化に伴う脂質過酸化物の増加は、lipofuscinの生成を起し、またCytochrome P-450 活性を低下させるなど、生体機能に多くの障害を与える。
- 2) 脂質過酸化反応において生じるTBA陽性物質には、アミノ化合物と反応して蛍光物質を生成するものと、Cytochrome P-450などを分解する、性質を異にする二種のSPが存在する。
- 3) MDAとアミノ化合物によって生成する蛍光物質は、励起波長392 nm、蛍光波長448 nmの蛍光スペクトルを持つ1,4-dihydropyridine化合物である。
- 4) SPとアミノ化合物から、励起波長345 nm、蛍光波長415 nmの蛍光スペクトルを持つ蛍光物質が生成し、紫外吸収やNMRの測定の結果などから、1,4-dihydropyridine化合物であることが推察された。
- 5) SPおよびMDAとアミノ化合物から生成した蛍光物質の蛍光スペクトルや安定性などをlipofuscinと比較した結果、生体におけるlipofuscinはMDAよりもSPとアミノ化合物から生成する事が示唆された。

論文の審査結果の要旨

生体の老化に伴って蓄積するLipofuscinの生成機構について検討し、不飽和脂肪酸の酸化分解物とアミノ化合物とから本物質から生成されることを明らかにした。また、不飽和脂肪酸の酸化分解物の中に上記のLipofuscinを生成するものと、Cytochrome P-450などを分解して有害性を示すものが混在しており、それぞれ異なった化合物であることを明らかにした。これらの結果は老化現象の解明に基礎的な知見を加えたものといえ、薬学博士を授与するにふさわしい研究成果であると判定した。