

論文内容の要旨

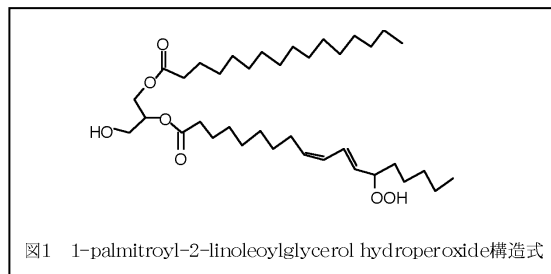
酸化ジアシルグリセロールの検出法の開発と病理的意義に関する研究

氏名 谷野 豊

プロテインキナーゼC (PKC) は細胞の増殖・分化に中心的な役割を担う酵素の一つであり、ジアシルグリセロール (DAG) により活性化される。一方、酸化ストレスは動脈硬化やがんなど各種疾病の発症に深く関わっていると考えられている。酸化ストレス下で生体膜リン脂質が酸化され、これがホスホリパーゼ C で加水分解されると酸化 DAG が生成する。酸化 DAG は PKC をホルボールエステル並に活性化する能力があり、病理的な状態での PKC 活性化因子の一翼を担う可能性がある。そこで、生体試料中の酸化 DAG 分析法を開発し、これを応用し酸化ストレス下の生体試料中に酸化 DAG がどの程度検出できるかを明らかにすることを本研究の目的とした。

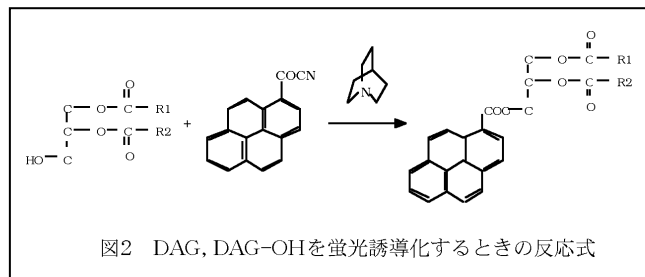
1) 研究の背景と目的

1995 年竹腰らは DAG が活性酸素によって酸化を受けて生成する酸化ジアシルグリセロール (DAG-OOH) (図 1 に代表例として 1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol hydroperoxide (PLG-OOH) の構造式を示す) が PMA に匹敵するほどの PKC 活性化能をもつことを明らかにした。1997 年山本らは、PMA 同様 PLG-OOH がヒト好中球の PKC を活性化し、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) の産生を誘導することを明らかにした。しかし、PLG-OOH の還元体である PLG-OH や 1,3-linoleoylglycerol hydroperoxide (1,3-LLG-OOH) は白血球を活性化しなかった。したがって、白血球の活性化には 1,2-DAG のヒドロペルオキシドであることが必要である。



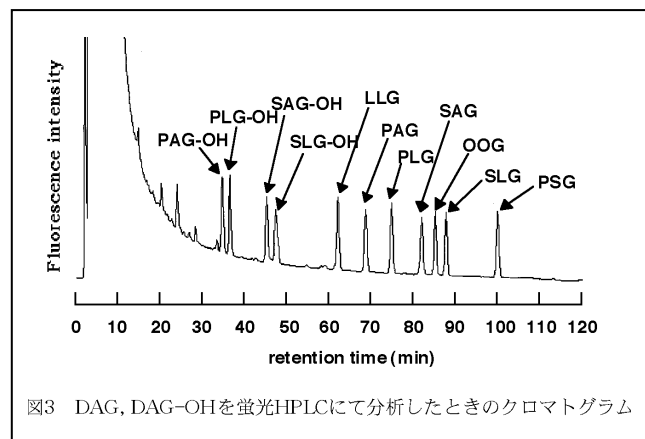
2) DAG, 酸化 DAG の分析法の開発

生体試料中の酸化 DAG は濃度が低いことが予想されるため酸化 DAG の 3 位の水酸基を蛍光誘導化すること(図 2)によって高感度の酸化 DAG 定量システムの開発を行った。同様の方法で未酸化の DAG も定量出来る。



これまで PKC 活性化について論ずる場合において, DAG の定量は $[r\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いていた。この方法では分子種が特定でき

ないばかりでなく, 感度的にも数十 pmol 程度の定量が出来るとどまっていた。分子種が特定できる DAG の定量法としては, HPLC, GLC を使った方法がある。しかし, これらの方法は PKC を活性化する DAG の分離定量というよりもむしろ, 主にリン脂質の各分子種の脂肪酸側鎖の比率を知るために用いられている。1, 2-DAG を誘導化しないでそのまま UV 205 nm で定量した例もあるが, そのままでは極性が高いため分離しにくいこと, 適当な UV 吸収がなく, 感度が低く基質特異性もないことから, 水酸基を蛍光誘導化して HPLC で分離定量する例が多い。よって本分析法の開発において, 3 位(1, 3-DAG の場合 2 位)の水酸基を蛍光誘導化し定量することにした。誘導化試薬として用いたピレン-1-カルボニルシアニド(PCC)は Nambara らによって, 蛍光ラベル反応液としてのみでなく, HPLC への応用に使われた。応用例としては, Nambara らのステロイド誘導体の他に, カルニチンの分析例がある。PCC は触媒としてアミンが必要である。Ramesha らは 1-anthroyl nitrile と DAG についてはキヌクリジンが有効であると報告しているため, 触媒としてキヌクリジンとトリエチルアミン(TEA)について検討した。キヌクリジンでは室温, 暗所で 30 分の反応時間で十分であり, 誘導化効率も良かったのでキヌクリジンを使用する事にした。また, 誘導体は 5 日間安定であった。反応させた DAG, DAG-OH を蛍光 HPLC にて分析したときのクロマトグラムを図 3 に示す。図中の P, S, L, A, O はそれぞれ palmitoyl, stearyl, linoleoyl, arachidonoyl, oleoyl を示すが, これら脂肪酸側鎖の違いによって DAG, DAG-OH の保持時間が異なる。



検量線を図 4 に示したが, PLG においては 220 fmol - 1 nmol の範囲において, PLG-OH においては 30 fmol - 1 nmol の範囲においてピーク面積と注入モル数との間に良好な比例関係が認められた。抽出溶媒としては DAG の溶解性にすぐれる 2-プロパノール(IPA)を用いた。

生体試料中には分析妨害物質も多く、酸化 DAG は微量であることが予想されるので、酸化 DAG 抽出サンプルを逆相 HPLC, 順相 HPLC にて精製後、蛍光誘導化し、最後に逆相 HPLC で定量した。各 HPLC 操作での酸化 DAG の回収率は 75%であった。

以上の結果から、本分析法は生体試料中の酸化 DAG と DAG の分離定量法として適当と考えられたので、以下の検討を行った。

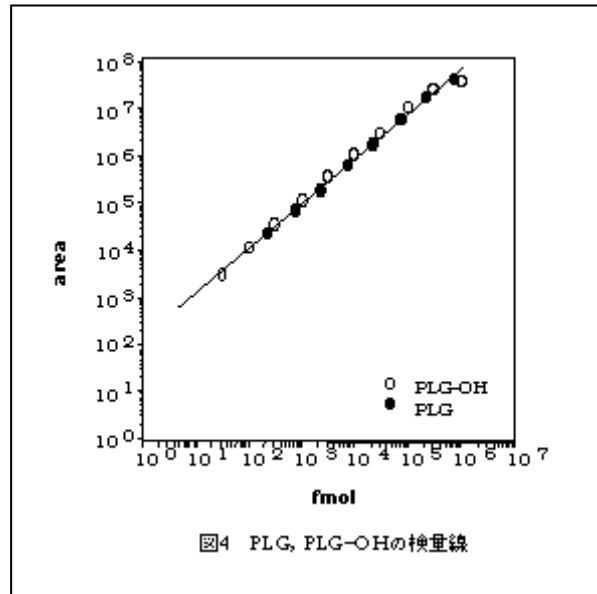


図4 PLG, PLG-OHの検量線

3) LEC ラットからの酸化 DAG の定量

LEC ラットは、遺伝的な肝炎、肝がん自然発症モデル動物として樹立された。肝臓に銅が異常に蓄積すること 18 週齢以降の肝炎発症の原因であり、銅のキレート剤であるトリエンチンを飲料水に溶解して経口投与すれば、肝炎の発症が抑えられる(図 5)。

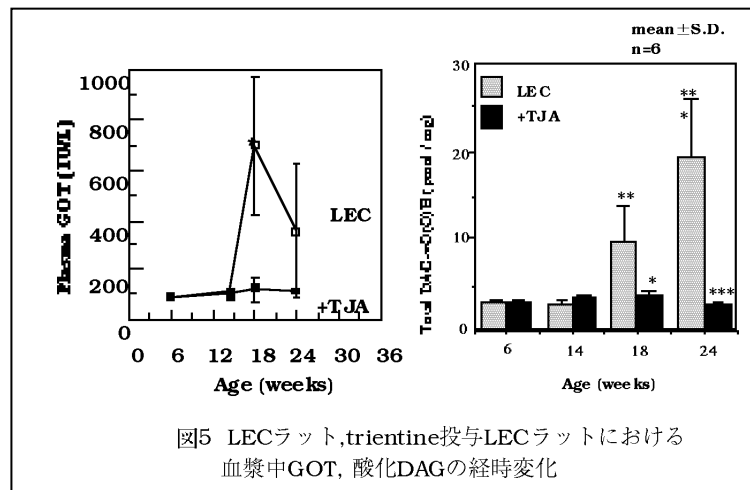


図5 LECラット, trientine投与LECラットにおける血漿中GOT, 酸化DAGの経時変化

LEC ラットとトリエンチン投与した LEC ラットの肝臓中の脂質を

20 μ M BHT および 200 μ M Ph₃P を含む IPA 1000 μ l で抽出した。BHT は操作中の酸化を抑え、Ph₃P は不安定なヒドロペルオキシドを還元し、安定なアルコールにするために加えた。内標として 1,3-PAG-OH を加え、遠心分離 (13000 rpm, 3 min) によりペレットを除いた上澄み 900 μ l を窒素気流下で乾固後、逆相 HPLC に導入し、8.5~13 分の分画を分取した。これを窒素気流下で乾固後、順相 HPLC に導入し、9~18 分の分画を分取した。その後、先に述べたような蛍光誘導化法によって蛍光誘導化し、蛍光検出器付き逆相 HPLC にて定量を行った。

図 5 右に示したとおり、酸化 DAG が LEC ラット肝臓中に検出され、肝炎を発症する 18 週齢以降その濃度は有意に増加し、20 pmol/mg-liver にまで達した。このレベルの DAG-OOH は白血球を活性化するのに十分である。一方、トリエンチンを投与した LEC ラットの肝臓では酸化 DAG レベルに変動はなかった。

4) UV 照射ヘアレスマウスとヒトボーエン病患者皮膚

紫外線照射は炎症や皮膚がんを誘発することが

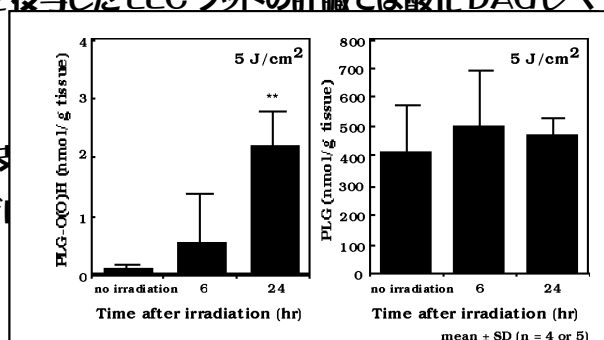


図7 UVA照射ヘアレスマウス皮膚中の酸化PLG, PLG濃度の経時変化

どの抗酸化物質の減少を伴うことから、酸化ストレスが関与していることが予想されている。そこで、UVB を照射したヘアレスマウスの皮膚から酸化 DAG の検出を試みた。400 mJ/cm² の UVB を照射後 6 時間後まで皮膚中の PLG-O(O)H レベルが上昇し、その後減少した (図 6)。DAG-OOH を特異的に検出できる化学発光/HPLC 分析の結果、得られた DAG-OOH は微量にとどまったため、酸化 DAG の大部分はアルコール体である。したがってヘアレスマウス皮膚にはヒドロペルオキシドの還元系が存在している。一方、未酸化の PLG レベルは 24 時間後まで減少したことから、DAG の加水分解系のあることが示唆される。酸化 DAG の PKC 活性化抑制のためにこうしたメカニズムが作用していることが考えられた。

同様に UVA 照射では未酸化の DAG レベルは変化しなかったが、酸化 DAG レベルの顕著な上昇が認められた (図 7)。皮膚がんリスクとして UVB が喧伝されてきたが、最近では UVA 照射も問題視されており、興味深い。

またヒト皮膚がん疾患の一つであるボーエン病患者の皮膚から酸化 DAG が検出され、コントロール皮膚組織からは検出されなかったことも興味深い。

5) 結語

生体試料中の酸化 DAG の高感度分析法を開発し、これを酸化ストレス下にある動物組織に酸化 DAG が顕著に増加することを見いだした。今後、本分析法が酸化 DAG の病理的役割の解明の一助となることが期待される。

発表論文

- 1) Y. Tanino, A. Budiyanto, M. Ueda, A. Nakada, W. T. Nyou, M. Yanagisawa, M. Ichihashi, and Y. Yamamoto: Decrease of Antioxidants and the Formation of Oxidized Diacylglycerol in Mouse Skin Caused by UV Irradiation. (2005) *J. dermatol. Sci.* **1**, S21-S28.
- 2) Y. Tanino, S. Yamashita, and Y. Yamamoto: Detection of oxidized 1, 2-Diacylglycerol by high-performance liquid chromatography. (In preparation)
- 3) Y. Tanino, A. Nakada, S. Yamashita, H. Sone, M. Nagao, and Y. Yamamoto: Presence of oxidized 1, 2-Diacylglycerol in the liver of LEC rats after the onset of hepatitis. (In preparation)

参考論文

- 1) M. Sohmiya, M. Tanaka, N. W. Tak, M. Yanagisawa, Y. Tanino, Y. Suzuki, K. Okamoto, and Y. Yamamoto: Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. (2004) *J. Neurol. Sci.*, **223**, 161-166.
- 2) M. Sohmiya, M. Tanaka, Y. Suzuki, Y. Tanino, K. Okamoto, and Y. Yamamoto: An increase of oxidized coenzyme Q-10 occurs in the plasma of sporadic ALS patients. (2005) *J. Neurol. Sci.*, **228**, 49-53.
- 3) G. Hasegawa, Y. Yamamoto, GZ. Jhi, Y. Tanino, M. Yamasaki, M. Yano, T. Nakajima, M. Fukui, T. Yoshikawa, N. Nakamura: Daily profile of plasma %CoQ10 level, a biomarker of oxidative stress, in patients with diabetes manifesting postprandial hyperglycaemia. (2005) *Acta Diabetol*, **42**, 179-181.