

E315

水溶性ラジカル存在下における生体膜脂質コレステロールの酸化反応速度

(東北大・工) (学)木村優也・(学)村上理彦・(正)久保正樹・(正)北川尚美*・(正)米本 年邦

【緒言】ヒトの内臓組織細胞を構成する生体膜脂質の酸化は癌や動脈硬化の一因であり、反応機構の詳細説明が望まれている。Fig.1(a)に示すように、生体膜は主にリン脂質とコレステロールからなる二重膜であり、経口摂取されたβ-カロテンやビタミンEなどの脂溶性抗酸化剤が血液を通じて運ばれ膜内に保持されている。また、血液(水相)中にはヒドロキシラジカルなどの水溶性ラジカルが存在し、リン脂質やコレステロールなどの生体膜脂質の酸化を引き起こす。リン脂質の酸化機構に関しては多くの報告があるものの、コレステロールに関しては僅少である¹⁾。本研究では、生体膜類似構造を有するリポソーム系(Fig.1(b))において、水溶性ラジカル開始剤存在下でコレステロールの酸化実験を行い、ラジカルや酸素の物質移動と反応機構を考慮することで、酸化挙動を表現できる速度論モデルを構築した。

【実験】リポソーム調製では、脂質相に酸化不活性な合成リン脂質を、水相にはTris-HCl緩衝液(pH 8.0)を用い、内包コレステロール濃度を390mol/m³-lipidで一定とした。酸化実験は、リポソーム懸濁液に水溶性ラジカル開始剤2,2'-アゾビス(2-メチルアミノプロパン)二塩酸塩(AAPH)を添加した後、容器を密封し、35℃、暗黒下で静置して行った。AAPH添加濃度は0-10mol/m³-waterと変化させた。各実験では、所定時間毎に残存コレステロール濃度をUV検出器を備えたHPLCで測定した。

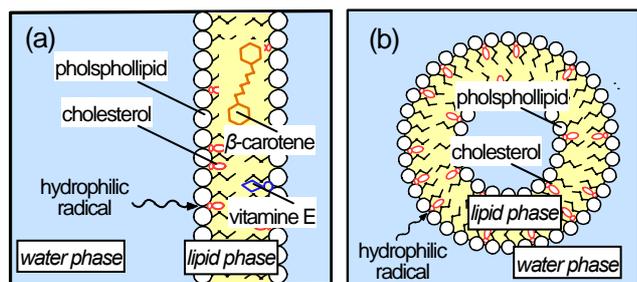


Fig.1 Schematic diagrams of biomembrane(a) and liposome(b)

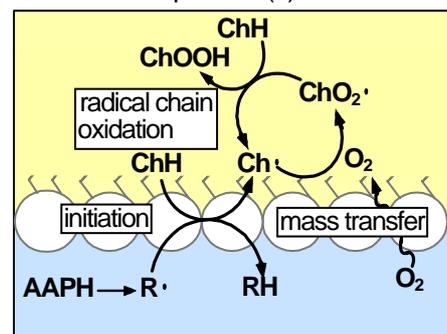


Fig.3 Conceptual diagram of reaction mechanism

【結果と考察】Fig.2に実験結果をプロットで示す。ラインは後述する。開始剤AAPHを添加しない条件では(×)、コレステロール濃度が初期値でほぼ一定となった。これより、開始剤が存在しない場合、コレステロールの酸化がほとんど進行しないと考えられる。一方、AAPHの添加濃度が大きくなるほど、コレステロール濃度がより速やかに減少した。従って、本系でのコレステロール酸化は、水溶性ラジカルによって開始されたと考えられる。

【速度論モデルの構築】Fig.3に本系での酸化機構の概略を示す。油水界面での水溶性ラジカルによる開始反応、脂質相でのコレステロールの連鎖酸化、水相から脂質相への酸素の物質移動を考慮した。各ラジカル濃度に擬定常状態を仮定し、脂質相コレステロール濃度C_{ChH}および酸素濃度C_{O₂,L}の変化速度式(1)-(3)式を導出した。本モデルの未知定数はAAPHの熱分解の速度定数k_{i,AP}、コレステロール酸化に関する速度定数k_{R1,Ch}、k_{PT,Ch}、酸素の物質移動に関する定数k_{L,O₂a}、H_{O₂,WL}の計5つであり、実験結果とのフィッティングにより推算した。モデルの適用結果を前述のFig.2にラインで示す。計算結果は、実験結果と概ね一致しており、AAPH添加濃度が大きいほどコレステロール濃度が速やかに減少する傾向を表現できた。

【文献】1) J.Chien et al., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1486 (2006)

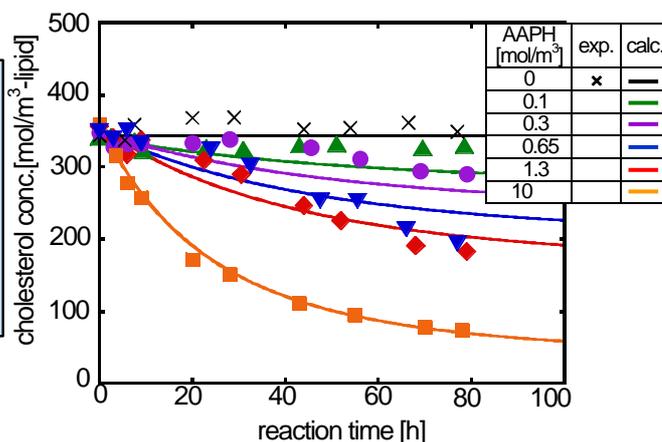


Fig.2 Experimental and calculated results of cholesterol concentration in liposome

$$\frac{dC_{ChH}}{dt} = -2k_{i,AP}C_{AP} - k_{PT,Ch}\sqrt{r_1}C_{ChH} \quad (1)$$

$$\frac{dC_{O_2,L}}{dt} = -k_{PT,Ch}\sqrt{r_1}C_{ChH} + k_{L,O_2}a(C_{O_2,W} - H_{O_2,WL}C_{O_2,L}) \quad (2)$$

$$r_1 = \frac{k_{i,AP}C_{AP}}{1 + k_{R1,Ch}\frac{C_{ChH}}{C_{O_2,L}}} \quad (3)$$

*E-mail : naomi@rpel.che.tohoku.ac.jp