

脂質分子集合体の活性酸素種分解機能の解明による 新規な抗酸化系の構築

山口大学工学部応用化学工学科

吉本 誠

The structure and function of phospholipids are modified in the presence of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide. An excess amount of the ROS is known to be decomposed enzymatically with catalase. To our knowledge, little is known on the role of phospholipid molecules in decomposing the ROS in the absence of the enzyme. In the present work, the decomposition of hydrogen peroxide at the initial concentration of 1.0 mM was examined at pH 7.4 in the presence of the various molecular assemblies of phospholipids. Phospholipids used were various phosphatidylcholines (PC) which were different in the number of carbon atoms in the acyl chains n as well as the degree of unsaturation. The saturated PCs ($n < 10$) forming monomers and micelles slightly enhanced the decomposition of hydrogen peroxide. In marked contrast, the PCs forming liposomes ($10 \leq n$) significantly enhanced the decomposition reaction with neither lipid peroxidation nor change in the size of liposomes. Therefore, the liposomes were suggested to undergo negligible physicochemical modifications in the presence of hydrogen peroxide. The steady-state fluorescence polarization of the probes incorporated in the liposome membranes was measured to clarify an effect of hydrogen peroxide on the fluidity of liposome membranes. The fluidity of the lipid-water interface in the liposomes was decreased by the presence of hydrogen peroxide. On the other hand, practically no effect of hydrogen peroxide was seen on the fluidity of the hydrophobic region in the membrane. These results obtained indicated that the liposome-mediated decomposition of hydrogen peroxide proceeded at the lipid-water interface of liposomes. In conclusion, it was revealed that the phospholipid bilayer membranes forming liposomes functioned as a novel antioxidant system which effectively decomposed hydrogen peroxide.

1. 緒言

過酸化水素をはじめとする活性酸素種は、生体内において種々の機能を制御する因子として重要である¹⁾。一方、過剰に生成蓄積した活性酸素は、脂質膜の過酸化を引き起こして疾病の原因となる²⁾。生体内では過酸化水素は通常カタラーゼ等の酵素により効率よく分解除去されている。一方、脂質膜自体が活性酸素に対して発現すると考えられる自己防御的な機能は殆ど知られていない。

著者らは、リポソーム内に封入されたグルコースオキシダーゼによるグルコース酸化反応を、酸素を連続的に供給する気泡塔バイオリアクターの条件下で行い、共存するリポソーム内封入カタラーゼにより生成過酸化水素が効率よく分解されることを報告した³⁻⁵⁾。この酸化反応過程において、カタラーゼ分子のみならず、リポソームを構成する脂質二分子膜自体が過酸化水素の分解を促進していることが示唆された。脂質二分子膜は、タンパク質や水をはじめとする種々の生体分子と静電・疎水性相互作用や水素結合などにより複合体を形成して、脂質膜に結合した分子の構造に影響を及ぼすことが報告されている^{6,7)}。これまでに、

活性酸素による不飽和脂質分子の過酸化反応については豊富な知見が蓄積されている。一方、脂質分子が活性酸素の安定性にどのように影響するのかについては不明な点が多い。脂質の共存下における活性酸素の安定性を明らかにすることは、活性酸素に対する脂質膜の自己防御機能を解明して脂質膜を利用した新規な抗酸化系を構築する観点から重要であると考えられる。

本研究では、種々の疎水鎖長、不飽和度を有するホスファチジルコリンを用いてリン脂質モノマー、ミセル溶液及びリポソーム懸濁液を調製し、それらの脂質分子集合体がモデル活性酸素である過酸化水素の分解反応に及ぼす影響を検討した。また、脂質分子集合体の化学的安定性、粒子径及び膜流動性に及ぼす共存過酸化水素の影響を検討して、脂質分子集合体と過酸化水素の相互作用機構を推定した。

2. 実験

2.1 リン脂質

飽和リン脂質として、脂質親水部位 (Choline) が同一であるが、疎水鎖を構成する炭素数が異なる種々の diC_nPC (diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, $n=4, 6, 7, 8, 10, 12, 14$) を用いた。また、不飽和リン脂質として、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) を用いた。

2.2 脂質分子集合体の調製

ナス型フラスコ内で脂質を有機溶媒に溶解した後、有機溶媒を留去してフラスコ壁面に脂質薄膜を形成させた。凍



A novel antioxidant system based on lipid assemblies-mediated decomposition of reactive oxygen species

Makoto Yoshimoto

Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Yamaguchi University

結乾燥機を用いて 8 Pa 以下の減圧下 (2 h) で有機溶媒をほぼ完全に留去した後、50 mM Tris-HCl/100 mM NaCl 緩衝液 (pH 7.4) で乾燥脂質膜を水和した。この操作により炭素鎖長の短い脂質 ($n \leq 8$) は、脂質濃度 10 mM において脂質モノマー溶液あるいは脂質ミセル溶液を形成した。リポソームを形成した脂質懸濁液について、大きな多重層リポソームを形成させるために、 -80°C で凍結及び 35°C で融解する操作を 7 回繰り返した。さらに、エクストルーダーを用いて平均細孔径が 400 nm、200 nm、100 nm、80 nm、50 nm、30 nm のポリカーボネート膜を 11 回通過させて種々の粒子径を有する一枚膜リポソームを調製した。脂質濃度は酵素法で測定し、調製した脂質分子集合体は -4°C で遮光保存した。

2.3 リン脂質共存下における過酸化水素の分解

脂質分子を溶解あるいは懸濁した Tris 緩衝液と過酸化水素水溶液を混合して、脂質と過酸化水素の濃度がそれぞれ 1.0 – 40 mM と 1.0 mM の溶液 1.0 – 1.5 mL を調製した。これをガラス製試験管に入れ、綿栓をして種々の温度に設定した恒温槽中に静置した。過酸化水素濃度の経時変化を後述の酵素法により 120 h 追跡した。

2.4 過酸化水素濃度の測定

過酸化水素濃度は、西洋ワサビ由来の Peroxidase (HRP) 触媒下の過酸化水素による *o*-dianisidine の酸化反応に基づき定量した³⁾。反応溶液中の HRP、*o*-dianisidine 及びコール酸ナトリウムの濃度は、それぞれ 5 μM 、3.3 mM 及び 10 mM とした。ここで、コール酸ナトリウムは、リポソームを溶解させ、リポソーム内水相の過酸化水素溶液を放出させるために添加した。 25°C において、460 nm の吸光度を測定して過酸化水素濃度を決定した。共存する脂質は、本定量に影響を及ぼさなかった。

2.5 脂質懸濁液の濁度測定

リポソーム粒子径及び粒子径分布の指標として、リポソームを懸濁した Tris 緩衝液の濁度を 600 nm、 25°C における吸光度 (OD_{600}) から評価した。初濃度 1.0 mM の過酸化水素と 120 h 共存させる前後のリポソーム懸濁液 ([lipid] = 10 mM) の濁度を測定した。

2.6 生成過酸化脂質量の評価

生成過酸化脂質量の指標として、過酸化脂質の二次反応生成物を定量することができるチオバルビツール酸 (4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine; TBA) 法⁸⁾を用いた。本測定は、脂質過酸化を受ける可能性がある不飽和脂質 POPC について行った。POPC リポソーム懸濁液 0.5 mL と 3.75 g/L TBA、150 g/L trichloroacetic acid, 0.25 M HCl

and 0.1 g/L 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT) からなる TBA 試薬 2 mL とを混合した。POPC-TBA 試薬混合液を密閉したガラス製容器に入れ、15 分間沸騰後、水冷した。遠心分離 (1000 g, 15 分) した後、532 nm の吸光度を測定して過酸化脂質量の指標とした。

2.7 脂質膜流動性の評価

脂質二分子膜の親水部位と疎水部位に配向する蛍光プローブとして、Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene iodide (TMA-DPH) と Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) をそれぞれ用いた。脂質濃度 0.5 mM のリポソームと 0.4 μM の DPH あるいは 2.0 μM の TMA-DPH を混合して 24 h 静置後、過酸化水素 (10 mM) を添加して 5 h 後の分極率 P を蛍光分光光度計で測定した。 $1/P$ 値をリポソーム膜流動性の指標とした。

3. 結果

3.1 リポソームの過酸化水素分解機能

Fig. 1 に 25°C において脂質を含有しない Tris 緩衝液 (pH 7.4) 及び平均直径 100 nm の POPC リポソームを種々の濃度で懸濁した Tris 緩衝液中の過酸化水素濃度の経時変化を示す。初期過酸化水素濃度は 1.0 mM である。脂質非共存系では、過酸化水素は 120 h の間 90% 以上が分解せずに安定に存在している。これより、過酸化水素分解の要因となり得る緩衝液中の不純物金属イオン及び試験管壁の影響は無視できることがわかる。一方、POPC リポソーム懸濁系では、過酸化水素の分解反応が促進されている。リポソームの過酸化水素分解促進効果は、高脂質濃度条件下ほど顕著である。100 μM Fe^{2+} イオン共存下において過酸化水素は 25 h で 90% 以上が分解した (データ省略)。これは、

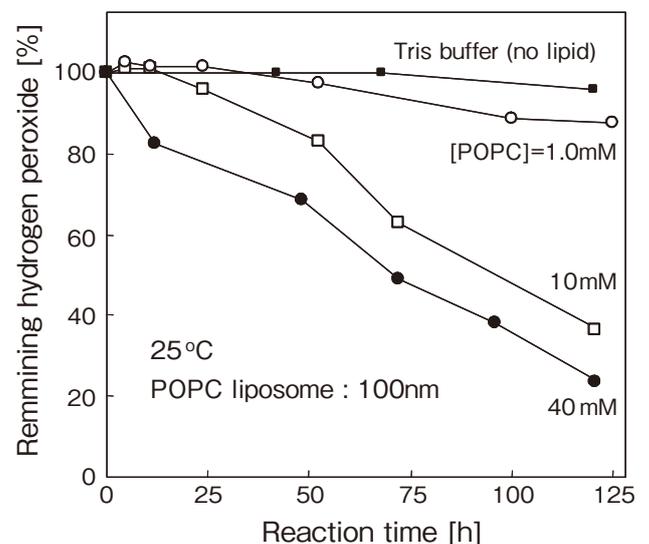


Fig. 1 初濃度 1.0 mM 過酸化水素の分解に及ぼす共存 POPC リポソームの影響 (25°C , pH 7.4)

Fe²⁺ イオンによりラジカル種が生成して過酸化水素の分解反応が著しく促進されたためである。リポソーム共存による過酸化水素分解反応速度は Fe²⁺ 共存下の分解反応の場合に比べて小さいことがわかった。

3.2 過酸化水素共存下におけるリポソームの物理化学的特性の変化

30-400nm の平均粒子径を有する POPC リポソームと過酸化水素を 120h 共存させた後にリポソーム懸濁液の濁度を測定して、過酸化水素共存前のそれぞれの濁度と比較した。結果を Table 1 に示す。リポソーム懸濁液の濁度は過酸化水素の共存により僅かに増加しているものの、120 h 静置中に一部のリポソーム間において凝集体が形成することを考慮すると、過酸化水素はリポソーム懸濁液の濁度に殆ど影響しないとみなすことができる。すなわち、リポソーム粒子径が共存過酸化水素の分解反応中に殆ど変化しないことがわかる。また、POPC リポソームと過酸化水素を 120h 共存させた後に過酸化脂質生成量を TBA 法で評価したところ、POPC は過酸化されていないことがわかった。以上の結果より、リポソームは過酸化水素共存下において物理化学的な修飾を受けることなく過酸化水素の分解反応を促進していると考えられる。

3.3 種々の脂質分子集合体の過酸化水素分解機能

脂質分子の会合状態と脂質の炭素鎖の特性が共存する過酸化水素の分解反応に及ぼす影響を検討した。脂質濃度を 10mM の一定として、脂質と初濃度 1.0mM の過酸化水素を 120 h 共存させたときの残存過酸化水素濃度を Fig. 2 に示す。分解反応は pH7.4、25°C の条件下で行った。脂質は、炭素鎖長 *n* により、モノマー溶液 (*n*=4, 6)、ミセル溶液 (*n*=7, 8)⁹⁾ 及びリポソーム懸濁液 (*n*=10, 12, 14, POPC) を形成した。リポソームの平均粒子径は 100 nm とした。脂質によるリポソームの形成は濁度から判定した。Fig. 2 において、脂質モノマーおよび脂質ミセル溶液中では、脂質を添加していない Tris 緩衝液系よりも過酸化水素の分解がやや促進されている。一方、リポソーム懸濁液中では、脂質モノマー、ミセル溶液中に比べて過酸化水素の分解が著しく促進されている。これより、脂質が発現する過酸化水素分解活性は脂質分子の集合状態に依存し、リポソームが最も高い活性をもつことがわかった。また、リポソームを形成する脂質の種類により、リポソームの過酸化水素分解促進効果が異なることがわかる。diC₁₄PC から形成されるリポソームは最も高い過酸化水素分解促進効果を示している。

Table 1 リポソーム懸濁液濁度に及ぼす共存過酸化水素の影響

リポソーム平均直径 [nm]	OD ₆₀₀ (過酸化水素非共存下)	OD ₆₀₀ (過酸化水素と120h 共存後)
50	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.07
100	0.39 ± 0.05	0.54 ± 0.23
200	0.79 ± 0.08	1.05 ± 0.25
400	2.13 ± 0.21	2.13 ± 0.09

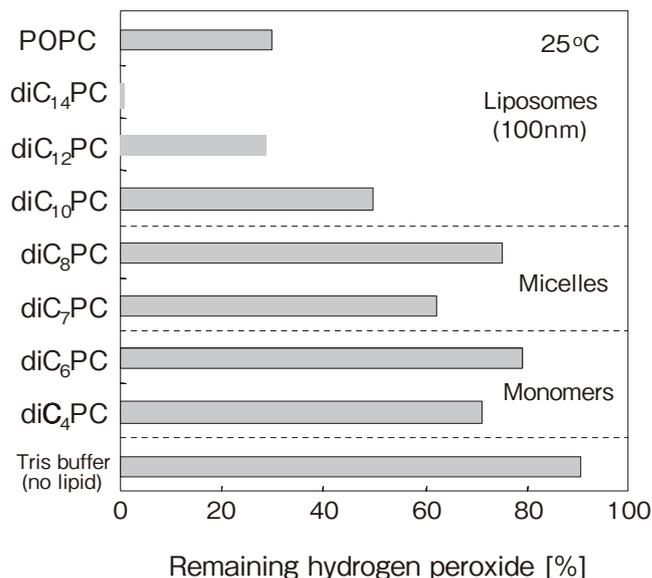


Fig. 2 1.0 mM 過酸化水素の分解に及ぼす種々の脂質分子の会合状態の影響 ([lipid] =10 mM, 25°C, pH 7.4)

3.4 リポソームの過酸化水素分解活性に及ぼす脂質膜相状態の影響

Fig. 3 に diC₁₄PC から形成される平均粒子径 100 nm のリポソームを 15–35 °C で初濃度 1.0 mM 過酸化水素と 120 h 共存させたときの残存過酸化水素量を示す。diC₁₄PC 膜がゲル相から液晶相へ転移する温度 T_m は 23 °C 付近である。リポソーム非共存系では、各温度において過酸化水素は安定である。リポソーム共存系では、全ての温度において過酸化水素の分解が促進されているが、15 °C ではリポソームの共存効果がやや小さくなる傾向が認められる。これより、液晶相の状態にあるリポソーム膜は共存過酸化水素の分解促進に有利であることが示唆される。

3.5 リポソームによる過酸化水素分解機構

リポソームと過酸化水素間の相互作用を効率よく検出するために、種々のリポソーム ([lipid] = 0.5 mM) を初濃度 10 mM の過酸化水素と 5 h 接触させ、H₂O₂/lipid モル比が高い条件下で膜流動性を測定した。Fig. 4 に異なる粒子径の POPC リポソームを用いたときに得られた結果を示す。いずれのリポソームでも疎水部位の流動性は親水部位に比べて高く、過酸化水素に殆ど影響を受けていない。一方、親水部位の流動性は、いずれの場合も過酸化水素の添加により僅かに減少している。この結果は、過酸化水素分子が脂質膜の親水部位（リポソーム膜表層）に結合して分解作用を受けることを示唆している。

4. 考察

POPC リポソームを過酸化水素と共存させた後に過酸化脂質の生成およびリポソーム径の変化が認められなかった (Table 1)。したがって、リポソームによる過酸化水素分解反応では、リポソーム自体が物理化学的に変化すること

なく、リポソームが触媒的に作用していることが示唆される。Fig. 1 で用いた 1.0 mM の過酸化水素は酵素カタラーゼを触媒とすると速やかに分解されることから、リポソームが発現する過酸化水素分解活性は微弱であり、低濃度の過酸化水素に対する脂質膜の自己防御的な機能として捉えることができる。脂質分子が過酸化水素の分解反応を効率よく促進するのは、脂質分子がリポソームを形成するときである (Fig. 2)。リポソームの脂質二分子膜は、数万から数十万の脂質分子が高密度かつ秩序的に集合して形成する安定な会合体であるのに対し、脂質ミセルはミセル間の脂質分子の組み換えが容易な不安定な会合体である。すなわち、脂質分子集合体内において分子の配向性と密度が高いことが過酸化水素分解活性の発現に寄与すると考えられる。また、Fig. 3 の結果は、diC₁₄PC から形成されるリポソームがゲル状態に比べて液晶状態にある場合に高い過酸化水素分解促進機能を示すことを示している。相転移温度が室温付近である diC₁₄PC リポソームの過酸化水素分解機能についてはさらに詳細な検討が必要である。

過酸化水素の共存による脂質膜親水部位の流動性の低下 (Fig. 4) より、過酸化水素分子がリン脂質親水部位と複合体を形成して、脂質分子の回転運動を阻害しているものと推測される。すなわち、過酸化水素の分解はリポソーム外膜-液本体及びリポソーム内膜-リポソーム内水相の各界面で行進すると推定される。

リポソーム膜が発現する過酸化水素分解活性を最大限に高めることができれば、リポソームを安定な抗酸化素子として活用できると考えられる。例えば、リポソームとカタラーゼを複合化した過酸化水素分解素子は、気泡塔バイオリアクターの条件下において、酸化酵素反応で副生する過酸化水素を効率よく安定に分解除去する機能を発現することを明らかにしている⁵⁾。

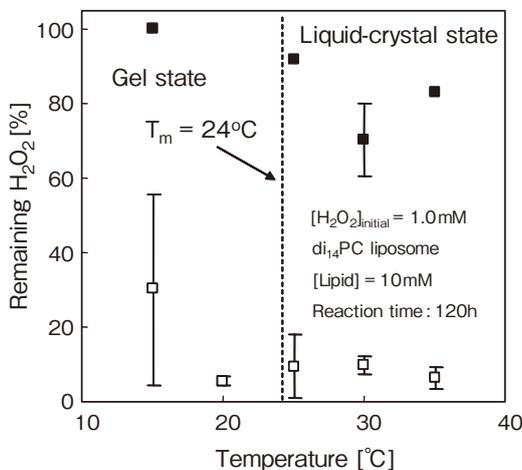


Fig. 3 DMPC リポソームの過酸化水素分解機能に及ぼす温度の影響 (■: 脂質非共存下、□: 脂質共存下、[lipid] = 10 mM, pH 7.4)

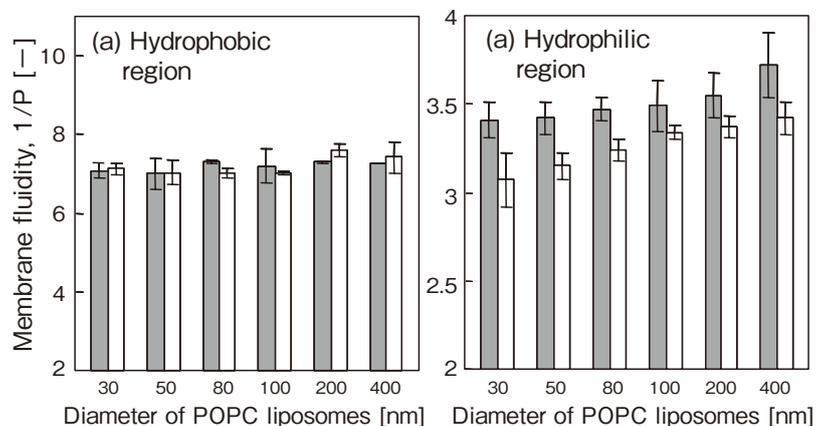


Fig. 4 POPC リポソームの (a) 疎水部と (b) 親水部の膜流動性の変化 (過酸化水素添加前 (■), 添加後 (□))

(参考文献)

- 1) Schallreuter, K. U., Elwary, S. M., Gibbons, N. C., Rokos, H. and Wood, J. M., Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 502-508 (2004)
- 2) Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F., Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacotherapy*, **58**, 39-46 (2004)
- 3) Yoshimoto, M., Miyazaki, Y., Sato, M., Fukunaga, K., Kuboi, R. and Nakao, K., Mechanism for high stability of liposomal glucose oxidase to inhibitor hydrogen peroxide produced in prolonged glucose oxidation. *Bioconjugate Chem.*, **15**, 1055-1061 (2004)
- 4) Yoshimoto, M., Wang, S., Fukunaga, K., Fournier, D., Walde, P., Kuboi, R. and Nakao, K. Novel immobilized liposomal glucose oxidase system using the channel protein OmpF and catalase. *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 231-238 (2005)
- 5) Yoshimoto, M., Miyazaki, Y., Kudo, Y., Fukunaga, K., Nakao, K. Glucose oxidation catalyzed by liposomal glucose oxidase in the presence of catalase-containing liposomes. *Biotechnol. Prog.*, **22**, (2006)
- 6) Paleos, C. M. and Tsiourvas, D., Molecular recognition and hydrogen-bonded amphiphiles. *Top. Curr. Chem.*, **227**, 1-29 (2003)
- 7) Kuboi, R., Yoshimoto, M., Walde, P. and Luisi, P. L., Refolding of carbonic anhydrase assisted by 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. *Biotechnol. Prog.*, **13**, 828 (1997)
- 8) Genot, C., Metro, B., Viau, M. and Bouchet, B., Characterisation and stability during storage of liposomes made of muscle phospholipids. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **32**, 167-174 (1999)
- 9) Hauser, H., Short-chain phospholipids as detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **1508**, 164-181 (2000)