

氏 名(本籍)	ひ 樋 ぐち 口 おう 央 き 紀
学位の種類	博 士 ( 農 学 )
学位記番号	農 博 第 8 3 6 号
学位授与年月日	平 成 17 年 11 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	アミノリン脂質のメイラード反応とその阻害物質に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 宮 澤 陽 夫 (副 査) 教 授 桑 原 重 文 教 授 山 下 ま り

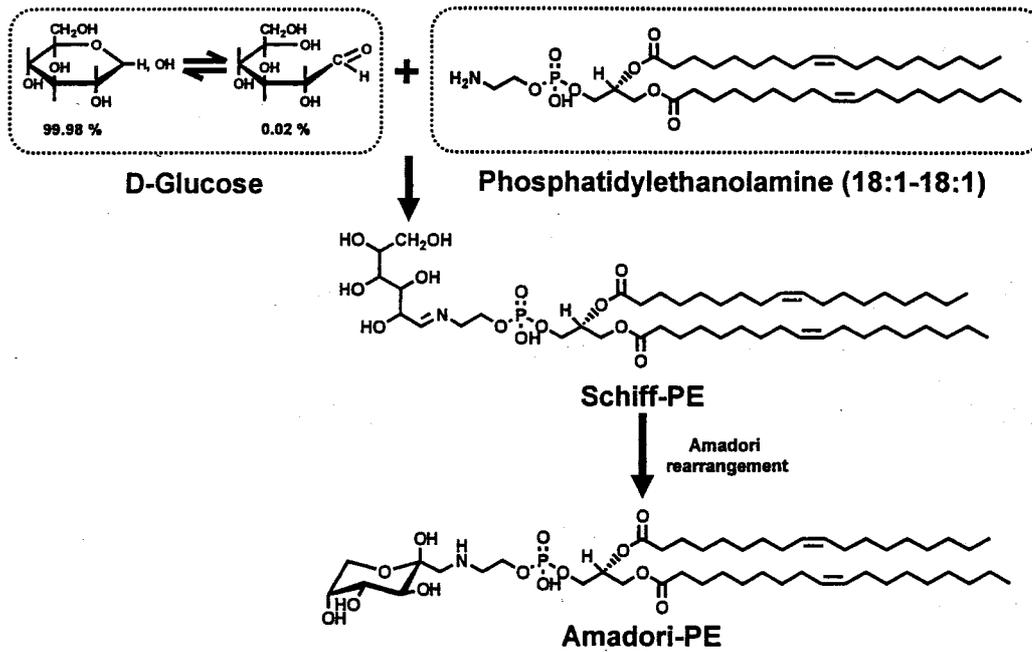
# 論文内容要旨

## 緒言

1912年にメイラード(Maillard)は、ビールの黄褐色の色素が、糖とアミノ酸の反応(糖化反応、グリケーション)によって生成することをはじめて報告した<sup>1)</sup>。この化学反応は、メイラード反応、またはアミノカルボニル反応と呼ばれ、主に食品化学分野で研究されてきた。しかし1979年に、血糖とヘモグロビンのグリケーション産物であるヘモグロビン A<sub>1c</sub>(HbA<sub>1c</sub>)が発見され<sup>2)</sup>、生体内でメイラード反応が起こることが証明された。これを契機に、生体内のタンパク質のグリケーション反応が重視されるようになった。タンパク質のグリケーションは、アマドリ化合物の形成までの初期段階と、アマドリ化合物の分解からはじまる後期段階からなる。初期段階は糖濃度や時間に依存した反応であるが、後期段階は様々な後期反応生成物(Advanced glycated end products; AGEs)を形成するため、複雑で不明な点が多い<sup>3)</sup>。アマドリ化合物や AGEs は、活性酸素を産生することから、生体膜脂質過酸化の原因物質としても考えられ、動脈硬化<sup>4)</sup>、糖尿病<sup>5)</sup>などに関与すると推定される。

リン脂質は動植物組織や細菌に広く存在し、主に生体膜を構成している。1993年に Bucala らは、アミノ基を持つホスファチジルエタノールアミン(PE)がタンパク質と同様にグリケーションを受けることを示唆した<sup>6)</sup>。Lertsiri らは、ホスファチジルエタノールアミン(PE)とグルコースとのメイラード反応によって生成するアマドリ型糖化脂質(Amadori-PE)(Fig.)の同定をはじめて成功し<sup>7)</sup>、この反応がヒト血漿で起こることを証明した<sup>7-9)</sup>。この Amadori-PE は、鉄イオンと共存すると活性酸素を生じ、膜脂質過酸化を強く誘発する<sup>10)</sup>と共に、糖尿病性網膜症に関与する血管新生を強く促進することがわかった<sup>11)</sup>。したがって Amadori-PE は、高血糖を伴う疾病の増悪化に関わると推定された。

このような経緯から、生体内の脂質とタンパク質のグリケーションはどちらが重要なのが議論され、世界的に注目されている。そこで、この点の解明を目的に本研究を企画し、第1章で、脂質とタンパク質のグリケーション速度に着目し、低密度リポタンパク質(LDL)を用いて、脂質とタンパク質のグリケーション速度を比較した。その結果、脂質はタンパク質よりグリケーションを受けやすいことが、本研究ではじめてわかった。脂質グリケーションの阻害で、膜脂質過酸化の抑制が可能と考えられた。したがって本研究は、第1章で脂質とタンパク質のグリケーション速度を比較し、第2章では、アミノリン脂質のグリケーション阻害物質を検索し、第3章では、見出した阻害物質の効果を動物実験で評価しようとした。



Oak, J. H., et al. *J. Lipid Res.* (2002)

Fig. Scheme for the glycation of PE. Glucose reacts with amino group of PE to form a Schiff-PE, which undergoes an Amadori rearrangement to yield Amadori-PE (deoxy-D-fructosyl PE).  
Oak, J. H., et al. *J. Lipid Res.* (2002)

## 第1章 脂質とタンパク質のグリケーション速度の比較

【目的】タンパク質のグリケーションに関する報告は多い。このような経緯から、「脂質とタンパク質のグリケーション速度はどちらが重要か？」が常に議論されている。そこで、脂質とタンパク質のグリケーション速度に着目した。本章では、血中の脂質輸送体である低密度リポタンパク質 (low-density lipoprotein; LDL) を用いて、脂質とタンパク質のグリケーション速度を比較し、脂質はタンパク質よりグリケーション受けやすいことを明らかにしようとした。

【方法】ヒト LDL は、超遠心密度濃度勾配法によって調製した。LDL (2mg protein/mL)、D-glucose (30 mM)、D-glucose-1- $^{14}\text{C}$  (111 kBq) を 1 mL の PBS (phosphate buffer in serine) 中で反応 (37°C, 0-72 h) させた。反応後、Folch 法によって脂質画分とタンパク質画分に分画した。タンパク質画分は限外濾過膜 (Centricon Plus-20, Millipore, Japan) によって濃縮した。脂質画分とタンパク質画分の放射活性 (D-glucose-1- $^{14}\text{C}$  由来) は、シンチレーションカウンターによって測定した。脂質画分のリン脂質サブクラスは LC-ELSD によって、タンパク質画分の apoB タンパク質は ELISA 法によって定量した。

【結果と考察】 LDL (1mg protein) あたりの脂質 (PE) とタンパク質 (apoB) のアミノ基の数は、ほぼ同数 (137 amino residue/LDL particle) であった (Table 1-1)。反応 24 時間後の LDL 脂質画分の放射活性 (D-glucose-1- $^{14}\text{C}$  由来) は、LDL タンパク質画分に比べ、約 2 倍高値であり、Amadori-PE の生成を TLC によって確認した (Fig. 1-1, 1-2)。またこのとき LDL 中の PE のみが有意に減少しており、ほかの脂質、過酸化脂質、apoB タンパク質に変動は認められなかった (Fig. 1-3)。以上より、脂質はタンパク質よりグリケーションを受けやすいといえる。したがって、高血糖状態における膜脂質過酸化は、タンパク質グリケーションよりもむしろ脂質グリケーションによって惹起される可能性が示唆された。

## 第2章 脂質グリケーション阻害試験方法の確立とその阻害物質

【目的】脂質グリケーション阻害を評価するためには、糖化脂質が効率よく生成する反応系が必須である。このために、PEの糖化条件を詳細に検討する必要がある。そこで、温度、時間、糖濃度、pH、緩衝液の種類、メタノール濃度について検討し、糖化脂質が最も生成する条件を見出し、これを利用して脂質グリケーション阻害物質を見出すことを目的とした。

【方法】PE(0.3 mM)の濃度を固定し、その他の条件(グルコース濃度、温度、pH、メタノール濃度時間)を変え、反応させた。Folch法によって脂質を抽出し、シッフ塩基型の糖化脂質(Schiff-PE)とアマドリ型の糖化脂質(Amadori-PE)をLC-ELSDによって定量した。脂質グリケーション阻害試験方法は、PE(0.3 mM)とグルコース(500 mM)を含む、メタノール(30% リン酸緩衝液を含む、pH7.4)1 mLの反応系に、試験物質を添加し、37°Cで2時間反応させ、糖化脂質を測定した。

【結果と考察】脂質グリケーションの反応条件を検討した結果(Fig. 2-1)、グルコース濃度を500 mM、反応温度を37°C、pH7.4、メタノール濃度を70%とすれば、反応2-6時間後に、Amadori-PEの前駆体であるSchiff-PEの蓄積が最大(0.18 mM)となり、その後Schiff-PEの減少に伴って、24時間後からAmadori-PEの生成蓄積が認められた(Fig. 2-2)。したがって、Schiff-PEを指標として、この生成を阻害する成分を見出せば、脂質グリケーションの亢進(Amadori-PEの生成)を阻害できると考えた。

次に、この反応系を利用してスクリーニングを行った結果(Fig. 2-3)、ビタミンB<sub>6</sub>群の中でアルデヒド基を持つピリドキサール(PL)とピリドキサール5'-リン酸(PLP)が、Schiff-PEとその後のAmadori-PEの蓄積を効果的に阻害することを見出した(Fig. 2-4)。PEのアミノ基とPLPのアルデヒド基の脱水縮合は新規物質であるPE-ピリドキサール5'-リン酸シッフ塩基付加物を生じ(Fig. 2-5, 2-6)、この生成速度がPEの糖化速度より速いため、競争的に脂質グリケーションが阻害された。また、このPE-ピリドキサール5'-リン酸シッフ塩基付加物が生体内(ヒトの赤血球膜)に存在することを、各種の機器分析で証明した(Fig. 2-7)。したがって、ビタミンB<sub>6</sub>群による脂質グリケーション阻害という新たな機能を明らかにした。

### 第3章 ストレプトゾチン誘導型糖尿病モデルラットに対するピリドキサール 5'-リン酸の脂質グリケーション阻害効果

【目的】 活性型ビタミン B<sub>6</sub> であるピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) の、脂質グリケーション阻害作用を第 2 章で見出した。ピリドキサール 5'-リン酸は、口角炎、口唇炎、舌炎、口内炎、アトピー皮膚炎、末梢神経炎などに対する抗炎症作用が知られている。しかし、脂質グリケーションの阻害作用については全く知られていない。そこで本章では、ピリドキサール 5'-リン酸摂取による脂質グリケーションの阻害作用を、ストレプトゾチン (STZ) 誘導型糖尿病モデルラットを用いて明らかにしようとした。

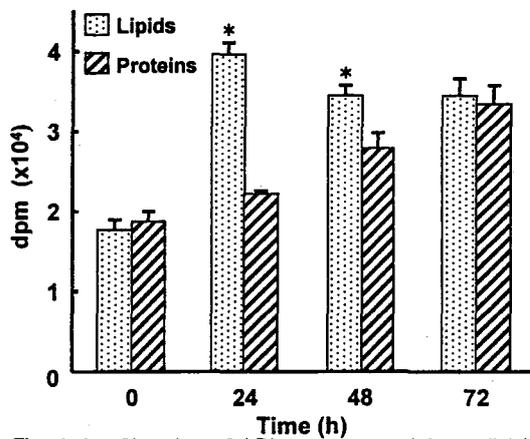
【方法】 4週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットを、1 週間予備飼育し、試験飼育を開始した。実験群は、STZ 群 (STZ, n=9)、STZ+ピリドキサール 5'-リン酸投与群 (STZ+PLP, n=9)、対照群 (C, n=6)、対照+ピリドキサール 5'-リン酸投与群 (C+PLP, n=6) の 4 群とした。STZ 群と STZ+PLP 群には、ストレプトゾチン溶液を腹腔内投与 (70 mg/kg body weight) し、高血糖を発症させた。飼育期間を 10 週間とし、自由摂食で飼育した。

【結果と考察】 対照群と対照+ピリドキサール 5'-リン酸投与群に比し、STZ 群と STZ+PLP 群は体重が有意に減少し、空腹時血糖値と HbA1c が有意に高値であった (Table 3-1)。血漿脂質組成は、対照群に比べ STZ 群は、PC、PE、TG、T-CHO が有意に増加し、STZ+PLP 群は、PE、TG、T-CHO のみが有意に増加した (Table 3-2)。血漿 TBARS を測定した結果、STZ 群が最も高値を示し、STZ+PLP 群は STZ 群よりも有意に TBARS 値が低値であった (Fig. 3-1)。血漿の PCOOH 量は、対照群に比べ STZ 群、STZ+PLP 群が有意に高値であったが、STZ+PLP 群の PCOOH 量は、STZ 群より低値であった (Fig. 3-2)。結論として、ピリドキサール 5'-リン酸の摂取による脂質グリケーション阻害作用を、ストレプトゾチン (STZ) 誘導型糖尿病モデルラットにより評価し、ピリドキサール 5'-リン酸の摂取は高血糖状態における脂質過酸化を阻害することがわかった。この阻害機構は、脂質グリケーションの阻害によるものと推定された。したがって、ピリドキサール 5'-リン酸は、糖尿病合併症などの抑制に有効と考えられた。

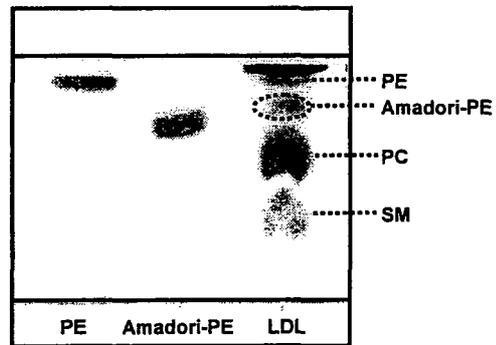
**Table 1-1 Composition of LDL subfractions**

	Total LDL mass %	Molecule /LDL particle	Total ε-Amino residue /LDL particle
<b>Proteins</b>			
ApoB	26 ± 1.0	1	680 (20-136) <sup>a</sup>
<b>Lipids</b>			
TG	8 ± 0.9	-	-
T-Cho	36 ± 1.2	-	-
F-Cho	8 ± 0.5	-	-
PC	14 ± 0.5	735	-
SM	5 ± 0.4	234	-
PE	2 ± 0.1	137	137
LPC	1 ± 0.1	40	-

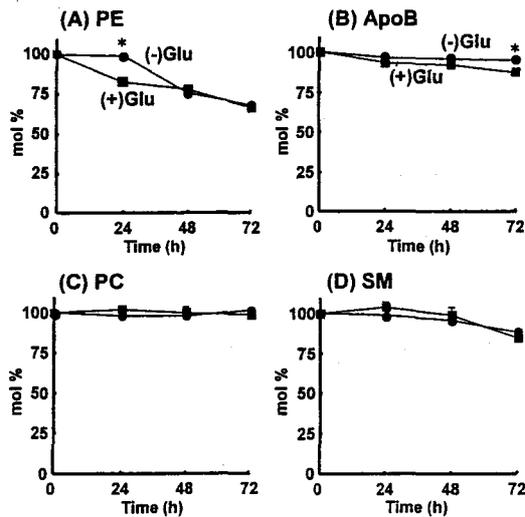
<sup>a</sup> Glycatable ε-Amino residues per LDL particle.



**Fig. 1-1** Glycation of LDL as measured by radiolabeled glucose incubation. LDL was incubated 30 mM glucose containing 111 kBq D-glucose-1-[<sup>14</sup>C]. Radioactivity was determined by scintillation counting for both lipid and protein fractions. \*Significant difference compared to control (P<0.05). Values are mean±S.D. (n=3).



**Fig. 1-2** Thin-layer chromatogram of LDL lipid fraction at 24 h. Plate, Silica gel 60; development solvent, chloroform/methanol/acetic acid/water (30:10:4:2 v/v/v/v)



**Fig. 1-3** Phospholipids and apoB protein kinetics on LDL glycation. (A,PE; B,ApoB; C, PC and D,SPH). LDL was incubated with D-glucose (30 mM) in at 37 °C for 0-72 h. After incubation, PE, PC, SPH and LPC were determined by LC-ELSD. ApoB was determined ELISA method. Values are mean±S.D. (n=3). \*Significant difference compared to control (P<0.05).

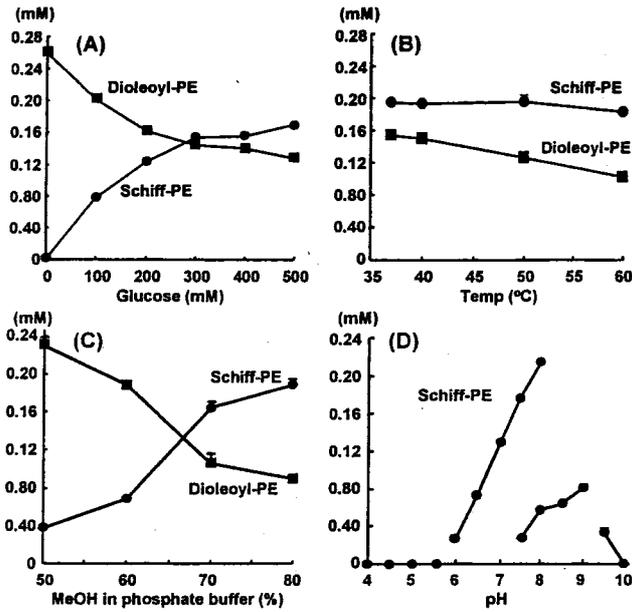


Fig. 2-1 Effect of incubation conditions (A, glucose; B, temperature; C, incubation solvent and D, pH) on lipid glycation kinetics. Dioleoyl-PE (0.3 mM) was incubated with D-glucose (0-500 mM) in 1 ml of 50-80 % methanolic buffer (0.1 M, pH 4.0-10.0) at 37-60 °C for 2 h. After incubation, Schiff-PE and dioleoyl-PE were determined by LC-ELSD. Values are mean  $\pm$  S.D. (n=3).

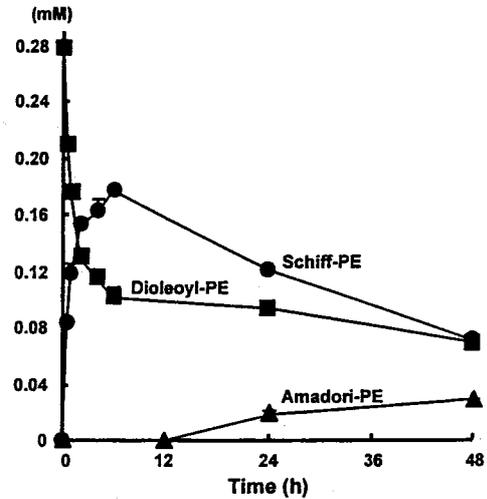


Fig. 2-2 Time course of changes in the yields of lipid glycation products under optimal incubation condition: dioleoyl-PE (0.3 mM) was incubated with D-glucose (500 mM) in 1 ml of 70 % methanolic phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) at 37 °C for 48 h. At different time intervals, Schiff-PE, Amadori-PE and dioleoyl-PE were determined by LC-ELSD. Values are mean  $\pm$  S.D. (n=3).

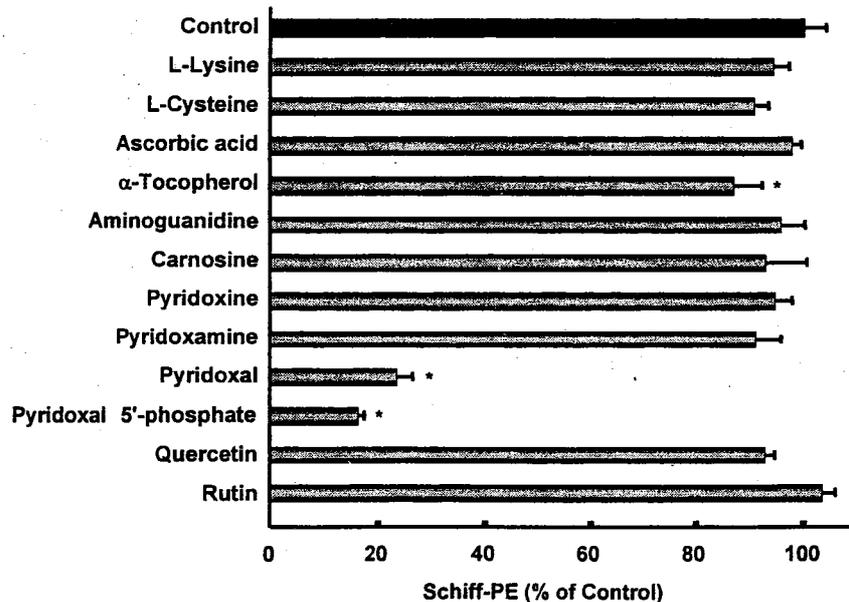


Fig. 2-3 Screening for lipid glycation inhibitor. Dioleoyl-PE (0.3 mM) was incubated with D-glucose (500 mM) in 1 ml of 70 % methanolic phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) in the absence (control) or presence of test compound (1 mM) at 37 °C for 2h. After incubation, Schiff-PE was determined by LC-ELSD. \*Significant difference compared to control (P<0.05). Values are mean  $\pm$  S.D. (n=3).

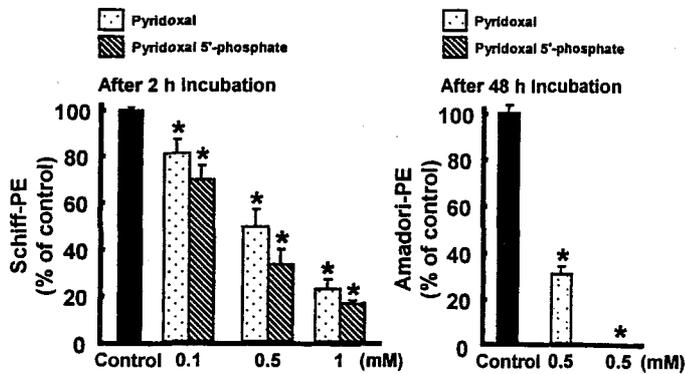


Fig. 2-4 Inhibitory effect of pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxal on lipid glycation. Dioleoyl-PE (0.3 mM) was incubated with D-glucose (500 mM) in 1 ml of 70 % methanolic phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) in the absence (control) or presence of pyridoxal 5'-phosphate or pyridoxal (each 0.1-1 mM) at 37°C for 2 and 48 h. \*Significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

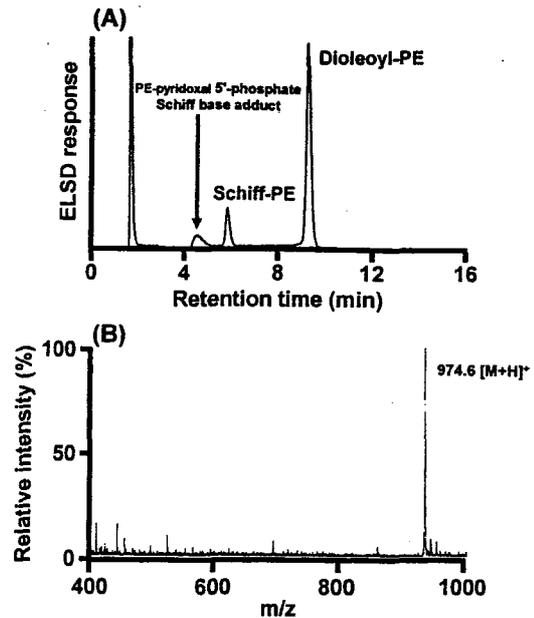


Fig. 2-5 Typical ELSD chromatogram of pyridoxal 5'-phosphate/dioleoyl-PE /glucose system. Dioleoyl-PE (0.3 mM) was incubated with D-glucose (500 mM) in 1 ml of 70 % methanolic phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) in the presence of pyridoxal 5'-phosphate (1 mM) at 37 °C for 2h. Lipid-soluble products were extracted from incubation mixture by a method of Folch et al. (9), and subjected to LC-ELSD-MS. A, ELSD chromatogram. B, Mass spectrum of the peak (4.6 min) detected in chromatogram A.

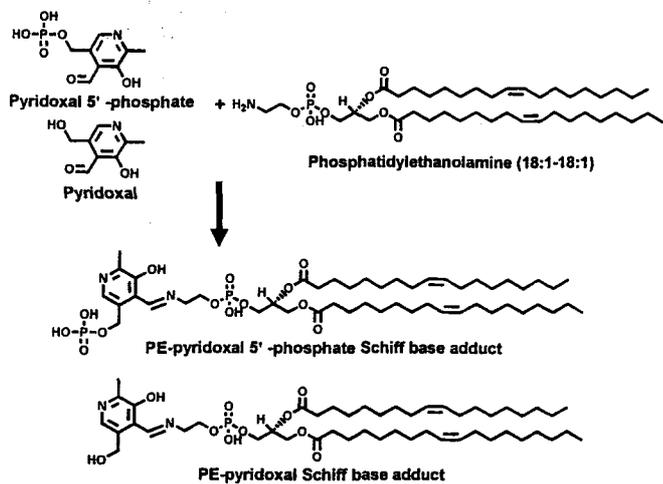


Fig. 2-6 Scheme for the condensation of pyridoxal 5'-phosphate or pyridoxal with PE. Pyridoxal 5'-phosphate or pyridoxal reacts with amino group of PE to form Schiff base adduct.

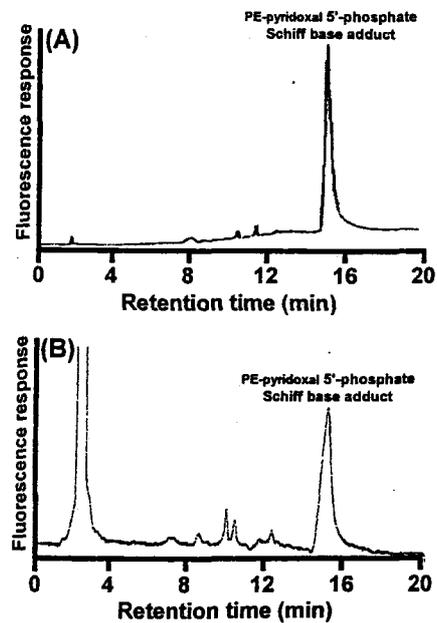


Fig. 2-7 Typical fluorescence chromatogram of PE-pyridoxal 5'-phosphate Schiff base adduct in human RBC. The lipid extract was subjected to LC-fluorescence detection (excitation 310 nm and emission 370 nm). A, Synthetic standard of PE-pyridoxal 5'-phosphate adduct. B, RBC total lipids.

**Table 3-1 Characteristics of the rats at the end of the study**

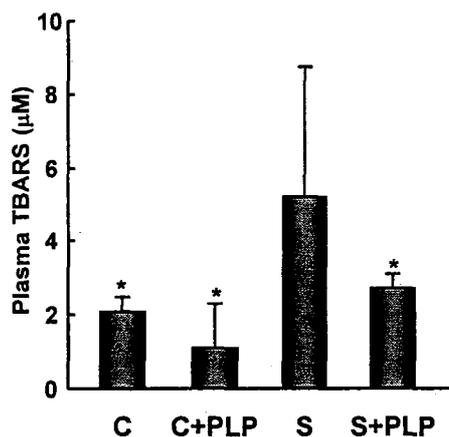
Parameters	Control (n=6)	Control + PLP (n=6)	STZ (n=9)	STZ + PLP (n=9)
Body weight, g	365.0 ± 22.6	368.0 ± 19.4	176.1 ± 26.0*	178.3 ± 29.0*
Blood glucose, mM	7.4 ± 0.9	8.5 ± 0.3	27.1 ± 2.1*	30.4 ± 3.7*
Glycated Hb, %	10.7 ± 1.4	11.4 ± 2.9	14.8 ± 1.0*	17.4 ± 1.4*

C, indicates control; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; and Hb, hemoglobin. Data are expressed as mean ± SD. \*P<0.05 vs control groups.

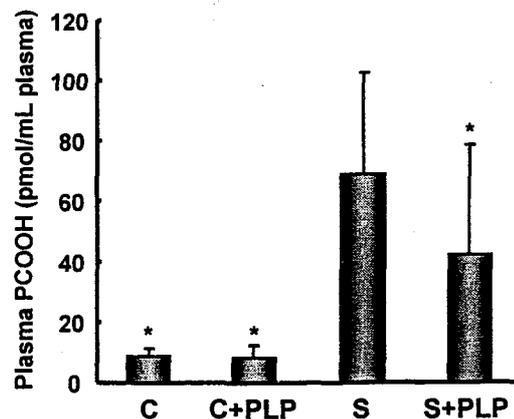
**Table 3-2 Phospholipids (PC, PE, SM, LPC), neutral lipids (TG, T-CHO) in plasma.**

Parameters	Control (n=6)	Control + PLP (n=6)	STZ (n=9)	STZ + PLP (n=9)
<b>Phospholipids (nM)</b>				
PC	893.0 ± 158.3	927.5 ± 175.7	1815.7 ± 718.0*	1516.5 ± 734.0
PE	65.6 ± 10.2	68.1 ± 15.1	229.3 ± 75.2*	205.3 ± 98.4*
SM	162.1 ± 28.8	164.8 ± 41.0	226.7 ± 74.3	202.7 ± 90.8
LPC	236.9 ± 51.6	268.7 ± 53.9	195.1 ± 69.0	218.8 ± 84.0
<b>Neutral lipids (mg/dl)</b>				
TG	89.9 ± 32.5	102.2 ± 9.2	475.5 ± 158.3*	390.5 ± 176.2*
T-CHO	37.2 ± 15.3	30.9 ± 12.0	198.1 ± 84.6*	170.6 ± 68.0*

C, indicates control; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; SM, sphingomyelin; LPC, lysophosphatidylcholine; TG, triglyceride; T-CHO, total cholesterol. Data are expressed as mean ± SD. \*P<0.05 vs control groups.



**Fig. 3-1** Quantification of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) values in rat plasma. C, Control; C+PLP, Control + pyridoxal 5'-phosphate; S, STZ; S+PLP, STZ + pyridoxal 5'-phosphate. \*Significant difference compared to S (STZ) (P<0.05). Values are mean ± S.D. (n=6-9).



**Fig. 3-2** Quantification of phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) in rat plasma. C, Control; C+PLP, Control + pyridoxal 5'-phosphate; S, STZ; S+PLP, STZ + pyridoxal 5'-phosphate. \*Significant difference compared to S (STZ) (P<0.05). Values are mean ± S.D. (n=6-9).

## 総括

本研究は、脂質とタンパク質のグリケーション速度の比較し(第1章)、アミノリン脂質のグリケーション阻害物質を見出し(第2章)、この阻害効果を動物実験で評価すること(第3章)を目的とした。

第1章では、脂質とタンパク質のグリケーション速度に着目し、低密度リポタンパク質(low-density lipoprotein; LDL)を用いて、脂質とタンパク質のグリケーション速度を比較、検討した。その結果、脂質はタンパク質よりグリケーションを受けやすいことを証明した。

第2章では、脂質グリケーション阻害を評価するために、PEの糖化条件(温度、時間、糖濃度、pH、緩衝液の種類、メタノール濃度)を詳細に検討し、糖化脂質が最も生成する条件を見出した。これを利用して脂質グリケーション阻害物質を見出すための反応系を確立した。これを利用してスクリーニングを行い、ビタミンB<sub>6</sub>群のピリドキサール(PL)とピリドキサール5'-リン酸(PLP)が、糖化脂質の蓄積を効果的に阻害することを見出した。その阻害機構は、PEのアミノ基とPLPのアルデヒド基の脱水縮合は、新規物質であるPE-ピリドキサール5'-リン酸シッフ塩基付加物を生じ、この生成速度がPEの糖化速度より速いため、競争的に脂質グリケーションが阻害された。また、このPE-ピリドキサール5'-リン酸シッフ塩基付加物が生体内(ヒトの赤血球膜)に存在することを証明した。したがって、ビタミンB<sub>6</sub>群による脂質グリケーション阻害という新たな機能を明らかにした。

第3章では、第2章で見出したピリドキサール5'-リン酸の脂質グリケーション阻害作用を、ストレプトゾトシン(STZ)誘導型糖尿病モデルラットを用いて検討した。糖尿病ラットにピリドキサール5'-リン酸を経口投与すると、それを与えない群(STZ群)に比べ有意に、PCOOHとTBARS値が低下した。したがって、脂質グリケーションの阻害により、膜脂質過酸化が阻害できることを示唆した。しかし、ピリドキサール5'-リン酸が、血漿中の糖化脂質を阻害したかどうかについては不明である。

これらの結果から、脂質のグリケーションはタンパク質のグリケーションよりも重要であり、ピリドキサール類による脂質グリケーション阻害作用を初めて明らかにした。しかし、ピリドキサール類の脂質グリケーション阻害作用が、糖尿病などの疾病に対して有効であるかどうかを判断するためには、ヒト介入試験などによる検討が必要であろう。

## 引用文献

- 1) Maillard, L. C. (1912) *C.R. Hebd. Seances. Acad. Sci.* 154:66-68.
- 2) Bunn, H. F., Shapiro, R., McManus, M., Garrick, L. M., McDonald, J., Gallop, P. M. and Gabbay, K. H. (1979) Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *J. Biol. Chem.* 254:3892-3898.
- 3) Rojas, A. and Morales, M. A. (2004) Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci.* 76:715-730.
- 4) Kinoshita, M., Oikawa, S., Hayasaka, K., Sekikawa, A., Nagashima, T., Toyota, T. and Miyazawa, T. (2000) Age-related increase in plasma phosphatidylcholine concentrations in normal subjects and patients with hyperlipidemia. *Clin. Chem.* 46:822-828.
- 5) Nagashima, T., Oikawa, S., Hirayama, Y., Tokita, Y., Sekikawa, A., Ishigaki, Y., Yamada, R. and Miyazawa, T. (2002) Increase of serum phosphatidylcholine hydroperoxide dependent on glycemic control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 56:19-25.
- 6) Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A. and Vlassara, H. (1993) Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:6434-6438.
- 7) Lertsiri, S., Shiraishi, M. and Miyazawa, T. (1998) Identification of deoxy-D-fructosyl phosphatidylethanolamine as a non-enzymic glycation product of phosphatidylethanolamine and its occurrence in human blood plasma and red blood cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:893-901.
- 8) Oak, J. H., Nakagawa, K. and Miyazawa, T. (2002) UV analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in foods and biological samples. *J. Lipid Res.* 43:523-529.
- 9) Miyazawa, T., Oak, J. H. and Nakagawa, K. (2005) Tandem mass spectrometric analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043:280-283.
- 10) Oak, J. H., Nakagawa, K. and Miyazawa, T. (2000) Synthetically prepared Amadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid peroxidation via free radical reactions. *FEBS Lett.* 481:26-30.
- 11) Oak, J. H., Nakagawa, K., Oikawa, S. and Miyazawa, T. (2003) Amadori-glycated phosphatidylethanolamine induces angiogenic differentiations in cultured human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.* 555:419-423.

## 発表論文

- 1) Higuchi, O., Nakagawa, K., Tsuzuki, T., Suzuki, T., Oikawa, S. and Miyazawa, T. (2005) Aminophospholipid glycation and its inhibitor screening system: a new role of pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxal as lipid glycation inhibitor. *J. Lipid Res.* 投稿中
- 2) Higuchi, O., Nakagawa, K., Tsuzuki, T., Suzuki, T., Oikawa, S. and Miyazawa, T. (2005) Aminophospholipid is susceptible to glycation more than protein for human low-density lipoprotein (LDL). *FEBS Lett.* 投稿中

## 参考論文

- 1) Higuchi, O., Tateshita, K. and Nishimura, H. (2003) Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human low-density lipoprotein (LDL) oxidation in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 51:7208-7214.
- 2) Nakagawa, K., Oak, J. H., Higuchi, O., Tsuzuki, T., Oikawa, S., Otani, H., Mune, M., Cai, H. and Miyazawa, T. (2005) Ion trap tandem mass spectrometric analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma with or without diabetes. *J. Lipid Res.* In press.
- 3) Nakagawa, K., Umeda, T., Higuchi, O., Tsuzuki, T., Suzuki, T. and Miyazawa, T. (2005) Evaporative light scattering analysis of sulforaphane in broccoli samples. *J. Agric. Food Chem.* 投稿中

## 論文審査結果要旨

種々の疾病において血液、臓器、細胞を構成している膜リン脂質が過酸化され、生じた過酸化リン脂質（ホスファチジルコリンヒドロパーオキシド；PCOOH）が細胞障害の原因になることが明らかにされている。例えば、糖尿病患者の血漿 PCOOH 濃度は健常者より高い。近年、この膜リン脂質過酸化（PCOOH 増加）の原因物質が探索され、アミノリン脂質であるホスファチジエタノールアミン（PE）がグリケーション（糖化）を受けて生成するアマドリ型の糖化脂質（Amadori-PE）が発見された。Amadori-PE は、鉄イオンと共存して活性酸素を生じ脂質過酸化を誘発するとともに、血管新生活性を示す。したがって、高血糖状態で PE がグリケーションを受け Amadori-PE に変換されると、これが原因で脂質過酸化が起こり、疾病の増悪化につながると考えられている。

本研究では、この脂質グリケーションに興味を持ち、これが従来から知られているタンパク質のグリケーションより高血糖下の細胞障害に強く関わると予想し、はじめに、ヒト低密度リポタンパク質（LDL）を用いて脂質とタンパク質のグリケーション速度を比較し、生体内における過酸化誘発物質としての Amadori-PE の重要性を明らかにしようとした。LDL 脂質画分への D-グルコース-1-<sup>14</sup>C の取り込み量を調べた結果、これはタンパク質（アポ B）画分への取り込み量よりも高値であることがわかった。LDL 脂質画分の PE のアミノ基とアポ B タンパク質のアミノ基の総モル数がほぼ同数であることから、脂質のグリケーション速度はタンパク質のグリケーション速度よりも速いことを明らかにした。

生体内における脂質グリケーションの重要性が明確になったため、次いで、高血糖による細胞障害の予防に向けて、脂質グリケーションを阻害できる食品成分の検索を行った。脂質グリケーション阻害の評価には、PE から糖化脂質が効率よく生成する反応系が必須であるが、この反応系の構築に成功した。この系を利用して、種々の食品素材・成分を評価し、ビタミン B6 群のピリドキサルリン酸 (PLP) は、脂質グリケーションを効果的に阻害できることを明らかにした。その阻害メカニズムは、PE のアミノ基と PLP のアルデヒド基の反応により生じる PLP-PE 付加物の生成速度が、PE とグルコースのグリケーション速度より早いためと考えられた。この PLP-PE 付加物は、ヒト血中（赤血球膜）に存在することを、4000QTRAP LC-MS/MS 分析で構造化学的に証明した。PLP を摂取したストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットでは、血漿の Amadori-PE と PCOOH の有意な低下が認められ、PLP など食品成分の脂質グリケーション阻害という新たな機能が示唆された。

本論文では、脂質グリケーションに興味を持ち、その生体内における重要性と阻害物質を検討した。本研究により、脂質は、タンパク質よりグリケーションを受けやすいことがわかり、その阻害成分として PLP を明らかにした。

以上のことから審査員一同は、本研究者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。