



Effects of visible light on iron ion release from ferritin and ferritin-mediated lipid peroxidation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大石, 健太郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1200

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 347号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	大 石 健太郎		
論文題目	Effects of visible light on iron ion release from ferritin and ferritin-mediated lipid peroxidation (フェリチンからの鉄イオン遊離およびフェリチン誘導性脂質過酸化反応に対する可視光線の影響)		

博士(医学) 大石 健太郎

論文題目

Effects of visible light on iron ion release from ferritin and ferritin-mediated lipid peroxidation

(フェリチンからの鉄イオン遊離およびフェリチン誘導性脂質過酸化反応に対する可視光線の影響)

論文の内容の要旨

〔目的〕

組織の光傷害には酸化ストレスが関与していることが知られている。網膜、特に視細胞外節は多価不飽和脂肪酸が非常に多く、脂質過酸化反応を惹起しやすい。我々はこれまで光と鉄イオンにより惹起される網膜過酸化反応について研究を行ってきた。大部分の鉄イオンはフェリチンと結合して細胞・組織内に存在しており遊離の状態ではほとんど存在していない。紫外線(365nm)がフェリチンからの鉄イオン遊離を惹起するという興味深い報告がある(Aubailly, 1991)。よりエネルギーの弱い可視光線によってフェリチンから鉄イオンが遊離するかどうかは検討されていない。この問題は生体での光傷害の機序を考える上でも重要と考えられる。本研究では可視光照射により誘導されるフェリチンからの鉄イオン遊離および脂質過酸化反応の促進について検討した。

〔方法〕

〈実験1〉フェリチンから遊離した鉄イオンの検出

500 μ g/ml フェリチン(ウマ脾臓由来)を、10mM ADPの存在または非存在下で、pH5.0-7.8、37℃、0～60分間のインキュベーションを行なった。光照射には蛍光灯を用いた(0, 500～17,000 lx)。インキュベーション後のサンプルにおけるフェリチンは遠心フィルターにより除去した。そのろ液に存在する遊離鉄イオンの濃度をdesferrioxamineによる比色定量法($E=2865\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)により測定した。

〈実験2〉過酸化脂質測定

実験1と同様の条件(ADP非存在)で、ブタ視細胞外節(ROS; 500 μ g protein/ml)とインキュベーションを行なった。malondialdehyde(MDA)およびlipid hydroperoxide(LOOH)生成量は、それぞれ、thiobarbituric acid法およびferrous oxidation/xylenol orange法により測定した。

〔結果〕

〈実験1〉ADP共存下では、pH7.0において、可視光による鉄イオン遊離が認められた。0, 4,000, 8,500, 17,000 lx、20min照射における鉄イオン遊離は、pH5.0で、それぞれ、5.5, 22.4, 23.4, 33.5 μ M、pH7.0で、それぞれ、1.9, 8.2, 10.2, 17.0 μ Mであった。この鉄イオン遊離は、酸性度の上昇、光量および照射時間に依存していた。遮光下では、鉄イオン遊離はほとんど促進されなかった。また、温度の上昇(42および47℃)はほとんど影響を与えなかった。ADP非共存下、生理的pHにおいては可視光照射によるフェリチンからの鉄イオン遊離は生じなかった。しかし、pH6.2以下では可視光により鉄イオン遊離が惹起された。

superoxideの消去剤であるsuperoxide dismutase(SOD; 1000U/ml)、一重項酸素の消去物質(sodium azideおよびhistidine; 10mM)やhydroxyl radicalの消去物質(dimethylthiourea, mannitolおよびglucose; 10mM)による影響はなかった。

〈実験2〉フェリチン存在下での光照射により惹起された視細胞外節でのMDAおよびLOOH生成は光量、照射時間、酸性度との間にそれぞれ相関が認められた。実験1におけるフェリチンからの鉄イオン遊離の結果とも完全に相関が認められた。0, 4,000, 8,500, 17,000 lx、pH7.0、20minにおけるMDA濃度は、0, 3.9, 5.8, 8.7nmol/mg protein ROSであった。

〔結論〕

可視光線の照射によってもフェリチンからの鉄イオン遊離が促進されることが確認された。鉄イオン遊離は光量やインキュベーション時間、酸性度、ADPのようなキレート物質の存在に依存していた。温度上昇はフェリチンからの鉄イオン遊離に対してほとんど影響を及ぼさなかった。また、抗酸化物質の添加実験から、活性酸素種の関与(superoxideや一重項酸素、hydroxyl radical)による影響も認められなかった。これらのことから可視光線照射により惹起されるフェリチンからの鉄イオン遊離は、活性酸素種や温度上昇という二次的影響ではなく、可視光線のフェリチンに対する直接作用によるものであると考えられた。

可視光照射により遊離した鉄イオンは脂質過酸化反応を惹起し、MDAやLOOHのような脂質過酸化反応の指標となる物質の生成を惹起することも確認された。

これらの結果から、*in vivo*での組織の光傷害においてフェリチンが光惹起性脂質過酸化反応を促進する因子の一つとして関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

フェリチンは鉄イオンの貯蔵に重要な役割を果たしている。鉄イオンは生体組織、細胞の重要な構成因子であるが、一方でフリーラジカルの発生原因の一つでもある。眼組織の光障害には酸化ストレスが関与していることが知られている。網膜、特に視細胞内節にはフェリチンが存在し、また視細胞には多価不飽和脂肪酸が多く、脂質過酸化反応を惹起しやすい。紫外線がフェリチンから鉄イオンを遊離させることが、近年報告され、紫外線の眼障害の一つの機序として注目されている。しかし紫外線よりエネルギーの弱い可視光線がフェリチンから鉄イオンを遊離させるのか、また視細胞外節より脂質過酸化反応を惹起させるのかについて不明であり、申請者はこれらの点を明らかにするため本研究を行った。

まず申請者は実験1として可視光線によりフェリチンから鉄イオンの遊離について検討した。フェリチン(ウマ脾臓由来)500 μ g/mlを10mM ADPの存在下または非存在下で、37℃にて0~60分間のインキュベーションを行い、蛍光灯による光照射(500-17,000 lux)を実施した。インキュベーション後遠心フィルターにてフェリチンを除去し、ろ液中の遊離鉄イオン濃度を測定した。フェリチンからの鉄イオン遊離は可視光の光量および照射時間に依存して増加し、溶媒の酸性度の上昇に伴って増加が認められた。Cytochrome c、トランスフェリン、ヘモグロビンなど鉄結合性蛋白においては可視光による鉄イオン遊離は認められなかった。また申請者は活性酸素種の各種消去剤(SOD、sodium azide、histidine、dimethylthiourea、mannitolなど)の添加実験を行ったが、可視光によるフェリチンからの鉄イオン遊離に活性酸素種の関与は認められなかった。

実験2はブタ視細胞外節(500 μ g protein/ml)存在下において実験1と同様にフェリチン(ウマ脾臓由来)500 μ g/mlとインキュベーションを行い、光照射を行った。脂質過酸化反応により生じるmalondialdehyde(MDA)およびlipid hydroperoxide(LOOH)の生成量を測定した。MDAおよびLOOHの生成はフェリチンか

らの鉄イオン遊離と相関し、光量、照射時間、溶媒の酸性度とともに増加した。

申請者はフェリチンの鉄イオン遊離に関与する様々な因子を数多くの実験で明らかにし、光網膜障害の一つの機構として、フェリチンが光惹起性脂質過酸化反応を促進する因子であることをin vitroで証明した。本研究はin vivoでの検討を実施する布石となるものであり、今後の発展が期待される。

審査の過程において、申請者に次の質問をおこなった。

- 1) 光照射に用いた蛍光灯の波長スペクトルは
- 2) 蛍光灯を選択した理由は
- 3) 網膜細胞におけるフェリチンの分布は
- 4) 視細胞外節の生理的役割について
- 5) 鉄イオンの測定方法では Fe^{2+} と Fe^{3+} を区別しているか
- 6) 統計解析について
- 7) ADPの役割と使用理由について
- 8) 脂質過酸化反応で一重項酸素が関与する系とその反応生成物について
- 9) 脂肪酸の酸化過程における酵素反応について
- 10) 鉄イオンのフェリチンへの取り込み様式について
- 11) 可視光による鉄イオンの遊離機構について

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	大 橋 京 一			
	副査	藤 瀬 裕	副査	山 本 清 二	