

ビリルビンと活性酸素

Bilirubin and Reactive Oxygen Species

林 亨子 HAYASHI Kyoko

1. はじめに

Bilirubin (BR) は Heme の代謝産物である。生体は Heme を酸化開環して Biliverdin (BV, 水溶性) にした後に、また敢えて還元して BR (水不溶性) として肝より排泄する (Fig. 1)。したがって、BR は単に排泄されるだけではなく、生体内において活性酸素を消去する抗酸化剤としての機能も持つ。

ヒトの尿を BR 抗体を用いた ELISA 法により測定すると、7 種類の化合物が検出される。そのうち 2 種類は既に同定され、BR (四ピロール体) の酸化分解物 BT (三ピロール体) であることが判っている (Fig. 2)。したがって、BR は酸化分解物となって尿中に排泄されていることがわかる。そして、その排泄分解物類のパターンは生体が受けている酸化ストレスの程度や様態を反映していると考えられる。

本研究では、*in vitro* クロロホルム CHCl₃ 中において BR (Fig. 3 脂溶性型) を過酢酸 CH₃COOOH と反応させ、その反応生成物分布パターンなどから反応機構を検討し、ヒト尿中 BR 分解物類パターンと対比して生体における BR 酸化機構を検討することを目的とした。

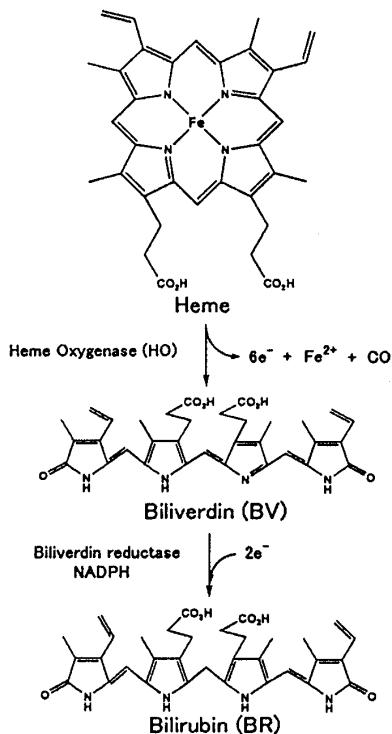


Fig. 1 From heme to bilirubin (BR) through biliverdin (BV)

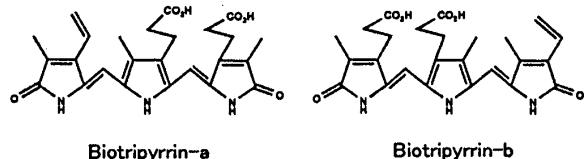


Fig. 2 Decomposition products, BT-a and BT-b, of BR found in human urine

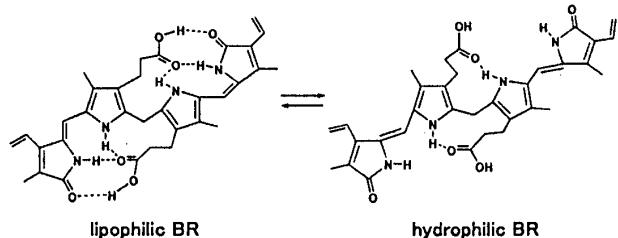


Fig. 3 Two types of chemical structures of BR

2. BR と CH₃COOOH との反応

ビリルビン BR (和光純薬) (10 mg) をクロロホルム CHCl₃ (50 mL) に溶解し、これに過酢酸 CH₃COOOH (0.5 mL) を加えることにより酸化反応を開始した (室温)。反応停止はチオ硫酸ナトリウム水溶液 10 % Na₂S₂O₃ (1 mL) を反応液に加え攪拌することにより行なった。反応液を水で洗ったのち、反応液に残った BR よりの生成物を薄層クロマトグラフ TLC (Silica Gel : Merck Art. 5744, 20×20 cm, 展開溶媒 : 20 % MeOH/CHCl₃) で分離した。

その結果、もとのビリルビン BR (橙) とその酸化体ビリベルジン BV (緑) のほかに、Fig. 4 に示す BY (黄、BR への酸素付加体) と BK (黒、BV への酸素付加体)、それに構造不明の BD (黄) とが得られた。このうち尿中 7 化合物に適合したのは構造不明の BD のみであった。

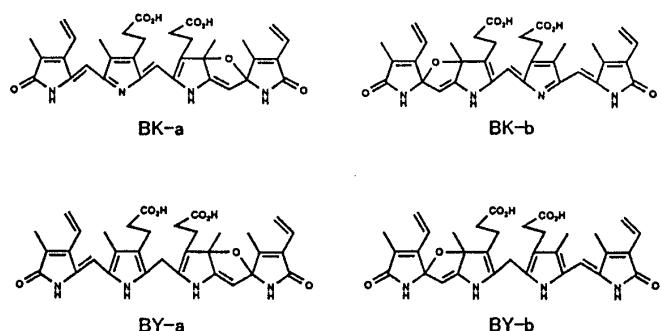


Fig. 4 Oxidative products, BKs and BYs, of BR with peracetic acid in CHCl₃

3. BD の合成

前節の予備実験に引き続き、構造解析のための BD 大量合成を試みた。BR (117 mg) を CHCl₃ (200 mL) に溶解し、これに過酢酸 (2.0 mL) を加えることにより酸化反応を開始した (室温)。反応時間は 2 hr, 21 hr, 72 hr とした。生成物は Flash Chromatography (溶媒: CHCl₃ から 20 % MeOH/CHCl₃ までのグラディエント, Silica Gel: Wakogel FC-40 (239-00895)) で分離精製した。BD は 3 % MeOH/CHCl₃ ~ 10 % MeOH/CHCl₃ の溶媒系で溶出された。

各反応時間における酸化物の重量収率を Table 1 に示す。結果は一見して明らかに変であるが、これは、 $t = 2\text{ h}$, 21 h の実験は夏に、 $t = 75\text{ h}$ の実験は冬に、いづれも室温で反応を行なったためと考えられる。

Table 1 Yield in weight of oxidative products from BR.

t/hour	BR	BV	BY	BK	BD
2	0.6235	0.0650	0.0479	0.0137	0.0051
21	0.2935	0.0623	0.0256	0.0684	0.0444
75	0.6215	0.1565	0.0581	0.0308	0.0214

さて、ここまでを振り返ってよく考えてみよう。BR を NADP で 2 電子酸化したものが BV である。これに対し、BR を酸素付加して 2 電子酸化したものが BY である。そして、BV をさらに酸素付加して 2 電子酸化したものが BK である。これらはいづれも四ピロール体であり、尿中には溶け出さない。

BR または BV の左右の架橋部に付加した酸素により、この架橋部がカルボニル化して分離して三ピロール体になったものが BT であろうと推測される。四ピロール体から三ピロール体へと小さくなり、かつカルボキシル基は 2 つとも残っているので、BT の水溶性が高まり、尿中に排泄される様になったものと思われる。その結果、逆にクロロホルムには溶けなくなつたため、上記の *in vitro* クロロホルム実験では BT は検出されなかつたものと考えられる。

ところが、BD は尿中にもクロロホルム中にも見出された。したがって、水溶性から言えば、BD は、三ピロール体 BT と四ピロール体 BR, BV, BY, BK の間に位置するものと考えられる。いま、水溶性のひとつの目安として、分子の有するカルボキシル基数 C とピロール環数 P との比 (C/P 比) を取れば、三ピロール体 BT の C/P 比は 2/3、四ピロール体 BR, BV, BY, BK の C/P 比はいづれも 2/4 = 1/2 である。したがって、BD の C/P 比は、1/2 より大きく、2/3 より小さいことが予想される。しかし

ながら、この 2 つの値の間の値を取る整数比は、分母、分子にそれぞれ 1, 2, 3, 4 を取る限り、存在しない。したがって BD の C/P 比は、1/2 か 2/3 であることが推測される。ところが、酸化分解すればピロール環数は減る傾向にある。すると、ピロール環数が 2 になったときにカルボキシル基数が 1 になれば、C/P 比は 1/2 であり、かつ、ピロール環数が 4 の四ピロール体 (C/P 比 = 1/2) よりもピロール環数が少ないので、より水溶性であることが期待できる。すなわち、BD は、二ピロール体で、かつ、カルボキシル基数が 1 の化合物だろうと予測される。

4. BD の生成機構

BD は、四ピロール体の最高酸化体 BK から直接生成したのではないかと考え、上記の推測のもとに経路で生成したと考え、BK と、水または塩酸との反応、および過酢酸との反応を行った。

まず、BK (3.6 mg) を 20 % MeOH/CHCl₃ に溶解し、H₂O または 10 % HCl を加えて室温で一晩攪拌したが、BD は生成しなかった。また、BK (4.8 mg) を 10 % MeOH/CHCl₃ (5 ml) に溶解して過酢酸 (0.5 ml) を加えて室温で 6.5 時間反応させたが、少量の BD しか生成せず、主生成物としてピロール環が分解開環したと考えられる物質が生成した。BK (6.0 mg) を 10 % MeOH/CHCl₃ (10 ml) に溶解、過酢酸 (0.1 ml) を加えて室温で 3 日間反応させたが、やはり少量の BD しか生成しなかった。したがって、BD は BK から直接生成するわけではないと考えた。

5. BD の構造

BD の構造解析のため、NMR を測定した。その結果、BD は BR の部分構造をもつことが判ったが、完全な構造決定は困難であった。そこで、BD をメチルエステル化してその構造を解析 (MS, NMR 分析) した。その結果、BD は dipyrrole 型の aldehyde 体であることがわかった (Fig. 5)。

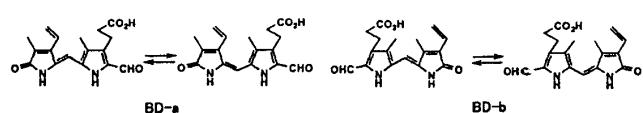


Fig. 5 Chemical structures of BD-a and BD-b.

[謝辞]

本研究を御指導下さった東京医科歯科大学・杉本昭子助教授に感謝致します。