

学 位 論 文 題 名

高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の酵素的合成と
生理機能に関する研究

学位論文内容の要旨

水産脂質に多く含まれる n-3 系高度不飽和脂肪酸 (HUFA)、すなわちエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) は、抗血栓、抗アレルギー、制ガン作用など多くの優れた生理機能を有することが知られている。近年では、EPA と DHA の生理機能が EPA や DHA の結合した脂質の化学形態により異なることも明らかにされつつある。本研究では EPA や DHA の結合したリン脂質に着目して、酵素反応による EPA 及び DHA 結合型リン脂質の合成方法の確立を試み、更には合成したリン脂質のヒト赤血球膜流動性及び変形能への影響、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60細胞) の増殖と分化への影響について検討した。

第 1 章では、リン脂質の sn-1 位、sn-2 位のそれぞれの位置に EPA や DHA の選択的導入を試みた。その結果、リゾ型リン脂質と HUFA を反応基質としてブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) によるエステル合成反応により、HUFA をリン脂質 sn-2 位に選択的に導入することが可能となった。一方、トリグリセリドの sn-1,3 位に特異性を有する固定化リパーゼ Lipozyme を用いてホスファチジルコリン (PC) と EPA のエステル交換反応により、リン脂質 sn-1 位に EPA の導入が可能となった。

HUFA 結合型リン脂質の合成反応において、酵素を活性化するために添加した水分が副反応である加水分解を進行させ、収率の低下を招いたことか

ら、第2章では目的反応の収率を高めるために活性化必須水分の代替物の使用を試みた。すなわち酵素タンパク質は水分子と多点水素結合を形成することにより、主鎖の自由度を増し触媒活性が発現すると考えられていることから、この役割を代替できる物質を用いて酵素を活性化することにより加水分解を抑制できると考えた。PLA₂のエステル合成反応における必須水分代替物の検索を行ったところ、高誘電率であるホルムアミドの添加によりPLA₂が活性化することを認め、合成率が61.0%に達した。水の添加では反応初速度がホルムアミドとほぼ同じであるのにもかかわらず合成率が29.7%であったことから、必須水分代替物としてホルムアミドを用いることにより、水と同等に酵素を活性化しつつ合成率が高まることが判明した。次いで、Lipozymeによるエステル交換反応における必須水分代替物の検索を行った結果、プロピレングリコールやエチレングリコールなど分子内に-OHを有するアルコール系の物質が必須水分代替物として有効であることが判明した。水とプロピレングリコールを併用することにより反応が一層効率的に進行し、水のみ添加と比べ回収率（基質PCに対する反応後残存するPCの割合）が25%程度高くなることを認めた。以上のことより、必須水分代替物を活用してPLA₂及びLipozymeの位置特異的酵素反応を行い、更に、既存のホスホリパーゼDによるホスファチジル基転移反応を併用することにより、様々な化学形態のEPA及びDHA結合型リン脂質分子種を調製することが可能となった。

第3章では、動脈硬化や血栓症と関係が深い、ヒト赤血球（RBC）の膜流動性及び変形能におよぼすEPA及びDHA結合型リン脂質の影響について検討した。その結果、PC、ホスファチジルエタノールアミン（PE）及びホスファチジルセリン（PS）のいずれの化学形態においてもEPA、DHA結合型リン脂質処理RBCの膜流動性が、比較対照とした大豆リン脂質処理RBCの膜流動性よりも高いことを認めた。EPA結合型リン脂質とDHA結合

型リン脂質の効果を比較したところ、PC形態では EPA 結合理型と DHA 結合理型の間に差がみられなかったのに対し、PE 形態では DHA結合理型、PS 形態では EPA 結合理型において膜流動性がより高められることが判明した。更に、シリコン単結晶基板マイクロチャンネルを用いてリン脂質のヒト RBC 変形能への影響を検討したところ、EPA 及び DHA 結合理型リン脂質処理 RBC において RBC 懸濁液の流速改善効果がみられ、その効果を顕微鏡下で確認することができた。PC、PE 形態では DHA 結合理型リン脂質処理 RBC において、PS 形態では EPA 結合理型リン脂質において RBC 変形能の改善効果が顕著であり、膜流動性の向上とは現象的に一致していた。すなわち、EPAや DHA 結合理型リン脂質が RBC 膜に取り込まれ、膜流動性を高めることにより間接的に変形能の改善に至ったとみられ、その効果はリン脂質の分子種や脂質形態により異なることが明らかとなった。

第4章では、HUFAの効果が注目される制ガン作用について、ヒト前骨髄性白血病細胞（HL-60細胞）を対象として EPA 及び DHA 結合理型リン脂質の影響を検討した。HL-60細胞の分化（脱ガン）におよぼす影響について検討したところ、EPA 及び DHA 結合理型リン脂質存在下で HL-60細胞を培養した後に分化誘導剤であるレチノイン酸（RA）を添加することにより、RAの細胞分化誘導作用が促進されることを認めた。その効果は EPA や DHA の脂肪酸やエチルエステルの形態に比べ、リン脂質の形態において顕著であり、これは RA を10倍量単独添加した場合の分化率に匹敵した。分子種間の効果を比較すると、EPA 結合理型リン脂質に比べて DHA 結合理型リン脂質の分化誘導促進効果が大きく、DHA 結合理型 PC 分子種においては、sn-1位がリノール酸が主である大豆由来の脂肪酸や EPA と比べて、パルミチン酸（Pal）やオレイン酸（Ole）が結合した分子種において促進効果が大きいことを認めた。一方、化学形態の違いによる効果を比較すると、同一アシル基の場合、PC や PS に比べて PE 形態において分化誘導作用の促進効果が大きかった。EPA

及びDHA 結合型 PE においては単独添加 (RA 非存在下) においても分化誘導作用がみられた。これらのことから RA の細胞分化誘導能に対し EPA 及びDHA 結合型リン脂質が分化率を高める促進的效果を示し、その作用が分子種や化学形態により異なることが明らかとなった。HUFA 結合型 PE は、このように HL-60細胞の分化を最も促進するとともに、同時にこの細胞の増殖も抑制していた。以上のように本研究では、RBCの膜流動性や変形能の改善効果及びガン細胞増殖抑制効果や細胞分化誘導促進能の何れにおいてもsn-2位に DHA の結合した PE 形態において効果が大きいことを認めた。

今後、リパーゼ剤やホスホリパーゼ剤の特異的な反応を活用することにより、高い機能性を有した EPA 及び DHA 結合型リン脂質を作出し、最終的にはこれらの HUFA 結合型リン脂質が特定保健用食品や医薬品へ応用されていくことが望まれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 羽 田 野 六 男
副 査 教 授 太 田 亨
副 査 助 教 授 高 橋 是 太 郎

学 位 論 文 題 名

高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の酵素的合成と 生理機能に関する研究

本論文ではエイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) 結合型リン脂質分子種の酵素的合成方法を確立し、その生理機能としてヒト赤血球膜流動性及び変形能への影響、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60細胞) の増殖と分化に及ぼす影響について、EPA及びDHA結合型リン脂質の分子種や化学形態と関連づけて検討を行った。

(1) リゾ型リン脂質とEPA又はDHAを反応基質として、ブタ膵臓由来ホスホリパーゼA₂によるエステル合成反応を行うことにより、リン脂質 sn-2位にEPAやDHAの選択的導入が可能となった。一方、トリグリセリドのsn-1,3位に位置特異性を有する固定化リパーゼ Lipozymeを用いてホスファチジルコリン(PC)とEPAのエステル交換反応を行うことにより、リン脂質 sn-1位へのEPAの導入が可能となった。

(2) 副反応である加水分解を抑制し、EPAやDHA結合型リン脂質の反応収率を高めるため、水以外の物質による酵素の活性化すなわち必須水分代替物の検索、使用を試みた。その結果、ホスホリパーゼA₂によるエステル合成反応において、高誘電率であるホルムアミドを必須水分代替物として使用することにより、従来までの水添加による反応に比べ合成率が30%程度上昇した。一方、Lipozymeによるエステル交換反応においては、必須水分代替物としてプロピレングリコールが有効であり、プロピレングリコール：水(1:1 v/v)を用いることにより反応収率が従来までの水分調整の反応に比べ25%程度高くなった。以上のことより、必須水分代替物を活用してホスホリパーゼA₂及び Lipozymeの位置特異的酵素反応や、既存のホスホリパーゼDによるホスファチジル基転移反応を併用することにより、様々な化学形態のEPA及び

DHA結合型リン脂質分子種を調製が可能となった。

(3) EPA結合型及びDHA結合型リン脂質のヒト赤血球膜流動性に及ぼす影響について検討した結果、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)及びホスファチジルセリン(PS)のいずれの化学形態においてもEPA、DHA結合型リン脂質が赤血球の膜流動性を大きく高めることを認めた。更に、シリコン単結晶基板マイクロチャンネルを用いてリン脂質のヒト赤血球変形能への影響を検討したところ、EPA及びDHA結合型リン脂質で処理した赤血球において流速改善がみられ、その効果を顕微鏡下で確認することができた。リン脂質の赤血球変形能に対する改善効果が、赤血球膜流動性の向上作用と現象的に一致していたことから、EPAやDHA結合型リン脂質が赤血球膜流動性を高めることにより間接的に変形能の改善に至ったと考えられ、その効果はリン脂質の分子種や脂質形態により異なることが明らかとなった。特に、sn-2位にDHAの結合したPCやPE、sn-1位にEPAの結合したPSにおいて効果が顕著であった。

(4) EPA 及び DHA 結合型リン脂質の制ガン作用を明らかにするため、ヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60細胞)の分化におよぼすEPA 及び DHA 結合型リン脂質の影響について検討した。HL-60細胞培養液にEPA及びDHA 結合型リン脂質を添加してあらかじめ24時間培養することにより、分化誘導剤であるレチノイン酸(RA)単独添加に比べ細胞分化率の上昇がみられ、その効果はリン脂質分子種や化学形態によって異なっていた。特に、sn-1位にパルミチン酸やオレイン酸が結合したDHA結合型PCにおいて促進効果が大きいことを認めた。一方、化学形態の違いによる効果を比較すると、DHAの遊離脂肪酸やエチルエステルに比べ、リン脂質形態での添加において細胞分化率の上昇が顕著であり、リン脂質形態の中でもPC や PS に比べて PE 形態においてその効果は大きかった。EPAやDHA 結合型 PE においてはリン脂質単独添加(RA 非存在下)においても細胞分化誘導作用がみられ、また、強い細胞増殖抑制効果も有することが明らかとなった。

本研究により、リパーゼ剤やホスホリパーゼ剤の特異的な反応を活用することにより、機能性を有するEPAとDHA結合型リン脂質分子種の調製法を確立し、これにより高度な三次機能を有した食品設計や医薬品への応用の可能性を明らかにした。これらの点を審査員一同は高く評価し、本論文が博士(水産学)の学位を受けるのに十分な内容を有するものと認定した。