

博士（水産科学） 小林秀誉

学位論文題名

水系における高度不飽和脂肪酸の酸化機構に関する研究

学位論文内容の要旨

高度不飽和脂肪酸(PUFA)にはn-3系とn-6系が存在し、ドコサヘキサエン酸(DHA)やイコサペンタエン酸(EPA)等のn-3系は抗アレルギー、血液凝固防止、記憶力や視力の増進機能を持ち、アラキドン酸(AA)、 $\alpha$ -リノレン酸(LN)、リノール酸(LA)などのn-6系はエイコサノイドに代謝されて免疫反応などに寄与する。いずれも生体内では生合成できず、相互変換も出来ないことから、両方の脂肪酸を食品から適度に摂取することが必要である。その一方、高度不飽和脂肪酸は容易に酸化される。生成した過酸化脂質は食品の品質を劣化させ、また生体内では細胞を傷害し、老化や疾病の原因となる。そのため、脂質過酸化反応の機構を研究することは重要である。いくつか知られている酸化機構のうち最も重要な自動酸化はラジカル反応であり、ビスアリル位の水素がラジカル的に引き抜かれることから始まる連鎖反応である。よって、分子内にビスアリル位を多く持つ化合物ほど酸化されやすい、例えばDHAやEPAはLAよりも酸化に対し不安定であることが予想される。この予想はバルク系及び有機溶媒溶液中においては正しい。しかし、エマルジョンやミセル、またホスファチジルコリン(PC)と結合してリポソームを形成した場合にはDHAやEPAがLAより安定となり、酸化安定性がバルク系や有機溶媒溶液系と逆転することが知られている。つまり、周囲の環境によって脂質鎖の物理的な状態が変わると、その脂質鎖の酸化に対する挙動が変わる。しかしながら、その原因は分かっていない。細胞や食品における一般的な脂質の存在状態であるエマルジョンは複雑な系であるため、本研究ではまず細胞のモデルとしてリポソーム、エマルジョンのモデルとしてミセルを用い、DHAなどが酸化に対して安定化する機構について、その反応生成物や物理的な状態に着目して検討した。さらに、実際の細胞についても酸化実験を行い、モデルであるリポソームと比較検討した。

PUFAのラジカル酸化では、LAで2種、LNで4種、AAで6種、EPAで8種、DHAで10種のモノヒドロペルオキシド(MHP)が生成することが知られているが、その異性体比を定量的かつ正確に分析する方法は

知られていない。本研究では、水素添加、エステル交換、トリメチルシリル化してからガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー(GC-MS)を用いる異性体比分析法をまず確立した。ここで、リポソームにおける酸化現象を知るため、グリセロールの1位にパルミチン酸、2位にPUFA(LA, AA, DHA)、3位にホスファチジルコリン(PC)を持つ物質(PC-PUFA)を2-メチル-2-プロパノール(tBuOH)溶液及び一枚膜リポソームに調製、それぞれを酸化させ、上記の方法により分析した。LAでは2種の異性体がいずれの条件でも等量生成した。AA, DHAではtBuOH溶液では生成し得るすべての異性体がほぼ等量ずつ生成するのに対し、リポソームでは異性体組成に偏りが見られ、AAでは11位、8位、5位に、DHAでは20位、16位、10位、8位、4位にヒドロペルオキシド基が付加した化合物が多く生成した。なお、いずれの場合もMHP以外の酸化物は少量しか生成しなかった。今までのリポソームに関する研究結果により、DHA鎖やAA鎖からなるPCによるリポソームはフレキシブルかつ透水性が高いことが知られていることを考えあわせ、これらのリポソームでは脂質鎖の反応部位近傍に水分子が多く存在することで反応部位間の距離が遠くなり、その結果として連鎖反応の速度が遅くなり、また異性体組成が偏るということが考えられる。

次に、PUFAエチルエステルをクロロホルム中に溶かし、またエマルジョンにしてそれぞれをラジカル酸化させ、先に確立した方法を用いてMHPの異性体組成を分析した。LA, LNではクロロホルム溶液とエマルジョンとで異性体組成に違いは見られなかったが、AA, EPA, DHAでは違いがあった。クロロホルム溶液の場合、生成し得るMHPのうちヒドロペルオキシド基が最もメチル基に近い位置及び最もカルボキシル基に近い位置に結合した化合物が多く見られたが、それはこの2者以外では1,3-環化反応が起こることによりMHPが生成しにくいためと考えられる。エマルジョンでもその傾向は見られたが、AAでは11位、EPAでは14位、DHAでは16位と10位にヒドロペルオキシド基が結合した酸化物も多く見られた。酸化生成物に違いが生じる原因を検討するため、エマルジョンのモデルとしてミセルを調製し、<sup>1</sup>H-NMRの緩和時間を用いて検討した。その結果、DHAやAAのミセルはLAミセルと比較し、メチル基近傍がよりフレキシブルであることを示唆する結果が得られた。つまり、ミセルにおいてもDHAやAAではミセルにおいて疎水性の高い部位がよりルーズに集合していると考えられ、透水性も高いことが予想された。以上のことより、ミセルにおいてもリポソームの場合と同じく、脂質鎖の反応部位近傍に水分子が多く存在することで反応部位間の距離が遠くなり、連鎖反応の速度が遅くなると共に酸化部位に選択性が現れると考えられた。

続いて、培養細胞とリポソームにおける脂質酸化を比較した。まず PUFA を添加した培地で細胞を培養すると、細胞中の脂肪酸組成において添加した PUFA が増加することが確認された。LA, AA 及び DHA を添加した培地で細胞を培養し、酸化ストレスをかけた後に MHP 存在比を測定したところ、いずれでも LA 由来の MHP が最も多く検出されたことから、細胞においては LA が DHA や AA よりも酸化されやすい可能性がある。AA 由来 MHP は AA 添加培地で培養した細胞から比較的多く見られ、DHA 由来 MHP は DHA 添加培地で培養した細胞からしか検出されず、いずれもリポソームを酸化した場合とは異なる異性体組成を示した。AA 由来 MHP について、 $\alpha$ -トコフェロール添加リポソームでほとんど生成しない 5-MHP が多く生成し、細胞に取り込まれた PUFA の酸化がリポソームに抗酸化物質を添加したものとも異なることが明らかとなつた。ただし、この結果は酸化生成物を測定しているため、酸化反応部位に偏りがあるのか、或いは一部の MHP が比較的早く分解、代謝されるのかについては今後の検討を要する。

以上より、GC-MS や NMR を用いた本研究の検討により、食品中や生体内といった複雑系における AA や DHA のような機能性脂肪酸の酸化挙動が始めて明らかにされた。こうした結果は今後のこの分野の研究に大きく寄与するものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 宮下和夫

副査 教授 板橋 豊

副査 教授 高橋 是太郎

副査 助教授 細川 雅史

## 学位論文題名

### 水系における高度不飽和脂肪酸の酸化機構に関する研究

ドコサヘキサエン酸(DHA)、アラキドン酸(AA)、リノール酸(LA)などの高度不飽和脂肪酸(PUFA)は様々な生体機能を有する。しかし、一方でこれらのPUFAは分子内に多数の二重結合を有するために、非常に酸化されやすい。生成した過酸化脂質は食品の品質を劣化させ、また生体内では細胞に傷害を与え、老化や疾病の原因となる。そのため、これらのPUFAの過酸化反応の機構を研究することはその利用を図る上で重要である。一般に、各PUFAの酸化安定性は不飽和度の高いものほど低下するが、エマルジョン中、ミセル中、リポソーム中といった水系では上述とはまったく逆に、不飽和度の高いものほど安定となることが知られている。しかし、水系における酸化反応生成物の特徴や酸化機構の詳細については不明な点が多い。水系での各PUFAの酸化反応を知ることは、食品や生体といった脂質が水と共に複雑に存在している場合の脂質酸化を理解する上で有益な知見を与えるものである。そこで、本研究では水系での各PUFAの酸化生成物の構造、異性体組成の特徴や、酸化反応の特徴を明らかにすることを目的として検討を行った。

1. 各PUFAの過酸化で生ずる初期酸化生成物としてのモノヒドロペルオキシド(MHP)の異性体組成比を、GC-MSを用いて定量的かつ正確に分析する方法を開発した。

2. 食品における一般的な脂質の存在状態であるエマルジョン中の各PUFAの酸化の特徴について明らかにするため、ミセル(エマルジョンのモデル)中での各PUFAの反応生成物や物理的な状態についてクロロホルム中と比較した。その結果、LA、LNではクロロホルム中とミセル中とでMHPの異性体組成に違いは見られなかったが、AA、EPA、DHAでは顕著な相違が観察された。

3. ミセル中とクロロホルム中で酸化生成物に違いが生じる原因を検討する

ため、<sup>1</sup>H-NMRの緩和時間を用いてミセル中での各PUFAの物理的状態について検討した。その結果、DHAやAAのミセルはLAミセルと比較し、メチル基近傍がよりフレキシブルであることを示唆する結果が得られた。つまり、AAやDHAからなるミセルにおいては、脂質鎖の反応部位近傍に水分子が多く存在することで反応部位間の距離が遠くなり、連鎖反応の速度が遅くなると共に酸化部位に選択性が現れることが示された。

3. 生体膜モデルであるリポソームにおける酸化の詳細を知るため、グリセロールの1位にパルミチン酸、2位にPUFA(LA,AA,DHA)、3位にホスファチジルコリン(PC)を持つ物質(PC-PUFA)を有機溶媒中及び一枚膜リポソーム中に分散させ酸化反応を行った。LAでは2種の異性体がいずれの条件(有機溶媒中とリポソーム中)でも等量生成した。AA、DHAではtBuOH溶液中では生成し得るすべての異性体がほぼ等量ずつ生成したのに対し、リポソーム中では異性体組成に偏りが見られ、AAでは11位、8位、5位に、DHAでは20位、16位、10位、8位、4位にヒドロペルオキシド基が付加した化合物が多く生成した。

4. 培養細胞においてもLAがDHAやAAよりも酸化されやすい可能性が示唆された。また、培養細胞中では、AAとDHAの酸化で生成するMHP異性体に偏りが見られ、その傾向はリポソームの場合と一致した。ただし、その偏りはリポソームの場合よりも顕著であり、細胞中ではDHAやAAは非常に特徴的かつ特異的な酸化反応を受けること、そのため、その分子構造から予想されるよりも酸化安定性が高くなること、また、その原因是これらPUFAの立体構造や物理的化学的な特徴に起因することなどが初めて明らかにされた。

以上より、GC-MSやNMRを用いた本研究の検討により、食品中や生体内といった複雑系におけるAAやDHAのような機能性脂肪酸の酸化挙動が始めて明らかにされた。DHAは水産物に特徴的に多く含まれるPUFAであり、その高い生理作用のゆえに、現在、機能性食品、薬品などの様々な分野にその応用が図られている。しかし、一方で、DHAはその酸化安定性が化学構造的に低いことが予想されるため、食品・薬品への利用についての問題点や、摂取後の生体内脂質過酸化の亢進などの問題が指摘されていた。本研究で得られた成果はこうした点について明確な解答を与えるものであり、DHAなどの高度不飽和脂質を積極的に活用する上で有益な知見を与えるものと高く評価される。よって審査員一同は本研究の申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。