

博 士 (水産科学) ムハマド イクバル イリヤス

学 位 論 文 題 名

Lipids and Prostaglandins in the Red Alga *Gracilaria vermiculophylla*

(紅藻オゴノリの脂質とプロスタグランジン)

学位論文内容の要旨

Gracilaria vermiculophylla, an agar-producing red alga, has been reported to contain eicosanoid compounds, such as prostaglandins (Fusetani & Hashimoto, 1984; Noguchi et al., 1994; Nakajima et al., 1998; Imbs et al., 2001), which are essential substances for humans. However, in 1994, human intoxications by eating raw *G. verrucosa* including eight victims with three deaths were reported in Japan, where PGE₂ is suspected as the causative substances (Fusetani and Hashimoto, 1984; Noguchi et al., 1994). The major eicosanoids detected in this alga are PGE₂, and 15-keto-PGE₂ (Fusetani & Hashimoto, 1984; Noguchi et al., 1994; Nakajima et al., 1998; Imbs et al., 2001). In biosynthesis of prostaglandins, 20:4n-6 plays a precursor role as substrate (Nakajima et al., 1998). However, the detailed mechanism of prostaglandin synthesis in the alga is not known. Therefore, the aim of this study is to characterize the composition of lipids and prostaglandins in *G. vermiculophylla* in order to describe the mechanism of prostaglandin synthesis.

Free fatty acid levels and galactolipase activity

Production of free fatty acids (FFA) including 20:4n-6 as a substrate for prostaglandin synthesis in *G. vermiculophylla* was studied by storing the alga at different conditions (fresh, stored at 20 °C, frozen for 7 days and thawing for 5 h, freeze-dried by

liquid nitrogen and boiled for 30 min). Highest amounts of FFA were found in the frozen and thawed sample (26.5% of total lipids), followed by the sample stored at 20 °C (18.0%), frozen sample (15.5%), freeze-dried sample (5.2%), but very low amounts of FFA were detected in the fresh and boiled samples (1.3 and 1.1%). The FFAs were isolated by preparative TLC with hexane-diethyl ether-acetic acid (80:20:1, v/v/v) and analyzed by gas chromatography. The major FFA components in all samples were palmitic acid (16:0; 18-40% of total fatty acids) and arachidonic acid (20:4n-6; 23-43%).

Purification and characterization of glycerolipid acyl-hydrolase

For confirmation of FFAs released from membrane lipids, a study on glycerolipid acyl-hydrolase (galactolipase), an enzyme responsible for glyco glycerolipid hydrolysis, was conducted. The results showed that the galactolipase activity was higher toward monogalactocyl diacylglycerol (MGDG), the major membrane lipid and phosphatidylcholine (PC). Both of the membrane lipids are rich in 20:4n-6. The glycerolipid acyl-hydrolase was purified (18.9 fold) by sequential column chromatographies and characterized. SDS-PAGE showed a single band at molecular mass of about 20 kDa, which indicated the high purity of the enzyme. The molecular mass of the enzyme was also determined by FPLC. The estimated molecular mass of the enzyme was found to be about 40 kDa. These observations demonstrated that the glycerolipid acyl-hydrolase from *G. vermiculophylla* is likely to be a homodimer of a 20 kDa subunit. Optimum temperature and pH for the enzyme were 37 °C and 8.0, respectively. The purified enzyme also hydrolyzed both glyco glycerolipids and phospholipids. The enzyme was considered to be responsible for releasing arachidonic acid, a substrate in prostaglandin synthesis.

Prostaglandin contents

Five types of prostaglandins, PGE₃, PGF_{2α}, PGE₂, 15-keto-PGE₂, PGA₂ and a

prostaglandin intermediate, 15-hydroperoxy-PGE₂ from *G. vermiculophylla* samples treated differently were identified by LC-MS and quantified by ODS-HPLC. The major prostaglandins detected were PGE₂ and 15-keto-PGE₂. The highest amounts of PGE₂ and 15-keto-PGE₂ were obtained from frozen-thawed samples (109.9 and 97.2 µg/g wet weight, respectively). The lowest amounts of both prostaglandins were found in boiled sample (5.2 and 4.5 µg/g wet weight, respectively).

Mechanism of prostaglandin synthesis

For elucidation of the mechanism of prostaglandin production in this alga, the acetone powder (as a crude enzyme) prepared from the alga was incubated with arachidonic acid sodium salt for 1 h at 20 °C under anaerobic conditions. With the incubation under anaerobic conditions, the production of PGE₂ and 15-keto-PGE₂ was declined along with a low amount of 15-hydroperoxy-PGE₂. Similar results were obtained when incubated in the presence of 5.6 mM and 10.1 mM of aspirin, thus indicating that cyclooxygenase, an enzyme responsible for synthesis of prostaglandins in mammals, is involved in the prostaglandin synthesis in this alga. Further confirmation for the conversion of 15-hydroperoxy-PGE₂ into PGE₂ was conducted. The hydroperoxy-PGE₂ was reduced using mild and strong reductants, SnCl₂ and NaBH₄, respectively. The 15-hydroperoxy-PGE₂ was converted to PGE₂ under mild reducing conditions, whereas the 15-hydroperoxy-PGE₂ was converted to PGE₂ and PGF_{2α} under strong reducing conditions. These results suggest that the biosynthetic pathway of prostaglandins in the alga might be similar to that of mammals. The proposed pathway of prostaglandin synthesis is summarized in the figure below.

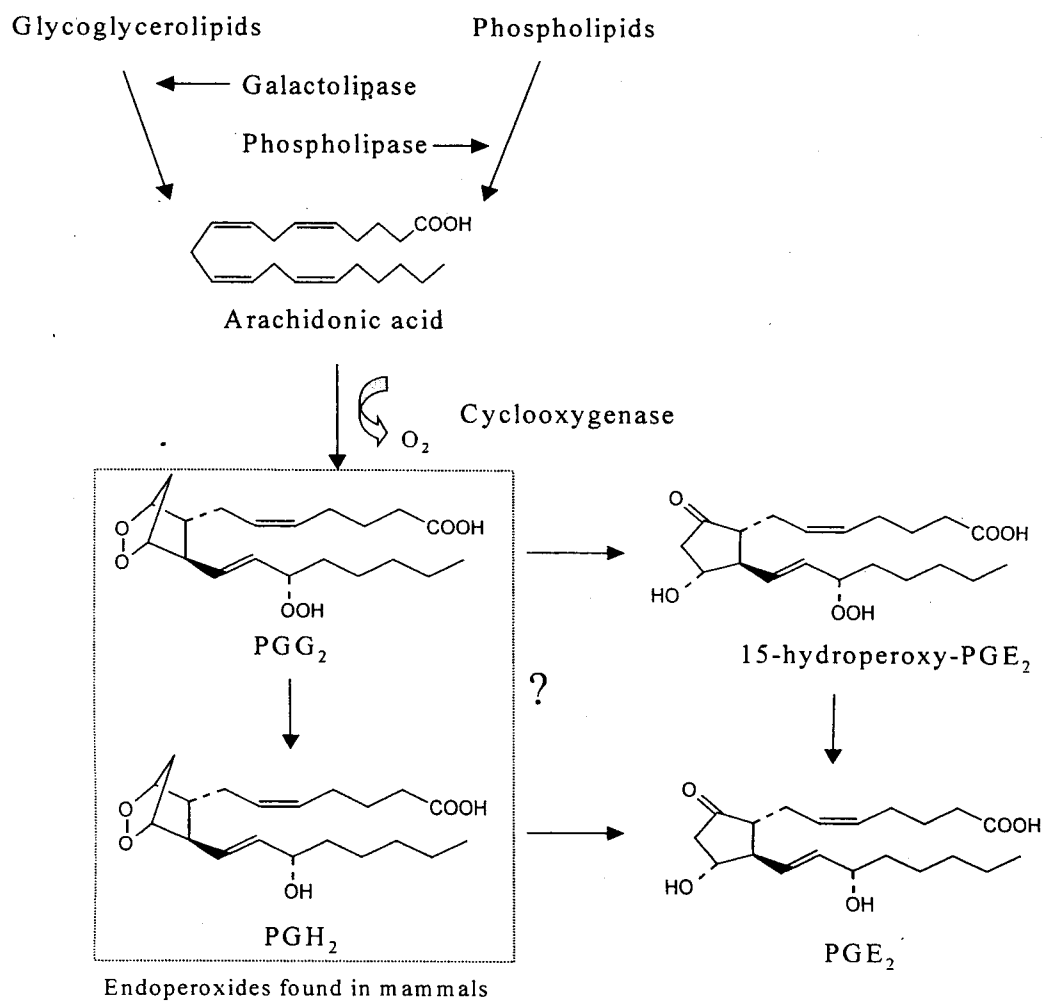


Fig. 1. Proposed pathway of prostaglandin synthesis in the red alga *G. vermiculophylla*.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 橋 豊
副 査 教 授 伏 谷 伸 宏
副 査 教 授 宮 下 和 夫
副 査 准教授 三 上 浩 司

学 位 論 文 題 名

Lipids and Prostaglandins in the Red Alga *Gracilaria vermiculophylla*

(紅藻オゴノリの脂質とプロスタグランジン)

紅藻オゴノリ *Gracilaria vermiculophylla* はプロスタグランジンを多量に産生する特異な海藻として知られるが、その機能も生合成経路も不明である。本研究は、オゴノリのプロスタグランジンと前駆体脂肪酸(アラキドン酸)の生成メカニズムを明らかにしようとしたものである。得られた成果は以下のように要約される。

- (1) 函館の海岸で採取したオゴノリを種々の条件で処理して、総脂質中の遊離アラキドン酸含量とプロスタグランジン含量を測定した。その結果、遊離アラキドン酸とプロスタグランジンは採取直後の新鮮な試料や加熱処理した試料中には極めて少なく、凍結保存や解凍した試料中に著量存在することを見出した(アラキドン酸含量:総脂質中 20~30%;プロスタグランジン含量:150~200 $\mu\text{g/g}$ 藻体)。
- (2) オゴノリの細胞膜を構成する脂質(モノガラクトシルジアシルグリセロールなどのグリセロ糖脂質及びホスファチジルコリンなどのグリセロリン脂質)を加水分解する酵素(ガラクトリパーゼ)活性が加熱処理した試料以外のすべての試料中に存在することを見出した。
- (3) 新鮮なオゴノリ藻体より調製したアセトン粉末から種々のクロマトグラフィーを用いてガラクトリパーゼを精製し、その性質を明らかにした。すなわち、精製酵素は SDS-PAGE では 20kDa の単一バンドを示したが、FPLC 分析では 40kDa の位置に溶出したことから、ホモダイマーであること、至適温度は 37°C で至適 pH は 7.0-8.0 であることを明らかにした。また、精製酵素はグリセロ糖脂質とリン脂質を加水分解したことから、本酵素がオゴノリの細胞膜脂質よりプロスタグランジンの基質であるアラキドン酸を遊離させるものと結論した。
- (4) オゴノリのガラクトリパーゼは、細切、凍結、解凍などの物理的刺激(細胞膜の破壊)によって活性化し、細胞膜を構成するグリセロ脂質(糖脂質、リン脂質)を加水分解してアラキドン酸を遊離し、これが幾つかの酵素反応によってヒドロペルオキシ-プロスタグランジン E_2 に変わり、その後還元されて主成分であるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) に変換されることを明らかにした。
- (5) 高速液体クロマトグラフィーとオンライン質量分析法(HPLC/ESI-MS)を駆使して、

オゴノリの産生するアラキドン酸代謝産物(エイコサノイド)を詳細に調べた。その結果、主要成分の PGE_2 とヒドロペルオキシ PGE_2 の他に数種のプロスタグランジン ($\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_3 , 15-keto- PGE_2 , PGA_2) の他にヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE), ジヒドロキシエイコサテトラエン酸 (diHETE) の異性体が多数検出され、オゴノリのアラキドン酸代謝産物が極めて複雑な組成を有することを明らかにした。

- (6) オゴノリの PGE_2 産生はシクロオキシゲナーゼ阻害剤(アスピリン)によって低下することを見出し、従来の説とは異なる生合成経路の存在する可能性を示した。また、オゴノリにおける PGE_2 合成の中間体と考えられる 15-ヒドロペルオキシ PGE_2 の産生は酸素雰囲気化で増加し、低酸素雰囲気化では極端に低下することを明らかにした。これらの結果は、オゴノリにおけるプロスタグランジン生合成の全容を解明する上で有益な知見を与えるものである。
- (7) 申請者の母国であるインドネシアで採集されたオゴノリもプロスタグランジン産生能の高いことを初めて明らかにした。
- (8) インドネシア産の希少海藻 *Exophyllum wentii* の脂質成分を初めて分析し、アラキドン酸が総脂肪酸中 30% を占めたことから、本藻が紅藻に属することを化学的観点から裏付けるとともに、本藻がプロスタグランジン産生能を有しないことを明らかにした。この結果は比較生化学や化学分類学の観点からも興味深く、高く評価されるものである。

以上、本研究は、オゴノリの産生するアラキドン酸とプロスタグランジンの組成、生合成過程及び関連酵素の性質を明らかにしたものであり、よって審査員一同は、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。