

博士(水産科学) 山本幸弘

学位論文題名

ホスホリパーゼを用いた機能性化合物の
リン脂質誘導化法に関する研究

学位論文内容の要旨

抗酸化作用や抗癌作用などの機能性を有する化合物を食品成分や化粧品素材、医薬品として用いる場合、乳化剤等を併用することで分散性や安定性、吸収性を高める必要がある。しかし、それによって利用用途が制限されることも少なくない。そのため機能性化合物に両親媒性を付与することが出来れば幅広い利用が可能となる。この様な機能性改善の手段の一つとして、アシル化やリン酸化等の誘導化が挙げられ、それによって分散性や吸収性を大きく改善出来る。

本研究では、優れた生体適合性と両親媒性から医療品や機能性食品、化粧品素材として広範に利用されているリン脂質の分子構造に着目し、種々の機能性物質をリン脂質誘導化するための新規反応プロセスの開発と、得られたリン脂質誘導体の機能性評価に関して研究を行った。その際、生体触媒である phospholipase A₂ (PLA₂) や phospholipase D (PLD) といったリン脂質関連酵素を利用し、温か環境で特異的な反応を簡便に進める方法について検討した。

第1章では、抗癌作用や抗肥満作用を有することから機能性脂肪酸として近年注目されている共役リノール酸(CLA)に着目し、PLA₂ を用いたエステル化反応による CLA 含有ホスファチジルコリン(CLA-PC)の合成を試みた(Fig. 1)。特に、PLA₂ を用いたエステル化反応では、副反応である加水分解反応を制御する反応系中の至適水分量の調節が非常に難しかったため、必須水代替物として formamide を利用した CLA-PC の合成を試みた。

まず、ブタ臍臓由来 PLA₂ (ppPLA₂) を用いて、glycerol を分散媒として用いた反応系にて CLA と卵黄由来 LPC とのエステル合成反応を行った。LPC 11 mg, CLA 18 mg, glycerol 550 mg, ppPLA₂

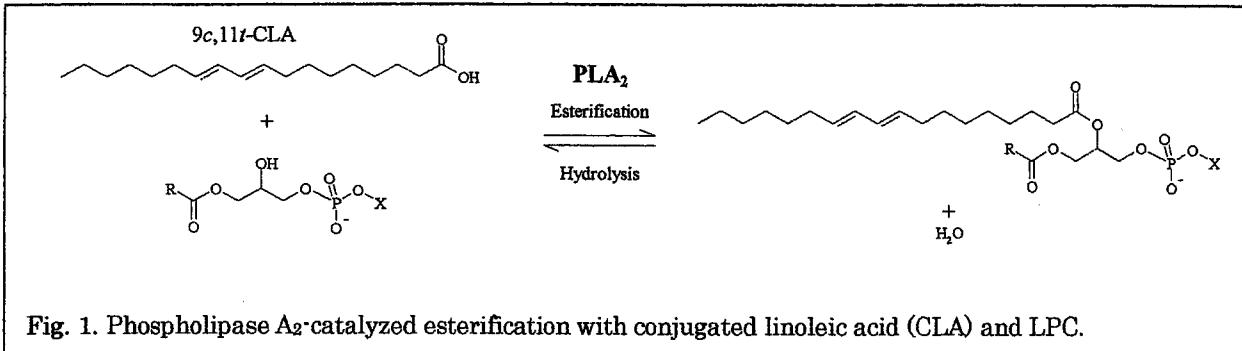


Fig. 1. Phospholipase A₂-catalyzed esterification with conjugated linoleic acid (CLA) and LPC.

3.3×10^4 U, CaCl_2 0.3 μmol , 37°C, 48 h の反応条件において、酵素を活性化する目的で水 50 μl 或いは formamide 50 μl を添加し CLA-PC の合成を試みたところ、水を用いた系では合成率が僅かに 2 mol% であった。それに対し、formamide を用いた系では 46 mol% となり、大幅に合成率が高まることが明らかとなった。得られた CLA-PC の脂肪酸組成を GC 分析したところ、基質として用いた CLA の約半分の脂肪酸組成比であったことより、LPC の *sn*-2 位に特異的に基質 CLA が導入されていることが示された。更に、合成率に及ぼす formamide 添加量や glycerol 添加量、ppPLA₂ 添加量の影響を検討して、至適反応条件を LPC 11 mg, CLA 18 mg, glycerol 550 mg, ppPLA₂ 3.3×10^4 U, formamide 50 μl , CaCl_2 0.3 μmol , 37°C, 6 h とした。その至適反応条件においては 65 mol% の合成率を得た。しかし、上記の反応条件では反応時間 6 h 以降では合成率の低下が見られた。その要因として大気中から吸湿される水分や、エステル合成反応の進行により生成した水が加水分解反応を亢進したと推察し、albumin や casein などのタンパク質を添加することにより PLA₂ 近傍に存在する過剰な水分のコントロールを試みた。その結果、前述の反応系に albumin 1 mg を添加することで、合成率の低下を抑えることが可能となった。酵素以外のタンパク質を添加するだけで合成率を維持できる結果は、水分の調節が困難であった PLA₂ を用いたエステル化反応において極めて有用な知見である。水分活性の調整や減圧下での反応では最終的な収率を高めることは可能であるが、反応初速度が低下する。それに対してタンパク質の添加による反応法は、簡便であるのみならずその吸水性が反応速度に影響を及ぼさない点が利点であることが示された。

第 2 章では PLD を用いたホスファチジル基転移反応 (Fig. 2) による機能性アルコールのリン脂質誘導化法について検討した。ホスファチジル基転移反応を様々な機能性化合物に応用する為には、様々なアルコール化合物を基質として用いて反応特性を明らかにする必要がある。そのような観点

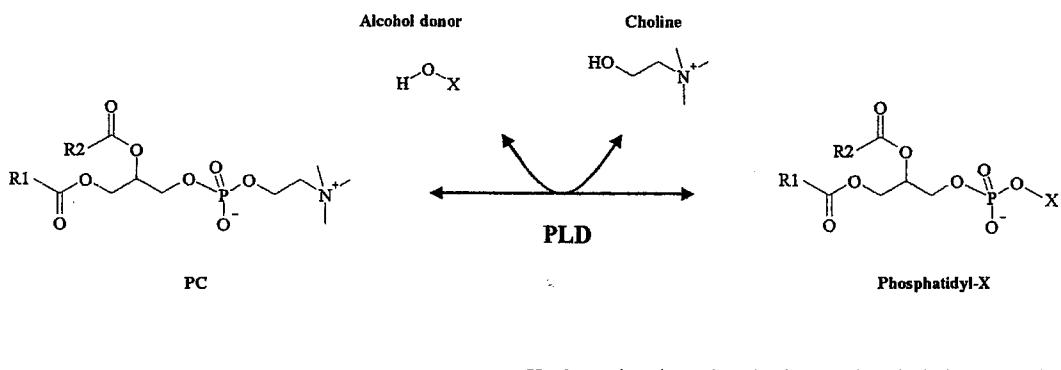


Fig. 2. Phospholipase D-catalyzed transesterification with phospholipids and alcohols.

から、本研究ではこれまで報告例のないテルペンアルコール化合物やフェニルアルコール化合物に着目し、それらのホスファチジル基転移反応について検討した。

PLD を用いたホスファチジル基転移反応は一般に、水とクロロホルムなどの有機溶媒との 2 相系により行われるが、そのような有機溶媒の使用は工業的応用をはかる際、安全面で問題点となる。そこで大豆 PC (SoyPC) とテルペンアルコールとのホスファチジル基転移反応では、酢酸エチルと 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5.6)との 2 相系及び、0.2M 酢酸緩衝液(pH 5.6)に基質を分散させて反応を行う水系にて試みた。反応系に及ぼす geraniol (1) の添加量の影響と酵素添加量の影響を検討し、合成率の経時的測定を行い最終的に至適反応条件を 2 相系 ; SoyPC 50 μmol, 基質アルコール 500 μmol, 酢酸エチル 1.6 ml, *Streptomyces* sp. 由来 PLD (ssPLD) 1.6 U, 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5.6) 0.8 ml, 37°C, 24 h, 水系 ; SoyPC 50 μmol, 基質アルコール 2000 μmol, ssPLD 1.6 U, 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5.6) 0.8 ml, 37°C, 24 h と定めた。この反応条件における phosphatidyl-geraniol の合成率は 2 相系では 52 mol% であったのに対し水系では 90 mol% となり、テルペンアルコールのリン脂質誘導化では水系が適していることが明らかとなった。一方、フェニルアルコールのリン脂質誘導化は、SoyPC を基質リン脂質とし酢酸エチルと 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5.6)との 2 相系によりホスファチジル基転移反応を行った。Tyrosol (8) の添加量の影響を検討するとともに、合成率の経時的変化を測定した結果、至適反応条件を SoyPC 50 μmol, 酢酸エチル 1.6 ml, 基質アルコール 500 μmol, ssPLD 1.6 U, 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5.6) 0.8 ml, 37°C, 24 h のように定め、この反応条件において phosphatidyl-Tyrosol の合成率は 87 ± 3.7 mol% に達した。

次いで、至適反応条件において各種基質アルコールを用い合成率を比較したところ、基質テルペ

ンアルコールの鎖長が長くなる程合成率が低下すること、perillyl alcohol (5)や myrtenol (6)のような分子内に環状構造を有するテルペノアルコールもホスファチジル基転移反応の基質になり得ることを明らかにした。また、フェニルアルコールのベンゼン環からホスファチジル基に置換される-OH 基までの距離が合成率に大きく影響を与えるのに対し、*p*-位の置換基はその種類によらずほとんど反応に影響を及ぼさないことが明らかになった(Fig. 3)。

第3章では第2章で合成された各種リン脂質誘導体について機能性評価を行った。特にヒト癌細胞株を用いた増殖抑制試験や DPPH ラジカル捕捉能、酸化安定性を指標に、抗癌作用ならびに抗酸化作用を評価した。

ヒト白血病細胞(HL-60)の細胞増殖に対するテルペノアルコール及びそのリン脂質誘導体の影響を調べたところ、母化合物である geraniol (1), perillyl alcohol (5), myrtenol (6), nerol (7)は 400 μM で 40%程度の増殖抑制効果であったのに対し、そのリン脂質誘導体では 100 μM で生細胞数がコン

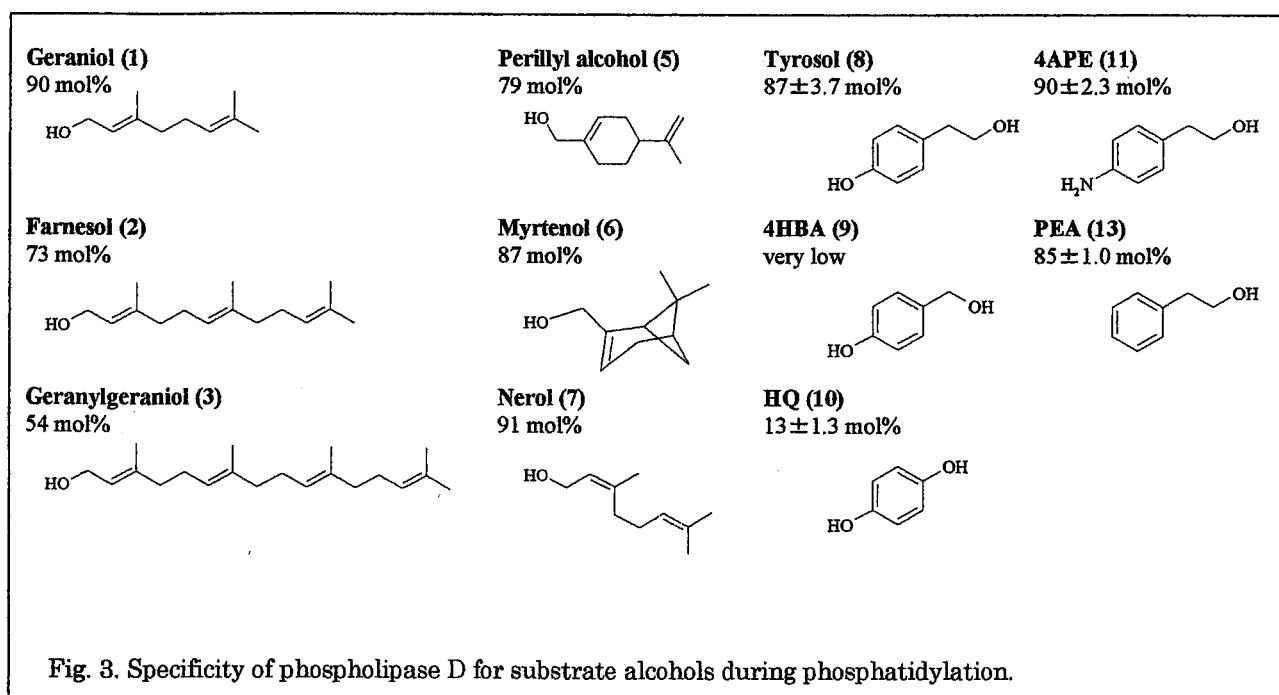


Fig. 3. Specificity of phospholipase D for substrate alcohols during phosphatidylation.

トロールの 20-30%まで減少し、リン脂質誘導化することで抗癌作用が増強されることが示された。また、ヘキスト染色によりアポトーシス細胞が観察されたことから、少なくとも部分的にはアポトーシスを誘導することでこれらの増殖抑制が起こされていることが明らかとなった。一方、高度不飽和脂肪酸に富むイクラ PC を基質リン脂質として得られた Tyrosol (8)のリン脂質誘導体は、基質リン脂質には無い DPPH ラジカル捕捉活性ならびに酸化安定性を有する新規リン脂質であることが明らかとなり、優れた供給形態であることが示された。

以上、本研究により PLA₂ 及び PLD を用いた機能性化合物のリン脂質誘導化法を確立し、それに

より得られたリン脂質誘導体の新規機能性を見出した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 宮下和夫
副査 教授 高橋是太郎
副査 准教授 細川雅史

学位論文題名

ホスホリパーゼを用いた機能性化合物の リン脂質誘導化法に関する研究

抗酸化作用や抗癌作用などの機能性を有する化合物を食品成分や化粧品素材、医薬品として用いる場合、乳化剤等を併用することで分散性や安定性、吸収性を高める必要がある。しかし、それによって利用用途の制限や、栄養機能性の低下といった欠点も生ずる。一方、機能性化合物に両親媒性を付与することが出来れば幅広い利用が可能となる。この様な機能性改善の手段の一つとして、アシル化やリン酸化等の誘導化が挙げられ、誘導化により分散性や吸収性を大きく改善出来る可能性がある。そこで、本研究では、優れた生体適合性と両親媒性から医療品や機能性食品、化粧品素材として広範に利用されているリン脂質の分子構造に着目し、種々の機能性物質をリン脂質誘導化するための新規反応プロセスの開発と、得られたリン脂質誘導体の機能性評価について研究を行った。その際、生体触媒であるphospholipase A2 (PLA2) や phospholipase D (PLD) といったリン脂質関連酵素を利用し、温和な環境で特異的な反応を簡便に進める方法について検討し、以下のような成果を得た。

1. 抗癌作用や抗肥満作用を有することから機能性脂肪酸として近年注目されている共役リノール酸(CLA)に着目し、PLA2を用いたエステル化反応によるCLA含有ホスファチジルコリン(CLA-PC)の合成を試みた。特に、PLA2を用いたエステル化反応では、副反応である加水分解反応を制御する反応系中の至適水分量の調節が非常に難しかったため、必須水代替物(ホルムアミド)を活用し、かつ、食品タンパク質を用いて反応水を吸収することにより、ホスホリパーゼA2による効果的なリン脂質合成法を確立した。これを機能性脂肪酸のエステル化反応に活用し、高い合成率を得ることに成功した。

2. PLDを用いたホスファチジル基転移反応による機能性アルコールのリン脂質誘導化法について検討した。ホスファチジル基転移反応を様々な機能性化合物に応用する為には、様々なアルコール化合物を基質として用いて反応特性を明らかにする必要がある。そのような観点から、本研究ではこれまで報告例のないテルペンアルコール化合物やフェニルアルコール化合物に着目

し、それらのホスファチジル基転移反応について検討した。その結果、優れた機能性を有するテルペンアルコール類とフェニルアルコール類をリン脂質のリン酸基に結合させることに初めて成功した。また、PLDを用いたホスファチジル基転移反応は一般に、水とクロロホルムなどの有機溶媒との2相系により行われるが、そのような有機溶媒の使用は工業的応用をはかる際、安全面で問題点となる。そこで本研究では水系での合成を試みた。その結果、水系の方が2相系よりも高い収率を得られる条件を見出した。例えば、phosphatidyl-geraniolの合成率は2相系では52 mol%であったのに対し水系では90 mol%となり、テルペンアルコールのリン脂質誘導化では水系が適していることが明らかにした。

3. 至適反応条件において各種基質アルコールを用い合成率を比較したところ、基質テルペンアルコールの鎖長が長くなる程合成率が低下すること、perillyl alcohol やmyrtenolのような分子内に環状構造を有するテルペンアルコールもホスファチジル基転移反応の基質になり得ることを明らかにした。また、フェニルアルコールのベンゼン環からホスファチジル基に置換される-OH基までの距離が合成率に大きく影響を与えるのに対し、*p*-位の置換基はその種類によらずほとんど反応に影響を及ぼさないことを明らかにした。

4. 各種リン脂質誘導体について機能性評価を行った。特にヒト癌細胞株を用いた増殖抑制試験やDPPHラジカル捕捉能、酸化安定性を指標に、抗癌作用ならびに抗酸化作用を評価した。ヒト白血病細胞(HL-60)の細胞増殖に対するテルペンアルコール及びそのリン脂質誘導体の影響を調べたところ、母化合物がgeraniol、perillyl alcohol、myrtenol、nero1の場合には、リン脂質誘導化することで抗癌作用が増強されることが示された。また、ヘキスト染色によりアポトーシス細胞が観察されたことから、少なくとも部分的にはアポトーシスを誘導することでこれらの増殖抑制が起こされていることが明らかとなった。一方、高度不飽和脂肪酸に富むイクラPCを基質リン脂質として得られたTyrosolのリン脂質誘導体は、基質リン脂質には無いDPPHラジカル捕捉活性ならびに酸化安定性を有する新規リン脂質であることが明らかとなり、優れた供給形態であることが示された。このように、誘導体化により、基質とした用いたテルペンアルコールとフェニルアルコールとは異なる機能性を示すことを見出した。

このように、本研究では、リン脂質を出発物質として、種々の機能性成分を、酵素(リパーゼ)を用いてエステル化させることに成功した。本研究で合成に成功したリン脂質誘導体は、優れた生体適合性と両親媒性から医療品や機能性食品、化粧品素材としての活用が期待される。これらの成果は、生物素材利用の研究分野において重要な知見になるとともに、機能性食品・化粧品への高度利用や水産資源の有効利用の分野に新たな視点を与える意義深いものである。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。