

学位論文題名

水産副次産物由来モノアシルリン脂質の安定性と機能性に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、リゾホスファチジン酸 (LPA) やリゾホスファチジルコリン (LPC) などのモノアシルリン脂質 (リゾリン脂質) は脂質メディエーターとしては注目されているが、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエンサン (EPA) 等の高度不飽和脂肪酸が結合したモノアシルリン脂質の生理機能についてはほとんど知られていない。リン脂質はトリアシルグリセロール (TAG) よりも生体親和性、生体適合性に優れ、特に DHA および EPA 結合型リン脂質の有用機能や作用機序の解明が待たれている。そこで本研究では、水産副次産物のスルメイカ皮から DHA 結合型リン脂質、キヒトデを EPA 結合型リン脂質の供給源として各種リン脂質クラスおよびリゾリン脂質クラスを調製し、抗アレルギー作用や血管新生抑制作用、悪液質緩和作用などの有用機能について検討した。リゾリン脂質はアシル基の結合位置により 1-アシル型と 2-アシル型に分けることができ、2-アシル型リゾリン脂質は 1-アシル型リゾリン脂質よりも不安定でアシル基転移が生じやすい。そのため、2-アシル LPC のアシル基転移について動的解析を試み、その安定性の評価も行った。

第1章では、供試料のスルメイカ皮およびキヒトデ内臓の一般成分、脂質クラス組成、全脂質および複合脂質の脂肪酸組成分析を行った。その結果、スルメイカ皮は単純脂質より複合脂質の含有率が高いのに対し、キヒトデ内臓は単純脂質の方が高いことが確認された。スルメイカ皮の複合脂質はホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) が大半を占めていたが、キヒトデ内臓ではセレブロシドが一番多く、次いで PE、PC の順であった。脂肪酸組成は、スルメイカ皮脂質の DHA の組成比が 40%におよび、キヒトデ内臓脂質の EPA 組成比が 20~37%を占めた。キヒトデは単純脂質よりも複合脂質の方が高度不飽和脂肪酸の組成比が高かった。よって、本研究ではスルメイカ皮を DHA 結合型ジアシルおよびモノアシルリン脂質、キヒトデ内臓を EPA 結合型ジアシルおよびモノアシルリン脂質の供給源として用いることにした。

第2章では、スルメイカ皮、キヒトデ内臓それぞれの供試料からリン脂質およびモノアシルリン脂質の精製を行った。PE および PC をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、LPC は Lipozyme RM IM による部分加水分解反応によって調製した。ホスファチジルセリン (PS) およびリゾホスファチジルセリン (LPS) はホスホリパーゼ D によるホスファチジル基転移反応によって調製した。各リン脂質の脂肪酸組成は、スルメイカ皮由来の PC および PS は DHA の組成比が 35%を超え、モノアシルリン脂質では 85%と高い値になった。一方、キヒトデ内臓由来 PE は EPA の組成比が高く、モノアシルリン脂質とほぼ同等の約 65%となった。よって、ジアシルリン脂質を加水分解してモノアシルリン脂質とすることで、高度不飽和脂肪酸の組成比を約 2 倍前後高めることが出来ることを認めた。

第3章では、ジアシルリン脂質のサブクラス分析を行い、LPC については脂肪酸結合位置およびアシル基転移の分析を行って、半減期の算出を試みた。スルメイカ PE は 1-アルケニル-2-アシルグリセロールが約 54%、キヒトデ PE では約 93%と大半を占めたことから、ジアシルリン脂質よりもプラズマローゲンが多く含有していることが示唆され、PE を Lipozyme RM IM によって加水分解することは困難であると推察された。スルメイカ PC から 1-アシル LPC および 2-アシル LPC を調製し、脂肪酸組成を分析した結果、1-アシル LPC はパルミチン酸等の飽和脂肪酸で 80%以上を占め、2-アシル LPC は EPA

と DHA の高度不飽和脂肪酸で 90%以上を占めていた。よって PC において高度不飽和脂肪酸は *sn*-2 位に多く結合していると考えられ、*sn*-1 位を加水分解することによって DHA が濃縮されたものと考えた。大豆油由来 2-モノアシルグリセロール (2-MAG)、2-オレオイル LPC、スルメイカ由来 2-アシル LPC のアシル基転移について分析した結果、時間経過および温度上昇に依存して 1-アシル型への転移が生じ、最終的に 1-アシル型と 2-アシル型は約 8 : 2 で平衡状態になった。2-オレオイル LPC は調製直後 94.4%存在していたが、80°C で 168 時間保存すると 17.2%にまで減少した。半減期は 18°C、80°C でそれぞれ 143、31 時間となり、活性化エネルギーは 23 kJ/mol となった。一方で、スルメイカ 2-アシル LPC の半減期は 18°C、80°C でそれぞれ 7368、23 時間となり、活性化エネルギーは、91 kJ/mol であった。活性化エネルギーが高い方が転移に対して安定であるということから、2-オレオイル LPC よりスルメイカ 2-アシル LPC の方がアシル基転移が生じにくいと推察された。

第 4 章では、調製したリン脂質の細胞毒性、抗アレルギー、血管新生抑制、悪液質緩和、 α -キモトリプシン阻害活性、タイトジャンクション (TJ) への影響、ラット胎児脳への DHA 移行性について調べた。Caco-2 細胞に対して PE、PC、PS は 1000 μ M までほとんど毒性が認められなかったが、LPC および LPS では乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出量がコントロールと比較して約 40%となり、高濃度では細胞毒性が現れ始めた。PB-3c 細胞に及ぼすロイコトリエン B₄ (LTB₄) の放出量は、スルメイカ LPC、DHA-PC、DHA-LPC において有意に低かった。よって抗アレルギー作用には DHA が効果を発揮していると推察される。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成への影響について試験を行った結果、キヒトデ内臓 LPC 100 μ M において有意に管腔形成抑制が認められたが、遊走能抑制効果については認められなかった。一方、増殖能に対しては有意に抑制効果を示した。よってキヒトデ内臓 LPC は HUVEC の増殖を抑制することによって管腔形成抑制効果を示すと推察される。動脈片を使用した血管新生試験では、スルメイカ LPC はこれまで抑制効果が報告されている共役 DHA よりも微小血管の新生を抑制した。悪液質モデルマウスにスルメイカ皮由来リン脂質を投与してその影響をみたところ、体重や血液生化学分析、臓器重量に明瞭な差異を確認することができなかったが、LPC 投与群においては、血漿中トリアシルグリセロールが高い傾向にあり、リポタンパク質リパーゼ (LPL) 活性の低下が見られた。よって、スルメイカ LPC 溶液をメラノーマ B16 担癌マウスに飲料形態で投与すると、悪液質がむしろ悪化する可能性が示唆された。 α -キモトリプシンに対する阻害活性試験では、キヒトデ PS 70 μ M で阻害率が約 47%となり、他のリン脂質と比較して高い値を示した。この値は既知阻害剤のフェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) とほぼ同等の阻害率となったことから阻害剤の 1 つとしての可能性が示唆された。Caco-2 細胞による小腸上皮細胞単層膜の TJ への影響試験では、スルメイカ皮 LPC および LPS、キヒトデ内臓 PE および LPS で経上皮電気抵抗値 (TEER 値) を有意に減少させた。よってスルメイカ皮およびキヒトデ内臓 LPS は TJ 開かせ、物質吸収を促進する可能性があると考えられる。試験後の Caco-2 細胞単層膜の脂肪酸組成は、モノアシルリン脂質の添加によって DHA および EPA の組成比が有意に上昇したことから、モノアシルリン脂質はジアシルリン脂質より細胞膜中へ取り込まれやすく、細胞膜の脂肪酸組成を変化させる作用があると推察される。妊娠ラットにスルメイカ LPC および LPS を投与すると、胎児脳の DHA 組成比がコントロール群と比べて有意に高くなった。母親ラットの血漿および脳脂質中の DHA 組成比は LPS 投与群で高かったことから、LPS の透過促進作用により血中キロミクロン中に DHA が取り込まれ、脳に移行したことが考えられる。

以上本研究では、モノアシルリン脂質のアシル基転移や有用機能について種々の検討を行った。その結果、LPC は温度および経過時間に依存してアシル基転移が進行し、その半減期は 80°C でおよそ 30 時間であることを明らかにした。また、LPC は抗アレルギー作用、血管新生抑制作用を有し、Caco-2 単層膜において TJ を開く作用も認められた。一方、LPS は、TJ を開く作用が最も高く、胎児脳の DHA 組成比を有意に上昇させた。高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質は、モノアシル態に誘導することによってさらに有用機能が高められる場合があることが、本研究により明らかになった。今後は有用機能に係る更なる研究を進め、作用機序の詳細を明らかにしていく必要がある。

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 栗 原 秀 幸

学 位 論 文 題 名

水産副次産物由来モノアシルリン脂質の安定性と機能性に関する研究

近年、リゾホスファチジン酸 (LPA) やリゾホスファチジルコリン (LPC) などのモノアシルリン脂質 (リゾリン脂質) は脂質メディエーターとして注目されているが、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエンサン (EPA) 等の高度不飽和脂肪酸が結合したモノアシルリン脂質の生理機能についてはほとんど知られていない。リン脂質はトリアシルグリセロール (TAG) よりも生体親和性、生体適合性に優れているといわれ、特に DHA および EPA 結合型リン脂質の有用機能や作用機序の解明が待たれている。本研究は、水産副次産物のスルメイカ皮を DHA 結合型リン脂質の給源、キヒトデを EPA 結合型リン脂質の給源とし、各種リン脂質クラスおよびリゾリン脂質クラスを調製して、それらの抗アレルギー作用、血管新生抑制作用、悪液質緩和作用、脳への効果的 DHA 送達作用など、その有用な機能の一端を明らかにしたものである。

リゾリン脂質はアシル基の結合位置により 1-アシル型と 2-アシル型に分けることができる。2-アシル型リゾリン脂質は 1-アシル型リゾリン脂質よりも不安定でアシル基転移が生じやすいことが知られているので、本研究では 2-アシル LPC のアシル基転移について動的解析を試み、その安定性についても明らかにしている。

本提出論文の第 1 章では、供試料のスルメイカ皮およびキヒトデ内臓の一般成分、脂質クラス組成、全脂質、複合脂質の脂肪酸組成分析を行い、スルメイカ皮は単純脂質より複合脂質の含有率が高いのに対し、キヒトデの内臓は単純脂質の含有率が高いことを明らかにしている。スルメイカ皮の複合脂質はホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) が大半を占め、キヒトデ内臓ではセレブロシドが一番多く、次いで PE、PC の順であることを示した。脂肪酸組成は、スルメイカ皮脂質の DHA の組成比が 40%におよび、キヒトデ内臓脂質では EPA の組成比が 20~37%を占めていることを認めている。

続く第 2 章では、スルメイカ皮、キヒトデ内臓それぞれの供試料からリン脂質およびモノアシルリン脂質の精製を行っている。PE および PC は順相クロマトグラフィーによって精製し、LPC を Lipozyme RM IM による部分加水分解反応によって調製している。ホスファチジルセリン (PS) およびリゾホスファチジルセリン (LPS) はホスホリパーゼ D によるホスファチジル基転移反応によって得ている。各リン脂質の脂肪酸組成は、スルメイカ皮由来の PC および PS で DHA の組成比が 35%を超え、モノアシルリン脂質では 85%に達したことを認めた。キヒトデ内臓由来 PE は EPA の組成比が高く、モノアシルリン脂質とほぼ同等の約 65%であることを認めている。以上により、ジアシルリン脂質を加水分解してモノアシルリン脂質とすることで、高度不飽和脂肪酸の組成比を約 2 倍前後にまで高めることが出来ることを明確にした。

第 3 章では、ジアシルリン脂質のサブクラス分析を行い、LPC については脂肪酸結合位置およびアシル基転移の分析を行って、半減期の算出を試みている。スルメイカ PE は 1-アルケニル-2-アシルグリセロールが約 54%、キヒトデ PE では約 93%と大半を占めたことから、ジアシルリン脂質よりもプラズマローゲンが多く含有していることが示唆され、PE を Lipozyme RM IM によって加水分解することが困難であると推察した。スルメイカ PC から 1-アシル LPC および 2-アシル LPC を調製し、脂肪酸組成を分析した結果、1-アシル LPC はパルミチン酸等の飽和脂肪酸で 80%以上を占め、2-アシル LPC は EPA と DHA の高度不飽和脂肪酸で 90%以上を占めていることを示した。このことから申請者は、PC において高度不飽和脂肪酸は *sn*-2 位に多く結合していると考え、*sn*-1 位を加水分解することによって DHA が濃縮されたものと考察した。次いで大豆油由来 2-モノアシ

ルグリセロール (2-MAG)、2-オレオイル LPC、スルメイカ由来 2-アシル LPC のアシル基転移について分析した結果、時間経過および温度上昇に依存して 1-アシル型への転移が生じ、最終的に 1-アシル型と 2-アシル型は約 8 : 2 で平衡状態になることを認めた。2-オレオイル LPC は調製直後 94.4% 存在していたが、80°C で 168 時間保存すると 17.2% にまで減少することを観察した。半減期は 18°C、80°C でそれぞれ 143、31 時間となり、活性化エネルギーは 23 kJ/mol と計算された。一方で、スルメイカ 2-アシル LPC の半減期は 18°C、80°C でそれぞれ 7368、23 時間となり、活性化エネルギーは、91 kJ/mol と算出された。活性化エネルギーが高い方が転移に対して安定であるということから、申請者は 2-オレオイル LPC よりスルメイカ 2-アシル LPC の方がアシル基転移が生じにくいものと推察した。

第 4 章では、調製したリン脂質の細胞毒性、抗アレルギー、血管新生抑制、悪液質緩和、 α -キモトリプシン阻害活性、タイトジャンクション (TJ) への影響、ラット胎児脳への DHA 移行性について調べた。Caco-2 細胞に対して PE、PC、PS は 1000 μ M までほとんど毒性を示さなかったのに対し、同濃度で LPC および LPS は乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出量がコントロールと比較して約 40% となり、高濃度では細胞毒性が現れ始めることを観察した。PB-3c 細胞に及ぼすロイコトリエン B₄ (LTB₄) の放出量は、スルメイカ LPC、DHA-PC、DHA-LPC 処理区において有意に低いことを認め、これらのリン脂質が抗アレルギー作用に有用であることを証明した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成への影響について調べた結果、キヒトデ内臓 LPC 100 μ M において有意に管腔形成抑制を認めたが、遊走能抑制効果については認めるに至らなかった。一方、増殖能に対しては有意な抑制効果を見出した。このことから申請者は、キヒトデ内臓 LPC が HUVEC の増殖を抑制することによって管腔形成抑制効果を発揮するものと推察した。さらに申請者は、動脈片を使用した血管新生試験で、スルメイカ LPC がこれまで抑制効果が報告されている共役 DHA よりも微小血管の新生を抑制することを見出した。悪液質モデルマウスに対しては、スルメイカ皮由来リン脂質の投与による体重や血液生化学分析、臓器重量に対照区との明瞭な差異を確認することができなかったが、DHA-LPC 投与群においては、血漿中トリアシルグリセロールが高い傾向にあり、リポタンパク質リパーゼ (LPL) 活性の低下を認めた。よって、スルメイカ LPC 溶液をメラノーマ B16 担癌マウスに飲料形態で投与すると、悪液質がむしろ悪化する可能性が示唆された。

キヒトデ PS は 70 μ M の濃度で、 α -キモトリプシンに対する阻害率が約 47% となり、既知阻害剤のフェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) とほぼ同等の阻害率となったことから、副作用の低い阻害剤の 1 つとしての有用性が示唆された。

経口投与の際の腸管への影響を調べるために、供試リン脂質添加時の小腸上皮細胞単層膜モデルにおける経上皮電気抵抗値 (TEER 値) を測定した。その結果、スルメイカ皮 LPC および LPS、キヒトデ内臓 PE および LPS で TEER 値を有意に減少させることを認めたことから、スルメイカおよびキヒトデ内臓 LPS は TJ を開かせ、物質吸収を促進する可能性があるものと考えた。試験後、単層膜の脂肪酸組成を調べた結果、モノアシルリン脂質の添加によって DHA および EPA の組成比が有意に上昇したことから、モノアシルリン脂質はジアシルリン脂質より細胞膜中へ取り込まれやすく、細胞膜の脂肪酸組成を速やかに変化させる作用があると推察した。

妊娠ラットにスルメイカ LPC および LPS を投与し、胎児脳の DHA 組成比がコントロール群と比べて有意に高くなることを認め、さらに母親ラットの血漿および脳脂質中の DHA 組成比が LPS 投与群で高かったことから、LPS の透過促進作用により血中キロミクロン中に DHA が取り込まれ、脳に移行したものと推察した。このことから、スルメイカのリン脂質から誘導した LPS が脳に DHA を送達する上で、非常に有望な脂質形態であることを強く示唆した。

以上のように、本研究では、水産副次産物より誘導したモノアシルリン脂質が、優れた抗アレルギー作用、血管新生抑制作用を有する可能性があることを示し、また特にスルメイカの副次産物 (皮) より誘導した LPS は腸管上皮細胞単層膜において TJ を効果的に開く作用があることを示した。特に LPS は胎児脳の DHA 組成比を有意に上昇させ、DHA の送達効率が最も優れた脂質形態である可能性が高いことを強く示唆した。

このように、水産副次産物リン脂質を、モノアシル態に誘導することによってさらに有用機能が高められる場合があることを示した本研究は、今後の水産副次産物の利用に新しいみちを切り開くものである。

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。