

工業用ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> による高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の合成細川雅史\*・高橋是太郎\*  
羽田野六男\*・江木 衷\*\*Polyunsaturated Fatty Phosphatide Synthesis  
by Industrial Phospholipase A<sub>2</sub>Masashi HOSOKAWA\*, Koretaro TAKAHASHI\*,  
Mutsuo HATANO\* and Makoto EGI\*\*\* Faculty of Fisheries, Hokkaido University,  
3-1, Minato-cho, Hakodate-shi,  
Hokkaido 041\*\* Foods and Liquors Research Laboratories,  
Kyowa Hakko Co., Ltd. 4041, Ami, Ami-  
machi, Inashiki-gun, Ibaraki-ken 300-03

Phospholipids consist of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were synthesized by use of an industrial pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. Lyso-phosphatidylcholine (LPC) isolated from a commercial emulsifier, mixed fatty acids obtained from sardine oil, the concentrated sardine oil (EPA + DHA > 60%), and 99.4% EPA were used as substrates. Optimum water content was found to 13.4%/system, and optimum ratio of LPC to mixed free fatty acids was 11 : 18 in weight base. When the substrate contained free EPA + DHA over 68%, the obtained phosphatidylcholine (PC) contained more than 31% of EPA + DHA. And when the substrate was 99.4% EPA, the obtained PC contained more than 45% of EPA, indicating that more than 90% of EPA was incorporated into sn-2 position of the PC molecule. (Received Mar. 11, 1991)

機能性食品(特定保健用食品)や医薬品として $\omega$ 3系高度不飽和脂肪酸(HUFA)の利用開発が進んでいるが、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)のもつ生理活性はこれらを含む脂質の分子種形態によって異なり、EPA、DHA含有リン脂質はエチルエステルやトリグリセリドの形態のものに比べ

て、生理活性が格段に高い<sup>1)~4)</sup>ということが知られるようになってきた。また、EPA、DHA含有リン脂質はEPA、DHAが本来有する生理活性に加え、脂肪組織重量の低下<sup>5)</sup>、細胞分化誘導作用<sup>6)</sup>のように、リン脂質由来の特異的な機能をあわせもつ興味深い脂質形態でもある。さらには、仔稚魚の成長促進作用<sup>7)8)</sup>の面においても有効であると考えられている。

このような生理活性をもつEPA、DHA含有リン脂質は、水産動物脂質中に比較的多く含まれてはいるが抽出が困難なためほとんど利用されていない。

一方、主に微生物源リパーゼを用いた油脂の改質が盛んに行われている。リパーゼによる反応は温和な条件下で進行するため、従来の化学合成法では困難を伴うHUFA含有脂質の合成が、その特異性を利用することにより比較的容易に行われつつある。グリセリドに比べリン脂質の合成は困難であると言われてきたが、昨年、著者らと時を同じくして研究していたNAら<sup>9)</sup>によりリゾホスファチジルコリン(LPC)とHUFAからブタ膵臓由来のホスホリパーゼA<sub>2</sub>によって2位に特異的にHUFAを含有するリン脂質の合成が可能であることが示された。また、PERNASら<sup>10)</sup>によりヘビ毒由来のホスホリパーゼA<sub>2</sub>を用いたリン脂質の合成も最近行われた。これらは、いずれも先駆的な研究ではあるが、分散剤が有害性である点が問題として残っていた。(本研究においては分散剤にグリセロールを用い、この点を解決した。)他方、微生物由来のリパーゼを用いたエステル交換反応によるHUFA含有リン脂質の合成の試みも、戸谷ら<sup>11)12)</sup>や吉本ら<sup>13)14)</sup>、八木ら<sup>15)</sup>によって行われており、この方法の追試が各方面で活発化してきている。

本研究では、乳化剤として市販されているリゾ型リン脂質より調製したLPCとイワシ油をケン化して調製したHUFAを基質として用い、工業的に使用されているブタ膵臓由来のホスホリパーゼA<sub>2</sub>(EC3.1.1.4)によるエステル合成反応を行い、2位にHUFAを含有するリン脂質の調製について検討した。

## 1. 実験方法

## (1) 試薬

乳化剤として市販されているリゾ型リン脂質(エルマイザーA、LPC含量約40%)を協和発酵工業(株)から入手し、クロロホルム-メタノール系ケイ酸カラムクロマトグラフィーによってLPCを精製した。得られた

\* 北海道大学水産学部(〒041 函館市港町3-1-1)

\*\* 協和発酵工業(株)食品酒類研究所(〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町阿見4041)

LPC の純度は、99.1% (TLC-FID 法による) であった。

イワシ油脂肪酸は、精製イワシ油 (日本化学飼料 (株)) を終濃度 6% の水酸化カリウムでケン化して調製した。また、得られたイワシ油脂肪酸を 7 倍量の 95% アセトンに溶解後、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-40^{\circ}\text{C}$ 、 $-60^{\circ}\text{C}$  の順に冷却して飽和脂肪酸を除去し、さらに 100% アセトンに溶解して 4 N メタノール性水酸化カリウムを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$  で冷却後、過剰の溶液を中和して溶媒を留去することにより EPA, DHA を濃縮して、EPA 濃度が 42.2%, DHA 濃度が 25.9% のイワシ油脂肪酸も併せて調製した。EPA 標品 (純度 99.4%) は出光石油化学 (株) より購入した。ブタ膵臓由来のホスホリパーゼ  $A_2$  は協和発酵工業 (株) から入手し、透析後、真空凍結乾燥したものを用了。

#### (2) 反応条件

LPC (純度 99.1%) 110 mg と脂肪酸 180 mg をグリセロール (nacalai tesque 蛍光分析用) 5 ml に分散後、ホスホリパーゼ  $A_2$  60 mg (Protein 38.8%) を 6 mM 塩化カルシウム含有 200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解したものを加えて、ホスファチジルコリン (PC) の生成量におよぼす反応系の水分量の影響について検討した。

また、LPC 110 mg に対し脂肪酸量を 30 mg から 600 mg まで変えて、PC の生成量におよぼす基質 LPC と脂肪酸の最適比を求めた。いずれの場合も、 $25^{\circ}\text{C}$ 、1500 rpm にて長径攪拌子により攪拌しながら 48 時間反応を行い、Folch 溶媒 (クロロホルム-メタノール (2:1, V/V) 溶液に、0.2 容の水を加える。) で脂質成分を抽出した。PC と LPC の回収は、抽出した脂質成分を Sep-Pak cartridge (Waters Associates, Inc.) に供し、クロロホルムによって脂肪酸画分を除いた後、メタノールによっておこなった。

#### (3) 脂質組成および脂肪酸組成の分析

回収したリン脂質画分をクロマトロッド SIII (ヤトロン (株)) に供し、クロロホルム-メタノール-水 (65:25:4, V/V) で展開後、TLC-FID 法 (イヤトロスキヤン TH-10 型, ヤトロン (株)) によって脂質組成を分析した。また、調製用 TLC プレート (Silica gel 60, E. Merck) で PC と LPC を分画して回収し、それらの画分の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー (Unisol 3000,  $3\phi \times 4\text{ m}$ , ガラスカラム) で分析した。

#### (4) 合成反応における位置特異性の検討

上記の方法で回収した PC を、エーテル 5 ml に溶解

して共検試験管に入れ、酵素液 0.5 ml を加え 30 秒間攪拌した後、 $37^{\circ}\text{C}$  に 2 時間放置した。反応後、減圧濃縮し Folch 溶媒で脂質成分を回収した。回収した脂質成分は、調製用 TLC プレート (Silica gel 60, E. Merck) を用いて遊離脂肪酸画分 (2 位由来) ならびに LPC 画分を回収し、脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで分析した。

## 2. 結果および考察

### (1) 至適水分量

ホスホリパーゼ  $A_2$  による LPC から PC への合成反応を効率よく行うために、至適水分量について検討した。その結果、Fig. 1 に示すように、微生物源リパーゼによるグリセリド合成の場合と同様、反応系の水分量に大きく影響されることが示された。すなわち、水分量が多くなると合成反応の逆反応である加水分解反応が促進され、逆に水分量が少なすぎると合成反応の効率が低下した。反応系の水分量が 0.5 ml (反応系中 13.4%) のとき、PC の合成率が 13.8% と最も高い値を示し、水分量が 0.4 ml、0.6 ml のときには PC の合成率がそれぞれ 7.2%、6.9% と低下した。このことより、PC から LPC 合成反応の至適水分量は 0.5 ml であると判断し、以後この条件により合成反応の検討を行った。

### (2) 至適基質比

ホスホリパーゼ  $A_2$  によるエステル合成反応の基質である LPC と脂肪酸の濃度比の違いによる PC 合成への影響について検討した。LPC を 110 mg と一定にし、脂肪酸の添加量を変化させて PC の合成を行った。Fig. 2 に示すように、脂肪酸量が 180 mg までは脂肪

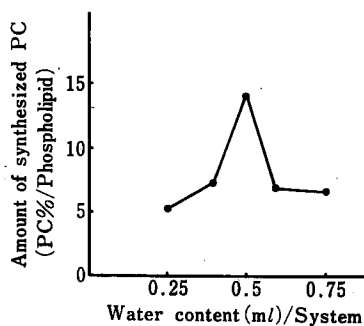


Fig. 1 Effect of water content on PC synthesis by phospholipase  $A_2$

LPC\* and sardine oil fatty acid mixture were used as substrates.

\*LPC: Lysophosphatidylcholine

酸の添加量とともに PC の合成率が急激に増加したが、脂肪酸量が180 mg 以上では PC の合成率にあまり大きな変化がみられなかった。

- (3) 脂肪酸組成の異なる混合脂肪酸を基質としたときの PC 合成の比較  
EPA, DHA 含量の異なる種々の混合脂肪酸を基質と

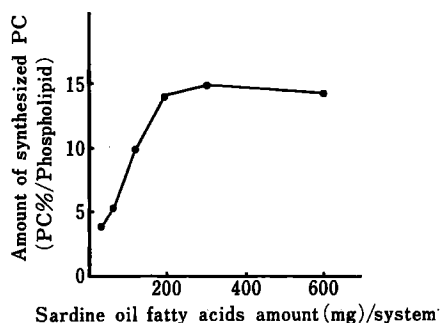


Fig. 2 Effect of fatty acid amount on PC synthesis by phospholipase A<sub>2</sub>  
LPC and sardine oil fatty acid mixture were used as substrates.

して、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> による PC の合成について比較検討した。基質として用いた LPC と脂肪酸の脂肪酸組成を Table 1 に、PC の合成率とその脂肪酸組成を Table 2 に示す。PC の合成率は、イワシ油脂肪酸を基質として用いた場合は 13.8%、その濃縮物を用いた場合には 14.8%、EPA 標品を用いた場合は 15.9% となり、HUPA 含量が多いほど増大した。

基質 LPC の脂肪酸組成は、リノール酸が 50.5% と多く、EPA は 0.2%、DHA は含まれていないのに対し、合成された PC 中には EPA, DHA が含有されていた。すなわち、合成された PC 中の EPA, DHA 含量は基質として用いた脂肪酸中の EPA, DHA の濃度に影響されており、イワシ油脂肪酸 (EPA 14.0% DHA 8.9%) を基質として用いた場合は、合成された PC 中の EPA, DHA 含量がそれぞれ 6.0%、4.0% であったのに対し、EPA を 42.2%、DHA を 25.9% 含む脂肪酸を基質として用いた場合には、合成された PC 中の EPA, DHA 含量はそれぞれ 20.1%、11.2% を占めていた。また、EPA 標品 (純度 99.4%) を基質として用いた場合は、合成された PC 中の EPA 含量が 45.1% にもなり、合成された PC 中の脂肪酸含量は、基質として用いた脂肪酸と LPC の脂肪酸の濃度の和の

Table 1 Fatty acid composition of sardine oil fatty acid mixture and LPC prepared as substrates for the PC synthesis using phospholipase A<sub>2</sub>

Substrate	Fatty acid (%)					
	16:0	18:0	18:1	18:2	20:5	22:6
LPC	23.6	6.9	11.3	50.5	0.2	—
Fatty acid mixture *	15.2	4.0	15.2	2.0	14.0	8.9
EPA, DHA concentrated fatty acid mixture *	0.5	4.4	1.9	0.9	42.2	25.9

\* Fatty acid mixtures prepared from sardine oil

Table 2 Fatty acid composition of synthesized PC by phospholipase A<sub>2</sub>

Substrate	Yield (%)**	Fatty acid (%)					
		16:0	18:0	18:1	18:2	20:5	22:6
Fatty acid mixture *	13.8	19.8	4.8	13.3	29.3	6.0	4.0
EPA, DHA concentrated fatty acid mixture *	14.8	12.6	5.2	7.4	28.0	20.1	11.2
Purified EPA	15.9	12.3	3.4	6.5	26.4	45.1	—

\* Fatty acid mixtures prepared from sardine oil

\*\* PC (%) / Phospholipid

約半分を占めた。これは、LPC の 2 位の位置が水酸基であることやホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の位置特異性から、2 位の位置にはほぼ理論上の上限近くまで特異的に基質脂肪酸が導入されたためと考えられる。

#### (4) 合成反応における位置特異性の検討

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> における位置特異性を確かめるため、合成した PC を再びホスホリパーゼ A<sub>2</sub> を用いて加水分解し、遊離脂肪酸画分と LPC 画分の脂肪酸組成を分析した。Table 3 に示したように、PC 中に含まれる EPA と DHA のほとんどが遊離脂肪酸として加水分解されている。すなわち、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> を用いた LPC と脂肪酸による合成反応においても、加水分解反応と同様に、2 位の位置に特異性を示すことが明らかになった。

HUFA 含有リン脂質の種々の優れた機能は、主に 2 位の位置に HUFA が結合しているときに発現するといわれている<sup>16)</sup>。通常のエステル交換反応では 2 位に HUFA を導入するといった観点からは能率が悪いといわざるを得ないが、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の利用によりこの点の改善がはかれることが本研究により明らかになった。

### 3. 要 約

乳化剤として市販されているリゾ型リン脂質より調製した LPC、ならびにイワシ油をケン化して調製した HUFA を基質として用い、ブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 触媒による HUFA 含有 PC の合成を行った。

Table 3 Fatty acid composition of sn-1 and sn-2 of synthesized PC by phospholipase A<sub>2</sub>

Fatty acid	Synthesized PC		
	Total	sn-1	sn-2
16:0	19.5	23.1	14.6
18:0	6.0	7.2	3.9
18:1	12.4	11.4	13.6
18:2	32.8	51.5	8.9
20:5	8.5	0.2	16.0
22:6	4.9	—	9.5

合成された PC の脂肪酸の濃度は、基質として用いた脂肪酸の濃度に影響され、2 位の位置に選択的に導入されることが明らかになった。

### 文 献

- 1) 常磐 繁・金澤昭夫：日特公，昭 58-38215. (1983).
- 2) 常磐 繁・金澤昭夫：日特公，昭 63-53968. (1988).
- 3) 矢澤一良：マリンバイオ，第 1 版，松永 是監修（シーエムシー，東京）p. 99 (1989).
- 4) 矢澤一良：月刊フードケミカル，1990，No. 12，62.
- 5) 矢澤一良・渡部和良・石川千夏子・増沢康男・山口宏二・近藤 聖・江 孟・木村修一：脂質生化学研究，32，291 (1990).
- 6) 小田島庸夫・甲野裕之：平成元年度 水産物健康性機能有効利用開発研究の成果の概要，水産庁研究部研究課，p. 11 (1990).
- 7) KANAZAWA, A., TESHIMA, S. and SAKAMOTO, M.: *Aquaculture*, 50, 39 (1985).
- 8) 金澤昭夫・手島新一・福永丈人・平田龍善・木村知巳：平成二年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，p. 115 (1990).
- 9) NA, A., ERIKSSON, C., ERIKSSON, S.G., OSTERBERG, E. and HOLMBERG, K.: *J. Amer. oil. Chem. Soc.*, 67, 766 (1990).
- 10) PERNAS, P., OLIVIER, J.L., LEGOY, M.D. and BEREZIAT, G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 644 (1990).
- 11) 戸谷洋一郎・渡部 健・原 節子：第 44 回日本栄養・食糧総会講演要旨集，p. 77 (1990).
- 12) 原 節子・渡部 健・戸谷洋一郎：第 29 回油化学討論会・油化学発表会講演要旨集，p. 189 (1990).
- 13) YOSHIMOTO, T., NAKATA, T., YAMAGUCHI, S., FUNADA, T., SAITO, Y. and INADA, Y.: *Biotechnol. lett.*, 8, 771 (1986).
- 14) 稲田裕二：日特公，昭 63-105686 (1988).
- 15) YAGI, T., NAKANISHI, T., YOSHIZAWA, Y. and FUKUI, F.: *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 23 (1990).
- 16) 松本啓次郎・森田育夫・日比野英彦・平野次郎・室田誠逸：生化学，61，1078 (1989).

(平成 3 年 3 月 11 日受理)