



Title	高度不飽和リン脂質の生理機能と酵素剤による合成
Author(s)	高橋, 是太郎
Citation	食用加工油脂技術研究会会報, 第80回, 19-31
Issue Date	1998-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49726
Type	journal article
File Information	shokuyo80_19.pdf



II. 高度不飽和リン脂質の生理機能と酵素剤による合成

北海道大学水産学部

高橋 是太郎

はじめに

アラキドン酸、EPAやDHAなど生体機能の制御に関連する高度不飽和脂肪酸は、それらがリン脂質になったときを起点として生理作用を発動し始める。一方、リン脂質は元来その構成脂肪酸にかかわらず、油脂や脂溶性ビタミンの消化、吸収を助けるとともに、それ自体もコリン、イノシトール、リンの供給源となる¹⁾。また、血中コレステロールをはじめとする血清中の脂質量を制御するなど、肝臓や胆のうの代謝機能にも深く関わっている。

ここでは特にリン脂質のうちでDHAやEPAをアシル基にもつ分子種群にしぼって、それらの高次機能について考えるとともに、そのようなリン脂質を酵素剤を用いて合成するには何が反応率を大きく左右するかについても考察する。

1. 高度不飽和リン脂質の生理機能

1-1 レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) に対する反応性低下作用

LCATはホスファチジルコリン (PC) の *sn*-2の脂肪酸をコレステロールにエステル変換させ、コレステロールエステルを生成する酵素である。図1に示すように、*sn*-2位DHA結合型PC (図では *sn*-1位がパルミトイルでPDPCと略記) を構成成分とする高密度リポタンパク質 (HDL) 類似合成粒子は、POPC (*sn*-1位がパルミトイル、*sn*-2位がオレイル)、PLPC (同 *sn*-2位がリノレオイル)、PAPC (同 *sn*-2位がアラキドニル) よりもLCATに対する反応性が低く、最もコレステロールエステルの生成量が少なかった²⁾。さらに、合成粒子のPC組成比を一定にして、POPC、PEPC、PDPC間でLCATにより加水分解されたPC分子種量を調べると、図2のようにPDPCが最も分解を受けにくかった²⁾。

このように、血液リン脂質の *sn*-2位の不飽和度が増すと、LCATの反応性が低下し (LCATの活性自体には変化がない)、これによって血中コレステロールエステル含量も低下するといわれている。また、コレステロールエステル含量の低下は、動脈硬化のリスクファクターの一つをある程度軽減できることにつながる。

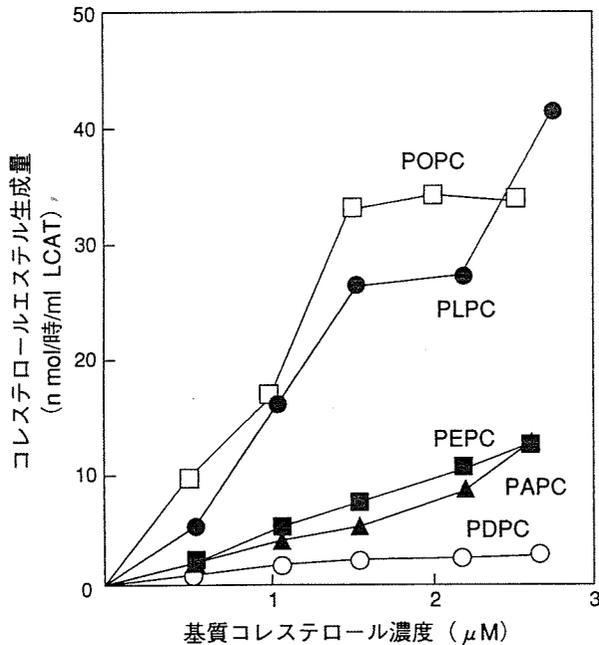


図1. 各種リン脂質分子種のHDL類似合成粒子に対するLCATの反応性²⁾

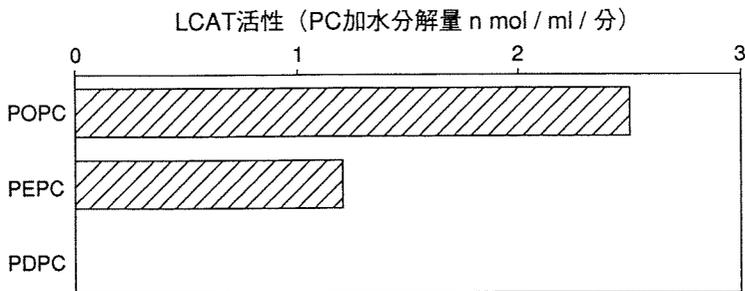


図2. POPC, PEPC, PDPCを構成成分とする合成粒子を基質としたときのLCATによる加水分解速度²⁾

1-2 超低密度リポタンパク質 (VLDL) 及び低密度リポタンパク質 (LDL) に対する間接的酸化防止作用

水溶性のラジカル発生剤をラットの腹腔内に注射することによって酸化ストレス負荷試験を行った結果、ラードを給餌 (フィードオイルの20%) した群では、図3のようにVLDLの過酸化度が高くなった³⁾。これに対して、高度不飽和リン脂質を含む給餌群では、HDLの過酸化度が高まった (同図)。HDLは過酸化脂質を肝臓に運搬する役割を果たすことから、高度不飽和リン脂質はVLDLや

LDLへの過酸化脂質の蓄積を間接的に抑える作用があると推察される。過酸化LDLはマクロファージにより、貪食され、大量の過酸化脂質を蓄積したマクロファージはやがて泡末化して動脈壁に付着する過程を経る。したがって、高度不飽和リン脂質は、LDLの過酸化を防ぐというプロセスによりアテローム性動脈硬化の進行を抑制していることが考えられる。ちなみに高度不飽和リン脂質給餌群は、血漿中の全過酸化度を低く抑えていた。このリン脂質はまた、血中のLDL量の明確な低下作用があった³⁾。

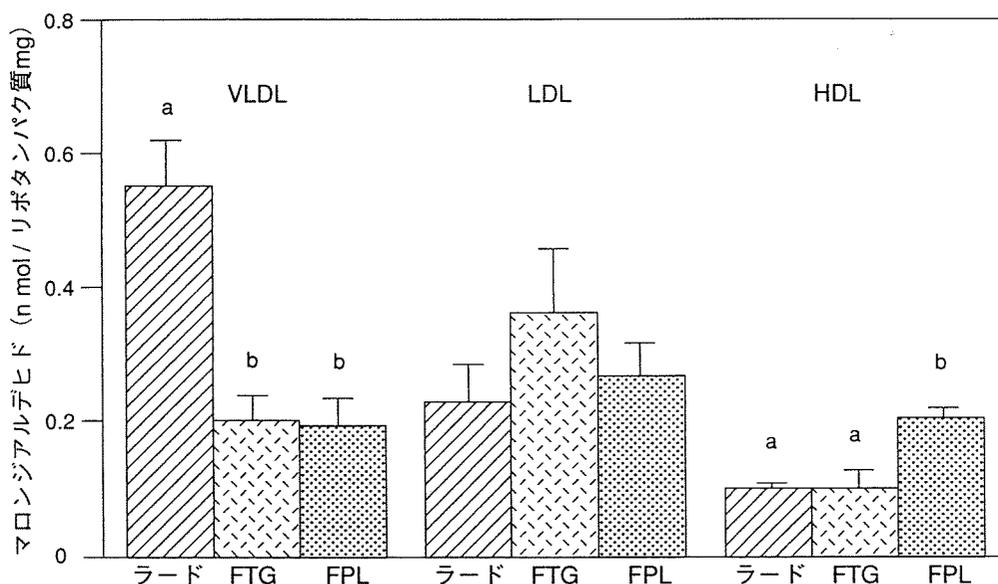


図3. 各種餌料で飼育した酸化ストレス負荷ラット*のリポタンパク質中のチオバルビツール酸試薬反応生成物量 (n=3)³⁾

添字は $p < 0.05$ のときの有意差の有無を表す。

*水溶性ラジカル発生剤として2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorideを腹腔内に注射、ラットには6週齢Wistar系雄を用い、1群7匹ずつで4週間飼育。

フィードオイルの20%をそれぞれ、ラード：ラードに置き換えた群；FTG：水産トリグリセリドに置き換えた群；FPL：水産(高度不飽和)リン脂質に置き換えた群を示す。

1-3 赤血球変形能の改善作用

一般に、血液粘度は血球の変形能によって大きく変わることが知られている。細胞レオロジー測定装置により高度不飽和リン脂質の赤血球変形能改善効果を検討した結果(図4)、高度不飽和リン脂質を取り込ませた赤血球は何れも変形能が向上し、特にsn-2位にDHAを結合するリゾ型PCが最も優れた改善効果を示した⁴⁾。

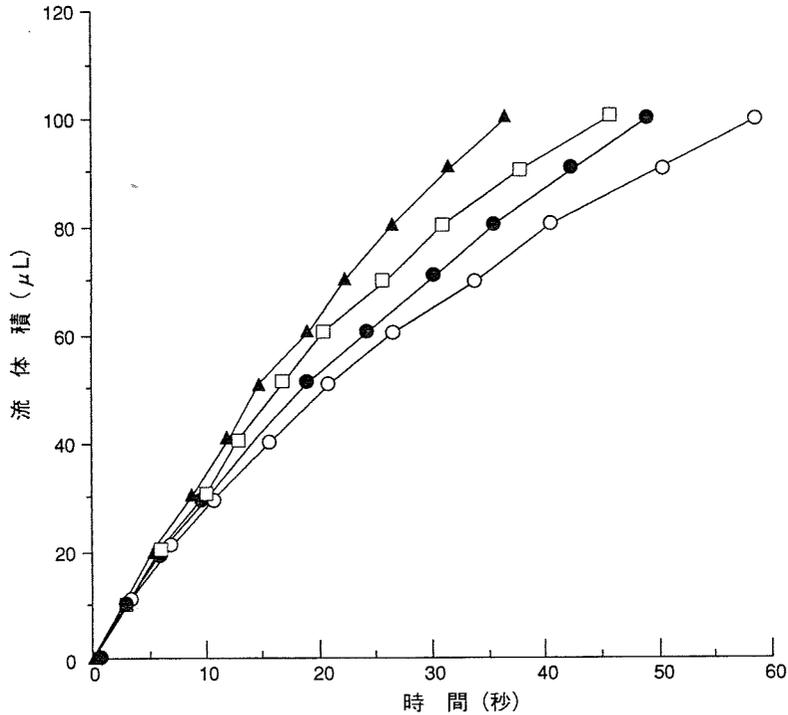


図4. 細胞レオロジー測定装置による各種リン脂質処理赤血球懸濁液のフローカーブ⁴⁾

- ▲ sn-2位にDHAを結合するリゾ型リン脂質
- sn-2位にDHAを結合するジアシル型リン脂質
- 大豆リン脂質 (ジアシル型)
- リン脂質未処理 (対照区)

1-4 制ガン剤の制ガン効果を促進する作用

マウス白血病細胞を種々の不飽和脂肪酸と共に培養し、細胞膜の脂質が十分に置換されたのを確認したのち、アドリアマイシンなどの制ガン剤を添加すると、図5に示す如くEPAとDHA、特に後者で制ガン効果の促進が認められた^{5, 6)}。一方、ヒトの前骨髄性白血病細胞を主々のリン脂質分子種と共に培養し、レチノイン酸 (分化誘導による制ガン効果があるビタミンA同族体) を添加すると、図6にみられるようにDHA結合型PEで、明らかな分化誘導 (脱ガン) 効果の促進作用が認められた (PCでもやや効果は弱いと同様)⁷⁾。一般に、遊離脂肪酸よりもリン脂質の方が細胞に対し親和性が高く、水系では酸化安定性も高いと考えられるので、制ガン効果を高める物質としてはリン脂質の方が多くの点でより望ましいといえる。

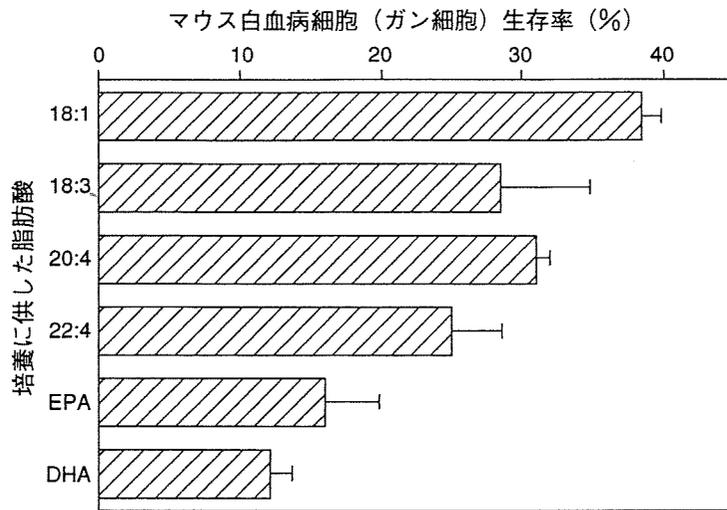


図5. マウス白血病細胞のアドリアマイシン感受性に対する各種脂肪酸添加の影響^{5, 6)}

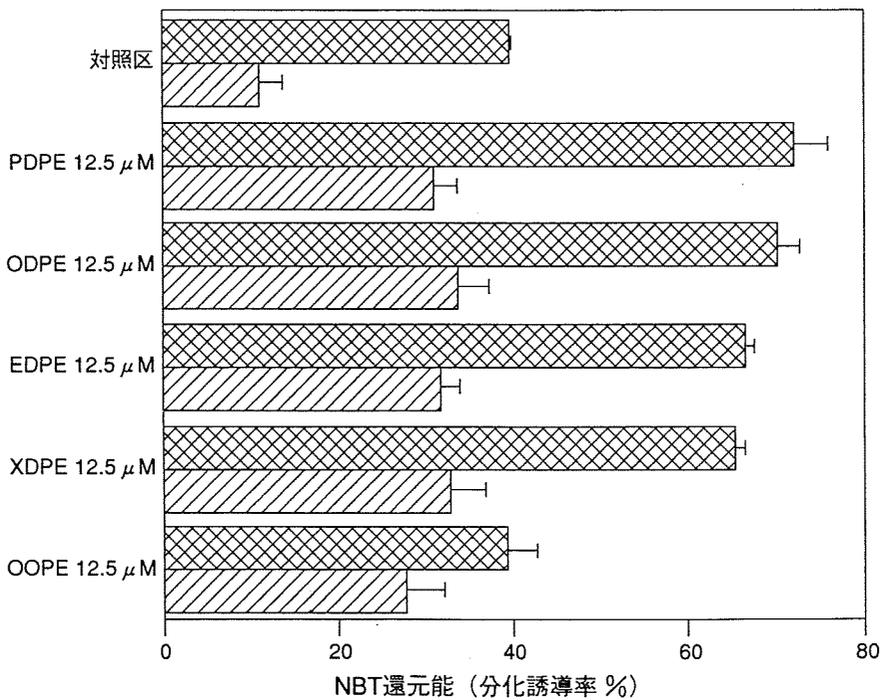


図6. レチノイン酸に対するPE分子種の分化誘導促進作用⁷⁾

 レチノイン酸 100nM 添加
 レチノイン酸 無添加

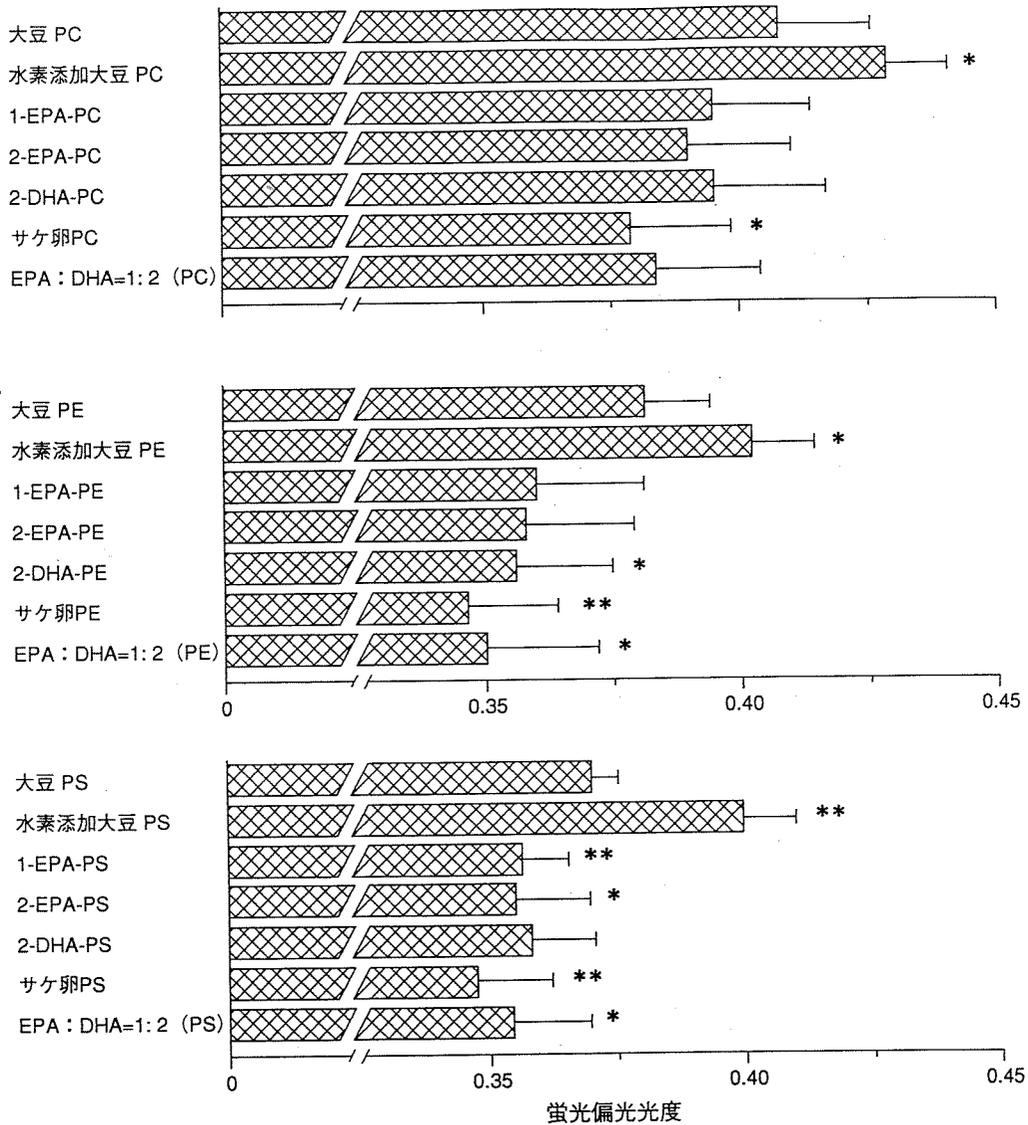


図7. 各種リン脂質で処理した赤血球膜の流動性 (n=5)⁸⁾

※蛍光偏光光度が低いほど膜流動性が高い。

(*) : それぞれ大豆リン脂質に対し、 $p < 0.05$ のときの有意差の有無 (t-検定)

(**) : それぞれ大豆リン脂質に対し、 $p < 0.01$ のときの有意差の有無 (t-検定)

1-EPA-PCとは、sn-1位にEPAを結合するPCを表す (以下同様)。

EPA : DHA=1 : 2(PC)とは、sn-2位におけるEPAとDHAの比が1 : 2のPCで、サケ卵を模した組成のPCを表す (以下同様、但しPEとPSは何れもPCのホスファチジル基転移反応によって調製したものである)。

以上のようにDHA、あるいはそれを含むリン脂質の薬物効果促進能（薬物に対する感受性の増大）は、DHAの細胞膜への取り組みに由来する膜流動性の増大によるものとしてしばしば説明される。事実、赤血球の例（図7）にみられるように、DHAやEPAを取り込んだ赤血球膜の流動性は向上する（図では、蛍光偏光消光の度合いが大きいほど、すなわち蛍光偏光光度が弱いほど、膜流動性が高いことを示す）⁸⁾。また、イオン透過性のみならず、非電解質の透過性の向上がsn-2位にDHAを結合するリン脂質が膜中に増えることによって起こることも知られている（図8）⁹⁾。一方、細胞の核内レチノイドXレセプターのmRNA発

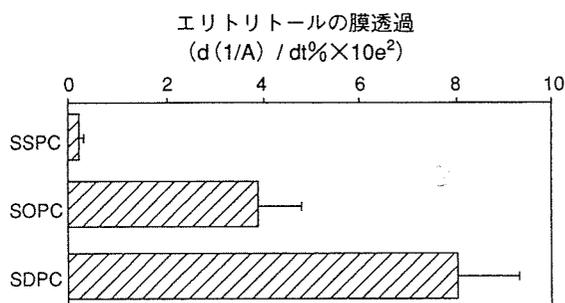


図8. リン脂質分子種二重膜に対するエリトリトールの透過性⁹⁾

S: ステアロイル、他は図1と同様の略記。

現量がsn-2位にDHAを結合するPEの添加によって増大することがHL-60細胞で既に観察されており（投稿中）、さらにはプロテインキナーゼCの阻害剤添加によって分化誘導効果が低下すること（投稿中）から、このリン酸化酵素の関与も示唆されている。おそらく、上記のすべての変化が連動あるいは互いに関連した形で、細胞の薬物に対する感受性を高めているのであろう。

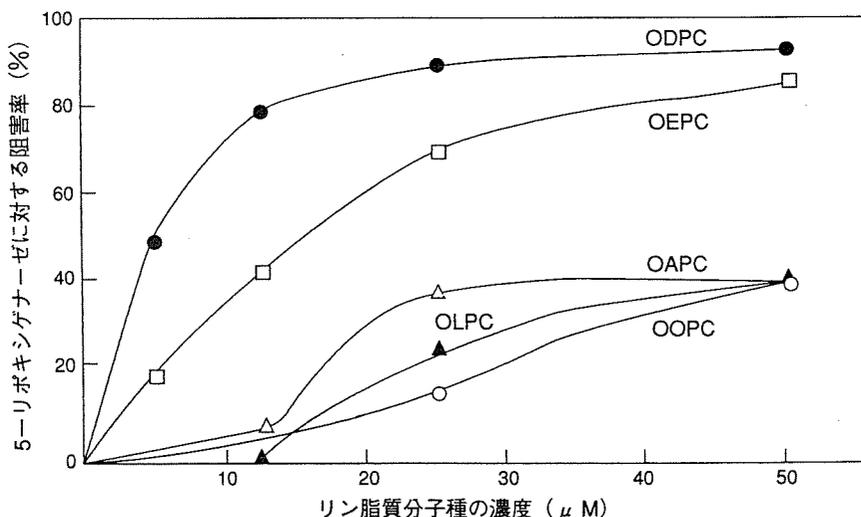


図9. 各種リン脂質分子種の5-リポキシゲナーゼ活性阻害¹⁰⁾

1-5 DHA結合型リン脂質の抗炎症作用

OOPC、OLPC、OAPC、OEPCおよびODPCの5-リポキシゲナーゼに対する活性阻害の程度を比較すると、OD > OE > OA > OL > OOの順になる(図9)¹⁰⁾。このとき、ODPCおよびOEPCは約90%の活性阻害を示すのに対し、OAPCになると約40%まで活性阻害が弱まる。5-リポキシゲナーゼの活性阻害が高まると、アラキドン酸の代謝産物である炎症やアレルギーのメディエーター関連ロイコトリエンの産生が抑制され、その結果として炎症が抑制されるものと推察されている。

1-6 EPA結合型リン脂質の脂肪組織重量低減効果

海洋細菌SCRC-2738(相模中研分離株)より得たsn-2位にEPAを結合するPEとホスファチジルグリセロールの混合物は、ラットの脂肪貯蔵組織を顕著に減少させる効果があった¹¹⁾。表1に示すように、このリン脂質混合物の投与(投与脂質の半分置き換え)により、腎臓周囲の脂肪組織を40%近く、また副睾丸の脂肪組織を26%以上減少させる効果が認められている。

表1. ラットへのEPA結合型リン脂質投与による組織重量の変化 (n=4~5)¹¹⁾

	コントロール群	EPAリン脂質投与群
肝臓	17.00 ± 1.43	17.42 ± 1.54
腎臓	2.71 ± 0.15	2.92 ± 0.15
肺	2.02 ± 0.26	2.32 ± 0.27
心臓	1.38 ± 0.10	1.35 ± 0.07
睾丸	2.74 ± 0.46	2.47 ± 0.71
脂肪組織(腎臓周辺)	3.58 ± 1.05	2.21 ± 0.51
	(減少率 -38.3%)	
脂肪組織(副睾丸)	4.20 ± 0.38	3.09 ± 0.29
	(減少率 -26.4%)	
脳	3.35 ± 0.15	3.31 ± 0.12

2. 高度不飽和リン脂質の合成

酸クロリド等を用いたグリセロリン脂質の合成は以前より行われてきたが、このような化学合成は、DHAやEPAを導入基質に用いた場合、著しい着色にみられるような副反応をともなう。これに対し、酵素剤を用いた所望リン脂質の合成法は、反応条件が温和であり、衛生上問題となるような副反応はほとんど

起こらない。しかし、用いる酵素剤が比較的高価なことや、反応率が低いことが製品化に至らない大きなネックになっている。一般に、加水分解酵素を用いて所望化合物を合成する場合、僅かでも水分が共存していると必ず副反応あるいは逆反応としての加水分解反応の進行がある程度は避けられない。反応系の水分を徹底的に除くことは可能であるが、この場合は酵素タンパク質そのものに水和している活性発現のためのコンホメーション維持に貢献している水をも奪うことになる。つまり、完全な水分の除去は酵素機能の消失を意味する。よって水分を除去する場合は、加水分解の基質にはなり得ず、かつ、水に代わって酵素タンパク質が活性発現の高次構造をとれるのを助ける物質、すなわち (water mimics) の応用が必要となる。このような物質は、水同様高い誘電率及び多点水素結合形成能を有しており、ポリアルコールやアミド類がこれに該当する。一般に、water mimicsを応用するには、水分の正確な制御が行われなければならない。したがって、単なる“水分量”で反応系中の水分を規定することは不適切であり、水分活性による酵素剤の水分制御が不可欠となる。

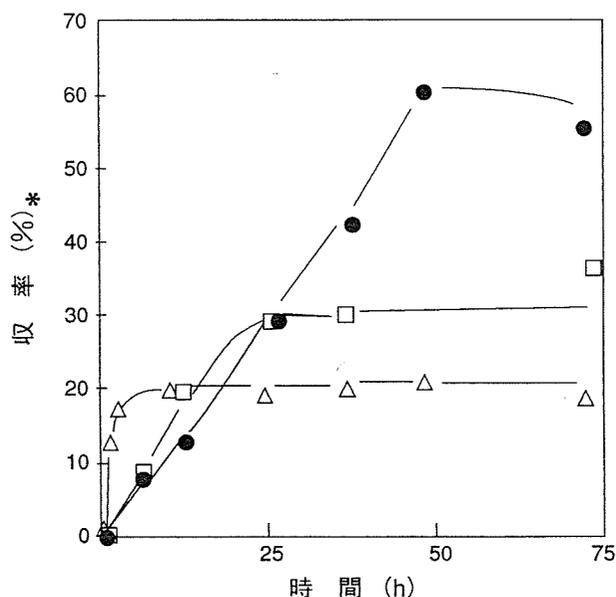


図10. ホスホリパーゼA₂剤によるリゾ型リン脂質のエステル化¹²⁾

反応条件：ホスホリパーゼA₂ 23mg, リゾPC 110mg,
EPA 180mg, グリセロール 5500mg, 3 μmol CaCl₂, 25°C,
800-1000rpmで攪拌。水分として0.2M tris-HCl pH8.0を使用。

*収率(%)=合成されたPC/基質リゾPC×100 (W/W)

—△— tris-HCl緩衝液 0.5 mL —□— tris-HCl緩衝液 0.2 mL

—●— ホルムアミド 0.5mL

2-1 リン脂質の *sn*-2位に高度不飽和脂肪酸を導入する反応

両性イオン性界面活性剤（乳化剤）として、市場に出ている大豆由来リゾPCおよびDHA（遊離型）を基質として、ホスホリパーゼA₂酵素剤によるエステル合成反応をグリセロール中で行うことができる。このとき、水分を添加する代わりにホルムアミドを用いると、図10にみられるように水分添加による収率低下を防ぐ上で有効である¹²⁾。

2-2 リン脂質の *sn*-1位に所望の脂肪酸を導入する反応

一方、*sn*-1位のアシル基を所望の脂肪酸に置き換える *n*-ヘキサン中のアシドリシスにおいては、図11のようにプロピレングリコールと水分の混合物の適量添加が収率と導入率の両立を図る上で有効である¹³⁾。このとき、プロピレングリコールと水分の混合物の添加前の段階において水分は可及的に除去されていないなければならない。

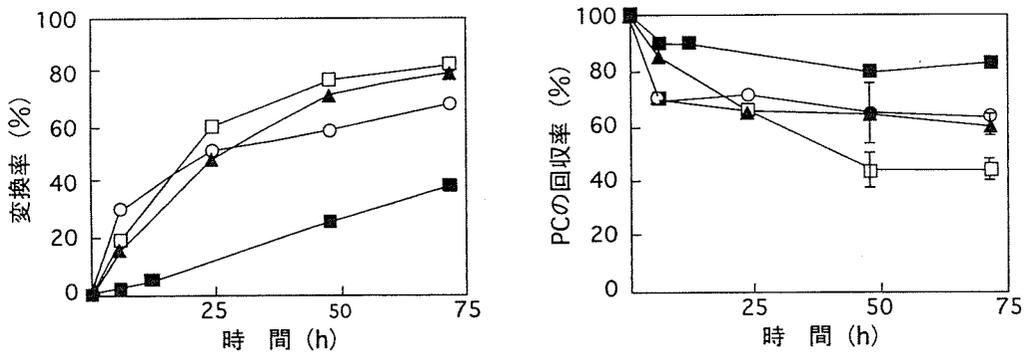


図11. リパーゼ剤による大豆リン脂質のアシドリシス¹³⁾

反応条件：Lipozyme IM-60（リパーゼ剤）23mg，大豆PC 10mg，
EPA 60mg，*n*-ヘキサン 0.5mL，40℃，75ストローク/分で振とう。

—□— 水 1 μ L —○— プロピレングリコール 1 μ L
—■— 無添加 —▲— プロピレングリコール+水 (1:1 v/v) 1 μ L

以上のように、water mimicsは加水分解酵素の応用によって所望の高度不飽和リン脂質を合成する場合に有効であるが、酵素の活性発現に必要な水分をすべて代替できる訳ではない。先のエステル合成反応では、分散媒として用いたグリセロール中の水分（0.15%）がこの役割を担っていると考えられる。

2-3 DHA結合型リン脂質を含むリン脂質混合物のDHAの組成比を向上させる反応

DHA強化卵黄のレシチンのように、DHAを既にある程度を含むリン脂質中のDHA組成比を上げるには、厳密な水分活性制御条件下での部分加水分解反応が有効である。図12に示すように、リパーゼ剤の水分活性を中間水分活性とし、*n*-ヘキサン溶液中の反応でDHAを11%含むリン脂質から比較的容易にDHAを35%以上含むリン脂質を得ることができる¹⁴⁾。このようにして得られたリン脂質は、 β -リゾ型リン脂質を主成分とするが、*sn*-1位と2位双方にDHAを結合するリン脂質もこの中に少量含まれていると考えられる。 β -リゾ型リン脂質は α -リゾ型リン脂質ほど生体膜を脆弱化せず（投稿中）、生体親和性が高いと予想されることから、今後注目してよい素材の一つであるといえる。

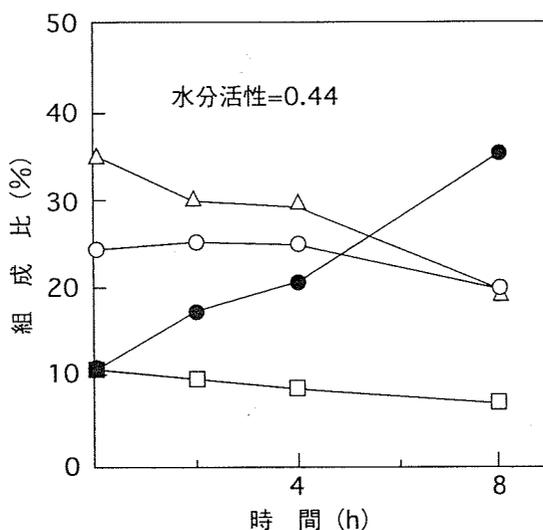


図12. DHA強化卵黄レシチンのLipozyme IMによる部分加水分解反応に及ぼすリパーゼ剤の水分活性の影響¹⁴⁾

- △— 反応中のパルミチン酸の組成比の変化
- 反応中のオレイン酸の組成比の変化
- 反応中のステアリン酸の組成比の変化
- 反応中のDHAの組成比の変化

おわりに

高度不飽和リン脂質は、別名水産リン脂質とも呼ばれる。事実、スルメイカの外殻膜には、DHAを30%以上も含むリン脂質が豊富に含まれており、肝すい臓の袋にもDHAを25%前後含むリン脂質が組織100g当たり700mg以上含まれて

いる。このほか、産卵回帰中の河川遡上シロサケ（川ブナ）の筋肉にもDHAを37%前後も含むリン脂質が筋肉100g当たり650mg前後含まれており、リン脂質が多いといわれるシラコよりもDHA組成比は高い。川ブナ筋肉の全脂質中35～40%がリン脂質であることを考え併せると、川ブナの利用価値は特に注目値する。このようなリン脂質は、純度を問わなければ組織重量の数倍量のエタノールでホモジナイズ後遠心分離することにより、上層に比較的容易に得ることができる。それにもかかわらず、現在は川ブナを含め、上記の水産物組織はほとんどすべて生ゴミとして焼却または処分場への埋め立て処理に付されているのが実状である。現在問題視されている環境負荷や少なからぬ廃棄処理コストの負担があるにもかかわらず、水産リン脂質となり得る水産資源が利用に振り向けられていないのは、これらがすべて廃棄物と位置づけられているために、鮮度管理が全くなされていないこと、集荷の手間、そして何よりも水産リン脂質の機能が十分に認知されていないからである。

先にも述べたように、高度不飽和リン脂質は、副作用をとまなわないうで生体膜や脂溶性情報伝達物質の受容体の状態を変化させることができる大きな可能性を持った生体親和性の高い素材である。農学、薬学、生理学をはじめとするあらゆる関連分野の連携で、今後高度不飽和リン脂質の機能解明が進むことを期待する。

文 献

- 1) D.J. Canty, S.H. Zeisel, *Nutr. Rev.* 52, 327(1994).
- 2) J.S. Parks, T.Y. Thuren, J.D. Schmitt, *J. Lipid Res.* 33, 879(1992).
- 3) O. Mori, T. Suzuki, K. Takama, in *Abstracts Book1*, XV International Congress of Nutrition, Adelaide, 1993, p.308.
- 4) 小野雅代, 細川雅史, 高橋是太郎, 井上良計, ヘモレオロジー研究会誌1, 7 (1998).
- 5) C.P. Burns, A.A. Spector, *Biochem. Biophys. Acta* 888, 10(1987).
- 6) C.P. Burns, *Cancer Invest.* 6, 439(1988).
- 7) K. Tochisawa, M. Hosokawa, H. Kurihara, H. Kohno, S. Odashima, K. Takahashi, *J.Jpn.Oil Chem.Soc.* 46, 383(1997).
- 8) M. Nojima, M. Hosokawa, K. Takahashi, M. Hatano, *Fisheries Science* 60, 729 (1994).
- 9) W. Stillwell, W. Ehringer, L.J. Jenks, *Lipids*, 28, 103(1993).
- 10) K. Matsumoto, I. Morita, H. Hibino, S. Murota, *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 49, 861(1993).

- 11) K. Yazawa, K. Watanabe, C. Ishikawa, K. Kondo, S. Kimura, in *Industrial Applications of Single Cell Oils*, edited by D.J. Kyle and C. Ratledge, American Oil Chemists' Society, Champaign, 1992, p.29.
- 12) M. Hosokawa, K. Takahashi, Y. Kikuchi, M. Hatano, *J.Am.Oil Chem.Soc.* 72, 1287(1995).
- 13) M. Hosokawa, K. Takahashi, N. Miyazaki, K. Okamura, M. Hatano, *J.Am.Oil Chem.Soc.* 72, 421(1995).
- 14) M. Ono, M. Hosokawa, Y. Inoue, K. Takahashi, *J.Am.Oil Chem.Soc.* 74, 1415 (1997).