



Title	高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の酵素的合成と生理機能に関する研究
Author(s)	細川, 雅史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	乙第4995号
Issue Date	1996-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.11501/3112184">https://doi.org/10.11501/3112184</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/51350">https://hdl.handle.net/2115/51350</a>
Type	doctoral thesis
File Information	000000297376.pdf



主 論 文

高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の  
酵素的合成と生運機構に関する研究

細 川 雅 史

平成8年

①

主 論 文

高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の  
酵素的合成と生理機能に関する研究

細 川 雅 史

平 成 8 年

## 目次

	頁
緒言	----- 1
第1章 酵素反応による高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の合成	----- 8
第1節 ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> によるリン脂質 <u>sn</u> -2位への高度不飽和脂肪酸の導入	
1. 高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の合成反応条件の検討	----- 9
2. エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸結合型リン脂質の合成	----- 19
第2節 固定化リパーゼによるリン脂質 <u>sn</u> -1位の脂肪酸のエステル交換反応	----- 34
第2章 高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質分子種の酵素的合成反応における必須水分代替物の応用	----- 46
第1節 ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> のエステル合成反応における必須水分代替物の応用	----- 48
第2節 リパーゼエステル交換反応における必須水分代替物の応用	----- 59
第3節 必須水分代替物の利用による高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質分子種の合成	----- 69
第3章 ヒト赤血球の膜流動性及び変形能におよぼす高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の影響	----- 78
第1節 ヒト赤血球に対するリン脂質と蛍光試薬の処理条件及び反応性の検討	

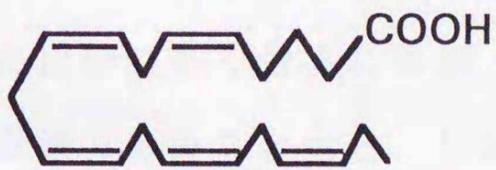
1. リン脂質及び蛍光試薬の処理条件の検討	----- 7 9
2. リン脂質及び蛍光試薬の反応性の検討	----- 9 1
第2節 ヒト赤血球の膜流動性におよぼす高度不飽和脂肪酸 結合型リン脂質の影響	--- 1 0 1
第3節 ヒト赤血球変形能におよぼす高度不飽和脂肪酸結合 型リン脂質の影響	--- 1 0 7
第4章 ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60細胞) の増殖及び分化 におよぼす高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の影響	--- 1 1 9
第1節 HL-60細胞の増殖と分化におよぼすエイコサペンタ エン酸及びドコサヘキサエン酸の影響	--- 1 2 1
第2節 HL-60細胞の増殖と分化におよぼすドコサヘキサエ ン酸結合型ホスファチジルコリン分子種の影響	--- 1 3 3
第3節 HL-60細胞の増殖と分化におよぼすエイコサペンタ エン酸及びドコサヘキサエン酸結合型リン脂質の化 学形態の影響	--- 1 4 1
総合考察	--- 1 5 2
要約	--- 1 5 8
謝辞	--- 1 5 9
文献	--- 1 6 0

## 緒言

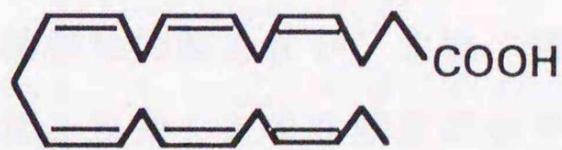
我が国の食生活は「飽食の時代」という言葉に代表されるように少なくとも量的には豊かになった。しかしその一方でエネルギー摂取量に占める脂肪エネルギーの比率が高まり、心臓病や脳梗塞、乳ガン、結腸ガンなど食事脂肪と関係の深い疾病が増加している。こうした中、特定の病気の発症を防ぐ目的で「機能性食品」の設計に関する研究が進められ、現在では「特定保健用食品」として多くの人々に利用されつつある。

特定保健用食品とは栄養に関わる一次機能、嗜好に関わる二次機能のほかに、生体の調節に関わる三次機能を兼ね備えた食品であり、生体自身が保持している生理機能に対し影響をおよぼし、保健効果が期待されているものをいう。

水産食品の多くはそれ自体に高い機能性を有することが明らかにされ、近年注目されているが、水産脂質の主な構成脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) も 1970年代のDyerbergら<sup>1)</sup>の疫学調査以来、抗動脈硬化や抗血栓性などの成人病予防の観点からその機能が注目されてきた。



Eicosapentaenoic acid (EPA)



Docosahexaenoic acid (DHA)

現在まで、EPA、DHAの生理機能に関する研究が盛んに行われ、血中脂質の低下作用、血圧降下作用、抗血栓作用、抗腫瘍作用、抗糖尿病作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用など多くの優れた生理機能<sup>2-5)</sup>が明らかに

されている。更に、DHAに関しては記憶学習能向上作用、網膜反射機能向上作用などの特有の生理機能<sup>6)</sup>も明らかにされつつあり、現在では多くの食品に使用されはじめている。

Lawsonら<sup>7)</sup>の研究以来、EPAやDHAの生理機能が化学形態により異なることが知られるところとなり、この方面の研究も進みつつある。これまでEPAやDHAがリン脂質の化学形態をとることによりエチルエステルの形態に比べコレステロール低下作用が増強する<sup>8)</sup>ほか、アレルギー反応と関係の深い5-リポキシゲナーゼを特異的に阻害する<sup>9)</sup>ことや、血漿コレステロールエステルの生成に関与するレシチン：コレステロール-アシルトランスフェラーゼ (LCAT) の阻害<sup>10)</sup>、低密度リポタンパク質(LDL)の過酸化防止<sup>11)</sup>や脂肪組織の重量低下<sup>12)</sup>などEPA、DHA結合型リン脂質特有の生理機能<sup>13)</sup>を有することが報告されている。一方リン脂質はEPAやDHAなどのアシル基のほかに、親水性のリン酸やコリン、エタノールアミン、セリンといった塩基部分を含んでおり、コリンが神経伝達物質であるアセチルコリンの前駆体となり、血中内の持続性の面からもリン脂質形態の有効性が報告されている<sup>14)</sup>ように、多くの機能をあわせもつきわめて興味深い化学形態でもある。

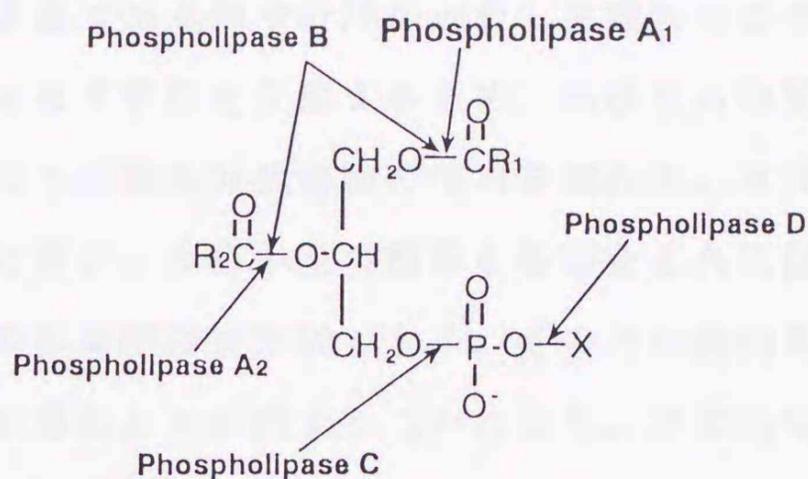
このような優れた生理機能を有するEPA、DHA結合型リン脂質は水産脂質中に比較的多く含まれるが、抽出、精製に困難を伴い、また、構成脂肪酸が複雑であることから、リン脂質形態を維持したまま特定の分子種を単離することは現時点では不可能に近い。

ジメチルアミノピリジンなどの触媒を用いた化学合成<sup>15)</sup>も試みられているが、反応が多段階におよぶこと、高温での反応ではEPAやDHAが酸化されやすいこと、更には化学触媒を使用するため生成物の使用用途が制限されることなどの問題点が残る。

そこで本研究では脂質工学の立場から国内外で利用研究が進められている酵素的合成反応に着目し、酸化されやすいEPAやDHAなどの高度不飽

和脂肪酸(HUFA)を温和な条件下で特異的に反応させることにより、高い機能性をもった脂質分子の設計方法の確立を試みた。

リン脂質に作用する酵素はアシル基のsn-1位、sn-2位をそれぞれ加水分解し、リゾ型リン脂質と脂肪酸を生成するホスホリパーゼA<sub>1</sub>、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>、アシル基の両方を区別無く加水分解するホスホリパーゼB、リン酸部分を分解するホスホリパーゼC、塩基部分を分解するホスホリパーゼDに分類される。



Sites of action of phospholipase on phospholipid

リン脂質の改質に関する研究においては、ホスホリパーゼDを用いた塩基部分の転移に関する研究<sup>16-18)</sup>や脂肪酸残基の加水分解<sup>19,20)</sup>による乳化性の向上などについての研究が行われてきた。リパーゼを用いたリン脂質脂肪酸のエステル交換反応についても近年研究が進められ<sup>21-24)</sup>、HUFA結合型リン脂質の合成に関する研究も行われているが反応率が低いなどの問題点があり<sup>25-28)</sup>、特定のリン脂質分子種の合成方法が確立されるには至っていない。

そこで第1章第1節ではリゾ型リン脂質とイワシ油脂肪酸混合物を基質とし、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>を用いて、リン脂質のsn-2位にHUFAを導入する反応条件について検討し、更に、sn-2位にEPAやDHAの結合したホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)の合成を試みた。

第2節ではホスホリパーゼA1活性を有する固定化リパーゼを用いてsn-1位を所望の脂肪酸にエステル交換する反応について検討した。

リパーゼやホスホリパーゼA2によるエステル交換反応、エステル合成反応は、反応系中の水分を微量にすることにより、水を生成する方向（エステル合成）に反応をシフトさせ生成物を得る。しかしながら、反応系から水を完全に除去すると酵素タンパクが活性発現のために必要な構造を維持できず反応は進行しない。逆に、水を過剰に添加すると高い触媒活性を示すものの、副反応である加水分解が進行し生成物の収率が低下する。このような相反する反応状態を克服するため、水以外の物質で酵素を活性化すること、すなわち必須水分代替物の使用を試みた。水は構成原子の酸素がやや負の電荷を帯び、水素が正の電荷を帯びた永久双極子であり、水一分子につき四つの水素結合を形成しうる。そのため高誘電率であり、酵素タンパクと多点水素結合を形成することにより、活性発現のために必要な酵素タンパクの揺らぎを形成すると考えられている<sup>29)</sup>。そこで水と同様の性質を有する物質を用いることにより、高い触媒活性を維持したまま、副反応である加水分解反応を抑制できると考えた。このような必須水分代替物の考えはKlivanovら<sup>30)</sup>により初めて報告され、共同研究者のKitaguchiら<sup>31)</sup>は生理活性ペプチドの合成において反応効率の改善を報告している。

第2章では第1章で検討した反応系において、必須水分代替物を使用することによりEPA、DHA結合型リン脂質の収率の向上を試みた。そのため第1節ではホスホリパーゼA2によるエステル合成反応における必須水分代替物の検索、使用、第2節では固定化リパーゼであるLipozyme IM60のエステル交換反応における必須水分代替物の検索、使用について検討した。

先にも述べたように、EPAやDHAが酸化されやすいことなどの理由から所望のリン脂質分子種の合成や抽出が困難であったため、生理機能の研究において分子種や化学形態と関連づけた研究はきわめて少ない。生体内においてEPA、DHA結合型リン脂質が神経系などの特定の組織に局在す

ることや、生体膜において種々のリン脂質が非対称に分布することなどから、生理機能がリン脂質の構造によって異なることが予想される。

そこで本研究では酵素反応により合成した種々のEPA、DHA結合型リン脂質の生理機能を脂質の構造と関連づけて明らかにするため、第3章第1節、第2節では生体膜流動性におよぼすEPA、DHA結合型リン脂質の影響を、蛍光試薬を用いた偏光度の測定により評価した。また第3節では高血圧や血栓症と関係が深い赤血球の変形能におよぼす影響について、ヒトの毛細血管をモデルとして製作したシリコン単結晶基板マイクロチャンネルを用いて、リン脂質分子種や脂質形態と関連づけて検討した。

第4章では制ガン効果について検討した。従来の研究では、EPAやDHAまたはそれらのエチルエステルの形態での影響について検討されてきたが、第1節ではヒト前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞の増殖と細胞分化におよぼすEPA及びDHA結合型リン脂質の影響を、脂肪酸やエチルエステルの形態と比較検討した。第2節ではDHA結合型リン脂質の分子種の影響について、また第3節ではEPA及びDHA結合型リン脂質の化学形態の影響について検討した。

以上本研究により、高い機能性を有したEPA、DHA結合型リン脂質分子の基本的な調製法が確立され、これにより高度な三次機能を有した食品の設計や医薬品への応用に関する可能性が広がった。また、これらを生産物を中心とする天然物中に求めることにより、ゆくゆくは水産物を一層高度に活用するうえでの貴重な指針を得ることができる。

## 略 語

本論文において以下の略語を使用した。

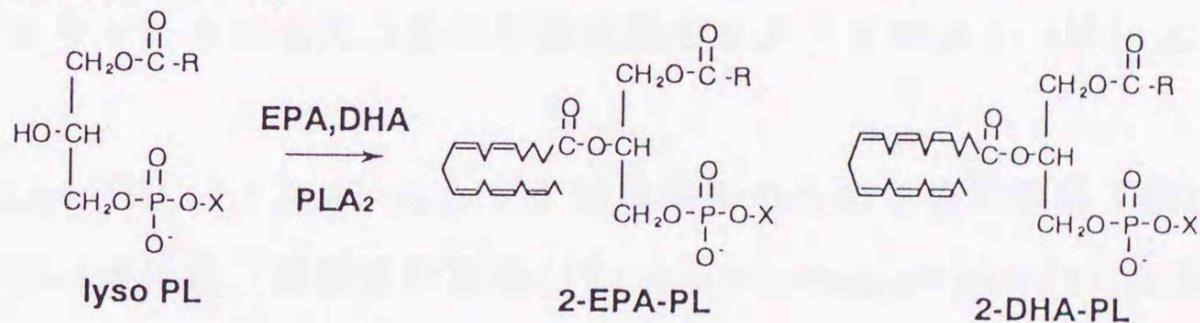
EPA	Eicosapentaenoic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
HUFA	Highly unsaturated fatty acid
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PL	Phospholipid
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
LPC	Lysophosphatidylcholine
TLC-FID	Thin layer chromatography-flame ionization detector
LPE	Lysophosphatidylethanolamine
GLC	Gas liquid chromatography
TLC	Thin layer chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
Pal	Palmitic acid
Ole	Oleic acid
PLD	Phospholipase D
PS	Phosphatidylserine
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene
PBS	Phosphate buffered saline

RBC	Red blood cell
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Hct.	Hematocrit value
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid sodium salt
RA	all- <i>trans</i> Retinoic acid
NBT	Nitro blue tetrazolium
TPA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
HA-1064	N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfoamide hydrochloride

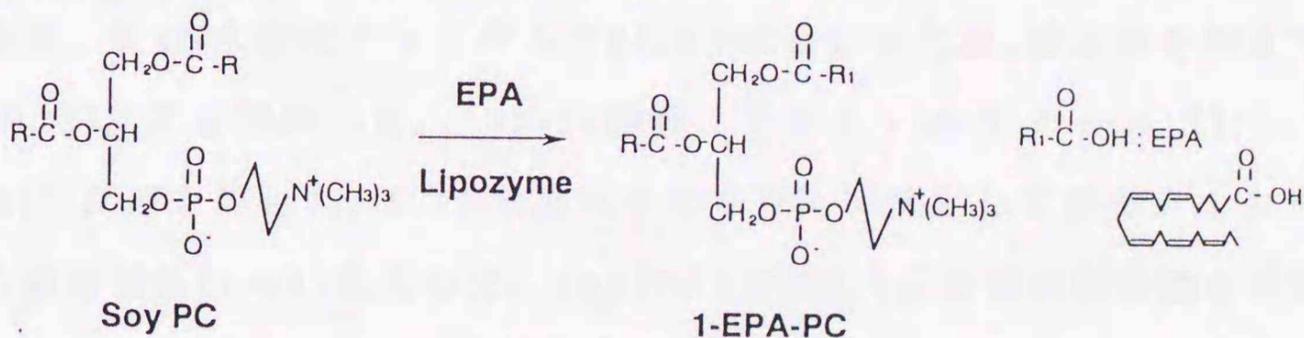
## 第1章 酵素反応による高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の合成

高度不飽和脂肪酸(HUFA)の結合したリン脂質は、HUFAとリン脂質(PL)の生理機能をあわせもつ極めて興味深い化学形態であり、HUFA結合型リン脂質特有の生理機能も報告されている<sup>8-13)</sup>。このようなHUFA結合型リン脂質は水産脂質中に比較的多く含まれているが分離が困難であり、脂肪酸組成も複雑であることから特定のリン脂質分子種を単離することは不可能に近い。

そこで第1章では、酵素のもつ温和且つ特異的な性質に着目し、リン脂質のsn-1位とsn-2位のそれぞれに所望の脂肪酸を導入する方法について検討した。第1節ではホスホリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)を用いてリゾ型リン脂質とHUFAをエステル合成することにより、sn-2位にHUFAの結合したリン脂質の作出を試みた。



第2節では、sn-1,3位に特異性を有する固定化リパーゼを用いて、リン脂質と所望の脂肪酸をエステル交換することにより、sn-1位に目的の脂肪酸を導入する方法について検討した。



以上の2段階の反応により、HUFA結合型リン脂質分子種の作出が可能になると考えた。

## 第1節 ホスホリパーゼA<sub>2</sub>によるリン脂質sn-2位への高度不飽和脂肪酸の導入

### 1. 高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の合成反応条件の検討

#### 実験方法

##### 1-1.1 試料及び試薬

リゾホスファチジルコリン(LPC)は、乳化剤として市販されているリゾ型リン脂質(商品名 エルマイザーA)を協和醗酵工業(株)より入手し、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純度97%以上(TLC-FID法)に精製したものをを用いた。イワシ油脂肪酸混合物は、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、更に酸分解することにより調製した。分散媒として用いたグリセロールは蛍光分析用特製試薬をナカライテスク(株)より入手した。

PLA<sub>2</sub>(EC 3.1.1.4)は、ブタ膵臓由来のものを協和醗酵工業(株)より入手し、透析後、凍結真空乾燥(191.4 units/mg powder)したものをを用いた。酵素活性は、De Hassら<sup>32)</sup>の方法をもとに中和滴定法で測定した。すなわち、卵黄1個を蒸留水100mlに懸濁した液10mlに、塩化カルシウム溶液(終濃度 $6 \times 10^{-3} \text{M}$ )およびデオキシコール酸(終濃度 $2.7 \times 10^{-3} \text{M}$ )を加え、0.1N水酸化ナトリウムでpH8.0に合わせた後、酵素液を加えて(全量30ml)反応を開始した。15-30秒後、アセトン:エタノール(1:1, v/v)20mlで反応を停止し、0.1N水酸化ナトリウムで滴定して消費アルカリ量から酵素活性(unit)を求めた。1unitは1分間に $1 \mu$ 当量の脂肪酸を遊離する酵素活性とした。その他の試薬は全て市販の特級品または蒸留したものをを用いた。

### 1-1.2 ホスホリパーゼA<sub>2</sub>によるエステル合成反応

LPC 110mgとイワシ油脂肪酸混合物 180mgをグリセロール 5500mgに分散後、PLA<sub>2</sub>(11484 units)を3  $\mu$ molの塩化カルシウムを含む200mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0) 0.5mlに溶解した酵素液を加えて反応を開始し、800-1000 rpmで攪拌しながら25°Cで反応を行った。一定時間反応後、クロロホルム:メタノール:水(10:5:3, v/v/v)で脂質成分を分離し、これを Sep-pak シリカカートリッジ(Waters)に供して、クロロホルム:メタノール(10:1, v/v)で脂肪酸画分を除いた後、メタノールを用いてリン脂質画分(合成ホスファチジルコリン(PC)+未反応 LPC)を回収し、重量を測定した。

### 1-1.3 合成率の算出

回収したリン脂質画分をクロマロッドSIII(ヤترون(株))に供し、クロロホルム:メタノール:水(65:25:4, v/v/v)で展開後、TLC-FID(イアトロスキャン TH-10型, ヤترون(株))によってLPCとPCの組成を分析した。ピーク面積と重量とのカリブレーションカーブよりLPC、PCの重量を求め、以下に示す式に従って合成率(Yield)を算出した。

Yield (%)

$$= \text{Synthesized PC} / \text{Substrate LPC} \times 100 (\text{w/w})$$

なお、TLC-FIDの測定条件は次の通りである。

装置：イアトロスキャン TH-10型 (ヤترون(株))

使用薄層棒：クロマロッドSIII

展開溶媒：クロロホルム：メタノール：水(65:25:4, v/v/v)

水素圧力：0.90kg/cm<sup>2</sup>

空気流量：2,000ml/min

#### 1-1.4 水分量の検討

リン脂質sn-2位にイワシ油脂肪酸混合物の結合したPC (2-Fatty acid mixture-PC) の合成反応は、反応系における水分量によって大きく左右されることがNaら<sup>26)</sup>によって報告されている。そこで反応系における至適水分量を求めるため、第1章1-1.2の反応条件において水分添加量を変えて合成反応を行い、経時的に合成率を測定することにより至適水分量について検討した。

#### 1-1.5 基質脂肪酸添加量の検討

第1章1-1.2の反応条件においてLPCを110mgと一定にし、イワシ油脂肪酸混合物の添加量を変えて48時間合成反応を行うことにより、2-Fatty acid mixture-PC合成におよぼす脂肪酸量の影響について検討した。

#### 1-1.6 酵素量の検討

第1章1-1.2の反応条件において酵素量を変えて48時間合成反応を行うことにより、至適酵素量について検討した。

#### 1-1.7 カルシウム量の検討

ブタ膵臓由来PLA<sub>2</sub>は、加水分解反応において活性発現のためにカルシウムを必要とするカルシウム依存型酵素<sup>33,34)</sup>であることが知られている。そこで、第1章1-1.2の反応条件下でカルシウム添加量を変えて合成反応を行うことにより、至適カルシウム量について検討した。

### 結果および考察

#### 1-1.1 水分量の検討

PLA<sub>2</sub>の2-Fatty acid mixture-PC合成反応における水分量の影響について検討した (Fig.1-1)。

水分添加量 0.25ml、0.4ml、0.5mlでは時間の経過とともに合成率の上

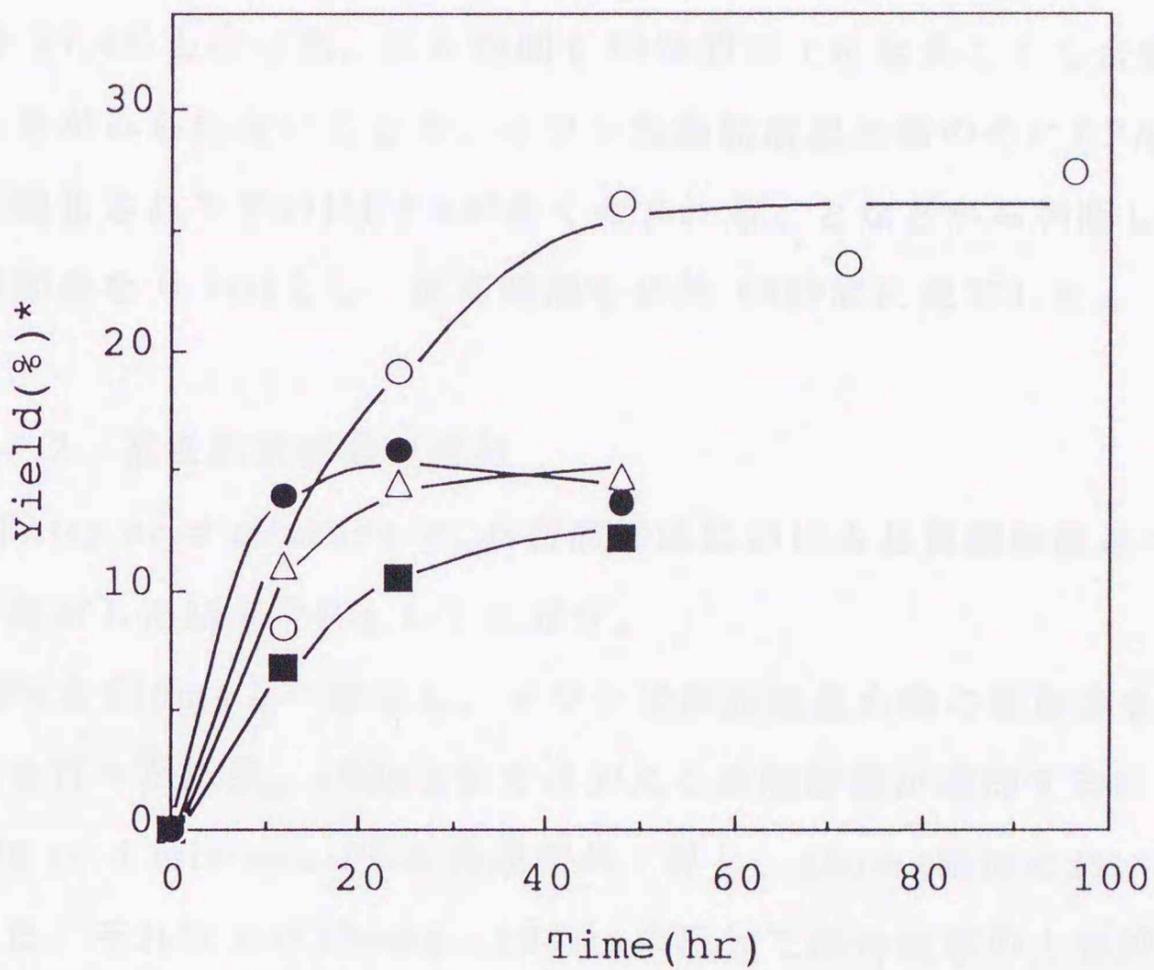


Fig.1-1. Effect of water content on phospholipase A<sub>2</sub>-mediated PC synthesis.

Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 60mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, 25°C, 800-1000rpm, 48hr.

\*Yield(%) = Synthesized PC/Substrate LPC × 100(w/w)

Abbreviations: PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine.

—■— 0.25ml —△— 0.4ml —○— 0.5ml —●— 0.6ml

昇がみられ、48時間において12.1%、14.7%、26.0%となり、0.5mlの添加において最も高くなった。0.6mlの添加では、初期速度は大きいものの24時間目以降では合成率の上昇はみられなかった。これは添加した水分とエステル合成により生成した水により反応が平衡に達したためと思われる。

次いで、水分添加量0.5mlの反応条件下において、反応時間を72時間、96時間に延長して2-Fatty acid mixture-PCの合成を行った。反応時間72時間では、2-Fatty acid mixture-PCの合成率が23.6%、96時間の反応では27.4%となった。反応時間を48時間以上に延長しても合成率に大きな上昇がみられないことや、イワシ油脂肪酸混合物の中にEPAやDHAなどの酸化されやすいHUFAが多く含まれることなどから判断して、至適水分添加量を0.5mlとし、反応時間を以後48時間に規定した。

#### 1-1.2 基質脂肪酸量の検討

2-Fatty acid mixture-PCの合成反応における基質脂肪酸量の影響について検討した結果をFig.1-2に示す。

LPCを110mgと一定にし、イワシ油脂肪酸混合物の添加量を変えて合成反応を行った結果、180mgまでは加える脂肪酸量が増加するにつれて2-Fatty acid mixture-PCの合成率が上昇し、180mg添加において26.1%となった。それ以上の300mg、600mgの添加では合成率の上昇がみられず、それぞれ26.7%、26.0%にとどまった。以上の結果より、PCの合成率を高めるには、LPCに対し一定量以上の基質脂肪酸が必要であり、基質比はLPC 110mgに対しイワシ油脂肪酸混合物が180mg、モル比では約1:3が適当であると判断した。

#### 1-1.3 酵素量の検討

2-Fatty acid mixture-PCの合成反応における酵素量の影響について検討した結果をFig.1-3に示す。

48時間の反応において、PLA<sub>2</sub> 25mg (4785units) 以上では合成率に

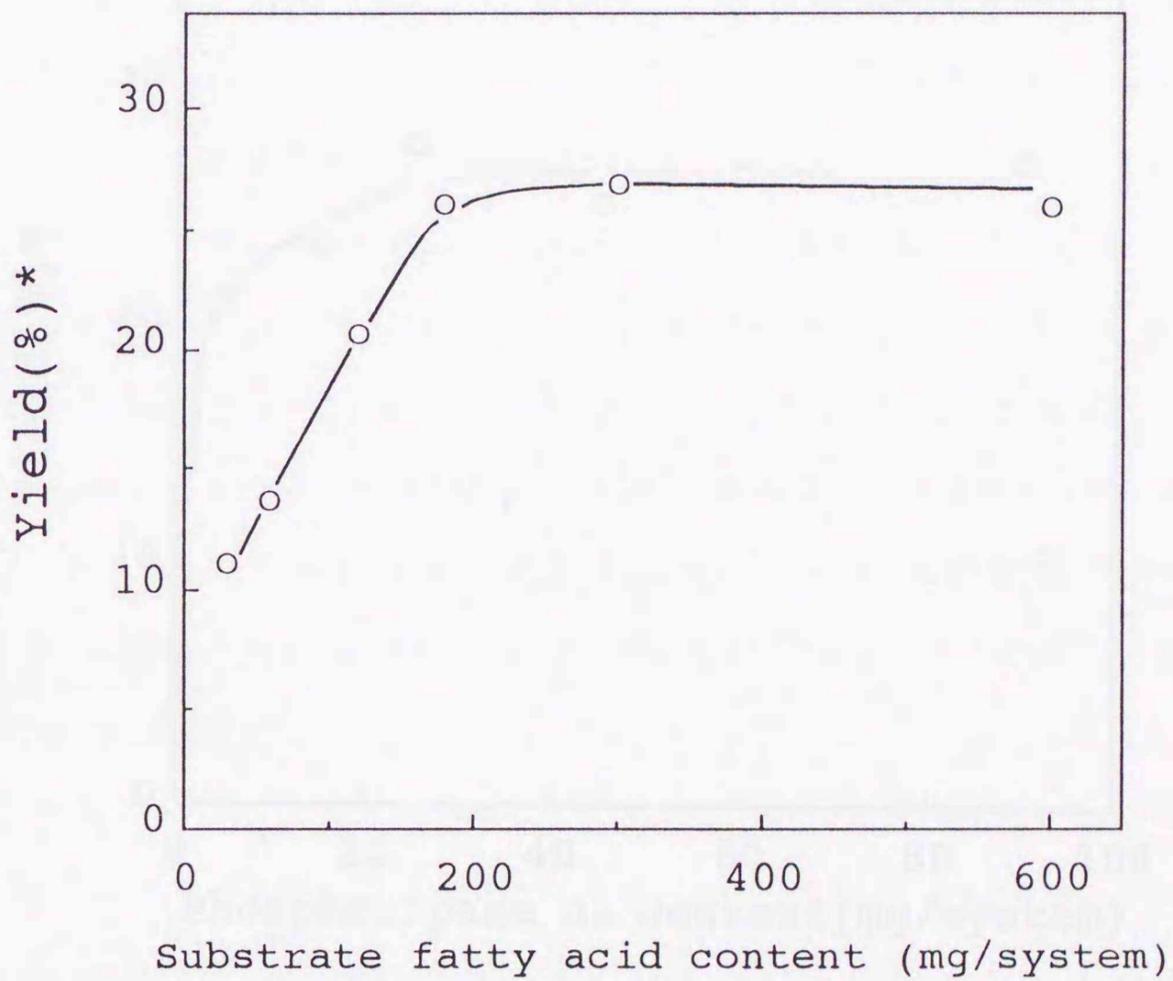


Fig.1-2. Effect of substrate fatty acid content on phospholipase A<sub>2</sub>-mediated PC synthesis.

Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 60mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, 25°C, 800-1000rpm, 48hr.

\*Yield(%) = Synthesized PC/Substrate LPC × 100(w/w)

Abbreviations are the same as in Fig.1-1.

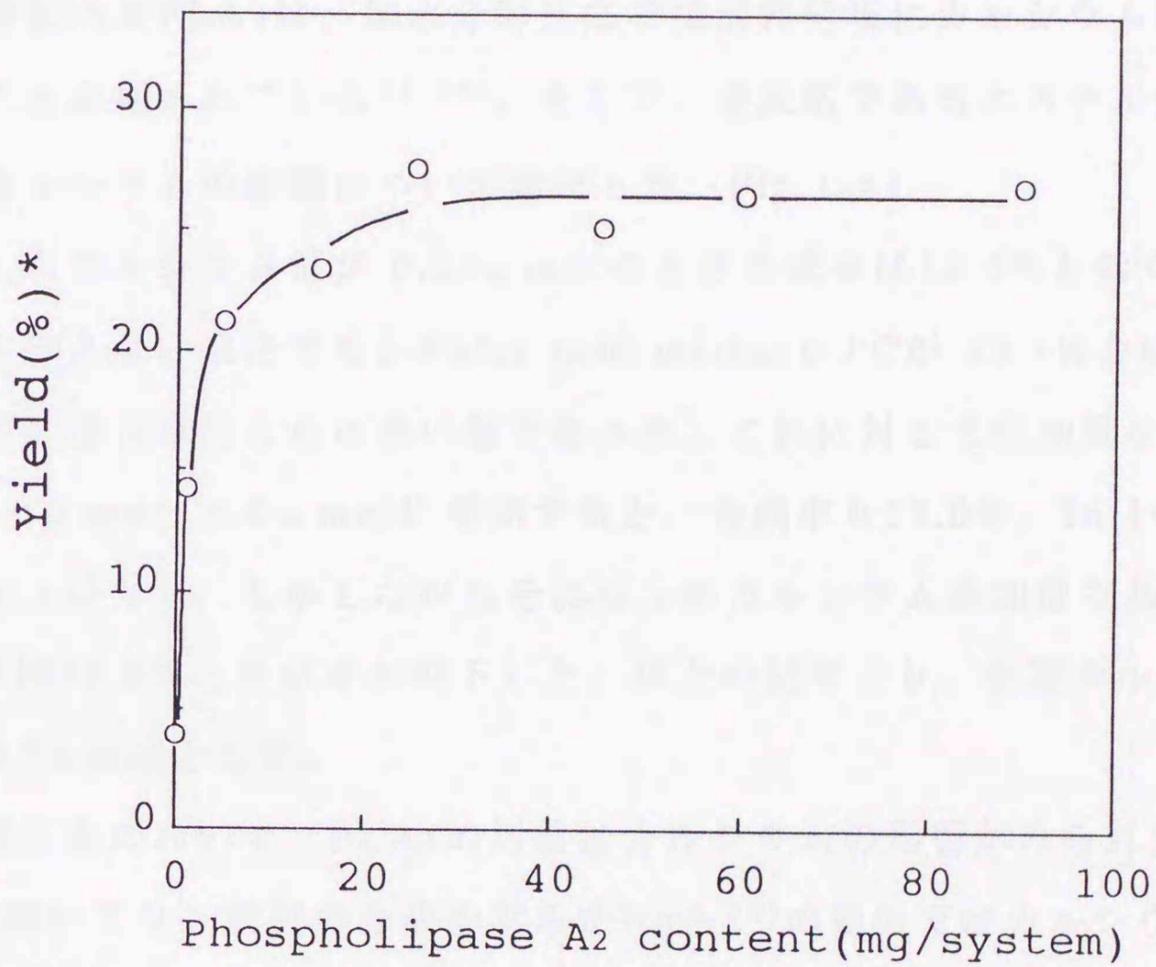


Fig.1-3. Effect of phospholipase A2 content on PC synthesis.

Reaction conditions: phospholipase A2 60mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, 25°C, 800-1000rpm, 48hr.

\*Yield(%) = Synthesized PC/Substrate LPC × 100(w/w)

Abbreviations are the same as in Fig.1-1.

大きな上昇はみられなかった。LPC 1mgに対し 43.5unitsに相当することから、リン脂質脂肪酸のエステル結合の加水分解するのに比べ、エステル合成反応には多量のPLA<sub>2</sub>が必要であることが明かとなった。

反応条件の変化による酵素活性の低下の影響を少なくするため、至適酵素量を60mg (11484units) とした。

#### 1-1.4 カルシウム量の検討

ブタ膵臓由来PLA<sub>2</sub>は、加水分解反応では活性発現にカルシウムを必要とすることが知られている<sup>33,34)</sup>。そこで、逆反応であるエステル合成反応でのカルシウムの影響について検討した (Fig.1-4)。

添加したカルシウム量が 0.25  $\mu$ mol のとき合成率は18.4%と低く、カルシウムを加えない場合でも 2-Fatty acid mixture-PCが 13.7%合成されているものの合成率はさらに低い値であった。これに対して添加量を 1.5  $\mu$ mol、3.0  $\mu$ mol、6.0  $\mu$ molに増加すると、合成率も27.0%、26.1%、29.2%と上昇した。しかしながらそれ以上のカルシウム添加量である 100  $\mu$ molでは22.8%と合成率が低下した。以上の結果より、至適カルシウム添加量を3  $\mu$ molとした。

本合成反応において、PLA<sub>2</sub>の活性にカルシウムの影響がみられた。PLA<sub>2</sub>を用いてリン脂質の合成を試みたNa<sup>26)</sup>の報告ではカルシウムの影響はみられず、Pernas<sup>22)</sup>の報告ではカルシウムの影響がみられたことから反応条件によってその影響が異なることが示唆された。カルシウムの触媒機構における役割は正確にはわかっていないが、次のように考えられている<sup>33,34)</sup>。カルシウムイオン(Ca<sup>++</sup>)は基質のリン酸基の*pro-S*酸素に結合して酵素基質複合体を安定化し基質の配向を制御する。同時にCa<sup>++</sup>は2位のカルボニル酸素と相互作用して、カルボニル基の分極を増大させて求核攻撃を受けやすくする。もしそうであるとするならば、合成反応では基質としてLPCを用いているため2位の位置が水酸基であり、カルボニル酸

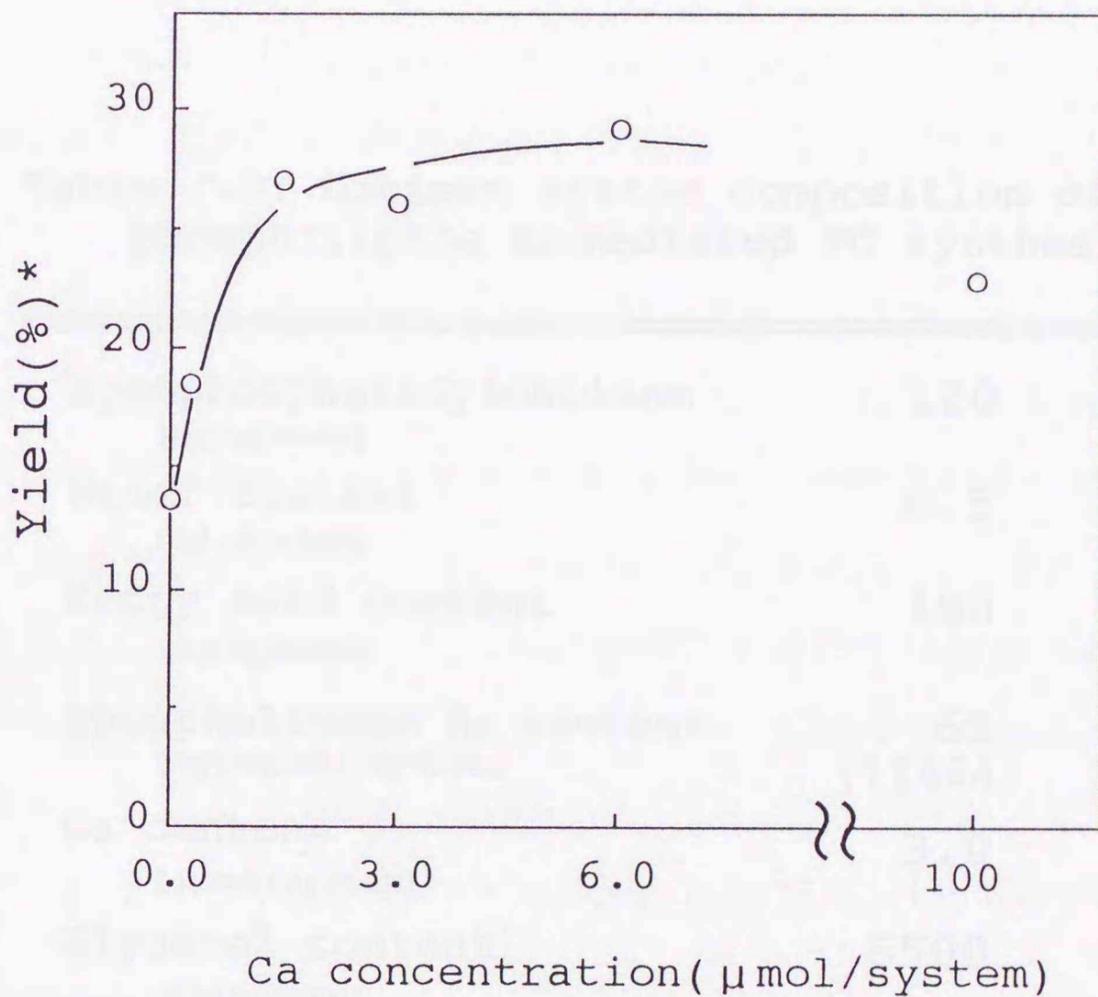


Fig.1-4. Effect of Ca concentration on phospholipase A<sub>2</sub>-mediated PC synthesis. Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 60mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, 25°C, 800-1000rpm, 48hr. \*Yield(%) = Synthesized PC/Substrate LPC × 100(w/w) Abbreviations are the same as in Fig.1-1.

素が存在しないためPLA<sub>2</sub>に対するCa<sup>++</sup>の役割も異なってくると考えられる。合成反応におけるカルシウムの役割については、合成率を高めるためにPLA<sub>2</sub>作用機序を考えるうえで、より一層の検討が必要であると思われる。

以上の結果より、PLA<sub>2</sub>によるエステル合成反応の至適反応条件をTable 1-1のように定めた。

Table 1-1. Optimum system composition of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated PC synthesis.

Lysophosphatidylcholine (mg/system)	110
Water content (ml/system)	0.5
Fatty acid content (mg/system)	180
Phospholipase A <sub>2</sub> content (mg(units)/system)	60 (11484)
Ca content (μmol/system)	3.0
Glycerol content (mg/system)	5500

Abbreviations are the same as in Fig.1-1.

## 2. エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸結合型リン脂質の合成

### 実験方法

#### 1-2.1 試薬

EPA標品(純度99%以上)、DHA標品(純度95%以上)は、出光石油化学(株)より購入した。脂肪酸の結合位置の分析に用いた精製PLA<sub>2</sub>(ブタ膵臓由来)、分子種分析に用いたホスホリパーゼC(EC 3.1.4.3、*Bacillus cereus*由来)はSigma Chemical Co. より購入した。

LPC、イワシ油脂肪酸混合物、合成反応に使用したPLA<sub>2</sub>およびグリセロールは第1章第1節1-1.1と同様のものを使用した。リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)の調製は、まず最初にJunejaら<sup>15)</sup>の方法に基づいてsoybean phosphatide extracts (lecithin > 95%, Avanti Polar Lipids, Inc.) をホスファチジルエタノールアミン(PE)に転移し、さらに、Wellsら<sup>35)</sup>の方法に基づいてPLA<sub>2</sub>を用いて加水分解することにより、LPEと遊離脂肪酸を生成した。ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより、クロロホルム:メタノール(9:1, v/v)を用いて遊離脂肪酸画分を除去した後、クロロホルム:メタノール(1:1, v/v)を用いてLPEを溶出した。LPEの純度の確認は、TLC-FID法(純度98%以上)と2次元薄層クロマトグラムにより行った。その他の試薬についても第1章第1節1-1.1と同様のものを使用した。

#### 1-2.2 ホスホリパーゼA<sub>2</sub>によるエステル合成反応

LPC または LPE 110mg と基質HUFAとしてイワシ油脂肪酸混合物、EPA または DHA 180mg をグリセロール 5500mg に分散後、3  $\mu$  mol の塩化カルシウムを含む 0.2M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0) 0.5ml に PLA<sub>2</sub> (PC 合成のとき 60mg (11484 units)、PE 合成のとき 25mg (4785 units)) を溶解した酵素液を加えて反応を開始し、800-1000 rpm で攪拌しながら

25°Cで48時間反応を行った。以後の操作は第1章第1節1-1.3と同様に行った。

### 1-2.3 合成率の算出

合成率の算出は第1章第1節1-1.3と同様に行った。

### 1-2.4 高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の脂肪酸組成の分析

回収したリン脂質画分（未反応リゾ型リン脂質＋合成リン脂質）を調製用TLCプレート(Macherey-Nagel GmbH&Co.)に供し、クロロホルム:メタノール:水(65:25:4, v/v/v)で展開した後、合成された2-HUFA-PC、2-HUFA-PE画分を分画し、メタノールで溶出した。メチルエステル化した後、ガスクロマトグラフィー(GLC)で脂肪酸組成を分析した。GLCの分析条件は以下によった。

装置 : 日立063形ガスクロマトグラフ

カラム : Unisole 3000、3mm×3m ガラスカラム

カラム温度 : 190°C

注入口および検出器(FID)温度 : 250°C

キャリアガス : N<sub>2</sub> 30ml/min

### 1-2.5 高度不飽和脂肪酸の結合位置の分析

合成した2-Fatty acid mixture-PC (5mg)をジエチルエーテル 5mlに溶解し、3  $\mu$ molの塩化カルシウムを含む精製PLA<sub>2</sub>溶液 0.5mlを添加し、30秒間攪拌後、37°Cで2時間加水分解した。2-eicosapentaenoyl-PE (2-EPA-PE)の加水分解は、6mM塩化カルシウム、27.5mMデオキシコール酸ナトリウム含有 0.2Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 2.6mlに 2-EPA-PE(8mg)を懸濁した後、精製PLA<sub>2</sub>を添加し、40°Cで45分間インキュベートすることにより行った。反応後、クロロホルム:メタノール:水(10:5:3,

v/v/v)を用いて分配し、クロロホルム層より脂質画分を回収した。これを調製用TLCプレート(Kieselgel 60, E.Merck)に供し、クロロホルム:メタノール:水(65:25:4, v/v/v)で展開後、遊離脂肪酸 (sn-2位) とリゾ型リン脂質 (sn-1位) に分画し、メチルエステル化後GLCでそれぞれの脂肪酸組成を分析した。GLCの分析条件は第1章第1節1-2.4と同様である。

#### 1-2.6 高度不飽和脂肪酸結合型ホスファチジルコリンの分子種組成の分析

合成した2-HUFA-PCをTakahashiら<sup>36)</sup>の方法に準じてアセチル化し、HPLCに供して分子種組成を分析した。すなわち以下の2ステップの誘導化を行った。先ずPC 200mgをジエチルエーテル 15mlに溶解、5mgのホスホリパーゼ Cと0.075mlの45%塩化カルシウム水溶液を含む1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.3)を15ml加え、室温で4時間ホスホリルコリンの遊離を行った。反応終了後、ジエチルエーテル層から粗1,2-ジグリセリド(1,2-DG)画分を回収し、TLCに供した後、*n*-ヘキサン:ジエチルエーテル(2:3, v/v)で展開し、2-HUFA-PC由来の1,2-DGを精製した。このもの60mgを0.6mlのピリジン(使用前に酸化バリウムで脱水)に溶解し、3.0mlの無水酢酸を加え、密栓して室温で15時間アセチル化反応を行った。反応後、溶剤を窒素ガスで留去し、生成物をジエチルエーテルに溶解し水洗した後、ジエチルエーテルを留去することにより粗1,2-DGアセチル誘導体を得た。TLCにより上記と同様の方法(*n*-ヘキサン:ジエチルエーテル(3:2, v/v))で1,2-DGアセチル誘導体を精製し、孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過後、HPLCの試料とした。各分子種ピークは、分取した後、メチルエステル化してGLCで脂肪酸組成を分析することにより同定した。HPLCの分析条件は以下によった。

装置：日立655A-11形 液体クロマトグラフ

カラム：Wakosil-5C18N 300x4mm

溶媒：アセトン：アセトニトリル：メタノール：イソプロピルアルコール  
(2:8:3:1, v/v/v/v)

流速：0.5ml/min

カラム温度：室温

検出器：日立655A-30形 示差屈折検出器

## 結果及び考察

### 1-2.1 高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の合成

第1章第1節 1ではイワシ油脂肪酸混合物を用いて、PLA<sub>2</sub>によるエステル合成反応の至適条件について検討した。本節では EPAやDHAを基質として至適反応条件下でエステル合成反応を行い、合成したリン脂質の脂肪酸組成について検討した。

基質 LPCの脂肪酸組成は、主にパルミチン酸(Pal, 16:0) 23.6%、オレイン酸(Ole, 18:1) 11.3%、リノール酸(18:2) 50.5%であり、EPAやDHAは含まれていなかった (Table 1-2)。これに対しイワシ油脂肪酸混合物はEPA 14.0%、DHA 8.9%を含んでいた。これらを基質として合成反応を行った結果、合成率は26.1%になり (Table 1-3)、合成されたPCの脂肪酸組成におけるEPA及びDHAの割合は6.0%、4.1%であった

(Table 1-4)。純度99.0%以上のEPA、DHAを用いて合成した2-EPA-PC及び2-DHA-PCの合成率は26.5%、26.1%となり、脂肪酸組成に占めるEPA、DHAの割合は45.1%、48.2%であった (Table 1-3、1-4)。

sn-2位にHUFAの結合したPEの化学的合成反応では、コリンに比べエタノールアミンの反応性が高いため、アミノ基に保護基をつけなければならず、生成物から保護基を除去する際にも回収率の低下がみられる。そこでPLA<sub>2</sub>を用いた酵素反応による 2-HUFA-PEの合成についても検討した。2-EPA-PE、2-DHA-PEの合成率は27.2%、29.7%となり、2-HUFA-PC

Table 1-2. Fatty acid composition of substrates employed for phospholipase A<sub>2</sub>-mediated PC synthesis.

	LPC	Fatty acid mixture*	Purified EPA	Purified DHA
14:0	-	7.2	-	-
16:0	23.6	15.8	-	-
16:1	-	9.1	-	-
18:0	6.9	4.0	-	-
18:1	11.3	15.8	-	-
18:2	50.5	2.0	-	-
18:3	5.9	1.0	-	-
18:4	-	2.4	-	-
20:1	-	5.3	-	-
20:4	-	-	-	-
20:5 (EPA)	-	14.0	>99.0	-
22:1	-	4.5	-	-
22:5	-	1.9	-	-
22:6 (DHA)	-	8.9	-	>99.0
others	1.8	8.1	<1.0	<1.0
total	100.0	100.0	100.0	100.0

\*Fatty acid mixture prepared from sardine oil.

Abbreviations: EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid. Other abbreviations are the same as in Fig.1-1.

Table 1-3. Comparison of the degree of PC synthesis among various kinds of substrate fatty acids.

Synthesized PC	Yield(%)*
2-Fatty acid mixture**-PC	26.1
2-EPA-PC	26.5
2-DHA-PC	26.1

\*Yield(%) = Synthesized PC/Substrate LPC × 100 (w/w)

\*\*Fatty acid mixture prepared from sardine oil.

Abbreviations: 2-Fatty acid mixture-PC, fatty acid mixture-containing phosphatidylcholine (at sn-2); 2-EPA-PC, eicosapentaenoic acid-containing PC (at sn-2); 2-DHA-PC, docosahexaenoic acid-containing PC (at sn-2). Other abbreviations are the same as in Fig. 1-1.

Table 1-4. Fatty acid composition of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated synthesized PC.

Fatty acid	2-Fatty acid mixture-PC	2-EPA-PC	2-DHA-PC
14:0	3.3	-	-
16:0	19.8	12.3	11.0
16:1	4.4	-	-
18:0	4.8	3.4	3.2
18:1	13.3	6.5	5.9
18:2	29.3	26.4	24.9
18:3	3.4	2.7	2.6
18:4	1.2	-	-
20:1	2.7	-	-
20:4	-	-	-
20:5 (EPA)	6.0	45.1	-
22:1	2.1	-	-
22:5	1.2	-	-
22:6 (DHA)	4.1	-	48.2
others	4.4	3.6	4.2
total	100.0	100.0	100.0

Abbreviations are the same as in Table 1-3.

の合成率に比べ高い傾向がみられたものの大きな差ではなかった (Table 1-5)。また、イワシ油脂肪酸混合物を基質として用いた場合の合成率は26.4%であった。このように合成率はどれも高くなかったが合成された2-HUFA-PEの脂肪酸組成に占める EPA、DHAの割合は46.5%、46.6%に達し、2-HUFA-PCの場合と同様に高い割合でEPAやDHAが導入されていた (Table 1-6)。これは後述する理由により、理論上のほぼ上限までEPA及びDHAが導入されていることを示すものである。

本反応系ではイワシ油脂肪酸混合物、EPA及びDHAを基質として2-HUFA-PLの合成を行った場合、合成率に大きな差がみられず、PLA<sub>2</sub>がHUFAに対し基質特異性のないことが示された。また、2-HUFA-PL中のEPA、DHA濃度は基質脂肪酸中のEPA、DHA濃度に依存し、脂肪酸組成は基質脂肪酸とLPCまたはLPEの各脂肪酸濃度の和の1/2であった。これはLPCやLPEの *sn*-2位が水酸基であることやPLA<sub>2</sub>の位置特異性から、*sn*-2位にほぼ理論上の上限近くまで基質脂肪酸が導入されたためと考えられた。

そこで合成した 2-Fatty acid mixture-PC及び 2-EPA-PEを精製PLA<sub>2</sub>を用いて加水分解し、EPAやDHAの結合位置を確認した (Table 1-7、1-8)。その結果、EPAやDHAはすべて*sn*-2位に結合しており、*sn*-1位の脂肪酸には含まれていなかったことから、基質脂肪酸がリン脂質の*sn*-2に選択的に導入されていることが明かとなった。Naら<sup>26)</sup>の報告では、EPAを40.7%、DHAを30.3%含む基質脂肪酸を用いて合成反応を行ったとき、合成されたHUFA結合型PC中のEPA及びDHA濃度は15.9%、10.5%であった。*sn*-2位にのみ基質脂肪酸が導入されたとすると、合成された2-HUFA-PCの脂肪酸組成は基質脂肪酸とLPCの各脂肪酸濃度の和の1/2、すなわちEPA 20.35%、DHA 15.15%になるはずである。しかし、実測値は理論値よりも低く、導入率(実測値/理論値(基質の各脂肪酸濃度の和の1/2) x 100)はEPAが78.1%、DHAが69.3%であった。また、純度90%のDHAを用いて合成した DHA結合型PC中のDHA濃度は34.6%であり、こ

Table 1-5. Comparison of the degree of PE synthesis among various kinds of substrate fatty acids.

Synthesized PE	Yield(%)*
2-Fatty acid mixture**-PE	26.4
2-EPA-PE	27.2
2-DHA-PE	29.7

\*Yield(%) = Synthesized PE/Substrate LPE × 100 (w/w)

\*\*Fatty acid mixture prepared from sardine oil.

Abbreviations: PE, phosphatidylethanolamine; 2-Fatty acid mixture-PE, fatty acid mixture-containing phosphatidylethanolamine (at sn-2); 2-EPA-PE, eicosapentaenoic acid-containing PE (at sn-2); 2-DHA-PE, docosahexaenoic acid-containing PE (at sn-2); LPE, lysophosphatidylethanolamine.

Table 1-6. Fatty acid composition of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated synthesized PE.

Fatty acid	2-EPA-PE	2-DHA-PE
14:0	-	-
16:0	12.2	11.5
16:1	-	-
18:0	3.9	3.7
18:1	6.0	6.2
18:2	27.3	27.7
18:3	2.7	2.9
18:4	-	-
20:1	-	-
20:4	-	-
20:5 (EPA)	46.5	-
22:1	-	-
22:5	-	-
22:6 (DHA)	-	46.6
others	1.4	1.4
total	100.0	100.0

Abbreviations are the same as in Table 1-5.

Table 1-7. Fatty acid compositions of sn-1 and sn-2 of synthesized PC mediated phospholipase A<sub>2</sub>.

Fatty acid	2-Fatty acid mixture*-PC		
	Direct analysis of PC	Position <u>sn</u> -1	Position <u>sn</u> -2
16:0	19.5	23.0	14.6
16:1	3.1	0.5	6.3
18:0	6.0	7.2	3.9
18:1	12.4	11.4	13.6
18:2	32.8	51.5	8.9
18:3	3.6	5.0	1.5
20:5 (EPA)	8.5	0.3	16.0
22:6 (DHA)	4.9	-	9.5

\*Fatty acid mixture prepared from sardine oil. Abbreviations are the same as in Table 1-3.

Table 1-8. Fatty acid compositions of sn-1 and sn-2 of synthesized EPA-containing PE mediated phospholipase A<sub>2</sub>.

Fatty acid	Synthesized 2-EPA-PE		
	Direct analysis of 2-EPA-PE	Position <u>sn</u> -1	Position <u>sn</u> -2
16:0	10.1	18.8	0.4
18:0	3.2	5.6	0.2
18:1	6.6	12.8	0.6
18:2	29.6	56.7	2.7
18:3	2.7	5.1	0.2
20:5 (EPA)	47.2	0.1	94.5

Abbreviations are the same as in Table 1-5.

のときの理論値が45.0%であることから導入率は76.9%と低い値であった。これに対し、本反応系では純度99.0%以上のDHAを基質として合成反応を行ったとき、合成された2-DHA-PC中のDHA濃度は48.2%に達し、導入率が97.4%となった。よって本法により基質脂肪酸中のHUFAを上限近くまで導入できることが明らかとなった。

本研究では、酵素の安定化剤として用いられているグリセロールを基質の分散媒として使用しており、Naラ<sup>26)</sup>の界面活性剤を用いたエマルジョンでの反応と比べ、酵素の安定性や基質の存在状態が異なることが予想される。グリセロールを分散媒として用いることにより基質脂肪酸がsn-2位に特異的に導入されることから、高純度のEPAやDHAを用いることにより、sn-2位が単一脂肪酸であるきわめて特徴的なリン脂質を合成できることが判明した。

#### 1-2.2 高度不飽和脂肪酸結合型ホスファチジルコリンの分子種組成

合成したHUFA結合型PCの分子種を分析したクロマトグラム、ならびに大豆PC (Soy PC) 分子種のクロマトグラムをFig.1-5に示す。また、これに基づいて求めた分子種組成をTable 1-9に示す。

純度99.0%以上のDHAとLPCを用いて合成した2-DHA-PCの分子種は(16:0,DHA)、(18:0,DHA)、(18:1,DHA)、(18:2,DHA)、(18:3,DHA)の5つで、それぞれ22.8%、6.5%、10.5%、53.9%、5.6%であった。純度99.0%のEPAを用いて合成した2-EPA-PCの分子種組成についてもDHAをEPAに置き換えた同様の結果が得られた。

イワシ油脂肪酸混合物を用いて合成反応を行った場合、脂肪酸組成が複雑であるため合成された2-Fatty acid mixture-PCの分子種組成も複雑となり、主な分子種は(18:2,EPA)、(18:2,DHA)、(16:0,EPA)、(18:1,18:2)、(16:0,18:2)、(18:1,DHA)+(16:0,DHA)+(16:1,18:1)であった。

一方、Soy PCの分子種にはHUFAを含んだものはみられず、主な分子種は(16:0,18:2)、(18:1,18:2)、(18:2,18:2)、(18:2,18:3)であった。基

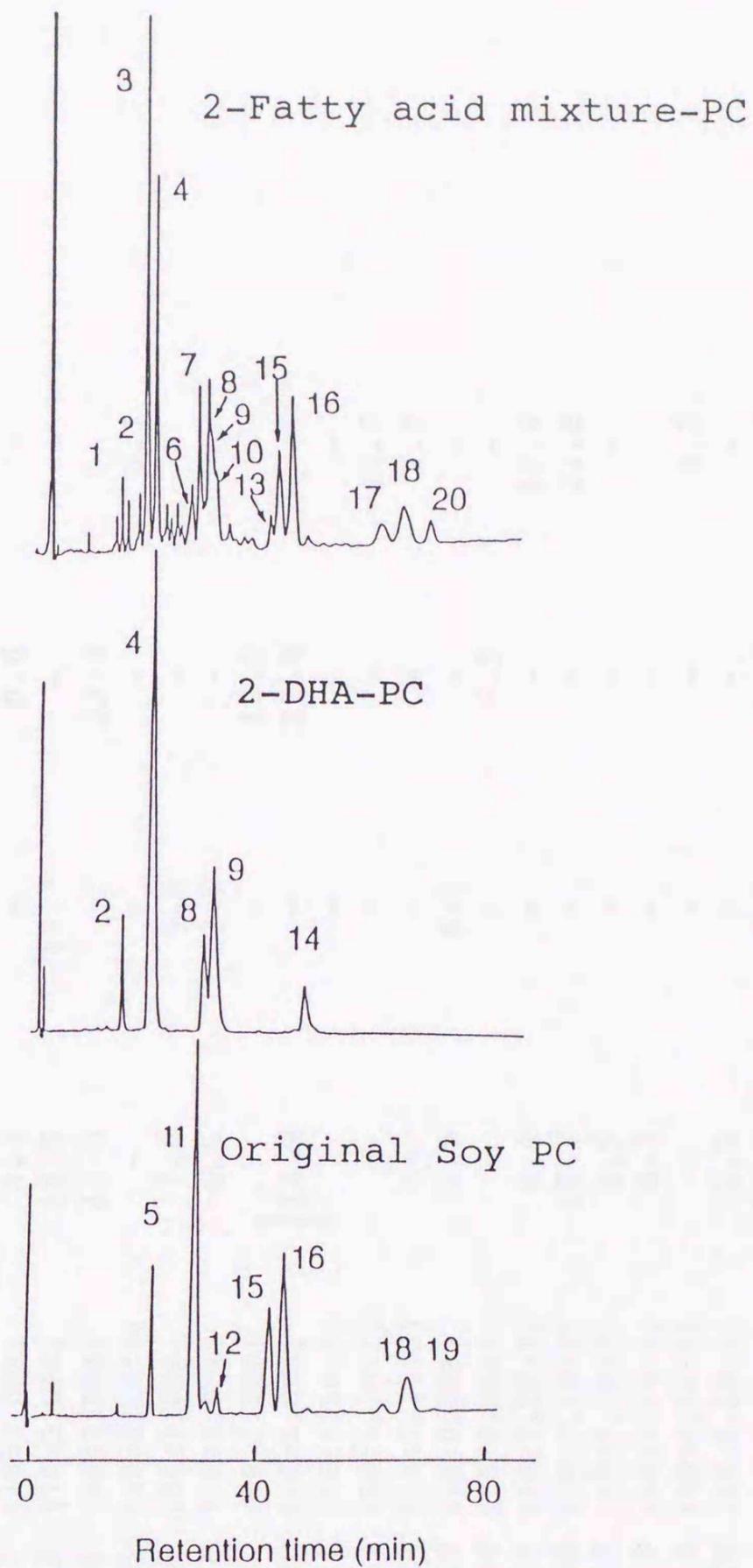


Fig.1-5. Reverse phase HPLC elution profiles of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated synthesized PC and that of original Soy PC.

Peaks are: 1:(18:3,EPA),2:(18:3,DHA),3:(18:2,EPA),4:(18:2,DHA),  
 5:(18:2,18:3),6:(18:1,EPA),7:(16:0,EPA),8:(18:1,DHA),9:(16:0,  
 DHA),10:(16:1,18:2),11:(18:2,18:2),12:(16:0,18:3),13:(18:0,  
 EPA),14:(18:0,DHA),15:(18:1,18:2),16:(16:0,18:2),17:(18:1,18:1),  
 18:(16:0,18:1),19:(18:0,18:2),20:(16:0,16:0).

Abbreviations are the same as in Table 1-2 and Table 1-9.

Table 1-9. Molecular species of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated synthesized PC prepared from various kinds of fatty acid substrates and that of the original Soy PC.

	2-Fatty acid* mixture-PC	2-EPA-PC	2-DHA-PC	Soy PC
1 (18:3,EPA)	1.5	5.0	-	-
2 (18:3,DHA)	1.1	-	5.6	-
3 (18:2,EPA)	14.9	47.7	-	-
4 (18:2,DHA)	11.5	-	53.9	-
5 (18:2,18:3)	-	-	-	8.3
6 (18:1,EPA)	3.6	9.5	-	-
7 (16:0,EPA)	6.0	22.8	-	-
8 (18:1,DHA)	-	-	10.5	-
9 (16:0,DHA)	-	-	22.8	-
10 (16:1,18:2)	15.9	-	-	-
11 (18:2,18:2)	-	-	-	41.6
12 (16:0,18:3)	-	-	-	2.2
13 (18:0,EPA)	1.5	6.1	-	-
14 (18:0,DHA)	-	-	6.5	-
15 (18:1,18:2)	6.4	-	-	12.6
16 (16:0,18:2)	10.7	-	-	21.8
17 (18:1,18:1)	2.5	-	-	-
18 (16:0,18:1)	4.7	-	-	-
19 (18:0,18:2)	-	-	-	8.2
20 (16:0,16:0)	1.9	-	-	-
Others	17.8	8.9	0.7	5.3
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

\*Fatty acid mixture prepared from sardine oil.  
Abbreviations: Soy PC, phosphatidylcholine from soybean.  
Other abbreviations are the same as in Table 1-2 and Table 1-3.

質のLPCがもともとSoy PCより調製されていることを考えると、本研究で試みたリン脂質合成反応によりSoy PCとは分子種組成の全く異なるPCが合成されたことは明らかである。また、純度の高い基質脂肪酸を用いることにより目的の分子種組成のPCを合成することが可能であることも明らかである。

## 第2節 固定化リパーゼによるリン脂質 sn-1位の脂肪酸のエステル交換反応

### 実験方法

#### 2.1 試薬

基質として使用したSoy PCはsoybean phosphatide extract (純度95%以上)をAvanti Polar Lipids, Incより購入した。EPA (純度90%)、DHA (純度88%)は、日本化学飼料(株)から入手し、*n*-ヘキサン:ジエチルエーテル系シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって過酸化物及び水分を除去したものの基質として用いた。

Lipozyme IM20(27.5 BIU/g)はトリグリセリド(TG)のsn-1,3位に対して特異性をもつMucor miehei起源のリパーゼを多孔性陰イオン交換樹脂に固定化した酵素剤で、Novo Nordisk A/Sより入手した。その他の試薬は全て市販の特級品または蒸留したものを用いた。

#### 2.2 Lipozyme IM20によるエステル交換反応

Soy PC 10mgとEPAを含んだ*n*-ヘキサン溶液に Lipozyme IM20加えて反応を開始し、40°Cの恒温往復振とう器(振とう幅 2cm 75rpm)で一定時間反応を行なった。アセトン:エタノール(1:1, v/v) 5mlを添加して反応停止し、更に、クロロホルム:メタノール(1:1, v/v) 30mlを用いて孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで酵素をろ別し、エバポレーターで溶媒を留去して脂質画分を回収した。

#### 2.3 回収率の算出

回収したリン脂質画分をSep-pak シリカカートリッジに供し、クロロホルム:メタノール(10:1, v/v)を用いて未反応の脂肪酸を除去した後、メタノールでリン脂質画分を回収した。TLC-FID分析によりPCのピーク面積を求め、重量とのカリブレーションカーブよりエステル交換反応により生

成した EPA結合型PC (1-EPA-PC) の重量を回収率 (Recovery) とし、以下の式に基づいて算出した。

Recovery (%)

$$= \text{Interesterified PC}^* / \text{Substrate PC} \times 100 (\text{w/w})$$

\*TLC-FIDによる脂質組成分析で測定したPC画分のピーク面積とカリブレーションカーブより算出

なお、TLC-FIDの測定条件は第1章第1節1-1.3と同様である。

#### 2.4 エステル交換率

回収したリン脂質画分をTLC(Kieselgel 60, E.Merck) にスポットし、クロロホルム:メタノール:水(65:25:4, v/v/v) で展開後、PC画分をかき取りメタノールで溶出した。メチルエステル化した後、GLC分析により脂肪酸組成を分析した。反応基質として使用したSoy PCにはEPAが含まれていないことから(Table 1-10)、脂肪酸組成における EPAの割合をエステル交換率とした。GLCの測定条件は次の通りである。

装置: 日立163形ガスクロマトグラフ

カラム: 40m × 1.2mm内径, 膜厚 0.5 μm G-300

(化学品検査協会 G-カラム)

カラム温度: 200°C

注入口及び検出器(FID)温度: 250°C

キャリアガス: He 4ml/min

#### 2.5 *n*-ヘキサン量の検討

Soy PC 10mg(12.9 μmol)とEPA 30mg (100 μmol) を含んだ 0.25-

Table 1-10. Fatty acid composition of substrate lipids.

	Soy PC	EPA
16:0	13.7	1.0
18:0	5.8	—
18:1	10.6	—
18:2	62.8	1.7
18:3	6.2	1.4
20:5 (EPA)	—	90.9
others	0.9	5.0

Abbreviations: Soy PC, phosphatidylcholine from soybean; EPA, eicosapentaenoic acid.

6.0mlの*n*-ヘキサン溶液に Lipozyme IM20 15mgを加えて48時間反応を行うことにより、反応溶媒として用いた*n*-ヘキサン量の影響について検討した。以後の操作は 第1章第2節2.2と同様に行った。

## 2.6 脂肪酸量の検討

Soy PC 10mgとEPA 15-150mgを含んだ*n*-ヘキサン溶液0.5mlに Lipozyme IM20 30mgを加えて48時間反応を行うことにより、エステル交換反応における基質脂肪酸量について検討した。以後の操作は 第2章第2節2.2と同様に行った。

## 2.7 酵素量の検討

Soy PC 10mgとEPA 60mgを含んだ*n*-ヘキサン溶液 0.5mlにLipozyme IM20 を15-60mg添加量を変えて48時間反応を行うことにより、エステル交換反応における酵素量について検討した。以後の操作は 第2章第2節2.2と同様に行った。

## 2.8 水分量の影響

種々の飽和塩溶液を用いて Lipozyme IM20 40mgの水分活性を25℃で24時間調整した後、Soy PC 10mg（水分量 0.4%）とEPA 60mg（水分量 0.076%）を含んだ*n*-ヘキサン溶液 0.5ml（水分量 57.6ppm）を加えて48時間反応を行うことにより、エステル交換反応における水分の影響について検討した。以後の操作は第2章第2節2.2と同様に行った。なお水分活性は、 $a_w=0.064$  (LiBr · H<sub>2</sub>O)、 $a_w=0.13$  (LiCl · H<sub>2</sub>O)、 $a_w=0.75$  (NaCl)、 $a_w \simeq 0$  (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)の4点について検討を行った。

## 2.9 エステル交換反応における位置特異性の検討

6mM 塩化カルシウムと27.5mMデオキシコール酸ナトリウムを含む0.2

Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 2.6mlに、先のエステル交換反応により調製した 1-EPA-PC(8mg)を懸濁した後、精製PLA<sub>2</sub>を添加し、40°Cで45分間加水分解を行った。以後の操作は第1章第1節1-2.5に従った。また、分析は第1章第2節2.4と同一条件で行った。

## 結果及び考察

### 2.1 *n*-ヘキサン量の検討

第2節では固定化リパーゼである Lipozyme IM20を用いて、リン脂質のsn-1を所望の脂肪酸にエステル交換する反応について検討した。

Soy PC 10mgとEPA 30mgを含んだ*n*-ヘキサン溶液の量を変えて48時間反応を行った結果、*n*-ヘキサン量が少なくなるにつれ、すなわち基質濃度が高まるにつれてエステル交換率、回収率ともに上昇し、反応溶液 0.5 mlでエステル交換率 30.2%、回収率 27.5%となった (Fig.1-6)。しかし、0.5ml以下では回収率は上昇するもののエステル交換率の低下がみられたことから、以後*n*-ヘキサン溶液量を 0.5mlに規定した。

### 2.2 基質脂肪酸量の検討

Soy PC 10mg(12.9  $\mu$ mol)に対し EPA量を変えて反応を行い至適脂肪酸量を検討した (Fig.1-7)。

EPA 30mg(100  $\mu$ mol)の添加ではエステル交換率が 33.5%であったのに対し、60mg(200  $\mu$ mol)では 39.0%まで上昇した。それ以上の 90mg(300  $\mu$ mol)、150mg(500  $\mu$ mol)の添加では逆にエステル交換率の低下がみられた。回収率は脂肪酸の添加量が増加するにつれて高くなった。sn-1位を EPAにエステル交換するためにはSoy PCに対し多量のEPAの添加が必要であるが、過剰量では反応が阻害されるため至適EPA量を 60 mgに規定した。

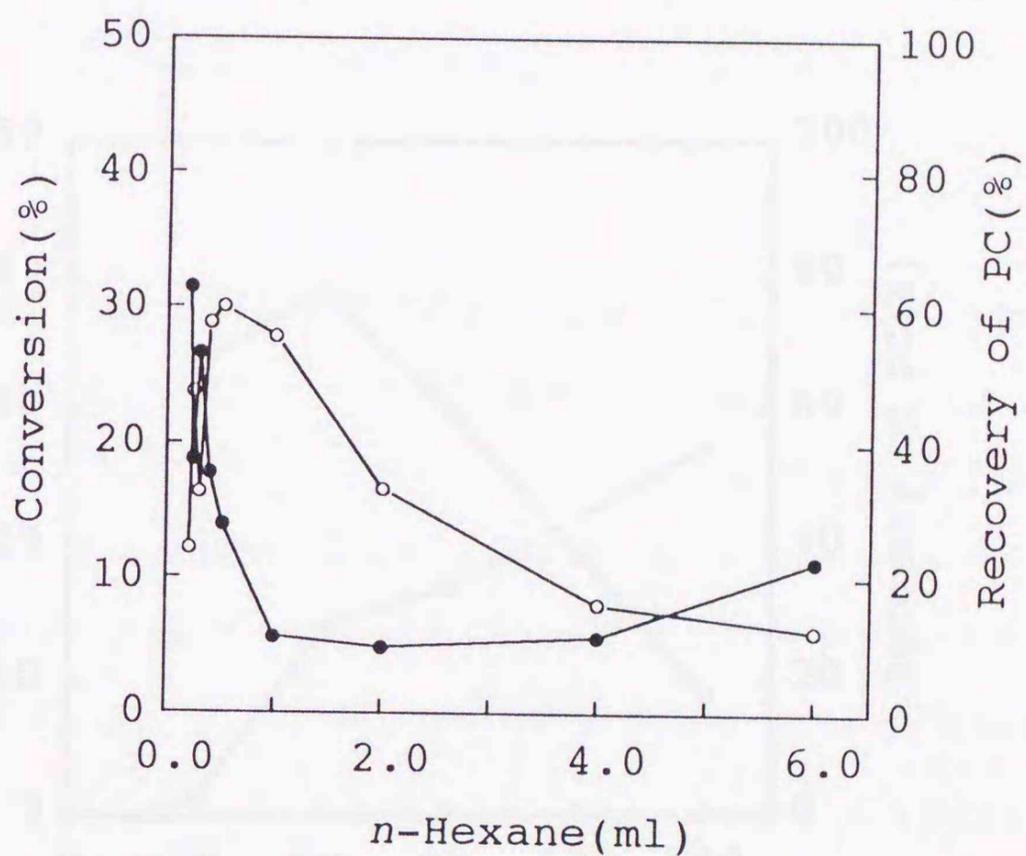


Fig.1-6. Effect of *n*-hexane content on Lipozyme IM20-mediated transesterification of PC. Reaction conditions: *n*-hexane containing 100mg Soy PC and 30mg EPA, 15mg Lipozyme IM20. Abbreviations are the same as in Table 1-10.

—○— Conversion(%) —●— Recovery of PC(%)

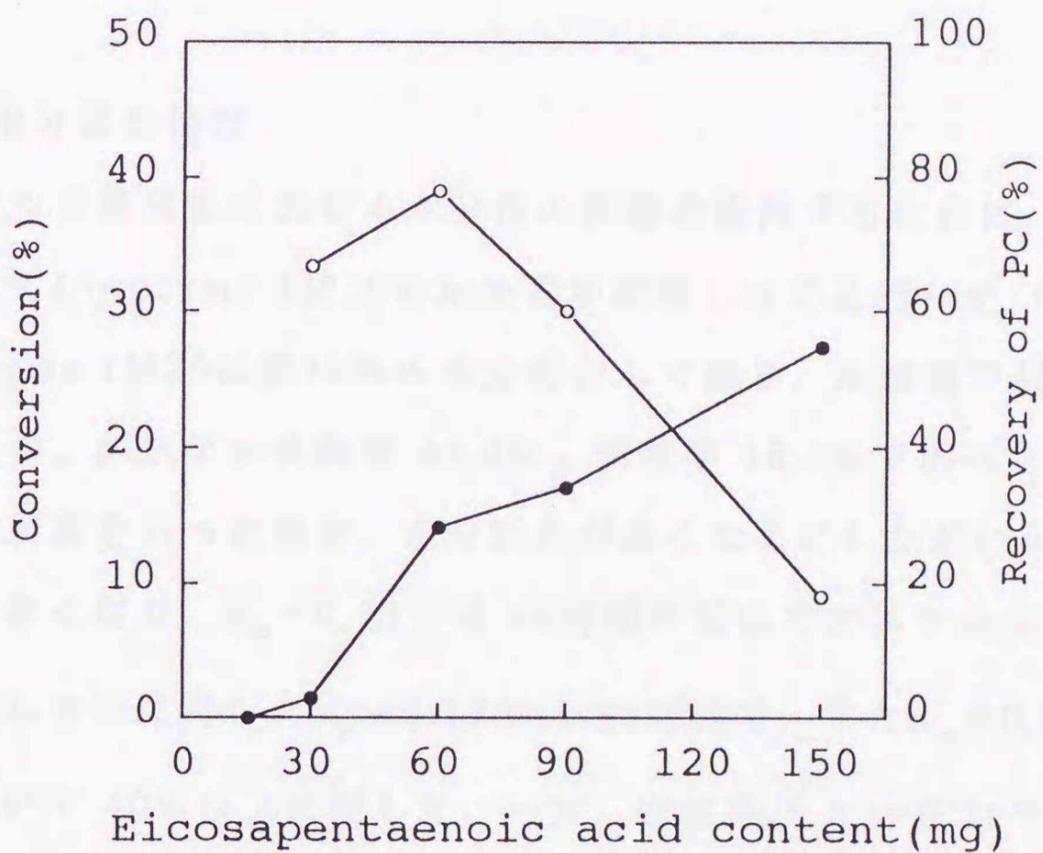


Fig.1-7. Effect of EPA content on Lipozyme IM20-mediated transesterification of PC.

Reaction conditions: 0.5ml *n*-hexane containing 10mg Soy PC and 15-150mg EPA, 30mg Lipozyme IM20. Abbreviations are the same as in Table 1-10.

—○— Conversion(%)      —●— Recovery of PC(%)

### 2.3 酵素量の検討

Lipozyme IM20の量を変えてエステル交換反応を行い、至適酵素量について検討した (Fig.1-8)。

Lipozyme IM20の添加量が増加するにつれて、エステル交換率が高くなり 40mgにおいて 44.7%、その際の回収率は 18.2%であった。それ以上の添加量ではエステル交換率および回収率の両方が低下することから、多量の酵素によって目的生成物の1-EPA-PCまでもが加水分解されることが考えられた。以上の結果より至適酵素量を 40mgに規定した。

### 2.4 水分量の検討

エステル交換反応における水分量の影響を検討するために、水分活性を指標としてLipozyme IM20の水分量を調整し反応を行った (Fig.1-9)。

Lipozyme IM20は約10%の水分を含んでおり、未調整で48時間反応を行った場合、エステル交換率 44.9%、回収率 18.2%であった。水分活性を調整後反応を行った場合、水分活性が高くなるにしたがいエステル交換速度が大きくなり、 $a_w=0.75$ では 48時間の反応でエステル交換率が 40%以上に達したのに対し、 $a_w=0.13$ では 96時間で、また $a_w=0.064$ では 120時間において 40%以上に達した。一方、回収率は  $a_w=0.75$ では時間の経過とともに急激に低下し、48時間で 20%以下になった。 $a_w=0.13$ 、 $a_w=0.064$ では交換率が 40%に達した96時間、120時間においても回収率が 34.9%、48.8%と比較的高い値を示した。一方、五酸化二リンで脱水した場合、回収率は80%程度であるものの反応系の水分が少ないためエステル交換率の上昇は著しく遅かった。

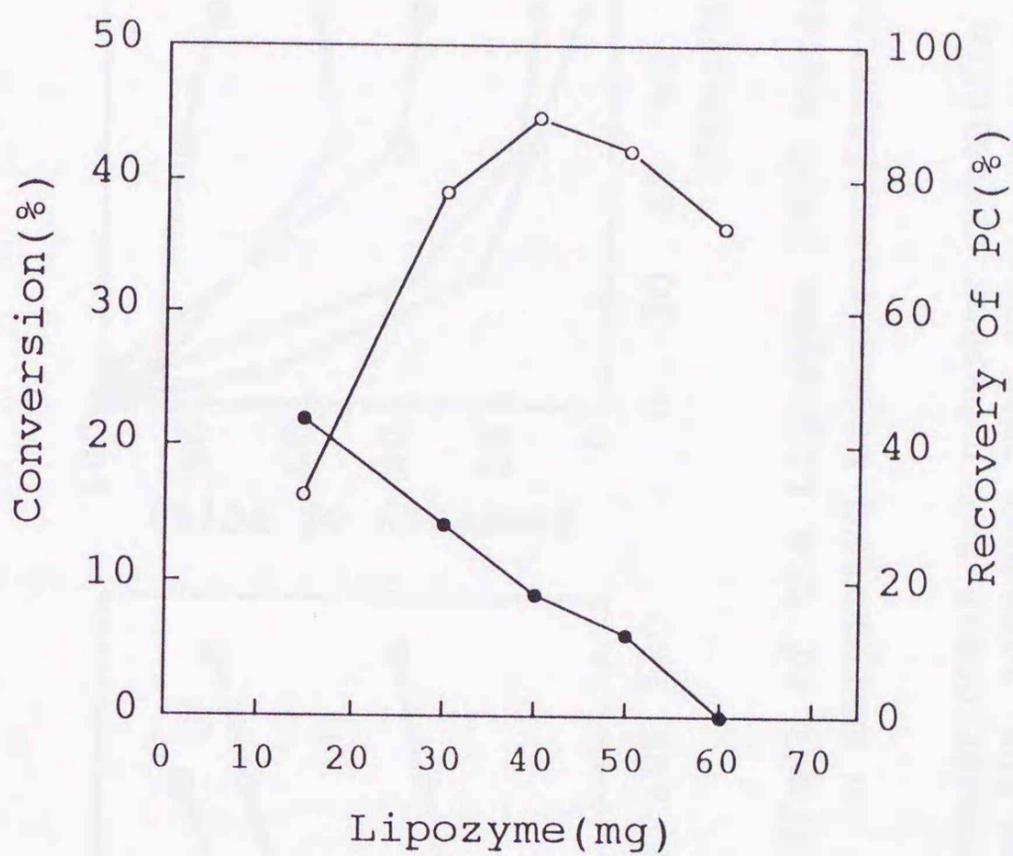


Fig.1-8. Effect of Lipozyme IM20 content on transesterification of PC.

Reaction conditions: 0.5ml *n*-hexane containing 10mg Soy PC and 60mg EPA, 15-60mg Lipozyme IM20. Abbreviations are the same as in Table 1-10.

—○— Conversion(%)    —●— Recovery of PC(%)

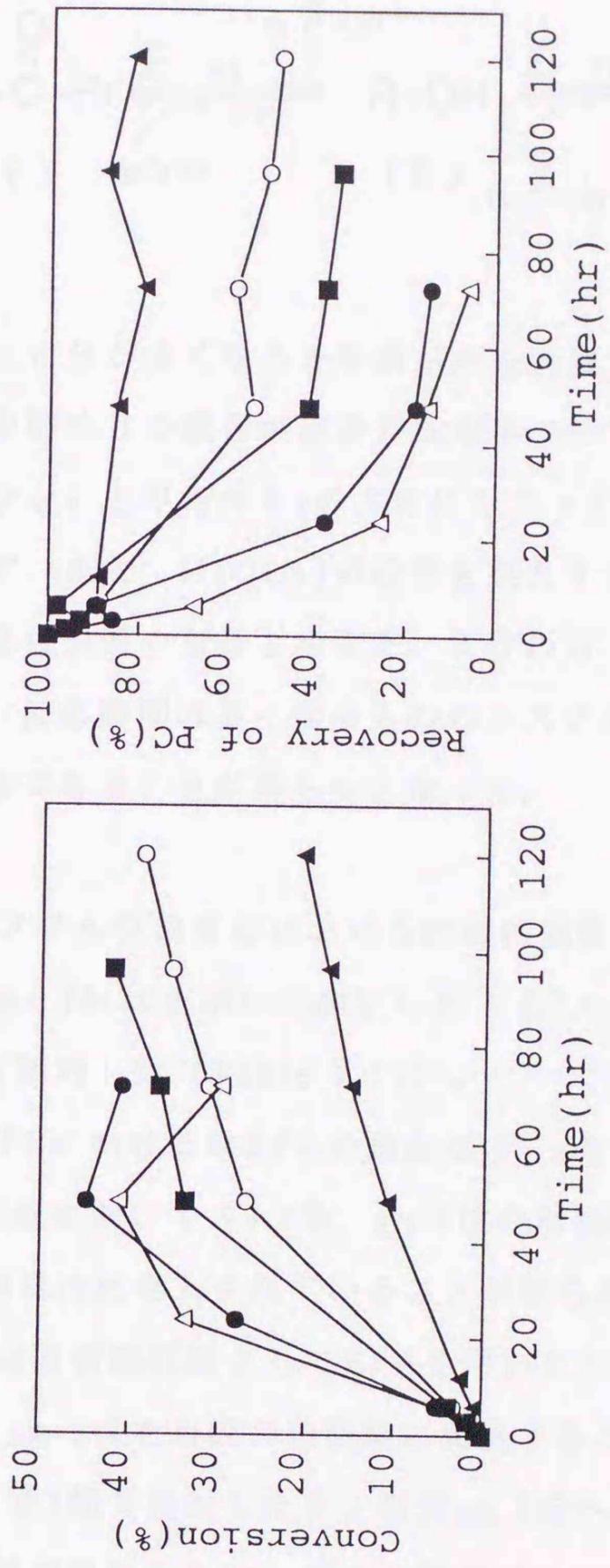
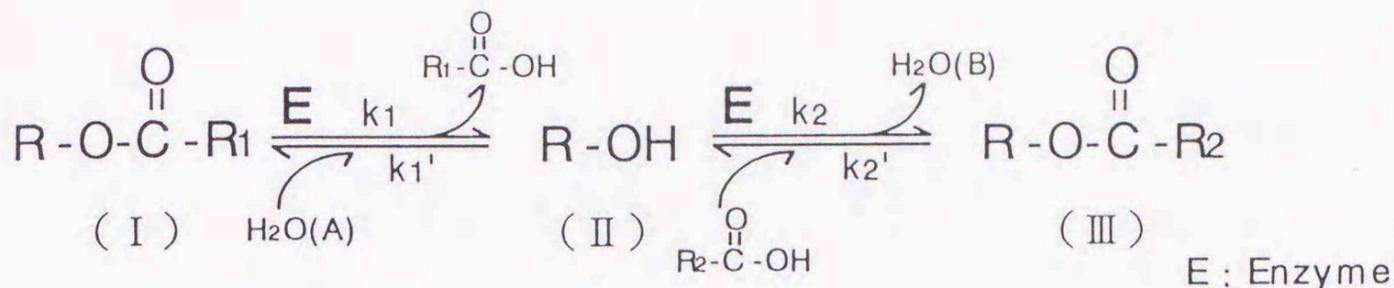


Fig.1-9. Effect of the Lipozyme IM20 water activity on enzymatic transesterification of PC.

Reaction conditions: 0.5ml n-hexane containing 10mg Soy PC and 60mg EPA, Lipozyme IM20 40mg (initial weight). Abbreviations are the same as in Table 1-10.

▲—P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dehydration —○—aw =0.064 —■—aw =0.13  
 —●—aw =0.75 —▼—without aw adjustment

エステル交換反応は以下の式のように示すことができる。



反応系に水分が多くなると平衡が水を消費する  $k_1$ 、 $k_2'$  の方向にシフトするため分解物 II の割合が高まり回収率の低下につながる。一方、反応系の水分が少ないと平衡が  $k_2$  の方向にシフトするが酵素タンパクが十分活性化されず、また、 $\text{H}_2\text{O(A)}$  の役割を果たす水の割合も低くなるため全体の反応の進行が遅くなると考えた。すなわち、反応系の水分量を少なくすることで、反応時間は長くなるもののエステル交換率の高い 1-EPA-PC を多量に調製できることが明らかとなった。

## 2.5 エステル交換反応における位置特異性の検討

Lipozyme IM20 を用いて調製した 1-EPA-PC における EPA の結合位置について検討した (Table 1-11)。

1-EPA-PC におけるは EPA の割合は 35.1% であった。EPA は、sn-1 位の脂肪酸組成において 73.3%、sn-2 位の脂肪酸組成において 0.6% を占め、sn-1 位に特異的に導入されていることが明らかとなった。

第 2 節では基質脂肪酸として EPA を用いたが、他の脂肪酸を用いることによって、sn-1 位を目的の脂肪酸に変換することが可能であることは明らかである。第 1 節で検討したリン脂質 sn-2 位への HUFA のエステル合成反応と、第 2 節で検討した sn-1 位の脂肪酸のエステル交換反応を併用することにより、EPA、DHA 結合型リン脂質分子種をはじめ、所望のリン脂質分子種の調製が可能である。

Table 1-11. Fatty acid composition of sn-1 and sn-2 of 1-EPA-PC prepared through Lipozyme IM20-mediated transesterification.

Fatty acid	Transesterified 1-EPA-PC		
	Direct analysis of 1-EPA-PC	Position <u>sn</u> -1	Position <u>sn</u> -2
16:0	2.8	3.2	1.7
18:0	0.6	1.1	0.0
18:1	7.1	2.9	11.3
18:2	46.8	12.3	74.2
18:3	4.8	2.1	6.3
20:5 (EPA)	35.1	73.3	0.6

Abbreviations: 1-EPA-PC, eicosapentaenoic acid-containing phosphatidylcholine (at sn-1)

## 第2章 高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質分子種の酵素的合成反応における必須水分代替物の応用

第1章ではリパーゼとPLA<sub>2</sub>の特異的な反応を利用して、有機溶媒中でリン脂質のsn-1、sn-2に所望の脂肪酸を導入する方法について検討した。しかし、酵素の活性発現のために加えた水が副反応である加水分解反応をも進行させ、エステル合成反応においては低い合成率にとどまり、またエステル交換反応においても回収率の低下がみられた。

有機溶媒中において完全無水の状態では酵素の触媒活性は発現しないものの、水和により活性が発現することが報告されている<sup>29)</sup>。この水和のプロセスは以下の段階を経て進行していると考えられている。

ステップ1 水分子の大部分はタンパク質側鎖のカルボキシル基のプロトン化、アミノ基のプロトン化を助ける。この状態で水分子およびタンパク質主鎖の運動の自由度はきわめて小さく、触媒活性は観察されない。

ステップ2 タンパク質側鎖残基のイオン化が完了した後、水分子は他の極性部位にクラスターを形成する。局所的な誘電率が高くなると同時にタンパク質分子の運動の自由度も急激に増大する。

以上は、水和の進行にともないタンパク質構造の運動の自由度が増大する過程である。コンホメーションは同じであるが、その揺らぎが大きくなると考えられている。

ステップ3 全ての極性部位が水和されタンパク質の運動の自由度はほぼ飽和するが、触媒活性は含水量に応じて向上する。

ステップ4 酵素分子全体が水の単分子層で覆われる。

以上の結果より、タンパク質の極性部位が水和されコンホメーションが柔軟になることが酵素活性発現に必要であるとするならば、水素結合能力

を有し高誘電率である物質を用いることにより、酵素を活性化し且つ副反応である加水分解を抑制することができるため収率の増加が期待できると考えた。

そこで第2章では、PLA<sub>2</sub>、リパーゼの反応における必須水分代替物の検索を行い、反応生成物の収率を高めることについて検討した。さらに、リパーゼとPLA<sub>2</sub>の反応を連続して行うことによりEPA及びDHA結合型リン脂質分子種を合成し、ホスホリパーゼD(PLD)を用いてホスファチジル基転移反応を行うことにより化学形態の異なるEPAやDHA結合型リン脂質分子種の調製を試みた。

## 第1節 ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>のエステル合成反応における必須水代替物の応用

### 実験方法

#### 1.1 試薬

LPCは、第1章第1節1-1.1と同様のものを使用した。EPA(純度90.0%)、DHA(純度95.0%)は日本化学飼料(株)より入手し、第1章第2節2.1と同様の方法で過酸化物及び水分を除去した後使用した。

PLA<sub>2</sub>は工業用に使用されているブタ膵臓由来のLecitase 10L (Novo Nordisk A/S) を透析後、凍結真空乾燥して用いた。PLA<sub>2</sub>活性は第1章第1節1-1.1と同様の方法で測定した結果、305.8 units/mg powderであった。ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、エチレングリコール、プロピレングリコールはそれぞれ和光純薬(株)製の試薬特級を使用した。

#### 1.2 ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> によるエステル合成反応

LPC 110mg、EPA または DHA 180mg をグリセロール 5500mg に分散させ、これにPLA<sub>2</sub> 23mg (7033.4units) と3  $\mu$ mol 塩化カルシウムを含んだ0.2M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0) または必須水分代替物を加えて、25°C、800-1000rpmで反応を行った。一定時間反応後、クロロホルム:メタノール:水(10:5:3, v/v/v)を加えて反応を停止し、クロロホルム層より脂質画分を回収した。以後の操作は第1章第1節1-1.2と同様に行った。

#### 1.3 合成率の算出

合成率 (Yield) は第1章第1節1-1.3と同様に以下の式により算出した。

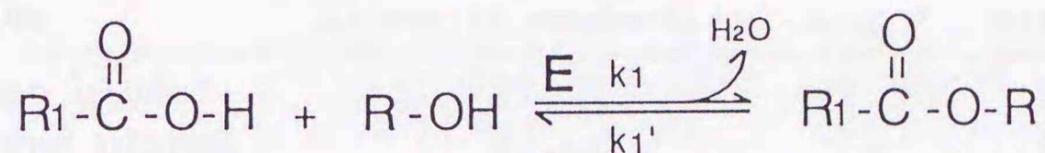
Yield(%)

$$= \text{Synthesized PC} / \text{Substrate LPC} \times 100(\text{w/w})$$

## 結果及び考察

### 1.1 ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>のエステル合成反応における必須水分代替物の検索

第1章第1節では PLA<sub>2</sub>によるエステル合成反応について検討した結果、sn-2位に選択的に HUFAを導入できることが明らかとなった。しかし、その際の合成率は 26-30%にとどまった。これは酵素を活性化させるために添加した水が加水分解をも進行させ、合成率が低い値にとどまったためであると考えられる。



E : Enzyme

本反応は過剰に添加した水により反応の平衡が加水分解側にシフトするため、見かけ上合成率が低くなる。

そこで酵素を活性化する水の働きを代替する物質を検索し使用することにより、加水分解反応を抑制しながら合成反応を進行させ、2-HUFA-PCの合成率を高めることができると考えた。

高誘電率で log P (オクタノール-水に対する分配係数) が小さな物質が酵素を活性化できる<sup>29,37)</sup>と考えられているため、まず最初に0.2Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.1ml と種々の物質 0.15mlを加えエステル合成反応を行った (Table 2-1)。

プロピレングリコールを添加した場合は、合成率が 17.1%と緩衝液 0.1 mlのみを添加した場合に比べ合成率に変化はみられなかった (Fig.2-1)。エチレングリコールを添加した場合は合成率が5.8%に低下した。一方、ホルムアミドを添加した場合、合成率が 41.6%まで上昇したものの、メチル

Table 2-1. Dielectric constant ( $\epsilon$ ),  $\log P$  and water content of the polar additives employed in enzyme activation.

Additive	Dielectric constant( $\epsilon$ )	$\log P$	Water (%)
Ethylene glycol	37.70	-1.93	0.85
Propylene glycol	32.00	-	0.22
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	37.00	-1.04	0.2
Formamide	107	-1.61	0.5
Water	78.39	-1.38	100
<i>N,N</i> -Dimethylacetamide	37.78	-0.77	0.1
Glycerol	42.50	-	0.15

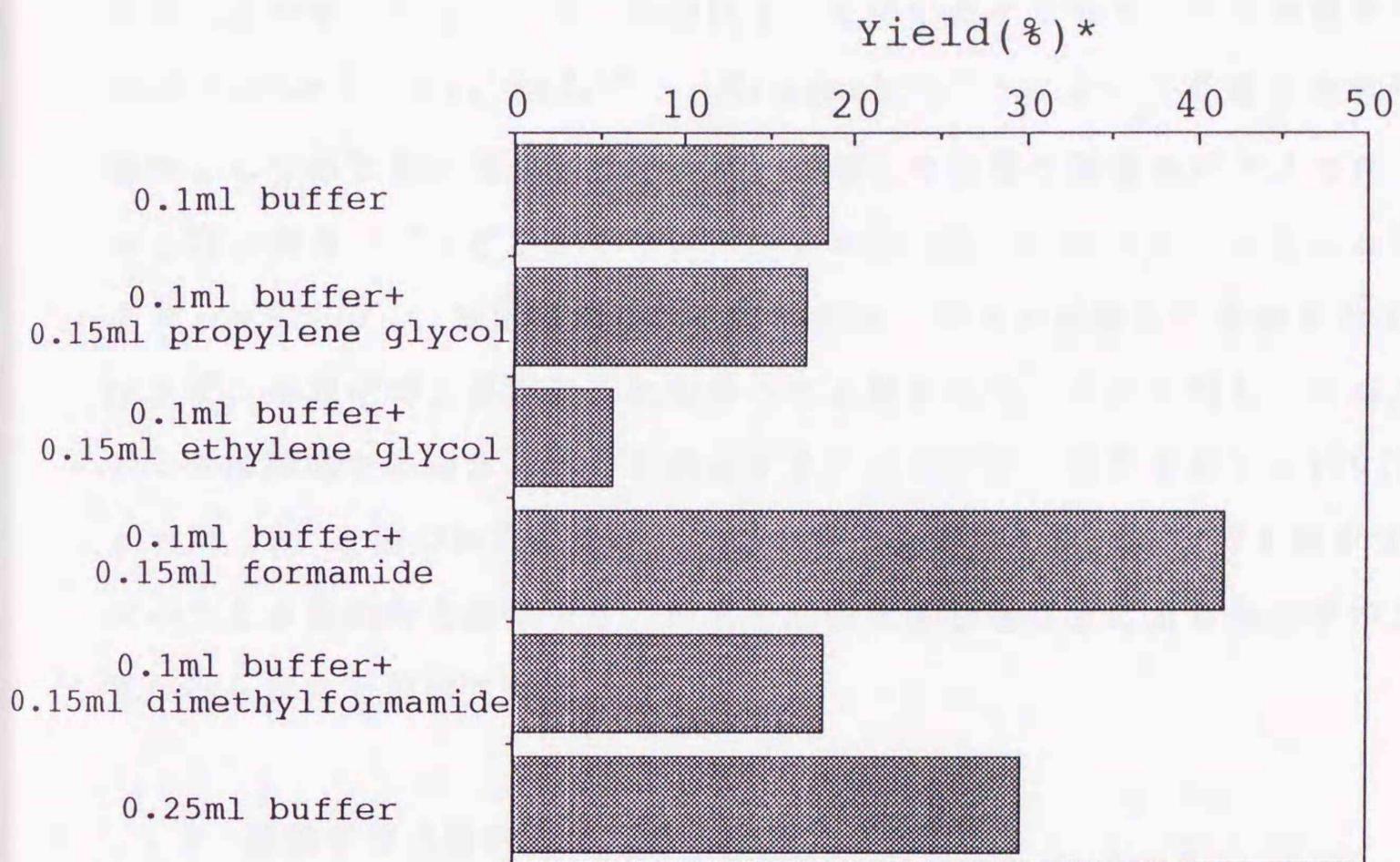


Fig.2-1. Effect of polar additives on phospholipase A<sub>2</sub>-mediated esterification.

Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 23mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, 25°C, 800-1000rpm, 48hr.

Buffer used was 0.2M tris-HCl pH8.0 containing 3 μmol CaCl<sub>2</sub>.

\* Yield(%) = synthesized PC / substrate LPC × 100 (w/w)

Abbreviations are the same as in Fig.1-1 and Table 1-2.

基の2個ついた*N,N*-ジメチルホルムアミドの添加では 18.1%となったことから、ホルムアミドのプロトン (-H) が酵素の活性化に重要な役割を果たしていることが示された。0.2M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 緩衝液を 0.25ml 添加した場合、合成率が 29.7% に上昇したもののホルムアミドにはおよばなかったことから、必須水分代替物としてホルムアミドが有効であることが明らかとなった。分散媒として用いたグリセロールは誘電率  $\epsilon = 42.50$  であり、Reslowら<sup>38)</sup>、Kitaguchiら<sup>31)</sup> によって必須水分代替物としての効果が報告されている。添加した物質の誘電率がグリセロールと同じ場合 (プロピレングリコール  $\epsilon = 32.00$ 、*N,N*-ジメチルホルムアミド  $\epsilon = 37.00$ )、反応系内において酵素タンパクの活性化に影響をおよぼさず、合成率の上昇がみられなかったと思われる。それに対し、ホルムアミドは酵素と多点水素結合を形成することができ、誘電率が  $\epsilon = 109$  (水  $\epsilon = 78.39$ ) と他の物質に比べ高いことから、グリセロール中でも酵素タンパクと水素結合を形成でき、酵素を活性化させることにより合成率の上昇がみられたと推察される。

## 1.2 必須水分代替物の添加量の影響

必須水分代替物としてホルムアミドが有効であったので、添加量を 0.5 ml とし、ホルムアミドと水 (緩衝液) の割合を変えて反応を行った。その結果、トリス-塩酸緩衝液のみを 0.5ml 添加したとき合成率が 16.3% であったのに対し、(トリス-塩酸緩衝液 0.3ml + ホルムアミド 0.2ml) では 23.7%、(トリス-塩酸緩衝液 0.2ml + ホルムアミド 0.3ml) では 29.7% と緩衝液をホルムアミドに置換するにつれて合成率が上昇し、ホルムアミドのみを 0.5ml 添加したとき 61.0% まで達した (Fig.2-2)。

ホルムアミドの添加量を変えて反応を行ってみると、0.5ml までは添加量の増加にともない合成率が上昇した (Fig.2-3)。トリス-塩酸緩衝液を添加した場合も添加量の増加につれて合成率の上昇がみられたが、最大値は 29.7% にとどまった。ホルムアミドを更に添加すると、逆に合成率が低

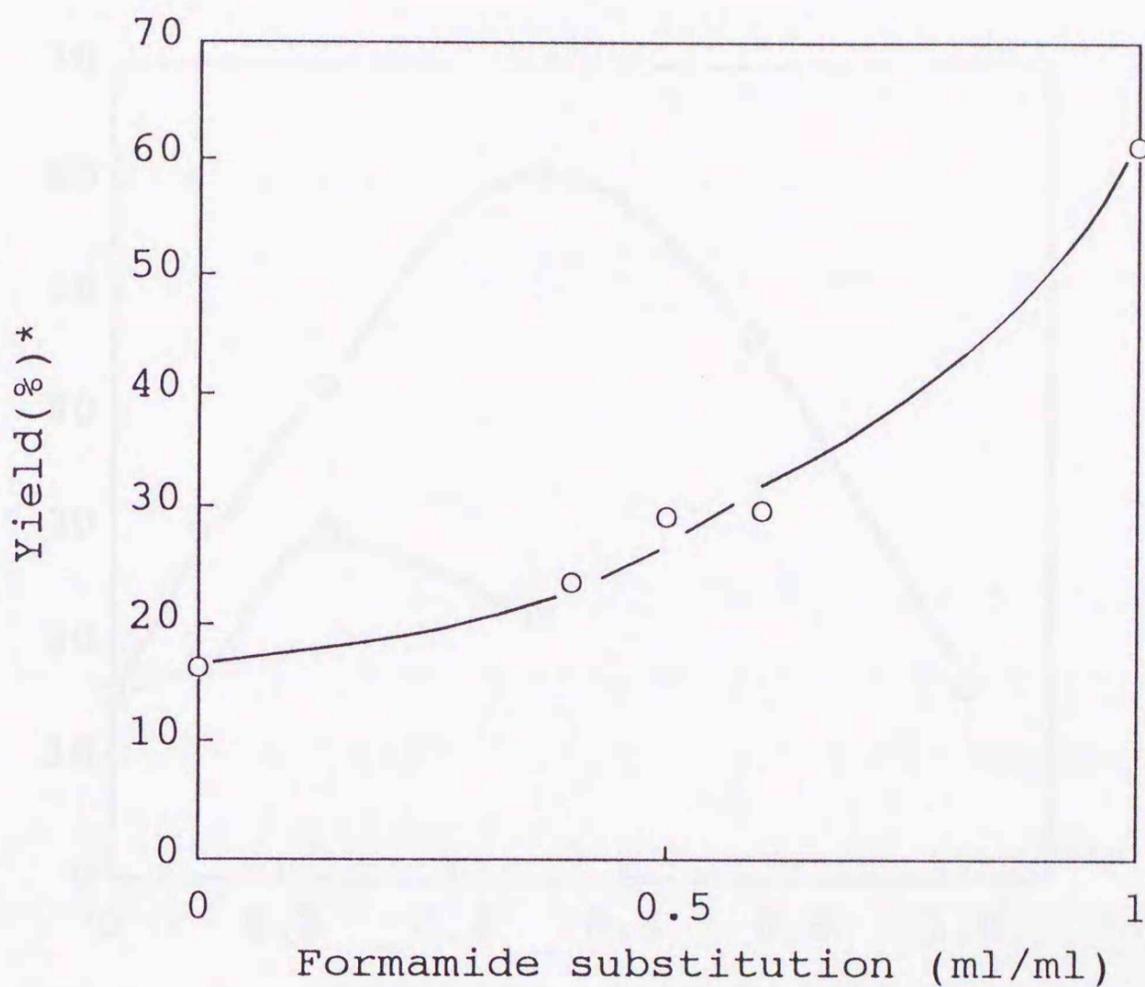


Fig.2-2. Effect of formamide substitution for essential water on phospholipase A<sub>2</sub>-mediated esterification.

Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 23mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, (formamide+buffer) 0.5ml, 25°C, 800-1000rpm, 48hr.

Buffer used was 0.2M tris-HCl pH8.0 which contains 3  $\mu$ mol CaCl<sub>2</sub>.

\* Yield(%) = synthesized PC / substrate LPC  $\times$  100 (w/w)  
Abbreviations are the same as in Fig.1-1 and Table 1-2.

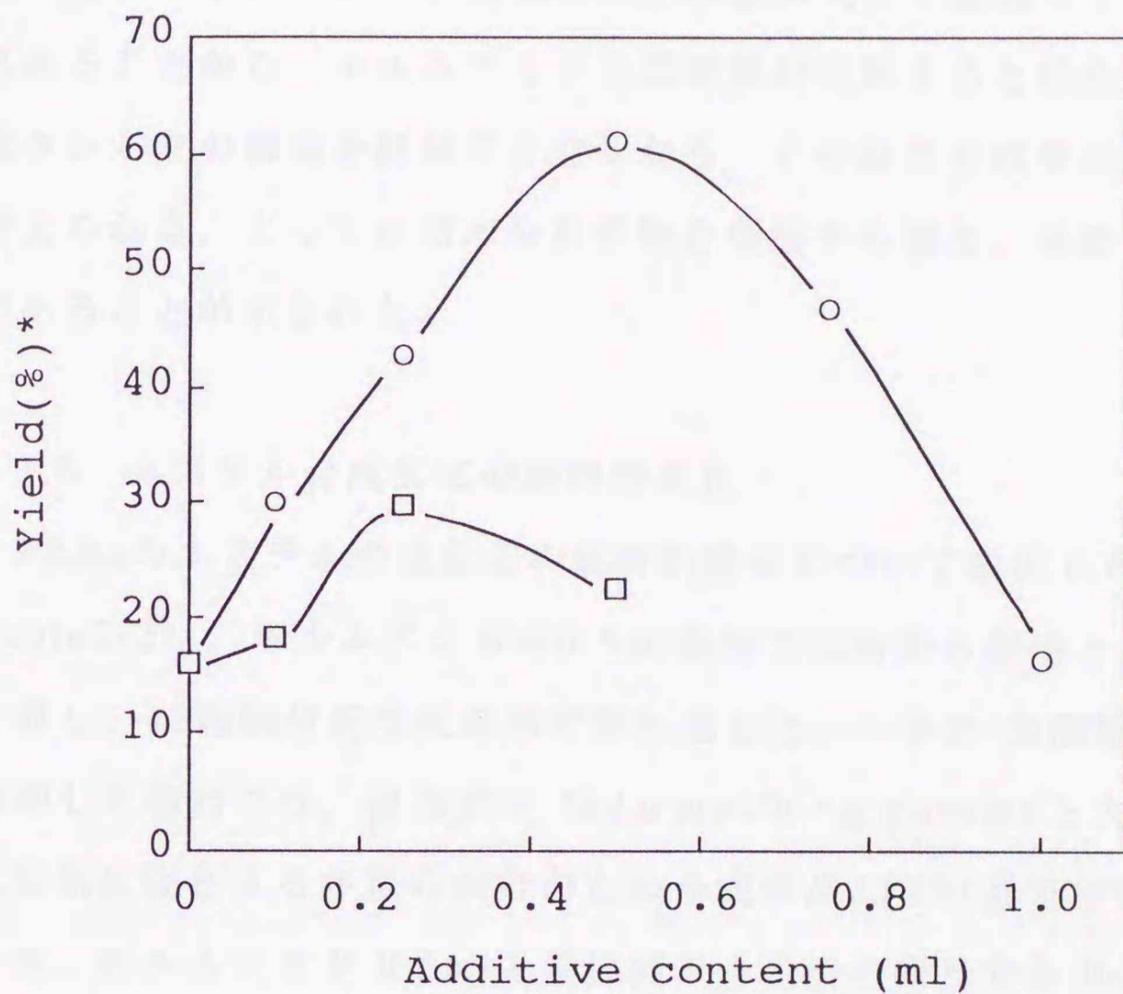


Fig.2-3. Effect of formamide and water content on phospholipase A<sub>2</sub>-mediated esterification.

Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 23mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, 3 μmol CaCl<sub>2</sub>, 25°C, 800-1000rpm, 48hr.

Buffer used was 0.2M tris-HCl pH8.0.

\* Yield(%) = synthesized PC / substrate LPC × 100 (w/w)  
Abbreviations are the same as in Fig.1-1 and Table 1-2.

—○— formamide      —□— tris-HCl buffer

下し 1.0mlの添加では 16.3%となった。木瀬ら<sup>39)</sup>、Triantafyllouら<sup>40)</sup>の報告においても過剰の必須水分代替物の添加が合成率や反応速度の低下をまねくことが報告されている。トリス-塩酸緩衝液とホルムアミドに溶解したPLA<sub>2</sub>の蛍光強度を測定したところ、ホルムアミド溶液において蛍光強度の大幅な低下と最大波長の長波長側へのシフトがみられた。すなわち、疎水性のトリプトファン残基の存在状態が大きく変化していることが予想されることから、ホルムアミドの添加量が増加すると活性発現に必要な酵素タンパクの構造を維持できなくなり、その結果合成率が低下したことが考えられる。よって必須水分代替物を使用する場合、至適量の検討が重要であることが示された。

### 1.3 エステル合成反応の経時的変化

PLA<sub>2</sub>のエステル合成反応の経時的変化について検討した (Fig.2-4、Table2-2)。ホルムアミドの0.5ml添加では時間の経過とともに合成率が上昇し、48時間付近で反応が平衡に達した。トリス-塩酸緩衝液を 0.5ml 添加した場合では、初速度が  $769 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g enzyme}$  と大きいものの、反応系に存在する多量の水分のため合成率が20%付近で平衡状態になった。一方、ホルムアミド 0.5ml とほぼ同モルの水に相当する 0.2ml のトリス-塩酸緩衝液の添加では、合成率が約 30% 付近で反応が平衡に達した。このとき初速度は  $89 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g enzyme}$  になりホルムアミド添加の場合の  $77 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g enzyme}$  とほぼ同じ値になった。以上の結果よりホルムアミドを必須水分代替物として用いた場合、モルあたりで水と同等の酵素活性化能力を維持しながら反応系の水分を少なくできることから水を生成するエステル合成の方向に反応が進み、結果として合成率が高まることが示された。

### 1.4 基質脂肪酸の影響

基質脂肪酸として同じ n-3 系列の DHA についても同様に反応を行った。

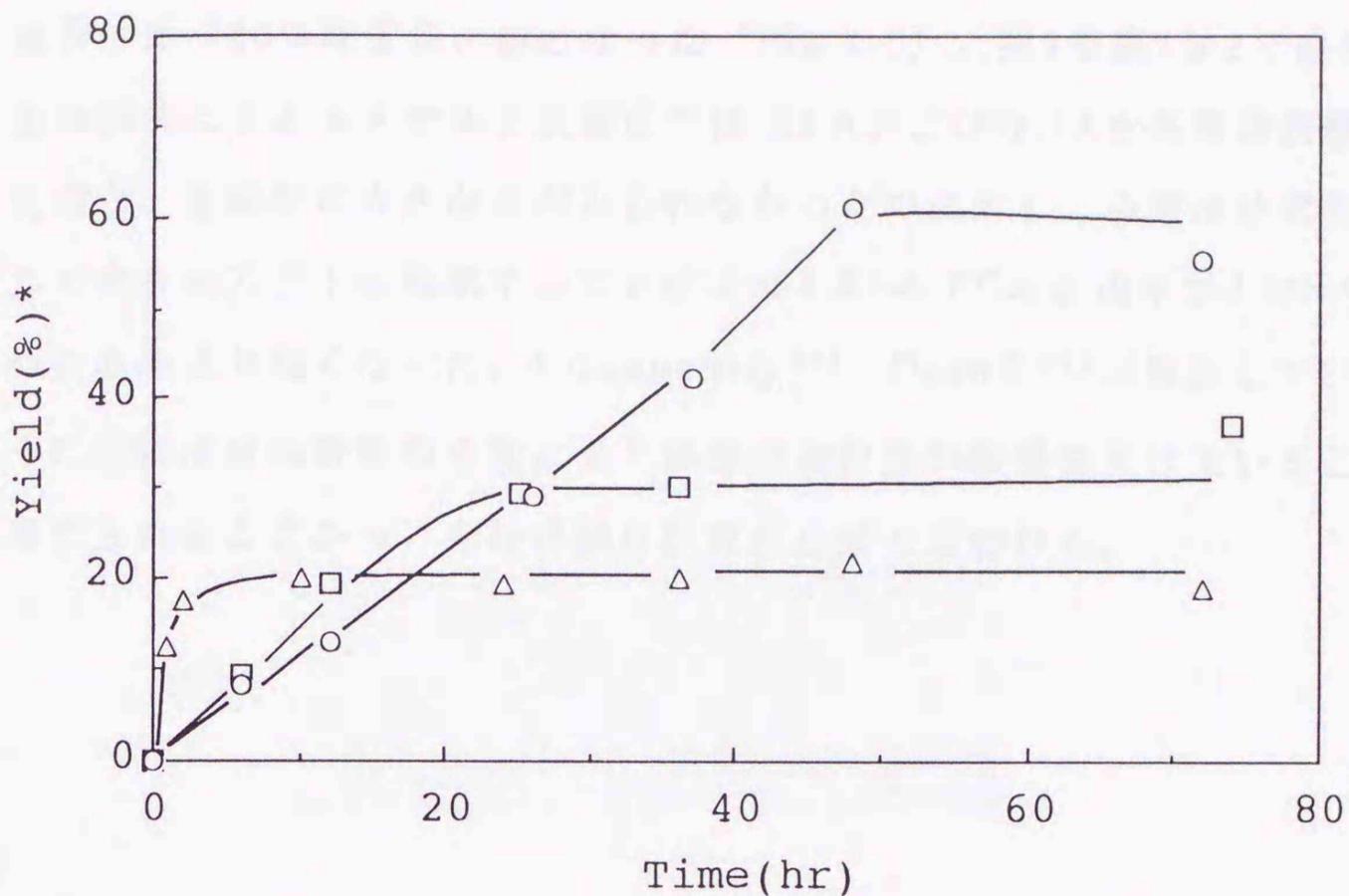


Fig.2-4. Time course of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated esterification.

Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 23mg, LPC 110mg, EPA 180mg, glycerol 5500mg, 3  $\mu$ mol CaCl<sub>2</sub>, 25°C, 800-1000rpm.

Buffer used was 0.2M tris-HCl pH8.0.

\* Yield(%) = synthesized PC / substrate LPC  $\times$ 100 (w/w)  
Abbreviations are the same as in Fig.1-1 and Table 1-2.

—△— tris-HCl buffer 0.5ml    —□— tris-HCl buffer 0.2ml  
—○— formamide 0.5ml

Table 2-2. Initial rate of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated esterification.

Additive	Initial rate*
0.5ml formamide	77
0.2ml tris-HCl buffer	89
0.5ml tris-HCl buffer	769

\*  $\mu$ mol / h·g enzyme

その結果、2-DHA-PCの合成率が43.2%となり EPAを基質として用いた場合に比べ20%程度低い値となった (Fig.2-5)。第1章第1節2で検討した水の添加によるエステル合成反応では EPAおよびDHAを基質脂肪酸とした場合、合成率に大きな差がみられなかったのに対し、必須水分代替物としてホルムアミドを使用することにより2-EPA-PCの合成率が2-DHA-PCの合成率より高くなった。Kitaguchiら<sup>41)</sup>、Duanら<sup>42)</sup>が報告しているように必須水分代替物の添加により酵素の選択性が影響を受けていることも考えられることから、今後詳細な研究が必要と思われる。

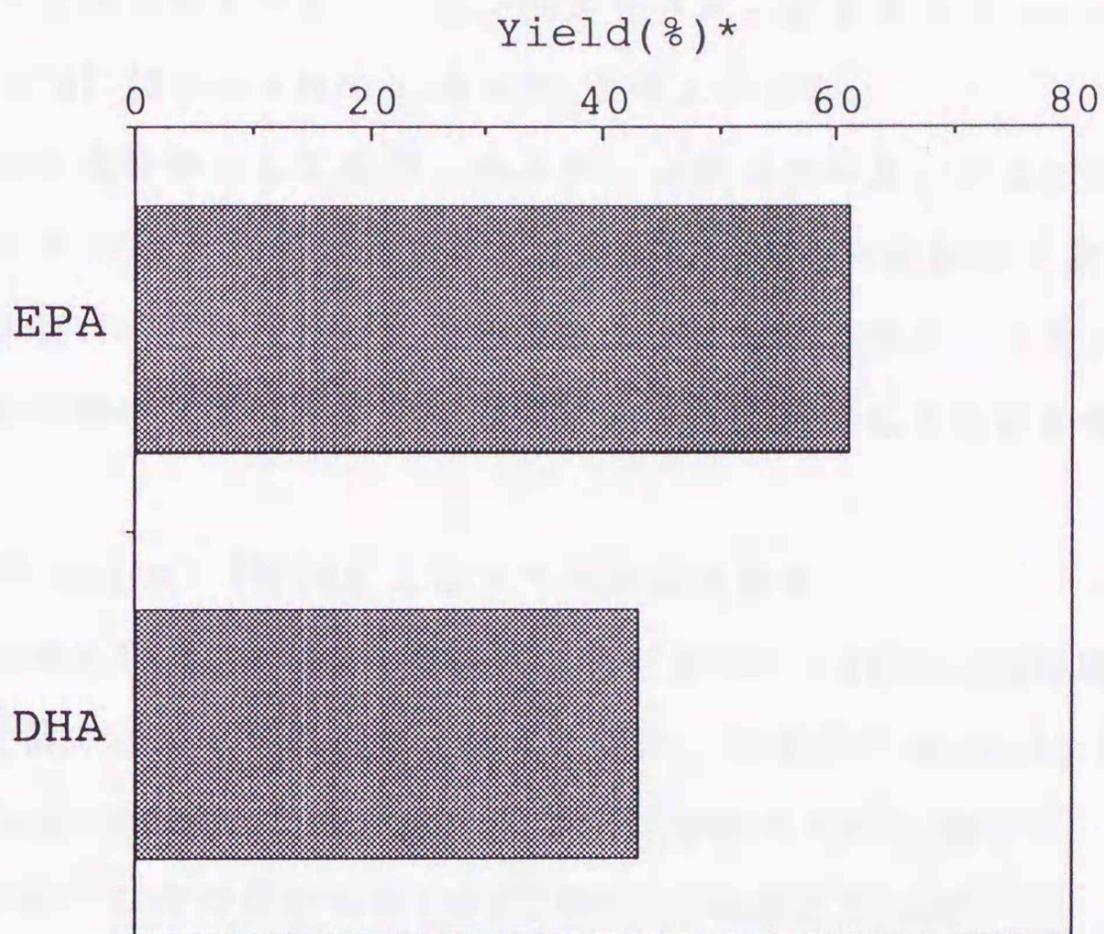


Fig.2-5. Synthesis of 2-EPA-PC and 2-DHA-PC through phospholipase A<sub>2</sub>-mediated esterification in the presence of formamide.

Reaction conditions: phospholipase A<sub>2</sub> 23mg, LPC 110mg, EPA or DHA 180mg, glycerol 5500mg, 3  $\mu$ mol CaCl<sub>2</sub> containing formamide 0.5ml, 25°C, 800-1000rpm, 48hr.

\* Yield(%) = synthesized PC / substrate LPC  $\times$ 100 (w/w)  
Abbreviations are the same as in Table 1-2 and Table 1-3.

## 第2節 リパーゼエステル交換反応における必須水分代替物の応用

### 実験方法

#### 2.1 試薬

Soy PCは第1章第1節1-2.1と同様のものを用いた。EPA、DHAは第2章第1節1.1と同様のものを用いた。固定化リパーゼである Lipozyme IM60 (48BIU/g) はNovo Nordisk A/S より入手した。

必須水分代替物として使用したエチレングリコール、プロピレングリコール、*N,N*-ジメチルアセトアミドは特級のを和光純薬工業(株)より、またグリセロールは蛍光分析用特製試薬をナカライテスク(株)より入手した。その他の試薬は全て市販の特級品または蒸留したものを用いた。

#### 2.2 Lipozyme IM60によるエステル交換反応

Lipozyme IM60 23mgを五酸化二リンを用いて25°C、24時間脱水した後、一定量の必須水分代替物を加え、更に、Soy PC 10mg(25.8mM)とEPA 60mg(400mM)を含んだ*n*-ヘキサン溶液 0.5mlに加えて一定時間反応を行った。以後の操作は第1章第2節2.2と同様に行った。

#### 2.3 回収率の算出

第1章第2節2.3と同様に回収率 (Recovery) を以下の式により算出した。

Recovery(%)

$$= \text{Interesterified PC} / \text{Substrate PC} \times 100(\text{w/w})$$

#### 2.4 エステル交換率

エステル交換率は第1章第2節2.4と同様の方法で分析することにより求めた。

## 結果及び考察

### 2.1 Lipozyme IM60のエステル交換反応における必須水分代替物の検索

第1章2節で示したようにTGにsn-1,3位特異性を有する固定化リパーゼLipozyme IM20を用いてエステル交換反応を行うことにより、リン脂質のsn-1位を所望の脂肪酸に交換できることが明らかとなった。しかし、活性化の目的でLipozyme IM20に含まれている10%の水分が副反応である加水分解反応を引き起こし、目的とする反応生成物すなわちsn-1位が所望の脂肪酸にエステル交換されたリン脂質の回収率 (Recovery) が低下することを認めた。一方、水分量を減らす (水分活性を低くする) と回収率は高まるものの、エステル交換速度が小さくなり長時間の反応を必要とした。

そこで、水以外の物質を用いて酵素を活性化することにより、高いエステル交換率を維持したまま、加水分解反応を抑制し且つ回収率を高める方法について検討した。Lipozyme IM60に含まれている水分を五酸化二リンで脱水後、プロピレングリコール、エチレングリコール、N,N-ジメチルアセトアミドを1 $\mu$ l添加してエステル交換反応を行った結果、五酸化二リンで脱水後、無添加で反応を行ったものは回収率が約80%と高かったものの、EPAのエステル交換率が低く48時間で13.3%、72時間では19.9%にすぎなかった (Fig.2-6)。これは反応系中に残存する微量の水分により反応が進行し、最終的にはエステル交換率も上昇するがその速度が著しく小さくなるためと考えられた。一方、プロピレングリコール、エチレングリコール及びN,N-ジメチルアセトアミドを添加した場合、EPAの導入速度が高まっておりLipozyme IM60がこれらの必須水分代替物により活性化されていることが認められた。

エチレングリコールを1 $\mu$ l添加した場合、エステル交換率は48時間で34.3%、72時間では39.6%であり、その時の回収率はそれぞれ56.3%、47.9%になった。プロピレングリコールを1 $\mu$ l添加した場合は、エステル

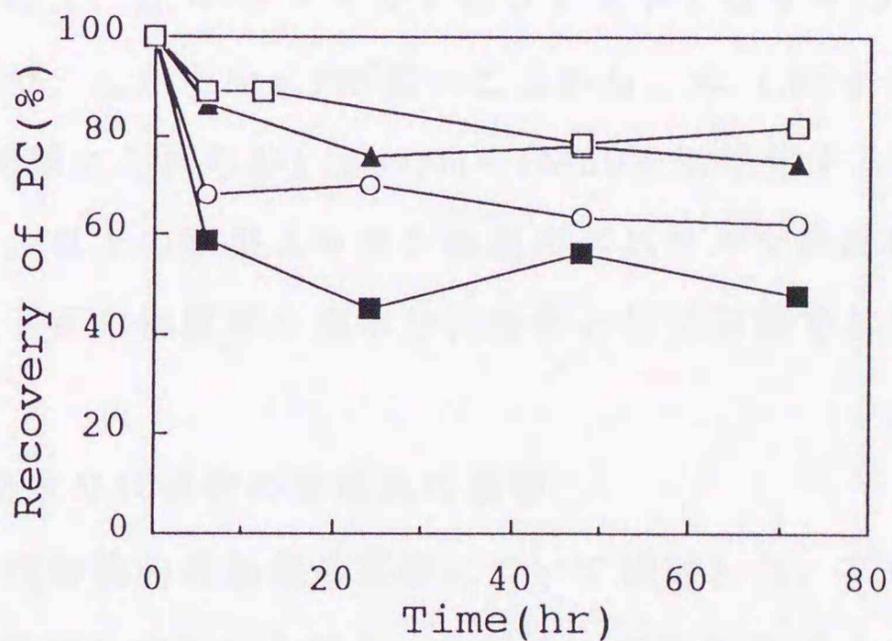
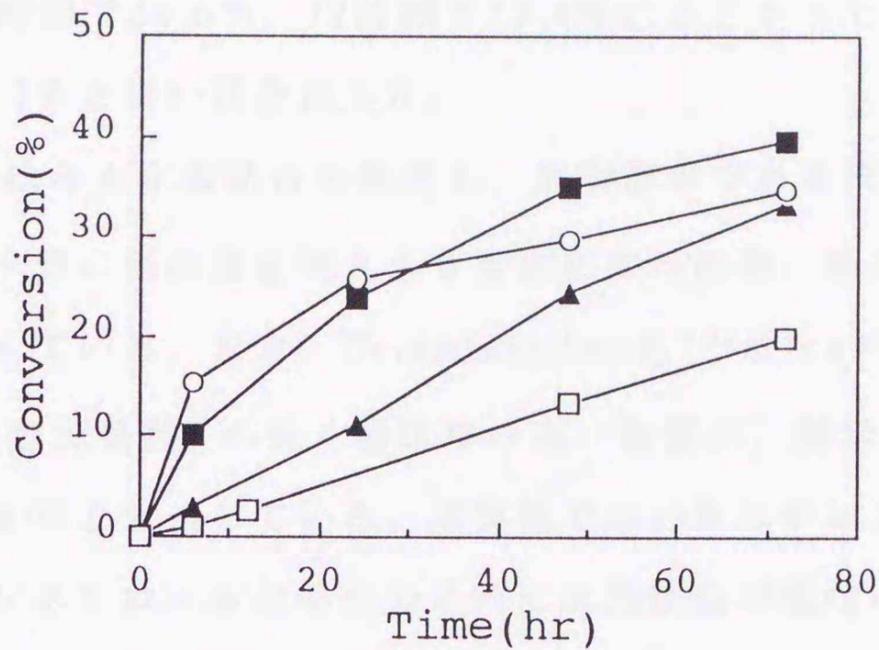


Fig.2-6. Effect of polar additives on Lipozyme IM60-mediated transesterification.

Reaction conditions: 0.5ml *n*-hexane containing 10mg (25.8mM) Soy PC and 60mg (400mM) EPA, Lipozyme IM60 23mg (initial weight), 40°C, 75rpm.

Abbreviations are the same as in Table 1-10.

—□— none                      —▲— *N,N*-dimethylacetamide 1μl  
 —■— ethylene glycol 1μl      —○— propylene glycol 1μl

交換率が48hrで29.6%、72hrでは34.5%となり、そのときの回収率はそれぞれ63.3%、62.3%であった。N,N-ジメチルアセトアミド 1 $\mu$ l添加ではエステル交換速度がエチレングリコールやプロピレングリコールよりも小さく、48時間で24.6%、72時間で33.4%にとどまったものの、回収率は77.6%、74.2%と高い値を示した。

北口ら<sup>29)</sup>は多点水素結合を形成し、高誘電率である物質が有機溶媒中の酵素タンパク質の自由度を増大させ柔軟にする結果、触媒活性が発現することを報告している。また、Triantafyllouら<sup>40)</sup>は $\log P$ ( $P$ はオクタノール-水に対する分配係数)が低く誘電率の高い物質が、酵素に対して水と同様の効果を与えると報告している。本実験で用いたエチレングリコールおよびプロピレングリコールはその分子内に水素結合可能な-OHを有し、エチレングリコールでは誘電率  $\epsilon = 37.70$ 、 $\log P = -1.93$ 、プロピレングリコールでは  $\epsilon = 32.0$ 、N,N-ジメチルアセトアミドでは  $\epsilon = 37.78$ 、 $\log P = -0.77$  と高誘電率で、しかも  $\log P$  が低いことから、水 (水:  $\epsilon = 78.39$ 、 $\log P = -1.38$ ) と同様にこれらがLipozyme IM60を活性化する性質のあることが示唆された。以上の結果よりリン脂質のエステル交換反応においてアルコールやアミド系の物質が必須水分代替物として有効であることが判明した。

## 2.2 必須水分代替物の添加量の影響

必須水分代替物の添加量の影響について検討した。プロピレングリコールを2.5 $\mu$ l添加して反応を行なった場合、無添加及び1 $\mu$ l添加に比べてEPAのエステル交換速度が大きく反応24時間で42.7%となったが、その際の回収率は31.9%と低い値にとどまった (Fig.2-7)。その後時間の経過とともにエステル交換率、回収率はともに低下した。N,N-ジメチルアセトアミド2.5 $\mu$ lの添加ではエステル交換率が48時間で9.0%、72時間では9.4%と1 $\mu$ l添加及び無添加で反応を行なった場合よりもエステル交換速度が小さくなった (Fig.2-8)。その際の回収率は各無添加、1 $\mu$ l、2.5 $\mu$ l

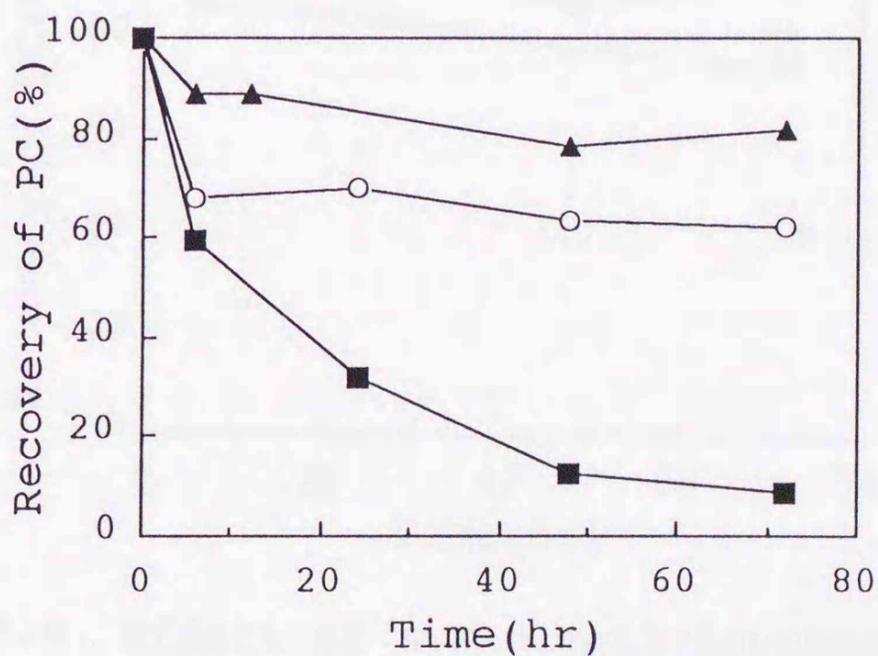
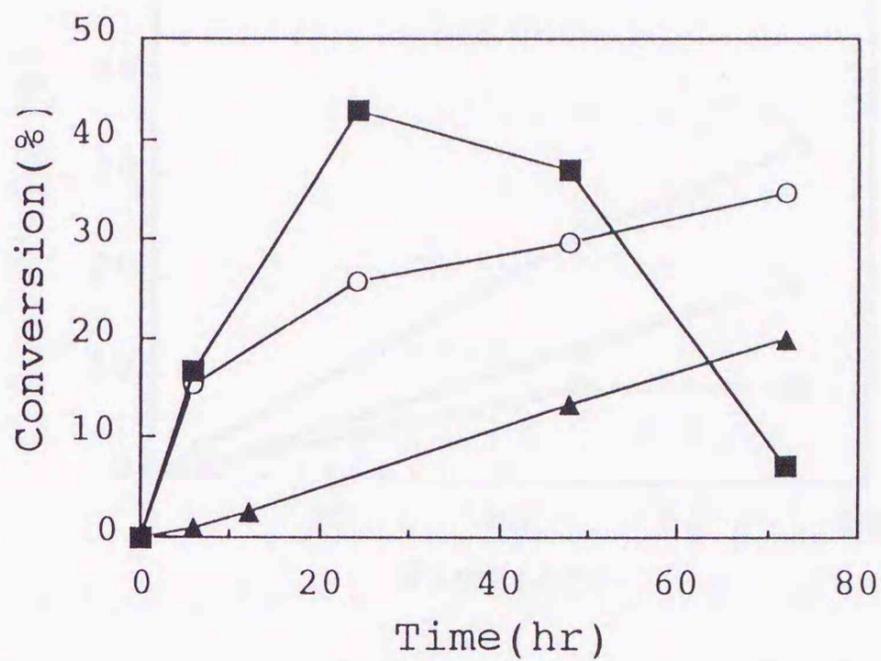


Fig.2-7. Effect of propylene glycol addition on Lipozyme IM60-mediated transesterification.

Reaction conditions: 0.5ml *n*-hexane containing 10mg Soy PC and 60mg EPA, Lipozyme IM60 23mg (initial weight), 40°C, 75rpm.

Abbreviations are the same as in Table 1-10.

—▲— none    —○— propylene glycol 1 μl  
 —■— propylene glycol 2.5 μl

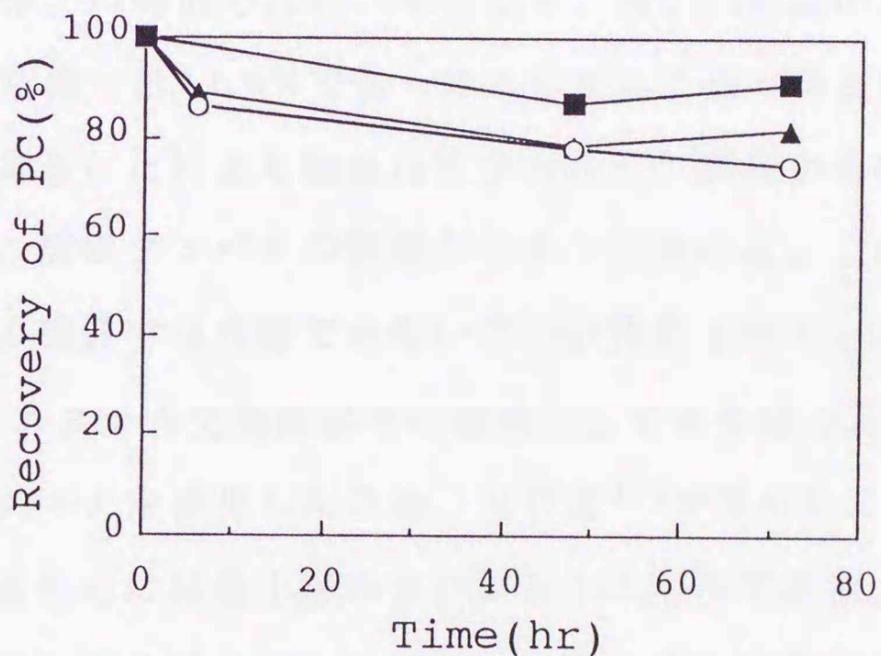
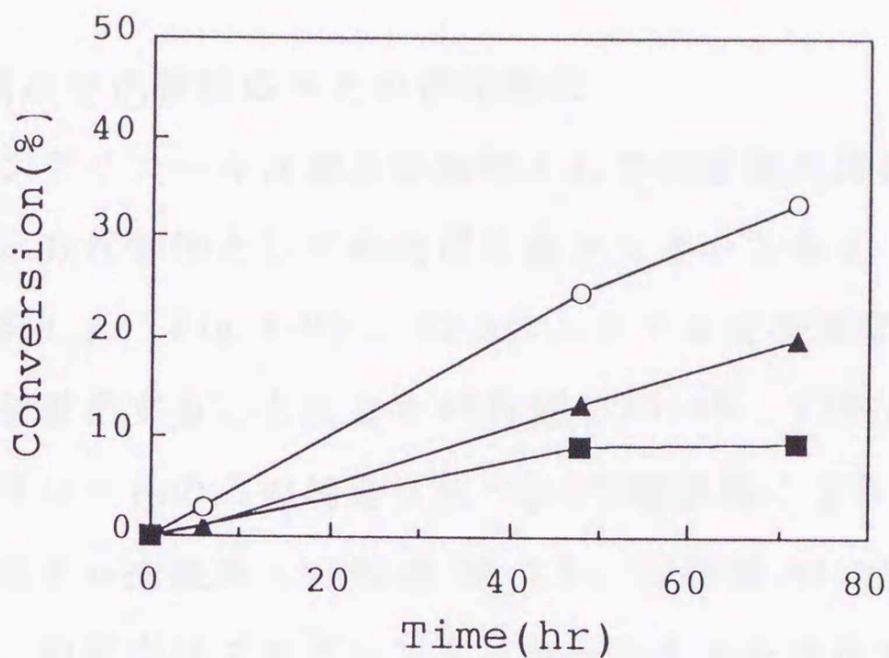


Fig.2-8. Effect of *N,N*-dimethylacetamide addition on Lipozyme IM60-mediated transesterification.

Reaction conditions: 0.5ml *n*-hexane containing 10mg Soy PC and 60mg EPA, Lipozyme IM60 23mg(initial weight), 40°C, 75rpm.

Abbreviations are the same as in Table 1-10.

—▲— none    —○— *N,N*-dimethylacetamide 1 μl  
 —■— *N,N*-dimethylacetamide 2.5 μl

の間で大きな差がないことから、*N,N*-ジメチルアセトアミドはLipozyme IM60を活性化するものの、添加量が過大になると反応がむしろ阻害されることが示された。

### 2.3 必須水分代替物の水との併用効果

プロピレングリコールは食品添加物としての使用が認められていることから、必須水分代替物としての使用用途が大きいと考え、水との併用効果について検討した (Fig. 2-9)。EPAのエステル交換率はプロピレングリコールと水を併用することにより48時間で36.4%、72時間では40.5%とプロピレングリコールのみの場合に比べ約6%程度高くなり、水を1  $\mu$ l添加した場合のエステル交換率 (48時間 38.7%、72時間 41.9%) と同じ値を示した。一方、回収率はプロピレングリコールと水を併用することにより48時間で63.7%、72時間では59.4%となり、水1  $\mu$ l添加の場合48時間で43.0%、72時間では42.6%であったのに対して約20%程度高い値となった。完全に脱水することにより触媒活性が消失した酵素が再び活性化する際、まず最初に、酵素タンパクの側鎖がイオン化される。これは水によってのみ進行し他の物質では代替できないことが報告されている<sup>29)</sup>。Lipozyme IM60によるエステル交換反応では溶媒として水をほとんど含まない*n*-ヘキサン (44.3 ppm) を使用したため、北口ら<sup>29)</sup>が報告しているように酵素反応が進行するためには最小限の水の存在が不可欠である。したがって必須水分代替物としてのプロピレングリコールと水を微量併用することにより酵素が活性化し、且つ加水分解を抑制しつつ効率的に反応が進行するものとする。

反応系を5倍量にして、プロピレングリコールと水の影響を更に検討した (Table 2-3)。プロピレングリコールと水を併用した場合、反応系を拡大しても反応が同様に進行し、エステル交換率40.5%、回収率64.6%となって、PC中にエステル交換されたEPAの絶対量も72時間において3.16

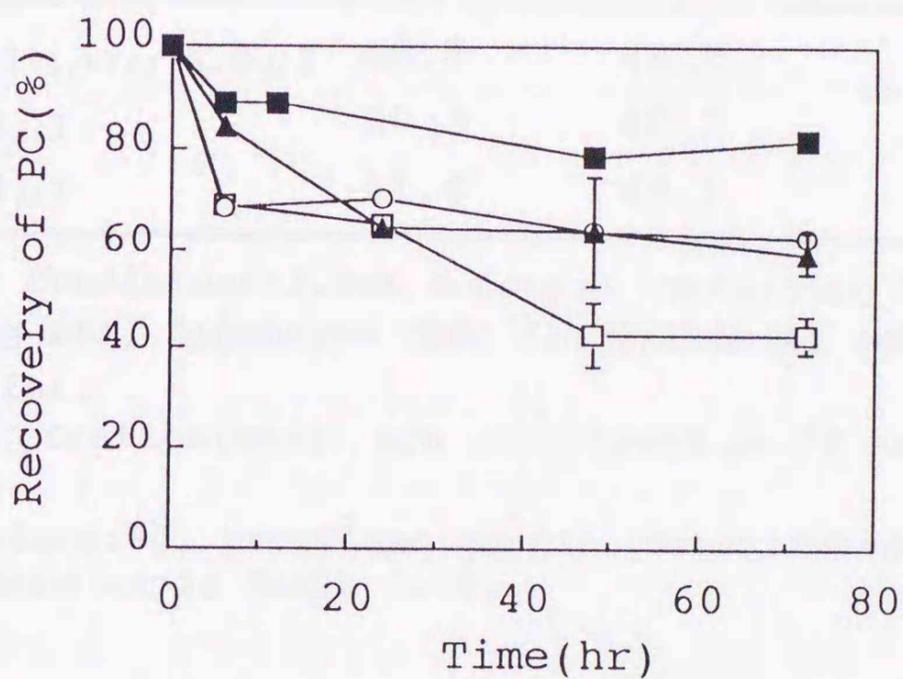
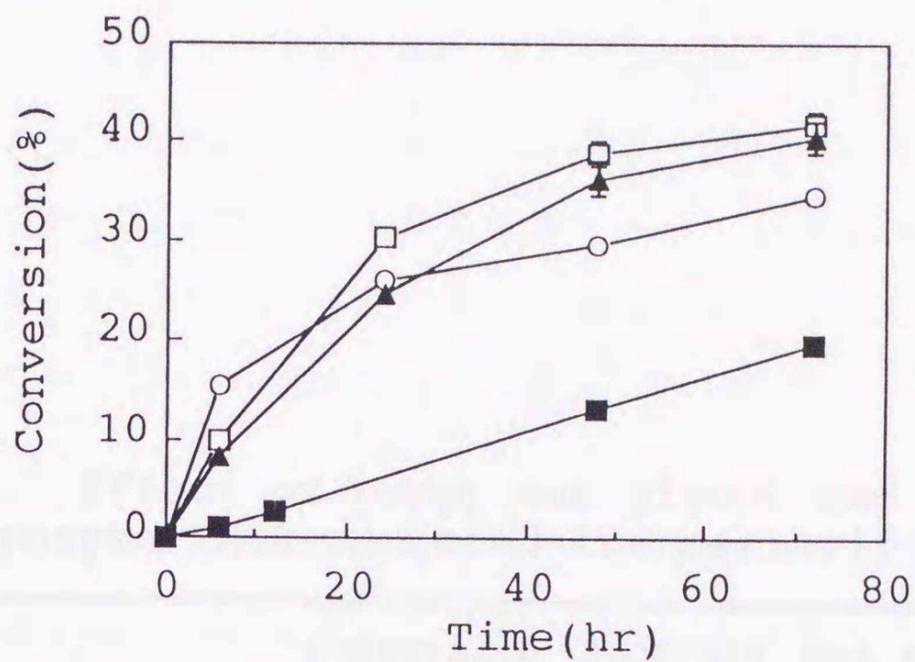


Fig.2-9. Effect of propylene glycol and water addition on Lipozyme IM60-mediated transesterification.

Reaction conditions: 0.5ml *n*-hexane containing 10mg Soy PC and 60mg EPA, Lipozyme IM60 23mg (initial weight), 40°C, 75rpm.

Abbreviations are the same as in Table 1-10.

—□— water 1 μl    —○— propylene glycol 1 μl  
 —■— none    —▲— propylene glycol+Water(1:1 v/v) 1 μl

Table 2-3. Effect of propylene glycol and water addition on Lipozyme IM60-mediated transesterification.

Additive	Conversion (%)	Recovery (%)	EPA incorporation (mmol)*
PG+Water(1:1,v/v) 5.0 $\mu$ l	40.5	64.6	3.16
Water 5.0 $\mu$ l	39.3	40.7	1.95
Water 3.8 $\mu$ l	41.4	45.1	2.26

Reaction conditions: 2.5ml *n*-hexane containing 50mg Soy PC and 300mg EPA, Lipozyme IM60 115mg(initial weight), 40°C, 75rpm, 72hr.

\*EPA incorporation(mmol) are calculated at 72 hour reaction time.

Abbreviations: PG, propylene glycol. Other abbreviations are the same as in Table 1-10.

mmolと水添加の場合の1.95 mmolに比べ高くなった。また、プロピレングリコールと脂肪酸がリパーゼによりエステル合成され、その際に生じる水の影響とプロピレングリコールそのものの酵素活性化の効果を区別するため、プロピレングリコール（比重 1.036、分子量 76.1）2.5  $\mu$ l すべてが脂肪酸とエステル合成した際に生成する水 1.3  $\mu$ lを考慮した水添加量 3.8  $\mu$ lで反応を行った。その結果、エステル交換率は 41.4%でほぼ同じ値であるものの回収率がプロピレングリコールと水を併用した場合に比べ 20%程度低くなっており、EPAの導入量も 2.26 mmolと少ないことから、プロピレングリコールそのものの必須水分代替物としての有効性が示された。

本研究では、sn-1位の脂肪酸を所望の脂肪酸であるEPAに変換するため、EPAの交換率が40%以上となる反応条件で回収率を高めることについて検討した。その結果、プロピレングリコールを必須水分代替物として使用し水と併用することにより、酵素を活性化し副反応である加水分解反応を抑制できるため、目的とする反応生成物を効率よく調製できることが明らかとなった。PLA<sub>2</sub>によるエステル合成反応で分散媒として使用したグリセロールは誘電率  $\epsilon = 42.50$ と高く、誘電率が同程度のアルコール系の物質の添加では必須水分代替物としての効果は見られなかったのに対し、Lipozyme IM60によるエステル交換反応では溶媒として疎水性のn-ヘキサンを使用したため、プロピレングリコールなどのアルコール系の物質でも酵素を活性化することができ、水を併用することにより効率よく反応が進んだことから、溶媒などの反応系組成物により必須水分代替物の種類や添加方法が異なることも明らかとなった。有機溶媒中で反応を行う場合、必須水分代替物を使用することにより酵素の基質、位置およびエナンチオ選択性をも制御できるという報告がある<sup>41,42)</sup>ことから、リン脂質はもとより機能性トリグリセリドやジグリセリドなどの分子設計への利用が期待できる。

### 第3節 必須水分代替物の利用による高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質分子種の合成

#### 実験方法

##### 3.1 試薬

LPCは第1章第1節1-1.1と同様の方法で調製した。EPA、DHAは第2章第1節1.1と同様のものを使用した。パルミチン酸 (Pal、16:0)、オレイン酸 (Ole、18:1) は純度99%以上のものをSigma Chemical Co. より入手した。内部標準として用いたtricosanoic acid methyl ester (23:0) はNu-Chek-Prep, Inc.より入手した。

PLA<sub>2</sub>は第2章第1節1.1と同様のものを使用した。固定化リパーゼであるLipozyme IM60 (42 BIU/g) は第2章第2節2.1と同様のものを使用した。ホスファチジル基転移反応に用いたPLD (EC 3.1.4.4) (108 unit/mg powder) は旭化成工業 (株) より供与を受けた *Streptomyces* sp. 由来のものを用いた。エタノールアミン塩酸塩は Aldrich Chemical Co., Int. より、L-セリン、牛血清アルブミンは和光純薬工業 (株) より入手した。酸化防止剤としてはエーザイ (株) より供与を受けたE ミックス ( $\alpha$ -トコフェロール 80%) を使用した。

##### 3.2 ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> によるエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸結合型ホスファチジルコリンの合成反応

LPC 1.1gとEPA または DHA 1.8g をグリセロール 55g に分散させ、30  $\mu$ mol 塩化カルシウムを含むホルムアミド 5ml に溶解したPLA<sub>2</sub> 230 mg (70334.0 units) を加え、25°C、600-800rpmで48時間反応を行った。クロロホルム:メタノール:水 (10:5:3, v/v/v) を加え反応を停止し、脂質画分をクロロホルム層より回収した。この脂質画分をクロロホルム:メタノール系ケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム:メタノール (100:2, v/v) で脂肪酸を溶出後、メタノールでリン脂質画分 (合成 PC+

未反応 LPC) を回収した。更に、リン脂質画分を調製用 TLCプレート (Kieselgel 60、E. Merck) に供し、クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4, v/v/v) で展開後、合成した 2-EPA-PC、2-DHA-PC 画分をかきとりメタノールで溶出した。

### 3.3 リパーゼエステル交換反応によるエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸結合型ホスファチジルコリン分子種の合成

2-EPA-PC、2-DHA-PC 100mg とパルミチン酸 (Pal) 520mg、オレイン酸 (Ole) 560mg または EPA 600mg、酸化防止剤として E ミックス 4.26mg を含む *n*-ヘキサン溶液 5ml に、五酸化二リンで 24 時間脱水した Lipozyme IM60 262mg (脱水前の重量) と必須水分代替物としてプロピレングリコール:水 (1:1, v/v) 8  $\mu$ l を加え 40°C、75rpm で 72 時間反応を行った。クロロホルム:メタノール (1:1, v/v) を用いて孔径 0.45  $\mu$ m フィルターにより酵素を分離することにより反応を終了した。回収した脂質画分を調製用 TLC プレート (Kieselgel 60、E. Merck) に供し、クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4, v/v/v) で展開後、調製 PC 画分をかきとりメタノールを用いて溶出した。調製 PC をメチルエステル化した後、内部標準として tricosanoic acid methyl ester を用いて GLC により脂肪酸組成を分析した。分析条件は第 1 章第 2 節 2.4 に示した通りである。

### 3.4 ホスファチジル基転移反応

ホスファチジル基転移反応は Juneja ら<sup>16,43)</sup> の方法に従って行った。PE への転移反応<sup>16)</sup> は、第 2 章第 3 節 3.3 で合成した 1-palmitoyl-2-eicosa-pentaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (1-Pal, 2-EPA-PC、置換基の位置は反応基質として大豆由来の LPC を使用したことより、sn-1 位、sn-2 位にアシル基が結合していると判断した。)、1-oleoyl-2-eicosa-pentaenoyl (1-Ole, 2-EPA)-PC、1-palmitoyl-2-docosa-hexaenoyl (1-

Pal,2-DHA)-PCまたは1-oleoyl-2-docosaheptaenoyl(1-Ole,2-DHA)-PC 100mgを含んだ酢酸エチル溶液 12mlと、牛血清アルブミン 71.5mg、PLD 2400 units、エタノールアミン塩酸塩 175.6mg (緩衝液中の終濃度 0.3M)を含んだ 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 6ml を混合し、30°C、1000 rpmで30分間行った。

ホスファチジルセリン(PS)への転移反応<sup>43)</sup>は、1-Pal,2-DHA-PCまたは1-Ole,2-DHA-PC 100mgを含んだ酢酸エチル溶液 3.4mlと、L-セリン 500mg (終濃度 0.95M)、塩化カルシウム 10mg、PLD 160unitsを含んだ 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5.6) 1.6ml を混合し、30°C、1000rpmで 4時間反応を行った。

クロロホルム:メタノール:水 (10:5:3, v/v/v) を加えて反応を停止し、脂質画分をクロロホルム層から回収した。更に、調製用 TLCプレートに供し、クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4, v/v/v) で展開後、PE 画分及びPS画分をかきとりメタノールを用いて溶出した。合成したPE、PSはTLC (Kieselgel 60, E.Merck) に供し上記の展開溶媒で展開後、ディットマー試薬により検出したスポットのRf値と、ニンヒドリン試薬による発色の併用により同定した。脂肪酸組成は第1章第2節2.4と同様の操作により分析した。

## 結果及び考察

### 3.1 必須水分代替物の利用によるエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸結合型ホスファチジルコリン分子種の合成

必須水分代替物としてホルムアミドを添加し、PLA<sub>2</sub>によるエステル合成を行い、2-EPA-PC及び2-DHA-PCを合成した。更に、2-EPA-PC及び2-DHA-PCを基質として *sn*-1位を所望の脂肪酸にエステル交換することを試みた。第1章第2節、第2章第2節ではEPAを基質として反応条件の検討を行ったが、PalやOleについても同様にエステル交換反応を行った。その結果、Pal 46.7%、EPA 47.2%を含む 1-Pal,2-EPA-PCを基質LPCに対

し36.9重量%(24.3mol%)で合成できた。また、Ole 46.2%、EPA 46.4%含む1-Ole,2-EPA-PC (30.0重量%、19.6mol%)、Pal 46.5%、DHA 46.0%含む1-Pal,2-DHA-PC (19.1重量%、12.5mol%)、Ole 47.8%、DHA45.8%含む1-Ole,2-DHA-PC及びEPA 44.7%、DHA 49.8%含む1-EPA,2-DHA-PC (12.5重量%、7.9mol%)と所望の位置に目的の脂肪酸の結合したリン脂質分子種の合成が可能となった (Table 2-4、2-5)。DHA結合型PC分子種の合成ではPLA<sub>2</sub>によるエステル合成反応が進行しづらかったため収率が低くなった。1-EPA,2-DHA-PCの逆相HPLCのクロマトグラムをFig.2-10に示す。基質として使用したEPAの純度が90%、DHAの純度が95%であり、EPAやDHA以外の脂肪酸が5-10%含まれていたことから (EPA,DHA) 以外の分子種ピークもみられるが、1-EPA,2-DHA-PCの大きなピークがみられたことからsn-1位、sn-2位への脂肪酸の導入による所望のPC分子種の合成が確認された。

次に、合成したEPA及びDHA結合型PC分子種をホスファチジル基転移反応によりPEおよびPSの化学形態に変換した。その結果、反応の前後で脂肪酸組成の大きな変化がないことを確認した。このときPEへの変換率は100%、PSへの変換率は56.4%であった。

以上、リパーゼ、PLA<sub>2</sub>及びPLDの3種類の酵素の特異的な反応を活用することにより、所望の化学形態であるリン脂質分子種の合成が可能となることが証明された (Table 2-6、2-7)。

HUFA結合型リン脂質分子種は水産生物脂質中に比較的多く含まれているが、リン脂質の形態のまま個々の分子種を単離することは困難である。(一般に、水産生物のリン脂質分子種を分析する場合、分子種組成が複雑であるため誘導体にして分析されている。) また、従来行われている化学触媒を用いた合成反応<sup>15)</sup>では、反応が多段階になり基質として遊離脂肪酸の形態では反応が進行しづらいため脂肪酸無水物などの誘導体に変換しなければならず操作が複雑である。本研究で示した酵素反応によるリン脂質分子種の合成法は、酸化されやすい高度不飽和脂肪酸を基質として用いた



Table 2-5. Fatty acid composition of enzymatically synthesized DHA-containing PC molecular species.

Fatty acid	1-Pal,2-DHA-PC	1-Ole,2-DHA-PC	1-EPA,2-DHA-PC
16:0	46.5	1.6	0.8
18:0	0.4	0.3	-
18:1	0.7	47.8	-
18:2	2.4	2.1	2.4
18:3	0.2	-	0.8
20:5(EPA)	2.5	2.2	44.7
22:6(DHA)	46.0	45.8	49.8
others	1.3	0.2	1.5

Abbreviations: 1-Pal,2-DHA-PC, 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; 1-Ole,2-DHA-PC, 1-oleoyl,2-docosahexaenoyl PC; 1-EPA,2-DHA-PC, 1-eicosapentaenoyl,2-docosahexaenoyl PC.

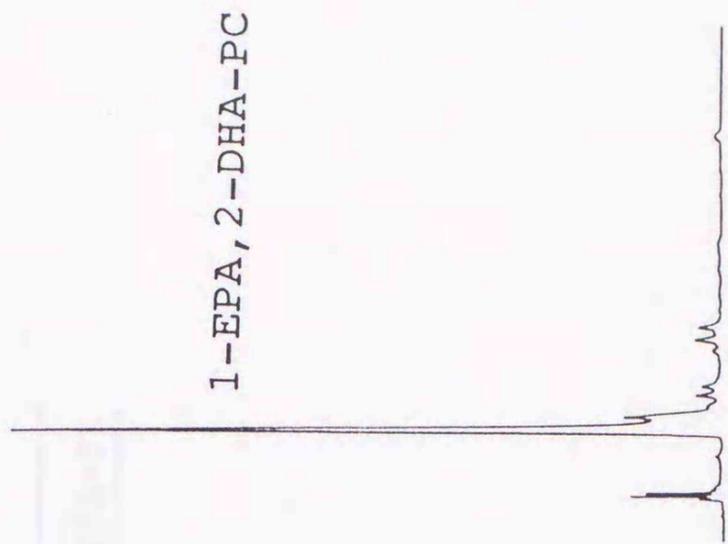
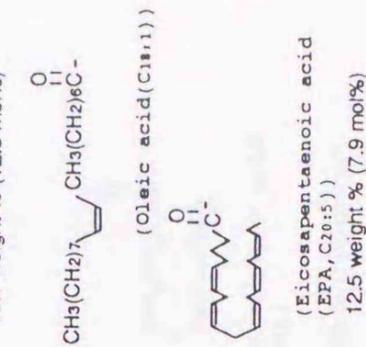
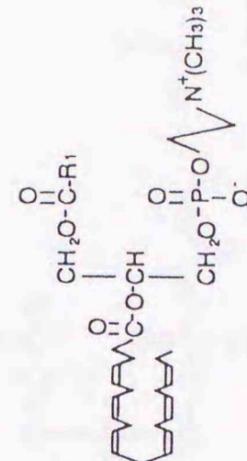
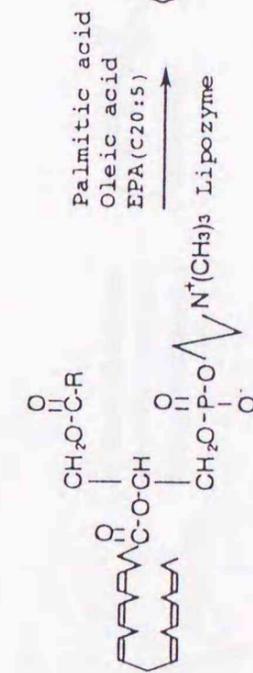
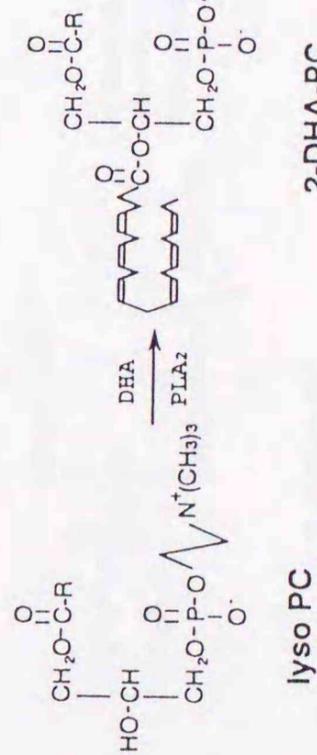


Fig.2-10. Reverse phase HPLC elution profile of the synthesized 1-EPA,2-DHA-PC.

Table 2-6. Fatty acid composition of phospholipase D-mediated transphosphatidylated DHA-containing PE molecular species.

Fatty acid	1-Pal,2-DHA-PE	1-Ole,2-DHA-PE	1-EPA,2-DHA-PE
16:0	49.1	1.5	0.4
18:0	0.5	0.4	-
18:1	0.9	47.5	0.4
18:2	1.9	2.7	2.0
18:3	0.2	-	0.8
20:5 (EPA)	2.3	2.6	45.8
22:6 (DHA)	45.1	45.2	49.3
others	-	0.1	1.3

Abbreviations: 1-Pal,2-DHA-PE, 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; 1-Ole,2-DHA-PE, 1-oleoyl-2-docosahexaenoyl PE; 1-EPA,2-DHA-PE, 1-eicosapentaenoyl-2-docosahexaenoyl PE.

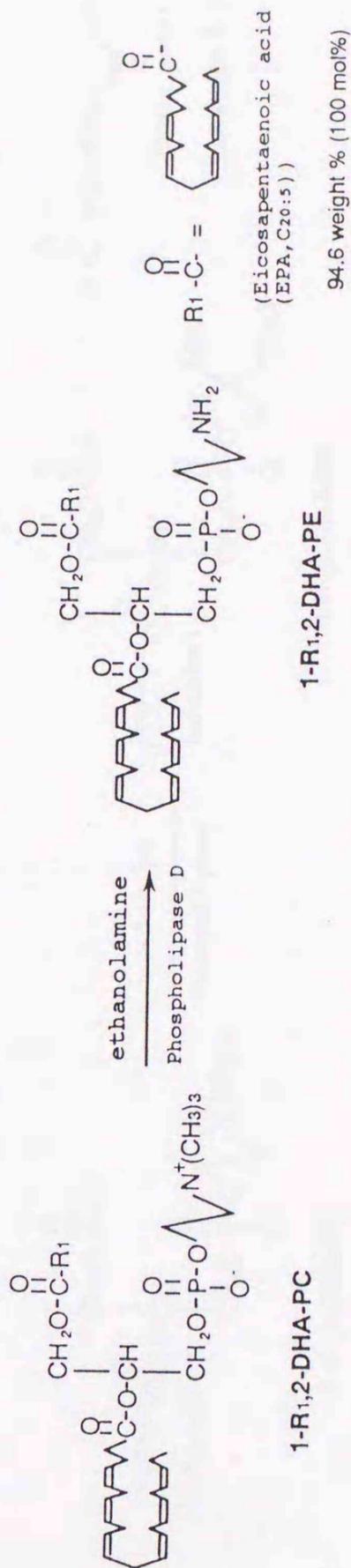
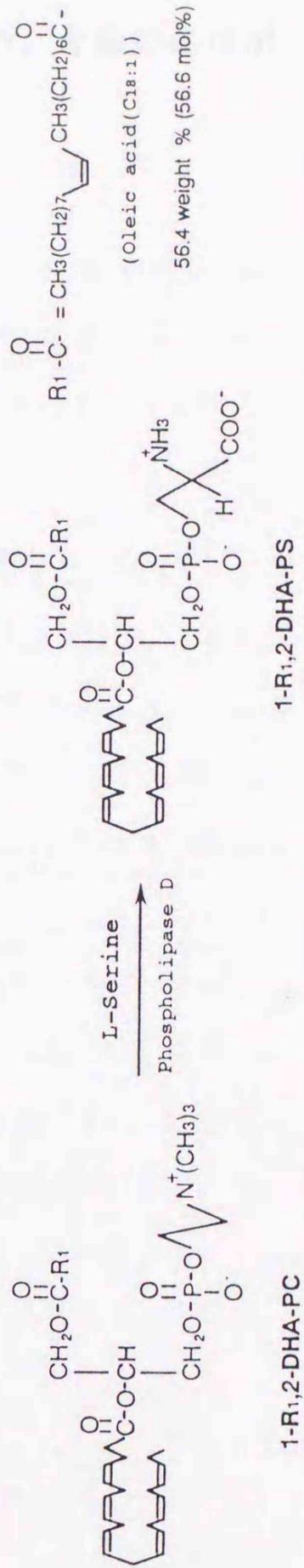


Table 2-7. Fatty acid composition of phospholipase D-mediated transphosphatidylated DHA-containing PS molecular species.

Fatty acid	1-Pal,2-DHA-PS	1-Ole,2-DHA-PS	(mol %)
16:0	46.2	1.8	
18:0	0.6	0.2	
18:1	0.8	46.4	
18:2	2.2	2.2	
18:3	0.3	0.3	
20:5 (EPA)	2.7	2.0	
22:6 (DHA)	46.6	45.4	
others	0.6	1.7	

Abbreviations: 1-Pal, 2-DHA-PS, 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoserine; 1-Ole, 2-DHA-PS, 1-oleoyl-2-docosahexaenoyl PS.



場合でも温和な条件下で2段階のみの反応で終了するため、今後の応用が期待される。

### 第3章 ヒト赤血球の膜流動性及び変形能におよぼす高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の影響

リン脂質二重層を基本骨格とする生体膜は、細胞内外の環境を隔離するばかりでなく、膜タンパクとともに物質の選択的透過性や能動輸送など多くの機能<sup>44)</sup>を発揮することが知られている。EPAやDHAなどのHUFAは膜リン脂質中に取り込まれ、生体膜の物性や生体膜構造の変化<sup>45)</sup>、それに伴い膜酵素類の活性へ影響<sup>46,47)</sup>をおよぼすことなどが知られている。

第3章では酵素反応により調製した種々のEPA、DHA結合型リン脂質の生体膜への影響をリン脂質の構造と関連づけて明らかにすることを目的とした。そのため細胞膜を唯一の膜とし、脂質合成系を持たないため膜脂質成分をその環境中の血漿脂質と交換すると考えられているヒト赤血球を試料として用いた。

第1節では赤血球へのリン脂質及び蛍光試薬の処理方法について検討した。第2節では検討した条件下で偏光度を指標として、赤血球膜流動性を測定し、更に第3節では赤血球の変形能を毛細血管モデルを用いて直接的に測定することにより、EPAやDHA結合型リン脂質の赤血球膜流動性及び変形能への影響についてリン脂質の構造と関連づけながら検討した。

## 第1節 ヒト赤血球に対するリン脂質と蛍光試薬の処理条件及び反応性の検討

### 1. リン脂質及び蛍光試薬の処理条件の検討

#### 実験方法

##### 1-1.1 試料及び試薬

血液はヒトから採血して得られた新鮮なものを用いた。血液の凝結防止には飽和EDTA・Na<sub>2</sub> pH7.4を用いた。血液を保存するときは保存期間を1週間以内とし、血液10mlに対してACD液（クエン酸ナトリウム2.2g、クエン酸0.8g、グルコース2.45gを水で定容）1.5mlを加えて低温下に静置保存した。赤血球（RBC）に作用させる各種リン脂質はTable 3-1に示す通りである。水添PC（HPC）は大豆由来のPCを水素添加することにより脂肪酸を飽和型に変換したPCである。蛍光試薬として用いた1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene（DPH）は東京化成工業（株）より入手した。RBCの洗浄及び懸濁に用いたPBS（phosphate buffered saline）は10mM リン酸水素二ナトリウム、125mM 塩化ナトリウム水溶液を4°Cでリン酸を用いてpH7.4に調整したものを、反应用PBSには2mM アデニン、10mM イノシン、10mM グルコースを加え、37°Cでリン酸を用いてpH7.4に調整したものをを用いた。

##### 1-1.2 各種リン脂質及び蛍光試薬の赤血球への処理方法

リン脂質及び蛍光試薬のRBCへの処理方法は、Schachterら<sup>48)</sup>の方法及び権ら<sup>49)</sup>の方法を応用した。すなわちヒトの静脈より採血し飽和EDTA・Na<sub>2</sub> pH7.4で凝結を防止した（血液に対して10%）血液を1000rpm、10min、4°Cで遠心分離し、Plasma及びbuffer coatを除去した。残存したRBCをPBSで3回洗浄した後、ヘマトクリット値（Hct.）を1%に調整し

Table 3-1. Fatty acid composition of the prepared PC for the measurement of membrane fluidity and deformability of RBC.

	Soy PC	HPC	1-EPA-PC	2-EPA-PC	2-DHA-PC	Salmon roe-PC
Sat.						
16:0	13.3	12.8	4.8	12.7	13.5	22.7
18:0	4.1	79.9	1.2	2.8	3.0	7.2
Mono.						
18:1	10.7	6.2	8.3	5.7	5.9	14.2
Poly.						
18:2	65.7	—	49.3	26.9	26.4	—
18:3	6.2	—	4.9	2.9	2.6	—
20:5(EPA)	—	—	31.1	48.0	1.0	15.0
22:5	—	—	—	—	1.6	4.9
22:6(DHA)	—	—	—	—	43.2	28.8

Abbreviations: Soy PC, phosphatidylcholine from soybean; HPC, hydrogenated PC; 1-EPA-PC, eicosapentaenoic acid (at sn-1) containing PC; 2-EPA-PC, eicosapentaenoic acid (at sn-2) containing PC; 2-DHA-PC, docosahexaenoic acid (at sn-2) containing PC; Salmon roe PC, natural occurring PC prepared from chum salmon roe; RBC, red blood cells.

た。洗浄RBC (Hct. 1%) 2mlに、リン脂質をそれぞれ1、5、10mMとDPHを1mM含むPL-DPH含有エタノール溶液を20 $\mu$ l加えた。これらの反応混液を遮光した状態で、37 $^{\circ}$ C、30min、80rpm/minで振とう恒温槽中でインキュベートした。その後、PBSで3回洗浄することによりリン脂質及びDPHを除去しPBSを用いてHct. 0.05%に調整した後、偏光度を測定することによりRBCに作用させるリン脂質量を検討した。

偏光度Pは以下の式のように定義される<sup>50,51)</sup>。

$$P = \frac{I_{//} - G \cdot I_{\perp}}{I_{//} + G \cdot I_{\perp}} \quad G = I'_{//} / I'_{\perp}$$

$I_{//}$ は励起光側偏光子が水平で、励起光の偏光面に対して平行な方向性をもった蛍光により測定された蛍光強度であり、 $I_{\perp}$ は励起光側の偏光面に対して、垂直な方向性をもった蛍光により測定された蛍光強度である。 $I'_{\perp}$ と $I'_{//}$ は励起光側偏光子が鉛直なもので、その他は $I_{\perp}$ 、 $I_{//}$ と同様である。偏光度測定条件は以下に示す通りである。

分光蛍光光度計：日立650-40型

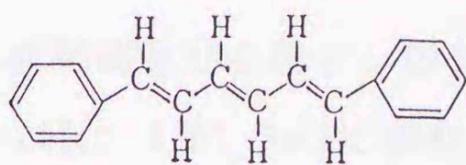
励起光側波長：360nm，スリット幅：10nm

蛍光側波長：450nm，スリット幅：15nm

測定温度：25 $^{\circ}$ C

偏光度を測定する際に励起光側の波長をスキャンスピード 60nm/minで350~370nmまで波長スキャンを行った。これは偏光度を測定する際の安定性があまりよくないことから、励起光側波長の360nmにおける偏光度の測定誤差を少なくするために行った。

本研究で使用した蛍光試薬である DPH<sup>51)</sup>は水溶液中では蛍光のない凝集体として存在するが、脂質には容易に溶け込んで蛍光を発し、リン脂質に対し非常に少ない量のプローブで測定が可能なこと、長い棒状の分子であるため環境の粘度の変化に敏感であり、脂質がゲル状のときは動きが束縛され大きな偏光度をもち、それが相転移により大きく変わる性質を有している。



1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene  
(DPH)

#### 1-1.3 赤血球への蛍光試薬及び各種リン脂質の反応時間の検討

洗浄RBC (Hct. 1%) 2mlにリン脂質及びDPHをそれぞれ1mM含むエタノール溶液を20 $\mu$ lを加えた。これらの反応混液を遮光した状態で37 $^{\circ}$ C、80rpm/minで30min、1時間、3時間インキュベートした。その後、PBSを用いて3回洗浄して余分なリン脂質及びDPHを除去した。PBSを用いてHct. 0.05%に調整し偏光度を測定することにより、RBCへの蛍光試薬及びリン脂質の反応時間の検討を行った。

#### 1-1.4 赤血球に作用させる蛍光試薬及びリン脂質の溶媒系の検討

リン脂質及びDPHの溶媒にエタノールまたはジメチルスルホキシド (DMSO):H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) を用いてその影響について検討した。エタノールを用いた場合、リン脂質及びDPHがそれぞれ1mM (終濃度10 $\mu$ M) となるようにエタノールに溶解したPL-DPH エタノール溶液20 $\mu$ lを洗浄RBC (Hct. 1%) 2mlに加えた。DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) を用いた場合は、リン脂質が4mM (終濃度10 $\mu$ M) となるように蒸留水に超音波懸濁したものと、DPHが4mM (終濃度10 $\mu$ M) となるようにDMSOに溶解したものを1:1(v/v)の割合で混合し、更に超音波処理したPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液10 $\mu$ lを洗浄RBC (Hct. 1%) 2mlに加えた。対照

はこの反応系からリン脂質を除いたものとした。

これらの反応混液を遮光した状態で、37°C、3時間、80rpm/minで振とう恒温槽中でインキュベートした。その後、PBSで3回洗浄することによって余分なリン脂質及びDPHを除去し、更にPBSを用いてHct. 0.05%に調整した後偏光度を測定することにより、RBCに作用させる蛍光試薬及びリン脂質の溶媒系の影響について検討を行った。

#### 1-1.5 蛍光試薬及び各種リン脂質溶液の保存性の検討

洗浄RBC (Hct. 1%) 2mlに調製直後のPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液10  $\mu$ l及び調製後10日間室温に放置したPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液10  $\mu$ lをそれぞれ加え、反応混液を遮光した状態で37°C、3時間、80rpm/minで振とう恒温槽中でインキュベートした。PL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液の調製方法は1-1.4と同様に行った。その後、PBSで3回洗浄することによって余分なリン脂質及びDPHを除去し、更にPBSを用いてHct. 0.05%に調整した後、偏光度を測定することによりRBCに作用させる蛍光試薬及びリン脂質溶液の保存性について検討を行った。

#### 1-1.6 反応時間の赤血球形状への影響

洗浄RBC (Hct. 1%) 5mlにPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液25  $\mu$ lを加え、遮光した状態で37°C、80rpm/minの振とう恒温槽中で1分、3時間、8時間インキュベートした。PL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液の調製方法は1-1.4と同様に行った。その後、PBSで3回洗浄することによって余分なリン脂質及びDPHを除去し、更にPBSを用いてHct. 0.05%に調整した後、偏光度を測定した。残りのリン脂質処理RBCをPBSを用いてHct. 1%に調整した後、顕微鏡下でRBCの形状の変化を観察した (Olympus Vanox-S microscope (Olympus Optical Co. Ltd.)、接眼レンズ10倍、対物レンズ100倍)。偏光度の測定と顕微鏡観察による形状

の変化から反応時間の影響を検討した。

## 結果及び考察

### 1-1.1 赤血球に作用させる各種リン脂質量の検討

RBCに作用させるリン脂質量について検討した。作用させたリン脂質はSoy PCとHPCで、リン脂質量を変えて作用させた後のリン脂質処理RBCの偏光度を比較した (Fig.3-1)。

いずれのリン脂質量においてもHPC処理RBCの偏光度がSoy PC処理RBCの偏光度より高かった。これはHPCの脂肪酸の大部分が飽和脂肪酸であるため、RBC膜に取り込まれると膜の流動性が低下して偏光度が高くなるためであると思われる。膜流動性と偏光度の関係については、第3章第2節2.1に示してある。Soy PC及びHPCを $100\mu\text{M}$ で作用させた場合、リン脂質が凝集し洗浄によって除去できなかったことからRBCに作用させるリン脂質量は $10\mu\text{M}$ が適当であると判断し、以後はこの濃度で実験を行った。

### 1-1.2 赤血球に反応させる蛍光試薬及び各種リン脂質の溶媒系の検討

RBCに作用させるリン脂質及び蛍光試薬を添加する溶媒系の偏光度への影響について検討した (Fig.3-2)。

溶媒としてエタノールまたはDMSO:H<sub>2</sub>O(1:1, v/v)を用いてSoy PC及びHPCを添加し、インキュベートしたリン脂質処理RBCの偏光度を比較した。なお、リン脂質を除き蛍光試薬と各溶媒混液を添加した場合をコントロールとした。

いずれの溶媒系でもHPC処理RBCの偏光度が高く、Soy PC処理RBC、対照RBCの順に偏光度が低くなったことから、リン脂質がRBCに取り込まれていることがわかる。リン脂質処理RBCの偏光度を比較すると、エタノール、DMSO:H<sub>2</sub>O(1:1, v/v)のどちらを用いても偏光度に大きな差はみられなかった。しかし、リン脂質処理RBCの蛍光強度を比較するとエタノールを用いた場合に比べDMSO:H<sub>2</sub>O(1:1, v/v)を用いた場合において明らか

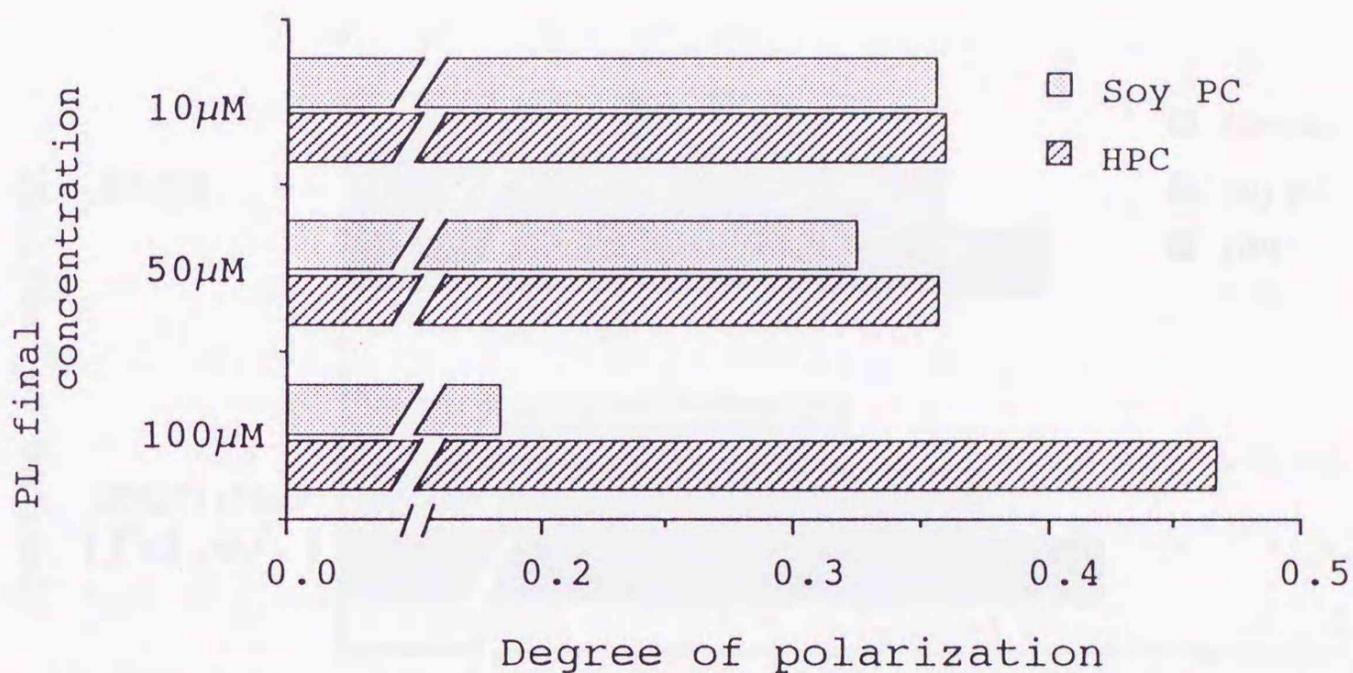


Fig.3-1. Effect of PL final concentration on degree of polarization of RBC suspension (Hct.1.0%).

PL-DPH was dissolved in absolute EtOH at a concentration of 1.0%.

Incubation was carried out for 30min at 37°C.

Abbreviation: PL, phospholipid; RBC, red blood cells; PL-DPH, mixture of phospholipid and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene.

Other abbreviations are the same as in Table 3-1.

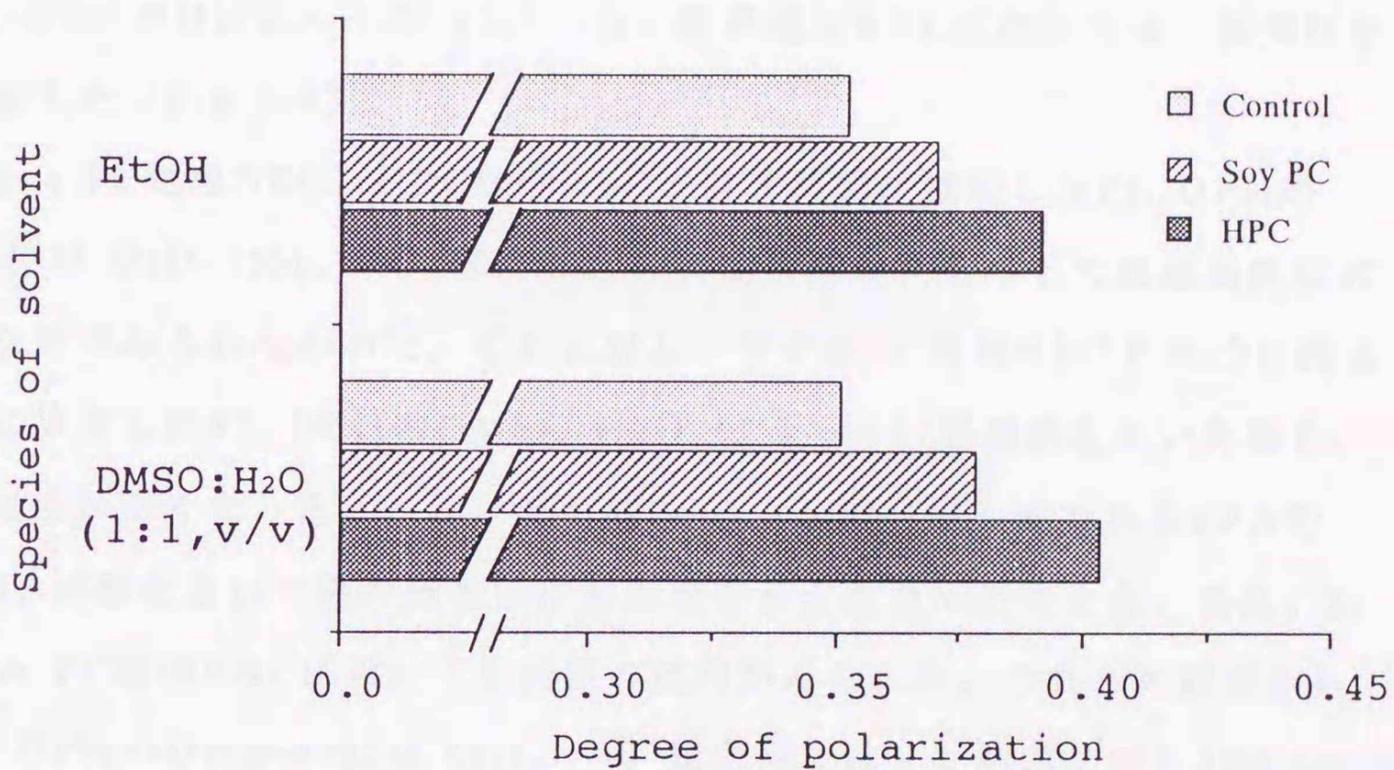


Fig.3-2. Effect of solvent for PL-DPH and PL dissolving on degree of polarization of RBC.

PL-DPH dissolved in solvent was added for 1.0% with mixing to the RBC suspension (Hct.1.0%) to give a final concentrations of 10 $\mu$ M PL-DPH.

Incubation was carried out for 3 hr at 37°C.

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide. Other abbreviations are the same as in Table 3-1 and Fig.3-1.

に高くなっていることから、蛍光試薬及びリン脂質がRBCに多く導入されており、偏光度測定において安定なデータを得ることができると考えた (Fig.3-3)。以上の結果からRBCに作用させるリン脂質の溶媒系にはDMSO:H<sub>2</sub>O(1:1, v/v)が適当であると判断した。

#### 1-1.3 蛍光試薬及びリン脂質溶液保存性の検討

Soy PC、HPC、2-EPA-PC、サケ卵PCをリン脂質として用い、使用前に調製したPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液と10日間放置したPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液をRBCに作用させ、偏光度を比較した (Fig.3-4)。

Soy PC処理RBC、HPC処理RBCでは使用前に調製したPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液と10日間放置したものとは偏光度に大きな差はみられなかった。それに対し、サケ卵PC処理RBCでは10日間室温に放置したPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液を用いた場合、偏光度が高くなった。これはサケ卵PCの主な構成脂肪酸であるEPAやDHAが酸化されて膜の流動性に悪影響を与えたためと考えた。また、2-EPA-PC処理RBCにおいても同様の傾向がみられた。これらの結果からPL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液にはリン脂質に対し100ppmのトコフェロールを加え、使用まで-40℃で保存することとし、その期間を1週間以内に規定した。

#### 1-1.4 反応時間のRBCの形状への影響

PL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液によるRBCの反応時間の影響を検討するため偏光度を測定するとともに、形状の変化を顕微鏡下で観察した。

1分間のインキュベート時間ではリン脂質がほとんど取り込まれないため、Soy PC処理RBC及びHPC処理RBCの偏光度が高くその値はほぼ同じであった (Fig.3-5)。これに対し、3時間、8時間のインキュベートでは

Species of solvent

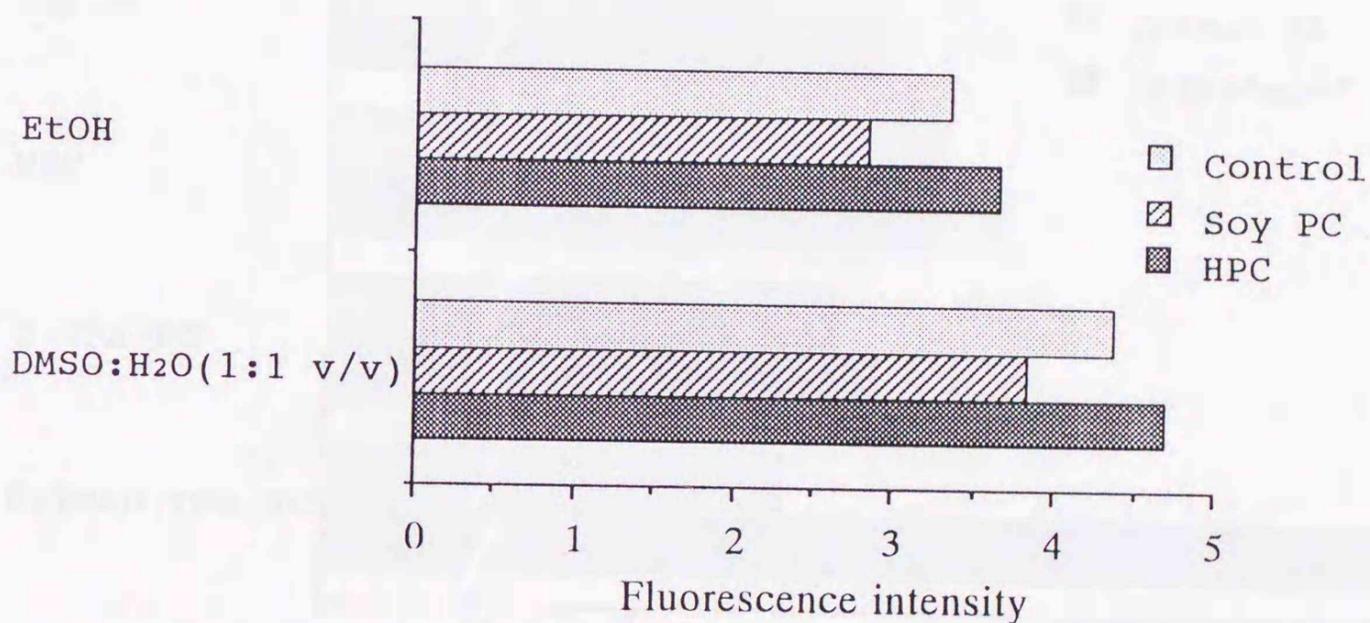


Fig.3-3. Comparison of fluorescence intensity of RBC among the kind of solvent for PL-DPH and PL treatments.

PL-DPH dissolved in solvent was added for 1.0% with mixing to the RBC suspension (Hct.1.0%) to give a final concentrations of 10 $\mu$ M PL-DPH.

Incubation was carried out for 3 hr at 37°C.

Abbreviations are the same as in Table 3-1 and Fig.3-2.

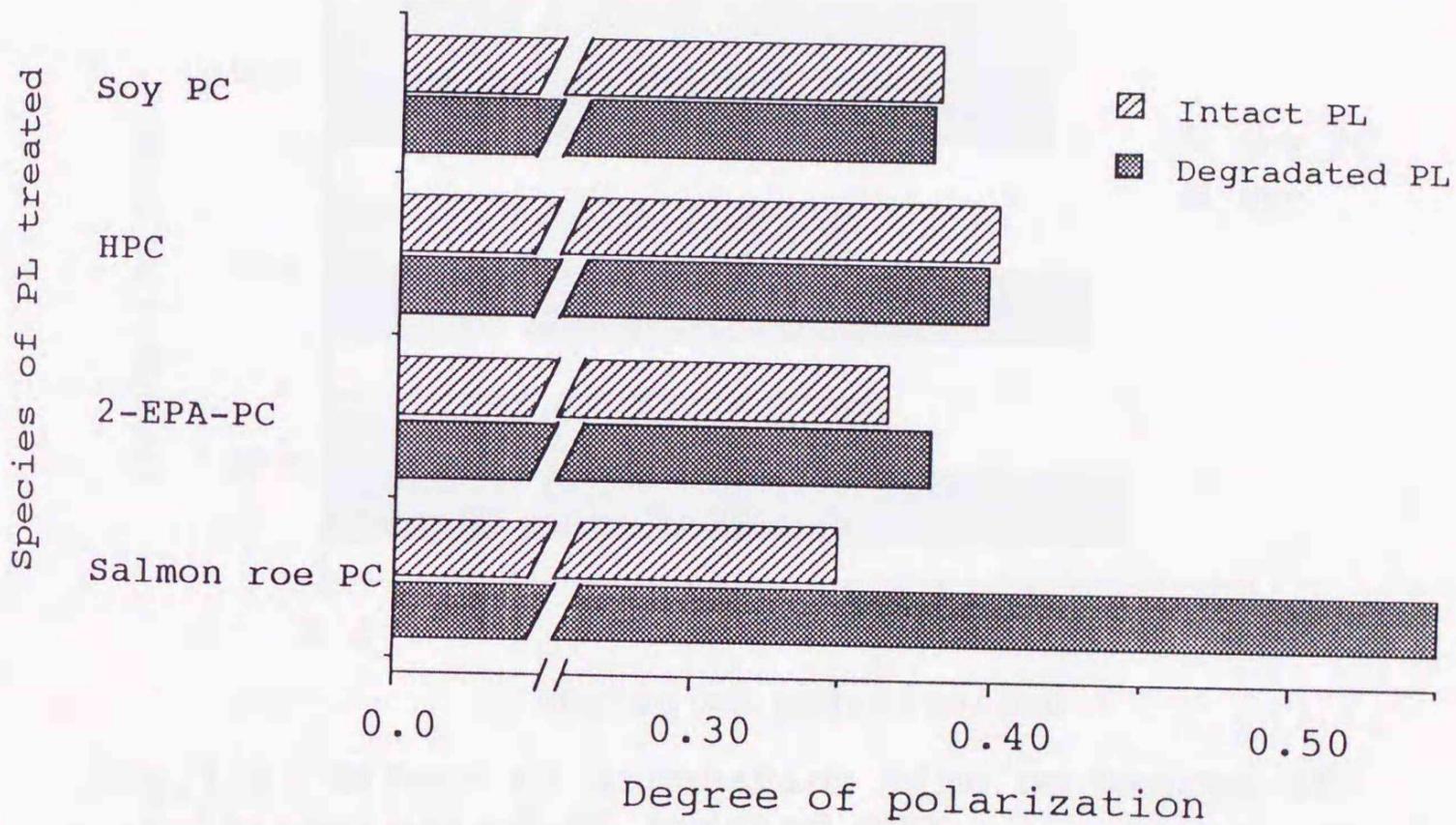


Fig.3-4. Effect of degraded PL on degree of polarization of PL treated RBC.

PL-DPH dissolved in DMSO:H<sub>2</sub>O(1:1,v/v) was added for 1.0% with mixing to the RBC suspension(Hct.1.0%) to give a final concentrations of 10 $\mu$ M PL-DPH.

Incubation was carried out for 3hr at 37°C.

Abbreviations are the same as in Table 3-1 and Fig.3-2.

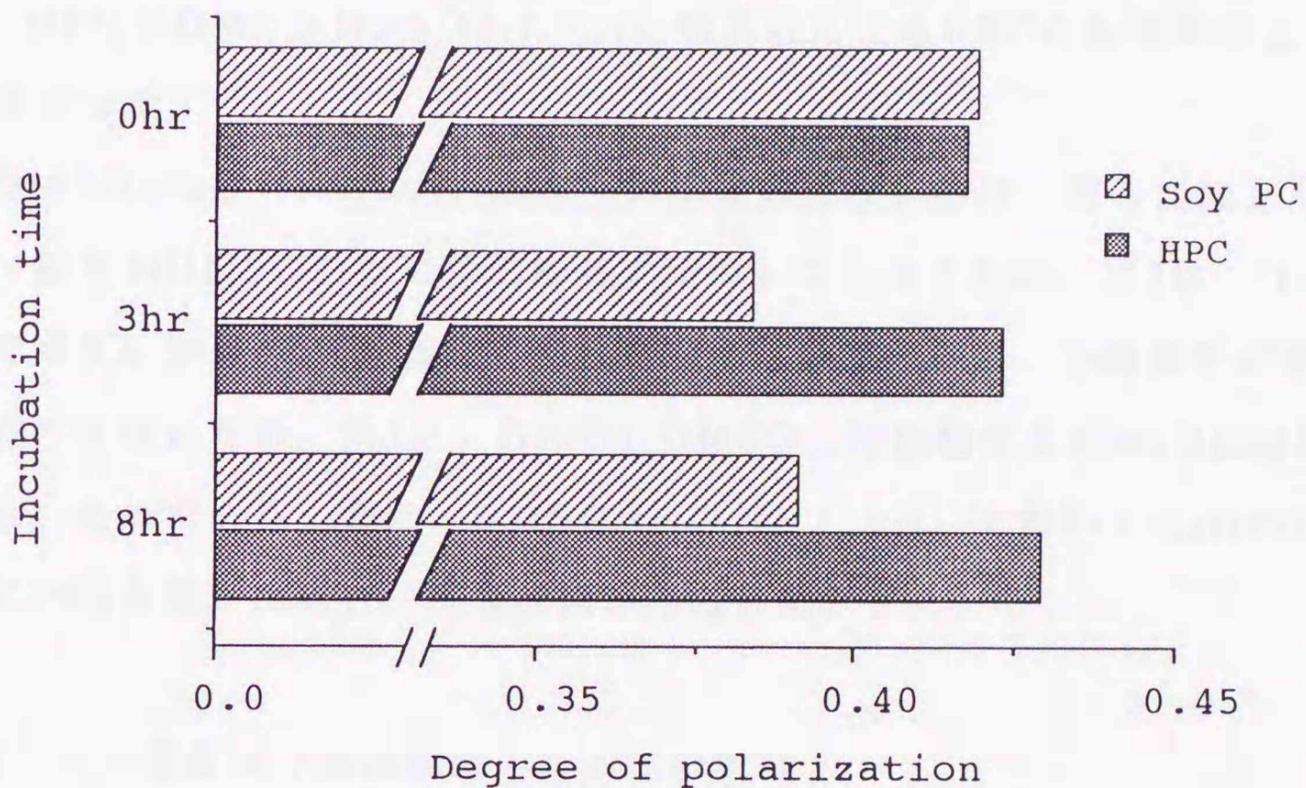


Fig.3-5. Effect of incubation time on degree of polarization of PL treated RBC.

PL-DPH dissolved in DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1,v/v) was added for 1.0% with mixing to RBC suspension (Hct.1.0%) to give a final concentrations of 10 $\mu$ M PL-DPH.

Incubation was carried out for at 37°C.

Abbreviations are the same as in Table 3-1 and Fig.3-2.

Soy PC及びHPCが取り込まれたため、飽和脂肪酸の多いHPCで処理したHPC処理RBCの偏光度がSoy PC処理RBCより高くなっていると考えられる。

また、一定時間インキュベートした後のRBCの形状を観察したところ、1分インキュベートしたRBCは正常な形を保っていたが（鈍鋸歯状に変形したRBC 約4%）、3時間インキュベートしたものでは鈍鋸歯状に変形したRBCが約10%含まれていた。8時間インキュベートしたRBCでは、鈍鋸歯状に変形したRBCが約40%に達し溶血もみられた。以上の結果から、PL-DPHのDMSO:H<sub>2</sub>O（1:1, v/v）懸濁液によるRBCの処理時間を3時間に規定した。

DMSO:H<sub>2</sub>O（1:1, v/v）が単一の溶媒系でないのは、第1にほとんどのリン脂質がDMSOのみには溶解せず沈殿してしまうため。第2に、H<sub>2</sub>Oのみではリン脂質が5mM程度であれば均一に分散するが、長時間その状態を維持できないため。第3に、DPHはDMSOには溶解するがH<sub>2</sub>Oには溶解しないためである。また、DMSO:H<sub>2</sub>O（1:1, v/v）においてH<sub>2</sub>Oの代わりにPBSを用いた場合、凝集沈澱がみられた。

## 2. リン脂質及び蛍光試薬の反応性の検討

### 実験方法

#### 1-2.1 試料及び試薬

RBCに作用させる2-HUFA-PCは第3章第1節1-1.1で調製したものを使用した。2-HUFA-PE及び2-HUFA-PSは第2章第3節3-1の方法に基づき、2-HUFA-PCをホスファチジル基転移したものをを用いた（Table 3-2、3-3）。

2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid sodium salt (TNBS)は生化学用試薬を和光純薬工業（株）より入手した。

血液は第3章第1節1-1.1と同様にヒトから採血して得られた新鮮血を用いた。その他の試薬は第3章第1節1-1.1と同様のものをを用いた。

Table 3-2. Fatty acid composition of the prepared PE for the measurement of membrane fluidity and deformability of RBC.

	Soy PE	HPE	1-EPA-PE	2-EPA-PE	2-DHA-PE	Salmon roe-PE
Sat.						
16:0	12.9	21.0	3.5	12.2	12.8	17.1
18:0	3.5	50.1	—	3.5	3.6	7.9
Mono.						
18:1	10.9	25.9	7.6	5.8	5.8	12.2
Poly.						
18:2	66.3	2.1	47.1	26.6	25.3	—
18:3	6.3	—	4.5	3.2	2.5	—
20:5 (EPA)	—	—	35.5	45.4	1.4	14.9
22:5	—	—	—	—	2.1	6.6
22:6 (DHA)	—	—	—	—	42.2	27.8

Abbreviations: Soy PE, phosphatidylethanolamine prepared through transphosphatidylation of Soy PC; HPE, hydrogenated PE; 1-EPA-PE, eicosapentaenoic acid (at sn-1) containing PE; 2-EPA-PE, eicosapentaenoic acid (at sn-2) containing PE; 2-DHA-PE, docosahexaenoic acid (at sn-2) containing PE; Salmon roe PE, PE prepared through transphosphatidylation of Salmon roe PC; RBC, red blood cells.

Table 3-3. Fatty acid composition of the prepared PS for the measurement of membrane fluidity and deformability of RBC.

	Soy PS	HPS	1-EPA-PS	2-EPA-PS	2-DHA-PS	Salmon roe-PS
Sat.						
16:0	14.1	19.1	3.3	14.3	14.9	16.6
18:0	3.3	58.5	—	3.8	3.9	7.5
Mono.						
18:1	11.2	17.8	7.7	6.3	6.3	11.9
Poly.						
18:2	63.7	2.5	47.0	27.7	26.7	—
18:3	6.3	—	4.5	3.2	2.3	—
20:5(EPA)	—	—	35.2	41.8	1.1	14.6
22:5	—	—	—	—	2.4	6.2
22:6(DHA)	—	—	—	—	39.6	30.1

Abbreviations: Soy PS, phosphatidylserine prepared through transphosphatidylation of Soy PC; HPS, hydrogenated PS; 1-EPA-PS, eicosapentaenoic acid (at sn-1) containing PS; 2-EPA-PS, eicosapentaenoic acid (at sn-2) containing PS; 2-DHA-PS, docosahexaenoic acid (at sn-2) containing PS; Salmon roe PS, PS prepared through transphosphatidylation of Salmon roe PC; RBC, red blood cells.

### 1-2.2 各種リン脂質及び蛍光試薬処理赤血球の蛍光強度の測定

RBCに対するリン脂質及び蛍光試薬処理は、第3章第1節1で検討した条件に基づいて行った。第3章第1節1-1.2に示す通り調製した洗浄RBC (Hct.1%) 5mlに、第3章第1節1-1.4に示す通り調製したPL-DPHの DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 懸濁液 25  $\mu$ lを加え、遮光した状態で37°C、3時間、80rpm/minでインキュベートした。このとき、2-EPA-PLと2-DHA-PLがサケ卵PLと同じ比率、すなわち、1:2(w/w)となるように混合した EPA:DHA=1:2(PL)もRBC処理用リン脂質として用いた。

インキュベート後、PBSを用いて3回洗浄しリン脂質及びDPHを除去した後、PBSに懸濁しHct. 0.05%に調整した。このRBC懸濁液の蛍光強度を測定し、RBCに対するリン脂質及び蛍光試薬の反応性について検討した。蛍光強度の測定条件は第3章第1節1-1.2に示す通りである。

### 1-2.3 統計的処理

各リン脂質処理RBCにつき5~6回蛍光強度を測定し、平均値と標準偏差を求めた。同一リン脂質分子種内で、PC、PE、PSの脂質クラス間で有意水準 5%、1%、0.1%で *t*-検定を行った。

### 1-2.4 TNBSクエンチングによるリン脂質及び蛍光試薬の導入部位の検討

TNBSクエンチングは、Grunbergerら<sup>52)</sup>の方法を応用して行った。

Grunbergerら<sup>52)</sup>は細胞  $4 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個に対して、2mg/mlの TNBS溶液 1mlを用いて測定を行った。これをRBCのHct.に換算すると0.05%に相当する(ヒトの血液のHct.が約45%であり、1ml中にRBCが約  $1.1 \times 10^{10}$ 個あるということに基づいて算出した。)

RBCをリン脂質とともに37°C、3時間インキュベートしてからPBSで洗浄し、Hct. 0.05%に調整するまでは、第3章第1節1-2.2と同様に行った。

なお、対照にはリン脂質非存在下で同様に操作したものをを用いた。

リン脂質処理RBCをPBSに懸濁し、Hct. 0.5%に調整した。このRBC懸濁液 (Hct. 0.5%) 0.5mlとTNBS溶液 (TNBSが2mg/mlとなるようにPBSに溶解したもの) 4.5mlを混合して、遮光した状態で4°C、1時間放置した後、PBSで3回洗浄し余分なTNBSを除去した。TNBSクエンチング効果の比較対照としてTNBS溶液のかわりにPBSを用いて同様の操作を行った。これらのRBC溶液をそれぞれ5mlのPBSに再懸濁し、第3章第1節 1-2.2と同様の条件で蛍光強度を測定し、RBCへのリン脂質及び蛍光試薬の導入状況について検討した。

## 結果及び考察

### 1-2.1 蛍光強度の測定によるリン脂質及び蛍光試薬の反応性の検討

蛍光強度を測定することにより、RBCに対するリン脂質及び蛍光試薬の反応性について検討した (Fig.3-6)。

脂肪酸残基が同じであるリン脂質を作用させたRBC全てにおいて、PC処理RBCに比べ、PE処理RBC及びPS処理RBCの蛍光強度が有意に高くなった。特に、EPA及びDHA結合型リン脂質を作用させたRBCにおいて、その差が顕著であった。蛍光強度が高いということは多くの蛍光試薬がRBCに導入され、偏光度の測定の際にも安定したデータが得られることになる。脂肪酸残基が同じPE、PS処理RBC間の蛍光強度を比較したところ有意差は認められなかった。

### 1-2.2 TNBSクエンチングによるリン脂質及び蛍光試薬導入部位の確認

TNBSクエンチングしたリン脂質及び蛍光試薬処理RBCの蛍光強度を測定することにより、RBCにおけるリン脂質及び蛍光試薬の導入状況に関して検討した。

対照 RBC、Soy PC処理RBC、Soy PE処理RBC及びSoy PS処理RBCのそれぞれにおいてTNBSクエンチング処理を施したもの (TNBS

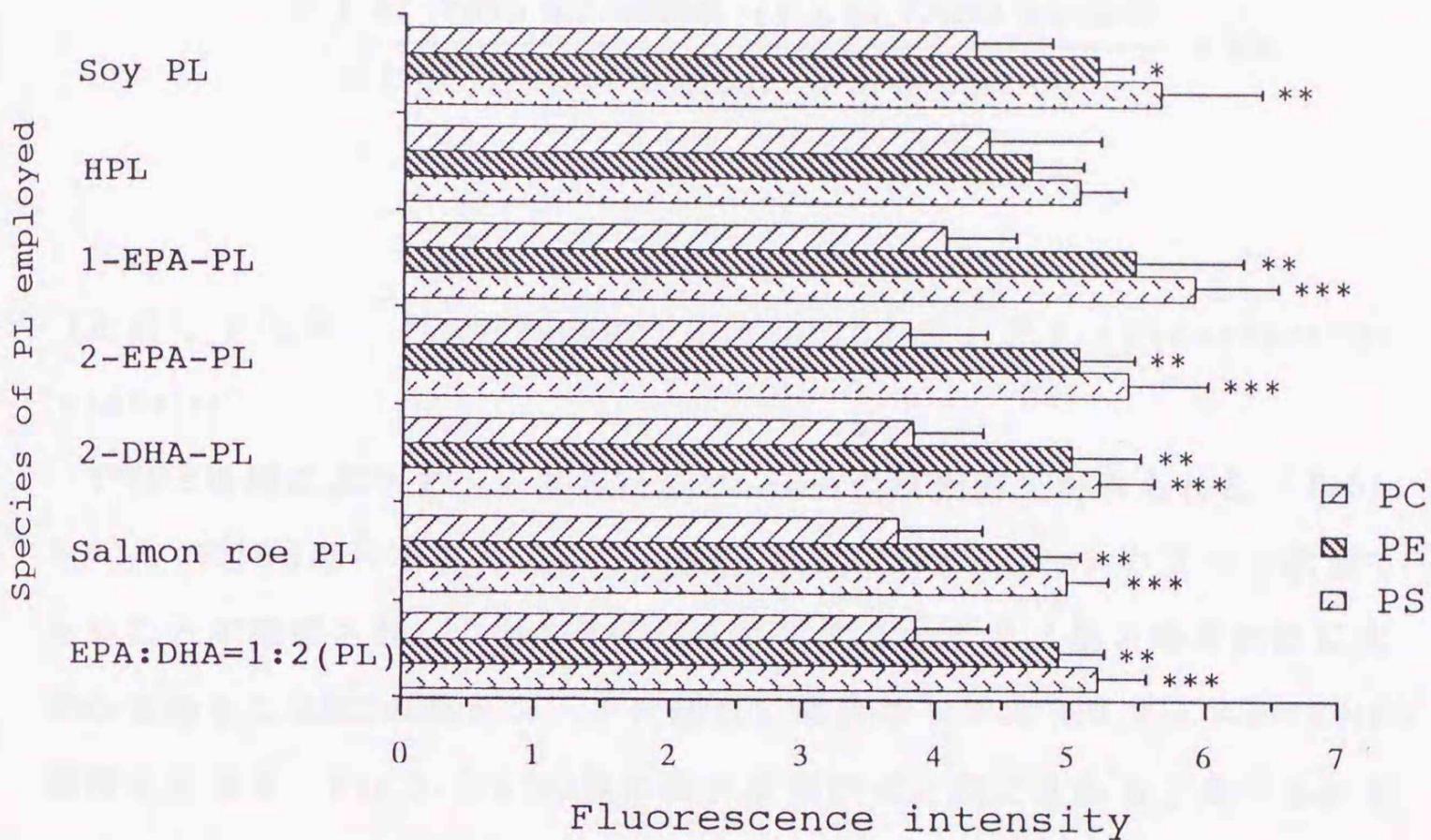


Fig.3-6. Comparison of fluorescence intensity among various PL treatments.

Mean±S.D. of measurements for 5-6 times are given in each group (\*):significantly different( $p < 0.05$ ) from each PC by paired  $t$ -test

(\*\*):significantly different( $p < 0.01$ ) from each PC by paired  $t$ -test

(\*\*\*):significantly different( $p < 0.001$ ) from each PC by paired  $t$ -test

Abbreviations:Soy PL,Soy phospholipid; HPL,hydrogenated PL; 1-EPA-PL,eicosapentaenoic acid(at  $sn$ -1) containing PL; 2-EPA-PL,eicosapentaenoic acid (at  $sn$ -2) containing PL; 2-DHA-PL,docosahexaenoic acid (at  $sn$ -2) containing PL; Salmon roe PL,natural occuring phospholipid prepared from chum salmon roe; EPA:DHA=1:2 (PL),mixed 2-EPA-PL and 2-DHA-PL with 1:2(w/w); PC,phosphatidylcholine; PE,Phosphatidylethanolamine; PS,Phosphatidylserine.

treated) と施さなかったもの (TNBS untreated) の蛍光強度を測定し、下記の式から蛍光消光率を算出した。

$$F.q.(%) = \frac{(F.I. \text{ of TNBS untreated}) - (F.I. \text{ of TNBS treated})}{(F.I. \text{ of TNBS untreated}) - (F.I. \text{ of control})} \times 100$$

(ただし F.q.% : Fluorescence quenching % ; F.I. : Fluorescence intensity)

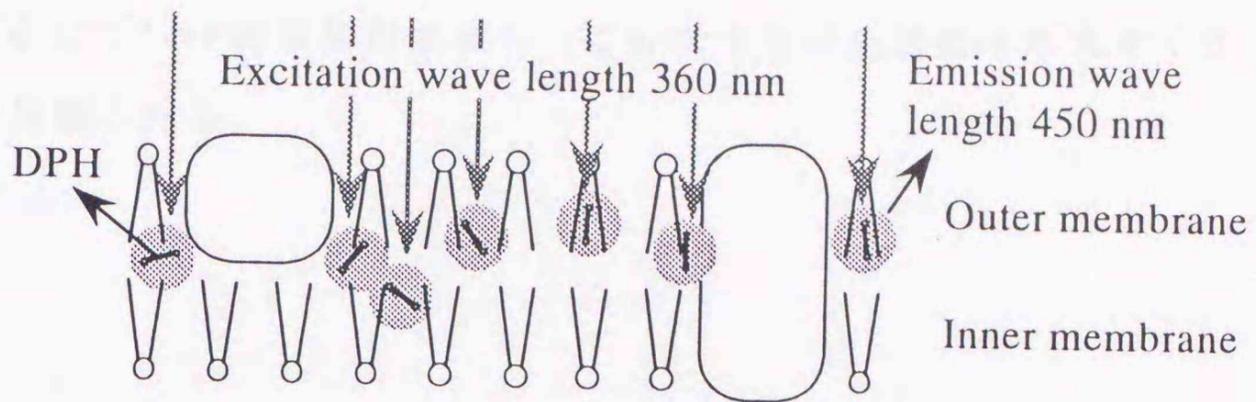
TNBS処理によりすべてにおいて30-50%の蛍光消光がみられた (Table 3-4)。TNBS処理を施していないRBC膜は、Fig.3-7(a) のような状態であることが推察され、これにTNBSを処理するとアミノ基と特異的に反応するため主にRBCの膜タンパクと結合し黄色のトリニトロフェニル(TNP)誘導体を与え、Fig.3-7(b)の様に蛍光消光が引き起こされると考えられる。すなわち、TNP誘導体付近のDPHが蛍光を発しなくなるため蛍光強度が減少する。また、TNBSが膜表面付近のアミノ基としか反応しなかったため膜中のDPHの一部しかクエンチングせず、残りのDPHが蛍光を発したと思われる。Table3-4の結果からRBCに取り込まれたDPHのうち36.4-47.2%以上が膜タンパクの近傍に取り込まれたことを示しており、蛍光プローブしたリン脂質も必然的に膜タンパクの近傍に取り込まれているものと判断される。

脂質クラスの蛍光消効率を比較すると、対照PC、Soy PCでは36.4%、37.7%であったのに対し、Soy PE、Soy PSでは44.5%、47.2%となっており差がみられた。DPHの膜への導入量は本節2.1で示したようにPE、PSの脂質クラスのほうが多いことから、蛍光消効率が高いのはTNP誘導体の量が多いためと考えられる。これは、Soy PE、Soy PSのアミノ基と

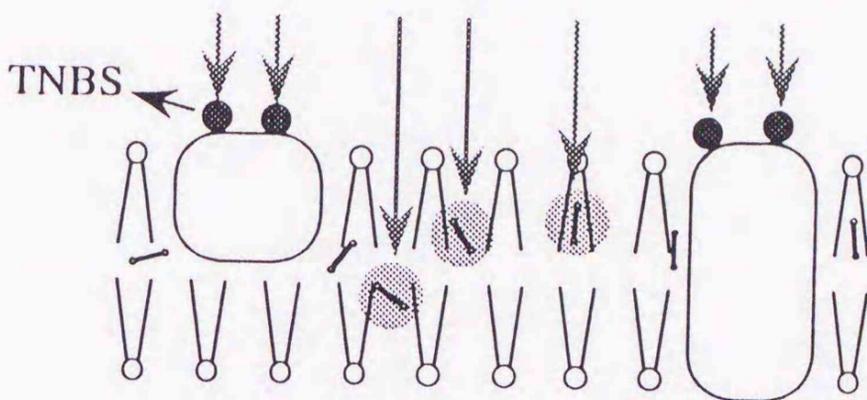
Table 3-4. Efficiency of fluorescence quenching with TNBS on PL-DPH treated RBC.

	Fluorescence intensity (Ex. 360nm, Em. 450nm)		Fluorescence quenching(%)
	Untreated	TNBS treated	
Control	1.90	1.39	36.4
Soy PC	2.12	1.51	37.7
Soy PE	2.14	1.41	44.5
Soy PS	2.98	1.81	47.2

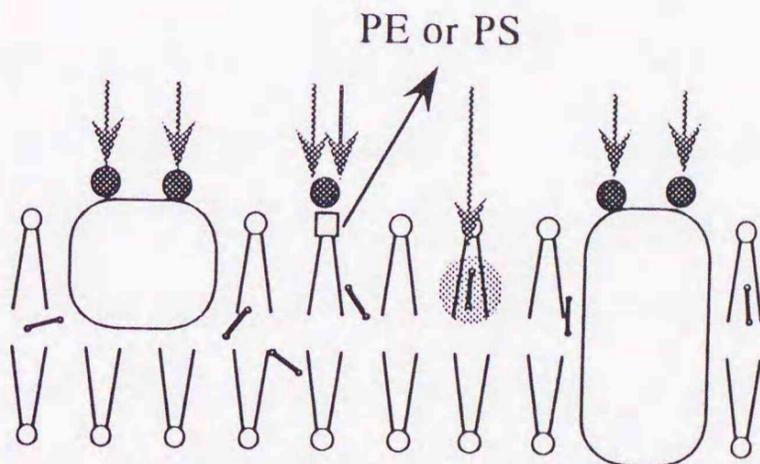
Abbreviations: TNBS, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid; Ex., excitation; Em., emission. Other abbreviations are the same in as Fig. 3-1 and Table 3-1-3-3.



(a)



(b)



(c)

Fig.3-7. Diagram of TNBS quenching.

- (a) PL-DPH treated on RBC membrane.
- (b) TNBS quenching against (a).
- (c) TNBS quenching when treated with PE or PS.

Abbreviations: PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine. Other abbreviations are the same as in Fig.3-1 and Table 3-4.

TNBSが反応してTNP誘導体が増加し、これにより蛍光消効率が大きくなったためと推察される。

## 第2節 ヒト赤血球の膜流動性におよぼす高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の影響

### 実験方法

#### 2.1 偏光度と膜流動性の関係

RBC膜流動性の指標として用いた偏光度Pは、次式のように定義される(50,51)。

$$P = \frac{I_{//} - G \cdot I_{\perp}}{I_{//} + G \cdot I_{\perp}} \quad G = I'_{//} / I'_{\perp}$$

膜流動性が向上すると、蛍光プローブであるDPHが動きやすくなり、蛍光偏光解消が起こって偏光度が減少する。逆に、膜の流動性が低下するとDPHの運動性が低下し、蛍光偏光解消が起こりにくくなり偏光度が増加する。すなわち、あるリン脂質処理したRBC懸濁液の偏光度が対象となるRBC懸濁液の偏光度よりも低ければ、リン脂質処理によってRBC膜の流動性が向上し、逆に偏光度が上昇した場合、リン脂質処理によりRBC膜の流動性が低下したと判断できる<sup>53)</sup>。本節ではこの考え方を応用し、先に作出したHUFA結合型リン脂質分子種の細胞膜流動性への影響について検討した。対象細胞には生体膜を一種類しかもたないヒトのRBCを用いた。

#### 2.2 試料及び試薬

RBCは第3章第1節1-1.2と同様の方法で、ヒトから採血した新鮮血より分離し使用した。RBCに作用させるリン脂質はTable 3-1~3-3に示す18種類を用いた。その他の試薬も第3章第1節1-1.1と同様のものを用いた。

### 2.3 各種リン脂質および蛍光試薬の赤血球への処理方法

RBCをリン脂質及びDPHとともに37°C、3時間インキュベートした後、PBSで洗浄しHct.値 0.05%に調整するまでは第3章第1節1-2.2と同様の操作を行った。このRBC懸濁液 (Hct.値 0.05%)の偏光度を第3章第1節1-1.2と同様に測定した。

### 2.4 統計処理

各リン脂質処理 RBCの偏光度を 5-6回測定し、PC、PE、PSの脂質形態ごとに、それぞれ Soy PC、Soy PE、Soy PSに対し有意水準 5%、1%で *t*-検定を行った。

### 2.5 リン脂質処理赤血球の脂肪酸組成

リン脂質処理RBCからBligh and Dyer法<sup>54)</sup>により全脂質を抽出し、これをSep pakシリカカートリッジに供した。クロロホルム:メタノール (10:1,v/v) で脂肪酸画分を除いた後、メタノールを用いてリン脂質画分を溶出した。このリン脂質画分の脂肪酸組成を第1章第2節2.4に示す方法で分析した。

## 結果及び考察

### 2.1 赤血球膜流動性におよぼす各種リン脂質の影響

偏光度を測定することによりRBC膜の流動性におよぼすリン脂質処理の影響について検討した (Fig.3-8)。いずれの脂質クラスにおいても飽和脂肪酸の結合した HPC、HPE、HPS処理RBCの偏光度が大豆由来のリン脂質処理RBCにくらべて有意に高く、膜の流動性が低下したことがわかる。これに対し、EPA、DHAの結合したリン脂質で処理したRBCの偏光度はすべて低い値を示し、膜の流動性が高いことが示された。特に、2-DHA-PE、1-EPA-PS、2-EPA-PS及び2-EPA-PEと2-DHA-PEを1:2 (w/w) で混合したもの、2-EPA-PSと2-DHA-PSを 1:2 (w/w) で混合したもの

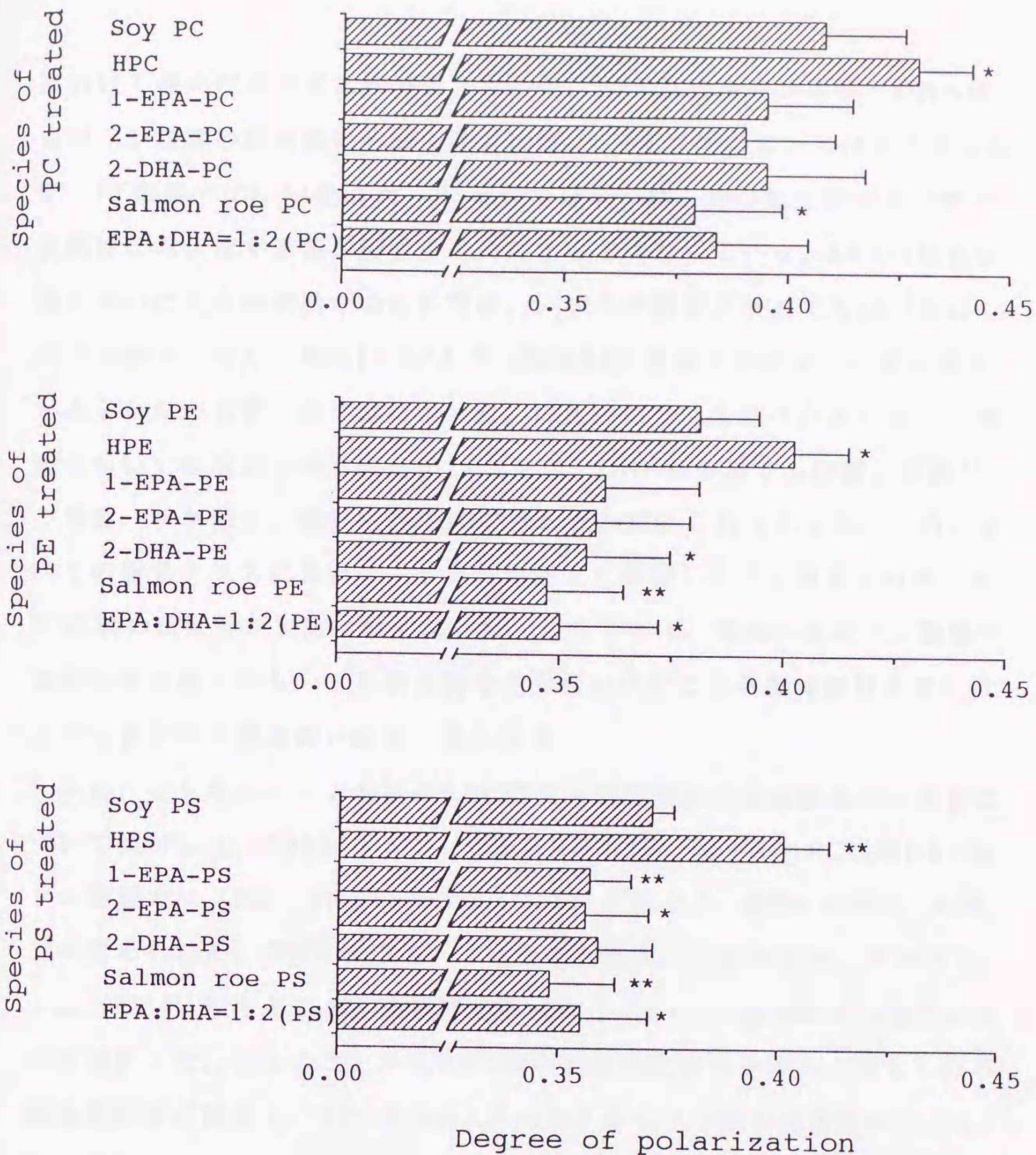


Fig.3-8. Comparison of the degree of polarization among various PL treatments.

Mean  $\pm$  S.D. of measurements for 5-6 times are given in each group  
 (\*):significantly different ( $p < 0.05$ ) from Soy PC or PE or PS by paired  $t$ -test

(\*\*):significantly different ( $p < 0.01$ ) from Soy PC or PE or PS by paired  $t$ -test

Abbreviations:EPA:DHA=1:2(PC),mixed 2-EPA-PC and 2-DHA-PC with 1:2; EPA:DHA=1:2(PE),mixed 2-EPA-PE and 2-DHA-PE with 1:2; EPA:DHA=1:2(PS),mixed 2-EPA-PS and 2-DHA-PS with 1:2. Other abbreviations are the same in Table 3-1-3-3.

において偏光度が有意に低い値となった。EPA結合型リン脂質とDHA結合型リン脂質の膜流動性へおよぼす影響は、PC形態においては差がみられず、PE形態ではDHA結合型、PS形態ではEPA結合型の偏光度が低く膜の流動性におよぼす影響が脂質クラスによって異なっていた。EPAの結合位置の違いによる膜流動性の比較では、いずれの脂質クラスでもsn-2位にEPAの結合したリン脂質(2-EPA-PL)処理RBCの偏光度のほうが低い傾向がみられたが有意な差ではなかった。溶血性について調べたところ、PS処理においては溶血がみられたが、PE形態、DHA結合型リン脂質、水添リン脂質、サケ卵リン脂質処理RBCでは溶血が認められなかった。一方、すべての脂質クラスにおいて、サケの卵巣より調製したリン脂質で処理したRBC膜の流動性が有意に低くなった。このことは、天然の水産リン脂質の高度利用を図ったり、より現実的な魚介類の摂取による健康維持を考える上でもきわめて興味深い結果と思われる。

次に、インキュベート前後のRBC膜リン脂質画分の脂肪酸組成の変化について検討した (Table 3-5)。未処理RBCに比べ2-EPA-PC処理RBCのリン脂質では、Pal (16:0) やOle (18:1) が減少し、EPA (20:5) の増加が認められた。DHA (22:6) にも増加の傾向がみられたが、アラキドン酸 (20:4) などその他の脂肪酸の組成は2-EPA-PC処理による変化がみられなかった。以上のことからRBC膜の流動性を低下させると考えられる飽和脂肪酸が減少し、EPAやDHAが増加することで膜の流動性が向上したと考えた。

Berlinら<sup>55)</sup>をはじめ多くの研究者によってEPAやDHAの投与によるRBC膜のEPAやDHA含量の増加と膜流動性の上昇についての報告がなされてきた。本研究ではEPAやDHAのリン脂質形態に着目し、RBC膜流動性への影響について *in vitro* で検討した結果、EPA及びDHA結合型リン脂質においてRBC膜流動性を上昇させる効果があることを証明した。同一単分子層内を脂質分子が横方向に移動する側方拡散運動が膜流動性に大きな影響を与え、側方拡散速度は炭化水素 (アシル基) 層の粘性によって決

Table 3-5. Changes in fatty acid composition of RBC before and after incubation with 2-EPA-PC.

Fatty acid	Untreated RBC	2-EPA-PC treated RBC
16:0	30.8	28.8
18:0	9.9	9.6
18:1	19.3	17.6
18:2	13.3	13.6
20:4	13.7	13.4
20:5 (EPA)	0.9	2.0
22:5	1.3	1.5
22:6 (DHA)	4.9	5.8
others	5.9	7.7

Abbreviations are the same as in Table 3-1.

定される<sup>56)</sup>ことから、HUFA結合型リン脂質分子で処理することにより、RBC膜内でのリン脂質分子運動が活発になり、このことが膜の流動性を上昇させたと考えられた。

本研究では、HUFA結合型リン脂質の中でもとりわけDHA結合型PEで処理したRBCにおいて膜流動性の上昇が大きいことが示された。ヒトのRBC膜のリン脂質のうち28.0%がPEであり、主に脂質二重膜の内膜に存在している(PCは34.7%で主に外膜に存在し、PSは14.3%で主に内膜に存在している<sup>44)</sup>)。PE中のHUFA含量が74.9%とPCおよびPS中のHUFAに比べて多い<sup>44)</sup>ことから、HUFAがPEの形態であることにより生理機能をより効果的に発現すると考えられる。また、RBCに取り込まれたリン脂質の外層から内層への移行は、PCでは120分で4%しか移行しないのに対し、PE、PSでは30分で30-70%と速い割合で移行する<sup>57)</sup>こと、細胞膜外層に比べ内層の流動性が7倍程度高いこと<sup>58)</sup>が報告されていることから考えると、2-DHA-PEで処理することによりRBCに取り込まれたPEがすみやかに内層に移行し、膜流動性を高めている可能性が考えられる。脂質二重層の非対称性と膜流動性の関係については未だ明らかにされていないことから、本研究結果はきわめて興味深いと思われる。

糖尿病患者、高血圧患者、肝疾患患者、腎不全透析患者、動脈効果患者などではRBC膜の流動性の低下することが報告されている<sup>59)</sup>。糖尿病患者ではインスリン依存性の不飽和化酵素活性が低下し、HUFAの生体内合成が低下するため膜流動性が低下する<sup>60)</sup>と考えられており、HUFAの投与による膜流動性の回復が期待される。短時間での改善を期待するとき、浜崎ら<sup>61)</sup>が報告しているようにDHA結合型リン脂質とDHAトリグリセリドの乳化液の投与が考えられ、また、経口投与においてもリン脂質形態において利用速度が早い<sup>62)</sup>という報告があることから、HUFA結合型リン脂質、特にPEの形態が効果的であると結論した。

### 第3節 ヒト赤血球変形能におよぼす高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の影響

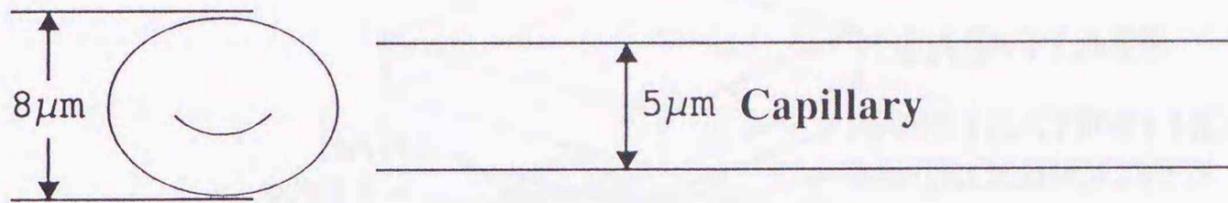
#### 実験方法

##### 3.1 人工毛細血管モデルの概要

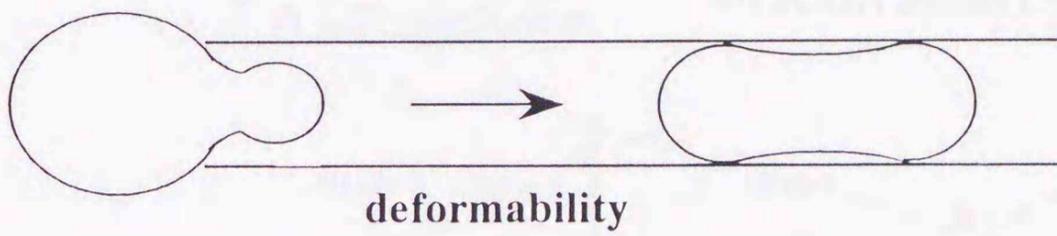
物質交換が行われる毛細血管においてはRBCの変形能が特に重要になる。その管径は組織によっても異なるが平均  $5\mu\text{m}$  程度である。これに対しRBCの径はヒトで約  $8\mu\text{m}$  である。したがってRBCは変形しないと毛細血管を通過し得ない関係にある。酸素消費量の大きい組織ほど毛細血管径は小さくなる傾向にあり、RBCの変形能がとくに重要になる。第3節ではこのようなヒトの毛細血管のモデルとして、半導体の製造技術を利用して製作した人工毛細血管様マイクロチャンネル<sup>63-65)</sup>を用い、EPA及びDHA結合型リン脂質のRBC変形能への影響について検討した (Scheme 3-1)。

菊池ら<sup>63-65)</sup>は半導体製造技術を用いてシリコン単結晶基板上に人工毛細血管モデルの加工を行った (Fig.3-9)。中央に試料を通す穴 (Penetrating hole) があり、その周りは四方をバンクで囲まれたWellになっている (Fig.3-9 (a))。よって試料はPenetrating holeを通過後Wellに到達し、Bank上に形成されたマイクロチャンネル (Microgrooves) を通過する。Bank上に形成されたマイクロチャンネルを拡大したものがFig.3-9(b)である。マイクロチャンネルの長さは約  $10\mu\text{m}$  であり、その前後には約  $30\mu\text{m}$  のTerraceがある。マイクロチャンネルの幅は約  $9\mu\text{m}$  でありその断面を三角形とみなしたとき、三角形の他の二辺の長さはTerraceに対して  $54.7^\circ$  の角度であることから  $7.7\mu\text{m}$  と算出される。よってマイクロチャンネルの断面積は  $27.7\mu\text{m}^2$  であり、これは直径  $6\mu\text{m}$  の円の面積に相当する。ヒトの毛細血管の平均径は約  $5\mu\text{m}$  であり、マイクロチャンネルの断面積より求めた径とほぼ一致する。RBCの平均径は約  $8\mu\text{m}$  であり、このRBCを一定条件下でマイクロチャンネルに流し、その通過時間と通過量を測定する

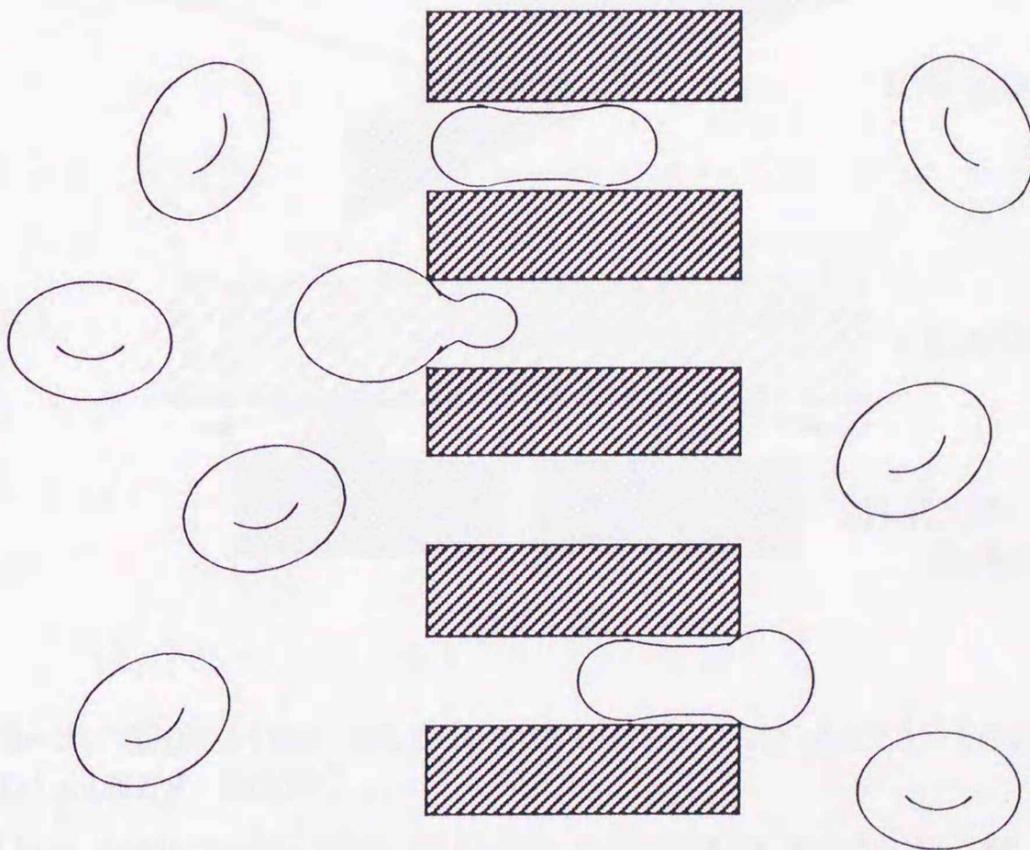
Red blood cell



Red blood cell



Microchannel



Scheme 3-1

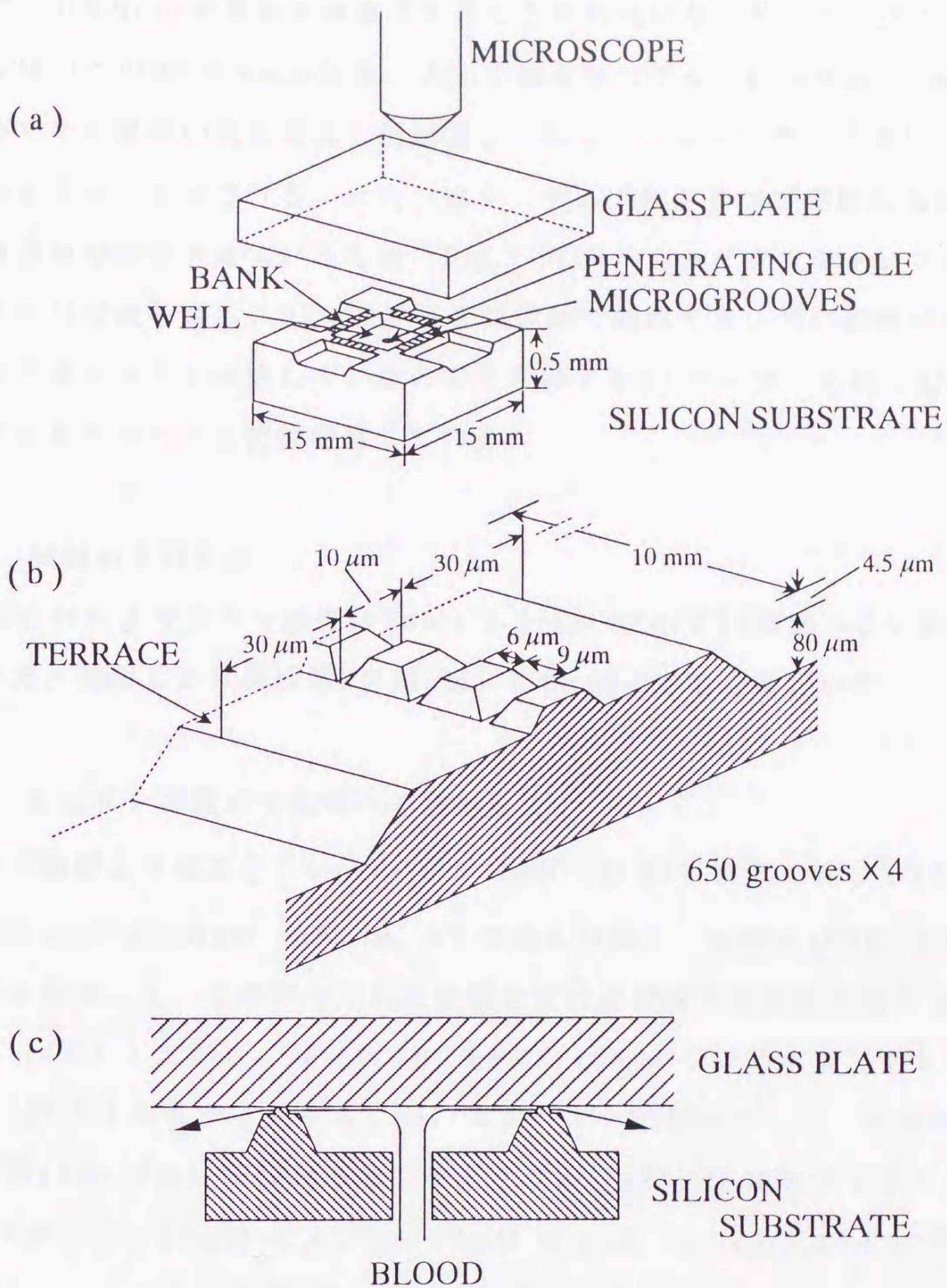


Fig.3-9. Outline structure of the Artificial Capillary Model.

- (a) Outline structure. The silicon substrate surface has the compartments (Wells) partitioned by the Banks.
- (b) Expanded view of the Bank. The level areas (Terraces) are placed at the two sides of the Bank at the same level to the groove depth.
- (c) Blood passage. The contact of the upper surface of the Bank to the glass plate can be made watertight with mechanical pressing alone because of the optical flatness of the both surfaces.

ことによりRBCの変形能を数値化することが可能になった。マイクロチャンネルは一つのBank上に650個、人工毛細血管モデル上には合計で2600個あるため、試料の通過時間と通過量を平均化して測定でき、再現性の高い結果を得ることができる。また、本システムではシリコン単結晶基板にガラス基板を圧着させているため (Fig.3-9(C))、マイクロチャンネルの入口と出口付近を流れるRBCの様子を顕微鏡で観察でき、更に接眼側に8ミリビデオカメラを設置しているのでその様子をTVモニターに映し記録、観察できるユニークな特徴を有している。

### 3.2 試料および試薬

RBCに作用させるリン脂質はTable 3-1~3-3に示す18種類のリン脂質を用いた。使用した試薬は第3章第1節1-1.1と同様のものを用いた。

### 3.3 各種リン脂質の赤血球への処理方法

ヒトの静脈より採血を行い(ヘパリン 1000 IU/mlを血液に対して5%加え凝血防止)、3000rpm、15min、4°Cで遠心分離し、血漿及びRBC以外の血球を除去した。この時得られた血漿を後ほど使用するために別の容器で保存(4°C)しておき、残ったRBCをPBS(10mM リン酸水素二ナトリウム、125mM 塩化ナトリウム、pH7.4 at 4°C)で3回洗浄した。洗浄RBCを反应用PBS(10mM リン酸水素二ナトリウム、125mM 塩化ナトリウム、2mM アデニン、10mM イノシン、10mM グルコース、pH7.4 at 37°C)に懸濁しヘマトクリット値(Hct.)を2%に調整した。

洗浄RBC(Hct.2%) 6mlに対してリン脂質懸濁液(リン脂質が4mMとなるように蒸留水に超音波懸濁したものと、DMSOを1:1の割合で混合し、さらに超音波処理したもの)を60 $\mu$ l加えた。これらの反応混液を37°C、3時間振盪恒温槽(80rpm/min)中でインキュベートし、再びPBSで3回洗浄することによって余分なリン脂質を除去、PBSに再懸濁し、Hct.10%に調

整した。このRBC懸濁液 0.5mlに前記の血漿 0.2mlを加えてよく混合した後、Nuclepore filter(5.0  $\mu$ m、Costar Scientific Corporation)に通したものを毛細血管モデルによるRBC変形能測定用の試料とした。

### 3.4 リン脂質処理RBCの変形能測定

Fig.3-9(a)に示した人工毛細血管モデルを用いてRBC変形能を測定した。人工毛細血管モデルをFig.3-9(c)のようにガラスと圧着させることによりマイクロチャンネル以外からの漏れを防止すると共に顕微鏡による観察を可能にした。外部から7.4mmHg (10cmH<sub>2</sub>O)の引圧をかけてマイクロチャンネルにRBCを通過させ、試料液100 $\mu$ lが流れるのに要する時間を10 $\mu$ l毎に計測した。このマイクロチャンネル通過速度と顕微鏡を通してTVモニターに映しだされた画像から(接眼レンズ10倍、対物レンズ10倍、8ミリビデオカメラ約10倍からTVモニターに映し出される画像は約1000倍)、種々のリン脂質処理がRBC変形能に及ぼす影響を比較検討した。すなわち、マイクロチャンネル通過速度が低下したものは変形能が悪化し、向上したものは変形能が改善されたと判断した。

## 結果及び考察

### 3.1 毛細血管モデルを用いた赤血球変形能測定法の再現性の検討

毛細血管モデルを用いたRBC変形能測定法の再現性に関して検討した結果をFig.3-10に示す。

対照(a)、(b)は、異なる日に同じヒトで採血を行い、その日のうちに同じ条件でRBCの変形能を測定したものである。対照(a)、(b)のflow curveはほぼ同一線上にあり、流量が10 $\mu$ l毎のマイクロチャンネル通過時間においても対照(a)、(b)間の差は1秒以内に納まっていた。このことから、本毛細血管モデルを用いたRBC変形能測定法の再現性は十分に高いものであることが確認された。

従来まで用いられてきたマイクロピペット法やフィルター法は、測定に

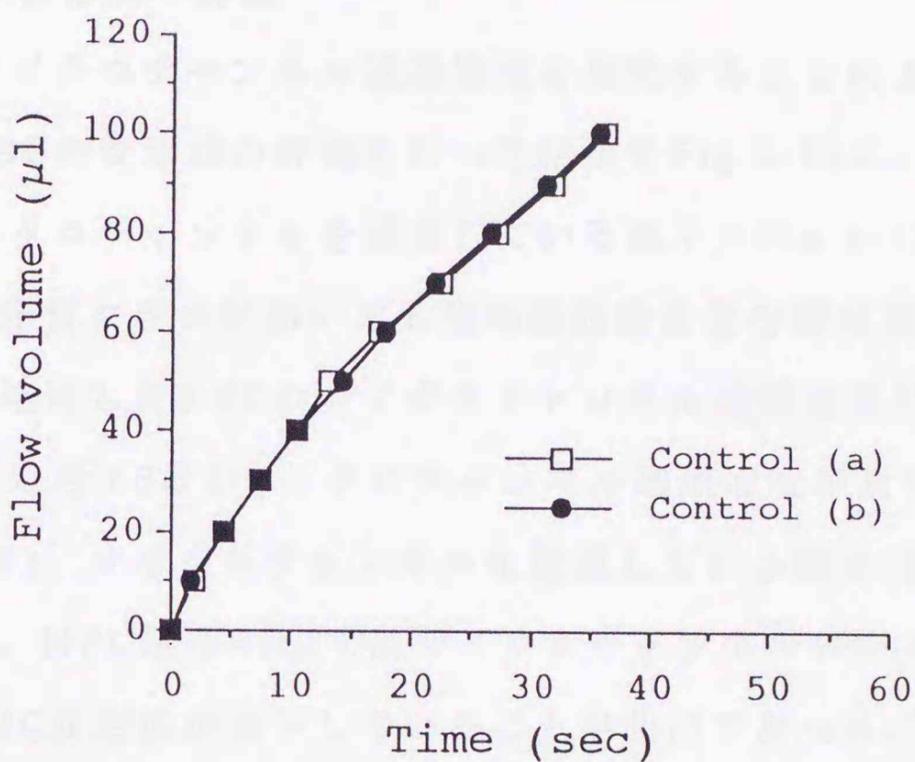


Fig.3-10. Reproducibility of deformability measurements with Artificial Capillary Model.

(Groove length of the microchannel:  $10\mu\text{m}$ ; Negative pressure applied into the reservoir  $7.4\text{mmHg}$  ( $10\text{cm H}_2\text{O}$ ); Temp.: ambient ( $24^\circ\text{C}$ ) Control(a)(b): RBC suspensions were prepared by incubation without PL.

Abbreviations are the same as in Fig.3-1.

熟練を要することや測定値にばらつきが多いことなどの問題点があった(66,67)。RBC変形能の測定に、シリコン単結晶基板毛細血管モデルを用いることで、ヒトの毛細血管にきわめて近い条件で信頼性のある値を得ることができると考えた。

### 3.2 毛細血管モデルによる高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質処理赤血球の変形能の評価

RBCのマイクロチャンネル通過速度を測定することにより、種々のリン脂質処理RBCの変形能の評価を行った結果をFig.3-11に、リン脂質処理RBCがマイクロチャンネルを通過している様子をFig.3-12~14に示す。

いずれの脂質クラスにおいても飽和脂肪酸を主な構成脂肪酸とする水添リン脂質で処理したRBCのマイクロチャンネル通過速度が遅くなっており、特に、HPC処理RBCでマイクロチャンネル通過速度が著しく遅くなっていた(Fig.3-11)。マイクロチャンネルを通過している様子(Fig.3-12(a))を観察すると、HPC処理RBCではマイクロチャンネルの出入口で引っ掛かりが見られRBC変形能が低下していることが明白であった。リノール酸を60%以上含むSoy PCで処理したRBCでは、PCを加えず同様に処理した対照RBCに比べRBC変形能に大きな変化はみられなかったのに対し、HUFA結合型PCで処理したRBCではすべてが対照RBCよりもマイクロチャンネル通過速度が速くなっており(Fig.3-11)、RBC変形能が向上していることが示された。またその結果は、マイクロチャンネルに引っ掛かることなくスムーズに通過しているRBCの様子(Fig.3-12(b))からも確認できた。

熊谷ら<sup>68)</sup>はEPAエチルエステルの投与により血液粘度が有意に低下し、RBC変形能も有意に上昇することを報告しているが、本実験においてもHUFA結合型リン脂質を用いたRBC処理により同様の結果が得られた。

脂質クラスごとでの分子種の影響は、PCおよびPEの脂質クラスでは

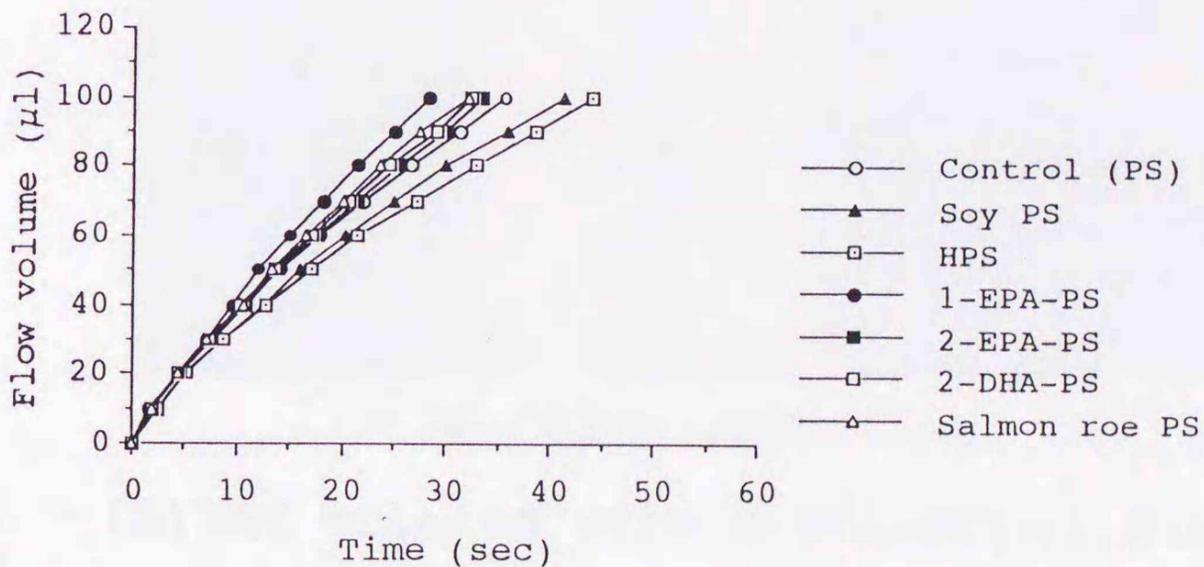
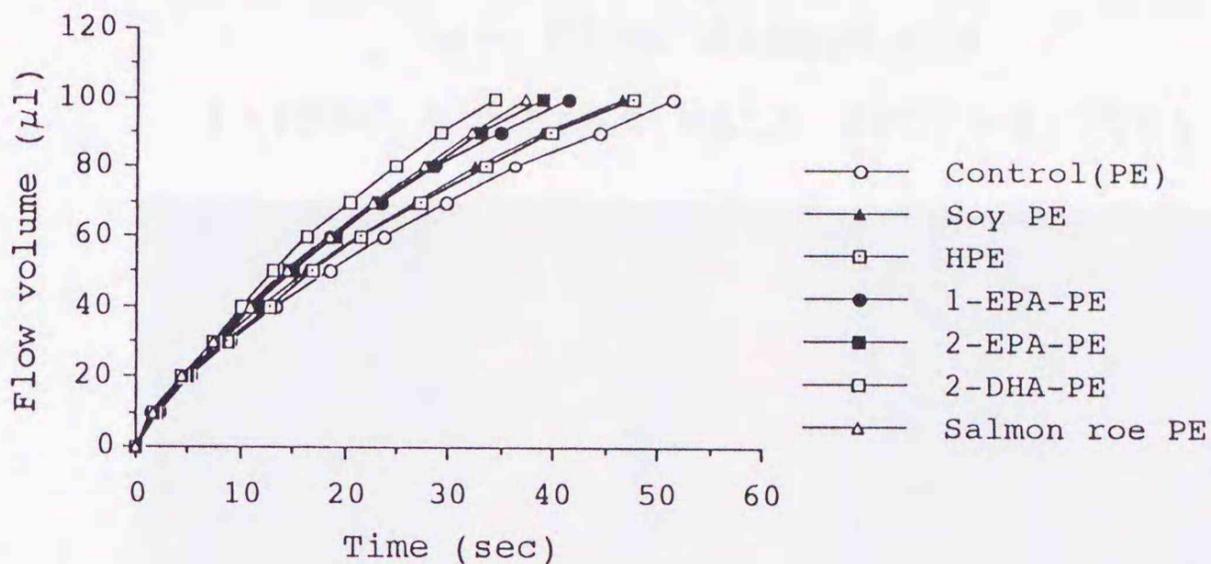
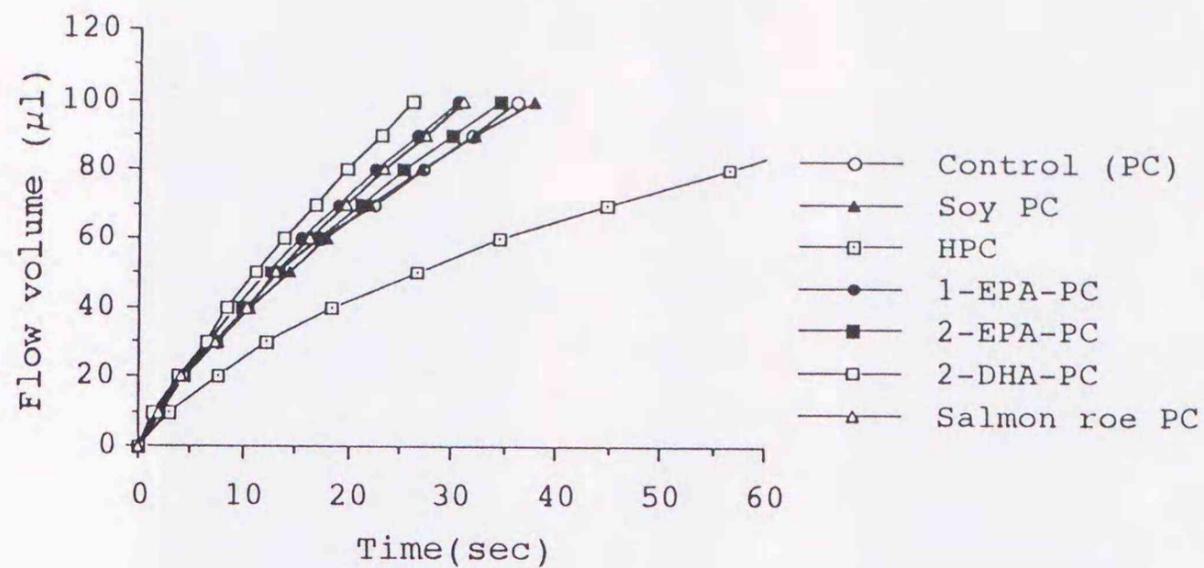
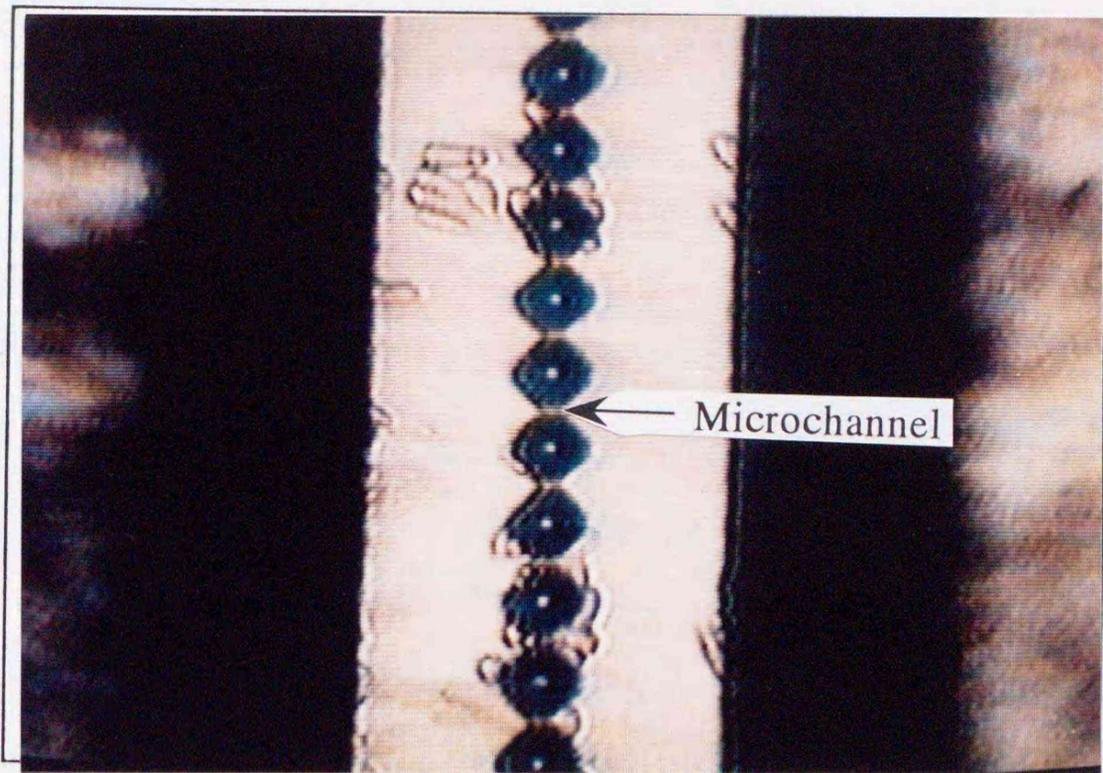


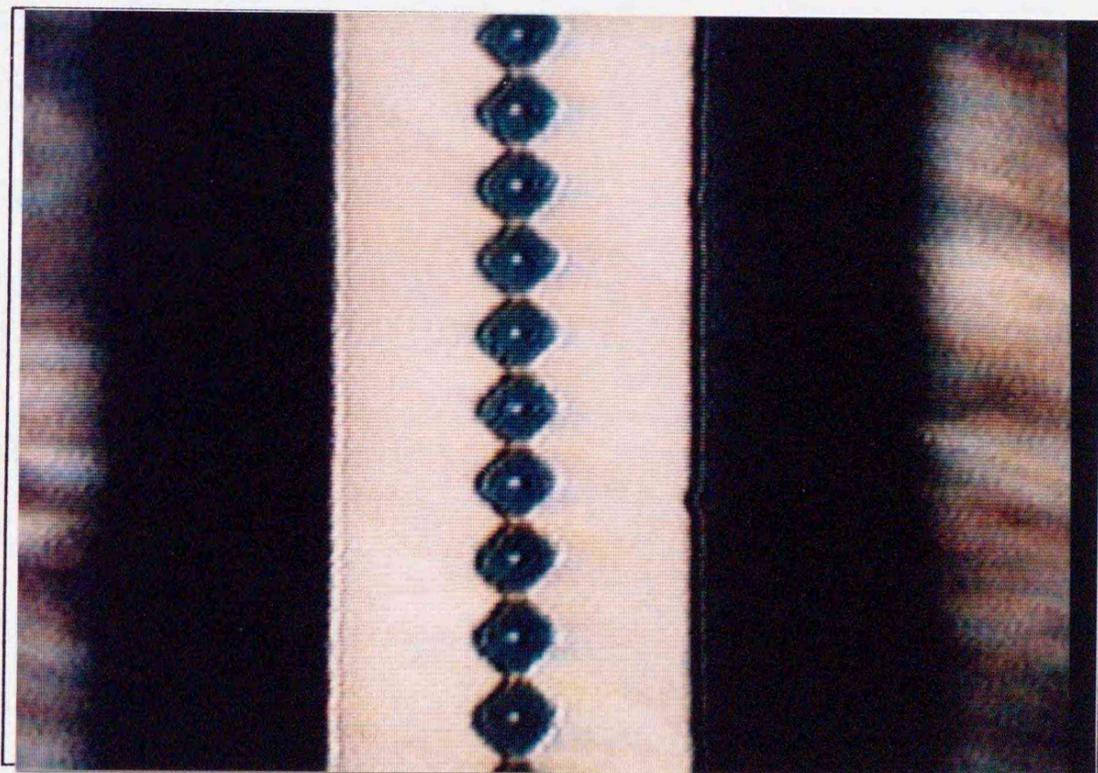
Fig.3-11. Flow curves of RBC treated with various PL obtained through evaluation of deformability with Artificial Capillary Model.

(Groove length of the microchannel:  $10 \mu\text{m}$ ; Negative pressure applied into the reservoir  $7.4\text{mmHg}$  ( $10\text{cm H}_2\text{O}$ ); Temp.: ambient ( $24^\circ\text{C}$ ))

Abbreviations are the same as in Table 3-1-3-3.



← flow direction  
 (a) RBC treated with HPC ( $\times 1,000$ )



← flow direction  
 (b) RBC treated with 2-DHA-PC ( $\times 1,000$ )

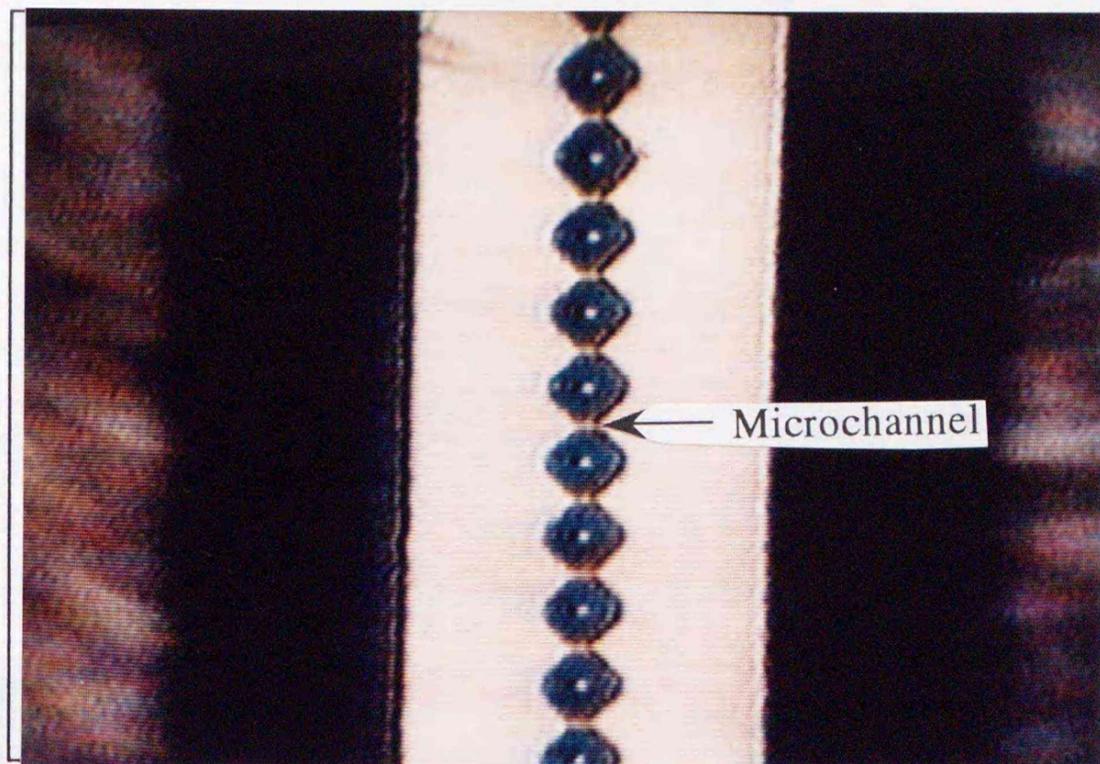
Fig.3-12. Microscopic observation of RBC treated with HPC(a) and 2-DHA-PC(b) in microgrooves of Artificial Capillary Model.

(Groove length of the microchannel:  $10\mu\text{m}$ ; Negative pressure applied into the reservoir  $7.4\text{mmHg}$  ( $10\text{cm H}_2\text{O}$ ); Temp.: ambient ( $24^\circ\text{C}$ )

Abbreviations are the same as in Table 3-1.

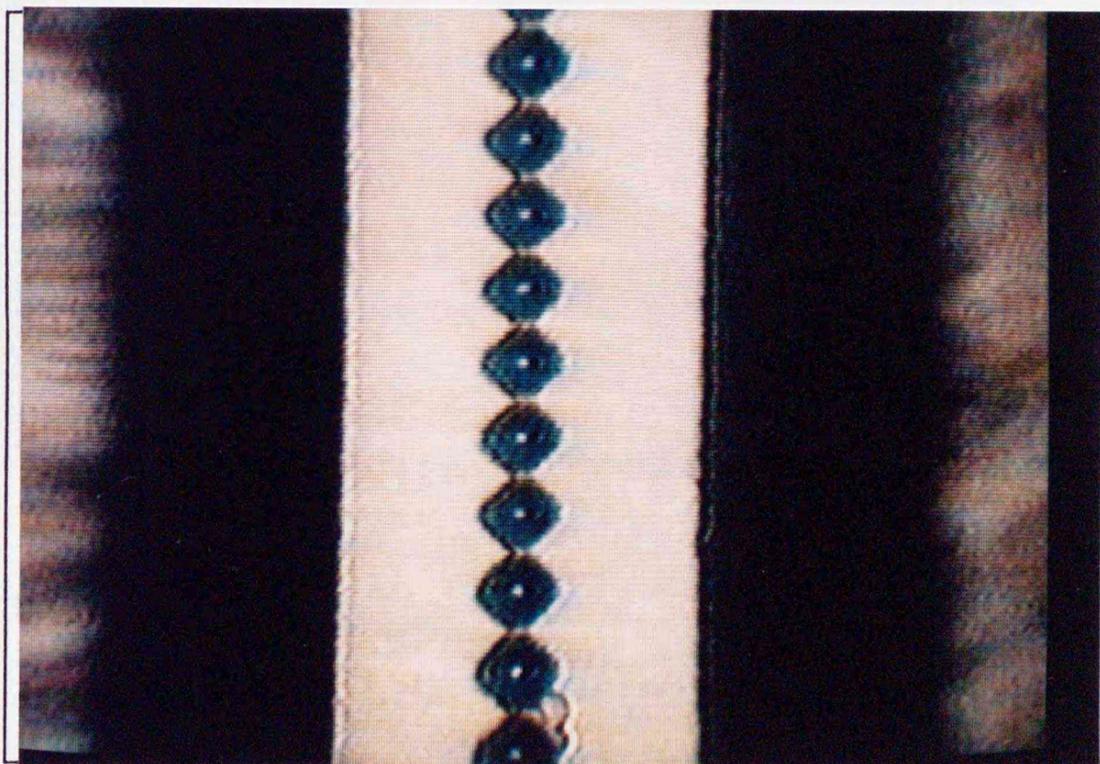
EPAよりDHAをsn-2位に結合する2-DHA-PC、2-DHA-PE、PSでは1-EPA-PSにおいてRBC変形能の向上作用が顕著であった (Fig.3-11、3-13)。第3章第2節で検討した偏光度測定によるRBCの膜流動性に対するHUFA結合型PL処理の影響と同様の結果が得られたことから、HUFA結合型リン脂質で処理することによりRBC膜流動性が高まり、その結果RBC変形能が向上することが考えられた。RBC膜流動性への影響と同様にリン脂質分子種や化学形態によりRBC変形能の向上効果が異なることが示唆された。また、サケ卵巣より抽出したリン脂質処理RBCにおいてもRBC変形能改善効果が大きかった (Fig.3-11、3-14)。

RBC変形能の向上は、膜リン脂質脂肪酸のコレステロールとの結合性や細胞内タンパク質との相互作用など様々な要因によって引き起こされると考えられる<sup>56)</sup> ことから、今後詳細な検討が必要と思われるが、本研究によりリン脂質の分子種によりRBC変形能へおよぼす効果が異なり、その様子を視覚的に明らかにすることができたことは意義が大きい。また、同じn-3系のHUFAにおいても、PC、PEの形態ではDHA結合型リン脂質が、PSではEPA結合型リン脂質が変形能を大きく高めることから、第2節と同様にHUFA結合型リン脂質の分子構造が重要な役割を果たしていると考えた。



← flow direction

(a) RBC treated with 2-DHA-PE ( $\times 1,000$ )



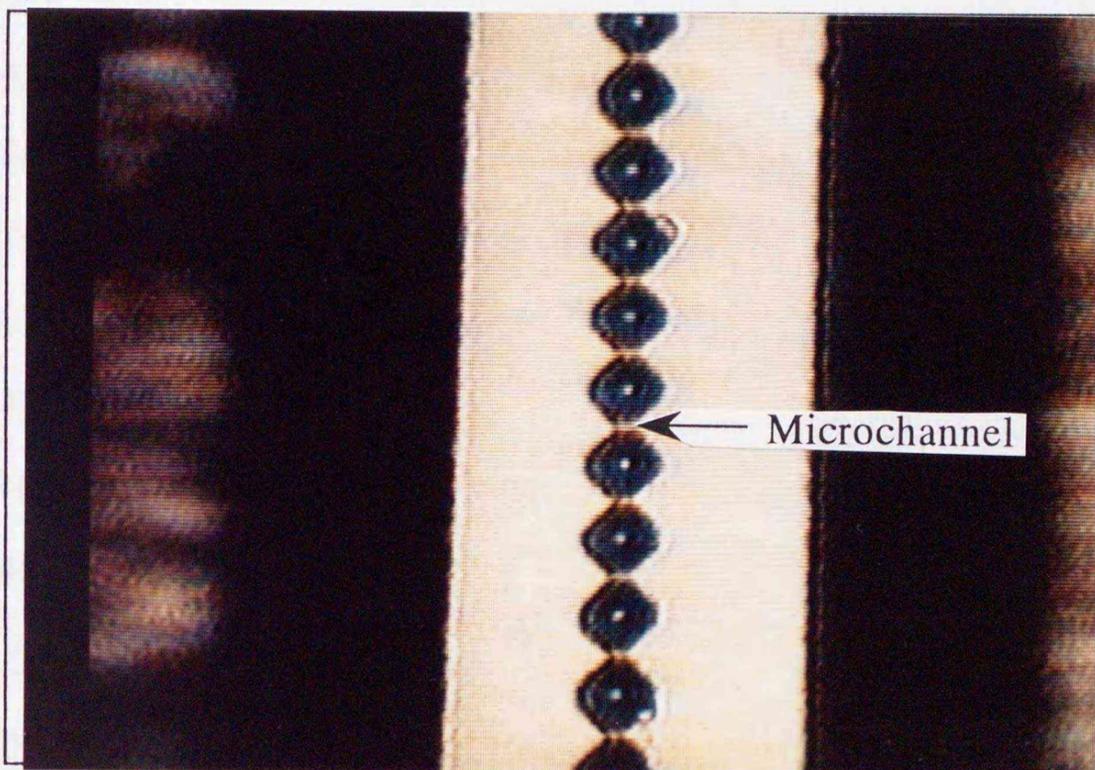
← flow direction

(b) RBC treated with 1-EPA-PS ( $\times 1,000$ )

Fig.3-13. Microscopic observation of RBC treated with 2-DHA-PE(a) and 1-EPA-PS(b) in microgrooves of Artificial Capillary Model.

(Groove length of the microchannel:  $10\mu\text{m}$ ; Negative pressure applied into the reservoir  $7.4\text{mmHg}$  ( $10\text{cm H}_2\text{O}$ ); Temp.: ambient ( $24^\circ\text{C}$ )

Abbreviations are the same as in Table 3-2-3-3.



← flow direction

RBC treated with Salmon roe PC( $\times 1,000$ )

Fig.3-14. Microscopic observation of RBC treated with Salmon roe PC in microgrooves of Artificial Capillary Model.

(Groove length of the microchannel:  $10\mu\text{m}$ ; Negative pressure applied into the reservoir  $7.4\text{mmHg}$  ( $10\text{cm H}_2\text{O}$ ); Temp.: ambient ( $24^\circ\text{C}$ )

Abbreviations are the same as in Table 3-1.

#### 第4章 ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60細胞) の増殖及び分化 におよぼす高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の影響

これまで多くの疫学調査により脂質とガンの関係が調べられてきた<sup>3,5,69,70</sup>)。その結果、EPAやDHAなどの n-3系高度不飽和脂肪酸は発ガン抑制的に働き、リノール酸や $\gamma$ -リノレン酸などの n-6系不飽和脂肪酸は発ガン促進的に働く傾向が認められている。しかしながら、それらのほとんどは動物実験による間接的証明であり、細胞レベルでの直接的証明が今後の研究課題であると思われる。

EPAやDHAは生体膜中でリン脂質分子に取り込まれ生理機能を発現すると考えられおり、その際、特にDHAは sn-2位に選択的に取り込まれ特定のDHA結合型リン脂質の立体構造をとる。その構造はsn-1位に結合した脂肪酸によっても大きく異なることが Applegateら<sup>71,72</sup>)により指摘されている。Matsumotoら<sup>9</sup>)は5-リポキシゲナーゼ活性に対するDHA結合型リン脂質分子種の影響を検討したところ、sn-2位にDHAの結合している場合 sn-1位の脂肪酸が Ole > DHA > Palの順で阻害活性が強いことを報告している。また、Suzukiら<sup>73</sup>)は細胞分化誘導能を有するリン脂質をニジマス胚から抽出し構造を調べたところ、sn-1位の脂肪酸が Palまたは Ole、sn-2位の脂肪酸が DHAであったことを認めている。このことより、立体構造のみならず生理機能も分子種により異なることが強く示唆される。

一方、リン脂質分子内には疎水性部分であるアシル基のほかに、塩基やリン酸基など親水性の原子団もあり、コリン、エタノールアミン、セリン、イノシトールなどの塩基の種類によりリン脂質分子全体の機能が大きく異なることが知られている。動物細胞の膜脂質二重層においてはPE、PSはともに細胞質側に多く存在し、PCとは反対側に位置しその生理機能が異なることは第3章の結果から裏づけられる。そこで本章では、n-3系HUFAの生理機能の1つである抗ガン作用、特にガン細胞の増殖及び分化におよぼ

すEPAやDHA結合型リン脂質の影響をリン脂質の構造と関連づけて明らかにすることを目的とし、第1節ではヒト前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞の増殖と分化におよぼすEPA及びDHA結合型リン脂質の影響を脂肪酸やエチルエステルの形態と比較しながら検討した。第2節では sn-1位に単一の脂肪酸を結合させたDHA結合型PCを用いて、HL-60細胞の増殖と分化におよぼすDHA結合型PC分子種の影響について検討した。第3節ではPCと同一アシル基で塩基部分の異なるEPA及びDHA結合型PE、PSを用いて、HL-60細胞の増殖や分化におよぼすリン脂質形態の影響について検討した。

## 第1節 HL-60細胞の増殖と分化におよぼすエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸の影響

### 実験方法

#### 1.1 試料及び試薬

HL-60細胞(ATCC CCL-240)は大日本製薬(株)より購入した。RPMI 1640培地、penicillin及びstreptomycinはGibco BRLより購入した。all-*trans* レチノイン酸(RA)、nitro blue tetrazolium (NBT)、phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)はSigma Chemical Co.より購入した。Soy PCとして使用したsoybean phosphatide extract (phosphatidylcholine >95%)は、Avanti Polar-Lipids, Inc.より購入した。EPA、DHA、EPAやDHAのエチルエステル(EPA-EE、DHA-EE)は日本化学飼料(株)より入手し、フロリジルカラムクロマトグラフィーにより過酸化物を除去したものを使用した。その他のリン脂質は第2章第1節の方法で調製し、酸化物を除去した後使用した(Table 4-1)。酸化物の除去はTeraoら<sup>74)</sup>の方法に準じてHUFA結合型PCを逆相ローバーカラム(Lichroprep RP-8, E. Merck)に供してクロロホルム:メタノール:水(1:10:0.5, v/v/v)を用いて行った。

#### 1.2 HL-60細胞の増殖の測定

HL-60細胞を10% ウシ胎児血清(56°Cで30分間非働化して使用)を含むRPMI 1640培地(penicillin 100 IU/ml、streptomycin 100 µg/ml含有)を用いて、5% CO<sub>2</sub>を含む気流中37°Cで培養した。細胞密度が $5 \times 10^4$  cells/mlとなるように調整した培養液に、種々の脂質のエタノール溶液(エタノールの濃度は細胞増殖に影響しない0.1%以下とした。)を添加した後、経時的に細胞数を測定した。死細胞はtrypan blue染色により確認した。

Table 4-1. Fatty acid composition of exogenously added lipids used in the experiments.

Fatty acid	2-EPA-PC	2-DHA-PC	Soy PC	EPA (mol %)	EPA-EE	DHA	DHA-EE
16:0	14.7	15.8	13.9	1.6	0.2	0.2	-
18:0	2.9	0.6	2.3	2.2	0.9	-	-
18:1	5.8	4.9	10.9	0.6	0.2	-	-
18:2	27.4	30.0	66.7	1.8	0.8	0.2	-
18:3	3.1	2.8	5.9	0.3	0.3	0.1	-
20:5(EPA)	44.4	6.6	-	89.4	90.8	4.5	4.3
22:6(DHA)	-	39.3	-	-	-	94.7	94.1
others	1.7	-	0.3	4.1	6.8	0.3	1.6

Abbreviations: 2-EPA-PC, eicosapentaenoic acid-containing phosphatidylcholine (at sn-2); 2-DHA-PC, docosahexaenoic acid-containing PC (at sn-2); Soy PC, PC from soybean; EPA, eicosapentaenoic acid; EPA-EE, EPA ethyl ester; DHA, docosahexaenoic acid; DHA-EE, DHA ethyl ester.

### 1.3 細胞分化誘導能の測定

HL-60細胞は、1977年にCollinsら<sup>75)</sup>により末梢血より樹立された急性前骨髄性白血病細胞で粗大なアズール顆粒を有することが特徴である。HL-60細胞はRA、DMSOなどの添加により顆粒球（好中球）に、TPAや $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>では単球/マクロファージに終末分化することが知られており(Table 4-2)<sup>76)</sup>、脱ガンという観点から研究が行われている。本研究では、終末分化にともない発現する活性酸素産生能をNBT色素を用いて測定することにより分化の指標とし、EPA及びDHA結合型リン脂質の影響について検討した。

HL-60細胞は10% ウシ胎児血清（56℃で30分間非働化して使用）を含むRPMI 1640培地（penicillin 100 IU/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml含有）を用いて、5% CO<sub>2</sub>を含む気流中 37℃で培養した。細胞密度が $1 \times 10^5$  cells/mlとなるように調整した培養液に、種々の脂質のエタノール溶液（エタノールの濃度は細胞増殖に影響しない0.1%以下とした。）を添加後24時間培養し、分化誘導剤であるRAのエタノール溶液を終濃度 100nMとなるように添加して、更に24時間培養した。細胞培養液の一部を用いてNBT色素還元能を測定し、細胞分化率とした。NBT還元能の測定<sup>77)</sup>は以下に示すように行った。2-4  $\times 10^5$ /mlの細胞懸濁液 0.5mlを試験管にとり、TPA(162nM)、NBT(0.5mg/ml)を含んだPBS溶液 0.5mlを加え、37℃で30分間インキュベートした後、細胞内にO<sub>2</sub><sup>-</sup>で還元されて青く沈着した色素（formazan deposit）を有する細胞を数え、百分率で表すことにより分化率を求めた。

$$\begin{aligned} \text{NBT positive(\%)} \\ = \frac{\text{blue-black formazan deposits containing cells}}{\text{total cells}} \times 100 \end{aligned}$$

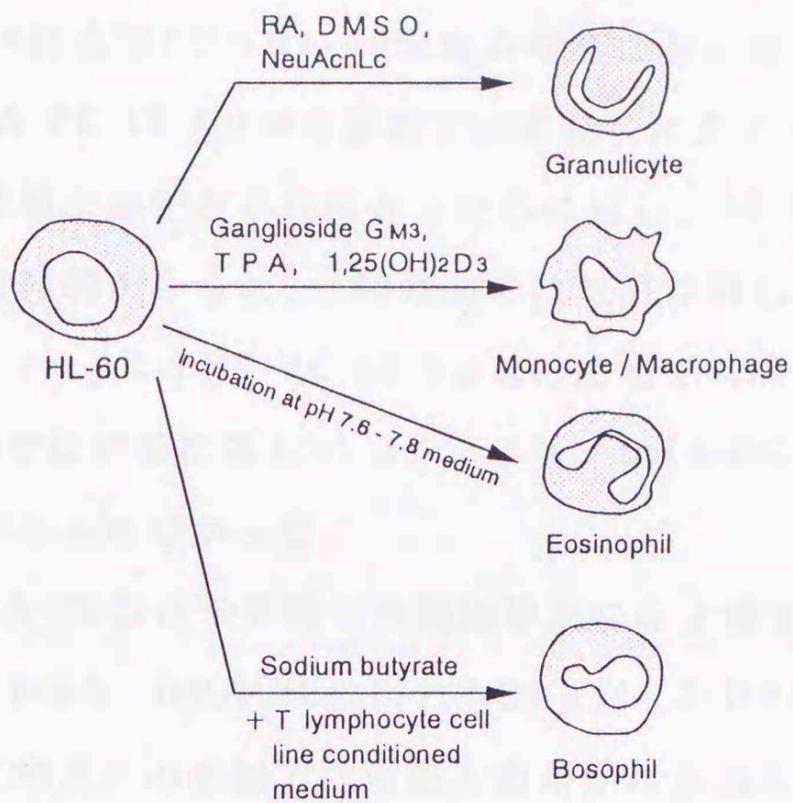


Table 4-2. Expression of functional characters by retinoic acid-induced differentiation of HL-60.<sup>76)</sup>

Functional character	HL-60	Granulocyte	Monocyte/Macrophage
Phagocytosis	-	+	+
NBT reduction (Superoxide anion generation)	-	+	+
Bactericidal action	-	+	+
Chemotaxis	-	+	+
Lysozyme	+	+	↑
Nonspecific esterase	-	-	+
Ganglioside GM <sub>3</sub>	+	↓	↑
NeuAcnLc	+	↑	↓

+ : positive, - : negative, ↑ : increase, ↓ : decrease.

Abbreviations: RA, retinoic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; NeuAcnLc, neolacto series gangliosides.

## 結果及び考察

### 1.1 HL-60細胞の細胞増殖におよぼすエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸の影響

EPAとDHA結合型PCのHL-60細胞の増殖におよぼす影響について検討した。2-DHA-PC 12.5  $\mu$ Mの添加では対照（エタノールのみ）の添加と比較し、細胞増殖に差がみられなかったのに対し、62.5  $\mu$ Mの添加では24時間目から増殖抑制がみられ、120時間では対照に対し36.4%の細胞数となった（Fig.4-1）。2-EPA-PC 62.5  $\mu$ Mの添加でも同様に増殖抑制がみられ、120時間では対照に対し41.3%となり2-DHA-PCと2-EPA-PCの間には大きな差がみられなかった。

DHAやDHA-EEの化学形態での細胞増殖におよぼす影響についても検討したところ、DHA、DHA-EEの何れも25  $\mu$ M（2-DHA-PC 12.5  $\mu$ Mのアシル基の数に相当）の添加では対照との差がみられなかったのに対し、5倍量の125  $\mu$ Mの添加ではリン脂質形態と同程度の増殖抑制効果がみられた（Fig.4-2）。

Burnsら<sup>78)</sup>はDHA 10  $\mu$ Mの添加によりHL-60細胞の増殖が抑制されたことを報告しているのに対し、Obermeierら<sup>79)</sup>はU937細胞にEPAやDHA 10  $\mu$ Mを添加しても増殖抑制がみられなかったことを報告しており、細胞の種類や培養条件によりHUFAの効果が異なることが予想される。また、Falconerら<sup>80)</sup>はHUFAの添加により膵臓ガン細胞の増殖が濃度依存的に抑制され、その作用が脂質過酸化反応と関係があることを報告している。本実験においても2-DHA-PC、2-EPA-PCのHUFA結合型PCを高濃度（62.5  $\mu$ M）で添加することによりHL-60細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

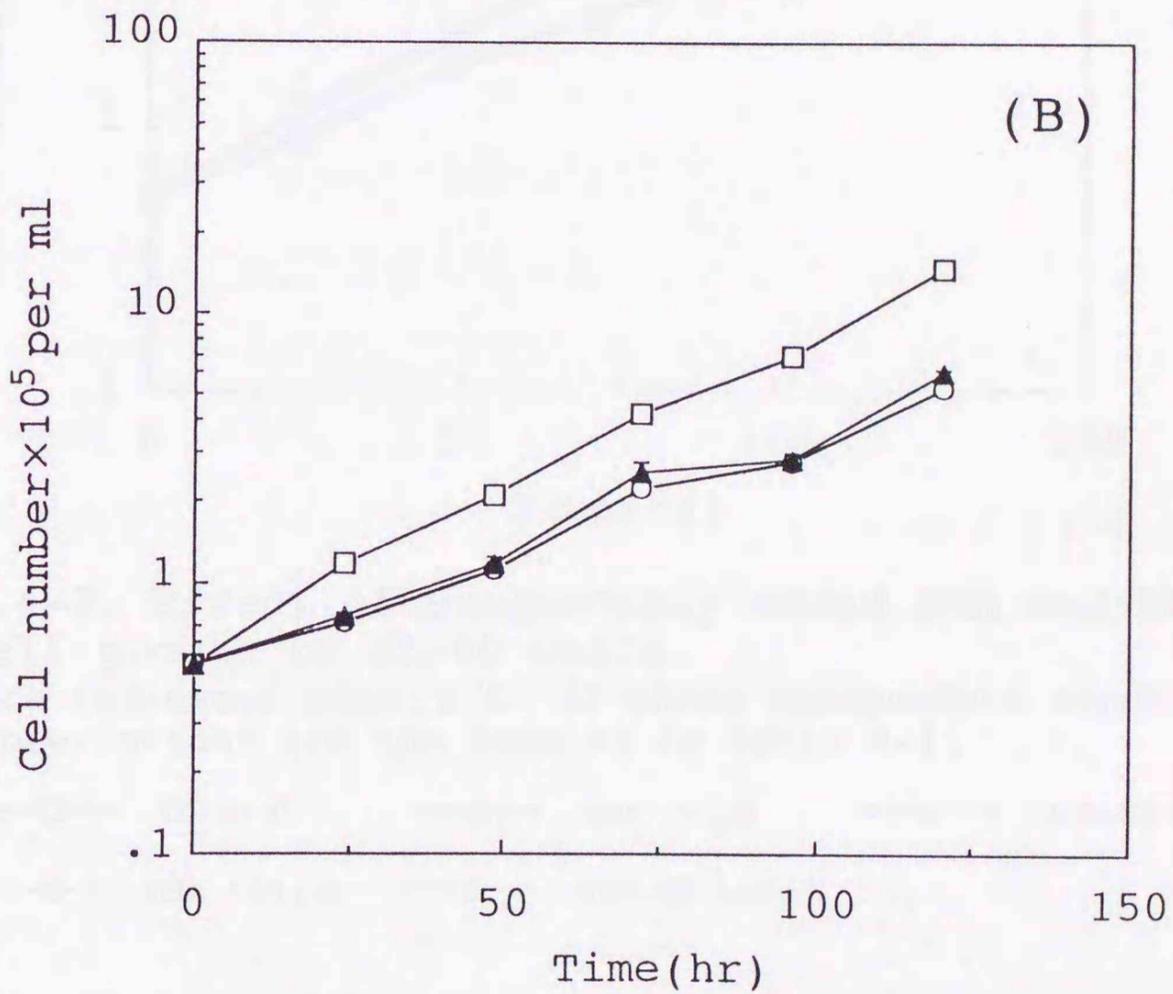
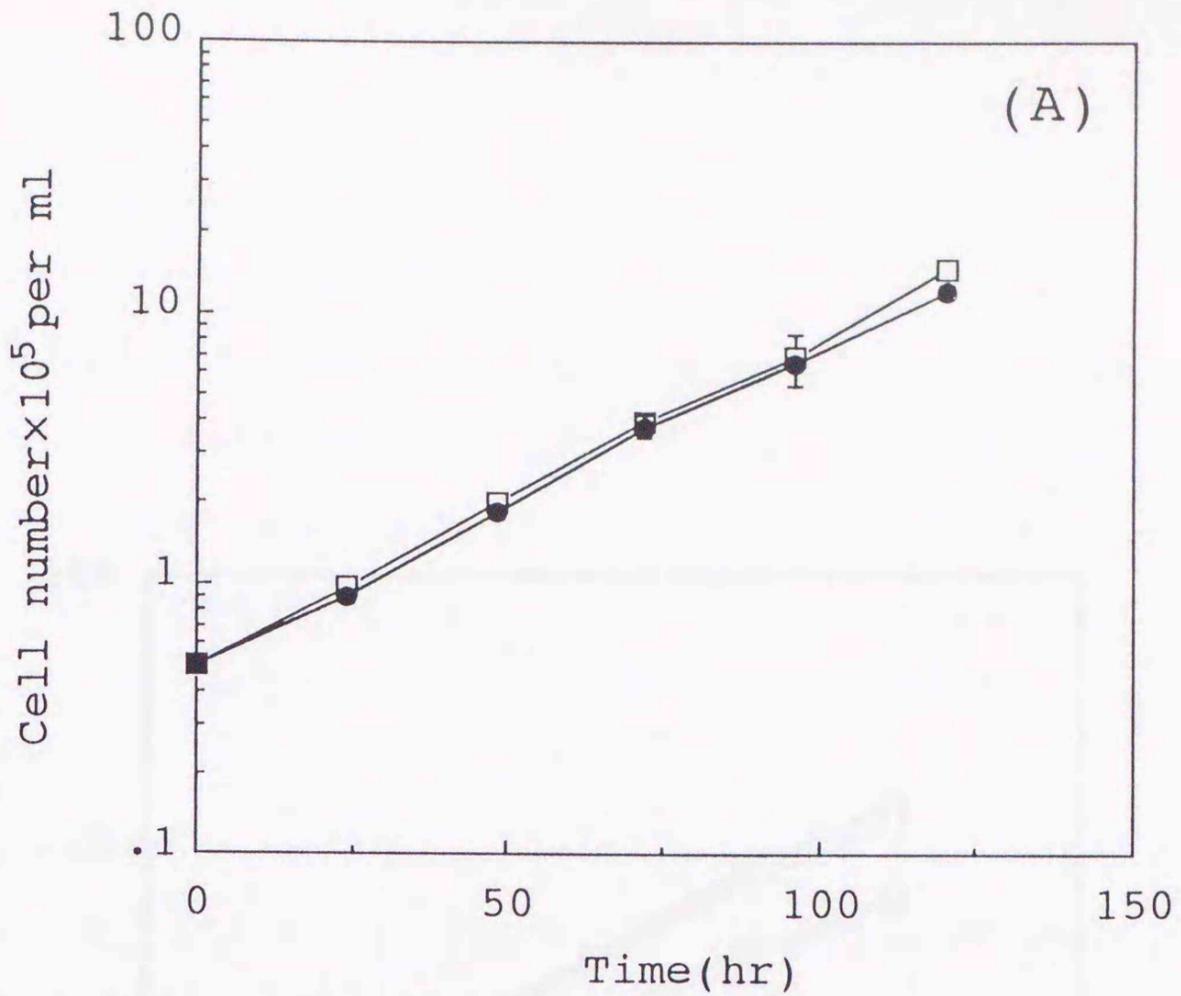


Fig.4-1. Effect of exogenously added 2-EPA-PC and 2-DHA-PC on cell growth of HL-60 cells. Data represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Abbreviations are the same as in Table 4-1.

—□— Control                      —○— 2-DHA-PC 62.5 μM  
 —●— 2-DHA-PC 12.5 μM          —▲— 2-EPA-PC 62.5 μM

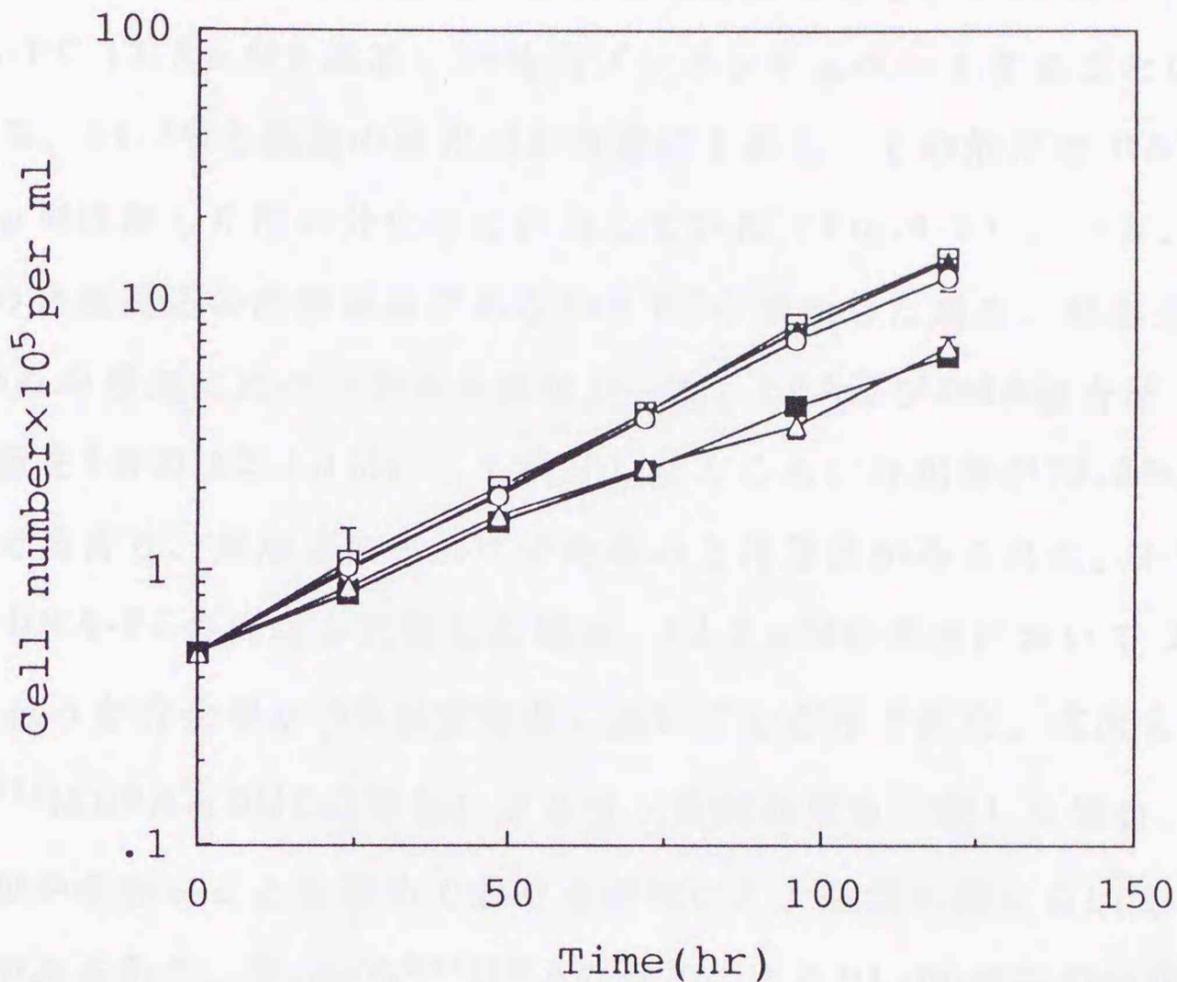


Fig.4-2. Effect of exogenously added DHA and DHA-EE on cell growth of HL-60 cells.

Data represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Abbreviations are the same as in Table 4-1.

—□— Control      —▲— DHA 25  $\mu$ M      —○— DHA-EE 25  $\mu$ M  
 —■— DHA 125  $\mu$ M      —△— DHA-EE 125  $\mu$ M

## 1.2 HL-60細胞の細胞分化におよぼすエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸の影響

EPA及びDHA結合型PCのRAによる細胞分化誘導作用への影響について検討した。RA 100nM（終濃度）を添加して24時間インキュベートすることにより40%程度の細胞分化率がみられたのに対し、2-EPA-PC及び2-DHA-PC 12.5  $\mu$ Mを添加し24時間プレインキュベートすることにより50.2%、54.5%と細胞の分化率が有意に上昇し、その効果はRAを10倍量の1  $\mu$ M添加した際の分化率に相当していた（Fig.4-3）。一方、2-HUFA-PCの合成反応の出発物質であるSoy PCを添加した場合、細胞分化率はRAのみの添加に比べ差がみられなかった。EPA及びDHA結合型リン脂質添加量を5倍の62.5  $\mu$ Mにして検討したところ、分化率が73.8%、72.5%にまで高まり、添加量に応じて分化率の上昇効果がみられた。2-EPA-PCと2-DHA-PCの作用を比較した場合、12.5  $\mu$ Mの添加において2-DHA-PCのほうが分化率が5%程度有意に高いことが示された。成沢ら<sup>81)</sup>、矢澤ら<sup>82)</sup>はEPAとDHAの添加によるガン抑制効果を比較した場合、DHAの効果がやや強いことを認めており本研究のリン脂質形態においても同様の傾向がみられた。Naitoら<sup>83)</sup>はRAの添加によりHL-60細胞の分化を誘導したとき、細胞内のリン脂質脂肪酸組成におけるDHAの割合が増加することを報告しており、このことから細胞分化においてDHAがより重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

一方、2-DHA-PCのみを添加した場合では、添加量を増加しても分化率がControl（エタノールのみ添加）と同様の10%程度にとどまったことから、2-EPA-PC、2-DHA-PCの効果はリン脂質そのものの細胞分化誘導効果ではなく、RAによる細胞分化誘導作用の促進的効果であると判断した。

EPA、EPA-EE、DHA及びDHA-EE添加の影響を同様に検討することにより、リン脂質形態との比較を行った。このときリン脂質は分子内にアシル基を2つ有するため添加濃度を2倍の25  $\mu$ M、125  $\mu$ Mとした。DHAと

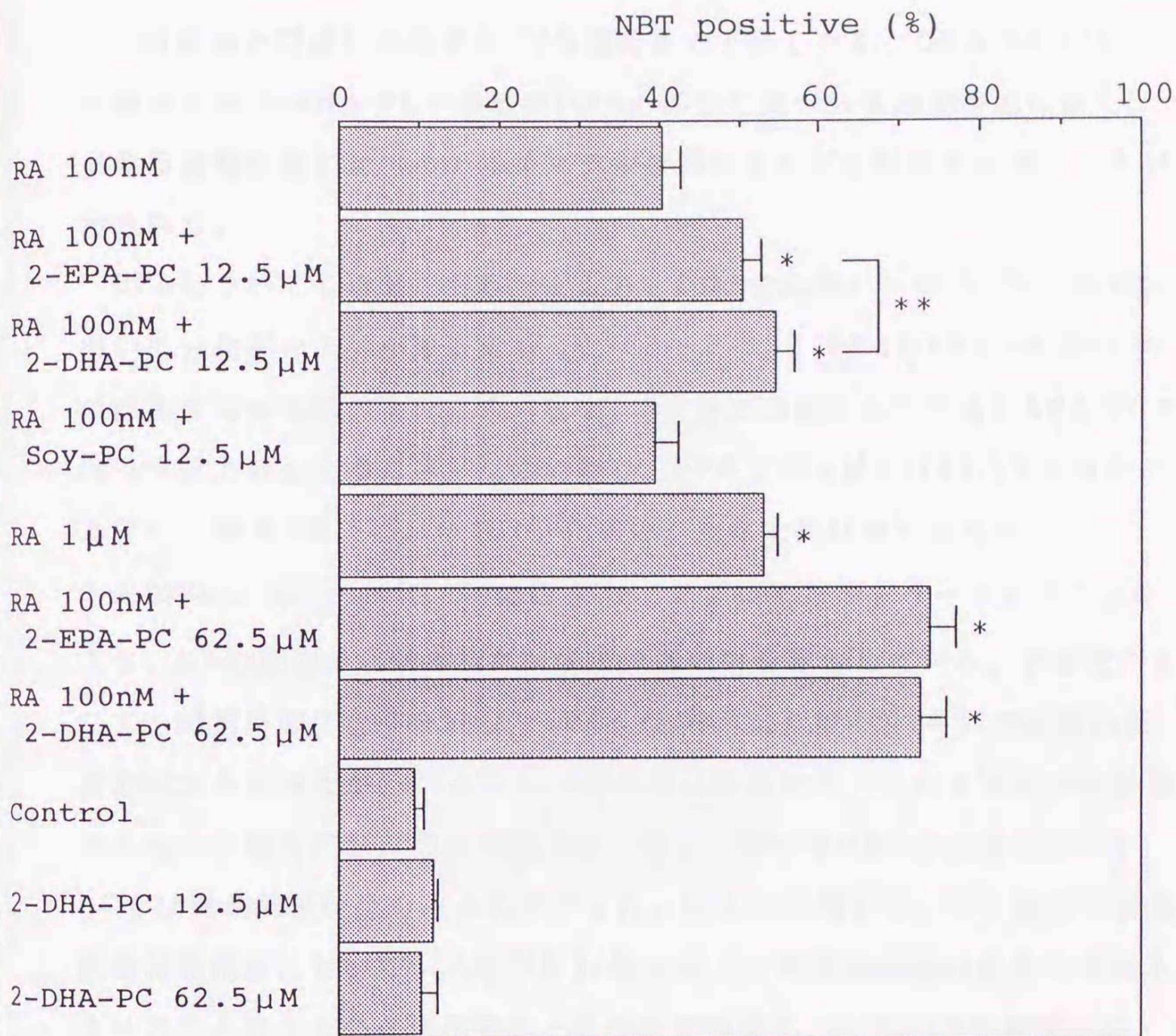


Fig.4-3. Effect of exogenously added 2-EPA-PC and 2-DHA-PC on retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells.

Values represent means  $\pm$  S.D.. \* $P < 0.01$  vs. RA 100nM.

Values are significantly different from each other.

\*\* $P < 0.01$

Abbreviations: RA, retinoic acid. Other abbreviations are the same as in Table 4-1.

DHA-EEをそれぞれ25  $\mu$  M添加した場合、分化率はそれぞれ46.5%、47.8%となり、RAのみの添加に比べ分化率が7%程度高く促進効果がみられたものの、2-DHA-PC 12.5  $\mu$  Mの添加に比べその効果は有意に低かった (Fig.4-4)。DHAを5倍量の125  $\mu$  M添加した場合には、2-DHA-PC 62.5  $\mu$  Mの添加と同様に分化率が70%程度まで上昇したが、DHA-EE 125  $\mu$  Mの添加では2-DHA-PCや遊離型DHAの添加に比べ分化率が有意に低く、遊離脂肪酸形態に比べエチルエステル形態のほうが促進効果が低いことが示された。

EPAについても検討してみたところ、DHAと同様に2-EPA-PCの形態において分化率の上昇が顕著であった (Fig.4-5)。EPAやEPA-EE 25  $\mu$  Mの添加では分化率の上昇はみられず、5倍量の添加においても2-EPA-PCでは70%以上の分化率に達したのに対し、EPA 125  $\mu$  Mでは47.2%と僅かに上昇し、EPA-EE 125  $\mu$  Mでは分化率の有意な上昇はみられなかった。

先のBurnsら<sup>78)</sup>はHL-60細胞をDHAでプレインキュベートすることにより、RAの細胞分化誘導能に対する促進効果を報告している。本研究においても酵素反応により合成したEPA及びDHA結合型PCにおいて同様の促進効果がみられたが、EPAやDHAの作用は脂肪酸やエチルエステルの形態よりもリン脂質形態のほうが明らかに高く、EPAやDHAを含まないSoy PCでは促進効果が全くみられなかった。以上の結果から、ガン細胞の分化誘導促進作用においてEPA及びDHA結合型リン脂質が細胞の感受性を向上させることにより分化誘導剤などの作用を増強していることが推察され、薬剤の減量とともに副作用の軽減への期待がもたれる。

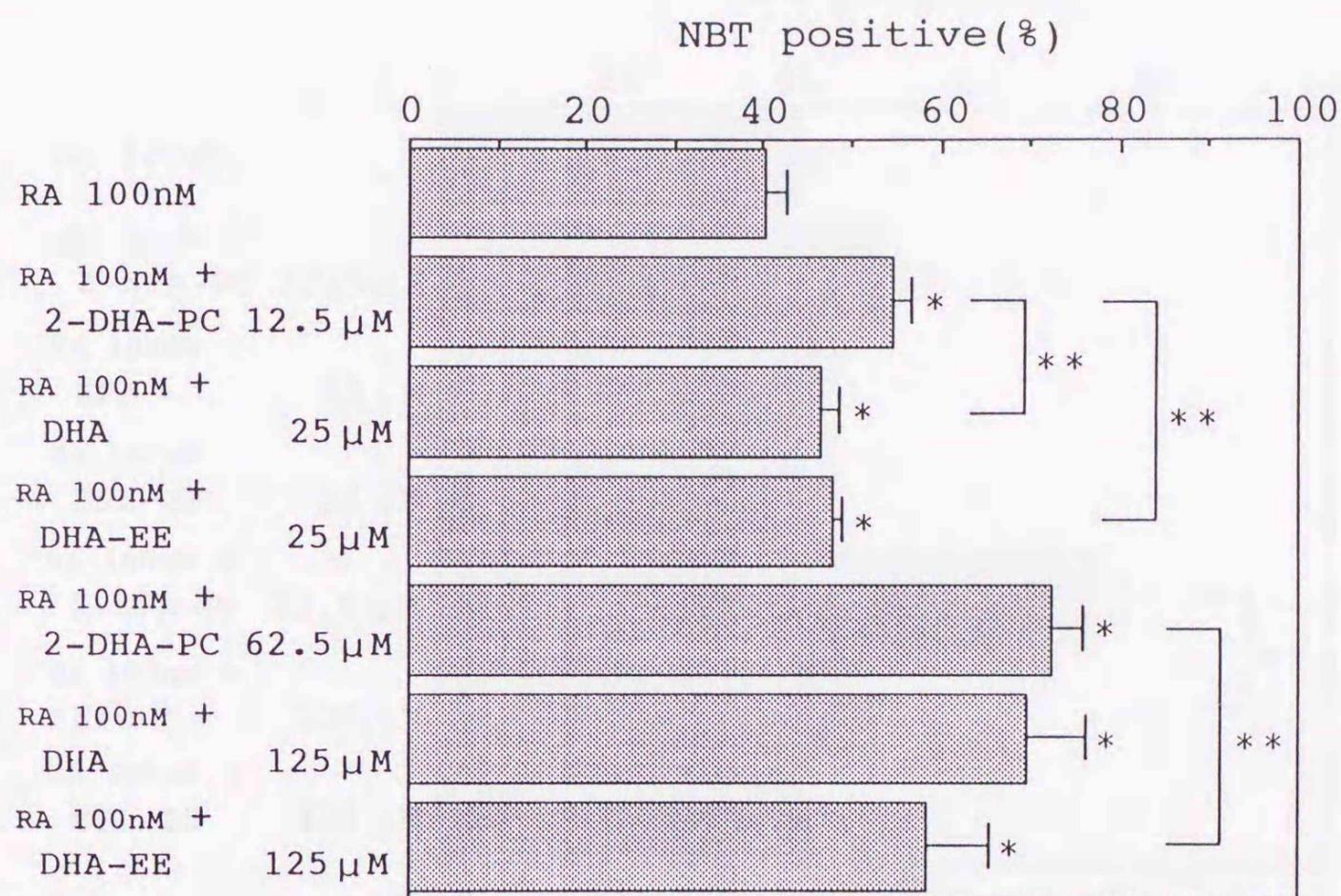


Fig.4-4. Comparison of retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells supplemented with DHA, DHA-EE and 2-DHA-PC.

Values represent means  $\pm$  S.D.. \* $P < 0.01$  vs. RA 100nM.

Values are significantly different from each other.

\*\* $P < 0.01$

Abbreviations are the same as in Table 4-1 and Fig.4-3.

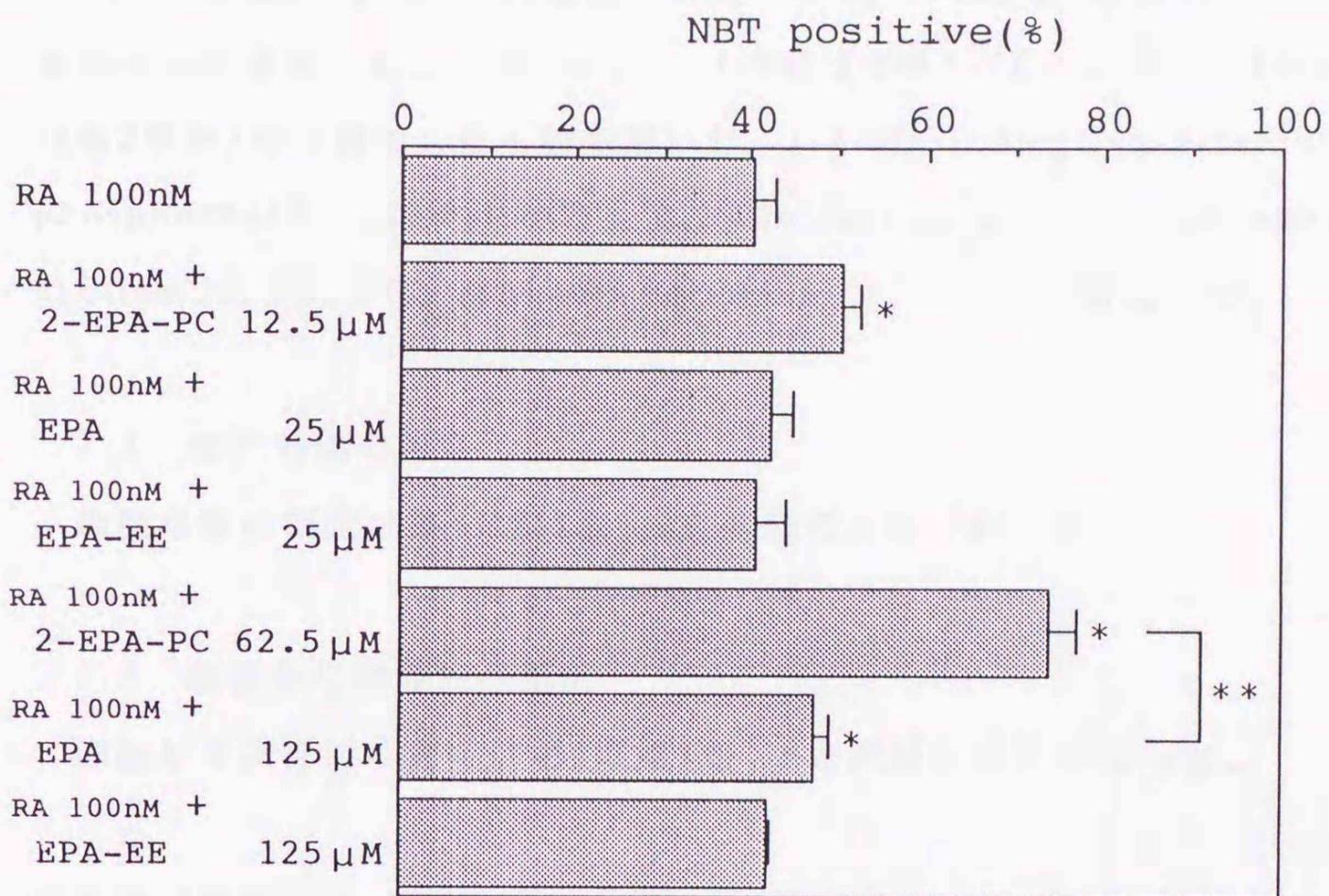


Fig.4-5. Comparison of retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells supplemented with EPA, EPA-EE and 2-EPA-PC.

Values represent means  $\pm$  S.D.. \* $P < 0.01$  vs. RA 100nM.

Values are significantly different from each other.

\*\* $P < 0.01$

Abbreviations are the as in Table 4-1 and Fig.4-3.

## 第2節 HL-60細胞の増殖と分化におよぼすドコサヘキサエン酸結合型 ホスファチジルコリン分子種の影響

### 実験方法

#### 2.1 試料及び試薬

HL-60細胞、RPMI 1640培地、RA、NBT、TPAは第4章第1節1.1と同様のものを使用した。2-DHA-PC、1-Pal,2-DHA-PC、1-Ole,2-DHA-PCは第2章第3節で調製したものをを用いた。1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (di-Pal-PC)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (di-Ole-PC)はAvanti Polar-Lipids, Inc.より購入した。

#### 2.2 細胞増殖の測定

細胞増殖の測定は第4章第1節1.2と同様の方法で行った。

#### 2.3 細胞分化誘導能の測定

細胞分化誘導能の測定は第4章第1節1.3と同様の方法で行った。

### 結果及び考察

#### 2.1 ドコサヘキサエン酸結合型ホスファチジルコリン分子種の細胞増殖におよぼす影響

sn-2位にDHAの結合した2-DHA-PCの生理活性作用はsn-1位の脂肪酸、すなわち分子種によって異なることが予想される。そこでHL-60細胞の増殖に対するDHA結合型PC分子種の影響について検討した。使用したリン脂質の脂肪酸組成をTable 4-3に示す。

すべてのリン脂質において12.5  $\mu$ Mの添加では細胞増殖が対照(エタノールのみ添加)と同様に進み、抑制効果はみられなかった(Fig.4-6)。62.5  $\mu$ Mの添加においても、di-Pal-PCやdi-Ole-PCの添加では対照と細胞

Table 4-3. Fatty acid composition of exogenously added DHA-containing PC molecular species used in the experiments.

Fatty acid	2-DHA-PC	1-Pal,2-DHA-PC	1-Ole,2-DHA-PC	1-EPA,2-DHA-PC	di-Pal-PC	di-Ole-PC
16:0	15.8	47.0	1.6	0.8	> 99.0	-
18:0	0.6	0.4	0.3	-	-	-
18:1	4.9	0.7	47.9	-	-	> 99.0
18:2	30.0	2.5	2.1	2.4	-	-
18:3	2.8	0.2	-	0.8	-	-
20:5(EPA)	6.6	2.5	2.2	44.7	-	-
22:6(DHA)	39.3	46.5	45.9	49.8	-	-
others	-	0.2	-	1.5	< 1.0	< 1.0

(mol %)

Abbreviations: 1-Pal,2-DHA-PC, 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; 1-Ole,2-DHA-PC, 1-oleoyl-2-docosahexaenoyl-PC; 1-EPA,2-DHA-PC, 1-eicosapentaenoyl-2-docosahexaenoyl-PC; di-Pal-PC, 1,2-dipalmitoyl-PC; di-Ole-PC, 1,2-dioleoyl-PC.

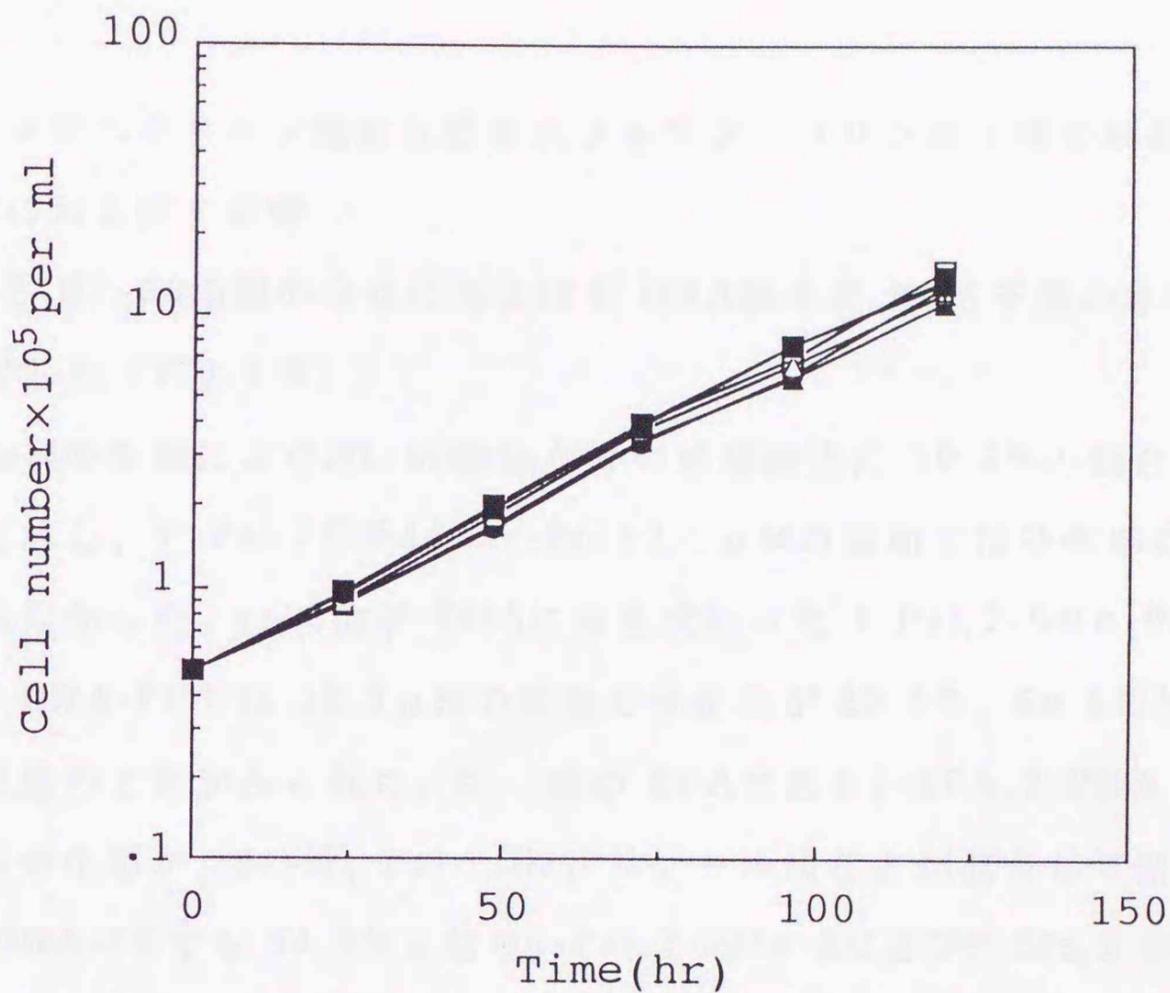


Fig.4-6. Effect of exogenously added various PC molecular species on cell growth of HL-60 cells. Data represent mean±S.D. of three independent experiments. Abbreviations are the same as in Table 4-3.

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| —□— Control                 | —Δ— 2-DHA-PC 12.5 μM        |
| —●— 1-Pal, 2-DHA-PC 12.5 μM | —▲— 1-Ole, 2-DHA-PC 12.5 μM |
| —○— di-Pal-PC 12.5 μM       | —■— di-Ole-PC 12.5 μM       |

増殖に差がみられなかったが、この濃度ではsn-2位が DHAにおき変わった1-Pal,2-DHA-PC及び1-Ole,2-DHA-PCでHL-60細胞の増殖抑制効果がみられ、DHAの結合がリン脂質のガン細胞増殖抑制作用の発現に重要であることが示された (Fig.4-7)。sn-1位の脂肪酸の違いによる差は認められず、sn-1位の脂肪酸を特定していない2-DHA-PCとのあいだにも大きな差はみられなかった。

## 2.2 ドコサヘキサエン酸結合型ホスファチジルコリン分子種の細胞分化におよぼす影響

RAによる HL-60細胞の分化におよぼす DHA結合型 PC分子種の影響について検討した (Fig.4-8)。

RA 100nMの添加によりHL-60細胞が好中球様細胞に 39.2%の割合で分化したのに対し、di-Pal-PCやdi-Ole-PC 12.5  $\mu$ Mの添加では分化率に変化がみられなかった。sn-2位が DHAにおき代わった 1-Pal,2-DHA-PC及び1-Ole,2-DHA-PCでは 12.5  $\mu$ Mの添加で分化率が 60.5%、60.2%となり、20%程度の上昇がみられた。sn-1位が EPAである1-EPA,2-DHA-PCの添加では分化率が 50.1%、Pal、Ole、リノール酸などが混合して結合している 2-DHA-PCでも 54.2%となり1-Pal,2-DHA-PC及び1-Ole,2-DHA-PCに比べ 5-10%程度低い値となった。

5倍濃度の 62.5  $\mu$ Mの添加においても、di-Pal-PCやdi-Ole-PCではRA 100nMのみの添加と比べ分化率に変化がみられなかったのに対し、1-Pal,2-DHA-PC および 1-Ole,2-DHA-PCの添加では分化率が 75.9%、74.5%まで上昇した (Fig.4-9)。62.5  $\mu$ Mの添加においても 2-DHA-PCの分化率 68.8%に比べ、1-Pal,2-DHA-PC及び1-Ole,2-DHA-PCの添加による分化率が 5%程度高い値であったことから、DHA結合型 PCの分子種により細胞分化誘導能の促進効果が異なることが明らかとなった。

細胞分化に対しDHA結合型PCが分子種により作用が異なった原因として、第一に細胞膜の透過性や流動性への影響が考えられる。Stillwellら<sup>84)</sup>

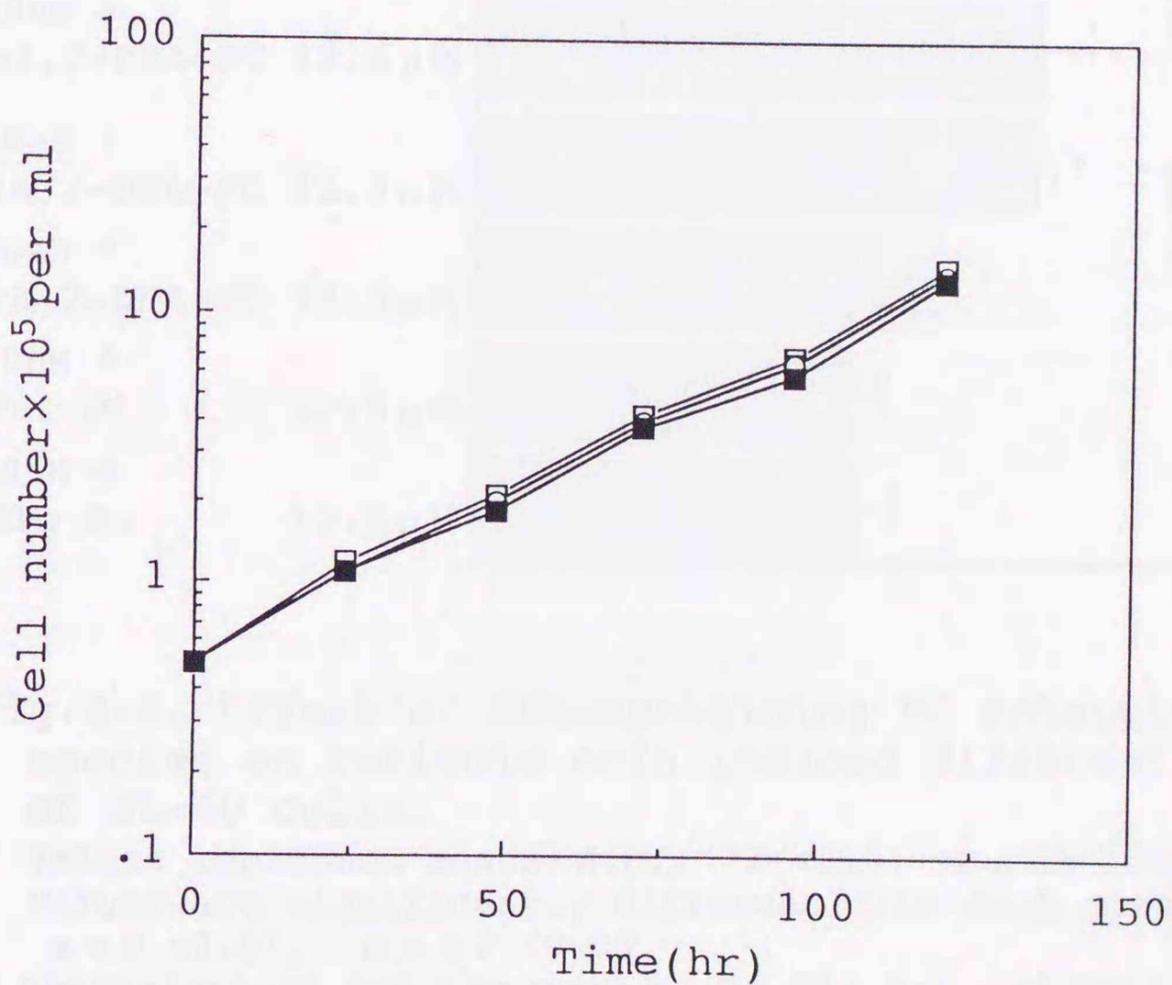
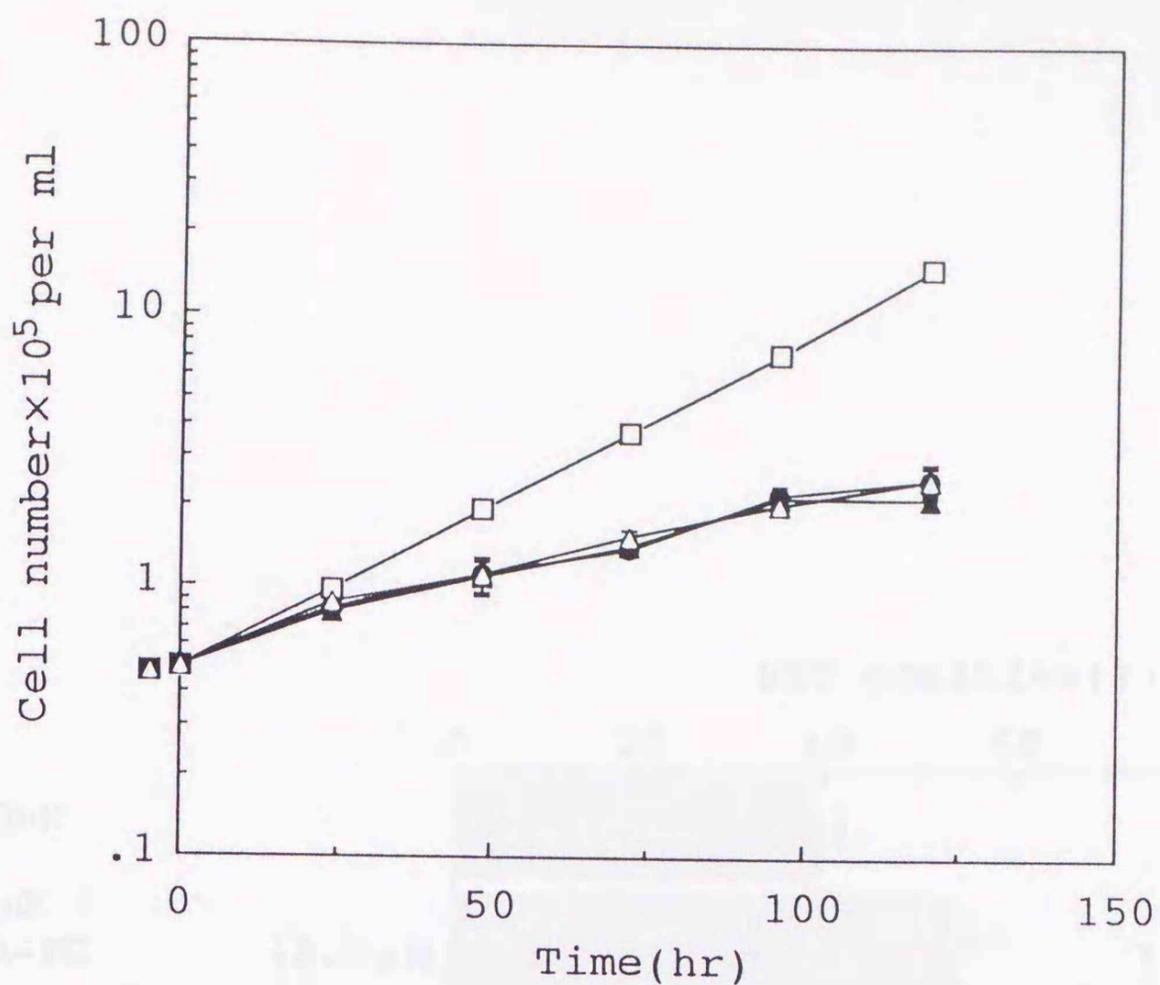


Fig.4-7. Effect of exogenously added various PC molecular species on cell growth of HL-60 cells. Data represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Abbreviations are the same as in Table 4-3.

- |                                  |                                  |
|----------------------------------|----------------------------------|
| —□— Control                      | —△— 2-DHA-PC 62.5 $\mu$ M        |
| —●— 1-Pal, 2-DHA-PC 62.5 $\mu$ M | —▲— 1-Ole, 2-DHA-PC 62.5 $\mu$ M |
| —○— di-Pal-PC 62.5 $\mu$ M       | —■— di-Ole-PC 62.5 $\mu$ M       |

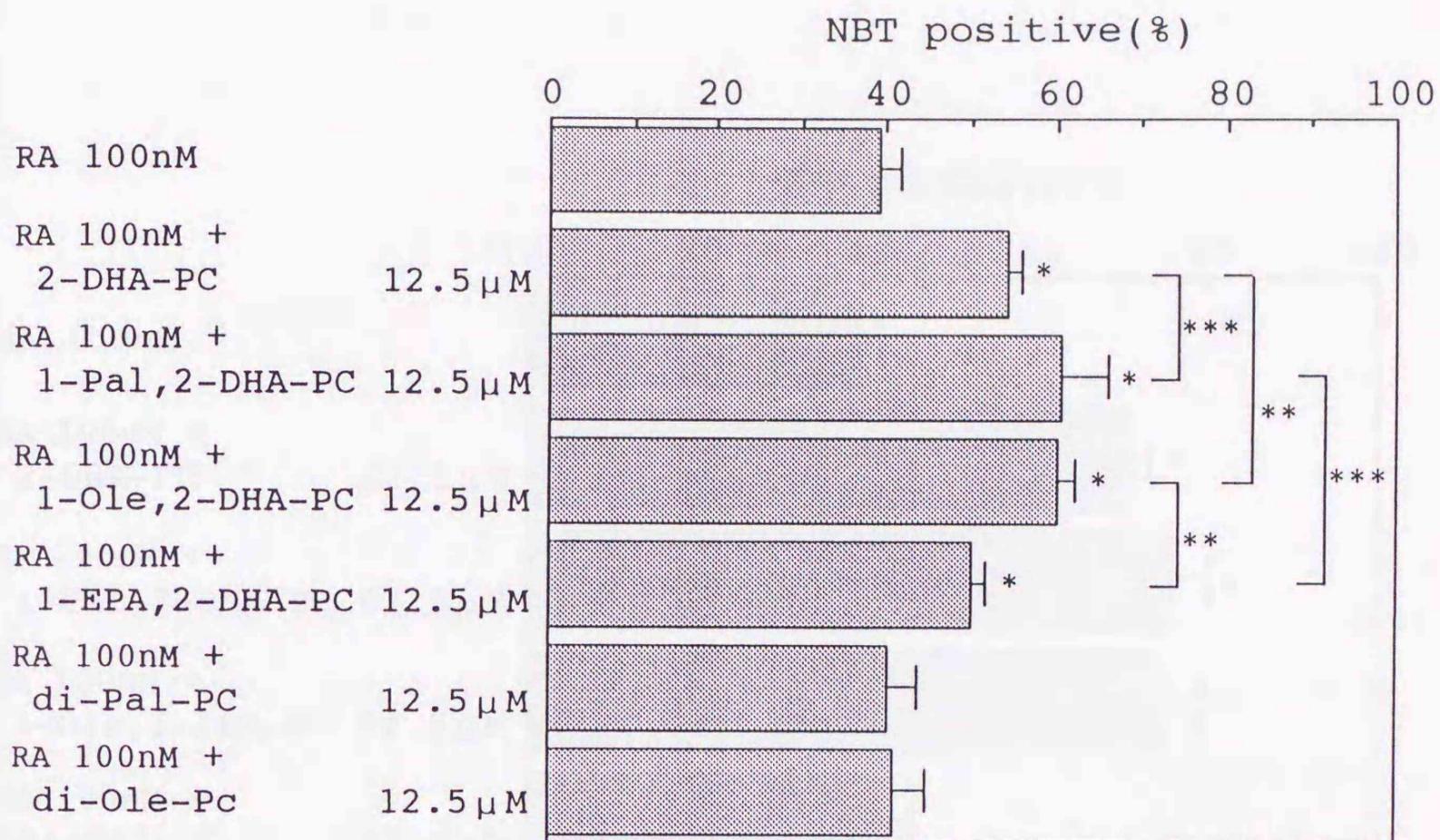


Fig.4-8. Effect of DHA-containing PC molecular species on retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells.

Values represent means±S.D.. \*P < 0.01 vs. RA 100nM.

Values are significantly different from each other.

\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.05

Abbreviations are the same as in Fig.4-3 and Table 4-3.

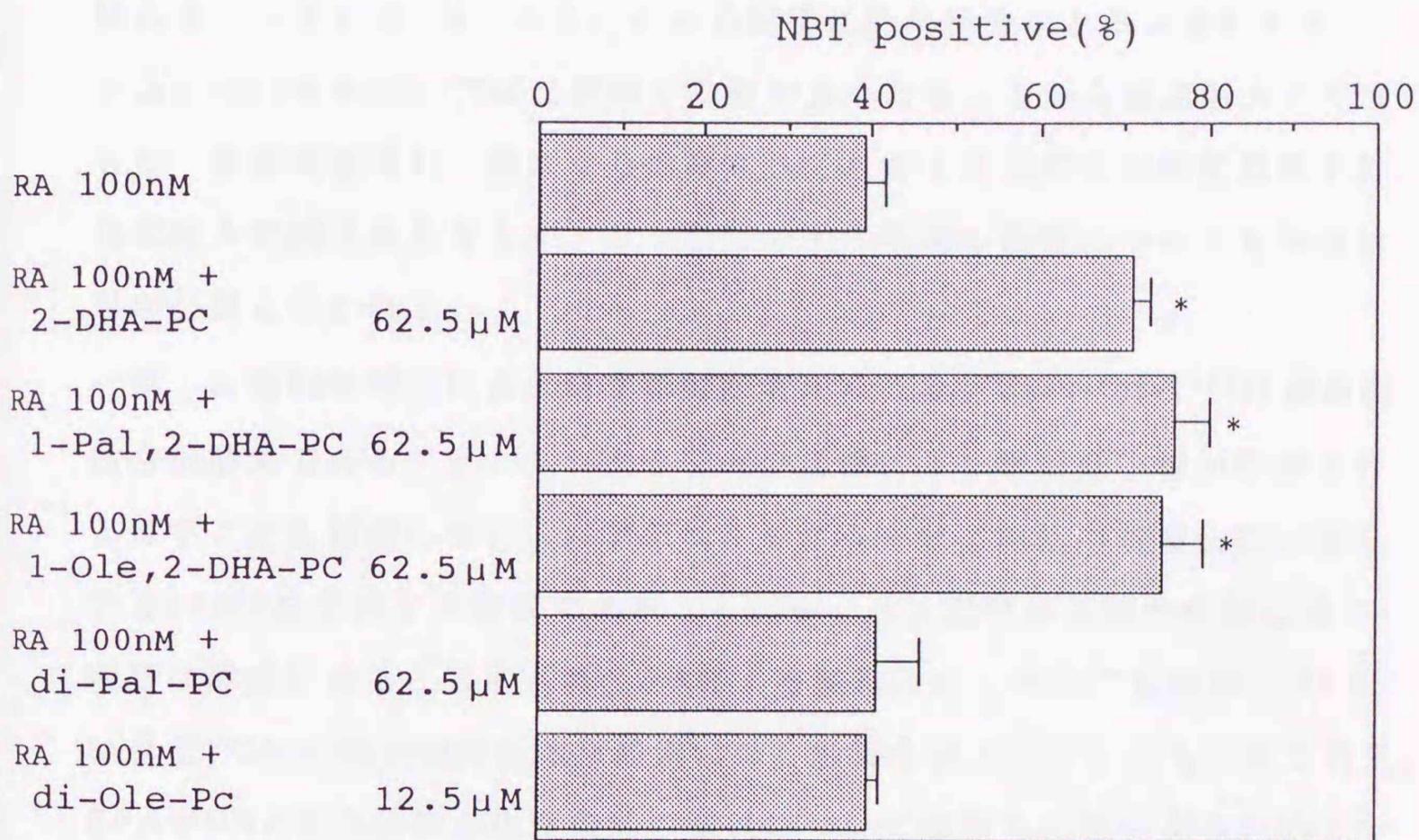


Fig.4-9. Effect of DHA-containing PC molecular species on retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells.

Values represent means±S.D.. \*P < 0.01 vs. RA 100nM.

Abbreviations are the same as in Fig.4-3 and Table 4-3.

はsn-1位がステアリン酸、sn-2位がDHAであるPCで修飾したT27A細胞において細胞膜透過性の上昇を報告していることから、RAの透過性に対するDHA結合型PC分子種の影響の違いが予想される。また、Applegateら<sup>71, 72)</sup>はsn-1位にステアリン酸、sn-2位にDHAの結合したジアシルグリセロールではステアリン酸とDHAが平行に配位した並列構造をとるため、分子が非常に密な構造をとることを報告している。本研究において細胞分化誘導促進効果の高かったPC分子種は、sn-1位が飽和脂肪酸であるPalや二重結合を一つ有するOleであることから同様に密な構造をとると思われる。一方、sn-1位がEPAでは二重結合の数が多くなることから構造も大きく異なることが予想され、従来より推察されてきた不飽和度と相転移温度や膜流動性との関係のみならず、リン脂質分子の構造の影響についても今後検討が必要と思われる。

第二に細胞膜酵素におよぼす影響が考えられる。Caloriniら<sup>85)</sup>は細胞膜結合型酵素であるアデニルシクラーゼの活性にリン脂質分子種が影響をおよぼすことを報告している。アデニルシクラーゼは細胞内情報伝達に参与するcAMPを合成する酵素であることから、リン脂質分子種が情報伝達と密接な関係にあると考えられ、RAによる細胞分化においても同様にDHA結合型PC分子種が情報伝達系酵素に対し影響をおよぼすことも予想される。EPAやDHAの分子種と生理機能の関係について検討した報告がきわめて少ないことから、作用機序を明らかにしていく上で分子種レベルでの検討が今後益々重要である。

### 第3節 HL-60細胞の増殖と分化におよぼすエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸結合型リン脂質の化学形態の影響

#### 実験方法

##### 3.1 試料及び試薬

HL-60細胞、RPMI 1640培地、RA、NBT、TPAは第4章第1節1.1と同様のものを使用した。1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (di-Ole-PE)はSigma Chemical Co.より購入した。2-EPA-PC、1-Pal, 2-DHA-PE、1-Ole, 2-DHA-PE、1-Pal, 2-DHA-PS、1-Ole, 2-DHA-PSは第2章第3節で調製したものをを用いた。2-EPA-PEは第2章第1節及び第3節の方法で調製した (Table 4-4)。プロテインキナーゼ阻害剤であるN-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfoamide hydrochloride (HA1004)は生化学工業 (株) より購入した。

##### 3.2 細胞増殖の測定

細胞増殖の測定は第4章第1節1.2と同様の方法で行った。

##### 3.3 細胞分化誘導能の測定

細胞分化誘導能の測定は第4章第1節1.3と同様の方法で行った。1-Pal, 2-DHA-PS、1-Ole, 2-DHA-PSはエタノールに不溶であったため、超音波処理によりDMSO:PBS (1:1, v/v)に懸濁して終濃度  $12.5 \mu\text{M}$  となるように培地中へ添加した。

##### 3.4 プロテインキナーゼ阻害剤1004の影響

第4章第1節1.3と同様にHL-60細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/mlとなるように調整した培養液に、1-Ole, 2-DHA-PE (終濃度  $12.5 \mu\text{M}$ ) のエタノール溶液とプロテインキナーゼ阻害剤 HA1004 (終濃度  $40 \mu\text{M}$ ) のPBS溶液を加え

Table 4-4. Fatty acid composition of exogenously added PE and PS used in the experiments.

Fatty acid	2-EPA-PE	1-Pal,2-DHA-PE	1-Ole,2-DHA-PE	di-Ole-PE	1-Pal,2-DHA-PS	1-Ole,2-DHA-PS
16:0	15.3	49.1	1.5	-	46.2	1.8
18:0	3.2	0.5	0.4	-	0.6	0.2
18:1	5.7	0.9	47.5	> 99.0	0.8	46.4
18:2	28.1	1.9	2.7	-	2.2	2.2
18:3	2.9	0.2	-	-	0.3	0.3
20:5(EPA)	42.9	2.3	2.6	-	2.7	2.0
22:6(DHA)	-	45.1	45.2	-	46.6	45.4
others	1.9	-	0.1	< 1.0	0.6	1.7

(mol %)

Abbreviations: 2-EPA-PE, eicosapentaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine (at sn-2); 1-Pal,2-DHA-PE, 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; 1-Ole,2-DHA-PE, 1-oleoyl-2-docosahexaenoyl-PE; di-Ole-PE, 1,2-dioleoyl-PE; 1-Pal,2-DHA-PS, 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoserine; 1-Ole,2-DHA-PS, 1-oleoyl-2-docosahexaenoyl-PS.

24時間培養した。培養後 RA (終濃度100nM) のエタノール溶液を加え、更に24時間培養しNBT還元能を第4章第1節1.3と同様に測定した。

## 結果及び考察

### 3.1 HL-60細胞の増殖におよぼすドコサヘキサエン酸結合型リン脂質の化学形態の影響

HL-60細胞の増殖に対するDHA結合型リン脂質の化学形態の影響について検討した (Fig.4-10)。

1-Pal, 2-DHA-PC、1-Ole, 2-DHA-PCを培地中に12.5  $\mu$ M添加した場合には増殖抑制効果がみられなかったのに対し、同一分子種のPE形態である1-Pal, 2-DHA-PE、1-Ole, 2-DHA-PEの12.5  $\mu$ Mの添加では細胞増殖の抑制がみられ、120時間での細胞数は対照に対し40.5%、34.2%となった。このようにsn-1位ではPalに比べ、Oleのほうが増殖抑制効果が大きい傾向がみられたが有意な差ではなかった。また、PE形態の増殖抑制効果は同一分子種のPCを62.5  $\mu$ M添加した場合の増殖抑制効果 (Fig.4-7) とほぼ同程度であり、EPA結合型リン脂質においてもPC形態よりPE形態において増殖抑制効果が大きかった (図未表示)。一方、DHA結合型PEより増殖抑制効果は弱い傾向であるものの、di-Ole-PEの添加においても増殖抑制効果がみられ、120時間の培養で細胞数が対照の44.3%となったことからPE形態による増殖抑制効果が明らかとなった。EPAやDHAのガン細胞増殖抑制効果には、脂肪酸過酸化反応の関与が考えられている<sup>80)</sup>。他方、PS形態においてはDNA合成阻害による増殖抑制が報告されている<sup>86)</sup>。本実験によりEPAやDHAの結合した同一分子種 (同一のアシル基の組合せ) のリン脂質においても化学形態の違いにより増殖抑制効果が異なったことから、EPA及びDHA結合型リン脂質はHUFAとリン脂質形態の両方の増殖抑制効果を合わせもつと考えられた。

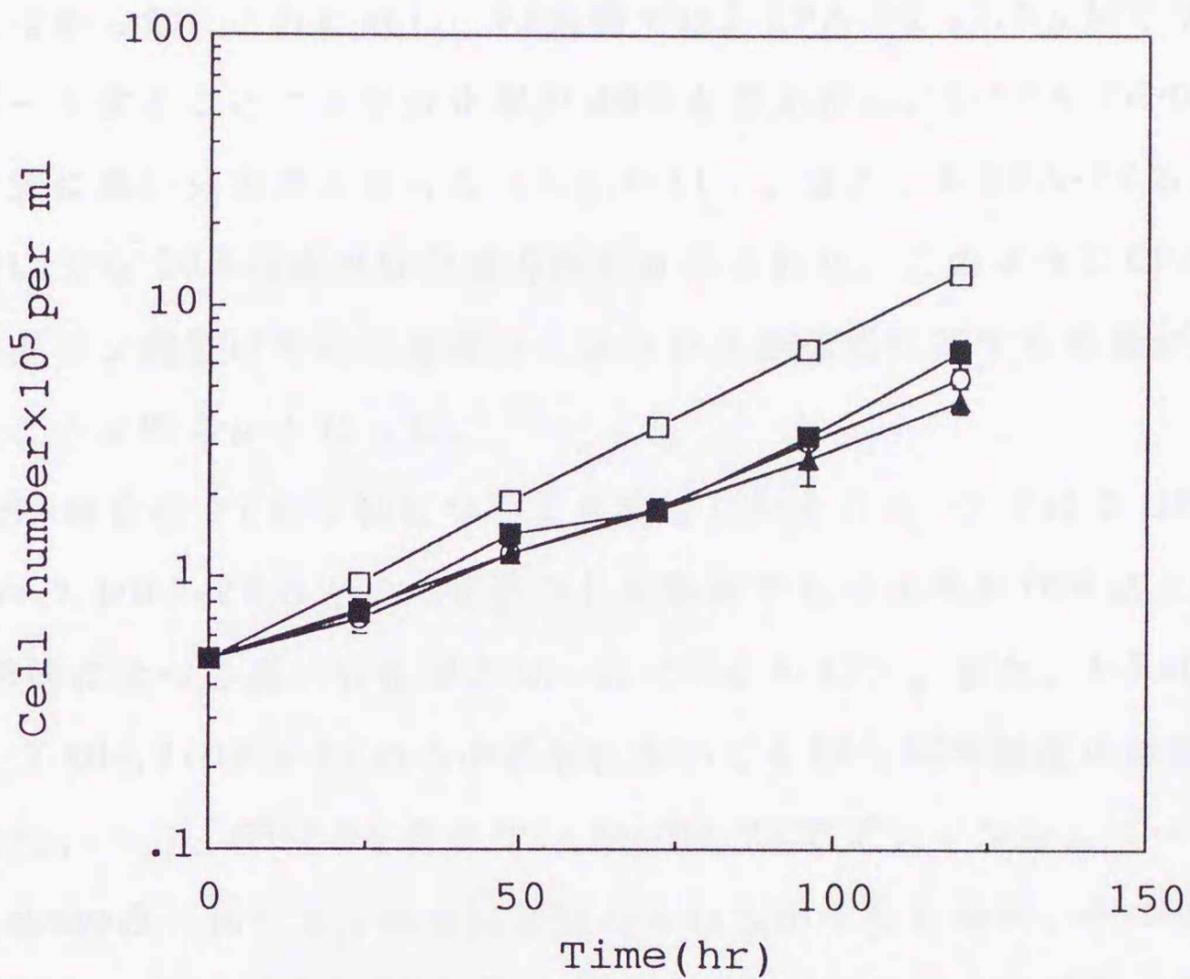


Fig.4-10. Effect of exogenously added various PE molecular species on cell growth of HL-60 cells. Data represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Abbreviations are the same as in Table 4-4.

—□— Control                      —○— 1-Pal,2-DHA-PE 12.5  $\mu$ M  
 —■— di-Ole-PE 12.5  $\mu$ M        —▲— 1-Ole,2-DHA-PE 12.5  $\mu$ M

### 3.2 HL-60細胞の細胞分化におよぼすエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸結合型リン脂質の化学形態の影響

RAの分化誘導作用に対するEPA及びDHA結合型リン脂質の化学形態の影響について検討した。2-EPA-PC 12.5  $\mu$ Mでプレインキュベートすることにより、Fig.4-3で示したようにRAのみ添加の分化誘導率に対し10%程度の促進効果がみられたが、2-EPA-PCのみの添加では分化誘導作用はみられなかった。これに対し、PE形態では2-EPA-PE 12.5  $\mu$ Mでプレインキュベートすることにより分化率が60%まで上昇し、2-EPA-PCの添加に比べ有意に高い分化率となった (Fig.4-11)。また、2-EPA-PEのみの添加においても20%程度の分化誘導作用がみられた。このようにEPAやDHA結合型リン脂質はその塩基部分により分化誘導能に対する効果が大きく異なることが明らかとなった。

DHA結合型PE分子種についても検討したところ、1-Pal,2-DHA-PE、1-Ole,2-DHA-PEのどちらを添加した場合でも分化率が70%以上となり、PC形態に比べて高い分化率となった (Fig.4-12)。また、1-Pal,2-DHA-PE、1-Ole,2-DHA-PEのみの添加においても25~30%程度の細胞分化がみられた。一方、HUFAを含まない di-Ole-PEでプレインキュベートした場合、RAのみと比べて分化率に差はみられなかったものの、di-Ole-PEのみの添加ではDHA結合型PEと同様に30%程度の分化がみられた。PE形態においてもEPA結合型に比べDHA結合型のほうが分化率が10%程度高かったものの、sn-1位の脂肪酸の違いによる大きな差はみられなかった。

DHA結合型PSはエタノールに不溶であったため、DMSO:PBS (1:1, v/v) の懸濁溶液として添加した。RAのみの添加では分化率が50.2%であったのに対し、1-Pal,2-DHA-PSと1-Ole,2-DHA-PSを12.5  $\mu$ M添加してプレインキュベートすることにより分化率がそれぞれ60.9%、63.7%となり10%程度の上昇がみられた (Fig.4-13)。また、1-Pal,2-DHA-PS、1-Ole,2-DHA-PSのみの添加においてもコントロールより分化率が5%程度高くなり、DHA結合型PEよりは分化率が低いもののDHA結合型PSそのも

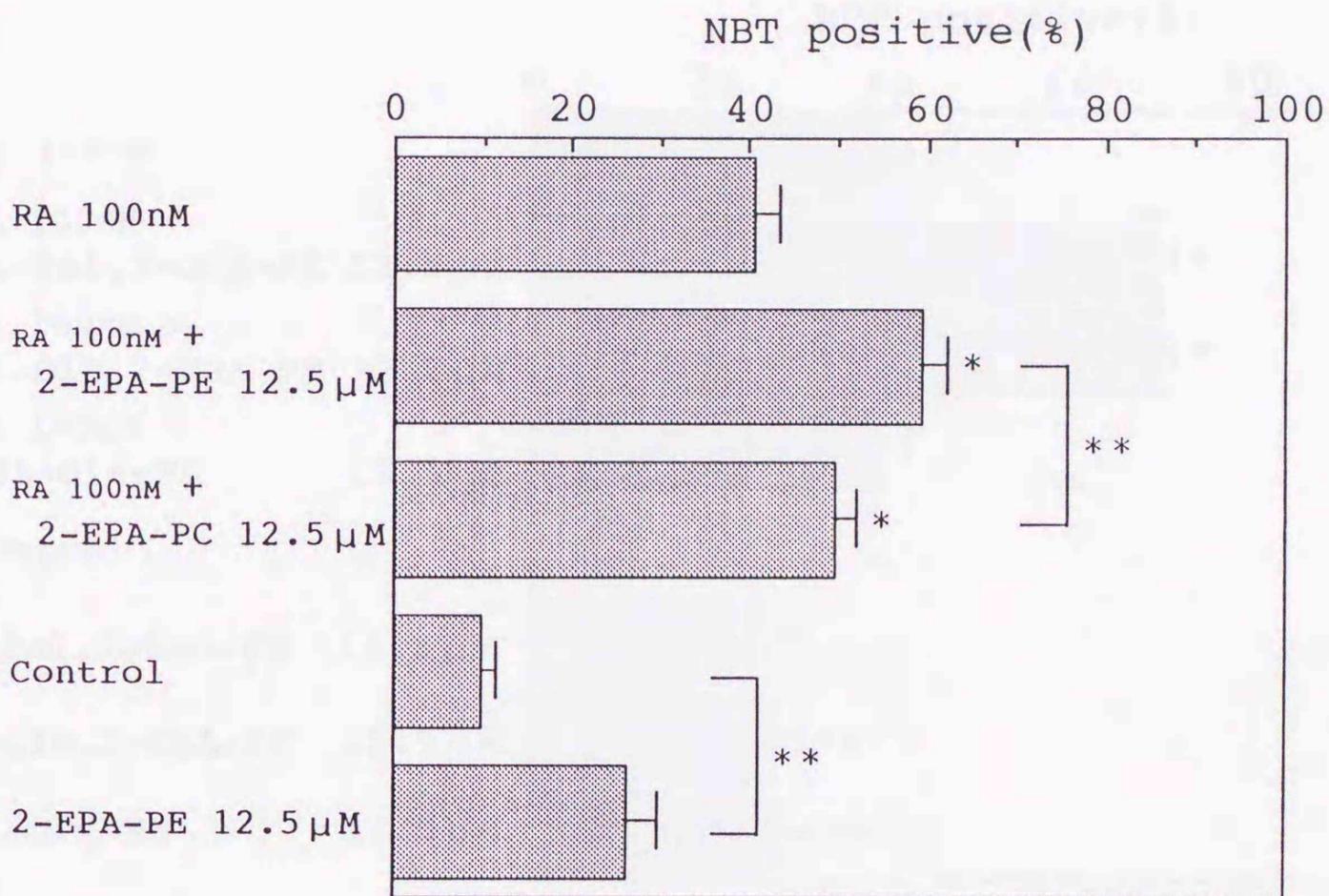


Fig.4-11. Comparison of retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells supplemented with 2-EPA-PC and 2-EPA-PE.

Values represent means±S.D.. \* $P < 0.01$  vs. RA 100nM.

Values are significantly different from each other.

\*\* $P < 0.01$

Abbreviations are the same as in Table 4-1 and Table 4-4.

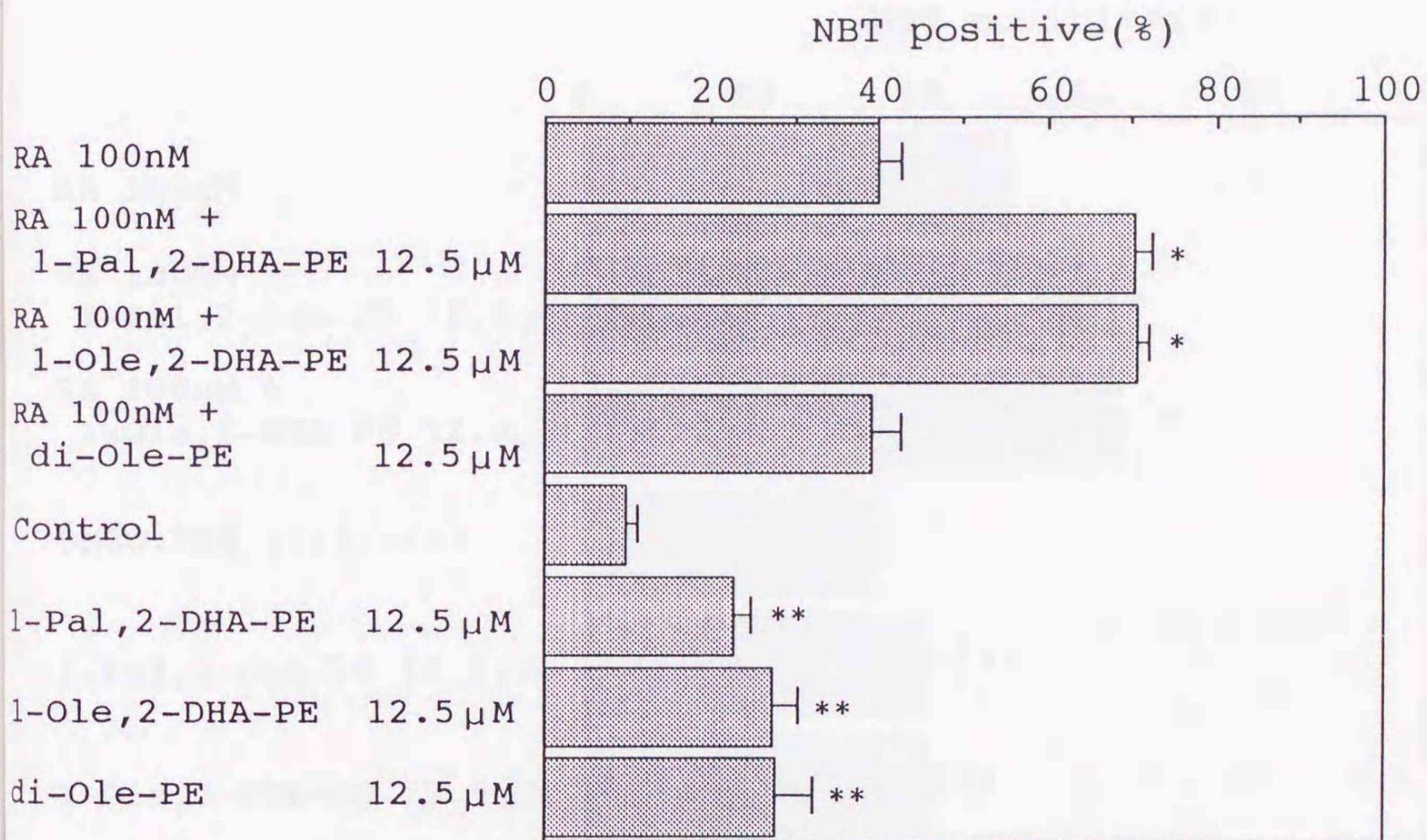


Fig.4-12. Effect of DHA-containing PE molecular species on retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells.

Values represent means  $\pm$  S.D.. \* $P < 0.01$  vs. RA 100nM.

\*\* $P < 0.01$  vs. Control.

Abbreviations are the same as in Fig.4-3 and Table 4-4.

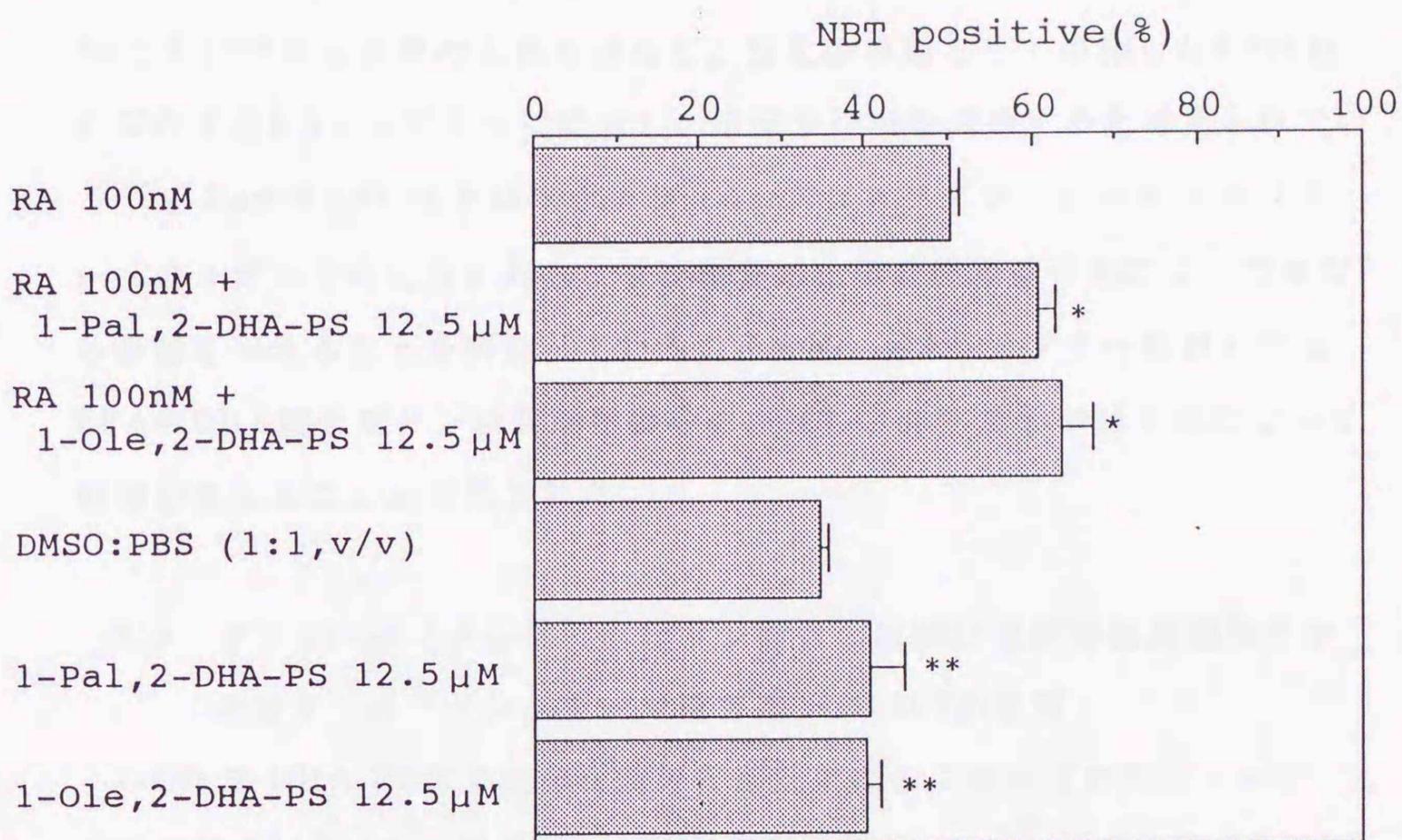


Fig.4-13. Effect of DHA-containing PS molecular species on retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells.

Values represent means  $\pm$  S.D.. \* $P < 0.01$  vs. RA 100nM.

\*\* $P < 0.05$  vs. Control.

Abbreviations are the same as in Fig.4-3 and Table 4-4.

のにも細胞分化誘導能がみられた。

以上の結果から、EPA及びDHA結合型のPC、PE、PSのすべての脂質形態においてRAの細胞分化誘導能に対する促進効果がみられ、その作用の大きさは塩基部分により異なることが示された。PCやPSの形態ではRAの分化誘導作用をともに10%程度しか促進しなかったのに対し、PEの形態では20-30%程度促進した。また、PE及びPSの形態ではEPA及びDHA結合型PE、PSそのものが分化誘導能を有し、RAを添加しなくてもPEで15-20%、PSで5-10%の分化率の上昇を認めた。分化誘導剤として添加したRAは核に存在するRAレセプターに結合し、遺伝子発現を調節すると考えられている<sup>87)</sup>。Bayonら<sup>88)</sup>はトロンボキサンA<sub>2</sub>/プロスタグランジンH<sub>2</sub>レセプターへのリガンドの結合に対し、リン脂質が化学形態や分子種によって異なる影響を与えることを報告していることから、RAレセプターに対してもEPAやDHA結合型リン脂質が影響をおよぼし、化学形態や分子種によって作用が異なることが予想された。

### 3.3 ドコサヘキサエン酸結合型リン脂質の細胞分化誘導促進効果におよぼすプロテインキナーゼ阻害剤 HA1004の影響

1-Ole, 2-DHA-PEの細胞分化誘導促進効果におよぼすプロテインキナーゼ阻害剤HA1004の影響について検討した。RAの添加による細胞分化は、HA1004の添加により影響を受けなかったのに対し、1-Ole, 2-DHA-PEの細胞分化促進効果はHA1004の添加により阻害を受け、分化率が10%程度低くなった (Fig. 4-14)。EPAやDHAの制ガン作用の機序の一つとしてプロテインキナーゼC<sup>89)</sup>の活性化が考えられているが、HA1004の添加により1-Ole, 2-DHA-PEの促進効果が阻害されたことから、プロテインキナーゼとの関係が示唆された。しかし、HA1004を添加した場合においてもRAのみ添加した場合の細胞分化率よりも分化率が15%程度高いことから、EPAやDHA結合型リン脂質の細胞分化誘導能に対する促進効果は複数の経

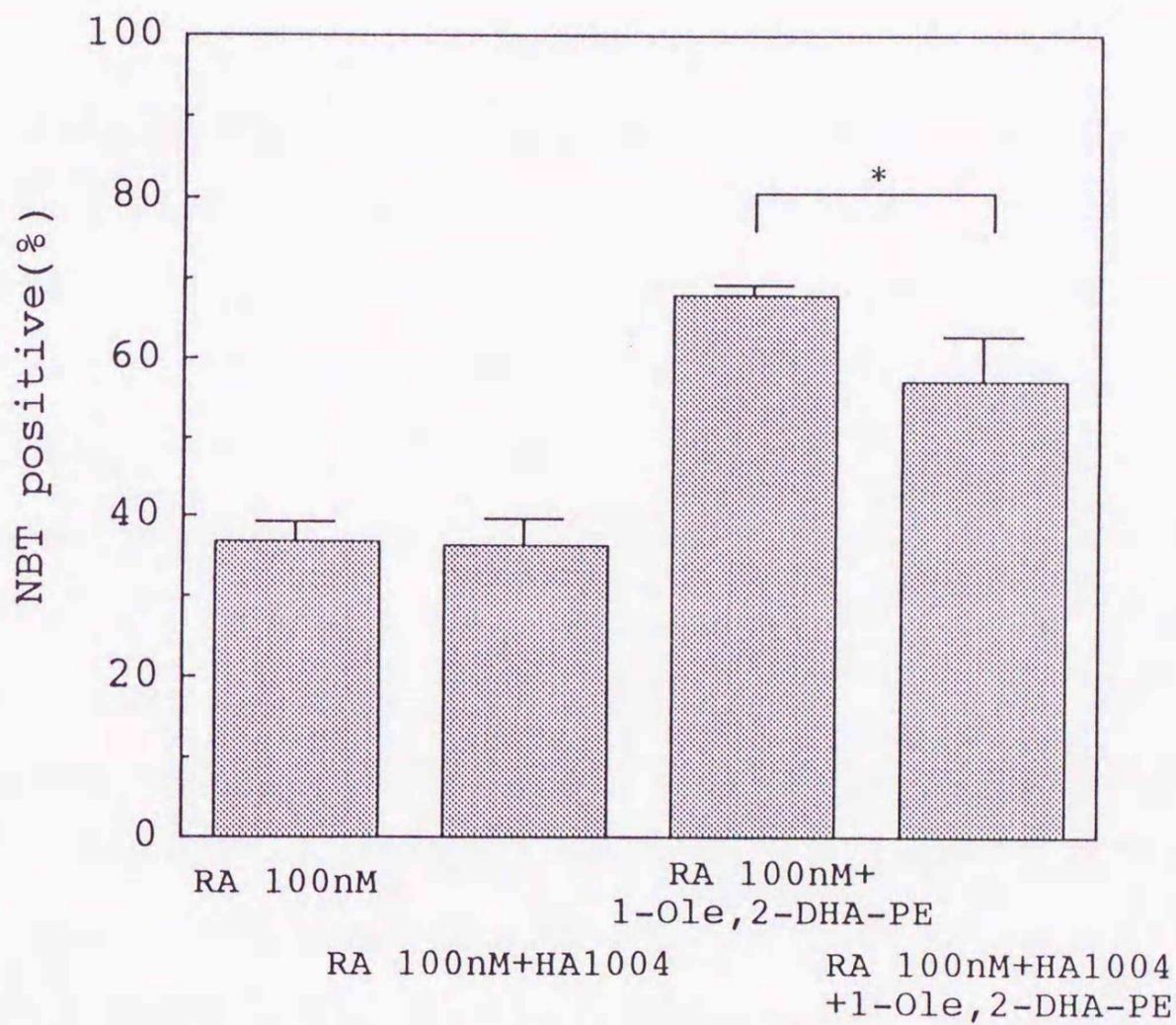


Fig.4-14. Effect of 1-Ole,2-DHA-PE and HA1004 on retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells.

Values represent means  $\pm$  S.D.. \*Represents significant difference at  $P < 0.01$ .

Abbreviations are the same as in Fig.4-3 and Table4-4.

路により発現しているとも考えられ今後の検討が待たれる。

n-3系の高度不飽和脂肪酸の生理機能については数多くの報告がみられるが、化学形態及び分子種と生理機能とを関連づけた報告は少ない。今後、EPAやDHAの生理機能の作用機序を明らかにして行く上でも、本研究結果はきわめて興味深いものと思われる。ガン細胞は増殖と分化の調節を失った細胞であり、終末細胞へ人為的に分化誘導することにより制癌の可能性が広がると考えられていることからEPA及びDHA結合型リン脂質の細胞分化促進作用に関する作用機序の解明が待たれる。

水産脂質に多く含まれるn-3系のHUFAであるEPAやDHAは多くの優れた生理機能を有し、近年ではEPAやDHAの化学形態と生理機能との関係についての研究<sup>7)</sup>が進められている。本研究ではEPAやDHAの結合したリン脂質形態に着目して、酵素反応によるEPA及びDHA結合型リン脂質分子種の合成方法の確立を試み、更には、合成したリン脂質のヒトRBC膜流動性、RBC変形能への影響及びヒト前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞の増殖及び分化におよぼす影響について検討した。

第1章第1節ではリン脂質のsn-2位にEPAやDHAの導入を試みた。現在まで、グリセロール骨格のsn-2位に特異的に作用するリパーゼの報告はない。唯一、PLA<sub>2</sub>はリン脂質のsn-2位を選択的に加水分解することが知られているが、リン脂質と脂肪酸の間でのエステル交換反応が進行しないことが複数の研究者により報告されている<sup>21,25)</sup>。そこでsn-2位が-OHであるリゾ型リン脂質とHUFAを反応基質としてエステル合成反応を行うことにより、sn-2位へのHUFAの導入を試みた。リゾ型リン脂質は極性が高いため反応に適した溶媒の選択が重要になるが、本研究ではグリセロールを用いることによりリゾ型リン脂質とHUFA、PLA<sub>2</sub>の分散を可能にした。種々の反応条件について検討したところ至適反応条件は、リゾ型リン脂質であるLPC 110mgに対し、イワシ油脂肪酸混合物(Fatty acid mixture) 180mg、グリセロール 5500mg、PLA<sub>2</sub> 60mg (11484 units) となり、合成率に大きな影響を与える水分量は、反応系の8.0% (w/w、グリセロールの水分量 0.15%もあわせて計算) に相当する 0.5mlの添加において合成率が最も高くなり26.1% (48時間反応) となった。基質脂肪酸をEPAやDHAにかえて反応を行った場合、また、LPCをLPEに変えた場合においても合成率に大きな差はみられなかったことからPLA<sub>2</sub>の基質特異性は観察されなかった。化学合成反応<sup>14)</sup>によるリン脂質へのHUFAの導入では

反応が多段階におよび、PEの合成では反応性が高いアミノ基の保護、脱保護が必要となり、それにともない収率の低下がみられる。PLA<sub>2</sub>によるエステル合成反応では基質特異性がなかったことから種々の基質に応用できる酵素反応であることが示された。

合成した2-Fatty acid mixture-PC、2-EPA-PEのsn-2位に基質脂肪酸が選択的に導入されていたことから、リン脂質sn-2位への所望のHUFAの導入が可能となった。Na<sup>26)</sup>は界面活性剤であるAOTを用いて反応基質であるLPCとHUFA、溶媒として用いたイソオクタンと緩衝液をエマルジョン状態にすることによりエステル合成反応を行っている。しかし、合成率が10%以下でありsn-2位へのHUFAの導入率も低く選択的な反応が進行していない。筆者は酵素の安定化剤として使用されているグリセロールを分散媒として用いることにより、酵素の特異性を維持したまま反応を進行させることを可能とした。

第1章第2節ではリン脂質のsn-1位を特定の脂肪酸にエステル交換する反応について検討した。トリグリセリドのsn-1,3位に特異性を有するMucor miehei由来の固定化リパーゼLipozyme IM20がリン脂質のsn-1位に対しても特異的に作用した。至適反応条件を検討したところ、Soy PC 10mg、EPA 60mgを含んだヘキサン溶液 0.5mlにLipozyme IM20 40mg (1100 BIU)を加え、48時間反応することによりエステル交換率が44.7%となり、反応生成物の収率(回収率)は18.2%になった。回収率に大きな影響をおよぼす水分量の検討は、反応前にLipozyme IM20の水分量を水分活性を指標として調整することにより行った。その結果、水分活性を低くするとエステル交換反応の進行が遅くなるため長時間の反応が必要になるものの、高い回収率で反応生成物を得られることがわかった。Svenssonら<sup>90)</sup>も反応系の水分活性を低くすることにより回収率が高まることを報告しているが、反応系に水分が多くなると反応の平衡が水を消費する方向にシフトするため加水分解が進行し回収率の低下につながることを認めた。逆に反応

系中の水分が少ないと加水分解が抑制されるが、酵素タンパクが十分活性化されず全体の反応の進行が遅くなるために上記のような結果になると考えた。

第1章では酵素を活性化するために水分量を調整して反応を行ったため、副反応である加水分解が進行し収率の低下が避けられなかった。また、酵素の水分活性を低くすることにより回収率を高めることができたものの、長い反応時間が必要であった。酵素の活性化と加水分解の抑制という相反する反応状態を打開するため第2章では必須水分代替物の使用を試みた。すなわち酵素タンパクは水分子と多点水素結合を形成することにより、主鎖の自由度を増し活性を発現すると考えられていることから、この役割を代替できる物質を用いることにより酵素を活性化し、且つ加水分解を抑制できると考えた。

第2章第1節ではPLA<sub>2</sub>のエステル合成反応における必須水分代替物の検索を行ったところ、誘電率  $\epsilon = 107$ 、 $\log P = -1.61$ であるホルムアミドの添加によりPLA<sub>2</sub>が活性化することを認めた。反応系中の水をホルムアミドに置換するにつれて合成率が上がり、反応系 (LPC 110mg、EPA 180mg、PLA<sub>2</sub> 23mg、Glycerol 5500mg) に対し8.9%(w/w)に相当する0.5mlの添加において最高値の61.0%に達した。水を同量の0.5ml添加して反応を行った場合では、反応初速度は $769 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g enzyme}$ と大きいものの合成率が20%付近で反応が平衡に達した。また、ホルムアミド0.5mlと同モルの水に相当する0.2mlの添加では反応初速度は $89 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g enzyme}$ となり、ホルムアミドの $77 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g enzyme}$ とほぼ同じであるが、合成率は30%付近で平衡に達した。すなわち、ホルムアミドを必須水分代替物として使用することにより、水と同等に酵素を活性化しつつ反応系の水分を少なくできるため合成率が高まることが明らかとなった。

第2章第2節ではLipozyme IM60によるエステル交換反応における必須水分代替物の検索を行った。その結果プロピレングリコール (誘電率  $\epsilon = 32.0$ ) やエチレングリコール (誘電率  $\epsilon = 37.70$ 、 $\log P = -1.93$ ) など分

子内に-OHを有するアルコール系の物質が有効であることが判明した。プロピレングリコールについて更に検討したところ、水とプロピレングリコールを併用することにより反応が効率的に進行し同量の水の添加の場合と比較して、エステル交換率はほぼ同じであったものの回収率は25%程度高くなることがわかった。すなわちLipozyme IM60のエステル交換反応においてプロピレングリコールと水を併用することにより高いエステル交換率を維持したまま、回収率を高めることが可能となった。

第3章、第4章ではEPAやDHA結合型リン脂質の生理機能について検討した。第3章では高血圧や動脈硬化、血栓症と関係が深い、ヒトRBC膜流動性及び変形能におよぼす影響について検討した。その結果、いずれの脂質クラスにおいてもEPAやDHA結合型リン脂質処理RBCの膜流動性が、比較対照としたSoyリン脂質処理RBCの膜流動性よりも高いことを認めた。更に、EPA結合型リン脂質とDHA結合型リン脂質の効果を比較したところPC形態ではEPAとDHAの間に差がみられなかったのに対し、PE形態ではDHA結合型、PS形態ではEPA結合型において膜流動性がより高められることがわかった。このことから、リン脂質分子種や化学形態により膜流動性への影響が異なることが明らかとなった。また、天然の水産リン脂質であるサケ卵リン脂質がどの化学形態においても膜流動性を大きく高めていたことは、水産物を利用する上で意義深い知見である。

シリコン単結晶基板マイクロチャンネルを用いてリン脂質のヒトRBC変形能への影響を検討したところ、EPA及びDHA結合型リン脂質処理RBCにおいて変形能改善効果がみられ、その様子を視覚的に観察することができた。PC、PE形態ではDHA結合型リン脂質処理RBCにおいて、また、PS形態ではEPA結合型リン脂質においてRBC変形能の改善効果が顕著であり、膜流動性への影響と一致していた。すなわち、EPA及びDHA結合型リン脂質がRBC膜に取り込まれ、膜流動性を高めることにより変形能の改善がみられ、その効果はリン脂質の分子種や脂質形態により異なることが明らかとなった。PE形態で処理したRBCにおいて溶血が少なかったこ

とを考えあわせると、2-DHA-PEがRBC膜流動性や変形能に対し優れた効果を有すると考えた。ヒトのRBC膜においてPEは主に脂質二重膜の内膜に存在し<sup>44)</sup>、PC及びPSに比べ脂肪酸組成に占めるHUFAの割合が高いことが知られている<sup>44)</sup>。またRBCに取り込まれたPEは外層から内層へ速いスピードで移行すること<sup>57)</sup>や細胞膜外層に比べ内層の流動性が7倍程度高いことが報告<sup>58)</sup>されていることから、HUFAが結合したPE形態の生理機能が注目される。

第4章ではHUFAの効果が注目されている制ガン作用について、ヒト前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞を用いてEPA、DHA結合型リン脂質の影響を検討した。その結果EPA及びDHA結合型PEにおいて細胞増殖抑制効果が顕著で、その効果は5倍濃度のPCに相当することを認めた。このとき分子種の違い（アシル基の組み合わせの違い）による抑制効果に顕著な差はみられず、HUFAを含まないdi-Ole-PEの添加においても抑制効果が認められたことから、HUFAのみならず化学形態の違いによる影響も大きいことが明らかとなった。

ガン細胞を正常細胞に分化させる脱ガンの観点からEPA及びDHA結合型リン脂質の影響について検討したところ、HUFAで細胞をプレインキュベートすることによりRAによる細胞分化誘導効果を促進し、その効果はEPAやDHA及びエチルエステルの形態に比べ、EPAやDHAの結合したリン脂質形態において顕著であることを認めた。RA 100nMの添加に先立ち、DHA結合型PC 12.5  $\mu$ MでHL-60細胞をプレインキュベートすることにより、RA 100nM単独添加の細胞分化率に比べて細胞分化率が上昇し、その効果はRAを10倍量の1  $\mu$ M単独添加した際の分化率にほぼ匹敵していたことから、HUFA結合型リン脂質が細胞の感受性を向上させることによって分化誘導剤の作用を増強していることが推察された。このことは薬剤などの減量とともに副作用の軽減への期待をつなぐものである。

EPAとDHAの効果を比較すると、EPA結合型リン脂質に比べてDHA結

合型リン脂質の分化誘導促進効果が大きく、DHA結合型PC分子種においてはsn-1位がEPAやリノール酸が主である大豆由来の脂肪酸に比べ、PalやOleの結合した分子種において促進効果が大きかった。また、PC形態に比べてPE形態において分化誘導能の促進効果が大きく、PE単独添加においても分化誘導効果がみられた。これらのことから、RAの細胞分化誘導能に対しEPA及びDHA結合型リン脂質は明らかに分化率を高める促進的效果を示し、その作用が分子種や脂質の化学形態により異なることが明らかとなった。本研究では細胞増殖抑制効果、細胞分化誘導促進能の何れにおいてもsn-1位にPalやOleが結合し、sn-2位にDHAの結合したPE形態において効果が最も大きいことを認めたが、先のRBC膜流動性や変形能の改善効果においても同様の結果を得たことは弱酸性型のリン脂質であるPE形態の生理的特性として興味深い知見である。DHA結合型PEの細胞分化誘導能に対するプロテインキナーゼ阻害剤の影響を検討したところ、阻害剤の添加により分化率の低下がみられた。しかし、その際の分化率はRA単独のみの添加による分化率に比べに高いことから、HUFAのプロテインキナーゼへの作用による制ガン効果のほかに、他の機序による生理機能の発現が考えられた。このように従来より考えられている不飽和度と細胞膜流動性への影響のみならず、細胞内酵素への影響やRAレセプター及び遺伝子発現への影響など様々な作用が考えられることから、今後はこれらに関連づけながら研究していかなければならない。

## 要約

1. リパーゼ剤やホスホリパーゼ剤を用いて特異的に反応を行うことにより、所望のEPA及びDHA結合型リン脂質分子種の合成方法を確立した。
2. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>によるエステル合成反応、リパーゼによるエステル交換反応において、必須水分代替物を検索、使用することにより副反応である加水分解を抑制し、EPAやDHA結合型リン脂質分子種の反応収率を向上できた。
3. 得られたEPA及びDHA結合型リン脂質は赤血球膜の流動性及び赤血球変形能を向上させた。その効果は分子種や脂質の化学形態によって異なり、特に、DHA結合型ホスファチジルエタノールアミンにおいて顕著であった。
4. ヒト前骨髄性白血病細胞（HL-60細胞）に対するレチノイン酸の細胞分化誘導作用をEPA及びDHA結合型リン脂質が促進した。その効果は脂肪酸やエチルエステルの形態よりもリン脂質形態において顕著であり、特に、sn-1位にパルミチン酸やオレイン酸、sn-2位にDHAの結合したホスファチジルエタノールアミンの効果が顕著であった。また、細胞増殖に対してもEPA及びDHA結合型のホスファチジルエタノールアミンにおいて増殖抑制効果が大きかった。

以上、酵素の特異的反応を利用することにより、EPA及びDHA結合型リン脂質の分子設計が可能となり、生理機能をリン脂質分子種や化学形態と関連づけて明らかにした。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学水産学部 羽田野 六男教授に心より深謝致します。本研究をまとめるにあたり、貴重な御助言と御校閲を賜りました北海道大学水産学部 太田 亨教授、並びに研究を遂行する上で適切な御指導、御助言を賜りました北海道大学水産学部 高橋 是太郎助教授に深謝致します。

さらに、赤血球変形能の測定に際し、御指導頂きました農林水産省食品総合研究所 菊池 佑二博士、細胞実験の御指導を頂きました北海道大学水産学部 吉水 守助教授、金沢医科大学 甲野 裕之講師、研究を遂行する上で御助言、御助力頂きました食品化学第一講座 栗原 秀幸助手に感謝致します。

また、貴重な試料を御供与いただきました日本化学飼料株式会社 穂刈 勝利氏、旭化成工業株式会社 今村 茂行博士、協和醗酵工業株式会社 江木 衷氏、ノボノルディスクバイオインダストリー株式会社 草山 泰和氏にお礼申し上げます。

最後に、本研究は野島 正博氏、大島 宏哲氏、宮崎 法子氏、栃沢 馨氏、古野 紀子氏をはじめ食品化学第一講座の学生の皆さん、田村 典子事務員、佐々木 美帆事務員の御協力により行われたものです。厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) J. Dyerberg, H.O. Bang, E. Stoffersen, S. Moncada and J.R. Vane,; Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?. *Lancet*, **ii**, 117-119 (1978).
- 2) 原 一郎監修: 油脂の栄養と疾病, 幸書房, 東京, 1990.
- 3) 藤本健四郎編: 水産脂質-その特性と生理活性, 恒星社厚生閣, 東京, 1993.
- 4) 熊谷 朗: EPAの医学, 中山書店, 東京, 1994.
- 5) 鹿山 光編: AA, EPA, DHA-高度不飽和脂肪酸, 恒星社厚生閣, 東京, 1995.
- 6) 矢沢一良, 影山治夫: ドコサヘキサエン酸の生理活性. *油化学*, **40**, 974-978 (1991).
- 7) L.D. Lawson and B.G. Hughes : Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **152**, 328-335 (1988).
- 8) 常盤 繁, 金沢昭夫: コレステロール低下剤. 特許 広報, 昭63-53968
- 9) K. Matsumoto, I. Morita, H. Hibino and S. Murota : Inhibitory effect of docosahexaenoic acid containing phospholipids on 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **49**, 861-866 (1993).
- 10) J.S. Parks, T.Y. Thuren, J.D. Schmitt. Inhibition of lecithin:cholesterol acyltransferase activity by synthetic phosphatidylcholine species containing eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid in the *sn*-2 position. *J. Lipid Res.*, **33**, 879-887 (1992).
- 11) 森 修, 福永健治, 鈴木鐵也, 高間浩蔵: ラット血漿リポタンパク質の過酸化に及ぼす食餌性脂質の影響. 平成6年度日本水産学会秋期大会講演要旨集, 220 (1994).
- 12) 矢澤一良, 渡部和郎, 石川千夏子, 増沢康男, 山口宏二, 近藤 聖, 江 孟燦, 木村修一: 海洋細菌由来のEPAリン脂質の生理活性. *脂質生化学研究*, **32**, 291-294 (1991).
- 13) 日比野英彦, 田中幸久: ドコサヘキサエン酸含有リン脂質の分子構造と生理機能. *油化学*, **43**, 687-697 (1994).
- 14) 日比野英彦, 海野麻美, 高島瑞夫, 西川 徹, 野田恭平, 高橋清久: ホスファチジルコリン投与による脳内コリン及びアセチルコリン含量への影響 (第1報). *油化学*,

- 41, 341-346 (1992).
- 15) J. Xia and Y.Z. Hui : An efficient and stereospecific synthesis of 1-stearoyl-2-[(z,z,z)-9,12,15-Linolenoyl]-sn-glycerophosphocholine and its bioactivity. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 1919-1922 (1995).
  - 16) L.R. Juneja, T. Kazuoka, T. Yamane and S. Shimizu : Kinetic evaluation of conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine by phospholipase D from different sources. *Biochim. Biophys. Acta*, **960**, 334-341 (1988).
  - 17) S. Shuto, S. Imamura, K. Fukukawa, H. Sakakibara and J. Murase : A facile one-step synthesis of phosphatidylhomoserines by phospholipase D-catalyzed transphosphatidyl-ation. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 447-449 (1987).
  - 18) A. Nagao, N. Ishida and J. Terao : Synthesis of 6-phosphatidyl-L-ascorbic acid by phospholipase D. *Lipids*, **26**, 390-394 (1991).
  - 19) M.J. Hass, K. Scott, W. Jun and G. Janssen : Enzymatic phosphatidylcholine hydrolysis in organic solvents: an examination of selected commercially available lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 483-490 (1994).
  - 20) A.M. Aura, P. Forssell, A. Mustranta, T. Suortti and K. Poutanen : Enzymatic hydrolysis of Oat and Soya Lecithin: effect on functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 887-891 (1994).
  - 21) T. Yagi, T. Nakanishi, Y. Yoshizawa, and F. Fukui : The enzymatic acyl exchange of phospholipids with lipases. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 23-25 (1990).
  - 22) P. Pernas, J.L. Olivier, M.D. Legoy and G. Bereziat : Phospholipid synthesis by extracellular phospholipase A<sub>2</sub> in organic solvents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **168**, 644-650 (1990).
  - 23) G. Lin, F.C. Wu and S.H. Lui : Phospholipase A<sub>2</sub> catalyses in organic media. *Tetrahedron Letter*, **34**, 1959-1962 (1993).
  - 24) A. Mustranta, T. Suortti and K. Poutanen. Transesterification of phospholipids in different reaction conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 1415-1419 (1994).
  - 25) T. Yoshimoto, M. Nakata, S. Yamaguchi, T. Funada, Y. Saito, and Y. Inada : Synthesis

- eicosapentaenoyl phosphatidylcholine by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biotechnol. Lett.*, **8**, 771-776 (1986).
- 26) A. Na, C. Eriksson, S.G. Eriksson, E. Osterberg and K. Holmberg : Synthesis of phosphatidylcholine with (n-3) fatty acids by phospholipase A<sub>2</sub> in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 766-770 (1990).
- 27) Y. Totani and S. Hara : Preparation of polyunsaturated phospholipid by lipase-catalyzed transesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 848-851 (1991).
- 28) L.M. Mutua, and C.C. Akoh : Lipase-catalyzed modification of phospholipids : Incorporation of n-3 fatty acid into biosurfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 125-128 (1993).
- 29) 北口博司 : 有機溶媒中の酵素反応. *化学と生物*, **30**, 792-798 (1992).
- 30) A. Zaks and A.M. Klibanov : The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021 (1988).
- 31) H. Kitaguchi and A.M. Klibanov : Enzymatic peptide synthesis via segment condensation in the presence of water mimics. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9272-9273 (1989).
- 32) G.H. De Hass, N.M. Postema, W. Nieuwenhuizen and L.L.M. Vandeenen : Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 103-117 (1968).
- 33) 池田 潔, 手島圭三 : ホスホリパーゼA<sub>2</sub>の触媒機能の分子論. *蛋白質 核酸 酵素*, **32**, 1422-1441 (1987).
- 34) 東城博雅, 岡本光弘 : ホスホリパーゼA<sub>2</sub>の酵素化学. *代謝*, **26**, 691-703 (1989).
- 35) M.A. Wells and D.J. Hanahan : *Methods in Enzymology* (ed. by J.M. Lowenstein), Vol. 10, Academic Press, New York, pp.178-184.
- 36) K. Takahashi, K. Zama, T. Matsuoka : Molecular species of fish muscle lipids I. Molecular species of triglyceride and phosphatidylcholine of sardine and rainbow trout. *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.*, **29**, 378-385 (1978).
- 37) L. Gubicza and I.K. HorVath : Effect of water mimicking additives on the synthetic activity and enantioselectivity in organic solvents of a *Candida cylindracea* lipase. *J. Mol. Catalysis*, **84**, L27-L32 (1993).

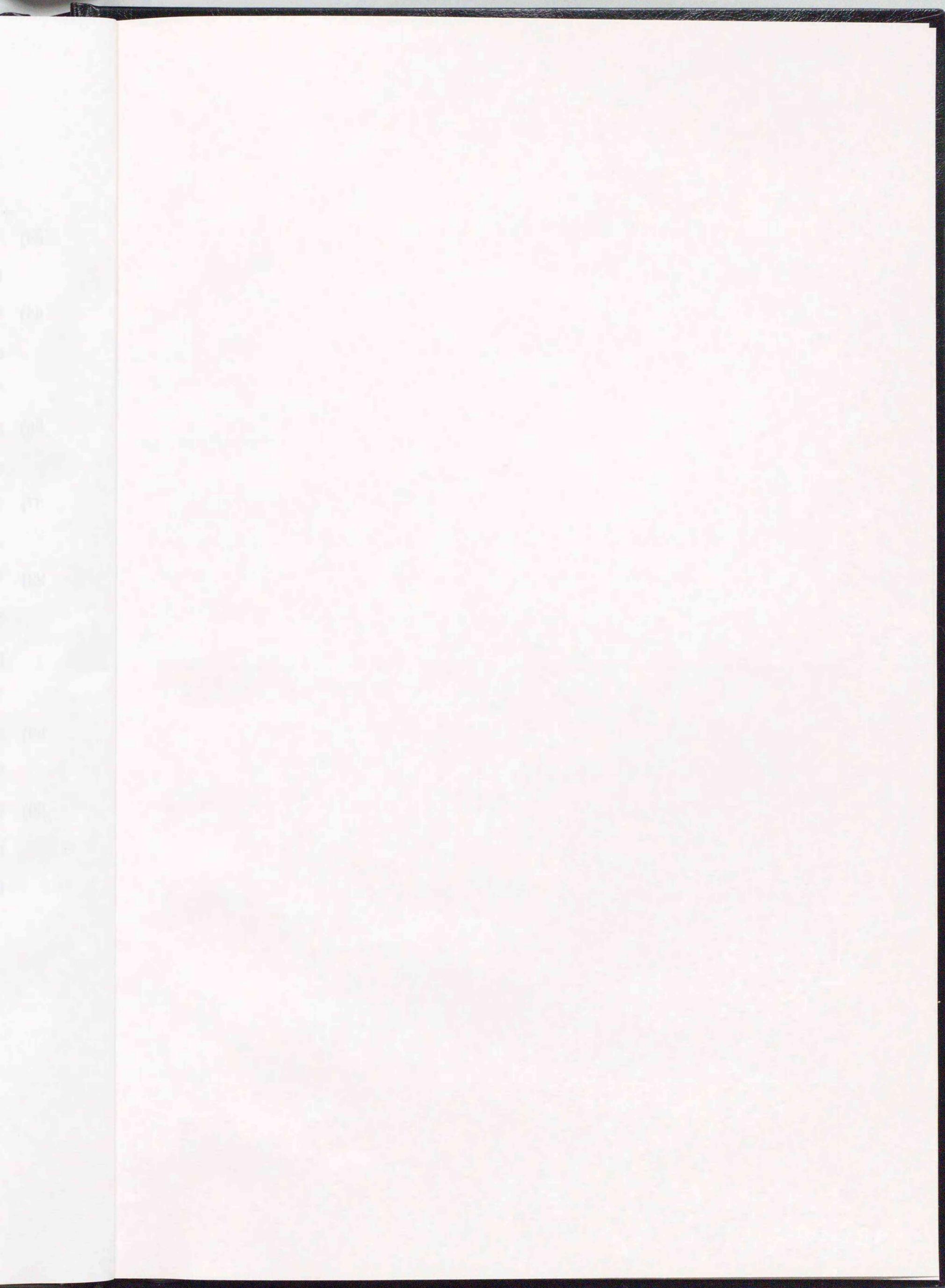
- 38) M. Reslow, P. Adlercreutz and B. Mattiasson : Modification of the microenvironment of enzyme in organic solvents. Substitution of water by polar solvents. *Biocatalysis* , **6**, 307-318 (1992).
- 39) 木瀬秀夫, 山本康仁, 佐々木俊哉, 野田直広 : 有機溶媒中での酵素活性に対する添加物効果. 第32回油化学討論会・研究発表会 講演要旨集, 170-171 (1993).
- 40) A.O. Triantafyllou, P. Adlercreutz and B. Mattiasson. Influence of the reaction medium on enzyme activity in bio-organic synthesis:behaviour of lipase from *Candida rugosa* in the presence of polar additives. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **17**, 167-179 (1993).
- 41) H. Kitaguchi, I. Itoh and M. Ono: Effect of water and water-mimicking solvents on the lipase-catalyzed esterification in an apolar solvent. *Chem. Lett.*, 1203-1206 (1990).
- 42) G. Duan and J.Y. Chen: Effects of polar additives on the enzyme enantioselectivity of an esterification reaction in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **16**, 1065-1068 (1994).
- 43) L.R. Juneja, T. Kazuoka, N. Goto, T. Yamane and S.Shimizu : Conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylserine by various phospholipase D in the presence of L- or D-serine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1003**, 277-283 (1989).
- 44) 大西俊一 : 生体膜の動的構造 (第2版) . 東京大学出版会, 東京, 1993.
- 45) T.A. Hagve, Y. Johansen and B. Christophersen : The effect of n-3 fatty acids on osmotic fragility of rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1084**, 251-254 (1991).
- 46) J.P. Infante : Docosahexaenoate-containing phospholipids in sarcoplasmic reticulum and retinal photoreceptor. Aproposal for a role in  $Ca^{2+}$ -ATPase calcium transport. *Mol. Cell. Biochem.*, **74**, 111-116 (1987).
- 47) M.E. Zuniga, B.R. Lokesh and J.E. Kinsella : Disparate effect of dietary fatty acids on activity of 5'-nucleotidase of rat liver plasma membrane. *J. Nutr.*, **119**, 152-160 (1989).
- 48) D. Schachter, U. Cogan and R.E. Abbott : Asymmetry of Lipid Dynamics in human erythrocyte membranes studied with permeant fluorophores. *Biochemistry*, **21**, 2146-2150 (1982).
- 49) 権 敬玉, 阿部正彦, 金 明子, 荻野圭三 : 蛍光プローブ法によるリン脂質二分子膜融合. 油化学, **41**, 501-506 (1992).

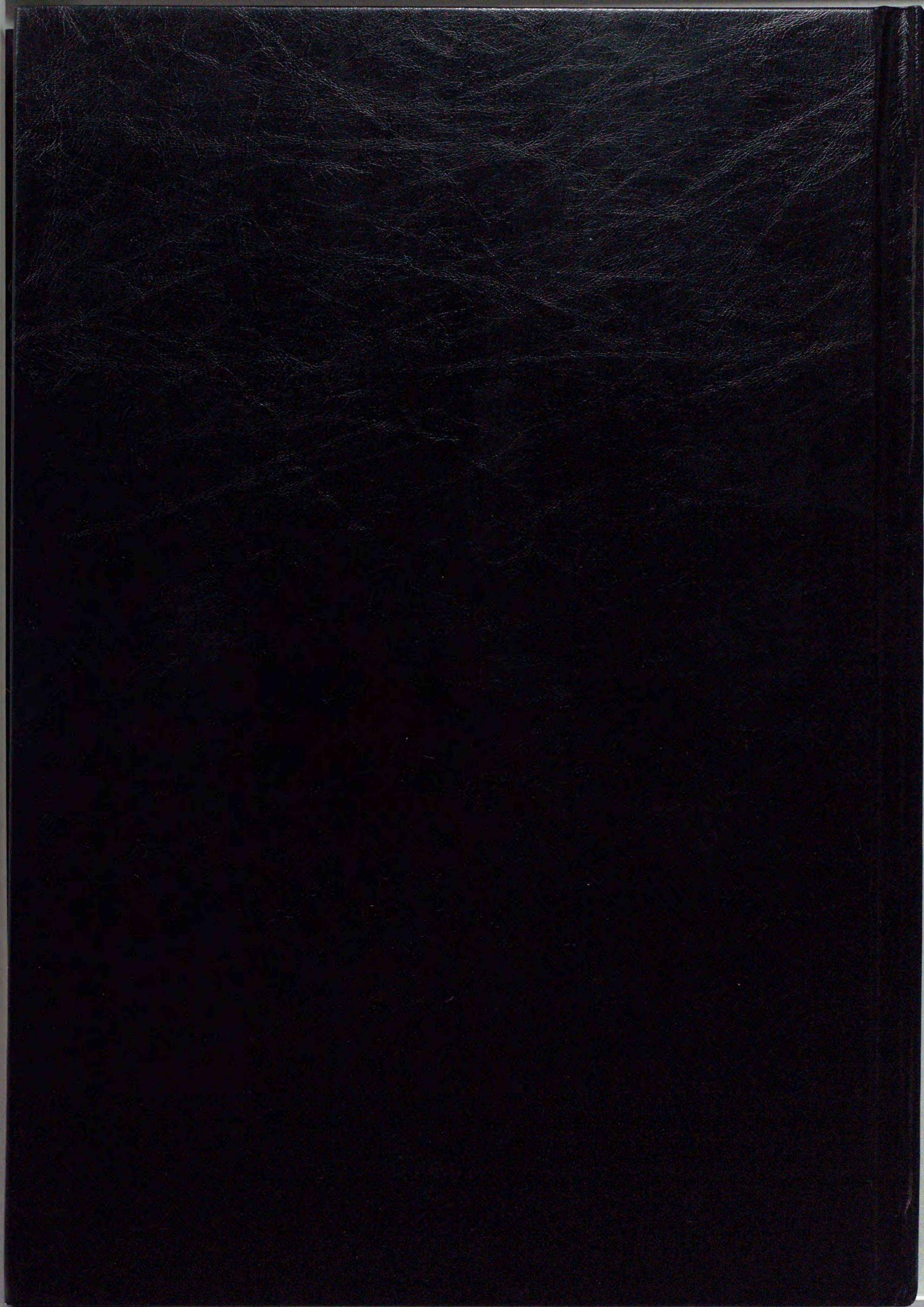
- 50) D. Freifelder : 生物化学研究法 物理的手法を中心に. 東京化学同人, 東京, 1979.
- 51) 木下一彦, 御橋廣眞 : 蛍光測定 生物学への応用, 学会出版センター, 東京, 1983.
- 52) D. Grunberger, R. Haimovitz and M. Shinitzky : Resolution of plasma membrane lipid fluidity in intact cells labelled with diphenylhexatriene. *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 764-774 (1982).
- 53) M. Treen, R.D. Uauy, D.M. Jameson, V.L. Thomas and D.R. Hoffman : Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 564-570 (1992).
- 54) E.G. Bligh and W.F. Dyer : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
- 55) E. Berlin, S.J. Bhathena, J.T. Judd, P.P. Nair, R.C. Peters, H.N. Bhagavan, R.B. Barbash and P.R. Taylor : Effect of omega-3 fatty acid and vitamin E supplementation on erythrocyte membrane fluidity, tocopherols, insulin binding, and lipid composition in adult men. *J. Nutr. Biochem.*, **3**, 392-400 (1992).
- 56) 荒磯恒久 : 膜脂質の流動性と膜タンパク質の動態. 膜(MEMBRANE). **19**, 3-13 (1994).
- 57) T. Fujii, A. Tamura and H. Narita : *Trans*-bilayer movement of added phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine species with various acyl chain length in plasma membrane of intact human erythrocytes. *J. Biochem.*, **98**, 1221-1227 (1985).
- 58) J.M. El Hage Chahine, S. Cribier and P.F. Devaux : Phospholipid transmembrane domains and lateral diffusion in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 447-451 (1993).
- 59) 尾辻省吾, 鎌田哲郎, 山下朋子, 副島安子, 瀬戸山史郎, 橋口 純, 中馬康男 : 糖尿病患者の赤血球膜流動性におよぼすイワシ魚油 (エイコサペンタエン酸) 摂取の影響. 臨床病理, **17**, 764-771 (1984).
- 60) M.G. Eck, J.O. Wynn, W.J. Carter and F.H. Faas : Fatty acid desaturation in experimental diabetes mellitus. *Diabetes*, **28**, 479-485 (1979).
- 61) T. Hamazaki, M. Urakaze, S. Yano, Y. Soda, A. Mayamoto, K. Kubota and F. Ibuki :

- Injection of tridocosaheptaenoyl-glycerol emulsion and fatty acid composition of blood cells. *Lipids*, **22**, 1031-1034 (1987).
- 62) K. Yazawa, K. Watanabe, C. Ishikawa, K. Kondo and S. Kimura : Production of eicosa-pentaenoic acid from marine bacteria, in " Industrial Applications of Single Cell Oils " (ed. by D.J. Kyle and C. Ratledge), American Oil Chemists' Society Campaign, Illinois, 1992, pp. 29-51.
- 63) 菊池佑二, 佐藤一雄 : 細胞計測・細胞加工への半導体技術の応用. 化学と生物, **30**, 31-37 (1992).
- 64) Y. Kikuchi, K. Sato, H. Ohki and T. Kaneko : Optically accessible microchannels formed in a single-crystal silicon substrate for studies of blood rheology. *Microvasc. Res.*, **44**, 226-240 (1992).
- 65) Y. Kikuchi, K. Sato and Y. Mizuguchi : Modified cell-flow microchannels in a single-crystal silicon substrate and flow behavior of blood cells. *Microvasc. Res.*, **47**, 126-139 (1994).
- 66) 菊池佑二 : 赤血球変形能の測定と環境因子による変化. 日本バイオレオロジー学会誌, **6**, 2-16 (1992).
- 67) 菊池佑二 : 毛細血管モデルを用いて血液の流動性を計測する. 食品工業, **35**, No 10, 1-8 (1992).
- 68) 熊谷 朗, 田村 泰, 平井愛山, 寺野 隆 : 血栓症の予防と治療に関する血小板代謝の研究. 臨床薬理の進歩 '85, 86-101 (1985).
- 69) N.H. Nielsen and J.P.H. Hansen : Breast cancer in Greenland-selected epidemiological, clinical, and histological features. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **98**, 287-299 (1980).
- 70) B.S. Reddy and H. Maruyama : Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F334 rats. *Cancer Res.*, **46**, 3367-3370 (1986).
- 71) K.R. Applegate and J.A. Glomset : Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.*, **27**, 658-680 (1986).
- 72) K.R. Applegate and J.A. Glomset : Effect of acyl chain unsaturated on the conformation of model diacylglycerols: a computer model study. *J. Lipid Res.*, **32**, 1635-1644 (1991).

- 73) M. Suzuki, K. Asahi, K. Isono, A. Sakurai and N. Takahashi : Differentiation inducing phosphatidyl choline(s) from the embryos rainbow trout (*salmo gairdneri*): isolation and structural elucidation. *Develop. Growth & Differ.*, **34**, 301-307 (1992).
- 74) S.J. Collins, R.C. Gallo and R.E. Gallagher : Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, **270**, 347-349 (1977).
- 75) J. Terao, Y. Hirota, M. Kawakatsu and S. Matsushita : Structural analysis of hydroperoxides formed by oxidation of phosphatidylcholine with singlet oxygen. *Lipids*, **16**, 427-432 (1981).
- 76) 山田道之, 橋中一也 : 骨髓性白血病細胞HL-60の細胞分化と遺伝子発現の調節. 蛋白質 核酸 酵素, **36**, 41-53 (1991).
- 77) T.R. Breitman, B.R. Keene and H. Hemmi : Studies of growth and differentiation of human myelomonocytic leukemia cell lines in serum-free medium, in "Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells" Alan R. Liss, Inc., New york, 1984, pp.215-236.
- 78) C.P. Burns, E.S. Petersen, J.A. North and L.M. Ingrraham : Effect of docosaehaenoic acid on rate of differentiation of HL-60 human leukemia. *Cancer Res.*, **49**, 3252-3258 (1989).
- 79) H. Obermeier, N. Hrboticky and A. Sellmayer : Differential effects polyunsaturated fatty acids on cell growth and differentiation of premonocytic U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1266**, 179-185 (1995).
- 80) J.S. Falconer, J.A. Ross, K.C.H. Fearon, R.A. Hawkins, M.G. O'Riordain and D.C. Carter : Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth *in vitro* of human pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, **69**, 826-832 (1994).
- 81) 成沢富雄, 高橋政弘, 丹羽 誠, 日下尚志, 山崎好日児, 西沢幸雄, 小沢一敏, 小番美恵子, 平野二郎, 磯田好弘 : 魚油 $\omega$ -3型多価不飽和脂肪酸のラット大腸発癌におよぼす影響. 医学の歩み, **145**, 911-912 (1988).
- 82) 矢沢一良 : DHA : 基礎と効能. ファルマシア, **31**, 42-46 (1995).
- 83) M. Naito, I. Kudo, Y. Nakagawa, K. Waku, H. Nojiri, M. Saito and K. Inoue : Lipids of

- human promyelocytic cell HL-60: increasing levels ether-linked phospholipids during retinoic acid-induced differentiation. *J. Biochem.*, **102**, 155-162 (1987).
- 84) W. Stillwell, W. Ehringer and L.J. Jenki : Docosahexaenoic acid increases permeability of lipid vesicles and tumor cells. *Lipids*, **28**, 103-108 (1993).
- 85) L. Calorini, G. Mugnai, A. Mannini and S. Ruggieri : Effect of phosphatidylcholine structure on the adenylate cyclase activity of a murine fibroblast cell line. *Lipids*, **28**, 727-730 (1993).
- 86) 内田佳予子、榎本和生、井上圭三、小林俊秀、梅田真郷 : ホスファチジルセリンの細胞増殖抑制作用についての解析. *生化学*, **67**, 583 (1995).
- 87) J.M. love and L.J. Gudas : Vitamin A, differentiation and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, **6**, 825-831 (1994).
- 88) Y. Bayon, M. Croset, D. Daveloose, F. Guerbette, V. Chirouze, J. Viret, J.C. Kader and M. Lagarde : Effect of specific phospholipid molecular species incorporated in human platelet membranes on thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *J. Lipid Res.*, **36**, 47-56 (1995).
- 89) S.G. Chen and K. Murakami : Synergistic activation of type III protein kinase C by *cis*-fatty acid and diacylglycerol. *Biochem. J.*, **282**, 33-39 (1992).
- 90) I. Svensson, P. Adlercreutz and B. Mattiasson : Lipase-catalyzed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 986-991 (1992).





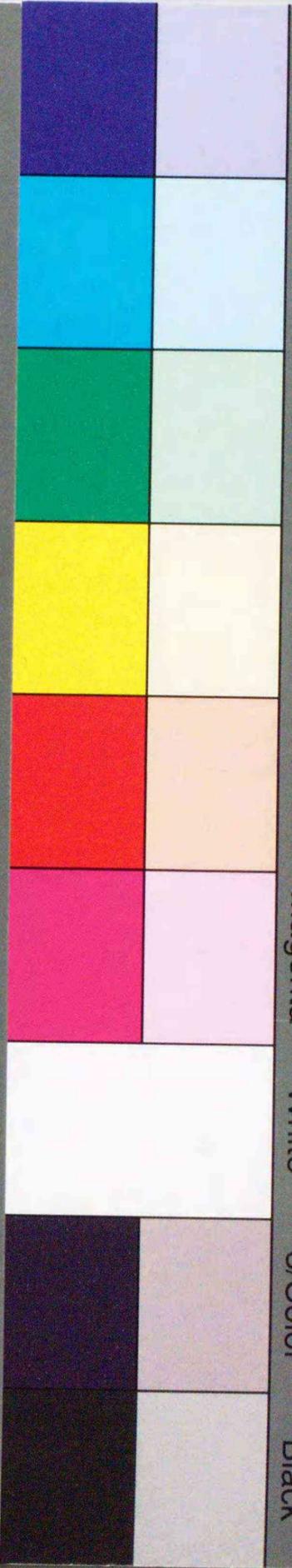
Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
Centimetres 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### KODAK Color Control Patches

© The Tiffen Company, 2000

**Kodak**  
LICENSED PRODUCT

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

