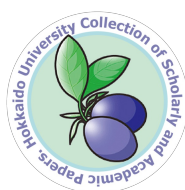




Title	ホスホリパーゼA2による高度不飽和脂肪酸含有ホスファチジルコリンの合成と細胞分化誘導作用に及ぼす影響
Author(s)	細川, 雅史; 大島, 宏哲; 甲野, 裕之 他
Citation	日本水産学会誌, 59(2), 309-314 https://doi.org/10.2331/suisan.59.309
Issue Date	1993
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52081
Rights	© 1993 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	JSFS59_309.pdf



ホスホリパーゼ A₂ による高度不飽和脂肪酸含有ホスファチジル コリンの合成と細胞分化誘導作用に及ぼす影響^{*1}

細川 雅史, 大島 宏哲, 甲野裕之, 高橋是太郎

羽田野六男, 小田島肅夫

(1992 年 6 月 22 日受付)

Synthesis of Phosphatidylcholine Containing Highly Unsaturated Fatty Acid by Phospholipase A₂ and Effect on Retinoic Acid Induced Differentiation of HL-60 Cells

Masashi Hosokawa,^{*2} Hiroaki Ohshima,^{*2} Hiroyuki Kohno,^{*3}
Koretaro Takahashi,^{*2} Mutuo Hatano,^{*2} and Shizuo Odashima^{*3}

Phosphatidylcholine containing highly unsaturated fatty acid (HUFA-PC) was prepared by porcine pancreatic phospholipase A₂, which catalyzed esterification between lysophosphatidylcholine (LPC) and highly unsaturated fatty acid (HUFA), under a scaled-up reaction system. Fatty acid mixture prepared from sardine oil, purified eicosapentaenoic acid (EPA), and purified docosahexaenoic acid (DHA) were used as the substrates of HUFA. The yield of HUFA-PC was 17.0-19.9%. Synthesized phosphatidylcholine containing DHA (DHA-PC) prepared from LPC and DHA had a DHA content of 46.5%, which indicated almost the maximum theoretical incorporation rate. DHA-PC molecular species consisted of (16:0, DHA), (18:0, DHA), (18:1, DHA), (18:2, DHA), and (18:3, DHA). It was obvious that the acyl groups in *sn*-1 of these molecular species originated from the substrate LPC. The rate of retinoic acid induced differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) was promoted by growing HL-60 cells in 10% FBS-PNM pre-treated with either EPA-PC or DHA-PC.

Dyerberg *et al.*¹⁾ の疫学的調査以来、魚油やその主な構成脂肪酸である *n*-3 系列のエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の生理的効果が注目されるようになり、多くの研究がなされてきた。

最近になり、EPA、DHA の生理的効果が脂質クラスや分子種の違いによって異なることが指摘され始め、高度不飽和脂肪酸 (HUFA) とリン脂質の両方のすぐれた作用を併せ持つと思われる HUFA 含有リン脂質の生理的効果が関心を集めるに至っている。EPA による血清コレステロール低下作用に関しては、メチルエステルの形態に比べリン脂質の形態のほうが低下作用が格段に高かったことが報告され、²⁾ また、海洋細菌から EPA 含有リン脂質を抽出してラットに経口投与した試験では、脂肪組織の重量低下というリン脂質形態特有の新たな効果がみられたことも報告³⁾ されている。今後は脂質形態や

分子種形態の違いを考慮した研究がますます活発になっていくものと予想される。

先に筆者らは、温和な条件下で反応を進めることができ、所望の位置に HUFA を導入することが可能な酵素的合成法に着目して、リゾホスファチジルコリン (LPC) と HUFA を基質として、ブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A₂ による HUFA 含有ホスファチジルコリン (PC) の合成について報告した。⁴⁾ 本研究では、先の反応系を拡大して HUFA 含有 PC を合成し、そのときの生成率、脂肪酸組成、分子種組成を分析し、さらに合成した HUFA 含有 PC の細胞分化誘導作用に及ぼす影響について検討した。

実験方法

試薬 LPC は、乳化剤として市販されているリゾ型

^{*1} 本研究は、文部省平成4年度科学研究費補助金に基づく研究(一般研究C)の一部として行ったものである。

^{*2} 北海道大学水産学部食品化学第一講座 (Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

^{*3} 金沢医科大学第一病理学教室 (Department of Pathology, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa 920-02, Japan).

リン脂質 (商品名 エルマイザー A) を協和醸酵工業 (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。イワン油脂脂肪酸は, 精製イワン油 (日本化学飼料 (株)) を終濃度 6% の水酸化カリウムでケン化して調製した。EPA 標品 (純度 99% 以上), DHA 標品 (純度 99% 以上) は, 出光石油化学 (株) より購入した。ホスホリパーゼ A₂ は工業規模で利用されているブタ脾臓由来のものを協和醸酵工業 (株) より入手し, 透析後, 真空凍結乾燥して (35.0 units/mg powder) を用いた。

HUFA 含有 PC 合成反応 HUFA 含有 PC の合成反応は LPC と基質脂肪酸をグリセロールに分散後, ホスホリパーゼ A₂ を 6 mm 塩化カルシウム含有 200 mm トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した酵素液を加えて反応を開始し, 1,000 rpm で攪拌しながら 25°C で 48 h 反応を行った。反応終了後, Folch 溶媒で脂質成分を抽出し, ケイ酸カラムクロマトグラフィーに供してメタノールによってリン脂質画分を回収し, 回収重量を測定した。

生成率の算出 回収したリン脂質画分をクロマトロッド S III (ヤマトロン (株)) 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, 脂質組成を TLC-FID 法 (イヤトロスキヤン TH-10 型, ヤマトロン (株)) で分析した。また, LPC ならびに合成した HUFA 含有 PC の重量とピークの面積 (Integrator: 日立 D-2000) 間の関係を示すキャリブレーションカーブを作成し, 脂質組成分析の結果とキャリブレーションカーブ, 回収リン脂質量に基づき, 合成された HUFA 含有 PC の重量を算出した。さらに反応開始時の LPC 秤取量から HUFA 含有 PC の生成率も算出した。

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{合成 HUFA 含有 PC 量}}{\text{LPC 秤取量}} \times 100 \text{ (w/w)}$$

反応系の容積および酵素量の検討 前報⁹⁾ における至適反応系を 2, 5, 10 倍に拡大して HUFA 含有 PC の合成反応を行い, 反応系の拡大による HUFA 含有 PC の生成率への影響について検討した。すなわち, 10 倍量の反応系では LPC 1.1 g, イワン油脂脂肪酸 1.8 g をグリセロール 55 g に分散後, 6 mm 塩化カルシウム含有 200 mm トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 5.0 ml にホスホリパーゼ A₂ 19.1 units/mg LPC を溶解した酵素液を加えて反応を行った。また, 上記の 10 倍量の反応系におけるホスホリパーゼ A₂ 量を変えて反応を行うことにより, 生成率に及ぼす酵素量の影響について検討した。

異なる基質脂肪酸を用いての HUFA 含有 PC の合成 同じく 10 倍量の反応条件下で, 基質脂肪酸としてイワン油脂脂肪酸 (EPA 15.3%, DHA 9.9%), EPA 標品,

DHA 標品をそれぞれ用いて合成反応を行った。以後の操作は上記と同様に行い生成率を算出した。また, リン脂質画分を調製用プレート (DC-Fertig platten, Macherey, Nagel) 上にプロットし, クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4, v/v/v) で展開後, PC 画分を回収しメチルエステル化を行い, ガスクロマトグラフィー (GLC) に供して脂肪酸組成を分析した。

分子種組成の分析 合成した HUFA 含有 PC を Takahashi *et al.* の方法⁹⁾ に準じてアセチル化し, 次の条件の逆相系 HPLC に供して各主要ピークを分取, メチルエステル化後, GLC により脂肪酸組成を分析して分子種の同定を行った。装置: 日立 655A-11 液体クロマトグラフ, カラム: Wakosil-5C18N (粒子径 5 μm) 300×4 mm, 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: 0.5 ml/分, カラム温度: 室温, 検出器: 日立 655A-30 示差屈折計。

HUFA 含有 PC の細胞分化誘導作用に及ぼす影響 レチノイン酸がヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60 細胞) を分化誘導すること¹⁰⁾ が知られているが, その分化誘導作用に対して, 本実験で合成した HUFA 含有 PC の影響について検討した。

試料には EPA 標品, DHA 標品を用いて合成した EPA 含有 PC, DHA 含有 PC を Terao *et al.* の方法⁹⁾ に準じて逆相ローバーカラム (Merck 社, Lichroprep RP-8 (粒子径 40-63 μm) 240×10 mm) に供してクロロホルム/メタノール/水 (1:10:0.5, v/v/v) により酸化 PC を除去したものをを用いた。10% FBS-PNM にて継代している HL-60 細胞 2.5×10⁴ 個/ml を 35 mm dish (Falcon 社) に植え込み, 5% CO₂, 37°C にて培養した。植え込み後 6 時間目で 10 μg の HUFA 含有 PC を含むエタノール溶液 1 ml を添加し, 24 時間後に分化誘導剤のレチノイン酸を添加して, さらに 24 時間後に分化誘導能を測定した。また, それとは別に無血清培地で培養した HL-60 細胞株を用い, 血清培地のときと同様にレチノイン酸添加 24 時間後に分化誘導能を測定した。なお, 分化誘導能は何れも NBT 還元能¹¹⁾ を指標とした。

結果および考察

反応系の容積の検討 本研究で行った HUFA 含有 PC の合成反応は極性の高い LPC を基質としているため, LPC を分散させて酵素反応を行うことのできる分散媒としてグリセロールを用いた。しかし, LPC とグリセロールは粘性が高いため, 反応系を拡大したときの攪拌状態が生成率に影響を与えることが予想された。そこで, HUFA 含有 PC 合成の反応系を 2, 5, 10 倍 (反応系は実験方法に示すとおり) に設定して合成反応を行

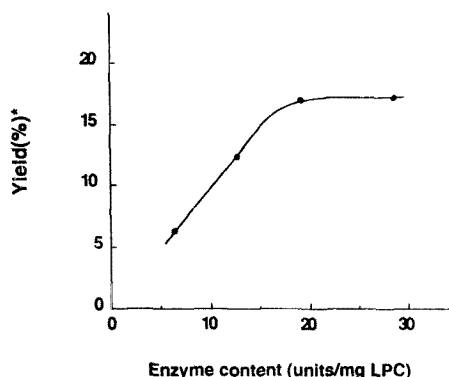


Fig. 1. Effect of phospholipase A₂ content on HUFA-PC synthesis.

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

Table 1. Degree of HUFA-PC synthesis among various kinds of substrate fatty acids (%)

	Yield* ¹
Fatty acid mixture* ²	17.0
Purified EPA	19.3
Purified DHA	19.9

*¹ Yield (%)

=(synthesized HUFA-PC/substrate LPC)×100 (w/w).

*² Fatty acid mixture prepared from sardine oil.

Abbreviations are: HUFA, highly unsaturated fatty acid; HUFA-PC, highly unsaturated fatty acid containing phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid.

い、反応系の容積と HUFA 含有 PC の生成率の関係について検討した。その結果、2, 5, 10 倍の反応系における HUFA 含有 PC の生成率はそれぞれ 15.5, 18.7, 17.0% となり、反応系の拡大による生成率の低下はみられなかった。このことより、以後の実験を 10 倍量の反応系で行うこととした。また、本実験では大量に生産され入手しやすいブタ脾臓由来ホスホリパーゼ A₂ を用いたため、酵素量の生成率におよぼす影響についても改めて検討した。その結果、効率的に反応を行うための酵素量は 19.1 unit/mgLPC であると判断した (Fig. 1)。

異なる基質脂肪酸を用いての HUFA 含有 PC の合成

上記の 10 倍量の反応条件下でイワシ油脂脂肪酸, EPA, DHA の 3 種類の基質脂肪酸を用いて HUFA 含有 PC の合成反応を行った。Table 1 に示すように HUFA 含有 PC の生成率は、イワシ油脂脂肪酸, EPA, DHA を用いたとき、それぞれ 17.0, 19.3, 19.9% になった。

反応に用いた基質の脂肪酸組成を Table 2 に、合成した HUFA 含有 PC の脂肪酸組成を Table 3 に示す。LPC とイワシ油脂脂肪酸 (EPA 15.3%, DHA 9.9%) を用いて合成したイワシ油脂脂肪酸含有 PC 中に EPA は 8.2%, DHA は 4.2% 含まれていた。前報⁹⁾で報告したように、LPC の 2 位の位置に基質脂肪酸が特異的に導入されると考え導入率 (実測値/理論値 (基質の各脂肪酸濃度の和の 1/2)×100) を計算してみると、EPA が 106.5%, DHA が 93.3% となった。一方、EPA 標品を用いて合成反応を行ったとき、合成された EPA 含有 PC 中には EPA が 47.6% 含まれており、このことから導入率は 96.2% になった。DHA 標品を用いて合成反応を

Table 2. Fatty acid composition of substrates for HUFA-PC synthesis by phospholipase A₂

Substrate	Substrate fatty acid					
	16:0	18:1	18:2	18:3	EPA	DHA
LPC	22.5	11.0	52.5	5.7	—	—
Fatty acid mixture*	18.0	14.0	1.2	—	15.3	9.9
Purified EPA	—	—	—	—	>99.0	—
Purified DHA	—	—	—	—	—	>99.0

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

Table 3. Fatty acid composition of synthesized HUFA-PC by phospholipase A₂

Synthesized HUFA-PC	Synthesized HUFA-PC fatty acid					
	16:0	18:1	18:2	18:3	EPA	DHA
Fatty acid mixture*-PC	17.2	12.3	31.7	3.8	8.2	4.2
EPA-PC	12.8	5.8	26.0	2.7	47.6	—
DHA-PC	12.5	5.7	25.8	2.7	—	46.5

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

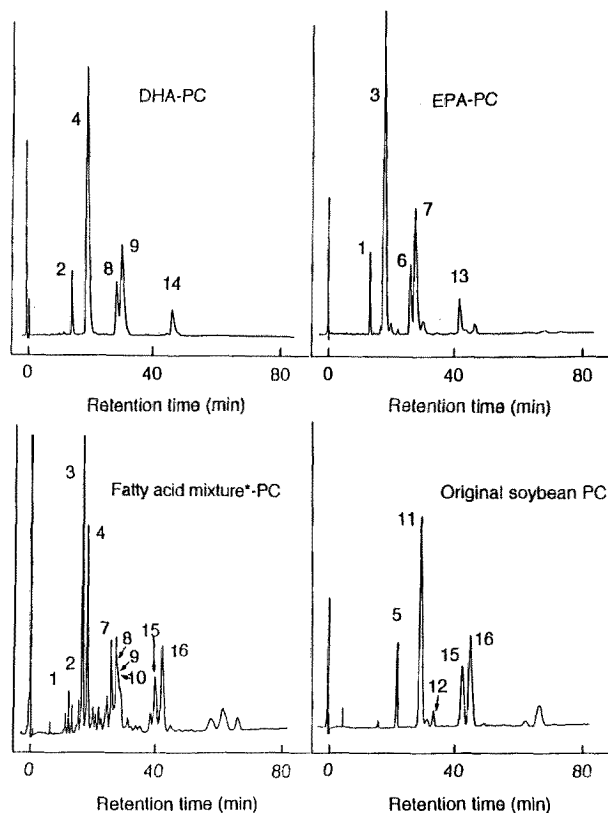


Fig. 2. Reverse phase HPLC chromatograms of synthesized HUFA-PC prepared from LPC and fatty acid mixture, EPA or DHA.

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); and 16, (16:0, 18:2).

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

行ったときは、合成された DHA 含有 PC 中には DHA が 46.5% 含まれ、導入率は 93.9% になり、基質脂肪酸中の EPA, DHA が両方ともほぼ理論値の上限近くまで導入されていることが明らかになった。

分子種組成の分析 合成した HUFA 含有 PC の分子種を分析したクロマトグラム、ならびに大豆 PC 分子種のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。DHA 標品と大豆由来 LPC を用いて合成した DHA 含有 PC の分子種は (16:0, DHA), (18:0, DHA), (18:1, DHA), (18:2, DHA), (18:3, DHA) の 5 種類で、組成比はそれぞれ 22.8, 6.5, 10.5, 53.9, 5.6% であった。LPC の主な脂肪酸が 16:0 22.5%, 18:0 6.9%, 18:1 11.0%, 18:2 52.5%, 18:3 5.6% であることから考え、DHA が 2 位の位置に

選択的に導入されたためこのような結果になったと考えられる。EPA 標品を用いて合成した EPA 含有 PC の分子種組成についても DHA を EPA に置き換えただけのほぼ同様の結果が得られた。一方、イワシ油脂脂肪酸を用いて合成反応を行った場合には、イワシ油脂脂肪酸の脂肪酸組成が複雑であるため合成されたイワシ油脂脂肪酸含有 PC の分子種組成も複雑になった。それに対し、大豆 PC の分子種には HUFA を含んだものは見られず、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。LPC が大豆 PC より調製されていることを考えると、本リン脂質合成反応により原料の大豆 PC とは分子種組成の全く異なる PC が合成されたといえる。

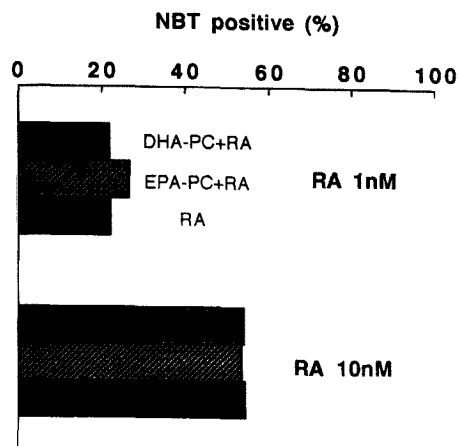


Fig. 3. Effect of synthesized HUFA-PC on the rate of retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cell in serum free medium.

Abbreviations are the same as in Table 1.

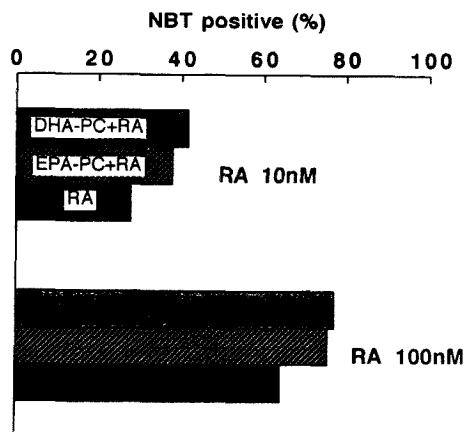


Fig. 4. Effect of synthesized HUFA-PC on the rate of retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cell in serum-supplemented medium.

Abbreviations are the same as in Table 1.

以上のように、本法は純度の高い基質脂肪酸を用いることにより2位の位置に特定の脂肪酸残基を有するPCを合成することが可能である。今後さらには1,3特異性のリパーゼを用いてエステル交換反応を行い、1位に特定の脂肪酸を導入することにより所望の分子種のPCを合成することも可能になるものと思われる。

HUFA 含有 PC の細胞分化誘導作用への影響 小田島らは水産動物由来の HUFA 含有 PC を用いて HL-

60 細胞を前処理することにより、レチノイン酸の分化誘導作用が促進されることを報告している。^{*4} そこで本法で合成した EPA 含有 PC, DHA 含有 PC を用いてレチノイン酸の細胞分化誘導作用に対する影響について検討した。

無血清培地で培養した HL-60 細胞株を用いて HUFA 含有 PC の分化誘導促進作用を検討した結果を Fig. 3 に示す。無血清培地では HUFA 含有 PC で前処理してもレチノイン酸単独の場合の分化誘導作用に比べ促進効果がみられなかった。これに対し、Fig. 4 に示すように血清存在下では EPA 含有 PC, DHA 含有 PC の何れで前処理した場合でもレチノイン酸単独添加による分化誘導作用に比べ、約 10-20% の促進効果がみられた。しかし、促進効果に大きな差がみられなかったことより2位の位置に結合する脂肪酸の種類と分化誘導促進作用の直接的な関係はみいだせなかった。旭らはマウスの赤芽性白血病細胞を用いて 1-palmitoyl-2-eicosapentaenoyl PC と 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl PC の分化誘導作用を比較したとき、2位の位置に DHA をもつ方が分化誘導活性が高いことを報告している。⁹⁾ 用いる細胞によっても当然効果が異なると考えられるため、効果の評価には今後慎重な検討が必要である。

血清存在下でのみ分化誘導作用に対する促進効果がみられたことより、HUFA 含有 PC が細胞膜の状態を変化させて血清中のホルモンなどの生理活性物質の細胞に対する作用を増強していることが推察される。したがって、HUFA 含有 PC で前処理することにより細胞の感受性を向上させて、薬剤の減量や副作用の軽減も期待できることになる。今後、脂質形態や分子種の違いによる細胞膜への影響についてより詳しい検討が必要であろう。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご協力頂いた株式会社ニチロ中央研究所の赤澤治夫所長ならびに狩野勇二郎氏、エルマイザー A とホスホリパーゼ A₂ を恵与された協和醸酵工業(株)の江木 衷氏に謝意を表す。

また、本研究は文部省平成4年度科学研究費補助金(一般研究C)によったものである。記して感謝する。

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*, 2, 117-119 (1978).
- 2) 常盤 繁, 金澤昭夫: コレステロール低下剤. 特許広報, 昭 63-53968.

*4 小田島庸夫, 甲野裕之: 水産物由来の生理活性物質の抗腫瘍作用に関する研究—癌細胞の再分化誘導(脱癌)及び転移の抑制—,「水産物健康性機能有効利用開発研究の成果の概要」,水産庁研究部研究課,1990,pp.11-19.

- 3) 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).
- 4) 細川雅史, 高橋是太郎, 羽田野六男, 江木 俊: 工業用ホスホリパーゼ A₂ による高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の合成. 日食工誌, **38**, 695-698 (1991).
- 5) K. Takahashi, T. Hirano, K. Takama, and K. Zama: Molecular species of fish muscle lecithin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 1803-1814 (1982).
- 6) T. R. Breitman, S. E. Selonick, and S. J. Collins: Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 2936-2940 (1980).
- 7) 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).
- 8) A. Yen, R. Van Sant, J. Harvey, and J. Fishbaugh: Myeloid differentiation inducing factors produced by pokeweed mitogen-treated normal G₁/0 lymphocytes but not chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Res.*, **45**, 4060-4066 (1985).
- 9) 旭 健一, 桜井 成, 高橋信孝, 日比野英彦, 福田信雄: 動物細胞に対する分化誘導物質 XXIX. EPA 含有脂質の分化誘導活性について. 農化誌, **62**, 574 (1988).