



天然由来機能性脂質の食品栄養学的特性に関する研究

東北大学大学院農学研究科 准教授 都 築 毅

はじめに

天然には、通常二重結合ではなく共役化した二重結合をもつ共役脂肪酸が存在する。牛肉や乳製品には、リノール酸(LA, 9Z12Z-18:2)の幾何・位置異性体である共役リノール酸(CLA, 18:2)が、含まれている(図1)。CLAは抗発癌作用、脂質代謝改善作用、動脈硬化抑制作用、免疫増強作用、骨代謝改善作用などが認められ、健康補助食品として販売されている。一方、天然にはCLA以外にも共役二重結合をもつ脂肪酸が存在する。キリやニガウリなどのある種の植物種子には、共役トリエン構造をもつ α -エロステアリン酸(ESA, 9Z11E13E-18:3)が存在している(図1)。また、紅藻あるいは緑藻には、さらに長鎖の共役EPAや共役DHAが見いだされている。CLAについてはさかんに研究されているが、他の共役脂肪酸は食品成分として摂取している可能性はあるものの、生理活性や栄養的な調査はほとんどされていなかった。そこで本研究では、天然から得ることが出来る共役リノレン酸や共役EPA、共役DHAに焦点を当ててCLAにかわる生理活性脂質になりうることを期待して、現在日本において最大の死因である癌に対する効果を検討し、癌予防食品へ応用するための基礎的検討を行った。さらに、食品への応用を見据えて、分析法、酸化安定性、体内動態や代謝、新規生理作用に関する検討を行った。

1. 共役脂肪酸の分析法の確立

共役脂肪酸の研究を進めるにあたり、正確に定量することは必須である。共役トリエン構造は反応性が高いことが考えられ、従来の分析法を見直す必要があると考えられた。そこで、異性を極力防いでガスクロマトグラフィー分析を行うための最適なメチル化条件を確立した。メチル化の方法は、酸触媒法と塩基触媒法に分けることができる。ESAは、いずれの塩基触媒法でも条件を最適化することにより、メチル化を安定に行うことができた。しかしながら、塩基触媒法には脂質選択性があるため、試料が限定される。そのため、トリメチルシリルジアズメタン法とナトリウムメトキシド法を組み合わせることとした。一方、ESAを極力異性化することなくメチル化できた酸触媒法は、条件を最適化した14%BF₃/MeOH法であった。

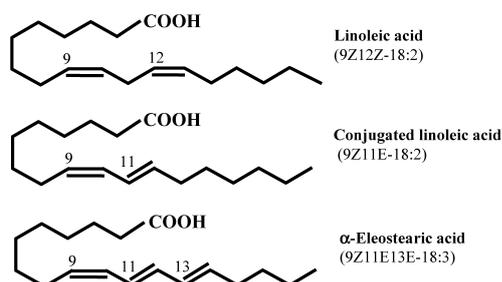


図1 共役脂肪酸の化学構造式

2. 共役脂肪酸の酸化安定性

共役脂肪酸の生理活性試験を検討し、食品に応用する場合、酸化安定性に関する情報は必要不可欠である。そこで、ESAと酸素の反応性を評価した。脂肪酸を試験管内部で薄膜にし、37°Cで自動酸化させたところ、残存脂肪酸量や酸素吸収量の結果から、共役脂肪酸は非共役脂肪酸より酸化されやすかった。しかし、過酸化物は、共役脂肪酸でほとんど生成しなかった。これより、共役脂肪酸と非共役脂肪酸では酸化機構に違いがあると考えられた。また、ESAの酸化速度は、CLAより速かった。酸化安定性の向上を目的として、トリアシルグリセロール(TG)型での試験や抗酸化剤を加えた試験を行った。共役脂肪酸はエステル型になっても、非共役脂肪酸と比べると酸化されやすかった。しかし、遊離型の時と比べると酸化安定性が大きく増すことがわかった。また、共役型TGは非共役型TGと比べて先に酸化し始めるが、酸化が始まってからの速度は緩やかであった。このことは、共役脂肪酸の酸化ラジカル反応は非共役脂肪酸と違いがあると考えられた。共役脂肪酸は抗酸化剤であるトコフェロール添加により、酸化安定性が大きく増加し、非共役脂肪酸と比較して抗酸化剤の影響を強く受けることが明らかとなった。これにより、共役脂肪酸の酸化安定性はエステル体にし、抗酸化剤を添加することによって飛躍的に増大し、食品などに応用できる範囲であることが明らかになった。

3. 共役脂肪酸の脂質代謝および生体内脂質過酸化の影響と吸収代謝

共役脂肪酸は非共役脂肪酸と比較して酸化されやすいことが明らかとなった。従って、共役脂肪酸の摂取は体内で酸化ストレスを促進する可能性が考えられた。また、摂取したESAが吸収されるかなど体内動態を検討した報告はなかった。ESAを食品に応用するためにも生体への安全性と体内動態を明らかにする必要がある。そこでESAの吸収と代謝、体内脂質過酸化に与える影響を検討した。ラットにESAを添加した試験食を摂取させたところ、血漿と肝臓の脂質組成と酸化ストレス指標に大きな変化はなかった。このことは、共役脂肪酸が、生体に対し悪影響を及ぼさないことを示している。また、非常に興味深いことにESAを摂取したラットの血漿と肝臓からCLAと保持時間が同一の未同定の脂肪酸が検出されたため、この脂肪酸の構造決定を試みた。ESAを摂取したラット肝臓の脂肪酸メチルエステルからAg⁺-HPLCを用いて、CLAを単離した。単離したCLAは、GC-EI/MSにて位置異性を、¹³C-NMRにて幾何異性を検討したところ、この構造は9Z11E-CLAと決定された。以上より、経口摂取した共役トリエン構造のESAの一部はラット体内において Δ 13飽和化反応を受け、共役ジエンであるCLAに転換されることが新たに見出された(図2)。この現象をさらに検討したところ、この反応は小腸や肝臓での酵素反応で、補酵素であるNADPH依存性であり、肝臓で活性が

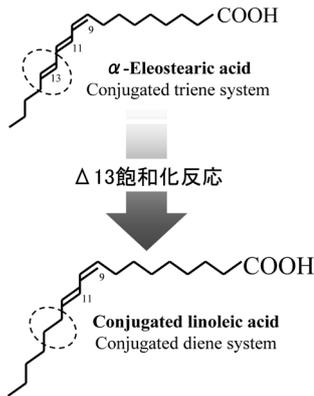


図2 Δ13位飽和化反応

ESAは生体内でNADPH依存性のΔ13位飽和化反応を受け、9Z11E-CLAに代謝転換される。

高いことが明らかとなった。また、ESA以外の共役トリエン型脂肪酸（ブニカ酸やジャカル酸など）においても検討し、カルボキシル基から最も遠い二重結合が飽和化されることを見出した。これら共役トリエン型脂肪酸は特定の植物種子に大量に含まれており、CLA供給源としての活用が期待できた。

4. 共役脂肪酸の抗癌作用

ESAが体内でCLAに転換されることより、ESAはCLA同様に抗癌作用を持つ可能性が考えられた。そこでESAの抗癌作用を検討し、CLAと比較した。ヌードマウスの背部皮下にヒト大腸癌細胞を移植し、ESAもしくはCLAを経口投与したところ、ESAにCLAより強い癌増殖抑制効果が見出された（図3）。また、ESAは正常組織である肝臓に対しては何ら影響を与えていなかった。これより、ESAは癌細胞選択的に細胞死を誘導することが考えられた。ESAを摂取したマウスの癌組織では過酸化脂質量が増加していた。よって、ESAの癌抑制効果に脂質過酸化が関わっている可能性が考えられた。そこで、培養細胞試験にて癌抑制メカニズムの詳細な検討を行なった。細胞増殖試験を行い、ESAが癌細胞に強い殺癌細胞効果を持つことを明らかとし、アポトーシス実行因子であるCaspaseの活性化およびmRNA発現量の増加を見出し、ESAによりアポトーシスが誘導されていることを明らかにした。加えて、ESAを添加した癌細胞において、過酸化脂質量は増加し、抗酸化剤であるトコフェロールを添加することで脂質過酸化や細胞死誘導は抑制された。これにより、ESAは脂質過酸化を介して、CLAより強力に癌を抑制することが明らかとなった。さらに、ESA以外の共役トリエン型脂肪酸や共役EPA、共役DHAなども検討を行い、強い効果を見出した。

5. 共役脂肪酸の腫瘍血管新生抑制作用

共役脂肪酸の癌抑制試験を行っている中で、共役脂肪酸を投与したマウスの癌組織では、内部が変色し、壊死を起こしていた。これは癌組織内部にまで栄養が行き届いていない状態であり、栄養を運ぶ血管が新生されていないと考えられた。よって、共役脂肪酸に血管新生を抑制する可能性が考えられた。癌の発生と進展には、血管系がさまざまな形で密接に関係している。現在、癌治療の目的で血管新生を抑制する成分が注目されている。そこで、共役脂肪酸の血管新生抑制効果を検討し、その作用機構を検討した。マウス背部皮下法にて、共役脂肪酸が血管新生を強力に阻害することを見出した。ヒト内皮細胞

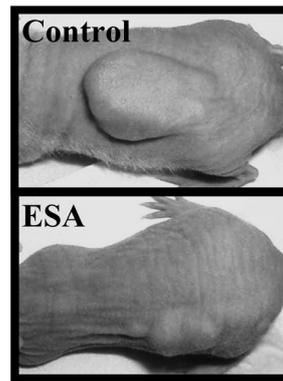


図3 ESAの癌抑制効果

ヌードマウスの背部にヒト癌細胞を移植し、ESAを経口投与すると、強い癌増殖抑制効果を示す。

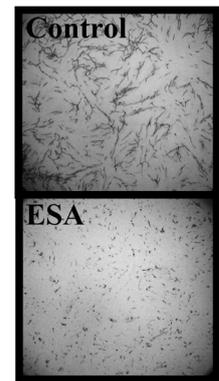


図4 ESAの血管新生抑制効果

ヒト血管内皮細胞に血管様管腔を形成させ、ESAを添加すると、強い血管新生抑制効果を示す。

(HUVEC)を用いて、血管新生の重要なステップである細胞の増殖、遊走、管腔形成を共役脂肪酸が抑制することを明らかにした（図4）。そして、血管新生阻害メカニズムは、核内受容体であるPPAR γ を活性化することで血管内皮細胞増殖因子であるVEGFの受容体発現を阻害することを明らかにした。以上により、共役脂肪酸の新しい生理機能として、強い血管新生抑制作用を見出した。これにより、日本人の死因の60%に関係する血管新生病（がん、動脈硬化、糖尿病など）を防ぐ天然成分として、共役脂肪酸を有効に利用できると考えられた。

6. 共役脂肪酸の新規生理作用

共役脂肪酸の新規生理作用の検討を行い、共役リノレン酸や共役EPA、共役DHAは抗肥満作用や脂質代謝改善作用を有することを明らかにした。また、トランス脂肪酸や非共役型脂肪酸（EPAやDHA）を検討することにより、共役脂肪酸との生理作用の違いを明確にした。

おわりに

本研究では、比較的手に入れることが簡単なキリやニガウリの種子に含まれる共役リノレン酸であるESAやその他の共役リノレン酸、海藻に含まれる共役EPAや共役DHAに興味を持ち、CLAにかわる生理活性脂質になりうることを期待して、安全性や有用性を検討した。そして、これら共役脂肪酸は、CLAより容易に調製でき、生理活性も強い、よって優れた健康補助食品として有効利用が十分に期待できた。今後、未だ明らかになっていない代謝系の解明や、より利用しやすい方法の確立に向けて研究を推進したい。

謝辞 栄誉ある2014年度農芸化学奨励賞を授与されたことに対し、選考委員・関係各位の先生方に厚く御礼申し上げます。本研究は、主に東北大学大学院農学研究科で行われたもので、在学中より現在に至りまして常にご指導を賜り、本奨励賞にご推薦いただきました東北大学大学院農学研究科教授の宮澤陽夫先生に心より感謝申し上げます。また、これまでご指導・ご助力を賜りました諸先生方と共同研究者の皆様へ御礼申し上げます。最後になりましたが、東北大学大学院農学研究科の卒業生・在校生の皆様のご協力、いつも近くで支えてくれる家族に深く感謝いたします。