（ 続紙 1 ）

京都大学	博士（　　農　学　　）	氏名	古元　秀洋
論文題目	Studies on Nutraceutical Properties of Modified Fatty Acids by Autoxidation and Lactic Acid Bacterial Metabolism （自動酸化および乳酸菌の代謝によって修飾された脂肪酸の食品機能特性に関する研究）		

（論文内容の要旨）

脂質代謝異常は、肥満や脂肪肝、動脈硬化症など多くの生活習慣病の主要因である。トリアシルグリセロール（TG）代謝は、食事療法や薬物療法の重要なターゲットの一つであり、その代謝の主要な組織は肝臓、骨格筋、脂肪組織である。とくに肝臓にTGが過剰に蓄積した状態である脂肪肝は、動脈硬化症などの循環器系疾患が進展するリスクを高めることが知られているが、近年、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）と非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が大きな注目を集めている。脂質合成の異常亢進などにより肝臓組織に過剰にTGが蓄積して引き起こされるNAFLDは、酸化ストレスや炎症反応が惹起されることで、さらに組織が障害されたNASHへと進行する。NASHまで病態が進展すると、症状の改善は難しく、最終的には肝硬変や肝がんなどの重篤な疾患を発症する危険性が高まる。これまでに海洋生物に多く含まれているエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などのn-3系高度不飽和脂肪酸が、脂質代謝改善作用を有していることが明らかにされている。さらに培養細胞レベルでは、高度不飽和脂肪酸の自動酸化物が、より強い脂質低下作用を示すことも見出されている。一方で、乳酸菌による水和反応を利用し、不飽和脂肪酸にヒドロキシル基やケトン基を修飾する技術が確立し、ヒドロキシル基やケトン基を有する様々な化学構造の修飾脂肪酸を特異的に調製することが可能となっている。これらの脂肪酸に新たな機能性が付与できれば、産業利用に結び付く可能性も高いといえる。本論文では、自動酸化および乳酸菌の酵素的代謝によって生じる修飾脂肪酸について、その食品機能性を明らかにすることで有効利用へとつなげることを目的として、脂質代謝と酸化ストレス応答に与える影響を評価し、その作用メカニズムについて遺伝子転写制御レベルでの解析を行った。本論文の内容は以下のように要約される。

1．自動酸化させたEPAが未酸化EPAよりも強く肝臓細胞の脂質合成を抑制することが培養細胞を用いた実験により見出されている。しかしながら、生体レベルの脂質代謝に対する酸化EPAの作用については明らかになっていなかった。そこで、脂肪肝を誘導したマウスの脂質代謝におけるEPAと酸化EPAの効果を検証した。ICRマウスに40%ショ糖を含む高ショ糖食を与え、さらに脂質合成を制御する核内受容体LXRαのアゴニストであるTO-901317を経口投与することで脂肪肝を誘導した。この脂肪肝誘導マウスに対して、一匹一日あたり5 mgのEPAまたは酸化EPAを経口投与し、2週間飼育を行なった。試験期間終了後、肝臓や脂肪組織の重量、各種血中パラメータおよび肝臓脂質を測定し、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現変動をリアルタイムRT-PCR法で調べた。その結果、EPAまたは酸化EPAの経口投与によって、肝臓重量の増加が抑制された。さらに酸化EPAの投与によって、肝臓の中性脂肪が有意に抑制された。また、脂質合成関連遺伝子について、EPAや酸化EPAによる抑制傾向が示され、酸化EPAは生体レベルでもEPAと同程度の脂質合成抑制作用を示すことが確認された。

2. 脂肪酸の自動酸化生成物は化学的に不安定であるため、食品や医薬品などへの利用には適さないと考えられる。そこで、安定供給が可能な修飾脂肪酸として、乳酸菌*Lactobacillus plantarum*の飽和化代謝反応を利用した高度不飽和脂肪酸の微生物代謝物に着目した。ヒト肝臓由来HepG2細胞を用いて、TO-901317添加によって脂質合成を誘導し、修飾脂肪酸による影響を検証した。その結果、10位にヒドロキシル基また

はカルボニル基が修飾され、11位にトランス二重結合を持つリノール酸誘導体（HYCとKetoC）が脂質の蓄積を有意に抑制することが新たに見出された。このとき、脂質合成を制御する転写因子SREBP-1cの遺伝子発現が強く抑制されることも確認された。とくにKetoCは極めて強い活性を有し、SREBP-1c下流の脂質合成関連遺伝子の発現やSREBP-1cタンパク質の成熟化および細胞内中性脂肪の蓄積を顕著に抑制したことから、11位の二重結合および10位にヒドロキシル基またはカルボニル基を有する修飾脂肪酸が強い脂質合成抑制作用を示すことがわかった。

3. 生体には酸化ストレスに対する様々な防御機構が備わっており、Nrf2-ARE経路を介した抗酸化酵素の発現調節が中心的な役割を果たしている。そこで、Nrf2-ARE経路を介した酸化ストレス応答に対する修飾脂肪酸の影響を検証した。培養細胞を用いた検討から、過酸化水素処理による酸化ストレスに対して、KetoCが強い保護作用を示すことが初めて明らかとなった。このときKetoCは、ARE転写活性および抗酸化酵素の遺伝子発現を顕著に促進したことから、Nrf2-ARE経路を活性化することで酸化ストレス防御を亢進することが示された。また、Nrf2タンパク質レベルが、KetoCによって高値を示したことから、Keap1-Nrf2制御系にKetoCが影響を及ぼすものと推測された。さらにα，β-不飽和カルボニル構造を有する他の修飾脂肪酸もまたARE転写活性を示したことから、α，β-不飽和カルボニル構造が酸化ストレス防御促進作用に関与することが強く示唆された。さらに、マウスを用いた動物実験によって、KetoCの経口投与は、肝臓のみならず心臓や胃などの臓器でもNrf2-ARE経路を介して制御される抗酸化酵素の発現を促進することが確認され、生体レベルでも効果を示すことがわかった。

以上の本論文の結果から、自動酸化や微生物の代謝によって生じる高度不飽和脂肪酸の誘導体の中から、強力な生物活性を示すものが見出された。なかでも非常に強い脂質合成抑制作用と酸化ストレス防御作用が確認されたα，β-不飽和カルボニル構造を有するKetoCは、その活性からNAFLDやNASHなどの脂質代謝異常症の改善に有効であることが期待される。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は１頁を３８字×３６行で作成し、合わせて、３,０００字を標準とすること。
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、４００～１,１００wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語５００～２,０００字程度で作成すること。

（続紙 ２ ）

（論文審査の結果の要旨）

脂質代謝異常は、肥満や脂肪肝、動脈硬化症など多くの生活習慣病の主要因であり、その予防と改善が求められている。これまでに海洋生物に多く含まれているEPAなどのn-3系高度不飽和脂肪酸が脂質代謝改善作用を有していることが明らかにされているが、空気中の酸素と反応し、酸化変性されやすいことが問題となっている。本研究は、自動酸化や微生物の代謝によって生成した修飾脂肪酸を用いて、とくに肝臓を中心とした脂質代謝と酸化ストレス応答に与える影響を評価し、その作用メカニズムについて遺伝子転写制御レベルでの解析を行った。とくに評価される点は以下の通りである。

１．EPA初期自動酸化物の経口摂取によって、未酸化EPAとほぼ同レベルでの肝臓脂質低下作用が示されることを動物実験で初めて明らかにした。

２．乳酸菌*Lactobacillus plantarum*の水和反応を利用した不飽和脂肪酸の微生物代謝物の中から、10位にヒドロキシル基またはケトン基を有し、11位にトランス二重結合をもつリノール酸誘導体（KetoC）が最も強い脂質合成抑制作用を示し、核内受容体LXRを介した転写因子SREBP-1cの発現を強く抑制することを見出した。

３． KetoCはNrf2-ARE経路を活性化し、酸化ストレス防御を亢進することを初めて見出した。この活性には、α，β-不飽和カルボニル構造が重要であることを確認した。

４．KetoCの経口投与によって、Nrf2-ARE経路を介して制御される抗酸化酵素の発現が生体レベルで促進されることを動物実験にて初めて確認した。

以上のように、本論文は自動酸化や乳酸菌による水和反応によって生じる修飾脂肪酸の新たな用途開発に道を開くものであり、海洋生物生産利用学、水産化学、食品機能学、発酵学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成２８年２月５日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第１４条第２項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注）論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日以降（学位授与日から３ヶ月以内）