

氏 名	ざい 財 満 のぶ ひろ
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1619 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Formation Mechanism and Bioactivities of <i>Trans</i> Isomers of Eicosapentaenoic Acid (エイコサペンタエン酸トランス異性体の生成機構と生理活性に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 平 田 孝 教 授 左 子 芳 彦 助 教 授 菅 原 達 也

論 文 内 容 の 要 旨

エイコサペンタエン酸(EPA)は海産物に豊富に含まれる n-3 系高度不飽和脂肪酸で、抗炎症効果や脂質代謝改善作用などの有益な生理機能を有するため、機能性食品成分や医薬品として利用されている。EPA の二重結合は通常はシス型で存在しているが、ヒト血小板やラット肝臓では二重結合がトランス異性化した EPA トランス異性体(TEPA)が存在することが報告された。この TEPA についての研究は少なく不明な点が多い。しかし、オレイン酸やリノール酸などの不飽和度の低い脂肪酸のトランス異性体は動脈硬化の危険因子であると考えられ、欧米諸国では規制の動きが強まっていることから、代表的な高度不飽和脂肪酸である EPA のトランス異性体の生理活性を明らかにすることは我々の食生活に関する有用な知見を得るために重要である。本論文は TEPA の生成機構と生理活性を明らかにすることを目的として行った研究成果をまとめたものである。以下にその概要を記す。

1) TEPA の生成機構を明らかにするために、ラジカル、加熱処理及び食材(マイワシ *Sardinops melanostictus*)調理が EPA のトランス異性化に及ぼす影響を調べた。二酸化窒素(NO_2)が EPA エチルエステルと反応して TEPA を生じさせたのに対し、ラジカル発生剤(AMVN)との反応では TEPA は生じなかった。この結果から、トランス異性化するために重要な反応は、活性メチレン基からの水素引き抜きではなく、二重結合へのラジカル付加であると考えられた。また、 200°C 、60時間加熱処理によって TEPA は生成されたが、焼く、煮る、電子レンジで加熱するといった家庭で通常利用される調理方法では TEPA は生じなかった。以上の結果から、TEPA は NO_2 と EPA の反応、および EPA の加熱によって生じることが示された。調理したマイワシからは TEPA が検出されなかったことから、調理中に TEPA が生じる可能性は低いと考えられた。

2) TEPA の特性を明らかにするために、酸化に対する安定性を評価した。本研究では触媒(*p*-トルエンスルフィン酸)を用いて調製した混合物をモデルとして用いた。有機溶媒中、水溶液中でのラジカル発生剤(AAPH, AMVN)に対する酸化安定性と大豆由来酵素(15-リポキシゲナーゼ)による酸化に対する安定性を評価した結果、TEPA はいずれにおいても EPA よりも酸化に対して安定であることが明らかになった。これは二重結合がトランス型に変化することによって、構造的に不安定な活性メチレン基が減少したためであると推測された。

3) ラット腹腔内浸潤細胞(PEC)を用い、ロイコトリエン B_4 (LTB_4) の放出抑制を指標として、TEPA が炎症に及ぼす影響を評価した。EPA を添加して培養した PEC はカルシウムイオノフォアに応答して放出される LTB_4 を有意に抑制したのに対し、TEPA は抑制しなかった。EPA 及び TEPA を添加培養した PEC の細胞膜リン脂質組成を分析した結果、EPA がリン脂質中に占める割合(20.9%)に対し、TEPA が占める割合(7.0%)は低いことが明らかになった。これらの結果から、TEPA は PEC の細胞膜リン脂質に取り込まれにくいこと、 LTB_4 の放出を抑制しないことが示唆され、TEPA の抗炎症作用は EPA よりも弱いと考えられた。

4) ヒト肝由来細胞の HepG2 細胞を用い、liver X receptor α ($\text{LXR}\alpha$), peroxisome proliferators-activated receptor α

(PPAR α)に制御される脂質代謝に及ぼす TEPA の影響を評価した。TEPA は LXR α 合成アゴニスト (T0901317) が誘導するトリアシルグリセロールの合成と脂質合成系酵素である fatty acid synthase, stearoyl CoA desaturase-1, glycerol-3-phosphate acyltransferase の mRNA 発現を EPA よりも有意に抑制した。また、TEPA は EPA と同等に LXR α の転写活性及び sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) の発現を抑制したが、EPA が LXR α , SREBP-1c の転写補助因子である peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator 1 β (PGC-1 β) の発現を増加させたのに対し、TEPA は減少させた。これらの結果から、TEPA によるトリアシルグリセロール合成の抑制は、TEPA が LXR α のアンタゴニストとして機能し、SREBP-1c の発現を抑制することに加え、PGC-1 β の発現を抑制することによるものであることが示唆された。また、TEPA は PPAR α をトランスフェクトした HepG2 細胞において、CPT1 の mRNA 発現を EPA よりも有意に誘導し、TEPA は EPA よりも PPAR α を活性化することで脂肪酸の β 酸化を亢進することが示唆された。以上の結果から、TEPA は EPA よりも強い脂質代謝改善作用がある可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

リノール酸やオレイン酸などの不飽和度の低い脂肪酸のトランス異性体は動脈硬化の危険因子として欧米などで規制の動きが強まっている。しかしながら、高度不飽和脂肪酸トランス異性体に関する研究は少なく、不明な点が多い。本論文は代表的な高度不飽和脂肪酸である EPA のトランス異性体の生成機構と生理活性を明らかにすることを目的としたものであり、成果として評価できる点は以下の通りである。

1) TEPA の調製と分析方法を確立した。本研究で得られた成果により、他の高度不飽和脂肪酸トランス異性体の生理活性をより簡便に評価することが可能となる。これは学术界のみならず産業界に貢献する成果として高く評価できる。

2) TEPA の生成機構を明らかにするために、ラジカル及び加熱処理が二重結合のトランス異性化に及ぼす影響を評価した。その結果、TEPA は NO₂ と EPA の反応と EPA の加熱によって生じることが示された。生体内で発生するラジカルとの反応によって TEPA が生じるという知見は非常に興味深い。今後は動脈硬化の早期マーカーとして TEPA を応用利用できる可能性が考えられ、研究の発展が期待される。

3) TEPA の酸化安定性、炎症に及ぼす影響、脂質代謝に及ぼす影響を評価しその機構を解明した。本研究により①トランス構造が酸化に対して安定である、② TEPA は細胞膜に取り込まれにくい、③ TEPA は核内受容体のリガンドとなる、という新知見が得られた。

4) TEPA は EPA よりも強い血清脂質低下作用を有していることを見出し、これは TEPA が LXR α のアンタゴニストとして EPA と同等に機能することに加え、TEPA が SREBP-1c の転写補助因子 PGC-1 β の発現を抑制するためであることを明らかにした。この機構はこれまでに報告のない極めて重要な知見であり、PGC-1 β が血清脂質改善を目的とした医薬品ならびに機能性食品の新規ターゲットとなりうることを示すものである。

以上のように、本論文は TEPA の生成機構と生理活性を明らかにするとともに、今後の応用利用につながる新発見を報告しており、その成果は海洋生物資源利用学、水産化学、食品機能学、脂質代謝学などの学術分野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19年2月16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。