

平成22年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580138  
 研究課題名（和文） リポキシゲナーゼによる n-3 系脂肪酸代謝と新規生理活性物質生成の解析  
 研究課題名（英文） Metabolism of n-3 polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases and production of novel bioactive agents  
 研究代表者  
 地阪 光生（JISAKA MITSUO）  
 島根大学・生物資源科学部・准教授  
 研究者番号：60243424

## 研究成果の概要（和文）：

n-3 系脂肪酸から、種々の生理活性物質が生合成されることが近年解明されてきている。これらの生合成過程には、種々のリポキシゲナーゼ（LOX）が関与することが想定されているが、未だ不明な点が多い。本研究では、精製した LOX および基質を用いて、LOX による n-3 系脂肪酸代謝を詳細に検討した。LOX には、特に、ヒトにおいて前立腺ガンの予防に関わりうる 15-LOX-2 と、そのマウスホモログである 8-LOX に着目した。15-LOX-2 は、DHA に 1 分子の酸素を付加し、17S-Hydroperoxyoctadecadienoic acid (17S-HPDHA) のみを特異的に生成した。一方、8-LOX は、速やかに 2 分子の酸素を付加し、10S,17S-diHPDHA および少量の 7S,17S-diHPDHA を生成した。この 10S,17S-diHPDHA は、ヒト血小板の凝集を抑制する働きを持つ。今回明らかとなった、8-LOX による 10S,17S-diHPDHA の選択的生成は、単一の酵素がこの物質を非常に高い選択性で生成する唯一の例である。

## 研究成果の概要（英文）：

Various bioactive agents are biosynthesized from docosahexaenoic acid (DHA). Although lipoxygenases (LOXs) are supposed to be involved in the biosynthetic pathways, details remain to be evaluated. In this research, we examined metabolism of DHA by LOX using purified enzymes and substrates. we focus on human 15-LOX-2, which may be involved in normal function of prostate tissue, and its mouse homologue, 8-LOX. 15-LOX-2 converted DHA solely to 17S-hydroperoxydocosahexaenoic acid (17S-HPDHA), while 8-LOX readily catalyzed double dioxygenation of DHA, producing 10S,17S-diHPDHA as a main product and 7S,17S-diHPDHA as a minor product. 10S,17S-diHPDHA, an isomer of neuroprotectin D1, is reported to suppress aggregation of human platelets. Our results may contribute effective production of some therapeutically significant DHA metabolites.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：リポキシゲナーゼ、n-3系脂肪酸、ドコサヘキサエン酸

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) n-3系脂肪酸の健康増進作用

脂肪酸の中には、我々自身では生合成できず摂取しなければならない必須脂肪酸が存在する。この必須脂肪酸は、n-6系脂肪酸およびn-3系脂肪酸に分類される。

主なn-6系脂肪酸は、リノール酸およびアラキドン酸である。リノール酸を摂取すれば、それよりアラキドン酸を生合成できる。リノール酸が欠乏すると、表皮から体液の漏水が引き起こされる。そのため、リノール酸は、必須のn-6系脂肪酸としてとりわけ重要である。

主なn-3系脂肪酸には、 $\alpha$ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA)、およびドコサヘキサエン酸 (DHA) がある。 $\alpha$ -リノレン酸を摂取すれば、それより EPA、さらには DHA へと変換できる。リノール酸欠乏が容易に目視できる皮膚症状を呈するのとは対照的に、n-3系脂肪酸の欠乏による明瞭な形態的異常はこれまで特定されていない。しかしながら、DHA が脳および網膜にとりわけ多く分布することから、n-3系脂肪酸が神経活動に関わっていることが推定され、また、それを示唆する個体レベルでの研究結果が多数報告されてきている。

### (2) n-3系脂肪酸の健康増進作用に関与する生理活性物質とその生合成

脂肪酸の生体内での存在場所は、主に、貯蔵エネルギー源としてのトリアシルグリセロールおよび生体膜を構成するリン脂質である。n-6系脂肪酸およびn-3系脂肪酸は、もっぱらリン脂質の構成成分として存在する。

リン脂質に含まれる脂肪酸は、それが構成する生体膜の物理化学的性質に大きく影響する。神経細胞では細胞膜に存在する多様なイオンチャネルや神経伝達物質受容体が正常に働く場を提供するうえで、n-3系脂肪酸の存在が重要であると考えられている。

一方で、リン脂質に含まれる多価不飽和脂肪酸は、種々の生理活性物質を生合成する出発物質でもある。その顕著な例は、リン脂質に含まれるn-6系脂肪酸であるアラキドン酸に由来する種々の生理活性物質である。これらはエイコサノイドと総称される。この中には炎症を引き起こすものがあり、その作用の制御が健康を維持するうえでの重要な課題

となっている。

近年、リン脂質に含まれるn-3系脂肪酸からも、種々の生理活性物質が生合成されることが解明されてきた。その発端は、炎症の緩解過程を制御する種々の物質の発見である。先ず EPA に由来する物質群が発見され、これらは Resolvin E 類と命名された。その後、DHA に由来するものも発見され、こちらは Resolvin D 類および Neuroprotectin D1 (NPD1) と命名された。NPD1 は、神経細胞の細胞死を抑制し、神経細胞を保護する作用にちなむ名称である。

アラキドン酸に由来する種々のエイコサノイドの生合成系は詳細に解明されてきている。しかしながら、n-3系脂肪酸に由来する物質については、リポキシゲナーゼ (LOX) が関与することが示唆されているものの、詳細には不明な点が多い。

### (3) 本研究者のこれまでの LOX 研究

LOX は、多価不飽和脂肪酸に位置および立体特異的に分子上酸素を付加し、脂肪酸ヒドロペルオキシドを生合成する酵素である。本研究者は、特に表皮組織で新たに発見された LOX を中心に、これらの酵素の反応特性を詳細に検討してきた。特に、マウス表皮において発癌プロモーターにより誘導される 8-LOX およびそのヒトホモログである 2 型の 15-LOX (15-LOX-2) に着目してきた。

8-LOX および 15-LOX-2 は、各々、アラキドン酸の 8 位および 15 位に、いずれも S 配置でヒドロペルオキシ基を導入する酵素である。両者は、アミノ酸レベルで 78% の相同性を有することから、明らかに互いにホモログであるにも関わらず、反応特異性は全く異なる。これらの反応特性を精査するなかで、8-LOX が、アラキドン酸の 8 位に反応した後、さらに 15 位に 2 分子目の酸素を付加することを見いだした。このような 2 重酸素付加は、15-LOX-2 では認められなかった。このことから、8-LOX は条件次第では「15-LOX」様の反応が可能であること、また、哺乳動物の LOX では唯一効率的な 2 重酸素付加を行える酵素であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

n-3系脂肪酸に由来する種々の生理活性物質の生合成には、複数の酸素付加反応が含まれる。これらには種々の LOX が関与することが示唆されているが、いまだ不明な点が多

い。そこで、表皮組織に存在する LOX を中心に、これらの酵素と n-3 系脂肪酸との反応を詳細に解析することで、n-3 系脂肪酸に由来する生理活性物質の生合成機構を解明するとともに、n-3 系脂肪酸代謝の新たな可能性を開拓することを目的とした。今回主に用いた LOX は、表皮組織に多く存在するものである。しかしながら、これらの酵素は、他の臓器でも検出されているほか、むしろその発現部位は未だ全て解明されてはいない。そのため、本研究で解明される事実は、表皮組織にとどまらず、他の部位で発生する可能性が十分にある。このような事態に備える基盤事項の構築が、本研究の主たる目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 酵素の調製：表皮組織由来リポキシゲナーゼの cDNA を大腸菌発現ベクターである pET28a に組み込み、得られた大腸菌発現プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した。この菌株を培養し、IPTG により LOX の発現を誘導した。この菌体を破碎して得た粗抽出液に Ni-NTA 樹脂を加えてよく混合し、これをカラムに充填した。非吸着画分および低吸着画分を溶出させた後、250 mM のイミダゾールを含む溶出緩衝液で Ni-NTA 樹脂に強く吸着している画分を溶出させた。粗抽出液に添加する Ni-NTA 樹脂の量を調節することで、一段階の精製ながら、SDS-PAGE 上でほぼ均一な精製酵素を得ることができた。(2) 基質脂肪酸の調製：購入した脂肪酸には、既に少量の過酸化物が含まれていることが多い。これらの過酸化物は、位置および立体非特異的に分子状酸素が付加して生成したものである。これらが酵素反応の生成物に混入した場合、互いに区別することは非常に困難であるため、実験結果を適切に解釈できなくなる。そこで、基質として用いる脂肪酸は、それに既に含まれている過酸化物を除去するため、全て逆相 HPLC にて精製した。

(3) 酵素反応と反応生成物の分析：精製した酵素および基質を *in vitro* で反応させ、反応過程は紫外吸収スペクトルで、また、反応生成物は逆相・順相・キラル相の各種 HPLC により分析した。

(4) LOX 反応の迅速測定：脂肪酸ヒドロペルオキシドの検出に ferric-xylene orange (FOX) 法を適用し、LOX 反応で生成する脂肪酸ヒドロペルオキシドを微量かつ簡便に定量した。と生成物を詳細に分析した。反応生成物の分析これら精製した酵素と基質を用いて、反応特性および反応生成物を詳細に検討し、反応機構を解析した。一方、酵素反応の迅速な検出系の開拓を行った。

### 4. 研究成果

(1) 表皮系リポキシゲナーゼと基質との相

互作用に関する基礎的解析：各リポキシゲナーゼ (LOX) と基質脂肪酸との相互作用の仕方は、酵素の多機能性の基礎となる。LOX と基質脂肪酸との相互作用は、互いの極性/非極性相互作用に大きく影響される。今回用いたヒト 15-LOX-2 の基質結合部位は、基質脂肪酸の非極性部分であるメチル末端側を受け入れると考えられている。そのため、脂肪酸の極性基であるカルボキシ基をメチエステル化すると、両側から酵素の基質結合部位に侵入でき、それに応じて 2 通りの反応位置特異性が生じると予想された。一方で、ヒト 15-LOX-2 のマウスホモログである。8-LOX では、その基質結合部位は基質脂肪酸の極性基であるカルボキシ基を受け入れると考えられる。そこで、これら両酵素を用い、アラキドン酸メチル (AA-Me) およびリノール酸メチル (LA-Me) との反応を比較検討した。15-LOX-2 は、AA-Me の 5S および 15S の両位置に酸素を付加した。一方、8-LOX は、5S、8S、12S および 15S の 4 カ所に、ほぼ同じ効率で酸素を付加した。いずれも、反応の位置特異性のみが変化し、立体特性は保持された。この結果から、8-LOX の基質結合部位は、基質脂肪酸の非極性部分も受け入れることができ、さらに、15-LOX-2 のより多様な位置選択性を持ちうることを示唆された。この結果は、n-3 系脂肪酸から種々の生理活性物質を生合成する際に、8-LOX は 15-LOX-2 よりも多様な反応が可能であることを示唆するものであった。

(2) 表皮系 LOX によるドコサヘキサエン酸 (DHA) の代謝：15-LOX-2 は DHA と速やかに反応し、その反応の最終生成物は、DHA の 17S 位に酸素が付加して生じる 17S-Hydroperoxydocosahexaenoic acid (17S-HPDHA) のみであった。これは、15-LOX-2 の基質結合部位が、基質脂肪酸の極性部分であるカルボキシ基を受け付けない性質に一致する反応特性である。一方、8-LOX では、2 分子の酸素の付加で生じる diHPDHA が速やかに蓄積した。LOX が 2 分子の酸素を付加する反応は、通常、2 段階からなる。1 段階は、基質脂肪酸に 1 分子目の酸素を特異的に付加してモノヒドロペルオキシドを生成する段階である。2 段階は、モノヒドロペルオキシドを基質に、2 分子目の酸素を付加し、ジヒドロペルオキシドを生成する段階である。8-LOX とアラキドン酸との反応では、まず、アラキドン酸が全て 8-ヒドロペルオキシドへと変換された後、この 8-ヒドロペルオキシドがさらに 8, 15-ジヒドロペルオキシドへと変換されることをこれまでに報告した。しかしながら、8-LOX と DHA との反応では、先ずモノヒドロペルオキシドが蓄積するものの、モノヒドロペルオキシドの出現後、速やかに

ジヒドロペルオキシドが生成し始めた。この生成物を精査したところ、主要生成物として10S, 17S-ジヒドロペルオキシドが検出された他、副生成物は、非常に少量の7S, 17S-ジヒドロペルオキシドのみであった。一方で、8-LOX および DHA の反応でジヒドロペルオキシドが速やかに生成する仕組みを解析するために、この反応過程で生成するモノヒドロペルオキシドを分析した。その結果、10S-ヒドロペルオキシドが主要な分子種ではあったが、同時に17S-ヒドロペルオキシドおよび少量の7S-ヒドロペルオキシドもまた検出された。この結果は、DHA が8-LOX の基質結合部位に結合する際には、アラキドン酸と同様に極性基であるカルボキシ基から主に侵入するが、一部、非極性基であるメチル末端側からも侵入できることを示唆している。このことは、DHA およびそのモノヒドロペルオキシドに対する8-LOX の基質選択性に影響を与える。8-LOX のアラキドン酸に対する反応効率(kcat/Km)は、アラキドン酸-8-ヒドロペルオキシドのその約10倍である。そのため、大部分のアラキドン酸が8-ヒドロペルオキシドに変換されるまで、2段階目の酸素付加は起こらない。一方、8-LOX のDHA およびそのヒドロペルオキシドに対する反応効率には、あまり違いがないからこそ、DHA からは速やかにジヒドロペルオキシドが生成することが想定される。異常より、今回得られた結果は、DHA を種々の生理活性物質へと誘導するうえで、8-LOX は、他のLOX と比べ、非常に有利な反応特性を有することを示唆している。これは、マウスの生理を考えるうえで非常に重要である。マウスは、医学研究には不可欠なモデル動物であるがため、ヒトとの類似点および相違点を明確に把握しておく必要がある。今回明らかとなったヒト15-LOX-2 およびマウス8-LOX の違いは、ヒトとマウスの顕著な違いの一つと位置づけられる。また、これら表皮系LOX がDHA 代謝物の製造に非常に有益であることも指摘できる。

DHA に由来する種々の生理活性物質が近年、解明されてきている。これらの生合成にはLOX が関わると想定されているが、その詳細は未だ不明である。本研究で得られた成果は、DHA の代謝に表皮系LOX もまた深く寄与していることを示唆するものである。また、そこには、ヒトとマウスにおいて、DHA 代謝の経路が異なる可能性も示唆された。

(3) LOX 反応の微量高感度迅速定量法の開拓：LOX 反応の測定には、紫外吸収スペクトルまたは反応生成物の極大吸収波長における紫外吸収の経時変化を測定するのが一般的である。しかしながら、この方法は、一度に1反応した測定できないため、多数の反応

を効率良く実施するには不向きである。そこで、多数のLOX 反応を効率的かつ微量で測定できる方法の開拓は、本研究分野においても非常に重要である。ここでは、LOX 反応で生成する脂肪酸ヒドロペルオキシドを高感度かつ迅速に定量するために、Ferric-xylene orange (FOX) 法の適用を検討した。この反応は2段階からなる。第1段階では、LOX 反応の生成物である脂肪酸ヒドロペルオキシド2価の鉄イオンとが反応して、鉄イオンの3価への酸化とヒドロペルオキシ基の酸素ラジカル(R-O $\cdot$ )および水酸化物イオンへの分解が起こる。ついで、第2段階では、3価の鉄イオンとキシレノールオレンジとが会合し、460-600 nm に強い極大吸収を持つ錯体を形成する。FOX 法はこの錯体を分光計で測定することにより、反応系に存在するヒドロペルオキシドを定量する方法である。近年、リン脂質を混在させることにより、錯体の極大吸収波長が610 nm へとレッドシフトすることが発見され、より夾雑物による吸収の影響を受けにくい変法が開発されてきている。そこで、本研究では、この修正FOX 法を微量測定に適用した。通常の変王スケール(数ml)の10分の1スケールにおける精密分析を行った。測定される吸光度とヒドロペルオキシド濃度との間には良好な比例関係が認められ、微量測定に適用できることが判明した。さらに、LOX 反応における紫外吸収スペクトルの経時変化と折々に修正FOX 法で測定されるヒドロペルオキシド濃度とはよく一致することが判明した。この結果より、多数のLOX 反応を同時に効率よく、かつ微量スケールで測定することが可能となった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. X. Chu, K. Nishimura, M. Jisaka, T. Nagaya, F. Shono, and K. Yokota, Up-regulation of adipogenesis in adipocytes expressing stably cyclooxygenase-2 in the antisense direction. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 91, 1-9, 2010, 査読有

2. Y. Kawakami, N. Kubota, N. Ekuni, T. Suzuki-Yamamoto, M. Kimoto, H. Yamashita, H. Tsuji, T. Yoshimoto, M. Jisaka, J. Tanaka, H. F. Fujimura, Y. Miwa, Y. Takahashi, Tumor-Suppressive Lipoxigenase Inhibit the Expression of c-myc mRNA Coding Region Determinant-Binding Protein/Insulin-Like

Growth Factor II mRNA-Binding Protein 1 in Human Prostate Carcinoma PC-3 Cells. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73, 1811-1817, 2009, 査読有

3. X. Chu, Y. Ageishi, K. Nishimura, M. Jisaka, T. Nagaya, F. Shono, and K. Yokota, Development of enzyme-linked immunosorbent assay for 8-iso-prostaglandin F2(alpha), a biomarker of oxidative stress in vivo, and its application to the quantification in aged rats. Journal of Pharmacological and Biomedical Analysis, 50, 911-916, 2009, 査読有

4. X. Chu, L. Xu, K. Nishimura, M. Jisaka, T. Nagaya, F. Shono, and K. Yokota, Suppression of adipogenesis program in cultured preadipocytes transfected stably with cyclooxygenase isoforms. Biochimica et Biophysica Acta, 1791, 273-280, 2009, 査読有

5. K. Fukuzawa, M. Sano, K. Akai, J. Morishige, A. Tokumura, and M. Jisaka, Measurement of Lipid Hydroperoxides by the Ferric-Xylenol Orange Method (2) Application to Lipoxygenase Assay. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 55, 92-98, 2009, 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. Mitsuo Jisaka, Physiological function of skin-related lipoxygenases, 4<sup>th</sup> International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), 平成21年5月25日, 学術総合センター

2. 地阪光生、細川 歩、西村浩二、長屋 敦、横田一成、マウス 8S-リポキシゲナーゼによるドコサヘキサエン酸の酸素添加反応. 第50回日本脂質生化学会、平成20年6月6日、徳島県郷土文化会館

3. 細川 歩、若槻 恵、西村浩二、長屋 敦、横田一成、地阪光生、表皮系リポキシゲナーゼによるドコサヘキサエン酸代謝の可能性、日本農芸化学会2008年度大会、平成20年3月26日、名城大学天白キャンパス(名古屋)

4. M. Jisaka, K. Nishimura, T. Nagaya, K. Yokota, Comparison of the substrate-binding sites of mouse 8-lipoxygenase and human 15-lipoxygenase-2 based on oxygenation of methyl arachidonate and methyl linoleate.

The 10<sup>th</sup> Conference on the Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases, 平成19年9月17日, La Centre Sheraton Hotel (Montreal, Canada)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
島根大学生物資源科学部ホームページ  
(<http://www.life.shimane-u.ac.jp>)

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
地阪 光生 (JISAKA MITSUO)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 60243424

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
横田 一成 (YOKOTA KAZUSHIGE)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 90158361

長屋 敦 (NAGAYA TSUTOMU)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 50284021

西村 浩二 (NISHIMURA KOHJI)  
島根大学・総合科学研究支援センター・助教  
研究者番号: 30304257

福澤 健治 (HUKUZAWA KENJI)  
安田女子大学・薬学部・教授

高橋 吉孝 (TAKAHASHI YOSHITAKA)  
岡山県立大学・保険福祉学部・教授  
研究者番号: 10236333