

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：平成 19 年度～平成 21 年度
 課題番号：19780162
 研究課題名 (和文) 天然由来の微量抗酸化活性脂質 (フラン脂肪酸) の薬理作用の解明
 研究課題名 (英文) Studies on the biological activity of furan fatty acids
 研究代表者
 協本 敏幸 (WAKIMOTO TOSHIYUKI)
 静岡県立大学薬学部・講師
 研究者番号：70363900

研究成果の概要 (和文) : 天然に広く存在する微量抗酸化活性脂質であるフラン脂肪酸の単離および検出方法を確立し、これまでにその存在が報告されてこなかったミドリイガイにフラン脂肪酸が含まれていることを明らかにした。その生物活性を明らかにするために、ラット関節炎モデルに対する抗炎症活性を評価したところ、EPA よりも強力な抗炎症活性を示した。本研究によってフラン脂肪酸の *in vivo* での生物活性を初めて明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文) : Furan fatty acid is known as naturally occurring in various organisms but rare fatty acid. The elucidation of biological activity of furan fatty acid has been limited to antioxidant activity *in vitro* due to paucity of this fatty acid. In this study, isolation and semi-synthesis of this fatty acid were established, which enable us to disclose more potent anti-inflammatory activity of furan fatty acid than that of EPA.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|-----------|---------|-----------|
| 19年度 | 1,200,000 | 0 | 1,200,000 |
| 20年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 21年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 600,000 | 3,800,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：フラン脂肪酸、ミドリイガイ、抗炎症活性

1. 研究開始当初の背景

フラン脂肪酸は 1974 年にサケ科魚類の一種、ノーザンパイクより見つかった新規の脂肪酸である。その構造的な特徴はアルキル 4 置換のフラン環を有する点にある。このようなアルキル 4 置換のフラン環は電子豊富な性質が故に不安定であり、天然物としては極めて稀な骨格である。特に淡水魚や海水魚、

カメ等の水圏生物に多く見いだされている他、オリーブオイルなどの陸上植物にも含まれていることが明らかにされている。天然に広く存在する脂肪酸であることが分かっているが、その含有量は非常に微量であり、かつシリカゲルクロマトグラフィー等で分解するほど不安定であることから、その機能、生理的意義はまったく未解明であった。生物

活性に関する唯一の研究例は杏林大学の岡田らによる *in vitro* での抗酸化活性の報告のみであり、*in vivo* での評価等、その他の生物活性についてはまったく研究例はなかった。ドイツの Gerhald Spitteller 教授は魚油に含まれる微量な抗酸化活性脂質であるフラン脂肪酸が魚油の生理活性を担う活性物質の一つである可能性を指摘しており、この仮説が正しければ、EPA、DHA に続く新たな生理活性脂肪酸としてフラン脂肪酸の重要性が浮かび上がる。

ニュージーランド近海に生息するミドリイガイ (*Perna canaliculus*) はイガイ科に属する二枚貝である。外見はムール貝と似ているが、外殻が緑色を呈する点が大きな特徴である。ニュージーランド先住民であるマオリ族は、古くからこの貝の生理作用に着目しており、滋養強壮作用を期待して常食してきた。その後の疫学的な研究によって、この貝には関節炎の予防効果や症状の改善作用が認められ^{1,2)}、抗炎症作用を示すサプリメントとして開発が進められてきた。しかし活性成分が極めて不安定な成分であったため、ミドリイガイの活性を保持した製品開発は容易ではなかった。現在では凍結乾燥物を超臨界二酸化炭素で抽出したオイル (Lyprinol) が市販されている。その活性成分は脂質成分に由来すると考えられており、探索研究も進められてきたが、未だに生物活性成分の特定には至っていない。すでにヒトでの臨床試験報告があることから、関節炎に対するサプリメントとして欧米で市販されており、その活性成分の特定が待たれている。

2. 研究の目的

本研究ではフラン脂肪酸の 1) 単離・精製、2) 半合成、3) 全合成方法を確認し、天然の微量成分の供給方法を確認する。さらにフラン脂肪酸の *in vivo* での生物活性を明らかにする。脂質の関与が疑われながら、その生物活性物質が特定されていない研究対象としてニュージーランド産ミドリイガイを選び、フラン脂肪酸の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まずフラン脂肪酸の生物活性を明らかにするために、その試料の調整方法の確認を試みた。天然において微量にしか存在しないフラン脂肪酸であるが、サケ科魚類の特に生殖巣には比較的高濃度で含まれていることが知られている。そこで、サケ白子からの単離・精製を試みた。また、サメの胆汁中には高濃度でフラン脂肪酸代謝産物が含まれていることを明らかにしており、その代謝産物を原料に用いて半合成方法の確認を試みた。さらに、フラン脂肪酸の全合成方法の報告は

これまで一例のみであり、柔軟な構造改変に対応できる合成経路の確認を試みた。

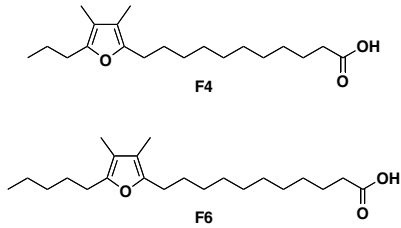
以上の方法によってフラン脂肪酸の調整方法を確認し、その *in vivo* における生物活性を明らかにするためにラット関節炎モデルを用いた抗炎症活性試験を行った。

また、ミドリイガイの脂肪酸組成の分析を行い、フラン脂肪酸が存在することを明らかにし、その含有量および抗炎症活性への寄与を上記活性試験によって検討した。

4. 研究成果

Lyprinol はステロールエステル、ステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸やリン脂質等の脂質成分によって構成されるオイルである。これまでの活性成分の探索研究において、我々ならびにオーストラリアのグループがともに脂肪酸画分が活性を示すことを明らかにしている。そのため、GC-MS を利用した脂肪酸組成の詳細な分析もすでに報告されている。ミドリイガイには、他の海洋生物と同様に高度不飽和脂肪酸 (PUFA) が高濃度で含有されている。EPA にはすでに抗炎症効果が知られていることから、緑イガイの作用もこれらの高度不飽和脂肪酸が活性本体だと考えられてきた。しかしながらそれらは緑イガイ特有の成分ではない上に、魚油を対照群に用いた活性試験において Lyprinol が圧倒的に強い抗炎症活性を示すことから、高度不飽和脂肪酸だけにその抗炎症作用を帰結する事はできない。その上、活性成分は極めて不安定な性質を有するはずであり、我々は脂肪酸画分に含まれる不安定活性成分を見いだす必要があった。また一方で、炎症には活性酸素が関与しており、酸化ストレスを軽減できる抗酸化活性物質は抗炎症活性に寄与する可能性が報告されている。そこで、天然油脂の微量脂肪酸であり、抗酸化活性を示すフラン脂肪酸に着目した。フラン脂肪酸は 1974 年にサケ科魚類より見いだされた新規脂肪酸である。その後の研究において、魚のみならずカエル、カメやオリーブオイルなどの植物オイルにも検出され、広く天然に存在する微量脂肪酸であることが分かっている。また *in vitro* の評価系において、ビタミン E をしのぐ一重項酸素消去能を示す事が明らかにされている。フラン環を有する天然物は数多く知られ、珍しいものではない。ところがフラン環の全ての炭素にアルキル基が置換した 4 置換フラン環は非常に電子豊富であり、その性質が故に強力な抗酸化活性を示す一方、極めて酸化されやすい性質を有する。そのため、4 置換フラン環を有する天然物はこれまでほとんど報告例がない。フラン脂肪酸は不安定な性質の上に微量にしか存在しないため、その *in vivo* における生理機能についてはこれまでまったく不明であつ

た。



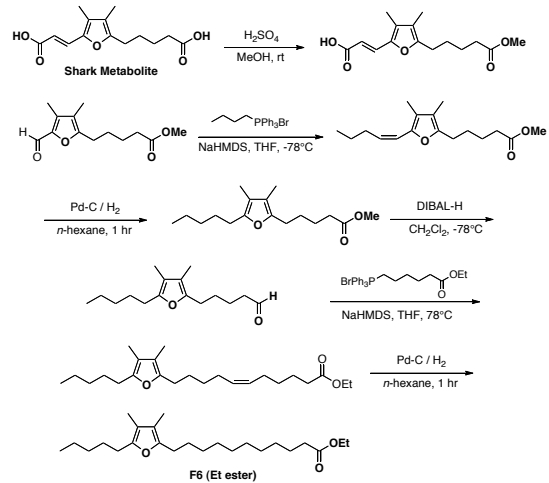
そこで我々は Lyprinol の脂肪酸画分よりフラン脂肪酸の探索を試みた。フラン脂肪酸は微量成分である上に、分離挙動が高度不飽和脂肪酸とほとんど一致するために、フラン脂肪酸を検出することは比較的難しい。また前述の GC-MS による脂肪酸組成の分析研究においてもフラン脂肪酸は検出されていない。そこでフラン脂肪酸を分離する目的で化学変換処理を行った。すなわち、遊離脂肪酸をジアゾメタンでメチル化後、高度不飽和脂肪酸を接触還元によって飽和脂肪酸へ変換し、シリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーで分離した。その結果、Lyprinol 中にフラン脂肪酸が比較的高含量で含有されている事を明らかにした。その含量は F4 および F6 の合計で 4 mg/g 程度であり、オリーブオイル等に比較して圧倒的に多い含量であった。

| | F6 | F4 |
|----------------------------|--------|--------|
| Lyprinol 1 g 中の 含量 (μg) | 2.2 mg | 1.9 mg |

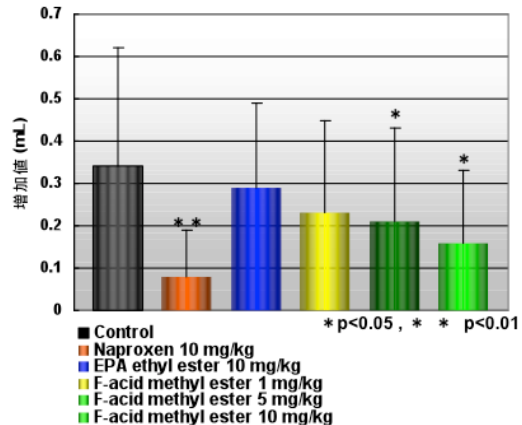
つぎにフラン脂肪酸の抗炎症活性を検討するために、フラン脂肪酸の大量調製方法を検討した。これまでに 4 置換フラン環を含むフラン脂肪酸の全合成例は、数例報告されているのみで収率は低い。そこで我々はフラン脂肪酸代謝産物に着目した。フラン脂肪酸は側鎖のみが β-酸化等の代謝分解を受け、残ったフラン環は脂質代謝の終着点である胆汁に濃縮される。そこでサメ胆汁を用いてフラン脂肪酸代謝産物を探索したところ、乾重量当たり約 10%含まれていることが分かった。またこの代謝産物はフラン環の一方の側鎖のみに 2 重結合が含まれており、各側鎖を選択的に修飾することが可能である。そこでこの代謝産物を利用してフラン脂肪酸の半合成を行うことにした。両端のそれぞれの側鎖をオレフィンの OsO₄-NaIO₄ 酸化およびエステル化の DIBAL 還元によって選択的にアルデヒドへ導き、Wittig 反応で側鎖を伸長してフラン脂肪酸へ導いた。この方法によって数百 mg スケールのフラン脂肪酸を調製

し活性試験に供した。

実際の抗炎症活性試験は、アジュバント関節炎モデルラットを用いた。0 日目に SD 系雌性ラットの右後足にアジュバントを注入し、10 日目以降に発症する 2 次炎症の指標として非処置足の浮腫体積を計測し、抗炎症活性の評価を行った。その結果、フラン脂肪酸は 0.5 mg/kg の経口投与で浮腫の抑制を示した。一方で、EPA は同じ投与量ではそのような抑制効果は示さなかった。このことか



足浮腫容積増加値



ら、Lyprinol の脂肪酸画分が示す抗炎症作用の活性物質はフラン脂肪酸である可能性が高いと考えている。

今後はより詳細に分離画分の活性評価を行うとともに、緑イ貝の抗炎症作用におけるフラン脂肪酸の寄与率を明らかにしていきたい。また、自然界に広く存在しているにもかかわらず、機能が未解明なフラン脂肪酸について、その生理機能を明らかにしていきたいと考えている。

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 10 件)

- 1) Y. Sakai, K. Ikeuchi, Y. Yamada, T. Wakimoto, T. Kan, Modified Julia-Kocienski reaction promoted by means of *m*-NPT (Nitrophenyltetrazole) sulfone.
Synlett, **20**, 827-829 (2010).
- 2) T. Furuta, H. Onuki, M. Mochizuki, M. Ito, M. Inai, T. Wakimoto, T. Kan, Solid support synthesis of artificial phospholipids.
Synlett, 3373-3377 (2009).
- 3) T. Wakimoto, M. Nitta, T. Chiba, Y. Yiping, K. Tsuji, T. Kan, H. Nukaya, M. Ishiguro, M. Koike, Y. Yokoo, Y. Suwa, Structure-activity relationship study on $\alpha 1$ adrenergic receptor antagonists from beer.
Bioorg. Med. Chem. Lett. **19**, 5905-5908 (2009).
- 4) T. Ishii, K. Minoda, M. -J. Bae, T. Mori, Y. Uekusa, T. Ichikawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, T. Nakayama, Binding affinity of tea catechins for human serum albumin: characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column.
Mol. Nutr. Food Res. **54**, 1-7 (2010).
- 5) H. Ishida, T. Wakimoto, Y. Kitao, S. Tanaka, T. Miyase, H. Nuakaya, Quantitation of chafuroside A and B in tea leaves and isolation of prechafuroside A and B from oolong tea leaves.
J. Agric. Food. Chem. **57**, 6779-6786 (2009).
- 6) Y. Aihara, A. Yoshida, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Akizawa, M. Konishi, T. Kan, Regioselective synthesis of methylated epigallocatechin gallate via nitrobenzenesulfonyl (Ns) protection group.
Bioorg. Med. Chem. Lett. **19**, 4171-4174 (2009).
- 7) T. Furuta, M. Nakayama, H. Suzuki, H. Tajimi, M. Inai, H. Nukaya, T. Wakimoto, T. Kan, Concise synthesis of chafuroside A and B.
Org. Lett. **11**, 2233-2236 (2009).
- 8) M. Inai, T. Goto, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, Stereocontrolled total synthesis of (-)-myriocin.
Tetrahedron: Asymmetry, **19**, 2771-2773 (2008).

- 9) Y. Koizumi, H. Kobayashi, T. Wakimoto, T. Furuta, T. Fukuyama, T. Kan, Total synthesis of (-)-Serotobenine.
J. Am. Chem. Soc. **130**, 16854-16855 (2008).
- 10) N. Yamaji, Y. Yokoo, T. Iwashita, A. Nemoto, M. Koike, Y. Suwa, H. Masuya, T. Wakimoto, K. Tsuji, H. Nukaya, Structural Determination of Two Active Compounds Bind to the Muscarinic M3 receptor in Beer.
Alcohol Clin. Exp. Res., **31**, S9-S14 (2007).

[学会発表] (計 6 件)

- 1) T. Wakimoto, H. Kondou, K. Tsuji, T. Kan, Anti-inflammatory activity of furan fatty acid
The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (Tokyo)
講演要旨集、p.99、2009年5月25日
- 2) 脇本敏幸、近藤 光、末永聖武、石田均司、辻 邦郎、糠谷東雄：緑イ貝中の抗炎症活性物質の探索
平成20年度日本水産学会春季大会（静岡）、講演要旨集、p.84、2008年3月30日
- 3) 近藤 光、脇本敏幸、末永聖武、石田均司、辻 邦郎、糠谷東雄：緑イ貝中の抗炎症活性成分の探索
日本薬学会年会 128 年会（横浜）、講演要旨集（2）、p.77、2008年3月26日
- 4) 脇本敏幸：緑イ貝中の微量抗酸化性脂質と抗炎症作用について
日本農芸化学会、中部支部第151回例会若手シンポジウム（静岡）、2007年11月17日
- 5) 脇本敏幸：緑イ貝中の抗炎症活性物質の探索
第2回 化学生態学研究会（函館）、2007年7月21日
- 6) 脇本敏幸、末永聖武、石田均司、辻 邦郎、糠谷東雄：緑イ貝中の抗炎症活性物質の探索
第21回 海洋生物活性談話会（鹿児島）、2007年5月19日

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称：自己免疫疾患処置剤
発明者：脇本敏幸
権利者：辻邦郎

種類：特許
番号：2007-231176
出願年月日：2007年8月20日
国内外の別：国内

名称：高脂血症処置剤
発明者：脇本敏幸
権利者：辻邦郎
種類：特許
番号：2007-231177
出願年月日：2007年8月20日
国内外の別：国内

名称：フラン脂肪酸乃至はその誘導体を含有する皮膚外用剤
発明者：脇本敏幸
権利者：辻邦郎
種類：特許
番号：2007-231178
出願年月日：2007年8月20日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇本 敏幸 (WAKIMOTO TOSHIYUKI)
静岡県立大学・薬学部・講師
研究者番号：70363900