

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15472

研究課題名（和文）海藻由来酵素を利用した共役型高度不飽和脂肪酸の合成と腫瘍成長抑制へ向けた応用

研究課題名（英文）Synthesis of conjugated fatty acids using enzymes from seaweeds and their antitumor effects

研究代表者

本間 太郎（Honma, Taro）

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：30707930

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：共役脂肪酸は、がん細胞に対して細胞毒性を持つことが報告されている。本研究において、共役脂肪酸を含む海藻類をスクリーニングした結果、褐藻ウミウチワ（*Padina arborescens* Holmes）において、共役脂肪酸を含有していることが示唆された。そこで、褐藻ウミウチワから粗酵素液を抽出し、 γ -リノレン酸を基質として添加したところ、共役テトラエン型脂肪酸であるパリナリン酸を合成することに成功した。さらに、細胞実験により、パリナリン酸が殺がん細胞効果を有することも確認できた。以上より、褐藻ウミウチワの酵素を使用して、殺がん細胞効果を持つ共役脂肪酸を合成できることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、褐藻ウミウチワ由来酵素を使用して、一般的に食用油として用いられている多価不飽和脂肪酸から、殺がん細胞効果を持つ共役脂肪酸を合成できることを明らかとした。将来的に、当該酵素を人工的に合成することに成功すれば、共役脂肪酸を大量生産することも可能となる。日本は超高齢社会にあり、がんによる死者数は増加の一途を辿っている。今後、共役脂肪酸の安全性評価に関するデータが蓄積すれば、がん予防効果を持つ成分として、共役脂肪酸をサプリメント等として利用することも可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Conjugated fatty acids have been reported to have cytotoxic effects on cancer cells. In this study, screening of seaweed containing conjugated fatty acids revealed that *Padina arborescens* Holmes, a brown alga, contains such fatty acids. Then, a crude enzyme solution was extracted from *P. arborescens* and reacted with γ -linolenic acid as a substrate. As a result, the enzyme successfully synthesized parinaric acid, a conjugated tetraenoic fatty acid. Furthermore, cellular experiments confirmed that parinaric acid has a cytotoxic effect on cancer cells. Thus, it was demonstrated that a conjugated fatty acid with cytotoxic effects on cancer cells can be synthesized using the enzyme from *P. arborescens*.

研究分野：食品科学

キーワード：共役脂肪酸 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では高齢者の割合が急増している。今後さらにその割合は増加し、老化性疾患の罹患率も上昇することが予想される。「老化を防ぎ健康に高齢すること」は、個人の QOL (quality of life) の向上をもたらすばかりでなく、社会的・経済的にも非常に重要な意味を持っている。現在、日本人の死因として最も多くの割合を占めているのは悪性新生物(がん)である。がんの進行は食生活に深く依存していることから、食品によるがん予防が期待される。本研究では、がん予防が期待できる食品成分として、殺がん細胞効果を持つ共役脂肪酸に着目した。共役脂肪酸はバリエーションに富んだ構造が存在し、殺がん細胞効果の強い共役脂肪酸を探索することは非常に意義深いと考えた。

2. 研究の目的

共役脂肪酸はがん細胞に対して酸化ストレスを介した細胞死を誘導することが報告されている。共役脂肪酸は共役二重結合の数や位置、さらには鎖長の違いなどから非常に多くの種類が存在しており、生理活性の強さもそれぞれ異なることが予想される。そこで本研究では、共役脂肪酸の構造の違いと殺がん細胞効果の強さの関係について詳細を明らかにする前段階として、様々な天然物を対象に共役脂肪酸含有天然物のスクリーニングを行い、多様な構造の共役脂肪酸を入手することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 共役脂肪酸含有種子油における殺がん細胞効果の検証

これまでの研究で、オミナエシ科に属する *Centranthus ruber* の種子油において共役トリエン型脂肪酸の一種である γ -エレオステアリン酸、 δ -エレオステアリン酸、カタルブ酸が含まれており、*Valeriana officinalis* の種子油において、 γ -エレオステアリン酸、 δ -エレオステアリン酸が含まれていることを報告した。そこで、これらの種子油をヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞に添加し、WST-8 法による細胞増殖試験を行った。

(2) 様々な海藻中の共役脂肪酸の探索

(1)の研究では、共役トリエン型脂肪酸を含有する植物種子の存在を新規に見出した。一方、天然には植物種子以外にも共役脂肪酸を含有する天然物が報告されている。例えば、海藻類の一種である紅藻クシベニヒバにはエイコサペンタエン酸 (EPA) の幾何・位置異性体で共役二重結合を持つ共役 EPA が存在することが報告されている。そこで、共役脂肪酸を含む海藻類を探索すべく、様々な海藻類について脂質分析を行った。具体的には、日本近海で採取した計 12 種類の海藻について、Bligh & Dyer 法により脂質を抽出し、エタノール溶液としたものについて吸光度スペクトル測定を行い、共役構造に特徴的なスペクトルを持つ脂質を探索した。

(3) 海藻由来酵素を使用した共役脂肪酸の合成

(2)で共役脂肪酸の含有が示唆された海藻について、粗酵素液を抽出し、非共役型の脂肪酸から共役脂肪酸を合成することを試みた。具体的には、凍結乾燥した褐藻ウミウチワを粉末化し、Tris-HCl バッファーに懸濁したのちから葉緑体画分を抽出し、バッファーに再懸濁して粗酵素液とした。得られた粗酵素液に γ -リノレン酸を添加し、20℃ で 3 日間インキュベートした。得られた反応物について吸光度スペクトル測定により共役構造の有無を確認したほか、HPLC 分析により γ -リノレン酸とは異なる化合物のピークを検出・分取し、NMR および MS 分析により化合物の構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 共役脂肪酸含有種子油における殺がん細胞効果の検証

細胞増殖試験を行った結果、どちらの種子油においても、HeLa 細胞の生存率はコントロール群に比べて有意に低下した。一方、酸化防止剤である BHT を種子油と同時に添加したところ、細胞死は起こらなかった。したがって、*Centranthus ruber*、*Valeriana officinalis* の種子油は HeLa 細胞に対して酸化ストレスを介した殺がん細胞効果を示すと考えられた。

(2) 様々な海藻中の共役脂肪酸の探索

日本近海で採取した計 12 種類の海藻から抽出した脂質の吸光度スペクトルを測定した結果、褐藻ウミウチワにおいて、共役テトラエン構造に特徴的な 320 nm 付近の吸収極大が確認された。したがって、褐藻ウミウチワは共役テトラエン型脂肪酸を含有すると考えられた。しかし、褐藻ウミウチワの脂質含量が乾燥重量あたり 10%未満と微量であり、また、得られた 320 nm 付近の吸収極大も極めて小さかったことから、褐藻ウミウチワから抽出した脂質をヒトに应用するために十分な量を確保することは現実的ではなく、褐藻ウミウチワに存在する共役脂肪酸合成酵

素を使用し、非共役型の脂肪酸から共役脂肪酸を合成することが効率よく共役脂肪酸を得る方法であると考えられた。

(3) 海藻由来酵素を使用した共役脂肪酸の合成

褐藻ウミウチワから得られた粗酵素液に γ -リノレン酸を添加し、3 日間インキュベート後に脂質を抽出した結果、共役テトラエン構造に特徴的な 320 nm 付近の吸収極大が確認された。得られた反応物を HPLC 分析した結果、 γ -リノレン酸とは異なるピークが出現し、当該ピークは共役テトラエン型脂肪酸であるパリナリン酸とリテンションタイムが一致した。溶出液を分取し、NMR 分析を行った結果、パリナリン酸の標準品と同一のスペクトルが得られ、また、MS 分析の結果、分子量がパリナリン酸と一致した。したがって、褐藻ウミウチワ由来酵素は、 γ -リノレン酸からパリナリン酸を合成できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤永晃、本間太郎、山下 純、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 -eleostearic acidが種々のがん細胞における細胞死に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤永晃、山崎菜南子、小山智之、本間太郎、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 海藻由来酵素を利用した -リノレン酸、リノール酸の共役化
3. 学会等名 第21回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤永晃、山崎菜南子、小山智之、本間太郎、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 海藻由来酵素を用いた -リノレン酸の共役化と、殺がん細胞効果の検証
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤健太郎、山崎菜南子、伊藤永晃、小山智之、本間太郎、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 褐藻ウミウチワ (Padina arborescens Holmes) 由来酵素を利用した共役脂肪酸の合成に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤永晃、岡田理人、本間太郎、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 共役テトラエン型脂肪酸による殺がん細胞効果と作用メカニズムの検証
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤永晃、山崎菜南子、平川真悠、本間太郎、小山智之、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 褐藻ウミウチワ (<i>Padina arborescens</i> Holmes) 由来酵素を利用した 3, 6系脂肪酸の共役化
3. 学会等名 日本食品科学工学会令和3年度関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤永晃、佐藤育美、平川真悠、宮本 新、高橋 健、小山智之、高柳 勉、本間太郎、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 褐藻ウミウチワ (<i>Padina arborescens</i> Holmes) 由来酵素を利用した共役テトラエン型脂肪酸の合成
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間太郎、佐藤育美、白谷信拓、片岡 鉄、木村 亮、高柳 勉、北 加代子、鈴木俊英
2. 発表標題 <i>Centranthus ruber</i> と <i>Valeriana officinalis</i> 種子油による酸化ストレスを介した殺がん細胞効果
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小山 智之 (Koyama Tomoyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------