

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11702

研究課題名(和文) 果実に多く含まれる一価不飽和脂肪酸の動物細胞における代謝動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of the metabolic pathways of monounsaturated fatty acids from fruits in cultured cells.

研究代表者

岩城 俊雄 (Iwaki, Toshio)

大阪公立大学・大学院生活科学研究科 ・准教授

研究者番号：20295728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：現代社会における肥満や生活習慣病の増加は、深刻な健康課題であり、その治療と予防は喫緊の課題であり、脂質栄養学的な研究が重要となっている。我々の日常摂取する食品、特にナッツ類などの果実には、二重結合を一つ含む、多様な一価不飽和脂肪酸が豊富に含まれる。しかし、これらの脂肪酸の生理機能については、未だ十分な解明がされていない。本研究では、動物細胞に果実由来の一価不飽和脂肪酸を添加した場合の代謝動態変動を解析した。その結果、これらの脂肪酸は細胞膜画分に取り込まれ蓄積し、鎖長延長などの代謝を受けていることが確認された。これは、果実由来の一価不飽和脂肪酸が新規の生理作用を持つ可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会における肥満や生活習慣病の増加は、深刻な健康課題であり、その治療と予防は喫緊の課題であり、脂質栄養学的な研究が重要となっている。本研究では、果実由来の一価不飽和脂肪酸の細胞内代謝動態を明らかにし、新規生理作用の可能性を示唆した。すなわち、血液を含め身体を構成する細胞に本来含まれない果実由来の一価不飽和脂肪酸が、食事を通して細胞内に取り込まれ、細胞の生理作用に影響を与える可能性が見出された。今後、更なる研究を通して、これら脂肪酸の具体的な作用機序を解明し、食事内容による健康増進への応用可能性を検討していく必要があると考える。

研究成果の概要(英文)：Obesity and lifestyle diseases pose a growing health concern, highlighting the need for research on lipid nutrition to improve treatment and prevention. While the benefits of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) like EPA and DHA are well-established, the physiological roles of monounsaturated fatty acids (MUFAs) abundant in fruits, particularly nuts, remain unclear. This study investigated the metabolic fate of fruit-derived MUFAs in animal cells. We found these MUFAs were incorporated into the cell membrane fraction and underwent metabolic processes, including chain elongation. These findings suggest fruit-derived MUFAs may exert novel physiological effects, warranting further investigation.

研究分野：脂質栄養学

キーワード：一価不飽和脂肪酸 cis-バクセン酸 オレイン酸 GC

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満ならびに生活習慣病の増加によって、これら疾患の予防対策が喫緊の課題である。そのような状況のもと、EPA や DHA などの n-3 系、アラキドン酸や γ -リノレン酸などの n-6 系で知られる多価不飽和脂肪酸の生理機能については多くの研究成果があり、脂質栄養の観点から理解が進んでいる。一方、動物細胞の脂質構成成分の半分を占める一価不飽和脂肪酸については、オレイン酸(C18:1, n-9)やパルミトレイン酸(C16:1, n-7)でいくつかの重要な生理作用が報告されているのみである。さらに、動物細胞に多く含まれる n-7 の cis-バクセン酸や n-5, n-12 などの一価不飽和脂肪酸などは果実をはじめとする食品中に多量に含まれているにも関わらず、動物細胞における取込みや代謝などの研究はほとんど進んでいない。

不飽和結合を一つ含む一価不飽和脂肪酸としては、オリーブ油の主成分であるオレイン酸(cis-9-オクタデセン酸, Ole)がよく知られている。近年、このような一価不飽和脂肪酸摂取による高血圧や心臓疾患などの生活習慣病の予防効果が認められ、その栄養学的重要性が注目されている。n-7 系一価不飽和脂肪酸である cis-バクセン酸 (cis-11-オクタデセン酸, cis-Vac) は、オレイン酸の不飽和結合位置異性体であり、動物や微生物の膜構成脂質として知られ、近年問題となっているトランス脂肪酸生成の関連物質としても知られている。申請者が所属する研究グループでは、これまで動物・植物・藻類等における脂肪酸の体内動態について、重水素標識脂肪酸を用いて解析してきた。その結果、cis-Vac が特に果実中に多く含まれることを見出し、柿やマンゴー果肉では、含まれる C18 不飽和脂肪酸のほとんどが cis-Vac であると報告した。また、マウスにおいて食餌性に標識パルミトレイン酸を摂取させた実験では、脳と心臓において cis-Vac から Ole への新規な二重結合位置異性化反応産物が確認され、未解明の酵素反応の存在が示唆された。当研究グループでは後述の重水素標識脂肪酸を用いた GC-MS による一価不飽和脂肪酸の構造解析プラットフォームを開発し、添加した脂肪酸の鎖長延長反応をトレースすることで、脂肪酸代謝の解析技術を発展させてきた。近年、長鎖脂肪酸の鎖長延長経路については Elovl6 を中心とした代謝経路が明らかになりつつあるが、一価不飽和脂肪酸として細胞内に多く存在する Ole や cis-Vac についての代謝経路や生理機能は、殆ど明らかにされていない。また、最近 cis-Vac が血管内皮細胞等で抗炎症性の作用を示すなどの報告がなされ、これらの代謝動態についての解明が重要になりつつある。疾病予防の観点からは、摂取した脂肪酸の組成などの質的構成が、エネルギー代謝だけでなく、種々の生活習慣病、NASH、インスリン関連の生理作用、さらには学習や情動行動など、非常に広範な影響を示すことが明らかになりつつある。そのような状況の中で、EPA や DHA などの多価不飽和脂肪酸についての研究が精力的になされる一方で、EPA や DHA に比較して食品中に多量に含まれ、かつ広範な生理学的機能が予想される一価不飽和脂肪酸の細胞内動態や代謝がどのようなものであるかを解明することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、食品中に含まれる各種一価不飽和脂肪酸の代謝動態の解明を目指し、生活習慣病予防への寄与の観点から動物細胞への取込みや代謝動態などの栄養科学的研究基盤を確立する。これまで Ole(n-9 系)などの生理作用については詳細な研究が進められており、血中コレステロール低下作用などが知られている。ここでは、n-5, n-7, n-12, n-13 等の、本来細胞にほとんど含まれない C18 一価不飽和脂肪酸について、メチル化誘導体を動物培養細胞に対する添加実験を実施する。それら細胞の脂肪酸組成変動を解析し、添加脂肪酸の代謝変動や細胞膜画分脂肪酸組成変動への影響を検討する。また、遺伝子発現解析、転写翻訳産物の蓄積量解析より、新規の代謝経路の解明を目指す。これらの結果より、薬に頼らない食による脂肪摂取と疾病予防の新たな関係性を提示を目的とする。

3. 研究の方法

(1)重水素ラベル脂肪酸の培養細胞への投与による代謝動態の解析

C16 や C18 の一価不飽和脂肪酸の C2 位重水素標識体を合成する。これらを、各種培養細胞(血管平滑筋細胞 VSMC, ヒト血管内皮細胞 EAHy926, 3T3-L1 脂肪分化細胞など)の培地へ添加後、標識をもとに脂肪酸代謝変動の評価を行う。細胞抽出画分は、TLC 分画により極性脂質画分および中性脂肪画分、さらには脂質クラスごとに分画し、取り込まれた脂肪酸の細胞内局在について明らかにすることで、情報伝達経路や生理機能および代謝動態について新たな知見を得る。

(2)脂肪酸投与により誘導される炎症性関連転写因子等の解析

前項の実験で得られた結果をもとに、各種脂肪酸添加による炎症性関連因子(TNF- α , NF- κ B, IL-6, COX-2, MCP-1, PPAR 等)の発現誘導を ELISA, RT-qPCR などで解析することで、cis-Vac などの一価不飽和脂肪酸のもつ新たな生理機能の解明や応用研究へと発展させる基盤情報を取得する。

4. 研究成果

(1) Ole および cis-Vac 投与による VSMC 脂肪酸蘇生変動について

VSMC 細胞に Ole および cis-Vac を添加したところ, cis-Vac 添加では細胞膜極性脂質の cis-Vac 量が Ole 量をはるかに超えるまで増加した. 一方, Ole 添加では, このような逆転現象は見られなかった (図 1). つまり, Ole は cis-Vac に置き換わることができるが, cis-Vac は Ole とは置き換わらない一定量が存在していることがわかった. さらに, PC, PE, PS, SPM の各リン脂質クラスごとの解析では, PC と PE においてこの傾向が確認された. これまでの研究で cis-バクセン酸が糖新生を阻害することや脳卒中易発症高血圧自然発症ラットで cis-バクセン酸合成が低下することが報告されており, その生理機能は生活習慣病などの疾病と関連があることが示唆される.

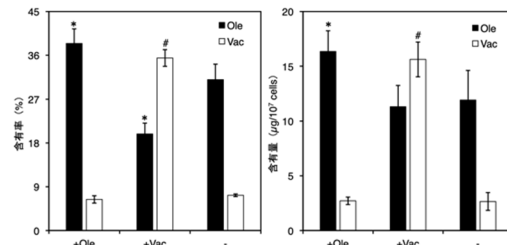


図 1 VSMC のリン脂質におけるオレイン酸と cis-バクセン酸の含有率と含有量.
+Ole: オレイン酸添加群, +Vac: cis-バクセン酸添加群, -: 非添加群.
値は平均値 ± SD (n=3). *P<0.05 vs 非添加群の Ole, #P<0.05 vs 非添加群の Vac

(2) cis-13-オクタデセン酸 (18:1(n-5)) 投与による細胞脂肪酸組成の変化について

cis-13-オクタデセン酸投与群では, もともと極性脂質画分 (PL) に約 0.6% しか含まれていなかった cis-13-オクタデセン酸が約 31% にまで増加するまで取り込まれ, cis-11-ヘキサデセン酸の含有量も増加していた. cis-11-ヘキサデセン酸については標識体は検出されなかった. このことは, 投与した標識体の cis-13-オクタデセン酸には C2 位に重水素が付加されているが, 取り込まれた標識体の脂肪酸が酸化された場合, C2 位が脂肪酸から離れる. そのため, 仮に cis-13-オクタデセン酸が酸化され cis-11-ヘキサデセン酸の含有量が増加していたとしても二硫化ジメチル付加物を用いた方法では追跡が困難である. しかし, ミリストレイン酸から cis-11-ヘキサデセン酸が鎖長延長されていることや, cis-13-オクタデセン酸投与群の cis-11-ヘキサデセン酸の含有量が有意に増加していることから, cis-11-ヘキサデセン酸が VSMC において存在できるということがわかるので, cis-13-オクタデセン酸が酸化されている可能性も十分に考えられる. また, もともと細胞にほとんど含有していない cis-13-オクタデセン酸が大幅に取り込まれ, 細胞に常に一定量存在している cis-7-ヘキサデセン酸, パルミトレイン酸, cis-Vac, Ole の含有量がそれぞれ半量程度まで減少した. このことから n-5 系 MUFA は n-9 系 MUFA, n-7 系 MUFA と置き換わることのできる脂肪酸であることが考えられる.

(3) cis-12-オクタデセン酸 (18:1(n-6)) 投与による細胞脂肪酸組成の変化について

cis-12-オクタデセン酸投与群では, もともと細胞に含有されていない cis-12-オクタデセン酸が PL と TG に取り込まれた. また, cis-7-ヘキサデセン酸, パルミトレイン酸, cis-Vac, および Ole の含有率の低下が cis-13-オクタデセン酸投与群と同様に確認された (図 2). このことから cis-12-オクタデセン酸もまた n-9 系 MUFA, n-7 系 MUFA と置き換わることのできる脂肪酸であることが考えられる. さらに, ジエン酸画分における FAME の GC-MS 分析から, 投与した cis-12-オクタデセン酸が 18:2 へ不飽和化されたことが判明し, その鎖長延長産物と考えられる 20:2 もそのフラグメントイオンの m/z 値から確認された. しかし, 重水素標識体を利用した二硫化ジメチル付加物による解析では, 二重結合を複数持つ分子の不飽和結合位置解析は複雑であるため結論に至っていない. また, cis-12-オクタデセン酸投与によってジホモ- -リノレン酸 (20:3(n-6)), アラキドン酸, およびドコサヘキサエン酸 (22:6(n-3)) の含有量が有意に増加し, 細胞がもともと含有していないジホモ- -リノレン酸, ドコサテトラエン酸, ドコサペンタエン酸についても増加がみられた. ジホモ- -リノレン酸は -リノレン酸の鎖長延長産物であり, アラキドン酸が鎖長延長されドコサテトラエン酸が合成され, それがさらに 4-デサチュラーゼによる不飽和化からドコサペンタエン酸が合成されるという報告があるが, 今回検出された標識体のジエン酸と上記のドコサトリエン酸, ドコサテトラエン酸, ドコサペンタエン酸についてはピロリジン誘導体を用いた詳細な解析が必要である.

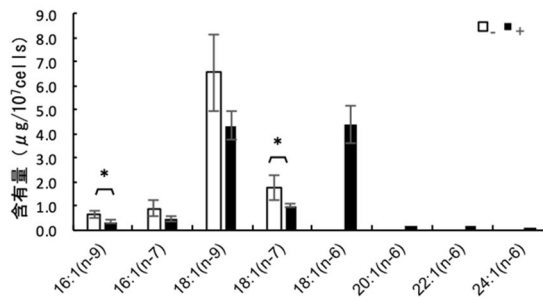


図 2 VSMC の cis-12-オクタデセン酸投与群における非投与群に対する PL の MUFA の含有量変化
-: 非投与群, +: cis-12-オクタデセン酸投与群,
値は平均 ± SD (n=3) または平均のみ (n=2) で示す.
*P<0.05 vs 非投与群の対応する脂肪酸

(4) ペトロセリン酸 (18:1(n-12)) 投与による細胞脂肪酸組成の変化について

ペトロセリン酸投与群においては PL と TG において標識体ペトロセリン酸の取り込みと cis-8-エイコセン酸への鎖長延長が確認された。標識体ではないが 16:1(n-12)の含有量も有意に増加しており、酸化による産物の可能性があり今後詳細に解析していく必要がある。また、ペトロセリン酸投与により cis-7-ヘキサデセン酸, 0le, パウリン酸, cis-15-エイコセン酸, リグノセリン酸, ネルボン酸の含有率が有意に減少した。ペトロセリン酸をはじめとした n-12 系 MUFA もまた細胞が元来含有している脂肪酸に置き換わることで脂肪酸であることが示唆される。

リン脂質クラスごとに分画し詳細に解析を行った結果、ペトロセリン酸投与群については、PC と PE においてはペトロセリン酸の取り込みが大きく、SFA と MUFA の比率が逆転したほどであった。PS と SPM においてはもともと MUFA の比率が低く、ペトロセリン酸の取り込みも微量であったが、ペトロセリン酸投与群の PL 画分で確認されたネルボン酸の減少の傾向が SPM でも確認された (図 3)。

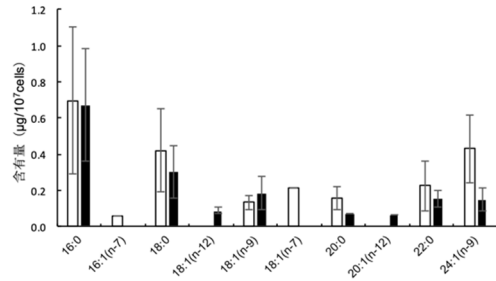


図 3 ペトロセリン酸投与群の SPM における脂肪酸含有量の変化
値は平均 ± SD (n=3) または平均のみ (n=2) で示す。

*P<0.05 vs 非投与群の対応する脂肪酸

(5) まとめ

本研究では動物培養細胞において各種 C18:1 オクタデセン酸の取り込みについて検討した結果、リン脂質ではもともと細胞が含有していた脂肪酸と添加した脂肪酸が置き換わったことがわかった。さらに細胞はもともとリン脂質に含有していた脂肪酸と新たに取り込んだ脂肪酸を中性脂質へ蓄積するということが示唆された。当初予定していた炎症性関連転写因子等の解析については、R5 年度後半からの実施となり現在進行中のため本報告に含めなかった。

代謝動態については、今回調べた細胞では 0le と cis-Vac の二重結合位置異性化経路は確認されなかったが、0le からゴンド酸への鎖長延長反応とパルミトレイン酸 (C16:1) から cis-Vac, さらにパウリン酸 (C20:1) への鎖長延長反応が確認された。ゴンド酸やパウリン酸はムクロジ科の種子に多く含有している一価不飽和脂肪酸である。これまでの研究で n-9 系一価不飽和脂肪酸については、動物では 0le からゴンド酸, エルカ酸 (22:1), ネルボン酸 (24:1) への鎖長延長経路が確認されており、その反応には Elovl3 が関わっていることがわかっている。一方、動物における cis-Vac からパウリン酸やその先の鎖長延長経路についてはいまだ不明である。ゴンド酸やパウリン酸以降の鎖長延長経路については、現在解析中である。

以上の結果より、高等植物やマウスの心筋で見られた 0le と cis-Vac における二重結合位置異性化反応は細胞においては確認することができなかったが、n-9 系一価不飽和脂肪酸と n-7 系一価不飽和脂肪酸の鎖長延長反応を確認することができた。今回確認されたゴンド酸とパウリン酸の合成経路の詳細についての解明は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nana Itoh, Shigenobu Matsumura, Toshio Iwaki, Shigeo Takenaka, Hiroaki Kanouchi	4. 巻 55
2. 論文標題 Low cellular pyridoxal 5'-phosphate levels decrease neurotransmitter and glutathione concentrations and increase susceptibility to hydrogen peroxide toxicity in SH-SY5Y cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clinical Nutrition Open Science	6. 最初と最後の頁 123-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Yamato, M. Seike, A. Wadano, H. Inui, T. Iwaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Irreversible degradation of vitamin C in broccoli during cryopreservation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Life Science Research	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24729/00017599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 豊山 実来、藤田 実希、永野 李奈、岩城 俊雄
2. 発表標題 果実由来 cis- オクタデセン酸投与による動物細胞の脂肪酸組成変動解析
3. 学会等名 第78回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 井手 美苗、澤井 亜月、島田 力、岩城 俊雄、松村 成暢、叶内 宏明、竹中 重雄
2. 発表標題 紅麴色素成分の代謝と吸収
3. 学会等名 第78回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 澤井 亜月、島田 力、岩城 俊雄、松村 成暢、叶内 宏明、竹中 重雄
2. 発表標題 ペニコウジ色素の代謝に関する検討
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤菜名、藤田琴美、岩城俊雄、竹中重雄、叶内宏明
2. 発表標題 ビタミン B6 欠乏状態における SH-SY5Y 神経細胞の代謝変化
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤井亜月、島田力、岩城俊雄、松村成暢、叶内宏明、竹中重雄
2. 発表標題 天然着色料紅麹色素成分の動物肝ミクロ ソーム酵素への影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤菜名、岩城俊雄、竹中重雄、叶内宏明
2. 発表標題 低濃度ピリドキサルリン酸で変化するヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞内代謝物の解析
3. 学会等名 第74回日本ビタミン学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高松愛梨, 岡本彩希, 松村成暢, 岩城俊雄, 叶内宏明, 竹中重雄
2. 発表標題 先天性ビタミンB12代謝異常症原因遺伝子群RNAiによるヒト神経芽細胞腫の分化抑制
3. 学会等名 第74回日本ビタミン学会大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	乾 博 (Inui Hiroshi) (20193568)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員 (24403)	

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
---------	---------