

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17658

研究課題名(和文) リン脂質の構造の違いが生体への生理作用に与える影響の精査

研究課題名(英文) Evaluation of physiological function on lipid metabolism by phospholipid regioisomers

研究代表者

田中 誠也 (TANAKA, SEIYA)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：40897906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、代表的なリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)について、脂肪酸の結合位置による異性体について分析法および体内分布を精査した。市販されていないPC異性体を有機合成および分取精製により作製した。作製したPC異性体の標準品を用いてPC異性体の精確な定量法を開発した。マウス体内におけるPC異性体分布を調べたところ、脳でのみPC異性体が存在し、投与したDHAはPCのsn-1位にDHAが結合したPC異性体として多く取り込まれていた。またDHAが結合したPC異性体間でDHAの吸収性を調べたところ、DHAはsn-1位よりもsn-2位に結合していたほうが血中への移行性が高いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によりリン脂質の中でも代表的であるホスファチジルコリン(PC)について、脂肪酸の結合位置が異なる位置異性体について、その正確な定量法を開発することができた。これは他のリン脂質にも適用できる手法であり、リン脂質研究の幅を広げる価値がある。さらに体内では脳で特異的にPC異性体が存在し、経口摂取したドコサヘキサエン酸(DHA)は脳では異性体に主に取り込まれることが明らかになった。このことはリン脂質異性体は脳で特別な生理的意義があることを示唆している。本研究は、リン脂質異性体の機能性研究の糸口になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylcholine has a positional isomer depending on the fatty acid binding site. It is unclear whether PC positional isomer has physiological effects. We developed the preparation method of PC positional isomer containing DHA. Furthermore, we examined the absorption rate of DHA bound to PC positional isomers. We found that DHA bound to the sn-2 position of PC was high uptake rate into the body compared to the sn-1 position of PC.

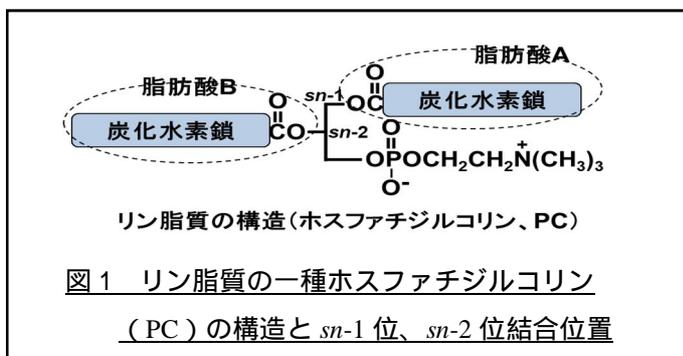
研究分野：食品機能化学

キーワード：ホスファチジルコリン 異性体 LC/MS/MS ドコサヘキサエン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リン脂質は細胞膜の構成成分であり、生体に必須な成分である。リン脂質は基本骨格に 2 つの脂肪酸がエステル結合した脂質であり、1 級アルコールの結合位置を *sn*-1 位、2 級アルコールの結合位置を *sn*-2 位と区別する(図 1)。生体はこれら結合位置を区別し消化酵素等が選択的に加水分解を行っている。これまで多くの脂質で保健機能が報告されてきているが、リン脂質の保健機能に関する研究はそのほとんどが脂肪酸種やリン脂質のリン酸基構造に着目し実施されているものであり、リン脂質中の脂肪酸結合位置に着目している研究は少なかった。過去の報告で、リン脂質中 *sn*-1 位に結合したドコサヘキサエン酸(DHA)の脳への輸送に関する研究がある(Sci. Rep. 7: 11263 (2017))。この研究では、*sn*-2 位ではなくリン脂質の *sn*-1 位に DHA を多く結合する脂質の方が、*sn*-2 位に DHA を結合する場合と比較して脳への蓄積性が高くなることを報告している。仮に *sn*-1 位に DHA が結合したリン脂質を摂取した場合、脳をはじめ各種組織への蓄積性が変化し、リン脂質の機能性および DHA の機能性がより顕著に観察できる可能性がある。自然界のリン脂質は *sn*-1 位には飽和脂肪酸、*sn*-2 位には不飽和脂肪酸が含まれることがほとんどであるが、一部脳にはこの結合位置が逆転しており、*sn*-1 位に不飽和脂肪酸、*sn*-2 位に飽和脂肪酸が結合したリン脂質も存在すると報告されている。しかし、これまでにリン脂質中の脂肪酸結合位置を考慮した研究は少なく、同じ機能性脂肪酸であっても結合位置の違いが脂肪酸の有する保健機能にどのように影響を与えるのかに関して精査した例はない。その原因として、リン脂質中の結合位置に望んだ脂肪酸が結合したものが市販されておらず、入手できないためである。そこで本研究では、これらを有機合成により作製することで詳細に調べることにした。



しかし、これまでにリン脂質中の脂肪酸結合位置を考慮した研究は少なく、同じ機能性脂肪酸であっても結合位置の違いが脂肪酸の有する保健機能にどのように影響を与えるのかに関して精査した例はない。その原因として、リン脂質中の結合位置に望んだ脂肪酸が結合したものが市販されておらず、入手できないためである。そこで本研究では、これらを有機合成により作製することで詳細に調べることにした。

2. 研究の目的

本研究では、保健機能を有する多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)がリン脂質中の脂肪酸結合位置である *sn*-1 位及び *sn*-2 位に結合したとき、結合位置が保健機能へどのような影響を与えるのかを精査することを目的とした。本研究では、特にリン脂質の中でも最も代表的なサブクラスであるホスファチジルコリン(PC)を対象とした。また DHA を含む PC の含量で豊富に存在する組み合わせとして、結合する脂肪酸はパルミチン酸(PA)と DHA とした。

上記の目的を達成するため、以下の具体的な目的を設定した。

- (1) PC 異性体である PC(PA/DHA)と PC(DHA/PA)の有機合成
PC(*sn*-1 位結合脂肪酸/*sn*-2 位結合脂肪酸)を表す
- (2) PC 異性体の分取精製法開発
- (3) PC 異性体の LC/MS/MS 分析法開発
- (4) PC 異性体のラット血中への吸収性比較
- (5) 食事摂取 DHA は PC 異性体として取り込まれるのか

3. 研究の方法

<実験 1 PC 異性体合成法>

脂肪酸が結合していない状態である *sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(GPC)を原料に PA と DHA をエステル結合させることで、PC 異性体を合成した。エステル化の順序や条件を詳細に検討し、収率の改善を行った。

<実験 2 PC 異性体分取精製>

PC 異性体は脂肪酸結合部位を区別して有機合成を行っても、アシル基転移が起こり異性体混合物が生成されてしまう。そのため、内径 20 mm の C30 カラムとリサイクル分取 HPLC を用いて、高純度の PC 異性体を分取精製した。

<実験 3 PC 異性体 LC/MS/MS 定量法開発>

作製した PC 異性体である PC(PA/DHA)と PC(DHA/PA)を用いて、液体クロマトグラフ・質量分析計の分析条件を開発した。また実験 2 で精製した高純度 PC 異性体を用いて、検量線を作製した。

<実験 4 PC 異性体のラット血中への吸収性比較>

重水素を用いて安定同位体標識することで天然の DHA から分子量が+2 された+2DHA を作製し、これを PC に結合させた PC(PA/+2DHA)および PC(+2DHA/PA)をラットに経口投与し、

1, 3, 6 時間後に尾静脈より採血し、24 時間後に解剖を行った。得られた血漿および肝臓、脳中の+2DHA を含むリン脂質および+2DHA 量を LC/MS/MS で定量し、PC 異性体間の+2DHA の吸収性を比較した。

<実験 5 脳中 PC 異性体の解析>

重水素で標識した+2DHA エチルエステルを ICR マウスに 5 日間投与し、6 日目に解剖を行い、組織中の+2DHA を含む PC 異性体の定量を行った。これにより食事摂取の DHA が PC 異性体のどちらに取り込まれるかを検証した。

4. 研究成果

<実験 1 および 2 PC 異性体作製>

PC 異性体である PC(PA/DHA)と PC(DHA/PA)を有機合成によりグラムスケールで得ることができた。GPC にエステル化させる際に PA と DHA を混合し同時にエステル化させることで収率が大幅に改善した。一方で有機合成では異性体を区別して合成することが困難であったため、リサイクル HPLC と内径 20 mm の C30 分取用カラムを用いて、異性体を分取精製することとした。リサイクル HPLC では該当ピークを切り出し、再びカラムに通す手法であり、この手法によりスケールアップした際にも分離度を維持して分取することができた。

<実験 3 PC 異性体 LC/MS/MS 定量法開発>

作製した PC 異性体により LC/MS/MS における分離条件を検討したところ、炭素含有量が高いポリメリック ODS カラムにより異性体のベースライン分離を達成し、それぞれに PC 異性体の LC/MS/MS のイオン化効率を確認した。その結果、天然に方法に存在する PC(PA/DHA)のイオン化効率が PC(DHA/PA)と比較して高いことを明らかにした。このことは PC の脂肪酸結合部位の違いによりイオン化効率が異なることを示唆し、精確な定量には PC 異性体それぞれの標準品を調製することが必要であることが示された。

<実験 4 PC 異性体のラット血中への吸収性比較>

安定同位体で標識した+2DHA を含む PC(PA/+2DHA)と PC(+2DHA/PA)をラットに経口投与した結果、両群で 3 時間後に+2DHA の血中濃度が最大となった。その際の+2DHA の血中への取り込み量は、天然豊富型である PC(PA/+2DHA)で高くなることが示唆された。このことは血中への DHA の取り込み率は異性体間で異なることを示唆し、DHA をもつ PC 異性体間で DHA の体内取り込み量にも影響を与えている可能性がある。今後さらに PC 異性体の生理機能比較について研究が進むことが期待される。

<実験 5 >

安定同位体で標識した+2DHA を摂取させたマウスの脳において、+2DHA を取り込んだ PC 異性体の比率を算出したところ、内因性の DHA は主に PC(PA/+2DHA)と *sn*-2 位に DHA が結合した PC として主に存在したのに対し、摂取させた外因性 DHA は PC(+2DHA/PA)として取り込まれることが示された。このことは外因性 DHA は PC の *sn*-1 位に多く取り込まれることが明らかになった。今後この *sn*-1 位に DHA が結合した PC 異性体の生理機能について明らかにしていく必要がある。

本研究により、代表的な PC 異性体である PC(PA/DHA)と PC(DHA/PA)に関して、グラムスケールの有機合成から分取精製法、LC/MS/MS による精確な定量法を開発し、動物試験により異性体間で血中への取り込み量に違いがあることが示唆された。さらに脳における外因性 DHA は PC(PC/DHA)と比較すると PC(DHA/PA)として主に取り込まれることが明らかになり、天然に豊富に存在する *sn*-2 位 DHA 結合型 PC ではなく、*sn*-1 位に DHA が結合した PC が何等かの生理機能を持っている可能性が示唆された。*sn*-1 位 DHA 結合型 PC について今後のさらなる研究が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中誠也、藤原果奈、北村哲志、後藤直宏
2. 発表標題 DHAの継続摂取は脳においてsn-1位にDHAが結合したリン脂質異性体を増大させる
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 藤原果奈、田中誠也、小山智之、後藤直宏
2. 発表標題 LC/MS/MSを用いた位置異性体リン脂質の定量分析法の確立
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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