

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19733

研究課題名（和文）天然油脂の構造を壊すことなく安定同位体ラベル化する手法の開発とその応用

研究課題名（英文）Development and application of stable isotope labeling method for natural fats and oils without destroying their structure

研究代表者

後藤 直宏（Gotoh, Naohiro）

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：60323854

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000円

研究成果の概要（和文）：油脂の主成分はグリセリンに脂肪酸が3つ結合をしたトリアシルグリセロール（TAG）である。機能性油脂として魚油、シソ油などが知られているが、摂取した油脂由来の脂肪酸が体の組織に取り込まれているのかを確認する術はない。本研究では、TAGに結合している脂肪酸の位炭素結合水素2つをTAG構造を破壊せず重水素ラベル化し、天然に存在する脂肪酸より分子量が2つ大きくなる方法を探索した。合成条件検討は、TAGであるトリオレインと重水素化メタノールを混合し、様々な種類の塩基性触媒および酸性触媒を加えて行った。合成確認は質量分析計を用いた。結果、TAGの構造を破壊することなく重水素化することは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で油脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TAG）に結合している脂肪酸の分子量をTAGの構造を破壊することなく重水素で2つ大きくする方法を探索した。結果、試みたすべての合成条件でTAGの分子構造を破壊することなく重水素化することは出来なかった。この方法でTAGの分子量を増やすことが出来れば、例えば健康食品で話題のシソ油由来の脂肪酸が本当に体内に残り、保健機能を発揮しているかを質量分析器を用いて確認できたはずである。このように、イメージだけでなく本当に体内の組織に組み込まれ機能するかを確認する方法は存在せず、完成すれば混んとした機能性油脂市場に確実な情報を与えることが出来たはずである。

研究成果の概要（英文）：The main component of fats and oils is triacylglycerol (TAG) consisting of one glycerin molecule and three fatty acids. Although fish oil and perilla oil are known as functional fats and oils, there is no way to confirm whether the fatty acids taken from the oil is really inserted into the tissues of the body. In the present study, we explored the method to exchange two hydrogens binding at α -position carbon of fatty acids in TAG into deuteriums without destroying the TAG structure. This exchange make possible to increase two of molecular weight compared to naturally occurring the same fatty acid. Triolein (TAG) and deuterium labeled methanol were mixed with various basic and acidic catalysts. Mass spectrometry was used to confirm the synthesis. As a result, it was not possible to deuterate the TAG without destroying its structure.

研究分野：油脂化学

キーワード：油脂 脂肪酸 安定同位体ラベル化 体内動態 質量分析器

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々が食品から摂取する油脂には、動物性油脂、植物性油脂、乳脂、魚油、卵油など様々なものがあり、それぞれ固有の物理的特徴、栄養的特徴を有する。これら油脂の90%以上はトリアシルグリセロール (TAG) と呼ばれる脂質クラスであり、グリセリン骨格に脂肪酸が3分子エステル結合をした構造を有している (図1)。各種油脂の特徴を表す指標として、油脂を構成する脂肪酸の分布が使用されることが多い。例えば食品分析表においても油脂の特徴を記す際に脂肪酸分布が使用されている。ところが、図1にも記すように、グリセリン骨格には3種類の結合位置が存在し、我々の体はこの結合位置の違いを認識してTAG (油脂) を代謝している。たとえば、魚油中には脳や神経の主たる構成成分であるDHAが多く含まれる。そのため、DHAの摂取は脳機能の維持や発達に良いとされ、粉ミルクにはDHAが意図的に添加されている。添加されるDHAは魚油由来で、TAGのグリセリン骨格のsn-2位に多く結合している。その一方で、近年海外で注目を浴びているアザラシ油 (海獣油) は、sn-3位にDHAを多く結合し、sn-2位にはほとんどDHAを結合しないことが近年報告されている。同じ機能性脂肪酸であってもTAG中での脂肪酸の結合位置の違いにより、脂肪酸の体内での代謝機構が異なることが報告されており、魚油と海獣油では、同じように摂取しても脳への体内輸送効率が異なるものと考えられる。このように、油脂の違いは体内における各種脂肪酸の分布や代謝へ強く影響すると考えるが、油脂の種類の違いが機能性脂肪酸の体内分布へどのように影響を与えるか直接観察する手法は存在しない。

(2) DHAを代表とするn-3系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は、体内でプロスタグランジ、ロイコトリエン、レゾルピン、プロテクチンなどの炎症や抗炎症をコントロールする脂肪酸由来の体内情報伝達物質へ変換される。この働きにより、n-3PUFAは機能性油脂として注目されている。ところが、投与した油脂から本当に各種脂肪酸由来の体内情報伝達物質へ変換されるのか。さらに、投与した油脂のどのくらいの割合が実際に変換されているかなどの知見も存在しない。

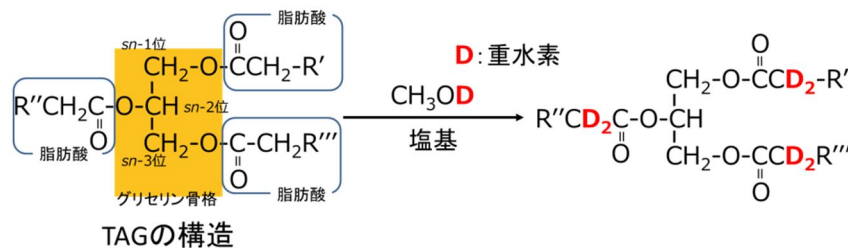


図1 TAG構造と脂肪酸の位を重水素置換反応 (概念図)

2. 研究の目的

(1) TAGを構成する脂肪酸を加水分解せずにそのまま脂肪酸中の2つの位水素を重水素置換すること (非破壊重水素ラベル化) が可能となれば、脂肪酸の分子量が2増えているため、高速液体クロマトグラフ - 三連四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) などの質量分析装置で測定することにより、生体内に既に存在する同種脂肪酸と区別して分析が可能となる。そこで、TAGの構造を破壊せずに脂肪酸中の位水素を重水素置換する合成方法を開発することを目的とした。

(2) 体内で発生した各種脂質由来メディエーター (プロスタグランジ、ロイコトリエン、レゾルピン、プロテクチンなどの炎症や抗炎症をコントロールする脂肪酸由来の体内情報伝達物質) で分子量が+2となっているものを網羅的にLC-MS/MSを用いて解析することも可能となり、投与した油脂が炎症をどのようにコントロールしているのかも精査可能となる (図2)。

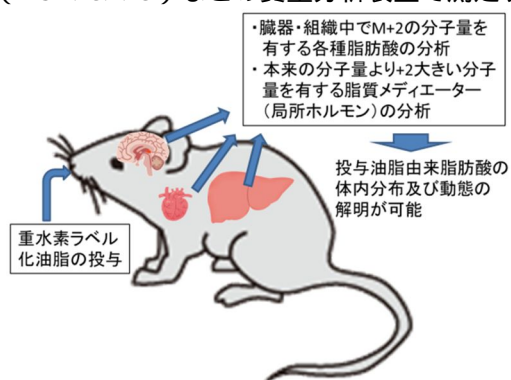


図2 重水素ラベル化油脂を用いた体内脂肪酸分布のモニタリング (イメージ)

3. 研究の方法

(1) 反応は二段階反応であり、最初に、TAGを構成する脂肪酸の位水素を塩基 (BOH) で置換する。その後、水酸基の水素が重水素化されたメタノール (CH_3OD) を反応させることで、重水素 (D) 化TAGを得る。TAGに結合している脂肪酸は、それぞれ分子量が+2となる。よって、TAG自身は、元の分子量と比較して+6になる。なお、トリオレインを用いて反応を行った。なお反応条件は、温度3種類 (氷冷、室温、ホットプレート加熱) と反応時間3種類 (1時間、4時間、24時間) を適宜組み合わせで行った。最初に、塩基のスクリーニングを実

施した(図3・反応①)。TAGに結合している脂肪酸の 位水素の pKa は不明(水素イオンを放出する強さは不明)であるため、各種塩基を TAG に添加し、どのような塩基(BOH)を添加したとき B(図3)との交換反応が起こるかを精査した。分解反応が起こるか否かは薄層クロマトグラフィーを用いて確認した。

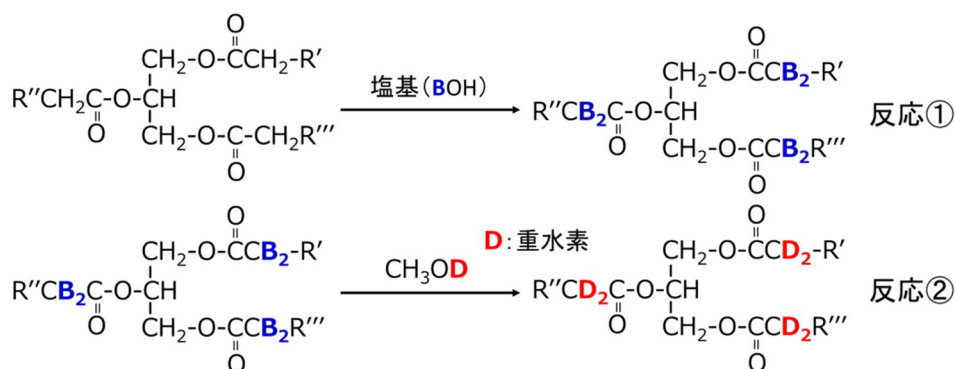


図3 反応機構の概要

(2) 塩基触媒で反応が進まない場合は、各種酸触媒も検討した。

(3) 薄層クロマトグラフィーで TAG 構造が崩れていない(加水分解していない)ものをサンプルとし、LC-MS/MS を用い、トリオレインの Na⁺付加物 (m/z : 908) より+6 のとなる m/z を指標にして判断した。

(4) 合成した TAG 重水素化物を ICR マウスへ投与し、その後、血管、心臓、肝臓、筋肉などに発生している各種由来メディエーターを LC-MS/MS で分析。

4. 研究成果

(1) 研究成果を塩基触媒(表1)、酸触媒(表2)、合わせて以下に記す。なお、薄層クロマトグラフィーで加水分解が確認されたものは MS 分析へは供さなかった。結果、一部の塩基触媒で加水分解が起こり交換反応は進行しなかった。さらに、加水分解が起こらなかった全ての反応条件においても、トリオレインの分子量が+6 とならず(図4、図5)、トリオレインの水素交換反応が進行しなかった。以上の結果より、これら触媒を用いて重水素化メタノールのアルコール重水素(OD)との交換反応は進行しないことが判明した。メタノールのアルコール水素の pKa は 15.5 であり、エステルの水素(酢酸メチルの場合)の pKa は 25 である。この値から考えると、アルコールの D は、TAG の水素と交換反応を起こしてしかるべきと考え、重水素化メタノールに絞って研究を進めてきたのであるが、結果的に反応は進行しなかった。

(2) TAG の水素交換反応が起こらず、重水素化 TAG を得ることができなかったことから、重水素化 TAG を動物へ投与し、体内で発生した重水素化各種脂肪酸由来体内情報伝達物質の分析には至らなかった。

表1 塩基触媒を用いた結果

| 塩基触媒 | 反応条件(温度条件:氷冷、室温、ホットプレート加熱の3種と、反応時間:1時間、4時間、24時間の3種類を適宜組み合わせ実施) |
|---|--|
| <i>tert</i> -BuOD | ×分子量変化なし |
| CH ₃ OD | ×分子量変化なし |
| <i>tert</i> -BuOK + BF ₃ + <i>tert</i> -BuOD | ×分子量変化なし |
| CH ₃ ONa + CH ₃ OD | ×加水分解 |
| BF ₃ + CH ₃ OD | ×加水分解 |
| D ₂ SO ₄ + CH ₃ OD | ×分子量変化なし |
| DMAP + CH ₃ OD | ×分子量変化なし |

D : 重水素、BuO : Butoxy、BF₃ : 三フッ化ホウ素、DMAP : ジメチルアミノピリジン

表2 酸触媒を用いた結果

| 酸触媒 | 反応条件 (温度条件: 氷冷、室温、ホットプレート加熱の3種と、反応時間: 1時間、4時間、24時間の3種類を適宜組み合わせ実施) |
|--|---|
| Benzenesulfonic acid + CH ₃ OD | × 分子量変化なし |
| 1,8-Diazabicyclo [5.4.0]undec-7-ene + CH ₃ OD | × 分子量変化なし |
| Methanesulfonic acid + CH ₃ OD | × 分子量変化なし |
| <i>p</i> -Toluenesulfonic Acid + CH ₃ OD | × 分子量変化なし |
| TFAA + CH ₃ OD | × 分子量変化なし |

TFAA : Trifluoroacetic acid

(1)

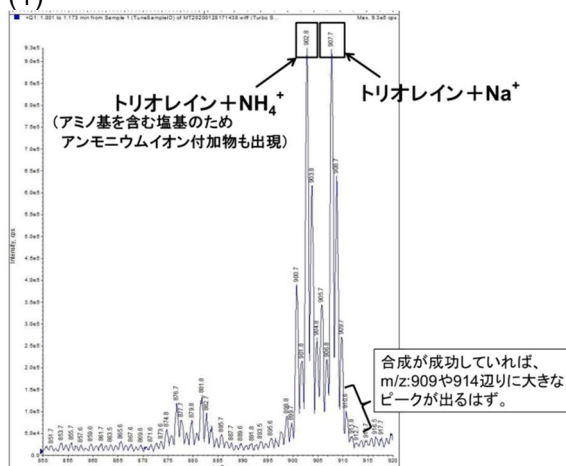


図4 DMAP (塩基触媒)でのMS分析結果

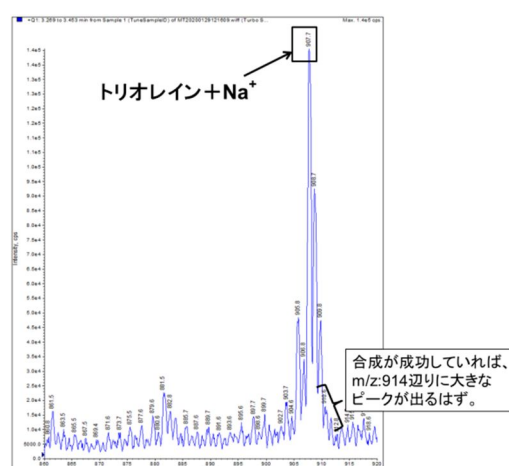


図5 TFAA (酸触媒)でのMS分析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|