

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21748

研究課題名（和文）多価不飽和脂肪酸中の炭素数および二重結合数が保健機能へ与える影響の精査

研究課題名（英文）The study on the effects of the number of carbons and double bonds in polyunsaturated fatty acids on health functions.

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、炭素数26、二重結合数7（26:7）などの自然界に存在する多価不飽和脂肪酸（PUFA）より炭素数が多く二重結合数が多い脂肪酸を合成する方法を確立すること。さらに、炭素数や二重結合数が増えると脂質代謝改善能はどのように変化するかを明らかにすることである。研究の結果、26:7の合成方法を確立することができた。さらに、Hepal-6細胞を用いた細胞試験で脂質蓄積抑制能を評価した結果、これまで報告されてきた天然に存在するPUFAで脂質蓄積能が最も強いTHA(24:6)と比較して、26:7の方が脂質蓄積抑制能は優れていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では炭素数や二重結合数が、天然に存在する多価不飽和脂肪酸（PUFA）より多い26:7（炭素数26、二重結合数7）を合成し、その脂質蓄積抑制能機能を精査した。結果、26:7の方が天然PUFAの中で最も高い機能を有するTHA（24:6）よりその効果は強かった。このことより、PUFAで炭素数や二重結合数は脂質蓄積抑制能に重要な因子であり、さらに炭素数や二重結合数が多いPUFAは、非常に強い脂質蓄積抑制剤が開発できるという知見を得るに至った。生活習慣病の増加、特に内臓脂肪の増加は糖尿病や心筋梗塞などにつながる。今回得た知見を基に強い脂質蓄積抑制剤が開発できることより本研究の社会的意義は大きい。

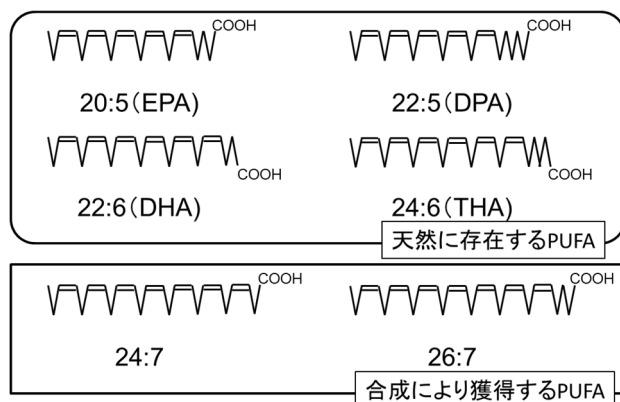
研究成果の概要（英文）：The object of this study is to establish a method to synthesize fatty acids with more carbons and more double bonds than naturally occurring polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as 26 carbons and 7 double bonds (26:7). Furthermore, to clarify how the ability to improve lipid metabolism changes as the number of carbons and double bonds increases. As the result, I could establish a method to synthesize 26:7. Furthermore, I could evaluate its ability to inhibit lipid accumulation in cell tests using Hepal-6 cells and found that 26:7 is superior to THA (24:6), a naturally occurring PUFA with the strongest lipid-accumulating protect ability reported so far.

研究分野：脂質化学

キーワード：脂質蓄積抑制 脂肪酸構造 多価不飽和脂肪酸 有機合成 保健機能

1. 研究開始当初の背景

3 大栄養素の一つに脂質がある。そしてほとんどの脂質は構造中に脂肪酸を有し、その脂肪酸は種々の保健機能を有する。たとえば魚油に特徴的に含まれる EPA は、血中中性脂肪値を低下させる機能を有するため血中中性脂肪低下薬として使用されている。EPA は多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の一つであり、構造中に多くの不飽和結合 (二重結合) を有する。同じように高い保健機能を有する脂肪酸として DHA が知られている。DHA も魚油に特徴的に多く含まれる PUFA の一つで、血中脂質や体脂肪蓄積を改善する機能を有する。EPA と DHA の構造を比較すると、EPA は炭素数 20、二重結合数 5 (「20:5」と表す) であるのに対し、DHA は、炭素数 22、二重結合数 6 (22:6) である (図 1)。実は魚油の中にはドコサペンタエン酸 (DPA) (炭素数 22、二重結合数 5 (22:5)) やテトラコサヘキサエン酸 (THA) (炭素数 24、二重結合数 6 (24:6)) なども存在する (図 1)。そこで我々は、市販されていない DPA と THA を有機合成により獲得し、脂肪酸を構成する炭素数と二重結合が保健機能に与える影響を横並びに比較した。その結果、肝臓脂肪蓄積抑制能 (脂質代謝



肝臓脂肪蓄積抑制能および血中アディポネクチン増加能の強さ
 $20:5 < 22:5 < 22:6 < 24:6 \rightarrow 24:7(?) \rightarrow 26:7(?)$
 ※天然に存在する脂肪酸の炭素数は偶数 不明

図 1 PUFA の構造の比較

改善能)が、EPA(20:5) < DPA(22:5) < DHA(22:6) < DHA(24:6) の順番で強くなり、同じ順番で血中アディポネクチン量が増加した。すなわち、炭素数が増えるほど、そして二重結合数が増えるほど機能が高まることを明らかにした (*J. Oleo Sci.* 67 1597-1607 (2018)、*J. Agri. Food Chem.* 57, 11047-11054 (2009))。ところが、天然には THA より炭素数が多く二重結合数が多い脂肪酸が存在せずこの法則をさらに炭素数が多く二重結合数が多い PUFA で確認することができない。

2. 研究の目的

そこで本研究では炭素数 26、二重結合数 7 (26:7) という自然界に存在する PUFA より炭素数も二重結合数も多い脂肪酸を合成し、この PUFA の脂質代謝へ与える機能を精査した。これにより、PUFA における炭素数及び二重結合数が脂質代謝機能にどのように影響を与えるかを明らかにできる。そのために 2 つの研究を実施した。

- (1) 天然にほとんど存在しない 26:7 の合成法の確立
- (2) 細胞を用いた、合成した 26:7 の脂質代謝改善能の確認

3. 研究の方法

研究の目的に従い、大きく2つの内容に分け研究を実施した。

(1) 26:7 合成方法の確立

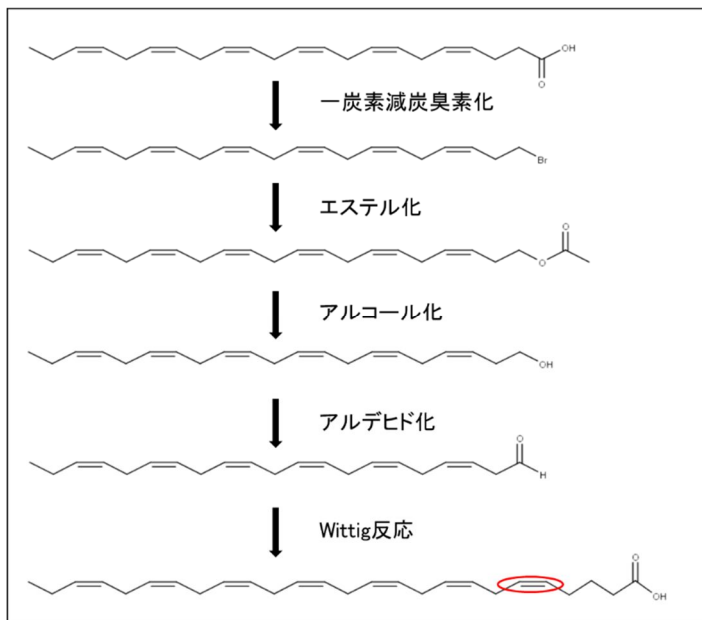


図2 新規長鎖 PUFA の合成経路

化により、アルデヒドである $C_{20}H_{29}CHO$ を得た。最後に、Wittig 反応により目的物である $C_{25}H_{37}COOH$ (26:7) を得た。なお Wittig 試薬には、4 - カルボキシブチルトリフェニルホスホニウムブロミドを用いた。

(2) 合成した 26:7 の細胞を用いた脂質蓄積抑制能評価

炭素数と二重結合数が異なる EPA、DPA、DHA、THA、および合成した 26:7 の 5 種の n-3 系長鎖多価不飽和脂肪酸を、オレイン酸 (OA) によって脂質蓄積状態に誘導したマウス肝癌由来細胞株 Hepa1-6 細胞に添加した。その後、Oil red O 染色法により細胞内に蓄積された脂肪滴の観察および脂質蓄積量の評価を行った。また、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム (DAOS) 法を用いた酵素試薬による定量キットで細胞内 TG の定量を行った。なお、脂肪酸の添加濃度は、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) を用いて、サンプル存在下における細胞生存率を測定することにより決定した。

研究成果

(1) 26:7 合成方法の確立

26:7 の合成各段階の収率は、減炭反応：66.0%、エステル化：72.0%、アルコール化：84.6%、アルデヒド化：53.7%、Wittig 反応：37.8%であり、反応全体では 8.16%であった。また、26:7 メチルエステル体をサンプルとしてガススペクトロメトリー - 質量分析

26:7 を合成する反応は、一炭素減炭臭素化、エステル化、アルコール化、アルデヒド化、Wittig 反応からなる五段階反応で行った (図2)。最初に Barton 脱カルボキシル化反応により、DHA より一炭素減炭された臭化物である $C_{21}H_{31}Br$ を得た。次に Br^- を脱離基、 CH_3COO^- を求核剤とした S_N2 反応により、エステルである $C_{21}H_{31}OC(O)CH_3$ を得た。これに水素化アルミニウムリチウム (LAH) を還元剤として還元を行い、アルコールである

$C_{21}H_{31}OH$ を得た。次に Swern 酸

計 (GC/MS) を用いた合成確認の結果を図 3 に示す。5 段階の反応を経て、目的物である $C_{25}H_{37}COOH$ (26:7) の合成が完了したことを確認した。しかし、反応全体での収率は 8% と低く、反応条件の検討の余地があると考えられた。

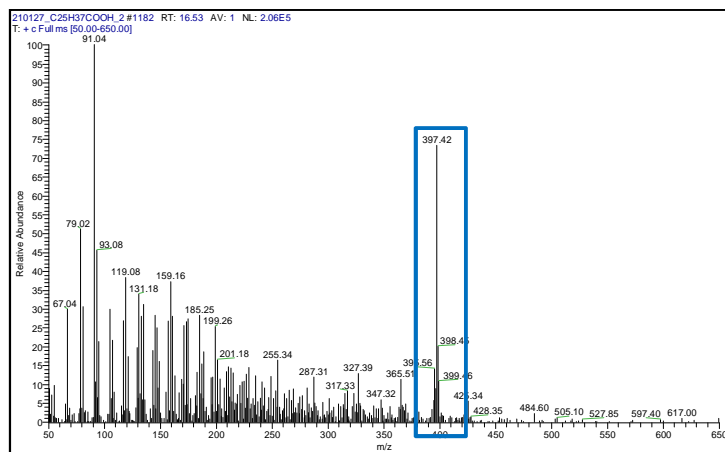


図 3 GC/MS による 26:7 の分析結果 (26:7 メチルエステルの m/z 397 を指標に確認)

(2) 合成した 26:7 の細胞を用いた脂質蓄積抑制能評価

本研究では Hepa1-6 細胞に対して行った細胞生存率試験では、各脂肪酸において終濃度 $70 \mu M$ 以下、24 時間のインキュベートであれば細胞毒性を及ぼさないことが確認されたため、

以後の試験では脂肪酸を終濃度 $70 \mu M$ で添加し、24 時間インキュベートすることとした。

Oil red O 染色により観察された Hepa1-6 細胞内蓄積脂肪滴の様子を図 4 に示す。また、Oil red O 染色後に細胞に 2-プロパノールを加えて Oil red O を溶出させ、波長 450 nm の吸光度を測定することで、コントロールに対する相対脂質蓄積量を評価した。この結果を図 6 に示す。Control (未処理群) と比較し、脂質蓄積誘導モデルであるオレイン酸 $500 \mu M$ 添加群では顕著な脂肪滴の蓄積が確認された。また、n-3 系長鎖多価不飽和脂肪酸を添加した群では、いずれも脂肪滴の蓄積抑制が確認された (図 5)。さらに、n-3 系長鎖多価不飽和脂肪酸による脂質蓄積抑制効果は、脂

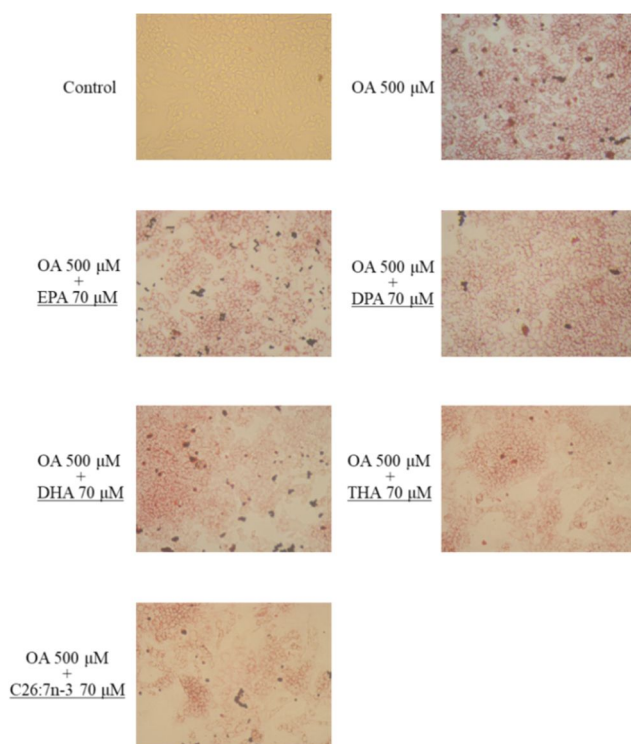


図 4 Oil red O 染色画像

脂肪酸の炭素数と二重結合数の増加にしたがって強く発揮される傾向であった (図 5)。

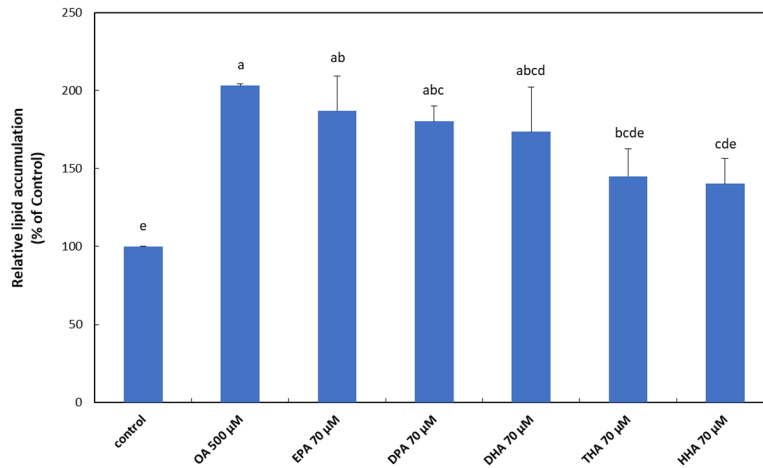


図5 コントロールに対する相対脂質蓄積量

各値は平均値 ± SE, n=3, 異符号間に有意差あり (Tukey-Kramer test $p < 0.05$)

細胞内トリアシルグリセロール (TG) 量は、オレイン酸と n-3 系長鎖多価不飽和脂肪酸を添加し 24 時間インキュベートした培養細胞より Bligh-Dyer 法で脂質を抽出し、前述の定量キットに供することにより測定した。また、細胞内 TG 量は総タンパク質量により補正を行った。細胞内 TG の定量結果を図 6 に示す。Control (未処理群) と比較し、オレイン酸を添加したその他の群では、著しく TG が蓄積していた。また、n-3 系長鎖多価不飽和脂肪酸の添加群では、オレイン酸のみの添加群と比較し TG 蓄積量が減少したが、その減少はわずかでありいずれも有意な減少ではなかった。

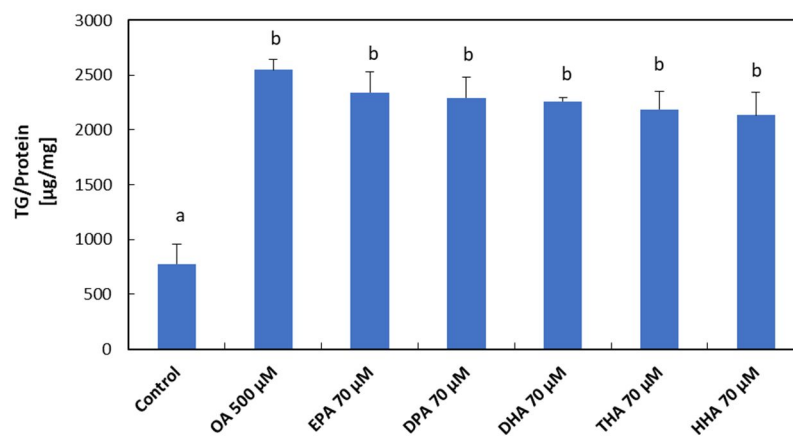


図6 細胞内 TG 蓄積量 (総タンパク質量で補正)

各値は平均値 ± SE, n=3, 異符号間に有意差あり (Tukey-Kramer test $p < 0.05$)

以上の結果より、PUFA の炭素数および二重結合数は脂質代謝改善機能と密接にかかわっていることを明らかにすることができた。

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

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