

「機能性食品の開発に向けた海産新規不飽和脂肪酸の構造決定と生物活性探索」

研究代表者 川島英城（岩県立大学宮古短期大学部教授）、共同研究者 木村賢一（岩手大学農学部教授）

<要旨>

研究代表者は、これまでにほとんど注目されなかった三陸産巻貝類の高度活用を目指し、ユニークな脂質成分の解明に取り組んできた。本研究では、ヨメガカサガイ (*Cellana toreuma*) から、GC/MS 分析により 10 種類の新規不飽和脂肪酸を新たに検出した。これらは、すべて奇数鎖を持つ非メチレン中断型脂肪酸(non-methylene-interrupted fatty acid, NMIFA)に該当し、その内 19:2Δ5, 18, 19:2Δ7, 18, 19:2Δ11, 18, 21:2Δ7, 20 及び 21:2Δ11, 20 の 5 種類を構造決定した。さらに、生物活性探索において、ユビキチンリガーゼ遺伝子変異酵母株 (*rsp5^{Δ401E}*) に対する生育回復活性並びにプロテインホスファターゼ 2C (PP2C) (PPM1A) 活性化作用を有する 2 種類の新規 NMIFA (A 及び B) を見いだすことに成功した。

1 研究の概要

非メチレン中断型脂肪酸 (NMIFA) とは、二重結合同士の間メチレン基を 2 つ以上挟んだ構造から成る。自然界における NMIFA の分布は、一部の裸子植物の油脂に見られるが、特異な構造は腹足類 (巻貝類を含む)、二枚貝類、カイメン類などの海洋無脊椎動物に主に見られる¹⁾。これまでに、海産由来の NMIFA に関する生物活性は、抗菌活性、細胞毒性、酵素に対する阻害活性などに限定され²⁾、生体シグナル伝達の解明に向けた研究は殆ど行われていない。

研究代表者らは、Ca²⁺シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母株 (*zds1Δ erg3Δ pdr1Δ pdr3Δ*) の生育回復活性とグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β (GSK-3β, 2 型糖尿病やアルツハイマー病の鍵酵素) に対する強力な阻害活性を有する 18:2Δ4, 15 が、ラット H4IIE 細胞でグルコースの取り込み抑制を示すことを明らかにした³⁾。また、18:2Δ4, 15 が生体機能性小分子として、生体シグナル伝達に関わることから、新規な構造を持つ NMIFA は新たな生体機能の発掘やその応用開発につながる事が期待できる。さらに、カサガイは、多彩な生物活性を有する 18:2Δ4, 15 のアナログだけでなく、多様で新規 NMIFA の宝庫であることから⁴⁻⁶⁾、生物活性探索に有用な生物資源になりうると考えている。

そこで、本研究では、機能性食品の開発に向けて、カサガイに由来する新規 NMIFA の構造に基づくユニークな生物活性を見いだすことを目的に行った。

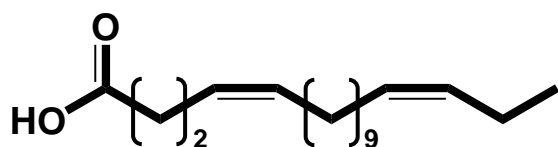


図 1 : 多彩な生物活性を有する 18:2Δ4,15 の構造

2 研究の内容

本研究では、以下の 3 つの項目について、取り組んだ。

- ① 三陸産カサガイの新規 NMIFA の同定 :
 優占種のヨメガカサガイ (*Cellana toreuma*) 及びベッコウカサガイ (*Cellana grata*) から、標的とする新規 NMIFA 画分を分離・精製し、GC 並びに GC/MS 分析 (ピロリジド及びピコリニル誘導体) による構造解析を行った。
- ② 類縁種や各脂質クラスにおける新規 NMIFA の分布特性の解明 :
 優占種のカサガイに認められる主要脂質クラスをケイ酸カラムで分離後、脂質クラスごとに各々の構成脂肪酸 (メチルエステル誘導体) を GC で分析・測定した。
- ③ 新規 NMIFA による遺伝子破壊酵母株 (アルツハイマー病、2 型糖尿病、がんなどに有効な活性物質探索) に対する生育回復活性評価並びに標的酵素に対する阻害活性の測定 :
 新規 NMIFA による 3 種類の新規遺伝子変異酵母株 [Ca²⁺シグナル伝達 (*zds1Δ erg3Δ pdr1Δ pdr3Δ*)、細胞周期 (*cdc2-1 rad9Δ*)、ユビキチンリガーゼ (*rsp5^{Δ401E}*)] に対する生育回復活性を評価した (図 2)。

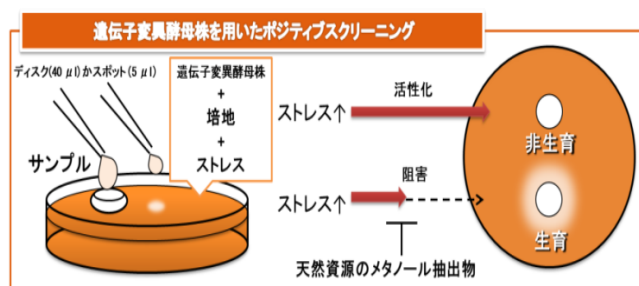


図 2: 遺伝変異酵母株による生物活性物質探索法の概略

さらに、新規 NMIFA による 3 種類の酵素阻害活性[GSK-3 β , プロリルオリゴペプチダーゼ (POP), プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) (PPM1A)] を測定した。

3 これまで得られた研究の成果

本研究では、独自のデータベースを用いた GC/MS 分析により、三陸産ヨメガカサガイに由来する新規 NMIFA に該当する 10 種類を検出した。その中で、今回は 5 種類の化学構造が決定された。具体的には、図 3 に示したとおり、19:2 Δ 5, 18, 19:2 Δ 7, 18, 19:2 Δ 11, 18, 21:2 Δ 7, 20 及び 21:2 Δ 11, 20 は、いずれも末端二重結合を有する奇数鎖のジエン酸であった。

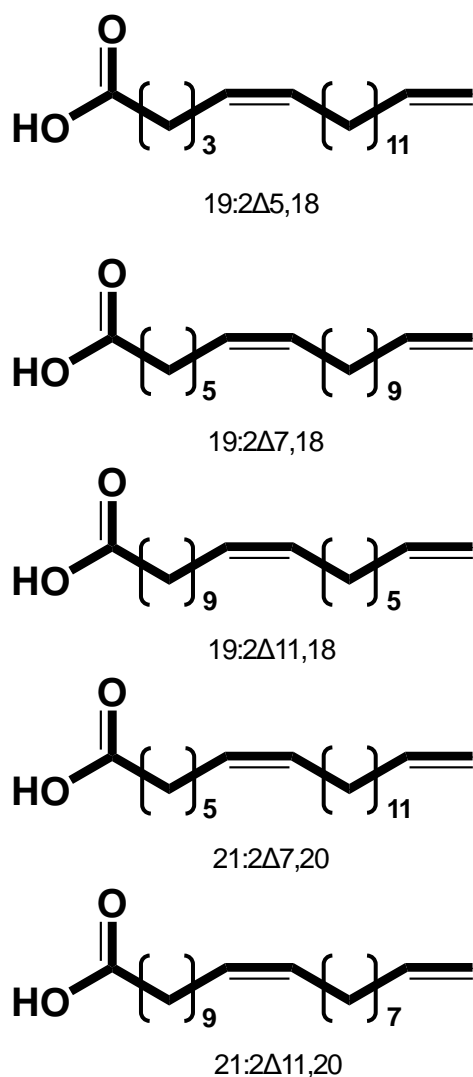


図 3 : カサガイに由来する新規 NMIFA の構造

次に、これら NMIFA の分布特性を明らかにするため、2 種類の優占種カサガイ (ベッコウカサガイ, ヨメガカサガイ) を調べた。その結果、ヨメガカサガイの生殖腺にはすべてに新規 NMIFA が分布していたが、ベッコウカサガイの生殖腺では 19:2 Δ 7, 18 及び 19:2 Δ 11, 18 のみの分布に限られていた。また、両種の生殖腺において、主要な脂質

クラスはトリアシルグリセロール及びリン脂質から成り、これらの構成脂肪酸として、検出された NMIFA は分布していた。

一方、3 種類の遺伝子変異酵母株を用いたアッセイを中心に評価を行った項目では、興味ある結果が得られた。今回は Ca²⁺シグナル伝達や細胞周期に関わる遺伝子変異酵母株でなく、ユビキチンリガーゼ遺伝子変異酵母株 (*rsp8^{Δ01E}*) に対する生育回復活性 (図 4) を有する 2 種類の新規 NMIFA (A 及び B) を見いだすことに成功した。さらに、これらは、PP2C (PPM1A) に対する活性化作用も示した。当該 NMIFA は新たな生体シグナル伝達に関わる機能を持つことが予想され、今後の研究展開が期待できる結果となった。

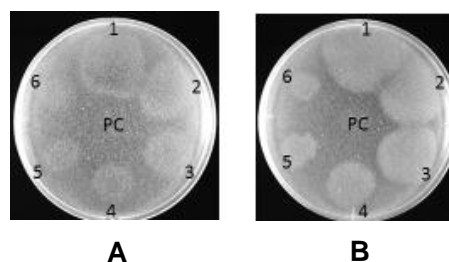


図 4 : ユビキチンリガーゼ遺伝子変異酵母株 (*rsp8^{Δ01E}*) に対する生育回復活性を示す 2 種類の新規 NMIFA (左, A ; 右, B)

No. 1: 5 μ g/spot; No. 2 ~ 6: No. 1 を 1/2 ごとに段階希釈; PC (positive control): FK506 12.5ng/spot

4 今後の具体的な展開

本研究では、三陸産巻貝に由来する新規 NMIFA の構造に基づいた生物活性に関する重要な手掛かりを得ることができた。海産不飽和脂肪酸の新たな付加価値を高めるという視点から、これまでに報告のない異なる 2 つの生物活性を有する新規 NMIFA (A 及び B) の作用メカニズムの解析に関する研究を展開する。さらに、検出された 10 種類の NMIFA に対する総合的な生物活性評価を進めることにより、特異な構造と生体機能の一端が明らかになり、機能性食品の開発に向けた研究への足掛かりになると考えている。

5 論文・学会発表等の実績

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kawashima H, Ohnishi M. "Novel odd-chain fatty acids with a terminal double bond in ovaries of the limpet *Cellana toreuma*." *Lipids* 52, 375-381 (2017) doi: 10.107/s11745-017-4240-7. (査読有り)
- ② Shimada K, Sugawara A, Korenaga T, Kawashima H. "Total synthesis and structural elucidation of two unusual non-methylene-interrupted fatty acids in ovaries of the limpet *Cellana toreuma*."

Lipids 52, 1019–1032 (2017) doi: 10.107/s11745-017-4303-9. (査読有り)

[学会発表] (計 2件)

- ① 川島英城
ヨメカサガイ (*Cellana toreuma*) 卵巣の新規ジエン酸、日本油化学会第56回年会、2017年9月13日
- ② 川島英城
カサガイ類の生殖細胞から見いだされた末端二重結合を有する新規ジエン酸の分布、日本農芸化学会2018年度大会、2018年3月16日

6 参考文献

- 1) Barnathan G. “Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: occurrence, characterization and biological properties.” *Biochimie* 91, 671-678 (2009) doi: 10.1016/j.biochi.2009.03.020.
- 2) Carballeira NM. “New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents.” *Prog Lipid Res* 47:50-61 (2008) doi: 10.1016/j.plipres.2007.10.002.
- 3) Yoshida J, Uesugi S, Kawamura T, Kimura K, Hu D, Xia S, Toyooka N, Ohnishi M, Kawashima H. “(4Z,15Z)-Octadecadienoic acid inhibits glycogen synthase kinase-3 β and glucose production in H4IIE cells.” *Lipids* 52, 295-301 (2017) doi: 10.107/s11745-017-4236-3.
- 4) Kawashima H, Ohnishi M. “An unprecedented occurrence of Δ 5,9- and Δ 9,15-dienoic fatty acids in ovaries of the archaeogastropod limpet *Cellana toreuma*.” *Lipids* 51, 257-262 (2016) doi: 10.107/s11745-015-4107-8.
- 5) Kawashima H, Ohnishi M. “Novel heneicosadienoic and tricosadienoic acid isomers in ovaries of marine archaeogastropods.” *Lipids* 47, 827-833 (2012) doi: 10.107/s11745-012-3692-z.
- 6) Kawashima H, Ohnishi M, Ogawa S, Matsui K. “Unusual fatty acid isomers of triacylglycerols and polar lipids in female gonads of *Cellana grata*.” *Lipids* 43, 559-567 (2008) doi: 10.107/s11745-008-3719-0.