

フラン脂肪酸の物性および抗炎症作用機序の解析

北海道大学大学院薬学研究院

脇本 敏幸

1. 研究の背景・目的

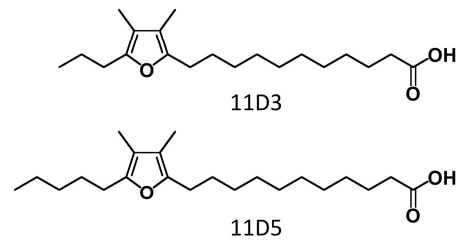
フラン脂肪酸は1974年にカワカマスより見出された天然の脂肪酸である。その後、水圏生物のみならず、オリーブや茶などを含む陸上の植物や、それを食す動物、動物性油脂、チーズやバターなどにも含まれる微量脂肪酸であることが明らかにされている。そのため、飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸と同様に我々が日々食品を通して摂取している脂肪酸である。フラン脂肪酸は分子内に4置換フラン環を含み、この点が他の脂肪酸とは大きく異なる構造的特徴である。このフラン環はすべての炭素原子がアルキル基で置換されているため、非常に電子豊富な性質を有し、酸化されやすく不安定な物性を有する。その物性ゆえにin vitroにおいて強力な抗酸化活性を示すことが分かっている。しかし、in vivoにおけるその生理作用については長年不明であった。我々はフラン脂肪酸のin vivoにおける生理活性を明らかにすべく、ラット関節炎モデルを用いて、フラン脂肪酸エチルエステルの経口投与による炎症抑制作用を調べた。その結果、EPAエチルエステルよりもより低濃度で強力な抗炎症活性を示すことを明らかにし、2011年に報告している(右図)。本研究成果は現時点でフラン脂肪酸のin vivoでの生物活性に関する唯一の報告である。

この研究はニュージーランド近海に生息するイガイ科に属する二枚貝、ミドリイガイに端を発する。ニュージーランド先住民であるマオリ族は、古くからこの貝の生理作用に着目しており、滋養強壮作用を期待して常食してきた。その後の疫学的な研究によって、この貝には関節炎の予防効果や症状の改善作用が認められ、抗炎症作用を示すサプリメントとして開発が進められてきた。しかし活性成分が極めて不安定な成分であったため、ミドリイガイの活性を保持した製品開発は容易ではなかった。現在では凍結乾燥物を超臨界二酸化炭素で抽出したオイル(Lyprinol)が市販されている。我々はこのLyprinolを用いて、抗炎症活性成分の探索研究に着手した。ミドリイガイには、他の海洋生物と同様に高度不飽和脂肪酸が高濃度で含有されている。EPAにはすでに抗炎症効果が知られていることから、ミドリイガイの作用もこれらの高度不飽和脂肪酸が活性本体だと考えられてきた。しかしながら魚油を対照群に用いた活性試験においてLyprinolがより低用量で抗炎症活性を示すことから、高度不飽和脂肪酸だけにその抗炎症作用を帰結する事はできなかった。その上、活性成分は極めて不安定な性質を有するはずであり、我々は脂肪酸画分に含まれる不安定活性成分を見いだす必要があった。そこで、天然油脂の微量脂肪酸であり、抗酸化活性を示すフラン脂肪酸に着目し、Lyprinol中にフラン脂肪酸が比較的高含量で含有されている事を明らかにした。その含量は約5 mg/g程度であり、オリーブオイル等に比較して圧倒的に多い含量であった。つぎにフラン脂肪酸の抗炎症活性を検討するために、フラン脂肪酸を半合成的に大量調製した。実際の抗炎症活性試験は、アジュバント関節炎モデルラットを用いた。0日目にSD系雌性ラットの右後足に結核菌の死菌をアジュバントとして注入し、10日目以降に発症する2次炎症の指標として非処置足の浮腫体積を計測し、抗炎症活性の評価を行った。その結果、フラン脂肪酸は0.5 mg/kgの経口投与で浮腫の抑制を示した。一方で、EPAは同じ投与量では抑制効果は示さなかった。¹

このように不安定な物性を有するフラン脂肪酸は広く天然の動植物に含まれる微量抗炎症活性脂肪酸である。しかしながら、不安定な性質を示すため、我々が日常的に摂取する食材等にどの程度含まれるかは加工方法にも依存するため、最終製品の段階で個別に検証する必要がある。そこで、本研究では機能性食品や薬用植物等を対象にフラン脂肪酸の有無を検証することにした。また、フラン脂肪酸の抗炎症活性の作用機序に関しては不明であり、未だ手つかずの状況にある。そこで、フラン脂肪酸の生物活性を細胞レベルで解析することを目的とした。脂肪細胞への分化能を有するマウス線維芽細胞3T3-L1を用いて、フラン脂肪酸の投与実験を行う。In vitroにおいては、フリーのフラン脂肪酸を用いて生物活性を評価する。一方で、実際に生体内に含まれるフラン脂肪酸は何だかのエステル体として存在している可能性が高い。ミドリイガイの先行研究ではin vivoでの生物活性を検証するため、エチルエステル体を用いたが、エチルエステル体は明らかに非天然型である。そこで、in vitroの評価系を用いて、フラン脂肪酸を構成脂肪酸として含む天然の生物活性脂質形態を明らかにする。

フラン脂肪酸

天然由来の微量抗酸化活性脂肪酸



ラット関節炎モデルにおいて強力な抗炎症活性を示す。

T. Wakimoto, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108, 17533-17537

2. 方法

まず、薬用植物や植物性食材を対象にフラン脂肪酸の有無を検証した。本研究では特に、滋養強壮作用が期待される食材や脂溶性成分を多量に含む薬用植物を分析対象として選別した。生薬としては白朮、蒼朮、人参および山薬、食材としては山薬の基原植物であるナガイモの他、銀杏を分析対象とした。各種生薬は栃本天海堂より刻み生薬として購入し、クロロホルム-メタノール中で抽出、ナトリウムメキシド処理によって脂肪酸メチルエステルを調製した。引き続きシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画し、各画分のGC-MS分析によってフラン脂肪酸の有無を検討した。

また、近年南極オキアミ由来の機能性脂質として着目されているクリルオイルを分析対象に選び、同様の手法にてフラン脂肪酸の分析を行った。さらにマウス線維芽細胞3T3-L1を用いて、脂肪細胞分化能に対するクリルオイルおよびフラン脂肪酸の作用を検討した。In vitroの生物活性試験においてはフリーのフラン脂肪酸を投与する必要があるため、フリーのフラン脂肪酸をサケ白子より抽出、精製し、調整した。すなわちサケ白子を凍結乾燥し、クロロホルム-メタノール中で抽出後、ナトリウムメキシドでメチルエステル化を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで脂肪酸メチルエステル画分を分画した。得られた脂肪酸メチルエステル画分に含まれる不飽和脂肪酸を接触還元によって飽和脂肪酸へ変換し、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することで、フラン脂肪酸メチルエステルを得た。得られたメチルエステル体を用いてベンジルアルコール中エステル交換反応を行い、ベンジルエステル体に変換し、再度精製したのちに、接触還元によってベンジル基を脱保護することで、フリーのフラン脂肪酸を調製した。

3. 結果

生薬中のフラン脂肪酸の分析を行った。白朮、蒼朮、人参および山薬を抽出し、脂肪酸メチルエステル画分の分析を行った結果、人参以外のすべてにフラン脂肪酸が含まれていることが明らかになった。特に含有量の多い生薬は蒼朮、山薬であった。興味深いことに、日本産の山薬においてはフラン脂肪酸が含まれていたが、中国産には検出されなかった。次に山薬の基原植物である長芋を用いて分析を行った。その結果、北海道産の長芋にもフラン脂肪酸が含まれていることが明らかになった。

ミドリイガイのオイルと同様に抗炎症活性など多様な生理活性が報告されている南極オキアミ由来のクリルオイルを対象に用いて同様の分析を行った。その結果、クリルオイルにはミドリイガイオイルに匹敵する濃度のフラン脂肪酸が含まれていることがわかった。そこで、マウス線維芽細胞3T3-L1の脂肪細胞への分化能を指標として、細胞レベルでの生物活性評価を試みた。クリルオイルはマウス線維芽細胞3T3-L1の脂肪細胞への分化を促進したため、クリルオイルの分画を行い、その活性成分の同定を進めた。その結果、複数のN-アシルアミノ酸を同定するに至った。また、サケ白子よりフリーのフラン脂肪酸を調製し、その脂肪細胞分化への効果を検討した。その結果、フラン脂肪酸は単独でも脂肪細胞分化を促進することが明らかになった。

4. 考察

本研究ではフラン脂肪酸の分析対象として、まず生薬を選んだ。これまで、生薬中のフラン脂肪酸の分析例は報告がなく、不安定なフラン脂肪酸が乾燥生薬に安定に含まれているのかどうか、全く不明であった。今回の分析対象としては特に脂溶性成分含量が多く、滋養強壮作用が期待されている生薬に着目した。白朮、蒼朮、人参および山薬を対象に分析を行った結果、白朮、蒼朮、山薬のいずれからもフラン脂肪酸が検出された。特に山薬は滋養強壮作用が期待されている生薬であり、ミドリイガイの事例との整合性が示唆される。そこで、基原植物である生の長芋を用いて分析を行った結果、北海道産の長芋よりフラン脂肪酸が検出された。また、山薬においてはフラン脂肪酸の有無が産地の違いにも依存することがわかった。このことは、山薬の加工方法の違いに由来する可能性もある。以上の結果は生薬よりフラン脂肪酸を検出した初めての結果である。生薬は通常原薬を湯中で煎じて服すため、元来は用事調製によって用いられてきた。したがって乾燥原薬の状態では安定に存在しているが、煎じた後には不安定で短寿命な有効成分が生薬に存在する可能性を示唆している。² 今回の結果より、フラン脂肪酸が生薬有効成分の一つである可能性も示唆されることから、今後はより精密な定量分析を進めるとともに、薬能と含有量との相関を検討していく。

また、ミドリイガイのオイルと類似した生理活性が報告されている健康食品素材であるクリルオイルを用いてフラン脂肪酸の分析を行った。クリルオイルは南極オキアミ由来の脂質であり、ミドリイガイと同様に通常の魚油よりも顕著な生理活性が認められている海洋性脂質である。しかし、その生理活性の活性本体は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、まずクリルオイル中のフラン脂肪酸の有無を検討した。その結果、ミドリイガイオイルに匹敵する濃度のフラン脂肪酸が含まれていることが明らかになった。その含量はオリーブオイル等のフラン脂肪酸含有植物オイルの十倍以上である。さらにクリルオイルの生物活性を検証するために、マウス線維芽細胞3T3-L1の脂肪細胞分化能を用いた。クリルオイルは脂肪細胞分化を促進することが明らかになったため、この生物活性を指標に活性成分の分画を進めた。その結果、活性成分としてN-アシルアミノ酸類を同定するに至った。³ 現在、N-アシルアミノ酸のアシル基に含まれる脂肪酸組成の解析を進めるとともに、それらを有機合成によって調製し、化合物レベルでのより詳細な生物活性の検討を進めている。

本研究成果によって、これまで検討されていなかった生薬や海洋性脂質にフラン脂肪酸が含まれていることが初めて明らかになった。特に生薬に含まれるフラン脂肪酸の意義は今後より詳細に薬能との関連を精査することで明らかにしていく必要がある。さらにミドリイガイの先行研究では脂肪酸エチルエステルでの抗炎症活性の検討に止まっていた有効成分の解析が、本研究でin vitroの生物活性試験を用いることで、新たな生物活性分子としてN-アシルアミノ酸を同定するに至った。これらの研究成果は未だprimitiveな段階ではあるが、本研究成果を基盤とし、今後統合的なフラン脂肪酸の生理機能や意義を明らかにしていく。

5. 発表論文、参考文献

本研究成果をまとめた論文は現在投稿準備中である。

参考文献

- 1) T. Wakimoto, H. Kondo, H. Nii, K. Kimura, Y. Egami, Y. Oka, M. Yoshida, E. Kida, Y. Ye, S. Akahoshi, T. Asakawa, K. Matsumura, H. Ishida, H. Nukaya, K. Tsuji, T. Kan, I. Abe, Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17533-17537 (2011)
- 2) T. Wakimoto, I. Abe, Labile natural products. *MedChemComm*, **3**, 866-870 (2012)
- 3) J. Z. Long, K. J. Svensson, L. A. Bateman, H. Lin, T. Kamenecka, I. A. Lokurkar, J. Lou, R. R. Rao, M. R. Chang, M. P. Jedrychowski, J. A. Paulo, S. P. Gygi, P. R. Griffin, D. K. Nomura, B. M. Spiegelman, The secreted enzyme PM20D1 regulates lipidated amino acid uncouplers of mitochondria. *Cell*, **166**, 424-435 (2016)