

# 肝臓における n-3系不飽和脂肪酸変換の活性化および その分子機構の解明に関する研究

## 学位論文内容の要旨

水産物に含まれている多価不飽和脂肪酸(PUFA)には、様々な生理作用を持つものが含まれている。特に DHA は、抗動脈硬化作用や抗腫瘍効果、抗炎症作用、記憶機能の改善作用など多くの生理作用を有することが知られており、乳幼児においては必須脂肪酸として積極的な摂取が望まれている。

一方、哺乳動物の生体内では必須脂肪酸として吸収された $\alpha$ -リノレン酸(18:3n-3; ALA)が、鎖長延長反応および不飽和化反応により DHA へと変換されることが知られている。しかしながら、ALA から DHA への変換率は 1-2%と非常に低いものである。よって生体内における DHA への変換の活性化は健康機能の維持に必要な DHA 量を効率的に供給する手段として有効であると考えられる。

以前の研究においてワカメ脂質に含まれるフコキサンチンがマウス肝臓中において定性的に DHA 含有率を増加させることが確認されており、定量的な分析による DHA 合成の促進作用とその分子機構の解明が課題であった。

そこで本研究では、フコキサンチンの新規機能性として肝臓における DHA 増加作用について詳細な検討を行った。第一章第一節において、まず、肥満/II型糖尿病モデルマウスである KK-*A*<sup>y</sup> マウスにフコキサンチン及びその生体内代謝物であるフコキサンチノールを投与して肝臓中の脂肪酸量を定量的に分析した。その結果、フコキサンチンおよびフコキサンチノール 0.1 %および 0.2 %を含む飼料を 4 週間投与することにより、肝臓中の DHA 含量がそれぞれの濃度に依存して有意に増加することを明らかにした。特に 0.2 %のフコキサンチンを投与した場合はコントロールと比較して約 2 倍まで DHA 含量が増加することが明らかとなった。

更に、第一章第二節において、正常マウスに対する DHA 含量の増加作用について調べた。その結果、正常マウスである C57BL/6J マウスに対しても、フコキサンチンを飼料中に 0.2 %含有させて投与することにより肝臓中の DHA 含量が増加し、特に PL 画分における DHA 含量の有意な増加を見出した。また、n-3PUFA 変換経路における律速酵素である D6D のタンパク質発現量を解析したところ、フコキサンチンの投与により増加することが明らかとなった。これらの結果よりフコキサンチンは糖尿病/肥満モデルである KK-*A*<sup>y</sup> マウスだけでなく、正常マウスである C57BL/6J マウスに対しても肝臓中の DHA 含量を増加させる作用を示すことを明らかにした。

第一章第三節では類似構造を持つキサントフィルであるアスタキサンチンとフィトールをそれぞれマウスに投与し、フコキサンチンの作用との比較を行った。その結果、フコキ

サンチンを投与した場合でのみ肝臓中の DHA 含量を有意に増加させ、アスタキサンチンやフィトールによる効果は見られなかった。よって、肝臓における DHA 含量の増加作用は、フコキサンチンに特徴的であることが推察される。

肝臓の脂質代謝は、転写因子である PPAR $\alpha$  や LXR によって制御されることが報告されている。そこで第二章ではそれらの転写因子のアゴニストである WY-14643 と TO-901317 を 10 週齢の C57BL/6J マウスに 4 週間投与し、肝臓の脂質代謝への影響や肝臓中の遺伝子変動について解析を行った。PPAR $\alpha$  のアゴニストである WY-14643 や LXR のアゴニストである TO-901317 を投与したマウスでは、肝臓の白色化及び組織中の脂肪滴の形成及び肥大化が組織観察によって認められ、脂肪肝が誘導されたことが示された。一方、このような脂肪肝はフコキサンチン投与マウスでは見られなかった。更に肝臓中の脂肪酸組成を分析したところ、WY-14643 を投与した群では control 群に比べて AA や DPA、DHA の含量の増加が見られた。また、TO-901317 を投与した群では 16:0 や 18:1n-9 の含量の顕著な増加が見られ、その一方で AA や DHA の含量は減少傾向にあった。更に、各試験飼料の投与による肝臓への影響をより詳細に明らかにするため、DNA マイクロアレイにより肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量を網羅的に解析した。その結果、WY-14643 を投与した群では  $\Delta$ 6-不飽和化酵素である FADS2 や鎖長延長酵素である ELOVL-5 の遺伝子発現が顕著に上昇したのに対し、TO-901317 を投与した群では  $\Delta$ 9-不飽和化酵素である SCD1 や鎖長延長酵素である ELOVL-6 の遺伝子発現が過剰に増加した。これらの結果から、PPAR $\alpha$  の活性化は DHA を増加させるが、LXR の活性化と同様にアセチル-CoA からオレイン酸までの生合成系も併せて活性化し、PUFA の変換に限らず脂肪酸合成および脂肪蓄積全体を促進すると推察される。一方、フコキサンチンの投与では脂肪蓄積が誘導されないことから PUFA の変換系を活性化させる一方で 16:0 や 18:0 への脂肪酸生合成系への大きな影響は見られないといえる。

近年の研究により ALA が  $\Delta$ 6-不飽和化反応により 18:4 へと変換されるだけでなく、鎖長延長反応により 20:3 へと変換される経路が報告された(図 1)。このことは生体内における n-3PUFA 変換経路が複数の経路から成り立つことを示している。そこで第三章ではヒト肝臓ガン細胞 HepG2 を用いて n-3PUFA 変換経路についてより詳細な検討を行った。

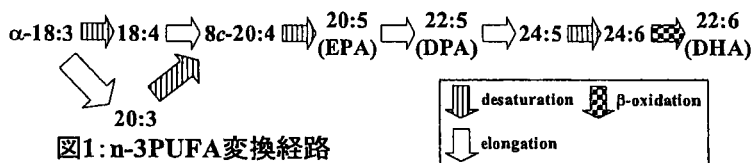


図1: n-3PUFA変換経路

まず第三章第一節では HepG2 に対して n-3PUFA を添加し、得られた総脂質のガスクロマトグラムを比較した。その結果、ALA を添加した細胞において代謝物と予想されるピークが複数検出された。さらに GC-MS による同定を行った結果、20:3n-3,6,9 や 20:4n-3,6,9,15 (5c-20:4) および 20:4n-3,6,9,12 (8c-20:4) を同定した。この結果から、ALA は通常 18:4n-3,6,9,12 へと不飽和化された後に鎖長延長され 8c-20:4 へと代謝されるが、それ以外に 5c-20:4 への変換経路が存在することが明らかとなった。また、5c-20:4 や 8c-20:4 を添加した細胞において異なる未知のピークが検出された。そこで第二節において不飽和化酵素 FADS1 および FADS2、鎖長延長酵素 ELOVL-5 の遺伝子を RNAi 法によりノックダウンし、脂肪酸組成を分析することにより変換経路の推定を行った。その結果、5c-20:4 以外に n-3PUFA 変換経路における代謝物として 22:4n-3,6,9,15 (7c-22:4) や 22:4n-3,6,9,12 (10c-22:4)、26:5n-3,6,9,12,15 (26:5n-3) の 3 分子を見出し、それぞれの変換経路としてこれら 3 分子への鎖長延長反応経

路を明らかにした。これらの結果から、HepG2 における新規 n-3PUFA 変換経路(図 2)と脂肪酸分子を下記のように推定した。

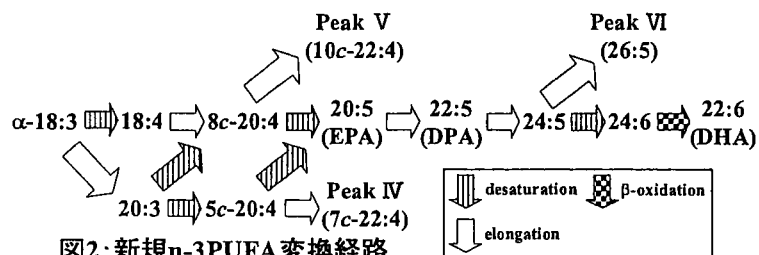


図2:新規n-3PUFA変換経路

第三章第三節では HepG2 に WY-14643 および TO-901317 を添加して ALA の変換に対する影響について検討した。その結果、ALA から 24:6 への変換には LXR の活性化による脂肪酸変換と同様の分子機構が部分的に関与していることが示唆された。また、24:6 から DHA への変換にはβ酸化が関与しているため、それらを制御する PPARαの活性化が必要であると考えられる。

一方、第一章においてフコキサンチンがマウス肝臓中の DHA 含量を増加させることを示した。本研究ではフコキサンチン代謝物であるフコキサンチノールおよびアマロウシアキサンチン A を HepG2 に添加し、ALA の変換に対する影響について検討した。その結果、アマロウシアキサンチン A を添加した細胞において DHA 含量に増加傾向が見られた。さらにこれらの細胞における鎖長延長酵素 ELOVL-2 および ELOVL-5、不飽和化酵素の FADS1 および FADS2 の mRNA 発現量を測定したところ、アマロウシアキサンチン A を添加した細胞において検討した 4 つの酵素の遺伝子発現量が有意に増加した。これらの結果から肝臓においてアマロウシアキサンチン A が DHA 含量を増加させる活性本体である可能性が示された。

本研究により、生体内における n-3PUFA 変換経路に関する新たな知見を得ることができた。また、その分子機構解明の過程においてフコキサンチンは ALA から DHA への変換反応の主要部分に深く関わっていることを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 下 和 夫  
副 査 教 授 高 橋 是 太 郎  
副 査 准 教 授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

## 肝臓における n-3系不飽和脂肪酸変換の活性化および その分子機構の解明に関する研究

水産物に含まれる多価不飽和脂肪酸(PUFA)は、様々な生理作用を有することが知られている。特にDHAは、脂質代謝制御作用、高血圧改善効果、心機能改善作用を有し、その適度な摂取により、動脈硬化などに起因する心臓病の予防作用が期待されている。また、脳の様々な機能を維持する上でも必須な成分であることが明らかになりつつある。ヒトなどの哺乳動物の体内では、必須脂肪酸として吸収された $\alpha$ -リノレン酸(18:3n-3; ALA)が、鎖長延長反応および不飽和化反応によりDHAへと変換されることが知られている。ただ、ALAからDHAへの変換率は一般に低いため、魚油などの直接摂取によるDHAの供給も推奨されている。しかし、DHAは化学構造的に極めて不安定で、酸素と容易に反応して毒性のある酸化物や風味劣化の原因となる種々の低分子化合物を生成するため、その直接利用には様々な問題点も指摘されている。したがって、生体内でのALAからのDHAへの変換反応を促進する物質やその反応機構の解明は、ヒトにとって重要な生理機能性成分であるDHAを、安全かつ適量得る上で重要であり、新たなDHA供給の手段を提案することにもなる。これまでの研究により、褐藻類に特徴的なカロテノイドであるフコキサンチンをマウスに投与した場合、肝臓中のDHAの増大が示唆された。しかし、その定量的な検討や、メカニズムの詳細については不明である。そこで、本研究では、フコキサンチン投与によるDHA合成の促進作用の定量的な分析と、その分子機構の解明を目的として実験を行い、以下のような成果を得た。

1. 肥満/II型糖尿病モデルマウスであるKK-*Ay*マウスに、フコキサンチン及びその生体内代謝物であるフコキサンチノールを投与して、肝臓中の脂肪酸量を定量的に分析したところ、肝臓中のDHA含量の有意な増加を見出した。その増大は投与したフコキサンチンまたはフコキサンチノールの濃度に依存して増大し、0.2%のフコキサンチンを投与した場合には、コントロールと比較して約2倍までDHA含量が増加することを明らかにした。
2. フコキサンチンの肝臓中DHA増大作用は、正常マウス(C57BL/6J)につ

いても見られ、この場合、特に肝臓脂質中のリン脂質画分におけるDHA含量の有意な増加が特徴的であることを見出した。

3. ALAからDHAへの変換経路の律速酵素は、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素(D6D)である。したがって、肝臓中でのDHAの増大は、D6Dの発現制御が深く関わっていると推察し、D6Dタンパク質の発現量を解析し、フコキサンチン投与によりこのタンパク質の増加を明らかにした。

4. フコキサンチンの作用の特異性を検討するため、フコキサンチンと類似構造を有するアスタキサンチンとフィトールをマウスに投与し、フコキサンチンの作用との比較を行った。その結果、フコキサンチンを投与した場合でのみ肝臓中のDHA含量は有意に増加することを確認した。

5. フコキサンチンは体内に取り込まれる際、そのほとんどがコキサンチノールに代謝される。また、フコキサンチノールの一部はさらにアマロウシアキサンチンAへと還元される。フコキサンチンを動物に投与した場合の活性本体を明らかにするため、両代謝物をHepG2に添加し、ALAのDHAへの変換反応について検討した。その結果、アマロウシアキサンチンAを添加した細胞においてのみDHA含量が増加した。さらにこれらの細胞における鎖長延長酵素ELOVL-2およびELOVL-5、不飽和化酵素のFADS1およびFADS2のmRNA発現量を測定したところ、アマロウシアキサンチンAを添加した細胞でこれら4つの酵素の遺伝子発現量が有意に増加した。以上より、フコキサンチン投与で見られた肝臓中DHA含量の増大の活性本体は、アマロウシアキサンチンAと推察した。

6. フコキサンチン投与による肝臓中DHA含量増大の分子機構を明らかにするため、肝臓の脂質代謝制御の鍵物質である転写因子(PPAR $\gamma$ やLXR)のアゴニストであるWY-14643とTO-901317のC57BL/6Jマウスに対する投与実験を行った。その結果より、アマロウシアキサンチンAによる肝臓中DHA含量の増大作用では、これら転写因子に対する単純な制御作用だけに基づくものではないことを明らかにした。

このように、本研究では、褐藻カロテノイドフコキサンチンによるマウス肝臓中のDHA合成促進作用を定量的に解明した。この促進作用は、肥満・糖尿病病態マウスだけでなく正常マウスにおいても見出された。さらに、ALAからDHA合成の律速酵素であるD6Dの発現増大が、フコキサンチンによるマウス肝臓中DHAの生成増大反応に大きく関与していること、またその活性本体はフコキサンチンの代謝物であるアマロウシアキサンチンAであることを明らかにした。本研究で明らかにしたフコキサンチンによるDHAの生体内での合成促進作用は、ヒトにとっての水産必須成分であるDHAの新たな供給方法を示すだけでなく、脂質代謝研究分野の重要な知見としても高く評価できる。よって審査員一同は本研究の申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。