

## ホスホリパーゼを用いた機能性化合物のリン脂質誘導化法に関する研究

山本 幸弘<sup>\*1</sup>, 細川 雅史<sup>\*2</sup>, 宮下 和夫<sup>\*3</sup>

### Study on phosphatidylation of functional compounds using phospholipases

Yukihiro YAMAMOTO<sup>\*1</sup>, Masashi HOSOKAWA<sup>\*2</sup>, Kazuo MIYASHITA<sup>\*3</sup>,

**ABSTRACT:** Here I describe about the phosphatidylation of functional compounds using phospholipases which is covered with my doctoral thesis. Physiologically active compound such as conjugated fatty acid, terpenes and phenolic compounds sometime exert their activity not fully because of their poor solubility in a certain environment. On the other hand, phospholipids have characteristic amphiphilic property and biocompatibility. In this study, several physiologically active compounds were phosphatidylated using phospholipases such as phospholipase A2 and phospholipase D. The enzymatic reaction was modified and optimized for the yield. In addition, the phosphatidylated compounds were tested for their physiological activity *in vitro*. Conjugated linoleic acids which have anti-obesity effects were phosphatidylated mediated by phospholipase A2. In this reaction, it is found that water mimics such as formamide was key factor for the synthetic reaction. Several terpenes and phenolic compounds which have anti-cancer effects or anti-oxidative effects were phosphatidylated mediated by phospholipase D. Some phosphatidylated compounds were exerted higher anti-cancer effects compare to parent compounds.

**Keywords:** phospholipid, phospholipase, conjugated linoleic acid, terpenes

(Received September 21, 2009)

#### 1. はじめに

抗酸化作用や抗癌作用などの機能性を有する化合物を食品成分や化粧品素材、医薬品として用いる場合、乳化剤等を併用することで分散性や安定性、吸収性を高める必要がある。しかし、それによって利用用途が制限されることも少なくない。そのため機能性化合物に両親媒性を付与することが出来れば幅広い利用が可能となる。このような機能性改善の手段の一つとして、アシル化やリン酸化等の誘導化が挙げられ、それによって分散性や吸収性を大きく改善出来る。

本研究では、優れた生体適合性と両親媒性から医療品や機能性食品、化粧品素材として広範に利用されているリン脂質の分子構造に着目し、種々の機能性物質をリン脂

質誘導化するための新規反応プロセスの開発と、得られたリン脂質誘導体の機能性評価に関して研究を行った。その際、生体触媒である **phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)** や **phospholipase D (PLD)** といったリン脂質関連酵素を利用し、温和な環境で特異的な反応を簡便に進める方法について検討した。

#### 1. 共役リノール酸含有ホスファチジルコリンの合成

抗癌作用や抗肥満作用を有することから機能性脂肪酸として近年注目されている共役リノール酸(CLA)に着目し<sup>1-6)</sup>, PLA<sub>2</sub>を用いたエステル化反応によるCLA含有ホスファチジルコリン(CLA-PC)の合成を試みた。特に, PLA<sub>2</sub>を用いたエステル化反応では, 副反応である加水分解反応を制御する反応系中の至適水分量の調節が非常に難しかったため, 必須水代替物としてformamideを利用したCLA-PCの合成を試みた。まず, ブタ腓臓由来 PLA<sub>2</sub> (ppPLA<sub>2</sub>)を用いて, glycerolを分散媒として用い

\*1 : 理工学部助教(yyamamoto@st.seikei.ac.jp)

\*2 : 北海道大学大学院水産科学研究院准教授

\*3 : 北海道大学大学院水産科学研究院教授

た反応系にてCLAと卵黄由来lysophosphatidylcholine (LPC) とのエステル合成反応を行った。LPC 11 mg, CLA 18 mg, glycerol 550 mg, ppPLA<sub>2</sub> 3.3×10<sup>4</sup> U, CaCl<sub>2</sub> 0.3 μmol, 37°C, 48 hの反応条件において、酵素を活性化するために水 50 μl あるいはformamide 50 μl を添加しCLA-PCの合成を試みたところ、水を用いた系では合成率が僅かに 2 mol%であった。それに対し、formamideを用いた系では 46 mol%となり、大幅に合成率が高まるのが明らかとなった。得られたCLA-PCの脂肪酸組成をGC分析したところ、基質として用いたCLAの約半分の脂肪酸組成比であったことより、LPCのsn-2 位に特異的に基質CLAが導入されていることが示された。更に、合成率に及ぼすformamide添加量やglycerol添加量、ppPLA<sub>2</sub> 添加量の影響を検討して、至適反応条件をLPC 11 mg, CLA 18 mg, glycerol 550 mg, ppPLA<sub>2</sub> 3.3×10<sup>4</sup> U, formamide 50 μl, CaCl<sub>2</sub> 0.3 μmol, 37°C, 6 hとした。その至適反応条件においては 65 mol%の合成率を得た。しかし、上記、反応条件では反応時間 6 h以降では合成率の低下が見られた。その要因として大気中から吸湿される水分や、エステル合成反応の進行により生成した水が加水分解反応を亢進したと推察し、albuminやcaseinなどのタンパク質を添加することによりPLA<sub>2</sub> 近傍に存在する過剰な水分のコントロールを試みた。その結果、前述の反応系にalbumin 1 mgを添加することで、合成率の低下を抑えることが可能となった(Fig. 1)。酵素以外のタンパク質を添加するだけで合成率を維持できる結果は、水分の調節が困難であったPLA<sub>2</sub> を用いたエステル化反応において極めて有用な知見である。水分活性の調整や減圧下での反応では最終的な収率を高めることは可能であるが、反応初速度が低下する。それに対してタンパク質の添加による反応法は、簡便であるのみならずその吸水性が反応速度に影響を及ぼさない点が利点であることが示された。

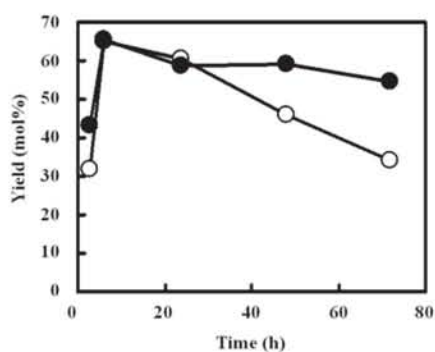


Fig. 1. Time course of CLA-PC synthesis mediated by PLA<sub>2</sub> in the presence (closed symbol) or absence (opened symbol)

of albumin. Reaction mixture: 11 mg LPC, 18 mg CLA-mixture, 550 mg glycerol, 3.3×10<sup>4</sup> U PLA<sub>2</sub>, 50 μl formamide, 0.3 mmol CaCl<sub>2</sub>, and 1 mg albumin. The reaction was conducted at 37°C for 48 h.

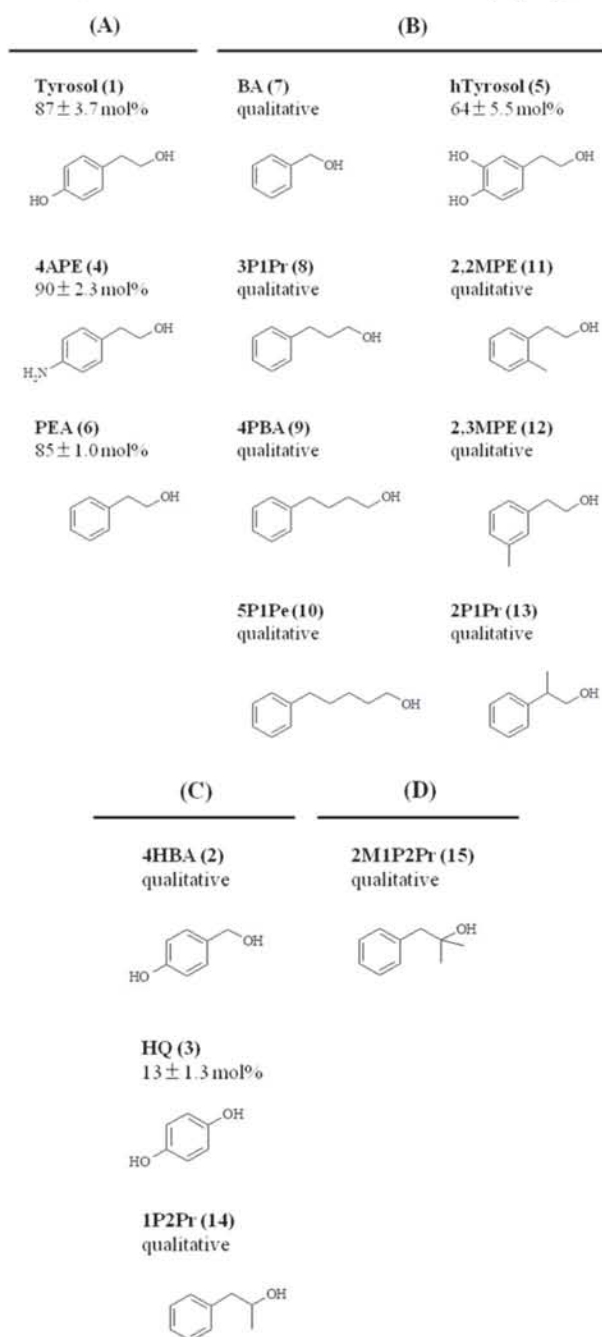
## 2. 機能性アルコールのリン脂質誘導化

PLDを用いたホスファチジル基転移反応による機能性アルコールのリン脂質誘導化法について検討した。ホスファチジル基転移反応を様々な機能性化合物に応用する為には、様々なアルコール化合物を基質として用いて反応特性を明らかにする必要がある。そのような観点から、本研究ではこれまで報告例のないテルペンアルコール化合物やフェニルアルコール化合物に着目し、それらのホスファチジル基転移反応について検討した。

PLDを用いたホスファチジル基転移反応は一般に、水とクロロホルムなどの有機溶媒との2相系により行われるが<sup>7-11)</sup>、そのような有機溶媒の使用は工業的応用をはかる際、安全面で問題点となる。そこで大豆PC (SoyPC) とテルペンアルコールとのホスファチジル基転移反応では、酢酸エチルと 0.2M酢酸緩衝液(pH 5.6)との2相系及び、0.2M酢酸緩衝液(pH 5.6)に基質を分散させて反応を行う水系にて試みた。反応系に及ぼすgeraniol (1) の添加量の影響と酵素添加量の影響を検討し、合成率の経時的測定を行い最終的に至適反応条件を2相系; SoyPC 50 μmol, 基質アルコール 500 μmol, 酢酸エチル 1.6 ml, *Streptomyces* sp.由来PLD (ssPLD) 1.6 U, 0.2M酢酸緩衝液(pH 5.6) 0.8 ml, 37°C, 24 h, 水系; SoyPC 50 μmol, 基質アルコール 2000 μmol, ssPLD 1.6 U, 0.2M酢酸緩衝液(pH 5.6) 0.8 ml, 37°C, 24 hと定めた。この反応条件におけるphosphatidyl-geraniolの合成率は2相系では 52 mol%であったのに対し水系では 90 mol%となり、テルペンアルコールのリン脂質誘導化では水系が適していることが明らかとなった。一方、フェニルアルコールのリン脂質誘導化は、SoyPCを基質リン脂質とし酢酸エチルと 0.2M酢酸緩衝液(pH 5.6)との2相系によりホスファチジル基転移反応を行った。Tyrosol (8) の添加量の影響を検討するとともに、合成率の経時的変化を測定した結果、至適反応条件をSoyPC 50 μmol, 酢酸エチル 1.6 ml, 基質アルコール 500 μmol, ssPLD 1.6 U, 0.2M酢酸緩衝液(pH 5.6) 0.8 ml, 37°C, 24 hのように定め、この反応条件においてphosphatidyl-Tyrosolの合成率は 87 ± 3.7 mol%に達した。

次いで、至適反応条件において各種基質アルコールを用い合成率を比較したところ、基質テルペンアルコール

の鎖長が長くなる程合成率が低下すること、perillyl alcohol (5) やmyrtenol (6) のような分子内に環状構造を有するテルペンアルコールもホスファチジル基転移反応の基質になり得ることを明らかにした。また、フェニルアルコールのベンゼン環からホスファチジル基に置換される-OH基までの距離が合成率に大きく影響を与えるのに対し、*p*-位の置換基はその種類によらずほとんど反応に影響を及ぼさないことが明らかになった(Fig. 2)。

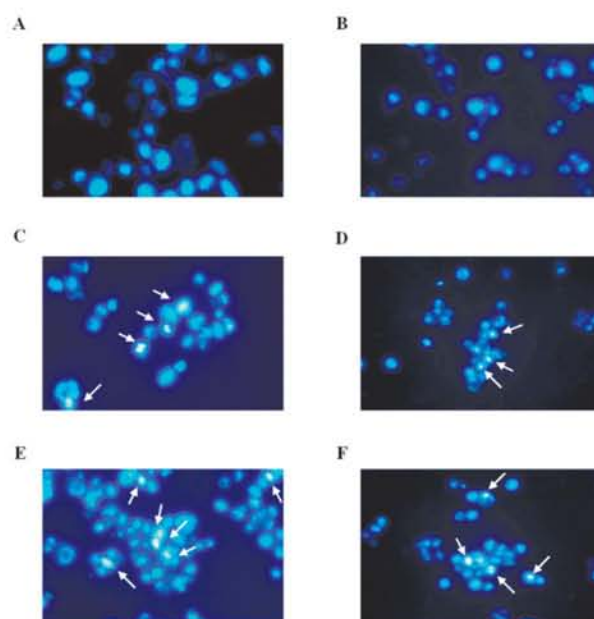


**Fig. 2.** Specificity of PLD on substrate phenyl alcohols for phosphatidylation. High yield, (A); Moderate yield, (B); Low yield, (C); Poor yield, (D). "Qualitative" means that the yield was qualitatively estimated by TLC.

### 3. リン脂質誘導体の機能性評価

合成された各種リン脂質誘導体について機能性評価を行った。特にヒト癌細胞株を用いた増殖抑制試験やDPPHラジカル捕捉能、酸化安定性を指標に、抗癌作用ならびに抗酸化作用を評価した。

ヒト白血病細胞(HL-60)の細胞増殖に対するテルペンアルコール及びそのリン脂質誘導体の影響を調べたところ、母化合物であるgeraniol (1), perillyl alcohol (5), myrtenol (6), nerol (7)は400 μMで40%程度の増殖抑制効果であったのに対し、そのリン脂質誘導体では100 μMで生細胞数がコントロールの20-30%まで減少し、リン脂質誘導化することで抗癌作用が増強されることが示された。また、ヘキスト染色によりアポトーシス細胞が観察されたことから、少なくとも部分的にはアポトーシスを誘導することでこれらの増殖抑制が起こされていることが明らかとなった(Fig. 3)。さらに不飽和脂肪酸に富むイクラPCを基質リン脂質として得られたTyrosol (8)のリン脂質誘導体は、基質リン脂質には無いDPPHラジカル捕捉活性ならびに酸化安定性を有する新規リン脂質であることが明らかとなり、誘導体が優れた供給形態であることが示された。



**Fig. 3.** Fluorescence dye staining observation of HL-60 cells treated with phosphatidylated terpene alcohols. (A) control (PBS), (B) SoyPC, (C) phosphatidyl-geraniol, (D) phosphatidyl-perillyl alcohol, (E) phosphatidyl-myrtanol, (F) phosphatidyl-nerol. Cells were incubated for 48 h in culture media containing 100 μM of individual PLs.

#### 4. むすび

以上、著者の学位論文に関して、概略をご紹介させていただいた。すぐれた両親媒性と生体親和性に着目し、機能性成分をリン脂質へ誘導化した研究例はいくつかあるが、得られた誘導体に対し、実際に機能性評価をした研究は少なかった。本研究によりPLA<sub>2</sub>及びPLDを用いた機能性化合物のリン脂質誘導化法を確立し、それにより得られたリン脂質誘導体の新規機能性を見出した。

#### 参考文献

- 1) C. Ip, J.A. Scimeca and HJ. Thompson: Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer* 74, 1050-1054 (1994).
- 2) K. Kang, M. Miyazaki, JM. Ntambi, and MW. Pariza: Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315, 532-537 (2004).
- 3) N. Inoue, K. Nagano, J. Hirata, YM. Wang and T. Yanagita: Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 679-684 (2004).
- 4) Y. Park, KJ. Albright, W. Liu, JM. Storkson, ME. Cook, and MW. Pariza: Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32, 853-858 (1997).
- 5) K. Nagao, YM. Wang, N. Inoue, SY. Han, Y. Buang, T. Noda, N. Kouda, H. Okamatsu, and T. Yanagita: The 10trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. *Nutrition* 19, 652-656 (2003).
- 6) KM. Hargrave, MJ. Azain, and JL. Miner: Dietary coconut oil increases conjugated linoleic acid-induced body fat loss in mice independent of essential fatty acid deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 1737, 52-60 (2005).
- 7) LR. Juneja, N. Hibi, N. Inagaki, T. Yamane, and S. Shimizu: Comparative study on conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylglycerol by cabbage phospholipase D in micelle and emulsion system. *Enzyme and Microbial Technology* 9, 350-354 (1987).
- 8) LR. Juneja, T. Kazuoka, T. Yamane, and S. Shimizu: Kinetic Evaluation of Conversion of Phosphatidylcholine to Phosphatidylethanolamine by Phospholipase D from Different Sources. *Biochimica et Biophysica Acta* 960, 334-341 (1988).
- 9) LR. Juneja, T. Kazuoka, N. Goto, T. Yamane, and S. Shimizu: Conversion of Phosphatidylcholine to Phosphatidylserine by Various Phospholipase D in The Presence of l- or d-Serine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1003, 277-283 (1989).
- 10) Y. Iwasaki and T. Yamane: Phospholipases in enzyme engineering of phospholipids for food, cosmetics and medical applications. In *"Lipid Biotechnology"* ed. by Tsung Min Kuo and Harold W. Gardner, Chap. 20 (pp. 417-431), Marcel Dekker, Inc., New York, (2002).
- 11) Z. Guo, AF. Vikbjerg, and X. Xu: Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances* 23, 203-205 (2005).