

植物油中の非メチレン中断型不飽和脂肪酸： 生理作用、構造解析および代謝

田中 保*

Non-Methylene Interrupted Polyenoic Fatty Acid in Plant Oil :
Physiological Effect, Structural Analysis and Metabolism

Tamotsu TANAKA*

ABSTRACT

The physiological effects of dietary non-methylene interrupted polyenoic fatty acids (NMIFAs) are reviewed. NMIFAs are constituents of lipids from some lower animals and some plants. Several investigators have been reported beneficial effects of dietary NMIFA-containing oils. This review also covers analytical methods and possible metabolic fate of dietary NMIFAs.

キーワード：非メチレン中断型不飽和脂肪酸、ガスクロマトグラフィー・質量分析、脂肪酸鎖長伸長酵素、ラット肝臓

Keywords: non-methylene interrupted polyenoic fatty acid, gas chromatography-mass spectrometry, fatty acid chain elongation system, rat liver

1. まえがき

植物界に広く分布する多価不飽和脂肪酸はリノール酸や α -リノレン酸である。これらの二重結合位置は Δ -9, 12位および Δ 9, 12, 15位で二重結合と二重結合との間にメチレンを1個挟んだ構造である。これに対し、ある種の植物は二重結合と二重結合との間にメチレンを2~4個挟んだタイプの多価不飽和脂肪酸が存在する。これらは非メチレン中断型不飽和脂肪酸と総称される。近年、このタイプの不飽和脂肪酸を含む油脂がユニークな生理作用を有することが報告され、注目されている。本稿では非メチレン中断型不飽和脂肪酸の生理作用、代謝についての知見を紹介する。

2. 非メチレン中断型不飽和脂肪酸の種類

非メチレン中断型不飽和脂肪酸は粘菌[1]や海綿動物[2]をはじめ、多くの植物に存在する[3-8]。高木と板橋はマキ、ナギ、イチョウ、マツ、イチイ、カヤ、マオウ、トウヒな

どの種子油に非メチレン中断型不飽和脂肪酸が含まれていることを報告している[3]。これらの裸子植物の種子には炭素数18の非メチレン中断型不飽和脂肪酸として、18:2(Δ -5, 9)、18:3(Δ -5, 9, 12)、18:4(Δ -5, 9, 12, 15)が、炭素数20の非メチレン中断型不飽和脂肪酸として、20:2(Δ -5, 11)、20:3(Δ -5, 11, 14)、20:4(Δ -5, 11, 14, 17)が数%から20%含まれている。いずれの脂肪酸も Δ 5位に二重結合を有し、 Δ 5不飽和化酵素の作用により生合成されることが推定される。一方、裸子植物でもオダマキは18:3(Δ -5t, 9, 12)のトランス型非メチレン中断型不飽和脂肪酸を含む[4]。

3. 非メチレン中断型不飽和脂肪酸の生理作用

五葉松 (*Pinus koraiensis*) の種子油には15%程度の18:3(Δ -5, 9, 12)が含まれる[5]。この脂肪酸はピノレン酸(Pinolenic acid)と呼ばれ、 γ -リノレン酸(18:3, Δ -6, 9, 12)の Δ 6位の二重結合が Δ 5位にシフトした非メチレン中断型不飽和脂肪酸である(図

1)。菅野らは自発性高血圧発症ラットを五葉松の種子油添加食で飼育し、この食餌がラットの血圧上昇を低下させること、動脈のプロスタサイクリン産生を減少させることを報告し[9]、別の実験では松の実油添加食がイムノグロブリンの産生量に影響することを報告している[10]。また、Assertらは松の実油添加食が超低密度リポタンパク質の減少を介し、血漿トリグリセリドレベルを下げることを報告している[11]。

コロンビン酸 (Columbinic acid) は $\Delta 5$ 位にトランス型二重結合を有し、ピノレン酸と幾何異性体の関係にある非メチレン中断型不飽和脂肪酸である(図1)。高等動物の生育にはリノール酸が必須であるが、高等動物ではこの脂肪酸を自身で合成できない。このため、リノール酸が摂取できなければ、成長抑制、皮膚症状(鱗層化、脱毛、壊死)などの欠乏症を呈することになる。コロンビン酸はこのような必須脂肪酸欠乏症を改善することが知られている[4]。このコロンビン酸の効果のメカニズムについては未だにはっきりとしない部分が多い。摂取されたコロンビン酸が単独[12]、あるいはそのリポキシゲナーゼ代謝産物[13]が症状の改善に寄与するとの報告もある一方で、コロンビン酸は必須脂肪酸欠乏状態にありながらも僅かに存在するリノール酸と置き換わり、遊離したリノール酸がアラキドン酸へと変換され、症状の改善に寄与するとも考えられている[14, 15]。

ポドカルプ酸 (Podocarpic acid) はアラキドン酸の $\Delta 8$ 位の二重結合を欠いた構造(図1)であり、高野槇や、クロベに多く含まれている非メチレン中断型不飽和脂肪酸である[3]。この脂肪酸を含むクロベの種子油添加食でラットを飼育するとポドカルプ酸はホスファチジルイノシトール(PI)画分によく取り込まれ、PIのアラキドン酸含量を低下させることが知られている[16]。

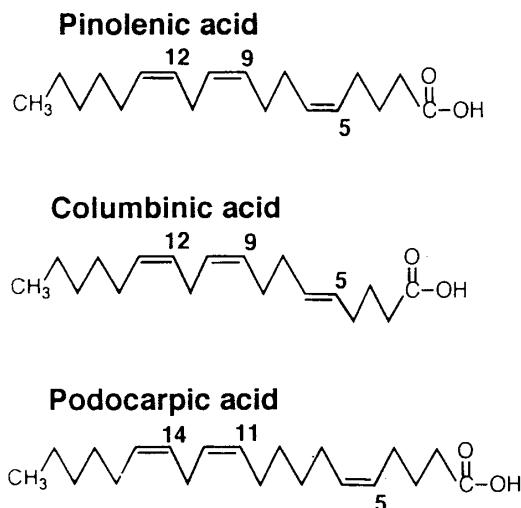


Fig. 1. Structures of NMIFAs in plants.

4. 非メチレン中断型不飽和脂肪酸の単離方法

上述した非メチレン中断型不飽和脂肪酸を含む油脂にはリノール酸やリノレン酸を多く含むものがある。従って、その油脂の作用が真に非メチレン中断型不飽和脂肪酸に由来することを説明するためには高純度の非メチレン中断型不飽和脂肪酸を用い、培養細胞系、あるいは *in vitro* の実験系で酵素レベルの解析が必要であるが、現在のところ、いずれの非メチレン中断型不飽和脂肪酸も市販されていない。従って、この目的には種子油よりこれらの脂肪酸を単離、精製する必要がある。筆者らは非メチレン中断型不飽和脂肪酸の単離手法を開発した[17]。硝酸銀薄層クロマトグラフィー (AgTLC) は銀イオンが π 電子に親和性を有することを利用して、不飽和脂肪酸をその不飽和度に応じて分離するものであるが、AgTLCを用いると同鎖長、同不飽和度のメチレン中断型と非メチレン中断型不飽和脂肪酸が分離できる。例えば、石油エーテル・ジエチルエーテル・酢酸(70:20:2, v/v)あるいはベンゼン・アセトン・ジエチルエーテル・酢酸(65:15:15:5, v/v)の展開溶媒で、展開させるとピノレン酸は γ -リノレン酸よりも移動度が低くなる。我々はこの系を用いて、五葉松の種子油、西洋オダマキおよび高野槇より、それぞれ、ピノレン酸、コロンビン酸およびポドカルプ酸を単離した。また、この2つの展開溶媒を組み合わせた AgTLC を行うと、動物組織に取り込まれた非メチレン中断型不飽和脂肪酸も単離できる。この単離手法とガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS) とを利用すると、非メチレン中断型不飽和脂肪酸の代謝物の構造を解析できる[18]。

5. 非メチレン中断型不飽和脂肪酸のGC-MSによる構造解析

一般にポリエン酸のエレクトロンインパクトマスペクトルは出現するフラグメントイオンが多すぎて、そのマスペクトルより二重結合の位置を読みとることが困難である。そこで、二重結合位置に由来するフラグメントイオンの強度を高くするため、種々の誘導体化法が考案されている[19-22]。筆者らはピノレン酸のジメチルオキサゾリンおよびピロリジン誘導体を調製し、そのマスペクトルを γ -リノレン酸のそれと比較してみた。その結果、ピノレン酸と γ -リノレン酸の二重結合位置の違いに由来するフラグメントイオンピークを判別することは困難であった。筆者らの得た結果からすると、先の誘導体化は二重結合が1~2までの不飽和脂肪酸にのみ有効である。ポリエン酸の二重結合位置の決定法には部分水素添加によって得

られるモノエン酸を分析対象とする方法が有効である[23]。この方法はまず、ポリエン酸をヒドラジン水和物と処理することにより部分的な水素添加を行うが、この反応は二重結合の転移や異性化を伴わず、ゆっくりと進行するために、反応をコントロールしやすい。得られるモノエン酸（元の二重結合位置を保持している）の二硫化ジメチル誘導体は二硫化ジメチル付加部分（元の二重結合位置）から解列したフラグメントイオンが高いイオン強度で現れるため、二重結合位置の解析が容易である。実際、ピノレン酸だけでなく、ポドカルプ酸の二重結合位置もたやすく解析することができた（図2）。ただし、この手法は誘導体化に多少手間がかかり、試料を多く（0.5mg 以上）必要とすることが欠点である。また、試料は単一にしておく必要があるが、先の AgTLC を用いれば単離は可能である。

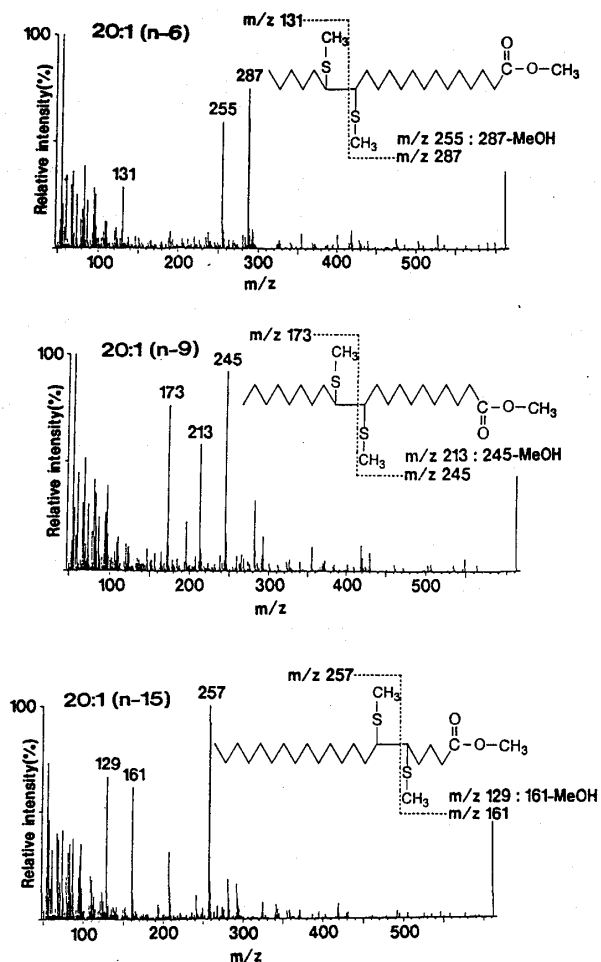


Fig. 2. Mass spectra of dimethyl disulfide (DMS) adducts of methyl monoenoates derived from the pure methyl podocarpate.

6. 非メチレン中断型不飽和脂肪酸の代謝

非メチレン中断型不飽和脂肪酸は生体内でどのように代謝されるのであろうか。菅野らは S.D. ラットに五葉松の種子油を1ヶ月間与え、サフラワー油添加食群と比較したが、両群間に食餌の摂取量、体重増加率に差が見られないことを報告した[9]。このラットの肝臓ホスファチジルコリン(PC)画分に取り込まれたピノレン酸は4.8%程度であった。筆者らも松の実油添加食をラットに6週間与え、肝臓リン脂質およびトリグリセリド画分の脂肪酸組成に及ぼす影響を調べたが、アシル化されたピノレン酸はPCおよびホスファチジルエタノールアミン画分で、3~4%、トリグリセリド画分で5%程度であった[18]。このように、ピノレン酸は松の実油中に15%と、比較的多く含まれているにも関わらず、この油を与えたラットの膜リン脂質にピノレン酸が蓄積することはない。一方、ピノレン酸の幾何異性体にあたるコロンビン酸を55%含む、*Aquilegia vulgaris* 油をラットに1ヶ月間与えた場合、コロンビン酸は肝臓のPC画分に20%近く取り込まれる[4]。必須脂肪酸欠乏ラットにコロンビン酸を与えた場合でも同様な結果が報告されており[14]、コロンビン酸はピノレン酸よりも蓄積しやすい脂肪酸と思われる。

このような、蓄積効率の差はリン脂質アシル化酵素の基質特異性が原因ではないと思われる。*in vitro* の系を用いて、リン脂質アシル化酵素による代謝をラット肝ミクロソームリン脂質への取り込みを指標とした場合、ピノレン酸はγ-リノレン酸と同等にリン脂質へアシル化される[24]。また、グリセロール-3-リン酸への取り込みを指標とした場合、ピノレン酸はγ-リノレン酸などと同等にアシル化される[25]。このことから、ピノレン酸はリン脂質の生成経路や修正系の段階で排除されているわけではない。さらに、後述するように、ピノレン酸は脂肪酸鎖長伸長酵素による代謝を受けにくいことが判明している[24]。つまり、C20脂肪酸へとはそれほど代謝されない。おそらく、摂取されたピノレン酸のほとんどは脂肪酸のβ酸化経路により代謝され、消去されると推定される。実際、ミトコンドリアへの脂肪酸輸送に関わる酵素のカルニチン-パルミトイル-トランスフェラーゼ1はγ-リノレン酸よりもピノレン酸を良い基質とすると報告されている[25]。肝臓に限らず多くの組織でリノール酸は豊富に存在する不飽和脂肪酸である。前述したようにコロンビン酸はリノール酸と置き換わりやすい。細胞の膜リン脂質構築において、コロンビン酸がリノール酸と等価として挙動するならば、脂肪酸代謝酵素はコ

ロンビン酸の $\Delta 5$ トランス二重結合を二重結合として認識しないのかもしれない。

7. 非メチレン中断型不飽和脂肪酸を用いた脂肪酸代謝酵素の解析

γ -リノレン酸は生体内で、脂肪酸鎖長伸長酵素により2炭素鎖長伸長され、ジホモ γ -リノレン酸へと代謝される。ピノレン酸は γ -リノレン酸とよく似た構造をしているにも関わらず、*in vivo*の実験でピノレン酸の鎖長伸長物は検出されない[9,18]。このことはピノレン酸は γ -リノレン酸とは異なり、鎖長伸長酵素により代謝されないか、代謝されてもすばやく消去されることを示唆する。そこで、ラット肝臓ミクロソーム画分を酵素源として、脂肪酸鎖長伸長酵素が認識する脂肪酸構造を非メチレン中断型不飽和脂肪酸を用いて調べた[24]。脂肪酸鎖長伸長酵素が最も良い基質とするのは γ -リノレン酸とステアリドン酸であり、両者とも、二重結合が $\Delta 6$ 位から始まるメチレン中断型不飽和脂肪酸である。しかし、 $\Delta 6$ 位の二重結合が $\Delta 5$ 位にシフトしたピノレン酸の代謝効率は γ -リノレン酸の約1/3にまで低下する。この $\Delta 5$ 位の二重結合がトランス型となったコロンビン酸は1/10にまで低下し、 $\Delta 6$ 位の二重結合を持たないリノール酸と同レベルであった。一方、炭素数20の不飽和脂肪酸のアラキドン酸もまた脂肪酸鎖長伸長酵素により代謝されやすい脂肪酸の1つであるが、アラキドン酸の $\Delta 8$ 位の二重結合を欠いたポドカルプ酸はほとんど代謝されない。一方、ラットに18:2(Δ -9,13t)を与えた場合、この脂肪酸は鎖長伸長され、20:4(Δ -5,8,11,15t)へと代謝されることが確認されている[26]。このことは鎖長伸長酵素が基質を認識するポイントは脂肪酸のメチル末端よりも、カルボキシ末端側にあることを意味している。鎖長伸長酵素は4段階の反応を行う複合酵素系であるが、最初の反応のアシル CoA とマロニル CoA との縮合が全反応の律速である[27,28]。このステップにおける生成物の量比は前述した結果とよく一致した[24]。以上より、脂肪酸鎖長伸長酵素による基質認識は縮合酵素が担っており、この酵素の活性中心にうまく適合するためには $\Delta 5$ 位あるいは $\Delta 6$ 位より始まるメチレン中断型のシス型二重結合配置が重要であると思われる。

Luthria と Sprecher は不飽和脂肪酸を基質とする鎖長伸長酵素には少なくとも2種のサブタイプが存在する可能性を報告している[29]が、筆者らもこの実験を通じ、確かにその可能性があることを確認した[24]。この場合にも、非メチレン中断型不飽和脂肪酸を用いた実験が有効であった。

おわりに

前述したように、植物中に存在するほとんどの非メチレン中断型不飽和脂肪酸は $\Delta 5$ 位に二重結合を有している。このため、この脂肪酸を摂取した場合、鎖長伸長-不飽和化のプロセスで代謝されても、アラキドン酸へとは変換されない。従って、膜リン脂質のアラキドン酸残基と置き換わるなどの効果を有する非メチレン中断型不飽和脂肪酸は、有用な実験ツールであるだけでなく、医薬品としての可能性も期待できる。

参考文献

- [1] T. Saito, H. Ochiai: Identification of a novel all-cis-5,9,12-heptadecatrienoic acid in the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*, *Lipids* 31, pp.445-447, (1996).
- [2] Y.-G. Joh, I.J. Elenkov, K.L.Stefanov, S.S.Popov, G. Dobson, W.W. Christie: Novel di-, tri-, and tetraenoic fatty acids with bis-methylene-interrupted double-bond system from the sponge *Heliclonia cinerea*, *Lipids* 32, pp.13-17, (1997).
- [3] T. Takagi, Y. Itabashi: cis-5-Olefinic unusual fatty acids in seed lipids of gymnospermae and their distribution in triacylglycerols, *Lipids* 17, pp716-723, (1982).
- [4] U.M.T. Houtsmuller: Columbunic acid, a new type of essential fatty acid, *Prog. Lipid Res.* 20, pp889-896, (1981).
- [5] R.L.Wolff, C.C.Bayard: Fatty acid composition of some pine seed oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, pp1043-1046, (1995).
- [6] D.-J. Carrier, J.E. Cunningham, L.R. Hogge, D.C. Taylor, D.I. Dunstan: Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of some fatty acids from white and interior spruce, *J. Chromatogr. A* 715, pp317-324, (1995).
- [7] M.O. Bagby, C.R. Smith, K.L. Mikolajczak, I.A. Wolf: *Thalictrum polycarpum* fatty acids-A new class of fatty acids from vegetable seed oils, *Biochemistry* 1, pp632-639, (1962).
- [8] M.S.F. Lie Ken Jie, H.B. Lao, Y.F. Zheng: Lipids in Chinese medicine. Characterization of all cis 5,11,14,17-eicosatetraenoic acid in *Biota orientalis* seed oil and a study of oxo/furanoid esters derived from *Biota* oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, pp597-600, (1988).
- [9] M. Sugano, I. Ikeda, K. Wakamatsu, T. Oka: Influence of Korean pine (*Pinus koraiensis*)-seed oil containing cis-5,cis-9,cis-12-octadecatrienoic acid on

- polyunsaturated fatty acid metabolism, Eicosanoid production and blood pressure of rats, *Br. J. Nutr.* 72, pp775-783, (1994).
- [10] N. Matsuo, K. Osada, T. Kodama, B.O. Lim, A. Nakao, K. Yamada, M. Sugano: Effects of γ -linolenic acid and its positional isomer pinolenic acid on immune parameters of brown-norway rats, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 55, pp223-229, (1996).
- [11] G. Assert, B. Staels, R. L. Wolff, E. Bauge, Z. Madj, J-C. Fruchart, J. Dallongeville: Effects of *Pinus pinaster* and *Pinus koraiensis* seed oil supplementation on lipoprotein metabolism in the rat, *Lipids* 34, pp39-44, (1999).
- [12] W.J. Elliot, H. Sprecher, P. Needleman: Physiologic effects of columbinic acid and its metabolites on rat skin, *Biochim. Biophys. Acta* 835, pp158-160, (1985).
- [13] W.J. Elliot, A.R. Morrison, H. Sprecher, P. Needleman: The metabolic transformations of columbinic acid and the effect of topical application of the major metabolites on rat skin, *J. Biol. Chem.* 260, pp987-992, (1985).
- [14] E.C. Mandon, I.N.T. de Gomez Dumm, R.R. Brenner: Effect of dietary columbinic acid on the fatty acid composition and physical membrane properties of different tissue of EFA-deficient rats, *Arch. Latinoam. Nutr.* 36, pp401-414, (1986)
- [15] M.J.T. de Alaniz, I.N.T. de Gomez Dumm, R.R. Brenner: Effect of different acids with Δ -9,12-dienoic structures on Δ 9 desaturation activity in rat liver microsomes, *Lipids* 21, pp425-429, (1986).
- [16] A. Berger, J.B. German: Extensive incorporation of dietary Δ -5,11,14 eicosatrienoate into the phosphatidylinositol pool, *Biochim. Biophys. Acta* 1085, pp371-376, (1991).
- [17] T. Tanaka, K. Shibata, H. Hino, T. Murashita, M. Kayama, K. Satouchi: Purification and gas chromatographic mass spectrometric characterization of non-methylene interrupted fatty acids incorporated in rat liver, *J. Chromatogr. B* 700, pp1-8, (1997).
- [18] T. Tanaka, T. Hattori, M. Kouchi, K. Hirano, K. Satouchi: Non-methylene interrupted polyenoic fatty acid: Structural characterization and metabolism by fatty acid chain elongation system in rat liver: in R.A. Riemersma (Ed.), *Essential Fatty Acid and Eicosanoids*, 4th International Congress, American Oil Chemists' Society Press pp229-223, (1998).
- [19] D.J. Harvey: Picolinyl ester as derivatives for the structural determination of long chain branched and unsaturated fatty acids, *Biomed. Mass Spectrom.* 9, pp33-38, (1982).
- [20] D.J. Harvey: Picolinyl derivatives for the structural determination of fatty acids by mass spectrometry: Application to polyenoic acids, hydroxy acids, di-acids and related compounds, *Biomed. Mass Spectrom.* 11, pp340-347, (1984).
- [21] D.L. Luthria, H. Sprecher: 2-Alkenyl-4,4-dimethyloxazolines as derivatives for the structural elucidation of isomeric unsaturated fatty acids, *Lipids*, 28, pp561-564, (1993).
- [22] B.A. Andersson, R.T. Holman: Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids, *Lipids* 9, pp185-190, (1974).
- [23] K. Yamamoto, A. Shibahara, T. Nakayama, G. Kajimoto: Double bond localization in Heneicosapentaenoic acid by a gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) method, *Lipids* 26, pp948-950, (1991).
- [24] T. Tanaka, T. Hattori, M. Kouchi, K. Hirano, K. Satouchi: Methylene-interrupted double bond in polyunsaturated fatty acid is an essential structure for metabolism by the fatty acid chain elongation system of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 1393, pp299-306, (1998).
- [25] T. Ide, M. Murata, M. Sugano: Octadecatrienoic acid as the substrates for the key enzymes in glycerolipid biosynthesis and fatty acid oxidation in rat liver, *Lipids* 30, pp755-762, (1995).
- [26] W.M.N. Ratnayake, Z.Y. Chen, G. Pelletier, D. Weber: Occurrence of 5c,8c,11c,15t-eicosatetraenoic acid and other unusual polyunsaturated fatty acids in rats fed partially hydrogenated canola oil, *Lipids* 29, pp707-714, (1994).
- [27] J.T. Bernert Jr., H. Sprecher: An analysis of partial reactions in the overall chain elongation of saturated and unsaturated fatty acid by rat liver microsomes, *J. Biol. Chem.* 252, pp6736-6744, (1977).
- [28] S. Yoshida, M. Takeshita: Comparison between condensation and overall chain elongation of arachidoyl-CoA and arachidonoyl-CoA in swine cerebral microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 254, pp180-187, (1987).
- [29] D.L. Luthria, H. Sprecher: Studies to determine if rat liver contains multiple chain elongating enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 1346, pp221-230, (1997).