

平成 31 年 2 月 15 日

2017 年度 一般財団法人杉山産業化学研究所研究助成 報告書

「緑黄色野菜および藻類に含まれるグリセロ糖脂質の分子種分析と 抗炎症作用特性の解明」

北海道大学大学院水産科学研究院
細川 雅史

【目的】

グリセロ糖脂質は、植物葉緑体のチラコイド膜を構成する主要脂質であり、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) を主要な脂質クラスとし、その脂肪酸組成は緑黄色野菜や藻類の種類によって大きく異なることを特徴とする。このような糖脂質は、酸化安定性に優れた脂質形態であることが報告されており、新たな機能性の探索が期待される。本研究では、グリセロ糖脂質の機能性として、様々な生活習慣病の発症に関わる過剰な炎症に着目し、その抑制効果について評価を行った。特に、グリセロ糖脂質の構造と抗炎症作用との関連性について調べることを目的とした。

【実験方法】

1. グリセロ糖脂質の分離および脂肪酸組成分析

緑黄色野菜のホウレンソウ、珪藻 *Isochrysis galbana*、紅藻ダルス (*Palmaria palmata*) から脂溶性成分を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにより MGDG、DGDG、SQDG をそれぞれ分離し、GC にて脂肪酸組成を分析した。さらに、ダルスより分離した各グリセロ糖脂質を DNPU 誘導化した後、LC-MS にて分子種分析を行った。

2. 炎症因子産生抑制作用

精製した各種グリセロ糖脂質をマクロファージ様 RAW264.7 細胞の培養液に添加して一定時間培養後、リポポリサッカライド (LPS) を用いて炎症を誘導した。その後、total RNA を抽出し、定量 PCR 法により炎症因子 mRNA の発現抑制作用を評価した。また、ELISA 法により、培地中に分泌されたサイトカイン等を定量し、グリセロ糖脂質の抗炎症作用を評価した。

【結果および考察】

1. 各種グリセロ糖脂質の脂肪酸および分子種組成

ホウレンソウより分離したグリセロ糖脂質の主要脂肪酸は α -リノレン酸 (18:3n-3) であり、MGDG では 65.12%、DGDG では 80.89%、SQDG では 37.70% であった (表 1)。一方、紅藻のダルスでは EPA 含有率が高く、MGDG では 87.63% に達した。また、*Isochrysis galbana* の主要な n-3 系 PUFA は 18:4n-3 および α -リノレン酸であり、由来により n-3 系 PUFA の含有率および組成が大きく異なることが確認された。ダルスより分離したグリセロ糖脂質について分子種分析を行った結果、MGDG では (EPA : EPA)、DGDG では (EPA:16:0)、SQDG では

(EPA:16:0)および (EPA:14:0)であり、*sn-1* に EPA を結合した分子種が主要であることが示された。

表1. 各種グリセロ糖脂質の脂肪酸組成(%)

	ホウレンソウ			ダルス			<i>Isochrysis galbana</i>		
	MGDG	DGDG	SQDG	MGDG	DGDG	SQDG	MGDG	DGDG	SQDG
14:0	0.06	0.04	0.11	0.35	3.9	11.15	11.11	23.11	13.33
16:0	0.93	9.12	31.72	5.27	43.05	23.92	4.15	7.07	18.95
16:3n-3	31.83	2.8	0.48	-	0.02	-	-	-	-
18:0	0.12	0.72	1.09	0.37	0.44	0.22	0.25	0.14	1.17
18:1n-9	0.22	0.82	1.67	0.83	10.21	1.00	4.66	5.63	4.63
18:2n-6	0.9	3.21	8.19	0.12	1.05	0.13	17.51	12.18	13.38
18:3n-6	-	-	-	0.06	0.09	0.14	3.06	1.03	2.15
18:3n-3	65.12	80.89	37.70	0.02	0.21	0.06	10.62	9.03	6.80
18:4n-3	-	-	-	0.09	0.06	0.19	28.54	11.33	17.65
20:4n-6	-	-	-	2.68	1.48	2.22	0.19	0.07	0.31
20:5n-3 (EPA)	-	-	-	87.63	36.08	49.83	1.48	0.47	3.29
22:6n-3 (DHA)	-	-	-	-	-	-	0.66	0.55	0.88

2. 炎症因子産生抑制作用

Isochrysis galbana から分離した MGDG、DGDG、SQDG をマクロファージ様 RAW264.7 細胞培養液に加え 24 時間培養後から 6 時間 LPS で炎症誘導を行った後、代表的な炎症性サイト

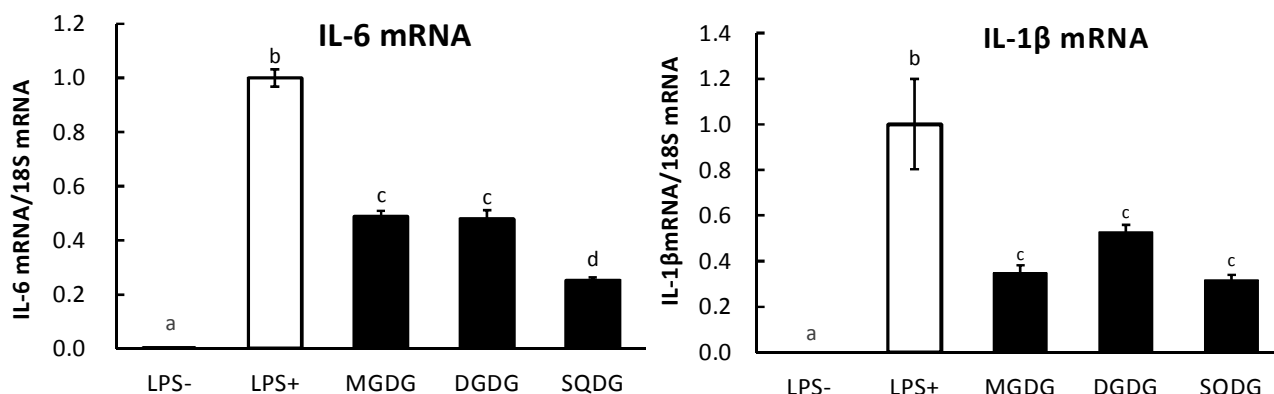


図1 *Isochrysis galbana* より分離したグリセロ糖脂質のRAW264.7細胞に対する炎症性サイトカインmRNA発現抑制効果 (各糖脂質:終濃度20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) $P < 0.05$

カインである IL-6 および IL-1 β の mRNA 発現量を測定した。いずれのグリセロ糖脂質においても、LPS で誘導される IL-6 および IL-1 β mRNA の過剰発現を有意に抑制した。特に、IL-6 においては、SQDG による抑制効果が強いことが示された。

そこで、*Isochrysis galbana* に加え、ホウレンソウおよびダルスから分離した SQDG を用いて、炎症抑制効果を比較検討した。各 SQDG を終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した場合、いずれにおいても IL-6 mRNA の発現を抑制し、試料間における有意な差は認められな

った。さらに、SQDG の添加終濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に低下して RAW264.7 細胞処理を行った結果、 α -リノレン酸を主要脂肪酸とするホウレンソウ由来 SQDG では培地中に分泌される IL-6 濃度に有意な差が見られなかったのに対し、18:4n-3 および EPA を主要脂肪酸とする *Isochrysis galbana* SQDG およびダルス SQDG 処理では有意な低下が認められた。

以上の結果より、緑黄色野菜や藻類に含まれるグリセロ糖脂質は、活性化マクロファージに対して炎症性サイトカインの mRNA を抑制し、特に SQDG による強い抑制効果が認められた。さらに、結合する脂肪酸によっても効果が異なり、18:4n-3 や EPA の結合した SQDG による抑制効果が示された。このようにグリセロ糖脂質の分子種により抗炎症作用が異なることが示されたことから、今後のより詳細な検討とその利用が期待される。

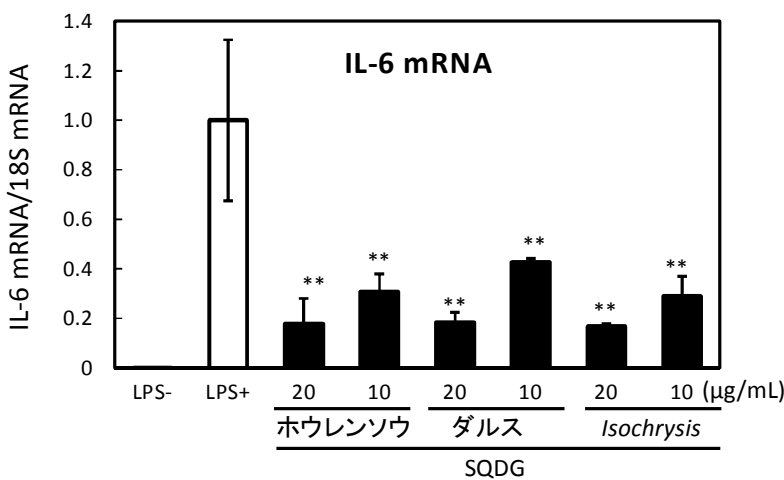


図2 各種SQDGのRAW264.7細胞に対するIL-6 mRNA発現抑制効果
** $P < 0.01$ vs.LPS+

表2. 培養上清のIL-6濃度

	添加量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IL-6 (pg/mL)
LPS-	-	8.557 \pm 0.661
LPS+	-	487.814 \pm 27.269
ホウレンソウ SQDG	5	435.887 \pm 11.893
	2.5	427.655 \pm 22.974
ダルス SQDG	5	350.292 \pm 70.804*
	2.5	516.217 \pm 31.153
<i>Isochrysis</i> SQDG	5	249.735 \pm 13.971*
	2.5	322.119 \pm 17.585*

* $P < 0.05$ vs.LPS+