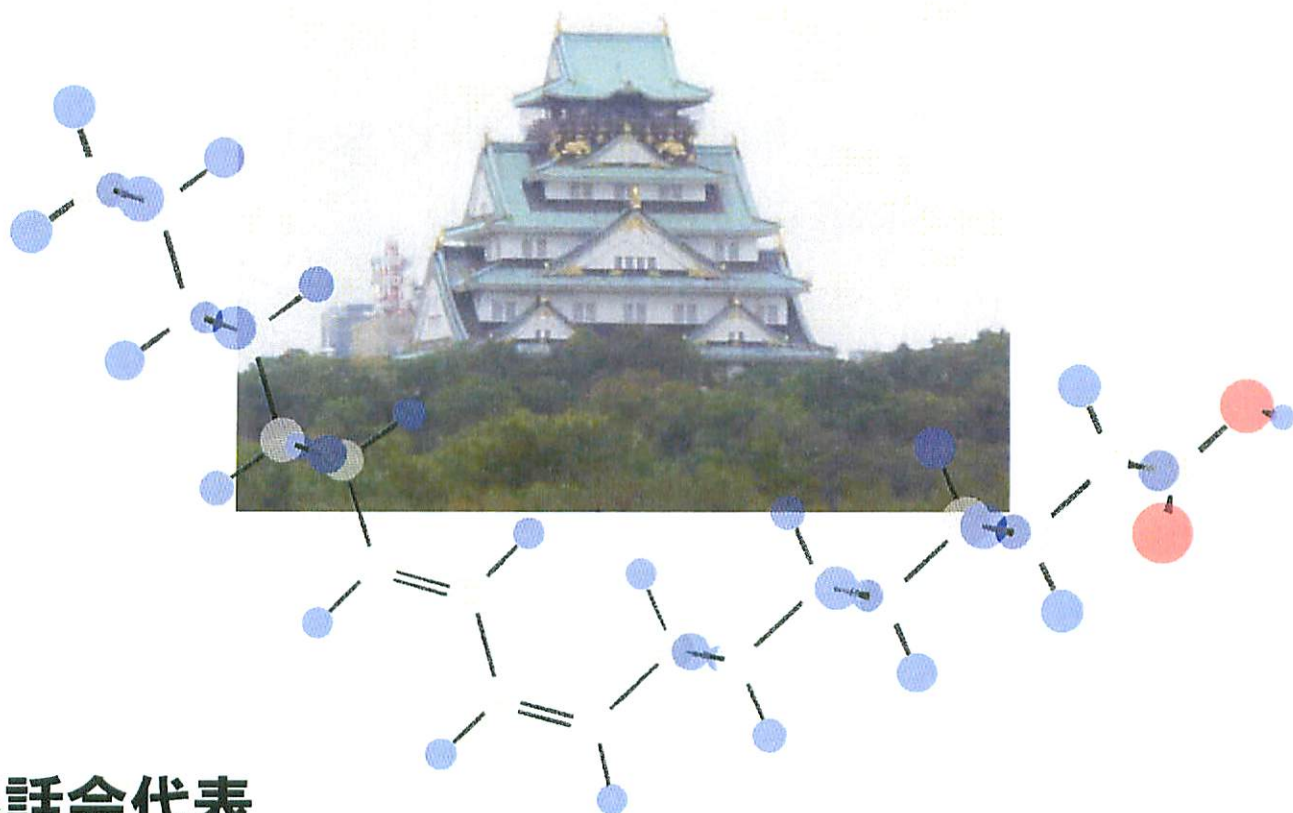


第9回 CLA懇話会



懇話会代表

九州大学・熊本県立大学名誉教授 菅野道廣

第9回世話人

大阪市立工業研究所 島田裕司、永尾寿浩

場所:KKRホテル大阪

日時:平成19年10月20日(土) 13時30分より

第9回 CLA懇話会 講演会要旨集

(一般公演時間 15分、討論時間 5分)

13:30

代表世話人挨拶 ○菅野道廣 (九州大・熊本県立大名誉教授)

講演会 (KKR ホテル大阪、3階・銀河東)

<座長：福田亘博 (宮崎大・農) >

13:40

① 肥満ラットにおける共役リノール酸の組織中含有量と生理作用の関係

○永尾晃治、井上奈穂、平田純一、王 玉明、柳田晃良 (佐賀大・農・生機科)

14:00

② CLAの体脂肪低減効果に対する大豆タンパク質摂取の効果

○古場一哲¹、赤星亜朱香²、田中一成¹、菅野道廣³

(¹ 県立長崎シーボルト大学、² 熊本県立大学、³ 九州大学名誉教授)

<座長：柳田晃良 (佐賀大・農) >

14:20

③ CLAの腫瘍血管新生抑制効果

○都築 毅¹、宮澤陽夫² (¹宮城大・食産業、²東北大院・農)

14:40

④ 酵素法による共役リノール酸モノアシルグリセロールの合成

渡辺 嘉¹、○島田裕司¹、山内良枝²

(¹大阪市立工業研究所、²日清オイリオグループ(株))

15:00 休憩

<座長：永尾寿浩 (大阪市立工業研究所) >

15:20

⑤ 乳酸菌由来遺伝子を導入した形質転換大腸菌による共役脂肪酸生産

○岸野重信^{1,2}、河合正昭²、小川 順²、横関健三¹、清水 昌²

(¹京大院・農・産業微生物、²京大院・農・応用生命)

15:40

⑥ 中鎖脂肪酸を用いた共役リノール酸異性体の溶剤分別と異性体結晶の物理化学的特性

○上原秀隆¹、菅沼智巳¹、根岸 聡¹、宇田幸弘²、古川義純²、上野 聡³、佐藤清隆³

(¹日清オイリオグループ(株)、²北大低温科学、³広島大院生物圏)

<座長：都築 毅 (宮城大・食産業) >

16:00

⑦ トランス脂肪酸基準油脂分析試験法制定とそのCLA分析への適用について

○白澤 聖一 (日清オイリオグループ(株))

16:20

⑧ 国際CLA会議の報告 ○菅野道廣、○小川 順、○柳田晃良、○古賀民穂、○岸野重信

懇親会

17:30～ (KKR ホテル大阪、2階・星華)

① 肥満ラットにおける共役リノール酸の組織中含有量と生理作用の関係

永尾晃治、井上奈穂、平田純一、王 玉明、柳田晃良
佐賀大・農・生機科

【目的】 共役リノール酸（CLA）は、体脂肪の減少・癌形成の阻害・動脈硬化の予防など様々な栄養生理機能が知られているが、これまでに我々も肥満モデル OLETF ラットにおける脂質低下作用および抗肥満作用について報告してきた。本研究では、CLA 食 2 週間摂取後に CLA 不含有食に置き換えて飼育した際の、組織中 CLA 残存量と生理作用について検討した。

【方法】 5 週齢の OLETF ラットに对照食（8%コーン油+2%サフラワー油）もしくは CLA 食（8%コーン油+2% CLA）を与えた 2 群（各 6 匹）を設け、2 週間飼育した。その後、全てのラットを对照食で 2 週間飼育した。

【結果】 最初の 2 週間飼育により、CLA 群では脂質低下作用および抗肥満作用が確認され、ほとんどの臓器で脂肪酸のモノ不飽和化抑制が認められた。また、ほとんどの組織では 9cis, 11trans 型 CLA が多く含有されていたが、心臓、脾臓、筋肉など 10trans, 12cis 型 CLA のほうが多い組織もあった。CLA 不含有食に置き換えて 2 週間飼育した後も、各臓器中に CLA が残存していることが確認された。しかしながら CLA 摂食中止以後 1 週間で CLA による体脂肪低下作用、脂質低下作用は認められなくなった。

②

CLA の体脂肪低減効果に対する大豆タンパク質摂取の効果

古場一哲¹・赤星亜朱香²・田中一成¹・菅野道廣³

¹県立長崎シーボルト大学、²熊本県立大学、³九州大学名誉教授

【目的】CLA の体脂肪低減作用は同時に摂取する食品成分で修飾されることが報告されている。私たちはこれまでに、ラットを用いた摂食試験により、CLA の作用は大豆タンパク質 (SPI) との同時摂取で強められることを観察している。最近、降トリグリセリド (TG) 作用は、SPI の構成成分の一つである β コングリシニン (CON) の方が SPI そのものよりも強いことが示唆されている。そこで本研究では、CON を CLA と同時にラットに摂取させると脂肪組織重量および TG 濃度がどのように影響を受けるのか検討を行った。

【方法】食餌タンパク質として、カゼイン (CAS)、SPI または CON、食餌脂肪として大豆油の一部 (食餌の 1%) をリノール酸または CLA (9c, 11t-18:2, 34.1%; 10t, 12c-18:2, 35.9%) で置き換えた AIN-93G 組成の純化食を、SD 系雄ラットに 4 週間自由摂食させた。屠殺後、脂肪組織重量、血清および肝臓脂質濃度、脂質代謝関連酵素活性などを測定した。

【結果・考察】摂食量および体重増加量は CAS 群と SPI 群の間で同程度であったが、CON 群ではこれらの値は抑えられ、この傾向は CLA を同時摂取した場合にさらに強まった。睾丸周辺および腎臓周辺の白色脂肪組織重量は CAS 群、SPI 群、CON 群の順に軽かった。CLA の摂取は食餌タンパク質の種類に関係なく白色脂肪組織重量を低下させた。血清 TG 濃度も同様に CAS 群、SPI 群、CON 群の順で低値を示し、CLA の摂取により同濃度は食餌タンパク質に関係なく低下傾向を示した。このような変化には少なくとも、SPI や CON の摂取による肝臓サイトソールの脂肪酸合成能の低下、CON および CLA 摂取による肝臓ミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化能の亢進が関与していると考えられた。これらのことから、CLA の効果は CON と同時摂取することでさらに強くなることが示唆された。

③

CLA の腫瘍血管新生抑制効果

○都築毅¹、宮澤陽夫²（宮城大・食産業¹、東北大院・農²）

【目的】天然には様々な脂肪酸が存在する。分子内に共役二重結合を有する共役リノール酸(CLA)は、抗癌作用を始め様々な生理機能を持つことが報告されている。我々も、細胞培養試験や動物試験において CLA が癌抑制作用を示すことを報告した。その時、CLA、特に 10t12c-CLA を投与したマウスの癌組織では、内部が変色し、壊死を起こしていた。これは癌組織内部にまで栄養が行き届いていない状態、つまり栄養を運ぶ血管が新生されていない状態であるように考えられた。癌の進展や転移には、血管系がさまざまな形で密接に関係している。癌が増殖するときには、宿主から癌組織に向かう血管の新生が重要なステップになる。癌治療の目的で血管新生を抑制する成分が注目されている。そこで本研究では、CLA の血管新生抑制効果を細胞培養試験と動物試験で検討し、メカニズムについても検討した。

【方法】供試試料には 9c11t-CLA と 10t12c-CLA の 2 種類の脂肪酸を使用し、ヒト内皮細胞 (HUVEC) を用いて、血管新生の重要なステップである細胞の管腔形成、増殖、遊走、を評価し、マウス背部皮下法やマトリゲル法にて動物試験でも検討した。また、血管新生に関与するタンパク質やその mRNA の動向を追った。

【結果】CLA はどちらの異性体も管腔形成を抑制した。その活性の強さは、10t12c - CLA が 9c11t - CLA より強い作用をしめした。CLA は内皮細胞増殖や細胞遊走を抑制した。CLA は動物試験でも血管新生を有意に阻害した。そして、CLA の血管新生阻害メカニズムとして、血管内皮細胞増殖因子である VEGF の受容体など、血管新生促進因子の発現が低下していることを明らかとした。

【考察】理論的には血管新生を制御出来れば、日本人の死因の 60%が制御可能となる。さらに最近では、血管新生は肥満にも関わっていることが判明している。CLA の様々な生理機能（癌抑制機構、動脈硬化抑制、体脂肪蓄積抑制など）のメカニズムの一つとして、血管新生抑制作用が関わっていることが考えられた。

④ 酵素法による共役リノール酸モノアシルグリセロールの合成

大阪市立工業研究所 渡辺 嘉、島田裕司
日清オイリオグループ(株) 山内良枝

食品用乳化剤として広く利用されているモノアシルグリセロール(MAG)は、高温・高圧下でトリアシルグリセロール(TAG)をグリセロリシスすることにより製造されている。この方法は飽和脂肪酸やモノエン酸のMAGの製造に適した方法であるが、二重結合を多く含む不安定な脂肪酸のMAGの合成に適用することはできない。一方、温和な条件で反応が進行する酵素法は不安定な脂肪酸のMAG合成に適している。ここでは、共役リノール酸(CLA)のMAGが合成できる3つの反応系と、溶媒結晶法を採用した反応混液からMAGの精製について述べる。

1. エステル化とグリセロリシスからなる2段階 *in situ* 反応

Penicillium camembertii リパーゼ(MAGとDAGは認識するがTAGを認識しない)を用いてCLA(FFA)とグリセリンをMAGが固化しない条件下でエステル化すると、ほぼ等量のMAGとジアシルグリセロール(DAG)が合成される。この反応液をそのままMAGが固化する温度(5℃)で2週間以上放置しておく、DAGがグリセロリシスされてMAGに変換される。このエステル化とグリセロリシスからなる2段階 *in situ* 反応を採用するとFFAのエステル化率は95%以上に達し、MAGの収率は90%以上となる。

2. CLAとグリセリンのエステル化

前項で述べたように、*P. camembertii* リパーゼを触媒としてCLA(FFA)とグリセリンをエステル化すると、エステル化率は95%以上に達し、MAGとDAGがほぼ等量合成される。*Candida rugosa*, *Rhizopus oryzae*, *P. camembertii* リパーゼなどを触媒とし、低温(MAGが固化する温度; 5℃)でエステル化すると、リパーゼは固化したMAGを基質として認識しにくいためMAGのDAGへの変換反応は進行せず、MAGを収率よく合成することができる(エステル化率, 95%以上; MAGの収率, 90%以上)。

3. 脱水反応

P. camembertii リパーゼを触媒とし、CLA(FFA)とグリセリンのエステル化を脱水しながら行う。初発水分量を1~2%とし、5 mmHgの減圧下で脱水しながら反応を行うと、反応系中の水分量は1500 ppm程度に維持され、48時間反応でエステル化率は95%以上に達し、MAG含量は90%以上に達する。

この反応系は、酵素の結合水量で説明できるかもしれない。1および2項で述べたように、脱水せずにエステル化反応を行うと、酵素は十分な(過剰量の)結合水を保持している。この状態にある酵素はMAGを基質として認識し、MAGはDAGに変換され、両産物がほぼ等量になったときに反応は平衡に達する。一方、脱水しながら反応を行うと、酵素の結合水量は減少する。制限された量の結合水しか持っていない酵素はMAGを基質として認識できなくなるためMAGからDAGへの変換反応は進行しない。

4. 反応液からMAGの精製

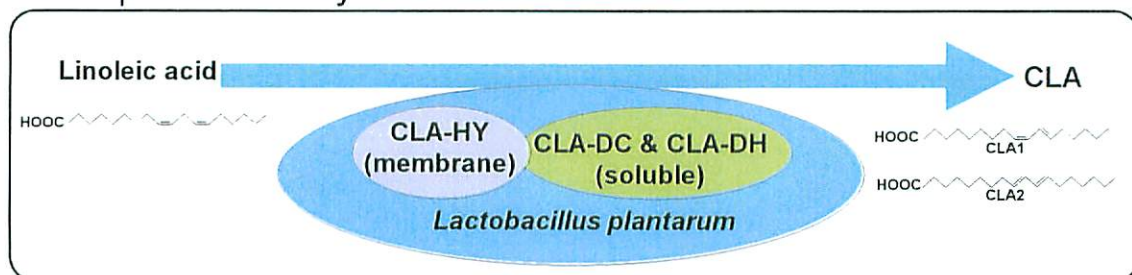
FFAとグリセリンのエステル化を行って得られた反応液中の成分の中で、最も融点が高いのはMAGである。反応液から油分を回収し、4倍量の*n*-ヘキサンを加え0℃に放置するとMAGが効率よく沈殿する。この溶媒結晶法を採用すると反応液から85%の回収率で純度98%のMAGを回収することができる。

- ⑤ 乳酸菌由来遺伝子を導入した形質転換大腸菌による共役脂肪酸生産
 岸野重信^{1,2}、河合正昭²、小川順²、横関健三¹、清水昌²
 (1京大院・農・産業微生物、2京大院・農・応用生命)

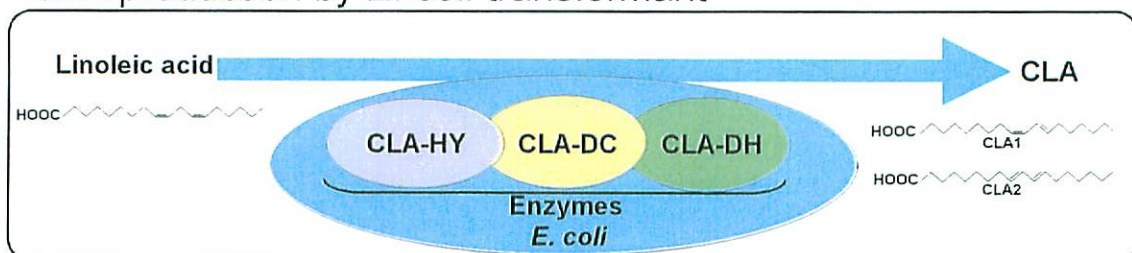
【目的】我々は、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a を用いることによりリノール酸を効率よく共役リノール酸 (CLA) (*cis*-9,*trans*-11-CLA および *trans*-9,*trans*-11-CLA) へと変換できることを報告している。さらに、本変換反応に関与する酵素系の解析を試みた結果、cell-free extract (CFE)の超遠心膜画分と可溶性画分とに本変換反応に必要なタンパク質が分散していることを明らかにした。さらに膜画分に存在する一つのタンパク質(CLA-HY)、可溶性画分に存在する二つのタンパク質(CLA-DH と CLA-DC)が本反応に関与することを昨年のCLA 懇話会にて報告した。本研究では、これら三つのタンパク質を共発現する形質転換大腸菌を作成し、本菌の休止菌体による共役脂肪酸生産を試みた。

【方法・結果】CLA-HY、CLA-DH 及び CLA-DC をコードする遺伝子を *L. plantarum* AKU 1009a のゲノムより PCR を用いて増幅し、それぞれの増幅断片を導入したプラスミドを作成した。得られたプラスミドにて宿主大腸菌を形質転換し、IPTG 添加培地にて導入タンパク質の誘導を行った。本形質転換大腸菌の休止菌体を用い、リノール酸、 α -リノレン酸 (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadecatrienoic acid (18:3))、 γ -リノレン酸 (*cis*-6,*cis*-9,*cis*-12-18:3) 及びステアリドン酸 (*cis*-6,*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadecatetraenoic acid) を基質とする反応を嫌気的に行った。その結果、本菌は基質の *cis*-9,*cis*-12 を共役構造 *cis*-9,*trans*-11 および *trans*-9,*trans*-11 へと変換することを見出した。これは、*L. plantarum* AKU 1009a が示す変換様式と同じものであった。

CLA production by lactic acid bacteria



CLA production by *E. coli* transformant



⑥ 中鎖脂肪酸を用いた共役リノール酸異性体の溶剤分別と異性体結晶の物理化学的特性

○上原秀隆¹・菅沼智巳¹・根岸聡¹・宇田幸弘²・古川義純²・上野聡³・佐藤清隆³
(日清オイリオグループ(株)¹・北大低温科学²・広島大院生物圏³)

1. はじめに

現在市販されている CLA 脂肪酸の多くはサフラワー油などのリノール酸含量の多い油をアルカリ共役化して製造されており、2種類の異性体 (9*c*11*t*, 10*t*12*c*) がほぼ等量含まれた混合物である¹⁾。異性体の分離には酵素を用いた方法が良く知られている²⁾が、より簡便な精製法である晶析による分離は困難である。また、CLA の生理活性については抗がん作用³⁾、体脂肪減退作用⁴⁾ など様々な研究がなされているが、各異性体特有の物性に関する研究はまだ十分行われていない。本研究では中鎖脂肪酸を用いた溶剤晶析により2種類の異性体を分離する方法を紹介するとともに、これら2つの異性体の高純度サンプルを用いて、DSC、XRD、FT-IR にて分析を行ったので報告する。

2. 中鎖脂肪酸を用いた共役リノール酸異性体の溶剤分別

9*c*, 11*t*-CLA (39%)、10*t*, 12*c*-CLA (40%)を含む CLA 混合物を用いて実験を行った。デカン酸を用いた溶剤晶析では、異性体比が 9*c*11*t*/10*t*12*c*=25/75 の結晶が、オクタン酸を用いた溶剤晶析では 9*c*11*t*/10*t*12*c* =30/70 の結晶が得られた。またこれらの操作を繰り返すことにより、異性体比を 9*c*11*t*/10*t*12*c*=4/96 と 9*c*11*t*/10*t*12*c*=95/5 まで向上させることに成功した。

3. CLA 異性体結晶の物理化学的特性

DSC 測定より、9*c*11*t*の融点は 14.9 °C、10*t*12*c*の融点は 19.8 °Cであることが明らかになった。融液(急冷・徐冷)および溶液(アセトニトリル・n-デカン)から得られた結晶についても同様の結果が得られ、多形は確認されなかった。XRD についても同様に多形の転移は確認されず、通常の結晶化では CLA の2つの異性体の多形は、いずれも1つであると考えられた。FT-IR の CH₂ はさみ振動、および CH₂ 横揺れ振動の分析結果および XRD の短面間隔パターンより、9*c*11*t*および 10*t*12*c*のサブセル構造は O₁であることが明らかになった。

引用文献

- 1) K. Nagao, T. Yanagita, *J. Biol. Chem.*, **100**, pp.152-157 (2005).
- 2) Nagao, T., Y. Shimada, Y. Yamauchi-Sato, T. Yamamoto, M. Kasai, K. Tsutsumi, A. Sugihara, and Y. Tominaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 303-308 (2002).
- 3) M. W. Pariza, *Bull. Int. Dairy Fed.*, **257**, pp29-30 (1991).
- 4) Y. Park, K.J. Albright, W. Liu, J.M. Storkson, M.E. Cook, M.W. Pariza, *Lipids* **32**, pp.853-858 (1997).

⑦ トランス脂肪酸基準油脂分析試験法制定とその CLA 分析への適用について

白澤 聖一

(日清オイリオグループ株式会社)

トランス脂肪酸の摂取と健康の関係について国際的に関心が高まり、諸外国において含有量表示の義務化などの動きが生じている。我が国においては現状トランス脂肪酸に関する規制の動きは無いが、国際的な動向を受け、トランス脂肪酸摂取量把握の前提となる含量分析法が求められ、今年5月に我々を含む10機関による合同実験を経て基準油脂分析試験法が制定された。共役酸はトランス脂肪酸の CODEX 定義から外れているため、試験法の対象外となっている。今回、基準油脂試験法の紹介と合わせ、本分析における CLA の溶出挙動について報告する。

1. トランス脂肪酸基準油脂試験法制定について

2005年4月から2年間の合同実験を経て、トランス脂肪酸の基準油脂分析試験法を制定した。合同実験において、総トランス含量約2~45%の試料について、 $CV_R < 10\%$ と実用上問題のない機関間相関が得られた(J.Oleo Sci.,56,405-415 (2007))。

試験法の骨子は以下である。

- ・適用範囲：油脂(乳脂・魚油を除く)
- ・方法：油脂のメチルエステル化 (BF₃-MeOH 法)を前処理とした直接キャピラリーGC法
- ・定量：C17遊離脂肪酸を内部標準とする、含量分析法
- ・使用カラム：カラム長50~100m 液相:cyanopropyl polysiloxane (SP2560, SP2340, CP-Sil88 など)、または70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (TC-70,BPX-70 など)
- ・GC条件：定流量・恒温分析

2. 基準油脂試験法における CLA の挙動について

CLA のメチルエステル化に際しては、異性化に留意する必要がある。BF₃-MeOH 法を適用する場合、試料に対する BF₃ 量および反応温度が異性化と相関があることを既に報告している(J.Oleo Sci.,50,237-241 (2001))。基準油脂試験法のメチルエステル条件は100℃であるため、より低温での反応が望ましい。

CLA 試料を基準油脂試験法条件の GC に適用した場合、掲載のいずれのカラムにおいても、 α リノレン酸の後に CLA は溶出し、C18:3 までの (非共役) トランス脂肪酸含量分析に問題はない。TC-70(60m)カラムを用いた場合、9c,11t/10t,12c などの異性体分離も比較的良好と確認された。