

植物油脂原料および副産物を用いたホスファチジルセリンの製造方法

福永健治

はじめに

大豆や肉類に含まれているホスファチジルセリン(PS)は、PSは認知機能やストレスへの内分泌反応を改善するほか、PSの補給が注意欠陥・多動性障害を持つ若年者に対する有益性が示されている。また、近年の研究成果では、PSを1日に100～300mg摂取することで、脳機能障害であるアルツハイマー症や老人性認知症といった記憶障害の改善が症例研究ではあるが報告されている。しかし、PSは大豆1kg中に約30mgとごく微量にしか存在していないことから、高価で日常の食生活では恩恵にあずかることは難しい。

そこで、本研究では安価にPSを生産できる方法を検討し、酵素原として菜種を用いる方法を検討した。菜種には、種々のホスホリパーゼが多く含まれていることが分かつており、ホスホリパーゼDのホスファチジル基転移触媒機能を利用して、コリンと反応系中に加えたセリンを転移させることで、PSの生産を試みた。

方法および材料

試料調製: 20mM CaCl₂含有0.1M酢酸緩衝pH3-10, 70mLに菜種5gを加え、ブレンダーでホモジネートした。その後、遠心分離(3000g、5min, 4°C)して得た上清20mLに粉末レシチン1g、セリン0.28gを加え、攪拌した後に35°Cで1時間振とうした。振とう後、大過剰のEDTA2Naを加えて攪拌し、試料と同量のn-ヘキサンを加えて再び攪拌し、反応を停止した。攪拌後、遠心分離(2000g、10min, 4°C)し、上層を分取して硫酸ナトリウムを加えて脱水した。その後、エバポレータで、溶媒を留去した。これをクリン脂質組成分析に用いた。

リン脂質組成の分析:一次展開には、クロロホルム:メタノール:酢酸:水=25:15:4:2(v/v/v)を、二次展開には、クロロホルム:メタノール:アンモニア水=65:35:5.5(v/v/v)およびクロロホルム:アセトン:メタノール:酢酸:水=3:4:1:1:0.5(v/v/v/v)を用いた。展開終了後、発色剤には、脂質全般に発色する酢酸銅リン酸溶液、PSが持つアミノ基に特異的に発色するニンヒドリン溶液を用いた。酢酸銅リン酸溶液の場合は160°Cで15~20分、ニンヒドリン溶液の場合は120°Cで3~5分、ドライオーブンで熱した。また、スポットの物質の信頼度を高める為に一次展開および二次展開の両方から確認を行った。

結果および考察

反応時のpHは、pH3~10で、同様の条件で反応を行って比較した結果、pH4がホスファチジルコリン(PC)の分解が進むことからpH4を採用した。また、振とう時間についても、当初は24時間で行っていたが、1時間でも結果が変わらないことから1時間を採用した。

粉末レシチンのみ加えた反応系抽出物と粉末レシチン+セリンを加えた反応系抽出物をTLCで比較すると、一箇所スポットが増えていたが、標品のPSのスポットとは異なるRf値であった。しかし、ニンヒドリン発色によって、アミノ基が存在していることは確かであるため、このスポットのリン脂質をPSのリゾ体であると推測した。(図1、図2)

当初、LPSよりPSの生成を目的にしていたことから、LPSの生成を抑制し、PSの生成を促進する目的で、遊離脂肪酸としてリノール酸を反応液に加え、ホスホリパーゼAによって切り出される脂肪酸を減らせると考えたが、PSの生成に影響は見られなかった(図1)。

また、菜種の種皮の影響を検討したところ、LPSの生成抑制、すなわちホスホリパーゼDの活性阻害が見られた。しかし、リゾホスファチジルコリン(LPC)の生成には影響がないことから、種皮にはホスホリパーゼA₂の活性阻害効果はないと考えた(図1)。

カルシウムの存在はホスホリパーゼDの活性発現に必須であるため、当初50mMで行っていたが、20mMでも同等の活性が得られたことから20mMとした。セリン量は基質量の分子量比から2/7の量とした。これ以上増加しても、LPS生成量には差がなかった。

植物油脂原料および副産物を用いたホスファチジルセリンの製造方法

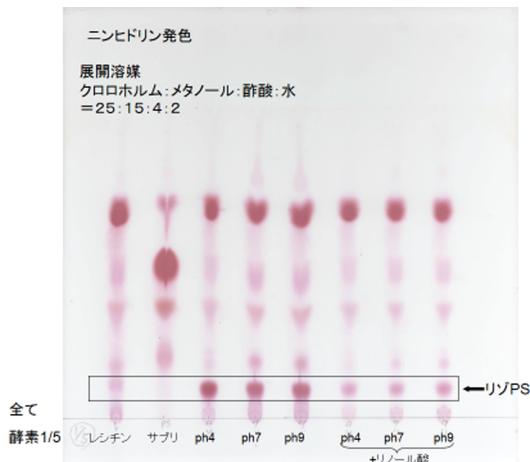


図1 反応系抽出物の一次元TLC分析結果

レシチン:1g セリン:0.14g リノール酸:1g

反応液:20mM CaCl₂含有0.1M酢酸緩衝液 70ml

菜種5g ホモジネート抽出画分, サブリ:PSサブリメント内容物(標品), 振とう時間:1時間

振とう時間:35°C

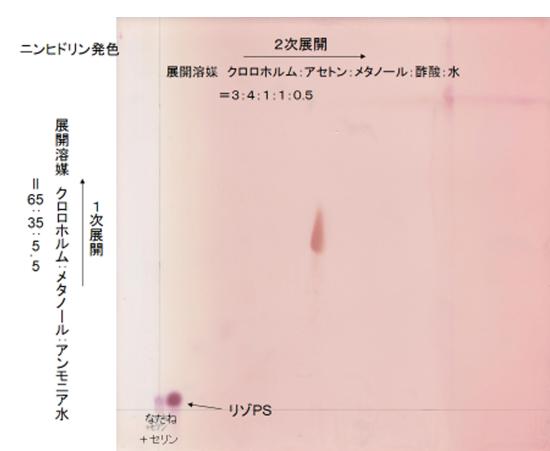


図2. 確立した反応系で得られたリゾPSの
TLC分析結果

レシチン:1g セリン:0.28g

反応液:20mM CaCl₂含有0.1M酢酸緩衝液 70ml

菜種5g ホモジネート、振とう時間:1時間

振とう時間:35°C

おわりに

本研究では、反応を水系で、界面活性剤非存在下で行っている。リゾPSの生成をアセトンなどの親水性有機溶媒あるいは界面活性剤存在下で生成物の確認を行い、さらに非水反応系の検討も必要であると考える。