

杉山産業化学研究所 2015 年度研究助成報告  
医薬品・化粧品・食品添加物素材に有用なスフィンゴ脂質の酵素的合成法に関する研究

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 衛生薬学分野  
准教授 田中 保

## 目的

リン脂質には疾患予防や治癒促進に効くものがある。例えば、ある種の肝炎には食事性レシチンが効果を示すし、プラズマローゲン型リン脂質の摂取が認知症を含めた神経変性疾患の予防に繋がるとの報告がある。我々は、経口投与したホスファチジン酸 (PA) がリゾホスファチジン酸 (LPA) へと消化され、特異的 LPA 受容体を介して胃潰瘍の予防効果を示すことを見出している [1, 2]。他にもリン脂質は食品加工や医薬品製剤に利用され、産業的に価値の高い化合物である。最近、我々は植物スフィンゴリン脂質であるグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) の D ポジションを加水分解する新規酵素 GIPC 特異的ホスホリパーゼ D (GIPC-PLD) をキャベツ葉に見出した [3]。セラミドはその保湿効果から化粧品素材として重用されるが、天然に豊富に存在するわけではない。本研究では植物酵素の GIPC-PLD と動物酵素のアルカリホスファターゼを用い、未利用リン脂質の GIPC からのセラミド調製を 2 段階反応で達成しようと考え研究を行った。

## 方法

### 1) GIPC から PC1P への酵素的変換

酵素源はシロイヌナズナの根ホモジネートの連続的遠心分離により得られた沈渣 (膜画分) とした。キャベツより精製した GIPC 約 50 nmol に 0.5ml の Tris / HCl 緩衝液 (pH7.4)、2mg のデオキシコール酸ナトリウム、0.1ml の酵素溶液を加え、インキュベートを行った。その後、適量のクロロホルム、メタノールを加え、脂質の抽出を行った。得られた脂質抽出物より TLC を用いて PC1P を単離した。

### 2) PC1P のセラミドへの酵素的変換

1) で得られた PC1P をウシ小腸由来アルカリホスファターゼと混合し、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 中で、37°C でインキュベートを行った。その後、適量のクロロホルム、メタノールを加え脂質の抽出を行い、TLC にて生成物を分離し、デンシトメトリー法にて定量した。生成したセラミドは、MALDI-TOF MS による解析で構造を確認した。

## 結果

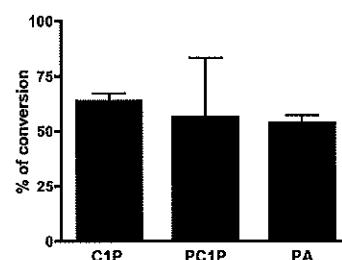
### GIPC の PC1P への変換

シロイヌナズナ由来の GIPC-PLD を GIPC に作用させたところ GIPC の濃度依存的に PC1P が生成した。MALDI-TOF MS による解析より、この反応で生じた PC1P は前駆体の GIPC の

分子種組成を反映するもので、特にアシル鎖に対する特異性は示さなかった。このときの酵素活性の  $K_m$  値は  $110 \mu\text{M}$  と計算された。本酵素活性の活性化にはジエチルエーテルなどの有機溶媒やデオキシコール酸などの界面活性剤が必要である。また、マイナス  $20^\circ\text{C}$  では数ヶ月の保存で徐々に活性を失うことがわかった（データ非掲載）。

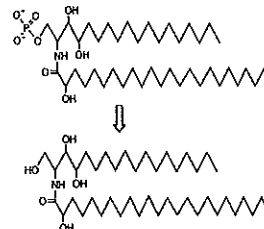
#### PC1P のフィトセラミドへのアルカリホスファターゼによる消化

TLC デンシトメトリー法を用いてウシの小腸由来アルカリホスファターゼによる PC1P からフィト型セラミドへの変換を確認した。その結果、C1P とホスファチジン酸 (PA) がそれぞれセラミド、ジアシルグリセロール (DG) に変換される条件において、PC1P が同程度の効率でフィトセラミドへ変換されることが確認された（右図）。



#### 考察

GIPC は植物に含まれる高極性スフィンゴリン脂質であり、食品成分として比較的豊富に含まれている（キャベツでは全リン脂質の 5%程度）。にもかかわらず、その抽出の難しさから現在でも消化吸収といった栄養学的な知見はなく、我々の知る限り、GIPC は産業的にも利用されていない。本研究では GIPC を PC1P に、次いで、セラミドへの連続的変換法について検討を行った。その結果、植物酵素 GIPC-PLD と動物消化酵素アルカリホスファターゼの連続的作用により化粧品添加物として有用なセラミドを GIPC から調製可能であることがわかった。本法は化学合成とは異なり、有害物質や廃液を出さない。また、食品廃棄物を利用でき資源の有効利用の観点からも有益である。今後は植物リン脂質の有用性を追求し[4]、植物型セラミドの医薬品素材や機能性食品分子としての可能性を検討したい。



#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、杉山産業化学研究所より助成をいただきました。お礼申し上げます。

#### 文献

- 1) Tanaka, T., et al., *Dig. Dis. Sci.*, 58, 950-958, 2013
- 2) Tanaka, T., et al., *BioFactors*, 40, 355-361, 2014
- 3) Tanaka, T., et al., *FEBS J.*, 280, 3797-3809, 2013
- 4) Sheuli A., et al., *J. Agric. Food Chem.*, 64, 6950-6957, 2016