In vitro コレステロールの生合成に及ぼす γ -リノレン酸の作用

中 村 治 雄 石 川 昌 子*

結 論

不飽和脂酸が血清コレステロール (以下 ch に略す) の低下作用を有するといわれているが、その作用については不明な点が多い。Spritz¹⁾らは、ヒトで不飽和脂酸の多い食事群では血液 ch は著しく低下していたが、ふんへの胆汁酸、中性ステロールの排泄には変化なかったとしたが、これに反し、Goldsmith²⁾ら、Lewis³⁾、Gordon⁴⁾は不飽和脂酸はふんの中性と acidic ステロールの排泄を増すという。しかし、血液の ch 低下は ch の異化作用および吸収阻害の増加、ch の生合成の変化によってもおきうるので、本論文では ch の生合成に対する作用を *in vitro* 面より検討した。

1. 実験方法

1) 各脂酸のコレステロールの生合成におよぼす作用: Capric 酸, lauric 酸, myristic 酸, Palmitic 酸, Stearin 酸, Oleic 酸, linolenic 酸の各脂酸を用いた。マウス肝を 2.5 倍の Bucher⁵⁾液 (0.03 M ニコチン酸アミド, 0.04 M MgCl₂, 0.125 M 蔗糖ふくむ) でホモジナイズし、400×g, 10 分遠心し、無細胞ホモジネートをうる。このホモジネート 2.0 ml に ATP 1.3 mg, DPN 7.6 mg, 酢酸-1-¹⁴C 5 μ Ci, 各脂酸を K 塩となし、4 μ M を加え、全量 2.2 ml となし、O₂ を封入し 37°C で 2 時間培養後、Carrier としてコレステロール 1.5 mg を加えた。アセトン-エタノール (1:1) で脂質を抽出後 KOH で鹼化後、コレステロールをジギトニットとして分離、gas flow counter で放射能を測定した。

2) γ -リノレン酸の濃度とコレステロール生合成: 1 の場合とまったく同様酢酸-1-¹⁴C からのとりこみをしらべた。 γ -リノレン酸は 0~2 mg (0~6.7 μ M) を加えた。培養後、Carrier としてコレステロール 1.5mg, 脂酸 5 mg を加えた。脂酸は不鹼化物除去後の液を酸性となし石油エーテルで抽出した。

3) リノール酸, γ -リノレン酸, アラヒドン酸, リノレン酸のコレステロール生合成におよぼす作用: 前とまっ

たく同様にして、酢酸-1-¹⁴C 5 μ Ci, またはメバロン酸-2-¹⁴C 0.1 μ Ci を加え、脂酸は 6 μ M を加えた。培養後 Carrier としてコレステロール 1.5 mg, 脂酸 5 mg を加えた。

4) γ -リノレン酸のコレステロールへの生合成におよぼす CoA の作用: 前述とまったく同様に肝ホモジネート 2.0 ml に γ -リノレン酸を 6 μ M, 酢酸-1-¹⁴C 4 μ Ci, CoA 250 γ を加え、O₂ 通気後栓をなし 37°C 2 時間培養後 Carrier としてコレステロール 1.5 mg, 脂酸 5 mg を加えた。

5) γ -リノレン酸のマロン酸-2-¹⁴C より総コレステロールおよび総脂酸へのとりこみにおよぼす作用: 前述とまったく同様の肝ホモジネート 2.0 ml に γ -リノレン酸を 4 mg, およびマロン酸-2-¹⁴C 0.86 μ Ci を加え全量 2.1 ml となし O₂ 通気後栓をなし、37°C 2 時間培養後 Carrier としてコレステロール 1.5 mg, 脂酸 5 mg を加えた。

6) γ -リノレン酸の酢酸-1-¹⁴C およびメバロン酸-2-¹⁴C よりスクワレン、ステロールへのとりこみにおよぼす作用: (1) 酢酸-1-¹⁴C よりスクワレンへのとりこみは前述のごとく作った肝ホモジネート 2.0 ml (ATP, DPN 加) に酢酸-1-¹⁴C 10 μ Ci, γ -リノレン酸 12 μ M を加え全量 2.1 ml となし、N₂ を 1 分間通気後 2 時間培養後、Carrier としてスクワレン 10 mg を加えた。(2) メバロン酸-2-¹⁴C よりスクワレン、ステロールへのとりこみ⁶⁾は酢酸の場合と同様であるがメバロン酸-2-¹⁴C 0.24 μ Ci を加え全量 2.1 ml となし O₂ で 20 秒通気後、1 時間培養した。Carrier としてスクワレン 10 mg, コレステロール 2 mg を加えた。各分画はアセトン-エタノール (1:1) で脂質を抽出後乾燥後 15% KOH エタノール液 4 ml を加え 100°C 10 分鹼化後、50% エタノール 4 ml を加え、石油エーテル 10 ml で 3 回抽出し、この石油エーテルを水 10ml であらひ乾燥後、少量の石油エーテルにとかしアルミナ column で 20 ml の石油エーテルでスクワレンを抽出後、エチルエーテル 50 ml で sterol を流出、乾燥後放射能を測定した。

7) 薬品: 放射性物質は第一化学株式会社 γ -リノレ

*H. Nakamura, M. Ishikawa: 北海道大学 歯学部生理学。

ン酸 (methyl- γ -linolenate) は小野薬品株式会社, アラヒドン酸, リノレン酸は Nutritional Biochemicals Corporation より得た。

2. 実験成績および考案

各脂酸の酢酸- $1-^{14}\text{C}$ から ch のとりこみは C_{10} , C_{12} , C_{18-1} , C_{18-2} において抑制されるが, C_{14} , C_{16} , C_{18} においては変化はみられなかった (図1), γ -リノレン酸の濃度と ch 合成は濃度増加するにつれて抑制され (図2), 同時に酢酸から総脂酸へのとりこみも平行して抑制された (表1), γ -リノレン酸とほかの不飽和脂酸と

※M±SE, 例数 4

図1. *In vitro* 各脂酸の酢酸- $1-^{14}\text{C}$ よりコレステロールのとりこみ

※M±SE, 各4例, cpm/mg コレステロールジギット

図2. *In vitro* γ -リノレン酸濃度と酢酸- $1-^{14}\text{C}$ からコレステロールのとりこみ

の関係をみると酢酸- $1-^{14}\text{C}$ から ch のとりこみはリノール酸の場合のとりこみを 100 としてみると, いずれも γ -リノレン酸, アラヒドン酸, リノレン酸の間には変化なかった (図3). またメバロン酸- $2-^{14}\text{C}$ から ch のと

表1. γ -リノレン酸の濃度と酢酸- $1-^{14}\text{C}$ よりの総脂酸へのとりこみ

添加量 (mg)	%	cpm/mg
0	100	1954 ± 165*
0.4	70.5	1378 ± 35
0.8	68.4	1335 ± 47
1.2	67.6	1321 ± 571
2.0	37.8	739 ± 20

* M±SE, 各4例

※M±SE, 例数 4, cpm/mg コレステロールジギット

図3. *In vitro* 酢酸- $1-^{14}\text{C}$ よりコレステロールへのとりこみ (リノール酸のとりこみ 100 とす)

※M±SE, 例数 4, cpm/mg コレステロールジギット

図4. *In vitro* メバロン酸- $2-^{14}\text{C}$ からコレステロールへのとりこみ

りこみはリノール酸, γ -リノレン酸, アラヒドン酸, リノレン酸において抑制され, 各脂酸間には差異なかった (図4). 以上のことから γ -リノレン酸についていえば ch の合成は酢酸からもメバロン酸からも強く抑制され, 各不飽和脂酸間には差異はみられなかった. さて脂酸の *In vitro* の ch の合成に対する作用について Wood^{7,8)}らは飽和脂酸, および不飽和脂酸, オレイン酸, リノール酸の酢酸- $1-^{14}\text{C}$ からの合成の抑制を, 脂酸へのとりこみのわずかな増加を報告しているが, 本実験ではコレステロールの合成については Wood^{7,8)}らの成績と同様であった. *In vitro* でメバロン酸- $2-^{14}\text{C}$ から

表 2. γ -リノレン酸のコレステロール生合成に対する CoA の作用

群	コレステロール (cpm/mg)	総 脂 酸 (cpm/mg)
対 照 (γ -リノレン酸)	2100 $\pm$ 495*	715 $\pm$ 19
投 与 (γ -リノレン酸 +CoA)	2050 $\pm$ 185	827 $\pm$ 64

* M $\pm$ SE, 各3例表 3. γ -リノレン酸のマロン酸-2- 14 C より総コレステロール, 総脂酸へのとりこみ

群	総コレステロール (cpm/mg)	総 脂 酸 (cpm/mg)
対 照	745 $\pm$ 57*	7.20 $\pm$ 1.0
投 与	930 $\pm$ 117	5.0 $\pm$ 0.3

* M $\pm$ SE, 各3例

の ch のとりこみについては Fluck ら⁹⁾は飽和脂酸 C₈ ~C₁₆ のうちで C₁₀, C₁₂, C₁₄ によって強く抑制されるというが, 本実験の不飽和脂酸においても強く抑制され, 各不飽和脂酸の間には差異なかった. Wood ら⁸⁾は二重結合を有する脂酸は二重結合を有しない脂酸より抑制作用が強く, また二重結合の数が増すと抑制作用が増加するとしているが, 本実験の不飽和脂酸のリノール酸(18-2), γ -リノレン酸(18-3), アラヒドン酸(20-4), リノレン酸(18-3)については酢酸からも, メバロン酸からも ch の生合成に対しては二重結合の位置, 数によらないことを示している. また γ -リノレン酸の濃度を増すと, 抑制作用が強くなることから酢酸 1- 14 C のうちまりによるのではないと思われる. Migicovsky ら¹⁰⁾は十分な CoA の添加は, *in vitro* で脂酸は ch の生合成をさらに強く抑制するというが, 本実験において γ -リノ

レン酸の酢酸からの ch へのとりこみには, ch および総脂酸へのとりこみとも変化はみられなかった(表2). マロン酸-2- 14 C からの ch, 脂酸へのとりこみも変化なかった(表3). ch, 脂酸の合成においては, アセチル-CoA とマロニール CoA からアセトアセチル-S-酵素ができ, これから脂酸の合成に, またさらに HMG-S-酵素となりメバロン酸に入る¹¹⁾のでこれらに変化をあたえないことを示している. 酢酸-1- 14 C からスクワレンのとりこみは γ -リノレン酸により抑制され, またメバロン酸-2- 14 C からのスクワレンへのとりこみも抑制されていたので(表4), γ -リノレン酸による ch 抑制の部位は本実験からメバロン酸とスクワレン間にあるといえる. Wood ら⁸⁾は脂酸による ch の生合成の抑制はアセチル-CoA 段階, アセト酢酸形成の以前にあると推定していた. しかし本実験では酢酸からメバロン酸へのとりこみについては行っていないのでこの点については不明であるが, 本実験の γ -リノレン酸の ch 抑制は *in vitro* ではメバロン酸とスクワレン間にある.

3. 結 論

- 1) 各脂酸の酢酸からコレステロールへのとりこみは C₁₀, C₁₂, C₁₈₋₁, C₁₈₋₂ において抑制されたが, C₁₄, C₁₆, C₁₈ では変化なかった.
- 2) γ -リノレン酸は酢酸からもメバロン酸からもコレステロールの生合成を抑制し, その抑制部位はメバロン酸とスクワレン間にある.
- 3) γ -リノレン酸による酢酸, およびメバロン酸からのコレステロールの生合成の抑制はほかの不飽和脂酸のリノール酸, アラヒドン酸, リノレン酸の場合と同一であった.
- 4) CoA の添加は γ -リノレン酸の酢酸からのコレステロールの生合成には変化を与えなかった.
- 5) γ -リノレン酸はマロン酸からコレステロールおよ

表 4. γ -リノレン酸のスクワレン, ステロールのとりこみに対する作用

群	例 数	酢 酸 -1- 14 C		例 数	メバロン酸 -2- 14 C	
		スクワレン (cpm/mg)	ステロール (cpm/mg)		スクワレン (cpm/mg)	ステロール (cpm/mg)
対 照	4	10.7 $\pm$ 3.6*	50.7 $\pm$ 7.8	3	475.2 $\pm$ 79	5512 $\pm$ 910
γ -リノレン酸	4	2.0 $\pm$ 0.63	22.0 $\pm$ 3.8	3	236.5 $\pm$ 16.7	3390 $\pm$ 530
<i>p</i>		<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.02		<i>p</i> <0.05	

* M $\pm$ SE,

び脂酸のとりこみに対しては変化を与えなかった。

文 献 1) Spritz, M., Grunday, S. & Ahrens, E. H.: J. Clin. Invest. **42**: 981, 1963. 2) Goldsmith, G. A., Hamilton, J. G. & Miller, O. M.: Arch. Int. Med. **105**: 512, 1960. 3) Lewis, B.: Lancet, **1**: 1090, 1958. 4) Gordon, H. B., Lewis, B., Eales. L. & Brock, J. F.: Lancet, ii: 1299, 1957. 5) Bucher, N. L. R. & McGarrah, K.: J. Biol. Chem. **221**, 1, 1956. 6) Colowick, P. S. & Kaplan, N. O.: Methods in

Enzymology, vol. 5, Academic Press, London, p. 493-494, 1962. 7) Wood, J. D. & Migicovsky, B. B.: Can. J. Biochem. Physiol, **35**: 645, 1957. 8) Wood, J. D. & Migicovsky, B. B.: Can. J. Biochem. & Physiol. **34**, 861, 1956. 9) Fluck, E. R. & Pritham, G. H.: Met. **10**: 444, 1961. 10) Migicovsky, B. B. & Greenberg, D. M.: Biochim. et Biophys. Acta. **13**: 135, 1954. 11) Brodie, J. D., Wasson, G. & Porter, J.: J. Biol. Chem. **239**: 346, 1964.