

論文内容要旨

第一章 緒言

ブロイラーの成長速度の著しい増進に伴って、脂肪肝や脂肪の過剰蓄積などの脂質代謝異常が多発している。脂肪肝や過剰の脂肪蓄積は鶏肉生産上のエネルギー的・経済的ロスであるばかりでなく、種々の代謝障害を起こす要因になっているとの観点から、それらの発生を制御する試みが多面的に行われてきた。

動物の脂質代謝には多様性がみられる。鶏の脂質代謝では、肝臓が脂肪酸合成の主部位であり、脂肪組織は主に脂質の貯蔵部位として機能している点で特異的である。このような鶏の脂質代謝特性から脂肪の過剰蓄積制御の方策を考えると、肝臓での脂肪酸合成を抑制する手法が有効である。これまで、鶏肝臓における脂肪酸合成能の栄養的調節が検討されてきた。油脂は飼料中の必須成分であり、しかも調節効果が大きいなどの点で、油脂による脂肪過剰蓄積抑制は実用的な手法であると考えられる。*n*-3系列の多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) をラットに給与すると、*n*-9系列脂肪酸給与時に比べ体脂肪や肝臓脂質が減少すること、そして肝臓と脂肪組織における脂肪酸合成能が低下するなどが報告されている。しかし、鶏の脂肪酸合成能に対する*n*-3系列PUFAの作用とその作用機作は十分には解明されていない。

脂肪酸合成能に対する*n*-3系列PUFAの作用機作についてはその代謝産物であるEPA(Eicosapentaenoic acid, 20:5(*n*-3))やDHA(Docosahexaenoic acid, 22:6(*n*-3))に注目した検討が多く、炭素鎖長18のPUFAである α -リノレン酸(18:3(*n*-3))の脂肪酸合成能調節作用と作用機作そのものに着目した報告は少ない。生体膜リン脂質中では炭素鎖長16-18の脂肪酸が主要な構成成分であるとの理解をもとに、 α -リノレン酸の脂肪酸合成能調節の作用機作を考えると、細胞内での長鎖化・不飽和化反応により産生される高度不飽和脂肪酸(EPAやDHA)を介する作用や、PUFAの酸化による細胞活性の調節作用よりも、細胞膜中に存在するホルモンレセプターなどの生体膜機能変化を介した調節作用の可能性がより大きいと考えられる。そして、細胞膜では*n*-3系列PUFAは脂肪酸合成能の促進作用を持つインスリンの応答性を調節している可能性が推察できる。

そこで、本研究では鶏肝臓におけるPUFA(特に炭素鎖長18の α -リノレン酸)の脂質合成能調節作用を明らかにした。さらに、PUFAの作用機作を肝細胞膜機能の点から明らかにする方向で、PUFAが肝細胞膜の脂質成分に与える変化と、それに起因する細胞内脂質代謝変化の関連をインスリン応答の側面から示すことを試みた。

第二章 鶏脂質代謝に対する多価不飽和脂肪酸給与の影響

鶏に*n*-3と*n*-6系列PUFAを給与した場合の脂質代謝の変動を調べた報告がいくつかある。しかし、これらの研究では、Linseed oil, Fish oil, Safflower oil, Corn oilなどを飼料油脂源として用いているため、複数の脂肪酸が同時に変化しており、単一の脂肪酸の影響を明確に示した例はない。

そこで、本実験では単一の脂肪酸のみが異なる試験飼料をニワトリに給与した場合の脂質代謝応答を、脂肪酸合成の主部位である肝臓を中心に検討するとともに、肝臓plasma membraneの脂肪酸組成を測定し、単一脂肪酸の作用機作の一端を考察することを試みた。

試験区は単一の脂肪酸のみを高めたパルミチン酸区(16:0)、オレイン酸区(18:1(n-9))、リノール酸区(18:2(n-6))、 α -リノレン酸区(18:3(n-3))の4区を設定した。試験飼料はME 3500kcal/kg、CP 23%、C Fat 8%の精製飼料とし、10日齢のプロイラーに14日間給与した。飼料組成をTable 2-1に示した。飼料中脂肪酸組成(計算値)はTable 2-2に示したように、それぞれ単一の脂肪酸を多く含むが、その他の組成はほぼ一定である。

肝臓脂質含量およびトリグリセリド含量はパルミチン酸区に比べてオレイン酸、リノール酸および α -リノレン酸区で減少し、リノール酸と α -リノレン酸区での減少は25%以上と顕著であった(Fig. 2-1)。単位体重あたりの腹腔内脂肪重量は α -リノレン酸区で他の区と比較して約2/3と有意に低下した(Fig. 2-2)。肝臓での脂肪酸合成酵素(FAS)およびクエン酸開裂酵素(CCE)の活性はパルミチン酸、オレイン酸区に対してリノール酸、 α -リノレン酸区では有意に低下した(Fig. 2-3)。肝臓アセチルCoAカルボキシラーゼ(ACC)活性もパルミチン酸に比べオレイン酸、リノール酸および α -リノレン酸区で減少する傾向が見られた。

肝臓のplasma membraneリン脂質中の脂肪酸組成では、全ての試験区において給与した単一脂肪酸の含量が大きく上昇した。一方、リノール酸および α -リノレン酸区ではそれぞれの代謝産物である脂肪酸の顕著な増加はみられなかった(Table 2-3)。

以上の結果から、鶏へのリノール酸および α -リノレン酸給与により脂質代謝が変動すること、特に α -リノレン酸給与では脂肪蓄積が減少し、しかも肝臓における脂肪酸合成能が有意に低下することが確認された。また、肝細胞膜リン脂質中では給与した脂肪酸の濃度が特異的に上昇し、肝細胞plasma membraneの脂肪酸組成が変動することが明らかになった。

第三章 脂肪酸給与時の肝臓 plasma membraneの脂肪酸組成を再現する鶏初代培養肝細胞系の確立

前章で、plasma membrane中の脂肪酸組成が異なる肝細胞では脂肪酸合成能が大きく変動することを示した。肝細胞においてplasma membraneリン脂質中の脂肪酸組成の変化自体が脂肪酸合成能に影響する可能性を検討するためには、培養細胞系を用いて進めるのが有効である。そこで本章では、本研究の遂行に適した鶏初代培養肝細胞系を確立することを試みた。

in situ 灌流法により調製した鶏初代培養肝細胞を用いた。培養開始24時間の単層形成後、 α -リノレン酸を500 μ Mの濃度で添加して24時間培養したところ、plasma membraneリン脂質中の α -リノレン酸含量は約15%と著しく上昇した(Table 3-1)。また、このときのplasma membrane脂質画分のほぼ全てはリン脂質であり、そのリン脂質組成の変動は小さいことが示された(Fig. 3-1)。

次に、オレイン酸・リノール酸・ α -リノレン酸の脂肪酸の添加培養を行った。その結果、肝細胞plasma membraneリン脂質中において、それぞれの添加した脂肪酸のみが著し

く上昇したが⁸(Table 3-2)、plasma membraneリン脂質中のリン脂質組成の変化はわずかであった(Fig. 3-2)。

次いで、単一脂肪酸の添加中止後における肝細胞plasma membrane中の脂肪酸組成の推移について検討した。plasma membraneリン脂質中に取り込まれた α -リノレン酸(約15%)は、脂肪酸無添加で培養を継続することによって徐々に減少し、その半減期は約24時間であることが明らかとなった(Fig. 3-3)。また、各種脂肪酸添加培養において、 α -リノレン酸添加区の肝細胞中脂肪酸合成酵素活性は他の脂肪酸添加区や脂肪酸無添加区に比べて低下する傾向にあった(Fig. 3-4)。

以上のように、鶏初代培養肝細胞を用いた本実験系を用いることにより、前章の*in vivo*実験で確認したPUFA給与によるplasma membraneリン脂質中の脂肪酸組成変化と脂肪酸合成能の変化を*in vitro*条件下で再現することに成功した。

第四章 Plasma membraneリン脂質中に α -リノレン酸を多く含む

鶏初代培養肝細胞における脂肪酸合成能とインスリン応答

第二および第三章において、PUFAを給与した鶏の肝臓、そしてplasma membraneリン脂質中に α -リノレン酸を特異的に多く含む鶏初代培養肝細胞で脂肪酸合成酵素活性の低下を確認した。これまでPUFA給与鶏においては、脂肪酸合成刺激作用を持つインスリンの血漿中濃度は変化しないことが報告されている。これらのことから、 α -リノレン酸の作用機作の一つとして、細胞膜リン脂質中の α -リノレン酸含量の上昇を介して細胞膜の機能(特にホルモンレセプターなど)が変化し、細胞内FAS活性の変化を導いている可能性が考えられる。そこで本章では、 α -リノレン酸含量の高い肝細胞を用いて、その脂肪酸合成能のインスリン応答について検討した。

鶏初代培養肝細胞をhormone free培地で1時間前培養した後に培養系にインスリン(0, 0.1, 0.5, 1.0 μ g/ml)を添加したところ、インスリン添加濃度0.1 μ g/ml以上でFAS活性が大きく上昇することが示された(Fig. 4-1)。すなわち、本培養系の肝細胞はインスリンに応答してFAS活性の上昇が起こる実験系であることを確認した。さらにこの条件下でオレイン酸および α -リノレン酸添加を行ったところ、 α -リノレン酸添加区では他の試験区に比べインスリンによるFAS活性上昇作用が顕著に抑制された(Fig. 4-2)。

次に、インスリン応答の第一段階である肝細胞のインスリン結合能を¹²⁵I-Insulinを用いたbinding assayにより検討した(Fig. 4-3)。 α -リノレン酸およびオレイン酸の脂肪酸添加区では高親和性受容体の親和性が脂肪酸無添加区に比べ非常に小さい(Table 4-1)。さらに、 α -リノレン酸添加区ではオレイン酸添加区に比べて高親和性受容体の親和性が約1/3に低下することが認められた。また、低親和性受容体数は脂肪酸無添加区およびオレイン酸添加区に比べ α -リノレン酸添加区で1/2以下に減少していることが示された。

次に、インスリンレセプターでのチロシンリン酸化を行うIRS-1のmRNA発現をRT-PCR

により確認したところ、GAPDHあたりのIRS-1の発現には脂肪酸添加区の間には差は見られなかった(Fig. 4-4, 4-5)。

このことから、インスリン刺激によるFAS活性の上昇を α -リノレン酸が抑制するメカニズムの一つとして、 α -リノレン酸がインスリンと細胞表面レセプターとの結合を調節している可能性が示された。一方、 α -リノレン酸はIRS-1の発現には大きくは関与していない可能性が推察された。

第五章 総合考察

本研究は、鶏(ブロイラー)に α -リノレン酸を給与すると、肝臓における脂肪酸合成能が低下し、脂肪蓄積が減少することを明確に示した。また、この時に、肝細胞plasma membraneの α -リノレン酸含量が特異的に上昇していることを確かめ、細胞膜の脂肪酸組成変化が脂肪酸合成の低下に関与している可能性を示した。

一般にPUFAによる脂肪酸合成能調節機構として、代謝産物としてのEPAやDHAを介した調節、細胞膜の酸化を介した調節、そして細胞膜機能の変化を介した調節が予想される。そこで、鶏初代培養肝細胞を用いて、 α -リノレン酸の脂肪酸合成能に対する作用と作用機作を端的に観察しうる実験系の作成を試み、plasma membraneリン脂質中に α -リノレン酸を多量に含む鶏初代肝細胞培養系の作成に成功した。しかも、この条件下ではplasma membrane中のEPAの上昇やリン脂質構成の変動は小さいことから、EPAを介した作用機作やリン脂質構成の変化を介した生体膜機能変化の可能性を除外した、すなわち、plasma membraneリン脂質中の脂肪酸組成のみが変動する状態で、 α -リノレン酸の作用機作を検討できることを明らかにした。

上記の鶏肝細胞培養系ではインスリン刺激によって脂肪酸合成能(FAS活性)が上昇すること、しかし α -リノレン酸を添加するとインスリン刺激によるFAS活性の上昇が抑制されることを確認した。そこで、 α -リノレン酸によるFAS活性の抑制機構を肝細胞におけるインスリン応答の点から検討した。 α -リノレン酸の添加ではオレイン酸添加と比べて肝細胞のインスリン結合能が低下し、高親和性受容体の親和性と低親和性受容体の数が減少する結果を得た。一方、インスリン応答に関与するIRS-1 mRNAの発現をRT-PCRで検討したところ、 α -リノレン酸による有意の変動は観察されなかった。

これらのことから、 α -リノレン酸は細胞膜リン脂質の脂肪酸組成の変化を介した膜機能の変化によりインスリン結合能を変化させ、脂肪酸合成能を抑制している可能性が示された。

本研究は α -リノレン酸あるいは α -リノレン酸に富む油脂の給与により、ブロイラー産業上の大きな問題点である過剰脂肪蓄積を抑制できることを明示した。また、その作用機作として、肝細胞膜中 α -リノレン酸含量の上昇に伴う膜機能(特にインスリン結合能)の変化を介した作用機作があり得ることを示したものである。

Table 2-1. Composition of experimental diets

Ingredients (%)	Diet			
	16:0	18:1(n-9)	18:2(n-6)	18:3(n-3)
Safflower oil	0.35	--	6.53	--
Linseed oil	--	--	--	6.53
Olive oil	--	7.59	0.99	0.99
Palm oil	7.25	--	--	--
Tripalmitin	--	--	0.20	0.21
Tristearin	--	0.11	0.15	0.13
Triolein	--	--	0.82	0.69
Cellulose	4.00	4.00	3.95	3.96
Casein	3.50	3.50	3.46	3.47
Soybean protein	22.75	22.73	22.49	22.52
Starch	51.59	50.98	45.07	45.83
Sea sand	1.67	2.22	7.57	6.88
Vitamins and minerals	8.88	8.88	8.79	8.80

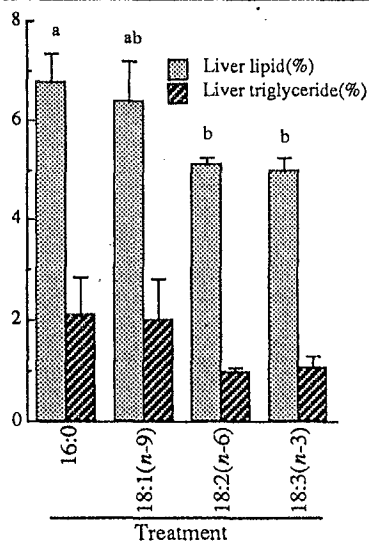


Fig. 2-1. Effect of dietary fatty acid on liver lipid and triglyceride concentrations. Values are means \pm SE, n=5. a, b Values with different superscripts for each treatment are significantly different, P<0.05.

Table 2-2. Fatty acid composition of experimental diets (as-fed basis, %)

Fatty acid	Diet			
	16:0	18:1(n-9)	18:2(n-6)	18:3(n-3)
16:0	<u>3.88</u>	0.71	0.80	0.80
16:1(n-7)	0.02	0.04	0.01	0.01
18:0	0.38	0.29	0.33	0.33
18:1(n-9)	2.37	<u>4.76</u>	2.32	2.31
18:2(n-6)	0.97	0.92	<u>5.19</u>	1.30
18:3(n-3)	0.02	0.04	0.03	<u>3.80</u>

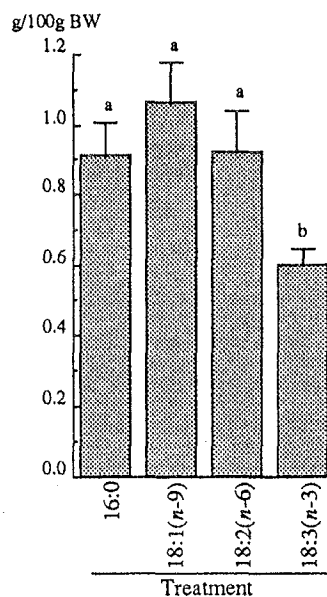


Fig. 2-2. Effect of dietary fatty acid on abdominal fat weight. Values are means \pm SE, n=12. a, b Values with different superscripts for each treatment are significantly different, P<0.05.

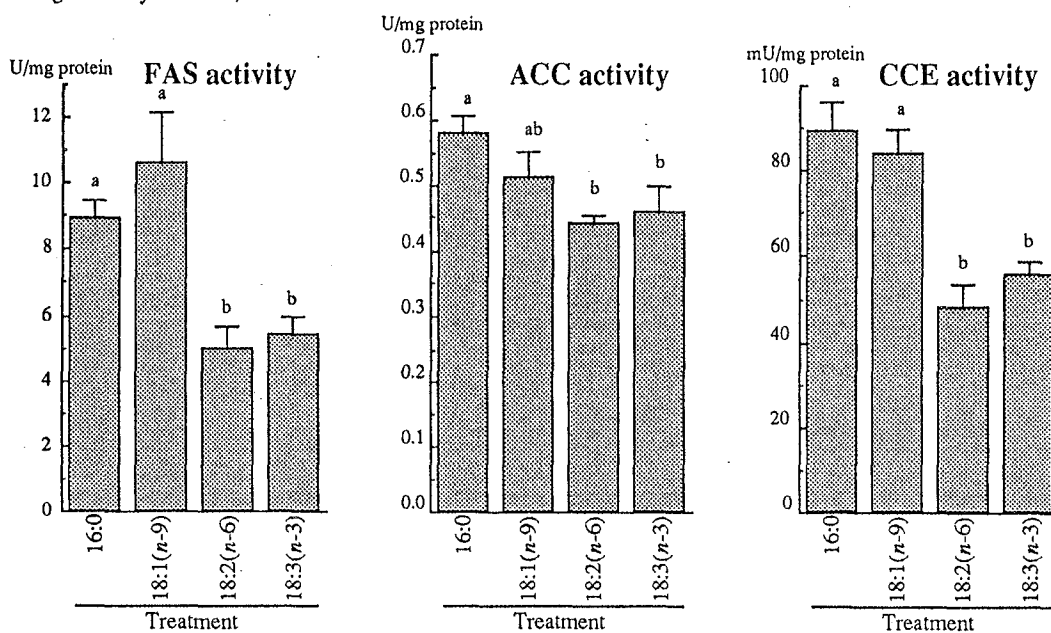


Fig. 2-3. Effect of dietary fatty acid on activities of FAS, ACC, CCE in hepatic tissues. Values are means \pm SE, n=5. a, b Values with different superscripts for each treatment are significantly different, P<0.05. FAS: fatty acid synthase, ACC: acetyl-CoA carboxylase, CCE: citrate cleavage enzyme.

Table 2-3. Fatty acid composition (wt%) of plasma membrane phospholipid in hepatic tissue

Fatty acid	Treatment			
	16:0	18:1(n-9)	18:2(n-6)	18:2(n-3)
16:0	<u>18.3 ± 0.7</u>	17.3 ± 2.4	17.9 ± 1.5	22.2 ± 2.9
16:1(n-7)	1.68 ± 0.86	1.78 ± 1.03	0.41 ± 0.18	2.29 ± 1.41
18:0	24.3 ± 0.6	22.5 ± 2.0	27.5 ± 1.5	25.8 ± 4.1
18:1(n-9)	24.5 ± 4.6	<u>29.2 ± 2.2</u>	8.56 ± 3.71	20.6 ± 5.7
18:2(n-6)	12.1 ± 1.0	9.31 ± 0.68	<u>21.6 ± 1.1</u>	14.1 ± 2.3
18:3(n-6)	ND	ND	ND	ND
18:3(n-3)	ND	ND	0.13 ± 0.23	<u>5.36 ± 1.04</u>
20:4(n-6)	14.9 ± 3.7	14.3 ± 1.9	20.3 ± 4.1	4.13 ± 1.02
20:5(n-3)	0.24 ± 0.24	1.15 ± 1.07	0.50 ± 0.07	0.50 ± 0.54
22:6(n-3)	4.08 ± 0.72	4.42 ± 0.49	3.17 ± 0.62	4.97 ± 1.85
Total n-3	4.32 ± 0.96	5.58 ± 1.56	3.80 ± 0.92	10.8 ± 3.4
Total n-6	27.0 ± 4.6	23.6 ± 2.6	41.9 ± 5.2	18.2 ± 3.3
Total n-9	26.1 ± 5.4	31.0 ± 3.2	8.97 ± 3.89	22.9 ± 7.1
n-3/n-6	0.16 ± 0.21	0.24	0.09 ± 0.18	0.59 ± 1.0

Values are expressed as mean proportion ± SD of total fatty acids (n=3).
ND: not detected.

Table 3-1. Fatty acid composition (wt%) of plasma membrane phospholipid in hepatocyte incubated with α-linolenic acid

Fatty acid	Treatment		
	Before incubation	None	18:3 (n-3)
16:0	19.2 ± 0.7 ^a	20.9 ± 0.8 ^a	15.3 ± 1.7 ^b
16:1(n-7)	1.1 ± 1.0 ^b	2.8 ± 0.2 ^a	0.7 ± 0.1 ^b
18:0	22.6 ± 1.2 ^a	19.8 ± 1.8 ^b	22.8 ± 0.9 ^a
18:1(n-9)	17.6 ± 3.0 ^b	23.2 ± 1.9 ^a	11.1 ± 0.5 ^c
18:2(n-6)	10.0 ± 0.8 ^b	9.1 ± 0.4 ^b	14.0 ± 1.0 ^a
18:3(n-6)	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2
18:3(n-3)	0.1 ± 0.2 ^b	0.6 ± 0.6 ^b	<u>15.2 ± 1.4^a</u>
20:4(n-6)	11.5 ± 1.1 ^a	11.6 ± 0.6 ^a	9.1 ± 1.5 ^b
20:5(n-3)	3.8 ± 2.1	2.7 ± 1.5	5.6 ± 4.5
22:6(n-3)	13.4 ± 3.6 ^a	8.8 ± 2.1 ^{ab}	5.7 ± 2.2 ^b

Values are expressed as mean proportion ± SD of total fatty acids (n=3).
a, b, c Values in a row with different superscripts are significantly different, P<0.05.

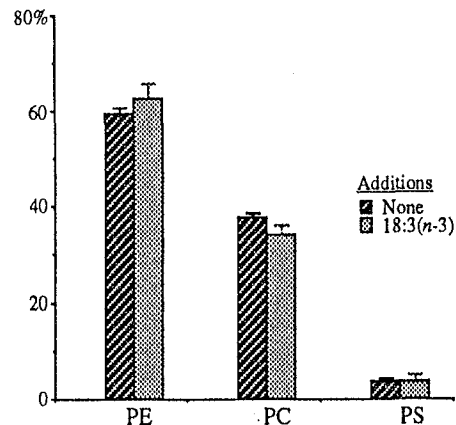


Fig. 3-1. Effect of fatty acid addition on phospholipid composition in plasma membrane of primary cultured hepatocytes. Values are means ± SD, n=3.
PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine, PS: phosphatidylserine.

Table 3-2. Fatty acid composition (wt%) of plasma membrane phospholipid in hepatocytes incubated with mono fatty acid

Fatty acid	Before incubation	Treatment			
		None	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-3)
16:0	20.1 ± 1.0 ^a	19.6 ± 1.8 ^a	16.0 ± 0.4 ^{bc}	16.7 ± 0.6 ^b	14.3 ± 0.5 ^c
16:1(n-7)	1.5 ± 0.1 ^c	2.4 ± 0.2 ^a	2.0 ± 0.3 ^b	0.8 ± 0.1 ^d	0.9 ± 0.2 ^d
18:0	23.9 ± 2.1 ^{ab}	25.5 ± 0.7 ^a	22.5 ± 0.9 ^b	25.6 ± 0.9 ^a	25.5 ± 0.4 ^a
18:1(n-9)	15.8 ± 1.2 ^c	20.4 ± 1.5 ^b	<u>28.4 ± 2.0^a</u>	6.7 ± 1.2 ^e	10.0 ± 0.4 ^d
18:2(n-6)	10.6 ± 0.2 ^c	9.1 ± 0.5 ^c	10.7 ± 0.7 ^c	<u>33.6 ± 1.8^a</u>	14.0 ± 0.2 ^b
18:3(n-6)	0.6 ± 0.3	1.4 ± 1.3	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.3
18:3(n-3)	0.2 ± 0.3 ^b	0.6 ± 0.5 ^b	0.6 ± 0.3 ^b	ND	<u>16.9 ± 0.7^a</u>
20:4(n-6)	10.6 ± 0.2 ^a	8.8 ± 0.2 ^b	8.5 ± 0.6 ^b	8.1 ± 1.2 ^b	6.5 ± 0.3 ^c
20:5(n-3)	2.5 ± 0.8	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.7	1.6 ± 0.9	2.7 ± 0.5
22:6(n-3)	14.4 ± 1.3 ^a	10.8 ± 0.5 ^b	9.4 ± 1.5 ^{bc}	6.7 ± 0.2 ^d	8.7 ± 0.8 ^c

Values are expressed as mean proportion ± SD of total fatty acids (n=3).
a, b, c, d, e Values in a row with different superscripts are significantly different, P<0.05.
ND: not detected.

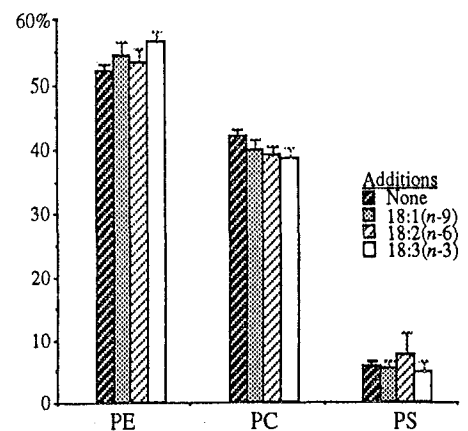


Fig. 3-2. Effect of fatty acid addition on phospholipid composition in plasma membrane of primary cultured hepatocytes. Values are means ± SD, n=3.

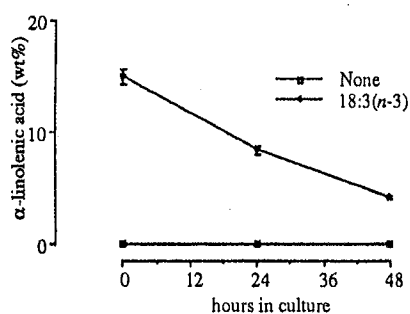


Fig. 3-3. Changes of 18:3(n-3) concentration in plasma membrane phospholipid after incubation with no fatty acids in 18:3(n-3)-enriched hepatocytes.

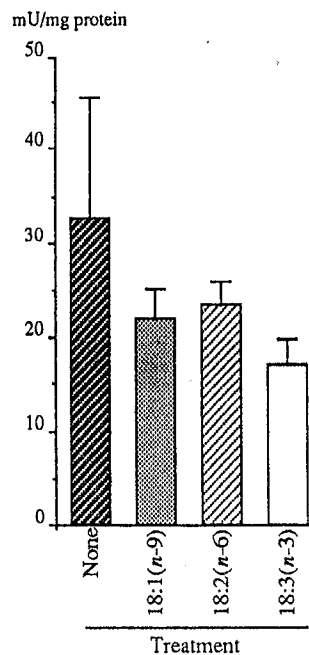


Fig. 3-4. Effect of fatty acid addition on cytosolic fatty acid synthase activity in primary culture of hepatocytes. Values are means \pm SD, n=3.

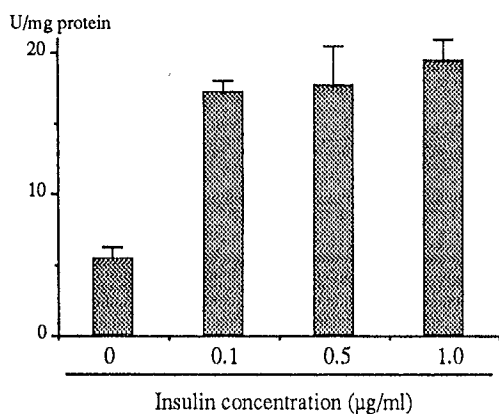


Fig. 4-1. Effect of insulin concentration on cytosolic fatty acid synthase activity in hepatocytes. Hepatocytes preincubated for 1hr with hormone-free medium were incubated with insulin for 24hr. Values are means \pm SD, n=4.

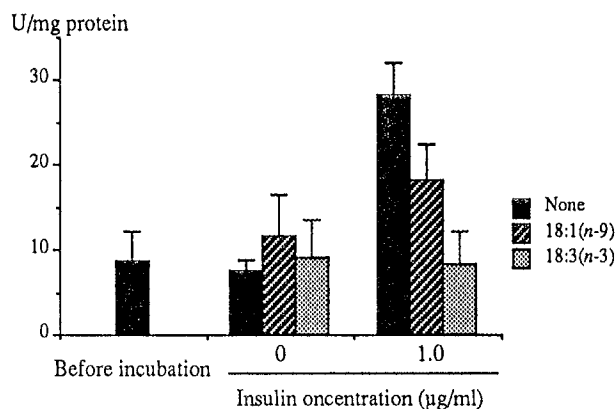


Fig. 4-2. Effect of insulin concentration on cytosolic fatty acid synthase activity of hepatocytes enriched with 18:1(n-9) or 18:3(n-3). Values are means \pm SD, n=4.

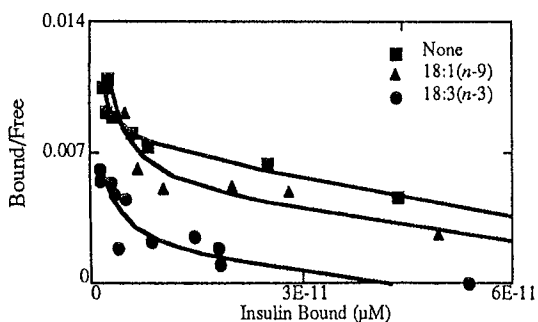


Fig. 4-3. Effects of fatty acid addition on insulin binding of primary cultured hepatocytes. Hepatocytes were incubated in medium containing [125 I]Insulin. The scatcherd plots were calculated from the insulin binding data.

Table 4-1. Effects of fatty acid addition on binding capacity and dissociation constant of chicken hepatocytes

Added fatty acid	High affinity sites		Low affinity sites	
	Binding capacity (units/cell)	Dissociation constant (M)	Binding capacity (units/cell)	Dissociation constant (M)
None	$6.04 \cdot 10^3$	$2.53 \cdot 10^{-11}$	$1.07 \cdot 10^6$	$1.49 \cdot 10^{-8}$
18:1(n-9)	$2.47 \cdot 10^4$	$2.04 \cdot 10^{-10}$	$9.74 \cdot 10^5$	$2.02 \cdot 10^{-8}$
18:3(n-3)	$3.35 \cdot 10^4$	$5.95 \cdot 10^{-10}$	$3.74 \cdot 10^5$	$2.10 \cdot 10^{-8}$

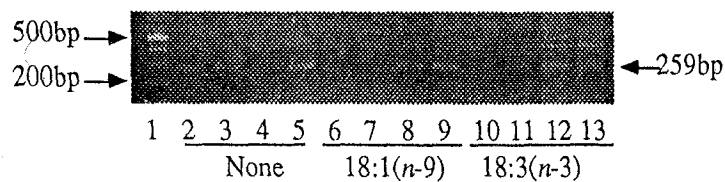


Fig. 4-4. Effect of fatty acid addition on IRS-1 mRNA expression in primary culture of hepatocytes. IRS-1 gene expression was measured by quantitative RT-PCR using total cellular RNA from hepatocytes. Expected size of amplified products is 259 bp for IRS-1 and is indicated. Lane 1: 100bp DNA Ladder. Lane 2-13: PCR products.

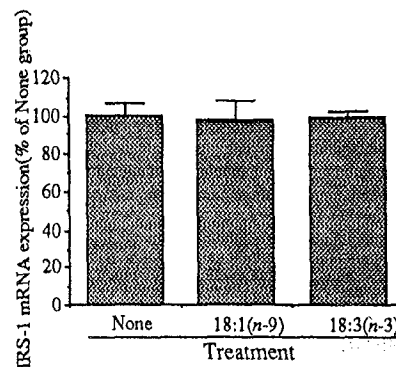


Fig. 4-5. IRS-1 mRNA expression in hepatocytes added with insulin and fatty acid. GAPDH mRNA expression was used as a house keeping gene. Relative mRNA expression between IRS-1 and GAPDH was calculated from densitometry. Values are means \pm SD, n=4.

論文審査結果要旨

家畜(特に肉用鶏であるブロイラー)では、成長速度の著しい増進に伴って脂肪の過剰蓄積を含めて種々の代謝異常の発生が多発している現状にある。過剰脂肪蓄積の制御は食肉の生産性と品質を高め、飼料資源の有効利用を図る観点で畜産動物共通の重要課題である。本研究では、鶏では肝臓における脂質合成を制御する手法が有効であるとの視点に立ち、多価不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)給与による制御を試みた。さらに、脂質代謝に対するPUFAの作用機作として、 α -リノレン酸(18:3, n-3)などのPUFAが肝臓の生体膜に組み込まれて生体膜機能を調節することにより発現するとの作業仮説を立て、鶏初代肝細胞培養系を駆使して仮説を実証した。

まず、ブロイラーの脂質代謝に対するPUFAの作用を明らかにするために、パルミチン酸(16:0)、オレイン酸(18:1, n-9)、リノール酸(18:2, n-6)、 α -リノレン酸(18:2, n-3)をそれぞれ特異的に多く含む飼料を2週間給与して脂質代謝の変化を詳細に検討した。その結果から、ブロイラーにPUFA、特に α -リノレン酸の給与により肝臓での脂肪酸合成能(Fatty acid synthetase活性, FAS活性)が低下して、体内脂肪蓄積量が減少すること、そして肝臓の細胞膜では給与した脂肪酸含量が上昇して、plasma membrane 脂肪酸組成が変動することを明らかにした。

次いで、 α -リノレン酸の作用機作を肝細胞膜脂肪酸組成の変化を介した調節の観点から証明するために、初代肝細胞培養系の確立を試みた。その結果、 α -リノレン酸を500 μ M添加して24時間培養することにより、plasmamembrane中の α -リノレン酸含量が著しく高く、しかも細胞FAS活性が低下する初代肝細胞培養系の作成に成功した。

上記の培養系を駆使して、 α -リノレン酸の脂肪酸合成能抑制作用機作を細胞膜のインスリン応答から検討した。培地にインスリンを0.1-1.0 μ g/ml添加したところ細胞FAS活性が著しく上昇し、その上昇は α -リノレン酸添加によりほぼ完全に抑制されることから、 α -リノレン酸は細胞のインスリン応答性を調節することを明示した。さらに肝細胞のインスリン結合能を検討したところ、 α -リノレン酸添加により高親和性受容体の親和性が低下する結果を得た。しかし、インスリンレセプターでのチロシンリン酸化に参与するIRS-1のmRNA発現の変動は認められなかった。これらの結果から、 α -リノレン酸は細胞表面レセプターとインスリンの結合を調節することにより肝細胞のインスリン応答性を抑え、脂肪酸合成能を抑制することを提示した。

本研究の成果は、 α -リノレン酸あるいは α -リノレン酸に富む油脂の給与により、ブロイラー産業上の緊急課題である過剰脂肪蓄積を制御できることを明示した。さらに、その作用機作を新たな視点から追究して実証した本成果は、脂質代謝研究に新たな視点を拓くものとして、審査員一同は本研究者が博士(農学)の学位を受けるに値するものと認定した。