

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660162

研究課題名(和文)水産リン脂質の光学異性体分析法の開発

研究課題名(英文)Development of an analytical method for enantiomeric marine phospholipids

研究代表者

板橋 豊 (Itabashi, Yutaka)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60142709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：「細胞膜を構成するリン脂質はキラルな化合物であり、ホスファチジルコリン(PtdCho)もエタノールアミン(PtdEtn)も、R配置である」と信じられているが、この常識は疑わしく思われる。すなわち、ある種の生物や特殊な生育環境下ではS配置のリン脂質も存在する可能性がある。このことを明らかにするためには、RとSを完全に識別する高精度分析法の開発が不可欠である。本研究では、これまで困難とされ、長年の研究課題となっている「クロマトグラフィーによるリン脂質光学異性体の分離分析法の開発」に取り組み、分子種と立体配置を同時に決定できる精密分析法(キラルHPLC/MS/MS)の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Chiral-phase high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for direct enantiomer separations of phosphatidylcholines (PtdCho) and phosphatidylethanolamines (PtdEtn) was developed. Complete enantiomer separations of racemic PtdCho and PtdEtn were achieved with appropriate retention times on a polysaccharide-based stationary phase under reversed-phase mode using a binary mixture of acetonitrile and methanol as the mobile phase. The optimized method was used for determining the chirality and molecular species composition of natural phospholipids. Individual molecular species of the phospholipids from soybean, egg yolk, and some bacteria (*E. coli* and *Bacillus* species) had only R-configuration (sn-1,2-diacyl-). The present study demonstrates that chiral-phase HPLC-MS/MS provides direct and unambiguous information about the configuration, identity, and quantity of molecular species in natural and synthetic PtdCho and PtdEtn.

研究分野：水産化学

キーワード：リン脂質 光学異性体 キラルHPLC 質量分析 分子種分析 細菌 大豆 卵黄

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 「タンパク質を構成するアミノ酸と細胞膜の主要成分であるリン脂質はともにL型の立体配置を有し、核酸の構成糖はD型である」。この生命世界のホモキラリティーは地球上の全生物に共通しており、不変であると考えられてきた。しかしながら、近年海洋生物を含む種々の生物中にD-アミノ酸が広く存在することが明らかになり、その由来や特異な機能に大きな関心が寄せられている(阿部, 2002)。D-アミノ酸研究の進展は主に分析技術の発展に負っている。すなわち、クロマトグラフィー(特にキラルHPLC)による微量のD-アミノ酸の分離分析が可能になったことである(Gübitz, 2004)。一方、リン脂質には、こうしたブレイクスルーは残念ながらまだ起きていない。リン脂質は両親媒性であるためキラル分析が難しいことが主な理由だが、研究者自身の光学異性体についての問題意識の低さもその一因であると思われる。水産分野に限って言えば、EPAやDHAに対する関心は高いが、多くはそこまでである。その中で、リン脂質に関する研究ではないが、日本の研究者がトリアシルグリセロールのHPLCによる光学異性体分離を試みているのは興味深い(Iwasakiら, 2001; Nagaiら, 2011)。国外でもリン脂質の光学分割が達成されたとの報告はないが(W.W. Christie, The AOCs Lipid Library. <http://lipidlibrary.aocs.org>), 米国のTatituriらは、著者らの微生物リン脂質(PtdGro)のジアステレオマー分析に関する研究(Itabashi & Kuksis, 1997)に興味を示し、著者との共同研究を実施している。欧州ではリン脂質の光学異性体分析を目的に日本への留学を希望する院生がいるなどわが国よりは関心が高いと思われる。

(2) 今から30年ほど前、グリセロ脂質の分析に関して未解決の大きな問題が2つあった。その1つが光学異性体をいかにして分析するかであった。著者は当時まだ分析化学者たちの研究レベルに過ぎなかったキラルHPLCを脂質化学の分野に導入し、モノアシルグリセロールやジアシルグリセロール等のグリセロ脂質の光学異性体分離を可能にした(Itabashi and Takagi, 1987)。以来、国内外の幾人もの研究者によって種々の脂質の光学分割が可能になり、その方法は脂質化学の多くの研究に応用されている(Itabashi, 2011; Itabshi, 2012)。リン脂質の光学異性体は、それでもなお分離できない成分として今日に残された課題である。

## 2. 研究の目的

「細胞膜を構成するリン脂質はキラルな化合物であり、ホスファチジルコリン(PtdCho)もエタノールアミン(PtdEtn)も、C2がL(すなわちR)配置であることに注意せよ」と有機化学や生化学の教科書(たとえば、マク

マリー有機化学第7版)に書かれているので、誰もこのことを疑わない(R配置のPtdChoの構造式を図1に示す)。しかし、この「常識」は、古くに脂質関連酵素(ホスホリパーゼA<sub>2</sub>などのリン脂質加水分解酵素)の立体特異性を用いる間接的な方法によって決められたものであり、分析精度が酵素の立体特異性の程度により左右されることから、結論に曖昧さを残している。著者は、ある種の生物や特殊な生育環境下ではS配置のリン脂質も存在する可能性があるかと推測している。このことを明らかにするためには正確な分析法の開発が不可欠である。本研究ではこれまで困難とされ、長年の研究課題である「リン脂質の光学異性体の分離分析法の開発」に挑戦することを目的とした。方法が確立すれば、リン脂質の新たな研究分野が拓かれるとともに、D型リン脂質、特に高度不飽和脂肪酸(EPA, DHA)に富む水産リン脂質の新たな機能開発とそれを利用する産業の創出に繋がるのが期待できる。

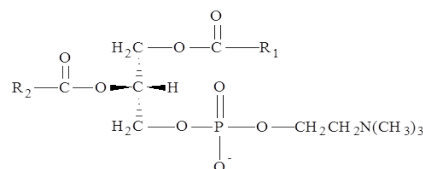


図1 ホスファチジルコリン光学異性体(R型)の構造

## 3. 研究の方法

(1) 飽和脂肪酸(12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0)と不飽和脂肪酸(18:1, 18:2, 18:3, 20:5, 22:6)から構成されるPtdCho及びPtdEtnのラセミ体と光学活性体を著者らが既に報告したホスホリパーゼDを用いる方法(Satoら, 2004)を参考にして合成した。実試料として、水素添加した大豆PtdChoと卵黄PtdCho、大腸菌1種、*Bacillus*属及び*Geobacillus*属の細菌計8種のPtdEtnを用いた。細菌の培養と脂質の抽出は既報に従って行った(藤島ら, 2004)。

(2) キラルHPLCには多糖誘導体をキラルセクターとする数種のカラム(内径4.6mm, 長さ25cm, 粒子径3µm)を使用して分離を検討した。移動相にはアセトニトリルとメタノールの混液に少量の塩または塩基を添加した溶剤を使用した。カラム温度は10~30に設定して分析した。検出器にはトリプル四重極型質量分析計を使用し、ESI-MSの正イオン(PtdCho)または負イオン(PtdEtn)スペクトルを測定した。簡便な蒸発光散乱検出器(ELSD)も使用した。

## 4. 研究成果

(1) キラル充填剤, 移動相, 添加剤, 分析温度を検討した結果, キラル固定相として

Amylose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) を含むカラムを逆相条件下で使用するにより, PtdCho のラセミ体が明瞭に分離されることを見出した(図2). 移動相は, アセトニトリルとメタノールの混液にギ酸アンモニウムを少量添加した溶剤が最適であった. 低温で分析するほど, 分離度が向上した. *R* 体が *S* 体よりも早く溶出した. ESI-MS/MS では, 顕著なプロトン化分子  $[M+H]^+$  と脂肪酸由来のプロダクトイオン ( $[M+H-RCH=C=O]^+$ ,  $[M+H-RCOOH]^+$ ,  $[M+H-RCOOH-N(CH_3)_3]^+$ ) が検出された. イオン強度 ( $[M+H-R_2CH=C=O]^+ > [M+H-R_1CH=C=O]^+$ ) を利用して, 脂肪酸の結合位置を含めた PtdCho 分子種の同定も可能であった.

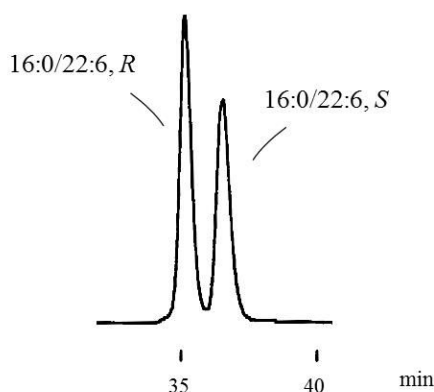


図2 キラル HPLC による DHA 含有ホスファチジルコリン (PtdCho) の光学異性体分離

(2) PtdEtn のラセミ体も PtdCho とほぼ同様の分析条件で明瞭に分離されることを見出した(図3). 移動相は, アセトニトリルとメタノールの混液にエタノールアミンを少量添加した溶剤が最適であった. PtdCho と同様に, 低温で分析するほど分離が向上し, *R* 体が *S* 体よりも早く溶出した. ESI-MS/MS では, 顕著な脱プロトン化分子  $[M-H]^-$  と脂肪酸由来プロダクトイオン ( $[RCOO]^-$ ,  $[M-RCO]^-$ ,  $[M-H-RCOOH]^-$ ) が検出された. イオン強度 ( $[R_2COO]^- > [R_1COO]^-$ ,  $[M-R_2CO]^- > [M-R_1CO]^-$ ,  $[M-H-R_2COOH]^- > [M-H-R_1COOH]^-$ ) を利用して, 脂肪酸の結合位置を含めた PtdEtn 分子種の同定も可能であった.

(3) 逆相キラル HPLC-ESI-MS/MS を用いる本法が, 種々の生物由来 PtdCho と PtdEtn の立体構造解析に適用可能であることを確認するために, 大豆 PtdCho, 卵黄 PtdCho, 大腸菌 *Escherichia coli* PtdEtn および好熱性細菌 7 種 (*Bacillus* 属, *Geobacillus* 属) の PtdEtn (細菌由来) の立体配置ならびに分子種の解析を行なった. 水素添加した大豆由来 PtdCho の総イオンクロマトグラム (TIC) と正イオンスペクトルを図4に示す. 合計7つの分子種が検出されたが, いずれの分子種も天然型とされる *R* 体のみ検出され, *S* 体は検出されなかった. 大豆 PtdCho の主な分子種

は, 16:0/18:0 (*sn*-1/*sn*-2) (34.0%), 18:0/18:0 (63.5%) であった. 水素添加した卵黄由来 PtdCho では, 合計 8 つの分子種が検出されたが, いずれも *R* 体であった. 主な分子種は, 大豆 PtdCho と同様に 16:0/18:0 (*sn*-1/*sn*-2) (61.0%), 18:0/18:0 (30.4%) であった. 大腸菌由来 PtdEtn では, 19 種の分子種が検出されたが, *S* 体は見出されなかった. *sn*-1 位に飽和脂肪酸, *sn*-2 位に不飽和脂肪酸あるいはシクロプロパン酸が結合した PtdEtn が大半を占めた. 主な分子種は 16:0/cy17:0 (47.9%), 16:0/18:1 (12.1%), 16:0/cy19:0 (9.2%) であった. バチルス属関連細菌の PtdEtn では, 合計 6 つの分子種が検出されたが, すべて *R* 体であった. 主な分子種は飽和脂肪酸のみで構成された 15:0/15:0, 16:0/15:0, 17:0/15:0 であり, *sn*-2 位に 15:0 が局在していることが認められた. 同定した分子種は, 従来の逆相 HPLC-MS を用いて求めた報告と近似しており, 少量成分 (総分子種中 1%以下) を含めて多数の分子種を正確に解析することが可能であった. クロマトグラフィーを用いて, リン脂質 (PtdCho, PtdEtn) の立体配置と分子種組成を同時に明らかにしたのは本研究が初めてである.

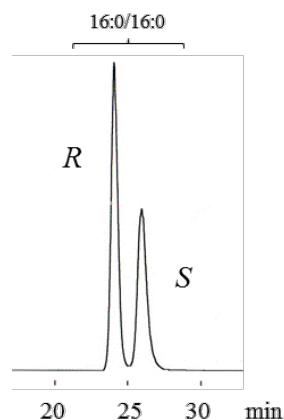


図3 キラル HPLC によるホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn) の光学異性体分離

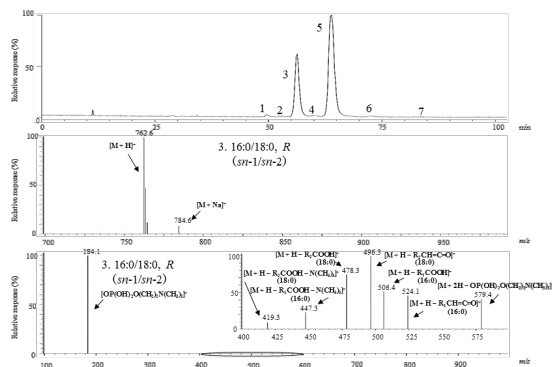


図4 キラル HPLC-MS/MS による水素添加大豆 PtdCho の分子種分析. (上) TIC, (中) ピーク 3 (16:0/18:0) の MS スペクトル, (下) MSMS スペクトル

(4) 本研究で確立した逆相キラル HPLC-MS/MS によるリン脂質(PtdCho, PtdEtn)の光学異性体分析法は、従来の酵素の立体特異性を利用する間接的な方法よりも正確で感度も高く、操作も簡単である。本法はリン脂質の立体配置のみならず分子種も同時に決定することが可能なことから、生物由来 PtdCho および PtdEtn の立体構造と分子種の解析(リポミクス)に広く適用できると考えられる。今回分析した試料からは、S 配置のリン脂質は見出されなかったが、今後極限微生物等特殊な環境下で生育する海洋生物を広く検索することを検討したい。

#### <引用文献>

- 阿部宏喜:日本水産学会誌 68, 516-525 (2002)  
G. Gübitz: in "Chiral separations", Humana Press, 2004  
Y. Itabashi and A. Kuksis: Anal. Biochem. 254, 49-56 (1997)  
T. Nagai, et al.: J. Chromatogr. A 1218, 2880-2886 (2011)  
Y. Iwasaki, et al., J. Chromatogr. A 905, 111-118 (2001)  
Y. Itabashi and T. Takagi: Lipids 21, 413-416 (1986)  
Y. Itabashi: Chromatography 32, 59-72 (2011)  
Y. Itabashi: J. Lipid Nutr. 21, 27-34 (2012)  
R. Sato, Y. Itabashi, H. Fujishima, H. Okuyama and A. Kuksis: Lipids 39, 1025-1030 (2004)  
藤島裕典, 蒲野淑子, 田岡裕佳子, 澤辺智雄, 板橋 豊: 日本水産学会誌 70, 200-202 (2004)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [学会発表](計 4 件)

- 木村 錬, 西村一彦, 板橋 豊, 逆相キラル HPLC によるリン脂質の光学異性体分析法の開発, 化学系学協会北海道支部 2015 年冬季研究発表会, 2015 年 1 月 27 日~2015 年 1 月 28 日, 北海道大学フロンティア応用科学研究棟(北海道札幌市)  
板橋 豊, 超臨界流体クロマトグラフィーによる脂質類の光学異性体分析, 日本油化学会第 53 回年回, 2014 年 9 月 9 日~2014 年 9 月 11 日, ホテルロイトン札幌(北海道札幌市)  
木村 錬, 西村一彦, 板橋 豊, 逆相キラル HPLC MS/MS によるリン脂質の光学異性体分析, 日本油化学会第 53 回年回, 2014 年 9 月 9 日~2014 年 9 月 11 日, ホテルロイトン札幌(北海道札幌市)  
木村 錬, 板橋 豊, キラル HPLC による

リン脂質光学異性体の分離分析, 第 73 回分析化学討論会(日本分析化学会主催), 2013 年 5 月 18 日~2013 年 5 月 19 日, 北海道大学水産学部(北海道函館市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

板橋 豊 (ITABASHI, Yutaka)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・特任教授  
研究者番号: 60142709

##### (2) 研究分担者

小玉修嗣 (KODAMA, Shuji)  
東海大学・理学部・教授  
研究者番号: 70360807