

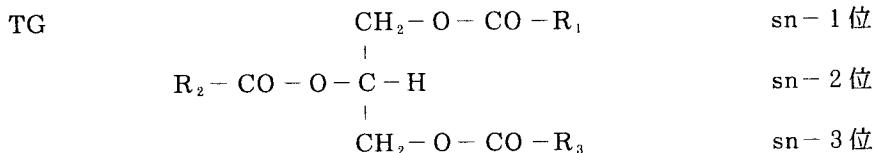
学位論文題名

STEREOSPECIFIC ANALYSIS OF FISH OIL TRIACYL
- SN - GLYCEROLS BY NEW CHIRAL HPLC METHOD

(新キラル HPLC 法による魚油トリアシルグリセロールの立体特異分析に関する研究)

学位論文内容の要旨

トリアシルグリセロール (TG) は脂質の主要成分として天然に広く存在し、グリセロール 1 分子に脂肪酸 3 分子がエステル結合した構造を有する。その結合の位置は、グリセロール骨格の Fischer 投影式に基づく立体特異的番号法 (stereospecifically numbered system) により、sn-1 位、sn-2 位および sn-3 位に区別される。TG の立体特異分析とは、これら 3 か所の位置の脂肪酸組成を求めて、脂肪酸の位置的な分布を明らかにすることである。



TG の立体特異分析のための方法は 1965 年に Brockhoff らによって初めて報告され、その後天然の TG の分析のために広く使われてきた。この方法はホスホリパーゼ A₂ の立体特異的な加水分解反応を利用するものであるが、酵素を使用するために生じる欠点の存在も否定し得ない。酵素には、個々の脂肪酸成分やその組み合わせに対する反応性が異なるという性質がある。水生生物の場合、陸上の動植物に比べてはるかに広範な炭素数・二重結合数の脂肪酸を含むため、酵素法による水生生物の TG の立体特異分析は形式的なものにならざるを得ず、信頼性の高い結果を得ることは本質的に困難であった。また、Brockhoff の方法には、sn-3 位の脂肪酸組成を直接求めることができないという欠点も存在する。

本研究では、酵素の立体特異的な反応に代わり、モノアシルグリセロール (MG) のキラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を導入することにより、水生生物の TG への適用を可能にするような新たな立体特異分析法を考案・検討し、次いで、実際に魚油 TG の分析を試みた。以下に、本研究で得た新たな知見について記す。

1. キラル HPLC による MG 混合物の対掌体分離

近年、Sumichiral OA-2100キラルカラムを用いたHPLCにより、1-MGの対掌体(sn-1-MGとsn-3-MG)が分離された。この技術は、立体構造の識別・分離のための新たな方法として有用である。しかし、天然物から得られるような複数の1-MGの混合物を分離・定量することはこれまで不可能であった。

本研究では、HPLCのキラルカラムを延長し、移動相の極性を下げるこことによって、対掌体の分離度と同族体ピーク間の分解能を向上させ、ごく簡単な混合物の定量分析を可能にした。さらに、対掌体の分離度が特に優れたSumichiral OA-4100カラムを新たに導入し、炭素数が2ずつ異なる6成分までの混合物、および二重結合数が1ずつ異なる4成分までの混合物の分離を可能にした。このOA-4100の使用により、天然のTGから得た1-MGを対掌体に分割し、定量分析ができるようになり、本研究では亜麻仁油TGのsn-1, sn-2, sn-3位の脂肪酸組成を求めるに成功した。

2. TG の立体特異分析法

前項で検討した1-MGのキラルHPLCによる分離を基礎として、以下に概略を示すTGの新たな立体特異分析法を考案した。TGを臭化エチルマグネシウムで部分的に加水分解し、生成する1-および2-MGをホウ酸-ケイ酸薄層クロマトグラフィー(TLC)で単離する。さらに、1-MGをOA-4100キラルカラムのHPLCでsn-1-MGおよびsn-3-MGに分割する。得られた各MG異性体および原料のTGの脂肪酸をメチルエステルとしてガスクロマトグラフィー(GLC)で分析する。この方法は酵素を全く用いないため、酵素法に特有の欠点を解決することができる。また、全ての位置の脂肪酸成分を直接分析できるため、特定の位置の結果への誤差の集中を防ぐことができる。

本研究では、構造既知の標準品と数種の植物油の分析を行い、この方法が正確で、しかも再現性に優れていることを明らかにした。さらに、高分解能毛細管GLCを使用することにより、不飽和脂肪酸の二重結合位置異性体の分布を求めることができるようにした。この結果、植物油では、18:1n-9とその異性体18:1n-7の分布は異なっており、脂肪酸の位置分布を支配する新たな因子として、不飽和脂肪酸の二重結合の位置が、炭素数や二重結合数と同様に重要であることを明らかにできた。

3. TG 立体特異分析法の微量化

TGの立体特異分析では、分析中に起こり得るアシル基の転移が、結果の正確さに大きく影響を及ぼすため、分析の操作に改良を施し、アシル基の転移が起こる機会を少なくするようにした。

この改良により、従来困難であった10mg-0.1mg程度の微量のTGでも、試料量100mgの場合に劣らぬ正確さで立体特異分析が行えるようになった。この微量化的成功は、前項で述べた新しい分析法が原理的に高い信頼性を有していることを支持している。ナツメ果肉脂から得られるTG(5mg)の分析にこの改良法を適用し、16:1n-5, 18:1n-7, 18:1n-5といったカルボキシル基から比較的離れた位置に二重結合をもつモノエン脂肪酸は、飽和脂肪酸18:0と似た分布傾向を示すことを明らかにした。

4. 魚油 TG の立体特異分析

Brockhoff らは、魚類、鯨類等多数の水生動物のTG分析の結果をもとに、脂肪酸の位置分布の一般則を報告した。また Litchfield は、魚油の外因性脂肪酸である22:6と22:5は他の脂肪酸の存在から影響を受けることなく、一定の比率でTGのsn-1, sn-2, sn-3位に分布していると報告した。しかし、これらの考察は、酵素法で得られた、わずかに11成分の分布をもとに行われたにすぎない。

本研究では、新分析法を実際にサンマ、ニシン、シシャモ、マイワシ、メンハーデン、オショロコマのTGの分析に適用し、これまで未報告であった微量な脂肪酸成分や二重結合位置異性体も含めた多数の脂肪酸の位置分布を初めて詳細にすることができた。本研究の分析結果から、これまで見出だしえなかっただ、脂肪酸の位置分布を支配する幾つかの因子を発見することができた。長鎖の高度不飽和脂肪酸である22:6n-3, 22:5n-3および20:5n-3の位置分布には、長鎖モノエン酸の20:1と22:1の総含有量からの影響がみとめられた。また、20:1と22:1の位置分布は、20:1の二重結合位置異性体である20:1n-9と20:1n-11の存在比によって異なっていた。さらに、短鎖の脂肪酸の分布は、より長鎖の脂肪酸全体の分布から影響を受けていた。これらの因子の存在をもとに、本研究では、魚油脂肪酸の位置分布を決定する要因として、脂肪酸間の相互作用という新たな概念を導入することが重要であるとの知見を得るに至った。さらに、各脂肪酸の起源の相違という概念も位置分布の決定要因として重要であることが明らかとなった。魚油脂肪酸の位置分布に関して、より高度な規則性の解明のために、これらの概念は特に有用である。

本研究は、水生生物のTGに適用可能な新たな立体特異分析法を開発し、それを用いて実際に魚油TGの分析を行うことにより、脂肪酸の位置分布の研究に必要な新たな基礎的知見を与えたものとして重要であると思われる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 太田 亨

副査 教授 羽田野 六男

副査 助教授 板橋 豊

トリアシルグリセロール (TG) における脂肪酸の立体特異的位置分布を精密に分析することは、最近、油脂加工の分野で注目されている。TG のアシル基配列に規則性を持たせた、いわゆる構造化油脂の研究や、脂質生化学（代謝、消化、吸収）の研究発展のためにも必要不可欠で、重要な課題である。これまで、TG の立体特異分析は専ら酵素の立体特異的反応を利用した方法に頼ってきた。しかし、酵素法では反応に脂肪酸選択性が伴う点や、特定の位置の結果に誤差が集積する点などから、特に天然物の分析においては信頼性の高い結果を得ることは困難であり、新たな分析法の開発が望まれていた。

本研究は、酵素法に代わるモノアシルグリセロール (MG) のキラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用する新たな TG の立体特異分析法の開発と、その魚油 TG への応用を目的として行われた。得られた成果について審査員が評価する点は以下の通りである。

- 1) モノアシルグリセロールのキラル HPLC において、カラムの延長、移動相の極性の低下など分離条件の改良、また、新たな Sumichiral OA-4100 カラムの導入によって、これまで不可能であった炭素数または二重結合数の異なる多成分系 1 - MG 混合物の対掌体の分離を可能にし、さらに、この技術が天然物からの 1 - MG 混合物の分離に適用し得ることを確認した。
- 2) キラル HPLC による 1 - MG の分離を基礎とした、以下に概略する TG の新立体特異分析法を開発した。

TG を臭化エチルマグネシウムで部分的に加水分解し、生成する 1 - MG および 2 - MG をホウ酸-ケイ酸薄層クロマトグラフィーで単離する。さらに 1 - MG を Sumichiral OA - 4100 カラムの HPLC で sn - 1 - MG および sn - 3 - MG に分割する。得られた各 MG 異性体および原料の TG の脂肪酸をメチルエステルとして高分解能ガスクロマトグラフィーで分析する。

この方法では、すべての位置の脂肪酸成分を直接分析できるため、誤差が特定の位置の結果へ集中することがない。現在、キラル HPLC による脂質成分の光学分割は、非常に簡便で迅速である点、正確かつ精度が極めて高い点、微量の試料へも適用可能な点、さらに特定の脂肪酸に対する選択性がない点などから、最も優れた技術となっているが、新分析法は、この技術の特長を

最大限に活用したものであり、酵素法に特有の欠点を解消したのみでなく、迅速性、汎用性の面でも遙かに実用的といえる。この新分析法により、広範な炭素数および二重結合数の脂肪酸によって構成される水産生物 TG の精密な立体特異分析が可能となった。

3) 新分析法に対し、TG の部分的加水分解生成物を即時誘導体化することにより、分析の正確さに大きく影響を及ぼすアシル基の転移を最小限にする改良を施した。この改良法を使用すれば、 $10 - 0.1\text{mg}$ 程度の微量の TG を試料とした場合でも、正確かつ迅速な立体特異分析が可能であることを明らかにした。

4) 植物油 TG を試料として、新分析法が正確で、再現性に優れていることを確認するとともに、植物油 TG では、脂肪酸の位置分布を支配する新たな因子として不飽和脂肪酸の二重結合の位置が、炭素数や二重結合数と同様に重要であること、さらに $16 : 1 n - 5$, $18 : 1 n - 7$, $18 : 1 n - 5$ のようなカルボキシル基から比較的離れた位置に二重結合をもつモノエン酸は、飽和脂肪酸 $18 : 0$ と共に分布傾向を示すことなどを明らかにした。

5) Brockerhoff らは、酵素法により魚類、鯨類など多数の水生動物 TG の立体特異分析を行い、脂肪酸 11 成分の位置分布を報告した。その結果をもとに Litchfield が報告した、魚油の外因性脂肪酸である $22 : 6$ と $22 : 5$ の分布則は、これらの脂肪酸の位置分布が他の脂肪酸の存在から影響を受けない独立した事象であることを示唆している。本研究では新分析法により数種（サンマ、ニシン、シシャモ、マイワシ、メンハーデン、オショロコマ）の TG を分析し、これまで未報告であった微量な成分や二重結合位置異性体も含めた 38-54 成分の脂肪酸の位置分布を初めて明らかにした。その結果、長鎖の高度不飽和脂肪酸である $22 : 6 n - 3$, $22 : 5 n - 3$ および $20 : 5 n - 3$ の位置分布には、長鎖モノエン酸の $20 : 1$ と $22 : 1$ の総含量からの影響があること、また $20 : 1$ と $22 : 1$ の位置分布は、 $20 : 1$ の二重結合位置異性体である $20 : 1 n - 9$ および $20 : 1 n - 11$ の存在比によって異なること、さらに、短鎖の脂肪酸の分布は、より長鎖の脂肪酸全体の分布から影響を受けることなど、これまで見出だしえなかった脂肪酸の位置分布を支配する幾つかの因子を発見した。

6) これらの因子を総合的に考察し、魚油 TG における脂肪酸の位置分布を決定する要因として、脂肪酸間の相互作用という概念、さらに各脂肪酸の起源の相違という概念を新たに導入することが重要であることを明らかにした。

これらの成果は、今後の海洋脂質の研究に要求される基礎的手段並びに基礎的知見を与えるもので、その発展のために大きく貢献するものと高く評価される。本論文の提出者は博士（水産学）の学位授与に充分な資格を有するものと、審査員一同は判定した。