

学 位 論 文 題 名

蛍光検出 HPLC によるキラル脂質の高感度分子種
分析法の開発とその海洋脂質成分分析への応用

学位論文内容の要旨

脂質の抽出や精製、化学反応や分析の過程では通常多量の有機溶媒が使用される。全ての有機溶媒は人体にとって有害であり、特にハロゲン系や芳香族系の溶媒は毒性が強く、環境破壊に繋がるものも多い。分析法の高感度化は実験スケールを縮小し、有機溶媒の使用量や化学反応等に使用される毒劇物などの試薬の量を減少させることができる。したがって分析法の高感度化は、微量成分分析のためだけではなく、資源や環境の保護および健康維持の面で必要である。本研究は脂質成分分析の高感度化を達成するために、新しい方法の確立を目的とした。

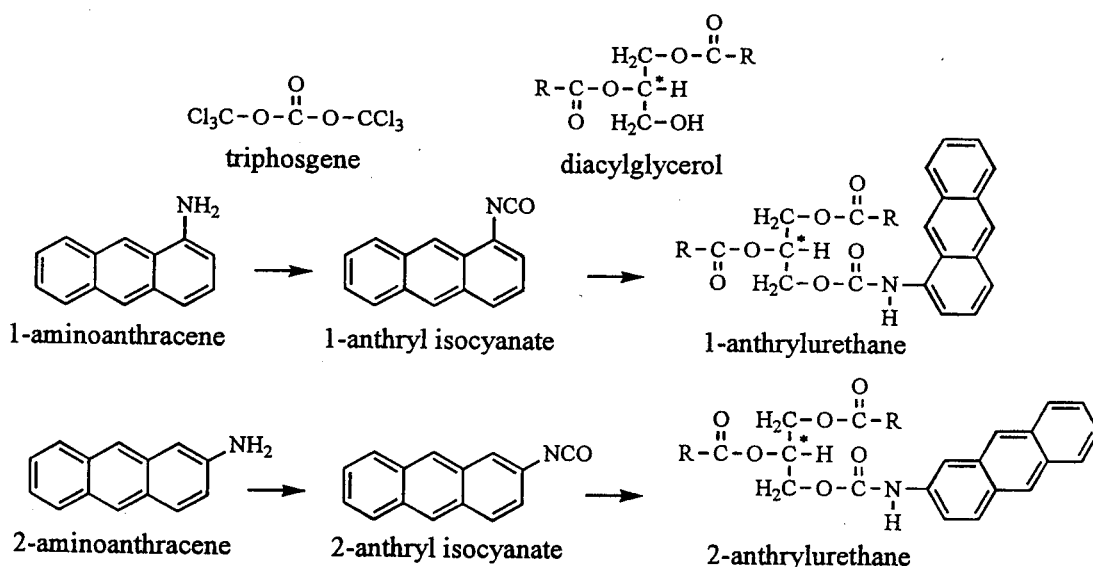
海洋生物中の脂質成分は、リン脂質や糖脂質などの極性脂質やトリアシルグリセロールなどの非極性脂質等到大別される。これらのグリセロ脂質は、ドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）などの高度不飽和脂肪酸を含む多数の分子種から構成されている。分子種には二重結合位置異性体および光学異性体が存在するので、海洋脂質成分の組成は極めて複雑である。近年、ガスクロマトグラフィー（GLC）や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の発展にともない、分子種の分離技術は目覚ましく進歩した。光学異性体は旋光性以外の物性が等しいために、クロマトグラフィーによる分離は極めて困難であったが、キラル固定相の開発により可能となった。たとえば分子内に水酸基をもつジアシルグリセロールのようなキラル脂質は、3,5-ジニトロフェニルウレタン（3,5-DNPU）に変換され、キラル HPLC（UV 検出）によりそ

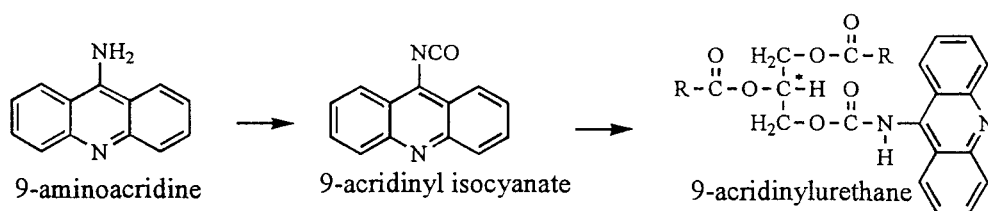
の光学異性体は良好に分離されている。しかし、生体試料中の微量成分に対しては、3,5-DNPU よりもさらに高感度な光学異性体や分子種の分析法が必要である。

本研究では、fmol (フェムトモル, 10^{-15} mol) レベルでの光学異性体の分離分析を可能にする蛍光ラベル化試薬をデザインし、ジアシルグリセロールおよびモノアシルグリセロールの光学異性体の蛍光検出/キラル HPLC 法を開発した。さらにこの蛍光誘導体化法に逆相 HPLC と質量分析法を併用し、海洋生物に存在するリン脂質 (ホスファチジルコリン, PC) の高感度な分子種分析法を確立した。

1. 新規蛍光ラベル化試薬の開発

発蛍光する 1-および 2-アミノアントラセンと 9-アミノアクリジンにトリホスゲンと反応させることにより、それぞれに対応する新規イソシアネートの合成に成功した。各イソシアネートは 30 分以内に 90% 以上の収率で得られ、ホスゲンガスを利用する方法よりも安全で簡便なイソシアネートの合成法を確立した。1-および 2-アンスリルイソシアネートと 9-アクリジニルイソシアネートはジアシルグリセロールと室温で容易に反応し、それぞれに対応するウレタンがほぼ定量的に得られることが認められた。





2. 蛍光検出／キラル HPLC によるジアシル

グリセロールの光学異性体分析

ジアシルグリセロールはトリアシルグリセロールやグリセロリン脂質の代謝中間体であり、細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャー分子として生体において重要な役割を果たしている。開発した蛍光ラベル化試薬を用いて、ジアシルグリセロールの高感度な光学異性体分析の検討を行った。アンスリルウレタン誘導体のキラル HPLC では、2-アンスリルウレタンが(R)-1-(1-ナフチル)エチルアミンポリマー固定相 (A-K03) でほぼ完全な分離を、1-アンスリルウレタンは部分的な分離を示した。これは 2-アンスリルウレタンの方が、立体的にキラル固定相のナフチルエチルアミドと強く相互作用するために、良い分離を示すと考えられる。1-および 2-アンスリルウレタンの蛍光検出感度は、それぞれ 3,5-DNPU (UV 検出) の 390 および 530 倍を示し、検出限界は S/N 比を 3 とした時、それぞれ 2 および 1 fmol であった。一方、塩基性の 9-アクリジニルウレタンは、移動相に少量のトリエチルアミンを添加し、N-(R)-1-(1-ナフチル)エチルアミノカルボニル-(S)-バリン固定相 (OA-4100) を 2 本直列に接続することにより、光学異性体のベースライン分離が得られた。9-アクリジニルウレタンはほとんど発蛍光しなかったが、UV 検出の感度は 3,5-DNPU の 10 倍を示し、検出限界は 1 pmol (10^{-12} mol) であった。

3. 蛍光検出／キラル HPLC によるモノアシル

グリセロールの光学異性体分析

モノアシルグリセロールは、トリアシルグリセロールの合成の前駆体であり、生体内に微量に存在する。また特定の分子種に抗菌性作用のあることが知られている。ジアシルグリセロールの光学異性体をほぼ完全

に分離できる 2-アンスリルイソシアネートを用いて、モノアシルグリセロールのキラル HPLC での光学異性体分離を検討した。A-K03 キラル固定相によって、モノアシルグリセロールのビス-2-アンスリルウレタンの光学異性体はジアシルグリセロールの場合よりも良好に分離した。また DHA や EPA を含む高度不飽和モノアシルグリセロールも飽和モノアシルグリセロールと同じ分離を示した。ビスアンスリルウレタンの蛍光検出の感度は、3,5-DNPU (UV 検出) の約 80 倍であった。

4. 蛍光検出／逆相 HPLC および LC/ESI/MS による

ホスファチジルコリンの高感度分子種分析

リン脂質は生体膜の主要な脂質クラスで、その流動性や機能を調節している。ホスホリパーゼ活性によってリン脂質から生成するプロスタグランジンや、エーテル型グリセロリン脂質に分類される血小板活性化因子の代謝に関する研究では、リン脂質の詳細な分子種分析が必要である。また魚肉脂質中のリン脂質は酵素的あるいは非酵素的作用によって変化を受け、その変化が魚の品質に影響を及ぼすことが知られている。キラル HPLC ではジアシルグリセロールの *sn*-1,2(2,3)-光学異性体はほぼ完全に分離するが、分子種は不飽和度別および炭素数別に明瞭に分離しない。そこで魚油 PC 分子種から調製した 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロールの 2-アンスリルウレタンの蛍光検出／逆相 HPLC およびオンラインエレクトロスプレーイオン化質量分析 (LC/ESI/MS) を行った。蛍光検出により、10 ng (組成比が 0.1%の分子種は約 10 fmol に相当する) の試料量で定量分析が可能であった。2-アンスリルウレタンは ESI/MS で強い $[M+Na]^+$ 擬似分子イオンを与えるので、LC/ESI/MS は各 PC 分子種の同定に極めて有効であった。これまでに報告されているように、いずれの魚油 PC についても 16:0-22:6 と 16:0-20:5 の占める割合が大きく、高度不飽和酸同士の組み合わせの分子種がサバとサケの筋肉に比較的多く含まれていることが確認された。また今回の分析で、ニシンの筋肉にも高度不飽和酸同士の組み合わせの分子種が比較的多く含まれていることや、サケ卵 PC に 18:0-22:6 が特徴的に多く含まれ

ていることが新たに見いだされた。魚油 PC は微量な分子種を非常に多くの含むので、これまで詳細な組成比を求めるのは困難であった。しかし本研究では、蛍光検出／逆相 HPLC に LC/ESI/MS を併用することにより、組成比が 1%以下の分子種まで精度よく定量できる分析法を確立した。

3,5-DNPI はアミンと反応して尿素誘導体を形成し、その光学異性体はキラル HPLC で分離することが知られている。本研究において開発したアンスリルイソシアネートとアクリジニルイソシアネートもアミンと尿素誘導体を形成し、キラル固定相で光学異性体を分離するものと考えられる。したがって、本試薬は脂質の光学異性体分析だけではなく、水酸基やアミノ基を有する糖やアミノ酸などの光学異性体の高感度な分析に広く利用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 太 田 亨

副 査 教 授 松 永 勝 彦

副 査 教 授 高 橋 是太郎

副 査 助 教 授 板 橋 豊

学 位 論 文 題 名

蛍光検出 HPLC によるキラル脂質の高感度分子種

分析法の開発とその海洋脂質成分分析への応用

海洋生物の産生するグリセロ脂質（リン脂質やトリアシルグリセロールなど）は構造のわずかに異なる多数のキラルな分子（分子種）の集合体であり、その組成は極めて複雑である。これらの中には DHA や EPA などの高度不飽和脂肪酸を構成成分とする機能性分子種や未だ構造も機能も不明な分子種が多数含まれている。微量成分をも含めて脂質の構造や機能および代謝に関する研究を行う場合、精度の高い高感度化された分離分析法は必用不可欠であり、古くから重要な研究課題となっている。また、高感度分析技術の開発は脂質化学研究の発展に貢献するばかりでなく、研究の過程で多量に用いられる有機溶剤や有毒・有害試薬の使用量を減少させることから、実験者の健康の維持や環境の保全にも繋がるものとして、今後その必要性は益々高まるものと考えられる。

本研究は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による脂質光学異性体の高感度分離分析法の開発とその手法を応用して魚類細胞膜の重要な構成成分であり、構造と組成が極めて複雑なホスファチジルコリン（PC）分子種の詳細を明らかにすることを目的として行われたものである。得られた成果は以下のように要約される。

- (1) HPLC によるフェムトモルレベルでの高感度分析を達成するために、ヒドロキシル基を有するグリセロ脂質と容易に反応する新規蛍光ラベル化試薬（アンスリルイソシアネート類）をデザインした。すなわち、発蛍光性の 1-アミノアントラセン、2-アミノアントラセンおよび 9-アミノアクリジンにトリホスゲンと反応させて、それぞれに対応する新規イソシアネートを合成した。これらイソシアネートは 100℃、30 分の反応で 90% 以上の収率で得られ、ホスゲンガスを使用するイソシアネートの一般的な

合成法よりも安全で簡便な方法を確認した。合成したイソシアネートは室温でキラル脂質と容易に反応し、対応するウレタン誘導体がほぼ定量的に得られたことから、グリセロ脂質分子種の高感度分析に極めて有用なラベル化試薬であることが認められた。

(2) 新たに開発した蛍光ラベル化試薬を用いて誘導体化したジアシルグリセロール(DG)およびモノアシルグリセロール(MG)光学異性体のキラルHPLCによる分離分析法を検討し、短時間で良好に光学異性体を分離できる蛍光検出／キラルHPLC法を開発した。特に2-アンスリルイソシアネートを用いて調製した2-アンスリルウレタン蛍光誘導体は飽和および不飽和分子種について良好な光学異性体分離を示し、その検出限界はDGでは1フェムトモル(1×10^{-15} mol)であった。これは現在までの光学異性体分析法としては最高レベルの感度である。また、光学異性体分離のメカニズムを考察し、固定相のキラルなナフチルエチル基と誘導体のアントラセン環の間に形成されるジアステレオメリックな電荷移動錯体は、2-アントラセン環の方が1-アントラセン環よりも立体的に形成されやすく、このことが2-アンスリルウレタンで良い分離が得られる最大の要因であることを明らかにした。

(3) この蛍光検出法に逆相HPLCと質量分析法(MS)を併用して複雑な組成を有する魚油PCの分子種組成を明らかにする新しい手法を検討した。魚油から分離したPCをDGアンスリルウレタン誘導体に変換して蛍光検出／逆相HPLCで分析した結果、ほとんどの分子種が明瞭に分離されることを見出した。エレクトロスプレーイオン化法(ESI)を適用し、分離したDG分子種の正イオンMSスペクトルをオンラインで測定した結果、 $(M+Na)^+$ の強い擬似分子イオンが得られ、HPLC／ESI／MS法がPC分子種の同定に極めて有用であることが明らかとなった。すなわち、分子種を蛍光検出／逆相HPLCで分離定量し、逆相HPLC／ESI／MSで同定することにより、組成比が1%以下のDHAやEPAを含むPC分子種まで精度良く分離分析できることが明らかとなり、海洋生物のPC分子種組成に関して従来の研究よりも詳細な知見を得ることが可能となった。

以上の研究成果は、キラル脂質成分のフェムトモルレベルでの高感度分析を達成するために新規蛍光試薬を開発し、キラルHPLC／蛍光検出による光学異性体の分離と逆相HPLC／ESI／MSによる魚油PCの分子種分析を初めて可能にしたものであり、海洋生物の脂質、特にグリセロ脂質の立体構造と機能および代謝の研究の発展に大きく貢献するものと高く評価される。よって審査員一同は、本研究の申請者が博士(水産学)の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。