

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	高橋 良輔
学位授与の日付	平成30年2月28日	
論文名	Comprehensive analysis of phospholipids in food using a 2D-HPLC system (2D-HPLC システムを用いた食品中のリン脂質の網羅的解析)	
論文審査委員	主査	北村 進一
	副査	乾 隆
	副査	谷森 紳治

## 論文要旨

### 緒論

リン脂質は、生体内で重要な役割を示す細胞膜の主要構成成分として知られるとともに、食品脂質として大豆や鶏卵、魚卵から抽出され、乳化剤や分散剤そしてサプリメントとして産業的に広く利用されている。

リン脂質は、グリセロール骨格の *sn*-1, *sn*-2位に2分子の脂肪酸がエステル結合し、*sn*-3位に1分子のリン酸を含む極性基が結合した構造を有し、この極性基の種類によって構造的に脂質クラスに分類される。ホスファチジルエタノールアミン (PE) およびホスファチジルコリン (PC) は、リン脂質の主要な脂質クラスである。また、リン脂質はグリセロール骨格に結合した脂肪酸の種類によって多数の分子種を有し、ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸といった多価不飽和脂肪酸はリン脂質において豊富に含まれることが知られている。

プラズマローゲンは、リン脂質のサブクラスであり、脂肪酸がグリセロール骨格の *sn*-1位にビニルエーテル結合した構造を有する。プラズマローゲンは、主にエタノールアミンプラズマローゲン (pls-PE) またはコリンプラズマローゲン (pls-PC) として存在し、鶏胸肉やホタテなどの海産性二枚貝に豊富に存在している。プラズマローゲンは抗酸化物質として機能する他、摂取することによる生体内量の増加が確認されている。プラズマローゲンを摂取したラットの細胞膜において pls-PE 量が増加し、血漿コレステロール値が減少するという報告がなされて

いる。さらに、Alzheimer病患者の脳におけるプラズマローゲン量の減少が確認されている。

リン脂質またはプラズマローゲンの機能は注目されているが、分子種レベルの研究は定量面で課題を有している。リン脂質が、非水溶性でUV吸収をもたず、酸化されやすいといった特徴を有することから、タンパク質や糖質と比較すると、定量分析手法が限られているためである。逆相 (RP) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、リン脂質の分子種組成分析が可能な分析手法である。特に、検出器に質量分析計 (MS) を備えたRP-HPLC/MSは、分子種の同定と定量を可能とし、リン脂質の研究において汎用的に用いられている。MSによる分子種の精確な定量は、対応する標準脂質試料を用いて検量線を作成することにより実施できる。従って、食品脂質のような大多数の分子種を有する試料の定量分析は、対応する多数の標準脂質試料を必要とする。また、食品脂質は、一般にリン脂質以外にトリアシルグリセロール (TAG) やセラミド、コレステロールといった無極性脂質および低極性脂質を多数含有する。複数の脂質クラスを分離せずに溶出させた場合、クロマトグラムの複雑化による分離能の低下や、共溶出によるイオン化抑制によって、定量値に影響が生じる。そのため、一般的には固相抽出や薄層クロマトグラフィー、順相 (NP) HPLCを用いて目的とするリン脂質のみを抽出するが、この前処理は、試料と時間のロスを招くとともに、プラズマローゲンのビニルエーテルや不飽和脂肪酸の酸化を誘発するため、定量値に影響を与える懸念がある。

近年、上記懸念を払拭可能な分析手法として、on-line で脂質クラスと分子種を分離可能な二次元 HPLC (2D-HPLC) システムが注目されている。他方、低極性脂質を豊富に含む食品脂質は、NP-HPLC と RP-HPLC の2つのモードを用いる必要があり、溶離液の非混和性の課題を解決した 2D-HPLC を構築する必要があった。

## 第1章 リン脂質の分析を目的とした 2D-HPLC システムの構築

2D-HPLC システムは、NP-HPLC と RP-HPLC を、スイッチングバルブとトラップカラム、make-up ポンプをインターフェースとして用いることで構築した。検出器は、Corona 荷電化粒子検出器 (CAD) と MS を、カラム出口の流路を分岐させることで併用して用いた。食品脂質は、粗精製大豆レシチン、および市販鶏胸肉から Folch 法によって抽出した総脂質をそれぞれ用いた。目的とする PE および PC の溶出時間は、NP-HPLC/CAD を用いた Hexane, Metyl-*tert*-butyl ether, Methanol の3液グラジエントメソッドにより、各種標準脂質を分析することで確認した。本メソッドは低極性の TAG から高極性のリゾホスファチジルコリンを含む主要な 12 種の脂質クラスを添加剤なしでベースライン分離させることができた。また、標準脂質を用いた検量線から、大豆レシチン 100 g 中の PE および PC 量は、それぞれ  $23.11 \pm 0.42$  g および  $16.90 \pm 0.35$  g と算出され、鶏胸肉抽出油 100 g 中の PE および PC 量は、それぞれ  $3.74 \pm 0.25$  g および  $7.41 \pm 0.41$  g と算出された。

溶出時間情報を元に、目的の脂質クラスの溶出時間で流路変更し、目的脂質をトラップカラムに導入、かつ make-up 溶媒をトラップカラム内に所定量通液させて一次元目の溶媒を通液除去するプログラムを作成した。その後、再度流路を変更する

ことでトラップカラムから目的脂質を二次元目のカラムに導入させ、クロマトグラムを確認したところ、得られた標準 PE および PC のピーク面積は、RP-HPLC/CAD で得た面積と一致しており、目的画分がトラップカラム内に 100%トラップされていることを確認した。

このとき得られた 2D-HPLC クロマトグラムは RP-HPLC/CAD 分析で得たクロマトグラムと比較して分離不十分であった。トラップ条件を精査した結果、make-up 溶媒を 60% Acetonitrile とし、1 次元目の溶出液をトラップする際の通液方向と、2 次元目の溶離液の通液方向を逆にすることで、ピーク形状を大きく改善させることができた。この結果はトラップカラムの長さ依存しておらず、トラップカラム上部で試料が濃縮されて 2 次元目のカラムに導入されていることが示唆された。

標準脂質分子種を用いた検量線を作成することにより、CAD を用いた分子種の定量下限は約 12.5 ng と求められた。得られた定量値は、同じ標準脂質を用いた MS での定量値とほぼ一致した。

## 第 2 章 食品中のホスファチジルエタノールアミンの分子種分析

構築した 2D-HPLC を用いて PE 分子種の定量および同定分析を実施した。大豆レシチン中の PE 分子種は、保持時間 84 分から 196 分の間に計 24 ピーク検出された。結合している脂肪酸を「炭素数：二重結合数」として表現すると、主要な分子種は、18:2-18:2PE (32.8%)、16:0-18:2PE (32.1%)、18:1-18:2PE (9.6%)であった。同定された分子種のほぼ全てが少なくとも 1 分子のリノール酸を含有していた。大豆レシチンの PE 分子種組成は、RP-HPLC/MS を用いた先行文献で 1 例報告されており、分子種組成は概ね一致した。他方、本 2D-HPLC を用いた分析では、18:2-20:0PE (0.28%)や 18:2-22:0PE (0.66%)のような微量分子種についても検出可能であった。

鶏胸肉抽出油中の PE 分子種は、保持時間 91 分から 162 分の間に計 43 ピーク検出された。この内、17 ピークがプラズマローゲンとして同定され、全 PE 分子種中の 57%を占めていることが確認された。主要な PE の分子種は 18:0-20:4PE (14.0%)、18:0-18:2PE (7.7%)、16:0-18:1PE (2.6%)であった。他方、pls-PE の主要分子種は、pls16:0-18:1PE (11.4%)、pls18:0-20:4PE (7.3%)、pls16:0-20:4PE (6.7%)であり、PE の主要分子種組成とは異なる組成であった。PE および pls-PE 中の炭素鎖組成を比較した結果、pls-PE は PE の 3 倍以上の 16:0 および 18:1 を有しており、22:4、22:5、22:6 を多く含有していた。検出した全 PE 分子種中の pls-PE の炭素鎖に着目すると、sn-1 位には 16:0、18:0 または 18:1 からなる炭素鎖が結合しており、pls16:0-18:1PE の割合が最も多く、pls16:0-20:4PE、pls18:0-20:4PE そして pls18:1-20:4PE の割合が高いことが明らかとなった。

## 第 3 章 食品中のホスファチジルコリンの分子種分析

大豆レシチン中の PC 分子種は 80 分から 192 分の間に計 26 ピーク検出された。主要な分子種は 18:2-18:2PE (35.3%)であり、大豆レシチン中の PE と同様、ほぼ全ての分子種がリノール酸を含んでいた。PC のクロマトグラムおよび分子種組成は、PE とよく類似していたが、その組成比には差が見出された。

鶏胸肉抽出油の場合、PCの分子種組成は、PEの分子種組成と全く異なっていた。PE分子種は89分から155分の間に計43ピーク検出され、同定された主要分子種は16:0-18:1PC (21.9%)、16:0-18:2PC (10.1%)、そして18:0-18:2PC (7.1%)であった。4ピークがpls-PCであり、それぞれpls16:0-18:1PC (4.6%)、pls16:0-20:4PC (3.2%)、pls18:1-20:4PC (2.3%)、そしてpls18:0-18:2PC (0.6%)であった。pls18:0-18:2PCはpls-PEでは見られない組成であった。

## 総括

リン脂質は学術だけでなく産業的にも重要な脂質であるにも関わらず、分子種を網羅的に解析する手法が無く、分子に着目した特徴付けが困難であった。本研究の成果は、様々な脂質が混在する試料のリン脂質分子種を2D-HPLCシステムを用いてngオーダーで定量可能であることを示すものであり、リン脂質を分子の集合体として理解する新たな手法を提供する。近年、リン脂質の機能性研究が進み、重要な機能が見出されているが、本システムを用いることにより、リン脂質の生理機能を分子種レベルで理解することも可能と考えている。

## 審査結果の要旨

リン脂質は、生体膜の主要構成成分であり、情報伝達にも重要な役割を担っている。これらは、体内で合成されるだけでなく食品からも摂取される。食品に含まれる代表的なものにホスファチジルエタノールアミン(PE)及びホスファチジルコリン(PC)がある。これらグリセロリン脂質は、そのグリセロール骨格に結合する脂肪酸の種類、結合様式の違いから、極めて多数の分子種が存在する。結合様式としてビニルエーテル結合を持つリン脂質はプラズマローゲン(pls)と呼ばれ、エタノールアミン型pls(pls-PE)やコリン型pls(pls-PC)に分類される。plsは強い抗酸化能を有しており、経口摂取により軽度アルツハイマー病の記憶機能が改善するとの報告があるが、機能性分子種は未だ解明されていない。これらリン脂質は、分子種の混合物として扱われているのが現状であり、分子種に着目し理解するためには、分子種を網羅的に定量分析する手法の確立が望まれている。

本研究の目的は、食品に含まれるリン脂質分子種の網羅的解析法の確立とその食品中のリン脂質分析への応用である。第1章では、脂質抽出物から迅速簡便にリン脂質の分子種の定性・定量分析を実行できる新規2D-HPLCシステムの構築について示した。次に、第2章と第3章では、本2D-HPLCシステムを用いて、食品脂質に含まれるPE及びPCを分析した例を示している。

第1章では、脂質抽出物からPE及びPCの分子種分析を実現する2D-HPLCシステムを構築するにあたり、まず、脂質抽出物から各脂質クラスを分離する1次元目の順相(NP)-HPLCの系を検討した。脂質クラスにより極性が大きく異なるため、NP-HPLCでは、ヘキ

サン, メチル-*t*-ブチルエーテル, メタノールによる 3 溶媒グラディエントを用い, 12 種の脂質クラス標準品のベースライン分離を実現している. 次に, NP-HPLC と逆相 (RP)-HPLC の接続をするため, インタフェイスとしてトラップカラムを装備したスイッチングバルブ及びトラップ用溶媒送液ポンプを導入した. 検出器として, MS に加えて Corona 荷電化粒子検出器を並列に配置することにより, 定量が可能なシステムとした. 連続分析できるシステムとして, トラップカラムに保持された PE あるいは PC を, RP-HPLC に導入し分子種の分離を行った.

トラップカラムの流路や, 長さ, 及び溶媒の最適化により, 1 次元目の分析カラム内で希釈された試料は, トラップカラム導入時にカラム内で濃縮され, 2 次元目の分析に導入される. 検出下限量は 12.5 ng と微量であり, 食品に含まれるリン脂質分子種を定量するために十分な性能である事が示された. 以上により, 脂質抽出物から PE 及び PC の分子種を迅速簡便に分析できる再現性の高い 2D-HPLC システムを構築している.

第2章では, 構築したシステムを用い, 粗精製大豆レシチン及び市販鶏胸肉の脂質抽出物の PE 及び pls-PE の同定及び定量分析の結果を示している. 粗精製大豆レシチンから 24 種の PE 分子種を定量した. 主要な分子種は従来法で分析した過去の報告と一致した. さらに, 過去の報告にはない 2 種の微量な分子種を定量できた. また, 市販鶏胸肉の脂質抽出物から 43 種の PE 分子種を定量した. この内, 17 種は pls であり全 PE 量の 57% を占めた. また, PE と pls-PE で主要な分子種が異なることがわかった. それぞれの脂肪酸組成を比較したところ, pls-PE は PE に比べて多価不飽和脂肪酸の比率が高かった. これが pls の機能性に関与していると考えられる.

第3章では第2章と同様の試料を用いて PC 及び pls-PC 分子種を定量した. 粗精製大豆レシチンから 27 種の PC 分子種を定量した. 主要な分子種は PE と類似していたが, 各分子種の含有率は異なっていた. また, 市販鶏胸肉の脂質抽出物から 43 種の PC 分子種を定量した. この内, 4 種は pls であり, 全 PC 量の約 10% 存在した. PC 分子種は PE の分子種組成とは異なることを示した.

本研究の成果は, 食品の脂質抽出物に含まれる主要なリン脂質である PE 及び PC を分子種レベルで定量する 2D-HPLC システムを構築し, その有用性を示したことである. これにより, 今まで脂質クラスと脂肪酸組成だけで特徴づけられることが多かった機能性が, 容易に分子種レベルで解析可能となった. リン脂質を網羅的にかつ ng オーダーで定量可能にしたことは, 食品に限らず, 様々な生体由来の脂質抽出物中に含まれるリン脂質分析に広く適用可能である. これらの成果は, 食品分析化学や生化学などの応用生命科学分野の発展に大きく寄与するものであり, 本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて, 博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める.