

氏 名 清水 るみ子

授与した学位 博士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博乙第4317号

学位授与の日付 平成21年 9月30日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第5条第2項該当)

学位論文の題目 タンデム型質量分析法による非天然型グリセロリン脂質の構造変化の追跡

論文審査委員 教授 馬場 直道 教授 中島 修平 教授 木村 吉伸

学位論文内容の要旨

脂質は生命に不可欠な成分であるが、タンパク質・核酸・糖とは異なり構造上の種類が多様である。グリセロリン脂質には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロールなどに分類され、それらに結合する脂肪酸の種類が多様であるため、多数の組み合わせが生じる。従って特定の脂質分子の化学変化を追跡することは従来の方法では困難である。

本研究では、生体に存在するリン脂質の構造とは部分的に少し異なる分子種を合成し、この分子をタンデム型質量分析計 (ESI MS) に導入して、共通のプロダクトイオンを与えるすべてのプレカーサーイオンを同時に検出する方法を開発した。この方法であれば、注目する分子種のための化学変化を追跡することができる。そこでホスファチジルコリン (PC) の3個のメチル基のうち、一つをエチル基に置換した化合物 (PC/Et) を合成し、この化合物を分子プローブとして ESI MS の Precursor ion scan mode (PIM) で分析することにより、複雑な生体組織や食品中でもその化学変化を追跡できると考えた。合成した非天然型リン脂質に加え、同様に合成した他の非天然型リン脂質を用いて、以下の実験を行った。

(1) DHA-HD-PC/Et は PLA₂, PLD の基質になったが、PLC の基質にはならなかった。(2) 植物種子と DHA-HD-PC/Et との接触実験において、DHA-HD-PC/Et は加水分解を受けたが、リポキシゲナーゼによる過酸化反応は起こらなかった。(3) リン脂質 DHA-HD-PC/Et, La-La-PC/Et, またはリン脂質過酸化物 La-Pa-PC-OOH/D₃ を皮膚に塗布し、6時間後、脂質成分を抽出し ESI MS の PIM で測定した。その結果リン脂質の大部分は分解されず、不飽和結合部分もほとんど変化しなかった。しかしリン脂質過酸化物はそのほとんどが分解した。皮膚上でも不安定なリン脂質過酸化物は分解されるが、リン脂質に結合する DHA やリノール酸は比較的安定であることが明らかになった。La-Pa-PC-OOH/D₃ はガラス表面上では皮膚と異なり、2種類のアルデヒドが生成した。(4) サンマの皮部分と肉部分に DHA-HD-PC/Et を染込ませたろ紙を接触させ、24時間放置後、脂質成分をろ紙から抽出し、抽出液を ESI MS の PIM で測定した。その結果、どの部位においても DHA-HD-PC/Et が分解して生成したと思われるシグナルは観察されなかった。今回用いたサンマに酸化防止剤が使用されていた可能性が高いことが示唆された。(5) ガラス板上に生成したアルデヒド PC に、身欠きニンジンから抽出されたアミン臭がするクロロホルム/メタノール混合溶媒を滴下し、19時間放置後、脂質画分を ESI MS の PIM で測定した結果、イミン型 PC とと思われるシグナルが観察された。(6) La-Pa-PC/D₃ と La-Pa-PC-OOH/D₃ をニワトリ及びヤギ血液と混合し、24時間インキュベートした。その脂質画分を ESI MS の PIM で測定した結果、La-Pa-PC/D₃ の大部分は分解せずに残っていた。しかし La-Pa-PC-OOH/D₃ はほとんど分解していた。

以上のように分子プローブとして合成したリン脂質を用いて、タンデム型質量分析計で分析することにより、リン脂質の構造変化を追跡できることを初めて実証することができた。今後、食品学や基礎生物学、臨床医学など幅広い分野の脂質研究に応用し得るものとする。

論文審査結果の要旨

本研究はタンデム型エレクトロスプレー質量分析法を活用した脂質分析の新しい方法を構築し、その応用の可能性について追求したものである。生体リン脂質は化学構造の異なる極めて複雑な混合物をなしており、それらは細胞膜の構成成分となるばかりでなく、生体情報伝達にも深く関わっている。さらにこれらのリン脂質は生体の恒常性を保つために常に構造的に変化しており、疾病や老化によっても変化する。また、食品に含まれるリン脂質に結合する多価不飽和脂肪酸は非常に酸化されやすく、その結果、リン脂質過酸化物が生成し、これは直ぐに分解して、アルデヒド類を含む様々な生成物を与え、これらの中には食品の劣化を招き、強い毒性を示すものもある。複雑な生体成分の中に存在するある特定のリン脂質の化学的変化を追跡する事は極めて困難であり、高速液体クロマトグラフィーやリピドミクスと呼ばれる手法でもってしても殆ど不可能である。そこで、本研究ではグリセロホスファチジルコリンのコリン部分の3個のメチル基の1個を天然には存在しないエチル基に置き換わったものが合成された。グリセロホスファチジルコリンをタンデム型エレクトロスプレー質量分析計で測定し、その一次イオンにアルゴンガスを衝突させると、二次イオンとして $m/z184$ にシグナルが検出される。しかしエチル型ホスファチジルコリンは $m/z198$ に二次イオンを与えるので、この値を使えばプレカーサーイオンスキャンモードによって自然界に存在するあらゆるグリセロホスファチジルコリンの影響を受けることなく元の親イオンのみを選択的に検出する事ができる。本研究では、リノール酸または DHA を結合するエチル型ホスファチジルコリンを食品素材としての蔬菜類種子、魚類、人皮膚、ガラス表面、羊およびニワトリの血液に添加し、一定時間インキュベートした後にエチル型ホスファチジルコリンを含む試料を抽出回収し、タンデム型エレクトロスプレー質量分析法によるプレカーサーイオンスキャンモードの測定を実施した。その結果、何れの試料においてもエチル型ホスファチジルコリンおよびその化学的に変化した化合物が選択的にシグナルとして観測できる事を明らかにした。このような新規な方法は今後、生体や食品の化学成分の酵素的・非酵素的変化の追跡に非常に適しており、今後の各方面への応用が期待される。以上の研究結果は博士学位（農学）の価値を十分有しているものと判断した。