



Title	褐藻エゾノネジモクのジガラクトシルジアシルグリセロール分子種
Author(s)	本田, 真己; Honda, Masaki; 鹿島, 晃洋 他
Citation	日本水産学会誌, 75(6), 1061-1069 https://doi.org/10.2331/suisan.75.1061
Issue Date	2009-11-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/44351
Rights	© 2009 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	75_1061.pdf



褐藻エゾノネジモクのジガラクトシルジアシルグリセロール分子種

本田 真己,¹ 鹿島 晃洋,¹ 高橋 是太郎,² 板橋 豊^{2*}

(2008年7月9日受付, 2009年5月22日受理)

¹北海道大学大学院水産科学院, ²北海道大学大学院水産科学研究院Molecular species of digalactosyldiacylglycerols in the brown alga *Sargassum yezoense*MASAKI HONDA,¹ AKIHIRO KASHIMA,¹KORETARO TAKAHASHI² AND YUTAKA ITABASHI^{2*}¹Graduate School of Fisheries Sciences, ²Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

Using reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), we have determined the molecular species of digalactosyldiacylglycerols (DGDG) in the brown alga *Sargassum yezoense*, which is widely distributed in the coast of the Sea of Japan and rich in polyunsaturated fatty acids but not used effectively. The diacylglycerols released from DGDG by periodate oxidation followed by hydrazinolysis were converted to their 3,5-dinitrophenylurethanes (DNPU) and subjected to HPLC on a highly efficient ODS column (250 × 4 mm i.d., 4 μm particle size) using acetonitrile as the mobile phase, which gave clear resolution of individual molecular species. Reversed-phase HPLC in conjunction with negative ESI-MS gave weak [RCOO]⁻ ions in addition to prominent deprotonated molecules [M-H]⁻, by which individual molecular species could be identified. The most predominant molecular species was 20:5n-3/18:4n-3 (46.8% of total DGDG), followed by 20:5n-3/18:3n-3 (11.1%). The DNPU derivatives were also analyzed by chiral-phase HPLC on (*R*)- and (*S*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymers, which gave complete resolution of enantiomeric 1,2- and 2,3-diacyl-*sn*-glycerols. The results clearly showed that the glycerol moieties in all the DGDG molecules had *S*-configuration (1,2-diacyl-*sn*-glycerols). The present study demonstrates that *S. yezoense* is a good source of polyunsaturated fatty acid-rich DGDG.

キーワード: *Sargassum yezoense*, エイコサペンタエン酸, エゾノネジモク, オクタデカテトラエン酸, 高速液体クロマトグラフィー, ジガラクトシルジアシルグリセロール, 質量分析, 分子種

ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG, Fig. 1) は, モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) やスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) と同様に葉緑体チラコイド膜を構成する主要脂質成分であり, 海藻や微細藻を含む植物に広く分布し, 光合成において重要な役割を果たしている。¹⁾ これらグリセロ糖脂質は, ウニやアワビなどの海洋動物に対して摂食刺激作用, 着底・変態誘起作用などの活性を有し,^{2,3)} また哺乳動物に対しては, 抗発癌プロモーション活性, 難吸収性物質の吸収促進作用, 抗高脂血症作用 (コレステロールの生成を抑え, 高脂血症の予防効果に有効) などの活性⁴⁾ を示す他, 製パン性向上⁵⁾ などの特異な性質を有することから医薬品や食品への効果的な利

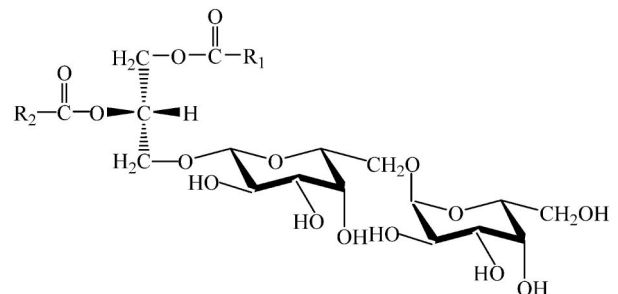


Fig. 1 Structure of a digalactosyldiacylglycerol: 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*-(6'-*O*- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerol.

用が期待されている。生物由来 DGDG は MGDG や SQDG と同様に 2 つのアシル基 (脂肪酸) の組み合わせの異なる多数の分子種から構成されているため複雑な組成を示す。DGDG の生化学的性質や機能は分子種によって大きく異なると考えられることから, その詳細を明らかにすることは, DGDG を食品や医薬品等に利用する上で必要である。

ホンダワラ科の褐藻エゾノネジモク *Sargassum yezoense* は, わが国では北海道から長崎県の日本海沿岸および宮城県の太平洋沿岸にかけて広く分布する未利用の海藻である。⁶⁾ 一般に *Sargassum* 属の海藻はエイコサペンタエン酸 (EPA) など水産生物に特有の高度不飽和脂肪酸を多く含む⁷⁻⁹⁾ が, その主な存在形態であるグリセロ糖脂質の分子種に関する研究は, 我々が知る限り実施されていない。本研究では, 函館の海岸に生育するエゾノネジモクから特に難吸収性物質の吸収促進効果が期待されている DGDG を分離し, その分子種を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) を用いて明らかにしたので報告する。

実験

試料と脂質抽出 2007 年 7 月に函館近郊の海岸で採取したエゾノネジモク *Sargassum yezoense* を実験に使用した。細切した藻体から Bligh-Dyer 法¹⁰⁾ で脂質を抽出し, これを既報¹¹⁾ にしたがって, カラムクロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィー (TLC) に付して

DGDG を単離した。

脂肪酸分析 テフロンシール付きスクリーキャップで密閉した試験管内で, DGDG (3 mg) を 5% HCl-メタノール試薬と 90°C で 1 時間反応させて脂肪酸メチルエステルを調製し,¹²⁾ これをガスクロマトグラフィー (GLC) で分析して脂肪酸組成を求めた。分析カラムには Omegawax 320 (Supelco 製, 30 m × 0.32 mm i.d., 膜厚 0.25 μm) を使用し, キャリヤーガス (ヘリウム) 流量 1.2 ml/min, カラム温度 190°C 及び 170~230°C (2°C/min), 検出器及び注入口温度 230°C, スプリット比 1/50 の条件でメチルエステル (ヘキサン溶液) を分析した。各成分は, 既報^{13,14)} に記載した海産動植物油脂肪酸の GLC 分析の結果と比較して同定した。

ジアシルグリセロールの調製 Heinze らの報告¹⁵⁾ にしたがって調製した。すなわち, DGDG (約 3 mg) に 0.2M HIO₄・2H₂O-メタノール溶液 (1 ml) を加え, 室温・暗所で 90 分間反応させた後, クロロホルム (4 ml) と 0.45% NaCl 溶液 (1.5 ml) を加えてよく攪拌し, 遠心分離して 2 層に分けた。下層 (クロロホルム層) を回収し, 少量の 2-プロパノールを加えた後, 窒素ガスで溶媒を除去した。残渣に 1% 1,1-ジメチルヒドラジン溶液 {2-プロパノール-クロロホルム-酢酸-水, 3.5 : 3 : 1.5 : 1 (v/v/v/v), 0.5 ml} を加え, 室温, 暗所で 4 時間反応させた。反応液に石油エーテル (3 ml) と 50 mM KH₂PO₄ 溶液 (2 ml) を加えてよく攪拌した後, 上層を回収して 1,2-ジアシルグリセロール (1,2-DAG) を得た (Fig. 2)。

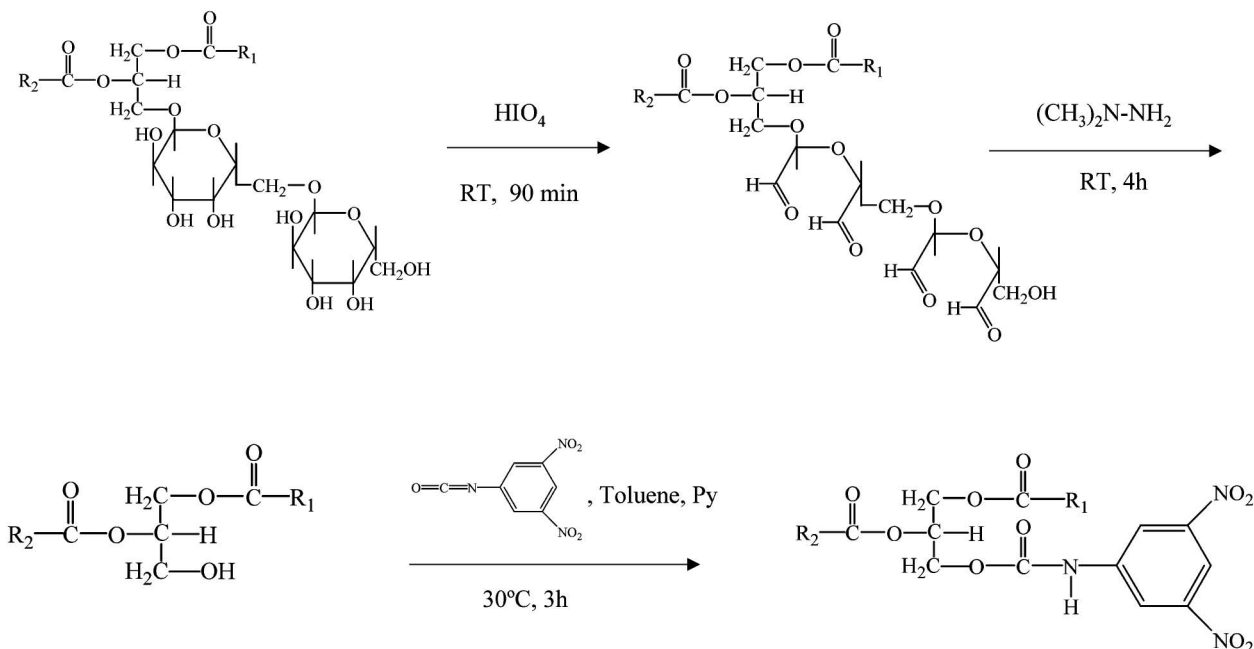


Fig. 2 Preparation of the 3,5-dinitrophenylurethane (DNPU) derivatives of 1,2-diacylglycerols from digalactosyldiacylglycerols.

誘導体の調製 既報¹¹⁾にしたがって、乾燥トルエン (0.5 ml) に溶解した DAG (1-2 mg) に 3,5-ジニトロフェニルイソシアネート (5 mg, 0.5 ml 乾燥トルエン溶液) と乾燥ピリジン (20 μ l) を加え、30°C で3時間反応させて 3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) 誘導体を調製した (Fig. 2)。反応混合物から TLC {シリカゲル 60 F₂₅₄ TLC 板, 20×20 cm, 厚さ 0.25 mm; 移動相, ヘキサン-ジクロロメタン-エタノール (40 : 10 : 3, v/v/v)} を用いて DNPU 誘導体を分離した。紫外線下 (UV) で誘導体を示すバンド (Rf 0.6-0.7) を確認した後、ジエチルエーテル用いてシリカゲルから抽出した。

キラル HPLC 立体配置の異なる 2 種類のカラム (A-K03 及び A-L03, 250×4.6 mm i.d., 5 μ m, YMC 製) を用いて 1,2-DAG (DNPU 誘導体) のキラル分析を行った。キラルカラムを L-6000 ポンプ (日立製) に接続し、カラム温度を恒温槽 (Model 557, GL Sciences 製) を用いて 10°C に設定した。移動相には、使用前に 0.45 μ m の PTEE フィルター (Millipore 製) を用いてろ過した HPLC 用のヘキサン/ジクロロメタン/エタノール (40 : 30 : 1, v/v/v) の混液を用い、流量を 1.0 ml/min とし、イソクラティック溶離法で分析した。試料を 1 mg/ml の濃度になるように 2-プロパノールに溶解し、その 5 μ l をカラムに注入した。検出器には L-4000 (日立製) を使用し、溶出成分を 254 nm でモニターした。エナンチオマー標準品には、まぐろ眼窩油のトリアシルグリセロールから調製した *sn*-1,2(2,3)-DAG の DNPU 誘導体を使用した。¹⁶⁾

逆相 HPLC UV 検出逆相 HPLC (HPLC/UV) を用いて、1,2-DAG (DNPU 誘導体) の分子種分析を行った。ODS カラム (Superspher 100 RP-18, 250×4.0 mm i.d., 4 μ m, Merck 製) を L-7100 ポンプ (日立製) に接続し、恒温相 (CTO-10AS, 島津製) を用いてカラム温度を 20°C に設定した。移動相には HPLC 用のアセトニトリル (関東化学製) を用い、流量を 0.5 ml/min とし、イソクラティック溶離法で分析した。検出器には L-7455 (日立製) を使用した。他の分析条件は上述したキラル HPLC と同様であった。

逆相 HPLC/ESI-MS 逆相 HPLC オンライン ESI-MS を用いて 1,2-DAG (DNPU 誘導体) の分子種を同定した。HPLC ポンプには P4000 (Finnigan 製) を使用した。試料を 100 μ g/ml の濃度になるように 2-プロパノールに溶解し、オートインジェクター (AS3000, Finnigan 製) を用いて、その 3~5 μ l をカラムに注入した。他の HPLC 条件は上述した逆相 HPLC の場合と同様であった。MS 分析には、イオントラップ型質量分析計 LCQ (Finnigan 製) を使用し、加熱キャピラリー温度 270°C, スプレー電圧 4.2 kV, シースガス (窒素) 流

量 80 arb (arbitrary units), 補助ガス (窒素) 流量 30 arb, キャピラリー電圧 -28 V 及びチューブレンズオフセットを -60 V に設定し、ESI 法により負イオンスペクトルを測定した (質量範囲 150~1500 amu)。この MS 条件では主に [M-H]⁻ の分子量関連イオンが得られた。脂肪酸由来のフラグメントイオン ([RCOO]⁻) は、衝突誘起解離エネルギー (source CID energy) を 40% に設定することによって得られた。

結果と考察

脂肪酸組成 以下に述べるように、逆相 HPLC/ESI-MS によって個々の DGDG 分子種の構成脂肪酸を特定できるが、あらかじめ GLC で総 DGDG の脂肪酸組成を求めておくことは、分子種の同定を確認する上で有効である。本研究で用いたエゾノネジモクの DGDG の脂肪酸組成を Table 1 に示す。主な脂肪酸は、エイコサペンタエン酸 (20 : 5n-3), ステアリン酸 (18 : 4n-3), α -リノレン酸 (18 : 3n-3) 及びパルミチン酸 (16 : 0)

Table 1 Fatty acid composition of digalactosyldiacylglycerols in *Sargassum yezoense*^{a)}

Fatty acid	wt%
14 : 0	1.5
15 : 0	0.2
16 : 0	10.4
17 : 0	0.1
18 : 0	0.6
20 : 0	0.1
22 : 0	0.1
Σ Saturates	12.9
16 : 1n-9	0.2
16 : 1n-7	1.1
18 : 1n-9	2.3
18 : 1n-7	0.1
20 : 1n-9	0.4
Σ Monoenes	4.1
16 : 2n-4	0.8
18 : 2n-6	4.7
18 : 3n-6	0.3
18 : 3n-3	12.7
18 : 4n-3	26.1
20 : 2n-6	0.1
20 : 3n-6	0.2
20 : 4n-6	5.2
20 : 4n-3	0.3
20 : 5n-3	31.9
Σ Polyenes	82.3
Others	0.7

a) GLC conditions: column, Omegawax 320 (30 m × 0.32 mm i.d.); carrier gas (He), 1.2 ml/min; column temperature; 170°C-230°C at 2°C/min.

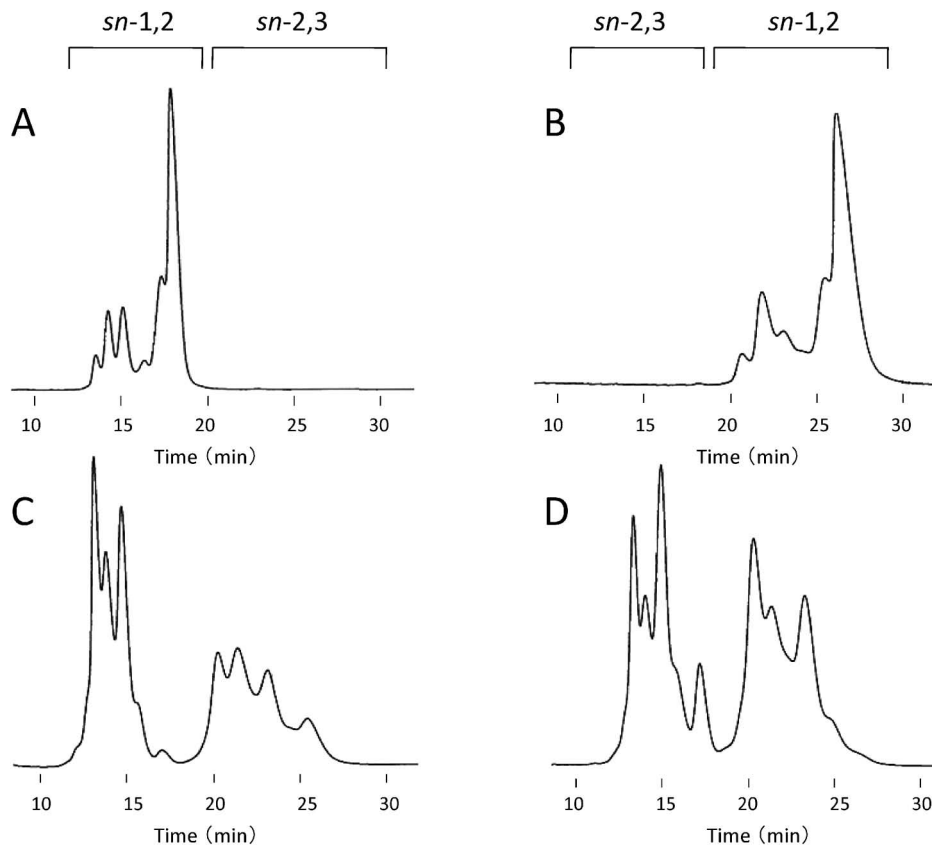


Fig. 3 Chiral-phase HPLC profiles of the DNPU derivatives of 1,2-diacylglycerols released from digalactosyldiacylglycerols of *Sargassum yezoense* (A and B), and of standard *sn*-1,2(2,3)-diacylglycerols derived from tuna orbital oil triacylglycerols by partial Grignard degradation (C and D) on columns containing (*R*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymer (A and C, YMC A-K03) and (*S*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymer (B and D, YMC A-L03).

であり、それぞれ全脂質中 31.9%、26.1%、12.7%、10.4% を占めた。同属のヨレモク *S. pallidum* やアカモク *S. horneri*、その他 (*S. marginatum*, *S. thunbergii*, *S. confusum*) での 20 : 5n-3 含量は、全脂質中 1~8% であり、^{7,9)} DGDG 中でも 17%⁸⁾ に過ぎない。また、18 : 4n-3 はこれらの種には存在しないか、⁸⁾ 存在したとしても全脂質中 4~8% に過ぎない。^{7,9)} これらのことから、本研究で分析したエゾノネジモクは *Sargassum* 属の中でも高い 20 : 5n-3, 18 : 4n-3 含量を示すことが明らかになった。

光学異性体分析 Fig. 3 に、エゾノネジモク DGDG から調製した 1,2-DAG と標準品としてまぐろ眼窩油から調製した *sn*-1,2(2,3)-DAG の DNPU 誘導体をキラル HPLC で分析した結果を示す。他の試料と同様に、^{3,11,16)} アシル基の鎖長と不飽和度の違いによる部分的な分離が認められたが、A-K03 カラムでは *sn*-1,2-DAG が *sn*-2,3-DAG より先に溶出し (Fig. 3A, 3C)、A-K03 カラムとは逆の立体配置を有する A-L03 カラムでは *sn*-2,3-DAG が *sn*-1,2-DAG より先に溶出した (Fig. 3B, 3D)。どちらのカラムを使用してもエゾノネ

ジモクのピークは標準品の *sn*-1,2-DAG とほぼ同じ時間に溶出したことから、エゾノネジモク DGDG のグリセロール部の立体配置は、陸上の高等植物や他の海藻¹¹⁾ と同様に *sn*-1,2-ジアシル型 (絶対配置 *S*, Fig. 1) であることが明らかになった。

分子種分離 エゾノネジモクの DGDG から調製した *sn*-1,2-DAG の DNPU 誘導体の逆相 HPLC/UV クロマトグラムを Fig. 4 に示す。移動相にアセトニトリルのみを用いてイソクラティック溶離法で分析した結果、少なくとも 16 成分が明瞭に分離された。各成分は、ECN (equivalent carbon number) 値^{12,17)} にしたがってカラムから溶出した (Table 2)。同様の現象は、ホスファチジルグリセロール誘導体 (ビス-DNPU) の逆相 HPLC¹⁷⁾ においても観察されている。脂肪酸分析 (Table 1) と以下に示す ESI-MS 分析の結果から、ほとんどすべての分子種が適用した条件下で分離溶出したものと判断され、分子種の組成分析が容易であることが認められた。16 ピークの中で、ピーク 1 が 46.8% (モル%) を占めたが、これは脂肪酸分析の結果 (Table 1) から 18 : 4n-3 と 20 : 5n-3 を含む分子種であると推測

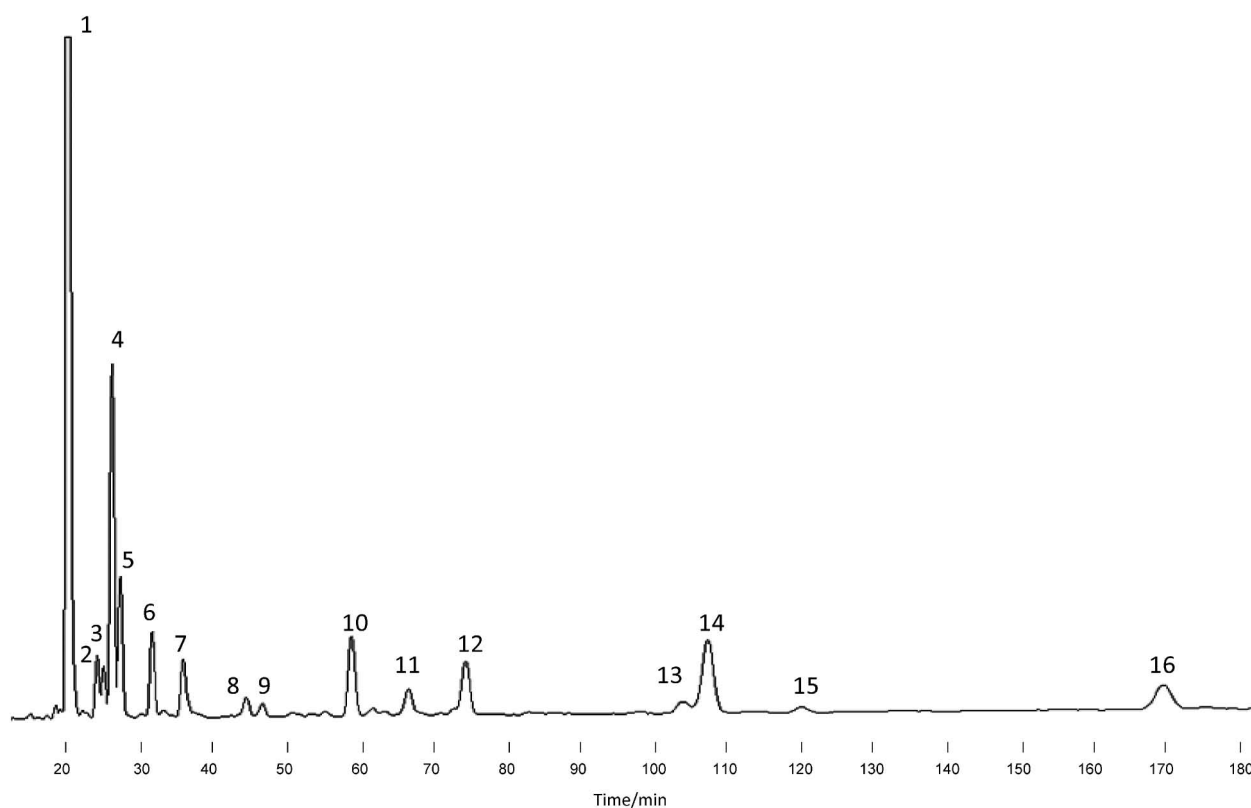


Fig. 4 Reversed-phase HPLC profile of the DNPU derivatives of diacylglycerols released from digalactosyldiacylglycerols of *Sargassum yezoense*.

Table 2 Molecular species composition of digalactosyldiacylglycerols from *Sargassum yezoense* obtained by HPLC/UV

Peak no. ^{a)}	Molecular species ^{b)} <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	ECN ^{c)}	RT ^{d)}	Mol%
1	20 : 5n-3/18 : 4n-3	20	20.85	46.8±1.9
2	18 : 3n-3/18 : 4n-3	22	24.83	1.9±0.1
3	20 : 5n-3/16 : 2n-4	22	25.71	1.6±0.1
4	20 : 5n-3/18 : 3n-3	22	26.85	11.1±0.4
5	20 : 4n-6/18 : 4n-3	22	27.97	4.9±0.2
6	18 : 3n-3/18 : 3n-3	24	32.32	3.0±0.1
7	20 : 4n-6/18 : 3n-3	24	36.53	2.5±0.4
8	18 : 3n-3/18 : 2n-6	26	45.17	0.8±0.1
9	14 : 0/18 : 3n-3	26	47.39	0.5±0.1
10	20 : 5n-3/16 : 0	26	59.55	4.4±0.2
11	14 : 0/18 : 2n-6	28	67.33	1.5±0.3
12	16 : 0/18 : 3n-3	28	75.12	3.7±0.2
13	14 : 0/18 : 1n-9	30	104.75	0.8±0.4
14	16 : 0/18 : 2n-6	30	108.19	6.9±0.4
15	18 : 0/18 : 3n-3	30	120.88	0.3±0.1
16	16 : 0/18 : 1n-9	32	170.37	2.4±1.0

^{a)} Peak numbers correspond to those in Fig. 4.

^{b)} Tentative identification based on the relative intensities of [RCOO]⁻ ions derived from the *sn*-1 and *sn*-2 positions.

^{c)} Equivalent carbon number = total acyl carbon number - 2 x number of double bonds.

^{d)} Retention time (min).

^{e)} Average value ± SD (n=3).

された。

分子種の同定 逆相 HPLC で分離された各分子種 (Fig. 4) をオンライン ESI-MS により同定した。エゾノネジモクの DGDG から調製した *sn*-1,2-DAG の DNPU 誘導体の逆相 HPLC/ESI-MS によって得られた総イオンカレントクロマトグラム (TIC) を Fig. 5A に示す。UV 検出 (Fig. 4) と同様のピーク成分が検出された。各ピークの負イオンスペクトル中に、ほぼ単一の強い脱プロトン化分子 ([M-H]⁻) が観察されたので、このイオンと脂肪酸分析の結果 (Table 1) を用いて各分子種を推測した。例えば、TIC 上で 20~22 分に溶出したピーク 1 は *m/z* 842 に強い [M-H]⁻ を与え (スペクトルは示さない)、これは脂肪酸組成 (Table 1) から 18 : 4n-3 と 20 : 5n-3 を含む分子種であると推測された。同様にして他のピークも同定されたが、分子量の等しい成分 (たとえば、ピーク 4 とピーク 5) を同定するためには、各成分の構成脂肪酸に関する情報が必要であった。そこで、イオン源に高電圧 (source CID energy, 40%) を印加してフラグメンテーションを行った結果、誘導体部由来の強い [DNPU-2H]⁻ (*m/z* 208) イオンの他に、1,2-DAG の脂肪酸が脱離した [RCOO]⁻ (カルボキシレートアニオン) のプロダクトイオンが検出された。Fig. 5B と 5D に、同一の [M-H]⁻ (*m/z* 844)

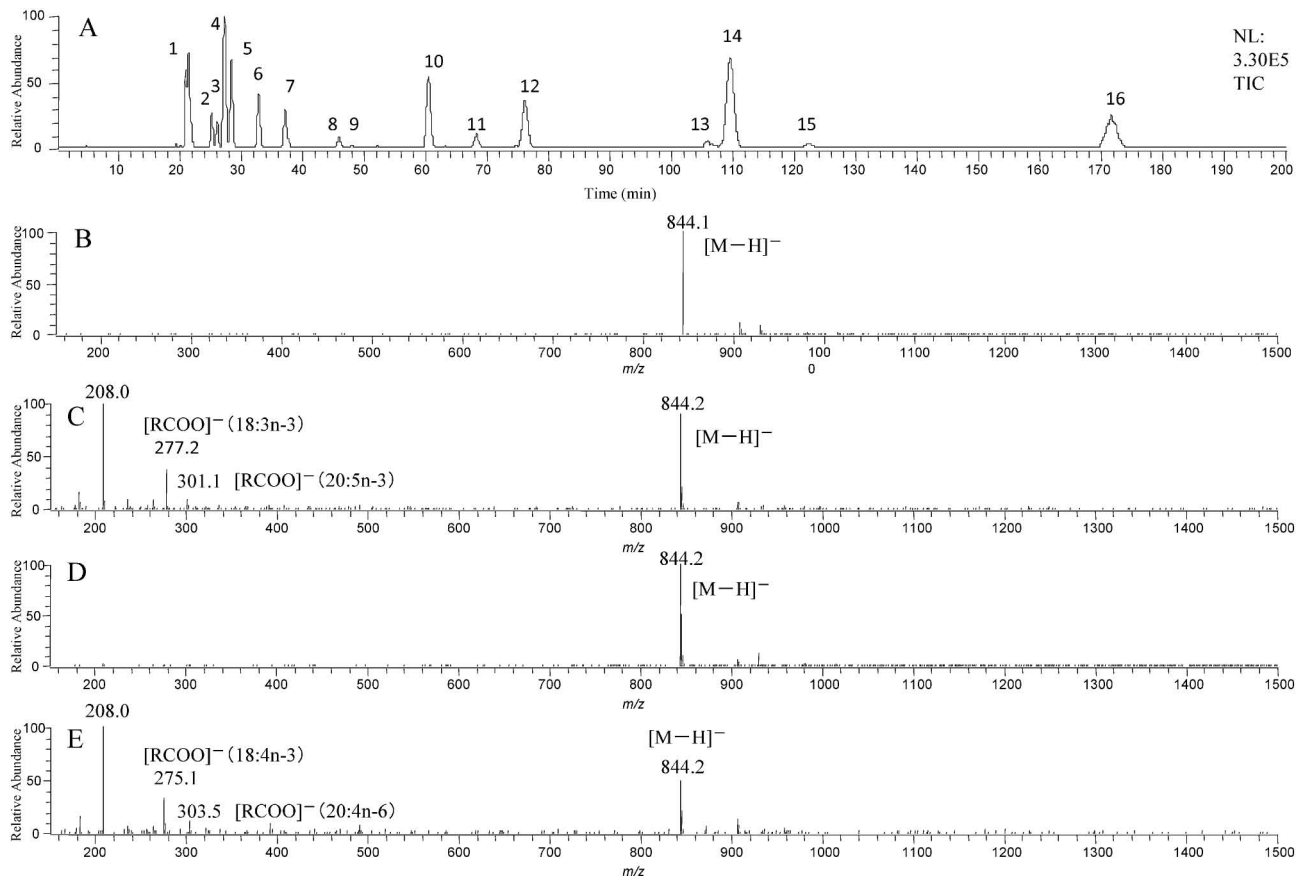


Fig. 5 Reversed-phased HPLC/ESI-MS profiles of the DNPU derivatives of diacylglycerols released from digalactosyldiacylglycerols of *Sargassum yezoense*. A: total ion chromatogram (TIC); B and C: mass spectra averaged over peak 4 between 26.0 and 27.0 min on TIC. D and E: mass spectra averaged over peak 5 between 27.5 and 28.0 min on TIC. Source CID energy: A, B and D, 0%; C and E, 40%.

を示すピーク4とピーク5のCID印加前のマススペクトルを、Fig. 5Cと5EにCID印加後のスペクトルをそれぞれ示す。後者のスペクトル中にみられる $[\text{RCOO}]^-$ イオンの m/z 値から、ピーク4は $18:3n-3$ と $20:5n-3$ を含むこと (Fig. 5C), また、ピーク5の構成脂肪酸は $18:4n-3$ と $20:4n-6$ であることが明らかとなった。同様にしてHPLCで分離されたすべての分子種を同定された (Table 2)。同定に誤りのないことは、マスクロマトグラムから、各ピークの m/z 値を検索することにより確認された (Fig. 6)。

橋立・板橋¹⁸⁾は2-プロパノールに溶解した1,2-DAG (DNPU誘導体) をインフュージョン法によりESIイオン源に導入し、MS・MSスペクトルを測定した結果、構成脂肪酸が $16:0$ と $18:1$ (又は $18:2$) の時は $[\text{RCOO}]^-$ の強度に違いがみられ、 $sn-2$ 位の脂肪酸が $sn-1$ 位のそれよりも脱離しやすいこと、及び $20:4$ や $22:6$ のような高度不飽和脂肪酸を含む1,2-DAGでは、これら脂肪酸は結合位置に関わらず脱離しやすい傾向のあることを報告した。すなわち、飽和脂肪酸とモノ

エン (またはジエン脂肪酸) からなる1,2-DAGの場合、MS・MSによって各脂肪酸の結合位置を正確に決定できるが、飽和脂肪酸と高度不飽和酸を含む場合は両脂肪酸の結合位置を区別するのは困難であることを示した。一方、本研究ではMS・MSを使用することなく、CIDを印加することによって1回のHPLC/MS分析で $[\text{RCOO}]^-$ イオンを生成させることができたが、そのイオン強度はMS・MSの場合¹⁸⁾と同様に脂肪酸の不飽和度と結合位置に依存するものと推測された。エゾノネジモクDGDG由来1,2-DAGの主要分子種は高度不飽和酸のペアであり、MS・MSでは位置の同定が困難であった高度不飽和酸と飽和酸からなる分子を含まないことから、両脂肪酸の結合位置は $[\text{RCOO}]^-$ イオンの強度比から推測できるものと考えられた。たとえば、最多成分である $20:5n-3/18:4n-3$ の分子種 (ピーク1, Fig. 5A) において、 $18:4n-3$ 由来のフラグメントイオンの強度は $20:5n-3$ 由来のそれよりも約3倍高い値を示したことは (Table 3), $20:5n-3$ が $sn-1$ 位に、 $18:4n-3$ が $sn-2$ 位に存在することを示唆する。同様に、主要

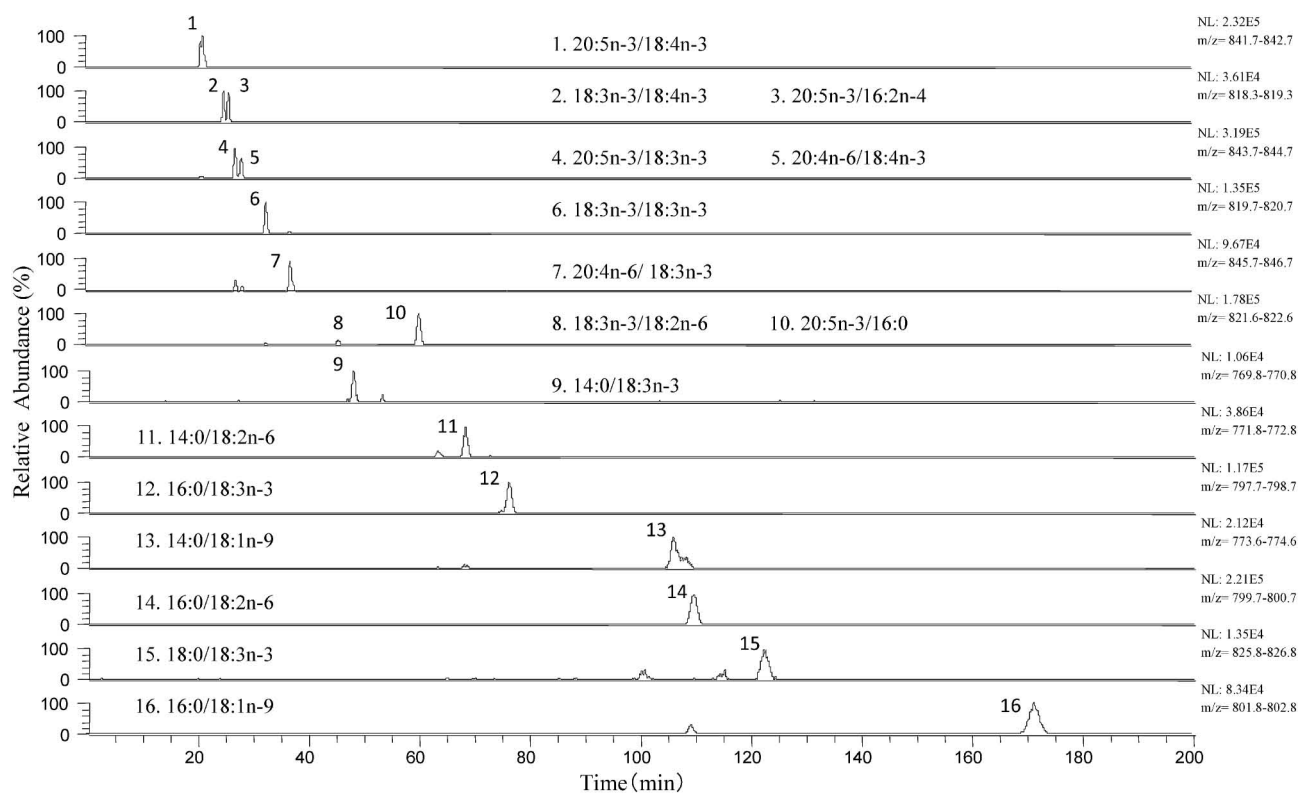


Fig. 6 Mass chromatograms representing $[M-H]^-$ ions of major molecular species of digalactosyldiacylglycerols from *Sargassum yezoense*.

Table 3 Molecular related and product ions of the 3,5-dinitrophenylurethanes of 1,2-diacyl-*sn*-glycerols generated from digalactosyldiacylglycerols of *Sargassum yezoense* by reversed-phase HPLC in conjunction with negative ESI-MS

Peak no. ^{a)}	Molecular species <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2 ^{b)}	$[M-H]^-$ <i>m/z</i>	$[R^1COO]^-$ ^{c)} <i>m/z</i>	$[R^2COO]^-$ ^{d)} <i>m/z</i>	Relative intensity, %	
					$[R^1COO]^-$	$[R^2COO]^-$
1	20 : 5n-3/18 : 4n-3	842.2	301.2	275.1	33	100
2	18 : 3n-3/18 : 4n-3	818.1	277.1	275.1	40	100
3	20 : 5n-3/16 : 2n-4	818.3	301.1	251.3	40	100
4	20 : 5n-3/18 : 3n-3	844.1	301.1	277.2	20	100
5	20 : 4n-6/18 : 4n-3	844.2	303.5	275.1	40	100
6	18 : 3n-3/18 : 3n-3	820.1	277.2	277.2	100	100
7	20 : 4n-6/18 : 3n-3	846.2	303.5	277.2	45	100
8	18 : 3n-3/18 : 2n-6	822.2	277.2	279.3	70	100
9	14 : 0/18 : 3n-3	770.1	227.4	277.3	5	100
10	20 : 5n-3/16 : 0	822.2	301.1	255.3	75	100
11	14 : 0/18 : 2n-6	772.2	227.4	279.3	10	100
12	16 : 0/18 : 3n-3	798.1	255.3	277.3	5	100
13	14 : 0/18 : 1n-9	774.2	227.4	281.7	5	100
14	16 : 0/18 : 2n-6	800.2	255.3	279.3	15	100
15	18 : 0/18 : 3n-3	826.2	283.7	277.3	5	100
16	16 : 0/18 : 1n-9	802.2	255.3	281.5	20	100

a) Peak numbers correspond to those in Fig. 4.

b) Tentative identification based on the relative intensities of $[RCOO]^-$ ions derived from the *sn*-1 and *sn*-2 positions.

c) $[R^1COO]^-$ ion derived from the *sn*-1 position.

d) $[R^2COO]^-$ ion derived from the *sn*-2 position.

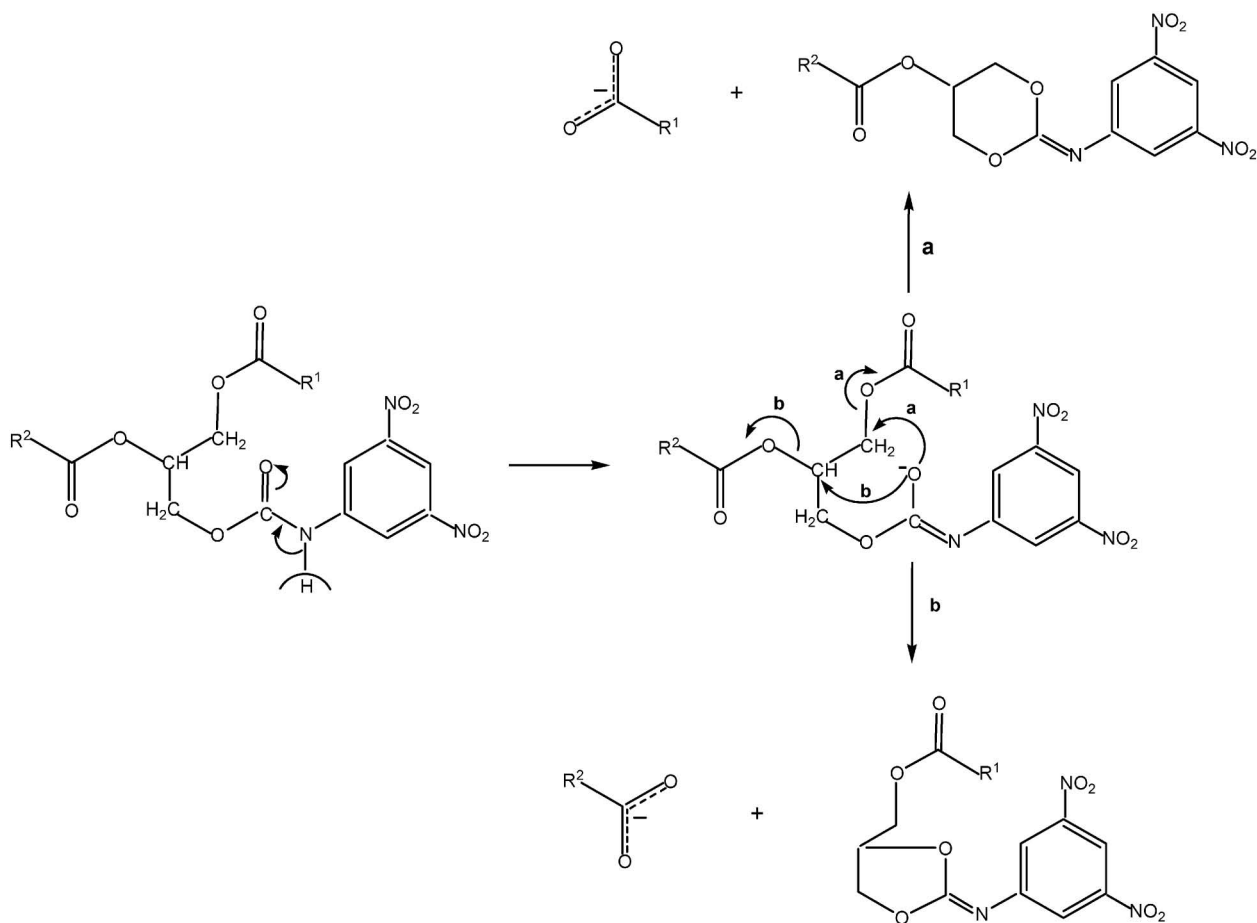


Fig. 7 Mechanism leading to the formation of the *sn*-1(3) and *sn*-2-carboxylate ions derived from the DNP derivatives of 1,2-diacylglycerols by negative ESI-MS.¹⁸⁾

成分の1つである 20 : 5n-3/18 : 3n-3 (ピーク 4) では, 18 : 3n-3 由来の $[\text{RCOO}]^-$ イオンの強度は 20 : 5n-3 由来の $[\text{RCOO}]^-$ イオン強度よりも明らかに大きく (Fig. 5, Table 3), 18 : 3n-3 は *sn*-2 位に, 20 : 5 は *sn*-1 位に存在するものと推測された。このようにして推定したエゾノネジモク DGDG の分子種を Table 2 と Table 3 に示す。

Fig. 7 にカルボキシレートイオン ($[\text{RCOO}]^-$) の生成機構を示す。初めに, 誘導体部分のアミド結合からプロトンが脱離して $[\text{M-H}]^-$ イオンが生成し, 次いで局在化したカルボキシル基の負電荷の攻撃によって 6 員環 (a) または 5 員環 (b) の遷移状態が形成され, その後ニュートラルロスを生じて $[\text{RCOO}]^-$ イオンが生成すると考えられる。*sn*-2 位由来の $[\text{R}^2\text{COO}]^-$ イオンが *sn*-1 位由来の $[\text{R}^1\text{COO}]^-$ イオンよりも多く生成することは, 6 員環よりも 5 員環の遷移状態が形成されやすいことを示唆する。脱プロトン化分子 ($[\text{M-H}]^-$) のかさばった状態 (立体障害) を緩めるために, *sn*-1 位よりも *sn*-2 位から $[\text{RCOO}]^-$ イオンが遊離するものと考

えられる。ホスファチジルコリンの ESI/MS と高速原子衝突質量分析 (FAB/MS) においても, $[\text{RCOO}]^-$ イオンが 6 員環または 5 員環の遷移状態を経て生成し, *sn*-2 位由来の $[\text{R}^2\text{COO}]^-$ が *sn*-1 位由来の $[\text{R}^1\text{COO}]^-$ よりも多く生成することが報告されている。¹⁹⁻²¹⁾

分子種組成 逆相 HPLC/UV で求めたエゾノネジモク DGDG の分子種組成を Table 2 に示す。最多成分は 20 : 5n-3/18 : 4n-3 の 46.8% であり, 次いで 20 : 5n-3/18 : 3n-3 が 11.1% であった。これら 2 つの分子種で全分子種の約 58% を占めた。その他の主な分子種は 18 : 2n-6/16 : 0 (6.9%), 20 : 4n-6/18 : 4n-3 (4.9%), 20 : 5n-3/16 : 0 (4.4%) であった。これらの結果から, エゾノネジモクの DGDG は高度不飽和脂肪酸を 2 分子含む分子種, 特に 20 : 5n-3/18 : 4n-3 に富んでいることが明らかになった。なお, 本研究で分析したエゾノネジモクの脂質含量は 2.2% (湿重量比) であり, 他の *Sargassum* 属の海藻⁷⁻⁹⁾ と同程度であった。また, TLC 分析により, 総脂質の 20~30% が DGDG と見積もられた。今後, 本藻が機能性を有する DGDG 資源として

有効に活用されることが期待される。

謝 辞

本研究の一部は、平成 18, 19 年度地域新生コンソーシアム研究開発事業「マイクロカプセルによる機能性食品素材の開発」委託費（研究代表者：高橋是太郎）及び科学研究費補助金（No. 18380122, 研究代表者：板橋豊）によって行われた。

文 献

- 1) Ohta H, Awai K, Takamiya K. Glyceroglycolipids of photosynthetic organisms—Their biosynthesis and evolutionary origin—. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 2000; **2**: 241–253.
- 2) Takahashi Y, Itoh K, Ishii M, Suzuki M, Itabashi Y. Induction of larval settlement and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by glyco-glycerolipids from the green alga *Ulva lens*. *Mar. Biol.* 2002; **140**: 763–771.
- 3) 板橋 豊. 海藻由来グリセロ糖脂質の異性体分析. 「水産機能性脂質—給源・機能・利用—, 水産学シリーズ142」(高橋是太郎 編) 恒星社厚生閣, 東京. 2004; 60–72.
- 4) Shirahashi H, Murakami N, Watanabe M, Nagatsu A, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A. Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Chem. Pharm. Bull.* 1993; **41**: 1664–1666.
- 5) Prieto JA, Ebri A, Collar C. Composition and distribution of individual molecular species of major glycolipids in wheat flour. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1992; **69**: 1019–1022.
- 6) 吉田忠生. 「新日本海藻誌」内田老鶴圃, 東京. 1998; 414.
- 7) Zhukova NV, Svetashev VI. A high level of dihomogammalinolenic acid in brown alga *Sargassum pallidum*. *Phytochemistry* 1999; **50**: 1209–1211.
- 8) Hossain Z, Kurihara H, Takahashi K. Biochemical composition and lipid compositional properties of the brown alga *Sargassum horneri*. *Pak. J. Biol. Sci.* 2003; **6**: 1497–1500.
- 9) Narayan B, Miyashita K, Hosokawa M. Comparative evaluation of fatty acid composition of different *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters. *J. Aqua. Food Prod. Technol.* 2004; **13**, 53–70.
- 10) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; **37**: 911–917.
- 11) Takahashi Y, Itabashi Y, Suzuki M, Kuksis A. Determination of stereochemical configuration of the glycerol moieties in glyco-glycerolipids by chiral phase high-performance liquid chromatography. *Lipids* 2001; **36**: 741–748.
- 12) Christie WW. *Lipid analysis (Third edition)*. The Oily Press, Bridgwater, England. 2003.
- 13) Terasaki M, Itabashi Y, Suzuki T, Nishimura K. An improved method for determining the composition of FFA in red tide flagellates by RP-HPLC with fluorescence detection. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2002; **79**: 1181–1186.
- 14) 板橋 豊, 高木 徹. 海産動植物油脂脂肪酸のガラスキャピラリーガスクロマトグラフィー. 油化学 1980; **29**: 855–865.
- 15) Heinze FJ, Linscheid M, Heinz E. Release of diacylglycerol moieties from various glycosyl diacylglycerols. *Anal. Biochem.* 1984; **139**: 126–133.
- 16) Itabashi Y, Kuksis A, Marai L, Takagi T. HPLC resolution of diacylglycerol moieties of natural triacylglycerols on a chiral phase consisting of bonded (*R*)-(+)–1-(1-naphthyl)ethylamine. *J. Lipid Res.* 1990; **31**: 1711–1717.
- 17) 石岡沙織, 田岡裕佳子, 板橋 豊. 高速液体クロマトグラフィー/質量法によるホスファチジルグリセロールの分子種分析. 分析化学 2003; **52**: 795–803.
- 18) 橋立 毅, 板橋 豊. 1,2-ジアシルグリセロール位置異性体のエレクトロスプレーイオン化質量分析. 分析化学 2005; **54**: 807–816.
- 19) Murphy RC. Mass Spectrometry of Lipids. In: Snyder F (ed). *Handbook of lipid research Vo. 7*, Plenum Press, New York. 1993; 213–252.
- 20) Vernooij EAAM, Brouwers JFHM, Kettenes-von den Bosch JJ, Crommelin DJA. *J. Sep. Sci.* 2002; **25**: 285–289.
- 21) Zirrolli JA, Murphy RC. Tandem mass spectrometry of negative ions from choline phospholipid molecular species related to platelet activating factor. *Lipids* 1991; **26**: 1112–1116.