講 座

脂 質 (XIV)

林 陽

近畿大学理工学部化学教室 (東大阪市小若江)

Lipids (XIV)

Akira HAYASHI

Department of Chemistry, Faculty of Science & Technology,
Kinki University (Kowakae, Higashiosaka)

3・5

3・5・1 分画・精製

リン脂質の他の脂質からの分離については、3・3 では述べたので、ここでは主としてリン脂質相互の分画、リン脂質のクラス分けについて述べる。

前にも述べたが (3・3・4), グリセロリン脂質、特に PE, PS, カルジオリピンなどは分解しやすいので、高温を避けて低温で取り扱う、乾燥することなくいつも溶液としておく、カラムクロマトグラフィーをはじめすべての操作を迅速に行うなどの注意が必要である。PC は lyso-PC に分解しやすい。

スフィンゴリン脂質またはスフィンゴスホノ脂質のみを扱う場合には、弱アルカリによる処理 (3・3・5 参照)、次いで Bligh-Dyen などの分配 (3・3・1・C) を行いグリセロリン脂質を分解・除去しておく、あとの分画がきれいに行える。

アルケニルエーテル型グリセロリン脂質 (プラズマロゲン) は脂質混合物を塩酸のメタノール溶液で酸性 (pH 1) として 1h 室温に放置すると、ビニルエーテル結合は分解される¹⁾。上述の弱アルカリ処理後、この操作を行えばアルケニルアシル型グリセロリン脂質は分解され、除くことができる。

以下、リン脂質相互の分画、精製について要点及び留意すべき点を述べる。

a) ケイ酸カラムクロマトグラフィー

3・3・2・a・i) で述べたケイ酸カラムクロマトグラフィーにより単純脂質及び糖脂質を含まないリン脂質のみの画分がメタノールにより溶出される。ただカルジオリピンやホスファチジン酸のような極性の小さい酸性リン脂質はアセトン溶出画分に含まれる。アセトンの代わりにクロロホルム-アセトンを用いると、これはある程度防止できる。アセトンの脱水効果によりリン脂質が強く吸着され、収量が悪くなるのを防ぐからである。

酸性リン脂質の溶解度やクロマトグラフィーでの挙動は、リン脂質が結合しているカチオンによって、かなり変化するので注意しなくてはならない。特に Ca や Mg のような 2 価イオンは PA, PS 及び PI のような酸性脂質に、Na や K 塩とは全く異なる溶出特性を与える。このため全リン脂質を単一の塩にしておくのが良い。この際、Na や K 塩が好ましい。これは脂質を chelating 樹脂 (例えば Bio-Rad の Chelex 100, 50~100 mesh) を通すと一定の塩にかえることができる。カチオンを含む溶液で、適当な溶媒に溶かした脂質を洗う方法 (例えば Folch の洗浄法) では部分的にしか置きかわらない。ただ、これは高度に正確な分析を試みる時に必要なことである。

C-M 混合溶媒の極性を変えて溶出する時、ケイ酸カラムからのリン脂質の溶出順序を表-1 に示しておいた。上述したように酸性脂質の溶出は、それが結合している

表-1 リン脂質のケイ酸カラムからの溶出順序
(C-M 使用時)

溶媒の極性	酸性脂質	非酸性脂質
弱	カルジオリピン (CL) ホスファチジン酸 (PA)	セラミド セラミドモノヘキシンド (CMH)
	セレブロシド硫酸エステル (CSE) または植物スルホリピド (SL) ホスファチジルグリセリン (PG)	
	ホスファチジルセリン (PS)	ホスファチジルエタノールアミン (PE)
	ホスファチジイルノシトール (PI)	ホスファチジルコリン (PC), lyso-PE セラミドジヘキシンド (CDH)
強	ジ-及びトリ-ホスホイノシチド	スフィンゴミニリン lyso-PC

カチオンにより影響を受け、溶出順序は変わらないが、前のものと重なって溶出したりする。

具体的なリン脂質分画の1例を表-2に示した。

表-2の分画法Cで用いているケイ酸-ケイ酸塩カラム²⁾は通常の方法でケイ酸を詰めた後、アンモニアを1%含むC-M(4:1, 1カラム容)で洗って作られる。PEとPSだけでなく、PCとSMもケイ酸カラムよりよく分かれる³⁾。酸洗したケイ酸カラムでもPSはPEより早く溶出する⁴⁾。

流速が遅く、脂質の負荷量が小さい時、及びグラジエント溶出が行われる時は、他の方法を行うより容易にずっと良い分離が得られる⁵⁾。内径3~10mmの小カラムを用いて0.5~2.0mgの脂質を分画すると能率が良いことをわれわれの研究室では経験している。

b) フロリシルとアルミナ

フロリシルはリン脂質を強く吸着するのでリン脂質の分画には用いられない。アルミナもその塩基性のために用いられない。グリセリン脂質の加水分解を生ずる。

c) イオン交換カラムクロマトグラフィー

(i) DEAE-及び TEAE-セルロース

この場合、極性脂質はそのイオン性により分けられるのでケイ酸カラムやTLCとは異なる挙動をする。すなわち3.3.2-bと3.3.2の表-2と表-3に述べてあるようにコリン脂質とエタノールアミン脂質がC-Mで分かれて溶出し、PSのような弱酸性脂質は酢酸で溶出する。PAやPIのような酸性脂質やイオン性脂質は無機塩またはアンモニアを加えた溶媒で溶出するなどの特徴がある。そこで、まずケイ酸カラムで分けた後に、DEAE-セルロースカラムを用いると良い。

DEAE(アセタート型)は交換しうるプロトンをもつが、TEAE(OH型)はもたないので、その溶出パタン

が異なる。例えばPEはDEAEではC-Mにより溶出するが、TEAEでは酸性溶媒でないと溶出しない。イオン交換カラムでは極性溶媒から非極性溶媒には直ちに变えないで、間にメタノールによる溶出をはさむ必要がある。流速は簡単なリン脂質では10ml/min、複雑なものでは3ml/minが適当である。溶出液中の塩類はセファデックスカラム(3.2.6参照)またはFolchやBligh-Dyenの分配法(3.3.1.c参照)により除くと良い。

(ii) QAE-セファデックス

QAE-セファデックスは酸性脂質を吸着する性質があるので、中性脂質と酸性脂質を分けるのに良い⁶⁾。中性糖脂質とホスホノ脂質やウロン酸を含む糖脂質の混合物をこのカラムにかけ、C-M-W(30:60:8)で中性糖脂質を溶出し、次いでホスホノ脂質やウロン酸含有糖脂質をC-M-1M酢酸ナトリウム(30:60:15)で溶出した後、ケイ酸カラムでこれら両者を分ける。

d) 分配クロマトグラフィー

3.4.4-aでも述べたが、グリセリン脂質にホスホリパーゼCを作用させて遊離するジグリセリドをLipidex 5000(3.3.2.c参照)を用いる逆相クロマトグラフィーによりアルキルアシル型、アルケニルアシル型及びジアシル型に分けることができる⁷⁾。こうして得た各ジグリセリドを更に硝酸銀TLCにより、その不飽和度による分離を行いえられる各フラクションをTMS化物としてGC-MSを行うと、リン脂質の分子種が正確に求められる⁸⁾。

セファデックスLH-20カラム(3.3.2.c参照)を用いて逆相クロマトグラフィーを行い、レシチンを直接その分子種にある程度分割した例がある⁹⁾。

e) 薄層クロマトグラフィー(TLC)

TLCはその高い分離能と迅速さのためリン酸質の分

表-2 ケイ酸カラムによるリン脂質の分画

分画法と各フラクション	溶 出 す る 脂 質	溶 出 溶 媒	カラム容積
A法	動物脂質——ケイ酸カラム		
1	単純脂質	クロロホルム	10
2	糖脂質と微量の酸性リン脂質	アセトン	40
3	リン脂質	メタノール	10
B法	A法のフラクション3——ケイ酸カラム		
1	PA+CL	C-M(95:5)	10
2	PE+PS	"(80:20)	20
3	PI+PC	"(50:50)	20
4	SM+lyso-PC	メタノール	20
C法	B法のフラクション2——ケイ酸-ケイ酸塩カラム		
1	PE	C-M(80:20)	8
2	PS	メタノール	3
D法	植物脂質——ケイ酸カラム		
1	MGDG	C-アセトン(50:50)	8
2	DGDG+スルホリピド	アセトン	10
3~6	B法の物質	B法の溶出溶媒	—

(1) ねずみ肝臓のリン脂質¹⁰⁾

プレート: シリカゲルH

溶媒系: クロロホルム-メタノール-酢酸-水
(25:15:4:2)(2) 植物葉の複合脂質¹¹⁾

プレート: シリカゲルG

溶媒系: ジイソブチルケトン-酢酸-水(40:25:4)
略号: ASG, アシルステリルグリコシド; DGD, ジガラクトシルジグリセリド; MGD, モノガラクトシルジグリセリド; LPC, lyso-PC; NL, 中性脂質; PA, ホスファチジン酸; Pigm., 色素; SG, ステリルグリコシド; SPM, スフィンゴミエリン。

図-1 複合脂質の薄層クロマトグラム

プレート: シリカゲルH

溶媒系: クロロホルム-メタノール-水
-28% NH₄OH (65:35:4:
0.2)発色: H₂SO₄-K₂Cr₂O₇ を噴霧後,
加熱スポット番号: 1, 原点; 2, lyso-PC; 3,
PC と PS; 4, PI; 5, PE;
6, unknown; 7, PG; 8, ジ
ホスファチジルグリセリン図-2 大麦リン脂質の薄層クロマトグラム¹²⁾

画・精製に多用されている (3・3・3 参照)。TLC における R_f 値は 3・3 の表-6 に既に示したが、ここでは分離の実例を図-1~図-3 に示した。なお二次元 TLC の実例を図-4 に示した。

TLC を用いて各リン脂質をその脂肪酸組成の差により、すなわち分子種により分けようとする試みがされている。いずれも硝酸銀含浸 TLC を用いてリン脂質そのものを不飽和度により分離した後に、今度は構成脂肪酸を主として炭素数により GLC を用いて分析し、ホスホリパーゼ A₂ による 2 位脂肪酸の分析結果とから分子種を求める方法である^{15)~17)}。PE, PS をトリフルオロアセトアミドとして硝酸銀 TLC を行くと分離度が良くなるという¹⁶⁾。硝酸銀 TLC の後で逆相分配 TLC を行い、レシチンをおる程度分けた例もあるが、まだ改良の余地がある¹⁷⁾。

スフィンゴリン脂質にホスホリパーゼ C を作用させて遊離するセラミドをアセタートとした後、硝酸銀 TLC,

プレート: Kiesel Gel F₂₅₄溶媒系: A, クロロホルム-酢酸-メタノール-水(75:
25:5:1.5)B, クロロホルム-メタノール-濃アンモニア
(65:35:5)

検出: オートラジオグラフィ

スポット	A	B
a	ジホスファチジルグリセリン	ジホスファチジルグリセリン
b	グリセリル-2-アミノエチル	グリセリルホスホリルエタノール
c	ホスホネート脂質	アミン脂質
d	グリセリルホスホリルエタノール	グリセリル-2-アミノエチル
e	アミン脂質	ホスホネート脂質
f	未同定	PC
g	未同定	未同定
h	セラミド 2-メチルアミノエチルホスホネート	未同定
i	セラミド 2-アミノエチルホスホネート	セラミド 2-メチルアミノエチルホスホネート
j	PC	セラミド 2-アミノエチルホスホネート
	未同定	未同定
	未同定	未同定

図-3 テトラヒメナの ³²P-リン脂質の薄層クロマトグラム¹³⁾

プレート：シリカゲルG
 溶媒系：X方向，クロロホルム-メタノール-7Nアンモニア（65：30：4）
 Y方向，クロロホルム-メタノール-酢酸-水（170：25：25：6）
 スポット番号：1, lyso-PC+lyso-PI+糖脂質；2, artefact；3, PS+糖脂質（低い部分）；4, PI+糖脂質（低い部分）；5, PC；6, スルホリピド；7, ジガラクトシルジグリセリド；8, PG；9, PE；10, 11, セレブロシド；12, ステリルグリコシド；13, PA；14, ジホスファチジルグリセリン；15, モノガラクトシルジグリセリド+アシルステリルグリコシド。

図-4 極性脂質の二次元薄層クロマトグラム¹⁴⁾

ホウ酸塩 TLC, 亜ヒ酸塩 TLC を用いて、ヒドロキシル基の位置、数や不飽和度により分子種に分ける試みがされ、ある程度成功している¹⁸⁾。この後、GC-MS を行うと正確な分子種とその組成の決定ができる。

f) 高速液体クロマトグラフィー

最近、種々の高速液体クロマトグラフの装置が市販され、その性能も向上してきた。しかし、複合脂質の分野へ応用されたのはここ 2~3 年のことである。リン脂質相互の分離と各リン脂質の分子種による分画について研究がある。

まず第一にリン脂質のクラス分けには 2 つの方法が報告されている。一つはアミノ基をもつリン脂質をビフェニルカルボニウム誘導体としてシリカゲル微粒（10~20 μ ）により分ける方法^{19), 20)}で、これにより PE, PS, lyso-PE の分離ができる。測定波長としては 280 nm を用いる。もう一つの方法は同じくシリカゲルのカラムを用いて 203 又は 205 nm でリン脂質を誘導体とすることなく検知し、分離する方法^{20), 21)}で、これにより PE, PC, SM, lyso-PC 分離が行われている（図-5）。また溶媒系を変えることにより、コレステロール、PA, PE, PI, PS, lyso-PC, lyso-PE が分離でき、PC と SM も部分的に分かれる。PC と SM は上記の溶媒系²¹⁾でよく分かれるので、一応リン脂質のクラス分けが可能である。なお調製スケール（リン脂質 1 g）でも分離ができると

カラム：Micropak SI-10
 溶媒：アセトニトリル-メタノール-水（75：21：14）
 流速：1.5 ml/min
 検出器：a Schoeffel spectromonitor (205 nm)
 添加量：PE, 5 μ g；PC, 10 μ g；SP (=SM), 20 μ g；LPC (=lyso-PC), 5 μ g。

図-5 リン脂質の高速液体クロマトグラフィー²⁰⁾

いっている²²⁾。

第二は各リン脂質の分子種による分離であって、これについてもいくつかの報告があり^{20), 22)~24)}、特に μ -Bondapak C-18（Waters、他社にも同種の充填剤がある）を用いて逆相クロマトグラフィーを行うと分離がよく^{20), 22), 24)}、最近の報告²⁴⁾では検知器に屈折率計を用いて“Critical Pair”をかなりの所まで分離している。セラミドの分子種を分けた例もある²⁵⁾。

カラム充填剤、検知器の改良及び溶媒系の工夫が進むと、高速液体クロマトグラフィーは分析用としても、また調製用としても大いに利用されることになるだろう。特に、リン脂質は不揮発性のために、そのまま分析または分離するには GLC では限界があるので、高速液体クロマトグラフィーは有用である。また、質量分析計と結合し、LC-MS が可能であるが²⁶⁾、リン脂質はそのままでは揮発性が小さいので LC-MS による利点は現在の所少ない。

g) ガスクロマトグラフィー (GLC)

GLC は最近の脂質化学の発達にその優れた分離能力により最も貢献した機器分析法といってよい。しかし、調製スケールで行うと分離が悪くなり、分離能を落とさないである程度の量を得るためには繰り返し行わねばならぬので長時間を要する欠点がある。

GLC には現在までに非常に多くのデータの蓄積があり、最近では質量分析計と結合した GC-MS として益々その有用性を高めている。そこで GLC についてはそれぞれの脂質の分析法（3・5・2・2 及び 3・5・3・2）で述べることにする。

h) ホスホノ脂質

グリセロホスホノ脂質（GP_nL）はケイ酸カラムにおいて C-M（90：10~80：20）の画分にグリセロリン脂質（GPL）とともに溶出する。PS や PE、セラミドホスホ

リルエタノールアミンとほぼ同一の画分にくる²⁹⁾。GP_nL の単離にはやはりケイ酸カラムが用いられる。クロロホルム (2 カラム容), アセトン (3 カラム容), アセトン-メタノール (9:1) (10 カラム容), C-M (9:1) (1 カラム容) の後で C-M (5:1) (5 カラム容) を流すと GP_nL が PE とともに溶出される。PE との分離は再ケイ酸カラムを C-AcOH (75:25) で行くと, まず GP_nL (約80%) が溶出し, 次いで PE が残りの GP_nL とともに溶出する²⁷⁾。ただしこの GP_nL はアミノエチルホスホン酸を含むものである。

スフィンゴホスホ脂質 (SP_nL) もケイ酸カラムにより分けられる。弱アルカリ処理 (3・3・5 参照) によりグリセロ脂質を分解し除去した後にカラムクロマトグラフィーを行うと分離がよい。クロロホルム, C-M (9:1), C-M (85:15), C-M (80:20), C-M (70:30) と流すとアミノエチルホスホン酸を含む SP_nL は C-M (9:1)~(85:15) の画分に, N-メチルアミノエチルホスホン酸を含む SP_nL は C-M (85:15)~(80:20) の画分に一部重なって溶出する。次いでこれら 2 種の SP_nL は C-M-HAc-W (100:20:12:5) を用いる調製用 TLC により分ける²⁸⁾。スフィンゴミエリンは C-M (1:1) より後の画分に溶出し SP_nL とは重ならない。

GP_nL と GPL の同族体を分離するにはシリカゲル G プレートに C-HAc (90~92%) (3:2, vol/vol) (エタノールアミン脂質の場合; コリン脂質では 85% 酢酸がよい) で展開する調製用 TLC が速くて分離もよいことが報告されている²⁹⁾。アルキルアシル型はジアシル型と同じ所に動く (図-6)。なお, この溶媒系 C-AcOH-W (75:25:1) はカラムクロマトグラフィーに用いても良い結果が得られている²⁹⁾³⁰⁾。

図-6 リン脂質の薄層クロマトグラム³⁰⁾

スフィンゴホスホ糖脂質については後述する (3・7・3・2 参照)。

(昭和 54 年 4 月 4 日受理)

文 献

1) M.F. Frosolono, M.M. Rapport, *J. Lipid Res.*, **10**,

504 (1969); S. Siggia, "Quantitative Organic Analysis via Functional Groups," Wiley, New York, (1949)
2) G. Rouser, J. O'brien, D. Heller, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 14 (1961)
3) G. Rouser, G. Kritchevsky, D. Heller, E. Lieber, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 425 (1963)
4) G. Rouser, G. Kritchevsky, A. Yamamoto, G. Simon, G. Galli, A.J. Bauman, "Methods in Enzymology", ed. by J.M. Lowenstein, Academic Press, Vol. 14 (1969) p. 272
5) H.A.I. Newman, C. Lin, D.B. Zilversmit, *J. Lipid Res.*, **2**, 403 (1961)
6) T. Hori, M. Sugita, A. Shiraki, Y. Yamamoto, *J. Biochem.*, 投稿中
7) T. Curstedt, *Biochim. Biophys. Acta*, **489**, 79 (1977)
8) 林 陽・森田全律, 日本油化学会-アメリカ油化学会(サンフランシスコ) (1979) にて発表
9) G.A.E. Arvidson, *J. Chromatog.*, **103**, 201 (1975)
10) F. Parker, N.F. Peterson, *J. Lipid Res.*, **6**, 455 (1965)
11) M. Noda, I. Katsura, K. Tanaka, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 70 (1965)
12) P.B. Price, J.G. Parsons, *Lipids*, **9**, 560 (1974)
13) C.V. Viswanathan, *J. Chromatog.*, **75**, 141 (1973)
14) M.E. McKillican, J.A.G. Larose, *Lipids*, **9**, 455 (1974)
15) N. Salem, Jr., L.G. Abood, W. Hoss, *Anal. Biochem.*, **76**, 407 (1976)
16) S.K.F. Yeung, A. Kuksis, L. Marai, J.J. Myher, *Lipids*, **12**, 529 (1977)
17) G.A.E. Arvidson, *J. Lipid Res.*, **8**, 155 (1967)
18) K.-A. Karlsson, I. Pascher, *J. Lipid Res.*, **12**, 466 (1971)
19) F.B. Jungalwala, R.J. Turel, J.E. Evans, R.H. McCluer, *Biochem. J.*, **145**, 517 (1975)
20) R.H. McCluer, F.B. Jungalwala, "High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Glycosphingolipids and phospholipids", in "Current Trends in Sphingolipidoses and Allied Disorders", ed. by B.W. Volk, L. Schneek, Plenum, New York (1976) p. 533
21) F.B. Jungalwala, J.E. Evans, R.H. McCluer, *Biochem. J.*, **155**, 55 (1976)
22) W.S.M.G. van Kessel, W.M.A. Hax, R.A. Demel, J. de Gier, *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 524 (1977)
23) C.M. Gupta, R. Radhakrishnan, H.G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4315 (1977)
24) N.A. Porter, R.A. Wolf, J.R. Nixon, *Lipids*, **14**, 20 (1979)
25) M. Sugita, M. Iwamori, J. Evans, R.H. McCluer, J.T. Dulaney, H.W. Moser, *J. Lipid Res.*, **15**, 223 (1974)
26) W.L. Erdahl, O.S. Privett, *Lipids*, **12**, 797 (1977)
27) H. Berger, D.J. Hanahan, *Biochim. Biophys. Acta*, **238**, 584 (1971)
28) T. Hori, M. Sugita, O. Itasaka, *J. Biochem.*, **65**, 451 (1969)
29) V.M. Kapoulas, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 324 (1969)
30) M. Sugita, T. Hori, *J. Biochem.*, **69**, 1149 (1971)