[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol.58, No.9, pp.881~885, 1984]

小麦種子の油脂とリン脂質の分子種的研究*

伊藤精亮, 朴 和鎮, 藤野安彦
(帯広畜産大学農産化学科)

昭和 59 年 6 月 11 日 受 理

Molecular Species of Fat and Phospholipid in Wheat Seeds

Seisuke ITO, Hwa Jin PARK and Yasuhiko FUJINO

*Department of Agricultural Chemistry, Obihiro University of Agriculture and
Veterinary Medicine, Obihiro 080*

The molecular species of the fatty acid in the fat of wheat seeds were C_{50} , C_{52} and C_{54} , based on carbon number. The main groups were C_{52} and C_{54} types. The main molecular species were 16:0-18:2-18:1 type in triene, 16:0-18:2-18:2 type in tetraene, 18:2-18:3-18:2 type in heptaene and 18:1-18:2-18:2 type in pentaene. Wheat seeds contained nine kinds of phospholipids. Phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, *N*-acylphosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol were the principal types. The main molecular species of phospholipids in wheat seeds were 18:2-18:2 and 16:0-18:2 types in phosphatidylethanolamine, 16:0-18:2 and 18:2-18:2 types in phosphatidylcholine and phosphatidylinositol and 16:0-18:2-*N*-18:2 and 18:2-18:2-*N*-18:2 types in *N*-acylphosphatidylethanolamine.

(Received June 11, 1984)

緒 言

油脂は植物の貯蔵脂質であるのに対し、グリセロリン脂質は植物細胞の膜脂質としての役割を有している。これらのグリセロ脂質はグリセリル基に結合している脂肪酸の種類および位置分布によって、多岐にわたる分子種が存在している。われわれは、これまでに米糠 TG⁽¹⁾, リン脂質⁽²⁾およびエンドウ種子 TG⁽³⁾, リン脂質⁽⁴⁾の分子種について報告してきた。今回は小麦種子中の油脂と主要なリン脂質 (PE, PC, PI, NAPE) の脂肪酸の位置

特異性および分子種を明らかにして、油脂とリン脂質の化学的性状を明らかにしようとした。

実 験 方 法

1. 全脂質の抽出と分画 1980 年度北海道産ホロシリコムギの種子 3 kg を 30 メッシュに粉碎し、ただちに 100°C で 5 分間煮沸して試料とした。これをクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) と水飽和ブタノールで抽出し、得られた抽出液を濃縮して水洗した⁽⁵⁾。そのクロロホルム層を濃縮して全脂質とした。これをケイ酸カラムクロマトグラフィー⁽⁶⁾に供して中性脂質、糖脂質およびリン脂質の各画分に分離した。

2. TG とリン脂質の分離 中性脂質画分は 7% 含水フロリシカルラムクロマトグラフィー⁽⁷⁾に供して、ヘキサン-エーテル系の溶媒で TG を溶出させた。また、リン脂質画分はケイ酸カラムクロマトグラフィー⁽⁸⁾に供して、クロロホルム-メタノール系の溶媒で各リン脂質を分離した。*N*-アシルリン脂質はクロロホルム-メタノール (7:1) と同 (4:1) の画分を 7% 含水フロリシ

* この報文では、次の略号を用いる。TG: トリアシルグリセロール, PE: ホスファチジルエタノールアミン, PC: ホスファチジルコリン, PI: ホスファチジルイノシトール, PS: ホスファチジルセリン, PG: ホスファチジルグリセロール, NAPE: *N*-アシルホスファチジルエタノールアミン, NALPE: *N*-アシルリゾホスファチジルエタノールアミン, LPC: リゾホスファチジルコリン, MG: モノアシルグリセロール, FFA: 遊離脂肪酸, TLC: 薄層クロマトグラフィー, GLC: ガスクロマトグラフィー, GC-MS: ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー。

ルカラムクロマトグラフィーに供して分離した。

3. **TG の構成脂肪酸の位置分布**^(9,10) TG にパンクレアチン (和光純薬工業) を作用させて 1, 2-, 2, 3-ジアシルグリセロールの混合物を調製した。これをピリジン中でフェニルジクロリン酸と反応させて, D, L-ホスファチジルフェノールを調製した。これを蛇毒 (*Trimeresurus flavoviridis*) のホスホリパーゼ A₂ で処理して, L-リゾホスファチジルフェノールと 2 位の脂肪酸を特異的に分離した。1 位の脂肪酸は生成されたリゾリン脂質の分析から, また 3 位の脂肪酸は TG の全脂肪酸から 1 位と 2 位のそれを差し引いて算出した。

4. **TG の分子種の分画** TG を不飽和度の程度に応じて分画するために, 調製用 ケイ酸-12.5% 硝酸銀 TLC に供して, クロロホルム-メタノール (98.8:1.2, v/v) で暗所で展開した⁽¹¹⁾。展開後プレートにローダミン 6G を噴霧し, 紫外線下で検出した。各亜画分の相対割合は, デンシトメトリーと抽出した各亜画分の重量から求めた。

5. **リン脂質の酵素分解** リン脂質分子内の脂肪酸分布を明らかにするために, 上記蛇毒のホスホリパーゼ A₂ を用いて酵素分解を行った⁽¹²⁾。生成した 2 位由来の遊離脂肪酸とリゾリン脂質を薄層プレートから抽出して分離した。ホスホリパーゼ A₂ に抵抗性の NAPE⁽¹³⁾は, 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0), 室温 8 時間の条件で, 基質の 20% が分解された。

6. **N-アシルリン脂質の水解** NAPE の N 位と O 位に分布する脂肪酸組成を調べるために, メタノール性 0.1N NaOH を加えて 37°C で 80 分間処理した⁽¹⁴⁾。生成された N-アシルグリセリルホスホリルエタノールアミンから N 位に, また遊離された脂肪酸から O 位に分布する脂肪酸組成を, それぞれ求めた。

7. **GLC** 日立製作所製 163 型ガスクロマトグラフを使用した。脂肪酸メチルエステルは 5% DEGS-Chromosorb WAW-DMCS, 170°C で分析した。また TG の亜画分は Diasolid ZT, 310°C で分析し, 得られた各ピークの炭素数はトリパルミチン (東京化成工業) を標準にして求めた⁽¹⁵⁾。

8. **GC-MS** 日立製作所製 RMU-6 MG 型ガスクロマトグラフ-質量分析計を使用した。TG 亜画分の分析には, ガラスカラム (0.3×100 cm) に Diasolid ZT を充填し, カラム温度 310°C で行った。質量分析の条件は, イオン源部温度 220°C, イオン化電圧 20 eV, イオ

ン化電流 80 μ A およびイオン加速電圧 3.2 kV とした。

TG のグリセリル基の 1 位と 3 位に結合している脂肪酸はマスマスペクトルでは区別できない⁽¹⁶⁾ので, この部分に結合している脂肪酸は, TG の分子内脂肪酸分布と TG 亜画分のそれを参考にして推定した。また各分子種の定量は Hites⁽¹⁷⁾ の方法に従って算出した。

結 果

1. 脂質の収量

小麦種子の脂質含有率は 2.4% で, これは小麦穀粒のそれ⁽¹⁸⁾とほぼ一致していた。このうち中性脂質, 糖脂質およびリン脂質の各画分の割合は, ほぼ 3:1:1 であった。中性脂質画分のなかで TG の占める割合は 76.5% であった。

2. TG の構成脂肪酸の分子内分布

小麦種子 TG の脂肪酸の位置分布を Table I に示す。TG の主要な脂肪酸はリノール酸, パルミチン酸およびオレイン酸で, 不飽和脂肪酸が全体の 80% を占めていた。TG 分子のグリセリル基の 1 位と 2 位と 3 位, とくに 2 位では大部分が不飽和脂肪酸によって占められていた。これは植物種子 TG の脂肪酸パターンのこれまでの報告⁽¹⁹⁾に一致していた。

3. TG 亜画分の脂肪酸組成

TG の硝酸銀含有ケイ酸 TLC の結果を Fig. 1 に示す。TG は薄層プレート上で, 不飽和度に応じて 7 個 (I~VII) の亜画分に分離された。各亜画分の相対割合と脂肪酸組成を Table II に示す。亜画分は多いほうが

Table I. Composition and Positional Distribution of Fatty Acids in Wheat Seed Triacylglycerol (%)

Fatty acid	Total	Position in triacylglycerol			
		C-1	C-2		C-3
			From 2-MG	From L-phosphatide ^a	
16:0	18.4	22.4	9.1	10.4	22.4
16:1	0.1	2.0	0.1	0.6	0.1
18:0	1.5	3.3	0.3	1.0	0.9
18:1	15.0	14.3	21.2	20.3	10.4
18:2	60.2	54.1	65.0	64.3	60.9
18:3	5.1	3.8	4.2	3.4	7.3
Saturated	19.9	25.7	9.4	11.4	23.3
Unsaturated	80.2	74.2	90.5	88.6	78.7

^a See Methods (3) in the text.

Table II. Fatty Acid Composition of Triacylglycerol Subfractions in Wheat Seed (%)

Triacylglycerol subfraction	Ratio	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
I	9.8	67.6	0.7	3.6	17.4	10.7	—
II	14.0	68.4	1.0	2.4	8.9	19.2	—
III	1.6	48.7	3.0	3.4	23.9	21.1	—
IV	17.9	45.4	7.6	4.0	17.1	26.0	—
V	22.4	25.6	2.2	1.5	16.9	52.0	1.7
VI	27.6	16.8	2.1	2.6	6.8	53.1	18.6
VII	6.5	25.6	4.8	3.0	10.1	37.0	19.4

ら VI, V, IV, II の順で、薄層プレート上で R_f 値の小さい亜画分ほどリノール酸とリノレン酸を多く含んでいた。

Fig.1. Thin-Layer Chromatogram of Wheat Seed Triacylglycerol. Glass plate was coated with silicic acid-silver nitrate (12.5%), developed by chloroform-methanol (98.8:1.2), and visualized by UV light after spraying with Rhodamine 6G in methanol.

4. TG 亜画分の脂肪酸の炭素数分布

TG 亜画分のなかで、代表的なそのガスクロマトグラムを Fig.2 に示す。全体の TG は C_{50} , C_{52} および C_{54} で構成され、その割合はほぼ 1:4:5 であった。亜画分 III は C_{52} , V は C_{52} と C_{54} , または VI では C_{54} がそれぞれ主要なものであった。このように小麦種子 TG の脂肪酸の炭素数は C_{52} と C_{54} が主要なものであったが、これはオリーブ油および大豆油⁽¹⁹⁾のそれと同じ傾向を示していた。なお、この脂肪酸の炭素分布のパターンから、隣接亜画分相互の若干の混入が示唆された。

Fig.2. Gas-Liquid Chromatograms of Representative Subfractions in Wheat Seed Triacylglycerol. Analyzed at 310°C on a glass column with Diasolid ZT.

Fig.3. Mass Spectrum of Subfraction V- C_{52} in Wheat Seed Triacylglycerol. The temperature and the energy level of ion source were 220°C and 20 eV, and the ionizing current was 80 μ A.

5. TG の分子種

TG の代表的な重画分 V-C₅₂ のマススペクトルを Fig. 3 に示す. m/z 854 (M⁺), 836 (M-18), 599 (M-R¹COO), 575 (M-R^{2,3}COO) 等の各イオンおよび m/z 585 (M-R¹COOCH₂) と 561 (M-R^{2,3}COOCH₂) の相対強度^(16,20,21)から, この TG の分子種は 16:0-18:2-18:2 と推定された. 同様に他の重画分について, GC-MS を行った結果, 主要な分子種 (Table III) は, 16:0-18:2-18:1 (34.7%) と 16:0-18:2-18:2 (31.5%) の C₅₂ 群のトリエン型とテトラエン型で, 次いで 18:2-18:3-18:2 (15.7%) と 18:1-18:2-18:2 (15.4%) の C₅₄ 群のヘプタエン型とペンタエン型であった.

6. リン脂質の構成脂肪酸の分布

小麦種子のリン脂質は, TLC 上でリン試薬に陽性の 9 個のスポットが検出され, そのなかで主要なものは

Table III. Major Molecular Species of Wheat Seed Triacylglycerol

Triacyl-glycerol	Ratio %	Molecular species
I-C ₅₀	—	16:0-18:1-16:0
C ₅₂	3.1	16:0-18:2-18:1, 18:1-18:2-16:0
II-C ₅₀	—	16:0-18:2-16:0
C ₅₂	9.1	16:0-18:2-18:1, 18:1-18:2-16:0
III-C ₅₂	22.5	16:0-18:2-18:1, 18:1-18:2-16:0
IV-C ₅₂	0.5	16:1-18:1-18:1, 18:1-18:1-16:1
C ₅₄	1.9	18:1-18:2-18:1
V-C ₅₂	31.5	16:0-18:2-18:2, 18:2-18:2-16:0
C ₅₄	15.4	18:1-18:2-18:2, 18:2-18:2-18:1
VI-C ₅₂	0.2	16:0-18:1-18:1, 18:1-18:1-16:0
C ₅₄	9.5	18:2-18:3-18:2
VII-C ₅₄	6.2	18:2-18:3-18:2

PE, PC, NAPE および PI であった. また NALPE, LPC, PS および PG も検出された. 主要な 4 つのリン脂質の構成脂肪酸とその位置分布を Table IV に示す. 各リン脂質ともに主要な構成脂肪酸はリノール酸, パルミチン酸およびオレイン酸であった. また各リン脂質の脂肪酸の分子内分布は, 植物リン脂質の脂肪酸パターン^(22,23)と類似して, グリセリル基の 1 位に飽和のパルミチン酸が, また 2 位には不飽和のリノール酸が多かった. とくに PI ではその傾向が顕著であった. NAPE の O-アシル基にはリノール酸, 次いでパルミチン酸が, また N-アシル基にはリノール酸とパルミチン酸が, ほぼ 1:1 で含まれていた.

7. リン脂質の分子種

小麦種子のリン脂質の分子内脂肪酸の位置分布 (Table IV) から, リン脂質の主要な分子種は次のように推定される. PE は 18:2-18:2 と 16:0-18:2, PC と PI は 16:0-18:2 と 18:2-18:2, また NAPE では 16:0-18:2-N-18:2 (16:0) と 18:2-18:2-N-18:2 (16:0) で, いずれもグリセリル基における分子種はジェン型とテトラエン型であった.

考 察

小麦種子の TG は中性脂質の大部分を占めており, また PE, PC, PI および NAPE はリン脂質の主要な成分であった.

TG はグリセリル基の 1 位と 3 位にリノール酸とパルミチン酸が, また 2 位にはリノール酸が多く分布していた. その代表的な分子種は 16:0-18:2-18:1 と 16:0-18:2-18:2 で, いずれも C₅₂ のトリエン型とテトラ

Table IV. Composition and Positional Distribution of Fatty Acid in Wheat Seed Glycerophospholipids (%)

Fatty acid	Phosphatidyl-ethanolamine			Phosphatidyl-choline			Phosphatidyl-inositol			N-acylphosphatidylethanolamine				
	Total	C-1	C-2	Total	C-1	C-2	Total	C-1	C-2	Total	O-acyl	C-1	C-2	N-acyl
16:0	18.2	32.5	5.9	22.9	39.1	6.1	57.9	57.0	12.4	30.3	25.0	45.6	12.7	38.8
16:1	0.5	2.4	0.7	0.5	4.8	1.7	0.2	5.2	0.7	0.4	0.6	2.3	3.2	1.5
18:0	0.9	1.9	0.9	0.8	3.3	1.3	0.4	6.7	0.8	0.4	0.5	3.6	2.2	1.8
18:1	13.6	12.6	10.4	13.6	12.1	18.4	5.1	13.2	13.1	7.6	5.4	9.8	12.1	17.7
18:2	58.0	48.9	77.9	58.0	37.4	69.5	34.1	17.6	69.8	58.9	67.8	36.4	67.4	40.0
18:3	3.8	1.7	4.1	3.8	3.2	2.9	2.2	0.2	3.2	2.4	0.7	2.2	2.4	—
Saturated	19.1	34.4	6.8	23.7	42.4	7.4	58.3	63.7	13.2	30.7	25.5	49.2	14.9	42.1
Unsaturated	81.8	65.4	93.1	75.9	57.5	92.5	41.6	36.2	86.8	69.1	74.5	50.7	84.2	57.7

エン型であった。また 18:2-18:3-18:2 と 18:1-18:2-18:2 の C₅₄ のヘプタエン型とペンタエン型もかなり含まれていた。今回は小麦種子全粒の TG について分析したが、小麦胚 TG⁽²⁴⁾は 16:0-18:2-18:2 や 16:0-18:2-18:1 が多く、また米糠 TG⁽¹⁾では 16:0-18:2-18:1, 16:0-18:2-18:2, 18:1-18:1-18:1 の C₅₂ および C₅₄ のトリエン型やテトラエン型が多いと報告されている。このように、貯蔵脂質である TG は植物の種、組織あるいは植物の生育温度によって、物性が変化してそれぞれ分子種が異なるものと考えられる。

リン脂質の分子内脂肪酸は、PC, PI および NAPE ではグリセリル基の 1 位にパルミチン酸とリノール酸が、2 位にはリノール酸が多く分布していた。したがって、これら 3 つのリン脂質は代謝的に関連があると推定されるが、PE は上記 3 つのリン脂質とは多少異なって、1 位にもリノール酸が多く分布しているのが特徴的であった。これまで植物リン脂質の分子種については大豆⁽²²⁾、小麦胚⁽²²⁾およびエンドウ種子⁽⁴⁾などについて調べられているが、小麦種子リン脂質のそれもほぼ類似したパターンを示し、16:0-18:2, 18:2-18:2, 16:0-18:1 などのジエン型、テトラエン型およびモノエン型の分子種から成っているようである。

要 約

(1) 小麦種子の油脂の脂肪酸の炭素数による分子種群は C₅₀, C₅₂ および C₅₄ で、主要なものは C₅₂ と C₅₄ のものであった。主要な分子種は、16:0-18:2-18:1 (トリエン型), 16:0-18:2-18:2 (テトラエン型), 18:2-18:3-18:2 (ヘプタエン型) および 18:1-18:2-18:2 (ペンタエン型) であった。

(2) 小麦種子のリン脂質は、9 種が認められ、主要なものはホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、N-アシルホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルイノシトールであった。

(3) リン脂質の主要な分子種は、ホスファチジルエタノールアミンでは 18:2-18:2 と 16:0-18:2, ホスファチジルコリンとホスファチジルイノシトールでは 16:0-18:2 と 18:2-18:2, N-アシルホスファチジルエタノールアミンでは 16:0-18:2-N-18:2 と 18:2-18:2-N-18:2 であった。

- (1) T. Miyazawa, H. Tazawa and Y. Fujino: *Cereal Chem.*, **55**, 138 (1978).
- (2) T. Miyazawa, Y. Yoshino and Y. Fujino: *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 889 (1977).
- (3) T. Miyazawa, S. Ito and Y. Fujino: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 137 (1975).
- (4) 宮沢陽夫, 藤野安彦: 農化, **50**, 169 (1976).
- (5) J. Folch, M. Lees and G. A. Sloane-Stanley: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- (6) G. Rouser, G. Kritchevsky, G. Simon and G. J. Nelson: *Lipids*, **2**, 37 (1967).
- (7) K. K. Carroll: *J. Lipid Res.*, **2**, 135 (1961).
- (8) D. J. Hanahan, J. C. Dittmer and E. Warashina: *J. Biol. Chem.*, **228**, 685 (1957).
- (9) H. Brockerhoff: *J. Lipid Res.*, **6**, 10 (1965).
- (10) H. Brockerhoff and M. Yurkowski: *J. Lipid Res.*, **7**, 62 (1966).
- (11) M. L. Blank, B. Verdino and O. S. Privett: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 87 (1965).
- (12) C. Long and I. F. Penny: *Biochem. J.*, **65**, 382 (1957).
- (13) R. A. Bomstein: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 49 (1965).
- (14) R. M. C. Dawson, N. Clarke and R. H. Quarles: *Biochem. J.*, **114**, 265 (1969).
- (15) A. Kuksis: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 269 (1965).
- (16) M. Barber, T. O. Murren and W. Kelley: *Tetrahedron Lett.*, **10**, 1063 (1964).
- (17) R. A. Hites: *Anal. Chem.*, **42**, 1736 (1970).
- (18) W. R. Morrison: "Recent Advances in the Biochemistry of Cereals," ed. by D. L. Laidman and R. G. Wyn Jones, Academic Press, New York, 1979, p. 313.
- (19) R. Neja, A. Bhati, R. J. Hamilton, F. B. Padley and D. A. Steven: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**, 135 (1980).
- (20) W. M. Lauer, A. J. Aasen, G. G. Graff and R. T. Holman: *Lipids*, **5**, 861 (1970).
- (21) T. Murata and S. Takahashi: *Anal. Chem.*, **45**, 1816 (1973).
- (22) O. S. Privett and L. J. Nutter: *Lipids*, **2**, 149 (1967).
- (23) M. E. McKillican: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 200 (1967).
- (24) P. J. Arnes: *Fette Seifen Anstrichm.*, **84**, 256 (1982).