穀類の複合脂質に関する研究

(第1報) うるち米のリン脂質について

小原 哲二郎*・宮田 信夫*

Studies on the Conjugated Lipids of Cereals

Part I. Phospholipids of nonglutinous rice

TETSUJIRO OBARA and NOBUO MIYATA

The Phospholipids compositions of three parts (unpolished, polished rice and bran) of nonglutinous rice were investigated comparatively. First, lipids were extracted from each materials with the solvent mixture of chloroform-methanol (2:1) at low temperature. Then, these were treated with cold acetone and conjugated lipids were obtained in acetone-insoluble fraction.

Identified or presumed phospholipids were phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine, lysophosphatidyl choline, lysophosphatidyl ethanolamine, lysophosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidyl glycerol and phosphatidic acid, but phosphatidyl serine and phosphatidic acid were not found in polished rice.

Total phospholipids were 1.41% in unpolished, 0.65% in polished rice and 5.16% in bran, and the ratio of distribution to polished rice and bran was 39.7:60.3. Only lysophosphatidyl choline of polished rice was more than that of bran.

Fatty acids compositions of these were mainly C₁₈-unsaturated acids. (Received Mar. 8, 1969)

著者らは植物組織の脂質¹⁾, ならびに複合脂質^{2,3)}に関する一連の実験を進めているが, 続いてうるち米のリン脂質成分を明らかにすることを企てた。うるち米に関しては, 白米中のリゾレシチンについて岩田⁴⁾の報告があるにすぎず, その他油脂化学的に報告されたものは見当たらない。

本報においては, うるちの玄米, 白米, ぬかの3区分におけるリン脂質成分について検索し, 比較検討を試みたのでその結果を報告する。

実験材料および方法

1. 供試材料

41年, 秋田県産水稻うるち米ヨネシロを用いた。ただし, 市販の玄米中には未熟な青米や, すでに砕けた不完全米などが混入していたので, それらを除去し完全な玄米 11 kg を選り分けた。この玄米 8.5 kg は, 佐竹製堅

第1表 うるち米3区分の供試重量ならびに性状

	供試重量(g)	平均千粒重(g)	a)	b)
			水分量(%)	粗脂肪量(%)
玄米	1910	22.5068	12.98	3.06
白米	6937	19.1662	13.10	0.97
ぬか	1335	—	12.35	22.03

注: a)…105°C 乾燥法による

b)…ソレックス抽出器によるエーテル抽出

型循環研削精米機で充分精米し, 白米部 84%, ぬか部 16% を得た。すなわち, 得られた白米は食卓に供せられるものとは異なり, 胚芽など完全に除去したものである。玄米, 白米はそれぞれ 20 メッシュに粉碎し, ぬかはそのままの状態ですぐに供試材料とした。原料3区分の供試重量, ならびに性状は第1表のとおりである。

2. 脂質の調製

3区分の材料はそれぞれクロロホルム・メタノール

* 東京教育大学農学部農業化学科 (東京都目黒区駒場 2-19-1)

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education, Meguro-ku, Tokyo.

(2: 1 v/v) 混液を2倍量加え、約 10°C で3日間、冷浸出を行なった。抽出溶液を分け、次に不溶部残渣について同様の操作を3回くり返した。おのおのについて全抽出液を合し、ロータリーエバポレーターを用いて 30°C 以下で溶媒を留去し、脂質を得た。次に冷アセトン10倍量加えて分別処理をくり返し、水および非リン脂質区分を除去してアセトン不溶性脂質、すなわち複合脂質を得た。さらにクロロホルム・メタノール (2: 1) 混液で精製したのち、リン脂質の供試材料とした。抽出重量および回収率は第2表に示した。また、これら複合脂質中のリン含量は、玄米 4.1%, 白米 2.2%, ぬか 5.6% であった。

3. 分析方法

リン脂質のカラムクロマトグラフィーは RHODES and DAWSON⁶⁾ らの方法に、薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と記す）は SKIPSKI⁶⁾, SKIDMORE⁷⁾ らの方法にならい分析を行なった。個々のリン脂質の確認は DAWSON⁸⁾ の部分加水分解法にならい、定量は WAGNER⁹⁾ の方法により比色定量から求めた。また、構成脂肪酸は、島津製作所製ガスクロマトグラフィー GC-2B 型（熱伝導検出器）を用いて検索した。ただし、使用条件は既報⁸⁾ に従った。

4. リン脂質の標品

ホスファチジルコリンは PANGBORN¹⁰⁾, 小原¹¹⁾ らの方法により調製したものを、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は市販品（東京化成より入手）を用い、それぞれ TLC で精製して標品とした。

5. 薄層の調製

一次元展開は SKIPSKI の方法によった。すなわち、シリカライダー（第一化学薬品）30g を 0.01M 炭酸ナトリウム溶液 60ml に懸濁し、矢沢化学製スタールの装置により、厚さ 250 μ の塩基性薄層を作った。炭酸ナトリウムは、酸性リン脂質の R_f 値を安定させる目的で使用したが、その他にはなんら影響がなかったと思われる。二次元展開は、通常の中性薄層にて実施した。

実験結果および考察

1. アセトン不溶性脂質の一次元TLC

おおよその形態を知るために、それぞ

れ3区分の未分画アセトン不溶性脂質を、一次元 TLC で分析した。展開溶媒は、クロロホルム・メタノール・酢酸・水 (65: 25: 8: 4) および (50: 25: 8: 4)⁶⁾ の2系を使用した。前者がやや良好な結果を与えた。第1図 (1) に示したとおり、玄米、ぬか区では15個のスポット (R_f 値の低い方から番号を付した)、白米区では9個のスポットが得られた。ただし、発色剤として10% リンモリブデン酸エタノール溶液および50% 硫酸を噴霧し、クロマトグラムをデンシトメーターにかけることによってスポットを認めた。この系による酸性リン脂質、とくにホスファチジルセリンの R_f 値はほぼ一定であった。その他 R_f 値の高い部分では溶媒系クロロホルム・メタノール・水 (65: 25: 4) を、 R_f 値の低い部分ではジイ

第2表 うるち米3区分の脂質および複合脂質の抽出量

	脂質(g) (原料に対する%)	複合脂質(g) (原料に対する%)
玄米	80 (4.19)	34.4 (1.80)
白米	140 (2.02)	64.3 (0.93)
ぬか	260 (19.48)	85.5 (6.40)

第1図 (1) 未分画および (2) 分画玄米複合脂質の薄層クロマトグラフィー

吸着剤: 0.01M Na_2CO_3 ・シリカライダー

展開溶媒: クロロホルム・メタノール・酢酸・水 (65: 25: 8: 4)

発色剤: 10% リンモリブデン酸エタノール溶液

スポット No. 4. リゾホスファチジルコリン (LPC)

5. リゾホスファチジルセリン (LPS)

6. リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)

7. ホスファチジルコリン (PC)+ホスファチジルグリセロール (PG)

8. ホスファチジルイノシトール (PI)

9. ホスファチジルセリン (PS)

11. ホスファチジルエタノールアミン (PE)

14. ホスファチジン酸 (PA)

以上リン脂質, その他 2, 3 糖脂質?

13. ホスホリルコリン (分解物)

1, 10, 12, 15. 未検案

ソプチルケトン・酢酸・水(40:25:3.7)を用いると鮮明なスポットが得られた。

2. カラムクロマトグラフィー, ならびに TLC による分析

第1図(1)で得られた各スポットを精査するために、ケイ酸カラムクロマトグラフィーを行なった。第3表のごとくクロロホルムとメタノールの混合比を変えて溶出した。各フラクションの成分は同様の TLC でチェックし、6画分にまとめた。なお、玄米、白米、ぬかの3区分について実施したが、ここでは玄米を代表させて詳述する。玄米区のクロマトグラムは第1図(2)に示し、各スポットの呈色性は第4表に示した。これより、スポット4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14がリン脂質およびその他のリン化合物である。そのうちスポット5, 6, 9, 11はニンヒドリン試薬に陽性であり、アミノ含有リン脂質である。同時展開した標品ホスファチジルエタノールアミンの R_f 値にスポット11が、標品ホスファチジルセリンの R_f 値にスポット9がそれぞれ一致した。ス

ット4, 7, 12, 13はドラゲンドルフ試薬に陽性であり、コリン含有脂質である。同時展開した標品ホスファチジルコリンの R_f 値にスポット7が一致した。またスポット13は調製したホスホリルコリンの R_f 値に一致し、非リン脂質であった。コリン含有スポット12は、シッフ試薬に陽性であり、コリンプラズマローゲンであるか否か検討した。すなわち、ケイ酸固定濾紙クロマトグラフィーを実施したところ、シッフ試薬および2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬⁽⁶⁾⁽¹⁰⁾に陰性であったため未同定である。なお、白米、ぬか区についても、それぞれ対応する番号において同様の結果をえた。

3. 二次元 TLC による分析

一次元 TLC ではホスファチジルコリン含量が多いため、スポット8が不鮮明であった。また、スポット14もフロントラインにひきつられ検出が困難であったため、二次元 TLC による分析を行なった。すなわち、前記 TLC よりスポット8, 14部位を数枚のプレートからかきとり、クロロホルム・メタノール混液に溶出させ、このものを SKIDMORE らによる二次元 TLC の試料に供した。すなわち中性薄層を用い、一次展開溶媒としてクロロホルム・メタノール・7N水酸化アンモニウム(60:35:5)、二次展開溶媒としてクロロホルム・メタノール・7N水酸化アンモニウム(35:60:5)を用いたところ第2図を得た。ただし、玄米区のクロマトグラムを示した。スポット8は硝酸銀アンモニウム試薬に陽性、ローダミン6Gで青色、スポット14は非常に微量であるが、ローダミン6Gで青色、BTB酸性試薬に陽性で、ともに酸性リン脂質であり、また同時展開した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との相互関係が SKIDMORE のクロマトグラムとよく一致したので、そ

第3表 カラムクロマトグラフィーの溶出溶媒

	溶 媒	溶出量(ml)
1	クロロホルム	200
2	C-M*(9:1)	200
3	C-M(8:2)	300
4	C-M(7:3)	300
5	C-M(5:5)	400
6	メタノール	400

(注) * C-M…クロロホルム・メタノール混液
カラム直径…3 cm
充填剤…100メッシュケイ酸 60 g
溶過助剤 30 g
負 荷…複合脂質 0.5 g 以下

第4表 検出スポットの呈色反応(玄米)

スポットNo.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
発色剤															
リン モ リ ブ デ ン 酸 ⁽¹²⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ローダミン 6 G ⁽¹²⁾	Y	Y	Y	Y	B	Y	Y	B	B	Y	Y	Y	Y	B	Y
リ ン 酸 青 ⁽¹²⁾				+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
モリブデン酸アンモニウム-過塩素酸 ⁽¹²⁾	±		+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	
ニンヒドリン ⁽⁷⁾			±	±	+	+			+		+				
ドラゲンドルフ ⁽⁷⁾				+			+					+	+		
硝酸銀アンモニウム ⁽⁷⁾								+							
シ ッ プ ⁽⁷⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
過ヨウ素酸-シッフ ⁽¹⁸⁾							+								
ジフェニルアミン ⁽¹⁴⁾		+	+												

注: Y……黄色
B……青色

第2図 玄米のスポット 8, 14 ならびに PC, PE の二次元薄層クロマトグラフィー

吸着剤: シリカゲル (中性プレート)

展開溶媒: 一次展開 クロロホルム-メタノール-7N 水酸化アンモニウム (60: 35: 5)

二次展開 クロロホルム-メタノール-7N 水酸化アンモニウム (35: 60: 5)

発色剤: 10% リンモリブデン酸エタノール溶液略号は第1図による

れぞれホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸と推定した。ぬか区においても同様の結果を得、白米区ではホスファチジン酸は見られなかった。

4. リン脂質加水分解物の TLC

個々のリン脂質を確認するため、アセトン不溶性脂質、ならびに薄層クロマトグラムの分離スポットをかきとったものについて DAWSON による水解を行なった。すなわち、アルカリ水解は 0.1N メタノール性 NaOH で 37°C、24 時間処理ののち、全液を塩酸性にしてエーテル部 (脂肪酸) と水溶部を得た。酸水解は 0.1N メタノール性 HCl で同じく 37°C、24 時間処理してエーテル部 (グリセリドまたはホスホリルグリセリド) と水溶部を得た。ここに得られた水溶部について、イオン交換したのち、TLC を実施した。展開溶媒はメタノール・98% 酢酸・水 (18: 13: 7)、およびエタノール・酢酸・水 (6: 5: 50)・飽和フェノールを使用した。前者が良好なスポットを与えた。その結果、スポット 4 と 7 ではともにグリセロホスホリルコリンと思われるスポット、およびコリンを得たことから、スポット 4 はリゾホスファチジルコリンと推定した。同様にスポット 6 と 11 ではグリセロホスホリルエタノールアミンとエタノールアミンを、スポット 5 と 9 ではグリセロホスホリルセリンとセリンをそれぞれ得たので、スポット 6 はリゾホスファチジルエタノールアミン、5 はリゾホスファチジルセリンと推定した。その他、スポット 14 にはカルジオリビンの分解物と思われるポリグリセロリン酸 (R_f 値 0.28) が見られ、またスポット 7 にはホスファチジルグリセロール

が混在していると思われる。以上のことより、本うるち玄米のリン脂質は第1図に記載のとおり同定または推定された。なお、白米、ぬか区についても同様の考察が可能であった。

5. リン脂質の定量

前述の一次元 TLC を用いて、各複合脂質 170 μ g を分離し、モリブデン酸アンモニウム過塩素酸試薬で検出した。各リン脂質のスポットをかきとり WAGNER の方法に従って灰化処理ののち、リン含量を比色定量した。ただし、WAGNER の方法は一部改良して実施した。すなわち、モリブデン酸アンモニウムを飽和した 60% 過塩素酸 0.5 ml 加え、180°C、2 時間加熱し、これを冷却後、水 2 ml 加え、ふとう水中に 10 分放置させて灰化を行なった。次に発色剤として 2.5% モリブデン酸アンモニウム、還元剤として 10% アスコルビン酸をおのおの 0.3 ml 加え、38°C に 2 時間放置後、全量を 50 ml にフィルアップした。これを 5 分間、3000 rpm で遠心分離し、その上澄液を波長 820 m μ で吸光度を測定した。シリカゲルが共存するため、同時に盲検を行ない測定値を補正し、リン標準曲線より、リン含量を求めた。なお、リン脂質の構成脂肪酸をリノール酸と仮定し、リン脂質係数 (各リン脂質分子量/31) をリン定量値に乗じて成分量を求めた。複合脂質に対するリン脂質の重量% (実験 5 回の平均を求めた) を第5表に示した。ただし、未検出のスポットについては定量しなかった。これより、玄米ではホスファチジルコリン、リゾ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含量が、白米ではリゾホスファチジルコリン、ホスファチジルコリン含量が、ぬかではホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノ

第5表 うるち米複合脂質のリン脂質組成

リン脂質	定量結果(重量%)		
	玄米	白米	ぬか
ホスファチジン酸 (PA)	T	—	T
ホスファチジルエタノールアミン (PE)	11.0	9.2	14.3
ホスファチジルセリン (PS)	T	—	T
ホスファチジルイノシトール (PI)	4.8	3.2	10.9
ホスファチジルコリン (PC)	28.3	24.0	38.3
リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)	T	T	T
リゾホスファチジルセリン (LPS)	8.4	T	8.1
リゾホスファチアルコリン (LPC)	25.7	33.2	9.0
総リン脂質の各複合脂質に対する %	78.2	69.6	80.6
総リン脂質の原料に対する %	1.41	0.65	5.16

注: T……微量

ールアミン, ホスファチジルイノシトール含量が高いことがわかる。複合脂質中の総リン脂質は, 玄米, 白米, ぬかにおいてそれぞれ, 78.2, 69.6, 80.6% であることから, 原料に対して 1.41, 0.65, 5.16% に相当することになる。いっぽう, 非リン脂質中, ホスホリルコリンはそれぞれ複合脂質に対し 11.6, 10.6, 10.5% とかなり高率であったが, これは試料中のリパーゼの影響によるものと考えられ, 従ってコリン含有リン脂質は実際にはやや数値が増えるものと思われる。

次に各リン脂質の, 白米, ぬかへの分布を考察したところ第6表を得た。ただし, 生玄米 10,000 g とったときの分布をグラムで示した。すなわち, 玄米中, 白米-ぬか(84: 16 w/w) を考慮して, たとえば白米への分布を求める場合, 8,400 g に複合脂質の抽出率(第2表より) を乗じ, さらに各リン脂質の含有率(第5表より) を乗じて求めた。したがって白米とぬかの各リン脂質を加えたものは玄米のリン脂質量を表わすものであるが, いっぽう玄米より求めた値との間に第6表にみるように1~6 g の差を生じた。これより, リン脂質は白米中に 39.7%, ぬか中に 60.3% の割合で分布するが, リゾホスファチジルコリンが白米中にかなりの量で存在することを除けば, 他のすべてのリン脂質はぬか中に多く存在していた。さらに, 玄米中のリン脂質量 (1.39±0.16) % は, 第5表の結果 1.41% にほぼ一致した。なお, 各区分ともホスファチジン酸が低含量だったのは抽出溶媒, とくにアセトンに対する溶解力が大きかったものと考えられる。

6. 脂肪酸組成

以上で検討したうるち米3区分のリン脂質を回収して, 構成脂肪酸のおおよその検索を試みたところ, 第7表を得た。これより, 3区分とも炭素数18の不飽和脂肪酸含量が顕著であり, 次いでパルミチン酸含量が高いことがわかった。本結果は, 複合脂質の特徴的なパターン, すなわち C₁₈ の不飽和酸が主成分であるということを示した。

要 約

うるちの玄米, 白米, ぬかの3区分におけるリン脂質成分について比較検討を試みた。

(1) 材料はクロロホルム・メタノール (2: 1) 混液で冷浸出を行ない, さらにアセトン沈殿法により複合脂質を抽出し, リン脂質の供試材料とした。

(2) 玄米, ぬかにおいて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の

第6表 玄米10,000 g中, リン脂質の白米, ぬかへの分布

リン脂質	白米 (g)	ぬか (g)	玄米 (g)*
PA	—	T	T
PE	7.2	14.6	20.8±1.0
PS	—	T	T
PI	2.5	11.2	11.3±2.4
PC	18.8	39.2	54.5±3.5
LPE	T	T	T
LPS	T	8.3	11.6±3.4
LPC	25.9	9.2	40.6±5.6
計	54.3	82.5	138.8±15.9**
分布率	(39.7%)	(60.3%)	

注: * 白米とぬかの値を加えたものと, 玄米より単独に求めた値の誤差の範囲を示した

** 玄米中, リン脂質は (1.39±0.16) % 存在する

第7表 うるち米3区分のリン脂質脂肪酸組成 (%)

脂 肪 酸	玄米	白米	ぬか
C 6:0	0.1	T	0.2
C 8:0	2.4	6.9	0.8
C10:0	T	—	T
C12:0	T	T	T
C16:0	17.4	19.0	18.1
C16:1?	1.2	3.4	T
C18:0	0.9	2.9	0.6
C18:1	27.9	21.9	32.6
C18:2	34.1	28.2	36.2
C18:3	15.8	16.6	10.7
?	0.2	—	0.7

注: T……微量

存在を確認し, また, リゾホスファチジルコリン, リゾホスファチジルエタノールアミン, リゾホスファチジルセリン, ホスファチジルイノシトール, ホスファチジン酸およびホスファチジルグリセロールを推定した。白米にはそのうち, ホスファチジルセリンおよびホスファチジン酸がみられなかった。

(3) リン脂質は玄米中 1.41%, 白米中 0.65%, ぬか中 5.16% 含有され, また白米とぬかへの分布率はそれぞれ 39.7%, 60.3% であった。

(4) 玄米ではホスファチジルコリン, 次いでリゾ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が多く, 白米ではリゾホスファチジルコリン, 次いでホスファチジルコリンが多く, ぬかではホスファチジルコリン

ン、次いでホスファチジルエタノールアミンが多かった。いっぽう、白米よりぬか中にほとんどのリン脂質が多く分布するが、リゾホスファチジルコリンに関しては、ぬかより白米中に多く存在することを知った。

(5) リン脂質構成脂肪酸は3区分とも大差なく、炭素数18の不飽和($\Delta 1\sim 3$)脂肪酸含量が顕著であった。

本実験は、昭和43年度日本農芸化学会関東支部大会において発表した。

終りに臨み、終始協力いただいた竹内孝三郎君に感謝する。

文 献

- 1) 小原哲二郎・北村光雄：農化誌，**25**，426 (1951)。
- 2) 小原哲二郎・場浅克己：農化誌，**43**，91 (1969)。
- 3) 小原哲二郎・宮田信夫：農化誌，**43**，95 (1969)。
- 4) 岩田元兄：農化誌，**6**，759 (1930)。
- 5) RHODES, D.N. and DAWSON, R.M.C.: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, ed. SMITH, I. (Interscience Publishers Inc., N.Y.), p. 363 (1960)。
- 6) SKIPSKI, V.P., PERTERSON, R.F. and BARCLAY M.: *J. Lipid Res.*, **3**, 467 (1962)。
- 7) SKIDMORE, W.D. and ENTENMAN, C.: *J. Lipid Res.*, **3**, 471 (1962)。
- 8) DAWSON, R.M.C.: *Biochem. J.*, **75**, 45 (1960)。
- 9) WAGNER, H.: *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **63**, 1119 (1961)。
- 10) PANGBORN, M.C.: *J. Biol. Chem.*, **188**, 471 (1951)。
- 11) 小原哲二郎・北村光雄：農化誌，**29**，37 (1955)。
- 12) 蛋白質・核酸・酵素編集部編：生物化学実験法 VII, 脂質実験法，(共立出版)，p. 20 (1967)。
- 13) HAVERKATE, F. and VAN DEENEN, L.L.M.: *Biochem. J.* **88**, 42 (1963)。
- 14) 石川正幸・原 昭二ら編：薄層クロマトグラフィー，第2版，(南山堂)，p. 137 (1965)。
- 15) REITSEMA, R.H.: *Anal. Chem.*, **26**, 960 (1954)。
(1969年3月8日受理)