

固体NMRによる種子含有脂肪の非破壊的測定法 — 千葉大学分析センターの装置を用いて —

島貫真実子*, 永江綾子**, 梶飛雄真***, 関 宏子****, 西野栄正*, 岡上伸雄*
(*園芸学部 植物構造学研究室; **大学院薬学研究院; ***大学院自然科学研究科; ****分析センター)

Non-destructive measurement of seed storage oils by solid-state NMR — A convenient method using usual machine —

Mamiko Shimanuki*, Ayako Nagae**, Hyuma Masu***, Hiroko Seki****,
Eisho Nishino* and Nobuo Okagami*

(*Laboratory of Plant Morphology, **Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Graduate School of Science and Technology, *Chemical Analysis Center)

Abstract

Magic angle spinning NMR (MAS-NMR) enables to observe the chemical shifts of solid samples. However, the institutes which have this apparatus are very few, because it is highly expensive. So, we tried to obtain the high-resolution spectrum using an ordinary NMR machine (JOEL JMN-LA400 in Chemical Analysis Center of Chiba University) temporarily equipped with a solid state probe instead for a usual probe. Even by this convenient manner, a high-resolution ^{13}C full spectrum of triacylglycerols of storage oils in intact seeds was obtained without any extraction procedure.

1. はじめに

生体を構成している物質の化学構造や存在状態に関する情報を、生体組織から物質を抽出せずを得ることが出来れば、生命現象の分子機構を理解することに大きく役立つものと思われる。通常のNMR装置による測定では、対象分子の運動が制限されにくい溶液の状態の試料からは高分解能スペクトルが得られる。一方、固体状態の物質は分子の配向が固定されているため、スペクトルの幅がブロードになり明瞭なスペクトルは得られない。しかし、試料の回転軸と磁場とがなす角度をある特定の値 ($[3 \cos^2 \theta - 1]$ がゼロになるような θ の値; 即ち54.7度) に設定すると、化学シフトの異方性を消去することができ、分子の動きが大きく制限されている固体からでも、高分解能スペクトルを得ることが出来る [7]。この角度54.7度はマジック角と称されている。それゆえこの方法による測定はMagic Angle Spinning NMR (MAS-NMR) またときにはSampleという語を補ってMASS-NMR) と呼ばれている。また、固体NMR (solid-state

NMR) とも呼ばれる。この方法は例えば材料工学の分野での ^{13}C や ^{29}Si などの核種をはじめとして、いろいろな分野でいろいろな核種について用いられており、生体試料についても個体や組織、さらに最近は土壤などをそのままNMRの試料セルに入れて測定し、抽出や分離操作を施さずに生体物質のスペクトルを得ることが試みられている [1, 2, 6]。だが生体試料の場合には多くの化合物からの幅が広くかつ弱いシグナルが重なり、明瞭なスペクトルは一般に得にくい。しかし、生体中に溶液として高濃度にかつ大量に存在する物質や、脂質膜のように液体的性質を持っていて大量に存在する物質からのシグナルは、明瞭に観測できることがある。脂肪種子の貯蔵脂肪もその一例である [5]。

我々はかねてより植物の繁殖戦略を分子のレベルから理解するために、ヤマノイモ属の近縁種間の種子貯蔵脂肪の化学構造の違い、発芽時におけるトリアシルグリセロール分子種の分別代謝などについて研究を進めてきた。これらの研究に際して用いた手法は、種子を磨砕して溶媒抽出により脂肪を精製しHPLCにより分析するものである [3, 4]。しかし、数個しか得られない希少種の

種子の場合には、非破壊的に測定したい。また、種子が含む多量の貯蔵脂肪の微小な変化量を正確に捕捉するには、同一種子（または同一集団）について非破壊的に経時的に測定することが望ましい。固体NMRはこれらの場合によく適合している分析手段であると考えた。しかし、固体NMR測定用の専用装置は、特定の目的で研究を行っているごく少数の大学や企業に設置されているのみであり、溶液NMR装置のように一般的ではない。そのため、専用装置を用いて多くの試料を予備的な実験も含めてルーチン的に測定することは困難であった。今回、千葉大学分析センターで学内共同利用に供されているNMR装置の1台が、拡張機能として固体用のプローブを付けると、簡易的方法による固体NMR測定が可能であることがわかったので、生体試料の場合にどの程度のスペクトルが得られるかをいろいろと検討した。その結果、植物種子が含む貯蔵脂肪の ^{13}C 高分解能スペクトルを、通常の溶液からのスペクトルと遜色ない精度で得ることが出来た。生体試料の固体NMR測定を試みるときの参考に供するために、ここにその方法を紹介するとともに、この方法で得られたスペクトルからどのようなことが読み取れたか、また読み取れる可能性があるかについても記した。

2. 方 法

(1) 植物試料

2001年10月、新潟県南魚沼郡清水にて自然状態で育成している株から採取したオニドコロ (*Dioscorea tokoro* Makino) の種子を用いた。種子は採取後風乾し、シリカゲルとともに約1年間保存した後に用いた。水分含量は6~8%程度であった。吸水をして発芽する時には65%前後の値になった。

(2) 固体NMRの測定手順

- ① NMR装置：千葉大学分析センターに設置され、ライセンス取得者の共同利用に供されている400MHzのごく一般的なNMR装置であるJEOL JNM-Lambda400を用いた。本来これは液体試料測定用の装置である。この装置のプローブ部分 (TH5ATFG2) を、拡張機能用の同社製の固体NMRプローブ (SH40T6/VT) に交換して測定した。
- ② Magic角の調整：固体NMRは試料の角度と磁場の角度が54.7度 (magic角) をなすように調整する必要がある。臭化カリウムを用いて調整を行った。
- ③ 測定試料：固体NMR測定のためのジルコニアで出来た専用のセル (内径約5mm, 深さ約20mm) にオ

ニドコロ種子を10個 (重量は約80mg) 入れ、ダイフロン製の蓋を確実に装着した。この種子の場合にはこの量でセルがちょうど一杯になる。

測定時にはセルを高速で回転させる必要がある。その際の振動を防ぐため、セルにはなるべく試料を均一に詰めるのがよい。ピーナッツのような大きなものなら切って詰める。ゴマのような小粒のものを口いばいに詰めるのが、振動させないためには、理想的である。スペクトルの強度は目的物質の重量に比例するので、なるべく多量の試料を詰め込むことが望ましい (⑧項と関連している)。

- ④ 測定核種の選択：今回は ^{13}C を選択した。

- ⑤ 測定モード：MAS-GHDによった。

測定対象分子のスピン—格子緩和時間の長さによって測定モードを選択する必要がある。スピン—格子緩和時間が長い分子 (固体の中でも固体的な状態にある分子) からのシグナルを得たいときにはCP-MAS (Cross Polarization and Magic Angle Spinning) やPST-MAS (Pulse Saturation Transfer and Magic Angle Spinning) をとり、緩和時間が短い分子 (固体の中でも液体的な状態にある分子) を対象とする場合にはMAS-GHD (Magic Angle Spinning and Gated High Power Decoupling) を選択する。見当がつかない場合にはそれぞれのモードで測定して選択する。今回の種子のCP-MAS測定では、おそらく種子表面の硬いワックスからのものと思われるピークがブロードに得られた。貯蔵脂肪のピークを得るにはMAS-GHDが有効であった。

- ⑥ 各種の条件設定：Rutar *et al.* (1989) [5] の条件を参考にして検討し、温度24℃ (この種子の発芽時の生理的な反応が起きる温度であり且つ装置の温度制御も行いやすい)、パルス照射時間幅は4.25 μ 秒、パルス取り込み時間を2秒、積算回数は1024回、 ^{13}C の0から200ppmの間でサンプリングポイントは8192に設定して測定を行った。スペクトルの描画時には、フーリエ変換後のスペクトルの分解能を上げるためにゼロフィーリングを行い、サンプリングポイントを4倍の32768にした。スペクトルの微細構造を読む必要がないときにはもっと少ないポイント数でも良いであろう。
- ⑦ チューニング：アダマンタンを用いて行った。
- ⑧ 試料セルの回転数：3000Hzに設定した。

固体 ^{13}C -NMRで幅が狭くサイドバンドが生じない良いスペクトルを得るには通常は5000Hz程度で回転させる必要があるとされている [7]。しかし、ある程度の量の水を含んでいる生体試料の場合には回転により生じる遠心力により脱水される。脱水を避けるため

になるべく低速で回転させたいときには、スペクトルの劣化の傾向を見ながら回転数を調整する。一方、不均一に詰めると回転に際してセルに振動が生じ回転数を上げられない。また、セルに振動が生じると自動的に測定が停止することもある。なお、スペクトルの強度は重量に比例するので、試料セルに充分量（重量）の種子を詰めるときには1000Hz弱の低速回転でも十分に良好なスペクトルが得られた。

- ⑨ 測定結果の保存など：データーはNMR装置制御用のワークステーションおよびMO（光ディスク）に保存した。スペクトルの描画は付属ソフトとレーザープリンターにより行った。
- ⑩ スペクトルの帰属：産業技術総合研究所の「有機化合物のスペクトルデータベース」http://www.aist.go.jp/aist_j/database/database.htmlを参考にして推定した。またさらに、固体測定の結果から種子が含むと推定された化合物の市販品について溶液モードで一次元（1D）および二次元（2D）各種測定法（NON, HH-COSY, HMQC-fg, HMBC-fgなど）を行うことにより、各ピークの帰属を確認した。なお、通常の液体のNMRのケミカルシフト値が基本的にはそのまま固体NMRにも適用できる。

3. 測定例

(1) 乾燥種子の固体 ^{13}C -NMRスペクトル（培養前の種子）

乾燥状態にある種子10個を試料セルにつめた固体 ^{13}C -

NMRの測定結果を図1に示す。 ^{13}C のケミカルシフトの全域にわたってピーク幅が狭いきれいなスペクトルが得られている。横軸はケミカルシフト値をppmで目盛っている。縦軸方向の高さ（幅があれば面積）は炭素の数を表している（しかし、 ^{13}C -NMRの特徴として、性質が異なる炭素間では炭素1個あたりのピークの高さは異なる）。なお、今回の測定方法では、1種類の炭素からは1本のピークしか生じない。以下に各ピークのケミカルシフト値について帰属結果を記す。

14ppm：末端メチルの炭素3個分。

23～34ppm：メチレンの炭素約40個分。

62ppmと70ppm：Oが結合した炭素。

62ppmはグリセロールの3個の炭素のうちの両端の2個（ $sn-1$ と3）。70ppmは中央の1個（ $sn-2$ ）。

128ppmと130ppm：二重結合をしている炭素。

128ppmは直鎖脂肪酸の二重結合をはさむ12位と13位の炭素2個分（ふたつの二重結合を持つ脂肪酸の、カルボニルから遠いほうの二重結合の両側の炭素）。130ppmは二重結合をはさむ9位と10位の2個の炭素（ひとつしか二重結合を持たない脂肪酸の分の炭素と、ふたつ二重結合をもつ脂肪酸のカルボニルに近いほうの二重結合の両側の炭素）。

二つのピークの高さが異なることから、この物質を構成している脂肪酸部には、二重結合が二つのものと一つのものの2種類が存在することが分かる。今回用いた一般的なパルスシーケンスでは、 ^{13}C を精度高く定量することは出来ないため、2種類の脂肪酸の正確な比率を計算することは困難である。し

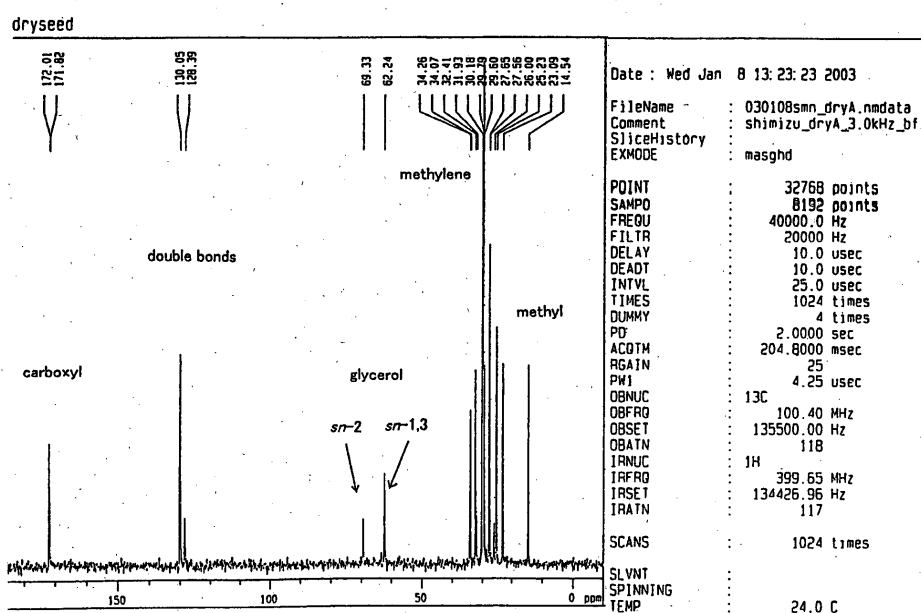


図1 オニドコロ乾燥種子（10個）の固体 ^{13}C -NMRスペクトル。各ピークの傍に帰属結果を記した。

かし、二重結合に関わる類似の二つのピークの炭素(128ppmと130ppm)はほとんど同じ程度の緩和時間を持つものと考えてピークの積分値を比較すると、二重結合1個の脂肪酸と2個の脂肪酸の含有比は、およそ1:4になると考えられる。

172ppm: エステル結合をしているカルボキシルの炭素。

この近傍の拡大描画をしたものを図2に示す。大きく二つのピークが見られる。左側の171.95ppmを中心とするピークはグリセロールの三つの炭素のうちの両側(*sn*-1と*sn*-3)に結合している脂肪酸のカルボニルの炭素のものである。右側の171.63ppmを中心とするものはグリセロールの中央の炭素(*sn*-2)に結合している脂肪酸のカルボニルのものである。これら二つのピークの相対面積はほぼ2:1である。それぞれのピークがスプリットしているが、その機構はデータベースや諸文献で前例が見つからないため今のところ不明である。脂肪酸の二重結合の数がカルボニル炭素にまで及んでケミカルシフト値を少しシフトさせているものと予想している。

以上のように、全ピークをトリアシルグリセロールのシグナルとして過不足なく帰属させることができた。また分解能が高いスペクトルであるため、微細構造をある程度論じることが可能である。

結局、今回の測定により得られた固体NMRのスペクトルから読み取れたおもなことは;

- ① 得られたすべてのシグナルがトリアシルグリセロールに帰属し、存在の可能性が考えられるテルペン類のシグナルはない。

② トリアシルグリセロールの脂肪酸部分には、二重結合を1個含むものと2個含むものとがあり、それらの含量比は 2個含む脂肪酸/1個含む脂肪酸 = 1/4 である。1/2や1/1ではないため、この種子が含むトリアシルグリセロールは複数の分子種からなる混合物であることが分かる。

③ これらの二重結合はZ (いわゆる*cis*) 体である。

④ アブラナやヒマの種子に含まれているような水酸基を結合した脂肪酸は含まれていない。

などである。これらの情報は、煩雑な実験操作なしには他のやり方からは得ることが出来ない。

比較のため、トリアシルグリセロールのひとつであるトリオレイルグリセロールの試薬 (Sigma, St. Louis, USA) のCDCl₃ (重クロロホルム) 溶液を同じ装置の通常の液体モードで測定した結果を図3に示す。使用した重クロロホルムが大きな3本のピークとして77ppm付近に観測されたほかは、微量の不純物(おそらく溶媒から)のシグナルが65ppm (ジオキサン?) と128ppm (ベンゼン?) に認められること以外は種子の固体測定のスเปクトル(図1)と極めて良く一致している。また、スペクトルの明瞭さも種子固体NMRのものが試薬のものほとんど変わりがなくとも分かる。なお、データベースとの比較による推定に加えて、本試薬試料については2-(2)-⑩に記した各種測定法を行うことにより各ピークの帰属を確認した。

(2) 培養後の固体¹³C-NMRスペクトル (12日間培養後 種子)

吸水前の乾燥状態の種子の固体NMRを測定した (図

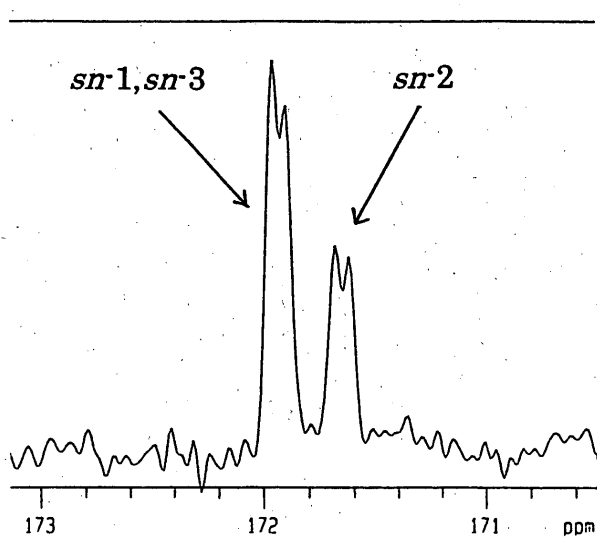


図2 カルボニル部分の拡大図 (図1とは別試料のため、ケミカルシフト値は多少異なる)。

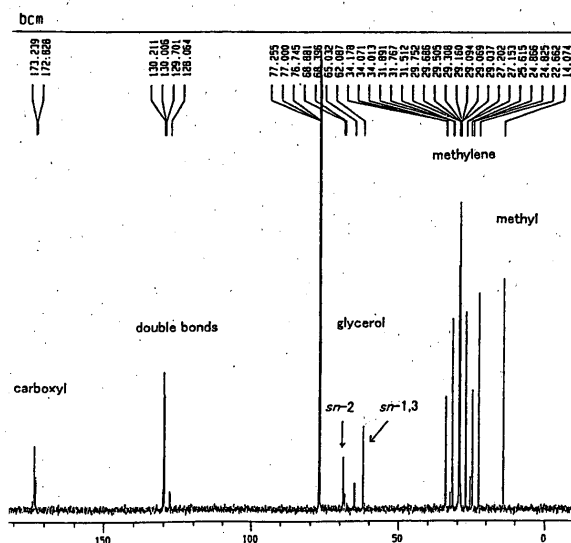


図3 市販試薬 (トリオレイルグリセロール) の重クロロホルム溶液の¹³C-NMRスペクトル。

4 A)．測定後に試料セルから種子を取り出し、ペトリ皿内の脱脂綿上で蒸留水とともに暗所20℃で12日間培養したところ、全数が通常のように発芽した。発芽した種子を試料セルに入れ、再び固体NMR測定を行った(図4 B)．培養により全体的にスペクトル強度が低くなっている。発芽に伴いトリアシルグリセロールの量が減少したためと考えられる。しかし、スペクトル強度の低下の程度は炭素の種類により異なり、カルボニルでは大きく約半分ほどまで低下しているが、グリセロール炭素(60ppm, 70ppm)と脂肪酸の二重結合領域(128~130 ppm)は8割前後が残っている。グリセロールの炭素よりも脂肪酸のメチレン基の方がおそらくより選択的に代謝されている可能性が考えられる。またここでは詳細を省くが、図3と同じ170ppm前後のカルボニル領域を拡大して描画をすると、培養後のものでは左側のほうのピークの面積が減少する程度が大きいので、グリセロールの両端の炭素に結合している脂肪酸が優先的に加水分解されている可能性が考えられる。このような点について抽出とHPLCにより探るには非常に煩雑な操作が必要であるが、固体NMRによれば容易である。

また、60ppmから75ppmにかけてブロードで弱いシグナルが生じている。これは水酸基と結合した炭素のシグナルである。発芽のプロセスの進行に伴い、糖新生反応により脂肪から変換されて生じた糖が、吸水した水に溶解したものからのシグナルであると推定できる。拡大描画をしてみると(図は省略した)二糖類は非常に少なく、単糖類が大部分であることもわかる。しかし、単糖がグルコースなのかフルクトースなのかというレベルの判定は今回の測定ではできなかった。なお、今回のスペクトルの積算回数は1024回であるが、10倍以上の積算回

数をとればS/N比が改善され、この図4 Bの糖の弱いシグナルをもっと明瞭にすることが可能になると思われる。

4. ま と め

通常のNMR装置のプロープを固体プロープに交換した、言わば簡易的な固体NMR装置によってでも、高分解能スペクトルを得られることが今回の研究により分かった。今回測定したような脂肪種子の貯蔵脂肪は、乾燥種子中でも液体の状態であるため、きれいな高分解能スペクトルが得られたものと考えている。脂肪種子中の貯蔵脂肪は生体試料の中でも固体NMRによる分析に最も適した試料であると思われる。油糧作物などの脂肪種子において、発芽と芽生えの成長時の脂肪代謝をはじめ種子成熟に伴う脂肪酸組成の変化などを知る際に、また保存した種子の品質の検定などにも今回のような簡易的なNMR装置は有効に用いることが可能であると思われる。

固体NMRによる生体試料の測定によれば他の方法によってでは得ることが困難な情報が得られる。しかし、生体試料の測定例はまだそう多くはなく、どんな状態の試料について何を目的にするかにより、独自の工夫や予備的な実験を多く要するのが現状である。今回の研究では本学設置の装置を長時間継続して使用することが出来たため、予備的な諸事項の検討を行うことが出来た。

摘 要

液体試料の測定を本来の機能とする千葉大学分析センターが保有する通常のNMR装置を用い、そのプロープを固体用に交換することにより、植物の種子をそのまま試料セルに詰めてスペクトルを得ることを試みた。いろいろな検討の結果高分解能スペクトルが得られ、種子貯蔵脂肪の化学構造、存在状態、発芽時の加水分解の状況などについての情報を得ることが出来た。ここにその測定方法とスペクトルの例を紹介する。

文 献

- [1] Forbes, J., Bowers, J., Shan, X., Moran, L., Oldfield, E. and Moscarello, M.A. (1988) Some new development in solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of lipids and biological membranes, including the effects of cholesterol in model and natural systems. *Journal of the Chemical Society, Faraday*

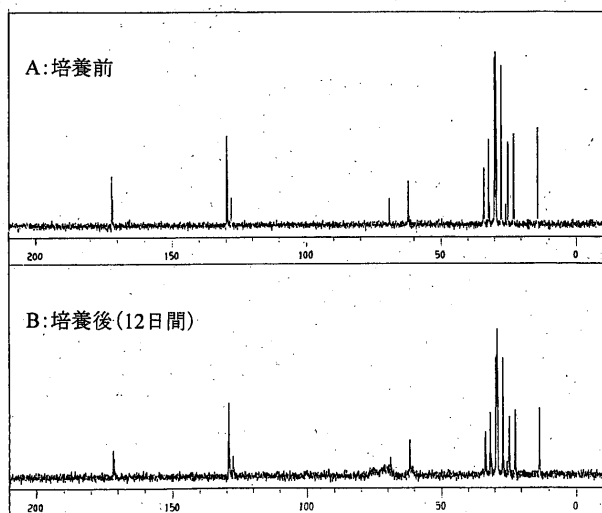


図4 オニドコロ種子(10個)の培養前(A)と培養後(B)の ^{13}C -NMRスペクトル。

- Transactions I* 84, 3821-3849.
- [2] Ishida, N., Kobayashi, T., Masuda, R., Kano, H., Yoshida, T. and Ogawa, H. (1990) Tracing metabolic changes in soybean cotyledons during germination by NMR. *Agricultural Biological Chemistry* 54, 1359-1365.
 - [3] 蒲谷明彦, 西野栄正, 岡上伸雄 (2003) 脂肪種子が貯蔵するトリアシルグリセロール分子種のHPLCによる分析法の改良. 千葉大学園芸学部学術報告57, 27-33.
 - [4] Okagami, N. and Terui, K. (1996) Differences in the rates of metabolism of various triacylglycerol during seed germination and the subsequent growth of seedlings of *Dioscorea tokoro*, a perennial herb. *Plant and Cell Physiology* 37, 273-277.
 - [5] Rutar, V., Kovac, M. and Lahajnar, G. (1989) Non destructive study of lipids in single fir seed using nuclear magnetic resonance and magic angle sample spinning. *Journal of American Oil Chemist's Society* 66, 961-965.
 - [6] Smernik, R.J. and Oades, J.M. (2002) Paramagnetic effects on solid state carbon-13 Magnetic resonance spectra of soil organic matter. *Journal of Environmental Quality* 31, 414-420.
 - [7] 寺尾武彦 (1988) 「固体高分解能NMR」化学総説No. 49 新しい磁気共鳴と化学への応用 (日本化学会編) pp. 62-79.