

# ケガニ, *Erimacrus isenbeckii* (節足動物, 甲殻類) における スフィンゴミエリンの存在

糸乗 前・木村幸史・北村孝普・北村朋典・杉田陸海

## Occurrence of Sphingomyelin in the Marine Crab, *Erimacrus isenbeckii*

Saki ITONORI, Koji KIMURA, Takayuki KITAMURA,  
Tomonori KITAMURA and Mutsumi SUGITA

### Abstract

The presence of sphingomyelin as phospholipid in lower animals is quite rare but characteristic of higher animals. This paper describes isolation and structural characterization of a sphingomyelin from the marine crab, *Erimacrus isenbeckii*. The chemical structure was completely characterized by aliphatic analyses, hydrogen fluoride degradation, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, infrared analysis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. The caramide moiety of the sphingomyelin consisted primarily of C<sub>18:0</sub>, C<sub>20:0</sub>, C<sub>22:0</sub> and C<sub>22:1</sub> fatty acids, and dihydroxy-C<sub>14:1</sub>, -C<sub>14:0</sub> and -C<sub>16:1</sub> sphingoids.

Keywords: sphingomyelin, sphingolipid, crab sphingolipid (*Erimacrus isenbeckii*)

### 1. 緒言

スフィンゴミエリン(セラミドホスホコリン)は、細胞膜における免疫応答やさまざまなシグナリングの中継点として働いているマイクロドメインあるいはラフトと呼ばれるクラスターの構成成分であるとともに、セラミドやスフィンゴシンなどの細胞内メディエーターの前駆体として極めて重要なスフィンゴリン脂質である(1)。このスフィンゴミエリンは高等動物には普遍的に存在しているが、下等動物では分布域が限られているようであり、今までにそのものは

きりと単離して同定を行った報告は、我々の知る限りでは2例、軟体動物の貝類の一部(2)および袋形動物の線虫類(3)のみである。そのような中で、最近、スフィンゴミエリンに極めて特異的に結合するミミズの体腔液由来のライセニンを用いて下等動物におけるスフィンゴミエリンの存否を調べた結果が報告されている(4)。

本論文では、節足動物甲殻類のカニ類を精査して、初めてその存在を明確にすることができたスフィンゴミエリンの化学構造について述べる。

### 2. 実験

#### 2.1 ケガニよりスフィンゴミエリン画分の調製

業者より購入した9個体(1個の平均湿重量360g)の生きたケガニ, *Erimacrus isenbeckii*よ

滋賀大学教育学部化学教室(Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University, 2-5-1 Hiratsu, Otsu, Shiga 520-0862)

連絡者: 糸乗前(Corresponding author: Sakitonori, E-mail: itonori@sue.shiga-u.ac.jp)

り甲羅と食餌物の混入を避けるために消化器官を除外した全ての肉質部を脂質抽出試料とした。ミキサーで細断した試料にアセトンを加えて脱水し、風乾した後、5倍容のクロロホルム-メタノール、2:1(以下、容比を示す)で2回、1:1で1回抽出を行った。全ての抽出液を合し、溶媒を減圧留去して得られる残渣からアシル型およびアルケニル型グリセロ脂質を分解除去するために弱アルカリけん化、続いて弱酸性処理を施した後、アセトンで数回洗浄し、アセトン不溶性物質(粗スフィンゴ脂質画分)を得た。このものを、DEAE-およびQAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーで、いずれも溶出溶媒としてクロロホルム-メタノール-水、30:60:8および0.45M 酢酸アンモニウム(メタノール溶液)を用いて分画した(5)。これらのクロマトグラフィーでいずれも前者の溶媒で溶出された非吸着性の画分をアセチル化してスフィンゴミエリン画分を調製した(6)。

## 2.2 スフィンゴミエリンの単離および精製

フロリシルカラムクロマトグラフィーによる分画で得たスフィンゴミエリン画分を中性アルミナ(ICN Alumina N-Super I, ICN Biomedicals, ドイツ)カラムクロマトグラフィー(1×5 cm)によってクロロホルム-メタノールの段階的溶出法で分画した(7)。カラムからの各溶出画分は濃縮後、薄層クロマトグラフィー(TLC, 展開剤: クロロホルム-メタノール-水, 60:40:10; 検出試薬: Dragendorff試薬(8)およびDittmer-Lester試薬(9))で確認した。最終的な精製は, Iatrobeads 6RS-8010カラム(4.6×250 mm, ヤトロン社)を装着した高速液体クロマトグラフィー(HPLC, LC-10A, 島津製作所)によって行った。カラムからの溶出溶媒には, クロロホルム-メタノール-水系, 60:25:3を用い, カラムオープン温度は40°C, 溶出速度は1 mL/minに設定して, 0.2mLずつ分取した。溶出液中のスフィンゴミエリンの存否については上述のTLC法に準じた。

## 2.3 フッ化水素酸分解および分解生成物の精製

2mgの試料をプラスチック製の試験管中で, 0.5mLのジメチルスルホキシドに溶解した後,

3.5mLの47%フッ化水素酸を加え, 20°Cで20時間反応させた。反応後, 直ちに流水透析し, その膜内液を凍結乾燥して得られた物質をIatrobeads 6RS-8060カラムクロマトグラフィー(1×10cm)で精製した(10)。カラムからの溶出には, クロロホルム-メタノール, 95:5を用い, 溶出液を1 mLずつ分取してTLC(展開剤: クロロホルム-メタノール, 92:8; 検出試薬: 50%硫酸およびヨウ素蒸気)で検した。

## 2.4 塩酸分解および分解生成物の分析

### 2.4.1 塩酸(6 M)分解

1~2 mgの試料に, 0.2mLの6M 塩酸を加えて, 100°Cで12時間加熱した。反応液に等量のヘキサンを加えて遊離の脂肪酸を抽出除去した後, 窒素気流下で可及的に脱酸乾固した。残渣に少量の水を加えて溶解し, TLC分析を行った(展開剤: 1-ブタノール-酢酸-水, 40:60:10; 検出試薬: Dragendorff試薬およびHanes-Isherwood試薬(11))。

### 2.4.2 ブタノール-塩酸分解

1~2 mgの試料に, 0.5 mL のブタノール-6 M 塩酸, 1:1混合溶液を加えて, 100°Cで1時間加熱した。反応後, 等量の水を加えて混合し, 遠心分離して得られる上層のブタノール液を濃縮乾固した。残渣をアセトンで洗浄し, アセトン不溶物とした後, 窒素気流中で乾燥した(12)。得られた乾燥物はIatrobeadsカラムクロマトグラフィーで精製した。カラムからの溶出にはクロロホルム-メタノール, 8:2, 7:3および6:4を用い, 溶出液を濃縮後, TLC(展開剤: クロロホルム-メタノール-酢酸-水, 60:40:10; 検出試薬: Dragendorff試薬, Dittmer-Lester試薬およびNinhydrin試薬)で検した。

## 2.5 酵素分解および分解生成物の分析

### 2.5.1 ホスホリパーゼC(EC 3.1.4.3)による分解

1mgの試料に0.2mLの50mM Tris-塩酸緩衝液(pH7.5), 0.1mLの20mM CaCl<sub>2</sub> および0.2 mLのエチルエーテルを加えて振盪し, 0.1mLの同緩衝液で希釈した酵素液(*Clostridium perfringens*由来, 酵素タンパクとして500 μg

を含む, Sigma社製)を添加して, 37°Cで24時間インキュベートした(13,14)。反応終了後, 加熱してエーテルを除去し, 2mLのクロロホルム-メタノール, 2:1を加えて混合し, 2層に分配した。上層および下層をそれぞれ濃縮後, TLCで検した。

### 2.5.2 スフィンゴミエリナーゼ(EC 3.1.4.12)による分解

1 mgの試料にそれぞれ0.1mLの200mM Borax-塩酸緩衝液(pH 7.0), 1%デオキシコール酸ナトリウムおよび10mM MgCl<sub>2</sub>を加えて振盪し, 0.1mLの同緩衝液で希釈した酵素液(*Bacillus cereus*由来, 酵素タンパクとして500 μgを含む, Sigma社製)を添加して, 37°Cで20時間インキュベートした(15,16)。反応終了後の操作は, 前述のホスホリパーゼCによる分解に準じた。

### 2.6 脂肪酸成分および長鎖塩基成分の分析

著者らによって報告されている電磁波分解法の改良法によった(詳細については別報する)(17,18)。すなわち, 50~100 μgの試料をスクリーキャップ付き丸底試験管(16×125mm)にとり, 十分乾燥させた後, 0.5mLの0.1M NaOH(メタノール溶液)を加え, 電子レンジ(東芝 ER-VS1)出力, レンジ強500Wで2分間加熱した。加熱後, 反応管中に霧状の白煙および反応液の白濁を確認してから十分に冷却した。次いで, 同反応管に0.3mLの2M 塩酸(メタノール-水, 7.5:1で濃塩酸を希釈したもの)を加え, さらに同電子レンジで2分間加熱した。反応管を十分に冷却した後, 生成した脂肪酸メチルエステルを0.5mLのヘキサンで3回抽出し, ガスクロマトグラフィー(GC)を行った。分析はすべてShimadzu GC-18Aで行い, キャピラリーカラムはShimadzu HiCap-CBP5(0.22mm×25 m)を使用した。分析温度は170°C→230°C(4°C/min)に設定し, 脂肪酸の同定は標準脂肪酸メチルエステルの相対保持時間との比較およびGC-MS分析によるマススペクトルの解析から行った。一方, 長鎖塩基成分の分析は脂肪酸メチルエステルを抽出した残部を用いて行った。すなわち, 脂肪酸メチルエステルを除いた下層のメタノール-水層を窒素気流下で濃縮乾固し

た後, 0.6mLの0.1M NaOH-メタノール, 3:4および0.72 mLのクロロホルムを加えて攪拌した。遠心分離で2層に分離し, 下層のクロロホルム層をさらに0.4mLの水-メタノール, 1:1によって洗浄した後, 窒素気流下で濃縮乾固して長鎖塩基画分を調製した。得られた画分をO-トリメチルシリル誘導体としてGCおよびGC-MSによる分析に供した。分析温度は210°C→230°C(2°C/min)に設定した。

### 2.7 赤外線吸収スペクトル分析(IR)

臭化カリウム錠剤法により, Shimadzu IR-400赤外分光光度計を用いて測定した。

### 2.8 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)

1 μLのクロロホルム-メタノール, 2:1に溶解した100pmol程度の試料をサンプルスライド上に添加し, 室温で分析装置付属の乾燥室で乾固させた後, 乾固物上にマトリックスとして1 μLの7-amino-4-methylcoumarin溶液(Coumarin 120, 50%エタノール水溶液で10 mg/mLの濃度とし, 使用時まで4°Cで暗所保存)を加え, 再度, 乾固したものを分析に処した。分析装置はShimadzu/KRATOS KOMPACT MALDI Iを, データ処理および装置のコントロールにはSun Microsystems社のSPARC stationを, スペクトルの解析にはKOMPACT (UNIX software)を用いた。イオン源として窒素レーザー(レーザー光波長, 337 nm; 3-nanosecond-wide pulses/sec)を使用し, positive ion linear mode測定を行った。質量校正はキンバエ幼虫の糖脂質によった(19)。

## 3. 結果および考察

### 3.1 ケガニのスフィンゴ脂質とスフィンゴミエリン

ケガニの粗スフィンゴ脂質画分をイオン交換セファデックスで分画した際のQAE-セファデックスへの吸着性画分からは新規ホスホセレブロシドとして, 4'-O-(2-aminoethyl phosphonyl)Glc, β 1-1ceramideおよび4'-O-(N-methyl-2-aminoethyl phosphonyl)Glc, β 1-1

ceramideの2種類を、既に報告している(5)。一方、非吸着性画分には、現在、分析中であるが、中性糖脂質が混在していることより、これらと区別してスフィンゴミエリンを含むリン反応陽性物質(両性イオン型脂質)画分を得るには、非吸着性画分のアセチル化物をフロリシルカラムクロマトグラフィーによって分画する方法を適用することが最適であると考えられた。すなわち、カラムからの溶出溶媒にジクロロエタン-ヘキサン, 4:1(v/v); ジクロロエタン; ジクロロエタン-アセトン, 1:1; ジクロロエタン-メタノール, 9:1および3:1; ジクロロエタン-メタノール-水, 2:8:1; クロロホルム-メタノール-水, 6:4:1を順次用いた時、最後の溶出画分にスフィンゴミエリンを含むリン反応陽性物質が検出された。この画分を脱アセチル化した後(収量, 133mg)のTLC結果をFig. 1(lane 1)に示したが、主に2個のスポットが観察された。これらはいずれも、Dittmer-Lester試薬およびDragendorff試薬に陽性を示すことから分子内にリン残基とコリン残基の両方を有することがわかった。次にこの画分を中性アルミナを用いてクロロホルム-メタノールの混合溶媒で段階的溶出法によって分画して、PL-1およびPL-2(仮称)の2画分をそれぞれ得た。これらの2画分の最終的な精製はHPLCによって行った(収量: PL-1, 2.8mg; PL-2, 30.3mg)(Fig. 1)。両者のIRスペクトルを測定したところ、PL-2からは標準のスフィンゴミエリンのスペクトルに酷似するように $960\text{cm}^{-1}$ にコリン残基に起因する強い吸収が、さらに $1220\text{cm}^{-1}$ にリン酸残基の-OH基、 $1650$ および $1550\text{cm}^{-1}$ にアミド結合I, IIに由来する吸収が認められ、スフィンゴミエリンであることが推測できた。一方、PL-1については、そのIRスペクトルからはスフィンゴ脂質に特徴的なアミド結合に由来する吸収が全く認められず、グリセリルエーテル型脂質のスペクトル(20)に極めて類似することからグリセリルエーテル型ホスホコリンであると判断して以後の分析は行わなかった。

### 3.2 セラミド、ホスホコリンおよびスフィンゴホスホコリンの同定

#### 3.2.1 フッ化水素酸による分解生成物からのセラミドの同定

PL-2をフッ化水素酸で処理して得られたクロロホルム可溶性の成績体を、Iatrobeadsカラ

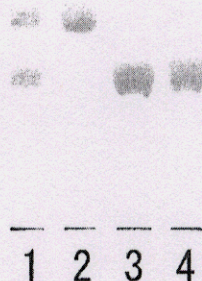


Fig. 1 Thin-Layer Chromatogram of the Purified Sphingomyelin obtained from the Marine Crab, *Erimacrus isenbeckii*.

Lane 1, sphingomyelin fraction eluted with chloroform-methanol-water, 6:4:1 (v/v) using Florisil column chromatography; lane 2, purified amphoteric phospholipid (PL-1); lane 3, purified amphoteric phospholipid (PL-2); lane 4, authentic sphingomyelin from bovine brain. The separation was performed on a precoated silica gel 60 plate developed in chloroform-methanol-water, 60:40:10 (v/v), and the spots were visualized with Dittmer-Lester reagent.

ムクロマトグラフィーで精製した後、IRおよびTLC分析を行った。そのIRスペクトルは化学合成した標準セラミド(*N*-palmitoylsphingosine)(21)のそれに吸収端が一致することよりセラミドであることを確認した。一方、TLC分析においてもPL-2から得た物質の移動度は標準のセラミドのそれと一致した。

#### 3.2.2 塩酸による分解生成物からのホスホコリンの同定

PL-2を6M 塩酸、 $100^{\circ}\text{C}$ で12時間加水分解し、その分解成績体のTLC分析よりホスホコリンに

相当するスポットを得た。しかし、本分解条件下ではコリンの遊離は全く認められなかった。

### 3.2.3 ブタノール-塩酸による分解生成物からのスフィンゴホスホコリンの同定

PL-2をブタノール-6M 塩酸, 1:1混合溶液で加水分解してスフィンゴホスホコリンを得た(TLC分析で標準として用いたスフィンゴホスホコリンは牛脳のスフィンゴミエリンより調製した)。

### 3.2.4 酵素による分解生成物からのセラミドおよびホスホコリンの同定

ホスホリパーゼC(EC 3.1.4.3)およびスフィンゴミエリナーゼ(EC 3.1.4.12)によるPL-2の加水分解成績体からはいずれもセラミドとホスホコリンの両方を得た。なお, セラミドについてはTLC上の移動度は, フッ化水素酸処理で得たセラミドのそれと同じであった。

### 3.3 スフィンゴミエリンの脂肪酸および長鎖塩基成分

PL-2のセラミド成分の同定は, 脂肪酸および長鎖塩基ともにGCとGC-MS分析によった。それらの結果をTable 1に示したが, 脂肪酸組成は全脂肪酸の78%を炭素数18, 20および22酸が占め, さらに炭素数22酸についてはそのうちの55%がモノ不飽和酸であった。一方, 長鎖塩基組成は, 炭素数が14および16のジヒドロキシスフィンゴイドで, スフィンゲニン(80%)とスフィンガニン(20%)より成っていた。炭素数が14および16のように比較的短鎖の長鎖塩基は節足動物の昆虫類(22-27)や甲殻類(28,29)に特徴的に存在するようであるが, 本動物も甲殻類に属することからその特徴を示しているものと思われる。また, このセラミド組成は, 既に報告している同動物のホスホセレブロシド(5)のそれらにも酷似しており, 同一のセラミドプールから生合成されていることが示唆された。

### 3.4 スフィンゴミエリンのMALDI-TOF MS分析

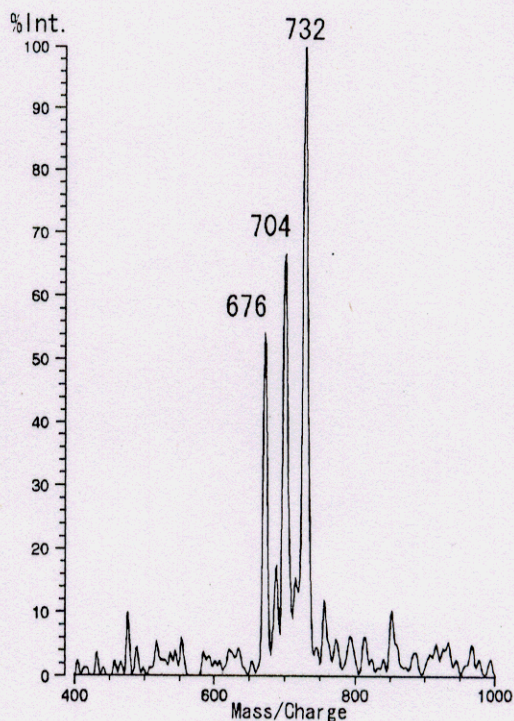
PL-2の陽イオンMALDI-TOF MSスペクトルをFig. 2に示したが, セラミドの相違に起因

**Table 1** Chemical Composition of the Ceramide Portion of PL-2

Fatty acid	(%)	Sphingoid**	(%)
18:0	16.1	d14:1	71.6
br* 19:0	1.1	d14:0	19.4
19:0	2.2	d16:1	9.0
br 20:0	1.1		
20:1	2.3		
20:0	17.6		
21:0	2.9		
22:1	22.4		
22:0	18.5		
23:1	2.5		
23:0	1.5		
24:1	9.8		
24:0	2.0		

\*br, branch

\*\*d, dihydroxysphingoid



**Fig. 2** Positive-Mode MALDI-TOF MS Spectrum of PL-2

すると考えられる主分子種  $[M+H]^+$ :  $m/z$  676 (18:0脂肪酸-d14:1長鎖塩基);  $m/z$  704 (20:0-d14:1);  $m/z$  730, 732 (22:1, 22:0-d14:1)の存在が観察できた。これらの結果はTable 1に示したセラミドの構成成分比にも合致していた。

### 3.5 動物界におけるスフィンゴミエリンの分布

高等動物のスフィンゴリン脂質がスフィンゴミエリンであるのに対して、下等動物、特に前口動物においては、スフィンゴミエリンを含有しているものは極めて少なくスフィンゴミエリンと相補的とも思えるように、セラミドホスホエタノールアミン(22, 30-32)やセラミドアミノエチルホスホン酸(2-アミノエチルホスホン酸セラミド)(33)が存在している。今から35年前にHoriらは、哺乳類(*Homo sapiens* ヒト, *Bos Taurus* ウシ, *Rattus norvegicus* ラット), 魚類(*Anaguilla japonica* ウナギ), 昆虫類(*Oxya vicina* イナゴ), 甲殻類(*Cambarus clarkii* ザリガニ, *Leander paucidens* エビ), 頭足類(*Polypus vulgaris* タコ), 斧足類(二枚貝類(*Pinctada martensii* アコヤガイ, *Corbicula sandai* セタシジミ, *Anodonta lauta* ドブガイ), 腹足類(巻貝類(*Cellana eucosmia* ベッコウカサガイ, *Haliotis gurneri* アワビ, *Monodonta labio* イシダタミ, *Batillaria multiformis* ウミニナ, *Heterogen longispira* ナガタニシ, *Semisulcospira bensonii* カワニナ, *Purpura bronni* テツボラガイ, *Pugilina ternatana*), 貧毛類(*Pheretima communissima* ミミズ)および線虫類(*Ascaris lumbricoides* カイチチュウ)におけるスフィンゴリン脂質成分を定量的に調べ、前口動物においては、イナゴ、ザリガニ、エビ、タコ、アコヤガイ、イシダタミ、ナガタニシ、テツボラガイ、ミミズおよびカイチチュウにスフィンゴミエリンの存在する可能性を予測している(34)。その後、杉田らによって1968年にアコヤガイ(2)、1996年にブタカイチュウ(3)からスフィンゴミエリンが単離、精製され、構造が決定されている。また、2001年の脂質生化学研究会(帯広)で会津らはスフィンゴミエリンを特異的に認識する毒素(ミミズ, *Eisenia foetida*の体腔液に含まれる溶血、血球

凝集、抗菌、細胞毒性などの生理活性を有する物質で、1997年にSekizawaらによってラット血管平滑筋を収縮させる新規蛋白質、ライセニン(Lysenin)として精製された(35-37))とその抗体を用いて動物におけるスフィンゴミエリンの存否を調べた結果を報告した(4)。それによると『後口動物においては、哺乳動物から尾索類(ホヤ)まで、調べた全ての動物群でスフィンゴミエリンが検出されたが、棘皮動物では検出されなかった。前口動物では、節足動物の全ての綱で認められたが、ショウジョバエでは例外的に検出されなかった。より下等な環形動物、軟体動物および扁形動物(プラナリヤ)には無いが、予想に反し従来の系統樹ではこの近傍に位置付けられている線形動物のC. エレガンスにスフィンゴミエリンが検出された』と述べている。キイロショウジョバエにスフィンゴミエリンが存在しないことについては、著者らも同じ双翅目のキンバエ幼虫, *Lucilia caesar*のスフィンゴ脂質を調べてきているが、主なスフィンゴリン脂質はセラミドホスホエタノールアミンで、前述したようにスフィンゴミエリンと相補的な関係にあるのではないかと考えている(38)。また、C. エレガンスが、我々が既にスフィンゴミエリンの単離、精製を報告しているブタカイチュウと同属(袋形動物、線虫類)であることより、本動物種には普遍的にスフィンゴミエリンが存在するのであろうと推論できる。

今のところスフィンゴミエリンが単離、精製されその構造が決定されている前口動物は、アコヤガイ*P. martensii*(軟体動物)(2)、ブタカイチュウ*Ascaris suum*(袋形動物)(3)およびケガニ*E. isenbeckii*(節足動物)の3種であるが、今後、さらに分布域が拡大することも考えられる。

### 謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金(若手研究(B)14780472)および平成14年度教育改善推進費(学長裁量経費)(若手研究者)によって行った。ここに記して謝意を表す。

## 文 献

1. 五十嵐靖之, 平林義雄, 小堤保則, 鈴木明身編(2002) *蛋白質核酸酵素*, **47**, 共立出版.
2. 杉田陸海, 荒川郁子, 板坂修, 堀太郎(1968) *生化学*, **40**, 254-256.
3. 杉田陸海, 栗本綾子, J.T. Dulaney, 鈴木實, 鈴木明身, 太田聡(1996) *日本油化学会誌*, **45**, 1261-1266.
4. 会津雅子, 小林英司, 尾村綾子, 梅田真郷(2001) *脂質生化学研究*, **43**, 217-220.
5. K.Kimura, S.Itonori, N.Hada, O.Itasaka, J.T.Dulaney, T.Takeda, M.Sugita (2002) *J.Oleo Sci.*, **51**, 83-91.
6. T. Saito, S. Hakomori (1971) *J. Lipid Res.*, **12**, 257-259.
7. 永井克孝, 杉田陸海, 岩森正男(1983) *実験生物学講座(4) 生化学の実験法* (金谷晴夫, 藤田善彦編), pp.327-328, 丸善株式会社.
8. E. Stahl, P.J.Schorn (1969) *Thin-Layer Chromatography*, pp.873 (Reagent No. 97), Springer-Verlag, New York.
9. J. C. Dittmer, R. L. Lester (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127.
10. M. Sugita, S. Miwa, K. Aoki, J. T. Dulaney, S. Ichikawa, F. Inagaki, M. Suzuki (2000) *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **49**, 33-43.
11. C. S. Hanes, F. A. Isherwood (1949) *Nature*, **164**, 1107-1112.
12. 武富保, 原厚(1991) *新生化学実験講座(4) 脂質(II) リン脂質* (日本生化学会編), pp. 198, 東京化学同人.
13. 荒川郁子, 杉田陸海, 堀太郎(1968) *生化学*, **40**, 154-157.
14. T. Hori, I. Arakawa, M. Sugita, O. Itasaka (1968) *J. Biochem.*, **64**, 533-536.
15. H. Ikezawa, M. Mori, T. Ohyabu, R. Taguchi (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 247-256.
16. 小泉恵子(1991) *新生化学実験講座(4) 脂質(II) リン脂質* (日本製化学会編), pp.438, 東京化学同人.
17. 高橋将人, 青木一弘, 杉田陸海(1999) *滋賀大学教育学部紀要*, **49**, 1-7.
18. 高橋将人(2002) *電磁波による脂質分解法の開発および分解生成物の検証* (滋賀大学大学院学位論文).
19. 青木一弘, 濱名秀樹, 山岡秀信, 杉田陸海(1998) *滋賀大学教育学部紀要*, **48**, 11-17.
20. M. Kates (1972) *Ether Lipids* (F. Snyder ed.), pp.357-364, Academic Press, New York.
21. 太田聡, 杉田陸海(1996) *滋賀大学教育学部紀要*, **46**, 75-79.
22. T.Hori, O.Itasaka, M.Sugita, I.Arakawa (1968) *J. Biochem.*, **64**, 123-124.
23. L. L. Bieber, J. D. O'Conner, C. C. Sweeley (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 157-159.
24. J. D. O'Conner, A. J. Polito, R. E. Monroe, C. C. Sweeley, L. L. Bieber (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 195-197.
25. M.Sugita, S.Itonori, F.Inagaki, T.Hori (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 15028-15033.
26. M.Sugita, F.Inagaki, H.Naito, T.Hori (1990) *J.Biochem.*, **107**, 899-903.
27. S. Itonori, M. Nishizawa, M. Suzuki, F. Inagaki, T. Hori, M. Sugita (1991) *J. Biochem.*, **110**, 479-485.
28. K. Shimomura, S. Hanjura, P. F. Ki, Y. Kishimoto (1983) *Science*, **220**, 1392-1393.
29. S. Itonori, K. Kamemura, K. Narushima, N. Sonku, O. Itasaka, T. Hori, M. Sugita (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1081**, 321-327.
30. T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, M. Akai (1965) *Jap. J. Exp. Med.*, **35**, 81-84.
31. 堀太郎, 早田知恵子, 仲谷文貴, 吉田利男, 杉田陸海(1993) *滋賀文化短期大学紀要*, **3**, 71-78.
32. 堀太郎, 坂田綾子, 青木一弘, 林陽, J. T. Dulaney, 杉田陸海(1995) *滋賀大学教育学部紀要*, **45**, 31-42.
33. T. Hori, M. Horiguchi, A. Hayashi eds.

- (1984) *Biochemistry of Natural C-P Compounds*, Maruzen Ltd., Kyoto.
34. T. Hori, O. Itasaka, M. Sugita, I. Arakawa (1967) *Mem. of the Faculty of Ed. Shiga Univ.*, **17**, 23-26.
  35. Y. Sekizawa, K. Hagiwara, T. Nakajima, H. Kobayashi (1996) *Biomed. Res.*, **17**, 197-203.
  36. Y. Sekizawa, T. Kubo, H. Kobayashi, T. Nakajima, S. Natori (1997) *Gene*, **191**, 97-102.
  37. A. Yamaji, Y. Sekizawa, K. Emoto, H. Sakuraba, K. Inoue, H. Kobayashi, M. Umeda (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5300-5306.
  38. T. Hori, O. Itasaka, M. Sugita, I. Arakawa (1968) *J. Biochem.*, **64**, 123-124.