

アコヤガイ, *Pinctada martensii*
スフィンゴミエリンの長鎖塩基*糸乗 前¹, 北村朋典¹, 田中理恵子¹, 宮垣紀子¹, 齋藤洋昭², 杉田陸海^{1**}Long Chain Bases in Sphingomyelin of the Pearl Oyster,
Pinctada martensii *Saki ITONORI¹, Tomonori KITAMURA¹, Rieko TANAKA¹,
Noriko MIYAGAKI¹, Hiroaki SAITO² and Mutsumi SUGITA^{1**}

Abstract

Long chain bases (LCB) of the sphingomyelin from the pearl oyster, *Pinctada martensii* were composed of sphingosines (hexadeca-4-sphingenine, 12.9% of total LCB and octadeca-4-sphingenine, 48.9%), sphinga-4,8-dienine (31.2%) and sphinga-4,8,10- trienine (7.0%). The numbers of carbons and double bonds of LCB were confirmed by gas chromatograph-mass spectrometry as their trimethylsilyl ether derivatives. Double bond positions in the aliphatic chains were also confirmed by gas chromatographic and gas chromatograph-mass spectrometric identifications of the fatty acid products after periodate-permanganate oxidation of the ceramides derived from the sphingomyelin by hydrogen fluoride degradation.

Keywords: long chain base, sphingomyelin, pearl oyster (*Pinctada martensii*)

1. 緒 言

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い。今までにスフィンゴミエリンが単離, 精製されている動物は, 1968 年に軟体動物のアコヤガイ, *P. martensii* (1), 1996 年に袋形動物のブタカイチュウ,

Ascaris suum (2), 2002 年に節足動物のケガニ *Erimacrus isenbeckii* (3) のわずか 3 種にすぎない。しかしながら, 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おり (4), 今後, 更に多くの動物種から単離, 精製され, その分布域の広がることが予想される。

* 本研究の一部は第 43 回日本油化学会年会 (2004 年 11 月 1,2 日 大阪) で発表。

¹ 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),

² 水産総合研究センター, 中央水産研究所 (National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, 2-12-4, Fuku-ura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-8648)

** 連絡者: 杉田陸海 (Corresponding author, Mutsumi Sugita; E-mail, sugita@sue.shiga-u.ac.jp)
(2004 年 9 月 28 日受理)

ところで、今から 36 年前にその存在が見出されたアコヤガイのスフィンゴミエリンについては、当時の報文の総括に、「アコヤガイのスフィンゴ脂質画分よりケイ酸カラムクロマトグラム法を用いてスフィンゴミエリンを単離した。脂肪酸成分は主にパルミチン酸、マーガリン酸、ステアリン酸から構成されているが、マーガリン酸を多量に含有することは高等動物のそれらに比して著しい特色を与える。」と、記されており、マーガリン酸メチルエステルのマススペクトルが示されている。

本報においては、現在、当教室で確立している下等動物の複合脂質の分離・精製方法に準じたアコヤガイからのスフィンゴミエリンの単離、その構成脂肪酸組成の再確認と、今回、明らかにすることができた長鎖塩基成分について述べる。

2. 実 験

2.1 アコヤガイ貝肉部よりスフィンゴミエリンの単離および精製

アコヤガイ 222 個体 (約 6.7kg) の乾燥貝肉 (約 350g) から 5 倍容のクロロホルム-メタノールの混合溶媒、2:1 (以下、容比を示す) で 2 回、1:1 で 1 回抽出を行い粗複合脂質約 42g を得た。次いでアシル型およびアルケニル型グリセロ脂質を可及的に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、4.0g の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、QAE-セファデックスイオン交換カラムクロマトグラフィーによって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 0.5 M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を用いて分画した (5)。このクロマトグラフィーにおいて、前者の溶媒で溶出された非吸着性画分 (2.0g) 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で分画した後、脱アセチル化して粗スフィンゴミエリン画分 (1.3g) を調製した (6)。次いで、その粗スフィンゴミエリン画分のうちの 250mg をケイ酸 (イアトロビーズ, 6RS-8060, ヤترون社) カラムクロマトグラフィー (2 × 60cm) によるクロロホルム-メタノール-水 (60:40:10, 800mL) の単一

溶出で分画、精製した。カラムからの溶出速度を 1mL/min に保って溶出し、10mL ずつ分取して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) でリン検出試薬の Dittmer-Lester 試薬 (7) に陽性を示す画分を分画した。

2.2 フッ化水素酸分解および分解生成物の精製

2-5mg の試料をプラスチック製の試験管中で、0.5 mL のジメチルスルホキシドに溶解した後、3.5 mL の 47% フッ化水素酸を加え、20℃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イアトロビーズ, 6RS-8060 カラムクロマトグラフィー (1 × 10 cm) で精製した (8)。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。

2.3 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 (9,10)。すなわち、300 μg の試料をスクリュウキャップ付き丸底試験管 (16 × 125 mm) にとり、十分乾燥させた後、0.5 mL の 0.1 M NaOH (メタノール溶液) を加え、電子レンジの出力 500W (レンジ強) 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 0.3 mL の 2 M HCl (メタノール溶液) 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 0.5 mL のヘキサンで 3 回抽出し、ガスクロマトグラフィー (GC) および GC-MS 分析を行った。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、0.6 mL の 0.1 M 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 0.4 mL 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 (TMS) 誘導体として GC および GC-MS による分析に供した。GC 分析にはすべて Shimadzu GC-18A を使用し、分析カラムは 0.22 mm x 25 m の無極性 5% フェニルメチルシリコン化学結合型 (0.25 μ m 膜厚) シリカキャピラリー (Shimadzu HiCap- CBP5) を用いた。分析温度は、脂肪酸メチルエステル分析: 170 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C /min), 長鎖塩基の TMS- 誘導体分析: 210 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C /min) に設定した。GC-MS 分析は Shimadzu GCMS-QP 5050 ガスクロマトグラフ - 質量分析計により、次の条件下で分析した。分析カラム: Shimadzu HiCap-CBP 5; カラム温度: 80 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 160 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C /min) \rightarrow 260 $^{\circ}$ C (6 $^{\circ}$ C /min) に設定; インターフェース温度: 250 $^{\circ}$ C; ヘリウム圧力: 100kPa; スプリットレス時間: 3.5min; イオン化電圧: 70eV; イオン化電流: 60 μ A。脂肪酸および長鎖塩基の同定はそれぞれ標準脂肪酸メチルエステルと標準スフィンゴシン TMS- 誘導体の相対保持時間との比較およびマススペクトルの解析から行った。

2.4 スフィンゴミエリンの水素による還元および還元スフィンゴミエリンからの長鎖塩基成分の調製

約 1mg のスフィンゴミエリンを 2mL のクロロホルム-メタノール、2:1 に溶解し、白金黒を触媒として、水素ガスを通じて攪拌しながら水素添加を行った (11-13)。反応終了後、遠心分離して触媒を除去し、溶媒を留去して得た残渣から 2.3 で述べた方法により長鎖塩基成分を調製し、GC および GC-MS による分析を行った。

2.5 セラミドの過ヨウ素酸 - 過マンガン酸々化

スクリュウキャップ付き丸底試験管に、2.2 で得た約 1-2mg の精製セラミドと 0.4mL の tert- ブタノールを入れて、3 分間の超音波照射で溶解した後、それに 1.2 mL の 0.02M Na₂CO₃ 水溶液、0.54mL の酸化剤 (10mg の

NaIO₄ と 0.8mg の KMnO₄ を含む) および 0.34mL の水を加えて室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、KMnO₄ の赤紫色が消失するまで粉末の NaHSO₄ を加え過剰の酸化剤を分解し、次いで、反応溶液に 6M HCl を 1, 2 滴加えて酸性とした (14,15)。二重結合のところで開裂して生成した短鎖脂肪酸を 0.5mL の n-hexane で抽出し、2.3 で述べた方法によってメチルエステル化後、GC および GC-MS による分析を行った。なお、分析対象が短鎖脂肪酸のメチルエステルであることより、GC 分析時における温度プログラムを 100 $^{\circ}$ C \rightarrow 116 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C /min) \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C /min) に設定した。

2.6 赤外線吸収スペクトル分析 (IR)

島津フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400S を用いて測定した。

3. 結果および考察

3.1 アコヤガイのスフィンゴ脂質とスフィンゴミエリン

アコヤガイの粗スフィンゴ脂質画分 (4.0g) 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 (1.9g) からはセラミドアミノエチルホスホン酸を、既に報告している (16)。一方、非吸着性画分 (2.0g) には、現在、分析中であるが、セレブロシド様糖脂質を含む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; 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、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、後 3 者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を検出した。これらの 3 画分をそれぞれ脱アセチル化した後に行った TLC 分析結果を踏まえて全てを合した (収量: 1.3g)。

Fig. 1 に示すように、主に 3 種のスポット (TLC 上での移動度の大きい順に、PL-1, PL-2 および PL-3 と仮称) が認められた。PL-1, PL-2 および PL-3 のいずれもリン残基検出試薬である Dittmer-Lester 試薬に陽性を示したが、PL-1 だけがコリン残基の特異的検出試薬である Dragendorff 試薬 (17) に陰性であった。このことから PL-2 および PL-3 は分子内にリン残基とコリン残基の両方を有していることがわかった。次に、この画分の 250mg を用いてケイ酸カラムクロマトグラフィーによるクロロホルム-メタノール-水系の単一溶媒溶出で分画して、PL-1 (収量: 8.8 mg), PL-2 (125mg) および PL-3 (8.6mg) をそれぞれ得た (回収率: 57%) (Fig. 1)。これらの IR スペクトルを測定したところ、PL-1 のスペクトルは、スフィンゴ脂質に特徴的なアミド結合に由来する吸収 (1650 および 1550 cm^{-1}) が認められず、グリセリルエーテル型脂質のスペクトル (18) に近似した。一方、PL-2 および PL-3 からは標準の牛脳スフィンゴミエリンのスペクトルに酷似するように 960 cm^{-1} にコリン残基に起因する強い吸収が、さらに 1220 cm^{-1} にリン酸残基の -OH 基、 1650 および 1550 cm^{-1} にアミド結合 I, II に由来する吸収が認められ、両者共にスフィンゴミエリンであることが推測できた (Fig. 2)。しかし、PL-3 については、PL-2 と比して量的に微少であることから以後の分析は PL-2 に限定した。

1968 年の報告 (1) では、3g の粗スフィンゴ脂質画分よりケイ酸カラムクロマトグラフィー分画で得た 50mg の微黄色粉末状物質から、酢酸エチル-メタノール, 3:2 による再結晶で、約 35mg の白色無定形のスフィンゴミエリンを収得している。本研究では、2. 実験のところでも述べたように、当教室で確立している下等動物組織より複合脂質を分離・精製する方法に準じてスフィンゴミエリンを単離したが、極めて効率良く純度の高い標品が得られた。

3.2 PL-2 におけるセラミド、ホスホコリンおよびスフィンゴホスホコリンの確認

フッ化水素酸による分解生成物からのセラミド: PL-2 をフッ化水素酸で処理して得られた

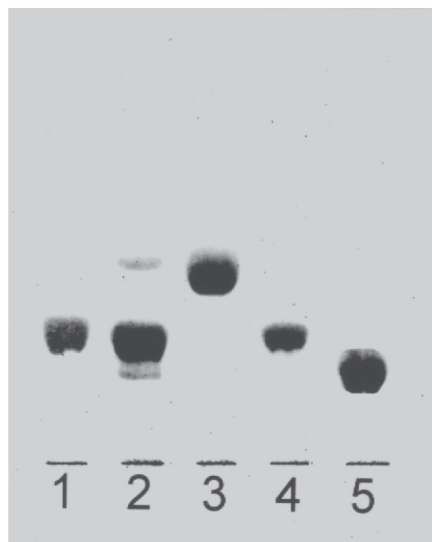


Fig. 1 Thin-layer chromatogram of the purified sphingomyelin obtained from the pearl oyster, *Pinctada martensii*.

1, authentic sphingomyelin from bovine brain; 2, sphingomyelin fraction eluted by Florisil column chromatography; 3, purified PL-1; 4, purified PL-2; 5, purified PL-3. The separation was performed on a precoated silica gel 60 plate developed in chloroform-methanol-water, 60:40:10 (v/v) for 15min, and the spots were visualized with Dittmer-Lester reagent.

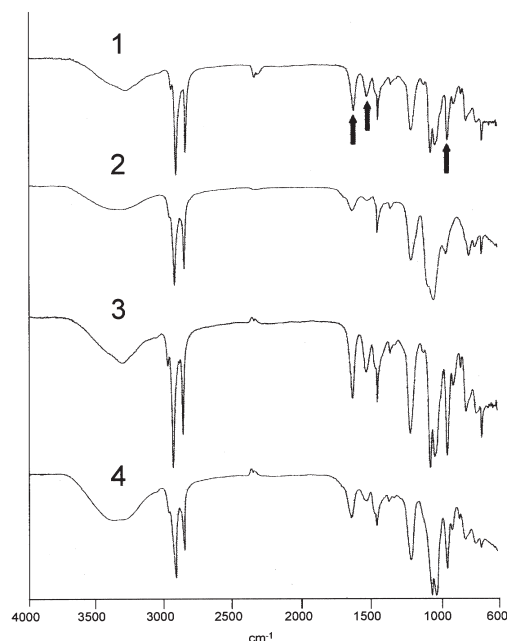


Fig. 2 Infrared spectra of PL-1, PL-2 and PL-3.

1, authentic sphingomyelin from bovine brain; 2, PL-1; 3, PL-2; 4, PL-3. The absorption bands marked with arrows at 1650 , 1550 and 960 cm^{-1} indicate the presence of the amide bonds I and II, and the choline residue.

クロロホルム可溶性の成績体を、イアトロビーズカラ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 スペクトルは市販の牛脳セレブロシド由来セラミドのそれに吸収端が一致することから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それと一致した。

塩酸による分解生成物からのホスホコリン：PL-2 を 6M HCl, 100℃で 12 時間加水分解し、その分解性成績体の TLC 分析よりホスホコリンに相当するスポットを得た。

ブタノール性 HCl による分解生成物からのスフィンゴホスホコリン：PL-2 をブタノール：6 M HCl, 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。

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：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、いずれもセラミドとホスホコリンの両方を得た。得られた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 PL-2(スフィンゴミエリン)のセラミド成分

PL-2 のセラミド成分については、まず、脂肪酸メチルエステル誘導体および長鎖塩基トリメチルシリル (TMS) 誘導体として GC と GC-MS 分析を行った。

3.3.1 脂肪酸メチルエステル誘導体分析

脂肪酸メチルエステル誘導体のガスクロマトグラムを Fig. 3 に示したが、それらの保持時間および GC-MS 分析結果より、その組成はパルミチン酸 (59.2%), マーガリン酸 (22.6%) およびステアリン酸 (18.2%) であり、既に報告している結果と同じであることを確認した (1)。

3.3.2 長鎖塩基トリメチルシリル (TMS) 誘導体分析

長鎖塩基のトリメチルシリル誘導体のガスクロマトグラムを Fig. 4 に、またそれらの GC-MS スペクトルを Fig. 5 に示した。ガスクロマトグラム上に 1 から 4 の番号を付したが、標準の

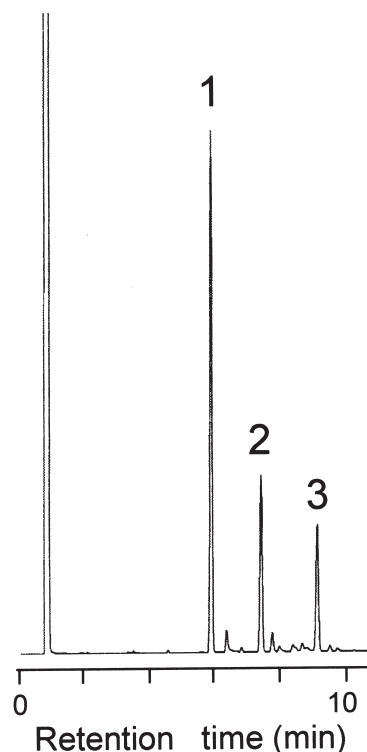


Fig. 3 Gas chromatogram of the fatty acid methyl esters from sphingomyelin, PL-2. 1, methyl palmitate; 2, methyl margarate; 3, methyl stearate.

スフィンゴシン (octadeca-4-sphingenine)-TMS 誘導体の保持時間および GC-MS スペクトル ($M=443$) と比べたところ、それぞれ、番号 1 は $d16:1$ ($M=415$) のスフィンゴシン (12.9%), 2 は $d18:2$ ($M=441$) のスフィンガジエニン (31.2%), 3 は $d18:1$ ($M=443$) のスフィンゴシン (48.9%), 4 は $d18:3$ ($M=439$) のスフィンガトリエニン (7.0%) であることが判明した。

また、水素添加したスフィンゴミエリン (PL-2) から調製した長鎖塩基の分析からは $d16:0$ (hexadecasphinganine) および $d18:0$ (octadecasphinganine) に相当するジヒドロスフィンゴシン (dihydrosphingosine) を検出した。特に $d18:0$ のピークが最も顕著であることより、炭素数 18 の同族体が長鎖塩基成分の大部分を占めることがわかり、前述の組成比を十分に支持する結果が得られた。一方、詳細な分析の結果からではないが、前報では、長鎖塩基成分はスフィンゴシン (85%) および *O*-メチルスフィンゴシン (15%) であると記載している (1)。そ

れは、*O*-メチルスフィンゴシンは分解副産物として生じ、その保持時間はスフィンガジエンおよびスフィンゴシンの保持時間に極めて近接していて、使用したカラムの分解能ではそれら3者の相互分離には限界があったと、考えるのが適切であろう。

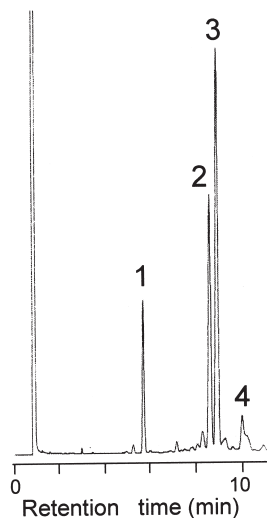


Fig. 4 Gas chromatogram of the long-chain base trimethylsilyl derivatives from sphingomyelin, PL-2.
1, d16:1; 2, d18:2; 3, d18:1; 4, d18:3.

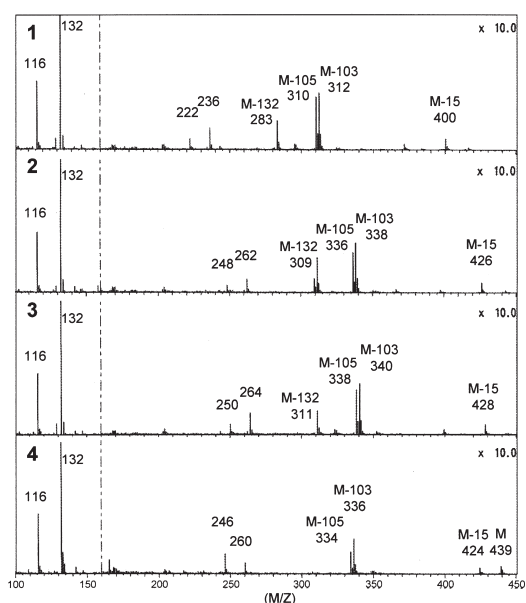


Fig. 5 Mass spectra of the peak nos. 1, 2, 3 and 4 shown in Fig. 4.
1, d16:1; 2, d18:2; 3, d18:1; 4, d18:3.

3.3.3 過ヨウ素酸-過マンガン酸々化による二重結合位置の決定

長鎖塩基の二重結合位置を決定するために、スフィンゴミエリン (PL-2) のフッ化水素酸処理で調製したセラミドを酸化分解 (過ヨウ素酸-過マンガン酸々化) し、その反応生成物として生じる短鎖脂肪酸を調べた。今までに複数の二重結合を有する炭素数 18- 同族体は、 Δ^4 -塩基を基本とするものとして $\Delta^{4,8}$ -, $\Delta^{4,11}$ -, $\Delta^{4,12}$ -, $\Delta^{4,13}$ -, $\Delta^{4,14}$ -, $\Delta^{4,8,10}$ -塩基の存在が報告されている (13,15,19-29)。もし、これらの塩基が存在するのであれば、酸化分解によって Δ^4 -塩基からはミリスチン酸、 $\Delta^{4,8}$ -塩基からはデカン酸、 $\Delta^{4,11}$ -塩基からはヘプタン酸、 $\Delta^{4,12}$ -塩基からはヘキサン酸、 $\Delta^{4,13}$ -塩基からはペンタン酸、 $\Delta^{4,14}$ -塩基からはブタン酸、 $\Delta^{4,8,10}$ -塩基からはオクタン酸が検出されなければならない。スフィンゴミエリン (PL-2) のセラミドを酸化分解した結果を Fig. 6 および Table 1 に示したが、オクタン酸 (4.8%)、デカン酸 (23.9%)、ドデカン酸 (15.1%) およびミリスチン酸 (56.2%) に相当する脂肪酸を検出した。この結果から、少なくとも Δ^4 、 Δ^8 および Δ^{10} に不飽和結合の存在することが推定できた。また、検出されたこれらの短鎖脂肪酸の組成比は、酸化分解前のセラミドの長鎖塩基組成比 (d18:3, 7.0%; d18:2, 31.2%; d18:1, 48.9%; d16:1, 12.9%) に対応して、ほぼ一致する結果を得ることができた。従って、アコヤガイスフィンゴミエリンの長鎖塩基は Δ^4 -d16:1, Δ^4 -d18:1, $\Delta^{4,8}$ -d18:2, $\Delta^{4,8,10}$ -d18:3 から成っていることが明らかと成った。なお、Fig. 6 において保持時間が 24 分以上で検出されるピークはスフィンゴミエリンの構成脂肪酸 (16:0, 17:0 および 18:0) を示しているが、酸化分解によってセラミドのアミド結合が分解を受けて生じたものか、あるいは酸化分解後のヘキサン抽出によって混在してきた未反応のセラミドに由来したと考えられる。

4. 総 括

アコヤガイ, *Pinctada martensii* から下等動物複合脂質の系統的分離方法によってスフィ

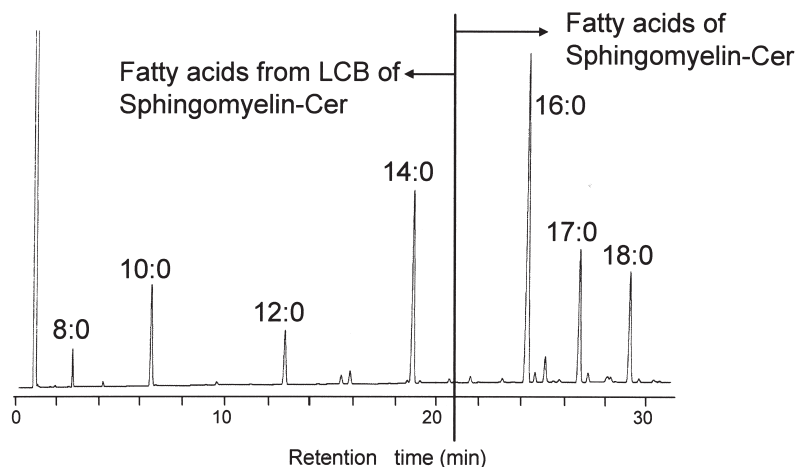


Fig. 6 Gas chromatogram of the fatty acid methyl esters derived from the products by periodate-permanganate oxidation of sphingomyelin, PL-2-ceramide.

Table 1 Chemical compositions of the ceramide portion of sphingomyelin, PL-2, and the fatty acid composition produced by the periodate-permanganate oxidation shown in Fig. 6.

Before oxidation (%)			After oxidation (%)		
Fatty acid	16:0	59.2	Fatty acid	16:0	60.1
	17:0	22.6		17:0	22.0
	18:0	18.2		18:0	17.9
LCB	d 16:1	12.9	→ Fatty acid	12:0(Δ^4 -LCB)	15.1
	d 18:1	48.9		14:0(Δ^4 -LCB)	56.2
	d 18:2	31.2		10:0($\Delta^{4,8}$ -LCB)	23.9
	d 18:3	7.0		8:0($\Delta^{4,8,10}$ -LCB)	4.8

ンゴミエリンを単離した。脂肪酸成分はパルミチン酸 (59.2%), マーガリン酸 (22.6%) およびステアリン酸 (18.2%) から構成されている。長鎖塩基成分は Δ^4 -スフィンゴシン (d16:1, 12.9%; d18:1, 48.9%), $\Delta^{4,8}$ -スフィンガジエニン (d18:2, 31.2%) および $\Delta^{4,8,10}$ -スフィンガトリエニン (d18:3, 7.0%) から構成されている。

本研究の一部は、独立行政法人水産総合センター受託研究費 (平成 15,16 年度「アコヤガイ等二枚貝廃棄物からのセラミドアミノエチルホスホン酸の効率的抽出」) および文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 (C)15570097) によって行った。

文 献

1. 杉田陸海, 荒川郁子, 板坂修, 堀太郎 (1968) 生化学, **40**, 254.
2. 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.
3. 糸乗前, 木村幸史, 北村孝普, 北村朋典, 杉田陸海 (2002) 滋賀大学教育学部紀要, **52**, 9.
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.
5. K. Kimura, S. Itonori, N. Hada, O. Itasaka, J. T. Dulaney, T. Takeda, M. Sugita (2002) *J. Oleo Sci.*, **51**, 83.
6. T. Saito, S. Hakomori (1971) *J. Lipid Res.*, **12**, 257.
7. J. C. Dittmer, R. L. Lester (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 126.
8. M. Sugita, S. Miwa, K. Aoki, J. T. Dulaney, S.

- Ichikawa, F. Inagaki, M. Suzuki (2000) *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **49**, 33.
9. 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.
 10. S. Itonori, M. Takahashi, T. Kitamura, K. Aoki, J. T. Dulaney, M. Sugita (2004) *J. Lipid Res.*, **45**, 574.
 11. 堀太郎, 杉田陸海, 西森千晶, 板坂修 (1975) *油化学*, **24**, 611.
 12. M. Sugita, O. Itasaka, T. Hori (1976) *Chem. Phys. Lipids*, **16**, 1.
 13. 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.
 14. M. L. Greene, T. Kaneshiro, J. H. Law (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 582.
 15. A. Hayashi, T. Matsubara (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **248**, 306.
 16. 杉田陸海, 荒川郁子, 堀太郎, 沢田保夫 (1968) *生化学*, **40**, 158.
 17. E. Stahl, P. J. Schorn (1969) *Thin-Layer Chromatography*, pp.873 (Reagent No. 97), Springer-Verlag, New York.
 18. M. Kates (1972) *Ether Lipids* (F. Snyder ed.), pp.357-364, Academic Press, New York.
 19. K. -A. Karlsson (1970) *Lipids*, **5**, 878.
 20. A. Hayashi, T. Matsubara (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 228.
 21. A. Hayashi, T. Matsubara, F. Matsuura (1975) *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 102.
 22. A. Hayashi, Y. Mishima, T. Matsubara (1990) *Chem. Phys. Lipids*, **52**, 171.
 23. A. Irie, H. Kubo, M. Hoshi (1990) *J. Biochem.*, **107**, 578.
 24. S. Itonori, K. Kamemura, K. Narushima, N. Sonku, O. Itasaka, T. Hori, M. Sugita (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1081**, 321.
 25. 岸根秀樹, 三島芳博, 林陽 (1995) *油化学*, **44**, 977.
 26. 杉田陸海, 青木一弘, 坂田綾子, 堀太郎 (1994) *滋賀大学教育学部紀要*, **44**, 25.
 27. M. Sugita, A. Morikawa, J. T. Dulaney, A. Okada (1996) *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 731.
 28. 三島芳博, 岸根秀樹, 林陽 (1997) *油化学*, **46**, 39.
 29. K. Aoki, S. Sugiyama, J. T. Dulaney, S. Itonori, M. Sugita (2002) *J. Oleo Sci.*, **51**, 463.