

食用キノコのスフィンゴ脂質
II. エリンギ, *Pleurotus eryngii* の多分岐型ガラクトースを含有した
マイコグリコリピドの構造

糸乗 前^{1*}, 卯田昌代¹, 矢野宏治¹, 青木一弘², 羽田紀康³,
山本憲二², 竹田忠紘³, 杉田陸海¹

Studies on Sphingolipids of Edible Fungi
II. Structures of Mycoglycolipids containing a Polytomy Galactose
from the King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii*

Saki ITONORI^{1*}, Akiyo UDA¹, Kouji YANO¹, Kazuhiro AOKI², Noriyasu HADA³,
Kenji YAMAMOTO², Tadahiro TAKEDA³ and Mutsumi SUGITA¹

Abstract

Three mycoglycolipids (glycoinositolphosphosphingolipids) were isolated from the edible mushroom, *Pleurotus eryngii* (the king oyster mushroom) by successive column chromatography on ion exchange Sephadex (DEAE-Sephadex) and silicic acid (Iatrobeds). Their chemical structures were characterized to be Man α 1-2Ins-P-Cer, (Gal α 1-6)(Fuc α 1-2)Gal β 1-6Man α 1-2Ins-P-Cer and (Gal α 1-3)(Gal α 1-6)(Fuc α 1-2)Gal β 1-6Man α 1-2Ins-P-Cer by sugar compositional analysis, methylation analysis, periodate oxidation, gas-liquid chromatography (GC), gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS), matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Aliphatic constituents of all three mycoglycolipids were virtually the same, with 2-hydroxy behenic and lignoceric acids as the fatty acids, and phytosphingosine as the sole sphingoid. In addition, an acidic glycosphingolipid, which was the precursor of the mycoglycolipids was also characterized as inositolphosphoceramide (Ins-P-Cer).

Keywords: Mycoglycolipid, Glycoinositolphosphosphingolipid, Edible fungi (*Pleurotus eryngii*)

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 京都大学大学院生命科学研究所 (Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

³ 共立薬科大学天然医薬資源学教室 (Division of Natural Medicines, Kyoritsu College of Pharmacy)

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

(2005年9月5日受理)

1. 緒言

キノコ類のスフィンゴ脂質には、遊離セラミド、セレブロシドおよびイノシトールリン酸含有脂質(マイコグリコリピド)の3種類の存在が知られている(1-11)。

著者らは先に、食用キノコの1種であるエリンギ(*Pleurotus eryngii*)の子実体より、中性スフィンゴ脂質画分を精査して、それぞれ2種類のセラミド(Cer-1, Cer-2)およびセレブロシド(CMH-1, CMH-2)の単離に成功し、それらの化学構造を、Cer-1: *N*-palmitoyl- (16.7%), *N*-stearoyl- (14.0%), *N*-behenoyl- (19.2%), *N*-lignoceroyl-phytosphingosines (27.7%); Cer-2: *N*-2' - hydroxybehenoyl- (22.6%), *N*-2' -hydroxylignoceroyl-phytosphingosines (60.5%); CMH-1: 1-*O*-glucosyl-*N*-2' -hydroxypentadecanoyl- (13.8%), 1-*O*-glucosyl-*N*-2' -hydroxypalmitoyl-nonadecasphingadienines (71.2%); CMH-2: 1-*O*-glucosyl-*N*-2' -hydroxypentadecanoyl- (15.3%), 1-*O*-glucosyl-*N*-2' -hydroxypalmitoyl-phytosphingosines (84.7%)と決定した(12,13)。

本論文では、同キノコ子実体の酸性糖脂質画分より単離した3種類のイノシトールリン酸含有糖脂質とこれらの糖脂質の前駆体脂質の化学構造について述べる。

2. 実験

2.1 エリンギ子実体より酸性糖脂質画分の調製

実験に用いたエリンギ(*P. eryngii*)は、食用としての市販品(ホクト社製)で、石突き部を除去したものである(9)。約200gの乾燥したエリンギ(約2kgを凍結乾燥したもの)を3Lのクロロホルム-メタノール(2:1および1:1, 以下、容比を示す)でそれぞれ2回、さらに、それぞれ2Lのクロロホルム-メタノール-水(60:35:8)で50℃, 2hおよび37℃, 12hの抽出を行った後、全ての抽出液を合して溶媒を減圧留去した(粗脂質画分, 収量: 約64g)。次いで、得られた粗脂質画分を弱アルカリ加水分解および弱酸処理して、アシル型, アルケニル型グリセロ脂質を除去した後、アセトン粉末

(粗スフィンゴ脂質画分)として1.4gを得た(乾燥重量当たり0.7%)。このものの1.3gを、DEAE-Sephadex A-25 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(COO⁻型, 3 x 20cm)によって、中性および両性イオン型糖脂質画分と酸性糖脂質画分に分画した。カラムからの溶出溶媒として、それぞれカラム容積の5倍容のクロロホルム-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)を用いた(14)。このクロマトグラフィーで後者の溶媒によって溶出されたいわゆる担体への吸着性の物質として650mgの酸性糖脂質画分を回収した(乾燥重量当たり0.3%)。

2.2 酸性糖脂質画分のケイ酸カラムクロマトグラフィーによる分画および精製

クロロホルム-メタノール-3Mアンモニア水(70:30:3)に懸濁したイアトロビーズ6RS-8060を充填したカラム(2 x 100cm)に少量の同溶媒に溶解した500mgの酸性糖脂質画分を注加した。溶出は、クロロホルム-メタノール-3Mアンモニア水(70:30:3, 1100mL ~ 50:50:17, 1250mL)の濃度勾配法を用い、溶出液は12mLずつ分取した。また、分画したそれぞれの酸性糖脂質の精製には、1-プロパノール-水-アンモニア水(75:20:5, 75:5:5)を溶出溶媒とする再ケイ酸カラムクロマトグラフィーを行った。

2.3 薄層クロマトグラフィー(TLC)

TLCプレートは、E. Merck社製のSilica gel 60を用いた。展開溶媒は、1-プロパノール-水-アンモニア水(75:30:5)を使用し、検出は、オルシノール-硫酸試薬(糖), Dittmer-Lester試薬(リン)(15)およびHanes-Isherwood試薬(リン)(16)によった。

2.4 ガスクロマトグラフィー(GC)

2.4.1 メチルグリコシド-トリメチルシリル誘導体の分析

200μgの試料に0.2mLの1Mメタノール性塩酸を加え、電子レンジ(TOSHIBA ER-VS1)で45sec間、電磁波を照射した(17)。冷却後、生成した脂肪酸メチルエステルを0.2mL

の n-ヘキサンで抽出除去し(後述の脂肪酸分析で使用), 残液を脱酸して濃縮乾固した。得られた残渣をトリメチルシリル誘導体として, GC(Shimadzu GC-18A) 分析を行った。分析カラムは 0.22mm x 25m 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-CBP 5) を使用した。分析温度は 140 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/min) に設定した。

2.4.2 アルジトールアセテート誘導体の分析

200 μ g の試料に 0.3mL の 2M 塩酸を加え, 20h, 100 $^{\circ}$ C で加熱した。反応後, 生成した脂肪酸を 1mL の n-ヘキサンで抽出除去し, 残液を 40 $^{\circ}$ C, 窒素気流下で濃縮乾固した。得られた濃縮残渣に 0.5mL の 1% 水素化ホウ素ナトリウム溶液 (10mM 水酸化ナトリウム水溶液) を加えて 12h, 20 $^{\circ}$ C に放置した。反応液に氷酢酸を加え, 過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解した後, メタノールを加えながら 40 $^{\circ}$ C で濃縮乾固した。得られた残渣に 0.25mL のピリジンおよび 0.25mL の無水酢酸を加えて, 100 $^{\circ}$ C, 15min でアセチル誘導体を調製して GC 分析を行った。GC 分析は, カラム温度, 170 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/min) を除いてすべてトリメチルシリル誘導体の場合と同じ条件で行った。

2.4.3 部分メチル化アルジトールアセテート誘導体の分析

400 μ g の試料を 0.2mL のジメチルスルホキシドに超音波照射によって完全に溶解し, これに約 20mg の粉末水酸化ナトリウムと 0.2mL のヨウ化メチルを加え, メチル化を行った(18)。5min 後, 反応液を冷却してから, 1mL のクロロホルムと 4mL の水を加えて二層に分配し, 遠心分離によって上層を除去した。下層のクロロホルム層を窒素気流下で濃縮乾固して, メチル化物を回収した。このメチル化物に 0.3mL の酢酸-塩酸-水 (8:0.5:1.5) を加え, 電磁波を 45sec 間照射して分解した後, 窒素気流下で濃縮乾固した。残渣に 0.5mL の 1% 水素化ホウ素ナトリウム溶液 (10mM 水酸化ナトリウム水溶液) を加えて, 20 $^{\circ}$ C, 12h 還元を行った。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で分解した後, 40 $^{\circ}$ C で窒素気流下で乾固した。得られ

た残渣をアセチル誘導体(前出)として GC 分析(カラム温度, 140 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min) に供した。

2.4.4 脂肪酸メチルエステルの分析

前述(2.4.1)のメタノリシスで得た n-ヘキサン抽出物を GC 分析(カラム温度, 170 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min) に供した。

2.4.5 長鎖塩基の分析

200 μ g の試料に 0.2mL の水性メタノール塩酸を加えて, 18h, 70 $^{\circ}$ C で加熱した(19)。生成した脂肪酸メチルエステルを n-ヘキサンで抽出除去した後, 残液よりメタノールを留去した。次いで, 0.6mL の 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液-メタノール (3:4) および 0.72mL のクロロホルムを加えて攪拌した後, 遠心分離して二層に分配した。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。得られた画分をトリメチルシリル誘導体として GC 分析 (210 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/min) に供した。

2.5 ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC-MS)

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: 部分メチル化アルジトールアセテート分析, 80 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 160 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 240 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min), 脂肪酸分析, 80 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 170 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 240 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min), 長鎖塩基分析, 80 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 210 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min) に設定; インターフェース温度: 250 $^{\circ}$ C; 試料注入口温度: 240 $^{\circ}$ 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(EI), 100eV(CI); イオン化電流: 60 μ A(EI), 200 μ A(CI); 反応ガス (CI): イソブタン。

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。

2.7 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-水 (60:35:8) に溶解した 100 pmol 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, negative ion linear mode 測定を行った。質量校正はエラコ (*Pseudopotamilla ocellata*) の酸性糖脂質によった (20)。

2.8 $^1\text{H-NMR}$ 分析

約 1mg の試料を 0.65mL の 2%D₂O/DMSO (ジメチルスルホキシド) に溶解し, JEOL- α 500 500MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトロメーターにより 60°C で測定した。

2.9 弱酸による部分加水分解

10mg の試料を 2mg ずつ 5 本のスクリーキャップ付き試験管に分取し, それぞれに 1mL の 20mM 塩酸を加えて超音波処理して懸濁させた後, 100°C, 15min 間加熱した。反応後, ヘキサンで脂肪酸を抽出除去し, 残液を 2 日間, 流水透析を行った。透析膜内液を濃縮し, 得られた残分をイアトロビーズカラムクロマトグラフィー (1.2 x 60 cm) によって分画, 精製した。カラムからの溶出は, 1-プロパノール-水-アンモニア水 (75:17.5:5) の単一溶媒溶出法で行った。

2.10 α - および β -ガラクトシダーゼによる加水分解

2.10.1 Green coffee bean 由来 α - ガラクトシダーゼによる加水分解

50 μg の試料を 100 μg のタウロデオキシコー

ル酸ナトリウムと 100 μg の γ -ガラクトノラクトンを含む 100 μL の緩衝液 (0.15M クエン酸-リン酸ナトリウム, pH6.4) に溶解し, これに 0.2U (5 μL) の酵素液 (Sigma-Aldrich 社) を加えた後, 25°C で 20h 反応させた (21)。反応後, 反応液に 1mL の水を加えて, 予め, それぞれ 3mL のクロロホルム-メタノール (2:1), メタノール, メタノール-水 (1:1), 水の溶媒順で洗浄した Sep-Pak カートリッジ (Sep-Pak Plus tC18 Cartridges, Waters 社) に注入した。カートリッジを 10mL の水で洗浄した後, 10mL のメタノールで糖脂質を溶出させた。溶出液は 1mL ずつ分取し, オルシノール-硫酸試薬による TLC spotting test で検して陽性の画分を濃縮した。

2.10.2 Jack bean 由来 β - ガラクトシダーゼによる加水分解

50 μg の試料を 100 μg のタウロデオキシコール酸ナトリウムを含む 100 μL の緩衝液 (0.1M クエン酸-リン酸ナトリウム, pH3.5) に溶解し, これに 0.2U (3 μL) の酵素液 (生化学工業社) を加えた後, 37°C で 18h 反応させた (21,22)。反応後は, 上述した Sep-Pak 処理に準じた。

2.11 過ヨウ素酸酸化法による結合位置の決定

5mg の試料を 0.5mL のエタノールに溶解し, それに 2mL の 80mM 過ヨウ素酸ナトリウム (0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液, pH4.5) を加えて, 暗所で 4°C, 120h 反応させた。0.3mL のエチレングリコールを加えて反応を停止した後, アンモニア水で液性を塩基性とした。次いで, 最終濃度が 5% になるように水素化ホウ素ナトリウムを添加して, 12h 還元反応を行った。水素の発生が認められなくなるまで酢酸を滴下した後, 流水中で 2 日間透析を行った。透析膜内液を濃縮して得られた反応成績体を MALDI-TOF MS 分析によって確認した後, このものを 0.3mL の 1M メタノール性塩酸で, 100°C, 3h メタノリシスした。n-ヘキサンで脂肪酸を抽出除去した残液を窒素気流下で濃縮乾固した。次いで, 得られた分解成績体に結合しているリン酸基を除去する目的で, その濃縮残渣に 0.2M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH8.5)

に溶解した 2U のアルカリホスファターゼ (*Escherichia coli* 由来, Sigma-Aldrich 社) を加えて, 37°C, 24h 反応させた。反応液を窒素気流下で濃縮乾固させた後, 0.25mL のピリジンと 0.25mL の無水酢酸を加えて, 100°C, 15min でアセチル化した。アセチル化物に 1mL のクロロホルムと 4mL の水を加えて洗浄後, 下層のクロロホルム層を GC および GC-MS 分析に処した (20, 23, 24)。

2.12 フッ化水素酸による加水分解

プラスチック試験管中で 500 μ g の試料を 0.5mL の DMSO に超音波処理して溶解した後, 3.5mL のフッ化水素酸 (35%) を加えて 20°C で 20h 反応させた。反応液を流水透析した後, 透析膜内液を濃縮して加水分解成績体を得た。

3. 結果および考察

3.1 エリンギの酸性糖脂質 (リン糖脂質)

エリンギの酸性糖脂質画分には少なくとも 4 種類のリン糖脂質が存在しており, これらを TLC 上での移動度の大きい順に, 既に報告しているブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) のリン糖脂質の移動度を参考にして, AGL₀, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ と仮称してそれぞれの単離, 精製を行った (13)。即ち, 500mg の酸性糖脂質画分 (DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー分画での吸着画分) をクロロホルム

–メタノール– 3M アンモニア水の濃度勾配法によるイアトロビーズカラムクロマトグラフィーで 8 画分 (Fr. 1~8) に分画した (Fig. 1)。各画分は TLC 上での移動度を考慮して, それぞれ Fr. 1: 非リン糖脂質と AGL₀ の混合 (収量, 68.7mg); Fr. 2: AGL₀ と AGL₁ の混合 (16.6mg); Fr. 3: AGL₁ (162.7mg); Fr. 4: AGL₁~AGL₄ の混合 (12.5mg); Fr. 5: その他と AGL₄ の混合 (9.1mg); Fr. 6: AGL₄ と AGL₅ の混合 (1.1mg); Fr. 7: AGL₅ (192.6mg); Fr. 8: AGL₅ とその他の混合 (36.1mg) とした。さらに, これらの画分のうち Fr. 1 からは 1-プロパノール–水–アンモニア水 (75:20:5) の溶出溶媒系による再イアトロビーズカラムクロマトグラフィーで 7mg の AGL₀ を, Fr. 5 からは 1-プロパノール–水–アンモニア水 (75:5:5) の溶出溶媒系による同カラムクロマトグラフィーで 3mg の AGL₄ を精製した。単離した AGL₀, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ の TLC を Fig. 2 に示したが, これらはすべてリン検出試薬である Hanes-Isherwood 試薬および微弱ではあるが Dittmer-Lester の両試薬に陽性であった。さらに, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ の 3 種類は糖検出試薬であるオルシノール–硫酸試薬にも強い陽性を示した。これらのことから, 分子内に AGL₀ はリン化合物を, また AGL₁, AGL₄ および AGL₅ はリン化合物に加えて中性糖も有することが明らかとなった。さらに, これらに含まれるリン化合物は, Dittmer-Lester 試薬に対する反応性がス

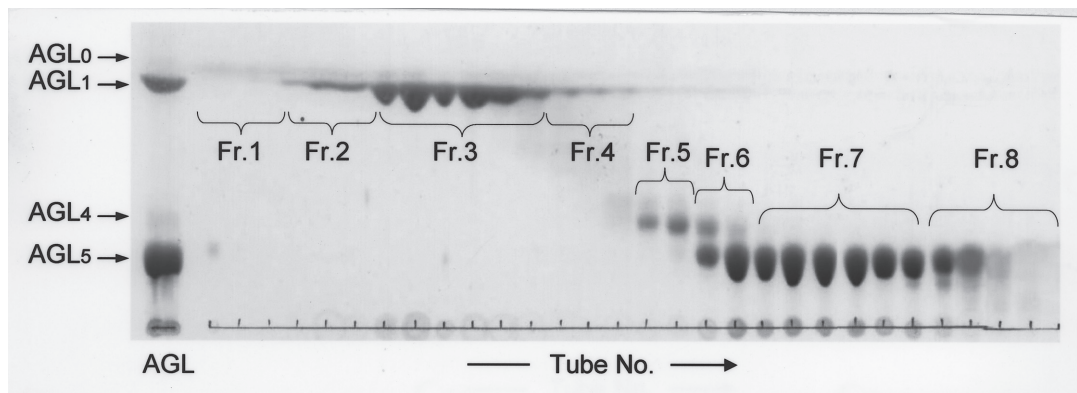


Fig. 1 Elution Profile of Mycoglycolipids from Iatrobeads Column Chromatography.

The column was eluted with a linear gradient system comprising chloroform-methanol-3M ammonia (70:30:3, 1100mL-50:50:17, 1250mL). The effluent was collected in 12mL- fractions and an aliquot was analyzed by TLC developing in 1-propanol-water-ammonia (75:30:5) for 2h. Spots were detected with orcinol-H₂SO₄ reagent. Separation of AGL (the acidic glycolipids obtained by DEAE-Sephadex fractionation- procedure) yielded eight subfractions designated Frs. 1-8.

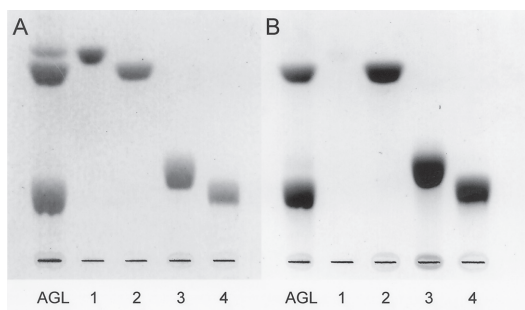


Fig. 2 Thin Layer Chromatograms of Mycoglycolipids from the King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii*.

AGL, acidic glycolipid fraction obtained from DEAE-Sephadex column chromatography; lanes 1 to 4, isolated AGL₀, AGL₁, AGL₄ and AGL₅. The plates were developed in 1-propanol-water-ammonia (75:30:5) for 2h, and the spots were visualized with Hanes-Isherwood reagent for Panel A and with orcinol-H₂SO₄ reagent for Panel B.

フィンゴミエリンやレシチンのようなリン脂質に比べて極めて微弱であるところからイノシトールリン酸型であることが推察された(後述するが, 酸加水分解で *myo*-イノシトールを検出)。一方, これら4種類の赤外スペクトルでは, リン酸基に起因する吸収が 1200cm⁻¹ 近傍に, アミド結合に由来する吸収が 1550cm⁻¹ および 1650cm⁻¹ に観察できること, さらに選択的にリン酸基結合(リン化合物結合)を分解するフッ化水素酸処理によりセラミドが生成することからセラミド型(スフィンゴ型)のリン糖脂質, 即ちマイコグリコリピドの一群であることが判明した。

3.2 AGL₀, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ のセラミド組成

セラミドの構成成分である脂肪酸と長鎖塩基の同定はともに, 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 AGL₀ が非ヒドロキシ酸を, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ が主に 2-ヒドロキシ酸を成分としていた。また, 長鎖塩基組成は, AGL₀ にスフィンゴシン (10.3%) の存在が認められるものの, 主成分は AGL₁, AGL₄ および AGL₅ ともにフィトスフィンゴシンであった。それぞれのマイコグリコリピドの脂肪酸は, AGL₀ がパルミチン酸 (15.8%), ステアリン酸 (15.0%), ベヘン酸

Table 1 Ceramide Compositions of Mycoglycolipids from the King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii*

Composition	AGL ₀	AGL ₁	AGL ₄	AGL ₅
Fatty acid (%)				
Nonhydroxy acid				
15:0	4.0	nd	nd	nd
16:0	15.8	3.1	3.3	tr
18:0	15.0	2.2	2.8	tr
22:0	27.5	3.9	4.1	tr
24:0	29.9	6.0	4.7	2.4
2-Hydroxy acid				
16:0	7.8	2.6	nd	nd
18:0	nd	5.1	3.2	4.0
20:0	nd	tr	2.0	tr
22:0	nd	21.2	24.7	24.0
23:0	nd	7.7	7.7	6.3
24:0	nd	45.6	45.0	60.0
24:1	nd	2.6	2.5	3.3
Sphingoid (%)				
d18:1	10.3	nd	nd	nd
t18:0	89.7	100	100	100

d, dihydroxy sphingoid (sphingosine);

t, trihydroxy sphingoid (phytosphingosine);

nd, not detected; tr, trace.

(27.5%), リグノセリン酸 (29.9%) を主要な成分として, さらに少量のペンタデカン酸 (4.0%) や 2-ヒドロキシパルミチン酸 (7.8%) を含有していた。一方, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ のそれらは, それぞれ 2-ヒドロキシベヘン酸 (21.2%, 24.7%, 24.0%) と 2-ヒドロキシリグノセリン酸 (45.6%, 45.0%, 60.0%) が主成分であった。本論文ではイアトロピーズカラムクロマトグラフィーによる分画操作で, Fr. 1 として溶出された AGL₀ についてのみ詳細に分析して報告をしているが, Fr. 2 として溶出された AGL₀ と AGL₁ の混合画分にも, 暫定的な分析結果ではあるが, 2-ヒドロキシベヘン酸および 2-ヒドロキシリグノセリン酸を成分としている AGL₀ の存在を認めている。また, エリンギの遊離セラミドにもこれらの2種類のヒドロキシ酸を主成分として含んでいるものの存在も明らかにしている (12)。これらの事実から, AGL₀, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ の4種類のマイコグリコリピドはフィトスフィンゴシンと 2-ヒドロキシ酸を成分とする, いわゆるフィトセラミドを前駆体としていることが推測された。特に, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ の3種類については, 非ヒドロキシ酸の含有率が極めて低いことか

ら、AGL₀の中でも2-ヒドロキシ酸を含有するものが選択的に基質となって生成されていることが示唆された。

3.3 MALDI-TOF MS 分析

MALDI-TOF MS 分析には、陽イオンモードと陰イオンモードの2種類の測定法があるが、分子内に酸性基を有する糖脂質については、前者では、イオン化の効率が極めて悪く測定することが困難なため、後者によった。AGL₀、AGL₁、AGL₄ および AGL₅ の MALDI-TOF MS スペクトルを **Fig. 3** に示した。マイコグリコリピドは、これを構成している基本となる物質は、セラミド (Cer=FA+LCB-H₂O)、リン酸 (H₃PO₄)、イノシトール (Ins) および糖 (Hex など) であり、これらがこの順序で脱水縮合している。AGL₀ については、TLC 上で糖の検出が観察されないところから、Ins-P-Cer であることが推定され、そのマススペクトルと次式、Cer(FA+LCB-H₂O)+H₃PO₄-H₂O+Ins-H₂O=Cer(FA+LCB-18)+98-18+180-18=FA+LCB+224 からセラミドの分子種を明らかにすることができる。即ち、AGL₀ のスペクトルに見られる6本のピーク、a (実測値 m/z 766.8), b (m/z 780.9), c (m/z 797.1), d (m/z 825.2), e (m/z 881.5), f (m/z 908.9) はそれぞれ a, 脂肪酸-長鎖塩基 (15:0-d18:1) の計算値 ([M-H]⁻=m/z 764); b, (16:0-d18:1) の計算値 ([M-H]⁻=m/z 778); c, (16:0-t18:0) の計算値 ([M-H]⁻=m/z 796); d, (18:0-t18:0) の計算値 ([M-H]⁻=m/z 824); e, (22:0-t18:0) の計算値 ([M-H]⁻=m/z 880); f, (24:0-t18:0) の計算値 ([M-H]⁻=m/z 908 に極めて近似する値を示した。一方、AGL₁、AGL₄ および AGL₅ については、これらのセラミド組成の主要な組合せ、脂肪酸-長鎖塩基が (2-hydroxy22:0-t18:0) と (2-hydroxy24:0-t18:0) の2種類であることから、次式の (Ins-P-Cer)+nHex-nH₂O=897+180n-18n および 925+180n-18n によって糖数 (n) を予測することが可能になる。このことを AGL₁、AGL₄ および AGL₅ のスペクトルについて見てみると、AGL₁ のスペクトルにおいては、ピークの実測値が [M-H]⁻=m/z 1058 と m/z 1085 であることよ

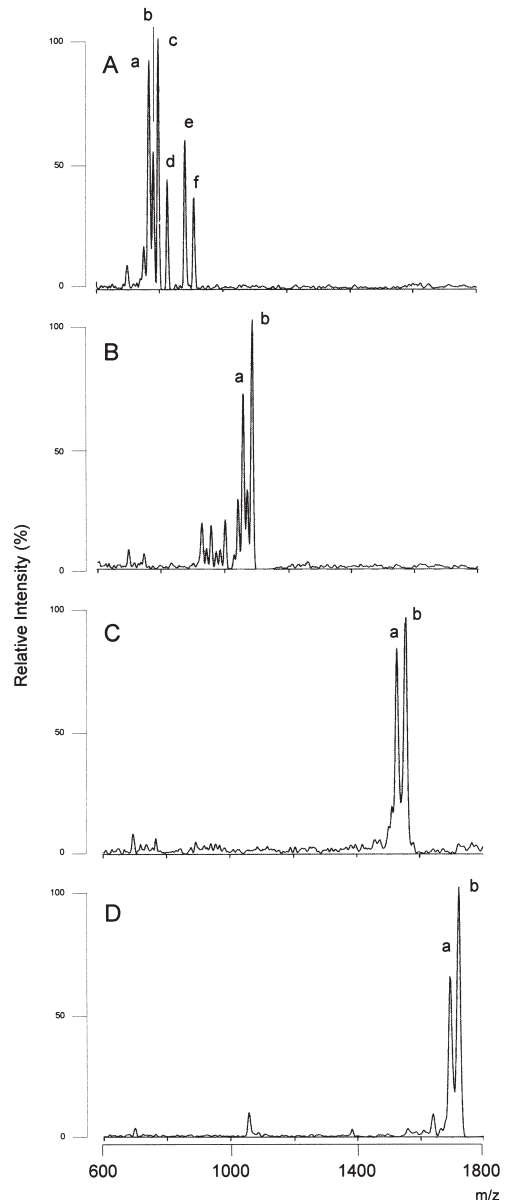


Fig. 3 Negative-Ion Linear Mode MALDI-TOF MS Spectra of AGL₀, AGL₁, AGL₄ and AGL₅.

A: AGL₀; a, [M-H]⁻ ion at m/z 766.8 (fatty acid-sphingoid, 15:0-d18:1); b, m/z 780.9 (16:0-d18:1); c, m/z 797.1 (16:0-t18:0); d, m/z 825.2 (18:0-t18:0); e, m/z 881.5 (22:0-t18:0); f, m/z 908.9 (24:0-t18:0); B: AGL₁; a, m/z 1057.8 (h22:0-t18:0); b, m/z 1085.4 (h24:0-t18:0); C: AGL₄; a, m/z 1530.1 (h22:0-t18:0); b, m/z 1558.3 (h24:0-t18:0); D: AGL₅; a, m/z 1692.7 (h22:0-t18:0); b, m/z 1720.7 (h24:0-t18:0).

り、それぞれ $897+180n-18n=1059$ および $925+180n-18n=1086$ の式から、両者ともに $n \div 1.0$ で Hex-Ins-P-Cer であると推定することができた。AGL₄ については、ピークの実測値

が $[M-H]^- = m/z$ 1530 と m/z 1558 であることより, それぞれ $897+180n-18n=1531$ および $925+180n-18n=1559$ の式から, 両者ともに $n \div 4.0$ で $(Hex)_4$ -Ins-P-Cer であると推定することができた。AGL₅ については, ピークの実測値が $[M-H]^- = m/z$ 1693 と m/z 1721 であることより, それぞれ $897+180n-18n=1694$ および $925+180n-18n=1722$ の式から, 両者ともに $n \div 5.0$ で $(Hex)_5$ -Ins-P-Cer であると推定することができた。

3.3 AGL₀, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ の構造

3.3.1 構成糖分析

AGL₀, AGL₁, AGL₄, AGL₅ をメタノリシスした後, メチルグリコシド TMS 誘導体として GC 分析したところ, AGL₀ からは全く糖のピークを検出しなかったが, AGL₁, AGL₄ および AGL₅ からは, それぞれ, AGL₁, Man; AGL₄, Man:Gal:Fuc (1.0:1.9:0.7); AGL₅, Man:Gal:Fuc (1.0:3.3:0.9) を検出した。また, 2M 塩酸, 20h, 100°C で加水分解した後, アルジトールアセテート誘導体として GC 分析したところ, 4 者すべてから *myo*-イノシトールを検出するとともに, AGL₁ からはさらにヘキサ (*O*-アセチル) マンニトールを, AGL₄ および AGL₅ からはヘキサ (*O*-アセチル) マンニトール, ヘキサ (*O*-アセチル) ガラクチトール, ペンタ (*O*-アセチル) フシトールを同定した (Fig. 4)。これらの結果は, AGL₀, Ins-P-Cer; AGL₁, Man-Ins-P-Cer; AGL₄, (Fuc)(Gal)₂(Man)-Ins-P-Cer; AGL₅, (Fuc)(Gal)₃(Man)-Ins-P-Cer と推察され, 前述の MALDI-TOF MS 分析の結果を極めて高く支持するものであった。

3.3.2 部分メチル化アルジトールアセテート法による糖鎖結合位置の予測

糖鎖の結合位置を決定するために AGL₁, AGL₄ および AGL₅ のメチル化分析を行った (Fig. 5)。AGL₁ からは 1,5-ジ (*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ (*O*-メチル) マンニトール (1Man) を, AGL₄ からは 1,5-ジ (*O*-アセチル)-2,3,4-トリ (*O*-メチル) フシトール (1Fuc), 1,5-ジ (*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ (*O*-メチル) ガラクチトール (1Gal), 1,5,6-トリ (*O*-アセチル)-2,3,4-

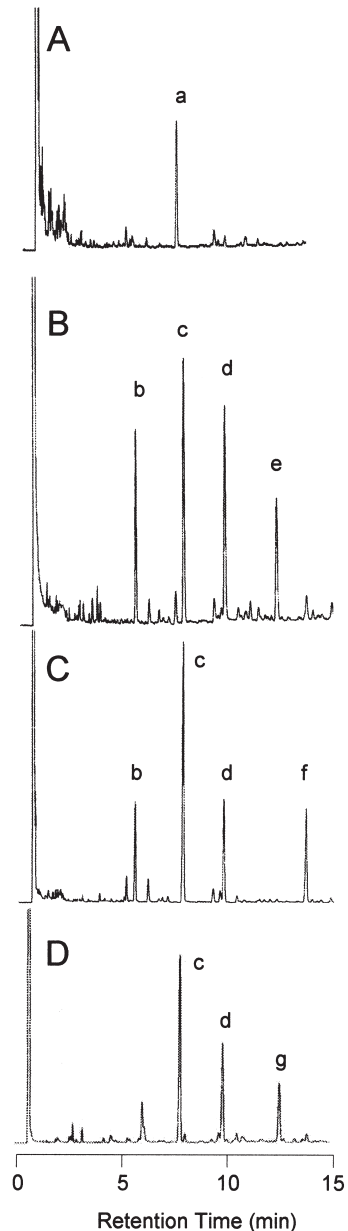


Fig. 4 Gas Chromatograms of Alditol Acetate Derivatives derived from AGL₀, AGL₁, AGL₄ and AGL₅.

A, AGL₀; B, AGL₁; C, AGL₄; D, AGL₅; peak a, *myo*-inositol hexaacetate; peak b, mannitol hexaacetate; peak c, fucitol pentaacetate; peak d, galactitol hexaacetate.

トリ (*O*-メチル) マンニトール (1,6Man) および 1,2,5,6-テトラ (*O*-アセチル)-3,4-ジ (*O*-メチル) ガラクチトール (1,2,6Gal) (Fig. 6-A) を, AGL₅ からは 1Fuc, 1Gal (2モル分), 1,6Man

および 1,2,3,5,6-ペンタ (*O*-アセチル)-4-(*O*-メチル)ガラクトール (1,2,3,6Gal) (**Fig. 6-B**) あるいは 1,2,4,5,6-ペンタ (*O*-アセチル)-3-(*O*-メチル)ガラクトール (1,2,4,6Gal) (**Fig. 6-B**) のいずれかと推測されるピークを検出した (**Fig. 6**)。これらのことから次のような糖鎖結合位置が予測できた。AGL₁ は Ins に Man が結合している。AGL₄ は AGL₁ の Man の 6 位に 2 位と 6 位で分岐した Gal が結合し、さらにその分岐のいずれかに Fuc と Gal がそれぞれ 1 モルずつ結合している。AGL₅ は AGL₄ の Man に結合している 2 位および 6 位での分岐 Gal にさらに 3 位あるいは 4 位で Gal が結合した多分岐構造を有しているものである。

3.3.3 AGL₅ の塩酸による部分加水分解成績体 (フラグメント脂質) の同定およびそれらのメチル化分析による多分岐型ガラクトースの結合位置の決定

前述したように、完全な構造の状態をした AGL₄ および AGL₅ (intact-AGL₄, intact-AGL₅) の部分メチル化アルジトールアセテート分析からは、多分岐 Gal への結合位置や Fuc の結合位置を決定することはできない。そこで、比較的含有量の多い AGL₅ を用いて希塩酸溶液による部分加水分解を行って得られる分解成績体のメチル化分析を試みた。10mg の AGL₅ より得られた分解成績体を 1-プロパノール-水-アンモニア水の混合溶液による単一溶媒溶出法によってケイ酸カラムクロマトグラフィーで 5 画分に分画・精製し、TLC 上での移動度の大きいものから順に AGL₅-1 (回収量, 0.5mg), AGL₅-2 (0.9mg), AGL₅-3a (0.7mg), AGL₅-3b (1.1mg), AGL₅-4 (4.0mg) と仮称した (**Fig. 7**)。それぞれの分解成績体を構成している中性糖成分は、AGL₅-1 が Man, AGL₅-2 が Man:Gal (1:1, モル比), AGL₅-3a および AGL₅-3b がともに Man:Gal (1:2), AGL₅-4 が Man:Gal (1:3) であり、いずれの分解成績体にも intact-AGL₅ の構成糖成分として含まれている Fuc を検出しなかった。また、**Fig. 8** にこれらの MALDI-TOF MS 分析結果を示したが、そのスペクトルから AGL₅-1 は Man-Ins-P-Cer, AGL₅-2 は Gal-Man-Ins-P-Cer, AGL₅-3a および AGL₅-3b は Gal-Gal-Man-

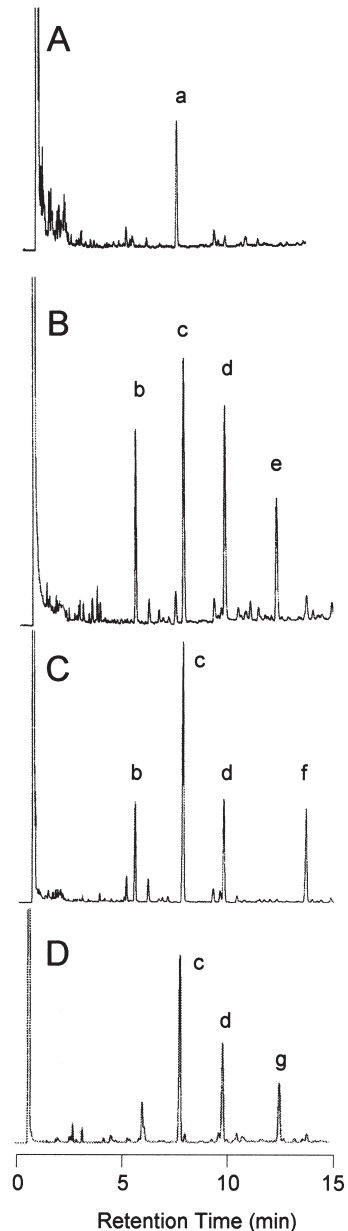


Fig. 5 Gas Chromatograms of Partially Methylated Alditol Acetate Derivatives derived from AGL₁, AGL₄, AGL₅ and AGL₅-4.

A, AGL₁; B, AGL₄; C, AGL₅; D, AGL₅-4 (purified from partial acid hydrolysates of AGL₅); peak a, 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylmannitol (1Man); peak b, 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylfucitol (1Fuc); peak c, 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactitol (1Gal); peak d, 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylmannitol (1,6Man); peak e, 1,2,5,6-tetra-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methylgalactitol (1,2,6Gal); peak f, 1,2,3,5,6-penta-*O*-acetyl-4-*O*-methylgalactitol (1,2,3,6Gal) or 1,2,4,5,6-penta-*O*-acetyl-3-*O*-methylgalactitol (1,2,4,6Gal); peak g, 1,3,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methylgalactitol (1,3,6Gal). Under these analytical conditions, all the expected inositol products remain phosphorylated and are hence not observable.

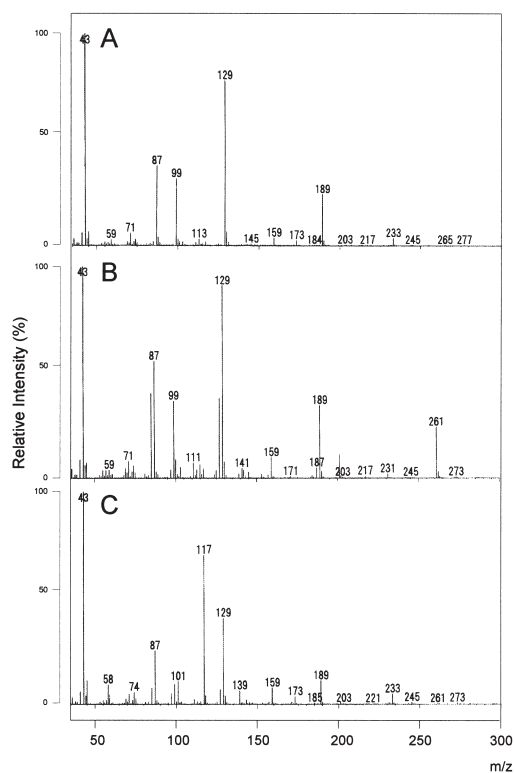


Fig. 6 EI-Mode GC-Mass Spectra of Peaks (e), (f) and (g) in Fig. 5.

A: (peak e), 1,2,5,6-tetra-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methylhexitol (1,2,6Hex); B: (peak f), 1,2,3,5,6-penta-*O*-acetyl-4-*O*-methylhexitol (1,2,3,6Hex) or 1,2,4,6-penta-*O*-acetyl-3-*O*-methylhexitol (1,2,4,6Hex); C: (peak g), 1,3,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methylhexitol (1,3,6Hex).

Ins-P-Cer, AGL₅-4 は (Gal)₂-Gal-Man-Ins-P-Cer であることが推定できた。即ち, AGL₅-1, [M-H]⁻: m/z 1058.2, 1085.2 ([計算値-H]⁻): (Ins-P-Cer)+Man-H₂O=(897 or 925)+180-18=1058, 1086); AGL₅-2, [M-H]⁻: m/z 1222.8, 1250.2 ([計算値-H]⁻): (Ins-P-Cer)+Man+Gal-2H₂O=(897 or 925)+180+180-36=1220, 1248); AGL₅-3a, [M-H]⁻: m/z 1382.1, 1409.9 ([計算値-H]⁻): (Ins-P-Cer)+Man+2Gal-3H₂O=(897 or 925)+180+180+180-54=1382, 1410); AGL₅-3b, [M-H]⁻: m/z 1382.7, 1410.3 ([計算値-H]⁻): (Ins-P-Cer)+Man+2Gal-3H₂O=(897 or 925)+180+180+180-54=1382, 1410); AGL₅-4, [M-H]⁻: m/z 1544.6, 1572.6 ([計算値-H]⁻): (Ins-P-Cer)+Man+3Gal-4H₂O=(897 or 925)+180+180+180+180-72=1544, 1572) が観察できた。一

方, それらの部分メチル化分析から, それぞれ AGL₅-1 では 1,5-ジ(*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ(*O*-メチル)マンニトール(1Man)を, AGL₅-2 では 1,5-ジ(*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ(*O*-メチル)ガラクトトール(1Gal)および 1,5,6-トリ(*O*-アセチル)-2,3,4-トリ(*O*-メチル)マンニトール(1,6Man)を, AGL₅-3a では 1Gal, 1,6Man および 1,3,5-トリ(*O*-アセチル)-2,4,6-トリ(*O*-メチル)ガラクトトール(1,3Gal)を, AGL₅-3b では 1Gal, 1,6Man および 1,5,6-トリ(*O*-アセチル)-2,3,4-トリ(*O*-メチル)ガラクトトール(1,6Gal)を, AGL₅-4 では 1Gal(2モル分), 1,6Man および 1,3,5,6-テトラ(*O*-アセチル)-2,4-ジ(*O*-メチル)ガラクトトール(1,3,6Gal)(Fig. 6-C)を同定した。これらの部分加水分解成績体のメチル化分析結果と intact-AGL₅ のメチル化分析結果 (Fig. 5-C) から多岐型ガラクトースの結合位置は 1,2,3,6 位であり, 糖鎖結合は (Gal1-3)(Gal1-6)(Fuc1-2)Gal1-6Man1-Ins-P-Cer であると決定した。さらに, AGL₄ は生合成の面から AGL₅ の前駆体になり得る物質と考えられることや, intact-AGL₄(Fig. 5-B) および AGL₅-4(部分加水分解によって脱フコースされている成績体)のメチ

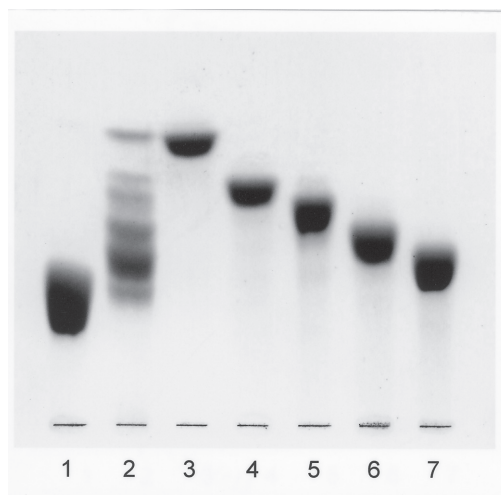


Fig. 7 Thin Layer Chromatogram of Acidic Hydrolysates of AGL₅.

Lane 1, intact AGL₅; lane 2, acidic hydrolysates of AGL₅; lanes 3 to 7, purified AGL₅-1, AGL₅-2, AGL₅-3a, AGL₅-3b and AGL₅-4. The plate was developed in 1-propanol-water-ammonia (75:30:5) for 2h, and the spots were visualized with orcinol-H₂SO₄ reagent.

ル化分析結果 (Fig. 5-D) から, その糖鎖結合は (Gal1-6)(Fuc1-2)Gal1-6Man1-Ins-P-Cer であると決定した。

3.3.4 Man → Ins の結合位置の決定

3.3.4.1 部分メチル化した糖アセチル誘導体からの (1 → 2) および (1 → 6) 結合の存在の推定 (部分メチル化イノシトールアセテートの GC-MS 分析)

AGL₁, AGL₄ および AGL₅ の基本構造は Man-Ins-P-Cer であることより, Man と Ins における可能な結合位置関係は, Man(1-2)Ins, Man(1-3)Ins, Man(1-4)Ins, Man(1-5)Ins, Man(1-6)Ins の 5 通りがある。しかし, これらの中で (1-2) と (1-6) および (1-3) と (1-5) 結合しているものはイノシトールの対称構造性より, それぞれ同一の部分メチル化イノシトールアセテートの GC-MS スペクトルを示すものと考えられる。そこで, (1-2): 1,2-ジ-(*O*-アセチル)-3,4,5,6-テトラ(*O*-メチル)イノシトール; (1-6): 1,6-ジ-(*O*-アセチル)-2,3,4,5-テトラ(*O*-メチル)イノシトール, (1-3): 1,3-ジ-(*O*-アセチル)-2,4,5,6-テトラ(*O*-メチル)イノシトール; (1-5): 1,5-ジ-(*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ(*O*-メチル)イノシトール, (1-4): 1,4-ジ-(*O*-アセチル)-2,3,5,6-テトラ(*O*-メチル)イノシトールの 3 種類の部分メチル化イノシトールアセテートのマススペクトルについて特徴的なフラグメントイオンを検索したところ, (1-2)(1-6) では m/z 172 (重水素化合体: m/z 175): $^{-4}\text{CH}^{-5}\text{CH}(\text{OCH}_3)^{-6}\text{CH}(\text{OCH}_3)^{-1}\text{CH}(\text{OCOCH}_3)$ または $^{-1}\text{CH}(\text{OCOCH}_3)^{-2}\text{CH}(\text{OCH}_3)^{-3}\text{CH}(\text{OCH}_3)^{-4}\text{CH}$ が, (1-3)(1-5) では m/z 116 (重水素化合体: m/z 119): $^{-3}\text{CH}(\text{OCOCH}_3)^{-4}\text{CH}(\text{OCH}_3)$ または $^{-1}\text{CH}(\text{OCOCH}_3)^{-6}\text{CH}(\text{OCH}_3)$ が, (1-4) では m/z 160 (重水素化合体: m/z 163): $^{-1}\text{CH}(\text{OCOCH}_3)^{-2}\text{CH}(\text{OCH}_3)^{-3}\text{CH}(\text{OCH}_3)$ がそれぞれに相当することを知った (data not shown, 投稿準備中)。全メチル化した AGL₁ を 2M 塩酸で 100 °C, 20h 分解して得た部分メチル化糖をアセチル誘導体として GC (Fig. 9) および GC-MS 分析 (Fig. 10) に処したところ, そのマススペクトル中に (1-2) および (1-6) 結合に特徴的なフラグメントイオンである m/z 172 の存在を確認した。

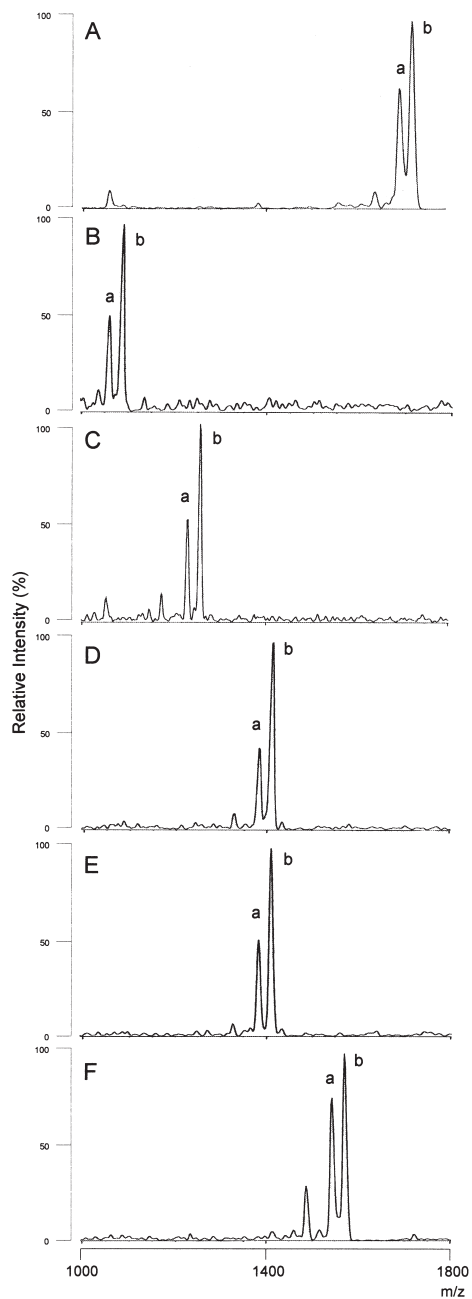


Fig. 8 Negative-Ion Linear Mode MALDI-TOF MS Spectra of Purified Partial Acidic Hydrolysates, AGL₅-1, AGL₅-2, AGL₅-3a, AGL₅-3b and AGL₅-4.

A: intact AGL₅; a, $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ ion at m/z 1692.7 (h22:0-t18:0); b, m/z 1720.7 (h24:0-t18:0); B: AGL₅-1; a, m/z 1058.2; b, m/z 1085.2; C: AGL₅-2; a, m/z 1222.8; b, m/z 1250.2; D: AGL₅-3a; a, m/z 1382.1; b, m/z 1409.9; E: AGL₅-3b; a, m/z 1382.7; b, m/z 1410.3; F: AGL₅-4; a, m/z 1544.6; b, m/z 1572.6.

3.3.4.2 過ヨウ素酸酸化によるエリトリトールの同定

Man と Ins の結合位置については, 上述したように部分メチル化イノシトールアセテートのマススペクトルから (1-2) あるいは (1-6) 結合のいずれかの可能性が示唆された。そこで, AGL₁ および AGL₅₋₁ を用いて Fig. 11 に示した反応スキームによって得られる過ヨウ素酸酸化成績体より結合位置の決定を試みた。即ち, Table 2 に示したように反応の最終成績体である糖アルコールの同定によりその結合位置を明らかにする方法であるが, AGL₁ および AGL₅₋₁ からは (1-2) 結合であれば最終成績体の糖アルコールとしてエリトリトールの, (1-6) 結合であればスレイトールの出現が確認できることになる。Fig. 12 に, 反応中間成績体で, いずれも反応スキーム (Fig. 11) の A(III) あるいは B(III) に相当するところの過ヨウ素酸酸化反応後の還元成績体の MALDI-TOF MS スペクトルを示した。AGL₁ の分解成績体からは [M-H]⁻: m/z 745, 773 (Fig. 12-A) を, AGL₅₋₁ の分解成績体からは [M-H]⁻: m/z 744, 772 (Fig. 12-B) を検出したが, いずれも

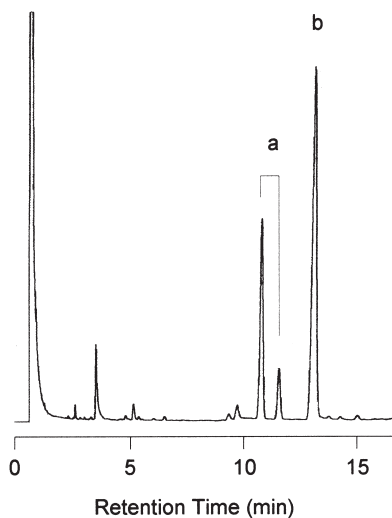


Fig. 9 Gas Chromatogram of Partially Methylated Sugar Acetate Derivatives derived from AGL₁. Peaks a, 1-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylmannose; peak b, 1,2-di-*O*-acetyl-3,4,5,6-tetra-*O*-methylinositol or 1,6-di-*O*-acetyl-2,3,4,5-tetra-*O*-methylinositol.

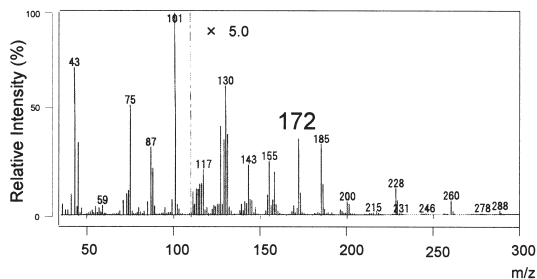


Fig. 10 EI-Mode GC-MS Spectrum of Peak (b) in Fig. 9.

計算値: [M-H]⁻: m/z 746, 774 に近似した。また, これらは, AGL₁ および AGL₅₋₁ の両者のスペクトルのマス数 ([M-H]⁻: m/z 1058, 1085) (Fig. 3-B, Fig. 8-A) に対して 312~314 マス (平均 313 マス) の差が認められた。このマス数の差が計算値: A(I)-A(III) または B(I)-B(III) により算出した [M-H]⁻ m/z 1058-746=312, [M-H]⁻ m/z 1086-774=312 に酷似していることから Man が Ins の 2 位あるいは 6 位に結合していることが強く示唆された。さらにこれらの反応中間成績体をメタノリシス, アルカリホスファターゼ処理して得られた糖アルコールをアセチル化後, GC および GC-MS 分析に処した。その結果, AGL₁ および AGL₅₋₁ のいずれからでもエリトリトールを検出したことから Man は Ins の 2 位に結合していることを決定した (Fig. 13)。

3.3.5 アノマー配置の決定

3.3.5.1 ¹H-NMR 分析

AGL₁ および AGL₅ について糖鎖のアノマー配置を決定するために ¹H-NMR 分析を行った。Fig. 14 にそれらのスペクトルを, また Table 3 に化学シフトおよびカップリング定数を示したが, AGL₁ からは α-アノマー Man に, AGL₅ からは α-アノマー Man, α-アノマー Fuc, α-アノマー Gal (2 モル分) および β-アノマー Gal に由来するシグナルがそれぞれ認められた。さらに, 二次元 NMR 分析の結果から AGL₅ に含まれる 3 モルの Gal のうち, 多分岐 Gal のみが β-アノマーであることが確認された (data not shown, 投稿準備中)。

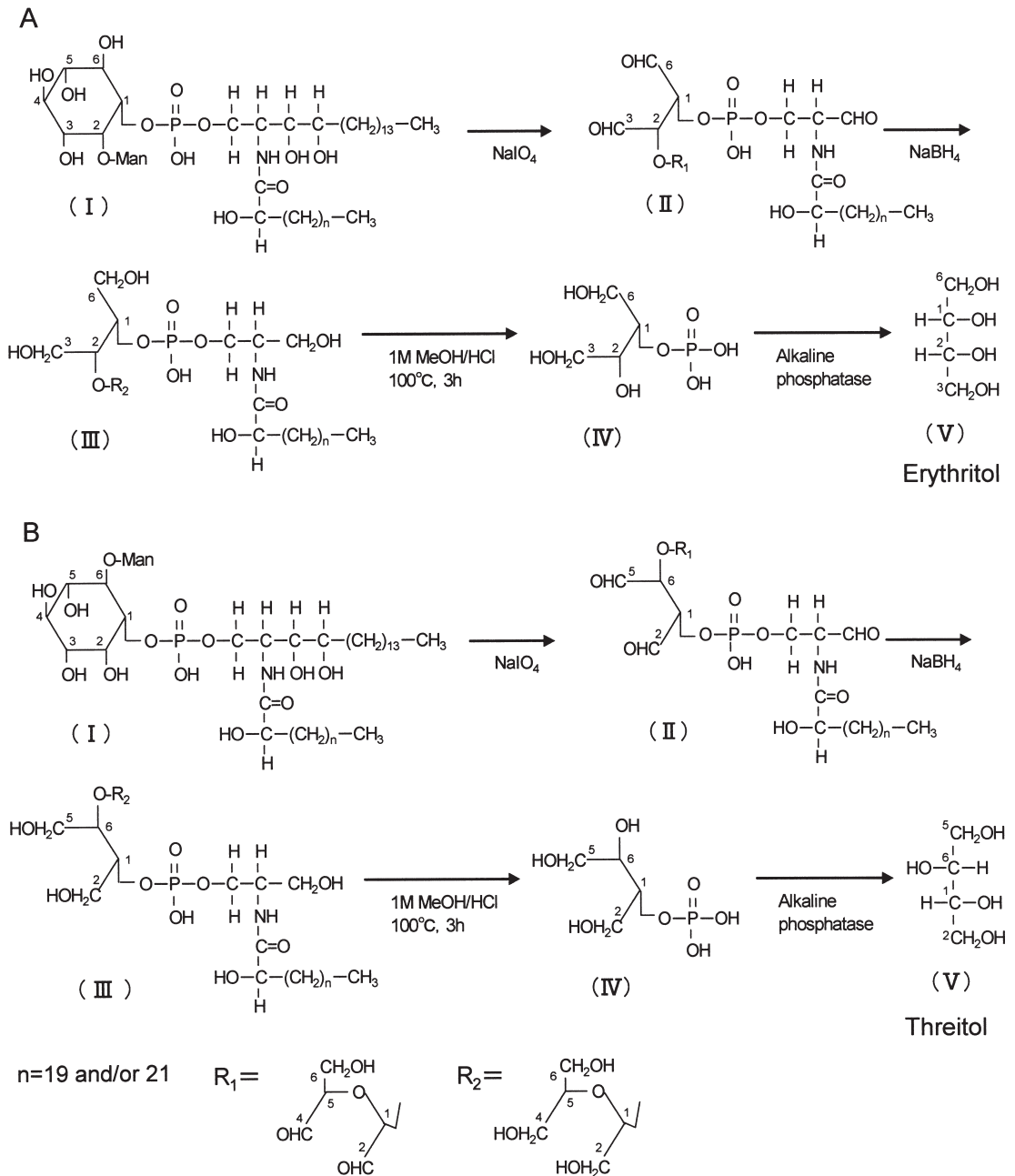


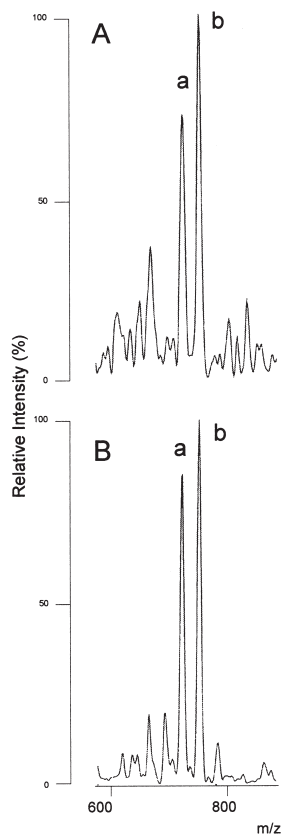
Fig. 11 Proposed Reaction Schemes of the Periodate Oxidation of AGL₁ and AGL₅₋₁, and Subsequent Processing Leading to Erythritol (A) or Threitol (B).

Table 2 Possible Substitutions on *myo*-Inositols by Mannose in AGL₁ and AGL₅₋₁

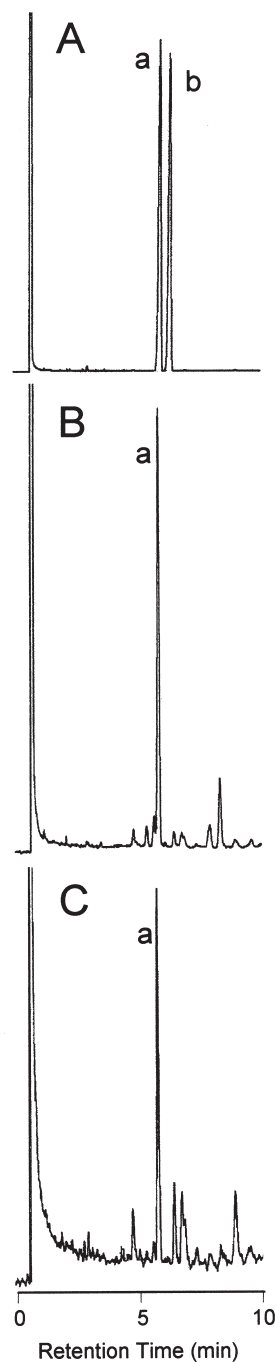
Possible substituted positions on <i>myo</i> -inositols of AGL ₁ and AGL ₅₋₁ *	Final alcohol products derived from substituted <i>myo</i> -inositol**
1,2	erythritol
1,3	ribitol
1,4	glycerol
1,5	xylitol
1,6	threitol

*Phosphate group is linked to *myo*-inositol at the C-1 position.

**The predicted corresponding final *myo*-inositol-derived alcohol products after periodate oxidation followed by NaBH₄ reduction, methanolysis, enzymatic dephosphorylation and acetylation.

**Fig. 12 Negative-Ion Linear Mode MALDI-TOF MS Spectra of the Periodate Oxidation Products of AGL₁ and AGL₅₋₁.**

A, [M-H]⁻ ions at *m/z* 745.3 (a) and 773.3 (b) from oxidized AGL₁ (Fig. 11-A or B (III)); B, [M-H]⁻ ions at *m/z* 743.6 (a) and 772.2 (b) from oxidized AGL₅₋₁ (Fig. 11-A or B (III)).

**Fig. 13 Gas Chromatograms of the Final Acetylated Alcohol Products derived from the *myo*-Inositol Rings of AGL₁ and AGL₅₋₁ by Periodate Oxidation.**

A, authentic erythritol (a) and threitol (b) peracetates; B and C, erythritol peracetates derived from the *myo*-inositol rings in AGL₁ and AGL₅₋₁.

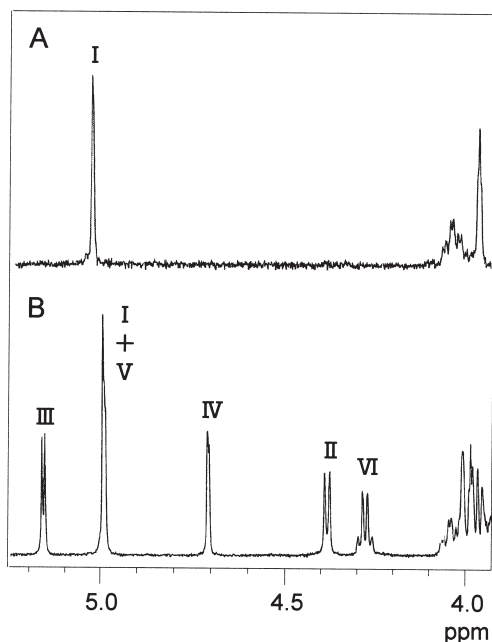


Fig. 14 Anomeric Proton Regions of the $^1\text{H-NMR}$ Spectra of AGL_1 and AGL_5 .

A, AGL_1 ; B, AGL_5 ; I, $\text{Man } \alpha$ (H-1); II, $\text{Gal } \beta$ (H-1); III, $\text{Fuc } \alpha$ (H-1); IV, $\text{Gal } \alpha$ (H-1); V, $\text{Gal } \alpha$ (H-1); VI, $\text{Fuc } \alpha$ (H-5).

3.3.5.2 酵素的加水分解によるガラクトース残基のアノマー配置

AGL_5 [(Gal1-3)(Gal1-6)(Fuc1-2)Gal1-6Man1-2Ins-P-Cer] および AGL_5 の部分加水分解成績体である AGL_{5-4} [(Gal1-3)(Gal1-6)Gal1-6Man1-2Ins-P-Cer] と AGL_{5-2} [Gal1-6Man1-2Ins-P-Cer] を用いて、これらの分子内に存在するガラクトース残基について α -、 β -ガラクトシダーゼによる酵素的加水分解を試みた。結果

の TLC を **Fig. 15** に示した。 AGL_5 は α -ガラクトシダーゼでのみ分解を受けて、TLC 上で移動度の異なる 3 種類の分解成績体を生じた (**Fig. 15-lane 2**)。移動度の最も大きい成績体は非還元末端に結合している 2 モルの Gal がすべて分解された [(Fuc1-2)Gal1-6Man1-2Ins-P-Cer] で、他の 2 種類は非還元末端に結合している Gal のいずれか一方が分解を受けたものであると考えられた。即ち、それらの構造は [(Gal1-3)(Fuc1-2)Gal1-6Man1-2Ins-P-Cer] および [(Gal1-6)(Fuc1-2)Gal1-6Man1-2Ins-P-Cer] で、両者のうちで TLC 上での移動度の大きい方は前者であることが、 AGL_5 の部分加水分解成績体の AGL_{5-3a} および AGL_{5-3b} の移動度 (**Fig. 7-lanes 4,5**) の差異から推察できた。一方、 AGL_{5-4} も α -ガラクトシダーゼでのみ分解を受けて、TLC 上で AGL_{5-2} と同じ移動度を示した (**Fig. 15-lane 5**)。また、 AGL_{5-4} が α -ガラクトシダーゼで、 AGL_{5-2} 以上の分解が生じないことから、 AGL_{5-2} の非還元末端に位置する Gal は β -アノマーであることが示唆された。従って AGL_{5-2} に β -ガラクトシダーゼを作用させたところ AGL_1 [Man1-2Ins-P-Cer] に相当する移動度に分解成績体を得ることができた (**Fig. 15-lane 9**)。これらの結果から AGL_5 に含まれる 3 モルのガラクトースのアノマー配置を次のように確認した。非還元末端に結合している 2 モルの Gal、即ち (Gal1-3) および (Gal1-6) は α -アノマー配置、分子内に存在する多分岐型の Gal は β -アノマーである。

Table 3 Chemical Shifts and $J_{1,2}$ Coupling Constants of the Protons of AGL_1 and AGL_5 in the Anomeric Regions.

AGL_1	Man α 1-2Ins -P-Cer				
	I				
Chemical shift (ppm)	5.03				
Coupling constant (Hz)	—				
AGL_5	(Gal α 1-3)(Gal α 1-6)(Fuc α 1-2)Gal β 1-6Man α 1-2Ins-P-Cer				
	V	IV	III	II	I
Chemical shift (ppm)	4.99	4.70	5.15	4.38	4.99
Coupling constant (Hz)	—	1.8	3.7	7.3	—

I to V are shown in Fig. 14.

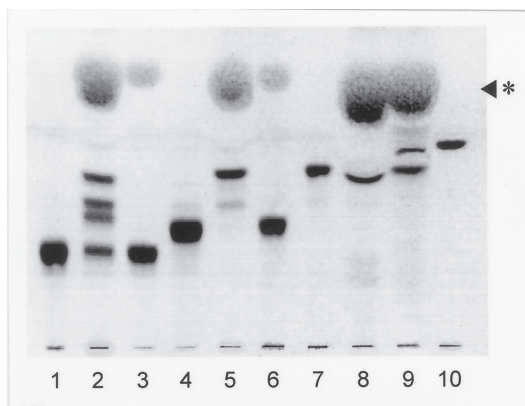


Fig. 15 Thin Layer Chromatogram of the Reaction Products from AGL₅, AGL₅-4 and AGL₅-2 obtained by Treatment with α - and β -Galactosidases.

Lanes 1, 4, 7 and 10, intact AGL₅, AGL₅-4, AGL₅-2 and AGL₁; lanes 2, 5 and 8, AGL₅, AGL₅-4 and AGL₅-2 incubated with α -galactosidase; lanes 3, 6 and 9, AGL₅, AGL₅-4 and AGL₅-2 incubated with β -galactosidase. * Asterisk indicates the detergent spots (sodium taurodeoxycholate). The plate was developed in 1-propanol-water-ammonia (75:30:5) for 2h, and the spots were visualized with orcinol-H₂SO₄.

4. まとめ

エリンギ (*Pleurotus eryngii*) の子実体より 3 種類のイノシトールリン酸含有糖脂質 (AGL₁, AGL₄, AGL₅) とこれらの糖脂質の前駆体脂質 (AGL₀) を単離し, それらの化学構造を AGL₀, Ins-P-Cer; AGL₁, Man α 1-2Ins-P-Cer; AGL₄, (Gal α 1-6)(Fuc α 1-2)Gal β 1-6Man α 1-2Ins-P-Cer; AGL₅, (Gal α 1-3)(Gal α 1-6)(Fuc α 1-2)Gal β 1-6Man α 1-2Ins-P-Cer と決定した。

本研究は, 財団法人北海道科学技術総合振興センター受託研究費 (平成 16 年度「食用茸類の未利用部を用いた機能性食品素材等の生産技術開発における有用成分の構造解析と生理活性の評価」) および文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 (B)16380063) によって行った。

文 献

1. J. D. Weete (1974) *Fungal Lipid Biochemistry*, Chapter 9. Sphingolipids, pp.267-286, Plenumpress, New York and London.
2. B. Weiss, R.L. Stiller (1972) *Biochemistry*, **11**, 4552-4557.
3. 浅輪和孝, 沢田満喜 (1979) *木材学会誌*, **25**, 749-752.
4. G. Kawai, Y. Ikeda (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **754**, 243-248.
5. 大西正男, 川瀬誠一, 伊藤精亮, 藤野安彦 (1984) 農芸化学会講演要旨集, pp.340.
6. 大西正男, 川瀬誠一, 伊藤精亮, 藤野安彦 (1984) 脂質生化学研究会要旨集, **26**, 112-115.
7. R. L. Lester, R. C. Dickson (1993) *Advances in Lipid Research*, Vol.26 (R. M. Bell, Y. A. Hannum, A. H. Merrill Jr., eds.) pp.253-274, Academic Press, San Diego.
8. M. Ohnishi, S. Kawase, Y. Kondo, Y. Fujino, S. Ito (1996) *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 51-56.
9. R. Jennemann, B. L. Bauer, H. Dertalanffy, R. Geyer, R. M. Gschwind, T. Selmer, H. Wiegandt (1999) *Eur. J. Biochem.*, **259**, 331-338.
10. N. Takakuwa, M. Tanji, A. Ohmura, M. Kinoshita, M. Ohnishi (2000) *JOCs/AOCS World Congress 2000 (Kyoto)*, pp.241.
11. R. Jennemann, R. Geyer, R. Sandhoff, R. M. Gschwind, S. B. Levery, H-J. Gröne, H. Wiegandt (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1190-1205.
12. 糸乗前, 卯田昌代, 山脇沙帆, 青木一弘, 杉田陸海 (2003) *滋賀大学教育学部紀要 自然科学*, **53**, 27-34.
13. 糸乗前, 青木一弘, 杉田陸海 (2004) *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, **209**, 211-218.
14. M. Sugita, T. Mizunoma, K. Aoki, J. T. Dulaney, F. Inagaki, M. Suzuki, A. Suzuki, S. Ichikawa, K. Kushida, S. Ohta, A. Kurimoto (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1302**, 185-192.
15. J. C. Dittmer, R. L. Lester (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127.
16. C. S. Hanes, F. A. Isherwood (1949) *Nature*, **164**, 1107-1112.
17. S. Itonori, M. Takahashi, T. Kitamura, K. Aoki, J. T. Dulaney, M. Sugita (2004) *J. Lipid Res.*, **45**, 574-581.
18. I. Ciucanu, F. Kerek (1984) *Carbohydr. Res.*, **131**, 209-217.
19. R. C. Gaver, C. C. Sweeley (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298.
20. 青木一弘, 前なおみ, 川尻佳絵, 杉田陸海 (1998) *脂質生化学研究*, **40**, 116-119.
21. 遠藤玉夫 (1996) *グライコバイオロジー実験プロトコール* (谷口直之, 鈴木明身, 古川清, 菅原一幸 監修) pp.29-32, 秀潤社.
22. 杉田陸海, 早田知恵子, 鈴木實, 竹田忠紘, 水野間智子, 牧野具加, 成島謙司, 堀太郎 (1992) *油化学*, **41**, 568-573.
23. T. C-Y. Hsieh, K. Kaul, R. A. Laine, R. L. Lester (1978) *Biochemistry*, **17**, 3575-3582.
24. M. Sugita, T. Mizunoma, K. Aoki, J. T. Dulaney, F. Inagaki, M. Suzuki, A. Suzuki, S. Ichikawa, K. Kushida, S. Ohta, A. Kurimoto (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1302**, 185-192.