

アコヤガイ, *Pinctada martensii* のホスホノ脂質 (Ceramide 2-Aminoethylphosphonate) のセラミド組成*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**}**Aliphatic Components of Phosphonolipids (Ceramide 2-Aminoethylphosphonates) from the Pearl Oyster, *Pinctada martensii****Saki ITONORI¹, Tomonori KITAMURA¹, Rieko TANAKA¹
Noriko MIYAGAKI¹, Hiroaki SAITO² and Mutsumi SUGITA^{1**}**Abstract**

Two phosphosphingolipids, ceramide aminoethylphosphonates named CAEPn-1 and CAEPn-2 were purified from the pearl oyster, *Pinctada martensii* by successive column chromatography on ion exchange Sephadex (QAE- and DEAE-Sephadex) and silicic acid (Iatrobeads) and their aliphatic components were determined by converting to various derivatives. The numbers of carbons and hydroxylated positions of the fatty acids were confirmed by gas chromatograph-mass spectrometry as their methyl ester derivatives. On the other hand, the numbers of carbons and double bonds of the sphingoids 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 CAEPn by hydrogen fluoride degradation. The major fatty acids of CAEPn-1 were hexadecanoic (82.0%) and heptadecanoic acid (13.9%), and those of CAEPn-2, 2-hydroxyhexadecanoic (84.1%) and 2-hydroxy heptadecanoic acid (15.9%). The major sphingoids of CAEPn-1 were octadeca sphinga-4-enine (24.7%), 4, 8-dienine (40.1%) and 4, 8, 10-trienine (24.6%), and those of CAEPn-2, octadeca sphinga-4, 8, 10-trienine (29.2%) and its 9-methyl homologue (58.6%).

Key words: Phosphonolipid, Sphingoid, Ceramide, Pearl oyster (*Pinctada martensii*)

* 本研究の一部は第43回(2004年11月, 大阪)および第44回(2005年9月, 横浜)日本油化学会年会で発表

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) (2006年9月26日受理)

1. 緒 言

貝類の主なスフィンゴリン脂質としてホスホノ脂質が存在し、中でもその代表的な ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEPn) は、多くの貝類において含有量も高くスフィンゴ脂質画分の 60～90% に及んでいる^{1,2)}。本論文の主題であるアコヤガイ、*Pinctada martensii* についても、今から 36 年前にその存在が見出され、当時の報文の総括に「1. 薄層クロマトグラム上で分離する 2 種の CAEPn が海産二枚貝のアコヤガイ、*P. martensii* 中に存在することを認め、それらをカラムクロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーを併用して単離することができた。2. 薄層クロマトグラムでクロロホルム-メタノール-氷酢酸-水 (100:20:12:5, v/v) による展開で高い移動率を示すものの構成脂肪酸は主にパルミチン (78%)、マーガリン (18%)、ステアリン (4%) の各酸、また、低い移動率を示すものは α -オキシパルミチン (82%)、 α -オキシマーガリン (16%) の各酸である。高等動物臓器のスフィンゴリピドの α -オキシ酸と比較すると一般に炭素数は小さいのが特徴のようである。」と、記されており、薄層クロマトグラム上で構成脂肪酸の相違で分離する 2 種類の CAEPn の存在と、詳細な脂肪酸分析結果について報告している。特に、脂肪酸については 3 種類 (パルミチン、マーガリンおよびステアリン酸) の α -オキシ酸を合成し、それらのメチルエステル誘導体のガスクロマトグラフィーによる保持時間より決定している³⁾。

本報では、現在、当教室で確立している無脊椎動物の複合脂質の分画、調製方法を用いたアコヤガイからの 2 種類の CAEPn の単離、それらの構成脂肪酸組成の再確認およびそれらの長鎖塩基成分について述べる。特に、長鎖塩基成分については、過ヨウ素酸-過マンガン酸酸化成績体の分析により、C-9 位における分枝型のトリエン塩基の存在を明らかにすることができた。

2. 実 験

2.1 アコヤガイ貝肉部より CAEPn (CAEPn-1 および CAEPn-2) の単離

アコヤガイ 500 個体 (長崎県五島市奈留町漁協より購入, 約 10 kg) の乾燥貝肉 (約 440 g) から 5 倍容のクロロホルム-メタノールの混合液, 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た後, 溶媒を減圧留去して粗複合脂質画分 (C/M extract) として 42 g を得た。次いでアシル型およびアルケニル型の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 pH 1 での弱酸性処理を施した後, アセトンで数回洗浄し, 6.6 g のアセトン不溶性粉末 (粗スフィンゴ脂質画分) を得た。このものを当教室で確立化している無脊椎動物複合脂質の分画, 調製法に準じて QAE-Sephadex A-25 (Amersham Biosciences AB) カラムクロマトグラフィー (OH⁻ form, 4.0 × 20 cm, bed volume 230 mL) によって中性および極性脂質画分に分画した⁴⁻⁶⁾。カラムからの溶出溶媒には, 中性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 1 倍容のメタノール, 極性溶媒としてそれぞれ 5 倍容の 0.05 M, 0.15 M, 0.45 M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を用いた。このクロマトグラフィーで後者の 0.05 M 濃度の極性溶媒によって溶出された画分を水道水に対して 2 日間, 透析脱塩し, 980 mg の, いわゆるカラム担体への吸着性物質を得た。さらに, この吸着性物質 (0.05 M 濃度溶出画分) の中から共存する酸性物質を除去するために, DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー (COO⁻ form, 4.0 × 20 cm, bed volume 160 mL) を行った。カラムからの溶出溶媒には中性溶媒としてカラム容積の 5 倍容のクロロホルム-メタノール-水 (30:60:8) および 1 倍容のメタノール, 極性溶媒として 1 倍容の 0.5 M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を用いた。このクロマトグラフィーにおいて, 前者のクロロホルム-メタノール-水で溶出されたカラム担体への非吸着性の物質として 850 mg

(CAEPn fraction) を回収した。次いで、その非吸着性物質 (CAEPn fraction) のうちの 150 mg をケイ酸 (Iatrobeads, 6 RS-8060, Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.) カラムクロマトグラフィー (1.0 × 90 cm, bed volume 70 mL) によるクロロホルム-メタノール-水 (80:20:1, 400 mL ~ 50:50:5, 475 mL) を溶出溶媒とする濃度勾配法を用いて展開した。カラムからの溶出速度を 0.6 mL/min に保って溶出し、3 mL ずつ分取して薄層クロマトグラフィーで検し、CAEPn-1 (収量, 55 mg) および CAEPn-2 (25 mg) を得た。Fig. 1 に当教室において確立したアコヤガイからのスフィンゴ脂質の分画方法および調製方法を示した。

2.2 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、クロロホルム-メタノール (95:5) およびクロロホルム-メタノール-水 (60:25:4) を使用し、検出はニンヒドリン試薬 (アミノ基)、Dittmer-Lester 試薬 (リン)⁷ および 50% 硫酸溶液によった。

2.3 TLC-immunostaining

試料をプラスチック製プレート (Polygram

Sil G, Macherey-Nagel GmbH & Co.) 上に、クロロホルム-メタノール-水 (60:25:4) を用いて展開した。展開後、風乾して溶媒を除去したプレートに、PBS (10 mM リン酸緩衝液-生理食塩水, pH 7.2) をスプレーして湿潤し、蒸留水で 5 倍に希釈したブロッキング溶液 (Blocking Solution in PBS for Immunoassay, pH 7.2, ナカライテック株式会社) の入ったプラスチック製容器 (7 × 4.5 cm) の中に、室温で 12 時間浸した。次に、ブロッキング溶液を除去して、5 mL の一次抗体希釈溶液 (ブロッキング溶液で 200 倍に希釈した抗 CAEPn 抗体⁸) を入れて、2 時間インキュベートした。反応後、PBS で 3 回洗浄し、次いで二次抗体としてブロッキング溶液で 200 倍に希釈した 5 mL のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L chain-specific (whole serum), Organon Teknika Cappel Research Products, Durham, NC) 溶液を入れ、1 時間インキュベートした。その後、PBS で 5 回洗浄し、基質溶液 (3 mg の 4-chloro-1-naphthol を 1 mL のメタノールに溶解したもの、5 mL の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) および 5 μ L の H₂O₂ の混合液) を添加して発色させた。反応は、青紫色のバンドが出現した

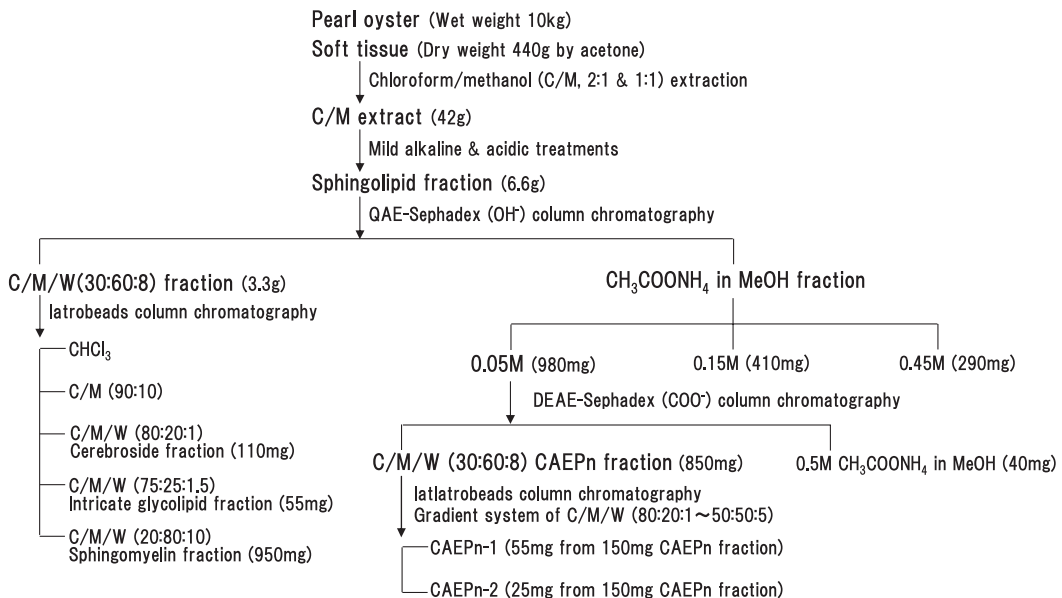


Fig. 1 Scheme for Preparation and Fractionation of Sphingolipids from the Pearl Oyster, *Pinctada martensii*.

ところで水洗いして停止した。

2.4 フッ化水素酸分解および分解成績体（セラミド）の精製

5～10 mg 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、室温 (20°C) で 18 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ケイ酸 (Iatrobeads, 6 RS-8060) カラムクロマトグラフィー (1.0 × 40 cm, bed volume 30 mL) で、クロロホルム-メタノール (98:2, 95:5, 90:10, 85:15 の各 30 mL) を溶出溶媒とする段階的溶出法を用いて精製した。それぞれの溶出液を濃縮乾固して TLC で検したが、目的とするセラミドは 90:10 溶出画分に存在した。

2.5 ガスクロマトグラフィー (GC)

2.5.1 脂肪酸メチルエステルの分析

200 μg の試料に 0.2 mL の 1 M メタノール性塩酸を加え、電子レンジ (TOSHIBA ER-VS 1) で 45 sec 間、電磁波を照射した⁹⁾。冷却後、生成した脂肪酸メチルエステルを 0.2 mL の n-ヘキサンで抽出し GC (Shimadzu GC-18 A) 分析を行った。分析カラムは 0.22 mm × 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 μm 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 170°C → 230°C (4°C/min) に設定した。

2.5.2 酸加水分解法による長鎖塩基の分析

200 μg の試料に 0.2 mL の水性メタノール塩酸 (8.6 mL の濃塩酸と 9.4 mL の水にメタノールを加えて全量を 100 mL に調製) を加えて、70°C で 18 時間反応させた¹⁰⁾。反応物に 0.2 mL の n-ヘキサンを加えて生成した脂肪酸メチルエステルの抽出除去操作を 3 回行った後、残液よりメタノールを留去した。次いで、0.6 mL の 1 M 水酸化ナトリウム水溶液-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後、遠心分離して 2 層に分配した。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°C → 230°C (2°C/min)) に供した。

2.5.3 アルカリ加水分解法による長鎖塩基の分析

約 1 mg の試料をスクリュウキャップ付の試験管にとり、2 mL の 1,4-dioxane および 2 mL の 10% (w/v) 水酸化バリウム水溶液を加えた後、反応温度を 110°C に保持したブロックヒーターに 24 時間入れた¹¹⁾。反応終了後、放冷し、2 mL のクロロホルムを加えて攪拌、遠心分離して、上層を除去した。残った下層に 5 mL の水を加えて攪拌し、遠心分離して上層を除去した。この洗浄操作を 5 回繰返した後、下層を窒素気流下で濃縮乾固し、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°C → 230°C (2°C/min)) に供した。

2.6 ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS)

Shimadzu GCMS-QP 5050 ガスクロマトグラフィー-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: 脂肪酸分析 (A), 80°C (2 min) → 170°C (20°C/min) → 240°C (4°C/min), 脂肪酸分析 (B), 80°C (2 min) → 140°C (20°C/min) → 240°C (4°C/min), 長鎖塩基分析, 80°C (2 min) → 210°C (20°C/min) → 230°C (4°C/min) に設定; インターフェース温度: 250°C; 試料注入口温度: 240°C; ヘリウム圧力: 100 kPa; スプリットレス時間: 3.5 min; イオン化電圧: 70 eV (EI), 100 eV (CI); イオン化電流: 60 μA (EI), 200 μA (CI); 反応ガス (CI): イソブタン。

2.7 CAEPn の水素による還元および還元 CAEPn からの長鎖塩基成分の調製

約 5 mg の CAEPn を 2 mL のクロロホルム-メタノール (2:1) に溶解し、Platinum Black 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^{4, 12, 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上述の方法 (2.5.2) により長鎖塩基成分を調製し、GC および GC-MS による分析 (2.5.2.6) や過ヨウ素酸-過マンガン酸酸化 (2.8) に処した。

2.8 過ヨウ素酸-過マンガン酸酸化

スクリュウキャップ付きの丸底試験管に、2.4で得たセラミドあるいは2.7で得た長鎖塩基のそれぞれ1~2 mgと0.4 mLのtert-Butanolを入れて、3分間の超音波照射をして溶解した後、それに1.2 mLの0.02 M炭酸ナトリウム水溶液、0.54 mLの酸化試薬(10 mgのNaIO₄および0.8 mgのKMnO₄を含む)、0.34 mLの水を加えて室温(20°C)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を加え過剰の酸化試薬を分解し、次いで、反応溶液に6 M HClを1, 2滴加えて酸性とした^{5,14}。二重結合のところ、あるいは水酸基とアミノ基の間で開裂して生成した脂肪酸を0.5 mLのn-ヘキサンで抽出し、2.5.1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分析を行った。なお、セラミドを試料として用いた場合は、二重結合のところを開裂して生じる脂肪酸が短鎖脂肪酸であることより、GC分析時における温度プログラムを100°C→116°C(2°C/min)→230°C(4°C/min)に設定した。GC-MS分析については、2.6に示した脂肪酸分析(B)、80°C(2 min)→140°C(20°C/min)→240°C(4°C/min)の分析プログラムを使用した。

2.9 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-8400 Sを用いて測定した。乾燥させた試料をMIRacleA(1回反射水平型ATR装置)のZnSeプリズム上に載せ、加圧用クランパーにより加圧した。バックグラウンド測定補正を行い、45回積算した。スペクトル解析にはIRsolution Ver. 1.2を用いた。

2.10 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)

4 μLのクロロホルム-メタノール(2:1)に溶解した100 pmol程度のN-アセチル化CAEPn(N-アセチル化反応:100 μgのCAEPnを500 μLのメタノールに溶解し、10 μLのピリジンと50 μLの無水酢酸を加えて室温で30分間反応)をサンプルスライド上に添

加し、室温で自然乾燥させた。次いで、乾固物上にマトリックスとして4 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Voyager-DE STRを、スペクトルの解析にはVoyager Workstation Ver. 5を用いた。イオン源として窒素レーザー(レーザー光波長、377 nm)を使用し、negative ion mode測定を行った。質量校正はangiotensin I(1296.68 Mass Units, Wako Pure Chemical Ind., Ltd.), bradykinin Fragment 1-5(Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, 573.31 Mass Units, Sigma Chemical Co.), キンバエ幼虫(*Lucilia caesar*)の中性糖脂質L-3, L-5およびL-7によった¹⁵。

3. 結果および考察

3.1 アコヤガイのスフィンゴ脂質と2種類のCAEPn(CAEPn-1およびCAEPn-2)

アコヤガイの粗スフィンゴ脂質画分(6.6 g)をイオン交換Sephadex(QAE-Sephadex A-25)で分画した際、非吸着性画分(C/M/W, 30:60:8 fraction, 3.3 g)からは、既にsphingomyelinを報告しており、さらに現在、分析中であるが、cerebroside, ceramide di-およびtrihexosideの存在も確認している^{5,16,17}。一方、吸着性画分は酢酸アンモニウム濃度を段階的に変化させた溶出で3画分(0.05 M濃度溶出画分, 980 mg; 0.15 M濃度, 410 mg; 0.45 M濃度, 290 mg)に分画された。最初の溶出画分(0.05 M濃度)にのみ、TLC上でニンヒドリン試薬およびリン試薬の両方に陽性を示す物質の存在を確認したが、後二者の画分については、それぞれ溶出物質を回収することが可能であるものの現時点では、非脂質性物質であると考えている。従って、以後の単離、精製および分析は、0.05 M濃度溶出画分を用いた。また、今までに種々の分画方法を試行してきているが、このQAE-Sephadex分画における段階的濃度溶出方法の採用が最適であると思われた。すなわち、次操作として純酸性物質を除去する目的で行うDEAE-Sephadex分画において、

Sephadex 樹脂および溶出溶媒の効率的な使用が可能となった。DEAE-Sephadex の非吸着性画分 (C/M/W, 30:60:8 CAEPn fraction, 850 mg) として, **Fig. 2, lane 1** に示すされるように, 主として2種のスポット (TLC 上での移動度の大きい順に, CAEPn-1 および CAEPn-2 と仮称) が認められた。CAEPn-1 および CAEPn-2 のいずれもニンヒドリン試薬およびリン試薬の両方に陽性を示した。次に, この画分の 150 mg 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-水系の濃度勾配溶出で分画し, TLC 上でほぼ単一の物質としてそれぞれ CAEPn-1 (収量: 55 mg) および CAEPn-2 (25 mg) を得た (回収率: 53.3%) (**Fig. 2**)。これらの IR スペクトルを測定したところ, 両者のスペクトルからは標準標品のセタシジミ CAEPn のスペクトルに酷似するように, 1180 cm^{-1} に C-P 結合のリン残基の -OH 基, 1650 および 1550 cm^{-1} にアミド結合 I, II に由来する吸収が観察され, セラミドアミノエチルホスホン

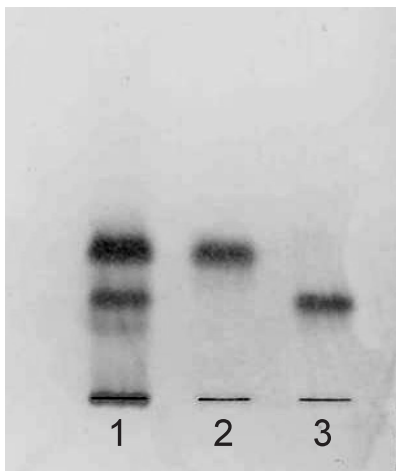


Fig. 2 Thin-Layer Chromatogram of the isolated Phosphonolipids from the Pearl Oyster, *P. martensii*.

Lane 1, CAEPn fraction eluted with C/M/W (30:60:8) using DEAE-Sephadex A-25 column chromatography shown in Fig. 1; lane 2, isolated CAEPn-1; lane 3, isolated CAEPn-2. The plate was developed in chloroform-methanol-water, 60:25:4 (v/v) for 30 min, and the spots were visualized with Dittmer-Lester reagent.

酸 (ceramide 2-aminoethylphosphonate) であることが推測できた。さらに, 当教室で開発した CAEPn に対して極めて高い特異性を有する抗 CAEPn 抗体を用いて TLC-immunostaining を試みたところ, 単離した2種類の CAEPn のいずれも染色されることが観察された。従って, この2種類はいずれもセラミドアミノエチルホスホン酸であることが決定された。また, これらの CAEPn をフッ化水素酸で処理して得られたクロロホルム-メタノール可溶性の成績体を, ケイ酸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。これらの 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スペクトルに吸収端が全て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 分析においてもこれらの成績体の移動度は標準品の移動度と一致した (**Fig. 3**)

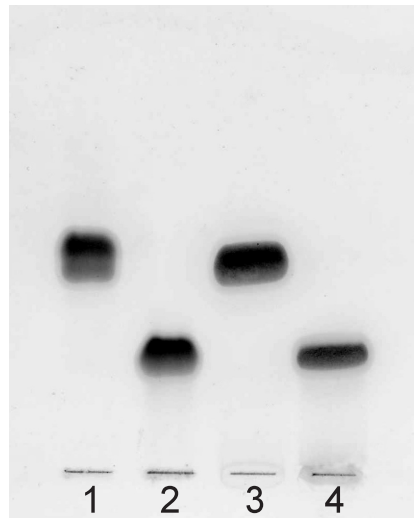


Fig. 3 Thin-Layer Chromatogram of Ceramides derived from CAEPn-1 and CAEPn-2 by HF Treatment

Lane 1, authentic ceramide-containing nonhydroxy fatty acids from the bovine brain; lane 2, authentic ceramide-containing hydroxyl fatty acids from the bovine brain; lane 3, ceramide derived from CAEPn-1; lane 4, ceramide derived from CAEPn-2. The plate was developed in chloroform-methanol, 95:5 (v/v) for 15 min, and the spots were visualized with 50% H_2SO_4 reagent.

3.2 CAEPn-1 および CAEPn-2 のセラミド成分中の脂肪酸組成

CAEPn-1 および CAEPn-2 のセラミド成分中の脂肪酸組成について、メチルエステル誘導体として GC と GC-MS 分析を行った。それらのガスクロマトグラムを Fig. 4 に示したが、GC の保持時間および GC-MS の分析結果より、それぞれ組成は、CAEPn-1 : パルミチン酸 (82.0%), マーガリン酸 (13.9%) およびステアリン酸 (4.1%), CAEPn-2 : 2-ヒドロキシパルミチン酸 (84.1%) および 2-ヒドロキシマーガリン酸 (15.9%) であり、既に報告している結果、CAEPn-1 : パルミチン酸 (78%), マーガリン酸 (18%) およびステアリン酸 (4%), CAEPn-2 : 2-ヒドロキシパルミチン酸 (82%) および 2-ヒドロキシマーガリン酸 (16%) に極めて近い値であることを確認した³⁾。

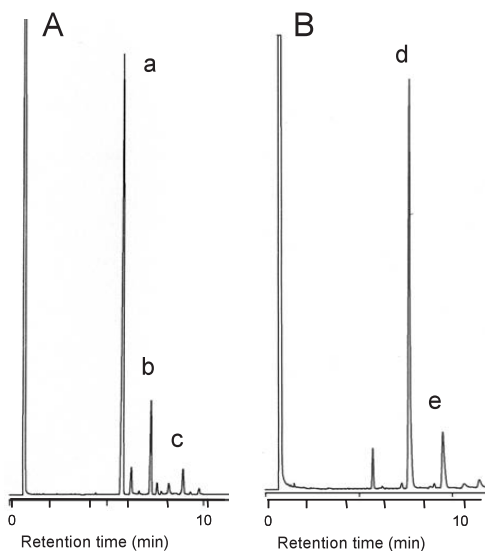


Fig. 4 Gas Chromatograms of Fatty Acid Compositions of CAEPn-1 and CAEPn-2.

A: Fatty acid methyl esters of CAEPn-1; a, methyl palmitate (16:0); b, methyl margarate (17:0); c, methyl stearate (18:0); B: fatty acid methyl esters of CAEPn-2; d, methyl 2-hydroxy palmitate (h16:0); e, methyl 2-hydroxy margarate (h17:0).

3.3 CAEPn-1 および CAEPn-2 のセラミド成分中の長鎖塩基組成

3.3.1 長鎖塩基のトリメチルシリル (TMS) 誘導体による分析

CAEPn-1 および CAEPn-2 のそれぞれについて、酸性とアルカリ性による2種類の加水分解を行って得た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. 5 に示した。また、CAEPn-1 のアルカリ性加水分解で得た長鎖塩基のトリメチルシリル誘導体の GC-MS スペクトルを Fig. 6 に示した。それぞれのガスクロマトグラム上に a, b, c, d, e を付したが、標準のスフィンゴシン (octadecasphingga-4-enine)-TMS 誘導体の GC での保持時間および GC-MS スペクトル ($M = 443$) と比べてところ、それぞれ、a は d 16:1 ($M = 415$) のスフィンゴシン, b は d 18:2 ($M = 441$) のスフィンガジエン, c は d 18:1 ($M = 443$) のスフィンゴシン, d は d 18:3 ($M = 439$) のスフィンガトリエン, e は d 19:3 ($M = 453$) のスフィンガトリエンであることが判明した。しかしながら、従来より広く一般に長鎖塩基成分の調製に用いられている水性メタノール性塩酸法による酸性加水分解で得られたデータ (Fig. 5, Acidic hydrolysis) と、新しく本実験に採用したアルカリ性加水分解法によって得られたデータ (Fig. 5, Alkaline hydrolysis) を比較する時、両者のガスクロマトグラム上のピークの形状が著しく異なるとともに、酸性加水分解法によるデータでは、特に、GC-MS 解析から d と e の混在が指摘されたり、また、大量の分解副産物と考えられるピークが出現した。これらの事実から、アコヤガイ CAEPn の長鎖塩基成分は、今までに見出されているそれらとは異なった構造を有しているものであることが示唆された。アルカリ性加水分解法は酸性加水分解法と比べて、長鎖塩基成分の回収率が低いために、分解に用いる試料量は、約 5 倍程度が必要となるが、今後、新規の長鎖塩基成分としているスフィンゴ脂質からの長鎖塩基成分の調製には、酸性およびアルカリ性の加水分解法の併用が推奨される。Table 1 にアルカリ性加水分解法による長鎖塩基の組成比を示したが、CAEPn-1 および CAEPn-2 とともに多

不飽和結合塩基が大部分を占めていた。また、水素添加した CAEPn-2 から調製した長鎖塩基の分析からは d 18:0 (octadecasphinganine) および d: 19:0 (nonadecasphinganine) に相当するジヒドロスフィンゴシン (dihydro-sphingosine) を検出したが (Fig. 5, Alkaline hydrolysis, CAEPn-2; Fig. 7), それらは前述した組成比である炭素数 18-同族体 (d 18:1 + d 18:2 + d 18:3 = 2.7% + 9.5% + 29.2% = 41.4%) と 19-同族体 (d 19:3 = 58.6%) を十分に支持する値、炭素数 18-同族体 (d 18:0 = 35.5%) および炭素数 19-同族体 (d 19:0 = 64.5%) を示した (Table 1)。しかしながら、d 18:0 に相当するジヒドロスフィンゴシンは標準品のそれと GC の保持時間が一致したが、d 19:0 に相当するジヒドロスフィンゴシンの保持時間は、用いた分析条件を考慮するとき、その保持時間が d 18:0 に極めて近接していることから分枝構造を有している可能性が示唆された。

3.3.2 過ヨウ素酸-過マンガン酸酸化による d 16:1, d 18:1, d 18:2, d 18:3 および d 19:3 における二重結合位置の決定

CAEPn-1 および CAEPn-2 のフッ化水素酸処理で調製したセラミド (CAEPn-1 Cer および CAEPn-2 Cer と仮称) を過ヨウ素酸-過マンガン酸試薬で酸化分解し、それらの反応成績体として生じる短鎖脂肪酸を GC および

GC-MS 分析によって調べて長鎖塩基の二重結合位置を決定した。今までに多不飽和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 $\Delta^{4,8}$ -, $\Delta^{4,11}$ -, $\Delta^{4,12}$ -, $\Delta^{4,13}$ -, $\Delta^{4,14}$ -, $\Delta^{4,8,10}$ -塩基などの存在が報告されている^{4,14,18-28}。もし、これらの塩基が存在するのであれば、過ヨウ素酸-過マンガン酸試薬での酸化分解によって Δ^4 -塩基からはミリスチン酸 (C 14:0), $\Delta^{4,8}$ -塩基からはデカン酸 (C 10:0), $\Delta^{4,11}$ -塩基からはヘプタン酸 (C 7:0), $\Delta^{4,12}$ -塩基からはヘキサン酸 (C 6:0), $\Delta^{4,13}$ -塩基からはペンタン酸 (C 5:0), $\Delta^{4,14}$ -塩基からはブタン酸 (C 4:0), $\Delta^{4,8,10}$ -塩基からはオクタン酸 (C 8:0) が検出されることになる。CAEPn-1 Cer および CAEPn-2 Cer の酸化分解成績体の分析結果を Fig. 8 および Table 2 に示した。CAEPn-1 Cer からはオクタン酸 (C 8:0), デカン酸 (C 10:

Table 1 LCB Compositions of CAEPn-1, CAEPn-2 and Hydrogenated CAEPn-2

Peak	LCB	CAEPn-1	CAEPn-2	
a	d16:1	4.5		Hydrogenated CAEPn-2 Peak LCB
b	d18:2	40.1	9.5	
c	d18:1	24.7	2.7	} 41.4 → f d18:0 35.5
d	d18:3	24.6	29.2	
e	d19:3	6.1	58.6	→ g d19:0 64.5

Peaks a~g in Table are corresponding to peaks a~g in Fig. 5, Alkaline hydrolysis A, B and C. Expressed by % of total LCB.

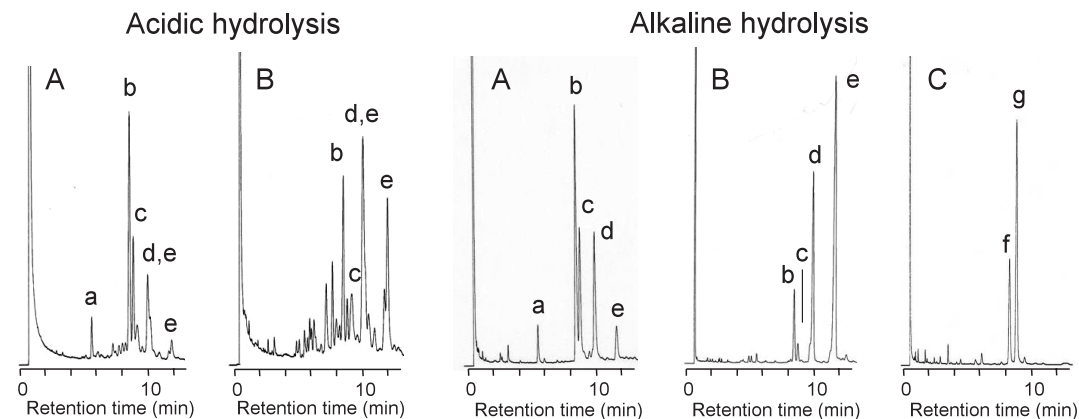


Fig. 5 Gas Chromatograms of Long-Chain Base (LCB) Compositions of CAEPn-1 and CAEPn-2.

A, *N*-free trimethylsilylated LCB derived from CAEPn-1; B, *N*-free trimethylsilylated LCB derived from CAEPn-2; C, *N*-free trimethylsilylated LCB derived from hydrogenated CAEPn-2; a, dihydroxy (d) 16:1; b, d18:2; c, d18:1; d, d18:3; e, d19:3; f, d18:0; g, d19:0.

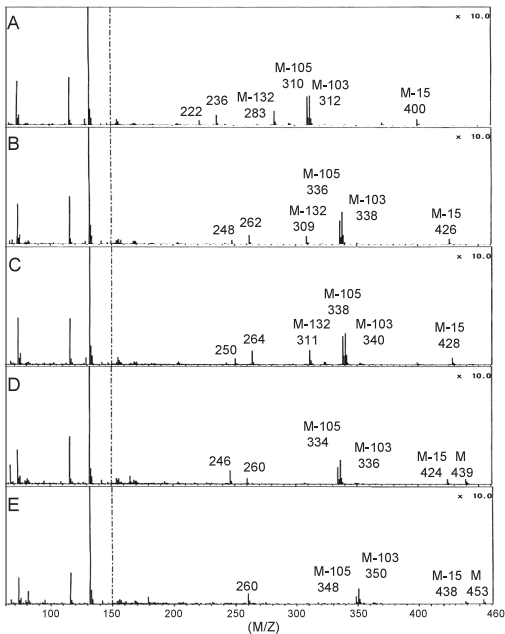


Fig. 6 Mass Spectra of LCB derived from CAEPn-1 by Alkaline Hydrolysis.

A~E are corresponding to Peaks a~e in Fig. 5, Alkaline Hydrolysis. A: d16:1 (hexadecaspinganine), Peak a; B: d18:2 (octadecaspingadienine), Peak b; C: d18:1 (octadecaspinganine), Peak c; D: d18:3 (octadecaspingatrienine), Peak d; E: d19:3 (nonadecaspingatrienine), Peak e.

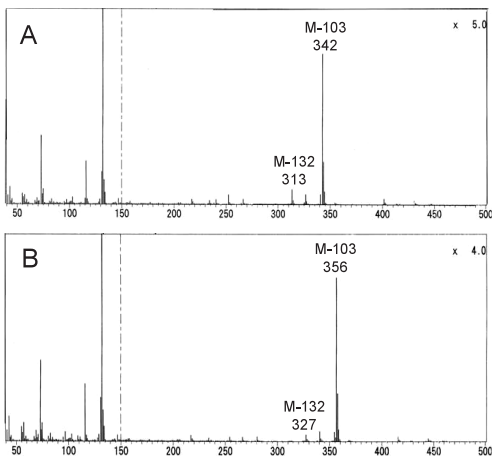


Fig. 7 Mass Spectra of LCB derived from Hydrogenated CAEPn-2 by Alkaline Hydrolysis.

A and B are corresponding to Peaks f and g in Fig. 5, Alkaline Hydrolysis. A: d18:0 (octadecaspinganine); B: d19:0 (nonadecaspinganine).

0), ドデカン酸 (C 12: 0) およびミリスチン酸 (C 14: 0), 一方, CAEPn-2Cerからはオクタン酸, デカン酸およびミリスチン酸に相当する脂肪酸を検出した。これらの結果から, アコヤガイ CAEPnの長鎖塩基は Δ^4 -, Δ^8 -, Δ^{10} -位に不飽和結合を有する Δ^4 -d 16: 1, Δ^4 -d 18: 1, $\Delta^{4,8}$ -d 18: 2, $\Delta^{4,8,10}$ -d 18: 3 および $\Delta^{4,8,10}$ -d 19: 3 から成っていることが明らかとなった。また, 分解生成体の脂肪酸は GC および GC-MS 分析の結果, すべて飽和ノルマル酸であることが確認されたため, 分枝構造が推測されている d 19: 3-塩基においては, 少なくとも分枝位置は C-10 位までに存在している可能性が示唆された。

3.3.3 過ヨウ素酸-過マンガン酸酸化による d 19: 3 における分枝位置の決定

前述 (3.3.1, 3.3.2) したように d 19: 3-塩基 (d 19:3-LCB) が分枝構造を有していることを極めて強く示唆する結果が得られていることより, d 19: 3-塩基をセラミドの主成分としている CAEPn-2 を用いてその分枝位置の決定を試みた。即ち, 二重結合数および二重結

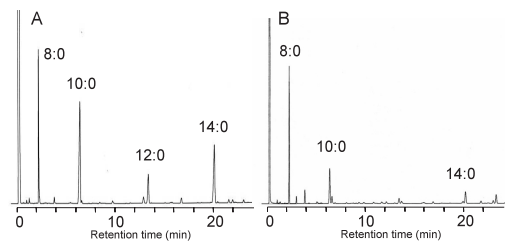


Fig. 8 Gas chromatograms of the Fatty Acid Methyl Esters derived from the Products by Periodate-Permanganate Oxidation of Ceramides (CAEPn-1Cer and CAEPn-2Cer).

A, Ceramide from CAEPn-1 (CAEPn-1Cer); B, ceramide from CAEPn-2 (CAEPn-2Cer).

Table 2 Positions of Double Bonds in LCB (Fatty Acid produced by the Periodate-Permanganate Oxidation of CAEPn-1Cer and CAEPn-2Cer in Fig. 8)

Before oxidation	After oxidation
LCB d16:1	Fatty acid 12:0 (Δ^4 -Sphingoid)
d18:1	14:0 (Δ^4 -Sphingoid)
d18:2	10:0 ($\Delta^{4,8}$ -Sphingoid)
d18:3	
d19:3	8:0 ($\Delta^{4,8,10}$ -Sphingoid)

合位置は既に明らかにしていることより、それらの情報が分枝位置の解明実験に影響を与えないようにするために、あらかじめ水素添加した CAEPn-2 より酸性分解法によって調製した長鎖塩基画分（飽和化した CAEPn については、酸性あるいはアルカリ性のいずれの分解法を用いても得られる分解成績体は同一であることを確認している）を過ヨウ素酸-過マンガン酸試薬で酸化分解した。酸化分解成績体である脂肪酸をヘキサンで抽出後、メチルエステルとして分析した結果を **Fig. 9, A** に示した。そのガスクロマトグラムの脂肪酸メチルエステルの組成パターンは水素添加した CAEPn-2 より得られた長鎖塩基のガスクロマトグラムのパターン (**Fig. 5, Alkaline hydrolysis, CAEPn-2**) に完全に一致して、水素添加した CAEPn-2 由来の長鎖塩基組成を反映していた。また、それらの GC-MS スペクトル (**Fig. 9, B**) のそれぞれの分子イオン [M^+ : m/z 270 および m/z 284] から、GC の保持時間の短いピークは炭素数が 16 の脂肪酸メチルエステルであること、保持時間の長いピークは炭素数が 17 の脂肪酸メチルエステルであることがわかった。さらに、炭素数が 16 の脂肪酸メチルエステルは、標準のパルミチン酸メチルエステルの保持時間と同一であることから、パルミチン酸であると決定した。一方、炭素数が 17 の脂肪酸メチルエ

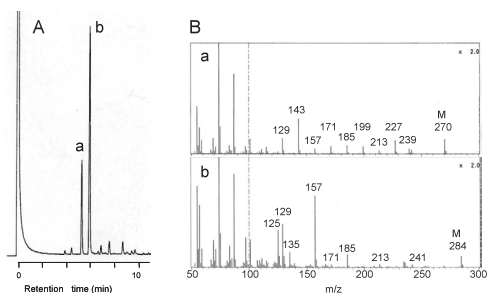


Fig. 9 Gas Chromatogram and Mass Spectra of the Fatty Acid Methyl Esters derived from the Products by Periodate-Permanganate Oxidation of LCB of Hydrogenated CAEPn-2.

A: Fatty acid methylesters; a, methyl palmitate (16:0); b, methyl heptadecanoate (17:0); B: mass spectra, a and b, are corresponding to the peaks a and b in A.

テルは標準のマーガリン酸メチルエステルの保持時間とは一致しなかったことから、推測していた分枝酸の可能性を、GC-MS スペクトル Data Library に示される分枝位置の異なる 4 種類のヘキサデカン酸メチルエステル (3, 5, 7, 9-位においてメチル基が分枝しており、総炭素数は 17 となる) のマススペクトルと比較した (**Fig. 10**)。その結果、メチル基の分枝位置が C-7 位のヘキサデカン酸メチルエステル (methyl-7-methyl hexadecanoate) のマススペクトルにすべてのフラグメントイオンが完全に一致することを見出した。長鎖塩基の過ヨウ素酸-過マンガン酸試薬による酸化分解は、アミノ基が結合している C-2 位と水酸基が結

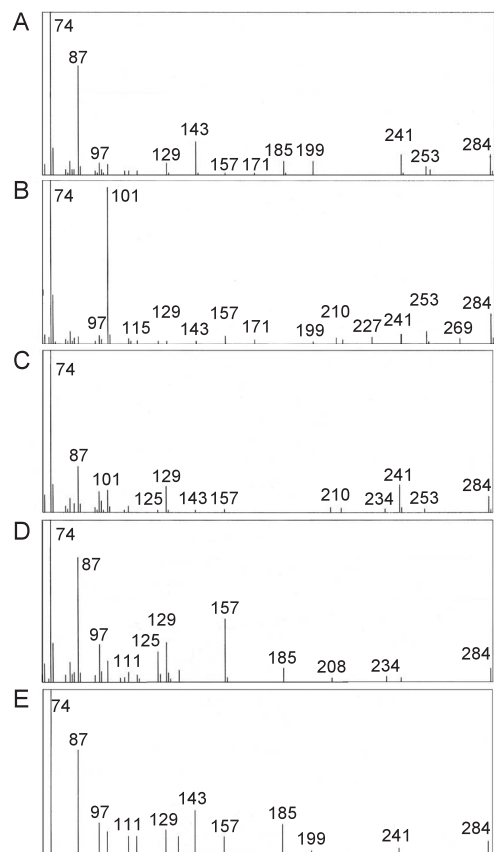


Fig. 10 Mass Spectra of Branched Fatty Acid Methyl Esters for the Data Libraries (Data Base: NIST, WILEY, VOC, DRUG).

A, Methyl heptadecanoate (17:0); B, 3-methyl hexadecanoate (3-Me16:0); C, 5-methyl hexadecanoate (5-Me16:0); D, 7-methyl hexadecanoate (7-Me16:0); E, 9-methyl hexadecanoate (9-Me16:0).

合している C-3 位の C-C 結合を分解して、アルデヒドから脂肪酸へと酸化する反応であり、元の長鎖塩基から炭素数が「2」減じた脂肪酸が生成する。従って、酸化分解反応の成績体としてパルミチン酸および 7-メチルヘキサデカン酸の生成は、C-18 (総炭素数) のジヒドロスフィンゴシンと C-19 (総炭素数) の 9-メチルジヒドロスフィンゴシンの存在を示していることになる。特に、この 9-メチルジヒドロスフィンゴシン、即ち、9-methyl-octadeca sphinga-4, 8, 10-trienine については、今までにヒトの糖脂質にその存在が報告されている^{29,30)}。また、キノコの糖脂質には 9-methyl-octadeca sphinga-4, 8-dienine^{31,32)}、ナマコの糖脂質には 14-methylsphingosine³³⁾ の存在も報告されている。

3. 4 MALDI-TOF MS 分析

MALDI-TOF MS 測定には、分析試料の極性によって適正なイオンモード (陽イオンモード測定あるいは陰イオンモード測定) の選択が必要である。著者らの経験から、分子内に酸性基を有する脂質については、前者の陽イオンモードではイオン化効率が低く解析に必要な情報を有するスペクトルを得ることが困難な場合が多いため、後者の陰イオンモードでの測定が推奨される。従って、CAEPn-1 および CAEPn-2 の測定に際しても、分子内にホスホン酸を有しているリン脂質であるところから、陰イオンモードでの測定を行った^{6,34)}。さらに、別報⁶⁾で、intact CAEPn (修飾していない、誘導体化していない CAEPn) の TOF MS 測定においては、原因不明の複数のスペクトルが出現し、それらは CAEPn 分子内におけるアミノエチルホスホン酸部分の遊離 (*N*-free) アミノ基の存在に起因しているのではないかと推測するに至り、遊離アミノ基を分子内に有するリン脂質の MALDI-TOF MS 分析には、それらを *N*-アセチル (*N*-acetyl) 誘導体として分析に処すことが極めて有効であることを明らかにした。そこで、CAEPn-1 および CAEPn-2 についても、分子内の遊離アミノ基をアセチル基で修飾、即ち *N*-アセチル化 (反応: 100 μ g の CAEPn-1 を 500 μ L のメタノールに溶解し、

10 μ L のピリジンと 50 μ L の無水酢酸を加えて室温で 30 分間反応) した後、MALDI-TOF MS 分析を行った。*N*-acetylated CAEPn-1 および *N*-acetylated CAEPn-2 の分析結果を **Fig. 11** に示したが、*N*-free より 42 マス分 [CH_3COO^- (= 42)] 増加したそれぞれの分子種 $[\text{M}-\text{H}]^-$ に基づくスペクトルを観察することができた。即ち、CAEPn-1 からは主なスペクトルとして、a: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 682 (16:0 脂肪酸-d 18:3 長鎖塩基), m/z 684 (16:0-d 18:2), m/z 686 (16:0-d 18:1); b: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 696 (17:0-d 18:3), m/z 698 (17:0-d 18:2), m/z 700 (17:0-d 18:1); c: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 710 (18:0-d 18:3), m/z 712 (18:0-d 18:2), m/z 714 (18:0-d 18:1) に相当するスペクトルが⁵⁾ (**Fig. 11, A**), 一方、CAEPn-2 からは、a: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 698 (h 16:0 脂肪酸-d 18:3 長鎖塩基), m/z 700 (h 16:0-d 18:2); b: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 712 (h 16:0-d 19:3) (h 17:0-d 18:3), m/z 714 (h 17:0-d 18:2); c: $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 726 (h

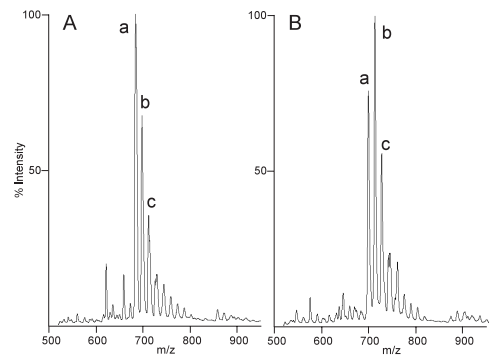


Fig. 11 Negative-Ion Mode MALDI-TOF MS Spectra of *N*-Acetylated CAEPn-1 and *N*-Acetylated CAEPn-2.

A, *N*-Acetylated CAEPn-1; a, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions at m/z 682 (Fatty acid-LCB, 16:0-d18:3), m/z 684 (16:0-d18:2), m/z 686 (16:0-d18:1); b, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions at m/z 696 (17:0-d18:3), m/z 698 (17:0-d18:2), m/z 700 (17:0-d18:1); c, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions at m/z 710 (18:0-d18:3), m/z 712 (18:0-d18:2), m/z 714 (18:0-d18:1); B, *N*-acetylated CAEPn-2; a, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions at 698 (h16:0-d18:3), m/z 700 (h 16:0-d18:2); b, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions at m/z 712 (h16:0-d19:3) (h17:0-d18:3), m/z 714 (h17:0-d18:2); c, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion at m/z 726 (h17:0-d19:3).

17: 0-d 19: 3) に相当するスペクトルが観察された (Fig. 11, B)。

本研究の一部は、独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所受託研究費 (平成 17, 18 年度農林水産バイオリサイクル研究委託事業) によって行った。

文 献

- 1) Hori, T., Sugita, M. (1984) "Biochemistry of Natural C-P Compounds", Chapter 9. Chemistry of Phosphonolipids, (Hori, T., Horiguchi, M., Hayashi, A. eds.), pp. 124-144, Maruzen (Tokyo).
- 2) Hori, T., Sugita, M. (1993) *Prog. Lipid Res.*, **32**, 22-45.
- 3) 杉田陸海, 荒川郁子, 堀太郎, 沢田保夫 (1994) *生化学*, **40**, 158-162.
- 4) 堀太郎, 坂田綾子, 青木一弘, 林陽, Dulaney, J. T., 杉田陸海 (1995) *滋賀大学教育学部紀要*, **45**, 31-42.
- 5) 糸乗前, 北村朋典, 田中理恵子, 宮垣紀子, 齋藤洋昭, 杉田陸海 (2004) *滋賀大学教育学部紀要*, **54**, 41-48.
- 6) 糸乗前, 清水赴正, 矢野宏治, 北村朋典, 小島寿夫, 松室有紀, 伊藤将弘, 豊川雅哉, 齋藤洋昭, 杉田陸海 (2006) *滋賀大学教育学部紀要*, **56**, 87-96.
- 7) Dittmer, J. C., Lester, R. L. (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127.
- 8) 杉田陸海, 村田真理, 板坂修, 堀太郎 (1990) *油化学*, **39**, 572-575.
- 9) Itonori, S., Takahashi, M., Kitamura, T., Aoki, K., Dulaney, J. T., Sugita, M. (2004) *J. Lipid Res.*, **45**, 574-581.
- 10) Sweeley, C. C., Gaver, R. C. (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298.
- 11) Morrison, W. R., Hay, J. D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 460-467.
- 12) 堀太郎, 杉田陸海, 西森千晶, 板坂修 (1975) *油化学*, **24**, 611-614.
- 13) Sugita, M., Itasaka, O., Hori, T. (1976) *Chem. Phys. Lipids*, **16**, 1-8.
- 14) Hayashi, A., Matsubara, T. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **248**, 306-314.
- 15) 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.
- 16) 糸乗前, 宮垣紀子, 北村朋典, 齋藤洋昭, 杉田陸海 (2005) 第 44 回日本油化学会年会 (横浜, 慶應義塾大学).
- 17) 寺尾円香, 北村朋典, 齋藤洋昭, 杉田陸海, 糸乗前 (2006) 第 45 回日本油化学会年会 (野田, 東京理科大学).
- 18) Karlsson, K.-A. (1970) *Lipids*, **5**, 878-891
- 19) Hayashi, A., Matsubara, T. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 228-230
- 20) Hayashi, A., Matsubara, T., Matsuura, F. (1975) *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 102-105.
- 21) Hayashi, A., Mishima, Y., Matsubara, T. (1990) *Chem. Phys. Lipids*, **52**, 171-178.
- 22) Irie, A., Kubo, H., Inagaki, F., Hoshi, M. (1990) *J. Biochem.*, **108**, 531-536.
- 23) Itonori, S., Kamemura, K., Narushima, K., Sonku, N., Itasaka, O., Hori, T., Sugita, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1081**, 321-327.
- 24) 岸根秀樹, 三島芳博, 林陽 (1995) *油化学*, **44**, 977-984.
- 25) 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**, 25-30.
- 26) Sugita, M., Morikawa, A., Dulaney, J. T., Okada, A. (1996) *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 731-740.
- 27) 三島芳博, 岸根秀樹, 林陽 (1997) *油化学*, **46**, 39-49.
- 28) Aoki, K., Sugiyama, S., Dulaney, J. T., Itonori, S., Sugita, M. (2002) *J. Oleo Sci.*, **51**, 463-472.
- 29) Irie, A., Kubo, H., Hoshi, M. (1990) *J. Biochem.*, **107**, 578-586.
- 30) Maier, M. S., Kuriss, A., Seldes, A. M. (1998) *Lipids*, **33**, 825-827.
- 31) Kawai, G., Ikeda, Y. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **754**, 243-248.
- 32) Ohnishi, M., Kawase, S., Kondo, Y., Fujino, Y., Ito, S. (1996) *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 51-56.
- 33) Higuchi, R., Inagaki, M., Togawa, K., Miyamoto, T., Komori, T. (1994) *Liebigs Ann. Chem.*, 79-81.
- 34) 糸乗前, 卯田晶代, 矢野宏治, 青木一弘, 羽田紀康, 山本憲二, 竹田忠紘, 杉田陸海 (2005) *滋賀大学教育学部紀要*, **55**, 15-30.