

エチゼンクラゲ, *Stomolophus nomurai* 傘部の Ceramide 2-Aminoethylphosphonate について†

糸 乗 前^{*}・清 水 赳 正¹・矢 野 宏 治¹・北 村 朋 典¹
小 島 寿 夫¹・松 室 有 紀²・伊 藤 將 弘²・豊 川 雅 哉³
齋 藤 洋 昭³・杉 田 陸 海¹

Isolation and Characterization of Ceramide 2-Aminoethylphosphonate from Umbrella Portion of Jellyfish, *Stomolophus nomurai* (Echizen-kurage)

Saki ITONORI¹, Takemasa SHIMIZU¹, Kouji YANO¹
Tomonori KITAMURA¹, Hisao KOJIMA¹, Yuki MATSUMURO²
Masahiro ITO², Masaya TOYOKAWA³
Hiroaki SAITO³ and Mutsumi SUGITA¹

Abstract

Ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEPn) was found to be the principal phosphosphingolipids in the phylum Mollusca, Cnidaria (Coelenterata) and Protozoa. The presence of CAEPn as a major phospholipid constituent in these organisms is unique, since it has not been found, or is present only in trace amounts in other animals investigated so far. In this paper, we describe the isolation and the structural characterization of CAEPn from the umbrella portion of the jellyfish, *Stomolophus nomurai* (Echizen-kurage) (phylum Cnidaria, class Scyphozoa). The chemical structure was completely characterized by TLC-immunostaining assay, aliphatic analyses, infrared analysis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. The ceramide moiety of purified CAEPn consisted primarily of miristic and palmitic acids, and the sole octadecasphingadienine.

Key words: Ceramide 2-aminoethylphosphonate, Phosphonolipid, Phosphosphingolipid, C-P compound, Jellyfish (*Stomolophus nomurai*)

† 本研究の一部は第27回C-P化合物研究会
(2005年12月2日, 長崎)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 立命館大学情報理工学部情報生物学教室 (Department of Bioscience and Bioinformatics, College of Information Science and Engineering, Ritsumeikan University, 1-1-1 ↗

↘ Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577)

3 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, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-8648)

* 連絡者: 糸乗前 (Corresponding author: Saki Itonori, E-mail: itonori@sue.shiga-u.ac.jp) (2006年9月28日受理)

1. 緒 言

刺胞動物 (Cnidaria)/ 腔腸動物 (Coelenterata) にはヒドロ虫綱 (Hydrozoa), 鉢くらげ綱 (Scyphozoa) および花虫綱 (Anthozoa) の3綱が含まれる。それらの脂質に関する研究は、花虫綱のイソギンチャクの研究が最も進んでおり、とりわけ、ホスホノ脂質 (phosphonolipid) として ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEPn) が本動物種より初めて見出されたのは周知のことである¹⁾。一方、他の刺胞動物については、エーゲ海で採集された鉢くらげ綱のオキクラゲ (*Pelagia noctiluca*) およびミズクラゲ (*Aurelia aurita*) に CAEPn やその N-メチル誘導体 (ceramide N-methyl-2-aminoethylphosphonate, CMAEPn) の存在が報告されている²⁻⁵⁾。著者らも刺胞動物の脂質については、今までにイソギンチャク^{注1)}の糖脂質を精査して、その主成分は、グルコセレブロシド (88%) およびガラクトセレブロシド (12%) の混在したセレブロシドであることを明らかにしている⁶⁾。

今回、鉢くらげ綱において、セレブロシドを中心とした糖脂質およびホスホノ脂質の分布域調査を、エチゼンクラゲ (*Stomolophus nomurai*)^{注2)} を試料として展開した。本論文では、

注1) ウメボシイソギンチャク科 (Actiniidae) の Actinogeton 属に属する未記載種 (新種) (串本海中公園センター附属鯖浦海中公園研究所 内田紘臣博士私信)

注2) エチゼンクラゲは刺胞動物門 (腔腸動物門)・鉢くらげ綱に属し、晩夏から真冬にかけて日本の沿岸に出現する。本種は、直径2メートル、重量200kg超にも達する大型で、かつては数も少なく極めて珍しい存在として記録されていたが、近年、連続的に大発生し、沿岸漁業等に深刻な影響を与えていることは記憶に新しい (1日に日本海沿岸に流れ着く数は、5億匹と言われている)。本種の発生場所や生長の肥大化など、生態に関してはほとんど明らかになっていないが、これらの原因として、現在、長江沿岸での海水温の上昇、富栄養化、魚介類資源の減少等が考えられているようである。一方、本種は内臓部および傘部ともに食用として消費されているが、特に我が国においては、塩漬けにされた傘部を輸入食材としている。

ホスホノ脂質、特に CAEPn の構成成分について述べる。

2. 実 験

2.1 エチゼンクラゲの傘部より極性脂質画分の調製

エチゼンクラゲの塩漬けされた傘部 (12.5 kg) の塩抜きしたものをアセトンで脱水した後 (725 g), 細かく裁断し 4.2 L のクロロホルム-メタノール (2:1, 以下、容比を示す) で2回, 3.7 L のクロロホルム-メタノール (1:1) で1回抽出を行った。3回分の抽出液を合して溶媒を減圧留去し、総脂質として 13.3 g を得た。このものを Folch の方法⁷⁾に準じて2層に分配し、下層のクロロホルム層より回収した物質 (5.4 g) を弱アルカリおよび酸処理した後、アセトン粉末としてスフィンゴ脂質画分を調製した (収量 166 mg)。このものを、既に当教室で確立化している無脊椎動物の脂質分画法に準じて、QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (OH⁻型, 2.5 × 30 cm) によって中性および極性脂質画分に分画した^{8,9)}。カラムからの溶出溶媒として、それぞれカラム容積の3倍容のクロロホルム-メタノール-水 (30:60:8) および5倍容の0.05 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溶媒によって溶出された、いわゆる担体への吸着性物質として 75 mg の極性脂質画分を回収した。

2.2 極性脂質画分のケイ酸カラムクロマトグラフィーによる CAEPn 画分の調製および CAEPn の精製

1-プロパノール-水-濃アンモニア水 (75:15:5) で充填したイアトロビーズ 6 RS-8060 (ケイ酸) カラム (1.0 × 115 cm) に少量の同溶媒に溶解した 75 mg の極性脂質画分を注加した。カラムからの溶出は、同溶媒の単一系溶出法で行った。溶出液を 2.3 薄層クロマトグラフィー (TLC) に記述した方法によって検し、ニンヒドリンおよびリン検出試薬

に陽性を呈するとともに、当教室でセタシジミ (*Corbicula sandai*) より精製した標準標品の CAEPn と同一の移動度を示す物質を含有する溶出画分を分取し、CAEPn 画分として 15 mg を回収した。次いで、この CAEPn 画分をさらに分画し、精製する目的で、クロロホルム-メタノール-水 (80 : 20 : 1,250 mL ~ 60 : 40 : 4,280 mL) を溶出溶媒とする濃度勾配法を用いて再イアトロビーズカラムクロマトグラフィー (1.0 × 85 cm) を展開した。

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、クロロホルム-メタノール-水 (60 : 25 : 4, 60 : 40 : 10) を使用し、検出はニンヒドリン試薬 (アミノ基) および Dittmer-Lester 試薬 (リン)¹⁰⁾ によった。

2.4 TLC-immunostaining

試料をプラスチック製プレート (Polygram Sil G, Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany) 上に展開 (溶媒: クロロホルム-メタノール-水, 65 : 25 : 4) した。展開後、風乾して溶媒を留去したプレートに、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, ナカライテスク株式会社) 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 500 倍に希釈した抗 CAEPn 抗体)¹¹⁾ 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 500 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, USA) 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 μL 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ところで水洗いして停止した。

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¹²⁾。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 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を加えて、18 h, 70°C で加熱した¹³⁾。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、0.6 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°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, 80°C (2 min) → 170°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 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。

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)

4 μ L のクロロホルム-メタノール (2 : 1) 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 μ L 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¹⁴⁾。

2.9 経時的湿式灰化による C-P 結合リンおよび C-O-P 結合リンの測定

C-P 化合物 (市販 2-Aminoethylphosphonic acid, AEPn; セタジミ由来 Ceramide 2-aminoethylphosphonate, CAEPn) および C-O-P 化合物 (市販 Phosphoethanolamine, PEA; キンバエ由来 Ceramide phosphoethanolamine = Sphingoethanolamine, CPEA) を精秤し、それぞれ水溶液および有機溶媒溶液 (クロロホルム-メタノール, 2 : 1) とした。それらより P 量として 10 ~ 100 μ g を含む一定容量をリン測定用特殊硬質試験管に分取した (水溶液は最大容量 20 μ L を限度として分取、一方、有機溶媒溶液は分取後、窒素気流下で溶媒を留去した)。検体の入った試験管に分解試薬である 60% HClO₄ の 1.2 mL を反応直前に加え、温度を 175°C に固定したブロックヒーター (ヤマト科学製, HF-21) 中へ経時的に加熱時間の最長から最短の順に挿入し、終了時

間での統一を図った。加熱分解終了後に生成したリン量は、King 法¹⁵⁾に準じて測定し、リン酸二水素カリウムを標準評品とした検量線より算出した。

3. 結果および考察

3.1 エチゼンクラゲ傘部の CAEPn

試料として用いたエチゼンクラゲ傘部 (12.5 kg) は、塩漬けの状態で入手したため、あらかじめ塩抜き操作を施した後、余分な水分を除去する目的でアセトン処理を行った。乾燥後、なお付着している塩を除去するために、再度、水洗およびアセトン処理操作を繰返した。得られた乾燥物の重量 725 g を、以後の分画・精製段階での回収率測定の基準値とした。分画操作過程における回収率は、① クロロホルム-メタノール抽出物 (総脂質画分), 13.3 g (1.83%); ② Folch 分配法による下層のクロロホルム層 (極性脂質画分), 5.4 g (0.74%); ③ 弱アルカリおよび弱酸性安定脂質 (スフィンゴ脂質画分), 166 mg (0.023%); ④ QAE-Sephadex A-25 吸着画分 (スフィンゴリン脂質画分), 75 mg (0.010%); ⑤ 第 1 回目のケイ酸カラムクロマトグラフィー (CAEPn 画分), 15 mg (0.002%) であった。特に分画の最終段階である⑤の CAEPn 画分の回収率については、本実験操作と少し分画操作が異なるものの、オキクラゲ全組織 (Whole body) からの回収率として報告されている値 (0.012%)^{3,5)} と比較して、その 1/6 である。従って、本実験におけるそれぞれの分画段階での低い回収率も、傘部に含まれる脂質量が内臓部のそれと比べて極めて少ない含有量であることに起因していると考えられる。上述の⑤第 1 回目のケイ酸カラムクロマトグラフィー (CAEPn 画分) では、標準標品であるセタジミ由来の CAEPn の移動度と極めて近似した移動度を示すニンヒドリン試薬および Dittmer-Lester 試薬のいずれにも陽性の、少なくとも 3 種類のリン脂質の存在することが認められた。それらの 3 種類のリン脂質を TLC 上での移動度の大きい順に CAEPn-1, CAEPn-2 および CAEPn-3 と仮称して、それぞれの単離、精製を試みた。即ち、15 mg の⑤ケイ

酸カラムクロマトグラフィー第1段階 (CAEPn 画分) を、溶媒としてクロロホルム-メタノール-水系を用いた濃度勾配溶出法によるケイ酸カラムクロマトグラフィー第2段階を行った。その結果: CAEPn-1, 4.8 mg; CAEPn-2, 0.8 mg \geq および CAEPn-3, 0.1 mg \geq をそれぞれ TLC 上でほぼ単一物質として得ることができた (Fig. 1)。更に、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¹⁾を用いて TLC-immunostaining assay を試みたところ、単離した3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3種類はいずれもセラミドアミノエチルホスホン酸 (ceramide 2-aminoethylphosphonate) であることが決定された (Fig. 2)。一方、オキクラゲやミズクラゲにおいてはホスホノ脂質として、CAEPn に加えて、その N-メチル誘導体の存在も示唆されているが^{4,5)}、エチゼンクラゲの傘部には、現在のところそれら

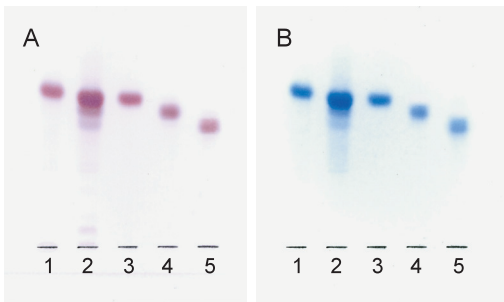


Fig. 1 Thin-Layer Chromatograms of the Purified Ceramide 2-Aminoethylphosphonate (CAEPn) obtained from the Umbrella Portion of the Jellyfish, *Stomolophus nomurai* (Echizen-kurage). Lane 1, authentic CAEPn from the freshwater bivalve, *Corbicula sandai*; lane 2, CAEPn fraction eluted with 1-propanol-water-ammonia, 75:15:5 (v/v) using Iatrobeds column chromatography; lane 3, purified CAEPn-1; lane 4, purified CAEPn-2; lane 5, purified CAEPn-3. The separation was performed on the precoated silica gel 60 plates developed in chloroform-methanol-water, 60:40:10 (v/v) for 20 min., and the spots were visualized with ninhydrin reagent for Panel A and with Dittmer-Lester reagent for Panel B.

の誘導体の存在は確認していない。もし、エチゼンクラゲにも N-メチル誘導体が存在するとすれば、未抽出組織である内臓部での組織局在性の可能性が考えられる。Fig. 3 に CAEPn-1 の IR スペクトルを示したが、標準標品のセタジミ 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,

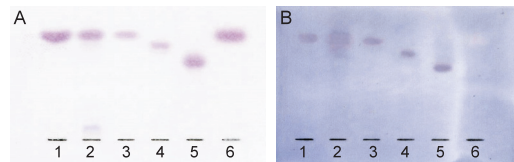


Fig. 2 Detection of CAEPn by TLC-Immunostaining.

Lane 1, authentic CAEPn from *C. sandai*; lane 2, CAEPn fraction from *S. nomurai*; lanes 3, 4 and 5, purified CAEPn-1, -2 and -3 from *S. nomurai*; lane 6, authentic ceramide phosphoethanolamine (sphingoethanolamine, CPEA) from the green bottle fly, *Lucilia caesar*. The separation was performed on the pre-coated Plygram Sil G plastic plates developed in chloroform-methanol-water, 65:25:4 (v/v) for 20 min., and the spots were visualized with ninhydrin reagent for Panel A and with immunostaining by anti-CAEPn antibody for Panel B.

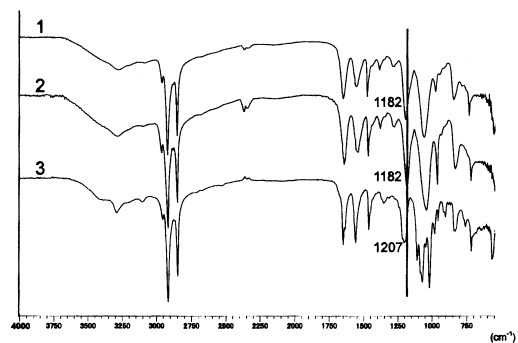


Fig. 3 Infrared Spectra of CAEPn and CPEA

1, authentic CAEPn from *C. sandai*; 2, purified CAEPn-1 from *S. nomurai*; 3, authentic CPEA from *L. caesar*. The absorption bands marked at Nos. 1182 and 1207 indicate the presence of C-P bond (at 1182 cm^{-1}) and C-O-P bond (at 1207 cm^{-1}), respectively.

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酸 (ceramide 2-aminoethylphosphonate) であることが確認できた。しかし、最終純化物としてのそれぞれの CAEPn の収量は前述した通りであるが、CAEPn-2 および CAEPn-3 のそれらは極めて少なく、継続的な分析データの集積が困難であることが判明したので、以後の分析は CAEPn-1 に限定した。なお、CAEPn-1 の King 法による全リン量の測定結果は 4.64% (平均分子量 637 とした計算値は 4.87%) であることから、得られた CAEPn-1 の純度は 95.4% と考えている (King 法による全リン量の測定方法については 3.4 参照)。

3.2 CAEPn-1 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 (Fig. 4, Table 1)。脂肪酸組成はミリスチン酸 (15.6%) およびパルミチン酸 (73.0%) を主要な成分としていたが、その他の構成脂肪酸として、奇数炭素鎖脂肪酸であるペンタデカン酸 (分枝型を含んで 9.2%) およびマーガリン酸 (2.2%) を含有していることは特筆すべき点である (Fig. 4-A)。一方、長鎖塩基組成は 2 個の二重結合を含む octadecasphingadienine のみを成分としていた (Fig. 4-B, C)。これらの結果をオキクラゲ^{3,5)} およびミズクラゲ⁴⁾ のセラミド組成と比較してみると、脂肪酸組成においては、いずれもパルミチン酸を主要成分とし、ペンタデカン酸を含有していることが特徴であると思われるが、内臓部を含む全組織からの CAEPn より傘部のそれの方が脂肪酸組成は単純であると言える。長鎖塩基組成においては、ミズクラゲのそれがフィトスフィンゴシン同族体を含んで極めてバラエティーに富む組成を示しているのに対して、エチゼンクラゲおよびオキクラゲにおいては、それぞれ d 18:2 および d 18:1 がほとんど単一成分として示されている。従って、鉢くらげ綱においてはその分類の特色は、長鎖塩基成分に優先的に発現していることが示唆される。

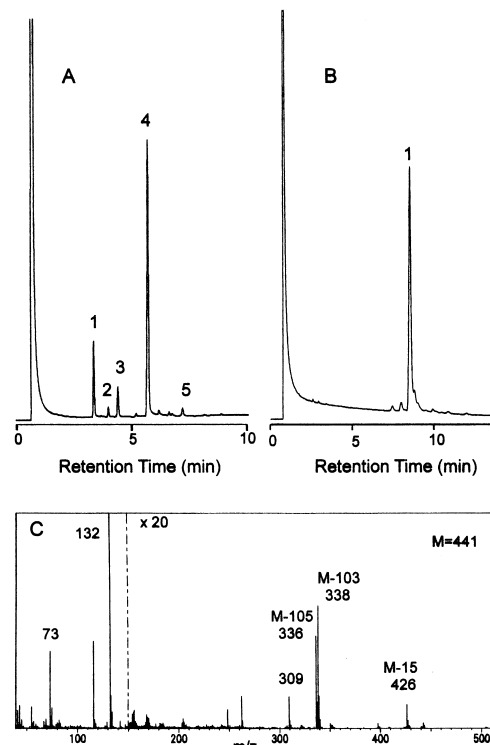


Fig. 4 Gas Chromatograms and Mass Spectrum of Fatty Acid and Sphingoid Compositions of CAEPn-1.

A: Fatty acid methyl esters; 1, methyl myristate (14:0); 2, branched methyl pentadecanoate (br15:0); 3, methyl pentadecanoate (15:0); 4, methyl palmitate (16:0); 5, methyl margarate (17:0); B: *N*-free trimethylsilylated sphingoid; 1, octadecasphingadienine (d18:2); C: mass spectrum of the peak in B (octadecasphingadienine).

Table 1 Ceramide Compositions of CAEPn-1 from the Jellyfish, *S. nomurai* (Echizenkura)

Fatty acid (%)		Sphingoid (%)	
14:0	15.6	d18:2	100.0
br15:0	2.2		
15:0	7.0		
16:0	73.0		
17:0	2.2		

br, branched chain; d, dihydroxysphingoid.

3.3 CAEPn-1 の MALDI-TOF MS 分析

MALDI-TOF MS の測定には、分析試料が有する極性基（官能基）によって陽イオンモード測定と陰イオンモード測定の2種類がある。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、前者ではイオン化効率が極めて悪く測定が困難なため、後者のモードで分析を行わなければならない。従って、CAEPn-1 についても陰イオンモードでの測定を行った。

Fig. 5-A に CAEPn-1 (Native, *N*-free) の MALDI-TOF MS 分析の結果を示したが、**Table 1** に見られるセラミドの構成成分に合致したセラミド分子種の相違に起因するそれぞれ $[M-H]^-$: a, m/z 613 (14:0 脂肪酸-d18:2 長鎖塩基); b, m/z 627 (br 15:0, 15:0-d18:2); c, m/z 641 (16:0-d18:2); d, m/z 655 (17:0-d18:2) に相当するスペクトルの存在が観察された。しかしながら、これらの分子種 (**Fig. 5-A, a, b, c, d**) に相当するスペクトルにそれぞれ対応するかのようになり、更に 60 マス分が増加したスペクトル (**Fig. 5-A, e, f, g, h**) の出現が観察された。現在のところこれらの帰属に関しては、CAEPn-1 の分子種成分に由来しているスペクトルであると推測しているが、出現した原因および 60 マス分の構造については検討中である。しかしながら、両性イオン型リン脂質であるスフィンゴミエリンの MALDI-TOF MS 分析については、同じスフィンゴリン脂質であるにもかかわらず、予想される分子種数に応じた極めて良好なスペクトルを得ることができるという事実、およびスフィンゴミエリンと CAEPn の両者の化学構造の相違性から、著者らは、CAEPn 分子内におけるアミノエチルホスホン酸部分の遊離アミノ基の存在が、原因不明の複数のスペクトルを生じさせているのではないかと推測するに至った。そこで、CAEPn 分子内の遊離アミノ基を酢酸基で修飾、即ち *N*-acetylation (*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 の分析結果を **Fig. 5-B** (**a, b, c, d**) に示したが、Native (*N*-free)

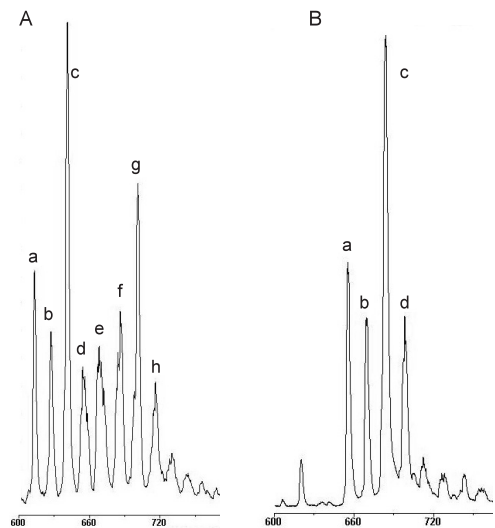


Fig. 5 Negative-Ion Mode MALDI-TOF MS Spectra of Native (*N*-Free) CAEPn-1 and *N*-Acetylated CAEPn-1.

A: Native (*N*-free) CAEPn-1; a, $[M-H]^-$ ion at m/z 613 (fatty acid-sphingoid, 14:0-d18:2); b, m/z 627 (br15:0, 15:0-d18:2); c, m/z 641 (16:0-d18:2); d, m/z 655 (17:0-d18:2); e, m/z 673; f, m/z 687; g, m/z 701; h, m/z 715; B: *N*-acetylated CAEPn-1; a, $[M-H]^-$ ion at m/z 655 (fatty acid-sphingoid, 14:0-d18:2); b, m/z 669 (br15:0, 15:0-d18:2); c, m/z 683 (16:0-d18:2); d, m/z 697 (17:0-d18:2).

CAEPn-1 (**Fig. 5-A, a, b, c, d**) より 42 マス分 $[CH_3COO^- (= 42)]$ 増加したそれぞれの分子種 $[M-H]^-$: a, m/z 655 (14:0 脂肪酸-d18:2 長鎖塩基); b, m/z 669 (br 15:0, 15:0-d18:2); c, m/z 683 (16:0-d18:2); d, m/z 697 (17:0-d18:2) に相当する良好なスペクトルの出現を観察することができた。即ち、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、それらをアセチル誘導体として分析に処することが極めて有効であることを明らかにした。

3.4 過塩素酸湿式灰化による恒温条件下での C-P 結合と C-O-P 結合の安定性

全リン量、C-P 結合リン量および C-O-P 結合リン量の測定には、試料を二分して、一方について全リン量を定量、他方は C-O-P 結合リンのみを測定し、その差として C-P 結合リン

を算出している。即ち、C-P 結合リン量 (%) は、 $100(\text{Pt-Pi})/\text{Pt}$ 式 (Pt, King 法で測定した全リン量; Pi, 6 M HCl 等の鉱酸で加水分解後、モリブデン酸アンモニウム法で測定した C-O-P 結合リン量) で求めている。しかし、Pi の定量には、 100°C (water-bath 使用) であるならば、6 M HCl で約 40 時間の分解時間を必要とする¹⁶⁾。また、近年、当教室においては、家庭用電子レンジを用いた分解時間の短縮化の開発についても報告しているが¹⁷⁾、いずれも Pt および Pi の測定を過塩素酸と塩酸の 2 種類の試薬を用いてそれぞれ単独に行わなければならない。今回、分解温度を 175°C に固定し、分解時間を変えることによって、分解試薬として過塩素酸のみの使用で、Pt と Pi の同時定量、更なる結果より Pt-Pi 式による C-P 結合リン量の算出を可能にすることに成功した。

Fig. 6 に 175°C 、60% 過塩素酸による経時的分解の結果を示した。C-O-P 化合物 (PEA, CPEA) は 30 分で 50%、1 時間で 80%、1.5 時間で 90% (CPEA)~100% (PEA)、2 時間で完全に 100% の分解率が認められたが、C-P 化合物 (AEPn, CAEPn) は、C-O-P 化合物と比べて短時間の分解では極めて分解率が低く、AEPn および CAEPn の両者とも 30 分では全く分解されず、1 時間で 3~4%、1.5 時間で 15% 程度の分解率に留まり、100% の分解率を得るには AEPn で 9 時間、CAEPn で 24 時間を必要とした (**Fig. 6** に示される AEPn の分解率曲線において、短時間分解での分解率にエラーバーを付したが、これらは King 法によるリン量測定可能範囲以下であることを付記する)。即ち、1 時間の分解において C-P 結合リンは殆ど分解されないこと (分解率は 3~4%)、C-O-P 結合リンは大部分が分解されること (80%) より、この分解量 (分解率) の差を利用することによって分解試薬が過塩素酸のみでの C-P 結合リンと C-O-P 結合リンの同時定量の可能性が示唆された。そこで、その可能性を追究し実証するために、C-P 化合物と C-O-P 化合物の総リン量を一定に保って、それらのモル比を変えて分解に供した。即ち、AEPn (only), AEPn/PEA (2:1), AEPn/PEA (1:1), AEPn/PEA (1:2), PEA (only)

の 5 条件で総リン量を $33\ \mu\text{g}$ (順に AEPn, $133\ \mu\text{g}$; AEPn+PEA, $89\ \mu\text{g} + 50\ \mu\text{g}$; AEPn+PEA, $67\ \mu\text{g} + 75\ \mu\text{g}$; AEPn+PEA, $44\ \mu\text{g} + 100\ \mu\text{g}$; PEA, $150\ \mu\text{g}$) として 175°C で 1 時間の分解に処した。一方、脂質結合性である CAEPn および CPEA についても同様の組み合わせで総リン量を $31\ \mu\text{g}$ (順に CAEPn, $640\ \mu\text{g}$; CAEPn + CPEA, $430\ \mu\text{g} + 225\ \mu\text{g}$; CAEPn + CPEA, $320\ \mu\text{g} + 335\ \mu\text{g}$; CAEPn + CPEA, $215\ \mu\text{g} + 450\ \mu\text{g}$; CPEA, $675\ \mu\text{g}$) として 175°C で 1 時間の分解に処した。それらの結果を **Fig. 7** に示したが、AEPn および CAEPn における C-P 結合リンの分解率は両者ともに 4% 程度であって、無視し得る値であると判断した。また、AEPn/PEA および CAEPn/CPEA における分解率は両者ともにそれらの混合比に合致した結果を得た。一方、経時的分解 (**Fig. 6**) の結果から、1 時間の分解では PEA および CPEA とともに約 80% 程度の分解率であることが示されているが、この C-P 化合物/C-O-P 化合物の分解実験においても両

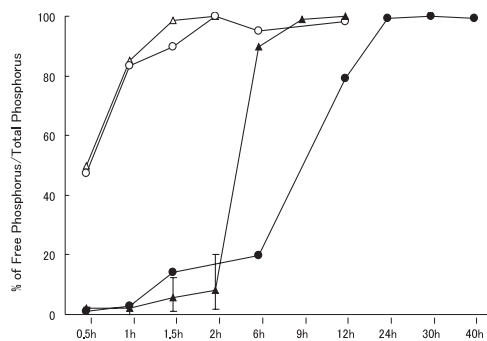


Fig. 6 Time Course of Phosphorous liberated from C-O-P (Phospho-) and/or C-P (Phosphono-) Compounds with Perchloric Acid.

○: CPEA, ceramide phosphoethanolamine (sphingoethanolamine) (prepared from the green bottle fly, *L. caesar*); △: PEA, phosphoethanolamine (obtained from Nacalai tesque, Inc.); ●: CAEPn, ceramide 2-aminoethylphosphonate (prepared from the fresh-water bivalve, *C. sandai*); ▲: AEPn, 2-aminoethylphosphonic acid (obtained from Sigma-Aldrich Fine Chemicals). The reaction was performed in 60% perchloric acid at 175°C .

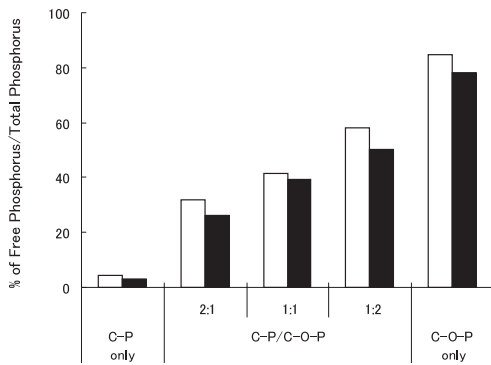


Fig. 7 Phosphorous liberated from the Mixtures of C-O-P and C-P Compounds with Perchloric Acid.

□, Mixtures of PEA and AEPn; ■, mixtures of CPEA and CAEPn. The reaction was performed in 60% perchloric acid at 175°C for 1.5 h.

者の分解率は80%に近似していた (**Fig. 7, PEA (only), CPEA (only)**)。また、この際 C-P 結合リンが共存するとしても、前述したように4%以下であることより、1時間の分解で得られる数値を0.8で除して算出した値を総 C-O-P 結合リン量と見なすことが可能であると判断した。従って、C-O-P 結合リン量の測定には1時間の分解を適用し、C-P 結合リンを含む全リン量の測定には少なくとも24時間以上の分解を必要とする。また、C-P 結合リンは、それぞれより得られるリン量の差より求めることができる。

4. 総 括

エチゼンクラゲ (*Stomolophus nomurai*) の傘部に3種類の ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEPn-1, 2, 3) の存在することを明らかにするとともに、最も含有量の多い CAEPn-1 のセラミド成分を決定した。脂肪酸成分はミリスチン酸 (15.6%), パルミチン酸 (73.0%), 奇数炭素鎖脂肪酸のペンタデカン酸 (9.2%) およびマーガリン酸 (2.2%) から構成されている。長鎖塩基成分は2個の二重結合を含む octadecasphingadienine のみであった。

MALDI-TOF MS 分析において、遊離アミノ基を分子内に有するリン脂質については、そ

れらを一アセチル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示した。

過塩素酸による湿式灰化法において、分解温度 175°C での C-P 化合物 (2-Aminoethylphosphonic acid, Ceramide 2-aminoethylphosphonate) および C-O-P 化合物 (phosphorylethanolamine, Ceramide phosphoethanolamine) の経時的分解能を検証した。

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。なお、本研究に用いたエチゼンクラゲ傘部を供与して頂いた (有) くら研代表取締役 福田金男氏に深謝します。

文 献

- 1) Rouser, G., Kritchevsky, G., Heller, D., Lieber, E. (1963) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 425-454.
- 2) Joseph, J. D. (1979) *Prog. Lipid Res.*, **18**, 1-30.
- 3) Nakhel, I. C., Mastronicolis, S. K., Miniadis-Meimaroglou, S. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **958**, 300-307.
- 4) Kariotoglou, D. M., Mastronicolis, S. K. (2001) *Lipids*, **36**, 1255-1264.
- 5) Kariotoglou, D. M., Mastronicolis, S. K. (2003) *Com. Biochem. Physiol., Part B*, **136**, 27-44.
- 6) 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.
- 7) Folch, J., Lees, M., Stauly, G. H. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-510.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Dittmer, J. C., Lester, R. L. (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127.
- 11) 杉田陸海, 村田真理, 坂板修, 堀太郎 (1990) *油化学*, **39**, 572-575.
- 12) Itonori, S., Takahashi, M., Kitamura, T., Aoki, K., Dulaney, J. T., Sugita, M. (2004) *J. Lipid Res.*, **45**, 574-581.
- 13) Sweeley, C. C., Gaver, R. C. (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298.
- 14) 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.

15) King, E. G. (1932) *Biochem. J.*, **26**, 292-297.

16) 蒲生昌仁, 杉田陸海 (1966) 滋賀大学教育学

部紀要, **16**, 31-36.

17) 糸乘前, 高橋将人, 木村幸史, 杉田陸海 (2001)

滋賀大学教育学部紀要, **51**, 1-6.