

スジエビ *Palaemon Paucidens* のセブレロシド *

糸乗 前^{1**}・鵜飼佑輝²・井上多加志²
小島寿夫^{1,2}・齋藤洋昭³・伊藤将弘²・杉田陸海¹

Characterization of Cerebrosides from the Fresh-Water Shrimp *Palaemon Paucidens**

Saki ITONORI^{1**}, Yuki UKAI², Takashi INOUE²
Hisao KOJIMA^{1,2}, Hiroaki SAITO³, Masahiro ITO² and Mutsumi SUGITA¹

Abstract

Cerebroside (monoglycosylceramide) was purified from the fresh-water shrimp *Palaemon paucidens* (Phylum, Arthropoda; Class, Crustacea). An alkali-stable lipid fraction (6.6g) prepared from the chloroform-methanol extracts of the shrimp whole tissues was successively fractionated on ion-exchange (QAE-Sephadex) and silicic acid (Iatrobeads) column chromatography. The purified cerebroside (6.5mg) was characterized to be a glucocerebroside by 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). The ceramide moiety was mainly composed of saturated C20, C22 and C24 acids as the fatty acids, and saturated and mono-unsaturated bases (C14 ~ C16) as the sphingoids.

Keywords: Glycolipid, Monoglycosylceramide, Cerebroside, Glucocerebroside, Fresh-water shrimp (*Palaemon paucidens*)

1. 緒 言

セブレロシド (cerebroside), いわゆる, モノグリコシルセラミド (monoglycosylceramide) については, 動物界に極めて普遍的に分布しているものとしてグルコセブレロシド (glucocerebroside, Glcβ1-1Cer) 及びガラクトセブレロシド (galactocerebroside, Galβ1-

1Cer) (1-3) が知られているが, その他にも, カモメ塩腺由来のキシロセブレロシド (xylocerebroside, Xylβ1-1Cer, Xylα1-1Cer) (4), ヒト大腸腫瘍由来のフコセブレロシド (fucocerebroside, Fucα1-1Cer) (5), グラム陰性菌 *Flavobacterium devorans* 由来のグルクロノセブレロシド (glucuronocerebroside, GlcA-Cer) (6), 淡水産二枚貝 (イケチョウ

* 本研究の一部は第 47 回日本油化学会年会 (2008 年 9 月, 東京) 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 立命館大学生命科学部情報生物学研究室 (Department of Bioinformatics, College of Life Science, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577) ³ 水産総合センター中央水産研究所利用加工部素材開発研究室 (Applied Biochemistry Section, Biochemistry and Food Technology Division, National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, 2-12-4, Fuku-ura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-8648)

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

(2008 年 11 月 18 日受理)

ガイ) 肝臓由来のマンノセレブロシド (mannocerebroside, Man β 1-1Cer) (7) が報告されている。今までに、著者らは節足動物、甲殻類に属する南極オキアミ、テナガエビ、ケガニの糖脂質を調べ、モノグリコシルセラミドとして、いずれもグルコセレブロシドのみを成分としていることを見出している。また、それらを前駆体とするホスホセレブロシド (MAEPn \rightarrow 6Glc β 1-Cer, MAEPn \rightarrow 4Glc β 1-Cer, AEPn \rightarrow 4Glc β 1-Cer) の存在についても報告している (8-12)。

本研究は、スジエビ *Palaemon paucidens* の糖脂質を精査して系統発生と生物分類の関係を調べる目的で行ったものであり、本論文ではセレブロシドの単離と構造解析について述べる。

2. 実験

2.1 実験材料

実験材料として用いたスジエビ *Palaemon paucidens* は、琵琶湖で採捕、釣り餌としてのもので、大津市の水産業者より購入した (2008 年 2 月)。

2.2 セレブロシド画分の調製及び精製

スジエビ (約 1kg, 湿重量) から附着物質、中性脂質及び水分を除去するためにアセトンで洗浄し、乾燥重量にして約 400g を得た。このものを粉碎した後、1.5L のクロロホルム/メタノール (C/M, 2:1, 以下断らない限り容比を示す) で 2 回抽出を行った (合計, 3L を使用)。濾過後, 2 回の濾液を合して溶媒を留去した。残渣に 135mL のメタノールと等量の 1M KOH 溶液 (メタノール/水, 95:5) を加えて 37℃ で 6 時間, 反応させた。反応後, 2M HCl で中和し, 流水に対して 2 日間透析を行った。透析膜内液を濃縮した後, 少量の C/M(2:1) に溶解し, 10 倍量の冷アセトンを加えて 6.6g の不溶性物質 (弱アルカリ処理安定脂質画分, スフィンゴ脂質画分) を得た。このものを, 既に確立している無脊椎動物複合脂質の系統的分画法に準じて QAE-Sephadex A-25 (Amersham Biosciences AB) column chromatography (OH-

型, 3 x 28cm) を行って, 非吸着画分 (中性糖脂質画分, 860mg) 及び吸着画分 (酸性, 極性脂質画分, 1.1g) に分画した (13-16)。前者の画分から C/M(2:1 及び 1:1) に不溶性の物質を除去した後の 350mg を Iatrobeads (6RS-8060, 三菱化学 ヤトロン) column chromatography (3 x 45cm) に処した。溶出溶媒 (クロロホルム/メタノール/水, C/M/W) の容比を段階的に変化させた溶出法 (各溶出溶剂量, 360mL) で 12 画分に分画し, 85:15:0.5 溶出画分に 6.5mg の精製セレブロシドを得た。

2.3 TLC 分析

TLC プレートは, Silica gel 60 (E. Merck) を用いた。展開溶媒は C/M/W (65:25:4 及び 60:40:10) を使用し, 検出は, orcinol-H₂SO₄ 試薬 (糖), Dittmer-Lester 試薬 (リン) (17) 及び Ninhydrin (アミノ基) によった。

2.4 GC 分析

2.4.1 メチルグリコシドトリメチルシリル誘導体

400 μ g の試料に 0.2mL の 1M メタノール性塩酸を加えて封管し, 100℃ の湯浴で 3 時間加熱した。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 3 回抽出除去した (後述の脂肪酸分析で使用)。残液に炭酸銀を加えて脱酸した後, 濃縮乾固し, 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℃ \rightarrow 230℃ (2℃ /min) に設定した。

2.4.2 脂肪酸メチルエステル誘導体

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℃ \rightarrow 230℃ (4℃ /min) に供した。

2.4.3 長鎖塩基トリメチルシリル誘導体

400 μ g の試料に 0.2mL の水性メタノール塩酸を加えて, 18 時間, 70℃ で加熱した (18)。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℃→230℃ (2℃/min) に供した。

2.5 GC-MS 分析

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：脂肪酸分析，80℃ (2min) → 170℃ (20℃ /min) → 240℃ (4℃ /min)；長鎖塩基分析，80℃ (2min) → 210℃ (20℃ /min) → 230℃ (4℃ /min) に設定；インターフェース温度：250℃；試料注入口温度：240℃；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)；イオン化電流：60μA(EI)。

2.6 MALDI-TOF MS 分析

分析機器は Applied Biosystems/Voyager DETMSTR を，データ解析には Workstation Ver.5.1 を用いた。試料を 2mg/mL の濃度になるように C/M(2:1) に溶解し，そのうちの約 5μL をサンプルプレートに乾燥させながらアブライした。次に 1μL のマトリックス溶液 (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 和光純薬工業，を 1mg/mL の 50%エタノール溶液として調製したもので，使用時まで 4℃で暗所保存) をのせ風乾させた後，分析を行った。照射レーザーは 337nm の窒素レーザーを用い，測定は陽イオンリフレクターモードで行った。質量校正にはアンジオテンシン I (和光純薬工業，[M+Na]⁺，m/z=1296.69) を用いた (19)。

2.7 ¹H-NMR 分析

3mg の試料を試験管に分取し，0.4mL の 2% D₂O/*d*₆-DMSO を加え，超音波照射によって溶解させた。分析には JEOL JNM-ALPHA400 を用い，分析条件は，観測周波数 400MHz，試料温度 60℃，積算回数は，512 回で行った。

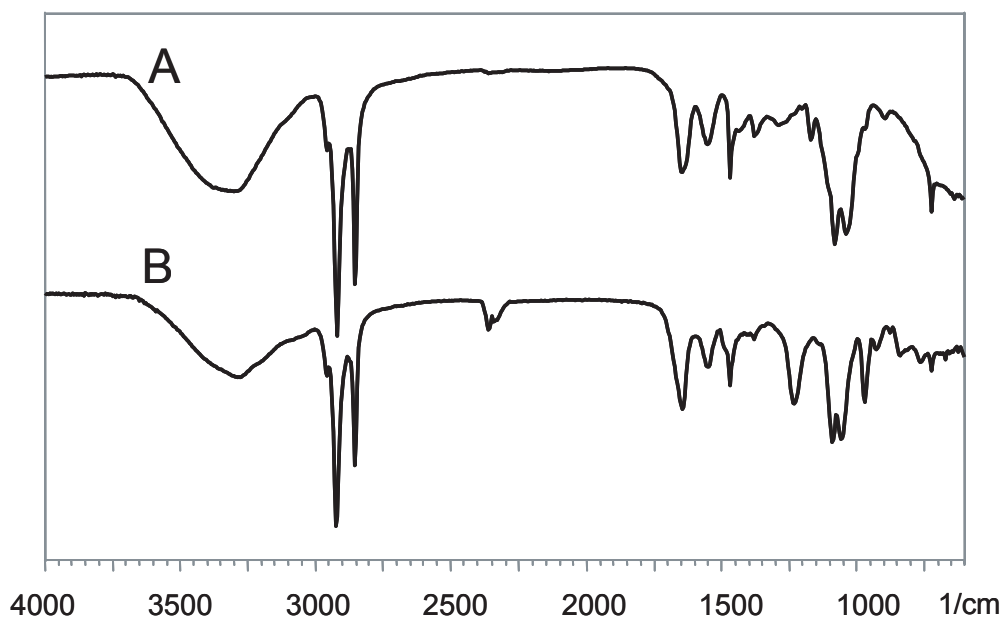


Fig. 1 Infrared spectra of cerebroside (A) and sphingomyelin (ceramide phosphocholine) (B) isolated from the fresh-water shrimp *Palaemon paucidens*.

2.8 IR 分析

島津フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400 を用いて測定した。

3. 結果および考察

3.1 スジエビのスフィンゴ脂質画分よりセレブロシドの精製

QAE-Sephadex A-25 カラム分画によって得られた非吸着画分を Iatrobeds カラム分画に処し, 12 画分: Fr. 1, Chloroform only; Fr. 2, C/M(90:10); Fr. 3, C/M/W(85:15:0.5); Fr. 4, (80:20:1); Fr. 5, (75:25:2.5); Fr. 6, (70:30:3); Fr. 7 (65:35:3.5); Fr. 8, (60:40:4); Fr. 9, (50:50:5); Fr. 10, (40:60:10); Fr. 11, (20:80:10); Fr. 12, M/W(100:10) に分画した (350mg の非吸着画分より 90mg を回収)。各画分を TLC で検したところ, Fr. 3(収量:6.5mg), Fr. 4(0.2mg)

及び Fr. 5(0.4mg) の 3 画分に糖の検出試薬である orcinol- H_2SO_4 のみに陽性を示す物質の存在が観察できた。また, Fr. 8(7.0mg), Fr. 9(28.0mg), Fr. 10(19.7mg) 及び Fr. 11(6.8mg) の 4 画分からは Dittmer-Lester 試薬にのみ陽性を示すリン化合物を含有する物質の存在を検出した。前者の画分中, Fr. 3 は TLC の移動度及び IR スペクトル (Fig. 1, A) よりセレブロシドであると判断し, 以後の分析対象物質としたが, Fr. 4 及び Fr. 5 については極めて微量であることより分析の対象から除外した。一方, 後者の画分については, いずれも TLC の移動度が極めて近接していることから同族物質であると考えられた。また, この物質の収量が全回収量の 68%を占めることから, スジエビのスフィンゴ脂質の主要成分であることがわかった。最近の著者らの研究で, 甲殻類, 特にエビ類の主要なスフィンゴ脂質がスフィンゴミエリン (ceramide phosphocholine) であることを, ブラインシュリンプ *Artemia* Sp. から明らかにしているが, 本研究の試料であるスジエビにおい

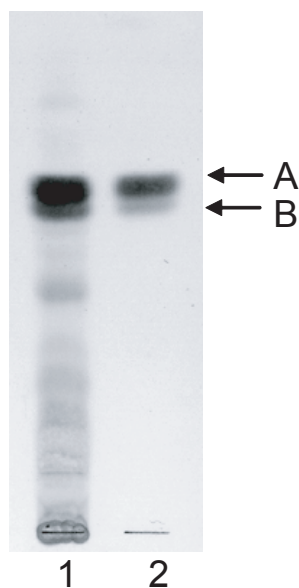


Fig. 2 Thin-layer chromatogram of the purified cerebroside from the fresh-water shrimp *P. paucidens*.

Lane 1, Neutral glycolipid fraction eluted with C/M/W (30:60:8) using QAE-Sephadex A-25 column chromatography; lane 2, purified cerebroside fraction. The plate was developed in C/M/W (65:35:8) for 30min, and the spots were visualized with orcinol- H_2SO_4 reagent.

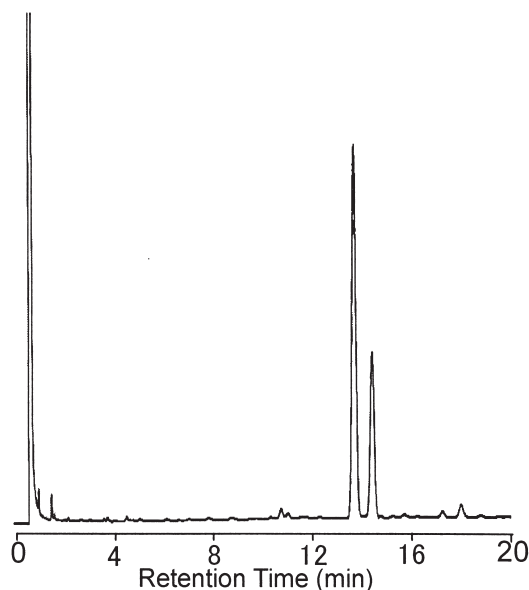


Fig. 3 Gas chromatogram of TMS-methyl glycosides from cerebroside.

Compositional sugar analysis of the isolated cerebroside as their TMS-methylglycosides was carried out by GC on a capillary column of HiCap-CBP 5, programmed at $2^\circ\text{C}/\text{min}$ from 140°C to 230°C .

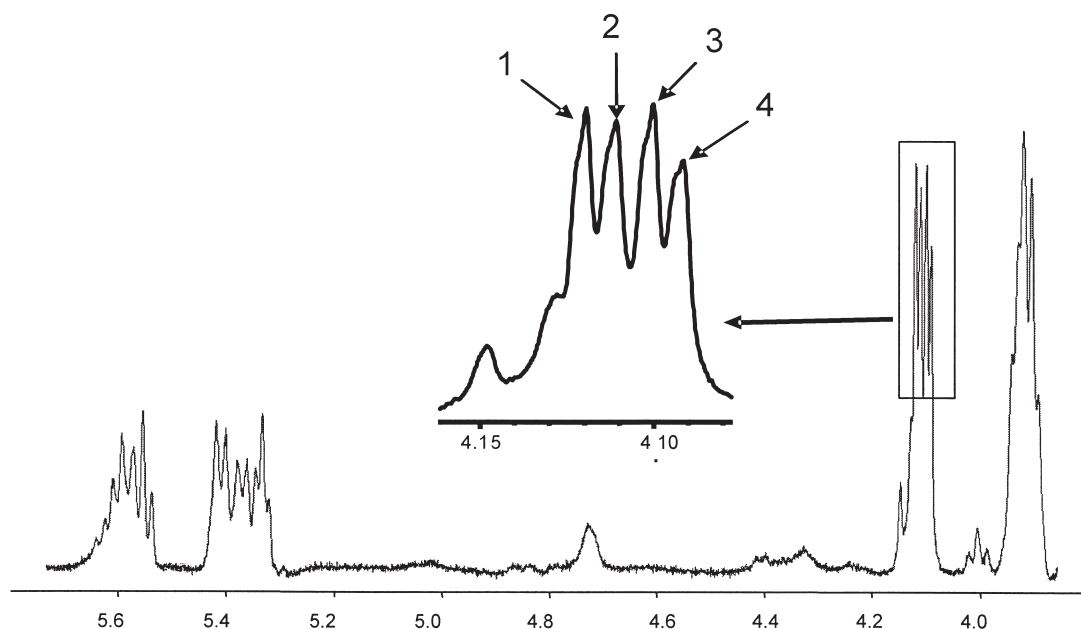


Fig. 4 ^1H -NMR spectrum of isolated cerebroside.

1 and 3, chemical shift: 4.11 ppm; coupling constant: 7.75 Hz.

2 and 4, chemical shift: 4.10 ppm; coupling constant: 6.95 Hz.

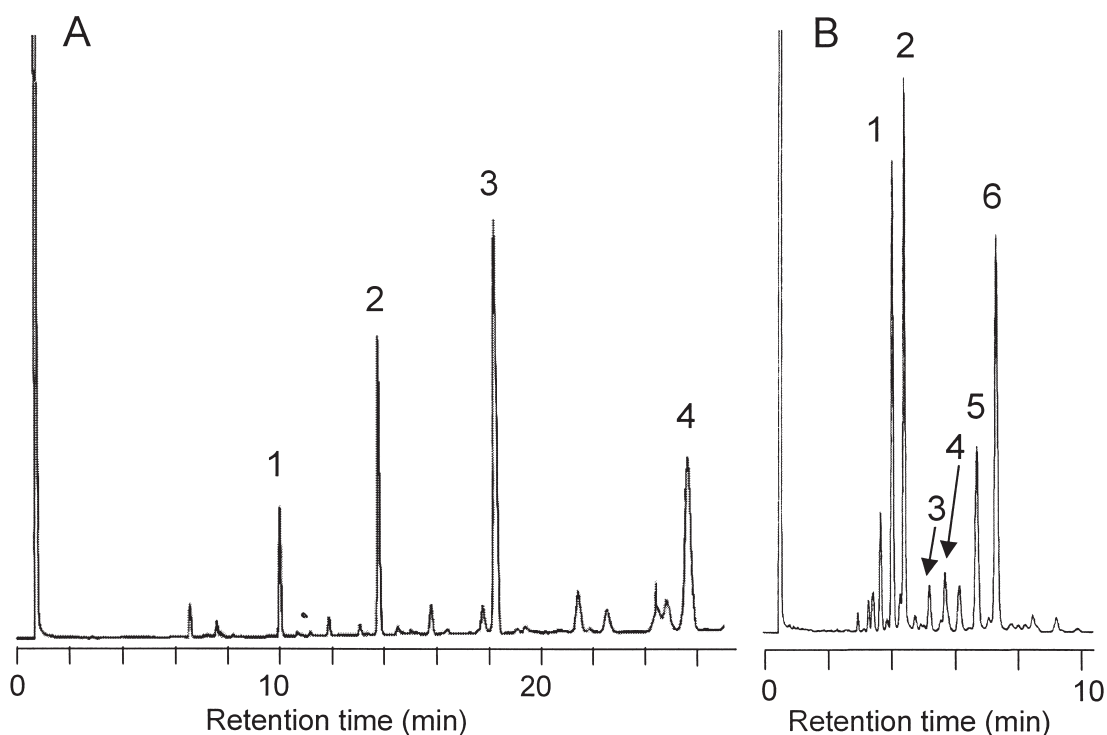


Fig. 5 Gas chromatograms of fatty acid and sphingoid compositions of cerebroside.

A: Fatty acid methyl esters; 1, methyl stearate (18:0); 2, methyl arachidate (20:0); 3, methyl behenate (22:0); 4, methyl lignocerate (24:0); B: *N*-free trimethylsilylated sphingoids; 1, tetradecasphingosine (d14:1); 2, tetradecasphinganine (dihydrosphingosine, d14:0); 3, pentadecasphingosine (d15:1); 4, pentadecasphinganine (d15:0); 5, hexadecasphingosine (d16:1); 6, hexadecasphinganine (d16:0).

でも同様の結果が得られたものとする (20)。本論文は、スジエビのセレブロシドの構造研究であることより、Fig. 1, B に Fr. 9 から得た IR 分析結果のみを示したが、典型的なスフィンゴミエリンのスペクトルであった (960cm^{-1} の存在)。

3.2 スジエビのセレブロシド

精製セレブロシド (Iatrobeads カラム分画による Fr.3 画分) は、TLC 上での移動度が異なる 2 つのスポット (Fig. 2, lane 2, A ; B) を示した。この現象については、構成糖種及びセラミド分子種 (脂肪酸成分及び長鎖塩基成分) のいずれかの相違に起因していると考えられ、前者については、Fig. 3 に示すように構成糖種としてグルコースのみを検出したことから、グルコセレブロシドの単一標品であると結論付けられ、その可能性は消滅した。一方、後者については、Fig. 4 に NMR スペクトルを示したが、化学シフトより、このグルコセレブロシドのアノマー配置は β -アノマーであることが確認されるとともに、複雑なシグナルが観察されたことより、その可能性が示唆された (後述)。

3.3 セレブロシドのセラミド成分

セラミドの構成成分である脂肪酸及び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 Fig. 5 及び Table 1 に示した。脂肪酸組成は、ステアリン酸 (6.7%)、アラキジン酸 (16.9%)、ベヘン酸 (36.2%) 及びリグノセリン酸 (27.1%) を主要な成分としていたが、少量ではあるが、奇数炭素鎖脂肪酸 (7.7%; 19:0, 21:0, 23:0) 及びヒドロキシ脂肪酸 (5.4%; h19:0, h21:0, h22:0, h23:0) を含有していた (Fig. 5, A; Table 1)。一方、長鎖塩基組成は、炭素数が 14, 15 及び 16 のスフィンゴシン (40.5%) とそれらの飽和型であるジヒドロスフィンゴシン同族体 (59.5%) を成分としていた (Fig. 5, B; Table 1)。特筆すべきことは、今までに報告されている甲殻類あるいは節足動物全般における長鎖塩基成分が、炭素数 14 及び 16 のスフィンゴシン型に限られているのに対して、スジエビのセレブロシドの長鎖塩基成分にはジヒドロスフィンゴシン型が極めて濃度

Table 1 Ceramide compositions of cerebroside from the fresh water shrimp *Palaemon paucidens*.

Fatty acid (%)		Sphingoid (%)	
18:0	6.7	d14:1	23.2
19:0	1.0	d14:0	26.3
20:0	16.9	d15:1	3.1
21:0	1.9	d15:0	4.5
22:0	36.2	d16:1	14.2
23:0	4.8	d16:0	28.7
24:0	27.1		
h19:0	0.7		
h21:0	0.8		
h22:0	2.9		
h23:0	1.0		

h, 2-hydroxy; d, dihydroxy.

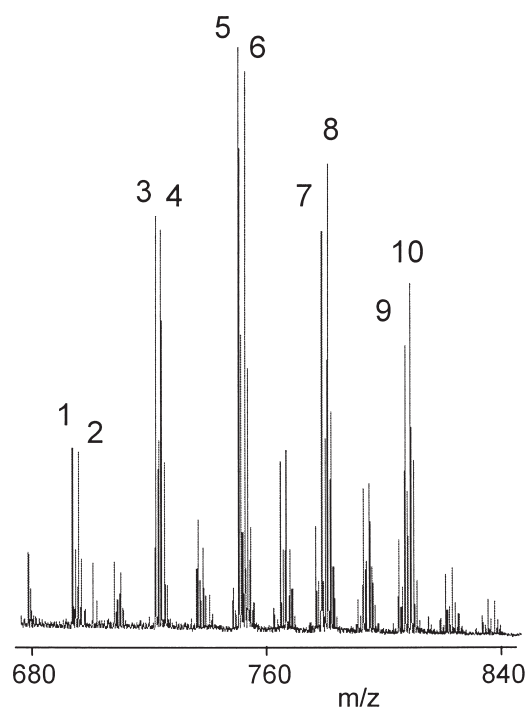


Fig. 6 Positive-ion mode MALDI-TOF MS spectrum of cerebroside.

1, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion at m/z 694.43 (sphingoid-fatty acid, d14:1-18:0); 2, m/z 696.43 (d14:0-18:0); 3, m/z 722.46 (d14:1-20:0, d16:1-18:0); 4, m/z 724.47 (d14:0-20:0, d16:0-18:0); 5, m/z 750.50 (d14:1-22:0, d16:1-20:0); 6, m/z 752.51 (d14:0-22:0, d16:0-20:0); 7, m/z 778.53 (d14:1-24:0, d16:1-22:0); 8, m/z 780.54 (d14:0-24:0, d16:0-22:0); 9, m/z 806.57 (d16:1-24:0); 10, m/z 808.66 (d16:0-24:0).

高く含まれている点であろう。また、Fig. 2 に示される TLC 上での移動度の異なる 2 つのスポット (A 及び B) については、前述したように、セラミド分子種の相違に起因することが示唆されたが、今回、A 及び B をそれぞれ単離、精製するには至らなかったため推測の域を出ないが、次の様に考察できる。即ち、移動度の大きいスポット A は、非ヒドロキシ脂肪酸とスフィンゴシン及びスフィンガニンのセラミド分子種から成るセレブロシド、一方、移動度の小さいスポット B は、ヒドロキシ脂肪酸とスフィンゴシンのセラミド分子種から成るセレブロシドである。更に、Fig. 4 の NMR スペクトルについて、グルコースの β -アノマー領域 (4.1ppm) に複数のシグナル (シグナル番号 1 ~ 4) が観察できた。経験的ではあるが、セラミド分子種にヒドロキシ脂肪酸と非ヒドロキシ脂肪酸を有するものが存在しているときには、それらの存在比に対応した 4 本のシグナルが観察された (8)。しかしながら、今回のシグナルは、セラミド分子種中におけるヒドロキシ脂肪酸と非ヒドロキシ脂肪酸の含有比に対応していないことより、他の要因として、長鎖塩基組成が影響を与えているものと推測している。ちなみに、5.3 ~ 5.6ppm に観察できるシグナルは、スフィンゴシンに由来するものである。

3.4 MALDI-TOF MS 分析

MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 6 に示したが、Fig. 5A; B 及び Table 1 に見られるセラミドの主要な構成成分 (長鎖塩基 d14:0, d14:1, d16:0, d16:1 と脂肪酸 18:0, 20:0, 22:0, 24:0) の 16 通りの組合わせに対応する、それぞれ $[M+Na]^+$: Fig. 6 の Peak No. 1, m/z 694.43 (長鎖塩基 d14:1-脂肪酸 18:0, 計算値 m/z 694.52); Peak No. 2, m/z 696.43 (d14:0-18:0, m/z 696.54); Peak No. 3, m/z 722.46 (d14:1-20:0, d16:1-18:0, m/z 722.55); Peak No. 4, m/z 724.47 (d14:0-20:0, d16:0-18:0, m/z 724.57); Peak No. 5, m/z 750.50 (d14:1-22:0, d16:1-20:0, m/z 750.59); Peak No. 6, m/z 752.51 (d14:0-22:0, d16:0-20:0, m/z 752.60); Peak No. 7, m/z 778.53 (d14:1-24:0, d16:1-22:0, m/z

778.62); Peak No. 8, m/z 780.54 (d14:0-24:0, d16:0-22:0, m/z 780.63); Peak No. 9, m/z 806.57 (d16:1-24:0, m/z 806.65); Peak No. 10, m/z 808.66 (d16:0-24:0, m/z 808.66) に帰属するスペクトルの存在を確認した。

本研究の一部は、農林水産省「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発 (マテリアル)」研究費によって行った。

文 献

1. “生化学データブック I”, 日本生化学会編, p.839, 東京化学同人 (1979).
2. A. Makita, N. Taniguchi, “New Comprehensive Biochemistry”, ed. by H. Wiegandt, Vol.10, p.1, Elsevier, Amsterdam (1985).
3. S. Itonori, M. Sugita, “Comprehensive Glycoscience”, ed. by J.P. Kamerling, Vol.3, p.253, Elsevier, Amsterdam (2007).
4. K.-A. Karlsson, B.E. Samuelsson, G.O. Steen, *J. Lipid Res.*, **13**, 169-176 (1972).
5. K. Watanabe, T. Matsubara, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, **251**, 2385-2387 (1976).
6. A. Yamamoto, I. Yano, M. Masui, E. Yabuuchi, *J. Biochem.*, **83**, 1213-1216 (1978).
7. T. Hori, M. Sugita, H. Shimizu, *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 170-173 (1981).
8. S. Itonori, K. Kamemura, K. Narushima, N. Sonku, O. Itasaka, T. Hori, M. Sugita, *Biochim. Biophys. Acta*, **1081**, 321-327 (1991).
9. 杉田陸海, 堀太郎, 蛋白質 核酸 酵素, **37**, 289-294 (1992).
10. 仲谷文貴, 杉田陸海, 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **47**, 1-7 (1997).
11. 板坂修, 木村幸史, 梶原千穂, 野々山綾, 溝口陽子, 松田英之, 杉田陸海, 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **47**, 9-16 (1997).
12. K. Kimura, S. Itonori, N. Hada, O. Itasaka, J. T. Dulaney, T. Takeda, M. Sugita, *J. Oleo Sci.*, **51**, 83-91 (2002).
13. 堀太郎, 坂田綾子, 青木一弘, 林陽, Dulaney, J.T., 杉田陸海, 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **45**, 31-42 (1995).
14. 糸乗前, 北村朋典, 田中理恵子, 宮垣紀子, 齋藤洋昭, 杉田陸海, 滋賀大学教育学部紀要Ⅲ: 自然科学, **54**, 41-48 (2004).
15. 糸乗前, 清水越正, 矢野宏治, 北村朋典, 小島寿

- 夫, 松室有紀, 伊藤將弘, 豊川雅哉, 齋藤洋昭, 杉田陸海, 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **56**, 87-96 (2006).
16. 糸乗前, 北村朋典, 田中理恵子, 宮垣紀子, 齋藤洋昭, 杉田陸海, 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **56**, 51-62 (2006).
17. Dittmer, J.C., Lester, R.L., *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127 (1964).
18. Sweeley, C.C., Gaver, R.C., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298 (1965).
19. Ito, M., Matsumuro, Y., Yamada, S., Kitamura, T., Itonori, S., Sugita, M., *J. Lipid Res.*, **48**, 96-103 (2007).
20. 小島寿夫, 清水香苗, 東野綾子, 伊藤將弘, 糸乗前, 杉田陸海, 第 46 回日本油化学会年会 (京都), P-56 (2007).