

ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* のホスホノ脂質の構造解析

杉田陸海^{1*}・糸乗 前¹・牧田 章²
伊藤将弘³・齋藤洋昭⁴・大塩由季¹・原田雅史¹
東野綾子¹・野崎仁崇¹・小島寿夫³

Structural Analysis of Phosphonolipids of the Giant Ezo Scallop *Patinopecten yessoensis*

Mutsumi SUGITA^{1*}, Saki ITONORI¹, Akira MAKITA²
Masahiro ITO³, Hiroaki SAITO⁴, Yuki OSHIO¹, Masashi HARADA¹
Ayako HIGASHINO¹, Hitoshi NOZAKI¹ and Hisao KOJIMA³

Abstract

Two phosphonolipids (ceramide 2-aminoethylphosphonates), CAEPn-1 and CAEPn-2, were isolated from the hepatopancreas of the Giant Ezo scallop *Patinopecten yessoensis* (Phylum, Mollusca; Class, Bivalvia; Family, Pectinidae). Their chemical structures were completely characterized by TLC-immunostaining assay, aliphatic analyses, infrared analysis and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. The major fatty acids were 16:0, br17:0, 17:0 and 18:0 for CAEPn-1, and their 2-hydroxylated acids for CAEPn-2. The major sphingoids were d16:1, d17:1, d18:1, d18:2, d18:3 and d19:3 for CAEPn-1, and d18:3 and d19:3 for CAEPn-2.

Keywords: Phosphonolipid, Ceramide, Fatty acid, Sphingoid, Giant Ezo scallop (*Patinopecten yessoensis*)

1. 緒言

現在、貝類からは、スフィンゴリン脂質として、セラミドアミノエチルホスホン酸、セラミドモノメチルアミノエチルホスホン酸、セラミドホスホエタノールアミン及びセラミドホスホコリン (スフィンゴミエリン) の4種類が見出されている。特に、セラミドアミノエチルホス

ホン酸とセラミドモノメチルアミノエチルホスホン酸は、分子内にC-P結合を有するホスホノ脂質で、前者は貝類を中心とした軟体動物全般やイソギンチャク (*Arthropleura elegantissima*, *Metridium senile*) 等の腔腸動物に分布していることが知られている(1,2)。一方、後者のセラミドモノメチルアミノエチルホスホン酸は、サザエ (*Turbo cornutus*) やイシダタミ (*Monodonta*

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 天使大学看護栄養学部栄養学科 (Department of Nutrition, Tenshi College School of Nursing and Nutrition, 1-30 Higashi 3-chome, Kita 13-jo, Higashi-ku, Sapporo 065-0013) ³ 立命館大学生命科学部情報生物学教室 (Department of Bioscience and Bioinformatics, College of Life Science, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577) ⁴ 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: 杉田陸海 (Corresponding author: Mutsumi Sugita, E-mail: sugita@edu.shiga-u.ac.jp) (2008年12月10日受理)

labio) 等の海産巻貝類を中心として、その分布域が限られているようである(2,3)。また、セラミドホスホエタノールアミンは、最初、淡水産巻貝類を中心にその分布域が示されていたが、今では、節足動物の昆虫類や倍脚類にも存在が知られている(3,4)。セラミドホスホコリン(スフィンゴミエリン)は、哺乳類を中心に高等動物には普遍的に存在する代表的なスフィンゴリン脂質であるが、下等動物においては、その存在が限定されているようであり、著者らの調査によれば、貝類では海産の真珠母貝であるアコヤガイ(*Pinctada martensii*)に高濃度で含まれている(5,6)。更に、貝類におけるこれらのスフィンゴリン脂質の含有量は、特に、ホスホノ脂質において極めて高く、スフィンゴ脂質画分の60~90%にも及んでいる(1,2)。

しかしながら、現在においても、ホスホノ脂質の生理機能については、C-P結合という極めて安定性の高い特異な構造を有することや生体のリン酸エステル化合物との構造類似性及び、動物界における限られた分布域などから、加水分解抵抗性の細胞膜の構築物質、リン酸エステル化合物の競合阻害剤、生物進化の遺物等としての憶測から脱し得ない(1)。

一方、このように貝類に大量に存在するホスホノ脂質を含むスフィンゴリン脂質画分からは、著者らが確立化している無脊椎動物複合脂質の系統的分画、調製法を用いると、極めて純度の高い標品を得ることができることから、これらの標品の有効的な利用法が追究されている。例えば、今のところ、スフィンゴ脂質のようなセラミド化合物は化粧品や研究用試薬として需要が増大しているが、天然には極めて少ないため、化学合成されたものや、低濃度で効率のそれほど良くない植物由来のセブレロシド等が利用されているのが、現状である、等の理由による。

更に、貝類は食用等にそれらの組織を部分的に利用しているが、大部分は水産廃棄物として処理されているところから、「バイオリサイクル」の観点からも、それらの有効的利用、即ち、「食品廃棄物や加工残渣を利用した高付加価値素材の開発」を行うには最適の材料であると考えられる。

本研究では、このような水産廃棄物や加工残渣から得られるセラミド化合物の生理機能や安全性等を明らかにする際に必要な情報を得ることを目的として、我国では食用としての需要度が極めて高いホタテガイ(*Patinopecten yessoensis* Giant Ezo scallop)を試料とした。

本論文では、特に、廃棄量の多い肝臓を中心に、それらの組織に含まれるホスホノ脂質の化学構造解析について述べる。

2. 実験

2.1 実験材料

材料のホタテガイは、2007年9月下旬に、内臓、貝柱及び外套膜の組織別実験用として150個体(貝殻付湿重量:27kg)を、また、2008年1月下旬に、生殖巣(卵巣及び精巣)の最も成熟している時期のものとして、150個体(31kg)のメス貝と120個体(25kg)のオス貝を、有限会社マルナカ漁業(青森県上北郡野辺地町)より購入した。組織別実験に用いるホタテガイは煮殺した後、貝殻を除いた貝肉部をアセトンで脱水した(アセトン層の着色が認められない程度まで抽出操作を行うので、アセトン可溶脂質及び色素等も除去される)。得られた乾燥貝肉部を内臓部(主に肝臓と鰓)、貝柱部及び外套膜部に分別した。それぞれの乾燥重量は内臓部:390g、貝柱部:1600g、外套膜部:250gであった。一方、生殖巣については、煮殺した後、貝殻を除いた貝肉部より特徴のある色彩(卵巣は赤色、精巣は白色)によって判定し、分別した。分別後は、組織別材料と同様にアセトン抽出を行って、卵巣から620g、精巣から600gの乾燥物を調製した。

2.2 スフィンゴ脂質画分の調製及び分画

Fig. 1に示した当教室で確立化している無脊椎動物複合脂質の分画、調製法に準じてスフィンゴ脂質画分の調製及び分画を行った。即ち、上述の内臓部、貝柱部、外套膜部、卵巣部及び精巣部のそれぞれから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 in Fig. 1) を得た。次いで、エステル型 (アシル型) 及びアセタール型 (アルケニル型) のグリセロ脂質を可及的に分解除去する目的で、弱アルカリけん化、続いて弱酸性 (pH 1) 処理を施した後、2 日間、流水で透析した。透析膜内液を濃縮し、アセトンを加えてアセトン不溶性粉末 (Sphingolipid fraction in Fig. 1) を調製した。この Sphingolipid fraction を QAE-Sephadex A-25 (Amersham Biosciences AB) column chromatography (OH⁻ form, bed volume 250mL ~ 350mL) によって、C/M/W(30:60:8) fraction (中性糖脂質画分) 及び Ammonium acetate fraction (酸性・極性脂質画分) に分画した。即ち、カラムからの溶出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) 及び等倍容のメタノール、極性溶媒としてそれぞれ 5 倍容の 0.05M, 0.15M, 0.45M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を用いた。極性溶媒での各溶出画分は、濃縮後、2 日間の流水透析に処した。

2.3 TLC 分析

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 (65:25:4, 60:35:8, 60:40:10) 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) 及び orcinol-H₂SO₄ 試薬 (糖) 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.) 上に、クロロホルム-メタノール-水 (65:25:4) を用いて展開した。展開後、風乾して溶媒を留去したプレートに、PBS(10mM リン酸緩衝液-生理食塩水, pH7.2) 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, pH7.2, 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 x 4.5cm) 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、5mL 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)(8-10) 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 5mL 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 (3mg の 4-chloro-1-naphthol を 1mL のメタノールに溶

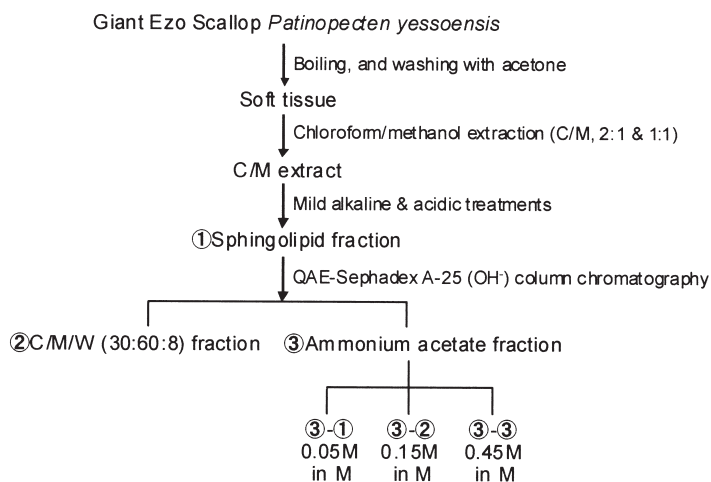


Fig. 1 Scheme for Preparation and Fractionation of Sphingolipids from the Giant Ezo Scallop *Patinopecten yessoensis*.

解したもの、5mLの50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 及び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ところで水洗いして停止した。

2.5 GC 分析

2.5.1 脂肪酸メチルエステル誘導体

200 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 $^{\circ}$ C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回抽出し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170 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min)に設定した。

2.5.2 酸加水分解法による長鎖塩基分析

500 μ gの試料に0.2mLの水性メタノール塩酸(8.6mLの濃塩酸と9.4mLの水にメタノールを加えて全量を100mLに調製)を加えて、18h、70 $^{\circ}$ Cで反応させた(11)。反応物に0.2mL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、0.6mLの1M水酸化ナトリウム水溶液-メタノール(3:4)及び0.72mLのクロロホルムを加えて攪拌した後、遠心分離して2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。

2.5.3 アルカリ加水分解法による長鎖塩基分析

約1mgの試料をスクリュウキャップ付の試験管にとり、2mLの1,4-dioxane及び2mLの10% (w/v) Ba(OH)₂水溶液を加えた後、反応温度を110 $^{\circ}$ Cに保持したブロックヒーターに24時間入れた(12)。反応終了後、放冷し、2mL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。この操作を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 $^{\circ}$ C \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/min))に供した。

2.6 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 $^{\circ}$ 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。

2.7 IR 分析

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。

2.8 MALDI-TOF MS 分析

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N-acetylCAEPn (N-acetylation: 100 μ gのCAEPn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)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10mg/mLの濃度とし、使用時まで4 $^{\circ}$ 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、377nm)を使用し、negative ion modeで測定を行った。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 及び L-7 を用いて行った(13)。

3. 結果および考察

3.1 ホタテガイの組織別スフィンゴ脂質

ホタテガイの5組織、即ち、内臓部(肝臓)(乾燥重量にして390g)、貝柱部(1600g)、外套膜部(250g)、卵巣部(620g)、精巣部(600g)より得たスフィンゴ脂質画分及びそれらの分画による中性糖脂質画分と酸性・極性脂質画分の量的な関係をTable 1に示した。各組織のスフィンゴ脂質含有率(① in Table 1)は、乾燥重量の0.5%~1.5%を占め、最も低い貝柱部(0.5%)を除いては、ほぼ同じ含有率であった。QAE-Sephadexによる分画では、セレブロシドを含む中性糖脂質画分(② in Table 1)が、それぞれスフィンゴ脂質画分の6.3%(内臓部)、1.4%(貝柱部)、6.3%(外套膜部)、4.8%(卵巣部)、2.5%(精巣部)であった。一方、極性溶出溶媒(③ in Table 1)による酸性・極性脂質画分の回収率は、スフィンゴ脂質画分の78.0%(内臓部)、65.3%(貝柱部)、70.8%(外套膜部)、55.2%(卵巣部)、64.5%(精巣部)であった。特に、これらのすべてについて、酢酸アンモニウム濃度の低い溶出溶媒(③-① in Table 1)での溶出物(ホスホノ脂質及び酸性糖

脂質と推定されるもの)が主であった。

SimonとRouser(14)によって種々の動物におけるリン脂質の組織別分布調査が行なわれ、貝類については、アワビ(*Haliotis corrugata* Pink Abalone)及びホタテガイ(*Hinnites giganteum* Large Rock Scallop)の貝柱のそれぞれが報告されており、両種ともにセラミドアミノエチルホスホン酸は存在しているが、スフィンゴミエリン及びセラミドホスホエタノールアミンは存在しないことが示されている。特に、ホタテガイの貝柱には、ホスファチジルコリン(レシチン)が、リン脂質全体の35.4%、ホスファチジルエタノールアミンが25.6%、ホスファチジルセリンが11.9%、セラミドアミノエチルホスホン酸が16.8%で、スフィンゴリン脂質としては、唯一、セラミドアミノエチルホスホン酸が高含有率で存在していることが示されており、今回、著者らの得ているホタテガイ貝柱での量的なデータとこれらの報告結果は、極めて類似していることが明らかとなった。

一方、貝類における組織別スフィンゴリン脂質については、Matsubara(15)によるマガキ(*Ostrea gigas* Oyster)の貝柱、鰓、外套膜及び内臓の報告がある。それによるとリン脂質全体に占めるスフィンゴホスホノ脂質の割合は、貝柱が45.2%、鰓が22.2%、外套膜が21.0%、内

Table 1 Quantitative Fractionation by QAE-Sephadex A-25 Column Chromatography.

	Viscera	Adductor	Mantle	Ovary	Testis
Soft tissue (Dry weight)	390g	1600g	250g	620g	600g
① Sphingolipid fraction	6.0g	8.6g	3.0g	9.5g	8.5g
QAE-Sephadex column chromatography					
② C/M/W (30:60:8) fraction	380mg	120mg	190mg	460mg	210mg
③ Ammonium acetate fraction					
③-① 0.05M in M	4.0g	5.1g	1.8g	3.4g	4.4g
③-② 0.15M in M	330mg	385mg	230mg	1500mg	640mg
③-③ 0.45M in M	350mg	230mg	95mg	340mg	440mg

Each soft tissue of viscera (mainly hepatopancreas), adductor muscle and mantle was obtained from 150 bivalves, ovary from 150 bivalves and testis from 120 bivalves. The fractions marked by ①, ②, ③, ③-①, ③-② and ③-③ are the same as described in Fig. 1.

臓が 19.2%で、貝柱が最も含有量が多く、また、4 組織ともホスホノ脂質はセラミドアミノエチルホスホン酸であった。

本論文では、内臓部の肝臓におけるホスホノ脂質について述べるが、内臓部の鰹のホスホノ脂質と糖脂質、貝柱部の酸性糖脂質、生殖巣(卵巣部及び精巣部)のホスホノ脂質と糖脂質については別報する。

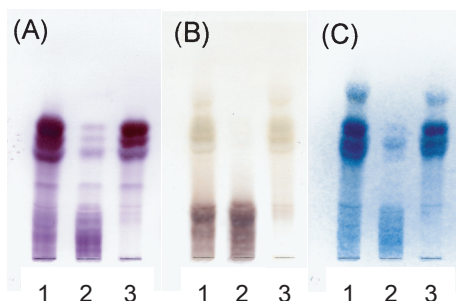


Fig. 2 Thin-Layer Chromatograms of the Upper and Lower Layers obtained by Folch's Partition.

Lane 1, 0.05M ammonium acetate fraction eluted from QAE-Sephadex A-25 column chromatography shown in Fig. 1; lane 2, upper layer by Folch's partition; lane 3, lower layer by Folch's partition. The plates were developed in chloroform-methanol-water, 60:35:8 for 20min, and the spots were visualized with ninhydrin (A), orcinol-H₂SO₄ (B) and Dittmer-Lester reagents (C).

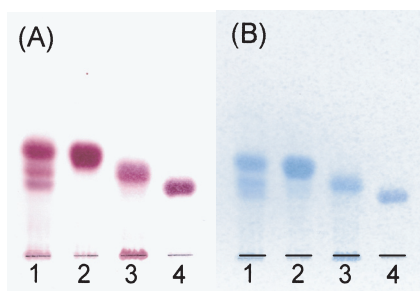


Fig. 3 Thin-Layer Chromatograms of the Phosphonolipid Fraction.

Lane 1, phosphonolipid fractions eluted from DEAE-Sephadex A-25 column chromatography with the neutral solvent (chloroform-methanol-water, 30:60:8); lane 2, Fr. 1 (CAEPn-1) fractionated by Iatrobeds column chromatography; lane 3, Fr. 2 (CAEPn-2); lane 4, Fr. 3. The plates were developed in chloroform-methanol-water, 65:25:4 for 30min, and the spots were visualized with ninhydrin (A) and Dittmer-Lester reagents (B).

3.2 ホタテガイ内臓(肝臓)のホスホノ脂質

QAE-Sephadex column chromatography での 0.05M 酢酸アンモニウム(メタノール溶液) 溶出によって得た画分(4.0g)には、TLC 上で極性の異なる2つの画分、即ち、アミノ基及びプリン発色試薬の両方に陽性を示す移動度の大きい画分(ホスホノ脂質画分)と糖発色試薬に陽性を示す移動度の小さい画分(酸性糖脂質画分)の存在が観察できた(Fig. 2, lane 1)。そこでこの2つの画分を、極性の違いを利用してそれぞれを分画する目的で Folch 分配(16)に処した。その結果、分配の上層画分より 1.0g, 下層画分より 2.7g を回収した(Fig. 2, lanes 2, 3)。更に、後者の下層画分中に残存する上層画分(酸性糖脂質)を除去するために DEAE-

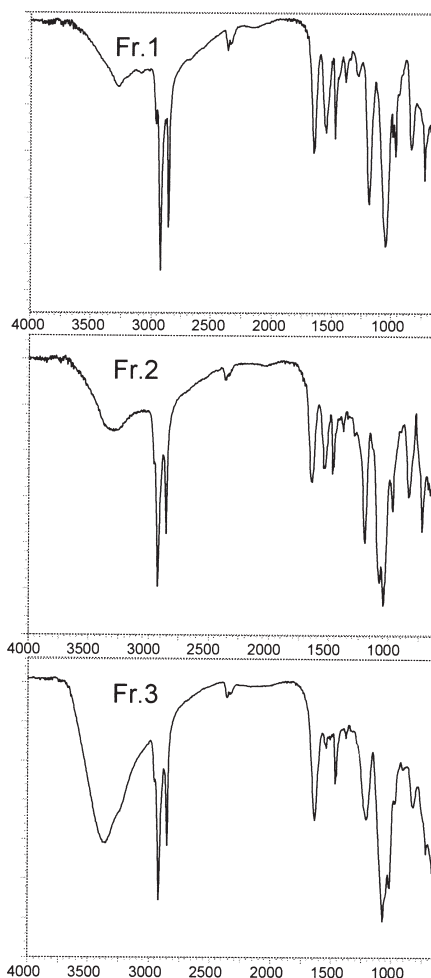


Fig. 4 Infrared Spectra of Fr. 1 (CAEPn-1), Fr. 2 (CAEPn-2) and Fr. 3.

Sephadex A-25 column chromatography(COO⁻ form, bed volume 60mL)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)及び等倍容のメタノール、極性溶媒としてそれぞれ5倍容の0.05M, 0.15M, 0.45M酢酸アンモニウム(メタノール溶液)を用いた。この分画操作で、中性溶媒(クロロホルム-メタノール-水)溶出物として、2.0gのカラム担体への非吸着性物質(ホスホノ脂質画分)を回収した。また、極性溶出溶媒ではそれぞれ560mg, 13mg及び11mgの担体への吸着物質を回収した。次いで、その非吸着性物質(ホスホノ脂質画分)のうちの200mg(回収画分の1/10)をIatrobeads(6RS-8060, Mitsubishi Kagaku Iatron Inc.) column chromatography(1.0 x 85cm, bed volume 65mL)によるクロロホルム-メタノール-水(80:20:1, 400mL ~ 50:50:5, 475mL)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0.6mL/minに保って溶出し、3mLずつ分取した後、溶出液をTLCで検し、移動度の異なる3画分(Fr. 1: 45mg, Fr. 2: 24mg及びFr. 3: 11mg)をそれぞれほぼ単一の標品として得た(回収率: 40%)(Fig. 3)。

これらのIRスペクトルを測定したところ、Fr. 1及びFr. 2のそれぞれの標品からのスペクトルは標準標品として当教室で調製したセタ

シジミのホスホノ脂質のスペクトルに一致するように、1180cm⁻¹及び1050cm⁻¹にC-P結合のリン酸基由来の-OH基、1650cm⁻¹及び1550cm⁻¹にアミド結合I、IIに由来する吸収が観察された(Fig. 4, Fr. 1, Fr. 2)。一方、Fr. 3については、そのスペクトルにアミド結合IIに由来する吸収が確認できないこと、また、C-P結合に特徴的な吸収である1180cm⁻¹がFr. 1及びFr. 2のそれらより弱いことより、Fr. 3はホスホノ脂質ではないという結論に達した(Fig. 4, Fr. 3)。従って、分析はFr. 1及びFr. 2について行うことにした。

更に、当教室で開発したセラミドアミノエチルホスホン酸(CAEPn)に対して極めて高い特異性を有する抗CAEPn抗体(8)を用いてTLC-immunostaining assayを試みたところ、Fr. 1及びFr. 2からの標品はいずれも染色されることが観察できた。従って、この段階で、両者ともに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(Fig. 5)。なお、Fr. 1から得た標品をCAEPn-1、Fr. 2から得た標品をCAEPn-2と仮称する。

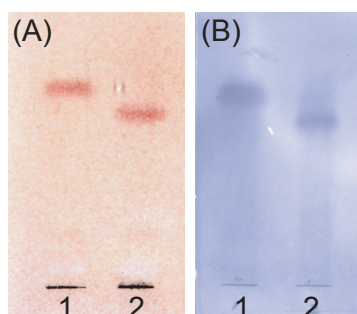


Fig. 5 Detection of CAEPn by TLC-Immunostaining. Lane 1, Fr. 1(CAEPn-1); lane 2, Fr. 2 (CAEPn-2). The separation was performed on the precoated Plygram Sil G plastic plates developed in chloroform-methanol-water, 65:25:4 for 20min, and the spots were visualized with ninhydrin (A) and with immunostaining by anti-CAEPn antibody (B).

Table 2 Ceramide Compositions of CAEPn-1 and CAEPn-2.

	CAEPn-1	CAEPn-2
Fatty acid (%)		
16:0	75.7	
br17:0	9.5	
17:0	11.3	
18:0	3.5	
h16:0		69.4
h,br17:0		11.4
h17:0		12.9
h18:0		6.3
LCB (%)		
d16:1	10.6	
d17:1	8.3	
d18:1	27.9	
d18:2	22.8	
d18:3	22.7	13.4
d19:3	7.7	86.8

br, branched chain; h, 2-hydroxy acid; d, dihydroxysphingoid.

3.3 肝臓のセラミドアミノエチルホスホン酸 (CAEPn-1 及び CAEPn-2) のセラミド成分

CAEPn-1 及び CAEPn-2 のセラミドを構成している脂肪酸及び長鎖塩基成分の同定はともに、GC と GC-MS 分析によった。それらの結果を **Table 2** に示したが、脂肪酸組成は CAEPn-1: パルミチン酸 (75.7%), 分枝型を含むマーガリン酸 (20.8%) 及びステアリン酸 (3.5%); CAEPn-2: 2-ヒドロキシパルミチン酸 (69.4%), 分枝型を含む 2-ヒドロキシマーガリン酸 (24.3%) 及び 2-ヒドロキシステアリン酸 (6.3%) であった。なお、マーガリン酸及び 2-ヒドロキシマーガリン酸における分枝位置については、今後、GS-MS スペクトルの詳細な解析による決定を目指すとともに別報を予定している。一方、長鎖塩基組成は CAEPn-1 及び CAEPn-2 のそれぞれについて 2 種類の加水分解 (酸性とアルカリ性) を行って得た塩基をトリメチルシリル誘導体として、それらの GC と GC-MS データより同定した。この 2 種類の加水分解法の適用に関しては、既にアコヤガイのホスホノ脂質の長鎖塩基分析で詳報したが (9), 塩基の組成に 4,8,10-トリエニン塩基の 9-メチルホモログが構成成分として存在する場合には、アルカリ性加水分解法が必須操作となる。本貝のホスホノ脂質についても極めて有効であることが、次の結果からも確認された。即ち、**Table 2** に示されるように CAEPn-1 及び CAEPn-2 ともに多不飽和結合を有する塩基成分 (d18:3 及び d19:3 のトリエニン) が大部分を占めており、特筆すべきは、CAEPn-2 ではトリエニンのみで構成されていることである。特に、d19:3 トリエニンについては、その GC 及び GC-MS での保持時間とスペクトルから、アコヤガイのホスホノ脂質からその存在が初めて報告された塩基と同一の 9-methyloctadecaspingina-4,8,10-trienine と決定した。また、TLC 上 (**Fig. 3**) で CAEPn-1 及び CAEPn-2 として移動度の異なる 2 種類の CAEPn の存在が観察される原因については、セラミドを構成している脂肪酸及び長鎖塩基の両組成比の相違に起因していることが考えられる。しかし、両者ともにトリエニン (d18:3 及び d19:3) を含有することから、その差異を反

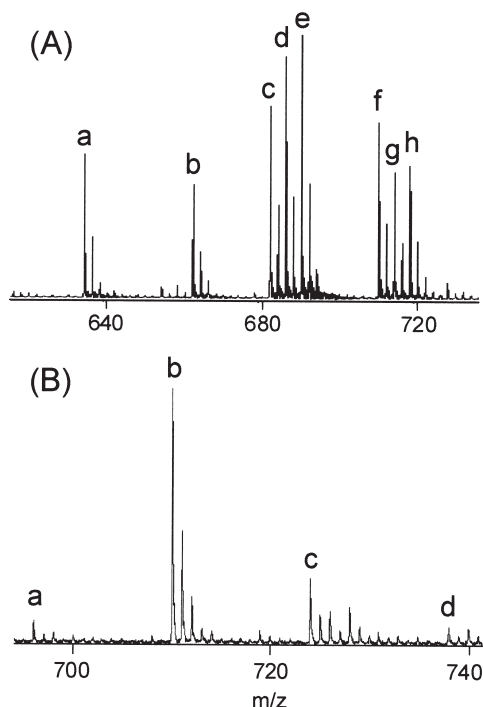


Fig. 6 Negative-Ion Mode MALDI-TOF MS Spectra of *N*-Acetylated CAEPn-1 and *N*-Acetylated CAEPn-2.

A, *N*-Acetylated CAEPn-1: a, $[M-H]^-$ ion at m/z 657.52 (Fatty acid-Sphingoid: 16:0-d16:1, Calculated value: 657.51); b, m/z 671.54 (16:0-d17:1, 671.52); c, m/z 681.53 (16:0-d18:3, 681.51); d, m/z 683.54 (16:0-d18:2, 683.52); e, m/z 685.56 (16:0-d18:1, 685.54); f, m/z 695.54 (17:0-d18:3, 695.52); g, m/z 697.56 (17:0-d18:2, 697.54); h, m/z 699.57 (17:0-d18:1, 699.56); B, *N*-acetylated CAEPn-2: a, $[M-H]^-$ ion at m/z 697.50 (Fatty acid-Sphingoid: h16:0-d18:3, Calculated value: 697.51); b, m/z 711.51 (h16:0-d19:3 and h17:0-d18:3, 711.53); c, m/z 725.52 (h17:0-d19:3, 725.55); d, m/z 739.54 (h18:0-d19:3, 739.56).

映しているのは、脂肪酸側の極性差 (非ヒドロキシ酸及びヒドロキシ酸) に由来していると結論付けた。更に、本貝 CAEPn のセラミド構成成分及び組成比が、既に報告しているアコヤガイのそれらに酷似していることは、両貝が動物分類学的に同一目 (ウグイスガイ目) であることを裏付けていると考えている。

3.4 MALDI-TOF MS 分析

MALDI-TOF MS の測定モードは、分析試料の有する官能基 (極性基) によって、陽イオンと陰イオン測定モードの 2 種類がある。著

者らは、測定試料の分子内に酸性の官能基を有する脂質については、陽イオンモードではイオン化効率が極めて悪く、測定困難がしばしば生じるため、陰イオンモードでの測定が適していることを明らかにしている(9)。また、遊離アミノ基(N-free)を分子内に有するリン脂質の場合は、それらをN-アセチル(N-acetyl)誘導体として分析することが極めて有効であることも報告している(10)。そこで、CAEPn-1及び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-アセチル化した後、陰イオンモードでMALDI-TOF MS分析を行った。N-acetylated CAEPn-1及びN-acetylated CAEPn-2の分析結果をFig. 6に示したが、Table 2に見られるセラミドの主要な構成成分に対応して、N-freeより42マス分子[CH₃COO⁻(=42)]増加したそれぞれの分子種[M-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, [M-H]⁻: m/z 657.52 (16:0 脂肪酸-d16:1 長鎖塩基, 計算値: 657.51); b, m/z 671.54 (16:0-d17:1, 671.52); c, m/z 681.53 (16:0-d18:3, 681.51); d, m/z 683.54 (16:0-d18:2, 683.52); e, m/z 685.56 (16:0-d18:1, 685.54); f, m/z 695.54 (17:0-d18:3, 695.52); g, m/z 697.56 (17:0-d18:2, 697.54); h, m/z 699.57 (17:0-d18:1, 699.56)に帰属するスペクトルの存在を(Fig. 6, A), 一方、CAEPn-2からは、a, [M-H]⁻: m/z 697.50 (h16:0 脂肪酸-d18:3 長鎖塩基, 計算値: 697.51); b, m/z 711.51 (h16:0-d19:3 及び h17:0-d18:3, 711.53); c, m/z 725.52 (h17:0-d19:3, 725.55); d, m/z 739.54 (h18:0-d19:3, 739.56)に帰属するスペクトルの存在を観察した(Fig. 6, B)。

本研究は、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

- 堀太郎(1978)“C-P化合物の生化学”, 2 C-P化合物の分布と構造, 2・2 ホスホノリピド(堀太郎, 堀口雅昭編), pp.50-75, 学会出版センター.
- 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.
- Hori, T., Sugita, M. (1993) *Prog. Lipid Res.*, **32**, 22-45.
- 堀太郎, 早田知恵子, 仲谷史貴, 吉田利男, 杉田陸海(1993) *滋賀文化短期大学紀要*, **3**, 71-78.
- 杉田陸海, 荒川郁子, 板坂修, 堀太郎(1968) *生化学*, **40**, 254-256.
- 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 自然科学*, **54**, 41-48.
- Dittmer, J. C., Lester, R. L. (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127.
- 杉田陸海, 村田真理, 板坂修, 堀太郎(1990) *油化学*, **39**, 572-575.
- 糸乗前, 北村朋典, 田中理恵子, 宮垣紀子, 齋藤洋昭, 杉田陸海(2006) *滋賀大学教育学部紀要 自然科学*, **56**, 51-62.
- 糸乗前, 清水起正, 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 自然科学*, **56**, 87-96.
- Sweeley, C. C., Gaver, R. C. (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298.
- Morrison, W. R., Hay, J. D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 460-467.
- 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 自然科学*, **48**, 11-17.
- Simon, G., Rouser, G. (1969) *Lipids*, **4**, 607-614.
- Matsubara, T. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **388**, 353-360.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. A. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.