

## スルメイカ *Todarodes pacificus* 内臓の スフィンゴリン脂質\*

野崎仁崇<sup>1</sup>・山本雅子<sup>1</sup>・小島寿夫<sup>2</sup>・齋藤洋昭<sup>3</sup>  
伊藤将弘<sup>2</sup>・糸乗 前<sup>1</sup>・杉田陸海<sup>1\*\*</sup>

## Studies on Phosphosphingolipids from the Viscera of the Japanese Flying Squid *Todarodes pacificus*\*

Hitoshi NOZAKI<sup>1</sup>, Masako YAMAMOTO<sup>1</sup>, Hisao KOJIMA<sup>2</sup>,  
Hiroaki SAITO<sup>3</sup>, Masahiro ITO<sup>2</sup>, Saki ITONORI<sup>1</sup> and Mutsumi SUGITA<sup>1\*\*</sup>

### Abstract

Sphingomyelin and ceramide aminoethylphosphonate as the major phosphosphingolipids were isolated from the viscera of the Japanese flying squid *Todarodes pacificus* and their chemical structures were completely characterized by TLC-immunostaining assay, aliphatic analysis, hydrogen fluoride degradation, enzymatic hydrolysis, infrared analysis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. The ceramide moieties of these lipids consisted of saturated (C16, 17, 18, 20 and 22) and mono-unsaturated (C22 and 24) acids as the fatty acids, and C16:1 base as a sole sphingoid.

**Keywords:** phosphosphingolipid, ceramide, fatty acid, sphingoid, Japanese Flying squid (*Todarodes pacificus*)

### 1. 緒 言

現在、自然界にはスフィンゴリン脂質としてスフィンゴミエリン (Sph.), スフィンゴエタノールアミン (セラミドホスホエタノールアミン, CPEA) 及びセラミドアミノエチルホスホン酸 (CAEPn) とその *N*-モノメチル誘導体 (CMAEPn) が知られている (1,2)。中でも

Sph. は高等動物には普遍的に存在しているが、下等動物、特に前口動物には、Sph. 以外のものが優先的に存在しており、それぞれのスフィンゴリン脂質はその分布域が限られているようである。

イカ類のスフィンゴリン脂質については、Hori *et al.* (3) のメヒカリイカ *Loligo edulis* に CAEPn が、Yamaguchi *et al.* (4) の *Loligo*

\*本研究の一部は第 48 回日本油化学会年会 (2009 年 9 月, 名古屋工業大学) で発表

<sup>1</sup>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) <sup>2</sup>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) <sup>3</sup>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)  
(2009 年 12 月 4 日受理)

*pealei* 神経組織に Sph. と CAEPn が共存するという報告がある。

本論文では、スルメイカ *Todarodes pacificus* 内臓よりスフィンゴリン脂質として精製した Sph. と CAEPn の構造解析について述べる。

## 2. 実験

### 2.1 スルメイカ内臓部スフィンゴ脂質画分の調製及び QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーによる非吸着性画分と吸着性画分の分画

水産業者より購入した長崎産のスルメイカ 10 個体 (湿重量, 3.2kg) を胴部, 内臓部及び頭足部に分別した後, 内臓部を加熱処理し, 次いでアセトン脱水して 370g の乾燥物を得た。この乾燥内臓部を著者らが確立している無脊椎動物からの複合脂質の調製方法に準拠して抽出, 分画を行った (Fig. 1)。即ち, 5 倍容のクロロホルム-メタノール, 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, 溶媒を減圧留去して得られる残渣からアシル型及びアルケニル型グリセロ脂質を分解除去するために弱アルカリけん化, 続

いて弱酸性処理を施した後, アセトンで 2 回洗浄して 5.4g のアセトン不溶性物質 (粗スフィンゴ脂質画分, ① in Fig. 1) を得た。このものを QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィー (QAE-Sephadex A-25, OH<sup>-</sup> form, 4 x 25cm, bed volume 314mL) で, 溶出溶媒としてクロロホルム-メタノール-水, 30:60:8 及び 0.05M, 0.15M, 0.45M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を用いて非吸着性画分 (② in Fig. 1, 760mg) と吸着性画分 (⑥ in Fig. 1: ⑥ - ① 0.05M, 1.9g; ⑥ - ② 0.15M, 40mg; ⑥ - ③ 0.45M, 250mg) に分画した (5)。

### 2.2 QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーの非吸着性画分より Sph. の精製

QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーで溶出された非吸着性画分 (② in Fig. 1, 760mg) には, 現在, 分析中であるが, 中性糖脂質 (③ in Fig. 1) が混在していることより, これらと区別して Sph. を含むリン試薬反応性物質 (両性イオン型脂質, ④ Sph. fraction in Fig. 1) 画分を調製するには, 非吸着性画分をアセチル化し, フロリシララムク

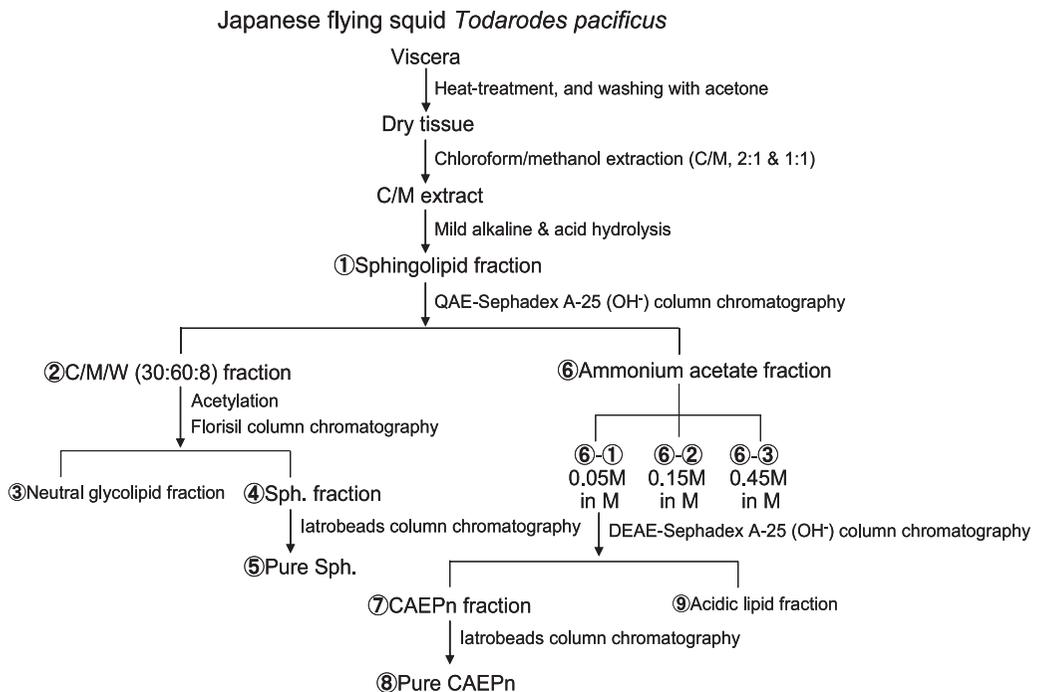


Fig. 1 Scheme for Preparation and Fractionation of Sphingolipids from the Japanese flying squid *Todarodes pacificus*

ロマトグラフィーによって分画しなければならない (6)。即ち、760mg の非吸着性画分をアセチル化した後、フロリシルカラムクロマトグラフィー (Florisisil, 1.6 x 50 cm) で、溶出溶媒にジクロロエタン-ヘキサン, 4:1; ジクロロエタン; ジクロロエタン-アセトン, 1:1; ジクロロエタン-メタノール, 3:1; ジクロロエタン-メタノール-水, 2.8:1; クロロホルム-メタノール-水, 6:4:1 を順次用いて展開した。最後の溶出画分に Sph. を含むリン試薬反応性物質の存在を確認した。この画分を脱アセチル化した後 (収量, 460mg), TLC (後述) で検したところ, Rf 値の極めて低い位置に糖発色試薬に陽性を示す物質 (高級中性糖脂質) の混在が認められた。そこで, これら除去する目的で極性の違いを利用した Folch 分配を行った (7)。その結果, 分配の下層画分より 343mg を回収した (④ Sph. fraction in Fig. 1)。次いで, このものをケイ酸カラムクロマトグラフィー (Iatrobeads, 6RS-8060; 2 x 60cm) によるクロロホルム-メタノール-水 (60:40:10, 800mL) の単一溶出で分画, 精製した。カラムからの溶出速度を 0.6mL/min に保ち, 溶出液を 3mL ずつ分取して, TLC によってリン発色試薬に陽性を示す画分を分画した (⑤ Pure Sph., 収量: 220mg)。

### 2.3 QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーの吸着性画分より CAEPn の精製

QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーで分画された3つの吸着性画分 (⑥-① 0.05M, 1.9g; ⑥-② 0.15M, 40mg; ⑥-③ 0.45M, 250mg) のうち⑥-① 0.05M 画分にのみ目的としているニンヒドリン試薬及びリン発色試薬の両方に陽性を示す物質の存在を確認した。更に, この画分の中から共存する酸性物質を除去するために, DEAE-セファデックスイオン交換カラムクロマトグラフィー (DEAE-Sephadex A-25, COO<sup>-</sup> form, 4 x 10cm, bed volume 120mL) を行った。カラムからの溶出には, QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーと同様の溶媒及び溶媒量を用いた。即ち, 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1倍容のメタノール, 極性溶媒として1倍容の0.5M 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920mg (⑦ CAEPn fraction in Fig. 1) を回収した。次いで, そのうちの300mg をケイ酸カラムクロマトグラフィー (Iatrobeads, 6RS-8060; 1 x 85cm) 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 ずつ分取して TLC で検し, ニンヒドリン試薬及びリン発色試薬の両方に陽性を示す画分を分画した (⑧ Pure CAEPn, 収量: 140mg)。

### 2.4 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 (98:2), クロロホルム-メタノール-水 (65:25:4, 60:40:10) を使用した。セルロース TLC プレートは, アビセル SF を使い, n-ブタノール-酢酸-水 (12:3:5) で展開した。検出はニンヒドリン試薬 (アミノ基), Dittmer-Lester 試薬 (リン) (8), Hanes-Isherwood 試薬 (リン) (9), 50%硫酸試薬 (有機物) 及び orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬 (糖) によった。

### 2.5 TLC-immunostaining Assay

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, Nacalai tesque) の入ったプラスチック製容器 (7 x 4.5cm) の中に, 室温で22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) (10-12) を入れ, 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 (Jackson Immuno社) 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のメタノールに溶解したもの、5mLの50mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.2)及び5 $\mu$ LのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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。

## 2.6 ホスホリパーゼC (EC 3.1.4.3) による分解及び分解生成物の分析

1mgの試料に0.2mLの50mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5), 0.1mLの20mM CaCl<sub>2</sub>及び0.2mLのエチルエーテルを加えて振盪し、0.1mLの同緩衝液で希釈した酵素液 (*Clostridium perfringens* 由来、酵素タンパクとして500 $\mu$ gを含む、Sigma Chemical) を添加して、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした (13,14)。反応終了後、加熱してエーテルを除去した。そこへ更に2mLのクロロホルム-メタノール、2:1を加えて混合し、2層に分配した。上層及び下層をそれぞれ濃縮後、TLCで検した。

## 2.7 フッ化水素酸分解及び分解成績体 (セラミド) の精製

5~10mgの試料をプラスチック製の試験管中で、0.5mLのジメチルスルホキシドに溶解した後、3.5mLの47%フッ化水素酸を加え、室温 (20 $^{\circ}$ C) で20時間反応させた。反応後、直ちに流水透析し、その透析膜内液を濃縮乾固して得られた残渣をケイ酸カラムクロマトグラフィー (Iatrobeads, 6RS-8060; 1.4 x 6cm) で、クロロホルム-メタノール (98:2, 95:5, 90:10, 85:15の各15mL) を溶出溶媒とする段階的溶出法を用いて精製した。それぞれの溶出物をTLC及びIRで検し、目的とするセラミドは90:10溶出画分に存在することを確認した。

## 2.8 GC分析

### 2.8.1 脂肪酸メチルエステル誘導体

1mg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 $\mu$ 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。

### 2.8.2 長鎖塩基の分析

1mgの試料に0.2mLの水性メタノール塩酸を加えて、18時間70 $^{\circ}$ Cで加熱した (15)。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、遠心分離して二層に分配した。下層のクロロホルム層を更に0.4mLのメタノール-水、1:1によって洗浄した後、そのクロロホルム層を窒素気流下で濃縮乾固して得られた長鎖塩基画分をトリメチルシリル誘導体としてGC分析に供した。分析温度は210 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 230 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/min) に設定した。

## 2.9 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: 240 $^{\circ}$ 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; EI イオン化電圧: 70eV; EI イオン化電流: 60 $\mu$ A。

## 2.10 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。

## 2.11 MALDI-TOF MS分析

約5 $\mu$ Lの試料溶液 (クロロホルム-メタノール、2:1で1mg/mLに調整) 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4 $\mu$ Lのマトリックス溶液( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acidの飽和50%エタノール水溶液)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。照射レーザーは窒素レーザー(光波長, 337 nm)を使用し、Sph.はreflector positive ion modeで、一方CAEPnはN-アセチル化物としてreflector negative ion modeで測定を行った。質量校正はangiotensin I (1296.68 Mass Units, Wako Pure Chemical)及びbradykinin Fragment 1-5 (Arg-Pro-Gly-Phe, 573.31 Mass Units, Sigma Chemical)を用いた。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 スルメイカ内臓部のスフィンゴリン脂質はスフィンゴミエリンとセラミドアミノエチルホスホン酸

試料として用いたスルメイカ内臓部は、予め胴部、内臓部及び頭足部の3部位に分別した後、加熱処理し(蒸すこと)、次いでアセトン処理を行っており、組織からの脱水とともに中性脂質や色素等も抽出除去されている。従って、本論文での乾燥組織重量は、上述のアセトン洗浄後の重量であることを明記しておく。スルメイカ10個体分の3.2kgより、上述の定義から乾燥重量として370gを得た(湿重量の11.6%)。この全量をFig. 1に示される無脊椎動物の複合脂質の調製方法に従って抽出、分画を行った。本法は、複合脂質の中でもスフィンゴ型脂質(セラミド型脂質)を特異的に分画するとともに、リン脂質については両性イオン型(ホスホコリン型)と極性型(アミノエチルホスホン酸及びホスホエタノールアミン型)を完全に分画することが可能であり、極めて優れた方法であると言える。即ち、スルメイカ内臓部の場合、分画の初期操作であるQAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーの段階において、主なスフィンゴリン脂質としてスフィンゴミエリンとセラミドアミノエチルホスホン酸の両者が存在している可能性を示唆することができた(この可能性は、文献(4)を基礎としている)。最終的に、乾燥重量370gの

内臓部よりSph.を220mg、CAEPnを140mg(920mgのCAEPn fractionのうち300mgを使用)単離した(Figs. 2, 3)。この収量を乾燥重量1kg当りに換算するとSph.は595mg、CAEPnは1.16gとなる。

Fig. 4に単離したSph.及びCAEPnのIRスペクトルを示したが、両者とも $1650\text{cm}^{-1}$ と $1550\text{cm}^{-1}$ にアミド結合に由来する吸収が観察された。Sph.には $960\text{cm}^{-1}$ にコリン基、また $1200\text{cm}^{-1}$ にC-O-P結合のリン残基の-OH基に由来する吸収が認められた。一方、CAEPnには $1180\text{cm}^{-1}$ にC-P結合のリン残基の-OH基に由来する吸収が確認された。これらのことから単離したSph.はスフィンゴミエリンであること、CAEPnはセラミドアミノエチルホスホン酸であることが推測できた。更に、これらのスペクトルは標準品として当教室で調製したアコヤガイ *Pinctada martensii* からのスフィンゴミエリン(16)及びホタテガイ *Patinopecten yessoensis* からのセラミドアミノエチルホスホ



Fig. 2 Thin-Layer Chromatogram of the isolated Sphingomyelin (Sph.) from the Japanese Flying Squid *Todarodes pacificus*.

Lane 1, Authentic Sph. from the pearl oyster *Pinctada martensii*; lane 2, Sph. fraction eluted with chloroform/methanol/water, 6:4:1 using Florisil column chromatography shown in Fig. 1; lane 3, isolated Sph. The plate was developed in chloroform/methanol/water, 60:40:10 for 20min, and the spots were visualized with Dittmer-Lester reagent.

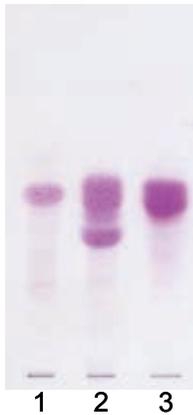


Fig. 3 Thin-Layer Chromatogram of the isolated Ceramide aminoethylphosphonate (CAEPn) from the Japanese Flying Squid *Todarodes pacificus*.

Lane 1, Authentic CAEPn from the giant ezo scallop *Patinopten yessoensis*; lane 2, CAEPn fraction eluted with chloroform/methanol/water, 30:60:8 Using DEAE-Sephadex A-25 column chromatography show in Fig. 1; lane 3, isolated CAEPn. The plate was developed in chloroform/methanol/water, 65:25:4 for 20min, and the spots were visualized with ninhydrin reagent.

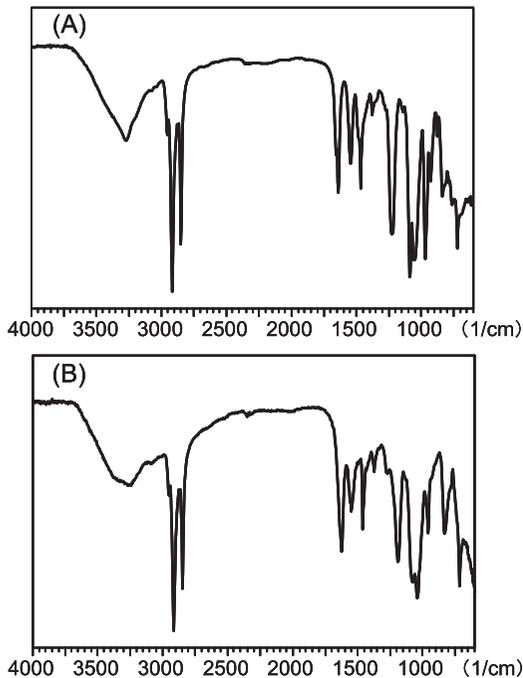


Fig. 4 Infrared Spectra of Sph. (A) and CAEPn (B).

ン酸 (5) のそれらに吸収端が完全に一致したことを付記する。

次に、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-免疫染色 (TLC-immunostaining assay) を試みたところ、単離した CAEPn について抗体との反応を示す染色が観察された (Fig. 5)。従って、この CAEPn は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、Sph. 及び CAEPn のホスホリパーゼ C (EC 3.1.4.3) による酵素的加水分解成績体からはいずれも脂溶性成分としてセラミドを、水溶性成分としてホスホコリンとアミノエチルホスホン酸を同定した (Fig. 6)。特に、両者のセラミドについては、TLC 上での移動度が標準セラミド (牛脳セブレロシド由来の非ヒドロキシセラミド) に近似しているところから、それらの構成脂肪酸成分が非ヒドロキシ酸を主成分としていることが示唆された。

更に、Sph. 及び 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 及び TLC 分析を行っ

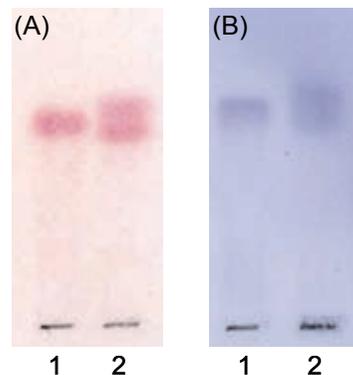


Fig. 5 Detection of CAEPn by TLC-Immuno-staining Assay.

Lane 1, authentic CAEPn from *P. yessoensis*; lane 2, isolated CAEPn from *T. pacificus*. The separation was performed on the precoated Polygram Sil G plastic plates developed in chloroform-methanol-water, 65:25:4 for 12 min, and the spots were visualized with ninhydrin reagent for Panel A and with immunostaining by anti-CAEPn antibody for Panel B.

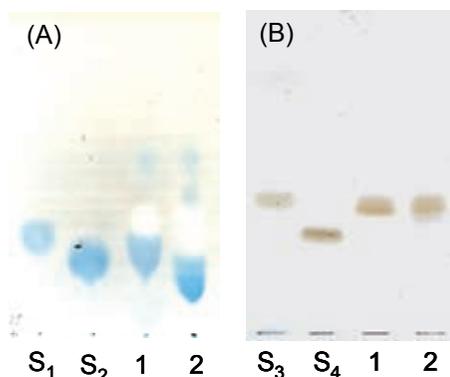


Fig. 6 Enzymatic Hydrolysis by Phospholipase C from *Clostridium perfringens*. Panel A, water-soluble fraction; Panel B, chloroform-soluble fraction; S<sub>1</sub>, authentic phosphocholine chloride (Sigma Chemical); S<sub>2</sub>, authentic 2-aminoethylphosphonic acid (Aldrich Chem.); S<sub>3</sub>, authentic ceramide (nonhydroxy fatty acid) from bovine brain (Nacalai tesque); S<sub>4</sub>, authentic ceramide (hydroxyl fatty acid) from bovine brain (Sigma); 1, hydrolyzates of Sph.; 2, hydrolyzates of CAEPn. The separation was performed on a precoated Cellulose glass plate developed for 2 hr in butanol-acetic acid-water, 12:3:5 for Panel A and on a precoated Silica gel 60 glass plate developed for 10 min in chloroform-methanol, 92:8 for Panel B. The spots were visualized with Hanes-Isherwood reagent for Panel A and with 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent for Panel B.

た。これらの IR スペクトルは標準セラミドのそれ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 (Fig. 7)。一方, TLC 分析においてもそれらの成績体の移動度は標準品及び前述のホスホリパーゼ C による酵素的加水分解成績体として得られたセラミドの移動度と一致した。

### 3.2 Sph. 及び CAEPn のセラミド成分中の脂肪酸組成

Sph. 及び CAEPn 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。それらの結果を Table 1 及び Fig. 8 に示したが, 両者とも C16, 17, 18, 20, 22- 飽和酸と C22, 24- モノ不飽和酸よ

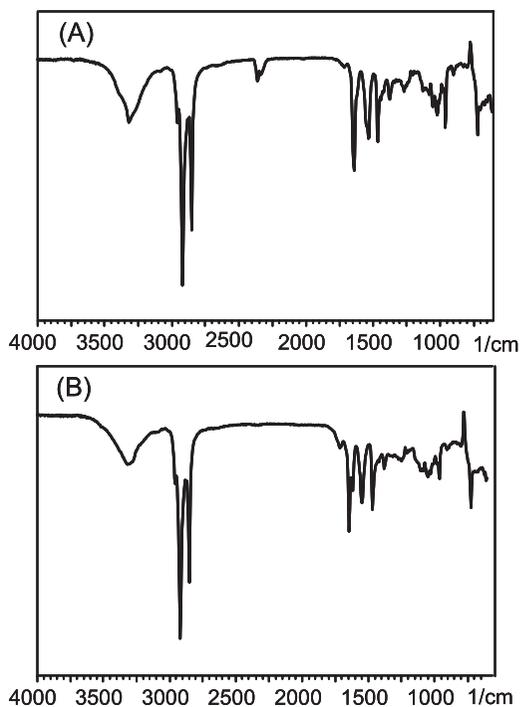


Fig. 7 Infrared Spectra of Chloroform-Soluble Products of Sph. (A) and CAEPn (B) after Hydrolysis by Phospholipase C.

りなっており, 中でもパルミチン酸が主成分であった (Sph., 81.3%; CAEPn, 56.8%)。一方, Yamaguchi *et al.* (4) によって報告されている別種のイカ *Loligo paelei* の神経組織からの Sph. 及び CAEPn の脂肪酸組成は, パルミチン酸 (Sph., 47%; CAEPn, 37%) とステアリン酸 (Sph., 48%; CAEPn, 56%) が主成分であり, スルメイカ由来のそれらとは組成に違いが見られた。

更に, スルメイカの CAEPn に含まれている C22:1 (12.7%) 及び C24:1 (16.7%) 酸は *Loligo paelei* 神経組織の Sph., CAEPn の両者においても全く含まれていなかった。これらの事実はスルメイカは内臓部を, *Loligo paelei* は神経系を材料としているところに起因する組織特異性に由来したものであると理解することができる。

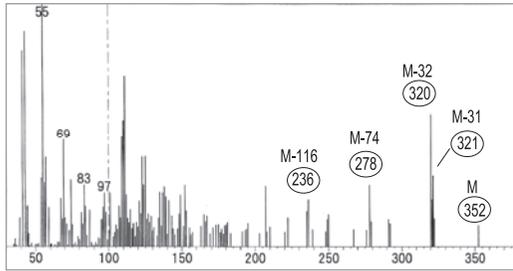


Fig. 8 Mass Spectrum of C22:1-Fatty Acid Methyl Ester.

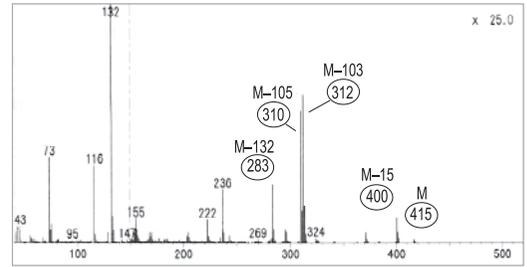


Fig. 9 Mass Spectrum of d16:1-Sphingoid (N-free-O-TMS).

Table 1 Ceramide Compositions of Sph. and CAEPn from the Japanese Flying Squid *T. pacificus*.

|                | Sph. | CAEPn |
|----------------|------|-------|
| Fatty Acid (%) |      |       |
| 16:0           | 81.3 | 56.8  |
| 17:0           | 1.8  | 2.9   |
| 18:0           | 4.3  | 5.9   |
| 20:0           | 2.6  | 2.4   |
| 22:1           | 2.7  | 12.7  |
| 22:0           | 1.5  | 2.6   |
| 24:1           | 5.8  | 16.7  |
| Sphingoid (%)  |      |       |
| d16:1          | 100  | 100   |

d, dihydroxysphingoid.

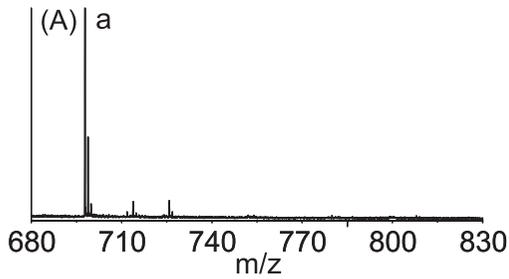
### 3.3 Sph. 及び CAEPn のセラミド成分中の長鎖塩基組成

Sph. 及び CAEPn のセラミド成分中の長鎖塩基組成について、トリメチルシリル誘導体として GC と GC-MS 分析によって同定した。それらの結果を Table 1 及び Fig. 9 に示したが、両者とも hexadeca-4-sphingenine のみを検出した。また、Ohashi *et al.* (17) によって unusual sphingoid base として *Loligo pealei* 神経組織の Sph. から positive-ion fast atom bombardment tandem mass spectrometry (FAB-MS/MS) 分析によって存在が明らかにされている 9-methyl-octadeca-4,8,10-sphingatrienine は、現在のところ、スルメイカの Sph. 及び CAEPn のいずれにも見出していない。

### 3.4 MALDI-TOF MS 分析

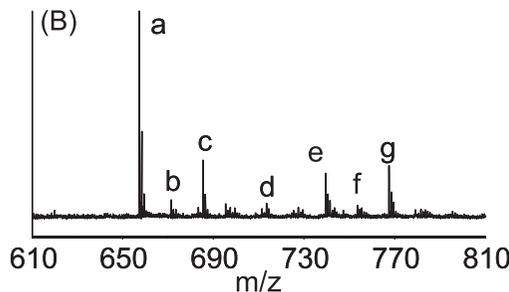
MALDI-TOF MS 測定には、分析試料の有する極性基（官能基）の種類によって適正なイオンモード（陽イオンモードあるいは陰イオンモード）の選択が求められる。著者らは、測定試料の分子内に酸性の官能基を有する脂質については、陽イオンモードではイオン効率が極めて悪く測定困難が生じるため、陰イオンモードでの測定が適していることを明らかにしている (11)。一方、測定試料の分子内に塩基性の官能基を有する脂質については陽イオンモードでの測定が適しているようである (6)。また、遊離アミノ基 (N-free) を分子内に有するリン脂質の場合は、それらを N-アセチル (N-acetyl) 誘導体として分析することが有効であることも報告している (12)。そこで Sph. については陽イオンモードで、CAEPn については分子内の遊離アミノ基をアセチル化した後、陰イオンモードで MALDI-TOF MS 分析を行った。分析結果を Fig. 10 に示したが、Table 1 に見られるセラミド分子種に帰属するスペクトルを観察することができた。

本研究の一部は、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター受託研究費 (平成 21 年度農林水産省「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)」) によって行った。



| FA-LCB      | Calc'd for<br>[M+Na] <sup>+</sup> (m/z) | Found<br>(m/z) |
|-------------|---|----------------|
| a 16:0-16:1 | 697.53                                  | 697.82         |

FA, Fatty acid; LCB, Sphingoid.



| FA-LCB      | Calc'd for<br>[M-H] <sup>-</sup> (m/z) | Found<br>(m/z) |
|-------------|--|----------------|
| a 16:0-16:1 | 657.50                                 | 657.45         |
| b 17:0-16:1 | 671.51                                 | 671.46         |
| c 18:0-16:1 | 685.53                                 | 685.47         |
| d 20:0-16:1 | 713.56                                 | 713.50         |
| e 22:1-16:1 | 739.58                                 | 739.52         |
| f 22:0-16:1 | 741.59                                 | 741.52         |
| g 24:1-16:1 | 767.61                                 | 767.55         |

Fig. 10 Positive-Ion Mode MALDI-TOF MS Spectrum of Sph. (A) and Negative-Ion Mode MALDI-TOF MS Spectrum of *N*-Acetylated CAEPn (B).

## 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., Arakawa, I., Sugita, M. (1967) *J. Biochem.*, **62**, 67-70.
- Yamaguchi, H., Tanaka, T., Ichioka, T., Stoskopf, M., Kishimoto, Y., Gould, R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, **922**, 78-84.
- 杉田陸海, 糸乗前, 牧田章, 伊藤将弘, 齋藤洋昭, 大塩由季, 原田雅史, 東野綾子, 野崎仁崇, 小島寿夫 (2008) 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **58**, 21-29.
- 糸乗前, 木村幸史, 北村孝普, 北村朋典, 杉田陸海 (2002) 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **52**, 9-16.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. A. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- Dittmer, J. C., Lester, R. L. (1964) *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127.
- Hanes, C. S., Isherwood, F. A. (1949) *Nature*, **164**, 1107-1112.
- 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, 清水越正, 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.
- 荒川郁子, 杉田陸海, 堀太郎 (1968) 生化学, **40**, 154-157.
- Hori, T., Arakawa, I., Sugita, M., Itasaka, O. (1968) *J. Biochem.*, **64**, 533-536.
- Gaver, R. C., Sweeley, C. C. (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298.
- 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.
- Ohashi, Y., Tanaka, T., Akashi, S., Morimoto, S., Kishimoto, Y., Nagai, Y. (2000) *J. Lipid Res.*, **41**, 1118-1124.