

## アメリカオオアカイカ *Dosidicus gigas* の スフィンゴ脂質の構造決定\*

糸乗 前<sup>1\*\*</sup>・野崎仁崇<sup>1</sup>・原 畠 鷹<sup>1</sup>・秋田悠里<sup>1</sup>  
橋本恭平<sup>1</sup>・小島寿夫<sup>2</sup>・西尾 匡<sup>2</sup>  
石川 哲<sup>3</sup>・齋藤洋昭<sup>4</sup>・伊藤将弘<sup>2</sup>・杉田陸海<sup>1</sup>

## Structural Characterization of Sphingolipids from the Jumbo Flying Squid *Dosidicus gigas*

Saki ITONORI<sup>1</sup>, Hitoshi NOZAKI<sup>1</sup>, Taka HARAHATA<sup>1</sup>, Yuri AKITA<sup>1</sup>  
Kyouhei HASHIMOTO<sup>1</sup>, Hisao KOJIMA<sup>2</sup>, Satoru ISHIKAWA<sup>3</sup>  
Hiroaki SAITO<sup>4</sup>, Masahiro ITO<sup>2</sup> and Mutsumi SUGITA<sup>1</sup>

### Abstract

Ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEP), sphingomyelin (Sph) and cerebroside (CMS) as the major sphingolipids were purified from the skin of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* and their chemical structures were characterized. The fatty acid compositions of CAEP and Sph consisted mainly of C16:0 acid, but CMS contained C16:0, C22:0 and C24:1 acids. The sphingoid components of Sph and CMS were C16:1 and C18:1 dihydroxybases, but those of CAEP were C16:1, C18:1 and C19:3 dihydroxybases.

Keywords: Sphingolipid, Ceramide, Fatty acid, Sphingoid, Jumbo Flying Squid (*Dosidicus gigas*)

### 1. 緒 言

本研究に用いたアメリカオオアカイカ

*Dosidicus gigas* は我が国で食用にされているが、その食品加工の過程で大量の“皮”が廃棄されている。また、著者らの予備的な実験においてもこの“皮”には大量のスフィンゴ脂質（セラ

\* 本研究の一部は第49回日本油化学会年会（2010年9月、北海道大学・函館）で発表（1）

<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>青森県産業技術センター食品総合研究所（Food Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, 2-10 Chikukougai, Hachinohe, Aomori 031-0831）<sup>4</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：糸乗 前（Corresponding author: Saki Itonori, E-mail: itonori@edu.shiga-u.ac.jp）  
（2010年11月30日受理）

ミド化合物) 画分 (乾燥重量 1 kg 当たり約 17 g) が含まれていることを明らかにしている (2)。一方、当教室で確立化している無脊椎動物複合脂質の系統的分画および調製方法を用いると、このように大量に存在するスフィンゴ脂質画分からは、極めて純度の高いセラミド化合物 (スフィンゴリン脂質およびスフィンゴ糖脂質) を得ることができるので、これらの標品をターゲットとした「高付加価値素材の開発」を行うにはバイオリサイクルの観点からも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、アメリカオオアカイカの“皮”よりスフィンゴリン脂質としてセラミド 2-アミノエチルホスホン酸 (CAEP) およびスフィンゴミエリン (Sph) を、スフィンゴ糖脂質としてセレブロシド (CMS) を単離・精製した (2)。

本論文では、それらの化学構造解析について述べる。

## 2. 実 験

### 2.1 スフィンゴ脂質画分の調製および 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画分と吸着画分に分画

試料は、ペルー沖で捕獲されたアメリカオオアカイカ *Dosidicus gigas* を加熱処理した後、分別・裁断・冷凍保存した“皮” (27kg: 1.8 kg x 15 ブロック) を青森県産業総合研究センターより恵与された。冷凍試料を流水で解凍した後、アセトンで脱水して 4.5 kg の乾燥物を得た。この乾燥物の 1 kg を破碎後、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およ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 17.4 g のアセトン不溶性物質 (スフィンゴ脂質画分) を得た。

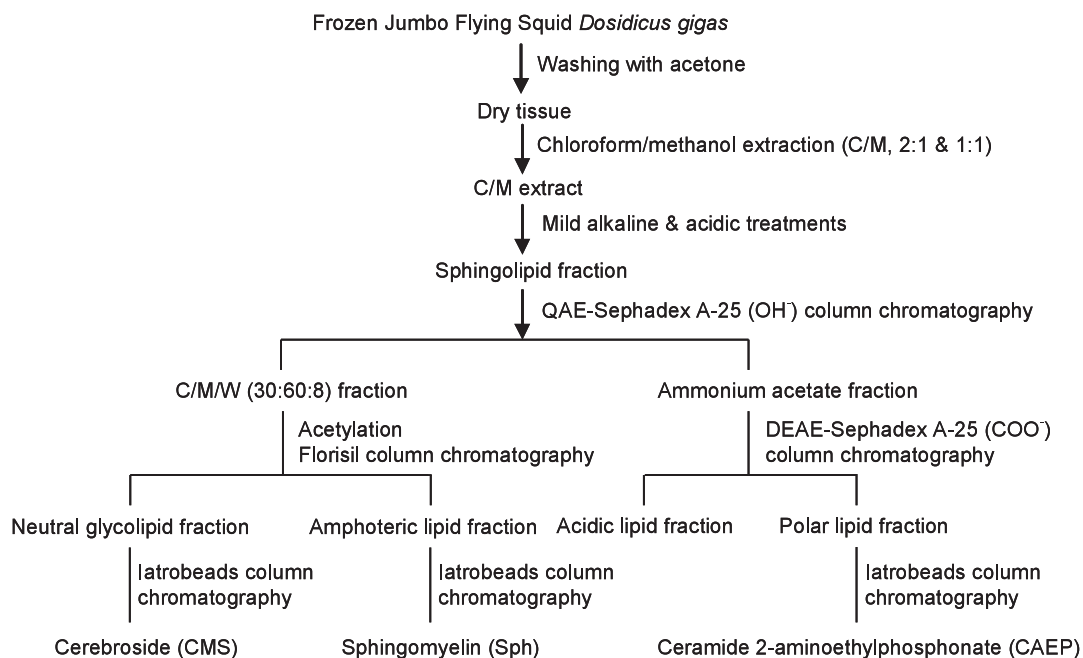


Fig. 1 Scheme for Preparation and Fractionation of Sphingolipids from the Jumbo Flying Squid *Dosidicus gigas*.

このうちの 15 g を用いて 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 30 cm, bed volume 377 mL) を行った。溶出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 0.05 M、0.15 M、0.45 M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を用いて非吸着画分 (クロロホルム-メタノール-水、30: 60: 8) と吸着画分 (0.05 M、0.15 M、0.45 M 酢酸アンモニウム) に分画した。なお、吸着画分の各溶出物は、濃縮後、2 日間の流水透析に処した。それぞれの溶出画分からの回収量および回収率は、非吸着画分: 3.2 g (21.3%)、吸着画分: 0.05 M、5.4 g (36.0%); 0.15 M、1.56 g (10.4%); 0.45 M、0.15 g (1.0%) であった。

## 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画分より中性糖脂質画分と両性脂質 (両性イオン型脂質) 画分に分画

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画分には、中性糖脂質と両性脂質 (両性イオン型脂質) が混在している。これらを相互分別するために非吸着画分をアセチル化し、フロリシルカラムクロマトグラフィーを行った (3)。即ち、3.2 g の非吸着画分のうち 2.2 g を用いてアセチル化した後、フロリシルカラムクロマトグラフィー (Florisil: 60~100 mesh, 2.0 x 60 cm, bed volume 188 mL) で、溶出溶媒にジクロロエタン-ヘキサン (4: 1, 3 倍容)、ジクロロエタン (1 倍容)、ジクロロエタン-アセトン (1: 1, 3 倍容)、ジクロロエタン-メタノール (3: 1, 3 倍容)、ジクロロエタン-メタノール-水 (2: 8: 1, 3 倍容)、クロロホルム-メタノール-水 (6: 4: 1, 5 倍容) を順次用いて展開した。それぞれの溶出液を濃縮した後、ジクロロエタン-ヘキサン (4: 1) およびジクロロエタン溶出画分を除いた残渣に、1 M KOH (メタノール溶液) を加えて 37℃ で 3 時間、けん化脱アセチル処理を行った。得られたけん化物を流水透析によって脱塩処理した後、透析膜内液を減圧濃縮した。各溶出画分の回収量およ

び回収率は、ジクロロエタン-アセトン (1: 1): 60 mg (2.7%)、ジクロロエタン-メタノール (3: 1): 11 mg (0.5%)、ジクロロエタン-メタノール-水 (2: 8: 1): 117 mg (5.3%)、クロロホルム-メタノール-水 (6: 4: 1): 934 mg (42.5%) であった。これらの画分を TLC (後述) で検したところ、最初の溶出画分のジクロロエタン-アセトン (1: 1) に糖発色試薬のみに陽性を示す物質の存在が認められた (中性糖脂質画分)。一方、ジクロロエタン-メタノール-水 (2: 8: 1) およびクロロホルム-メタノール-水 (6: 4: 1) 溶出画分にリン試薬に極めて強い反応性を示す物質と R<sub>f</sub> 値の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 (両性脂質画分)。

### 2.2.1 中性糖脂質画分よりセレブロシド (CMS) の精製

60 mg の中性糖脂質画分をイアトロビーズ (6RS-8060、三菱化学ヤトロン) カラムクロマトグラフィー (1.0 x 60 cm, bed volume 47 mL) に処した。クロロホルム-メタノール-水を溶出溶媒とする二段階の濃度勾配法 (80: 20: 1, 240 mL~50: 50: 5, 350 mL および 50: 50: 5, 240 mL~20: 80: 10, 350 mL) 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 ずつ分取した。溶出液を TLC で検し、糖発色試薬に陽性の移動度の異なる 6 画分に分画した。それぞれの回収量および回収率は: Fr. 1, 20 mg (33.3%); Fr. 2, 1.1 mg (1.8%); Fr. 3, 5.6 mg (9.3%); Fr. 4, 1.5 mg (2.5%); Fr. 5, 1.8 mg (3.0%); Fr. 6, 2.5 mg (4.2); others, 9.9 mg (16.5%) であった。

### 2.2.2 両性脂質 (両性イオン型脂質) 画分よりスフィンゴミエリン (Sph) の精製

ジクロロエタン-メタノール-水 (2: 8: 1) とクロロホルム-メタノール-水 (6: 4: 1) 溶出画分を合した 1.1 g の両性脂質 (両性イオン型脂質) 画分のうち 300 mg を用いてイアトロビーズカラムクロマトグラフィー (2.0 x 40 cm, bed volume 125 mL) によるクロロホルム-メタノール-水 (60: 40: 10, 600 mL) の単一溶出で分画した。カラムからの溶出速度を 0.6 mL/min に保ち、溶出液を 3 mL ずつ分

取して、TLC によってリン発色試薬に陽性を示す移動度の異なる 4 画分に分画した。それぞれの回収量および回収率は：Fr. 1, 15 mg (5.0%)；Fr. 2, 3 mg (1.0%)；Fr. 3, 147 mg (49.0%)；Fr. 4, 32 mg (10.7%) であった。

### 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画分よりセラミド-2-アミノエチルホスホン酸 (CAEP) 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 つの吸着画分 (0.05 M, 5.4 g；0.15 M, 1.56 g；0.45 M, 0.15 g) のうち 0.05 M 画分に目的としているニンヒドリン試薬およ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、このうちの 1 g を用いて 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, 3 x 10 cm, bed volume 70 mL) 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、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 0.05 M, 0.15 M, 0.45 M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を用いて非吸着画分 (クロロホルム-メタノール-水、30:60:8) と吸着画分 (0.05 M, 0.15 M, 0.45 M 酢酸アンモニウム) に分画した。なお、吸着画分の各溶出物は、濃縮後、2 日間の流水透析に処した。それぞれの溶出画分からの回収量および回収率は、非吸着画分：703 mg (70.3%)、吸着画分：0.05 M, 253 mg (25.3%)；0.15 M, 15 mg (1.5%)；0.45 M, 3 mg (0.3%) であった。次いで 703 mg の非吸着画分をイアトロビーズカラムクロマトグラフィー (2.0 x 60 cm, bed volume 188 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 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 4 画分に分画した。それぞれの回収量および回収

率は：Fr. 1, 440 mg (62.6%)；Fr. 2, 75 mg (10.7%)；Fr. 3, 5 mg (0.7%)；Fr. 4, 68 mg (9.7%) であった。

### 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 を用い、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) (4)、Hanes-Isherwood 試薬 (リン) (5)、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-免疫染色

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、風乾して溶媒を除去したプレートに、PBS (10 mM 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 4.5 cm) 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、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) (6-8) 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 5 mL 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 (3 mg の 4-chloro-1-naphtol 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 7.2) 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 ホスホリパーゼによる酵素的加水分解および分解成績体の分析

2 mg の試料に 0.2 mL の 50 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5)、0.1 mL の 20 mM  $\text{CaCl}_2$  および 0.2 mL のエチルエーテルを加えて混合した後、0.1 mL の同緩衝液で希釈した酵素液 (ホスホリパーゼ C, EC 3.1.4.3, *Clostridium perfringens* 由来、500 mg の酵素タンパク質を含む、Sigma Chemical) を添加して、37℃ で 24 時間インキュベートした (9,10)。反応終了後、加熱してエーテルを除去した。そこへ 2 mL 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。上層および下層をそれぞれ濃縮後、TLC で検した。更に、下層を少量のクロロホルムに溶解し、同溶媒で充填したイアトロビーズカラム (2 x 8 cm, bed volume 25 mL) に注加した。溶出はクロロホルム - メタノール (90:10) で行った。

## 2.7 フッ化水素酸分解および分解成績体 (セラミド) の精製

2 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℃) で 20 時間反応させた。反応後、直ちに流水透析し、透析膜内液を濃縮乾固した。得られた残渣を少量のクロロホルムに溶解し、同溶媒で充填したイアトロビーズカラム (2 x 8 cm, bed volume 25 mL) に注加した。溶出はクロロホルム - メタノール (90:10) で行った。

## 2.8 GC 分析

### 2.8.1 脂肪酸

1 mg の試料に 0.2 mL の 1 M 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 0.2 mL 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 0.22 mm x 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 mm 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℃ → 230℃ (4℃ /min) に設定した。

### 2.8.2 長鎖塩基

#### 2.8.2.1 酸加水分解法

1 mg の試料に 0.3 mL の水性メタノール塩酸を加えて、18 時間 70℃ で加熱した (11)。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 0.1 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、遠心分離して二層に分配した。下層のクロロホルム層を更に 0.4 mL 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℃ → 230℃ (2℃ /min) に設定した。

#### 2.8.2.1 アルカリ加水分解法

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)  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  水溶液を加えた後、反応温度を 110℃ 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、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。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た。得られ残渣に 0.6 mL の 0.1 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、遠心分離して二層に分配した。下層のクロロホルム層を更に 0.4 mL 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℃ → 230℃ (2℃ /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℃ (2min) → 170℃ (20℃ /min) → 240℃ (4℃ /min)、長鎖塩基分析、80℃ (2 min) → 210℃ (20℃ /min) → 230℃ (4℃ /min) に設定; インターフェース温度: 240℃; 試料注入口温度: 240℃; ヘリウム圧力: 100 kPa; スプリットレス時間: 3.5



min; EI イオン化電圧: 70 eV; EI イオン化電流: 60 mA。

## 2.10 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 1 mg/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、CMS および Sph は reflector positive ion mode で、一方 CAEP 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) および bradykinin Fragment 1-5 (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, 573.31 Mass Units, Sigma Chemical) を用いた。

## 2.11 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。

## 2.12 $^1\text{H}$ -NMR 分析

約 1 mg の試料を約 0.6 mL の 2%  $\text{D}_2\text{O}$ /DMSO- $d_6$  に溶解した後、NMR 試料管 ( $\phi$ 5 mm) に充填し、JEOL ECS-400  $^1\text{H}$ -NMR スペクトロメーターにより、測定温度 60°C で 1024 回積算した。化学シフトの内部標準には DMSO- $d_6$  の溶媒シグナル ( $\delta$ H2.49 ppm) を使用した。

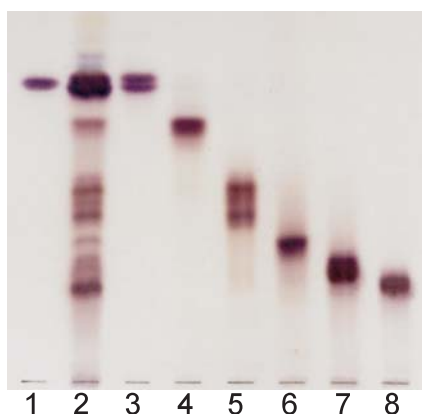
## 結果および考察

### 3.1 アメリカオオアカイカの主なスフィンゴ脂質

試料として用いた冷凍されたアメリカオオアカイカの“皮”は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ほとんど抽出除去されている。従って、本論文での乾燥組織重量は、このアセトン洗浄後の重量

であることを記しておく。アメリカオオアカイカ“皮” 27 kg (湿重量) より、上述の定義から乾燥重量として 4.5 kg を得た (湿重量の 16.7%)。このうちの 1 kg 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 (2-アミノエチルホスホン酸およびホスホエタノールアミン型) を完全に分画することができる。さらに、これらのリン脂質と糖脂質をも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。これらのことは、アメリカオオアカイカの“皮”の場合、分画の初期操作であるスフィンゴ脂質画分の 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顕著に観察することができた。即ち、主なスフィンゴ脂質として非吸着画分にスフィンゴミエリンと推測できる両性脂質 (両性イオン型脂質) とセレブロシドを含む中性糖脂質の両者が存在していることを、一方、吸着画分にはセラミド 2-アミノエチルホスホン酸と推測できる極性脂質の存在することを示唆することができた (この可能性は、文献 (13) および (14) を基礎としている)。精製のために用いた各画分の重量は異なるが、最終的に、60 mg の中性糖脂質画分から 20 mg (実験 2.2.1、Fr. 1) のセレブロシド (CMS) を、300 mg の両性脂質 (両性イオン型脂質) 画分から 147 mg (実験 2.2.2、Fr. 3) のスフィンゴミエリン (Sph) を、703 mg の極性脂質画分から 440 mg (実験 2.3、Fr. 1) のセラミド 2-アミノエチルホスホン酸 (CAEP) を単離した (Figs. 2、3、4)。これらの精製収量をアメリカオオアカイカ“皮”の乾燥重量 1 kg 当りに換算すると CMS は 35 mg、Sph は 70 mg、CAEP は 3,000 mg (3 g) となる。

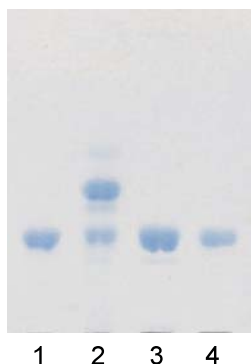
Fig. 5 に単離した Sph、CAEP および CMS の IR スペクトルを示したが、いずれもアミド結合に由来する吸収 ( $1650\text{ cm}^{-1}$  と  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) が観察された。また、Sph にはコリン基 ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) および C-O-P 結合のリン残基の -OH 基に由来する吸収 ( $1200\text{ cm}^{-1}$ ) が認められた。一方、CAEPn には C-P 結合のリン残基の -OH



**Fig. 2 Thin-Layer Chromatogram of Cerebroside (CMS) Fraction.**

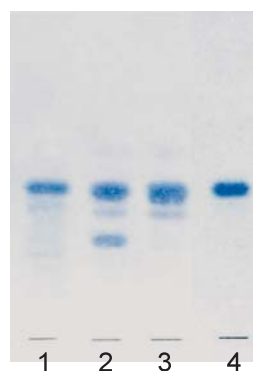
Lane 1, authentic CMS from the fresh-water bivalve *Hyriopsis schelegelii*; lane 2, neutral glycolipid fraction from the jumbo flying squid shown in **Fig. 1**; lanes 3~8, neutral glycolipids fractionated by Iatrobeds column chromatography (lanes 3 and 4, purified CMS and CDS; lanes 5~8, much more intricate glycolipids).

The plate was developed in chloroform-methanol-water, 60:40:10 (v/v) for 20 min, and the spots were visualized with orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  reagent.



**Fig. 3 Thin-Layer Chromatogram of Sphingomyelin (Sph) Fraction.**

Lane 1, authentic Sph from the pearl oyster *Pinctada martensii*; lane 2, sphingolipid fraction shown in **Fig. 1**; lane 3, chloroform-methanol-water, 30:60:8 (v/v) fraction eluted from QAE-Sephadex A-25 column chromatography; lane 4, Sph purified by Iatrobeds column chromatography. TLC conditions were the same as described in **Fig. 2**.



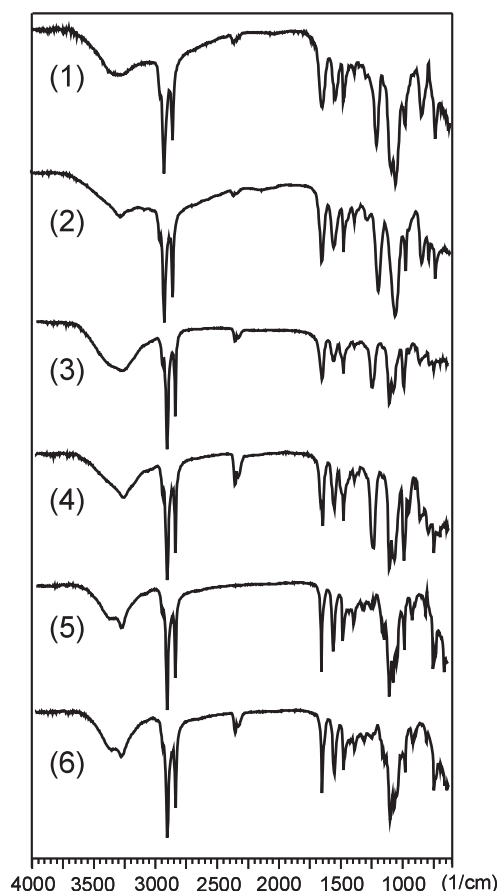
**Fig. 4 Thin-Layer Chromatogram of Ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) Fraction.**

Lane 1, authentic CAEP from the fresh-water bivalve *Corbicula sandai*; lane 2, sphingolipid fraction shown in **Fig. 1**; lane 3, 0.05 M ammonium acetate fraction eluted from QAE-Sephadex A-25 column chromatography; lane 4, CAEP purified by Iatrobeds column chromatography. The plate was developed in chloroform-methanol-water, 60:40:10 (v/v) for 20 min, and the spots were visualized with Dittmer-Lester reagent.

基に由来する吸収 ( $1180\text{ cm}^{-1}$ ) が確認された。更に、これら3者のスペクトルは、いずれも、それぞれの標準スペクトルとも吸収端が完全に一致することから単離した Sph. はスフィンゴミエリンであること、CAEPn はセラミド2-アミノエチルホスホン酸であること、CMS はセレブロシドであることが判明したことを付記する。

更に、Sph および CAEP については、King による過塩素酸湿式灰化法 (15) を用いて全リン量の測定を行った。その結果、Sph:P=4.00%、CAEP:P=4.01% であり、それぞれの平均分子量から算出した値 (Sph=4.42%, CAEP=4.76%) より推定される純度は Sph が 90.5%、CAEP が 84.2% であった。一方、CMS については、アンスロン法により糖定量を行ったところ 24.7% であり、平均分子量からの計算値 (24.4%) に近似した結果を得ることができた。

次に、CAEP については特に著者らが開発・調製した CAEP に対して極めて高い特異性を有する抗 CAEP 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 CAEP について抗体反応を示す染色が観察された (**Fig. 6**)。従って、この CAEP



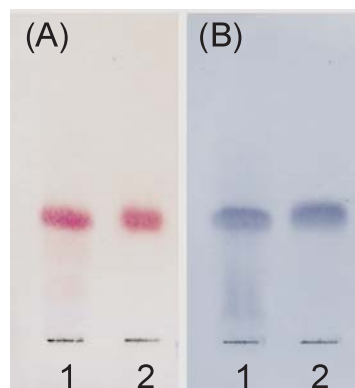
**Fig. 5 Infrared Spectra of Purified CAEP, Sph and CMS.**

1, authentic CAEP from *C. sandai*; 2, purified CAEP; 3, authentic Sph from *P. martensii*; 4, purified Sph; 5, authentic CMS from *H. schlegelii*; 6, purified CMS.

はセラミド 2-アミノエチルホスホン酸であることが決定された。

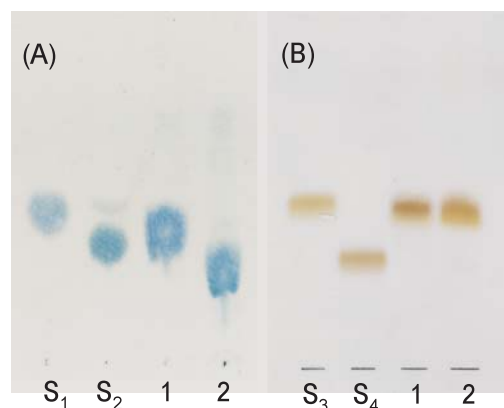
### 3.2 スフィンゴリン脂質 (Sph、CAEP) のホスホリパーゼおよび HF による分解と分解成績体

Sph および CAEP 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 2-アミノエチルホスホン酸を同定した (Fig. 7)。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



**Fig. 6 Detection of CAEP by TLC-Immunostaining.**

Lane 1, authentic CAEP from *C. sandai*; lane 2, purified CAEP from *D. gigas*. The separation was performed on the precoated Plygram Sil G plastic plates developed in chloroform-methanol-water, 65:25:4 for 20 min, and the spots were visualized with ninhydrin (A) and with immunostaining by anti-CAEP antibody (B).



**Fig. 7 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 CAEP. The separation was performed on a recoated 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.



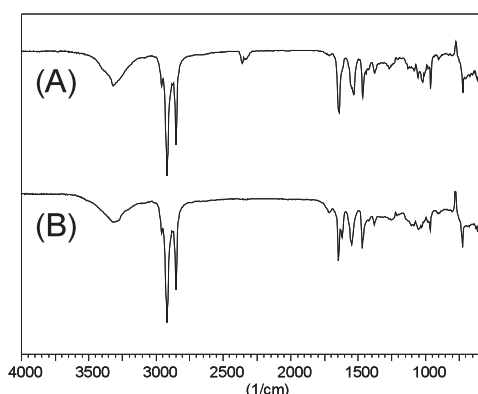


Fig. 8 Infrared Spectra of Chloroform-Soluble Products of Sph (A) and CAEP (B) after Hydrolysis by Phospholipase C.

こ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 および CAEP を HF（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、イアトロビーズ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. 8）。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およ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。

### 3.3 アメリカオオアカイカのスフィンゴ糖脂質

#### 3.3.1 セレブロシド (CMS)

精製セレブロシド (CMS) は、TLC 上で移動度が極めて近接した 2 つのスポットを示した（Fig. 2, lane 3）。この現象については、構成糖種およびセラミド分子種（脂肪酸成分および長鎖塩基成分）のいずれかの相違に起因していると考えられる。Fig. 9 に示すようにアメリカオオアカイカ“皮”のセレブロシドは、構成糖種としてガラクトースとグルコース（77:23）を検出したことから、ガラクトセレブロシドとグルコセレブロシドの混合標品であると結論付けられ、前者の可能性が示唆された。しかしながら、TLC 上でのスポットがあまりにも近接状態にあることから、構成糖種の相違に起因す

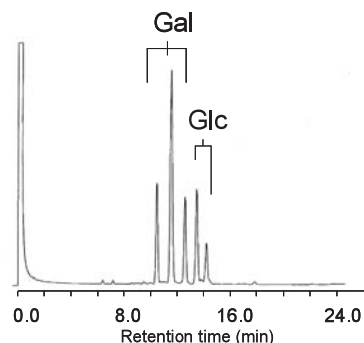


Fig. 9 Gas Chromatogram of TMS-Methyl glycosides from Purified CMS.

るだけでなく、セラミド分子種からも影響を受けていることが推察された（後述の Table 1 参照）。Fig. 10 に NMR スペクトルを示したが、化学シフト（4.04 ppm と 4.09 ppm）およびカップリング定数（7.0 と 7.7）より、ガラクトセレブロシドおよびグルコセレブロシドの両者ともアノマー配置は  $\beta$ -アノマーであることが確認された。スペクトル中の 5.3~5.6 ppm に観察されるシグナルは長鎖塩基に由来するものである。

#### 3.3.2 高級糖脂質におけるマンノ脂質の存在

アメリカオオアカイカ“皮”のその他の中性糖脂質については、含有量が極めて少ないが、セラミドジサッカリドを単離している（Fig. 2, lane 4）。構成糖種はグルコース、マンノース、ガラクトースで、それらのモル比は 1.0:0.8:0.2 であることから、Man-Glc-Cer（80%）および Gal-Glc-Cer（20%）の混合物であると推測している。更に糖鎖の長い高級糖脂質、特にマンノースを構成糖種に含有しているマンノ脂質の存在も確認しているが、現在のところ構造決定には至っていない（Fig. 2, lanes 5~8）。

### 3.4 Sph、CAEP および CMS のセラミド組成

#### 3.4.1 脂肪酸組成

CAEP、Sph および CMS 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 に示した。CAEP および Sph は両者とも C16、17、18、20、22-飽和酸（CAEP, 91.4%; Sph, 87.9%）と C22、24-モノ

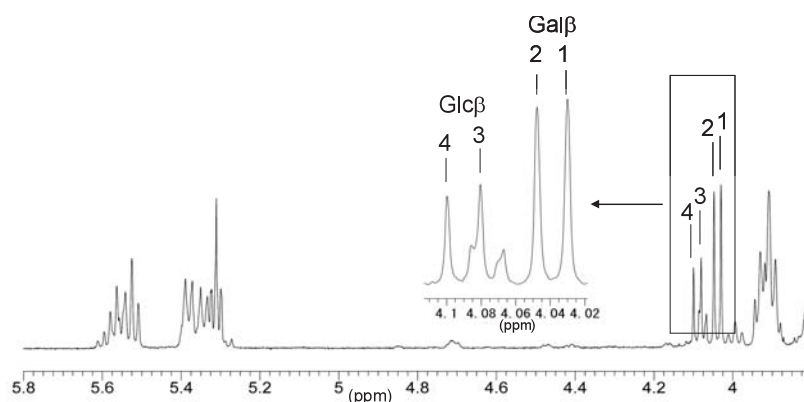


Fig. 10  $^1\text{H}$ -NMR Spectrum of CMS.

1 and 2,  $\beta$ -galactose anomer (chemical shift, 4.04; coupling constant ( $J_{1,2}$ ), 7.0); 3 and 4,  $\beta$ -glucose anomer (chemical shift, 4.09; coupling constant 7.7)

Table 1 Ceramide Compositions of CAEP

	CAEP	Sph	CMS
Fatty acid (%)			
16:0	76.4	73.7	31.7
17:0	3.0	3.1	2.2
18:0	7.5	4.9	2.4
20:0	2.8	3.6	5.8
21:0			1.5
22:1	5.5	8.3	5.3
22:0	1.7	2.6	11.2
23:0			3.3
24:1	3.1	3.8	22.8
24:0			6.1
h24:1			7.7
LCB (%)			
d16:1	39.8	73.5	81.7
d17:1	3.3	tr.	4.2
d18:1	13.4	26.5	14.1
d19:2	7.3	tr.	
d19:3	36.2	tr.	

h, 2-hydroxy acid; d, dihydroxisphingoid; tr, trace.

不飽和酸 (CAEP, 8.6%; Sph, 12.1%) より成っており、中でもパルミチン酸が主成分 (CAEP, 76.4%; Sph, 73.7%) で、酷似していた。また、この結果は、著者らが既に明らかにしているスルメイカ *Todarodes pacificus* 内臓の CAEP および Sph の脂肪酸組成にも類似していた (14)。一方、Yamaguchi *et al.* (13) 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 CAEP および Sph の脂肪酸組成は、パルミチン酸 (CAEPn, 37%; Sph, 47%) とステアリン酸 (CAEP, 56%; Sph, 48%) が主成分であり、アメリカオオアカイカ “皮” 由来のそれらとは組成に違いが見られた。更に、前述した

ようにアメリカオオアカイカ “皮” やスルメイカ内臓の CAEP や Sph に含まれる不飽和酸 (スルメイカの場合: CAEP は 29.4% の C22、24-モノ不飽和酸を、Sph は 8.5% の C22、24-モノ不飽和酸を含む) は、*Loligo paelei* 神経組織の CAEP と Sph の両者共に全く含まれていなかった。これらの事実はアメリカオオアカイカは “皮” を、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ているのではないかと考えている。

一方、CMS の脂肪酸組成は、C16、17、18、20、21、22、23、24-飽和酸 (64.2%)、C22、24-モノ不飽和酸 (28.1%) および 2-ヒドロキシ C-24 モノ不飽和酸 (7.7%) より成っており、中でもパルミチン酸 (C16: 0, 31.7%)、ペヘン酸 (C22: 0, 11.2%)、ネルボン酸 (C24: 1, 22.8%) が主な成分であった。CMS の脂肪酸組成は CAEP や Sph のそれらとは異なっていた。

### 3.4.2 長鎖塩基組成

Sph、CAEP および CMS 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 に示した。その結果、Sph と CMS には d16:1 および d18:1 を主成分としているところに共通性が認められた (Sph: d16:1, 73.5%; d17:1, tr; d18:1, 26.5%; CMS: d16:1, 81.7%; d17:1, 4.2%; d18:1, 14.1%)。一方、CAEP は d16:1 (39.8%)、d18:1 (13.4%) および d19:3 (36.2%) を主な成分

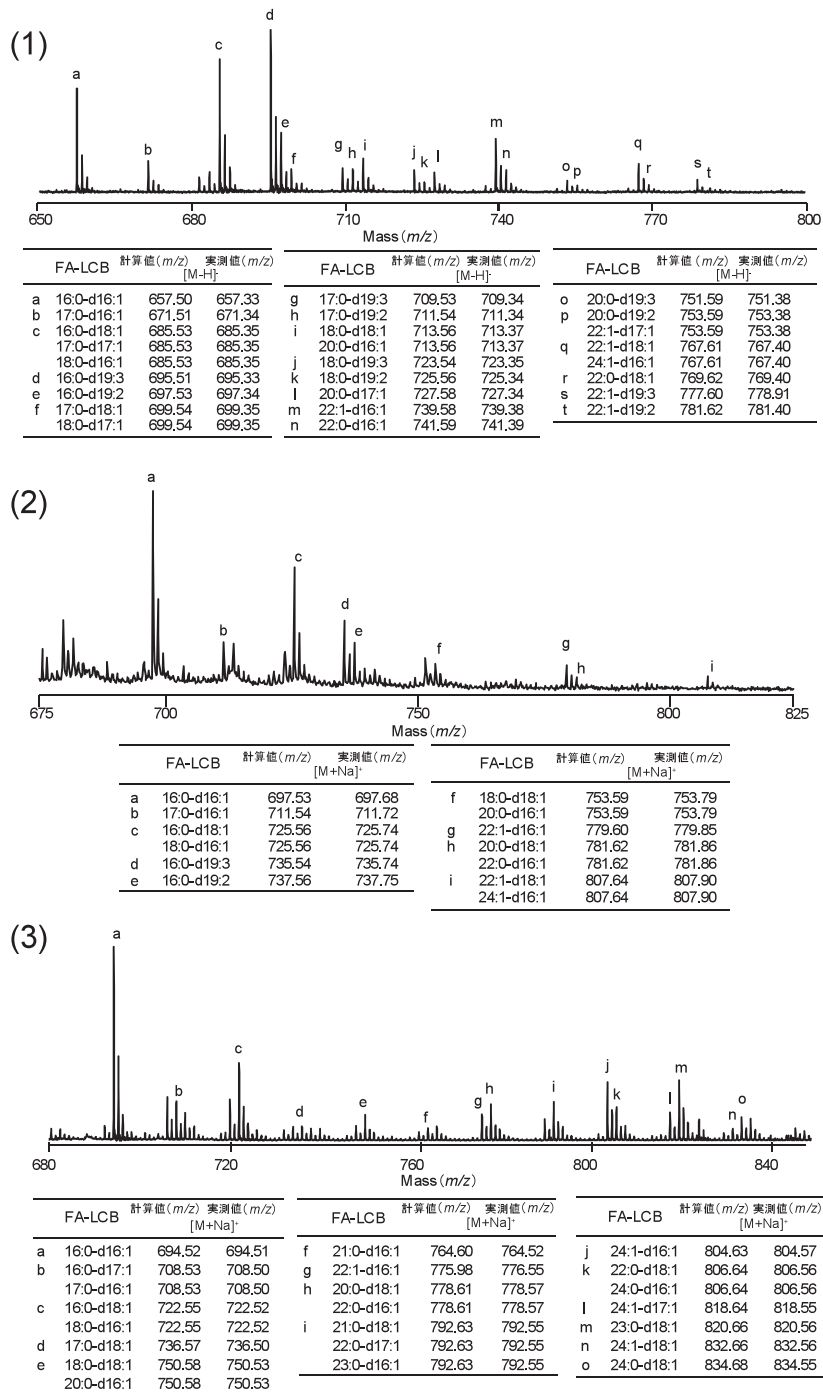


Fig. 11 MALDI-TOF MS Spectra.

- 1, *N*-acetylated CAEP (negative-ion mode) ;
- 2, Sph (positive-ion mode) ;
- 3, CMS (positive-ion mode).

としていたが、CAEP にのみ、d17:1 (3.3%) に加えて d19:2 (7.3%) および d19:3 の多不飽和塩基を検出した。特に、この d19:3 塩基についてはアコヤガイ *Pinctada martensii* の CAEP (7) や Ohashi *et al.* (16) 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 であることを予想している。

### 3.5 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 (7)。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 (3)。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 (8)。そこで Sph および CMS については陽イオンモードで、CAEP 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. 11 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 22 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。

### 文 献

1. 野崎仁崇, 原島鷹, 橋本恭平, 西尾匡, 小島寿夫, 石川哲, 齋藤洋昭, 伊藤将弘, 杉田陸海, 糸乗前 (2010.9) 第 49 回日本油化学会年会 (函館), p. 200 (2E-02).
2. 山本雅子, 野崎仁崇, 橋本恭平, 西尾匡, 小島寿夫, 伊藤将弘, 石川哲, 齋藤洋昭, 杉田陸海, 糸乗前 (2009.12) 第 2 回リン化合物討論会 (第 29 回 C-P 化合物研究会) (静岡).
3. 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.
4. Dittmer, J. C., Lester, R. L. (1964) J. Lipid Res., **5**, 126-127.
5. Hanes, C. S., Isherwood, F. A. (1949) Nature, **164**, 1107-1112.
6. 杉田陸海, 村田真理, 板坂修, 堀太郎 (1990) 油化学, **39**, 572-575.
7. 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.
8. 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.
9. 荒川郁子, 杉田陸海, 堀太郎 (1968) 生化学, **40**, 154-157.
10. Hori, T., Arakawa, I., Sugita, M., Itasaka, O. (1968) J. Biochem., **64**, 533-536.
11. Gaver, R. C., Sweeley, C. C. (1965) J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 294-298.
12. Morrison, W. R., Hay, J. D. (1970) Biochim. Biophys. Acta, **202**, 460-467.
13. Yamaguchi, H., Tanaka, T., Ichioka, T., Stoskopf, M., Kishimoto, Y., Gould, R. (1987) Biochim. Biophys. Acta, **922**, 78-84.
14. 野崎仁崇, 山本雅子, 小島寿夫, 齋藤洋昭, 伊藤将弘, 糸乗前, 杉田陸海 (2009) 滋賀大学教育学部紀要 III: 自然科学, **59**, 29-37.
15. King, E. G. (1932) Biochem. J., **26**, 292-297.
16. Ohashi, Y., Tanaka, T., Akashi, S., Morimoto, S., Kishimoto, Y., Nagai, Y. (2000) J. Lipid Res., **41**, 1118-1124.