

ホタテガイの主なスフィンゴ脂質

Chemical Characterization of Two Main Sphingolipids of Scallop

牧 田 章¹⁾

Akira MAKITA

佐 藤 あゆみ²⁾

Ayumi SATO

杉 田 陸 海³⁾

Mutsumi SUGITA

糸 乗 前³⁾

Saki ITONORI

伊 藤 将 弘⁴⁾

Masahiro ITO

荒 川 義 人¹⁾

Yoshito ARAKAWA

The key sphingolipids—monoglycosylceramide (cerebroside) and phosphosphingolipid—were isolated from the visceral samples of giant ezo scallop *Patinopecten yessoensis* by successive column chromatographies (anion-exchange and silicic acid columns). The contents of the isolated lipids were analyzed by gas chromatography and enzymatic methods.

The carbohydrate moieties of the cerebroside were galactose (82%) and glucose (18%). The main fatty acids were palmitic, oleic, and stearic acids.

Thin layer chromatography analysis of purified phosphosphingolipid fraction after treatment with *Clostridium perfringens* phospholipase C revealed 2-aminoethyl phosphonate and ceramide, thereby indicating that the chemical structure of the phosphosphingolipid was ceramide 2-aminoethylphosphonate. The main fatty acids in this phospholipid were palmitic acid, branched margaric acid, and 2-hydroxy palmitic acid.

ホタテガイ (*Giant Ezo Scallop Patinopecten yessoensis*) 内臓から、陰イオン交換樹脂、珪酸のカラムクロマトグラフィーで二つのスフィンゴ脂質、モノグリコシルセラミド (セレブロシド) と スフィンゴリン脂質を単離した。これらスフィンゴ脂質の構成成分をガスクロマトグラフィーや酵素加水分解法で分析した。

セレブロシドの構成単糖はガラクトース (82%) とグルコース (18%) であった。主な構成脂肪酸はパルミチン酸、オレイン酸およびステアリン酸であった。

スフィンゴリン脂質を *Clostridium perfringens* のホスホリパーゼCで処理すると、2-アミノエチルホスホン酸とセラミドが検出された。したがって、このリン脂質はセラミド 2-アミノエチルホスホン酸と同定された。主な構成脂肪酸は パルミチン酸、分枝鎖マーガリン酸および、2-ヒドロキシパルミチン酸であった。

Key words : ceramide(セラミド)
 sphingoglycolipid(スフィンゴ糖脂質)
 sphingophospholipid(スフィンゴリン脂質)
 phosphonolipid(ホスホノ脂質)
 scallop (ホタテガイ)

1) 天使大学 看護栄養学部 栄養学科

(2009年11月2日受稿、2010年2月15日 審査終了受理)

2) 北海道立食品加工研究センター

3) 滋賀大学教育学部 化学教室

4) 立命館大学 総合理工学院・生命科学部 生命情報学科

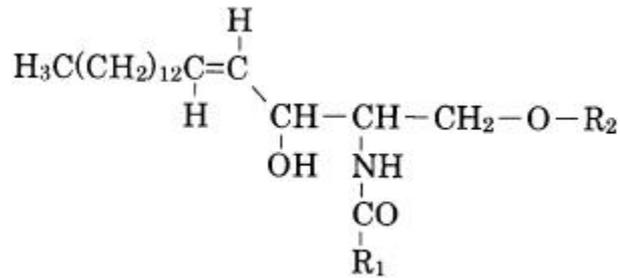
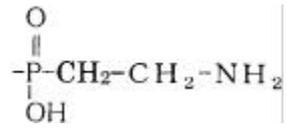


図1．スフィンゴ脂質の化学構造

R₁ = 脂肪酸残基、R₂ = 単糖または糖鎖（スフィンゴ糖脂類） またはホスホリルコリン

（スフィンゴミエリン） または 2 - アミノエチルホスホン酸、（セラミドアミノエチルホスホン酸）。

はじめに

スフィンゴ脂質はスフィンゴシン（同族体も含めて長鎖塩基と総称）と脂肪酸が酸アミド結合したセラミドに、糖鎖またはリン化合物が結合した複合脂質の一群である（図1）。糖鎖を結合しものをスフィンゴ糖脂質、リン化合物を結合したものをスフィンゴリン脂質と呼んでいる。これらは、グリセロ複合脂質に比べて量的に少ないが、真核細胞の細胞膜構成脂質として脊椎動物や無脊椎動物から植物にいたるまで広く分布している。生体での機能として、スフィンゴ糖脂質はその糖鎖構造の特異性によってヒトの血液型抗原や癌関連抗原として、あるいは細菌毒素やサイトカインの受容体として機能する^{1,2)}。スフィンゴ脂質の代謝産物は細胞シグナル伝達の脂質メディエーターとして細胞の分化やアポトーシスにはたらく。自然界における広い分布から知られるように、我々は日常的にスフィンゴ脂質を摂取している。また、実験動物の腸管においてセラプロシドやスフィンゴミエリンが消化、吸収されることが報告されている^{3,4)}。

無脊椎動物のスフィンゴ脂質について^{5,6)}、貝類のものが詳しく調べられている。それらのスフィンゴ糖脂質は高等動物のものとは糖鎖構造が異なる。リン脂質に関し、高等動物の主要なスフィンゴリン脂質はスフィンゴミエリン（P - O - C結合型）であるのに対し、多くの貝類はセラミドアミノエチルホスホン酸（P - C結合型）⁷⁾ であ

り、スフィンゴ脂質の60～90%を占める。極めて安定なP - C結合を有する脂質をホスホノ脂質と呼ぶが、生理的機能は推測の域を出ない。

我が国では食用として需要が高いホタテガイ（*Eso Scallop Patinopecten yessoensis*）は貝殻以外の軟部組織はすべて可食であり、湾内で懸垂栽培されるものは貝殻付で市販されているが、オホーツク海沿岸で沿海放流栽培するホタテガイは貝柱のみが食用に供される。スフィンゴ（糖）脂質は器官・組織によって分布、構成を異にするが、本論文はホタテガイの肝膵臓⁸⁾を除いた内臓について主なスフィンゴ脂質を調べたものである。

実験

1. 実験材料

ホタテガイは、貝殻と貝柱を除いたものが北海道枝幸漁業協同組合から供与された。このものから、外套膜、生殖腺および黒味をおびた肝膵部を除いた残りの内臓を実験材料とした。材料を5倍容のアセトンを加えて、ワーリングブレンダーでホモジェナイズした後、ろ過した。残渣を更に2回アセトン抽出し、風乾してアセトンパウダー（260 g）を得た。

2. 粗複合脂質の調製

アセトンパウダーに5倍容のクロロホルム-メタノール（2：1）（1：1）および（1：2）で室温抽出した。溶媒の比率は容積比で示す。全抽出液を一緒にして溶媒を減圧溜去して粗複合脂

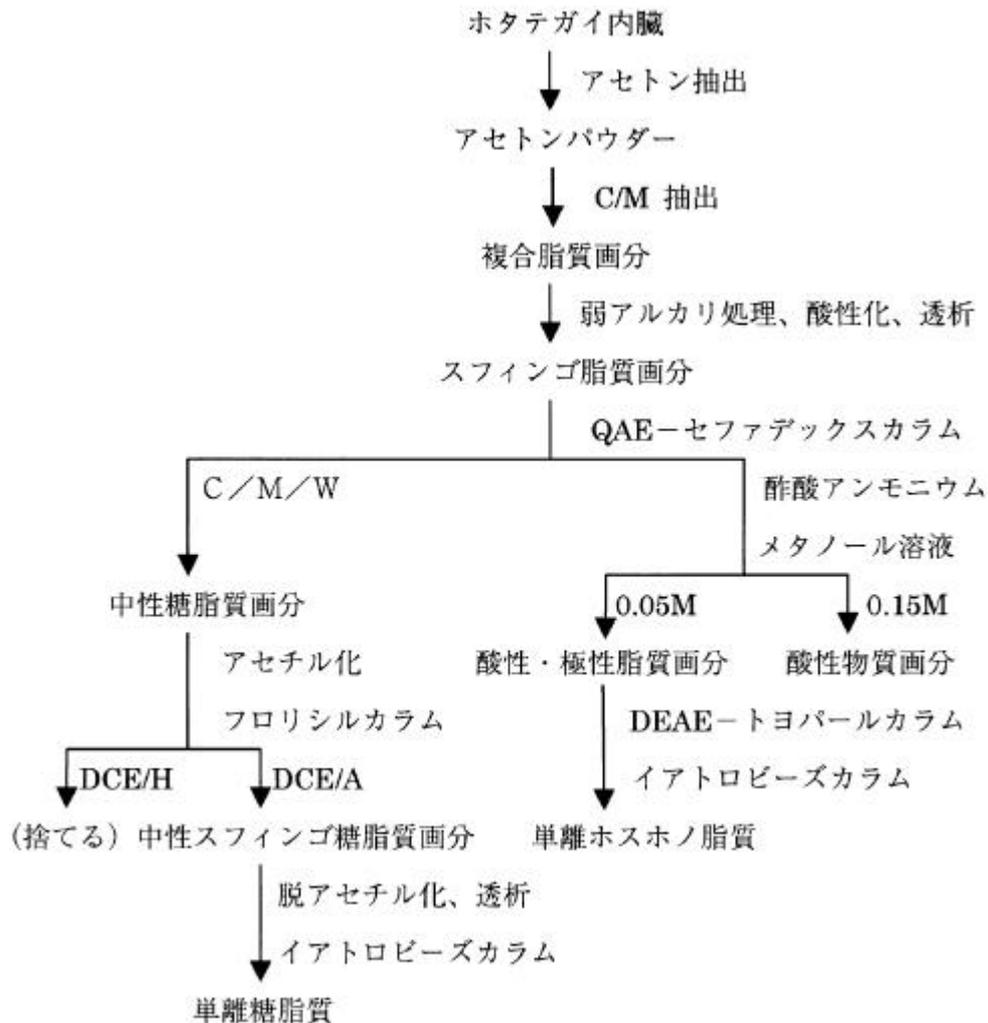


図2 . スフィンゴ糖脂質とスフィンゴリン脂質精製の概要

C/M/W、クロロホルム-メタノール-水；DCE/H, ジクロロエタン-ヘキサン；A,アセトン。

質画分を得た。図2にスフィンゴ脂質調製の概要を示した。

3 . スフィンゴ脂質の調製

粗複合脂質画分のエステル型脂質を分解するため、0.5 M KOH メタノール-水 (1 ; 1) で室温、1夜放置した。アセター型脂質を分解するため、6 M 塩酸を加え、弱酸性化 (pH 1、室温、3時間) 処理をした。反応液を水に対して透析後、透析内液を減圧濃縮してアセトン沈殿、洗浄を行って粗スフィンゴ脂質画分を調製した。

4 . スフィンゴ脂質の分画

スフィンゴ脂質の分画は Hori らの方法⁹⁾に準拠した。粗スフィンゴ脂質画分を、クロロホルム-メタノール-水 (30 : 60 : 8) で調製した QAE-

セファデックス A-25 (OH⁺型、Amersham Bioscience) カラム (210ml) にアプライし、5 倍容の同混液で溶出する (中性スフィンゴ糖脂質画分) 。 2 倍容のメタノールで溶出。 5 倍容の 0.05 M 酢酸アンモニウムメタノール溶液で溶出 (極性・酸性脂質画分) 。 そのあと 0.15M 酢酸アンモニウム・メタノールで溶出した画分 (酸性脂質画分) には intact なスフィンゴ脂質はみられなかった。

5 . スフィンゴ糖脂質の単離

QAE - セファデックスカラムの 溶出液を減圧濃縮、乾燥してから、ピリジン-無水酢酸 (3 : 2) に溶解。室温に一夜おいて完全アセチル化を行う。溶媒を減圧乾涸してから、アセチル化物をヘキサン-ジクロロメタン (1 : 4) で調

製したフロリシル (Floridin Co.) カラム (61ml) にアプライした。4 培容の同じ混液でカラムを洗浄した後、5 培容のアセトン-ジクロロエタン (1 : 1) で溶出したアセチル化脂質を弱アルカリ処理で脱アセチル化、透析、内液から糖脂質画分 (233mg) を得た。

糖脂質画分を、クロロホルム-メタノール-水 (90:10:1) で調製したイアトロピース (6 RS-8060 Mitsubishi Kagaku Iatron Inc.) カラム (1.5 X 90 cm) にアプライし、クロロホルム-メタノール-水 (90:10:1) 150ml, (80:20:2) 150ml, (70:30:2) 150ml, (60:40:4) 104ml, (50:50:5) 105ml, (40:60:6) 212ml で溶出した。3 ml ずつ分取し、薄層クロマト (TLC) オルシン発色で検出し、同じ移動度を示す試料を集めた。

6. スフィンゴリン脂質の単離

QAE-セファデックスカラムクロマトにおいて、0.05M 酢酸アンモニウム・メタノール溶液で溶出された画分 (II 4.) を濃縮、透析後、DEAE-Toyopearl (OH⁺型、東洋ソーダ Co.) カラムにかけ、クロロホルム-メタノール-水 (30:60:8) で溶出される非吸着画分を濃縮して得られた脂質を上記のようにイアトロピースカラムクロマトにかけ、各培容のクロロホルム-メタノール (9 : 1), (8 : 2), (7 : 3), (6 : 4), (5 : 5), (4 : 6), (2 : 8) で溶出、分取、脂質を TLC、リン発色でモニターし、同じ移動度を示すリン脂質 (セラミドアミノエチルホスホン酸に相当) を集めた。

7. TLC

TLC プレートはシリカゲル G (Merck Co.) を用いた。展開溶媒はクロロホルム-メタノール-水 (65:25:4, 60:30:8, 60:40:10) を用いた。検出はアミノ基はニンヒドリン試薬で、リンは Dittmer - Lester 試薬¹⁰⁾で、糖はオルシン硫酸試薬を用いた。

8. スフィンゴリン脂質の酵素分解

ホタテガイのスフィンゴリン脂質の構造解析のため、以下の酵素反応を行った¹¹⁾。1mg のホタテリン脂質に 0.2ml の 50 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、0.1ml の 20mM CaCl₂ および、0.2ml のエチルエーテルを加え混和する。このも

のに Clostridium perfringens のホスホリパーゼ C (Sigma Chemical Co.) 500 μg を含む 0.1 ml の Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を添加、37、24時間インキュベートする。反応液を沸騰水中で加熱してエーテルを除去、蛋白質を凝固する。次いで、2 ml のクロロホルム-メタノール (2 : 1) を加えて混和する (Folch の分配)。下層の脂質 (セラミド) を TLC でクロロホルム-メタノール (98 : 2) によって展開、50% 硫酸噴霧、加熱して検出した。上層 (アミノエチルホスホン酸画分) を濃縮してセルロース薄層プレート (アピセル SE) にアプライ、n-ブタノール : 酢酸 : 水 (4 : 1 : 2) で展開し、ニンヒドリン試薬で検出した。

9. スフィンゴ脂質の構成成分の分析

構成脂肪酸：約 500 μg のスフィンゴ脂質を 1 M 塩酸メタノールを加えて封管、100、3時間メタノリシスを行い、冷却後、n-ヘキサンで抽出。抽出を 3 回繰り返して得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー (GC、Shimazu GC-18A) で分析した。分析カラムは 0.22mm x 25m の無極性 5% フェニルシリコン化学結合型 (0.25 μm 膜厚) シリコンキャピラリーカラム (Simazu HiCap-CBP 5) を使用した。分析温度は、170 230 (4 /min) に設定した。

ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS)：分析計 Shimazu GCMS-QP 5050 を用いて次の条件下で分析した。上記のキャピラリーカラムで、カラム温度 (脂肪酸メチルエステル) 80 (2 min) 170 (20 /min) 240 (4 /min)。インターフェース温度 250、試料注入温度 240、ヘリウム圧力 100kPa、スプリットレス時間 3.5 min、イオン化電圧 70eV (EI), 100eV (CI), イオン化電流 60 μA (EI), 200 μA (CI)。反応ガス (CI) イソブタン。

構成糖：糖脂質を上記のようにメタノリシス、脂肪酸メチルエステルを抽出後、メタノール層の単糖メチルグリコシドをトリメチルシリル (TMS) 化した¹²⁾。TMS 化糖は上記 Shimazu HiCap-CBP 5 キャピラリーカラムを用い、温度勾配 140 230 (2 /min) で分析した。

その他：タモギダケのグルコシルセラミドは石田真己氏 (株式会社スリービー) から供与された。セラミドはスフィンゴミエリン (ウシ脊髄、

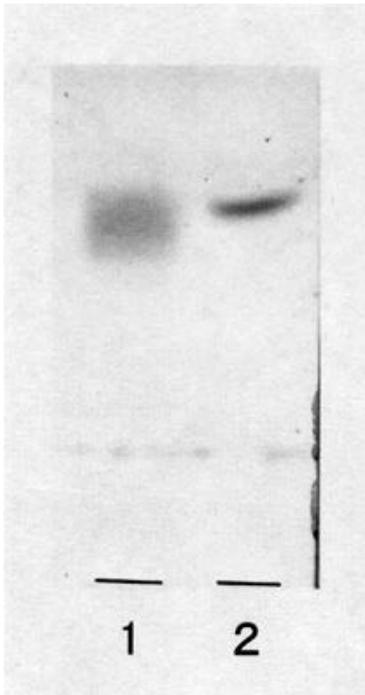


図3 . スフィンゴ糖脂質の TLC

レーン1、ホタテガイ糖脂質；レーン2、標準グルコシルセラミド。クロロホルム-メタノール-水（65:25:4）で展開、オルシン硫酸試薬で発色。

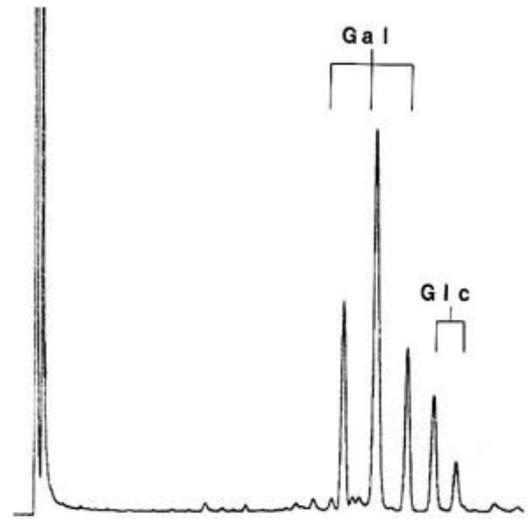


図4 . ホタテガイ糖脂質構成単糖のガスクロマトグラム

Gal, ガラクトース；Glc, グルコース。

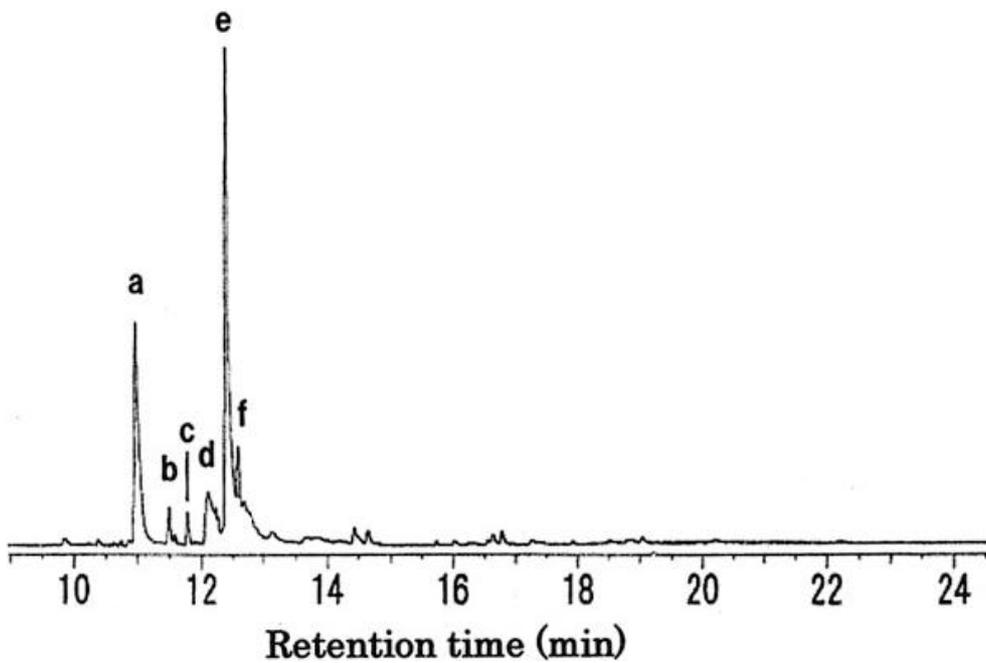


図5 . ホタテガイ糖脂質の構成脂肪酸のガスクロマトグラム

a, パルミチン酸（16:0） b, 分枝型マーガリン酸（br17:0）
c, マーガリン酸（17:0） d, 本文参照, e, オレイン酸（18:1）
f, ステアリン酸（18:0）

表 1 . 脂肪酸組成

脂肪酸	セレブロシド	ホスホノ脂質
パルミチン酸	35.4 (%)	59.9 (%)
分枝型マーガリン酸	3.0	10.0
マーガリン酸	2.5	5.4
2- ヒドロキシパルミチン酸	-	12.2
オレイン酸	42.4	5.3
ステアリン酸	16.6	7.2

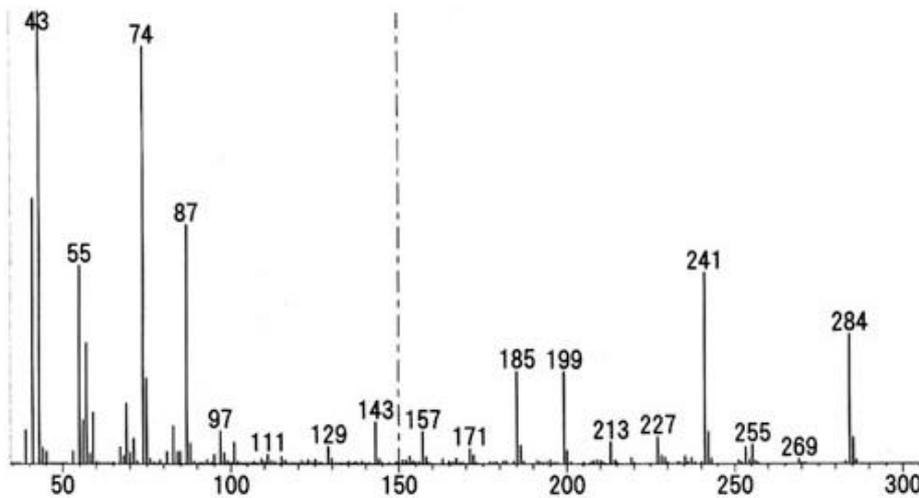


図 6 . ホタテガイ糖脂質マーガリン酸の質量スペクトル

Sigma Chemical Co.) を *C. perfringens* のホスホリパーゼ C で上記の方法に従って調製した。アコヤガイ (*Pinctada martensii*) から精製したセラミドアミノエチルホスホン酸¹³⁾および、その酵素分解産物、アミノエチルホスホン酸を標準として用いた。長鎖塩基については別途検討のうえ報告する。

結果および考察

1. ホタテガイ内臓の糖脂質

ホタテガイの内臓のスフィンゴ脂質画分を QA E セファデックスカラムで分けた非吸着画分から、上記 (II.5) の方法で得られた糖脂質画分をイアトロビーズカラムでクロロホルム/メタノールの段階濃度勾配によって溶出すると、TLC でセレブロシドと同じ移動度を示す糖脂質が得られた (図 3)。構成単糖を TMS - メチルグリコシド誘導体としてガスクロマトグラフィイーで調べると、

図 4 に示すように、ガラクトース (82 %) とグルコース (18 %) であった。ガラクトシルセレブロシドとグルコシルセレブロシドの分離が困難であったので、両者全体について構成脂肪酸を分析した。そのガスクロマトグラムを図 5 に、分析値を表 1 に示す。パルミチン酸 (16:0)、オレイン酸 (18:1) およびステアリン酸 (18:0) が 95 % 近くを占めた (図 5 のピーク d の保持時間はヒドロキシパルミチン酸に相当するが、質量スペクトルが合致しないので、表 1 から除いた)。貝類スフィンゴ脂質の脂肪酸の特徴の一つとして、マーガリン酸 (margaric acid, 17:0) を有意の濃度で含むことである。ホタテガイセレブロシドからのマーガリン酸のマスマスペクトルを図 6 に示す。分子イオン (M^+ 、 m/e 284)、開裂 [$M - 31$ ($R C = O^+$), m/e 253]、開裂 (m/e 74)、炭化水素の脱離による $M - 29$ (m/e 255)、 $M - 43$ (m/e 241) などが観察される。ホタテガイセレブロシドは分枝位は不明であるが分枝鎖 17:0 も存在する。



図7 . ホタテガイホスホノ脂質の TLC

左レーン、標準2- アミノエチルホスホン酸
右レーン、ホタテガイのスフィンゴ脂質
クロロホルム-メタノール-水 (60:30:8) で展開
後、リン試薬で発色。

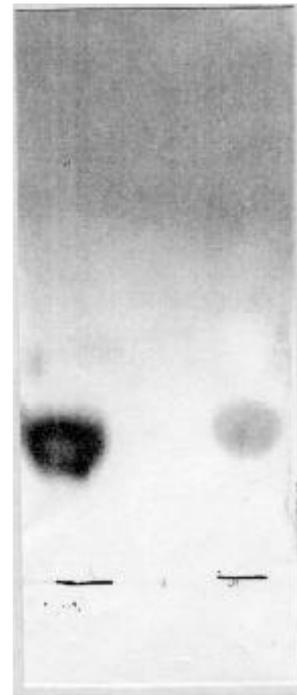


図9 . ホスホノ脂質のホスホリパーゼCによる水溶性産物

左レーン、標準2- アミノエチルホスホン酸； 右
レーン、ホタテガイスフィンゴリン脂質の酵素分解
産物。ホタテガイのスフィンゴリン脂質をホスホリ
パーゼCで反応後、Folchの分配を行って上層を
セルロース TLCを行い、ニンヒドリンで発色した。

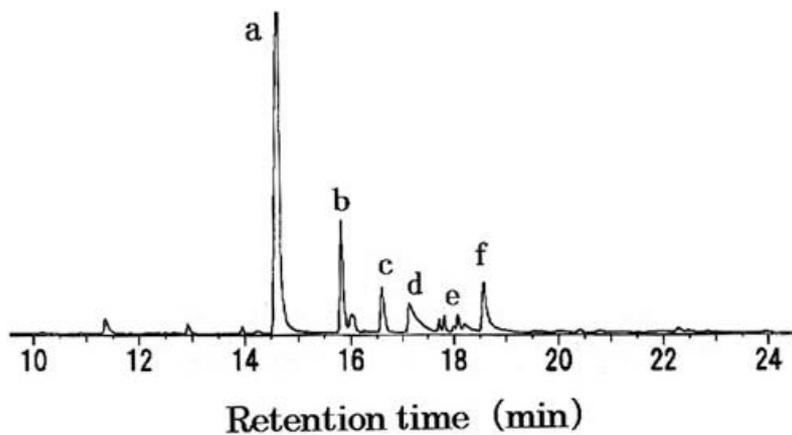


図8 . ホタテガイスフィンゴリン脂質の脂肪酸のガスクロマトグラム

a, パルミチン酸；b, 分岐型マーガリン酸；c, マーガリン酸；d, 2 - ヒドロキシパルミチン酸；
e, 分岐型ステアリン酸；f, ステアリン酸.

調べられた貝類のセレブロシドはグルコシルセ
レブロシドやガラクトシルセレブロシドが多い
が⁶⁾、淡水産真珠母貝のイケチョウガイ
(*Hyriopsis schlegelii*) はこれらに加えてマンノ
シルセレブロシドも含む¹⁴⁾。セレブロシドは広く
生物界に分布する基本的糖脂質であるが、脂肪酸
について貝類のものは哺乳類セレブロシドに多く

含まれる超長鎖酸 (24:0、リグノセリン酸など)
は見られない。

上記イアトロビーズカラムクロマトで、後半の
溶出で長糖鎖の複数とみられる糖脂質が検出され
たが、それらについては別に報告する。

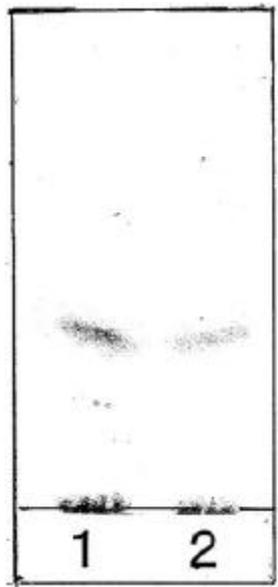


図10 .ホスホノ脂質の酵素分解で生じた脂溶性物質のTLC

レーン1、標準セラミド；レーン2、ホタテガイスフィンゴリン脂質の酵素分解後の脂溶性産物。ホタテガイスフィンゴリン脂質をホスホリパーゼCと反応後、Folchiの分配を行い、下層をTLC、クロロホルム-メタノール(98:2)で展開、50%硫酸を噴霧、加熱して検出。

2. ホスホノリン脂質

QAE-セファデックスカラムに吸着した脂質を0.05M酢酸アンモニウム・メタノールで溶出される画分をイアトロピーズカラムにかけた(図2参照)。カラムをクロロホルム・メタノールの段階濃度勾配で溶出し、リン発色陽性、ニンヒドリン陽性でセラミドアミノエチルホスホン酸に相当する脂質を単離した(図7)。この脂質の構成脂肪酸は、図8と表1に示すようにパルミチン酸が59.9%と最も多かった。

セラミドアミノエチルホスホン酸は細菌のホスホリパーゼCで加水分解されることが知られている¹¹⁾。ホタテガイリン脂質をC.perfringensのホスホリパーゼCで処理したところ、2-アミノエチルホスホン酸(図9)とセラミド(図10)に開裂し、本リン脂質はセラミド2-アミノエチルホスホン酸と同定された。

スフィンゴ脂質の分画に用いたQAE-セファデックスクロマトの非吸着部には中性糖脂質とともにスフィンゴミエリンも溶出される¹³⁾。ホタテガイは肝膵臓⁸⁾も他の内臓(本報)もスフィンゴミエリンは得られなかった。海産真珠母貝のアコヤガイはセラミドアミノエチルホスホン酸とスフィ

ンゴミエリンの双方を含む¹³⁾。

SimonとRouser¹⁵⁾は、種々の動物組織、ならびに、貝類(ホタテガイとアワビ)のリン脂質について定性と定量分析を行った。ホタテガイ(Large Rock Scallop、Hinnites giganteum)の貝柱は、全リン脂質の16.8%がセラミドアミノエチルホスホン酸であり、グリセロリン脂質としてホスファチジルコリン(レシチン)が35.4%、ホスファチジルエタノラミンが15.6%、ホスファチジルセリンが11.9%で、スフィンゴミエリンは検出されなかったと述べている。アワビもスフィンゴミエリンは検出されなかったと記している。

C-P化合物は下等動物ばかりではなく、ヒトを含めたほ哺乳動物組織にも微量存在する⁷⁾。

高等動物はC-P結合を合成できず、食物連鎖による蓄積であろうと考えられている。

謝 辞

本研究の材料用ホタテガイを提供された枝幸漁業協同組合、グルコシルセラブレプロシドを供与された石田真己氏に感謝します。本研究の初期は札幌医科大学化学教室(主任 賀佐伸省教授)でおこなわれ、谷内田洋一先生のご支援を受けた。これらに対し深謝します。

引用文献

- 1) Makita, A. and Taniguti, N.: Glycosphingolipids In New Comprehensive Biochemistry, Vol. 10, ed. Wiegandt, H., 1-99, Elsevier, 1985.
- 2) Varki, A. et al. Essentials of glycobiology, ed. Varki, A. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
鈴木康夫 他, 訳 スフィンゴ糖脂質、糖鎖生物学(鈴木康夫 監修) 91-101, 丸善, 2003.
- 3) Nilsson, A. : Metabolism of cerebroside in the intestinal tract of the rat. Biochim. Biophys. Acta, 194, 113-121. 1985.
- 4) Schmelz, E. M. et al. : Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated loops of mice. J.Nutr. 124, 702-721, 1994.
- 5) 杉田陸海: 無脊椎動物の複合脂質に関する構造生化学的研究、オレオサイエンス、3、653-661, 2003.
- 6) Itonori, M. and Sugita, M. : Glycophylogenetic

- aspects of lower animals In Comprehensive Glycoscience: Vol. 3 Biochemistry of glycoconjugate glycans, ed. Kamerling, J. P. pp.253-284, Elsevier, 2007.
- 7) 堀 太郎 : 2・2 ホスホノリピド、「C-P 化合物の生化学」堀 太郎、堀口雅昭 編、50-75、学会出版センター、1978 .
- 8) 杉田 陸海 他 : ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* のホスホノ脂質 (ceramide 2-aminoethylphosphonate の構造解析、滋賀大学教育学部紀要 自然科学 58, 21-29、2008 .
- 9) Hori,T. et al.: Characterization of a novel glycosphingolipid, ceramide nonasaccharide isolated from spermatozoa of the fresh water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*. J. Biol. Chem. 256, 10979-10985. 1981.
- 10) Dittmer, J.C. and Lester, R.L.: A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin layer chromatogram. J. Lipid Res., 5, 126-127, 1966.
- 11) Hori,T. et al. : Biochemistry of shellfish IX Enzymatic hydrolysis of ceramide 2-aminoethylphosphonate and sphingoethanolamine. J. Biochem. 64, 533-536, 1968.
- 12) Sweeley, C. C. and Waker , D.: Dermination of carboydrates in glycolipides and gangliosides by gaschromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc. 34, 1461-1465, 1964.
- 13) 糸則 前 他 : アコヤガイ、*Pinctada martensii* のホスホノ脂質 (ceramide 2-aminoethylphosphonate) のセラミド組成 滋賀大学教育学部紀要、自然科学、56, 51-62, 2006.
- 14) Hori, T. et al. : Identification of α -mannosylceramide in hepatopancreas in the fresh-water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*. Biochem. Biophys. Acta, 665, 170-173,1981.
- 15) Simon,G., and Rouser, G. : Spacies variations in phospholipid distribution of organs. II Heart and skeletal muscle. Lipids 4, 607-614, 1969.