

キシヤステ, *Parafontaria laminata armigera*  
(節足動物, 倍脚類)における  
スフィンゴエタノールアミンの存在

堀 太郎<sup>1</sup>・早田知恵子<sup>2</sup>・仲谷 文貴<sup>2</sup>・吉田 利男<sup>3</sup>・杉田 陸海<sup>2</sup>

Occurrence of Sphingoethanolamine in Millipede,  
*Parafontaria laminata armigera*

Taro HORI<sup>1</sup>, Chieko HAYATA<sup>2</sup>, Fumiki NAKATANI<sup>2</sup>,  
Toshio YOSHIDA<sup>3</sup> and Mutsumi SUGITA<sup>2</sup>

Sphingoethanolamine (ceramide phosphoethanolamine) was found to be the principal phospholipids in the mesogastropodean snails and the dipterous insects. The presence of sphingoethanolamine as a major phospholipid constituent in these organisms is unique, since this phospholipid has been not found or only trace in all other animals investigated so far. In this communication we describe the isolation and the structural characterization of sphingoethanolamine from the millipede, *Parafontaria laminata armigera* (phylum Arthropoda, class Diplopoda). An alkali-stable lipid fraction (10.5g) prepared from the chloroform-methanol extracts of the millipede whole tissues was successively fractionated on Sephadex ion-exchange (QAE- and DEAE-Sephadex) column chromatography and silicic acid (Iatrobeads) column chromatography. The homogeneity of the isolated sphingoethanolamine (36.6mg) was determined on thin layer plates developed with chloroform-methanol-water (65 : 35 : 6, v/v) and chloroform-methanol-acetic acid-water (100 : 20 : 12 : 5, v/v). Acid hydrolysis of sphingoethanolamine with 1N HCl for 2hr at 100°C yielded ethanolamine and phosphoethanolamine. The latter was converted to a trimethylsilyl derivative with bis(trimethylsilyl)acetamide, and analyzed by gas chromatograph-mass spectrometer. Phosphoethanolamine was identified by a reference to the mass spectrum of the authentic compound. Enzymatic degradation of sphingoethanolamine by phospholipase C from *Cl. perfringens* yielded ceramide and phosphoethanolamine. The ceramide moiety was composed of heptadeca-, octadeca-, nonadeca- and eicosa-4-sphingenine, and their branching homologues as the sphingoids, and saturated C<sub>15</sub>~C<sub>24</sub>-acids as the fatty acids. This is the first report on the presence of sphingoethanolamine in Diplopoda.

<sup>1</sup> 滋賀文化短期大学 (1 Shiga Junior College of Cultural Studies)

<sup>2</sup> 滋賀大学教育学部化学教室 (2 Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University)

<sup>3</sup> 信州大学教養部生物学教室 (3 Biological Institute, Faculty of Liberal Arts, Shinsyu University)  
(1993年10月20日受理)

## 1 緒 言

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)は、1965年に堀らによって淡水産巻貝類(軟体動物、腹足類)のナガタニシに見いだされ、命名されたもので(1、2)、高等動物の細胞膜や神経組織に広く分布しているスフィンゴミエリン(3)、軟体動物や腔腸動物を中心に分布しているホスホン酸を成分とするホスホノ脂質(4)と並ぶスフィンゴリン脂質の1種であり、今では、微量ながら細菌から哺乳動物に至るまで広く分布することが知られている(5~16)。中でも、軟体動物や節足動物には比較的多量にスフィンゴエタノールアミンを含有するものが多いが、それもほとんどが腹足類と昆虫類で、わずかに斧足類にも存在するようである。

現在、節足動物は、地球上で最も繁栄し、種類の最多を誇っている動物の一群であり、この中には昆虫、エビ、カニ、クモ、ムカデ、ヤスデなど、身近に見られる馴染み深いものを含み、さまざまなものが人間生活と密接な関係を持っている。節足動物はそれらの形態や生態に関して多様性を示すところから、節口綱(カブトガニ)、蛛形綱(クモ、サソリの類)、皆脚綱(ウミグモの類)、甲殻綱(エビ、カニの類)、唇脚綱(ムカデの類)、倍脚綱(ヤスデの類)、少脚綱(ヤスデモドキの類)、結合綱(コムカデの類)および昆虫綱(ハエ、トンボ、チョウの類)の9綱に分類されている(17)。それらのうち、近年、昆虫類および甲殻類の仲間について、複合脂質の研究が著者らを中心として行われ、比較生化学的分野の開発が進められている。その中で、複合リン脂質については、高等動物細胞に普遍的に存在しているスフィンゴミエリンはほとんど分布していないが、相補的存在とも考えられるスフィンゴエタノールアミンやアミノエチルホスホン酸セラミド(ホスホノ脂質)が広く見いだされている。しかし、上述の2綱(昆虫類および甲殻類)以外の7綱に属する動物については、試料の大量採集が極めて困難であることから、今まで手付かずであった。ところが、1992年10月に大発生したキシヤスデ(倍脚類)の大量採集に成功し、複合脂質の分析を行う

機会を得ることができた。

その結果、複合リン脂質成分中にスフィンゴエタノールアミンが存在するを見いだした。著者らの知る限りでは、倍脚類におけるスフィンゴエタノールアミンの存在を明らかにしたのはこれが最初である。

## 2 試料および実験方法

### 2.1 キシヤスデ脂質の抽出

試料として用いたヤスデは、8年周期で大発生する周期キシヤスデ(節足動物、倍脚類、ババヤスデ科) *Parafontaria laminata armigera*で1992年10月、八ヶ岳山麓(山梨県清里)において約3000匹を採集した(18~20)。採集したヤスデから附着物質および中性脂質を除去するため直ちにアセトンで洗浄し、乾燥重量にして2.5kgを得た。このものを粉碎した後、5倍容のクロロホルム-メタノール(C-M、2:1、および1:1、以下断らない限り容比を示す)でそれぞれ2回抽出を行った。ろ過後、全てのろ液を合して溶媒を除去した。

### 2.2 アルカリけん化法によるグリセロリン脂質の除去

上記の抽出物に250mlのメタノールと250mlの1N水酸化カリウム溶液(メタノール:水、95:5)を加えて37°Cで6hr反応させた。反応液に2N HClを加えてpH1に調整し、室温に1hr放置した後、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倍量のアセトンを加えて10.5gの不溶性物質(スフィンゴ脂質画分)を得た。

### 2.3 スフィンゴエタノールアミンの単離

#### 2.3.1 セファデックスイオン交換カラムクロマトグラフィーによるスフィンゴリン脂質画分の調製

スフィンゴ脂質画分よりスフィンゴリン脂質画分の調製には、2種類のイオン交換性を有するセファデックスカラムクロマトグラフィーを行った(21、22)。クロロホルム-メタノール-水(C-M-

W、30:60:8)に懸濁したQAE-Sephadex A-25 (OH<sup>-</sup>型、ベッド容積450ml)を充填したカラムに同溶媒に溶解した10.5gのスフィンゴリン脂質画分を注加した。カラム容積の5倍量のC-M-W (30:60:8)、2倍量のメタノールおよび5倍量の0.45M 酢酸アンモニウム-メタノール溶液を順次流して溶出を行った。酢酸アンモニウム-メタノール溶液溶出画分を濃縮後、透析して得たものを、さらにDEAE-Sephadex A-25 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>型、ベッド容積300ml)カラムクロマトグラフィーで分画した。カラムからの溶出溶媒は、上述のQAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーと同様のものを用い、最初のC-M-W (30:60:8)溶出画分より220mgのスフィンゴリン脂質画分を得た。

### 2.3.2 ケイ酸カラムクロマトグラフィーによるスフィンゴエタノールアミンの精製

C-M-W (80:20:1)で懸濁したイヤトロビーズを充填したカラム (2 x 120cm) に上記のスフィンゴリン脂質画分を同溶媒に溶解して注加した。カラムからの溶出はC-M-W (80:20:1, 880ml~50:50:5, 1000ml)の濃度勾配法を用いた。溶出液は5mlづつ分取して薄層クロマトグラフィー (展開剤: クロロホルム-メタノール-水 (65:35:6) およびクロロホルム-メタノール-酢酸-水 (100:20:12:5) によってDittmer 試薬 (リン) および Ninhydrin 試薬 (アミノ基) で検し、両試薬に陽性の画分を集め溶媒を留去した。

### 2.4 塩酸による加水分解

スクリーキャップ付き試験管に試料約1mgをとり、これに0.5mlの1N HClを加えて、100°Cで2hr加熱した。反応終了後、n-ヘキサンで脂肪酸を抽出除去し、残液を濃縮乾固した。残渣を2分して、シリカゲル薄層クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析計に供した。薄層クロマトグラフィーは、展開剤として2-プロパノール-酢酸-28%アンモニア-水 (5:2:4:3)を用い(23)、ガスクロマトグラフィー質量分析はトリメチルシリル誘導体として分析した(24)。

### 2.5 ホスホリパーゼC (EC 3.1.4.3) による加水分解

スクリーキャップ付き試験管に試料約1mgをとり、これに0.05M Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5) 0.2 ml、2 x 10<sup>-2</sup>M CaCl<sub>2</sub>溶液0.1mlおよびエチルエーテル0.2mlを加えてよく振盪し、上記緩衝液で希釈した酵素液0.1ml (*Cl. perfringens*より調製、酵素タンパク500 μgを含む)を添加して、37°Cで24hrインキュベートした。反応終了後、2mlのC-M (2:1)を加えて混合し、2層に分配した。上層を濃縮し、少量の水に溶かしてイオン交換カラム (Amberlite CG-120、H<sup>+</sup>型 0.5cm x 1cm)に注入し、5mlの水で溶出した。全溶出液を濃縮乾固後、トリメチルシリル誘導体としてガスクロマトグラフィー分析に供した。下層のクロロホルム層は濃縮後、薄層クロマトグラフィー (展開剤、C-M 90:10; 検出試薬、ヨ-素蒸気および50%硫酸)で検した(25)。

### 2.6 脂肪酸成分の分析

試料500 μgに0.3mlの1N メタノール性塩酸を加えて封管し、3hr、100°Cで加熱した。生成した脂肪酸のメチルエステルを0.5mlのn-ヘキサンで3回抽出し、ガスクロマトグラフィーによる分析に供した。

### 2.7 長鎖塩基成分の分析

試料2mgに0.5mlのメタノール性塩酸 (濃塩酸、8.6ml; 水、0.4ml; メタノール、41mlの混合溶液)を加えて封管し、4hr、75°Cで加熱した。生成した脂肪酸エステルをヘキサンで抽出除去した後、残液を窒素気流下で濃縮乾固し、それに0.6mlの0.1N NaOH、1mlのメタノール、2mlのクロロホルムを加えて混合した。下層のクロロホルム層を濃縮乾固し、トリメチルシリル誘導体としてガスクロマトグラフィー分析に供した(26)。

### 2.8 赤外線吸収スペクトル分析

臭化カリウムの錠剤法で、Shimadzu IR-400赤外分光光度計を用いて測定した。

### 3 結果および考察

#### 3.1 キシャヤステのスフィンゴ脂質

キシャヤステの全組織から得たC-M抽出物をアルカリけん化してスフィンゴ脂質画分 (10.5g) を得た。褐色の粉末状であるが、これを既に確立化している下等動物複合脂質の系統的分画法に準じて2種類のセファデックスイオン交換カラムクロマトグラフィーによって、中性スフィンゴ糖脂質画分 (540mg)、酸性スフィンゴ糖脂質画分

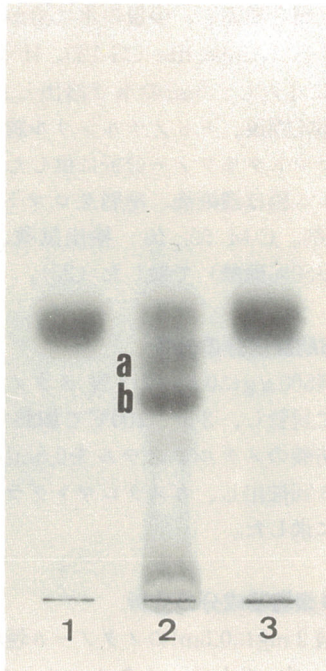


Fig.-1 Thin layer chromatogram of the phosphosphingolipid fraction from the millipede, *Parafontaria laminata armigera*.

Lane 1, authentic sphingoethanolamine (ceramide phosphoethanolamine) isolated from the green bottle fly, *Lucilia caesar*; Lane 2, phosphosphingolipid fraction fractionated by QAE- and DEAE-Sephadex column chromatography; Lane 3, sphingoethanolamine isolated from the millipede, *P. l. armigera* by Iatrobeds column chromatography. The plate was developed with chloroform-methanol-water (65:35:6,v/v). The spots were visualized with ninhydrin reagent. Neither (a) nor (b) were sphingolipids.

(219mg) およびスフィンゴリン脂質画分 (220 mg) に分画した。そのうちのスフィンゴリン脂質画分を、さらに、ケイ酸カラムクロマトグラフィー (濃度勾配溶出方法) により Dittmer および Ninhydrin の両試薬に陽性反応を示す3つの画分 (Fr.1、Fr.2 および Fr.3) に分けた。収量は、Fr.1、36.6mg; Fr.2、27.1mg; Fr.3、54.4mgであり、いずれも淡黄色の粉末状であった。一方、前2者の中性および酸性スフィンゴ糖脂質画分については、現在研究中であるが、今までのところ中性スフィンゴ糖脂質は、節足動物に特徴的な arthro 系列の糖脂質であること、さらに、新型糖脂質として  $\text{Man } \beta 1-4(\text{Fuc } \alpha 1-3)\text{Glc } \beta 1\text{-Ceramide}$  が存在すること等を明らかにしている (27)。

#### 3.2 キシャヤステのスフィンゴエタノールアミン

単離した Fr.1、Fr.2 および Fr.3 を薄層クロマトグラフィーで検したところ、いずれも単一のスポットとして検出されることより、極めて純度の高いことが判った (Fig.-1)。それぞれの赤外線吸収スペクトル分析を行ったところ、Fr.1より得たスペクトルのみが、既報のスフィンゴエタノールアミンのものと完全に一致した (Fig.-2) (13)。一方、Fr.2 および Fr.3 のスペクトルは、いずれもスフィンゴ型脂質の特徴的な吸収であるアミド結合に由来する吸収 ( $1650\text{cm}^{-1}$  および  $1550\text{cm}^{-1}$ ) が、Fr.1のそれらに比較して極めて弱く、グリセリルエーテル型リン脂質 (リソ型) の可能性が示唆されたため (28)、以後の分析は行わなかった。

#### 3.3 セラミド、ホスホエタノールアミンおよびエタノールアミンの同定

##### 3.3.1 塩酸による加水分解生成物

Fr.1 (スフィンゴエタノールアミン) の塩酸による加水分解物をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで調べたところ、標準のホスホエタノールアミンおよびエタノールアミンと同一の移動度を示す Ninhydrin 試薬に陽性のスポットを検出した (Fig.-3)。さらに、ビス (トリメチルシリル) アセトアミドによりトリメチルシリル誘導体にしてガスクロマトグラフィー質量分析計に注入した。ガ

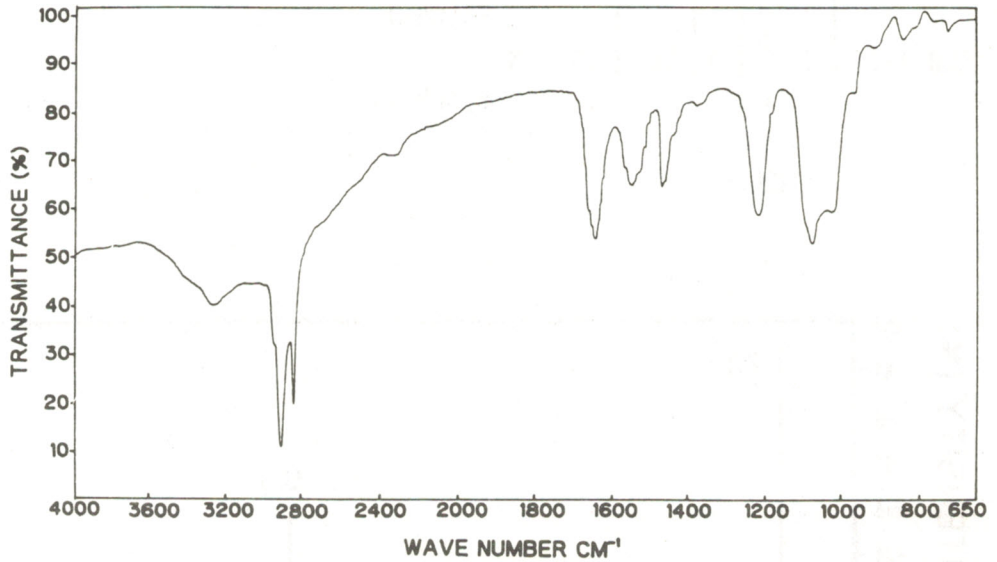


Fig.-2 Infrared spectrum of sphingoethanolamine from the millipede, *P. l. armigera*, pressed in KBr.

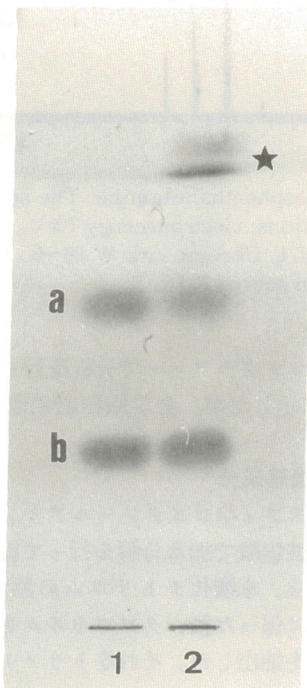


Fig.-3 Thin layer chromatogram of the acidic hydrolysates of sphingoethanolamine. Lane 1, a mixture of authentic ethanolamine (a) and phosphoethanolamine (b) ; Lane 2, acidic hydrolysates of sphingoethanolamine. The plate was developed with 2-propanol-acetic acid-28% ammonia-water (5 : 2 : 4 : 3, v/v). The spots were visualized with ninhydrin reagent. Spots denoted by ★ was the remaining unreactive sphingoethanolamine.

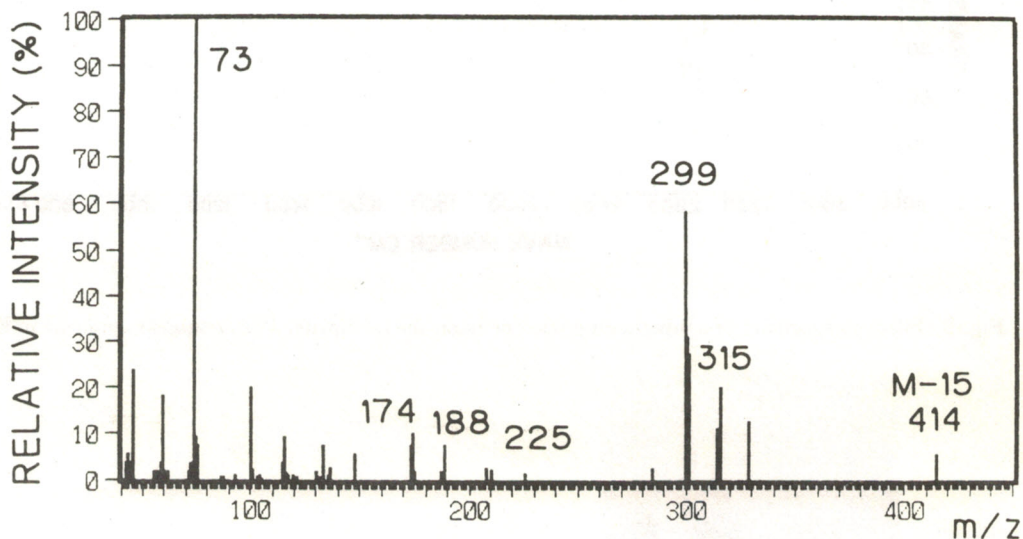
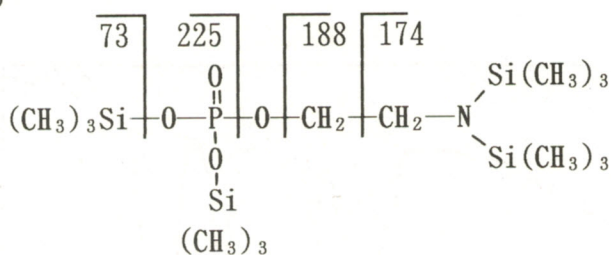


Fig.-4 Mass spectrum of trimethylsilyl ether derivative of phosphoethanolamine. The spectrum was recorded on Shimadzu LKB-9000 at the following conditions; electronenergy 70eV, accelerating voltage 3.5kV, ionizing current 60  $\mu$  A, column (1% OV-1, Chromosorb W 60~80 mesh, 2m x 3mm) temperature 140°C, molecular separator 170°C, ion source 200°C.

スクロマトグラム上のピークは1つで、その質量スペクトルは標準のホスホエタノールアミンのそれと完全に一致した (Fig.-4)。

### 3.3.2 ホスホリパーゼCによる加水分解生成物

Fr.1 (スフィンゴエタノールアミン) の酵素による加水分解生成物より、クロロホルム可溶性成分としてセラミド (Fig.-5) を、水溶性成分としてホスホエタノールアミンを同定した。

### 3.4 脂肪酸成分

Fr.1 (スフィンゴエタノールアミン) をメタノール性塩酸で加水分解を行って得られる分解成績体からn-ヘキサンを用いて脂肪酸メチルを分取し、

ガスクロマトグラフィーで分析を行った。結果をTable-1に示したが、全て飽和直鎖脂肪酸であった。

### 3.5 長鎖塩基成分

Fr.1 (スフィンゴエタノールアミン) を水性メタノール性塩酸で加水分解を行って得られる分解成績体から、水酸化ナトリウムの添加でpHをアルカリ側に保った後、クロロホルムを加えて長鎖塩基成分を抽出した。それをトリメチルシリル誘導体にした後、ガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、Fig.-6に示す様にガスクロマトグラムから7種類の成分 (Peak 1~7) が存在することを認めた。それぞれの質量スペクトルに帰属



Fig.-5 Thin layer chromatogram of the ceramide produced from *P. l. armigera* sphingoethanolamine after hydrolysis by *Cl. perfringens* phospholipase C. Lane 1, authentic ceramide obtained from sphingoethanolamine of the green bottle fly, *L. caesar*; Lane 2, ceramide obtained from sphingoethanolamine of the millipede, *P. l. armigera*. The plate was developed with chloroform-methanol (90:10, v/v). The spots were visualized with 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

の明らかなフラグメントとして[M-15]<sup>-</sup>: M-CH<sub>3</sub>、m/z 132: [-HCNH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] および m/z 103: [-H<sub>2</sub>COSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] が認められるので、これらの7成分はいずれもスフィンゲニン同族体である。Peak2、4、6は標準試料のそれと保持時間および質量スペクトルが一致することより、heptadeca-, octadeca-, nonadeca-4-sphingenineであると決定した。Peak1、3、5、7はそれぞれPeak2、4、6およびeicosa-4-sphingenineの質量スペクトルに一致するが、いずれも保持時間に差異が生じていることから、枝分かれの4-

Table-1 Fatty acid composition of sphingoethanolamine from the millipede, *P. l. armigera*. The gas chromatography was carried out using the following conditions; column, HiCap-CBPS 5 (25m, Shimadzu), temp., programmed at 2°C/min from 180 to 240°C. Data are expressed as percent of total methyl esters.

Fattyacid	%
C15:0	1.6
C16:0	35.8
C17:0	10.5
C18:0	13.4
C19:0	1.7
C20:0	3.4
C21:0	1.7
C22:0	13.5
C23:0	6.0
C24:0	5.3
unknown	7.1

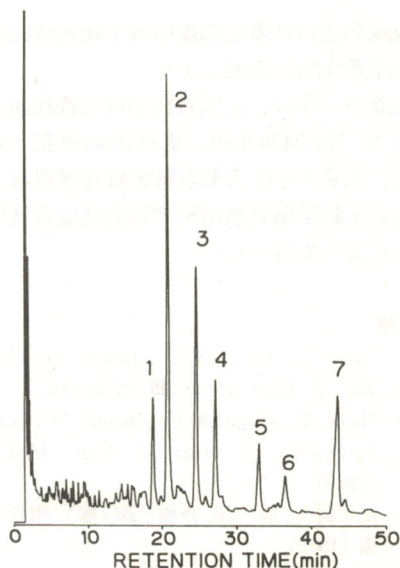


Fig.-6 Gas chromatogram of trimethylsilyl derivatives of long-chain bases of sphingoethanolamine from the millipede, *P. l. armigera*. Peaks 1, 3, 5 and 7 are presumably branched heptadeca-, octadeca-, nonadeca- and eicosa-4-sphingenines; Peaks 2, 4 and 6 are heptadeca-, octadeca- and nonadeca-4-sphingenines, respectively. The gas chromatography was carried out using the following conditions; column, HiCap-CBPS 5 (25m), temp., programmed at 2°C/min from 200 to 240°C.

sphingenine 同族体であろうと推定できる。

#### 4 まとめ

節足動物、倍脚類の周期キジャステのスフィンゴ脂質中にスフィンゴエタノールアミンの存在することを認めた。節足動物の9綱の中で研究が進んでいる昆虫類および甲殻類では、昆虫類からスフィンゴエタノールアミン、甲殻類からホスホ脂質が見いだされている。今回、倍脚類にスフィンゴエタノールアミンの存在することが見いだされたことは、節足動物の中で倍脚類と昆虫類との間に進化の類似性を示唆するものとして興味もたれる。ヤステにスフィンゴエタノールアミンの存在することを明らかにしたのはこれが最初である。

御校閲を頂いた東京都臨床医学総合研究所所長の永井克孝先生に深謝します。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金（総合研究A：No.04304049、重点領域研究：No.05274212）、平成5年度文部省特定研究経費および財団法人日本科学協会笹川科学研究助成金（早田知恵子）によって行った。

#### 文 献

- (1) Hori, T., Itasaka, O., Inoue, H., Akai, M., *Jap. J. Exp. Med.*, **35**, 81 (1965)
- (2) Hori, T., Itasaka, O., Inoue, H., Gamo, M., Arakawa, I., *Jap. J. Exp. Med.*, **36**, 85 (1966)
- (3) 山川民夫, 原一郎, 舟橋三郎 (編), 脂質1, 共立出版 (1970)
- (4) Hori, T., Horiguchi, M., Hayashi, A. (Eds.), *Biochemistry of Natural C-P Compounds*, Japanese Association for Research on the Biochemistry of C-P Compounds, Maruzen Ltd., Kyoto (1984)
- (5) Kunsman, J.E., Katz, I., Keeney, M., *Abstr. Amer. Chem. Soc.*, 152nd meeting, New York, C-255 (1966)
- (6) LaBach, J.P., White, D.C., *J. Lipid Res.*, **10**, 528 (1969)
- (7) Rizza, V., Toker, A.N., White, D.C., *J. Bacteriol.*, **101**, 84 (1970)
- (8) Dawson, R.M.C., Kemp, P., *Biochem. J.*, **105**, 837 (1967)
- (9) Crone, H.D., Bridges, R.G., *Biochem. J.*, **89**, 11 (1963)
- (10) Hori, T., Itasaka, O., Sugita, M., Arakawa, I., *J. Biochem.*, **64**, 123 (1968)
- (11) Dawson, R.M.C., Kemp, P., *Biochem. J.*, **106**, 319 (1968)
- (12) Subrahmanyam, D., Moturu, L.B., Rao, R.H., *Lipids*, **6**, 867 (1971)
- (13) Hori, T., Sugita, M., Arakawa, I., *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 211 (1968)
- (14) 保田茂次郎, 油化学, **16**, 596 (1967)
- (15) Itasaka, O., Hori, T., Uno, A., Iwamori, M., *J. Biochem.*, **73**, 191 (1973)
- (16) Muehlenberg, B.A., Sribney, M., Duffe, M.K., *Can. J. Biochem.*, **50**, 166 (1972)
- (17) 山田真弓, 西田誠, 丸山工作, 進化系統学, 裳華房 (1985)
- (18) 吉田利男, 林秀剛, 藤山静雄, *Edaphogia*, **34**, 21 (1985)
- (19) 吉田利男, 菅平研報, **8**, 83 (1987)
- (20) 石井実, 動物たちの地球 (週刊朝日百科), **1** (7), 226 (1991)
- (21) Hori, T., Sugita, M., Ando, S., Tsukada, K., Shiota, K., Tsuzuki, M., Itasaka, O., *J. Biol. Chem.*, **258**, 2239 (1983)
- (22) Sugita, M., Itonori, S., Inagaki, F., Hori, T., *J. Biol. Chem.*, **264**, 15028 (1989)
- (23) Snyder, W.R., Law, J.H., *Lipids*, **5**, 800 (1970)
- (24) Karlsson, K.-A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **39**, 847 (1970)
- (25) Hori, T., Arakawa, I., Sugita, M., Itasaka, O., *J. Biochem.*, **64**, 533 (1968)
- (26) Ando, S., Yu, R.K., *J. Biol. Chem.*, **254**, 12224 (1979)
- (27) 早田知恵子, 仲谷文貴, 吉田利男, 堀太郎, 杉田陸海, 第32回油化学討論会・研究発表会講演要旨集 (豊中市) p.190 (1993)
- (28) Snyder, F. (Ed.), *Ether Lipids*, Academic Press, New York (1972)