

## 報 文

イトメ, *Tylorhynchus heterochaetus*, (環形動物) の中性  
及び両性イオン型スフィンゴ糖脂質杉田 陸海\*・牧野 具加\*・早田 知恵子\*・鈴木 實\*\*・  
鈴木 明身\*\*・堀 太郎\*\*\*・三輪 祥代\*・仲谷 文貴\*

\* 滋賀大学教育学部化学教室 (〒520 大津市平津 2-5-1)

\*\* 東京都臨床医学総合研究所生体膜教室 (〒113 文京区本駒込 3-18-22)

\*\*\* 滋賀文化短期大学 (〒527 八日市市布施町 29)

Neutral and Amphoteric Glycosphingolipids from Annelida  
(Lugworm, *Tylorhynchus heterochaetus*)Mutsumi SUGITA\*, Tomoka MAKINO\*, Chieko HAYATA\*, Minoru SUZUKI\*\*,  
Akemi SUZUKI\*\*, Taro HORI\*\*\*, Sachiyo MIWA\*, and Fumiki NAKATANI\*\* Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University  
(2-5-1, Hiratsu, Otsu-shi, 〒520)\*\* Department of Membrane Biochemistry, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science  
(3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo, 〒113)

\*\*\* Shiga Junior College of Cultural Studies (29, Fuse, Yokaichi-shi, 〒527)

Gal  $\beta$ 1-Cer (CMS<sub>3</sub>) and cholinephosphoryl  $\rightarrow$  6 Gal  $\beta$ 1-Cer (PGL) were found as the main neutral and amphoteric glycosphingolipids from the whole tissue of the lugworm, *Tylorhynchus heterochaetus*. These lipids were purified by successive column chromatography on DEAE- and QAE-Sephadex A-25, Florisil and silicic acid (Iatrobeds), and identified by gas-liquid chromatography, methylation analysis, enzymatic hydrolysis, chromium trioxide oxidation, hydrogen fluoride degradation and positive-ion fast atom bombardment mass spectrometry.

The ceramide moieties of both glycolipids were virtually the same : fatty acids were saturated C<sub>16</sub>-, C<sub>17</sub>- and C<sub>18</sub>-acids ; sphingoids were octadeca-4-sphingenine and octadeca-4,8-sphingadienine. The structural similarity of the ceramide moieties suggests PGL biosynthesis from CMS<sub>3</sub>.

In addition, their thin-layer chromatographic behaviors and the results of sugar analysis suggest that the structures of at least three minor components of the ceramide mono-, di- and trisaccharide fractions are Glc-Cer, Man-Gal-Cer and Man-Gal-Gal-Cer, respectively.

## 1 緒 言

環形動物 (Annelida) は、動物系統分類学の上から節足動物 (Arthropoda) と軟体動物 (Mollusca) の中間に位置するとされ、現在、原始環虫綱 (Archiannelida)、多毛綱 (Polychaeta)、貧毛綱 (Oligochaeta)、ヒル綱 (Hirudinea) 及びユムシ綱 (Echiuroidea) の5綱

略語 : CMS, ceramide monosaccharide ; CDS, ceramide disaccharide ; CTS, ceramide trisaccharide ; PGL, phosphocholine-containing glycolipid.

連絡者 : 杉田陸海

に分類されている<sup>1),2)</sup>。これらの中で、我々は既に、貧毛綱に属するヒトツモンミズ, *Pheretima hilgendorfi* の複合糖脂質の主な構造は neogala 系 (Gal  $\beta$ 1-6 Gal) であること<sup>3)</sup>、また、新しくホスホコリンを含有する2種類の両性イオン型糖脂質の存在することを明らかにし、それらの化学構造を決定している<sup>4)</sup>。このように環形動物の糖脂質には、他の前口動物由来の糖脂質と比べて、極めて特異な化学構造を有するものが含まれていることから、糖脂質の特異な領域を成していると考えている。

本研究は、多毛綱に属するイトメ, *Tylorhynchus*

*heterochaetus* の複合糖脂質を精査して系統発生と生物分類の関係を調べる目的で行ったものであり、本論文では中性糖脂質と両性イオン型糖脂質について述べる。

## 2 実 験

### 2.1 中性及び両性イオン型糖脂質画分の調製

イトメは環形動物門 (Phylum Annelida), 多毛綱 (Class Polychaeta), 游在目 (Order Errantia), ゴカイ科 (Nereidae) に属している。約 100 g (アセトン脱水後の重量) のイトメ (三重県津市御殿場で購入) を細粉砕した後, 2 L のクロロホルム-メタノール, 2 : 1 (vol/vol) で 2 回, 1 : 1 (vol/vol) で 1 回の抽出を行った。この抽出物を弱アルカリ加水分解及び弱酸処理して, アシル型, アルケニル型グリセロ脂質を除去した後, アセトン粉末として 2.2 g を得た (乾燥重量当たり 2.2%)。このものを, 既に確立している前口動物複合脂質の系統的分離法に準じて QAE-及び DEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィーを行って, 中性・両性イオン型 (700 mg), 酸性 (200 mg) 及び極性脂質画分 (250 mg) に分画した<sup>5),6)</sup>。さらに, これらの 3 画分中の中性・両性イオン型脂質画分をアセチル化し, フロリシカラムで分画後, それぞれ脱アセチル化して, 中性糖脂質画分 (25 mg) 及び両性イオン型糖脂質画分 (150 mg) を得た<sup>7)</sup>。

### 2.2 中性及び両性イオン型糖脂質画分のケイ酸 (Iatrobeads) カラムクロマトグラフィーによる分画

中性及び両性イオン型糖脂質画分をそれぞれ Iatrobeads (6 RS-8060, ヤトロン社製) カラムクロマトグラフィーでクロロホルム-メタノール-水の混合溶媒による濃度勾配溶出法を用いて分画した。すなわち, 中性糖脂質画分は 1.0×60 cm カラムを用いてクロロホルム-メタノール-水の 80 : 20 : 1, vol/vol/vol, 480 mL ~ 50 : 50 : 5,500 mL で, 両性イオン型糖脂質画分は 2.0×120 cm カラム, 30 : 70 : 7,880 mL ~ 10 : 90 : 13, 1 L で溶出を行った。

### 2.3 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層プレートは Merck 社製の Silica gel 60 を用いた。展開剤はクロロホルム-メタノール-水 (60 : 40 : 10, 30 : 30 : 10, vol/vol/vol), 2-プロパノール-アンモニア-水 (75 : 5 : 10, vol/vol/vol), 1-ブタノール-酢酸-水 (40 : 20 : 10, vol/vol/vol) を使用し, 展開後の発色はオルシノール-硫酸 (糖), Dittmer 試薬 (リン)<sup>8)</sup>, ニンヒドリン試薬 (アミノ基), Dragendorff 試薬 (コリン)<sup>9)</sup>, ローダミン 6 G 試薬 (脂質) によった。

### 2.4 赤外スペクトル (IR)

Shimadzu IR-400 赤外分光光度計により臭化カリウム錠剤法で測定した (試料 : 500 µg, 臭化カリウム : 40

mg)。

### 2.5 ガスクロマトグラフィー (GC)

糖組成は TMS-メチルグリコシド, 脂肪酸組成はメチルエステル, 長鎖塩基組成は TMS-誘導体として GC 分析した。分析はすべて Shimadzu GC-9 A で行い, 分析カラムは 0.2 mm×25 m の 0.25 µm 5% フェニルメチルシリコン化学結合型シリカキャピラリー (Shimadzu HiCap-CBP 5) を使用した。分析温度はそれぞれ次のように設定した。糖 (160 → 230°C, 2°C/min), 脂肪酸 (140 → 240°C, 180 → 240°C, 2°C/min), 長鎖塩基 (200 → 230°C, 2°C/min)。

### 2.6 陽イオン FAB-MS 分析

JEOL HX-110 MS スペクトロメーター/DA 5000 コンピューターシステムにより行った。マトリックスとして *m*-ニトロベンジルアルコールを用い, 加速電圧 8.0 kV, 一次粒子 (Xe<sup>0</sup>) 6.0 kV で測定した。

### 2.7 両性イオン型糖脂質の酸加水分解

2 mg の試料に 1 mL の 6 N HCl を加え, 100°C で 3 h 加熱した後, ヘキサンで脂肪酸を抽出除去し, 水溶性部を減圧濃縮した。得られた残分を少量の水に溶解して TLC 分析を行った。

### 2.8 両性イオン型糖脂質のフッ化水素による脱ホスホコリン残基

プラスチック製試験管中で 10 mg の試料を 0.5 mL のジメチルスルホキシドに超音波で溶解した後, 3.5 mL のフッ化水素を加え, 15°C で 20 h 反応させた<sup>4)</sup>。反応後, 流水透析した膜内液を減圧濃縮して得られた残分をケイ酸カラムクロマトグラフィー (1.2×30 cm) で精製した。溶出はクロロホルム-メタノール-水の混合溶媒を用いて, 濃度勾配法 (80 : 20 : 1 ; 220 mL ~ 50 : 50 : 5 ; 250 mL, vol/vol/vol) で行った。

### 2.9 アノマー配置の決定法

#### 2.9.1 β-ガラクトシダーゼによる加水分解

10 µg の試料を 100 µg のタウロデオキシコール酸ナトリウムを含む 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.5) 50 µL に溶かし, 50 µL の同緩衝液で希釈したナタマメ由来の β-ガラクトシダーゼ (5 U/250 µL, 生化学工業) を加えて, 37°C で 24 h 反応させた。反応後, 500 µL のクロロホルム-メタノール (2 : 1, vol/vol) を加えて二層に分配した。下層を濃縮した後, 少量のクロロホルム-メタノール (2 : 1) に溶解して TLC 分析を行った<sup>3)</sup>。

#### 2.9.2 三酸化クロムによる酸化

500 µg の試料と内部標準物質としてイノシトールを混合してアセチル化した後, 0.5 mL の氷酢酸と 50 mg の三酸化クロムを加え, 40°C, 15 min 超音波処理した。反応後, 3 mL の水と 3 mL のクロロホルムを加えて二層に分配した下層を濃縮乾固し, 常法によってアルジトールアセートとして GC 分析した<sup>10)</sup>。

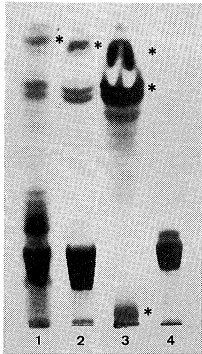
### 2.10 過ヨウ素酸-過マンガン酸酸化による長鎖塩基の二重結合位置の決定

1 mg の長鎖塩基に 0.4 mL の *t*-ブチルアルコール、1.2 mL の 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.54 mL の酸化溶液 (10 mg の NaIO<sub>4</sub>、0.8 mg の KMnO<sub>4</sub> を 0.34 mL の水に溶解) を加え、室温で 3 h かくはんした。反応後、NaHSO<sub>3</sub> で酸性にし、ヘキサンで抽出した。ヘキサン層を窒素気流下で濃縮乾固した後、少量のヘキサンに溶解して GC 分析を行った<sup>11)</sup>。

## 3 結果及び考察

### 3.1 イトメの糖脂質

イトメの弱アルカリ処理に安定な脂質画分の TLC を Fig.-1 (lane 1) に示したが、移動度の大きいグループと小さいグループの二群に大別される糖脂質の存在が認められた。これらの中から酸性及び極性脂質(ホスホエタノールアミンを含有した脂質)を除去するため、QAE-セファデックス処理を行って得た中性脂質画分 (Fig.-1, lane 2) を、さらにアセチル化してフロリシルで分画



Lane 1, alkali-stable lipid fraction of lugworm ; lane 2, neutral and amphoteric glycolipid fraction fractionated by QAE-Sephadex column chromatography ; lane 3, neutral glycolipid fraction eluted with dichloroethane-acetone (1 : 1, vol/vol) and dichloroethane-methanol (9 : 1, vol/vol) using Florisil column chromatography ; lane 4, amphoteric glycolipid fraction eluted with dichloroethane-methanol (3 : 1, vol/vol) and dichloroethane-methanol-water (2 : 8 : 1, vol/vol/vol) using Florisil column chromatography. The separation was shown on a TLC glass plate of silica gel 60 (E. Merck) developed in chloroform-methanol-water (60 : 40 : 10, vol/vol/vol), and the spots were visualized with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent. Spots denoted by asterisks are not glycolipids.

**Fig.-1** Thin layer chromatogram of neutral and amphoteric glycolipid fraction obtained from lugworm, *Tylorhynchus heterochaetus*.

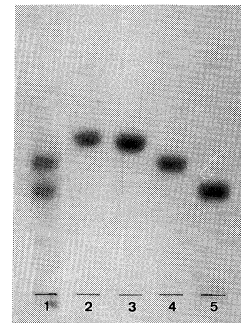
した。ジクロロエタン-アセトン (1 : 1, vol/vol) 及びジクロロエタン-メタノール (9 : 1, vol/vol) 溶出画分に移動度の大きいグループを、ジクロロエタン-メタノール (3 : 1, vol/vol) 及びジクロロエタン-メタノール-水 (2 : 8 : 1, vol/vol/vol) 溶出画分に移動度の小さいグループを得た (Fig.-1 lanes 3, 4)。

### 3.2 中性糖脂質の単離

フロリシル分画のジクロロエタン-アセトン (1 : 1, vol/vol) 及びジクロロエタン-メタノール (9 : 1, vol/vol) 溶出画分に含まれる移動度の大きいグループの糖脂質の精製を行うため、Iatrobeads を用いて濃度勾配溶出法によって分画し、ceramide mono-(CMS), di-(CDS) 及び trisaccharide (CTS) に相当する画分を得た。さらに、CMS 画分については 2-プロパノール-アンモニア-水 (75 : 5 : 5, vol/vol/vol) を溶出溶媒とした Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行って、4 種類の CMS (CMS<sub>1</sub>, CMS<sub>2</sub>, CMS<sub>3</sub> 及び CMS<sub>4</sub>) を単離した (Fig.-2)。一方、CDS と CTS 画分についてはいずれも極めて微量であったために構成糖分析のみ行った (後述)。

### 3.3 CMS (CMS<sub>1</sub>, CMS<sub>2</sub>, CMS<sub>3</sub> 及び CMS<sub>4</sub>) の構造

単離した 4 種類の CMS のうち CMS<sub>1</sub> と CMS<sub>2</sub> は極めて低収量であったため、構成糖及び脂肪酸組成のみを



Lane 1, CMS fraction obtained from neutral glycolipid fraction (in Fig.-1, lane 3), which was fractionated by Iatrobeads column chromatography using a gradient elution system of chloroform-methanol-water ; lanes 2, 3, 4 and 5, isolated CMS<sub>1</sub>, CMS<sub>2</sub>, CMS<sub>3</sub> and CMS<sub>4</sub>, respectively. The spots were visualized with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent after developing in 2-propanol-ammonia-water (75 : 10 : 5, vol/vol/vol).

**Fig.-2** Thin layer chromatograms of ceramide monosaccharides purified by silicic acid (Iatrobeads) column chromatography using a 2-propanol-water-ammonia system as the eluting solvent.

**Table-1** Fatty acid and sphingoid compositions of the lugworm glycolipids, neutral (CMS) and amphoteric (PGL).

Fatty acid <sup>a</sup>	CMS <sub>1</sub>	CMS <sub>2</sub>	CMS <sub>3</sub>	CMS <sub>4</sub>	PGL
16 : 0	54.7		82.3		82.6
17 : 0	22.0		8.5		8.5
18 : 0	23.3		9.2		8.9
h <sup>b</sup> 16 : 0		67.2		58.8	
h <sup>b</sup> 17 : 0		32.8		41.2	
Sphingoid <sup>a,d</sup>	CMS <sub>3</sub>		CMS <sub>4</sub>	PGL	
Δ <sup>4</sup> 18 : 1 <sup>c</sup>	57.3			57.8	
Δ <sup>4,8</sup> 18 : 2 <sup>c</sup>	42.7		15.5	42.4	
Uncharacterized <sup>e</sup>			84.5		

<sup>a</sup> Expressed as percentage of total fatty acids and sphingoids.

<sup>b</sup> 2-Hydroxyfatty acid.

<sup>c</sup> Dihydroxysphingoid.

<sup>d</sup> Sphingoid compositions of CMS<sub>1</sub> and CMS<sub>2</sub> were not analyzed for the lack of materials.

<sup>e</sup> Under investigation.

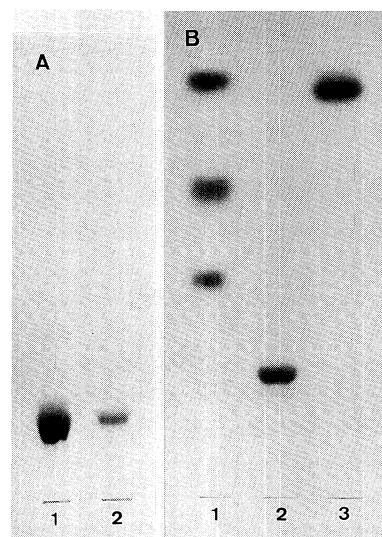
調べた。構成糖の GC 分析の結果、CMS<sub>1</sub> と CMS<sub>2</sub> からはグルコース、CMS<sub>3</sub> と CMS<sub>4</sub> からはいずれもガラクトースが検出されることから、CMS<sub>1</sub> と CMS<sub>2</sub> は glucosylceramide、CMS<sub>3</sub> と CMS<sub>4</sub> は galactosylceramide と推定できた。それぞれのアノマー配置の決定を酵素的加水分解及びクロム酸化法によって行ったところ、すべて β-結合であった。セラミドの構成成分を Table-1 に示したが、脂肪酸は C<sub>16:0</sub> 及びその 2-hydroxy 体が主成分であった。一方、CMS<sub>3</sub> 及び CMS<sub>4</sub> の長鎖塩基については、CMS<sub>3</sub> はほぼ等量の C<sub>18:1</sub> と C<sub>18:2</sub> より、また、CMS<sub>4</sub> は塩基成分の 85% を占める未同定塩基と C<sub>18:2</sub> より成っていた。現在、CMS<sub>4</sub> の未同定塩基の研究は続行中である。CMS<sub>3</sub> に見られる C<sub>18:1</sub> 及び C<sub>18:2</sub> の二重結合位置の決定は、長鎖塩基の過ヨウ素酸-過マンガン酸酸化によって生成する脂肪酸のメチルエステルの GC 分析による。

その結果、デカン酸 (C<sub>18:2</sub> の Δ<sup>8</sup> 由来) とミリスチン酸 (C<sub>18:1</sub> の Δ<sup>4</sup> 由来) を同定できたことから、C<sub>18:1</sub> と C<sub>18:2</sub> 長鎖塩基はそれぞれ octadeca-4-sphinganine 及び octadeca-4,8-sphingadienine と推定している。今までに種々のジェニン型長鎖塩基が見いだされているが、中でも octadeca-4,8-sphingadienine は海産動物由来の長鎖塩基成分として極めて含量高く存在することが報告されている<sup>12)~17)</sup>。イトメの CMS 画分は塩基性系展開剤 (2-プロパノール-アンモニア-水) を用いた TLC で 4 種類に分離するが、移動度の大きい 2 種類は glucosylceramide でそれぞれ構成脂肪酸の差異

(非ヒドロキシ及びヒドロキシ脂肪酸) で、また移動度の小さい 2 種類もいずれも galactosylceramide の脂肪酸組成の違いであると思われる。4 者の含有量においては、CMS<sub>1</sub>、CMS<sub>2</sub> が CMS<sub>3</sub>、CMS<sub>4</sub> に比して極めて少ないことや、ツリミズ、*Lumbricus terrestris* (環形動物、貧毛綱) の神経系のセラブロシドが glucosylceramide のみであるという報告から<sup>18)</sup>、多毛綱においても glucosylceramide は神経系に局在していることが推察でき、免疫化学的手法を用いる組織内分布の検索を検討している。

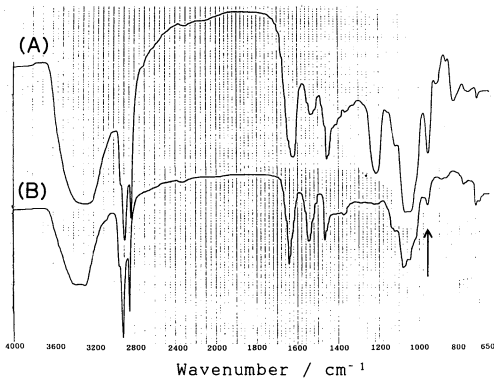
### 3.4 CDS 及び CTS 画分の構成糖分析

Iatrobeds カラムクロマトグラフィーで分画した CDS 及び CTS 画分は、いずれも極めて微量だったので、GC による構成糖分析のみ行った。両画分共に、ガラクトースとマンノースを構成糖とする糖脂質の存在が推定され、α、β-マンノシダーゼ処理の結果から、現在のところ糖の配列は Man-Gal-Cer 及び Man-Gal-Gal-Cer と推定している。特に、後者の糖脂質につい



Panel A : lane 1, amphoteric glycolipid fractionated by Florisil column chromatography (in Fig.-1, lane 4); lane 2, isolated PGL. Panel B : lane 1, a mixture of authentic ceramide mono-, di- and trisaccharides from the earthworm, *Pheretima hilgendorfi*<sup>3)</sup>; lane 2, isolated PGL (before HF treatment); lane 3, Dep-PGL (after HF treatment). The plates were developed in chloroform-methanol-water (60 : 40 : 10, vol/vol/vol). The spots were visualized with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent.

**Fig.-3** Thin layer chromatograms of isolated amphoteric glycolipid (PGL) and its degradation product (Dep-PGL) obtained with hydrogen fluoride.



In the infrared spectra, the band marked with an arrow at around  $960\text{ cm}^{-1}$  indicates the presence of the choline residue.

Fig.-4 Infrared spectra of PGL (A) and Dep-PGL (B).

では、貧毛綱(ヒトツモンミズ)にその存在を見だし、構造を  $\text{Man } \alpha 1-4 \text{ Gal } \beta 1-6 \text{ Gal } \beta 1-\text{Cer}$  と決定していることから<sup>3),19)</sup>、微量ではあるが、環形動物を特徴付ける新しい糖脂質シリーズの mannoneogala (マンネオガラ)系糖脂質と言えよう。

### 3.5 両性イオン型糖脂質の単離及び性状

フロリシル分画のジクロロエタン-メタノール(3:1, vol/vol)及びジクロロエタン-メタノール-水(2:8:1, vol/vol/vol)溶出画分に含まれる移動度の小さいグループはほとんど単一と思われる糖脂質で占められていたが(Fig.-3 A lane 1), さらに Iatrobeads カラムクロマトグラフィーで精製を行った(Fig.-3 A lane 2)。得られた物質の TLC 上での定性反応結果はローダミン 6 G, オルシノール-硫酸及び Dragendorff 試薬に対して陽性反応を, ニンヒドリン試薬には陰性反応を示した。特に, Dittmer 試薬に対しては, リン糖脂質に特徴的である弱陽性反応が観察された。また, IR スペクトル分析では  $960\text{ cm}^{-1}$  にコリンに起因する強い吸収が, さらに  $1220\text{ cm}^{-1}$  にリン酸の-OH 基,  $1620$  及び  $1540\text{ cm}^{-1}$  にアミド結合等に由来する吸収が認められた(Fig.-4 A)。以上の結果より, 本物質はコリン残基を分子内に有するセラミド型リン糖脂質(PGL と仮称)であることが推測できた。

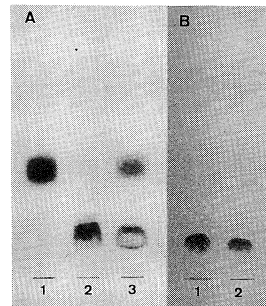
### 3.6 両性イオン型糖脂質(PGL)の構造

#### 3.6.1 酸加水分解による PGL の水溶性成分の推定

PGL を加水分解(6 N HCl,  $100^\circ\text{C}$ , 3 h)し, 単糖(ガラクトース), 糖リン酸(ガラクトース-6-リン酸)及びコリンに相当する水溶性の分解生成物を得た(Fig.-5)。

#### 3.6.2 フッ化水素による PGL の脱リン酸化成績体

特異的にリン化合物結合を分解除去する方法として汎



Panel A : lane 1, authentic galactose ; lane 2, authentic galactose 6-phosphate ; lane 3, acidic hydrolysate of PGL. Panel B : lane 1, authentic choline ; lane 2, acidic hydrolysate of PGL. The plates were developed with chloroform-methanol-water (30 : 30 : 10, vol/vol/vol) for A and with 1-butanol-acetic acid-water (40 : 20 : 10, vol/vol/vol) for B. The spots were visualized with orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  reagent for A and with Dragendorff's reagent for B.

Fig.-5 Thin layer chromatograms of the acidic hydrolysates of PGL.

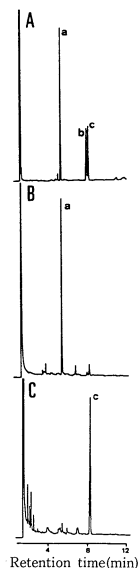
用されているフッ化水素処理を施した PGL (Dep-PGL) は, 標準として用いたヒトツモンミズやイトメの galactosylceramide ( $\text{CMS}_3$ , 3.3 参照) と同一の移動度を示し(Fig.-3 B), IR スペクトルにおいても  $960\text{ cm}^{-1}$  及び  $1220\text{ cm}^{-1}$  の吸収が消失して典型的なセレブロシドのスペクトルを示した(Fig.-4 B)。また, Dep-PGL の構成糖を TMS-メチルグリコシドとして GC 分析したところガラクトースのみを検出したことから, PGL はガラクトースにホスホコリン残基が結合した ceramide monosaccharide であることがわかった。さらに, Dep-PGL を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理してセラミドの生成が認められることから, ガラクトースのアノマー配置は  $\beta$  であることが決定できた。

#### 3.6.3 PGL におけるホスホコリン残基の結合位置

ガラクトースのホスホコリン残基が結合している位置の決定は, 全メチル化 Dep-PGL 及び全メチル化 PGL のフッ化水素処理成績体をアルジトールアセテートとして GC 分析し, 標準物の部分メチル化アルジトールアセテートの保持時間との比較から行った(Fig.-6)。前者から 1-Gal(2,3,4,6-tetra-O-methyl-1,5-di-O-acetylgalactitol) を, 後者からは 1,6-Gal(2,3,4-tri-O-methyl-1,5,6-tri-O-acetylgalactitol) を同定したことより, ホスホコリン残基はガラクトースの C-6 位に結合していることが判明した。

#### 3.6.4 PGL の脂肪酸及び長鎖塩基成分

Table-1 に示したように PGL の脂肪酸は  $\text{C}_{16:0}$  が, 長鎖塩基は  $\Delta^4$ -octadeca-4-sphinganine 及び  $\Delta^{4,8}$ ,



A, authentic disaccharide (Gal<sub>p</sub> 1-6 Gal<sub>p,f</sub>); B, permethylated Dep-PGL; C, dephosphorylated compound after permethylation of the intact PGL; a, 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-1,5-di-*O*-acetyl-galactitol (1-substituted Gal<sub>p</sub>); b, 2,3,5-tri-*O*-methyl-1,4,6-tri-*O*-acetyl-galactitol (1,6-Gal<sub>f</sub>); c, 2,3,4-tri-*O*-methyl-1,5,6-tri-*O*-acetyl-galactitol (1,6-Gal<sub>p</sub>).

Fig.-6 Gas chromatograms of partially methylated alditol acetates.

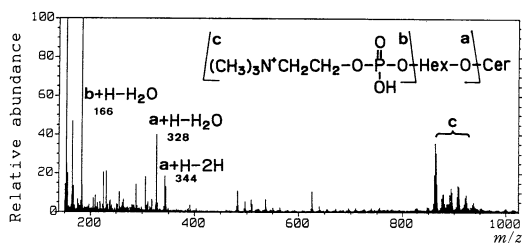


Fig.-7 Positive-mode FAB-MS spectrum of PGL.

-octadeca-4,8-sphingadienine が主要成分で、同動物の galactosylceramide (CMS<sub>3</sub>) に酷似しており CMS<sub>3</sub> より生合成されることが示唆された。

#### 3.6.5 PGL の陽イオン FAB-MS スペクトル

PGL の陽イオン FAB-MS スペクトルを Fig.-7 に示したが、分子イオン；主な分子種  $m/z$  863 (C<sub>16</sub>:0 脂肪酸-C<sub>18</sub>:2 長鎖塩基), 865 (C<sub>16</sub>:0-C<sub>18</sub>:1), 877 (C<sub>17</sub>:0-C<sub>18</sub>:2), 879 (C<sub>17</sub>:0-C<sub>18</sub>:1), 891 (C<sub>18</sub>:0-C<sub>18</sub>:2), 893 (C<sub>18</sub>:0-C<sub>18</sub>:2), ガラクトース←ホスホコリン残基フラグメント ( $m/z$  328, 344)<sup>4)</sup> 及びホスホコリン残基フラグメント ( $m/z$  166)<sup>4)</sup> の存在が認められた。

以上の結果から PGL の構造を choline phosphate→6 Gal<sub>p</sub> β 1-Cer と決定した。このタイプのリン糖脂質(両性イオン型糖脂質)の自然界における存在については、既に著者らによって最初に、貧毛綱のヒトツモンミズから<sup>4)</sup>, Noda らによって多毛綱のイワムシ *Marphysa sanguinea* から<sup>20)</sup> 報告されているが、現在のところ

環形動物に限られているようである。軟体動物及び節足動物のリン糖脂質には、ホスホエタノールアミン残基<sup>21)~24)</sup> やアミノエチルホスホン酸残基<sup>25)~28)</sup> を含有しているものが報告されているが、動物分類学上、両者の中間に位置付けられている環形動物には、それらに代わってホスホコリン残基を有するリン糖脂質が存在する。また、今までに環形動物にスフィンゴミエリンが存在するという報告がないことから、それに代わる機能性脂質として、この両性イオン型糖脂質に極めて強い関心が寄せられる。現在、機能性を探る手始めとして、この糖脂質の糖鎖認識プローブの開発を目指して、特異抗体の調製を行っている。

## 4 まとめ

環形動物の多毛綱に属するイトメの中性糖脂質は、ガラクトセプロシドが主成分であるが、グルコセプロシドやマンノースを含有する neogala 系脂質も微量ながら存在する。また、新型糖脂質として、その存在が報告され始めたホスホコリン残基を分子内に含む両性イオン型糖脂質も大量に存在することが認められた。現在までのところ、両性イオン型糖脂質の動物界での分布域は環形動物に限られているようであるが、環形動物のようにスフィンゴミエリンを含有しない動物における機能的相応性を考える上で極めて興味がある。

さらに、イトメの糖脂質の長鎖塩基成分の約 50 % が、 $\Delta^{4,8}$ -ジエニンで占められていることから、この動物においても海産動物種に言われている polyunsaturated sphingoid を多く含む傾向が現れているようである。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(重点領域研究 No. 04250101, No. 05274212)及び財団法人日本科学協会笹川科学研究助成(早田)によって行った。

(平成 5 年(1993 年) 5 月 31 日受理)

## 文 献

- 1) 山田真弓, 西田 誠, 丸山工作, “進化系統学”, 裳華房(1985) p. 176
- 2) 内田 亨, 山田真弓, 山口英二, 長尾 善, 加藤光次郎, 森川国康, “動物系統分類学”, 中山書店(1967) p. 8
- 3) 杉田陸海, 早田知恵子, 鈴木 實, 竹田忠統, 水野間智子, 牧野具加, 成島謙司, 堀 太郎, 油化学, 41, 568 (1992)
- 4) M. Sugita, H. Fujii, F. Inagaki, M. Suzuki, C. Hayata, T. Hori, *J. Biol. Chem.*, 267, 22595 (1992)
- 5) T. Hori, M. Sugita, S. Ando, K. Tsukada, K. Shiota, M. Tsuzuki, O. Itasaka, *J. Biol. Chem.*, 258, 2239 (1983)
- 6) M. Sugita, H. Nakae, T. Yamamura, Y. Takamiya, O. Itasaka, T. Hori, *J. Biochem.*, 98, 27 (1985)
- 7) T. Saito, S. Hakomori, *J. Lipid Res.*, 12, 257

- (1971)
- 8) J.C. Dittmer, R.L. Lester, *J. Lipid Res.*, **5**, 126 (1964)
  - 9) E. Stahl, P.J. Schorn, "Thin-Layer Chromatography", Springer-Verlag, New York (1969) p. 873 (Reagent No. 97)
  - 10) O. Itasaka, M. Sugita, H. Yoshizaki, T. Hori, *J. Biochem.*, **80**, 935 (1976)
  - 11) A. Hayashi, T. Matsubara, *Biochim. Biophys. Acta*, **248**, 306 (1971)
  - 12) A. Hayashi, T. Matsubara, *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 228 (1970)
  - 13) K.-A. Karlsson, *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 6 (1970)
  - 14) K.-A. Karlsson, B.E. Samuelsson, *Biochim. Biophys. Acta*, **337**, 204 (1974)
  - 15) T. Matsubara, *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 247 (1975)
  - 16) A. Hayashi, T. Matsubara, *Biochim. Biophys. Acta*, **1006**, 89 (1989)
  - 17) A. Irie, H. Kubo, M. Hoshi, *J. Biochem.*, **107**, 578 (1990)
  - 18) N. Okamura, M. Stoskopf, F. Hendricks, Y. Kishimoto, *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 6779 (1985)
  - 19) 杉田陸海, 藤居裕士, 早田知恵子, 水野間智子, 牧野具加, 板坂 修, 木谷ひとみ, 堀 太郎, 脂質生化学研究, **34**, 59 (1992)
  - 20) N. Noda, R. Tanaka, K. Miyahara, T. Kawasaki, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7527 (1992)
  - 21) O. Itasaka, T. Hori, *J. Biochem.*, **85**, 1469 (1979)
  - 22) M. Sugita, S. Itonori, F. Inagaki, T. Hori, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15028 (1989)
  - 23) S. Itonori, M. Nishizawa, M. Suzuki, F. Inagaki, T. Hori, M. Sugita, *J. Biochem.*, **110**, 479 (1991)
  - 24) S. Araki, S. Abe, S. Yamada, M. Satake, N. Fujiwara, K. Kon, S. Ando, *J. Biochem.*, **112**, 461 (1992)
  - 25) A. Hayashi, F. Matsuura, *Chem. Phys. Lipids*, **22**, 9 (1979)
  - 26) S. Araki, S. Abe, S. Odani, S. Ando, N. Fujii, M. Satake, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14141 (1987)
  - 27) S. Araki, S. Abe, S. Ando, K. Kon, N. Fujiwara, M. Satake, *J. Biol. Chem.*, **264**, 19922 (1989)
  - 28) S. Itonori, K. Kamemura, K. Narushima, N. Sonku, O. Itasaka, T. Hori, M. Sugita, *Biochim. Biophys. Acta*, **1081**, 321 (1991)
-