

報 文

ブタカイチュウ, *Ascaris suum* (袋形動物, 線虫綱) の中性糖脂質の Arthro 系糖脂質への帰属^{注1}

杉田陸海*・水野間智子*・早田知恵子*
 堀 太郎**・仲谷文貴*・青木一弘*

*滋賀大学教育学部化学教室 (〒520 大津市平津 2-5-1)

**滋賀文化短期大学 (〒527 八日市市布施町 29)

Classification into Arthro-series of Neutral Glycosphingolipids from Porcine Roundworm, *Ascaris suum*, (Aschelminthes, Nematoda)*¹

Mutsumi SUGITA*, Tomoko MIZUNOMA*, Chieko HAYATA*,
 Taro HORI**, Fumiki NAKATANI*, and Kazuhiro AOKI*

* Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education,
 Shiga University (2-5-1, Hiratsu, Otsu-shi, 〒520)

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

Neutral glycosphingolipids of the arthro-series were isolated from the porcine roundworm, *Ascaris suum*, Class Nematoda, Phylum Aschelminthes. Oligosaccharide structures of the glycolipids were completely characterized as Glc β 1-Cer (CMS₁ and CMS₂), Man β 1-4 Glc β 1-Cer (CDS), GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer (CTS), GalNAc β 1-4 GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer (CQS) and Gal α 1-3 GalNAc β 1-4 GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer (CPS) by compositional analysis, methylation analysis, exoglycosidase hydrolysis, acid hydrolysis, chromium trioxide oxidation and TLC-immunostaining.

The fatty acid and sphingoid compositions of CMS₁, CDS, CTS, CQS and CPS were virtually the same, with those of 2-hydroxy C_{24:0}-acid and branched heptadecaspingosine and heptadeca-4-sphingenine predominating. There would thus appear to be a common metabolic pathway for CMS₁ to CPS. However, CMS₂ differed completely from the sphingoid components of other glycolipids with trihydroxy bases. Thin-layer chromatography and the results of sugar analysis indicated the presence of at least four minor glycolipids possessing large oligosaccharide chains each with six, seven sugars.

1 緒 言

現在, 全世界で約 10,000 種の線虫が知られているが, それらは食性上, 寄生性と自由生活性に大別できる。前者はさらに動物及び植物寄生性に分類することが

でき, 我が国では動物寄生種約 400 種, 植物寄生種約 70 種が報告されている^{1)~3)}。動物寄生性のうち, 人畜に寄生するものは医学及び獣医学的に重要な寄生虫であり, 一方, 植物寄生性の中で, 農林作物を加害するものは農林業上重要視される有害動物となっており, これら

注1: 無脊椎動物の糖脂質は, コア-オリゴ糖鎖種で, 現在のところ Arthro 系列 (節足動物由来), Mollu 系列 (軟体動物由来) 及び Neogala 系列の 3 系列に分類されている。

*1: Glycolipids are divided into separate series based on the nature of the core oligosaccharide. Their series of invertebrates are classified into Arthro (a name derived from Arthropod) series, Mollu (a name derived from Mollusc) series and Neogala series. (New Comprehensive Biochemistry, vol. 10, 1985 and Annual Review of Biochemistry, vol. 58, 1989)

連絡先: 杉田陸海

をテーマとして多くの研究者が取り組み、近年その研究の一層の推進が要求されている。今までに多くの生物学的事実の集積を見ているが、生化学的にはその緊急性にもかかわらず、ほとんど未開拓で、これからの分野である。多くの寄生性動物において重要視されることは、宿主との特異的識別の問題である。既に、細胞生物学及び細胞社会学的研究が細菌やウイルスの感染の分子機構の解析で明らかにしているように、この種の識別の分子機構については、糖質分子が重要な役割を演じていることが予想され、現在、この方向に沿った活発な研究が開始されつつある^{4)~6)}。本研究はそうした中で、動物寄生性線虫の1種であるブタカイチュウを用い、宿主との相互関係の決定要因のひとつとして糖脂質分子に焦点を絞り、その化学構造を決定し、相互識別の基本的機構を分子レベルで明らかにすることを目的としている。本論文では、ブタカイチュウの中性糖脂質の中で比較的糖鎖の短いセラミドモノ〜ペンタサッカリドの化学構造について述べる。

2 実験

2.1 中性糖脂質画分の調製

ブタカイチュウ, *Ascaris suum*, は袋形動物門 (Phylum Aschelminthes), 線虫綱 (Class Nematoda) に属している。460 g のブタカイチュウ (と殺直後のブタより採集し, アセトンで脱水, 洗浄した後の乾燥重量) を細粉碎した後, 1.5 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, 弱酸処理を施し, アセトン粉末として20.3 g を得た。このものを, 既に確立化している前口動物の糖脂質の系統的分画法を用いて DEAE-及び QAE-セファデックスイオン交換クロマトグラフィーを行って, 中性, 酸性及び極性脂質画分に分画した^{7), 8)}。さらに, これらの3画分中の中性脂質画分をアセチル化し, フロリシカラムクロマトグラフィーで分画後, 脱アセチル化して中性糖脂質画分を得た⁹⁾。

2.2 中性糖脂質画分のケイ酸カラムクロマトグラフィーによる分画

中性糖脂質画分をケイ酸 (Iatrobeads, 6RS-8060, ヤトロン社) カラムクロマトグラフィー (2×60 cm) によってクロロホルム-メタノール-水系 (80 : 20 : 1, vol/vol/vol, 480 mL~50 : 50 : 5, 500 mL) の濃度勾配溶出法で分画した。カラムからの溶出速度は0.8 mL/min とし, 溶出液を5 mL ずつ分取して糖脂質の存否を薄層クロマトグラフィー (後述) で確認した後, セラミドモノ (CMS), ジ (CDS), トリ (CTS), テトラ (CQS) 及びペンタサッカリド (CPS) の5画分を得

た。

2.3 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層プレートは 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-水 (60 : 40 : 10, vol/vol/vol), 2-プロパノール-アンモニア-水 (70 : 5 : 5, vol/vol/vol) 及びクロロホルム-メタノール-2.5 M アンモニア (60 : 40 : 7, vol/vol/vol) を使用し, 検出はオルシノール-硫酸及びローダミン 6 G 試薬によった。

2.4 ガスクロマトグラフィー (GLC)

糖組成は *N*-アセチル-*O*-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, また糖鎖の結合位置は部分メチル化アルジトールアセテート法によりそれぞれ GLC 分析した。分析はすべて Shimadzu GC-9 A で行い, 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 (島津 HiCap-CBP 5) を使用した。分析温度は次のように設定した。糖, 160→200°C, 2°C/min; 脂肪酸, 180→240°C, 2°C/min; 長鎖塩基, 200→240°C, 2°C/min; 部分メチル化アルジトールアセテート, 200°C。

2.5 エクソグリコシダーゼによる加水分解

10~15 µg の糖脂質を 100 µg のタウロデオキシコール酸ナトリウムを含む 50 µL の緩衝液 (後述) に溶かし, 適量の酵素溶液 (後述) を加えた後, 緩衝液で反応液の最終容量を 100 µL とし, 25°C 及び 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。用いた酵素, 酵素源, 酵素量および緩衝液は次のとおりである。 α -マンノシダーゼ: タチナタマメ由来 (ベーリンガー・マンハイム山之内社), 0.01 U, クエン酸緩衝液 (50 mM, pH 4.5); β -マンノシダーゼ: アフリカマイマイ由来 (生化学工業社), 0.02 U, クエン酸緩衝液 (100 mM, pH 4.5); β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ: タチナタマメ由来 (生化学工業社), 1 U, クエン酸緩衝液 (100 mM, pH 5.0); α -ガラクトシダーゼ: *Aspergillus niger* 由来 (シグマ社), 0.1 U, クエン酸緩衝液 (100 mM, pH 4.0); α -ガラクトシダーゼ: 緑コーヒー豆由来 (シグマ社), 1 U, Tris-HCl 緩衝液 (100 mM, pH 6.5); β -ガラクトシダーゼ: タチナタマメ由来 (生化学工業社), 1 U, クエン酸緩衝液 (100 mM, pH 3.5); β -ガラクトシダーゼ: ウシこう (皐) 丸由来 (ベーリンガー・マンハイム山之内社), 0.07 U, クエン酸緩衝液 (100 mM, pH 4.5); β -ガラクトシダーゼ: 大腸菌由来 (ベーリンガー・マンハイム山之内社), 75 U, Tris-HCl 緩衝液 (100 mM, pH 6.6)。なお, 反応温度は α -ガラク

トシダーゼが25°C, 他の酵素は37°Cであった。

2・6 TLC/免疫染色

試料をプラスチック製プレート (Polygram Sil G, Macherey-Nagel 社, あらかじめ, クロホルム-メタノール-水 (60 : 40 : 10, vol/vol/vol) で展開し, 110°C で 30 min 加熱活性化したもの) 上に展開した後, Higashiら¹⁰⁾及び佐内¹¹⁾の変法に準じた¹²⁾。すなわち, 展開したプレートを風乾した後, PBS (10 mM リン酸緩衝液-生理食塩水, pH 7.2) で湿潤し, 室温で 1 h, blocking solution (10% ウマ血清-PBS, 0.1% NaN₃) に浸した。PBS で 3 回洗浄したプレートをプラスチック製容器に移し, それに希釈 (希釈液, 3% PVP-PBS) した一次抗体をプレートが浸る程度に入れて, 2 h, 反応させた。反応後, プレートを PBS で 3 回洗浄し, 次いで二次抗体として 200 倍に希釈した peroxidase-標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (オルガノンテクニカ社) を浸る程度入れ, 1.5 h, 反応させた。その後, プレートを PBS で 5 回以上洗浄し, 基質溶液 (6 mg の 4-chloro-1-naphtol を 2 mL のメタノールに溶解したもの, 10 mL の Tris と NaOH の 0.1 M 溶液を 2 M HCl で pH 7.2 に調整したもの, 20 µL の 30% H₂O₂ の混合液) を添加して発色させた。発色はシャーレで行い, 青紫色のバンドが現れたところで水洗いした後, 乾燥した。

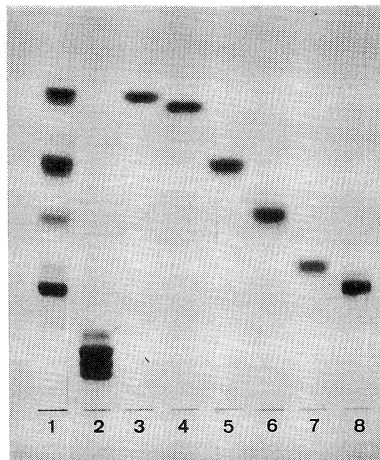
3 結果及び考察

3・1 ブタカイチュウの中性糖脂質

DEAE-及び QAE-セファデックスで分画したブタカイチュウの中性糖脂質画分には極めて多量のステロール様物質が混在しているので, これを除去する目的で, 中性糖脂質画分をさらにアセチル化してフロリシルで分画した。フロリシル分画のジクロロエタン-アセトン (1 : 1, vol/vol) 溶出画分 (Fr. 1) 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 (Fr. 2) にオルシノール-硫酸 (糖検出試薬) で陽性反応が認められた。この 2 画分を脱アセチル化した後の TLC 結果を Fig.-1 (lanes 1 及び 2) に示したが, 前者 (lane 1) からは 1 糖~5 糖程度の糖鎖, 後者 (lane 2) からはさらに長い糖鎖を含むと思われる糖脂質の存在することがわかった。それぞれの画分の収量は, 85 mg (Fr. 1) 及び 38 mg (Fr. 2) であった。

3・2 糖鎖の短い中性糖脂質 (CMS₁, CMS₂, CDS, CTS, CQS 及び CPS) の単離

フロリシル分画でのジクロロエタン-アセトンによる溶出物 (Fr. 1) の脱アセチル化糖脂質画分 (85 mg) を Iatrobeads を用いて濃度勾配溶出法によって分画した。クロホルム-メタノール-水 (60 : 40 : 10, vol/vol/vol) の中性系展開溶媒を用いた TLC 上でそれぞれ



Lane 1, neutral glycolipid fraction (Fr. 1) fractionated by Florisil column chromatography using dichloroethane-acetone as the eluting solvent according to the method of Saito and Hakomori⁹⁾; lane 2, neutral glycolipid fraction fractionated by Florisil column chromatography using dichloroethane-methanol-water; lane 3, isolated ceramide monosaccharide-1 (CMS₁); lane 4, isolated ceramide monosaccharide-2 (CMS₂); lane 5, isolated ceramide disaccharide (CDS); lane 6, isolated ceramide trisaccharide (CTS); lane 7, isolated ceramide tetrasaccharide (CQS); lane 8, isolated ceramide pentasaccharide (CPS). The separation was shown on TLC glass plate of silica gel 60 (E. Merck) developed with chloroform-methanol-water (60 : 40 : 10, vol/vol/vol), and the spots were visualized with orcinol-H₂SO₄ reagent. Fig.-1 Thin layer chromatogram of roundworm, *A. suum* neutral glycolipids.

単一のバンドを示す溶出画分を分取し, 移動度の大きい順に CMS (35.6 mg), CDS (15.0 mg), CTS (4.6 mg), CQS (0.8 mg) 及び CPS (2.5 mg) 画分とした。このようにして得られた 5 画分を, さらに塩基性系展開溶媒 (2-プロパノール-アンモニア-水) を用いて調べたところ, CMS 画分は 2 本のバンドに分離した。そこで TLC に用いた塩基性展開溶媒を溶出液とした Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行って, それぞれを単離し, TLC 上の移動度の大きい順に CMS₁ (23.4 mg) 及び CMS₂ (5.8 mg) とした (Fig.-1, lanes 3~8)。

3・3 CMS₁, CMS₂, CDS, CTS, CQS 及び CPS の糖鎖構造

Table-1 に単離した 6 種の中性糖脂質の構成糖の分析結果を示したが, CMS₁ 及び CMS₂ はいずれもグルコースのみ, CDS はグルコースとマンノース, CTS は

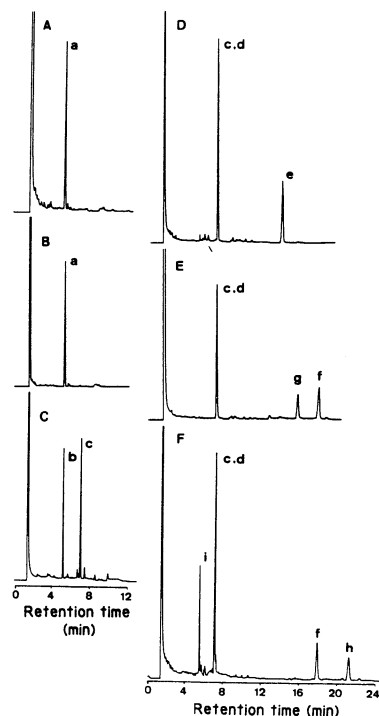
Table-1 Carbohydrate compositions of CMS₁, CMS₂, CDS, CTS, CQS and CPS^a.

	Glc	Man	GlcNAc	GalNAc	Gal
CMS ₁	+				
CMS ₂	+				
CDS	1.00	0.87			
CTS	1.00	0.93	0.70		
CQS	1.00	0.91	0.75	0.72	
CPS	1.00	0.88	0.80	0.70	0.92

^aCarbohydrate compositions were determined by GLC using *N*-acetyl-TMS derivatives of methanolysates, and expressed as molar ratios.

グルコース、マンノースと *N*-アセチルグルコサミン、CQS はグルコース、マンノース、*N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルガラクトサミン、CPS はグルコース、マンノース、*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルガラクトサミンとガラクトースを成分としており、TLC の移動度から判断してそれぞれセラミドモノ、ジ、トリ、テトラ及びペンタサッカリドと推定した。糖鎖の結合順序及び結合位置については、部分加水分解生成物の構成糖分析及び既報の昆虫類糖脂質より得た部分メチル化アルジトールアセテートを標準とした GLC の保持時間との比較から決定した¹³⁾。すなわち、CMS₁ 及び CMS₂ からは 1,5-ジ(*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ(*O*-メチル)グルシトール (1 Glc) のみを、CDS からは 1,4,5-トリ(*O*-アセチル)-2,3,6-トリ(*O*-メチル)グルシトール (1,4 Glc) と 1,5-ジ(*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ(*O*-メチル)マンニトール (1 Man) を、CTS からは 1,4 Glc, 1,3,5-トリ(*O*-アセチル)-2,4,6-トリ(*O*-メチル)マンニトール (1,3 Man) と 1,5-ジ(*O*-アセチル)-3,4,6-トリ(*O*-メチル)-*N*-アセチルグルコサミニトール (1 GlcNAc) を、CQS からは 1,4 Glc, 1,3 Man, 1,4,5-トリ(*O*-アセチル)-3,6-ジ(*O*-メチル)-*N*-アセチルグルコサミニトール (1,4 GlcNAc) と 1,5-ジ(*O*-アセチル)-3,4,6-トリ(*O*-メチル)-*N*-アセチルガラクトサミニトール (1 GalNAc) を、CPS からは 1,4 Glc, 1,3 Man, 1,4-GlcNAc, 1,3,5-トリ(*O*-アセチル)-4,6-ジ(*O*-メチル)-*N*-アセチルガラクトサミニトール (1,3 GalNAc) と 1,5-ジ(*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ(*O*-メチル)ガラクトール (1 Gal) を同定した (Fig.-2)。一方、アノマー配置については、エクソグリコシダーゼによる酵素的分解法及びクロム酸々化法¹⁴⁾で、すべての糖脂質のグルコース、マンノース、*N*-アセチルグルコサミン及び *N*-アセチルガラクトサミンは β -アノマーであることを、また、ガラクトースは α -アノマーであることを決定した (Fig.-3)。

以上の結果から CMS₁, CMS₂, CDS, CTS, CQS,

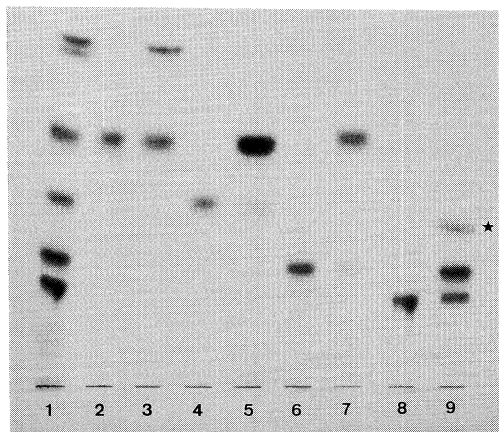


Gas chromatograms of partially methylated alditol acetates of A, CMS₁; B, CMS₂; C, CDS; D, CTS; E, CQS and F, CPS. a, 1,5-di(*O*-acetyl)-2,3,4,6-tetra(*O*-methyl)glucitol; b, 1,5-di(*O*-acetyl)-2,3,4,6-tetra(*O*-methyl)mannitol; c, 1,4,5-tri(*O*-acetyl)-2,3,6-tri(*O*-methyl)glucitol; d, 1,3,5-tri(*O*-acetyl)-2,4,6-tri(*O*-methyl)mannitol; e, 1,5-di(*O*-acetyl)-3,4,6-tri(*O*-methyl)-2-*N*-methylacetamido-2-deoxyglucitol; f, 1,4,5-tri(*O*-acetyl)-3,6-di(*O*-methyl)-2-*N*-methylacetamide-2-deoxyglucitol; g, 1,5-di(*O*-acetyl)-3,4,6-tri(*O*-methyl)-2-*N*-methylacetamido-2-deoxygalactitol; h, 1,3,5-tri(*O*-acetyl)-4,6-di(*O*-methyl)-2-*N*-methylacetamido-2-deoxygalactitol; i, 1,5-di(*O*-acetyl)-2,3,4,6-tetra(*O*-methyl)galactitol.

Fig.-2 Glycosidic linkage analysis (substituted positions of sugars) of CMS₁, CMS₂, CDS, CTS, CQS and CPS.

CPS の構造を次のように推定した。CMS₁, CMS₂, Glc β 1-Cer; CDS, Man β 1-4 Glc β 1-Cer; CTS, GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer; CQS, GalNAc β 1-4 GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer; CPS, Gal α 1-3 GalNAc β 1-4 GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer。

これらの糖脂質は、既に節足動物昆虫綱に見いだされ^{15),16)}、化学構造の上から Arthro 系列として特色づ



Lane 1, a mixture of CMS, CDS, CTS, CQS and CPS ; lanes 2, 4, 6, and 8, intact CDS, CTS, CQS and CPS ; lane 3, CDS+*A. fulica* β -mannosidase ; lane 5, CTS+jack bean β -*N*-acetylhexosaminidase ; lane 7, CQS+ β -*N*-acetylhexosaminidase ; lane 9, CPS+green coffee bean α -galactosidase. The plate was developed with chloroform-methanol-water (60 : 40 : 10, vol/vol/vol), and the spots were visualized with orcinol-H₂SO₄ reagent. ★, contaminants from the enzyme.

Fig.-3 Thin layer chromatogram of the reaction products derived from CDS, CTS, CQS and CPS on treatments with exoglycosidases.

Table-2 Chemical compositions of the ceramide portions of CMS₁, CMS₂, CDS, CTS, CQS and CPS.

Fatty acid ^a	CMS ₁	CMS ₂	CDS	CTS	CQS	CPS
16 : 0		1.5	4.3	5.1	2.2	3.2
18 : 0		1.6	3.3	3.8	1.7	2.1
20 : 0		4.2				
22 : 0	1.3	1.9	8.6	11.0		
h 21 : 0	1.3	4.4	3.1	1.9		
h 22 : 0	3.2	3.9	9.7	6.0	10.6	12.7
h 23 : 0	3.7	3.2	4.8	3.8	5.8	4.6
h 24 : 0	90.5	79.3	66.2	68.4	79.7	77.4
Sphingoid ^a	CMS ₁	CMS ₂	CDS	CTS	CQS	CPS
d,br-17 : 1	22.8		37.1	32.8	33.6	31.3
d,br-17 : 0	76.2		62.9	67.2	66.4	68.7
t,br-17 : 0		65.9				
t-18 : 0		34.1				

^aExpressed as percentage of total fatty acids and sphingoids.

h, 2-hydroxyfatty acid ; d, dihydroxysphingoid ; t, trihydroxy sphingoid ; br, branched.

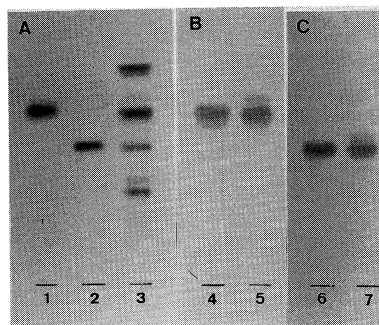
けられているものである¹⁷⁾。

3.4 CMS₁, CMS₂, CDS, CTS, CQS, CPS の脂肪酸及び長鎖塩基成分

単離した6種類の糖脂質のセラミド成分の同定は、脂肪酸及び長鎖塩基共に GLC, GC-MS 分析によった。それらの結果を Table-2 に示したが、いずれの糖脂質も脂肪酸はすべて C₂₄ の 2-ヒドロキシ酸が、長鎖塩基は CMS₂ を除いて分枝型の C₁₇-スフィンゲニンとスフィンガニンが主成分であった。CMS₂ だけが長鎖塩基成分はすべてトリヒドロキシ型の分枝 C_{17:0} 及び C_{18:0} であった。このことから、少なくとも CMS₁, CDS, CTS, CQS 及び CPS は同一経路によって生合成されることが推測できる。

3.5 ブタカイチュウの中性糖脂質画分の TLC/免疫染色

Arthro 系マンノ脂質を特徴づける 2 種類の糖脂質、Man β 1-4 Glc β 1-Cer (MIOse₂Cer, 軟体動物二枚貝類より得たもの) 及び GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer (ArOse₃Cer, 節足動物昆虫類より得たもの) を抗原として調製した極めて特異性の高いポリクローン抗体 (IgG type)^{18),19)} を用いて、ブタカイチュウの中性糖



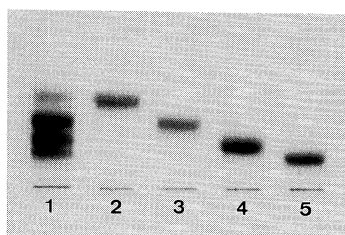
Lane 1 and 4, authentic MIOse₂Cer (Man β 1-4 Glc β 1-Cer) obtained from bivalve shellfish, *Hyriopsis schlegelii* : lane 1, 10 nmol ; lane 4, 50 pmol ; lanes 2 and 6, authentic ArOse₃Cer (GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-Cer) obtained from insect, *Lucilia caesar* : lane 2, 10 nmol ; lane 6, 20 pmol ; lanes 3, 5 and 7, neutral glycolipid fraction of proudworm : lane 3, 20 μ g ; lane 5 and 7, 300 ng. The plates (Polygram Sil G, pre-coated plastic sheet, Macherey-Nagel) were developed with chloroform-methanol-water (60 : 40 : 10, vol/vol/vol). The spots were visualized with orcinol-H₂SO₄ for plate A and immunostaining for plates B and C.

Fig.-4 Detection of MIOse₂Cer and ArOse₃Cer by TLC/immunostaining.

脂質画分（フロリシル画分の Fr. 1, ジクロロエタン-アセトン溶出画分）の TLC/免疫染色を行った。その結果を Fig.-4 に示したが、それぞれの抗原 (MIOse₂ Cer 及び ArOse₃ Cer) と同じ移動度を与える糖脂質, CDS 及び CTS と反応することが確認できた。

3・6 糖鎖の長い中性糖脂質

フロリシル画分のジクロロエタン-メタノール-水による溶出画分, Fr. 2 (約 35 mg) を, クロロホルム-メタノール-水 (60 : 40 : 10, vol/vol/vol) を溶出溶媒とした Iatrobeads カラムクロマトグラフィーによって精製し, 糖鎖の長い中性糖脂質画分 (収量 10.3 mg) を得た。この画分は赤外吸収スペクトル分析で, 1620 及び 1540 cm⁻¹ にアミド結合に由来する吸収が認められることから, スフィンゴ型糖脂質であると判断し, 調製用 TLC (展開溶媒: クロロホルム-メタノール-2.5 M NH₄OH, 60 : 40 : 7, vol/vol/vol) によって, 4 種類の糖脂質を単離した (Fig.-5)。TLC 上での移動度の大きい順に NGL₁~NGL₄ と仮称するが, それぞれの収量 (NGL₁, <0.1 mg; NGL₂, 1.5 mg; NGL₃, 0.8 mg; NGL₄, <0.5 mg) が極めて低かったので, GLC による構成糖分析のみを行った。NGL₁ はグルコースとマンノースを, NGL₂ はグルコース, マンノース, ガラクトース, ガラクトサミンを, NGL₃ 及び NGL₄ はグルコース, マンノース, ガラクトース, ガラクトサミン, フコースを構成糖成分としていたが, いずれからもグルコサミンは検出しなかった。このことからブタカイチュウの糖鎖の長い中性糖脂質は, アミノ糖成分として



Lane 1, neutral glycolipid fraction (Fr. 2) fractionated by Florisil column chromatography using dichloroethane-methanol-water as the eluting solvent according to the method of Saito and Hakomori⁹⁾ (lane 2 in Fig.-1) ; lanes 2 to 5, glycolipids (NGL₁ to NGL₄, provisionally designated in the text) isolated by preparative thin layer chromatography. The plate (Silica gel 60) was developed with chloroform-methanol-2.5 M NH₄OH (60 : 40 : 7, vol/vol/vol), and spots were visualized with orcinol-H₂SO₄.

Fig.-5 Thin layer chromatogram of neutral glycolipids having large oligosaccharide chains.

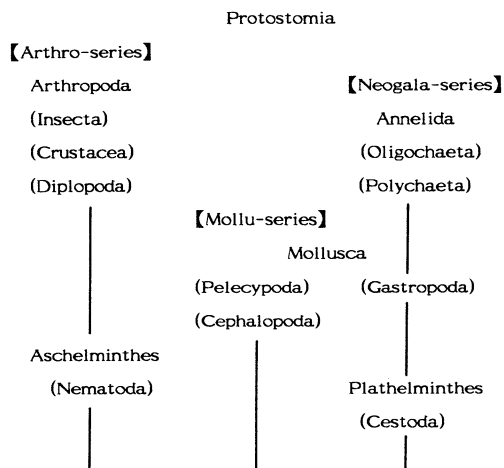


Fig.-6 Taxonomic classification of glycolipid-series, Arthro-, Mollu- and Neogala-series, in Protostomia phylum.

ガラクトサミンのみを含有する新しいタイプのマンノ脂質であることが示唆され, 構造決定のため研究を続行中である。

3・7 ブタカイチュウの中性糖脂質は Arthro 系糖脂質

現在までのところ, 前口動物の中性糖脂質の中でも比較的糖鎖の短いもの (ジ~テトラサッカリド) は, Mollu 系 (...GlcNAc β 1-2 Man α 1-3 Man β 1-4 Glc, 軟体動物の斧足綱²⁰⁾, 頭足綱²¹⁾), Arthro 系 (GalNAc β 1-4 GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc, 節足動物の昆虫綱^{22),23)}, 甲殻綱^{18),19)}, 倍脚綱²⁴⁾及び Neogala 系 (...Gal β 1-6 Gal β 1-6 Gal, 軟体動物の腹足綱²⁵⁾, 扁形動物の条虫綱^{26)~28)}, 環形動物の多毛綱²⁹⁾, 貧毛綱³⁰⁾) の 3 種類に分類される。最近, 扁形動物の吸虫綱から, GalNAc β 1-4 Glc 構造を持つ糖脂質が見いだされ Schisto 系糖脂質として提案されている^{31),32)}。これらの前口系の動物の中で, 動物分類学の上から中位に位置づけられている袋形動物では, 今回, 初めて線虫綱 (ブタカイチュウ) に Arthro 系糖脂質の存在を見いだした (Fig.-6)。

4 総 括

袋形動物の線虫綱に属するブタカイチュウの中性糖脂質は, Arthro 系糖脂質であることを明らかにした。

今までに, 前口動物の中性糖脂質が化学構造の上から 3 種類の系列 (Arthro, Mollu 及び Neogala 系列) に特色づけられているが, 今回, 初めて袋形動物に Arthro 系糖脂質の存在を見いだしたことは, 生物進化を考える上で極めて興味を引く知見である。また, Arthro 系糖脂質が宿主であるブタには存在しないこと

から、本動物は宿主に依存することなく独自の糖脂質合成系を有しているものと考えられる。

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. 05274212)及び財団法人内藤記念科学振興財団研究助成金によって行った。

なお、試料の採集に御協力を頂いた塩田邦郎(東京大学農学部獣医生化学)、奥村直尊(岐阜県食肉センター)両先生に深謝します。

(平成5年(1993年)12月28日 受理)

文 献

- 1) 江原昭三, 只野正志, “動物系統分類学4 袋形動物”, 内田 亨監修, 中山書店(1962) p. 90
- 2) “新日本動物圖鑑” 岡田 要, 内田清之助, 内田 亨監修, 北陸館(1965) p. 429
- 3) 山田真弓, 西田 誠, 丸山工作, “進化系統学”, 裳華房(1985) p. 168
- 4) 内貴正治, 細胞工学, 5, 664 (1986)
- 5) 内貴正治, 現代化学, 11, 38 (1991)
- 6) 木村博久, 内貴正治, “糖鎖工学”, 産業調査会(1992) p. 197
- 7) T. Hori, M. Sugita, S. Ando, K. Tsukada, K. Shitota, M. Tsuzuki, O. Itasaka, *J. Biol. Chem.*, **258**, 2239 (1983)
- 8) M. Sugita, H. Nakae, T. Yamamura, Y. Takamiya, O. Itasaka, T. Hori, *J. Biochem.*, **98**, 27 (1985)
- 9) T. Saito, S. Hokomori, *J. Lipid Res.*, **12**, 257 (1971)
- 10) H. Higashi, Y. Fukui, S. Ueda, S. Kato, Y. Hirabayashi, M. Matsumoto, M. Naiki, *J. Biochem.*, **95**, 1517 (1984)
- 11) 佐内 豊, 実験医学, **6**, 87 (1988)
- 12) M. Sugita, Y. Sanai, S. Itonori, T. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, **962**, 159 (1988)
- 13) S. Itonori, M. Nishizawa, M. Suzuki, F. Inagaki, T. Hori, M. Sugita, *J. Biochem.*, **110**, 479 (1991)
- 14) O. Itasaka, M. Sugita, H. Yoshizaki, T. Hori, *J. Biochem.*, **80**, 935 (1976)
- 15) M. Sugita, M. Nishida, T. Hori, *J. Biochem.*, **92**, 327 (1982)
- 16) R. D. Dennis, R. Geyer, H. Egge, J. P-Katalinic, S. C. Li, S. Stirm, H. Wiegandt, *J. Biol. Chem.*, **260**, 5370 (1985)
- 17) T. Hori, M. Sugita, *Prog. Lipid Res.*, **32**, 25 (1993)
- 18) S. Itonori, M. Hiratsuka, N. Sonku, H. Tsuji, O. Itasaka, T. Hori, M. Sugita, *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**, 263 (1992)
- 19) M. Sugita, C. Hayata, T. Hori, A. Morikawa, S. Miwa, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, **42**, 649 (1993)
- 20) T. Hori, M. Sugita, S. Ando, M. Kuwahara, K. Kumauchi, E. Sugie, O. Itasaka, *J. Biol. Chem.*, **256**, 10979 (1981)
- 21) 板坂 修, 杉田陸海, 堀内理江, 吉田幸子, 伊藤将弘, 木谷ひとみ, 堀 太郎, 滋賀大学教育学部紀要, **41**, 43 (1991)
- 22) M. Sugita, F. Inagaki, H. Naito, T. Hori, *J. Biochem.*, **107**, 899 (1990)
- 23) H. Wiegandt, *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**, 117 (1992)
- 24) 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・油化学研究発表会講演要旨集(豊中市) p. 190 (1993)
- 25) T. Matsubara, A. Hayashi, *J. Biochem.*, **89**, 645 (1981)
- 26) K. Nishimura, A. Suzuki, H. Kino, *Biochim. Biophys. Acta*, **1086**, 141 (1991)
- 27) R. D. Dennis, S. Baumeister, R. Geyer, J. P-Katalinic, R. Hartmann, H. Egge, E. Geyer, H. Wiegandt, *Eur. J. Biochem.*, **207**, 1053 (1992)
- 28) F. Persat, J-F. Bouhours, M. Mojon, A-F, Peta-vy, *J. Biol. Chem.*, **267**, 8764 (1992)
- 29) 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, 油化学, **42**, 935 (1993)
- 30) 杉田陸海, 早田知恵子, 鈴木 實, 竹田忠紘, 水野間智子, 牧野具加, 成島謙司, 堀 太郎, 油化学, **41**, 568 (1992)
- 31) C. K. Makkaru, R. T. Damian, D. F. Smith, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.*, **267**, 2251 (1992)
- 32) S. B. Lavery, J. B. Weiss, M. E. K. Salyan, C. E. Roberts, S. Hakomori, J. L. Magnani, M. Strand, *J. Biol. Chem.*, **267**, 5542 (1992)