糖脂質の構造研究における最近の進歩

安 藤 進

東京大学医学部生化学教室 (東京都文京区本郷 7-3-1)
東京都老人総合研究所生化学部 (東京都板橋区柴町 35-2)

Recent Progress in the Structural Studies of Glycolipids

Susumu ANDO

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, The University of Tokyo
(7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo)

Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute for Gerontology
(35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo)

1 ま え が き

糖脂質はリン脂質とともに複合脂質として分類されているが、生体膜の大切な成分である。糖脂質はとくに細胞膜表面の一部の機能をになっていることが次第に明らかにされてきている。リン脂質と同じようにハプテンとしての性質をもっており、ホルスマン抗原, A, B, O 血液型などは細胞性抗原としてよく知られている。動物細胞には同じ種類の細胞同志が集まる性質 (cell sorting) や細胞同志が重なり合うことなく平面に培養される性質 (contact inhibition) などがあって、この相手細胞を識別する機能はたとえば多種類の細胞が Organ を形成する上で重要なものと想像される。この contact inhibition は細胞の悪性変化 (ガン化) の程度に応じて弱くなり、同時に細胞の糖脂質パターンも変化することが見いだされ^{1), 2)}, 細胞自身の識別機能にも糖脂質の関与していることが推定されるようになってきた³⁾。

このように個体や種によって、あるいは細胞の状態によって糖脂質成分が異なっているとすると、非常に興味深いことではあるが、その実験事実を得るだけの方法が体系化されていないのが現状である。

糖脂質は脂質の中ではむしろ微量成分であって、その糖脂質分画は構成糖あるいは糖含量の異なる数種以上の成分に分けられるのが普通である。とくにアミノ糖やシアル酸を含む糖脂質は、構成糖の数も多くなり、結合順序, 結合位置, 結合様式など分子の抗原性を決めるファクターがあまりにも多すぎる。リン脂質の分野と異なり、未同定の糖脂質もかなりあるであろうし、抗原性など生物活性を発現するための立体配置 (configuration)

や立体配座 (conformation) など、分子構造の立体化学も重要なテーマになりつつある。本稿ではまず糖脂質の化学構造上の特徴を概説し、つぎに、最近の実験方法の進歩, およびいくつかの成果について略述する。

2 糖脂質の化学構造

動物の糖脂質はリン酸を含まないスフィンゴリピドである。スフィンゴシン塩基に脂肪酸がアミド結合して作られるセラミドが共通した脂質性部分となっていて、ほぼジグリセリドに近い極性と想像される。親水性部分としては単糖あるいはオリゴ糖がスフィンゴシンの末端水酸基にグリコシド結合して、糖脂質を構成している。この糖部分こそ糖脂質の特徴を現わすもので、中性糖, アミノ糖, シアル酸あるいは硫酸エステルをもつ糖などから表-1 に示したような種々のオリゴ糖が作られている。オリゴ糖部分はその構成糖の違いのほかに、位置異性体や configuration の違いによる立体異性体などがあって、同一の分子量のものであっても、立体構造が著しく異なるために生物活性の有無が起こってくる。糖部分がまったく同じ場合にもセラミド側がいろいろに変化していて普通それらの混合物になっている。脂肪酸とスフィンゴシン塩基の炭素鎖の長さの違い, 二重結合の数と位置の違い, それに水酸基や側鎖の有無の組合せによって複雑な分子群をなしている。光学異性体について考えてみると、糖部分に多数の不斉炭素があるのは当然であるが、スフィンゴシンの C-2, 3 も不斉炭素で、いままで知られているものは 2D, 3D 体 (R/S system で表わすと 2S, 3R-体) のみである^{4), 5)}。ヒドロキシ脂肪酸が含まれているとさらに不斉炭素がふえることになる。

表-1 代表的な糖脂質

	オリゴ糖部分の構造	略号	備 考
中性糖よりなるもの	(A) 中性糖脂質 $\begin{array}{l} \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \end{array}$	CMH CDH CTH	セレブロシド
	(B) 硫酸基を含むもの $\begin{array}{l} \text{Gal}(3'-\text{SO}_3\text{H}) \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal}(3'-\text{SO}_3\text{H}) \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \end{array}$		サルファチド
アミノ糖を含むもの	(A) グロボシド $\begin{array}{l} \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \end{array}$		Tay.Sachs グロボシド モルモット 血球 Globoside I ヒト, プタ 血球 ホルスマン 抗原 ウサギ血球 弱いB型活性をもつ
	(B) フコースをあわせもつもの(血液型活性糖脂質) $\begin{array}{l} \text{Fuc} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{Fuc} \\ \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{Fuc} \end{array}$		全構造は確定されていない O型活性 B型活性 A型活性
ノイラミン酸を含むもの(ガングリオシド)	$\begin{array}{l} \text{NA} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{NA} \rightarrow \text{NA} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NA} \\ \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NA} \rightarrow \text{NA} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NA} \\ \text{NA} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NA} \\ \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NA} \rightarrow \text{NA} \\ \text{NA} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Gal} \cdot \text{N} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Glc} \rightarrow \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NA} \rightarrow \text{NA} \end{array}$	G _{M8} G _{D3} G _{M2} G _{D2} G _{M1} G _{D1a} G _{D1b} G _{T1}	ヘマトシド Tay.Sachs ガングリオシド

略号 Glc: グルコース, Gal: ガラクトース, Glc·N: グルコサミン, Gal·N: ガラクトサミン, NA: ノイラミン酸, Fuc: フコース, Cer: セラミド

このように糖脂質は生物の微量成分でありながら、化学構造の異なった多くの同属体から成っているわけである。それらの糖脂質がどのように細胞膜に組み込まれているか、さらに、そこではどのような conformation を

とって他の分子と相互作用をもっているのか、大変興味深い問題である。糖脂質の化学構造は、脂質の精製の技術の進歩に伴って多くの種類について明らかになってきており、微細な立体構造の変化についても検討されはじめているので、構造と生理活性との関係が分子レベルで説明されるようになるのも近い将来のことと期待される。

3 構造研究法の進歩

3-1 ケイ酸クロマトグラフィーによる分離分析の進歩

クロマトグラフィーの基本的な技術開発はほとんど完成されつつあるといってもよく、脂質実験法の成書、総説に詳しく記述されている⁶⁾⁻⁸⁾。しかし、構成糖部分が大きな分子の場合や、わずかに構造が異なる脂質同志の分離になると予想されない困難さが出てくるので当然個々のくふうが必要である。この些細なくふう、改良が後の構造決定や実験に大きく影響するところから、大きな努力が払われるわけである。この面での最近の進歩としては、ガングリオシド^{9), 10), 24)} や血液型脂質¹¹⁾ などのいわゆる高級糖脂質がうまく分離されるようになってきたことであろう。

カラムの分離能(理論段数)を少しでも高めることが必要であるが、ガスクロマトグラフィーのカラム効率についてもくふうされているように¹²⁾、吸着剤の mesh サイズを狭い範囲にそろえること、できれば一層細かいサイズのものを使うことなどは、第一に注目されてきた点である。普通 100 mesh のケイ酸を用いることが多いが、メタノール^{9), 13)}あるいは蒸留水¹⁴⁾に懸濁し、傾シャ法(decantation)であらい粒子と微粒子を除くことによって、一定の溶出速度が得られるようになることから再現性のよいクロマトができて具合がよい。100 mesh より細かいケイ酸としては Mallinckrodt 社より 200~325 mesh のもの(Silic AR)が出されていて、これは mesh サイズもそろっているためか、ろ過助剤を加えずともかなりの流速が得られるし、分離もすぐれている¹¹⁾。Unisil, 200~325 mesh (Clarkson Chem. Co.)も使われている¹⁵⁾。最近 Sorval 社の遠心クロマト(Centrichrom)の装置が輸入されており、3×65 mm のガラスカラムに 0.012 μ の微粒子ケイ酸を詰めて短時間に遠心展開するものであるが、ちょうどディスク電気泳動のように、バンドとして移動位置を確認できる。しかし、この装置の有用性については、今後検討されていくものと思われる。

ケイ酸は極性の大きいものほど強く吸着するので、ケイ酸自身の含水量が吸脱着の現象に著しく影響する。すなわち、含水量が少ないケイ酸(いわゆる活性が強い)は、糖含量の少ない脂質を定量的によく分離するが、高

級糖脂質には活性が強すぎるためか tailing を起こし分離も収率も悪くしている。反対に溶出溶媒に水を加えて活性を下げた状態でクロマトを行なうと、親水性の高級糖脂質も良好な分離を示すようになる。たとえば、ガングリオシドや血球ムコリピドの薄層クロマトグラフィー (TLC) ではクロロホルム-メタノール-水 (C-M-W) あるいはクロロホルム-メタノール-アンモニア水 (C-M-Amm) の展開溶媒でみごとに分離していることは、TLC で loading factor が小さいということのほかにケイ酸の活性が関係しているように思われる。従来、ガングリオシドなどは TLC からかきとる方法でないと精製できないといわれていたが⁶⁾、Penick⁹⁾ や林ら¹⁰⁾は、ガングリオシドをケイ酸カラムにかけ、C-M-W の系でうまく分離している。著者も¹¹⁾ヒト血球の型活性分画を数成分に分離している。

糖脂質分画に混在してくるリン脂質を完全に除き去るのは、はなはだやっかいな問題である。リン脂質の量は糖脂質より圧倒的に多いのが普通であるし、クロマト上の挙動も似ているので、特別のくふうが必要である。よく行なわれる方法として、弱アルカリ水解^{15)~20)}でグリセロリン脂質を分解してしまうのが簡単であるが、スフィンゴミエリンは分解されずに残る。糖脂質の中でも水溶性のガングリオシドだけをとり出す場合には、クロロホルム-メタノール-水系の分配を行なうと、リン脂質をほとんど除くことができる^{21)~24)}。一方ではケイ酸カラムで一挙に分離しようという試みもあり、Gray²⁵⁾はテトラヒドロフラン-メチラール-メタノール-水 (10:6:4:1) で糖脂質を溶出している。またよく活性化した微粒子ケイ酸 (200~325 mesh) カラムからアセトン-メタノール (9:1) で選択的に糖脂質グループを、desorption する方法を定量分析に応用している例がある¹⁵⁾、²⁰⁾。しかし、この分画には、ホスファチジルイノシチドの混入してくるのが避けられない²⁰⁾。TLC 上での糖脂質とリン脂質の分離は Florisil 添加ケイ酸プレート²⁶⁾、²⁷⁾である程度成功している。Neskovic ら²⁷⁾はラット脳とヒト血清脂質を Folch 法の分配²¹⁾でガングリオシドを除いてから、クロロホルム-アセトン-ピリジン-アンモニア水 (20:30:60:2:2) の系で選択的に糖脂質を展開している。

TLC については、ここに記すまでもなく、実に広く応用され手軽に使われている日常である。糖脂質の領域では、ケイ酸が主であるが、ときに Florisil (ケイ酸マグネシウム) 添加ケイ酸²⁶⁾、²⁷⁾が吸着剤として使われる。展開溶媒としては、一般にクロロホルム-メタノール-水 (あるいはアンモニア水) 系、*n*-プロパノール-水 (あるいはアンモニア水) 系が種々の混合比で用いられているが、McCluer²⁸⁾ や Puro²⁴⁾ によって各溶媒系が比較されている。伊藤、金子²⁹⁾は、吸着剤に混存してい

るナトリウム塩が展開中に酢酸ナトリウムに変わって、レシチンの移動度に著しく影響を及ぼすことを見ているが、Puro²⁴⁾ は、ガングリオシドの分離の場合、メタノール-エーテル (4:1) でプレートを前処理している。かきとり実験ではプレートの中央に接着プレートを貼って、シリカゲルの Strip (reference strip) をとってレゾルシン試薬で、シアル酸を発色させ位置を確かめてから残りのプレートの該当部分をかきとり、メタノール-クロロホルム-ピリジン-水 (4:2:1:1) でガングリオシドを溶出している²⁴⁾。Handa と Burton³⁰⁾は、プレートの上端にロ紙をはさみ無限展開法で³¹⁾、ガングリオシドをよく分離しておき、各成分をかきとって、中性糖、シアル酸、ヘキササミン、脂肪酸、スフィンゴシンなどの定量をしている。Yogeswaran³²⁾ らは、マウスの培養細胞 (L-929) $10^7 \sim 10^8$ 個より得たガングリオシドを TLC で分離し、かきとってシアル酸を定量している。

このように、TLC プレートからのかきとりによる定量分析が広く行なわれていたが、手間のかかるのが難点であるし、transfer によるサンプルのロスも誤差の原因となる。TLC 上で直接定量する方法として、ローダミン 6 G を噴霧して 0.4~130 μg の脂質をフルオロメー

図-1 シンクログラフ装置

ピークは右からコレステリンエステル、トリグリセリド、遊離コレステリンおよびリン脂質を示す。

図-1 B シンクログラフによる記録例

ターで定量(誤差 $\pm 0.2 \mu\text{g}$)しているのがあるが³³⁾, これによるとデンストメーターで測定する場合のように光散乱による誤差がないので一つのよい方法である³⁴⁾。最近ヤトロン (Iatron Laboratories, 東京) から “Thin-chrograph” と称する TLC-autodetector が出された(図-1)。同様の原理に基づくものはすでに報告されている^{35), 36)}が, 簡便ですぐれているし, よくくふうされている。石英棒上の薄層に展開分離されたサンプルを水素炎イオン化検出器で自動的に測る装置で, 脂質として $5\sim 20 \mu\text{g}$ くらいの量があれば定量可能である。元来臨床検査用に開発されたものであるが, 今後研究用としても充分利用する価値があると思われる。

3・2 ガスクロマトグラフィー (GC) および質量スペクトロメトリー (MS) による構造研究

3・2・1 脂肪酸の分析

脂肪酸の GC については日常分析法としてほとんど完成されているので, ここでは二重結合の位置を決める問題とヒドロキシ酸および *trans* 型脂肪酸の分析についてだけ述べたい。

二重結合の位置を決めるには, 従来過マンガン酸 過ヨウ素酸酸化による方法 (Rudloff 酸化)^{37)~40)} が行なわれていたが, Berozaら⁴¹⁾ はマイクロゾナイザー⁴²⁾を使い, わずか $1\sim 5 \mu\text{g}$ のサンプルをオゾン分解して得られたアルデヒドの GC から二重結合の位置を決めている。この方法では収率もオレイン酸メチル, リレノン酸メチルの場合 $75\sim 90\%$ とかなりよい。Privettら⁴³⁾ のオゾン分解の方法では $10\sim 100 \mu\text{g}$ のサンプル量を必要としていた。

もう一つの例として, GC-MS で炭素

鎖長と同時に二重結合の位置を決めた報告がある⁴⁴⁾。脂肪酸のメチルエステル 1 mg を四酸化オスミウムの 2% ジオキサン溶液で酸化し, ついで亜硫酸ナトリウム還元でジオールにする。これをエーテルで抽出し, トリメチルシリル化 (TMS 化) して GC-MS に導入する。

MS では TMS 化された C-C 間で開裂し, *a*, *b* に由来するピークを生じ容易に二重結合の位置を決めることができる。GC を直結した MS を用いるとこの例のように, 脂肪酸の混合試料のままで個々の脂肪酸についてのデータが得られるので大変有利な方法である。

ヒドロキシ酸を含む糖脂質としては脳セレブロシドがよく知られていたが, 最近ブタ赤血球膜のグロボシドに

もヒドロキシ酸が多く存在することがわかってきた^{20), 45)}。CMH, CDH, CTH, グロボシドの順でヒドロキシ酸の含量が高くなる傾向にあって, グロボシドでは 50% 以上も占めている⁴⁵⁾。炭素鎖は $24:0$, $24:1$, $22:0$ が主であった^{20), 45)}。これらの脂肪酸は TLC 上で 2-ヒドロキシステアレートと一致し, 3-ヒドロキシ, 12-ヒドロキシ, あるいは 9,10-ジヒドロキシステアレートとは異なる挙動を示したことから 2-ヒドロキシ酸であろうと推定され, MS の分析からも支持された²⁰⁾。一方 Morrison らは牛乳の糖脂質でグルコセプロシドと CDH にも 2-ヒドロキシ酸を認めて⁴⁶⁾, それらの O-TMS 誘導体の MS を測定し, やはり 2-ヒドロキシ酸の MS パターン^{47), 48)}であるとしている。

最近スフィンゴミエリンの脂肪酸に *trans* 不飽和結合をもつものがみつかる^{46), 49), 50)}。Hirvisaloら⁴⁹⁾ が *trans* 型脂肪酸を初めてスフィンゴリピドに見出したとして詳細に報告している。かれらはヒト血清スフィンゴミエリンをホスホリパーゼ C で処理してセラミドを得て, アセチル化後硝酸銀添加ケイ酸薄層クロマト (AgNO_3 -TLC) でかきとりによって 6 種のサブフラク

表-2 ヒト血清スフィンゴミエリンのサブフラクションの組成⁴⁸⁾

Subfraction	Composition of ceramide		Relative amount	
	Fatty acid	Sphingosine base	Gravimetric analysis after preparative TLC (%)	GLC analysis with internal standard (%)
I	Saturated	Sphingenines	58	52
II	<i>trans</i> -Monoenoic	Sphingenines	3.6	4.4
III	<i>cis</i> -Monoenoic	Sphingenines	26	26
IV	Saturated	Sphingadienine	5.4	8.9
V	<i>trans</i> -Monoenoic	Sphingadienine	0.2	—
VI	<i>cis</i> -Monoenoic	Sphingadienine	6.8	8.0

表-3 ヒト血清スフィンゴミエリンサブフラクション由来のセラミドの脂肪酸組成⁴⁹⁾

Fatty acid	Fraction (%)					
	I	II	III	IV	V	VI
C _{14:0}	1.5					
C _{16:0}	48	7.5	2.2	15	5.5	0.6
C _{18:0}	9.6	4.3	1.0	13	7.0	0.8
C _{18:1}		1.8	1.6	1.6	5.5	1.3
C _{20:0}	5.7			8.7	6.4	
C _{20:1}					3.5	
C _{21:0}				1.0		
C _{22:0}	16	1.9		24	5.0	
C _{22:1}		35	1.5	3.1	30	1.3
C _{23:0}	9.1			13		
C _{23:1}		14			7.0	
C _{24:0}	10	1.5		15	1.9	
C _{24:1}		34	94	6.0	27	96

ションに分けた。Samuelsson ら⁵¹⁾も同様に 4 種のセラミドを分離しているが、Hirvisalo ら⁴⁹⁾によると非芳香性溶媒を選ぶことと、プレートを十分に活性化することが微妙な分離を成功させるのに大切であるという。6 種のセラミドはそれぞれアルカリ水解され、脂肪酸とスフィンゴシン塩基が GC で分析された (表-2.3)。表-2 をみると飽和脂肪酸は約 63%, *cis* 体は 33%, *trans* 体は 4% の割合になっていて、さらにその内訳は表-3 でわかるように著しい片寄りのみられるのがおもしろい。すなわち、スフィンゴシン塩基と脂肪酸の組合せがランダムでないことを示している。たとえば、I と IV の飽和酸のサブフラクションで比較すると、4-sphingenine-C_{16:0} と sphingadienine-C_{22:0} の組合せがそれぞれ優位につくられている。Morrison ら⁴⁶⁾は牛乳のスフィンゴミエリン中の脂肪酸について、飽和体、*cis* 体、*trans* 体の各グループで炭素鎖の分布が異なっていることを報告しているが、やはり同様の現象と考えてよいであろう。牛乳には分枝スフィンゴシン塩基も含まれており^{46), 52)}, Hirvisalo ら⁴⁹⁾は分枝スフィンゴシン塩基、*trans* 体脂肪酸とも食性のものではないかと想像している。

3・2・2 スフィンゴシン塩基の分析

糖脂質のもう一つの疎水性部分であるスフィンゴシン塩基としては、つい数年前まで動物にはいわゆるスフィンゴシンとジヒドロスフィンゴシン (二つを総称して dihydroxy base)、植物にはフィツスフィンゴシン (tri-hydroxy base) であると割り切って理解されていたが、最近種々のタイプのものが続々と発見され Karlsson の総説⁵³⁾によると 60 種以上のスフィンゴシン塩基が整理されていて、急速に進んできた状況がよくわかる (表-4)。表-4 のスフィンゴシン塩基のうち 17 種が分離され、まだわずかに 10 種類の構造が完全に決められたにすぎない。他の大部分は塩基の混合物のままで酸化反応による分解物を調べたり、あるいは GC-MS によって構造が推定されているものである。しかし、このように多種類のスフィンゴシン塩基が見いだされるようになってきたのは、上に述べた GC, TLC などクロマト技術の進歩や、MS などによる機器分析法が導入されてきたことに大いによっているといえよう。

スフィンゴシン塩基の基本構造をまとめてみると次のようになる。

1) 極性基グループとしては 1,3-dihydroxy-2-

表-4 天然のスフィンゴシン塩基⁵³⁾

No. of carbon atoms	Shorthand ^{a)} formula	Systematic name	Origin ^{b)}	Reference
Saturated straight chain dihydroxy bases				
12	d 12 : 0	1,3-Dihydroxy-2-aminododecane	A	52)
14	d 14 : 0	1,3-Dihydroxy-2-aminotetradecane	A	52), 77), 84)
15	d 15 : 0	1,3-Dihydroxy-2-aminopentadecane	A	52)
16	d 16 : 0	1,3-Dihydroxy-2-aminohexadecane	A, P	52), 56), 57), 78), 85), 86)
17	d 17 : 0	1,3-Dihydroxy-2-aminoheptadecane	A, P	49), 52), 56), 78), 86)
18	d 18 : 0	<i>D-erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-aminooctadecane(sphinganine) ^{c)}	A, B, P	80), 88), 87)
19	d 19 : 0	1,3-Dihydroxy-2-aminononadecane	A, P	52), 86)
20	d 20 : 0	1,3-Dihydroxy-2-aminoeicosane	A, P	86), 89)~91)
Monounsaturated straight chain dihydroxy bases				
12	d 12 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-dodecene	A	52)
13	d 13 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-tridecene	A	52)
14	d 14 : 1 ^d	<i>D-erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4-tetradecene	A	52), 77), 84), 85), 92), 93),
15	d 15 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-pentadecene	A	52), 85)
16	d 16 : 1 ^d	<i>D-erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4-hexadecene	A	49), 52), 55), 77), 78), 84),
17	d 17 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-heptadecene	A	85), 92), 95)
18	d 18 : 1 ^d	<i>D-erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4-octadecene (4-sphingenine)	A	49), 52), 55), 77), 78), 85), 94)
18	d 18 : 1 ^{no 14}	1,3-Dihydroxy-2-aminooctadecene	A	95)~98)
18	d 18 : 1 ⁸	1,3-Dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -8-octadecene	A	77)
19	d 19 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-nonadecene	P	99)
20	d 20 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-eicosene	A	52), 70)
20	d 20 : 1 ¹¹	<i>D-erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4-eicosene	A	89), 91), 100)
22	d 22 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-11-eicosene	A	84)
22	d 22 : 1 ^d	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-docosene	A	100)
22	d 22 : 1 ⁹	<i>Erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>cis</i> -9-docosene	A	54)
22	d 22 : 1 ¹⁸	<i>Erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>cis</i> -13-docosene	A	54)

No. of carbon atoms	Shorthand ^{a)} formula	Systematic name	Origin ^{b)}	Reference
Diunsaturated straight chain dihydroxy bases				
16	d 16 : 2	1,3-Dihydroxy-2-aminohexadecadiene	A	55), 70)
17	d 17 : 2	1,3-Dihydroxy-2-aminoheptadecadiene	A	40), 55), 70)
18	d 18 : 2 ^{4,14}	<i>D-erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4, <i>cis</i> -14-octadecadiene	A	40), 54)~56)
18	d 18 : 2 ^{4,8}	<i>D-erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4, <i>trans</i> -8-octadecadiene(4,8-sphingadienine) ^{c)}	A	54), 101)
18	d 18 : 2 ^{4,13}	1,3-Dihydroxy-2-amino-4,13-octadecadiene	A	102)
18	d 18 : 2 ^{4,12}	1,3-Dihydroxy-2-amino-4,12-octadecadiene	A	78)
18	d 18 : 2	1,3-Dihydroxy-2-aminooctadecadiene	A	77)
20	d 20 : 2 ^{4,11}	1,3-Dihydroxy-2-amino-4,11-eicosadiene	A	84)
20	d 20 : 2	1,3-Dihydroxy-2-aminoeicosadiene	P	55)
22	d 22 : 2 ^{4,9}	<i>Erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4, <i>cis</i> -9-docosadiene	A	54)
22	d 22 : 2 ^{4,13}	<i>Erythro</i> -1,3-dihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -4, <i>cis</i> -13-docosadiene	A	54)
Saturated straight chain trihydroxy bases				
16	t 16 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-aminohexadecane	A, P	54), 86)
17	t 17 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-aminoheptadecane	A, P	54), 57), 58), 86)
18	t 18 : 0	<i>D-ribo</i> -1,3,4-trihydroxy-2-aminooctadecane (4 <i>D</i> -hydroxysphinganine) ^{c)}	A, P	54), 98), 103)
19	t 19 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-aminononadecane	A, P	54), 70), 86)
20	t 20 : 0	<i>D-ribo</i> -1,3,4-trihydroxy-2-aminoeicosane	A, P	86), 104), 105)
Unsaturated straight chain trihydroxy bases				
18	t 18 : 1 ⁸	<i>D-ribo</i> -1,3,4-trihydroxy-2-amino- <i>trans</i> -8-octadecene	P	103)
Saturated branched chain dihydroxy bases				
17	<i>iso</i> d 17 : 0	1,3-Dihydroxy-2-amino-15-methylhexadecane	A, B	52), 62), 80)
18	<i>iso</i> d 18 : 0	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-methylheptadecane	A, B	52), 62), 80)
19	<i>iso</i> d 19 : 0	1,3-Dihydroxy-2-amino-17-methyloctadecane	A, B	52), 62), 80)
20	<i>iso</i> d 20 : 0	1,3-Dihydroxy-2-amino-18-methylnonadecane	A	52), 62)
17	<i>anteiso</i> d 17 : 0	1,3-Dihydroxy-2-amino-14-methylhexadecane	A	52)
19	<i>anteiso</i> d 19 : 0	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-methyloctadecane	A	52), 54)
Unsaturated branched chain dihydroxy bases				
14	<i>iso</i> d 14 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-12-methyl-4-tridecene	A	52)
15	<i>iso</i> d 15 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-13-methyl-4-tetradecene	A	52)
17	<i>iso</i> d 17 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-15-methyl-4-hexadecene	A	52), 62)
18	<i>iso</i> d 18 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-methyl-4-heptadecene	A	49), 52), 54), 57), 58), 62)
19	<i>iso</i> d 19 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-17-methyl-4-octadecene	A	52), 54), 62)
15	<i>anteiso</i> d 15 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-12-methyl-4-tetradecene	A	52)
17	<i>anteiso</i> d 17 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-14-methyl-4-hexadecene	A	52)
19	<i>anteiso</i> d 19 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-methyl- <i>trans</i> -4-octadecene	A	49), 52), 54)
20	<i>anteiso</i> d 20 : 1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-17-methyl-4-nonadecene	A	54)
Saturated branched chain trihydroxy bases				
17	<i>iso</i> t 17 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-15-methylhexadecane	A	54)
18	<i>iso</i> t 18 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-16-methylheptadecane	A	54)
19	<i>iso</i> t 19 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-17-methyloctadecane	A	57)
21	<i>iso</i> t 21 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-19-methyleicosane	A	63)
19	<i>anteiso</i> t 19 : 0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-16-methyloctadecane	A	54), 57)

a) d は dihydroxy base を, t は trihydroxy base を示す。コロンの前の数字は炭素鎖数を, コロンの後の数字は二重結合数を, 肩の数字は二重結合の位置を示す。

b) A は動物, B はバクテリア, P は植物を示す。

c) カッコは IUPAC-IUB name を示す。

amino-基が共通している。

- 2) 炭素鎖は 12~22
- 3) 分枝アルキル鎖としては *iso*, *anteiso* が知られている。
- 4) C 2, C 3, C 4 の configuration はすべて D である。
- 5) 不飽和結合としては次のとおり。

(a) Monoene	(b) Diene
d*n : 1 ⁴ <i>trans</i>	d 18 : 2 ⁴ <i>trans</i> , 14 <i>cis</i>
d 18 : 1 ^{not 4}	d 18 : 2 ⁴ <i>trans</i> , 8 <i>trans</i>
d 18 : 1 ⁸	d 18 : 2 ⁴ , x
t*18 : 1 ⁸ <i>trans</i>	d 20 : 2 ⁴ , 11
d 20 : 1 ¹¹	d 22 : 2 ⁴ <i>trans</i> , 9 <i>cis</i>
d 22 : 1 ⁹ <i>cis</i>	d 22 : 2 ⁴ <i>trans</i> , 13 <i>cis</i>
d 22 : 1 ¹³ <i>cis</i>	

(* d は dihydroxy base, t は trihydroxy base を示す)

これらのスフィンゴシン塩基の分布には特徴があって、種や組織、あるいは脂質の種類によって著しく異なっているようである。ヒト血清の CMH, CDH ではフィトスフィンゴシンが含まれているが⁵⁴⁾、同血清のスフィンゴミエリンではジェンタイプのスフィンゴシン塩基を多量に含んでいる^{40), 49), 51), 54)~56)}。一方ジン(腎)にはさまざまなタイプのスフィンゴシン塩基が見いだされ^{54), 57)~59)}、ヒトによって異なっていたり⁶⁰⁾、組織の部位によって違いがある^{58), 61)}とさえ報告されている。分枝スフィンゴシン塩基は protozoa に初めて見いだされ^{62), 63)}、ホ乳類では腸内微生物によって合成された分枝塩基が利用されているのではないかと想像されている⁶⁴⁾。分枝塩基は末梢神経系には見いだされるが、中枢神経系にはないという⁵⁴⁾。おもに腸粘膜やジンに多いフィトスフィンゴシンタイプのものは食ジに由来しているという⁶¹⁾。

糖脂質の塩基成分を調べるにはまずスフィンゴシン塩基を intact な形でとらなければならないが、それがなかなか容易でない。4 位にある二重結合が酸水解⁶⁰⁾や酸性メタノリシス⁶⁵⁾中にアリル転移をするため、現在その副反応をできるだけおさえる処方として Gaver らの塩酸-水-メタノール (8.6 : 9.4 : 82) が広く用いられている⁶⁶⁾。しかしながら、この方法によっても一割くらいのメチルスフィンゴシンが生じてきて、しかも intact なスフィンゴシンとクロマト上の挙動が似ていて精製しにくいという理由から、Karlsson は塩酸水解を用いている^{53), 54)}。

酸性メタノリシスの際に生じる副生物については古くから議論されてきているが、3-O-メチルスフィンゴシンと5-O-メチルスフィンゴシンがおよそ 3 : 7 で生じるというところに落ち着いてきたようである^{67), 68)}。それらの生成機構についてもいろいろと提出されている⁵³⁾。

⁶⁹⁾。フィトスフィンゴシンについても酸水解で脱水が起こりテトラヒドロフラン環が生じたり^{70)~72)}、アセトリシスで 3,4 位の configuration の反転が起こると報告されている⁶⁰⁾。

CMH の場合には過ヨウ素酸酸化と弱酸水解でセラミド部分を取り、アルカリ水解をして副生物を含まないスフィンゴシン塩基を得ることができる⁷³⁾。

Karlsson ら⁶⁰⁾はヒトのジン臓 (60~90 才)の糖脂質から CMH, CDH, CTH, グロボシド, スルファチドを得て、それらのスフィンゴシン塩基の組成について調べている。数 mg の各糖脂質を塩酸水解し、DNP 化⁷⁴⁾したものをケイ酸カラムで精製後、TLC と GC 分析をした。GC では四酢酸鉛で酸化して得られたアルデヒドをみて、もとのスフィンゴシン塩基を推定する方法^{74)~76)}をとった。この方法では初めの酸水解の段階で不飽和塩基の約 50% もが副生物になってしまうので、残りの半分で全体の塩基組成を代表させることになる。この方法の不足なところは今後改良されるべきであるが、かれらの研究の成果は、糖脂質の種類によってスフィンゴシン塩基のパターンが著しく異なっていること、とくにセラプロシドとスルファチドでフィトスフィンゴシンが多量に存在していることが明らかにされた点である。

スフィンゴシン塩基の構造を調べようというときには、その目的物を単一なものにしなければならない。いままで preparative AgNO₃-TLC⁴⁰⁾、TLC と逆相ペーパークロマトの組合せ⁵⁶⁾、あるいは GC⁵⁵⁾などが使われてきた。

二重結合の位置を決めるには、脂肪酸の項で述べたように二つの方法があり、一つは酸化的開裂後 GC で分析するもの^{55), 77), 78)}と、もう一つは四酸化オスミウムの反応で生じたヒドロキシ誘導体を MS で調べる方法である^{54), 79)}。分枝スフィンゴシン塩基の側鎖の位置を決めるには遊離のスフィンゴシン塩基の MS を直接測定してもあまり情報が得られないので、酸化的開裂でアルデヒドか脂肪酸にかえてから GC-MS 分析に供する必要があるという^{53), 54), 80)}。

スフィンゴシン塩基の立体異性体である *erythro*, *threo* 型の分離は TLC⁵⁴⁾や GLC^{81)~83)}で行なわれている。Karlsson⁵⁴⁾によると水素添加して DNP 誘導体になると TLC 上でみごとに分離するという。

ヒト血清スフィンゴミエリン中のジェン型スフィンゴシン塩基の構造決定に至る過程は、巧妙に実験が行なわれた例としておもしろい。ジェン型塩基の存在は Sweeley ら⁷⁵⁾によって初めて指摘され、Karlsson⁷⁸⁾によって 4,14-sphingadienine と 4,12-sphingadienine の混合物であろうと推定されていた。Polito ら⁵⁵⁾は N-アセチル-O-TMS 誘導体として GC で分取し、その MS を測定した。*m/e* 468 (M-15)⁺のピークから分子量

4-Sphingene の誘導体 (MW=671)

4,14-Sphingadiene の誘導体 (MW=847)

図-2 ヒト血清スフィンゴミエリン中のジェン型塩基 (下) と 4-sphingene (上) の質量スペクトルにおける開裂⁵⁴⁾

が 483 であることがわかり、 C_{18} のスフィンゴシンとすると 2 個の二重結合を含むことを示した。 C_2-C_3 での allylic cleavage に由来すると思われる m/e 174 $[\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3]^+$ のピークの存在で d^4 がわかったが、もう一つの二重結合の位置は MS の開裂からはわからなかった。過マンガン酸-過ヨウ素酸酸化を行なって dimethyl sebacate を得たことから d^{14} を推定し、さらに四酸化オスミウム酸化で二重結合を水酸化し、つづいて TMS 化して MS 分析を行ない d^4 , d^{14} を証明している。なお Polito ら⁵⁵⁾ は d^4 , d^{12} の異性体については確認していない。Karlsson^{54), 56)} は d^4 , d^{14} について別途証明している。DNP 化⁷⁴⁾ したスフィンゴシン塩基の混合物を AgNO_3 -TLC と逆相ペーパークロマトで精製してジェン型の塩基を得て⁵⁶⁾、まず O-メチル化してから二重結合の水酸化を行ない、新たに生じた水酸基に TMS 基を導入して MS 分析を行なった⁵⁴⁾。ジェン型塩基の開裂を 4-sphingene のと比べて 4,14-sphingadiene であることを確認した (図-2)。 C_2-C_3 の立体配置については、GC の保持時間⁵⁵⁾ や、TLC の移動度^{40), 54)} から *erythro* 型であると推定されている。 d^4 , d^{14} については Renkonen ら⁴⁰⁾ がヒドラジンによる部分還元で $d18:1^{trans}$ と $d18:1^{cis}$ を分離して証明している。以上の結果を総合してジェン型の塩基は D-*erythro*-1,3-dihydroxy-2-amino-*trans*-4, *cis*-14-octadecadiene (4, *cis*-14-sphingadiene) であることが明らかとなった。

3.2.3 オリゴ糖の分析

糖脂質の構成糖分析に GC の応用はますます盛んになってきている。現在繁用されているのは、おもに Sweeley ら¹⁰⁶⁾ および山川¹⁰⁷⁾ によって詳しく述べられている TMS 誘導体を用いる方法である。Sweeley ら¹⁰⁸⁾ は

この方法をガングリオシドの分析にみごとに応用している。最近、トリフルオロアセチル (TFA) 誘導体が試みられるようになり、著しく揮発性が高いので注目されている^{109)~115)}。還元糖のままでは十分な分離が得られないので¹⁰⁹⁾、 NaBH_4 で糖アルコールに変えてから TFA 誘導体として分析する方法が発展してきた^{110)~111)}。しかし、この方法では還元反応が必要な上に、中性糖とヘキシサミンを別々に処理するなど操作がやや複雑である。著者ら¹¹⁵⁾ は、糖脂質のメタノリシス分解物から脂肪酸を除去した残りを TFA 化して、一回の GC 分析で中性糖からヘキシサミン、シアル酸、スフィンゴシン塩基までを定量する方法をくふうした (図-3)。この方法の利点は一回の分析でスフィンゴリピドであることがわかると同時に mol 比が決定でき、しかも糖アルコールにする方法と異なり、一つの糖に複数のアノマーピークの組合せがあるので同定を誤まらないことである。TFA 誘導体の安定性は TMS 誘導体とほぼ同等以上で¹¹⁵⁾、ガラスカラムを用いた on-column injection で分析すると非常に定量性がよい。ただし、水蒸気で分解しやすくやや扱いにくいところがあるので注意を要する。TFA 誘導体はエレクトロンキャプチャ検出器 (ECD) を用いるとナノグラムオーダーの分析ができる¹¹⁰⁾ ので、今後超微量分析の可能性を開くものと考えられる。

トリフルオロアセチル (TFA) 誘導体として、90°C から 210°C まで 2°C/min で昇温分析した¹¹⁵⁾。

図-3 Tay-Sachs ガングリオシドのガスクロマト分析

糖脂質の糖の結合順序を決めるには普通メチル化の手法が用いられている。完全メチル化物を加水分解して、 NaBH_4 処理後アセチル化物を得て GC-MS で分析する方法は確実でよい方法である^{116), 117)}。

糖脂質のオリゴ糖部分をそっくりはずす方法として Wiegandt ら^{118), 119)} のオゾノリシス-アルカリ分解法と箱守¹²¹⁾ の四酸化オスミウム-過ヨウ素酸法とがあるが、どちらの場合もスフィンゴシン塩基の C_4 に二重結合がないと適用できない。Wiegandt^{119), 120)} はガングリオシド粗分画からオゾン分解で得たオリゴ糖の混合物をペー

パークロマトで分離し、切り抜き一抽出一構成糖分析で各スポットのオリゴ糖を同定して、もとのガングリオシドの組成を推定する方法をとっている。著者ら¹²²⁾はヒト血球の Globoside I とヒツジ血球のホルスマン活性糖脂質とからオリゴ糖をとってそれぞれの NMR スペクトルを測定した。糖脂質からオリゴ糖部分はずす反応にはスフィンゴシン塩基による制限があるので定量分析にはむかないが、たとえばオリゴ糖部分だけの性質を調べたいときなどには、これらの方法によらなければならない。

3・2・4 セラミド、サイコシンおよびセレブロシドの GC-MS 分析

糖脂質の共通部分であるセラミドはスフィンゴシン塩基と脂肪酸の組合せで非常にたくさんの分子種が考えられる。従来はセラミドを TLC でいくつかのサブフラクションに分けておいて、それぞれについて塩基と脂肪酸を分析する方法がとられていたが、その結果によると両者の組合せはランダムではないことを示しているという⁴⁹⁾。これは生物らしい現象で、考えられるセラミドの分子種のうちどれがどのくらいの比重で存在するかを調べることは大変興味ある問題である。Samuelsson 一派^{123)~127)}は最近、この仕事を強力に推しすすめ GC-MS によるセラミドの構造決定法をほぼ確立し、Casparrini¹²⁸⁾らも同様の結果を出している。

Samuelsson ら^{123), 127)}はスフィンゴシン塩基として 4-sphingenine と sphinganine を選び、脂肪酸として $C_{16}\sim C_{26}$ の飽和酸、 $C_{18:1}, C_{18:2}, C_{24:1}$ (*trans* および *cis*) の不飽和酸、それに $C_{14}\sim C_{26}$ の 2-ヒドロキシ酸などを選び 6 系列のセラミドを合成した。これらのセラミドを TMS 誘導体で測定した質量スペクトルを整理して、フラグメントイオンには“分子量”、“塩基部分”、“脂肪酸部分”についての情報を与える三つのグループのあることがわかった。すなわち、分子量は $(M-15)^+$ 、 $(M-90)^+$ および $(M-103)^+$ のピークからわかり、スフィンゴシン塩基については 図-4 の開裂図からわかるように $(M-(b+1))^+$ 、 $(M-(b+1+90))^+$ および $(M-d)^+$ の各ピークで炭素鎖の長さが示され、sphingenine は $(M-(b+1+e))^+$ のピーク、sphinganine は $(M-(b+1+c))^+$ のピークで判定できる。脂肪酸部分についての

図-4 セラミドの質量スペクトルにみられる主要な開裂^{128), 127)}

表-5 ステアリン酸を含むセラミドの質量スペクトルにおける主要なイオン

Sphingosine base	Sphingosine (%)		Sphinganine (%)	
Fatty acid	Normal	2-Hydroxy	Normal	2-Hydroxy
M	1	1	1	2
M-15	7	4	8	11
M-90	5	6	5	5
M-103	3	3	13	13
M-2×90	2	4	1	2
M-103-90	4	9	8	1
M-a	100	100	16	25
M-a-16	—	13	—	8
M-(a-73)	20	19	33	100
M-(a-73)-16	—	3	—	8
M-(a-73)-90	—	3	—	8
M-a-89	—	6	44	86
M-a-89-16	—	1	—	5
M-(a-73)-(g-1)	7	3	15	14
M-(a-73)-(g-1)-90	23	6	62	17
M-(a-73)-(g-1)-2×90	—	3	—	8
M-(b+1)	45	22	4	5
M-(b+1+90)	6	10	—	—
M-(b+1+e)	24	12	—	—
M-(b+1+c)	—	4	28	30
b+1+73	4	14	5	24
b+2	—	5	—	20
M-d	60	31	100	58
f	—	20	—	30
M-(g-1)	—	—	—	5

情報は $(M-a)^+$ 、 $(M-(a+89))^+$ および $(M-(a-73))^+$ の各ピークで与えられる。ヒドロキシ脂肪酸を含むセラミドについても同様に解析されて^{126), 127)}、それぞれの場合のフラグメントイオンの相対強度を比較して 4 系列のセラミドが容易に同定されるようになった (表-5)。

Samuelsson らはこれらの基礎的なデータを使って、ヒト血しょうスフィンゴミエリンのセラミドの分子種分布を明らかにしたり^{124), 125), 127)}、ウシ脳セレブロシドのセラミドを調べたり¹²⁹⁾、さらにヒドロキシ酸を含むセラミドからのセレブロシドの生合成実験へ応用したりしている¹³⁰⁾。現在のところ脂肪酸部分の二重結合の位置についての情報が得られないのと、CDH 以上の糖脂質からセラミドを有効にとる方法のないことが制限になっている。そのうえ、この方法はかなりのテクニックと労力を要するが、今後それらの制限を越えておおいに応用されていくものと思われる。

最近さらに進んでセレブロシドの GC-MS も測定されるようになった。Karlsson⁵⁴⁾はヒト脳のセレブロシドの MS をウシ脳のセレブロシドおよびサイコシンと比較している。MS から CMH であることと塩基部分が 18:1 でないことがわかり、詳しくはセラミドに

してから解析された。セラミドにヘキソースが1個ついたことにより TMS 化されておよそ 400 ほど分子量が大きくなっているが、セラミド部分の開裂様式は上に述べたセラミド自身のものによく似ている。

以上のように MS は少量のサンプルで分子全体についてのなんらかの情報が得られることで大きなメリットがある。スフィンゴシン塩基、セラミド、サイコシン、セレブロシドと進んできて、さらに四糖を含む高級糖脂質まで分析されはじめているという⁵⁵⁾。今後分析機器の改良とともに新しい研究法の進展がみられるに違いない。

3.3 円二色性 (CD), 核磁気共鳴 (NMR) 分光法の応用

タンパク質や核酸方面では UV 吸収スペクトルが有用な分析法であるが、脂質や糖脂質領域においてはあまり有効でない。もっぱら IR スペクトルが用いられてきた感があるが、これは官能基試験がおもな目的である。ときに configuration の決定に使われることもあるが、分子の conformation の問題までは解析の困難さからなかなか利用されない。まえがきに述べたように、糖脂質もなんらかの生物活性を発現するためにある限られた configuration や conformation があるとすれば、糖脂質の立体構造とか他の分子と相互作用するときの conformation の変化などを知る手段をもたなければならない。その目的にはどの方法はだめでどの方法が有効かという結論は出ていないが、ここでは CD と NMR の応用について紹介したい。

3.3.1 ノイラミン酸の CD スペクトル

ノイラミン酸はガングリオシドの重要な構成成分である。ノイラミン酸の open-chain 構造の場合の5個の不斉中心についての configuration はすでに決められており^{131), 132)}、環構造をとって他の糖と結合している場合には C2 に新たな不斉中心ができて 図-5 の α -ケトシド

図-5 N-アセチルノイラミン酸の二つのアノマーの構造

と β -ケトシドとが可能である。Yu と Ledeen¹³³⁾ は N-アセチルノイラミン酸 (NANA) のメチルケトシドの二つのアノマーを合成し (図-5 で R=CH₃)、そのうち II のタイプはラク톤を生じることからカルボキシル基が equatorial, すなわち β -ケトシドであることを化学的手法で確認した。ところでシアリダーゼの作用を受けるのはラク톤を生じない I の α -ケトシドタイプのものだけであった。

このようなことがわかってくると、ガングリオシドに含まれるシアル酸のうちシアリダーゼの作用を受けないものは β -ケトシドであろうかと想像したくなる。ところが Tay-Sachs ガングリオシドの場合には弱い条件で末端のヘキソサミンをはずすとシアリダーゼが作用するようになることから、この場合にはヘキソサミンの立体障害が考えられた¹³⁴⁾ (図-6)。正常脳の主要なガングリオシドである GM₁ についても同様な事実がみつまっている¹³⁵⁾。

Ledeen¹³⁶⁾ は CD スペクトルを用いてノイラミン酸の anomeric configuration を簡単、確実に決める方法を試みている。図-7 をみると α -メチルケトシドでは negative band を、 β -メチルケトシドでは positive band を示すことがわかる。図-8 ではヘマトシド-CDH の CD 差スペクトルの強い negative band からノイラミン酸の α -ケトシドがはっきりと証明された。Tay-Sachs ガングリオシドと脳ガングリオシド混合物についても強い negative band を認めている。

図-6 末端ガラクトサミンを除いてヘマトシドにすると初めてシアリダーゼが作用するようになる。

図-7 N-アセチルノイラミン酸のメチルケトシドの CD スペクトル

ヘマトシド-CDH の CD 差スペクトル

図-8 ヘマトシド-CDH の CD 差スペクトル

3.3.2 糖脂質の NMR スペクトル

ノイラミン酸以外のオリゴ糖部分の anomeric configuration を決めるには、旋光度をはかるのが手軽であるが、分子全体の総合された光学活性をみているのでただちに anomeric configuration についての結論をひきだすにはむずかしいことがある。最近、この configuration を決めるのに NMR スペクトルがよく使われるようになってきた。

Kawanami⁽¹³⁷⁾は Nakahara-Fukuoka肉腫の CTH から sphingosyl trihexoside をとって、その NMR スペクトルから末端のガラクトースは α -結合していることを示した。Fabry 病患者の CTH については, Sweeley ら⁽¹³⁸⁾が脂質のまま、あるいはそのオリゴ糖部分を TMS 誘導体にして NMR スペクトルを測定し、いくぶんの疑いを残しながらも

Gal-(β 1 $\rightarrow$ 4)-Gal-(β 1 $\rightarrow$ 4)-Glc-(β 1 $\rightarrow$ 1)-ceramide と結論した。ところが Handa ら⁽¹³⁹⁾はオゾン分解で CTH から三糖を得て、還元末端を糖アルコールにしてから NMR スペクトルをとって、 α -プロトン (δ =5.02 ppm, J =2.7 Hz) と β -プロトン (δ =4.59 ppm, J =7.5 Hz) をおよそ 1:1 で検出した。この結果から Fabry 病患者に蓄積する CTH の構造は

Gal-(α 1 $\rightarrow$ 4)-Gal-(β 1 $\rightarrow$ 4)-Glc-(β 1 $\rightarrow$ 1)-ceramide であろうと推定され、Fabry 病患者ジンは α -ガラクトシダーゼ活性が著しく低下している^{(139), (140)}ことよくつじつまがあうのである。著者はヒト血球 Globoside I の四糖の NMR スペクトルをとっていたが、5.02 ppm のシグナルが α -プロトンに帰属できずに誤りをおかした⁽¹²²⁾。後に Hakomori ら⁽¹⁴¹⁾はイチジクの α -ガラクトシダーゼの反応と NMR の証コから Globoside I の構造を次のように確定した。

-Gac-(β 1 $\rightarrow$ 1)-ceramide.

このように anomeric configuration への NMR の応用は盛んになりつつあるが、上にあげた例のようにシグナルの帰属をつけるのがむずかしい。さらに糖脂質分子の conformation の変化を知る方法として NMR が応用できるのではないかという立場から著者は基礎的な検討をすすめている。

図-9 にスフィンゴシン塩基の代表として 4-sphingene と sphinganine の全プロトンの帰属を示した^{(142)~(144)}。ここで (f) のプロトンが (d), (e) より低磁場シフトしているのは予想通りであったが、(h) プロトンが (g) よりも低磁場シフトしているのは意外であった。 J_{gh} は 15.4 Hz と大きく (g), (h) が *trans* 配置であることを示している。また (g) は (c) と long-range のスピン-スピン相互作用をもっていることもわかった。官能基にアセチル基を導入すると図-10 のように著しく低磁場シフトし、トリメチルシリル (TMS) 基を入れると逆に高磁場シフトが観測され、それぞれ置換基の電気陰性度が反映しているものと想像される。これらの置換基によって、(e), (e') プロトンの環境に差を生じるためか ABX 系の分裂がはっきりとできてきている。

図-9 スフィンゴシン塩基の NMR スペクトル (60 MHz)

図-10 スフィンゴシン誘導体の NMR スペクトル (60 MHz)

図-11 フレノシンの NMR スペクトル (100 MHz)

複合スフィンゴリピドでは、アルキル鎖とともにたくさんの水酸基をもっているために、単一の無極性溶液中では著しく線幅の広がったスペクトルしか得られないのが普通である。複合脂質の conformation を追求するために高分解能 NMR において鋭いシグナルを出す必要から、フレノシン（ヒドロキシ酸を含むセレブロシド）について溶媒効果を観察した^{(113), (144)}。図-11 にメタノール-クロロホルム、メタノール-ベンゼン、クロロホルム-ピリジンの各混合溶媒系で測定したスペクトルを示す。溶媒の種類によって (g), (h) プロトンの化学シフトが著しく変わったり、脂肪酸部分のオレフィンプロトン ($\delta=5.34\sim 5.45$ ppm) とはっきり区別されているのがおもしろい。糖のプロトンはこれらの溶媒系で初めて鋭いシグナルを示すよ

うになり、スフィンゴシンの (e), (e') プロトンも明りょうに認められるようになった。この (e), (e') の結合定数の変化から糖の結合位置付近の conformation の変化の様子が解かれることも期待される。

4 おわりに

糖脂質は細胞膜の重要な構成成分であって、それらの役割を理解する上で化学構造の研究がまず第一に必要である。新しい方法を導入することによって従来の結果が訂正されることもあるし、飛躍的に発展することもあるに違いない。しかし、思考の面で先入観念や常識にとらわれすぎていないかどうかをふり返ってみることも大切である。

脂質の研究は脂質の化学と代謝が大きな比重を占めてきた。糖脂質が生体に存在する状態ではどういう立体構造をとっているのか、あるいは他の分子と相互作用するときにはどのような conformation の変化が起こるのか、などという疑問も脂質の生化学にかかわりあいをもってくるはずである。単なる興味からその現象の一端だけでも知りたいと思っている。

広い範囲のなかのごく一部について著者の興味に片寄って述べてきたことをご容赦いただきたい。

ご校閲いただいた山川民夫教授、ならびに執筆の機会を与えていただいた北里大学金子 弘教授に深謝致します。

(昭和 47 年 3 月 11 日受理)

文 献

- 1) S. Hakomori, W.T. Murakami, *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, **59**, 254 (1968)

- 2) S. Hakomori, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **67**, 1741 (1970)
- 3) 箱守, 生体の科学, **19**, 102 (1968)
- 4) IUPAC-IUB, *J. Lipid Res.*, **8**, 523 (1967)
- 5) IUPAC-IUB, *Eur. J. Biochem.*, **2**, 127 (1967)
- 6) 安藤, 寺山, 西沢, 山川編 “生化学研究法” I. (1967) 朝倉書店
- 7) 牧田, 蛋白質核酸酵素別冊 “生物化学実験法 VII, 脂質実験法” p. 106 (1967) 共立出版
- 8) G. Rouser, G. Kritchevsky, A. Yamamoto “Lipid Chromatographic Analysis” p. 99 (1967) by G.V. Marinetti, Marcel Dekker, N.Y.
- 9) R.J. Penick, M.H. Meisler, R.H. McCluer, *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 279 (1966)
- 10) 林, 片桐, “脂質生化学研究 XII” 43 (1970), 群馬
- 11) S. Ando, T. Yamakawa, *J. Biochem.*, in press
- 12) T.R. Mon, R.A. Flath, R.R. Forrey, R. Teranishi, *J. Gaschromatog.*, 409 (1967)
- 13) 安田, 大野, 蛋白質核酸酵素別冊 “生物化学実験法 VII” 84, (1967) 共立出版
- 14) 安藤, 未発表
- 15) D.E. Vance, C.C. Sweeley, *J. Lipid Res.*, **8**, 621 (1967)
- 16) R.M.C. Dawson, *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 374 (1954)
- 17) G. Hübscher, J.N. Hawthorne, P. Kemp, *J. Lipid Res.*, **1**, 433 (1960)
- 18) E. Mårtensson, *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 296, 309 (1966)
- 19) P.B. Schneider, E.P. Kennedy, *J. Lipid Res.*, **9**, 58 (1968)
- 20) D.J. Hanahan, J.E. Ekholm, B. Benson, *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 343 (1971)
- 21) J. Folch-Pi, M. Lees, G.H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)
- 22) E.G. Bligh, W.J. Dyer, *Can. J. Biochem. Phys.*, **37**, 911 (1959)
- 23) K. Suzuki, *J. Neurochem.*, **12**, 629 (1965)
- 24) K. Puro, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 13 (1970)
- 25) G.M. Gray, *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 511 (1967)
- 26) V.P. Skipski, A.F. Smolowe, M. Barclay, *J. Lipid Res.*, **8**, 295 (1967)
- 27) N.M. Neskovic, J.L. Nussbaum, P. Mandel, *J. Chromatog.*, **49**, 255 (1970)
- 28) R.H. McCluer, *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 220 (1970)
- 29) 伊藤, 金子, 油化学, **20**, 23 (1971)
- 30) S. Handa, R.M. Burton, *Lipids*, **4**, 205 (1969)
- 31) J. Jun, Eichberger, V.P. Whittacker, R.M.C. Dawson, *Biochem. J.*, **92**, 91 (1964)
- 32) G. Yogeeswaran, J.R. Wherrett, S. Chatterjee, R.K. Murray, *J. Biol. Chem.*, **245**, 6718 (1970)
- 33) R.J. Nicolosi, S.C. Smith, R.F. Santerre, *J. Chromatog.*, **60**, 111 (1971)
- 34) E. Stahl, H. Jork, *Zeiss Inform.*, **16**, 52 (1968)
- 35) F.B. Padley, *J. Chromatog.*, **39**, 37 (1969)
- 36) J.J. Szakasts, P.V. Peurifoy, L.A. Woods, *Anal. Chem.*, **42**, 351 (1970)
- 37) E. von Rudloff, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **33**, 126 (1956)
- 38) E. von Rudloff, *Canad. J. Chem.*, **34**, 1413 (1956)
- 39) F. Davidoff, E.D. Korn, *J. Biol. Chem.*, **238**, 3199 (1963)
- 40) O. Renkonen, E.L. Hirvisalo, *J. Lipid Res.*, **10**, 687 (1969)
- 41) M. Beroza, B.A. Bierl, *Anal. Chem.*, **39**, 1131 (1967)
- 42) M. Beroza, B.A. Bierl, *Anal. Chem.*, **38**, 1976 (1966)
- 43) O.S. Privett, E.C. Nickell, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **43**, 393 (1966)
- 44) P. Capella, C.M. Zorzut, *Anal. Chem.*, **40**, 1458 (1968)
- 45) E. Coles, J.L. Foote, *J. Lipid Res.*, **11**, 433 (1970)
- 46) W.R. Morrison, J.D. Hay, *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 460 (1970)
- 47) G. Eglinton, D.H. Hunneman, McCormick, *Org. Mass Spectro.*, **1**, 593 (1968)
- 48) P. Capella, C. Galli, R. Fumagalli, *Lipids*, **3**, 431 (1968)
- 49) E.L. Hirvisalo, O. Renkonen, *J. Lipid Res.*, **11**, 54 (1970)
- 50) O. Renkonen, *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 190 (1970)
- 51) B. Samuelsson, K. Samuelsson, *J. Lipid Res.*, **10**, 47 (1969)
- 52) W.R. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 537 (1969)
- 53) K.A. Karlsson, *Lipids*, **5**, 878 (1970)
- 54) K.A. Karlsson, *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 6 (1970)
- 55) A.J. Polito, T. Akita, C.C. Sweeley, *Biochemistry*, **7**, 2609 (1968)
- 56) K.A. Karlsson, *Acta Chem. Scand.*, **21**, 2577 (1967)
- 57) H.E. Carter, C.B. Hirschberg, *Biochemistry*, **7**, 2296 (1968)
- 58) K.A. Karlsson, B.E. Samuelsson, G.O. Steen, *Acta Chem. Scand.*, **22**, 1361 (1968)
- 59) K. Puro, A. Keranen, *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 393 (1969)
- 60) K.A. Karlsson, E. Mårtensson, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 230 (1968)
- 61) K.A. Karlsson, G.O. Steen, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 798 (1968)
- 62) H.E. Carter, R.C. Gaver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 886 (1967)
- 63) H.E. Carter, R.C. Gaver, R.K. Yu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 316 (1966)
- 64) K. Okabe, R.W. Keenan, G. Schmidt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 137 (1968)
- 65) H.E. Carter, W.P. Norris, F.J. Glick, G.E. Phillips, R. Harris, *J. Biol. Chem.*, **170**, 269 (1947)
- 66) R.C. Gaver, C.C. Sweeley, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 294 (1965)
- 67) B. Weiss, *Biochemistry*, **3**, 1288 (1964)
- 68) 内田, 未発表
- 69) H.E. Carter, Y. Fujino, *J. Biol. Chem.*, **221**, 879 (1956)
- 70) K.A. Karlsson, G.A.L. Holm, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 2423 (1965)
- 71) P.W. O'Connell, S.H. Tsien, *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 289 (1959)
- 72) H.E. Carter, J.L. Koob, *J. Lipid Res.*, **10**, 363 (1969)
- 73) H.E. Carter, J.A. Rothfus, R. Gigg, *J. Lipid Res.*, **2**, 228 (1961)
- 74) K.A. Karlsson, *Nature*, **188**, 312 (1960)
- 75) C.C. Sweeley, E.A. Moscatelli, *J. Lipid Res.*, **1**, 40 (1960)
- 76) R. Wood, R.D. Harlow, *J. Lipid Res.*, **10**, 463 (1969)

- 77) R.V. Panganamala, J.C. Geer, D.G. Cornwell, *J. Lipid Res.*, **10**, 445 (1969)
- 78) K.A. Karlsson, *Acta Chem. Scand.*, **18**, 2395 (1964)
- 79) A.J. Polito, J. Naworal, C.C. Sweeley, *Biochemistry*, **8**, 1811 (1969)
- 80) D.C. White, A.N. Tucker, C.C. Sweeley, *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 527 (1969)
- 81) R.C. Gaver, C.C. Sweeley, *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 3643 (1966)
- 82) H.E. Carter, R.C. Gaver, *J. Lipid Res.*, **8**, 391 (1967)
- 83) K. Sambasivarao, R.H. McCluer, *J. Lipid Res.*, **4**, 106 (1963)
- 84) J.D. O'Conner, A.J. Polito, R.E. Monroe, C.C. Sweeley, L.L. Bieber, *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 195 (1970)
- 85) L.L. Bieber, J.D. O'Conner, C.C. Sweeley, *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 157 (1969)
- 86) K.A. Karlsson, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2884 (1966)
- 87) H.E. Carter, D. Shapiro, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5131 (1953)
- 88) E.F. Jenny, C.A. Grob, *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1936 (1953)
- 89) K.A. Karlsson, *Acta Chim. Scand.*, **18**, 565 (1964)
- 90) K. Sambasivarao, R.H. McCluer, *J. Lipid Res.*, **5**, 103 (1964)
- 91) N.Z. Stanacev, E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 168 (1965)
- 92) S.G. Karlsson, K.A. Karlsson, B.E. Samuelsson, G.O. Steen, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 3597 (1969)
- 93) E.A. Moscatelli, K.M. Gilliland, *Lipids*, **4**, 244 (1969)
- 94) M. Popovic, *Biochim. Biophys. Acta*, **125**, 178 (1966)
- 95) H.E. Carter, F.J. Glick, W.P. Norris, G.E. Phillips, *J. Biol. Chem.*, **170**, 285 (1947)
- 96) H.E. Carter, Humiston, *J. Biol. Chem.*, **191**, 727 (1951)
- 97) G. Marinetti, E. Stotz, *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 1347 (1954)
- 98) J. Gigg, R. Gigg, C.D. Warren, *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 1872
- 99) H.E. Carter, R.A. Hendry, S. Nojima, N.Z. Stanacev, K. Ohno, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1912 (1961)
- 100) E. Klenk, R.T.C. Huang, *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1081 (1969)
- 101) A. Hayashi, T. Matsubara, *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 228 (1970)
- 102) M. Popovic, *Bull. Sci., Conseil Acad. RSF Yugoslavia*, **11**, 98 (1966)
- 103) H.E. Carter, H.S. Hendrickson, *Biochemistry*, **2**, 289 (1963)
- 104) J. Gigg, R. Gigg, *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 1876
- 105) K.A. Karlsson, *Acta Chem. Scand.*, **18**, 2397 (1964)
- 106) C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W.W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963)
- 107) T. Yamakawa, N. Ueta, I. Ishizuka, *Japan. J. Exp. Med.*, **34**, 231 (1964)
- 108) C.C. Sweeley, B. Walker, *Anal. Chem.*, **36**, 1461 (1964)
- 109) M. Vilkas, Hiu-I-Jan, Mme. G. Boussac, Mme. M.C. Bonnard, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 1441
- 110) Z. Tamura, T. Imanari, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 246 (1967)
- 111) M. Matsui, M. Okada, T. Imanari, Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1383 (1968)
- 112) Z. Tamura, T. Imanari, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1864 (1968)
- 113) T. Imanari, Y. Arakawa, Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1967 (1969)
- 114) J. Shapira, *Nature*, **222**, 792 (1969)
- 115) S. Ando, T. Yamakawa, *J. Biochem.*, **70**, 335 (1971)
- 116) H. Björndal, B. Lindberg, S. Svensson, *Acta Chem. Scand.*, **21**, 1801 (1967)
- 117) H. Björndal, B. Lindberg, S. Svensson, *Carbohydr Res.*, **5**, 433 (1967)
- 118) H. Wiegandt, G. Baschang, *Z. Naturforsch.*, **20**, 164 (1965)
- 119) H. Wiegandt, H.W. Bucking, *Eur. J. Biochem.*, **15**, 287 (1970)
- 120) H. Wiegandt, *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 198 (1970)
- 121) S. Hakomori, *J. Lipid Res.*, **7**, 789 (1966)
- 122) S. Ando, T. Yamakawa, *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 91 (1970)
- 123) B. Samuelsson, K. Samuelsson, *J. Lipid Res.*, **10**, 41 (1969)
- 124) B. Samuelsson, K. Samuelsson, *J. Lipid Res.*, **10**, 47 (1969)
- 125) K. Samuelsson, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 211 (1969)
- 126) S. Hammarström, B. Samuelsson, K. Samuelsson, *J. Lipid Res.*, **11**, 150 (1970)
- 127) K. Samuelsson, B. Samuelsson, *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 44 (1970)
- 128) G. Casparrini, E.C. Horning, M.G. Horning, *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 1 (1969)
- 129) S. Hammarström, *Eur. J. Biochem.*, **15**, 581 (1970)
- 130) S. Hammarström, B. Samuelsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1027 (1970)
- 131) D.G. Comb, S.J. Roseman, *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 497 (1958)
- 132) R. Kuhn, G. Baschang, *Chem. Ber.*, **95**, 2384 (1962)
- 133) R.K. Yu, R. Ledeen, *J. Biol. Chem.*, **244**, 1306 (1969)
- 134) R. Ledeen, K. Salsman, *Biochemistry*, **4**, 2225 (1965)
- 135) R. Kuhn, H. Wiegandt, *Chem. Ber.*, **96**, 866 (1963)
- 136) R. Ledeen, *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 205 (1970)
- 137) J. Kawanami, *J. Biochem.*, **62**, 105 (1967)
- 138) C.C. Sweeley, P.D. Snyder, Jr., *Chem. Phys. Lipids*, **4**, 393 (1970)
- 139) S. Handa, T. Ariga, T. Miyatake, T. Yamakawa, *J. Biochem.*, **69**, 625 (1971)
- 140) J.A. Kint, *Science*, **167**, 1268 (1970)
- 141) S. Hakomori, B. Siddiqui, Yu-Teh Li, Su-Chen Li, C.G. Hellerqvist, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2271 (1971)
- 142) 安藤, 山川, 日本化学会, 22 年会, 予稿集 III, 1909 (1969 Mar., 東京)
- 143) 安藤, 山川, 第 42 回日本生化学会, 生化学, **41**, 615 (1969, Oct., 広島)
- 144) 安藤, 内田, 山川, 脂質生化学研究, **13**, 33 (1971)