イケチョウガイ卵のセラミド 2-アミノエチル ホスホネートについて

堀 太郎・杉田陸海・上林純子・板坂 修

滋賀大学教育学部化学教室 (滋賀県大津市石山平津町)

Isolation and Characterization of Ceramide 2-Aminoethylphosphonate from Ova of the Fresh-Water Bivalve, *Hyriopsis schlegelii*

Tarō HORI, Mutsumi SUGITA, Junko KANBAYASHI and Osamu ITASAKA

Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University
(Ishiyama-Hiratsu, Ohtsu-shi, Shiga)

Ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEP) was found to be the principal phosphosphingolipids in the shellfish. The presence of CAEP as a major lipid constituent in these organism is unique, since this phospholipid has been not found or only trace in all other animals investigated so far.

In this paper authors report the isolation and characterization of CAEP from ova of a fresh-water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*. Total lipid (0.5 g) from the ova was subjected to alkaline methanolysis according to a modified procedure of Dawson. An alkali-stable lipid fraction (200 mg) was fractionated on a silicic acid column with chloroform-methanol mixture. CAEP (32 mg) was eluted from the column with 350 ml of chloroform-methanol (80:20, by vol) and the homogeneity of the isolated CAEP was determined on thin-layer plates developed in chloroform-methanol-water (65:25:4, by vol) and chloroform-methanol-acetic acid-water (100:20:12:5, by vol). Enzymatic degradation of CAEP by phospholipase C from *Cl. perfringens* yielded ceramide and 2-aminoethylphosphonic acid, and the former was purified by chromatography on a silicic acid column using chloroform, chloroform-methanol (98:2, by vol). The chloroform-methanol eluate contained only one component as revealed by thin-layer chromatography.

Acid hydrolysis of ceramide derived from CAEP was performed by heating for 18 hr at 70°C in aqueous 1 N-methanolic HCl. The fatty acid methyl esters produced by the acid hydrolysis were extracted with *n*-hexane and estimated by gas-liquid chromatography at 160°C on a 15% DEGS column. The fatty acids identified were C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:0} (predominant), C_{17:0} and C_{18:0}. After removal of fatty acid components by extraction with *n*-hexane the remaining aqueous solution was adjusted to pH 11.0 by adding 1 N-NaOH. The long-chain bases were extracted with diethyl ether from the remaining solution, converted to their trimethylsilyl derivatives and analyzed by gas-liquid chromatograph-mass spectrometer at 200°C on a 1% OV-1 column. Octadeca-4-sphingenine (predominant), and presumable branched octadeca- and nonadeca-4-sphingenine were the principal long-chain bases of CAEP.

To determine 2-aminoethylphosphonic acid obtained as one of the enzymatic hydrolyzates, a small portion of the hydrolyzates was converted to a trimethylsilyl derivative with bis (trimethylsilyl) acetamide-pyridine-trimethyl chlorosilane (1 hr, 60°C), and analyzed by gas-liquid chromatograph-mass spectrometer. 2-Aminoethylphosphonic acid was identified by a reference to the mass spectrum of the synthetic compound.

The occurrence of CAEP in nature is well documented. However, this is the first finding of this compound in the lipids of shellfish ova.

1 緒 言

種々の生物が生命現象を能率よく営むためにリン元素を効果的に利用していることは周知の事実であるが、多くの場合の生体リン成分はオルト、メタ、ピロリン酸、もしくはそれらのエステル化物である。しかるに、10数年前、リンと炭素の元素が共有結合している、いわゆる“C-P”化合物が別のリン化合物型として生体内に存在することが証明され¹⁾、その後間もなくこの種の化合物が複合脂質の構成成分として軟体こう(腔)腸、原生動物などに多量に分布していることが明らかになった^{2)~5)}。この脂質群を“Phosphonolipid”と呼んでいるが⁶⁾、二枚貝類のスフィンゴリン脂質中では90~100%⁷⁾が、また原生動物のテトラヒメナ(繊毛類)ではグリセロリン脂質の60%がこの種の脂質で占められているという⁸⁾。

淡水二枚貝の一種であるイケチョウガイは琵琶湖特産の貝であり、淡水真珠の母貝でもある。したがって、稚貝の不足から人工養殖の研究の必要性が強調されており、その一環として今回、同貝の配偶子膜の脂質組成を調べた。受精現象は配偶子膜の表面機構が関与する生理現象であることから⁹⁾、まず表面膜に豊富に分布するスフィンゴ脂質を調べることにした。その結果、ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEP) が高濃度(スフィンゴ脂質の11%にあたる)に存在することを知った。著者らの知る限りでは卵におけるCAEP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 卵脂質の抽出

琵琶湖畔の真珠養殖場(近江真珠会社)において採集した、生殖期直前(3~4月)のイケチョウガイのメス貝100個体より卵を取り出し、凍結乾燥重量にして31.6gを得た。この30gにクロロホルム-メタノール(C-M, 2:1, 以下断わらない限り容比を示す)200mlを加えて40°C, 1hr温浸抽出を行った。ろ過後、残分に再び250mlの上記溶媒を加えて抽出を行って、初めの抽出液と合して溶媒を除去した。収量5.6g。

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(5g)に50mlのメタノールと50mlの1*N*-メタノール性水酸化ナトリウム溶液を加えて37°C, 4hr反応させた。反応液にメタノール性塩酸を加えpH1~2に調整し、室温に1hr放置した。メタノールを減圧下で留去後、残液に等量のクロロホルムと5mlの25%硫酸ナトリウム水溶液を加えて振とうした。静置してからクロロホルム層(下層)を分取した。水層(上層)に等量のクロロホルムを加えて再び同様の操作を行った後、先に得たクロロホルム層と合し溶媒を除去した。クロロホルム可溶物はアセトンで洗浄後、C-M

(2:1)5mlを用いて可、不溶物に分離し、可溶物をスフィンゴ脂質画分とした。収量280mg。

2.3 CAEPの単離

2.3.1 ケイ酸カラムクロマトグラフィー

ケイ酸(Mallinckrodt製クロマト用, 100 mesh)30gとハイフロスーパーセル15gをおのおの110°C, 16hr活性化したのち混合し、クロロホルムに懸濁させてからカラム(2.2cm×30cm)に注入した。上記のスフィンゴ脂質200mgを5mlのクロロホルムに溶かして注加した。クロロホルム300ml, C-M(90:10)400ml, (80:20)350ml, (70:30)370mlおよびメタノール500mlを順次カラムに流して溶出を行った。おのおの溶出液から溶媒を留去し、薄層クロマトプレート(2.3.2項参照)を用いて各画分におけるCAEPの存否を検した。

2.3.2 薄層クロマトグラフィー

シリカゲルG(半井製)の厚さ0.25mmのプレートを用いた。展開剤はクロロホルム-メタノール-水65:25:4およびクロロホルム-メタノール-氷酢酸-水100:20:12:5を使用し、展開後の顯色はDittmer試薬⁹⁾およびニンヒドリン試薬によった。

2.4 ホスホリパーゼC(EC 3.1.4.3)による加水分解

試験管に試料約10mgをとり、これに0.05*M*-トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)0.8ml, 2×10⁻²*M*-塩化カルシウム溶液0.4mlおよびエチルエーテル0.8mlを加えてよく振とうし、上記緩衝液で希釈した酵素液0.4ml(*Cl. perfringens*より調製したSigma製, 酵素タンパク2mgを含む)を添加して、37°Cで24hrインキュベートした¹⁰⁾。反応を停止させるため沸騰水中で5min加熱し、冷後、直ちにセロファンチューブ(Visking社製)で蒸留水を用いて24hr透析を行って、加水分解物を透析膜内物および膜外物に分離した。

2.4.1 セラミドの単離(膜内物)

上記の透析膜内物を凍結乾燥した後、少量のC-M, 95:5を用いて抽出を行った。抽出物をケイ酸3g(Mallinckrodt製, 100 mesh, 110°C, 4hr活性化)とハイフロスーパーセル1.5gの混合物を充てんしたカラム(1.0cm×15cm)でクロマトグラフィーを行い、クロロホルム100ml, C-M, 98:2 100mlを順次用いて溶出した。薄層クロマトプレートでチェックし、C-M, 98:2の画分からセラミドを得た。用いたプレートはシリカレイヤーG, 展開剤はC-M, 95:5 検出はヨウ素蒸気を使用した。

2.4.2 セラミドのメタノリシス

上記のセラミド1.7mgにメタノール性塩酸(塩酸8.6mlに水9.4mlを加え、さらにメタノールを加えて100mlにしたもの)1mlを加えて封管し、18hr, 70°Cで加熱した¹¹⁾。生成した脂肪酸メチルを*n*-ヘキサン2mlで5回抽出し、抽出液を水洗して硫酸ナトリウムで

乾燥後ガスクロマトグラフィーによる分析に供した。一方、脂肪酸メチルを除いた残液よりメタノールを留去したのち、1*N*-水酸化ナトリウムで pH 11.0 に調整してから長鎖塩基を毎回エーテル 2 ml を用いて 5 回抽出し、抽出液を水洗して硫酸ナトリウムで乾燥した。

2.4.3 脂肪酸成分の同定

ガスクロマトグラフィーは Shimadzu GC-5 A, カラムは長さ 2 m, 直径 3 mm のガラス製を用い、窒素をキャリアガス (0.8 kg/cm²) とした。温度は 160°C, 充てん剤は 15% DEGS (和光製, Shimalite 60~80 mesh) を使用した。脂肪酸の同定は, 標準脂肪酸 (ミリスチン, パルミチン, マーガリンおよびステアリン酸) のメチルエステルの相対保持時間より行った。

2.4.4 長鎖塩基成分の同定

2.4.2 で得た長鎖塩基成分にトリメチルシリル化試薬 (ヘキサメチルジシラザン-トリメチルクロロシラン-ピリジン, 3:1:9 のうわづみを使用) 0.1 ml を加え 10 min 60°C で加熱した¹²⁾。反応終了後, クロロホルム 1 ml を加えて水 5 ml で 5 回洗浄を行い, クロロホルム溶液を濃縮乾固してトリメチルシリル誘導体を得た。少量のクロロホルムに溶かし, 次の条件下でガスクロマトグラフ-質量分析計 (Shimadzu LKB 9000) で分析した。条件: 1% OV-1 カラム (西尾工業製, Chromosorb W 60~80 mesh, 2 m×3 mm), 温度はカラム 200°C, セパレーター 230°C, イオン源 270°C, 電子エネルギー 70 eV, 加速電圧 3.5 kV, イオン化電流 60 μA。標準試料として hexadeca-4-sphingenine (近畿大学, 林陽教授より恵与), octadeca-4-sphingenine, octadecasphinganine (Calbiochem 製), のトリメチルシリル誘導体を用いた。

2.4.5 2-アミノエチルホスホン酸 (膜外物) の同定

上記酵素反応液の透析膜外液を減圧濃縮し, 少量の水に溶かしてイオン交換カラム (アンバーライト CG-120 H⁺ 型 0.5 cm×3 cm) に注入し純水 20 ml で溶出した¹³⁾。全溶出液を濃縮乾固後, ビス (トリメチルシリル) アセトアミド 20 μl, ピリジン 10 μl およびトリメチルクロロシラン 4 μl を順次加えてから 1 hr, 60°C で加熱してトリメチルシリル誘導体としたのちガスクロマトグラフ-質量分析計で分析した¹⁴⁾。ガスクロマトグラフ-質量分析は温度 (カラム 140°C, セパレーター 170°C, イオン源 200°C) を除いてすべて長鎖塩基成分の場合と同じ条件で行った。なお, 標準の 2-アミノエチルホスホン酸は Kosolapoff らの方法¹⁵⁾により合成したものを用いた。

2.5 構成成分の定量

全リンおよび C-P 結合性リンの定量は, Aalbers らの方法を用いた¹⁶⁾。窒素の分析は日立 026 CHN 分析計を用いた。脂肪酸量は Rosenberg 法¹⁷⁾によりパルミチ

ン酸として, また長鎖塩基量は Lauter らの方法¹⁸⁾により octadeca-4-sphingenine として比色定量した。

2.6 機器による分析

2.6.1 赤外スペクトル

臭化カリウムの錠剤法で Shimadzu IR-27 C 赤外分光光度計を用いて測定した。

2.6.2 融点の測定

ヤマト model MP-21 融点測定装置を用いて行った。

2.6.3 旋光度の測定

柳本電磁式直読旋光計 OR-10 型で行った。

3 結果および考察

イケチョウガイ卵から得た全脂質をアルカリけん化して, スフィンゴ脂質画分を得た。白色の粉末状であるが, これをケイ酸カラムクロマト法により 5 つの画分に分けた。そのうち, C-M, 80:20 で溶出する画分が CAEP のみを含むことを, 薄層クロマトグラフィーで確かめた (収量 32 mg)。

P/N=1.0, 脂肪酸:長鎖塩基:リンのモル比はほぼ 1:1:1 を示した。mp 157.5~158°C, $[\alpha]_D^{20} = +20.0^\circ$ であり, 赤外スペクトルは既報のものと完全に一致した (Fig. 1)¹⁹⁾。

Fig. 1 Infrared spectrum of ceramide 2-aminoethylphosphonate from ova of the fresh-water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*, pressed in KBr.

4.1 脂肪酸成分

CAEP (約 10 mg) を酵素的に加水分解したのち, 分解物の透析を行って膜内物および膜外物に分別した。膜内物よりセラミド部分を抽出し, カラムクロマトグラフィーでこれを純化した。収量 6.8 mg。

この約 1.7 mg を用いて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, すべて飽和直鎖脂肪酸であり, パルミチル酸 (77.9%) が主要成分である。

4.2 長鎖塩基成分

n-ヘキサン不溶部 (脂肪酸成分を除いた残部) に水酸化ナトリウム水溶液を添加して pH をアルカリ側に保ったのち, エーテル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のち, ガスクロマトグラフ-質量分析計で分析した。その結果, Fig. 2 に示すようにガスクロマトグラムからピーク 1, 2 および

Table-1 Fatty acid composition of ceramide 2-aminoethylphosphonate from ova of the fresh-water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*. The analytical column (3 mm×2 m) was packed with 15% DEGS on Shimalite (60~80 mesh). The column temperature was 160°C and the carrier gas was nitrogen (0.8 kg/cm²). Data are expressed as percent of total methyl esters.

Fatty acid	%
Myristic acid	7.1
Pentadecanoic acid	10.3
Palmitic acid	77.9
Margaric acid	1.1
Stearic acid	3.6

3の3成分の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の明らかなフラグメントイオンとしてM-15 (M-CH₃), 132 (ベースピーク, -HCNH₂CH₂OSi(CH₃)₃) および 103 (-H₂COSi(CH₃)₃) が存在するので、これらの3成分はいずれも sphingenine 同族体であることを認めた²⁰⁾。ピーク2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 octadeca-4-sphingenine であると同定した。ピーク1の質量スペクトルは直鎖の octadeca-4-sphingenine, ピーク3の質量スペクトルは nonadeca-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ることから枝分かれの octadeca- および nonadeca-4-sphingenine であろうと推定する。

4.3 2-アミノエチルホスホン酸の同定

CAEP の酵素による加水分解物のうち、透析性の成分は膜外液を濃縮後、陽イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーを行うことによって分取できた。ビス(ト

Fig.-2 Gas chromatogram of trimethylsilyl derivatives of long-chain bases of ceramide 2-aminoethylphosphonate from ova of the fresh-water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*. Peaks 1 and 3 are presumably branched octadeca- and nonadeca-4-sphingenine, respectively; 2 is octadeca-4-sphingenine. The chromatography was carried out using the following conditions; column, 3 mm×2 m, 1% OV-1 on Chromosorb W (60~80 mesh, HMDS), temp., 200°C.

リメチルシリル) アセトアミドにより、それをトリメチルシリル誘導体にしてガスクロマトグラフ-質量分析計に注入した。ガ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(**Fig.-3**)は標準の2-アミノエチルホスホン酸のそれと完全に一致した。

Fig.-3 Mass spectrum of trimethylsilyl ether derivative of 2-aminoethylphosphonic acid. The spectrum was recorded on Shimadzu LKB 9000 at the following conditions; Electron energy 70 eV, accelerating voltage 3.5 kV, ionizing current 60 μA, molecular separator 170°C, ion source 200°C. Some fragments have been indicated in the following formula.

5 結 論

イケチョウガイ卵のスフィンゴ脂質中に CAEP の存在することを認めた。その構成成分の脂肪酸および長鎖塩基(枝分かれ長鎖塩基を含む)は従来から他の貝類より発見されている CAEP よりも種類が多く、CAEP の分子種が複雑であることを知る。

貝の卵に CAEP の存在することを明らかにしたのはこれが最初である。(昭和49年8月19日受理)

文 献

- 1) M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Nature*, **184**, 901 (1959)
- 2) 堀, 油化学, **20**, 2 (1971)
- 3) A.D. DeKoning, *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 187 (1970)
- 4) 林, 松原, 松浦, 油化学, **18**, 118 (1969)
- 5) 保田, 油化学, **18**, 239 (1969)
- 6) E. Baer, N.Z. Stanacev, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3209 (1964)
- 7) 堀, 生化学, **43**, 1009 (1971)
- 8) G.A. Thompson, Y. Nozawa, *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 249 (1972)
- 9) 永井, 星, 大沢, 蛋白質核酸酵素, **19**, 48 (1974)
- 10) J.C. Dittmer, R.L. Lester, *J. Lipid Res.*, **5**, 126 (1964)
- 11) 荒川, 杉田, 堀, 生化学, **40**, 154 (1968)
- 12) Y. Kishimoto, M. Hoshi, "Method of Neurochemistry" p. 75 (1972), Marcel Dekker, New York
- 13) T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, *Jap. J. Exptl. Med.*, **36**, 85 (1966)
- 14) K.-A. Karlsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 847 (1970)
- 15) G.M. Kosolapoff, *J. Amer. Chem. Soc.*, **69**, 2112 (1947)
- 16) J.A. Aalbers, L.L. Bieber, *Anal. Chem.*, **24**, 443 (1968)
- 17) A. Rosenberg, E. Chargaff, *J. Biol. Chem.*, **232**, 1031 (1958)
- 18) C.J. Lauter, E.C. Trams, *J. Lipid Res.*, **3**, 136 (1962)
- 19) T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, *J. Biochem.*, **59**, 570 (1966)
- 20) K.-A. Karlsson, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 2425 (1965)