セブレロシドの酵素的合成のもうひとつの経路*

中野 益男, 藤野 安彦

(帯広畜産大学農産化学科)

昭和 44 年 5 月 26 日 受 理

An Alternative Pathway for Enzymatic Synthesis of Cerebroside

by Masuo NAKANO and Yasuhiko FUJINO

Department of Agricultural Chemistry, Obihiro Zootechnical University,
Obihiro, Hokkaido

It has been reported in the literature that the formation of galactocerebroside (galactosyl ceramide), one of the representative glycolipids, occurs *via* reaction between psychosine (galactosyl sphingosine) and acyl-CoA. The present paper describes experiments which indicate that the enzymatic reaction of ceramide with UDP-galactose catalyzed by ceramide galactosyltransferase produces galactocerebroside (galactosyl ceramide) and the enzymatic reaction of ceramide with UDP-glucose catalyzed by ceramide glucosyltransferase gives glucocerebroside (glucosyl ceramide) in the particulate fraction prepared from animal tissue, particularly from rat brain. This signifies that, for the biosynthesis of cerebroside, there is an alternative pathway including ceramide as intermediate in addition to the known pathway comprising psychosine as precursor. (Received May 26, 1969)

緒 言

代表的な糖脂質であるセブレロシドは、サイコシンの酵素的アシル化によって合成されることが報告されている⁽¹⁾。

[1]

ところで、セブレロシドの類縁化合物であるスフィンゴミエリンには 2 つの生合成経路が知られている。そのひとつは、アシル-CoA からスフィンゴシルホスホリルコリンへアシル基が移動するルート^(2,3)、他のひとつは CDP-コリンからセラミドへリン酸コリンが転移するルートである^(4,5)。上記のセブレロシド合成経路は、スフィンゴミエリン合成の第 1 の反応と同じ型であるから、セブレロシドの合成にも第 2 の反応形式、すなわち次式のように、UDP-ヘキソースからセラミドへ糖部分が転移するルートが存在するかもしれないと考えられた。

われわれは動物臓器ことにネズミの脳の顆粒画分を用いて酵素実験を行なった結果、セラミドと UDP-ガラクトースとからはガラクトセブレロシド (ガラクトシルセラミド) が、またセラミドと UDP-グルコースからはグルコセブレロシド (グルコシルセラミド) がそれぞれ酵素的に合成されることを認めたので報告する**。

材 料 と 方 法

1. 材 料

a) セラミド: 天然のセラミドは Fränkel und Bielschowsky (1932)⁽⁷⁾ の方法に従って牛の脾臓から分離した。

合成セラミドは牛の脊髄のプレノシン⁽⁸⁾から調製したスフィンゴシン塩基を出発物質として合成した。まずスフィンゴシン塩基は、プレノシンを Gaver and Sweeley

* 本研究の要旨は日本農芸化学会北海道支部講演会 (昭和 43 年 11 月 30 日) および日本農芸化学会大会 (昭和 44 年 4 月 1 日~4 日, 東京) で発表した。また、この研究の一部は *Biochem. J.*, **113**, 573(1969) に速報した。

** この論文を作成中に到着した *J. Biol. Chem.* 誌上で, Basu, Kaufman and Roseman (1968)⁽⁶⁾ がニワトリ胎児の脳ホモジネートを使って、セラミドと UDP-グルコースからグルコセブレロシドを酵素的に合成したことを速報しているのを知った。

(1965)⁽⁹⁾ の含水メタノール性 1 N 塩酸で加水分解し, 異性化により生じたエリスロースフィンゴシン塩基とスレオースフィンゴシン塩基の混合物をケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し, クロロホルム, クロロホルム-メタノール性 0.1 N NH_4OH (9:1; 4:1; 2:1; 1:1; 1:2) およびメタノール性 0.1 N NH_4OH を溶出溶媒とする Stepwise-gradient elution の手法で分離, 精製した. 得られたスフィンゴシン塩基を Carter and Gaver (1967)⁽¹⁰⁾ の方法に従い, 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により分析したところ, この塩基は C_{18} -スフィンゴシンであることが認められた.

これらのスフィンゴシン塩基を原料として, 各種の N-アシル化合物 (合成セラミド) を次のようにして誘導した. N-アセチル-エリスロースフィンゴシンと N-アセチル-スレオースフィンゴシンは当該スフィンゴシン異性体の無水酢酸によるアセチル化⁽¹¹⁾により, また N-パルミトイル-エリスロースフィンゴシンと N-パルミトイル-スレオースフィンゴシンは当該スフィンゴシン異性体のパルミチン酸塩化物によるパルミトイル化⁽¹²⁾により合成した. N-アセチル-エリスロ-ジヒドロスフィンゴシンと N-アセチル-スレオ-ジヒドロスフィンゴシンは, 上記の N-アセチルスフィンゴシン異性体にそれぞれ水素添加を行なって調製した⁽¹³⁾.

b) UDP-ヘキソース: UDP-ガラクトース- ^{14}C と UDP-グルコース- ^{14}C は New England Nuclear 社から, また, UDP-ガラクトースと UDP-グルコースは Sigma Chemical 社からそれぞれ購入した.

c) 酵素標品: 酵素系は Brady, Bradley, Young and Kaller (1965)⁽²⁾ の方法に準じて調製した. すなわち, 生後 15 日目のネズミの脳を 4 倍量の 0.25 M ショ糖溶液でホモジネートし, これを $600\times g$ で 12 分間遠心して組織細片を除去した後, $8600\times g$ で 12 分間遠心して, 沈澱してくる顆粒画分をミトコンドリア画分とし, この上澄液を $100,000\times g$ で 30 分間遠沈して得られる顆粒画分をミクロソーム画分とした.

d) その他: サイコシンはフレノシンのバリタ水解により調製した⁽⁸⁾. グルコセレブロシドおよびセラミドジヘキソシドは, 当研究室で牛乳から分離したものを用いた⁽¹⁴⁾. グロボシドは札幌医科大学化学研究室より恵与されたものである.

2. 方法

(1) 反応混液の調製: 反応混液の標準的な組成を

Table I. Composition of Reaction Mixture

Phosphate buffer (pH 7.8)	100 μmoles
MgCl_2	4 μmoles
Cysteine	20 μmoles
ATP	4 μmoles
Tween 20	3 mg
Triton X-100	2 mg
Ceramide	4 μmoles
UDP-galactose- ^{14}C (62, 500 cpm/ μmole) or UDP-glucose- ^{14}C (42, 500 cpm/ μmole)	1 μmole
Enzyme solution (ca. 10 mg protein)	0.25 ml
Final volume:	1.0 ml

The reaction mixture was incubated at 37°C for 2 hr.

Table I に示した. この混液は, リン酸緩衝液にセラミド, UDP-ヘキソース, 酵素溶液およびコファクターをサスペンドさせたものである. これらを乳化する手順は Fujino, Nakano, Negishi and Ito (1968)⁽⁶⁾ の方法に従った. 得られた反応混液の全量を 1 ml とし, 37°C で 2 時間インキュベートした. インキュベーション中, 乳化状態はほぼ完全に維持された.

(2) 放射性糖脂質の測定: 全脂質の抽出は Kam-pine, Martensson, Yankee and Kanfer (1968)⁽¹⁵⁾ の方法に準じて行なった. すなわち, インキュベーションが終った後, 混液 1 ml に 3.5 ml のメタノールを加えて反応を止める. これを 55°C に 10 分間保った後, 7 ml のクロロホルムを加えてリピドを抽出する. 全抽出液が 20 ml になるまでクロロホルム-メタノール (2:1) で数回抽出し, フェノールフタレンに対しアルカリ性にしてから, 4 ml の 0.1 M 塩化カリを混和して全液を水層とクロロホルム層に分離する. クロロホルム層を Folch の水洗法⁽¹⁶⁾の溶媒系上層であるクロロホルム-メタノール-0.1 M 塩化カリ (3:48:47), およびクロロホルム-メタノール-水 (3:48:47) の各 8 ml で充分水洗したのち, このクロロホルム層の放射能をガスフローカウンターで測定した.

結 果

1. 放射性糖脂質の生成

Table I の組成と条件に従い酵素反応を行なって, リピドに組込まれた糖の放射能をガスフローカウンターで測定した結果が Table II である. この表に示されるように, 天然セラミドも合成セラミドともに基質活性を有し, またセラミドに対してのみならず, スフィンゴシン塩基に対しても放射能の組込みが認められた. UDP-

Table II. Incorporation of Labeled UDP-hexose into Lipids
(composition of reaction mixture : see Table I)

Acceptor	Incorporation	
	UDP-galactose- ¹⁴ C (mμmoles)	UDP-glucose- ¹⁴ C (mμmoles)
No acceptor, control	3.2	4.8
Natural ceramide	20.3	28.0
N-Acetyl-erythro-sphingosine	23.3	48.5
N-Acetyl-threo-sphingosine	17.0	28.8
erythro-Sphingosine	14.3	21.2
threo-Sphingosine	10.3	16.2

ヘキソースについては、どの基質の場合も UDP-グルコースのほうが UDP-ガラクトースよりも高い組込みを示した。

2. 酵素反応の条件

(1) 乳化剤の影響 : セラミドを基質とするこの反応混液は乳化しにくいので、乳化しやすい条件を検討した。天然セラミドと合成セラミドを基質とする反応混液 (Table I) に、乳化剤として Tween 20, Triton X-100, コール酸ソーダを種々に組合せて反応活性を調べた結果が Table III である。この表でわかるように、天然セラミドに対しては Tween 20-Triton X-100 (3:2) を添加したとき、合成セラミドに対しては Triton X-100-Tween 20-コール酸ソーダ (2:1:2) を添加したときそれぞれ反応活性がもっとも高かった。

(2) 最適 pH : 天然セラミドを基質とする反応混液 (Table I) について、種々の pH の下に酵素反応を行なった結果が Fig. 1 である。この図に見るように、受容体が UDP-ガラクトースのときも、UDP-グルコースのときも pH 7.6~7.8 で反応の最大活性がみられた。

(3) 金属イオンの影響 : 天然セラミドを基質とす

Fig. 1. Effect of pH on Incorporation of Labeled UDP-hexose into Lipids.

(composition of reaction mixture : see Table I)

●—● Donor : UDP-galactose-¹⁴C
○—○ Donor : UDP-glucose-¹⁴C

Fig. 2. Effect of Metal Ion Concentration on Incorporation of Labeled UDP-hexose into Lipids.

(composition of reaction mixture : see Table I)

●—● Mg²⁺ ○—○ Mn²⁺

る反応混液 (Table I) について、種々の Mg²⁺ 濃度、Mn²⁺ 濃度の下に酵素反応を行なった結果が Fig. 2 である。両イオンとも反応を活性化させるが、UDP-ガラ

Table III. Effect of Detergents on Incorporation of UDP-galactose-¹⁴C into Lipids
(composition of reaction mixture : see Table I)

Acceptor	Detergents	Incorporation (mμmoles)
Natural ceramide	Tween 20 (3 mg)+Triton X-100 (2 mg)	12.3
"	Triton X-100 (2 mg)+Tween 20 (1 mg)+Na cholate (2 mg)	11.3
"	Triton X-100 (4 mg)+Na cholate (1 mg)	6.6
N-Acetyl-erythro-sphingosine	Tween 20 (3 mg)+Triton X-100 (2 mg)	15.3
"	Triton X-100 (2 mg)+Tween 20 (1 mg)+Na cholate (2 mg)	17.6
"	Triton X-100 (4 mg)+Tween 20 (1 mg)	9.8
N-Acetyl-threo-sphingosine	Twern 20 (3 mg)+Triton X-100 (2 mg)	8.5
"	Triton X-100 (2 mg)+Tween 20 (1 mg)+Na cholate (2 mg)	10.2
"	Triton X-100 (4 mg)+Tween 20 (1 mg)	5.9

クトースでは Mn^{2+} の方が, また UDP-グルコースでは Mg^{2+} の方が有効で, その最適の濃度範囲は 2~6 μ モル/ml であった。

(4) ATP の効果: Table I の反応混液に対する ATP の効果を調べた結果が Table IV である。この表

Table IV. Effect of ATP on Incorporation of Labeled UDP-hexose into Lipids
(composition of reaction mixture: see Table I)

Acceptor	Incorporation			
	UDP-galactose- ^{14}C		UDP-glucose- ^{14}C	
	+ATP ($m\mu$ moles)	-ATP	+ATP ($m\mu$ moles)	-ATP
Natural ceramide	6.4	4.9	14.1	10.9
N-Acetyl-erythro-sphingosine	15.4	8.5	59.6	35.5
N-Acetyl-threo-sphingosine	5.9	4.0	9.8	6.0

Table V. Enzymatic Activity in Tissues for Incorporation of Labeled UDP-hexose into Lipids
(composition of reaction mixture: see Table I)

Enzyme source	Acceptor	Incorporation	
		UDP-galactose- ^{14}C ($m\mu$ moles)	UDP-glucose- ^{14}C ($m\mu$ moles)
Chicken liver	Natural ceramide	14.3	15.6
"	N-Acetyl-erythro-sphingosine	16.1	18.4
"	N-Acetyl-threo-sphingosine	12.9	12.9
Rat liver	Natural ceramide	19.4	15.6
"	N-Acetyl-erythro-sphingosine	24.1	29.4
"	N-Acetyl-threo-sphingosine	13.7	17.1
Rat brain	Natural ceramide	22.5	25.0
"	N-Acetyl-erythro-sphingosine	29.8	49.9
"	N-Acetyl-threo-Sphingosine	17.6	27.0

Table VI. Enzymatic Activity in Rat Brain Cells for Incorporation of Labeled UDP-hexose into Lipids
(composition of reaction mixture: see Table I)

Acceptor	Incorporation			
	UDP-galactose- ^{14}C		UDP-glucose- ^{14}C	
	Mitochondrial ($m\mu$ moles)	Microsomal	Mitochondrial ($m\mu$ moles)	Microsomal
No acceptor	—	3.4	—	4.8
Natural ceramide	9.0	16.7	12.5	22.8
N-Acetyl-erythro-sphingosine	12.5	25.0	35.9	58.7
N-Acetyl-threo-sphingosine	8.4	13.4	16.3	21.1
N-Acetyl-erythro-dihydrosphingosine	7.3	15.6	17.6	18.9
N-Acetyl-threo-dihydrosphingosine	5.9	10.6	14.6	18.8
N-Palmitoyl-erythro-sphingosine	7.4	13.1	12.2	19.6
N-Palmitoyl-threo-sphingosine	6.4	12.5	9.8	16.8
erythro-Sphingosine	5.2	14.3	5.6	16.5
threo-Sphingosine	3.3	10.2	9.9	11.5

に見るように, 天然セラミドを基質とする場合も, 合成セラミドを基質とする場合も, とともに酵素反応は ATP 添加によって 1.3~1.5 倍活性化されていることがわかる。

(5) 酵素活性の所在: 生後 15 日目のネズミの脳および肝臓, 50 日目のニワトリの肝臓を原料とし, 前述の酵素調製法に従って, 600 $\times g$ と 100,000 $\times g$ の間で得られる顆粒画分を調製し, それぞれの酵素活性を調べた結果が Table V である。この表でわかるように, どの酵素系も反応を触媒することが認められたが, このうちネズミの脳が最も高い活性を示した。次に, ネズミの脳における酵素の細胞内分布を調べた結果が Table VI である。この表に見るように, 基質のいかんを問わず, ミクロソーム画分のほうがミトコンドリア画分に比べて高い酵素活性を示した。

3. 糖脂質の確認

(1) ラジオ薄層クロ

マトグラフィー: 天然セラミド, 合成セラミドおよびスフィンゴシン塩基をそれぞれ基質として Table I のように酵素反応を行ない, インキュベーションの後反応混液にキャリアとしてフレノシンとサイコシンを加えて, 放射性リピドを分離し, これをラジオ薄層クロマ

Fig. 3. Radio Thin-layer Chromatography of Lipids Enzymatically Formed.

1. Phrenosine; 2. Ceramide dihexoside; 3. Psychosine;
4. Globoside; 5. Lipids enzymatically formed from natural ceramide.

Developed by chloroform-methanol-water (65:25:4).

Detected by anthrone reagent.

トグラフィーに供した。天然セラミドを基質とした場合の実験結果を Fig. 3 に示す。この図に見るように、放射能は、セレブロシド、セラミドジヘキソシド、サイコシン、ガンゲリオシドのそれぞれ相当部分に検出された。このラジオ薄層クロマトグラムから、放射能の糖脂質間における分布を算出した成績が Table VII である。セラミドを基質としたときは、UDP-ガラクトースまたは UDP-グルコースから取り込まれた全放射能の 60~70% がセレブロシド画分に取り込まれており、その程度は UDP-ガラクトースからよりも UDP-グルコースからのほうが全体に高かった。スフィンゴシンを基質としたときは、大部分の放射能がサイコシン画分に組込まれており、セレブロシド画分にもいくらか組込まれたが、その他の画分には放射能は認められ

なかった。

(2) カラムクロマトグラフィー：

天然セラミドを基質として Table I の 50 倍スケールの酵素反応を行ない、インキュベーションの後反応混液にキャリアとしてフレノシンを加え、混液から放射性リビドをクロロホルム-メタノール (2:1) で抽出、全抽出液にメタノール性カセイカリを 0.4N 溶液になるように加えて、アルカリ処理を行なった。得られたアルカリ安定性のリビドをケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム、クロロホルム-メタノール (98:2; 95:5; 90:10; 80:20; 67:33; 50:50; 20:80)、およびメタノールで順次

Fig. 4. Elution Curve of Radioactivity in Silicic Column Chromatography of Labeled Lipids.

- Radioactivity obtained from cerebroside fraction originating in UDP-galactose- ^{14}C .
○—○ Radioactivity obtained from cerebroside fraction originating in UDP-glucose- ^{14}C .

Table VII. Distribution of Radioactivity in Glycolipids

Acceptor	Incorporation							
	UDP-galactose- ^{14}C				UDP-glucose- ^{14}C			
	Cerebro- side fraction	Ceramide di- hexoside fraction (mμmoles)	Psy- chosine fraction	Ganglio- side fraction	Cerebro- side fraction	Ceramide di- hexoside fraction (mμmoles)	Psy- chosine fraction	Ganglio- side fraction
Natural ceramide	13.3	2.1	3.5	1.3	16.9	3.1	4.5	4.1
N-Acetyl-erythro-sphingosine	16.8	1.0	4.2	0.7	32.7	3.5	6.3	4.5
N-Acetyl-threo-sphingosine	10.4	0.5	4.6	1.0	18.5	2.0	5.2	3.0
erythro-Sphingosine	2.2	0	11.3	0	4.7	0.3	16.0	0.5
threo-Sphingosine	2.8	0	7.4	0	4.5	0.5	11.5	0.2

に溶出して分画を行なった⁽¹⁵⁾。溶出された各画分の糖をアンスロン法⁽¹⁷⁾、放射能をガスフローカウンタで測定した。そのうち、とくにセレブロシド画分の放射能パターンを示したものが Fig. 4 である。この図の放射能曲線から、UDP-ガラクトースを供与体とした場合の放射性セレブロシド画分は、小さなピーク I と大きなピーク II にそれぞれ相当

する 2 つの放射性フラクション、また UDP-グルコースを供与体としたときの放射性セレブロシド画分は、大きなピーク I' とそれよりやや小さなピーク II' にそれぞれ相当する 2 つの放射性フラクションを含むことが推察された。この放射能のパターンは、ガラクトセレブロシドとグルコセレブロシドの混合物を同じケイ酸カラムクロマトグラフィーに供したときの糖⁽¹⁷⁾の測定曲線とほぼ一致し、I と I' のピークはグルコセレブロシド、II と II' のピークはガラクトセレブロシドにそれぞれほぼ対応した。これを確かめるために、この各放射性ピークの画分を集め、Kean (1966)⁽¹⁸⁾に従いホウ酸含有のケイ酸板上でラジオ薄層クロマトグラフィーによる分析を行なった。その結果が Fig. 5 である。図に見るように、放射性ピーク I と I' のフラクションはグルコセレブロシドに、また放射性ピーク II と II' のフラクションはガラクトセレブロシドに、それぞれ合致することが認められた。

Fig. 5. Radio Thin-layer Chromatography of Cerebroside Fraction on Borax-impregnated Silica Gel Plate.

1. Galactosyl ceramide (phrenosine), standard.
2. Glucosyl ceramide, standard.
- I. Fraction of No. 22~25 in Fig. 4.
- II. Fraction of No. 26~35 in Fig. 4.
- I'. Fraction of No. 18~26 in Fig. 4.
- II'. Fraction of No. 27~34 in Fig. 4.

Developed by chloroform-methanol-water (24 : 7 : 1).
Detected by anthrone reagent.

Table VIII. Radioactivity in Sugar Portion obtained from Hydrolysate of Labeled Lipids

Lipid fraction tested	Radioactivity		Recovery (%)
	Before hydrolysis	After hydrolysis (sugar portion) (cpm)	
Cerebroside fraction originating in UDP-galactose	1850	1493	80.7
Cerebroside fraction originating from UDP-glucose	2120	1759	83.0
Galactosyl ceramide fraction	1250	1087	87.0
Glucosyl ceramide fraction	680	557	81.9

(3) 加水分解：上記のようにして得られた放射性セレブロシド、ガラクトセレブロシドおよびグルコセレブロシドの各画分を Sweeley and Walker (1964)⁽¹⁹⁾、Suzuki and Chen (1967)⁽²⁰⁾の方法に準じ、メタノール性 5% 塩化水素を用いて 100°C で 16 時間封管中で加水分解した。分解産物の中から脂肪酸メチルエステル部分をヘキサンで、またスフィンゴシン塩基部分をエーテルで除去した後、残ったメタノール層を Amberlite IR 120 (H⁺) と Amberlite IRA 400 (OH⁻) に通し、無機塩を除去して糖部分を精製した。これらの糖部分の放射能を測ったところ、Table VIII のように、いずれの場合も放射性糖脂質の放射能の大部分が糖部分中に回収された。

次に加水分解により遊離した糖部分を東洋濾紙 No. 50 のペーパーを使い、*n*-ブタノール-ピリジン-水 (6 : 4 : 3) を展開溶媒⁽²¹⁾とするペーパークロマトグラフィーに

供して分析を行なった。その結果が Fig. 6 である。この図で見ると、UDP-ガラクトースに由来する放射性セレブロシド画分からの糖では、ガラクトースのスポットに大部分の放射能とグルコースの位置に若干の放射能、また UDP-グルコースに由来する放射性セレブロシド画分からの糖では、グルコースのスポットに大部分の放射能とガラクトースの位置にいくらかの放射能、ガラクトシルセラミド画分からの糖ではガラクトースのスポットに放射能、またグルコシルセラミド画分からの糖ではグルコースの位置に放射能が、それぞれに検出された。このことは、放射性セレブロシドの放射活性が、それぞれのセレブロシドを構成するヘキソース部分の放射活性とよく対応していることを示す。

Fig. 6. Radio Paper Chromatography of Sugar Portion obtained from Hydrolysate of Labeled Lipids.

1. Sugar portion obtained from cerebroside fraction originating in UDP-galactose- ^{14}C .
2. Sugar portion obtained from cerebroside fraction originating in UDP-glucose- ^{14}C .
3. Sugar portion obtained from labeled galactosyl ceramide fraction.
4. Sugar portion obtained from labeled glucosyl ceramide fraction.
5. Methylgalactose, standard.
6. Methylglucose, standard.

Developed by *n*-butanol-pyridine-water (6 : 4 : 3)
Detected by silver nitrate-sodiumhydroxide method

4. 酵素反応の経時的変化

天然セラミドを基質として, Table I のような酵素反応を行ない, インキュベーション後の放射性糖脂質の各画分を分離し, これをラジオ薄層クロマトグラフィーに供して, それぞれの放射活性を経時的にプロットしたものが Fig. 7 である. この図に見るように, 供与体が UDP-ガラクトースの場合も, UDP-グルコースの場合も, セレブロシドの合成が優先的に進行し, その他の糖脂質

の生成は副次的に進むことがわかった. このことは, 与えられた反応条件のもとでは, セレブロシドがセラミドから直接につくられ, 他の糖脂質はセレブロシドから2次的に生成されるのであろうことを示している.

考 察

以上の成績は, ネズミの脳, 肝臓またはニワトリのヒナの肝臓の顆粒画分中で, セラミドと UDP-ヘキソースとから糖脂質が酵素的に合成されることを示す. この場合, UDP-ガラクトースを供与体としたときは主としてガラクトシルセラミドが, また UDP-グルコースを供与体としたときは主としてグルコシルセラミドが合成された (Fig. 4, 5, 6).

この合成反応を触媒するネズミの脳のミクロソーム画分には, セラミドをスフィンゴシンと脂肪酸とに分解するセラミダーゼが存在することも知られている⁽²²⁾. したがって, 基質のセラミドがセラミダーゼの作用を受けて, 一たんスフィンゴシンに分解され, これが UDP-ヘキソースのヘキソース部分を受容してサイコシンを経てセレブロシドが合成される可能性も考えられる. しかし, スフィンゴシンの基質活性がセラミドのそれよりも低いこと (Table II, Table VII), またセレブロシドの生成がサイコシンのそれに先行すること (Fig. 7) は, この可能性を否定するものである. ただし, この反応系に多少ともサイコシン経路の存在することはみとめられた (Table VII).

これらの成績は, セレブロシドがサイコシンから合成されるという既知の経路のほかに⁽¹⁾, セラミドを直接の前駆物質とする新しい経路によっても合成されることを示すものである. この反応は, 次式に従って行なわれるものと考えられる. これらの反応を触媒する酵素は, [3] に対してはセラミド-UDP-ガラクトース ガラクトシルトランスフェラーゼ(系統名), もしくはセラミド-ガラクトシルトランスフェラーゼ(常用名), また [4] に対してはセラミド-

Fig. 7. Time Course of Incorporation of Labeled UDP-hexose into Glycolipids.

(composition of reaction mixture: see Table I)

- Cerebroside fraction; ▲—▲ Psychosine fraction;
○—○ Ganglioside fraction; △—△ Ceramide dihexoside fraction.

UDP-グルコース グルコシルトランスフェラーゼ(系統名), もしくはセラミド-グルコシルトランスフェラーゼ(常用名)と名づけられるべきものであろう。

セラミド+UDP-ガラクトース→

ガラクトシルセラミド(ガラクトセレブロシド)
+UDP [3]

セラミド+UDP-グルコース→

グルコシルセラミド(グルコセレブロシド)
+UDP [4]

セラミドからのセレブロシドの酵素的合成で, UDP-ガラクトースと UDP-グルコースのいずれを供与体としても, それぞれガラクトシルセラミドとグルコシルセラミドの混合物が生成された(Fig. 4, 5, 6). これは, 合成反応の経過中に UDP-ヘキソースの異性化またはヘキソシルセラミドの異性化が起こることによるものと思われる。今回の実験ではその異性化の直接の確認はしなかったが, 脳組織中には UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼの存在が報告されている⁽²³⁾から, UDP-ヘキソースの異性化による可能性が大きいかもしれない。

セラミドに対する UDP-ヘキソースの反応活性は, UDP-ガラクトースよりも UDP-グルコースの方が常に高く (Table II, IV~VII, Fig. 1, 2, 7), またセレブロシドに随伴する複合糖脂質の生成も, UDP-ガラクトースからよりも UDP-グルコースからの方が優勢であった (Table VII, Fig. 7). Hauser (1967)⁽²⁴⁾ はグルコシルセラミドからのラクトシルセラミドの生成を *in vitro* の実験で証明したが, このことは Kampine, Martensson, Yankee and Kanfer (1968)⁽¹⁵⁾ および Basu, Kaufman and Roseman (1968)⁽⁶⁾ によってもそれぞれ *in vivo* および *in vitro* で観察されている。また, Nishimura and Yamakawa (1968)⁽²⁵⁾ はグルコシルセラミドからのガングリオシドの生成を *in vivo* の実験で推測し, Basu, Kaufman and Roseman (1965)⁽²⁶⁾, 1968⁽⁶⁾ はそれを *in vitro* で段階的に明らかにしつつある。われわれの成績をこれらの知見と総合すると, セラミドはガラクトセレブロシドの前駆体としてよりも, むしろグルコセレブロシドならびにそれから誘導される各種の複合糖脂質の前駆体として重要な役割を果たすのかもしれないと推察される。

反応基質としてのセラミドのエリスロ, スレオの立体配置については, 両型ともに基質活性を有し, どちらかといえばエリスロ型の方の活性が高かった (Table II~

VII). これはスフィンゴ脂質の酵素的合成において, 反応を触媒する酵素が基質のエリスロ, スレオの立体異性に対し, 絶対的な特異性を持たないという既報のわれわれの見解⁽⁵⁾とよく一致した。

要 約

代表的な糖脂質であるセレブロシドは, サイコシンが酵素的にアシル化を受けて合成されることが知られている。本研究は, 動物組織の顆粒画分中で, セラミドと UDP-ガラクトースとからセラミド グラクトシルトランスフェラーゼの作用によりガラクトシルセラミドが, また, セラミドと UDP-グルコースとからセラミド グルコシルトランスフェラーゼの作用によりグルコシルセラミドが合成されることを明らかにした。このことは, セレブロシドの生合成には, サイコシンを前駆体とする既知の経路のほかに, セラミドを中間体とするもうひとつの経路があることを示すものである。

本研究は, 主として文部省科学研究費によって行なわれた。記して謝意を表する。

- (1) R. O. Brady: *J. Biol. Chem.*, **237**, PC 2416 (1962).
- (2) R. O. Brady, R. M. Bradley, O. M. Young and H. Kaller: *J. Biol. Chem.*, **240**, PC 3693 (1965).
- (3) Y. Fujino and T. Negishi: *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 428 (1968).
- (4) M. Sribney and E. P. Kennedy: *J. Biol. Chem.*, **233**, 1315 (1958).
- (5) Y. Fujino, M. Nakano, T. Negishi and S. Ito: *J. Biol. Chem.*, **243**, 4615 (1968).
- (6) S. Basu, B. Kaufman and S. Roseman: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5802 (1968).
- (7) E. Fränkel und F. Bielschowsky: *Z. Physiol. Chem.*, **202**, 58 (1932).
- (8) H. E. Carter and Y. Fujino: *J. Biol. Chem.*, **221**, 879 (1956).
- (9) R. C. Gaver and C. C. Sweeley: *J. Am. Oil Chemist' Soc.*, **42**, 294 (1965).
- (10) H. E. Carter and R. C. Gaver: *J. Lipid Res.*, **8**, 391 (1967).
- (11) R. C. Gaver and C. C. Sweeley: *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3644 (1966).
- (12) H. E. Carter, F. J. Glick, W. P. Norris, G. E. Phillips and R. Harris: *J. Biol. Chem.*, **170**, 269 (1947).
- (13) S. Gatt and M. M. Rapport: *Biochem. J.*, **101**, 680 (1966).
- (14) 藤野安彦, 佐伯 徹, 伊藤精亮, 根岸 孝: 日

- 畜会報, **40**, 349 (1969).
- (15) J. P. Kampine, E. Martensson, R. A. Yankee and J. N. Kanfer : *Lipids*, **3**, 151 (1968).
- (16) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloan-Stanley : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- (17) N. S. Radin, F. B. Lavin and J. R. Brown : *J. Biol. Chem.*, **217**, 789 (1955).
- (18) E. L. Kean : *J. Lipid Res.*, **7**, 449 (1966).
- (19) C. C. Sweeley and B. Walker : *Anal. Chem.*, **36**, 1461 (1964).
- (20) K. Suzuki and C. Chen : *J. Lipid Res.*, **8**, 105 (1967).
- (21) A. Jeans, C. S. Wise and R. J. Dimler : *Anal. Chem.*, **23**, 415 (1951).
- (22) S. Gatt : *J. Biol. Chem.*, **241**, 3724 (1966).
- (23) E. S. Maxwell, H. M. Kalckar and R. M. Burton : *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 444 (1955).
- (24) G. Hauser : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 502 (1967).
- (25) K. Nishimura and T. Yamakawa : *Lipids*, **3**, 262 (1968).
- (26) S. Basu, B. Kaufman and S. Roseman : *J. Biol. Chem.*, **240**, PC 4115 (1965).
-