

〔報 文〕

ラットとマアジの脳に分布する セラミドモノヘキソシド (CMH) の特徴

田尾 早奈英・田中 伸子

Characteristics of Ceramide Monohexoside (CMH) in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

Sanae TAO and Nobuko TANAKA

Glycolipids closely mediate many biomembrane functions such as cell recognition, multiplication, differentiation, intercellular adhesiveness, etc. so as to closely relate to the metabolism. Therefore, studies on glycolipids have been vigorously pursued in recent years from the molecular physiological viewpoint.

Since high-pressure liquid chromatography (HPLC) has been a very useful method to separate and purify lipids, we attempted to apply HPLC to purify glycolipids which shows the hydrophilicity and the hydrophobicity.

For the first step, some glycolipids were extracted from the brain of rat and yellowfin horse mackerel to clarify their constituent elements.

CMH exists in high concentrations in the brain as the principal component of neutral glycosphingolipids. The analysis revealed that CMH isolated from rats and yellowfin horse mackerels consisted of the same two components. We named the isolated component of the higher Rf value on TLC as CMH-1, and the lower Rf value as CMH-2.

CMH in the brain of rat consisted of 16% of CMH-1 and 84% of CMH-2, but in yellowfin horse mackerel, CMH-1 had a high level (78%).

CMH in the rat brain consisted of nearly 95% of galactose, and the yellowfin horse mackerel brain consisted of 100% galactose.

The sugar composition of CMH in the brain is predominantly galactose over glucose in the cerebral functionality irrespective of animal species.

The principal fatty acids of CMH of rat have carbon chains of h24:0 (46.1%), and the ratio of hydroxyl fatty acids is higher (72.6%). In comparison with these values, the principal fatty acids of yellowfin horse mackerel have carbon chain of 24:1 (48.7%), and the ratio of unsaturated fatty acids was higher than those of rat.

The composition of fatty acid of CMH in the brain of yellowfin horse mackerel was clearly different from CMH of rat.

Key words: brain (脳), cell membrane (細胞膜), ceramide monohexoside (CMH), composition of fatty acid (構成脂肪酸), thin-layer chromatography (TLC)

1. 緒 言

複合脂質の一種である糖脂質(glycolipids)は、生体の細胞膜に局在し、細胞間認識、細胞増殖や分化、あるいは細胞接着分子などの機能が報告され^{1)~3)}、分子生物学的見地から研究の発展が期待される生理活性成分の一つである。しかし、細胞膜の主要構成脂質であるリン脂質やコレステロールに比べてその含有量が低いことから、今後詳細な研究を進めるにあたって簡便で収率の良い分離精製方法の導入が強く望まれている。近年の脂質分析技術は飛躍的に向上しているが、中でも高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は高感度、高分離能であることに加え、短時間かつ高い再現性が得られるなど、様々な利点を持ち広く活用されている。糖脂質分析においても、その分子構造上の特徴である疎水性、ならびに親水性の差異を利用して、誘導体化せずに簡便で収率の高い分離精製法の確立が期待できると考えられ、現在少数ではあるがその報告⁴⁾が見受けられる。岩森らによれば、動物種により多種類の糖脂質⁵⁾が報告されており、分析法の検討に用いる試料として、構成成分の異なる、すなわち疎水性に注目するならば構成脂肪酸既知なる糖脂質を、分析に必要なかつ十分な量を数種類用意することが可能である。

そこで、HPLCの分析法検討の第一段階として、脳を始め各組織に広く分布し⁶⁾、糖脂質代謝の基本となる中性糖脂質の中でもセラミドに糖が1分子結合したセラミドモノヘキソシド(Ceramide mono-hexoside: 以下CMHと略記する)に注目し、分析試料の調製を試みた。すなわち糖脂質研究の中心で、文献によるデータが豊富な哺乳類に分類されるラット脳CMHと、比較するため我々は魚類の糖脂質分析⁷⁾⁸⁾に実績があるので魚類に注目し、まだ報告の見られないマアジの脳CMHの構成成分について検討を加え、新しい知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2-1. 試料

ラットから全脳10.24g(6匹)を、マアジ(*Trachurus Japonicus*)から全脳1.52g(6尾)を

摘出し細断後、粗糖脂質の抽出に供した。

2-2. 粗糖脂質の抽出

組織から糖脂質の抽出は、Svennerholm法⁹⁾を用いた。すなわち組織にその20倍容のクロロホルム-メタノール-水(C-M-W=4/8/3, v/v/v)を加えて室温にて第1回目抽出を行い、濾過後、その組織残渣に20倍容のC-M-W=4/8/3(v/v/v)を加えて第2回目の抽出を行った。2回分の濾液を合わせて抽出液とした。

抽出液はC-M-Wを4/8/5.6(v/v/v)となるように蒸留水を添加し、室温にて溶媒分配を行い、中性糖脂質やリン脂質は下層に、酸性糖脂質は上層にそれぞれ分画した。

スフィンゴ脂質の脂肪酸は、アミド結合のため弱アルカリ処理に対して安定であるが、同時に抽出されたグリセロリン脂質やトリグリセリドは、エステル結合であるため弱アルカリ処理で容易に分解する。そこで、混入しているそれらのグリセロ脂質を除くために、水酸化ナトリウム溶液を最終濃度0.5規定となるように加えて調製し、37℃で3時間インキュベートした。反応液はその後透析膜(Seamless Cellulose Tubing, Viskase社)を用いて流水および蒸留水中で2日間ずつ透析してアルカリを除去し、粗スフィンゴ糖脂質を得た。

2-3. 粗スフィンゴ糖脂質のカラム分画による精製

脳の中性スフィンゴ糖脂質の主成分であるCMHを分離精製するためにまず、得られた粗スフィンゴ糖脂質に混在している、疎水性が高く糖鎖の短い酸性スフィンゴ糖脂質を、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーのDEAE-SephadexA-25(アセテート型, Pharmacia社; ウプサラ, スウェーデン)を用いて分離した。すなわち中性画分(N)はC-M-W=3/7/1(v/v/v)で、酸性画分はC-M-2.0M酢酸アンモニウム=3/7/1(v/v/v)の溶媒系でそれぞれ溶出した。

引き続きN画分に残存しているリン脂質やトリグリセリドを除去するために、アセチル化法¹⁰⁾を行

った。すなわち、ピリジン-無水酢酸=3/2 (v/v)を加えて室温で1昼夜放置してアセチル化を行い、フロリジルカラム分画で (Florisil, 150~250 μ m, 60~100mesh, 和光純薬工業社; 大阪, 日本), ヘキサン-ジクロロエタン (DCE)=1/4 (v/v) でコレステロールなどを除去した後, 8倍量のDCE-アセトン=1/1 (v/v) でアセチル化糖脂質を溶出し, さらに4倍量のDCE-M-W=2/8/1 (v/v/v) でリン脂質を溶出させた。アセチル化糖脂質は溶媒を除去した後, 0.2M水酸化ナトリウムを含むC-M=1/1 (v/v) に溶解し, 室温にて30分放置して脱アセチル化反応を行った。続いて酢酸で中和後, 蒸留水中で2日間透析し糖脂質を回収した。

得られたCMHは2成分からなるため, さらにIatrobeds (IB, 6RS-8060, Iatron社; 東京, 日本)を用いた吸着カラムクロマトグラフィーを行い, 各成分の単離を試みた。IBカラムにCMHを吸着させた後, 溶出溶媒C-M=95/5 (v/v) でトリグリセリドを除去し, フラクションコレクターでC-M=90/10 (v/v) を4mlずつ分取してCMHを回収し, 最後はC-M=50/50 (v/v) で溶出した。その後, TLCで確認しながらCMHを2成分に分離した。

2-4. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による糖脂質の検討と定量

N画分 (CMHが主成分) のTLCによる検討には高分解能薄層クロマトグラフィー (HPTLC, Silicagel 60, MERCK社; ダームシュタット, ドイツ)を用いた。

展開溶媒はC-M-0.2%塩化カルシウム=65/25/4 (v/v/v)を用いた。糖脂質はオルシノール硫酸試薬¹¹⁾を噴霧し, 100℃で15分間加熱し検出した。

糖脂質の定量は, 同一プレート上に種々の濃度の標準物質CMHを定量的に塗布し, その後デンストメーター (島津二波長フライングスポットスキャナー CS-9000) で分析し定量化した。測定波長は540nmを用いた。

2-5. 糖脂質構成成分のガスクロマトグラフィーによる分析

CMHを構成する糖, 脂肪酸は以下の方法に従ってGLC分析 (FID, 島津GC-14B)を行った。

糖は, SweeleyとWalkerによる方法¹²⁾に従い, 糖を75℃18時間メタノリシスした後にTMS誘導体に変え, 2%-Silicone OV-101 (2.1m \times 3.2mmI.D.)で分析した。分析温度は150℃から開始し, 4分後に3℃昇温で260℃までとした。糖の同定には, 市販のガラクトシルセラミドとラクトース (生化学工業社)を, 上記方法でTMS化した後に標準物質として用いた。

脂肪酸は, 0.5N塩酸-メタノールによるメタノリシス (100℃で3時間) でメチル化した後で, 2%-Silicone OV-101 (2.1m \times 3.2mmI.D.)で分析した。分析温度は160℃で開始し, 2.5℃昇温で260℃までを用いた。

3. 結果および考察

3-1. 脳中性糖脂質の特徴

脳から抽出した全中性糖脂質画分は, ラット脳, マアジ脳ともにCMHは2成分から構成されていた。ここでは便宜上, 溶出時間が早くRf値の高いもの (上部)をCMH-1, Rf値の低いもの (下部)をCMH-2とする。ラット脳では図1中のレーン②に見られるように, CMH-2の含有量がCMH-1に比べて多く, これに反してマアジ脳では図2中のレーン③から, CMH-2よりもCMH-1の含有量が多い全く逆の分布が認められた。そこで, 2成分からなるCMHの構成率を求めるためにデンストメーターを用いて定量を行った。その結果を表1に示した。ラット脳ではCMH-1が16%, CMH-2が84%であったのに対して, マアジ脳ではCMH-1は78%, CMH-2は22%, という対照的な結果となった。CMHの標準物質として用いたウシの脳CMHではCMH-2, 既に報告したイワシの脳CMHではCMH-1が多く¹³⁾, 動物種によるCMHの脂肪酸構成に差異があることが確認された。

また図1のレーン②③, 図2のレーン③④から, ラット脳, マアジ脳ともにCMHの上部にトリグリセリド, リン脂質, 遊離脂肪酸由来と思われる未精製脂質が認められた。

さらに図1のレーン①②⑥から, ラット脳は



1 2 3 4 5 6 7

Fig. 1 Thin-layer Chromatogram of Neutral Glycosphingolipid(NGL) in the Brain of Rat

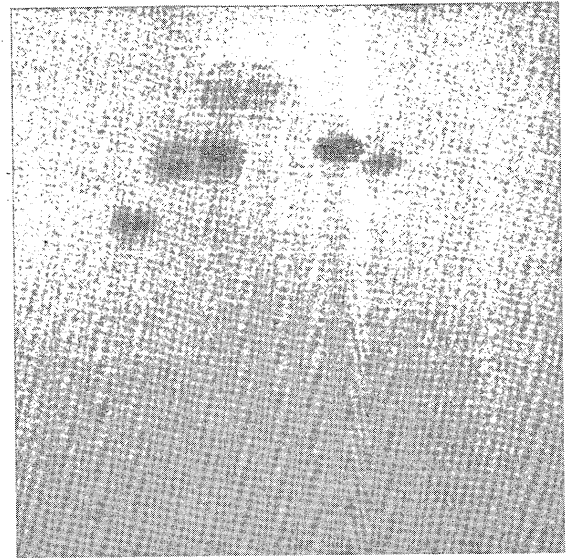
Lanes: 1, reference CMH and Ceramide dihexoside (CDH); 2, Total NGL in the Brain; 3, eluted fraction with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}=95/5(\text{v/v})$; 4, CMH-1 in the Brain; 5, CMH-2 in the Brain; 6, CDH in the Brain; 7, eluted fraction with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}=50/50(\text{v/v})$.

The plate was developed with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}-0.2\%\text{CaCl}_2(65:25:4)$, sprayed with orcinol- H_2SO_4 reagent.

CMHの下部にごく微量ではあるがセラミドジヘキソシド（以下CDHと略記する）の存在が認められた。これに対してマアジ脳はCDHの存在がほとんど認められなかった。イワシでも同様の結果⁷⁾が得られており、魚類の中性糖脂質の分布パターンは、哺乳類に比べ非常に単純である特徴が見られた。

3-2. CMHのIBカラム分画による単離

TLC上で2成分に分かれたCMH-1, CMH-2を各成分に単離させるため、IBカラム分画を行った。溶出溶媒は緩やかな系、すなわちC-M=90/10(v/v)のステップワイズで分画した結果をまとめ図1, 2に、ラット脳のエリューションパターンを図3にそれぞれ示した。ここではCMH-1とCMH-2の単離はできたものの、その回収率は約60%と低く、試料の精製度を高めるためには、IBカラムの繰り返し導入は避けられず、オープンカラムによる単離には限界があるといえる。これらの結果から、生体組織に微量に存在するCMHを短時間かつ高い回収



1 2 3 4 5 6 7

Fig. 2 Thin-layer Chromatogram of Total NGL in the Brain of Yellowfin Horse Mackerel

Lanes: 1, reference CDH; 2, reference CMH; 3, Total NGL in the Brain; 4, eluted fraction with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}=95/5(\text{v/v})$; 5, CMH-1 in the Brain; 6, CMH-2 in the Brain; 7, eluted fraction with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}=50/50(\text{v/v})$.

The plate was developed with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}-0.2\%\text{CaCl}_2(65:25:4)$, sprayed with orcinol- H_2SO_4 reagent.

Table 1 CMH Compositions in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

	Compositions (% of total CMH)	
	Rat	Yellowfin Horse Mackerel
CMH-1	16	78
CMH-2	84	22

率で確保できるHPLCによる分離精製法が強く望まれ、そのためには、分離精製法の検討に用いる構成成分の明らかな試料を調製することが必要不可欠である。

3-3. 構成糖のGLC分析

ラット脳およびマアジ脳CMHの構成糖を分析した結果を図4に示した。ラット脳はCMH-1, CMH-2ともに90%以上がガラクトースで構成されており、ごくわずかではあるがグルコースがCMH-1では8%, CMH-2では3.5%混在していた。以前、我々が分析したイワシ脳でもCMH-1, CMH-2ともに大部分がガラクトースで構成されていた⁷⁾。今回の検討で、

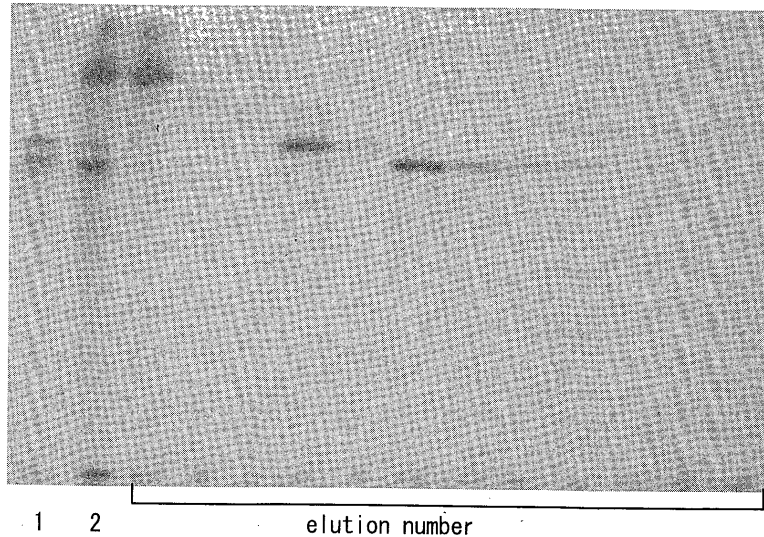


Fig. 3 Elution Pattern of Total NGL in the Brain of Rat
Lanes; 1, references CMH; 2, Total NGL in the Brain.
The plate was developed with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-0.2\%CaCl}_2$
(65:25:4), sprayed with orcinol- H_2SO_4 reagent.

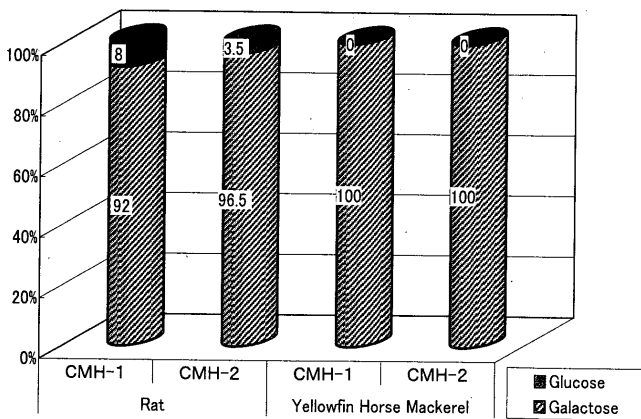


Fig. 4 Sugar Composition of CMH-1 and CMH-2 in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

マアジ脳CMHの構成糖は100%ガラクトースであり、グルコースの存在は確認されず、脳のCMHは大部分がガラクトースという従来のデータを追認するものであった。HPLCの分析条件に影響を及ぼす要因の一つに、CMHの親水性部分である糖鎖が挙げられるが、マアジやイワシなど魚類の脳やラット脳の中性糖脂質は図1, 2のTLC結果が示すように、CMH以外の糖鎖の長い中性糖脂質はほとんど検出されなかった。従って、HPLCの分離条件に影響を及ぼす他の要因である疎水性に注目し、検討を加えることにした。そのためにまず、ラット脳およびマアジ脳のCMH構成脂肪酸の特徴を明らかにした。

3-4. 構成脂肪酸のGLC分析

TLCおよび構成糖のGLC分析結果から、CMHが2成分に分離したのは疎水性を示す構成脂肪酸の差が大きく影響していると考えられた。HPLC分析方法を検討するにあたり、動物種の異なる試料の脂肪酸構成パターンを明らかにし、その特徴を検討する必要があると考え、前述の方法に従ってGLC分析を行った。結果を図5に示す。

ラット脳CMHは90.4%、マアジ脳CMHは98.1%が炭素数の多い20以降の脂肪酸で構成されていた。これに対して、食品中のトリグリセリドの大部分は、炭素数20までの脂肪酸で構成されており、脂肪酸構成の異なった特徴を見ることができた。

ラット脳CMHを構成する脂肪酸の全体的な特徴を述べると、主要成分はC24:0のヒドロキシ脂肪酸(46.1%)、次いでC22:0のヒドロキシ脂肪酸(16.5%)、C24:1のヒドロキシ脂肪酸(6.0%)で、ヒドロキシ脂肪酸および、飽和脂肪酸の含有量が高いことである。これに反してマアジ脳では、主要脂肪酸はC24:1(48.7%)とC24:0(22.2%)が70.9%を占めていたが、ヒドロキシ脂肪酸および飽和脂肪酸の含有量は低かった。加えて、ラット脳では炭素数の短いC16:0とC18:0が合わせて10%

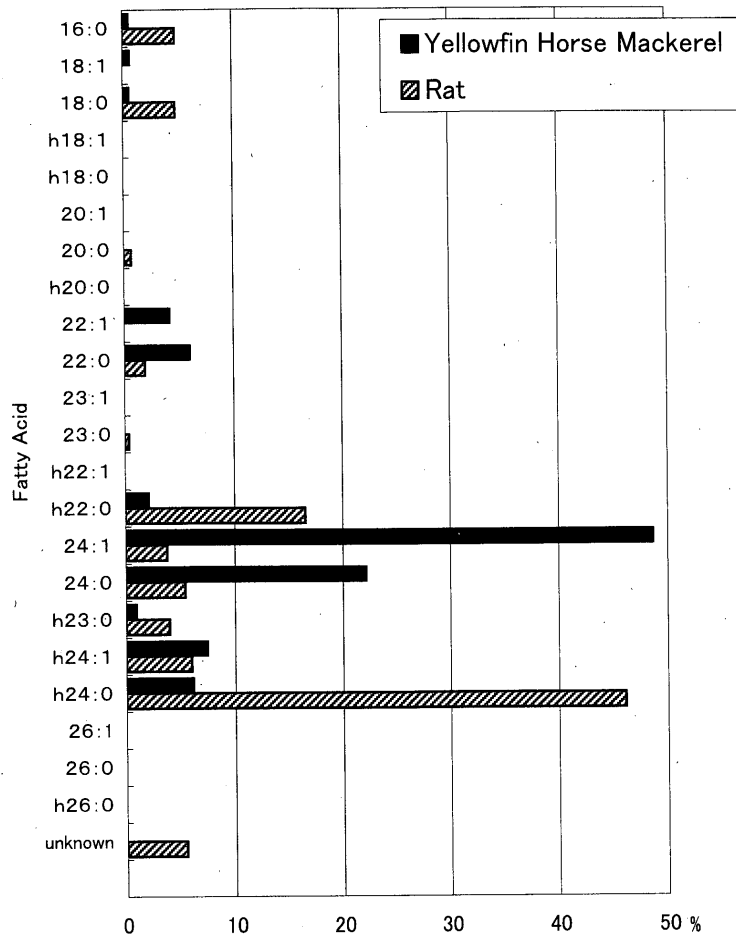


Fig. 5 Fatty Acid Composition of Total CMH in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

程度含まれていたのに対して、マアジ脳ではごくわずかしかなかったが、CMHを構成しているほとんどがC22以上の長鎖脂肪酸であることが確認できた。

構成脂肪酸の特徴的な分布パターンを明らかにするために、ラット脳およびマアジ脳のCMH-1、CMH-2それぞれのヒドロキシ脂肪酸の構成率を図6に示した。ラット脳CMH-1は未知の脂肪酸を除いて87.8%が非ヒドロキシ脂肪酸であったのに対して、CMH-2では非ヒドロキシ脂肪酸は9.3%と少なく、逆にヒドロキシ脂肪酸が85.5%と高い構成率であった。マアジ脳CMH-1は100%非ヒドロキシ脂肪酸で構成されていた。すでに我々が報告したように、魚類であるイワシ脳CMH-1もすべて非ヒドロキシ脂肪酸で構成されており7)、同じ動物種すなわち魚類間の類似性が示唆された。次に、

脳CMH全体のヒドロキシ脂肪酸の構成率を図7に示した。その結果、ラット脳ではヒドロキシ脂肪酸が72.6%と高かったのに対して、マアジ脳ではイワシ脳と同様に、非ヒドロキシ脂肪酸が83.1%と高い構成率を示し、動物種により異なる構成パターンを持つことが確認された。

哺乳類ヒト脳のCMHの構成脂肪酸の特徴として、C16とC18が7%程度とごくわずかではあるが含まれ、さらにヒドロキシ脂肪酸が全体の約60%を占め、中でもC23やC24の長鎖のヒドロキシ脂肪酸の構成率が高いことが報告されているが14)15)、ヒトと同じ哺乳類のラット脳CMHにも、大変似通った特徴を見ることができた。

次にラット脳およびマアジ脳のCMH-1、CMH-2の不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の構成率を図8に示した。その結果、ラット脳では飽和脂肪酸がCMH-1

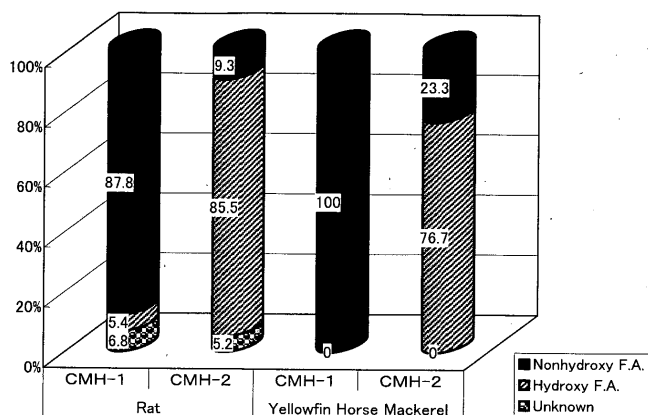


Fig. 6 Hydroxy Fatty Acid Composition of CMH-1 and CMH-2 in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

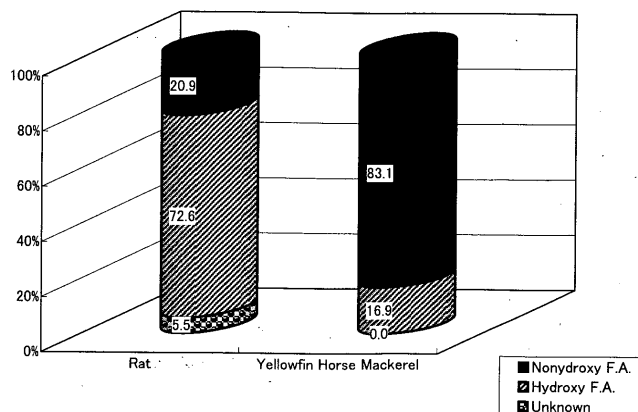


Fig. 7 Hydroxy Fatty Acid Composition of Total CMH in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

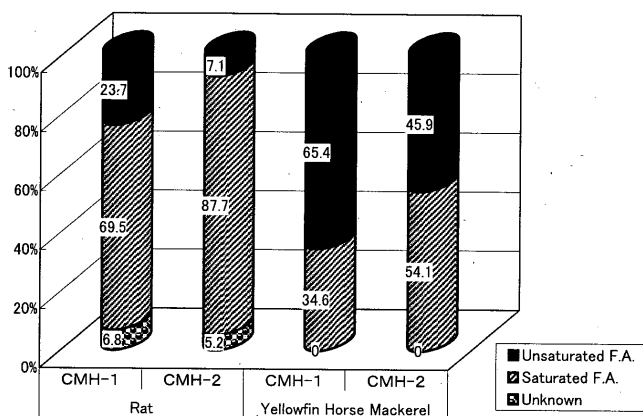


Fig. 8 Unsaturated Fatty Acid Composition of CMH-1 and CMH-2 in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

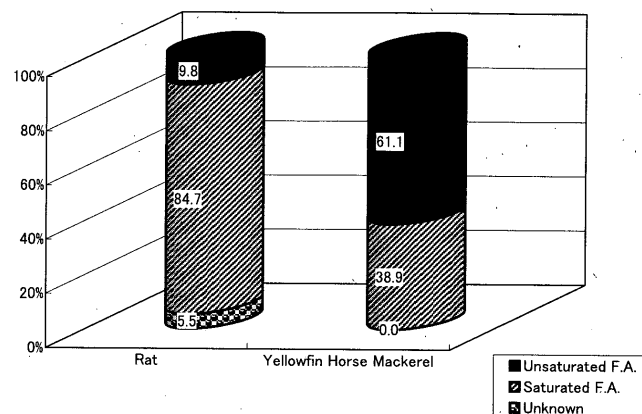


Fig. 9 Unsaturated Fatty Acid Composition of Total CMH in the Brain of Rat and Yellowfin Horse Mackerel

で69.5%, CMH-2で87.7%であったのに反して, マアジ脳のCMH-1では飽和脂肪酸が34.6%, CMH-2では54.1%といずれもラット脳に比べて低い構成率であった。CMH全体として構成率をまとめた図9を見ると, ラット脳では飽和脂肪酸が84.7%と高かったのに対して, マアジ脳では38.9%と低かった。これらの結果はイワシ脳でも確認されており⁷⁾, 動物種による脂肪酸構成パターンの差異が明確に現れていた。

糖脂質のほとんどは細胞膜上に局在しており, その細胞膜の流動性に関する一つの要因として構成脂肪酸の不飽和度があげられる。今回試料として用いた哺乳類ラット, 魚類マアジでも動物種による構成脂肪酸の差異が認められ, 水陸が異なる棲息環境にも大きく依存しているものと推察された。

糖脂質は微量成分であり両親媒性の複雑な化学構造を持つ。現在, 研究に用いる十分量かつ多種類の糖脂質を生体組織から精製単離するために, 簡便で収率の高い分離精製方法の導入が強く望まれている。本研究では, 糖脂質分析へのHPLC導入に向けて, 動物種の異なるラット脳CMHとマアジ脳CMHの調製を試み, 2~3の知見を得たので報告した。糖脂質の生理機能を明らかにするためには, 構成成分の差異の明確な分析試料を多種類調製することが必要となる。そのためのHPLCを用いた試料単離条件の検討をさらに進めてゆきたい。

4. 要 約

複合脂質の一種である糖脂質は生体の細胞膜に局在し, 細胞間認識, 細胞増殖や分化, あるいは細胞

接着分子などの機能が報告され、分子生物学的見地から研究が期待される。

糖脂質の分離精製法として、最近幅広く利用されているHPLCの導入を試み、その分析方法の検討を行うことにした。その第一ステップとして哺乳類ラット由来のCMHと魚類マアジ由来のCMHを分離精製し、その構成成分の比較検討を行った。

ラットもマアジもCMHはTLC上では2つのバンドから構成されていたが、その割合は異なり、ラットは上部が16%、下部が84%であるのに対して、マアジは上部が78%、下部が22%であり対照的な結果となった。

構成糖はガラクトースであり、ラットが約95%、マアジは100%ガラクトースから構成されていた。ラットはわずかであるがグルコースが混在していたが、動物種による脳の構成糖の差異はほとんど認められず、主要構成糖はガラクトースであった。

主要な構成脂肪酸は、ラットの場合C24:0の hidroキシ脂肪酸が46.1%を占め、マアジに比べて16や18の炭素数の少ない脂肪酸の割合が高かった。マアジの主要脂肪酸はC24:1が48.7%を占め、不飽和脂肪酸の割合が高く、ラットと明確に異なる結果が得られた。

参考文献

- 1) Hashimoto, Y., Suzuki, A.: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44**, 730-737(1995)
- 2) 左一八: 薬学雑誌, **123(5)**, 315-322(2003)
- 3) Lingwood, C.A.: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **12**, 7-16(200)
- 4) Kawashima, M., Nakagawa, K., Sugawara, T., Miyazawa, T., Murakami, C., Miyashita, R., Ono, J., F.S.Deschamps, P.Chaminade: *J. Oleo Sci.*, **51**, 347-354(2002)
- 5) Iwamori, M., Nagai, Y.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **665**, 214-220(1981)
- 6) Saga, Y., Gasa, S., Makita, A., Oikawa, K.: *Journal of Chromatography*, **513**, 379-383(1990)
- 7) Tanaka, N., Okamura, H.: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **48**, 693-697(1999)
- 8) 田中伸子, 岡村浩: *J. Oleo Sci.*, **52**, 234-243(2003)
- 9) L.Svennerholm, P.Fredman: *Biochem. Biophys.*

Acta., **617**, 97-109(1980)

- 10) Saito, T., Hakomori, S.: *J. Lipid Res.*, **12**, 257-259(1971)
- 11) L.Svennerholm: *J. Neurochem.*, **1**, 42-43(1956)
- 12) C.C.Sweeley, B.Walker: *Anal. Chem.*, **36**, 1461(1964)
- 13) Tanaka, N., Okamura, H.: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **48**, 131-134(1999)
- 14) L.Svennerholm, S.Stallberg-Stenhagen: *Journal of Lipid Research*, **9**, 215-225(1968)
- 15) R.W.Ledeer: *J. Neurochem.*, **21**, 829-839(1973)

(たお さなえ 食物科学科)
(たなか のぶこ 食物科学科)