

## マイワシ頭部に分布するスフィンゴ糖質の検討

田中伸子, 岡村 浩

### Comparative investigation of glycosphingolipid composition of Japanese pilchard head

Nobuko Tanaka and Hiroshi Okamura

The distribution and composition of glycosphingolipid in the head that of Japanese pilchard were studied.

The head (wet weight= 81.4g) was removed from six Japanese pilchards. The total glycosphingolipid of the head was extracted with the procedure of Svennerholm and divided into four fractions. ( neutral glycolipid: N.L., sulfatide: CSE, monosialoganglioside: GM and polysialoganglioside:  $\geq$ GD )

The results of our experiment are as follows:

- 1) The head included N.L., CSE and ganglioside of low concentration compared with various animal brains.
- 2) The head contained monosialoganglioside as the main component of ganglioside ; where the fish brain contained polysialoganglioside predominantly. Monosialoganglioside, which mainly consisted of GM3 and GM2, occupied 64 % of ganglioside.
- 3) Three components derived from CMH were the principal constituents of neutral glycolipid in the head.

イワシやサバなどの魚類の脂質には、多価不飽和脂肪酸であるイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) が他の動物の脂質と比較して多く含まれている。これら EPA や DHA は脳神経系組織や網膜に高濃度に存在し、生体の膜の構造物質であるとともに、ホメオスタシス維持に関連しており、EPA の抗動脈硬化作用や抗炎症・抗アレルギー作用<sup>1)</sup>、DHA の抗視力障害や学習能力への影響など<sup>2)</sup>その機能が注目されている脂質成分である。従って、魚類の脂質に関する研究はもっぱら単純脂質に片寄りがちであるが、生体機能の面から脂質成分である複合脂質についても、知見を深めることは必要不可欠なことであると考えられる。

この複合脂質の 1 種である糖脂質は、微量ながら細胞表面膜に局在し、流動性を持ち、脂質二重層の外層に疎水基であるセラミド部分を結合させ、親水基である糖鎖を細胞外に向けて存在している。これら多様な糖鎖による細胞間の認識や相互作用、物質輸送などの生体膜機能への関与が示唆<sup>3)~6)</sup>され、近年研究は益々盛んになっている。動物界に広く分布する糖脂質はスフィンゴ糖脂質で、哺乳類の神経系組織や赤血球膜を中心に研究が進められた。特に赤血球膜で動物種の差が認められた結果、哺乳類を中心とする各種動物の臓器の比較検討<sup>7)~9)</sup>が行われた。中でも、その種類が多く、習性も多岐に亘っている魚類では、神経系 (脳)<sup>10)~11)</sup>のほかにボラの卵<sup>12)</sup>、ヒラメの肝臓<sup>13)</sup>などに哺乳

乳類には見られない新しい糖脂質に関する報告がなされ、発生学的に非常に興味深い結果を示唆している。

そこで、魚類のなかでも硬骨魚類ニシン科に分類されるマイワシの頭部に注目し、そこに分布しているスフィンゴ糖脂質の組成について薄層クロマトグラフィー (TLC) による検討を加えたので報告する。

## 実験方法

### 1. 実験材料

マイワシ (硬骨魚類, *Sardinops melanosticta*) 6匹 (平均体重  $77.8 \pm 3.9$ g) の鰓ブタからハサミを入れ背骨を切断し頭部 (眼球を含む) を切り離し、さらに細断し総糖脂質の抽出に供した。湿組織重量は総量81.4g (平均重量  $13.6 \pm 1.1$ g) であった。

TLCの標準糖脂質は、市販の GM4, GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b, GT1b, CSE, CMH, CDH, Globo. (和光純薬工業, 生化学工業) をそれぞれ用いた。

### 2. 粗糖脂質の抽出

粗糖脂質はSvennerholm法に従って抽出した。すなわち、組織重量の10倍量のクロロホルム-メタノール-水 (C-M-W = 4:8:3 v/v/v) で室温抽出を2回繰り返した後、合わせた抽出液の水の比率を5.6に調整し、上層 (酸性糖脂質) と下層 (中性糖脂質) への溶媒分配を行った。混在するグリセロ脂質を分解除去するために、上層、下層それぞれの液量を約1/10まで濃縮し、NaOH溶液を加え最終濃度0.5規定に調整し、37℃で3時間、弱アルカリ処理をした。2つの反応液は、流水および脱イオン水中で連続して透析した後に濃縮し、粗スフィンゴ糖脂質とした。

### 3. 酸性および中性スフィンゴ糖脂質の精製

#### 1) 酸性スフィンゴ糖脂質の分画・精製

上層の粗酸性スフィンゴ糖脂質はさらに混在する中性スフィンゴ糖脂質を除去するために、CMW 3/7/1の溶媒系でDEAE-SephadexA-25 (アセテート型) を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行い、中性画分 (N) と酸性画分に分離した。すなわち、上層画分は、150 ml のCMW (3/7/1, v/v/v) に溶かしてDEAEカラムにかけた (カラム bed vol. 30ml)。カラム容積の10倍量のCMW 3/7/1で中性糖脂質を溶出させた後で、引き続き酸性画分はガングリオシドに結合するシアル酸数に基づき、CMW 3/7/1の水の代わりに酢酸アンモニウム溶液を同じ割合で加えた溶媒を用いて、塩濃度0.2Mでモノシアロガングリオシド (GM) とスルファチド (CSE) を、塩濃度1.5Mでポリシアロガングリオシド ( $\geq$ GD) をそれぞれ溶出した。溶出液は濃縮後、流水および脱イオン水中で連続して透析し濃縮して、GM画分、 $\geq$ GD画分を得た。さらに、上層のGM画分は下層のDEAEカラム分画により回収されたGM画分を合わせた後に、Iatrobeads 6RS-8060 (IB, Iatron, Tokyo) を用いた吸着カラムクロマトグラフィー (カラム bed vol. 20ml) を行い、カラムの10倍量のCMW 80/20/0.5で混入しているCSEを、CMW 40/58/2でGMをそれぞれ分離溶出した。

#### 2) 中性糖脂質の精製

下層画分はかなり単純脂質が含まれているために、まず少量のCM 95/5に溶かしてIBカラム (カラム bed vol. 90ml) の上部に吸着させ、カラムの10倍量のCM 95/5で単純脂質を溶出分離させ、引き続き20倍量のCM 4/6で中性糖脂質を回収した。さらに、前述した上層の粗酸性スフィンゴ糖脂質からDEAEカラム分画により得られた中性画分と合わせ、混在するCSEを

回収するためにDEAEカラム（カラム bed vol. 25 ml）分画を行った。250 ml の CMW 3/7/1 で中性糖脂質を、250mlのCM- 0.2M-CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 3/7/1 でCSEをそれぞれ溶出した。CSE画分は濃縮し、流水および脱イオン水中で透析した後で、上層のGM画分と合わせ、前述した様にIBカラムによりCSE画分を分離溶出した。

### 3. 薄層クロマトグラフィー（TLC）分析

抽出・精製したスフィンゴ糖脂質は、1D-、2D-TLC上で比較検討した。プレートは高分解能シリカゲルプレート（HPTLC, Merck社）を使用した。

展開溶媒系は酸性糖脂質には a). C-M-0.2%CaCl<sub>2</sub> (60:35:8, V/V/V), b). N-Propanol-28%NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (75:5:25, V/V/V), c). C-M-2.5N NH<sub>4</sub>OH (60:35:8, V/V/V) を併用し、中性糖脂質には d). C-M-W (65:25:4, V/V/V) を用いた。酸性スフィンゴ糖脂質はレゾルシノール塩酸（100℃, 20分間加熱）、中性スフィンゴ糖脂質はオルシノール硫酸（100℃, 15分間加熱）を噴霧し検出した。

### 4. 糖脂質の定量

#### 1) ガングリオシドの定量

酸性スフィンゴ糖脂質のうちガングリオシドは、島津ダブルビーム分光光度計UV-180で結合シアル酸をレゾルシノール塩酸法により比色定量<sup>14)</sup>した。標準物質としてN-アセチルノイラミン酸を用いた。

#### 2) 中性スフィンゴ糖脂質およびスルファチドの定量

中性スフィンゴ糖脂質およびスルファチドは、標準物質としてCMHとCSEをそれぞれ異なる濃度を試料と同一プレートにスポットし展開溶媒 d)を用いて分離し、オルシノール硫酸を噴霧し発色させた後に、デンシトメーター（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540 nm を用いた。

### 実験結果および考察

マイワシ頭部のスフィンゴ糖脂質は図1に示した様に抽出分離を行い、中性スフィンゴ糖脂質と酸性スフィンゴ糖脂質（CSEとガングリオシド）を得た。安藤らの、タラの脳ではモノシアロガングリオシドはわずか0.9%を占めるだけで、残りはポリシアロガングリオシドで、特にGQ1cは44%と高濃度であった<sup>14)</sup>との報告に見られるように、魚類の脳にはポリシアロガングリオシドが多く含まれていることから、本実験では、ガングリオシドをさらにGM画分と $\geq$ GD画分に分けて精製した。

まず、これら4画分について、それぞれ前述した方法を用いてスフィンゴ糖脂質を定量した結果を表1にまとめた。本実験では、マイワシの頭部をまとめて抽出に供したため神経系組織と非神経系組織（結合組織や軟骨・骨組織を含む）が混在するとともに、組織重量がかなり大きな数値を示したが、比較のために各スフィンゴ糖脂質はすべて湿組織 1g あたりで表現した。イワシ頭部の全ガングリオシド濃度は7.2  $\mu$ g NANA/g 湿組織重量であった。これは一般的にガングリオシド濃度の低い組織である筋肉のレベルとほぼ等しかった。（ヒト；19.0  $\mu$ g, サル；8.1  $\mu$ g, ウシ；10.1  $\mu$ g, イヌ；14.4  $\mu$ g, ウサギ；6.0  $\mu$ g, マウス；7.2  $\mu$ g, ニワトリ；4.2  $\mu$ g, 単位； $\mu$ g NANA/g 湿組織重量）<sup>15)</sup>。

またガングリオシド濃度の高い組織として知られている各種動物の脳の約1/50~1/100（ネコ；234  $\mu$ g, ウサギ；816  $\mu$ g, ニワトリ；471  $\mu$ g, カエル；264  $\mu$ g, タラ；363  $\mu$ g, コイ；315  $\mu$ g, ガンギエイ；229  $\mu$ g, 単位； $\mu$ g NANA/g 湿組織重量）<sup>16)</sup> でしかなかった。同様に脳の

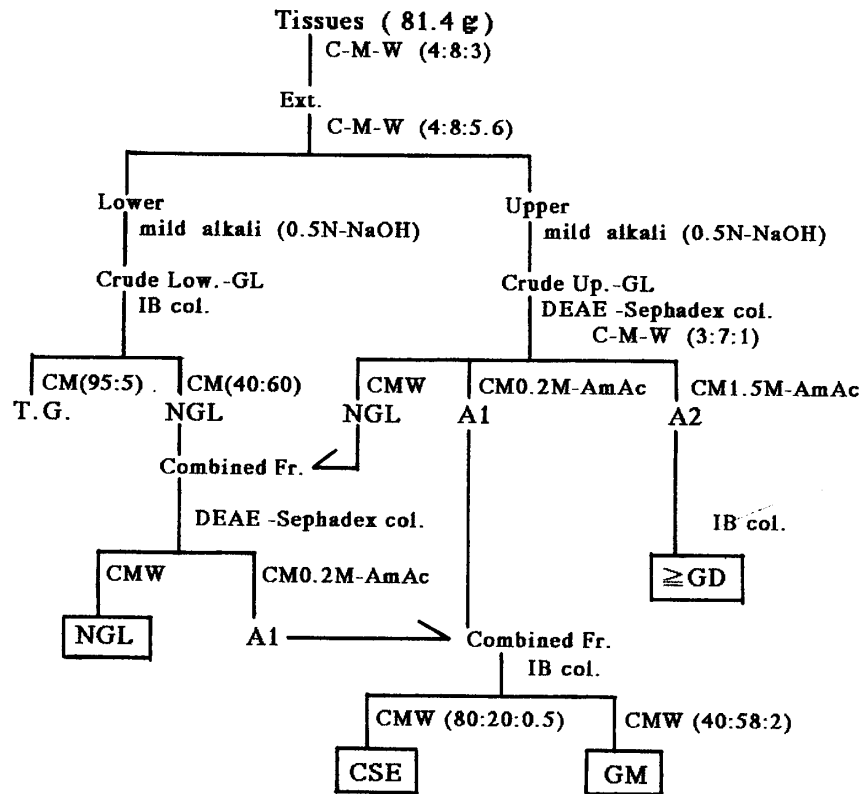


Fig.1 Fractionation of glycosphingolipids from head in Japanese pilchard.

Table 1 Contents of glycosphingolipids in Japanese pilchard head.

Tissues	Cerebroside as $\mu\text{g}$ CMH	Sulfatide as $\mu\text{g}$ CSE	Gangliosid as $\mu\text{g}$ NeuAc	
			GM	$\geq\text{GD}$
	————— per g of wet tissue —————			
Head (81.4g)	23.3	19.0	4.6 (64%)	2.6 (36%)
			└ 7.2 ─┘	

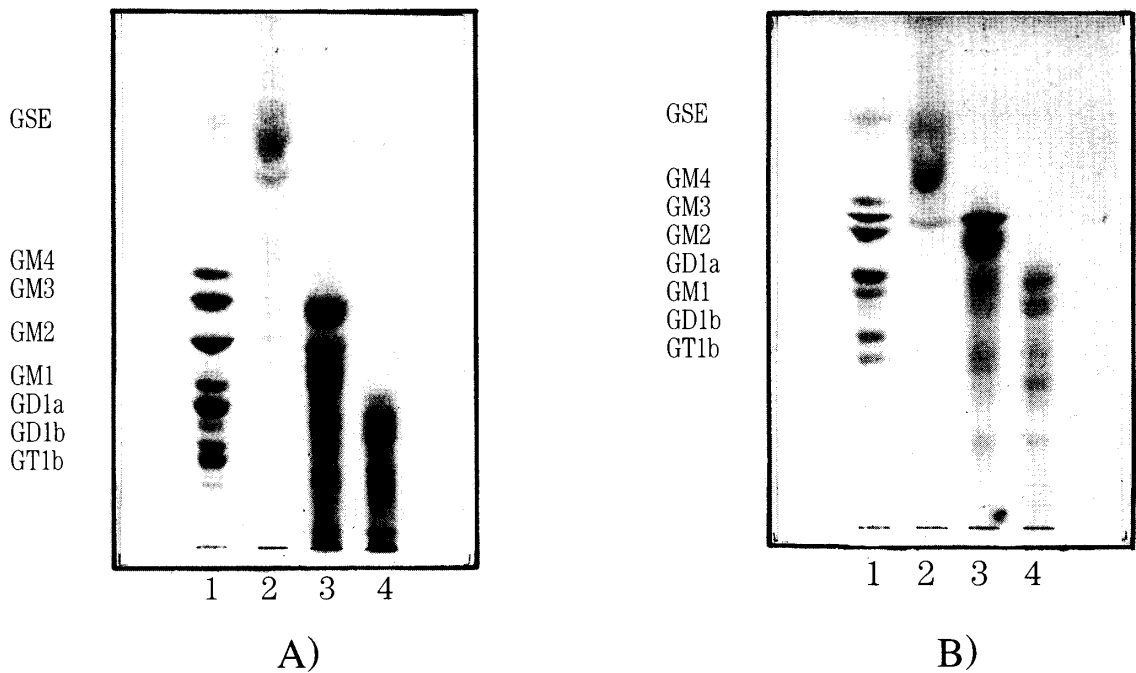


Fig. 2. Thin-layer chromatograms of the isolated acid glycosphingolipids from Japanese pilchard head with two different solvent systems. Lanes : 1, CSE, GM4, GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b and GT1b (references) ; 2, Fr.-CSE; 3, Fr.-GM; and 4, Fr.- $\geq$ GD.

The solvents used for chromatograms A) and B) were systems  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-2.5N-NH}_4\text{OH}$  (60:35:8) and  $n\text{-propanol-28\% NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}$  (75:5:25), respectively. The components were visualized with resorcinol-HCl reagent.

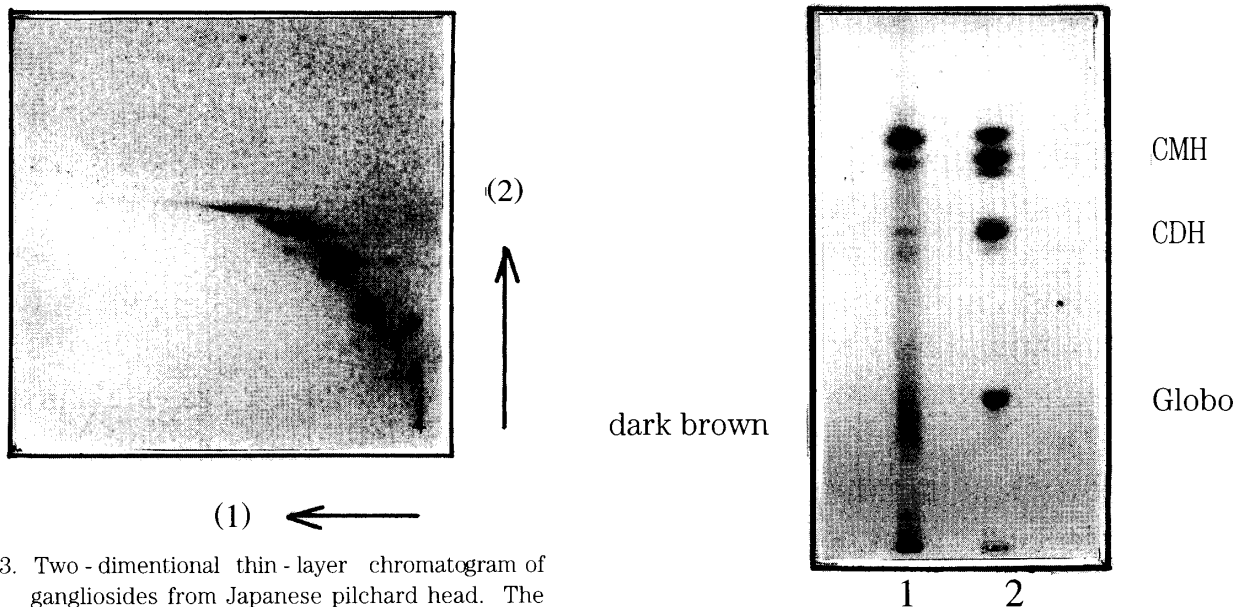


Fig. 3. Two-dimensional thin-layer chromatogram of gangliosides from Japanese pilchard head. The plate was developed with the following solvent systems;  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-0.2\%CaCl}_2$  (60:35:8) in the first run (1) and  $n\text{-propanol-28\% NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}$  (75:5:25) in the second run (2). The components were visualized with resorcinol-HCl reagent.

Fig. 4. Thin-layer chromatograms of the isolated neutral glycosphingolipids from Japanese pilchard head. Lanes: 1, Fr.-NGL; 2, CMH, CDH, Globo (references). The plate was developed with  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-2.5N-NH}_4\text{OH}$  (60:35:8), sprayed with orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  reagent.

中性スフィンゴ糖脂質 (28 nmol) と CSE (21 nmol) に関して、他の魚類と比較すると (タラ; 4.22  $\mu$  mol, 0.98  $\mu$  mol, ヒゲダラ; 5.97  $\mu$  mol, 1.54  $\mu$  mol, アンコウ; 2.60  $\mu$  mol, 1.54  $\mu$  mol) <sup>10)</sup> 約 1/60~1/150 とやはり低いレベルであった。

また、GM画分と $\geq$ GD画分の割合は64%と36%で、GM画分の濃度が倍近く高く、一般的にポリシアロガングリオシドが約80%近くを占める脳よりも、むしろGM3を高濃度に含むため、モノシアロガングリオシドが平均 70% 近くを占める非神経系組織の分布割合<sup>9)</sup>に近かった。この結果は先に述べた様に、頭部は非神経系組織の割合が大きかったためと考える。

マイワシ頭部の酸性スフィンゴ糖脂質の3画分を比較するために行った1D-TLC結果を図2に、複雑な分布が認められるガングリオシドのための2D-TLC結果を図3にそれぞれ示した。両者を比較検討した結果、マイワシ頭部に存在する酸性スフィンゴ糖脂質としては、CSE, GM3, GM2, GD1aが主成分として確認された。今回は同定にまで至らなかったが、シアロシルパラグロボシドと推定される成分も高濃度に存在していた。CSEとGD1aは各種動物脳に高濃度に含まれていることから、脳由来と考えられた。濃度は低いものの、魚脳の特徴の1つであるGQ, GPなどのポリシアロガングリオシドの存在も確認された。マイワシ頭部に高濃度で含有されているGM3は、ガングリオシド生合成の中心となる物質<sup>11)</sup>であり、各組織に幅広い分布が認められている。特に非神経系の組織には多く含まれており、脳とは逆にGM画分の濃度が高い割合を示す1因にもなっている。ガングリオシド濃度の分布割合から非神経系組織を多く含むと考えられる頭部では、TLCの結果からも、GM3は高濃度に含まれていることが確認された。

ガングリオシドが複雑な分布パターンを示したのに反して、中性スフィンゴ糖脂質は、極めて単純であり (図4)、主成分であるCMH (85%) と、少量 (15%) のCDHから構成されていた。TLC上のGlobo.より下側に見えるバンドは、発色時の色調から、今回の弱アルカリ処理で除去出来なかったグリセロリン脂質と推定された。更に、セラミド側の構造の差から、CMHは3成分、CDHは2成分に分離しており、各成分の単離を試みその構成脂肪酸や長鎖塩基のGLC分析などを行ってその差異を詳細に検討してゆく必要がある。

マイワシ頭部のスフィンゴシン糖脂質の分布をTLCを用いて比較検討したところ、特にガングリオシドにおいて、非神経系組織に見られる特徴が強く現われていた。即ち、GM3とGM2がかなり高濃度に存在するため、モノシアロガングリオシドが2倍近い高濃度を示す結果となった。また、微量ではあるが、脳由来と考えられるGQや更にシアル酸が1分子結合したGPの存在も推察され、全体として複雑な分布パターンを示していた。中性スフィンゴ糖脂質は単純でCMHが主成分であった。今後は特にガングリオシドに注目して、各組織ごとにそのパターンを比較するとともに、各成分の構造についても詳細な検討を加え、その差異を明らかにしていきたい。

## 引用文献

- 1) 浜崎智仁: 臨床栄養, **83**, 612 - 618 (1993)
- 2) 横田明重: 臨床栄養, **83**, 619 - 624 (1993)
- 3) 永井克孝: 細胞, **14**, 119 - 125 (1982)
- 4) 安藤 進: 油化学, **37**, 923 - 933 (1988)
- 5) 岩森正男: 油化学, **40**, 361 - 369 (1991)
- 6) 小島直也: 油化学, **40**, 344 - 351 (1991)
- 7) Iwamori, M., Shimomura, J., Tsuyuhara, S. and Nagai, Y.: J. Biochem., **95**, 761-

- 770 (1984)
- 8) Iwamori, M. and Nagai, Y. : B.B.A. , **665**,  
214 - 220 (1981)
  - 9) Iwamori, M. and Nagai, Y. : J. Biochem. , **84**,  
1609 - 1615 (1978)
  - 10) Yu, R.K. , Ando, S. , : Adv. Exp. Med. Biol. ,  
**125**, 33 - 45 (1980)
  - 11) Tamai, Y. , Kojima, H. , Abe, K. and Saito,  
S. : Adv. Exp. Med. Biol. , **152**, 315-323  
(1982)
  - 12) DeGasperi, R. , Koerner, T.A.W. , Quarles,  
R.H. , Ilyas, A.A. , Ishikawa, Y. , Li, S.C. and  
Li, Y.T. : J. Biol. Chem. , **262**, 17149 -17155  
(1987)
  - 13) Ostrander, G. K. , Levery, S. B. Eaton H. L. ,  
Salyan, M.E.K. , Hakomori, S. and Holmes,  
E. H. : J. Biol. Chem. , **263**, 3103 - 3110 (1988)
  - 14) Svennerholm, L. : B. B. A. , **24**, 604 - 611  
(1957)
  - 15) Nakamura, k. , Ariga, T. , Yahagi, T. ,  
Miyatake, T. , Suzuki, A. and Yamakawa,  
T. : J. Biochem. , **94**, 1359 - 1365 (1983)
  - 16) 日本生化学会編：生化学データブック I ,  
1816 - 1817 (1984) 東京化学同人  
(東京)
  - 17) 鈴木明身, 鈴木實：複合糖質（蛋白質  
核酸 酵素増刊号), 2088 -2093 (1992)  
共立出版 (東京)