# ラット腎硫酸化糖脂質の分離と 構造解析

## 1994 年

# 有富(只野)桂子

目次	

序論	1
第一章 新しい硫酸化糖脂質の発見	11
1-1 モノ硫酸化糖脂質の発見	13
1-2 ビス硫酸化糖脂質の発見	15
第二章 抽出,分離および精製	16
2-1 総脂質の抽出と中性,酸性糖脂質のグループ分け	
2-2 個々の硫酸化糖脂質の分離精製	
2-2-1 SM2a の精製	20
2-2-2 SMiGb4 および SMiGb5 の精製	21
2-2-3 SB2 および SB1a の精製	23
第三章 構造解析	25
3-1 Solvolysis による脱硫酸	25
3-2 構成糖,脂肪酸およびスフィンゴイド塩基組成の分析	28
3-3 メチル化法の改良と応用	31
3-3-1 糖鎖配列および硫酸基結合位置の決定	31
3-3-2 完全メチル化糖脂質の直接導入 EI-MS	35
3-4 赤外吸収スペクトルによる分析	36
	27
3-5 <sup>1</sup> H-NMR による構造解析	

3-5-2 磁化移動法による構成単糖の同定40
3-5-3 NOESY による構成単糖相互の結合位置の決定44
3-6 質量分析法による構造解析47
3-6-1 負イオン LSIMS47
3-6-2 衝突解離(CID)スペクトル51
第四章 硫酸基の定量法の開発56
4-1 アセチル化-アズール A 法の操作手順56
4-2 測定法の検討および結果57
第五章 結論と考察60
実験の部
謝辞80
参考文献

.

`

硫酸化糖脂質の略号は Svennerholm のガングリオシドの略記法<sup>®</sup>を応用した<sup>7),8)</sup>.他の糖脂質の略号は IUPAC-IUB の生化学命名委員会に従って表記した<sup>2)</sup>.

Hex	hexose (ヘキソース)
HexNAc	N-acetylhexosamine (N-アセチルヘキソサミン)
Glc	glucose (グルコース)
Gal	galactose(ガラクトース)
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine( <i>N</i> -アセチルガラクトサミン)
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine( <i>N</i> -アセチルグルコサミン)
NeuAc	<i>N</i> -acetylneuraminic acid( <i>N</i> -アセチルノイラミン酸)
Lac	lactose (ラクトース)
Cer	ceramide (セラミド)
d18:1	4-sphingenine
t18:0	4-hydroxysphinganine
GalCer	galactosylceramide(ガラクトシルセラミド), Galβ1-Cer
LacCer	lactosylceramide (ラクトシルセラミド), Galβ1-4Glcβ1-Cer
Gg3Cer	gangliotriaosylceramide(ガングリオトリアオシルセラミド),
	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
Gg4Cer	gangliotetraosylceramide(ガングリオテトラオシルセラミド),
	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
iGb3Cer	isoglobotriaosylceramide(イソグロボトリアオシルセラミド),
	$Gal\alpha 1-3Gal\beta 1-4Glc\beta 1-Cer$

	iGb4Cer	isoglobotetraosylceramide(イソグロボテトラオシルセラミド),
		GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
	iGb5Cer	isoglobopentaosylceramide(イソグロボペンタオシルセラミド),
		Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
	Gb4Cer	globotetraosylceramide(グロボテトラオシルセラミド),
		GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
	Gb5Cer	globopentaosylceramide(グロボペンタオシルセラミド),
		Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
	SM4s	GalCer I <sup>3</sup> -sulfate(ガラクトシルセラミド硫酸)
	SM4g	HSO3- <i>O</i> -3Gal <i>p</i> β1-3- <i>sn</i> -AAG
		(sulfogalactosylalkylacylglycerol, セミノリピド)
	SM3	LacCer II <sup>3</sup> -sulfate(ラクトシルセラミド硫酸)
	SM2a	Gg3Cer II <sup>3</sup> -sulfate(ガングリオトリアオシルセラミド硫酸)
	SB2	Gg3Cer II <sup>3</sup> ,III <sup>3</sup> -bis-sulfate(ガングリオトリアオシルセラミドビス硫酸)
	SB1a	Gg4Cer II <sup>3</sup> ,IV <sup>3</sup> -bis-sulfate(ガングリオテトラオシルセラミドビス硫酸)
	SMiGb4	iGb4Cer IV <sup>3</sup> -sulfate(イソグロボテトラオシルセラミド硫酸)
	SMiGb <sup>5</sup>	iGb5Cer V <sup>3</sup> -sulfate(イソグロボペンタオシルセラミド硫酸)
	SMGb4	Gb4Cer IV <sup>3</sup> -sulfate(グロボテトラオシルセラミド硫酸)
	SMGb5	Gb5Cer V <sup>3</sup> -sulfate(グロボペンタオシルセラミド硫酸)
	GM4	II <sup>3</sup> NeuAc $\alpha$ -GalCer
	GM3	II <sup>3</sup> NeuAcα-LacCer
	GT3	II $^{3}$ NeuAc $\alpha$ 3-LacCer
'n	GM1a	II <sup>3</sup> NeuAcα-Gg4Cer
	GD1a	IV <sup>3</sup> NeuAcaII <sup>3</sup> NeuAca-Gg4Cer

•

DMSO	dimethyl sulfoxide(ジメチルスルホキシド)
TEA	triethanolamine (トリエタノールアミン)
3-NBA	3-nitrobenzyl alcohol (3-ニトロベンジルアルコール)
TMS	trimethylsilyl (トリメチルシリル)
TLC	thin layer chromatography (薄層クロマトグラフィー)
HPTLC	high-performance TLC(高性能薄層クロマトグラフィー)
IR	infrared spectroscopy(赤外分光分析)
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy(フーリエ変換赤外分光分析)
HPLC	high-performance liquid chromatography
	(高速液体クロマトグラフィー)
GLC	gas-liquid chromatography(ガスクロマトグラフィー)
GC/MS	gas chromatography/mass spectrometry
	(ガスクロマトグラフィー/質量分析)
EI-MS	electron ionization mass spectrometry(電子衝撃イオン化質量分析)
LSIMS	liquid secondary ion mass spectrometry(液体二次イオン質量分析)
CID	collision-induced dissociation(衝突解離)
NMR	nuclear magnetic resonance(核磁気共鳴)
COSY	chemical-shift-correlated spectroscopy(同種核化学シフト相関分光法)
NOE	nuclear Overhauser effect(核オーバーハウザー効果)
NOESY	NOE spectroscopy(核オーバーハウザー効果分光法)
DQF	double quantum-filtered(二量子フィルター)

**.** . .

**序論** 

糖脂質(glycolipids)はその名のとおり糖鎖部分と脂質部分から成り、その脂質部分の構造の違いから2つに分類される.脂質部分(脂溶性側鎖)にグリセロールを含むものをグリセロ糖脂質(glycoglycerolipids),スフィンゴイド(sphingoid)とよばれる長鎖塩基を含むものをスフィンゴ糖脂質(glycosphingolipids)とよんでいる.

前者は主に植物や微生物界に,後者は主に動物界に存在する.このように糖脂質は 親水性糖鎖と脂溶性側鎖のハイブリッド分子であり,いずれの構造も多様性に富ん でおり,細胞の種類のみではなく,同じ細胞の増殖・分化段階や細胞のおかれた環 境によっても変化することが知られている.

スフィンゴ糖脂質はスフィンゴイドの第一級アルコール性水酸基がグリコシド結合によって単糖またはオリゴ糖と結合し、さらに脂肪酸(fatty acid)がアミド結合した構造をもっている.スフィンゴイド塩基と脂肪酸からなる部分はセラミド(ceramide, Cer と略記)とよばれている(Fig. 1).



ラクトシルセラミド (LacCer)

Fig. 1. スフィンゴ糖脂質の構造

スフィンゴ糖脂質の構成成分のうち、スフィンゴイド塩基は哺乳動物では C18 の スフィンゴシン(4-sphingenine, d18:1 と略記)が最も広く存在するが、ヒト腎など には4番目の炭素に水酸基がもう1つ付いたフィトスフィンゴシン(4-hydroxysphinganine, t18:0 と略記)も存在することが知られている.脂肪酸は炭素数16~ 24(C16~C24)のものが多い.糖鎖を構成する単糖としてはGlc, Gal, GalNAc, GlcNAc およびシアル酸などがあり、シアル酸をもつ糖脂質はガングリオシドとよ ばれている.糖鎖の鎖長は糖タンパク質やプロテオグリカンと比べるとより短く、 10個以内の糖残基をもつものがほとんどである.糖鎖部分は糖タンパク質のそれと 同様に非常に多様な構造を生み出し、さまざまな生理機能や細胞認識に関与するこ とが明らかになってきた.

このように糖脂質は糖鎖部分も脂質部分も多様性に富んでいるが、分類および命 名は糖鎖を基に行われている<sup>1),2)</sup>.糖脂質の生合成は、糖タンパク質のように糖鎖が 一括して結合した後に修飾されるのではなく、それぞれの糖転移酵素の厳密な基質 特異性のもとに単糖が疎水性側鎖あるいは糖鎖の非還元末端に順次付加されて合成 される.スフィンゴ糖脂質はこの代謝経路そのものを反映して、グロボ(globo)、 イソグロボ(isoglobo)、ラクト(lacto)、ネオラクト(neolacto)、ガングリオ (ganglio)系列などに分類されている.Table 1 に代表的な基本糖鎖系列の構造と略 号を示す.

系列	略号	糖鎖構造
ganglio	Gg	$GalNAc\beta 1-4Gal\beta 1-3GalNAc\beta 1-4Gal\beta 1-4Glc$
globo	Glob	$Gal\beta 1\text{-}3GalNAc\beta 1\text{-}3Gal\alpha 1\text{-}4Gal\beta 1\text{-}4Glc$
isoglobo	iGlob	GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
lacto	Lc	$(Gal\beta 1-3GlcNAc\beta 1)n-3Gal\beta 1-4Glc$
neolacto	nLc	$(Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1)n-3Gal\beta 1-4Glc$

Table 1. 糖脂質の糖鎖系列

糖鎖はこれら各系列を示す接頭語に、単糖の個数を意味する接尾語、-triaose、 -tetraose および -pentaose などを付し、たとえばガングリオ系列の3糖からなる糖鎖 は gangliotriaose、イソグロボ系列の4糖からなる糖鎖は isoglobotetraose のように名 付けられる.単糖の個数を示す接尾語は下線で示すように -ose の前に a を入れて、 単糖その物の名称、たとえば -tetrose (四単糖) などと区別する.また、それぞれの 糖鎖がセラミド (ceramide) に結合した糖脂質では、糖鎖名の語尾を yl に変化させ て、gangliotriaos ylceramide、 isoglobotetraosylceramide などとよばれる.略号の場合は

糖を意味する Ose に単糖の個数を示す数字を右下に付けて -Ose3, -Ose4 のように示 し, ceramide は Cer と略記するので, スフィンゴ糖脂質は一般に -OsenCer (例, gangliotriaosylceramide = GgOse3Cer) と略記される. 略号をより簡略にするために Ose を除いた書き方をすることも多く, 本研究でもその表記を用い, たとえば gangliotriaosylceramide は Gg3Cer, isoglobotetraosylceramide は iGb4Cer と略記した (Table 2).

構造	名称	略号
Galβ1-Cer	galactosylceramide	GalCer
Galβ1-4Glcβ1-Cer	lactosylceramide	LacCer
GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer	gangliotriaosylceramide	Gg3Cer
Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer	gangliotetraosylceramide	Gg4Cer
$Gal\alpha 1-3Gal\beta 1-4Glc\beta 1-Cer$	isoglobotriaosylceramide	iGb3Cer
GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer	isoglobotetraosylceramide	iGb4Ce
$Gal\beta 1\text{-}3GalNAc\beta 1\text{-}3Gal\alpha 1\text{-}3Gal\beta 1\text{-}4Glc\beta 1\text{-}Cer$	isoglobopentaosylceramide	iGb5Ce
GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-Cer	globotetraosylceramide	Gb4Cer

Table 2. 本研究に関係する1~5糖の糖鎖をもつスフィンゴ糖脂質と略号

硫酸化糖脂質は糖脂質の糖鎖部分の硫酸エステル化物の総称であり、シアル酸を もつ糖脂質(ガングリオシド)とともに酸性糖脂質に属している. 1962 年に山川ら により初めての硫酸化スフィンゴ糖脂質であるガラクトシルセラミド硫酸(GalCer I<sup>3</sup>-sulfate, SM4s, ガラクトシルスルファチド)の最終構造が決定され<sup>3)</sup>, 1966 年に Martensson によりラクトシルセラミド硫酸(LacCer II<sup>3</sup>-sulfate, SM3, ラクトシルス ルファチド)が報告された<sup>4)</sup>. また, 硫酸化グリセロ糖脂質としては 1972 年に石塚 らによりセミノリピド(GalAAG I<sup>3</sup>-sulfate, SM4g)が同定された(Fig. 2)<sup>3)</sup>. 以来, 哺乳類の硫酸化糖脂質はこの3種のみと考えられ, スルファチドは狭義的には SM4s を指す語であった. 硫酸化糖脂質の命名法は LacCer II<sup>3</sup>-sulfate のように, 硫酸 基の結合位置はセラミド側から数えて何番目の単糖かをローマ数字で示し, 単糖の 何番目の炭素に位置するかはアラビア数字でローマ数字の右肩に表記する(Fig. 2).

ガラクトシルセラミド硫酸 (HSO3-3Galβ1-Cer, GalCer I<sup>3</sup>-sulfate, SM4s)



ラクトシルセラミド硫酸 (HSO3-3Galβ1-4Glcβ1-Cer, LacCer II<sup>3</sup>-sulfate, SM3)



セミノリピド (Galβ1-3alkylacylgrycerol I<sup>3</sup>-sulfate, GalAAG I<sup>3</sup>-sulfate, SM4g)



Fig. 2. 代表的な硫酸化糖脂質の構造

本研究では硫酸化糖脂質の略号をより簡略化するためにガングリオ系列に属する ものは Svennerholm のガングリオシドの略記法<sup>6</sup>を応用し, ganglioside を表す G を sufoglycolipid を表す S に変えて表記した<sup>7),8)</sup>. Svennerholm の略記法は ganglioside を 表す G に続いてシアル酸の数を M (1つ), D (2つ), T (3つ) などで示し, 基 本糖鎖についてはガングリオ系列の 4 糖からなる糖鎖 (Gg4Cer) を 1, 3 糖からな る糖鎖 (Gg3Cer) を 2, LacCer を 3, GalCer を 4 で表す. また Cer から数えて 2 番 目の Gal に結合するシアル酸が 1 つの場合は a, 2 つの場合は b を右下に表記する. たとえば, GM4, GM3, GM2, GM1a および GD1a は次の構造を有するガングリオ シドの略号である.

#### NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-Cer, II<sup>3</sup>NeuAc $\alpha$ -GalCer, GM4

#### NeuAcα2-3Galβ1-4Glcβ1-Cer, II<sup>3</sup>NeuAcα-LacCer, GM3

### 2aNeuAc

GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer, II<sup>3</sup>NeuAc $\alpha$ -Gg<sup>3</sup>Cer, GM2

### $2\alpha$ NeuAc

Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer, II<sup>3</sup>NeuAc $\alpha$ -Gg<sup>4</sup>Cer, GM1a

2αNeuAc 2α NeuAc

 $Gal\beta 1-3GalNAc\beta 1-4Gal\beta 1-4Glc\beta 1-Cer, IV^{3}NeuAc\alpha II^{3}NeuAc\alpha-Gg 4Cer, GD1a$ 

従って, SM4s および SM3 はそれぞれ, GM4 および GM3 のシアル酸を硫酸基で 置き換えた構造を有する硫酸化糖脂質を示すことになる(Fig. 2). なお, SM4s と SM4g の s と g はそれぞれ sphingolipid および glyceroipid を示す<sup>7,8)</sup>.

硫酸化糖脂質は強い陰性荷電をもつ硫酸基を分子内にもつ特異な性質のため,生 体内での機能解明のターゲットになってきた.近年,生理機能の明らかないくつか のタンパク質とスルファチドとの結合が報告され<sup>9</sup>, それらタンパク質の機能発現の モデュレーターとしてのスルファチドの役割が注目されてきた. 細胞接着タンパク 質であるラミニン<sup>10</sup>, トロンボスポンジン<sup>11</sup>, von Willebrand 因子(血液凝固 VIII 因 子の高分子量部 VIIIR)<sup>12</sup>との結合は比較的早くから研究されていたが, さらに補体 第3成分活性化作用をもつプロペルジン<sup>13</sup>, ヒルのもつ血液凝固阻害タンパク質で あるアンチスタシン<sup>14</sup>などもスルファチドと結合することが示され, 最近ではリン パ球ホーミングリセプターであるセレクチンとの結合<sup>15,16</sup>も報告されている.

硫酸化糖脂質は脳に次いで腎に高濃度に存在することから,尿細管における輸送 機能との関連が議論されてきた<sup>17)</sup>.またバクテリアなどを含む多くの生物種でも硫 酸化糖脂質の輸送機能との相関が示唆されている<sup>18)</sup>.哺乳類腎の硫酸化糖脂質は, ヒト腎に SM4s と SM3 が約 3:1 の比で存在する例<sup>4)</sup>をのぞけば SM4s のみであり,ガ ングリオシドのような構造の多様性はないものと考えられてきた.

腎における機能を解明するためには存在する硫酸化糖脂質の構造および組成を正 しく知る必要がある.本研究ではラット腎を研究材料に選び,その糖脂質組成を詳 細に検討した結果,SM3より長い糖鎖構造をもつ新しい硫酸化糖脂質5種類を見出 した<sup>19)25)</sup>.これらを分離精製し,構造解析を行った結果,ラット腎にはSM4sと SM3に加えて,より長い糖鎖構造をもつモノ硫酸化糖脂質3種,さらに,分子内に 2つの硫酸エステルをもつビス硫酸化糖脂質2種が存在することが明らかになった. それらの構造の模式図および略号をFig.3に示し,最終的な構造決定に至るまでの ステップをFig.4に示した.以下,ステップ項に従って第一章ではこれらの硫酸化 糖脂質発見,第二章では抽出および分離精製法,第三章では構造解析法について述 べる.

硫酸化糖脂質の種類の増加とともに、どの硫酸化糖脂質にも応用できる簡便な硫酸基の定量法が必要となった.そこで本研究ではアズールAを用いた SM4s の定量法(Kean の方法<sup>26)</sup>)を改良し、他の硫酸化糖脂質にも応用できる簡便な定量法を開発した<sup>8</sup>.アセチル化アズールA法については第四章で述べる.

SB2\*



SB1a\*

-4 -Cer

Fig. 3. 新しい硫酸化糖脂質の略号と構造模式図

 $\bigcirc$ ; Galβ,  $\bigcirc$ ; Galα,  $\diamondsuit$ ; GalNAcβ,  $\square$ ; Glcβ, ▲; 硫酸基.

\* 略号の付け方は Svennerholm のガングリオシドの略記法<sup>の</sup>に従った(本文7ページ 参照)

\*\*イソグロボ系列に属する硫酸化糖脂質は sufoglycolipid を表す S, モノスルホを表す M の後にイソグロボ系列糖鎖の略号を付して表記した.



Fig. 4. 新しい硫酸化糖脂質の構造解析ステップ

### 第一章 新しい硫酸化糖脂質の発見

未知の硫酸化糖脂質を発見する発端となったのは、腎上皮由来培養細胞株を用いた<sup>35</sup>S-硫酸の糖脂質画分への取込み実験であった.使用した4種類の樹立細胞株、 MDCK(イヌ腎)、MDBK(ウシ腎)、JTC-12(サル腎)およびLLC-PK1(ブタ腎) のうち、MDCK、JTC-12 およびLLC-PK1はそれぞれ、バソプレッシン、副甲状腺 ホルモン、カルシトニンに対する反応性を示す(Fig.1-1)ことから<sup>27)</sup>、腎尿細管の 機能を保持しており、硫酸化糖脂質の合成能力も保持していることが期待された.



Fig. 1-1. 腎由来樹立細胞株の cAMP レベルに対するホルモン添加の効果 各細胞は 10 mM theophylline 存在下で 10 分培養した後, 各ホルモンを添加し, 5 分後の cAMP 値を Gilman の方法<sup>28)</sup>により測定した. PTH (parathyroid hormone), 1 u/ml; CT (calcitonin), 50 mu/ml; VP (vasopressin), 5 mu/ml. そこで、培養液中に<sup>35</sup>S-硫酸を加えて培養すると、これら3種類の培養腎細胞は SM4s および SM3 を生合成していること<sup>27),29</sup>、さらに JTC-12 および LLC-PK1 細胞 はより長い糖鎖をもつことが予想される未知の新しい硫酸化糖脂質をも生合成して いることが明らかになった(Fig. 1-2). しかし、大量培養によっても、培養細胞か らこれら未知物質を精製し、全構造を決定するのは困難であった. そこで、ラット に <sup>35</sup>S-硫酸を投与することにより、腎の糖脂質画分への取り込みを詳細に検討した. その結果、TLC-オートラジオグラフィーで培養細胞に見出された物質と同様の Rf 値を示す物質に加えて、より下に移動する未知の複数の物質へ放射活性が取り込ま れることを見出した.



Fig.1-2. 腎由来細胞株の各硫酸化糖脂質画分への H2<sup>35</sup>SO4 の取り込み Chol-sulfate: コレステロール硫酸.

### 1-1 モノ硫酸化糖脂質の発見

Fig. 1-3 はラットに H2<sup>35</sup>SO4 (1 mCi)を投与し、16 時間後の腎の酸性糖脂質画分 への放射活性の取り込みを、陰イオン交換カラム (DEAE-Sephadex A-25)からの酢 酸アンモニウムの濃度勾配を用いた溶出パターンでしらべた結果である. 放射活性 を示す曲線からわかるように、大部分の放射活性は主要成分である SM4s に取り込 まれるが、その直前に小さなピークが認められ、そのピークは TLC では A で示し た物質の溶出ピークに一致した. この物質はオルシノール染色陽性であることから ヘキソースを持つこと、すなわち硫酸化糖脂質であること、また、レゾルシノール およびモリブデン酸染色で陰性であることから、シアル酸およびリン酸基をもたな いことがわっかた. また TLC では SM3 より下に移動することから 2 糖以上の糖鎖 をもつこと、陰イオン交換カラムから SM4s 付近に溶出されることから SM4s と同 程度の酸性度をもつこと、すなわち硫酸基は1つであることが予想された. 後にこ の物質は SM2a であることがわかった<sup>19,20</sup>.



Fig.1-3. ラット腎 <sup>35</sup>S-標識酸性糖脂質の DEAE-Sephadex A-25 column による分画 各フラクションの一部は放射活性および HPTLC で検出した. HPTLC プレートは chloroform/methanol/acetone/酢酸/水 (8:2:4:2:1) で展開し、オルシノール試薬およびレゾルシ ノール試薬で発色した. A; SM2a, S-GalCer; SM4s, S-LacCer; SM3.

SM2a の精製過程で,この画分にはより微量の未知成分が2種類存在することに 気付いた(p. 19, Fig. 2-2 参照). これらは TLC 上で SM2a と同様の染色性を示す こと,また,SM2a より下に移動することから、3 糖以上の糖鎖と硫酸基を1つもつ 硫酸化糖脂質ではないかと予想された. これらは SM2a に比べてはるかに微量成分 であるため、約 2000 匹のラット腎(3.9 kg)を集めて,抽出を開始した. 構造解析 の結果,これらは SMiGb4<sup>24)</sup> および SMiGb5<sup>25)</sup> であることがわかった.

### 1-2 ビス硫酸化糖脂質の発見

Fig.1-3の陰イオン交換カラム(DEAE-Sephadex A-25)をさらに高濃度の酢酸アン モニウムで溶出を続けると、2つの未知物質が約3Mの酢酸アンモニウムで溶出さ れた(p.19, Fig. 2-2 参照). これらはともにオルシノール染色陽性であることから ヘキソースを持つこと,また,溶出位置がシアル酸を2つ持つ糖脂質(ジシアロガ ングリオシド)よりはるかに後であることから、かなり強い酸性基を持つこと、す なわち、もし硫酸基であれば、2つ以上もつことが予想された。 ガングリオシドに ついては分子内に2つ以上のシアル酸をもつポリシアロガングリオシドが多数報告 されているが、硫酸化糖脂質、特に哺乳動物の硫酸化糖脂質はモノ硫酸化糖脂質の みと考えられ、ビス硫酸化糖脂質の存在はそれまで予想もされていなかった.これ らは DEAE-Sephadex A-25 カラムからの溶出位置から判断すると、トリシアロガン グリオシドであることが予想されたが、TLC上では最も糖鎖の短いトリシアロガン グリオシド(II<sup>3</sup>NeuAca3-LacCer, GT3)より移動度がはるかに大きく、また、レゾ ルシノールおよびモリブデン酸染色陰性であることから、ガングリオシドである可 能性は完全に否定され、硫酸化糖脂質であることが強く示唆された、構造解析の結 果,これらは分子内に硫酸基を2 つもつビス硫酸化糖脂質,SB2<sup>21),22)</sup>および SB1a<sup>23)</sup> であった.

### 第二章 抽出,分離および精製

糖脂質は糖鎖部分は親水性(水溶性)であり、脂質部分は疎水性(脂溶性)であ るため、生体内ではアルキル鎖を介する疎水性相互作用と、-OH、-NH-CO-、 -COOHなどの極性基による水素結合によって、生体膜中の他の成分と強い相互作用 をもっていると想像されている. それらの相互作用を切って効率よく抽出するため には、親油性溶媒だけでなく、水となじむような溶媒も同時に存在させる必要があ る. 今回は糖脂質を含む総脂質の抽出に最も広く用いられている chloroform/ methanol/水の混合溶媒系を用いた.この第一段階の抽出操作で得られた総脂質の大 部分を占めるのは単純脂質やリン脂質である。第二段階では、これらを除くため、 スフィンゴ糖脂質は弱アルカリ性に抵抗性であるのに対して、グリセロリン脂質が 容易に分解される性質に基づいて,弱アルカリ分解を行い,粗糖脂質画分を得た. 第三段階では陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、粗糖脂質画分を中性 および酸性糖脂質に分画し、酸性糖脂質画分はさらに酸性度の違いによる分離を行っ た. 第四段階では高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた吸着クロマトグ ラフィーにより個々の糖脂質にまで単離した.以下, Fig. 2-1 に示した分離,精製の 手順に従って、2-1では抽出から陰イオン交換カラムクロマトグラフィーまで、2-2 では個々の硫酸化糖脂質の単離について述べる。





### 2-1 総脂質の抽出と中性,酸性糖脂質のグループ分け

ラット腎 600 ~ 700gから Folch-鈴木法<sup>30)</sup>により chloroform/methanol/水の混合溶媒 系を用いて総脂質を抽出し、Folch 分配法<sup>30)</sup>により二相分配を行った。その下層につ いてメタノール性弱アルカリ処理し、上層と合わせて粗糖脂質画分とした、このよ うに大量に調製した粗糖脂質画分から微量成分を取り出す第一歩として、粗糖脂質 画分は DEAE-Sephadex A-25 (acetate form) カラムにかけ、中性脂質を chloroform/ methanol/水 (5:10:1) で溶出して除いた. 酸性糖脂質は chloroform/methanol/水 (5:10:1) 中の酢酸アンモニウムの concave 型濃度勾配(0.04~3.5 M) により酸性 度に従って順次溶出した(Fig. 2-2)<sup>19)-23)</sup>. あるいは、 相糖脂質分画は DEAE-Toyopearl 650M (acetate form) カラムを用いた FPLC により chloroform/methanol/水 (5:10:1) で中性脂質を溶出した後, chloroform/methanol/水 (5:10:1) 中の酢酸アン モニウムの2段階の直線濃度勾配(0~0.5Mおよび0.5~2.0M)により酸性糖脂 質を溶出した<sup>24),25)</sup>. フラクションの一部を取って TLC を行い, 溶出パターンを分析 した. Fig. 2-2 に示すように, SM2a は SM4s の直前に(フラクション 60~88), SMiGb4 および SMiGb5 は SM4s とほぼ同時に(フラクション 88 ~ 92)、 SB2 およ び SB1a は SM4s よりかなり遅れてジシアロガングリオシドより更に後に(フラク ション 204 ~ 260) 溶出された. SM2a を含む画分, SMiGb4 および SMiGb5を含む 画分, SB2 および SB1aを含む画分をそれぞれ集めた. 上記の操作を繰り返し, 合計 3.9 kg のラット腎より得た各画分を合わせて脱塩し、次の精製ステップに進んだ.



フラクション120 までは各フラクションの約 1/2000, 121 からは約 1/200 をスポットし, chloroform/methanol/0.2% CaCl2(60:40:9)で展開後, オルシノール試薬で発色した. Fig. 2-3. DEAE-Sephadex A-25 カラムによるラット腎酸性糖脂質の分離 BA;ラット脳酸性糖脂質. Chol-S;コレステロール硫酸.

19

### 2-2 個々の硫酸化糖脂質の分離精製

2-1 で得られた各粗硫酸化糖脂質画分はシリカゲルカラムクロマトグラフィーに より、主として糖鎖の長さによって、ガングリオシドや他の脂質および不純物と分 離した.糖脂質は多くの水酸基をもつためにシリカゲルに強く吸着されるので、溶 出溶媒に水を加えて吸着力を弱め、テーリングを防止した.また分解能を高めるた め、球状で均一な粒径の充填剤(Iatrobeads 6RS-8060、粒径 60 μm)を用い、精製の 最終段階はより粒子の細かい Iatrobeads 6RS-8010(粒径 10 μm)あるいは 6RS-8005 (粒径 5 μm)を用いた高速液体クラマトグラフィー(HPLC)により chloroform/ methanol/水あるいは chloroform/methanol/3 ~ 4 M NH4OH の直線濃度勾配で分離し、 純度の高い硫酸化糖脂質を得ることができた.糖脂質の純度とおおよその糖鎖の長 さは薄層クロマトグラフィー(TLC)によって既知の糖脂質とRf 値を比較すること により予想することができた.同じ糖鎖構造をもちながらセラミドを構成する脂肪 酸あるいは、スフィンゴイド塩基が異なる場合はTLC上で複数のバンドを与えた.

2-2-1 SM2a の精製

Fig. 2-2 に示すように DEAE-Sephadex カラムより, SM2a はガングリオシド GM4 にひき続いてガングリオシド GM3 と同時に溶出された. この 2 つのガングリ オシドのうち GM4 は中性の展開溶媒 (chloroform/methanol/0.2% CaCl2 など) による TLC では Rf 値が SM2a とほとんど等しく, また, *N*-acetyl 型のシアル酸 (NeuAc) をもつ GM3 (NeuAc) も Rf 値が近く, 分離するのは困難であることが予想された. この 2 つのガングリオシドは, DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーにおいて 酢酸アンモニウムの 濃度勾配をより緩やかにすることによって、かなりの部分を除 くことができたが、特に GM4 を完全に分離するのは困難であった.そこで、少量 の GM4 の混在が予想されるフラクションを集め、あらかじめ neuraminidase 処理に よってシアル酸を切断することにより、GM4 を GalCer に変換させてから Iatrobeads 6RS-8060 カラムにかけ、chloroform 中 methanol と水の直線濃度勾配を用いて分離溶 出した. SM2a を含むフラクションを集めてさらに Iatrobeads 6RS-8010 カラムにか け、chloroform/methanol/水の直線濃度勾配による HPLC を行い、Fig. 2-4 に示すよ うに完全に精製することができた<sup>19,20</sup>.

#### 2-2-2 SMiGb4 および SMiGb5 の精製

この画分には主要酸性糖脂質成分である SM4s のみでなく、メタノール性弱アル カリ処理で分解されないリン脂質などが大量に混在していた. SMiGb4 および SMiGb5 は Fig. 2-2 からもわかるように微量成分であるため(SM4s の 約 0.1 %、SM2a の 約 1 %)、まず、Iatrobeads 6RS-8060 カラムを用いて chloroform/ methanol (9:1) から chloroform/methanol/水(50:50:5)の直線濃度勾配により部分精 製を行って SM4s や SM3、および大量に存在する他の不純物を除いた. 続いて Iatrobeads 6RS-8010 カラムを用いた HPLCにより、chloroform/methanol/3 M NH4OH の直線濃度勾配(82:15:1 から 60:40:5)により溶出し、さらにchloroform/methanol/水 の直線濃度勾配(80:15:0.5 から 70:30:3)による再クロマトにより、Fig. 2-3 に示す ように SMiGb4 および SMiGb5 を相互に分離するとともに、完全に精製することが できた<sup>23),24)</sup>.



Fig. 2-3. SMiGb4, SMiGb5 および solvolysis による生成物の TLC

HPTLC プレートは chloroform/methanol/0.2% CaCl2 (60:40:9)で展開し、オルシノール試薬で 発色した. A: 1. ラット脳酸性糖脂質, 2. SMiGb4, 3. SMiGb4 の solvolysis による生成物 (iGb4Cer), 4. SMiGb4 の solvolysis による生成物 (iGb3Cer), 5. iGb4Cer, 6. Gb4Cer, 7. 中性 糖脂質 (上から LacCer, Gb 3Cer, Gb4Cer). Solvolysis については (p. 25, 3-1 参照). B: 1. 中性 糖脂質 (上から LacCer, Gb 3Cer, Gb4Cer), 2. SMiGb5, 3. SMiGb5 の solvolysis (2 時間), 4. 中 性糖脂質 (上から LacCer, Gg 3Cer, Gg 4Cer).

#### 2-2-3 SB2 および SB1a の精製

DEAE-Sephadex カラムより分画したこの画分には他の糖脂質がほとんど含まれて いないため、精製は比較的容易であった.DEAE-Sephadex カラムクロマトグラ フィーにおける酢酸アンモニウムの濃度勾配をより緩やかにすることによって、こ の段階で SB2 および SB1a の大部分を相互に分離することができた.続いて Iatrobeads 6RS-8010 カラムを用いた HPLC に注入し、chloroform/methanol/3.5 M の直 線濃度勾配により溶出し、Fig. 2-4 に示すように完全に精製することができた<sup>21)23)</sup>.







### Fig. 2-4. 精製した硫酸化糖脂質の TLC

HPTLC プレートは次の溶媒で展開し、オルシノール試薬で発色した. A: chloroform/ methanol/0.2% CaCl2 (60:40:9), B: chloroform/methanol/3.5 M NH4OH (60:40:9), C: chloroform/ methanol/acetone/酢酸/水 (8:2:4:2:1). 1. ラット脳酸性糖脂質, 2. コレステロール硫酸, 3. SM4g, 4. SM4s, 5. SM3, 6. SM2a, 7. SB2, 8. SB1a, 9. 中性糖脂質 (上から GalCer (+ GlcCer), LacCer, Gb3Cer, Gb4Cer).

### 第三章 構造解析

第二章で述べた分離,精製の操作を重ねて,5種類の物質はTLC上単一物質となっ たが(Fig. 2-3 および 2-4 参照),これらは手元にある標準試料とも,また文献に記 載された物質とも合致しない未知の物質であった.そこで,すでに確立している化 学分析の手法を微量成分に応用するために改良を加え,また新しく開発された化学 分析や機器分析の手法を駆使することにより,以下に示すように構造解析を進めた. また,分離した物質その物だけではなく,その物質の限定分解により生じた物質も 同時に解析することにより,未知物質の構造をより確実に決定した.

### 3-1 Solvolysis による脱硫酸

非還元末端に硫酸基をもち、1~2糖からなる糖鎖構造をもつ硫酸化糖脂質 (SM4s, SM3, SM4g)はジオキサンと100℃,10分間加熱するだけで、定量的に 硫酸基を切り離すことができる<sup>33)</sup>. 硫酸エステルが切れ始めると2価の無機硫酸が 生じるので、反応は加速度的に進行する.しかし、より糖鎖の長い硫酸化糖脂質は より強い条件、たとえば1時間加熱しても脱硫酸は起こらなかった<sup>19)</sup>. Stoffyn らに より<sup>33)</sup>0.05 Mメタノール性塩酸、室温4時間での SM4s からの効率的な脱硫酸が報 告されて以来、様々な硫酸化糖脂質に応用されているが、この条件ではメタノリシ スの効果により、脂肪酸や N-アセチルヘキソサミンの N-アセチルなどがわずかに 切断し、また、内側の糖に結合している硫酸基は非還元末端の硫酸基に比べて著し く切れにくかった.本研究では、井上、長沢らのコンドロイチン硫酸の脱硫酸法<sup>33)</sup> を応用し、5 mM 塩酸(あるいは硫酸)を含む DMSO/methanol (95:5) 中 80℃,30 分処理すると、糖鎖の切断と脱 N-アセチルを最小限に抑えることができ、非還元末 端の硫酸基を失った糖脂質を得ることができた. さらに長時間加熱すると、内側の 硫酸基も一部開裂したが、同時に非還元末端の糖鎖も一部失われた. SMiGbs の solvolysis を Fig. 2-3 (B) (p. 22) に示したが、80 ℃、2 時間処理すると約 50% が脱 硫酸化物 (iGbsCer) に変化し、約 20% は硫酸基と非還元末端の 2 糖が外れた物質 (iGb3Cer) に変化した (Fig. 3-2). 内側の糖に硫酸基をもつ糖脂質 (SM2a, SB2, SB1a) の場合は、糖鎖を切断することなく完全な脱硫酸化物を定量的に得る ことはできなかった. 各硫酸化糖脂質の solvolysis による生成物は陰イオン交換カ ラムクロマトグラフィーおよび吸着カラムクロマトグラフィーにより単→成分にま で精製し、以下の実験に用いた. Solvolysis による生成物の構造模式図を Fig. 3-1 に 示す.



Fig. 3-2. Solvolysis による主な生成物の模式図 〇; Gal $\beta$ , 〇; Gal $\alpha$ , ◇; GalNAc $\beta$ , □; Glc $\beta$ , ▲; 硫酸基. Solvolysis 前の intact な硫酸化糖脂質は □\_\_\_\_ で示した.

### 3-2 構成糖,脂肪酸およびスフィンゴイド塩基組成の分析18-24)

精製単離した糖脂質の構成単糖のモル比は、糖脂質をメタノリシスにより単糖の メチルグリコシドに分解し、次に TMS 化することにより、生じた TMS 化メチルグ リコシドを GLC および GC/MS で分析して求めた.メタノリシスの際、同時に遊離 する脂肪酸メチルエステルを hexane で抽出し、GLC および GC/MS で分析して脂肪 酸組成を決定した.スフィンゴイド塩基は糖脂質を酸加水分解後、chloroform 層に 抽出し、TMS 化して GLC および GC/MS で分析した.Table 3-1 に脂肪酸およびス フィンゴイド組成を、Table 3-2 に糖組成を示す.また、各硫酸化糖脂質の収量も同 時に Table 3-2 に示した.硫酸基の定量については第四章を参照.

		Fatty :	atty acid					Sphingoid base	
	16:0	18:0	20:0	22:0	23:0	24:0		t18:0	d18:1
	percentage of total								
SM2a	5.9	5.2	19.2	28.9	15.9	38.2		76.3	18.9
SMiGb4	10.0	4.2	5.7	5.1	12.5	57.9		69.2	30.8
SMiGb5	14 <b>.9</b>	7.7	12.7	22.1	12.9	22.5		89.2	10.8
SB2	4.5	2.8	8.6	20.2	16.2	42.0		81.7	9.9
SB1a	7.5	5.6	10.2	18.0	17.5	29.7		76.9	16.2

Table 3-1.5 種類の硫酸化糖脂質の脂肪酸およびスフィンゴイド塩基組成

	Glc	Gal	GalNAc	Sulfate	Yield/g	wet tissue
			mol/mol		nmol	μg*
SM2a						
	1.0	1.0	1.0	0.9	24	31
	1.0	0.9	0.9	ND	1	٧Ď
SMiGb4						·
▲-◇-◎-○-□-Cer	1.0	1.7	1.1	1.0	0.27	0.39
	1.0	1.8	0.9	ND	1	ND
©-⊖-⊡-Cer (iGb3Cer)	1.0	1.9	0	ND	1	ND
SMiGbs						
▲-○-◇-◎-○-□-Cer	1.0	2.7	0.9	1.0	0.11	0.18
⊖-\$-@-⊖-□-Cer (iGb5Cer)	1.0	2.8	0.9	ND	1	ND
◎-○-□-Cer (iGb3Cer)	1.0	1.8	0	ND	l	ND
SB2						
<b>◇-</b> ○-□-Cer	1.0	1.0	1.0	1.8	11	15
O-□-Cer (SM2a)	1.0	1.0	1.1	ND	]	ND
	1.0	1.0	0.9	ND	]	ND
○-□-Cer (LacCer)	1.0	1.0	0	ND	]	ND
SB1a						
<u>○-◇-○-□-Cer</u>	1.0	1.9	1.0	1.9	5.5	8.4
○-◇-○-□-Cer (SM1a)	1.0	1.9	1.1	ND	, -	ND
○-□-Cer (LacCer)	1.0	0.9	0	ND		ND

Table 3-2. 5 種類の硫酸化糖脂質の糖鎖部分の組成および収量

 $\bigcirc; Gal \, \beta, \bigcirc; Gal \, \alpha, \diamondsuit; Gal NAc \, \beta, \Box; Glc \, \beta, \blacktriangle; \tilde{M} \mathfrak{G} \hspace{-0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} \hspace{0.5mm} } \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} \hspace{0.5mm} } \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} \hspace{0.5mm} ; \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} } \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} } \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} } \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}} } \hspace{0.5mm} \check{\hspace{0.5mm} \hspace{0.5mm}}$ 

Solvolysis 前の intact な硫酸化糖脂質は \_\_\_\_\_ で囲んだ.

\*主な分子種の分子量より計算した.

Table 3-2 に示すように各物質の構成単糖は Glc, Gal, GalNAc の3種であり, SM2a, SB2 は3糖, SB1a, SMiGb4 は4糖, SMiGb5 は5 糖からなるオリゴ糖鎖を もつ糖脂質であることがわかった.脂肪酸は炭素数 24 の飽和脂肪酸 (C24:0) が主 成分で,不飽和およびヒドロキシ脂肪酸は検出できなかった.スフィンゴイド塩基 は4-hydroxysphinganine (t18:0) が70%以上を占めた (Table 3-1).以上の結果か ら,各糖脂質は糖鎖とセラミドをもっているスフィンゴ糖脂質であること,すなわ ち,SM2a,SB2 はトリグリコシルセラミド,SB1a,SMiGb4 はテトラグリコシルセ ラミド,SMiGb5 はペンタグリコシルセラミドであることが明らかとなった.各糖 脂質の腎 g 湿重量あたりの収量を Table 3-2 に示したが,主要成分である SM4s に対 する%で比較すると,SM2a は 13%,SB2 は6%,SB1a は 3%,SMiGb4 は 0.15 %,SMiGb5 は 0.06% であった.

Solvolysis による生成物は糖組成分析の結果,モノ硫酸化糖脂質の場合は硫酸基の みが外れた中性糖脂質,および非還元末端の1~3糖も外れた中性糖脂質,ビス硫 酸化糖脂質の場合は非還元末端の糖に結合した硫酸基のみ外れたモノ硫酸化糖脂質, および2つの硫酸基と非還元末端の1~2糖が同時に外れた中性糖脂質であった. 内側の糖に結合した硫酸基は solvolysis に抵抗性を示し,SM2a,SB2 および SB1a では,糖鎖が切断せずに硫酸基のみが完全に外れた中性糖脂質はわずかに生じたの みであった (Table 3-2, Fig. 3-2).
## 3-3 メチル化法の改良と応用

### 3-3-1 糖鎖配列および硫酸基結合位置の決定

硫酸化糖脂質を完全メチル化後、加水分解で単糖にまで切断すると、もとの糖鎖 の中でグリコシド結合に使われていたか、または硫酸基が結合していた炭素位の OH 基のみ遊離の形で残り、他の炭素位はメトキシ基(-OCH3)となっている. こ の部分メチル化糖を還元後、アセチル化するとOH 基はアセチル基(-OCOCH3)に 変わる. この部分メチル化アルジトールアセテート(Fig. 3-3)をGLCおよび電子 衝撃イオン化(electron ionization, EI)GC/MSにより同定すると、もとの糖鎖の中 でグリコシド結合に使われていたか、または硫酸基が結合していた炭素位を決定す ることができる. 還元のステップでNaBH4を用いると、たとえばヘキシトールの場 合、還元基側の炭素から数えてC1-C3およびC4-C6由来のフラグメントはともに m/z161であるが、NaB<sup>2</sup>H4を用いると還元基側のC1-C3由来のフラグメントのみ1 質量単位増えてm/z162となり(Fig. 3-3)、GC/MSでたとえば-3Galと-4Galを容 易に識別することができた. Solvolysisによる生成物も同様に分析することにより、 硫酸基の結合位置を確定するとともに、solvolysisにより外れた糖鎖の結合位置を知 ることができ、糖鎖の配列順序に関する情報も得ることができた.

-3Gal	<sup>2</sup> H	-4Gal	<sup>2</sup> H	
	H-C1-O-Ac		H-C1-O-Ac	
	H-C2-O-Me		H-C2-O-Me	
	H-C3-O-Ac		H-C <sub>3</sub> -O-Me 162 (161+1)	
	H-C4-O-Me 161		H-C4-O-Ac	
	H-C5-O-Ac		H-C5-O-Ac	
	H-C6-O-Me		H-C6-O-Me	
	Η̈́		H	

Fig. 3-3. 還元のステップで NaB<sup>2</sup>H4 を用いた場合の部分メチル化アルジトールアセ テートの構造.

-3Gal: 2,4,6-tri-*O*-methylgalactitol-1,3,5-tri-*O*-acetate. -4Gal: 2,3,6-tri-*O*-methylgalactitol-1,4,5-tri-*O*-acetate. Ac: COCH3. Me: CH3.

糖脂質のメチル化としてはメチルスルフィニルカルバニオンを塩基として用いる 箱守法<sup>34)</sup>が最近まで広く使われてきた. Ciucanu-Kerek が開発した方法<sup>35)</sup>は試薬,操 作がより簡便なため,糖脂質の分野でも普及してきている.本研究ではこの2つの 方法を特に微量試料(10~20 nmol)に応用できるように改良した<sup>24),25)</sup>.

SMiGb4 の分析例を Fig. 3-4 に示す. SMiGb4 からは -4Glc (Fig. 3-4 のピーク 2), -3Gal (ピーク 3), -3GalNAc (ピーク 5) が 1:2:1 のモル比で検出された. SMiGb4 の脱硫酸化物 (iGb4Cer) からは -3GalNAc のかわりに, GalNAc- (ピーク 4) が検出 されたことから,非還元末端の糖は GalNAc であり, 硫酸基はこの GalNAc の 3 位 に結合していること, すなわち HSO3-3GalNAc 構造をもつことがわかった. また, 硫酸基および非還元末端の 1 糖が外れた生成物 (iGb3Cer) では GalNAc- と 2 モルの -3Gal のうちの 1 モルが消失して代わりに Gal- (ピーク 1) が 1 モル検出されたこと から, GalNAc は Gal の 3 位に結合していること, すなわち, SMiGb4 の非還元末端 の糖鎖は -3GalNAc-3Gal であることがあきらかとなった. 各硫酸化糖脂質について 同様に分析した結果を Table 3-3 に示す.



Fig. 3-4. 部分メチル化アルジトールアセテートの GLC

化学結合型 Fused Silica キャピラリーカラム (0.2 mm × 25 m) を使用. 液相:メチルシリ コン (膜厚 0.25 mm) . 温度勾配: 160 ~ 240°C, 4°C/分. A; SMiGb4, B; SMiGb4の solvolysis 産物 (iGb 4Cer), C; SMiGb 4の solvolysis 産物 (iGb 3Cer). ピーク 1; Gal- (2,3,4,6tetra-O-methylgalactitol acetate), 2; -4Glc (2,3,6-tri-O-methylglucitol acetate), 3; -3Gal (2,4,6tri-O-methylgalactitol acetate), 4; GalNAc- (3,4,6-tri-O-methyl-2-N-methyl-acetamidogalactitol acetate), 5; -3GalNAc (4,6-di-O-methyl-2-N-methylacetamidogalactitol acetate).

	Gal-	-3Gal	-4Gal	-3,4Gal	GalNAc-	-3GalNAc	-4Glc
SM2a		mol/m	ol				
♦-⊖-⊡-Cer				1.1	1.0		1.0
			1.0		1.1		1.0
SMiGb4							
▲-◇-◎-○-□-Cer		2.0				0.8	1.0
		1.9			0.8		1.0
⊚-⊖-⊡-Cer	0.8	1.0					1.0
SMiGb5							
▲-○-◇-◎-○-□-Cer		2.7				0.9	1.0
⊖-\$-@-⊖- <u></u> -Cer	1.0	2.0				0.9	1.0
©-⊖-□-Cer	0.8	1.0					1.0
SB2							
			,				
♦-O-□-Cer				1.0		1.0	1.0
◇-〇-□-Cer				1.0	1.0		1.0
◇-〇-□-Cer			1.0		1.0		0.9
·							
⊖- <u></u> -Cer	1.0						1.0
SB1a							
		1.0					
		1.0		1.1		0.9	0.9
	1.0						
<u></u> ∪-√-∪-∐-Cer	1.0	1.1				1.1	1.0
()-[_]-Cer	1.0					·····	1.0

Table 3-3. 硫酸化糖脂質およびそれらの solvolysis による生成物のメチル化分析

○; Galβ, ②; Galα, ◇; GalNAcβ, □; Glcβ, ▲; 硫酸基

、

Solvolysis 前の intact な硫酸化糖脂質は \_\_\_\_\_ で囲んだ.

### 3-3-2 完全メチル化糖脂質の直接導入 EI-MS<sup>23),36)</sup>

完全メチル化硫酸化糖脂質を solvolysis により脱硫酸すると,誘導体化していな い硫酸化糖脂質の solvolysis の場合のような糖鎖の切断を引き起こすことなく,硫 酸基のみを切断して,対応する中性部分メチル化糖脂質を得ることができた.この 脱硫酸化メチル化糖脂質を C<sup>2</sup>H3Iを用いて再メチル化すると,硫酸基が結合してい た OH 基が C<sup>2</sup>H3O 基に変わる.この物質を直接導入 EI-MS (electron ionization mass spectrometry) により分析すると,硫酸基が結合していた糖鎖のフラグメントのみ3 質量単位増えるため,硫酸基が結合していた糖鎖を容易に特定することができた. SB1a のスペクトルを Fig. 3-5 に示す.



Fig. 3-5. SB1a の直接導入 EI-MS スペクトル

## 3-4 赤外吸収スペクトルによる分析

R 分析により、硫酸基の特徴的な吸収(1230~1240 cm<sup>-1</sup>, S=O 伸縮)をみるこ とができる.また、硫酸基のピラノース環に対する配向が equatorial 結合(810~ 815 cm<sup>-1</sup>, C-O-S 振動)か axial 結合(850 cm<sup>-1</sup>)かの区別をすることができる.分子 中の硫酸基のモル数は1240 および 820 cm<sup>-1</sup>の吸収の大きさをメチレンなど他の吸収 の大きさと比較することにより、1 個か2 個かの見当をつけることができる.本研 究では FT-IR を用いることにより、より少ない試料(10~20 nmol)で S/N 比のよ いスペクトルを得ることができた. Fig. 3-6 に SMiGb4 の例を示すが、分離した5 種 の糖脂質は全て equatorial 結合の硫酸エステルをもつことがわかり、従って、Gal ま たは GalNAc に硫酸基が結合している場合、4 位に結合している可能性は否定され







## 3-5<sup>1</sup>H-NMR による構造解析

超伝導磁石の導入およびコンピューター技術の発達により,NMR の感度,分解 能は飛躍的に向上し,糖脂質糖鎖についても数百マイクログラム程度の試料で構造 解析が可能となった.NMR 法は他の構造解析法に比較して非破壊分析という大き な利点をもっており,また,二次元 NMR などの新しい方法の発展により<sup>37)</sup>,従来 シグナルの重なりのために解析が困難であった糖脂質糖鎖についても NMR のみに よる完全一次構造の解析を可能にした<sup>38)</sup>.本研究では磁化移動法を利用した chemical shift-correlated spectroscopy (COSY)<sup>39),40)</sup>,多重リレー COSY<sup>41),43)</sup>,および nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)<sup>44)</sup>などの二次元 NMR 法により,構 成単糖の同定,硫酸基結合位置の同定,および構成単糖相互の結合位置の同定を行っ た.





Fig. 3-7. 糖脂質構成成分として見出される単糖とセラミドの構造式と番号付け

3-5-1 スピン結合定数によるアノマー解析

Fig. 3-7 に分離した5種類の糖脂質の構成成分である単糖とセラミド部分の構造式 および各プロトンの番号付けを示す.単糖の種類により Fig. 3-7 に示すような安定 な椅子型(\*Cl)の配座をとる. このような安定配座をとるとき,糖のリングプロト ンに観測されるスピン結合定数(J)の大きさは互いにトランスの位置にあるとき(  $\beta$ アノマー)は7~9 Hz,ゴーシュの位置にあるとき( $\alpha$ アノマー)は2~4 Hz と なる. このようにスピン結合定数の大きさは隣接するプロトン相互の配置を反映し ているため,糖鎖のプロトンは単糖の種類に応じて特徴的なスピン結合による分裂 パターンを示す.特にアノメリックプロトン(H-1)は他の糖鎖のプロトンとは分 離して低磁場側に観測されるため,H-2 との間に観測されるスピン結合定数  $h_2$ の 大きさを一次元スペクトル上で読みとることができる. このように  $h_2$ の大きさは 糖のアノメリック配置を反映し,Gal,GlcおよびGalNAcの場合, $\alpha$ アノマーでは 2~4 Hz, $\beta$ アノマーでは7~9 Hz となるため,分離した硫酸化糖脂質の構成単糖 全てのアノマー配向を一次元スペクトルから判定することができた.Fig. 3-8 に SMiGb4の一次元スペクトルを示す.アノメリック配置の決定は他の方法では比較 的困難であり,NMR 法の利点の1つである.



Fig. 3-8. SMiGb4 の一次元 <sup>1</sup>H-NMR スペクトル SMiGb4 (800 nmol) は DMSO- な/<sup>2</sup>H20 (98:2) 0.5 ml に溶かし, 60℃で測定した

#### 3-5-2 磁化移動法による構成単糖の同定

糖脂質糖鎖の NMR スペクトル解析の問題点は Fig. 3-8 で明らかなように、比較的 分離して観測されるアノメリックプロトンを除いて、多くの糖鎖のプロトンシグナ ルが重なり合うため帰属が困難な点である.しかし、個々の構成単糖についてみれ ばシグナルの分離はかなりよく、また、スピン結合定数(J)は個々の単糖に固有で あるため、構成単糖のサブスペクトル抽出ができれば、糖の種類を決定することが できる.そこで、スピン結合を通しての磁化移動を利用した二次元 NMR の代表的 な手法として COSY および多重リレー COSY の測定により、構成単糖のプロトンの 帰属を行った. Fig. 3-9 に SMiGbs の double quantum-filtered COSY (DQF-COSY) ス ペクトルを示す. COSY では H-1 の磁化は J,2 を通して H-2 に伝わり、この磁化移 動の過程は二次元スペクトル上で H-1 から展開した交差ピークとして観測される. アノメリックプロトン(H-1)は他の糖鎖のリングプロトンとは分離して観測され るので、H-1より順次磁化移動の過程を追うことにより、構成各単糖のH-1,H-2, H-3, および H-4 のシグナルを抽出することができた. これらのシグナルの化学 シフトおよびスピン分裂のパターンは単糖の種類に特徴的であるため、これらのパ ターンに応じて各構成単糖の帰属を行った.スフィンゴイド塩基の L1a, L1b, L2, L3 プロトン(Fig. 3-7) も糖鎖プロトン領域に重なるため解析が困難であるが、 L4 および L5 から磁化移動の過程を追うことにより帰属することができた (Fig. 3-9). SMiGb4 および solvolysis による生成物の各プロトンの化学シフトおよびスピ ン結合定数を Table 3-4 にまとめた.他の硫酸化糖脂質, SM2a, SB2, SB1a, SMiGbs およびそれらの solvolysis による生成物についても同様に各プロトンの帰属 を行った.



Fig. 3-9. SMiGbs の二次元 DQF-COSY スペクトル

SMiGbs (300 nmol) は DMSO- 𝒰/<sup>2</sup>H20 (98:2) 0.5 ml に溶かし, 60℃ で測定した. 各交差ピー クは単糖をローマ数字で, プロトンの帰属をアラビア数字で示した.

Table 3-4. SMiGb4 とその solvolysis による生成物, iGb4Cer および Gb4Cer の 化学シフトおよびスピン結合定数(J).

Compound	Proton ( J)	Chemical shift (J) for				
		IV GalNAcb1-3	III Gala1-3	II Galb1-4	I Glcb1-1	
		ppm (Hz)				
SMiGb4	H1 ( <sup>3</sup> <i>J</i> <sub>1,2</sub> ) H2 ( <sup>3</sup> <i>J</i> <sub>2,3</sub> ) H3 ( <sup>3</sup> <i>J</i> <sub>3,4</sub> ) H4	4.663 (8.2) 3.817 (9.2) 4.092 (2.9) 4.114	4.874 (3.2) 3.712 (10.2) 3.742 (2.9) 3.945	4.301 (7.3) 3.480 (8.8) 3.501 (3.8) 3.890	4.192 (7.8) 3.046 (8.2) 3.349 (6.9) -	
Solvolysis products	s of SMiGb4					
iGb4Cer	H1 ( <sup>3</sup> J <sub>1,2</sub> ) H2 ( <sup>3</sup> J <sub>2,3</sub> ) H3 ( <sup>3</sup> J <sub>3,4</sub> ) H4	4.596 (8.3) 3.680 (9.3) 3.507 (3.9) 3.664	4.900 (3.4) 3.774 (9.3) 3.741 (2.9) 3.961	4.311 (7.3) 3.473 (9.3) 3.518 (3.4) 3.902	4.190 (7.8) 3.044 (8.3) 3.346 (7.8) -	
iGb3Cer	H1 ( <sup>3</sup> J <sub>1,2</sub> ) H2 ( <sup>3</sup> J <sub>2,3</sub> ) H3 ( <sup>3</sup> J <sub>3,4</sub> ) H4	- - ***********************************	4.849 (3.7) 3.599 (10.0) 3.646 (3.2) 3.758	4.302 (7.3) 3.446 (8.8) 3.419 (3.2) 3.873	4.189 (7.8) 3.043 (8.2) 3.346 -	
iGb4Cer	H1 ( <sup>3</sup> <i>J</i> <sub>1,2</sub> ) H2 ( <sup>3</sup> <i>J</i> <sub>2,3</sub> ) H3 ( <sup>3</sup> <i>J</i> <sub>3,4</sub> ) H4	4.597 (8.2) 3.678 (10.2) 3.507 (3.8) 3.665	4.902 (3.3) 3.776 (9.2) 3.742 (2.7) 3.961	4.312 (7.3) 3.478 (9.5) 3.519 (3.2) 3.900	4.174 (7.8) 3.044 (8.7) 3.346 (8.7) -	
Gb4Cer	H1 ( <sup>3</sup> J <sub>1,2</sub> )	4.546 (8.2)	4.835 (3.2)	4.279 (7.3)	4.224 (7.8)	

各糖脂質はDMSO-d6/<sup>2</sup>H20 (98:2) 0.5 ml に溶かし, 60℃で測定した.

42

,

SMiGb4 および SMiGbs の糖鎖の構造解析における重要なポイントの1つは、それ らが globo 系列に属するか、あるいは isoglobo 系列に属するかを決定することであ り、それら2つの系列の糖鎖構造の違いは3ページの Table 1 に示すように Galα1-4Galβ 結合をもつ(globo 系列)か、Galα1-3Galβ 結合をもつ(isoglobo 系列)かの 差のみである. Dabrowski らにより報告されているグリコシレーションシフトの法 則によると、グリコシド結合の部位は、大きく低磁場シフトしている3つのリング プロトンのうちの、まん中のプロトンと決定することができる<sup>45)</sup>. たとえば SMiGb4 では、Galβ の H-1 ~ H-5 の化学シフトを LacCer の Galβ の H-1 ~ H-5 の化学シ フトと比較すると、それぞれ、0.088(H-1)、0.110(H-2)、0.185(H-3)、0.239 (H-4) および 0.03(H-5)ppm 低磁場シフトしていた. グリコシレーションシフト の法則をあてはめると、Gala は Galβ の H-3 に結合していること、すなわち Gala1-3Galβ 結合をもつ isoglobo 系列の硫酸化糖脂質であることが確認できた.

硫酸基が結合することによるリングプロトンの化学シフトの変化をしらべるため, 硫酸化糖脂質およびそれらの solvolysis による脱硫酸化物の COSY スペクトルを比 較した. 硫酸基はヒドロキシル (OH) 基と比べて電気陰性度が大きいため, 硫酸化 された3位の炭素 (C-3) に結合したプロトン (H-3) は脱遮蔽を受けて<sup>40,46),47)</sup>, Gal の場合 0.6 ~ 0.7 ppm, GalNAc の場合 0.4 ~ 0.6 ppm と大きく低磁場シフトしていた. また, C-3 の両隣のプロトンでは axial プロトンである H-2 よりも equatorial プロト ンである H-4 の方が Gal の場合約 0.3 ppm, GalNAc の場合約 0.4 ppm と脱硫酸化物 の H-4 と比べて大きく低磁場シフトしていた (Table 3-5). この結果から, ともに 硫酸基結合位置 (C-3) の隣のプロトンでありながら, H-2 あるいは H-4 と硫酸基と の空間的な位置関係は互いに異なることが示唆された. このように, 硫酸基の結合 位置のリングプロトンの化学シフトを脱硫酸化物のそれと比較することにより,

SM2a, SB1a および SMiGb5 の硫酸基の結合位置は Gal の 3 位, SMiGb4 では GalNAc の 3 位, SB2 では Gal および GalNAc の 3 位と決定できた.

	HSO3-3Gal		HSO3-3GalNAc		
	Gal H-3	Gal H-4	GalNAc H-3	GalNAc H-4	
SM2a-Gg3Cer	0.611	0.309			
SB2-Gg3Cer	0.561	0.260	0.387	0.471	
SB1a-Gg4Cer	0.607	0.286			
	0.666	0.327			
SMiGb4-iGb4Cer			0.585	0.45	

Table 3-5. 硫酸化による化学シフトの変化(脱硫酸化物と比べた低磁場シフトの値)

#### 3-5-3 NOESY による構成単糖相互の結合位置の決定

NOESY では、空間的に近接したプロトン同士の間で双極子相互作用を通じて磁 化移動が行われる.たとえば、ある糖の H-1 は同じ糖内のプロトン(Fig. 3-10 の H-3 および H-5)とだけではなく、その糖が結合する隣の糖の結合部位のプロトン

(Fig. 3-10 の H-1 と H-4') とも空間的に近接するため, NOESY スペクトル上でこ れらのプロトン同士に磁化移動ピークが観測される. あらかじめ COSY などにより 確定した各構成単糖のプロトンシグナルの帰属(3-5-2 参照)と組み合わせることに よりNOESY スペクトルの交差ピークの帰属を行い,結合位置と配列を同時に決定 することができた. SMiGbs の場合 (Fig. 3-11) を例にとると、 $\beta$ Gal(V)H-1 との交差 ピークは分子内の H-2 の他に $\beta$ GalNAc(IV)H-3 にも NOESY 交差ピークが観測され <sup>49</sup>, Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$  の結合が明らかとなった.次に、 $\beta$ GalNAc(IV)H-1 との交差ピー クは分子内の H-2 の他に $\alpha$ Gal(III)H-3 にも NOE が観測され、GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ の結 合が明らかとなった. 同様にして NOESY スペクトルを順次解析することにより、 SMiGbs は Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$  の糖鎖構造をもつことが明ら かとなった. さらに COSY スペクトルで観測された Gal(V) の H-3 プロトンの低磁 場シフトの結果と合わせて、SMiGbs の構造は HSO3-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer と確定できた.



Fig. 3-10. 近接したプロトン同士の間で双極子相互作用を通じた磁化移動



Fig. 3-11. SMiGbsのNOESY スペクトル

SMiGbs (300 nmol) は DMSO-*d*6<sup>P</sup>H20 (98:2) 0.5 ml に溶かし, 混合時間を 500 ms に設定し, 30℃ で測定した. 各交差ピークは単糖をローマ数字で, プロトンの帰属をアラビア数字で 示した.

## 3-6 質量分析法による構造解析

質量分析は、何らかの方法で試料分子をイオン化して、生成したイオンを磁場な どで分離後検出する分析法で、従来、電子衝撃イオン化(EI)と化学イオン化 (chemical ionization, CI)がよく用いられてきた.これらのイオン化法では試料の 気化が不可欠なので、試料を誘導体に変え、さらに加熱するという前処理を必要と した.近年の質量分析法の進歩はめざましく、試料を気化せずにきわめてソフトに イオン化する FAB/MS (fast atom bombardment mass spectrometry)あるいは LSIMS (liquid secondary ion mass spectrometry)イオン化法の発見および大型質量分析計の 出現は、分子量の大きい不揮発性物質である糖脂質の構造解析を可能にした<sup>49,55)</sup>. FAB/MS あるいは LSIMS の最大の特徴は誘導体化せずにそのままの形で分子量の決 定が可能である点である.正イオンのマススペクトルでは通常 [M+H]<sup>+</sup>が、負イオ ンのマススペクトルでは通常 [M-H]<sup>-</sup>が観測されるため、容易に分子量が決定できる. 本研究では負イオン LSIMS スペクトルを測定するとともに、分子関連イオンをプリ カーサーイオン(親イオン)とした衝突解離(CID)スペクトルの解析により糖鎖 を構成する各単糖の区別とその配列、および硫酸基の結合位置を決定した<sup>50</sup>.

### 3-6-1 負イオン LSIMS

FAB/MS あるいは LSIMS では、試料分子は圧倒的に大量のマトリックス分子に囲まれている.ここに~keV 程度のエネルギーをもつ一次粒子を照射すると、試料分子とマトリックスの間でプロトンの授受が起こり、試料分子の [M-H] や [M+H]<sup>+</sup> が 生じる.通常、与えられたエネルギーの一部が内部エネルギーに転化し、その過剰 の部分が分子関連イオンの結合の開裂(フラグメンテーション)を引き起こす<sup>57</sup>. 本研究では高質量域の感度を上げるために、より高いエネルギー(10 ~ 30 keV)を 与えることができる Cs<sup>+</sup> を一次粒子とする LSIMS を行った.



Fig. 3-12. モノおよびビス硫酸化糖脂質の負イオン LSIMS スペクトル (A) SM2a, マトリックス: triethanolamine. (B) SB2, マトリックス: 3-nitrobenzyl alcohol.

糖脂質は通常セラミド構造の異なる複数の分子種から構成されているため、マス スペクトルはセラミド分子種の多様性を反映したものとなる. Fig. 3-12 に示すよう にモノ硫酸化糖脂質では [M-H], ビス硫酸化糖脂質では [M-2H+Na] に相当する一 連のイオンが観測された.マトリックスには試料との間のプロトンの授受のほかに その粘性を利用して試料の補充 (replenishment) や保護の役割があり,マトリック スの選択は感度に大きな影響を与えた.モノ硫酸化糖脂質では triethanolamine

(TEA) が最も適切であったが,ビス硫酸化糖脂質では 3-nitrobenzyl alcohol (3-NBA)を用いると [M-2H+Na]<sup>-</sup> イオンがより強く観測された.ビス硫酸化糖脂質で はさらに、一方の硫酸基が外れた一連の [M-SO<sub>3</sub>H]<sup>-</sup> イオンが観測され、SB2 の場合、 このイオンは対応するモノ硫酸化糖脂質である SM2a の [M-H]<sup>-</sup> と一致した (Fig. 3-13).この一連の分子関連イオンの強度比から確認した、脂肪酸およびスフィンゴ イド塩基の組成は、化学分析の結果と一致した.また、いずれの場合も m/z 97 に硫 酸エステルに特徴的なフラグメントイオン [OSO<sub>3</sub>H]<sup>-</sup> が観測され (Fig. 3-12),硫酸 基の存在が確認できた.



Fig. 3-13. SM2a, SM1a, SB2 および SB1a の分子関連イオン領域の負イオン LSIMS スペクトル

○: Hex, ◇: HexNAc, ▲: 硫酸基. SM1a は SB1a の solvolysis により調製した (p. 27, Fig. 3-2).

#### 3-6-2 衝突解離(CID) スペクトル

生体由来の糖脂質は前述(3-6-1 参照)のようにセラミド組成の違いによる分子種 分布を示すのが普通であり、複雑なマススペクトルを示す.加えて、微量成分の場 合、完全な単離精製には非常に時間がかかり、高度な技術を必要とする.このよう な混合物の構造解析法として、混合物のままイオン源に導入し、生じたイオンの中 からある特定のイオンを指定し、そのイオンをプリカーサーイオン(親イオン)と して、そのイオンから生じたプロダクトイオン(娘イオン)のみを選別する方法が ある.この方法では、通常のFAB/MS あるいは LSIMS スペクトルで必ず出現する マトリックス由来のイオンや混在する他の物質由来のイオンを排除し、構造解析や フラグメンテーションの研究に確実な情報を得ることができる.プロダクトイオン を強制的に作り出すために二重収束(セクター型)質量分析計ではプリカーサーイ オンが電場に入る前(第一自由領域, first field-free region, FER) に衝突室

(collision cell)を設け、不活性気体(ヘリウム、アルゴンなど)と衝突させると、 結合の開裂が促される(衝突解離, collision-induced dissociation, CID)<sup>59)</sup>. 三連四 重極型(triple stage quadrupole, TSQ)の場合には、第1段目(Q1)で質量分離を行 い、第2段目(Q2)は低エネルギー衝突室であり、第3段目(Q3)でCIDスペク トルを得る. このように、CID はセクター型質量分析計を用いた高エネルギー(約 10<sup>3</sup> eV) CID と四重極型質量分析計による低エネルギー(約10<sup>1</sup> ~ 10<sup>2</sup> eV) CID に区 別される. それぞれ衝突エネルギーのちがいにより、異なったスペクトルを与える ので<sup>59)</sup>それらを比較することにより、より多くの情報を得ることができた. 本研究 ではプリカーサーイオンとして分子関連イオンを選び、衝突ガスとして空気を衝突 室に導入した高エネルギー CID、および、衝突ガスとしてアルゴンを用いた低エネ

ルギー CID により生成したプロダクトイオンを検出し,高および低エネルギー CID スペクトルを得た.

高エネルギー CID では、非還元末端に硫酸基をもつ糖脂質の場合、グリコシド結 合の開裂による硫酸化1糖から5糖に由来するプロダクトイオン(いわゆるシーケ ンスイオン)が順次観測された<sup>60)</sup>. たとえば SMiGbs では Fig. 3-14 に示すように非 還元末端の硫酸化ヘキソースに由来するプロダクトイオン([HSO3-O-Hex-(O) minus 2H]<sup>-</sup>)が m/z 241 と m/z 257 に、硫酸化 2 糖のプロダクトイオン([HSO3-O-Hex-O-HexNAc-(O) minus 2H]<sup>-</sup>)が m/z 444 と m/z 460 に観測された. 同様に硫酸化 3, 4, 5 糖に由来するプロダクトイオンが m/z 606, 622, 768, 784, 930 および 946 に観測 された. これらのプロダクトイオンの質量数の差を計算すると 162, 203, 162, 162 および 162 となり、SMiGbs は非還元末端から Hex、HexNAc、Hex、Hex、Hex の 糖鎖配列をもつことが確認できた.



Fig. 3-14. SMiGbs (A) および SM2a (B) の高エネルギー CID スペクトル.

マトリックス: TEA. プリカーサーイオンは [M-H], (A) m/z 1597 (SMiGb5) および (B) m/z 1273 (SM2a).

内側の糖に硫酸基が結合した SM2a の場合は、硫酸基が結合していない非還元末 端のヘキソースに由来するプロダクトイオンは検出されず、硫酸基を含む2糖およ び3糖のイオンである [HexNAc-(HSO3-)Hex-O minus 2H] および [HexNAc-(HSO3-)Hex-O-Hex-(O) minus 2H] が m/z 460, 606 および 622 に強く観測された (Fig. 3-14). このように、硫酸化糖脂質の場合、硫酸基を含むイオンのみが観測 され、硫酸基を含まない非還元末端の糖に由来するプロダクトイオンを得ることは できなかった. これは硫酸化糖脂質では電荷が硫酸基に著しく局在しているため、 電荷を担う基を含むイオンのみが強く観測されるためである.また高質量域では、 電荷から離れた位置にあるセラミド部分のメチレン単位での解裂 (charge-remote fragmentation)<sup>61),62</sup>による一連のプロダクトイオンが観測された.

SB1a の高および低エネルギー CID スペクトルを Fig. 3-15 に示した. 高エネルギー CID では SMiGb5 の場合と同様に, グリコシド結合の解裂による硫酸化1~4 糖に 由来するシーケンスイオンが m/z 257, 444, 724 および 886 に観測された. 一方, 低エネルギー CID スペクトルは極めて単純で, 内側の Gal に結合した硫酸基および セラミドを含む [(HSO3-O-Hex-O-Hex-O-Cer)-H]<sup>-</sup> (m/z 1070) および非還元末端の硫酸 基を含む [(HSO3-O-Hex-O-HexNAc)-2H]<sup>-</sup> (m/z 444) の 2 つのイオンのみが強く観測さ れた.

以上のように、通常の負イオンLSIMS スペクトルと高および低エネルギー CID スペクトルを組み合わせて解析することにより、1 n mol 以下の試料から硫酸化糖脂 質の糖鎖配列、硫酸基の数および結合位置を確認することができた.



Fig. 3-15. SB1a の高エネルギー (A) および低エネルギー (B) CID スペクトル (A) マトリックス: 3-NBA. プリカーサーイオン: [M-2H+Na] (m/z 1537). (B) マトリック ス: TEA. プリカーサーイオン: [M-SO3H] (m/z 1435). ○: Hex, ◇: HexNAc, ▲: 硫 酸基.

# 第四章 硫酸基の定量法の開発

従来,硫酸化糖脂質の硫酸基の定量は,酸加水分解により遊離した無機硫酸を過 剰に加えた Ba<sup>2+</sup>と沈殿させ,残存する Ba<sup>2+</sup>をロジゾン酸のキレートとして比色定量 する方法が用いられてきた<sup>63)</sup>. この方法は最小 10 nmol の無機硫酸の定量が可能で あるが,操作が極めて煩雑である. Kean は塩基性色素アズールA とSM4s の複合体 が, chloroform/methanol/水による分配で下層(有機層)に分配される性質を利用し た簡便な比色定量法を報告した<sup>26)</sup>. この方法は SM4s については便利であるが,2糖 以上の硫酸化糖脂質のアズール A 複合体は水層に分配されるため,その吸光度は著 しく低かった.また,ビス硫酸化糖脂質の場合は濁りを生じた.本研究では硫酸化 糖脂質をあらかじめ穏やかな条件で完全アセチル化した後,アズールA により比色 定量すれば,最小 0.5 nmol で定量が可能であり,1~5 糖の糖鎖をもつ硫酸化糖脂 質を簡便に定量できることを明らかにした<sup>9</sup>.

#### 4-1 アセチル化-アズールA法の操作手順<sup>8</sup>

<アセチル化硫酸化糖脂質の調製>

- 1) 硫酸化糖脂質(0.5~8 nmol)をねじ蓋付き試験管に取り, P2O5上で減圧下で乾燥する.
- 2) 0.1 ml の pyridine / 無水酢酸(1:1) に溶かして窒素を充填し, 室温で 18 時間反応 させる.
- 3) Toluene 0.1 ml を共沸のために加えて,窒素気流下で溶媒を留去する. さらに toluene を加えて同じ操作を繰り返し,溶媒を完全に除く.

<Kean の方法による定量>

4) 3)の試験管に chloroform/methanol (1:1)を1.5 ml, 0.05 N 硫酸を 1.5 ml, および アズールA 試薬を 0.3 ml 加えてかくはんしてから, 800 × g で 10 分間遠心する.
5) 有機層(下層)を取り, 635 nm における吸光度を測定する.

4-2 測定法の検討および結果

SM4s を室温, 18 時間でアセチル化した場合の吸光度は 0.5 ~ 8.0 nmol の範囲で 直線性が得られ,アセチル化していない SM4s と同じ吸光度を与えた. 100 ℃, 15 分でアセチル化すると,3 nmol 以上で吸光度が低下することから,一部脱硫酸が起 きていることが予想された(Fig. 4-1). この結果から,アセチル化は室温で行うこ ととした.アセチル化していない SM3 の吸光度は SM4s の 82% であったが,アセ チル化 SM3 はSM4s と同じ吸光度を与えた(Table 4-1).3 糖より長い糖鎖をもつ 硫酸化糖脂質の吸光度は SM4s の 25% 以下であり,定量の直線性もみとめられなかっ たが,アセチル化することにより SM4s と同様の吸光度および直線性が得られた. また,ビス硫酸化糖脂質はモノ硫酸化糖脂質の約2倍の吸光度を与えた(Fig. 4 1, Table 4-1).

アセチル化-アズールA法により,単離した5種の糖脂質は硫酸基を1つあるい は2つもつことがわかり,それぞれモノおよびビス硫酸化糖脂質であることが確か められた(第三章, Table 3-1 参照).



Fig. 4-1. アセチル化-アズールA法による硫酸化糖脂質の定量.

アセチル化は室温 18 時間 (-----) または 100°C 15 分 (-----) で行った. A : ○, SM4s ; △, SM4g ; □, lyso-SM4g. B : ○, SM3 ; △, SM2a. C : ○, SM1a ; △, SB2 ; □, SB1a. 白 抜きの記号はアセチル化前, 黒色の記号はアセチル化後を示す.

硫酸化糖脂質以外の酸性糖脂質であるガングリオシドおよびリン脂質, さらに中 性糖脂質もアセチル化前後で同様に測定したが, それらの発色率は SM4s の 6% 以 下であった.また,塩化カリウムや酢酸アンモニウムなどの塩が存在しても,分配 の過程で水層に移行するため,発色には全く影響を与えなかった.このことから, この方法によって 1~5 硫酸化糖脂質を特異的に測定できることが確認できた.ま た,粗糖脂質画分中に存在する硫酸化糖脂質の定量にも応用できることが予想され た.

	Color yiel	ds (%)		
Compound	Native	After acetylation		
SM4s	100	100		
SM3	82	109		
SM2a	25	129		
SB2	25	176		
SB1a	19	217		
SM4g	122	120		
GalCer	<1	<1		
GM3	18	6		
Sphingomyelin	<1	< 1		
KCl	<1	< 1		
Ammonium acetate	<1	<1		

Table 4-1. 硫酸化糖脂質,他の脂質および塩類の発色率

# 第五章 結論と考察

第一章から第三章で5種類の新しい硫酸化糖脂質の発見から構造決定に至る過程 を述べた、第四章で示した硫酸基の定量結果と合わせて最終的に決定した全構造お よびコンピューター上での分子モデリングを Table 5-1, Fig. 5-1 および Fig. 5-2 に示 した.

Ganglio-series HSQ3 GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer (Gg<sup>3</sup>Cer II<sup>3</sup>-sulfate, SM2a)<sup>19),20)</sup> HSQ3 HSO3 GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer (Gg3Cer II<sup>3</sup>,III<sup>3</sup>-bis-sulfate, SB2)<sup>21),22)</sup> HSQ3 HSO<sub>3</sub>  $Gal\beta 1$ -3 $GalNAc\beta 1$ -4 $Gal\beta 1$ -4 $Glc\beta 1$ -1Cer(Gg4Cer II<sup>3</sup>,IV<sup>3</sup>-bis-sulfate, SB1a)<sup>23)</sup>

Table 5-1. 新しいモノおよびビス硫酸化糖脂質の構造

Isoglobo-series

HSO<sub>3</sub> GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer (iGb4Cer IV<sup>3</sup>-sulfate, SMiGb4)<sup>24)</sup>

```
HSQ3
   3
```

Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer (iGb<sup>5</sup>Cer V<sup>3</sup>-sulfate, SMiGb<sup>5</sup>)<sup>25)</sup>





Fig. 5-1. SB1a の構造式,および糖鎖部分の三次元分子モデル.

•





Fig. 5-2. SMiGb4 の構造式,および糖鎖部分の三次元分子モデル.

,

.



Fig. 5-3. 各硫酸化糖脂質の推定生合成経路

本研究で構造を決定した硫酸化糖脂質は\_\_\_\_\_で示した.

SM2a, SB2 および SB1a は, ガングリオ (ganglio) 系列 (p. 3, Table 1 参照)の 糖鎖構造をもつモノおよびビス硫酸化糖脂質であった. SM2a は GM2, SB1a は GD1a に対応する構造をもつことから, これら ganglio 系列のガングリオシドと同様 に Fig. 5-3 に示す生合成経路で合成される一連の糖脂質であることが予想された.

SMiGb4 および SMiGb5 はイソグロボ (isoglobo) 系列 (p. 3, Table 1 参照)の糖鎖 構造をもつモノ硫酸化糖脂質であり, Fig. 5-3 に示す生合成経路で前駆体の中性糖 脂質 (iGb4Cer および iGb5Cer) への硫酸基転移によって合成される糖脂質であるこ とが予想された. 一方, ヒト腎にはグロボ (globo) 系列 (p. 3, Table 1 参照)の糖 鎖構造をもつモノ硫酸化糖脂質であるSMGb4 (Gb4Cer IV<sup>3</sup>-sulfate)<sup>64)</sup> および SMGb5 (Gb5Cer IV<sup>3</sup>-sulfate)<sup>65)</sup> が存在することが報告されており, これらは Gb4Cer および Gb5Cer への硫酸基転移によって合成される糖脂質であることが予想される.

最近硫酸化糖脂質とヒトにおける癌化との関連が報告されている.たとえば,正常な肝組織では通常硫酸化糖脂質は検出できないが,肝癌患者の組織にはSB1aが蓄積しており,血中には正常では検出できないSB1aなどの抗体価が上昇していることが報告されている<sup>60</sup>.また,ヒト子宮癌<sup>67</sup>あるいは腎癌由来細胞<sup>68)</sup>ではSM2aなどの正常では検出できない硫酸化糖脂質が高度に発現されること,さらに,腎癌での硫酸化糖脂質発現は,硫酸基転移酵素活性の上昇によるものであることも見出され<sup>69</sup>,癌の診断および細胞増殖抑制と硫酸化糖脂質発現の関連が示唆されている.

ラット腎の中性糖脂質画分には SMiGb4 の生合成の前駆体と考えられるイソグロ ボシド(iGb4Cer)が存在する. ヒト赤血球膜や多くの動物組織に見出されるグロボ シド(Gb4Cer)がサイトリピンKとよばれるのに対して, iGb4Cer はラットの種特 異的な糖脂質であることから,サイトリピンRとよばれており<sup>70)</sup>,ラットにおける 癌化との関連も報告されている<sup>71),72)</sup>. Gb4Cer と iGb4Cer の糖鎖構造の違いは 3 ペー ジの Table 1 に示すように Gal α1-4Gal β 結合をもつ(globo 系列)か, Gal α1-3Gal β

結合をもつ(isoglobo 系列)かの差のみであり、それぞれ、α1-4-galactosyltransferase あるいはα1-3-galactosyltransferase によって生合成されると考えられる. iGb4Cer が ラットのみに発現され、α1-3-galactosyltransferase 活性を有する他の多くの動物で発 現されていないのは興味深い点である. iGb4Cer の硫酸エステルである SMiGb4 は正 常ラット腎では微量成分であったが、前述のヒト腎癌細胞における SB1a の発現に みられるように、悪性化により増加することも予想される.

腎では硫酸化糖脂質の重量あたりの量が他の組織より多いことや、尿の濃縮力の 高い腎髄質では腎皮質よりも含量が多いことなどから、イオン輸送との関連が議論 されてきた<sup>17),73)</sup>. 腎髄質では腎皮質に比べて通常浸透圧が高く、このことが腎髄質 における水の再吸収の原動力となっている. 腎由来細胞株を用いて、培養液の浸透 圧を変化させたときの糖脂質の変化をしらべてみると、糖脂質の中では硫酸化糖脂 質のみが特異的に浸透圧により変化することが明らかとなり<sup>74),75</sup>, 腎における硫酸 化糖脂質代謝と輸送機能との密接な関連が示唆されている. 今後、これら硫酸化糖 脂質の腎輸送機能調節のメカニズムおよび細胞増殖、悪性化などとの関連について 詳細に検討を進めたい.

# 実験の部

### 材料および試薬

腎(3.9 kg) は正常な Wistar または Sprague Dawley ラットより得た. Chloroform および methanol は市販の特級品(和光純薬)をそのまま使用した. TMS 化に使用 した bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) は Sigma から,メチル化に使用した NaB<sup>2</sup>H4 (98%) および C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>I (99%) は Merck から購入した. <sup>1</sup>H-NMR 測定用 DMSO-*d*6 (99.95%) および <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.996%) は Aldrich より購入した. 他の全ての試薬は市販の特 級品を使用した. Silica Gel 60 HPTLC プレートは Merck から購入した. 陰イオン交 換樹脂, DEAE-Sephadex A-25 および DEAE-Toyopearl 650M, は Pharmacia および東 ソーからそれぞれ購入した. 球状シリカゲル粒子であるイアトロビーズ

(Iatrobeads) 6RS-6080 (粒径 60 µm), 6RS-6010 (粒径 10 µm) および 6RS-6005 (粒径 5 µm) はヤトロンより購入した. GLC 用膜厚 0.25 µm メチルシリコーン化学 結合型キャピラリーカラム (CBP1, 0.2 mm × 25 m) は島津より購入した. 標準糖 脂質として使用した,酸性糖脂質混合物 (SM4s, GM3, GM1, GD1a, GD1b など を含む) はラット脳, SM4g はブタ精巣, SM4s および SM3 はヒト腎, Gb4Cer およ び iGb4Cer はラット腎よりそれぞれ調製した. 他の標準糖脂質および GLC/MS 用の 標準物質として使用した脂肪酸メチルエステル, スフィンゴイド塩基, メチル化ア ルジトールアセテートなどは参考文献 19) ~ 25) に従った.
# 第二章 抽出,分離および精製

# 2-1 総脂質の抽出と中性,酸性糖脂質のグループ分け<sup>19-25)</sup>

#### 粗糖脂質分画の調製

- ラット腎約 600gは、1回目:19倍量の chloroform/methanol (2:1)、2回目:10倍 量の chloroform/methanol/0.88% KCl (60:120:9)、3回目:10倍量の chloroform/ methanol/0.4 M 酢酸ナトリウム (30:60:8) を抽出溶媒として、ワーリングブレンダー を用いて3段階で抽出した。
- 抽出液はロータリーエバポレーターで濃縮した後,溶媒の組成を chloroform/ methanol/水 (8:4:3) に合わせて二相分配を行った(Folch 分配 1 回目).
- 3. 2の下層を分取してロータリーエバポレーターで乾固し, 0.2 M NaOH/methanol 溶 液 400 ml を加え, 37℃で振とうしながら2時間反応させた(メタノール性弱ア ルカリ処理).
- 4.3の反応液は1M塩酸-methanolを加えて中和し、組成を chloroform/methanol/水 (8:4:3)に合わせて Folch 分配を行った(Folch 分配 2 回目).
- 5. Folch 分配1回目と2回目の上層を合わせてロータリーエバポレーターで濃縮した後,透析チューブに移し,蒸留水で約24時間透析することにより脱塩した.
- 6. チューブの内液を凍結乾燥し, Folch 分配 2 回目の下層と合わせて粗糖脂質画分とした.

# DEAE-Sephadex A-25 カラムによる酸性糖脂質の分離

1. DEAE-Sephadex A-25 (塩酸型) は 0.1 M NaOH に懸濁した後, 蒸留水で洗浄し, カラムにつめて 0.8 M 酢酸ナトリウムを十分 (3~4カラム容量) 流して酢酸型 に換え,蒸留水で十分洗浄した.

- 2. 1 で調製した DEAE-Sephadex A-25 (酢酸型) は カラム (200 ml, 3 × 35 cm) に 充填し、約 200 ml の chloroform/methanol/水 (5:10:1) を流して平衡化した.
- ラット腎約 600gより調製した粗糖脂質画分(p. 67, 「粗糖脂質分画の調製」6.
   参照)を約1ℓの chloroform/methanol/水 (5:10:1) に溶かして2のカラムにゆっくり(20~50 ml/cm²/h)流して吸着させ、約 600 ml の同溶媒で非吸着成分(中性脂質画分)を溶出した.
- 4. 酸性糖脂質は chloroform/methanol/水 (5:10:1) 中の酢酸アンモニウムの濃度勾配法 で溶出した. モノからビス硫酸化糖脂質までを連続して溶出するために下記の第 1~3 溶媒による concave 型濃度勾配法を用いた.
  - 第1溶媒: chloroform/methanol/0.04 M 酢酸アンモニウム (5:10:1, 2ℓ)
  - 第2溶媒: chloroform/methanol/0.8 M 酢酸アンモニウム (5:10:1, 2ℓ)
  - 第3溶媒: chloroform/methanol/3.5 M 酢酸アンモニウム (5:10:1, 22)

#### DEAE-Toyopearl 650M カラムによる酸性糖脂質の分離

- DEAE-Toyopearl 650M は DEAE-Sephadex A-25 と同様の方法で酢酸型に調製して カラム(220 ml, 2.5 × 45 cm)に充填し, FPLC システム(Pharmacia LKB Biotechnology)を用いて 5 ml/分で溶出した.
- ラット腎約 600gより調製した粗糖脂質画分(p. 67, 「粗糖脂質分画の調製」 6.
   参照)を約 500 ml の chloroform/methanol/水 (5:10:1) に溶かして 1 のカラムにのせ, 約 600 ml の同溶媒で非吸着成分(中性脂質画分)を溶出した.
- 3.酸性糖脂質は chloroform/methanol/水 (5:10:1) 中の酢酸アンモニウムの下記の2段 階の直線濃度勾配法で溶出した.

第1段階: chloroform/methanol/0.04 M 酢酸アンモニウム (5:10:1, 500 ml)

chloroform/methanol/0.8 M 酢酸アンモニウム (5:10:1, 500 ml)

第2段階: chloroform/methanol/0.8 M 酢酸アンモニウム (5:10:1, 500 ml)

chloroform/methanol/3.5 M 酢酸アンモニウム (5:10:1, 500 ml)

## <u>薄層クロマトグラフィー(TLC)による検出</u>

- DEAE-Sephadex A-25 または DEAE-Toyopearl 650M からの溶出液はフラクション コレクターで 20 ml ずつ集め、1~2本おきに 10~300 μl を小試験管に取り、減 圧下で一晩放置して酢酸アンモニウムを昇華させた。
- 小試験管の内容物は少量の chloroform/methanol (1:1) に溶かし、全量を HPTLC プレートに 3 ~ 5 mm 巾にスポットした後、 chloroform/methanol/0.2% CaCl2 (60:40:9) または chloroform/methanol/3.5 M NH4OH (60:40:9) などの展開溶媒で展開した。
- 展開後のプレートは風乾後、オルシノール硫酸試薬をスプレーし、約110℃のホットプレートで2~3分加熱すると糖脂質(ヘキソースを含む物質)は赤紫色に発色した. コレステロール硫酸は糖脂質よりも早く橙色に発色するの区別することができた.

# 2-2 個々の硫酸化糖脂質の分離精製<sup>19-25)</sup>

2-2-1 SM2a の精製/2-2-2 SMiGb4 および SMiGb5 の精製

#### Neuraminidase 処理

GM4の混在が予想されるフラクションを集め、neuraminidase (*Clostridium perfringens*)を 0.1 U/ml 加え、50 mM トリス酢酸緩衝液 (pH 6.5) 中で 37℃、2 時間反応させ、透析により脱塩した.

#### Iatrobeads 6RS-6080 カラムによる粗分画

- Iatrobeads 6RS-6080 は chloroform/methanol (9:1) に懸濁してカラム (220 ml, 2.5 × 45 cm) に充填した.
- 「2-1 総脂質の抽出と中性,酸性糖脂質のグループ分け」(p. 67 ~)で述べた,陰 イオン交換カラムから溶出した SM2a あるいは,SMiGb4 および SMiGb5 を含む 画分は,約10 mlの chloroform/methanol (9:1)に溶かして1のカラムにのせ, chloroform/methanol (9:1)から chloroform/methanol/水 (50:50:5)までの直線濃度勾 配により合計 3ℓで溶出した.
- 溶出液はフラクションコレクターで 20 ml ずつ集め、1~2本おきに 5~10 μl を HPTLC プレートに 3~5 mm 巾にスポットした. Chloroform/methanol/0.2% CaCl2 (60:40:9) または chloroform/methanol/3.5 M NH4OH (60:40:9) などの展開溶媒で展開 し、オルシノール硫酸試薬で発色した (p. 69、「薄層クロマトグラフィー (TLC)」による検出」 参照).

#### Iatrobeads 6RS-6010 カラムによる SM2a の精製

- 1. Iatrobeads 6RS-6010 を充填した HPLC 用カラム(24 ml, 1 × 30 cm) は chloroform/methanol (85:15) を約 100 ml 流して平衡化した.
- 前述の Iatrobeads 6RS-6080 カラムを用いた粗分画により得た SM2a を含むフラクションは、chloroform/methanol (85:15) に溶かしてグラスファイバーフィルターでろ過し、1のカラムに注入した.
- 第1溶媒に chloroform/methanol (85:15),第2溶媒に chloroform/methanol/水 (75:25:2.5)を用いた直線濃度勾配により1.6 ml/分で溶出した. HPLC 装置は LC-9A(島津)を用いた.
- 容出液はフラクションコレクターで13 ml ずつ100本のフラクションに集めた.
   SM2aは45~60に溶出された.

#### Iatrobeads 6RS-6010 および 6RS-6005 カラムによる SMiGb4 および SMiGb5 の精製

- 1. Iatrobeads 6RS-6010 を充填した HPLC 用カラム(24 ml, 1 × 30 cm)は chloroform/methanol/3 M NH4OH (85:15:1) を約 100 ml 流して平衡化した.
- Iatrobeads 6RS-6080 カラムから溶出した(p. 70, 「Iatrobeads 6RS-6080 カラムによる粗分」画参照) SMiGb4 および SMiGbs を含むフラクションを集め, chloroform/methanol/3 M NH4OH (85:15:1) に溶かし、グラスファイバーフィルター でろ過し、1のカラムに注入した.
- 第1溶媒に chloroform/methanol/3 M NH4OH (85:15:1),第2溶媒に chloroform/ methanol/3 M NH4OH (60:40:5)を用いた直線濃度勾配により1.6 ml/分で溶出し、 溶出液はフラクションコレクターで13 ml ずつ100本のフラクションに集めた.
- 4. SMiGb4 および SMiGbs を含むフラクションを集め, chloroform/methanol/水

(85:15:0.5) で平衡化した Iatrobeads 6RS-6005 HPLC 用カラム (24 ml, 1 × 30 cm) に注入した.

5. 第1溶媒に chloroform/methanol/水 (85:15:0.5),第2溶媒に chloroform/methanol/水 (70:30:3)を用いた直線濃度勾配により1.6 ml/分で溶出し、溶出液はフラクションコレクターで13 ml ずつ100本のフラクションに集めた. SMiGb4 はフラクション30~45, SMiGb5 は 60~75 に溶出された.

#### Iatrobeads 6RS-6010 カラムによる SB2 および SB1a の精製

- 1. Iatrobeads 6RS-6010 を充填した HPLC 用カラム(24 ml, 1 × 30 cm)は chloroform/methanol/3 M NH4OH (80:20:1) を約 100 ml 流して平衡化した.
- Iatrobeads 6RS-6080 カラムから溶出した SB2 および SB1a を含むフラクションを 集め、chloroform/methanol/3 M NH4OH (80:20:1) に溶かし、グラスファイバーフィ ルターでろ過し、1のカラムに注入した.
- 第1溶媒に chloroform/methanol/3.5 M NH4OH (80:20:1),第2溶媒に chloroform/ methanol/3.5 M NH4OH (65:35:4)を用いた直線濃度勾配により1.6 ml/分で溶出し、 溶出液はフラクションコレクターで13 ml ずつ900本のフラクションに集めた. SB2 はフラクション26~41,SB1aは56~70に溶出された.

# 第三章 構造解析

# 3-1 Solvolysis による脱硫酸<sup>19-25)</sup>

#### 塩酸/DMSO による solvolysis

Solvolysis は 5 mM 塩酸(あるいは硫酸)を含む DMSO/methanol (95:5) 中で行っ たが,後処理がより簡便な塩酸/DMSO による solvolysis について示す.

- 精製した硫酸化糖脂質(100~500 nmol)に5 mM 塩酸を含む DMSO/methanol (95:5) 0.3~0.5 ml を加え, 80℃で 0.5~3 時間反応させた.
- 途中で反応液の一部を取って減圧下で溶媒を乾固し、HPTLC プレートにスポットし、chloroform/methanol/0.2% CaCl2(60:40:9)または chloroform/methanol/3.5 M NH4OH (60:40:9)などの展開溶媒で展開し、オルシノール硫酸試薬で発色して solvolysisの経過をしらべた。
- 反応終了後は減圧下で溶媒を乾固し, Iatrobeads 6RS-6005 を充填した HPLC 用カ ラム(3.3 ml, 0.46 × 20 cm)を用いた HPLC により,「2-2 個々の硫酸化糖脂質 の分離精製」(p. 70 ~)に従って各反応生成物を分離精製した.

## 3-2 構成糖,脂肪酸およびスフィンゴイド塩基組成の分析<sup>19-25)</sup>

#### 構成糖および脂肪酸の GLC による定量

- 1. 精製した糖脂質(約 20 nmol)をねじ蓋付き試験管に取り, P2O5上減圧下で十分 乾燥させた.
- 2. 0.5 mlの1M 塩酸-methanolを加え,窒素を充填して 80℃, 24 時間加熱した.
- Hexane 0.5 ml を加えてかくはんし、3000 rpm で5分遠心分離することを2回繰り返し、上層(hexane 層)に脂肪酸メチルエステルを抽出した.

- 4.3の下層に pyridine 150 μl を加えて残存する塩酸を中和した.
- 5. 2のメタノリシスにより HexNAc の *N*-アセチル基は脱離するため、無水酢酸 0.1 ml を加えて室温で 30 分反応させることによって再 *N*-アセチル化した.
- 窒素気流化に溶媒を留去し、共沸のため toluene を加えてさらに乾固して溶媒を 完全に除いた後、内部標準として 0.2 mM マンニトールの methanol 溶液 50 μl (10 nmol 相当)を加えた.
- P2O5 上減圧下で十分乾燥させた後,BSTFA/pyridine (2:1)を 30 µl 加えて室温で 30 分反応させることによってトリメチルシリル (TMS) 化し、1~2µl を GLC により分析した.
- 8. GLC は次の条件で行った. ガスクロマトグラフ:GC-14A(島津). カラム:
  0.25 µm メチルシリコーン化学結合型キャピラリーカラム(CBP1, 0.2 mm × 25 m)(島津). 温度勾配:160~240℃, 4℃/分.
- 3の上層(hexane 層)は窒素気流化に溶媒を留去して 30 µl の acetone に溶解し,
   1~2µlをGLC(条件は 8. 参照,温度は 230℃一定)により分析した.
- GLC で検出した各ピークはさらに GC/MS により分析した. GLC は 8. に示した 条件で行い,質量分析計は QP-1000(島津)を用いて EI-MS (イオン化電圧 70 eV)により同定した.

スフィンゴイド塩基の分析

- 約 20 nmol の糖脂質をねじ蓋付き試験管に取り、0.3 mlの methanol/塩酸/水 (82:8.6:9.4)を加えて 70℃、18 時間加熱した.
- Hexane 0.5 ml を加えてかくはんし、3000 rpm で5分遠心分離することを2回繰り返し、上層(hexane 層)に脂肪酸を抽出除去した.
- 3. 下層は窒素気流化に溶媒を留去し、0.2 mlの methanol を加えて窒素気流化に留去

し, 塩酸を完全に除いた.

- 0.8 mlの 0.1 M NaOH および 1 mlの chloroform を加えて二相に分配し、下層 (chloroform 層)は 0.8 mlの蒸留水を加えて 2 回分配して洗浄した.
- 下層(chloroform 層)は窒素気流化に溶媒を留去し、 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上減圧下で十分乾燥 させた後、無水 methanol/無水酢酸 (4:1) を 50 µl 加えて室温で 17 時間反応させる ことによって N-アセチル化した.
- 6. 0.5 mlの toluene を共沸のため加えて窒素気流下で留去することを2回繰り返して 溶媒を完全に除いた後, P2O5上減圧下で十分乾燥させた.
- BSTFA/pyridine (9:1) を 30 μl 加えて室温で 30 分反応させることによってTMS 化
   し、1~2μlをGLCにより、脂肪酸メチルエステルと同様の条件で分析した.

## 3-3 メチル化法の改良と応用<sup>23-25)</sup>

#### Ciucanu-Kerek の方法によるメチル化<sup>35)</sup>

- NaOH1~2粒を乾いた乳鉢に取って手早く粉末にし、その約40mgをねじ蓋付 きポリプロピレン容器に取り、DMSO1mlを加えて超音波浴中で溶解(懸濁)した(40mg/ml NaOH/DMSO溶液).
- 2. 10~20 nmol の糖脂質をねじ蓋付き試験管に取り、40 mg/ml NaOH/DMSO 溶液を 100 µl, CH3Iを 20 µl 加え,超音波浴中で 25~30℃,30 分反応させた.
- 反応液にchloroform/methanol (2:1) 2 ml および 0.88% KCl 0.5 ml を加えてかくはんし、3000 rpm で 5 分遠心分離して (Folch 分配) 上層をすて、上層が中性になるまでさらに 2~3 回分配した.
- 下層の一部を HPTLC プレートにスポットし、chloroform/methanol/水 (65:25:4) で
   展開してオルシノール硫酸試薬で発色し、メチル化反応を確認した.

メチル化糖のアルジトールアセテート化

- Ciucanu-Kerekの方法により調製したメチル化糖脂質 10~20 nmol をねじ蓋付き 試験管に取り、0.3 mlの0.5 M 塩酸-80% 酢酸を加えて窒素を充填し、75℃で18 時間加熱した(アセトリシス).
- 2. 窒素気流下で乾固して塩酸および酢酸を完全に除いた.
- 3. 50 μl の 1% NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> -10 mM NaOH を氷冷しながら加え,超音波浴中で数分間反応させた後,さらに 50 μl の 1% NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> -10 mM NaOH を加え,数時間 ~ 一晩放置した(還元).
- 4.1 M 酢酸を氷冷しながら少しずつ加えて pH を 4 ~ 5 に合わせ (pH 試験紙で確認), 凍結乾燥あるいは遠心濃縮により乾固した.
- 約 0.2 mlの1~2%の酢酸を含む無水 methanol を加えて窒素気流下で留去することを5~6回繰り返すことにより、H3BO3をメチルエステルとして除き、P2O5 上減圧下で十分乾燥させた.
- 6. 100 µl の pyridine および無水酢酸を加え,窒素を充填して 100℃, 30 分加熱し
   (アセチル化), 0.5 ml の toluene を共沸のため加えて窒素気流下で留去すること
   を2回繰り返して溶媒を完全に除いた.
- 7.1 mlの chloroform と 0.1 M 塩酸を加えて分配した後上層を除き、さらに 1 mlの
   0.05% NaHCO3 で 1 回、蒸留水で 2 回分配して上層を除いた.
- 下層を窒素気流下で乾固し、30 μlの acetone に溶解して1~2 μlをGLCまたは GC/MS(条件は p. 73,「構成糖および脂肪酸のGLCによる定量」8.参照)に より分析した.

#### 完全メチル化糖脂質の直接導入 EI-MS<sup>23),36)</sup>

- 硫酸化糖脂質を前述の方法 (p. 75, 「Ciucznu-Kerek の方法によるメチル化」参照)あるいは箱守法<sup>34)</sup>で完全メチル化し、得られたメチル化糖脂質は solvolysis により脱硫酸して、メチル化脱硫酸化糖脂質を得た。
- メチル化脱硫酸化糖脂質は CH<sub>3</sub>I の代わりに C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>I を用いて同様の方法で再メチル 化し、反応液は Folch 分配後、Iatrobeads 6RS-8060 カラム(約 500 mg をパスツー ルピペットなどに詰める)にのせ、それぞれ 3 カラム溶量の n-hexane、n-hexane/ diethylether (1:1), chloroform/methanol (9:1), (4:1), (3:1), (2:1) で順次溶出した.
   メチル化中性糖脂質は chloroform/methanol (9:1) で溶出された.
- 精製したメチル化中性糖脂質(10 nmol)は次に示す条件で直接導入 EI/MS により分析した. 質量分析装置: Model 6020 Auto GC/MS(島津). データ処理:
   SCAP 1123 data system. 加速電圧: 1.75 kV. イオン化電圧: 20 eV. イオン源温度: 280℃. プローブ温度: 30~310℃を 20~30℃/分で昇温.

# 3-4 赤外吸収スペクトルによる分析

従来のIR に比べてより少ない試料(10~20 nmol) で S/N比のよいスペクトル を得ることができる FT-IR により測定した. 各硫酸化糖脂質(約 15 nmol) を KBr で希釈し, FTIR-4200(島津)で拡散反射により約 600 回の積算で測定した.

# 3-5 <sup>1</sup>H-NMR による構造解析

各硫酸化糖脂質(100~800 nmol) に<sup>2</sup>H20約0.5 mlを加えて凍結乾燥することを 2 回繰り返して重水素置換した後, P2Os 上減圧下で十分乾燥し, DMSO-d6/<sup>2</sup>H20 (98:2) 0.5 ml に溶かして試料とした.装置はGX-400(400 MHz)(日本電子)を用 い, 1-D スペクトル, 2-D DQF-COSY, relayed COSY および double relayed COSY を 観測周波数領域 800 MHz, 測定温度 60℃ で測定した. NOESY スペクトルは混合時 間を 300 ~ 500 ms に設定し, 30℃ で測定した. H20 のシグナルはラジオ波照射に より抑制した.

## 3-6 質量分析法による糖鎖構造の解析

負イオン LSIMS および高エネルギー衝突解離(CID)スペクトル

装置はセシウムイオン源を装着した Concept IH (Shimadzu/Kratos) を用い, 負 イオンモードで測定した. Cs<sup>+</sup> (14 keV) を一次粒子として用い, 加速電圧は8 kV とした. モノ硫酸化糖脂質の場合は triethanolamine (TEA), ビス硫酸化糖脂質の場 合は 3-nitrobenzyl alcohol (3-NBA) をマトリックスとし, 試料は約 0.5 nmol の精製 した硫酸化糖脂質を用いて, 分解能 1000 ~ 2000, スキャン速度 5 s/decade で測定 した.

高エネルギー CID スペクトルは分子関連イオンをプリカーサーイオンとして選択し、衝突ガスとして air を衝突室に導入して *B/E* 一定リンク操作により測定した.

# 低エネルギー CID スペクトル

装置は TSQ-70 三連四重極型質量分析計(Finnigan MAT)を用い,負イオンモー ドで測定した.一次粒子は Cs<sup>+</sup>(20 keV)を,マトリックスは TEA を用い,約1 nmol の精製した硫酸化糖脂質を試料とした.低エネルギー CID MS/MS は分子関連 イオンをプリカーサーイオンとして選択し,1.5×10<sup>3</sup> torr の Ar を衝突ガスとして 衝突エネルギーは 10 eV とした.測定質量範囲を m/z 50~1600 とし,スキャン速 度 250 Da/s で測定した.

## 謝辞

本論文提出の機会を御恵与下さると共に、本論文の作成に際して御指導を賜りました千葉大学薬学部教授 今成登志男先生に深甚なる謝意を表します.

本研究の機会を御恵与下さると共に,研究の遂行および本論文の作成に際して終 始御懇切なる御指導,御校閲を賜りました帝京大学医学部教授石塚稲夫先生に深く 感謝いたします.

本研究の遂行に際して御助言および御協力下さいました,帝京大学医学部新村幸雄講師,永井謙一講師,田中直子助手,小川道子助手に心より御礼申し上げます.

また、本論文の作成にあたり御助言および御協力下さいました、千葉大学薬学部 戸井田敏彦助教授、薬品分析化学研究室の皆様に厚く御礼申し上げます.

最後に,実験を行うにあたり,御協力下さいました,帝京大学医学部第二生化学 教室の大学院生,中央機器室および基礎 RI 室の皆様に厚く御礼申し上げます.

## 参考文献

- 岩森正男," 脂質 Ⅲ 糖脂質(新生化学実験講座 4)"日本生化学会編, pp. 7-36, 東京化学同人 (1989)
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Eur. J. Biochem., 79, 11-21 (1977)
- T. Yamakawa, N. Kiso, S. Handa, A. Makita and S. Yokoyama, J. Biochem. (Tokyo), 52, 226-227 (1962)
- 4) E. Martensson, Biochim. Biophys. Acta, 116, 521-531 (1966)
- 5) I. Ishizuka, M. Suzuki and T. Yamakawa, J. Biochem. (Tokyo), 73, 77-87 (1973)
- 6) L. Svennerholm, J. Neurchem., 10, 613-623 (1963)
- 7) I. Ishizuka and K. Tadano, in New Vistas in Glycolipid Research (A. Makita, S. Handa, T. Taketomi and Y. Nagai, eds) pp.195-206, Plenum Press, New York (1982)
- 8) K. Tadano-Aritomi and I. Ishizuka, J. Lipid Res., 24, 1368-1375 (1983)
- 9) D.D. Robert and V. Ginsburg, Arch.Biochem.Biophys., 267, 405-415 (1988)
- D.D. Robert, C.N. Rao, J.L. Magnani, S.L. Spitalnik, A. Liotta and V. Ginsburg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1306-1310 (1985)
- D.D. Robert, D.M. Haberstick, V.M. Dixit, W.A. Frazier, S.A. Santoro and V. Ginsburg, J. Biol. Chem., 260, 9405-9411 (1985)
- 12) D.D. Robert, S.B. Williams, H.R. Gralnick and V. Ginsburg, J. Biol. Chem., 261, 3306-3309 (1986)
- 13) G.D. Holt, M.K. Pangburn and V. Ginsburg, J. Biol. Chem., 265, 2852-2855 (1990)
- 14) G.D. Holt, H.C. Krivan, G.J. Gasic and V. Ginsburg, J. Biol. Chem., 264, 12138-12140
   (1989)

- P.J. Green, T. Tamatani, T. Watanabe, M. Miyasaka, A. Hasegawa, M. Kiso, C-T. Yuen,
   M.S. Stoll, and T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103, 1006-1013 (1980)
- Y. Suzuki, Y. Toda, Y. Tamatani, T. Watanabe, T. Suzuki, T. Nakao, K. Murase, M. Kiso, A. Hasegawa, K. Tadano-Aritomi, I. Ishizuka and M. Miyasaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 426-434 (1993)
- 17) K.-A. Karlsson in *Biological Membranes* (D. Chapman ed.) Vol.4., pp. 1-74, Academic Press, London (1982)
- I. Ishizuka and T. Yamakawa in *Glycolipids* (H. Wiegandt ed.) pp. 101-196, Elsevier, Amsterdam (1985)
- 19) K. Tadano and I. Ishizuka, Biochem. Biophys. Res. Commun., 97, 126-132 (1980)
- 20) K. Tadano and I. Ishizuka, J. Biol. Chem., 257, 1482-1490 (1982)
- 21) K. Tadano and I. Ishizuka, Biochem. Biophys. Res. Commun., 103, 1006-1013 (1980)
- 22) K. Tadano and I. Ishizuka, J. Biol. Chem., 257, 9294-9299 (1982)
- 23) K. Tadano, I. Ishizuka, M. Matsuo and S. Matsumoto, J. Biol. Chem., 257, 13413-3420 (1982)
- 24) K. Tadano-Aritomi, T. Kasama, S. Handa and I. Ishizuka, *Eur. J. Biochem.*, 209, 305-313 (1992)
- 25) K. Tadano-Aritomi, M. Okuda, I. Ishizuka, H. Kubo and P. Ireland, *Carbohydr. Res.*, in press (1994)
- 26) E.L. Kean, J. Lipid Res., 9, 319-327 (1968)
- 27) I. Ishizuka, K. Tadano, N. Nagata, Y. Niimura and Y. Nagai, *Biochim. Biophys. Acta*, 541, 467-482 (1978)
- (28) A.G. Gilman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 305-312 (1970)

- 29) K. Tadano and I. Ishizuka, Biochim. Biophys. Acta, 575, 421-430 (1979)
- 30) J. Folch, M. Lees and G.H. Sloane Stanley, J. Biol. Chem., 226, 497-509 (1978)
- 31) I. Ishizuka, M. Inomata, I. Ueno, T. Yamakawa, J. Biol. Chem., 253, 898-907 (1978)
- 32) P. Stoffyn and A. Stoffin, Biochim. Biophys. Acta, 70, 107-108 (1963)
- 33) Y. Inoue and K. Nagasawa, Carbohydr. Res., 85, 107-119 (1980)
- 34) S. B. Levery and S. Hakomori, Methods Enzymol., 138, 13-25 (1978)
- 35) I. Ciucanu and F. Kerek, Carbohydr. Res., 131, 209-217 (1984)
- 36) I. Ishizuka and K. Tadano-Aritomi, J. Biochem. (Tokyo), 96, 829-839 (1984)
- 37) J. Dabrowski, P. Hanfland and H. Egge, Biochemistry, 19, 5652-5658 (1980)
- 38) 稲垣冬彦," 糖鎖工学",糖鎖工学研究協議会監修, pp. 424-434, 産業調査会 バイオテクノロジー情報センター (1992)
- 39) T.A.W. Koerner, Jr., J.H. Prestegard, P.C. Demou and R.K. Yu, *Biochemistry*, 22, 2676-2687 (1983)
- 40) S. Gasa, M. Nakamura A. Makita, M. Ikura and K. Hikichi, *Eur. J. Biochem.*, 155, 603-611 (1986)
- 41) F. Inagaki, D. Kohda, C. Kodama and A. Suzuki, FEBS Lett., 212, 91-97 (1987)
- 42) S.W. Homans, R.A. Dwek, D.L. Fernandes and T.W. Rademacher, *Proc. Natl. Acad.* Sci. USA, 81, 6286-6289 (1984)
- 43) M. Ikura and K. Hikichi, Carbohydr. Res., 163, 1-8 (1987)
- 44) A. Kumar, R.R. Ernst and K.Wuthrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 103, 1006-1013 (1980)
- 45) J. Dabrowski, K. Trauner, K. Koike and T. Ogawa, Chem. Phys. Lipids, 49, 31-37 (1988)

- 46) M.J. Harris and J.R. Turvey, Carbohydr. Res., 15, 57-63 (1970)
- N. Iida, T. Toida, Y. Kushi, S. Handa, P. Fredman, L. Svennerholm and I. Ishizuka, J. Biol. Chem., 264, 5974-5980 (1989)
- 48) C.A. Bush and R.E. Feeney, Int. J. Peptide Protein Res., 28, 386-397 (1986)
- 49) Y. Kushi, S. Handa and Ishizuka, J. Biochem. (Tokyo), 97, 419-428 (1985)
- V.N. Reinhold, in Mass Spectrometry in Biomedical Research (S.J. Gaskell ed.) pp. 181-213, John Wiley & Sons Ltd. (1986)
- 51) B.L. Gillece-Castro and A.L. Burlingane, Methods Enzymol., 193, 689-712 (1990)
- 52) J. Peter-Katalinic and H. Egge, Methods Enzymol., 193, 713-733 (1990)
- 53) T. Matsubara and A. Hayashi, Prg. Lipid Res., 30, 310-322 (1991)
- 54) A. Dell, A.J. Reason, K.-H. Khoo, M. Ranico, R.A. McDowell and H.R. Morris, Methods Enzymol., 230, 108-132 (1994)
- 55) H. Leffler, G.C. Hansson and N. Stromberg, J. Biol. Chem., 261, 1440-1444 (1986)
- 56) K. Tadano-Aritomi, T. Kasama, S. Handa, H. Kubo, P. Ireland and I. Ishizuka, Proceedings of the Kyoto'92 International Conference on Biological Mass Spectrometry (T. Matsuo ed.), pp. 326-327, San-ei Publishing Co. (1993)
- 57) 鈴木実,大橋陽子,鈴木明身,"糖鎖工学",糖鎖工学研究協議会監修,pp. 434-451,産業調査会バイオテクノロジー情報センター (1992)
- M.J. Farncombe, R.S. Mason, K.R. Jennings and J. Scrivens, Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 44, 91-107 (1982)
- 59) T. Kasama and S. Handa, Biochemistry, 30, 5621-5624 (1991)
- 60) B. Domon and C.E. Costello, Biochemistry, 27, 1534-1543 (1988)
- 61) J. Adams, Mass Spectrom. Rev., 9, 141-186 (1990)

- 62) Y. Ohashi and Y. Nagai, Carbohydr. Res., 221, 235-243 (1991)
- 63) T.T. Teruho and K. Hartiala, Anal. Biochem., 41, 471-476 (1971)
- 64) K. Nagai, D.D. Roberts, T. Toida, H. Matsumoto, Y. Kushi, S. Handa and I. Ishizuka, J. Biochem. (Tokyo), 106, 878-886 (1984)
- 65) K. Nagai, D.D. Roberts, T. Toida, H. Matsumoto, Y. Kushi, S. Handa and I. Ishizuka, J. Biol. Chem., 264, 16229-16237 (1986)
- 66) N. Hiraiwa, Y. Fukuda, H. Imura, K. Tadano-Aritomi, K. Nagai, I. Ishizuka and R. Kannagi, *Cancer Res.*, 50, 2917-2928 (1990)
- 67) K. Kubushiro, Acta Obst. Gynaec. Jpn, 41, 397-404 (1989)
- S. Gasa, M.-T. Casl, A. Makita, N. Sakakibara, T. Kobayashi and T. Atsuta, *Eur. J. Biochem.*, 189, 301-306 (1990)
- 69) T. Kobayashi, K. Honke, K. Kamio, N. Sakakibara, S. Gasa, N. Miyao, T. Tsukamoto, I. Ishizuka, T. Miyazaki and A. Makita, Br. J. Cancer, 67, 76-80 (1993)
- 70) A. Makita and N. Taniguchi, in *Glycolipids* (H. Wiegandt, ed.) pp. 1-99, Elsevier
   Scientific Publishing Co., Amsterdam (1985)
- 71) R. Laine, C.C. Sweeley, Y.-T. Li, A. Kisic and M. Rapport, J. Lipid Res., 13, 519-524 (1972)
- 72) H. Arita and J. Kawanami, J. Biochem. (Tokyo), 76, 1067-1074 (1974)
- 73) K. Nagai, I. Ishizuka and S. Oda, J. Biochem. (Tokyo), 95, 1501-1511 (1984)
- 74) Y. Niimura and I. Ishizuka, Biochim. Biophys. Acta, 1052, 248-254 (1990)
- 75) Y. Niimura and I. Ishizuka, Comp. Biochem. Physiol., 100B, 535-541 (1991)

85

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた.

主査	千葉大学教授(薬学部)	薬学博士	今成 登志男
司木	工業十学業派(英学堂)	革兵中十	山川目乙
町 <u>1</u> 1	未八子 钗 ( 采子 ロ) /	采于侍工	中川首于
	千葉大学教授(薬学部)	薬学博士	相見則郎
	千葉大学教授(薬学部)	薬学博士	坂井 進一郎
	千葉大学教授(薬学部)	薬学博士	廣瀬 聖雄