

ソフトイオン化質量分析法による
生体膜糖脂質の構造解析に
関する研究

1986年

有 賀 敏 夫

目 次

緒 言	1
第1編 化学イオン化質量分析計による糖脂質の構造解析	3
序	3
第1章 ゴーシェ病脾臓グルコセレブロシドのガスクロマトグラフィー	
化学イオン化質量分析.....	4
第1節 序	4
第2節 実験方法	4
第3節 実験結果	5
第4節 考 察	10
第2章 グルコセレブロシドおよびガラクトセレブロシドの直接導入系	
一化学イオン化質量分析	11
第1節 序	11
第2節 実験方法	11
第3節 実験結果	12
第4節 考 察	19
第3章 複合糖脂質の化学イオン化質量分析	20
第1節 序	20
第2節 実験方法	20
第3節 実験結果	21
第4節 考 察	31
第4章 GM ₁ ガングリオシドの化学イオン化質量分析	33
第1節 序	33
第2節 実験方法	33
第3節 実験結果	34
第4節 考 察	40

第5章	ガングリオシドの化学イオン化質量分析	42
第1節	序	42
第2節	実験方法	42
第3節	実験結果	43
第4節	考察	50
第2編	高速中性原子衝撃一質量分析計による糖脂質の構造解析	51
序		51
第1章	クロム親和性細胞(PC12細胞)の主要糖脂質; グロボシドの 高速中性原子衝撃質量分析	52
第1節	序	52
第2節	実験方法	52
第3節	実験結果および考察	53
第2章	ヒト末梢神経由来グルクロン酸を有する酸性糖脂質の高速中 性原子衝撃一質量分析	55
第1節	序	55
第2節	実験方法	55
第3節	実験結果および考察	56
第3章	ヒト脳モノシアロガングリオシドGM ₁ a およびGM ₁ b の高速 中性原子衝撃一質量分析	58
第1節	序	58
第2節	実験方法	58
第3節	実験結果および考察	59
総括		62
謝辞		64
掲載論文目録		65
引用文献		67

緒
構
鎖
親
合
り
要
セ
お
る。
類
する
ば
免
細胞
はG
こと
ガン
種
する
の糖
構造
にク
一電
量分
その
しか

緒 言

スフィンゴ糖脂質は疎水性の脂質部分と親水性の糖質部分からなり細胞膜の微量構成成分である。疎水性の脂質部分はセラミドと呼ばれアミノアルコールである長鎖スフィンゴシン塩基の2位の炭素の窒素原子に脂肪酸が酸アミド結合している。親水性の糖質部分は単糖あるいはオリゴ糖がスフィンゴシン塩基の1位の炭素に結合している。脂質部分は生体膜中でコレステロール、リン脂質など脂質2重層にとりこまれ、糖鎖部分は大部分細胞の表面に出ているとされており細胞間の認識に重要な役割をもっていると考えられている。自然界にはスフィンゴ糖脂質以外にグリセロ糖脂質が知られているが、後者は著しく少ない。糖鎖は中性糖以外にアミノ糖およびシアル酸からなる。スフィンゴ糖脂質は中性糖脂質と酸性糖脂質に大別される。酸性糖脂質は硫酸基を有する硫糖脂質とシアル酸を有するガングリオンドに分類される。糖脂質は主に神経組織に多いが他の臓器を含め動物細胞に普遍的に存在する^{1,2)}。糖脂質は生体膜の構造を維持するのに役立っているだけでなく、病気例えば先天的な酵素欠損による脂質蓄積症では糖脂質が蓄積される事が知られている³⁾。免疫機構に大きくかわり、血液型、菌種などの決定因子として重要である⁴⁾。また細胞の分化、正常細胞の腫瘍細胞への形質転換に関与する。ヒトメラノーマの抗原はGD₃ガングリオンドであり^{5,6)}、またNK細胞のマーカーはアシアロGM₁である^{7,8)}。ことなどが知られ、糖脂質が癌化と深く関連していると考えられている⁹⁾。更にGM₁ガングリオンドはコレラ毒素のリセプターとして働く^{10,11)}ことが知られており、各種細菌毒素¹²⁾、蛋白性ホルモン¹³⁾、ウイルス¹⁴⁾、インターフェロン¹⁵⁾などと強く結合することが証明されている。近年糖脂質の分離、精製技術が急速に発展して、種々の糖脂質の存在が次々と報告される様になり、種々の機能と関連した糖脂質の化学構造が重要になっている。1969年、Samuelsson, Karlssonらにより^{16,17)}同時にグルコセレブロンド(Glc-Cer)、セラミドがガスクロマトグラフィー(GLC)ー電子衝撃法(electron impact; EI)ー質量分析法で測定が試みられて以来、質量分析法は鋭敏かつ迅速な糖脂質の構造解析法として重要な位置を占める様になり、その後装置の改良、高分解能化に伴い、一連の複合糖脂質への応用が試みられた¹⁸⁻²⁴⁾。しかしEI法は試料のイオン化に強いエネルギーを要することが知られている。

糖脂質は一般に沢山の水酸基を持ち、特にシアル酸をもつガングリオシドは熱に対して不安定である。また複合糖脂質になるに従い EI 法では高質量部の分子イオンあるいはフラグメントイオンは殆んど検出不能になり、その有効性は限界があることが証明されている。これに変わるソフトイオン化法として、電界電離法 (Field Desorption; FD), 電界イオン化法 (Field ionization; FI), 更にごく最近になり高速中性原子衝撃法 (Fast Atom Bombardment; FAB) あるいは二次イオン化法 (Secondary Ion Ionization; SII) 等がスフィンゴ糖脂質の構造解析にもちいられる様になった。CI 法はこれらソフトイオン化法では一番早く利用され、1974 年 Markey らにより始めて低級糖脂質の測定に応用された²⁵⁾。彼らは反応ガスとして、メタンを使用しているが、糖脂質の分子イオンは極めて小さく、フラグメントイオンは EI 法を変らずそれ程良い結果は得られていない。彼らによるその後の報告は全くみられない。しかし CI 法は新しいイオン化方式であるので我々の研究室で 1976 年からその特性を生かし、生体中の生理活性物質の微量定量法の開発、脂肪酸、リン脂質など単純脂質および一連のスフィンゴ糖脂質の構造解析に応用した結果、糖脂質の構造解析には従来の EI 法にくらべ特に分子イオンが顕著に検出され、スペクトルの再現性も良く、また、複合糖脂質においても糖鎖の結合様式も非常に明瞭に区別され、脂肪酸やスフィンゴシン塩基の差異による糖脂質の分子種の測定に非常に有効である事が示されたので本論文で報告する。FI あるいは FD 法は CI 法の後、高分子の分子量測定には有用であるとされ糖脂質の測定に試みられているが、試料に不純物があったりするといちじるしく再現性が悪く糖脂質は出にくい試料の 1 つに数えられている。1982 年になり Rinehart が FAB 法をスフィンゴ糖脂質の測定に応用した。この方法は FD, FI 法に変わるもので高分子蛋白質、糖脂質の分子量の測定に有効であることが報告されている²⁶⁾。最近開発された手法でその利用範囲は未知数であるが、近年質量分析計の高分解能化およびデータシステムの改良により、報告される様になった。我々は病気や免疫機構に関与する新しい糖脂質の構造解析にこの方法を応用し、CI 法に劣らず分子量の決定のみならず糖鎖の結合様式についても有効であることが判ったので併せて報告する。

第1編 化学イオン化質量分析計による糖脂質の構造解析

序

Field, Munson ら^{28,29)} により開発された化学イオン化とよばれる新しいイオン化法は、メタン、イソブタン、アンモニアで代表される試薬ガスを高圧で電子衝撃法によりイオン化し、生成された種々の2次イオンによって試料のイオン化を行う方法である。試薬イオンを過剰にすると（通常、試料分子の100～1,000倍）、非常に試料分子のイオン化が促進される。しかもこの場合、イオン化はプロトンの転移、ハイドライドの引き抜き、アルキルイオンの転移などに限られることが多いため、特徴としてマスペクトルが非常に単純なものとなり、 $(M \pm H)^+$ 、即ち擬似分子イオン(Quasi Molecular Ion; QM^+)を多く生成し、分子イオンの開裂はあまり起こらない。したがって、生化学領域の試料にみられる熱に対し不安定な化合物に対しても、正確な分子量を知ることが出来、また開裂があまり起こらないことから、検出感度も一段と高まるので生体中微量成分や薬物の検出および定量へ応用が期待されている^{29,30)}。定量法の応用例は脳内カテコールアミン^{31,32)}、 γ -アミノ酪酸^{34,35)}等で既に報告した。構造解析への応用は、脂肪酸³⁶⁻⁴¹⁾、プロスタグランジン^{42,43)}、リン脂質⁴⁴⁾、および神経疾患の尿中オリゴ糖⁴⁵⁻⁴⁷⁾等で有効であることを報告した。

本論文では更に高分子で複雑な構造をもつ細胞膜に微量に存在する一連のスフィンゴ糖脂質の構造解析へ応用したので報告する⁴⁸⁻⁵²⁾。

第 1 章 ゴーシェ病脾臓グルコセレブロシドのガスクロマトグラフィー化学イオン化質量分析

第 1 節 序

ゴーシェ病は 1882 年 Gaucher により肝脾腫，皮膚色素沈着，巨細胞を主症状とする疾患として最初に報告された常染色体劣性を示す脂質蓄積症である。セレブロシド分解酵素の欠損によってグルコセレブロシド (Glc-Cer または GL_{1a}) が脾臓，肝臓等に蓄積する病気であることが知られている⁵³⁾。成人型ゴーシェ病患者 (25 歳女性) から脾臓を摘出後，総脂質を抽出し，脾臓に蓄積している Glc-Cer を精製し，トリメチルシリル誘導体としてガスクロマトグラフィー (GLC)-化学イオン化 (CI) 質量分析法 (MS) で測定した。従来の電子衝撃法 (EI)-MS と比較検討した結果，Glc-Cer の分子量および脂肪酸の差異による分子種の測定に有効であることが証明された。

第 2 節 実験方法

ゴーシェ病患者の脾臓 880 g から Folch らの方法に従い総脂質を 20 倍量のクロロホルム：メタノール (2：1 および 1：2 容比) で抽出後，容媒を蒸発乾固後残渣をクロロホルム：メタノール (2：1，容比) にとかし 5 分の 1 容の水を加え Folch の分配を行なった⁵⁴⁾。下層に来る粗 Glc-Cer を濃縮折出させた (収量約 29 g)。粗 Glc-Cer をクロロホルム：メタノール (9：1 容比) にとかしフロリジルのカラムにかけ 9：1 および 4：1 (容比) で溶出させ Glc-Cer 純品を得た。Glc-Cer，100 μ g にトリメチルシリル化剤 (ピリジン：ヘキサメチルジシラザン：トリメチルシラン，5：2：1，容比) 100 μ l を加え，60 $^{\circ}$ C，10 分間反応させ，Glc-Cer のトリメチルシリル誘導体 (TMS) を作製した。装置は島津 LKB-9000A 化学イオン化質量分析計 (CI-MS) を使用した。GLC-CI 分析には 1.5 % OV-1 (1m $\times$ 0.3 cm，内径) のガラスカラムを用い，試料を注入後，カラムオープン温度を 290 $^{\circ}$ C から 320 $^{\circ}$ C まで毎分 3 $^{\circ}$ C で昇温した。CI 法の条件は反応ガスとし

でイソブタン，メタン，あるいはアンモニアを使用し，真空圧 0.7 torr の条件下イオン化電圧 500 eV，イオン化電流 500 μ A および加速電圧 3.5 KV で測定した。電子衝撃法 (EI) -MS はイオン化電圧 70 eV およびイオン化電流 60 μ A，および加速電圧 3.5 KV で測定した。

第3節 実験結果

GLC の分析により，ゴーシェ病の Glc-Cer はスフィンゴジン塩基は 1.3 ジヒドロキシ-2-アミノオクタデセン (C18 スフィンゲニン) (約 98%) であった。また脂肪酸は C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0 および C24:1 を主成分とする分子種であった。図 1 に Glc-Cer の TMS 誘導体の GLC による分析結果を示した。図 2 に図 1 の A から F の主成分のイソブタン CI-MS を示した。

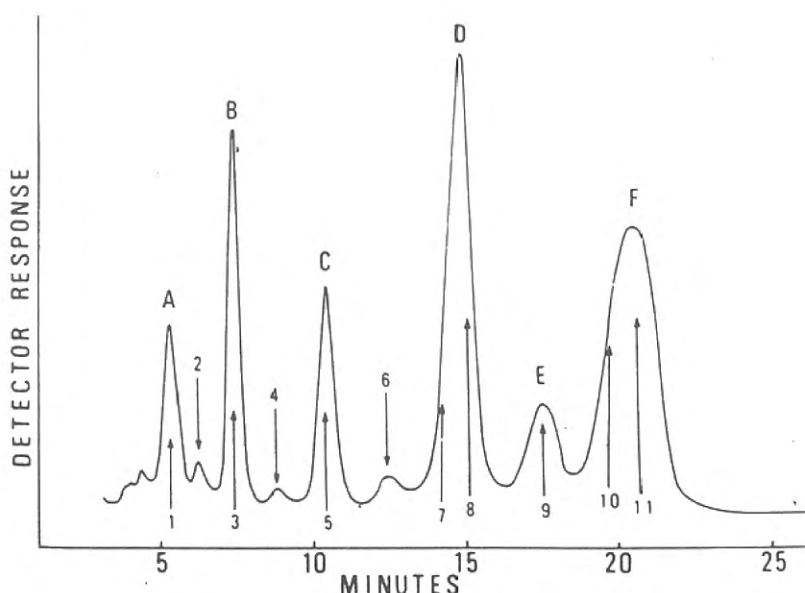


Fig. 1 Gas chromatographic separation of TMS-derivatives of glucocerebrosides from a spleen of Gaucher's disease.

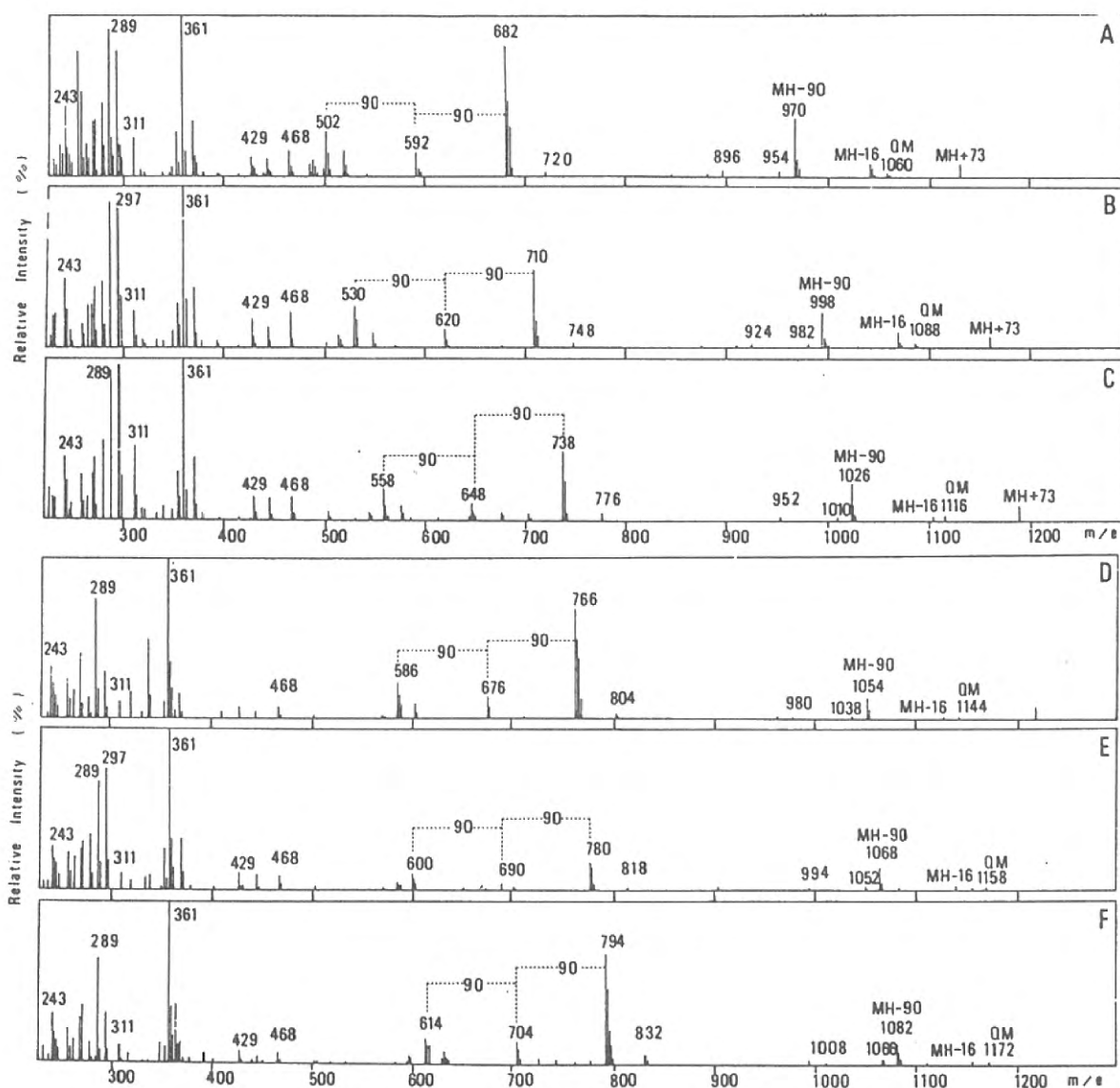


Fig. 2 Isobutane chemical ionization mass spectra of TMS-derivatives of glucocerebrosides.

図3に同じ試料のEI-MSを示した。EI-MSでは m/z 400以上は4倍に拡大しないとピークとして検出されず、10倍に拡大しても分子イオンあるいは分子イオンからトリメチルシラノール (TMSOH; m/z 90) がとれたフラグメントイオンは全く検出されなかった。この結果は既に Samuelsson らにより報告された Glc-Cer の EI-MS の結果とよく一致していた¹⁶⁾。それに対し CI-MS では擬似分子イオン (QM^+ ; $M+1$) およびトリメチルシリル基 (TMS; m/z 73) が付加した $M+73$ 更に QM^+ から TMSOH が脱離されたフラグメントイオン m/z ($MH-90$) が顕著に検出され、セラミドの長短脂肪酸の差異による Glc-Cer の分子量が容易に決定出

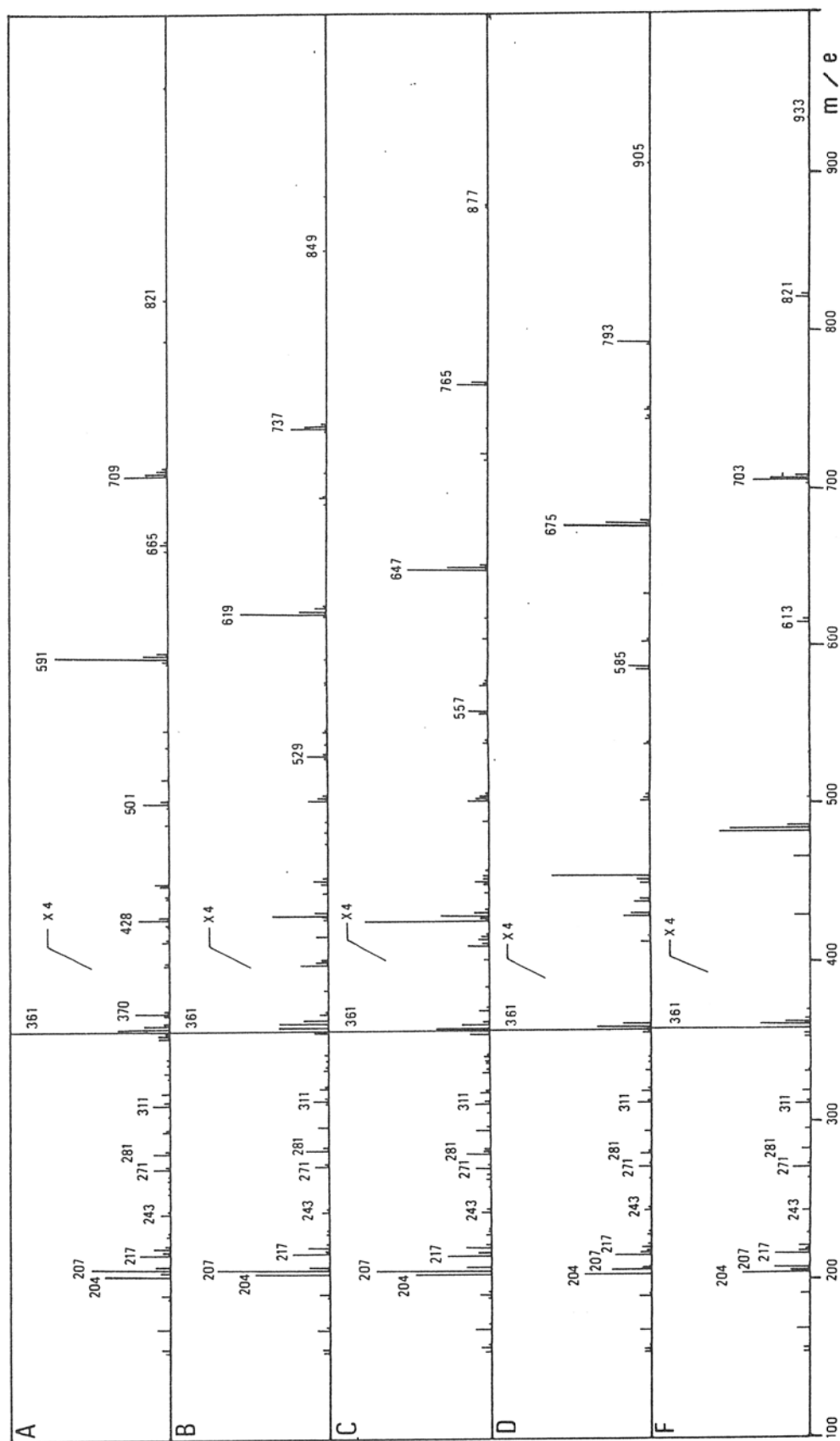


Fig. 3 Electron impact mass spectra of TMS-derivatives of glucocerebrosides.

来た。反応ガスをイソブタン、メタン、アンモニアのいずれを使用しても基本的開裂様式は殆んど同じで、いずれも擬似分子イオンが検出された。図4にGlc-Cerの開裂様式を示した。CI および EI 共にグルコース由来の m/z 361 が基準ピークになっている。 m/z 311 は長鎖スフィンゴシン塩基由来でゴーシェ病 Glc-Cer は C18 スフィンゲニンであると推定される。このことは GLC 分析でも証明された。

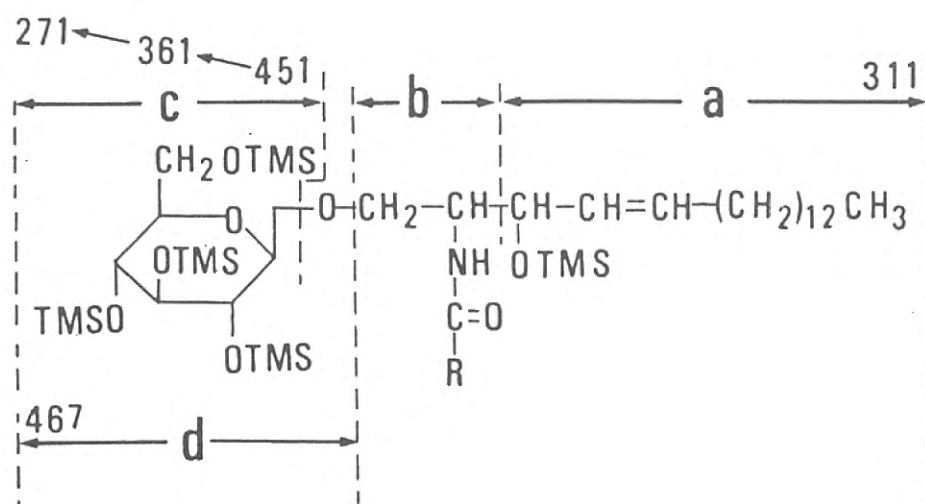


Fig. 4 Fragmentation of glucocerebroside by GLC-CI mass spectrometry.

Glc-Cer の TMS 誘導体の GLC 分析では飽和および不飽和脂肪酸をもつ Glc-Cer は分離されないで同じ保持時間をもつが、CI-MS では両者を明瞭に区別出来た。例えば図1でピーク7は2成分あり CI-MS でそれぞれ分子量 1141 および 1143 であることがわかり、またピーク10は同様に 1169 と 1171 をもつ分子種が存在することがわかった。ここで 1141 および 1169 はそれぞれ不飽和脂肪酸 C22:1 および C24:1 をもつ Glc-Cer の分子種である。1143 および 1171 はそれぞれの飽和脂肪酸をもつ Glc-Cer である。表1に CI-MS で解明されたゴーシェ病 Glc-Cer の主成分の分子種をまとめた。

Table 1 Major fragments of glucocerebroside molecular species
by isobutane GLC-CI mass spectrometry.

No.	Molecular ion	LCB + FA (MH-d+1 = L)			Molecular species LCB/fatty acid *
		(M ⁺ +1)	(MH ⁺ -90)	(MH ⁺ -90-73)	
1 (A)	1060	970	896	502	18:1/16:0
2	1074	984	910	516	18:1/17:0
3 (B)	1088	998	924	530	18:1/18:0
4	1102	1012	938	544	18:1/19:0
5 (C)	1116	1026	952	558	18:1/20:0
6	1130	1040	966	572	18:1/21:0
7	1142	1052	978	584	18:1/22:1
8 (D)	1144	1054	980	586	18:1/22:0
9 (E)	1158	1068	994	600	18:1/23:0
10	1170	1080	1006	612	18:1/24:1
11 (F)	1172	1082	1008	614	18:1/24:0

* LCB, long chain base (sphingosine base).

m/z (M-467)(L) およびトリメチルシラノールの脱離に由来するピーク m/z (M-467-90; L-90) は CI-MS で顕著に検出された。これらのピークは EI-MS でも検出されたが CI-MS では更に L+90 に相当するフラグメントイオンが検出された。この様な付加イオンが検出されるのも CI-MS の特徴であり、これらフラグメントイオンの存在により情報量が多くなり、糖脂質の構造解析を容易に行うことが出来た。

第 4 節 考 察

Rauvala により神経組織以外の臓器由来のスフィンゴ糖脂質は脂肪酸は一般的に長短飽和および不飽和脂肪酸あるいは α -オキシ脂肪酸を有し、長鎖スフィンゴシン塩基は C18 スフィンゲニンの分子種であることが指摘されている⁵⁵⁾。Samuelsson らが、はじめてこの様な複雑な構造をもつ糖脂質の分子種の測定に GLC-EI-MS を応用し、成功を収めて以来質量分析法が糖脂質の微量構造解析に広くもちいられるようになった¹⁶⁾。しかしここに示した様に Glc-Cer の GLC-EI-MS では、高質量部のフラグメントイオンは m/z 400 以上を 4 倍に拡大してはじめて観察され、分子イオンは全く観察されなかった。これは EI 法はイオン化に強いエネルギーを用いるためと推定される。またセラミド部分の開裂も起り、それ由来のフラグメントイオンも生成し、複雑なスペクトルを与えた。一方 Markey らがはじめて CI-MS で同様の糖脂質を測定しているが、高質量部のフラグメントイオン、分子イオンは極めて小さく、全体的に EI と類似したマスパターンを示し、CI-MS の有効性を立証するまでにはいたっていなかった²⁵⁾。今回得られた結果は従来の EI 法に比べ CI 法の特性が顕著に生かされ、解裂様式は単純であり、Glc-Cer 分子種の疑似分子イオンも強く検出され、分子量の決定が容易に出来ただけでなく、フラグメントイオンも強く表われ複雑な脂肪酸構成をもつ Glc-Cer 分子種の構造解析に極めて有効であることが認められた。また GLC 分析では飽和および不飽和脂肪酸を含む Glc-Cer の分子種の分析はこのままでは全く分析不可能であったが CI-MS により両者を分離測定することが出来、微量で未知構造の糖脂質の直接定性分析に応用が可能であることが推定される。

第2章 グルコセレブロシドおよびガラクトセレブロシドの直接導入系—化学イオン化質量分析⁴⁹⁾

第1節 序

糖脂質は生体膜の微量構成成分で一般に糖鎖は単糖あるいはオリゴ糖である。糖鎖が2つ以上になると、どのような誘導体としても沸点は著しく高くなり、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GLC-MS) で測定可能なものは限られる。そこで前回報告したゴーシェ病脾臓グルコセレブロシド (Glc-Cer) とウシ脳から精製したガラクトセレブロシド (Gal-Cer) について、それぞれのトリメチルシリル誘導体 (TMS) を作製し、GLC を介さず直接導入系から CI-MS の測定を試みた。ウシ脳 Gal-Cer は通常 of 長短飽和および不飽和脂肪酸以外に α -オキシ脂肪酸を含むことを特徴としている。これらセレブロシドの分子種の直接定性および定量に CI-MS が有効であったので報告する。

第2節 実験方法

ゴーシェ病脾臓からの Glc-Cer の精製方法は前回報告した。Gal-Cer はウシ脳総脂質の約 30% を示める主要中性糖脂質である。ウシ脳, 100g から 20 倍量のクロロホルム: メタノール (2:1 および 1:1 容比) で総脂質を抽出後, 抽出液を直接安藤らの方法⁵⁶⁾ に従いイオン交換樹脂 (DEAE-Sephadex A-25; アセテート型) のカラムにかけ, 酸性脂質即ちガングリオシドおよびサルファチドを吸着させ, 素通り of 中性糖脂質画分を濃縮し, 析出した粗 Gal-Cer をイヤトロビーズのカラムにかけクロロホルム: メタノール (95:5 および 80:20, 容比) で溶出させ, Gal-Cer の純品を得た。

CI-MS の測定条件は前回とほぼ同様である。反応ガスとしてはイソブタンを使用し, 試料を TMS 化して, ガスクロマトグラフィーを介さず直接導入系から測定した。

一方 Glc-Cer および Gal-Cer を 3% 塩酸メタノールで 75℃, 10 時間メタ

ノリシス後，溶媒を窒素で蒸発乾固し，残渣を少量のクロロホルムに溶かし，薄層クロマトグラフィーにのせ，ヘキサン：エーテル：酢酸（90：10：1，容比）で展開し，メタノリシスにより生成された通常の長短飽和および不飽和脂肪酸と α -オキシ脂肪酸メチルエステルを分離精製し，後者についてはTMS誘導体としてGLCで，それぞれの脂肪酸組成を調べた。使用した装置は島津ガスクロマトグラフGC5A型を用い，カラムは10%EGSS-X（1.5m×0.3cm，内径）を用い，180℃で測定した。

第3節 実験結果

図1にゴーシェ病脾臓Glc-Cerの直接導入系からのイソブタンCI-MSの結果を示した。4つの顕著なイオン群即ち m/z 1128から1244， m/z 956から1082， m/z 668から794，更に m/z 578から704が高質量部に検出された。これらのイオン群は長短飽和および不飽和脂肪酸の種類によるGlc-Cerの分子種を示し，それぞれ構造解析に有効であった。即ち m/z 1128から1244にわたるイオン群はGlc-Cer分子とTMS化剤とのイオン分子反応により生成された疑似分子イオン $(M+73)^+$ であると推定された。 m/z 956から1082のイオン群は

層
 で展
 -オ
 1LC
 を
 た。

 結果
 ら
 した。
 子種
 をる
 似
 羊は

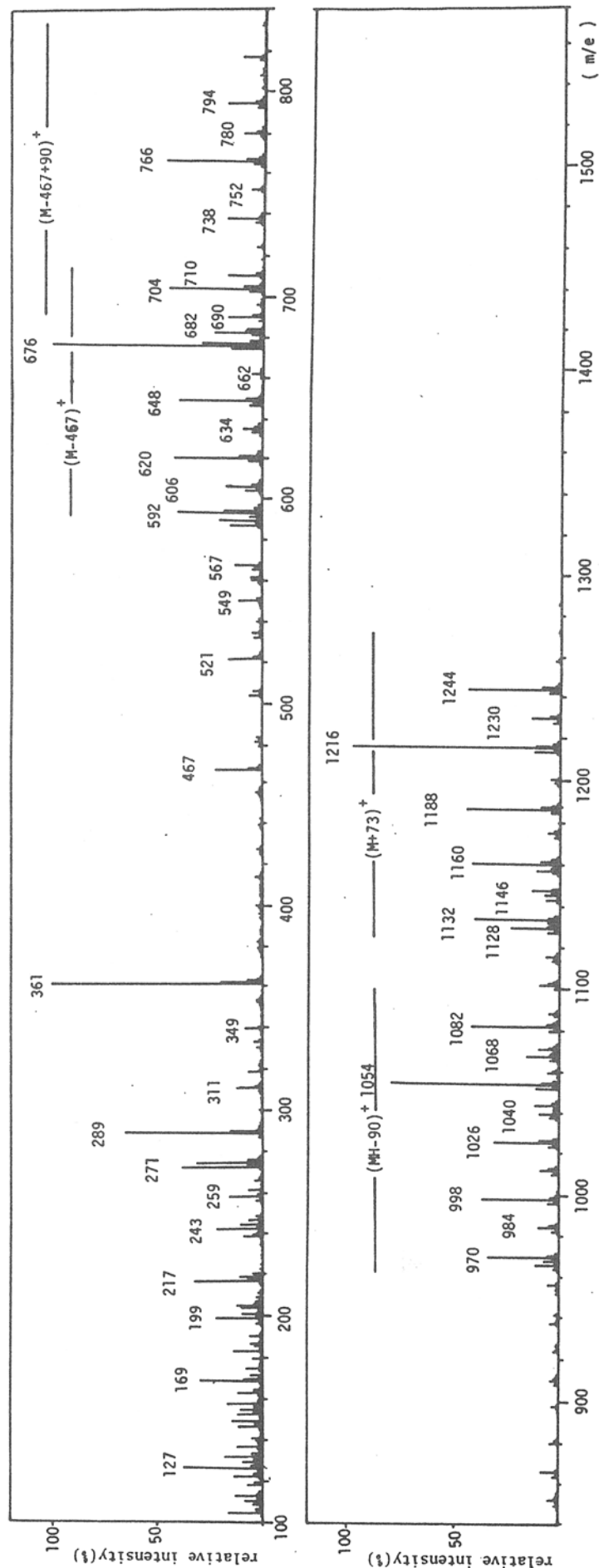


Fig.1 Chemical ionization mass spectra of glucocerebrosides from the spleen of a patient with Gaucher's disease. The fragment ions greater than m/z 500 were enlarged five times.

擬似分子イオン ($M+1$)⁺ からトリメチルシラノール (TMSOH; 90) がとれたものである。 ($M+1$)⁺ に相当するイオン群は検出されず, TMS 誘導体ではこのイオンは非常に不安定であろうと推定された。 m/z 578 から 704 にわたるイオン群は図 2 に示す様にグルコース糖鎖由来のイオン m/z 467 がとれて生成されたものであり, m/z 668 から 794 にわたるイオン群は CI のイオン源内でセラミドと TMS 化剤とのイオン分子反応で生成された再生イオン群であると推定される。これらイオン群は長短脂肪酸 C16:0 から C24:0 をもつ Glc-Cer の分子種に由来するものと推定された。グルコース糖鎖由来のフラグメントイオンは m/z 467, 361 および 271 に検出された (図 2)。

m/z 311 は長鎖スフィンゴシン塩基由来で C18 スフィンゲニンと推定される。長短不飽和脂肪酸をもつ Glc-Cer の分子種は飽和脂肪酸をもつものに比べ 2 マスだけ低く観察された。

図 3 にウシ脳由来 Gal-Cer の CI-MS の結果を示した。

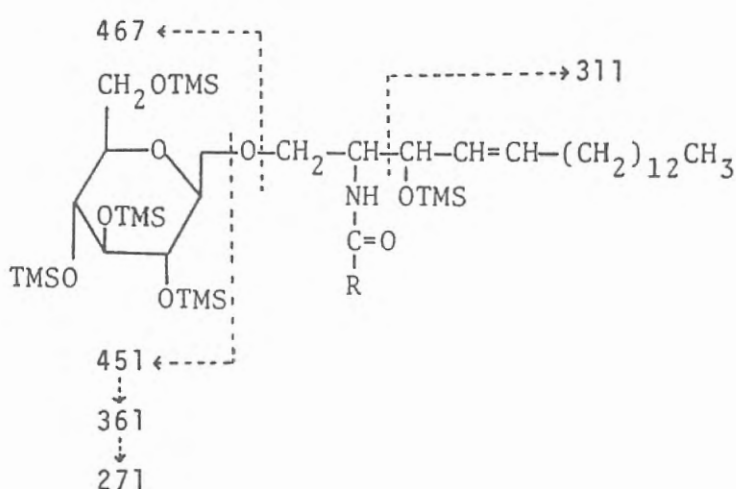


Fig. 2 Simplified formula showing the fragmentation of glucocerebroside

たものイオン群ものと。こるも271

CH₃

le
osides

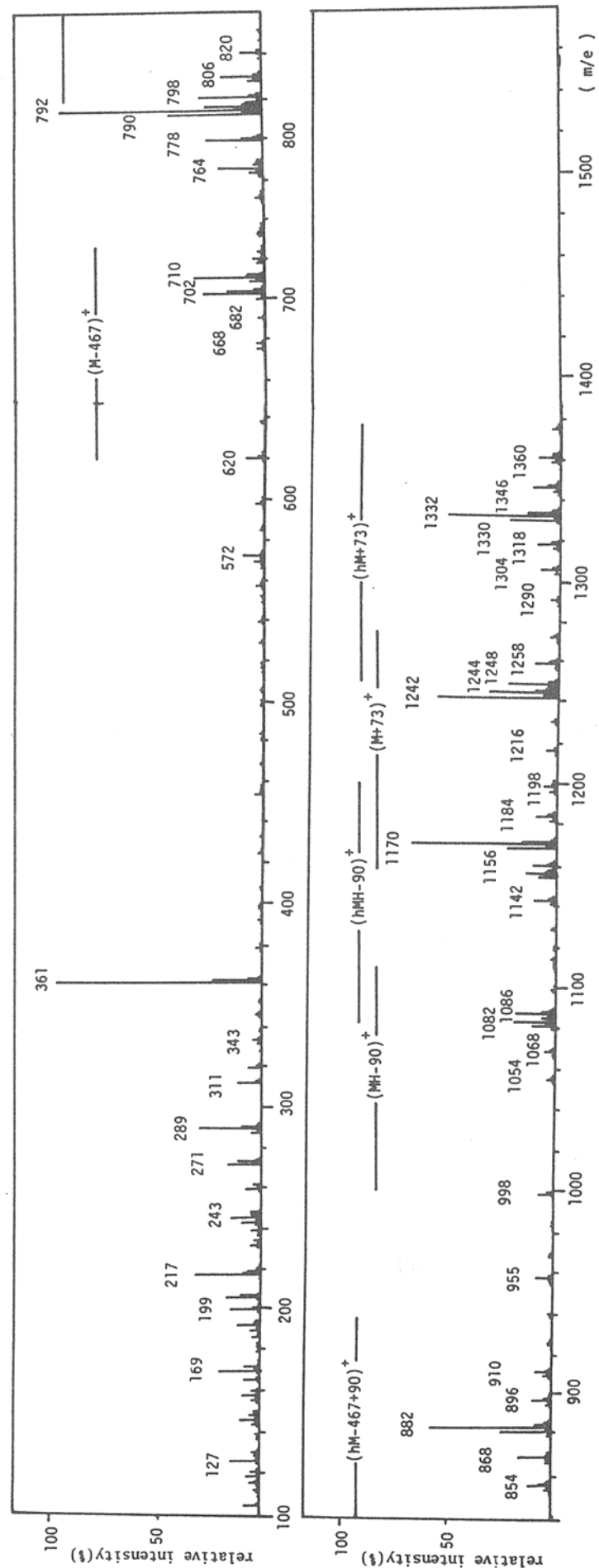


Fig. 3 Chemical ionization mass spectra of galactocerebroside from the white matter of bovine brain. The fragment ions greater than m/z 500 were enlarged five times.

Gal-Cer は通常の長短飽和および不飽和脂肪酸以外に α -オキシ脂肪酸を含むことを特徴とすることは述べた。従って両者に由来する Gal-Cer の分子種に相当するイオン群が検出され、さらに複雑になることが予想される。Gal-Cer の TMS 誘導体では擬似分子イオンで比較すると α -オキシ脂肪酸を含む Gal-Cer は OH 基が TMS 化され丁度 88 マスユニット高くシフトされ検出されたので、両者を明瞭に区別出来た。例えば m/z 1160 から 1286 は通常の長短飽和および不飽和脂肪酸をもつ Gal-Cer の m/z $(M+73)^+$ に相当するイオン群であり、 α -オキシ脂肪酸をもつものは m/z 1248 から 1374 $(hM+73)^+$ に検出された。フラグメントイオンも同様 α -オキシ脂肪酸をもつものでは 88 マスユニット高く観察された。 α -オキシ脂肪酸をもつ Gal-Cer のガラクトース糖鎖の脱離による $(hM-467)^+$ に相当するイオン群は通常の脂肪酸をもつ Gal-Cer の再生イオン群 $(M-467+90)^+$ と、更にトリメチルシラノールの脱離により生成される $(MH-90)^+$ と $(hMH-90)^+$ のイオン群はそれぞれ若干ピークが重複するが、 $(M-467)^+$ と $(hM-467+90)^+$ のイオン群は明瞭に区別され両者の分離定性更にこれらのイオン強度を測ることにより定量できた。長短不飽和脂肪酸をもつ Gal-Cer の分子種は両者とも 2 マスユニット低く観察された。図 4 にゴーシェ病患者の脾臓から得た Glc-Cer の GLC による分析結果を示した。それぞれのピークは長短脂肪酸の差異による Gal-Cer の分子種に相当し、ガスクロマトグラフのパターンは図 1 に示した CI MS のパターンと良く類似していた。例えば $(M+73)^+$ に相当する m/z 1132,

1160, 1188, 1216, 1230
および 1244 は GLC のピー

ク 1, 3, 5, 7, 8 および
9 に相当し、これは脂肪酸
C16:0, C18:0, C20:0,

C22:0, C23:0 および C24:0 をもつ GLC-Cer と推定された。図 4 で Glc-Cer の TMS 誘導体の GLC では長短飽和および不飽和脂肪酸をもつ Glc-Cer は分離されていない。このことは既に前回報告した⁴⁸⁾。しかしながら CI

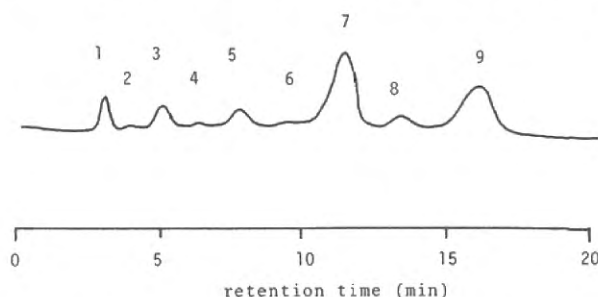


Fig. 4. Gas chromatogram of the trimethylsilyl derivatives of glucocerebrosides from the spleen of a patient with Gaucher's disease. Peaks: 1, C₁₆; 2, C₁₇; 3, C₁₈; 4, C₁₉; 5, C₂₀; 6, C₂₁; 7, C₂₂; 8, C₂₃; 9, C₂₄. The glucocerebrosides with monounsaturated fatty acids cannot be isolated from those with saturated fatty acids as a separated peak by GLC.

MS では長短不飽和脂肪酸をもつものは 2 マスユニット低く検出されるので両者を明瞭に区別可能であった。ガスクロマトグラフをもちいないで、直接定性分析が可能であるのは CI の特性と考えられる。長短脂肪酸の分子種によるイオンの出方は $(MH-90)^+$, $(M-467)^+$ および再生イオン $(M-467+90)^+$ のイオン群においても同様であった。

表 1 に Glc-Cer をメタノリシスして、脂肪酸メチルエステルを GLC で間接的に分析した結果と直接 CI-MS を用いて、フラグメントイオン群 m/z $(M-467)^+$ で定量した結果を比較検討した。ゴーシェ病脾臓の Glc-Cer は C22:0 をもつものが主成分で更に C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0 が多いことが両方の方法で確認され、両者でそれぞれの比は非常によく類似していることが証明された。同様の解析をウシ脳由来の Gal-Cer で行なった。図 5 に Gal-Cer の TMS 誘導体の

Table 1 Molecular species of glucocerebrosides from the spleen of Gaucher's disease

Fatty acid	Mass Spectrometry ^a	GLC ^b
C16:0	10.5	12.2
C16:1	1.8	1.4
C17:0	1.1	0.6
C18:0	10.5	11.7
C19:0	0.2	—
C20:0	11.1	8.3
C20:1	1.8	0.6
C22:0	30.5	28.7
C22:1	4.7	1.7
C23:0	5.3	5.1
C23:1	1.4	1.0
C24:0	13.5	18.0
C24:1	4.0	8.2
C25:0	2.3	2.0

^aValues of the DI-CI mass spectrometry are expressed as peak intensity percent of total glucocerebrosides. Values of the DI-CI mass spectrometry were calculated from the ion groups at m/z $(M-467)^+$.

^bGLC values are expressed as weight percent of total fatty acids from glucocerebrosides.

GLC分析の結果を示した。Glc-Cerに比べGal-Cerは α -オキシ脂肪酸をもつものも含まれ、それぞれまた長鎖飽和および不飽和脂肪酸を有するものがありさらに複雑である。GLC分析ではこれら分子種をもつGal-Cerは全く分離されず、同一の保持時間を有する。図5でピーク1,2,3,4,5,6,7,8および9は長鎖飽和および不飽和脂肪酸C18, C19,

C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26

をもつGal-Cer分子種であると推定された。これら分子種を完全に分離するには脂肪酸の分析を行なわねばならない。CI-MSでは直接これら分子種をもつGal-Cer

を直接定量することが出来た。即ち通常の飽和および不飽和脂肪酸をもつGal-Cerは $m/z (M-467)^+$

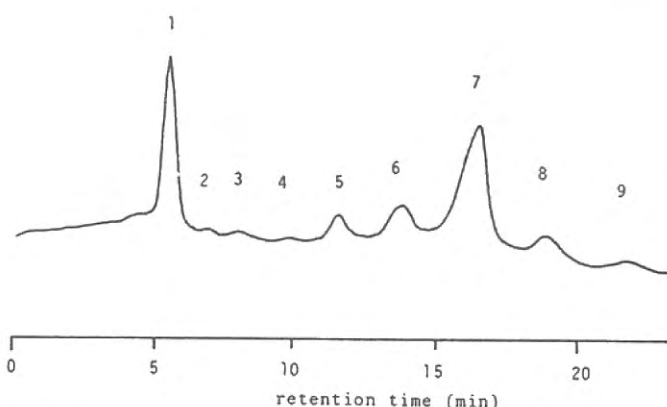


Fig. 5. Gas chromatogram of the trimethylsilyl derivatives of galactocerebrosides from the white matter of bovine brain. Peaks: 1, C₁₈; 2, C₁₉; 3, C₂₀; 4, C₂₁; 5, C₂₂; 6, C₂₃; 7, C₂₄; 8, C₂₅; 9, C₂₆. The galactocerebrosides with nonhydroxy, hydroxy, mono-unsaturated, and saturated fatty acids have the same GLC retention times.

Table 2 Molecular species of galactocerebrosides from the white matter of bovine brain

Fatty acid	Mass Spectrometry ^a		GLC ^b	
	Normal	Hydroxy	Normal	Hydroxy
C18:0	11.0	12.1	12.9	17.8
C18:1	3.6	3.9	1.0	0.1
C21:0	0.7	1.0	—	—
C22:0	8.5	5.9	9.4	11.2
C22:1	5.0	1.8	1.8	1.8
C23:0	3.6	7.3	8.0	9.0
C23:1	—	—	—	2.4
C24:0	23.4	35.3	23.7	39.6
C24:1	34.0	15.2	37.4	13.4
C25:0	6.0	5.8	4.0	4.0
C25:1	2.0	3.0	0.6	0.9
C26:0	2.2	4.5	0.6	0.9
C26:1	—	1.5	—	—

^aValues of the DI-CI mass spectrometry are expressed as peak intensity percent of total galactocerebrosides. Values of the DI-CI mass spectrometry were calculated from the ion groups at $m/z (M-467)^+$ for galactocerebrosides with non-hydroxy fatty acids and $m/z (hM-467+90)^+$ for galactocerebrosides with hydroxy fatty acids.

^bValues of gas chromatography were expressed as weight percent of total fatty acids from galactocerebrosides.

で α -オキシ脂肪酸をもつものは m/z ($hM-467+90$)⁺ で直接同時分析が可能であった。

表2にCI-MSでの直接定量した結果とGLCで脂肪酸を分析した結果を示した。Gal-Cerにおいても2つの方法で非常に良く一致した結果が得られ、CI-MSで直接、Gal-Cerが脂肪酸C24をもつものが主成分であると推定出来、GLC分析にくらべより多くの情報が得られた。

第4節 考 察

セレブロシドのGLCで測定できなかった長短飽和およびモノ不飽和脂肪酸を含む分子量がCI-MSでは2マスユニットの差で測定が直接出来、組成比がもとめられた。更に通常の脂肪酸と α -オキシ脂肪酸をもつGal-Cerは、従来の方法では、塩酸メタノールで加水分解後得られた脂肪酸メチルエステルとして両者を分離後 α -オキシ脂肪酸はTMS誘導体として別々にGLC分析してもとめていたが、直接導入系によるCI-MSではそのままTMS誘導体として88マスユニットの差で直接分離定量が出来るなど分析時間は著しく短縮されることが期待される。しかも疑似分子イオン、トリメチルシラノールの脱離したフラグメントイオンや糖鎖由来のピークはGLC-CI-MSにくらべ強く検出され、より簡便かつ迅速な分子量の測定が可能であり、生体中の低級糖脂質の構造解析定量分析など応用範囲が広がると推定される。

また従来は通常の長短脂肪酸と α -オキシ脂肪酸の割合はGLC分析あるいは比色定量などにより間接的にもとめていたが、両者の比も直接CI-MSで測定でき、質量分析法の利点であろう。

CI-MSの再現性はEI-MSにくらべ劣るとされていたが、疑似分子イオンおよびフラグメントイオン共に長短脂肪酸によるピークは、それぞれイオン強度は変わらず微量直接定量分析にも応用が可能であることが示された。

第3章 複合糖脂質の化学イオン化質量分析

第1節 序

前報でイソブタン-化学イオン化質量分析(CI-MS)で長短飽和および不飽和脂肪酸のみならず α -オキシ脂肪酸をもつセレブロシド分子種の構造解析および直接定量にトリメチルシリル(TMS)誘導体の有効性を報告した⁴⁹⁾。しかし生体膜のスフィンゴ糖脂質には、オリゴ糖が付いた複合糖脂質が多数存在する。これらの化合物ではTMS誘導体として測定すると分子量が多くなりすぎ、高質量部での感度が著しく低下することが推定された。完全メチル誘導体はそれ程分子量は大きくなりすぎず、TMS誘導体とくらべて揮発性もそれ程変わらず、複合糖脂質の分析には適していると推定される。ウシ脳由来がガラクトセレブロシド(Gal-Cer または GL_{1b})およびブタあるいはヒツジ由来の赤血球膜複合糖脂質について、一部薄層クロマトグラフィーを用いて、通常の長短脂肪酸をもつ糖脂質と α -オキシ脂肪酸をもつ糖脂質とにそれぞれ分離精製後、完全メチル誘導体として、反応ガスとしてアンモニアを用い、直接導入系からCI-MSで測定した結果、複合糖脂質の構造解析にも応用出来ることを示した。

第2節 実験方法

ゴーシェ病脾臓 Glc-Cer (GL_{1a}) から武富⁵⁷⁾の方法に従い、サイコシン(グルコシルスフィンゴシン)を得、Sharom⁵⁸⁾の方法に従い、当モル量のパルミチン酸をサイコシンのピリジン溶液に加え、同じく当モル量のジシクロヘキシルカルボジミドを加え、室温で24時間反応させ、粗パルミトイル GL_{1a} を合成した。粗パルミトイル GL_{1a} をケイ酸カラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム:メタノール(9:1, 容比)で溶出し、パルミトイル GL_{1a} を精製した(収率は25%)。ウシ脳 Gal-Cer (GL_{1b}) の精製方法は前報で報告した。ラクトシルセラミド(GL_{2a})、ガラクトシルラクトシルセラミド(GL₃)およびグロボシド(GL₄)はブタ赤血球膜から、更にホルスマン糖脂質(GL₅)はヒツジ赤血球膜から、宮武

ら⁵⁹⁾の方法に従い、赤血球膜ゴーストから20倍容のクロロホルム：メタノール（2：1，1：1容比）で総脂質を抽出し、弱アルカリ水解をして過剰のリン脂質を除去し、ケイ酸およびフロリジルカラムクロマトグラフィーにかけ、それぞれの純品を得た。得られた中性糖脂質はシリカゲル薄層クロマトグラフィーでは、2つのバンドに分かれる。これは脂肪酸の種類特に通常の長短飽和および不飽和脂肪酸をもつものと同じく長短飽和および不飽和 α -オキシ脂肪酸をもつものに由来すると推定されている。それぞれの糖脂質を薄層クロマトグラフィーにより、クロロホルム：メタノール：水（65：25：4，容比）で展開して、それぞれの上下のバンドをかきとり、再度、ケイ酸カラムにかけ、クロロホルム：メタノール混液95：5から35：65に段階的に量比を変えて、それぞれ精製した。得られた糖脂質純品を箱守らの方法に従い、ジメチルスルホキサイドにとかし、メチルカルバニオンとヨウ化メチルで糖脂質の完全メチル誘導体を作製した⁶⁰⁾。糖脂質の完全メチル誘導体はこのままでは副産物など不純物を多く含むので測定に少なからず影響をおよぼすので、薄層クロマトグラフィーでクロロホルム：メタノール（9：1，容比）で展開し、各々精製した。質量分析計の測定条件は前報とほぼ同様である⁴⁹⁾。加速電圧は1.75KVで測定した。試料50~100 μ gを直接導入系からイオン源に入れ、イオン源の温度を100℃から400℃まで、毎分50℃の割合で昇温し、マスパターンを連続的に測定した。反応ガスとしてはアンモニアを用いた。マスマークはパーフルオロケラセンおよびイソペンタデカフルオロヘプチル-S-トリアジン（MW 1185）で補正した。

第3節 実験結果

図1に精製した糖脂質純品の薄層クロマトグラフィーの結果を示した。いずれも単一のバンドであった。GL_{1b}, GL_{2a}, およびGL₃の2つのバンドはこれら糖脂質の長短脂肪酸および α -オキシ脂肪酸をもつ分子種であると推定された。図2に合成したパルミトイルGlc-Cer (GL_{1a})のCI-MSを示した。擬似分子イオン(M+H)⁺はm/z 784に、またアンモニア分子が分子イオンに付加したと推定される(M+18)⁺がm/z 801に検出されたが、これらイオンは著しく小さかった。しかし(M+H)⁺

からメタノール分子が順次脱離された m/z 752 ($MH-32$)⁺ および M/Z 720 ($MH-32 \times 2$)⁺ が検出された。前者は基準ピークになった。この基準ピークからグルコール分子; m/z 219 がとれたセラミドに相当するイオン m/z 533 も非常に強く検出された。 m/z 253 は長鎖スフィンゴシン塩基由来でC18スフィンゲニンであることがわかった。グルコース糖鎖は m/z 219 および187 ($219-32$; $219-CH_3OH$)⁺ に検出された。

図3にウシ脳から精製したGal-Cer (GL_{1b}) の通常の長短脂肪酸を有するGL_{1b} と α -オキシ脂肪酸を有するGL_{1b} のCI-MSの結果を示した。図3Aでは2つの顕著なイオン群, 即ち m/z 752 から906 および m/z 533 から687 にわたるイオン群が検出された。前者は($MH-32$; $MH-CH_3OH$)⁺ に相当するイオン群で,

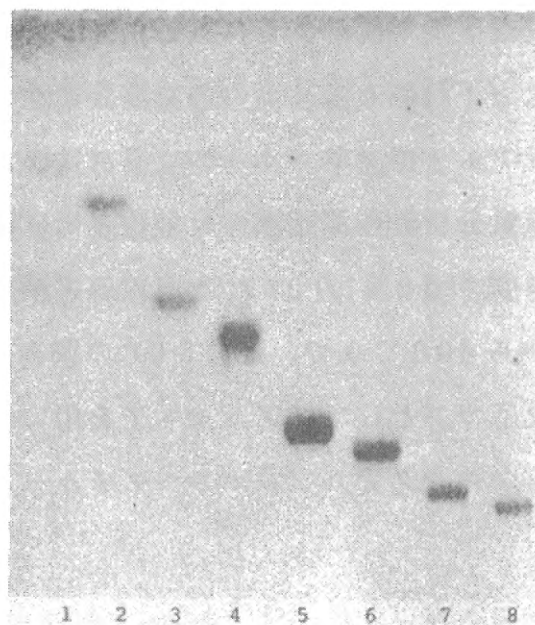


Fig. 1 Thin-layer chromatogram of isolated glycosphingolipids. Lane 1, GL_{1b} with nonhydroxy fatty acid; 2, GL_{1b} with hydroxy fatty acid; 3, GL_{2a} with nonhydroxy fatty acids; 4, GL_{2a} with hydroxy fatty acid; 5, GL₃ with nonhydroxy fatty acid; 6, GL₃ with enriched with hydroxy fatty acid; 7, GL₄; 8, GL₅. GL_{1b} was obtained from bovine brain white matter. GL_{2a}, GL₃ and GL₄ were obtained from hog erythrocyte membranes. GL₅ was obtained from sheep erythrocyte membranes. The plate was developed with a solvent system of chloroform:methanol:water 65:25:4 (by volume). Glycosphingolipids were visualized by anthrone sulfuric acid reagent.

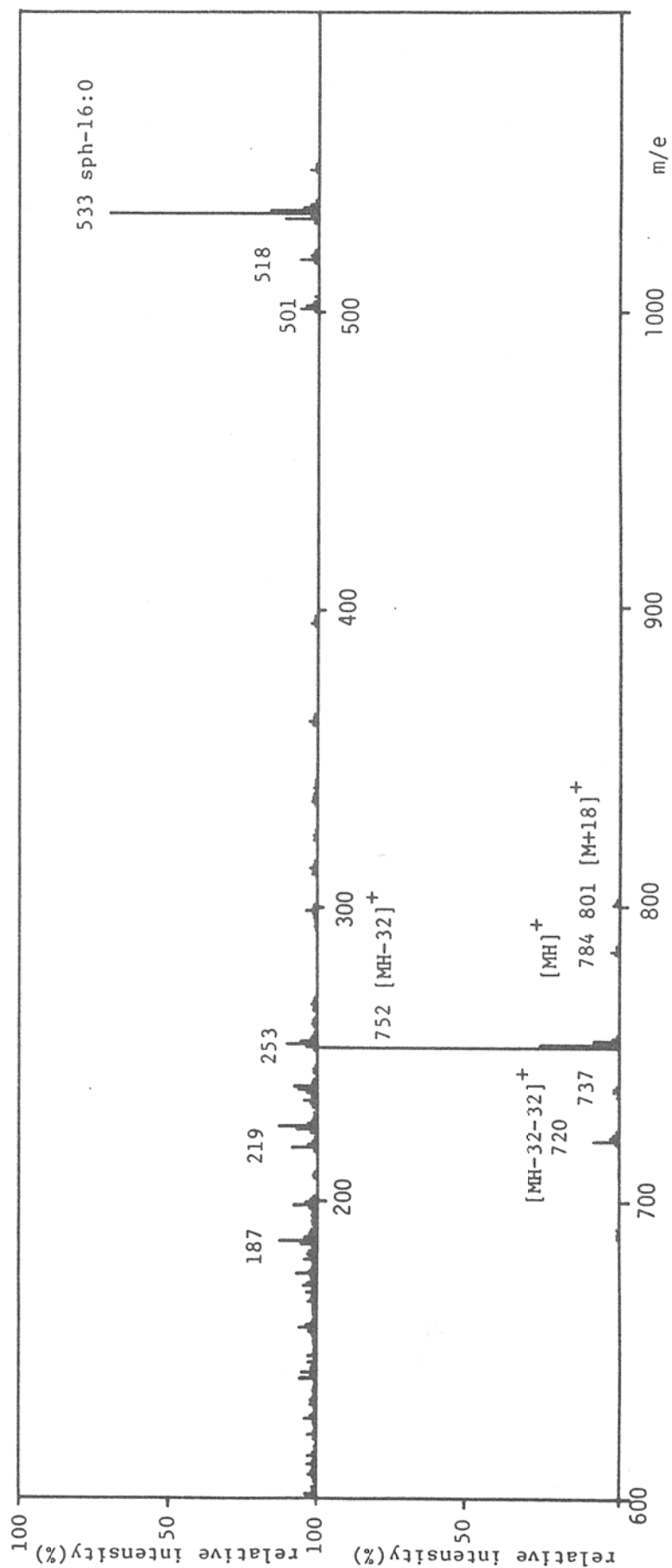


Fig. 2 Chemical ionization mass spectra of synthetic palmitoyl GL1a.

後者はセラミドの分子種に相当する。これらのイオン群は脂肪酸 C16: 0 から C27: 0 に相当する GL_{1b} の分子種であると推定された。同じように 図 3 B のオキシ脂肪酸をもつ、図 1 で薄層クロマトグラフィーで下のバンド GL_{1b} は図 3 A にくらべい
 いずれも 30 マスユニット高くシフトして観察された。即ち脱メタノールされた
 m/z 810 から 936 にわたるイオン群 (hMH-32)⁺ と m/z 563 から 717 にわ
 たるセラミドのイオン群になり、これらはそれぞれ α -オキシ脂肪酸 C18: 0 から
 C27: 0 をもつ GL_{1b} の分子種であると推定された。ウシ脳の GL_{1b} は両者とも 脂肪
 酸 C24: 0 および C24: 1 をもつ分子種が高い割合を占めていた。 m/z 500 以下の
 低質量部ではガラクトース由来のピーク m/z 219, 187 が、またスフィンゴシン由来
 のピーク m/z 253 が観察された。

100
 50
 [A]
 Intensity (%)

643 sph-24:1

645 sph-24:0

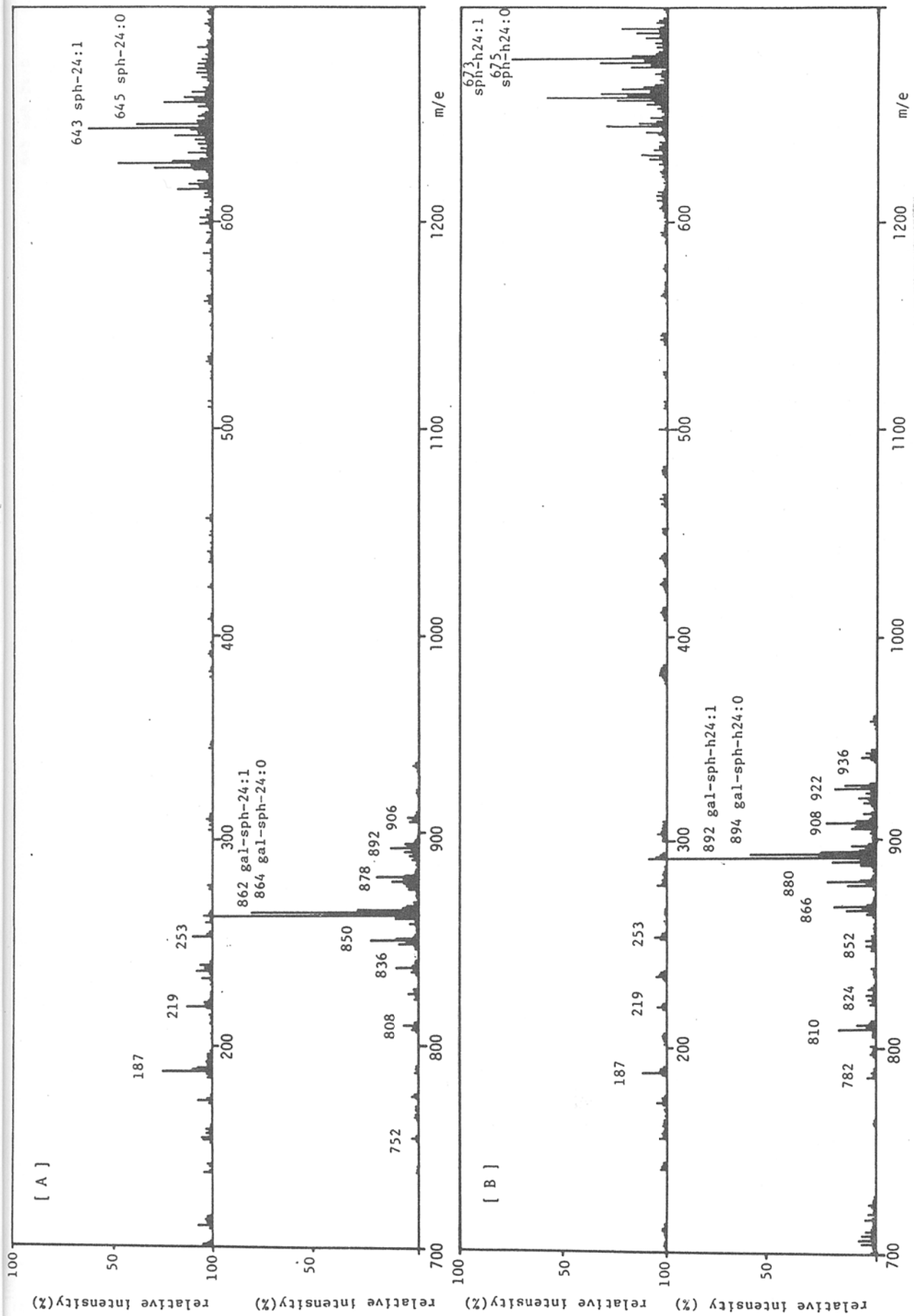


Fig. 3 Chemical ionization mass spectra of GL1b from bovine brain white matter. (A), GL1b with nonhydroxy fatty acid; (B), GL1b with hydroxy fatty acid.

図4にブタ赤血球由来Lac-Cer (GL_{2a})の薄層クロマトグラフィーの上下のバンドのCI-MSを示した。両者ともに、3つのイオン群に分けられ、それぞれ両者の差は30マスユニット、 α -オキシ脂肪酸をもつ下のバンドのGL_{2a}で高質量部にシフトしていた。脂肪酸はC18:0からC26:0にわたり、両者ともにC24:1, C24:0をもつGL_{2a}が主成分であった。他にC22:0, C23:0およびC26:0をもつGL_{2a}の分子種があることがわかった。

図5は同様に、Gb₃-Cer 即ちGL₃の薄層クロマトグラフィーの上下のバンドのCI-MSを示したが、4つのイオン群に分けられた。両者ではやはり30マスユニット、後者で高質量部にシフトされたマスパターンが得られ、下のバンドは α -オキシ脂肪酸を主成分とするGL₃と推定された。しかしながら薄層クロマトグラフィーでは単一なバンドであったが、通常 of 長短飽和および不飽和脂肪酸をもつGL₃も検出され、以前として混合物であると推定された。両者ともにGL_{2a}と同様C24:0, C24:1を主成分とするGL₃であることが証明された。

図6および図7にブタ赤血球膜グロボシド (GL₄) およびホルスマン抗原糖脂質 (GL₅) のCI-MSを示した。

のバ
両者
量部
1,
の
ユニ
オキ
ー
も検
,
質

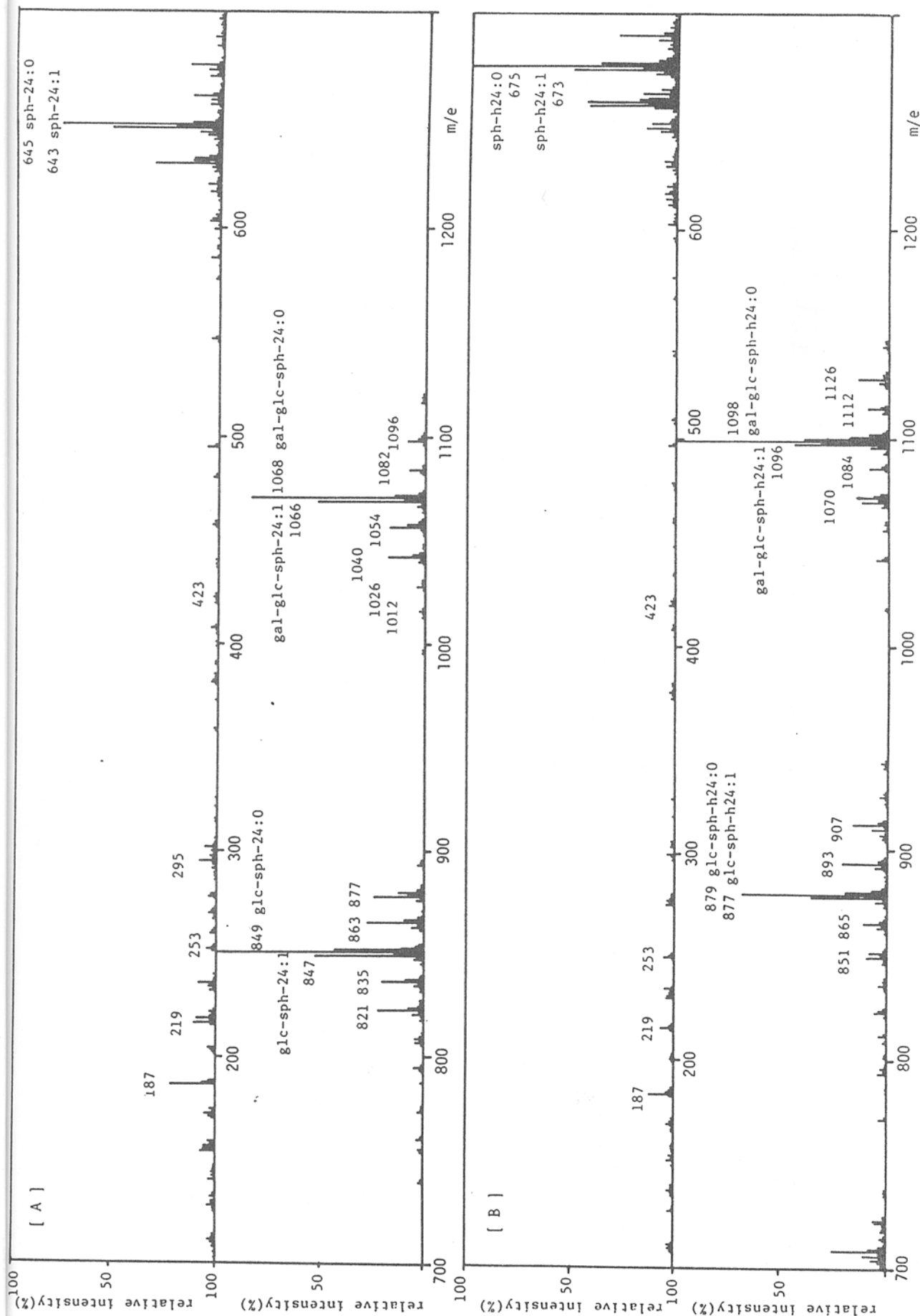
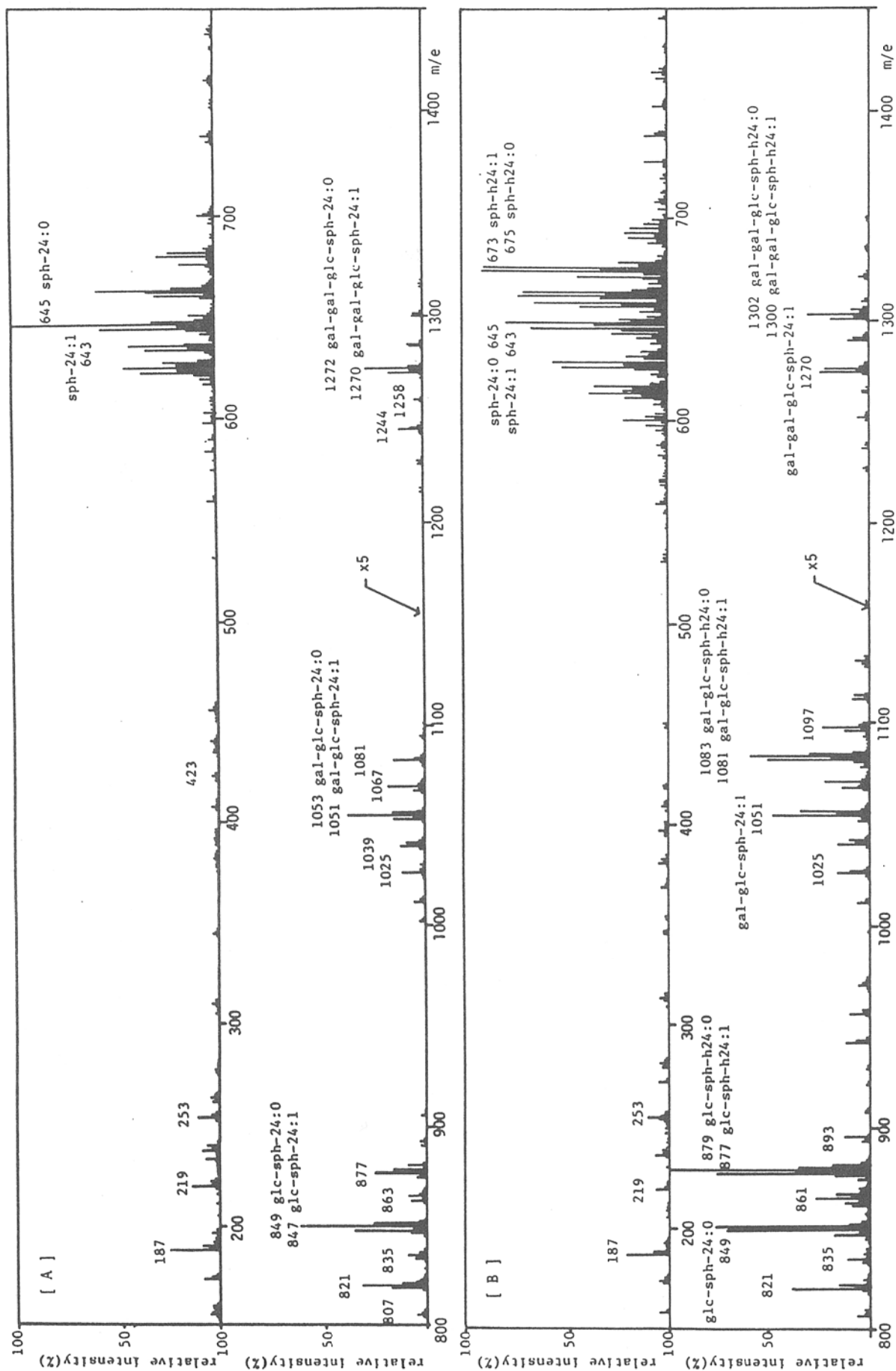


Fig. 4 Chemical ionization mass spectra of GL2a from hog erythrocyte membranes. (A), GL2a with nonhydroxy fatty acid; (B), GL2a with hydroxy fatty acid.



D



D

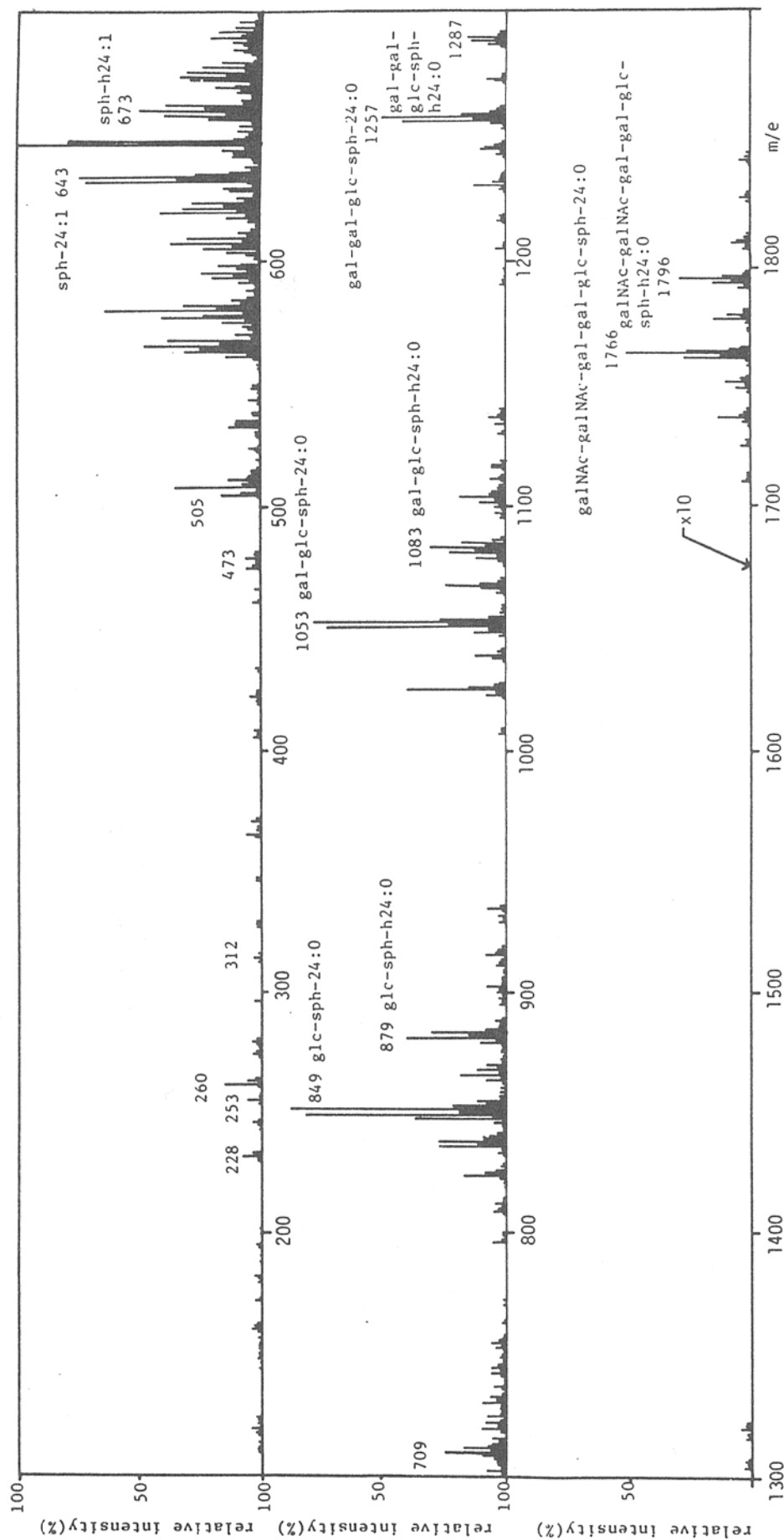


Fig. 7 Chemical ionization mass spectra of GL5 from sheep erythrocyte membranes.

これをも共に通では倍に成分トサずれ式を

第4 生 キシ う。 本論 ノー の分 ントの方のとと炭

これら糖脂質は薄層クロマトグラフィーで分離精製しなかったため、通常の脂肪酸をもつものと α -オキシ脂肪酸をもつものと区別されていない。GL₄ および GL₅ 共に5つのイオン群が検出された。両者共、脱メタノールに起因するイオン群、即ち通常の脂肪酸をもつものでは $(MH-32)^+$ あるいは α -オキシ脂肪酸をもつものでは $(MH-32)^+$ あるいは α -オキシ脂肪酸をもつものでは $(hMH-32)^+$ が10倍に拡大して明瞭に検出され、いずれの場合も、やはり脂肪酸 C24:0, C24:1 を主成分とする複合糖脂質であった。GL₅ では特徴として、末端のN-アセチルガラクトサミンどうしの結合が他のグリコシド結合にくらべて著しく強い様で、1分子はズれたイオン群は検出されなかった。図8にGL₅ の構造とCI-MS による解裂様式を示した。

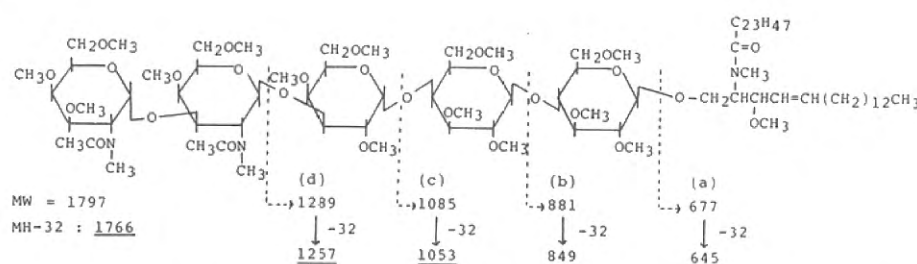


Fig. 8 Principal fragmentation of GL₅ with C24:0.

第4節 考察

生体膜の中性糖脂質は複雑で多くの分子種からなることは述べた。従って α -オキシ酸の存在を考慮して理想的にはトリメチルシリル誘導体(TMS)が良いであろう。反面分析には分子量が大きくなり、複合糖脂質になるにしがたい問題となろう。本論文では完全メチル誘導体はTMS誘導体にくらべ分子イオンは小さいが脱メタノールされたイオン群 $(MH-32$ または $hMH-32)^+$ が明瞭に検出され、複合糖脂質の分子量が決定出来、糖鎖が末端から順番にとれて、セラミド骨格をもつフラグメントイオン群が特徴的に生成され糖鎖構造解析が容易であることが証明された。この方法の欠点は完全メチル誘導体では通常の長短飽和および不飽和脂肪酸をもつものと α -オキシ脂肪酸をもつものとの差は30マスユニットになり、一緒に分析すると若干複雑であることが推定される。自然界の糖脂質は偶数脂肪酸が多く、従って炭素数による脂肪酸相互の差異は丁度28マスユニットで原理的には通常の長短

飽和脂肪酸とオキシ脂肪酸の長短モノ飽和脂肪酸をもつものとは同一の質量数になるはずで重なって測定される。幸にして多くの糖脂質はモノ不飽和脂肪酸をもつものはC24:1を除いて少ない。GL₄あるいはGL₅で直接CI-MSで測定した結果C24をもつものは一般に大きな比率を示すが互に分離されて観察されるので、複合糖脂質においても、本法は直接定性分析が可能であると推定された。もちろん正確に糖脂質の分子種を分析するには本論文で示した様にあらかじめシリカゲル薄層クロマトグラフィーを併用して、分子種を分離してCI-MSで個別測定すれば可能であることが証明された。Karlsson¹⁹もホウ酸を塗布したシリカゲルカラムを用いて、あらかじめ糖脂質の分子種を分離後個別定性分析を行っており、²⁰複雑な分子種の測定にはこれらの併用は良い方法であろうと推定される。

第4章 GM₁ ガングリオシドの化学イオン化質量分析⁵¹⁾

第1節 序

1971年VanHeynigenらがシアル酸をもつ糖脂質即ちガングリオシドがコレラ毒素を不活性化することを報告した¹⁰⁾。その後、この不活性化は毒素とGM₁ ガングリオシドが結合したことにより起ることを見出し、ガングリオシドの種々のリセプターとしての機能が注目される様になった¹¹⁾。ガングリオシドはシアル酸を持っているため、非常に熱に対して不安定で、中性糖脂質にくらべ、従来のEI法では分析しにくい化合物に属する様である。Karlssonらが1973年、GM₁ ガングリオシドを高分解能電子衝撃法(EI)で報告している。彼らはGM₁ ガングリオシドを完全メチル誘導体として測定を試みたが、分子イオンは全く検出されず、 m/z 1000以上の高質量部はフラグメントイオンは出現していなかった。これはシアル酸がカルボキシル基を持っていると推定して、水酸化リチウムアルミニウムでカルボキシル基を還元して糖アルコールにかえ、トリメチルシリル(TMS)誘導体として高質量部のフラグメントイオンと分子イオンを検出している^{61,62)}。化学イオン化(CI)法は、イオン分子反応にもとづいているので、ガングリオシドの様な化合物に対しても、EI法で測定できなかった完全メチル誘導体で、分子イオン、有効な高質量部のフラグメントイオンを顕著に測定できたので報告する。

第2節 実験方法

ウシ脳からクロロホルム：メタノール溶液で総脂質を抽出し、抽出液をDEAE-セファデックスA-25(アセテート型)のカラムにかけ、中性糖脂質画分を除去後、0.2M 酸ナトリウムのメタノール溶液を流し、GM₁ ガングリオシドを含む酸性糖脂質画分を得た⁵⁶⁾。酸性画分は、水に対して透析脱塩後、桃井らの方法に従い、イヤトロビーズのカラムにかけ、クロロホルム：メタノール：水(65:35:2と45:55:4, 容比)で連続的に溶出させ、GM₁ ガングリオシド純品を得た⁶³⁾。GM₁ ガングリオシドの完全メチル誘導体の作製は安藤らの方法⁶⁴⁾に従った。即ち、

GM₁ガングリオシド, 50 μ g, をジメチルスルホキサイド 50 μ l にとかし, それぞれ 100 μ l のジメチルホルムアミドおよびナトリウムヒドライド (mg/ml ジメチルホルムアミド溶液) を加え, 30 分間水中に放置後, ヨーカメチル 150 μ l を加え 30 分間水中に放置した。この操作を 2 度繰り返し, メチル化を完了した。クロロホルム 3 ml と水 3 ml を加え, GM₁ 完全メチル誘導体をクロロホルム層に回収した。一部を水酸化リチウムアルミニウム (LiAlH₄) のエーテル溶液で, 3 時間室温で処理し, シアル酸のカルボキシル基を還元し, 糖アルコールとし還元型の GM₁ガングリオシド誘導体を作製した。この方法で同時にスフィンゴシン塩基の酸アミドも還元される²⁴⁾。両者をシリカゲル薄層クロマトグラフィーをもちいて, クロロホルム: メタノール: n-ヘキサン (4: 1: 2, 容比) で展開して, 精製した。また還元型 GM₁ガングリオシドは一部シリル化剤を加え, 還元型 GM₁ガングリオシドの TMS 誘導体を作製した。質量分析計の測定条件は前報⁵⁰⁾と同様に行なった。反応ガスとしてはアンモニアを用いた。マスマーカの補正にトリパーフルオロノール-S-トリアジン (MW: 1485) およびウルトラマーカ (MW: 1621) を使用した。

第 3 節 実験結果

中枢神経由来の GM₁ガングリオシドは長鎖スフィンゴシン塩基は C18 および C20 スフィンゲニンからなりその比は約 1: 1 で, 他の塩基は 5% 以下である。また脂肪酸は大部ステアリン酸 (90% 以上) である⁶⁴⁻⁶⁶⁾。従って長鎖スフィンゴシン塩基の差異による主として 2 つの分子種によるフラグメントイオンが検出されることが予想された。

図 1 に GM₁ガングリオシドの完全メチル誘導体の CI-MS のパターンを示した。EI 法では全く不可能であった, 分子イオンが顕著に検出出来た。GM₁ガングリオシドの場合, m/z (MH-32; MH-CH₃OH)⁺ に相当するイオンが m/z 1794 および 1822 に, また中性糖脂質では検出しにくかった m/z (M+H)⁺ も m/z 1826 と 1854 に検出された。特徴として GM₁オリゴ糖鎖のシアル酸がまずはずれて, セラミド骨格を保持したままの形で, 1 個 1 個末端の糖鎖からはずれた。これらフラグ

れぞ
メチ
加え
ロロ
た。
時間
の
の酸
、ク
製し
リオ
った。
ノニ
を使

C20
脂肪
基の
が予

。
、リオ
4 お
6と
、セラ
、ラグ

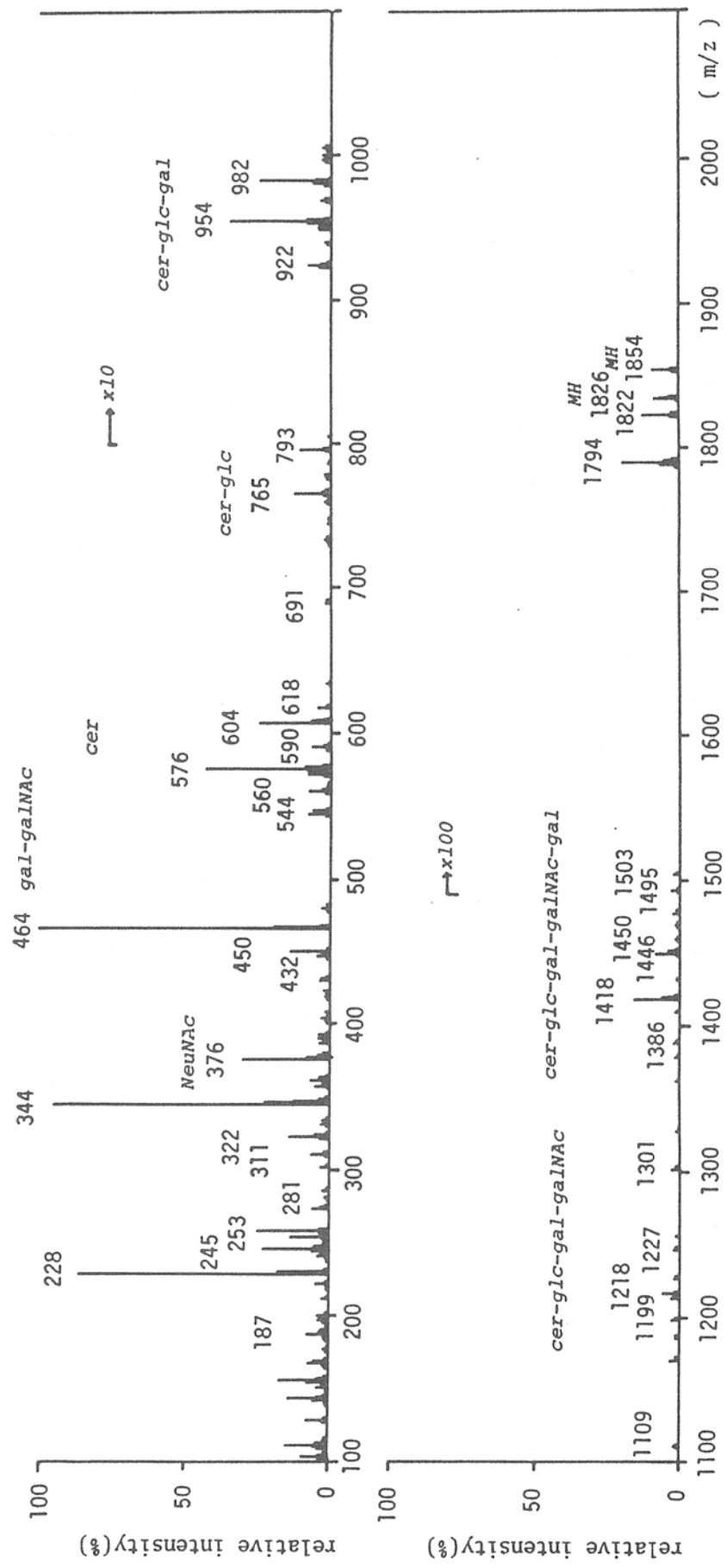


Fig. 1 Chemical ionization mass spectrum of the completely methylated GM₁ ganglioside.

メントイオンはスフィンゴシン塩基の差異を反映して、主として2本強く観察された。 m/z 576と604, m/z 765と793, m/z 954と982および m/z 1199と1227はそれぞれ, セラミド, グルコシルセラミド, ラクトシルセラミド, ガングリオ-N-トリオシルセラミドおよびガングリオ-N-テトラオシルセラミドと推定された。また糖鎖由来のフラグメントイオンも観察され, m/z 464は末端の2糖(ガラクトース-N-アセチルガラクトサミン分子)と推定される。シアル酸は m/z 376および344($376-32$; $376-\text{CH}_3\text{OH}$)⁺に強く検出された。図2

にC20スフィンゲニンおよびステアリン酸をもつGM₁ガングリオシドの構造と開裂様式を示した。図3に還元型GM₁ガングリオシドのメチ

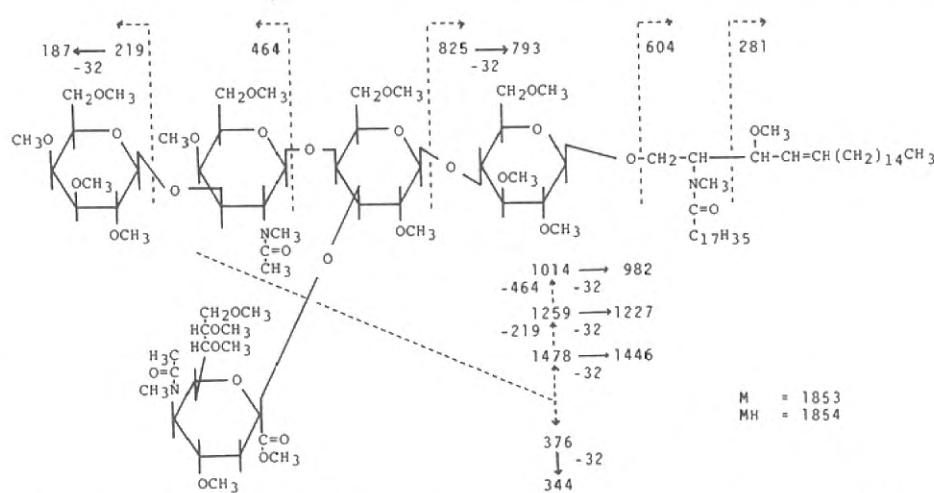


Fig. 2 Fragmentation diagram of the completely methylated GM₁ ganglioside with C20 sphingosine.

ル誘導体のCI

-MSを示した。予想に反して還元型GM₁ガングリオシドのCI-MSでは完全メチル誘導体にくらべ, 分子イオン($M+H$)⁺; m/z 1756と1784はいくらか小さく, また($MH-32$)⁺に相当するイオンは殆んど検出されなかった。一方脱シアル酸されたアシアロGM₁に相当する m/z 1422および1450は強く検出された。完全メチル誘導体にくらべ, セラミド骨格を有するフラグメントイオン以外に末端の糖鎖由来の解裂によるフラグメントイオンも検出された。即ち m/z 450, 640および844は2糖, 3糖および4糖(ガングリオ-N-テトラオース)と推定された。シアル酸を含む5糖に相当するフラグメントイオン m/z 1177, 1193および1207が検出され, 完全メチル誘導にくらべ, スペクトルは若干複雑であった。シアル酸由来のピークは還元され m/z 334にまた末端のガラクトース・N-アセチルガラクトサミン由来のピークは m/z 450に検出された。図4にC20スフィンゲニンおよびステアリン酸もつ還元型GM₁ガングリオシドの開裂機構を示した。図5にKarlsson

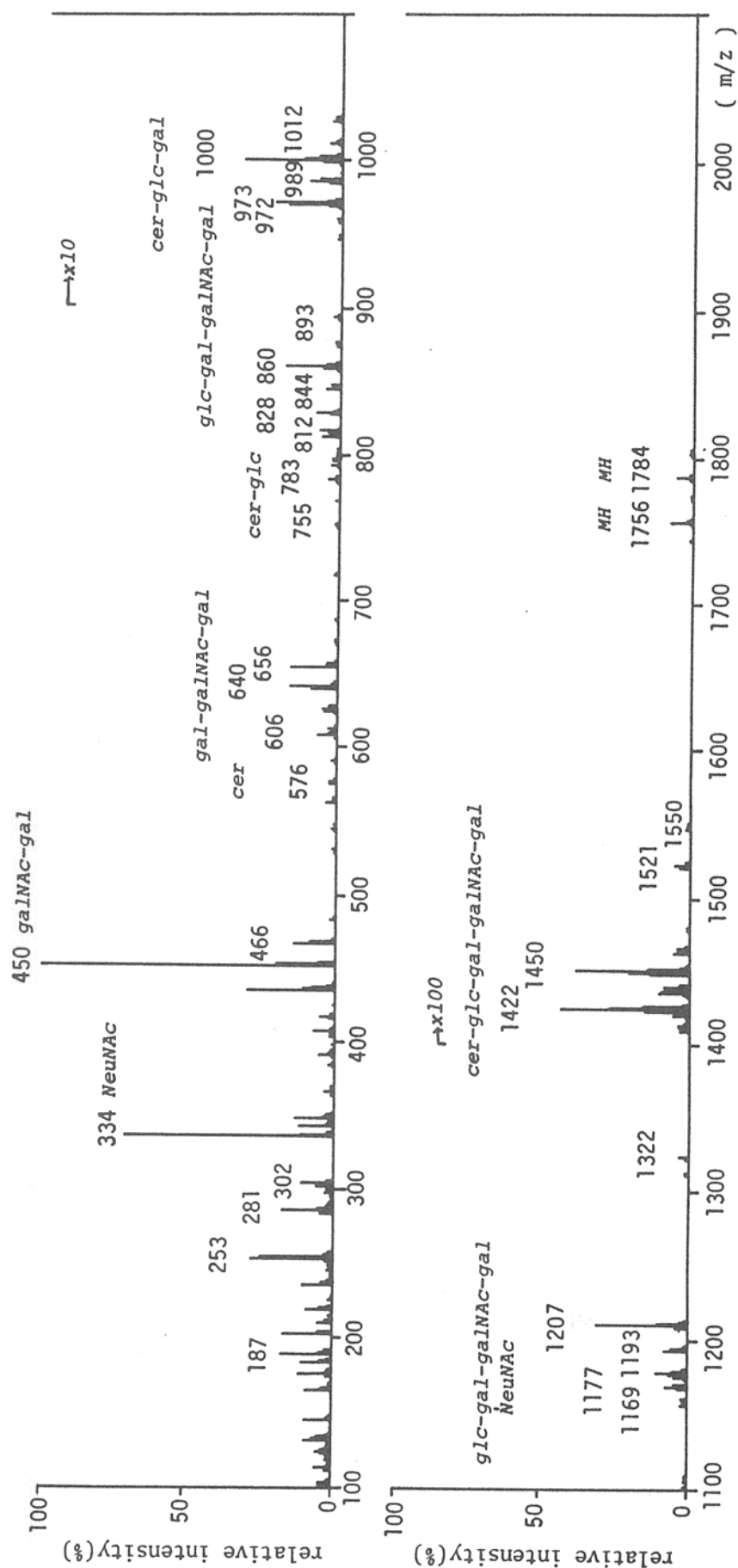


Fig. 3 Chemical ionization mass spectrum of the methylated and reduced GM₁ ganglioside.

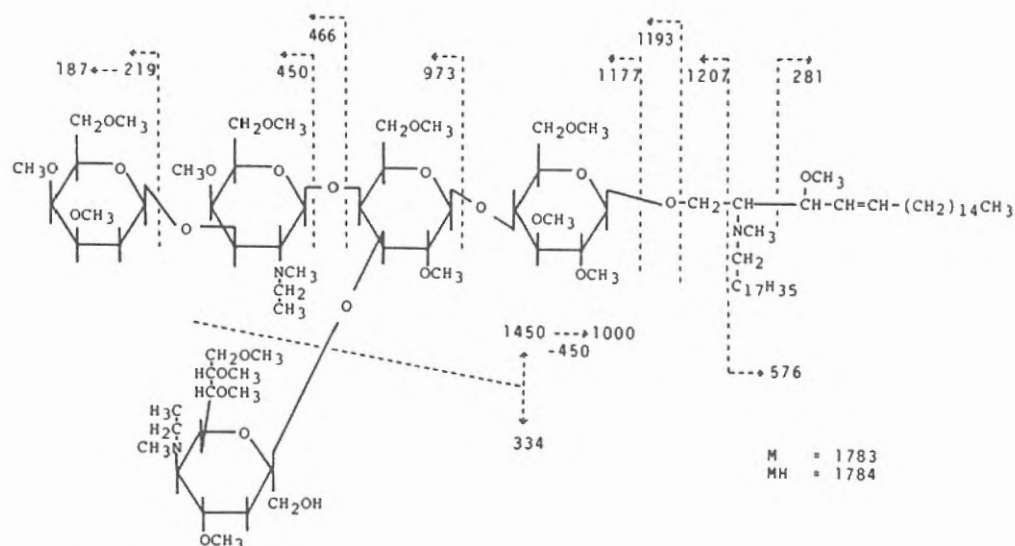


Fig. 4 Fragmentation diagram of the methylated and reduced GM₁ ganglioside with C₂₀ sphingosine.

らが高分解能EI-MSで測定した方法に従い、メチル化後GM₁ガングリオシドのシアル酸をLiAlH₄で還元し、糖アルコールとしTMS誘導体としてCI-MSで測定した結果を示した。この操作で脂肪酸の酸アミド結合も還元さる。CI-MSの結果はKarls-sonらの結果と非常に良く似ていて、末端のオリゴ糖鎖由来の解裂によるフラグメントイオンが強く検出され⁶²⁾、反面セラミド骨格を有するフラグメントイオンは殆んど検出されなかった。擬似分子イオン(M+H)⁺; m/z 1828と1856 および(M+73)⁺; m/z 1900と1928が特徴的に検出された。シアル酸をもつ糖鎖はm/z 1045, 1061, 1249および1265に検出された。2糖, 3糖および4糖に相当するイオンはm/z 450, 640および844にそれぞれ検出された。シアル酸はTMS誘導体となりm/z 406に検出された。図6にC₂₀スフィンゲニンおよびステアリン酸をもつ還元型GM₁ガングリオシドのトリメチルシリル誘導体の解裂様式を示した。高質量部で観察されるm/z 1574はGM₁のオリゴ糖鎖に脂肪酸;ステアリン酸がついたフラグメントイオンと推定され、EI-MSにおいても特徴的に検出されている⁶²⁾。

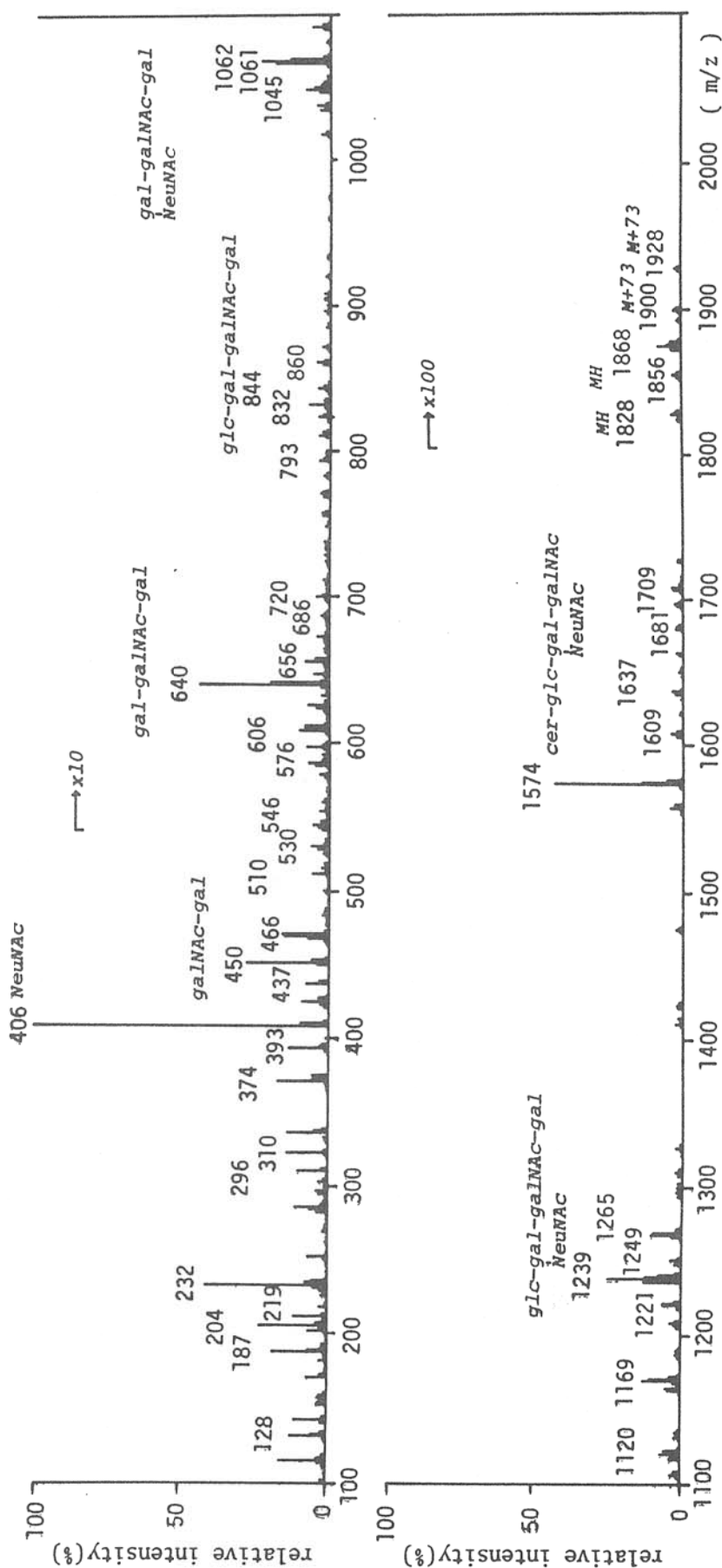


Fig. 5 Chemical ionization mass spectrum of the methylated, reduced, and trimethylsilylated GM₁ ganglioside.

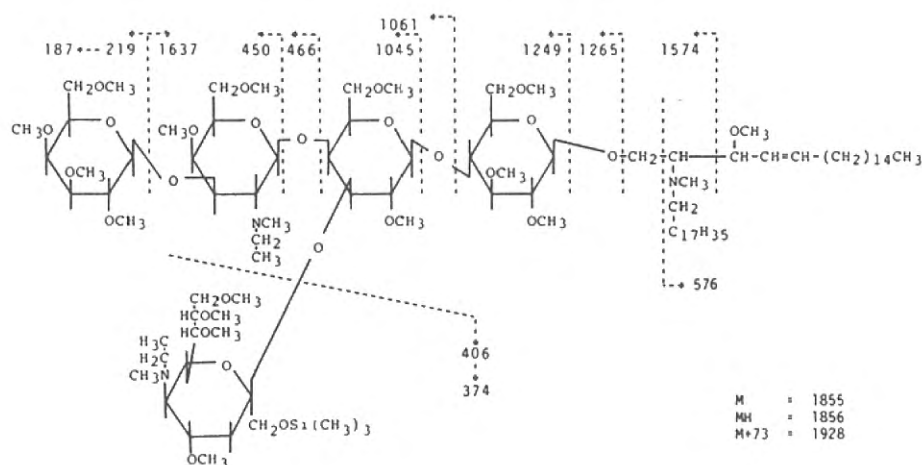


Fig. 6 Fragmentation diagram of the methylated, reduced, and trimethylsilylated GM₁ ganglioside with C20 sphingosine.

第4章 考 察

Karlsson らの報告では GM₁ ガングリオシドの完全メチル誘導体，還元型共に分子イオンは高分解能の EI-MS を使用したにもかかわらずフラグメントイオンも m/z 1000 以上は著しく小さく判別することは不可能であった。また還元型の GM₁ ガングリオシドの TMS 誘導体では分子イオンが検出されているが著しく小さい⁶²⁾。我々が使用している CI-MS は低分解で最大質量数 m/z 2000 までしか測定出来ないが，CI 法では，この様に熱に対し不安定なガングリオシドも容易に分子量の測定が出来るのは利点であろう。本論文では GM₁ ガングリオシドの完全メチル誘導体，還元型および還元後 TMS 誘導体で測定したがいずれの場合も分子イオンは顕著に観察され，分子量の決定にはそれぞれ差異は認められなかった。しかし3つの誘導体で著しくフラグメントイオンの生成が異なり，完全メチル誘導体では従来の中性糖脂質に見られる様なセラミド骨格を有する形で糖鎖がとれている。還元型ではセラミドを含む糖鎖構造を保持するイオンと末端糖鎖がはずれて解裂した，2糖や3糖が見られた。シアル酸のカルボキシル基を還元後糖アルコールにして TMS 誘導体とした場合は全くセラミド骨格を完全に有するものは検出されず，末端の糖鎖由来のイオンが優位であった。TMS 誘導体の CI-MS は非常に EI-MS と類似した多くフラグメントイオンを与え，解裂様式は3者の中では非常に複雑であ

った。3者の誘導体では完全メチル体が一番優れている様であった。また、3者の誘導体で著しく開裂様式が異なるのは興味深い。いろいろ誘導体の種類で使い分けが出来るのはCI-MSの特徴であろう。

こ分
も
の
小
さ
か測
こ分
メチ
イオ
かし
では
、還
した、
て
末端
と
であ

第5章 ガングリオシドの化学イオン化質量分析⁵²⁾

第1節 序

ガングリオシドのシアル酸は主としてN-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) と N-グリコルノイラミン酸 (NeuGc) がある。NeuGc は NeuAc が水酸化され生成されるが、ヒトおよびニワトリはこの酵素はなく、NeuGc をもつガングリオシドは存在しないといわれている。最近 NeuGc をもつ、ガングリオシドのいくつかは Hangantziu-Deicher (HD) 抗原となりうることから、ヒトの癌細胞にその存在が報告され、NeuGc をもつガングリオシドの構造が注目されている⁶⁷⁾。我々は種々の生体膜から NeuGc をもつガングリオシドを精製し、それらの構造を調べた⁶⁸⁻⁷²⁾。これら NeuGc をもつガングリオシドの機能は全くわかっていない。その中で、山川らによりウマの赤血球で発見された NeuGc をもつ GM₃⁷³⁾ は現在では HD-1 抗原として注目されている。一方、箱守らにより培養細胞で正常では長鎖の酸性糖脂質が見られるが、細胞をウイルスなどでトランスホームすると GM₃ など糖鎖の短いものに変化することが発見され⁷⁴⁾ 又最近ではヒト白血球細胞の分化誘導に GM₃ が関係することが報告されている⁷⁵⁾。本論文ではウシ副腎髄質の主成分である GM₃ ガングリオシドおよびウシ脳由来ジシアロガングリオシド (GD₁a および GD₁b) を精製して MS で解析した結果これらの構造異性体についても明瞭に区別出来有用であることを示した。GM₃ は NeuGc および NeuAc の分子種であり、GD₁a と GD₁b はシアル酸の結合が異なる異性体である。

第2節 実験方法

GM₃ ガングリオシドはウシ副腎髄質から、一方 GD₁a および GD₁b ガングリオシドは前報と同じ様に DEAE-セファデックス A-25 およびイアトロビーズカラムマトグラフィーにより精製した⁵¹⁾。ガングリオシドの構成脂肪酸、糖および長鎖スフィンゴシン塩基の組成はガスクロマトグラフィー (GLC) で調べた⁶⁸⁾。シアル酸の種類は Yu らの方法に従い、ガングリオシドを 0.05 N 塩基メタノールで弱酸水解後、

遊離したシアル酸をトリメチルシリル誘導体として GLC で調べた⁷⁶⁾。ガングリオシドの完全メチル誘導体の作製は前報に従って行なった⁵¹⁾。CI-MSの測定条件は前報と同じである。マスマーカーはトリパーフルオロノニール-S-トリアジンおよびウルトラマーカーで補正した。反応ガスはアンモニアを使用した。プローブ温度を270℃から330℃に昇温し各試料を10回測定した後平均してマスパターンを作製した。

第3節 実験結果

Ledeen らの報告ではウシ副腎髄質からの GM₃ (ヘマトシド) は総ガングリオシドの約92%を占め NeuAc と NeuGc をもつものが約2:3の割合であることが示されている⁷⁷⁾。脂肪酸は長短飽和および不飽和脂肪酸を含み共に C16:0, C18:0, C23:0, C24:0 および C24:1 が主成分で、長鎖スフィンゴシンは C18:1 である α -オキシ脂肪酸は含まない⁷⁸⁾。図1および2に NeuAc および NeuGc を含む GM₃ ガングリオシドの完全メチル誘導体の CI-MS を示した。それぞれの図の上にネルボン酸 (C24:0) と C18 スフィンゲニンとした場合の GM₃ ガングリオシドの解裂様式を示した。GM₁ ガングリオシドで確認された様に GM₃ の完全メチル誘導体でセラミド骨格をもつ5つの顕著なイオン群が検出された。擬似分子イオン (M+H)⁺ および脱メタノール分子に担当する (MH-32; MH-CH₃OH)⁺ に相当するイオン群は丁度 NeuAc および NeuGc をもつ GM₃ で30 マスユニット異なり、後者で高磁場にシフトしている。図1で m/z 1346 から1462 に相当する (M+H)⁺ と m/z 1314 から1430 に相当する脱メタノールピーク (MH-32)⁺ は脂肪酸 C16:0 から C24:0 にわたる GM₃ (NeuAc) の分子種である。図2に示す様に GM₃(NeuGc) では、これらのイオン群は30 マスユニットだけ高くシフトして検出される。それぞれの脱メタノールピーク; MH-32 から生成されたフラグメントイオンは両者共に変わらず、m/z 548 から660, m/z 737 から849 および m/z 941 から1053 に表われるイオン群はそれぞれセラミド、グルコシルセラミドおよびラクトシルセラミドの分子種に相当する。これら3つのイオン群のイオン強度はセレブロシドの TMS 誘導体で得られた成績⁴⁹⁾と同様、再現性があり、表1に示すように定量性が

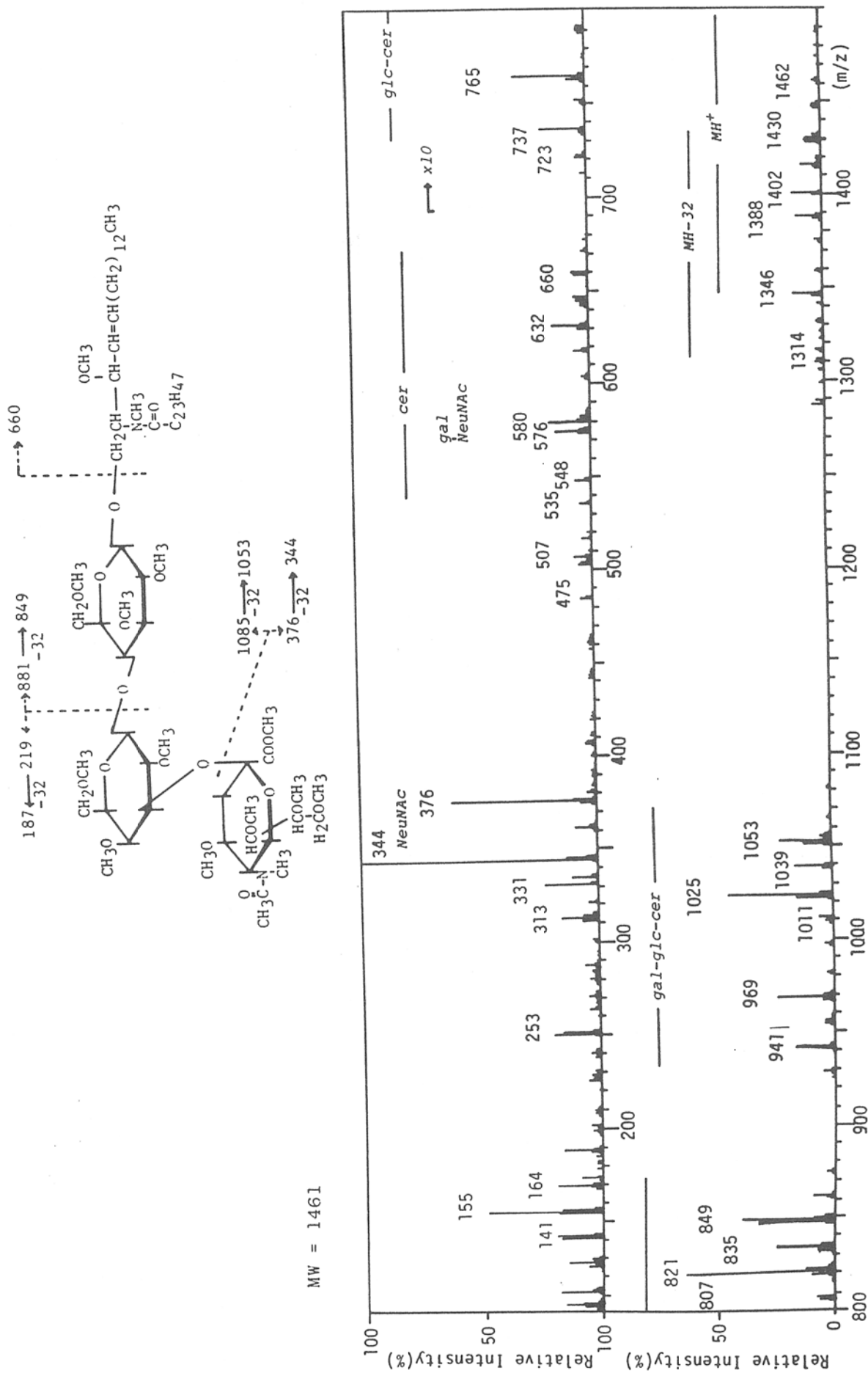


Fig. 1 Chemical ionization mass spectrum of NeuNAc-containing GM3 from bovine adrenal medulla.

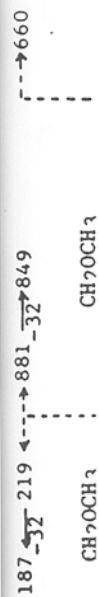
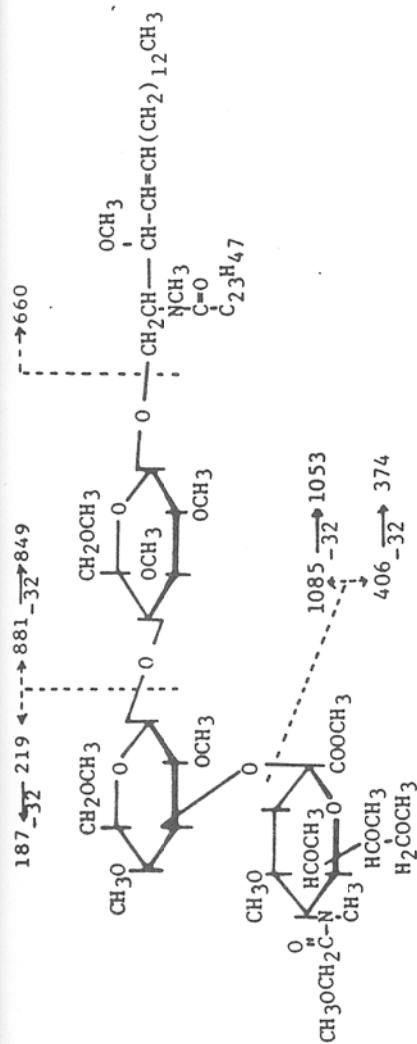


Fig. 1 Chemical ionization mass spectrum of NeuNAc-containing GM₃ from bovine adrenal medulla.



MW = 1491

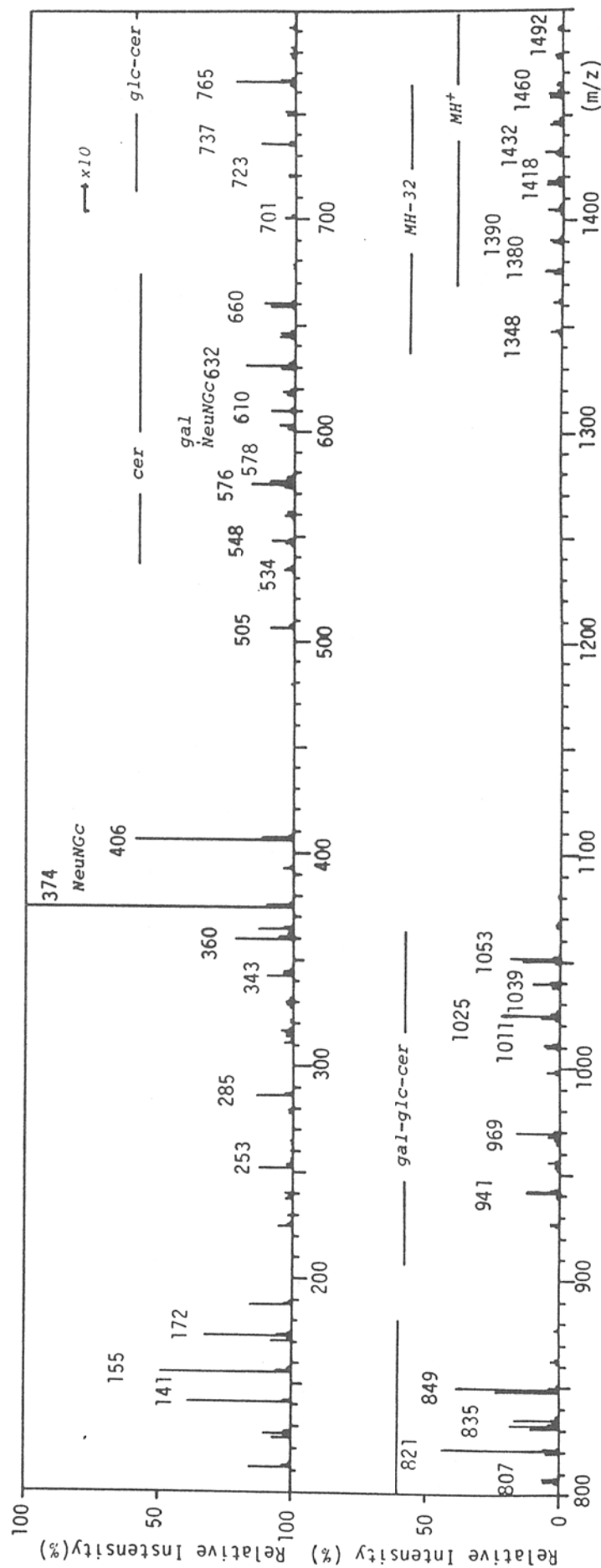


Fig. 2 Chemical ionization mass spectrum of NeuNGc-containing GM₃ from bovine adrenal medulla.

あった。例えば m/z 548, 576, 632 および 660 はそれぞれ脂肪酸 C16:0, C18:0, C22:0 および C24:0 をもつセラミドに相当する。GLC による脂肪酸の測定結果と良く一致しており, また Ledeen らの文献⁷⁸⁾ともよく一致しており CI-MS を測定することにより直接分子種の割合を見ることが出来, 有効性が認められた。グルコシルセラシドおよびラクトシルセラミドに相当するフラグメントイオンについても同様であった。図1で低磁場に見られる m/z 376 および 344 ($376-32$;

Table 1 Percent distribution of fatty acids of hematosides from bovine adrenal medulla

Fatty acids	Mass Spectrometry				GLC	
	Cer	Glc-Cer	Lac-Cer	Average ^a	This	Reference
					Study	78
GM ₃ (NeuNAc)						
C16:0	9.7	7.1	9.0	8.6 ± 1.3	10.0	14.4
C18:1	1.8	1.6	2.5	2.0 ± 0.5	2.8	2.4
C18:0	21.9	15.5	15.9	17.8 ± 3.6	17.2	15.9
C20:0	8.9	5.2	5.1	6.4 ± 2.2	3.8	4.4
C21:0	4.1	2.5	2.5	3.0 ± 0.9	1.2	
C22:1	1.0	0.8	2.5	1.4 ± 0.9	0.3	
C22:0	26.0	26.2	29.2	27.1 ± 1.8	27.6	28.9
C23:0	5.9	11.4	10.8	9.4 ± 3.0	8.4	5.6
C24:1	8.9	13.7	8.2	10.3 ± 3.0	13.8	12.0
C24:0	11.8	16.6	14.1	14.2 ± 2.4	14.7	12.8
GM ₃ (NeuNGc)						
C16:0	8.8	6.5	9.8	8.4 ± 1.7	11.1	16.1
C18:1	3.1	2.2	1.5	2.3 ± 0.8	2.5	2.3
C18:0	18.9	12.7	15.6	15.7 ± 3.1	13.5	12.3
C20:0	5.7	4.7	5.1	5.2 ± 0.5	3.6	3.3
C21:0	4.4	3.2	5.5	4.4 ± 1.2	1.0	0.4
C22:1	2.2	2.4	1.1	1.9 ± 0.7	0.4	
C22:0	21.6	24.6	20.4	22.2 ± 2.3	24.8	22.6
C23:0	7.0	10.8	9.5	9.1 ± 1.9	10.4	9.5
C24:1	10.1	11.9	13.5	11.8 ± 1.7	15.4	15.6
C24:0	18.1	21.1	18.2	19.1 ± 1.7	17.1	14.6

^aAverage ± SD (n=3)

376-CH₃OH)⁺はNeuAc由来であり、図2のGM₃(NeuGc)ではこれらイオンはm/z 406および374にシフトしている。同様にガラクトースーシアル酸由来のピークはGM₃(NeuAc)でm/z 580にGM₃(NeuGc)ではm/z 610に検出され、両者の区別が容易に出来、構造解析に有効であることが示された。図3および4にGD_{1a}とGD_{1b}のCI-MSを示した。ウシGM₁ガングリオシドと同様、脂肪酸はステアリン酸で、ほぼ同じ比率のC18およびC20スフィンゲニンを含むことが知られている⁶⁶⁾。従ってこれらのガングリオシドでは両者長鎖スフィンゴシン塩基の差異による分子種に相当するイオンが28マスユニットはなれて優位に検出された。図3および4にGD_{1a}およびGD_{1b}のC20スフィンゲニンおよびステアリン酸を有する分子種の解裂機構を示した。m/z 2000以上は使用した機種のマスマーカの限界から分子量の測定は出来なかった。しかしシアル酸が1分子はずれたGM₁ガングリオシドに相当するイオンm/z 1839および1807(1839-32)⁺が検出され、これらはC20スフィンゲニンをもつものと推定された。セラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、ガングリオ-N-トリオシルセラミドに相当するイオン群はm/z 576と604, m/z 765と793, m/z 954と982さらにm/z 1199と1227にそれぞれ2本ずつ検出され、これらはC20およびC20スフィンゲニンを主成分とすることが証明された。またこれらのイオンはGM₁ガングリオシドの完全メチル誘導体のCI-MSでも観察されている⁵¹⁾。GD_{1a}とGD_{1b}の差異は2分子付いているシアル酸の脱離に由来するイオンに顕著である。即ちGD_{1b}ではm/z 1418と1446これはGM₁ガングリオシド(ガングリオ-N-テトラオース)を示すイオンであるが、これらのイオンが検出された。このことにより、2分子のシアル酸は互にグリコシル結合しており、ガングリオシドの2つあるガラクトース分子の1方についていることが推定された。一方GD_{1a}ではm/z 1403と1431に検出され、2つのシアル酸分子は、異なったガラクトース2分子についていることが示唆された。更にGD_{1b}ではm/z 705が検出され、これは2分子のシアル酸はグリコシル結合してジシアル型であることが推定され、前者の結果と併わせて、GD_{1b}の構造が推定された。更に低磁場側のフラグメントイオンを比較するとGD_{1a}ではm/z 548が検出され、これはガラクトースーシアル酸分子に由来することが推定された。また両者の差異はGD_{1a}でm/z 450更にGD_{1b}では

Fig. 3 Chemical ionization mass spectrum of GD1a from bovine

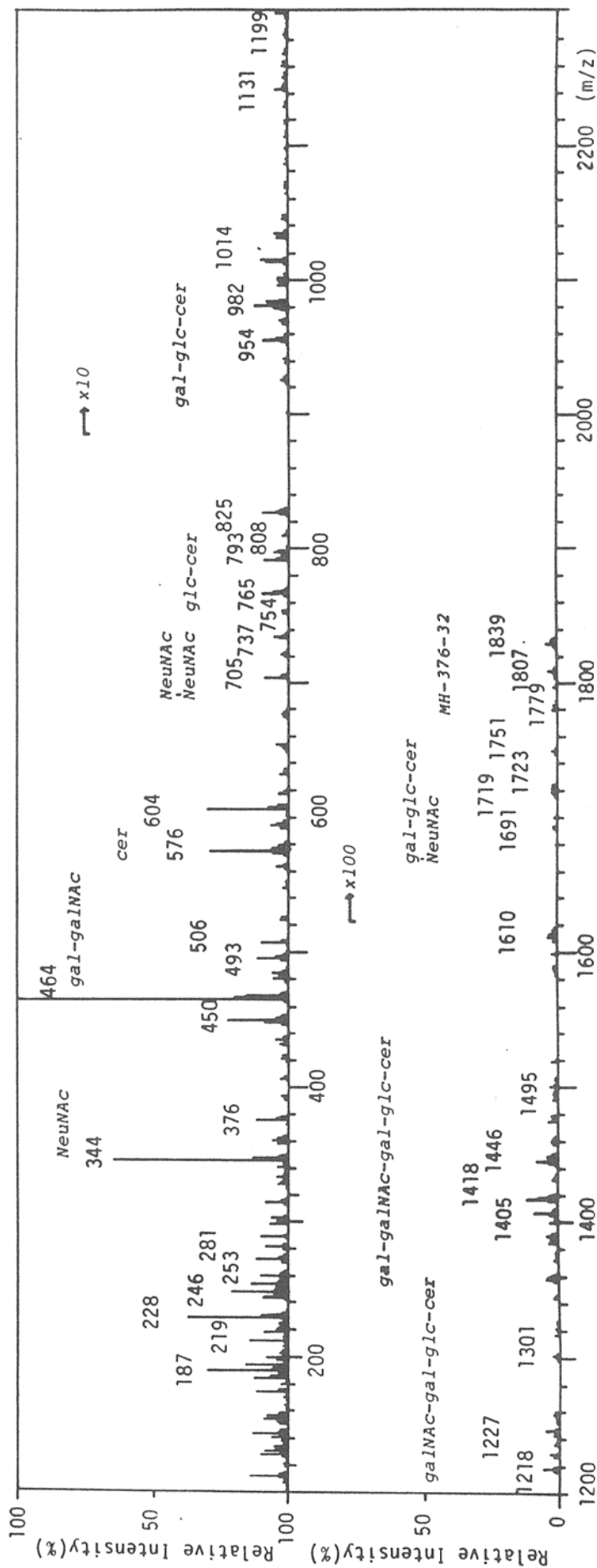
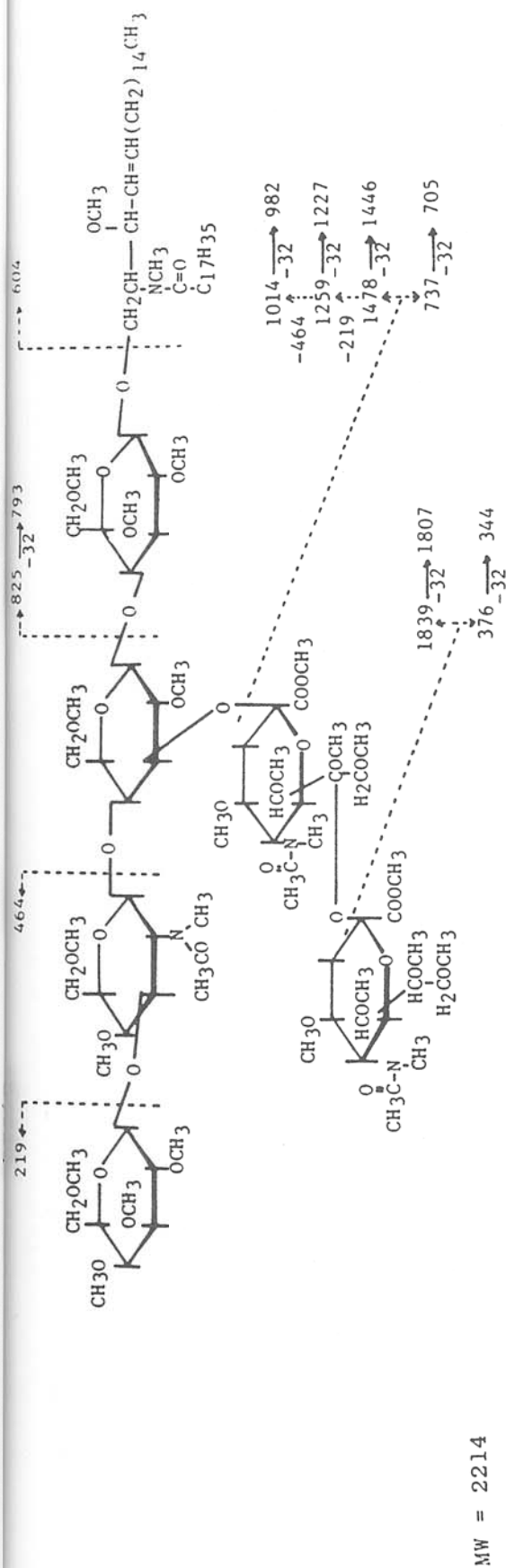


Fig. 4 Chemical ionization mass spectrum of GD1b from bovine brain.

m/z 464 が特徴的でいずれも末端のガラクトース-N-アセチルガラクトサミン分子に由来するピークであるが、これらのイオンは GD_{1a} および GD_{1b} の構造異性体を区別する非常に有効であった。

第 4 節 考 察

CI-MS はシアル酸をもつ複合糖脂質；ガングリオシドの分子量の測定，シアル酸の分子種および結合の異なる構造異性体の構造解析にも有効であることが証明された。シアル酸のグリコシル結合は他の糖鎖にくらべ弱い様でシアル酸残基由来のフラグメントが強く観察され，中性糖脂質と同様セラミドの解裂は起らず，骨格が保持されており，スペクトルが単純で解析し易い。 $NeuAc$ と $NeuGc$ をもつ GM_3 ではメチル誘導体になると丁度 30 マスユニット異なり，後者で高質量部にシフトすることがわかり，両者を明瞭に区別することが出来た。 $NeuGc$ をもつガングリオシド生体に多く存在するのでこの様な化合物の構造解析に利用出来ると考えられる。シアル酸の結合が異なるジシアロガングリオシドでは，シアル酸が 1 分子とれたモノシアロガングリオシドで差がみられた。また 2 分子付いているシアル酸に由来するイオンに顕著であった。使用した機種のマスマーカの限界により分子イオンは検出されなかった。しかし多くの情報が得られ，このままでも構造解析は容易に出来ると推定された。更にシアル酸を含むポリシアロガングリオシドについても応用が可能であろうと推定された。一方分子量の大きい複合糖脂質の構造解析として，セラミド部分をオゾンで化学的に分解してはずしてしまい低分子化したオリゴ糖を糖アルコールに変えメチル誘導体として測定するのも良い方法である。即ち GD_{1a} と GD_{1b} のオリゴ糖では擬似分子イオン $(M+H)^+$ とアンモニアが付加した $(M+NH_3)^+$ が m/z 1642 と 1659 に顕著に検出された。両者は基本的にはガングリオシドで観察された糖鎖由来のフラグメントイオンで差異がみられたが，それぞれ相当するフラグメントイオンがより強く検出され，複合糖脂質の糖鎖構造を正確に解析するのに良い方法であろうと推定された^{79,80)}。

第2編 高速中性原子衝撃質量分析計による糖脂質の構造解析

1981年 Barberらにより開発された高速中性原子衝撃法 (Fast Atom Bombardment; FAB) と呼ばれる最新のイオン化法はアルゴンあるいはキセノガスをイオン化して得られる一次イオン粒子を中性のアルゴンあるいはキセノンガスと衝突させ、生成した中性原子ビームを高速 (通常 3 ~ 10 keV) で粘性の高い難揮発性のグリセリンなどのマトリックスと一緒にまぜた試料に照射し試料をイオン化させる方法である⁸¹⁾。高分子の極性の高い熱分解し易い試料でも誘導体にせず、そのままの分子量の測定が可能で、FI法やFD法にくらべ、同時にフラグメントイオンも多数高質量部に検出され、しかもこれらのイオンは比較的長時間安定であることが証明され、急速に高分子の蛋白質など生化学試料の分子量の測定および構造解析に応用されている。糖脂質への応用は1982年 Rinehart が報告している²⁶⁾が従来のEIおよびCI法くらべ、応用範囲はかなり未知数であるが、少しずつ報告される様になった⁸²⁻⁸⁸⁾。

本論文では高分解能負イオンFAB-MSを使ってクロム親和性細胞から見つかったガン抗原糖脂質, IgM-M 蛋白と結合するヒト末梢神経組織由来のグルクロン酸をもつ新しい酸性糖脂質および中枢神経系ガングリオシドの構造解析に応用したので報告する。

第1章 クロム親和性細胞(PC12細胞)の主要糖脂質; グロボ ンドの高速中性原子衝撃-質量分析^{89,90)}

第1節 序

PC12細胞はラット副腎髄質由来のクロム親和性細胞(pheochromocytoma Cells)のクローン細胞(ガン細胞)である。発生学的には外胚葉起源であり、交感神経系に属し、Caイオン、カテコールアミンやATPなどが貯蔵されている細胞として知られている。Nerve Growth Factorなどにより形態学的、生理学的に変わることがわかり、正常の副腎由来のクロム親和性顆粒細胞に見られる機能を有することから、神経細胞のモデルとして注目され、細胞膜の構造あるいは構成成分の研究が進められている^{94,95)}。Margolisらは糖蛋白質の構造と最近、フコースをもつガングリオシドがあることを報告している^{96,97)}が以外に少ない。我々はPC12細胞の中性糖脂質画分を薄層クロマトグラフィーで調べた所、異常に蓄積される糖脂質があることを見い出し、高速中性原子衝撃-質量分析計(FAB-MS)でこの中性糖脂質の構造を調べた。

第2節 実験方法

大量培養により得たPC12細胞(745mg蛋白)からクロロホルム:メタノールで総脂質を抽出した(収量675mg)。次にDEAE-セフアデックスA-25のカラムにかけ、酸性脂質を除去後中性糖脂質画分を得た。弱アルカリ水解によりリン脂質を除去後、イアトロピーズのカラム(10g, 1×40cm)にかけ、クロロホルム:メタノール(4:1, 1:1および1:3, 容比)を50mlずつ加え、フラクシ
ョンコレクターにより糖脂質画分を順番に溶出させた。主要糖脂質はクロロホルム:メタノール(1:1, 容比)のフラクシ
ョンに溶出精製された。収量は6mgで中性糖脂質画分の約80%に相当した。精製した糖脂質, 50μg, をクロロホルム:メタノール(2:1, 容比)10μlにとかし, トリエタノールアミン:テトラメチル尿素(1:1, 容比)を2μl加え, 質量分析用試料とした。装置は日本電子製

ボ (HX100型) 大型高分解能負イオンFAB-MSを使用し、試料を1 μ l試料台に塗布しキセノンガスを用い6KeVで照射し、負イオンFABマスペクトルを測定した。

第3節 実験結果および考察

図1にPC12細胞由来主要糖脂質のFAB-MSを示した。FAB-MSでは5つ顕著なイオン群が検出された。これらのイオン群は m/z 536から648, m/z 698から810, m/z 860から972, m/z 1022から1134および m/z 1225から

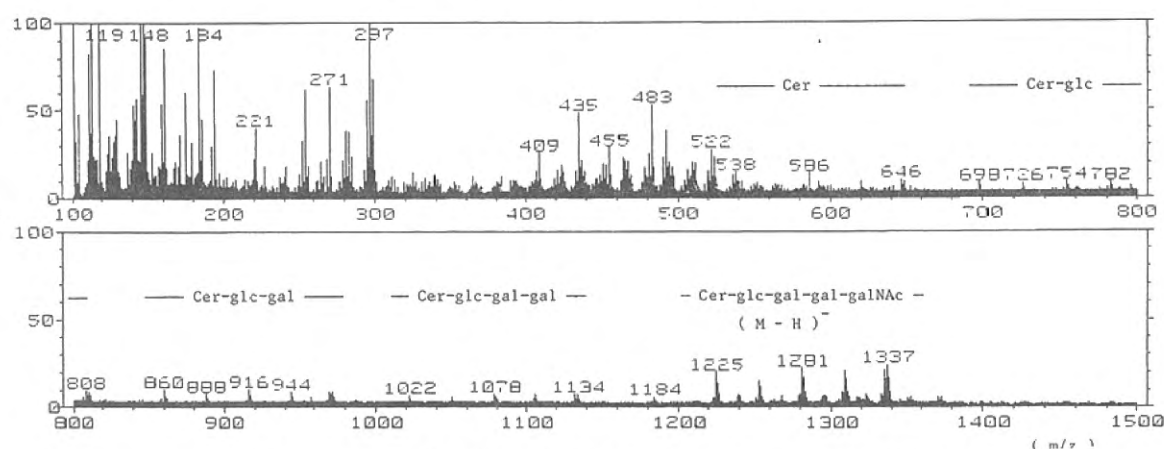


Fig. 1 Negative ion fast atom bombardment mass spectrum of major neutral sphingoglycolipid from PC 12 pheochromocytoma cells.

1337でありそれぞれセラミド, グルコシルセラミド, ラクトシルセラミド, グロボトリオシルセラミド, およびグロボテトラオシルセラミド(グロボシド)と推定された。負イオンFAB-MSでは分子イオンは $(M-H)^-$ として検出される。高質量部の m/z 1225, 1253, 1281, 1309, 1335および1337は脂肪酸C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1およびC24:0を分子種とするグロボシドであることが証明された。なおPC12細胞から精製された糖脂質はシリカゲル薄層クロマトグラフィーでブタ赤血球膜由来の標準物質グロボシドと R_f 値は全く同一であること, 0.1 N塩酸で100 $^{\circ}$ C, 30分間PC12細胞糖脂質を弱酸水解後, FAB-MSでも確認されたグルコシルセラミド, ラクトシルセラミド, グロボトリオシルセラミドが酸水解物として生成されることを確認した。またGLC分析で糖組成はグルコース, ガラクトースおよびN-アセチルガラクトサミンが検出され, それぞれの比

は 1 : 2 : 1 で赤血球膜グロボシド標準物質と一致した。スフィンゴシン塩基は通常の C18 スフィンゲニンであった。脂肪酸は C16: 0 (1 0 %) , C18: 0 (1 6 %) C20: 0 (2 3 %) , C24: 1 (1 7 %) および C24: 0 (2 4 %) で赤血球膜由来のグロボシドにみられる α -オキシ脂肪酸は 5 % 以下であった。図 2 に PC12 細胞から単離したグロボシドの構造を示した。

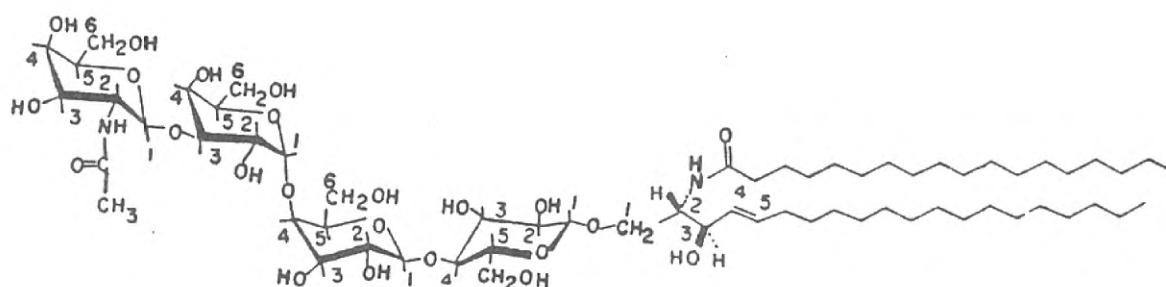


Fig.2 Structure of globoside from PC 12 cells:
GalNAc(β 1-3)Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc(β 1-1')ceramide.

グロボシドは山川らにより、ヒト赤血球膜の主要糖脂質であることが報告されている⁴⁾。箱守らによりハムスター NIL 細胞でグロボシドを培地に加えると細胞の粘着性が増加し、癌化にみられる様な細胞の癒着あるいは融合が起ることが報告され、⁹⁸⁾ PC12 細胞ではグロボシドが腫瘍細胞のマーカあるいは癌化になんらかの寄与が推定される。FAB-MS による測定の結果は CI-MS で見られた様にセラミド骨格を保持した形で糖鎖が末端からはずれ、糖鎖構造が明瞭に解析出来た。FAB-MS では、低磁場の方はマトリックスの影響で殆んどフラグメントイオンの帰属は不可能であった。

第2章 ヒト末梢神経由来グルクロン酸を有する酸性糖脂質の 高速中性原子衝撃-質量分析計^{91,92)}

第1節 序

形質細胞系異常増殖症はM蛋白血症として知られている。これらの疾患の約1割は脱髄性の神経炎を伴う^{99,100)}。M蛋白が脱髄に直接関与している報告は少ないが、M蛋白は神経と強く反応する。最近になり髄鞘の成分であるMyelin Associated Glycoprotein (MAG) がM蛋白と結合することが報告されている¹⁰¹⁻¹⁰³⁾。我々はヒト末梢神経に同じ様にM蛋白と強く結合する酸性糖脂質があることを発見した^{91,104,105)}。このものは末端にグルクロン酸をもつままで報告されていない糖脂質であった。この酸性糖脂質の機能は全くわかっていないが、これらの疾患でM蛋白の異常増加に強く関係していると推定される¹⁰⁶⁾。高速中性原子衝撃-質量分析計(FAB-MS)を使い、この酸性糖脂質の構造解析を行なった。

第2節 実験方法

ヒト末梢神経の馬尾神経組織150g からクロロホルム：メタノール(2:1, 1:2, 容比)で総脂質を抽出後、アセトン分画し、粗糖脂質画分を得、次にイオン交換樹脂(DEAE-セファデックスA-25)のカラムにかけ、中性糖脂質画分を溶出後、酢酸ソーダを含むメタノール溶液を0から0.4 Mまで連続的に変え酸性糖脂質画分を得た。IgM-M蛋白と結合する酸性糖脂質は親和性が強く、シアル酸4個に相当するガングリオシド画分に溶出された。この分画を集め蒸留水に対して透析し、脱塩後イアトロビーズおよび高速液体クロマトグラフィーにより、酸性糖脂質を精製した。収量は4 mgであった。精製した酸性糖脂質50 μgをクロロホルム：メタノール(2:1, 容比)20 μlにとかし、その2 μl にトリエタノールアミン2 μlを加え、ステンレス製の試料台に塗布し、質量分析の試料とした。装置はデータシステム(VG11/250型)の付いたZAB社大型高感度FAB-MS(VGZAB-HF型)を使用した。キセノンガスを用い中性電子ビーム9 KeVで試料を照射し、負イオンFABマスペクトルを測定した。

第3節 実験結果と考察

図1に末梢神経由来酸性糖脂質のFAB-MSを示した。酸性糖脂質は糖鎖5つあることが示された。即ち脂肪酸の分子種による6つの顕著なイオン，セラミド，セ

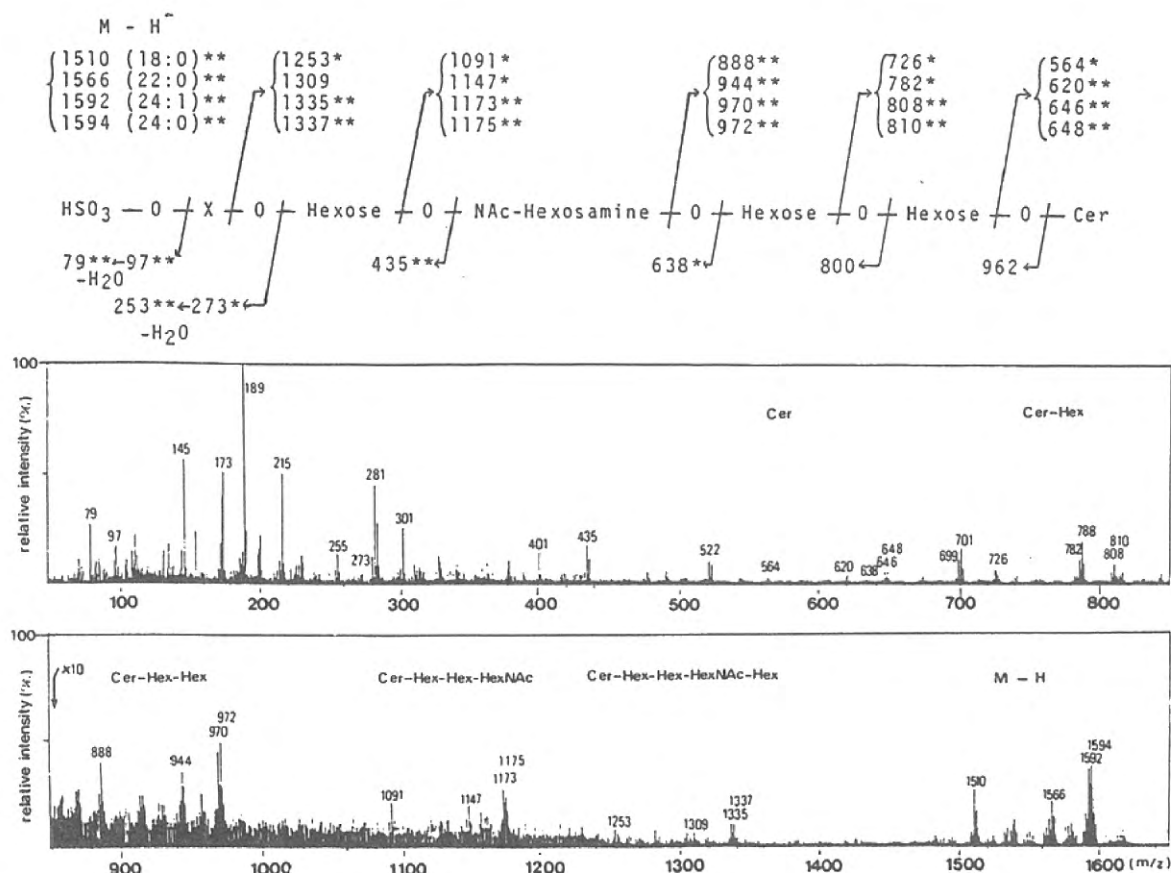
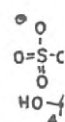


Fig. 1 Negative ion fast atom bombardment mass spectrum of glucuronic acid sulfate-containing paragloboside from human cauda equina.

ラミドモノ，ジ，トリ，テトラおよびペンタサツカライドに相当するイオン群が検出された。分子イオンは m/z $(M-H)^-$ として検出され， m/z 1510, 1566, 1592 および 1594 はそれぞれ脂肪酸 C18:0, C22:0, C24:1 および C24:0 をもつ酸性糖脂質であることが，構成脂肪酸およびスフィンゴシン塩基の GLC により証明された。 α -オキシン脂肪酸をもつ分子種は検出されなかった。使用した ZAB 社の装置は大型コンピュータがついているのでマトリックス由来のピークを除去することが可能で低磁場に現われるフラグメントイオンも帰属が容易に出来た。即ちフラグメントイオン m/z 97は末端の糖鎖に硫酸基の存在が推定された。硫酸基の存在

は赤
確認
25'
ソー
推定
トリ
糖鎖
成粉
から
ン酸
グロ
ノク
じ様
った
(Na
コー
コー
した
が直
を下
は酸
かの



は赤外吸収スペクトルで 1240 cm^{-1} および 820 cm^{-1} に特徴的なピークが検出され確認された。マスペクトルの解析から、末端から硫酸基を有する酸性糖質 (m/z 257), ヘキソース (m/z 163), N-アセチルヘキソサミン (m/z 203), ヘキソース (m/z 163), ヘキソース (m/z 163) の順の糖鎖構造を有する糖脂質と推定された。酸性糖脂質を3%塩酸メタノールでメタノリシス後、遊離した単糖をトリメチルシリル誘導体として、キャピラリ GLC-CI-MS で測定した所、末端の糖鎖はいままで糖脂質では報告されていないグルクロン酸であることが判った。構成糖はグルクロン酸, ガラクトース, グルコースおよびN-アセチルグルコサミンからなりそれぞれの比は1:2:1:1であった。従って末端に硫酸基をもつグルクロン酸を有するパラグロボシド (Cer-glc-gal-glcNAc-gal) と推定された。パラグロボシドの骨格は脱硫酸後スミス分解して得られた糖脂質は抗パラグロボシドモノクロナール抗体で染色されることから免疫化学的に証明した。硫酸基の位置は同じ様に、硫酸基をはずさずに酸性糖脂質をスミス分解した結果、全く分解されなかったこと、さらに酸性糖脂質の完全メチル誘導体を、水酸化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) で、末端のグルクロン酸のカルボキシル基を還元した後、単糖の糖アルコールを得、アセチル誘導体として GLC-EI-MS により3および6ヌケのグルコースを新たに検出したことにより、グルクロン酸の3位に付いていることを証明した。図2に推定構造を示した。病気との関係は全くわかっていないが、M蛋白が直接脱髄に関係しているという証明は少ないが、血漿搬出法でM蛋白の血中濃度を下げると多発性神経炎で症状が改善されるという報告がある¹⁰⁰。抗MAGあるいは酸性糖脂質抗体がNK (ナチュラルキラー) 活性を抑制し、免疫調節機能に何らかの影響、即ちM蛋白異常排泄に関与していると推定される。

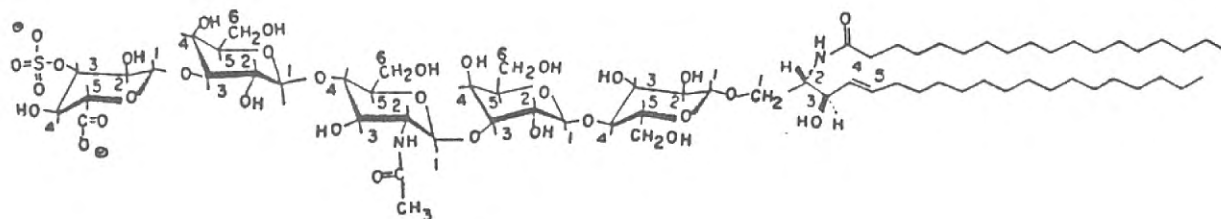


Fig. 2 Structure of glucuronic acid sulfate-containing paragloboside from human cauda equina.

第3章 ヒト脳モノシアログングリオシド GM₁a および GM₁b の高速中性原子衝撃-質量分析⁹³⁾

第1節 序

GM₁ (GM₁a) は中枢神経系の主要ガングリオシドであることが知られ、コレラ毒素のリセプターであることが報告されている^{10,11)}。ヒト脳の GM₁ ガングリオシド画分から、神経系ではいままで全く報告されていない GM₁b ガングリオシドを検出した。GM₁b は GM₁a の構造異性体でシアル酸は末端のガラクトースに付いており Stoffyn らがラット脳ホモジネートを用いて、アシアロ GM₁ (ガングリオ-N-テトラオシルセラミド) と CMP-シアル酸を基質にして、生合成したものでシアリダーゼ感受性のガングリオシドとして報告し¹⁰⁷⁾、その存在も示唆されていたが、神経系には報告されていなかった。最近になり、前駆体のアシアロ GM₁ がラット脳髄鞘に微量することが発見され、益々 GM₁b の存在の可能性が示唆された¹⁰⁸⁾。FAB-MS で脳モノシアログングリオシドの構造解析を行なった。

第2節 実験方法

ヒト成人脳、2.3 Kg からクロロホルム：メタノールで総脂質を抽出し、安藤らの方法¹⁰⁹⁾に従い、DEAE-セファデックス A-25 カラムにかけ中性糖脂質画分を除去後、0.2 M 酢酸ソーダのメタノール溶液を流しガングリオシド画分を得、透析脱塩後、再び DEAE-セファデックスのカラムにかけ、酢酸ソーダのメタノール溶液を 0.05 M から 0.3 M まで連続的に濃度を変え、モノシアログングリオシド画分を得た。この画分を脱塩後、イアトロビーズのカラムにかけ、クロロホルム：メタノール：水の系で同様に連続的にそれぞれの比を 65：35：4 から 35：65：5 (容比) に変え、GM₁ ガングリオシド画分を得た。GM₁b は GM₁ (GM₁a) の主要ピークのテーリング部分に溶出されたのでこの画分を再度イアトロビーズのカラムにかけ、n-プロパノール：水 (85：15, 容比) で溶出させ GM₁b を精製した。収量は 6 mg であった。精製したそれぞれのモノシアログングリオシド、約 50 μg, をクロロホ

ルム：メタノール溶液（2：1，容比）20 μ l にとかし，その5 μ l にトリエタノールアミン2 μ l を加え，少量のテトラメチル尿素を加え，試料台に塗布し，日本電子製高分解能FAB-MS（HX100XL）で測定した。キセノンガスを用い，中性電速ビーム6 KeVに設定した。

第3節 実験結果および考察

図1にGM₁aとGM₁bの構造と負イオンFAB-MSの測定結果を示した。GM₁aおよびGM₁bは共に脂肪酸はステアリン酸であり，スフィンゴシン塩基はC18およびC20スフィンゲニンである。従ってスフィンゴシン塩基の差異による主要な2つのイオンが検出された。図1AのGM₁bでは主要なイオン群は6つ顕著に検出出来た。これらのイオン群はセラミド(a)，グルコシルセラミド(b)，ラクトシルセラミド(c)ガングリオ-N-トリオシルセラミド(d)，ガングリオシル-N-テトラオシルセラミド(e)であると推定された。分子イオンは両者共に(M-H)⁻として観察され，m/z 1544および1572はそれぞれC18およびC20スフィンゲニンを，更に脂肪酸ステアリン酸をもつ分子種と推定された。GM₁bでは末端のシアル酸がはじめに開裂を受け，ガラクトース，N-アセチルガラクトサミン，ガラクトースグルコースの順に開裂され，これらのフラグメントイオンはそれぞれm/z 1091と1119，m/z 888と916，m/z 726と754さらにm/z 564と592になることが推定され，FAB-MSで構造解析が可能であると証明された。しかしGM₁aの場合は分子イオン(M-H)⁻，セラミド(a)およびグルコシルセラミド(b)は顕著に観察されたが，少々複雑で末端のガラクトース分子の開裂がはじめに起る様である。このイオンはm/z 1382および1410に検出された。このイオンから更に開裂を受けて，シアル酸を保持するフラグメントイオンも観察された。GM₁bと同じ様にシアル酸残基がはじめにはずれた系路も小さいながら観察された。GM₁aガングリオシドの構造解析は，CI法の方がシアル酸残基の開裂がはじめに起り，セラミド骨格を保持したまま糖鎖がはずれたイオンが優位でマスパターンは非常に単純でFAB-MSより解析し易い様である⁵¹⁾。ガングリオシドのFAB-MSは中性糖脂質の場合に比べフラグメントイオンおよび分子イオンの解析は複雑である。シアル

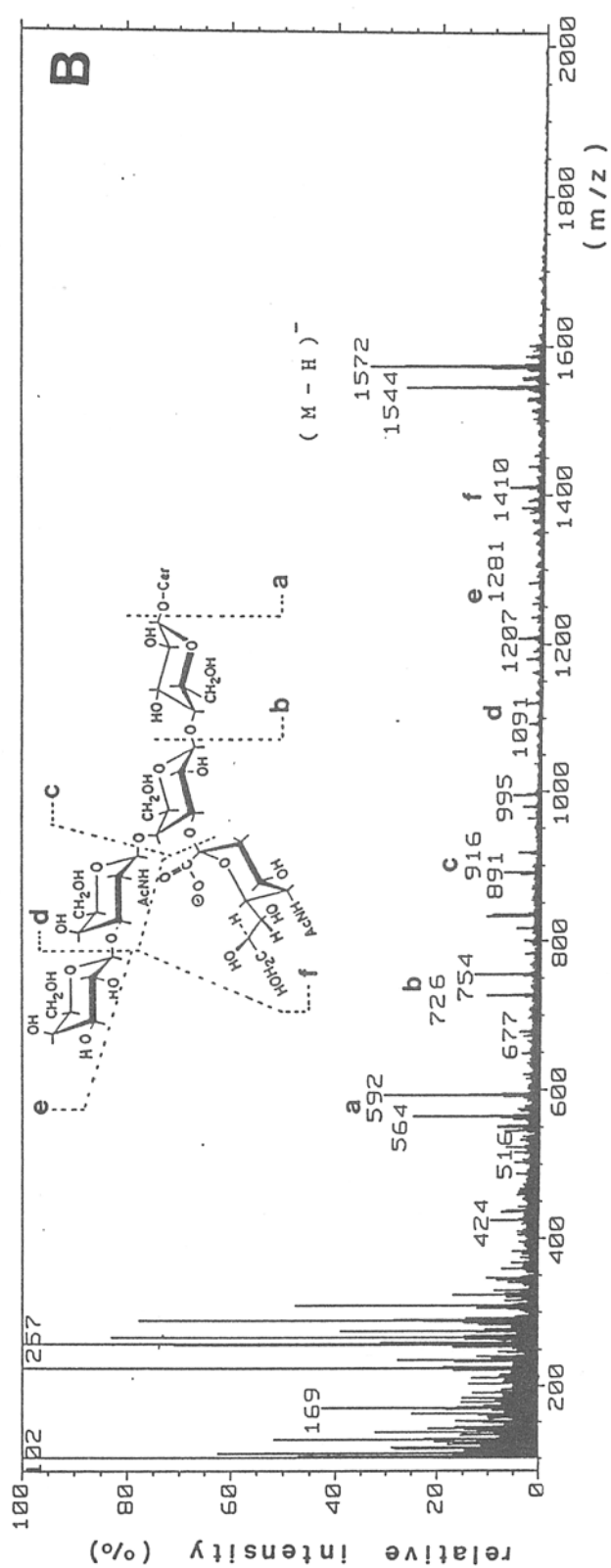
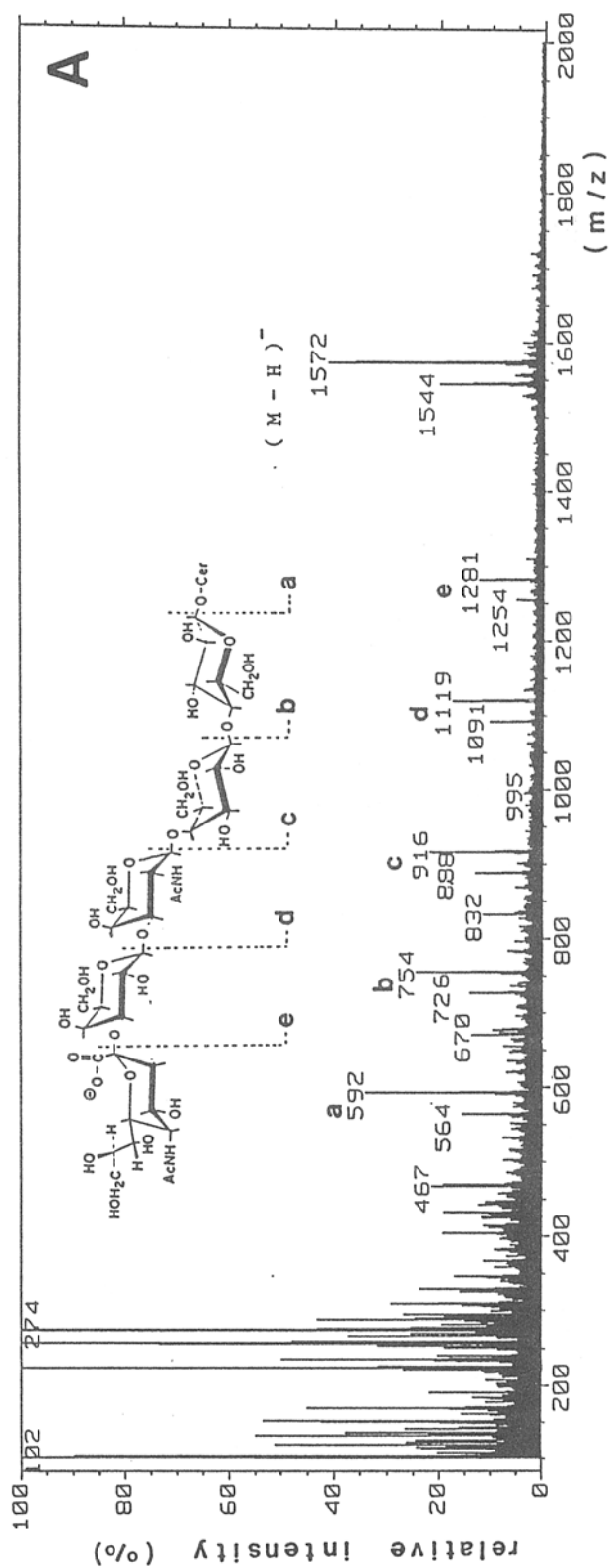


Fig. 1 Negative ion fast atom bombardment mass spectra of monosialogangliosides from human brain. A, GM1b; B, GM1a.

酸が2個以上ついた場合、分子イオンは $(M-H)^-$ はかなり小さくなり、かわりに $(M+Na-H)^-$, $(M+2Na-H)^-$,等の擬似分子イオンが検出され、しかもそれぞれから由来したフラグメントイオンがいずれもNaイオンが付加しており、脂肪酸あるいはスフィンゴシン塩基の種類の差によるガングリオシド分子種の解析には十分注意をしなければならない⁸⁷⁾。GM₁b ガングリオシドは腹水肝癌細胞AH-7974¹¹⁰⁾、マウスミエロイド白血病細胞¹¹¹⁾など癌細胞にみとめられ、最近マウス脾臓¹¹²⁾などの免疫系にもその存在が確認され細胞の突然変異や癌細胞の粘着性を抑えることも報告されている^{108,113,114)}。今回神経系に見つかったことから、このガングリオシドは自己免疫疾患などの神経系、免疫系の共通抗原の可能性が示唆された。

総 括

電子衝撃法 (EI 法) は長い歴史があり、有機、物理、無機化学、薬学などの広い領域で利用されていた。測定試料特有のフラグメントイオンを与え、沢山のデータ集も集積されている。多くの未知の試料もマススペクトルをとることにより、これをもとにして同定される確率が高い。例えば、糖脂質の糖鎖構造を調べる上で糖鎖の結合がどうなっているかを知る方法として糖鎖の水酸基を完全メチル誘導体として酸で加水分解後、単糖を得て還元して糖アルコールにして、グリコシル結合由来のメチル化されていない残りの水酸基をアセチル化してGLC-MSで調べることにより、結合様式を決定できるが、どの様な機種を使用しても、EI-MSはそれぞれの糖アルコールに特有のフラグメントイオンを与え、直ちにデータ集あるいは文献から決定出来る。EI法はスペクトルの再現性は非常に良い反面、熱分解し易い難揮発性のものの測定に限界がある様である。自然科学の分野には、この様な化合物は非常に多い。これらの要求に答える様に質量分析計の改良特にイオン化の方法の改良が行なわれ、いままで測定出来なかった化合物も測定出来る様になり、生体微量成分の分子量の測定および定量に益々、質量分析法の重要性は高まりつつある。これらのイオン化法はソフトイオン化と呼ばれ、代表的なものはCI, FD, FI, FAB, SI (二次イオン化法) などであるが、年々新しいイオン化法が報告されている。ソフトイオン化法の多くはスペクトルの再現性は著しく劣る。一般には機種を変えただけで、フラグメントイオンの出方、開裂様式も異なることもある。CI法は同機種を使用していれば、比較的良い方である。勿論反応ガスや誘導体を変えるとマスパターンは変わる。逆にこれらの特性を利用して異性体の構造解析や分子量の決定、微量定量に応用出来る。CI法にひき続き導入されたFD, FI法は高分子の化合物の分子量の決定には有効とされているが、一般に生体試料の測定では再現性はかなり劣る。試料に不純物が入っていると全く測定できなかったり、スペクトルに影響を与える様である。FABあるいはSI法についても、標準試料については安定したスペクトルを与えるが、同じことがいえそうである。また、同一の試料でも機種によりかなり限定される様で大型の高分解能質量分析計を使用した方が良い結果がえられる様である。生体試料を取り扱っている者には目的のものがどの位の

分子量であるのか、また生理活性物質など定量したいと考えている者には、どの機種でどのイオン化法が一番強い分子イオンが出るかあるいは強いフラグメントイオンが出易いかということが重要である。観察された分子イオンあるいはフラグメントイオンがどのような機構で生成するか正確な理論づけが出来なくても、有益な情報がえられればよい。今後も質量分析法の改良は益々進むであろう。それに従って機種およびソフトイオン化の撰択範囲は益々広がり試行錯誤が当分続くであろう。

本論文では生体膜の微量構成成分ながら最近多くの生理活性が注目されている糖脂質を材料にして、それら微量構造解析の方法としてソフトイオン化—質量分析法を応用した成績をまとめた。要約すると(1) CI 法は試料とメタン、イソブタン、アンモニアなど反応ガスとのイオンモレキュラー反応にもとずいている。従って EI 法で測定しにくい化合物に対しても有効である。スペクトルにも EI マスにくらべ単純で解析が容易である。QM など分子イオン領域および高質量部のフラグメントイオンも強く、検出され易い。糖脂質は分子量が大きく分子イオンも出現しにくく、解析困難な場合が多い、特に熱分解し易いシアル酸を含む糖脂質の完全メチル化誘導体は分子イオンの検出はもちろん、高質量部のフラグメントイオンも出現せず構造解析は困難と思われる。CI 法ではこのような化合物にも有効であることを示した。(2) FAB 法はキャノンやアルゴンの中性原子ビームを高速でグリセロールなどマトリックスをまぜた試料に照射して、イオン化させる方法で 難揮発性のものに特に有効で、全く誘導体とせず分子量の測定が可能であるが、中性糖脂質では CI 法と変わらない開裂様式を与えた。しかしシアル酸を含むガングリオシドではシアル酸残基を多く含む複合糖脂質では Na イオンが付加した分子イオン、フラグメントイオンが検出され、複雑な脂肪酸、長鎖スフィンゴシン塩基を有する糖脂質の分子種の構造解析には限界がある様に思われる。

謝

辞

終りに臨み、本論文作製に際して終始御懇篤なる御指導と御高配を賜りました千葉大学薬学部 北川晴雄教授に深く感謝の意を表します。

また本研究を行うに当り 終始御懇篤なる御指導を賜りました。東京都臨床医学総合研究所 山川民夫所長，鈴木明身室長ならびに新潟大学医学部神経内科 宮武正教授，エール大学医学部神経内科 Robert K. Yu 教授，東京都老人総合研究所 臨床生化学 安藤 進室長および国立病院医療センター 臨床生化学 大島美恵子室長に深く感謝の意を表します。

さらに本研究に当って研究面で終始助力を賜りました東京都臨床医学総合研究所 鈴木 實先生に深く感謝申し上げます。

掲 載 雑 誌 目 録

1. 第1編, 第1章の内容は *Chem. Phys. Lipids* 19:289-299(1977) に下記表題で掲載されたものである。

Combined gas chromatography— chemical ionization mass spectrometry of sphingolipids. 1. Glucosyl sphingosine, ceramides and cerebrosides of the spleen in Gaucher's disease. 本論文ではグルコセレブロシドに関する化学イオン化質量分析のデータのみ掲載した。

2. 第1編, 第2章の内容は *J. Lipid Res.* 19:370-374(1978)に下記表題で掲載されたものである。

Characterization of trimethylsilyl derivatives of cerebrosides by direct inlet-chemical ionization mass spectrometry.

3. 第1編, 第3章の内容は *J. Lipid Res.* 21:879-887(1980) に下記表題で掲載されたものである。

Characterization of glycosphingolipids by direct inlet chemical ionization mass spectrometry.

4. 第1編, 第4章の内容は *J. Lipid Res.* 23:437-442(1982) に下記表題で掲載されたものである。

Characterization of GM₁ ganglioside by direct inlet chemical ionization mass spectrometry.

5. 第1編, 第5章の内容は *J. Lipid Res.* 25:1090-1101(1984) 下記表題で掲載されたものである。

Characterization of gangliosides by direct inlet chemical ionization mass spectrometry.

6. 第2編, 第1章の内容はLipids に下記表題で掲載予定である。

Lipid analyses of pheochromocytoma PC12 cells: Characterization of globoside as a major neutral glycolipid. 本論文では高速中性原子衝撃-質量分析のデータのみ掲載した。

7. 第2編, 第2章の内容はNeurology 35:1420-1424(1985) に下記表題で掲載されたものである。またJ. Biol.Chem. に下記表題で投稿中である。

The neuropathy of plasma cell dyscrasia: Binding of IgM M-proteins to peripheral nerve glycolipids.

Characterization of glucuronic acid sulfate-containing glycolipids reacting with monoclonal IgM M-proteins in patients with neuropathy.

本論文では高速中性原子衝撃-質量分析のデータのみ掲載した。

8. 第2編, 第3章の内容はJ.Lipid Res. に下記表題で掲載予定である。

Isolation and characterization of ganglioside GM_{1b} from normal human brain. 本論文では高速中性原子衝撃-質量分析のデータのみ掲載した。

文 献

1. S. Hakomori Ann. Rev. Biochem. 50: 733-764 (1981)
2. S. Ando Neurochem. Int. 5: 507-537 (1983)
3. T. Miyatake and T. Ariga J. Neurochem. 19: 1911-1916 (1972)
4. T. Yamakawa and Y. Nagai Trends. Biochem. Sci. 3: 128-131 (1978)
5. E. Nudelman, S. Hakomori and R. Kannagi J. Biol. Chem. 257: 12752-12756 (1982)
6. C.S. Pukel, K.O. Lloyd, L.R. Travassos, W.G. Dippold, H.F. Oettgen and L.J. Old J. Exp. Med. 155: 1133-1147 (1982)
7. M. Kasai, M. Iwamori, Y. Nagai, K. Okamura and T. Tada Eur. J. Immunol. 10: 175-180 (1980)
8. G. Schwarting and A. Summers J. Immunol. 124: 1691-1194 (1980)
9. S. Hakomori and R. Kannagi J. Nat. Can. Inst. 71: 231-251 (1983)
10. W.E. VanHeynigen, C.C.J. Carpenter, N.F. Pierce and W.B. Greenough J. Infect. Dis. 124: 415-418 (1971)
11. J. Holmgren, I. Lonnroth and L. Svennerholm Infect. Immunity 8: 208-214 (1973)
12. W.E. VanHeynigen Nature 249: 415-417 (1974)
13. G. Lees, S.M. Aloj and L.D. Kohn Biochem. Biophys. Res. Commu. 77: 434-441 (1977)

14. P.S. Wu, R.W. Ledeen, S. Udem and Y.A. Isaacson
J. Virol 33: 304-310 (1980)
15. A.J. Yates, R.E. Stephens, P.J. Elder, D.L.
Markowitz and J.M. Rice Cancer Res. 45: 1033-
1039 (1985)
16. K. Samuelsson and B. Samuelsson Biochem. Bio-
phy. Res. Commu. 37: 15-21 (1969)
17. K.A. Karlsson, B.E. Samuelsson and G.O.
Steen Biochem. Biophy. Res. Commu. 37: 22-27
(1969)
18. K.A. Karlsson, I. Pascher, W. Pimlott and B.E.
Samuelsson Biomed. Mass Spectrom. 1: 49-56
(1974)
19. K.A. Karlsson, H. Leffler and B.E. Samuelsson
J. Biol. Chem. 249, 4819-4823 (1974)
20. E.L. Smith, J.M. McKibbin, K.A. Karlsson, I.
Pascher and B.E. Samuelsson Biochim. Biophys.
Acta. 388: 171-179 (1975)
21. P. Hanfland and H. Egge Chem. Phys. Lipid 15:
243-247 (1975)
22. P. Hanfland and H. Egge Chem. Phys. Lipid 16:
201-214 (1976)
23. M. Holm, I. Pascher and B.E. Samuelsson Biomed.
Mass Spectrom. 4: 77-81 (1977)
24. K.A. Karlsson Biochemistry 13: 3643-3647
(1974)
25. S.P. Markey and D.A. Wenger Chem. Phys. Lipids
12: 182-200 (1974)

26. K.L. Rinehart Science 218: 254-260 (1982)
27. F.H. Field and S.B. Munson J. Amm. Chem. Soc. 88: 2621-2626 (1966)
28. B. Munson Anal. Chem. 43: 284 (1971)
29. 村田武, 荒木英爾, 近一夫, 有賀敏夫, 大島美恵子 蛋白質核酸酵素 21: 720-735 (1976)
30. 有賀敏夫 医学のあゆみ 100: 581-586 (1977)
31. Y. Mizuno and T. Ariga Clin. Chim. Acta. 98: 217-224 (1979)
32. 水野美邦, 有賀敏夫 臨床神経学 19: 367-371 (1979)
33. M. Suzuki, I. Morita, M. Kawamura, S. Murota, M. Nishizawa and T. Miyatake J. Chromatogr. 221: 361-366 (1980)
34. M. Yoshida, T. Ariga, I. Kanazawa and T. Miyatake J. Neurochem. 37: 670-676 (1981)
35. T. Ariga, N. Nakajima and M. Yoshida Except. Medica 3-11 (1981)
36. E. Araki, T. Ariga and T. Murata Biomed. Mass Spectrom. 3: 261-264 (1976)
37. T. Ariga, E. Araki and T. Murata Chem. Phys. Lipids 19: 14-19 (1977)
38. T. Ariga, E. Araki and T. Murata Anal. Biochem. 83: 474-483 (1977)
39. T. Murata, T. Ariga and E. Araki J. Lipid Res. 19: 172-176 (1978)
40. E. Araki and T. Ariga Jap. J. Clin. Oncol. 8: 31-35 (1978)

41. M. Suzuki, T. Ariga, M. Sekine, E. Araki and T. Miyatake Anal. Chem. 53: 985-988 (1981)
42. I. Morita, S. Murota, M. Suzuki, T. Ariga and T. Miyatake J. Chromatogr. 154: 285-290 (1975)
43. T. Ariga, M. Suzuki, I. Morita, S. Murota and T. Miyatake Anal. Biochem. 90: 174-182 (1978)
44. Y. Kagawa and T. Ariga J. Biochem. (Tokyo) 81: 1161-1165 (1977)
45. M. Kuriyama, T. Ariga, S. Ando, M. Suzuki, T. Yamada, and T. Miyatake J. Biol. Chem. 256: 12316-12321 (1981)
46. M. Kuriyama, R. Hiwatari, T. Ariga, Y. Sano, J. Abe, M. Osame and A. Igata J. Biochem. (Tokyo) 98: 1041-1047 (1985)
47. M. Kuriyama, T. Ariga, S. Ando, M. Suzuki, T. Yamada, T. Miyatake and A. Igata J. Biochem. (Tokyo) 98: 1049-1054 (1985)
48. M. Oshima, T. Ariga and T. Murata Chem. Phys. Lipids 19: 289-299 (1977)
49. T. Murata, T. Ariga, M. Oshima and T. Miyatake J. Lipid Res. 19: 370-374 (1978)
50. T. Ariga, T. Murata, M. Oshima, M. Maezawa and T. Miyatake J. Lipid Res. 21: 879-887 (1980)
51. T. Ariga, R.K. Yu, M. Suzuki, S. Ando and T. Miyatake J. Lipid Res. 23: 437-442 (1982)
52. T. Ariga, R.K. Yu and T. Miyatake J. Lipid Res. 25: 1096-1101 (1984)

53. R.O. Brady in " The metabolic basis of inherited disease " pp. 731-746 (1978)
54. J. Folch, M. Lees and G.H. Sloane-Stanley J. Biol. Chem. 226: 497-509 (1957)
55. H. Rauvala J. Biol. Chem. 251: 7517-7520 (1976)
56. S. Ando, N.C. Chang and R.K. Yu Anal. Biochem. 89: 437-450 (1978)
57. T. Taketomi and T. Yamakawa J. Biochem. (Tokyo) 54: 441-451 (1963)
58. F.T. Scharom and C.W.M. Grant Biochem. Biophys. Res. Commu. 67: 1501-1506 (1975)
59. T. Miyatake, S. Handa and T. Yamakawa Jap. J. Exp. Med. 38: 135-138 (1968)
60. S. Hakomori J. Biochem. (Tokyo) 55: 205-208 (1964)
61. K.A. Karlsson, I. Pascher and B.E. Samuelsson Chem. Phys. Lipids 12: 271-286 (1974)
62. K.A. Karlsson FEBS. Letts. 32: 317-320 (1973)
63. T. Momoi, S. Ando and Y. Nagai Biochim. Biophys. Acta. 441: 488-497 (1976)
64. S. Ando, K. Kon, Y. Nagai and T. Murata J. Biochem. (Tokyo) 82: 1623-1632 (1977)
65. Y. Kishimoto, W.E. Davies and N.S. Radin J. Lipid Res. 6: 532-535 (1965)
66. S. Ando and R.K. Yu J. Neurosci. Res. 12: 205-211 (1984)
67. Y. Fuji, H. Higashi, K. Ikuta, S. Kato and M. Naiki Mol. Immunol. 19: 87-94 (1982)

68. T. Ariga, M. Sekine, R.K. Yu and T. Miyatake
J. Biol. Chem. 257: 2230-2235 (1982)
69. T. Ariga, M. Sekine, K. Nakamura, M. Igarashi,
M. Nagashima, T. Miyatake, A. Suzuki and T.
Yamakawa J. Biochem. (Tokyo). 93: 889-893
(1983)
70. K. Nakamura, M. Nagashima, M. Sekine, M.
Igarashi, T. Ariga, T. Atsumi, T. Miyatake, A.
Suzuki and T. Yamakawa Biochim. Biophys. Acta.
752: 291-300 (1983)
71. T. Ariga, M. Sekine, R.K. Yu and T. Miyatake
J. Lipid Res. 24: 737-745 (1983)
72. T. Ariga, M. Sekine, R.K. Yu and T. Miyatake
Arch. Biochem. Biophys. 232: 305-309 (1984)
73. T. Yamakawa and S. Suzuki J. Biochem. (Tokyo)
38: 199-212 (1951)
74. S. Hakomori Biochim. Biophys. Acta. 417: 55-89
(1975)
75. H. Nojiri, F. Takaku, M. Ohta, Y. Miura and M.
Saito Cancer Res. 45, 6100-6106 (1985)
76. R.K. Yu and R.W. Ledeen J. Lipid Res. 11: 506-
516 (1970)
77. R.W. Ledeen, K. Salsman and K. Cabrers Bio-
chemistry 7: 2287-2295 (1968)
78. R.W. Ledeen and K. Salsman Lipids 5: 751-756
(1970)
79. Y. Tanaka, R.K. Yu, S. Ando, T. Ariga and T.
Itoh Carbohydr. Res. 126: 1-14 (1984)

80. R.K. Yu, S. Ando, Y. Tanaka, T. Itoh, T. Ariga, M. Suzuki and T. Miyatake Glycoconjugates 6: 198-199 (1981)
81. M. Barber, R.S. Bordori, R.D. Sedwick and A.W. Tyler Nature 293: 270-275 (1981)
82. M. Arita, M. Iwamori, H. Higuchi and Y. Nagai J. Biochem. (Tokyo). 94: 249-256 (1983)
83. A. Dell, H.R. Morris, H. Egge, H. VanNicolai and G. Strecker Carbohydr. Res. 115: 41-52 (1983)
84. H. Egge, J. Peter-Katalinic and P. Hanfland Adv. Exp. Med. Biol. 174: 55-63 (1984)
85. M. Arita, M. Iwamori, H. Higuchi and Y. Nagai J. Biochem. (Tokyo). 95: 971-981 (1984)
86. M. Hemling, R.K. Yu, D. Sedwick and K.L. Rinehart Biochemistry 23: 5706-5713 (1984)
87. M. Hemling, R.K. Yu, T. Ariga and K.L. Rinehart Biochemistry in press. (1986)
88. T. Ariga, D. Pentek and R.K. Yu Carbohydr. Chem. in press. (1986)
89. T. Ariga, R.K. Margolis, R.K. Yu, L.C. Macala, M. Saito, L.A. Greene and R.U. Margolis Lipids in press. (1986)
90. R.K. Yu, R.K. Margolis, T. Ariga, L.C. Macala, M. Saito, L.A. Greene and R.U. Margolis J. Am. Oil Chem. Soc. 63: 421 (1986)
91. L. Fredo, T. Ariga, M. Saito, L.C. Macala, R.K. Yu and N. Latov Neurology 35: 1420-1424 (1985)

92. T. Ariga, L. Fredo, N. Latov, M. Saito and R.K. Yu J. Biol. Chem. submitted (1986)
93. T. Ariga and R.K. Yu J. Lipid Res. in press. (1986)
94. L.A. Greene and A.S. Tischler Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 2424-2428 (1976)
95. M.A. Dichter, A.S. Tischler and L.A. Greene Nature 268: 501-504 (1977)
96. R.K. Margolis, S.R.J. Salton and R.U. Margolis J. Biol. Chem. 258: 4110-4117 (1983)
97. R.U. Margolis, M. Mazzulla, L.A. Greene and R.K. Margolis FEBS. Letts 172: 339-342 (1984)
98. R.A. Lain and S. Hakomori Biochem. Biophy. Res. Commu. 54: 1039-1045 (1973)
99. J.G. McLeod, J.C. Walsh and J.D. Pollard Peripheral Neuropathy pp. 1847-1865 (1984)
100. N. Latov Neuroimmunol. Raven Press pp. 261-273 (1984)
101. N. Latov, P.E. Braun, R.B. Gross, W.H. Sherman and L. Chess Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 7139-7142 (1981)
102. P.E. Braun, D.E. Frail and N. Latov J. Neurochem. 39: 1261-1265 (1982)
103. A.J. Steck, N. Murray, N. Page and G. Pewceisseau Neurology 33: 19-23 (1983)
104. T. Ariga, L. Fredo, N. Latov, M. Saito, L. Macala and R.K. Yu Trans. Am. Soc. Neurochem. 16: 158 (1985)

105. L. Fredde, T. Ariga, M. Saito, L. Macala, R.K. Yu and N. Latov J. Neurochem. 44: S56 (1985)
106. K.H. Chou, A.A. Ilyas, J.E. Evans, R.H. Quales and F.B. Jungawala Biochem. Biophys. Res. Commu. 128: 383-388 (1985)
107. A. Stoffyn, P. Stoffyn and M.C.M. Yip Biochim. Biophys. Acta. 409: 97-103 (1975)
108. S. Kusunoki, S. Tsuji and Y. Nagai Brain Res. 334: 117-124 (1985)
109. S. Ando and R.K. Yu J. Biol. Chem. 254: 12224-12229 (1979)
110. M. Matsumoto, T. Taki, B. Samuelsson, I. Pascher, Y. Hirabayashi, S.C. Li and Y.T. Li J. Biol. Chem. 256: 9737-9741 (1981)
111. M. Saito, H. Nojiri and M. Yamada Biochem. Biophys. Res. Commu. 97: 452-462 (1980)
112. K. Nakamura, Y. Hashimoto, M. Suzuki, A. Suzuki and T. Yamakawa J. Biochem. (Tokyo) 96: 949-957 (1984)
113. T. Taki, H. Kimura, C. Takatsu and M. Matsumoto J. Biochem. (Tokyo). 94: 925-930 (1983)
114. M.C.M. Yip and N.T. Nguyen Lipids 16: 72-74 (1981)