

助成番号：216

牛乳中のスフィンゴ脂質の化学構造と分子種の解析

伊藤 精 亮

農産化学科食品化学研究室

1. 目 的

乳脂中の球膜を構成するスフィンゴ脂質の構造および組成については、著者らを含めて2, 3の報告があるが、分子種的な解析を行った報告は見あたらない。今回、著者らは牛乳からスフィンゴミエリン (SPM)、モノグリコシルセラミド (G_1 CM)、ジグリコシルセラミド (G_2 CM) を分離して、それぞれの構成成分、とくに牛乳スフィンゴ脂質に特徴的な分枝型スフィンゴイドについて調べ、さらに SPM の分子種について検討した。また微量成分であるガングリオシドについてもその構成成分について調べた。

2. 方 法

(1) スフィンゴ脂質の分離

牛乳 20l を用いて行なったスフィンゴ脂質の分離法の概略を Fig. 1 に示す。

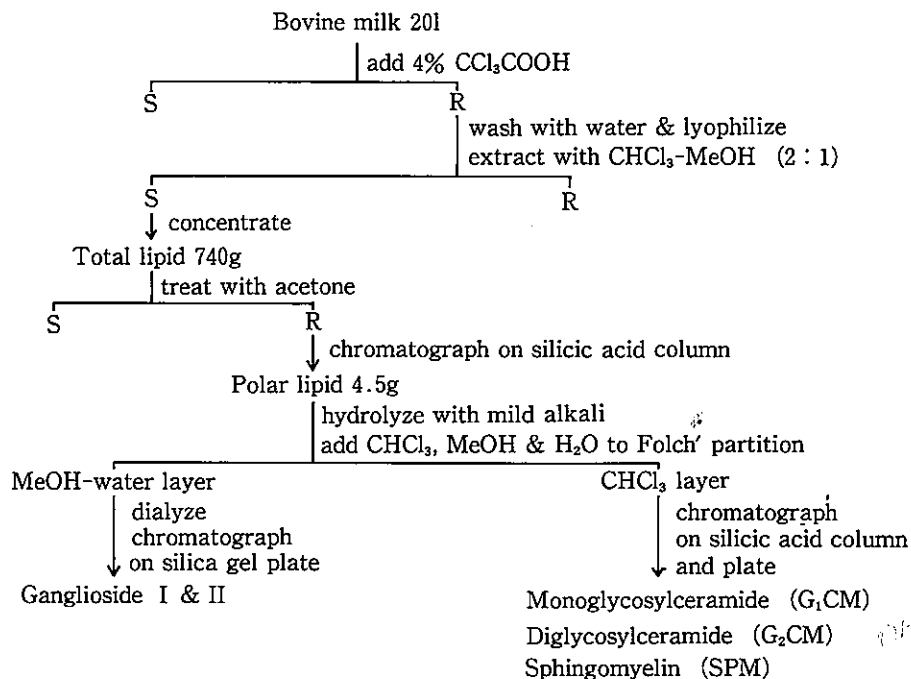


Fig. 1. Isolation of bovine milk sphingolipids

(2) スフィンゴミエリンの酵素分解

SPM をホスホリパーゼ C で水解してセラミド (CM) を調製した。

(3) セラミド残基の分析

SPM から調製した CM 残基の主要な分子種は、主としてガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) で分析した。

(4) 構成成分の分析

各スフィンゴ脂質を酸およびアルカリで水解して得られた脂肪酸、スフィンゴイドおよび糖を薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー (GLC) および GC-MS で分析した。またスフィンゴイドは過ヨウ素酸酸化でアルデヒドに誘導して GLC で分析した。ガングリオシドはノイラミニダーゼで処理して、生成物を TLC で分別した。

3. 結 果

牛乳 20ml からのスフィンゴ脂質の収量は 1.1g で、SPM, G₁CM, G₂CM およびガングリオシドの割合は、ほぼ 69 : 10 : 20 : 1 であった。TLC 上でレゾルシノール試薬陽性のガングリオシドに相当するスポットは 4 つが検出され、その主要なスポット I および II を分離して、以下の分析に供した。

(2) 脂肪酸組成

スフィンゴ脂質全体を通じて、主要な構成脂肪酸は C₂₀~C₂₄ の飽和酸で、とくに C₂₃ の存在が特徴的であった (Table 1)。また G₁CM と G₂CM には 2-ヒドロキシ脂肪酸も検出された。牛乳中の

Table 1. Composition of fatty acids in bovine milk sphingolipids (%)

Fatty acid	(CM)	G ₁ CM		G ₂ CM		SPM	Ganglioside		
		Normal	2-Hydroxy	Normal	2-Hydroxy		Total	I	II
16:0	7	18	2	17	11	18	8	7	6
18:0	1	2	1	1	1	2	3	2	1
20:0	<1	1	1	2	4	1	1	1	1
21:0	2	1	1	2	8	1	<1	1	1
22:0	18	24	16	22	3	22	22	23	28
22:1	<1	1	-	2	-	1	1	<1	1
23:0	38	27	36	25	17	29	30	31	34
23:1	<1	1	-	3	-	2	1	3	1
24:0	30	15	38	15	34	20	21,	25	24
Others	4	10	5	11	22	4	13	7	3
Ratio		75	: 25	97	: 3				

ガングリオシドの脂肪酸組成については Keenan および Kaung の報告があるが、今回の結果はそれらのパターンとは異なっていた。

(3) スフィンゴイド組成

主要なスフィンゴイドは各スフィンゴ脂質に共通で、C₁₈-スフィンゲニン (h₂18:1) が最も多かった。その他 h₂16:1, 16-メチル-h₂17:1, h₂16:0, h₂17:1 および 17-メチル-h₂18:1 などが認められた。直鎖型と分枝型の割合は、ほぼ 9:1 であった。

Table 2. Composition of sphingoids in bovine milk sphingolipids (%)

Sphingoid	(CM)	G ₁ CM		G ₂ CM		SPM	
		Authors	Morrison*	Authors	Morrison	Authors	Morrison
h ₂ 16:1	36.1	16.3	10.4	10.3	11.6	21.6	21.0
h ₂ 16:0	7.3	3.2	2.1	9.3	3.6	13.5	8.2
h ₂ 17:1	7.9	6.7	4.7	5.0	3.9	6.9	6.4
iso h ₂ 18:1	16.0	12.7	6.7	9.1	7.7	13.2	8.9
h ₂ 18:1	35.0	50.6	48.1	42.9	37.6	25.9	33.5
h ₂ 18:0	1.0	1.8	2.0	11.8	4.9	9.1	5.9
iso h ₂ 19:1	1.2	1.3	2.2	1.6	2.0	0.1	1.8
h ₂ 19:1	<0.1	3.5	2.0	4.2	2.2	2.9	0.8
others	<0.1	3.9	21.8	5.4	26.5	6.8	13.5

*Biochim. Biophys. Acta (1970)

(4) ガングリオシドの酵素分解生成物

主要なガングリオシド I および II をノイラミニダーゼで処理した後に TLC に供すると、中性糖脂質成分はいずれも G_2CM と同様の挙動を示した。ガングリオシド I および II の中性糖の組成は、いずれもグルコースとガラクトースの比がほぼ 1:1 であったことから、分解生成物はいずれもラクトシルセラミド (G_2CM) であることが認められた。したがってガングリオシド I および II の構造は TLC 上の R_f 値および糖組成から、それぞれヘマトシド (GM_3) およびジシアロヘマトシド (GD_3) と推定された。

(5) スフィンゴミエリンの分子種

SPM をホスホリパーゼ C で処理して得られた CM を TLC に供すると、2 つのスポットに分離した。これらは CM を構成している脂肪酸が異なる分子種群によるものと推定された。全体の CM をトリメチルシリル化後に GLC および GC-MS で分析すると、トータルイオンにおいて 8 つのピークが検出された。ピーク I ~ II は TLC の下のスポットの CM 群に対応し、比較的炭素数の小さい分子種群で、またピーク III ~ VIII は TLC の上のスポットに相当して、炭素数の大きい分子種群であった。それぞれのピークのマスペクトルを測定すると、すべてのピークに CM に特有のイオンが検出された。そのうち脂肪酸に由来する M-a およびスフィンゴイドに由来する M-d の各イオンによるマスキロマトグラム (Fig. 2) から、脂肪酸は主として $C_{16}:0$, $C_{22}:0$, $C_{23}:0$ および $C_{24}:0$,

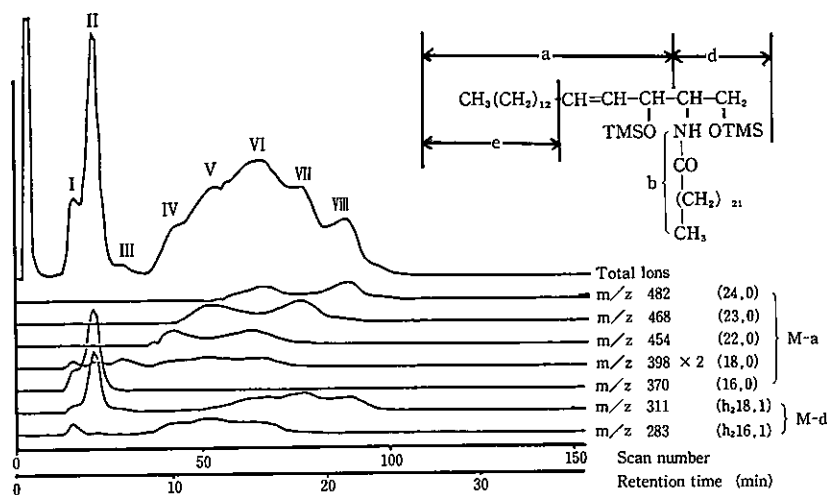


Fig. 2. Mass chromatograms of ceramides prepared from bovine milk SPM

またスフィンゴイドは主として $h_218:1$ および $h_216:1$ の存在が認められた。

これらの結果から、SPM から調製した CM の分子種 (Table 3) は炭素数 32 から 42 までのものが 70% 以上を占めていた。このなかで主要なタイプは $h_218:1-C_{23}:0$, $h_216:1-C_{23}:0$, $h_218:1-C_{16}:0$ および $h_218:1-C_{22}:0$ であった。

Table 3 . Molecular species of ceramide prepared from bovine milk SPM

Peak number	Carbon number	Major molecular species (%) (sphingoid-fatty acid)
I	32	$h_216 : 1-16 : 0$ 4.5
II	34	$h_218 : 1-16 : 0$ 14.3
III	36	$h_218 : 1-18 : 0$ 0.4
IV	38	$h_216 : 1-22 : 0$ 9.0
V	39	$h_216 : 1-23 : 0$ 17.5
VI	40	$h_216 : 1-24 : 0$ 11.6
		$h_218 : 1-22 : 0$ 13.7
VII	41	$h_218 : 1-23 : 0$ 17.8
VIII	42	$h_218 : 1-24 : 0$ 11.2

4. 考 察

今回は SPM 以外のスフィンゴ脂質の分子種については分析を行なわなかったが、各スフィンゴ脂質の脂肪酸組成 (Table 1) およびスフィンゴイド組成 (Table 2) が高い類似性を示すことから、牛乳スフィンゴ脂質の構造は、SPM とほぼ同様の共通の CM 基を有することが示唆された (Fig.

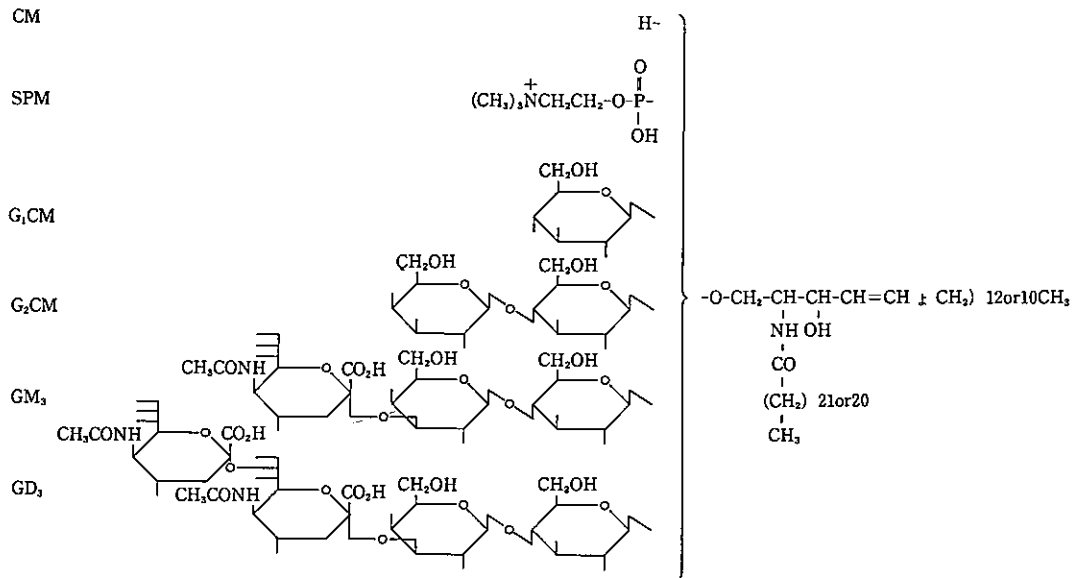


Fig. 3 . Principal molecular species of bovine milk sphingolipids

3)。またガングリオシド画分としては4つのスポットが検出されたが、微量の2つのスポットについては分析できなかった。今後はこれらの成分についてもさらに解析を進めたい。