

# <sup>15</sup>N-標識基質の経口投与によるマウス臓器組織での グリセロリン脂質とスフィンゴ脂質の塩基代謝

倉橋 壽

信州大学医学部加齢適応研究センター神経加齢部門加齢生化学分野  
(主任: 武富 保教授)

## Metabolic Studies of N-Bases of Glycerophospholipids and Sphingolipids in Various Organs and Tissues of Mouse after Oral Administration of <sup>15</sup>N-Labeled Substrates

Hisashi KURAHASHI

Department of Biochemistry, Division of Neuro-Aging,  
Research Center on Aging and Adaptation, Shinshu University School of Medicine  
(Director: Prof. Tamotsu TAKETOMI)

After oral administration of <sup>15</sup>N-labeled glycine, L-serine, ethanolamine and choline to mice, the lipid metabolism of the incorporation of <sup>15</sup>N-atom into N-bases of glycerophospholipids and sphingolipids in organs and tissues was investigated. <sup>15</sup>N-Glycine was assumed to be taken into the cells and metabolically converted to <sup>15</sup>N-L-serine which was used for the production of glycerophospholipids and sphingolipids. <sup>15</sup>N-Ethanolamine was incorporated into phosphatidylethanolamine, which was also converted to phosphatidylcholine (PC) by methylation, thereafter the free <sup>15</sup>N-choline derived from PC was assumed to be metabolized through betaine to <sup>15</sup>N-glycine and <sup>15</sup>N-L-serine. Although the CDP-<sup>15</sup>N-choline is produced by <sup>15</sup>N-choline, the rate of <sup>15</sup>N-atom% excess in sphingomyelin (SM) to PC was found to be a little different in the administration of <sup>15</sup>N-choline and <sup>15</sup>N-ethanolamine. It was thus suggested that SM was mainly synthesized from ceramide and phosphocholine derived from PC, not from CDP-choline. <sup>15</sup>N-Choline and <sup>15</sup>N-ethanolamine were incorporated into phospholipids more quantitatively than <sup>15</sup>N-serine. The <sup>15</sup>N-choline and <sup>15</sup>N-ethanolamine labeled phospholipids were assumed to be utilized for the formation of lipoprotein which is synthesized in liver and secreted into the blood circulation. From the result of the utilization of <sup>15</sup>N-substrates for the synthesis of phospholipids, it was shown that phospholipids are always metabolized and synthesized so as to maintain their own compositions in organs and tissues. *Shinshu Med J* 45: 515-534, 1997

(Received for publication July 31, 1997)

---

**Key words:** lipid metabolism, stable isotope labeling, betaine, glycerophospholipid, sphingolipid  
脂質代謝, 安定同位体標識, ベタイン, グリセロリン脂質, スフィンゴ脂質

---

### I 緒 言

別刷請求先: 倉橋 壽

〒390 松本市旭 3-1-1

信州大学医学部加齢適応研究センター加齢生化学

従来, 多くの研究者によって報告されているように  
脂質は神経の機能や細胞の生存に重要な役割を果たし

ており、セリン、コリン、エタノールアミンなどの基質はリン脂質組成を決めるリン脂質塩基代謝に深い係わりを有している。リン脂質の代謝速度は通常その半減期や単位時間当たりの更新量で表示されるが、各種の基質をその代謝経路上で再利用し、更に循環経路も多く存在するため真の代謝速度を測定することについての困難さが生じる。そのため実際には $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ などの放射性同位元素を含む標識化合物を投与して各脂質に取り込ませたのち、各脂質の放射活性がどのように変化するかを観察していることが多い。

この研究手段として $^{15}\text{N}$ -安定同位元素を利用して *in vivo* で N-含有脂質の塩基代謝を研究することは取り扱いの安全性に加えて分析も比較的容易であり放射性同位元素の $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ などを用いた研究とは違った長所がある。 $^{15}\text{N}$ -安定同位元素の標識化合物を使用する利点は基質に1個存在する窒素原子が複合脂質の塩基に取り込まれて塩基とともに移動するため正味の塩基代謝が反映されることである。

$^{15}\text{N}$ -標識化合物を使用したリン脂質代謝の最初の研究は Stetten<sup>1)</sup>により成熟ラットのリン脂質で $^{15}\text{N}$ -コリンと $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンが置き換えられることが確認され、エタノールアミンはリン脂質を介してコリン生合成の前駆物質となっていることが示された。この当時の研究は質量分析器により $^{15}\text{N}$ -同位元素の分析を行っていたが $^{15}\text{N}$ -分光分析器が使用されるようになるとより迅速かつ簡便に行われるようになった。

Takekomiら<sup>2)3)</sup>はマウスの脳以外の臓器組織で $^{15}\text{N}$ -コリンと $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンが数時間でリン脂質に取り込まれることを見だし、 $^{15}\text{N}$ -DL-セリンもマウスの脳と臓器のリン脂質やスフィンゴ脂質に取り込まれることを確認した。その後、培養神経芽腫細胞に $^{15}\text{N}$ -グリシンを添加してグリセロリン脂質およびスフィンゴ脂質の N-塩基の形成にグリシンが間接的に利用されることを $^{15}\text{N}$ -L-セリン、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンおよび $^{15}\text{N}$ -コリンと比較して確認した<sup>4)</sup>。その際、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの添加で少量の $^{15}\text{N}$ -ホスファチジルセリンが測定されたことからリン脂質の生合成に関与する新たな経路の存在が推定された。

一方、脳では脳血液関門により血中のアミノ酸や塩基などの基質導入が抑制されているように、生体の各臓器組織では脂質代謝に関与する酵素が作用して脂質の組成やその合成能力に相違が生じており、 $^{15}\text{N}$ -標識化合物を利用して各種の臓器組織で一度に脂質構成動態を比較検討した報告は見当たらない。この方法によ

ってリン脂質生合成の新たな経路の存在が明らかにされるだけでなく、スフィンゴミエリンなど脂質生合成上の問題点も解明される手掛かりになり得るものと期待される。本研究では、 $^{15}\text{N}$ -標識化合物をマウスに継続して経口投与し、各臓器組織のグリセロリン脂質とスフィンゴ脂質への $^{15}\text{N}$ -原子の取り込みを測定し、複合脂質の塩基代謝を中心に関連する諸問題について考察した。

## II 材料と方法

### A 実験動物と $^{15}\text{N}$ -化合物の投与

$^{15}\text{N}$ -化合物は $^{15}\text{N}$ -グリシン (99 atom%)、 $^{15}\text{N}$ -L-セリン (95-99 atom%)、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミン (99 atom%)を ICON 社 (New York) の製品で、 $^{15}\text{N}$ -塩化コリン (92 atom%)は光興業社 (東京) の製品を使用し、蒸留水で16%の溶液を調製した。

実験動物は生後4カ月で体重約45gのマウス(雄, ddy系)を使用し、12匹を1群3匹の4群とした。 $^{15}\text{N}$ -グリシン16%溶液を体重10g当たり0.1ml、すなわち1.6g/kgで1日間、2日間、4日間、8日間の各期間の群に分けて1日1回経口投与した。 $^{15}\text{N}$ -L-セリン、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミン、 $^{15}\text{N}$ -塩化コリンも $^{15}\text{N}$ -グリシン投与と同様に1.6g/kgで1日間、2日間、4日間、8日間の各群に経口投与して実験に供した。実験期間中の水や餌は自由に摂取させ、 $^{15}\text{N}$ -化合物最終投与の24時間後に吸入麻酔し、心臓穿刺により採血後、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、小腸、精巣、大腿筋をそれぞれ摘出した。

### B 脂質の抽出と TLC による分離

各臓器組織は $^{15}\text{N}$ -化合物別、投与期間別に分けて冷却し直ちに脂質抽出を行った。各群の臓器組織は20容のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 溶液中でホモジナイザーにより破碎し一夜放置後、濾過して濾液を採取し、残渣は10容のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 溶液中で再度、抽出濾過して採取した濾液を合わせて Folch's partition<sup>5)</sup>に従い分液ロートにその1/5量の水を加えて分配した。上層と下層を分離して下層のクロロホルム層を取り理論的上層で洗った後、窒素ガスで乾燥して重量を計りクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に溶解して TLC の試料とした。

Silica gel 60 の TLC はクロマトグラフィーを行う前にオープンで活性化した<sup>6)</sup>。脂質はクロロホルム/メタノール/水 (65:25:4, v/v) で1次展開した

のちホスファチジルエタノールアミン (PE) とエタノールアミンプラスマローゲン (EPL) とを分離するため塩酸ガスに数分曝してから乾燥し、クロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水 (50:20:10:15:5, v/v) で2次展開した。TLCは沃素蒸気に曝してそれぞれの脂質の分画を確認し、その分画の珪酸をかきとりクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) で溶解して遠心分離後、溶液部分を窒素ガスで乾燥して $^{15}\text{N}$ -atom% excess とリンの分析試料とした。セラミド (CER) の分離はグラスウールを詰めたガラス管内に0.5gのKieselgel 60を入れた珪酸カラムクロマトグラフィーを用いた。カラムにクロロホルムを満たし、CERを含むTLCの珪酸分画をカラム上部に加え、12.5mlのクロロホルムでコレステロールエステル等を流出させ、次いでクロロホルム/メタノール (95:5) 溶液でCERを流出させて分取した溶液を窒素ガスで乾燥して $^{15}\text{N}$ -atom% excess の分析試料とした。

#### C グリセリン脂質とスフィンゴ脂質の $^{15}\text{N}$ -atom% excess の測定

各脂質成分はクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) の3滴に溶解し、外径2mm, 内径0.8mm, 長さ1cmの小径ガラス管の内側に吸い込ませ、80°Cの乾燥器内に1時間放置した。 $^{15}\text{N}$ 分析用のKumazawa Model NIA-1の装置<sup>7)</sup>に適するように加工した外径4mm, 内径2.2mm, 長さ18cmのガラス管に酸化銅と酸化カルシウムを混合した錠剤の破片を適量加えて580°Cで加熱活性化した放電管を作製し、その中へ脂質を付着させた小径ガラス管を挿入後、減圧高真空にして放電管の末端を融封した。放電管内の脂質試料は電気炉内580°Cで約3時間加熱分解し、生じる水と炭酸ガスを活性化した酸化銅と酸化カルシウムに吸収させた。放電管内に残った窒素ガスを高周波により撫子色に励起発光させるN-15分析器 (JASCO, Model NIA-1) により $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ と $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ の分光強度比を3回以上測定して $^{15}\text{N}$ -atom%の平均値を計算し、自然界に存在する $^{15}\text{N}$ の割合0.36%を差し引いて $^{15}\text{N}$ -atom% excess が求められた<sup>7)</sup>。

#### D リン脂質のリンの定量

リン脂質の組成はTLCにより分画されたリン脂質を試験管にかきとり、Bartlettの方法<sup>8)</sup>でリンを定量することにより決定した。

### III 結果

#### A 各 $^{15}\text{N}$ -基質のN-含有脂質への取り込みの比較

##### 1 $^{15}\text{N}$ -L-セリンのN-含有脂質への取り込み

$^{15}\text{N}$ -L-セリンを経口投与した結果はFig. 1に示すようにホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE), エタノールアミンプラスマローゲン (EPL), ホスファチジルコリン (PC), セラミド (CER), スフィンゴミエリン (SM) のN-含有脂質で投与回数により $^{15}\text{N}$ -atom% excessの増加が見られた。PSやCERの多くはL-セリンから生合成されており、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンや $^{15}\text{N}$ -コリンからの生合成は少ないことがわかる。脳以外の臓器組織のPEの $^{15}\text{N}$ -atom% excessは前駆体であるPSの値に比例してやや増加したが、脳はPSの $^{15}\text{N}$ -atom% excessが他の組織とほぼ同様であるにもかかわらずPEへの変換は遅く少ない。PCは小胞体のメチル転移酵素によるPEのメチル化で合成され<sup>9)10)</sup>,  $^{15}\text{N}$ -atom% excessの割合から肝臓で特に増加していた。CERにおける $^{15}\text{N}$ -atom% excessの増加は $^{15}\text{N}$ -L-セリンから生じたスフィンゴシン塩基によるものであり<sup>11)~14)</sup>, 腎臓, 小腸, 肝臓, 膵臓などで生合成が盛んで、そのほとんどがSMに転換される<sup>15)16)</sup>。またSMは主にCERにPCのホスホコリン基が導入されて生合成されるが<sup>17)</sup>, 肝臓や腎臓での生合成が多くなされていた。 $^{15}\text{N}$ -L-セリンを経口投与した場合、セリン塩基交換反応で最初に生合成されるPSの $^{15}\text{N}$ -atom% excessは投与8日目でも3%前後と低いため引き続き生合成されるN-含有脂質の $^{15}\text{N}$ -atom% excessも2%前後で少なかった。

##### 2 $^{15}\text{N}$ -グリシンのN-含有脂質への取り込み

$^{15}\text{N}$ -グリシンを経口投与した場合はFig. 2に示すように投与回数の増加によりPS, PE, EPL, PC, CER, SMの全ての脂質で $^{15}\text{N}$ -atom% excessの増加が見られ、これらのN-含有脂質の生合成にはグリシンが関与していることが確認された。この結果は $^{15}\text{N}$ -L-セリンを経口投与した結果と類似しており、PSがPEやPCの塩基部分をL-セリンと交換して合成されることから、グリシンはL-セリンに変換された後でPSに取り込まれたものと考えられた。 $^{15}\text{N}$ -L-セリンと比較すると $^{15}\text{N}$ -グリシンでは当初、多くの組織で $^{15}\text{N}$ -atom% excessが少なくN-含有脂質の生合成が遅れていたが、 $^{15}\text{N}$ -グリシンの投与回数が増えると肝臓, 腎臓, 小腸などで $^{15}\text{N}$ -L-セリン投与の $^{15}\text{N}$ -

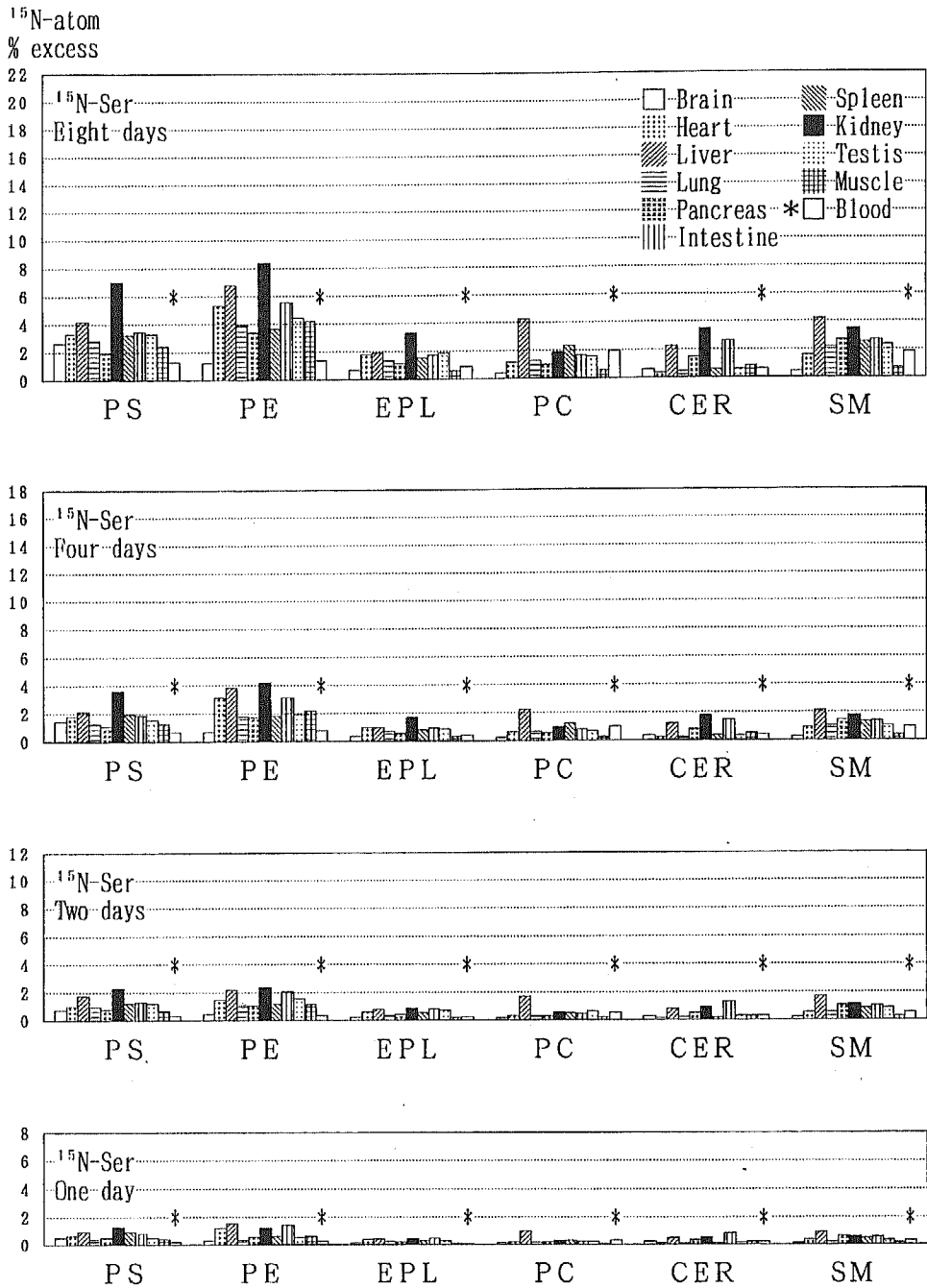


Fig. 1 Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -atom into glycerophospholipids and sphingolipids in various tissues of mice at different days after oral administration of  $^{15}\text{N}$ -L-serine ( $^{15}\text{N}$ -Ser) 1.6g/kg body weight/day. Abbreviations as in Table 1.

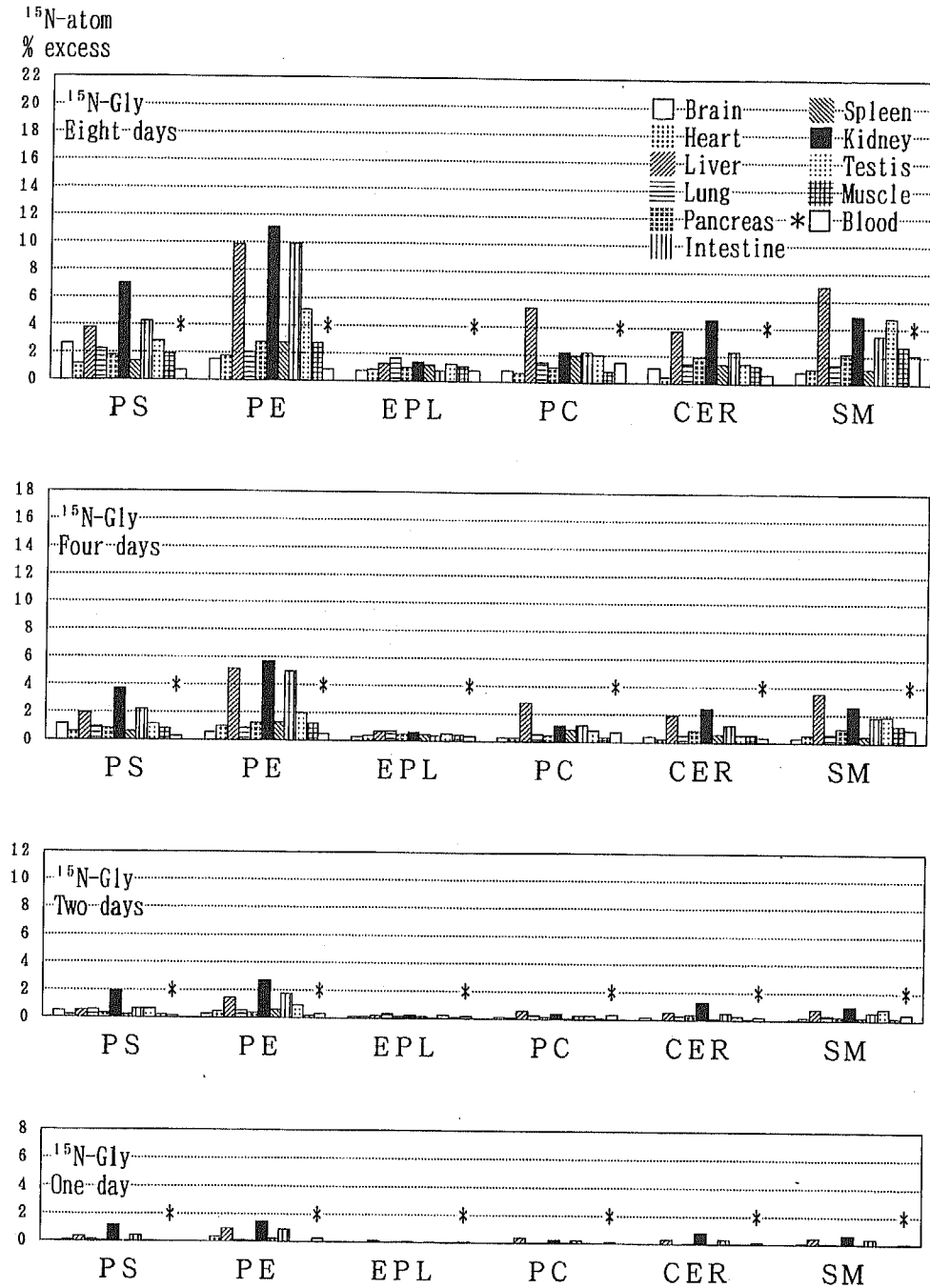


Fig. 2 Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -atom into glycerophospholipids and sphingolipids in various tissues of mice at different days after oral administration of  $^{15}\text{N}$ -glycine ( $^{15}\text{N}$ -Gly) 1.6g/kg body weight/day. Abbreviations as in Table 1.

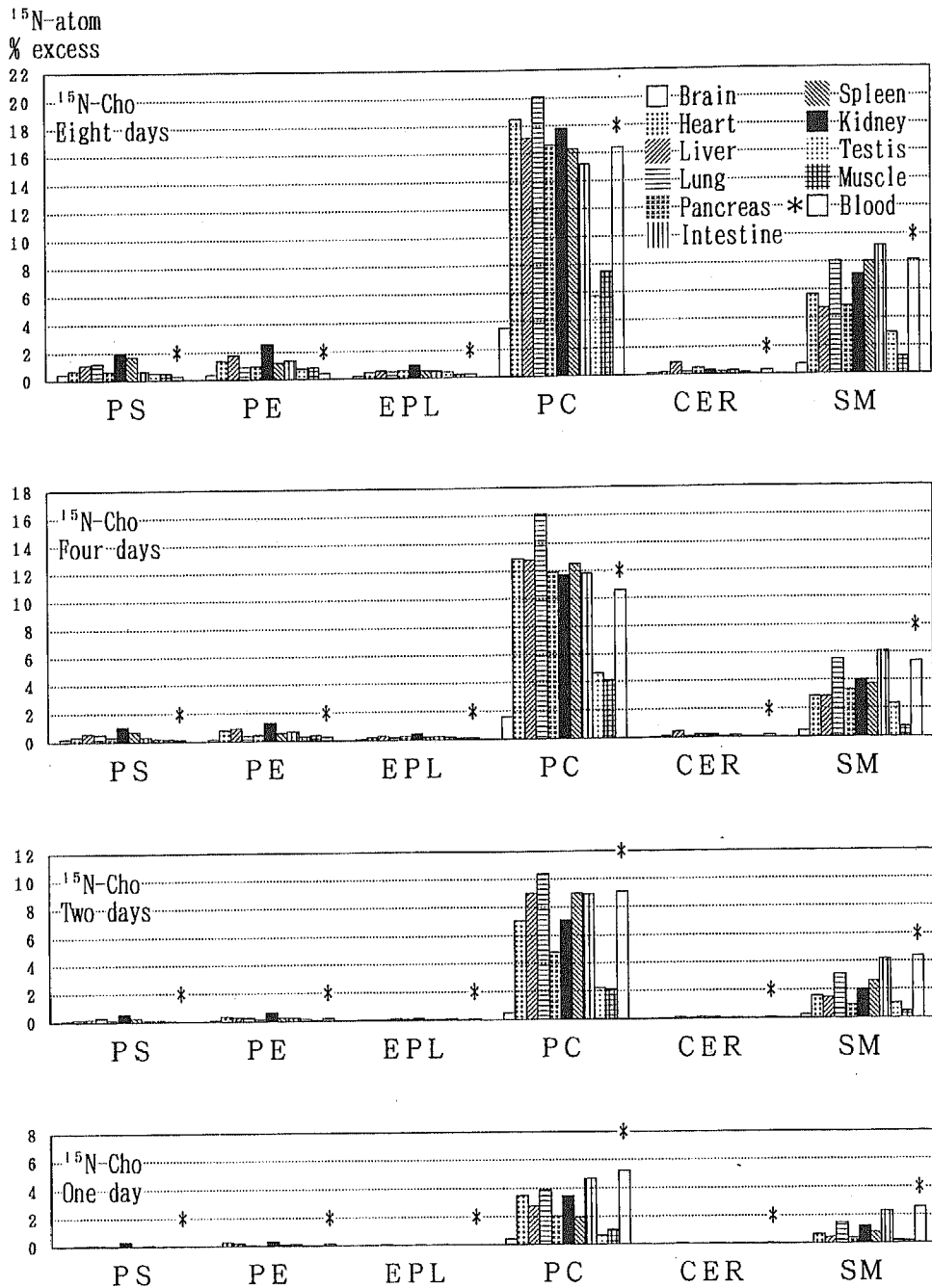


Fig. 3 Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -atom into glycerophospholipids and sphingolipids in various tissues of mice at different days after oral administration of  $^{15}\text{N}$ -choline ( $^{15}\text{N}$ -Cho) 1.6g/kg body weight/day. Abbreviations as in Table 1.

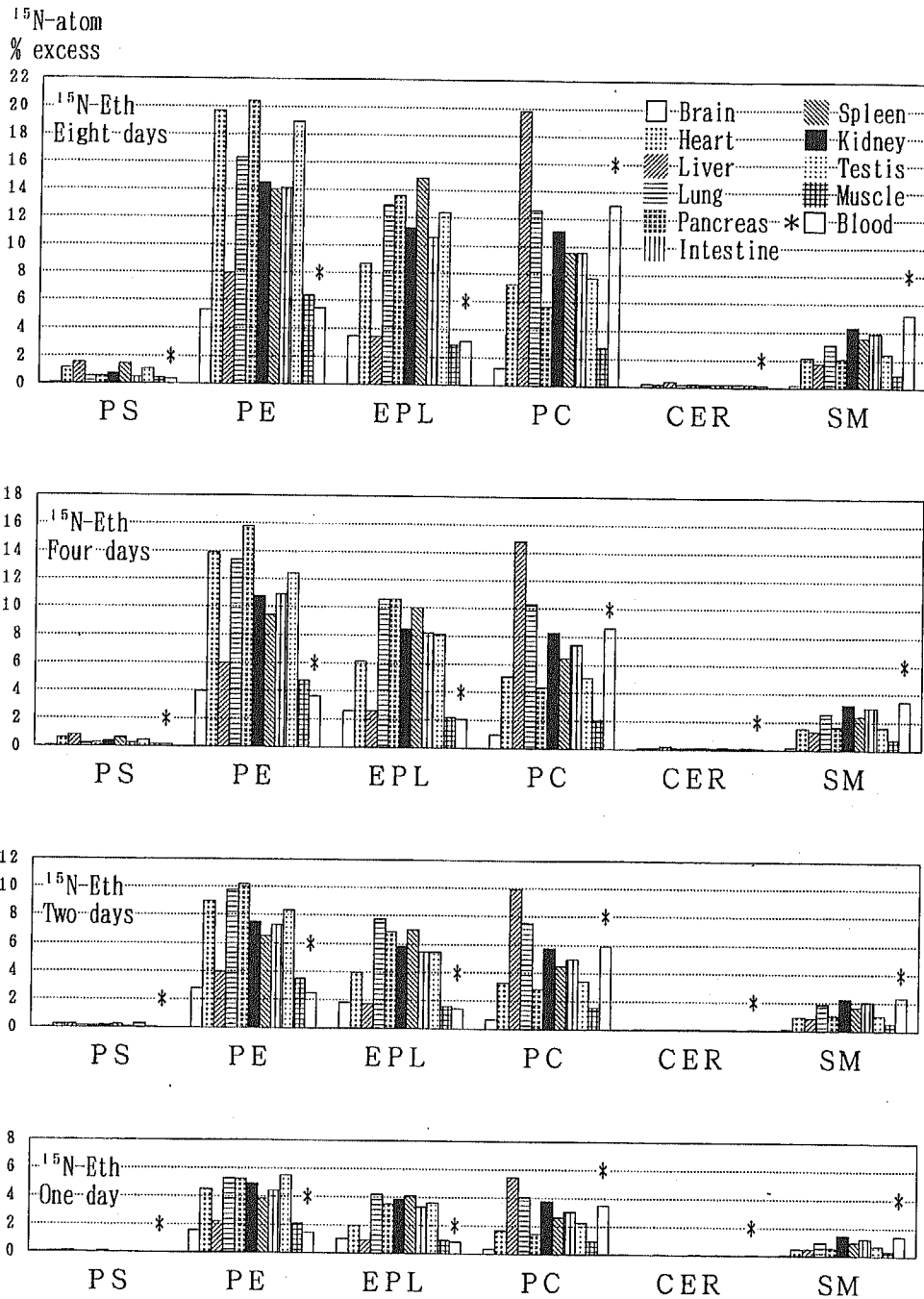
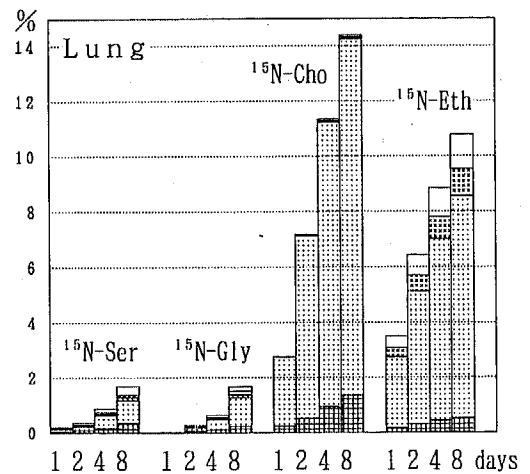
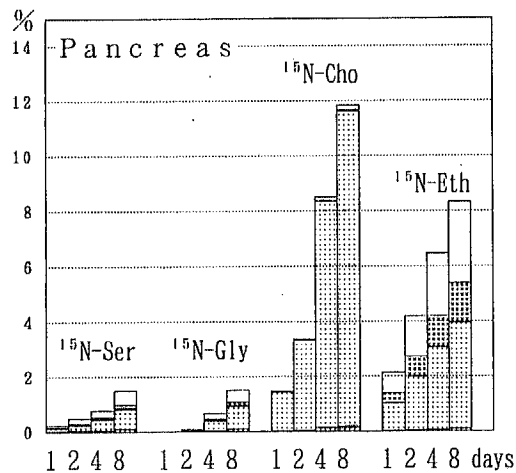
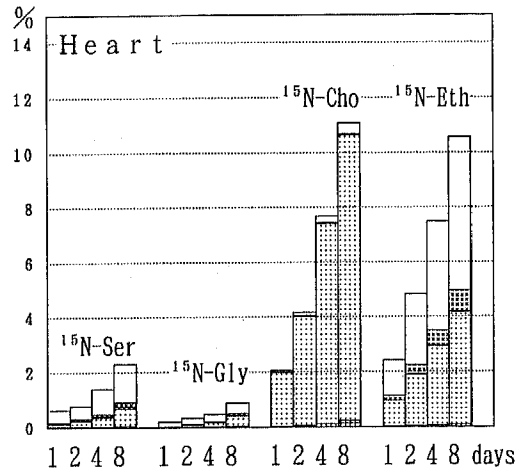
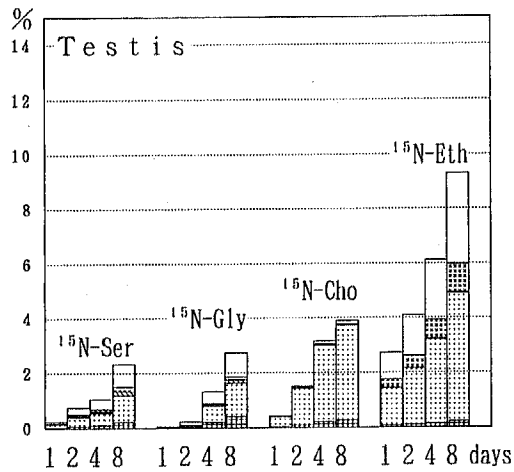
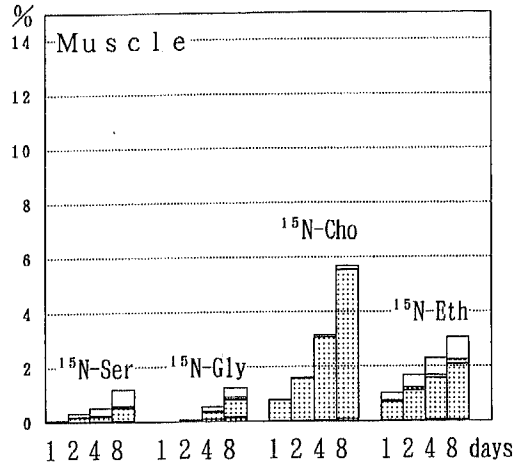
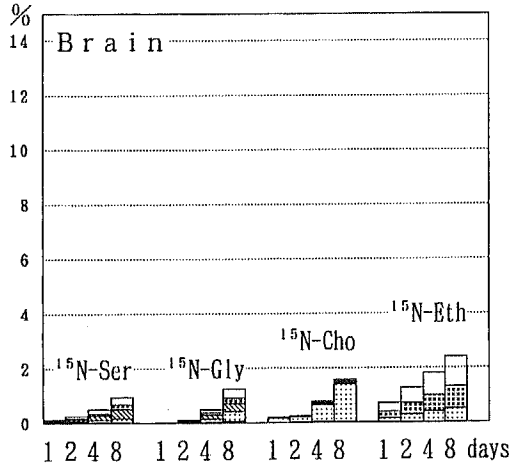


Fig. 4 Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -atom into glycerophospholipids and sphingolipids in various tissues of mice at different days after oral administration of  $^{15}\text{N}$ -ethanolamine ( $^{15}\text{N}$ -Eth) 1.6g/kg body weight/day. Abbreviations as in Table 1.





各臓器組織におけるN-含有脂質の塩基代謝

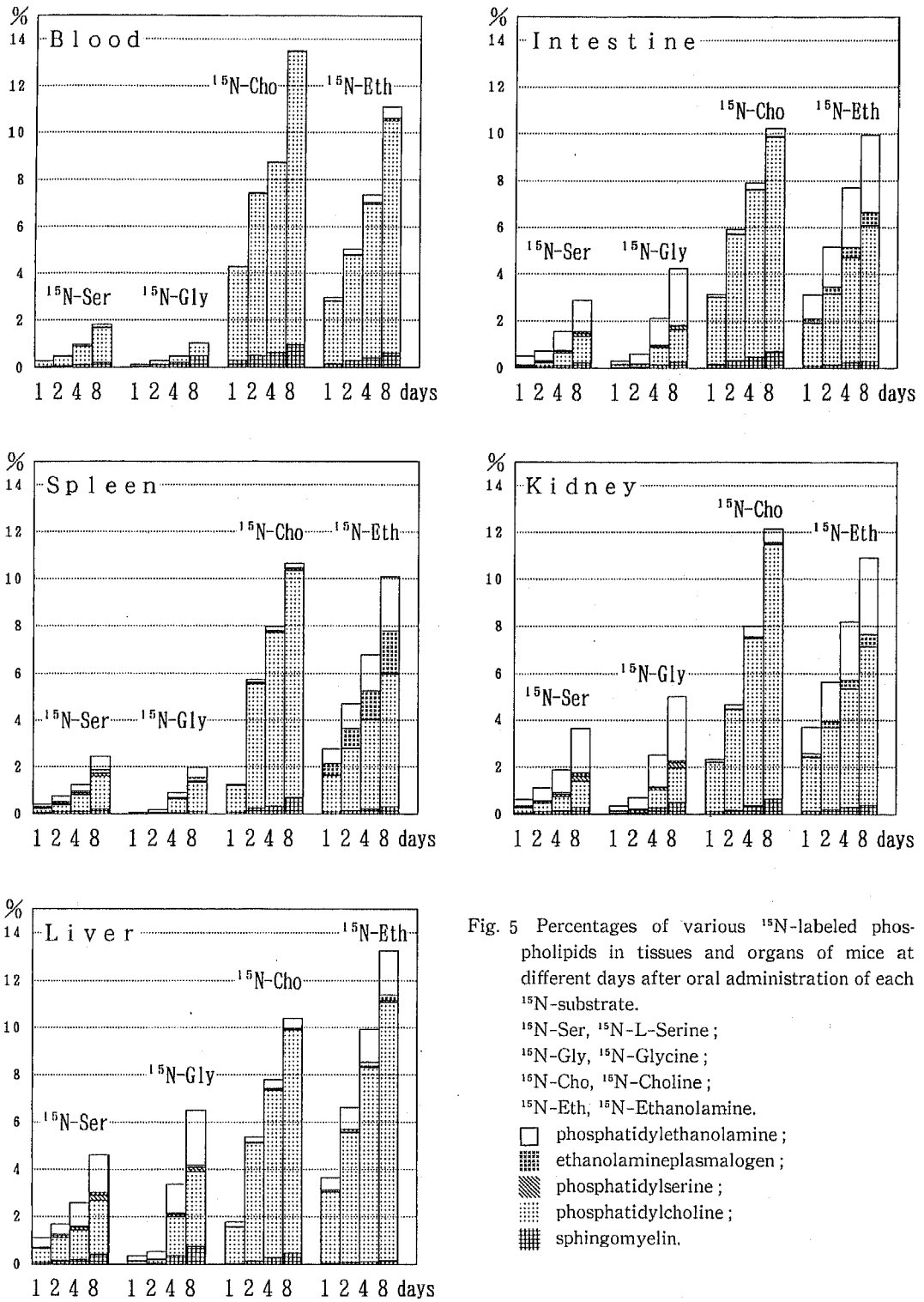


Fig. 5 Percentages of various <sup>15</sup>N-labeled phospholipids in tissues and organs of mice at different days after oral administration of each <sup>15</sup>N-substrate.

<sup>15</sup>N-Ser, <sup>15</sup>N-L-Serine ;

<sup>15</sup>N-Gly, <sup>15</sup>N-Glycine ;

<sup>15</sup>N-Cho, <sup>15</sup>N-Choline ;

<sup>15</sup>N-Eth, <sup>15</sup>N-Ethanolamine.

□ phosphatidylethanolamine ;

▨ ethanolamineplasmalogen ;

▩ phosphatidylserine ;

▧ phosphatidylcholine ;

▦ sphingomyelin.

atom% excess を越える値が観察された。また PS から引き続いて生合成される N-含有脂質の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は  $^{15}\text{N}$ -L-セリン投与の結果と類似していた。 $^{15}\text{N}$ -L-セリンに比べて  $^{15}\text{N}$ -グリシンの投与で各組織のリン脂質の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess により多くの差が生じたことは、 $^{15}\text{N}$ -グリシンが細胞のミトコンドリアに局在するセリン水酸化メチル転移酵素により  $^{15}\text{N}$ -L-セリンに変換される速度が各組織で異なるためと考えられ、この酵素活性は  $^{15}\text{N}$ -グリシンと  $^{15}\text{N}$ -L-セリン投与による各脂質の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess の比較から腎臓、肝臓、小腸などで高く心臓で低いと推察された。

### 3 $^{15}\text{N}$ -コリンの N-含有脂質への取り込み

$^{15}\text{N}$ -コリンを経口投与した結果は Fig. 3 に示すように投与回数の増加に伴いコリン含有リン脂質の PC と SM の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess が顕著に増加したが、PS, PE, EPL, CER でもわずかな増加が認められた。投与 8 日目の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は肺、心臓、腎臓などで 18%前後まで増加したが、脳では 4%、精巣で 6%、筋肉で 7%と低い値を示した。 $^{15}\text{N}$ -コリンの投与による N-含有脂質の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess はどの臓器組織でも PC が多く、引き続き生成される SM の  $^{15}\text{N}$ -原子も PC から由来するため各臓器組織の SM の生合成は PC と比例していた。

### 4 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの N-含有脂質への取り込み

$^{15}\text{N}$ -エタノールアミンを経口投与した結果は Fig. 4 に示すように投与回数の増加にともないエタノールアミン含有リン脂質の PE と EPL およびコリン含有リン脂質の PC と SM の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess が増加した。投与 8 日目における PE の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は脾臓、心臓、精巣で 20%前後と高かったが、脳、血液、筋肉では 6%前後、肝臓では 8%と低かった。このうち PC の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は肝臓で 20%、血液で 13%と増加が見られた。一方、PS と CER の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess にもわずかな増加があり  $^{15}\text{N}$ -コリンの投与結果と類似していた。EPL は  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミン投与でのみ各臓器組織の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess の増加があり、投与 8 日目で脾臓や腎臓は 14%前後の値を示したが脳、血液、筋肉、肝臓では 3%前後と低かった。

### B $^{15}\text{N}$ -各基質投与で生合成された $^{15}\text{N}$ -リン脂質の臓器組織別の比較

経口投与した  $^{15}\text{N}$ -各基質により各臓器組織で生合成された  $^{15}\text{N}$ -リン脂質組成と割合を知るために  $^{15}\text{N}$ -

atom% excess にリン脂質組成を乗じて Fig. 5 で比較した。 $^{15}\text{N}$ -グリシン投与では  $^{15}\text{N}$ -L-セリンに比べて初期の  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の生合成が全ての臓器組織で遅れていたが投与回数の増加により徐々に増加し、脳、精巣、小腸、腎臓、肝臓では  $^{15}\text{N}$ -L-セリン投与を上回る生合成が観察された。 $^{15}\text{N}$ -L-セリン投与では心臓、血液、脾臓で  $^{15}\text{N}$ -リン脂質が  $^{15}\text{N}$ -グリシン投与より多く生合成された。 $^{15}\text{N}$ -コリン投与で生合成される  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の割合は脳で特に少なく、精巣、筋肉でも少ない一方、その他の臓器組織では多く肺と血液では特に多かった。また  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミン投与で生合成される  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の割合は脳、筋肉でかなり少なく、その他の組織では多く、肝臓では特に多かった。生合成された  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の割合を見ると、脳ではどの基質からも新たに生合成された  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の割合が少なく、続いて筋肉、精巣の順に少なかった。一方、肝臓ではどの基質に対しても新たに生合成された割合が多く、続いて腎臓、小腸の順に多かった。各臓器組織で新たに生合成された  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の割合は  $^{15}\text{N}$ -L-セリンや  $^{15}\text{N}$ -グリシンの投与より  $^{15}\text{N}$ -コリンや  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与で多いことが確認された。 $^{15}\text{N}$ -基質の投与で当初の数時間ほどの臓器組織も  $^{15}\text{N}$ -基質から最初に生合成されるリン脂質の割合が増えるが<sup>22,23</sup>、リン脂質の蓄積はそれぞれの生合成経路での選択があり<sup>18</sup> 時間の経過とともに各臓器組織が持つリン脂質の組成に従って生合成の調整がなされるものと思われた。

#### 1 脳

Table 1 に示すように脳では PC が約 37%と各臓器組織の中で最も少なく、EPL の約 21%と PS の約 11%は最も多い。 $^{15}\text{N}$ -L-セリンまたは  $^{15}\text{N}$ -グリシンの投与で生合成された  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の組成は Table 2 に示すような割合で、他の組織に比べて PS と EPL が特に多く PC や SM は少ない。 $^{15}\text{N}$ -コリンを投与した場合は他の組織と同様に PC のみの増加が見られた。また  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンを投与した場合は PE と EPL が増加してその他は少なかった。リン脂質全体に対する  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の生合成はどの基質でも投与 8 日目で 1%から 2%と少なかった。

#### 2 心臓

心臓での  $^{15}\text{N}$ -リン脂質は Fig. 5 に示すように  $^{15}\text{N}$ -コリンや  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンからの生合成が投与 8 日目でともに 11%前後と多いのに対し、 $^{15}\text{N}$ -L-セリンからは 2%と少なく、L-セリンへの転換後に生

各臓器組織におけるN-含有脂質の塩基代謝

Table 1 Phospholipid compositions in various tissues of male mice

	LPC	SM	CPL	PC	PS	EPL	PE	Rest
Brain	0.0	3.5	1.4	37.3	11.7	21.1	18.3	6.7
Heart	1.0	3.4	1.6	46.6	1.8	7.4	23.6	14.6
Lung	2.8	15.2	0.8	58.4	4.0	6.8	7.0	5.0
Liver	1.8	8.7	3.0	47.5	4.1	6.0	20.0	8.9
Kidney	0.0	10.3	2.1	44.6	5.0	7.8	20.4	9.8
Spleen	2.4	7.6	0.0	51.3	3.5	10.3	14.2	10.7
Pancreas	2.0	3.6	2.9	63.0	2.3	9.6	13.2	3.4
Intestine	3.2	6.9	3.0	53.8	3.1	4.7	20.9	4.4
Blood	12.7	9.8	0.0	63.6	0.0	2.9	7.4	3.6
Muscle	4.5	5.4	1.9	63.0	2.4	5.2	11.0	6.6
Testis	1.4	8.6	2.4	56.8	4.2	7.8	16.6	2.2

Data are expressed by mean percent value of three male mice. Abbreviations: LPC, lysophosphatidylcholine; SM, sphingomyelin; CPL, cholineplasmalogen; PC, phosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; EPL, ethanolamineplasmalogen; PE, phosphatidylethanolamine; CER, ceramide; Rest, other phospholipids.

Table 2 Percentage of <sup>15</sup>N-labeled phospholipids in various tissues of mice biosynthesized from each <sup>15</sup>N-substrate

Substrate	<sup>15</sup> N-serine					<sup>15</sup> N-glycine				
	PS	PE	EPL	PC	SM	PS	PE	EPL	PC	SM
Brain	35.2	27.6	18.4	16.4	2.4	24.4	26.3	16.1	29.3	3.9
Heart	3.0	60.6	6.3	27.6	2.5	2.6	42.0	8.6	42.4	4.4
Lung	7.1	18.4	5.5	47.5	21.4	6.0	9.7	8.2	62.1	14.0
Liver	4.3	34.2	2.9	49.6	9.0	2.8	35.8	1.4	48.4	11.6
Kidney	5.8	51.8	4.1	29.8	8.4	4.7	54.7	1.5	29.4	9.8
Spleen	4.4	23.2	6.9	57.1	8.4	2.9	20.6	7.7	64.1	4.8
Pancreas	3.1	34.2	8.2	47.8	6.7	3.1	28.9	7.4	54.4	6.2
Intestine	4.3	45.7	3.1	39.4	7.5	3.6	56.7	1.0	32.3	6.4
Blood	0.0	6.6	1.9	80.0	11.6	0.0	2.2	0.4	50.4	47.0
Muscle	6.2	48.8	3.3	37.9	3.7	4.1	27.7	5.2	49.5	13.4
Testis	6.6	36.1	7.0	40.9	9.5	4.3	32.4	3.6	44.3	15.4

Substrate	<sup>15</sup> N-choline					<sup>15</sup> N-ethanolamine				
	PS	PE	EPL	PC	SM	PS	PE	EPL	PC	SM
Brain	3.3	4.6	2.9	87.1	2.1	0.4	44.6	33.7	20.8	0.5
Heart	0.1	3.5	0.4	93.9	2.1	0.2	53.1	7.3	38.5	0.8
Lung	0.4	0.5	0.2	89.6	9.3	0.2	11.6	8.9	74.4	4.8
Liver	0.5	4.0	0.4	90.6	4.6	0.6	14.0	1.8	82.3	1.3
Kidney	0.5	4.7	0.4	89.0	5.4	0.2	30.0	4.7	61.5	3.6
Spleen	0.6	1.9	0.6	90.3	6.6	0.6	22.6	17.6	56.1	3.1
Pancreas	0.1	1.2	0.5	96.6	1.6	0.2	35.2	17.2	46.5	1.0
Intestine	0.2	3.1	0.2	89.5	6.9	0.2	33.1	5.6	58.1	3.0
Blood	0.0	0.3	0.1	92.6	7.0	0.0	4.3	1.0	89.2	5.5
Muscle	0.2	1.9	0.3	96.2	1.4	0.4	26.1	5.6	65.9	2.0
Testis	0.6	3.4	0.9	88.3	6.8	0.5	36.0	11.0	50.1	2.4

Data are expressed by mean value of three male mice. Each <sup>15</sup>N-substrate was administered at 1.6g/kg/day orally for eight days. Abbreviations as in Table 1.

合成される<sup>15</sup>N-グリシンからの<sup>15</sup>N-リン脂質は更に少なかった。<sup>15</sup>N-L-セリンの投与によって心臓で生じた<sup>15</sup>N-リン脂質はTable 2に示すようにPCよりPEが多く、<sup>15</sup>N-エタノールアミンを投与した場合も同様にPEが最も多かった。

### 3 肺

肺では肺胞の安定性を維持するためPCを多量に含むリン脂質を必要としており、Fig. 5に示すように<sup>15</sup>N-コリン投与からの<sup>15</sup>N-リン脂質の生合成が投与8日目で14%と最も活発であり、<sup>15</sup>N-エタノールアミンの投与によるCDP-エタノールアミン経路でも11%であったが、<sup>15</sup>N-L-セリンまたは<sup>15</sup>N-グリシンの投与では2%以下と少なかった。肺で組成の多いPCは主に<sup>15</sup>N-コリンと<sup>15</sup>N-エタノールアミンから生合成されており、SMもPEより多く生合成されていた。

### 4 肝臓

Fig. 5に示すように肝臓では<sup>15</sup>N-L-セリン、<sup>15</sup>N-グリシン、<sup>15</sup>N-エタノールアミンの各基質投与で生成される<sup>15</sup>N-リン脂質の割合が各臓器組織中で最も高く、<sup>15</sup>N-コリンの投与でも高い割合を示したことから肝臓は生体組織の中で最も活発にリン脂質の生合成が行われる組織であると言える。しかし肝臓では各基質からの<sup>15</sup>N-リン脂質生合成にそれぞれの違いが見られた。すなわち<sup>15</sup>N-グリシンからの生合成の割合は当初、<sup>15</sup>N-L-セリンからの生合成に比べて少ないが投与8日目で6%を越えて<sup>15</sup>N-L-セリンの4%より増加した。<sup>15</sup>N-エタノールアミンの投与ではメチル化が活発でPEの割合が低下してPCが多くなることが観察された。また<sup>15</sup>N-エタノールアミンの投与で生成される<sup>15</sup>N-リン脂質の割合は投与8日目で13%を越え、<sup>15</sup>N-コリンの10%より多いことが認められた。

### 5 腎臓と小腸

Fig. 5に示すように腎臓と小腸はリン脂質が活発に生合成される組織であり、その塩基交換経路では肝臓に次いで<sup>15</sup>N-リン脂質の生合成が多い。<sup>15</sup>N-グリシン投与による<sup>15</sup>N-リン脂質の生成は当初、<sup>15</sup>N-L-セリン投与よりも少ないが日数経過でむしろ増加することから腎臓や小腸でもグリシンから転換されたL-セリンは、直接投与で存在するL-セリンより積極的にリン脂質の生合成に利用されているという結果が得られた。<sup>15</sup>N-グリシンや<sup>15</sup>N-L-セリン投与により腎臓や小腸で生合成される<sup>15</sup>N-リン脂質組成はこの経路でメチル化が不活発なためTable 2に示すようにPEが多くなりPCは減少する。また<sup>15</sup>N-エタノールアミ

Table 3 Ratio<sup>a</sup> of each <sup>15</sup>N-phosphatidylserine (PS) produced in various tissues at different days by oral administration of <sup>15</sup>N-glycine or <sup>15</sup>N-L-serine

Days	1	2	4	8
Brain	33	53	85	89
Heart	23	27	30	33
Lung	28	50	80	82
Liver	24	30	94	97
Kidney	66	68	108	111
Spleen	0	16	30	53
Pancreas	6	24	85	104
Intestine	45	50	115	124
Blood	0	0	23	35
Muscle	0	32	66	70
Testis	50	58	76	80

<sup>a</sup> Ratio(%) = PS, gly ÷ PS, ser

PS, gly: <sup>15</sup>N-atom% excess of PS by intake of <sup>15</sup>N-glycine.

PS, ser: <sup>15</sup>N-atom% excess of PS by intake of <sup>15</sup>N-serine.

ン投与の場合はPCの組成が増加するが、メチル化の作用が弱いためPEも比較的多く存在した。

### 6 脾臓と膵臓

脾臓と膵臓のリン脂質の組成は共にEPLの比率が約10%と脳に次いで多い。EPL生合成の主要経路はCDP-エタノールアミン経路であり、<sup>15</sup>N-エタノールアミンの投与によるEPLの<sup>15</sup>N-atom% excessは脾臓と膵臓で高い値を示した。これらの組織でもリン脂質の生合成は塩基交換経路よりCDP-塩基経路が活発であった。膵臓では<sup>15</sup>N-コリン投与でPCの割合が多いにもかかわらずSMの割合が少なかった。

### 7 血液

Fig. 5に示すように血液では<sup>15</sup>N-コリン投与の場合に生成される<sup>15</sup>N-リン脂質の割合が最も多く<sup>15</sup>N-エタノールアミンの投与でも比較的多いが、<sup>15</sup>N-グリシンや<sup>15</sup>N-L-セリンからの生成は少ないことが確認された。Table 1に示すように血液のリン脂質組成は他の組織に比べてPCが最も多い。一方、PEは肺と同様に少なくEPLとPSは各組織の中で最も少なかった。Table 2に示すように生成された血液のリン脂質はどの基質からでもEPLやPSはほとんど存在せず、PEは<sup>15</sup>N-エタノールアミンの投与でも僅かしか生成されなかった。

### 8 精巣

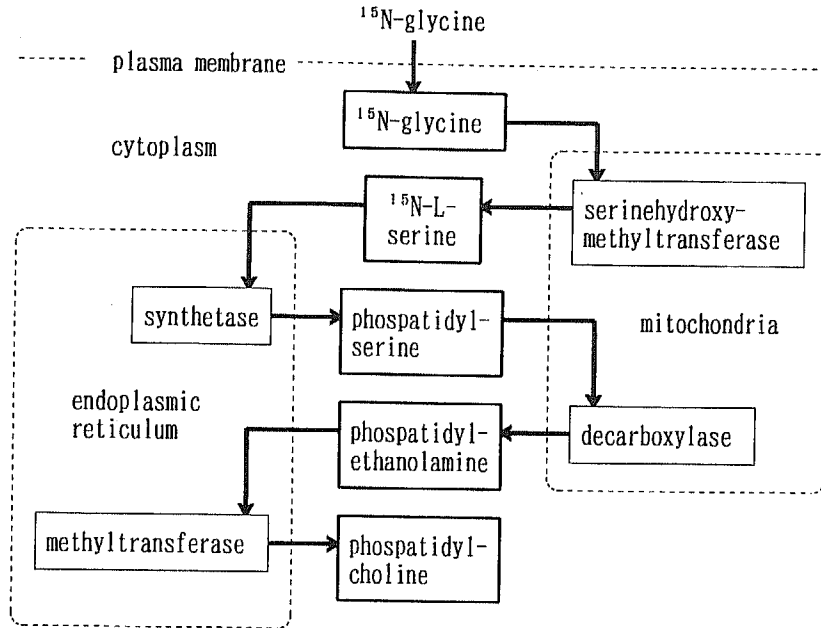


Fig. 6 The transference of  $^{15}\text{N}$ -atoms into phospholipid bases in organs and tissues on administration of  $^{15}\text{N}$ -glycine.

Fig. 5 に示すように精巣では  $^{15}\text{N}$ -コリン投与の場合に生合成される  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の割合が他の臓器組織に比べて少ない。他はどの基質からも比較的活発にリン脂質の生合成を行っており、 $^{15}\text{N}$ -グリシンや  $^{15}\text{N}$ -L-セリン投与による塩基交換経路では肝臓、腎臓、小腸に次いで活発であった。 $^{15}\text{N}$ -コリン投与で生成される PC の量は  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与で部分的に生合成される PC の量より少なく、精巣では他の臓器組織に比べて CDP-コリン経路の利用が特に少なかった。

#### 9 大腿筋

Fig. 5 に示すように大腿筋では  $^{15}\text{N}$ -コリン投与による  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の生成がやや多いことを除いて、その他の基質のリン脂質への取り込みが少なかった。 $^{15}\text{N}$ -コリン投与により生成される  $^{15}\text{N}$ -リン脂質の成分は主に PC であり、PE などその他の成分は  $^{15}\text{N}$ -グリシン、 $^{15}\text{N}$ -L-セリン、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与で生合成されるが、これらの経路が不活発なために全体としては少なくなり、 $^{15}\text{N}$ -リン脂質生合成は脳に次いで少なかった。

#### IV 考 察

$^{15}\text{N}$ -グリシン投与では  $^{15}\text{N}$ -L-セリン投与と比べてすべての組織で当初、 $^{15}\text{N}$ -atom% excess が低く Fig.

2 や Table 3 に示すように PS を始めとする N-含有脂質の合成に遅れて利用されることがわかった。これらの基質から合成される N-含有脂質の組成は各臓器組織で類似することから同一の経路で合成されたと考えられた。投与された  $^{15}\text{N}$ -グリシンは Fig. 6 に示すように組織の細胞に取り込まれてミトコンドリアに局在するメチレンテトラヒドロ葉酸とともにセリンヒドロキシルメチルトランスフェラーゼにより  $^{15}\text{N}$ -L-セリンになると思われる<sup>19)20)</sup>。合成された L-セリンは引き続き小胞体に存在する L-セリン塩基交換酵素により PE のエタノールアミンと交換されたり<sup>21)22)</sup>、PC のコリンと交換されて PS に合成されたと考えられ<sup>23)</sup>、培養神経芽腫細胞に  $^{15}\text{N}$ -グリシンを添加して合成されたリン脂質の構成でも同様な結果が観察された<sup>4)</sup>。また Fig. 1 のように  $^{15}\text{N}$ -L-セリンの投与で脳を除く臓器組織の PS の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess が引き続いて生成される PE の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess に比例することから PS は細胞ミトコンドリアに存在する脱炭酸酵素により<sup>24)</sup> 容易に PE へ変換されることが考えられた。脳の PS の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は他の組織と同じ割合であるにもかかわらず PE の割合が減少することから、PE への変換が遅れていることが認められた<sup>3)25)26)</sup>。

一方、細胞に取り込まれたエタノールアミンはエタ

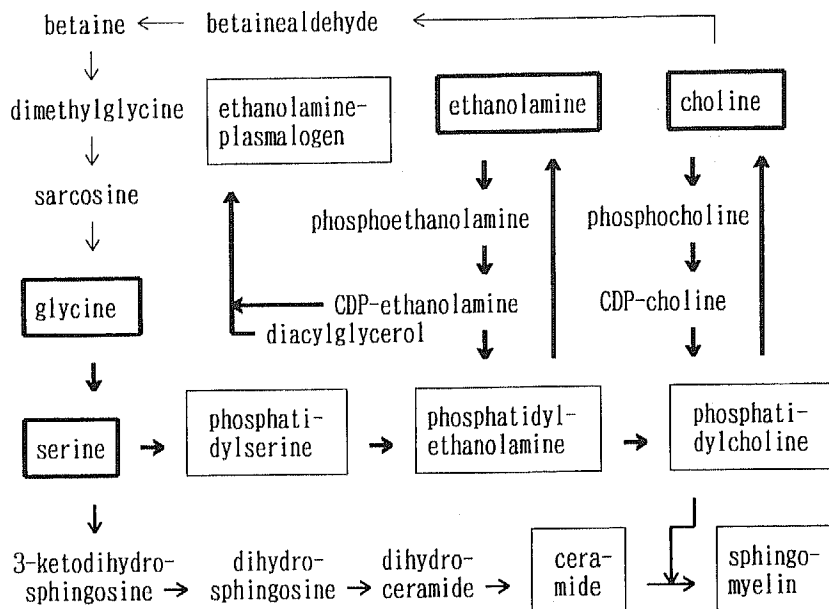


Fig. 7 Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -atoms into phospholipids and sphingolipids using  $^{15}\text{N}$ -amino acids and  $^{15}\text{N}$ -bases.

ノールアミンキナーゼによりリン酸化されてホスホエタノールアミンとなり、続いてホスホエタノールアミンシチジルトランスフェラーゼにより活性化されて CDP-エタノールアミンとなり、ホスホエタノールアミン部分がジアシルグリセロールエタノールアミンホスホトランスフェラーゼによりジアシルグリセロールに転移されて PE と EPL が合成される。 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与により各組織の CDP-エタノールアミン経路で合成される PE の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は Fig. 1 と Fig. 4 の比較で示すように、PS の脱炭酸反応による塩基交換経路で合成される PE より多いことがわかり、培養神経芽腫細胞に  $^{15}\text{N}$ -L-セリンと  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンを添加して合成された PE の比較でも同様な結果が観察された<sup>4)</sup>。 $^{15}\text{N}$ -グリシンや  $^{15}\text{N}$ -L-セリンから PS を経て合成される PE は L-セリン塩基交換酵素で調節されており<sup>23)</sup>、エタノールアミンのリン酸化により合成される PE はエタノールアミンキナーゼにより調節されているための違いと思われる。 $^{15}\text{N}$ -グリシンや  $^{15}\text{N}$ -L-セリンから PS を経て塩基交換経路で合成される PE の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は腎臓、肝臓、小腸で高く、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンのリン酸化による CDP-エタノールアミン経路で合成された PE の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は膵臓、心臓、精巣な

どで高いため、各組織で経路を利用する割合が異なり PE の生合成能力に相違が生じていた。特に心臓では PE から PC へのメチル化を抑制し、EPL の合成を抑えて PE を増やそうとする状況が見られた。また肝臓では Fig. 4 に示すように PE や SM の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess が減少し、PC だけ増加することから PC を主とするリン脂質がリポプロテインとして血中へ分泌されていると考えられた。一方、 $^{15}\text{N}$ -グリシンや  $^{15}\text{N}$ -L-セリンの投与による塩基交換経路では細胞のミトコンドリアの膜で PS が脱炭酸されて PE が合成されるが<sup>27)</sup>、Fig. 1 と Fig. 2 に示すように肝臓の PE や SM の  $^{15}\text{N}$ -atom% excess は PC より多いことから、この経路で生成される PC は血中へのリポプロテインへの分泌が少なく、主に肝臓自身の細胞に利用されているものと考えられた。

CDP-エタノールアミン経路はエタノールアミンから EPL を生合成する唯一の経路であり、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミン投与の時に最も生合成の効率が高くなって PE と EPL の生合成に利用されるが、臓器組織で利用の程度が異なっていた<sup>28)</sup>。 $^{15}\text{N}$ -L-セリンを投与した場合にも PS の脱炭酸で生合成される PE から遊離した  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンがこの経路に入って生合成される EPL は  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの直接投与より

減少する。

PCはコリンのリン酸化によるCDP-コリン経路とPEのエタノールアミン部分のメチル化経路により生合成される。投与された $^{15}\text{N}$ -コリンは細胞に取り込まれ、そのうち多くはコリンキナーゼによりリン酸化されてホスホコリンになり、続いてホスホコリンシチジルトランスフェラーゼにより活性化されてCDP-コリンとなり、ジアシルグリセロールにホスホコリン部分がジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼにより転移されてPCが生合成される。 $^{15}\text{N}$ -コリンの投与によるPCの $^{15}\text{N}$ -atom% excessは脳、精巣、筋肉を除く全ての組織で高い数値を示し、特に肺では肺胞の安定性を維持するためにPCを主とする十分なリン脂質を必要としてコリンキナーゼの活動が盛んなことから最も高い数値を示したものと思われる。また脳に取り込まれたコリンはコリンキナーゼによりホスホコリンとなって存在するが、その後のリン脂質への取り込みが遅れるためPCの $^{15}\text{N}$ -atom% excessは低い。一方 $^{15}\text{N}$ -グリシン、 $^{15}\text{N}$ -L-セリン、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与で生合成されたPCはPEのメチル化によるものであり、PE合成の盛んなCDP-エタノールアミン経路で生成されたPCの $^{15}\text{N}$ -atom% excessは $^{15}\text{N}$ -グリシンや $^{15}\text{N}$ -L-セリンの投与による塩基交換経路で生成されたPCの $^{15}\text{N}$ -atom% excessより高い数値を示し、コリンが不足した場合に対応する経路と考えられた<sup>29)30)</sup>。

また $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの添加で培養細胞のPSに僅かな $^{15}\text{N}$ -atom% excessが認められたことから<sup>4)</sup>、 $^{15}\text{N}$ -コリンと $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの経口投与でも $^{15}\text{N}$ -atom% excessが認められるかどうか測定したところ、Fig. 3とFig. 4に示すように $^{15}\text{N}$ -エタノールアミン投与では僅かな $^{15}\text{N}$ -atom% excessがPSとCERに、 $^{15}\text{N}$ -コリン投与ではより多くPSとCERに、またPEとEPLにもいくらかの $^{15}\text{N}$ -atom% excessが認められた。PSだけでなくCERにも $^{15}\text{N}$ -atom% excessが認められたことから $^{15}\text{N}$ -コリンと $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの経口投与で $^{15}\text{N}$ -L-セリンが生合成されているものと思われ、PEのメチル化でできたPCから遊離した $^{15}\text{N}$ -コリンや投与された $^{15}\text{N}$ -コリンがFig. 7に示すように細胞ミトコンドリアに存在するコリンデヒドロゲナーゼにより酸化されてベタインアルデヒドとなり、続いてベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼによりベタインとなりPEへのメチル供与体となる。ベタインはベタイン・ホモシステイン

メチルトランスフェラーゼによりジメチルグリシンとなり<sup>31)32)</sup>、更に細胞ミトコンドリアに存在するジメチルグリシンデヒドロゲナーゼによる酸化的脱メチル化反応でサルコンンとなり、サルコンンデヒドロゲナーゼによる同様の反応でグリシンに変換されてL-セリンとなり $^{15}\text{N}$ -含有脂質に取り込まれたものと推察された<sup>33)</sup>。

CERのスフィンゴシン塩基の生合成はL-セリンが前駆物質となることから投与されたグリシンはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼによりL-セリンに変換されたものと考えられ<sup>4)</sup>、この酵素の活性は $^{15}\text{N}$ -グリシンの投与によるCERやPSの $^{15}\text{N}$ -atom% excessから腎臓、肝臓、小腸で高い値を示した。一方、 $^{15}\text{N}$ -コリンと $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与では全ての組織でCERの $^{15}\text{N}$ -atom% excessがわずかであったことから、エタノールアミンのみがグリシンに変換されて<sup>34)</sup>、L-セリンとなりPSやCERに取り込まれることはないものと考えられた。CERの $^{15}\text{N}$ -atom% excessはエタノールアミンの投与よりもコリンの投与でより多くなったことから、投与された $^{15}\text{N}$ -コリンはベタインの経路によりグリシン、L-セリンと変換されてCERやPSに生合成されたと考えられ、 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンはPEに取り込まれた後、PCにメチル化されて遊離した $^{15}\text{N}$ -コリンが同じベタイン経路でCERに変換されたものと考えられた。L-セリンはパルミトイルCoAとともにセリンパルミトイルトランスフェラーゼにより3-ケトジヒドロスフィンゴシン(3-ケトスフィンガニン)となり、続いて3-ケトジヒドロスフィンゴシンリダクターゼによりジヒドロスフィンゴシン(スフィンガニン)となり、ジヒドロスフィンゴシンN-アシルトランスフェラーゼによりジヒドロセラミドとなり、ジヒドロセラミドデサチュラーゼによってCERとなる。CERはリン脂質全体と比較すると数%と少ないが細胞内の量は常に一定に保たれており、そのほとんどがSMに変換される。 $^{15}\text{N}$ -グリシンや $^{15}\text{N}$ -L-セリンの投与によるCERの $^{15}\text{N}$ -atom% excessは腎臓、肝臓、小腸、脾臓で高く、その他の組織でも一定の数値が見られたことから、どの組織でも需要を満たす生合成が行われていると考えられた。

細胞の生存にとってスフィンゴ脂質、中でもSMは細胞の増殖に必須の成分であり<sup>35)</sup>、SMの合成される部位は滑面小胞体もしくはゴルジ膜の内腔側で、その合成経路は以下の二通りが考えられる。CERにPC

Table 4 Ratio<sup>a</sup> of <sup>15</sup>N-sphingomyelin (SM) to <sup>15</sup>N-phosphatidylcholine (PC) produced in various tissues at different days by oral administration of <sup>15</sup>N-choline or <sup>15</sup>N-ethanolamine

Days	1	2	4	8	Mean±S. E.
Brain	0.68	2.41	1.54	1.10	1.43±0.64
Heart	0.61	0.74	0.73	1.02	0.78±0.15
Lung	1.48	1.19	1.37	1.60	1.41±0.15
Liver <sup>b</sup>	1.81	1.84	2.50	3.11	2.32±0.54
Kidney	0.90	0.73	0.88	1.03	0.88±0.11
Spleen	1.12	0.78	0.80	1.33	1.01±0.23
Pancreas	0.51	0.51	0.74	0.78	0.64±0.13
Intestine	1.21	1.15	1.26	1.48	1.28±0.13
Blood	1.22	1.20	1.26	1.23	1.23±0.02
Muscle	0.42	0.62	0.49	0.47	0.50±0.07
Testis	0.91	1.48	1.59	1.61	1.40±0.29

<sup>a</sup> Ratio = (SM, cho ÷ PC, cho) ÷ (SM, eth ÷ PC, eth)

SM, cho: <sup>15</sup>N-atom% excess of SM by intake of <sup>15</sup>N-choline.

PC, cho: <sup>15</sup>N-atom% excess of PC by intake of <sup>15</sup>N-choline.

SM, eth: <sup>15</sup>N-atom% excess of SM by intake of <sup>15</sup>N-ethanolamine.

PC, eth: <sup>15</sup>N-atom% excess of PC by intake of <sup>15</sup>N-ethanolamine.

<sup>b</sup> Liver synthesized a little SM by intake of <sup>15</sup>N-ethanolamine for the secretion of lipoprotein.

からホスホコリンが転移される系, CERにCDP-コリンのホスホコリンが転移される系であるが, 現在は最初の経路が主要経路と考えられている。培養細胞に<sup>3</sup>H-コリンを添加すると放射活性はホスホコリンとCDP-コリンで増加した後にPCとSMでも増加し,<sup>3</sup>H-メチオニンを添加すると放射活性はPEで増加した後, 同様にPCとSMでも増加するが時間経過によりホスホコリンとCDP-コリンの放射活性が無くなってもSMの活性の増加が見られることからSMのホスホコリンの供与体はPCであると推察される<sup>16)</sup>。また<sup>14</sup>C-エタノールアミンを投与した時に生成されるホスホエタノールアミンが直接CERに転移するSMの合成は起こらない<sup>36)</sup>。しかしPCからホスホコリンが外れてCERに転移する反応を触媒する酵素により合成される<sup>17)</sup>と言われるが, 酵素が単離されないことからこの合成機構はいまもよく分かっていない。PCはホスホコリンやCDP-コリンあるいは遊離したコリンへ代謝されることから<sup>37)</sup>, 本実験においても<sup>15</sup>N-エタノールアミンを投与した場合に生合成されるPCからホスホコリンやCDP-コリンあるいは遊離コリンが生成すると考えられる。一方, <sup>15</sup>N-コリンの投与ではPCを生合成する前に直接ホスホコリンやCDP-コリンが生成されるため, SMの生合成において直接生成

されたCDP-コリンからのホスホコリンが利用されるならば, PCに対するSMの比率は<sup>15</sup>N-コリン投与で<sup>15</sup>N-エタノールアミン投与より高くなるものと考えられた。そこで<sup>15</sup>N-コリン投与と<sup>15</sup>N-エタノールアミン投与の<sup>15</sup>N-atom% excessについてPCから生じるSMの比率を各基質で計算し, Table 4に示すように両基質でのSM/PCの数値を比較するため<sup>15</sup>N-コリン/<sup>15</sup>N-エタノールアミンとして示し, その値が1を越えた場合, その越えた割合がCDP-コリンからのホスホコリンの利用と考えられた。その結果は臓器によって相違はあるものの, 投与1日では<sup>15</sup>N-コリン投与と<sup>15</sup>N-エタノールアミン投与であまり差が無く, 投与日数が増加すると<sup>15</sup>N-コリン投与でSMの割合がやや増加した。このため<sup>15</sup>N-コリンを連日投与した場合や比率が1よりやや大きいいくつかの臓器では<sup>15</sup>N-コリン投与で生成されるCDP-コリンのホスホコリンがSMの生合成に多少利用される可能性が考えられるが, リポタンパク質分泌により数値が2を越えた肝臓を除いてその割合が1よりやや多い程度であることからSMの生合成はやはりCERにPCからのホスホコリンが転移される系が主要経路であると考えられ, 各臓器組織間で見られる数値の相違はその生合成経路から生じたSMとPCの比率の特異性と推察



された。 $^{15}\text{N}$ -基質の比較では $^{15}\text{N}$ -コリンを投与した時にPCの生合成が最も多くなることからSMの $^{15}\text{N}$ -atom% excessも各臓器組織で高い値を示した。また $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンを経口投与した時はPEやEPLの生合成が活発でPCの増加が少ないためSMの $^{15}\text{N}$ -atom% excessもあまり増加が見られなかった。 $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンを経口投与した肝臓では活発なPEのメチル化によりPCの $^{15}\text{N}$ -atom% excessが高い値となってもSMは低いことから、肝臓で生合成されるPCはリポプロテインとなって血液に多く移行しSMへの変換が少ないものと思われた。一方、 $^{15}\text{N}$ -L-セリンや $^{15}\text{N}$ -グリシンの投与ではCERとPCの両方に $^{15}\text{N}$ -atom% excessが存在してSMへ取り込まれるがCERとPCの $^{15}\text{N}$ -atom% excessがともに低い場合SMの $^{15}\text{N}$ -atom% excessも同様に低い値となった。

新たに生合成されたN-含有脂質の組成を経路別に分類すると組成の中で最も多いPCの生合成はCDP-コリン経路が主要経路となるが、その他の経路でもPCはかなり多くの割合で生合成されていることが観察された。PEの生合成は臓器組織の需要によって異なり、Fig. 5に示すようにCDP-エタノールアミン経路でPEの生合成が多い臓器組織では塩基交換経路でもPEの生合成が多いという関連が見られた。EPLはCDP-エタノールアミン経路が主要経路であり $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与で最も多く生合成されるが、塩基交換経路ではPEの生成が少ないことからEPLも少なかった。PSやCERの生合成は塩基交換経路が主要経路となるが、PCから遊離したコリンがベタイン経路でグリシンからL-セリンに転換してPSやCERの生合成に関与する補助的な経路を $^{15}\text{N}$ -コリンや $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与により観察できた。SMの生合成は $^{15}\text{N}$ -コリン投与で $^{15}\text{N}$ -atom% excessが高いことからCDP-コリン経路で最も多く生合成されていた。

異なる経路で生成される脂質はその経路に存在する酵素により細胞内調節されて生合成されているが、それぞれ同じ構造であっても機能が同様であるかどうかは重要で興味のある問題である。例えばPEはFig. 7に示すように、塩基交換反応によるPSの合成反応に続く脱炭酸反応で生合成される経路と、エタノールアミンのリン酸化によるCDP-エタノールアミン経路から合成されるが、シヨウジョウバエでのエタノールアミンキナーゼの欠損が神経細胞の興奮性を変化させて

行動異常を示すことから<sup>30)</sup>それぞれのPE合成経路では生理的意義が異なることが考えられる。 $^{15}\text{N}$ -L-セリンと $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与の比較でも肝臓においてCDP-エタノールアミン経路はPCを主とするリン脂質をリポプロテインに分泌しており、自身の細胞に対するPEの供給は塩基交換経路を主要経路としていることが認められたことからその利用形態が異なると推察された。肝臓、腎臓、小腸などの臓器では投与日数が増えると $^{15}\text{N}$ -グリシンからのリン脂質合成が $^{15}\text{N}$ -L-セリンを上回るようになるため、細胞のミトコンドリアでグリシンから合成されるL-セリンと投与されたL-セリンの用途に相違があることも考えられた。脳では他の組織に比べて代謝が遅く、投与された $^{15}\text{N}$ -基質から最初に合成されたリン脂質が多く存在しその他のリン脂質は少ない傾向が見られる。これは培養マウス神経芽腫細胞に $^{15}\text{N}$ -基質を添加した結果と同様であり<sup>31)</sup>、血液循環のない培養細胞でも $^{15}\text{N}$ -セリンや $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンから少量のPCが合成されたことから脳でも同様にPCが合成されると推測される。血中のリポプロテインに多く存在するPCやSMは必要に応じて脳に取り込まれることも考えられるが、あまり存在しないPSやEPLなどは必要とする基質から穏やかに合成されるものと思われた。 $^{15}\text{N}$ -基質の取り込みは一般に塩基交換反応よりもホスホ塩基導入によるほうが効率よくリン脂質の合成に利用されていることが観察された。 $^{15}\text{N}$ -基質の投与により多くの臓器組織での $^{15}\text{N}$ -含有脂質の代謝を $^{15}\text{N}$ -原子の取り込みから検討していくつかの知見を得たが、引き続きこれらの脂質の細胞内代謝や、代謝を調節している関連酵素を新しい実験手法や分析技術で測定することで生化学的データの蓄積と解析が可能になり脂質の果たす重要な生理的役割が更に解明されるものと思われる。

## V 結 語

リン脂質やスフィンゴ脂質の代謝を調べる目的で4種類の $^{15}\text{N}$ -基質をマウスに経口投与して $^{15}\text{N}$ -含有脂質の $^{15}\text{N}$ -atom% excessから各臓器組織で脂質代謝がどのように行われるかを調べた。その結果、以下の知見を得た。

- 1 グリシンは細胞に取り込まれてから一般に蛋白質、核酸、コラーゲンなどの合成に利用されることがよく知られているが、 $^{15}\text{N}$ -グリシンは $^{15}\text{N}$ -L-セリンに変換された後、グリセリン脂質やスフィンゴ脂

- 質の合成に利用されることが確認された。
- 2  $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンはPEに取り込まれてからPCに転移し、PCから遊離する $^{15}\text{N}$ -コリンがベタインを経由して $^{15}\text{N}$ -グリシンから $^{15}\text{N}$ -L-セリンに変換されてPSやCERに取り込まれ、さらに関連する複合脂質に取り込まれる経路が明らかになった。
  - 3 SMの生合成は $^{15}\text{N}$ -コリンと $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンの投与比較により、CERにPCからのホスホコリンが転移される系が主要経路であると考えられた。
  - 4  $^{15}\text{N}$ -基質の取り込みは $^{15}\text{N}$ -セリンよりも $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンや $^{15}\text{N}$ -コリンで効率がよく、この差はリン脂質組成を決定する主要な要素となっていた。
  - 5 肝臓から血液のリボプロテインに分泌されるリン脂質は主に $^{15}\text{N}$ -エタノールアミンや $^{15}\text{N}$ -コリンを利用しており、 $^{15}\text{N}$ -セリンからの利用は少なかった。
  - 6 リン脂質は肝臓、腎臓、小腸などで活発に合成が

行われているが、脳では脳血液関門でアミノ酸や塩基の取り込みが制限されて合成が少なくなるなど、各臓器組織におけるリン脂質合成経路の利用状況と合成される成分組成が明らかとなった。

- 7 それぞれの臓器組織は固有のリン脂質組成を維持するために、どの経路においてもその組成に従うようなリン脂質の生合成を行っていた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました信州大学医学部加齢適応研究センター神経加齢部門加齢生化学分野、武富 保教授に深謝いたします。また本研究に際し適切なお教授、ご助力をいただきました上村敬一助教授、原 厚講師をはじめ教室の皆様併せて感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第69回日本生化学会大会、第19回日本分子生物学会年会、合同年会（1996年8月、札幌）において発表した。

## 文 献

- 1) Stetten D: Biological relationships of choline, ethanolamine, and related compounds. *J Biol Chem* 140: 143-152, 1941
- 2) Taketomi T, Uemura K, Kunishita T: Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -ethanolamine and  $^{15}\text{N}$ -choline into phospholipids in various organs and tissues of young and adult mice after the intraperitoneal injection. *Jpn J Exp Med* 49: 325-330, 1979
- 3) Taketomi T, Uemura K, Yuzawa M: Metabolic studies of N-bases of phospholipids and long chain bases of sphingolipids in two-weeks-old mouse brain tissue in comparison with one-month-old mouse visceral tissues. *Jpn J Exp Med* 50: 267-273, 1980
- 4) Kurahashi H, Uemura K, Hara A, Taketomi T: Evidence for indirect utilization of glycine for production of N-bases of glycerophospholipids and sphingolipids in mouse neuroblastoma cells by using  $^{15}\text{N}$ -labeled glycine. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 44-50, 1995
- 5) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957
- 6) Khan MU, Williams JP: Microwave-mediated methanolysis of lipids and activation of thin-layer chromatographic plates. *Lipids* 28: 953-955, 1993
- 7) Muhammad S, Kumazawa K: Use of optical spectrographic nitrogen-15 analyses to trace nitrogen applied at the heading stage of rice. *Soil Sci & Plant Nutr* 18: 143-146, 1972
- 8) Bartlett GR: Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234: 466-468, 1959
- 9) Bremer J, Greenberg DM: Methyl-transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecthin (phosphatidylcholine). *Biochim Biophys Acta* 46: 205-216, 1961
- 10) Vance DE, Ridgway ND: The methylation of phosphatidylethanolamine. *Prog Lipid Res* 27: 61-79, 1988
- 11) Braun PE, Snell EE: Biosynthesis of sphingolipid bases. *J Biol Chem* 243: 3775-3783, 1968
- 12) Stoffel W, LeKim D, Sticht G: Biosynthesis of dihydrosphingosine in vitro. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 349: 664-670, 1968

- 13) Merrill AH Jr: Characterization of serine palmitoyltransferase activity in chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 754 : 284-291, 1983
- 14) Mandon EC, Van Echten G, Brik R, Schmidt RR, Sandhoff K: Sphingolipid biosynthesis in cultured neurons. *Eur J Biochem* 198 : 667-674, 1991
- 15) Bernert JT Jr, Ullman MD: Biosynthesis of sphingomyelin from *erythro*-ceramides and phosphatidylcholine by a microsomal cholinephosphotransferase. *Biochim Biophys Acta* 666 : 99-109, 1981
- 16) Voelker DR, Kennedy EP: Cellular and enzymic synthesis of sphingomyelin. *Biochemistry* 21 : 2753-2759, 1982
- 17) Merrill AH, Jones DD: An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1044 : 1-12, 1990
- 18) Vance JE, Vance DE: Specific pools of phospholipids are used for lipoprotein by cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261 : 4486-4491, 1986
- 19) Shirch L, Gross L: Serine transhydroxymethylase. *J Biol Chem* 243 : 5651-5655, 1968
- 20) Fujioka M: Purification and properties of serinehydroxymethylase from soluble and mitochondrial fractions of rabbit liver. *Biochim Biophys Acta* 185 : 338-349, 1969
- 21) White A, Handler P, Smith EL, Hill RL, Lehman IR: Principles of biochemistry. 6th ed, p 610, McGraw Hill, London, 1978
- 22) 国下龍英, 服部 浩, 原 厚, 武富 保: 神経系磷脂質の代謝および機能をめぐる主たる問題点. *蛋白質核酸酵素* 29 : 186-201, 1984
- 23) Vance JE: Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266 : 89-97, 1991
- 24) Vance JE, Vance DE: Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion? *J Biol Chem* 263 : 5898-5909, 1988
- 25) Toffano G, Battistella A, Mazzari S, Orlando P, Massari P, Giordano C: Fate of phosphatidyl-L-(U-<sup>14</sup>C)serine in mice. In: Horrocks LA, Ansell GB, Porcellati GP(eds), *Phospholipids in the nervous system*, vol 1: Metabolism, pp 173-180, Raven Press, New York, 1982
- 26) Butler M, Morell P: The role of phosphatidylserine decarboxylase in brain phospholipids metabolism. *J Neurochem* 41 : 1445-1454, 1983
- 27) Hovius R, Faber B, Brigot B, Nicolay K, Kruijff B: On the mechanism of the mitochondrial decarboxylation of phosphatidylserine. *J Biol Chem* 267 : 16790-16795, 1992
- 28) Arthur G, Page L: Synthesis of phosphatidylethanolamine and ethanolamineplasmalogen by the CDP-ethanolamine and decarboxylase pathways in rat heart, kidney and liver. *Biochem J* 273 : 121-125, 1991
- 29) Schneider WJ, Vance DE: Effect of choline deficiency on the enzymes that synthesize phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat liver. *Eur J Biochem* 85 : 181-187, 1978
- 30) Cui Z, Vance DE: Expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 is markedly enhanced in long term choline-deficient rats. *J Biol Chem* 271 : 2839-2843, 1996
- 31) Awad WM Jr, Whitney PL, Skiba WE, Mangum JH, Wells MS: Evidence for direct methyl transfer in betaine: homocysteine S-methyl-transferase. *J Biol Chem* 258 : 12790-12792, 1983
- 32) Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J: Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. *Metabolism; Clinical & Experimental* 42 : 1448-1460, 1993
- 33) 平賀絃一, 古谷田裕久: グリシンおよびβ-アラニン関連物質の異常代謝. *日本臨床* 50 : 1575-1580, 1992
- 34) Shimojo T, Akino T, Miura Y, Schroepfer GJ Jr: Sphingolipid base metabolism. Stereospecific uptake of proton in the enzymatic conversion of sphinganine 1-phosphate to ethanolamine 1-phosphate. *J Biol*

Chem 261 : 4448-4457, 1976

- 35) Hanada K, Nishijima M, Kiso M, Hasegawa A, Fujita S, Ogawa T, Akamatsu Y: Sphigolipids are essential for the growth of chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 267 : 23527-23533, 1992
- 36) Vos JP, De Haas CGM, Van Golde LMG, Lopes-Cardozo M: Relationships between phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and sphingomyelin metabolism in cultured oligodendrocytes. *J Neurochem* 68 : 1252-1260, 1997
- 37) Marggraf WD, Anderer FA, Kanfer JN: The formation of sphingomyelin from phosphatidylcholine in plasma membrane preparations from mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 664 : 61-73, 1981
- 38) Pavlidis P, Ramaswami M, Tanouye MA: The drosophila easily shocked gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell* 79 : 23-33, 1994

(9. 7. 31 受稿)

---