

# ヒツジ肝臓, 腎臓, 骨髄, 赤血球およびその他血液成分のスフィンゴ糖脂質に関する生化学的研究

小 泉 典 章

信州大学医学部付属心臓病研究施設脂質生化学部門  
(指導: 武富保教授)

## Biochemical Studies on Glycosphingolipids of Sheep Liver, Kidney, Bone Marrow, Erythrocytes, and Other Blood Cells

Noriaki KOIZUMI

*Department of Lipid Biochemistry, Institute of Cardiovascular Disease, Shinshu University School of Medicine*  
(Director: Prof. Tamotsu TAKEYOMI)

Glycosphingolipids of sheep liver, kidney, erythrocytes, bone marrow, leukocytes, platelets, and plasma were systematically analysed. It was confirmed that Forssman glycolipids were not present in these materials except for erythrocytes. The neutral glycosphingolipids of liver and kidney were found to belong to the globo-series. The major glycolipids of liver and kidney were lactosylceramide and monohexosylceramide, respectively. On the other hand, the gangliosides extracted from liver belonged to the ganglio-series, but those from kidney to the lacto-series. The gangliosides mainly contained the N-glycolyl type of sialic acids. In the erythrocytes, unknown glycosphingolipids, reactive to Forssman antibody, were detected by the thin-layer chromatography immunostaining method in addition to Forssman glycolipids. GM3-ganglioside and disialosyllactoneotetraosylceramide were also found in the erythrocytes. *Shinshu Med. J.*, 35: 118-129, 1987

(Received for publication September 29, 1986)

---

**Key words** : sheep erythrocytes (SRBC), sheep liver, sheep kidney, Forssman glycolipids, disialosyllactoneotetraosylceramide

ヒツジ赤血球, ヒツジ肝臓, ヒツジ腎臓, フォルスマン糖脂質, ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミド

---

略語: Cer, セラミド Chol, コレステロール  
CMH, モノヘキシシルセラミド  
CDH, ラクトシルセラミド  
CTH, グロボトリアオシルセラミド  
CSE, スルファテド

Gal, ガラクトース Glc, グルコース  
GalNAc, N-アセチルガラクトサミン  
GlcNAc, N-アセチルグルコサミン  
Glob. 1, グロボテトラオシルセラミド  
SA, シアル酸

## I 緒 言

長鎖塩基のアミノ基に脂肪酸が酸アミド結合したものはセラミドと呼ばれる。さらにこのセラミドの一級アルコールに単糖あるいはオリゴ糖がグリコシド結合したものが、スフィンゴ糖脂質である。これらのスフィンゴ糖脂質は、生体膜の脂質二層膜構造に、疎水性のセラミド部分が、コレステロールやリン脂質とともに埋めこまれ、親水性の糖部分が、細胞表層に露出していると考えられている。

スフィンゴ糖脂質は、生体膜の主成分であるリン脂質やコレステロールに対し、含量はきわめて少量であるが、高等動物の種差、器官による違いが大きいことが特徴的である<sup>1)</sup>。この分布の多様性によるスフィンゴ糖脂質の機能の解明が今日なされてきている。たとえば、細胞間識別、細胞膜抗原、細胞分化の標識、細胞膜受容体、細胞増殖因子、腫瘍特異抗原などにおける生物学的意味が調べられている。またスフィンゴ糖脂質は、その糖構造の骨格からグロブ系、ラクト系、ガングリオ系などの3つに分類され、代謝も考察されている。

ヒツジ赤血球は以前から免疫学的に補体結合反応などに用いられているが、この免疫反応の抗原物質であるフォルスマン糖脂質を、その主要構成糖脂質としてもつことから、多くの研究がなされている。しかしながら、ヒツジはこのようにフォルスマン陽性の哺乳動物とされているが、その赤血球ストローマ以外の臓器などには、フォルスマン活性物質は見出されていない。本研究では、これまで明確にされていないヒツジ赤血球の酸性糖脂質さらに、臓器の糖脂質についても詳細な分析を行ったので報告する。

## II 方 法

## A 材 料

ヒツジの血液は渦血により、また臓器は肝臓、腎臓、骨髄を死後解剖して得た。(標本のヒツジは本学第1内科高地性肺水腫研究班の御厚意により入手することができた。) EDTA 存在下で採血したヒツジ血液を3,000rpm, 5分間遠心し、血漿を分離、除去した。さらに、この赤血球を生理的食塩水で3~4回洗い、白血球成分および血漿成分を除いた。得られた赤血球を10倍量の0.3%酢酸中で溶血させ、沈殿を蒸留水で洗い、赤血球膜を得た。一方、臓器は、屍体より取り出して直ちに、生理的食塩水にて灌流し、血液成分をで

きるだけ除いた。

## B 糖脂質の調製

おのおのの組織当たり20倍量のクロロホルム—メタノール混合液(2:1, v/v)でホモジナイズして抽出し、さらに残渣の20倍量の5%水を含んだクロロホルム—メタノール混合液(1:2, v/v)で再度抽出し、これらの抽出液を一緒にして、蒸発乾固した後、総脂質とした。

総脂質を、0.1Nの水酸化ナトリウム・メタノール溶液で、中性脂肪、リン脂質を除くため、アルカリ加水分解を行った。水に対し透析後、Ledeenらの方法<sup>2)</sup>に従い、DEAE-Sephadex A 25 (Pharmacia Fine Chemical) カラムにかけ、クロロホルム—メタノール—水(以下C:M:Wと略す)(30:60:8, v/v/v)で中性脂質を溶出し、次いでC-M-0.8M酢酸ナトリウム(30:60:8, v/v/v)で酸性脂質を溶出した。

中性脂質画分はアセチル化後、HaraとTaketomiの方法<sup>3)</sup>に従いシリカゲル(Merck社)カラムにかけ、ヘキサン—トルエン(1:1)で単純脂質を溶出し、C-M(8:2)で中性糖脂質画分を溶出した。

酸性画分は、流水に対し透析後、蒸発乾固した。Ledeenらの方法<sup>2)</sup>にしたがってシリカゲルカラムにかけ、C-M(8:2)で硫脂質を、C-M(1:1)でガングリオシド画分を溶出した。さらに、各糖脂質は調製用薄層クロマトグラフィーにて単離した。

## C 分析方法

1 薄層クロマトグラフィー(TLC, thin layer chromatography)

TLCはシリカゲル60プレート(Merck社製)および高性能TLC(Merck社)を適宜用いた。

中性糖脂質はC-M-W(65:25:4, v/v/v)で、ガングリオシドはクロロホルム—メタノール—0.25%塩化カリウム水溶液(60:35:8, v/v/v)で展開した。

バンドの検出には、ヨウ素、BTB試薬、酢酸銅リン酸試薬、アンスロン試薬、レゾルシノール塩酸試薬を適宜用いた。

ガングリオシドの一部はSvennerholmらの方法<sup>4)</sup>でシアル酸を除去した。

脂質結合シアル酸の定量はレゾルシノール塩酸法<sup>5)</sup>によった。

## 2 ガスクロマトグラフィー(GLC)

各糖脂質は3%塩酸メタノールを用いて、95°C, 3時間メタノリシスを行った。ヘキサンで脂肪酸メチルエステルを除いた後、得られたメチルグリコシドを

N-アセチル化し、さらにトリメチルシリル (TMS) 化し、2% OV-1 (3mm×2m) のガラスカラムを用い、内部標準にマンニトールを用いて構成糖の定性ならびに定量を行った。脂肪酸メチルエステルはキャピラリーカラム OV-101 (0.2mm×25m) を用いた。長鎖塩基は常法によりトリメチルシリル化誘導体として分析した。ガングリオシドのシアル酸の N-アシル基の同定は Yu と Ledeen の方法<sup>6)</sup> に従って 2% OV-1 のガラスカラムを用いて GLC 分析した。

構成糖の結合位置の分析は、メチル化法<sup>7)</sup> によって得た完全メチル化糖脂質を用いて行った。Yang と Hakomori の方法<sup>8)</sup> に従いアルジトールアセテート誘導体とし、部分メチル化糖アルジトールアセテートを GLC で分析した。

### 3 酵素分解

ガングリオシド (5μg シアル酸相当) を 0.01M トリス-塩酸緩衝液、pH7.0 中で 0.1 単位の *Cl. perfringens* から得たノイラミダーゼ (Sigma 社, 129C-8085-1) とインキュベートした<sup>9)</sup>。

### 4 薄層クロマトグラフィー免疫染色法<sup>10)</sup> (TLC-immunostaining)

アルミ製 TLC (Merck 社) を用い、糖脂質を C-M-W (60 : 35 : 8) で展開し、TLC を、リン酸緩衝液に溶かした 5% ウシ血清アルブミンで、ブロッキングした。その後、一次抗体として、アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した抗フォルスマン-ウサギ IgG 抗体を 10 倍希釈、一夜反応させ、洗浄、次に二次抗体として、<sup>125</sup>I-標識抗ウサギ IgG-ブタ抗体をさらに 4 時間反応させ、洗浄後、それを X 線フィルムに感光させた。

## III 結 果

### A 臓器成分の中性糖脂質

図 1 は、臓器の中性糖脂質画分の薄層クロマトグラフィーである。肝臓の中性糖脂質はラクトシルセラミドがもっとも多く、フォルスマン糖脂質は認められない。また、ヒトの肝臓で見出されるようなグロボテトラオシルセラミドも検出されず、単純なパターンを示した。GLC の定量 (表 1) では、グルコシルセラミド (16.7 nmol/g 組織)、ラクトシルセラミド (63.6 nmol/g 組織) およびグロボトリアオシルセラミド (3.3 nmol/g 組織) で構成されていた。赤血球膜の主要糖脂質であるフォルスマン糖脂質は検出されなかった。これらを構成する脂肪酸は、表 2 の通り、直鎖脂

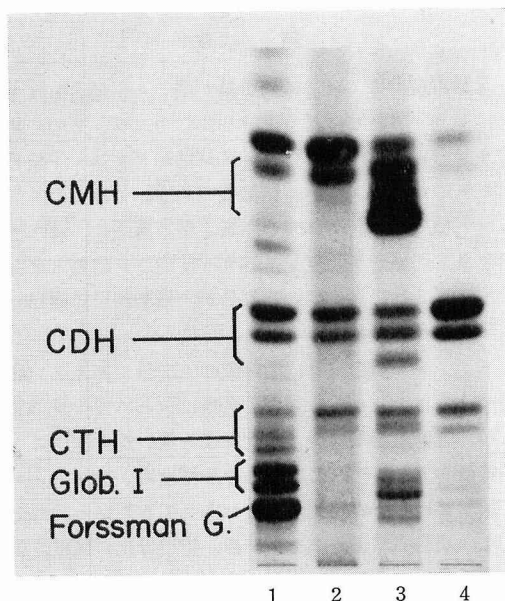


図 1 臓器の中性糖脂質の TLC

1 : 標準 2 : 肝臓 3 : 腎臓 4 : 骨髄  
3 の腎臓の CDH のバンドは 3 つあるが、上の 2 つを CDHa, 下を CDHb とした。(TLC 上で CMH より上に存在するバンドはアンスロン試薬陰性なので糖脂質ではない)

検出法 炭化法

展開溶媒 C-M-W (65 : 25 : 4, v/v/v)

表 1 臓器の中性糖脂質の定性と定量

	Glc : Gal : GalNAc	nmol/g wet tissue
Liver		
CMH	1 : 0 : 0	16.7
CDH	1 : 1.03 : 0	63.6
CTH	1 : 1.80 : 0	3.3
Kidney		
CMH	1 : 0.36 : 0	95.5
CDHa	1 : 1.02 : 0	14.4
CDHb	1 : 1.02 : 0	6.6
CTH	1 : 1.88 : 0	13.1
Glob. I	1 : 1.82 : 0.78	23.3
Bone marrow		
CMH	1 : 0 : 0	27.8
CDH	1 : 1.06 : 0	151.9
CTH	1 : 1.79 : 0	36.0

## ヒツジ各種臓器のスフィンゴ糖脂質

表2 肝臓の糖脂質の脂肪酸組成(%)

	CMH	CDH	CTH	GM3
16	16.0	25.5	18.3	13.2
18	5.0	5.1	8.7	7.7
20	2.1	1.7	2.2	1.9
21	1.0	0.7	1.0	
22	22.1	20.2	20.2	21.3
23	18.3	9.8	13.7	1.8
24:1	6.5	10.3	2.8	16.1
24	25.2	24.4	28.7	30.7
25:1	1.5		1.8	2.7
25	2.1	1.6	2.7	2.6
26	0.2	0.6		

表3 腎臓の糖脂質の脂肪酸組成(%)

	CMH	CDHa	CDHb	CTH	Glob.1	CSE	GM3
16	2.0	16.7	5.5	18.9	10.5	3.1	13.7
18	0.7	5.0	5.3	8.8	4.1	1.7	17.1
20	0.7	2.0	1.5	2.4	1.7	0.1	1.5
22	8.0	23.1	3.8	21.2	15.2	3.1	14.0
23	4.9	10.1	2.0	12.0	8.0	1.1	6.3
24:1	0.4	2.0		1.1	2.7	1.2	7.7
24	9.1	31.2	4.1	28.6	18.0	2.6	21.2
25:1	0.1						
25	0.8	2.6	2.3	1.8			
16h	3.0					7.5	0.6
18h	1.7					2.8	1.7
20h	1.7				2.5	1.4	
22h	24.0	2.6	27.0	2.0	16.6	24.3	8.8
23h	18.6	2.1	21.9	1.5	10.8	21.8	
24h:1	0.9					2.2	
24h	21.2	2.1	26.6	2.0	11.0	24.7	7.6
25h:1	0.2					0.5	
25h	1.4					1.4	
26h:1						0.4	
27h:1						0.1	
オキシ酸の占める割合(%)	72.7	6.8	75.5	5.5	40.9	87.1	18.7

脂肪酸のみから構成されており、主要構成脂肪酸は、C16、C22、C23およびC24であり、各糖脂質の構成脂肪酸の80%以上を占めるものが大部分であった。

図1のように腎臓の中性糖脂質は、モノヘキソシル

セラミドが多量に存在し、ラクトシルセラミドは2バンドの下に、さらにもう1つのバンドがあった。そして、グロボトリアオシルセラミドとさらにグロボテトラオシルセラミドとRf値を同じくするバンドがみられた。GLCの分析ではモノヘキソシルセラミド(約96nmol/g組織)がやはり主成分であり、そのうちグルコースのついたモノヘキソシルセラミドが約71nmol/g組織、ガラクトースのついたモノヘキソシルセラミドが約25nmol/g組織であった。次いで多いのがグロボテトラオシルセラミド(23.3nmol/g組織)およびラクトシルセラミド(21.0nmol/g組織)で、最後にグロボトリアオシルセラミド(13.1nmol/g組織)の順であった。肝臓の場合と同様に、フォルスマン糖脂質は検出されなかった。これらの中性糖脂質の脂肪酸組成(表3)は、モノヘキソシルセラミドでは、オキシ酸含有率が約73%と高く、C22h(24%)、C23h(19%)、およびC24h(22%)が主要構成脂肪酸であった。ラクトシルセラミド(CDHa+CDHb)を、全体として分析するとオキシ酸含有率は27%と低く、主要構成脂肪酸はC16(14%)、C22(17%)、C24(24%)、C22h(10%)、およびC24h(9%)であった。表3でCDHbにオキシ酸が多いことがわかる。グロボテトラオシルセラミドはオキシ酸が半分約41%を占めていた。主要構成脂肪酸は、C16(11%)、C22(15%)、C24(21%)、C22h(17%)、C23h(11%)、およびC24h(11%)であった。グロボトリアオシルセラミドは、オキシ酸含量は6%と低く、主要構成脂肪酸はC16(19%)、C22(21%)、C23(12%)、C24(30%)であった。

表4 骨髄の中性糖脂質の脂肪酸組成(%)

	CMH	CDH	CTH
16	28.5	23.9	35.9
18	7.3	2.8	36.6
20	4.5	1.2	0.8
22	17.7	19.0	9.7
23	6.2	2.6	
24:1	3.5	6.9	0.6
24	29.6	39.6	16.4
25:1	1.3		
25	0.8	1.1	
26:1		1.3	
26	0.6	1.7	

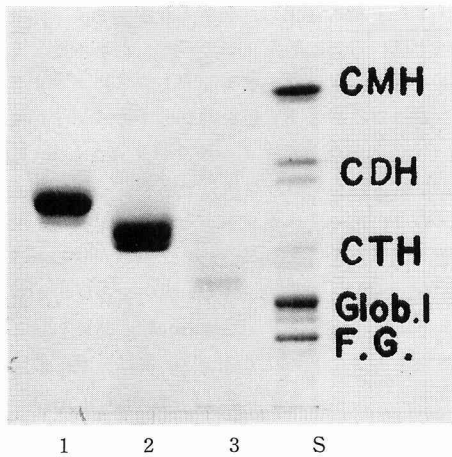


図2 腎臓より精製した硫脂質画分の TLC  
 1: Cholesterol sulfate 2: CSE  
 3: Lac-CSE S: Standard  
 展開溶媒 C-M-W (65:25:4, v/v/v)

骨髄の中性糖脂質は図1のように、ラクトシルセラミドが圧倒的に多く、フォルスマン糖脂質は検出されず、同様に GLC の分析でも表1の通り、骨髄ではラクトシルセラミドが 151.9nmol/g 組織と多量で、フォルスマン糖脂質を検出できなかった。骨髄の中性糖脂質の脂肪酸組成は表4に示すが、肝臓と同様に直鎖脂肪酸のみからなり、主要構成脂肪酸はC16、C22およびC24であった。

**B 臓器成分の酸性糖脂質**

図2の TLC において腎臓の酸性画分にコレステロール硫酸とスルファチドとラクトシルスルファチドの存在を確認し、また図3の TLC では腎臓と肝臓のガングリオシド画分はほとんどが、GM3-ガングリオシド(ヘマトシド)であることがわかる。

肝臓の酸性糖脂質(表5)では、そのほとんどが、GM3-ガングリオシドから構成されており、その含量は、約13nmol/g 組織であった。その他、薄層上で小さい Rf 値をとる2本のバンドが検出された。その1つは、GM1-ガングリオシドであり、組織含量は1.2nmol/g 組織であった。もう1つのバンドは GDla-ガングリオシドと同定され、その含量は1.6nmol/g 組織であった。各ガングリオシドのシアル酸は、N-アセチルノイラミン酸または N-グリコシルノイラミ

表5 臓器の酸性糖脂質の定性と定量

	Glc	Gal	GlcNAc	GalNAc	SA	Chol	nmol/g wet tissue
Kidney							
S-1						1	1.0
S-2		1					22.2
S-3	1	0.98					3.3
G-1	1	0.99			1		18.8
G-2	1	1.18			1.97		6.9
G-3	1	2.81	1.83		2.13		3.9
Liver							
1	1	1.01			1		12.9
2	1	1.68		0.87	0.87		1.2
3	1	1.93		0.84	1.74		1.6

Kidney S-1; Cholesterol Sulfate S-2; CSE  
 S-3; Lac-CSE G-1; GM3 G-2; GD3  
 G-3; disialosylnorhexaosylceramide  
 Liver 1; GM3 2; GM1 3; GDla

なお、腎臓の S-1, S-2, S-3 は図2の硫脂質のバンド1, 2, 3に対応し、G-1, G-2, G-3 は図3の(B)のガングリオシドのバンド1, 2, 3に対応する。また、肝臓の1, 2, 3は図3の(A)のバンド1, 2, 3に対応する

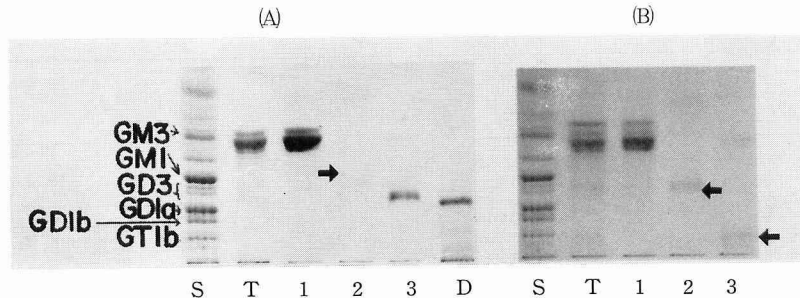


図3 肝臓と腎臓のガングリオシドの TLC S: Standard T: Total gangliosides  
 (A)肝臓 1: GM3 2: GM1 3: GDla  
 D: ヒツジ血球の Disialosyllactoneotetraosylceramide  
 (B)腎臓 1: GM3 2: GD3 3: Disialosylnorhexaosylceramide  
 展開溶媒 C-M-0.25%KCl (60:35:8, v/v/v)

ン酸から構成されていた。肝臓の3種類のガングリオシドとも N-グリコシルノイラミン酸の含量が高く、GM3では85%、GM1で71%、GD1aで64%を占めていた。一方、これらのガングリオシドの脂肪酸組成はC22、C23、およびC24が主要構成脂肪酸であり、50%以上を占めていた。スフィンゴシン塩基組成は、GM3-ガングリオシドについてのみ分析し、4-スフィンゲニンが86.3%、スフィンガニンが13.7%という数値を得た。

腎臓の酸性糖脂質の分析結果を表5に示す。腎臓に通常含まれるスルファチドおよびラクトシルスルファチドの含量は、それぞれ、22.2および3.3nmol/g組織であった。ガングリオシドは、GM3-ガングリオシド(約19nmol/g組織)が主要ガングリオシドで、次いで、GD3-ガングリオシド(6.9nmol/g組織)、ジシアロシルノルヘキサオシルセラミド(3.9nmol/g組織)の順で、さらに微量にシアロシルラクトネオテトラオシルセラミド(3.2nmol/g組織)、およびジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミド(2.5nmol/g組織)が認められた。(ジシアロシルノルヘキサオシルセラミド、ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドの構造に関しては、C赤血球の酸性糖脂質の項参照)。肝臓のガングリオシドがガングリオ系であるのに対し、腎臓は、ラクト系のガングリオシドから構成されており、臓器によるガングリオシドの生合成系の違いを示していた。中性の展開系ではGM3-ガングリオシドのシアル酸種の違いがわからないので、アンモニアの系で展開したTLCを図4に示す。コントロールのGM3-ガングリオシドは、脂肪酸の違いで、1のヒト脳では下のバンドが濃く、4のヒト肝臓では上のバンドが濃く示されている。ヒトにはN-アセチル型のシアル酸しかないが、ヒツジのGM3-ガングリオシドは、シアル酸にN-アセチル型の他にN-グリコシル型があるので、このRf値が異なる。肝臓はN-グリコシル型が主で2つのバンド、腎臓はN-アセチル型が主で2つのバンドに分かれている。実際、腎臓のガングリオシドに結合しているシアル酸の種類をGLCで分析すると、GM3-ガングリオシドでは43%がN-グリコシル型から構成されており、また、GD3-ガングリオシドでは65%がN-グリコシル型であった。腎臓のGM3-ガングリオシドは、肝臓の数値と比べ、N-グリコシル型の含有率が約半分となっている。次に、スルファチドおよびガングリオシドの脂肪酸組成をみると、両者とも、オキシ酸を含有していた。スル

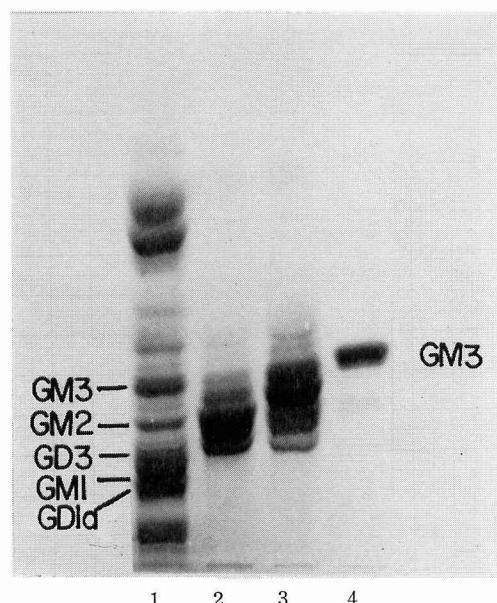


図4 肝臓と腎臓のヘマトシド (GM3) のアンモニアの展開系による TLC  
1:標準 (ヒト脳) 2:肝臓の GM3  
3:腎臓の GM3 4:ヒト肝臓の GM3  
展開溶媒 C-M-2.5N NH<sub>4</sub>OH (60:35:8, v/v/v)

ファチドでは、オキシ酸が約87%を占め、主要構成脂肪酸はC22h (24%)、C23h (22%)、およびC24h (25%)、であった。ラクトシルスルファチドは、オキシ酸含有率が68%とスルファチドより、少し低値を示したが、構成脂肪酸は、スルファチドと類似したパターンを示した。GM3-ガングリオシドは、オキシ酸含有率約19%で、C16 (14%)、C18 (17%)、C22 (14%)、C24 (21%)、C22h (9%)、C24h (8%)が主要構成脂肪酸であった。スフィンゴシン塩基のTMS誘導体をGLCで分析し、次の結果を得た。スルファチド、GM3-およびGD3-ガングリオシドとも70~80%が4-スフィンゲニンから構成されており、さらに、10~30%のC18-フィトスフィンゴシンおよび少量のスフィンガニンおよびC20-フィトスフィンゴシンから構成されていた。この組成は、他の哺乳動物の腎臓における糖脂質のスフィンゴシン塩基組成と同様のパターンである。

#### C 赤血球の酸性糖脂質

図5はヒツジ血球膜のガングリオシドを、炭化法で検出したものである。TLC上では、図5の3本の主要なバンドが検出された。この3本の糖脂質をGLCで

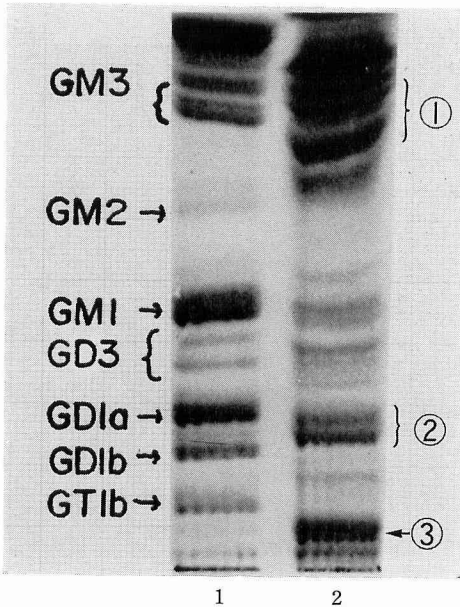


図5 ヒツジ赤血球のガングリオシドの TLC  
 1: Standard 2: Total gangliosides  
 バンド①; GM3-ganglioside  
 バンド②; Disialosyllactoneotetraosylceramide  
 バンド③; Disialosylnorhexaosylceramide  
 (TLC 上でバンド①より上に存在するバンドはレゾルシノール 試薬陰性なのでガングリオシドではない)  
 検出法 炭化法  
 展開溶媒 C-M-0.25%KCl (60:35:8, v/v/v)

表6 赤血球のガングリオシドの糖組成比

	Glc	Gal	GlcNAc	SA
①	1	1.16		0.89
②	1	2.00	0.99	1.80
③	1	3.20	1.79	1.95

①, ②, ③は図5のバンド①, バンド②, バンド③に相当

定量すると、それらの比は、バンド①38%、バンド②35%、バンド③27%であった。この他にも微量のバンドが数本存在したが、今回は分析に用いなかった。各バンドの糖組成は、表6に示す。バンド①ではグルコース対ガラクトース対シアル酸が1:1:1、バンド②では、グルコース対ガラクトース対N-アセチルグルコサミン対シアル酸が1:2:1:2、バンド③で

は、この比が、1:3:2:2であった。この結果から、バンド①は GM3-ガングリオシド、バンド②は、ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミド、バンド③は、ジシアロシルノルヘキサオシルセラミドと推定された。バンド②のガングリオシドを1Mのギ酸処理し、薄層クロマトグラフィーで検索したところラクトネオテトラオシルセラミド (Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer) を思わせる薄層上 Rf 値の同一のバンドを得たので、さらに②の化学構造について構造決定を進めた。このガングリオシドを完全メチル化後、アルジトールアセテートにして GLC で分析すると、図6のように、2, 3, 6-トリ-O-メチルグルチトールアセテートの他に、2, 4, 6-トリ-O-メチルガラクトールアセテートの大きなピークが検出された。以上のことは、2モルの3位の欠けたガラクトースがあり、末端のガラクトースにシアル酸がついていることを示しており、内側のガラクトースにはシアル酸はついていないことを同時に意味している。また、別にこのガングリオシドのシアル酸を *Cl. perfringens* のノイラミニダーゼを用いて、酵素的に除去した。図7に示されるように、コントロールのヒト血球由来のシアロシルラクトネオテトラオシルセラミド、ヒツジ血球のジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドはともに同じ条件で、ノイラミニダーゼ処理をし、その結果フォルスマン糖脂質の上に同一の Rf 値をもつバンドを得た。ジシアロラクトネオテトラオシルセラミドのシアル酸は2モルともはずれたと考えられ、この2モルのシアル酸が末端ガラクトースの3位に結合していることは、*Cl. perfringens* のノイラミニダーゼで完全にシアル酸が除かれ、ラクトネオテトラオシルセラミドと薄層上で同一の物質が出現することからも支持された。ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドはフォルスマン糖脂質に対し定量すると、モル比にして8%あることがわかった。

GM3-ガングリオシド、ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミド、およびジシアロシルノルヘキサオシルセラミドのシアル酸は、N-アセチル型とN-グリコリル型から構成されていたが、N-グリコリル型が主体を成し、そのN-グリコリル型の比率は、それぞれ、51%、60%および74%であった。脂肪酸組成は、直鎖酸のみから構成されており、主要脂肪酸は、GM3-ガングリオシドが C18 (38%)、C22 (25%) および C24 (21%) であった。ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドでは、C16 (17%)、

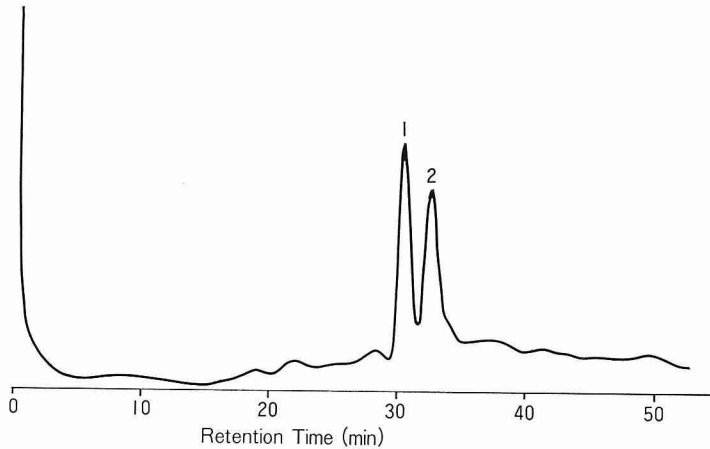


図6 ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドの部分メチル化糖アルジトールアセテート誘導体の GLC  
 1: 2,4,6-トリ-O-メチルガラクトールアセテート  
 2: 2,3,6-トリ-O-メチルグルチトールアセテート  
 条件 カラム: 3% ECNSS-M (3mm×2m) 150-220°C (2°C/min)

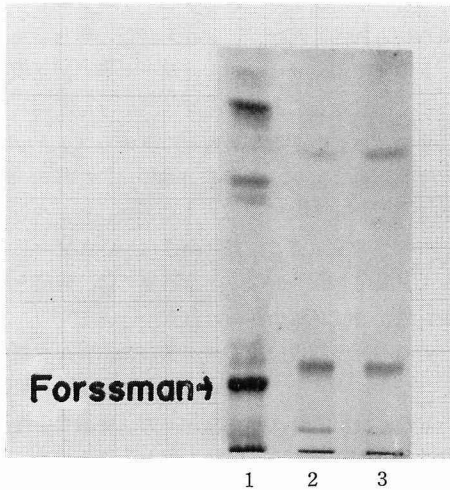


図7 ジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドのノイラミニダーゼ酵素分解し得た産物の TLC  
 1: 標準  
 2: ヒト血球よりのシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドをノイラミニダーゼ酵素分解し得たラクトネオテトラオシルセラミド  
 3: ヒツジ血球よりのジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドをノイラミニダーゼ酵素分解し得た産物  
 展開溶媒 C-M-W (65:25:4, v/v/v)

C22 (18%), および C24 (48%) が主要脂肪酸, ジシアロシルノルヘキサオシルセラミドでは C22 (27%) および C24 (57%) が主要脂肪酸であった。

また, モノシアロ画分の微量の6つのバンドが, 個々に分離同定できなかったが, 混合物として分析すると, GLC 上, アミノ糖として N-アセチルグルコサミンのピークが認められた。このようにヒツジ赤血球では, ラクト系のガングリオシドが主体をなすと考えられる。

#### D 赤血球の中性糖脂質

図8はヒツジとヤギの赤血球の中性糖脂質の薄層クロマトグラフィーである。両方とも, 分布のパターンは酷似する。同じ中性糖脂質を, 別の展開溶媒 C-M-W (60:35:8) で展開後, フォルスマン抗体により, radioimmunostaining で染色した結果が図9である。薄層クロマトグラフィーの中心付近にある濃いバンドがフォルスマン糖脂質である。フォルスマン糖脂質はフォルスマン抗体と Ouchterlony 法で, 沈降反応を示すと同様, 薄層クロマトグラフィー上でもフォルスマン抗体と反応した。さらに, フォルスマン糖脂質とは別な位置に, ラクトネオテトラオシルセラミドと同じ Rf 値をもつバンド(4糖の位置)とグロボテトラオシルセラミドよりも Rf 値が大きいバンド(3糖か4糖の位置)がフォルスマン抗体により認識されていることがわかった。ともにアンスロン陽性である糖



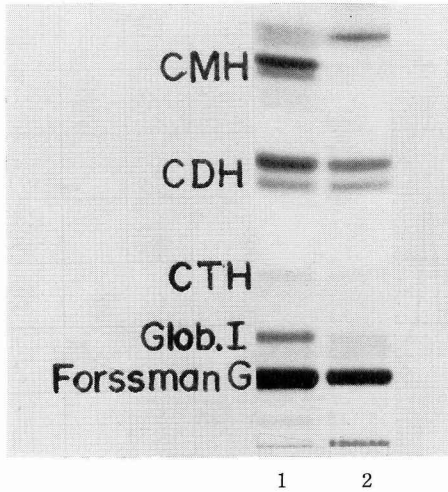


図8 赤血球の中性糖脂質の TLC  
 1: ヤギの赤血球の中性糖脂質  
 2: ヒツジの赤血球の中性糖脂質  
 展開溶媒 C-M-W (65:25:4, v/v/v)

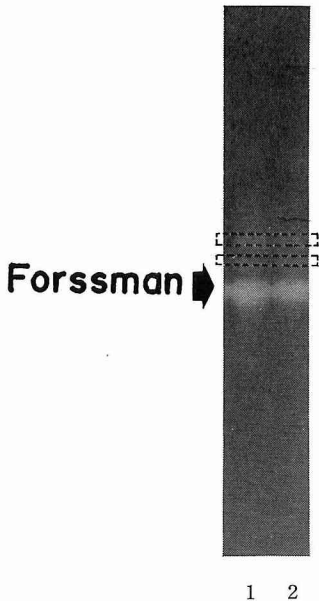


図9 図8と同一のサンプルをフォルスマン抗体を用いて薄層クロマトグラフィー免疫染色した TLC  
 1: ヤギの赤血球の中性糖脂質  
 2: ヒツジの赤血球の中性糖脂質  
 フォルスマン糖脂質より上に2本のバンド(粹内)がある  
 展開溶媒 C-M-W (60:35:8, v/v/v)

脂質である。また二次抗体としてペルオキシダーゼをラベルした抗体を用いても同じ結果を得た。このことはフォルスマン抗体は、末端の  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミンを認識しているため、これらのアンスロン陽性の糖脂質は少なくとも非還元末端は ( $\alpha$ -GalNAc) だと考えられる。

#### E ヒツジ各血液成分の糖脂質

フィコールを用いた細胞分画により得られた白血球と血小板の中性糖脂質の薄層クロマトグラフィーではラクトシルセラミドが主成分で、フォルスマン糖脂質は見出されなかった。血漿では明らかに赤血球のパターンと異なり、ラクトシルセラミドが主要成分で4糖以上の糖脂質はほとんど検出されず、フォルスマン糖脂質は見出されなかった。酸性糖脂質は GM3-ガングリオシドが大部分だった。

#### IV 考 察

もともとフォルスマン抗原は、モルモットの腎臓をすり潰して家兎に免疫すると、家兎血清にヒツジの赤血球に対する溶血素 (hemolysin) ができるといふ現象から知られ、これは、ヒツジとは種の異なったモルモットの臓器に、ヒツジの赤血球と共通の抗原構造があることを意味しており、異好性抗原とも呼ばれている。そのヒツジの赤血球溶血素に対するフォルスマン抗原とは糖脂質であり、構造も Siddiqui と Hakomori (11) によって決定されている。ところが、ヒツジ自体のフォルスマン糖脂質の臓器特異性については今日までほとんど調べられていない。本研究では、肝臓と腎臓についてまず検討が加えられた。

肝臓の中性糖脂質は、グロボ系の糖脂質から構成されていたが、グロボテトラオシルセラミドより糖鎖の長いものは検出されなかった。一方、腎臓の中性糖脂質では、やはりグロボ系の糖脂質から成りフォルスマン糖脂質はみられなかった。

以上の結果より、少なくとも肝や腎にはフォルスマン糖脂質は存在しないことが判明した。最近、Dahiya と Brasitus (12) によりヒツジの消化管粘膜について、糖脂質が調べられたが、やはりフォルスマン糖脂質は検出されていない。したがって発生学的に内胚葉由来の肝臓および消化管、中胚葉由来の腎臓にフォルスマン糖脂質はみられない。

さらに、血液の成分についても検討が加えられた。今日まで、赤血球以外の白血球、血小板、血漿については、フォルスマン抗原は、生化学的には調べられて

いない。ただ、Yoshida ら<sup>13)</sup>はゲル内 cytolysis による免疫学的な手法により、ヒツジの血小板には、フォルスマン抗原があるというが、今回の分析では見出せなかった。また白血球にもフォルスマン糖脂質は検出できなかった。

赤血球の中性糖脂質の主成分がフォルスマン糖脂質であることは、よく知られているが、発生学的に、赤血球の成熟のどの段階で、この糖脂質が出現してくるのかは興味深い。ヒツジの骨髄の中性糖脂質を分析してみたが、ほとんどがラクトシルセラミドで、フォルスマン糖脂質は検出し得なかった。また、今回の研究では血小板、白血球、および血漿ともフォルスマン糖脂質は存在せず、赤血球に特異的に存在するものと考えられる。ヒトの血球の型物質の1つであるルイス型糖脂質は Marcus と Cass<sup>14)</sup>により血清より移行することが唱えられていたが、ヒツジ血球のフォルスマン糖脂質では、血清リポ蛋白中の糖脂質より由来する可能性も今回の研究では否定的であった。赤血球の成熟のどの段階でフォルスマン糖脂質が出現するのか興味ある問題である。

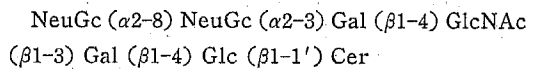
また、ヒツジ赤血球はヒトTリンパ球と特異的にロゼット形成することから、臨床的に、Tリンパ球を同定するマーカーとして汎用されている。ところが、ヒツジ赤血球の成分の何が、ヒトTリンパ球を認識するのに関与しているのかは、今日の免疫学研究上もわかっていない。1981年 Guertler<sup>15)</sup>は、ヒツジ赤血球より分離された糖脂質が関与するとしたが、それも今後検討される問題だと思われる。

一方、ヒツジ赤血球にはフォルスマン抗原以外に、異好性抗原として Paul Bunnell 抗原 (PB 抗原)、Hanganutziu-Deicher 抗原 (HD 抗原) が存在している。伝染性単核球症 (Infectious mononucleosis) に感染したとき PB 抗体は出現するが、PB 抗原の抗原構造は今のところ不明である。HD 抗体は serum sickness のときに出現するが、Higashi ら<sup>16)</sup>は HD 抗体はガングリオンドのシアル酸の N-グリコリル型を認識するとしているが、今回の分析でもヒツジ赤血球のガングリオンドのシアル酸は N-グリコリル型が主を占めることより、それが裏付けられた。

さらに今まで知られていない糖脂質の分布についても知見を得た。肝臓の中性糖脂質は、グロボ系の糖脂質から構成されていたが、一方、酸性糖脂質は GM3-ガングリオンドおよびガングリオ系の微量ガングリオンド (GM1-および GD1a-ガングリオンド) から構成

されており、中性および酸性糖脂質とも、ヒト肝臓と比べ、単純なパターンを示した。構成脂肪酸は直鎖酸のみから構成されており、ヒトと同じであった。腎臓の中性糖脂質では、グルコシルセラミドおよびガラクトシルセラミドから成るモノヘキソシルセラミドが圧倒的に多く特徴あるパターンといえる。最近、Nagai ら<sup>17)</sup>はジャコウネズミ、ラット、ウシ、ウマ、ヒトなど哺乳類のスルフォリビドに関して、スルファチドとラクトシルスルファチドが腎臓に臓器特異的に存在することを述べているが、今回、ヒツジの場合にも確かめられた。また、腎臓の酸性糖脂質は、GM3-および GD3-ガングリオンドの他は、ラクト系のガングリオンドから構成されており、ガングリオ系を表現している肝臓とは対照的であった。

さて、もともと GM3-ガングリオンドはウマ、ヒト赤血球より最初に単離された物質である。一方、ヒツジ赤血球の糖脂質はグロボ系の糖脂質から構成されていることが知られていた<sup>18)</sup>が、Momoi と Yamakawa<sup>19)</sup>は、ラクト系の糖脂質であるラクトネオテトラオシルセラミド (パラグロボシド) がヒツジ赤血球にあることを見出した。また同時に、シアル酸がついた糖脂質の存在を示唆していたが、詳細は検討されていなかったため、今回、ヒツジ赤血球の微量ガングリオンドについて分析を試みた。ヒツジ赤血球にも、やはり GM3-ガングリオンドが認められたが、その他にかなり多くのラクト系のガングリオンドが存在し、その主要ガングリオンドとしてジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドがヒツジ血球に存在することを初めて明らかにした。それはメチル化や酵素処理により、次の構造を持つと考えられる。



基本骨格はラクトネオテトラオシルセラミドと同じで、末端ガラクトースに2モルのシアル酸がついている構造が予想される。この物質自体は、Rauvala ら<sup>20)</sup>により、ヒトの腎臓から得られ、最初に構造が決定された。最近、Kundu ら<sup>21)</sup>はこれと同じ物質を、ヒトの血球より見出している。ところが以上はいずれも、ヒト由来のため、シアル酸は N-アセチル型しかない。今回の分析の結果、N-グリコリル型が、60% 認められたので、2モルのシアル酸がともに N-グリコリル型であるものが、少なくともみられることがわかった。

さて、以上の結果より、その骨格構造から、生合成における代謝経路が推定される。ジシアロシルラクト

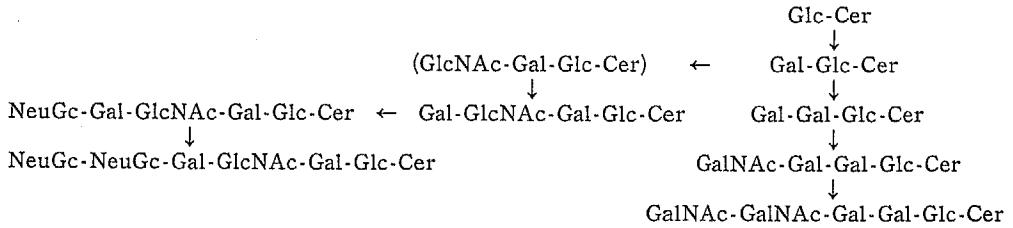


図10 ヒツジ赤血球の糖脂質の代謝模式図

ネオテトラオシルセラミドは、図10のごとく、ラクトネオテトラオシルセラミドから、シアル酸が付き、合成されてくると考えられる。Higashiら<sup>22)</sup>はニワトリの胚の脳組織を用いて sialyltransferase によりラクトネオテトラオシルセラミドから同じものが合成されることを見出している。

### V 結 語

ヒツジでは、従来知られていたように赤血球ではフォルスマン糖脂質が主要糖脂質であり、フォルスマン糖脂質は肝臓と腎臓に存在せず、白血球、血小板、血漿にもみられなかった。ヒツジ赤血球のガングリオンドとして GM3-ガングリオンドとジシアロシルラクトネオテトラオシルセラミドを見出した。肝臓および腎臓の中性糖脂質はともにグロボ系であり、その主要構成糖脂質は肝臓ではラクトシルセラミド、腎臓では

モノヘキソシルセラミドであった。肝臓のガングリオンドはガングリオ系、腎臓のガングリオンドはラクト系を表現していた。薄層クロマトグラフィー免疫染色法でフォルスマン抗体と反応する糖脂質がフォルスマン糖脂質以外に2種類認められた。ヒツジのガングリオンドのシアル酸は主に N-グリコリル型で、それぞれ臓器、血球において分布を異にする。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師武富保教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し、御教示、御指導下さいました上村敬一助教授、原厚講師ならびに教室諸兄に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第55回日本生化学会総会(1982年10月、大阪)、第56回日本生化学会総会(1983年9月、博多)、第57回日本生化学会総会(1984年10月、東京)において発表した。

### 文 献

- 1) Yamakawa, T. : Glycolipids of the red blood cells. In : Agar, N.S. and Board, P.G. (ed.), Red blood cells of domestic mammals, pp.37-53, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1983
- 2) Ledeen, R.W., Yu, R.K. and Eng, L.F. : Gangliosides of human myelin : sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component. J Neurochem, 21 : 829-839, 1973
- 3) Hara, A. and Taketomi, T. : Hepatic glycosphingolipid abnormalities in a patient with GM1-gangliosidosis. J Biochem (Tokyo), 96 : 1051-1059, 1984
- 4) Svennerholm, L., Månsson, J-E. and Li, Y-T. : Isolation and structural determination of a novel ganglioside, a disialosylpentahexosylceramide from human brain. J Biol Chem, 25 : 740-742, 1973
- 5) Miettinen, T. and Takki-Lukkainen, I-T. : Use of butyl acetate in determination of sialic acid. Acta Chem Scand [B], 13 : 856-858, 1959
- 6) Yu, R.K. and Ledeen, R.W. : Gas-liquid chromatography assay of lipid-bound sialic acids : Measurement of gangliosides in brain of several species. J Lipid Res, 11 : 506-516, 1970
- 7) Phillips, L.R. and Fraser, B.A. : Methylation of carbohydrates with dimethyl potassium in dimethyl sulfoxide. Carbohydr Res, 90 : 149-152, 1981
- 8) Yang, H-J. and Hakomori, S. : A sphingolipid having a novel type of ceramide and lacto-N-fucopentaose III. J Biol Chem, 246 : 1192-1200, 1971
- 9) Rokukawa, C., Kushi, Y., Ueno, K. and Handa, S. : Structural study on gangliosides from rat liver and erythrocytes. J Biochem (Tokyo), 92 : 1481-1488, 1982

- 10) Magnani, J.L., Brockhaus, M., Smith D.F., Ginsburg, V., Blaszczyk, M., Mitchell, K.F., Steplewski, Z. and Koprowski, H. : A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. *Science*, 212 : 55-56, 1981
- 11) Siddiqui, B. and Hakomori, S. : A revised structure for the Forssmann glycolipid hapten. *J Biol Chem*, 246 : 5766-5769, 1971
- 12) Dahjya, R. and Brasitus, T.A. : Glycosphingolipid patterns of fetal and adult small intestinal mucosa in the sheep. *Biochim Biophys Acta*, 875 : 220-226, 1986
- 13) Yoshida, H., Kano, K. and Milgrom, F. : Thrombocytolysis in gel. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 46 : 458-469, 1974
- 14) Marcus, D.M. and Cass, L.E. : Glycosphingolipids with Lewis blood group activity ; Uptake by human erythrocytes. *Science*, 164 : 553-555, 1969
- 15) Guertler, L.G. : Glycolipid and p40 are the binding sites in the sheep erythrocyte and T-lymphocyte membrane responsible for rosette formation. *Immunobiology*, 158 : 426-438, 1981
- 16) Higashi, H., Naiki, M., Matsuo, S. and Okouchi, K. : Antigen of "serum sickness" type of heterophile antibodies in human sera : Identification as gangliosides with N-glycolylneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 79 : 388-395, 1977
- 17) Nagai, K., Ishizuka, I. and Oda, K. : Acidic glycolipids from kidney of suncus (Insectivora). *J Biochem (Tokyo)*, 95 : 1501-1511, 1984
- 18) Yamakawa, T., Irie, R. and Iwanaga, M. : The chemistry of lipid of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. *J Biochem (Tokyo)*, 48 : 490-507, 1960
- 19) Momoi, M. and Yamakawa, T. : Glucosamine-containing sphingoglycolipids from sheep erythrocytes. *J Biochem (Tokyo)*, 84 : 317-325, 1978
- 20) Rauvala, H., Krusius, T. and Finne, J. : Disialosyl paragloboside. A novel ganglioside isolated from human kidney. *Biochim Biophys Acta*, 531 : 266-274, 1978
- 21) Kundu, S.K., Samuelsson, B.E., Pascher, I. and Marcus, D.M. : New gangliosides from human erythrocytes. *J Biol Chem*, 258 : 13857-13866, 1983
- 22) Higashi, H., Basu, M. and Basu, S. : Biosynthesis *in vitro* of disialosylneolactotetraosylceramide by a solubilized sialyltransferase from embryonic chicken brain. *J Biol Chem*, 260 : 824-828, 1985

---

(61. 9. 29 受稿)