食品由来スフィンゴ脂質の構造と機能に関する研究

食品工業部
柘植圭介　澤田和敬
佐賀大学農学部
北垣浩志　高橋宏志郎　平田みよ
浦野義崇　Lahiru Niroshan Jayakody

焼酎粕からスフィンゴ脂質を精製し，エレクトロスプレーイオン化-イオントラップ型質量分析装置を用いることにより，主要なピークとして m/z 736.6 及び 792.6 に観測される分子種を見出した．m/z 736.6 の分子種について，衝突誘導乖離法を用いたフラグメント解析を行ったところ，ceramide に該当する分子種（m/z 574.6），glucosylsphingoid base に該当する分子種（m/z 482.3），脂肪酸/スフィンゴイド塩基に該当する分子種（m/z 320.3）及びグルコースに該当する分子種（m/z 203.0）を見出した．また，m/z 792.6 の分子種について同様にフラグメント解析したところ，ceramide に該当する分子種（m/z 630.6），glucosylsphingoid base に該当する分子種（m/z 482.4）及び脂肪酸に該当する分子種（m/z 376.4）を見出した．以上の情報から，焼酎粕に含まれる主要なスフィンゴ脂質は cerebroside であると導かれ，それらの構造を，D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine 及び D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylarachidoyl-4,8-sphingadienine と同定した．

１．はじめに

スフィンゴ脂質はその保湿作用から，化粧品・保湿剤・機能性食品の原料として潜在的に大きな市場性が見込まれている [1,2]．またスフィンゴ脂質はさまざまなシグナルの因子でもあり [3-5]，抗がん作用も報告され，ガンの予防効果も期待されている [6-8]．スフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴシン 1 リン酸は G タンパク質連動型受容体のリガンドであり静的な繊維芽細胞の刺激効果があることから，抗ガン剤開発の対象物質となっている [9]．さらに最近では，スフィンゴ脂質の脂質代謝改善作用についても報告がなされている．例えば，インシュリン感受性の改善作用や抗炎症作用，抗アポトーシス作用があるアディポネクチンの下流のシグナル因子であることが示されている [10]．また，glucosylceramide 合成酵素が脂質代謝やインシュリン抵抗性を制御することも明らかにされている [11-13]．

このように，スフィンゴ脂質は機能性脂質として世界中で精力的に研究されており，今後の大きな市場形成が期待されている．しかしその抽出源に関する研究はほとんど行われておらず，唯一我々が焼酎粕にスフィンゴ脂質が 2.2 mg から 3.3 mg（乾燥重量 1 g あたり）の濃度で含まれていることを示している [14]．

複合スフィンゴ脂質は構造が複雑で，かつ多様な結合を持つ．このことから，その分析には多くの化学処理が必要で，かつそれらの化学処理は繊細な操作が求められ，場合によっては artifact を引き起こす恐れがあるため，スフィンゴ脂質の分析や構造解析は一部の研究室でしか行われてこなかった．しかし近年，質量分析法を利用したスフィンゴ脂質の解析技術が開発され [15]，化学処理を行わずに直接質量分析装置を用いてスフィンゴ脂質を同定すると同時に，その構造を明らかにできる手法が開発された [16]．すなわち，スフィンゴ脂質の分子構造を極性基の周りの結合から開裂させていき，生じたフラグメントイオンを解析するというものである．この方法は少ないステップでスフィンゴ脂質の分子構造を明らかにできる画期的な方法であるが，この方法を使った研究報告は世界的にもまだ少なく，醸造学への適用例もこれまでない．

一方，我々は既報 [14] で焼酎粕にスフィンゴ脂質が含まれることを明らかにしたが，そこでの同定法は脂質の化学的性質と Rf 値から脂質クラスを推定するというものであり，分子量，分子構造に関する情報はなかった．そこで，本研究では，エレクトロスプレーイオン化-イオントラップ型質量分析装置（ESI-ITMS）を使ったフラグメントイオン解析により焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質の構造を解析した．本報告では，焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質の分子種及び構造に関する解析結果，ならびに新規スフィンゴ脂質 D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-

hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine (d18:2$^{\Delta4,\Delta8}$/h16:0) 及び D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylarachidoyl-4,8-sphingadienine (d18:2$^{\Delta4,\Delta8}$/h20:0)について報告する.

２．実験方法

2.1 材料及びスフィンゴ脂質の精製

焼酎粕として，表皮から約 30%削った大麦及び白麹菌を使って減圧蒸留で製造したものを用いた．スフィンゴ脂質は焼酎粕から既報 [14]に従い抽出した．乾燥した焼酎粕 0.3 g から抽出したスフィンゴ脂質をよく乾燥させたのち chloroform:methanol (2:1, v/v) 1.5 ml で溶解し，0.5 ml を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に注入した．HPLC による精製条件は以下のとおりである．

カラム： Inertsil SIL 100A 5 μm 直径 4.6 mm×長さ 250 mm (GL Science Inc.)

移動相 A：chloroform

移動相 B：methanol:water (95:5, v/v))

グラジエント条件：0 min B0%→15min B25%→20min B90%, 25 min B100%, 35 min B100%

流速：0.7 ml/min.

溶出液は 1 分ごとに採取し，薄層クロマトグラフィー（TLC）にスポット後，展開して染色した．TLC へのスポット，展開及び染色は既報 [14]の方法に従った．

2.2 質量分析

スフィンゴ脂質の ESI-ITMS には HCT-ultra (Bruker Daltonics 製；平成 17 年度電源立地地域対策交付金補助物件)を用いた．2.1 項で示した条件に従い精製したスフィンゴ脂質を methanol に溶解し，オンラインシリンジポンプを通じて流量 3 μl/min で質量分析装置に注入した．窒素を 10 L/min の流量で流し，脱溶媒のために 350℃で加熱しネブライザーガスは圧力 20 psi で流した．positive ion モードで測定し，キャピラリー電位は 4 kV に，end plate offset は 0.5 kV に設定した．マススペクトルは 50-1500 m/z の範囲で，8100 m/z per second のスキャンスピードで取得した．縦列型の質量分析はヘリウムガスを衝突ガスとして用いた衝突誘導乖離法 collision induced dissociation（CID）を用いて行った．precursor ion は 4 m/z の幅で単離し，1.0V の乖離の振幅で MS^3 までの多段型質量分析を行った．

３．結果

3.1 スフィンゴ脂質の HPLC による精製

全脂質を抽出し，弱アルカリ耐性脂質を分画するだけでは，スフィンゴ脂質と一緒に steryl glucoside（sterol に glucose がアセタール結合した分子種）も残存してしまい，以後の解析に困難をきたす．そこで，スフィンゴ脂質を steryl glucoside から分画するために，HPLC を用いて精製を行った．フラクションを TLC により解析したところ，スフィンゴ脂質が steryl glucoside から分離していることが確認できた（図１）．そこで保持時間 23 分の画分を以後の解析に供した．

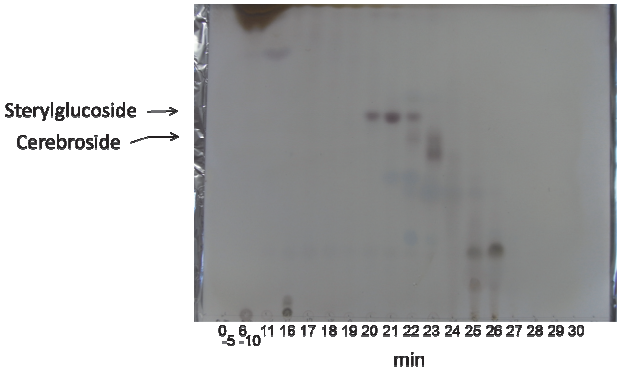

図１　焼酎粕由来スフィンゴ脂質の分画

保持時間23-24分の画分にスフィンゴ脂質が検出されたため，これを分画した。

3.2 精製したスフィンゴ脂質の質量分析

精製したスフィンゴ脂質を ESI-ITMS で解析し，その分子量を調べた．その結果，主要なピークの一つとして，m/z 736.6 の分子種が観察された（図２）．脂質抽出の工程で NaOH 処理を行なっていることを考慮すれば，本分析により検出されたスフィンゴ脂質はナトリウムが付加した分子 $[M+Na]^+$ で，M の質量は 713.6 であることが推察される．一方，Sullards らは，スフィンゴ脂質の一種である cerebroside（ceramide に glucose がアセタール結合した分子種）にリチウムを添加し，質量分析によりリチウム付加分子 $[M+Li]^+$を検出する方法で構造解析を行なっている．この実験でも，M=713.6 に相当する m/z 720.9（$[M+Li]^+$）が観察され [16]、その分子種は D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine（d18:2$^{\Delta4,\Delta8}$/h16:0）*であった．これらのことか

*前半の文字と数字は，スフィンゴイド塩基の分子構成を表し，d の記号は 4 位に水酸基がなく 3 位と 4 位の間に二重結合が入っていることを，その後の数字は炭素鎖の長さを，：の後は二重結合の数を，上付きの文字は二重結合の位置を表す．後半の文字と数字は，脂肪酸の分子構成を表し，h はα位が水酸化していることを，その後の数字は炭素鎖の長さを，：の後の数字は二重結合の数を表す．

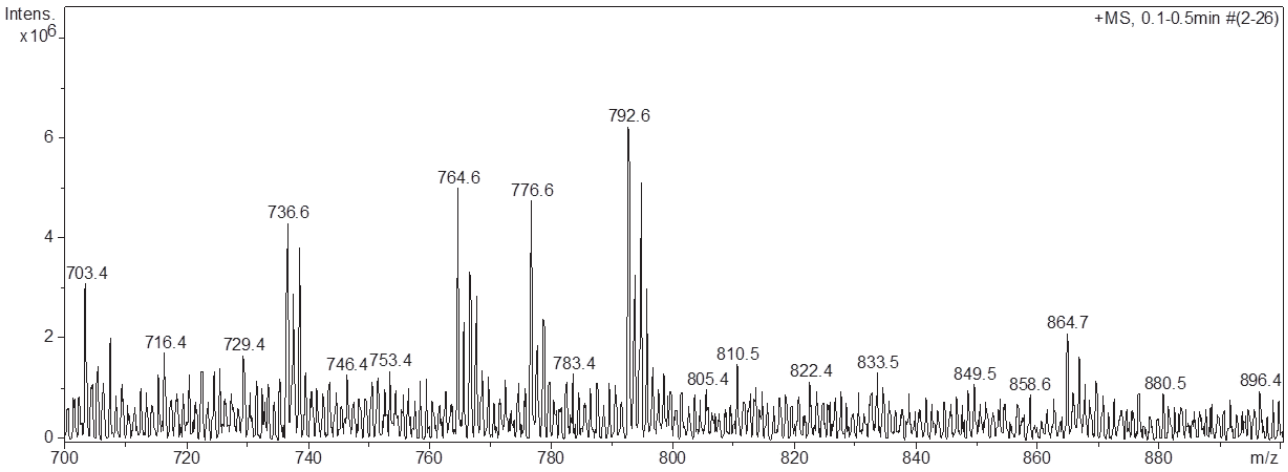

図２　焼酎粕由来Cerebroside精製物のESI-ITMSスペクトル

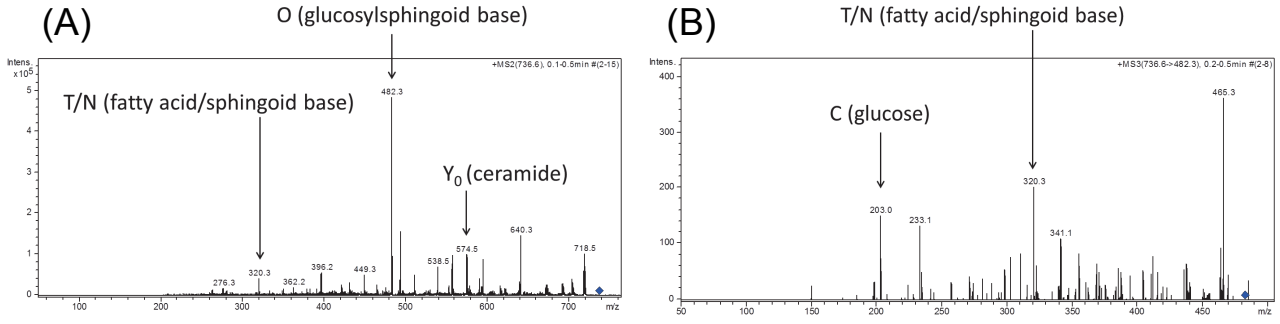

図３　焼酎粕由来Cerebroside [precursor: m/z 736.6]のCIDによるフラグメント解析
(A) MS^2解析 [precursor: m/z 736.6], (B) MS^3解析 [precursor: m/z 482.3]

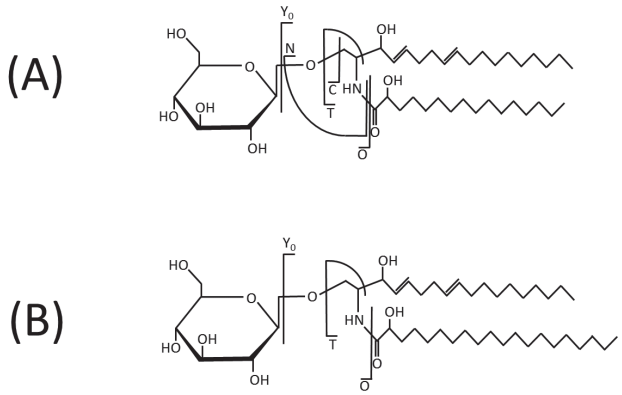

図４　焼酎粕由来Cerebroside における分子構造の推定
(A) D-glucosyl-β-1,1'-N-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine
(B) D-glucosyl-β-1,1'-N-2-hydroxylarachidoyl-4,8-sphingadienine

ら，焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質は、上述の cerebroside、あるいはその構造／立体異性体である可能性が想起される。そこでさらにこの分子種の構造を明らかにするため，CID を使ったフラグメント解析を行った．

3.3 精製した cerebroside の CID によるフラグメントイオン解析

3.2 項で記述した m/z 736.6 の分子種を選び，CID 後の MS^n 解析によりその構造を解析した．これまでの研究で，cerebroside の$[M+Li]^+$は，MS^n 解析によりフラグメントイオンとして，極性基の周りの化学結合が開裂した分子種を生成することがわかっている．そこで，この分子種に対して CID を使ったフラグメントイオン解析を行った．Sullards らの方法ではス

表１　焼酎粕由来スフィンゴ脂質のフラグメント解析

単位：m/z

	Sullards et al [16]			This study					
	$[M+Li]^+$	$[M]^+$	neutral loss	$[M+Na]^+$	$[M]^+$	neutral loss	$[M+Na]^+$	$[M]^+$	neutral loss
Precursor ion	720.9	714.0		736.6	713.6		792.6	769.6	
Y0	558.9	552.0	162.0	574.5	551.5	162.1	630.6	607.6	162.0
O	466.6	459.7	254.3	482.3	459.3	254.3	482.4	459.4	310.2
T/N	304.5	297.6	416.4	320.3	297.3	416.3	376.4	353.4	416.2
C	187.1	180.2	533.8	203.0	180.0	533.6	-	-	-

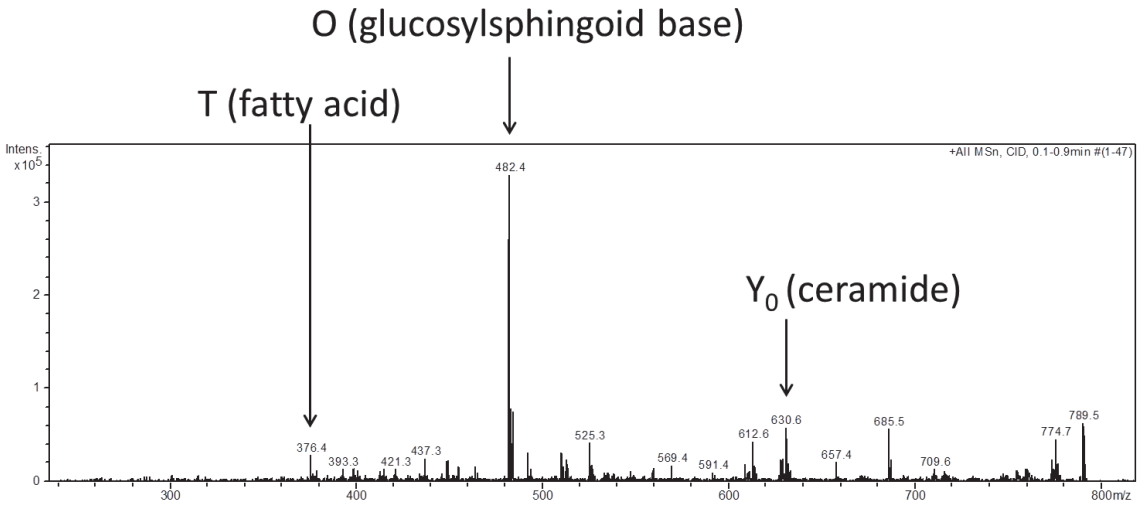

図５　焼酎粕由来Cerebroside [precursor: m/z 792.6]のCIDによるMS²フラグメント解析

フィンゴ脂質を Li^+でカチオン化しているが，今回の解析では，脂質の調製で NaOH を使用しており，$[M+Na]^+$が生じると考えられたため，Na^+と Li^+の質量の差を勘案して以後の計算を行った(表１).

解析の結果，図３A に示すように、この分子種の CID により m/z 574.6 の分子種が観察された．D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine を報告した Sullards らの論文 [16]では，CID によりアセタール結合が開裂してグルコースが脱離し，ceramide に該当する分子種（Y_0）が neutral loss 162.0 で生成することが示されている（図４A）．$[M+Na]^+$で換算すると m/z 574.6 （$C_{34}H_{65}O_4NNa^+$）と計算され m/z が一致し，この分子種は ceramide に該当すると考えられた．同様に，この分子種の CID により m/z 482.3 の分子種が観察された（図３A）．これまで D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine の CID によりアミド結合が開裂して脂肪酸が脱離した glucosylsphingoid base（O）が neutral loss 254.3 で生成することが示されている．$[M+Na]^+$で換算すると m/z 482.3 （$C_{24}H_{45}O_7NNa^+$）と計算され，m/z が一致し，この分子種は glucosylsphingoid base であると考えられた. この分子種の CID により m/z 320.3 の分子種も観察された（図３A）.

D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine の CID によりアセタール結合とアミド結合の両方が開裂した脂肪酸/スフィンゴイド塩基の分子種（T/N）が neutral loss 416.3 で生成することが示されている（図４A）. $[M+Na]^+$で換算すると m/z 320.3 ($C_{18}H_{35}NO_2Na^+$)と計算され，m/z が一致し，この分子種は脂肪酸/スフィンゴイド塩基であると考えられた.

次に m/z482.3 の分子種 O をさらに CID により MS^3 解析したところ，m/z 482.3 の T/N の分子種や m/z 203.0 の分子種が観察された（図３B）．過去の検討では，D-glucosyl-β-1,1'-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine の CID によりアセタール結合が開裂し，グルコースの側にプラス電荷が負荷した分子種（C）が，neutral loss 533.8 で生成することが示されている（図４A）[16]. $[M+Na]^+$で計算すると m/z 203.0 （$C_6H_{12}O_6Na^+$）と計算され m/z が一致し，この分子

種はグルコースであると考えられた．

同様に MS で観察されたもうひとつの主要なスフィンゴ脂質である m/z 792.6 の分子種についても MS^2 解析を行った（図５）．その結果，Y_0 の m/z に相当する 630.6，O の m/z に相当する 482.4，T/N の m/z に相当する 376.4 の２つのピークが観察された（図 4B, 表１）ことから，h20:0 の脂肪酸，d18:$2^{\Delta4,\Delta8}$ の 4,8-sphingadienine，１個のグルコースを持った cerebroside，D-glucosyl-β-1,1’-*N*-2-hydroxylarachidoyl-4,8-sphingadienine であると考えられた．

これらの情報から，焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質は，スフィンゴイド塩基と脂肪酸がアミド結合した ceramide に，さらに糖がアセタール結合している cerebroside と同定される．また、スフィンゴイド塩基の炭素数は 18，脂肪酸の炭素数は 16 もしくは 20，結合するグルコースの数は 1 個，スフィンゴイド塩基の二重結合数は 2 個, 脂肪酸の2位に水酸基がついた分子種であることが明らかとなった．以上から，焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質及びそれらのフラグメントイオンの分子構造は D-glucosyl-β-1,1’-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine （ d18:$2^{\Delta4,\Delta8}$/h16:0）及び D-glucosyl-β−1,1’-*N*-2-hydroxylarachidoyl-4,8-sphinga-dienine（d18:$2^{\Delta4,\ \Delta8}$/h20:0）と推定された (Fig. 4A, B).

大豆に含まれるスフィンゴ脂質を ESI-MS/MS 解析した研究 [17]でも，[M+H]+として m/z 714.6 の，$[M+Na]^+$として m/z 736.6 のスフィンゴ脂質を報告しており，本報告と同じく D-glucosyl-β-1,1’-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine だと考えられる．また$[M+H]^+$として m/z 770.6 の，$[M+Na]^+$として m/z 792.6 のスフィンゴ脂質を報告しており，本報告と同じく D-glucosyl-β-1,1’-*N*-2-hydroxylarachidoyl-4,8-sphingadienine だと考えられる．

ジャガイモやサツマイモのスフィンゴ脂質を ESI-MS/MS 解析した研究 [18]では，α位が水酸化した h16:0 の脂肪酸，d18:$2^{\Delta4,\Delta8}$ の sphingadienine を持った ceramide に相当する分子種の$[M+H]^+$として 552.5 の m/z が得られている．この分子種は本報告の Y0 の$[M]^+$の 551.5 と m/z が一致することから，この結果は本報告の分子が ceramide を持った cerebroside であることを強く示している．

シロイヌナズナのスフィンゴ脂質を $ESI-MS^2$ を使って解析した研究 [19]では，スフィンゴイド塩基として二重結合を二つ持った d18:2 が存在しないので直接の比較はできないが，d18:0/h16:0 の cerebroside の$[M+H]^+$として m/z 718.6 の分子種を報告している．スフィンゴイド塩基に二重結合が２つ入れば分子量は４少なくなり，$[M]^+$の分子種としては m/z 713.6 になる．この m/z は本報告の D-glucosyl-β-1,1’-N-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine の分子種と m/z が一致する（表１）．また d18:0/h20:1 の cerebroside の$[M+H]^+$として m/z 772.6 の分子種を報告している．二重結合の差は１個であり，この分の２個のプロトンを差し引き，$[M]^+$を計算すると m/z 769.6 になり，本報告の d18:$2^{\Delta4,\Delta8}$/h20:0 の分子種と m/z が一致する（表１）．これらの結果は，本研究により解析された分子が cerebroside であることを強く補強している．

これまで焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質の分子構造情報は一切なく，本報告で焼酎粕に含まれているスフィンゴ脂質の分子構造の情報が初めて明らかになった意義は大きい．この構造のスフィンゴ脂質はこれまで大豆や小麦から同定されている [17]が，大麦や微生物からはまだ同定されたことはない．同じくこれまで *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus awamori* などの焼酎麹菌が生産するスフィンゴ脂質の分子種に関する報告は一切なく，今後本研究が進展することでこの分子種がどの原料あるいは微生物に由来するのかの情報も明らかになっていくことが期待される．

４．おわりに

(1) 焼酎粕からスフィンゴ脂質を精製し，エレクトロスプレーイオン化-イオントラップ型質量分析装置を用いた分析結果から, 主要なピークとして m/z 736.6 及び m/z 792.6 の分子種を見出した．

(2) 焼酎粕から精製した m/z 736.6 の分子種を，衝突誘導乖離を使ってフラグメントイオン解析したところ, ceramide に該当する分子種（m/z 574.6），glucosylsphingoid base に該当する分子種（m/z 482.3）, 脂肪酸/スフィンゴイド塩基に該当する分子種（m/z 320.3）及びグルコースに該当する分子種（m/z 203.0）を見出した．

(3) 焼酎粕から精製した m/z 792.6 の分子種を，衝突誘導乖離法を使ってフラグメントイオン解析したところ ceramide に該当する分子種(m/z 630.6), glucosylsphingoid base に該当する分子種（m/z 482.4）及び脂肪酸に該当する分子種（m/z 376.4）を見出した．

(4)(1)~(3) の情報から，焼酎粕に含まれている cerebroside の構造を，D-glucosyl-β-1,1’-*N*-2-hydroxylpalmitoyl-4,8-sphingadienine (d18:$2^{\Delta4,\Delta8}$/h16:0) 及び D-glucosyl-β-1,1’-*N*-2- hydroxyl

arachidoyl-4,8-sphingadienine (d18:2$^{\Delta4,\ \Delta8}$/h20:0)と同定することで, 焼酎粕に含まれているスフィンゴ脂質の分子構造を初めて明らかにした.

５．参考文献

1) N. Asano-Kato, K. Fukagawa, Y. Takano, T. Kawakita, K. Tsubota, H. Fujishima and S. Takahashi: *Br. J. Ophthalmol.*,87, 362-363 (2003).

2) K. Lintner, P. Mondon, F. Girard and C. Gibaud: *Int. J. Cosmetic Sci.*,19(1), 15–25 (1997)

3) Y. A. Hannun, and L. M. Obeid: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*,9, 139-150 (2008)

4) R. C. Dickson: *Annual Rev. Biochem.*,67, 27-48 (1998)

5) L. M. Obeid, C. M. Linardic, L. A. Karolak and Y. A. Hannun: *Science*, 259(5102) 1769-1771 (1993)

6) D. L. Dillehay, S. K. Webb, E. M. Schmelz andA. H. Merrill:*J. Nutr*.,124(5), 615-620 (1994)

7) P. Zhang, B. Li, B, S. Gao andR. D. Duan: *Anticancer Res.*,28(6A), 3631-3635 (2008)

8) Fujiwara, K., Kitatani, K., Fukushima, K., Yazama, H., Umehara, H., Kikuchi, M., Igarashi, Y., Kitano, H. and Okazaki, T: *Int. J. Clin. Oncol.*,16(2), 133-140 (2011)

9) A. Kihara, S. Mitsutake, Y. Mizutani, Y. Igarashi: *Prog. Lipid Res.*, 46(2), 126–144(2007)

10) W. L. Holland, R. A. Miller, Z. V. Wang, K. Sun, B. M. Barth, H. H. Bui, K. E. Davis, B. T. Bikman, N. Halberg, J. M. Rutkowski, M. R. Wade, V. M. Tenorio, M. S. Kuo, J. T. Brozinick, B. B. Zhang, M. J. Birnbaum, S. A. Summers and P. E. Scherer: *Nat. Med.*,17(1), 55-63 (2011)

11) A. Kohyama-Koganeya, T. Nabetani, M. Miura, and Y. Hirabayashi: *J. Lipid Res.*,52, 1392-1399 (2011)

12) J. M. Aerts, R. Ottenhoff, A. S. Powlson, A. Grefhorst, M. van Eijk, P. F. Dubbelhuis, J. Aten, F. Kuipers, M. J. Serlie, T. Wennekes, J. K. Sethi, S. O'Rahilly and H. S. Overkleeft: *Diabetes*,56(5), 1341-1349 (2007)

13) Z. Li, H. Zhang, J. Liu, C-P. Liang, Y. Li, Y. Li, G. Teitelman, T. Beyer, H. H. Bui, D. A. Peake, Y. Zhang, P. E. Sanders, M-S. Kuo, T-S. Park, G. Cao, and X-C. Jiang: *Mol. Cell. Biol.*,31(20), 4205-4218 (2011)

14) 平田みよ, 浦野義崇, 稲葉繁樹, 北谷和之, 岡崎俊朗, 北垣浩志: 醸協, 106,(12), 848-853 (2011)

15) H. Kitagaki, L. Cowart, N. Matmati, S. Vaena de Avalos, S. A. Novgorodov, Y. H. Zeidan, J. Bielawski, L. M. Obeid and Y. A. Hannun: *Biochim. Biophys. Acta,* 1768, 2849-2861 (2007)

16) M. C. Sullards, D. V. Lynch, A. H. Merrill Jr and J. Adams: *J. Mass Spectr.*, 35, 347-353 (2000).

17) T. Sugawara, K. Aida, J. Duan and T. Hirata: *J. Oleo Sci.*, 59, 387-394 (2010).

18) N. Bartke, A. Fischbeck and H. U. Hunpf: *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 1201-1211 (2006).

19) J. E. Markham and J. G. Jaworski: *Rapid Comm. Mass Spectr.*, 21, 1304-1314 (2007).