

動物組織におけるセラミド 1-リン酸および
その前駆体の解析

2023 年

山下 量平

目次

緒言	4
第一章.....	7
序論.....	8
第1節・実験方法	9
第2節・結果	12
第3節・考察	19
第二章.....	21
序論.....	22
第1節・実験方法	24
第2節・結果	27
第3節・考察	36
総括	38
参考文献.....	40
謝辞	47

本論文では、以下の略語を用いた。

C1P	Ceramide 1-Phosphate (セラミド 1-リン酸)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (エチレンジアミン四酢酸)
ESI	Electrospray ionization (エレクトロスプレーイオン化)
GC	Gas Chromatography (ガスクロマトグラフィー)
hC1P	2-hydroxy Ceramide 1-Phosphate (2-ヒドロキシセラミド 1-リン酸)
hCer	2-hydroxy Ceramide (2-ヒドロキシセラミド)
hFA	2-hydroxy Fatty Acid (2-ヒドロキシ脂肪酸)
hSM	2-hydroxy Sphingomyelin (2-ヒドロキシスフィンゴミエリン)
LC	Liquid Chromatography (液体クロマトグラフィー)
LPA	Lysophosphatidic Acid (リゾホスファチジン酸)
LPC	Lysophosphatidylcholine (リゾホスファチジルコリン)
LPP	Lipid phosphate phosphatase (脂質リン酸ホスファターゼ)
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化)
MS	Mass Spectrometry (マススペクトロメトリー)
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry (タンデムマススペクトロメトリー)
PA	Phosphatidic Acid (ホスファチジン酸)
PC	Phosphatidylcholine (ホスファチジルコリン)
PE	Phosphatidylethanolamine (ホスファチジルエタノールアミン)
PI	Phosphatidylinositol (ホスファチジルイノシトール)
PLA ₂	Phospholipase A ₂ (ホスホリパーゼ A ₂)
PLD	Phospholipase D (ホスホリパーゼ D)
SM	Sphingomyelin (スフィンゴミエリン)
S1P	Sphingosine 1-Phosphate (スフィンゴシン 1-リン酸)
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenone (2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノン)
TLC	Thin-Layer Chromatography (薄層クロマトグラフィー)
Tween20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (界面活性剤)
TOF	Time of Flight (飛行時間型)

緒言

スフィンゴ脂質は長鎖スフィンゴイド塩基に脂肪酸がアミド結合した構造を持つ脂質の総称であり、生体膜の主要な構成成分の一つである。生体には多様なスフィンゴ脂質が存在している。スフィンゴ脂質の一種のスフィンゴミエリン(SM)は動物の細胞膜の構成成分として重要であり、細胞膜中に最も豊富に存在するスフィンゴリン脂質である。スフィンゴ脂質は生体膜構成成分としてだけでなく細胞内シグナル伝達分子としても機能しており、セラミドは細胞内でアポトーシス誘導因子として働くことが知られている[1]。また、スフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化されることで生じるスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)は、その特異的な受容体を介して細胞増殖、細胞運動、炎症反応、血管新生など多様な生理作用に関与する脂質メディエーターとして機能することが知られている[2]。医薬品としても、多発性硬化症の治療薬として使用されているフィンゴリモドはリンパ球上の S1P 受容体(S1P1)の内在化を誘導する機能的アンタゴニストとして作用することで免疫抑制作用を示すことが明らかになっている[3]。また、スフィンゴ脂質は細胞外にも存在しており、皮膚ではセラミドは皮膚バリア機能に関与していることが知られている[4]。セラミドは皮膚の最上層である角質の細胞間脂質として豊富に存在しており、角質からの水分蒸散に対するバリアとして機能して皮膚バリア機能を形成する。皮膚特異的に存在するアシルセラミドが皮膚バリア機能の形成に必須であり、アシルセラミドの産生に必要な酵素を欠損することで重篤な皮膚疾患である魚鱗癬を引き起こすことが知られている[5]。

生体内のスフィンゴ脂質はスフィンゴシン骨格の種類や N-アシル基の違いによって多様な分子種が存在している。スフィンゴ脂質を構成する N-アシル鎖は C16 や C18 などの長鎖脂肪酸を有するタイプや C24 などの極長鎖脂肪酸を有するタイプがある。C24 の極長鎖脂肪酸を有する分子種はグリセリン脂質ではほとんど見られず、スフィンゴ脂質に特徴的な分子種である。C16 セラミドはアポトーシス初期に増加するが C24 セラミドはアポトーシス後期に増加することが報告されており[6,7]、セラミドは N-アシル鎖の違いによって異なる役割を有していると考えられる。また、セラミド合成酵素は通常の脂肪酸だけでなく、 α -hydroxy 脂肪酸(hFA)も基質とすると報告されており[8]、哺乳類の動物組織には N-アシル鎖に hFA を有するセラミドやスフィンゴ糖脂質が広く存在する[9]。SM においても α -hydroxy 脂肪酸を有するスフィンゴミエリン(hSM) (Fig. 1A)の存在が報告されている[10]。hFA を有するスフィンゴ脂質は、セラミドやスフィンゴ糖脂質では動物組織に広く存在しているのに対して、hSM に関する報告は限られており、珍しい分子種であると考えられる。これまでに哺乳類の動物組織では皮膚、精巣、腸管粘膜等で hSM の存在が報告されている[10,11,12]。脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ(FA2H)をノックアウトしたマウスでは脱髄や深刻な軸索異常を引き起こすことが報告されており[13,14]、ヒトの FA2H の変異で脱髄及び神経変性を起こす疾患であるロイコジストロフィーを発症することが報告されている[15]。このことから hFA を有するスフィンゴ脂質は生体内で何ら

かの重要な役割を果たしていることが示唆される。hSM の生体内での役割についてはまだ分かっていないが、スフィンゴ脂質は N-アシル鎖の鎖長の長さや水酸基の有無など構造の多様性によって異なる役割を有していると考えられることから、SM においても N-アシル鎖の構造の違いによって異なる役割を有しているのかもしれない。

セラミド 1-リン酸(C1P)はセラミドがセラミドキナーゼによってリン酸化されて生じると考えられているスフィンゴリン脂質である。C1P は新たな生理活性リン脂質として注目されており、アポトーシスの抑制[16]、細胞遊走作用[17]、細胞増殖を促進する作用[18]、ホスホリパーゼ A2 α (PLA2 α)を活性化することで炎症反応を促進する作用[19]等が報告されている。セラミドキナーゼをノックアウトすることで血管形成が障害される[20]ことや好中球が減少し免疫系が障害される[21]ことも報告されている。C1P の生合成経路としては、SM がスフィンゴミエリナーゼによってセラミドへと変換され、セラミドがセラミドキナーゼによって C1P に変換されることによって産生されると考えられている[22]。前述したように、生体内のスフィンゴ脂質は長鎖塩基と脂肪酸構造の違いにより多様な分子種が存在している。C1P にも多様な分子種が派生すると考えられるが、C1P の組織ごとの分子種組成については分かっていない。

私の所属する研究室ではこれまでリン酸モノエステル残基に特異的に結合する亜鉛錯体の Phos-tag を用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) によって、リゾホスファチジン酸 (LPA) や S1P の定量方法を開発してきた[23,24]。また、植物における C1P の分析にも本手法を適用できることを示してきた[25]。

本研究において私は Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS による動物組織中の C1P の分子種分析方法を確立した。マウスの皮膚、脳、肝臓、腎臓、小腸の各組織について総 C1P 量を定量し、C1P の分子種組成について明らかにした。皮膚では未同定の C1P 分子種が検出され、私は未同定 C1P 分子種についてヒドロキシパルミチン酸を有する C1P (hC1P) (Fig1. B)であることを同定した。hC1P 分子種は皮膚のみで検出され、脳、肝臓、腎臓、小腸では検出されなかった。また、マウス各組織の SM を *S. chromofuscus* 由来ホスホリパーゼ D (PLD)を用いて処理し C1P に変換してから Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS で分析し、その分子種組成を比較した。これらの結果を第一章にまとめる。

hSM は皮膚等において存在することが報告されており、皮膚において C1P の分子種組成は SM と類似していたことから hSM は hC1P の前駆体であることが示唆される。しかし、生体内の hSM を分析するための信頼性の高い定量方法はまだ十分に確立されていない。そこで私は質量分析法を用いた hSM の定量方法について検討を行い、その結果を第二章にまとめる。

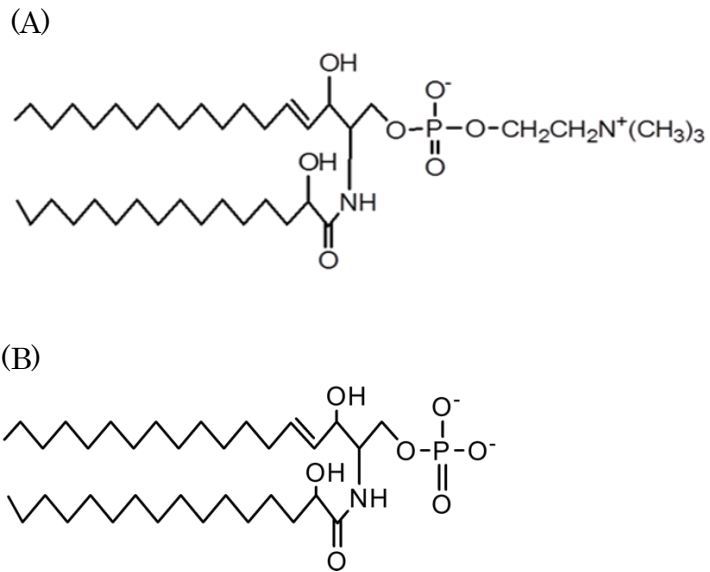


Fig. 1 α -hydroxy パルミチン酸を有する SM と C1P の構造

(A) α -hydroxy パルミチン酸を有する SM

(B) α -hydroxy パルミチン酸を有する C1P

第一章

MALDI-TOF MS を用いたスフィンゴミエリンと

セラミド 1-リン酸の分子種組成の分析

序論

スフィンゴ脂質は生体膜の構成成分としてだけでなく、細胞内外で機能するシグナル伝達分子としても重要である。C1P はセラミドキナーゼによるセラミドのリン酸化により産生されるスフィンゴリン脂質であり、C1P は近年新たな生理活性を有するスフィンゴリン脂質として注目されている。C1P はマクロファージでのアポトーシスの抑制[16]、細胞遊走作用[17]、C2C12筋芽細胞において細胞増殖を促進する作用[18]、PLA2 α を活性化し炎症反応を促進する作用[19]などが報告されている。また、C1P は細胞内においてゴルジ体で産生されるが[26]、C1P を特異的に輸送するタンパク質がサイトゾルに存在し、様々な臓器で広く分布しておりアラキドン酸の放出に関与していることも報告されている[27]。

スフィンゴ脂質は長鎖塩基と N-アシル基の違いによって多様な分子種が存在している。例えば長鎖塩基は多くのスフィンゴ脂質ではスフィンゴシン(d18:1)やスフィンガニン(d18:0)であるが、長鎖塩基にフィトスフィンゴシン(t18:0)を有するセラミドも表皮角質層[28]、腎臓及び肝臓[29]で報告されている。N-アシル基は鎖長の長さの違いに多様性がある[30]だけでなく、N-アシル鎖に α ヒドロキシ脂肪酸を有する分子種の存在も報告されている。例えば α ヒドロキシ脂肪酸を有するセラミドがヒトの表皮角質層[28]、ラットの腎臓、肝臓、脳[29]で報告されており、SM でも α ヒドロキシ脂肪酸を有する分子種がマウスやヒトの皮膚[10,31]、ウシの腸管粘膜や腎臓[12]等で報告されている。これらの知見から、C1P にも多様な分子種が派生しているかもしれない。しかし動物の各組織における C1P の分子種組成についてはまだ明らかではない。

これらのことを背景に本研究ではマウスを用いて動物組織における C1P の分子種分析を行った。脂質の分子種組成の網羅的な分析には MALDI-TOF MS が広く用いられている。しかしリン酸モノエステル型リン脂質ではナトリウムやプロトン等が組み合わさって付加した複数のイオンとして検出され、検出感度の低下を招くことやイオン強度比に基づいた定量が困難になる点で問題となる。我々の研究グループではリン酸モノエステル残基に特異的に結合する亜鉛錯体である Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS による LPA や S1P の分析法をこれまで開発してきた[23,24]。本手法を用いることで検出されるリン酸モノエステル型脂質イオンは Phos-tag 複合体である[M+Phos-tag]⁺に統一され、LPA や S1P のイオン強度に基づいた定量が可能となる。私は動物における C1P 分析に本手法を応用できると考え、本研究ではマウスの皮膚、脳、肝臓、腎臓、小腸の各組織について Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS により C1P の定量を行いその分子種組成を分析した。また、C1P は SM から代謝されたセラミドがセラミドキナーゼによってリン酸化されることで生合成されると考えられているが、SM と C1P の分子種組成が類似しているかどうかは分かっていない。そこで SM を PLD で処理して C1P に変換してから Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS で分析し、その分子種組成を比較した。

第1節 実験方法

1-1 試薬

N-lauroyl-ceramide-1-phosphate (d18:1/12:0-C1P)、N-palmitoyl-ceramide-1-phosphate (d18:1/16:0-C1P)、N-lignoceroyl-ceramide-1-phosphate (d18:1/24:0-C1P) は Avanti Polar Lipids 社 (Alabaster, AL, USA) 製を用いた。*Streptomyces chromofuscus* 由来 PLD は Sigma-Aldrich 社 (St Louis, MO, USA) 製を用いた。三フッ化ホウ素メタノール溶液、リン酸モノエステルに特異的に結合する亜鉛錯体 [^{68}Zn] を有する Phos-tag は、和光純薬工業株式会社製を用いた。2,4,6-トリヒドロキシ-アセトフェノン (THAP) は Acros Organics 社 (Pittsburgh, PA, USA) 製を用いた。Methyl 2-hydroxyhexadecanoate (methyl h16:0) は Larodan Fine Chemicals 社 (Malmo, Sweden) 製を用いた。クロロホルム、メタノール、塩酸、ピリジン、ペンタン、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、水酸化カリウム、ジエチルエーテル、ヘキサン、28%アンモニア、マラカイトグリーン、七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 (粉末)、60%過塩素酸は関東化学より購入した。プリムリン、Tween 20、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、o-vanadate、無水酢酸はナカライテスク製を用いた。TLC は Merck 社 (Dramstadt, Germany) 製の TLC Silica gel 60 (Glass plates, 20×20 cm) を用いた。試薬は特に断らない限り特級品を用いた。

1-2 マウス各組織からの C1P 及び SM の単離

5週齢の雄性ヘアレスマウス (Hos:HR-1) は、日本 SLC (静岡県) から購入した。また、本実験は徳島大学動物実験委員会の承認を得たものである。マウスをジエチルエーテルによる麻酔下で断頭して安楽死させた後、マウスから背部の皮膚、小腸、脳、肝臓、腎臓を摘出した。秤量して生理食塩水で洗浄後、各組織を 10 mM vanadate を含む等量の生理食塩水と混合して細かく切り、ウルトラディスペルサー (LK-21、ヤマト化学株式会社製) で 4℃、5 分間ホモジナイズした。得られたホモジネートから Bligh & Dyer 法 [32] に従って脂質抽出を行った。一層系溶媒 [クロロホルム:メタノール:水 = 1:2:0.8(v/v/v)] で十分に攪拌後、遠心分離 (1,300×g、10 分間、4℃) を行った。上清を回収し、残渣に再度一層系溶媒を適量加えて同様の操作を行い上清を回収した。クロロホルム、メタノール、水を適量加えて二層系溶媒 [クロロホルム:メタノール:水 = 1:1:0.9(v/v/v)] とした。pH2 となるように 5N HCl を適量加え、よく攪拌した後、遠心分離 (1,300×g、10 分間、4℃) を行い、下層の有機層を回収した。取った下層と同量のクロロホルム:メタノール = 17:3(v/v) を上層に加え、よく攪拌した後、遠心分離 (1,300×g、10 分、4℃) を行い、再び下層を回収した。その後、得られた有機層をエバポレーターで減圧濃縮し、残渣を適量のクロロホルム:メタノール = 2:1(v/v) の溶媒で溶解した。

得られた脂質抽出物を 0.1N KOH 含有 95%メタノール中で 60°C、10 分間加熱した。冷却後、クロロホルム/メタノール/水の二層系溶媒としてから、pH2 となるように 5N HCl を適量加え、Bligh & Dyer 法で脂質を抽出した。得られた脂質を[クロロホルム:メタノール:28%アンモニア水=60:35:8(v/v/v)]を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開して、C1P と SM を単離した。得られた SM はリンモリブデンマラカイトグリーン法 [33] により比色定量した。また、組織のホモジネートに既知量の C1P を添加して単離された C1P の量を測定することにより、本実験で用いた C1P の単離操作における回収率を算出した。その結果、C1P の回収率は 80 %であることがわかった。

1-3 スフィンゴミエリンの C1P への変換

スフィンゴミエリン(SM)の PLD 処理による C1P への変換は以下のようにして行った。0.1 μmol SM を分取し、50 mM tris/HCl buffer (pH 8)、25 mM CaCl_2 、0.25 mM MgCl_2 、*Streptomyces chromofuscus* 由来 PLD 100 unit からなる総量 0.4 mL の反応混合物を調製した。これに 1 mL のジエチルエーテルを加えた後、37°C で 1 時間、連続的に攪拌しながらインキュベートした。窒素気流によりジエチルエーテルを除去し、60 °C で 5 分間加熱して酵素を不活性化した後、酸性条件下の Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した。得られた脂質を[クロロホルム:メタノール:28%アンモニア水=60:35:8(v/v/v)]を展開溶媒とする TLC で精製し、C1P を単離した。得られた C1P は後述する Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によって分析した。

1-4 Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS

Morishige らの方法[24]に従い、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によりリン脂質を分析した。適量のリン脂質を 0.3%アンモニア性メタノール 100 μl で溶解した。この溶液 10 μl を取り、0.1mM の ^{68}Zn Phos-tag 溶液 5 μl と混合してよく攪拌することで、リン脂質-Phos-tag 複合体を形成させた。このうち 0.5 μl をサンプルプレートにスポットした。その後、直ちにその上からマトリックスとして THAP 溶液 (10mg/ml アセトニトリル) 0.5 μl を素早くスポットし結晶化させた。マトリックス/分析物共結晶は Voyager DE STR 質量分析計 (Applied Biosystems 社 (Framingham, MA, USA) 製) を用いて陽イオン検出モードで分析した。窒素レーザーの波長は 337 nm、イオンチャンバー内の圧力は 3.7×10^{-7} Torr、加速電圧は 20 kV とした。再現性向上のため、256 回のレーザーショットで得られる各マススペクトルを平均した。

1-5 C1P のアセチル化

C1P にピリジン 50 μl 及び無水酢酸 100 μl を加えて溶解し、37°C で 3 時間加熱してアセチル化反応を行った。40°C で窒素気流によって溶媒を留去した後、Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した。得られたアセチル化 C1P を 1-4 で示した Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によって分析した。

1-6 GC-MS

1-2 に示した方法でマウス皮膚から TLC によって単離されたヒドロキシ脂肪酸を含むスフィンゴミエリン(hSM)に、14%三フッ化ホウ素含有メタノールを 1ml 加え、100°C、90 分で加熱した。室温まで冷却してから、水 1ml とペンタン 2ml を加え、よく攪拌した後、遠心分離(1100×g、5 分、4°C)を行い、上層の有機層を回収した。回収した有機層を窒素気流によって溶媒を留去し、得られた脂肪酸メチルエステルをヘキサン 100 μ l に溶解し、GC5890 ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 社 (Wilmington, DE, USA) 製)と Automass 質量分析計 (JEOL 社製) を用いた GC-MS により分析した。GC に使用したキャピラリーカラムは、非極性 DB-1 カラム (長さ 30 m×内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、J & W Scientific 社 (Folsom, CA, USA) 製) を使用した。カラム温度は 100°C で 1 分間保持した後、1 分当たり 20°C で 300°C まで昇温し、この温度で保持した。キャリアガスはヘリウムを使用した。イオン化エネルギーは 70 eV で行った。

1-7 MALDI-TOF MS を用いた C1P の定量

C1P の定量は、LPA や S1P の定量に用いられた方法[23,24]と同様の方法で行った。C1P は MALDI-TOF MS において観察される分子イオンのイオン相対強度に基づき定量した。まず、一定量の d18:1/12:0 C1P (内部標準) に対し、d18:1/16:0-C1P、d18:1/24:0-C1P、d18:1/h16:0-C1P を 0.25 倍から 2 倍の比率で混合した。これを Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS で分析し、d18:1/12:0 C1P に対する各 C1P のスペクトルの相対強度の比から検量線をそれぞれ作成した。検量線の傾きの値を、d18:1/12:0 C1P と各 C1P のイオン化効率の差を補正するための係数として使用した。分析するサンプルに内部標準として既知量の d18:1/12:0 C1P を混合し、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によって分析した。検量線を用いたイオン化効率の補正と、組織ホモジネートからの C1P の回収率(80%)の補正を行ったから、内部標準に対する相対強度の比から C1P 各分子種を定量した。

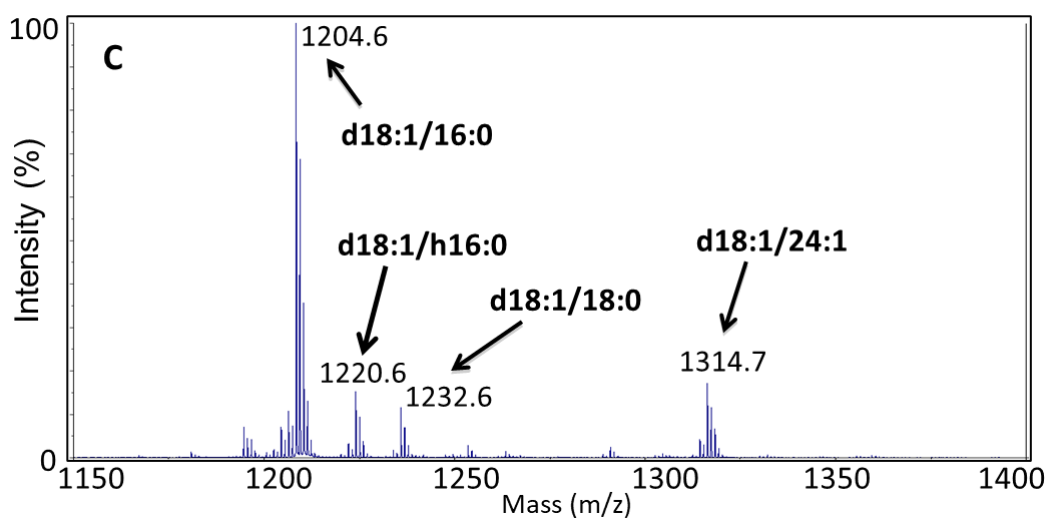
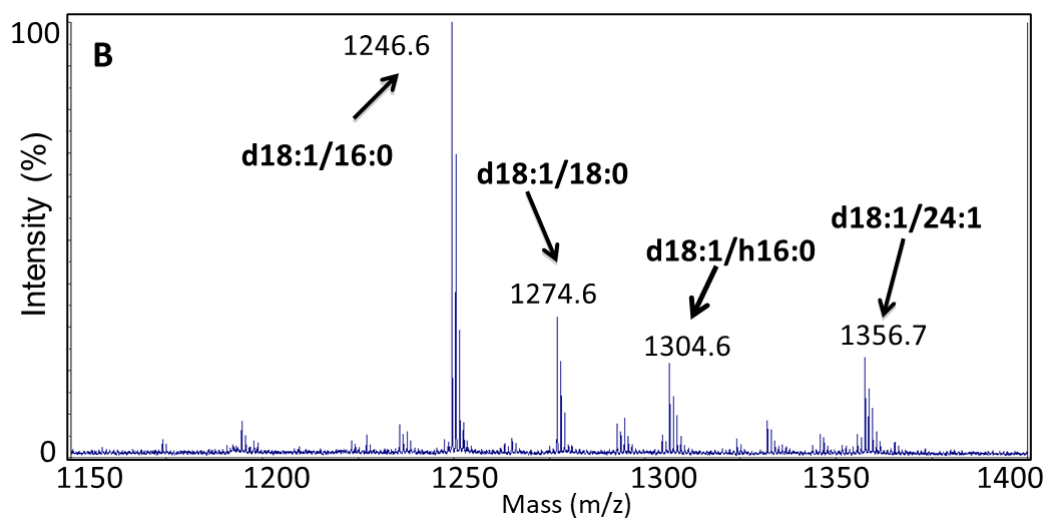
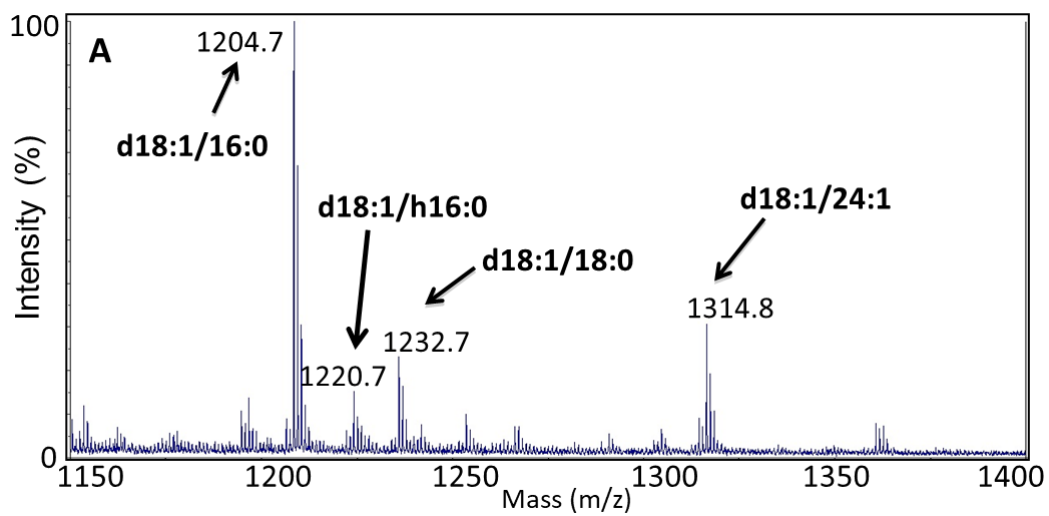
第 2 節 実験結果

2-1 Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によるマウス皮膚 C1P の分析

マウス皮膚の脂質抽出物から C1P 画分を単離し、リン酸モノエステルに特異的に結合する亜鉛錯体である $[^{68}\text{Zn}]$ Phos-tag を用いて Phos-tag/C1P 複合体を形成させ、MALDI-TOF MS による分析を行った。得られたマススペクトルを Fig. 1A に示す。分析の結果、主要な 4 つのピークとして m/z 1204.7、 m/z 1220.7、 m/z 1232.7、 m/z 1314.8 が得られた。次に、マウス皮膚 C1P のアセチル化処理を行い(Fig. 1B)、アセチル化前後のマススペクトルを比較した。 m/z 1204.7、 m/z 1232.7、 m/z 1314.8 のピークは m/z 1246.6、 m/z 1274.6、 m/z 1356.7 にマシフトし、それぞれ 42 マスユニットのシフトが観察された。これは 1 個の水酸基の H 原子がアセチル基に置換された分子量に相当する。 m/z 1220.7 のピークは m/z 1304.6 にマシフトしており、84 マスユニットシフトが観察された。これは 2 個の水酸基がアセチル基に置換された分子量に相当する。この結果から、 m/z 1204.7、 m/z 1232.7、 m/z 1314.8 は 1 個の水酸基を持ちセラミド構造として d18:1/16:0、d18:1/18:0、d18:1/24:1 を持つ C1P であり、 m/z 1220.7 は 2 個の水酸基を持ちヒドロキシパルミチン酸を有する C1P (d18:1/h16:0) であると考えられる。Phos-tag と d18:1/h16:0 C1P との複合体の構造式について Fig. 1D に示す。

マウス皮膚から単離した SM を PLD(*Streptomyces chromofuscus* 由来)を用いて C1P に変換した後、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によって分析した(Fig. 1C)。得られたマススペクトルはマウス皮膚 C1P と類似していることがわかった。マウス皮膚 SM の分析により検出された主要な分子種はマウス皮膚 C1P の分子種と一致しており、マウス皮膚の SM と C1P の分子種組成は類似していると考えられる。

マウス皮膚にはヒドロキシパルミチン酸を有するスフィンゴミエリンと思われるピークが検出された。ヒドロキシパルミチン酸を有するスフィンゴミエリンの存在について確認するため、マウス皮膚より単離したヒドロキシ脂肪酸を有するスフィンゴミエリン(hSM)について脂肪酸メチルエステル化処理を行い、GC-MS で分析を行った。その結果、マウス皮膚から単離した hSM 由来メチルエステルの保持時間及びマススペクトルが標準品である α -OH C16:0 脂肪酸メチルエステルと一致するピークを主要なピークとして認めた(Fig. 1D, E)。 m/z 227 に検出されたイオンは $[\text{M}-59]^+$ のピークであり(Fig. 1G)、これは α -OH C16:0 脂肪酸メチルエステルのフラグメンテーションの結果出現するイオンである。これらの結果から、hSM の脂肪酸の構造は C16:0- α -OH であると決定した。



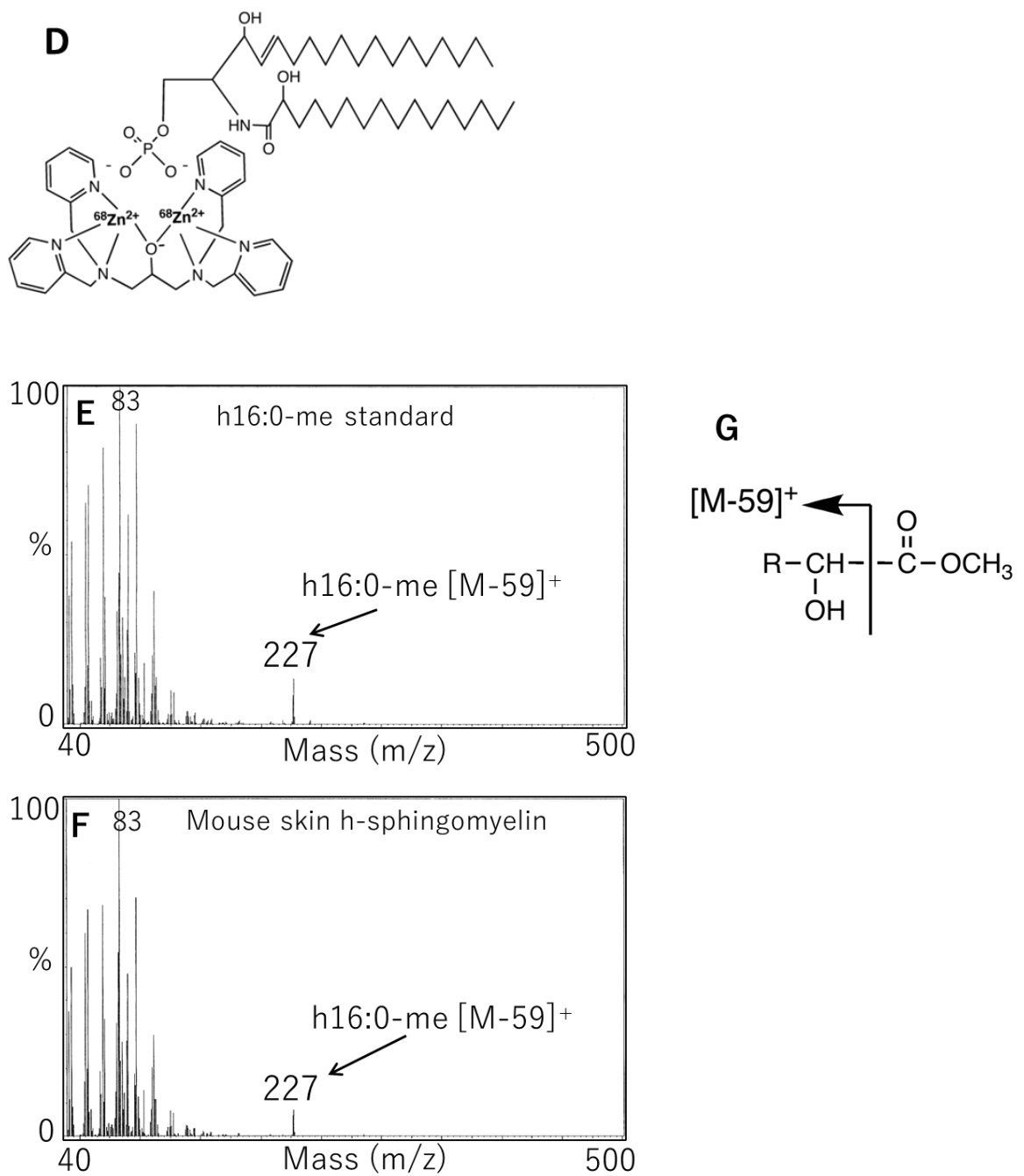


Fig. 1 Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によるマウス皮膚 C1P とスフィンゴミエリンの分析

マウス皮膚から単離した C1P を Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS により分析を行った (A)。マウス皮膚 C1P のアセチル化処理を行い Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS により分析を行った (B)。マウス皮膚スフィンゴミエリンを PLD 処理により C1P に変換後、Phos-tag

を用いた MALDI-TOF MS により分析を行った(C)。Phos-tag と d18:1/h16:0-C1P 複合体の構造式(D)。 α -OH C16:0 脂肪酸メチルエステル標準品の GC-MS による分析(E)。マウス皮膚 hSM 由来メチルエステルの GC-MS による分析(F)。m/z 227[M-59]⁺フラグメントイオンの構造式(G)。

2-2 マウス各組織における C1P の定量

d18:1/12:0-C1P を内部標準として Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS により C1P の定量を行った。C1P 分子種による検出効率の差を補正するため、d18:1/12:0-C1P に対する d18:1/16:0-C1P、d18:1/24:0-C1P、d18:1/h16:0-C1P の検出効率に基づいて検量線を作成した(Fig. 2A)。その結果、d18:1/16:0-C1P と d18:1/24:0-C1P の検量線の傾きはともに約 0.8 であり、両者の検出効率は同程度であることがわかった。一方、d18:1/h16:0-C1P の検量線の傾きは約 0.4 であった。そこで、水酸基の無い脂肪酸アシル基を持つ C1P には補正係数 0.8 を、ヒドロキシ脂肪酸アシル基を持つ C1P には補正係数 0.4 を適用することにした。内部標準として d18:1/12:0-C1P を適量加えて Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS での内部標準に対する各 C1P 分子種の分子イオンの相対強度を求め、補正係数を用いてイオン化効率の差を補正し、マウス皮膚 C1P の定量を行った。その結果、総 C1P 量は 344 ± 39 pmol/g (湿重量)、h-C1P 量は 44 ± 3 pmol/g であった(Fig. 2B)

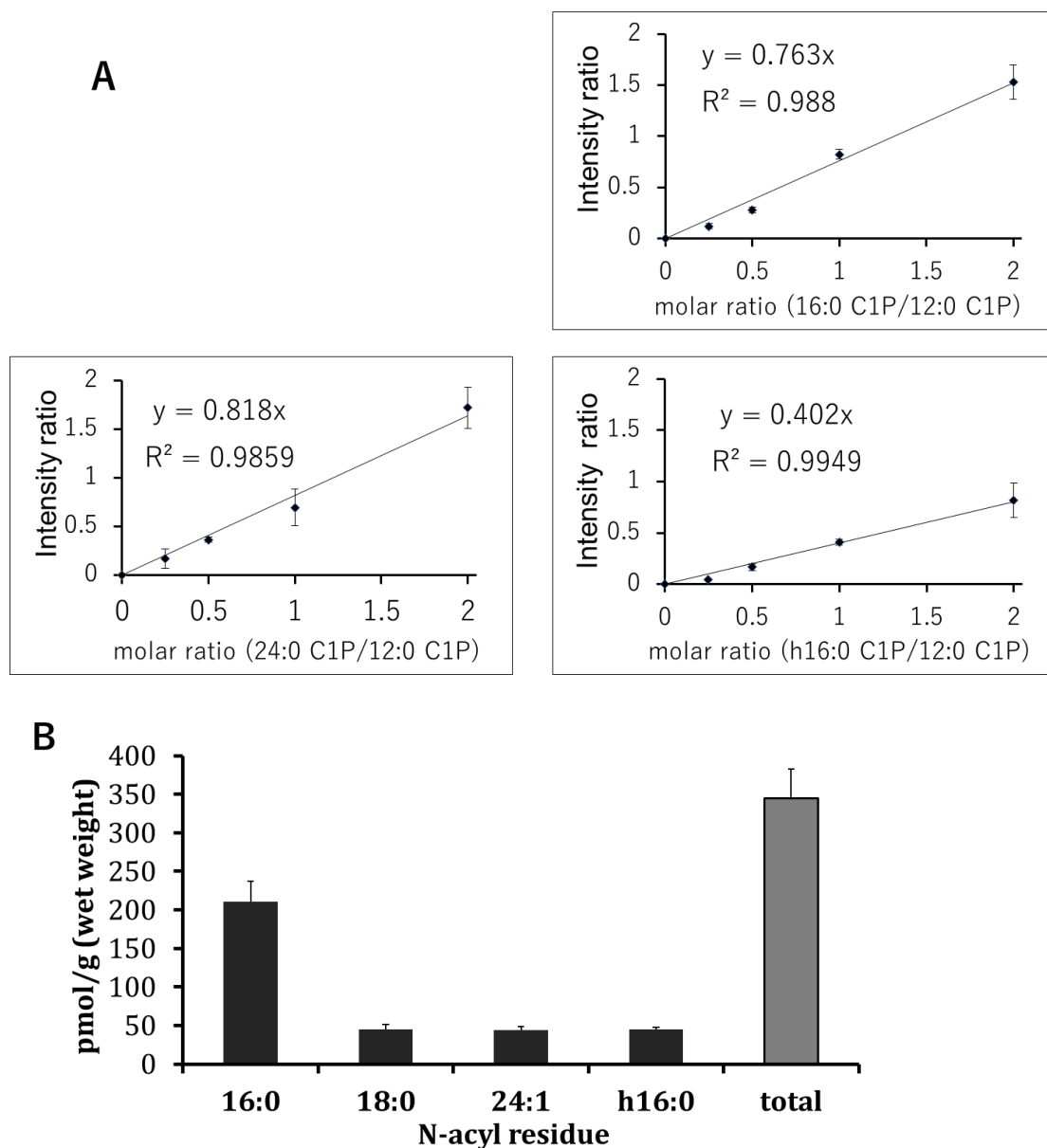


Fig. 2 Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS による C1P の定量
 Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS 分析におけるマススペクトルのイオン強度に基づいて d18:1/12:0-C1P に対する d18:1/16:0-C1P、d18:1/24:0-C1P、d18:1/h16:0-C1P の検量線を作成した(A)。データは Means±S.D. n=3 で示した。
 マウス皮膚 C1P の各分子種の定量結果。内部標準として d18:1/12:0-C1P を適量加えてマウス皮膚 C1P を MALDI-TOF MS で分析し、得られたマススペクトルの相対強度から検量線を用いて補正することで C1P 各分子種の定量を行った(B)。データは Means±S.D. n=3 で示した。

2-3 マウス各組織の SM 及び C1P の分析

Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS により、肝臓と脳における C1P と SM の分析を行った。肝臓と脳における C1P の分子種組成 (Fig. 3A, C) は、これらの組織における SM の分子種組成 (Fig. 3B, D) とは異なるものであった。例えば、マウス肝臓では、d18:1/16:0 が最も豊富な SM の分子種であったが、C1P では d18:1/16:0 の分子種は検出されなかった。過去の報告[30,34]と同様に、脳 SM では d18:1/18:0 分子種が優勢であった。しかし、マウス脳の C1P では d18:1/18:0 は検出されなかった。また、マウス肝臓と脳では hC1P と hSM は検出されなかった。

マウス肝臓、脳、小腸、腎臓の C1P の定量を行った (Fig. 4 A-D)。マウス肝臓、脳、腎臓、小腸における C1P の総量は、それぞれ 198、151、96、90 pmol/g (湿重量) であると測定された。肝臓では C24:1 が最も豊富な C1P 分子種であったが、脳では C22:0 が最も豊富な分子種であり、腎臓では C16:0 と C22:0 が主要な分子種であり、小腸では C16:0 のみが検出可能な分子種であった。各臓器によって C1P 分子種は異なる組成であることがわかった。

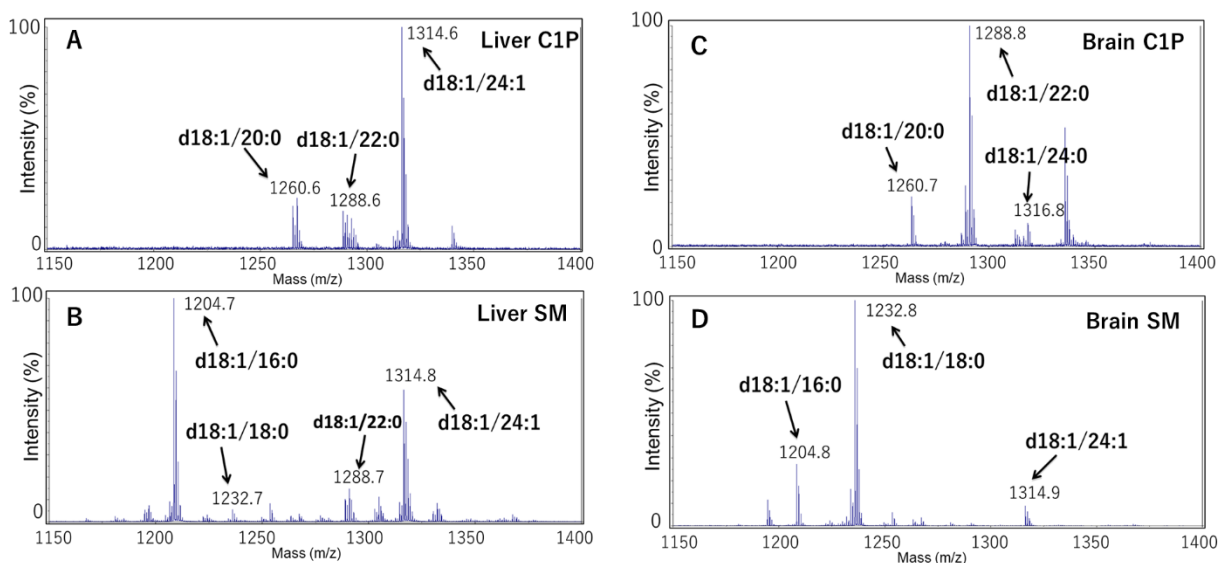


Fig. 3 マウス肝臓、脳の C1P と SM の分析

マウス肝臓の C1P (A) 及び SM (B)、マウス脳の C1P (C) 及び SM (D) について、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS により分析を行った。SM は PLD 処理により C1P に変換後に分析を行っている。

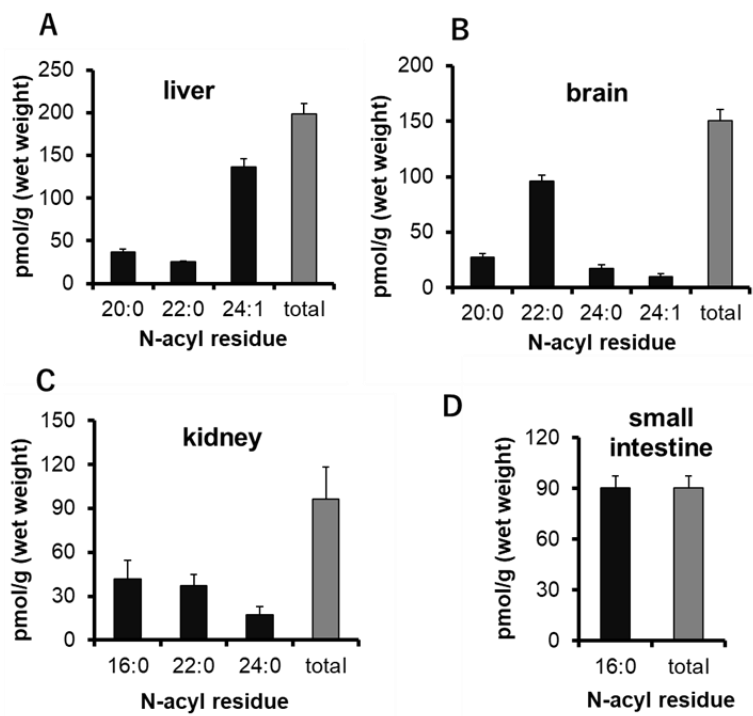


Fig. 4 マウス肝臓、脳、腎臓、小腸の C1P の定量
 マウス肝臓(A)、脳(B)、腎臓(C)、小腸(D)の C1P 各分子種について、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS により定量を行った。データは Means \pm S.D. n=3 で示した。

第3節 考察

MALDI-TOF MS は生体脂質の分子種組成の網羅的な解析に広く用いられている分析法である。MALDI-TOF MS は簡便で迅速に試料の分析を行うことができ、流路系を持たないので LC-MS で問題となるようなイオン源の汚染による影響もなく分析が可能である。MALDI-TOF MS のマススペクトルの比較から分子種組成の変化や新たなホモログの存在について検出することができる。リン酸モノエステル型リン脂質の LPA や S1P は MALDI-TOF MS に Phos-tag を用いることで検出されるイオンが $[M+\text{Phos-tag}]^+$ に統一され、検出感度の向上やイオン強度に基づいた定量が可能になることがこれまでに示されている[23,24]。本研究では、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS による動物 C1P の分子種組成の決定及び定量の方法を開発した。皮膚、肝臓、脳、腎臓、小腸における総 C1P 量は約 90-350 pmol/g(湿重量)であることがわかった。また、マウス皮膚では α -ヒドロキシパルミチン酸を有する C1P 分子種を同定した。アセチル化処理前後のマウス皮膚 C1P のマスシフトを比較した結果、 α -ヒドロキシパルミチン酸に相当すると思われるピークでは予想された 2 個のアセチル基分のマスシフトが起り、2 個の水酸基を有することが確認された。動物組織において α -ヒドロキシ脂肪酸を有する C1P 分子種はこれまでに報告されておらず、本研究で見出した α -ヒドロキシパルミチン酸含有 C1P(hC1P)は新規の C1P 分子種である。

本研究における SM の分析は PLD 処理により C1P に変換後、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS による分子種組成の解析を行った。*S. chromofuscus* 由来 PLD はグリセロリン脂質だけでなく、SM も加水分解することができる[35]。これにより SM は C1P と同一の方法で測定することができ、得られたマススペクトルから SM と C1P の分子種組成の比較を容易に行うことができる。本研究の結果からマウス皮膚の SM の分子種組成は C1P の分子種組成と非常に類似していることがわかった。マウス肝臓と脳の C1P と SM の分子種組成に類似性は見られなかった。肝臓の SM は C16 の脂肪酸を有する分子種が最も豊富な分子種であり脳の SM は C18 の脂肪酸を有する分子種が最も豊富な分子種であるにも関わらず、肝臓と脳の C1P では C16 や C18 の分子種は検出されなかった。肝臓と脳で C16 や C18 の分子種の C1P が存在しないのは、肝臓や脳ではこれらの分子種が優先的に分解されているためであるかもしれない。皮膚では SM と C1P の分子種組成が類似していることから、C1P の生合成経路では N-アシル鎖の構造の違いは識別されずに SM からセラミドを経て C1P が合成されると考えられる。マウス皮膚セラミドの分子種組成は Pappinen らにより報告されている[36]が、C24:0 セラミドが最も豊富なセラミド分子種であることや α ヒドロキシ脂肪酸含有セラミドとして C16:0、C24:0、C24:1、C30:0、C32:0 等の分子種が存在することが示されており、本研究で得られた SM と C1P の分子種組成とは類似しておらず大きく異なっている。これらの結果から de novo 経路で合成されたセラミドから直接 C1P が生合成されているのではなく、Dressler らが報告した通り[22]、SM がスフィンゴミエリナーゼによってセラミドへと変換され、

さらにこのセラミドがセラミドキナーゼによって C1P に変換されていると考えられる。あるいは SM から C1P に直接代謝する経路が存在しているかもしれない。SM を直接 C1P に変換する酵素活性はスフィンゴリエリナーゼ D と呼ばれており、動物ではクモ類では報告されているが[37]、哺乳類にこの酵素が存在することは報告されていない。肝臓や脳では C1P の分子種組成は SM のそれと必ずしも一致しないことから、試料のアルカリ加水分解操作により SM から Artificial に C1P が生成された可能性については否定することができる。また、C1P の定量結果はスフィンゴリエリンの存在量の約 1000 分の 1 程度であるが、6500 nmol の SM にアルカリ加水分解処理を加えても C1P は生成されないことを確認している。このことから今回測定した C1P は試料のアルカリ加水分解処理中に生じた Artifact ではないと考えられる。

hFA 含有スフィンゴ脂質の N-アシル鎖の水酸基の立体配置として R 体と S 体の立体異性体が考えられるが、哺乳類に存在する hFA 含有スフィンゴ脂質は専ら R 体であることが知られている[38]。また、哺乳類の脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ (FA2H) は R 体を選択的に産生すると報告されている[39]。これらの報告を考慮すると、本研究でマウス皮膚から検出した hSM と hC1P の N-アシル鎖の水酸基の立体配置は R 体の可能性が高いと考えられる。

マウス皮膚から新規の C1P 分子種である hC1P を同定した。hC1P は肝臓、脳、腎臓、小腸では検出されなかった。hFA を含むスフィンゴ脂質の生合成には FA2H による脂肪酸の 2-ヒドロキシ化が必要であり、FA2H をノックアウトしたマウスでは脱髄と深刻な軸索の欠損を引き起こすことが報告されている[13,14]。Kitano らは皮膚の腫瘍では hSM が選択的にヒドロキシセラミドに加水分解されることを報告している[10]。これらの知見は 2-ヒドロキシ脂肪酸を有するスフィンゴ脂質が特定の組織で何らかの役割を果たしていることを示唆している。

近年、C1P はアポトーシスの抑制、細胞増殖促進作用などが報告されており、生体内に存在する新たな生理活性リン脂質として注目されている物質である。C1P の生合成酵素であるセラミドキナーゼのダウンレギュレーションにより細胞増殖は抑制されアポトーシスが促進されることが報告されている[40]。また、C1P がマクロファージの細胞遊走を促進すること[17]や、ホスホリパーゼ A₂(PLA₂α)を活性化することで炎症反応を促進する[19]が報告されており、C1P は炎症反応の重要なメディエーターであることが考えられている。これらのことから C1P は創薬研究の標的となることが期待されている。本研究で私は Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS による動物組織の C1P の分析法を示した。C1P の生合成経路の上流にある SM の分析においても *S. chromofuscus* 由来 PLD により C1P に変換することで本手法を適用することができる。本論文で示した分析手法は生体内の C1P の分子種組成の変化を測定するのに有用であり、C1P の生体内での役割の解明や C1P を標的とした創薬研究を進展させる一助となることが期待できる。

第二章

マウス組織中の α ヒドロキシ脂肪酸を有するスフィンゴミエリンの
質量分析を用いた解析

序論

スフィンゴ脂質はグリセリン脂質やコレステロールと並んで動物組織を構成する主要な脂質である。動物の細胞膜中には SM が豊富に存在することが知られている。また、セラミドは細胞のアポトーシス誘導因子であり、また皮膚では細胞外セラミドが皮膚バリア機能の形成に必須である。これらのスフィンゴ脂質に含まれる脂肪酸は鎖長や水酸基の有無の違いによって様々な種類が存在している。哺乳類のグリセロ脂質は、C14 から C22 の鎖長の飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸が主要な脂肪酸であるが、スフィンゴ脂質では C24:0 や C24:1 のような飽和または一価不飽和の極長鎖脂肪酸は、多くの動物組織でスフィンゴ脂質を構成する脂肪酸として含まれている[41,42]。また、スフィンゴ脂質ではヒドロキシ脂肪酸 (hFA) も特徴的に含まれる脂肪酸である。

hFA は脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼによって脂肪酸の α 位が水酸化されることで生合成される。セラミド合成酵素は hFA の CoA エステルを基質として用いることができることが知られており[8]、セラミド合成酵素によってジヒドロスフィンゴシンのアミノ基に転移されジヒドロセラミドが合成され、さらにジヒドロセラミド不飽和化酵素によりセラミドへと変換される。得られた hFA 含有セラミド(hCer)からはスフィンゴ糖脂質や SM が生合成される。動物組織には hFA を有するスフィンゴ糖脂質の存在が知られており、hFA を有するグリコシルセラミドはヒトの肝臓、腎臓、皮膚、マウスの腸管粘膜など広範な組織で報告がある[9]。また、hFA を有するガラクトシルセラミドやスルファチドは神経系のミエリン脂質として豊富に存在している[9]。UDP-ガラクトース:セラミドガラクトシルトランスフェラーゼは、hCer を基質として優先的に利用してガラクトシルセラミドを産生することが知られており[43]、脳に hFA を含むスフィンゴ脂質が豊富に存在する機序であると考えられている。近年、脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ遺伝子をノックアウトしたマウスでは脱髄や軸索異常を引き起こすことが報告されており[13,14]、これらの報告からも hFA は生体内において何らかの重要な役割を果たしていることが示唆される。

SM でも hFA を有する分子種が動物組織に存在することが報告されているが、これまでの哺乳類の動物組織での hSM の報告としてはマウスやヒトの皮膚[10,31]、ラット、ヒツジ、ウシ、クマ精巣及び精子とヒトの精子[11]、ウシの胃[44]、腸管粘膜、腎臓[12]などに限られる。hSM のこれらの組織での生理的役割や生合成機構はまだ十分に解明されていない。

セラミド 1-リン酸(C1P)は抗アポトーシス活性[16]や細胞遊走活性[17]が報告されており、近年新たな生理活性リン脂質として注目されている生体内スフィンゴリン脂質である。第一章では hFA を有する C1P 分子種がマウス皮膚に存在することを見出した。皮膚の SM の分子種組成は C1P の分子種組成とほとんど同じであったことから、hC1P は hSM を前駆体として生合成されている可能性が示唆された。

動物における hSM の代謝や生理的意義を理解するためには、信頼性の高い hSM の分析方法が必要である。しかし、現時点では hSM の合成された標準品は市販されておらず、hSM

の定量方法はこれまで十分に確立されていない。そこで本研究ではマウス皮膚から hSM を単離し、この hSM について、構造解析と定量を行った。

第 1 節 実験方法

1-1 試薬

ウシ脳由来 SM 及び C12:0-SM (d18:1/12:0), C16:0-SM (d18:1/16:0), C24:1-SM (d18:1/24:1)は Avanti Polar Lipids 社(Alabaster, AL, USA)製を用いた。卵黄ホスファチジルコリン(PC0、大豆ホスファチジルイノシトール(PI)、ウシ脳ホスファチジリエタノールアミン(PE)、ブタ脳ホスファチジルセリン(PS)、ウシ心臓カルジオリピン(CL)は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA)製を用いた。Methyl 2-hydroxyhexadecanoate (methyl h16:0)は Larodan Fine Chemicals 社 (Malmo, Sweden)製を用いた。クロロホルム、メタノール、塩酸、ピリジン、水酸化カリウム、ヘキサン、28%アンモニア、マラカイトグリーン、セモリブデン酸六アンモニウム四水和物(粉末)、60%過塩素酸は関東化学より購入した。プリムリン、Tween 20、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、o-vanadate、無水酢酸はナカライテスク製を用いた。シリカゲルでコーティングした TLC プレート(Merck Art 5721, Darmstadt, Germany)を使用した。試薬は特に断らない限り特級品を用いた。

1-2 マウス各組織からの脂質抽出

5 週齢の雄性 ICR マウスは、日本チャールズリバー研究所(神奈川県)から購入した。また、本実験は徳島大学動物実験委員会の承認を得たものである。マウスを安楽死させた後、マウスから背部の皮膚、小腸、脳、肝臓を摘出した。腸管粘膜は、小腸の内腔表面をスライドガラスの縁で削り取ることで得た。秤量した後、組織を小片に切断して生理食塩水と混合し、ウルトラディスペルサー(LK-21、ヤマト化学株式会社製)で4℃、5分間ホモジナイズした。得られたホモジネートから Bligh & Dyer 法 [32] に従って脂質抽出を行った。一層系溶媒[クロロホルム:メタノール:水=1:2:0.8(v/v/v)]中で十分に攪拌後、遠心分離(1,300×g、10分間、4℃)を行った。上清を回収し、残渣に再度一層系溶媒を適量加えて同様の操作を行い上清を回収した。クロロホルム、メタノール、水を適量加えて二層系溶媒[クロロホルム:メタノール:水=1:1:0.9(v/v/v)]とした。pH2 となるように 5N HCl を適量加え、よく攪拌した後、遠心分離(1,300×g、10分間、4℃)を行い、下層の有機層を回収した。取った下層と同量のクロロホルム:メタノール=17:3(v/v)を上層に加え、よく攪拌した後、遠心分離(1,300×g、10分、4℃)を行い、再び下層を回収した。その後、得られた有機層をエバポレーターで減圧濃縮し、残渣を適量のクロロホルム:メタノール=2:1(v/v)の溶媒で溶解した。

1-3 二次元薄層クロマトグラフィー(TLC)によるマウス皮膚のリン脂質分析

1-2 で得られたマウス皮膚脂質抽出物を、あらかじめ 100℃、1 時間の加熱で活性化させておいた TLC プレートに下端、左端よりそれぞれ 1.5cm のスポットにアプライし

た。あらかじめ飽和させておいた塩基性系の一次元溶媒 [クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水=60:35:8(v/v/v)] でプレートの上端近くになるまで展開させた。展開槽から TLC プレートを取り出して完全に乾燥させた後、このプレートを 90 度回転させ、一次元目で展開した端が下端となるようにして、酸性系の二次元溶媒 [クロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水=50:20:10:13:5(v/v/v/v/v)] をあらかじめ飽和させておいた展開槽でプレートの上端近くになるまで再展開した。ドラフト内で完全に溶媒を留去した後、プリムリン試薬を噴霧し、UV 照射(365nm)によって発色を示す各リン脂質の発色を確認した。また、リン酸基と反応し青く呈色する Dittmer 試薬を噴霧した。

1-4 リン脂質の定量

1-3 で示したように二次元 TLC で分離された各リン脂質画分についてシリカゲルを削り取り Bligh&Dyer 法によって回収した。各リン脂質について Chalvardjian と Rudnicki の方法[33]に従い有機リン含量を測定した。リン脂質を含む試料液の一定量を試験管に分取し、窒素気流によって溶媒を留去した。これに 60%過塩素酸 0.1ml 及び水 0.1ml を加え、160℃で 90 分加熱した。室温まで冷却した後、水 1ml、4.2%モリブデン酸アンモニウム・マラカイトグリーン試薬 5ml 及び 1.5% Tween20 溶液 0.2ml を加えよく混合した後、島津 UV-1600 分光光度計で 660nm の吸光度を比色定量した。

1-5 マウス脂質抽出物のアルカリ加水分解及び SM と hSM の単離

1-2 の方法で得られた脂質抽出物を 0.1N KOH 含有 95%メタノール中で 60℃、10 分間加熱してグリセロ脂質を加水分解した。冷却後、クロロホルム/メタノール/水の二層系溶媒としてから、pH2 となるように 5N HCl を適量加え、Bligh & Dyer 法で脂質を抽出した。得られたアルカリ加水分解後脂質抽出物を [クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水=60:35:8 (v/v/v)]を展開溶媒とする TLC で展開して SM 画分及び hSM 画分を単離した。

1-6 エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析法(ESI-TOF-MS)による SM 及び hSM 画分の分析

(1) ESI-TOF-MS によるマウス皮膚 SM 画分及び hSM 画分の分析

1-5 で得られた SM 及び hSM 画分をそれぞれ少量分取し、窒素気流によって溶媒を留去し、5mM ギ酸アンモニウム含有メタノール：水=95：5 (v/v)の溶媒に溶かした。シリンジポンプを用いて試料を装置に注入し、ESI-TOF-MS による分析を行った。ESI-TOF-MS の装置は LCT プレミア質量分析計 (Micromass/Waters 社 (Milford, MA, USA) 製)であり陽イオン検出モードで検出を行った。desolvation temperatures は 150℃、ion source temperatures は 100℃とした。キャピラリー電圧は 3000V、サンプリング電圧は 75V とした。

(2) アセチル化した hSM 画分の分析

マウス皮膚 hSM 画分をスピッツ管に分取し窒素気流によって溶媒を留去して、ピリジン 50 μ l 及び無水酢酸 100 μ l を加えて溶解し、37 $^{\circ}$ C で 3 時間加熱してアセチル化反応を行った。40 $^{\circ}$ C で窒素気流によって溶媒を留去した後、Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した。得られたアセチル化 hSM 画分は ESI-TOF-MS により分析を行った。

1-7 GC による皮膚 SM の分析

マウス皮膚の総 SM (SM 画分 + hSM 画分) を TLC で単離し、14%三フッ化ホウ素含有メタノールを 1ml 加え、100 $^{\circ}$ C、90 分で加熱した。室温まで冷却してから、水 1ml とペンタン 2ml を加え、よく攪拌した後、遠心分離(1100 \times g、5 分、4 $^{\circ}$ C)を行い、上層の有機層を回収した。回収した有機層を窒素気流によって溶媒を留去し、得られた脂肪酸メチルエステルをヘキサンに溶解して試料溶液とし GC による分析に供した。なお、内部標準としてメチルエステル化前の試料には 17 : 0/17 : 0PC を添加している。GC の装置として SHIMADZU GC-15A(島津製作所(京都)製)を使用し、キャピラリーカラムとして DB-225 カラム(長さ 30 m \times 内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、Agilent Technologies 社 (Santa Clara, CA, USA) 製)を用いて分析を行った。オープン温度は 100 C で 0.5 分間保持した後、25 C/min の速度で 195 C まで昇温した。その後、205 $^{\circ}$ C まで 3 $^{\circ}$ C/分で昇温し、さらに 240 $^{\circ}$ C まで 8 $^{\circ}$ C/分で昇温し、240 $^{\circ}$ C で 10 分間保持して測定を行った。

1-8 液体クロマトグラフィー(LC)-MS/MS によるマウス各組織 SM の分析

マウスの皮膚、脳、肝臓、腸管粘膜に内部標準として合成品の d18:1/12:0-SM を添加した後、1-2 に記述した方法で脂質抽出を行った。5mM ギ酸アンモニウム含有メタノール/ギ酸 (99:1, v/v) 0.1mL に脂質を溶解し、LC-MS/MS で分析を行った。Agilent 1100 liquid chromatograph(Agilent Technologies 社(Wilmington, DE, USA)製)、HTS PAL オートサンプラー(CTC Analytics AC 社(Zwingen, Switzerland)製)、四重極リニアイオントラップハイブリッド型質量分析装置の 4000Q Trap(Applied Biosystems/MDS Sciex 社 (Concord, Ontario, Canada)製)を装置として分析に用いた。4000Q Trap は Multiple reaction monitoring (MRM) positive ionization モードで分析を行った。プロトン化された分子イオン m/z [M+H]⁺とフラグメントイオン m/z 184 [phosphocholine]⁺を MRM モードで検出した。LC カラムとして Cadenza CD-C18 カラム(50 \times 2 mm, 3 μ m, Imtakt 社(京都)製)を用いて 42 $^{\circ}$ C で脂質抽出物の分離を行った。移動相として 5mM ギ酸アンモニウム含有メタノール/ギ酸 (99:1, v/v)を用いて、流速は 300 μ L/min で分析を行った。内部標準 C12:0-SM に対する d18:1/h16:0-SM(hSM)、d18:1/16:0-SM、d18:1/24:1-SM の濃度をそれぞれ 0.25、0.5、1、2、3 の比で混合した条件で測定し、ピーク面積比から検量線を作成した。

第2節 実験結果

2-1 マウス皮膚脂質からの hSM の単離

マウス皮膚から Bligh&Dyer 法により得られた脂質抽出物を、一次元目に塩基性系展開溶媒、二次元目に酸性系展開溶媒を用いた二次元 TLC で展開した。Fig.1 に示すように、マウス皮膚脂質画分から α -ヒドロキシ脂肪酸を有するスフィンゴミエリン(hSM)を分離することができた。二次元 TLC で分離された各リン脂質をプレートから回収し、リン比色定量により各リン脂質の定量を行った。Table1 に示すように、hSM は総リン脂質に対し 1.7 ± 0.4 mol%存在していることが分かった。皮膚からのリン脂質の抽出量 (5.9 ± 0.5 $\mu\text{mol/g}$ (湿重量))から算出すると、皮膚の hSM の存在量は 0.1 ± 0.02 $\mu\text{mol/g}$ (湿重量)である。SM の総量に対する hSM の割合は 11.5 mol%であった。

マウス皮膚脂質をアルカリ加水分解処理後に hSM 画分と通常の SM 画分(長鎖脂肪酸(LCFA)-SM+極長鎖脂肪酸(VLCFA)-SM)を TLC で分離した(Fig. 2)。SM 画分と hSM 画分をそれぞれ ESI TOF-MS で分析した(Fig. 3A,B)。SM 画分では d18:1/16:0 に相当する m/z 703.6 が最も高いピークとして検出された。次いで、d18:1/24:1 に相当する m/z 813.7 と d18:1/18:0 に相当する m/z 731.6 も検出された。hSM 画分では m/z 719.6 が主要なピークとして検出された。hSM 画分についてアセチル化処理を行うと m/z 803.6 にピークが検出され 84 マスユニットのシフトが見られた(Fig. 3C)。これは 2 個の OH 基の H 原子がアセチル基に置換された分子量に相当し、m/z 719.6 に相当する分子は 2 個の OH 基を有することを意味する。また、マウス皮膚 hSM 画分の脂肪酸メチルエステル化処理を行い GC-MS で分析したところ、hSM 由来メチルエステルの保持時間及びマススペクトルが α -ヒドロキシパルミチン酸メチルエステル標準品と一致するピークを主要なピークとして認め(Fig. 3D,E)、これは α -ヒドロキシパルミチン酸に特徴的なフラグメントイオンである m/z227 [M-59]⁺ (Fig. 3F)のピークであった。この結果は、hSM の OH 基の位置は脂肪酸残基の α 位であることを示している。以上の結果より、マウス皮膚には α -hydroxy 脂肪酸を有する hSM の存在が確認できた。この結果は、本研究で単離した hSM と SM は互いに大きな不純物を含まないことも示している。

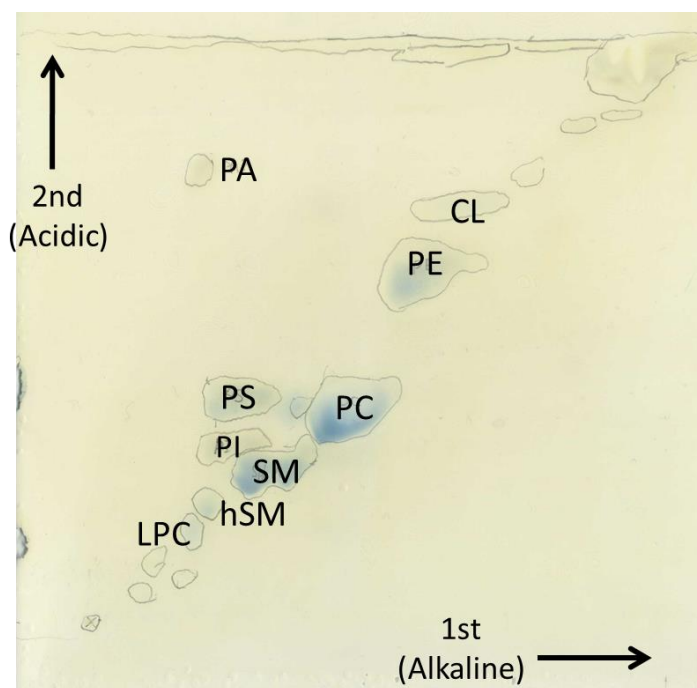


Fig.1 二次元 TLC によるマウス皮膚脂質抽出物の分析

一次元目(右方向に展開)は塩基性系展開溶媒[クロロホルム:メタノール:28%アンモニア水=60:35:8(v/v/v)]、二次元目(上方向に展開)は酸性系展開溶媒[クロロホルム:アセトン:メタノール:酢酸:水=50:20:10:13:5(v/v/v/v/v)]で TLC の展開を行った。展開後、ブリンリン試薬を噴霧し UV 光下で発色を確認し、発色した脂質スポットを鉛筆でなぞった。続いてリン脂質と反応して青く呈色する Dittmer 試薬を噴霧し、撮影した。

SM, Sphingomyelin ; hSM, Hydroxy-sphingomyelin ; PC, Phosphatidylcholine ; PE, Phosphatidylethanolamine ; PS, Phosphatidylserine ; PI, Phosphatidylinositol ; LPC, Lysophosphatidylcholine ; CL, Cardiolipin ; PA, Phosphatidic acid

リン脂質	Mol(%)
Sphingomyelin	13.1±3.6
Hydroxy-sphingomyelin	1.7±0.4
Phosphatidylcholine	52.7±1.4
Phosphatidylethanolamine	17.0±1.9
Phosphatidylserine	5.3±1.7
Phosphatidylinositol	4.3±0.9
Lysophosphatidylcholine	3.0±0.2
Cardiolipin	2.6±2.1
Phosphatidic acid	0.4±0.2

Table 1 マウス皮膚のリン脂質組成

二次元 TLC で分離した各リン脂質画分について定量を行った。総リン脂質に対する各リン脂質の割合を mol%として示した。データは Means±S.D. n=3 で示した。

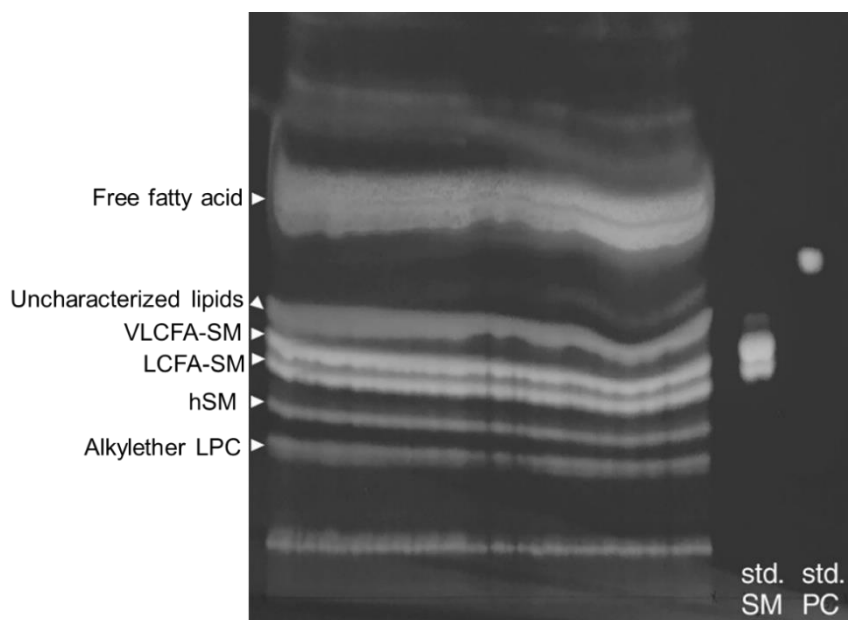
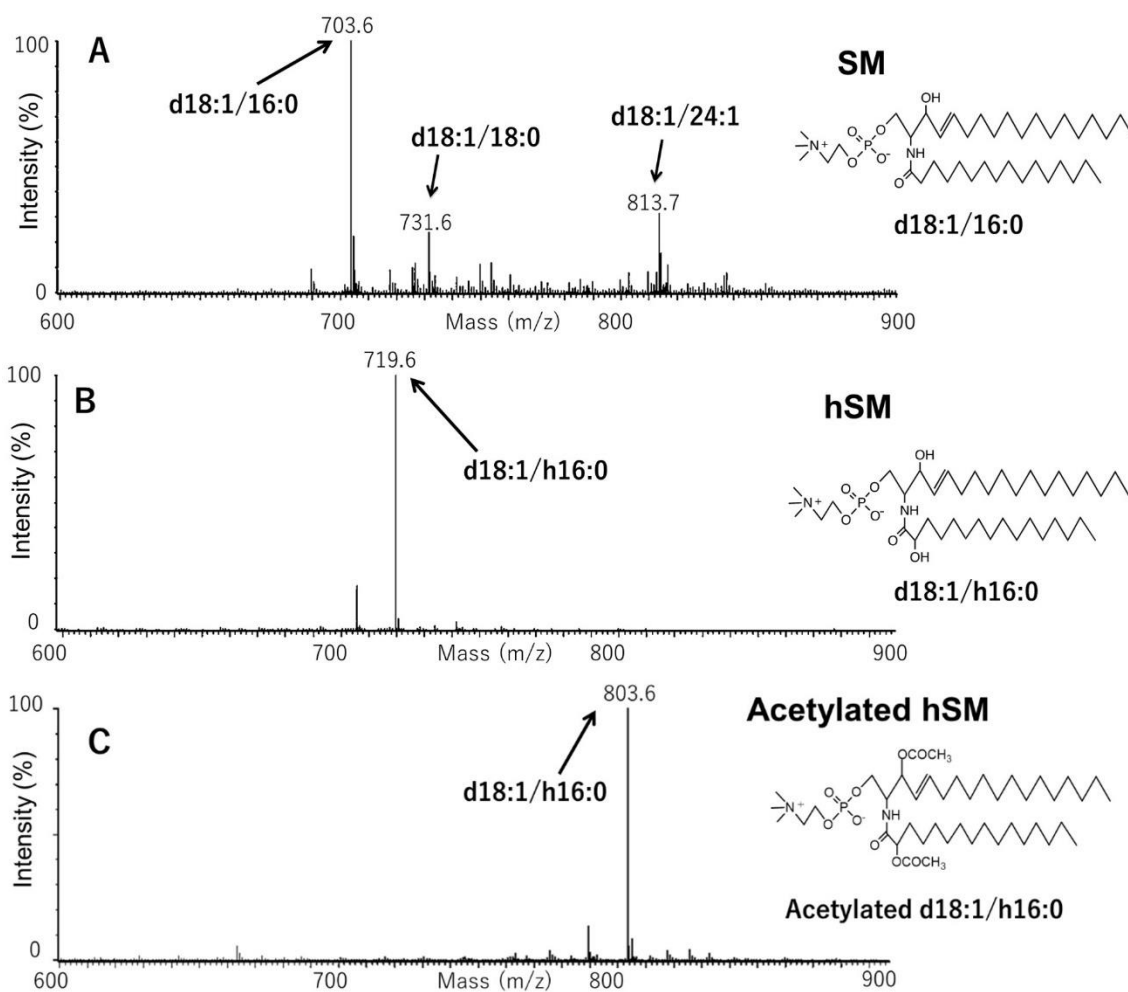


Fig.2 TLC による hSM と SM 画分の単離

アルカリ加水分解後のマウス皮膚脂質抽出物を TLC で塩基性系展開溶媒[クロロホルム:メタノール:28%アンモニア水=60:35:8(v/v/v)]により展開した。プリムリン試薬噴霧後、UV 光下

で撮影した。LCFA:長鎖脂肪酸(主に C16-C20)、VLCFA:超長鎖脂肪酸(主に C22-C24)。



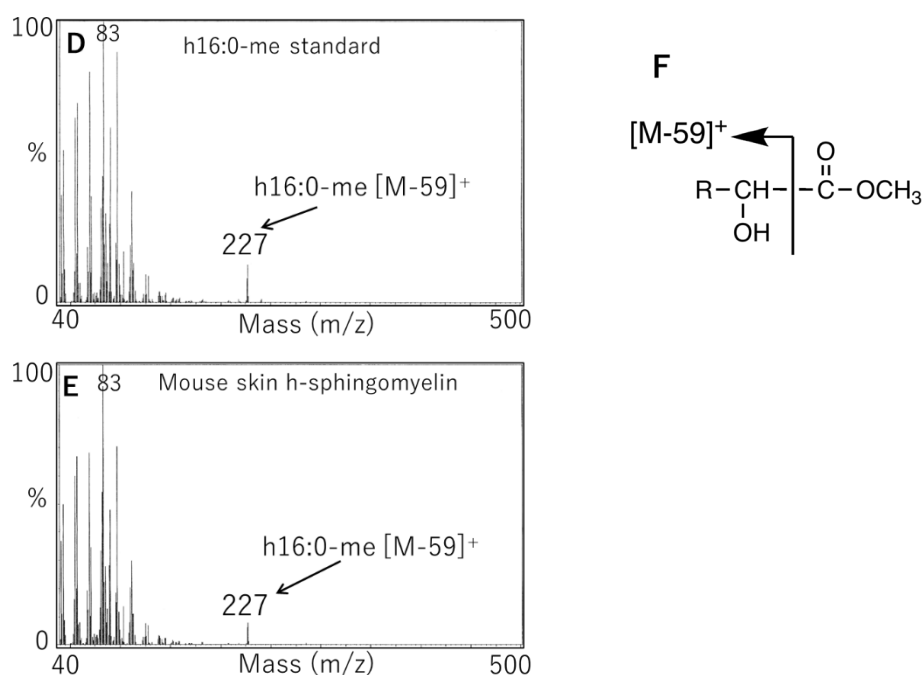


Fig. 3 ESI-TOF-MS と GC-MS による hSM の構造解析

マウス皮膚から単離した SM 画分(A)と hSM 画分(B)について ESI-TOF-MS で分析を行った。hSM 画分をアセチル化処理して ESI-TOF-MS で分析を行った(C)。構造式はマウス皮膚で最も主要に検出された SM 分子種である d18:1/16:0-SM、hSM として主要に検出された d18:1/h16:0-SM、アセチル化処理後の d18:1/h16:0-SM について示した。 α -OH C16:0 脂肪酸メチルエステル標準品の GC-MS による分析(D)。マウス皮膚 hSM 由来メチルエステルの GC-MS による分析(E)。m/z 227[M-59]⁺フラグメントイオンの構造式(F)。

2-2 マウス皮膚脂質の GC 分析

マウス皮膚脂質から得られた総 SM 画分(SM + hSM 画分)を脂肪酸メチルエステル処理して、GC による脂肪酸分析に供した。Fig. 4A に示すように α -ヒドロキシパルミチン酸(h16:0)メチルエステルのピークが 10.6 分に検出された。それ以外に検出可能なヒドロキシ脂肪酸(hFA)のピークはクロマトグラム上に見られなかった。各ピークと内部標準とのピーク面積比から、SM 画分の各脂肪酸の組成を算出した(Fig. 4B)。マウス皮膚の hSM は皮膚総リン脂質中に 13 ± 1 nmol/ μ mol 含まれていることがわかった。また、総 SM 中の hSM の比率を算出すると 10 mol%であった。これらの結果は、2-1 で述べたようなリン脂質の比色定量で得られたデータと同等であった。

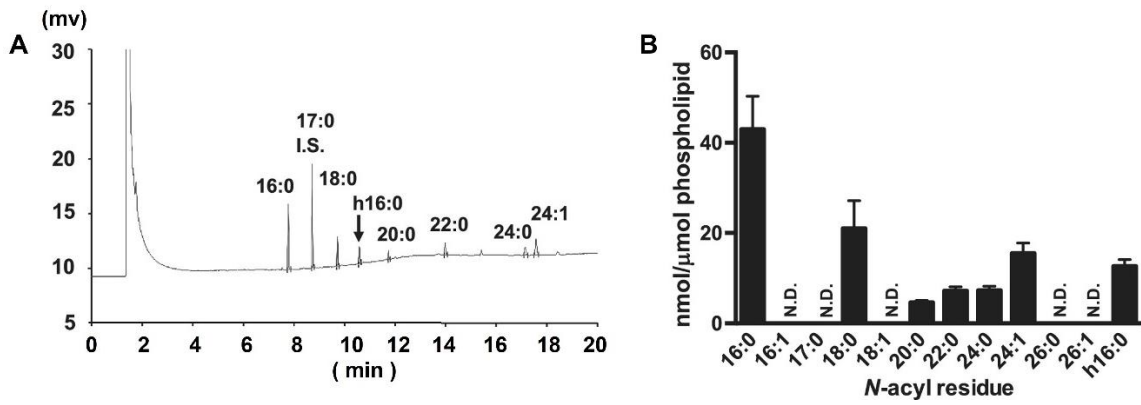


Fig.4 GCによるマウス皮膚 SM の分析

マウス皮膚から SM 画分と hSM 画分を合わせて単離し、脂肪酸メチルエステルを調製した。内部標準として 17:0/17:0PC 由来の脂肪酸メチルエステル(17:0 脂肪酸メチルエステル)を用いた。得られた脂肪酸メチルエステルを GC により分析した(A)。GC のピーク面積の比からマウス皮膚 SM の組成を算出した(B)。データは Means ± S.D. n=3 で示した。

2-3 LC-MS/MS による hSM の分析

マウス皮膚脂質抽出物の SM について LC-MS/MS で分析を行った。Fig. 5A に示したように MRM モードで一段目の検出ではプロトン化された分子イオン m/z $[M+H]^+$ 、二段目の検出ではフラグメントイオン m/z 184 $[\text{phosphocholine}]^+$ を検出に用いた。LC-MS/MS で検出されたマウス皮膚 SM 分子種のマスキロマトグラフを Fig. 5B に示す。内部標準として用いた d18:1/12:0-SM と d18:1/16:0-SM、d18:1/24:1-SM、d18:1/h16:0-SM を濃度比を変えて混合し、LC-MS/MS で測定されたピーク面積比に基づいて検量線を作成した(Fig. 5C)。得られた検量線の傾きは内部標準(d18:1/12:0)に対する d18:1/16:0-SM、d18:1/24:1-SM、d18:1/h16:0-SM の検出効率の差を示している。d18:1/12:0-SM と d18:1/16:0-SM、d18:1/24:1-SM の検出効率はほとんど同じであった。一方、d18:1/h16:0-SM の検量線は傾き 0.31 であり、検出効率は d18:1/12:0-SM の約 3 分の 1 であることが分かった。この結果に基づいて、hSM の検出効率の差を補正して定量を行った。マウス皮膚、脳、肝臓、腸管粘膜の SM 分子種を定量した結果を Fig. 6A-D に示す。GC 分析では検出されなかった d18:1/16:1、d18:1/17:0(d17:1/18:0)、d18:1/18:1、d18:1/26:0 および d18:1/26:1 などの微量な SM 分子種が高感度で検出された。なお各ピークの帰属は、動物組織中のスフィンゴ脂質の長鎖塩基骨格は d18:1 スフィンゴシンが主であるとの仮定に基づいている[45]。しかし、Shimada らは皮膚には相当量の d17:1 スフィンゴシンが存在することを報告している[46]。そのため皮膚で d18:1/17:0 として割り当てられたピークは、d18:1/17:0 に加えて d17:1/18:0 SM を相当量含む可能性がある。LC-MS/MS 分析によって、皮膚の hSM は皮膚総リン脂質中に $16 \pm 4 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$ 含まれていることが算出された。この値は 2-1 で示した従来のリン脂質の比色定量法や、2-2 で示した GC 分析による定量で得られた値と同程度である。LC-MS/MS による分析では、腸管粘膜にも hSM を見出した。一方で、脳と肝臓では hSM 分子種は検出されなかった。腸管粘膜の hSM 分子種は d18:1/h16:0 であり、その量は総リン脂質中 $0.8 \pm 0.4 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$ であると算出された。

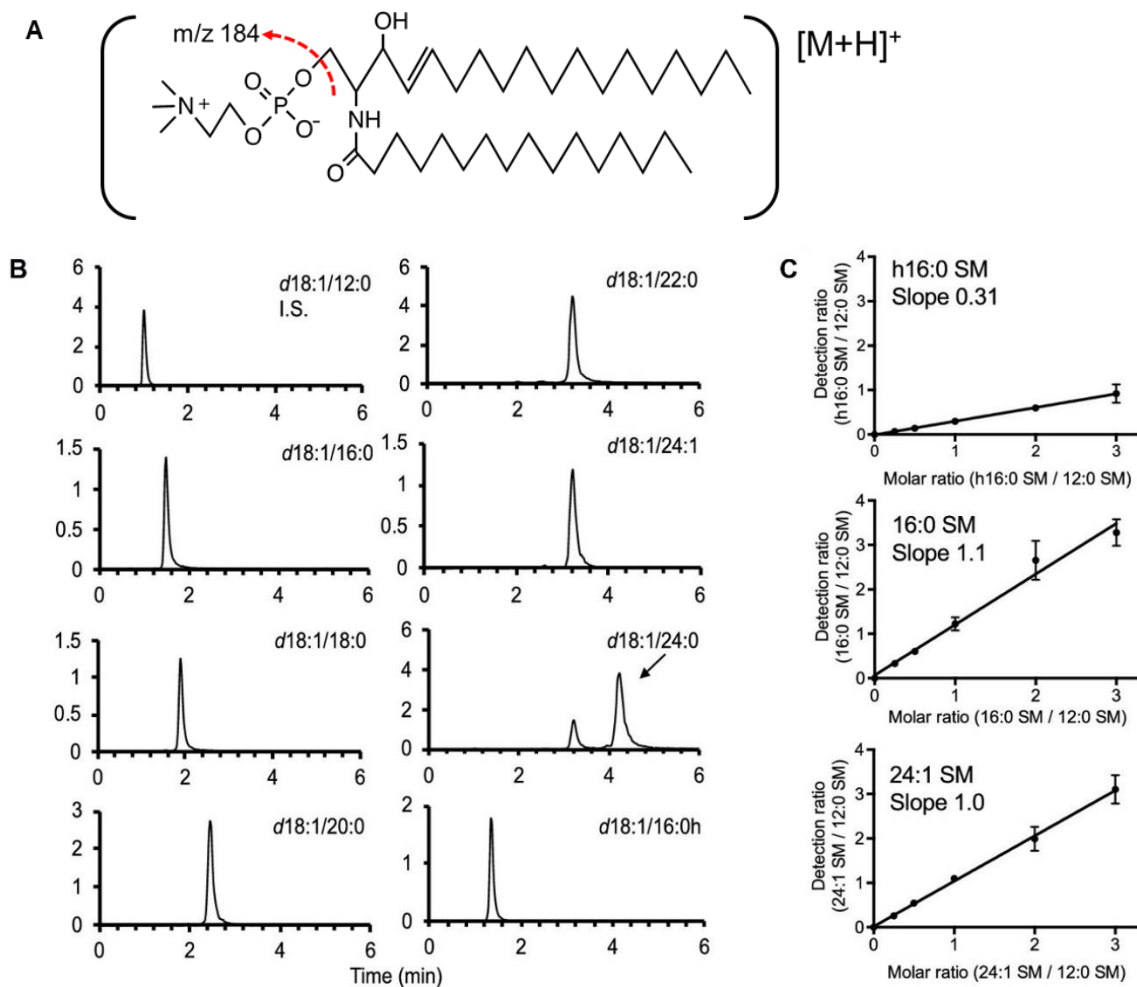


Fig. 5 LC-MS/MS によるマウス皮膚脂質の分析

マウス皮膚脂質抽出物について LC-MS/MS で分析を行った。SM の検出に用いた分子イオン m/z $[M+H]^+$ とフラグメントイオン m/z 184 [phosphocholine] $^+$ の構造を示した(A)。マウス皮膚 SM 各分子種のマスクロマトグラフを示した(B)。内部標準として用いた $d18:1/12:0$ -SM に対する $hSM(d18:1/h16:0$ -SM)、 $d18:1/16:0$ -SM、 $d18:1/24:1$ -SM を 0.25、0.5、1、2、3 の各濃度比で混合し、LC-MS/MS により得られたピーク面積比に基づいて検量線を作成した(C)。データは Means \pm S.D. $n=3$ で示した。

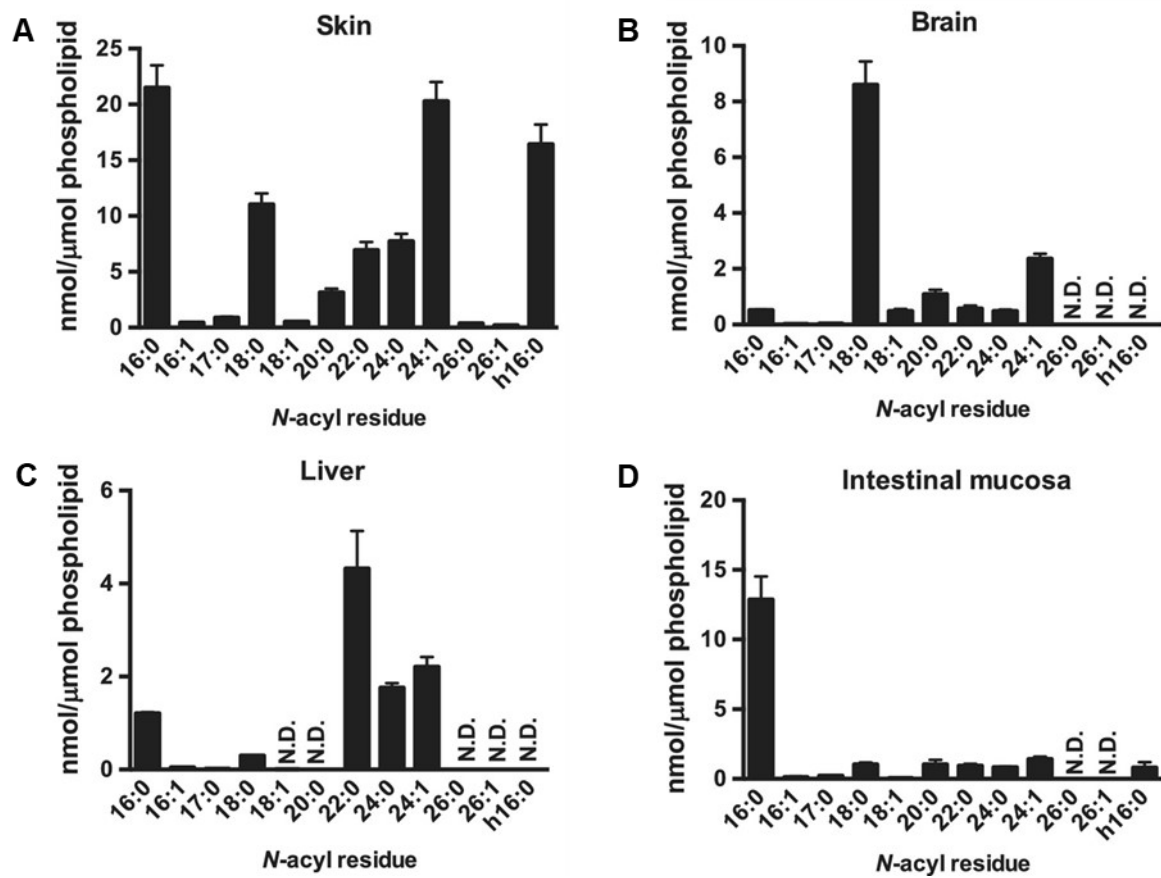


Fig. 6 LC-MS/MSによるマウス皮膚、脳、肝臓、腸管粘膜のSM各分子種の定量
 マウス皮膚 (A)、脳 (B)、肝臓 (C)、腸管粘膜 (D) の脂質抽出物について LC-MS/MS で測定し、SM 各分子種の定量を行った。SM 各分子種の帰属は長鎖塩基骨格を d18:1 と仮定して同定した。データは Means±S.D. n=3 で示した。

第3節 考察

本研究では3種類の異なる方法を用いて皮膚の hSM の分析を行った。この中で LC-MS/MS による分析は高価な装置を必要とするが、検出感度や試料調製の簡便さの面で優れている。リン比色定量や GC による分析は脂質抽出物から SM を精製する必要があるが、LC-MS/MS と比べて高価な装置を必要としない利点がある。リン・モリブデンブルーを利用したリン比色定量法はリン脂質の定量法として従来から用いられてきた手法である。二次元 TLC と組み合わせることで各リン脂質クラスを分離することができるので、脂質抽出物からリン脂質クラスの組成を明らかにできる。さらにアセチル化処理を行い質量分析によるマスシフトを確認することや、GC-MS による分析を組み合わせることで分子種の構造に関する情報が得られる。我々の研究グループでは以前に植物脂質中における未知スフィンゴリン脂質をこれらの手法を組み合わせることで構造解析し、 α -ヒドロキシ脂肪酸を N-アシル基に持つ PC1P と構造決定できた[25]。本研究では私はこれらの手法の組み合わせが hSM の確認に有用であることを示した。また、GC は脂質研究において従来から広く利用されている分析法である。GC による分析では脂肪酸組成を正確に知ることができ、内部標準物質を用いることで各脂肪酸の定量が可能である。分析法の違いにより得られた hSM の定量値に大きな差はなかった。

GC 及び ESI-TOF-MS の結果から、マウス皮膚から二次元 TLC で分離された hSM 画分は、ほぼ d18:1/h16:0 の単一分子種で構成されていることが分かった。これは第一章で示したように、マウス皮膚 SM の MALDI-TOF MS による分析の結果とも一致する。Kitano ら及び Uchida らは d18:1/h16:0 がマウス皮膚の hSM の主要な分子種であることを報告しており[10,31]、この事実は本研究での分析結果と一致するものである。Uchida らはヘアレスマウスの hSM は SM 全体の約 40%であることを報告しており、本実験で得られた hSM の比率はそれより低い結果となった。この違いの理由としてマウス系統の違い、分析方法の違い、組織調製法の違いに起因する可能性が考えられる。このうち組織調製法については Uchida らの実験では皮膚の表皮のみを分析していたのに対して本実験では表皮と真皮を合わせて分析に使用したことからの違いの理由となった可能性が考えられる。

LC-MS/MS による SM の分析では鎖長の異なる d18:1/12:0-SM、d18:1/16:0-SM、d18:1/24:1-SM の検出効率はほとんど同じであったのに対して、hSM の検出効率は脂肪酸に水酸基を有さない SM に比べて著しく検出効率が低いことが明らかになった。また第一章で示したように、MALDI-TOF MS においても hFA を持つ C1P は脂肪酸に水酸基を有さない C1P 分子種と比べて検出効率が約半分であり、hFA を持つ脂質の検出効率の低さが観察された。水酸基の数が異なる脂質の質量分析では、検出効率の違いを考慮することが重要である。

LC-MS/MS によるマウス各組織の分析では皮膚の他に腸管粘膜からも d18:1/h16:0 が検

出された。本実験で得られたマウス腸管粘膜の SM の分子種組成は、hSM の検出を除いて 1979 年の Bouhours and Guignard の報告[47]と一致する。彼らの報告では GC による SM の分析を行っており、hSM が検出できなかったのは GC と LC-MS/MS の検出感度の違いに起因すると思われる。腸管粘膜で測定された hSM の存在量は皮膚の約 20 分の 1 程度であった。また、脳と肝臓では hSM は検出されなかった。動物組織における hSM の分布は限られているものと考えられる。脳では hFA を有するスフィンゴ糖脂質は豊富に存在していることが知られている[9]ことから、新規に生合成された hFA 含有セラミドはスフィンゴミエリンには変換されずスフィンゴ糖脂質のみに変換されているのかもしれない。

Uchida らの報告によると、表皮組織及び培養ケラチノサイトには FA2H が発現しており、ケラチノサイトでは分化とともに FA2H 活性が増加するようである[48]。この報告では、FA2H サイレンシングにより表皮の透過性バリアに必要なラメラ体の形成と分泌が著しく減少して細胞外脂質層の形成が阻害されることが示されている。表皮は外層から角質層、顆粒層、有棘層、基底層の四層からなり表皮のケラチノサイトは基底層で分裂して分化しながら最外層である角質層へと移動するが、hSM は角質層と顆粒層により多く存在することが報告されており[31]、hSM はケラチノサイトの分化に関与しているのかもしれない。また、Maier らの報告によれば、FA2H をノックアウトしたマウスでは皮膚において皮脂細胞過増殖と皮脂腺肥大を引き起こす[49]。しかし、この報告ではマウスの FA2H を欠損させても皮膚の hFA 含有セラミドは減少しておらず hFA 含有グルコシルセラミドのみが減少していることが報告されており、皮膚には既知の FA2H 以外に未知の脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼまたは fatty acyl-CoA 2-ヒドロキシラーゼが存在していることが予想される。hSM の生合成には既知の FA2H 以外の酵素も関与しているかもしれない。

また、アポトーシス誘導因子であるセラミドでは N-アシル鎖の水酸基の有無により異なる生理活性を有することが知られており、hFA を有するセラミドは、水酸基を持たない通常型の脂肪酸を有するセラミドに比べ、アポトーシスを強力に誘導することが報告されている[50]。皮膚と腸管粘膜に豊富に存在する hSM の生理的役割はまだ明らかではないが、皮膚や腸管粘膜に存在する hSM はアポトーシス促進性のセラミドの前駆体として機能しているのかもしれない。

皮膚に存在する hSM の生理的意義をより深く理解するためには、hSM の生合成と分解に関して今後さらなる研究の進展が必要である。本研究で示した手法は hSM の分析に有用であり、研究の進展に役立つものであると考えられる。

総括

本研究では、まずマウス各組織の C1P について分析を行い、その組成を明らかにした。C1P の分析では Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS が有用であることを示した。皮膚では未同定の C1P 分子種が見出され、これはヒドロキシパルミチン酸を有する C1P であると同定することができた。動物組織におけるヒドロキシ脂肪酸(hFA)を有する C1P の存在はこれまでに報告がなく、本研究で見出した新規な C1P 分子種である。肝臓、脳、腎臓、小腸では hC1P は検出されなかった。また、その前駆体と考えられる SM の分析法として Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS を適用するため *S. chromofuscus* 由来 phospholipase D (PLD) を用いて SM を C1P に変換してから分析に供した。その結果、皮膚では C1P と SM の分子種組成は類似していることが明らかになった。小腸も C1P、SM 共に C16 が主要分子種であることから類似していると考えられる。一方で、肝臓や脳では C1P と SM の分子種組成に類似性は認められなかった。

続いて hC1P の前駆体と思われる hSM について複数の分析法を用いて分析を行い、それぞれの分析法でこれが定量できることを実証した。塩基性系溶媒と酸性系溶媒を用いた二次元 TLC を用いることで脂質抽出物から各リン脂質クラスの分離をすることができ、リン・モリブデンブルーによるリン比色定量法により hSM の定量を行うことができる。さらにアセチル化処理を行い質量分析と組み合わせることでマスシフトを確認することで未知物質の水酸基の数についての情報が得られること、GC-MS と組み合わせることで脂肪酸部分の構造についての情報が得られることを示し、これらの分析手法を組み合わせることで構造解析を行い皮膚脂質の TLC による単離で得られる物質が hSM であることを確認した。また GC と LC-MS/MS を用いた hSM 及び SM 各分子種の定量を行い、いずれの手法も hSM の分析法として有用であることを実証した。

また、LC-MS/MS における SM の分析及び MALDI-TOF MS における C1P の分析では、hFA を有する SM や C1P は hFA を有さない SM や C1P と比べていずれの分析法でも検出効率が低いことが明らかとなった。このことから、質量分析を用いて脂肪酸に水酸基を有する分子種の正確な定量を行う上では検出効率の補正が必要であることを示した。

C1P は抗アポトーシス活性を有する生理活性リン脂質である。一方、セラミドはアポトーシス誘導因子として知られており、セラミドと C1P は細胞の生存と死においてそれぞれ重要な役割を果たしている。SM は細胞膜の構成成分であるだけでなく、セラミドと C1P の前駆体として重要であると考えられる。皮膚における C1P と SM の分子種組成の類似性は、C1P の生合成経路として *de novo* 経路で合成されたセラミドが直接 C1P に変換されているのではなく、SM が C1P の生合成経路における主要な前駆体であることを示唆している。Dressler らは SM 由来のセラミドが C1P の前駆体となっていることを報告しており[22]、本研究で明らかとなった皮膚における C1P と SM の分子種組成の類似性はこのことを裏付けるものであると考えられる。肝臓や脳ではこの類似性は見られなかったことから、これらの組織では特定の C1P 分子種が

優先的に代謝され消去されているのかもしれない。C1P はセラミドキナーゼによってセラミドから生合成され脂質リン酸ホスファターゼ (LPP) により脱リン酸化されセラミドに代謝される[51]が、セラミドキナーゼは N-アシル鎖の鎖長 C14 以上のセラミドを同等の基質特異性で C1P 合成に利用できることが知られており[52]、C1P の生合成過程で分子種の違いによる差異はないと考えられる。C1P 脱リン酸化に分子種による基質特異性の差異があるのかは不明であり今後の研究が必要である。

特定の組織で特異的に見出された hC1P と hSM の生理的役割は明らかではないが、hFA を有するセラミド (hCer) は強力なアポトーシス誘導因子である[50]ことから、細胞交代の頻繁な皮膚や腸管粘膜において hSM は hCer の前駆体として重要であるのかもしれない。興味深いことに、Kitano らは皮膚の腫瘍では hSM が選択的に hCer に加水分解されることを報告しており[10]、hFA を有するスフィンゴ脂質は皮膚などの組織において何らかの重要な役割を果たしているのかもしれない。また、hC1P の役割は不明であるが C1P は抗アポトーシス活性を有していることから hC1P が皮膚において何らかの役割を果たしているのかもしれない。

hC1P とその前駆体である hSM についての生理的役割を理解するためにはさらなる研究が必要である。本研究で示した分析法は hC1P や hSM の分析において有用であると考えられる。スフィンゴ脂質は生体内で様々な役割を担っていることが明らかになっており、近年は創薬標的としても注目されている研究分野である。スフィンゴ脂質の研究においては分子種による役割の違いを理解することも重要であり、本研究で示した分析法がスフィンゴ脂質研究を進展させる一助になれば幸いである。

参考文献

- [1] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, Many ceramides. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (2011) 27855–27862.
- [2] A. Kihara, S. Mitsutake, Y. Mizutani, Y. Igarashi, Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Progress in lipid research*. 46 (2007) 126–144.
- [3] Y. Nagaoka, K. Otsuki, T. Fujita, S. Uesato, Effects of Phosphorylation of Immunomodulatory Agent FTY720 (Fingolimod) on Antiproliferative Activity against Breast and Colon Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31 (2008) 1177-1181.
- [4] L. Coderch, O. López, A. de la Maza, J. L. Parra, Ceramides and skin function, *American Journal of Clinical Dermatology*. 4 (2003) 107-129.
- [5] Y. Ohno, S. Nakamichi, A. Ohkuni, N. Kamiyama, A. Naoe, H. Tsujimura, U. Yokose, K. Sugiura, J. Ishikawa, M. Akiyama, A. Kihara, Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112 (2015) 7707-7712.
- [6] B. J. Kroesen, B. Pettus, C. Luberto, M. Busman, H. Sietsma, L. de Leij, Y. A. Hannun, Induction of Apoptosis through B-cell Receptor Cross-linking Occurs via de Novo Generated C16-Ceramide and Involves Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. (2001) 276: 13606-13614.
- [7] B. J. Kroesen, S. Jacobs, B. J. Pettus, H. Sietsma, J. W. Kok, Y. A. Hannun, L. F. de Leij, BcR-induced Apoptosis Involves Differential Regulation of C16 and C24-Ceramide Formation and Sphingolipid-dependent Activation of the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 14723-14731.
- [8] Y. Mizutani, A. Kihara, H. Chiba, H. Tojo, Y. Igarashi, 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *Journal of Lipid Research*. 49 (2008) 2356-2364.

- [9] H. Hama, Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1801 (2010) 405–414.
- [10] Y. Kitano, Y. Iwamori, K. Kiguchi, J. DiGiovanni, T. Takahashi, K. Kasama, T. Niwa, K. Harii, M. Iwamori, Selective Reduction in α -Hydroxypalmitic Acid-containing Sphingomyelin and Concurrent Increase in Hydroxylated Ceramides in Murine Skin Tumors Induced by an Initiation-promotion Regimen. *Japanese Journal of Cancer Research*. 87 (1996) 437-441.
- [11] B.S. Robinson, D.W. Johnson, A. Poulos, Novel molecular species of sphingomyelin containing 2-hydroxylated polyenoic very-long-chain fatty acids in mammalian testes and spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*. 267 (1992) 1746-1751.
- [12] M.E. Breimer, K.A. Karlsson, B.E. Samuelsson, Presence of phytosphingosine combined with 2-hydroxy fatty acids in sphingomyelins of bovine kidney and intestinal mucosa. *Lipids* 10 (1975) 17-19.
- [13] K. A. Potter, M. J. Kern, G. Fullbright, J. Bielawski, S. S. Scherer, S. W. Yum, J. J. Li, H. Cheng, X. Han, J. K. Venkata, P. A. A. Khan, B. Rohrer, H. Hama, Central nervous system dysfunction in a mouse model of Fa2h deficiency. *Glia*. 59 7 (2011) 1009–1021.
- [14] I. Zoller, M. Meixner, D. Hartmann, H. Bussow, R. Meyer, V. Gieselmann, M. Eckhardt, Absence of 2-Hydroxylated Sphingolipids Is Compatible with Normal Neural Development But Causes Late-Onset Axon and Myelin Sheath Degeneration. *The Journal of Neuroscience* 28:39 (2008) 9741-9754.
- [15] S. Edvardson, H. Hama, A. Shaag, J.M. Gomori, I. Berger, D. Soffer, S.H. Korman, I. Taustein, A. Saada, O. Elpeleg, Mutations in the Fatty Acid 2-Hydroxylase Gene Are Associated with Leukodystrophy with Spastic Paraparesis and Dystonia. *The American Journal of Human Genetics* 83 (2008) 643-648.
- [16] A. Gomez-Munoz, J.Y. Kong, K. Parhar, S.W. Wang, P. Gangoiti, M. Gonzalez, S. Eivemark, B. Salh, V. Duronio, U.P. Steinbrecher, Ceramide-1-phosphate

promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* 579 (2005) 3744–3750.

[17] M.H. Granada, P. Gangoiti, A. Ouro, L. Arana, M. Gonzalez, M. Trueba, A. Gomez-Munoz, Ceramide 1-phosphate (C1P) promotes cell migration: Involvement of a specific C1P receptor. *Cellular Signalling.* 21 (2009) 405-412.

[18] P. Gangoiti, C. Bernacchioni, C. Donati, F. Cencetti, A.Ouro, A. Gómez-Muñoz, Paora Bruni, Ceramide 1-phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts. *Biochimie.* 94, 3 (2012) 597-607.

[19] D.S. Wijesinghe, P. Subramanian, N.F. Lamour, L.B. Gentile, M.H. Granada, A. Bielawska, Z. Szulc, A. Gomez-Munoz, C.E. Chalfant, Chain length specificity for activation of cPLA2 α by C1P: use of the dodecane delivery system to determine lipid-specific effects. *Journal of Lipid Research.* 50 (2009) 1986-1995.

[20] S. Niwa, C. Graf, F. Bornancin, Ceramide kinase deficiency impairs microendothelial cell angiogenesis in vitro. *Microvascular Research* 77 (2009) 389-393.

[21] C. Graf, B. Zemann, P. Rovina, N. Urtz, A. Schanzer, R. Reuschel, D. Mechtcheriakova, M. Müller, E. Fischer, C. Reichel, S. Huber, J. Dawson, J. G. Meingassner, A. Billich, S. Niwa, R. Badegruber, P. P. Van Veldhoven, B. Kinzel, T. Baumruker, F. Bornancin, Neutropenia with Impaired Immune Response to *Streptococcus pneumoniae* in Ceramide Kinase-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 180 (2008) 3457-3466.

[22] K.A. Dressler, R.N. Kolesnick, Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *Journal of Biochemistry.* 265 (1990) 14917-14921.

[23] T. Tanaka, H. Tsutsui, K. Hirano, T. Koike, A. Tokumura, K. Satouchi, Quantitative analysis of lysophosphatidic acid by time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule. *The Journal of Lipid Research.* 45, (2004) 2145-2150.

- [24] J. Morishige, M. Urikura, H. Takagi, K. Hirano, T. Koike, T. Tanaka, K. Satouchi, A clean-up technology for the simultaneous determination of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule, Phos-tag. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 24 (2010) 1075-1084.
- [25] T. Tanaka, T. Kida, H. Imai, J. Morishige, R. Yamashita, H. Matsuoka, S. Uozumi, K. Satouchi, M. Nagano, A. Tokumura. Identification of a sphingolipid-specific phospholipase D activity associated with the generation of phytoceramide-1-phosphate in cabbage leaves. *FEBS Journal* 280 (2013) 3797–3809.
- [26] A. Boath, C. Graf, E. Lidome, T. Ullrich, P. Nussbaimer, F. Bornancin, Regulation and Traffic of Ceramide 1-Phosphate Produced by Ceramide Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 283, 13 (2008) 8517-8526.
- [27] D. K. Simanshu, R. K. Kamlekar, D. S. Wijesinghe, X. Zou, X. Zhai, S. K. Mishra, J. G. Molotkovsky, L. Malinina, E. H. Hinchcliffe. C. E. Chalfant, R. E. Brown, D. J. Patel, Non-vesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids. *Nature* 500 (2013) 463-467.
- [28] Y. Masukawa, H. Narita, H. Sato, A. Naoe, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, T. Kitahara, Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *Journal of Lipid Research*. 50 (2009) 1708–1719.
- [29] M. Iwamori, C. Costello, H. W. Moser, Analysis and quantitation of free ceramide containing nonhydroxy and 2-hydroxy fatty acids, and phytosphingosine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*. 20 (1979) 86–96.
- [30] J.S. O'brien, G. Rouser, The fatty acid composition of brain sphingolipids: sphingomyelin, ceramide, cerebroside, and cerebroside sulfate. *Journal of Lipid Research*. 5 (1964) 339-342.

- [31] Y. Uchida, M. Hara, H. Nishio, E. Sidansky, S. Inoue, F. Otsuka, A. Suzuki, P. M. Elias, W. M. Holleran, S. Hamanaka, Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *Journal of Lipid Research*, 41 (2000) 2071–2082.
- [32] E. G. Bligh, W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (1959) 911–917.
- [33] A. Chalvardjian, E. Rudnicki, Determination of lipid phosphorus in the nanomolar range. *Analytical Biochemistry*. 36 (1970) 225–230.
- [34] G. Rouser, G. Feldman, C. Galli, Fatty acid compositions of human brain lecithin and sphingomyelin in normal individuals, senile cerebral cortical atrophy, Alzheimer's disease, metachromatic leucodystrophy, Tay-Sachs and Niemann-Pick diseases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42 (1965) 411–412.
- [35] S. Imamura, Y. Horiuti, Purification of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D by hydrophobic affinity chromatography on palmitoyl cellulose. *Journal of Biochemistry*. 85 (1979) 79–95.
- [36] S. Pappinen, M. Hermansson, J. Kuntsche, P. Somerharju, P. Wertz, A. Urtti, M. Suhonen, Comparison of rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) with intact human skin: Lipid composition and thermal phase behavior of the stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (2008) 824-834.
- [37] van Meeteren, L. A., F. Frederiks, B. N. Giepmans, M. F. Pedrosa, S. J. Billington, B. H. Jost, D. V. Tambourgi, W. H. Moolenaar, Spider and Bacterial Sphingomyelinases D Target Cellular Lysophosphatidic Acid Receptors by Hydrolyzing Lysophosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 10833-10836.
- [38] V. Kota and H. Hama, 2'-Hydroxy ceramide in membrane homeostasis and cell signaling. *Adv. Biol. Regul.*, 54 (2014), 223-230.

- [39] L. Guo, X. Zhang, D. Zhou, A.L. Okunade, X. Su, Stereospecificity of fatty acid 2-hydroxylase and differential functions of 2-hydroxy fatty acid enantiomers. *Journal of Lipid Research*, 53 (2012) 1327-1335.
- [40] P. Mitra, M. Maceyka, S. G. Payne, N. Lamour, S. Milstien, C. E. Chalfant, S. Spiegel, Ceramide kinase regulates growth and survival of A549 human lung adenocarcinoma cells. *FEBS Letters* 581, 735–740 (2007).
- [41] J. L. Kerwin, A. R. Tuininga, L. H. Ericsson, Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 35 (1994) 1102–1114.
- [42] K.Y. Tserng, & R. Griffin, Quantification and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, 323 (2003) 84–93.
- [43] N. Schaeren-Wiemers, P. van der Bijl, M. E. Schwab, The UDP-galactose: Ceramide galactosyltransferase: Expression pattern in oligodendrocytes and Schwann cell during myelination and substrate preference for hydroxyceramide. *Journal of Neurochemistry*, 65 (1998) 2267–2278.
- [44] K. Karlsson, K. Nilsson, B.E. Samuelsson, G.O. Steen, The presence of hydroxy fatty acids in sphingomyelins of bovine rennet stomach. *Biochimica et Biophysica Acta*. 176 (1969), 660-663
- [45] A. Kihara, Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in Lipid Research*. 63 (2016) 50–69.
- [46] E. Shimada, K. Aida, T. Sugawara, T. Hirata, Inhibitory effect of topical maize glucosylceramides on skin photoaging in UVA-irradiated hairless mice. *Journal of Oleo Science*. 60 (2011) 321–325
- [47] J.F. Bouhours, & H. Guignard, Free ceramide, sphingomyelin, and glucosylceramide of isolated rat intestinal cells. *Journal of Lipid Research*. 20: (1979) 897-907.

- [48] Y. Uchida, H. Hama, N.L. Alderson, S. Douangpanya, Y. Wang, D.A. Crumrine, P.M. Elias, W.M. Holleran, Fatty acid 2-hydroxylase, encoded by FA2H, accounts for differentiation-associated increase in 2-OH ceramides during keratinocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007), 13211-13219.
- [49] H. Maier, M. Meixner, D. Hartmann, R. Sandhoff, L. Wang-Eckhardt, I. Zoller, V. Gieselmann, M. Eckhardt, Normal fur development and sebum production depends on fatty acid 2-hydroxylase expression in sebaceous glands. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (2011), 25922-25934.
- [50] M. Kyogashima, K. T. Aritomi, T. Aoyama, A. Yusa, Y. Goto, K. T. Koizumi, H. Ito, T. Murate, R. Kannagi, A. Hara, Chemical and Apoptotic Properties of Hydroxy-Ceramides Containing Long-Chain Bases with Unusual Alkyl Chain Lengths. *Journal of Biochemistry*. 144 (2008) 95-106.
- [51] C. E. Chalfant, S. Spiegel, Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *Journal of Cell Science*. (2005) 118 (20): 4605–4612.
- [52] D. S. Wijesinghe, A. Massiello, P. Subramanian, Z. Szulc, A. Bielawska, C. E. Chalfant, Substrate specificity of human ceramide kinase. *Journal of Lipid Research*. 46 (2005) 2706-2716.

謝辞

本研究の遂行並びに論文作成に際し、終始適切な御指導御鞭撻を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域食料科学分野（前徳島大学大学院医歯薬研究部衛生薬学分野 准教授）の田中保教授に心より感謝いたします。

また、本研究の遂行の機会を与えていただき多大なる御支援を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部衛生薬学研究室小暮健太郎教授に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、御協力を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部の Hanif Ali 博士、栗飯原睦美先生、林順司先生、川上竜巳先生、金沢大学医薬保健研究域の盛重純一先生、徳島大学薬学部土屋浩一郎教授、徳島大学大学院医歯薬研究部佐野茂樹教授、中尾允泰先生、安田女子大学薬学部徳村彰教授、徳島大学薬科学教育部衛生薬学研究室出身で現在京都薬科大学衛生科学分野の森戸克弥先生、徳島大学薬学部衛生薬学研究室卒業生の喜田由美香(旧姓:田畑)様、高岸永里奈(旧姓:伊賀)様、柿内直哉様はじめ卒業生、在学生の皆様に厚く御礼申し上げます。