

# キヒトデ (*Asterias amurensis*) 由来セレブロシドの構造とその特徴的な構造分布

## Structure and characteristic structure distribution of cerebrosides derived from starfish *Asterias amurensis*

山口亮介<sup>1)</sup>、蟹江善美<sup>2)</sup>、蟹江治<sup>1,2,3)</sup>、清水 佳隆<sup>1,2,3)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、<sup>2)</sup>東海大学工学部生命化学科、<sup>3)</sup>東海大学先進生命科学研究所

Ryosuke Yamaguchi<sup>1)</sup>, Yoshimi Kanie<sup>2)</sup>, Osamu Kanie<sup>1,2,3)</sup>, Yoshitaka Shimizu<sup>1,2,3)</sup>

<sup>1)</sup> Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University

<sup>2)</sup> Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

<sup>3)</sup> Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

### [要旨]

セレブロシドは、グルコースあるいはガラクトース残基を有するモノグリコシルセラミドであり、そのセラミド部分の構造の違いにより様々な分子種が存在する。セレブロシドは化粧品や食品の添加物として利用されており、産業利用されているセレブロシドのほとんどが植物由来である。一方、キヒトデは植物原料に比べて高い比率でセレブロシドを含むことが知られており、セレブロシドの供給原料として有望である。これまでにキヒトデのセレブロシドの主要な構造は解析されているが、その全体像は明らかにされていない。そこで我々はキヒトデから得たセレブロシドを ODS-HPLC で構造毎に分画し、LC-MS、GC-MS、MS/MS、NMR によりキヒトデに含まれるセレブロシドの全構造を解析した。その結果、セレブロシドのセラミド部分を構成する脂肪酸とスフィンゴシンの組み合わせには特徴的なパターンがあることを明らかとした。

### [Abstract]

Cerebrosides are mono-glycosylated ceramides bearing either a glucose or galactose residue, which exist in various molecular species depending on the differences in the structure of the ceramide part. Cerebrosides are used as excipients in cosmetics and food, and almost all cerebrosides used in the industry are derived from plants. Nonetheless, *Asterias amurensis* is known to contain a higher ratio of cerebrosides than other plants, thus it is a promising source of raw material for obtaining cerebrosides. The structures of major *Asterias amurensis* cerebrosides have been previously analyzed; however, their overall profile has not been elucidated. Therefore, we fractionated each cerebroside obtained from *Asterias amurensis* using ODS-HPLC chromatography, and then fully characterized them by LC-MS, GC-MS, MS/MS, and NMR analyses. As a result, it was revealed that the arrangement of the fatty acids and sphingosine that constitute the ceramide part of these cerebrosides exhibit a characteristic pattern.

### [Key Words]

Cerebroside, Glucosylceramide, Starfish *Asterias amurensis*, Structure distribution

### 1. はじめに

セレブロシド (図 1) はスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid) の一種でグルコースあるいはガラクトース残基を有するモノグリコシルセラミドである。セレブロシドの構成成分であるセラミド (N-アシルスフィンゴシン) は長鎖アミノアルコールであるスフィンゴイドに脂肪酸が結合した最もシンプルなスフィンゴ脂質

である。セレブロシドは細胞膜や、組織を構成する成分の一つとして生物界に普遍的に存在しており、結合する

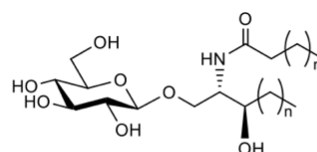


図 1. セレブロシド (グルコシルセラミド) の一般的な構造

単糖の違いに加え、セラミド部分の脂肪酸あるいはスフィンゴイド塩基の炭素数や、二重結合の数などが異なる多くの分子種が存在する。セラブロシドの単糖部分がグルコースのグルコシルセラミド (GlcCer) は細胞内ではセラミド-グルコース転移酵素によって UDP-グルコースとセラミドから合成され、GlcCer は、 $\beta$ -グルコセラミダーゼによりグルコースとセラミドに分解される。セラミドは表皮において皮膚の内部を保護するバリア機能に重要な役割を果たしている<sup>1-4)</sup>。また、セラブロシドの経口摂取により皮膚のバリア機能や保湿効果の向上などが報告されている<sup>5-9)</sup>。セラブロシドの産業利用としては主にローション等に保湿目的で配合され、化粧品添加物として利用されている。これまで天然由来のセラブロシドは主に牛脳を原料として抽出精製されてきたが、牛脳抽出物はいわゆる「狂牛病」の原因物質であるプリオンの混入の可能性を否定出来ないことから、現在はダイズ、コメ、コンニャク、トウモロコシなど植物由来のセラブロシドが用いられている<sup>10,11)</sup>。しかしながら、これらの植物原料はセラブロシド含有量が少なく、高純度化が困難であり、製品価格が極めて高価になることがセラブロシドを産業へ応用展開する際の妨げとなっている。

キヒトデ (*Asterias amurensis*) はホタテ養殖などの漁場では害獣であり、年間数万トンが廃棄されている。キヒトデの内臓はセラブロシドの含有量が高いことが知られており<sup>12)</sup>、セラブロシドの供給源として注目されている。これまでにキヒトデ由来セラブロシドの主要な構造<sup>13-16)</sup>、あるいはセラブロシドの脂肪酸とスフィンゴイド塩基を別々に構造解析した報告はなされているが<sup>17-19)</sup>、セラブロシドのセラミド部分の構造は多様でありその詳細については明らかではない。キヒトデのセラブロシドを

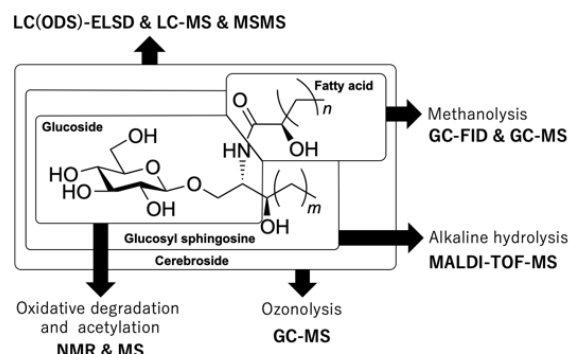


図2. セラブロシドの構造解析戦略の概要

機能性食品や化粧品等の各種分野で応用するにあたり、その構造と組成を明らかにし、原料として利用価値を評価する必要がある。そのため本研究ではキヒトデの内臓からセラブロシドを抽出精製後、HPLC、GC、MS、NMRなどの各種分析機器を駆使することによって構造を解析した。本論文では構造解析の概略と解析によって明らかとなったキヒトデ由来セラブロシドの構造上の特徴に関して紹介するが、それらの詳細に関しては我々の研究報告<sup>20)</sup>を参照されたい。

## 2. 実験

本研究で行なったセラブロシドの構造解析戦略の概要を図2に示す。具体的には、抽出精製によって得られたセラブロシドは蒸発光散乱検出器 (ELSD) で検出する ODS カラムを用いた HPLC により、構造に基づき分離した。各溶出ピークを分画して ESI-MS および MS/MS 解析で構造を推定した。また、脂肪酸部分の分析ではセラブロシドを 5% 塩酸-メタノール試薬を用いて誘導体化後、メチルエステル化した脂肪酸を GC-MS で定性、あるいは GC-FID

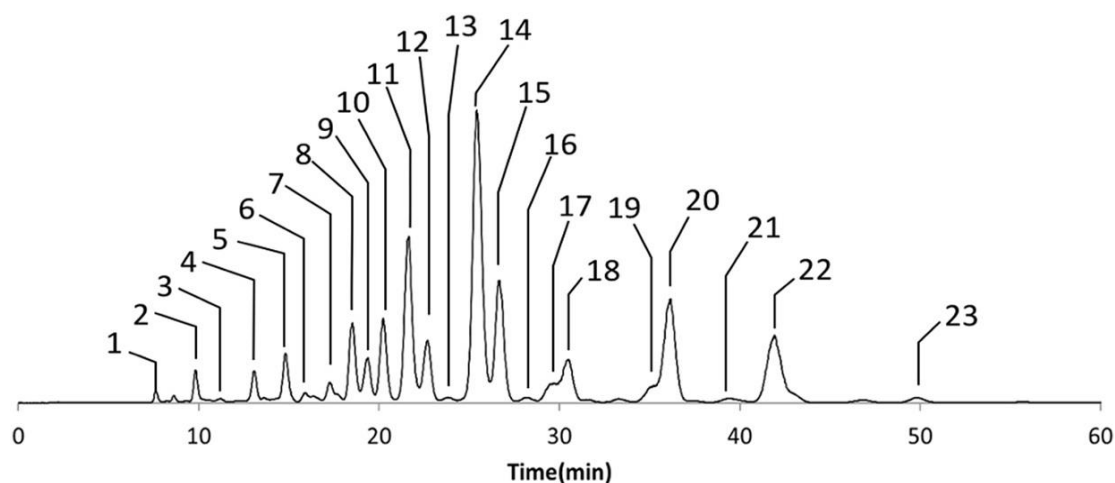


図3. キヒトデ (*Asterias amurensis*) から得られたセラブロシドの LC-ELSD クロマトグラム

表 1. LC-ELSDで得られた各溶出ピークに含まれるセブレロシドの構造とLogP値

| Peak number | structure | Cerebroside<br>Sphingoid base/<br>Fatty acid | LogP                 |
|-------------|-----------|--|----------------------|
| 1           |           | t22:2/h14:0                                  | 7.92                 |
| 2           |           | t22:2/h15:0                                  | 7.58                 |
| 3           |           | t22:2/h16:0                                  | 8.81                 |
| 4           |           | d18:3/h14:0                                  | 6.61                 |
| 5           |           | d18:2/h14:0<br>d18:3/h15:0                   | 6.97<br>7.60         |
| 6           |           | d18:3/h16:0                                  | 7.56                 |
| 7           |           | d18:2/h16:0<br>br18:3/h16:0<br>t22:1/h14:0   | 7.86<br>7.74<br>8.29 |
| 8           |           | br18:3/h17:0                                 | 8.23                 |
| 9           |           | d22:2/h14:0<br>t22:1/h15:0                   | 8.59<br>9.56         |
| 10          |           | br18:3/h18:0                                 | 8.63                 |
| 11          |           | d22:2/h15:0<br>t22:1/h16:0                   | 9.2<br>8.2           |

| Peak number | structure | Cerebroside<br>Sphingoid base/<br>Fatty acid | LogP           |
|-------------|-----------|--|----------------|
| 12          |           | d22:2/h15:0                                  | 9.2            |
| 13          |           | d22:1/h14:0                                  | 9.11           |
| 14          |           | d22:2/h16:0                                  | 9.64           |
| 15          |           | d22:2/h16:0                                  | 9.64           |
| 16          |           | d22:1/h16:0<br>d18:3/h22:1                   | 10.00<br>9.81  |
| 17          |           | d18:2/h22:1                                  | 10.17          |
| 18          |           | d18:3/h23:1                                  | 10.25          |
| 19          |           | d18:2/h23:1                                  | 10.61          |
| 20          |           | d18:3/h24:1                                  | 10.69          |
| 21          |           | d18:1/h23:1                                  | 10.97          |
| 22          |           | br18:3/h24:1<br>d18:2/h24:1                  | 10.94<br>11.06 |
| 23          |           | d18:1/h24:1<br>br18:3/h25:1                  | 11.42<br>11.43 |

で定量した。スフィンゴイド部分はアルカリ分解で脂肪酸を切断してMALDI-TOF-MSで構造を決定した。セラミド部の二重結合の位置はオゾン分解後GC-MSで分析した。

また、キヒトデ由来セレブロシドの糖構造および立体配置をNMRで解析することは、セラミド部の構造が多様なため解析が困難であった。そのため、セレブロシドのグリコシドの立体配置を保持してセラミド部と分離することができる酸化分解を行った。得られた化合物はアセチル化後<sup>1</sup>H-NMR解析した。最終的に決定されたセレブロシドの各構造に関してMarvin sketchを用いLogP値を算出することで物性評価を行った。

### 3. 結果

ODS-HPLCによる解析ではキヒトデから得たセレブロシドは20種類以上の溶出ピークとして検出された(図3)。これらの溶出ピーク毎に構造解析を行うことで、キヒトデ由来セレブロシドの全構造を決定した。NaClOを用いた酸化分解反応による単糖の解析では検出された全ての分子種の単糖が $\beta$ -Glcであることが確認された。また、分子種全体の内でも多くを占めていたのは、スフィンゴイド塩基部分がd22:2で脂肪酸部分がh16:0、スフィンゴイド塩基部分がd18:3で脂肪酸部分がh24:1の分子種であった(図3および表1)。

全てのセレブロシド構造を決定したことによって、セレブロシドを構成するセラミド構造は脂肪酸部分とスフィンゴイド塩基部分の長さの組み合わせが特徴的な3つの群に分類できることを見出した。すなわち1) C22:1などの比較的長いスフィンゴシンの場合、脂肪酸の長さはC16以下に制限された。2) スフィンゴシンの長さが典型的なC18の場合には脂肪酸の長さはC23よりも大きいことが観察された。3) スフィンゴシンと脂肪酸が共に短い組み合わせは観察されたが、興味深い事にスフィンゴシンと脂肪酸の両方が長い組み合わせは確認できなかった。

### 4. 考察

構造解析の結果から明らかとなったヒトデのセレブロシドのセラミド部分における特徴的な構造選択は、セラミド-グルコース転移酵素の基質特異性やセラミド合成酵素の基質特異性に依存していると考えられる。これらの酵素反応における基質特異性は哺乳動物では詳細に研究されているが<sup>21-26)</sup>、ヒトデではほとんど知られておらず、今後の研究によりその詳細が明らかにされることが期待される。

セレブロシドは糖部分に4つの水酸基があることから、

セレブロシドはセラミドと比較してより親水的であり、その保湿効果は化粧品用途として有用性が認められている<sup>27)</sup>。本研究で解析されたキヒトデ由来セレブロシドの全構造から分子種ごとのLogP値を求めたところ、6.61から11.43の範囲に分布し、セレブロシドのほぼ80%が9から11の範囲に入っていることが確認された(表1)。現在、化粧品に用いられている植物由来セレブロシドの主要な構造におけるLogP値は、大豆で7.86(d18:2/h16:0)、コンニャクで8.75(d18:2/h18:0)、米とトウモロコシで9.64(d18:2/h20:0)であり、同程度のLogP値を示すキヒトデ由来セレブロシドは化粧品原料として他の植物由来セレブロシドと同様の効果があると考えられる。

キヒトデ由来セレブロシドをリポソームやミセルとして化粧品や食品に利用するためには、その物理化学的性質を知ることが必要である<sup>28)</sup>。また、セレブロシドは構造の違いにより様々な生理的活性を持つことが明らかとされている。これらのことから、本研究で得られた成果はキヒトデのセレブロシドを産業応用するための重要な知見になると思われる。

### 5. 引用文献

- [1] W. M. Holleran *et al.*, FEBS Lett. 580 (2006) 5456.
- [2] R. Jennemann *et al.*, J. Biol. Chem. 282 (2007) 3083.
- [3] Y. Mizutani *et al.*, Biochimie 91 (2009) 784.
- [4] J. van Smeden *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1841 (2014) 295.
- [5] K. Miyanishi *et al.*, Allergy 60 (2005) 1454.
- [6] K. Tuji *et al.*, J. Dermatol. Sci. 44 (2006) 101.
- [7] T. Uchiyama *et al.*, J. Health Sci., 54(5) (2008) 559.
- [8] J. Ishikawa *et al.*, J. Dermatol. Sci. 56 (2009) 216.
- [9] R. Ideta *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem. 75 (2011) 1516.
- [10] T. Sugawara *et al.*, Lipids 34 (1999) 1231.
- [11] N. Takakuwa *et al.*, Bioresour. Technol. 96 (2005) 1089
- [12] L. R. Björkman *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 270 (1972) 260.
- [13] R. Higuchi *et al.*, Liebig's Ann. (1996) 593-599.
- [14] T. Maruta *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 53 (2005) 1255.
- [15] T. Sugawara *et al.*, J. Oleo Sci. 59(7) (2010) 387.
- [16] T. Park *et al.*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 25 (2011) 572.
- [17] A. Irie *et al.*, J. Biochem. 107 (1990) 578.
- [18] S. Kawatake *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 50(8) (2002) 1091.
- [19] A. K. M. A. Shah *et al.*, J. Oleo Sci. 57(9) (2008) 477.

- [20] R. Yamaguchi *et al.*, *Carbohydrate Research*, 473 (2019) 115.
- [21] M. Levy *et al.*, *IUBMB Life*. 62 (5) (2010) 347.
- [22] T. D. Mullen *et al.*, *Biochem. J.* 441 (2012) 789.
- [23] G. D'Angelo *et al.*, *FEBS J.* 280 (2013) 6338.
- [24] T. D. Butters *et al.*, *Tetrahedron Asym.* 11 (2000) 113.
- [25] A. H. Merrill *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277 (29) (2002) 25843.
- [26] H.-U. Humpf *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19060.
- [27] Viswanadhan, V. N. *et al.*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29 (1989) 163.
- [28] L. Du *et al.*, *Food Funct.*, 7 (2016) 1904.

## 6. 本研究に関連する業績

### 【論文発表】

- 1) R. Yamaguchi *et al.*, *Carbohydrate Research*, 473, 115 (2019).

### 【学会発表】

- 1) 風巻貴士、島田真美、樺澤桃子、蟹江善美、蟹江治、小島直也、清水佳隆：経口投与型 DDS 担体としての GC-Lip. の利用、第 34 回日本 DDS 学術集会(長崎)、2018 年 06 月.
- 2) 山崎素美、笹川昇、清水佳隆：ヒトデ由来グルコシルセラミドが *C.elegans* の寿命に与える影響、第 37 回日本糖質学会年会 (仙台)、2018 年 08 月.
- 3) 山口亮介、蟹江善美、清水佳隆、蟹江治：キヒトデ由来 GlcCer による Caco-2 細胞膜流動性変化、第 37 回日本糖質学会年会 (仙台)、2018 年 08 月.
- 4) 山崎素未、笹川昇、清水佳隆：ヒトデ由来グルコシルセラミドの *C.elegans* における生理作用の検討、第 5 回 FCCA シンポジウム、2018 年 08 月.
- 5) 山口亮介、蟹江善美、清水佳隆、蟹江治：キヒトデ由来セレブロシド含有リポソームによる Caco-2 細胞の膜流動性への影響、第 5 回 FCCA シンポジウム、2018 年 08 月.