

皮膚の糖脂質

山口労災病院

東京都臨床医学総合研究所

浜 中 すみ子 ・ 鈴木 實

Human epidermis gave two glycolipid bands that migrated faster than glucosylceramides and two bands that migrated like glucosylceramide and galactosylceramide, respectively, on TLC. The two faster migrating glycolipids (GL-I and GL-II), which exhibited alkali-lability, were purified by conventional DEAE and silica gel column chromatographies, and further by HPLC on a silica gel column. Structure determination of the two components, named GL-I 3 and GL-II 3, which were finally purified from GL-I and GL-II, respectively, by HPLC on a reversed column, was performed by means of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, fast atom bombardment mass spectrometry, and component analysis involving GLC-mass spectrometry. GL-I 3 was determined to be a mixture of glucosyl β 1-N-(ω -O-linoleoyl) triacontanoyl and -dotriacontanoyl-eicosasphingene, and one of the two components of GL-II 3 was determined to be glucosyl β 1-N-(ω -O-linoleoyl) triacontanoyl-trihydroxeicosasphingene. GL-I 3 and GL-II 3 were the major components of GL-I and GL-II, respectively, and both the latter contained additional four components, which were heterogeneous as to the ceramide portion. This paper reports the structures of acylglucosylceramides isolated from human epidermis together with $^1\text{H-NMR}$ spectra and mass spectra demonstrating their molecular weights. The structure of molecular species containing trihydroxysphingosine having a double bond is novel.

はじめに

1929年, BurrとBurrによって初めて必須脂肪酸の概念が提唱された¹⁾。ラットを無脂肪食で飼育すると, 皮膚の落屑, 体重減少, 不妊, 水分消費の増加, 尿量減少を生じ, 易感染性となり死に至る。これらの症状は ω -6不飽和脂肪酸(リノール酸, γ -リノレン酸, ジホモ γ -リノレン酸, アラキドン酸)の投与で著しく改善されることから, 生存に必須の脂肪酸の存在することが認識された。その後, 臨床的に必須脂肪酸欠乏症が注目されるようになったのは1970年代に高カロリーの非経口的栄養補液(経静脈投与)が盛んに行なわれるようになってからである²⁾。

臨床症状はリノール酸を50%含む大豆油を原料とした乳化脂肪の投与で改善された。必須脂肪酸欠乏時には多くの症状が報告されている³⁾が⁴⁾, 臨床的にとくに注目されるのは皮膚症状, 易感染性⁵⁾, 血小板数減少およびその機能低下, 体重増加不良などがあげられる⁶⁾。これらの症状のうち体重減少, 尿量減少, 水分消費の増加は皮膚からの水分漏出の結果生じる二次的変化であり, 水分漏出はリノール酸を外用するだけでも阻止できることが明らかとなると, 皮膚に水分漏出を防ぐ保護バリアーが存在するのではないかと想定されるようになった⁷⁾。

Glycolipids of Mammalian Epidermis

Sumiko Hamanaka · Minoru Suzuki†

1. 皮膚脂質の研究

人体の約70%を占める水分を保持し、紫外線や異物・微生物などから人体を保護することは皮膚の重要な機能である。皮膚が基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞と分化し、最終的に角質細胞となって角層を形成する目的の1つは、角層で水分保護バリアー (transepidermal water permeability barrier) をつくることである(図1)⁶⁾。角層には細胞間に脂質の層状構造 (intercellular lipid lamellae) が観察され、この脂質構造がバリアーの本体であろうと考えられている⁷⁾。角層を構成する脂質はトリグリセリド、セラミド、ステロール、ステロール/ワックスエステル、アルカン、スクワレンであり、リン脂質や糖脂質はほとんど含まれていない(表1)⁸⁾。角層の脂質はセラミドを豊富に含み、しかもセラミドの分子種は7種と多様である。もっとも特徴的なセラミドはアシルセラミドであり、酸アミド結合脂肪酸が ω -ヒド

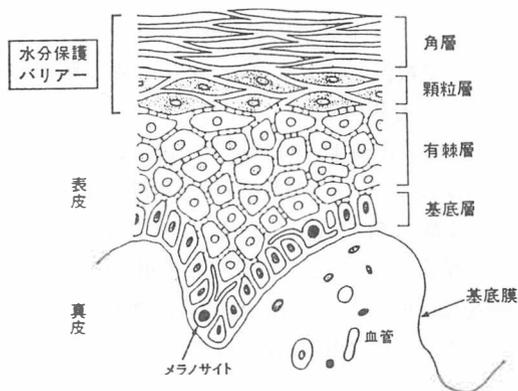


図1 皮膚の構造
基底層、有棘層、顆粒層、角層は、それぞれ基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞よりなる。〔標準皮膚科学(医学書院)を一部改訂〕

表1 ヒト表皮細胞の脂質組成

脂質	基底層/ 有棘層	顆粒層	角層
極性脂質	44.5	25.3	4.9
コレステロール硫酸塩	2.6	5.5	1.5
中性脂肪	51.0	56.5	77.7
遊離ステロール	11.2	11.5	14.0
遊離脂肪酸	7.0	9.2	19.3
トリグリセリド	12.4	24.7	25.2
ステロール/ワックスエステル	5.3	4.7	5.4
スクアレン	4.9	4.6	4.8
n-アルカン	3.9	3.8	6.1
スフィンゴ脂質	7.3	11.7	18.1
グルコンルセラミド	3.5	5.3	trace
セラミド	3.8	8.8	18.1
計	99.1	101.1	99.3

ロキシ脂肪酸で、その ω 末端にリノール酸がエステル結合をしている⁹⁾。

このアシルセラミドは脂質を層状に構築するのに必要であろうと考えられている。バリアーを形成する脂質がどこから由来するのか明らかにするために緻密な電顕的観察が続けられた結果、顆粒細胞に存在する小器官である層板顆粒 (lamellar body, keratinosome, cementosome, Odland body, membrane coating granule などの名称でよばれる) で生成されることが明らかとなった¹⁰⁾。層板顆粒は100~300nmの球形ないし卵形の顆粒で、生体膜に包まれ、内部にdiscと表現される層状構造をもつ(図2)¹¹⁾。内容物はクロロホルム-メタノール処理により消失すること¹²⁾、水分の保持能力が衰えた皮膚では層板顆粒は空虚となること¹³⁾から内容物は脂質であり、水分保護に重要な役割を担うことが推定された。電顕的に、層板顆粒がゴルジ体から細胞膜へと移動し、膜と融合したのち内容物を細胞外の角層直下に放出するのが観察された。放出された層板構造物は角層細胞間に伸展し、層状脂質となる(図3)¹⁴⁾。

* 1 ①肉眼的所見：成長停止，体重減少，皮膚乾燥，落屑，肥厚，脱毛，生殖異常，血尿，創傷治癒遅延，易感染性など。②顕微鏡的所見：皮膚の角質異常，肝の脂肪浸潤，腎壊死など。③生理・生化学的所見：水分消費量や基礎代謝の増加，血小板減少症，血清および各臓器脂肪酸構成の変化，細胞膜透過性の変化，ミトコンドリア細網内皮系などの機能変化など。

* 2 必須脂肪酸欠乏時には肺炎に罹患しやすい。

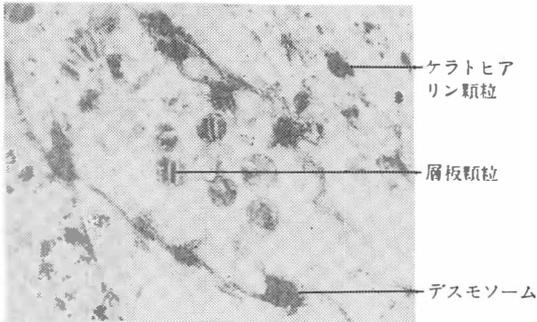


図2 顆粒細胞の電顕像
層板顆粒を示す。〔Dermatology, Sandoz 著
(Medical Publications)より抜粋〕

表皮脂質の分析が進むにつれ、顆粒層で糖脂質が増加すること(表1)、さらに層板顆粒にはめずらしい糖脂質アシルグルコシルセラミドが豊富に存在し、角層に至ると糖脂質が消失することが明

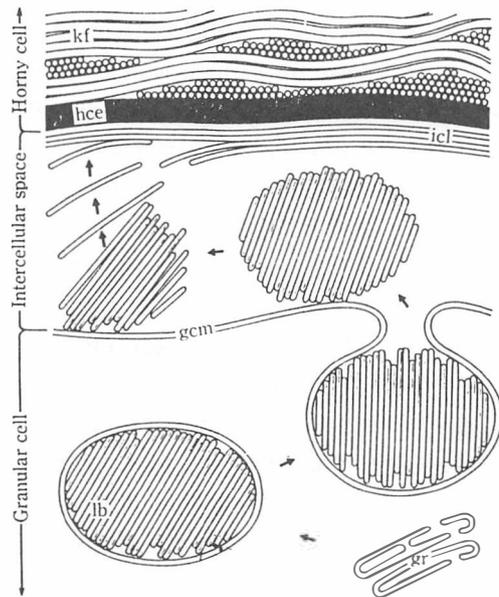


図3 水分保護バリアーとしての脂質構造が形成される過程の電顕的模式図¹⁴⁾
Granular cell : 顆粒細胞, Intercellular space : 細胞間隙, Horny cell : 角質細胞, gr : ゴルジ体, gcm : 顆粒細胞膜, icl : 細胞間層状脂質, hce : 角質細胞膜, kf : ケラチンフィラメント, lb : 層板顆粒。

らかとなった。このことから、表皮では糖脂質は細胞分化に従って著明に変化し、また、水分保護バリアーである層状脂質に形成するために、まずアシルグルコシルセラミドが合成され、ついで糖が切断されアシルセラミドとなることにより、重要な脂質成分の1つが供給されていると考えられる。そこで、表皮糖脂質の解析、とりわけアシルグルコシルセラミドの解析が注目された。

2. 表皮糖脂質の構造研究

Grayはブタとヒト表皮から糖脂質を単離・構造解析を行ない、各種グルコシルセラミドの構造解析に関して報告した¹⁵⁾。これらグルコシルセラミドはシリカゲルTLC上で4成分に分離され、このなかでもっとも非極性な成分はグルコースの3位に脂肪酸を有するアシルグルコシルセラミドであることを示した。そしてこの脂肪酸はリノール酸が主で、ブタで77.4%、ヒトで56.2%を占めることを報告した¹⁶⁾。1983年、Downingらのグループはブタ表皮を用いて追試を行ない、その結果、セラミドを構成する酸アミド結合脂肪酸はGrayの報告とは異なり ω -ヒドロキシ脂肪酸であることを報告した¹⁷⁾。

2年後の1985年、同グループは、このアシルグルコシルセラミドの構造解析を再度行なって、リノール酸は糖ではなく ω -ヒドロキシ脂肪酸とエステル結合をしていることを初めて明らかにした¹⁸⁾。時をほぼ同じくしてBowserらのグループがブタ表皮から¹⁹⁾、内田らがモルモット表皮から²⁰⁾、ほぼ同様の構造のアシルグルコシルセラミドを検出し報告した。他にラット²¹⁾、ウマ²²⁾のアシルグルコシルセラミドも解析された。

これらの研究結果から、哺乳類の表皮糖脂質には以下の特徴が認められた(図4)。

①動物種属間に差は認められない。②糖脂質は薄層クロマト上で4成分検出され、これらはすべて糖としてグルコースをもつ。③主成分はアシルグルコシルセラミドであり、その構造はグルコー

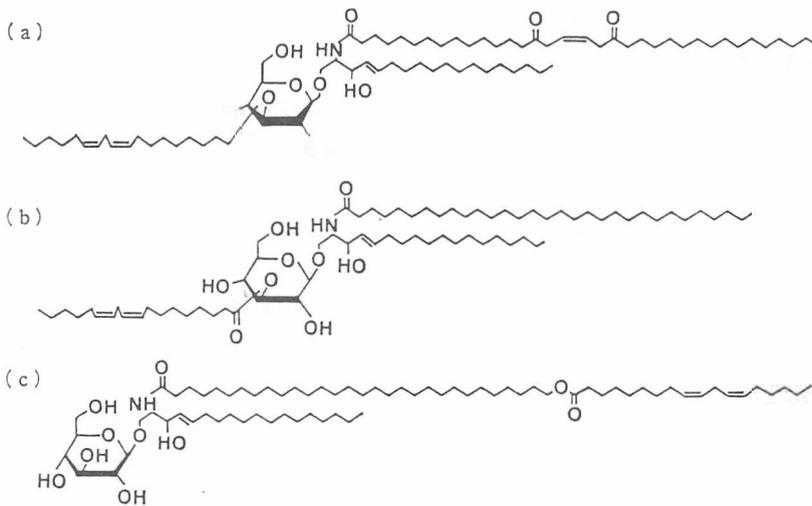


図4 表皮アシルグルコシルセラミドの構造研究(哺乳類)

- (a) 1-(3'-O-acyl)-β-glucosyl-N-dihydroxypentatriacontadienoyl-sphingosine. [ヒト, ブタ](Gray, G. M., White, R. J., Majer, J. R., 1978)
- (b) ω-ヒドロキシ脂肪酸の同定。[ブタ](Wertz, P. W., Downing, D. T., 1983), [ラット](Wertz, P. W., Cho, E. S., Downing, D. T., 1983)
- (c) リノール酸はω-ヒドロキシ脂肪酸のω末端にエステル結合。[ブタ](Bowser, P. A., Nugteren, D. H., White, R. J., Houtsmuller, U. M. T., Protty, C., 1985; Abraham, W., Wertz, P. W., Downing, D. T., 1985), [モルモット](Uchida, Y., Iwamori, M., Nagai, Y., 1988)

ス1mol, スフィンゴシンにきわめて長鎖のω-ヒドロキシ脂肪酸が酸アミド結合を形成したセラミド1mol, さらにそのω-ヒドロキシ脂肪酸のω末端に脂肪酸1molがエステル結合を形成している糖脂質である。④エステル結合脂肪酸としては, リノール酸の含有率が高い。

②項に関して, 筆者らはブタ表皮に少量のガラクトシルセラミドが存在することを認めている。筆者らは基底層を含む表皮を真皮から分離することに成功し, そこから抽出した脂質を解析に使用した。基底層にはメラノサイトが存在しており, ガラクトシルセラミドはメラノサイトから由来したと考えることができる²³⁾。次に筆者らは, ヒト表皮についての解析がGray以来報告がないので, ブタで成功した表皮調製法を用いてヒト表皮を調製し, 糖脂質を分析することにした。

3. ヒト表皮の糖脂質エピデルモシドの構造解析²⁴⁾

ヒト表皮糖脂質をシリカゲルTLCで分析するとセレブロシドに相当する位置に4成分の糖脂質が認められた(図5)。シリカゲルを用いたHPLC

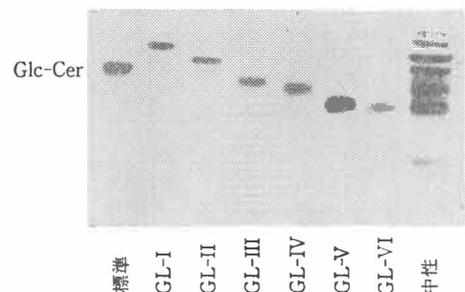


図5 表皮糖脂質の薄層クロマトグラム
Glc-Cer: グルコシルセラミド, GL-I ~ VI: ヒト表皮糖脂質, 中性: ヒト表皮糖脂質の中性画分。

で分離すると6成分に分けられた。アルカリ処理を行なってTLCで分析してみると、非極性の2成分(Rf値の大きい成分をGL-I, 小さい成分をGL-IIとする)はRf値のより小さい糖脂質となった(図6)。その際, GL-IとGL-IIはそれぞれ脂肪酸を遊離していた。遊離脂肪酸はリノール酸であり, 他の脂肪酸は検出されなかった。GL-IとGL-IIの構成糖はおのこのグルコース1糖であった。すなわちヒト表皮糖脂質には2成分のアシルグルコシルセラミドが存在し, エステル結合脂肪酸はリノール酸であると結論された。

GL-I, GL-IIをODSカラムを用いたHPLCで精製したところ, それぞれ大きく5成分に分離された。HPLCクロマトグラムから各成分の構成比を算出し, GL-Iの主成分であるGL-I3とGL-IIの主成分であるGL-II3について構造解析を行なった。GL-I3およびGL-II3の負イオンFAB(高速原子衝撃)マススペクトルでは, 擬似分子イオン($[M-H]^-$)が m/z 1200および1226(図7A), m/z 1216および1242(図7C)にそれぞれ明瞭に検出されている。さらにマトリックスである3-ニトロベンジルアルコール(NBA)が分子に付加したことに起因するイオン($[M+NBA]^-$)も m/z 1354および1380(図7A),

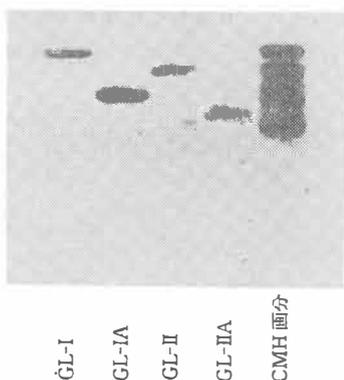


図6 アルカリ処理をほどこしたGL-IとGL-IIの薄層クロマトグラム
GL-I A: アルカリ処理後のGL-I, GL-II A: アルカリ処理後のGL-II。CMH画分: ヒト表皮糖脂質のセラブロシド画分。

m/z 1370および1396(図7C)にそれぞれ観察されている。このことからGL-I3およびGL-II3はそれぞれ, 分子量1201および1227と, 1217および1243の混合物であることがわかった。

次に, アルカリ処理後のFABマススペクトルでは($[M-H]^-$)および($[M+NBA]^-$)に起因するピークが262amuシフトした形(m/z 938および964と m/z 1092および1118(図7B), m/z 954および980と m/z 1108および1134(図7D)]で出現している。アルカリ処理後のこの262amuの質量差は, リノール酸脱離の質量差に完全に一致している。

これらGL-I3およびGL-II3の 1H -NMRスペクトルでは, とともに共通して出現しているシグナル, すなわちシグナルe (2.30ppm: エステル結合カルボニル基の α -メチレンプロトン), f (2.77ppm: 二重結合間のメチレンプロトン), g (4.06ppm: エステル結合に隣接したメチレンプロトン)が観察されている(図8)。常法に従ってアルカリ処理を施し, ODSカラムで精製したあとのそれぞれの 1H -NMRスペクトルでは, シグナ

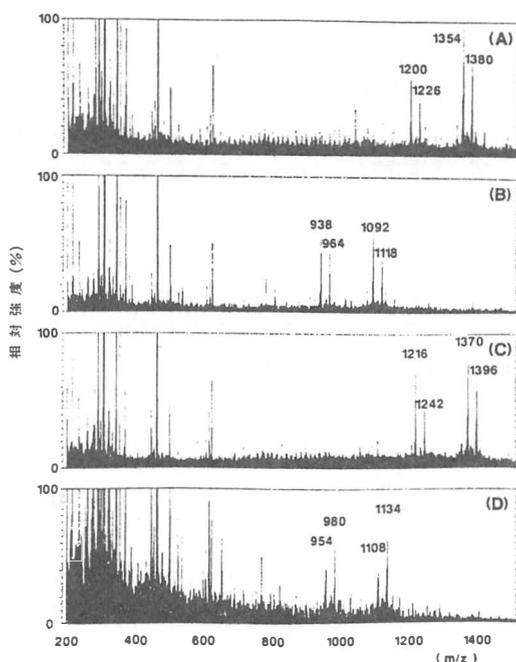


図7 負イオンFABマススペクトル
(A)GL-I3 (B)アルカリ処理後のGL-I3, (C)GL-II3, (D)アルカリ処理後のGL-II3。

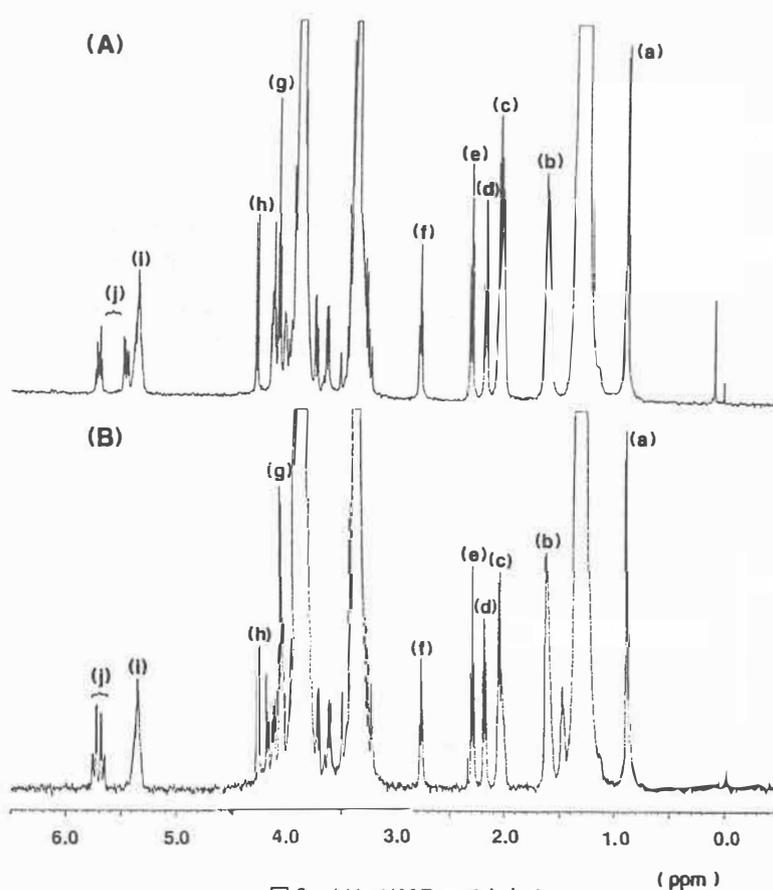


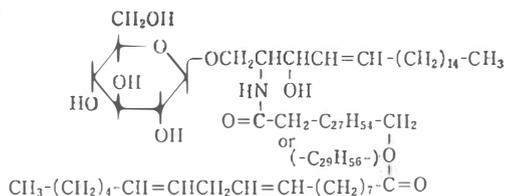
図8 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
(A) GL-I3, (B) GL-II3.

ル e と f は消失し、かつ g は 3.63 ppm に高磁場シフトする。このことは各アシルグルコシルセラミドがアルカリ処理により脂肪酸すなわチリノール酸を遊離した結果 ω -ヒドロキシ基が新たに生成していることを示している。またアルカリ処理によりシグナル a では 2 個のメチル基 (6H) が 1 個分 (3H) 減少していることも上述の結果を支持している。さらにアルカリ処理によりシグナル i の強度はそれぞれ約 25% 減少したことから、シス二重結合由来のプロトンの 75% がリノール酸由来で、残り 25% が酸アミド結合の ω -ヒドロキシ脂肪酸由来であろうと考えられた。GL-I3 のシグナル j は、スフィンゴシンのトランス二重結合由来であるものの、一方 GL-II3 における j は上述のものと異なり、フィトスフィンゴシンに存在するト

ランス二重結合由来であろうと考えられた。

次に、GLC/MS を用いてセラミド側の構造解析を行なった。アシルグルコシルセラミドのセラミドを構成する ω -ヒドロキシ脂肪酸は、前述の FAB マススペクトルから得られた分子量を考慮すると、きわめて長鎖なものでありと考慮された。そこで TMS 誘導体に比べ安定で、かつ低温で分析可能なメチル誘導体として GLC/MS 分析を行なった。加えて、このメチル誘導体のマススペクトルは、特徴的なフラグメントイオンを生成することが知られており、解析が容易になると予測された。アルカリ処理後の GL-I3 および GL-II3 の GLC/MS 分析の結果、GL-I3 のスフィンゴシン塩基は d20:1、酸アミド結合 ω -ヒドロキシ脂肪酸は C30:0 および C32:1 と同定された。

GL-I3 :



GL-II3 :

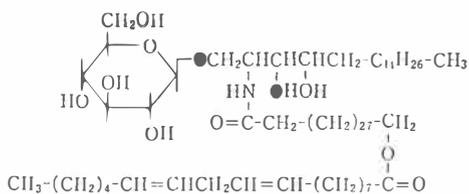


図9 ヒト表皮アシルグルコシルセラミド(エピデルモシド)の構造

このことは、GL-I3のセラミド部分はd20:1-C30:0-C18:2およびd20:1-C32:1-C18:2の2種類の存在を示しており、この結果は前述のFAB/MSの結果ときわめてよく一致している。一方、GL-II3では、スフィンゴシンは二重結合の位置はまだ決定されていないものの、t20:1、 ω -ヒドロキシ脂肪酸としてはC30:0が同定された。GL-I3はこれまでブタ、モルモットで確認され、ウマ、ラットにも共通する物質である。しかしGL-II3はこれまで報告されていない糖脂質であり、ヒト表皮に特有のアシルグルコシルセラミドである可能性がある(図9)。このような表皮特有のアシルグルコシルセラミドに対し、エピデルモシドと命名した。

おわりに

必須脂肪酸欠乏時には、エピデルモシドのアシル基はオレイン酸に置き換わっているのが観察されたこと²⁵⁾、アラキドン酸を投与しても、エピデルモシドのアシル基はリノール酸であったこと(アラキドン酸がリノール酸にretroconversionされている)²⁶⁾から、表皮はリノール酸を必須としていることは明らかである。リノール酸はエピデルモシドという表皮特有の糖脂質の必須成分と

して生体に要求される脂肪酸であったと結論される。エピデルモシドは明らかに機能を有する糖脂質であり、その特有な構造が、層板顆粒内の脂質をディスク状に保つように役だっていることが想像されるが、詳しい局在、他の成分とどのように相互作用して脂質の層板構造をつくるのか、長鎖の ω -ヒドロキシ脂肪酸とリノール酸のエステル結合でなければならないのはなぜなのか、水分保持の分子機作は何なのかなど、今後の研究に期待したい。

また、必須脂肪酸欠乏時、あるいは高カロリー補液時に投与される乳化脂肪の役割が、ともすればエネルギー論に偏りがちな今日の医療において、リノール酸はそれ自身、人体に必須要素であることを強調しておきたい。

本研究は山口大学医学部皮膚科の麻上千鳥教授、東京都臨床医学総合研究所の鈴木明身博士(生体膜)、稲垣冬彦博士(生理活性物質)各氏との共同研究であり、ここに深謝します。また、つねに暖かいご支援をいただいた恩師山川民夫先生に深謝いたします。

文献

- 1) Burr, G. O., Burr, M. M. : *J. Biol. Chem.*, 82, 345-367(1929)
- 2) Collins, F. D., Sinclair, A. J., Royle, J. P., Coats, D. A., Maynard, A. T., Leonard, R. F. : *Nutr. Metabol.*, 13, 150-167(1971)
- 3) 田代亜彦・真島吉也・山森秀夫・林田和也・堀部和夫・奥井勝二 : 小児外科, 19, 1013-1021(1987)
- 4) 村上龍助・藤田 位・木村彰宏・中村 肇 : 日新生児会誌, 17, 404-411(1981)
- 5) Hansen, H. S. : *TIBS*, 11, 263-265(1986)
- 6) Elias, P. M. : *Arch. Dermatol. Res.*, 270, 95-117(1981)
- 7) Lavker, R. M. : *J. Ultrastr. Res.*, 55, 79-86(1976)
- 8) Lampe, M. A., Williams, M. I., Elias, P. M. : *J. Lipid Res.*, 24, 131-140(1983)

- 9) Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Abraham, W., Madison, K., Downing, D. T. : *Arch. Dermatol.*, 123, 1381-1384(1987)
- 10) Van Golde, L. M. G., Van den Bergh, S. : in *Lipid Metabolism in Mammals*(ed. Snyder, F.), Vol.1, pp.1-33, Plenum, New York (1977):Gan-Elepano, M., Aeberhard, E., Mead, J. F.: *Lipids*, 16, 790(1981)
- 11) Odland, G. F. : *J. Invest. Dermatol.*, 34, 456 (1966)
- 12) 鈴木啓之・石川勝利 : 日皮会誌, 83, 616(1973)
- 13) Tezuka, T.: *Dermatologica*, 166, 57-61(1983)
- 14) Wertz, P. W., Downing, D. T. : *Science*, 217, 1261-1262(1982)
- 15) Feay, G. M., White, R. J. : *J. Invest. Dermatol.*, 70, 336-341(1978)
- 16) Gray, G. M., White, R. J., Major, J. R. : *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 127-137(1978)
- 17) Wertz, P. W., Downing, D. T., : *J. Lipid Res.*, 24, 753-757(1983)
- 18) Abraham, W., Wertz, P. W., Downing, D. T. : *J. Lipid Res.*, 26, 761-766(1985)
- 19) Bowser, P. A., Nugteren, D. H., White, R. J., Houtsmuller, U. M. T., Prottey, C. : *Biochim. Biophys. Acta*, 834, 419-428(1985)
- 20) Uchida, Y., Iwamori, M., Nagai, Y. : *Jpn. J. Exp. Med.*, 58, 153-161(1988)
- 21) Wertz, P. W., Cho, E. S., Downing, D. T. : *Biochim. Biophys. Acta*, 753, 350-355(1983)
- 22) Wertz, P. W., Colton, S. W. -Vi, Downing, D. T : *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 75, 217-220 (1983)
- 23) Hamanaka, S., Yamaguchi, Y., Yamamoto, T., Asagami, C. : *Biochim. Biophys. Acta*, 961, 374-377(1988)
- 24) Hamanaka, S., Asagami, C., Suzuki, M., Inagaki, F., Suzuki, A. : *J. Biochem.*, 105, 684-690(1989)
- 25) Melton, J. L., Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Downing, D. T. : *Biochim. Biophys. Acta*, 921, 191-197(1987)
- 26) Hansen, H., Jensen, B., von Wettstein-Knowles, P. : *Biochim. Biophys. Acta*, 878, 284-287(1986)