報 文

サザエの脂質の生化学的研究 (第1報)

内臓部複合脂質について (その1)

林 陽・松原淑子・松浦史登

近畿大学理工学部化学教室 (東大阪市小若江 321)

Biochemical Studies on the Lipids of *Turbo cornutus*. I.

The Conjugated Lipids of Viscera (Part I)

Akira HAYASHI, Toshiko MATSUBARA and Fumito MATSUURA

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
Kinki University (321, Kowakae, Higashiōsaka-shi, Ōsaka)

The composition of the conjugated lipids obtained from the viscera of *T. cornutus* was studied. The lipids were separated and purified by silicic acid column chromatography followed by dialysis (cellophane or rubber), DEAE-cellulose column chromatography, thin layer chromatography, and mild alkaline hydrolysis (Scheme-1). Thin-layer chromatography and infrared spectroscopy were used for the identification of each purified lipid; then, the hydrolyzed products were analyzed by paper chromatography, gas chromatography, and automatic amino acid analyzer.

The results of the analysis were as follows:

(1) The phospholipid fractions were composed of two kinds of glycerophospholipids which were phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl choline, and two sphingophosphonolipids which consisted of C₁₆-sphingosine, carbon-phosphorus bonding nitrogen-base (2-N-methylaminoethylphosphonic acid), and fatty acids (one was mainly palmitic acid and another mainly palmitic acid and uncharacterized acid X).

(2) The glycolipid was a globoside type mucolipid which contained sphingosine bases, fatty acids (mainly palmitic acid and uncharacterized acid X), and sugars (glucose, galactose, fucose, and glucosamine).

1 緒 言

貝類の脂質については、多くの研究があるが、最近その複合脂質の研究も漸次行なわれている。座間ら¹⁾はアカザラガイ、ホタテガイ中にレシチン、ケファリンを見だし、保田^{2),3)}はアサリのアセトン可溶脂質およびリン脂質の組成について報告している。また堀ら^{4)~6)}はセタシジミを中心とする淡水産二枚貝の複合脂質について広く研究を行ない、とくにセラミド-2-アミノエチルホスホネート (CAEP) およびスフィンゴエタノールアミンの存在について報告している。著者ら^{9),10)}は海水産二枚貝であるマガキの糖脂質が脂肪酸、スフィンゴシン、中性糖およびアミノ糖よりなるグロボシド型ムコ脂質であることを報告するとともに、CAEPの存在も見いだし

海水産巻貝であるサザエ (*Turbo cornutus*) の脂質については、堀ら⁷⁾が薄層クロマトグラフィーとアミノ酸自動分析により、ホスファチジルエタノールアミン、CAEP、ホスファチジルセリン、セラミドモノヘキシシドなどの確認を行なっているにすぎない。著者らはサザエの脂質について研究するとともに、二枚貝であるマガキの脂質との比較検討を行なっている。本報では、サザエの緑色軟質の内臓部より抽出した複合脂質について調べた結果を報告する。

2 実 験

2.1 複合脂質の抽出

サザエより殻を除き、白色硬質の肉部と緑色軟質の内臓部とに分けた。このうち内臓部 5.23 kg をアセトンとともにホモジナイズし、アセトンにより脱水するととも

にアセトン可溶脂質を除いた。アセトン抽出はアセトン層が着色しなくなるまで行なった。ついで残サについてソックスレー抽出器を用いてエーテル抽出を行なった。その残サ 1.17 kg より、クロロホルム-メタノール (C-M) (1:2) 注1)を用いてソックスレー抽出器で複合脂質の抽出を行なった。C-M を不活性ガスを通じながら減圧下に除去し、粗脂質を新鮮重量に対して 6.7% 得た。この粗脂質の分析結果は物リン 1.13%, 窒素 5.68%, 糖 3.74% であり、エーテル抽出物のリン量が 0.30% であることおよび薄層クロマトグラフィー (TLC) の結果より、複合脂質はほとんど C-M で抽出されている。

注1) この研究で用いた溶媒系の混合比はすべて vol/vol である。

2.2 複合脂質の分画と精製

2.1 で得た粗脂質の分画精製法の概略を Scheme-1 に示した。

Scheme-1 Separation and purification of the conjugated lipids of *T. cornutus*.

2.2.1 ケイ酸カラムクロマトグラフィー

ケイ酸 (Mallinckrodt 製, 100~120 mesh) 130 g と Hyflo Super-Cel 65 g をよく混合し, 120°C で 3 hr 活性化し, デシケーター中にて冷却後, クロロホルムに懸濁させ内径 50 mm, 長さ 240 mm のカラムを作った。これに粗脂質 5.00 g を C-M (9:1) 溶液として注入し, 溶出溶媒を C-M (9:1), (4:1), (3:2), (2:3), (1:4), メタノールと順次替えて溶出した。100 ml ずつに分画し, 320 mμ の吸収と 0.5 ml 当たりの糖の吸収 (アントロン法¹¹⁾) の測定を行ない Fig.-1 の溶出曲線を得た。

Fig.-1 Silicic acid column chromatography of the conjugated lipids.

この各フラクション (Fr.) を赤外線吸収スペクトル (IR) と TLC で調べたところ, いずれの Fr. も 2~3 成分の混合物であり単一成分とは認められなかった。複合脂質の含まれる Fr. II, III, IV, V についてさらに Scheme-1 により精製し研究を行なった。

2.2.2 透析

ゴム膜透析は脂質を C-M (5:1) に溶かし, 薄いゴム膜に入れ, ヘキサンに対して透析を行ない中性脂肪を除いた。またセロハン膜透析は脂質を適当な混合割合の C-M 溶液としてセロハン膜 (Visking Co., No. 1) に入れ水に対して透析を行ないアミノ酸などを除いた。アミノ酸の除去は *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2) を用いるペーパークロマトグラフィー (PC) により確認した。

2.2.3 DEAE セロルースカラムクロマトグラフィー

カラムは Rouser ら¹²⁾の方法に従って充てんし, 溶出溶媒には C-M (9:1), C-M (7:3), メタノール, クロロホルム-酢酸 (3:1), 氷酢酸, クロロホルム-メタノール (4:1)+濃アンモニア水 (20 ml/l) を順次用いた。Fr. II および Fr. IV は C-M (9:1) で, Fr. V は C-M (7:3) で大部分の脂質を溶出した。IR と TLC で調べたところ Fr. V は単一成分に分離されたが, Fr. II は少量のアミノ酸を含み, Fr. IV は3種のリン脂質の混合物であったのでそれぞれ透析および TLC により分画精製した。

2.3 薄層クロマトグラフィー

薄層はケイ酸 (Silica gel G, Merck 社) と水を 1:2 の割合で混合し, 0.25 mm の厚みに調製した。試料は適当な C-M 溶液にて点着し, つぎの3種の溶媒系を用いて展開した。中性脂肪の検索には石油エーテル (bp 30~60°C)-エーテル-酢酸 (85:15:1), 複合脂質にはクロロホルム-メタノール-水 (65:25:4) およびクロロホルム-メタノール-酢酸-水 (50:25:6:2) を用いた。スポットの検出は 50% 硫酸, モリブデンブルー試薬,

ニンヒドリン試薬, ドラゲンドルフ試薬, およびアントロン試薬¹¹⁾を用いた。

Fr. IV の3種のリン脂質の分画精製に用いた TLC は Wako B-O を吸着剤とし, クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (50:25:6:2) を展開溶媒に用いて 12 cm 展開した。風乾後, プレートの両端をモリブデンブルー試薬により発色させ, スポットに相当する部分をかきとり, C-M (4:1) による溶媒抽出と遠心分離を繰り返して各成分を回収した。なおこのクロマトグラムで R_f 値

Fig.-2 a Thin-layer chromatograms of phospholipid fractions.

Fig.-2 b Thin-layer chromatograms of phospholipid fractions.

の高い物質より順に, Fr. IV-A, Fr. IV-B, および Fr. IV-C と名づけた (Fig.-2 a および Fig.-2 b)。

2.4 弱アルカリ加水分解

Carter ら¹³⁾の方法に準じて行なった。脂質 1g に対し 1N-カセイカリ 25 ml の割合で加え, 37°C, 24 hr 振り混ぜケン化した。ケン化後 5N-塩酸 5 ml で中和し, さらにこの反応液を pH 1 に保持するために 5N-塩酸を適量加えた。1 hr 放置後, アセトン 50 ml を加え一夜冷室に放置した。生じた沈殿を遠心分離後, 2% 塩酸-アセトン (2:4) で沈殿物を 1 回洗い, ついでアセトンを用いて数回洗浄を行なった。

2.5 定量分析

リンの定量は King 法¹⁴⁾と Bartlett 法¹⁵⁾で行なった。全窒素はマイクロケルダール法により分解後インドフェノール反応¹⁶⁾により比色定量し, アミノ窒素は Lea and Rhodes の方法¹⁷⁾で定量した。アントロン法¹¹⁾とフェノール硫酸法¹⁸⁾により中性糖を, チオグリコール酸法¹⁹⁾によりメチルペントースを, そして Elson-Morgan 法²⁰⁾によりアミノ糖を比色定量した。脂肪酸は Snyder and Stephens の方法²¹⁾によりエステル結合を比色定量し, これとガスクロマトグラフィー (GLC) の結果より得た平均炭素数の脂肪酸より算出した。またスフィンゴシンは Lauter and Trams の方法²²⁾により定量した。

2.6 構成成分の検索

2.6.1 脂肪酸

脂質数 mg について 7% メタノール性塩酸で封管中, 100°C, 5 hr メタノリシスの後, 石油エーテルで脂肪酸メチルエステルを抽出し, これについて GLC を行ないピークの面積比より組成を求めた。GLC は日立 K 53 型を用い, ジエチレングリコールポリサクシネートエステルを固定相担体クロモソルブ W に 15% 吸着させた充テン剤を 2 m のカラムに詰め, カラム温度 195°C, 水素炎イオン化検知器で行なった。

2.6.2 長鎖塩基

7% メタノール性塩酸による分解物より脂肪酸を除去後, メタノール層を半量まで濃縮し, pH 12 に調整して長鎖塩基をエーテルで抽出した。牛脳の糖脂質より同じ操作で得たスフィンゴシンを標準物とし, クロロホルム-メタノール-2N-アンモニア (40:10:1) を展開溶媒として, シリカゲル G による TLC を行ないニンヒドリン試薬でスポットの検出を行なった。

2.6.3 糖

7% メタノール性塩酸による分解物より脂肪酸を除去したのちのメタノール層の 1 部を山川²³⁾の方法によりトリメチルシリル化し GLC を行なった。GLC は日立 KGL 2 A 型 (水素炎イオン化検知器) を使用し, UC ON LB-550 X をクロモソルブ W HMDS に 5% 吸着させた充テン剤を詰めた 2 m のカラムとネオペンチル

グリコールサクシネートをクロモソルブ W に 8% 吸着させた充テン剤を詰めた 3m のカラムを用いた。カラム温度はそれぞれ 165°C と 175°C とした。

メタノール層の 1 部を濃縮し、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2) およびフェノール-水 (3:1 wt/wt) を展開溶媒として PC を行なった。発色は銀-アンモニア試薬²⁴⁾によった。

またアミノ酸自動分析計 (三田村 A-220 III 型) によりアミノ糖の検索を行なった。

2.6.4 窒素塩基

4 *N*-塩酸 (100°C, 6 hr) および 6 *N*-塩酸 (110°C, 25 hr) 加水分解物より、石油エーテルで脂肪酸除去のち、水層について PC を行なった。展開溶媒系として *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2) およびフェノール-水 (80:20) を用い、ニンヒドリン試薬によりアミノ基の、Rosenberg 試薬²⁵⁾によりリンの検出を行なった。水層の 1 部についてアミノ酸自動分析計によるアミノ酸分析も行なった。

3 結果および考察

3.1 リン脂質画分

Scheme-1 に示した操作により精製した Fr. II, Fr. III, Fr. IV-A, Fr. IV-B および Fr. IV-C は Fig.-2 a と Fig.-2 b に示す TLC においてモリブデンブルー試薬に対して陽性のスポットを与えることより、リン脂質画分と認められる。Fr. I はほとんど中性脂質の画分であった。

Fr. II および Fr. III は TLC において標準のホスファチジルエタノールアミンに一致する、モリブデンブルー試薬およびニンヒドリン試薬に対して陽性のスポットを示した。しかし Fr. II は TLC において、50% 硫酸による発色で、相当量の中性脂質の存在が見られ、IR においても中性脂質の吸収を示しており、この画分中のリン脂質量は少ないと考えられる。Fr. III は Fig.-3 に示す IR もホスファチジルエタノールアミンのそれとよく一致している。この両画分の 4 *N*-塩酸加水分解物を PC およびアミノ酸自動分析計 (Fig.-4) により検索した結果、エタノールアミンの存在を見だし、この両画分中に含まれるリン脂質はホスファチジルエタノールアミンであると確認した。

Fr. IV-A および Fr. IV-B は IR がスフィンゴ型脂質特有の吸収を示したが、なおエステル結合の吸収もいくらかみられたのでさらに弱アルカリ加水分解を行ない精製した。得られた脂質の TLC は Fig.-2 a および Fig.-2 b に示すように、マガキより単離した CAEP の *R_f* 値に比べて、Fr. IV-A はわずかに大きく、Fr. IV-B はわずかに小さい、モリブデンブルー試薬に対して陽性のリン脂質であった。しかし CAEP と比べてニンヒ

Fig.-3 Infrared spectra of the conjugated lipids of *T. cornutus*.

Column; Amberlite CG-120 III
6×150mm
Buffer; pH 5.28, 20ml/hr
Temp.; 50°C

Fig.-4 Elution pattern of acid hydrolyzate of Fr. III by automatic amino acid analyzer.

ドリン試薬に対する発色が非常に少なく、この二つの脂質がアミノ基でなくイミノ基を持つと推定した。また IR は Fig.-3 に示すように 1545 cm⁻¹ および 1642 cm⁻¹ のアミド吸収、970 cm⁻¹ のトランス二重結合の吸収など典型的なスフィンゴ脂質のパターンを示しており、かつ CAEP のそれとほとんど同一であり、CAEP と類縁の物質を予想させた。そこで、これらの脂質について、さらにメタノール性塩酸によるメタノリシスおよび 6 *N*-塩酸による加水分解を行ない構成成分について

研究した結果、スフィンゴシンと 2-N-メチルアミノエチルホスホン酸が認められ、これら両脂質が 2-N-メチルアミノエチルホスホン酸なる C-P 結合を持つ新しい脂質であることを認めた²⁶⁾。

Fr. IV-C は TLC (Fig.-2 a および Fig.-2 b) において標準のホスファチジルコリンと完全に一致するスポットを検出した。このスポットはニンヒドリン試薬に対して陰性で、ドラゲンドルフ試薬に対して陽性であることよりホスファチジルコリンと確認した。

以上の各リン脂質の構成脂肪酸検索の結果を Table-1 に示す。Fr. III はパルミチン酸、ステアリン酸、C_{20:1} および C_{23:0} が主構成脂肪酸である。Fr. IV-A においてはパルミチン酸が主成分であり全体の 90% を占めているが、Fr. IV-B においてはパルミチン酸が 42%、

Table-1 Fatty acid compositions of the conjugated lipids of *T. cornutus* (%).

Carbon number	Fr. III	Fr. IV		Fr. V
		A	B	
14:0	6.0	—	—	—
16:0	16.7	88.8	42.0	47.6
16:1	1.5	3.5	1.9	3.5
16:2	3.8	—	—	—
17:0	2.4	4.0	2.4	4.7
18:0	14.6	1.3	1.8	—
18:1	5.0	—	1.0	—
18:2	3.4	—	—	—
20:0	1.2	—	—	—
20:1	16.3	—	1.6	—
20:2	—	—	—	2.2
21:0	4.1	—	—	—
X	—	1.2	37.7	29.0
iso 22	1.7	—	—	—
22:0	—	—	3.9	5.3
23:0	15.5	—	5.8	4.6

Fig.-5 Paper chromatograms of acid hydrolyzate of glycolipid.

Fig.-6 Gaschromatogram of TMS-methylglycoside from glycolipid.

未確認酸 X が 38% であり、大きな差異が認められる。この未確認酸 X の構造については目下研究中である。現在のところ、この脂肪酸組成の違いが他の構成成分は同一であるにもかかわらず TLC において R_f 値が異なる原因と考えている。

Table-2 Analysis of glycolipid fraction of *T. cornutus*.

N	(%)	3.89
NH ₂ -N	(%)	none
		1.32 (after hydrolysis)
P	(%)	1.24
Sugar	(%)	22.9 (Anthrone)
		28.4 (PhOH-H ₂ SO ₄)
Methylpentose	(%)	5.2
Aminosugar	(%)	5.6
Sphingosine	(%)	22.7
Ester	(μ mol/mg)	0.26
		1.04 (after hydrolysis)

Fig.-7 Elution pattern of aminosugars by automatic amino acid analyzer.

以上より、サザエ内臓部のリン脂質としてホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンおよびつぎに示す構造式の C-P 結合を持つ新しいスフィンゴホスホ脂質を見いだした。

R; Fr. IV-A, パルミチン酸

Fr. IV-B, パルミチン酸および X

2-N-メチルアミノエチルホスホン酸はイソギンチャク²⁷⁾中にその存在が認められながら、その存在形態は不明のものであったが、上記のような脂質の形で存在することが明らかとなった。このスフィンゴホスホ脂質は二枚貝であるマガキ中には見いだされておらず、巻貝であるサザエに多量存在することは非常に興味深い。

3.3 糖脂質画分

ケイ酸カラムクロマトグラフィーにおいて C-M (3:2) で溶出する画分 (Fr. V) を透析および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。この脂質の IR (Fig. 3) は 1545 cm^{-1} および 1642 cm^{-1} のアミド吸収、 3360 cm^{-1} および $1030\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ の幅広い水酸基の吸収など典型的なセラミド型糖脂質のパターンを示しており、クロロホルム-メタノール-水 (65:25:4) を展開溶媒とする TLC においてもアントロン試薬に陽性の、 R_f 値 0.13 の単一スポットを示し糖脂質である。これは Table-2 に示す分析結果よりも確証される。

PC および GLC による構成糖検索の結果をそれぞれ Fig. 5 および Fig. 6 に示す。両図の結果より、グルコース、ガラクトース、フコースおよびヘキソサミンを検出した。ヘキソサミンはアミノ酸自動分析計により、ほとんどがグルコサミンであることを見いだした (Fig. 7)。糖の結合様式および各構成糖の割合についてはさらに検討中である。

構成脂肪酸は Table-1 に示すように、パルミチン酸と未確認酸 X を主成分とし、長鎖塩基は TLC により、牛脳より得たスフィンゴシンと一致するスポットを検出した。Fig. 5 に示す PC より数種のアミノ酸が認められ、Table-2 に示すように酸加水分解によりアミノ窒素量が増加することより、なんらかの形で結合していると考えられる。

マガキの糖脂質⁹⁾と比べて、構成糖には差異は認められないが、脂肪酸がマガキではパルミチン酸、ヘプタデカン酸およびステアリン酸が主成分であったのに対し、サザエにおいてはパルミチン酸のほかに未確認酸 X が相当量認められる点に大きな差がある。

ケイ酸カラムクロマトグラフィーにおいて C-M (2:3) および C-M (1:4) で溶出する画分も IR および TLC において糖脂質画分と認められるが今回は触れなかった。

終わりに、アミノ酸自動分析を行なっていただいた滋賀大学堀教授、2-N-メチルアミノエチルホスホン酸をいただいた東京大学神立教授、堀口博士に感謝します。

(昭和 43 年 9 月 6 日受理)

文 献

- 1) 座間, 羽田野, 五十嵐, 日水産, **28**, 917 (1960)
- 2) 保田, 油化学, **15**, 50 (1966)
- 3) 保田, 油化学, **16**, 596 (1967)
- 4) T. Hori, O. Itasaka, T. Hashimoto, H. Inoue, *J. Biochem.*, **55**, 545 (1964)
- 5) T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, K. Yamada, *J. Biochem.*, **56**, 477 (1964)
- 6) T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, *J. Biochem.*, **59**, 570 (1966)
- 7) 堀, 荒川, 滋賀大紀要, **16**, 25 (1966)
- 8) T. Hori, M. Sugita, I. Arakawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 211 (1968)
- 9) A. Hayashi, T. Matsubara, *J. Fac. Sci. Technol. Kinki Univ.*, **1**, 25, (1966)
- 10) A. Hayashi, T. Matsubara, Y. Mishima, *J. Fac. Sci. Technol. Kinki Univ.*, **2**, 39 (1967)
- 11) J.E. Hodge, B.T. Hofreiter "Methods in Carbohydrate Chemistry" ed. by R.H. Whistler *et al.*, Vol. 1, p. 390 (1962) Academic Press Inc., New York
- 12) G. Rouser, G. Kritchevsky, D. Heller, E. Lieber, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 425 (1963)
- 13) H.E. Carter, D.B. Smith, D.N. Jones, *J. Biol. Chem.*, **232**, 681 (1958)
- 14) E.J. King, *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932)
- 15) G.R. Bartlett, *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959)
- 16) S. Akamatsu, *J. Biochem.*, **39**, 203 (1952)
- 17) C.H. Lea, D.N. Rhodes, *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 416 (1955)
- 18) M. Dubois, A. Gills, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- 19) M.N. Gibbons, *Analyst*, **80**, 268 (1955)
- 20) Z. Dische, "Methods in Carbohydrate Chemistry" ed. by R.H. Whistler *et al.*, Academic Press Inc., New York, Vol. 1, p. 507 (1962)
- 21) F. Snyder, N. Stephens, *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 244 (1959)
- 22) C.J. Lauter, E.G. Trams, *J. Lipid Res.*, **3**, 136 (1962)
- 23) T. Yamakawa, N. Ueta, *Japan. J. Exp. Med.*, **34**, 37 (1964)
- 24) W.E. Trevelyan, D.P. Proctor, T.S. Harrison, *Nature*, **166**, 444 (1950)
- 25) H. Rosenberg, *J. Chromatog.*, **2**, 487 (1959)
- 26) A. Hayashi, F. Matsuura, T. Matsubara, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 208 (1969)
- 27) J.S. Kittredge, A.F. Isbell, R.R. Hughes, *Biochemistry*, **6**, 289 (1967)