水産動物燐脂質に関する研究 (第 16 報)*

イ ノ シ ッ ト 燐 脂 質

座間宏一, 五十嵐久尙 (北海道大学水産学部水産化学教室)

昭和 33 年 8 月 11 日 受 理

燐脂質には phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine などのいわゆるグリセロ燐脂質及びスフィンゴミエリンなどのスフィンゴ燐脂質の他に所謂ケファリン劃分中にイノシット含有燐脂質の存在することが Anderson ら⁽¹⁾によってヒト型結核菌中に発見され, 次いで Klenk ら⁽²⁾によって大豆燐脂質中にイノシットが認められて以来, 細菌, 植物種子, 動物組織等の燐脂質中にイノシットを含有する燐脂質の存在することが多くの研究者によって報告されている。とくに動物組織より得られたイノシット燐脂質については, Folch^(3,4,5-6) らのウシ脳ケファリンに関する詳細な研究, Burmaster ら⁽⁷⁾ 及び Hawthorn ら⁽⁸⁾ のコウシ脳イノシット燐脂質, 更に Faure ら⁽⁹⁾ のウシ心臓より得られたグリセロイノシット燐脂酸に関する研究がみられる。

また水産動物組織中におけるイノシット燐脂質の存在については著者らが既にクジラ類脳^(10,11), 魚類脳⁽¹²⁾, 魚卵^(13,14)類及び魚類筋肉⁽¹⁵⁾について報告した。

ウシ脳より得られたイノシット燐脂質はイノシット 2 燐酸を核としていることが Folch によって明らかにされ, またウシ心臓より得られたものはグリセリンとイノシット 1 燐酸の結合した一種の燐脂酸と考えられている。即ち動物組織中に存在するイノシット燐脂質は細菌又は植物より得られるものがグリセリン, イノシット燐酸, 脂肪酸, 多塩基性酸, 有機塩基及び糖類と結合し比較的複雑な構造を有しているのに反し, イノシット 1 燐酸又はイノシット 2 燐酸を核としている比較的簡単な構造を有しているものと推測される。

著者らはさきに抹香鯨脳ケファリンを更にクロロホルムエタノール劃分を行い粗イノシット燐脂質を劃分し, その加水分解生産物としてイノシットを得た⁽¹⁰⁾。またイワシクジラ脳ケファリンも同様に劃分し粗イノシット燐脂質を得た⁽¹¹⁾。それ故この劃分を更にクロロホルム-メタノール劃分を行い精製し, 更にその加水分解生産物としてグリセリン, イノシット, イノシット 2 燐酸を得, またこの劃分より得られた脂肪酸を検索したのでその結果について報告する。

実 験 の 部

P は Lieb 法, N はマイクロケルダール, グリセリンは Blix 法, 沃素価は Wijs 法で測定した。

試料: イワシクジラ脳ケファリン中クロロホルム可溶エタノール難溶, Scherer 反応陽性劃分 (前報 第 1 表, 画分 I) を用いた。

イノシット燐脂質の調製 上記試料 1 g 当り 12 ml のクロロホルムに溶解。22 ml のメタノールを加えて析出する沈澱を遠心分離し更にこの劃分 1 g 当り 10 ml のクロロホルムに溶解 20 ml のメタノールを加えて沈澱を得た。この操作を更に 8 回繰り返して得た析出物を 1 g につき 20 ml のメタノールと煮沸, 冷却後可溶部を除去, この操作を更に 3 回行って得たものを 1 g 当り 20 ml のアセトンで振盪可溶部を除去すること 3 回, 最後に熱アセトンで 2 回処理し, 30 g の試料より 5.9 g のイノシット燐脂質を得た。

このものは Scherer 反応強陽性の淡黄色粉末である。

元素分析結果 P 5.16%, N 0.18%, グリセリン 6.98%, 灰分 20.76%。

この粉末 4.5 g を 90 ml の 1N 塩酸に懸濁, 氷室中で蒸留水に対し 4 日間透析, 透析膜内容物をアセトン 1000 ml 中に注入, 生じた沈澱を集め, 更に 300 ml, 最後に 200 ml のアセトンで処理した後, 真空デシケーター中で乾燥, 3.2 g の精製イノシット燐脂質を得た。

分析結果 P 6.31%, N 0.23%, グリセリン 9.16%, P: グリセリン=1.989:1

イノシット燐脂質加水分解物の検索 イノシットの分離: 精製イノシット燐脂質 0.5 g を 6N 塩酸 50 ml と 48 時間還流加水分解。冷後エーテルで脂肪酸を除去した加水分解液を 50° 以下で減圧濃縮乾固, 残渣を 15 ml の水に溶解, 0.5 ml の水酢及び 2 g の酸化銀を加えて生ずる沈澱を濾去, 沈澱は少量の 1% 酢酸で数回洗

* Studies on the Phosphatide of Aquatic Animals. Part XVI. Inositolphosphatide.

By Koichi ZAMA and Hisanao IGARASHI (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate)

濾液及び洗液は合し H_2S を内じて脱銀, 50° 以下で減圧濃縮, 残渣を 10 ml の水に溶解, 不溶物を濾去後塩酸処理脱色炭で処理, 約 1 ml 迄濃縮, 20 ml の無水エタノールを加え氷室に保ち, 80 mg の Scherer 反応強陽性の白色粉末を得た. 0.1 N 塩酸と無水エタノールより再結を繰り返えし無色針状のイノシットを得た. 収量 10 mg. m. p. 225° , イノシットと混融するも融点の降下は認められなかった.

分析結果 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 計算値 C 39.98%, 実験値 C 39.97%. 計算値 H 6.67%, 実験値 H 6.47%.

イノシット 2 磷酸の分離: 精製イノシット磷脂質 2.3 g を 92 ml の水に懸濁, 同容の濃塩酸を加え, 20 分間 CO_2 気流下に沸騰水浴上で加水分解し, 冷後脂肪酸及び未分解のイノシット磷脂質をクロロホルムで抽出, クロロホルム層は少量の水で数回洗滌, 加水分解液及び洗滌液は合し 50° 以下で減圧濃縮, 残渣を 75 ml の水に溶解, 25% 中性酢酸鉛水溶液 15 ml を加え氷室に保ち生じた沈澱を集め, 3% 氷冷中性酢酸鉛水溶液で洗滌後 50 ml の水に懸濁, H_2S で脱鉛, 塩酸処理脱色炭で処理後, 50° 以下で減圧濃縮して得た淡黄色のシロップ状物質を 3.5 ml の温水に溶解, 70 ml の無水エタノールを加え氷室に保ち 45 mg の白色沈澱を得た. 水, 無水エタノールより精製を繰り返えし, 最後に無水エタノールで洗滌し精製イノシット 2 磷酸を得た. このものは Scherer 反応陽性の白色粉末である.

分析結果 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4(\text{HPO}_4)_2$ 計算値 P 18.22%, 実験値 P 18.01%. 計算値 C 21.18%, 実験値 C 21.03%. 計算値 H 4.15%, 実験値 H 4.20%.

グリセリン及び磷酸の証明: 前記イノシット磷脂質加水分解物の中性酢酸鉛沈澱の濾液を H_2S で脱鉛し, 減圧濃縮, 脂肪酸調製の際に得られた不純化物と合し, 50 ml の塩酸飽和メタノールと 24 時間還流加水分解, 冷後溶剤を溜去, 残留物を水蒸溜フラスコに移し, 浴温 210° , 10 mm-Hg で減圧蒸溜し 111 mg の粘稠な液体を得た.

溜出物を 5 ml のピリジンに溶解, 0.5 g のベンゾイルクロライドと反応せしめ 85 mg の反応生成物を得た. エタノールより再結を繰り返えし, 無色針状のグリセリントリベンゾエートを得た. m. p. 76.5° , グリセリントリベンゾエートと混融した結果殆んど m. p. の降下は認められなかった.

分析結果 $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_6$ 計算値 C 71.26%, 実験値 C 70.61%. 計算値 H 4.98%, 実験値 4.60%.

グリセリン蒸溜残渣の一部をとり硫酸硝酸混液で分解, モリブデン酸アンモンを加えると燐モリブデン酸アンモンの黄色沈澱を生ずる.

イノシット磷脂質の構成脂肪酸: 前記イノシット磷脂質中間加水分解の際得られたクロロホルム抽出物をアルコール性苛性カリで鹼化, 混合脂肪酸 (中和価 195.9, 沃素価 52.3) 970 mg を得た. この脂肪酸を Herbr-Riemenschneider の方法⁽¹⁷⁾により 21% 苛性カリ-エチレングリコール中で窒素気流中で 180° , 15 分間共軛化した後, そのメタノール溶液の 233, 268, 315, 346 及び 374 m μ における比吸光係数を測定し, Hammond-

表. イノシット磷脂質の脂肪酸組成

ヘキサエン酸 (ドコサヘキサエン酸として)	4.3%
ペンタエン酸 (イワシ酸として)	3.5%
テトラエン酸 (アラキドン酸として)	1.7%
トリエン酸 (リノレン酸として)	1.3%
ジエン酸 (リノール酸として)	1.8%
モノエチレン酸 (オレイン酸として)	29.2%
飽和酸	58.2%

Lundberg の式⁽¹⁸⁾ に従いその組成を計算し左表の結果を得た.

考 察

動物組織より得られたイノシット磷脂質について, Faure ら⁽⁹⁾ がウシ心臓より得たイノシット磷脂質のごとく, 本質的には有機塩基を含まず, グリセリン, 磷酸, イノシットが 1:1:1 の割合で結合しこれに脂肪酸の結合したグリセロイノシット磷脂酸と Folch⁽⁶⁾ がウシ脳のケファリン割分より得, 多少の有機塩基の存在の考えられる diphosphoinositide の二つの型が知られている.

著者らがイワシクジラ脳ケファリン割分より分別したイノシット磷脂質は最近報告されている植物イノシット磷脂質の向流抽出による結果⁽¹⁹⁾, あるいは該物質の窒素の含有量等よりみて必ずしも単一のものとは断言出来難いが, 加水分解生産物としてグリセリン, イノシット 2 磷酸が得られており, また分析結果よりグリセリン対 P の比が約 1:2 近くなっていることよりグリセリンとイノシット 2 磷酸が一つの磷酸基のところでエステル結合をした形のものが核となっているのではないかと考えられる.

結合脂肪酸については未だ検討の余地はあるが, 飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が大体 6:4 の割合で存在しており, 加水分解物として得られた脂肪酸量よりみるとイノシット磷脂質に 2 モル結合しているものと考えられる.

それ故このイノシット磷脂質は分析結果及び加水分解物より、グリセリン、イノシット 2 磷酸及び脂肪酸が 1 : 1 : 2 の割合で結合しているものと推定される。

また僅かではあるが窒素が存在しているが、これは恐らくは混在しているグリセロ磷脂質に由来するものでグリセロイノシット磷脂質に結合しているものではないと考えられる。

総 括

イワシクジラ脳ケファリン割分よりイノシット磷脂質を分離し、その加水分解生産物としてグリセリン、イノシット、イノシット 2 磷酸及び脂肪酸を得た。また脂肪酸をアルカリで共軛化し、ジェン、トリエン、テトラエン、ペンタエン酸及びヘキサエン酸の存在を認め定量を行った。

試料採取に当り御便宜を賜った日本水産株式会社、後藤賢二氏に厚く謝意を表する。

(1) R. J. Anderson : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 52, 1607 (1930).	(12) 座間宏一, 五十嵐久尙 : 本誌, 30, 433 (1956).
(2) E. Klenk, R. Sakai : <i>Z. Physiol. Chem.</i> , 258, 33 (1939).	(13) 五十嵐久尙, 座間宏一, 片田宗男 : 本誌, 30, 368 (1956).
(3) J. Folch, D. W. Woolley : <i>J. Biol. Chem.</i> , 142, 963 (1942).	(14) 五十嵐久尙, 座間宏一, 片田宗男 : 本誌, 31, 4 (1957).
(3') J. Folch, H. A. Schneider : <i>ibid.</i> , 137, 51 (1941).	(15) 五十嵐久尙, 座間宏一, 片田宗男 : 日本誌, 23, 278 (1957).
(4) J. Folch : <i>ibid.</i> , 146, 35 (1942).	(16) G. Blix : <i>Mikrochim. Acta.</i> , 1, 75 (1936).
(5) J. Folch : <i>ibid.</i> , 177, 497 (1949).	(17) S. F. Herb, R. W. Riemenschneider : <i>Anal. Chem.</i> , 25, 953 (1953).
(6) J. Folch : <i>ibid.</i> , 177, 505 (1949).	(18) E. G. Hammond, W. O. Lundberg : <i>J. Am. Oil. Chemists' Soc.</i> , 30, 433 (1953).
(7) C. F. Burmaster : <i>ibid.</i> , 165, 577 (1946).	(19) C. R. Scholfield, T. A. McGuire, H. J. Dutton : <i>J. Am. Oil. Chemists' Soc.</i> , 27, 352 (1950).
(8) J. N. Hawthorn, E. Chargaff : <i>ibid.</i> , 200, 27 (1954).	(20) T. A. McGuire, F. R. Earle : <i>ibid.</i> 28, 328 (1951).
(9) M. Faure, M. J. Marelec-Coulon : <i>Compt. rend.</i> , 238, 411 (1954).	
(10) 座間宏一, 五十嵐久尙 : 本誌, 30, 435 (1956).	
(11) 座間宏一, 五十嵐久尙 : 本誌, 31, 582 (1957).	