カツオの生化学的研究—Ⅳ— 幽門垂のアミノ酸分布

柿本大壹・金沢昭夫・柏田研一

(鹿児島大学水産学部)

Biochemical Studies on Skipjack (*Katsuwonus vagans*)—Ⅳ.

Distribution of Amino-Acid in Pyloric Coeca

Daiichi KAKIMOTO, Akio KANAZAWA and Ken'ichi KASHIWADA

Amino-acids containing in pyloric coeca of skipjack were examined by paper partition chromatography.

For this experiment authors used the many fractions treated with various reagents. As the results of above mentioned examinations, they ascertained that in pyloric coeca next 15 amino-acids or its relational substance were included: tyrosine, glutamic acid, aspartic acid, glycine, alanine, threonine, arginine, serine, leucine, valine, proline, cystine, lysine, histidine, ornithine, and one of unknown substance.

By the case of acidic and basic amino-acids Rf value often got out of normal place, but its cause could not be decided in this experiment.

著者等は本研究の第1報¹⁾に於てカツオ幽門垂が全窒素の約60%に当るアミノ態窒素を含有することを報告したが、この多量のアミノ酸を個々に確認することは幽門垂の生理的機能を究明する上に重要な意義をもつものと考えられるので、濾紙クロマトグラフィーにより此等のアミノ酸を検索した。この方法に於ては試料に共存する他物質が時として結果を不確実ならしめることが CONSDEN²⁾、大高³⁾氏等によつて報告されているが、幽門垂エキスはアミノ酸以外に高級含窒素成分を含有し⁴⁾更に或る種の有機塩基、糖その他の成分も検出されるので先ず此等の共存物質がアミノ酸のクロマトグラムに影響を与えるか否かを確かめるため十数種のアミノ酸を標準にして幽門垂に含まれるアミノ酸の Rf 値を比較した所、後で述べる様に二三のアミノ酸に対して多少の影響のあることを知つた。

実験の部

従来の方法に少しく改良を加えた二次元法を行つた。方法の要点のみ略述する。

濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用いた。之を一辺の長さ 35 cm の正方形とし原点は相隣る二辺から夫々 6 cm の個所とし上昇法により 25 cm 展開せしめた。濾紙を円筒形に巻き上端を重ねてクリップでとめて展開剤を入れた容器に立てると、濾紙の重なつた部分は展開剤の移動が早く行われるため試料は原点から垂直に上昇せず、濾紙の中央部に傾いて斜めに移動するため移動距離の長いアミノ酸は二次元にかけた場合 Rf 値に相当の影響が現われることを発見したので、濾紙の両端近くを二箇所切り込み小硝子棒でとめて濾紙が重り合わぬようにした所良結果を得た。展開は一定の温度 (27±1°C) で行つた。展開剤としてはブタノール・

Fig. 1 Paper chromatogram of pyloric coeca extract.

醋酸・水 (4:1:1) とフェノール (25%含水) を用い、呈色剤はニンヒドリンの 0.25 % ブタノール (水飽和) 溶液を用いた。

試料の調製

(1) 冷水浸出液の酸水解物 皮膜を除去した幽門垂から血管を注意して除いた後、内部に分布する樹枝状の脈組織を除くため細目の金網で漉し、乳鉢中で良く磨碎し冷水を加えて浸出した濾液を減圧濃縮し 10 倍容の 20 % 塩酸で 1 時間煮沸した後減圧濃縮して塩酸を可及的に除き苛性ソーダで中和濾過した。

(2) 熱水浸出液 上の如く血管、脈組織を除いた幽門垂に水を加えて煮熟した後濾過した。

(3) 熱水浸出液の酸水解物 (2) の試料を (1) と同様塩酸で加水分解した。

(4) 熱水浸出液のアルカリ水解物 (2) の試料を 20 % バリタで 20 時間水解し、バリタを硫酸で定量的に除去した後減圧濃縮した。

(5) 熱水浸出液の脱脂物 (2) の試料を液体浸出器によりエーテル抽出を行つた後エーテルを除去した。

(6) 脱脂エキスの酸水解物 (5) の試料につき (1) の方法に準じて塩酸で加水分解した。

(7) 醋酸鉛処理物 (6) の試料に中性及塩基性醋酸鉛を相次いで加え生じた沈澱を除き、濾液中の鉛を H_2S によつて除いた後減圧濃縮した。

(8) アンモニア性醋酸鉛による処理物 (5) の試料にアンモニア性塩基性醋酸鉛を加えて生ずる多量の沈澱 (之は顕著な Molish 反応を示す) を除き、濾液から鉛を H_2S で除去し減圧濃縮した。

(9) 銅塩 (7) の試料に炭酸銅を加えて煮沸して生成した銅塩の溶液をそのまま試料とした。

(10) ブタノールで抽出されない部分 (9) の試料から銅を H_2S で除いたものを Dakin の装置によつてブタノールで抽出し、抽出されない部分からブタノールを除き減圧濃縮した。

(11) ブタノールで抽出される部分 (10) の処理に於てブタノールで抽出された部分からブタノールを去り減圧濃縮した。

(12) ブタノール抽出残部の磷タングステン酸沈澱部 (10) の試料に塩酸と磷タングステン酸を加えて生じた沈澱を集め、磷タングステン酸をバリタで、バリタを硫酸で除いて減圧濃縮した。

(13) (12) の試料に炭酸ガスを飽和せしめた後昇汞を加えて生じた沈澱を集め、水洗後水銀を H_2S で除き減圧濃縮した。

(14) (13) の試料に醋酸水銀を加えて生じた沈澱を集め、水洗後水銀を H_2S で除いて減圧濃縮した。

以上 14 種の各試料につき夫々 3—5 回クロマトグラフィーを行つた。

成績並に考察

実験の結果は Fig. 1 の通りで番号は前記各試料番号を表わす。原点位置は各図の右下端で縦軸はブタノール・醋酸、横軸はフェノールによる展開である。

このクロマトグラムによるとカツオ幽門垂エキスのアミノ酸は Tyrosine, Glutamic acid, Aspartic acid, Glycocoll, Alanine, Threonine, Arginine, Serine, Leucine, Valine, Proline, Cysteine, Lysine, Histidine, Ornithine と外に 1 個の未知の Spot がある。Tyrosine はエキスを濃縮する際多量析出する。Methionine と Valine は殆んど同じ個所に Spot が現われるが、ニトロプルシッドナトリウム反応³⁾が陰性であつたので Valine と推定した。加水分解しても Spot の増減は認められないが磷タングステン酸沈澱部に於ても濾液部に於てもビュレット反応を与え、軽度の酸分解によつてアミノ態窒素が増加し、又高級含窒素成分の存在も認められるので⁴⁾ 此等のことからポリペプチッドの存在を予想して研究を進めている。エーテル抽出は脂肪類その他エーテル可溶性物質の影響を除くため、醋酸鉛は蛋白其他高分子化合物の影響、塩基性醋酸鉛アンモニア溶液は主として糖類の影響を除くために採つた操作である。磷タングステン酸処理

は塩基性アミノ酸を分離し其の確認を目的とした操作で、この外アミノ酸分離の方法を応用し共存物質の影響を除くことに努めた。此等の処理を行つた各試料のクロマトグラムから得られる知見を述べると、磷タングステン酸沈澱部に見られる Arginine, Histidine, Lysine と思われる Spot は何れも正常の位置から少しくずれていたが、之は試料が純粋な蛋白質の分解物でなく他の共存物質の影響と思われる。此の部分から磷タングステン酸を除去したものはビュレット反応、坂口反応、デアゾ反応を示し、ピクリン酸では沈澱を生じないがフラビオン酸、ニトロアニール酸によつて沈澱を生じた。磷タングステン酸沈澱部はかなり多量得られるので、KOSSEL 法によつて Histidine の分離を試みたが成功しなかつた。pH 7.3 で昇示で沈澱する部分のクロマトグラム (No. 13) 中 Spot 14 は Histidine と判断したが実は正常の位置からやゝずれている。然るにこの試料の一部を更に醋酸水銀で沈澱せしめたもの (No. 14) では Spot 14 は全く Histidine の正常位置を示した。その理由は明らかでないが昇示沈澱物中に来る他物質の影響ではあるまいか。Cystine は不明瞭であるが之は難溶性であるからエキス中に溶出し難いか、若しくは酸化されたかによるものであろう。No. 3 及び No. 10 に於て Cysteic acid の検出されることから後者の現象が想像される。エーテル抽出を行つたもの (No. 5 以下) に Cystine が検出されず抽出処理を施さぬもの (No. 2) に Cystine の現われることから Cystine の酸化を阻止する物質の存在が想像される。Proline は試料濃度の高い場合一次元で確認されるが二次元ではブタノール抽出部に於てのみ認められた。Proline の消失限界濃度の高いためであろう。熱水浸出液及びアルカリ水解物に於て Ornithine が認められたが幽門垂中に初めから存在したものの可否は不明である。バリタ分解物中のものはアルカリ処理によつて Arginine から生じたものかも知れぬが、熱水浸出液に存在するものに対しては適切な説明を与え得ない。Glutamic acid と Aspartic acid は酸水解物と此の部分とを他のアミノ酸から分離した区分に於てのみ正常の Rf 値を示すが然らざる試料に於ては著しくずれる。特に試料 2 及び 8 が著しかつた。即ち酸性及び塩基性アミノ酸のクロマトグラムは共存物質の影響を受け易いか、或は他の原因によるものか明らかでないが少くとも此の実験では Rf 値が変動し易いように考えられる。

摘 要

カツオ幽門垂エキスは全窒素の約 60% に当るアミノ態窒素を含有するので濾紙クロマト法によつてアミノ酸の種類を検索した。エキスのまゝ及びその加水分解物、醋酸鉛、磷タングステン酸、昇示、醋酸水銀等で処理した 14 種の試料につき実験した結果、Tyrosine, Glutamic acid, Aspartic acid, Glycocoll, Alanine, Threonine, Arginine, Serine, Leucine, Valine, Proline, Cystine, Lysine, Histidine, Ornithine を検出し、更に未知の 1 Spot を得た。酸性及び塩基性アミノ酸の Spot は正常の位置より少しくずれたがその理由は充分明らかでない。

本研究は昭和 26 年度文部省科学研究費によつて行つたもの一つである。幽門垂は本県枕崎市漁業協同組合長立石松義氏から提供されたもので、その好意に対し深謝の意を表する次第である。

文 献

- 1) 柏田, 柿本: 日水誌 **18**, 147 (1952).
- 2) R. CONSDEN: *C. A.* **43**, 265 (1949).
- 3) 大高: 農化 **24**, 366 (1951).
- 4) 柿本, 山崎, 柏田: 日水誌 **19**, 15 (1953).
- 5) MC CARTHY, SULLIVAN: *J. Biol. Chem.*, **141**, 871 (1941).