マ グ ロ 筋 肉 の 脂 質—V.

アミノ磷脂質について*

片田 宗男・座間 宏一・五十嵐久尙

(北海道大学水産学部水産化学教室)

Lipids of the Muscle of Tuna, *Thynnus orientalis*—V.

Further Researches on the Phosphoaminolipids**

Muneo KATADA, Koichi ZAMA and Hisanao IGARASHI

The phosphoaminolipids obtained from cephalins of the muscle of a tuna, *Thynnus orientalis*, were converted to their dinitrophenyl (DNP) derivatives and applied to the chromatographic separation with a silicic acid/celite (2: 1) column and chloroform/methanol to yield a DNP-ethanolamine-containing lipid (I), and amino acid-containing lipids (II), which gave a DNP-serine-containing lipid (II-a) and a mixture of DNP-serine-containing and DNP-threonine-containing lipids (II-b) by rechromatography. Hydrolysis of I with hydrochloric acid yielded DNP-ethanolamine, which gave free ethanolamine by decomposing with concentrated ammonium hydroxide. DNP-serine and threonine, and free serine and threonine were isolated and identified with the same manner from II-a and II-b respectively. Periodate oxidation of the threonine fraction obtained from DNP-threonine of II-b gave acetaldehyde and glyoxylic acid. Component fatty acids of each fraction were found to be palmitic and oleic acids by paper chromatography. The presence of palmitoyl-oleoylglycerolphosphoryl esters of ethanolamine, serine and threonine can be supposed.

著者らは前報¹⁾において得たクロマグロ, *Thynnus orientalis* の普通筋のケファリンを精製・分離し, その 2, 4-ジニトロフェニル (DNP) 誘導体をつくり, 珪酸/セライトのカラムクロマトグラフによる分離を行つて 2-アミノエタノール (エタノールアミン), セリン及びスレオニンをそれぞれ含む磷脂質の存在を確認, その結果の一部をさきに発表した²⁾ が, ここにその詳細を報告する。

一般に磷脂質に結合している窒素塩基としてはコリン, セリン, 2-アミノエタノール及びスフィンゴシンが知られているが, 最近これら以外の成分の存在がしばしば報告されている。この多くが細菌の磷脂質であるが, 動物からは LEVINE ら³⁾ がウシ脳のカファリンに 3 種の未知塩基を推定し, LOVERN ら⁴⁾ はハドック, *Gadus aeglefinus* とタラ, *G. callarias* の筋肉の磷脂質にコリン類似と考えられる未知塩基の存在をみとめた。また PILGERAM ら⁵⁾ はネズミ肝臓の磷脂質からグルタミン酸を分離した。上記の各研究者のみとめたアミノ酸にはスレオニンは含まれていないが, これを微量にみとめたものとしては BLASS ら⁶⁾ のヒト及びウマの血漿と血球から得た磷脂質, 及び RHODES ら⁷⁾ のニワトリ卵の磷脂質についての報告がある。

著者らが精製して得たアミノ磷脂質区分はその分析値及び過沃素酸と反応しないことから, 遊離の β -オキシ- α -アミノ酸, -アミノアルコール及びグリセリンを含まないことを知つた。この区分を DNP 誘導体とし, 珪酸/セライトのカラム上でクロロホルム/メタノールにより展開して 2-アミノエタノール区分 (I) 及びアミノ酸区分 (II) を分離し, 後者を更にクロマトグラフによりセリン区分 (II-a) 及びスレオニン+セリン区分

1958 年 8 月 15 日受理

* 水産動物磷脂質に関する研究—XVII.

** Studies on the Phosphatide of Aquatic Animals—XVII.

(II-b) に分離した。これらの加水分解物よりそれぞれの DNP-塩基を単離、確認し、次いで DNP 誘導体を分解して得た遊離アミノ化合物をペーパークロマトグラフにより確認した。特にスレオニンについては DNP-スレオニン区分より得た遊離アミノ酸区分を過沃素酸により酸化し、反応生成物からアセトアルデヒドを 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして確認し、HOPKINS-COLE 反応によりグリオキシル酸の存在をみると、このアミノ酸が α -アミノ- β -オキシ酪酸 (スレオニン) なることを確めた。アミノ磷脂質原区分の分析結果及びアミノ基のみが遊離であること、また上記 3 区分からの脂肪酸の収量が各区分に対してそれぞれ約 1: 2 の分子比であることからこれらの磷脂質が従来考えられているところの Phosphatidylethanolamine, -serine の構造を有することはほぼ確実であり、スレオニン含有磷脂質もおそらくはこのような構造であることが考えられる。更にこれら各区分の構成脂肪酸がパルミチン酸とオレイン酸の大約等モルの混合物であることから, Palmitoyloleoylglycerolphosphorylethanolamine, -serine 及び -threonine なる構造も推測され得るのである。

実験及び結果

(1) アミノ磷脂質区分の調製

前報¹⁾に記した普通筋ケファリン W-2, 3 及び 4 の区分を合一 (3.48 g), これをクロロホルム 24 cc に溶解し, 30 cc の無水エタノールを加え, 1 夜氷室に放置後生じた少量の不溶物を除き, 溶媒を溜去した。これを水 180 cc に懸濁, 濃塩酸 18 cc を加え遠沈し, 沈澱を N/10 塩酸に再び懸濁し遠沈した。沈澱をクロロホルム/メタノール (2: 1) 100 cc に溶解し, 900 cc の水による FOLCH ら⁸⁾の washing を 3 回行つた。クロロホルム層を少量に濃縮し大量のアセトンを加え氷室に放置後遠沈し, 沈澱を同様にしてクロロホルム/メタノールから無水エタノールにより 2 回沈澱した。この沈澱をくりかえし石油エーテルで抽出して石油エーテル可溶区分を得た。収量 2.98 g, 乳白色の固体で P 4.08%, N 1.81%, グリセリン 11.80%, 沃素価 33.6。6N 塩酸で 100°, 48 時間加水分解した生成物はペーパークロマトグラフにおいて 2-アミノエタノール, セリン及びスレオニンの存在を示し, ニンヒドリンに対する呈色の強度はセリン > 2-アミノエタノール > スレオニンの順序で, 水飽和フェノールを用いてそれぞれ R_f 値 0.42, 0.95, 0.55 を示し, n-ブタノール/ジエチレングリコール/水 (4: 1: 1) を用いてそれぞれ R_f 値 0.18, 0.35, 0.30 を示した。またこの水解物では SCHERER 反応を呈しなかつたのでイノシットは存在しないものと考えられる。更にこの磷脂質区分 0.40 g (ケファリンとして約 0.5 mM) をクロロホルム 10 cc に溶解, 0.1M 過沃素酸 95% 醋酸溶液 10 cc を加え, 空試験と共に放置し, 一定時間後にその一部をとり沃化カリを加えてチオ硫酸ナトリウムで滴定したが 6 時間後においても過沃素酸の消費はみとめられなかつた。

(2) DNP-アミノ磷脂質区分の調製

前記アミノ磷脂質 2.40 g (Phosphatidylserine に換算して約 3 mM) をクロロホルム 35 cc に溶解, 7% 2, 4-ジニトロフルオルベンゼンのエタノール溶液 25 cc, 4% 炭酸ナトリウム水溶液 25 cc を加え, 室温で 20 時間振盪, 水層を塩酸性とし, クロロホルム層をとり, 更にクロロホルム 10 cc で水層を抽出, クロロホルム溶液を合一, これに 50% エタノールを加えて振盪し, クロロホルム層をとつた。クロロホルム溶液は水洗, 乾燥し, 溶媒を溜去, 乾固して DNP-アミノ磷脂質を得た。収量 2.52 g。

(3) DNP-アミノ磷脂質のクロマトグラフ

経 2.6 cm の吸着管に珪酸/セライト (2: 1) を充填し, アセトン, 次いでクロロホルムを流下して前処理を行い, 高さ 20 cm のカラムを調製した。上記 DNP-アミノ磷脂質を 3 cc のクロロホルムに溶解, これを 5 g の吸着剤と攪拌したものをカラムの上端におき, 次のようにして展開した。まず展開剤としてクロロホルム/メタノール (98: 2) を用いて展開して区分-I を溶出, 次いで (95: 5) により区分-II, III を溶出, (9: 1) により区分-IV, (8: 2) により区分-V, VI を溶出せしめた。各流下液から溶媒を溜去し乾固した。これら各区分の収量は I 1.050 g, II 1.280 g, III 0.092 g, IV 0.017 g, V 0.003 g, VI 0.007 g であつた。これらの一部をとり, リグロイン (b. p. 80~100°) 5 cc 及び 6N 塩酸 5 cc を加え, 20 時間還流して加水

分解後酸層をとり、乾固して水酸化ナトリウム上で減圧乾燥した。残渣に少量の水を加え、約 0.5cc の醋酸エチルで DNP-アミノ酸を抽出して、東洋汙紙 No. 50 を用い、水飽和ブタノールで展開してペーパークロマトグラフを行つた。その結果区分-I の水解物より R_f 値 0.85 の DNP-2-アミノエタノール、区分-II より R_f 値がそれぞれ 0.33, 0.47 の DNP-セリン及び DNP-スレオニンのスポットをみとめた。区分-III 以下は少量のため更に検索を行わなかつた。次いで区分-II 1.20g を 2cc のクロロホルムに溶解し、5g の吸着剤と攪拌したものを前述の如く調製した珪酸/セライト (2: 1) カラム (1.5 × 20cm) の上端におき、クロロホルム/メタノール (1: 1) で展開し、II-a 及び II-b の 2 吸着層を溶出した。ただしこの 2 層の分離は完全には行われなかつた。区分-II-a の収量は 0.825g, II-b は 0.210g, その水解物のペーパークロマトグラフにより II-a に DNP-セリン、II-b に DNP-スレオニンと DNP-セリンをみとめた。

(4) DNP-アミノ磷脂質の加水分解

区分-I: 区分-I 1.010g にリグロイン 25cc, 6N 塩酸 25cc を加えて 20 時間還流後酸層をとり、リグロインで 1 回抽出後減圧乾固し、水酸化ナトリウム上で減圧乾燥し、残渣を少量の水に溶解、醋酸エチルで DNP-アミンを抽出した。これを少量の珪酸/セライト (2: 1) に吸収せしめ、珪酸/セライト (2: 1) カラム (2.6 × 20cm) の上端におき、醋酸/醋酸エチル/リグロイン (1: 1: 8) を用いて展開した。その結果 2 吸着層を溶出し、これらを乾固した。第 1 層に含まれた物質をベンゼン/リグロイン (7: 3) から再結して得た黄色結晶の収量 12mg, m. p. 175~6°, 合成 2, 4-ジニトロアニリンと混融して融点を降下しなかつた。第 2 層の物質をベンゼンから再結して橙黄色結晶 135mg を得た。m. p. 89~90°, 合成 DNP-2-アミノエタノール⁹⁾と混融して融点を降下せず、N 分析値 18.08%, $C_8H_9N_3O_5$ 計算値 18.50%。この一部を濃アンモニア水 2cc と封管中 100° に 2 時間反応せしめ、管を開いて濃硫酸上で乾固した。残渣に 1N 塩酸 2cc を加えエーテルで抽出してジニトロフェノール及び未分解物を除いて遊離アミン溶液を得た¹⁰⁾。この遊離アミンのペーパークロマトグラフを行つた結果、水飽和フェノールにて 0.95, n-ブタノール/ジエチレングリコール/水 (4: 1: 1) にて 0.35 の R_f 値を示し、それぞれ 2-アミノエタノールの標準品に一致した。塩酸加水分解の際に得られたリグロイン溶液を合一し、水洗、乾燥後溶媒を溜去し、残渣をエタノール性水酸化カリで鹼化、不鹼化物をエーテルで除去後、常法によつて混合脂肪酸を得た。収量 0.521g, 中和価 205.1, 沃素価 49.6。井上・野田¹¹⁾の方法により東洋汙紙 No. 2 を用い、固定相にテトラリン、移動相に 90% メタノール/酢酸/テトラリン (10: 2: 1) によつて脂肪酸の 2, 4-ジニトロフェニルヒドラチドのペーパークロマトグラフを行つた結果 R_f 値 0.21 のパルミチン酸ジニトロフェニルヒドラチドの存在をみとめ、また野田・平山・井上¹²⁾の方法により調製した脂肪酸の酢酸水銀附加物を東洋汙紙 No. 50, 固定相にテトラリン、移動相に 90% メタノール/酢酸/テトラリン (10: 2: 1) を用いて展開した結果 R_f 値 0.15 にオレイン酸酢酸水銀附加物のスポットをみとめた。パルミチン酸とオレイン酸の等分子混合物の中和価計算値 208.2, 沃素価計算値 47.1。

区分-II-a: この 0.810g を区分-I と同様に加水分解し、次いで DNP-誘導体のカラムクロマトグラフにより 2 層を溶出した。第 1 層の物質はジニトロアニリンであり、収量 7mg, 第 2 層に含まれる物質をメタノールから再結して橙黄色結晶 125mg を得た。m. p. 189~90°, 合成 DNP-DL-セリン¹³⁾と混融して融点を降下せず、N 分析値 15.13%, $C_9H_9N_3O_7$ 計算値 15.50%。これより得た遊離アミノ酸はペーパークロマトグラフにて水飽和フェノールを用いて R_f 値 0.42, n-ブタノール/ジエチレングリコール/水 (4: 1: 1) を用いて R_f 値 0.18 を示し、セリンの標準品と一致した。この区分からの脂肪酸の収量は 0.369g, 中和価 204.8, 沃素価 48.5, ペーパークロマトグラフによりパルミチン酸とオレイン酸の存在をみとめた。

区分-II-b: 0.180g を加水分解し、DNP-誘導体部のカラムクロマトグラフにより 3 層を溶出した。第 1 層の物質はジニトロアニリンで収量 5mg, 第 2 層の物質をメタノールから再結して黄色結晶 26mg を得た。m. p. 149~52°, 合成 DNP-DL-スレオニン¹³⁾と混融して融点を降下せず。分析値 C 41.99%, H 3.70%, N 14.62%, $C_{10}H_{11}N_3O_7$ 計算値 C 42.11%, H 3.88%, N 14.73%。DNP-スレオニン部 10mg をアンモニアで分解して得た遊離アミノ酸はペーパークロマトグラフにて水飽和フェノールを用いて R_f 値 0.55,

n-ブタノール/ジエチレングリコール/水 (4: 1: 1) を用いて R_f 値 0.30 を示し、スレオニンの標準品に一致した。遊離アミノ酸液の残部 (約 1.5 cc) を 0.5 N 水酸化ナトリウムで中和し、氷冷しつつ磷酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.12) 10 cc, 0.1 M 亜硫酸ナトリウム水溶液 5 cc 及び 0.1 M 過沃素酸水溶液 1 cc を加え、水浴上で約 30° に加温しつつ 1 時間通気した。揮発性物質は 1% 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンのエタノール溶液 20 cc に捕集し、反応終了後ベンゼンで抽出、ベンゼン溶液を 1×10 cm のアルミナカラムを通過、更にベンゼンを流下して過剰のヒドラジンを吸着し、ヒドラゾンのみを溶出した。ベンゼン溶出液より溶媒を除去、残渣をエタノール、次いでリグロインから再結して橙黄色結晶 3 mg を得た。m. p. 131~2°, アセトアルデヒドの 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンと混融して融点を降下せず、またリグロイン/エーテル (95:5) を溶媒としてペーパークロマトグラフを行い、 R_f 値 0.78 に標準品と一致するスポットをみとめた。揮発性物質を除いた過沃素酸反応液に濃硫酸を加えて強酸性とし、トリプトファンを用いて HOPKINS-COLE 反応を行つたところ陽性を呈し、グリオキシル酸の生成をみとめた。第 3 層に含まれる物質をメタノールから再結して橙黄色結晶 8 mg を得た。m. p. 188~9°, DNP-セリンと混融して融点を降下せず。区分 II-b からの脂肪酸の収量は 0.081 g, 中和価 209.7, 沃素価 45.6, ペーパークロマトグラフによりパルミチン酸とオレイン酸の存在をみとめた。

要 約

クロマドロの普通筋ケファリンよりアミノ磷脂質区分を分離し、これをジニトロフェニル誘導体としてカラムクロマトグラフにより分画を行つた結果、2-アミノエタノール、セリン及びスレオニンをそれぞれその構成塩基とする磷脂質を得た。これらの磷脂質はおのおの 1 分子づつのアミノ塩基、磷酸、グリセリン、パルミチン酸及びオレイン酸よりなるものと考えられる。

本研究は文部省科学研究総合研究“魚類の血合肉と普通肉の生化学的研究”の分担として行つた。

文 献

- 1) 五十嵐久尙・座間安一・片田宗男: 本誌, **23**, 278 (1957).
- 2) H. IGARASHI, K. ZAMA, M. KATADA: *Nature*, **181**, 1282 (1958).
- 3) C. LEVINE, E. CHARGAFF: *J. Biol. Chem.*, **192**, 465 (1951).
- 4) J. A. LOVERN, J. OLLEY: *Biochem. J.*, **54**, 128, 559; **55**, 686 (1953); **62**, 99 (1956).
- 5) L. O. PILGERAM, D. M. GREENBERG: *J. Biol. Chem.*, **216**, 465 (1955).
- 6) J. BLASS, A. ROUHI, O. LECOMPTE, M. MACHEBOEUF: *Bull. soc. chim. biol.*, **35**, 959 (1953).
- 7) D. N. RHODES, C. H. LEA: *Biochem. J.*, **65**, 526 (1957).
- 8) J. FOLCH, I. ASCOLI, M. LEES, J. A. MEATH, F. N. LE BARON: *J. Biol. Chem.*, **191**, 833 (1951).
- 9) H. JATZKEWITZ, N. D. TAM: *Z. physiol. Chem.*, **296**, 188 (1954).
- 10) A. G. LOWTHER: *Nature*, **167**, 767 (1951).
- 11) Y. INOUE, M. NODA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 214 (1955).
- 12) 野田万次郎・平山 修・井上吉之: 農化, **30**, 166 (1956).
- 13) R. R. PORTER, F. SANGER: *Biochem. J.*, **42**, 287 (1948).