ミシマオコゼ (*Uranoscops japonicus* HOUTTUYN) 肝臓中の アントラニル酸およびアントラニル酸誘導体について*

山 田 紀 作・田 中 瑞 穂

(1959 年 12 月 16 日受理)

STUDIES ON ANTHRANILIC ACID AND ITS DERIVATIVE IN THE LIVER OF JAPANESE STAR-GAZER (*URANOSCOPS JAPONICUS* HOUTTUYN)

Kisaku YAMADA and Mizuho TANAKA**

For the purpose of utilizing fish-wastes, we determined aqueous vitamins in those materials and found that the liver of Japanese star-gazer (*Uranoscops japonicus* HOUTTUYN) contained a large amount of anthranilic acid and its derivative. The summary of the experimental results are described below.

- (1) The anthranilic acid content of Japanese star-gazer liver is from twenty to fifty times as much as those of other fishes or rats. While the nicotinic acid content is lower than those of other kinds.
- (2) The anthranilic acid derivative described above is easily hydrolyzed by NH_4SO_4 at 80°C in 30 minutes and yields free anthranilic acid and other component not yet clear.
- (3) The derivative seems to be a compound which combines with some component through the amino group, for the test by Ehrlich reagent is negative and the color of quinhydrone reaction is yellow, while the former test becomes positive and the latter reaction produces red after hydrolysis.

水産物中特に魚類廃棄物の高度利用のため、基礎的な研究として各種魚類肝臓中のビタミン類含量を測定したところ、分析中に東海産ミシマオコゼ肝臓において多量のアントラニル酸 (AA と略記す) と未知のアントラニル酸誘導体 (AAD と略記す) を検出した。哺乳類あるいは昆虫類体内の AA については過去幾多の研究がなされトリプトファンの中間代謝生産物であることが証明されているが、魚類についてこの点不明である。しかし、後述するように多量の AA あるいは未知の AAD を蓄積しておくこと、および AAD が哺乳類あるいは昆虫類などで現在まで検出されている生体内生成物とは異なることなどは特異な現象と思われる。上記廃棄物の高度利用とこれの特異的な現象を合わせて解明するために AA の代謝生産物といわれているニコチン酸、トリプトファンの代謝過程で直接 AA の生成に関与するキヌレニナーゼの補酵素であるピリドキシン¹⁾の含有量についてミシマオコゼと他の数種の魚類とを比較検討し、また AAD の構造について二、三の分析を行つたので報告する。

実 験

実験材料： 実験に供した魚種は長崎魚市に水揚げされた直後の新鮮なものでマサバ *Scomber japonicus*、マアジ *Trachurus japonicus*、ブリ *Seriola quinqueradiata*、マダイ *Pagrosomus major*、キントキダイ *Priacanthus macracanthus*、ミシマオコゼ *Uranoscops japonicus* を使用し、それぞれの魚類の

* 本研究の要旨は 1959 年 10 月 25 日、日本水産学会全国大会 (大阪府) において発表した。

** 西海区水産研究所 (Seikai Reg. Fish. Res. Lab., Nagasaki, Japan).

肝臓および普通筋肉を使用した。

I. 各種ビタミン含有量について

1. 定 量 法

ピリドキシン: 藤田・松浦・藤野による蛍光的定量法²⁾。

ニコチン酸: Kodicek 法³⁾⁴⁾。この場合ニコチン酸アミドも含めてその総量を測定した。

アントラニル酸: 大谷・本田反応による方法⁵⁾。ただし大谷・本田反応を実施する前に試料液に H_2SO_4 を約 1N となるように加えて湯煎中で $80^\circ C$, 30 分加熱し、後述の AAD を加水分解して AA となし、遊離のと合わせてその総量を測定した。

2. 定量結果

定量結果は Table 1 のごとくであつた。表よりミシマオコゼ肝臓中の AA, AAD 総量は他の魚類あるいはネズミに比較して 20~50 倍の濃度で含まれており、筋肉においても比較的が多い。つぎにニコチン酸については AA ととは逆にミシマオコゼの場合が少くなっている。ピリドキシンについては特異な傾向は見られない。

Table 1. Aqueous vitamin contents of marine fish and rat.

Species	Organs	$\mu g.$ in 1g of muscle and liver		
		anthranilic acid	nicotinic acid	pyridoxine
<i>Scomber japonicus</i> HONSABA	muscle	1.83	114.4	2.5
		4.95	915.0	43.2
<i>Trachurus japonicus</i> MAAJI	muscle	1.83	40.2	3.0
		5.02	—	80.0
<i>Seriola quinqueradiata</i> BURI	muscle	0.22	46.6	2.5
		2.42	460.6	10.0
<i>Pagrosomus major</i> MADAI	muscle	3.83	20.1	8.0
		16.66	605.0	—
<i>Priacanthus macracanthus</i> KINTOKIDAI	muscle	2.83	62.8	1.8
		7.10	—	9.6
<i>Uranoscopus japonicus</i> MISIMAOKOZE	muscle	5.55	10.9	1.1
		121.70	190.0	21.6
Rat NEZUMI	muscle	6.0 ^(ab)	81.0 ^(ba)	1.2 ^(ab)
		28.0 ^(ab)	148.0 ^(ba)	29.0 ^(ab)

II. ミシマオコゼ肝臓中の AA および AAD について

Table 1 の結果よりミシマオコゼ肝臓中に多量の AA が含まれていることが判明したので、その分離を試みたところ AA と、その誘導体 AAD を分離した。

1. 抽 出 法

新鮮なミシマオコゼ肝臓約 300g に倍量の熱湯を加え $80^\circ C$, 10 分加熱後 homogenize し再び $80^\circ C$, 30 分加熱し、固形物は遠沈除去し、上澄液を室温まで冷却する。冷却後 $N H_2SO_4$ で pH を 6.5 とし、液体浸出器を用いて一昼夜エチルエーテルで抽出をすると移行した AA, AAD のためにエーテル層は紫色の蛍光を放つ。上記エーテル抽出液を蒸留水で 2~3 回水洗後 $N/5 NaOH$ 約 30cc とともに分離ロート内で振盪し静置すれば AA, AAD はアルカリ層へ移行する。これはエーテル層の蛍光の消失により容易に判別される。つぎにアルカリ層を取出し弱酸性とし、再びエーテルで抽出すれば一応中性脂肪と分離した AA, AAD の粗エーテル溶液が得られる。

2. P・P・C による精製

上記のエーテル溶液を東洋濾紙 No. 52 (40×40 cm) の下部に帯状に塗布し 3N NH_4OH を飽和した BuOH 9 容と無水 EtOH 1 容を混和した展開剤で 17 時間室温で展開後風乾し、紫外線を照射すれば Rf. 0.26 (C_1) に紫色, Rf. 0.51 (C_2) に青白色の螢光を発する spot が検出される。それぞれの spot を切り取って濾紙片が浸る位の無水 EtOH あるいはアセトンで逆流クーラーをつけ 30 分間微沸騰させ抽出する。アセトン抽出液を時計皿に取り室温でアセトンを蒸発させれば C_1 は黄色葉状に C_2 は無色針状に結晶する。

3. 化学的性質

上記の C_1 , C_2 が AA であるかどうかを知るためにつぎのごとき定性反応および分析操作を試みた。

a) Ehrlich 試薬 (Ehr 試薬と略記す) に対する反応。

b) Quinhydrone 反応⁷⁾ (Quin 反応と略記す)。

c) P・P・C 分析。

展開剤 I: 3N NH_4OH 飽和 BuOH + EtOH (9: 1)。

展開剤 II: BuOH + AcOH + 水 (4: 1: 5)。

d) 紫外部分光分析 日立製 EPU-2 型分光光度計使用。

e) 螢光特性 同上螢光測定装置使用。

それぞれの実験結果を Fig. 1 と Table 2 に示す。

C_1 : Ehr 試薬に対して黄色を示し、また Quin 反応は赤色であることから芳香族アミンと考えられ、紫外吸収曲線, Rf 値, 融点, 螢光特性から当物質はアントラニル酸 (*o*-aminobenzoic acid) と推定される。

C_2 : Ehr 試薬に対しては negative であるが、加熱すれば黄色となる。Quin 反応は黄褐色であり Ehr 試薬におけるように加熱してもその色調は変化しない。これは Ehr 試薬中に含まれている H_2SO_4 のためと考えられるので上記抽出法で調製した C_2 のアル

Fig. 1. Ultra-violet light absorption spectra of anthranilic acid (I), its derivative (II), and hydrolysate of the derivative (III) from star-gazer liver. Commercial anthranilic acid in 99.5% EtOH. (IV)

Table 2. Properties of the anthranilic acid and its derivative from star-gazer.

Samples	Chemical tests		Rf value		M. P. (°C)	Fluorescence λ_{max} (mμ)
	Ehrlich test	Quinhydrone reaction	I	II		
Anthranilic acid derivative from star-gazer liver	negative	yellow	0.51	0.92	150~152	425 (pale blue)
Hydrolysate of the above derivative	positive	redishviolet	0.26	0.92	144~146	410 (violet)
Anthranilic acid from star-gazer liver	"	"	0.26	0.92	144~146	410 (violet)
Anthranilic acid (commercial)	"	"	0.26	0.92	144~146	410 (violet)

Solvent of (I): BuOH saturated with 3N NH_4OH + 99.5% EtOH (9: 1).

Solvent of (II): BuOH + AcOH + distilled water (4: 1: 5).

コール溶液に H_2SO_4 濃度が約 1N になるように H_2SO_4 を加えて逆流クーラを附し、湯煎中で 80°C , 30 分熱後中和濃縮し、P·P·C で展開、紫外線を照射して螢光の有無を調べたところ Rf. 0.51 の spot は消失し 0.26 に紫色の螢光を放つ物質を検出した。当物質について上記の定性反応および分析操作を試みた結果は Table 2 のごとくであり、Ehr 試薬に対する反応、Quin 反応、Rf 値等 AA と一致し、また紫外部吸収曲線 (Fig. 1) も $300\text{m}\mu$ 附近の λ_{max} が $320\text{m}\mu$ 附近に移動して AA のそれと一致し $250\text{m}\mu$ と $320\text{m}\mu$ との吸収比も酸分解後は AA での吸収比と大体同じになっていることから当物質は AA であり、 C_2 は AA の誘導体であることが明らかである。また酸による分解の前後での Ehr 試薬に対する反応および Quin 反応の色調の変化から当 AAD は AA のアミノ基にある物質が結合しているものと考えられるが、その結合物については今後検討し報告する。

考 察

哺乳類あるいは昆虫類においては正常な場合トリプトファンはキヌレニンから 3-オキシキヌレニン、3-オキシアントラニル酸を経てニコチン酸への代謝される⁸⁻¹¹⁾。またキヌレニンから直接アントニル酸を経て 5-オキシアントラニル酸となり、その酸化物であるキノニミンカルボン酸と酸化還元系を形成する¹²⁾ともいわれているが、過剰のアントラニル酸はそれ以上代謝されず抱合グルクロン酸として排泄せられる。一方微生物、すなわち *Pseudomonas* のある菌種ではアントラニル酸はカテコールを経てシス-シス-スコン酸から β ケトアジピン酸へとベンゾール核を開裂する代謝経路を持つている^{13), 14)}。魚類についてはこのようなトリプトファン代謝の詳細は明らかではないが、キヌレニンを経てニコチン酸となることはそれぞれの代謝物が検出¹⁵⁾されるので哺乳類と同じような代謝経路を持つていると想像されるが、しかしミシマオコゼの場合はアントラニル酸の誘導体が現在まで動物体内で検出された諸種の誘導体と異なり、そのアミノ基が誘導化されており、このことはニコチン酸含量の僅少なことを考え合わせて動物あるいは微生物とはアントラニル酸の代謝様式が異つていのではないかと考えらる。また廃棄物の高度利用の面ではアントラニル酸が哺乳因子としてのビタミン L_1 と同じ生理的效果¹⁶⁾があるので妊娠中の家畜とくに仔育率の悪い家畜に対して有効な餌料と思われる。

要 約

- 1) ミシマオコゼ肝臓中にはアントラニル酸およびその誘導体が他の魚類あるいはネズミに比較して 20 ~50 倍の高濃度で蓄積されている。これに反しニコチン酸含量は低い。
- 2) 同肝臓よりアントラニル酸およびその誘導体を分離結晶化し同定した。
- 3) 上記誘導体はアントラニル酸のアミノ基にある物質が結合しており、N H_2SO_4 中で 80°C , 30 分加熱すると分解しアントラニル酸を生ずる。

文 献

- 1) JAKOBY, W. and BONNER, D.: *J. Biol. Chem.* **205**, 699 (1953).
- 2) 藤田秋治: ビタミン定量法, 南江堂, 335 (1955).
- 3) 桂・榎田: ビタミン, **6**, 904 (1953).
- 4) KODICEK: *Biochem. J.* **34**, 712 (1940).
- 5a) 鈴木梅太郎: ビタミン, 日本評論社, 473 (1950).
- 5b) 鈴木梅太郎: ———, 480 ().
- 6a) 佐橋佳一・他: ビタミン学, 金原出版株式会社, 757 (1956).
- 6b) 佐橋佳一・他: ———, 751.
- 7) 船久保英一: 有機化合物確認法 (下巻), 養賢堂, 10.
- 8) KOTAKE und MASAYAMA: *Z. physiol. Chem.*, **243**, 237 (1936).
- 9) A, BUTENANDT et al.: *ibid.*, **279**, 27 (1943).
- 10) C, HEIDELBERGER et al.: *J. Biol. Chem.*, **184**, 589 (1950).
- 11) R, SCHAYER et al.: *ibid.*, **195**, 657 (1952).
- 12) 古武彌四郎・古武彌人: 大阪医学雑誌, **41**, 1028 (1942).
- 13) R, STANIER et al.: *J. Bact.*, **59**, 137 (1950).
- 14) 須田正己・他: 酵素化学シンポジウム, 第1集, 73 (1949).
- 15) 未発表.
- 16) 鈴木梅太郎: ビタミン, 日本評論社, 463 (1950).