魚体表面の粘性物質に関する研究—I.

ドジョウの体表面粘性物質の化学的性質*

榎 本 則 行・富 安 行 雄

(1960 年 4 月 20 日受理)

STUDIES ON THE EXTERNAL MUCOUS SUBSTANCE OF FISHES—I.
ON THE CHEMICAL PROPERTIES OF THE MUCOUS SUBSTANCE
OF LOACH, *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS* CANTOR.

Noriyuki ENOMOTO and Yukio TOMIYASU**

The present work is an attempt to elucidate the chemical properties of the external mucous substance of loach. The precipitation test, the identification of amino acids and carbohydrates by paper chromatography, and the quantitative analysis of the polysaccharide were employed.

The external mucous substance of loach was prepared by dipping living loaches in ethanol, scraping the mucous substance carefully from the whole surface of the body, washing it with ethanol and drying it in vacuo. Greyish powder was obtained. Sample for identification of amino acid component was repeatedly dissolved in 0.1% sodium hydroxide and precipitated at pH 4.0 with dilute hydrochloric acid. Sample for analysis of carbohydrate was prepared by hydrolyzing with pepsin and trypsin. The results obtained are as follows:

- 1) The result of precipitation test of the external mucous substance is shown in Table 1. All reagents used for the protein precipitation took effect, but heating was futile.
- 2) 16 amino acids were identified and the presence of an unidentified amino acid was detected (Fig. 1).
- 3) Ribose, arabinose, glucose, galactose, glucosamine and chondrosamine were identified.
- 4) It seems that the polysaccharide of the external mucous substance is composed of hexose and hexosamine at equimolar ratio.

動植物界を通じて、粘性物質の作用については生体機能の円滑化、外囲環境に対する保護作用などが挙げられている。魚体表面の粘性物質についても同様の生理作用が考えられるが、未だ殆んど不明のままの状態である。

ドジョウの体表面粘性物質（以下粘質物と略称する）は腫物の解熱剤として使用されており、ウナギの粘質物は解熱剤を作つたり¹⁾、強壮剤にされたり²⁾して薬用的にも興味があるが、その作用本態についての研究は見当たらない。

左右田等³⁾はボウシウボラの鰓下腺から acetone を用いて固化粘質物を得、これについて沈澱反応を試みた後、還元糖量を測定している。小幡等^{4,5)}は鮭の粘質物から picrolonate を作つて揮発性塩基成分を研究し、八坂等^{6,7)}はヒイラギ、ナマズの粘質物についてアミノ酸組成、糖組成を報告しているが未決解の点が多い。FERRY⁸⁾は hagfish の粘質物について述べ、最近 WESSLER 等⁹⁾は plaice, cod, whiting, eel, pike, ray および hagfish の粘質物を集めアミノ酸組成、糖組成を示した。ドジョウの粘質物については鶴見等¹⁰⁾の報告がある。著者等^{11,12,13)}は先にドジョウの粘質物が防腐剤と拮抗的に作用することおよびそれ

* 本報告の一部は 1957 年 10 月 10 日、日本水産学会秋季大会（函館）において発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem. Fac. Agr. Kyushu Univ., Fukuoka, Japan).

を細菌培地とした場合の菌の増殖について報告したが、これらに関連して更に基礎的な研究の必要を痛感した。本報はドジョウの粘質物の化学的性質について調べた結果の記載である。

実験および考察

I. ドジョウ粘質物の調製

前報¹⁾に準じて行つた。すなわち生きたままのドジョウを ethanol 中に投入し白く凝固した粘質物を注意深くこさぎとつた。これを ethanol で数回洗滌後、減圧乾燥、粉碎した粗製粉末を試料とした。灰白色の粉末で収量は 0.4~0.5% であつた。

II. ドジョウ粘質物の沈澱反応

粉末粘質物は水に殆んど溶けないが、アルカリに溶けて粘性を示す。0.1% NaOH を用い、1% の濃度になるように粉末粘質物を加え 30°C に1夜放置後、HCl で中和して遠心分離した上澄を試料とした。結果を Table 1 に示した。

Table 1. Precipitation test of the external mucous substance of loach.

Test	Precipitation	Remark
Heat coagulation	—	faint turbidity
Trichloroacetic acid	+++	
Phosphotungstic acid	+++	
Tannic acid	+++	
Lead acetate (dil. soln.)	+++	
Cupric sulfate (dil. soln.)	+++	
25% mercuric acetate soln.	+++	soluble by saturation with NaCl
Sulfosalicylic acid	+++	
Acetic acid (dil. soln.)	+++	soluble in glacial acetic acid
Hydrochloric acid (dil. soln.)	+++	soluble in conc. hydrochloric acid
Nitric acid (conc. soln.)	+++	{ soluble in excess nitric acid, colour turning yellow
Saturation with NaCl	+++	
Saturation with (NH ₄) ₂ SO ₄	+++	
Saturation with Na ₂ SO ₄	+++	
Ethanol	+++	

使用したすべての蛋白沈澱剤によつて沈澱を生ずるが、加熱によつては殆んど沈澱は生じない。しかし粉末粘質物の濃度が 2%, 3% と高くなると濃度に比例して混濁が増加する。うすい酢酸、塩酸によつて生じた沈澱はいずれもそれぞれの濃酸によつて溶解し水で稀釈すれば再び沈澱する。この点は八坂等²⁾ のヒイラギ粘質物と一致する。左右田等³⁾ によると、ボウシウボラの鰓下腺粘液は acetic acid, sulfosalicylic acid, ferric chloride, lead acetate で沈澱し、銀塩、水銀塩では沈澱しないという。ドジョウ粘質物が加熱によつて非凝固である点は共通しているが、水銀塩でも沈澱する点は異つている。

III. ドジョウ粘質物の構成アミノ酸

粗製粉末粘質物は小さな鱗を含んでいるのでこれを除くためにつぎの操作を行つた。粉末 2g に 0.1% NaOH 400cc を加え 30°C に1夜放置して溶解後、遠心分離して上澄液をとり稀塩酸で pH 4.0 とし、生じた沈澱を遠心分離して集めた。この操作を再び繰返して、得られた沈澱を ethanol で2回洗滌後、さらに acetone, ether で洗つて乾燥した。

この精製粘質物を常法に従つて 8N HCl で10時間加水分解し、減圧濃縮を3回反復して HCl をできるだけ除き、得られた茶褐色の濃縮液を paper chromatography の試料とした。

展開用紙は東洋用紙 No. 51 (40×40 cm), 展開溶媒は一次元 phenol: 水 (8:2), 二次元 *n*-butanol: 酢酸: 水 (4:1:2) を用い ninhydrin で発色せしめた。別に標準アミノ酸 (味の素製, paper chromatography 用試薬) 混液を同一条件で同時に展開し, これと対比することにより各 spot を同定した。結果は Fig. 1 に示した。

cystine, lysine, histidine, glycine, aspartic acid, serine, glutamic acid, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, phenylalanine, leucine の 16 種のアミノ酸を認めた。図の spot K は標準アミノ酸の展開結果と比較すると hydroxyproline の位置に近いが, 呈色が薄紫赤色を示すので同定し得なかった。spot の大きさ, 呈色度から見て aspartic acid, glutamic acid, lysine, threonine, valine, leucine が多く, histidine, tyrosine, methionine が少いと推定される。

既報¹¹⁾のように粘質物は xanthoproteic reaction, Hopkins-Cole test が陽性なので tryptophan が存在すると考えられるが, 酸分解を行つたため認め得なかった。

飯藤¹⁴⁾は市販ペプトン並びに肉エキスの遊離アミノ酸について研究し, glycine, arginine, histidine, lysine, methionine, tryptophan, leucine, glutamic acid, proline,

tyrosine, cystine を認め, さらに 3 回加熱すると valine, phenylalanine が出現することを見ている。ドジョウ粘質物のアミノ酸組成を先に報告した細菌培地¹²⁾としての見地から検討すると, 含量の点を無視すれば bouillon 中に存在するアミノ酸は全部揃っているわけで, 粘質物の加水分解物中では菌の増殖が良好な理由もなづける。

IV. ドジョウ粘質物の hexose および hexosamine 含量

粗製粘質物粉末中の hexose および hexosamine 含量を RIMINGTON 法¹⁵⁾によって定量し, hexose (as galactose) 6.15%, hexosamine (as glucosamine) 4.68% を得た。なお全窒素量は 12.3% であった。これらの値は粗粉末中に鱗を含んでいるので一応の目安にすぎない。鱗を除くために稀アルカリ, 稀酸を用いて前記のような精製法を行つたものは hexose 含量が 3.08% であった。TILLMANS 等¹⁸⁾は大豆蛋白質中の carbohydrate を定量する際, 蛋白質をアルカリに溶かして酸でおとすという精製をくり返すと carbohydrate 含量は 1 回目 19.7% を示したものが 2 回目には 9.7%, 4 回目には 7.7% にまで低下したことを述べている。粘質物中の hexose 含量が精製操作によつて低下したのもこれと一致する。

鶴見等¹⁰⁾はドジョウの粘質物中に galactose 9.77%, glucosamine 17.86% を含むことを報告している。試料の調製法もかなり異っているが, 著者等の結果とは大きな差がある。

V. ドジョウ粘質物の構成糖

粗製粘質物粉末を堀口¹⁷⁾の方法 (MEYER¹⁸⁾の変法) によつて酵素分解し polysaccharide を得た。白～灰白色粉末で収量は約 4% であった。このものは FEHLING 還元性を示さないが, 加水分解すると強い還元性を示した。この粉末に 30 倍容の 0.5N HCl を加えて 5 時間加水分解後, 減圧濃縮 (50°C 以下) をくり返して paper chromatography の試料とした。

a) Paper chromatography による糖の分別

東洋用紙 No. 51 (40×40 cm) の下縁から 6.5 cm の距離に帯状に全試料をひき, phenol: 水 (8:2) で 3 回多重展開して Fig. 2 のように 3 区分に分離し得た。この 3 区分を切りとつて 45°C の温水で抽出, 各

Fig. 1. Two-dimensional paper chromatogram showing the amino acid pattern of the external mucous substance of loach.

A	Cystine	J	Alanine
B	Lysine	K	?
C	Histidine	L	Proline
D	Glycine	M	Tyrosine
E	Arginine	N	Valine
F	Aspartic acid	P	Phenylalanine
G	Serine	Q	Leucine
H	Glutamic acid	R	Methionine
I	Threonine

区分を濃縮して Upper, Middle, Lower の3試料を作った。これらの3区分についての各種溶媒による展開結果をまとめて Fig. 3 に示した。

b) Upper part の糖の同定

この区分に存在する糖は pentose, methylpentose と推定される。aniline hydrogen phthalate で呈色させると、前者は赤色、後者は黄色に発色し判別が容易である。4種の溶媒による展開結果から arabinose, ribose と同定した。

c) Middle part の糖の同定

呈色試薬は aniline hydrogen phthalate を用いた。この区分は hexose から成り褐色に呈色する。phenol : 水 (8 : 2) で多重展開した結果、2つ

Fig. 2. Fractionation of sugar components of the external mucous substance of loach by paper chromatography.

Multiple development with phenol : water (8 : 2) was employed. 3 parts were separated and extracted with water at 45°C.

Fig. 3. Paper chromatogram showing sugar components of the external mucous substance of loach.

Solvent { A; phenol : water (8 : 2). multiple development
B; *n*-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 2)
C; butylacetate : ethanol : acetic acid : water (3 : 2 : 1 : 1)
D; *n*-butanol; ethanol : water : ammonia (40 : 10 : 49 : 1)

I, II, III; fractional sample in Fig. 2.

1; fucose, 2; ribose, 3; arabinose, 4; rhamnose, 5; xylose, 6; galactose, 7; glucose, 8; mannose, 9; fructose, 10; glucosamine, 11; chondrosamine, 12; glucuronic acid.

Colour reagent; aniline hydrogen phthalate in upper and middle part.
p-anisidine-HCl in lower part.

Oblique lined spots show red~pink colour and white spots show yellow (in upper part) and brown colour (in middle and lower part).

の spot の内 Rf の小さい方は glucose であるが、Rf の大きい方は galactose および mannose と Rf が接近し判然としなかつた。そこでさらに他の 2 種の溶媒による展開を行うと、この場合は galactose の Rf が glucose よりも小となるので mannose と区別し得る。従つてこの部分は glucose, galactose と同定した。

d) Lower part の糖の同定

この区分に存在するものは酸性糖、塩基性糖と推定される。酸性糖は *p*-anisidine-HCl で呈色させると赤色を示し特異的である。これに反し塩基性糖は褐色に発色するので判別が容易である。

chondrosamine の同定は純品が入手できなかつたので chondroitin-sulfuric acid の加水分解物を用いた。粗製の chondroitin-sulfuric acid は加水分解すると, glucosamine, chondrosamine, galactose, glucuronic acid の 4 つの spot を示す¹⁹⁾ので、この結果を追試しこれを用いて粘質物中の chondrosamine の同定を行った。

3 種の溶媒による展開結果から glucosamine, chondrosamine を認めたが、酸性糖は認められなかつた。

以上 3 区分の結果を綜合して、ドジョウ粘質物構成糖は arabinose, ribose, glucose, galactose, glucosamine, chondrosamine の 6 種と同定した。この内 arabinose を除く他の糖は動物性粘質物中にしばしば見出されているが、arabinose がドジョウ粘質物中に認められたのは注目すべきであろう。arabinose は天然に存在する aldopentose として結核菌の多糖類、尿、アラビアゴム、甜菜等に見出されているが、動物性粘質物に見出されたのは始めてであると思う。鶴見等¹⁰⁾はドジョウ粘質物の呈色反応を試み、methylpentose および pentose 反応が陰性であると述べたが、pentose は存在する。

VI. ドジョウ粘質物の polysaccharide の組成

前記 polysaccharide の hexose, hexosamine の組成を知るため、nitrogen (N), hexose, hexosamine, acetyl 基を定量した。N 量は micro-KJELDAHL 法、hexose は TREVELYAN 等²⁰⁾の anthrone 呈色法、hexosamine は RIMINGTON¹⁶⁾の acetylacetone および *p*-dimethylaminobenzaldehyde による呈色法、acetyl 基は KÖGL 法²¹⁾によつて測定した。

結果を Table 2 に示した。

mol 比は完全な整数比を示さなかつたが、これは試料の純度が低いためであろう。acetyl 基が高い値を示したが、鶴見等¹⁰⁾によれば glucosamine と acetyl 基の mol 比は 1:2.31 を示し、direct OSAKI-TURUMI test が陽性であつたと述べているので sialic acid (acylated neuraminic acid) の存在が考えられる。これについてはさらに検討し度い。

以上の結果から粘質物 polysaccharide は hexose : hexosamine = 1 : 1 の結合をしているものと考えらる。

Table 2. Quantitative analysis of the polysaccharide obtained from the external mucous substance of loach.

	Per cent	Equivalent per equivalent weight
Nitrogen	6.35	
Hexosamine as glucosamine	22.52	1.00
Hexose as galactose	27.63	1.15
Acetyl	6.95	1.23

摘 要

1) ドジョウの体表面粘性物質の化学的性質を調べ、その沈澱反応、構成アミノ酸、構成糖および polysaccharide の組成を明らかにした。

2) ドジョウの体表面粘性物質溶液は加熱凝固は示さないが、供試したすべての蛋白沈澱剤によつて沈澱を生じた (Table 1)。

3) ドジョウの体表面粘性物質の構成アミノ酸として、cystine, lysine, histidine, glycine, aspartic acid, serine, glutamic acid, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine,

phenylalanine, leucine の 16 種を同定, 不明のアミノ酸 1 種を認めた。なお呈色反応により tryptophan の存在が推定された。

4) ドジョウの体表面粘性物質の構成糖として, arabinose, ribose, glucose, galactose, glucosamine, chondrosamine の 6 種を認めた。

5) ドジョウの体表面粘性物質の polysaccharide は hexose : hexosamine = 1 : 1 の比で結合しているものと推定した。

文 献

- 1) 沼野井春雄: 特許公告 No. 732, 昭 24. 3. 11.
- 2) 久保通猷: 特許公告 No. 64, 昭 6. 1. 9.
- 3) 左右田徳郎・服部親宏・寺崎広節: 日化, **57**, 981 (1936).
- 4) 小幡弥太郎・山西 貢: 本誌, **15**, 554 (1950).
- 5) 小幡弥太郎・山西 貢: 本誌, **16**, 361 (1951).
- 6) 八坂 茂・松本敬一: 長崎大水产報告, No. 2, 51 (1954).
- 7) 八坂 茂・田端義明・増元 勲: 長崎大水产報告, No. 3, 43 (1955).
- 8) FERRY, J. D.: *J. Biol. Chem.*, **138**, 263 (1941).
- 9) WESSLER, E. and WERNER, I.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1240 (1957).
- 10) TURUMI, K. and SAITO, Y.: *Tohoku J. Exp. Med.*, **58**, 247 (1953).
- 11) 富安行雄・榎本則行: 九大農学芸誌, **16**, 323 (1957).
- 12) 榎本則行・富安行雄: 九大農学芸誌, **16**, 601 (1958).
- 13) 榎本則行・古森善裕・富安行雄: 九大農学芸誌, **16**, 609 (1958).
- 14) 飯藤謙三: 仁泉医学, **5**, 82 (1954).
- 15) RIMINGTON, C.: *Biochem. J.*, **34**, 931 (1940).
- 16) TILLMANS, J. und PHILLIPPI, K.: *Biochem. Z.*, **215**, 36 (1929).
- 17) 堀口吉重: 本誌, **22**, 463 (1956).
- 18) MEYER, K., LINKER, A., DAVIDSON, E. A., and WEISSMANN, B.: *J. Biol. Chem.*, **205**, 611 (1953).
- 19) MASAMUNE, H., YOSIZAWA, Z., and MAKI, M.: *Tohoku J. Exp. Med.*, **53**, 237 (1951).
- 20) TREVELYAN, W. E., and HARRISON, J. S.: *Biochem. J.*, **50**, 298 (1952).
- 21) 船久保英一: “有機化合物確認法”, 上巻, 養賢堂, 東京, (1954), pp. 92.