アカガレイ脂質—II.

アカガレイ筋肉複合脂質

五十嵐久尚・座間宏一・高間浩蔵・羽田野六男

(1963 年 6 月 18 日受理)

LIPIDS OF FLOUNDER—II.
CONJUGATED LIPIDS FROM FLOUNDER FRESH,
*HIPPOGLOSSOIDES DUBIUS**

Hisanao IGARASHI, Kōichi ZAMA, Kōzō TAKAMA and Mutsuo HATANO**

The conjugated lipids obtained from flounder fresh, *Hippoglossoides dubius*, were fractionated into nine fractions, such as glycerids, choline-, ethanolamine-, serine-, and sphingolipids-rich fractions, by means of a silicic acid-celite (2:1, w/w) column chromatography.

As shown in Table 3, the fatty acid composition of lecithin, which was separated by rechromatography of the choline-rich fraction, indicated that it consisted of palmitic acid and oleic acid at about 40 and 20% respectively.

アカガレイ筋肉のアセトン可溶性脂質については先きに報告した¹⁾が、本報ではその複合脂質画分をケイ酸カラムクロマトグラフィーによって検索した結果を述べる。

実験・結果および考察

脂質抽出液の溶剤留去、濃縮などの操作はすべて減圧下、炭酸ガス気流中で行なつた。

分析法： P は Fiske-Subbarow 法²⁾, N は微量拡散分析法, コリンは Beattie 法³⁾, アミノ塩基は Nojima-Utsugi 法⁴⁾, グリセロールは Blix 法⁵⁾, アルデヒド (ステアラルールとして) は Wittenberg 法⁶⁾, ヘキソース (ガラクトースとして) は Anthron 法⁷⁾, スフィンゴシン-N は McKibbin-Taylor 法⁸⁾, 沃素価は Yasuda 法⁹⁾ によって測定した。また試料の加水分解は 6N-HCl により封管中で 100°C, 24 時間行ないクロロホルム可溶部を除去した水溶部を分析に供した。ペーパークロマトグラフィーは脂質に関しては原法¹⁰⁾, 加水分解水溶性物質については n-ブタノール・酢酸・水 (4: 1: 5) による一次元上昇法によつた。

試薬： すべて溶剤は一度蒸留して用いた。カラムクロマトグラフィーに用いたセルローズパウダーは Whatman cellulose (ashless grade), ケイ酸は Mallinckrodt silicic acid (analytical reagent, 100 mesh), セライトは John-Manville Celite-545 を用いた。ケイ酸は使用に先きだつてメタノールにてコロイド性微粒子を除去し 110°C, 24 時間窒素気流下で活性化を行なつた。

試料の調製： 1960 年 9 月, 北海道函館近海で捕獲したアカガレイ 64 尾の筋肉磨砕物 11.35 kg より前報¹⁾のごとくして 55 g の粗複合脂質を得た。

セルローズパウダーカラムクロマトグラフィー： 複合脂質画分に混在する非脂質性含窒素化合物除去

* Studies on the Phosphatide of Aquatic Animals. XXVIII. 水産動物燐脂質に関する研究第 28 報。昭和 36 年, 日本水産学会秋季大会 (鹿児島) にて一部講演。

** 北海道大学水産学部水産化学教室 (Lab. of Chem., Fac. of Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Japan). 昭和 36 年度, 文部省科学研究「魚類筋肉の複合脂質に関する研究」によつた。

のために Bevan ら¹¹⁾の方法にしたがつてセルローズパウダーカラムに通した。すなわち試料 54 g をクロロホルム・エタノール・水 (800: 200: 25) の 10% 溶液とし、クロロホルムで洗浄した試料の約 5 倍量のセルローズパウダーをつめたカラム (5×53 cm) に注加後、同じ溶剤で溶出を行ない、溶出液を合し濃縮後 47 g の複合脂質を得た。

ケイ酸カラムクロマトグラフィー: ケイ酸・セライト-545 (2: 1) 混合物 750 g を内径 5 cm のカラムにつめ、アセトン 2 l, 次いでクロロホルム 1.7 l にて洗浄後、複合脂質 46 g をクロロホルムの 10% 溶液としてカラムクロマトグラフを行なった。溶出はクロロホルム・メタノールで行ない、漸次メタノール濃度を 10% ずつ増加したものを用い、溶出液は各 25 ml を捕集した。その結果, Fig. 1 に示すごとく 9 画分を得たがそれらの性状を Table 1 に示した。また、各画分の P 量を 100 としたときの各成分のモル比を算出した結果を Table 2 に示した。

Fig. 1. Fractionation of the conjugated lipids of flounder fresh by stepwise elution from silicic acid-celite (2:1, w/w) with varying concentrations (v/v) of methanol in chloroform.

46 g of phospholipids were chromatographed over 750 g silicic acid-celite column. The eluate was collected in 25 ml. fractions.

グリセライド: Table 1 および 2 の結果からクロロホルム・メタノール 10:0 および 9:1 で溶出された Fract. A は P および N 量が共に小さく、ペーパークロマトグラフィーの結果もニンヒドリン反応並びにコリン呈色反応が陰性で明らかにグリセライドのみと考えられる。

セリン脂質: クロロホルム・メタノール 8:2 で非常にはつきりしたバンドとして溶出された Fract. B は約 53% のセリン脂質が溶出されて来ているが、この画分中ではセリン脂質の 2 倍に近いエタノールアミン脂質も混在している。

Table 1. Distribution and analysis of conjugated lipids separated by silicic acid chromatography.

	Tube No.	Yield (%)	P (%)	N (%)	Choline (%)	Ethanol-amine (%)	Serine (%)	Glycerol (%)	Aldehyde (%)*	Sphingo-sine (%)	Hexose (%)	Iodin no.
Original sample		100.0	2.85	1.31	10.88	0.83	0.15	10.59	0.26	0.84	0.07	49.1
A	1~56	0.4	0.16	0.94	—	—	—	—	0.14	—	—	20.0
B	57~190	15.3	2.53	1.13	0.16	0.74	0.63	11.99	0.25	—	tr	27.9
C	110~146	6.5	3.17	1.81	0.95	1.35	0.12	11.79	0.22	—	tr	48.1
D	147~202	11.4	3.29	1.68	13.56	0.42	0.07	11.19	0.28	—	tr	125.1
E	203~280	16.9	3.51	1.22	9.94	0.26	0.12	11.97	0.21	—	tr	98.0
F	281~312	7.8	3.06	1.61	7.08	0.79	0.20	11.24	0.28	0.35	0.02	68.5
G	313~349	4.8	3.05	1.43	8.16	0.89	0.17	10.00	0.31	0.87	0.12	69.6
H	350~383	3.3	3.41	1.83	9.19	0.88	0.24	11.35	0.23	0.55	0.09	32.4
I	384~450	6.6	3.90	1.75	16.84	0.65	0.22	12.34	0.09	0.17	0.24	42.3

* Calculated as stearyl.

Table 2. Distribution and analysis of conjugated lipids separated by silicic acid chromatography
The total-P on the column was 1311 mg and the total-P recovered was 1069 mg.

Fraction	Solvent system CHCl ₃ -MeOH (v/v)	P. content % of total (lipid P.)	Molar ratio (P = 100)					
			Choline	Ethanol-amine	Serine	Sphingo-sine	Aldehyde*	Hexose
A	10:0 9:1	0.02	—	—	—	—	10.0	—
B	8:2	13.70	1.2	14.6	7.3	—	1.1	tr
C	7:3	7.25	7.8	21.6	1.0	—	0.8	tr
D	6:4 5:5	13.30	105.7	6.6	0.9	—	1.0	tr
E	4:6 3:7	20.88	72.6	3.5	0.9	—	0.7	tr
F	2:8	8.40	58.6	13.1	2.0	25.3	1.0	0.1
G	1:9	5.12	68.4	15.3	2.0	63.3	1.1	0.7
H	0:10	3.90	69.1	12.7	1.8	35.5	0.8	0.5
I	0:10	8.92	110.3	8.7	1.6	9.5	0.2	1.0

* Calculated as stearyl.

エタノールアミン脂質: クロロホルム・メタノール 7: 3 で比較的小さなバンドとして溶出せられた Fract. C は略 20% ほどのエタノールアミン脂質を含有している。またその約 1/3 ほどのコリン脂質も溶出され始めている。

コリン脂質: クロロホルム・メタノール 6: 4 から 3: 7 の間に溶出して来た Fract. D および E はいずれもほとんどがコリン脂質によつて占められ、とくに Fract. D は大部分がレシチンによつて占められている。

スフィンゴ脂質: クロロホルム・メタノール 1: 9 で溶出された小さなバンドの Fract. G には全スフィンゴ脂質の約 50% が溶出されていてクロロホルム・メタノール 2: 8 での Fract. F と合せて全体の 70% ほどのスフィンゴ脂質が溶出されている。しかし P に対する N 量、および加水分解物のペーパークロマ

トグラムに対するアンモニウム性硝酸銀の陽性反応などのことから明らかに糖脂質が多く含有されているものと推定されるが、その値が比較的低いのは分析法に起因しているものと考えられる。

クロロホルム・メタノール 0:10 で溶出された Fract. H および I は Fig. 1. にも見られるように Fract. G のテーリングと見られ、それぞれがコリン、エタノールアミンおよびセリン値の比較的高いことはメタノールのみによつて溶出されて来たそれ以外の含窒素化合物に由来する測定誤差から生じたものと考えられる。

酸加水分解物のペーパークロマトグラフィーの結果、いずれの画分にもスレオニンの存在が認められ、さらに Fract. H および I には R_f 値の小さな未確認ニヒドリン陽性物質が認められた。アミノ塩基の定量値にこれらの物質が少なからず影響していることが想像された。

セリン脂質画分の再カラムクロマトグラフィー: クロロホルム・メタノール 8:2 によつて溶出せられた Fract. B をセリン脂質とエタノールアミン脂質とに分取する目的で試料の 20 倍量のケイ酸を用いて再度カラムクロマトグラフィーを試みた。その結果、5 画分を得たがどの画分も互いに混在し、分取の目的は達成されなかつた。ケイ酸カラムによるセリン脂質、エタノールアミン脂質の分取は試料を未処理のままではかなり困難のように考えられる。

コリン脂質の再カラムクロマトグラフィー: クロロホルム・メタノール 6:4~3:7 の間に溶出せられた Fract. D および E は双方で約 57% のコリン脂質を含有していた。そこで初回と同様、試料 (10 g) の 10 倍量のケイ酸をつめたカラム (3.5×45 cm) で再度クロマトグラフィーを行なつた。その結果、クロロホルム・メタノール 7:3 でレシチン画分 3.3 g を得た。その分析値を次に示す。

P 3.13%, N 1.54%, コリン 10.86%, グリセロール 10.21%, アルデヒド 0.04%, 沃素価 115.0。

レシチンの構成脂肪酸: レシチンの脂肪酸組成検索は常法通り鹼化後、メチルエステルとして既報¹²⁾のごとくガスクロマトグラフ分析を行なつた。その結果 Table 3 に示す通り飽和酸と不飽和酸がほぼ、等量近い割合を示し、 C_{16} および C_{18} 酸、とくにパルミチン酸、オレイン酸が大半を占め、前報¹⁾ のアセトン可溶性脂質の脂肪酸組成と比較するとパルミチン酸量が著しく多いのに対し、 C_{20} 以上の高度不飽和酸がかなり少ない。

要 約

1) アカガレイ筋肉の複合脂質をケイ酸・セライトカラムクロマトグラフィーによつて分画を試み、アミノ塩基に基づいて 5 画分を得た。

2) 再度のケイ酸・セライトカラムクロマトグラフィーによつてコリン脂質からレシチンを精取したが、ケファリン画分のセリン、エタノールアミン・ケファリンの分取は困難であつた。

3) レシチンの構成脂肪酸は 80% 近くが C_{16} および C_{18} 酸であり、とくにパルミチン酸は全体の約 40% を、またオレイン酸は約 20% を占めていた。 C_{20} 以上の高度不飽和酸はアセトン可溶性脂質くらべに著しく少なかつた。

Table 3. Fatty acid composition of lecithin and acetone-soluble lipid.

$C_m : n^*$	Lecithin	Acetone-soluble lipid**
$C_{12} : 0$	—	0.3
$C_{14} : 0$ $C_{14} : 1$	2.8 1.4 Σ 4.2	12.5 4.3 Σ 16.8
$C_{15} : 0$	tr	—
$C_{16} : 0$ $C_{16} : 1$ $C_{16} : 2$	38.4 6.5 4.4 Σ 49.3	5.9 22.5 Σ 28.4
$C_{17} : 0$	3.4	—
$C_{18} : 0$ $C_{18} : 1$ $C_{18} : 2$	7.2 18.5 2.9 Σ 28.6	1.6 17.5 Σ 19.1
$C_{20} : 0$ $C_{20} : 1$ $C_{20} : 4$	— 3.5 2.8 Σ 6.3	tr 17.3 Σ 17.3
$C_{22} : 1$ $C_{22} : 4$ $C_{22} : 5$ $C_{22} : 6$	5.4 0.9 0.5 1.3 Σ 8.1	18.1

* m: Number of carbon atoms.

n: Number of double bonds.

** See previous report¹⁾.

文 献

- 1) 五十嵐久尚・座間宏一・羽田野六男・高間浩蔵: 本誌, **28**, 518 (1962).
- 2) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- 3) F. JANE and R. BEATTIE: *Biochem. J.*, **30**, 1554 (1936).
- 4) S. NOJIMA and N. UTSUGI: *J. Biochem.*, **44**, 565 (1957).
- 5) G. BLIX: *Mikrochim. Acta*, **1**, 75 (1937).
- 6) J. B. WITTENBERG, S. R. KOREY and F. H. SWENSON: *J. Biol. Chem.*, **219**, 39 (1956).
- 7) S. MALLOV, J. M. MCKIBBIN and J. S. ROBB: *Ibid.*, **201**, 825 (1953).
- 8) J. M. MCKIBBIN and W. E. TAYLOR: *Ibid.*, **178**, 29 (1949).
- 9) M. YASUDA: *J. Biochem.*, **25**, 417 (1937).
- 10) 原 一郎・金子 弘・加藤彰彦: 油化学, **9**, 362 (1960).
- 11) T. H. BEVAN, G. I. GREGOR Y, T. MALKIN and A. G. POOLE: *J. Chem. Soc.*, **841** (1951).
- 12) 高間浩蔵・羽田野六男・座間宏一・五十嵐久尚: 北大水産彙報, **14**, 31 (1963).