HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ナガズカ卵巣の毒性物質：第8報 毒性燐脂質の部分精製とその性状
Author(s)	羽田野, 六男
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 22(2), 177-186
Issue Date	1971-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23450
Type	bulletin (article)
File Information	22(2)_P177-186.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ナガズカ卵巣の毒性物質

第8報　毒性燐脂質の部分精製とその性状*

羽田野　六　男**

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny

VIII. Partial purification and characterization of toxic phospholipid

Mutsuo HATANO

Abstract

In the preceding paper the author reported that the toxic phospholipid was a toxic component of the lipostichaerin. In this paper partial purification and the characterization of the toxic phospholipid will be reported.

A crude toxic phospholipid was obtained using standard procedures for the extraction and fractionation of phospholipids from the blenny roe.

After that the crude toxic phospholipid was partially purified on a silicic acid column chromatography. The 2 to 5 eluted fractions were toxic, one of which, Fraction 3, showd high toxicity, and it was almost homogeneous with a thin layer chromatography when n-butanol-ethyleneglycol-water (4:1:2, upper phase) was used as a solvent.

Chemical analysis of the partially purified toxic phospholipid showed 7.33% nitrogen, 2.68% phosphorus, 6.0 molar ratio of nitgrogen to phosphorus, and ir-spectrum indicated that the material had peptide. The toxic substance consists of glycerol, the amino acids mainly of aspartic acid and glycine, the fatty acids mainly of palmitic, hexadecenoic, stearic, octadecenoic and docosadienoic acids, but not being detected in sugar and choline.

Therefore the toxic phospholipid appears to be composed of phosphatidohexa-peptide. From these results, it may be reasonably concluded that a hexapeptide consisting of aspartic acid and glycine was an active part of the toxic phospholipid structure.

In addition, no toxicities were found in the phosphatidylcholine, phosphatidyl-ethanolamine and phosphatidylserine in this roe nor phospholipid portions of muscle and milt in this fish.

緒　　言

前報[1]においてナガズカ卵巣の毒性物質，lipostichaerin は卵黄リポ蛋白質の1種 β-lipovitellin として存在するが，この蛋白部分には毒性はなく脂質部分にのみ毒性を示すことを認め，さらにこのうちのある種の燐脂質が毒性の発現にきわめて関係があることを認めた。

すでに浅野ら[2]も Thiele 法によって毒性燐脂質を抽出，分画し毒性を示すエタノール不溶性脂質を得ているがこのものは若干の蛋白性を有しているとし δ-lipostichaerin と命名している。

* 昭和46年4月　日本水産学会年会（東京）にて講演発表

** 北海道大学　水産学部　食品化学第一講座
(*Loboratory of Food chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

著者はナガズカ卵巣の Toxic component である毒性燐脂質の分離を目的として本実験を行なったが，すなわち卵巣をアセトンで抽出し溶剤分画，ケイ酸カラムクロマトを併用して薄層クロマト的にほゞ均一の Phosphatidopeptide と推定される毒性燐脂質を得たのでその性状とあわせ報告する。

実験および結果

実験方法：

窒素，燐，糖，沃素価，赤外線吸収 (IR) スペクトルなどの測定，脂肪酸のエステル化とガスクロマトグラフィー (GLC) および毒性試験はほゞ前報[1] と同様であるが，なお脂肪酸を除く加水分解物の検索はペーパークロマトにより定性的に行なった。

試料：

昭和 43 年 5 月，北海道森町沿岸で漁獲されたナガズカの新鮮な成熟卵巣 (220 葉) を用いた。

毒性燐脂質の抽出・分画とその毒性：

卵巣から卵巣膜を除去した卵 (20 kg) に等量の水を加えてホモゲナイズし，アセトンを加えて抽出を行ない Fig. 1 に示すごとくアセトン抽出物を溶剤分画，粗毒性燐脂質画分 27.1 g を得た。これらの画分の性状と毒性試験結果は Table 1, 2 に示すとおりでさる。

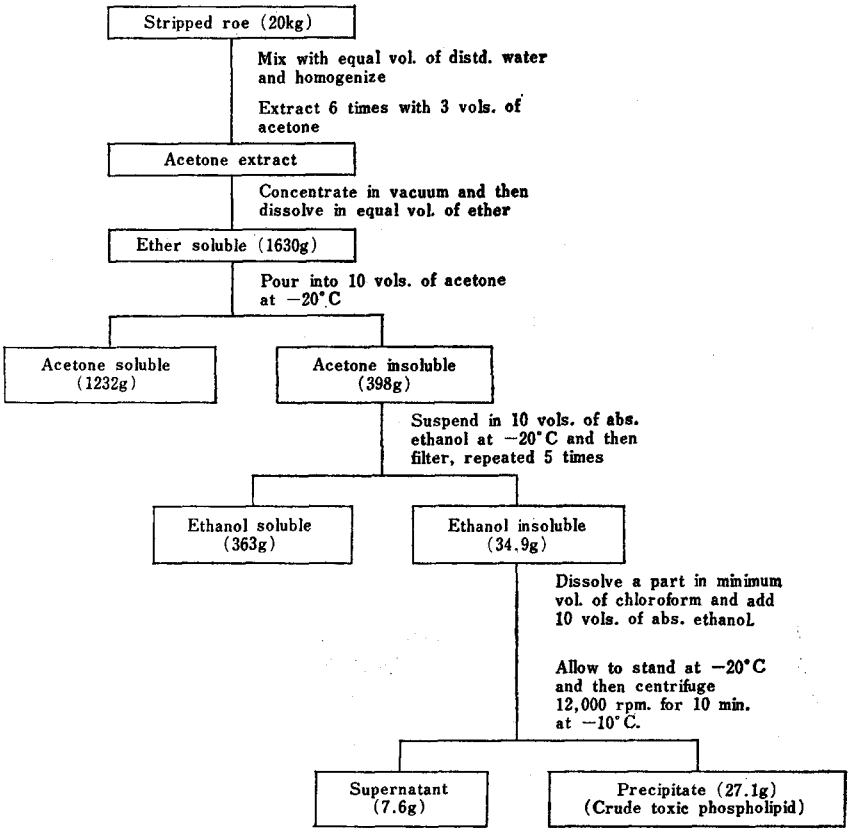


Fig. 1 Extraction and fractionation of toxic phospholipid from the roe

Table 1 Toxicity test of each fraction by intraperitoneal injection into mice, NIH strain

Fraction	Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, (hrs.)
			mg	ml	mg/g. B.W.	
Acetone soluble	18.0	♂	20.5	0.50	1.13	Survived
	18.5	♀	20.5	0.50	1.10	Survived
	19.5	♀	20.5	0.50	1.05	Survived
Acetone insoluble	17.0	♂	17.0	0.50	1.00	Within 22
	21.0	♀	20.4	0.60	0.97	Within 22
	19.5	♀	18.7	0.55	0.95	24
Ethanol soluble	22.0	♂	32.4	0.60	1.47	Within 44
	25.5	♀	37.8	0.70	1.48	Within 72
	20.5	♀	21.4	0.40	1.04	Survived
	20.0	♀	21.4	0.40	1.07	Survived
Ethanol insoluble	23.0	♂	8.0	0.50	0.34	Within 15
	27.5	♂	9.6	0.60	0.35	Within 15
	25.0	♀	8.8	0.55	0.35	Within 15
Supernatant	20.0	♂	6.5	0.50	0.32	Survived
	20.5	♀	6.5	0.50	0.32	Survived
	20.0	♂	5.2	0.40	0.26	Survived
	21.5	♀	5.2	0.40	0.24	Survived
Precipitate (Crude toxic phospholipid)	23.0	♂	7.5	0.50	0.33	Within 22
	23.0	♀	7.5	0.50	0.33	Within 15
	26.5	♀	6.8	0.45	0.26	Within 22
	22.0	♂	6.0	0.40	0.27	Within 22
	25.0	♂	3.0	0.20	0.12	72
	23.0	♀	2.3	0.15	0.10	72

Table 2 Chemical property of each fraction

Fraction	Yield* %	N, %	P, %	N/P**	Iod. V.†	Toxicity	Main component††
Acetone soluble	6.16	0.18	0.31	1.3	187.0	−	Neutral lipids
Acetone insoluble	1.99	2.15	3.10	1.5	175.4	+	Phospholipid
Ethanol soluble	1.81	1.65	3.10	1.2	173.8	±	PhC
Ethanol insoluble	0.18	7.06	3.18	4.9	125.8	+	PhE, PhS and toxic phospholipid
Supernatant	0.04	2.01	2.96	1.5	125.1	−	PhE and PhS
Precipitate (Crude toxic phospholipid)	0.14	8.38	3.61	5.0	73.8	+	Toxic phospholipid

No sugar was detected in all fractions

* in original roe weight

** molar ratio

† Wijs' method

†† Detected by TLC (PhC: phosphatidylcholine; PhE: phosphatidyl ethanolamine and PhS: phosphatidylserine)

Table 3 Properties of eluted fractions separated from crude toxic phospholipid by a silicic acid column

Eluted fraction	Eluent, $CHCl_3$-MeOH-H_2O (ml)	Yield, %	N, %	P, %	N/P	Iod. V.
1	8 : 2 : 0 (500)	18.5	0.80	0.62	2.8	93.5
2	5 : 5 : 0 (300)	14.4	6.59	3.27	4.5	54.2
3	2 : 8 : 0 (300)	22.6	7.33	2.68	6.0	60.1
4	0 : 10 : 0 (300)	7.6	5.17	2.00	5.7	50.0
5	65 : 25 : 4 (470)	18.3	7.88	3.51	5.0	42.5
6	65 : 50 : 10 (250)	5.8	4.70	2.96	3.5	—
	Recovery	87.2				

The crude toxic phospholipid (2.2 g) was chromatographed on a 180 g silicic acid column, 3×52 cm

Table 4 Toxicity test of each eluted fraction

Eluted fraction	Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, (hrs.)
			mg	ml	mg/g B.W.	
1	22.0	♂	31.8	0.60	1.44	Survived
	19.5	♂	29.2	0.55	1.55	Survived
	24.5	♂	31.8	0.60	1.29	Survived
	24.0	♂	31.8	0.60	1.32	Survived
2	19.5	♂	24.8	0.55	1.27	24
	19.0	♀	24.8	0.55	1.30	Within 16
	27.0	♂	27.0	0.60	1.00	24
	27.0	♂	27.0	0.60	1.00	Within 24
	23.0	♀	9.0	0.20	0.39	Survived
	23.0	♀	9.0	0.20	0.39	Survived
3	23.5	♂	23.5	0.50	1.00	Within 24
	24.5	♂	25.9	0.55	1.05	Within 24
	22.0	♀	7.1	0.15	0.32	45
	22.0	♀	7.1	0.15	0.32	45
	24.0	♂	2.8	0.06	0.11	Within 72
	21.5	♀	2.8	0.06	0.11	Within 72
4	20.0	♂	18.6	0.60	0.93	24
	21.5	♀	20.2	0.65	0.93	30
	24.0	♂	15.5	0.50	0.65	Within 42
	23.5	♂	15.5	0.50	0.66	Within 42
5	27.5	♂	30.0	0.60	1.09	42
	24.5	♂	25.0	0.50	1.02	Survived
	19.5	♀	20.0	0.40	1.02	72
	19.5	♀	20.0	0.40	1.02	Survived
6	20.5	♀	15.5	0.50	0.75	Survived
	19.0	♀	15.5	0.50	0.81	Survived
	20.5	♂	12.4	0.40	0.60	Survived
	21.5	♂	14.0	0.45	0.60	Survived

Also all mice (NIH) were injected intraperitoneally

以上の結果エタノール不溶画分（いわゆるケファリン画分）に毒性を認め，さらにこのものをクロロホルムとエタノールによる分別処理を行ない生じた沈澱（粗毒性燐脂質画分）に毒性が認められた。

粗毒性燐脂質画分のケイ酸カラムクロマトによる部分的精製とその毒性：

粗毒性燐脂質画分の1部 2.2 g をケイ酸カラムクロマト（Mallinckrodt 製 180 g，3×52 cm）によって精製を試みた。すなわちクロロホルム・メタノール；クロロホルム・メタノール・水系の混合溶剤で順次溶出を行ない各溶出区分の性状と毒性を検討し Table 3, 4, Fig. 2, 3 に示す結果を得た。

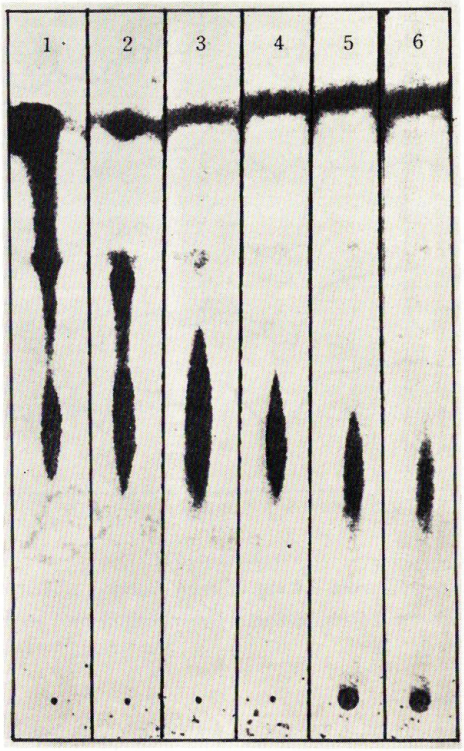
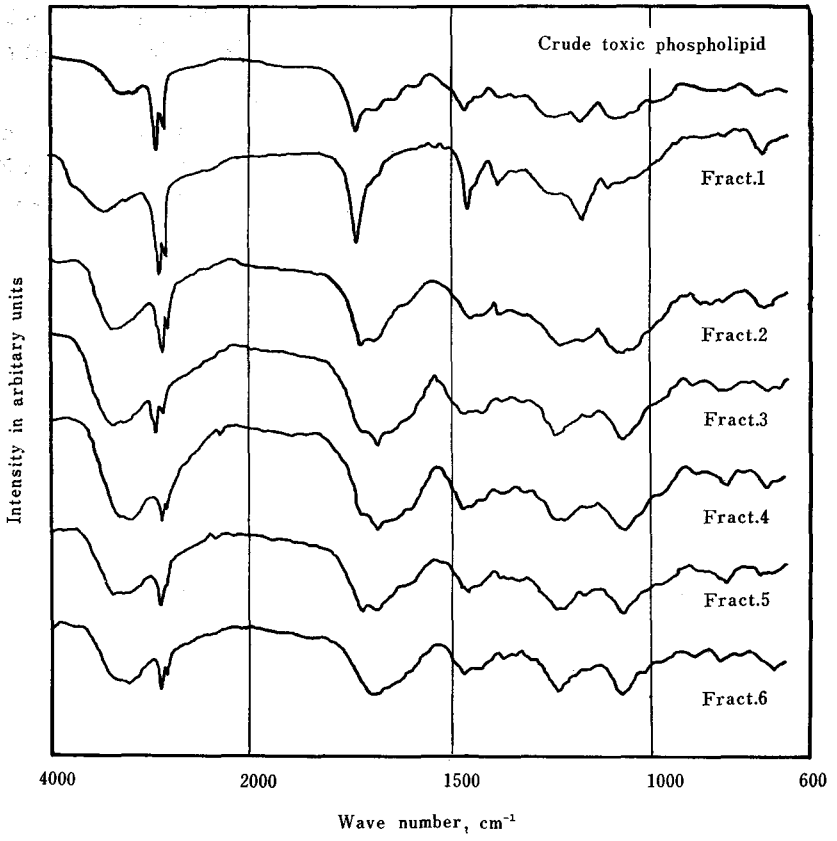


Plate: Kieselgel G, 0.25 mm, activated for 30 min. at 110°C
Solvent: n-BuOH-ethyleneglycol-H_2O (4 : 1 : 2, upper phase)
Detection: Hanes-Isherwood reagent
Fig. 2　Thin layer chromatogram of each eluted fraction

この結果，毒性は Fract. 2 から 5 にみられ特に Fract. 3 が最も強い。（このことは前報[1] における脂質部分のケイ酸カラムクロマトの結果と相違しているが，このことについては考察で述べる。）また薄層クロマトグラム（Fig. 2）で Fract. 1 は 3 スポット，Fract. 2 は 2 スポットで Fract. 3 以下は 1 スポットを示すが，Fract. 3, 4 の R_f 値は 0.47，Fract. 5, 6 は 0.36 であり明らかに異なる物質である。Fract. 3 は N/P のモル比が 6.0 で IR スペクトル測定結果からペプタイドに帰属されるアミド I・II の吸収を有し，その分子中に hexapeptide をもつことが推定される。したがってこのものは毒性試験結果と考えあわせ部分的に精製された毒性燐脂質であると考えられる。



The ir-pellet was prepared from 3.0 mg of each fraction mixed with 600 mg KBr

Fig. 3 Infrared spectra of crude toxic phospholipid and each eluted fraction

各溶出区分の加水分解物の検索：

各溶出区分の構成々分の検討のために各区分を 6N HCl とともに封管中で 100°C, 22時間加水分解しクロロホルム可溶部（脂肪酸）を除去した水溶性物質をペーパークロマトにより定性的に検索し Table 5 に示す結果を得た。

この結果毒性の強い Fract. 3 と 4 にはコリンと糖は存在せずグリセロールとアスパラギン酸，グリシン，リジン，スレオニン，オキシプロリンのアミノ酸が検出され特にアスパラギン酸とグリシンが多量存在することを認めた。したがって前述の hexapeptide はこれら 5 種のアミノ酸によって構成されているものと考えられる。

毒性燐脂質の部分精製物 (Fract. 3) の構成脂肪酸：

Fract. 3 の構成脂肪酸について GLC により検討し，あわせて前報[1] の lipostichaerin の毒性燐脂質画分 (Eluted fract. 3)，浅野ら[2] の δ-lipostichaerin，ナガズカ卵巣レシチンおよびケファリンのそれと比較を行なった。

これらの結果は Table 6 に示されるが，Fract. 3 の主な構成脂肪酸はパルミチン酸，ヘキサデセン酸，ステアリン酸，オクタデセン酸およびドコサジエン酸であり高度不飽和酸は含有されていない。

Table 5 HCl-hydrolysate of each eluted fraction

Eluted fraction	Glycerol	Choline	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	Pro	Hypro	Et(OH)NH_2	Peptide ?
1	+	−	−	±	+	±	−	−	−	+	−
2	+	+	−	++	−	+	±	−	+	−	+
3	+	−	±	++	−	+	±	−	+	−	−
4	+	−	±	++	−	+	±	−	+	−	−
5	+	−	−	++	−	+	±	+	−	−	−
6	+	−	−	++	−	+	±	+	−	−	−

No sugar was detected in all fractions
Paper: Toyo No. 51 A filter paper
Solvent: n-BuOH-AcOH-H_2O (3:1:1 and 4:2:1) and Phenol (satd. with H_2O)
Detection: Hough's (glycerol and sugar), Dragendorff (choline), and ninhydrin (amino compounds) reagents

Table 6 Fatty acid composition of partially purified toxic phospholipid, eluted fractions 3, %

Cn:m	Partially purified Toxic phospholipid*	Toxic phospholipid fraction of lipostichaerin**	δ-lipostichaerin***	Lecithin*	Cephalin*
14:0	7.4	5.1	0.5	2.9	0.9
15:0	tr	tr	0.1	0.5	0.4
16:0	15.3	9.8	11.9	22.7	12.5
17:0	0.2	1.9	1.9	0.5	1.1
18:0	11.7	22.8	12.0	10.0	17.5
20:0	—	0.1	—	—	0.4
Total satd. acids	34.6	39.7	26.4	36.6	32.8
16:1	13.6	14.3	4.9	12.7	6.1
16:2	1.0	3.7	—	2.2	0.1
16:3	—	—	—	1.5	2.4
18:1	26.9	34.1	14.7	24.5	19.5
18:2	1.0	tr	1.4	1.2	2.7
18:3	tr	0.7	+	0.1	0.6
18:4	—	—	0.1	tr	1.4
20:1	2.5	1.1	(+18:3) 1.9	1.3	5.8
20:2	1.7	0.4	—	0.4	tr
20:3	—	—	—	—	6.6
20:4	—	—	0.3	2.4	—
20:5	—	—	20.9	—	9.5
22:1	1.0	—	6.4	6.9	0.8
22:2	17.7	6.0	—	8.6	—
22:5	—	—	1.5	—	11.7
22:6	—	—	20.8	1.6	—
Total unsatd. acids	65.4	60.3	72.9	63.4	67.2

* Present study ** Preceding report[1] *** Asano, M. and Itoh, M.[2]
The condition of GLC was the same as in the preceding report[1]

このことはFract. 3の沃素価からも当然な結果である。また前報のlipostichaerinの毒性燐脂質画分の脂肪酸組成と比較すると，若干の相違はあるが一般に近似した傾向を示している。この相違についてはlipostichaerinの毒性燐脂質画分がレシチンを混有することに由来しているものと考えられる。またδ-lipostichaerinはエイコサペンタエン酸のごとき高度不飽和酸を多量に含むことなどの点で明らかな差異が認められた。

ナガズカ卵巣レシチン・ケファリンと筋肉および精巣の毒性試験：

対照としてナガズカ卵巣のレシチン，ケファリン（Phosphatidylethanolamineとphosphatidylserine混合物）と筋肉および精巣をFig. 1と同様に抽出し分画を行ない得られたアセトン不溶画分（いわゆる燐脂質画分）についても，その性状（Table 7）と毒性試験（Table 8）について検討したが，いずれにも毒性は認められずこの毒性燐脂質は卵巣にのみ存在する特有なもので一般の燐脂質とは異なるものであることが推定された。

Table 7 Chemical properties of phospholipids from muscle, milt and roe of the blenny

Fraction obtained	Yield, %	N, %	P, %	N/P	Iod. V.	Toxicity
Acetone insoluble, in muscle	0.37	1.49	3.68	0.9	141.8	—
Acetone insoluble, in milt	1.38	7.16	3.64	4.4	136.0	—
Lecithin, in roe	—	1.52	3.34	1.0	178.6	—
Cephalin*, in roe	—	1.56	2.81	1.2	156.6	—

* Phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine mixture

Table 8 Toxicity tests of phospholipids from muscle, milt and roe of the blenny

	Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, (hrs.)
			mg	ml	mg/g B.W.	
Muscle	28.0	♂	30.0	0.60	1.07	Survived
	25.0	♀	25.0	0.50	1.00	Survived
	26.5	♀	27.5	0.55	1.07	Survived
Milt	28.0	♂	28.0	0.45	1.00	Survived
	27.0	♀	28.0	0.45	1.03	Survived
	27.0	♀	28.0	0.45	1.04	Survived
Lecithin	19.5	♀	25.5	0.50	1.30	Survived
	18.5	♀	25.5	0.50	1.38	Survived
	19.0	♀	25.5	0.50	1.33	Survived
Cephalin	23.5	♂	27.5	0.55	1.17	Survived
	23.0	♂	27.5	0.55	1.20	Survived
	23.0	♀	27.5	0.55	1.20	Survived

Also all mice (NIH) were injected intraperitoneally

考察および総括

ナガズカ卵巣のアセトン抽出物を溶剤分画し毒性を示すエタノール不溶性の沈澱を得，さらにケイ酸カラムクロマトにより精製を試み，薄層クロマト的にほゞ均一な毒性燐脂質の部分精製物を得た。このものと浅野ら[2]のδ-lipostichaerinの性状について比較した結果（Table 9），N/Pのモル比は両

Table 9 Comparison of characterization with partially purified toxic phospholipid and δ-lipostichaerin

	Partially purified toxic phospholipid	δ-lipostichaerin*
N/P, molar ratio	6.0	5.7–5.9
Choline, %	Nil	1.48–3.30
Sugar, %	Nil	?
Major amino acids	Asp and Gly	Tau, Ser, Gly, Glu, Asp. Ala and Thr.
Glycerol, %	+	6.56
Iodine value	60	96
Major fatty acids	$C_{16:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ and $C_{22:2}$	$C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{20:5}$ and $C_{22:6}$
Toxic principle	Phosphatidopeptide	Lipoprotein or lipopeptide

* Asano, M. and Itoh, M.[2]

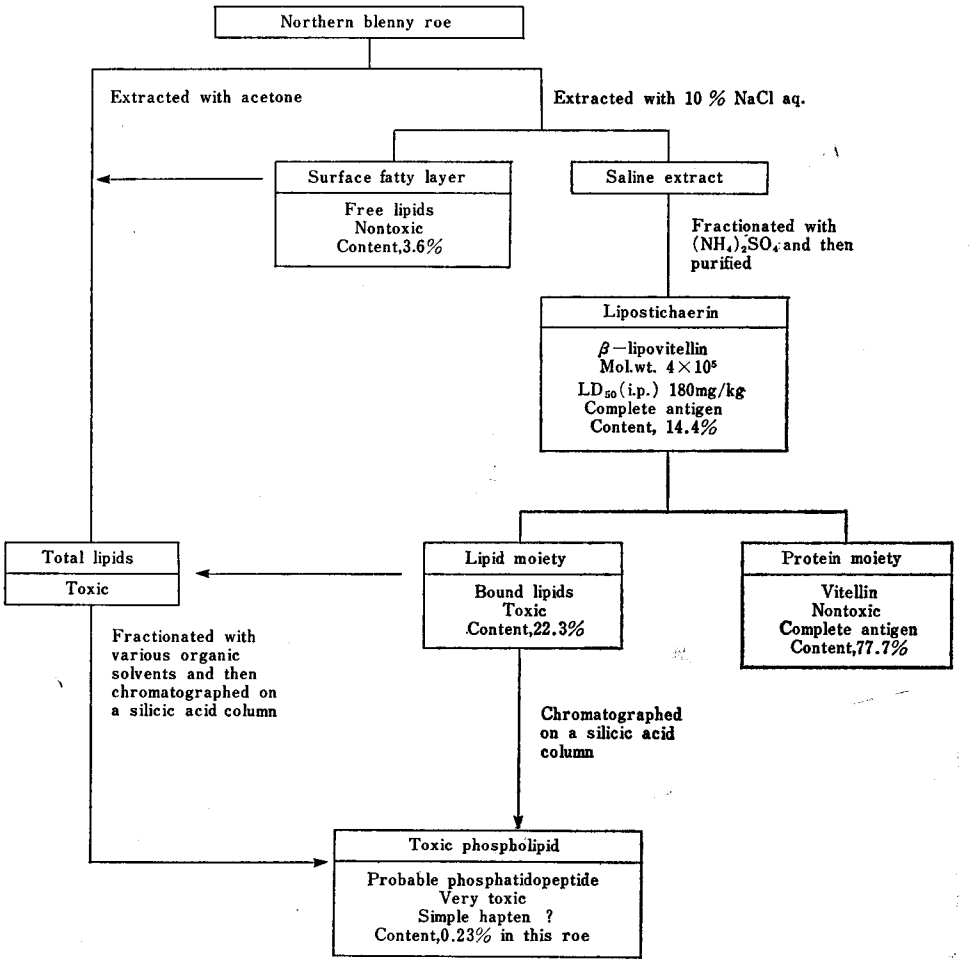


Fig. 4 Toxic principles in northern blenny

者とも同じではあるが，コリンの含有，構成アミノ酸（δ-lipostichaerin はタウリン量が非常に多い）および構成脂肪酸（δ-lipostichaerin は高度不飽和酸を著量に含む）などについてかなりの相違がみられる。

本実験において得られた毒性燐脂質は構造上主としてアスパラギン酸とグリシンからなる Glycerophosphoryl hexapeptide を骨格とする phosphatidopeptide と考られ，さらに毒性を示さないレシチンとケファリンの構成脂肪酸から考えて毒作用を発現する部分は脂肪酸部分ではなくペプタイド部分によるものと推察された。またこのものは前報[1] における lipostichaerin の毒性燐脂質とはケイ酸カラムクロロマトにおいて溶出の挙動に相違はあるが，前報の場合脂質部分（全脂質）のクロマトのため多量の中性脂質とレシチンの存在によりその挙動が変化したものと思われ，さらに溶剤組成の簡略化による溶出にも原因するものと考えられる。しかしながら lipostichaerin の毒性燐脂質と本実験における毒性燐脂質とは薄層クロマトグラム上で一致しまったく同一物質であることが確認された。したがってナガズカ卵巣中の毒性燐脂質は蛋白質と結合し通常リポ蛋白質の形で存在していることも判明した。

なお前報と同様筋肉，精巣の燐脂質画分についても毒性試験を試みたが，いずれにも毒性は存在せず，本毒性燐脂質はナガズカ卵巣にのみ存在することが認められた。また以上の結果と前報[1)3)] までの結果を総括するとナガズカ卵巣の毒性物質は魚卵毒（Ichthyootoxin）の範疇に入るものであり，その Toxic principle は Fig. 4 に示されるものと考えられる。

謝　　辞

本研究にあたり終始御指導を賜わった本学部五十嵐久尚教授ならびに坂井稔教授にまた有益な御助言をいたゞいた東京大学農学部橘本芳郎教授に深く感謝するとともに，御援助下さった本学部座間宏一助教授に厚く感謝の意を表する。

文　　献

1) 羽田野六男 (1971). 北大水産彙報 **22** (2), 168-176.
2) Asano, M. & Itoh, M. (1966). *Tohoku J. Agr. Res.* **16** (4), 299-316.
3) 羽田野六男・新井良治 (1971). 北大水産彙報 **21** (4), 325-330.