



Title	スケトウダラ心臓脂質：第2報 複合脂質
Author(s)	座間， 宏一
Citation	北海道大學水産學部研究彙報， 13(4)， 186-192
Issue Date	1963-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23166
Type	departmental bulletin paper
File Information	13(4)_P186-192.pdf



スケトウダラ心臓脂質

第2報 複合脂質

座 間 宏 一

(北海道大学水産学部水産化学教室)

Lipids of Pollack Heart

II. Conjugated lipids from heart of pollack, *Theragra chalcogramma**

Kōichi ZAMA

Abstract

Lecithin (I), cephalin (II) and phosphatidic acid (III) were obtained from heart of pollack. The following properties were found. (I): P 3.94%, N 1.73%, choline 14.53%, glycerol 11.20% and iodine no. 109.4; (II): P 3.99%, N 1.55%, ethanolamine 5.03%, serine 2.56%, glycerol 10.85%, iodine no. 102.7, and some amount of inositol was present; and (III): P 4.21%, glycerol 16.5% and iodine no. 93.2.

The component fatty acid of (I) consisted of saturated and lower unsaturated fatty acids 71.5% and higher unsaturated fatty acids 28.5%.

The contents of saturated, monoethylenic, dienoic, trienoic, tetraenoic, pentaenoic and hexaenoic acids were: 14.4, 50.3, 8.6, 4.4, 2.3, 10.0 and 10.0%, respectively, in (II); and 12.8, 81.5, 1.9, 0.5, 0.6, 1.3 and 1.4%, respectively, in (III).

It was considered that (II) consisted of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and inositolphospholipid. As glyceryltriglycerophosphoric acid was obtained as a main hydrolysate from phosphatidic acid, it was assumed to be a cardiolipin-like substance.

緒 言

哺乳動物心臓の複合脂質に関しては Pangborn¹⁾⁻⁶⁾, Faure ら⁷⁾⁸⁾, Rapport ら⁹⁾, Gray ら^{10), 11)}, Marinetti ら¹²⁾ によるウシ心臓複合脂質, また Marinetti ら¹³⁻¹⁵⁾ のブタ心臓複合脂質およびチトロームを活性化する脂質に関する一連の研究が行われている他, 著者ら¹⁶⁾のイワシ心臓についての報告がある。

魚類心臓複合脂質についてはその研究例は見当たらない。著者¹⁷⁾は前報においてスケトウダラ心臓アセトン可溶性脂質の性状について報告したが本報では, 複合脂質の性状について報告する。

* Studies on the Phosphatide of Aquatic Animals. XXVII.

水産動物磷脂質に関する研究 第27報

実験および結果

実験操作および分析法: 脂質抽出液の濃縮等の操作は前報¹⁷⁾に示したが、分析法はそれぞれ P: Fiske-Subbarow 法, N: ミクロケールダール法, コリン: Beattie 法¹⁸⁾, アミノ塩基: Nojima-Utsugi 法¹⁹⁾, グリセロール: Blix 法²⁰⁾, アルデヒド: Wittenberg 法²¹⁾, 沃素価: Wijs 法によって測定, イノシットは Scherer 反応によって検出した。

I. レシチン: 大略前報 Fig. 1 に示したようにして得られた心臓アセトン抽出物より得られた粗レシチン-CdCl₂ 塩, アセトン抽出残渣からの 95% メタノール可溶部よりの粗レシチン-CdCl₂ 塩を合せ, アセトンで数回洗滌し 38.5 g (湿量) のレシチン-CdCl₂ 塩を得た。このものを 200 ml の石油エーテルに懸濁, 等量の 30% エタノールと激しく振盪して脱 CdCl₂ すること 17 回, CdCl₂ を完全に除去した後石油エーテルを溜去し得られた残渣を 150 ml の 95% エタノールに溶解氷室に保ち生じた不溶部を遠沈除去, エタノール可溶部はアルミナクロマトグラフ (15×180 mm, アルミナは Merck 製クロマトグラフ用のものを 400°C, 2 時間活性化した 30 g を用いた。)を行い, 更に 95% エタノール 400 ml にて溶出, 溶出液よりエタノールを溜去しエーテルに溶解 700 ml のアセトンに注入, このエーテル, アセトンによる精製を数回くり返えし精製レシチン 3.5 g を得た。

分析結果: P 3.94%, N 1.73%, コリン 14.53%, グリセロール 11.20%, アルデヒド 0.01 %, 沃素価 109.4%, N/P 0.97, コリン/N 0.97, グリセロール/P 0.96

レシチンの脂肪酸: レシチン 2.9 g を常法通り鹼化し 1.6 g の脂肪酸 (中和価 199.3, 沃素価 130.8) を得た。このものをさらに鉛塩エタノール法により固体酸, 液体酸に分別, 後者はさらにリチウム塩アセトン法により低度不飽和酸および高度不飽和酸に分別し Table 1 に示す結果を得た。

Table 1. Fractionation of the component acids of lecithin

	Yield, %	Neutr. no.	Iodine no.
Mixed acids	—	199.2	130.8
Solid acids	42.9	207.2	17.6
Lower unsatd. acids	22.8	195.4	116.3
Higher unsatd. acid	34.3	192.6	280.7

(i) 固体酸は 90% エタノールより再結, この酸塩化物をピリジン中で 2,4-ジニトロフェニールヒドラジンと反応させ脂肪酸ジニトロフェニールヒドラゾンを生成, 井上ら²²⁾の方法によりペーパークロマトグラフで検索し Table 2 に示す結果を得た。

(ii) 低度不飽和酸については一部をラネーニッケルを触媒とし水添を行って得た飽和酸を前記同様ペーパークロマトグラフにより検索, Table 2 に示す結果を得た。また残りをメチルエステルとし井上ら²³⁾の方法によりメタノール中で酢酸第二水銀と反応させ生じた酢酸水銀付加物をペーパークロマトグラフで検索 Table 3 に示す結果を得た。

(iii) 高度不飽和酸の一部をとり前記同様水添後ペーパークロマトグラフ (Table 2) を行い, また一部を Herb ら²⁴⁾の方法に従い異性化して紫外部吸収を測定し Hammond ら²⁵⁾の式に従いジエン, トリエン, テトラエン, ペンタエン, ヘキサエン酸量を算出し Table 4 に示す結果を得た。

Table 2. R_f value of 2,4-dinitrophenylhydrazides of component acids of lecithin*

Acids	Lauric	Myristic	Palmitic	Stearic	Arachidic	Behenic	Lignoceric (?)
Saturated acids	—	0.41	0.31	0.21	0.12	0.07	—
Hydrogenated acids from lower unsatd. acids	—	—	0.31	0.21	0.12	—	—
Hydrogenated acids from higher unsatd. acids	—	—	0.31	0.21	0.12	0.06	0.01
Standard	0.53	0.40	0.31	0.20	0.11	0.06	—

* Paper: Tōyō No. 2, Moving phase: 90% MeOH-AcOH-tetralin (10:2:1), Stationary phase: Tetralin, Development: Ascending at 30°C, Detection: 0.5 N KOH in ethanol.

Table 3. R_f value of mercuric acetate complex of component lower unsaturated acids of lecithin*

Acids	Zoomaric	Oleic	Eicosenoic	Linoleic	Linolenic
Sample	0.28	0.15	0.08	0.52	0.72
Standard	0.27	0.16	0.09	0.51	0.73

* Paper: Tōyō No. 50., Moving and stationary phase are the same as Table 2. Detection: 0.2% Diphenylcarbazone in ethanol.

Table 4. Spectrophotometric analysis of component acids of conjugated lipids (%)

Fatty acids from	Hexaenoic	Pentaenoic	Tetraenoic	Trienoic	Dienoic	Monoenic	Saturated
Higher unsatd. acids of lecithin	13.2	9.6	5.7	1.2	4.6	—	—
Mixed acids of cephalin	10.0	10.0	2.3	4.4	8.6	50.3	14.4
Mixed acids of phosphatidic acid	1.4	1.3	0.6	0.5	1.9	81.5	12.8

II. ケファリン: 大略前報 Fig. 1 に示すようにして得られたアセトン抽出物を処理したエタノール不溶部, 95%メタノール可溶部およびメタノール抽出残渣よりエーテル抽出により得られたケファリン区分計 2.5 g を 30 ml のエーテルに溶解, 150 ml のエタノールに注入氷室に保った後, 沈澱を集めこの沈澱を 30 ml のエーテルに溶解再び氷室に保ち, 生ずる微量の沈澱物を遠沈除去上澄液を 300 ml のアセトンに注入生じた沈澱を集める。このエーテル, アセトンによる精製をくり返えし淡黄白色粉末状のケファリン 0.5 g を得た。

分析結果: P 3.99%, N 1.55%, エタノールアミン 5.08%, セリン 2.56%, グリセロール 10.85%, アルデヒド 0.00%, 沃素価 102.7, イノシット +, N/P 0.90, グリセロール/P 0.92

ケファリンの脂肪酸: ケファリン 297 mg を鹼化し脂肪酸 (中和価 198.5, 沃素価 108.8) 185 mg を得た。この脂肪酸をレシチン高度不飽和酸部同様分光分析を行い脂肪酸組成を算出し Table 4 に示す結果を得た。

III. 磷脂酸: 前報 Fig. 1 に示すごとく 95% メタノール抽出液より得られた Ba 塩をエーテル 1700 ml, エタノール 170 ml, 5% 硫酸ナトリウム水溶液 850 ml と振盪, エーテル層を脱水芒硝で乾燥後エーテルを溜去して得られた残留物を更にエーテル 250 ml, メタノール 120 ml, 氷水 300 ml および少量の 5% 塩酸水溶液と振盪しエーテル層をとり, 水・エタノール層は更に 150 ml, 100 ml のエーテルで抽出しエーテル層を合せ 20 ml まで濃縮 150 ml のアセトンに注入, 粗ケファリン部と遊離磷脂酸部に分別しアセトン可溶の磷脂酸部は 20% 酢酸ナトリウム水溶液を滴下中和後, 氷室に保ち磷脂酸 Na (湿量 2 g) を沈澱させこの沈澱をメタノール 100 ml に溶解, 氷室に保ち生じた析出物除去, 20% 塩化バリウム水溶液 3 ml を加え氷室に保ち得られた沈澱をメタノールで 3 回, アセトンで 2 回処理した後 20 ml のエーテルに懸濁, 等量のアセトンを加え再び沈澱物を得た。この操作を更に 5 回くり返した沈澱を 20 ml のエーテルに懸濁, 数滴の水を加え氷室に保ち生じた沈澱を除去した後無水アセトン 50 ml を加え氷室に保ち再び生じた沈澱を遠心分離して集めた。この沈澱をエタノール 10 ml, 含水エーテル 90 ml 混合液に溶解, $\frac{1}{2}$ 量の半飽和食塩水と振盪, エーテル層は脱水芒硝で乾燥後 600 ml の無水エタノールに注入し, この混合溶液を 500 ml まで濃縮した後 20 ml の 50% CdCl_2 水溶液を加え氷室に保ち磷脂酸 CdCl_2 塩 (湿量 1.6 g) を得た。この沈澱をクロロホルム 80 ml に懸濁, 等量のアセトンを加え精製磷脂酸 CdCl_2 塩 (湿量 1.0 g) を得た。このものを更にクロロホルム 30 ml に溶解しアンモニア性メタノールと振盪, CdCl_2 を除去した後少量の塩酸を加え過剰のアンモニアを中和, 10% 食塩水と数回振盪しクロロホルム層を分取, 脱水芒硝で乾燥, 溶剤を溜去, 磷脂酸 Na (262 mg) を得た。なお分析結果は Table 5 に示す。

Table 5. The analytical value of phosphatidic acid -Na

	Found	Calculated as		
		(a)	(b)	(c)
P %	4.21	4.23	4.20	4.17
Glycerol %	16.51	16.78	16.64	16.58
Iodine no.	93.2	127.2	126.5	125.1

Note: Values calculated in per cent for the following formulas.

- $\text{C}_{120}\text{H}_{205}\text{O}_{24}\text{P}_3\text{Na}_3$ with eleven double bonds (five linoleyl radicals and one oleyl)
- Formula (a)+1 molecule of H_2O
- Formula (a)+2 molecule of H_2O

(i) 磷脂酸のペーパークロマトグラフ: 磷脂酸 Na を Huennekens ら²⁰⁾ の方法に従ってペーパークロマトグラフを行い Table 6 に示す結果を得た。

Table 6. Paper chromatography of phosphatidic acid*

	Phosphoric acid ester ²⁷⁾	Unsaturated ²⁸⁾	Fatty material ²⁹⁾	Amino base	Choline ³⁰⁾	Ammonia
R _f	0.89—0.90	0.88—0.90	0.89—0.90	—	—	Nil

* Paper: Tōyō No. 50, Moving phase: n-BuOH-AcOH-H₂O (8:1:1),
Development: Ascending at 25°C

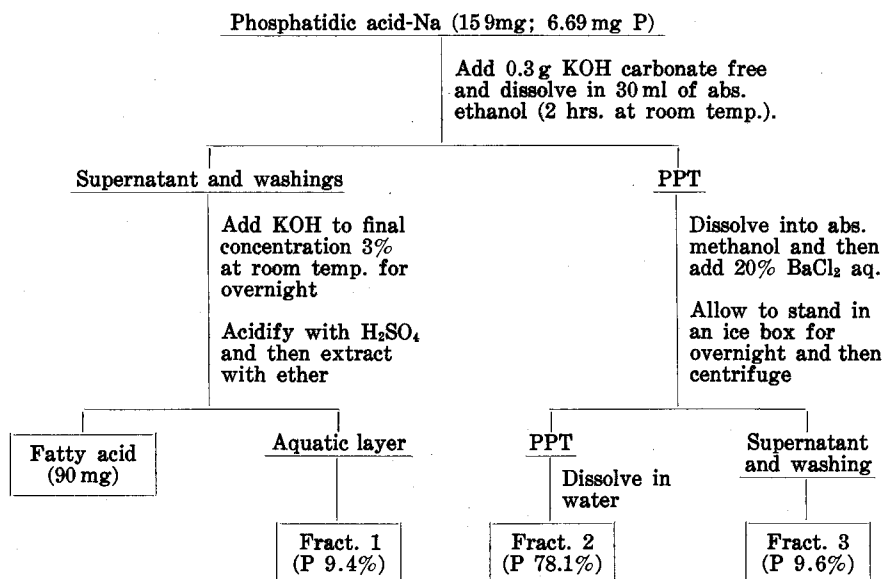


Fig. 1. Hydrolysis of phosphatidic acid

(ii) 磷脂酸の加水分解生産物: 磷脂酸 Na 159 mg を Fig. 1 に示すごとく冷鹼化を行いその生成物を検索した。

a) 脂肪酸: 前記磷脂酸 Na の冷鹼化により脂肪酸 (中和価 196.7, 沃素価 104.7) 90 mg を得, 前記同様分析を行った結果を Table 4 に示す。

b) 水溶性グリセロ磷脂: Fig. 1 に示す Fract. 1, Fract. 3 は少量のため検索しなかったが, メタノール不溶性 Ba 塩 (Fract. 2) 42 mg を 25 ml の水に溶解しその 2 ml をとり P を定量, 残部に等量の無水エタノールを加え沈澱を除去, エタノール層を濃縮後 15 倍量の無水メタノール中に注入し生じた沈澱を集めた。この操作を組合せて 31 mg の精製 Ba 塩を得た。その分析値は Table 7 に示す通りである。

考 察 お よ び 総 括

スケトウダラ心臓よりレシチン, ケファリンおよび磷脂酸を調製し主としてその脂肪酸組成を検討した結果, レシチンの構成脂肪酸はミリスチン酸, パルミチン酸, ステアリン酸, アラキジン酸, ペ

Table 7. Analysis of barium salt of fract. 3

Component	Found	Calculated as		
		(A)	(B)	(C)
Ba %	27.01	25.66	27.21	28.06
P %	12.40	11.57	12.28	12.66
Glycerol %	47.83	51.58	48.63	47.03

Values calculated in per cent for the following formulas.

(A) $C_2H_{20}O_{13}P_3Ba$ (2-glycerophosphoric acid-1-glycerol)

(B) $C_{12}H_{26}O_{15}P_3Ba_{2/3}$ (3-glycerophosphoric acid-1-glycerol)

(C) $C_{15}H_{32}O_{23}P_4Ba_2$ (4-glycerophosphoric acid-1-glycerol)

ヘニン酸等の飽和酸, ゾーマリン酸, オレイン酸, エイコセン酸, リノール酸, リノレン酸等の低度不飽和酸は約 71.5%, アラキドン酸, イワシ酸, ドコサヘキサエン酸等の高度不飽和酸約 28.5% よりなり, ケファリンは Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine および Inositolphospholipid の混合物でその構成脂肪酸は飽和酸 14.4%, 低度不飽和酸 63.3%, 高度不飽和酸 22.3% よりなることが判明した。

磷脂酸の加水分解により得られたグリセロ磷酸の約 80% はその分析値より考えると 3-glycerophosphoric acid-1-glycerol を主体とするものと考えられる故にこの磷脂酸は Pangborn によって報告された cardiolipin 類似物と考えられるが脂肪酸組成は Table 4 に示すように大部分はモノエチレン酸および飽和酸によって占められているが, さらに少量の他の不飽和酸の存在することも明らかに cardiolipin とは結合脂肪酸が多少異なるものと考えることが出来る。

本実験を行うに当り終始御懇篤な御指導を下された五十嵐久尚教授に謝意を表するとともに試料の採取に御便宜を計られた余市町 阿部寅四郎氏に厚く謝意を表する。

文 献

- 1) Pangborn, M. C. (1942). *J. Biol. chem.* 143, 247-256.
- 2) ————— (1944). *ibid.* 153, 343-348.
- 3) ————— (1945). *ibid.* 155, 691-692.
- 4) ————— (1945). *ibid.* 161, 71-82.
- 5) ————— (1947). *ibid.* 168, 351-361.
- 6) ————— (1951). *ibid.* 188, 471-476.
- 7) Faure, M. and Coulon, M. J. (1948). *Bull. soc. chim. biol.* 30, 533-538.
- 8) ————— (1954). *Compt. rend.* 238, 411-412.
- 9) Rapport, M. M. and Alonzo, N. (1955). *J. Biol. Chem.* 217, 199-204.
- 10) Gray, G. M. and Macfarlane, M. G. (1958). *Biochem. J.* 70, 409-425.
- 11) Gray, G. M. (1958). *ibid.* 70, 425-433.
- 12) Marinetti, G. V, Erbland, J. and Stotz, E. (1959). *J. Am. Chem. Soc.* 81, 861-864.
- 13) ————— (1958). *J. Biol. Chem.* 233, 562-565.

- 14) ————— . ————— . Morison, M. and Stotz, E. (1958). *J. Am. Chem. Soc.* 80, 402-404.
- 15) ————— . ————— . Stotz, E. (1958). *ibid.* 80, 1624-1628.
- 16) 五十嵐久尚・座間宏一・片田宗男 (1956). 農化 30, 116-119.
- 17) 座間宏一 (1962). 北大水産彙報 13, 181-185.
- 18) Jane, F. and Beattie, R. (1936). *Biochem. J.* 30, 1554-1559.
- 19) Nojima, S. and Utsugi, N. (1957). *J. Biochem. (Tokyo)*. 44, 565-573.
- 20) Blix, G. (1937). *Mikrochim. Acta*. 1, 75-77.
- 21) Wittenberg, J. B., Korey, S. R. and Swenson, F. H. (1956). *J. Biol. Chem.* 219, 39-47.
- 22) Inoue, Y. and Noda, M. (1955). *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.* 19, 214-219.
- 23) 野田万次郎・平山修・井上吉之 (1956). 農化 30, 106-111.
- 24) Herb, S. F. and Riemenschneider, R. W. (1953). *Anal. Chem.* 25, 953-955.
- 25) Hammond, E. G. and Lundberg, W. O. (1953). *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 30, 432-438.
- 26) Huennekens, F. M., Hanahan, D. J. and Uziel, M. (1954). *J. Biol. Chem.* 206, 443-447.
- 27) Hans, C. S. and Isherwood, F. A. (1949). *Nature*. 164, 1107-1112.
- 28) Ashley, B. D. and Westphal, U. (1955). *Arch. Biochem. Biophys.* 56, 1-10.
- 29) Hack, M. H. (1953). *Biochem. J.* 54, 602-605.
- 30) Bevan, T. H., Gregory, G. I., Malkin, T. and Poole, A. G. (1951). *J. Chem. Soc.* 841-842.