



Title	ナガズカ卵巣の毒性物質：第3報 毒性リポ蛋白質Lipostichaerinの分離と性状
Author(s)	羽田野, 六男; HATANO, Mutsuo
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 20(4), 329-338
Issue Date	1970-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23408
Type	departmental bulletin paper
File Information	20(4)_P329-338.pdf



ナガズカ卵巣の毒性物質

第3報 毒性リポ蛋白質 Lipostichaerin の分離と性状*

羽田野六男**

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny

III. Isolation and characterization of toxic lipoprotein, lipostichaerin.

Mutsuo HATANO

Abstract

The toxic lipoprotein fraction was prepared as follows: The northern blenny roe was extracted with 10% NaCl, pH 7.0. The toxic lipoprotein fraction in the NaCl extracts was precipitated in the presence of 30% saturation with solid ammonium sulfate at pH 6.8 and it was a relatively high toxicity. The material was further reprecipitated adding to 50% saturation with saturated ammonium sulfate solution at pH 7.0. The reprecipitate was purified by preparative ultracentrifugation using several density solvents, i.e. 1.016, 1.063 and 1.21, according to the method of Havel and coworkers. A high toxicity was recognized in only high density lipoprotein fraction ($1.063 < d < 1.21$), named lipostichaerin. The lipostichaerin was homogeneous with electrophoretic criterion and gel filtration on Sephadex G-100, and it gave an ultraviolet spectrum with a peak of maximum absorption at 279 $m\mu$ and an infrared spectrum with characteristic absorption at 1730, 1675 and 1530 cm^{-1} . It assayed N, 12.16%; P, 0.88%; and $[a]_D^{25}$, -36.7.

As shown in Table 9, the amino acid composition of lipostichaerin is very similar to β -lipostichaerin fraction described by Asano and Itoh, except for the amounts of serine, valine, methionine, isoleucine, lysine and tryptophane.

The toxicity of lipostichaerin was approximately 0.9 mg. per g. of body weight of a mouse, but the toxic principle has not yet been clarified.

緒 言

前報¹⁾においてナガズカ卵巣の毒性物質は脂質性以外に蛋白性のもも存在しそれがリポ蛋白質であることを報告したが、最近 Fuhrman ら²⁾は Cabezon, *Scorpaenichthys marmoratus* (カジカの1種) 卵巣を 0.14 M 食塩水で抽出を行ない LD₅₀ 150 mg/kg の毒性を示す区分 (分析値 C 57.57%, H 8.27%, N 6.70%, P 0.85%) を分離し、また 0.5% 食塩水抽出では LD₅₀ 200 mg/kg の毒性を示す区分 (分析値 C 49.3%, H 7.4%, N 11.6%, P 0.61%) を得ているが、いずれもリポ蛋白質であると報告している。

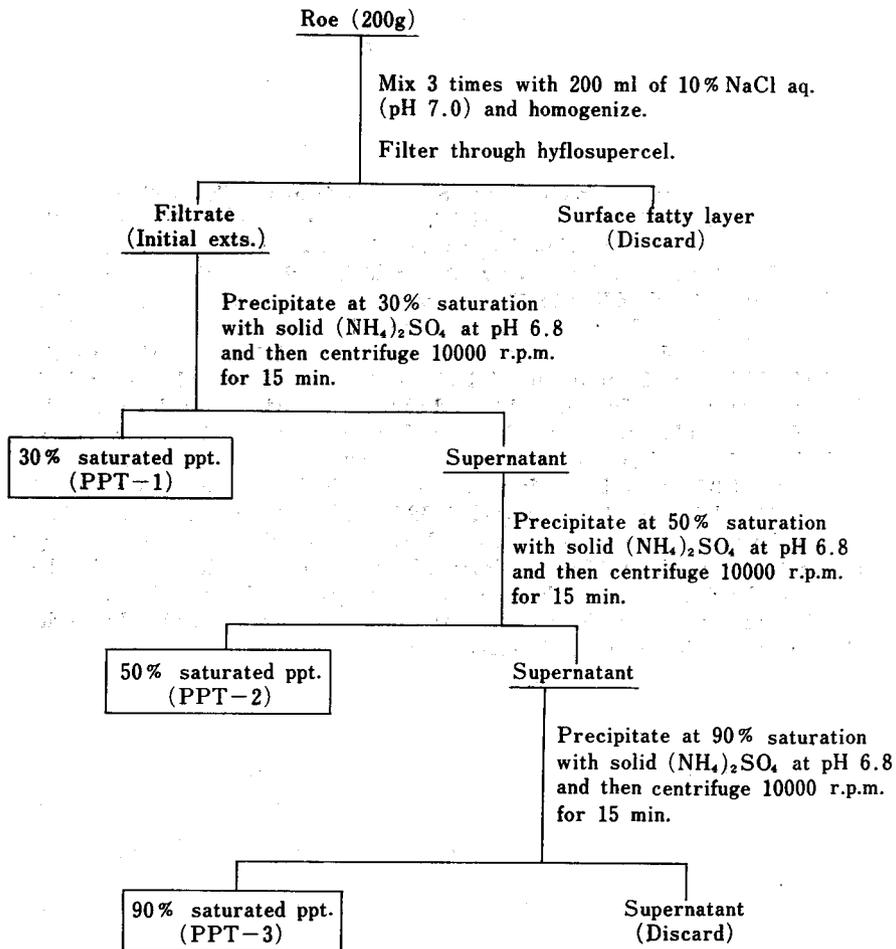
* 本研究は 1967年8月17日 The 9th Japanese Conference of the Biochemistry of Lipids. (Tokyo) で講演発表

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

著者は前報同様ナガズカ卵巣を 10% 食塩水抽出を行ない毒性リポ蛋白質区分を得たが、これを硫酸アンモニウム分画、さらに調製超遠心法によって毒性リポ蛋白質 Lipostichaerin を分離しその性状について検討を行なったので報告する。

実験および結果

実験方法：分析法および毒性試験法は前報同様であるが、リポ蛋白質の分離は種々の密度の均一溶媒を用いる超遠心法⁹⁾によって行ない日立 55 P 形超遠心機を使用した。電気泳動は日立 HTB-2 チェリウス電気泳動装置、比旋光度測定は柳本自記旋光計 OR-1 を使用した。アミノ酸分析は試料を



These precipitates were dissolved in distilled water and then dialyzed against distilled water containing 0.01% EDTA

Fig. 1. Extraction and fractionation of toxic lipoprotein, lipostichaerin, from the northern blenny roe

6 N HCl とともに封管内で 110°C, 36 時間, 22 時間加水分解を行ない日立アミノ酸分析計 KLA-2 型で測定した。なお加水分解における個々のアミノ酸の分解に対する補正は 36 時間, 22 時間両加水分解物の定量値から外挿法であるいは 36 時間 定量値を採用した。トリプリファン[®]の測定は紫外部吸収法[®]を併用した。

試料： 前報同様のものを供した。

毒性リボ蛋白質の抽出とその毒性： Fig. 1 に示すごとく卵巣 200 g を 10 % 食塩水 (pH 7.0) 200ml とホモジナイズしたのちハイフロスパーセルを用いて吸引濾過を行ない, 抽出残渣にさらに 10 % 食塩水を加えて 2 回抽出を行なった。これら抽出液を合せこれに固型硫酸アンモニウムを添加し 30 %

Table 1. Toxicity tests of initial extracts and each fraction

Fraction	Body wt. (g)	Sex	Dose*			Death time, hrs.
			mg	ml	mg/g.B.W.	
Initial exts.	28.0	♂	24.2	0.5	0.86	24
	26.0	♀	24.2	0.5	0.93	19
PPT-1	25.0	♂	31.6	0.4	1.26	Within 21
	26.0	♀	31.6	0.4	1.21	Within 21
	19.0	♂	15.8	0.2	0.83	Within 21
	20.0	♀	15.8	0.2	0.78	Within 21
	35.5	♂	6.5	0.5	0.18	Survived
	36.0	♀	6.5	0.5	0.18	Survived
PPT-2	23.0	♂	31.4	0.5	1.36	Within 21
	24.5	♀	31.4	0.5	1.28	Within 21
	22.0	♂	18.9	0.3	0.85	Survived
	21.0	♀	18.9	0.3	0.90	Survived
	28.5	♂	6.2	0.5	0.21	Survived
	36.0	♀	6.2	0.5	0.17	Survived
PPT-3	25.0	♂	35.3	0.5	1.41	Survived
	25.0	♀	35.3	0.5	1.41	Survived

* Route: Intraperitoneal injection

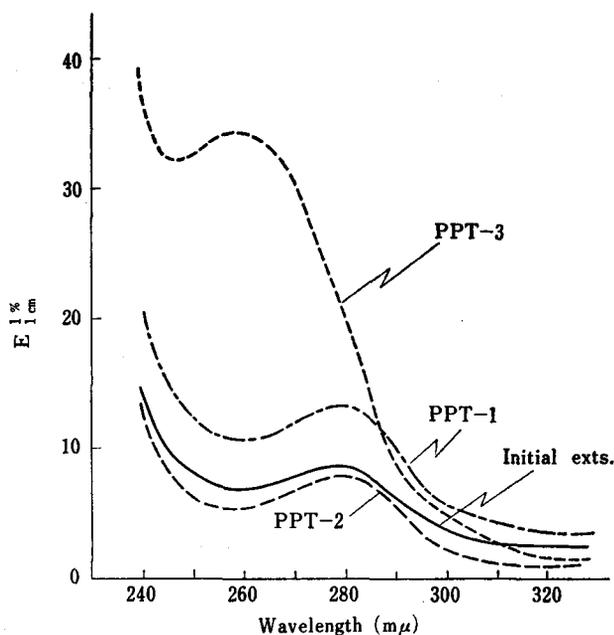
Table 2. Properties of initial extracts and each fraction

Fraction	Amount of protein (% of original roe wt.)	N, %	P, %	E _{1cm} ^{1%} (at 279 mμ)	Cellulose acetate electrophoretic distribution, **%				Toxicity†
					Peak a	Peak b	Peak c	Peak d	
Initial exts.	26.41	11.45	0.69	8.1	0.7	10.8	79.7	8.8	+
PPT-1	16.02	11.47	0.73	13.0	3.5	4.6	84.4	7.5	+
PPT-2	6.53	10.88	0.62	7.6	3.4	19.9	63.6	13.1	±
PPT-3	0.75	9.08	1.14	34.5*	19.8	12.3	54.3	13.6	-

* at 257 mμ

** See Fig. 5 in previous report¹⁾

† —: non toxic, ±: weakly toxic, +: moderately toxic, ++: Strongly toxic



Each fraction was dissolved in 5% NaCl aq., pH 7.0

Fig. 2. Ultraviolet spectra of initial extracts and each fraction

飽和沈殿 (PPT-1), 50% 飽和沈殿 (PPT-2), 90% 飽和沈殿 (PPT-3) の3区分に分画した。これらの結果はそれぞれ Table 1, 2, Fig. 2 に示すとおりである。

毒性リボ蛋白質の硫酸アンモニウム分画とその毒性： 前述の毒性の認められた PPT-1 と PPT-2 をそれぞれ 0.01% EDTA を含む水に透析し凍結乾燥後、3% 食塩水に再溶解これに硫酸アンモニウム

Table 3. Toxicity test of each reprecipitate

Fraction	Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, hrs.
			mg	ml	mg/g.B.W.	
PPT-1-30% reppt	23.5	♂	22.3	0.7	0.95	120
	24.5	♀	25.4	0.8	1.03	120
PPT-1-50% reppt	22.0	♂	22.5	0.5	1.02	Within 21
	21.0	♀	22.5	0.5	1.07	Within 21
PPT-1-70% reppt	23.0	♂	21.5	0.5	0.93	Within 24
	23.5	♀	21.5	0.5	0.93	Survived
PPT-2-50% reppt	25.5	♂	25.1	0.8	0.98	120
	23.0	♀	22.0	0.7	0.98	120
PPT-2-70% reppt	22.5	♂	21.5	0.7	0.95	Survived
	26.0	♀	24.5	0.8	0.98	Survived
PPT-2-90% reppt	22.5	♂	22.5	0.7	1.00	Survived
	22.5	♀	25.6	0.8	1.00	Survived

Table 4. Property of each reprecipitate

Fraction	Amount of protein, %*	N, %	P, %	E _{1cm} ^{1%} (at 279 mμ)	Cellulose acetate electrophoretic distribution, %				Toxicity
					Peake a	Peake b	Peak c	Peak d	
PPT-1-30% reppt.	6.4	5.45	0.42	12.1	3.3	21.7	70.0	5.0	+
PPT-1-50% reppt.	80.0	11.17	0.62	10.8	3.2	9.2	85.0	2.6	±
PPT-1-70% reppt.	10.6	12.56	0.59	10.6	1.6	0.0	81.2	17.2	±
PPT-2-50% reppt.	80.2	12.67	0.70	—	8.4	29.3	58.1	4.2	±
PPT-2-70% reppt.	5.3	12.20	0.51	—	22.6	6.2	48.6	22.6	—
PPT-2-90% reppt.	4.1	8.35	0.38	—	5.0	22.0	69.0	4.0	—

* in PPT-1 or PPT-2 wt.

飽和水溶液を加え pH 7.0 に調整，分画を行なった。生成した各沈殿は遠心分離によって集め水に溶解，0.01 % EDTA を含む水に透析したのち凍結乾燥し毒性試験と分析に供した。これらの結果は Table 3, 4 に示すとおりである。

毒性リポ蛋白質 (Lipostichaerin) の調製超遠心法による分離とその毒性：Table 3, 4 の結果毒性の比較的強い PPT-1-50 % reppt 区分 7.6 g を 0.154 M NaCl (d=1.006) 100 ml に溶解し，同液に 3 時間透析後 d=1.085 溶媒を計算量加えて d=1.019 の試料溶液を調製した。このものを Table 5 に示すごとく超遠心分離 (40,000 rpm, 12-15°C) を行ない，低密度リポ蛋白質 (LDL₁, LDL₂), 高密度リポ蛋白質 (HDL₁, HDL₂), 超遠心沈渣 (UR) とに分別した。それぞれの区分は 0.05 % EDTA を含む水に透析，凍結乾燥し試料とした。毒性試験 (Table 6) とセルローズアセテート電気泳動 (Table 7) の結果 HDL₂ 区分が Lipostichaerin 区分に相当することが認められた。

Lipostichaerin の性状：分離した Lipostichaerin は高密度リポ蛋白質 (1.063 < d < 1.21) であるが，純度を検討するためチセリウス電気泳動 (Fig. 3), Sephadex G-100 によるゲル濾過 (Fig. 4), と超遠心分析を行なったが超遠心分析においては溶媒密度と蛋白濃度の欠陥によって鋭いシュリレンパターンは得られず均一性を検討することは不成功であった。しかし電気泳動とゲル濾過では均一

Table 5. Scheme of separation of toxic lipoprotein by preparative ultracentrifugation

Lipoprotein class	Abbreviation	Density range (d)	Fraction collected	Gravitational force (g)	Density of medium	Salt	Time, hrs.
Low density	LDL ₁	d < 1.019	Top	67,910	1.019	NaCl	22
Low density	LDL ₂	1.019-1.063	Top	67,910	1.063	NaCl-NaBr	22
High density	HDL ₁	1.063-1.21	Top	67,910	1.21	NaCl-NaBr	36
High density	HDL ₂	1.063-1.21	Infranatant	105,400	1.21	NaCl-NaBr	36
Ultracentrifugal residue	UR	1.21 < d	bottom	144,700	1.21	NaCl-NaBr	36

Rotor model: 40.0

Table 6. Toxicity test of each fraction by preparative ultracentrifugation

Fraction	Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, hrs.
			mg	ml	mg/g.B.W.	
LDL ₁	25.0	♂	25.0	0.5	1.00	Survived
	25.0	♀	25.0	0.5	1.00	Survived
LDL ₂	26.0	♂	25.0	0.5	0.96	Survived
	25.0	♀	25.0	0.5	1.00	Survived
HDL ₁	26.5	♂	27.8	0.5	1.04	15
	26.5	♀	27.8	0.5	1.04	15
HDL ₂	28.0	♀	30.2	0.6	1.07	18
	26.5	♂	27.0	0.5	1.01	15
	27.5	♀	26.6	0.7	0.96	Within 24
	22.0	♂	20.7	0.5	0.94	Within 24
UR	27.0	♂	28.6	0.6	1.05	Survived
	21.0	♂	26.0	0.5	1.23	24

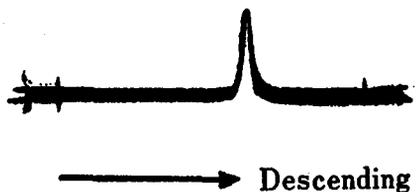
Table 7. Property of each fraction by preparative ultracentrifugation

Fraction	Amount of protein, %*	N, %	P, %	E _{1cm} ^{1%} (at 279 mμ)	[α] _D ²⁶ †	Cellulose acetate electrophoretic distribution, %				Toxicity
						Peak a	Peak b	Peak c	Peak d	
LDL ₁	0.9	—	—	10.5	—	—	—	—	—	—
LDL ₂	5.5	5.32	1.57	3.6	—	14.2	14.2	70.3	0.0	—
HDL ₁	6.2	13.46	1.08	11.3	-36.6	17.5	0.0	80.3	1.7	±
HDL ₂ **	20.0	12.16	0.88	11.7	-36.7	0.0	0.0	100.0	0.0	±
UR	—	12.44	0.54	10.5	-36.5	3.0	0.0	95.2	1.8	±

* in PPT-1.50% reppt. wt.

** Lipostichaerin fraction

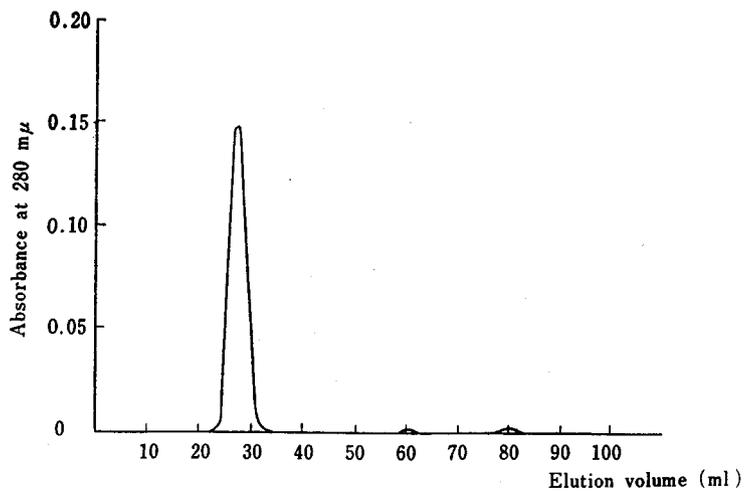
† as a solution of 5% NaCl, pH 7.2



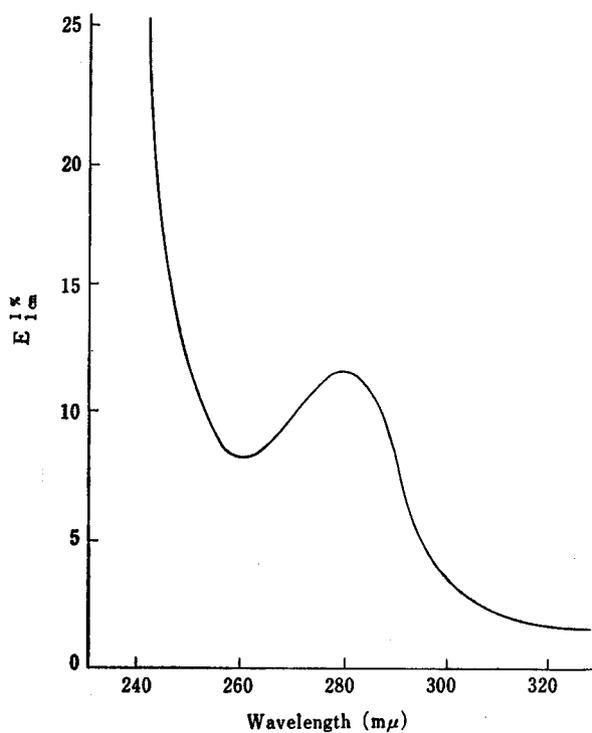
Lipostichaerin was dissolved in veronal buffer, pH 8.82, μ=0.1 and carried out at 10mA for 150min.

Fig. 3 Electrophoretic diagram of lipostichaerin

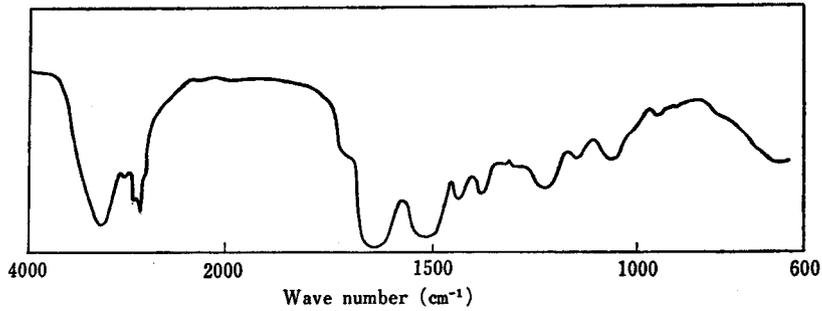
性を示したのでこのものの性状について検討を行なった。それらの結果は Fig. 5, 6, Table 7, 8 に示すとおりである。



Lipostichaerin was eluted through a column, 2×65.5 cm, using 2.5% NaCl aq., pH 7.0 as eluent and collected each 2 ml
 Fig. 4. Gel filtration of lipostichaerin on Sephadex G-100



Lipostichaerin was dissolved in 5% NaCl aq., pH 7.0
 Fig. 5. Ultraviolet absorption spectrum of lipostichaerin



The ir-pellet was prepared from 4.0 mg of lipostichaerin mixed with 600 mg of KBr

Fig. 6. Infrared spectrum of lipostichaerin

Table 8. Amino acid composition of lipostichaerin

Amino acid	Lipostichaerin				α -lipostichaerin ¹⁾	β -lipostichaerin ¹⁾	γ -lipostichaerin ¹⁾
	Amino acid, g/100 g protein	Amino acid residue, g/100 g protein	N recovery, %	Amino acid, mM/100g protein	Amino acid, mM/100 g protein	Amino acid, mM/100 g protein	Amino acid, mM/100 g protein
Asp*	5.99	5.18	0.63	45.0	50.0	47.9	56.7
Thr*	3.91	3.28	0.49	35.1	36.3	34.3	36.5
Ser*	2.96	2.45	0.39	28.1	51.2	56.5	42.8
Glu	11.32	10.15	0.91	65.0	65.7	63.8	55.7
Pro	3.80	3.21	0.46	33.0	31.7	25.7	44.4
Gly	2.14	1.63	1.40	28.5	43.2	33.9	40.5
Ala	6.98	5.57	1.10	78.3	62.6	70.6	40.3
CySO ₃ H	—	—	—	—	8.3	6.7	10.2
Val	4.83	4.09	0.58	41.3	38.6	32.7	38.9
Met	2.78	2.45	0.25	18.6	0.8	—	—
Ileu	5.55	4.79	0.59	42.3	28.5	30.2	22.6
Leu	7.35	6.34	0.79	56.0	56.4	53.2	48.2
Tyr	3.22	2.90	0.25	17.8	19.3	15.3	20.6
Phe	3.98	3.55	0.34	24.1	24.5	24.1	23.3
Try**	4.29	3.91	0.59	21.0	—	—	—
Lys	5.96	5.23	1.14	40.8	57.8	58.0	47.1
His	1.83	1.62	0.33	11.8	15.3	15.0	15.0
Arg	4.70	4.21	1.51	27.0	31.4	31.2	26.8
NH ₃ *	(0.90)†	—	0.74	(52.8)†	(35.6)†	(37.6)†	(68.0)†
Total	81.59	70.56	11.49	613.7	621.6	599.1	569.6

* Adopted by extrapolation to zero time of hydrolysis

** Estimated from the absorbance of the protein

† Omitted from the totals

For the other amino acids, the values of 36 hr. hydrolysates were employed

考察および総括

ナガズカ卵巣を 10% 食塩水で抽出し抽出液に固型硫酸アンモニウムを加えて粗分画を行ない 30% 飽和沈殿 (PPT-1) に毒性を認めた。この区分をさらに精密に硫酸アンモニウム 飽和溶液を加えて分

画し毒性の強い 50% 飽和再沈殿 (PPT-1・50% rept.) を得た。この区分は前報の結果よりリポ蛋白質と考えられるので、最近よく行なわれる分離法である調製超遠心法によって毒性リポ蛋白質の分離を試みた結果、高密度リポ蛋白質 ($1.063 < d < 1.21$) 区分の HDL₂ に強い毒性を認めた。この区分を Asano ら⁶⁾ に従って Lipostichaerin と名づけた。

Lipostichaerin の性状はチセリウス電気泳動、セルローズアセテート電気泳動 (Peak c に相当) では均一性を示し、また Sephadex G-100 のゲル濾過でも均一性を示した。しかし超遠心分析によってその均一性と Flotation rate (S_f) を測定したが種々の欠陥により均一性の検討はできなかつた。しかし S_f の値は 1-2 であることが推定された。UV スペクトルでは λ_{max} 279 m μ , $E_{1cm}^{1\%}$ 11.7, E_{280}/E_{260} の比は 1.38 であり、IR スペクトルではそれぞれペプチドと脂質に帰属される ν_{max}^{KBr} 1650 cm⁻¹ (アミド-I), 1525 cm⁻¹ (アミド-II), 1730 cm⁻¹ (エステル) の吸収を有しておりこのものがリポ蛋白質であることが認められる。構成アミノ組成は Ala と Glu の含量が比較的多いほか、Asano らの β -lipostichaerin のそれと比較すると Ser, Val, Met, Ileu, Lys および Try 以外はほぼ同じ傾向を有している。なお分離した Lipostichaerin は Young ら⁷⁾, Bernardi ら⁸⁾ の卵黄リポ蛋白質電気泳動図より lipovitellin に相当するものと考えられる。

魚卵毒性物質について化学的検討がなされたものは Table 9 に示すが、Pawlowsky⁹⁾ が European sturgeon (ダリチョウザメ属あるいはチョウザメ属) の卵より Acipenserin と称する毒性物質を分離し、プロタミンであると述べているが、卵黄にプロタミンが存在するとは考えられず、またこの卵は Cavier として賞味されることより非常に疑わしい。Mc Crudden¹⁰⁾ は Pike (カワカマス属) と Barbel (ニゴイの近縁種) 卵より水溶性の有毒アルブミンを分離しているがいずれも毒性リポ蛋白質とは異っている。今回著者が分離した Lipostichaerin はリポ蛋白質であり Asano らの β -lipostichaerin, Fuhrman らの Cabezon roe toxin II とよく類似している。

Table 9. Ichthyotoxins of several fishes

Fish	Ichthyotoxin	Fraction obtained	N, %	P, %	Component
Northern blenny	Lipostichaerin*	High density	12.16	0.88	Lipoprotein
	α -lipostichaerin ⁶⁾	Low density	3.56	0.75	Lipoprotein
	β -lipostichaerin ⁶⁾	High density	11.37	1.25	Lipoprotein
	γ -lipostichaerin ⁶⁾	High density	11.47	0.69	Lipoprotein
Cabezon	Toxin I ²⁾	18% NaCl satn. ppt.	6.70	0.85	Lipoprotein
	Toxin II ²⁾	Eluate from Biogel P-2	11.6	0.61	Lipoprotein
European sturgeon	Acipenserin ⁹⁾	—	29.88	nil	Protamine
Pike	Toxalbumin ¹⁰⁾	Aqueous exts.	—	—	Albumin
Barbel	Toxalbumin ¹⁰⁾	Aqueous exts.	—	—	Albumin

* Present study

なお産地では“ナガズカの卵は捨てておいてもカラスも寄らない。”といわれこのことは周知の事実とされているが、Pillsbury¹¹⁾ も British Columbia の海岸でやはり Cabezon の卵にカモメやカラスも寄らないことを観察しており、この点でも共通性がみられた。

謝 辞

本研究において本学部五十嵐久尚教授、坂井稔教授、座間宏一助教授に種々の御指導をいただき、超遠心機、チセリウス電気泳動装置の使用の御好意をいただいた斎藤恒行教授、アミノ酸分析に御援助下さった農学部坂村貞雄教授、動物試験に微生物学講座絵面良男修士、試料の調製に生物化学講座故牛山寛修士の御援助を、試料入手に木古内保健所林功課長の御好意によったことをここに記し厚く感謝の意を表す。

なお本研究の費用の一部は科学研究費補助金によった。

文 献

- 1) 羽田野六男 (1970). 本誌 20, 320-328.
- 2) Fuhrman, F.A., Fuhrman, G.J., Dull, D.L. & Mosher, H.S. (1969). *J. Agr. Food Chem.* 17, 417-424.
- 3) Havel, R.J., Eder, H.A. & Bragdon, J.H. (1955). *J. Clin. Invest.* 34, 1345-1353.
- 4) Bragdon, J.H., Havel, R.J. & Boyle, E. (1956). *J. Lab. & Clin. Med.* 48, 36-42.
- 5) Goodwin, T.W. & Morton, R.A. (1946). *Biochem. J.* 40, 628-632.
- 6) Asano, M. & Itoh, M. (1966). *Tohoku J. Agr. Res.* 16, 299-316.
- 7) Young, E.G. & Phinney, J.I. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 73-80.
- 8) Bernardi, G. & Cook, W.H. (1960). *Biochim. Biophys. Acta.* 44, 86-96.
- 9) Pawlowsky, E.N. (1928). *Gifttiere und ihre Giftigkeit.* 515 p. Jena; Gustav Fischer.
(not seen by author) (Halstead B.W. (1964). *Clin. Pharmacol. Therap.* 5, 615-627. より引用)
- 10) McCrudden, F.H. (1921). *Arch. expil. Path. Pharm.* 91, 46-80.
- 11) Pillsbury, R.W. (1957). *Copeia* (3), 251-252.