



Title	ナガズカ卵巣の毒性物質：第7報 毒性リポ蛋白質lipostichaerinの性状
Author(s)	羽田野, 六男; HATANO, Mutsuo
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 22(2), 168-176
Issue Date	1971-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23449
Type	departmental bulletin paper
File Information	22(2)_P168-176.pdf



ナガスカ 卵巣の毒性物質
第7報 毒性リポ蛋白質 lipostichaerin の性状*

羽田野 六 男**

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny
VII. Further characterization of lipostichaerin

Mutsuo HATANO

Abstract

In a previous paper a study was made on the toxic lipoprotein, denoted lipostichaerin, which was isolated from the roe of *Stichaeus grigorjewi*. In this paper further characterization of the lipostichaerin will be described.

The lipostichaerin showed homogeneous with chromatographically criterion (on hydroxyapatite) and gel filtration through the Sephadex G-200, and the chromatographic component according to Bernardi and Cook, was evidently β -lipovitellin which had a molecular weight of 4×10^5 , and the total amount of lipostichaerin reached 14.4% of the original roe.

The LD₅₀, by intraperitoneal injection into mice, was 180 mg/kg and no hemolytic activity was seen on sheep red blood cells.

The lipostichaerin was delipidated according to the method of Scanu et al. The lipid moiety (22.3%) was toxic and the protein moiety (77.7%) was nontoxic.

The lipid moiety was then fractionated on a silicic acid column. The only Fraction 3, eluted with CHCl₃-MeOH-H₂O (65:25:4) mixture, was toxic and it consisted mainly of phosphatidylcholine and a toxic phospholipid.

On the other hand, a livetin fraction of this roe, and protein fractions, 0.5 saturated precipitates, of muscle and milt of this fish were nontoxic.

These experiments indicated that the toxic phospholipid (0.23% in this roe) of the lipostichaerin is a certain phosphatidopeptide.

結 言

第3報¹⁾においてナガスカ卵巣より硫酸アンモニウム分画と調製超遠心法により lipostichaerin の分離を試み、高密度リポ蛋白質区分 ($1.063 < d < 1.21$) の subfraction HDL₂ に強い毒性を認めた。この HDL₂ (lipostichaerin) はチセリウス電気泳動、セファデックス G-100 のゲル濾過などで均一性を示し、さらにこのものについて紫外外部吸収スペクトル、赤外線吸収スペクトル、アミノ酸組成などを検討し特にセルローズ・アセテート膜電気泳動の挙動より lipovitellin 様物質であることを推定した。本報ではこの lipostichaerin は卵黄リポ蛋白質の1種 β -lipovitellin であることを認めさらにその分子量、等電点、50%致死量、溶血性などの性状のほか脂質部分の組成についても検討を行ない、Toxic component はある種の磷脂質であることを認めたので報告する。

* 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

(Laboratory of Food chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

実験および結果

実験方法:

分析法, 赤外線吸収スペクトル (IR スペクトル) の測定および毒性試験法はほぼ既報¹⁾と同様であるが, 50% 致死量 (LD₅₀)²⁾ は SWJ 系マウスに lipostichaerin をそれぞれ腹腔内接種 (*i. p.*) し 72 時間以内におけるマウスの斃死数から Behrens-Kärber 法によって計算した。

分子量は Andrews³⁾ の方法によりセファデックス G-200 を用いて測定した。

等電点 (pI) は種々の pH の M/15 磷酸緩衝液を用いセルローズ・アセテート膜電気泳動 (0.6 mA/cm/50 min.) を行ない, pH と移動距離との関係より求めた。

lipovitellin の同定は Tiselius⁴⁾ によるヒドロオキシアパタイト・カラムクロマトを行ないその溶出挙動から Bernardi と Cook ら⁵⁾ の方法にしたがって同定を行なった。

糖についてはアンスロン法⁶⁾ によって測定した。

50% 溶血単位 (H. H. U.) はヒツジ赤血球に対する溶血性を Herbert と Todd ら⁷⁾ の方法に準じて行なった。

脂質部分の分画とその組成はケイ酸カラムクロマト (Mallinckrodt 製, 110°C, 24 時間活性) により中性脂質, 磷脂質その他毒性磷脂質の 3 画分に分画し, 薄層クロマト (TLC) によって脂質組成を検討したが TLC の条件は既報⁸⁾ とほぼ同様である。

脂肪酸組成は前述の画分をそれぞれ 10% 塩酸メタノールとともに封管中で加熱しメチルエステルとしたものをガスクロマトグラフィー (GLC) によって検討した。

試料:

第 3 報¹⁾ で述べたところの lipostichaerin を使用した。

lipostichaerin の精製:

精製法については既報¹⁾ で述べたがその概略は Fig. 1 に示すとおりである。すなわちナガスカ卵巣を 10% 食塩水でくり返し抽出を行ない浮上脂肪層を除去した食塩抽出液に固型硫酸アンモニウムを加えて粗分画を行なった。得られた毒性を示す画分に硫酸アンモニウム飽和水溶液を加え, 毒性の強い画分として 50% 飽和再沈澱 (PPT-1, 50% reppt) を得た。このものの精製は Gofman の調製超遠心法によって行ない lipostichaerin は高密度リポ蛋白質 (1.063 > d > 1.21) の subfraction HDL₂ として得られた。

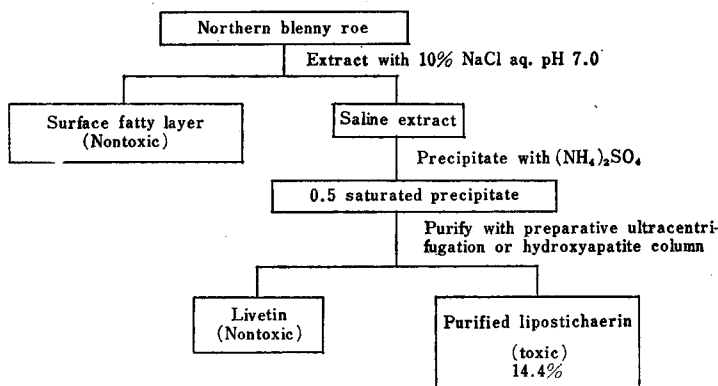
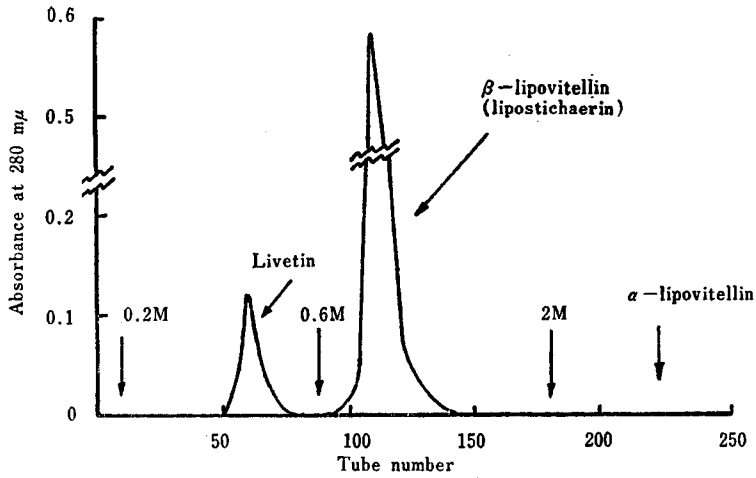


Fig. 1 Purification of lipostichaerin



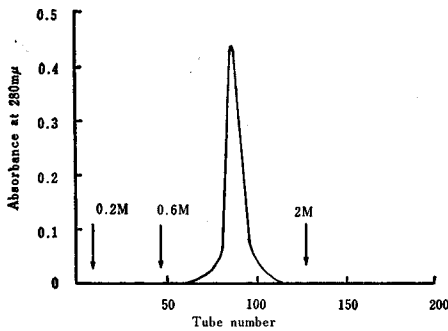
The column, 2.0×50.5 cm, was equilibrated with 0.2 M potassium phosphate buffer, pH 6.8. Three elution steps were used, namely, 0.2 M, 0.6 M and 2 M potassium phosphate, and from each collected 2 ml.

Fig. 2A Chromatography of 0.5 saturated precipitate on hydroxyapatite column

また卵黄リポ蛋白質の分離法であるハイドロオキシアパタイト・カラムクロマトによって50%飽和再沈澱 (60 mg) の分離・精製を試みた結果, Fig. 2A に示すごとく 0.2 M 磷酸緩衝液で溶出される livetin 区分と 0.6 M 磷酸緩衝液で溶出される β-lipovitellin に分離された。しかし α-lipovitellin は 2 M 磷酸緩衝液で溶出されるのであるが溶出されずこの試料には存在しなかった。したがってこの方法により大量に lipostichaerin (β-lipovitellin) を調製し一部の実験に供した。

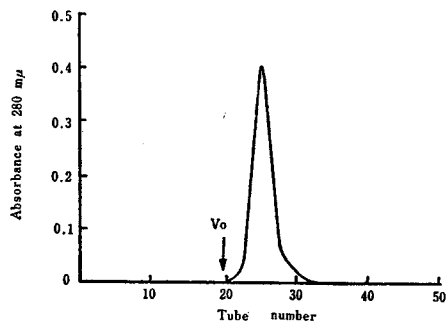
lipostichaerin の均一性:

先にテリウス電気泳動, セファデックス G-100 のゲル濾過による均一性を認めたが, 本実験においてもさらにハイドロオキシアパタイト・カラムクロマトおよびセファデックス G-200 によるゲル



Purified lipostichaerin was eluted through a column, 1.4×24.0 cm, and other condition was the same as in Fig. 2A.

Fig. 2B Chromatography of purified lipostichaerin on hydroxyapatite column



Purified lipostichaerin was eluted through a column, 1.7×55.0 cm using 0.5 M NaCl, pH 7.0, as a eluent, and from each collected 1 ml.

Fig. 3 Gel filtration of purified lipostichaerin on Sephadex G-200

濾過で検討を行なった。その結果はそれぞれ Fig. 2B と Fig. 3 に示すとおりであり、いずれにおいても均一であることを認めた。

lipostichaerin の毒性試験 (LD₅₀):

lipostichaerin の毒性試験は Table 1 に示すとおりであるが この結果から Behrens-Kärber 法によって LD₅₀ を求めると 180 mg/kg の値を示した。

Table 1 Toxicity test of purified lipostichaerin by intraperitoneal injection into mice, SWJ strain

Dosage (mg/kg)	Average body wt. (g)	Deaths no.	Mortality (%)	Average death time, (hrs.)
500	15.0	6	100	48
300	19.0	5	83	70
200	19.5	4	66	70
100	23.5	2	33	72
50	21.5	0	0	—

Six mice used for each group

lipostichaerin の性状:

既報^{1),8)}の結果と本実験の結果とをあわせて Table 2 に示すが、この結果 lipostichaerin は高密度リポ蛋白質で分子量 4×10^5 の β -lipovitellin と同定され、LD₅₀(i. p.) 180 mg/kg の毒性を有している。さらに血清学的性状としては溶血性は認められずまた抗原性では完全抗原としての性格を有していることを認めた。

Table 2 Characterization of purified lipostichaerin

Lipoprotein form	β -lipovitellin	Total nitrogen*	12.16 %
Hydrated density*	High density	Total phosphorus*	0.88 %
Flotation rate, S _f 1.12*	(1.063 < d < 1.21)	Sugar (as hexose)	Nil
Molecular weight	ca 1~2	Lipid moiety	22.3 %
pH	4.0×10^5	Protein moiety	77.3 %
λ_{max} *	5.8	LD ₅₀ (i. p.) in 72 hrs.	180 mg/kg
E ₁ ^{1%} _{1cm} at 279 m μ *	279 m μ	Hemolytic activity	No hemolysis
	11.7	Antigenicity*	Complete antigen

* See the previous report¹⁾⁹⁾

脂質部分と蛋白部分の性状:

ハイドロオキシアパタイト・カラムクロマトによって得られた lipostichaerin 3.0 g を 3 倍量のクロロホルム・メタノール(2:1)混合溶剤で処理し、脂質部分 0.67 g (22.3%) と蛋白部分(77.7%) とに分離した。なお一部については蛋白部分の毒性試験 (Table 5) のために Scanu ら¹⁰⁾の方法にしたがって脱脂を行なった。これらの性状については Table 3 に示すとおりであるが脂質部分は結合脂質よりなり毒性を示した。また H. H. U. は 36 mg/ml で、別にナガスガ卵巣より調製したリゾレシチンの値 (38 μ g/ml H. H. U.) と比較すると約 1/1000 の強さでほとんど溶血性はないが、わずかの溶血性は後述する脂質部分の中に混在する微量のリゾレシチンによるものと考えられる。一方蛋白部分については Vitellin (磷蛋白質) で毒性は存在せずまた溶血性もないが、完全抗原としての抗原性を有し lipostichaerin のそれと共通抗原であることが認められた。

Table 3 Properties of lipid and protein moieties of lipostichaerin

	Lipid moiety	Protein moiety
Recovery, %	22.3	77.7
Component	Bound lipids	Vitellin*
Toxicity	Toxic	Nontoxic
Hemolytic activity	36 mg/ml H.H.U.	No hemolysis
Antigenicity	Simple hapten ?	Complete antigen

* N: 12.75% ; P: 0.18%

脂質部分の分画とその毒性:

前述のごとく脂質部分にのみ毒性が存在するので脂質部分 (560 mg) をケイ酸カラムクロマトによる分画を試み, Table 4, 5, 6 に示す結果を得た。

この結果, CHCl₃ で溶出される Fract. 1 は毒性が認められず中性脂質を主成分とする画分であり, 次に CHCl₃-MeOH (7:3) で溶出される Fract. 2 も毒性がなくレシチンとケファリンを主成分とし微量のリゾレシチンを含む磷脂質画分であった。最後の CHCl₃-MeOH-H₂O (65:25:4) で溶出される Fract. 3 は毒性を示し, 毒性磷脂質のほかレシチンの混在も認められる画分であった。なおこの画分の IR スペクトルは Fig. 4 に示すとおりである。

各溶出画分の脂肪酸組成:

各溶出画分の脂肪酸組成を GLC によって検討した結果は Table 7 に示すとおりであるが, 特に毒性磷脂質画分 (Fract. 3) の主な構成脂肪酸はパルミチン酸, ヘキサデセン酸, ステアリン酸およびオクタデセン酸で, 中性脂質, 磷脂質画分のそれと比較すると高度不飽和酸の欠除していることが認められた。

ナガズカ筋肉および精巢の蛋白質と livetin の毒性試験:

ナガズカ筋肉および精巢をそれぞれ3倍量の10%食塩水 (pH 7.0) で3回抽出を行ない, 得られた食塩抽出液に硫酸アンモニウム飽和水溶液を加えて塩析し50%飽和沈澱を得た。これらのものと先に lipostichaerin の分離過程で得られた livetin についても毒性試験を行ない Table 8 に示す結果を得たがいずれにも毒性は認められなかった。

考察および総括

ナガズカ卵巣の毒性物質 lipostichaerin はリポ蛋白質として卵巣中に存在しているが, このものの性状については Table 9 に示すとおりである。

Table 4 Fractionation of lipid moiety on a silicic acid column

Eluted Fraction	Eluent, CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, (ml)	Yield, %	N, %	P, %	N/P*	Iod. V.**	Toxicity
1	10 : 0 : 0 (150)	46.1	Nil	Nil	-	182.9	-
2	7 : 3 : 0 (150)	38.9	1.42	3.47	1.1	146.2	±
3	65 : 25 : 4 (150)	15.0	+	+	-	-	+

* Molar ratio, ** Wijs' method

The lipid moiety (560 mg) was chromatographed on a 10 g silicic acid column, 1.8 × 25 cm.

Table 5 Toxicity tests of each eluted fraction and a protein moiety

Fraction	Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, (hrs.)
			mg	ml	mg/g B.W.	
Eluted fract. 1	27.0	♂	21.6	0.50	0.80	Survived
	27.0	♀	21.6	0.50	0.80	Survived
	24.0	♂	19.4	0.45	0.81	Survived
	21.0	♂	17.3	0.40	0.82	Survived
Eluted fract. 2	22.0	♂	17.6	0.60	0.80	57
	22.0	♀	17.6	0.60	0.80	50
	20.5	♂	10.3	0.35	0.50	Survived
	26.0	♀	13.2	0.45	0.51	Survived
Eluted fract. 3	20.5	♂	10.2	0.50	0.50	22
	21.0	♂	10.2	0.50	0.49	24
Protein moiety	22.0	♂	36.0	0.40	1.63	Survived
	24.0	♀	40.5	0.45	1.68	Survived
	22.5	♂	27.0	0.30	1.20	Survived
	25.0	♂	31.5	0.35	1.26	Survived
	22.0	♂	22.5	0.25	1.02	Survived
	18.0	♂	18.0	0.20	1.00	Survived

All mice (NIH) were injected intraperitoneally

Table 6 Lipid composition of each eluted fraction, %

Eluted fraction	MG	Free sterols	Free fatty acids	TG	Sterol esters	Lec	Lysolec	Cep	Toxic phL
1	7.6	8.5	9.6	14.5	5.9	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	25.7	tr	11.2	2.0
3	—	—	—	—	—	9.6	—	—	5.4
total	7.6	8.5	9.6	14.5	5.9	35.3	tr	11.2	7.4

All values were based in lipid moiety

Abbreviation: MG: Monoglycerides; TG: Triglycerides; Lec: Lecithin (phosphatidylcholine); Lysolec: Lysolecithin; Cep: Cephalin (phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine); and Toxic phL: Toxic phospholipid

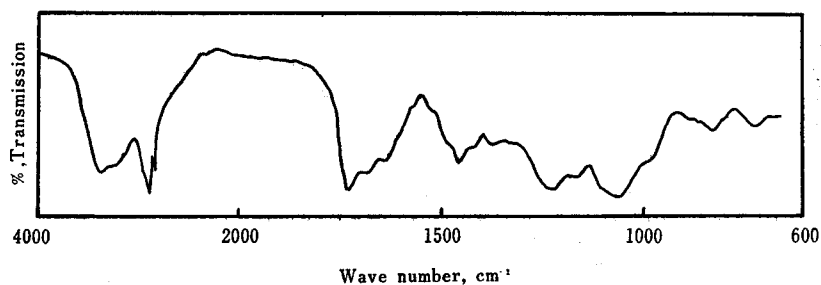


Fig. 4 Infrared spectrum of toxic phospholipid fraction, eluted fraction 3, passed in KBr

Table 7 Fatty acid composition of each eluted fraction, %

Cn:m	1	2	3
14:0	1.6	2.3	5.1
15:0	0.5	0.7	tr
16:0	20.1	24.1	9.8
17:0	1.4	1.7	1.9
18:0	4.9	5.9	22.8
20:0	0.5	tr	0.1
Total satd. acids	29.0	34.7	39.7
16:1	14.2	22.0	14.3
16:2	2.1	0.1	3.7
18:1	29.9	22.8	34.1
18:2	2.4	2.0	tr
20:1	3.3	tr	0.7
20:2	0.4	—	1.1
20:4	0.7	5.8	0.4
22:2	8.0	2.0	6.0
22:3	—	6.3	—
22:6	10.0	4.3	—
Total unsatd. acids	71.0	65.3	60.3

The condition of gas liquid chromatography was as follows:

Hitachi F6-D gas chromatograph; DEGS column length 2 m (3 mm, i.d.); Column temp. 205°; FID temp. 300°; Injection temp. 300°; N₂ pressure 0.6 kg/cm²; H₂ pressure 0.6 kg/cm² and air pressure 1.2 kg/cm²

Table 8 Toxicity tests of 0.5 saturated precipitates of muscle and milt from the blenny and livetin from its fish roe

	Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, (hrs.)
			mg	ml	mg/g B.W.	
Muscle*	25.0	♀	51.0	0.55	2.04	Survived
	24.0	♂	48.3	0.50	2.01	Survived
	25.5	♀	51.0	0.55	2.00	Survived
Milt**	23.0	♀	33.7	0.60	1.43	Survived
	24.0	♂	33.7	0.60	1.40	Survived
	25.0	♀	33.7	0.60	1.34	Survived
Livetin	28.5	♂	30.0	0.60	1.05	Survived
	24.5	♀	25.0	0.50	1.02	Survived
	21.0	♀	20.0	0.40	0.95	Survived

Also all mice (NIH) were injected intraperitoneally

*N: 12.78 % ; P: 2.78 % ** N: 13.35 % ; P: 1.30 %

Table 9 の結果からこのものは卵巣リポ蛋白質の1種 β -lipovitellin (分子量 4×10^5) であり、その毒性 (LD₅₀ 180 mg/kg) は Gleason の毒性基準⁹⁾ によると中等度 (very toxic) で他の水産動物毒の例とくらべても強くないが、Fuhrman ら¹¹⁾ による Cabezon の魚卵毒の値 (LD₅₀ 150 mg/kg) と近似している。またこのものは溶血性毒でないことも認められた。なお α -lipovitellin の存在は認められな

Table 9 Summarized characterization of purified lipostichaerin

	Lipostichaerin	Lipid moiety	Protein moiety
Designation	β -lipovitellin	Bound lipids	Vitellin
Hydrated density	High density	—	—
Mol. wt.	4×10^6	—	—
Toxicity (i.p.)	180 mg/kg LD ₅₀	Toxic	Nontoxic
Hemolytic activity	Not hemolytic	Slightly hemolytic	Not hemolytic
Antigenicity	Complete antigen	Simple hapten ?	Complete antigen
Lipid content, (%)	22.3	100.0	Nil
Neutral lipids (%)	10.3	46.1	—
Phospholipids (%)	13.0	53.9	—
Lecithin (%)	8.5	35.3	—
Cephalin (%)	2.7	11.2	—
Toxic phospholipid*(%)	1.8	7.4	—

* Toxic component (Possible phosphatidopeptide)

ったがその原因については不明である。さらにこの lipostichaerin を脂質部分と蛋白部分に分離すると毒性は脂質部分にのみ存在し蛋白部分には認められない。この脂質部分の組成は磷脂質が約 54% を占めるがその大部分はレシチンであり毒性磷脂質も少量であるが 7.4% (lipostichaerin に対して 1.8%) 含まれている。

この毒性磷脂質はナガスガ卵巣の毒作用を決定する重要な要素となるものであるが、その性状はクロロホルム・メタノール・水で溶出されることから一般の磷脂質より強い極性を有し、定性的(TLC)にはニンビドリン反応陽性でさらに IR スペクトルからはエステル結合、ペプチド結合、磷酸基などの存在が認められるものである。またその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、オクタデセン酸を主成分(81%)とし高度不飽和酸を含有していない。以上の結果からこのものはある種の Phosphatidopeptide であることが予想され毒性を発現させる部分は脂肪酸部分によるものではなくペプチド部分に由来するものと考えられる。

対照としてナガスガ筋肉と精巣の蛋白質についても毒性の有無を検討したがいずれにも毒性は認められず毒性は卵巣にのみ局在していることを認めた。

謝 辞

本研究にあたり終始御指導を賜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だいた東京大学農学部橋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、新井健一博士に厚く感謝の意を表す。

文 献

- 1) 羽田野六男 (1970). 北大水産彙報 20 (4), 329-338.
- 2) 高木敬次郎・小沢光 (1967). 薬物学実験. 194p. 東京; 南山堂.
- 3) Andrews, P. (1965). *Biochem. J.* 96, 595-606.
- 4) Tiselius, T., Hjerten, S. & Levin, Ö. (1956). *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 132-155.
- 5) Bernardi, G. & Cook, W.H. (1960). *Biochim. Biophys. Acta.* 44, 96-105.
- 6) Herbert, D. & Todd, E.W. (1941). *Biochem. J.* 35 (10-11), 1124-1139.

- 7) Mallov, S., McKibbin, J.M. & Robb, J.S. (1953). *J. Biol. Chem.* **201**, 825-838.
- 8) 羽田野六男 (1970). 北大水産彙報 **20** (4), 320-328.
- 9) ———— · 新井良治 (1971). 同誌 **21** (4), 325-330.
- 10) Seanu, A., Lewis, L.A. & Bumpus, F.M. (1958). *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 390-397.
- 11) Fuhrman, F. A., Fuhrman, G. J., Dull, C.L. & Mosher, H.S. (1969). *J. Agr. Food Chem.* **17** (3), 417-424.