

アサリ貝複合脂質に関する研究

アサリ貝複合脂質に存在するタウリン及び 2-アミノエチルホスホン酸について

亀 山 春
(栄養学研究室)

Studies on Asari (Short-neck Clam) Complex Lipids 2-Aminoethylsulfonic Acid (taurine) and 2-Aminoethylphosphonic Acid (2-AEP) in Asari Complex Lipids

Haru KAMEYAMA

緒 言

先にフェノール・次亜塩素酸ソーダ法による2-アミノエチルホスホン酸（以下2-AEPと略す）の比色定量法を確立し、二・三貝類複合脂質中の2-AEPの定量に応用することを試みたところ、アサリ貝複合脂質中には、2-AEP以外に本法により発色する物質が混在していることを認めた^{1) 2) 3)}。

本報告では、アサリ貝複合脂質中に存在するフェノール・次亜塩素酸ソーダ試薬に発色する物質を、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより単離し、元素分析、赤外吸収、ペーパークロマトグラフィー等により同定し、次いで複合脂質全窒素に対する定量を行ない、更に複合脂質中での存在様式についての検討を試みたのでその概要を報告する。

実 験 方 法

1. 供試材料 本実験では松江市販のアサリ貝を用いた。
2. 複合脂質の調製 生アサリ貝肉をアセトンで数回抽出して、水分、中性油脂、脂肪酸、ステロール等を除いた後、クロロホルム・メタノール混液（2：1）で3回抽出し、全抽出液を濃縮した。
3. その他 2-AEPはKosolapoff等⁴⁾の方法により合成した後イオン交換樹脂カラム（Amberlite IR-120, H型）で精製したものをを用いた。赤外吸収は日立赤外分光光度計EP I-S型を用い、KBr pellet として測定した。フェノール・次亜塩素酸ソーダ法は既報³⁾、ニンヒド

リン法はシアンカリ法、窒素の定量はセミマイクロケルダール法にそれぞれ従って行なった。又C-P結合のリンの定量はセミマイクロケルダール用分解フラスコに試料を加え、6N-硫酸と過塩素酸で無機リン酸にまで分解した後Chen⁵⁾の方法に従って定量した。又ペーパークロマトグラフィーは、担体東洋濾紙No.51を用い、イソブロピールアルコール：水：アンモニア：トリクロロ酢酸（75：25：0.5：5, v/v/v/g）を溶媒とし上昇法で行なった。

実験結果及び考察

アサリ貝複合脂質に含まれるフェノール・次亜塩素酸ソーダ反応陽性物質の単離及び同定

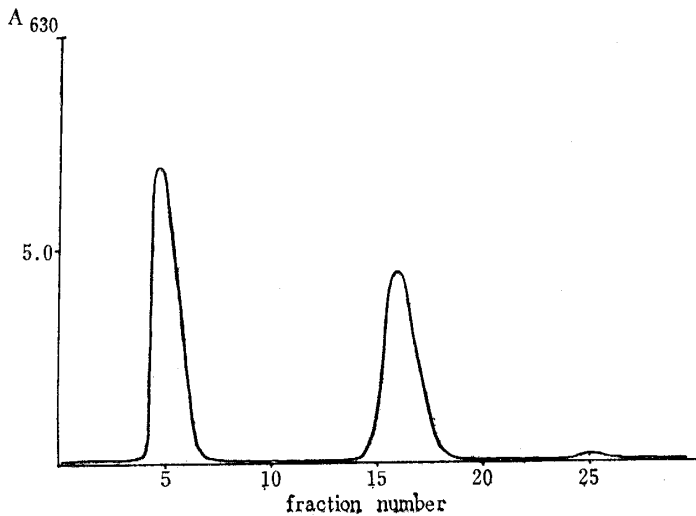
アサリ貝複合脂質に0.2Nメタノール性塩酸を加え、6時間加水分解を行なった後、分解生成物に石油エーテルを加えてよく振盪して脂溶性物質を除き、残りのメタノール層を少量に濃縮した。

濃縮残渣は少量の水に溶解し、イオン交換樹脂カラム（Amberlite IR-120, H型, 15×140mm）に添加した後水で溶出し、フェノール・次亜塩素酸ソーダ試薬に陽性を与える分画を集め少量に濃縮した。

次いで濃縮残渣を少量の0.6N塩酸に溶解し、あらかじめ0.6N塩酸で調製したイオン交換樹脂カラム（Dowex 50, H型, 10×420mm）に添加した後、0.6N塩酸で溶出し、フラクションコレクターを用いて溶出液を5mlずつ分集した。

各分画液の0.2mlを試験管にとり、フェノール・次亜

Fig.1 Elution Pattern of the Hydrolysate of Asari Complex Lipids



The hydrolysate of Asari complex lipids was fractionated on Dowex 50 H⁺ cation-exchange-resin column, made up in 0.6 N HCl. The column was eluted with the same solvent and five-ml fractions were collected. An aliquot was taken out from each fractions and detected with the phenol: sodium hypochlorite reagents.

塩素酸ソーダ法により発色せしめた後、溶出液量に対し、その吸光度を求めた。

Fig. 1に示す如く、f 4~7及び f 15~18に2つの大きなピーク（ピークA及びBと称す）と f 24~27にごくわずかなピークが認められた。ピークA及びBの溶出液の一部をとってペーパークロマトグラフィーを行なったところピークAは Rf 0.38に、Bは0.64の位置にスポットが得られた。又両ピークについて C-P 結合のリンの存在を定性的に調べたところ、Bにのみ認めることが出来た。

通常主として複合脂質中に含まれる含窒素物はエタノールアミン、コリン、セリン、スフィンゴシンの四つをあげることが出来る。このうちスフィンゴシンについては実験的に証明していないが、他の3つのうち、エタノールアミンのみがフェノール・次亜塩素酸ソーダ試薬により発色を示すが、イオン交換樹脂 (Amberlite IR-120, H型) で処理した場合には樹脂に吸着され、溶出液には認められない³⁾。

又ごく稀に 2-AEP, リジン, オルニチン, スレオニン, アラニン, グリシン等が複合脂質の構成成分として存在していると報告されているが⁶⁾⁷⁾, フェノール・次亜塩素酸ソーダ法に陽性を示すものは前者で、このうちリジン及びオルニチンはイオン交換樹脂 Amberlite IR-120の処理で樹脂に吸着され、2-AEPのみが水に溶出される。

従ってアサリ貝複合脂質に存在するフェノール・次亜塩素酸ソーダ試薬に陽性を示す2つのピークのうち、ピークBは前述の如く、C-P 結合のリンを有すること、フェノール・次亜塩素酸ソーダ試薬に陽性を示すこと及びイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 処理で水溶出液に検出される事等により2-AEPと推定されるが、ピークAは現在までの報告に見られない物質であろうと考えられる。

そこでこれ等2つのピークに存在する物質を同定することを目的として、それぞれの溶出液から結晶化を試み、更に得られた結晶について、元素分析及び赤外吸収の測定、ペーパークロマトグラフィーを行なった。

まず、ピークA及びピークBの溶出液を各々集めて濃縮した後、その残渣を少量の水に溶解し過した。次いで過液に加熱しながらわずかに白濁が生ずるまでエタノールを少しずつ加えた。(エタノール最終濃度はピークAについては50%, ピークBは40%であった。) このエタノール溶液は冷蔵庫内で一夜放置し、析出して来た結晶を過した後、冷エタノールで洗滌し、更に水・エタノールで再結した。

次に2つの結晶(ピークAからは結晶A、ピークBからは結晶Bと称す)について元素分析、赤外吸収の測定及びペーパークロマトグラフィーを行ない、Table 1, Fig. 2.3にそれぞれの結果を示した。

Table 1 に示す如く、結晶Aの元素分析結果はタウリンと又結晶Bについては2-AEPのそれぞれの理論値と一致した。赤外吸収については、Fig. 2 に示す如く、結晶Aはタウリン、結晶Bは2-AEPの標品とよく一致した。又ペーパークロマトグラフィーの結果も、Fig. 3 に示す如く、結晶Aはタウリン、結晶Bは2-AEPと同じ Rf 値にスポットを示した。

以上元素分析、赤外吸収の測定及びペーパークロマトグラフィーの結果から、結晶Aはタウリン結晶Bは2-AEPと同定した。

アサリ貝複合脂質に含まれる2-AEP及びタウリンの定量

前項において、アサリ貝脂質中にタウリン及び2-AE

Table 1 Elementary Analyses

I) Crystal A Taurine (C ₂ H ₇ O ₃ NS)				
	C	H	N	S
Calculated (%)	19.19	5.64	11.19	25.62
Found (%)	19.37	6.11	11.41	25.34
II) Crystal B 2-AEP (C ₂ H ₈ O ₃ NP)				
	C	H	N	P
Calculated (%)	19.20	6.55	11.20	24.78
Found (%)	19.06	7.09	11.06	24.42

Pが存在していることを明らかにしたが、本項においては、これら両物質の複合脂質中に占める割合を求めることを目的とし、複合脂質中の両物質と全窒素の定量を行った。

前項と同じ方法によりアサリ貝複合脂質 4.39g をメタノール性塩酸で加水分解した後、水溶性物質を更に 6N 塩酸で 24 時間加水分解し、分解生成物を一定量に定容し、分析に供した。

供試液の一部をセミマイクロケルダール法により全窒素を定量し、その結果を Table 2 に示した。又供試液の一部を前述の方法により Amberlite IR-120 (H型, 15×140mm) で処理した後、イオン交換樹脂カラム (Dowex 50, H型, 10×420mm) によりタウリン及び 2-AEP に分画した。次いで各分画液を集め、一定量に定容した後、タウリンについては、フェノール・次亜塩素酸ソーダ法とニンヒドリン法により、又 2-AEP については同じくフェノール・次亜塩素酸ソーダ法と C-P 結合のリンを定量することにより各々 2 つの異なる方法により分析し、それぞれの結果を Table 2 に示した。

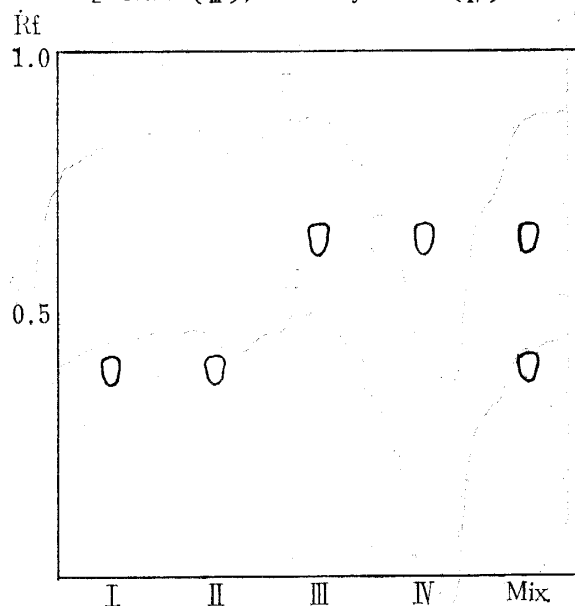
Table 2 に示す如く、複合脂質中に含まれる全窒素量は 2.130 mmole/lg lipids, タウリンは 0.2686 mmole/lg lipids, 又 2-AEP は 0.1516 mmol/lg lipids であった。今仮りに、1 分子の複合脂質中に 1 分子の窒素を、又 1 分子の複合脂質中に 1 分子のタウリンあるいは 2-AEP を含有しているとすれば、Table 2 の結果から全複合脂質中に占めるタウリン含有脂質及び 2-AEP 含有脂質量はそれぞれ 12.6%, 7.1% であると考察出来る。

アサリ貝複合脂質におけるタウリン及び 2-AEP の存在形態について

前項においてアサリ貝複合脂質中にタウリン含有脂質が約 13%, 又 2-AEP 含有脂質が約 7% 程度存在していることを認めた。

タウリンは、かき軟体部の糖脂質組成として存在して

Fig 3 Paper Chromatogram of Authentic Taurine (I), Crystal A (II), Authentic 2-AEP (III), and Crystal B (IV)



Paper : Toyo Roshi No.51
Solvent : Isopropylalcohol : Water : Ammonia : Trichloroacetic acid (75 : 25 : 0.3 : 5 = v/v/v/g)
Detection : Ninhydrin
Assenbing 18hrs.

Table 2 Determination of Nitrogen, Taurine and 2-AEP in Asari Complex Lipids

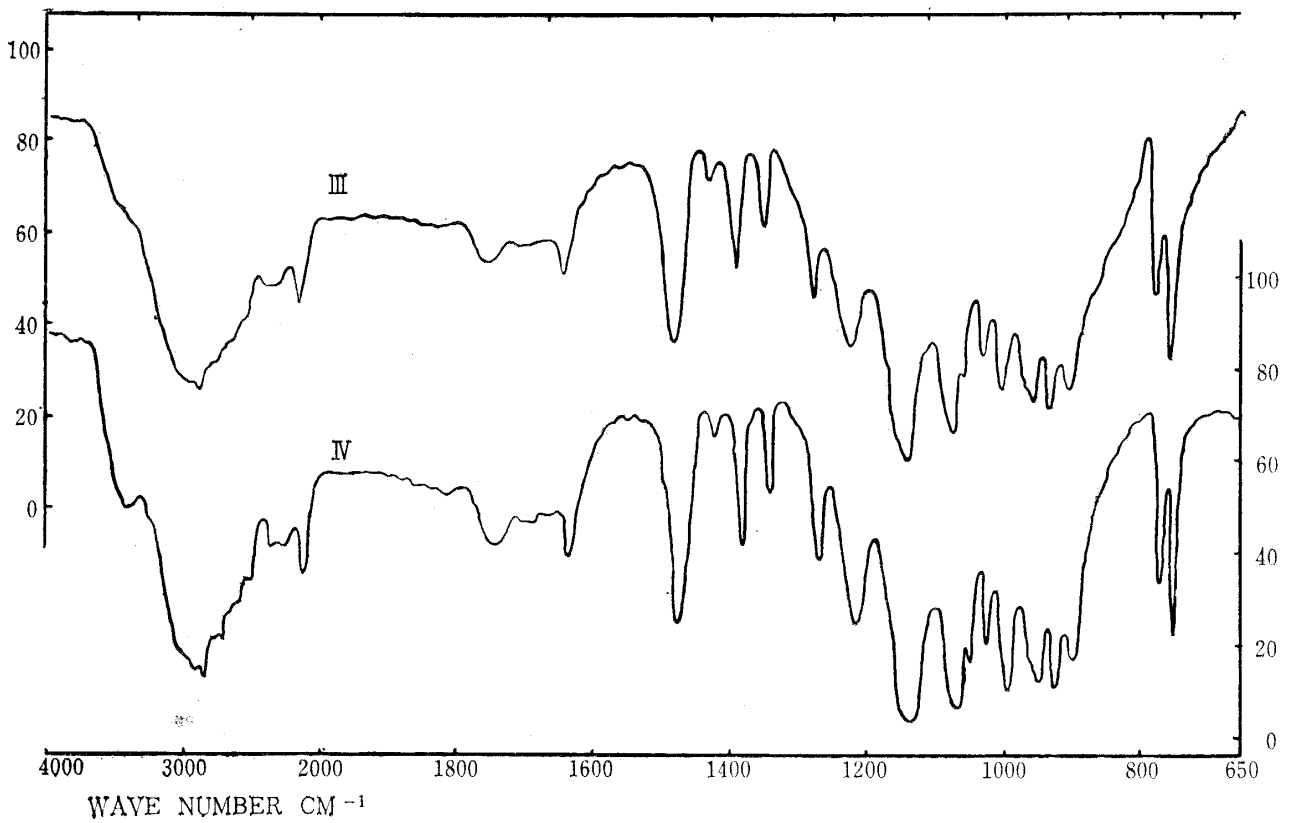
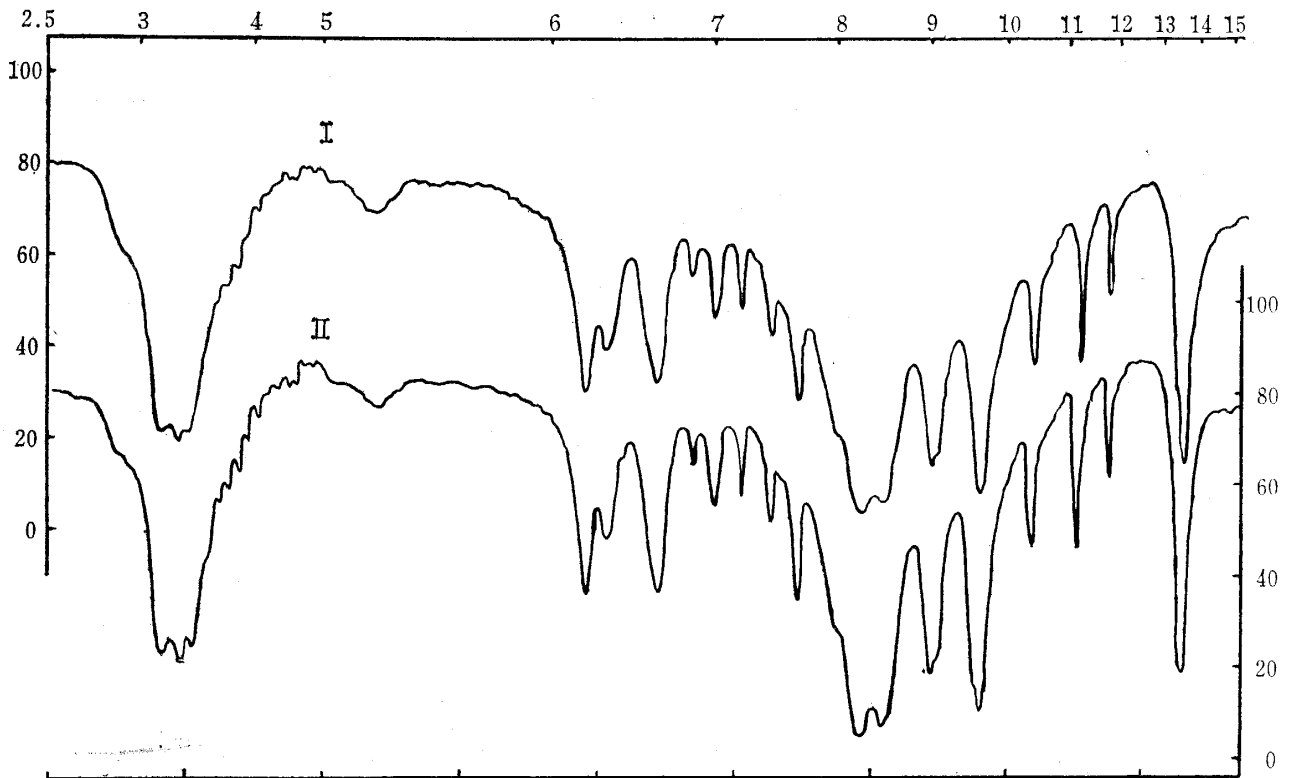
		mmole/lg lipids
Nitrogen		2.130
Taurine	Phenol-hypochlorite Method	0.2661
	Ninhydrin Method	0.2711
2-AEP	Phenol-hypochlorite Method	0.1528
	Phosphorus Method	0.1503

Nitrogen, taurine and 2-AEP in asari complex lipids were determined by the semimicro Kjeldahl, phenol-hypochlorite, ninhydrin and phosphorus method.

いることが、秋谷等により報告されているが、最近になって藤原等により本物質の存在が否定された⁸⁾。現在までのところ、タウリンを組成とする複合脂質に関して上記以外の報告はみられない。

これに対し 2-AEP については 1959 年 神立等により初めて反すう胃せん毛虫から単離されて以来脂質組成として下等動物に広く存在していることが認められている⁹⁾。特にスフィンゴ脂質型の場合は構造も決定され、生物界における分布も明らかにされている。アサリ貝に

Fig.2 Infrared Spectra of Authentic Taurine (I), Crystal A (II), Authentic 2-AEP (III) and Crystal B (IV).



Infrared spectra were recorded in KBr pellet with a spectrometer EPI-S (Hitachi Co).

については赤外吸収と酸加水分解物の同定により N-acyl-sphingosyl-1-(2-aminoethyl) phosphonateであると報告されている¹⁰⁾。一方グリセロ脂質型については、1962年 Kittredge 等により初めてその存在が認められて以来数人の研究者により報告されて来ているが、微量試料に加え、間接的証明のため推察の域を出ていなかった⁶⁾。しかしながらごく最近堀, Hanahan 等¹¹⁾¹²⁾は2-AEPのグリセロ型脂質のカラムクロマトによる単離方法を確立し、赤外吸収、酸加水分解物の同定、ガスクロマトグラフィー等により、テトラヒメナ脂質中に2-AEPの diacylglycerolester が存在していることを証明した。このことから2-AEPのグリセロ脂質型に関する研究が急速に進展するものと期待される。

従ってタウリン及び2-AEPの複合脂質としての存在形態を明らかにすることは脂質研究の上で重要かつ興味ある問題と考え、まず予備実験的にエーテルに対する溶解度の点からアサリ貝複合脂質中でのタウリン及び2-AEPの存在形態の考察を試みた。

アサリ貝複合脂質約700mgをエーテルに溶解し、可溶部のみをあらかじめクロロホルムで調製しておいた silicic acid : hyflosupercell (2 : 1) (20×320mm) のカラムに添加し400mlのクロロホルムで混在する中性脂質を除いた後、クロロホルム：メタノール混液 C-M (12 : 1) 200ml, C-M (9 : 1) 200ml, C-M (4 : 1) 500ml, C-M (3 : 2) 600ml, M 400mlで順次溶出した。溶出液のそれぞれは溶媒を溜去した後、残渣をエーテルに溶解し、可溶部のみを集めて濃縮した。なおC-M (12 : 1), C-M (9 : 1), C-M (4 : 1) に溶出された脂質はエーテルに可溶であったが、C-M (3 : 2) の一部は不溶又メタノール溶出のものはほとんどエーテルに不溶であった。次に濃縮残渣に6N塩酸5mlを加え、封筒中で24時間130°Cに保って加水分解した後、脂溶性物質をエーテルで除き残りの水溶性物質をIR-120で処理し、ペーパークロマトグラフィーによりタウリン及び2-AEPの検出を行なった。

その結果 C-M (12 : 1), C-M (9 : 1), C-M (4 : 1), C-M (3 : 2) のいずれの分画にも両者が認められた。又ペーパークロマト上のスポットの発色の状態からエーテル可溶物の場合は総複合脂質に比べ、やや量的に2-AEPの方がタウリンより多い様に観察された。通常グリセロ脂質型はエーテルに可溶であり、従って本実験においてエーテル可溶の分画に両物質が認められたことは、アサリ貝脂質中にタウリン及び2-AEPを組成とするグリセロ脂質型の複合脂質が存在していることを示すものと考察された。

なお、タウリン及び2-AEPは酸性アミノ酸であるため、複合脂質中の塩基とイオン結合して脂質分画に存在している可能性もあり、このことについては更に詳細な検討を行なう予定である。

要 約

アサリ貝複合脂質に含まれるフェノール・次亜塩素酸ソーダ試薬に陽性を示す物質を、イオン交換クロマトグラフィーにより単離し、元素分析、赤外吸収の測定及びペーパークロマトグラフィーによってタウリン及び2-AEPと同定した。これら両物質の脂質中に存在する量は、前者が0.2686 mmole/ lg lipids, 後者が0.1516 mmole/ lg lipids であった。又タウリン及び2-AEPは複合脂質のエーテル可溶部に存在していることから、両物質はグリセロ脂質の組成であろうと考察される。

終りにC, H, Nの元素分析と赤外吸収の測定は大阪府立大学農学部農芸化学教室で、又Sの元素分析は京都大学薬学部分析センターで行なったものである。実験に際し種々御便宜をいただきました大阪府立大学農学部北岡正三郎教授、京都大学薬学部中垣正幸教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 亀山 春, 北岡 正三郎: 日本農芸化学会誌, 44, N100 (1970).
- 2) 亀山 春, 北岡 正三郎: 生化学, 8, 452 (1970).
- 3) H. Kameyama and S. Kitaoka: Agr. Biol. Chem., 35, 2127 (1971).
- 4) G. M. Kosolapoff: J. Amer. Chem. Soc., 69, 2112 (1947).
E. Baer and N. Z. Stanacev: J. Biol. Chem., 239, 3209 (1964).
- 5) P. S. Chen et al.: Anal. Chem., 28, 1756 (1956).
- 6) 堀 太郎, 板坂 修: 化学, 24, 306 (1969).
堀 太郎: 油化学, 20, 2 (1971).
堀 太郎: 生化学, 43, 1009 (1971).
- 7) K. J. I. Thorne et al.: Nature, 208, 1156 (1956).
H. Igarashi et al.: Nature, 181, 1282 (1958).
M. G. Macfarlane: Nature, 196, 136 (1962).
U. M. T. Houtsmuller and L. L. M. van Deenen: Biochim. Biophys. Acta, 70, 211 (1963).
M. Kates et al.: Can. J. Biochem. Biophys.,

- 42, 461 (1964).
U. M. T. Houtsmuller and L. L. M. van Deenen : *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 438 (1965).
Ibid, 564 (1965)
M. Verbeck and G. V. Marrinetti : *Biochemistry*, **4**, 296 (1965).
- 8) 藤原 八重子, 久保田 尚志 : 脂質生化学研究, 1970, 47.
- 9) M. Horiguchi and M. Kandatsu : *Nature*, **184**, 901 (1959).
- 10) 保田 茂次郎 : 油化学, **18**, 239 (1969).
- 11) M. Sugita and T. Hori : *J. Biochem.*, **69**, 1149 (1971).
- 12) H. Berger and D. J. Hanahan : *Biochim. Biophys. Acta*, **238**, 584 (1971).
- (昭和47年1月17日受理)

Summary

2-Aminoethylsulfonic acid (taurine) and 2-aminoethylphosphonic acid (2-AEP) have been isolated in crystallin form from the hydrolysate of asari (short-neck clam) complex lipids and identified by the elementary analysis, infrared spectrum and paper chromatography. The contents per 1 g of lipids were 0.2686 mmole and 0.1516 mmole respectively. They are found in the ether fraction of the eluate from silicic acid column chromatography, and it seems that they are components of glycerophospholipids.