

# ヒトデ内臓脂質に関する研究 第I報

— ヒトデ内臓各臓器の脂質成分について —

秋野豊明 下条 貞

札幌医科大学生化学第一講座 (主任 大野教授)

佐々木 禎一

札幌医科大学附属病院中央検査部

## Studies on Visceral Lipids of Star Fish

### I. Lipid Components of Various Organs

Toyoaki AKINO and Tadashi SHIMOJO

*Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College  
(Chief: Prof. K. Ohno)*

Teiichi SASAKI

*Central Clinical Laboratory (Biochemical Section),  
Sapporo Medical College Hospital*

Visceral organs of star fish were divided into the following three parts, i. e. pyloric caeca (L), cardial stomach (D) and gonad (E). The lipids of each organ were analyzed by column chromatography, thin-layer chromatography followed by a qualitative test and infrared spectroscopy.

It was found that (L)-lipids consisted mainly of polar lipids (PL). The major component of PL was ceramide monohexoside (CMH). The remainder contained lysolecithin, lecithin, phosphatidylserine and ceramide aminoethylphosphonate (CAPE) as its phospholipid components. But no cephalin, sphingomyelin and cardiolipin were present. Lysolecithin and lecithin seemed to contain a considerable amount of alkenyl and alkyl.

Less polar lipid (LPL) and PL in (E)-lipids were approximately 40 and 60% respectively. LPL consisted of neutral lipid (NL), cholesterol (Chol) and fatty acid (FA). PL contained CMH and phospholipids, such as cephalin, lecithin, lysolecithin, phosphatidylserine and CAEP, but no sphingomyelin and cardiolipin were found.

In (D)-lipids only a trace amount of PL was detected and LPL consisted qualitatively of NL, Chol and FA, among which FA was quantitatively a major component.

Fatty acid components of the total lipids were determined by gas chromatography. There was hardly any qualitative and quantitative difference in the fatty acid composition between each organ. Higher amounts of monounsaturated fatty acids, i. e. 16:1, 18:1, 20:1, and polyunsaturated fatty acids, i. e. 20:4, 20:5, were found in each organ.

## 緒 言

近年日本海沿岸においてヒトデの異常繁殖がみられ、沿岸漁民の脅威となっている。魚貝類保護のために、ヒトデの駆除は重要であるが、単に駆除するに止まらず、食用あるいは薬用への利用も期待されている。しかし、ヒトデ内臓成分に関する生化学的研究は非常に少なく、脂質分析については、プラズマローゲンの構造に関する報告<sup>15)</sup>をみる

に過ぎない。

本報は、ヒトデ内臓脂質に関する研究の第1報として、内臓各臓器脂質成分を総合的に分析することによって、ヒトデ内臓脂質の特徴について検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 実験材料ヒトデの採取と内臓部の分画

ヒトデ (Star Fish, *Asterina pectinifera*) は札幌医科大学

本研究の一部は「北海道科学研究費昭和44年度補助金」(指定課題)により行なわれた。

学附属臨海医学研究所(東利尻町、鴛泊)近辺の海中から、径12~15 cm, 産卵期の成熟ヒトデを採取(1969年, 7月), 直ちに内臓部を幽門盲囊 pyloric caeca, 直腸囊 cardial stomach, 生殖腺 gonad に分けた後 -20°C に冷凍保存した。重量はヒトデ1個当たり(73個の平均), 幽門盲囊 4.6 g, 直腸囊 0.9 g, 生殖腺 4.2 g であった。採取されたヒトデは、産卵期にあったため、生殖腺は卵で満されていた。また幽門盲囊, 直腸囊は、いわゆる肝臓, 消化器に相当する臓器とみなされるので、以下幽門盲囊を(L), 直腸囊を(D), 生殖腺を(E)と略記する。

## 2. 脂質抽出および less polar lipid, polar lipid 画分の分離

各湿重量 50 g のヒトデの(L), (D), (E)の全脂質を chloroform-methanol (2:1) 液約 1 ℓ にて3回抽出後, Folch 法<sup>1)</sup>で分配し, この下層を減圧乾固させ, デシケーター中 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で一晩放置し, これを各臓器の全脂質画分とした。次いでこの全脂質画分を chloroform に溶解させ, 珪酸カラム (3.0×15 cm) に注加, chloroform 500 ml で溶出する画分を less polar lipid 画分, 同量の methanol で溶出する画分を polar lipid 画分とした。

## 3. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

Stahl の方法<sup>2)</sup>で調製した厚さ 0.5 mm の Kiesel Gel G (Merk AG, Darmstadt) 薄層板プレートを 110°C 2時間活性化後使用した。less polar lipid 相互分離のための展開溶媒は, hexane-ether-acetic acid (50:50:1) を用い, trimyristin, 1, 2- および 1, 3- dipalmitin, cholesterol, myristic acid (以上 Sigma Co. 製) の R<sub>f</sub> と比較して spot を同定した。polar lipid の分離には一次元および二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) が併用された。一次元 TLC の場合は, chloroform-methanol-water (14:6:1) または chloroform-methanol-7.5 M ammonia (65:35:5) を使用, 二次元 TLC では Rouser らの方法<sup>3)</sup>, すなわち第一溶媒 chloroform-methanol-conc. ammonia (65:35:5), 第二溶媒 chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (5:2:1:1:0.5) を使用, 当教室で分離された脂質 (cerebroside, sulfatide, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid, cardiolipin) の R<sub>f</sub> と比較して spot が同定された。

薄層クロマトプレート上の spot の定性的検出には次の方法が用いられた。全脂質の検出には 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 37% HCHO (97:3) を spray 後, 140°C, 20分間加熱する方法により, 燐化合物は Dittmer の試薬, アミノ基は 0.2% ninhydrin-acetone 試薬, コリン化合物は Dragendorff

試薬, およびプラズマローゼンは 0.5% DNP-2N HCl 試薬によって検出された。

脂質を回収する目的の実験の場合は, 0.2% fluorescein ethanol 溶液 spray 後, 紫外線下で, spot 部分をかき出して小試験管に移し, chloroform-methanol (4:1) を加えてはげしく mixing 後, 珪酸カラム (1.5×1.2 cm) から同溶媒で溶出し, 4N NH<sub>4</sub>OH, 50% methanol による洗滌にて色素を除去, 下層の chloroform 層から脂質を回収した。

脂肪酸 methylester 同定の目的には硝酸銀薄層クロマトグラフィー (AgNO<sub>3</sub>-TLC) が用いられた。硝酸銀薄層クロマトプレートは 10% AgNO<sub>3</sub>-Kiesel Gel G から調製され, 110°C, 3時間活性化後用いられた。不飽和度の低い脂肪酸 methylester 相互分離の目的には hexane-ether (80:20) が, 高度不飽和脂肪酸 methylester の分離には hexane-ether (60:40) が用いられ, spot の検出は 0.2% fluorescein ethanol 液を spray 後, 紫外線下で行なわれた。

## 4. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

DEAE-セルロース (Serva 製) を Rouser の方法<sup>8)</sup>に従って活性化後, 著者らが既に報告した方法<sup>4,5)</sup>で各脂質画分を分離した。すなわち中性脂肪を chloroform で溶出後, chloroform-methanol (以下 CM と略す) (98:2) で ceramide monohexoside が, CM (9:1) でコリン含有リン脂質が, CM (7:3) でエタノールアミン含有リン脂質が溶出し, 次いで酸性リン脂質は, 酢酸で phosphatidylserine が溶出, phosphatidylinositol と cardiolipin は methanol でカラムを洗滌後 CM (4:1) 1 ℓ を 28% アンモニア 20 ml で飽和, これに 50 mM 酢酸アンモニウムを加えた液で溶出した。

## 5. 脂質のアルカリおよび酸分解

アルカリ分解は Hüschler の変法<sup>6)</sup>が用いられた。脂質約 5 mg を CM (2:1) 5 ml に溶解し, methanol 性 1N NaOH 1 ml を加えて混和後, 室温に 30分間放置し, Folch 法で分配, この chloroform 層を alkaline stable lipid 画分とした。次いでこの画分を減圧乾固後 CM (2:1) 5 ml に再び溶解, methanol 性 2N HCl 5 ml を加えて混和し, 70°C, 1.5時間放置, Folch 法<sup>1)</sup>で分配した下層を alkaline-acid stable lipid 画分とした。

## 6. 赤外線吸収スペクトル測定

脂質を約 20% chloroform 溶液とし, 日立 IR spectrophotometer を用いて測定した。

## 7. ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸成分の分析

脂質 5~10 mg を methanol 性 1N HCl 2 ml に加え封管中, 100°C, 4時間加熱するか, あるいは 14% BF<sub>3</sub> methanol

1 ml に加え沸騰水浴中にて、30 分加熱した。次いで生成した脂肪酸 methylester を hexane 3 ml で 2 回抽出し、これを水洗した後、珪酸カラムで hexane-ether (95:5) 画分に脂肪酸 methylester を回収し、さらにガスクロマトグラフィーにかけた。ガスクロマトグラフは、日立 Model F-6、カラムは長さ 1 m、直径 0.4 mm stainless steel 製を用い、窒素を carrier gas とした。温度は 180°C、chart speed は 0.5 cm/min、充填剤は 15% diethylene glycol succinate polyester を使用した。標準脂肪酸としては myristic acid (14:0), palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2), linolenic acid (18:3), arachidic acid (20:0), arachidonic acid (20:4), lignoceric acid (24:0) の各 methylester (以上 Sigma. Co 製) を使用した。

8. 化学分析

脂質の秤量は、脂質を窒素ガス下に乾固した後、デシケーター中 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で一晩放置し、セミマイクロ天秤を用いて行なわれた。燐は、Bartlett 法<sup>7)</sup> で測定された。

実験結果

1. Less polar, polar lipid の含量比率

ヒトデの (L), (D), および (E) 各 50 g から、それぞれ 1.88 g, 0.99 g, 0.92 g の全脂質を分離、それらの less polar, polar lipid の比率は Table 1 に示される。全脂質の湿重量に対する比率は約 2~4% であったが、各臓器における less polar, polar lipid の比率に著明な差異が認められた。すなわち (L) 脂質の大部分が polar lipid であるのに対し、(D) 脂質ではその大半が less polar lipid であったことは極めて注目せねばならない。

Table 1 Distribution of Total Lipid, Less Polar and Polar Lipids in Various Organs of Star Fish

Organ	Total lipid (g)	% for wet tissue (%)	Percentage of lipid	
			Less polar lipid (%)	Polar lipid (%)
(L)	1.88	3.77	6.7	93.3
(D)	0.99	1.98	98.2	1.8
(E)	0.92	1.84	38.8	61.2

- (L) represents the Pyloric caeca of star fish, which is considered to have liver like function of mammalian.
- (D) represents the cardial stomach of star fish, which seems to be digestive gland.
- (E) represents the Gonad of star fish, which contains large amounts of egg.

2. Less polar lipid 画分の脂質

各臓器の less polar lipid を薄層クロマトグラフィーにて分析した結果は Fig. 1 に示されるとおりである。(D) less polar lipid (D-LPL), (E) less polar lipid (E-LPL) は、哺乳動物の less polar lipid と量的、質的ともにはほぼ同様の脂質構成を示している<sup>9)</sup>。すなわち triglyceride, 1, 2-diglyceride, monoglyceride, cholesterol, 脂肪酸および微量の同定不能の脂質が確認された。(L) less polar lipid (L-LPL) についてはこれらの脂質を含まず、polar lipid が珪酸カラムより溶出時にまぎれ込んだものと思われる原点の spot が認められるにすぎなかった。

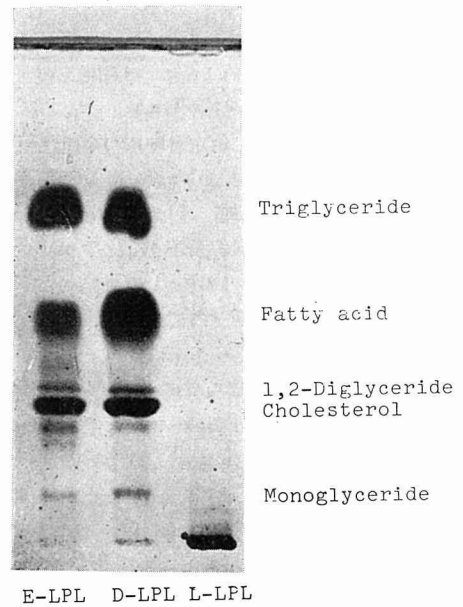


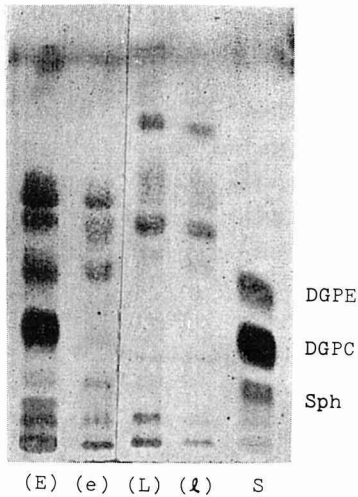
Fig. 1 Thin-layer chromatogram of less polar lipids in various organs of star fish.

Solvent, Hexane-Ether-Acetic acid (50:50:1, v/v/v) Spot detection, Sprayed with a mixture of 3 vol of 37% formaldehyde solution plus 97 vol of 98% sulfuric acid and heated at 140 C for minutes.

- E-LPL: (E) less polar lipid
- D-LPL: (D) Less polar lipid
- L-LPL: (L) less polar lipid

3. Polar lipid 画分の脂質

(E) polar lipid (E-PL) の一次元薄層クロマトグラムは Fig. 2 の (E), および (E) のアルカリ分解安定脂質 (e) に示され、二次元薄層クロマトグラムは Fig. 3 に、そして Table 2 に各 spot の定性的な同定の結果が示されている。E-PL の主たる脂質は ceramide monohexoside (CMH), phosphatidylethanolamine (cephalin), phosphatidylcholine (lecithin) であったが、そのほかに ceramide amino-



**Fig. 2** Thin-layer chromatogram of polar lipids in (E) and (L) of star fish.

Solvent, chloroform-methanol-water (14:6:1, v/v)

Spot detection as for Fig. 1.

Abbreviations:

DGPE: Phosphatidylethanolamine

DGPC: Phosphatidylcholine

Sph: Sphingomyelin

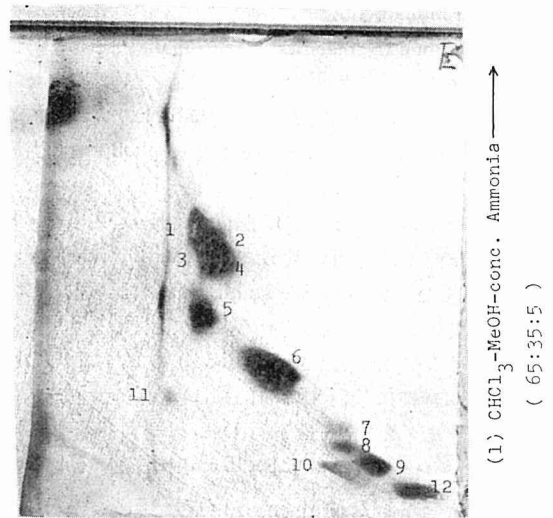
E: (E) polar lipid

(e): lipids obtained after alkaline hydrolysis of (E) polar lipid

L: (L) polar lipid

(l): lipids obtained after alkaline hydrolysis of (L) polar lipid

S: standard phospholipids obtained from rat liver.



← (2)  $\text{CHCl}_3$ -Acetone-MeOH-AcOH- $\text{H}_2\text{O}$   
( 5:2:1:1:0.5 )

**Fig. 3** Thin-layer chromatogram of (E) polar lipid of star fish.

First solvent, chloroform-methanol-conc. ammonia (65:35:5, v/v/v)

Second solvent, chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (5:2:1:1:0.5, v/v/v/v)

Spot detection as for Fig. 1.

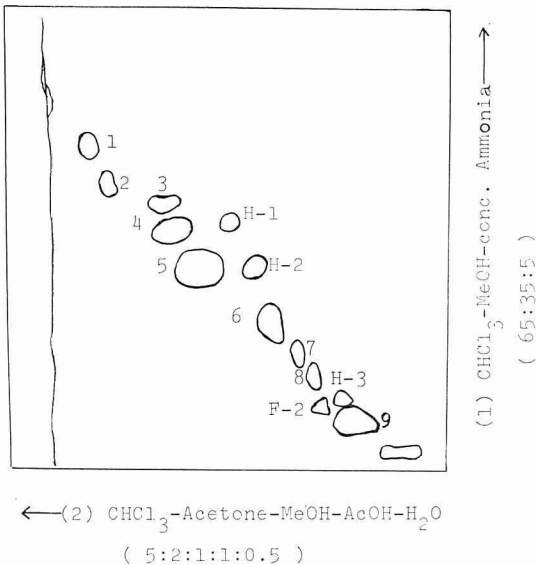
Qualitative identification of each spot is shown in Table 2.

**Table 2** Qualitative Identification of the Spots in Fig. 3

Spot	Dittmer	Anthrone	Ninhydrin	Dragendorff	Designation
1	—	—	—	—	X <sub>E1</sub>
2	—	—	—	—	X <sub>E2</sub>
3	—	+	—	—	Ceramide monohexoside
4	—	+	—	—	Ceramide monohexoside
5	+	—	+	—	Phosphatidylethanolamine
6	+	—	—	+	Phosphatidylcholine
7	+	—	+	—	(Ceramide aminoethylphosphonate)
8	+	—	+	—	(Ceramide aminoethylphosphonate)
9	+	—	—	+	Lysophosphatidylcholine
10	+	—	+	—	Phosphatidylserine
11	—	—	—	—	X <sub>E3</sub>
12	+	—	+	—	X <sub>E4</sub>

ethylphosphonate (CAEP) と推定される脂質, lysophosphatidylcholine (lysolecithin), phosphatidylserine が認められ, また同定不能の脂質 (X<sub>E1</sub>-X<sub>E4</sub>) が認められた. lecithin はアルカリ不安定だが, cephalin はアルカリにかなり安定なので, プラズマローゲン型 cephalin を相当量含むものと推定される.

(L) polar lipid (L-PL) は (L) 脂質の大部分を占める. アルカリ分解前後の脂質の比較では (Fig. 2), ほぼ同様の spot を示したので, alkaline stable lipid 群から主として構成されているものと見なされる. 二次元薄層クロマトグラムで多くの脂質が検出された (Fig. 4) ので, これらの脂質をさらに詳細に検討する目的で DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを施行した. L-PL (690 mg) を DEAE-セルロースカラム (2.8×15 cm) に注加, 分画した結果は Table 3 に示される. また DEAE-セルロースカラムクロマトで得られた A-H 画分の薄層クロマトグラフィーの結果は Fig. 5 および Table 4 にまとめられている. すなわち Fig. 5 にみられるように DEAE-セルロースカラムクロマトでは, B, C, D, E 各画分の中に各脂質間の著明な分離は得られなかったので, 各画分を薄層クロマトグラフィーで各 spot に分離し, 回収した (回収率 69.6%). 回収された各 spot の定量的分布および定性的同定の結果



**Fig. 4** Map of spots obtained by thin-layer chromatography of (L) polar lipids of star fish.

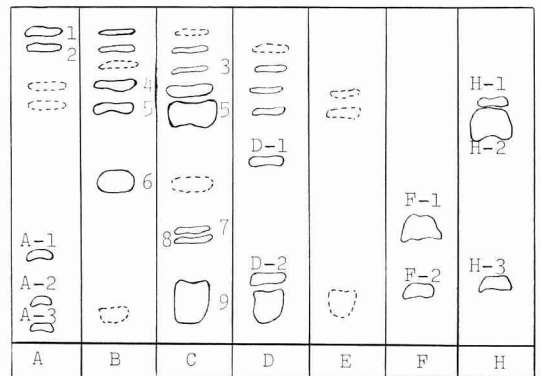
The chromatogram was developed as described in the legend for Fig. 3.

Qualitative identification and quantitative data of each spot is given in Table 4.

は Table 4 に示される. L-PL で最も多い脂質は CMH でその約 40% を占めた. 次に, lysolecithin が約 10% で, これがリン脂質として最も多かった. 次に CAEP と推定される脂質は 5% で, このほかにリン脂質としては, lecithin, phosphatidylserine, phosphatidylinositol の存在が確認された. phosphatidylserine, phosphatidylinositol は共にアルカリ不安定なので, ジアシル型と考えられる. なお, cephalin, sphingomyelin, cardiolipin の存在は認められなかった. spot 6 (lecithin), spot 9 (lysolecithin) の赤外線吸収スペクトルは Fig. 6 に示されるが, 1740 (C=O) のエステル吸収が spot 6 で, 著明であるに対し, spot 9 では 1650~1680 (C=C) の吸収が著明であり, spot 9 の lysolecithin はプラズマローゲン型であることが示唆される. しかしこの両者をアルカリ, 酸分解した結果 (Table 5) では, 両者共に alkaline-acid stable fr. を約 40~50% 含み, むしろエーテル型が多いことを示唆している.

ヒトデの場合のスフィンゴ脂質としては, CMH が主たるものであり, sphingomyelin は存在せず, その代りに CAEP が存在するものと思われる.

同定の出来なかった多くの脂質が認められた (Fig. 5). A-1, A-2, A-3 については同一 R<sub>f</sub> に二つの脂質が重なっている可能性はあるが, 燐および糖を含有する脂質であり, 今後の検討が必要と思われる. spot 1, 2, 3 を, less polar lipid 分離用展開溶媒を用い薄層クロマトグラフィーを施行したが, やはり原点に止まり, 現在なお未同定である.



**Fig. 5** Thin-layer chromatogram of the fractions obtained by DEAE-cellulose column chromatography in Table 3.

Solvent, chloroform-methanol-7.5 M ammonia (65:35:5, v/v/v)

Each spot was sprayed with 0.2% fluorescein in ethanol and detected under U. V light. Qualitative identification and quantitative data is given in Table 4.

**Table 3** *Elution of (L) Polar Lipid of Star Fish from DEAE-Cellulose Column*

Fraction	Tube NO.	Solvent	% for		Lipids detected by TLC.
			Weight (mg)	Lipid recovered (%)	
A	1-5	CHCl <sub>3</sub> 500 ml	70.8	15.2	1, 2, (4), (5), A-1, A-2, A-3
B	6-10	CM (98:2) 500 ml	67.2	14.4	1, 2, (3), 4, 5, 6, (9)
C	11-15	CM (9:1) 500 ml	188.0	40.4	(1), 2, 3, 4, 5, 6, (9)
D	16-20	CM (7:3) 500 ml	50.8	10.9	2, 3, 4, 5, D-1, D-2
E	21-25	MeOH 500 ml	5.3	1.1	4, 5, (9)
F	26-30	AcOH 500 ml	27.7	5.9	F-1, F-2
G	31-32	MeOH 200 ml	1.2	0.3	
H	33-37	CM (4:1)+20 ml/liter conc. ammonia+50 mM NH <sub>4</sub> Ac 500 ml	55.3	11.8	H-1, H-2, H-3

Column volume: 2.8×15 cm

Each tube: 100 ml

Applied lipid: 690 mg

Recovered lipid: 466 mg (67.6%)

Abbreviations: NH<sub>4</sub>Ac=ammonium acetate, C=chloroform, M=methanol, TLC=thin-layer chromatography.**Table 4** *Qualitative Identification and Quantitative Distribution of the Spots Obtained from Thin-layer Chromatography of (L) Polar Lipids fractionated by DEAE-Cellulose Column Chromatography*

Spot	Weight (mg)	% for recovered lipid (%)	Qualitative test					Designation
			Dittmer	Anthrone	Ninhydrin	Dragendorff	DNP-test	
1	30.6	9.4	—	—	—	—	—	X <sub>L1</sub>
2	24.2	7.4	—	—	—	—	—	X <sub>L2</sub>
3	11.0	3.4	—	—	—	—	—	X <sub>L3</sub>
4	28.6	8.8	—	+	—	—	—	Ceramide monohexoside
5	102.8	31.7	—	+	—	—	—	Ceramide monohexoside
6	12.1	3.7	+	—	—	+	+	Phosphatidylcholine
7 (8)	17.8	5.5	+	—	+	—	—	(Ceramide aminoethylphosphonate)
9	32.2	10.0	+	—	—	+	+	Lysophosphatidylcholine
A-1	4.9	1.5	+	+	—	—	—	X <sub>L4</sub>
A-2	7.3	2.2	+	+	—	—	—	X <sub>L5</sub>
A-3	7.4	2.2	+	—	—	—	—	X <sub>L6</sub>
D-1	5.4	1.7	—	—	—	—	—	X <sub>L7</sub>
D-2	4.8	1.4	+	—	—	+	—	X <sub>L8</sub>
F-1	6.9	2.1	—	—	—	—	—	X <sub>L9</sub>
F-2	5.3	1.6	+	—	+	—	—	Phosphatidylserine
H-1	7.6	2.3	—	+	—	—	—	X <sub>L10</sub>
H-2	17.4	8.7	—	—	—	—	—	X <sub>L11</sub>
H-3	5.6	1.6	+	—	—	—	—	Phosphatidylinositol

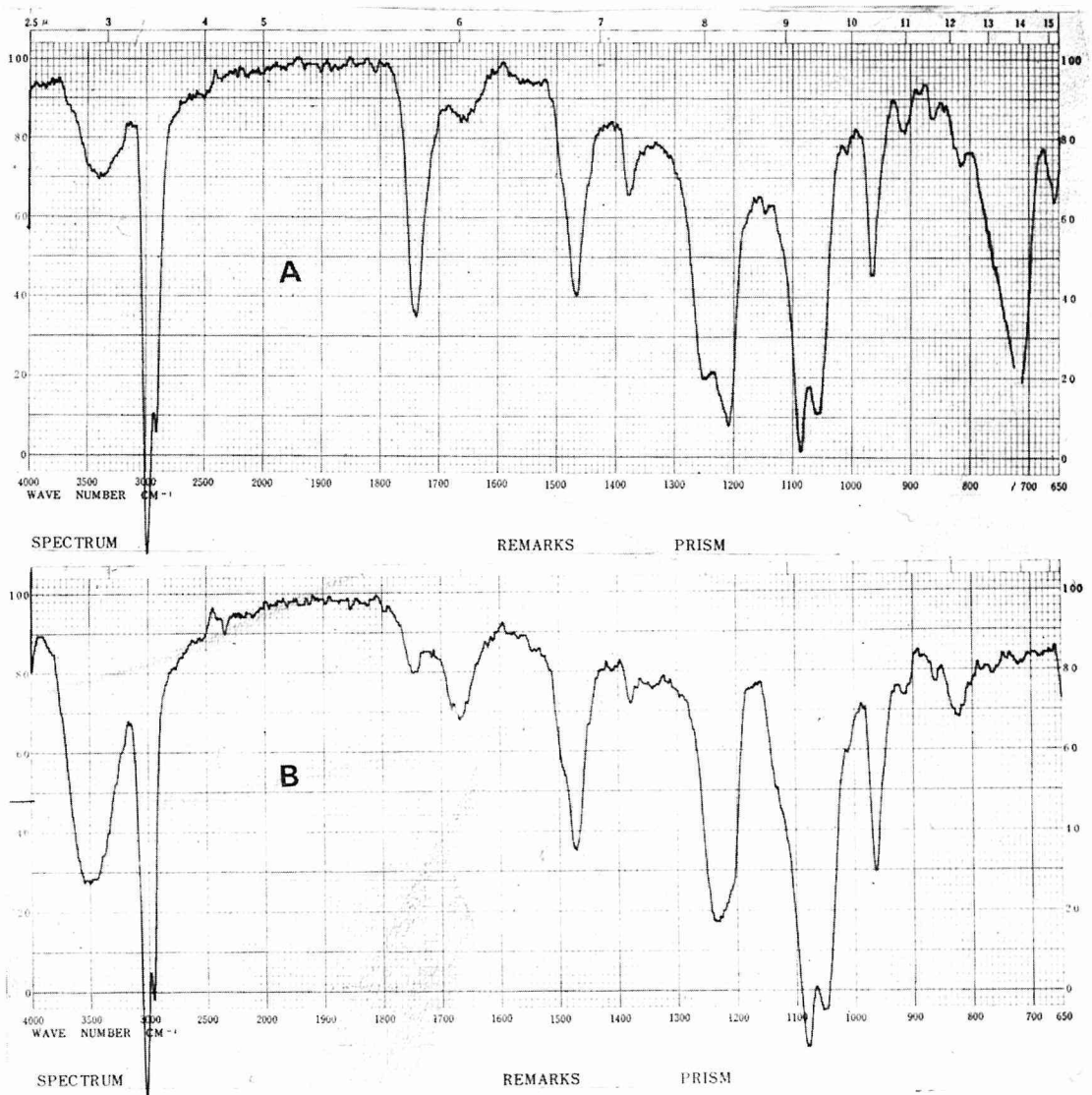


Fig. 6 Infrared spectrum of spot 6 (A, phosphatidylcholine) and spot 9 (B, lysophosphatidylcholine) obtained by thin-layer chromatography of (L) polar lipid of star fish.

Table 5 Distribution of Spot 6 (Phosphatidylcholine) and 9 (Lysophosphatidylcholine) of Star Fish (L) between the Fractions of Alkaline Stable and Alkaline-Acid Stable Lipids

	Spot 6 (phosphatidylcholine) (P $\mu$ g)	Spot 9 (lysophosphatidylcholine) (P $\mu$ g)
Original lipid fr.	40.0 (100)	70.5 (100)
Alkaline stable lipid fr.	30.5 ( 75)	42.5 ( 61)
Alkaline-acid stable lipid fr.	17.5 ( 43)	37.0 ( 53)

Values in parenthesis are given as percentage for the values of original lipid fr.

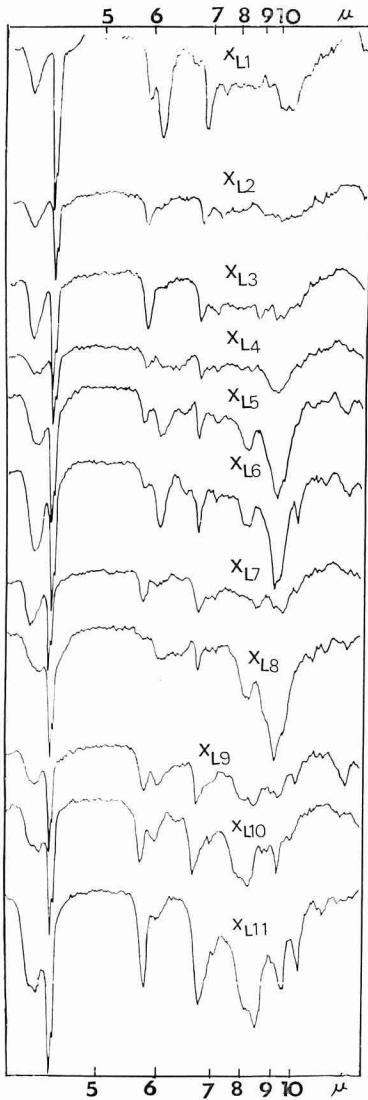


Fig. 7 Infrared spectrum of unidentified lipids (XL1-XL11) of star fish L.

これらの同定不能脂質の赤外線吸収スペクトルを Fig. 7 にまとめて示した。

4. 脂肪酸の分析

各臓器全脂質の脂肪酸 methylester をガスクロマトグラフィーで分析した結果は Fig. 8, Table 6 に示される。各 peak の同定は、標準試料の保持時間と比較する方法および AgNO<sub>3</sub>-TLC によって得られた各不飽和脂肪酸の peak から同定する方法によって行なわれた。脂肪酸 methylester の AgNO<sub>3</sub>-TLC はラット肝 lecithin, cephalin 画分より得られた脂肪酸 methylester を標準試料として用い、これと比較して不飽和度から saturated species,

monoene, diene, triene, tetraene, polyene (pentaene, hexaene) に分画した。その結果は Figs. 9, 10 に示される。

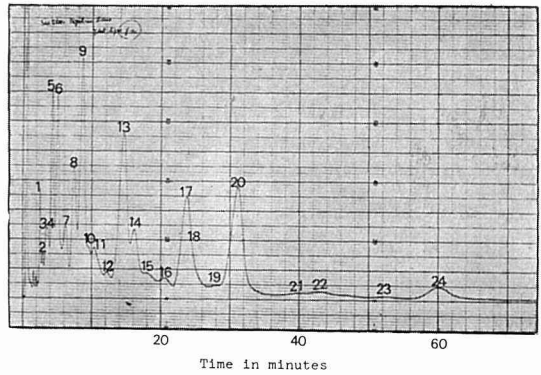


Fig. 8 Gas-chromatogram of fatty acid methyl-esters obtained from total lipid of star fish (D).

Column: 15% diethylene glycol succinate polyester, 100-200 mesh acid washed and silanized chromosorb W. 1 m×0.4 mm stainless steel column.

Carrier gas: N<sub>2</sub>, 0.7 kg/cm<sup>2</sup>.

Chart speed: 0.5 cm/min.

Peak identification is shown in Fig. 10 and Table 6.

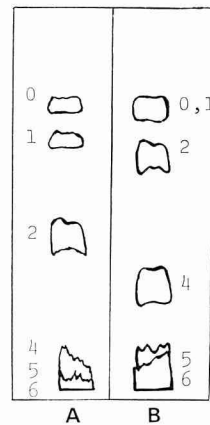


Fig. 9 Separation of fatty acid methyl-esters obtained from (E) total lipid of star fish by degree of unsaturation.

10% AgNO<sub>3</sub>-Silica Gel G thin-layer chromatographic plate was used.

Solvent, A: Hexane-Ether (80:20, v/v)

B: Hexane-Ether (60:40, v/v)

Spot detection, sprayed with 0.2% fluorescein in ethanol and detected under U. V light.

0: saturated species, 1: monoenoic species, 2: dienoic species, 4: tetraenoic species, 5, 6: polyenoic species.



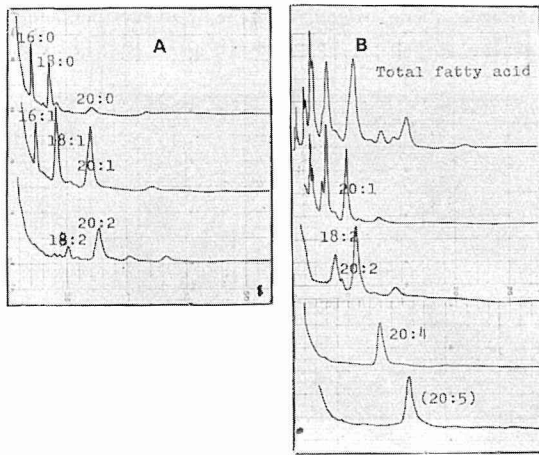


Fig. 10 Gas-chromatograms of each fraction of fatty acid methyl esters obtained by  $\text{AgNO}_3$ -TLC in Fig. 9, A and B.

Chromatographic condition was the same as described in the legend for 8.

すなわち展開溶媒 hexane-ether (80:20) では saturated species, monoene, diene が分離し, これから 16:0, 18:0; 16:1, 18:1, 20:1; 18:2, 20:2 がそれぞれ同定された. 次いで展開溶媒 hexane-ether (60:40) を用いた場合, tetraene は一つの peak のみを示し, ラット肝の phosphatidylinositol より得られた 20:4 と全く同一の保持時間を示すことから, 20:4 と同定された. polyene 画分も単一の peak のみを示すが, これはラット肝 cephalin に含まれる 20:5 の保持時間と全く重なることから 20:5 と推定された. これらの方法によってもなお同定できない peak ( $X_{FA1}$ - $X_{FA11}$ ) が多数存在するが, その含量は各臓器で約 4~7% にすぎない.

Table 6 は各臓器全脂質画分の脂肪酸組成を示したものである. L, D, E の間に脂肪酸組成の著明な差は認められなかった. (L) では (D) および (E) に比して 16:0, 20:1 が多く, 20:4 が若干低い程度であった. 各臓器で飽和脂肪酸は約 13~15% であり, ほかは不飽和脂肪酸が占められていたことは注目せねばならない. そのうち mono 不飽和脂肪酸 (16:1, 18:1, 20:1, 24:1) が 37~40% で最も多く, いわゆる高度不飽和脂肪酸 (tetraene, polyene) は 29~30% でこれに次ぐ. すなわちヒトデ全脂質脂肪酸の大半は mono 不飽和および高度不飽和脂肪酸により占められていた.

#### 考 按

最近脂質生化学領域で水産動物, すなわち貝類, 軟体動物などの脂質分析から興味ある事象が見出されている. 哺

Table 6 Fatty Acid Composition of Total Lipid in Various Organs of Star Fish

Peak NO.	Peak identification	(L) (%)	(D) (%)	(E) (%)
1	14:0	1.8	2.0	1.5
2	14:1	0.5	tr	0.8
3	$X_{FA1}$	tr	tr	tr
4	$X_{FA2}$	tr	tr	0.5
5	16:0	10.1	5.8	6.3
6	16:1	5.3	6.2	4.4
7	$X_{FA3}$	tr	2.1	1.6
8	18:0	4.0	5.2	4.8
9	18:1	15.6	13.1	11.4
10	$X_{FA4}$	tr	tr	tr
11	18:2	1.0	0.9	1.0
12	$X_{FA5}$	ND	tr	0.8
13	20:1	25.9	16.6	18.2
14	20:2	2.1	2.2	7.3
15	$X_{FA6}$	tr	tr	tr
16	$X_{FA7}$	tr	0.8	0.5
17	20:4	8.5	16.8	14.6
18	$X_{FA8}$	2.8	ND	ND
19	$X_{FA9}$	ND	tr	tr
20	(20:5)	19.3	22.6	20.5
21	24:0	tr	tr	tr
22	24:1	2.6	0.8	2.2
23	$X_{FA10}$	tr	tr	tr
24	$X_{FA11}$	1.5	4.4	1.7

Each fatty acid is expressed as percentage of the total fatty acids. Fatty acid present at less than 0.5% are regarded as *tr* and non-detectable acids as *ND*. Each peak number is the same as for Fig. 9.

乳動物の内臓脂質について主たるスフィンゴ脂質は sphingomyelin であるが, 水産動物脂質の著明な特徴として, スフィンゴ脂質の質的な分布の違いがあげられている. Rouser らの報告<sup>10)</sup>によれば, ザリガニでは哺乳動物におけると同じく sphingomyelin が主たるスフィンゴ脂質であるが, 多くの貝類およびイソギンチャクにおいては C-P 結合を有する CAEP を, またウニでは ceramide phosphorylcholine (CPC) を含み, その他のスフィンゴ脂質は含まないという. CAEP, CPC はそれぞれの水産動物においては sphingomyelin に代る脂質成分であり, sphingomyelin の代謝と機能を償う意味において存在しているのだろうと現在考えられている<sup>11,12)</sup>.

また水産動物にはプラズマローゲン型リン脂質が多く含まれ<sup>13,14)</sup>、特に卵に多いこと<sup>15)</sup>、またヒトデ脂質でプラズマローゲン型グリセリドが見出されるなど<sup>16)</sup>、プラズマローゲン型脂質が水産動物脂質の第2の特徴にあげられる。エーテル型リン脂質の存在も軟体動物で報告されている<sup>17)</sup> 脂肪酸としては、古くから高度不飽和脂肪酸含量が多いことが報告されているが<sup>18,19)</sup>、貝類から分離された CAEP, sphingomyelin の脂肪酸は炭素数が短いことが特徴である<sup>20,21)</sup>。

ヒトデ内臓のスフィンゴ脂質としては、CMH と CAEP が見出されたが、sphingomyelin は検出されず、(L) では CMH 含量が高いことが認められた。ヒトデはウニに近い水産動物だが、スフィンゴ脂質の分布はむしろ貝類に近く、またイソギンチャクとは CMH を含む点で異なっている。水産動物糖脂質の構造については、よく知られていないが、二重結合を二個もつ C<sub>18</sub>-スフィンゴシン塩基の存在が報告され<sup>21)</sup>、哺乳動物のそれとは異なった組成をもつことが示されている。

また本研究ではヒトデリン脂質がプラズマローゲンを含むことも示された。すなわち、エタノールアミンおよびコリンプラズマローゲンの存在が、赤外線吸収スペクトル、アルカリ分解法で確認された。しかし、分離された phosphatidylserine, phosphatidylinositol は、アルカリ不安定なので、Rappart が報告<sup>15)</sup> しているような phosphatidylserine のプラズマローゲン型は含まれないものと考えられる。

本研究で得られたヒトデ内臓脂質の特徴は、ほかの水産動物で報告された脂質分析に関する内容と類似する所はあるが、そのリン脂質構成がかなり異なっていることは注目せねばならないだろう。Rouser らが詳細に検討したイソギンチャク脂質の場合<sup>8,10)</sup> にはリン脂質が主たる脂質であって、次いで lecithin, cephalin, CAEP, phosphatidylserine, が多く見出されるが、sphingomyelin は存在しなく、糖脂質も存在しない。杉田ら<sup>12)</sup> は CAEP と sphingomyelin が共存する貝類を見出し、sphingomyelin を単離している。Rouser ら<sup>10)</sup> はまたザリガニ、ホタテガイ、アワビ、ウニが前述せるスフィンゴ脂質の特異な分布を除けば、通常のリン脂質をほぼ同じ割合で含むことを報告している。本研究のヒトデの場合、(E) で認められた cephalin は、(L) では認められず、(L) の主たるリン脂質が lysolecithin であること、(L) の lecithin 含量が低いことなど特異なリン脂質の分布を示している。しかし、これをもってヒトデリン脂質が特異なリン脂質組成をもつとするのは早計のように思われる。Rouser が指摘しているように<sup>10)</sup>、本試料は -20°C に保存されたものではあるが、保存中に

酵素的変化をうけた可能性は否定できない。すなわち死後の酵素的変化によって脂質の分解が進行し、脂質組成が変化したのであるかも知れない。polar lipid がほとんど認められなかった (D) において、脂肪酸が多く認められたことは、(D) における消化酵素 (リン脂質およびスフィンゴ脂質分解酵素を含む) の作用によるとも考えられる。しかし (L) では、lysolecithin が多く認められるにもかかわらず、脂肪酸はほとんど認められず、この考えとは矛盾するよう思われる。ヒトデの蛋白分解酵素は、臓器間で特異な分布を示すことが認められているが<sup>22)</sup>、脂質分解酵素に関する検討はまだ行なわれていない。本研究で得られた脂質構成の特異な分布は、脂質分解酵素に関する今後の検討によりさらに考究されねばならないであろう。

## 結 語

ヒトデ内臓を幽門盲囊 (L)、直腸囊 (D)、生殖腺 (E) に分け、各臓器の脂質の分析を行なって次の結果を得た。

1) (L) 脂質の大部分は polar lipid であり、その約 40% は ceramide monohexoside が占めている。リン脂質としては、lysolecithin, lecithin, phosphatidylserine, phosphatidylinositol および ceramide aminoethylphosphonate と推定される脂質が認められるが、cephalin, sphingomyelin, cardiolipin は認められない。

2) (E) 脂質の 38.8% が less polar lipid であり、中性脂肪、cholesterol、脂肪酸を含んでいる。一方 polar lipid は 61.2% であって cephalin, lecithin, lysolecithin, phosphatidylserine, ceramide aminoethylphosphonate と推定される脂質および ceramide monohexoside を認めるが sphingomyelin は認め得ない。

3) (D) 脂質の 98.2% が less polar lipid であり polar lipid は痕跡程度しか含有しない。脂肪酸含量が多く、次いで中性脂肪、cholesterol が認められる。

4) 全脂質の脂肪酸組成については、各臓器間に著明な差は認めず、ほぼ同様の組成を示す。mono 不飽和脂肪酸および高度不飽和脂肪酸含量が多いことが特徴である。主たる高度不飽和酸は 20:4, 20:5 である。

本研究にご協力いただいた札幌医科大学附属臨海医学研究所高橋正樹助教授に深謝します。(昭和 45.5.30 受付)

## 文 献

- 1) Folch, J., Less, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).

- 2) Stahl, E.: Apparatus and general techniques in TLC. In: Stahl, E.: Thin-layer chromatography, 52-85, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969).
- 3) Rouser, G., Siakotos, A. N. and Fleischer, S.: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* **1**, 85-86 (1966).
- 4) Akino, T.: Sphingosine base and fatty acid compositions of pig brain sphingolipids. *Tohoku J. exp. Med.* **98**, 87-97 (1969).
- 5) Akino, T., Kanoh, H. and Shimojo, T.: On the molecular species of rat liver phosphatidylinositol. *Tohoku J. exp. Med.* **101** (1970).
- 6) Hübscher, G., Hawthorne, J. N. and Kemp, P.: The analysis of tissue phospholipids: hydrolysis procedure and results with pig liver. *J. Lipid Res.* **1**, 433-438 (1960).
- 7) Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1959).
- 8) Rouser, G., Kritchevsky, G., Heller, D. and Lieber, E.: Lipid composition of beef brain, beef liver, and the sea anemone: Two approaches to quantitative fractionation of complex lipid mixtures. *J. Am. Oil Chemists Soc.* **40**, 425-454 (1963).
- 9) Deuel, Jr, H. J.: The lipids, their chemistry and biochemistry. Volume II: the occurrence of lipids in the animal as a whole, 521-707, Interscience Publishers, Inc., New York (1951).
- 10) Simon, G. and Rouser, G.: Species variations in phospholipid class distribution of organs: Heart and skeletal muscle. *Lipids* **4**, 607-614 (1969).
- 11) Simon, G. and Rouser, G.: Phospholipids of the sea anemone: Absence of carbon-phosphorus linkages in glycerol phospholipids; structural elucidation of ceramide aminoethylphosphonate. *Lipids* **2**, 55-59 (1969).
- 12) 杉田陸海, 荒川郁子, 板坂 修, 堀 太郎: 貝類脂質の生化学的研究 (第 XI 報): Sphingomyelin の単離と脂肪酸成分について, *生化学* **40**, 254-256 (1968).
- 13) Rapport, M. M. and Norton, W. T.: Plasmalogens chemistry of the lipids. In: *Ann. Rev. Biochem.* **31**, 112-112 (1962).
- 14) Rapport, M. M.: The  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ether (plasmalogen) content of the tissues of several mollusks. *Biol. Bull.* **121**, 376-377 (1961).
- 15) Rapport, M. M. and Alonzo, N. F.: The structure of plasmalogens. V. lipids of marine invertebrates. *J. Biol. Chem.* **235**, 1953-1956 (1960).
- 16) Eichberg, J., Gilbertson, J. R. and Karnovsky, M. L.: Neutral plasmalogens analogous to the neutral triglycerides. *J. Biol. Chem.* **236**, 15-16 (1961).
- 17) Thompson, G. A. and Lee, P.: Studies on the glyceryl ether lipids occurring in molluscan tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 151-159 (1965).
- 18) Deuel, Jr. H. J.: The lipids, their chemistry and biochemistry. Volume I: Chemistry, 17-26, Interscience Publishers, Inc., New York (1951).
- 19) Renknonen, O.: Individual molecular species of phospholipids. VII. Analysis of lecithins containing ten to twelve double bonds. *Lipids* **3**, 191-192 (1968).
- 20) 杉田陸海, 荒川郁子, 堀 太郎, 沢田保夫: 貝類脂質の生化学的研究 (第 X 報): Ceramide 2-aminoethylphosphonate の脂肪酸組成について. *生化学* **40**, 158-162 (1968).
- 21) Hayashi, A. and Matsubara, T.: On the occurrence of sphinga-4, 8-dienine in oyster glycolipid. *Biochim. Biophys. Acta.* **202**, 228-230 (1970).
- 22) 佐々木禎一: ヒトデ内臓の蛋白分解酵素について. 未発表.