

## マミズイトミミズの磷脂質区分に おける磷代謝について (Ⅱ)

### 磷脂質の分画および同定

Phosphorus Metabolism in Phospholipid Fraction  
of *Rhizodrilus limasus* (Ⅱ)  
Fractionation and Identification of Phospholipids

大 山 重 信

Shigenobu OOHAMA

(原稿受理 昭和47年8月1日)

Extraction and purification of the phospholipid fraction obtained from *Rhizodrilus limasus* were reported in the previous paper<sup>1)</sup>. This paper is concerned with the fractionation and identification of the phospholipids, prepared according to the previous paper<sup>1)</sup>, by silicic acid column chromatography and silicate (radio) paper chromatography.

Obtained results show the  $^{32}\text{P}$  absorbed by *Rhizodrilus limasus*, incubated for 24 hours in  $^{32}\text{P}$  ( $\text{H}_3\text{ }^{32}\text{PO}_4$ ) containing water, incorporated into phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl choline.

#### I 緒 言

前報<sup>1)</sup>において筆者はマミズイトミミズからの磷脂質区分の抽出法とそのセルロースカラムクロマトグラフィによる精製とについて報告したが、引き続いて今回は磷脂質の珪酸カラムクロマトグラフィおよび珪酸(ラジオ)ペーパークロマトグラフィによる分画と同定とについて報告する。なお、ラジオペーパークロマトグラフィに関してはラジオペーパークロマトグラフの便が得られなかったので、鉛板を用い原理的にクロマトグラフと同様になるように工夫して放射能を測定しクロマトグラムを作製した。

#### II 実 験 方 法

##### 1 試 料

前報<sup>1)</sup>と同様にしてマミズイトミミズを用いた。

##### 2 溶媒の精製, 磷脂質区分の抽出およびセルロースカラムクロマトグラフィによる精製.

前報<sup>1)</sup>と同様に行なった。

### 3 Lipid esterの定量

Snyderらの方法<sup>2)</sup>に従って行なった。標品としてレシチンを用いた場合の標準曲線は前報<sup>1)</sup>に示した通りである。

### 4 全燐の定量

Fiske-Subbarowの方法<sup>3)</sup>を改変した Bartlett の方法<sup>4)</sup>に従い、硫酸と過酸化水素で湿式灰化した後発色させ 820 m $\mu$  で比色定量した。

### 5 無機燐真値の定量

燐モリブデン酸をイソブタノールで抽出し、アスコルビン酸で還元して比色する高橋法<sup>5)</sup>により測定した。

### 6 珪酸カラムクロマトグラフィ

珪酸の活性化は安田ら<sup>6,7)</sup>に従って行なった。すなわち、Mallinckrodt 製クロマト用珪酸, 100 mesh, を予めメタノールで上澄液が透明となるまで反覆洗浄し, 風乾後110~120°Cで4時間乾燥しデシケーター中に保存した。

この珪酸をメタノールに懸濁しカラムに充填(カラム直径1.4cm, 高さ 22cm)後珪酸カラム層の上端までメタノールを排出し, 珪酸の3倍量のクロロホルムを流した後使用した。

試料はセルロースカラムを通して精製した燐脂質区分を窒素ガス気流下に減圧濃縮した後, クロロホルム 5 mlに溶解して珪酸カラムに吸着させ, その後メタノールとクロロホルムとの混合比を変えた8種の溶媒を用いて1.2ml/minの流速で溶出し, 溶出液を6 mlずつ分取した。なお, 溶出中も燐脂質と空気との接触を遮断するため, 溶出溶媒は分液漏斗にいてカラムと接続し, 分液漏斗中には窒素ガスが流入するようにした。

### 7 珪酸ペーパークロマトグラフィ

安田らの方法<sup>6,7)</sup>に従って珪酸ペーパーを調製した。すなわち, 東洋濾紙 Na 51 A (40×2.5 cm) を水ガラス:水 (1:1) 溶液中に浸した後5分間空中につるして過剰な液を除き, 次に希塩酸〔濃塩酸:水 (1:5)〕中に30分間浸した後水中に5分間浸し酸を除く。この水中浸漬を水道水で5回, 蒸留水で1回反覆した後空中に一夜放置し, 110°Cで1時間乾燥させて珪酸ペーパーを調製した。

展開剤としてはジイソブチルケトン:酢酸:水 (40:25:5)<sup>6,7)</sup>を用い, 上昇法により展開した。

発色剤として用いた試薬名, 調製法および使用法は次のようである。

(1) ローダミン 6 G 試薬<sup>8,9)</sup> 240 mgのローダミン 6 Gを蒸留水 1 lに溶解し, 一夜放置後その 50 mlをとって水で 1 lに希釈した液に風乾したクロマトグラムを1~3分間浸した後, 過剰の色素を蒸留水でゆすいで洗い, 濡れているうちに紫外光をあてて検出する。レシ

## 大山: マミズイトミミズの磷脂質区分における磷代謝について (I)

チン, スフィンゴミエリンおよびホスファチジルエタノールアミンは黄色, ホスファチジルセリンは青色のスポットが得られる。

(2) ニンヒドリン試薬<sup>6)</sup> 0.2%ニンヒドリン水飽和ブタノール液を風乾したクロマトグラムに散布し10分間80~100°Cで加熱する。ホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルセリンは紫色に呈色する。

(3) 磷酸試薬<sup>6,10)</sup> 60%過塩素酸 5 ml, 1 N塩酸 10 ml, 4%モリブデン酸アンモニウム 25 mlを混合し水を加えて 100 mlとする。ペーパーに噴霧したのち紫外線照射すると青色に呈色する。

(4) コリン脂質試薬<sup>9,11)</sup> 風乾したペーパーを2%モリブデン酸水溶液に2分間浸した後20分間流水で洗い、次に1%塩化第一錫3N塩酸溶液に浸すとコリンを含む脂質のスポットは青色となる。

### 8 放射能の測定

スケラーは東芝製 EAG 31103型 Radiation Counterのものをを用いた。そして溶液の放射能測定の際には、スケラーに日本無線製液浸用 GM 管1206を接続して測定し、ラジオペーパークロマトグラムの作製の際には端窓型 GM 管を接続して測定した。

### 9 ラジオペーパークロマトグラムの作製

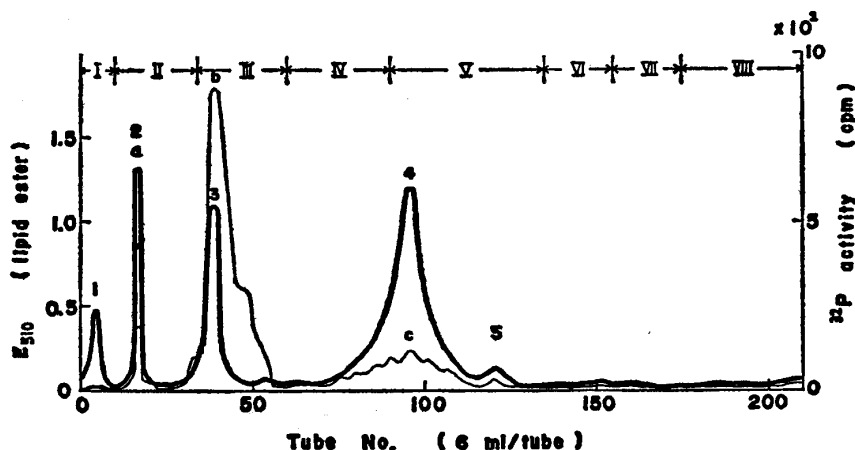
鉛板 (17×8×0.2cm) に 1.0×2.5cmの長方形の穴をくり抜き、これを発色後風乾させた珪酸ペーパーの上におき、測定すべきペーパーの部分と穴の部分とを一致させ、その上から端窓型 GM 管をあて、ペーパーの長さ 1 cm毎に放射能を測定してラジオクロマトグラムを作製した。

## III 実験結果

### 1 珪酸カラムクロマトグラフィ

<sup>32</sup>P水中に24時間飼育して <sup>32</sup>Pを吸収させたイトミミズから前報<sup>1)</sup>の Table 1に従って磷脂質区分を得、この区分をさらにセルロースカラムクロマトにより処理して得られた溶出液を窒素ガス気流下に減圧濃縮し、ついでこれをクロロホルム 5 mlに溶解して、イトミミズ生鮮16.5 g相当量を珪酸カラム (直径1.4cm, 高さ22cm) に吸着させた後、クロロホルムとメタノールとの混合比を変えた8種の溶媒で溶出した。溶出液を 6 mlずつ分取し 各溶出液についてlipid esterの定量操作に従い E<sub>510</sub>値を測定するとともに <sup>32</sup>P放射能を測定した結果は、Fig. 1に示すようになった。図にみられるように、E<sub>510</sub>値から5個のピーク1, 2, …… , 5が得られ <sup>32</sup>P放射能からは3個のピークa, b, cが得られた。これらのうち、ピーク1はほとんど放射能を示さなかったが、2とaとはその溶出位置がまったく一致した。3は単一のピークのようにみえる。一方、放射能の大部分が集中的に存在することが認められたbは、その形からみて幾つかの放射能のピークが重なり合っているように思われる。ピーク4とcとは位置が一致しているが、4の大きさに比べ放射能のピークはあまり大きくなかった。ピーク5は4の裾にあり、小さなものであった。

Fig. 1. Silicic acid column chromatogram for the phospholipids obtained from  $^{32}\text{P}$ -labeled *Rhizodrilus limasus*.



Bold line shows optical density at 510 mμ (lipid ester) and fine line indicates  $^{32}\text{P}$  radioactivity.

*Rhizodrilus limasus* was cultured in  $^{32}\text{P}$  containing water for 24 hours under constant aeration. Temperature of water : 19~20°C. Volume of water : 1.5 l.  $^{32}\text{P}$  activity in water : 286,000 cpm. Contents of phosphorus in water : 1,000 μg/l.

Phospholipid fraction of  $^{32}\text{P}$ -labeled *R. limasus* was extracted with  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1) solvent and purified with cellulose column chromatography according to the previous paper<sup>1)</sup>. Purified phospholipid fraction, equivalent to 16.5 g of fresh  $^{32}\text{P}$ -labeled *R. limasus*, was concentrated under reduced pressure in  $\text{N}_2$  gas, resolved in 5 ml of  $\text{CHCl}_3$  and then subjected to silicic acid column chromatography.

Silicic acid column size: dia. 1.4 cm, height 22 cm. Eluting agent: I,  $\text{CHCl}_3$  (100). II,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (95:5). III,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (90:10). IV,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (80:20). V,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (70:30). VI,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (60:40). VII,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (50:50). VIII,  $\text{CHCl}_3$  (100). Flow rate : 1.2 ml/min.

標品としてDL-α-ホスファチジルエタノールアミン (Synthetic), ホスファチジルコリン (Nutritional Biochemicals Corp.製, 動物性, 純度90%) およびスフィンゴミエリン (KCK Lab. Inc.製, crude) をそれぞれ7 mg用い, Fig. 1の珪酸カラムクロマトと同じ条件でクロマトを行ない, 溶出液についてlipid esterを発色させて $E_{510}$ 値を測定し, それぞれの溶出位置を求めてみたところ, ホスファチジルエタノールアミンはクロロホルム:メタノール (90:10)の部分に, ホスファチジルコリンは (70:30)の部分に溶出されたので, 溶出位置からみてピーク3はホスファチジルエタノールアミン, ピーク4はホスファチジルコリンに相当した。スフィンゴミエリンはどの溶出部分にもlipid esterの発色がみられず溶出位置の確認はできなかったが, これはスフィンゴミエリンの吸着量が少なかったためか若しくはスフィンゴミエリンの

## 大山: マミズイトミミズの磷脂質区分における磷代謝について (I)

溶出位置が珪酸カラムクロマトにおいてはほとんど最後に近い部分にある<sup>7)</sup>のでメタノールによる溶出が不十分であったためかもしれない。

Fig. 2はFig. 1の場合と同様に、<sup>32</sup>Pを吸収させたイトミミズ生鮮19.75g相当量から得られた磷脂質区分をセルロースカラムクロマトにより精製後、珪酸カラムクロマトを行ない溶出液を6mlずつ分取し、各溶出液についてlipid ester (E<sub>510</sub>)、<sup>32</sup>P放射能、および全磷量 (E<sub>820</sub>)を測定した結果を示す。Fig. 1の場合よりも各ピークはよく分離され、lipid esterの測定値 (E<sub>510</sub>)から1', 2', ……7', 8'の8個、<sup>32</sup>P放射能からa', b', c' (Tube No.43~63の部分を一括した), d', e'の5個、全磷量の測定値 (E<sub>820</sub>)からA, B, ……F, Gの7個のピークが認められた。これらのピークの中(2', a', A), (3', b', B), (4', d', C), (8', e', G)はそれぞれ E<sub>510</sub>, <sup>32</sup>P放射能および E<sub>820</sub>の3種のピークの溶出位置が一致していた。

### 2 珪酸ペーパークロマトグラフィ

ピーク2, 3, 4については、この部分の溶出液を集めて窒素ガス気流下に濃縮し、珪酸ペーパークロマトを行なった。ピーク2を展開させたペーパーには、前記ペーパークロマト用発色試薬を全て使用して検出を試みたが、まったく呈色はみられなかった。これは試料濃度が低いためと思われる。ピーク3はニンヒドリン試薬により発色を認め、その R<sub>f</sub> はホスファチジルエタノールアミン標品とまったく一致した。ピーク4はコリン脂質試薬により発色させたところ、青色のスポットが1個得られた。一方、ホスファチジルコリン標品からは、極めて接近して3個あるのではないかとみられるようなスポットが得られ、そのうち呈色面積が最も広く R<sub>f</sub> も最も大きい部分の R<sub>f</sub> と、ピーク4についてのスポットの R<sub>f</sub> とが一致した。

### 3 ラジオペーパークロマトグラフィ

スポットの R<sub>f</sub> を測定した後ペーパーのラジオクロマトグラムを作製した。すなわち、端窓型GM管によりペーパーの長さ1cm毎に放射能を測定した結果はFig. 3および4に示すようになった。イトミミズに<sup>32</sup>Pを吸収させて実験開始後日数をかなり経過していたため放射能が弱くピーク2についてのラジオクロマトグラムは得られなかった。ピーク3については、放射能を検出した部分と発色させたスポットの部分とがまったく一致し、ホスファチジルエタノールアミンに<sup>32</sup>Pがとり込まれていることを示していた。また、ピーク4についても放射能は弱かったが、放射能のピークと発色させたスポットの部分とが一致し、ホスファチジルコリンに<sup>32</sup>Pがとり込まれていることを示していた。

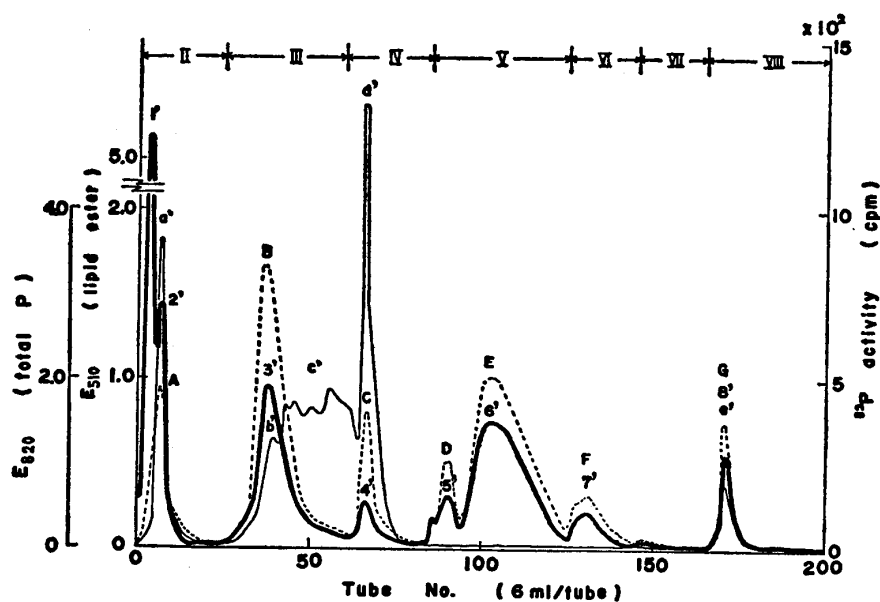
なお、Fig. 1にみられる放射能を測定した後、ペーパーの放射能を測定するまでにかなりの日数を経過していたが、Fig. 3および4に示したラジオクロマトグラムの放射能には decayによる補正を施していない。従って、Fig. 1にみられる放射能との関係の調整はなされていない。

#### IV 考 察

前報<sup>1)</sup>の Table 1 に従って得た磷脂質区分をセルロースカラム処理したものについて無機磷真値の定量を行なってみたが、ほとんど発色はみられず、セルロースカラム処理までしたものに遊離の無機磷は存在しないとして差し支えない。一方、珪酸カラムクロマトにより分画したものについての無機磷真値は測定していないけれども、lipid ester (E<sub>510</sub>) のピークと全磷量 (E<sub>820</sub>) のピークとが一致しているものはすべて磷脂質としてよいであろう。

Fig. 1 と Fig. 2 は略同様な条件で実験したにも拘わらず同一模様を示さず、Fig. 2 の場合の方が各ピークはよく分離された。この原因はよく分らないけれども、珪酸の活性度の相違あるいはイトミミズの棲息採集場所の相違による体成分組成や体成分の活性度の季節的変動等の原因が考えられる。

Fig. 2. Silicic acid column chromatogram for the phospholipids obtained from <sup>32</sup>P-labeled *Rhizodrilus limasus*.



Bold line shows optical density at 510 mμ (lipid ester) and fine line indicates <sup>32</sup>P radioactivity and dotted line shows optical density at 820 mμ (total P).

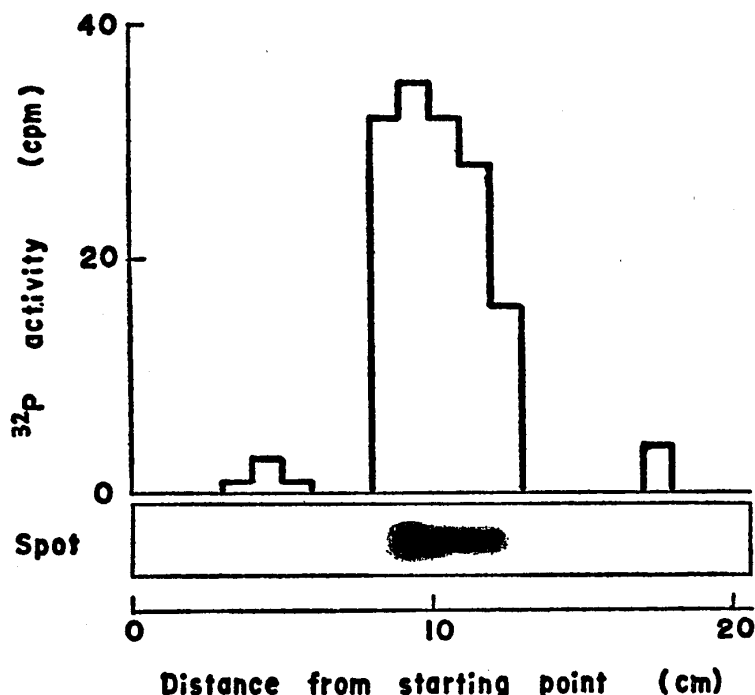
*Rhizodrilus limasus* was cultured in <sup>32</sup>P containing water for 24 hrs. under constant aeration.

Temperature of water : 17.5~19.0°C. Volume of water : 1.0 l. <sup>32</sup>P activity in water : 200,000 cpm.

Phospholipids subjected to silicic acid column chromatography was equivalent to 19.75 g of fresh <sup>32</sup>P-labeled *R. limasus*.

Methods of extraction and purification of phospholipid fraction, silicic acid column size, eluting agent, flow rate : refer to the footnote of Fig. 1.

Fig. 3. Silicate (radio) paper chromatogram for peak 3.



Peak 3 was identified as phosphatidyl ethanolamine.

Silicate paper was prepared according to the Yasuda et al's method<sup>6,7)</sup>.

Filter paper : "Toyo" No. 51A. Ascending method.

Solvent system : diisobutylketone:acetic acid:water (40:25:5) .

Colour reagent : 0.2% ninhydrine water sat. butanol spray reagent<sup>6)</sup>.

A lead plate (17×8×0.2cm), in which a hole (1.0×2.5cm) was bored, was placed on the paper and then radioactivity passed through the hole in every 1 cm of the paper was measured with window type GM tube.

Estimated <sup>32</sup>P activity of the paper is not compensated for decay, therefore, the correlation of <sup>32</sup>P activity between Fig. 1 and Fig. 3 is not adjusted.

Fig. 2にみられる各ピークの同定はしていないけれども, Fig. 1と対照するならば, Fig. 2の1'は, Fig. 1のピーク1に相当するものであろう。(2', a')は溶出位置が同じであることから(2, a)に相当すると考えられる。3'は3に相当するピークと考えられ, 6'はピークの大きさからみて4に相当している。ピーク3および4は, 珪酸カラムクロマトにおける溶出位置および珪酸(ラジオ)ペーパークロマトの結果から, 3はホスファチジルエタノールアミン, 4はホスファチジルコリンであるので, 3'はホスファチジルエタノールアミン, 6'はホスファチジルコリンに相当する。

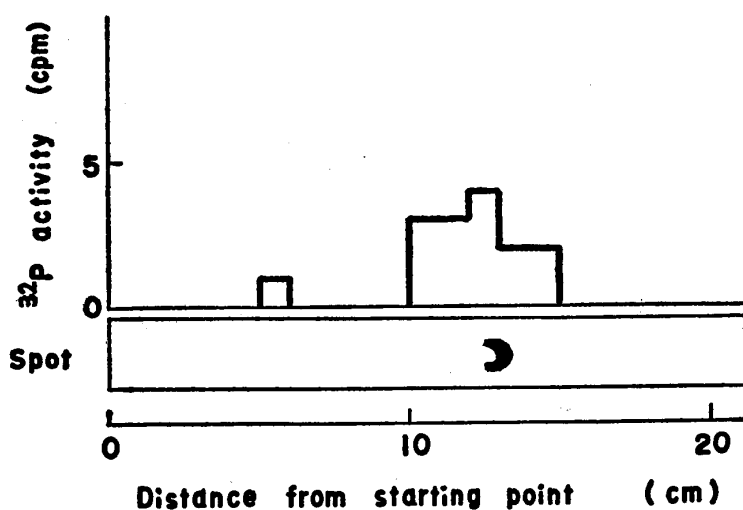
珪酸カラムクロマトにおいて, まず最初に溶出されるのはグリセリド, コレステロール, 脂肪酸等の非極性脂質<sup>7)</sup>であるが, ピーク1は放射能を示さず, また1'も放射能および全磷量

のピークをもたないので、ピーク 1, 1'はおそらくそのようなものである<sup>7)</sup>。前報<sup>1)</sup>の Table 1 に示した分画法は、脂質の溶媒に対する溶解度に基づいて考案したものであるため、磷脂質以外のものが磷脂質区分にまだ混入していたのであろう。

ピーク (2, a), (2', a', A) は lipid ester,  $^{32}\text{P}$  放射能, 全磷量のピークが一致しており, 文献<sup>7,12)</sup>にある溶出位置からみてホスファチジン酸, カルジオリピンのようなものではないかと思われる。ペーパークロマト用発色剤である磷酸試薬により検出できなかったのは濃度が低かったためであらう。

放射能のピーク b はその形から単一のピークとみることはできず, 2 個以上のピークが重なっているようである。このことは Fig. 2 から明らかなであって, b は Fig. 2 中の b', c' および d' に相当するものと考えられる。c' もその形から単一のピークではなくて数個のピークより構成されている疑いがある。c' および d' は lipid ester 量および全磷量に比べ, 放射能の高いことがその特徴であった。マウスを用いた実験<sup>13)</sup>によれば,  $^{32}\text{P}$  ラベル磷脂質を静脈注入投与から 30 分乃至 12 時間後には, 磷脂質中で  $^{32}\text{P}$  は主としてホスホイノシチドとして存在し, またマグロ筋肉の磷脂質の珪酸カラムクロマト<sup>14)</sup>においては, クロロホルム:メタノール (82:18) でホスホイノシチドを含む少量の磷脂質が溶出される。また, 溶出位置<sup>7,12)</sup>からみてモノホスホイノシチド, ホスファチジルイノシトールは ホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルコリンとの中間に溶出されるので, ピーク b の右より部分および c', d' の部分にはイノシトールホスホリピドの存在が考えられる。

Fig. 4. Silicate (radio) paper chromatogram for peak 4.



Peak 4 was identified as phosphatidyl choline.  
 Colour reagent : choline-lipid reagent<sup>9,11)</sup>.  
 Refer to the footnote of Fig. 3 except colour reagent.



Fig. 2においてピーク3' (ホスファチジルエタノールアミン) は放射能を示したが、ピーク6' (ホスファチジルコリン) はほとんど放射能を示さなかった。下条<sup>13)</sup>がマウスの実験によって磷脂質はホスホイノシチド→エタノールアミン型→コリン型と代謝されたと推測していることから類推するならば、Fig. 2においてはレシチン区分に  $^{32}\text{P}$  がとり込まれる以前の状態にあるものとも考えることもできよう。

ペーパークロマトによるRfの比較およびラジオクロマトグラムを作製した結果は、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンに  $^{32}\text{P}$  がとり込まれていることを示しており、イトミミズに吸収された  $^{32}\text{P}$  が磷脂質区分においてはホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンの形で存在することを示していた。ペーパークロマトにおいて、ホスファチジルコリン標品のスポットとピーク4のスポットとがやや異なる模様を示したのはピーク4の試料量が少なかったためと思われる。

## V 要 約

マミズイトミミズの磷脂質区分における磷代謝の模様を調べるため、磷脂質区分の抽出法およびセルロースカラムクロマトによる精製を検討した前報<sup>1)</sup>に引き続いて、珪酸カラムクロマトおよび珪酸ペーパークロマト (ラジオペーパークロマト) による磷脂質の分画および同定を試みた。その結果  $^{32}\text{P}$  ( $\text{H}_3\text{ }^{32}\text{PO}_4$ ) 水中に24時間飼育したイトミミズによって水中から吸収された  $^{32}\text{P}$  がホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンにとり込まれていることを明らかにした。

## 文 献

- 1) 大山重信：鹿児島県立短大紀要., **22**, 1 (1971)
- 2) F. Snyder, and N. Stephens: *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 244 (1959)
- 3) C.H. Fiske, and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)
- 4) G.R. Bartlett: *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959)
- 5) 高橋泰常：生化学, **26**, 690 (1955)
- 6) 安田守雄, 大野公吉：蛋・核・酵., **7**, 106 (1962)
- 7) 安田守雄, 大野公吉：脂質実験法, 共立出版, p.84 (1967)
- 8) G.V. Marinetti: *J. Lipid Res.*, **3**, 1 (1962)
- 9) 野田万次郎：脂質実験法, 共立出版, p.3 (1967)
- 10) C.H. Hanes, and F.A. Isherwood: *Nature*, **164**, 1107 (1949)
- 11) L.W. Wheeldon, and F.D. Collins: *Biochem. J.*, **70**, 43 (1958)
- 12) D.N. Rhodes, and R.M.C. Dawson: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques* (ed. J. Smith), Interscience Publishers Inc., N.Y., **1**, p.363 (1960)
- 13) 下条貞：札幌医誌., **20**, 185 (1961)
- 14) C.Y. Shuster, J.R. Froines, and H.S. Olcott: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **41**, 36 (1964)