

ニジマス卵発生中におけるコレステロールの消長

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者	渡辺, 悦生 安藤, 一夫
巻/号	38巻7号
掲載ページ	p. 711-715
発行年月	1972年7月

ニジマス卵発生中におけるコレステロールの消長

渡辺悦生・安藤一夫

(1972年2月21日受理)

Changes in Cholesterol in Developing Rainbow Trout Egg

Etuo WATANABE and Kazuo ANDO*

Cholesterol in the free and esterified forms and the esterforming fatty acids were studied in the rainbow trout egg during its development.

In the fertilized egg, free cholesterol decreased slightly while the esterified form increased, there being a slight decrease in the sum of these two.

Until eyeing stage some of the ester-forming fatty acids increased while others decreased, the former being C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:1} and C_{18:4}+C_{20:1}, the latter being C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0} and C_{18:2}. Almost all the fatty acids were maximal after the hatching stage.

Unfertilized egg which was kept alive for 24 days under the same conditions as the fertilized showed a remarkable increase in lower fatty acids (less than 12 carbon atoms) during this period.

These observations may suggest that cholesterol plays an important role in fat metabolism in the developing egg.

コレステロールは脂質代謝に重要な役割を果たすことが知られている。とくに、コレステロールの役割は、それが脂質代謝上易動的であり、脂肪酸の運搬にあると考えられている。

著者らの一人¹⁾はニジマス卵の発生過程における脂質成分の変化を追求し、不ケン化物含量の変化をみて、その主成分であるコレステロールについての検討は行なっていない。本研究では、発生過程におけるコレステロールの含有量およびそのエステル構成脂肪酸を調べ、二、三の知見がえられたので報告する。

実験方法

ニジマス卵の発生: ニジマス卵は1970年12月に東京水産大学大泉実習場で受精させたもので、吸水後、氷冷して、実験室にもちかえり、水温12-13°Cの流水で発生を継続させた。また、不受精卵は受精卵のように発生継続のための代謝はほとんどなく、生命の維持だけで大きなエネルギーの消費はないものと考えられる。そこで不受精卵における諸変化が受精卵におけるそれらと同じかどうかを、一、二調べるために、全く同一条件で接水して放置した。

試料油の調製: 受精直後から浮上までを、5日目ごとに300粒(総脂質として約2.3g)をぬきとり、あらかじめ乳鉢でつぶしたのに対して、アルコール:エーテル(3:1)500mlで3回、次にクロロホルム:メタノール(2:1)250mlで1回、各々40分間、窒素気流中で攪拌し、全脂質を抽出し、その後、溶剤を除去して試料油とした。不受精卵については、接水して放置後、1、15および24日目のものについて、卵が透明であるものを選び、同様に処理した。

コレステロールの分離: 120°Cで3時間、活性化したシリカゲル(関東化学 K.K., 100 mesh) 10gに対して、市販のコレステロール(10.0mg)、コレステロールパルミテート(15.6mg)、モノ(10mg)、ジ

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. of Fisheries, Minato-ku, Tokyo)

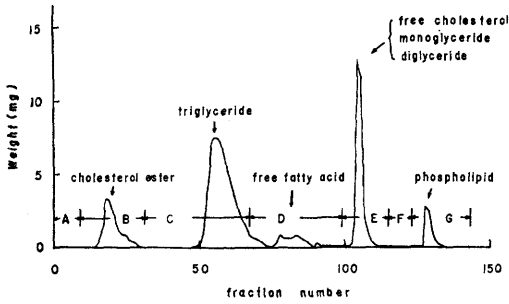


Fig. 1. An elution pattern of lipid components used for standardization for this experiment.

Standard mixture was chromatographed on Silica Gel, eluted with various solvents, each 5 ml fraction was collected.

- A: hexane 45 ml.
- B: 15% benzene hexane 110 ml.
- C: 5% ether hexane 170 ml.
- D: 15% ether hexane 160 ml.
- E: 50% ether hexane 80 ml.
- F: ether 40 ml.
- G: methanol 100 ml.

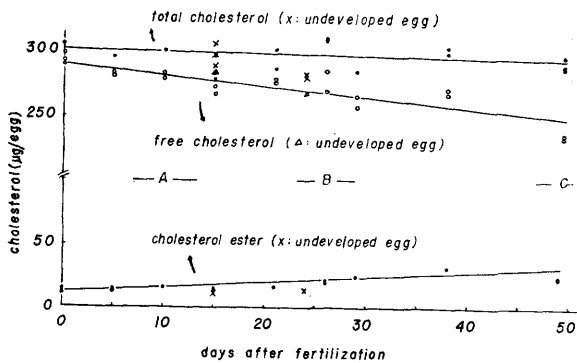


Fig. 3. Changes of cholesterol in free and esterified forms during development of rainbow trout egg. A: eye appeared, B: hatching, C: swim up fry

し、小野²⁾の方法により各々のコレステロールを定量した。また、総コレステロール量を上述試料油 10-15 mg から、同じく小野の方法で測定した。

一方、コレステロールの測定にもちいられるジギトニン³⁾はコレステロールのみならず、3位に OH 基を

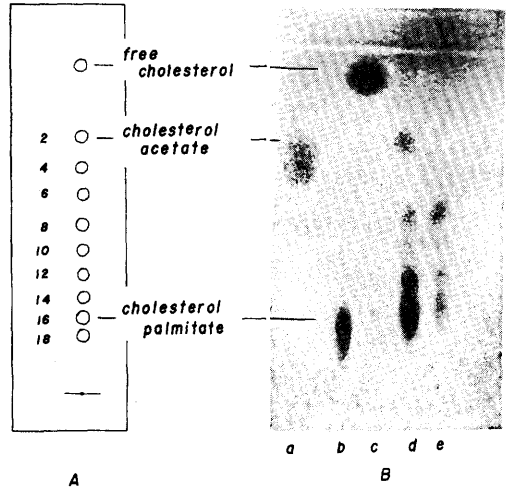


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of cholesterol ester prepared from rainbow trout egg.

- A: thin-layer chromatogram of Cholesterol ester by H. P. KAUFMAN *et al.* (Figures show number of carbon atoms of saturated fatty acid).
- B: a, b, c-standard
- d-cholesterol ester of undeveloped egg (keeping in water for 15 days).
- e-cholesterol ester of fertilized egg (5 days after fertilization).

(10 mg), およびトリパルミチン (83.5 mg), パルミチン酸 (8.0 mg), レンチン (12.9 mg) を総量で 150 mg 適用して、カラムクロマトグラフィーを行ない、Fig. 1 に示されるような溶出曲線がえられた。したがって、15% ベンゼンヘキサン 110 ml のフラクションをコレステロールエステルとし、50% エーテルヘキサン 80 ml のフラクションを遊離のコレステロールとして、以下の実験を行なった。

コレステロールの測定: 上述カラムを用いて試料油 150 mg から遊離のコレステロールおよびコレステロールを回収

もつステロールとは反応して、ジグトドを形成するから、もし存在しているとすれば、コレステロール以外のステロールも測定していることになるので、薄層クロマトグラフィーにより、二、三検索したが、薄層クロマト的には他のステロール類を検出することができなかつた。また、LIEBERMAN-BURCHARD³⁾ 試薬をもちいて、FAS⁴⁾ (*fast acting sterol: ergosterol* など) および SAS⁴⁾ (*slow acting sterol: cholesterol* など) の測定を行なつたが FAS は比色定量できなかつた。

コレステロールの脂肪酸組成: 得られたコレステロールエステルを SPERRY-WEBB⁵⁾ 法でケン化し、ケン化液中の遊離のコレステロールをエーテルで抽出除去後、残液に希硫酸を加え、エーテル抽出して脂肪酸をえた。さらに、この脂肪酸を硫酸メタノールでメチルエステルとし、ガスクロマトグラフィーで分析した。なお、使用機器、その他分析条件、および各脂肪酸の同定法は安藤¹⁾ と同じであるが、低分子量の脂肪酸の検索にはカラム温度を 120°C で行なつた。またカラムクロマトでコレステロールエステルを回収し、それを直接薄層クロマト⁶⁾ で展開したものを Fig. 2 に示す。これによれば、炭素数の少ない脂肪酸とのエステルがはつきりと認められるので、低級脂肪酸がコレステロールエステル分離後の操作によつて生じたものではないと考えられる。

結果および考察

コレステロールの変化: 遊離のコレステロール、コレステロールエステル、および総コレステロール量の変化を Fig. 3 に示す。これによれば、受精卵では、遊離のコレステロールにかなりはつきりした、および総コレステロールにわずかな減少がみられ、コレステロールにわずかな減少がみられ、コレステロールエステルに増加がみられる。一方、不受精卵では測定点がわずかに二点で何とも言えない。受精直後のコレステロールエステル量と脂質代謝の盛んと思われる⁷⁾ 受精後 38~48 日目のそれとでは、総コレステロール量に対するエステル量の変化としては少ないが、エステル量で 2.2-2 倍の変化をしめしている。このことは、一般にエステル型の方が代謝的に動きやすいといわれていることをよく表わしており、興味深い。

コレステロールエステルの脂肪酸組成: 発生過程におけるコレステロールエステルの構成脂肪酸の分析値を Table 1 に、また、主要成分である C₁₈、C₁₆ の飽和および不飽和酸、C₁₄ および C₁₂ の飽和酸の変

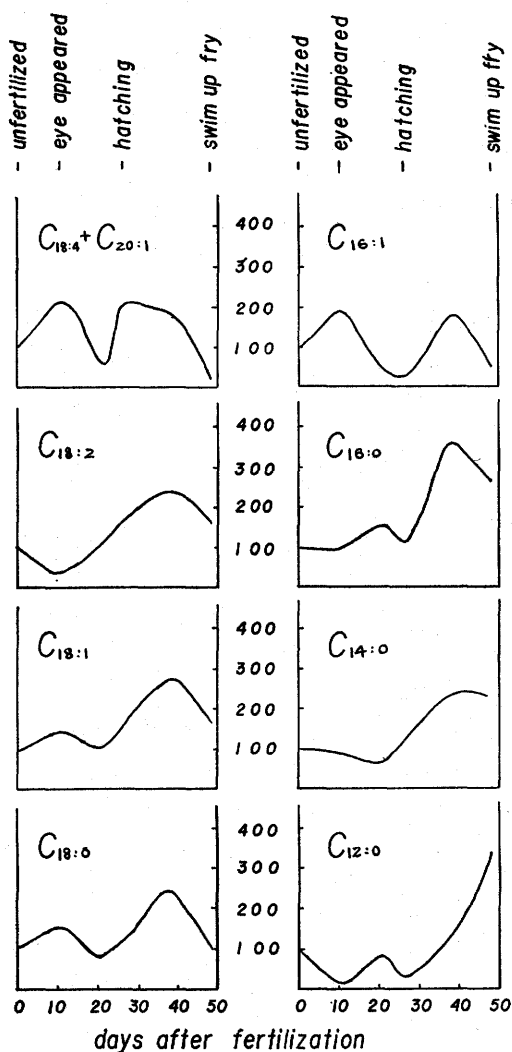


Fig. 4. Changes in relative contents on individual fatty acid of cholesterol ester in developing rainbow trout egg.

Values are calculated by the considering individual fatty acid contents of cholesterol ester per one unfertilized egg are 100.

Table 1. Fatty acids composition of cholesterol ester in developing rainbow trout egg.

Apparatus of gas chromatography: Shimadzu GC-1C, column: DEGS, 210°C, carrier gas: N₂, 99 ml/min, detector: FID, 250°C, H₂: 60 ml/min, air: 1 kg/cm²

number of carbon atoms and double bond	days after fertilization							
	0	10	15*	21	24*	26	38	48
	unfertilized	eye appeared				hatching		swim up fry
below 12	2.8	0.9	7.0	6.9	57.8	3.2	3.5	6.4
12:0	6.0	0.7	3.1	3.7	4.1	1.0	2.8	11.4
12:1	trace			1.6				
13:0}				1.9	13.6	trace	trace	trace
13:1}								
14:0	3.3	2.6	2.6	1.6	4.1	2.7	3.1	4.5
14:1}				trace	8.9	0.4	0.7	0.4
15:0}	0.4	0.4	0.5					
14:2}				trace	5.4	0.3	0.3	0.3
15:1}	trace	0.3	0.2					
16:0	24.5	21.1	20.5	29.1	3.8	17.6	34.5	35.8
16:1	3.5	6.1	3.1	1.2		6.0	2.5	0.8
17:0	0.4	0.9	0.4	0.3		0.5	0.7	0.3
16:2}								
17:1}	0.3	0.4	0.6		2.4	0.5		
18:0	6.4	9.0	3.9	3.9		5.3	6.3	3.7
18:1	30.0	37.4	24.0	21.6		32.4	31.5	25.9
18:2	7.7	2.1	6.5	6.1		9.1	7.3	6.9
18:3	trace	0.4	4.0	0.4		0.3	0.7	3.3
18:4}								
20:1}	6.2	12.0	2.4	2.5		9.1	1.5	trace
20:2	2.6	3.5	1.1	1.3		5.7	5.1	
X	0.7		0.8	0.9		1.1		
20:3	0.4			0.9		1.6		
20:5	3.1			3.4				
20:4}								
22:1}	1.0	2.9	16.7	4.8		2.9		
22:5				1.2				
22:6				7.0				

* analytical values of undeveloped egg which was kept in water under the same condition as the fertilized egg.

化を、未受精卵1個当りに含まれるコレステロールエステルの各脂肪酸量を各々100として、Fig. 4に示す。これらによれば、おおまかに、受精から発眼にかけて増加する脂肪酸と減少する脂肪酸とにわけることができる。前者は、C_{16:1}、C_{18:0}、C_{18:1}、およびC_{18:4}+C_{20:1}酸であり、後者はC_{12:0}、C_{14:0}、C_{16:0}、およびC_{18:2}酸であった。また、ほとんどの酸が孵化以後に極大値をもち、発眼から浮上にかけての脂質代謝が活発であることを示している。

一方、Table 1より、受精卵では、主要成分はC₁₆、C₁₈の飽和および不飽和酸であつて、全量の70%

以上を占めていることがわかるが、無視できないのは、 C_{12} 以下の脂肪酸量で、受精卵および不受精卵で共に顕著に認められる。ここで、Table 1 の $C_{12:0}$ を基準にして $C_{12:0}$ 以下の量が全体の何%位になるかをおおまかに算出すると、受精卵では 0 日目、12%、10 日目、3.3%、26 日目、4%、38 日目、3.5%、48 日目、11.5%、不受精卵では、0 日目、12%、15 日目、7.9%、24 日目、57.8%、となり、これによれば、総脂質¹⁾においては C_{12} 以下の脂肪酸がほとんど皆無であるのに比べ、コレステロールエステル中のそれらは相対的に非常に多く、ニジマス卵中における脂肪酸の代謝にコレステロールエステルが関与していると考えざるをえない。さらに、Table 1 と考えあわせれば、不受精卵におけるコレステロールエステルの構成脂肪酸は、15 日目までは C_{16} 、 C_{18} の不飽和酸で約 60% とわずかに減少しているが、24 日目にいたると、 C_{16} 、 C_{18} の飽和および不飽和酸は急激に減少し、炭素数の少ない脂肪酸が圧倒的に増加してきている。これは、すでに述べたように、不受精卵が単に生体の膜機能維持のためのエネルギーを必要とするにすぎないと思われることから考えて、不受精卵のもつていたコレステロールエステル構成脂肪酸の生体内酸化によって、膜機能維持のためのエネルギーにコレステロールエステルが関与していることを示すものではなからうか。

一方、発生中にコレステロールエステルの増加する原因については、血漿中のコレステロールエステルの生成について考えられている⁹⁾ ように、コレステロールエステルが、*lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) によって、レシチンの 2 位の脂肪酸と遊離のコレステロールとから合成されるとも考えられる。安藤¹⁾ もニジマス卵発生中におけるリン脂質の消長についてくわしく研究しているが、その中でレシチンの減少がはげしいと報告している。しかしながら、ニジマス卵に LCAT の存在を確認していない現在、この考え方は推定の域をでない。いずれにせよ、コレステロールエステルが脂質代謝に重要な意味をもっていることは事実であろう。

摘 要

ニジマスの受精および不受精卵におけるコレステロール量、およびコレステロールエステルの脂肪酸組成の変化をしらべた。

1. 受精卵におけるコレステロールは、総量および遊離型において、発生中わずかに減少し、エステル型において増加した。(Fig. 3)
2. コレステロールエステルを構成する主要な脂肪酸を受精から発眼にかけて増加する脂肪酸と減少する脂肪酸とに分けることができる。前者は、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、および $C_{18:4}+C_{20:1}$ 酸であり、後者は、 $C_{12:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、および $C_{18:2}$ 酸であつた。またほとんどの酸が孵化以後に極大値をもつことを認めた。(Fig. 4)
3. 不受精卵 (24 日目) におけるコレステロールエステルの低級脂肪酸 (C_{12} 以下) が非常に増加するのを認めた。
4. 以上より、ニジマス受精卵、および不受精卵における脂質代謝にコレステロールエステルが関与していることを推定した。

本研究を行なうにあたり、東京水産大学教授 野村 稔先生をはじめ、同研究室の皆様にも多大なる御援助をいただきました。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) K. ANDO: *J. Tokyo University of Fisheries* 54, 61-98 (1968).
- 2) 小野輝夫: 生化学 38, 283-290 (1966).
- 3) R. P. COOK: *Analyst* 86, 373-381 (1961).
- 4) R. P. MOORE, C. A. BAUMANN: *J. Biol. Chem.*, 195, 615-621 (1952).
- 5) W. M. SPERRY, M. WEBB: *ibid.*, 187, 97-106 (1950).
- 6) H. P. KAUFMANN, C. V. VISWANATHAN: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 65, 538-543 (1963).
- 7) 磯野直秀・茅野春雄: 蛋白質・核酸・酵素, 11, 1000-1010 (1966).
- 8) JOHN. A. GLOMSET: *J. Lipid Research*; 9, 155-167 (1968).