



Title	水産動物筋肉の生化学的研究：第1報 ホタテ貝柱煮熟液に溶存する5' -アデニール酸について
Author(s)	飯田, 優; IIDA, Atsushi; 荒木, 功 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 12(2), 151-159
Issue Date	1961-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23133
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(2)_P151-159.pdf



水産動物筋肉の生化学的研究

第1報 ホタテ貝柱煮熟液に溶存する 5'-アデニール酸について

飯田 優・荒木 功・村田喜一

(青森県水産物加工研究所) (北海道大学水産学部食品化学教室)

Biochemical Studies on Muscle of Sea Animals

I. On adenylic acid in the boiled liquor with the muscle of scallop, *Pecten yessoensis*

Atsushi IIDA, Isao ARAKI and Kiichi MURATA

Abstract

The shell fish, *Pecten yessoensis* has been caught on Mutsu Bay in Aomori Prefecture and on the eastern coast of Hokkaido district, and its muscle has been boiled to make the dried products, Hotate Kaibashira, from it. Therefore much volume of boiled liquor with its muscle has been obtained as byproduct and spent.

The authors proved the presence of 5'-adenylic acid in its liquor and then estimated this acid content on some liquor by paperchromatography. Also the authors isolated crystal 5'-adenylic acid from some liquor, and some characteristics of this crystal were compared with those of standard material.

The authors can conclude that in future, this spent liquor may be possible a resource of 5'-adenylic acid.

ホタテ貝 (*Pecten yessoensis*) は青森県陸奥湾及び北海道東海岸に於いて量産され、その貝柱筋肉(以下貝柱と記す)は煮乾品であるホタテ乾貝柱に加工されるが、その際貝柱煮熟残液が大量に副産され廃棄されている。一方ホタテ乾貝柱は製造後保管中に鮭色から赤褐色乃至は黒褐色に変色することが多く、製品管理上の障害となつているが、著者等は此の変色原因を究明する意図で上記の貝柱煮熟残液について諸性質を調査している途中、同液中に稍々多量の 5'-アデニール酸(以下アデニール酸と記す)が溶存することを確認したので、その含量を測定し更にアデニール酸を結晶状に単離した。貝柱煮熟残液中のアデニール酸含量は第4表に示す如くであるが、著者等は煮熟残液同様に廃棄されているホタテ貝の他の組織についても同様の研究を進めている。

最近アデニール酸の薬理効果¹⁾が報告され、又諸種磷酸化合物の合成原料としてその利用面が開拓されつつあるが、現在徒らに廃棄されている貝柱煮熟残液がアデニール酸原料として利用されることを期待する次第である。以下ホタテ貝柱煮熟残液について著者等の行つた実験結果を報告する。

実験の部

1) ホタテ貝柱煮熟残液中のアデニール酸の検出

試料

昭和 35 年 7 月青森県陸奥湾に於いてホタテ貝柱煮熟残液 (第 1 表) を入手し, 入手後直ちに少量のトルオールを加えて約 2 日間静置後速心分離して, その上澄液を試料とした。

ペーパークロマトグラフィーによる検出方法及び結果

Table 1. Some characteristics of spent liquor boiled with muscle of *Pecten yessoensis*

Color	pH	NaCl g/100ml	Total-N mg/100ml	Amino-N mg/100ml	Total sugar g/100ml	Reducing sugar mg/100ml
Semitransparent orange brown	6.0	20.12	435	364	4.20	20

上記の試料をペーパークロマトグラフィーに展開したが, クロマト濾紙は 5% 塩酸で処理^{2,3)}した東洋濾紙 No. 51 を用い, 20°±2°C で一次元上昇法を行つた。発色法は又クレオチドの検出を目的とし, そのためプリン・ピリミジン核の検出に Vischer 等⁴⁾の硝酸水銀試薬による方法及びフロロエツセイン稀アンモニア溶液噴霧による紫外線透視法を, 還元糖の検出にアニリン・ヒドロゲン・フタレート法⁵⁾, オルシノール法⁶⁾及び p-塩酸アニシジン法⁷⁾を, 磷酸エステル⁸⁾の検出にはモリブデン

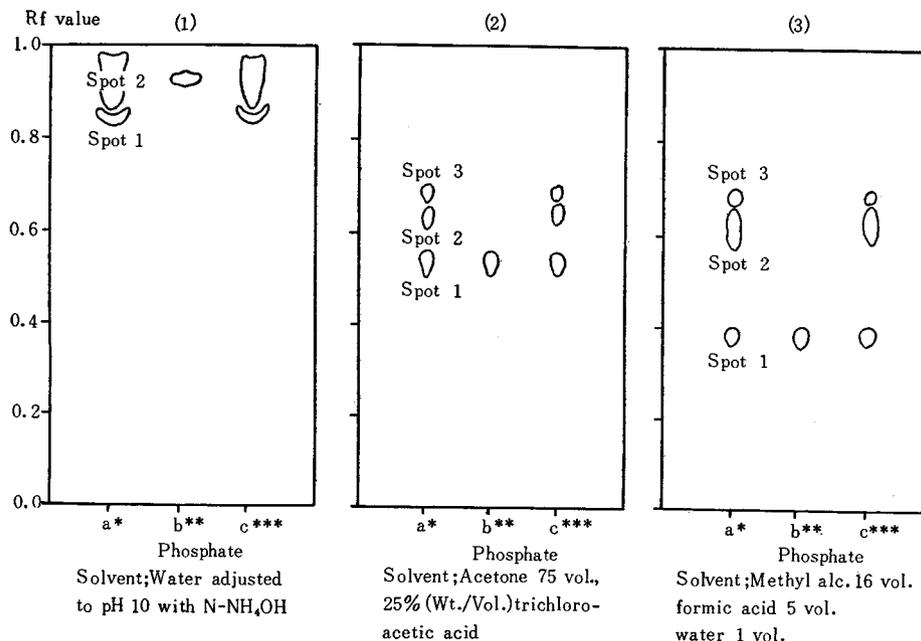


Fig. 1. Chromatograms of spent liquor boiled with muscle of *Pecten yessoensis*

a*) Liquor

b**) Standard 5'-adenylic acid; prepared by Daiichi Yakuhin Kagaku K. K.

c***) Mix. of liquor and standard adenylic acid

酸アンモン試薬⁹⁾を噴霧して紫外線を照射⁹⁾せしめる方法を夫々併用した。展開剤として pH 10 のアンモニア水¹⁰⁾、アセトン・トリクロル醋酸¹⁰⁾、メタノール・蟻酸・水⁹⁾の三種溶剤を用いた。この結果第1図に示す如き各クロマトグラムを得た。各クロマトグラムのスポット I はいずれもプリン・ピリミジン核、還元糖、磷酸エステル陽性で又クレオチド類似の反応を示した。又アデニール酸標準品(第一化学薬品株式会社製)との共展開、混合展開によりその Rf 値はアデニール酸のそれと略々類似する結果を得た。又各クロマトグラムのスポット II と III は夫々次項アデニール酸の確認に際して行つた通りの方法で再抽出、再展開を行つて検討したところ、いずれもヌクレオチド以外の二種以上の物質からなるものであり、又これ等のスポット以外にアデノシンの存在を同様確認した。

1) ペーパークロマトグラフィー再展開によるアデニール酸の確認

前記の試験結果により得られたアデニール酸類似のヌクレオチドについてペーパークロマトグラフィーで再展開し、アデニール酸の確認を行つた。即ち前回同様の方法、条件によりメタノール・蟻酸・水を溶媒として展開したクロマトグラム多数からアデニール酸展開部 (Rf=0.29) を切り取り、エーテル洗滌後これを 0.1 N-塩酸¹¹⁾で再抽出した。抽出液を毛細管に受け、これを試料として加熱することなくクロマト濾紙に塗抹し、各種溶媒で展開したのち前回同様の方法でヌクレオチドの検出を行い、第2表の結果を得た。即ち抽出液のクロマトグラムから常に一種のヌクレオチドを検出したが、

Table 2. Rf values of 5'-adenylic Acid

Sample	Extract	Standard adenylic acid
Solvent system		
n-BtOH NH ₃	0.04	0.04
Isopropyl alc. HCl	0.44	0.44
Na ₂ HPO ₄ Isoamyl alc.	0.74	0.75
Water (pH 10)	0.93	0.93
Acetone Trichloroacetic acid	0.52—0.53	0.52
MtOH Formic acid Water	0.39	0.39
Ethyl acetate Acetic acid Water	0.24	0.24

* Extracted from paperchromatogram of spent liquor boiled with muscle of *Pecten yessoensis*.

- a) n-Buthyl alc. satd. with water at about 23°C 100 ml., 15N-NH₄OH 1 ml.; Hotchkiss, R. D. (1948). J. Biol. Chem. 175, 315.
- b) Isopropyl alc. 170 ml., concd. HCl 41 ml., water to make 250 ml.; Chargaff, E. & Davidson, J. N. (1955). "The Nucleic Acids". Vol. I, (p. 252). New York; Academic Press.
- c) 5% aq. Na₂HPO₄ satd. with isoamyl alc., both aq. and nonaq. phase being present in the trough; Ibid. (p. 251).
- d) Water adjusted to pH 10 with N-NH₄OH; Ibid. (p. 252).
- e) Acetone 75 vol., 25% (Wt./Vol.) trichloroacetic acid 25 vol.; Ibid. (p. 251).
- f) Methyl alc. 16 vol., 88% formic acid 3 vol., water 1 vol.; Bandurski, R. S. & Axelrod, B. (1951). J. Biol. Chem. 193, 405.
- g) Ethyl acetate 3 vol., acetic acid 3 vol., water 1 vol.; Mortimer, D. C. (1952). Can. J. Chem. 30, 653.

その Rf 値はアデニール酸の Rf 値に一致し、アデニール酸との混合展開の結果両者の Rf 値は全く一致した。

別に試料の初展開クロマトグラム及びアデニール酸の同様クロマトグラムについて、これらからアデニール酸展開部を切り取り、エーテル洗滌後細かく切り、夫々 0.01 N-塩酸^{12,13)}、pH 2 塩酸¹⁴⁾、pH 7 苛性ソーダ¹⁴⁾、pH 10 苛性ソーダの各溶液中で 24 時間 37°C に放置して抽出を行い、これを濾過したのちベックマン型光電光度計により吸収極大波長と 250, 260, 280 m μ 各波長に於ける吸光値の比を求めた。この結果は第 3 表に示す通りで試料クロマトグラムの各抽出液はアデニール酸の同様抽出液と略々同一の性状を示した。

Table 3. Absorption maxima and ratios at 250, 260 and 280 m μ of adenylic acid extracted from paperchromatograms and standard

	$\lambda_{MAX.}$		250/260		280/260	
	Extract	Standard adenylic acid	Extract	Standard adenylic acid	Extract	Standard adenylic acid
pH2 HCl	257	257	0.86	0.88	0.00	0.00
pH7 NaOH	258	258	0.85	0.86	0.10	0.15
pH10 NaOH	258	258	0.86	0.83	0.07	0.07
0.01 N HCl	157	257	0.86	0.84	0.10	0.10

以上の結果から前記ホタテ貝柱煮熟残液にはヌクレオチドが存在し、それがアデニール酸であることを確認した。

2) ホタテ貝柱煮熟残液のアデニール酸含量

煮熟残液中のアデニール酸をペーパークロマトグラフィーによつて分離したのち抽出し、抽出液の 260 m μ に於ける吸光値からアデニール酸含量を算出した結果について述べる。

検量曲線

アデニール酸標準品 0~0.1 mM の 0.1 N 塩酸各溶液について、前項定性試験の場合と同様の方法条件で前述のアセトン・トリクロル醋酸を溶媒とする一次元クロマトグラフィーを行い、その展開部 (Rf=0.48~0.57) を切り取り、エーテル洗滌、風乾する。此の濾紙片を短冊型に切つたのち目盛試験管にとつて 0.01 N 塩酸で全容を 5 cc とし、時々振盪しつつ 37°C に 24 時間放置して抽出を行つた。抽出液は濾過したのち 260 m μ に於ける吸光値を読み、第 2 図に示した如き検量曲線を得たが、この測定値より計算すると本定量法によるアデニール酸のミリモル吸光係数は 13.9 ± 0.22 であつた。別に求めたアデニール酸標準品 0.1 mM · 0.01 N 塩酸溶液のミリモル吸光係数は 13.9 で文献値¹³⁾に一致し、この結果から計算した本定量法によるアデニール酸回収率は $100 \pm 1.95\%$ となつた。

試料

青森県陸奥湾に於いて昭和 35 年 11 月より 36 年 2 月までに入手した四種類のホタテ貝柱煮熟残液を、入手後 3 日乃至 5 日間冷室内に静置して混濁物を沈澱せしめ、その上澄液をガラスフィルター (3G3) で濾過して供試した。

測定方法及び結果

試料毎に検量曲線を作製した場合と全く同様のクロマトグラフィー及び抽出を行つて、各試料 0.02 cc 宛のアデニール酸抽出液 3 ケ宛を作つた。クロマトグラムのアデニール酸展開部を試料、アデニール

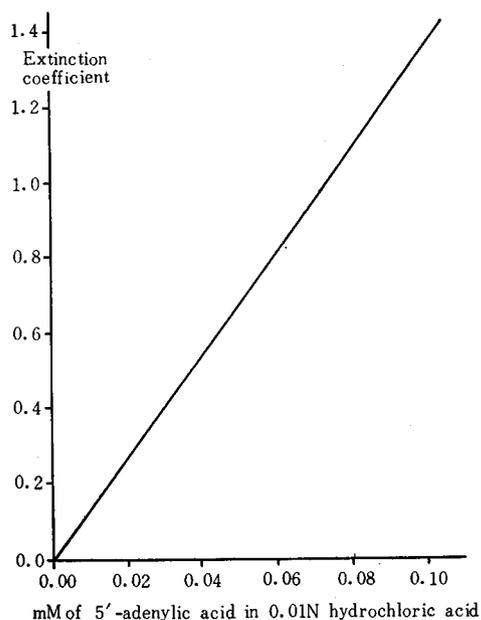


Fig. 2. Relation between the concentration of 5'-adenylic acid in 0.01 N hydrochloric acid and extinction coefficient at 260 m μ

Table 4. 5'-Adenylic acid content in spent liquor boiled with muscle of *Pecten yessoensis*

Sample No.	Date of collection	Freshness of origine muscle	Wt. (kg) of boiled muscle per total vol. (L) of liquor	Passed time on each sample before analysing from when prepared (day)	Content of adenylic acid	
					mM	g/L
I	Nov. 17, '60	fresh — ill fresh	1,190/200	15	2.94	1.10
II	Dec. 22, '60	very fresh	1,110/200	5	5.67	2.12
III	Jan. 7, '61	very fresh	850/200	3	2.88	1.00
IV	Feb. 7, '61	very fresh	1,060/200	3	4.93	1.80

ル酸標準品及び両者の混合物を一組のガイドストリップとして定量用試料の両端に展開せしめたのち、燐酸エステルの検出を行つて決定した。なお当展開部については同時に展開した別の3個のクロマトグラムについて、前項の定性確認試験の場合と同様の方法により、0.1 N 塩酸で毛细管内に再抽出したのちこれを pH 10 アンモニア水、アセトン・トリクロル醋酸及びメタノール・蟻酸・水の三種溶媒で再展開せしめ、プリン・ピリミジン核の検出を行つてアデニール酸以外に反応陽性物質が存在しな

いことを確めたものである。上記の試料抽出液の極大吸収は 257-260 $m\mu$ にあつたが、260 $m\mu$ に於ける吸光値の平均値から検量曲線によりアデニール酸のミリモル濃度を求め、抽出時の稀釈倍数を乗じて試料中のアデニール酸含量を算出し、その結果を第4表に示した。

煮熟残液のアデニール酸溶存量に影響すると考えられるホタテ貝柱の鮮度、貝柱処理総重量、煮熟液総延容量について現地で聴取した資料その他をも併わせて第4表に記した。現地ではふつう延べ1000 kg 内外のホタテ貝柱を約 200 l の水で煮熟していたが、表記の試料は生産される煮熟残液を代表するものと考えてよく、従つて青森県陸奥湾に於いて 11 月乃至 2 月の冬季間に得られる煮熟残液は 1 l 当り 1 乃至 2 g 程度のアデニール酸を含有するものと考えられる。

なお、ホタテ貝柱を貯蔵する際の酸可溶核酸成分の変化については、新井氏^{15,16)}は ATP がアデニール酸を経てヒポキサンチンに迄分解することを報告している。著者等がこの実験に用いた煮熟残液にはアデニール酸以外のヌクレオチドをも溶存するものがあつたが、そのヌクレオチドは確認するに至らず、又ヌクレオシドの存在は認め得なかつた。

3) アデニール酸の単離

活性炭処理条件の検討

ホタテ貝柱煮熟残液の成分組成は第1表にその一例を示した如く、橙褐色を呈する混濁した液で 10 乃至 20 容量%の食塩をはじめ多くの無機、有機物が溶存している。この液からアデニール酸を単離するに先立つて活性炭処理による精製法を検討した。液中の混濁物質は静置することにより大部分が沈澱して除去出来るので、その上澄液を活性炭処理しアデニール酸の大部分を活性炭に吸着せしめ、水洗して水可溶物を完全に除去する。しかし活性炭にはアデニール酸以外に橙褐色の色素様物質も吸着され、溶離に際して従来活性炭からヌクレオチドを溶離するに用いられているアンモニア・アルカリ性アセトン、アンモニア・アルカリ性アルコール、ピリジン水溶液等¹⁷⁾のアルカリ性有機溶剤を用いればアデニール酸の溶出液中に色素様物質が著しく混合溶出してくる。著者等は各種の溶離剤を検討したがその結果、塩酸、硫酸、過塩素酸等の酸性有機溶剤を用いるとアルカリ性溶剤に比較して溶出液中の色素様物質の混合溶出が少ないことを認めた。なおこの抽出法は継続検討中であるが、硫酸酸性溶剤を用いると溶出液中の酸根が容易に除去出来て後の処理が簡単なので、アデニール酸の分離に際しては下記の如く稀硫酸酸性エタノールを用いることとした。

試料及びアデニール酸分離の方法

Fig. 3. Isolation of 5'-adenylic acid from spent liquor boiled with muscle of *Pecten yessoensis*

Spent liquor

filtered under reduced pressure through the layer of Hyflo Super Cel
passed through column of active carbon and then column was washed
with water
eluted with 0.05 M sulfuric acid-30% ethyl alc.

Elutant

neutralized with barium hydroxide and concentrated
diluted with water to original volume
added again barium hydroxide to make pH 8.2
centrifuged

Supernatant

concentrated
added with acetic acid to make 0.2% acetic acid soln. and with 0.05
vol. of 20% mercuric acetate

Precipitate

washed with 0.2% mercuric acetate
suspended on water and was passed with hydrogen gas

Supernatant

excepted hydrogen sulfide gas by airtation
centrifuged and filtered
added with acetone

Crude 5'-adenylic acid

前項のアデニール酸含量の測定に用いた試料 IV を用いた。これを冷室内に静置して得た上澄を活性炭処理したのち、Kerr¹⁸⁾ の分別沈澱法によつてアデニール酸を分離した。その概要は第 3 図に示した通りである。即ち煮熟残液 0.8 l を活性炭とハイフロ・スーパー・セルの混合カラム (重量比 1:1, 98 cm²×3cm) に通じ、カラムを約 2 l の水で洗滌したのち 0.05 M・硫酸酸性-30% エタノールでアデニール酸フラクションを溶出した。溶出液約 600 cc を集め、水酸化バリウム末で中和後 50°C 以下で減圧濃縮してエタノールを除去したのち再び水で 600 cc としたものを水酸化バリウム末で pH 8.2 とし一夜放置した。生成した沈澱はハイフロ・スーパー・セルの層を通して濾過し、濾液を稀硫酸で pH 7 としたのち 50°C 以下で約 1/15 容量迄減圧濃縮した。この濃縮液を 0.2% 醋酸酸性とし、これに約 0.05 部の 20% 醋酸第二水銀を加えて一夜放置、遠心してアデニール酸水銀を分離し、0.5% 醋酸水銀で一回洗滌、少量の水に混浮させる。これに約 1 時間硫化水素を通じ、硫化鉄を遠心及び濾過して除去、沈澱を少量の水で洗つたのち、濾液を洗液を合してこれに通気する。これに約 1.5 倍容量のアセトンを加えると鱗片状白色沈澱が生ずるのでこれを濾別し、アルコール及びエーテルで洗い乾燥した。沈澱の乾燥重量は約 200 mg であつた。この沈澱はプリン・ピリミジン核、還元糖磷酸エステルとの反応がいずれも陽性であり、ペーパークロマトグラフィーによるアデニール酸標準品との共同展開、混合展開によつてアデニール酸フラクションであることを認めた。次にこの沈澱を少量の熱水から再結晶を 5 回行い、アルコール、エーテルで洗滌してシリカゲルのデシケータ中で乾燥し約 60 mg のアデニール酸とした。再結晶の際に熱水アセトン又は熱水アルコールを用いると白色針状のアデニール酸が得られるが、熱水再結では不定形な珊瑚状のアデニール酸が得られた。

分離したアデニール酸の性状

本品は硫酸浴による融点測定の結果 190~191°C で発泡分解し、又アデニール酸標準品は 191~192°C で同様発泡分解し、両者の混合物は 190~192°C で発泡分解した。

Table 5. Absorption maxima and Ratios at 250, 260 and 280 m μ of 5'-adenylic acid obtained and standard

	λ_{MAX}		250/260		280/260	
	Matter obtained	Standard adenylic acid	Matter obtained	Standard adenylic acid	Matter obtained	Standard adenylic acid
pH2 HCl	258	258	0.80	0.79	0.18	0.17
pH7 NaOH	260	260	0.71	0.72	0.12	0.11
pH10 NaOH	260	260	0.74	0.74	0.13	0.15
0.01 N HCl	258	268	0.79	0.81	0.19	0.19

又第2表に示した7種の溶媒を用いてアデニール酸標準品と共同展開する両者の Rf 値は一致し、又混合展開によつて得られるヌクレオチドのスポットは唯一つでその Rf 値はアデニール酸標準品の Rf 値に一致した。

第5表は本品とアデニール酸標準品の各種 pH 溶液中の吸収スペクトルを測定した結果を示すものであるが、吸収極大波長及び、250, 260, 280 m μ に於ける各吸光値の比は両者よく一致する結果を得た。

なお、アデニール酸標準品の 0.01 N 塩酸溶液について 260 m μ に於ける吸光値を測定し、これが1モルの結晶水を含むものとしてミリモル吸光係数を求めたところ 13.9 となつて文献値に一致したが、本品について同様ミリモル吸光係数を求めて、両者の吸光係数の比より本品の純度を計算して 94% 強となつた。

要 約

- 1) ホタテ乾貝柱の加工に際して副産される貝柱煮熟液中の溶存アデニール酸についてペーパークロマトグラフィーを行い、初展開クロマトグラムから得た抽出液の紫外部吸収スペクトルと、同抽出液の再展開による Rf 値、呈色反応からその存在を定性的に確認した。
- 2) 貝柱煮熟残液中のアデニール酸をペーパークロマトグラフィーで分離定量して、液 1 l 当り 1 乃至 2 g のアデニール酸が溶存することを知つた。
- 3) 貝柱煮熟残液を活性炭処理し、吸着したアデニール酸を硫酸酸性エタノールで溶出したのち、分別沈澱法によつてアデニール酸を単離し、二三の性状について標準品との比較を行つた。

本研究を遂行するに當つてアデニール酸標準品を分譲し下さり、又光電光度計の使用に便宜を賜つた大木製菓入戸工場に対し深堪の謝意を表する。

文 献

- 1) 松岡義忠・伊古美文雄・鈴木義政 (1960). 日化総覧. 34, 2863e.
- 2) 小松豊彦 (1960). 生化学. 32, 351.
- 3) 吉川春泰・高橋泰常他編 (1960). 磷酸代謝実験法. [p. 122]. 東京; 広川書店.
- 4) Viser, E. & Chargaff, E. (1948). *J. Biol. Chem.* 176, 703, 715.
- 5) Partridge, S. M. (1949). *Nature* 164, 443.
- 6) Bevenue, A. & Williams, K. T. (1951). *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 225.
- 7) Houghm, L., Jones, J. K. N. & Wadman, W. H. (1950). *J. Chem. Soc.* 1702.
- 8) Burrows, S., Grilis, F. S. M. & Harrison, J. S. (1952). *Nature* 170, 800.
- 9) Bandurski, R. S. & Axelrod, B. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 405.
- 10) Chargaff, E. & Davidson, J. N. (1955). *The Nucleic Acids* Vol. I. [p. 256]. New York; Academic Press.
- 11) 吉川春泰・高橋泰常他編 (1955). 磷酸代謝実験法. [p. 124]. 東京; 広川書店.
- 12) Chargaff, E. & Davidson, J. N. (1955). *The Nucleic Acids* Vol. I. [p. 262]. New York; Academic Press.
- 13) Chargaff, E. & Carter, C. E. (1951). *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1516.
- 14) Chargaff, E. & Davidson, J. N. (1955). *The Nucleic Acids* Vol. I. [p. 513]. New York; Academic Press.

1961]

飯田外：水産動物筋肉の生化学的研究

- 15) 新井健一 (1960a). 北大水産彙報 **11**, 67.
- 16) ——— (1960b). 同 誌 **11**, 225.
- 17) 吉川春泰・高橋泰常他編 (1958). 磷酸代謝実験法. [p. 196]. 東京; 広川書店.
- 19) Kerr, S. E. (1941). *J. Biol. Chem.* **139**, 121.