



| | |
|------------------|---|
| Title | 水産動物筋肉中の有機リン酸化合物に関する研究 XVIII : エゾアワビ筋肉中の酸可溶核酸成分について |
| Author(s) | 西田, 清義; NISHITA, Kiyoyoshi; 新井, 健一 他 |
| Citation | 北海道大學水産學部研究彙報, 17(3), 139-146 |
| Issue Date | 1966-11 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/23282 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 17(3)_P139-146.pdf |



水産動物筋肉中の有機リン酸化合物に関する研究 XVIII

エゾアワビ筋肉中の酸可溶核酸成分について

西田清義・新井健一・斉藤恒行

Studies on the Organic Phosphates in Muscle of Aquatic Animals XVIII Acid-soluble nucleotides in the muscle of abalone

Kiyoyoshi NISHITA*, Ken-ichi ARAI* and Tsuneyuki SAITO*

Abstract

The acid-soluble nucleotides in the muscle of abalone have been separated by anion-exchange chromatography and identified as follows;

(1) The substances other than nucleotides, have been separated and identified as homarine, tryptophane and unidentified substances which show the absorption maximum at about 330 m μ .

(2) In addition to AMP, ADP, and ATP which are observed as the main components, CDP or CDPX, UDP or UDPX, UTP, and GTP have been identified as minor components.

Furthermore, the approximate amounts of each of them were estimated.

緒 言

水産動物特に魚類筋肉の酸可溶核酸成分の定量および種々の条件下における変化に関してはすでに多くの報告がなされているが、水産無脊椎動物筋肉に関してはあまり多くの例をみない。従来まで見られるものとしては中島らのイカ、クルマエビ、貝柱についての報告¹⁾があるが、クルマエビ以外は新鮮な筋肉ではない。また新井は新鮮な 11 種の海産無脊椎動物筋肉について同成分の検討を行なっている²⁾。これらの研究では分析に供する試料が数グラム以内の少量であり、Adenine nucleotides, Hypoxanthine nucleotides などの主要成分のみを扱って、微量の高エネルギー核酸成分あるいはその他不安定な代謝中間生産物については従来まったく報告されていない。そこで著者らは水産無脊椎動物としてエゾアワビを選び、その筋肉中のそれら主要ヌクレオチド類および微量核酸成分の存在について検討した。

実験材料および方法

材料： 核酸関連標準試薬は下記のものを使用した。

Hypoxanthine, Adenine, UMP, CMP は和光純薬株式会社

本報告においては次の略称を使用した。

| | |
|--|---|
| AMP: Adenosine-5'-monophosphate | UDP: Uridine-5'-diphosphate |
| ADP: Adenosine-5'-diphosphate | UDPX: Uridine-5'-diphosphate derivative |
| ATP: Adenosine-5'-triphosphate | UTP: Uridine-5'-triphosphate |
| CDP: Cytidine-5'-diphosphate | GDP: Guanosine-5'-diphosphate |
| CDPX: Cytidine-5'-diphosphate derivative | GTP: Guanosine-5'-triphosphate |

* 北海道大学水産学部水産化学教室

Adenosine は東京化成工業株式会社

Inosine は L. Light & Co. Ltd.

AMP, ATP は Sigma Chem. Co.

GDP, UDP は C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim

試料: エゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) は函館近海産で、水揚げ数時間以内の生きているものを市場から求め、筋肉部を殻からはずして直ちに周縁部を削除した均質な筋肉部分を試料とした。

方法:

① 抽出方法

筋肉 50g を冷却した 0.6 N 過塩素酸 150 cc でホモジェナイズ (日本精機製ホモジェナイザー) したあと遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) により筋肉残渣を分離した。残渣はさらに 50 cc の 0.6 N 過塩素酸を加えて乳鉢中で摩砕再抽出を行なった。上澄液を合わせて 6 N 水酸化カリウムで PH 6.5 まで中和し、低温で約 1 時間静置して過塩素酸カリウムを晶出沈澱させたのち、遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) によって沈澱を除去し、抽出液とした。以上の操作は可及的低温で行なった。抽出液は直ちにイオン交換クロマトグラフィーに供した。

② イオン交換クロマトグラフィー

Dowex 1 X8 カラム (formate, ϕ 1.8 cm \times 17.5 cm, 100—200 mesh) を使用して Bergkvist の方法³⁾ (ギ酸及びギ酸ソーダ) に準じ低温室 (+5°C) 中で除イオン交換クロマトグラフィーを行なった。流速は 1—1.5 ml./min. で 10 ml. ずつ東洋科学産業株式会社製角型フラクションコレクターによって分取し、分取した各フラクションは吸収極大波長での吸光度で測定した。光電分光光度計は島津製 QR-50 型、自記光電分光光度計は島津製 SV-50 A 型を使用した。

③ 再クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーで得られた各画分は活性炭処理をして溶媒を除去したあと、再び Dowex 1 X8 カラム (formate, ϕ 1.1 cm \times 15 cm) でイオン交換クロマトグラフィーを行ない各成分を精製した。

④ 活性炭吸着および溶出

イオン交換クロマトグラフィーで分別した画分からギ酸ナトリウムを除去するために活性炭カラム (和光純薬製, クロマトグラフィー用活性炭) に通してヌクレオチドを吸着させた。カラムをよく水洗したあと、アンモニア性アルコール (エタノール: 濃アンモニア: 水 = 50: 2: 48 v/v) で溶出した。溶出液は直ちにロータリーエボレーターで 25°C 以下で減圧濃縮した。

⑤ ペーパークロマトグラフィー

あらかじめ 2N 酢酸で洗浄した東洋濾紙 No. 3 を使用した。展開剤として次の 7 種類を使用した。

- (1) 95% Ethanol-1M Ammonium acetate (PH 4.5) [65: 35 v/v]
- (2) 95% Ethanol-1M Ammonium acetate (PH 7.5) [75: 30 v/v]
- (3) 95% Ethanol-1M Ammonium acetate (PH 3.8) [75: 30 v/v]
- (4) Isoamylalcohol-5% Na₂HPO₄
- (5) Water (PH 10)
- (6) Isopropyl alcohol-satd. Ammonium sulfate-Water [2: 79: 19 v/v/v]
- (7) Isopropyl alcohol-concd. Hydrochloric acid-Water [170: 41: 39 v/v/v]

またアミノ酸のペーパークロマトグラフィーでは下記の 4 種類を使用した。

- (8) n-Butanol satd. Water
 (9) n-Butanol-Acetic acid-Water [4: 1: 2 v/v/v]
 (10) n-Butanol-Pyridine-Water [1: 1: 1 v/v/v]
 (11) Phenol-Water [4: 1 v/v]

各画分の成分を同定するためには同時に標準物質を展開した。ペーパークロマトグラフィーにより分別されたスポットは切り取って水または N/100 塩酸で一夜抽出し、紫外線吸収スペクトルの測定、リボースおよび磷酸の測定に使用した。クロマトグラムの検出は紫外線検出器 (東芝製 F1-3S型) によつて、またアミノ酸は 0.25% ニンヒドリンのアセトン溶液噴霧によつて行なつた。

⑥ 紫外線吸収スペクトルの測定

ペーパークロマトグラフィーで精製した後、各成分のスポットを溶出し、その溶出液について種々の PH のもとで測定した。また塩基成出の確認の方法として臭素化によるスペクトルの変化⁴⁾も調べた。なお紫外線吸収スペクトルは自記光電分光光度計 (島津製作所 SV-50A 型) を使用して求めた。

⑦ 赤外線吸収スペクトルの測定

粉末状の試料を KBr disk とし、日本分光製光研 DS-301 型を使用して測定した。

⑧ 全リン酸および不安定リン酸の測定

全リン酸は各ピークの成分を Fiske & SubbaRow 法⁹⁾に準じて分解し、また不安定リン酸は各成分を 1N 硫酸溶液中で 100°C, 10 分間加熱し、遊離した無機リン酸塩を中島らの方法⁹⁾によつて発色させ、呈色物質はイソブタノールで抽出して⁷⁾ 660 m μ における吸光度を測定した。

⑨ リボースの測定

オルシノール塩酸法⁸⁾によつて行なつた。プリンヌクレオチドは直接測定したが、ピリミジンヌクレオチドの場合は臭素処理⁹⁾をしたあと測定した。

⑩ 構成塩基の検出

塩基成分の検索のために 1N 塩酸溶液で 100°C 1 時間加熱した。これによりプリンヌクレオチドは塩基まで分解されるが、ピリミジンヌクレオチドは monophosphate までより分解されない。

実験結果

エゾアウビ筋肉 50 g の酸可溶核酸成分の典型的な溶出図を Fig. 1 に示した。各ピークは吸収極大波長における吸光度を測定して目盛である。これにより Adsorption & Water 画分と Peak I までの合計 10 の画分が得られた。極微量成分のピークについては 2~3 回分を合わせて充分な量を得てから性質の検討を行なつた。

Adsorption & water

これは抽出液をカラムに通した時の通過液とカラムの水洗液を合わせた画分である。ここには既に報告したホマリンと 330 m μ 付近に吸収極大を有する物質¹⁰⁾が含まれている。Dowex 1X8 カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィー¹¹⁾および展開剤 4, 5, 6 によるペーパークロマトグラフィーの結果では塩基、ヌクレオチドは検出されなかった。

Peak A

この画分の再クロマトグラフィーの結果、Optical density unit (O. D. unit) で 6% の成分 a と 94% の成分 b にわけられた。a は PH 2 で λ max. 275 m μ であり、281 m μ に肩を有する紫外線吸収スペクトルを示し、核酸関連物質以外のものと考えられるが本体不明である。

この画分の b 成分の紫外線吸収スペクトルは 273 m μ , 280 m μ , 289 m μ に吸収極大を有し、トリ

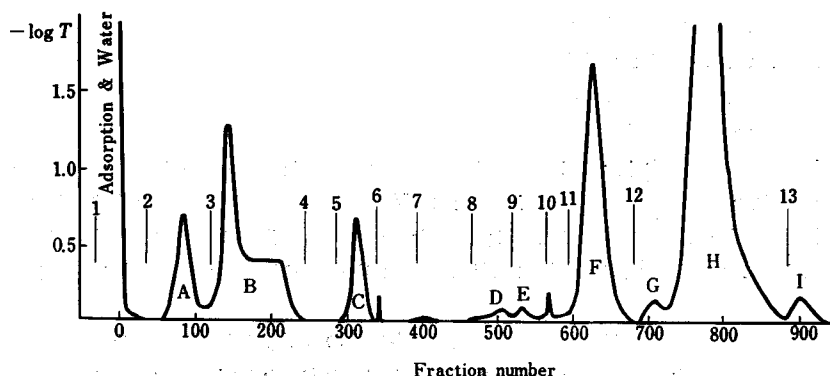


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of the acid-soluble nucleotides in the muscle of abalone
 Exchanger: Dowex 1 X8-formate, 100-200 mesh, ϕ 1.8 cm \times 17.5 cm

Eluting solution:

- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| (1) Adsorption & water | (2) 0.005 M Formic |
| (3) 0.02 M Formic | (4) 0.05 M Formic |
| (5) 0.1 M Formic | (6) 0.1 M Formic, 0.05 M Formate |
| (7) 0.1 M Formic, 0.1 M Formate | (8) 0.1 M Formic, 0.2 M Formate |
| (9) 0.1 M Formic, 0.3 M Formate | (10) 0.1 M Formic, 0.4 M Formate |
| (11) 0.1 M Formic, 0.5 M Formate | (12) 0.1 M Formic, 0.7 M Formate |
| (13) 0.1 M Formic, 1.0 M Formate | |

Flow rate: 1-1.5 ml./min.

Each 10 ml. fraction was collected by automatic fraction collector

プトファンのもので一致した。この成分は Adamkiewitz 反応および濾紙上での Ehrlich 反応を調べたところ、いずれも陽性であった。展開剤 8, 9, 10, 11 でのペーパークロマトグラフィーで標準トリプトファンに完全に一致した (Table-1)。さらに濃縮乾固して得た白色粉末を KBr disk として赤外線吸収スペクトルを測定して L-トリプトファンに完全に一致することを確認した。以上の結果からも成分は L-トリプトファンである。

Peak B

この画分には吸収極大が 310 m μ 付近および 330 m μ 付近にある 2 つの物質が溶出される。Adsorption & water 画分に見出される λ_{max} . 330 m μ の物質¹⁰⁾に類似の化合物であると考えられるが、本体は不明であり現在検討をつづけている。

Peak C

この画分は単一成分から成り紫外線吸収スペクトルは PH 2 で λ_{max} . 257 m μ , λ_{min} . 231 m μ であり、臭素化によってもスペクトルに変化なく、塩基はアデニンであることを示している。展開剤 4, 6 によるペーパークロマトグラフィーで標準 AMP と一致する単一のスポットを得た (Rf: 展開剤 4

Table 1. Paperchromatography of substance b in peak A

| | Solvent 8 | Solvent 9 | Solvent 10 | Solvent 11 |
|-------------|-----------|-----------|------------|------------|
| Peak A, b | 0.17 | 0.52 | 0.50 | 0.71 |
| Tryptophane | 0.16 | 0.50 | 0.50 | 0.72 |

AMP 0.73, Peak C 0.74, 展開剤 6 AMP 0.36, Peak C 0.37)。アデニン, 全リン酸, リボースのモル比は 1: 1.16: 1.00 であり, この画分は AMP である。

Peaks D and E

Peak D と Peak E は非常に量が少いうえに互に分離が不完全であったために合わせて再クロマト

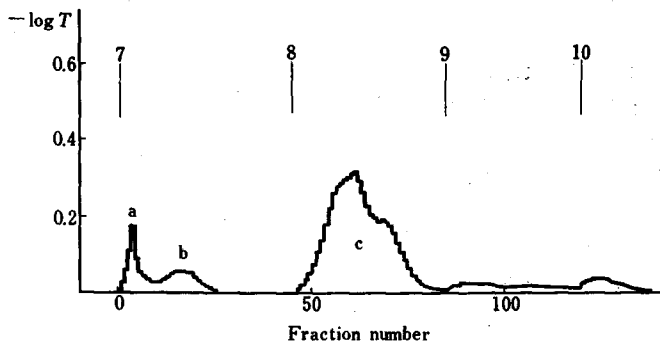


Fig. 2. Rechromatography of the peaks D and E

Exchanger: Dowex 1 X8-formate, 100-200 mesh, ϕ 1.1 cm \times 15 cm
Other experimental conditions are the same as in Fig. 1

得られた。このうち C_1 は PH 2 で λ_{max} . 254 m μ , λ_{min} . 230 m μ を示し, 臭素化で吸収スペクトルは完全に消失し, リン酸は含んでいない。今までのところ, この物質は本体不明であるが核酸関連物質以外のものであると考えられる。 C_2 の紫外線吸収スペクトルは PH 2 で λ_{max} . 262 m μ , λ_{min} . 231 m μ であり臭素化により特異的な吸収スペクトルは完全に消失した。また C_3 もこれとまったく同じ態度を示した。 C_2 , C_3 の混合溶液は 1N 塩酸で 100°C, 1 時間加水分解して展開剤 4 でペーパークロマトグラフィーを行なうと, UMP に一致する単一のスポットを与えた (Rf: UMP 0.84, 加水分解物 0.82)。これらのことは C_2 および C_3 の塩基はウラシルであることを示している。 C_2 はウラシル, 全リン酸のモル比が 1: 1.84 であり, C_3 のそれは 1: 1.74 であった。展開剤 1 による C_2 , C_3 の Rf は明らかに異なる (Rf: C_2 0.39, C_3 0.30, UDP 0.27)。以上の結果から Peak D, Peak E は UDP 誘導体と UDP あるいは UDP 誘導体だけから成っていると考えられる。これ以上の実験はサンプルが少量のために行なうことが出来なかった。

Peak F

この画分の再クロマトグラフィーの結果 O. D. unit で 7% の成分 a と 91% の成分 b とが得られた。展開剤 1 で a のペーパークロマトグラフィーを行ない, a_1 , a_2 および痕跡の a_3 のスポットを得た。 a_1 の紫外線吸収スペクトルはアデニンヌクレオチドであることを示し, アデニン, 全リン酸のモル比が 1: 1.06 であることから分解生成物は AMP と確認した。 a_2 の紫外線吸収スペクトルは PH 2 で λ_{max} . 280 m μ , λ_{min} . 240 m μ , PH 9 では λ_{max} . 270 m μ , λ_{min} . 247 m μ であり, 臭素化によりその特有なスペクトルは完全に消失した。このことから a_2 の塩基はシトシンでありシトシンと全リン酸のモル比は 1: 2.04 であった。サンプルが微量のため, これ以上の検討は出来なかったが, a_2 は CDP または CDPX であるが溶出位置から考えて CDP の可能性が高い。 b の吸収スペクトルは PH 2 において λ_{max} . 258 m μ , λ_{min} . 230 m μ を示し臭素化によってもスペクトルに変化を生じない。加水分解して展開剤 4 および 5 でペーパークロマトグラフィーを行ない, アデニンに一致する単一スポットを検出した (Rf: 展開剤 4 アデニン 0.39, 加水分解物 0.38,

グラフィーを行ない, Fig. 2 の溶出曲線を得た。この図によれば微量の夾雑物 a, b および主成分 C の 3 つにわかれている。主成分 C の溶出曲線の間中部は λ_{max} . 250 m μ 付近であり, その前後は λ_{max} . 260 m μ 付近であって, 2~3 成分の混合を暗示するような溶出曲線を示している。

展開剤 1 によるペーパークロマトグラフィーで C_1 , C_2 , C_3 の 3 個のスポットが

展開剤 5 アデニン 0.37, 加水分解物 0.35)。これらの結果から構成塩基はアデニンであり、アデニン、リボース、不安定リン酸、全リン酸は 1: 1.04: 0.82: 1.87 であった。溶出曲線上の位置、量的関係からも b は ADP である。

Peak G.

この画分の再クロマトグラフィーの結果を Fig. 3 に示した。b の紫外線吸収スペクトルは PH 2 において λ_{\max} . 262 $m\mu$, λ_{\min} : 231 $m\mu$ を示し、臭素化により特有なスペクトルは消失することから構成塩基はウラシルであることが判明した。展開剤 1 を用いたペーパークロマトグラフィーで標準の UDP は一致したことから、b は UDP であると考えられる (Rf: b 0.25, UDP 0.25)。

c は展開剤 1 によるペーパークロマトグラフィーで UDP に一致する痕跡のスポット C₁ とその下に主成分 C₂ のスポットが出現した (Rf: C₁ 0.25, C₂ 0.16, UDP 0.25)。これらはいずれもウラシルヌクレオチドの紫外線吸収スペクトルを示しており、全リン酸の測定は行なっていないが、b は Rf が標準 UDP に一致していることから考えて恐らく C₂ の分解生成物 UDP であって、展開剤 1 では triphosphate は diphosphate よりも Rf が小さいことから考えると C₂ は UTP であると考えられる。

Peak H

この画分は再クロマトグラフィーによって 25% の a と 68% の b に大きく分別された。b の紫外線吸収スペクトルは典型的なアデニンヌクレオチドであることを示した。アデニン、リボース、不安定リン酸、全リン酸は 1: 0.93: 1.85: 2.84 であった。展開剤 2, 3 によるペーパークロマトグラフィーで標準 ATP に完全に一致した (Rf: 展開剤 2, ATP 0.05, b 0.05, 展開剤 3, ATP 0.14, b 0.13)。溶出曲線上の位置、大量に存在することなども考えに入れて、この画分は ATP である。

なお a はアデニンヌクレオチドの紫外線吸収スペクトルを示し、アデニン、リボース、不安定リン酸、全リン酸のモル比は 1: 1.03: 0.88: 1.93 であった。この結果から ADP であることを確認した。これは活性炭処理の間に ATP が分解して生じたものと考えられる。

Peak I

この画分は再クロマトグラフィーにより 16% の a, 26% の b, 59% の c に分別された。a には Peaks D and E における C₁ と同じ紫外線吸収スペクトルを示し、リン酸の結合していない物質が含まれている。本物質の特性については検討していない。

b は pH 2 で λ_{\max} . 257 $m\mu$, λ_{\min} . 229 $m\mu$ を示し、280 $m\mu$ 付近に肩を有しており、PH 11 ではこの肩が 270 $m\mu$ 付近に移動し、さらに臭素化によりスペクトルは完全に消失した。これはグアニンヌクレオチドの典型的なスペクトルである。グアニン、全リン酸のモル比は 1: 2.15 であり、展開剤 1 によるペーパークロマトグラフィーで標準 GDP に一致した (Rf: GDP 0.16, b 0.15)。これは後述する C の分解生成物であろうと考えられる。

c は b の紫外線吸収スペクトルとまったく同じ型を示し、構成塩基はグアニンである。グアニン、

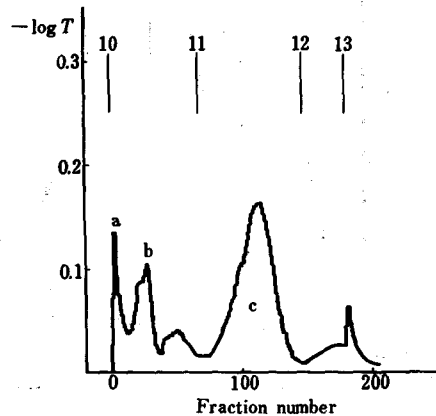


Fig. 3. Rechromatography of the peak G
Experimental conditions are the same as in Fig. 2

全リン酸のモル比は 1: 2.78 であることから, c は GTP である。

考 察

エゾアワビ筋肉の酸可溶核酸成分のイオン交換クロマトグラフィーによる分析の結果から各種ヌクレオチドの含有量を概算して Table 2 に示した。この結果を新井が報告しているエゾアワビ筋肉の主要ヌクレオチドについての分析値¹²⁾と比較するとよく一致している。

Table 2. Acid-soluble nucleotide content of muscle of abalone

| Nucleotide | Content ($10^{-2}\mu\text{mole/g. fresh weight}$) | Percent |
|-------------------------|--|---------|
| AMP | 17 | 5.1 |
| ADP | 73 | 21.7 |
| ATP | 230 | 67.9 |
| UDP UDP-derivatives} | 6.8 | 2.0 |
| CDP (or CDPX) | Trace | — |
| UTP | 5.6 | 1.7 |
| GTP | 5.8 | 1.7 |

また, ATP, ADP, AMP の主要成分のほかにごく微量の成分として UDP または UDPX, CDP または CDPX, UTP, GTP が確認された。塩基およびヌクレオチドがまったく検出されなかったことは, すでに新井によって報告されており¹²⁾, 他の動物には見られないきわめて特異的な現象である。CDP, UDP, UTP, GTP などの高エネルギーリン酸化合物も常に見出されるとは限らず, 量的な変動はかなり大きいように見受けられた。これらは筋肉の生理的条件はもちろんのこと生活環境条件個体差によるところが大きいと考えられる。さらに生体内における糖類代謝に重要な関係をもっている Nucleotide sugar として UDP 誘導体の存在を確認した。しかし一般に筋肉 50 g 程度を使っての分析ではこれらの誘導体を詳細に研究することは困難である。著者らはエゾアワビ筋肉を多量に使用して現在まで不明の諸点についても解明のための検討を重ねている。

要 約

エゾアワビ筋肉の酸可溶核酸成分を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析した。

- 1, 核酸関連成分以外の成分としてホマリン, トリプトファン, および $\lambda \text{ max.}$ を 330 m μ 付近に有する未同定の化合物の存在を認めた。
- 2, 核酸関連成分として AMP, ADP, ATP の主要成分のほか微量成分として CDP または CDPX, UDP または UDPX, UTP, GTP の各成分を確認した。

また, それらの成分の含有量を概算した。

文 献

- 1) 中島宣郎, 市川恒平, 鎌田政喜, 藤田栄一郎 (1961). 農化誌 **35**, 803.
- 2) 新井健一 (1966). 日水誌 **32**, 174.

- 3) Bergkvist, R. and Deutch, A. (1954). *Acta chem. Scand.* **8**, 1877.
- 4) Suzuki, T. and Ito, E. (1958). *J. Biochem.* **45**, 403.
- 5) Fiske, C. H. and Subba Row, Y. (1925). *J. Biol. Chem.* **66**, 575.
- 6) 中島宣郎. 市川恒平. 吉村育子. 栗山千枝子. 鎌田政喜. 藤田栄一郎 (1963). *農化誌* **37**, 558.
- 7) Allen, R. J. L. (1932). *Biochem. J.* **26**, 292.
- 8) Ashwell, G. (1957). "Methods in Enzymology" Vol. 3, P 88, Academic Press, New York.
- 9) Cohn, W. E. (1956). *Biochem. J.* **64**, 28.
- 10) 西田清義, 新井健一, 齊藤恒行 (1965). *北大水産集報* **16**, 114.
- 11) 新井健一, 齊藤恒行 (1963). *日水誌* **29**, 168.
- 12) 新井健一 (1961). *北大水産集報* **11**, 225.