HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産動物臓器の有機燐酸化合物に関する研究 II：コイ肝臓中の酸可溶性核酸成分について
Author(s)	関, 伸夫; 斎藤, 恒行
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 18(3), 231-239
Issue Date	1967-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23321
Type	departmental bulletin paper
File Information	18(3)_P231-239.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

水産動物臓器の有機燐酸化合物に関する研究 II
コイ肝臓中の酸可溶性核酸成分について

関　伸夫*・斎藤　恒行*

Studies on the Organic Phosphates in Viscera of Aquatic Animals II
Acid-soluble nucleotides in the liver of carp

Nobuo Seki and Tsuneyuki Saito

Abstract

The acid-soluble nucleotides and related substances of the liver of carp have been separated by anion-exchange chromatography at low temperature.

The following nucleotides have been characterized and identified: CMP, AMP, ADP, IMP, UMP, UDP, UDPAH, UDPH, UDPUA, GMP, NAD, NADP and ADPR.

In addition, the following nucleosides, bases and a few unidentified substances were found: uracil, guanine, hypoxanthine, xanthine, uridine, inosine, adenosine, guanosine, nicotinamide, CDP derivative and AMPS (or AMPS derivative).

Among the nucleosides and bases identified from the liver of carp, inosine is the major component. The nucleotide pattern obtained is different from that reported in the preceding paper for the hepatopancreas of abalone.

Neither pyridine nucleotides nor UDPUA were detected in the hepatopancreas of abalone.

先に著者らは水産無脊椎動物の１種として，エゾアワビ肝膵臓中の酸可溶性核酸成分について分析を行い，従来行つて来たアワビ筋肉の結果と比較検討し，両者の組成にきわめて顕著な特異性のあることを指摘した。さらに動物の生理，生態を特徴づける代謝過程は当然その主要器官の成分にも関係を持つことは予想されるので，各種動物の肝臓を用い，その種による酸可溶性核酸成分の違いを検討することは意義のあることと考えられる。そこで今回は脊椎動物のコイを選び，コイ肝臓中の酸可溶性核酸成分について分析を行い，アワビとは質的にも，また量的にもこれらの成分に可成りの相異のあることを認めたので，ここに報告する。

実　験　方　法

試料として用いた市販の養殖コイ (*Cyprinus carpio*) は撲殺した後，直ちに肝臓を採取，秤量し，前報[1] に準じて処理，および酸可溶性成分の分析を行なつた。即ち，２倍量の冷 0.6N-$HClO_4$ によりらいかい抽出し，遠心分離後，上澄液を 6N-KOH で中和し，生じた $KClO_4$ を除いた。濾液は活性炭処理を行った後，アニオン交換クロマトグラフィーに供した。ヌクレオシドおよび塩基画分の再クロマトグラフィーは，新井・斎藤の方法[2] に準じて行った。

* 北海道大学水産学部水産化学教室

ペーパークロマトグラフィーの溶媒は次のものを使用した。

1 H_2O (pH 10)
2 iso-propylalcohol-sat. $(NH_4)_2SO_4$-H_2O (2 : 79 : 19)
3 iso-propylalcohol-N-HCl (8 : 2)
4 methylalcohol-28% NH_4OH-H_2O (6 : 1 : 3)
5 ethylalcohol-M-ammonium acetate buffer, pH 3.8 (75 : 30)
6 ethylalcohol-M-ammonium acetate buffer, pH 7.5 (75 : 30)
7 n-butanol-acetic acid-H_2O (2 : 1 : 1)

濾紙泳動には, pyridine-acetic acid-H_2O (1 : 10 : 289, pH 3.6) を用い, 濾紙は東洋濾紙 No. 50 を使用した。電圧は 25V/cm をかけ, 3.5 時間泳動させた。

標準試薬は前報の他に次のものを用いた。

nicotinamide, galacturonic acid は和光純薬工業株式会社, glucuronic acid (lactone form) は東京化成工業株式会社, NAD は Sigma Chemical Company. 製。

実 験 結 果

コイ肝臓 24g 相当の過塩素酸抽出液のアニオン交換クロマトグラムを Fig. 1. に示した。図の様に, 1から 17 までのピークが得られた。

Peak 1

このピークはイオン交換樹脂に吸着されなかつた画分, および水で溶出された画分で, ヌクレオシドおよび塩基類が含まれることが考えられる。この画分の再クロマトグラムを, Fig. 2 に示した。得られた各画分は HCl で酸性とし, 活性炭処理を行い溶離剤を除去した。活性炭よりアンモニア性アルコールで溶出, 乾固したのち, 各ピークについて検討を加えた。

1-1 : このピークの紫外線吸収スペクトルは, pH 2 で λmax 262 mμ, pH 11 で同じく λmax 262 mμ にある。これはニコチン酸アミドと同一のスペクトルである。溶媒 6 で, ペーパークロマトグラフィーを行うと Rf 0.82 を示し, 標準のニコチン酸アミドに一致するので, このものはニコチン酸アミドと同定した。

1-2 : このピークからは溶媒 1 で Rf 0.73 および 0.50 を示す 2 個のスポットが得られる。Rf の大なる方を 1-2-a, 小なる方を 1-2-b とする。

1-2-a は pH 2 で λmax 260 mμ, pH 11 で λmax 267 mμ のスペクトルを示す。リボースは検出されない。紫外線吸収スペクトルから, ウラシルと推定した。

1-2-b はアデノシンのスペクトルを示し, 塩基とリボースのモル比は 1 : 0.88 である。溶媒 1, 2, 3 で標準のアデノシンとともにペーパークロマトグラフィーを行うと, Rf 0.50, 0.18, 0.17 を示し, いずれも標準品に一致をみるので, このものはアデノシンである。

1-3 : このピークからも溶媒 1 でペーパークロマトグラフィーを行うと, Rf 0.82 と 0.37 を示す 2 成分より成り, それぞれ標準のウリジンおよびグアニンに一致する。紫外線吸収スペクトルの結果からも, 前者は pH 2 および pH 11 で λmax 263 mμ, 後者は pH 2 で λmax 248 mμ を示す。後者からはリボースは検出されなかつた。以上の結果から, このピークにはウリジンとグアニンが含まれる。

1-4 : このピークは溶媒 1, 2, 3 でペーパークロマトグラフィーを行うと, それぞれ Rf 0.52, 0.40, 0.23 を示し, いずれも標準のヒポキサンチンに一致するスポットをうる。紫外線吸収スペクトルは, pH 2 で λmax 250 mμ, pH 11 で λmax 259 mμ にある。以上からヒポキサンチンと同定した。

1-5 : このピークを溶媒 1 および 2 でペーパークロマトグラフィーを行なうと, Rf 0.72 と 0.57, および Rf 0.43 と 0.41 を示す 2 個のスポットが得られる。これらの紫外線吸収スペクトルは, いず

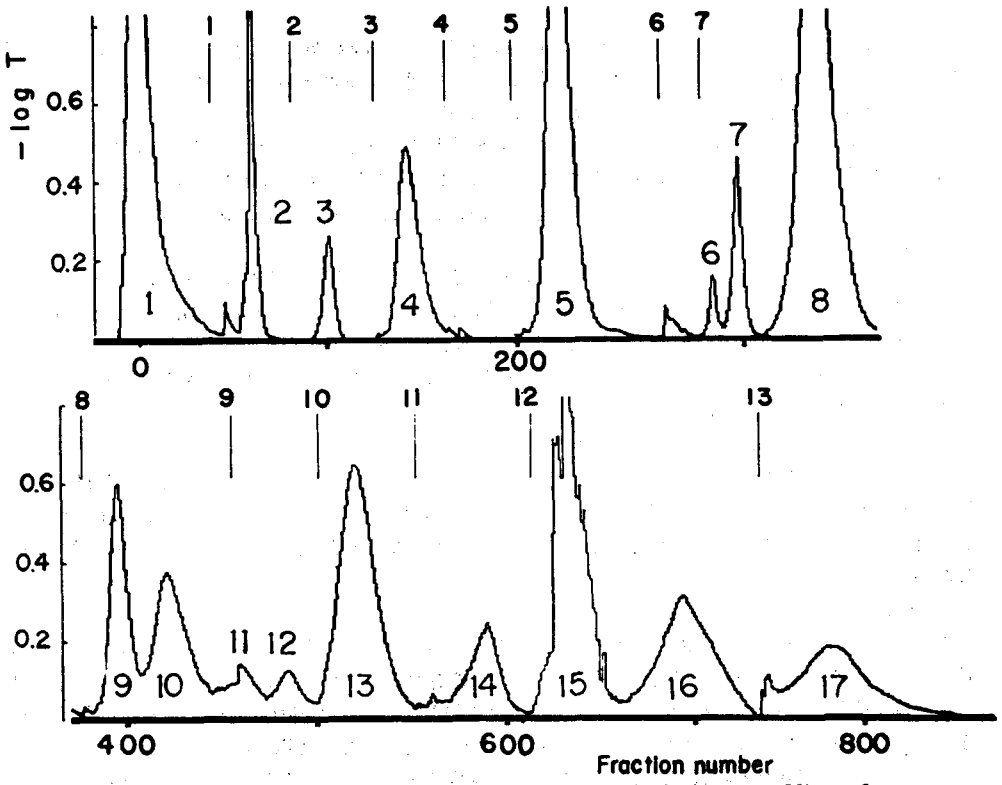

Fig. 1. Anion-exchange chromatography of the acid-soluble fraction of liver of carp

The acid-soluble substances of liver (24 g.) were extracted with 0.6 N-perchloric acid and chromatographed on a column (ϕ 1.2 cm×18 cm) of Dowex 1×8 (formate, 100–200 mesh) and then, eluted by the stepwise system as shown in the preceding paper. Fraction size was 10 ml.

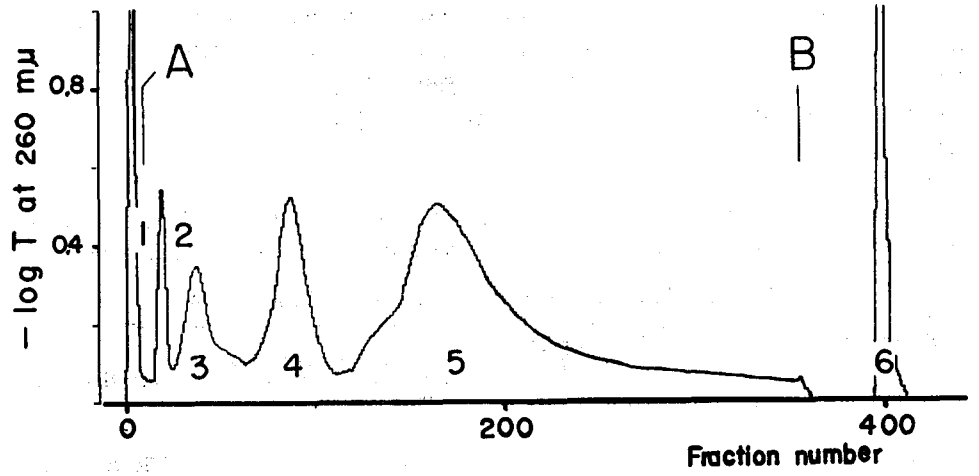

Fig. 2. Rechromatography of peak 1

After charcoal treatment, peak 1 (equivalent to 56 g. of liver) was adjusted pH 10–11 with NH_4OH and put on a column of Dowex 1×8 (Cl^- form, 100–200 mesh, ϕ 1 cm×10 cm). Eluting solutions: A) 0.1 N NH_4OH–0.035 N HCl–0.005 N $Na_2B_4O_7$, B) 0.001 N HCl–0.0002 N $Na_2B_4O_7$.

れも Rf 値の大なる方がイノシン (λ max 250 mμ (pH 2), λ max 254 mμ (pH 11)), 小なる方がグアノシン (λ max 253 mμ (pH 2)) を示し, 塩基1モルに対するリボースのモル比は 1.02 と 0.82 である。以上から, それぞれイノシンとグアノシンと同定した。

1-6: このものを溶媒 1, 2, 3 でペーパークロマトグラフィーを行うと Rf 0.72, 0.43, 0.26 を示し, いずれも標準のイノシンおよび1-5から得たイノシンに一致する。紫外線吸収スペクトルもイノシンのそれと同一である。リボースは塩基1モル当り 0.92 であった。以上からこのものはイノシンである。

Peak 2

溶媒1でペーパークロマトグラフィーを行うと, Rf 0.85 と 0.55 を示すスポットが得られる。Rf 値の大なる方は, シチジンヌクレオチドの紫外線吸収スペクトルを示し, 塩基と総リン酸のモル比は, 1 : 1.80 である。溶出位置から, このものは CDP 誘導体と推定される。

Rf 値小なる方は, リン酸, リボースともに検出されず, キサンチンの紫外線吸収スペクトルを示すので, これはキサンチンと同定した。

Peak 3

このピークはシチジン系ヌクレオチドの紫外線吸収スペクトルを示し, シトシンと総リン酸のモル比は, 1 : 0.83 である。標準の 5'-CMP とともに溶媒 4, 5, 6 でペーパークロマトグラフィーを行うと, それぞれ Rf 0.53, 0.37, 0.58 を示し, いずれも標準品に一致する。以上から, このものは CMP である。

Peak 4

このものは紫外線吸収スペクトルはアデノシンに似るが, KCN 添加[3] により, 新たに 327 mμ にピークが現れる。Rosenberg らの方法[4] で, このものをオートクレーブ分解 (120°, 15 lb, 7 分間) し, 分解生成物をペーパークロマトグラフィーにより検討すると, 3個のスポットが得られる。これらは, ニコチン酸アミド, AMP, ADPR (ADP-Ribose) と同定した (Table 1)。以上から, このものは NAD と推定される。NAD, リボース, 総リン酸のモル比は 1 : 1.71 : 1.80 である。また標準の NAD とともに溶媒 4, 5, 6 を用いて, ペーパークロマトグラフィーを行うと, Rf 0.45, 0.16, 0.18 を示し, いずれも標準品に一致するので, このものは NAD と同定した。

Peak 5, 7, 8, 9, 12, 13 の各ピークは紫外線吸収スペクトル, リン酸, リボースの定量値, ペーパークロマトグラフィーなどの分析結果より, それぞれ, AMP, UMP, IMP, UDP-N-acetylglucosamine (UDPAG) および UDP-N-acetylgalactosamine (UDPAGal) の混合物, UDP, ADP と同定した (Table 2)。また, これらのピークは前報のアワビ肝膵臓から得た, Peak H, J, L, M-a, O, P の各ピークと同一のものである。Peak 6 は Peak I に相当し, 未同定ではあるが核酸成分ではないと考えられる。

Peak 8

このピークは溶出の後半に E_{250}/E_{260} の値が小さくなるので IMP の他に少量の成分が混在していることが考えられる。このものは溶媒 5, 6 でペーパークロマトグラフィーを行うと R IMP, 0.45,

Table 1. Analysis of autocleaved products of the peak 4

Paper chromatography Rf		U. V. Spectra λ max (mu)		Ribose per mole base	Total phosphate per mole base	Identification
Sol. 5	6	pH 2	pH 11			
0.78	0.78	262	262	—	—	Nicotinamide
0.37	0.25	258	260			AMP
0.16	0.26	258	260	1.68	1.98	ADPR

Table 2. Separation and characterization of acid-soluble nucleotides from liver of carp

Peak	λ max (mu)		Ribose per mole base	Total phosphate per mole base	Sugar after hydrolysis	PC* Rf values			Identification	Content umoles/g wet weight
	pH 2	pH 11				Sol. 4	5	6		
3	280	271		0.83		0.53	0.37	0.38	CMP	0.06
4	260	260	1.71	1.80		0.45	0.16	0.18	NAD	0.16
5	258	260	0.91	0.89		0.44	0.34	0.15	AMP	0.50
7	262	262	0.81	0.88		0.62	0.41	0.21	UMP	0.16
8-1	250	254	0.92	0.96		0.61	0.32	0.21	IMP	0.86
8-2	260	260	1.96	3.14					NADP	
9	262	262	0.95	2.10	N-acetyl glucosamine N-acetyl galactosamine		0.33	0.37	UDPAG } UDPAGal }	0.30
10-1	262	262		1.94	glucose galactose		0.26	0.32	UDPG } UDPGal }	0.18
10-2	256		0.87	0.77			0.33	0.10	GMP	0.17
11	258	260	1.70	1.88			0.16	0.26	ADPR	0.04
12	262	262					0.27	0.18	UDP	0.10
13	258	260		1.85		0.21	0.14		ADP	0.45
14	262	262		2.02	gluculonic acid galacturonic acid		0.58**	0.22**	UDPUA	0.19
16	258	260							unidentification	
17	267	269	0.90	0.98					AMPS or AMPS derivative	0.19***

* PC is paper chromatography using Toyo Roshi filter paper No. 3. Solvent systems: 4; methylalcohol-28% NH_4OH-H_2O (6:1:3). 5; ethylalcohol-M-ammonium acetate buffer pH 3.8 (75:30). 6; ethylalcohol-M-mammonium acetate buffer pH 7.5 (75:30).

** Values are expressed as RUDP.

*** Value is calculated as AMPS (adenylosuccinic acid).

0.44 をそれぞれ示す。紫外線吸収スペクトルは NAD と似たスペクトルで，KCN 添加を行うと NAD と同じ様に，327 mμ に新しいピークが現われる。NAD，リボース，総リン酸のモル比が，1：1.96：3.14 であることから，このものは NADP と考えられる。

Peak 10

このピークは溶媒6でペーパークロマトグラフィーを行うと，Rf 0 32 および 0.10 を示す2個のスポットをうる。Rf 値の大なる方から 10-1，10-2 とする。

10-1：紫外線吸収スペクトルはウリジンを示し，塩基と総リン酸のモル比は 1：1.94 である。溶媒 5，6 でペーパークロマトグラフィーを行なうと，Rf 0.26，0.32 を示し，いずれも標準の UDP-glucose (UDPG) に一致する。N/100 HCl，100°，15 分間このものを分解すると，UMP と UDP が検出される。糖部分ではアニリンヒドロジンフタレートを噴霧すると，グルコースとガラクトースに一致する 2 個の褐色スポットを得る (Fig 3)。以上からこのものは，UDPG と UDPGal (UDP-galactose) との混合物である。

10-2：これは Table 2 の分析結果から GMP と同定した。

Peak 11

このヌクレオチドは，アデノシンに似たスペクトルを示す。ピーク 4 (NAD) のオートクレーブ分解で得た ADPR とともに溶媒 5, 6 でペーパークロマトグラフィーを行うと Rf 0.16, 0.26 をそれぞれ示し，両者は一致する。塩基，リボース，総リン酸のモル比は 1:1.70:1.80 である。以上から，このものは ADPR と考えられる。

Peak 14

このピークは典型的なウリジン系ヌクレオチドの紫外線吸収スペクトルを示し，ウラシルと総リン酸のモル比は 1:2.02 であるが，溶媒 5, 6 でペーパークロマトグラフィーを行うと，それぞれ RUDP, 0.58, 0.22 を示すので，UDP 誘導体と考えられる。N/100 HCl 加水分解を行うと，UMP と UDP に一致するスポットを得る。

糖部分は ethylacetate-acetic acid-H_2O-formic acid (18:3:1:4) で展開すると，ウロン酸に相当するスポットが現われる。また Gee らの方法[5]に従って pH 2, 80°, 30 分間ラクトン化し，ethylacetate-pyridine-H_2O-acetic acid (5:5:3:1) でペーパークロマトグラフィーを行い，アニリン-トリクロル酢酸塩で発色させると，標準のグルクロン酸(ラクトン型)とガラクチュロン酸に相当するスポットが検出される。またラクトンは hydroxamic acid-ferric chloride を噴霧して発色させた (Fig 4)。以上から，糖部分はグルクロン酸とガラクチュロン酸の混合物で，このピークは UDP-glucuronic acid と UDP-galacturonic acid から成るものと推定される。

Peak 15

このピークはアニオン交換樹脂からの溶出が不均一であるので，活性炭処理，EDTA 洗浄を行なった後，再クロマトグラフィーを行ったが，再クロマトグラフィーからは，ピークが得られなかった。おそらくピーク 15 は不純物による goast peak と思われる。

Peak 16

このピークの紫外線吸収スペクトルはアデノシンに似ているが，検討中である。ATP とはペーパー

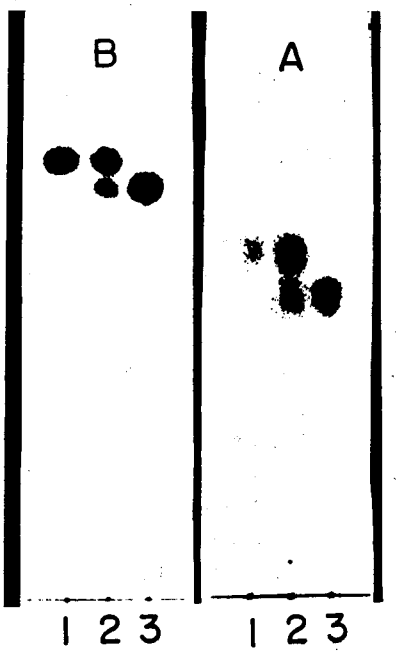

Fig. 3. Paper chromatography of suger moieties obtained by acid hydrolysis of the peak 10–1

1; Auth. glucose, 2; Hydrolysates of the peak 10–1, 3: Auth. galactose. Solvents: A) n-butanol-pyridine-H_2O (6:4:3) for 17 hours × 2. B) ethylacetate-pyridine-H_2O (2:1:2) for 9 hours × 2.

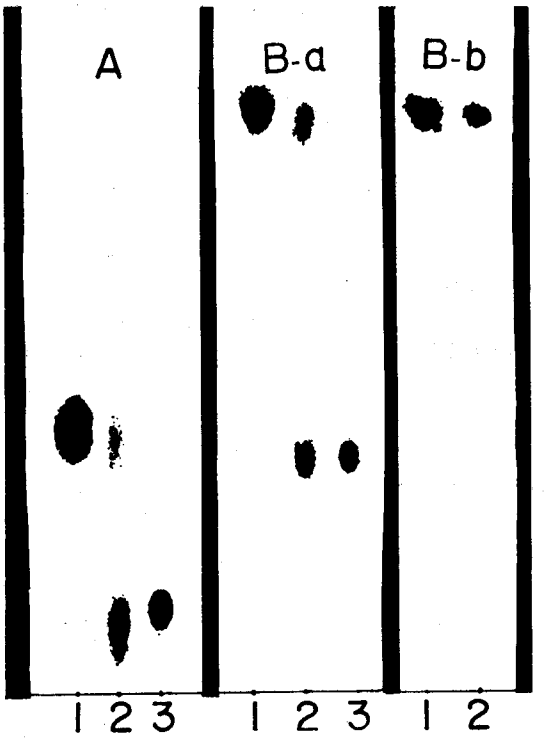

Fig. 4. Paper chromatograms of sugar moieties obtained by acid hydrolysis of the peak 14

1; Auth. glucuronic acid (lactone form). 2; Sugar moieties obtained from the peak 14. 3; Auth. galacturonic acid.

A) Decending chromatography was carried out on Toyo Roshi filter paper No. 50 and spots were revealed by applying the anilinhydrogenphthalate spray. B) After lactonized (pH 2, 80°, 30 min.), B-a was tested with anilintrichloroacetic acid and B-b with the hydroxamic acid-ferric ion test for lactone. Soluvent systems: A) ethylacetate-acetic acid-H_2O-formic acid (18 : 3 : 1 : 4) B) ethylacetate-pyridine-H_2O-acetic acid (5:5:3:1).

クロマトグラフィーで一致しない。

Peak 17

このものは溶媒 5, 6, 7 でペーパークロマトグラフィーを行うと Rf 0.20, 0.05, 0.38 を示すスポットを得る。紫外線吸収スペクトルは Fig. 5 に示す様に Adenylosuccinic acid (AMPS) のスペクトル[6)7)] に似ている。このものを N-HCl, 100°, 20 分間分解すると AMPS の aglycone のスペクトル[6)8)] と同一のスペクトルを示し，さらにこれを N-HCl, 100°, 5 時間，封管中で加水分解し，生成物を濾紙泳動で検討すると，アスパラギン酸とグリシンと思われるニンヒドリン陽性のスポットをうるので，このものの塩基は 6-succinoamino purine である。AMPS，リボース，総リン酸のモル比は 1 : 0.90 : 0.98 であり，リボースは臭素処理を行なわずとも発色する。

試料が少なくこれ以上の検討は行えなかったが，タラ肝臓[9)]，サケ肝臓[10)] には AMPS 誘導体の報告があるので，このものについても AMPS 誘導体の可能性もあり，あらためて検討したい。

コイの肝臓中のヌクレオチド含量は分子吸光

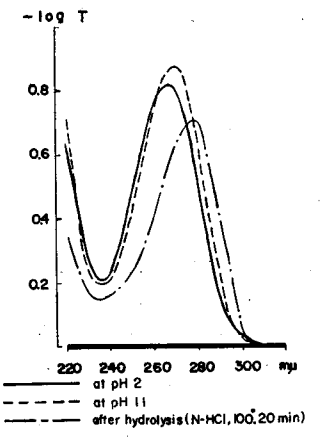

Fig. 5. Absorption spectra of the peak 17

係数を用いて概算し，その結果を Table 2 の最後の行に示した。

考　　察

先に行ったアワビ肝膵臓と，コイの肝臓中の酸可溶性核酸成分を比較してみると，アニオン交換樹脂より，水で溶出される画分は，ニコチン酸アミドを除けば両者とも成分的には大差はなく，主成分はイノシンである。コイ肝臓では，この画分は 260 mμ での総吸光値のおよそ 12.3% を占めている。

ヌクレオチドでは，アワビに見出された AMP, UMP, IMP, ADP, UDP, UDPH, UDPAH, GDP の他に，さらに CMP, NAD, NADP, 還元型 NAD の酸分解物[11] である ADPR および UDPUA を同定し，二，三の未同定のヌクレオチドが認められた。コイ肝臓中のヌクレオチド組成を，ラッテ肝臓[12][13] のそれと較べると，ラッテ肝臓に存在するシチジン，グアノシン，アデノシン，ウリジンの各トリリン酸あるいはジリン酸などの高エネルギー化合物は少なく，ほとんどコイ肝臓には認めることが出来なかった。

今回の分析では IMP が全ヌクレオチドの約 26% を占めており，コイ肝臓では本質的に IMP 含量が高いものかどうかは疑問であるが，従来肝臓中における AMP deaminase の作用に関する研究は adenosine deaminase との関連において，その活性を否定するもの[14]，積極的に肯定するもの[15] といろいろである。従って，各種水産動物肝臓中の，これらの酵素作用に関する研究の必要性を痛感する。

UDP-糖化合物に関しては，UDPAH が主であるが，コイでは UDPH, UDPUA が，可成りの量見出される。UDP-糖化合物が，ウリジンヌクレオチドに占める割合は，およそ 72% であるが，アワビでは約 45% で UMP 含量が高い。

また，ウリジンヌクレオチドは，全ヌクレオチドの 28% を占め，コイ筋肉の主成分がアデノシンヌクレオチドであるのに比して，ウリジンヌクレオチドの比率が高くなっているのは，アワビ内臓と筋肉の違いと全く同様の傾向にあり，肝臓機能の本質的な意義を示すものと解される。

要　　約

コイ肝臓中の酸可溶性核酸成分を分析し，CMP, AMP, ADP, IMP, UMP, UDP, UDPAH, UDPH, UDPUA, GMP, NAD, NADP, ADPR を同定し，ヌクレオシドおよび塩基成分として，uracil, guanine, hypoxanthine, xanthine, uridine, inosine, adenosine, guanosine を確認し，さらに 2, 3 の未同定の化合物を認めた。コイ肝臓中のこれらの化合物のパターンは先に報告したアワビ肝膵臓と比較して，かなりの差異が認められた。

文　　献

1) 関　伸夫・新井健一・斎藤恒行 (1967). 北大水産彙報 **17**, 184.
2) 新井健一・斎藤恒行 (1963). 日水誌 **29**, 168.
3) Ciotti, M.M. & Kaplan, N.O., (1957). Methods in Enzymology, vol 3, 890.
4) Rosenberg, S. & Bovarnik, M.R., (1954). J. Biol. Chem., **211**, 763.
5) Gee, M. & Mc Cready, R.M., (1957). Anal. Chem., **29**, 257.
6) Carter, C.E. & Cohen, L.H., (1956). J. Biol. Chem., **222**, 17.
7) ——— & ——— (1955). J. Am. Chem. Soc., **77**, 499.
8) ——— (1956). J. Biol. Chem., **223**, 139.
9) Story, I.D.E. & Love, D.N., (1956). Biochem. J., **64**, 53P.

10) Tsuyuki, H. & Idler, D. R., (1957). J. Am. Chem. Soc., **79**, 1771.
11) Forest, R. J., Wilken, D. R. & Hansen, R. G., (1960). Biochem. Biophys. Acta., **37**, 551.
12) Hurlbert, R. B., Schmitz, H. & Brumm, A. F., (1954). J. Biol. Chem., **209**, 24.
13) Donath, R., (1964). Z. Physiol. Chem., **337**, 1.
14) Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H. (1952). J. Biol. Chem., **195**, 161.
15) Kizer, D. E., Cox, B., Lovig, C. A. & de Estrugo, S. F., (1963). Ibid. **238**, 3048.