HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ピリジンヌクレオチド類のDEAE-Sephadexカラムクロマトグラフィー
Author(s)	外岡, 秀一; 佐々木, 昭雄; 柿本, 七郎
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 38, 46-52
Issue Date	1978-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26508
Type	departmental bulletin paper
File Information	38_P46-52.pdf

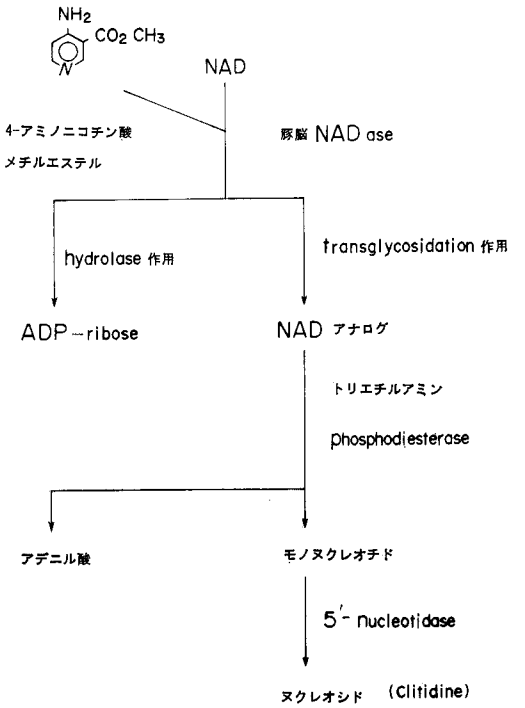
Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ピリジンヌクレオチド類の DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー

外岡秀一　佐々木昭雄*　柿本七郎
(北海道大学免疫科学研究所化学部門, *細菌感染部門)

(昭和52年12月12日受付)

東北地方において，しばしば中毒事件を起こす毒キノコの1種にヤブシメジ (*Clitocybe acromelalga*, Ichimura) がある。最近，このキノコの有毒成分として，松本ら[1]によって，新らしいピリジンヌクレオシドが単離され，clitidine と名付けられた。牛沢らは[2]，このものの薬理作用について報告し，さらに病理学的検討を行っている。clitidine は NAD に関連するヌクレオシドを除くと，天然に初めて見出されたピリジンヌクレオシドであるので，このものだけでなく，その近縁の化合物にも何らかの生理活性が期待される。そこで我々は clitidine を，図-1に示したような酵素反応を利用して比較的簡単に，しかも効率よく合成する方法を見出した[3]。同様な方法でその近縁化合物も合成すべく研究中であるが，その過程で検討を要したのは，中間生成物の単離精製法である。従来，核酸系化合物の精製法として陰イオン交換樹脂 Dowex 1 を使った例が数多く報告されているが[4),5]，溶離に高濃度の塩や，pH 2附近の酸性条件を用いているので，試料の安定性に問題がある場合には，不向きである。我々の目的とするヌクレオチド類は中性附近では安定であったが，強い酸性条件下では分解する可能性も考えられた。そこで Dowex よりも温和な条件で溶離出来る陰イオン交換樹脂 DEAE-Sephadex A-25 を選び，分離条件を検討した。



図—1　Clitidine の酵素的合成法

実験材料および方法

NAD (Grade III, Sigma 社), phosphodiesterase (PDE, from snake venom, Boehringer-Manheim 社), 5′-nucleotidase (from snake venom, Grade III, Sigma 社) は市販品を使用した。4-アミノニコチン酸，およびそのメチルエステルは，Herz らの方法[6]に従って β-ピコリンより，4段階および5段階の反応で合成した。NADase は Kaplan らの方法[7]に従い，豚脳の homogenate より前報[8]におけると同様にして調製した。NAD の INH および INA アナログは既報[9]の方法で合成した。

薄層クロマト (TLC) は，次の2種類の系で行った。System A: Silicagel H (Merck 社) に F_{254} 蛍光指示薬 (Merck 社) を3%の割合で混合し，0.25 mm の厚さに塗布したプレートを使用し，アンモニア蒸気を飽和した iso-PrOH-H_2O (3:2, v/v) で展開した。System B: 市販の cellulose F アルミニウムシート (Merck 社) を使用し，EtOH-acetone-AcOH-3%NH_4OH (7:5:3:5) で展開した。DEAE-Sephadex (A-25, 3.5 meq/g) カラムクロマトグラフィーは，次の3種類のカラムで行った。ミクロとして 1.0×5 cm のガラス注射筒にステンレスメッシュとガラス繊維濾紙 (Whatman GF/B) を入れたもの，中型および大型としては Pharmacia 社の K 9/60 および SR 25/45 を，それぞれ使用した。流速は LKB-Perpex ポンプ (10200) により調節し，ミクロおよび中

型カラムでは 20 mℓ/hr，大型カラムでは 100 mℓ/hr で行った。溶出液は，LKB-Uvicord II 型 (254 nm) を通した後，Toyo SF-160 K フラクションコレクターで分取し，吸光度および紫外吸収極大の測定には日立デジタル分光光度計 624 型および日立自記分光光度計 EPS-3 型をそれぞれ使用した。また必要に応じて，イオン強度をエムエス CD-32 M 型伝導度計で測定した。なお分離精製物の赤外-，および核磁気共鳴-スペクトルの測定には島津 IR-27 G および日立 R-20 B をそれぞれ使用し，それらの解析結果等についてはすでに報告した[3]。

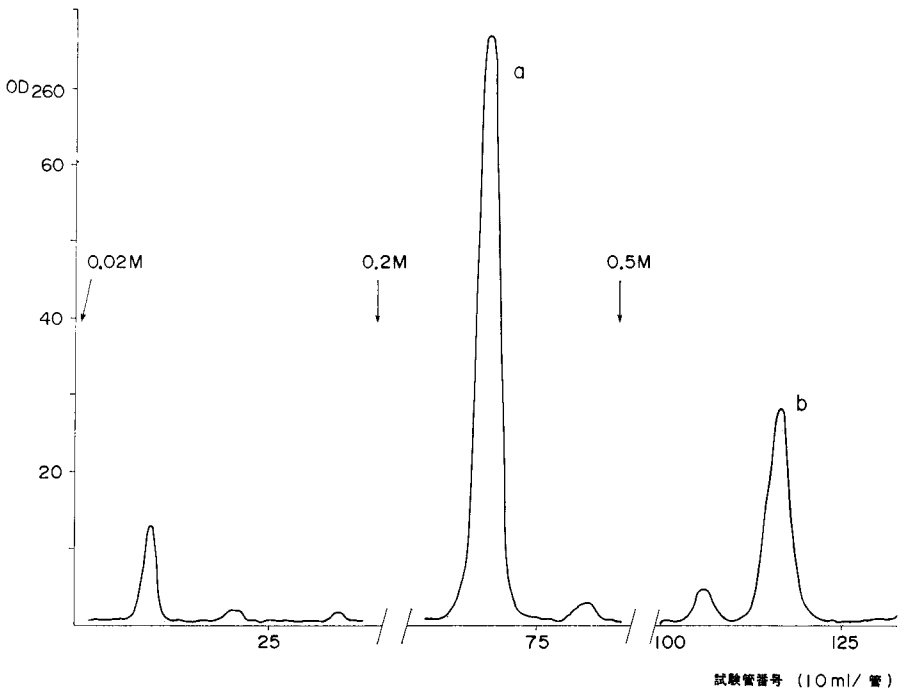
実験結果

NAD の 4-アミノニコチン酸メチルエステル-アナログの単離

図-1 に示した方法で clitidine を合成するために，まずピリジン塩基として 4-アミノニコチン酸を使って，その NAD-アナログを合成することを試みたが，得られたものは ADP-ribose のみで，目的とする生成物は得ることが出来なかった。そこで塩基として 4-アミノニコチン酸メチルエステルを使用してみた。得られた生成物は TLC (System A) 上で ADP-ribose に相当するスポットのほかに，アナログのものと思われるスポットを示した。両成分を分離精製するために以下の実験を行った。

表—1 ミクロカラムによる NAD-アナログと ADP-ribose の吸着・溶離テスト

ギ酸アンモニウム濃度	試験管番号 (5 mℓ/管)	吸光度 (260 nm)
0.1 M	1	0.058
	2	0.072
	3	0.578
0.2 M	4	0.885
	5	0.147
	6	0.065
0.3 M	7	0.059
	8	0.079
	9	0.174
0.4 M	10	0.400
	11	0.387
	12	0.091
0.5 M	13	0.066
	14	0.068
	15	0.067
0.6 M	16	0.065
	17	0.064
	18	0.066



図—2 ギ酸アンモニウムによるアナログ (a) と ADP-ribose (b) の分離

NAD (265 mg, 0.4 mmole) と 4-アミノニコチン酸メチルエステル (243 mg, 1.6 mmole) を，0.05 M Tris-HCl (pH 7.4, 40 mℓ) に溶解し，NADase (4.3 U, 20 mℓ) を加え，37°C にて 8 時間 incubate する。50%-TCA (1 mℓ) を加えて除タンパク後，上清にアセトン (300 mℓ) を加え氷庫中に一夜放置する。生じた沈澱物を集めてアセトンで洗うと 240 mg の吸湿性の白色粉末が得られた。このものは TLC (System A) 上で 2 ケの主要なスポットのみを示し，ピリジン塩基類の殆どはアセトン処理で除かれていた。

まずミクロカラムを使用して吸着と溶離の条件を検討した。上記白色粉末を 2.2 mg/mℓ の水溶液とし，その 0.25 mℓ (試料 0.55 mg) をカラムに添加して，ギ酸アンモニウム (pH 6.8) による stepwise 溶出を試みた。表-1 に示すように，0.1 M の後半から 0.2 M の前半にかけて溶出してくる第 1 画分と，0.3 M の後半から 0.4 M にかけて溶出してくる第 2 画分が得られた。両画分はそれぞれ 264 nm と 259 nm に紫外吸収極大を示し，明らかに違っていた。さらに塩濃度を上げても溶出してくるものは認められなかった。そこで溶出は 0.2 M および 0.5 M の stepwise 法で行うことにし，中型カラムを使用して予備実験を行った。試料添加時の塩濃度は 0.02 M で行い何ら不都合は認められなかった。すなわち目的とするヌクレオチド類は吸着され，僅かながら混入しているピリジン塩基はそのまま流出され，塩基の回収にも有効であると思われた。各溶出部は sharp に分画され，TLC (System A) で単一スポットを示し，このカラム条件で十分に分離精製が可能であることが確認された。

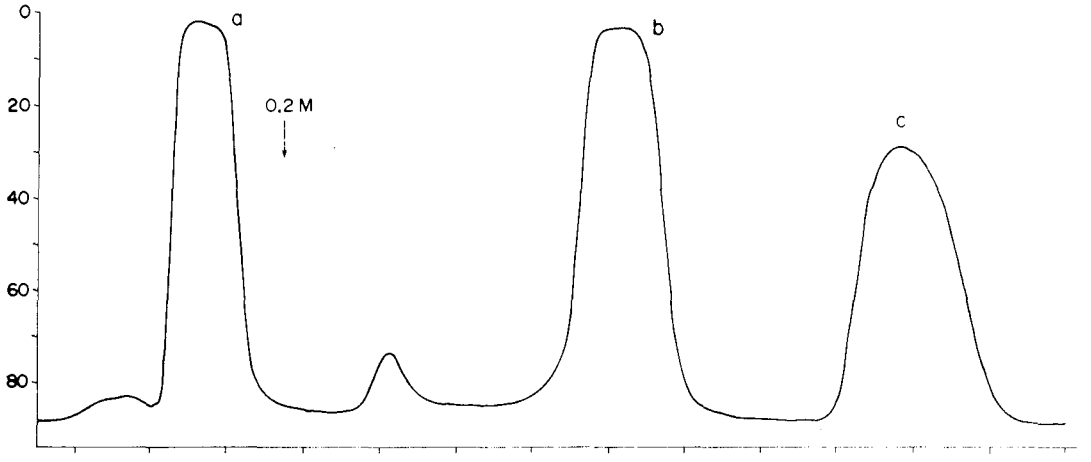
以上の基礎データをもとにして，240 mg の試料を 40 mℓ の 0.02 M-ギ酸アンモニウムに溶解し，大型カラムにかけた。その溶出パターンは図-2 に示した。特に 2 ケの主要ピークは sharp にあらわれ，分離パターンとしては理想的であった。**a** および **b** 画分について，凍結乾燥を数回繰返してギ酸アンモニウムを除き，それぞれ 142 mg (**a**)，64 mg (**b**) の単離精製物が白色粉末として得られた。**a**, **b** とも TLC (System A) 上で単一スポットを示し，赤外吸収-，核磁気共鳴-スペクトル等の解析結果ならびに元素分析等から，**a** が目的とする NAD-アナログ，**b** は NAD が単に加水分解されて出来た ADP-ribose であることが確認された。

4-アミノニコチン酸メチルエステル-モノヌクレオチド，および 4-アミノニコチン酸-モノヌクレオチドの単離

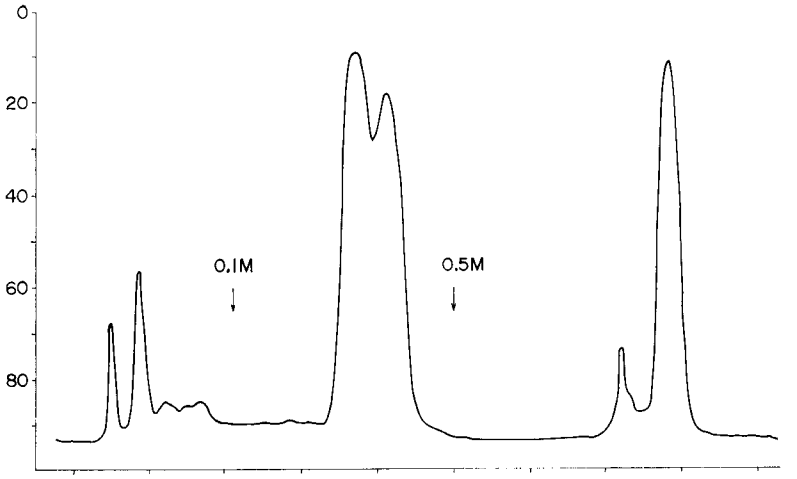
4-アミノニコチン酸メチルエステル-アナログ (150 mg, 0.22 mmole) を 0.2 M Tris-HCl (pH 9.2, 4.0 mℓ) に溶解し，0.2 M $MgCl_2$ (0.1 mℓ) および PDE (2 U, 0.2 mℓ) を加え，37°C で 5 時間 incubate する。経過は TLC (System B) で調べた。終了後，反応液はそのまま水で 10 倍量に希釈しカラム用の試料とした。

まず，ミクロカラムを使って分離条件を検討した。溶出は重炭酸トリエチルアミン (pH 7.8) で試みた。試料添加 (0.5 mℓ) 時の塩濃度は 0.02 M では一部吸着されずに流出したので，0.01 M で行った。溶出は，まず 0.2 M で試みたところ，3 ケのピークが近接してあらわれた。さらに 0.5 M に濃度を上げても溶離物質は認められなかった。

次に 0.1 M で溶出すると，1 ケのピーク (**a**) のみがあらわれ，さらに 0.2 M で溶出すると 2 ケのピーク (**b**, **c**) があらわれた。各画分はそれぞれ 266 nm, 268 nm, 259 nm に紫外吸収極大を示し，この条件でじゅうぶん分離



図—3 重炭酸トリエチルアミンによる PDE 分解物のクロマトグラム
(Uvicord による記録)



図—4 **a** 画分 (図-3) のギ酸アンモニウムによる再クロマトグラム
(Uvicord による記録)

可能であることが確認された。そこで大型カラムに全試料をかけて同様な分画を行った。図-3に示すように，0.1 M で **a** が，0.2 M で **b**, **c** が溶出され，それぞれ相当する紫外吸収極大を示した。各画分を減圧下濃縮乾固し P_2O_5 存在下，減圧で十分乾燥すると 47 mg (**a**)，53 mg (**b**)，77 mg (**c**)，がそれぞれトリエチルアンモニウム塩として得られた。これらの TLC (System B) は，**b**, **c** については単一スポット，**a** についてはなお数スポットを示した。赤外-および核磁気共鳴-スペクトル，リン酸定量から，**b** はメチルエステルがはずれた 4-アミノニコチン酸モノヌクレオチド，**c** はアデニル酸，**a** は粗エステルモノヌクレオチドで，いずれもモノトリエチルアンモニウム塩であることが確認された。反応が弱アルカリ性の条件下で行われているので，エステルが加水分解されたと思われるが，カラム操作中にも一部分解する可能性があるので，**a** 画分のギ酸アンモニウム (pH 6.8) による再クロマトを試みた。図-4に示すように，0.1 M で溶出した部分には近接した2ケのピークがあらわれ，さらに 0.5 M で溶出すると1ケのピークがあらわれた。紫外吸収極大の位置から，後者は図-3の **b** 画分に相当していた。0.1 M で溶出した2ケのピークのそれぞれ中央部のみをとって，TLC (System B) で調べると両者とも2ケ以上のスポットが認められ，結局精製された 4-アミノニコチン酸メチルエステル-モノヌクレオチドは得られなかった。しかしメチルエステル基は，アナログ合成にのみ必要な保護基であって，clitidine は **b** 画分からリン酸をはずすことによって得られる。したがって，NAD-アナログの段階で前以ってエステル基をはずし，PDE-反応を行うことにした。

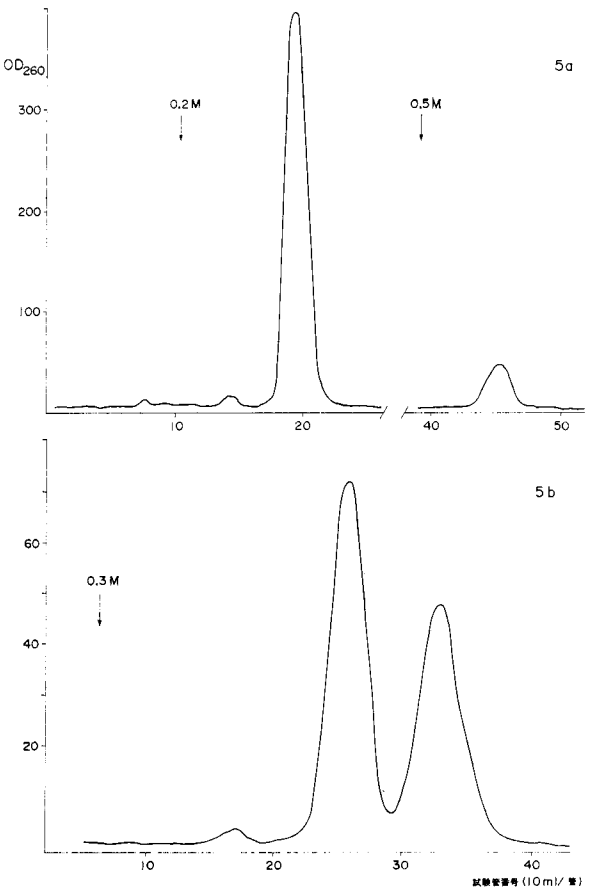
4-アミノニコチン酸メチルエステル-アナログ (150 mg, 0.22 mmole) を 0.2 M トリエチルアミン (H_2O-MeOH, 5 mℓ) 中，40°C，12時間処理し，減圧下濃縮乾固する。残査を 0.2 M Tris-HCl (pH 9.2, 4.0 mℓ) に溶解し，0.2 M $MgCl_2$ (0.1 mℓ)，および PDE (2 U, 0.2 mℓ) を加え，37°C で5時間 incubate する。経過は TLC (System B) で調べた。分離精製は反応終了液を水で10倍量に希釈し，大型カラムにかけ，図-3における条件で同様に行った。その結果，**a** に相当するピークは見られず，**b** と **c** に相当する画分それぞれ 78 mg と 77 mg が精製物として得られ，図-3におけるそれらと一致した。

Clitidine の単離

4-アミノニコチン酸-モノヌクレオチドのトリエチルアンモニウム塩 (47 mg, 0.11 mmole) を 0.1 M glycine-NaOH (pH 9.0, 1.5 mℓ) に溶解し，0.2 M-$MgCl_2$ (0.2 mℓ)，および 5′-nucleotidase (7.5 U, 0.15 mℓ) を加え，37°C で6時間 incubate する。経過は遊離してくるリン酸の定量で調べた。終了後，反応液は4倍量に希釈し，大型カラムにかけ，0.02 M 重炭酸トリエチルアミンで溶出し，精製物を単離した。この場合は，ヌクレオシドと無機リン酸の分離なので比較的容易に行われた。ただ glycine との分離が懸念されたが，分取液の伝導度を測定してみると，Uvicord のピーク位置と十分はなれていた。紫外吸収を持つ画分を減圧下濃縮乾固して 27 mg の clitidine が得られた。

NAD の INH-，および INA-アナログの単離

INH-，および INA-アナログについても上述の系が適用できるかどうかを調べた。図-5 a は INH-アナログを含む粗生成物 500 mg を分画した結果を示したもので，



図—5a INH アナログと ADP-ribose の分離
図—5b INA アナログと ADP-ribose の分離

80% 以上がアナログであって，0.2 M ギ酸アンモニウムで容易に溶出された。0.5 M で溶出される ADP-ribose は僅かであって，溶出位置が十分はなれているので再クロマトの必要はなく，410 mg の精製アナログ (82%) が得られた。これに対して，図-5 b は INA-アナログを含む粗生成物 250 mg を同じカラムで分画した結果を示したもので，この場合は，アナログは 0.2 M ギ酸アンモニウムでは溶出されにくかった。そこで 0.3 M を用いて溶出したが，図に見られるように 2 ケのピークが近接してあらわれ，ADP-ribose の量がかなり多いことが INH の場合と著しく異っていた。さきに溶出されてくる画分がアナログで，それを再クロマトして 93 mg の精製アナログ (38%) が得られた。

考　　察

1953 年，Kaplan ら[10] が最初に豚脳 homogenate を使って NAD と INH から INH-アナログを調製した時は，反応後 TCA を加えて除タンパクし，上清にアセトンを加えて生ずる沈澱物を粗アナログとした。この反応においては，図-1 の左側に示した副反応による ADP-ribose の生成量は比較的少なく，粗生成物といっても，実験条件によっては 90% 以上の純度のアナログを得ることができた。しかしその後数多くのアナログが作られるようになり[11)~13)]，副反応による ADP-ribose の生成量が無視できなくなると，従来から核酸系物質の分画に用いられていた Dowex-1 による陰イオン交換カラムクロマトグラフィーが，アナログの精製に適用されるようになった。通常ギ酸型または Cl^- 型[5] の樹脂が使われ，溶出は 0.1 M ギ酸＋0.1 M ギ酸ソーダ，或は薄い塩酸 (pH 3.6, 2.4 など) で行われている。しかし，NAD から clitidine を合成するときの第一中間生成物である今回のアナログは，メチルエステルを含んでいるため，酸性溶出条件では分解する可能性が考えられた。前報[8] において我々は INH-，および INA-アナログの精製に Sephadex G-10 によるゲル濾過法を利用したが，アナログと ADP-ribose の間の分子量差が小さく，かつこれらの化合物はいずれも Sephadex に対する親和力が大きいため，分離能が著しく悪く，再クロマトを繰返す必要があった。これに対し Dowex より溶出条件が温和な DEAE-Sephadex を利用した今回のイオン交換クロマトグラフィーは十分満足すべき分離能を有していた。

分画単離物は元素分析等を行うためには，塩を含まない方が都合が良い。ゲル濾過法は上述のように，試料の Sephadex に対する親和力が大きいため，カラム容積の数十倍の水を流した後 broad なピークとなって溶出するので，あまり良い方法とは言えない。そこで，イオン交換におけるアナログの溶出溶媒としては，凍結乾燥で気化しやすく，水溶液の pH が中性附近 (6.8) のギ酸アンモニウムを使用した。一方，第二中間生成物であるモノヌクレオチドの場合は，反応が pH 9.2 で行われているのでギ酸アンモニウムよりも後処理の容易な重炭酸トリエチルアミンで行った[14]。この溶出系の利点は，エバポレーターによる減圧濃縮で容易に塩が除去できることであるが，調製後なるべく早く使用しないと CO_2 が失われて pH 9 以上になるので注意を要する。また今回の結果 (図-3) が示すように，エステルが分解されやすいことが欠点で，アルカリ性に敏感な試料の場合はむしろ，酢酸トリエチルアミン (pH 6.5) の[14] 方が有利と思われる。しかし，いずれにしても試料がトリエチルアンモニウム塩として単離されると，機器分析，とくに ^1H- ならびに ^{13}C-核磁気共鳴スペクトル測定の妨害となる場合が多い。この点を考慮して現在 LiCl による溶出条件[15]

を検討中である。すなわちLiClはアセトン，エタノールなどに対する溶解度が大きいのに対して，NAD-アナログやヌクレオチド類はこれらの溶媒に難溶であることを利用するものである。しかし試料のLi塩になることによる溶解度の変化を注意すべきであろう。DEAE-Sephadex A-25によるイオン交換クロマトグラフィーは，今回の我々の試料に関しては満足すべき分離を示したが，INA-アナログとADP-riboseのように(図-5 b) 2ケのピークがかなり近接することもあり，場合によっては2成分が同時に溶出することも考えられる。その場合には支持体としてSephadexの代りにcelluloseを用いたDE-32などを利用することも考えられよう。しかし，DE-32の交換容量は0.8 meq/gであるのに対してDEAE-Sephadexは3.5 meq/gであるので一般的には後者を先に検討する方がゲル容量が少くてすむ上に，ゲルの充填が簡単であることから有利と言える。図-4において0.1 Mで溶出された近接した2ケのピークはまだ解析していないが，エステル型ピリジンヌクレオチドを得る方法としては，そのアナログをPDEの代りにpH 7.0で反応するpyrophosphataseで処理し，ギ酸アンモニウム或はLiClによるDEAE-Sephadexクロマトグラフィーが考えられる。現在この方向の実験を検討中である。

結　論

ピリジンヌクレオチド類のDEAE-Sephadexカラムによる分離条件を検討し，次の結果が得られた。

ギ酸アンモニウムのstepwise溶出法により，NADの4-アミノニコチン酸メチルエステル-アナログとADP-riboseが効率よく分離された。

4-アミノニコチン酸-モノヌクレオチドとアデニル酸は重炭酸トリエチルアミンの系で分離された。

INH-アナログとADP-riboseの分離は上と同様に行われたが，INA-アナログの場合には，さらに高い塩濃度が必要で，その結果ADP-riboseと近接して溶出された。

文　献

1) Konno, K., Hayano, K., Shirahama, H., Saito H. and Matsumoto, T.: Tetrahedron Lett., 481. 1977.
2) 牛沢　勇，片桐信弥，加藤鉄三，平　則夫：医学と生物学，**94**, 251, 1977.
3) Tono-oka, S., Sasaki, A., Shirahama, H., Matsumoto, T. and Kakimoto, S.: Chemistry Lett., 1449, 1977.
4) Kaplan, N. O. and Stolzenbach, F. E.: "Methods in Enzymology", Vol. 3, p. 899, 1957. New York, Academic Press.
5) Alivisatos, S. G. A.: Nature, **181**, 271, 1958.
6) Herz, W. and Murty, D. R. K.: J. Org. Chem., **26**, 122, 1961.
7) Zatman, L. J., Kaplan, N. O., Colowick, S. P. and Ciotti, M. M.: J. Biol. Chem., **209**, 453, 1954.
8) 外岡秀一，柿本七郎：北大免疫研紀要，**37**, 17, 1977.
9) Seydel, J. K., Tono-oka, S., Schaper, K.-J., Bock, L. and Wiencke, M.: Arzneim.-Forsch., **26**, 477, 1976.
10) Zatman, L. J., Kaplan, N. O., Colowick, S. P. and Ciotti, M. M.: J. Am. Chem. Soc., **75**, 3293, 1953.
11) Kaplan, N. O. and Ciotti, M. M.: J. Biol. Chem., **221**, 823. 1956.
12) Alivisatos, S. G. A., Lamantia, L. and Matijevitch, B. L.: Biochim. Biophys. Acta, **58**, 209, 1962.
13) Walter, P. and Kaplan, N. O.: J. Biol. Chem., **238**, 2823, 1963.
14) 大塚栄子：核酸実験法上（蛋白質・核酸・酵素，別冊），p. 106, 1972.
15) Randevath, E. and Randevath, K.: J. Chromatog., **16**, 126, 1964.

DEAE-Sephadex Column Chromatography of Pyridine Nucleotides

Shuichi TONO-OKA, Akio SASAKI
and Shichiro KAKIMOTO

In the course of the enzymatic synthesis of pyridine nucleosides, we had to purify several nucleotides. These were successfully separated on the column of an anion exchanger, DEAE-Sephadex A-25.

The NAD-analogue of methyl 4-aminonicotinate was easily eluted with 0.2 M ammonium formate, whereas ADP-ribose, which was the by-product of enzymatic reaction, was hardly eluted.

Although methyl 4-aminonicotinate mononucleotide could not be isolated, the cleavage product of the demethylated analogue by phosphodiesterase action, 4-aminonicotinic acid mononucleotide and adenylic acid, were separated with the solvent system of triethylammonium bicarbonate.

INH-analogue and ADP-ribose were also separated easily by the same procedure described above. On the other hand, INA-analogue was hardly eluted with 0.2 M salt. It was eluted with 0.3 M salt as a single peak, which was adjacent to that of ADP-ribose.

Possible modification of the present procedure was discussed.