

カツオ幽門垂に於ける核酸及び 関連物質について(予報)

柏田 研一, 柿本 大 壱

On the Nucleic Acid and its Related Compounds
in Pyloric Appendage of Skipjack

Ken-ichi KASHIWADA and Daiichi KAKIMOTO

緒 言

核酸, 核蛋白及びその関連物質に関しては従来陸上哺乳動物の胸腺, 脾臓, 脾臓, 腎臓等の内臓器官, 酵母, 癌組織, 或る種の細菌, ヴィールス, 魚精等を試料として, その抽出, 精製, 組成の探索, 定量, 生体内に於ける代謝等, 広汎な研究が行われている. これらの夥しい研究の中でサケの白子から初めて核酸を抽出し, これに関連した物質研究の端緒を作つた Miescher 氏⁽¹⁾の研究は歴史上不滅の業績であるが, 魚類を取扱つた例としてはその後 Mirsky, Pollister 氏等⁽²⁾はマスの精虫から, デソキシペントース核酸に属するヌクレオプロタミンを分離し, 又ナスカザメの肝臓, 脾臓, 血球, マス, Shad の精虫からも核蛋白が抽出されており, 関連物質としてはモノヌクレオチドなるイノシン酸が奥田氏⁽³⁾等によつて, カツオその他の魚類, 甲殻類, 軟体動物のエキス成分として検出され, グアニン, アデニン, キサンチン等のプリン塩基も微量ながら広く水産動物肉にその存在が認められている. 又核酸と結合している蛋白部分は主として山川⁽⁴⁾, Kossel⁽⁵⁾氏等によつて, 多くの魚精から夫々異なるプロタミン及びヒストンが分離命名され, その大部分のものに対しては実験式も与えられている.

併し全体的に見て核酸及び関連物質は含量の豊富なことと恐らく試料採取の容易等の理由から, 牛の胸腺或は酵母等試料を陸上のものに求めている研究が多く, 水産物としては魚精はしばしば用いられたが, 精以外の器官或は組織を試料として取上げた研究例は比較的少い. 著者等はカツオ幽門垂及びそのエキスに於て, 従来核酸構成々分として知られている数種の物質を検出したことから核酸(又は核蛋白)の存在を推定し, その分離について研究を進めた.

従来の研究例によれば核酸を糸状に抽出分離するためには, 動物の内臓を用いる場合には屠殺後 30 分乃至 1 時間以内試料を採取し, その後の全操作を 0°~5°C のような低温下で行ふべきことが要求されている. これは組織中に当然共存すべきヌクレアーゼによる分解を阻止することの必要性から来ているもので, 上記の条件で行わない限り変化しない状態, 即ち糸状に核酸を分離することは困難とされている. マスの精虫からヌクレオプロタミンを抽出した Mirsky 氏等の研究でも, やはり全操作を 0~1°C の低温で行つていたので, この条件を満足せしめることは少くともカツオの場合, 陸揚げされたものから試料を採つている著者等の現状では殆んど不可能である. 著者等が此の実験で用いた試料はこ

これらの条件とはかなりかけ離れたものであるが、核酸そのものの分離が目的ではなく、核酸構成々分を定性分析によつて試験し、核酸の存在を知ることが目的とした予備的実験であつたため暫くこの程度の試料、方法で満足したわけで、核酸を分離するためには改めて細心の注意を払つて試料採取が行われなければならないことは言を俟たない。核酸従つて核蛋白質の存在を推定せしめる二三の試験結果を記して本研究の予報とする。

実 験

1. 糖成分の定性

昭和26年5月下旬、枕崎市に陸揚げされた新鮮なカツオから幽門垂を採り、約30日間冷蔵庫内に凍結貯蔵したものにつき試験したところ、ペントースその他核酸関連物質の二三の反応を認めたと、陸上に於て求め得る最も新鮮な材料を用いるため、本縣山川町に赴き当日漁獲、又は漁獲後1、2日を出ないと言うカツオから幽門垂を採取した。併しこれとても死後少くとも数時間以上を経過している、前記の条件とはややかけ離れており、従つて核蛋白質或は核酸もある程度分解しているに相違ないと思われるものである。採取した幽門垂は直ちに乳鉢中で潰して少量の水を加え、幽門垂の水分を80%とみなして全体が1M濃度となるように食塩を加え、ヌクレアーゼの作用を抑制する目的で0.01M濃度となるようにクエン酸ソーダを加え、氷冷しつつ実験室に持ち帰り、時々振盪しながら氷室内で2昼夜浸出した濾液を用いて糖の反応を試験した結果は第1表の通りであつた。

第1表 糖の反応

反 応	強さ	推定される物質
モーリツシユ反応	卅	炭水化合物
アニリン反応	卅	ペントース
オルシン塩酸反応	卅	同
松木片反応	十	デソキシペントース
ヂフェニルアミン反応	卅	同
システイン硫酸反応	卅	同

表記の定性試験は何れも極めて顕著な陽性反応を与え、前記の如く処理した試料中には炭水化合物として核酸の構成々分である所のペントース及びデソキシペントースの存在が推定される。

なおこれとは別に試料を比較的長時間煮沸した場合、及び長時間湯煎鍋上に加熱濃縮して調製したシラップ状のエキスについても同時に試験したが、斯かる試料では上記の各反応殊にヂフェニルアミン反応が微弱となり、又往々にして殆ど検出されなくなる場合もあつた。又幽門垂の熱水浸出液を濃縮したエキスは原料の鮮度によつて色調を異にし、極めて新鮮な原料を用いたものは黄褐色を呈するが、長期冷蔵した幽門垂から調製したエキスは殆ど黒色に近い褐色を呈する。これらの試料を比較して見ると後者は前者に比較し糖としての各反応が遙かに微弱である。これらの事実から考えると幽門垂中に存在する糖成分は比較的不安定で、永く貯蔵するか或は長時間加熱することによつて変化するものらしい。この定性試験で検出されたソデキシペントースは甚だ不安定な物質と言われているが、この糖の反応が長期貯蔵した幽門垂から調製したエキス、及び調製に際し長時間加熱されたエキスに於て弱くなるのは、その間に分解したものと想像される。

2. 塩基成分の定性

核酸の他の一つの成分であるプリン塩基、ピリミデン塩基の定性試験を前と同一の試料について行つた結果は第2表の通りである。

第2表 塩基の反応

反 応	強 さ	推 定 さ れ る 物 質
デアゾ反応	卅	グアニン, キサンチン, ヒポキサンチン, チミン, シトシン, ウラシル, チロシン, ヒスチジン
ムレキシド反応	士	十ならばグアニン, サキンチン
キサンチン反応	士	同 上
コッセル反応	卅	アデニン, ヒポキサンチン
ホイラー・ジョンソン反応	卅	ウラシル, シトシン
メタ燐酸	士	沈澱を生ずればアデニン, グアニン

デアゾ反応は塩基類の外チロシン, ヒスチジン等も与えるので塩基の証明にはならないが, 表の如くプリン塩基としてアデニン又はヒポキサンチン, ビリミジン塩基としてはホイラー・ジョンソン反応が加熱しなくても認められるので, ウラシル又はウラシル, シトシン両者の存在が推定される. ムレキシド反応とキサンチン反応は時として微かに陽性を与えたかに見える場合もあるが, 多くの場合汚い色を与えてあまり明瞭でない. 元来この反応は組織の浸出液は素より, 核蛋白又は純粹な核酸でも往々にして汚い色を与えて鋭敏度も低く, 従つてあまり良い反応ではないとの記載が見られるが, 本試験に用いた試料は幽門垂の1M食塩浸出液そのまま, 著者等の研究によると幽門垂エキスの主要固形成分はアミノ酸で, これにペプトン等高級蛋白分解物や, 未だ充分確認されてはいないが, その外にも種々の物質が含まれているので, 存在する塩基類は量的に遙かに多いこれら共存物質によつてその呈色を妨害され, 従つて明瞭な反応を示さないのが寧ろ当然で, この反応の結果に対してはあまり重要性を与えない方が適當と思われる.

3. 硝酸銀沈澱部の定性

以上幽門垂の1M食塩浸出液及び熱水浸出液について, 核酸の構成成分とみなされる糖及

第3表 幽門垂エキスの硝酸銀沈澱部に於ける糖及び塩基の反応

反 応	強 さ	推 定 さ れ る 物 質
モーリツシュ反応	卅	炭水化物
アニリン反応	卅	ペントース
オルシン塩酸反応	十	同
デフエニルアミン反応	一	十ならばデソキシペントース
デアゾ反応	卅	
ムレキシド反応	士	グアニン, キサンチン
キサンチン反応	士	同
コッセル反応	卅	アデニン, ヒポキサンチン
燐酸の反応	卅	燐 酸
ビクリン酸	十	アデニン (アンモニア水に可溶)

び塩基類を検出し、且つ磷酸は何れの試料に於ても明らかに検出されるが、上記の如く塩基の反応に明瞭を欠くものがあつたので、検出に用うる試料をこれらの成分に関して純粹にすることによつて反応が明確になるのではないかと考え、次の如くエキスの硝酸銀沈澱部について塩基及び糖の定性を行つた。

昭和25年8月、本縣枕崎市に赴き陸揚直後のカツオから摘出された幽門垂の中から、殆ど自己消化を起していないと思われる新鮮なものを選別し直ちに蒸留水を加えて煮熱、濾紙で濾過した透明な液汁を濃縮調製したエキスを試料とした。これに適量の水を加えて溶解し、バリタを加えて生ずる沈澱を濾別し、濾液を硝酸で中和し、硝酸銀溶液を加えて生ずる沈澱を集め、少量の水に分布し、硫化水素を通じて銀を除き、濾液に空気を通じて硫化水素を除いた液について定性試験を行つた結果は第3表の通りであつた。

銀塩を分取した濾液にはアニリン反応が認められないので、ペントース化合物は銀塩として沈澱することが解つた。併しこの場合もムレキシド反応、キサントニン反応はやはり汚い色を与え、従つてこの両反応の確認を主目的としたこの実験は不成功に終つた。即ち前記の操作を経た試料に於ても結果はほぼ同様で、磷酸、ペントース、及び或る種のプリン塩基が検出された。

4. ペーパー・クロマトグラフィーによるプリン塩基の検出及び全プリン体の定量

以上、従来普通に試みられている定性試験の結果を総合すると、カツオ幽門垂中にはペントース核酸、デオキシペントース核酸両者の存在を推定し得るが、クロマトグラフィーによつて塩基部 (特にプリン塩基) を試験し、更に既知の方法によつて全プリン体を定量した。

先づクロマトグラフィーは Schmidt 法に従つて硫酸の2%濃度で生幽門垂を100°Cに6時間加熱したものを試料とし、Vischer 及び Chargaff氏⁽⁶⁾の行つた方法により n-ブタノール (水飽和) を展開剤とし、硝酸第二水銀の0.5N硝酸溶液を固定剤として Rf 値を求めた。濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用いた。3個のスポットを得たが Rf 値の小さいもの程現われた黒点が濃厚であつた。結果は第4表の通りであつた。

著者等の実験で得た3個のスポットを Vischer 氏等の発表しているプリン塩基の Rf 値から判断すると、上表の如く夫々アデニン、ヒポキサンチン、グアニン (又はキサントニン) に相当している。

次に3の実験に用いたと同じ試料エキスを Edlbacher 及び Jucker 氏等の方法即ち2%硫酸、4時間煮沸によつて加水分解した溶液につき、全プリン体即ち核酸、ヌクレオチド、ヌクレ

第4表 濾紙クロマトグラフィーによるプリン塩基の検出 (Rf 値)

研究者	アデニン	ヒポキサンチン	グアニン	キサントニン
Vischer外	0.28	0.17	0.074	0.071
著者	0.21	0.14	0.10	—

第5表 エキスのプリン態窒素

窒素成分	エキス無水物中
全窒素	13.11%
プリン態窒素	0.44
アミノ態窒素	6.41
アンモニア態窒素	2.04

オシドを構成するプリン体と遊離プリン体との総和を Graff 及び Maculla⁷⁾の方法によつて定量した結果は、第5表に示した如くエキス無水物に対し 0.44% であつた。

なお第5表には常法によつて定量した他の窒素成分も参考のため附記した。

摘 要

1. カツオ幽門垂の 1M食塩水浸出液及び熱水浸出物(エキス)につき定性試験を行つた結果、糖としてペントース及びデソキシペントース、塩基類としてアデニン又はヒポキサンチン、ウラシル(又はウラシルとシトシン)、及び磷酸が検出されたので、核酸又は核蛋白の存在を推定した。

2. 糖殊にデソキシペントースの反応は、長期貯蔵した幽門垂或は長時間加熱して調製したエキスに於ては微弱となることを見た。

3. 濾紙クロマトグラフィーにより、幽門垂エキスの加水分解物中にアデニン、ヒポキサンチン及びグアニン(又はキサンチン)を検出した。

4. 同じ試料につき全プリン体の窒素を定量した結果はエキスの無水物に対し 0.44% であつた。

此の研究は昭和 26 年度文部省科学研究費によつて為されたものの一つであり、実験試料としたカツオ幽門垂は本縣山川町のもは同地、村山庄吉氏、枕崎市のもは同市漁業協同組合長立石松義氏の好意により採集し且つ寄贈されたものである。特記して深謝の意を表する次第である。

R é s u m é

We studied qualitatively on the compounds related to nucleic acid in pyloric appendage of skipjack. In the extract of pyloric appendage treated with 0.1M-NaCl or hot water, we confirmed pentose and desoxypentose as sugar components, adenine or hypoxanthine, uracil (or uracil and cytosin) as purin and pyrimidin derivatives. It was found that the color reaction of sugars was faint in those samples which were stored for long times or heated for long hours. And also we confirmed adenine, hypoxanthine and guanine (or xanthine) in the hydrolysate of pyloric appendage extract by paper partition chromatography, and the total purin base nitrogen was 0.44%.

文 献

- (1) F. Miescher: Oppenheimer, Handbuch d. Biochemie., I, 608 (1909)
- (2) A. E. Mirsky & A. W. Pollister: Proc. Natl. Acad. Sci., 28, 344 (1942)
- (3) 奥田: 農学会報, 200号(大8)
- (4) 山川外: 水講(1916~1934)
- (5) A. Kossel: Z. physiol. Chem. (1884~1929)
- (6) E. Vischer & E. Chargaff: J. Biol. Chem., 176, 703, 715 (1948)
- (7) S. Graff & A. Maculla: J. Biol. Chem., 110, 71 (1935)