

Title	人胎盤の酸可溶性スクレオチドについて：中間報告
Sub Title	The acid soluble nucleotides of human placenta (intermediary report)
Author	宇田, 智子(Uda, Satoko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1967
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.12 (1967.) ,p.85- 90
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000012-0085

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

人胎盤の酸可溶性スクレオチドについて —中間報告—

宇 田 智 子

The acid soluble nucleotides of human placenta (Intermediary report)

Satoko UDA

In the study of acid soluble nucleotides of human placenta, the nucleotides were fractionated by anion-exchange resin column chromatography and the Structures of them were determined.

Cytidine-5'-monophosphate Cytidine-2'(3')-monophosphate, Nicotinamide-adenine-dinucleotide, Adenine-5'-monophosphate, Uridine-5'-monophosphate, Uridine-2'(3')-monophosphate, Inosine-5'-monophosphate and Guanine-5'-monophosphate were identified by comparison with each standard substance employing ultraviolet rays absorption spectrum, paper chromatography and paper electrophoresis, etc.

近年友田¹⁾は人胎盤からキシロースより成る多糖体を単離してその構造を決定しているが、キシロースが動物組織中に発見された例は稀であり、胎盤の特殊な機能を考え合せると興味あることである。一般に多糖類は生体内では、ヌクレオチドと結合した糖を前駆物質として生合成されることが知られているが、人胎盤中の酸可溶性スクレオチドについては、小野²⁾の報告があるのみである。この報文では、人胎盤中のスクレオチドについて、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーによる溶出位置からその構造を推定しているにすぎない。本実験は人胎盤中のスクレオチド類を、より確実な化学的方法で同定することを目的として行なった。

本報告書ではモノヌクレオチドの同定結果について述べる。

実験材料及び方法

I) 材 料

人胎盤は正常な分娩後30分以内に娩出の胎盤を用い、直ちに鋏で小片に刻み、アセトン・ドライアイスで凍結して実験室に持ち帰り -20°C に保存。

II) 酸可溶性スクレオチドの作成

凍結組織に2倍容の氷冷 0.6N-過塩素酸を加え、ミキサーでホモジナイズする。遠心分離後更に沈澱物を2倍容氷冷 0.2N-過塩素酸でホモジナイズし、上澄液を合してフェノールレッドを指示薬に水酸化カリウム液で中和する。一夜氷室に放置して KClO_4 を十分析出させた後、 KClO_4 は濾過して除く。

この液中にはスクレオチド以外の燐酸エステルなど他物質を多量に含むと思われるので、Baddiley³⁾の方法に従いスクレオチドを精製した。即ち総吸光度 (O.D 260 $\text{m}\mu$) 1400の試料液に活性炭 4.5 g を加えて5分間強く攪拌し30分放置してスクレオチドを十分炭末に吸着させた後、

1) S. Akiya & M. Tomoda: 薬学雑誌 664 77(1957), M. Tomoda & K. Murayama: Japan. J. Exp. Med. 35, 159(1965)

2) 小野恵: 東京女子医大誌 30, 1423(1960)

3) J. Baddiley: Biochemical. J. 64, 599(1956)

別に用意した径 4 cm のガラス管に、ガラスウール、ハイフロスーパーセル 1.5 g を流し込んだカラムを作り、この上に炭末液を注入する。こうして出来た炭末カラムは、0.1N 蟻酸及び水で洗滌した後、エタノール・水・アンモニア (25 : 24 : 1) 混液 200 ml で溶出する。ここで得た溶出液を 20°C 以下で減圧濃縮して、pH 7 に補正し分画に供した。

Ⅲ) カラムの作製とイオン交換クロマトグラフィー

カラムの調製及び溶出は Cohn⁴⁾ の分離法に従って行なった。使用した樹脂は Dowex 1 × 2 の 200~400 メッシュ、蟻酸塩型で、カラムのサイズは 1.1×14.5 cm である。溶出は 0.01N 蟻酸、0.1M 蟻酸、0.04M 蟻酸アンモニウム-0.004M 蟻酸、0.1M 蟻酸アンモニウム-0.1M 蟻酸の各溶離液を用いて Stepwise 法で行なった。これらの分画操作は室温で行なった。

カラムクロマトグラフィーはフラクションコレクターを用いて分画し、各管について、その紫外外部吸収を分光光度計を用いて 260 m μ と 280 m μ の吸光度測定してクロマトグラムを作製した。クロマトグラムの各ピークについて分画液を凍結乾燥し、ヌクレオチドの同定を行なった。

Ⅳ) ペーパークロマトグラフィー

ヌクレオチドのペーパークロマトグラフィーは東洋汙紙 No. 51 を用いて次の溶媒による上昇法で行ない、標準品 R^f 値と比較した。

1. イソプロパノール : アンモニア : 水 (7 : 1 : 2)
2. イソプロパノール : 飽和硫安 : 0.1M 酢酸ソーダ (2 : 79 : 19)
3. メチルエチルケトン : tert-ブタノール : 水酢 : 氷 : 濃塩酸 (22.5 : 22.5 : 35 : 19 : 1)

汙紙電気泳動は東洋汙紙 No. 51 を用い、n-ブタノール : ピリジン : 氷酢 : 水 (20 : 10 : 2 : 968) アンモニアで pH 8.5 に調整した液中で 50 V/cm の電位勾配で 40 分間行なった。

紫外外部吸収曲線については 0.1N-塩酸酸性、0.1N-苛性カリアルカリ性、中性で各々作製して特性を検討した。

実験結果

I) 人胎盤酸可溶性成分の陰イオン交換樹脂による分離

胎盤湿性重量約 130 g (1/3 個) について行なった分画を図示すれば次の様である。Fig. 1 実験条件は「実験材料及び方法」で示した通りである。得られたピークは 15 個で左から 1~15 と分画番号をつけた。また 260 m μ における吸光度に対する 280 m μ における吸光度の比率は上段に記入した。

II) 各ピークの成分の同定

分画 1) — 分画 1 については、ペーパークロマトグラフィーによってなお 8 スポットに別かれ、比較的 R^f 値の高いものが多いことからオロチン酸などヌクレオチド以外のものの混入も考えられ、未同定である。

分画 2) — ペーパークロマトグラフィーによって 2 スポットに別かれ、下部位については シチジン 5' リン酸が予想されるが上部位については ペーパークロマトグラフィー、および紫外外部吸収曲線からはシチジン 2' あるいは 3' リン酸の挙動を示すものの溶出順位や分画 4) を考えに入れるとなお検討を要する部分と思われる。

分画 3) — ペーパークロマトグラフィーによって 2 スポットに別けられるが、下部は微少である。上部については 2 種ペーパークロマトグラフィーで 5' CMP に一致する単一スポットを得、

4) W.E. Cohn : J. B. C. 203, 319 (1953)

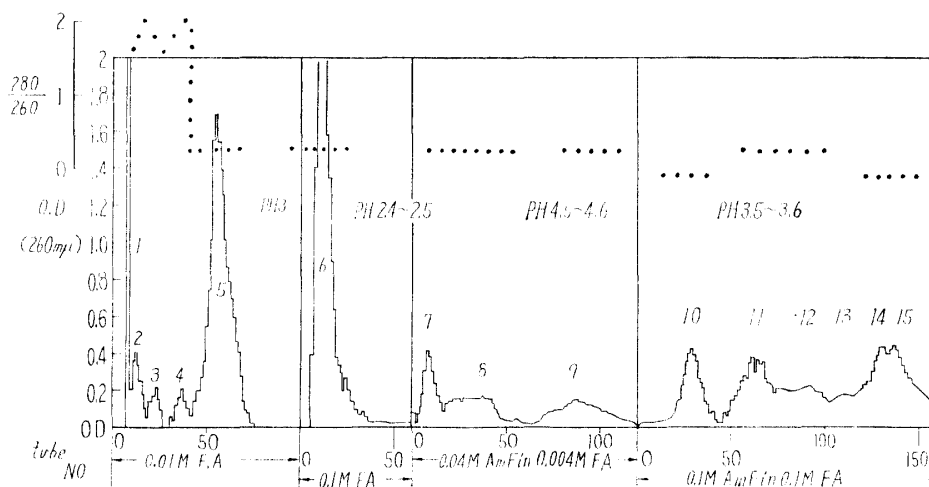


Fig. 1 胎盤の酸可溶性スクレオチドの分画図

試料 130g
 カラム Dowex 1×2, ギサン塩型, 200~400 メッシュ, 11×14.5 cm, 流速 48 ml/h, 6 ml フラクション
 溶出液
 0.01M-Formic Acid
 0.1M-Formic Acid
 0.04M Ammonium formate in 0.004 Formic Acid
 0.1M Ammonium formate in 0.1M Formic acid

紫外外部吸収スペクトルはシチジール酸の特性を有し, 過沃素酸-ベンチジン⁵⁾ 反応陽性を示す。従ってこのピークはシチジン 5' リン酸である。

分画4) — 2種ペーパークロマトグラフィーで 2' CMP, 3' CMP に一致する単一スポットを得, 紫外外部吸収スペクトルはシチジール酸の特性を有する。過沃素酸ベンチジン反応は陰性, 従ってこのピークはシチジン 2' (3') リン酸である。

分画5) — 2種ペーパークロマトグラフィーで NAD に一致する単一スポットを得, 沝紙電気泳動法によっても pH 8.6 で NAD と一致, 紫外外部吸収スペクトルは KCN によって還元型 NADH 特有の曲線を示す。過沃素酸・ベンチジン反応陽性, 従ってこのピークはニコチンアミドアデニンジスクレオチドである。Fig. 2

分画6) — 2種ペーパークロマトグラフィーで AMP 5' に一致する単一スポットを得, 紫外外部吸収スペクトルはアデニール酸の特性を示し, 過沃素酸ベンチジン反応は陽性, 従ってこのピークはアデニン 5' リン酸である。

分画7) — ペーパークロマトグラフィーによって 2つのスポットに分けられる。うち一方は UMP 5' に一致し, 紫外外部吸収スペクトルもウリジル酸の特性を示し, 過沃素酸ベンチジン反応も陽性であることからウリジン 5' リン酸である。もう一方のスポットについては痕跡程度で分析困難である。

分画8) — ペーパークロマトグラフィーによって 2つのスポットに分けられる。うち一方は UMP 2' (3') に一致し, 紫外外部吸収スペクトルはウリジル酸の特性を示し, 過沃素酸・ベンチジン反応陰性, 他方スポットは IMP 5' に一致し, 紫外外部吸収スペクトルはイノシン酸の特性を示し, 過沃素酸・ベンチジン反応は陽性である。従ってこのピークはウリジン 2' (3') リン酸とイノシ

5) J.G. Buchanan: Analytical Chem. 26, 1132 (1954)

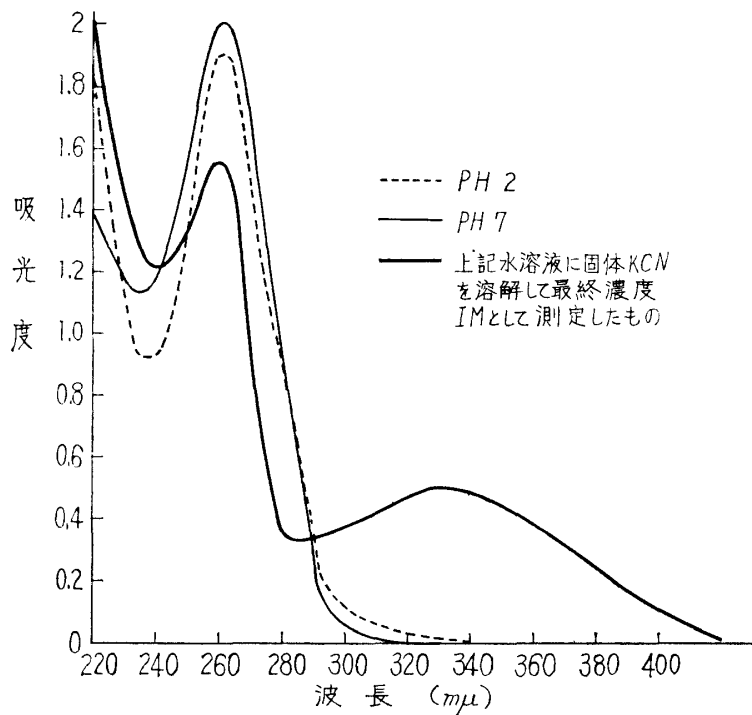


Fig. 2 分画5)における NAD の特性を示す紫外外部吸収スペクトル

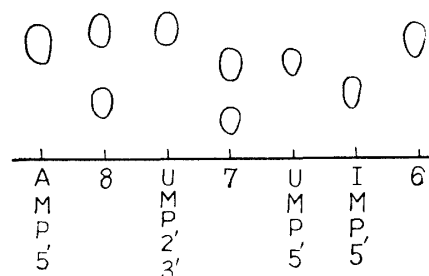


Fig. 3 分画6～分画8におけるスクオチドのペーパークロマトグラム
 展開溶媒
 イソプロパノール：ア
 モニア：水
 上昇法 2日間

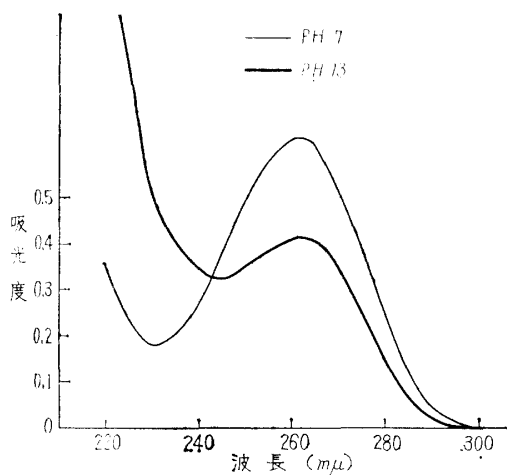


Fig. 4 分画8におけるペーパークロマトグラム上部スポットについての紫外外部吸収スペクトルウリジール酸の特性を示すもの

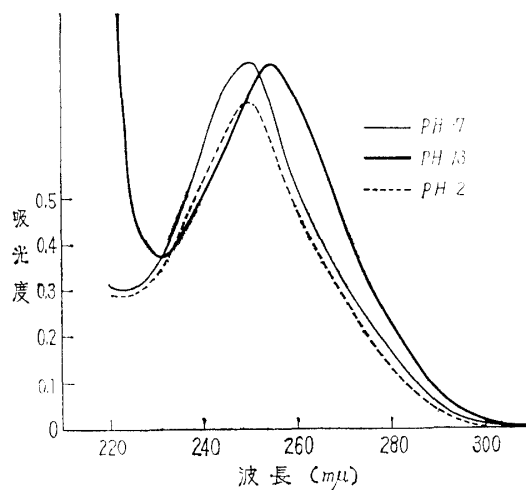


Fig. 5 分画8におけるペーパークロマトグラム下部スポットについての紫外外部吸収スペクトルイノシン酸の特性を示すもの

ン 5' リン酸の混合である。Fig. 3, 4, 5

分画9) — 2種ペーパークロマトグラフィーで GMP 5' に一致する単一スポットを得、紫外外部吸収スペクトルはグアニール酸の特性を示し、過沃素酸・ペンチジン反応陽性である。従ってこ

のピークはグアニン 5' リン酸である。

なお分画 3) 以前, 分画 10) 以後については目下検索中である。

各ピークの成分の同定一覧表

分画番号 (ストポツ部)	P. P. C.		U V 曲線			$\frac{280}{260}$	10_4 -Benzidin	PEP	同定スクレオチド
	1*	2*	pH	max	min				
2 (上)	CMP 2'(3')	CMP	7	^(mμ) 275	^(mμ) 250	1.05			
			2	280	240	2.05			
(下)	CMP 5'						(+)		
3 (上)	CMP 5'	CMP	7	275	250	1.14	(+)		CMP 5'
			2	280	240	2.08			
(下)									
4	CMP 2'(3')	CMP 2'(3')	7	272	250	1	(-)		CMP 2'(3')
			2	280	240	1.8			
5	NAD AMP 5'	NAD	7	260	230	0.25	(+)	NAD	NAD
			2	260	230				
			KCN による		⁽²⁶⁰⁾ ⁽³³⁰⁾	⁽²⁴⁰⁾ ⁽²⁹⁰⁾			
6	AMP 5'	AMP 5'	7	260	230	0.22	(+)		AMP 5'
			2	258	235	0.26			
			13	260	230	0.197			
7 (上)	UMP 5'		7	263	230	0.41	(+)		UMP 5'
			13	263	245	0.4			
			7	263	232	0.47			
			2	263	232	0.42			
8 (上)	UMP 2'(3')		7	263	230	0.35	(+)		UMP 2'(3')
			13	263	245	0.31			
			7	250	225	0.3			
			13	255	230	0.24			
(下)	IMP 5'					(+)		IMP 5'	
9	GMP 5'	GMP 5'	7	253	225	0.65	(+)		GMP 5'
10			7	260	232	0.28			
			2	260	232	0.34			
			13	260	232	0.35			

* 溶媒 1 イソプロパノール:アンモニア:水 (7:1:2)

溶媒 2 イソプロパノール:飽和硫酸:0.1M酢酸ソーダ (2:79:19) pH 6

考 察

以上の実験結果からは, ピーク 9 まではモノヌクレオチドのピークであり, 分画 3) ではシチジン 5' リン酸, 分画 4) ではシチジン 2'(3') リン酸, 分画 5) ではニコチンアミドアデニンジ

90 (1967)

ヌクレオチド，分画6) でアデニン 5' リン酸，分画7) でウリジン 5' リン酸，分画8) でウリジン 2'(3') リン酸およびイノシン 5' リン酸，分画9) でグアニン 5' リン酸を同定できた。

ピーク10以後はヌクレオシドポリリン酸またはヌクレオチドと糖との結合を持つものと思われる。なお実験結果の総吸光度概算から推して，まだかなりの酸可溶性ヌクレオチドがカラムに残存していると思われる。この部分はさらに，ヌクレオシドポリリン酸および糖と結合したヌクレオチドの存在が予想され，これらの構造を調べることは胎盤の機能と考え合わせて興味あることと思われる。この部分のヌクレオチド類縁体については目下研究中である。

本実験について，直接ご指導下さった浮田忠之進教授，寺尾允男博士，多くのご助言を頂いた中村勇蔵教授に深謝いたします。