北海道産大豆中の遊離アデニン量

横 澤 隆 子*, 中 川 暁**, 大 浦 彦 吉*

*富山医科薬科大学和漢薬研究所臨床利用部門

**富山大学教育学部栄養化学教室

Free Adenine Content of Soybean Cultivated in Hokkaido

Takako YOKOZAWA,* Hitomi NAKAGAWA** and Hikokichi OURA*

*Department of Applied Biochemistry, Research Institute for Wakan-Yaku,
Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, 930-01

**Department of Nutritional Chemistry, Faculty of Education, Toyama
University, Toyama, 930

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 38, 129~133 (1985)

Quantitative analysis of free adenine in soybean was made by the following procedures. The defatted soybean powder was extracted with H₂O at 4°C for 48 hr, after centrifugation at 3,000 rpm for 20 min. The supernatant fluid was deproteinized with PCA (final concentration, 5%). The deproteinized supernatant was neutralized with KOH and submitted to the ion-exchange chromatography (AG 50 W-X 8, 1×25cm). The adenine fraction was further applied to the high-performance liquid chromatography (Shim-pack CLC-ODS, 0.15 m×6.0 φ) equipped with UV-VIS spectrophotometric detector. Free adenine content was evaluated from proportion of peak area to that of standard material. Average value of free adenine content in raw soybean was 0.05%.

(Received August 2, 1984)

adenine phosphoribosyltransferase (APRT) の先天性欠損症では、アデニンの代謝産物である 2,8-dihydroxyadenine (DHOA) が尿中に多量排泄され、この DHOA が水にきわめて難溶性であることから、腎結石や尿路結石を形成し^{1)~17)}、一部に腎不全を併発することが、最近数多く報告されている^{6)8)~10)14)17)}。

一方、肝のキサンチンオキシダーゼにより、アデニンから DHOA が生成することやアデニン投与による腎機能障害および毒性については、すでに Bendich ら¹⁸⁾、Philips ら¹⁹⁾、Lindblad ら²⁰⁾によって実験的に明らかにされている。

著者らは先に各種プリン体をラットに 6 日間経口投与し、アデニンのみが排泄低下型の高尿酸血症を引き起こすとともに高窒素血症を呈することを見いだした^{21)~24)}。さらに、30 日間アデニンを経口投与した結果、尿細管における多量の針状結晶、大白色腎、尿路結石を認め、これらの結晶、結石は DHOA であることを証明した。さらに 60 日間の投与により高度な腎毒性、腎障害が認められ、著明な高窒素血症（尿素窒素、クレアチニンの増加）、尿素サイクルの異常、グアニジノ化合物（メチル

グアニジン、グアニジノコハク酸など）の著しい増加、アミノ酸パターンの異常および低カルシウム、高リン酸血症などを見だし、尿細管性の慢性腎不全モデル動物となりうることを報告した^{25)~29)}。

最近、DHOA 結石が小児のみならず成人になって発症する例も数多く報告され⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾¹³⁾、食品、とくに豆類との関連性が指摘されている³⁰⁾。

従来、食品中のプリン体の含有量に関する研究は、いずれも加熱酸分解法により核酸中に存在する結合型プリン体を主眼とする定量法で^{31)~33)}、遊離型のプリン体を定量した研究は見当たらない。今回、著者らは食品中の遊離アデニンに興味をもち、北海道産大豆中の遊離アデニンを定量したので以下報告する。

実験方法

1. 試料の調製

昭和 58 年産北海道大豆（北娘）を富山市場から購入し、その粉末をエーテルで脱脂した後、試料 4.933 g を 4°C にて 48 時間攪拌下に水抽出を 3 回行ない、260 nm で抽出液を毎回チェックし、次に抽出液を過塩素酸（終濃度 5%）で除タンパクした。上清を水酸化カリウムで中和、沈殿を遠心分離し、上清を減圧濃縮した後、イオ

* 〒930-01 富山市杉谷 2630

** 〒930 富山市五福 3190

Fig. 1. Ion-exchange chromatogram of purine bases and nucleosides.

I, inosine; X, xanthine; Gus, guanosine; Hx, hypoxanthine; Ads, adenosine; G, guanine; A, adenine.

ン交換クロマトグラフィー用のサンプルとした。なおエーテル可溶脂質成分は 16.77% であった。

2. イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換樹脂 (AG 50W-X 8, 200~400 mesh, BIO-RAD Laboratories, 1×25 cm カラム) を用い, 0~4 N 塩酸の連続的濃度勾配法で溶出した³⁴⁾。各フラクションは 10 ml ずつ分取し, 260 nm で測定した。

3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC は島津 LC-5 A を用い, カラム (Shim-pack CLC-ODS, 0.15 m×6.0 φ) は 50°C とし, 移動相は 5 mM リン酸-0.06% トリエチルアミンを用い, 流速は 1.5 ml/min, 検出は島津液クロ用フォトダイオードアレイ (UV-VIS 分光光度計検出器 SPD-MIA) により三次元クロマトグラフィーを行なった。

ピークの同定は標準物質の溶出時間 (RT) と UV 吸収曲線の比較により行ない, 濃度計算は内部標準とのピーク面積比で行なった。

4. 試 薬

試薬はすべて和光純薬工業(株)特級品を使用した。

実 験 結 果

1. イオン交換クロマトグラフィー

アデニンの溶出域を知るため, 各種プリン体標品とともに検討した結果, Fig. 1 のごとくイノシン, キサンチン, グアノシン, ヒポキサンチン, アデノシン, グアニン, アデニンの順に溶出し, アデニンは Fraction No. 80 付近に溶出することを確認した。

次に大豆の水抽出物をイオン交換クロマトグラフィーした結果, Fig. 2 のごとくピークが得られ, それぞれ P-1, P-2, P-3 および P-4 とした。

2. P-4 (No. 82) の HPLC

P-4 中にアデニンが存在するのではないかと推定し, pH 3.8 に試料を調整して HPLC を行なった。その結

Fig. 2. Ion-exchange chromatogram of soybean extract.

Fig. 3. Chromatogram of adenine and P-4 obtained by HPLC.

— P-4-1, ---- adenine.

果, Fig. 3 のごとく 2 個のピークが認められ, RT 2.18 のピークがアデニンの RT 2.23 に相当し, UV 吸収曲線 ($\lambda_{\max}$ 266 nm) はアデニンと完全に一致することを確認した。しかし他のピークについては同定することができなかった。

3. 三次元クロマトグラフィーによるアデニンの定量

P-4 (No. 82) にアデニンが証明されたので, P-4 付近の No. 71~88 の各フラクションについて, HPLC とフォトダイオードアレイを併用して三次元クロマトグラフィーを行ない, アデニンの確認と定量を行なった。

その結果, Fig. 4 のごとく RT および $\lambda_{\max}$ から No. 80~84 でアデニンの大きなピークが認められた。しかし, No. 76~79 ではわずかに小さなピークが認められたが, No. 71 および No. 88 ではアデニンのピークは消失していた。これらのフラクションの 266 nm の OD を内部標準とのピーク比から濃度を算出した結果, Table 1 の値が得られ, これらを Fig. 2 の closed column に示した。

Fig. 4. Three-dimensional HPLC of each fraction obtained by ion-exchange chromatography (A, adenine).

Table 1. Adenine content of each fraction obtained by ion-exchange chromatography.

Fraction No.	Total OD/10 ml	Adenine mg/10 ml
71	0.00	0.000
72	4.70	0.052
73	4.70	0.052
74	6.00	0.067
75	6.60	0.074
76	7.20	0.080
77	7.30	0.081
78	7.80	0.087
79	11.40	0.127
80	18.80	0.209
81	36.00	0.401
82	66.20	0.737
83	35.40	0.394
84	26.40	0.294
85	15.60	0.174
86	7.40	0.082
87	2.90	0.032
88	0.00	0.000
Total	264.40	2.943

本実験に用いた脱脂大豆粉末 4.933 g 中に 2.943 mg のアデニンが含有していたことが判明し、これを元の生大豆 100 g 当たりに換算すると 49.655 mg のアデニン含量になり、約 0.05% という結果が得られた。

Fig. 5. Chromatogram of cytidine, guanosine and P-1 obtained by HPLC.

Fig. 6. Chromatogram of guanine and P-3 obtained by HPLC.

— P-3-3, ---- guanine.

4. P-1 および P-3 の HPLC

P-1 の HPLC により Fig. 5 のごとく RT から 6 個のピークが認められたが、これらのうち、P-1-3 と P-1-5 は RT および UV 吸収曲線からそれぞれシチジンとグアノシンと同定された。

また、P-3 は HPLC により Fig. 6 のごとく RT から 3 個のピークが認められたが、P-3-3 は RT および UV 吸収曲線からグアニンと同定された。

しかし P-2 の HPLC を検討したが、4 個のピークのいずれも同定することができなかった。

以上の実験結果から、北海道産大豆中に遊離の塩基としてアデニンとグアニン、ヌクレオシドとしてシチジンとグアノシンが存在していることを明らかにした。

考 察

プリン代謝の salvage 経路系の酵素である APRT が欠損すると、アデニンが AMP に再利用されないため、アデニンは 8-ハイドロキシアデニンを経て DHOA に

変化する。この物質は尿中に排泄されるが非常に難溶性であるため、尿中で析出して結石を形成する。

最近、鎌谷ら³⁵⁾により生体内におけるアデニン生合成経路が明らかにされた。すなわち、ATP から生成するS-アデノシルメチオニンがブトレッシンからスペルミン、スペルミンのポリアミン生成過程で $-(CH_2)_3NH_2$ 基の donor となり、生成する5'-メチルチオアデノシンが加水分解されてアデニンが生成することを証明し、従来不明であったアデニンの生合成が明らかとなった。さらにヒトの尿中から0.07~2 $\mu\text{mol/day}$ の5'-メチルチオアデノシンを検出し、アデニンに転換するものと推定している³⁶⁾。

アデニンの生合成に関する実験はヒトの培養リンパ芽球を用いて行なわれたもので、植物細胞にも該当するか否かは不明であるが、今回の著者らの実験で大豆中に遊離のアデニンが0.05% 存在することが明らかとなり、アデニンに内因性と食事由来の外因性アデニンがあることが判明した。

著者らはアデニン投与による高尿酸血症、DHOA 結石さらに慢性腎不全モデル動物の作製等、一連の研究から外因性のアデニンによる腎障害について報告してきた²¹⁾⁻²⁹⁾。ヒトのAPRT完全欠損による幼児の結石の発症は内因性アデニンによるものか外因性アデニンに起因するかは不明だが、成人に発症する例もあり⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾¹³⁾、これらはAPRT部分欠損症によるといわれている。低プリン食を与え、2年以上結石の再発を見ない例も報告されている⁹⁾。

今回、大豆中に遊離のアデニンを見だし、その定量法について検討し、市販乾燥大豆中に遊離アデニンを約0.05% 見出した。大豆は正常人にはきわめて良質のタンパク質源として広く用いられているが、先天的にAPRTを完全あるいは不完全欠損しているヒトの場合、大量の大豆を摂取することは、アデニン結石ならびに腎不全を惹起する可能性も否定できない。現在、各産地の大豆についてさらに遊離アデニンの定量を行なっており、それらについて後日報告したい。

要 約

イオン交換クロマトグラフィー、三次元展開法を用いた高速液体クロマトグラフィーにより、北海道産大豆中の遊離アデニンを定量した。これを元の乾燥大豆当りに換算すると、約0.05% 含有する結果を得た。

本研究の費用の一部は、文部省科学研究費一般研究C (No. 57580029) の援助によって行なわれた。

文 献

- Cartier, P. and Hamet, M. : *C.A. Acad. Sci.*, 279, 883 (1974)
- Debray, H., Cartier, P., Temstet, A. and Cendron, J. : *Pediatric. Res.*, 10, 762 (1976)
- Simmonds, H.A., Van Acker, K.J., Cameron, J.S. and Snedden, W. : *Biochem. J.*, 157, 485 (1976)
- Van Acker, K.J., Simmonds, H.A., Potter, C. F. and Cameron, J.S. : *N. Engl. J. Med.*, 297, 127 (1977)
- Barratt, T.M., Simmonds, H.A., Cameron, J.S., Potter, C.F., Rose, G.A., Arkell, D.G. and Williams, D.I. : *Arch. Dis. Child.*, 54, 25 (1979)
- 武本征人, 永野俊介: 泌尿紀要, 25, 265 (1979)
- 黒田昌男, 三木恒治, 清原久和, 宇佐美道之, 中村隆幸, 古武敏彦, 武本征人, 園田孝夫: 日泌尿会誌, 17, 283 (1980)
- 野呂忠夫, 信原怜子, 萩原正明, 露木和光, 宮島祐, 松岡敏彦: 臨泌, 34, 271 (1980)
- 長田尚夫, 井上武夫, 平野昭彦, 田中一成, 萩田善一, 磯部正治, 林 真一: 臨泌, 34, 981 (1980)
- 竹内宣久, 小野佳成, 梅田俊一, 網川常郎, 松浦治, 平林 聡, 小川洋史, 大島伸一: 泌尿紀要, 27, 1079 (1981)
- Takeuchi, H., Tomoyoshi, T., Takahashi, Y., Yoshida, O., Uchida, M. and Nakamura, T. : *Acta Urol. Jpn.*, 27, 189 (1981)
- Sakamoto, K., Fujisawa, Y., Ohmori, A., Minoda, K., Yamanaka, H. and Nishioka, K. : *Urol. Int.*, 36, 274 (1981)
- Gault, M.H., Simmonds, H.A., Snedden, W., Dow, D., Churchill, D.N. and Penney, H. : *N. Engl. J. Med.*, 305, 1570 (1981)
- Greenwood, M.C., Dillon, M.J., Simmonds, H.A., Barratt, T.M., Pincott, T.R. and Metreweli, C. : *Eur. J. Pediatr.*, 138, 346 (1982)
- 山本 洋, 平石攻治, 白根由美子, 住吉義光, 中村章一郎, 比嘉 功, 山中 寿: 尿酸, 5, 62 (1982)
- 岸 高正, 木谷和夫, 駒澤克孝, 佐倉伸夫, 中本貴久, 中津 博, 林 睦雄, 森山浩之, 仁平寛己, 臼井朋包: 尿酸, 6, 140 (1982)
- 東福要平, 安藤 明, 黒田満彦, 竹田亮祐, 鎌谷直之, 藤森 新, 金子希代子, 赤岡家雄: 第15回尿酸研究会講演抄録, 29 (1984), (東京)
- Bendich, A., Brown, G.B., Philips, F.S. and Thiersch, J.B. : *J. Biol. Chem.*, 183, 267 (1950)
- Philips, F.S., Thiersch, J.B. and Bendich, A. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 104, 20 (1952)
- Lindblad, G., Jonsson, G. and Falk, J. : *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 32, 246 (1973)
- 横澤隆子, 大浦彦吉, 中川 眸, 竹本佳世子: 栄養と食糧, 34, 35 (1981)
- 横澤隆子, 大浦彦吉, 中川 眸, 福田裕子: 農化, 55, 811 (1981)
- Yokozawa, T., Oura, H. and Okada, T. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 28, 519 (1982)
- Yokozawa, T., Oura, H., Zheng, P.D., Fukase, M., Koizumi, F. and Kanaoka, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1297 (1983)
- 横澤隆子, 大浦彦吉, 中川 眸, 岡田敏夫: 農化, 56, 655 (1982)

- 26) Yokozawa, T., Zheng, P.D. and Oura, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2341 (1983)
- 27) Yokozawa, T., Zheng, P.D. and Oura, H. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 245 (1984)
- 28) 大浦彦吉, 横澤隆子, 深瀬真之, 小泉富美朝 : 医学のあゆみ, **125**, 791 (1983)
- 29) 大浦彦吉, 横澤隆子, 鄭 平東, 小泉富美朝 : 医学のあゆみ, **130**, 729 (1984)
- 30) Clifford, A.J. and Story, D.L. : *J. Nutr.*, **106**, 435 (1976)
- 31) 松本美和子, 青柳康夫, 菅原龍幸 : 栄養と食糧, **30**, 155 (1977)
- 32) 篠田隆子, 青柳康夫, 菅原龍幸 : 栄養と食糧, **34**, 153 (1981)
- 33) 篠田隆子, 青柳康夫, 菅原龍幸 : 栄養と食糧, **35**, 103 (1982)
- 34) Stern, I.J., Cosmas, F. and Garvin, P.J. : *Transfusion*, **12**, 382 (1972)
- 35) Kamatani, N. and Carson, D.A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **675**, 344 (1981)
- 36) 金子希代子, 中山裕子, 田島誠也, 藤森 新, 赤岡家雄, 鎌谷直之, 竹内二士夫, 西田琇太郎 : 尿酸, **7**, 252 (1983)

(昭和59年8月2日受理)