核酸系物質に関する研究 (第 1 報)

カツオ幽門垂の核酸並に核蛋白について

守 康 則 (広島大学教育学部)

昭和 29 年 8 月 20 日 受理

Studies on the Substances of Nucleic Acid System. Part 1. Nucleic Acid and Nucleoprotein of Pyloric Caeca of *Skipjack Katsuwonus Vagans*.

By Yasunori MORI (Faculty of Education, Univ. of Hiroshima)

I. 緒 言

核酸が発生、分化、生長、増殖、遺伝適応など生命に関する物質の発現に対して意義をもち、又細胞内に於ける蛋白質と核酸との消長に明瞭なる関連性が見出されて以来核酸系物質の研究の重要性は多くの人人により再認識されて来た。これ等に関しては既に FEULGEN⁽¹⁾, STEUDEL⁽²⁾, BAUMANN⁽³⁾, CLARK⁽⁴⁾, SCHYVER⁽⁴⁾, LEVENE⁽⁵⁾, HAMMARSTEN⁽⁶⁾ その他多くの報文がみられ、その動植物界に於ける分布も胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、淋巴液、酵母等広範囲に及んでいるが、魚類臓器については、精子核蛋白である nucleoprotamine 及び nucleohistone を除いては比較的報文が少い。硬骨魚類に固有な器官である幽門垂の核酸は酵素系及び蛋白合成と関連して興味をそそる。故に著者は硬骨魚類中カツオを選んで次の実験を試みた。

II. 実 験 成 績

(1) 実験材料並に実験方法

A. 供試品 本実験に供したものは高知県宇佐港に陸揚げされた体重 3~4 kg のカツオの幽門垂にして 4 月~8 月魚獲のものであり、その一般成分の平均値は Table 1 の如くである。

B. 核酸の検出並に定量

1. Feulgen 染色法 : 幽門垂組織の固定剤として 6% $\text{HgCl}_2 + \text{CH}_3\text{COOH} + 9.5\% \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (100 : 2 : 100) を用い、操作は凡て塗抹標本固定にした。なお組織原形質中に存在を予想される plasmogen も Hg-Cl_2 と反応分解して aldehyde を生成し、SCHIFF 試薬を着色、FEULGEN 反応と混同されるおそれがあるので、特に 95% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ を併用し plasmogen の溶出除去に努めた。本反応は desoxyribonucleic acid (DNA) より導かれる thymine nucleotide と fucsin 亜硫酸との附加化合物に基づく呈色で、該反応は顕著な陽性を示した。

2. 紫外部吸光係数の測定 : OGUR 法に従つて nucleic acid fraction を分離し、その構成塩基に基づく紫外部の吸光度を Beckmann 光電光度計により測定した。その結果は Fig. 1 の如くである。

3. 磷酸の定量 : SCHMIDT-THAUNHAUSER 法⁽⁶⁾により幽門垂の各種形態の磷酸を定量し、特に核酸分割区の磷酸より次式の如く desoxyribonucleic acid (DNA) 及び ribonucleic acid (RNA) の量を算出した。磷酸の定量はすべて ALLEN 法⁽⁹⁾によつた。その結果は Table 2 の如くである。

Table 1. Chemical Composition of Pyloric Coeca. (Per 100 g fresh matter)

Moisture (%)	Crude protein (%)	True Protein (%)	Crude Fat (%)	Ash (%)
76.20	13.02	3.57	3.37	1.55
AV. Wt. of Pyloric Caeca. 65.2 g

Fig. 1. The ultraviolet spectrum of nucleic acid of the Pyloric Coeca by OGUR method.

A. RNA ; B. DNA

RNA-P $\times$ 10.6=RNA DNA-P $\times$ 10.1=DNA
Table 2. The Distribution of the Phosphate Compounds in the Pyloric Coeca.

(Figures are expressed as mg of P per 100 g of the fresh tissue)

	Total P (mg)	Acid sol. P* (mg)			
		Total P	Inorg. P	Δ_7 P.†**	Organic P
Ratio to T.P.	138.0	82.0	50.0	15.0	32.0
	100	59.4	36.2	10.8	23.2
	Total P (mg)	Nucleic acid fract.		phospho-lipide P	phospho-protein P
		RNA-P	DNA P		
Ratio to T.P.	138	12.0	14.0	3.8	16.0
	100	8.7	10.1	2.7	11.6

* Trichloro-acetic acid (T.C.A) sol.

** Δ_7 P: amount of inorg. P increased by heating 7 min., 100° with 1N HCl.

Contents of RNA and DNA (in 100 g of fresh matter)

P mg (found)	NAC mg (calculated)	
RNA-P 12.0	127.2	DNA/RNA=1.12
DNA-P 14.0	141.4	

† nucleic acid; †† RNA-P $\times$ 10.6=RNA, DNA-P $\times$ 10.1=DNA.

and MIRSKY 法⁽¹⁰⁾が考えられる。RNA に対しては後報に報告することとし、本報に於ては DNA を主体として高濃度の食塩水による単離を行つた。精製は SAVAGE⁽¹¹⁾ の CHCl_3 -gel 法に従い、抽出精製の全過程を通じて組織中の nuclease による核酸の分解を抑制するために、冷却するか又は sodium citric acid を共存せしめた。その結果は Table 3 の如くである。調製された DNA は淡黄白色、無定形の粉末にして、Feulgenr,

Table 3. Separation of DNA by POLLISTER and MIRSKY method.

Fresh tissue 1 kg	
+2M* NaCl Soln.	
Sup. **	Residue.
+(CHCl_3 0.25 Vol +amyl alcohol. 0.1 Vol.	
Sup.	Ppt. (CHCl_3 -Protein-gel)
+95% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	
Ppt.	Sup.
treated same process as above	
Ppt.	Sup.
Washed with absolute alcohol and ether, dried in vacuum.	

Yield: about 1 g. N: 14.2%, p: 7.8%. N/P=1.82.

Thymine: m. p. 321° 一部昇華, 短針状結晶

Analysis: Found N. 22.12%. Calcd. for $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ N. 22.33%

Cytosine picrate: m. p. 250°. 265° にて黒色化.

Analysis: Found N. 24.78%. Calcd. for $\text{C}_4\text{H}_5\text{ON}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3$ N, 24.70%.

該核酸加水分解液の purine 分割区を paper chromatography⁽¹³⁾ にかける溶媒 n -butanol(4)+diethylen glycol (1) + H_2O (1), n -butanol (4) +diethyleneglycol (1) +0.1 N HCl (1), 下降法. spot は水銀塩として固定し, 硫化アンモンにて発色せしめた。下記の塩基を確認した。

n -Butanol (4) +diethyleneglycol (1) + H_2O (1) の場合 R_F : adenine 0.52, guanine 0.27, xanthine 0.30, hypoxanthine 0.42.

n -Butanol (4) +diethyleneglycol (1) +0.1 N HCl (1) の場合 R_F : adenine 0.22, guanine 0.08, xanthine 0.32, hypoxanthine 0.29.

(III) 核蛋白の単離とそのアミノ酸組成

細胞組織に於ては核酸は蛋白質と結合して存在し、従つてこれらの核蛋白が細胞の示す形態学的特長とも関連性をもつてくる。これらの核蛋白は普通は高分子の nucleic acid と比較的簡単な塩基性蛋白である protamins

以上の結果より考察するに、幽門垂中には RNA 並に DNA の分布をみる。一般に細胞質中に含有される RNA は細胞核中に分布をみる DNA に比して、変動し易く生産的活性度も大と考えられるが、カツオ幽門垂に於ては、両者の著しき量的差異は認められなかつた。

(II) Desoxyribonucleic

acid の単離とその組成

一般に RNA に対しては CLARK and SCHRYVER 法⁽⁴⁾, DNA に対しては POLLISTER

and MIRSKY 法⁽¹⁰⁾が考えられる。RNA に対しては後報に報告することとし、本報に於ては DNA を主体として高濃度の食塩水による単離を行つた。精製は SAVAGE⁽¹¹⁾ の CHCl_3 -gel 法に従い、抽出精製の全過程を通じて組織中の nuclease による核酸の分解を抑制するために、冷却するか又は sodium citric acid を共存せしめた。その結果は Table 3 の如くである。調製された DNA は淡黄白色、無定形の粉末にして、Feulgenr, Diphenylamine, MOLISH, Phloroglycine, Resocin, Diazobenzol 反応はいずれも陽性を示した。該核酸の加水分解物については、主として LEVENE 及び SCHOENHEINER and BARNES⁽¹²⁾ の方法に従つて、その構成成分である塩基を単離した。即ち調製核酸を封管中にて 1 N H_2SO_4 にて 175° は於て加水分解, pH 9.0, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 弱アルカリ性に於て遠心分離, 上澄液に pH 6.0 の硝酸酸性に於て 5% AgNO_3 を加えて遠心分離, 上澄液に pH 9.0, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 弱アルカリ性に於て AgNO_3 を加え, 得られる Ag 塩を 1 N HCl にて分解遠沈, 上澄液よりそれぞれ遊離の thymine 及び cytosine picrate を単離した。分析結果は次の通りである。

又は histone 等と静電的結合をなし nucleoprotamine 又は nucleohistone となつていられるが、細菌及びバイラスの desoxypentose-nucleoprotein, 細胞質中の RNA を含む蛋白顆粒などは分子が大きく、非常に複雑にして、その結合も従つて複雑なる配列構造をとることが予想される。RNA 及び DNA の共存をみる幽門垂核蛋白に於ても、histone, protamine とは異なることが予想される。従つて POLLISTER 及び MIRSKY 法⁽¹⁰⁾によつて、核蛋白の分離を行い、併せてそのアミノ酸組成をしらべた。結果は Table 4, 5 に示す通りである。本分離法に於ては、nucleo-clupein の如き糸状沈澱は得られなかつた。鈴木、渡辺⁽¹⁴⁾らは糸状沈澱の形には、蛋白/DNA の比が大なる影響をもち、この比が 0.7 以上に於て始めて糸状沈澱を形成し 0.3~0.7 の間成は絮状沈澱、0.3 以下に於ては乳濁を示すと指摘している。又溶液中の pH により解重合を起し易く、pH 5.6 より酸性に傾くか或は pH 10.9 よりアルカリ性に傾くと急に解重合を伴うと言つている。Clupein は CHCl_3 -gel 形成能を欠くことより、本核蛋白質はその性質に於て、clupein とは趣きを異にするものとする。

Table 4. Separation of Nucleoprotein from the Pyloric Coeca.

Fresh Tissue	
+2 M*NaCl soln.	
Sup.	Ppt.
+ CH_3COOH , pH 6.0	
Ppt. (N: 12.45%, P: 2.35%, N/P=5.3)	
+ (0.25 Vol. + 0.1 Vol.)** (CHCl_3 + amyl alcohol)	
Ppt.	Sup.
+95% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	
Ppt.	Sup.
Washed with absolute $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, dried in vacuum..	
Nucleoprotein: Millon, Biuret, Molish, Xanthoprotein, Orcin-HCl, Phloroglycine React. Positive.	

Analysis, N: 14.45%, P: 2.35%, N/P = 6.15.

* 1 M 以上の NaCl 水中に於ては DNA と蛋白質に比較的容易に解離し、NaCl 濃度が高い程解離度は高く、飽和 NaCl 水中に於ては殆んど完全に近い迄解離される。

** 蛋白質は CHCl_3 +amyl alcohol によつて CHCl_3 -protein gel を形成し除かれる。

白、精製を行い、該核酸の酸加水分解物として、thymine, cytosine の結晶を塩基成分として単離、更らに paper chromatography によつて、purine 塩基として adenine, guanine, xanthine, hypoxanthine を検出した。核蛋白に就て、二次元 paper chromatography を行つた結果そのアミノ酸組成として、glycine, alanine, aspartic acid, glutamic acid, threonine, arginine, histidine, proline, phenylalanine, leucine, tyrosine を検出した。これらの結果幽門垂核蛋白は nucleoprotamine, nucleohistone の如き塩基性蛋白とは異なる構成アミノ酸を有つことが知られる。

終りに臨み、御教示並びに御援助を戴いた九大教授佐々木周郁先生に深く感謝いたします。本報の要旨は昭和 26 年 11 月日本農芸化学会臨時大会に於て発表した。

Table 5. Paper Chromatogram of Amino Acids from the Nucleoprotein of the Pyloric Coeca.
(two dimensional method.)

Amino acid	Density	R _F value.	
		Phenol+ 0.1% NH_4OH	Collidin+ H_2O (1:9)
Alanine	卅	0.65	0.31
Aspartic acid	卅	0.46	0.40
Arginine	卅	0.88	0.18
Leucine	卅	0.86	0.55
Glycine	卅	0.48	0.16
Glutamic acid	卅	0.07	0.23
Histidine	卅	0.75	0.29
Proline	卅	0.88	0.38
Phenylalanine	卅	0.96	0.54
Threonine	卅	0.52	0.37
Tyrosine	卅	0.58	0.66

III. 要 約

カツオ幽門垂に就て、Feulgen 染色、OGUR 法による紫外外部吸光度、SCHMIDT-THAUNHAUSER 法による磷酸の定量より核酸を定量的結果、DNA と共に RNA が存在することを知り、而して両者の著しき量的差異は認められない。POLLISTER and MIRSKY 法により DNA を単離、SAVAGE 法の CHCl_3 の蛋白質に対する特異的 gel 形成の性質を利用して除蛋白、

(1) FEULGEN : *Z. physiol. Chem.*, 90, 261 (1914); 100, 241 (1917).

(2) STEUDEL : *Z. physiol. Chem.*, 42, 170 (1904).

(3) BAUMANN : *J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 17, 118 (1920).

(4) CLARK and SCHRYVER : *Biochem. J.*

11, 319 (1917).

(5) LEVENE : *J. Biol. Chem.*, 53, 441 (1922); 93, 623 (1931), 111, 313 (1935).

(6) HAMMARSTEIN : *Z. physiol. Chem.*, 19, 19 (1894).

(7) OGUR and ROSEN : *Arch. Biochem.*, 25, 262 (1950).

- (8) SCHMIDT and THAUNHAUSER : *J. Biol. Chem.*, 161, 83 (1945).
 (9) ALLEN : *Biochem.*, *J.*, 34, 858 (1940).
 (10) POLISTER and MIRSKY : *J. Gen. Physiol.*, 30, 101 (1946).
 (11) SANAGE : *J. Biol. Chem.*, 140, 833 (1941).
 (12) BARENES and SEHOENHEINER : *J. Biol. Chem.*, 151, 123 (1943).
 (13) HOTCHKISS : *J. Biol. Chem.*, 175, 315 (1948).
 HOLIDY : *Nature*, 163, 212 (1949).
 VISCHUR : *J. Biol. Chem.*, 176, 703 (1948), 168, 781 (1947).
 (14) 鈴木, 渡辺 : 自化, 72, 578 (1951); 72, 58 (1951).

Summary

The substances of nucleic acid system in the Pyloric coeca of *Skipjack Kasuwonus Vagans* were estimated by the phosphate compound fractionation and the optical density of ultraviolet spectrum, and there was found that its tissue contained DNA and RNA in almost equal amount. DNA was extracted by POLLISTER and MIRSKY method and purified by SAVAGE method. Thymine and cytosine were isolated from the pyrimidine fraction and adenine, guanine, xanthine and hypoxanthine were identified by the paper chromatogram from the purine fraction. Nucleoprotein was isolated; and arginine, leucine, threonine, glycine, aspartic acid, histidine, alanine, phenylalanine, proline, tyrosine and glutamic acid were identified by the chromatogram from the hydrolysate of the nucleic acid. The properties of this nucleoprotein seems to be different from nucleoprotamin or nucleohistone.

核酸系物質に関する研究 (第2報)

豚膵臓に於ける Ribonuclease について

守 康 則 (広島大学教育学部)

昭和 29 年 8 月 20 日 受理

Studies on the Substances of Nucleic Acid System. Part 2.

On the Ribonuclease of the Pig Pancreas.

By Yasunori MORI (Faculty of Education, Univ. of Hiroshima)

I. 緒 言

核酸及びその誘導体に作用する核酸分解酵素は広く動植物界に分布し、膵臓、肝臓、脾臓、腸粘膜、植物種子等に存在して核酸の調製や核酸構造の研究に重要性を示している。核酸分解酵素は、ribonucleic acid (RNA) 及び desoxyribonucleic acid (DNA) の代謝調節に関与するばかりでなく、生体内の細胞組織に於ける磷酸代謝、蛋白合成とも関係をもつことが予想される。特に蛋白合成との関係の特質づけるものとして、JEENER⁽¹⁾, BRADFIELD⁽²⁾ は細胞質顆粒に分布をみるアルカリ性 phosphatase が新蛋白の合成特に繊維性蛋白の生成に関係をもつことを示し、DAVIDSON⁽³⁾ もアルカリ性 phosphatase が細胞組織に於て、蛋白合成の位置に多くなることを認めている。著者は細胞に於けるアルカリ性 phosphatase の活性と核蛋白との関連性、更に核酸あるいは蛋白質に関係する磷酸代謝との関係についての知見を得る手段として、核酸分解酵素中特に耐熱性、耐酸性に特異性をもつ解重合酵素たる ribonuclease の特性を豚膵臓について調べた。なお、豚膵 ribonuclease に関する研究としては JONES⁽⁴⁾, KUNITZ⁽⁵⁾, McDONALD⁽⁶⁾ の牛膵臓、MACLEOD⁽⁷⁾ の鼠、兎の膵臓に関するものの外には豚に関するものがないので併せて牛膵臓のものと特性を比較検討することにした。

II. 実験材料及び実験方法

(1) 酵素液の調製⁽⁸⁾ 新鮮豚膵臓を冷却下に磨碎し、氷冷しながら 0.25 N H₂SO₄ にて抽出し、抽出液について、(NH₄)₂SO₄ による分別精製を行つた。即ち (NH₄)₂SO₄ 0.5 飽和度に於て、chymotrypsinogen 等の夾雑する蛋白質分解酵素を除き、0.8 飽和に於て ribonuclease (RNase) を沈澱分離した。更に随伴する蛋白分解酵素を除くために、(NH₄)₂SO₄ 0.2 飽和液、pH 3.0 (この飽和度及び pH に於て RNase は最も安定度が高い) 中に 95°, 5 分間加熱処理を行い、冷却後遠心分離して、得られる上澄液について、(NH₄)₂SO₄ の分別精製を同じ方法で更に 2 回繰りかえし行つた。精製酵素を蒸留水に溶解し実験に供した。