報 文

5'-リボヌクレオチドの安定性に関する研究 (第3報)

トリウムイオンによる 5'-リボヌクレオチド脱リン酸の分析的应用

その 1. 簡単なリボヌクレオシド調製法

(昭和 49 年 12 月 3 日受理)

楠 井 貞 郎* 村 越 明*
森 田 泰 輔* 森 秀 将*

Studies on the Stabilities of 5'-Ribonucleotides (III)

Analytical Applications of the Dephosphorylation of 5'-Ribonucleotides
with Thorium Ion

Part 1. A Simple Preparation of Ribonucleosides

Sadao KUSUI, Akira MURAKOSHI, Taisuke MORITA
and Hideyuki MORI(Quality Testing Section of Takasago Plant, Takeda Chemical Industries, Ltd.: 1-5,
Aioi-machi, Takasago-cho, Takasago, Hyogo)

A simple preparation of ribonucleoside (I) from 5'-ribonucleotide (II) was investigated by taking advantage of the dephosphorylation of II with thorium ion (Th(IV)).

The decomposition of II to I with Th(IV) was remarkably influenced by a kind of buffer solutions employed. The decomposition was greatly accelerated in acetate (pH 3 and 4), Tris-hydrochloric acid (pH 7), and ammonium (pH 9~12) buffers, but completely inhibited in citrate (pH 4), phosphate (pH 7), and carbonate (pH 11) buffers.

An increased reaction temperature in the range of 25 to 100°C tested was advantageous for the production of I from II.

The production of I apparently attained equilibrium when Th(IV) was used 4 times the molar quantity of II in acidic media, and 6~8 times that of II in neutral and alkaline media.

From the results described above, the most suitable conditions for the decomposition of II to I have been established. For the preparation of a purine I, the corresponding II is treated in ammonium buffer (pH 10) with Th(IV) at 8 times the molar quantity of II at 100°C for 2 hours. For that of a pyrimidine I, the corresponding II is decomposed in acetate buffer (pH 3) with Th(IV) at 4 times the molar quantity of II at 100°C for an hour.

All the reaction mixtures treated under the conditions described above were found to be utilized as standards of I, which are examined in the thin-layer chromatography of II described in "The Japanese Standards of Food Additives 3rd Ed".

It has been suggested that I obtained from II can be simply isolated by suitable

* 武田薬品工業株式会社 高砂工場試験課: 兵庫県高砂市高砂町相生町1番5号

separation procedures.

(Received December 3, 1974)

緒 言

「食添三」に収載されている 5'-ribonucleotide (5'-RNT) のうち, 5'-イノシン酸ナトリウム (5'-IMP), 5'-ウリジル酸ナトリウム (5'-UMP), 5'-グアニル酸ナトリウム (5'-GMP), 5'-シチジル酸ナトリウム (5'-CMP) では, それらに混入する不純物の一つとして, それぞれの ribonucleoside (RNS) が薄層クロマトグラフィー (TLC) で調べられる¹⁾. この場合, 標品の RNS には試薬が用いられるが, 実験室で手軽に RNS を調製する方法があれば, 十分そのような目的に使用できると思われる. 簡易さからは, 試験しようとする 5'-RNT を原料として RNS を調製するのが最もよいと思われる. そのような方法としては脱リン酸酵素による方法^{2)~4)}, 高温加圧下で分解する方法⁵⁾, 還流下に長時間加熱分解する方法^{6), 7)}, などが考えられるが, いずれも実験室的な方法としては難点がある. そのため, 本報では, トリウムイオン [Th(IV)] のもつ強い脱リン酸触媒作用^{8), 9)} を利用し, 5'-RNT から RNS を調製して, 「食添三」の 5'-RNT 純度試験項目中の TLC へ応用した.

実験方法

1. 5'-RNT

5'-IMP, 5'-GMP, 5'-UMP, 5'-CMP, および disodium 5'-adenylate (5'-AMP) はいずれも武田薬品(株)製を使

用.

2. 試 薬

2.1 RNS および Base

inosine (Ino), guanosine (Guo), cytidine (Cyd), uridine (Urd), hypoxanthine (Hyp), guanine (Gua), cytosine (Cyt), uracil (Ura) はいずれも和光純薬(株)製を使用.

2.2 Th(IV) 溶液

特別に断りのない限り, 前報⁸⁾ と同じ液を用いた.

2.3 緩 衝 液

次の 1 M 緩衝液を使用. 酢酸ナトリウム—塩酸 (pH 3, 4, 5), 第二クエン酸ナトリウム—塩酸 (pH 4), グリシン—塩化ナトリウム—塩酸 (pH 4), トリシュー塩酸 (pH 7), リン酸—カリウム—リン酸二ナトリウム (pH 7), グリシン—水酸化ナトリウム (pH 7), アンモニア水—塩化アンモニウム (pH 9, 10, 11, 12), 炭酸ナトリウム—炭酸水素ナトリウム (pH 11).

2.4 その他の試薬

試薬特級 (和光純薬(株)製) を使用.

3. 5'-RNT から RNS への分解

特別に断りのない限り, 5'-RNT のうち, 5'-IMP と 5'-UMP とを選び, 前報の方法⁸⁾ で加熱分解し, 生成した Ino または Urd を定量した⁹⁾.

Table 1. Influence of Buffers and pHs on the Production of Ribonucleosides from 5'-Ribonucleotides with Th(IV)

Each reaction mixture consisting of 5'-IMP or 5'-UMP (6×10^{-3} M, 1 ml), Th(IV) (1×10^{-2} M, 2 ml) or plain water (2 ml) and a buffer (1 M, 3 ml) was kept at 100°C for 120 min

pH	Buffer	Produced ribonucleoside (%)			
		Inosine		Uridine	
		Without Th(IV)	Th(IV) added	Without Th(IV)	Th(IV) added
3	Acetate	10.0	61.1	6.4	86.6
4	Acetate	9.7	71.5	6.1	77.1
	Citrate	11.6	11.0	—	—
	Glycine-HCl	13.8	22.9	8.9	23.6
7	Tris-HCl	4.6	40.1	4.2	41.2
	Phosphate	3.3	2.3	—	—
11	Glycine-NaOH	0.7	38.3	0.7	32.4
	Carbonate	1.8	1.0	—	—
9	Ammonium	2.1	61.9	1.7	57.9
10	Ammonium	1.4	66.0	2.1	59.9
11	Ammonium	0	66.1	0.3	56.8
12	Ammonium	0	63.7	0.7	54.4

Fig. 1. Influence of pH on the production of inosine from 5'-IMP with Th(IV)

The same reaction mixture as described in Table 1 was kept at 100°C for the indicated time.

○—○, pH 4 (acetate); ◐—◐, pH 7 (Tris-HCl); ●—●, pH 10 (ammonium).

Fig. 2. Influence of pH on the production of uridine from 5'-UMP with Th(IV)

The same reaction mixture as described in Table 1 was kept at 100°C for the indicated time.

△—△, pH 4 (acetate); ◐—◐, pH 7 (Tris-HCl); ▲—▲, pH 10 (NH₄OH)

4. TLC 標品に用いる RNS の調製法

4.1 Ino および Guo

$6 \times 10^{-3} M$ 5'-IMP または 5'-GMP 溶液 0.5 ml, $2.4 \times 10^{-2} M$ Th(IV) 溶液 1 ml, 1 M アンモニウム塩緩衝液 (pH 10) 1.5 ml を 10 または 20 ml の試験管にとり、軽く栓をして 100° (水浴中) で 2 時間加熱する。反応混合物を流水中で室温まで冷却し、その 1~2 μ l を Ino ま

Fig. 3. Influence of temperature on the production of ribonucleosides from 5'-ribonucleotides with Th(IV)

The same reaction mixture as described in Table 1 was kept at the indicated temperature for 300 min and the symbols are the same as those of Figs. 1 and 2.

Fig. 4. Influence of amount of Th(IV) on the production of ribonucleosides from 5'-ribonucleotides

The procedure except amount of Th(IV) was the same as described in Table 1 and the symbols are the same as those of Figs. 1 and 2.

たは Guo の標品として TLC に用いる。

4.2 Urd および Cyt

$6 \times 10^{-3} M$ 5'-UMP または 5'-CMP 溶液 0.5 ml, $1.2 \times 10^{-2} M$ Th(IV) 溶液 1 ml, 1 M 酢酸塩緩衝液 (pH 3) 1.5 ml をとり、以下 4.1 と同様に操作して、TLC 用の Urd または Cyt 標品とする。ただし、分解時間は 1 時間とする。

Fig. 5. Time course of the production of purine ribonucleosides from 5'-ribonucleotides with Th(IV)

Each reaction mixture consisting of a ribonucleotide ($6 \times 10^{-3} M$, 0.5 ml), Th(IV) ($2.4 \times 10^{-2} M$, 1 ml) and 1 M ammonium buffer (pH 10, 1.5 ml) was kept at 100°C for the indicated time.

×—×, adenosine from 5'-AMP; ●—●, inosine from 5'-IMP; ■—■, guanosine from 5'-GMP.

5. TLC

「食添三」の方法⁹⁾および Grippo らの方法¹⁰⁾によった。

すなわち, 5'-IMP, 5'-GMP, および 5'-CMP とそれぞれの分解物の TLC には, 薄層板として市販のシリカゲル (けい光剤入り) 板 (メルク社製), 展開溶媒として, アセトン—アンモニア試液—*n*-プロピルアルコール (2:5:6) を用いた。また, 5'-UMP とその分解物の場合には, 薄層板として市販の微結晶セルロース板 (東京化成(株)製), 展開溶媒としてアルコール—うすめた塩酸 (1→10)—エチレングリコール モノメチル エーテル (2:1:2) を用いた。

一方, 薄層板として市販の微結晶セルロース板 (東京化成(株)製), 展開溶媒として飽和硫酸 アンモニウム溶液—1 M 酢酸ナトリウム溶液—イソプロピルアルコール (40:9:1) を用いる Grippo らの方法では, 4 種の 5'-RNT とそれぞれの分解物を同一板上で展開した。

なお, いずれの場合も, 5'-RNT およびその分解物は $6 \times 10^{-3} M$ 溶液を 1~2 μ l 塗布し, 原線から約 10 cm まで展開して風乾後, 紫外線下に班点を検出した。

結 果

1. 5'-RNT から RNS への分解について

1.1 緩衝液と pH

Th(IV) による 5'-RNT の脱リン酸は pH によって^{8),9)}, また他のリン酸モノエステルの例でみられるよ

Fig. 6. Time course of the production of pyrimidine ribonucleosides from 5'-ribonucleotides with Th(IV)

Each reaction mixture consisting of a 5'-ribonucleotide ($6 \times 10^{-3} M$, 0.5 ml), Th(IV) ($1.2 \times 10^{-2} M$, 1 ml), and 1 M acetate buffer (pH 3, 1.5 ml) was kept at 100°C for the indicated time.

△—△, uridine from 5'-UMP; □—□, cytidine from 5'-CMP.

うに緩衝液によっても影響される¹¹⁾。そのため, 5'-RNT から RNS への分解についても緩衝液と pH の影響について, 120分の分解時間で調べた。

Th(IV) による 5'-RNT から RNS への分解は, Table 1 のように, pH によっても, また同一 pH でも緩衝液が異なれば, Ino および Urd の生成量は大きく変動した。Th(IV) 共存時に, Ino または Urd 生成率の高かった緩衝液としては, 酢酸塩 (pH 3, 4), アンモニウム塩 (pH 9~12), トリス—塩酸 (pH 7), グリシン—水酸化ナトリウム (pH 11) であった。これらの緩衝液中では, Th(IV) が 5'-RNT に対する脱リン酸触媒作用を十分発揮し, RNS の生成に有利となっていることが分かった。

一方, クエン酸塩 (pH 4), リン酸塩 (pH 7), 炭酸塩 (pH 11) では Th(IV) の 5'-RNT に対する脱リン酸触媒作用が完全に消失した。また, グリシン—塩酸 (pH 4) でも触媒作用が弱められた。したがって, これらの緩衝液は, RNS を得る目的に使用できないことになる。

5'-RNT に対する Th(IV) の脱リン酸触媒作用に有効であった緩衝液のうち, アンモニウム塩以外は, Table 1 に示した pH 付近で, Th(IV) の触媒作用が極大となることがすでに確認されている⁸⁾。今回の検討で, アンモニウム塩緩衝液では, pH 9~12 で Th(IV) の脱リン酸触媒作用に大差がないが, pH 10 付近が極大となっていることが分かった。

Fig. 7. Thin-layer chromatogram of 5'-ribo-nucleotides and their decomposition products

Adsorbent, microcrystalline cellulose; developing solvent, saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ soln.—1 M CH_3COONa —*iso*-PrOH (40 : 9 : 1); detection, UV light (254 nm).

A and B, decomposition products of 5'-IMP and 5'-GMP with Th(IV) for 2 hr under the same condition as described in Fig. 5; C and D, decomposition products of 5'-UMP and 5'-CMP with Th(IV) for 1 hr under the same condition as described in Fig. 6.

さらに、Ino または Urd がどの極大で最も効率よく生成されているかを知るため、それぞれの生成の時間的経過を調べた。

Fig. 1 に示すように、Ino の生成量は、反応初期において pH 4 (酢酸塩) が最も高いが、時間の経過で pH 10 (アンモニウム塩) が最高となることが分かった。

Fig. 2 には、5'-UMP からの Urd 生成の様子を示すが、pH 3 (酢酸塩) が最も効率のよい Urd 生成条件であった。以後 Urd 生成には、酢酸塩 (pH 3) を用いた。

1.2 温度

RNS の生成に及ぼす温度の影響を知るため、5'-IMP を酢酸塩 (pH 4) およびトリス塩 (pH 7) 中で、5'-UMP を酢酸塩 (pH 3) 中で、25~100°, 5時間加熱分解した。

生成した Ino および Urd と温度との関係を Fig. 3 に示す。

Fig. 3 のように、温度の影響は Ino と Urd とで、また pH によっても若干異なった。しかし、いずれの場合も温度の上昇で、Ino または Urd 生成は急激に高くなったので、RNS の調製には、高い温度ほど有利と思

Fig. 8. Thin-layer chromatogram of 5'-ribo-nucleotides and their decomposition products according to the method described in JSFA III.

Adsorbent, silica gel F₂₅₄, developing solvent, CH_3COCH_3 — NH_4OH TS—*n*-PrOH (2 : 5 : 6); detection, UV light (254 nm).

A, B and D, the same decomposition products as described in Fig. 7.

われた。

1.3 Th(IV) 添加量

5'-RNT から RNS への分解に Th(IV) の使用量がどのように影響するかを調べるため、5'-IMP を酢酸塩 (pH 4), トリス塩 (pH 7), アンモニウム塩 (pH 10) 中で、5'-UMP を酢酸塩 (pH 3) 中で、Th(IV) 添加量を1/2~10倍 (モル比) として、120分間加熱分解した。

Fig. 4 に示すように、pH 3 または4では、Th(IV) 量が5'-RNT の4倍以上、pH 7 で7倍以上、pH 10 で8倍以上のとき、Ino または Urd の生成が見掛け上一定となった。しかし、みかけの平衡状態における Ino または Urd の生成量は、それぞれの条件で異なった。Ino に例をとれば、pH 10 > pH 4 > pH 7 であった。

1.4 RNS 生成の至適条件

前項までに調べた結果から、実験方法4のような、5'-RNT から RNS の生成至適条件を設定した。これらの条件下における各 RNS の生成の時間的経過を示せば、Fig. 5 および 6 のようになる。

purine RNS の生成は、Fig. 5 のように、反応1時間で急激に起こり、2~3時間で見掛けの平衡に達した。

pyrimidine RNS の生成は、Fig. 6 のように、1~2時間で見掛けの平衡に達した。

Fig. 9. Thin-layer chromatogram of 5'-UMP and its decomposition products according to the method described in JSFA III.

Adsorbent, microcrystalline cellulose; developing solvent, EtOH—dil-HCl—HOCH₂CH₂OCH₃ (2 : 1 : 2); detection, UV light (254 nm); C, the same decomposition product as described in Fig. 7.

2. TLC への応用

「食添三」収載の 5'-RNT の純度試験中「他の核酸分解物」では、5'-RNT の分解物の一つとして RNS の混入が TLC で調べられる¹⁾。前項に述べたように、RNS の生成は至適条件下で 80~95% に達し、しかも RNS 以外の分解物は無視し得る²⁾ので、RNS を単離しなくとも、反応混合物はそのまま RNS の標品として TLC に用いることができると思われた。そこで、実験方法 4 で処理した反応混合物をそのまま TLC に用いた。

4 種の 5'-RNT とそれぞれの分解物を同時に展開した Grippo らの方法¹⁰⁾によるクロマトグラムを Fig. 7 に示す。また、「食添三」法¹⁾による 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-CMP とそれぞれの分解物のクロマトグラムを Fig. 8 に、5'-UMP の場合を Fig. 9 に示す。これらのクロマトグラムで明らかなように、いずれの反応混合物も RNS の 1 スポットしか与えず、それぞれは RNS の標品として用いられることが確認された。

考 察

Th(IV) による 5'-RNT から RNS への分解は、緩衝液の種類によって大きな影響を受けた。これは、脱リン酸反応が 5'-RNT のリン酸基と Th(IV) との結合から始まり、この第 1 段階へ緩衝液の成分が影響するためと思われる。

Table 1 に示したように、クエン酸塩緩衝液中では、Th(IV) の脱リン酸触媒作用が全く消失した。強力なキレート作用をもつクエン酸塩と Th(IV) がキレート化合

物を形成し、Th(IV) がもはや 5'-RNT と反応し得ない状態になったためと考えられる。同じく触媒作用を弱めたグリシン緩衝液でも、グリシンのキレート作用にその原因を求めることができよう。また、リン酸塩、炭酸塩緩衝液中でも Th(IV) の作用は全く消失した。この場合は、リン酸塩および炭酸塩は Th(IV) と結合して、白色難溶性沈殿を生成したが、この沈殿反応が Th(IV) と 5'-RNT のリン酸基との反応より優先して起こる結果と考えられる。

本報では、5'-RNT を Th(IV) で分解した反応混合物をそのまま RNS の標品として TLC に用いたが、反応混合物を適当な分離手段、例えば、高美らの方法⁷⁾を用いれば、従来から知られている 5'-RNT から RNS を得るの方法よりも簡便な RNS 調製法となり得るものと考えられる。

要 約

Th(IV) 触媒による 5'-RNT の脱リン酸反応を利用して、RNS の簡単な調製法が検討された。使用する緩衝液とその pH、反応温度、Th(IV) 添加量を検討した結果、次のような条件を設定した。

purine RNS は「アンモニウム塩緩衝液 (pH 10) 中、5'-purine RNT をその 8 倍 (モル比) の Th(IV) 共存下に 100°, 2 時間分解」する。

pyrimidine RNS は「酢酸塩緩衝液 (pH 3) 中、5'-pyrimidine RNT をその 4 倍 (モル比) の Th(IV) 共存下に 100°, 1 時間分解」する。

これらの条件で処理した反応混合物は、そのまま RNS の標品として、「食添三」収載の 5'-RNT 純度試験項目中の TLC に用いることができた。

また、適当な分離法を併用すれば、5'-RNT から RNS が簡単に単離調製できることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うに当たり終始御鞭撻を賜った当工場長多田統雄氏に深謝します。また実験に協力していただいた松尾みち子、田中淳子の両嬢に感謝します。

文 献

- 1) 食品添加物公定書解説書編集委員会編: “第三版食品添加物公定書解説書” B109, 114, 220, 399, 968, 971 (1973) 広川書店。
- 2) 中尾義雄, 神崎俊彦, 奈良 潔, 五十嵐政二: 特許公告, 昭和43—28959。
- 3) 今田 哲, 五十嵐政二: 特許公告, 昭和43—28956。
- 4) 藤島鉄郎, 辻村潤治, 鈴木守郎, 吉野 宏: 特許公告, 昭和47—27037。
- 5) 野村容朗, 鈴木光男: 特許公告, 昭和42—11835。
- 6) 奈良 潔, 小島保夫: 特許公告, 昭和39—26858。
- 7) 高美 章, 今沢正興, 入江昌親, 浮田忠之進: 薬誌, 85, 658 (1965)。

-
8) 楠井貞郎, 村越 明, 森 秀将: 食衛誌. 15 , 356 (1974).	10) Grippo, P., Iaccarino, M., Rossi, M., Scarano, E.: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 95 , 1 (1965).
9) 楠井貞郎, 村越 明, 森 秀将: 同上, 14 , 535 (1973).	11) 楠井貞郎, 片桐 清, 中谷弘実: 武田研究所報, 30 , 344 (1971).