カツオ幽門垂中の未知因子に関する研究—V—

未知因子の成分組成

柿 本 大 壱

(1962 年 2 月 12 日受理)

STUDIES ON THE UNKNOWN FACTOR IN THE
PYLORIC COECA OF SKIPJACK—V—
COMPOSITION OF THE UNKNOWN FACTOR

Daiichi KAKIMOTO*

The chemical composition of an unknown factor having promoting effect on the growth of *Leuconostoc citrovorum* was measured and the following results were obtained.

The unknown factor contains ribose and amino acid complexes; it shows higher ribose content (about 60%) and lower amino acid complexes (about 40%).

The content of amino acid in the unknown factor is 22.0, 5.2, 4.3 and 7.4% for lysine, serine, alanine and glutamic acid, respectively (Table 1).

未知因子の濃縮分離法については、すでに本誌^{1),2)}で報告したところである。今回はこのかなり活性の高められた未知因子の結晶に含まれる各種成分を検出し、さらに概略の組成を知ることができたので、その実験法ならびに結果について報告する。

実験ならびに考察

第Ⅲ報¹⁾の分離法により得た粗結晶をさらに無水アルコールならびに水を用いて再結晶を繰り返えし、低温に放置すれば柔かい針状結晶を得る。この結晶はいくぶん黄褐色を呈する。該結晶は *Leuconostoc citrovorum* に対し第Ⅲ報に記されたのとはほぼ同程度の活性を示す。以下述べる実験結果はこの結晶を試料に用いたものである。未知因子は各種の定性試験により糖類、アミノ酸からなる物質と判断されるが、とくに糖成分は糖反応中モリッシュ反応、オルシン反応陽性なることから五炭糖の存在が予想され、また窒素成分は全窒素の大部分がアミノ態窒素であることから、アミノ酸が主体であることも想像される。

i 未知因子の元素分析

元素分析の結果は H: 6.1%, C: 48.9%, N: 9.4%, 灰分 0.05% であり、ケルダール法による N は 8.75%, パンスライク法によるアミノ態 N は 1.23%, 加水分解後のアミノ態 N は 6.2% であつた。

ii 糖成分の決定

未知因子の結晶が五炭糖の反応を与えるので、その糖を決定するため、結晶を核酸中の糖分離の加水分解法³⁾ならびに多糖類の分解法⁴⁾にならい加水分解を行なつた。すなわち 20mg の結晶に 0.1N-HCl を 20cc 加え、逆流冷却下で加熱し、おのおの 1 時間から 12 時間の各時間ごとに分解液の 2cc をとり、モリッシュ、オルシンおよびアニンフタレートによる呈色を検べた結果は各時間とも前二者による反応のみが陽性でアニンフタレートの反応は陰性であつた。しかるに 10% HCl で前回同様に加水分解すると 2 時間加水分解したものには前記いずれの反応も陽性を示し、加水分解物は *Leuconostoc citrovorum* に対し不活性になることを知つた。すなわち加水分解によつて糖が遊離したものは未知因子としての活性を示さない。モリッ

* 鹿児島大学水産学部 (Fac. of Fish., Univ. of Kagoshima, Shimoarata-cho, Kagoshima).

ユ、オルシンなどの反応はウロン酸に対しても同様に呈色するので、未知因子中の糖は五炭糖もしくはウロン酸によるものと推定される。次にこれらの糖がいずれに属するかを決めるために、10% HCl で2時間加水分解した試料を減圧下で濃縮し、塩酸をできるだけ除去後残る酸を少量の苛性ソーダで正確に中和する。中和液はさらに減圧濃縮して乾固し、アルコールで糖を抽出した。抽出した溶液を濃縮後、汙紙クロマト法で糖の検出を行なった結果、標本のD・リボースと一致した。さらに糖の種類を確かめるために抽出液の一部はプロモ・フェニール・ヒドラゼンによりヒドラゾンに代え、その融点を測定した結果は164°Cで、これもまた標本D・リボースと良く一致した。しかしながら前記の糖反応はウロン酸とリボースを正確に区別するものではない。自然界にはキシラン、アラバンのごとき多糖類も知られているので、もし未知因子の糖がウロン酸であつても脱炭酸されて五炭糖を生成しないとはいいい得ない。未知因子の糖がウロン酸より成るか否かを確かめるために、この結晶をそのまま試料として一般に知られている次のごときウロン酸の反応を試験してみた。

1) ナフトレゾルシン反応: 未知因子 25mg を蒸留水 10cc に溶解し、その 4cc に 38% の塩酸 4cc およびナフトール・レゾルシン(1,3-デヒドロキシナフタレン) 0.1g を加え 1 分間煮沸後 50°C に冷却し、ベンゼン 10cc でこれを抽出し赤紫色の反応を観察した。標本のウロン酸(市販グルコウロン酸ラクトン)はこの試験により呈色したが、未知因子は呈色しなかつた。なお、ナフトレゾルシン反応を行なったものについて吸光曲線を求めた結果、市販グルコウロン酸は 559m μ にピークが認められるのに対し、未知因子は 550m μ および 451m μ の二カ所にピークが認められた。以上の結果からも未知因子の糖はウロン酸ではないと思われる。

2) カルバゾール・硫酸反応: 未知因子の結晶 25mg を 1cc の水に溶解し、冷却しつつ濃硫酸を約 6cc 加え、これを湯煎上で 20 分間加熱後冷却しつつ 0.1% のカルバゾールのアルコール溶液 0.2cc を加えたが、標本のグルコウロン酸はピンク色に発色したが、この結晶はまったく発色を認めなかつた。以上、結晶による前記両反応とも陰性であるのみならず、加水分解した試料も同様な試験でウロン酸の反応を示さなかつた。したがつて、これらの実験結果から未知因子の糖はリボースであることが推定される。

iii 窒素成分の決定

すでに述べたように、元素分析による N の値がケルダール法と比較してほぼ一致することから、未知因子の窒素は大部分が $-NH_2$ 、 $-NH$ などに由来するものと解釈される。パンスライク法によるアミノ態窒素の量は 1.23% であるのに対し、加水分解後は 6.2% と増加を示すことから一種のペプチッドが予想される。よつてこの事実を確かめるために、この結晶とその加水分解物につき汙紙クロマトを行ない、含まれるアミノ酸類の検出を行なった。すなわち、未知因子結晶 50mg をごく少量の水に溶解し、汙紙クロマトにかけると同時に、同量の結晶を 10% の塩酸で約 20 時間加水分解し、減圧濃縮を繰り返してできるだけ残存する塩酸を除去し、少量の苛性ソーダで pH を 6.4 に調整したものを汙紙クロマトにかけた。展開剤はブタノール・酢酸・水 (4:1:1)、および 25% 含水フェノールによる二次元法のクロマトを行ない、ニンヒドリンで発色させた。結晶そのものはまったくニンヒドリンによるスポットを与えないが、加水分解したものはリジン、グルタミン酸、セリン、アラニンの四種類と一致する色斑を与えた。

iv 未知因子の成分組成

未知因子が糖とアミノ酸よりなる物質であることは前項までの実験結果で明らかにされ、さらに定性的にはリボースとリジン、グルタミン酸、セリン、アラニンなどが確認された。未知因子中にこれらの各成分がいかほど含まれるかにつき、おのおのを定量した結果は次のごとくである。

a) 糖の含有量: 未知因子結晶 20mg を試料とし、Mejdaum 法によりオルシン・HCl 反応で定量した。

b) アミノ酸類の含有量: 未知因子結晶 50mg を 10% HCl で 20 時間加水分解を行ない、常法にしたがい塩酸を除去、pH を 6.4 に調整したものを全容を 0.1cc とし、その 0.02cc をマイクロピペットで正確に汙紙上にとり、ブタノール・酢酸・水 (4:1:1) の展開剤で 25cm まで展開したのちニンヒドリンで発

色せしめ、デンストメータを使用し各アミノ酸を定量した。糖、アミノ酸の含有量は Table 1 の通りである。

以上の実験で明らかなように未知因子の主成分は糖（リボース）であり、全体の約 60% を占めている。またアミノ酸ではリジンが多く 22% であり、ほかの三種類はほぼ似た含有量で約 5~7% であつた。糖とアミノ酸よりなる化合物の一種として Taichoic acid⁹⁾

が知られているが、これは主として *Lactobacillus arabinosus*, *Bacillus subtilis* から分離された化合物である。いままでに知られているこの物質の組成は Polyribitol phosphate が glucosyl ならびに alanyl 結合をしていることがわかつている。また細菌類の細胞膜には糖とペプチドの結合したのもも発見されているが、著者がいままで報告した未知因子は、これらの化合物とは異なるようである。現在までの研究結果からは未知因子が単に *Leuconostoc citrovorum* に活性を示し、CF と栄養要求の面で置き換えられること以外には何ら明らかではない。本報告では *Leuconostoc citrovorum* に対する活性物質が糖とアミノ酸類から成る物質なることを予想し得たが、さらにこの結晶の純度を確かめた上で決定的なものにしたいと考えている。

本研究に御教示を賜つた北大中村幸彦教授、菌を分譲して下さつた醸酵研究所長長谷川武志氏に深謝すると同時に、本研究の一部は昭和 36 年度文部省科学研究費によつて行なわれたことを付記し、これらの御協力に謝意を表する。

要 約

Leuconostoc citrovorum の発育因子としてカツオ幽門垂から分離した未知因子の成分組成を研究し、五炭糖と数種のアミノ酸よりなる化合物であることを知つた。糖はリボースであり約 60% 含まれ、アミノ酸中もつとも多く含まれるものはリジンで約 22%、そのほかはほぼ類似の含有量でおのおのアラニン 4.3%、グルタミン酸 7.4%、セリン 5.2% であつた。

文 献

- 1) 柿本大竜：本誌，26，989 (1960).
- 2) ———：本誌，26，996 (1960).
- 3) 江上不二夫：“核酸および核蛋白質” 共立出版株式会社，昭和 26 年，p. 102.
- 4) 左右田徳郎・江上不二夫編：“多糖類化学” 共立出版株式会社，昭和 30 年，p. 23.
- 5) J. J. ARMSTRONG, J. BADDILEY, J. C. BUCHANAN, B. CARSS and G. R. GREEN-BERY: *J. Chem. Soc.*, 1958, 4344.

Table 1. Content of ribose and amino acids in the crystalline crude Unknown Factor.

Components	Content in 100g. of the crude crystal	g.
Serine	5.2	
Alanine	4.3	
Glutamic acid	7.4	
Lysine	22.0	
Ribose	61.5	