124. 清水隆作: Ag-RNA-Complex を介する核酸の精製法について (第3報¹⁾)Ryusaku Shimizu: A Method for Purification of Ribonucleic Acid
through the Formation of Ag-RNA-Complex. III.

(Department of Chemistry, Research Institute of Tuberculosis, Kanazawa University*)

The fact that the ribonucleic acid regenerated from its silver complex is of higher purity than that of commercial yeast nucleic acid preparation suggests the possibility of the use of this process for purification of ribonucleic acid preparations. The commercial preparation of sodium yeast-ribonucleate was found by ninhydrin reaction tests to be contaminated with a fair amount of proteinic substances. Therefore, such a commercial preparation was submitted to comparative tests of deproteinization by purification through silver-ribonucleic acid complex formation and by Sevag's chloroform gel method. The former was found to be highly effective, the deproteinization effect obtained finally by nine repetition of the chloroform gel process being attained in one purification through the silver-ribonucleic acid complex.

It was assumed that the deproteinization of this purification through the silver complex is effected by colloidal absorption of occluded impurities by the silver sulfide formed. Therefore, copper nitrate or nickel nitrate and hydrogen sulfide can also effect purification of nucleic acid but the yield in such a case is only around 20~40% against that of 80~90% by the silver complex method. Further, the purification process becomes more complicated by the use of copper or nickel salts.

(Received December 19, 1956)

前報¹⁾で著者は偶々この再生核酸が著しく純化された状態のものであることを観察したが、今回はその続きとしてこの Ag-RNA-complex の脱銀による再生の核酸精製法としての利用価値、またその精製機序に対し ninhydrin 反応を指標として研究を続けた。

先ず前報実験に於いて確立した Ag-RNA-complex の脱銀によるリボ核酸の再生法が、Ag-RNA-complex のアンモニアアルカリ性水溶液を NaCl 濃度 5%とした溶液に対する硫化水素処理、エタノール沈澱、透析等の諸過程を経るものである事から、ninhydrin 反応の陰性化 (即ち蛋白性物質の除去) を招来せしめる条件の所在如何に就いての吟味実験を行つた。その結果として Table I の如く、エタノール沈澱及び透析の操作はもとより単にアンモニア或いは食塩が存在することだけでは ninhydrin 反応の陰性化は期待出来ず、硫化水素による脱銀操作の過程が重要である事を知つた。そこで、今度は現在 Sevag 等による chloroform-gel 法²⁾が核酸標品に対する最も効果的な除蛋白法であるとして広く利用されていることから Sevag 法と Ag-RNA-complex を介する精製法との対比実験に移つた。即ち市販酵母核酸ソーダ標品を試料として、これに対し、1) 連続して Sevag 法による chloroform-amylic alcohol 振盪操作を 3 回、6 回、9 回及び 12 回行つて得た 4 つの精製 RNA-Na 標品と、2) Ag-RNA-complex を介する精製法を 1 回、2 回、3 回及び 4 回と順次適用してその都度得られた 4 つの再生 RNA-Na 標品とについて、それぞれの 10%水溶液の 1 滴宛を濾紙上に一列に滴下せしめ、風乾した後 ninhydrin 反応を行う方式の実験を行つた処、Table II の如く市販核酸標品に対し唯 1 回の Ag-RNA-complex を介する精製法を施行するだけで、Sevag 法を連続して 9 回施行した場合にも匹敵する程に純化された核酸標品が得られた。ところが Table II に於ける濾紙上での ninhydrin 反応試験で極微陽性 (±) と判断された精製 RNA-Na 標品は、Sevag 法によつたものもまた Ag-RNA-complex を介する方法によつたものも、何れもこれを 10%水溶液の状態 で ninhydrin 反応の試験をすると全くの陰性成績を示すことから、更に精細な検討が必要となつて来た。そこで核酸の純度問題に関して文献を調査した処、蛋白合成と核酸との関係では RNA

* Tsuchitoribanaga-machi, Kanazawa. 1) 清水: 本誌 77, 676(1957); 本誌 76, 158(1956).

2) M. G. Sevag, D. B. Lackman, J. Smolens: J. Biol. Chem. 124, 425(1938).

Table I. Experiment on the Influence of Withdrawal of Conditions involved in the Desilvering Procedure, which makes it possible to regenerate RNA from Ag-RNA-Complex, upon the Positive Ninhydrin Reaction of a Sample of Sodium Ribonucleate "Merck"

Original RNA-Na solution		Six grams of commercial sodium ribonucleate was dissolved in 600 cc. of distributed water. This solution was distributed into six flasks, 100 cc. for each.						10% aqueous solution of sodium ribonucleate "Merck" (Control)
Constitution of solution to be examined	Original RNA-Na solution	100 cc.	100 cc.	100 cc.	100 cc.	100 cc.	100 cc.	
	0.1 N AgNO ₃	15 cc.	.	.	.	.	.	
	5% NH ₄ OH	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	.	.	
	Saturated NaCl solution	20 cc.	20 cc.	20 cc.	.	20 cc.	.	
Introduction of H ₂ S in gaseous form at room temperature for		15 min.	15 min.	.	.	.	.	
Further treatment of the solution		Each solution was treated separately in the same way as described in the previous paper*, i.e., centrifugation, precipitation with 200 cc. of 95% ethanol, centrifugation, dialysis of precipitate, after dissolved in 100 cc. of distilled water, against distilled water for 24 hours, addition of 300 cc. of 95% ethanol containing some sodium acetate, placing the precipitate, after washing with ethanol and ether, in a vacuum desiccator.						
Each sample, in 10% aqueous solution, was tested for ninhydrin reaction.								
Ninhydrin test		-	+	+	+	+	+	
* in press.								

Table II. Comparative Ninhydrin Test upon RNA-Na Samples obtained by Sevag's Purification Procedure and RNA-Na Samples obtained by Desilvering of Ag-RNA-Complex

Effect of repeating the Sevag's procedure upon positive reactivity of a commercial sample of sodium ribonucleate to ninhydrin		Effect of repeating the procedure, which makes it possible to regenerate nucleic acid from Ag-RNA-Complex by hydrogen sulfide, upon positive reactivity of a commercial sample of sodium ribonucleate to ninhydrin	
Sample	Ninhydrin reaction, tested on filter paper placed one drop of 10% aqueous solution of the sample to be examined	Sample	Ninhydrin reaction, tested on filter paper placed one drop of 10% aqueous solution of the sample to be examined
Commercial sodium yeast ribonucleate	##	Commercial sodium yeast ribonucleate	##
Purification of the commercial sodium yeast ribonucleate according to the Sevag's method	Sample obtained after treating with chloroform and amyl alcohol three times	Purification of the commercial sodium yeast ribonucleate through the formation of Ag-RNA-Complex	Sample obtained after the first desilvering procedure
	Sample obtained after treating with chloroform and amyl alcohol six times		Sample obtained after the second desilvering procedure
	Sample obtained after treating with chloroform and amyl alcohol nine times		Sample obtained after the third desilvering procedure
	Sample obtained after treating with chloroform and amyl alcohol twelve times		Sample obtained after the fourth desilvering procedure

The grade of positive ninhydrin reaction demonstrated on the commercial sample of sodium yeast ribonucleate was shown arbitrary as ## in this table.

には化学的に結合したアミノ酸(或いは peptide) があり得ることを示唆している Fleming, Jordan³⁾, Dounce⁴⁾, Potter, Dounce⁵⁾ 及び Borsook⁶⁾ 等の報告があり, また Sevag 法で除去し得ない強い結合のアミノ酸があるとしている Frick⁷⁾ の報告があり, しかもこれ等の研究者の主張は何れも水解物のペーパー・クロマト試験によつて得られた知見に基づいている事を見出したので, とり敢えず上記の Sevag 法による精製標品 (S-12) と Ag-RNA-complex を介して精製した標品 (Ag-2) を選んで水解実験を試みる事とした. そしてこの検査には HCl と加熱下で adenine 及び guanine⁸⁻¹⁴⁾ より glycine, アンモニア及び義酸が生成されること及び還元性物質の存在下でアンモニアが ninhydrin に対しアミノ酸と類似の発色を呈する¹⁵⁾ ことが報告されていることから, それぞれ adenine 及び adenosine (adenine D-riboside) を対象とする実験をも併行して行つた. 即ち Fig. 1 は Ag-2, S-12, adenine 及び adenosine の 4 つの試料の 18% HCl 水解物に就いて, 同時にペーパー・クロマト試験を行つて得た成績を図示したものであるが, 結局この様な実験では, 本図からも看取されるように, adenine では glycine に該当するスポットのみが証明され, 他の三者では glycine 以外にも ninhydrin 反応極微弱陽性とも判ぜられる色調変化が認められたが, それぞれの色調度には大差がなく, S-12 及び Ag-2 の両標品にアミノ酸(或いは蛋白性物質) が格別余計に存在するとはいいい切れない. 勿論この成績から直ちに核酸分子に於ける強固結合のアミノ酸の存在を否定し得る訳のものでもなく, また核酸に果して構成成分としてアミノ酸が有るか否かのつきつめた問題は, 現在核酸の化学的³⁻⁷⁾ 並びに遺伝生化学的研究^{16,17)} が当面している諸難問題^{18,19)} に直接関連して来るので早計に論断すべきでなく, 今後の研究に俟つとした方が寧ろ穩当といえよう. 以上のことから

Fig. 1.

Hydrolytic Destruction of Two Purified RNA-Na Samples, Ag-2 and S-12, Adenosine and Adenine. Ninhydrin Test on Paper Chromatograms run in a Mixture of Butanol: abs. Ethanol: Water (4:1:2)

Each sample was treated with 18% hydrochloric acid at 100°C for 6 hrs.

A=Hydrolysate of adenine, AP=Hydrolysate of adenosine, S-12=Hydrolysate of RNA-Na obtained after 12 times treatings by Sevag's method, Ag-2=Hydrolysate of RNA-Na obtained after the second purification procedure through Ag-RNA-Complex.

- 3) M. Fleming, D.O. Jordan: Disc. Farady Soc. **13**, 217(1953).
- 4) A.L. Dounce: Enzymologia **15**, 251(1952); A.L. Dounce, E.R.M. Kay: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **83**, 321(1953).
- 5) J.L. Potter, A.L. Dounce: J. Am. Chem. Soc. **78**, 3078(1956).
- 6) H. Borsook: "The Biosynthesis of Peptides and Proteins" 3 éme congrés international de biochimie, Rapports, Bruxelles 54(1955).
- 7) G. Frick: Biochim. et Biophys. Acta **13**, 41(1954).
- 8) A. Strecker: Ann. der Chem. u. Pharm. **146**, 142(1868).
- 9) M. Krüger: Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) **16**, 160(1892); **18**, 351(1894).
- 10) C. Wulff: Ibid. **17**, 468(1893).
- 11) L.F. Cavalieri, J.F. Tinker, G.B. Brown: J. Am. Chem. Soc. **71**, 3973(1949).
- 12) R. Markam, J.D. Smith: Nature **164**, 1052(1949).
- 13) G. Frick: Ibid. **169**, 758(1952).
- 14) R.D. Hotchkiss: "Phosphorus Metabolism" Vol. 2, 426(1952).
- 15) W. Klingner: Naturwissenschaften **42**, 645(1955).
- 16) A.E. Mirsky: "Nucleic Acids and Nucleoproteins" in Symposia on Quantitative Biology (Cold Spring Harbor Symposia) Vol. II, 16(1947).
- 17) A.E. Mirsky, A.W. Pollister: J. Gen. Physiol. **30**, 117(1946).
- 18) 江上: "核酸及び核蛋白質" 上・下巻 (1951).
- 19) E. Chargaff, J.N. Davidson: "The Nucleic Acids. Chemistry & Biology" Vol. I, II(1955).

Ag-RNA-complex の脱銀による核酸再生法が、核酸標品に対する除蛋白効果に於いて Sevag 法のそれにも匹敵（むしろより効果的）するものである事が判つたが、次に除蛋白機序に関しては、1) それが Ag-RNA-complex に対する H_2S の脱銀的影響に直結しているものか、2) これには直接の関係はなく、生成される硫化銀によつて不純物がコロイド吸着を受ける為の二次的影響のものか、の二つの可能性が考えられた。そこで硫化物生成能の大なる $Ni(NO_3)_2$ 及び $Cu(NO_3)_2$ の二つを選び、それぞれの 0.1 N 溶液を市販酵母核酸溶液に加えたものに対する H_2S 処理の実験を行つた処、Table III から判るように、硫化金属生成が核酸標品の除蛋白に関与していると断ぜられる結果が得られた。然しこの実験では、核酸水溶液と 0.1 N $Ni(NO_3)_2$ 或いは $Cu(NO_3)_2$ の混液（一部沈澱）に対し一旦エタノールによる沈澱分離の操作を加えねばならないという煩雑さがあり、また純化核酸の得量が 24~40% を超えないので、精製法としては Ag-RNA-complex を介するもの（再生核酸の得量は 80% 以上）に対して著しく劣る。

Table III. Showing the Similar Purifying Effect of the Formation of Copper Sulfide and Nickel Sulfide to the Purification of Ribonucleic Acid Sample through the Formation of Ag-RNA-Complex

Original solution	Twenty grams of a commercial sample of sodium yeast ribonucleate was dissolved in 2,000 cc. of distilled water. This solution was distributed into four flasks, 500 cc. for each.			
Addition of metal salt solution to original solution	To 500 cc. of original solution was added 75 cc. of 0.1 N $AgNO_3$ [There occurred no precipitate]	To 500 cc. of original solution was added 75 cc. of 0.1 N $Ni(NO_3)_2$ [There occurred slight precipitate]	To 500 cc. of original solution was added 75 cc. of 0.1 N $Cu(NO_3)_2$ [There occurred heavy precipitate]	To 500 cc. of original solution was added 75 cc. of distilled water
Treatment of solution	To each solution, 1,000 cc. of 95% ethanol was added, and centrifuged. To the precipitate resulted, after addition of 500 cc. of distilled water, 5 cc. of 5% ammoniacal solution and 100 cc. of saturated NaCl-solution, hydrogen sulfide was introduced at room temperature, and then centrifuged. Further treatment of the clear supernatants thus obtained was the same as described in Table I. Thus, four samples were yielded in the form of white, amorphous powder.			

Each sample, in 10% aqueous solution, was tested for ninhydrin reaction.

Ninhydrin test — — — +

本研究に対し終始御指導を賜わつた所長岡本 肇教授、越村三郎助教授に謹謝する。尙江上不二夫教授から有益なる御助言を賜わつた。ここに感謝する。

実 験 の 部

Ag-RNA-complex の脱銀によるリボ核酸再生法における各条件の吟味 市販酵母核酸ソーダ（メルグ）6 g を蒸留水 600 cc に溶解したものを原液とし、その 100 cc に対し、それぞれ、1) 0.1 N $AgNO_3$ 15 cc, 5% アンモニア水 1 cc, 飽和 NaCl 溶液 20 cc を加えて室温下で H_2S ガスを 15 分通じたもの、2) 5% アンモニア水 1 cc, 飽和 NaCl 溶液 20 cc を加えて、室温下で H_2S ガス 15 分通じたもの、3) 5% アンモニア水 1 cc, 飽和 NaCl 溶液 20 cc を加えたもの、4) 5% アンモニア水 1 cc を加えたもの、5) 飽和 NaCl 溶液 20 cc を加えたもの、6) 原液そのままのもの、の 6 種を調製し各々に対し順次次の操作を行う。すなわち遠心分離、95% エタノール 200 cc の追加、遠心による沈澱物を蒸留水 100 cc に溶解、溶液のセロファン囊による室温下での 24 時間蒸留水に対する透析、膜内液に対する 95% エタノール 300 cc（少量の酢酸ソーダを加える）による沈澱、沈澱物に対するエタノール洗滌 2 回、エーテル処理 1 回、減圧下乾燥。かくて白色または類白色無晶形粉状の標品 6 種を得。次いで各標品を 10% 水溶液とし、別に対照として市販酵母核酸標品の 10% 水溶液を調製して、ninhydrin 反応を検する。1) の $AgNO_3$, アンモニア, 飽和 NaCl 溶液を加え H_2S 通気を行つて得た標品のみが ninhydrin 反応全く陰性で、他は何れも強陽性であつた。

核酸標品に対する Sevag 法と Ag-RNA-complex を介する精製法の比較 1. Sevag 法による精製実験：市販酵母核酸ソーダ 6 g を蒸留水 800 cc に溶解し、これに chloroform 200 cc, amyl alcohol 80 cc を加えて 15 分間強く振盪後、遠心分離によつて上清液を分取。上清液に対し前回同様の chloroform, amyl alcohol による振盪操作を行い、遠心分離、得られた遠心上清液に対し更に同様の操作を施す。この三度目の操作で最早 chloroform-gel の生成は見られなくなつた。ここにおいて上清液（約 800 cc）から 200 cc を分取。これに対し

95%エタノール 400 cc と少量の酢酸ソーダを加えて沈澱を生起させる。得た沈澱に対しエタノール洗滌 2 回、エーテル処理 1 回、減圧下に乾燥せしめ類白色の粉末 (Sevag 法 3 回標品) 1.2 g を得。他方前記上清液の残り約 600 cc に対して chloroform 150 cc と amyl alcohol 60 cc を以つてする Sevag 法を更に連続 3 回行つた後、その上清液 (約 600 cc) から 200 cc を分取し、この 200 cc に対し上記同様のエタノール沈澱、エタノール及びエーテル洗滌、減圧乾燥を行つて類白色の粉末 (Sevag 法 6 回標品) 1.2 g を得。残りの上清液約 400 cc に対しては、更に chloroform 100 cc 及び amyl alcohol 40 cc を以つてする Sevag 精製法を連続 3 回繰り返す、ここに得た上清液 (約 400 cc) から 200 cc を分取し、常法に従つて類白色の粉末 (Sevag 法 9 回標品) 1.2 g を得。最後に残つた上清液約 200 cc に対して chloroform 50 cc と amyl alcohol 20 cc を以つてする Sevag 精製法を 3 回連続せしめた後、その遠心上清液に常法に従つて操作して類白色の粉末 (Sevag 法 12 回標品) 1.1 g を得。

2. Ag-RNA-complex を介する精製実験：市販酵母核酸ソーダ 9 g を蒸留水 900 cc に溶解、これに 0.1 N AgNO_3 135 cc, 5%アンモニア水 9 cc, 飽和 NaCl 溶液 180 cc を加え、この混液に対し H_2S ガスを Ag_2S の析出が生じなくなる迄通じた後、遠心によつて沈澱物を除去。上清液に 95%エタノール 2,000 cc を加え沈澱を析出せしむ。沈澱を遠心によつて分離し、蒸留水 900 cc に溶解せしめてセロファン囊に入れ、蒸留水に対して透析、外液に Cl^- が検出されなくなる迄透析、膜内液を遠心分離、上清液を濾過。無色透明の濾液に 95%エタノール 2,500 cc と少量の飽和酢酸ソーダ・エタノール溶液を加えて沈澱を生起させる。遠心分離によつて得た沈澱を、エタノールで 2 回、エーテルで 1 回洗滌後減圧下で乾燥、白色粉末 (脱銀法 1 回標品) 8.1 g を得。前記脱銀法 1 回標品 5 g を蒸留水 500 cc に溶解、これに 0.1 N AgNO_3 75 cc, 5%アンモニア水 5 cc, 飽和 NaCl 溶液 100 cc を順次加えた後、 H_2S ガスを通ず。遠心上清液に対し 95%エタノール 1,000 cc による沈澱、沈澱物の蒸留水 500 cc への溶解、透析、膜内液のエタノールによる沈澱、洗滌、乾燥、白色粉末 (脱銀法 2 回標品) 4.2 g を得。脱銀法 2 回標品 3 g を蒸留水 300 cc に溶解、これに 0.1 N AgNO_3 45 cc, 5%アンモニア水 3 cc, 飽和 NaCl 溶液 60 cc を加えたものに H_2S ガスを通じた後、前記様式に準じて白色粉末 (脱銀法 3 回標品) 2.5 g を得。脱銀法 3 回標品 1 g を蒸留水 100 cc に溶解、これに 0.1 N AgNO_3 15 cc, 5%アンモニア水 1 cc, 飽和 NaCl 溶液 20 cc を加え、この混液に H_2S ガスを通じてから常法通り処理して白色粉末 (脱銀法 4 回標品) 0.8 g を得。

3. 分析値並びに ninhydrin 反応試験：各標品に就いてその 10%水溶液での ninhydrin 反応を行つた (Nw), また各標品の 10%水溶液の 1 滴を東洋濾紙 No. 50 の上に 2 列に滴下し、風乾の後これに ninhydrin 試薬を噴霧せしめてから 80°C の乾燥器中で発色せしめた (Np)。

		C(%)	H(%)	N(%)	P	N/P	Nw	Np
[A]	原料 RNA-Na (メルク) :	28.09	6.18	12.29	7.50	1.63	+	卅
[B]	Sevag 法 3 回標品 :	28.95	5.71	13.23	8.15	1.62	+	卅
	6 回標品 :	28.34	5.04	13.30	8.15	1.63	-	+
	9 回標品 :	28.91	6.04	14.42	9.45	1.52	-	±
	12 回標品 :	28.40	5.82	13.80	8.85	1.55	-	±
[C]	脱銀法 1 回標品 :	29.27	5.63	12.74	8.25	1.54	-	±
	2 回標品 :	28.62	6.76	13.00	8.40	1.54	-	±
	3 回標品 :	29.40	4.53	13.57	9.45	1.43	-	±
	4 回標品 :	29.41	5.01	13.60	9.30	1.45	-	±

水解実験 Sevag 法 12 回標品 (S-12), 脱銀法 2 回標品 (Ag-2), adenine 及び adenosine の各試料を 100 mg ずつコルベンに秤取す。それぞれに対し 18% HCl 5 cc を加え、還流冷却器を付して 100° の水浴上で 6 時間加熱。次いで内容物を 40° 以下の温度で減圧乾固後、これに対し更に蒸留水 10 cc を加えて減圧下乾固せしめる操作を 3 回繰り返す。かくして最後に得られた各残渣を蒸留水 1 cc ずつに溶解せしめ、それぞれの 1 滴ずつをクロマト用濾紙に附着、風乾せしめた後、ブタノール：無水エタノール：水(4:1:2)の溶媒で上昇法によつて展開。12 時間後各濾紙を風乾して ninhydrin 反応を試験。各紙に Rf 0.08 の glycine の明確なる斑点が現われた。なお adenine 水解物以外では glycine 斑点の上方の二カ所で辛うじて識別し得る程度の発色を認めた。

硫化ニッケル並びに硫化銅生成による核酸の精製実験 市販酵母核酸ソーダの 1% 水溶液 500 cc に対し、0.1 N $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 或いは $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ を 75 cc 加う (この時前者では少量の沈澱を、後者では多量の沈澱を生ず)。次いで各混液に対し一旦 95%エタノール 1,000 cc による沈澱分離の操作を施してから、蒸留水 500 cc, 5%アンモニア水 5 cc, 及び飽和 NaCl 溶液 100 cc を加う。ここに到つて初めて H_2S を室温下で通ず。以下は Ag-RNA-complex の脱銀法におけると同様の操作を行つた。白色無晶形粉末標品、それぞれ 2.0 g (40%) 及び 1.2 g (24%) を得。同様方式の実験を 0.1 N AgNO_3 で行つて白色無晶形粉末 4.2 g (84%) を得。各標品の 10%水溶液についての ninhydrin 反応は何れも全く陰性。