清水隆作：Ag-RNA-Complex からの脱銀によるリボ核酸の再生について（第2報）

Ryusaku Shimizu: A Study on the Regeneration of Ribonucleic Acid from Ag-RNA-Complex by Desilvering Procedure. II.

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

An examination was made for the process of regenerating ribonucleic acid from its complex with silver, reported in the preceding paper¹⁾, and following processes were carried out.

1) To 100 cc. of 1% aqueous solution of silver-ribonucleic acid complex, 1 cc. of 5% ammonia water and 20 cc. of saturated sodium chloride solution are added in that order, and hydrogen sulfide is passed through this solution to precipitate the silver.

2) This solution is then centrifuged, to its supernatant solution is added ethanol, and the precipitate formed is collected. The precipitate is dissolved in distilled water, dialyzed, and ethanol added to the dialyzate in the membrane. The precipitate thereby obtained is washed with ethanol and ether, and dried under a reduced pressure.

By such a procedure, white amorphous powder is obtained that agrees with ribonucleic acid in various physical and chemical properties as well as in biological activity, such as the increased production of streptolysin S from *Streptococcus hemolyticus*, and entirely devoid of silver. This regenerated ribonucleic acid is obtained in 80~90% yield and its purity was found to be far higher than the commercial yeast nucleic acid preparation by the ninhydrin reaction and sulfur detection tests.

(Received December 19, 1956)

さきに著者は酵母核酸（以下 RNA と略記）には Ag^+ と結合してこれを非イオン化せしめる特性がある、そしてこれは少なくとも銀塩の分散化、或いは Ag^+ の遮蔽化等の単なる理化学的要因によるものではなく水溶性の Ag-RNA-complex の形成に基づくものである事を報告¹⁾したが、しかればこの Ag-RNA-complex から果して銀を奪取して RNA を再生せしめる事が可能であろうか、今回はこの問題に対して検討を進めた。

先ず第一着手として RNA が鉍酸並びに強アルカリ²⁻⁶⁾ に対し、就中加熱下で極めて不安定で分解され易いがアンモニア⁷⁾ に対しては比較的安定である事から、Ag-RNA-complex の弱アンモニアアルカリ性水溶液に対し室温下で硫化水素を通ずる実験を行つた。然しこの条件下では溶液が黒褐色を呈し、確かに硫化銀生成の徴が見られるにも拘らず、硫化銀の沈積が起らないままであるということの為に以後の精製操作が全く不可能となり、結局この実験は失敗に帰した。そこで今度は前記の実験で硫化銀の沈積を来たさしめる方途ありやについて種々探索したところ、食塩の追加が効果的である事を知つたので、ここに室温下で Ag-RNA-complex 水溶液に対しアンモニアと食塩を加えたものに硫化水素を通じて脱銀反応を完結せしめる最適条件如何の考查に移り、遂に Ag-RNA-complex からの脱銀が完全でありしかも変性を起していない RNA を取得し得る方法を確立する事に成功した。即ちその方法は Table I に示したように、Ag-RNA-complex の 1%水溶液に対する

1. 脱銀操作 a) 1% Ag-RNA-complex 水溶液 100 cc に対し、先ず 5%アンモニア水溶液 1 cc を加え、次いで飽和食塩水 20 cc を追加。 b) この混液に対し室温下で硫化水素ガスを 15 分間通ずる。 c) 遠心沈澱による黒褐色沈澱物の除去。

* Tsuchitoriba-naga-machi, Kanazawa.

1) 清水：本誌 76, 158(1956).

2) H. Steudel, E. Peiser: Z. Physiol. Chem. 144, 201(1921); 120, 292(1922).

3) W. Jones, M. E. Perkins: J. Biol. Chem. 55, 567(1923).

4) G. Schmidt, S. T. Thannhauser: Ibid. 161, 83(1945).

5) 江上：“核酸及び核蛋白質”上・下巻(1951).

6) E. Chargaff, J. N. Davidson: “The Nucleic Acids. Chemistry & Biology” Vol. I (1955).

7) P. A. Levene: J. Biol. Chem. 33, 425(1918).

Table I. Procedure for Removing the Silver from Ag-RNA-Complex, using Ammoniacal Hydrogen Sulfide as Desilvering Agent

2. 遠心上清液に対する処置 a) 2 倍量のエタノール添加による沈澱物の取得 (硫化アンモンはエタノールにより溶去). b) 沈澱物を蒸留水に溶解せしめて透析. c) 透析内液に対するエタノールによる沈澱.

3. 沈澱物のエタノール, エーテルによる洗滌に次ぐ減圧下での乾燥

等の数段に亘る過程を経るものであつて, かくして得られる物質は白色無晶形粉末であつて, 全然 Ag を含まず, しかもリボ核酸としての物理的並びに化学的性状, 及び溶連菌の streptolysin S の産出を増進せしめる生物学的活性⁸⁾を示す. この結果は再生 RNA が変性を起していないものであることを立証するものである.

Table II は市販のメルク製酵母核酸を原料とし, これから前回報告銀錯塩の分離法に従つて調製した Ag-RNA-complex, 及びこの complex から上記の脱銀法によつて精製分離した再生 RNA の 3 標品について, 各その諸物理化学的性状並びに生物学的活性を比較検討して得た成績を示したものである.

ところで, 一般に市販の酵母核酸標品は相当不純であつて, これに蛋白性物質などの夾雑物が混在している事は周知の如くであるが, 本表に於いても原料としたメルク製酵母核酸標品が淡黄に着色, ninhydrin 及び硫黄反応が共に陽性であることはその不純であることを示しているものであつて, 原料核酸と再生核酸との間に於ける C, H, N 及び P の元素分析値の不一致も亦兩者の純不純に基づいているものといえよう. とに角, この結果から著者は間もなく核酸標品の精製には Ag-RNA-complex を介する脱銀法が極めて効果的である事を実証するに至つたのであるが, これに関しては次報に報告する.

なお最後に付記すべきことは本法の確立迄に行つた吟味実験に於いて, アンモニア, 食塩及び硫化水素の何れの条件の一つを欠くとも, またアンモニア及び食塩の追加量が上述の量的関係より不足しても Ag-RNA-complex からの完全脱銀の目的は達し得なかつたことである.

然し, 本法に於ける脱銀機序に関しては Ag-RNA-complex からの硫化水素による脱銀に対する促進要因として, アンモニアの銀錯塩生成能, 食塩の塩化銀生成能, 食塩の硫化銀に対する塩析能 (Ag-RNA-complex は RNA と同様 5%食塩水に易溶) 等が考えられ, その何れをもつて主とし得ず, 現在の処完全脱銀はこれら要因

8) H. Okamoto: Japan. J. Med. Sci. IV; Pharmacology 12, 167(1940); 細胞化学シンポジウム 3, 145 (1954).

の総合協力の結果としか判じ得ない状態である。

Table II. Comparison of Chemical, Physical, and Biological Properties of the Sample obtained from Ag-RNA-Complex by the Desilvering Procedure, the Sample of Ag-RNA-Complex and the Original Sodium Yeast Ribonucleate Sample

Kind of examination	Sample	Original sodium yeast ribonucleate	Ag-RNA-Complex	Sample obtained by Ag-RNA-complex desilvering
	Appearance	Pale yellowish, amorphous powder	Greyish white, amorphous powder	White, amorphous powder
Solubility (Precipitability)	Water	soluble	soluble	soluble
	Alkali	“	“	“
	Ethanol	insoluble	insoluble	insoluble
	H ₂ SO ₄	“	“	“
	HCl	“	“	“
Color reaction	Orcinol test	≡	≡	≡
	Diphenylamine test	—	—	—
	Ninhydrin test (in 10% solution)	+	indemonstrable due to becoming brownish black discoloration	—
	Iodoazide test for sulfur	+	/	—
Analytical figures (in %)	C	28.09	/	29.27
	H	6.18	/	5.63
	N	12.29	12.38	12.79
	P	7.50	6.58	8.25
	N/P	1.63	1.88	1.54
	Ag	0.0	12.94	0.0
Ability to transfer silver salt into non-ionized form		+ (Ag 0.16 mg. : sample 1 mg.)	—	+ (Ag 0.16 mg. : sample 1 mg.)
Paper chromatographic determination after hydrolysis in 1% NaOH	Adenylic acid	+	+	+
	Guanylic acid	+	+	+
	Uridylic acid	+	+	+
	Cytidylic acid	+	+	+
UV-absorption	λ _{max}	258	262	258
	λ _{min}	228	233	227
Activity to promote the production of streptolysin S of hemolytic streptococcus		≡	indemonstrable due to toxicity for cocci	≡

The electrophoresis patterns of the original RNA-Na sample, Ag-RNA-complex sample, and the sample obtained from the complex by desilvering procedure were all found to be identical.

本研究に対し終始御指導を賜わった所長岡本 肇教授，越村三郎助教授に謹謝する。

金沢大学結核研究所