

グリセリン抽出による肝 Ribo-核酸の分離試験

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本教授)

得 田 与 夫

Tomoo Tokuda

山 本 恵 一

Keiichi Yamamoto

山 田 治 郎 左 衛 門

Jirozaemon Yamada

葛 葉 晋

Susumu Kuzuba

(昭和30年5月13日受附)

Ribo-核酸の分離精製法に関しては Levene¹⁾, Blumann²⁾, Clarke & Schryver³⁾, Kerr & Seraidarian⁴⁾, Loring⁵⁾, 等幾多の学者による報告があることは周知の如くである⁶⁾。しかし Ribo-核酸は甚だしく不安定なる高分子化合物であるため、これが生体よりの分離試験においては純粋化を図れば自然の状態を保持し難く、又変性を起させないような緩和な分離操作では夾雑物が混入して来るという具合で、この困難性を克服すべくなお核酸の精製分離の研究が続けられているという現状である。

最近当研究室において核酸の性状についての検討が行われている中に、

1) 酵母核酸ソーダ自体がグリセリンに常温でも易溶であり、而も

2) この核酸ソーダグリセリン溶液を100°Cに2時間加熱しても依然として核酸効果を呈する性能を保有している、

という二つの注目すべき事実が観察された。私等はこの事は核酸の分離精製に利用し得るとなし、直ちに肝臓を対象としてグリセリン抽出による核酸の分離試験に移った。そして種々考査研究の結果、遂に極めて高純度の Ribo-核酸を分離し得ることを確めたので、とりあえず現在迄の成果を報告する次第である。

実 験 の 部

I 肝臓よりのグリセリン抽出による Ribo-核酸の分離

グリセリン抽出による Ribo-核酸の分離実験は

a) 肝臓の乾燥粉末に対しグリセリンを加え、蛋白の熱凝固を計ると同時に、核酸をソーダ塩の状態グリセリンに移行せしめる、

b) グリセリン抽出液からアルコールによつて抽出物(粗核酸)を沈澱せしめる、

c) 粗核酸に対し混在する蛋白性物質を除去する目的で pH 4.2 での精製操作を加うる、ことの三つを骨子として行われた。今その全分離過程について記すれば次の如くである、

1) 肝臓の乾燥粉末化：

屠殺直後の牛肝臓約 300g を Homogenizer にて粥状となし、アルコール 500cc を加えて

15時間氷室に放置した後、濾紙で濾過して沈澱物を捕取する。次いでこのアルコール沈澱物に対しエーテル処置を施してから乾燥する。

2) 肝臓粉末に対するグリセリンによる抽出操作：

前記の乾燥粉末に対しグリセリン 400cc を少量宛加えて泥状となし、泥液がラクムス中性になるように 10% Na_2CO_3 の少量を加える。次いでこの泥液を 30°C 、1時間加熱した後、更に5分間 100°C に加熱する。

3) グリセリン抽出液の処置：

冷後 (0°C) 先ずガーゼによる粗大物の除去を行つてから遠心沈澱を行い、ここに得た濁濁液に2倍量の冷アルコールを加え、遠心によつて沈澱物を分取する。

4) 沈澱物に対する精製操作：

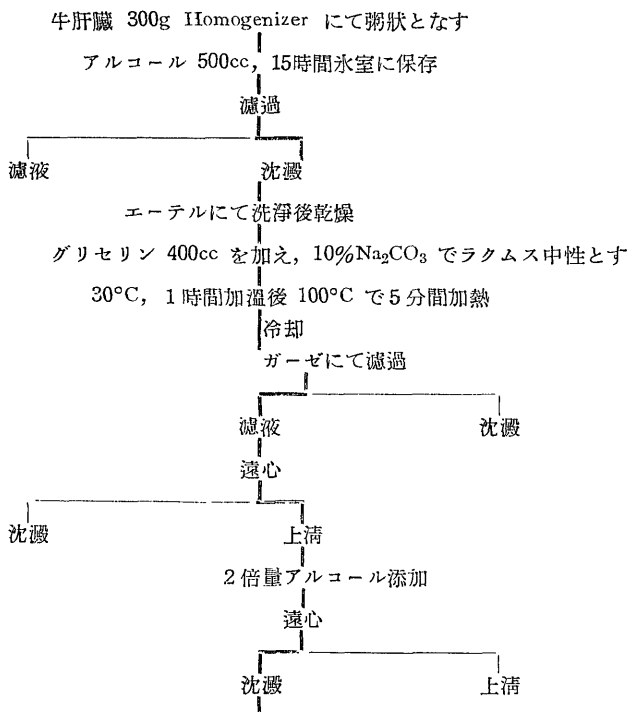
沈澱物に生理的食塩水 150cc を加え、10% Na_2CO_3 にて pH 6.8~7.0 とした後、遠心によつて不溶物を除去する。ここに得た上清液

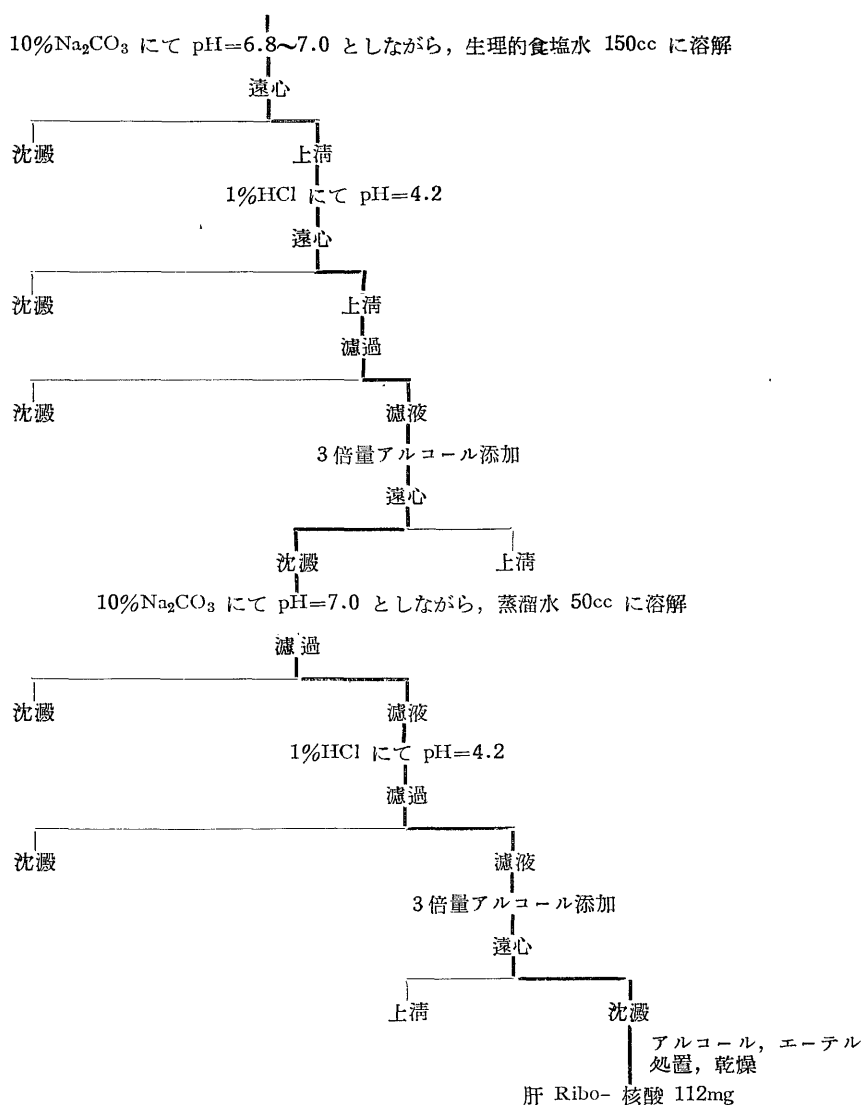
(淡褐色) に対し 1% HCl を加え pH 4.2 とす (この時相当多量の沈澱を生起する)。暫時静置の後に、先ず遠心沈澱、次いで濾紙濾過によつて透明なる濾液を得。ここにおいて濾液に対して3倍量のアルコールを添加した後、遠心によつて沈澱物を捕取する。沈澱物を 10% Na_2CO_3 にて中和しながら蒸留水 50cc に溶解せしめ、一旦濾過した後、濾液の pH を 1% HCl をもつて 4.2 とす。生起した沈澱を濾過によつて除去する。濾液 (微黄色透明) に 3 倍量のアルコールを加えて生起する沈澱を遠心によつて分離し、この沈澱に対しアルコールによる洗滌 2 回、エーテルによる洗滌 1 回の操作を施して、真空乾燥器中に納める。

収量は 112mg, 純白色無晶形粉末、水に不溶なるもアルカリの追加によつて容易に溶解する。

因に第 1 表は以上の分離過程を表示したものである。

第 1 表 グリセリン抽出による牛肝臓よりの Ribo- 核酸分離





II 肝 Ribo-核酸標品の定性試験

前記の分離試験で得られた肝 Ribo-核酸標品と Merck 製酵母核酸 (対照) について、夫々の 1% 中性水溶液における Orcin 反応, Feulgen 反応, 蛋白反応の有無強弱如何を試験した所、第 2 表の如き成績が得られた。

即ちこの実験成績から肝 Ribo-核酸標品がその純度において極めて高く、たとえこれに DNA 及び蛋白質が混在しているとしてもその量は極微であろうことが知られよう。

第2表 肝 Ribo- 核酸と酵母核酸との定性試験

検標品被	反 応	Orcin 反 応	Feulgen 反 応	蛋白の検出試験	
				Biuret 反 応	Tetrabromo- phenolphthalein ethyl ester 反 応
1%肝 Ribo- 核酸ソーダ水 溶液 (中性)	卍	—	—	—	—
1%酵母核酸 ソーダ水溶液 (中 性)	卍	—	—	—	—

〔註〕 卍, 卍 = 陽性反応における呈色度を示す

— = 陰性

* Egg-albumin は Tetrabromophenolphthalein ethyl ester 反応に対し
0.001%迄陽性反応を示した

III 肝 Ribo-核酸標品についての核酸効果試験

核酸効果 (即ち溶連菌の Streptolysin-S 産出を増強せしめる効果)^{7), 8)} の有無強弱は Ribo-核酸の変性度を探知するための有力な標識であつて、同じく Ribo-核酸であつても、その製法の如何によつて核酸効果を呈する性能に著しい差違が生じて来ることは、既に細谷、江上⁹⁾等*によつて明示されたところである。

然らば彼上の分離法によつて得た肝 Ribo-核酸標品の核酸効果を呈する性能はどうであろうか。この間の消息を知るべく肝 Ribo-核酸と酵母核酸 “Merck” の両標品について核酸効果の比較実験を行つた。

第3表はその成績を示したものであつて、これによつてグリセリン抽出法による時は変性を

第3表 肝 Ribo- 核酸と酵母核酸との核酸効果比較実験

1%肝 Ribo- 核酸加ブイオン (pH=7.6) 4cc, 1%酵母核酸加ブイオン (pH=7.6) 4cc と普通ブイオン 4cc の3つの培地に対し、溶連菌 “S” 株のブイオン24時間培養の1白金耳宛を接種、37°C に30時間培養し、それらの遠心上清液について型の如く倍数稀釈法による溶血力の比較実験を行う。

溶連菌の培 養メジウム	判 定 時 間	培 養 上 清 液 の 稀 釈 倍 数												対 照 (上 清 液 を ま じ り こ す)	備 考				
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480	40,960		81,920	上清液の 溶血限界 濃度	核酸 効果の 程 度		
1%酵母核酸加 ブイオン	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	1:20,480	卍
	24	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍		
1%肝 Ribo-核 酸加ブイオン	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	1:20,480	卍
	24	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍		
普通ブイオン	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:20 液 は非溶血	.
	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

〔註〕 卍=完全溶血；卍, 卍, +, 卍=不完全溶血；—=非溶血

* 核酸を得る場合 Baumann 法²⁾や Levene 法¹⁾のように精製過程中にアルカリ性になる製法で得られた酵母核酸は無効であるに対し、アルカリ性になる過程のない Clark & Schryver 法³⁾による時は強力なる核酸効果を呈する核酸が収得される。

来たすような恐れが少なく、核酸効果発揮能においてよく Merck 製酵母核酸のそれに匹敵し

得る Ribo-核酸標品が収得され得ることが知られよう。

結 語

本論文では肝臓を対象として行ったグリセリン抽出による Ribo-核酸の分離試験の成績について記載した。勿論この分離方法にはなお改良、工夫を加えるべき余地があるうし、又臓器

を異にした場合には夫々に応じて適当な処置を考えるべきであろう事はいうまでもない。これらの事については更に今後の研究に待つこととする。

文 献

- 1) Levene, P. A., La Forge, F. B. : *Ber.*, **43**, 3164, 1910. 2) Baumann, E. : *J. Biol. Chem.*, **61**, 1, 1924. 3) Clarke, G., Schryver, S. B. : *Biochem. J.*, **11**, 319, 1917. 4) Kerr, S. E., Seraidarian, K. : *J. Biol. Chem.*, **180**, 1203, 1949. 5)

- Loring, H. S. : *Biol. Chem.*, **130**, 251, 1939. 6) 江上 : 核酸及び核蛋白質 (上巻).
7) 岡本 : 細胞化学シンポジウム, **3**, 145, 1954.
8) 伊藤(亮) : 日本薬物学雑誌, **28**, 41, 1950.
9) 細谷, 林, 森, 江上, 鈴木 : 基礎と臨床, **1**, 205, 1948.