

マミズイトミミズの酸可溶性化合物について (I)

—酸可溶性化合物の分画—

The Components of Acid-soluble Fraction
Obtained from *Rhizodrilus limasus* (I)

Fractionation of the Components
of Acid-soluble Fraction

大山重信

SHIGENOBU OYAMA

[Received June 11, 1973]

The fractionation of the components of acid-soluble fraction from a sludge worm, *Rhizodrilus limasus*, using Dowex 1, Cl form was previously reported⁽¹¹⁻¹⁵⁾, but good separation of nucleotide was not always obtained with the resin Cl form. Therefore, the separation of the components with the resin formate form instead of the Cl form was attempted.

Some peaks separated by ion exchange chromatography using Dowex 1, formate form were moreover subjected to rechromatography using the resin Cl form, and the peaks separated by the rechromatography were identified through ultraviolet absorption curve and the eluted position in chromatogram.

The obtained results were as follows;

1. Seven peaks were obtained by chromatography using Dowex 1, formate form.
2. On the basis of ultraviolet absorption curves, the presence of guanine and three adenosine derivatives was confirmed.
3. In due consideration of the eluted position in chromatogram and their ultraviolet absorption curves, the three adenosine derivatives were assumed as AMP, ADP, and ATP, respectively.

I 緒 言

生物にとって磷化合物が栄養源の1つであるとともに、化学的には高エネルギー結合を生成し、エネルギー代謝上極めて重要な役割を果していることは述べるまでもない。水棲生物によって水中の $^{32}\text{PO}_4$ イオンが吸収蓄積されることについては数多くの研究がある。筆者もさきに海藻における ^{32}P の代謝⁷⁾のみならず、マミズイトミミズによって水中から吸収された ^{32}P が磷脂質区分において代謝される模様^{8,9)}の一端について報告したが、これより早く小林ら¹⁰⁾は、マミズイトミミズによって水中の ^{32}P が吸収蓄積されることおよび吸収された ^{32}P が種々の磷化合物間を遷移する模様について報告している。また筆者は、小林・富山とともに^{11~15)}、マミズイトミミズから得られた酸可溶区分をDowex 1, C1型を用いてイオン交換クロマトを行ない、種々の磷化合物を分画・同定し、吸収された ^{32}P がイトミミズの体内においてどのような化学形態で存在するかを明らかにすることができた。しかし、Dowex 1, C1型による分画の短所としてヌクレオチド相互の分離が必ずしもよくないので、C1型ではなくFormate型として分画を試みることにした。

II 実験方法

1. 試 料

マミズイトミミズ, *Rhizodrilus limasus*, は採取後えさを与えずに流水中に3日間飼育して、汚物を排泄させるとともに、一匹ずつ肉眼的に選別し、傷ついているものはすべて除外した。このようにして選別した後、イトミミズに付着している水分をろ紙で除いて1.5gを秤量し、直ちにポリエチレン袋に包んでドライアイス・エタノールの寒剤中に浸漬して凍結した。

2. 酸可溶区分の抽出

筆者が小林らとともにさきに報告した方法¹¹⁾と同様にして抽出した。すなわち、予め氷冷した5%過塩素酸溶液(以下PCAと略記)15mlをホモゲナイザー・カップにとり、この中へ凍結したイトミミズ1.5gを入れ、カップの外側を食塩・水で冷却しながら2分間ホモナイズして、東洋ろ紙No6(PCAによって紫外部に吸収をもつ物質がろ紙から溶出されるので予めPCAでろ紙を洗浄してから用いた)でろ過した。このろ液10mlを取り、氷冷しながら5%苛性カリ溶液を徐々に加えてpH2.8程度とし、再びろ紙でろ過して沈澱を除去した後、10%アンモニア水でpH8.6程度としてから水を加えて50mlとし、樹脂に吸着させた。

3. イオン交換樹脂の活性化

樹脂はDowex 1, x2, 200~400 meshを用い、常法¹⁶⁾に従がい前処理を行なってC1型とした。樹脂をFormate型とするためには、C1型とした樹脂をカラムに充填し、2Mギ酸+2Mギ酸ナトリウム溶液を樹脂量の40倍量流した後蒸留水で洗浄してFormate型とした。

4. Formate 型樹脂によるイオン交換クロマトグラフィ

溶出剤はギ酸とギ酸ナトリウムによることとし、Bergkvist らの方法¹⁷⁾を種々検討の結果同法の一部を改変し、次の8種の溶出剤を用いることとした。すなわち、

- I 0.1 M ギ酸
- II 0.1 M ギ酸 + 0.05 M ギ酸ナトリウム、
- III 0.1 M ギ酸 + 0.1 M ギ酸ナトリウム、
- IV 0.1 M ギ酸 + 0.2 M ギ酸ナトリウム、
- V 0.1 M ギ酸 + 0.3 M ギ酸ナトリウム、
- VI 0.1 M ギ酸 + 0.4 M ギ酸ナトリウム、
- VII 0.1 M ギ酸 + 0.6 M ギ酸ナトリウム、
- VIII 0.1 M ギ酸 + 1 M ギ酸ナトリウム。

溶出速度は $0.7 \text{ ml} / \text{min}$ で、溶出液はフラクション・コレクターで 5 ml ずつ分取し、日立製分光光度計 E P U 2 A 型により $260 \text{ m}\mu$ における吸光値を測定して溶出図を作製した。

5. 再クロマトグラフィ

樹脂は、Dowex 1, $\times 2$, 200~400 mesh, Cl 型を用い、カラムに充填 ($1.13 \text{ cm}^2 \times 5 \text{ cm}$) して行なった。すなわち、Formate 型樹脂を用いてクロマトを行ない、得られた溶出液のうち適当な分画を集めてアニオン濃度が 0.01 M 以下¹⁸⁾ となるよう蒸留水で希釈した後、10%アンモニア水で pH 8.6 程度として Cl 型樹脂に吸着させ、Cohn-Carter 法¹⁹⁾ に準じて溶出し、溶出液は 5 ml ずつ分取し $260 \text{ m}\mu$ における吸光値を測定して溶出図を作製した。

6. 紫外部吸収曲線による同定

再クロマトにより得られたピークについては、塩酸または苛性ソーダで pH を酸性、中性、アルカリ性とした場合と、1 N 塩酸溶液になるよう濃塩酸を加えて 100°C 、1 時間加水分解したものの pH を苛性ソーダで中性、アルカリ性に変えた場合の吸収曲線を求め、文献記載の吸収曲線²⁰⁾ と比較して物質名を定めた。

III 実験結果

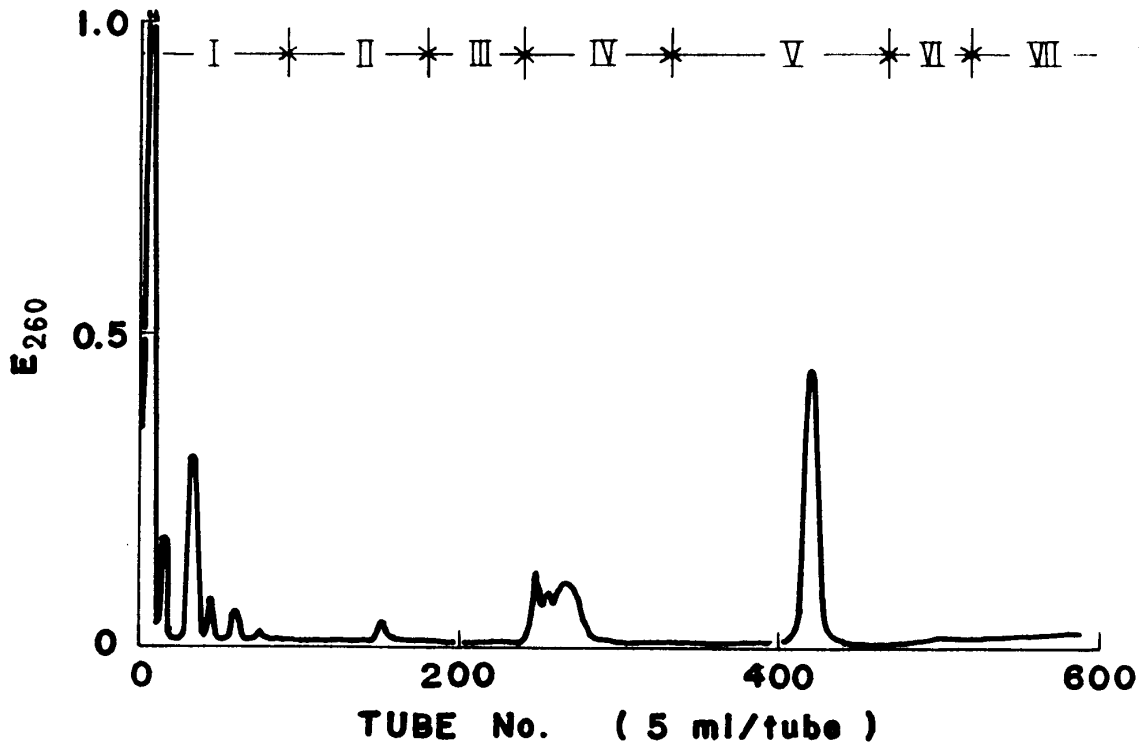
1. Formate 型樹脂によるイオン交換クロマトグラフィ

イトミミズ 1.5 g を前述のように処理して得られた抽出液をイオン交換樹脂カラム (樹脂量 $1.13 \text{ cm}^2 \times 12 \text{ cm}$) に吸着させ、Bergkvist らの方法¹⁷⁾ に従って7種の溶出剤、すなわち、

- I 0.1 M ギ酸,
- II 0.1 M ギ酸 + 0.05 M ギ酸ナトリウム,
- III 0.1 M ギ酸 + 0.1 M ギ酸ナトリウム,
- IV 0.1 M ギ酸 + 0.3 M ギ酸ナトリウム,
- V 0.1 M ギ酸 + 0.4 M ギ酸ナトリウム,
- VI 0.1 M ギ酸 + 0.5 M ギ酸ナトリウム,
- VII 0.1 M ギ酸 + 1 M ギ酸ナトリウム.

によって溶出し、溶出図を作製したところ、Fig. 1に示すようになり数個のピークがみられた

Fig. 1. Ion exchange chromatogram of PCA extract form *Rhizodrilus limasus*.



Resin , Dowex 1, x2, 200 ~ 400 mesh, formate form.

Column size ; 1.13 cm² x 12 cm . Flow rate ; 0.7 ml/min

Sample ; Equivalent to about 0.9g of fresh *R. limasus*

Eluents ; I 0.1 M formic acid

II 0.1 M formic acid + 0.05 M sodium formate,

III 0.1 M formic acid + 0.1 M sodium formate,

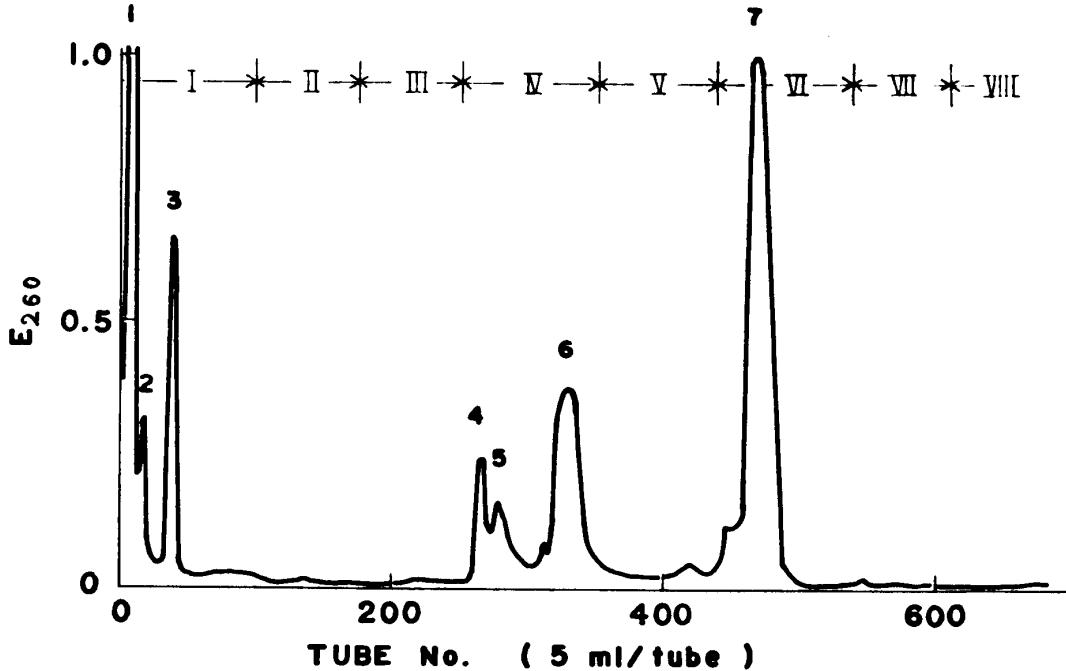
IV 0.1 M formic acid + 0.3 M sodium formate,

V 0.1 M formic acid + 0.4 M sodium formate,

VI 0.1 M formic acid + 0.5 M sodium formate,

VII 0.1 M formic acid + 1 M sodium formate.

Fig. 2. Ion exchange chromatogram of PCA extract from *Rhizodrilus limasus*.



Resin, flow rate; Refer to the footnote of Fig. 1.

Column size; $1.54\text{ cm}^2 \times 18\text{ cm}$.

Sample; Equivalent to 6.22g of fresh *R. limasus*.

Eluents: ; I 0.1 M formic acid

II 0.1 M formic acid + 0.05 M sodium formate,

III 0.1 M formic acid + 0.1 M sodium formate,

IV 0.1 M formic acid + 0.2 M sodium formate,

V 0.1 M formic acid + 0.3 M sodium formate,

VI 0.1 M formic acid + 0.4 M sodium formate,

VII 0.1 M formic acid + 0.6 M sodium formate,

VIII 0.1 M formic acid + 1 M sodium formate.

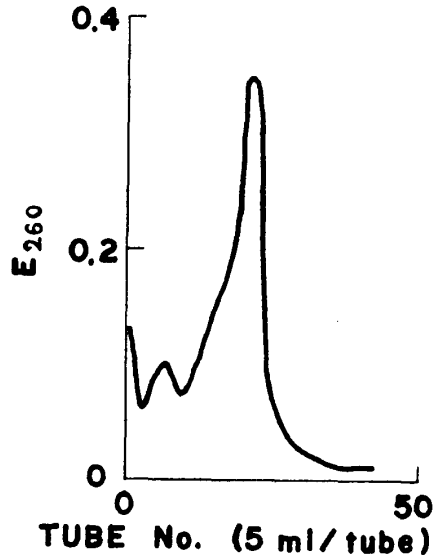
が、幾つかのピークは相互に接近したりあるいは重なりあっていたので、溶出剤を一部改変することを検討した結果、実験方法において述べた8種の溶出剤を用いることとした。そして、カラムに充填したFormate型樹脂 ($1.54\text{ cm}^2 \times 18\text{ cm}$) にイトミミズ生鮮6.22g相当量の抽出液を吸着させた後溶出したときの溶出図はFig. 2のようになり、1~7にいたる7個のピークが得られた。

2. 再クロマトグラフィおよび紫外外部吸収曲線による同定

Fig. 2にみられる7個のピークについて同定のため吸収曲線を調べることにしたが、溶出剤がギ酸系であるため溶出剤自体が紫外外部の吸収をもつので、再クロマトによりギ酸およびギ酸ナトリウムを除いた後吸収曲線をとることにした。

ピーク1: 再クロマトを行なった結果はFig. 3. に示すように2個のピークに分かれた。

• Fig. 3. Rechromatogram of the peak 1 which was shown in Fig. 2.

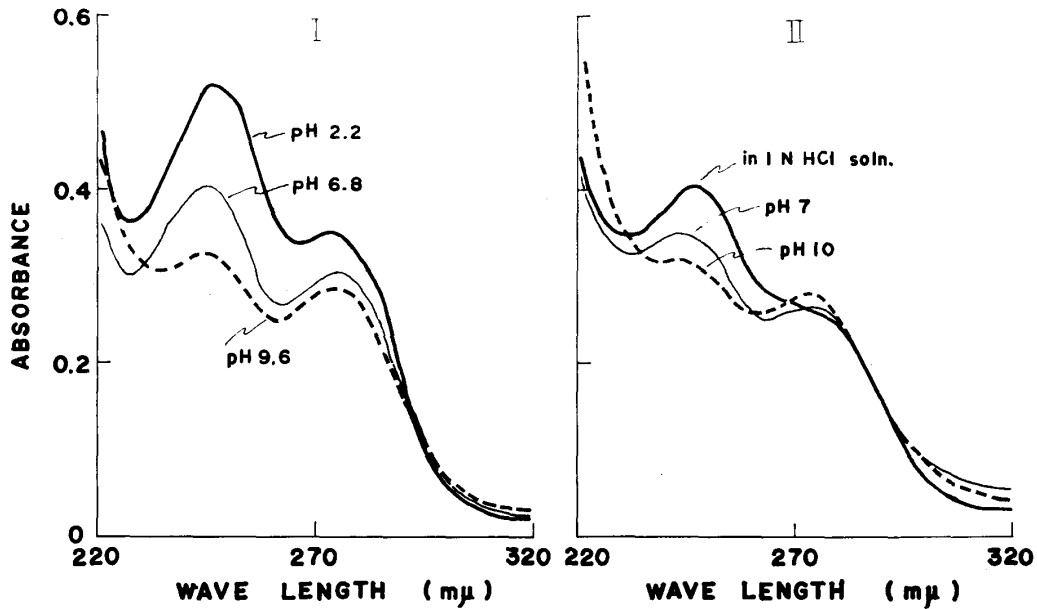


Resin ; Dowex 1,×2, 200 ~ 400 mesh, Cl form.

Column size ; 1.13 cm²×5 cm.

Eluent ; 0.01M NH₄Cl

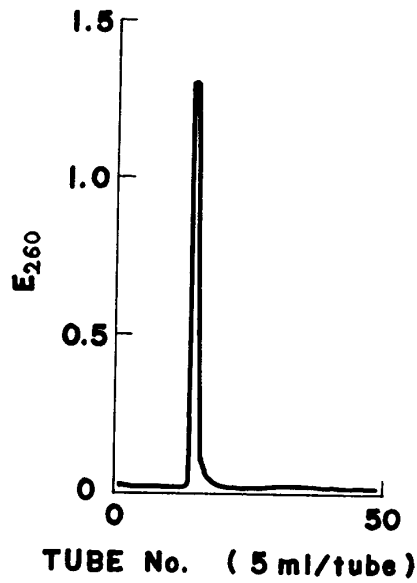
Fig. 4. Ultraviolet absorption curves of the peak which was shown in Fig. 3.



I and II ; Ultraviolet absorption curves before (I) and after (II) hydrolysis with HCl.

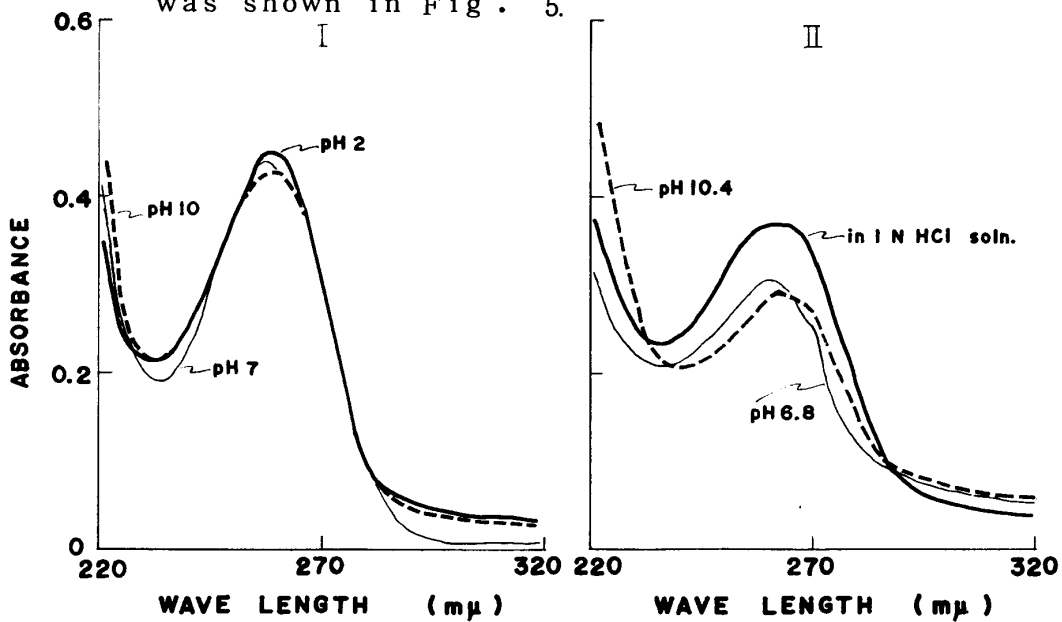
I ; Guanine. II ; Guanine.

Fig. 5. Rechromatogram of the peak 3 which was shown in Fig. 2.



Resin, column size ; Refer to the footnote of Fig. 3.
Eluent ; 0.01 M HCl + 0.02 M NaCl.

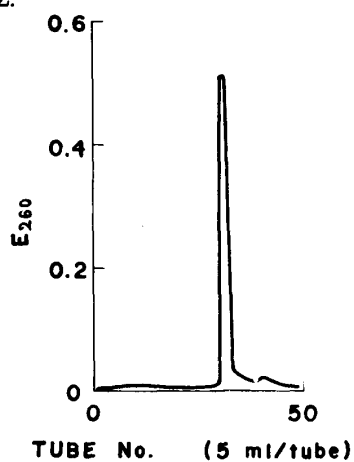
Fig. 6. Ultraviolet absorption curves of the peak which was shown in Fig. 5.



I and II ; The absorption curves before (I) and after (II) hydrolysis with HCl.

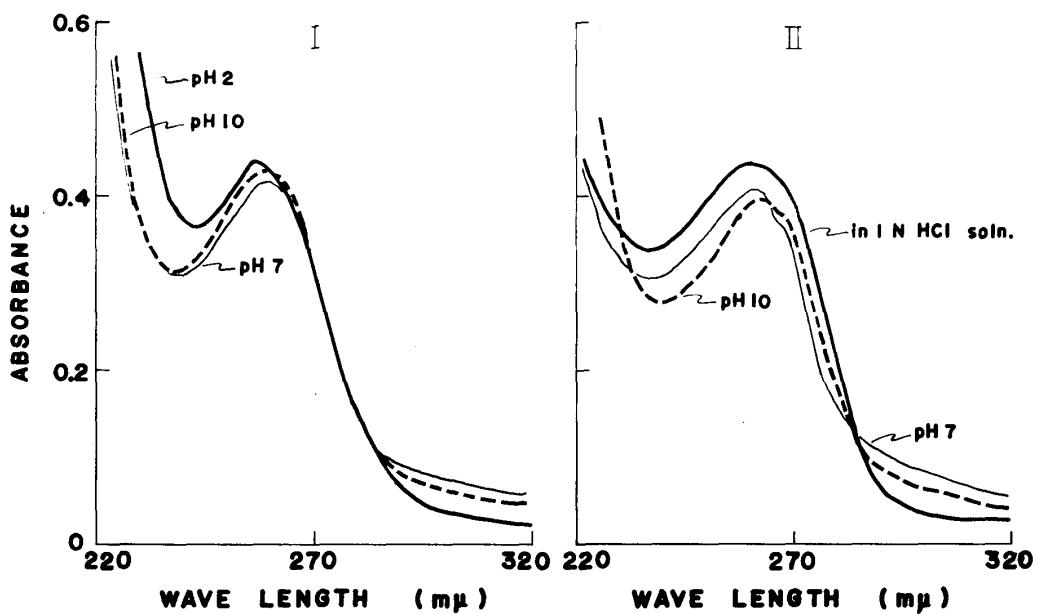
I ; Adenosine. II ; Adenine.

Fig. 7. Rechromatogram of the peak 6 which was shown in Fig. 2.



Resin, column size ; Refer to the footnote of Fig. 3.
Eluent ; 0.01 M HCl + 0.2 M NaCl.

Fig. 8. Ultraviolet absorption curves of the peak which was shown in Fig. 7.

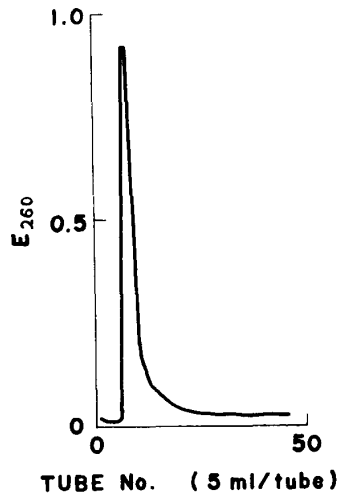


I and II ; The absorption curves before (I) and after (II) hydrolysis with HCl.

I ; Adenosine.

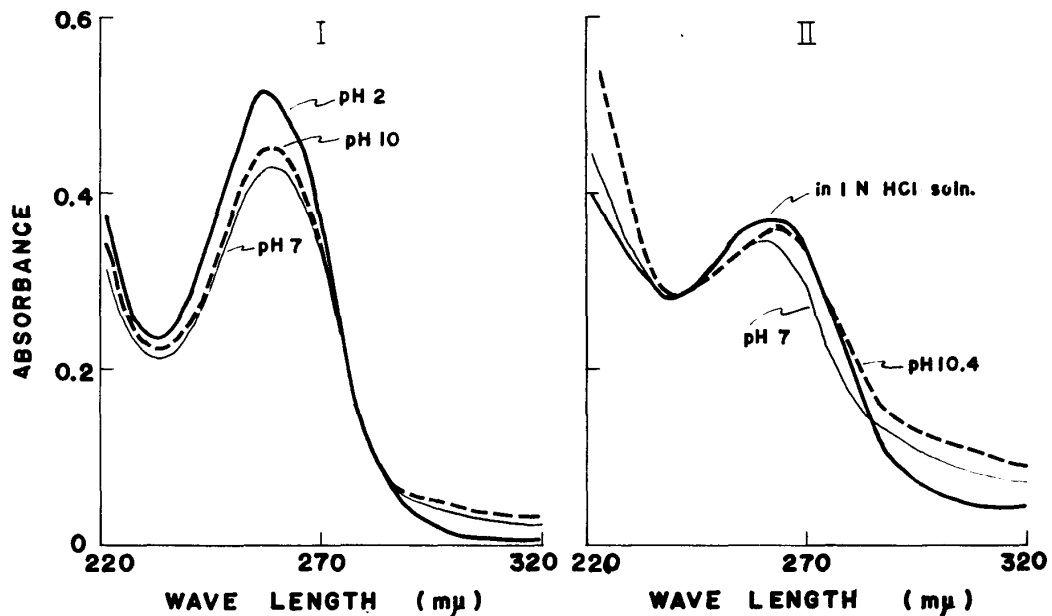
II ; Adenine.

Fig. 9. Rechromatogram of the peak 7 which was shown in Fig. 2.



Resin, column size ; Refer to the footnote of Fig. 3.
Eluent ; 0.01 M HCl + 0.2 M NaCl.

Fig. 10. Ultraviolet absorption curves of the peak which was shown in Fig. 9.



I and II ; The absorption curves before (I) and after (II) hydrolysis with HCl.

I ; Adenosine. II ; Adenine

そのうち1個は吸光値が低く吸収曲線を調べるができなかった。他の1個の吸収曲線の模様は塩酸による分解前後において変わらず (Fig. 4), guanine と判定された。

ピーク2: ピーク1の裾にあって1と混在し, 吸光値も高くないので同定しなかった。

ピーク3: 再クロマトにおいて0.01 M HCl + 0.02 M NaCl で溶出し, 溶出図は Fig. 5 のようになった。塩酸分解前の吸収曲線は adenosine, 分解後は adenine であることを示していた。(Fig. 6)

ピーク4および5: 吸光値が低いために同定しなかった。

ピーク6: 再クロマトにおいて0.01 M HCl + 0.2 M NaCl で溶出した。Fig. 7 はその溶出図である。このピークの吸収曲線はピーク3と同様に塩酸分解前は adenosine, 分解後は adenine であった (Fig. 8)。

ピーク7: Fig. 2 において最も大きなピークであって再クロマトを行なった結果は, Fig. 9 のようになった。塩酸分解前後の吸収曲線は adenosine および adenine であった (Fig. 10)。

IV 考 察

本研究においてはまず溶出剤について検討するため数回実験を重ね, 溶出剤の濃度を一部改変した。4月下旬から10月上旬にかけて行なった数回の実験において, 樹脂に吸着させた試料量は同じであるにもかかわらずクロマトグラム中の吸光値に幾分かの差がみられた。すなわち, 8月下旬においてもっともヌクレオチド量が多いような結果が得られたが, これは季節的変動によるものではないかと思われる。魚の場合²¹⁾, 適水温では筋肉内に高エネルギー化合物を多量に含有するようになり, また高温で飼育した場合と低温で飼育した場合とでは, 酸溶性燐量が変わり, 低温では減少すると報告されている。イトミミズの場合でも, 夏季に気温が高く活発に活動している場合と, 気温が低くなって活動が鈍くなっている場合とを比べると魚の場合と同様であろうと推測される。

Fig. 2 にみられるピーク3, 6, 7の吸収曲線はいずれも adenosine 系物質であることを示していた。これらのピークの溶出位置を文献^{17, 22)} と比較して考えるとピーク3は AMP, 6は ADP, 7は ATP と推定される。筆者が小林・富山とともに^{11~15)} 以前 C1 型樹脂を用いて分析した場合にもクロマトグラム中最も大きいピークは ATP であった。Nilsson²²⁾ はミミズ (*Lumbricus terrestris*) のヌクレオチドについて Formate 型樹脂により分析しているが Nilsson の結果でも最も大きいピークは ATP である。生鮮海藻の場合^{1, 2, 5, 6)} にも, また魚類²³⁾, 軟体動物²⁴⁾, 貝類²⁴⁾ などの場合にも生鮮時にはヌクレオチド類のうち ATP が量的に最も多い。陸上植物のジャガイモ²⁵⁾ の場合でも同様である。よって一般に生物においてはエネルギー代謝上極めて重要な役割を有する ATP がヌクレオチド中最も多量に存在するものと考えられる。生物試料よりヌクレオチドを低温において抽出したにもかかわらず ATP がまったく存在しないような結果を示す報告²⁶⁾ がみられる場合があるが, これは分析の途中で酵素などの作用により ATP が分解消失したのであろう。

大山：マミズイトミミズの酸可溶性化合物について (I)

ピーク 4 および 5 は文献^{17,22)}にある溶出図を参考とし、溶出位置から判断すれば、そのどちらかはおそらく UDP ないしは UDP 関連物質ではないかと思われる。筆者は UDP-sugar がイトミミズに存在することを小林・富山とともに報告^{14,15)}している。

Formate 型樹脂によるクロマトは C1 型におけると同様に再現性は極めて良好であった。

V 要 約

マミズイトミミズから得られた酸可溶区分について Dowex 1, Formate 型によりイオン交換クロマトを行なうとともに C1 型樹脂により再クロマトを行ない紫外外部吸収曲線および溶出位置から同定を試み次の結果を得た。

1. Formate 型樹脂によるクロマトによって 7 個の分画が得られた。
2. 紫外外部吸収曲線から guanine および 3 個の adenosine 系物質の存在をみとめた。
3. これら 3 個の adenosine 系物質は溶出位置からそれぞれ AMP, ADP, ATP であろうと推定した。

文 献

- 1) 大山重信・小林邦男・富山哲夫：藻類の磷代謝に関する研究 I. アサクサノリのヌクレオチドについて。日水誌。 , 34, 59~64 (1968)
- 2) 大山重信・小林邦男・富山哲夫：藻類の磷代謝に関する研究 - II. アサクサノりに吸収された ³²P の各種ヌクレオチドへのとり込み。日水誌。 , 34, 722~725 (1968)
- 3) 大山重信・小林邦男・富山哲夫・夕田光治・大島二郎：藻類の磷代謝に関する研究 - III. 日水誌。 , 投稿中
- 4) 富山哲夫・小林邦男・夕田光治・大山重信：有明海における水質汚濁の生化学的研究 - III. アサクサノリ正常葉および癌腫病葉の磷酸代謝について。日本農学大会水産部会発表。昭41. 4 (1966)
- 5) 大山重信・小林邦男・富山哲夫：藻類の磷代謝に関する研究 II. アサクサノリの各種磷化合物における ³²P の転移。日本水産学会秋季大会発表。昭41. 10 (1966)
- 6) 大山重信・小林邦男・富山哲夫：藻類の磷代謝に関する研究 - III. アサクサノリのヌクレオチドについて。日本水産学会秋季大会発表。昭41. 10 (1966)
- 7) 大山重信・大島二郎・小林邦男・富山哲夫：藻類の磷代謝に関する研究 - IV. 数種の海藻における各種磷化合物態磷含量。日本水産学会秋季大会発表。昭44. 10 (1969)
- 8) 大山重信：マミズイトミミズの磷脂質区分における磷代謝について (I)。磷脂質区分の調製。鹿児島県立短大紀要 (自然科学篇) , 22, 1~8 (1971)
- 9) 大山重信：マミズイトミミズの磷脂質区分における磷代謝について (II)。磷脂質の分画および同定。鹿児島県立短大紀要 (自然科学篇) , 23, 1~9 (1972)

大山：マミズイトミミズの酸可溶性化合物について (I)

- 10) 小林邦男・富山哲夫：水棲生物における³²Pの吸収および代謝に関する研究-I。
マミズイトミミズによる³²Pの吸収および代謝。日水誌，25，576～580 (1959)
- 11) 小林邦男・大山重信・富山哲夫：水棲生物における³²Pの吸収および代謝に関する研究-II。
マミズイトミミズに吸収された³²Pの各種酸可溶性リン化合物への分布。
日水誌，26，338～342 (1960)
- 12) 小林邦男・大山重信・富山哲夫：水棲生物における³²Pの吸収および代謝に関する研究-II。
水中³²Pの各種酸可溶性リン化合物への移行について。日本水産学会秋季大会発表。
昭34. 10 (1959)
- 13) 小林邦男・富山哲夫：水中³²Pの各種酸可溶性リン化合物への移行について。日本農学大会水産部
会，水族生理学シンポジウムにおいて発表。昭35. 4 (1960)
- 14) 大山重信・小林邦男・富山哲夫：水棲生物における³²Pの吸収および代謝に関する研究-IV。
マミズイトミミズの各種酸可溶性リン化合物の再クロマトグラフィによる分離と同定。日本農学大会
水産部会発表。昭36. 4 (1961)
- 15) 富山哲夫：放射性同位元素による物質代謝の研究。日本水産学会秋季大会，水産と放射線に関す
るシンポジウムにおいて発表。昭36. 10 (1961)
- 16) 宮木侃治・中尾 真・田中伸一：磷酸代謝実験法 (I) (吉川・高橋編著)，p, 158, 広川書店
(1958)
- 17) R. Bergkvist and A. Deutsch : Ion Exchange Chromatography
of Nucleoside Polyphosphates. *Acta Chem. Scand.*, 8, 1877~1879
(1954)
- 18) 宮本侃治・中尾 真・田中伸一：磷酸代謝実験法 (I) (吉川・高橋編著)，p 177,
広川書店 (1958)
- 19) W. E. Cohn and C. E. Carter : The Separation of Adenosine
Triphosphates by Ion Exchange and Paper Chromatography.
J. Am. Chem. Soc., 72, 4273~4275 (1955)
- 20) E. Chargaff and J. N. Davidson : The Nucleic Acids, Academic
Press Inc., New York (1955)
- 21) 中野智夫：魚類筋肉内リン化合物の生理化学的研究-V。水温変化に伴うリン化合物量の変動。
日水誌，27，357～360 (1961)
- 22) R. Nilsson : Acid-soluble Nucleotides of the Earthworm
(*Lumbricus terrestris*). *Acta Chem. Scand.*, 11, 1003~1012
(1957)
- 23) 斉藤恒行・新井健一：水産動物筋肉中の有機リン化合物に関する研究 第1報。鯉筋肉中の
adenosine polyphosphate の定量に就て。北大水産彙集，3，228～233
(1955)

斉藤恒行・新井健一：水産動物筋肉中の有機リン化合物に関する研究-III。コイ筋肉中の

adenosine polyphosphate に及ぼす貯蔵温度の影響。日水誌, 22, 569~573 (1957)

齊藤恒行・新井健一: 水産動物筋肉中の有機リン化合物に関する研究-V. コイ筋肉中の核酸系化合物の凍結貯蔵中における変化について, 日水誌, 23, 265~268 (1957)

T, Saito and K, Arai : Slow Freezing of Carp Muscle and Inosinic Acid Formation. *Nature* 179, 820~821 (1957)

T. Saito and K. Arai : Slow Freezing of Carp Muscle and Inosinic Acid Formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 73, 315~319 (1958)

富山哲夫・小林邦男・北原慶子・小橋昌裕: 低温貯蔵中のベラの筋肉におけるヌクレオチドの変化について。日水誌, 32, 600~604 (1966)

富山哲夫・小林邦男・北原慶子・白石悦子・大庭信良: 低温貯蔵中におけるコイ肉ヌクレオチドの変化と鮮度について。日水誌, 32, 262~266 (1966)

小林邦男: 魚肉のヌクレオチド。日水誌, 32, 166~170 (1966)

24) 齊藤恒行: 水産動物筋肉におけるATPならびに関連化合物。日水誌, 27, 461~470 (1961)

25) K. Mori, M. Nakamura, and S. Funahashi : Fractionation of Sugar Phosphates and Nucleotides in Potato Tubers. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24, 344~350 (1960)

26) 中村佐兵衛・赤川久義・猪川倫好・川野辺英昭: 数種海藻のヌクレオチドの分離と同定。植物学雑誌, 81, 556~565 (1968)