

## 鶏胚酸可溶性画分中のデオキシリボチド

嶋林 幸英・荒木 幸隆\*・田口 寛

## Deoxyribotides in Acid Soluble Fraction of Chick Embryo

Yoshihide SHIMABAYASHI, Yukitaka ARAKI and Hiroshi TAGUCHI

## 結 言

鶏胚の DNA 代謝と密接な関連性を有する酸可溶性低分子デオキシリボシル化合物のうち、デオキシリボチドに関しては、デオキシチミジン (dT), デオキシウリジン (dU), デオキシシチジン (dC) およびデオキシイノシン (dI) が主なものとして検出、同定されている<sup>1,2)</sup> のに反し、デオキシリボチドに関しては実験例に乏しい<sup>3)</sup>。

本報では、鶏胚の成長に伴うデオキシリボチドの変化並びに DNA 代謝を明らかにするため、酸可溶性画分中のデオキシリボチドの検出を試みた結果を報告する。

## 材 料 と 方 法

## 1. 材 料

1) 鶏胚 岐阜県種鶏場から入手した白色レグホーン種の種卵を常法にしたがい孵卵した。14日目に卵殻を破り正常胚を取り出し、附着している卵黄や血液等を除去するため、水冷生理食塩水でよく洗滌した。胚体表面の水分は、濾紙で出来る限り吸い取った後、直ちに試料の調製に供した。

2) セライト 市販のセライト No. 545 を、R. H. HALL<sup>2)</sup>の方法に準じて精製したものを実験に用いた。

3) イオン交換樹脂 Dowex-1 ×2, Cl 型で 100~200メッシュのものを用いた。

4) バイオアッセイ用培地 バイオアッセイに用いた *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 (*L. leichmannii*) の保存用、接種用および分析用培地は、いずれも日本製薬株式会社製のものを用いた。

5) 標準デオキシリボチドおよびデオキシリボチド

PL Biochemical Inc. から入手した。

6) 5'-ヌクレオチダーゼ BOM Chemicals Ltd. から入手した。

## 2. 方 法

1) 酸可溶性画分の調製 鶏胚 100g に対し、水冷した 0.6N 過塩素酸 (PCA) 400 ml を加え、ホモジナイズした。このホモジネートを 4°C, 10,000×g で10分間遠心分離し上澄液を得た。沈澱には、水冷した 0.6N PCA 400 ml を再度加へ、同様の操作を繰り返した。再上澄液を合わせ、セライトを濾過助剤として用い吸引濾過した。透明濾液は水酸化カリウムで中和、低温室 (4°C) で一夜放置後、生じた過塩素酸カリウムの結晶等を濾別した。濾液は減圧下で濃縮し約 10 ml とした。これを蒸留水 2 l に対して透析した。繰り返して透析し得た外液は合わせて約 5 ml 起濃縮し、酸可溶性画分とした。なお、これ以後の実験には、必要に応じて更に濃縮して実験に供した。

2) カラムクロマトグラフィー 酸可溶性画分中のヌクレオチド類の分離は、R. H. HALL の方法<sup>2)</sup> を一部修正したセライトカラムクロマトグラフィー<sup>4)</sup> および Dowex-1 を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー<sup>5)</sup> によった。

3) 高圧濾紙電気泳動 東洋濾紙 No. 51 を用い、pH 3.5 (水-酢酸-ピリジン; 89:10:1) で 3,000 V, 90分間泳動した<sup>6)</sup>。

4) ペーパークロマトグラフィー 東洋濾紙 No. 50 を用い、n-ブタノール-水-28% アンモニア水 (255:45:0.5) で一次元上昇法により展開した。

5) デオキシリボシル化合物の検出 *L. leichmannii* を用いたマイタロバイオアッセイ法<sup>7)</sup> によった。

昭和 60 年 6 月 29 日 受理

\* 現在、明治乳業株式会社

## 結果と考察

## 1. 酸可溶性画分の分別

新鮮14日目の鶏胚約 100 g から調製した酸可溶性画分 2 ml をセライトカラムクロマトグラフィーに供した。展開には、既報の酢酸エチル-n-ブタノール系の溶媒を用い、順次極性を高めた 6 種類の溶媒<sup>4)</sup>で展開し、最後は蒸留水を用いた。10 ml ずつ分取し、260 nm の吸光度を測定した後、偶数番号の画分は減圧下で濃縮した。乾固物には蒸留水 2.5 ml を加へ溶解した後、常法にしたがい *L. leichmannii* に対する生長促進効果を求めた。その結果を Fig. 1 に示した。主として、5 つの *L. leichmannii* 生長促進ピークを見出したが、このうち Peak I, Peak II, Peak III および Peak IV は、それぞれ dT, dU, dI および dC とすでに同定している<sup>5)</sup>。酢酸エチル-n-ブタノール系の溶媒で展開した *L. leichmannii* 生長促進物質がデオキシリボシドであったこと、および標準デオキシリボシル化合物をセライトカラムクロマトグラフィーに供した場合、デオキシリボシドは蒸留水ではじめて溶出した結果 (Fig. 2) から、Peak V はデオキ

シリボシドを含有すると推定した。

## 2. デオキシリボシドの検出

鶏胚約 800 g から調製した酸可溶性画分をセライトカラムクロマトグラフィーに供し、酢酸エチル-n-ブタノール-水 (1:1:1) の上層 900 ml で展開し、塩基やヌクレオシド類等を分別後、蒸留水 200 ml を用いてヌクレオシド類等を溶出した。溶出液は減圧下で約 30 ml まで濃縮した後、活性炭処理<sup>6)</sup>で部分精製した。これをさらに減圧下で濃縮し約 4 ml とした後、Dowex-1 × 2 カラム (0.8 × 12.5 cm) に供した。充分水洗した後、0.004N HCl で溶出した。約 1000 ml の溶出液を集め、減圧下浴温 40°C 以下で濃縮しヌクレオシド画分とした。

ヌクレオシド画分は 0.5 ml の脱イオン水に溶解した後、一部を高圧濾紙電気泳動に供し、*L. leichmannii* 生長促進物質を検索した結果を Fig. 3 に示した。検出した 4 種類の *L. leichmannii* 生長促進物質は標品として用いたデオキシシチジン-一磷酸 (dCMP)、デオキシアデノシン-一磷酸 (dAMP)、デオキシグアノシン-一磷酸 (dGMP) およびデオキシチミジン-一磷酸 (dTMP) と

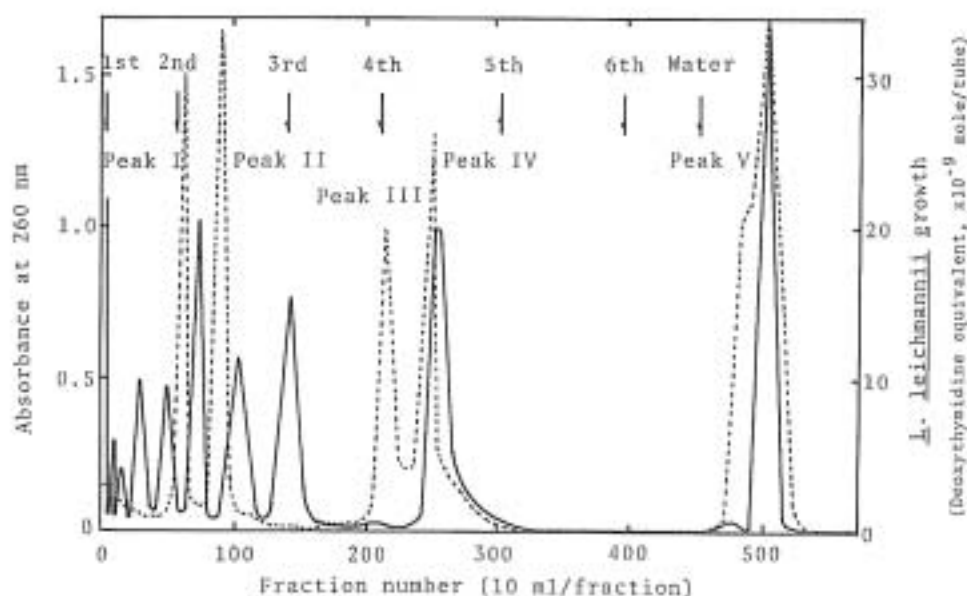


Fig. 1. Fractionation of Acid Soluble Fraction Prepared from Chick Embryo by Celite Column Chromatography.

The elution was performed by stepwise addition of the each upper phase of solvent systems from the first to the sixth and then water, successively. Solvent systems used were same as described already<sup>4)</sup>. Column size, 1.8 × 80 cm; Flow rate, 30 ml/hr.

—, Absorbance at 260 nm; ·····, *L. leichmannii* growth.

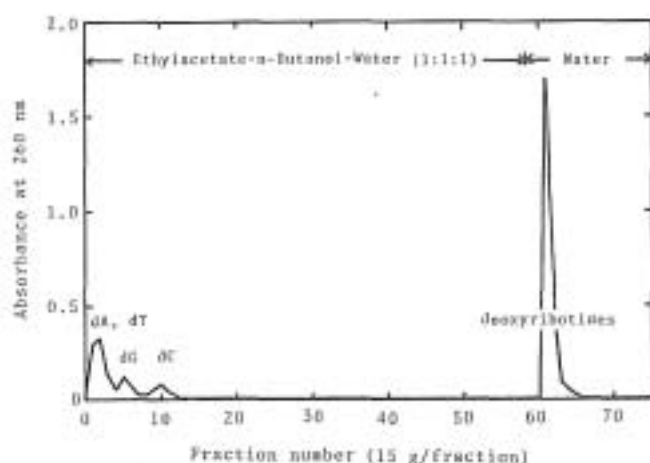


Fig. 2. Fractionation of Authentic Deoxyribosyl Compounds by Celite Column Chromatography. Column size, 1.8×40 cm; Flow rate, 30 g/hr.

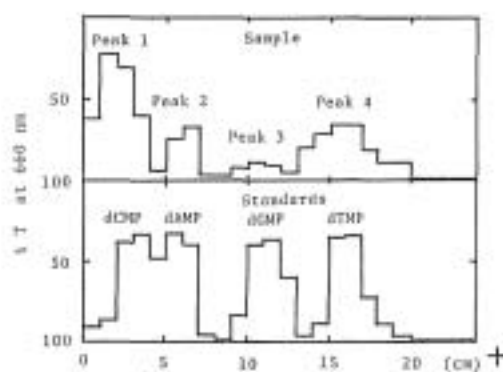


Fig. 3. Paper Electrophoresis of Nucleotide Fraction. Electrophoresis was performed on a 4×60 cm strip of Tōyō No. 51 paper at 1.5 mA/cm and 3000 V for 90 min with use of pyridine-acetic acid-water (1:10:89) at pH 3.5. The electropherogram was examined by microbial assay with *L. leichmannii*.

泳動距離でよく一致した。

*L. leichmannii* は、ビタミン B<sub>12</sub> ならびにその関連物質以外に、デオキシリボシドおよびデオキシリボチドにより生長が促進されることはよく知られている。ここで検出した *L. leichmannii* 生長促進物質は、セライトカラムクロマトグラフィーならびに Dowex-1 を用いたイオン交換クロマトグラフィーに対する挙動および高圧濾紙電気泳動の結果から、ビタミン B<sub>12</sub> ならびにその関連物質およびデオキシリボシド類ではなく、デオキシリボチドと推定した。

この点を明らかにするため、5'-ヌクレオチダーゼ処理により遊離してくるデオキシリボシドの検出を試みた。

すなわち、上記実験に用いた残部のヌクレオチド画分を高圧濾紙電気泳動に供し、デオキシリボチドを分別した。風乾した濾紙は、Fig. 3 に示した *L. leichmannii* の生長ピークにしたがい切断後水を加えて抽出した。抽出液に 5'-ヌクレオチダーゼを加へ、pH 9.0, 37°C で一夜分解した<sup>4)</sup>。分解液を濃縮後、東洋濾紙 No. 50 に検出し、n-ブタノール-水-28% アンモニア水 (255:45:

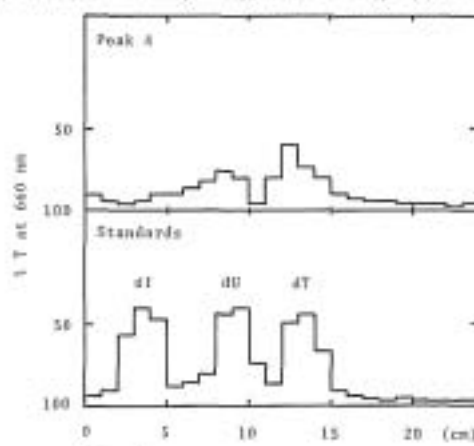


Fig. 4. Paper Chromatography of Peak 4 digested with 5'-Nucleotidase.

Paper chromatography was performed on a 2×40 cm strip of Tōyō No. 50 paper with use of n-butanol-water-ammonia (255:45:0.5) by ascending method. The chromatogram was examined by microbial assay with *L. leichmannii*.

0.5)\*で展開した。風乾濾紙を *L. leichmannii* 法で分析した結果、Peak 1, Peak 2 および Peak 3 からそれぞれ dC, dA および dG の展開距離に一致した各生長促進物質を検出した。また、Peak 4 からは dU ならびに dT の展開距離に一致した生長促進物質を見出した。その一例を Fig. 4 に示した。

以上、ヌクレオチド画分から検出した *L. leichmannii* 生長促進物質は、カラムクロマトグラフィーに対する挙動および濾紙電気泳動並びに 5'-ヌクレオチダーゼ処理の結果より、dCMP, dAMP, dGMP, dUMP および dTMP と同定した。今後、これらの各デオキシリボチドの分別定量法を検討した後、胚体成長に伴う変化を追究し、その DNA 代謝の解明に資したいと考えている。

### 要 約

ふ卵14日目の鶏胚から調製した酸可溶性画分をセライトカラムクロマトグラフィーに供し、塩基類およびヌクレオシド類を分別後、Dowex 1 イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、ヌクレオチド画分を得た。これを高圧濾紙電気泳動に供した後、*L. leichmannii* を用いた

マイクロバイオアッセイでデオキシリボチドを検出するとともに、分別した各デオキシリボチドを 5'-ヌクレオチダーゼで分解し、生成したデオキシリボチドを検討した結果、酸可溶性画分中のデオキシリボチドは、dAMP, dCMP, dGMP, dTMP および dUMP と同定した。

### 文 献

- 1) SHIMABAYASHI, Y. and K. IWAMOTO, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 947, 1966.
- 2) SHIMABAYASHI, Y., Y. SEKIYA, F. HAMAJI and A. FUKAZU, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 183, 1979.
- 3) HALL, R. H., *J. Biol. Chem.*, **237**, 2283, 1962.
- 4) SHIMABAYASHI, Y., M. TANAKA and T. TAKAHASHI, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 919, 1978.
- 5) 蛋白質, 核酸, 酵素, 生物化学実験法 VI, 核酸, p. 521~526, 1960.
- 6) KLOUWEN, H. M., *J. Chromatog.* **7**, 216, 1962.
- 7) SHIMABAYASHI, Y. and K. IWAMOTO, *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 379, 1965.
- 8) 田口 寛, 高見武宏, 武藤真子, 嶋林幸英, 岩井和夫, *ビタミン*, **52**, 363, 1978.
- 9) FELIX, F., J. L. POTTER and M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1150, 1960.

### Summary

Nucleoside fraction in extract with cold perchloric acid from 14 day old chick embryos was prepared by successive column chromatography on celite and Dowex-1 ion exchanger.

An aliquot of the nucleotide fraction was subjected to high voltage paper electrophoresis at 3000 V for 90 min at pH 3.5, and then examined by microbioassay method with *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830. Four deoxyribosides (dCMP, dAMP, dGMP and dUMP or dTMP) were detected on the paper. Each compound on the electropherogram was eluted with water and digested with 5'-nucleotidase. The digest was developed on Tōyō No. 50 paper by ascending technique with n-butanol-water-conc. ammonia (255:45:0.5 v/v), and then investigated by the microbioassay. Deoxyriboside detected was dC, dA, dG, dU and dT, respectively.

The results indicated that major deoxyribosides in the fraction were dCMP, dAMP, dGMP, dUMP and dTMP.

\* デオキシリボチドは、本培養では展開せず原点にとどまる。