

豌豆中の核酸の分離

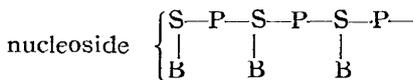
大庭和子*

緒 論

核酸類の発見のはじめとなった基礎的研究は Friedrich (1844~1895) によってなされた。即ち1868年に外科手術のほう帯から得た化膿細胞から核を分離し、それから取り出された核物質に、特殊なリン酸化化合物が含まれていることをみつけ、彼はそれを“ヌクレイン”と名づけた。その後も彼は、サケの精子の頭部から今では核酸といっている物質を取り出している。

核酸は、糖とリン酸と塩基（プリン塩基又はピリミジン塩基）が、1分子づつ結合したヌクレオチドを構成単位として重合したポリヌクレオチド※であって、糖部分は5炭糖で、D-リボースの入っているものをリボ核酸

※ 核酸を模式化して表わすと次のようになる。



nucleotide

S: 糖

P: リン酸

B: プリン ピリミジン塩基

以下RNAの略号を用いる。)と称し、2'-オキシ-D-リボースの入っているものをデオキシリボ核酸(以下DNAの略号を用いる)と称する) Mieschenの発見した核酸はDNAでこのDNAは核にのみ存在し、もつとあとになつて発見されたRNAに主として細胞質に多く含まれている

RNAは生体内におけるタンパク質合成と最も密接な関係を有する物質として注目されておりDNA遺伝現象に本質的な役割を演じている。即ち核酸は生物現象において最も根本的な特異性の決定維持伝達の機構に鍵を握っている物質であるとみすなことができる。

タンパク質合成と核酸の関係についての研究の第一歩は Brachet⁽²⁾及び Caspersson⁽²⁾によりタンパク質合成の盛んと考えられる臓器の細胞はRNA含量が多く生理的に活発であつてもタンパク質合成が盛んでないと考えられる臓器の細胞中にはRNA含量が少いと提唱されたことに始る。

その後種々の細胞化学実験や定量において、この考え

は確認された。例えば、植物においてエンドウの受精及びその初期の発生過程において、RNA及びDNAがタンパク質合成に利用されていることや、タマネギの鱗茎を結晶リボスクレアーゼで処理をすると、生長が著しく阻害され、このリボスクレアーゼ処理をしたものに酵母RNAを与えると、阻害が一時的に回復する³⁾ことは、植物の生長に対する核酸の重要性を示すものである。

我々が、食品中に含まれている核酸と体内に摂取すると、唾液及び腸液中の酵素によつて消化される。即ちNucleaseの作用でNucleotideとなり、これはNucleotidaseによつてリン酸を放つてNucleosideとなり、次いで、Nucleosidaseの作用で糖と塩基に分解される。塩基は更に酵素の作用により、最終的には尿酸を形成する。

核酸の食品化学的研究に関しては、最近我が国において長足の進歩をなし、天然資源中に存在するイノシン酸をいろいろな方法例えばポリヌクレオチドを適当な酵素処理によつて分解し、イオン交換樹脂を用いて容易に抽出する方法⁴⁾等が研究され、工業的に量産化されるようになり、基礎応用方面に利用されている。

このように核酸は、医学や生化学の分野ばかりでなく、各方面で広範囲に研究、利用されている。

そこで本研究においては、高等植物の一種として、又日常、煮豆、グリーンピースその他の調理により、我々の食卓を賑わしているエンドウ豆をとりあげ、その種実中の核酸の定量及び分離、分離核酸の構成成分の検索を行った。

実 験

〔I〕実験試料の調製

市販 30日きぬさやいんげん⁵⁾の風乾物を精粉機にて粉末とし、これを実験材料とした。

〔II〕核酸の定量

核酸の定量に際しては、組織中より出来るだけ純粋な形で核酸を取り出してから、その構成成分である糖、リン酸あるいは塩基を測定して核酸量を定量する。

現在採りあげられている核酸分画法としては、実験試料をあらかじめ破壊して均一化し、各物質を抽出さ

* 昭和36年度本学卒業生

れやすい状態にしておき、まず低温で酸処理をして低分子化合物を、有機溶媒を用いて、脂質成分を除去すると、残渣として DNA, RNA・タンパク質などの混合物が残る。これから DNA・RNA を選択的に抽出する。

このような分画方法には Schmidt-Jhannhausen 法⁵⁾ Schneider 法⁶⁾ などがある。Schneider 法は、従来から動物組織の核酸の定量に用いられてきたが、この方法は植物組織にそのまま適用することは出来ない。それは植物組織にはペントーゼンやポリウロニド、その他の多糖類が多量に存在し、それが Scneider 法における核酸の糖の呈色反応を著しく阻害したり、あるいは高い定量値を与えるためである。

Ogur, Rosen 等は Schneider の欠点を改良して HClO₄による抽出及び紫外線吸収法を用いて微量の RNA や DNA を含む植物組織中の両核酸の分画定量に成功した。本実験においては、Ogur-Rosen 法に Schneider 法を組み合わせた分画方法を用いて、次の実験を試みた。

A) 核酸分画の分離 (Ogur-Rosen, Schneider 法³⁾)

(1) 酸可溶性物質の除去^{註1)}

乾燥粉末試料 1 g を正確に秤取し、氷冷 10% TCA (トリクロール酢酸) 10 ml を加えて、素早く、攪拌して遠心分離する。上澄液を除き残渣に前記操作を再び行う。二回分の上澄液を酸可溶性物質分画として除去した。

(2) アルコール・エーテル可溶性物質の除去

(1)の残渣を水 4 ml に懸濁し、95% エタノール 16 ml を加え遠心分離する。この残渣を 6 ml のエタノール・の混液 (3 : 1) に

註1 酸可溶性物質とはリン酸 mononucleotide, 糖質, その他低分子リン酸エステル等である。この抽出操作は DNA のプリン塩基が離れやすいため、できるだけ速やかに行うことが必要である。

懸濁し、室温でしばらく攪拌したのち、沸騰石を入れ、冷却管を付して湯浴中で内容物を 3 分間沸騰させる。冷却後遠心分離し、上澄液を除く。この操作を 3 回繰返して行い、上澄液を合してアルコール・エーテル可溶性物質の分画として除去した。

(3) RNA の抽出

(2)の残渣に 0.2N 氷冷 PCA (過塩素酸) 20 ml を加え素早く遠心分離²⁾する。この操作を 2 回行い、いずれも上澄液は棄去した。

残渣に 1N PCA 20 ml を加え、4°C で 18 時間分解

し、遠心分離する。上澄液を除去したものに 1N 氷冷 PCA 20 ml を加えて遠心分離する。この操作は 2 回繰返した。

(抽出液総量 57 ml)

(4) DNA の抽出

(3)の残渣に 0.5N PCA 20 ml を加え、70°C で 20 分間分解し、遠心分離する。この操作を 2 回行い、上澄液を合併して DNA 分画とした。(抽出液総量 38 ml)

註2 PCA に RNA が抽出するおそれがあるため早く行う。

B) 定量

(1) RNA の定量 (Orcinol-HCl 反応……Kerr 等の方法⁷⁾)

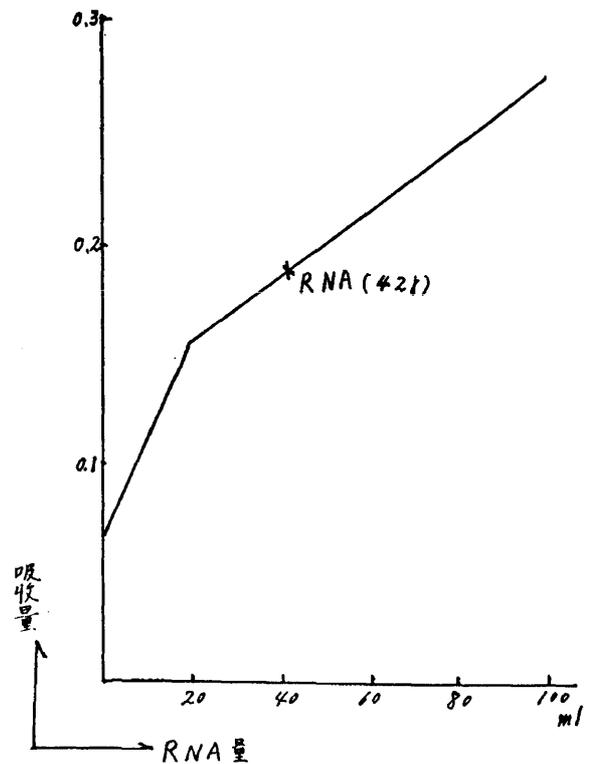
(a) 試料: 前記 RNA 分画抽出液を用いた。³⁾

(b) 試薬: FeCl₃ を 0.02% 含む濃 HCl (分析用)⁴⁾

10% Orcinol-Alcohol 溶液

(c) 操作: 試料 5 ml を日盛付共栓試験管にとり、5 ml の HCl-FeCl₃ 試薬及び 0.3 ml の Orcinol 試薬を加えて、20 分間沸騰湯浴中で加熱し、冷却後シマズ、コタキ光電比色計 (F12) を用いて同様に比色定量して作った。標準検量曲線 (酵母 RNA を用いた。) に照らし、RNA 量を求めた。第 1 図が検量曲線である。RNA 抽出液が濃すぎるので 10 倍に稀釈して用いた。

(d) 結果: 第 1 図より



RNA 抽出液 1 ml (42 × 10 =) 4207

エンドウ粉末 1g当 23.94mg

となりエンドウ粉末100g中約2.4%の RNA を含んでいることになる。

(2) DNA の定量 (Diphenylamine 反応)⁸⁾

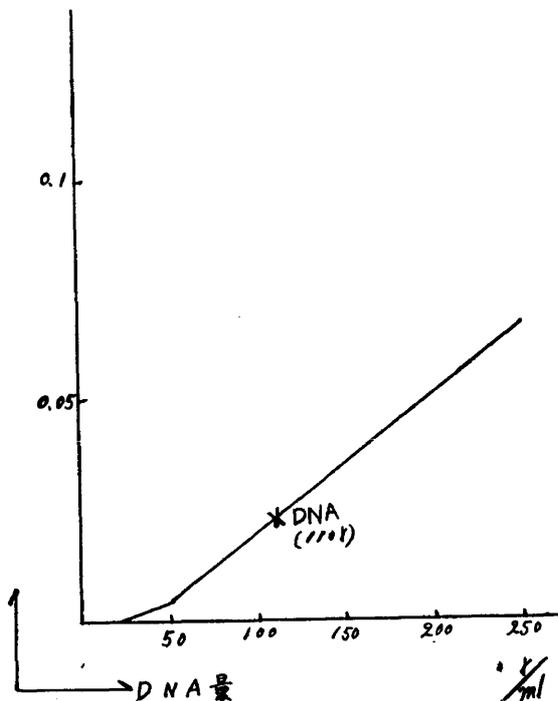
(a) 試料：前期 DNA 分画抽出液を用いた。

註3 この混液は共栓付フラスコに保存する，コルク栓はコルク中にペントースを含むから決して用いてはならない。

註4 密栓して暗所に保存する，新しいときは殆んど無色であるが，古くなるとオレンジ色を帯びてくるから使用時に調製した方がよい。

(b) 試薬：1gの Diphenylamine を98mlの再蒸留水⁵⁾に溶かし，濃硫酸 2ml を加えて調製する。

(c) 操作：共栓付試験管に前記調製試薬を2.5ml とり，その中に試料 1ml を加えてよく混ぜ，沸騰湯浴中で5分間加熱する。冷却後シマズーコタキ光電比色計 (F10) を用いて定量した。定量は同様操作により比色定量して作った。標準検量曲線 (スパーム DNA) に照らし，DNA 量を求めた。第2図が検量曲線である。



(d) 結果…第2図より

DNA 抽出液 1ml 中 110t

エンドウ粉末 1g当 4.18mg

となりエンドウ粉末100g中約0.4%の DNA が含まれていることになる。

以上の定量結果をまとめるとエンドウ粉末100g中には

RNA 2.394g DNA 0.418g 含まれていることになり，RNA，DNA 両核酸が共に相当量存在することが認められた。

註5 この試薬は冷所に置き，使用時に調製する方がよい。

〔Ⅲ〕 エンドウ核酸の分離

核酸の分離方法としては，1930年代までは主として化学的組織が研究の対象であったために，アルカリ抽出，酸沈澱といったかなり激しい処理方法が採られてはきたが，核酸や核タンパク質が高分子であることが判明した現在では，食塩水抽出，アルコール沈澱のような出来るだけ温和な方法が採用されるようになった。そこで本実験では，食塩水抽出法によりエンドウ核酸の分離を行った。

A) 試料

〔Ⅱ〕核酸の定量に用いたと同じく30日きぬきやいんげんの粉末を用いた。

B) 操作

(1) 脂質成分の除去

丸底フラスコに乾燥粉末試料300gと95%エタノール90mlを入れ，冷却管を付して湯浴中にて2時間内容物を煮沸する。吸引濾過し，濾液を塗いた。

(2) 抽出

(1)の沈澱物を室温で減圧乾燥したのち，10% NaCl 1lを加え，電気恒温器中で75°Cに保ち5日間抽出した。

(3) 洗浄

抽出物を吸引濾過し，濾液を10°C以下に氷冷しながら，水でうすめた HCl (35% HCl : H₂O = 1 : 1) を PH 2程度まで加え，核酸を沈澱させ，遠心分離した。この沈澱物をガラスフィルターにとり，ゆるやかに吸引しながら50%エタノールでClのなくなるまで洗浄した。Clがなくなってから95%エタノールを加え，20時間放置した。吸引濾過後，99.5%エタノール及びエーテルで洗浄し，減圧乾燥した。この生成物をエンドウ粗核酸とした。

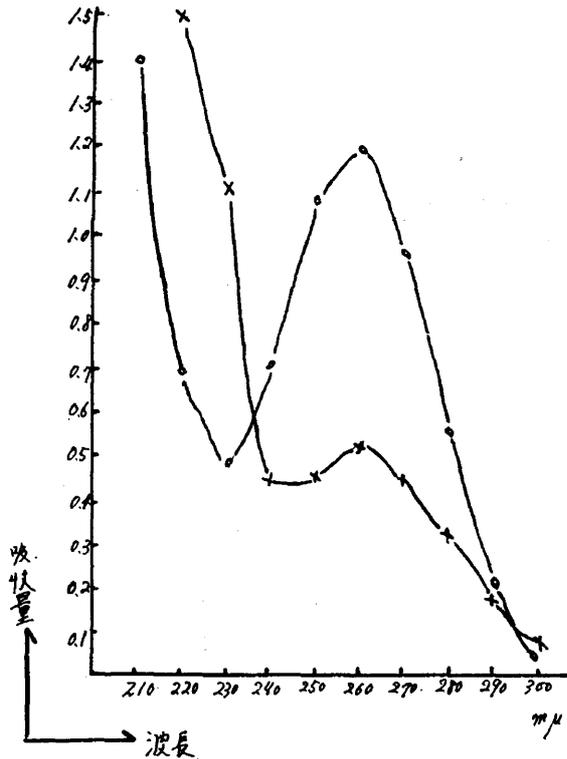
C) 結果

エンドウ粗核酸は半透明の琥珀色をしており，光線の角度により光沢を呈した。収量はエンドウ粉末300gよ6.42g (2.14%)を得た。

〔Ⅳ〕 エンドウ粗核酸の精製

註6 エタノールの沸点が低いので，安全を期して，直火にせず別に沸した湯を water Bath に注ぎ煮沸した。又突沸を防ぐために沸騰石を入れた。

一般に核酸は生体内ではタンパク質と結合し、核タンパク質として存在していることが知られている。そこで前記抽出エンドウ粗核酸（以下粗核酸と略す）を水に溶かし HITACHI PHOTO-ELECTRIC SPECTRO-PHOTOMETERにより、紫外外部吸収曲線をかくと第3—I図のようになった。（対照曲線として酵母RNAを同様に測定した。第3—I図より極小、極大波長は第1表の通りである。



この結果、極大波長は共に 260mμ で一致したが、極小波長は酵母RNAが30mμ²、粗核酸が240mμで10mμのずれが出来、吸収値が230分間3000回転で遠心分離する。上澄液を取り出し、水を加えて 60mℓとし、更にクロロホルム-オクチールアルコールの混液を 20mℓ加えて、タンパクゲルの出来なくなった核酸 sol¹¹⁾ 30mℓに同容の95%エタノールを加え、次で pH 2位になるように稀HCl (HCl·H₂O= 1 : 1) を加えて核酸を沈澱させる。以下粗核酸の洗浄と同様に Cl のなくなるまで50%エタノールで洗浄し、95%エタノールに浸して最後に99.5%アルコールで洗って減圧乾燥した

註8 オクチールアルコールは消泡剤として添加した。

註9 攪拌するとクロロホルムは乳濁され、そのクロロホルム滴の表面に攪拌により変性したタンパク質が吸着する

註10 上層の核酸sol は以後の各実験において使用

するので、特に分量を指定していない核酸溶液は、この物質をいい、「核酸sol」であらわす。

(2) 結果

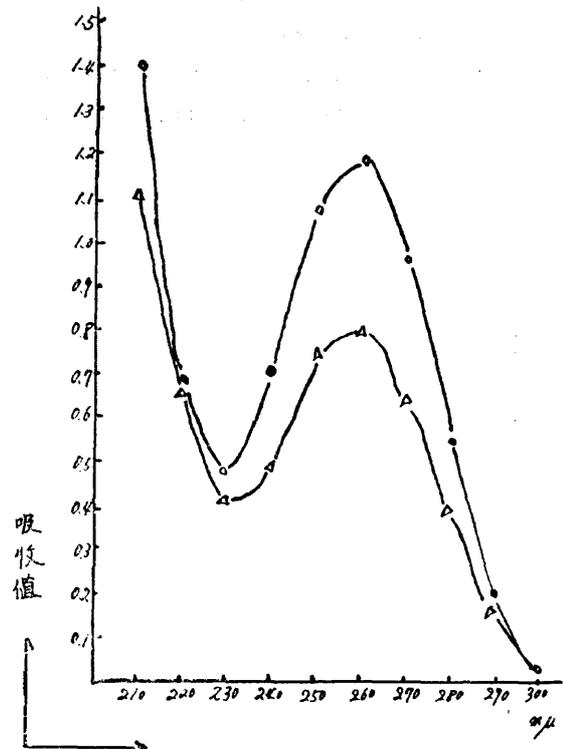
純白の粉末の核酸を得、その収量は核酸 sol 30mℓ中、0.167gを得た。即ち粗核酸15gより0.167gの精製核酸を得たことになる。

B) 純度判定

核酸の純度判定には種々の方法があるが、本実験においては紫外外部吸収曲線及び Biuret 反応によりエンドウ精製核酸の純度を判定した。

(1)紫外外部吸収曲線

核酸 sol の紫外外部吸収曲線を前記操作により書くと、第3—II図のようになった。



この図によると、極大、極小波長は酵母RNA、精製核酸いずれも第2表に示すごとくそれぞれ、260mμ 230mμ となり一致した。又260mμ の吸収値が230mμ あるいは 280mμ の吸収値の2倍になっていれば、その核酸はほぼ純粋物であるとみてよいとされている。¹¹⁾ そこで吸収値の比率をまとめてみると第2表の通りになった。

(2)Biuret反応

この方法はタンパク質が存在すると、Biuret 青紫色を呈し、エタノール層に抽出されるが、未反応の銅イオンや他のものによる色はエタノール層に移らない。またこの方法によると、約50μg のタンパク質ま

で検出出来るので、3~5mgの試料をとれば、1%のタンパク質が検出出来るいいかえるとエタノール層に呈色がなければタンパク質は1%以下といえることになる。

a) 試料

精製核酸 4 mg

b) 操作

試験管に製精核酸 4 mg をとり水 1 ml に溶かして、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液 0.05 ml を加える。約 0.9g の KOH を加えて飽和させ、0.3 ml の 95% エタノールを更に加えた。

	260 μ /230 μ	260 μ /280 μ
エンドウ核酸	1.96	2.00
酵母 RNA	2.49	2.10

c) 結果

$\text{CuSO}_4 : 5\text{H}_2\text{O}$ を加えると青紫色を呈し、エタノールを加えると二層に分離した。エタノール層は無色透明であった。従ってタンパク質は1%以下であると考えられる。

以上の紫外部吸収曲線、Biuret 反応の結果をまとめると、

(i) 極大、極小吸収波長はそれぞれ 260 μ 、230 μ で酵母 RNA と精製核酸は一致した。

(ii) 吸収値の比率が精製核酸において 260 μ /230 μ 、260 μ /280 μ がそれぞれ 1.96、2.00 でいずれも 2 に近い値を示した。

(iii) Biuret 反応により精製核酸中のタンパク質は 1% 以下であった。従って精製核酸の純度は、かなり高いものであると考えられた。

〔V〕 エンドウ核酸の構成成分の検索

A) ペントースに対するオルシン反応

(1) 試料

核酸 sol を用いた。

(2) 操作

前記 RNA 定量時と同様に反応させ、その呈色の有無を見た。

(3) 結果

反応液は緑色を呈した。即ちエンドウ核酸中に糖としてペントースが存在していることを認めた。

B) デオキシペントースに対するジフェニルアミン反応

(1) 試料

核酸 sol を用いた

(2) 操作

前記 DNA 定量時と同様に反応させ、その呈色の有無を見た。

(3) 結果

反応液はわずかに青藍色を呈した。即ちエンドウ核酸中に糖としてデオキシペントースがわずかに存在していることを認めた。

C) リン酸に対する Allen, 中村変法¹²⁾

(1) 試料

精製核酸 10mg を水 10ml にとかしたものをを用いた。

(2) 試薬

(i) 15% H_2SO_4 ¹¹⁾

(ii) アミドール亜硫酸塩液¹²⁾

(iii) 3.3% モリブデン酸アンモニウム液¹³⁾

(3) 操作

分解びんに 1 mg / 1 ml 核酸溶液 0.5 ml と 60% PCA 0.9 ml をとり、マイクロケルダールのバーナー上で加熱した。内容物は加熱により、褐変化し、やがて無色になり白煙が分解びんを還流ししたが、しばらくその状態で加熱し続けた。分解にようした時間は 45 分であった。分解がおわったら放冷し、4 ml の水を加えて、激しく沸騰している湯浴中に 15 分間つけ、流水を冷却後、目盛付試験管に移した。

これに前記試薬を (i)(ii)(iii) 順に各 1 ml 加え、水で全量を 10 ml にした。このものを 20°C に 20 分間保ちその呈色の有無を見た。

註11 メスシリンダー中で 85 ml の H_2SO_4 を加えて 100 ml にする。

註12 市販写真用アミドール 0.4g、重亜硫酸ナトリウム 8g を水に溶かして 100 ml とする。アミドールにより、黒色の不溶物を残したり、液が褐色をあげたりするから、冷時少量の活性炭を加え、振盪濾過した。使用時に作った方がよい。

註13 水に加熱溶解して作る、放置すると白沈を生ずるが、濾過して除いた。

(4) 結果

反応液は顕著に青色を呈した。即ちエンドウ核酸中にリン酸が存在していることを認めた。

D) 有機塩基の検索 (Paper chromatography 法)¹⁴⁾

(1) 試料 エンドウ核酸を用いた。

(2) 試料の調製 (塩基組成の分解)

エンドウ核酸 45mg を直径 1 cm の glass bombe にとり、6 N HCl 3 ml を加え、封管後 100°C 2 時間

湯浴中で加水分解する。開管後HClを湯浴上で溜去し、蒸留水3 mlで溶解して、これを Paper chromatography 用Sample とした。

第3表

Base	SampleRf値	standard Rf値
Adenie	0.36	0.35
Guanine	0.27	0.29
Hypoxanthine	0.24	0.23
Xanthine	0.14	0.15
Uracil	0.56	0.56
Cytocine	0.41	0.43
Thymine	0.68	0.68
	0.02	—

(3) 操作

- a)方法; Paper Chromatography 一次元上昇法
- b)濾紙; 東洋濾紙No. 50 (40cm×2cm)
- c)溶媒; n-ブタノール:モルフォリン:水 (5 : 1

点の名称を決定する為に夫々の純粋物を同時に展開した。

Rf値を示すと第3表のようになった。

註14 植物界に存在し、Nを含む塩基性物質を総称してアルカロイドと称し、苦味質として知られているが、ここでは新陳代謝に伴う遊離のプリン、ピリミジン塩基をいう。

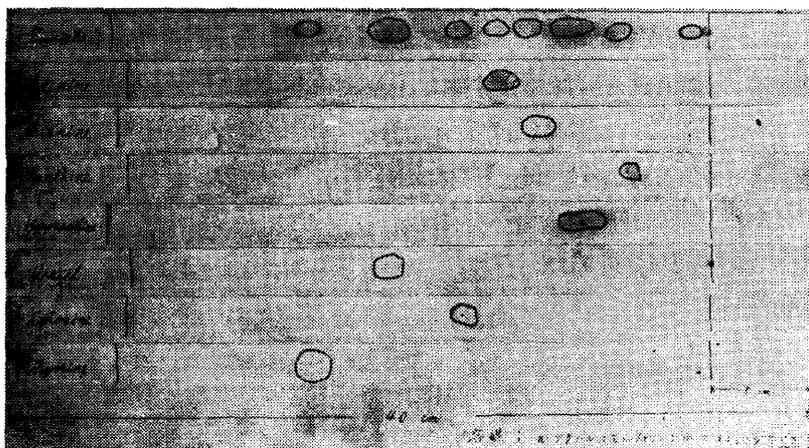
以上の結果から Purine Base として4個、即ち Adenine Guanine, Xanthine, Hypoxanthine と、Pyrimidine Base として3個、即ち Uracil Cytocine Thymine を検出し、認めた。尚 Rf値0.02のSpotはこれに相当する塩基が見当たらないので未確認である。

註15 使用時に新しく調製する、

註16 洗浄が完全か否かを見る為、別の濾紙片を sample 展開の濾紙と共に酢酸第二水銀液に浸す、洗浄中に時々取り出し、硫化アンモニウム溶液に浸してみても黒変するか否かで判定した。

又第4図は Spot の位置を示す。

第
四
図



: 4)

- d)展開温度及び時間; 32°C 恒温器中で約30時間
- e)発色方法 (吸着位置の決定)

風乾した Paper をエーテルで洗って乾かしてから、80°C 30分加熱後、pH6.2の0.1M酢酸第二水銀液に約30秒浸す、これに水を入れてあふれさせ、ゆるい流水中で完全に洗浄する硫化アンモニウム溶液に浸すと、硫化水銀の黒い斑点が塩基の位置を示した。

(4) 結果

発色処理により、黒色斑点を8個検出した。この斑

総括と考察

1) Ogur-Rosen Schneider 法により、エンドウ豆中の核酸を定量した結果、RNA 2.394%, DNA 0.

418%でかなりの含有量を示した。

これにより植物組織中にRNAは勿論のこと、DNAも存在するという事を再確認した。

2)食塩水抽出法によりエンドウ核酸の分離を行い、エンドウ粉末300gより粗核酸として6.24g(2.14%)を得た。

3)エンドウ粗核酸は、その紫外部吸収曲線及びタンパク質定性反応から、かなり不純物を含んでいると考えられたので、Chlorborm-gel 法で精製した結果、波長260mμに吸収極大、230mμに吸収極小をもつ紫外部吸収曲線を示すようになった。これは核酸の標準曲線と全く一致した。精製核酸の収量は、粗核酸1.5gより、0.167gであった。これにより核酸の分離にあたっては、核蛋白質として単離したのち、核酸を分離し

たほうが不純物の混入を防ぐ意味で望ましいと考えられる。

4) 分離・精製した核酸の純度は

(a) 吸収値の比率

260m μ /230m μ ; 1.96

260m μ /280m μ ; 2.00

b Biuret 反応によりタンパク質の含有量は1%以下。

となり、ほぼ純粋物であると判定した。

5) エンドウ核酸の構成成分の検索

(a) ペントース, デオキシペントスの定性反応はいずれも陽性を示したが、得られたエンドウ核酸はRNAとDNAの混合物であると考えられる。

(b) リン酸の定性反応を行った結果、陽性を示した。したがって得られたエンドウ核酸の構成成分としてリン酸の存在を認めた。

(c) 塩基として Purine Base 4 個 (Adenine, Guanine, Xanthine Hypoxanthine) Pyrimidine Base として 3 個 (Uracil, Cytocine Thymine) 未確認の spot 1 個を検出した。

以上の諸実験結果より、エンドウ種実中には、RNA, DNA の両核酸が存在し、かなりの含有量を示した。またエンドウ核酸はほぼ純粋物として分離することができた。しかし核酸を種実中より分離するにあたっては、各段階において試料の損失が見られ、実験操作の未熟さも手伝って、あまり良い収量を得ることができなかったのは残念である。と共に今後の検討がまたれる。

核酸は、現在各分野において大変興味深い研究の対象となっている。最近では特に遺伝の根本原因を握る

物質として究明されたり、癌細胞中にDNAが存在していることが発見されている。

食物科学においても、核酸は脳細胞の増強作用を有し、投与されている現在更に進んだ研究が、今後ますます活発に行われることを祈ってやまない。

参 考 文 献

- 1) J. N. Davidson (石田政弘・植田勝己訳) : 核酸の生化学
- 2) 共立出版KK編 : 蛋白質 : 核酸 : 酵素, 5, No. 11. 45 (1960)
- 3) 共立出版KK編 : 蛋白質 : 核酸 : 酵素, 3, No. 113~22 (1958)
- 4) 日本栄養食糧学会編 : 栄養と食糧, 14, No. 2, 84 (1961)
- 5) 江上不二夫(代表) : 標準生化学実験, 136 (1953)
- 6) M. Ogur, G. Rosen : Arch Biochem, 25. 262 (1950)
- 7) 江上不二夫 : 核酸及び核蛋白質, 上巻143 (1953)
- 8) 日本化学会編実験化学講座23生化学 I, 289(1961)
- 9) 道喜美代 : 栄養学実験法, 18(1960)
- 10) 江上不二夫(代表) : 標準生化学実験, 141 (1953)
- 11) 日本化学会編 : 実験化学講座23生化学 I, 250, 251 (1961)
- 12) 〃 536, 532 (1961)
- 13) 〃 316 (1961)
- 14) 江上不二夫 : 核酸及び核蛋白質, 上巻154 (1953)