

発光菌体中のヌクレオチド類の分離精製

深 沢 茂 樹*

Purification of Nucleotides from the Extracts of *Photobacterium phosphoreum*

Shigeki FUKASAWA*

(With 2 text-figures and 1 table)

Extracts prepared from the luminescent bacteria, *Photobacterium phosphoreum* were found to contain ultraviolet absorbing material. The components were separated by column chromatography using Sephadex G-10 and Dowex 1. Two of them were found to be 2'-GMP and 3'-GMP by means of paper chromatography and by measuring their ultraviolet absorption spectra.

緒 言

著者は米谷 (1960) の方法により、発光菌から得られる蛍光物質の分離精製を行っていたが、それに伴い、波長 260 nm 付近に極大吸収をもつ物質の画分が得られた。そこで、ヌクレオチド類を含むと思われる画分を分離精製したところ、その内の 2 つは Guanosine-2'-monophosphate と Guanosine-3'-monophosphate であると推定された。

分離精製の主眼が蛍光物質におかれていた為に、試料量が少なくて他のヌクレオチド類は推定できなかった。しかし、久里浜にて漁獲された発光魚チゴダラ *Physiculus japonicus* HILGENDOLF に共生している発光菌について検討中である。この発光菌は羽根田博士より供与された。チゴダラの発光菌に於ても、菌体抽出物にヌクレオチド類が含まれており、また、完全合成培地による培養を試みたところ、菌体外にもヌクレオチド類が漏出していると思われた。

ヌクレオチド類の検出、推定はペーパー・クロマトグラフィー、紫外吸収スペクトルによった。

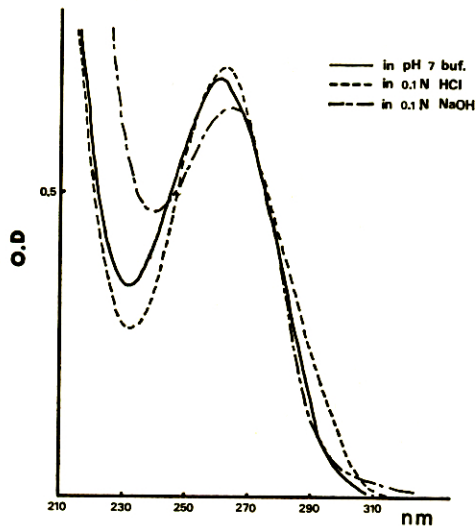
なお、発光菌の蛍光物質の構造決定などに関しては MATSUURA (1973) たちにより報告されている。

実 験 方 法

発光菌の培養及び菌体の処理は米谷 (1960) の方法により行なわれた。その抽出物 (粉

* 城西大学理学部生化学研究室 Laboratory of Biochemistry, Faculty of Sciences, Josai University, Saitama 350-02, Japan

原稿受理 1976 年 8 月 24 日, 横須賀市博物館業績第 260 号



第1図 Nx の紫外吸収スペクトル。
(横軸—波長, 縦軸—O. D)

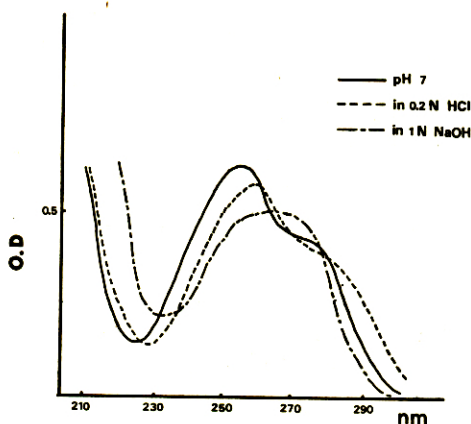
末)に 80% 熱エタノールを加えて再抽出し, 減圧濃縮後, 水溶液として Sephadex G-10 を用いたカラム・クロマトグラフィー (カラム・サイズ $\phi 55 \text{ mm} \times 800 \text{ mm}$) により分画した。

得られた蛍光物質を含む分画部分を陰イオン交換樹脂・Dowex 1 \times 2 (100-200 mesh) のカラム・クロマトグラフィー (カラム・サイズ $\phi 25 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$) により分離した。溶出は 0~0.75 N の塩酸溶液による濃度勾配を用いて行なった。紫色蛍光物質の分画に伴って得られた 260 nm 紫外吸収物質の分画部分を集め, 凍結乾燥濃縮し, ペーパー・クロマトグラフィーによる定性を平行しながら, Dowex 1 \times 2 (100-200 mesh) の小カラム (カラム・サイズ $\phi 7.5 \text{ mm} \times 90 \text{ mm}$) によるクロマトグラフィーを数回行ない, その主成分を精製し, 仮に Nx と名付けた。溶出は塩酸溶液による濃度勾配及び段階濃度を用いた。

この分離精製において, 蛍光物質の検出は簡易的に MANASLU-LIGHT (3650 Å) を照射して目安とし, 260 nm 紫外吸収物質の検出測定は分光光度計 (日立 101 型及び自記 EPS-3 T 型) を使用し, 沓紙上での検出は MANASLU-LIGHT (2536 Å) と LUMICOLOR-PLATE (SA) を用いた。ペーパー・クロマトグラフィーは全て上昇法とし, 沓紙は東洋 No 51 を使用した。ヌクレオチド標品は和光純薬株式会社の製品を用いた。

結果ならびに考察

精製された Nx についてペーパー・クロマトグラフィーを行なった。BUTLER (1959) の溶媒 [n-ブタノール: 水: 濃アンモニア (76: 14: 5)] で Nx は原点にとどまった。この溶媒ではヌクレオチドは展開されない。次に, CHARGAFF (1963) の溶媒 [メタノール: 濃塩酸: 水 (7: 2: 1), メタノール: エタノール: 濃塩酸: 水 (50: 25: 6: 19)] で展



第2図 3'-GMPの紫外吸収スペクトル。
(JOHNSON, 1955)

第1表 Nx, 2'-GMP 及び 3'-GMP の Rf 値の比較

	A	B	C	D
Nx	0.40 0.50	0.81	0.05	0.50
2'-GMP	0.50	0.81	0.05	—
3'-GMP	0.40	—	—	0.50

- 溶媒. A. 飽和硫酸: イソプロパノール: 水 (79:2:19) (SMITH, 1951)
 B. 5%リン酸ナトリウム: 飽和イソアミルアルコール (DENT, 1948)
 C. イソプロパノール: 濃アンモニア: 水 (70:5:25) (SMITH, 1952)
 D. メタノール: 濃塩酸: 水 (70:20:10) (KIRBY, 1955)

開し, Guanine 及び Guanosine に対する相対 Rf 値を求めたところ, その値が Guanosine-3'-monophosphate の値に酷似した。また, Nx の酸加水分解物を同様に CHARGAFF (1963) の溶媒で展開したところ Guanosine の Rf 値と一致した。そこで, 第1図に示したように, 沓紙から抽出した Nx の紫外吸収スペクトルを測定し, 酸性・塩基性溶液中におけるシフトを検討した。

第2図は JOHNSON (1955) による Guanosine-3'-monophosphate の紫外吸収スペクトルである。この両図におけるシフトの様子は類似している。さらに, 第1表に示した溶媒を用いて標品と同時に展開して Nx と比較した。

これらの結果から, Nx は 2'-GMP と 3'-GMP の2種のみを含むと推定できる。

さて, 菌体処理から Nx までの精製過程を考えてみるに, アルカリ加水分解は行なわれておらず, 同様に核酸分解酵素による作用もないものと思われる。従って, 他種の 2'-, 3'-ヌクレオチドの存在も充分に考えられる。

著者の研究に発光菌を供与され, 日頃より研究その他に多大の御教示を頂いた横須賀市博物館の羽根田弥太博士ならびに同館の方々に心から御礼申し上げます。

文 献

- BUTLER, G. C. 1959. *Biochim. et Biophys. Acta.*, **33**: 281.
CHARGAFF, E. 1963. *Ibid.*, **63**: 147.
DENT, C. E. 1948. *Biochem. Jour.*, **52**: 552.
JOHNSON, E. A. 1955. *The Nucleic Acid., I.* Academic Press Inc., : 493.
KIRBY, K. S. 1955. *Biochim. et Biophys. Acta.*, **18**: 575.
米谷清正. 1960. 発光バクテリアの培養と紫色蛍光物質の分離. 大阪市立大学医学雑誌, **9**(12): 231-235.
MATSUURA, S. 1973. The structure of pteridines from *Photobacterium phosphoreum*.
Chemistry Letters, (4): 343-346.
SMITH, J. D. 1951. *Biochem. Jour.*, **49**: 401.
——— 1952. *Ibid.*, **52**: 552.