

キチンによる核酸類縁物質の 薄層クロマトグラフィー*

武田道夫・冨田輝雄

Chitin Adsorbent in Thin-Layer Chromatography for
Separation of Nucleic Acid Derivatives

By

Michio TAKEDA and Teruo TOMIDA

The fractionating ability of chitin powder for nucleic acid bases, nucleosides, and nucleotides was studied on thin-layer chromatography. The results obtained are summarized as follows:

The resolution ability of chitin layer was almost equal to that of crystalline cellulose powder for nucleic acid bases (*i.e.* adenine, cytosine, guanine, thymine, uracil, and hypoxanthine), nucleosides (*i.e.* adenosine, inosine, guanosine, cytidine, and uridine), and nucleotides [*i.e.* 2'(3')-monophosphates of adenosine, cytidine, and uridine, and 5'-monophosphates of adenosine, inosine, cytidine, and uridine, respectively]. The thin-layer chromatogram on chitin yields a higher R_f -values than those on cellulose layer, throughout.

The solvent systems of saturated aqueous ammonium sulfate solution/7M sodium acetate/2-propanol and iso-butyric acid/aqueous ammonia/water were suited for chitin layer as well as for cellulose powder, but the former system had a poor efficiency for the resolution of nucleotides.

The chromatography on chitin layer brought about a reduction in the developing time.

Ribonucleic acid extracted from yeast was hydrolyzed with dilute hydrochloric acid, dilute potassium hydroxide, or perchloric acid individually, and each hydrolysate was fractionated on chitin and cellulose layer. Then, adenine, guanine, cytosine, uracil, 2'(3')-monophosphates of cytidine, guanosine, and uridine, and 5'-monophosphates of guanosine and uridine were identified in them.

* 水産大学校研究業績 第653号, 1972年1月24日 受理.
Contribution from the Shimonoseki University Series, No. 653.
Received Jan. 24, 1972.

1. 緒 言

タラバガニ甲殻より精製したキチン粉末を吸着剤とする薄層クロマトグラフィーにより、フェーノール類およびアミノ酸が分別できることを先¹⁾に報告した。その際、含窒素化合物に対して、キチンが特有の吸着性を持つことを示したが、今回は、さらに核酸類縁物の分離に利用した結果を報告する。

2. 実験方法

2・1 キチン粉末：北洋漁場より送られたタラバガニ甲殻を、水洗の後、カルシウム分およびタンパク質を、希塩酸および希水酸化ナトリウム水溶液で除いた。色素はエタノールで抽出除去した後、漂白を行った。この乾燥物をボールミルで粉碎し、その内 325メッシュ以下のものを薄層用として用いた。

また、部分脱アセチルキチンとしてキチン粉末を水酸化ナトリウム水溶液にて加熱処理後、洗浄乾燥したものを用いた（ケルダール法による窒素分析の結果、脱アセチル化度44%）。

2・2 薄層の形成：キチン粉末に2.5倍（ v/w ）のジオキサンを加え、この懸濁液をアプリケーションナーにより、0.25mmの薄層とした。この薄層は室温で乾燥した後、約80°Cで30分間活性化を行なった。なお比較のために、シリカゲルG（MERCK製）および微結晶性セルロース粉末（旭化成製、アビセルSF）による薄層も用いた。

2・3 薄層クロマトグラフィー：常法により展開し、赤外ランプ下で溶媒を蒸発した後、暗室で紫外線（254nm）により、スポットを確認した。

2・4 核酸およびその類縁物質：與人製のつぎのものを用いた。

2・4・1 核酸塩基：アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチン。

2・4・2 ヌクレオチド：アデノシン、イノシン、グアノシン、シチジンおよびウリジン。

2・4・3 ヌクレオチド：2'(3')-モノリン酸エステルとしてはアデノシン、グアノシン、シチジンおよびウリジンの誘導体（それぞれAMP, GMP, CMP, およびUMPと略す）。5'-モノリン酸エステルとしては、アデノシン、イノシン、シチジンおよびウリジンの誘導体（それぞれ5'-AMP, 5'-IMP, 5'-CMPおよび5'-UMPと略す）。

2・4・4 核酸：酵母より抽出したりボ核酸をつぎの3方法により分解して、薄層クロマトグラフィー用試料とした。

a. アルカリ分解²⁾：0.3N水酸化カリウム水溶液を用いて、37°で18時間分解し、中和したものを、2'(3')-モノヌクレオチドの分離用試料とした。

b. 塩酸分解²⁾：1N塩酸により、100°で1時間分解し、プリン塩基とピリミジン系ヌクレオチドについて同定を行なった。

c. 過塩素酸分解³⁾：70%過塩素酸により、100°で1時間分解、核酸塩基の分離用試料とした。

3. 実験結果および考察

3・1 核酸塩基の分離：飽和硫酸アンモニウム溶液 / 7M醋酸ナトリウム / 2-プロパノール = (40 : 9 : 1)（以下溶媒Aと略す）の展開溶媒により、キチンおよびセルロースを吸着剤とする場合の分離の結果を、第1図で比較して示した。図から明らかなように、キチンの場合、一般的に移動速度が大きく、展開時間は約150分で、セルロースの場合の約300分の半分であった。キチンおよびセルロースのいずれの場合でも、シトシンとウラシルの分離が不明確となるが、同定にあたっては、シトシンの R_f 値がやや小さいので

いずれか一方を混合物中より除くことにより、確認することができる。

イソ酪酸/アンモニア水/水=(33:1:16)(以下溶媒Bと略す)の展開溶媒によっても、良い結果が得られたが、溶媒Aを用いた場合と、それぞれの R_f 値の大小の順が逆となった。この間の関係を、各塩基の、 pK_a 値⁴⁾、および含窒素%とともに、第1表に示した。即ち、アデニンに例をとると、溶媒Aの場合には、使用した塩基中で最小の R_f 値 ($\times 10^2$ 値、以下同じ) であったのが、溶媒Bでは最高の値を示している。溶媒Aの場合、プリン塩基とピリミジン塩基は、その R_f 値の上で、それぞれ2つの群に分かれ、またチミン以外は、その含窒素%の大きい順に移動距離が小さいが、 R_f 値の順序と分子量または pK_a 値との間の関連性は余り無いものと考えられる。一方溶媒Bでは、同じプリン塩基に属するアデニンとグアニンが5種類中の最高と最低の R_f 値となり、分子構造、 pK_a 値などと移動距離とを関係づけることは困難となっている。

Table 1. Comparison of separation effects of nucleic acid bases on chitin and cellulose layer in same solvents

Base	Type of base	Content of nitrogen (%)	pK_{a1}	pK_{a2}	R_f -value $\times 100$			
					Solvent A*		Solvent B**	
					Chitin	Cellulose	Chitin	Cellulose
adenine	purine	51.8	4.15	9.80	33	14	99	96
guanine	"	46.3	3.3	9.20	53	20	75	53
hypoxanthine	"	41.2	8.8	12.0	65	37	76	52
thymine	pyrimidine	22.2	9.94	13.0	68	47	86	73
cytosine	"	37.8	4.60	12.6	77	59	88	88
uracil	"	25.0	9.45	>13	80	58	76	56

*Solvent A: saturated ammonium sulfate aqueous solution/7M sodium acetate/2-propanol = 40 + 9 + 1.

**Solvent B: iso-butyric acid/ammonia water/water = 33 + 1 + 16.

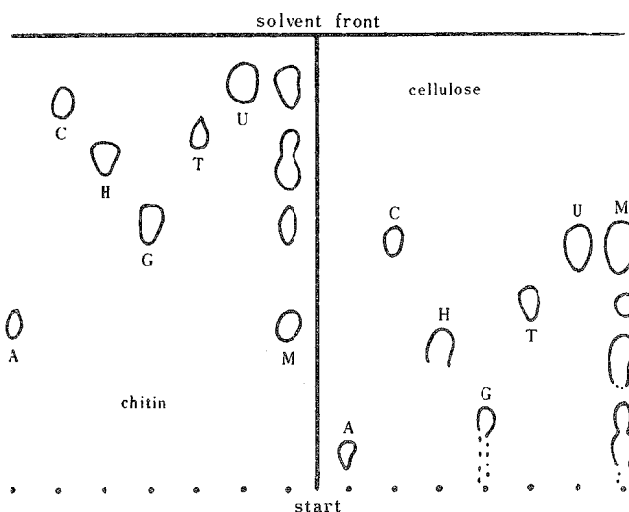


Fig. 1. Comparison of thin-layer chromatogram of nucleic acid bases on chitin and cellulose.

Solvent: saturated aqueous ammonium sulfate solution/7M sodium acetate/2-propanol = 40 + 9 + 1. Made visible in UV-light. Abbreviations of nucleic acid base: A=adenine, G=guanine, H=hypoxanthine, T=thymine, C=cytosine, U=uracil, and M=mixture of bases.

R_f 値の最大と最小の差 ΔR_f 値をもって、その分離能判定の資料とすると、溶媒Aではキチンの ΔR_f 値47はセルロースの44よりやや大きい、溶媒Bでは、セルロースの ΔR_f 値は溶媒Aの時と変わらないが、キチンは24と大きく低下し、キチンを吸着剤とする場合、溶媒Aの使用が有利である。キチン薄層の分離能を、イオン交換セルロース粉末による実験結果⁵⁾と比較して見ても、大体同じ結果またはよりすぐれている。

なお展開溶媒としては、この外水、および0.01N塩酸を使用することができた。

3・2 ヌクレオシドの分離：核酸塩基の場合と同じ展開溶媒AおよびBを使用した時のキチンとセルロースによる分離結果を第2図および第2表に示した。この場合にも、キチン薄層による R_f 値が全般に大きくなった。しかし、溶媒Aの場合、 ΔR_f 値がセルロースでは50であるに対し、キチンは38で、核酸塩基の分離能より小となっている。 R_f 値の順序は、相当する核酸塩基の場合と同じである。

Table 2. Comparison of separation effects of nucleoside on chitin and cellulose layer in same solvents

Nucleoside	R_f -value $\times 100$			
	Solvent A*		Solvent B*	
	Chitin	Cellulose	Chitin	Cellulose
adenosine	39	18	92	82
guanosine	59	38	65	41
inosine	68	50	68	42
cytidine	71	64	72	61
uridine	77	68	65	43

*The components of solvent are identical to those described in Table 1.

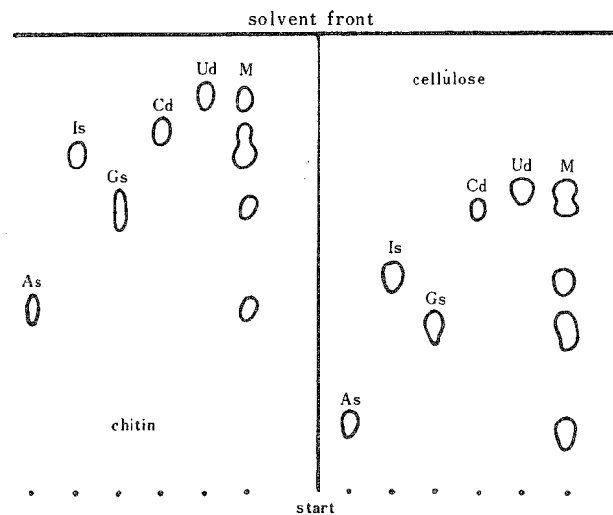


Fig. 2. Comparison of thin-layer chromatogram of nucleosides on chitin and cellulose.

The solvent is identical to that in Fig. 1. Made visible in UV-light. Abbreviations for nucleoside : As=adenosine, Gs=guanosine, Is=inosine, Cd=cytidine, Ud=uridine, and M=mixture of nucleosides.

なおシリカゲルGを吸着層として用いた場合の、核酸塩基およびヌクレオシドの分離結果を第3図に示した。即ちこのままでは分離は困難であった。

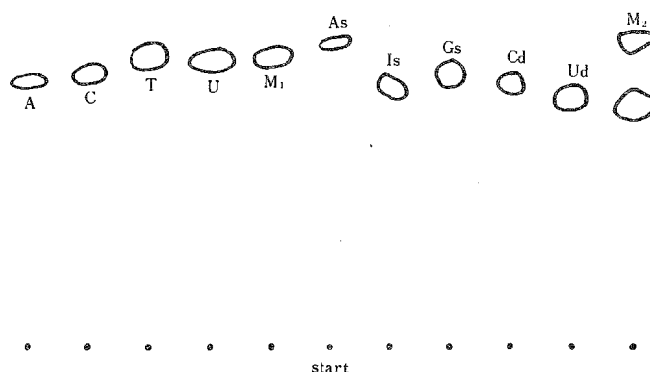


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of nucleic acid bases and nucleosides on silica gel G.

Solvent: iso-butyric acid/aqueous ammonia/water = 33 + 1 + 16. Made visible in UV-light. For abbreviations of nucleic acid bases and nucleosides see Fig. 1 and Fig. 2. M₁=mixture of nucleic acid bases and M₂=mixture of nucleosides.

3・3 ヌクレオチドの分離：展開溶媒Bによるヌクレオチドの分離結果を、キチン薄層とセルロース薄層の場合を同一図上で比較したのが第4図である。実線のスポットはキチン薄層の、破線のスポットはセルロース薄層による分離結果をそれぞれ示すものである。この場合にも前者による場合が、全般に高い R_f 値を示している。(第3表参照)。△R_f 値はいずれも33で同じとなり、その分離能は同程度と考えることができるが、キチンの方が展開時間が短かくなっていた。ただ溶媒Aはヌクレオチドの分離には余り効果がなかった。

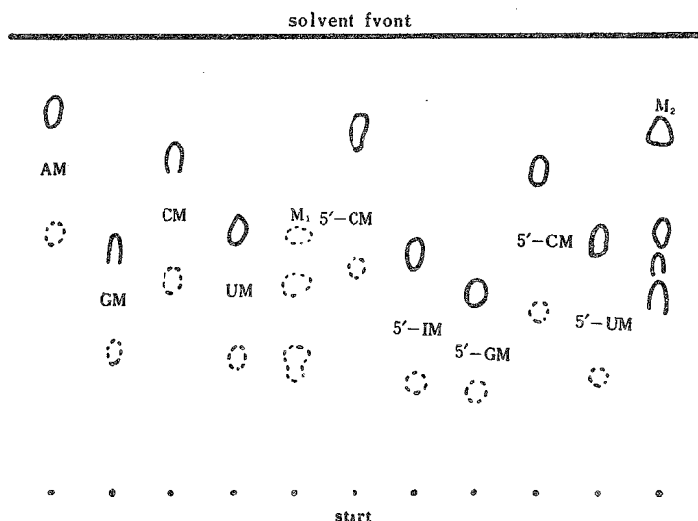


Fig. 4. Comparison of thin-layer chromatogram of nucleotides on chitin and cellulose.

Solvent: iso-butyric acid/aqueous ammonia/water = 33 + 1 + 16. Made visible in UV-light. Abbreviations of nucleotide: AM=2' (3')-AMP, GM=2' (3')-GMP, CM=2' (3')-CMP, UM=2' (3')-UMP, 5'-nucleotide-5'-monophosphate, M₁=mixture of nucleotide-2' (3')-monophosphates, and M₂=mixture of nucleotide-5'-monophosphates. (———): spots on chitin layer, (-----): spots on cellulose layer.

Table 3. Comparison of separation effects of nucleotides on chitin and cellulose layer in same solvent

Nucleotide	R_f -value $\times 100$	
	Chitin	Cellulose
2' (3')-AMP	80	63
2' (3')-GMP	50	32
2' (3')-CMP	64	50
2' (3')-UMP	53	34
5'-AMP	72	50
5'-IMP	47	30
5'-CMP	61	44
5'-UMP	49	32

Solvent: iso-butyric acid/aqueous ammonia/water = 33 + 1 + 16.

3・4 リボ核酸分解生成物の分離同定：酵母リボ核酸の塩酸による分解生成物の分離結果を第5図に示した。塩酸分解生成物にはプリン塩基とピリミジン系ヌクレオチドが含まれる²⁾と考えられているので、それらの標準物質と対照した結果、アデニン、グアニンおよびヌクレオチドとしてCMP、および、UMPのものを同定することができた。

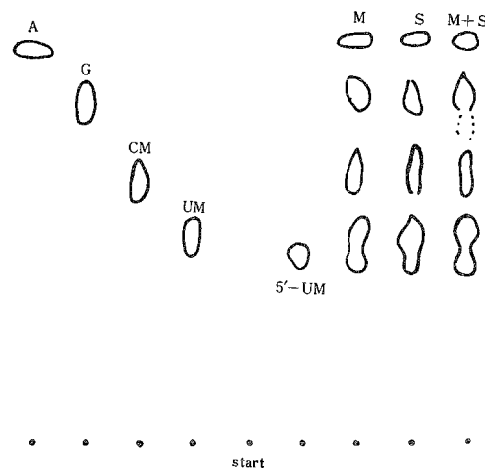


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of ribonucleic acid hydrolysates with hydrochloric acid on chitin layer.

Ribonucleic acid of yeast was degraded with 1N hydrochloric acid for 1hr at 100°. Developer: iso-butyric acid/aqueous ammonia/water = 33 + 1 + 16. For abbreviation see Fig. 1, 2, and 4, except for M=authentic mixture, and S=RNA hydrolysates.

アルカリによる加水分解生成物の分離結果を第6図に示した。即ちアルカリ分解では主としてモノヌクレオチドが得られ、ヌクレオチドも含まれることがあると考えられているので、先づヌクレオチドに対する同定を行なったが、確認できなかったため、図で示した様に、ヌクレオチドについて同定を行なった。図より

明らかな様に、標準物質の混合物(M)，加水分解生成物(S)およびその両者の混合物(M+S)のスポットを比較することにより、5'-CMPおよび5'-AMPは含まれていない。

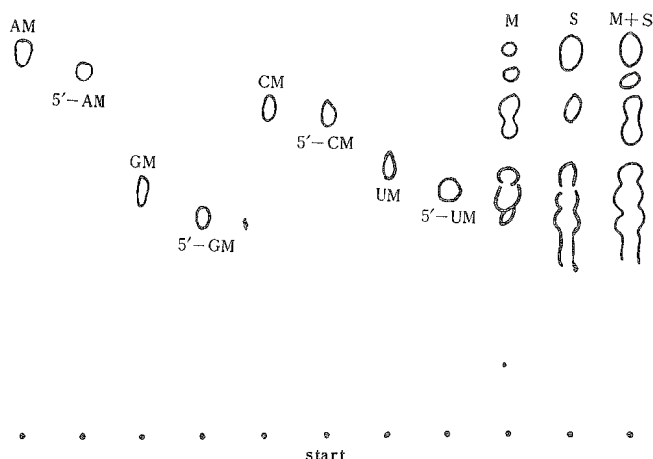


Fig. 6. Thin-layer chromatogram of ribonucleic acid hydrolysates with alkali on chitin layer.

Ribonucleic acid of yeast was degraded with 0.3N potassium hydroxide for 18hr at 37°. Developer : iso-butyric acid/aqueous ammonia/water = 33 + 1 + 16. For abbreviation see Fig. 1, 2, and 4, expect for M=authentic mixture, and S=RNA hydrolysates.

過塩素酸による分解生成物の薄層クロマトグラムはテーリングがはげしく、同定することは困難であった。以上、酵母リボ核酸の加水分解生成物をキチンによる薄層クロマトグラフィーにより、プリン塩基としてアデニンおよびグアニンを、ピリミジン塩基としてシトシン、およびウラシルを、ヌクレオチドとして、2'(3')-CMP, 2'(3')-GMP, 5'-GMP, 2'(3')-UMP, および5'-UMPを同定することができた。

なお、部分脱アセチルキチン粉末は、薄層になり難しく、また乾燥中にひび割れを生じるなど、技術的に未だ解決しなければならない多くの問題を持っている。またその分離能も、テーリングがはなはだしく、予期した効果が得られなかったので、さらに検討中である。

4. 結 言

キチンを吸着剤とする核酸類縁物質の薄層クロマトグラフィーの実験を行ない、つぎの様な結果を得た。

1. 核酸塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドの分離に対して、キチン粉末はほとんどセルロース粉末と変わらない能力を示し、全般的に R_f 値が大きかった。

2. 展開溶媒としては、飽和硫酸アンモニウム系およびアンモニア性イソ酪酸系のものが有効であった。しかし、ヌクレオチドに対しては硫酸アンモニウム系は余り効果が無かった。その他、水、N/100塩酸もヌクレオチド以外には使用できた。

3. キチンを薄層とする場合は、展開時間がセルロースの場合の約半分であった。

4. 酵母リボ核酸の加水分解生成物の分離の結果、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、2'(3')-CMP, 2'(3')-GMP, 5'-GMP, 2'(3')-UMPおよび5'-UMPを同定することができた。

多量のタラバガニ甲殻を毎度供せられている北洋水産株式会社飯田 仁氏，実験に協力していただいた赤井浩，米沢竜三の両氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 武田道夫・富田輝雄，1969：本報告，18，36.
- 2) 水野重樹，1969：「核酸の一般的分離・定量法」，東京大学出版会，p.196.
- 3) 浮田忠之進，1965：「核酸，ヌクレオシド，ヌクレオチド」，朝倉書店，p.24.
- 4) 同上　：　p.23.
- 5) 本庄美喜男，1967：「薄層クロマトグラフィー第2集」(化学の領域増刊64号)，南江堂，p.10.