

ノート

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 53, No. 4, pp. 131~133, 1979]

クロレラ抽出液よりヌクレオシド
の分離について

栗田ヒサコ, 田島 修*, 富金原 孝
(日農化学工業株式会社, *拓殖大学)

昭和 53 年 10 月 23 日受理

Isolation and Identification of Nucleosides
in Chlorella Extract

Hisako KURITA, Osamu TAJIMA*
and Takashi FUKIMBARA
Nichino Chemical Industrial Co., Ltd.,
Yashio, Saitama 340

*Takushoku University, Hachioji, Tokyo 193

The present investigation was carried out to obtain promoting substance for the growth of *Lactobacillus* species in Chlorella extract.

Chlorella extract was treated with Amberlite IR-45 (OH⁻ form) resin. Then, the filtrate was fractionated by a column chromatography on Dowex 50×2. The each fraction was purified by passing through Sephadex G-25 and crystallized from organic solvent.

As the result, two nucleoside (A) and (B) were isolated. The nucleoside (A) and (B) were identified as guanosine and adenosine by means of chemical and physical methods.

(Received October 23, 1978)

近時, 健康食品として注目されているクロレラエキ스는, 奥田ら⁽¹⁾によりコレステロールの上昇抑制効果, 中村ら⁽²⁾により網内系機能亢進作用, 小島ら⁽³⁾により活性多糖類の網内系食能に及ぼす効果など, 多くの生理活性が指摘されている。

また生長促進効果についても, 武智⁽⁴⁾により, ブタノール系展開剤によるペーパークロマトグラムで $R_f = 0.2, 0.6$ の区分に *Lactobacillus* 属の生長促進物質が存在することが指摘され, 田宮ら⁽⁵⁾によりそれらの水解物が核酸, アミノ酸などを生ずることから, ペプチドヌクレオチド複合体と推定されている。しかしながら, こ

れらの生長促進物質はまだ純粋に単離されるに至っていない。

著者らは, これらの生長促進物質の分離を検討しつつあるが, 今回, 本操作中に 2 種のヌクレオシド, アデノシンおよびグアノシンを結晶として分離し, クロレラエキス中にその存在を確認したので, その結果を報告する。

試料は台湾産クロレラから熱水抽出したクロレラエキス粉末を使用し, 標品アデニン, アデノシン, グアニン, グアノシンは和光純薬特級を, リボースおよびデオキシリボースは東京化成特級を使用した。

アルカリ加水分解によるニンヒドリンの定量は Hirs ら⁽⁶⁾の方法により 2.5N 水酸化ナトリウムで加水分解後, 等量の 30% (v/v) 酢酸で中和 (pH 5.0) し, その 0.2 ml を試料として Yemm ら⁽⁷⁾の方法によるアミノ酸量をロイシンに換算した値で示し, 核酸量は Bial⁽⁸⁾のオルシール法によった。

赤外吸収スペクトルは島津 IR-17 G 型を用い KBr 錠剤法で, 核磁気共鳴スペクトルは Varian HA-100 D (100 Mc) を用い DMSO 溶液および D₂O 添加で測定・積算し, 質量分析スペクトル, 紫外吸収スペクトルおよび融点はそれぞれ日本電子 JMS-OJSG 型, 島津 UV-200 型, 島津微量融点測定装置 MM-2 型を使用した。

薄層クロマトグラフィーは Kieselgel G を用い, 紫外吸収およびアニスアルデハイド⁽⁹⁾溶液により確認した。

クロレラエキスの分画

Fig. 1 に示す分別法により, クロレラエキス粉末 30 g を水 3000 ml に溶かし, 弱アニオン交換樹脂 Amberlite IR-45 カラム (5×50 cm) に流し酸性物質を吸着, 0.5N 酢酸で溶出, 水洗し, 流出液を減圧で濃縮して酸性区分とした。

この酸性区分を Schroeder ら⁽¹⁰⁾の方法に準じて Dowex 50×2 (3.5×100 cm) のカラムを用い, 展開速度 60 ml/hr, 分取量 10 ml でカラムクロマトグラフィーを行い分画を試みた。得られた遊離アミノ酸量, 核酸量の分布および分画を Fig. 2 に示す。

この結果, 核酸では 4 個, アミノ酸では 6 個のピークが認められたので, Fig. 2 に示すように I, II, III, IV, V および VI に分画した。なお, 画分 III および画分 V は両測定値が重なり, n-ブタノール:酢酸:水 (4:1:1) にて展開, ニンヒドリン呈色のペーパークロマトグラムは

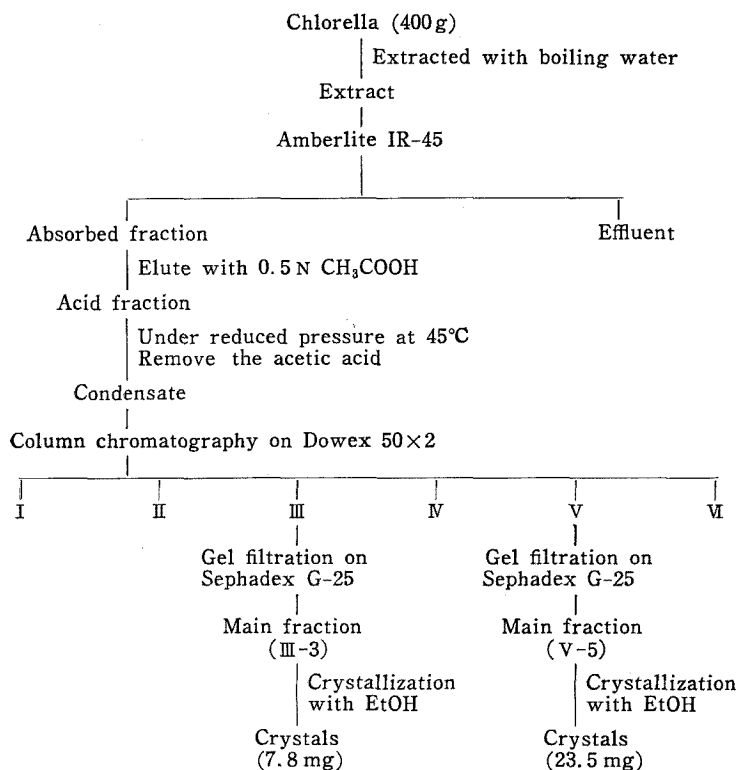


Fig. 1. Scheme of Isolation of Nucleosides.

微弱な未知呈色物質の存在を示し、田宮ら⁽⁵⁾により指摘された成長促進物質の存在の可能性が示唆された。

そこで、画分Ⅲについて Sephadex G-25 のガラム

単離物質の同定

得られた結晶 (A), (B) はいずれも紫外外部吸収を示し、アニスアルデハイド反応陽性、リン酸反応陰性で、

(1.8×150 cm) を用い、展開速度 18g/hr, 分取量 3g で、0.5 N 酢酸によるゲルろ過を行い分離を試みた。この結果、アルカリ加水分解後のニンヒドリン測定値および 260 nm の O.D. の分布はそれぞれ、2 個および 1 個のピークを示した。得られた画分 Ⅲ-3 は 260 nm の吸収のみを示し、核酸関連物質と推定されたので活性炭により脱色・精製後、水-エタノールから結晶化、再結をし、針状結晶 (A) 7.8 mg を得た。

また、画分 V も画分 Ⅲ と同様に Sephadex G-25 ゲルろ過による分画を試みた。その結果、ニンヒドリンでは 3 個、260 nm の吸収では 2 個のピークを示し、得られた画分 V-5 は 260 nm の吸収のみで核酸関連物質と推定されたので、Ⅲ-3 と同様に脱色・精製後、水-エタノールから結晶化、再結し、柱状結晶 (B) 23.5 mg を得た。

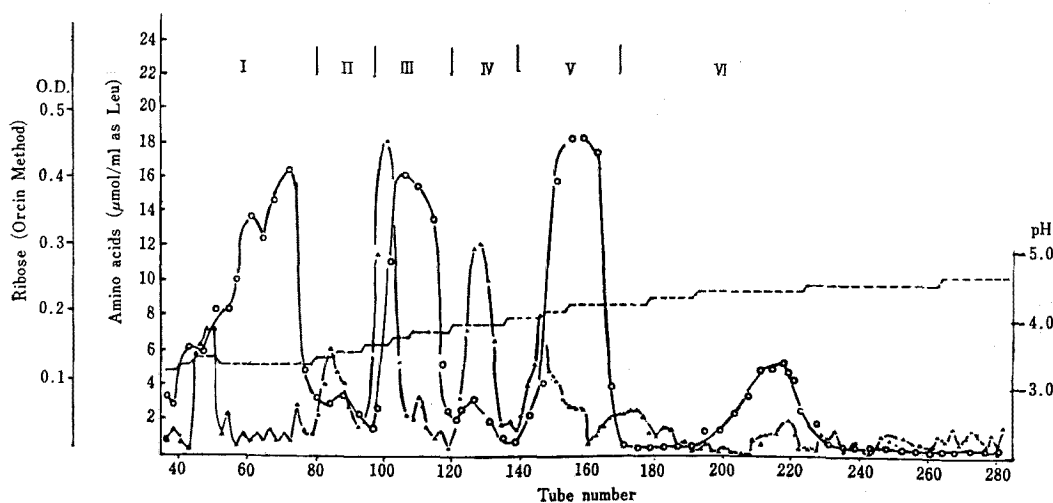


Fig. 2. Column Chromatography of Amino Acids and Nucleic Acids of Separated Acidic Fraction from Chlorella on Dowex 50×2. Ninhydrin, —▲—; orcin, —○—; pH, ---.

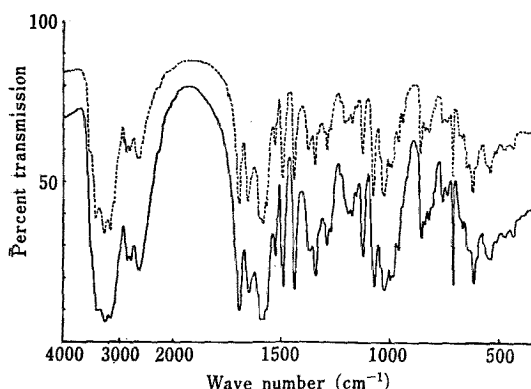


Fig. 3. Infra-red Spectrum of Isolated Compound (A) from Chlorella (KBr pellet). ---, authentic guanosine; —, isolated compound (A).

n-ブタノール：水 (43 : 7), *n*-ブタノール：水：ギ酸 (77 : 13 : 10), *n*-ブタノール：水：濃アンモニア (86 : 9 : 5) で展開した薄層クロマトグラムは単一スポットのみを示し純粋と認められた。また、融点は (A) 240°C (分解), (B) 236°C であった。

0.1 N HCl, 100°C, 1 時間の加水分解物についてアミノアルデヒド呈色および紫外吸収により確認した薄層クロマトグラムから、構成塩基は (A) はグアニン, (B) はアデニンと、構成糖はいずれもリボースと認められた。

また結晶 (A) の紫外吸収および IR スペクトル (Fig. 3) は標品グアニンと、結晶 (B) の MS, NMR, 紫外の各スペクトル, および IR スペクトル (Fig. 4) は標品アデニンといずれもよく一致し、したがって結晶 (A) はグアニン, 結晶 (B) はアデニンと同定された。

これらの結果から、クロレラエキス中にこれらのヌクレオシドが存在することを確認した。

終りに臨み、本研究に際し種々ご便宜、ご指導を賜った理化学研究所主任研究員、堀越弘毅博士、ならびに

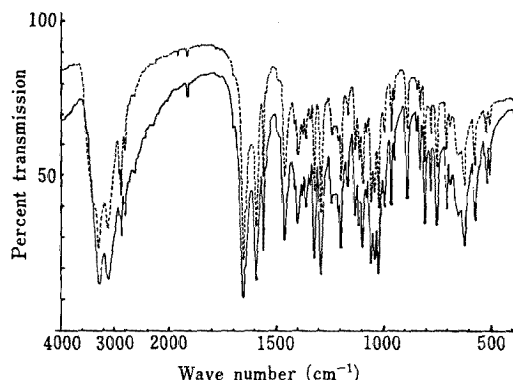


Fig. 4. Infra-red Spectrum of Isolated Compound (B) from Chlorella (KBr pellet). ---, authentic adenosine; —, isolated compound (B)

NMR, MS スペクトルの測定に協力いただいた鶴沢氏ら共同利用機器の各位、発表の機会を与えられた日農化学の鹿野社長に深く感謝します。

なお、本研究の要旨は昭和 53 年度日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) 奥田正男, 佐野利彦, 渡辺剛志, 田中邦明, 田中幸男: 昭和 53 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1978, p. 223.
- (2) 中村尚夫, 田中晶子, 福渡 正, 井上万里子, 山崎研一: 同上, 1978, p. 401.
- (3) 小島 瑞, 猪野 茂, 高瀬信夫, 矢野教治, 小林精三郎, 土橋陸夫, 渡辺兼男: 農化, **46**, 373 (1972).
- (4) 武智芳郎: クロレラその基礎と応用, 学習研究社, 1975, p. 202.
- (5) 武智芳郎: 同上, 学習研究社, 1975, p. 123.
- (6) C. H. W. Hirs, S. Moore and W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, **219**, 623 (1956).
- (7) E. W. Yemm and E. C. Cocking: *Analyst*, **80**, 209 (1955).
- (8) M. Bial: *Dtsch. Med. Wochenshr.*, **28**, 253 (1902); *ibid.*, **29**, 477 (1903).
- (9) E. Stahl and U. Kaltenbach: *J. Chromatogr.*, **5**, 351 (1961).
- (10) W. A. Schroeder, R. T. Janes, J. Cormick and K. McCalla: *Anal. Chem.*, **34**, 1750 (1962).