

米糠の酸性リボヌクレアーゼについて (その 1)

精製および一般的性質

川崎 良文・阿久根 了*

An Acid Ribonuclease from Rice Bran Part 1. Purification and General Properties

Yoshifumi KAWASAKI and Satoru AKUNE

I. 緒 言

高等植物には種々のヌクレアーゼが存在し、それらのいくつかは精製されてその一般的性質および基質特異性が明らかにされている。

米糠のヌクレアーゼについて、Contardi と Ravazzoni¹⁾ は米糠の水抽出液中に至適 pH 4 のポリヌクレオチダーゼが存在することを報告している。また、向井²⁾ は至適 pH 5.3 のデオキシリボヌクレアーゼを精製している。一方、Jono³⁾ は種々の植物に含まれるリボヌクレアーゼ (RNase) 活性を調べているが、これによると米に含まれる RNase 含量は比較的多い。そこで、著者は材料として比較的入手し易い米糠を使用し、これに含まれる RNase を精製して酵素の一般的性質および基質特異性についての研究を行なった。その結果、米糠には至適 pH, 基質特異性などの異なる数種類の RNase が存在し、その中の 1 つはグアニン塩基に特異性をもつアルカリ性 RNase であることを見いだした⁴⁾。本報では、米糠 RNase の主成分である酸性 RNase の精製および一般的性質について報告する。

II. 実験材料および方法

1. 材 料

試料として収穫後 1 年以内の米 (品種・朝風) から新しく搗いて得られる米糠を使用した。酵素活性測定用の基質として、Nutritional and Biochemicals Corporation 製または Sigma 社製の RNA を Sevag らの方法⁵⁾ にて除蛋白後、使用した。DEAE-cellulose (0.88 meq/g) は Brown 社製, Sephadex G-75 (40—120 μ) および CM-Sephadex (C-50, 4.5 \pm 0.5 meq/g) は Pharmacia 社製, Amberlite IRC-50 (XE-64, 10 meq/g) は Rohm and Haas Company 製のものをを使用した。

2. RNase 活性の測定法

酵素液 0.20 ml, 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) または 0.2 M トリス** - 塩酸緩衝液 (pH 7.7)

* 九州大学農学部農芸化学科

** tris (hydroxymethyl) aminomethane

0.25 ml, 蒸留水 0.30 ml および 1.2% RNA 溶液 0.25 ml を含む溶液を37°Cで15分間保った後, ウラニウム試薬 (0.75% 酢酸ウラニウムを含む 25% 過塩素酸) 0.20 ml を加えて反応を停止させる。室温に 30 分間放置後, 遠心分離 (2,500 rpm, 10 分間) し, 上清 0.20 ml に水 4.8 ml を加えて 260 m μ における吸光度 (A_{260}) を測定する。酸性 RNase の場合, A_{260} が 1.5 以下では酵素量と A_{260} 値は比例関係にあった。上記の測定条件下で, 反応液 1 ml の A_{260} を 1.0 増加させる酵素量を 1 単位と定義する。比活性は蛋白量 (mg) 当たりの酵素単位で示される。蛋白量は, 粗抽出液についてのみ牛血清アルブミンを標準として, ビウレット法⁶⁾によって定量した。その他は $A_{280}=1$ のとき, 1 mg/ml の蛋白濃度と仮定して表示した。

III. 実験結果

1. 酵素の精製

以下に述べる精製操作はすべて 3~5°C の低温で行なった。

(1) 抽出

米糠 400 g に 0.2 M 食塩水 2 l を加えウォーリングブレンダーにて 5 分間磨砕後, 二重ガーゼを用いて残渣を除き, 遠心分離 (9,000 rpm, 10 分間) して得られる上清を粗抽出液とした。以上の操作を 4 回繰返して, 粗抽出液 6.56 l を得た。

(2) 硫酸画分

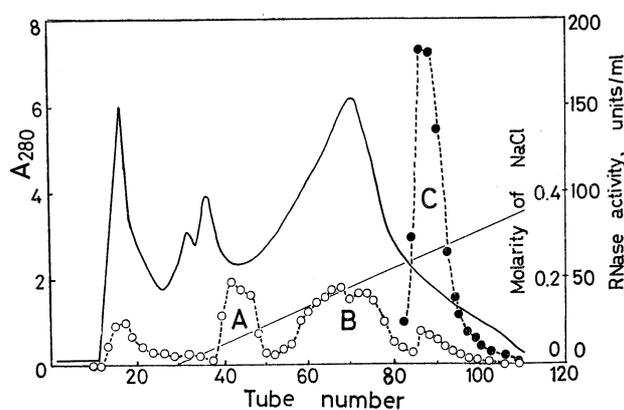


Fig. 1. Chromatography of the ammonium sulfate fraction on DEAE-cellulose column (3.8×50 cm). Linear gradient elution was carried out from 1.5 l of 0.005M sodium phosphate, pH 7.1 to 1.5 l of 0.4M NaCl in 0.1M sodium phosphate, pH 5.0. Flow rate, 60ml/hr; 25.7ml/tube. —, absorbancy at 280m μ (left-hand scale) and molarity of NaCl (right-hand inner scale); ...○..., RNase activity at pH 7.7; ...●..., RNase activity at pH 5.3. Peaks A, B, and C were called RNase A, RNase B, and RNase C, respectively.

粗抽出液に硫酸を加えて 0.4 飽和とし, これを遠心分離 (12,000 rpm, 10 分間) して得られる不透明な上清はさらにセライト層を通して濾過後, 濾液に硫酸を加えて 0.6 飽和とした。生じた沈殿を遠心分離 (9,000 rpm, 10 分間) にて集め, 水にけん濁して 0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) に対して 3 日間透析した。透析内液の遠心分離 (12,000 rpm, 15 分間) 上清には脂肪様の物質が少量混入していたので, ガラスフィルター (G-1) にて濾過した。このようにして得られる淡褐色透明な濾液を硫酸 (0.4~0.6 飽和) 画分とし, -20°C に保存して適宜使用したが, 保存中の活性の低下は少なかった。

(3) DEAE-cellulose によるカラムクロ

マトグラフィー

硫酸画分 135 ml (蛋白量 7.53 g) を DEAE-cellulose カラム (3.8×50 cm) に吸着させて,

溶出は食塩濃度を直線的に上げ、同時に pH を下げながら行なった (第1図)。

なお、食塩濃度は Mohr 法⁷⁾ により塩素を滴定して求めた。RNase 活性は大きく3つ (A, B, C) に分離され、溶出順にそれぞれ RNase A, RNase B および RNase C と称する。RNase A および RNase B の至適 pH は 7.5~8.0, RNase C のそれは 5.3 であった。したがって、表題の酸性リボヌクレアーゼを以下 RNase C と称する。一方、RNase A の前に溶出された小さな活性のピークはホスホジエステラーゼによるもので、RNA を基質としたときの至適 pH は 6.5~7.0 であった。

(4) Sephadex G-75 によるゲル濾過

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによって得られた RNase C 画分 (試験管番号 85~96) に硫酸を加えて 0.9 飽和とし、生ずる沈でんを遠心分離 (12,000 rpm, 15 分間) にて集め、水を加えて 15 ml としたものを試料とした。ゲル濾過の結果を第2図に示す。なお、伝導度は試料に含まれる硫酸の溶出位置を示す。

(5) CM-Sephadex (C-50) によるカラムクロマトグラフィー

Sephadex G-75 画分 (試験管番号 35~44) を2つ分 (米糠 3.2 kg からの試料に相当) 合わせて硫酸 0.9 飽和とし、生ずる沈でんを水 5 ml で溶解して、0.01M 酢酸アンモニウム (pH 6.8) に対して透析後、1N 酢酸を加えて pH 4.8 としたものを試料とした。クロマトグラフィーの結果を第3図に示す。

溶出終了後、カラムの高さは初めの 57 cm から 39 cm に縮まった。これは、緩衝液のイオン強度が増加したことによる。

(6) Amberlite IRC-50 (XE-64) によるカラムクロマトグラフィー

CM-Sephadex 画分 (試験管番号 81~90) を硫酸 0.9 飽和で沈でんさせ、0.2 M リン酸緩衝液

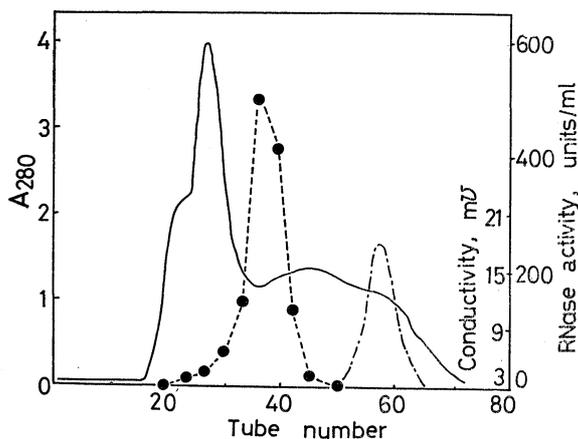


Fig. 2. Gel filtration of the DEAE-cellulose fraction through Sephadex G-75 column (3.8 × 55cm). Eluting solution, 0.1M NaCl in 0.01 M ammonium acetate, pH 6.8. Flow rate, 30ml/hr; 10ml/tube. —, absorbancy at 280 mμ; ···●···, RNase activity; ·····, conductivity.

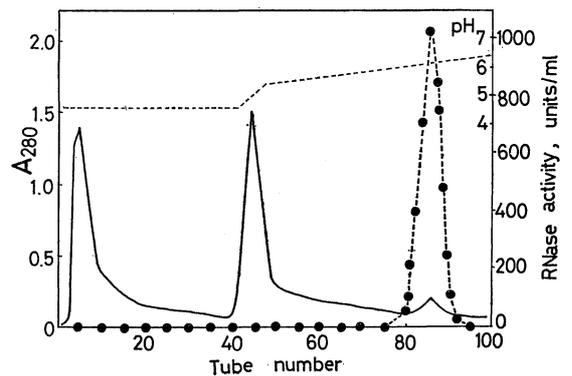


Fig. 3. Chromatography of the Sephadex fraction on CM-Sephadex (C-50) column (1.9 × 57cm). Linear gradient elution was performed from 500 ml of 0.05 M ammonium acetate, pH 4.8 to 500ml of 0.3M ammonium acetate, pH 6.8. Flow rate, 30 ml/hr; 10 ml /tube. —, absorbancy at 280 mμ; ···●···, RNase activity; ·····, effluent pH.

(pH 5.7) に対して透析したものを試料とした。第4図にクロマトグラフィーの結果を示す。

以上 (1) から (6) までの精製過程をまとめて第1表に示す。ただし CM-Sephadex 画分および

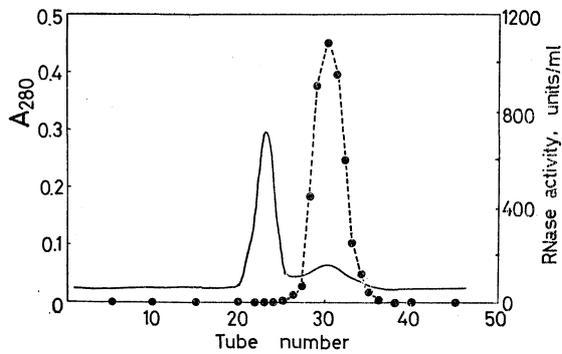


Fig. 4. Chromatography of the CM-Sephadex fraction on Amberlite IRC-50 column (1.9×55cm). Eluting solution, 0.2M sodium phosphate, pH 5.7. Flow rate, 8ml/hr; 3.8ml/tube.—, absorbancy at 280mμ; ...●..., RNase activity.

Amberlite 画分の数値は、原料 1.6kg に換算したものである。RNase Cは粗抽出液から 2,400 倍に精製された。この段階においてもまだ蛋白化学的に純粋とはいえないが、デオキシリボスクレアーゼ、ホスホジエステラーゼおよびホスホモノエステラーゼ活性は 37°C, 18 時間のインキュベーションによっても全く検出されなかった。

2. 酵素の一般的性質

Amberlite 画分を蒸留水に対して透析したものを酵素標品として使用した。なお、希釈に

Table 1. Purification of RNase C from rice bran*

Fraction	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity	Yield (%)
1. Crude extract	6,560	37,800	310,000	8.6	100
2. Ammonium sulfate (0.4-0.6 satn.)	135	7,530	127,000	17	41
3. DEAE-cellulose	15	747	46,900	63	15
4. Sephadex G-75	7	136	31,000	230	10
5. CM-Sephadex (C-50)		9.5	17,400	1,830	6
6. Amberlite IRC-50		0.44	9,000	20,400	3

* Sixteen hundred grams of rice bran was used as starting material.

際しては 0.1% アルブミン溶液を用い、酵素の希釈による不活性化を防いだ。

(1) 至適 pH

各種 pH の緩衝液を用いて、標準の測定法により酵素活性を測定した (第5図)。

比較するために硫酸画分の pH—活性曲線をも図示した。RNase C の至適 pH は 5.3 付近にあることが認められる。しかも、本酵素は pH8 以上では全く活性を示さなかった。これに反して、硫酸画分においては pH8 付近でもかなりの活性が存在した。このことから、アルカリ性 RNase の存在が推察できる。実際第1図に示したように、DEAE-cellulose カラムによってこれらは分離された。

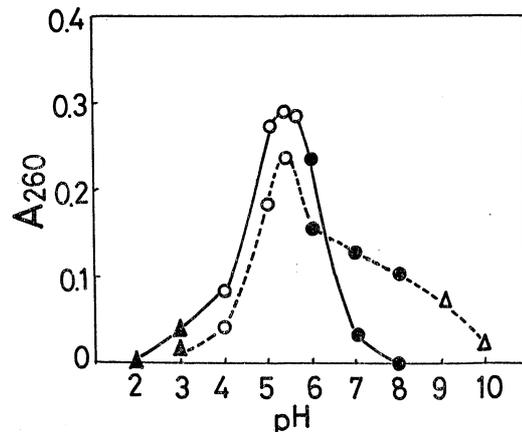


Fig. 5. pH optima of RNase C (—○—) and the ammonium sulfate fraction (---○---). Buffers used: ▲, acetate-HCl; ○, acetate; ●, phosphate; △, glycine-NaOH.

(2) 至適温度

酢酸緩衝液 (pH 5.3) を用いて、各温度における酵素活性を測定した (第6図)。至適温度は 60°C 付近であった。

(3) 熱安定性

酵素を各種 pH の緩衝液中で 70°C, 10 分間の熱処理を行なった後、活性を測定した (第7図)。本酵素は pH3 および 9 付近の 2 個所において、熱処理に対して安定であった。さらに、100°C で 5 分間の熱処理を以下に行なった。すなわち、酵素液 0.05 ml (60 単位) に 0.2 M 緩衝液 0.10 ml, 1% アルブミン溶液 0.04 ml および水 0.21 ml を加え、100°C で 5 分間の熱処理を行なって急冷後、0.1% アルブミン溶液 3.6 ml を加えて希釈し、その 0.2 ml の活性を

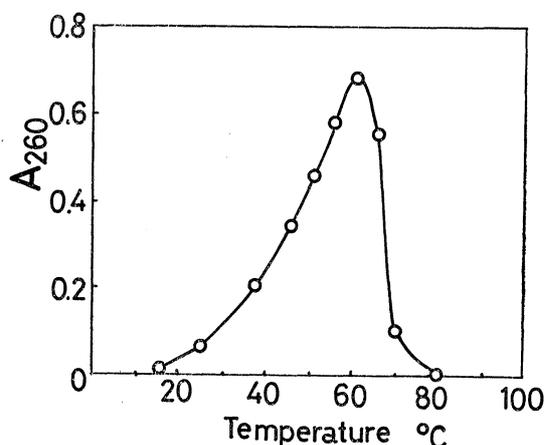


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of RNase C.

測定した。その結果 pH 2.7, 5.4 および 9.1 における残存活性はそれぞれ 92, 8 および 71% であった。pH 2.7 で 92% の活性を保持したことから、本酵素は耐熱性の酵素であることが判明した。

(4) 各種試薬の影響

反応液に各試薬を終濃度 0.001 モルになるように加えて、酵素活性を測定した (第2表)。その結果、実験に用いたいずれの試薬によっても本酵素の賦活はみられず、Fe³⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ および Sn²⁺ で強く阻害された。また、モノヨード酢酸, PCMB によって活性はほとんど低下しなかったため、本酵素は SH 酵素ではないと考えられる。

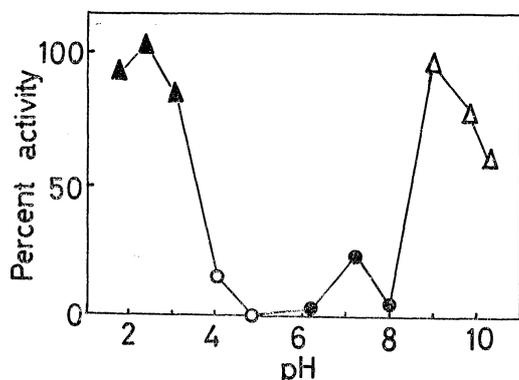


Fig. 7. Thermostability of RNase C as a function of pH. Samples of the enzyme, 0.3 ml (30 units) and 0.1M buffer (0.1 ml), were held at 70°C for 10 minutes. After 2.5-fold dilution with 0.1% albumin, 0.2 ml samples were assayed by the standard method. Buffers used were the same as described in Fig. 5.

Table 2. Effect of reagents on the activity of RNase C

Substance (10 ⁻³ M)	Relative activity (%)	Substance (10 ⁻³ M)	Relative activity (%)
None	100	ZnCl ₂	3
EDTA*	102	SnCl ₂	2
KCl	100	AgNO ₃	55
BaCl ₂	100	NaHSO ₃	102
CaCl ₂	94	NaF	98
MgCl ₂	91	NaCN	100
Mn(CH ₃ COO) ₂	82	Sodium phosphate	91
CoCl ₂	73	Thiourea	101
NiSO ₄	58	Mercaptoethanol	99
FeSO ₄	69	Cysteine	94
FeCl ₃	1	CH ₂ ICOOH	97
HgCl ₂	9	PCMB**	85
CuSO ₄	7		

* Ethylenediaminetetraacetate

** p-Chloromercuribenzoate

(5) ゲル濾過法による分子量の推定

Whitaker の方法⁸⁾に準じて, RNase C の分子量を推定した。使用したカラムは Sephadex G-75

Table 3. Elution volume and molecular weight of proteins

Protein	Ve/Vo	Molecular weight
Blue dextran*	1.00	2,000,000
Bovine serum albumin	1.39	70,000
α -Chymotrypsin	2.01	24,000
Trypsin	2.20	20,000
RNase 1	2.29	13,600
Ammonium sulfate*	3.14	132
RNase C	2.00	24,000

* These were used as markers.

の V_0 (=185ml) で割った値およびこの値を分子量の対数値に対しプロットして直線を引き、この直線から推定される RNase C の分子量の既略値を示す。RNase C の分子量は 24,000 と推定された。

(3.8×55 cm) である。分子量既知の蛋白質として、Nutritional and Biochemicals Corporation 製のトリプシン, RNase 1, α -キモトリプシン および牛血清アルブミンを使用した。Void volume (V_0) は blue dextran 2000 (Pharmacia 社製) を使用して求めた。低分子物質の目印として硫酸を使用した。第3表に分子量既知物質の elution volume (V_e) をカラムの V_0 (=185ml) で割った値およびこの値を分子量の対数値に対しプロットして直線を引き、この直線から推定される RNase C の分子量の既略値を示す。RNase C の分子量は 24,000 と推定された。

IV. 考 察

米糠には少なくとも3種類の RNase が存在することが DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによって判明した。これらの中で酸性 RNase (RNase C) が主成分を占めている。そこで、この酸性 RNase を硫酸分画, DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー, Sephadex ゲル濾過, CM-Sephadex カラムクロマトグラフィーおよび Amberlite カラムクロマトグラフィーにより、2,400 倍に精製した。

本酵素の至適 pH は 5.3 で、他の植物起源の RNase と同様酸性側にあった。すなわち、エンドウの葉⁹⁾、タバコの葉¹⁰⁾、ダイズの芽ばえ¹¹⁾、ryegrass の芽ばえ¹²⁾、ハウレンソウの葉¹³⁾、コムギの芽ばえ¹⁴⁾、mungbean の芽ばえ¹⁵⁾¹⁶⁾、緑豆発芽体¹⁷⁾、ソテツ種子¹⁸⁾ およびイチョウ種子¹⁹⁾ の RNase の至適 pH はいずれも 4.5~6 にある。また本酵素は熱に対して安定で、タバコ¹⁰⁾、ダイズ¹¹⁾、ryegrass¹²⁾ およびハウレンソウ¹³⁾ などの酵素に似ている。

一方、ゲル濾過法によって本酵素の分子量は約 24,000 と推定された。この値はトウモロコシの RNase の分子量 23,000²⁰⁾ と類似している。

V. 要 約

米糠に含まれる酸性 RNase を硫酸分画, DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー, Sephadex G-75 ゲル濾過, CM-Sephadex (C-50) カラムクロマトグラフィーおよび Amberlite IRC-50 カラムクロマトグラフィーにより、2,400 倍に精製した。

本酵素は至適 pH 5.3, 至適温度 60°C の耐熱性の酵素である。金属イオンその他の試薬によって酵素は賦活されず Fe^{3+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} および Hg^{2+} で強く阻害される。精製酵素標品にはデオキシリボヌクレアーゼ, ホスホジエステラーゼおよびホスホモノエステラーゼ活性は存在しない。

分子量は、ゲル濾過法によると、約 24,000 である。

文 献

- 1) C. A. Contardi and C. Ravazzoni: *Arch. ital. biol.*, **92**, 64 (1934)
- 2) J.-I. Mukai: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **13**, 361 (1965)
- 3) Y. Jono: *Acta schol. med. univ. imp. Kyoto*, **13**, 162 (1930)
- 4) 川崎良文, 阿久根了: 昭和43年日本農芸化学会大会講演要旨集, P. 223
- 5) M. G. Sevag, D. B. Lackman, and J. Smoles: *J. Biol. Chem.*, **124**, 425 (1938)
- 6) 日本化学会編: 実験化学講座 **23**, 23 (1964), 丸善
- 7) 京大農化編: 農芸化学実験書第一巻 P. 105 (1958), 産業図書
- 8) J. R. Whitaker: *Anal. Chem.*, **35**, 1950 (1963)
- 9) M. Holden and N. W. Pirie: *Biochem. J.*, **60**, 53 (1955)
- 10) W. Frisch-Niggemeyer and K. K. Reddi: *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 40 (1957)
- 11) A. J. Merola and F. F. Davis: *ibid.*, **55**, 431 (1962)
- 12) L. Schuster: *J. Biol. Chem.*, **229**, 289 (1957)
- 13) T. W. Tuve and C. B. Anfinsen: *ibid.*, **235**, 3437 (1960)
- 14) S. Matsushita: *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, **17**, 23 (1959)
- 15) J. Stockx and L. Vandendriessche: *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **69**, 521 (1961)
- 16) T. L. Walters and H. S. Loring: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2870 (1966)
- 17) 石井茂孝, 杉本洋, 横塚保: 日本農芸化学会誌, **41**, 340 (1967)
- 18) 原彰, 矢野浩, 渡部常樹: 同, **43**, 13 (1969)
- 19) 原彰, 佐藤武, 吉原和子, 渡部常樹: 鹿大農学部学術報告, **19**, 89 (1969)
- 20) C. M. Wilson: *J. Biol. Chem.*, **242**, 2260 (1967)

Summary

An acid ribonuclease, called RNase C, was purified 2,400-fold from rice bran by fractionation with ammonium sulfate, chromatography on DEAE-cellulose, gel filtration through Sephadex G-75, chromatography on CM-Sephadex (C-50), and chromatography on Amberlite IRC-50.

The enzyme has a pH optimum at 5.3 and a temperature optimum at 60°C, and is heat stable. The enzyme is inhibited by Fe^{3+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , and Hg^{2+} . The purified enzyme is free of deoxyribonuclease, phosphodiesterase, and phosphomonoesterase activities. A molecular weight of about 24,000 is estimated for the enzyme by gel filtration.