

米糠の異種アルカリ性リボヌクレアーゼ の精製および一般的性質

川崎 良文

Purification and General Properties of the Other Alkaline Ribonucleases from Rice Bran

Yoshifumi KAWASAKI

I. 緒言

前報¹⁾²⁾³⁾において、米糠に含まれる酸性およびアルカリ性 RNase の精製ならびに一般的性質、とくに基質特異性について報告してきた。本報では前報³⁾とは異なった種類のアルカリ性 RNase (RNase B) を部分精製し、その一般的性質について研究した結果について報告する。

II. 実験材料および方法

実験材料、RNase とその他の酵素活性の測定法、蛋白質の定量法およびペーパークロマトグラフィは前報¹⁾²⁾³⁾に準じた。

III. 実験結果

1. 酵素の精製

(1) 抽出

米糠 400 g に 0.2M 塩化ナトリウム溶液 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 3 回繰返して、粗抽出液 4.72 l を得た。

(2) 硫酸アンモニウムおよびアセトンによる分別沈でん

粗抽出液に固体硫酸アンモニウムを加えて 0.4 から 0.6 飽和で沈でんする画分を集め、0.005M リン酸緩衝液 (pH 7.3) に対して透析した。この溶液 (81 ml) を氷冷し、95%アセトン (-20°C) 59 ml を攪拌しながら 10 分間にわたって徐々に加え (終濃度 40%)、さらに 5 分間攪拌後、遠心分離 (12,000 rpm, 10 分間, -10°C) により沈でんを得た。アセトンを除去してから沈でんに上記リン酸緩衝液 10 ml を加えて遠心分離 (12,000 rpm, 10 分間) し上清を得た。沈でんをもう一度 5 ml の同緩衝液にて溶解し、遠心上清を前者と混合して全量を 20 ml とした。

(3) DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィー

アセトン画分の半量 (10ml) を DEAE-cellulose カラム (1.7×80 cm) に吸着させて、0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 400 ml から 0.4M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) 400 ml への直線的濃度勾配法により溶出した (第1図)。

(4) Sephadex G-75によるゲル濾過

DEAE-cellulose 画分 (試験管番号 41~58) に硫酸アンモニウムを加えて0.9飽和とし、生ずる

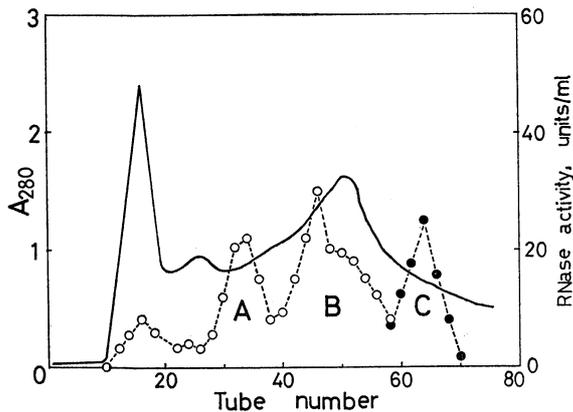


Fig. 1. Chromatography of the acetone fraction on DEAE-cellulose column (1.7×80 cm). Linear gradient was carried out from 400ml of 0.005M sodium phosphate, pH 7.3, to 400ml of 0.4 M NaCl in 0.1 M sodium phosphate, pH 5.0. Flow rate, 40 ml/hr; 11 ml/tube. —, absorbancy at 280m μ ; $\cdots\circ\cdots$, RNase activity at pH 7.7; $\cdots\bullet\cdots$, RNase activity at pH 5.3. Peaks A, B, and C were named rice bran RNase A, RNase B, and RNase C, respectively.

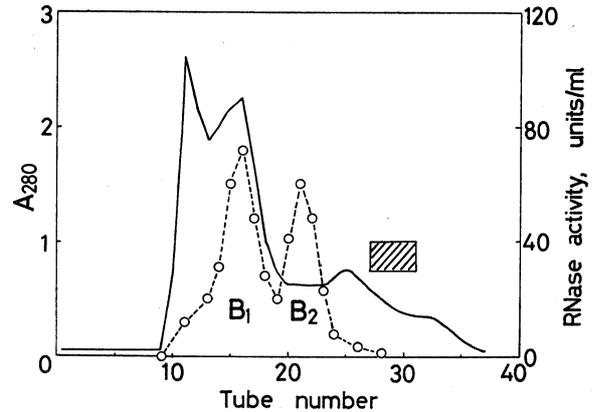


Fig. 2. Gel filtration of the DEAE-cellulose fraction through Sephadex G-75 column (1.7×80cm). Eluting solution, 0.1 M NaCl in 0.01 M ammonium acetate, pH 6.8. Flow rate, 10ml/hr; 5ml/tube. —, absorbancy at 280 m μ ; $\cdots\circ\cdots$, RNase activity; //// , ammonium sulfate detected with barium chloride. Peaks B₁ and B₂ were named rice bran RNase B₁ and RNase B₂, respectively.

沈でんを遠心分離 (12,000 rpm, 10 分間) にて集め、少量の水に溶解して Sephadex G-75 カラム (1.7×80cm) にかけた (第2図)。その結果 RNase Bはゲル濾過により2成分 (RNase B₁ および RNase B₂) に分離された。以上の精製過程をまとめて第1表に示す。なお、DEAE-cellulose と Sephadex による精製はアセトン画分の半量を使用して行なったので、2倍した数値を示してあ

Table 1. Summary of purification procedure

Fraction	Volume (ml)	Total A ₂₈₀	Total activity (units)	Specific activity	Yield (%)
1. Crude extract	4,720	24,100	60,300	2.5	100
2. Ammonium sulfate (0.4—0.6satn.)	89	5,820	35,100	6.0	58
3. Acetone(0—40%)	20	1,650	18,700	11	31
4. DEAE-cellulose	9.6	278	6,150	22	10
5. Sephadex G-75 {B ₁ B ₂ }		131 39	3,270 2,560	25 66	5) 4)

Twelve hundred grams of rice bran was used as starting material.

る。RNase B₁ は粗抽出液から10倍、RNase B₂ は 26 倍に部分精製された。RNase B₁, B₂ 両画分には強いホスホモノエステラーゼ (PMase) 活性が混在していたため、他のクロマトグラフィーによる分離を 2, 3 試みたが、満足すべき結果は得られなかった。それ故に、本酵素の精製操作はこの段階で一応打ち切り RNase B₁, B₂ 両酵素の一般的性質を調べて、混在する PMase を特異的に除去する方法を検索した。

2. 酵素の一般的性質

(1) 耐熱性

RNase B₁ および RNase B₂ 両酵素標品をそれぞれ 0.05M 塩化ナトリウムを含む 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) またはトリス塩酸緩衝液 (pH 7.3) 中で 100°C 5 分間加熱処理後、RNase

Table 2. Effect of heating* on activity

Sample	Remaining Activity (%)			
	RNase		PMase	
	pH 4.7	pH 7.3	pH 4.7	pH 7.3
Control	100	100	100	100
RNase B ₁	0	14	0	0
RNase B ₂	73	66	0	0

* 100°C, 5min.

と PMase の残在活性を測定した (第 2 表)。RNase B₂ はかなり耐熱性であり、両 pH で約 70% の活性を保持した。これに反して RNase B₁ は熱処理によってほとんど失活した。RNase B₂ に混在する PMase は熱処理により完全に失活するので、基質特異性を調べる事が可能である。なお、RNase B₁ および RNase B₂ 両酵素標品中には 37°C, 24 時間のインキュ

ベーションによっても、デオキシリボヌクレアーゼおよびホスホジエステラーゼ活性は全く検出されなかった。

(2) 至適 pH および至適温度

RNase B₂ の至適 pH は 7.5~8.0 に (第 3 図)、至適温度は 50°C 付近にあった (第 4 図)。なお RNase B₁ の至適 pH も 7.5~8.0 にあった。

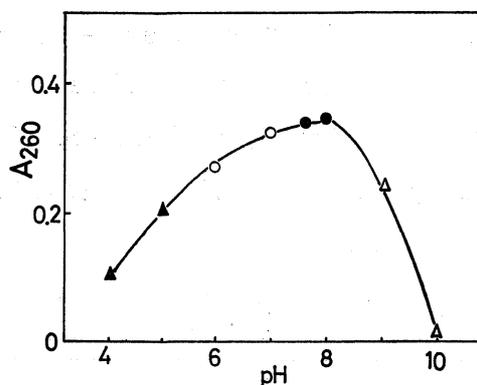


Fig. 3. PH optimum of RNase B₂. Buffers used: ▲, acetate; ○, phosphate; ●, Tris-HCl; △, glycine-NaOH.

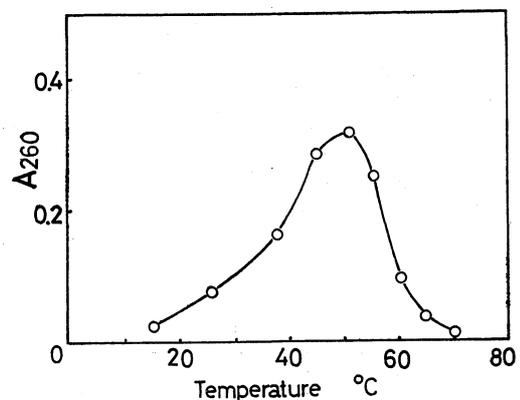


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of RNase B₂.

(3) 各種試薬の酵素活性に及ぼす影響

熱処理 RNase B₂ を酵素標品として用い、本酵素に対する各種試薬の影響を調べた。各試薬を

終濃度 0.001 モルになるように反応液に加えて実験した結果を第3表に示す。本酵素は Zn^{2+} により約90%阻害され、 Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} によっても30~40%阻害された。しかし、金属キレート剤の EDTA によって17%賦活された。モノヨード酢酸および PCMB で阻害されなかったので、本酵素はいわゆる SH 酵素ではないと思われる。一方、別の実験より RNase B₁ は0.02 モルの無機リン酸によって74%阻害されたが、RNase B₂ は全く阻害されなかった。

(4) ゲル濾過法による分子量の推定

前報¹⁾ に準じて Sephadex G-75 を使用して RNase B₁ および RNase B₂ の分子量を推定した。RNase B₁ および RNase B₂ の V_e/V_0 はそれぞれ 2.52, 1.65 で、分子量約 46,000, 19,000 と推定された。

3. 塩基特異性

(1) RNA の酵素分解

酵母高分子 RNA 51.7mg に 0.2 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.7) 0.25ml, 熱処理 RNase B₂ 2.0ml (235 単位) トルエン 3 滴を加えて37°C で24時間反応させた。これに等容のフェノールを加えて除蛋白し、残存するフェノールはエーテルにて抽出除去した⁴⁾。

(2) 7M 尿素-DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

分解液 1.0ml(296A₂₆₀ units) に 1 N 過塩素酸 0.11ml を加えて 37°C に 2 時間保ち、酵素分解によって生じたかもしれない環状ヌクレオチドを開裂させた。1 N 水酸化カリウムにて中和後遠心し、上清に尿素 0.4g, 7 M 尿素 7 ml を加えて DEAE-cellulose カラム (1.0×38 cm) に吸着させた。溶出は 7 M 尿素存在下で 0.02M 酢酸ナトリウム (pH 7.5) 250ml から 0.4M 酢酸ナトリウム (pH 7.5) 250ml への直線的濃度勾配法により行なった (第5図)。各ピークを溶出順にピーク I, ピーク II, ピーク III と称する。

(3) 各ピークの同定

(イ) ピーク I の同定

Table 3. Effect of substances on the activity of RNase B₂

Substance	Relative (10 ⁻³ M) activity (%)	Substance	Relative (10 ⁻³ M) activity (%)
None	100	FeSO ₄	89
EDTA	117	FeCl ₃	59
KCl	100	NaHSO ₃	97
CaCl ₂	97	NaCN	99
MgCl ₂	95	NaF	104
Mn(CH ₃ COO) ₂	94	Sodium phosphate	102
BaCl ₂	92	Thiourea	103
SnCl ₂	86	Cysteine	100
CoCl ₂	85	Mercaptoethanol	94
NiSO ₄	69	CH ₂ ICOOH	100
CuSO ₄	64	PCMB	95
ZnCl ₂	13		

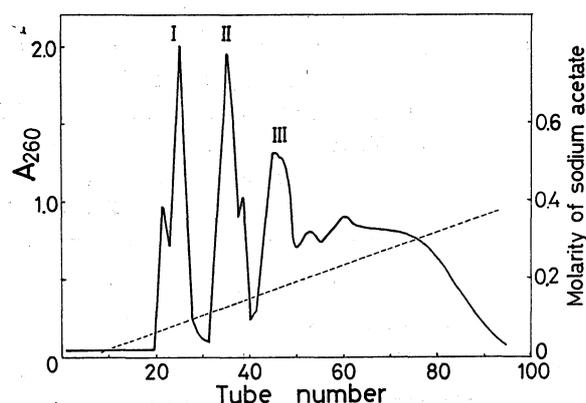


Fig. 5. Chromatography of rice bran RNase B₂ digests of RNA on DEAE-cellulose column (1.0×38cm). Linear gradient was carried out from 250ml of 0.02M sodium acetate in 7 M urea, pH 7.5, to 250ml of 0.4 M sodium acetate in 7 M urea, pH 7.5. Flow rate, 10ml/hr; 5.4ml/tube. —, absorbancy at 260m μ ; , molarity of sodium acetate.

ピーク I を水で 5 倍に希釈して pH 8.6 とした後, Rushizky と Sober の方法⁵⁾ に準じて DEAE-cellulose カラム (2.3×20 cm) を用いて脱塩した。供試液約 5A₂₆₀ units を濾紙につけ二次元のペーパークロマトグラフィーを行なった。一次元にイソ酪酸—0.5N アンモニア (pH 3.6)⁶⁾, 二次元に飽和硫酸アンモニウム: 1M 酢酸ナトリウム: イソプロパノール (80:20:2)⁷⁾ あるいは 95% エチルアルコール: 1M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.5) (75:30)⁸⁾ の溶媒を用いていずれも下降法で展開した (第 6 図)。3'- (または 2'-) のグアニル酸, アデニル酸, シチジル酸, ウルジル酸の 4 種類モノヌクレオチド全部が検出された。別に分解物を酸処理せずにそのままペーパークロマトグラフィーにかけたところ 2'-異性体は検出できなかったのので, ここで検出された 2'-異性体は分解物中に含まれる 2', 3'-環状ヌクレオチドを酸処理した際に生じたものと考えられる。なお, 各モノヌ

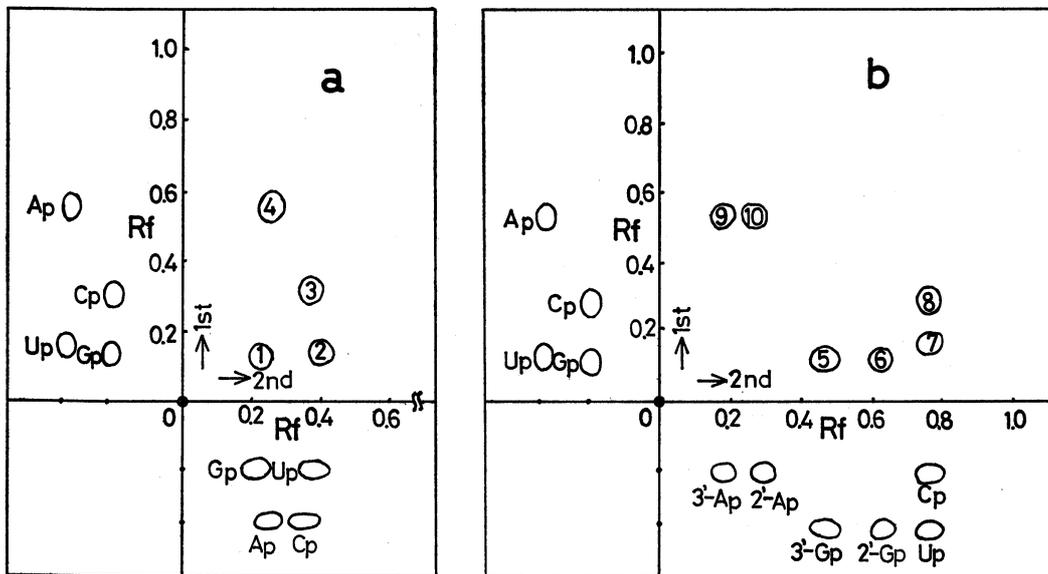


Fig. 6. Paper chromatography of peak I. Authentic mononucleotides were used as markers. (a) : first dimension, isobutyric acid-0.5 M ammonium hydroxide, pH 3.6; second dimension, 95% ethanol-1M ammonium acetate, pH 7.5, (75:30). (b): first dimension, isobutyric acid-0.5M ammonium hydroxide, pH 3.6; second dimension, satd. ammonium sulfate-1M sodium acetate-isopropanol (80:20:2). Spots 1 to 10 were identified as Gp, Up, Cp, Ap, 3'-Gp, 2'-Gp, Up, Cp, 3'-Ap, and 2'-Ap, respectively.

Table 4. Amount of mononucleotides found in RNase B₂ digest of yeast RNA.

Compound	A ₂₆₀ units at pH 7		Mononucleotide liberated (Mole %*)
	Mononucleotide	Whole nucleotide	
Adenylic acid	6.0	108	6
Guanylic acid	19.0	83	23
Cytidylic acid	0.4	39	1
Uridylic acid	5.3	66	8
Total	30.7	296**	10

* Represented in moles per hundred moles of individual nucleotides.

** Initial amount of RNase B₂ digest.

クレオチドの pH 2 と 12 における A_{250}/A_{260} , A_{280}/A_{260} , A_{290}/A_{260} の値は文献値⁹⁾ と一致した。つぎに各モノヌクレオチドを抽出・定量して、遊離された全モノヌクレオチド量 ($30.7A_{260}$ units) にそれぞれ換算した。そして、RNA 中の各ヌクレオチドのうち、モノヌクレオチドとして遊離されたもののモル%を算出した (第 4 表)。この分解条件下で 10% がモノヌクレオチドとして遊離され、各モノヌクレオチドの量比はグアニル酸:ウリジル酸:アデニル酸:シチジル酸=23:8:6:1 であった。すなわち、RNase B₂ は RNA に作用してグアニル酸を優先的に遊離させた。

(ロ) ピーク II の分離

ピーク II を DEAE-cellulose カラム (1.7×10 cm) で脱塩後、2 M 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.4) にて溶出し、これを減圧濃縮した。この $8.5A_{260}$ units を濾紙につけ、一次元に、容器を濃アンモニアで飽和したイソプロパノール:水 (70:30)¹⁰⁾、二次元に 飽和硫酸アンモニウム:1M 酢酸ナトリウム:イソプロパノール (80:20:2)⁷⁾ の溶媒を用いていずれも下降法で展開した (第 7 図)。各スポットの同定は行なわなかったが、ピーク II は 7M 尿素-DEAE-cellulose カラムの溶出位置からジヌクレオチドに相当し、この中に少なくとも 7 個のジヌクレオチドが検出できたことから、本酵素は RNA に含まれる 4 個の塩基のうち 2 個以上の塩基に作用したことがわかる。

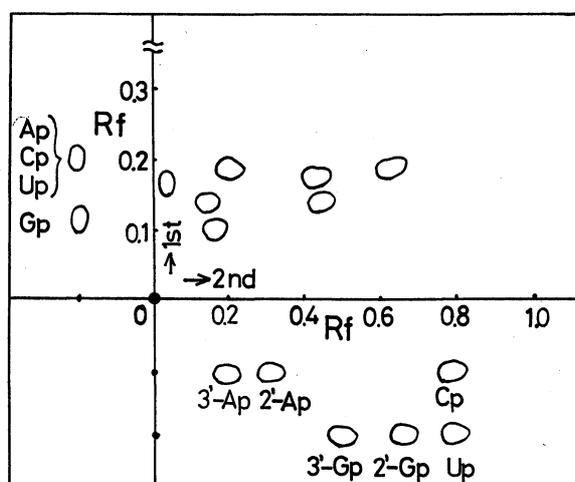


Fig. 7. Paper chromatography of peak II. Solvents: first dimension, isopropanol-water (70:30), ammonia in vapor phase; second dimension, satd. ammonium sulfate-1M sodium acetate-isopropanol (80:20:2).

IV. 考 察

米糠に含まれる諸種 RNase は DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによって少なくとも 3 種類に分離できる¹⁾。それらの中で酸性 RNase (RNase C) が主成分であり、至適 pH をはじめその他の性質とくに基質特異性は他の植物起源の酵素と類似し、RNA を分解してプリンおよびピリミジンの 2', 3'-環状モノヌクレオチドを生成する²⁾。米糠にはこの酸性 RNase の他にアルカリ性 RNase が 2, 3 存在し、その 1 つ (RNase A) は現在までに報告されている他の植物起源の酵素とは全く異なり、RNA 中のグアニル酸の 3'-リン酸基と隣りのヌクレオチドの 5'-水酸基の間の結合を加水分解する RNase T₁ 型の基質特異性の高い酵素である³⁾。

本報で部分精製した RNase は 2 種類あり、いずれも至適 pH 7.5~8.0 である。RNase B₁ は熱処理により失活し、また無機リン酸によりかなり阻害されたが、RNase B₂ は熱処理によってもかなりの活性を保持し、また無機リン酸によって阻害されなかった。一方、ゲル濾過法より推定さ

れる分子量は RNase B₁ が大きく、また RNase B₂ の整数倍になっていないので RNase B₁ は RNase B₂ の会合体とは考えられない。以上のことから両酵素は異なった酵素と考えられる。RNase B₂ の基質特異性は、至適 pH がアルカリ側にあるにもかかわらず、RNase A とは異なり他の植物起源の酵素のそれと類似していた。このように同一植物体に至適 pH や基質特異性の異なる数種類の RNase が存在することが知られているにもかかわらず、それらの生理的意義については不明な点が多い。

V. 要 約

米糠に含まれる 2 種類のアルカリ性 RNase (RNase B₁ および RNase B₂) を硫酸分画、アセトン分画、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーおよび Sephadex G-75 ゲル濾過により部分精製し、その一般的性質を調べた。

両酵素の至適 pH は 7.5~8.0 である。RNase B₁ および RNase B₂ の分子量は、ゲル濾過法によると、それぞれ 46,000, 19,000 位である。RNase B₁ は熱処理によって失活するが、RNase B₂ は耐熱性である。両酵素標品にはデオキシリボヌクレアーゼおよびホスホジエステラーゼ活性は存在しない。混在するホスホモノエステラーゼは熱処理により除去できる。RNase B₂ は Zn²⁺ によって強く阻害され Fe³⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ によってもかなり阻害されるが、EDTA によって若干賦活される。

RNase B₂ は RNA を分解してプリンおよびピリミジンの 2', 3'-環状モノヌクレオチドを生成する。またモノヌクレオチドのうちグアニル酸を優先的に遊離させる。

文 献

- 1) 川崎良文, 阿久根了: 鹿大教育学部研究紀要, **21**, 69 (1969)
- 2) 川崎良文, 阿久根了: 同, **21**, 76 (1969)
- 3) 川崎良文: 同, **22**, 17 (1970)
- 4) R. W. Holley, J. T. Madison, and A. Zamir: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 389 (1964)
- 5) G. W. Rushizky and H. A. Sober: *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 217 (1962)
- 6) B. Magasanik, E. Visher, R. Doniger, D. Elson, and E. Chargaff: *J. Biol. Chem.*, **186**, 37 (1950)
- 7) R. Markham and J. D. Smith: *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951)
- 8) A. C. Paladini and L. F. Leloir: *ibid.*, **51**, 426 (1952)
- 9) E. Volkin and W. E. Cohn: *Methods Biochem. Anal.*, **1**, 304 (1961)
- 10) R. Markham and J. D. Smith: *Biochem. J.*, **52**, 552 (1952)

Summary

Two alkaline ribonucleases named RNase B₁ and RNase B₂ were partially purified from rice bran by fractionation with ammonium sulfate and with acetone, chromatography on DEAE-cellulose, and gel filtration through Sephadex G-75.

Both of the enzymes have a pH optimum at 7.5 to 8.0. Molecular weights of about 46,000 and 19,000 are estimated by gel filtration for RNase B₁ and RNase B₂, respectively. RNase B₁ is heat labile; however, RNase B₂ is heat stable. Both of the enzymes are free of deoxyribonuclease and phosphodiesterase activities. The contaminating phosphomonoesterase can be eliminated by heating at 100°C and pH 4.7 for 5 minutes. RNase B₂ is inhibited by Zn²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺, and Cu²⁺; however, the enzyme is slightly activated by EDTA.

RNase B₂ hydrolyzes ribonucleic acid to both purine and pyrimidine nucleoside 2', 3'-cyclic phosphates and has much more preference for guanosine 3'-phosphate linkages.