

ソテツの核酸分解酵素について (第2報)

ソテツ種子の胚及び胚乳のリボヌクレアーゼに関する研究

原 彰・吉原和子・渡部常樹

Studies on the Nucleases from the Japanese Cycad (*Cycas revoluta* Thunb.)

2. Partial Purification and General Properties of Ribonucleases from Embryo and Endosperm in the Japanese Cycad Seeds

Akira HARA, Kazuko YOSHIHARA and Tsuneki WATANABE

(Laboratory of Biochemistry)

緒 論

著者らは、前報¹⁾においてソテツ種子の胚乳のリボヌクレアーゼの分離精製及びその性質について報告した。本報では、ソテツ種子の胚からリボヌクレアーゼを分離精製し、胚乳のリボヌクレアーゼとの比較検討を試みた結果と胚乳リボヌクレアーゼのセファデックスによる精製法及びそのヌクレオシド 2', 3'-環状リン酸への作用について報告する。

実験方法

(1) 材料 前報¹⁾と同じ。セファデックス G₁₀₀ は Pharmacia 社製を、アデノシン環状リン酸及びシチジン環状リン酸は Sigma 社製を使用した。

(2) 活性測定法 前報¹⁾と同じ。

(3) ペーパークロマトグラフィー 前報と同じ。

(4) A. 胚リボヌクレアーゼの酵素調製法

水抽出—ソテツ種子胚 50.2 g (種子 500 個分) に 150 ml の冷水と数滴のオクチルアルコールを加え、氷冷下ワーリングブレンダーで破碎後、冷却遠心分離 (10,000 回転, 20 分間) し、上清を分けた後、沈でんに 75 ml の冷水を加えブレンダーで同様に処理し遠心分離して得られた上清を前回の上清と合せ、粗酵素液 228 ml を得た。

硫酸分画—上清 228 ml に硫酸を加え、0.45 飽和度で生じた沈でんを遠心分離して除去し、上清にさらに硫酸を加え 0.9 飽和度とし、一夜放置後、冷却遠心分離 (15,000 回転, 30 分間) し、液表面に生じた浮遊残渣をとり冷水 50 ml にとかして 0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー—透析内液 (130 ml) を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (1.8×30 cm) に吸着させ、0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を含む 0.05 M, 0.10 M, 0.20 M, 0.30 M, 0.50 M の食塩溶液で段階的に溶出した。0.20 M 及び 0.30 M の食塩濃度で溶出された酵素画分 S₁, S₂ をそれぞれ 0.001 M のリン酸緩衝液 (pH 6.8) に対して透析した。

ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー—透析内液 S₁, 258 ml, S₂, 58.5 ml を 0.001 M のリン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化したヒドロキシルアパタイトゲルカラム (S₁ は 1.8×10 cm, S₂ は 1.8×7 cm) のカラムに吸着させ 0.01 M, 0.04 M, 0.07 M, 0.10 M, 0.20 M のリン酸緩衝液 (pH 6.8) で段階的に溶出した。

B. 胚乳リボヌクレアーゼのセファデックスゲルろ過法による精製

前報¹⁾において、第3回 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでは、酵素と蛋白のクロマトグラムが一致せず不純の蛋白を含んでいると思われるので、試験管番号 39—50 までを集め、その一部、蛋白濃度 A 280=24, 酵素単位 18,300 を約 5 ml に濃縮し、セファデックスカラム (2.1×54 cm) に通し、0.1 M 食塩を含む 0.02 M リン酸カリ—0.01 M ホウ酸ソーダ緩衝液 (pH 8.0) を溶媒として、ゲルろ過を行なった。第4回で示されるように酵素はさらに精製されたが、酵素蛋白の単一のピークは得られなかった。収量は約 70% であった。

実験結果

(1) 酵素の精製 胚リボヌクレアーゼの精製の結

* 本報告の一部は、昭和42年度日本農芸化学会西日本支部大会において発表した。

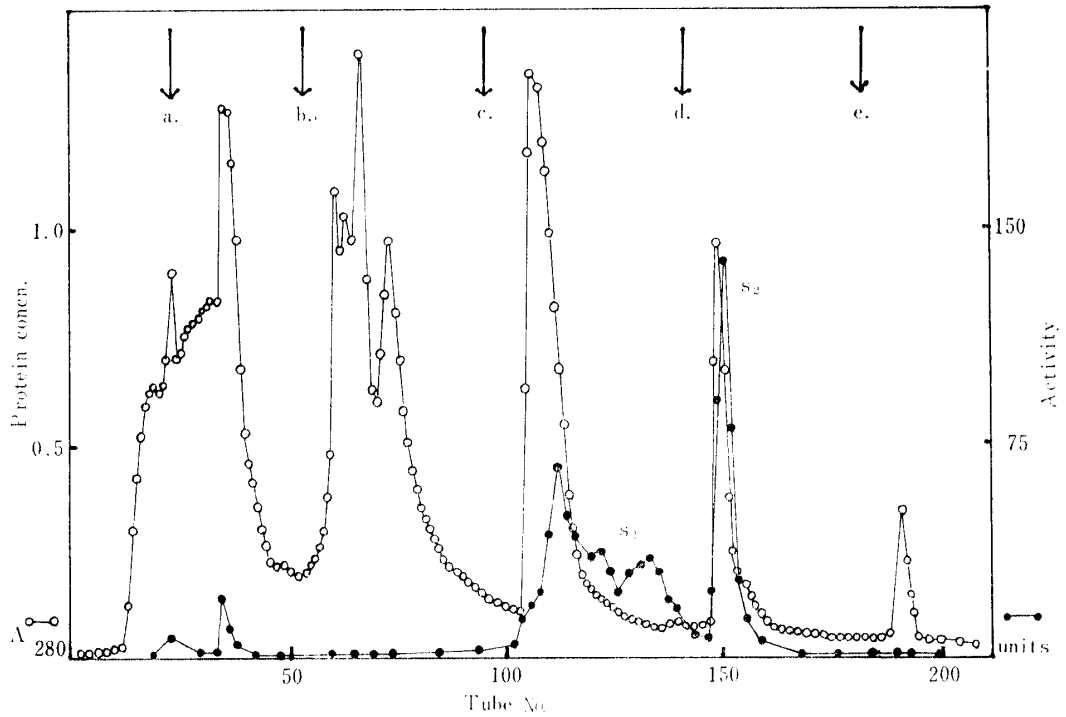


Fig. 1. Chromatography on DEAE-cellulose column of ammonium sulfate fraction.

Fluting buffer: 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) containing NaCl (a. 0.05 M, b. 0.10 M, c. 0.20 M, d. 0.30 M, e. 0.50 M).

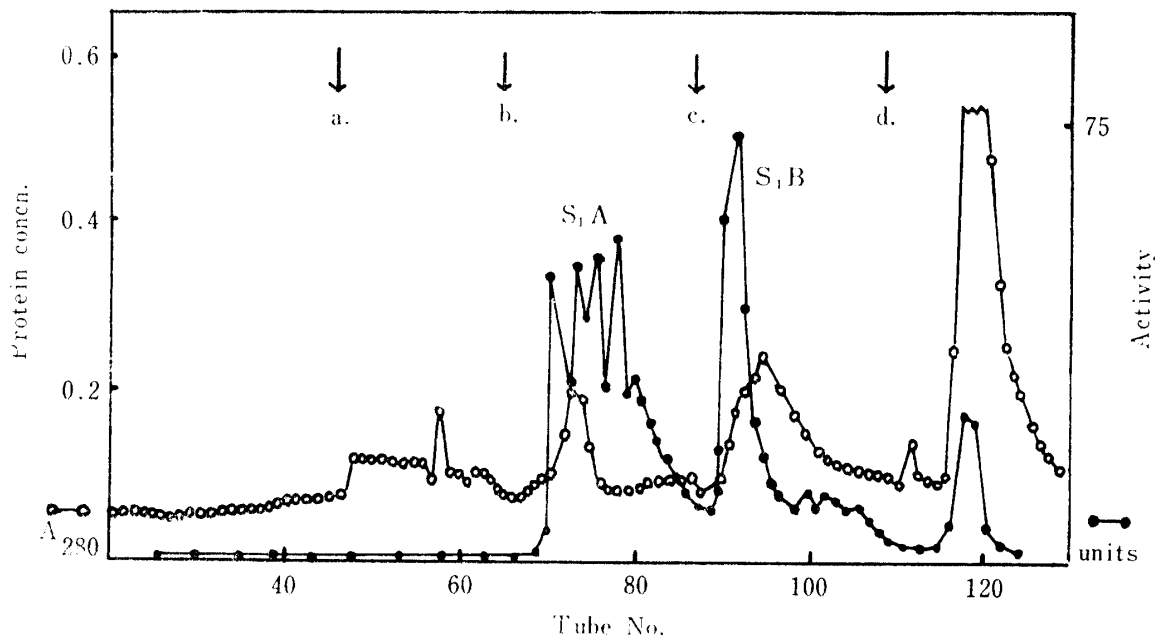


Fig. 2. Chromatography on hydroxylapatite column of S_1 fraction.

Eluting buffer: phosphate buffer (pH 6.8), a. 0.01 M, b. 0.04 M, c. 0.07 M, d. 0.20 M.

果は、第1表に要約した。酵素は 0.45~0.90 飽和度硫酸塩析によって、粗酵素液から 60% 回収され、比活性は約 4 倍に上昇した。塩析によって生じた沈殿

は軽く、遠心分離によって液の表面に浮く為回収が悪くなった。DEAE-セルロースクロマトグラフィーでは、前報¹⁾における胚乳リボスクレアーゼ精製と同

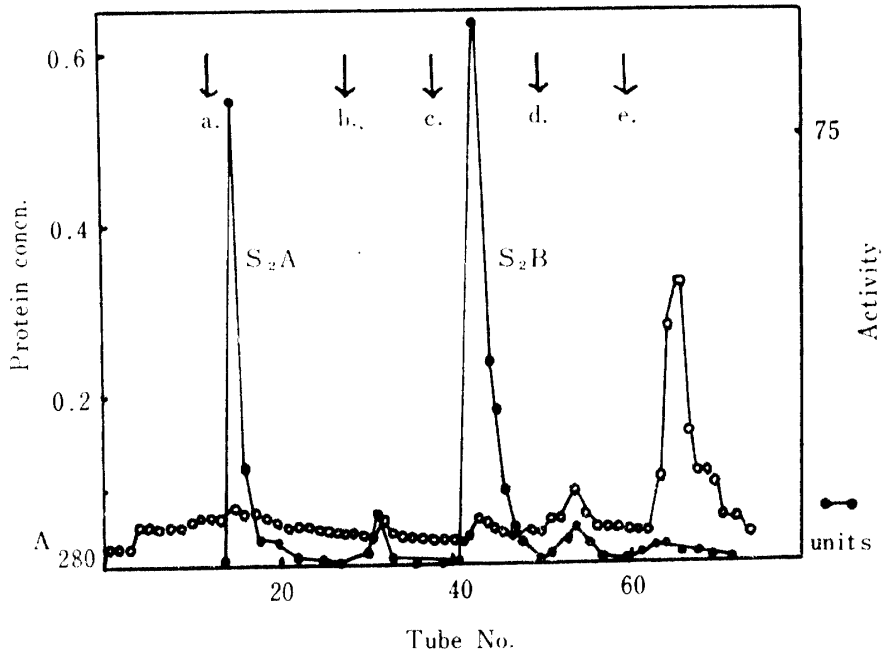


Fig. 3. Chromatography on hydroxylapatite column of S_2 fraction.
Eluting buffer: phosphate buffer (pH 6.8), a. 0.01 M,
b. 0.04 M, c. 0.07 M, d. 0.10 M, e. 0.20 M.

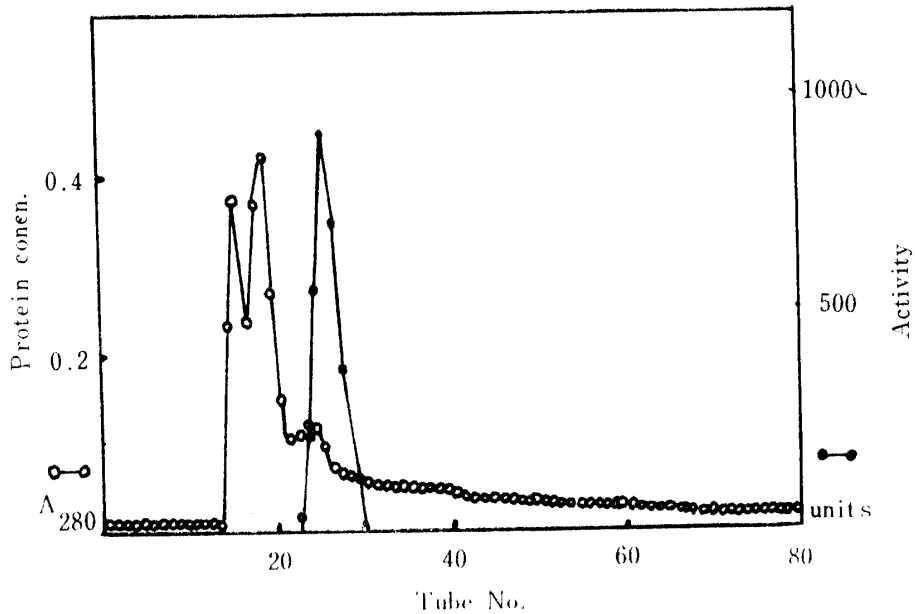


Fig. 4. Gel filtration through Sephadex G_{100} column.

じ条件の $pH 8.0$, 食塩の直線的濃度勾配溶出法では分離が悪い為に、また $pH 7.0$ の条件では分離はややよくなるが、活性画分がひろがってしまう為に食塩濃度を段階的に変えて溶出を試みたが、第1図のように $0.2 M$ 食塩濃度での酵素の溶出は完全におこなわれず、蛋白濃度曲線と活性曲線は一致がみられず活性曲線はいくつかのピークをもち不規則であった。この酵素画分 S_1 はヒドロキシルアパタイトクロマトグラフ

イーにおいても第2図のように $0.04 M$ と $0.07 M$ のリン酸緩衝液によって溶出されたが、 $0.04 M$ での溶出は完全でなく、しかも不規則な溶出曲線を描いた。以下、 $0.04 M$ のリン酸緩衝液で溶出された酵素画分を S_1A , $0.07 M$ で溶出された画分 S_1B とした。一方、DEAE-セルロースカラムで $0.3 M$ 食塩によって溶出された画分 S_2 のヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーでは、第3図のように $0.01 M$ と

Table 1. Summary of enzyme purification procedures

Step		volume (ml)	Total protein (A ₂₈₀)	Total activity (units)	Specific activity (units/A ₂₈₀)	Yield (%)
Water extracts		228	31,283	21,854	6.7	100
Ammonium sulfate ppt.		131	478	13,342	27.9	61
Chromatography on DEAE-cellulose	(S ₁)	258	89.3	8,242	92.7	37.9
	(S ₂)	58.5	20.8	3,449	165.7	15.8
Chromatography on hydroxylapatite	(S ₁ A)	66.5	9.1	2,294	252	10.5
	(S ₁ B)	18.3	2.65	1,097	414	5.0
Chromatography on hydroxylapatite	(S ₂ A)	5.1	0.34	466	1,370	2.1
	(S ₂ B)	12.2	0.61	891	1,460	4.1

0.07 M のリン酸緩衝液で鋭く溶出された。この 0.01 M で溶出された画分を S₂A、0.07 M のリン酸緩衝液濃度で溶出された画分を S₂B とした。以下の実験ではヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーによって得られたそれぞれの酵素画分を水に対して透析して用いた。

(2) 酵素の至適 pH 酵素の至適 pH をクエン酸-リン酸緩衝液によって測定した結果を第 5 図に示した。ヒドロキシルアパタイトカラムで 0.04 M、0.07 M のリン酸緩衝液で溶出された酵素画分 S₁A、S₁B、S₂B は至適 pH 6.0 であり極めて類似した pH 活性曲線を描いた。

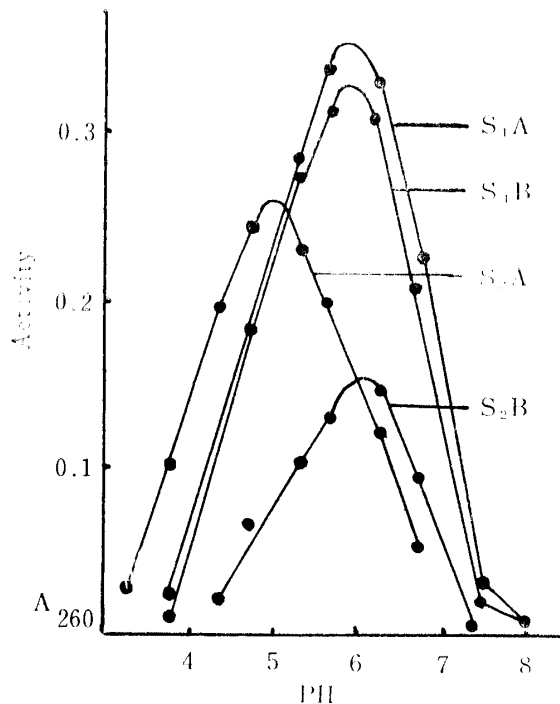


Fig. 5. Effect of pH on RNase activity.

(3) 酵素反応に及ぼす塩濃度の効果 酵素反応に及ぼす食塩及びリン酸イオンの効果を第 6 図、第 7 図に示した。食塩濃度の効果測定は、反応液に 0.01 M クエン酸-0.02 M リン酸ソーダ緩衝液を含み、リン酸イオン (pH 6.0 又は 5.0) の効果測定は、それぞれの濃度のリン酸塩の他に、酢酸緩衝液 (pH 6.0 又は 5.0) を、0.05 M となるように加えた。胚乳の酵素のみ pH 5.0 と 6.0 について行なったが、胚の酵素はすべて pH 6.0 で行なった。S₁A、S₁B、S₂B はともに類似した傾向を示し、食塩濃度が 0.3 M までは活性に対する影響は全くみられず、リン酸イオンに対しては濃度増加 (0.2 M まで) とともにやや活性は増加した。一方、S₂A は、明らかにリン酸イオンによって阻害され、0.15 M リン酸では、対照 (リン酸イオンを含まない) に比べて 30% の活性を示したにすぎない。S₂A は、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにおいて胚乳リボヌクレアーゼと同じく低濃度のリン酸緩衝液によって溶出されたので、胚乳リボヌクレアーゼにも同様の実験を行なったところ、

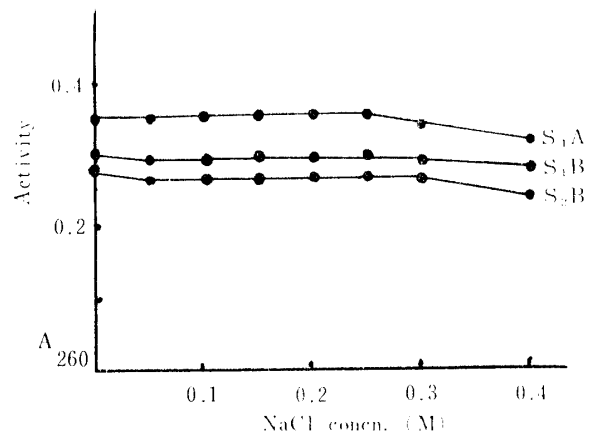


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on RNase activity.

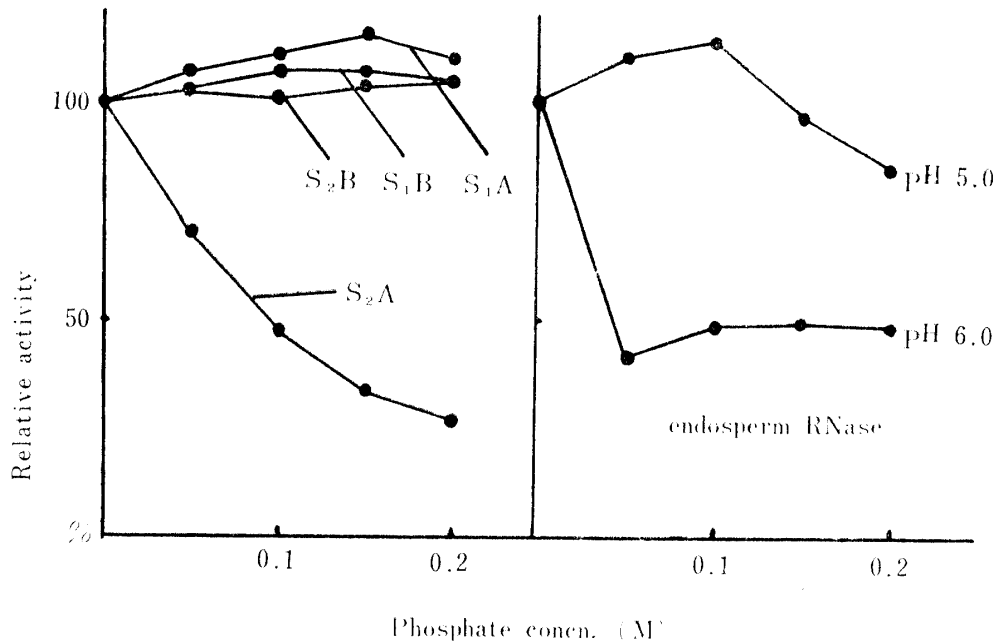


Fig. 7. Effect of phosphate concentration on RNase activity.

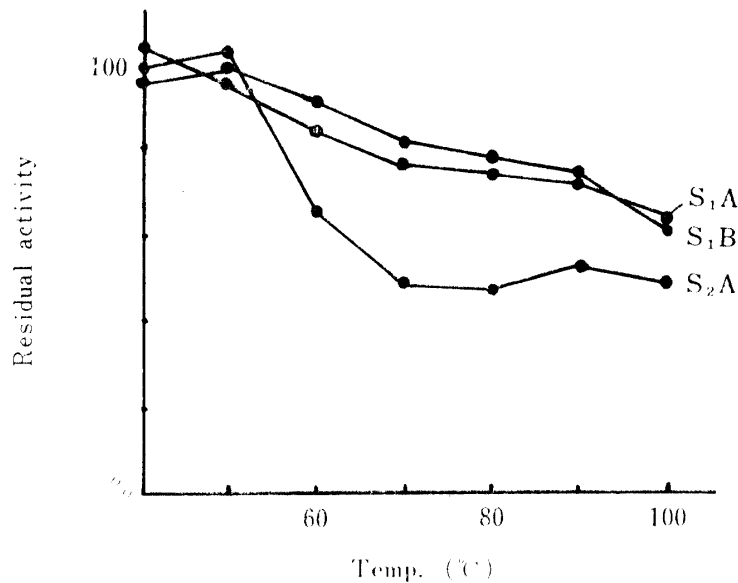


Fig. 8. Effect of temperature on RNase stability.

pH 5.0 ではリン酸濃度が 0.1 M までやや賦活化の傾向がみられるがそれ以上の濃度になると阻害的に作用した。 pH 6.0 ではリン酸イオンが加わると活性は 50% にまで低下するが、それ以上のリン酸イオンの増加によっては活性の低下を示さなかったことから S_2A との類似は認められなかった。

(4) 酵素の種々の pH に対する安定性 酵素 0.2 ml に 1/25 M リン酸ソーダ-1/50 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0~8.0), 1/40 M ホウ酸ソーダ-1/40 M リン酸カリ緩衝液 (pH 8.0~9.0), 及び 1/40 M ホウ酸ソーダ-1/40 M 炭酸ソーダ緩衝液 (pH 10.0~11.0)

をそれぞれ 0.1 ml 加えて、3~5°C, 24 時間放置し、 pH に対する安定度を S_1A , S_1B , S_2B について測定した。各酵素とも pH 4.0~10.0 までは、ほとんど活性の低下がみられず、僅かに pH 11.0 で約 10% の活性の低下があった。従って 5°C 以下では、 pH 3.0~10.0 までの溶液中での保存が可能であった。

(5) 酵素の種々の温度に対する安定性 酵素の温度に対する安定性を第 8 図に示した。酵素液 0.4 ml に 0.2 M リン酸ソーダ-0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を 0.3 ml 加え、各温度に 5 分間保った後、氷中で急冷後、常法に従い活性を測定した。 S_1A と S_1B は類似

した傾向を示し、60°C から僅かずつ徐々に失活するが 100°C でも、尚も 60% の活性が残存した。

一方、S₂A は 60°C で急に 40% 程失活するが、70°C から 100°C までは 50% の活性が残存する事から、胚乳リボスクレアーゼと明確に区別された。

Table 2. Effect of divalent cations on RNase activity

Salts (10 ⁻³ M)	Enzyme	S ₁ A	S ₁ B	S ₂ B
Control (H ₂ O)		100	100	100
Mg (CH ₃ COO) ₂		102	96	102
CaCl ₂		101	92	101
MnSO ₄		103	94	105
ZnSO ₄		83	87	85
CuSO ₄		70	77	75
FeSO ₄		82	76	70
BaCl ₂		92	95	93
Pb (CH ₃ COO) ₂		79	80	68
CdSO ₄		77	96	81
HgCl ₂		1	0	5
HgCl ₂ (10 ⁻⁴ M)		6	0	5
EDTA*		96	100	97

* Etylenediaminetetraacetate

(6) 酵素反応に及ぼす 2 価の金属イオンの効果
 主な 2 価の金属イオンと EDTA の酵素反応に及ぼす影響を第 2 表に示した。2 価の金属イオンは 10⁻³M 又は 10⁻⁴M 濃度であり、pH は 6.0 で、リン酸ソーダ-クエン酸緩衝液を用いた。一般に 2 価の金属イオンは植物起源のリボスクレアーゼに対して阻害的に働くが、胚乳リボスクレアーゼの場合、S₁A、S₁B、S₂B の酵素については同じような結果が得られた。即ち、Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Ba²⁺ は酵素活性にほとんど影響を及ぼさないが、Hg²⁺ は、10⁻⁴M 濃度で完全に阻害し、Cu²⁺、Fe²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺ も 10⁻³M 濃度でやや阻害した。

(7) 胚乳リボスクレアーゼによるリボ核酸の分解
 CRESTFIELD の方法によって調製したリボ核酸 2 mg を、0.05 ml の水を加えて溶解後、0.05 ml の 0.2 M リン酸ソーダ-0.1 M クエン酸緩衝液 (S₁A、S₁B、S₂B の場合は pH 6.0、S₂A は pH 5.0) を加え、37°C、24 時間分解を行なった。加えた酵素は、S₁A 52 単位、S₁B 37 単位、S₂A 48 単位、S₂B 41 単位である。分解後、その一部を東洋ろ紙 No. 51 にスポットし、溶媒 (1) で、上昇法により室温で展開後、紫外線ランプでスポットを検出した。

第 9 図で示されるように、すべての酵素分解物について 2'(3')-モノスクレオチド標品よりも Rf 値が高く、ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸及びヌクレオシドに匹敵する位置に検出されたので、燐モリブデン酸酸

化によるリンの発色²⁾を試みた結果、青色を呈した事によりヌクレオシド 2',3'-環状リン酸の存在が確認された。分解物の詳しい分析は、得られた酵素量が少量のため検討できなかった。

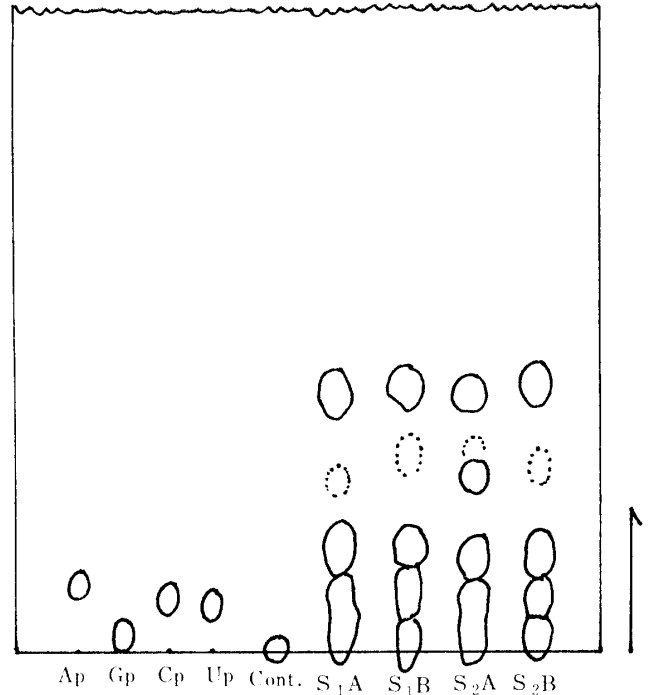


Fig. 9. Paperchromatogram of the digested products of ribonucleic acid by embryo RNase fraction.

Ap, Gp, Cp and Up indicate 2'(3')-adenylic, guanylic, cytidylic and uridylic acids. Cont. is the spot of intact ribonucleic acid.

(8) 胚乳リボスクレアーゼによるヌクレオシド 2',3'-環状リン酸の分解
 前報において、胚乳リボスクレアーゼがヌクレオシド 2',3'-環状リン酸をモノスクレオチドにまでさらに分解できるかどうか示されなかったので、プリン 2',3'-環状ヌクレオチドとして、アデノシン 2',3'-環状リン酸、ピリミジン 2',3'-環状ヌクレオチドとして、シチジン 2',3'-環状リン酸を使用して分解実験を行なった。それぞれのヌクレオシド 2',3'-環状リン酸 1 mg を 0.02 ml の水に溶かし、0.1 M クエン酸-0.2 M リン酸ソーダ緩衝液 0.03 ml (pH 4.7) 及び酵素 0.25 ml (870 単位) を加え、37°C で反応させ、4 時間及び 24 時間後、その 0.02 ml をとり東洋ろ紙 No. 51 にスポットし、溶媒 (1) によって 20 時間展開後、それぞれのスポットを切りとり、0.1 規定塩酸 5 ml を加えて、室温で一昼夜抽出後、アデノシンリン酸及びその環状リン酸については、260 m μ で、シチジンリン酸及びその環状リン酸につ

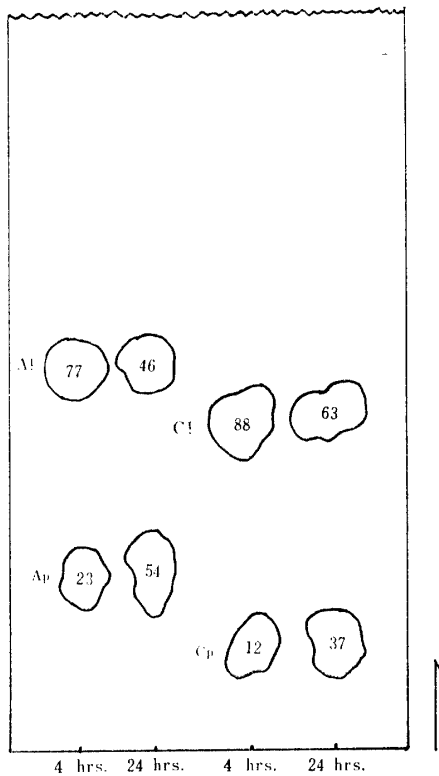


Fig. 10. Paperchromatogram of the digested products of adenosine and cytidine 2',3'-cyclic phosphates by endosperm RNase.

Ap, Cp, A! and C! indicate respectively adenylic and cytidylic acids and adenosine and cytidine 2',3'-cyclic phosphates.

いては $280 m\mu$ での紫外吸収を測定し分解率をパーセントで表わし、第10図に示した。ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸は、水溶液中で徐々に分解されるので酵素の代わりに水を加えた反応液をコントロールとして測定し、その分解値を差し引いた。アデノシン 2',3'-環状リン酸は、4時間で 23%、24時間で 54%、モノヌクレオチドに分解されたが、シチジン 2',3'-環状リン酸は、4時間で 12%、24時間で 37%分解された。

考 察

ソテツ種子中の胚には、胚乳リボヌクレアーゼといくつかの点で相違する酵素を含む事が確認された。ソテツ胚乳リボヌクレアーゼの精製の場合と異なり、胚乳リボヌクレアーゼの精製は DEAE-セルロースカラムの使用による食塩の直線的濃度勾配溶出法及び食塩濃度を段階的に高めた溶出法では不完全な分離を示した。ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにおいて、リン酸濃度 $0.04 M$ で溶出された酵素画分 S_1A , $0.07 M$ で溶出された酵素画 S_1B , S_2B はそ

の至適 pH はいずれも 6.0 であり、リン酸イオン濃度及び食塩濃度に対する反応、 pH に対する安定性、温度に対する安定性、2価の金属イオンの効果及びリボ核酸の分解生成物の点などで酷似している事からクロマトグラフィーによる不規則な挙動は、同じ酵素蛋白が精製操作の途中で部分的に変性した結果であるのか、或いは非常に類似した酵素蛋白であるのかもしれない。

一方、ヒドロキシルアパタイトカラムにおいて、 $0.01 M$ の低いリン酸濃度で溶出された酵素画分 S_2A は、至適 pH 、リン酸イオン濃度に対する反応、温度に対する安定性の点などから、前記三種の酵素と明らかに相違している。又、胚乳リボヌクレアーゼと比べて、至適 pH は、やや高く、 $pH 6.0$ でのリン酸イオン濃度増加に対して異なった反応を示し、熱に対しては安定で $100^\circ C$ 、5分の加熱でも 50%の活性が残存する事、及び胚と胚乳との分離の際に、胚乳の混入はほとんど考えられない事から、相異なる酵素と考えられる。

以上の結果から、ソテツの種子の胚には少なくとも二種の酵素が含まれ、それらの酵素の至適 pH は酸性側にあり、2価の金属イオン、特に Hg^{++} によって強く阻害される事、リボ核酸を分解してヌクレオシド 2',3'-環状リン酸を生ずる性質から胚にも現在までに報告された植物起源リボヌクレアーゼと同様の酵素が含まれる事が証明された。

ソテツの種子の胚乳リボヌクレアーゼは、セファデックス G_{100} ゲルろ過法によってさらに精製されたが、それでもなおクロマトグラフィー的に均一な酵素画分は得られなかった。ゲルろ過法は、硫酸分画後に脱塩もかねて行なえば、より迅速な酵素調製が可能である。植物起源のヌクレオシド 2',3'-環状リン酸を生ずるリボヌクレアーゼは現在、二群に分離されており、プリン 2',3'-環状ヌクレオチドのみをヌクレオチドに分解できるエンドウ葉やタバコ葉等に含まれる酵素と、すべてのヌクレオシド 2',3'-環状リン酸をモノヌクレオチドまでに分解するライグラスやホウレン草葉に含まれる酵素とである。K. K. REDDI³⁾ は、前者を RNase I、後者を RNase II と命名している。ところでソテツ胚乳酵素の場合は、プリン、ピリミジン 2',3'-環状ヌクレオチドのいずれをも分解できる RNase II 型である事が分った。アデノシンとシチジン 2',3'-環状リン酸を比較した場合、前者の方がより早くモノヌクレオチドに分解された。

又、著者らは、ソテツ花粉⁴⁾、及び同じ裸子植物で

あるイチョウ種子⁵⁾からも同様の性質をもった酵素の存在を確認、部分精製している。植物中に必ずこのような性質のリボヌクレアーゼが量的にも多く含まれる事実は、それが生体内において核酸代謝に一定の役割を果しているものと考えられるが、その詳しい説明は困難であろう。

結 論

前報¹⁾では、ソテツ種子の胚乳のリボヌクレアーゼについて検討した。今回は、さらに胚のリボヌクレアーゼの分離と諸性質及び胚乳リボヌクレアーゼのセファデックスゲルカラムによる精製、ヌクレオシド 2', 3'-環状リン酸に対する作用について検討した。結果は、次のように要約される。

(1) ソテツ胚より、硫酸塩析、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーにより、リボヌクレアーゼを分離した。ソテツ胚は、至適 pH の異なる少くとも 2 種の酵素を含んでいた。

(2) 至適 pH を 5.0 にもつ酵素は、0.4 M までの食塩によって影響されず、100°C、5 分間の加熱で 60% の活性が残存し、 $10^{-4}M$ の Hg⁺⁺ によってほぼ完全に阻害された。

(3) 至適 pH を 6.0 にもつ酵素は、リン酸イオ

ンによって阻害され、50°C 以上、5 分間の加熱で、約 50% 失活した。

(4) どちらの酵素も、胚乳リボヌクレアーゼと同様、リボ核酸を分解してヌクレオシド 2', 3'-環状リン酸を生じた。

(5) ソテツ胚乳のリボヌクレアーゼの精製にセファデックス G₁₀₀ カラムによるゲルろ過法は有効であった。ソテツ胚乳のリボヌクレアーゼは、プリン及びピリミジン環状ヌクレオチドのいずれも相当する 3'-モノヌクレオチドに分解するライグラス型 (RNase II) の酵素であった。

本研究を行うにあたり、試料の提供と種々の御助言をいただきました九州大学農学部阿久根了教授、向井純一郎博士ならびに本学小林昭助教授に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 原 彰, 矢野 浩・渡部常樹, 日農化誌, **43**, 13~20 (1969)
- 2) BANDURSKI, R. S.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 405 (1951)
- 3) REDDI, K. K.: *Procedures in Nucleic acid Research*, 71~84 (1966). Harper and Row, Publishers, New York.
- 4) 原 彰, 吉原和子・渡部常樹, 未報告
- 5) 原 彰, 佐藤 武・吉原和子・渡部常樹, 鹿大農学術報告, **19**, 89~97 (1969)

Summary

In the first paper⁽¹⁾, the authors reported the studies on the ribonuclease of endosperm from the Japanese cycad. In the present paper, they described the isolation and properties of ribonucleases of embryo, and the purification through Sephadex gel column and the action of nucleoside 2', 3'-cyclic phosphates of endosperm ribonuclease.

The results were summarized as follows:

1) Ribonucleases were isolated from embryo of the Japanese cycad by means of ammonium sulfate precipitation, chromatography on DEAE-cellulose and chromatography on hydroxylapatite. It was ascertained that at least two sorts of ribonucleases distinguishable from each other in the respective optimum pH were contained in embryo.

2) The enzyme having the optimum pH at 5.0 was not influenced by NaCl solution diluted to 0.4 M, kept its activity above 60% after 5 minutes' heating at 100°C and was almost completely inhibited by $10^{-4}M$ Hg⁺⁺.

3) The enzyme having the optimum pH at 6.0 was inhibited by phosphate ions and inactivated 50% after 5 minutes' heating above 50°C.

4) Both enzymes, as was seen in case of endosperm ribonuclease, hydrolyzed ribonucleic acid giving rise to nucleoside 2', 3'-cyclic phosphates.

5) Gel filtration through Sephadex G₁₀₀ column was effective to further purification of endosperm ribonuclease. Endosperm ribonuclease was ascertained to be one of the enzymes of ryegrass type (RNase II) which hydrolyzes both the purine and pyrimidine 2', 3'-cyclic nucleotides to their corresponding nucleoside 3' phosphates.