

米糠の酸性リボヌクレアーゼについて (その 2)

基質特異性

川崎良文・阿久根 了*

An Acid Ribonuclease from Rice Bran

Part 2. Substrate Specificity

Yoshifumi KAWASAKI and Satoru AKUNE

I. 緒 言

前報¹⁾において、米糠に存在する酸性 RNase の分離精製および一般的性質について報告した。本報では酸性 RNase の基質特異性、すなわち本酵素が (イ) エンドヌクレアーゼであるか、あるいはエクソヌクレアーゼであるか、(ロ) 3'-モノヌクレオチド生成型か、または 5'-モノヌクレオチド生成型か、(ハ) 塩基に特異性をもつかどうか、(ニ) 二次構造をもつ可溶性 RNA (sRNA) を分解するか、(ホ) 合成ホモポリマーを分解するか、(ヘ) 環状モノヌクレオチドを分解するか否かについて報告する。

II. 実験材料および方法

1. 材 料

酵素標品としては前報¹⁾に従って精製した酸性 RNase (RNase C と称する) を使用した。高分子 RNA は Crestfield らの方法²⁾, sRNA は Monier らの方法³⁾ に準じて酵母より調製したものを使用した。なお高分子 RNA の塩基組成 (モル%) はアデニン 27.6, グアニン 27.0, シトシン 19.8, ウラシル 25.6 であった。DEAE-cellulose (0.88 meq/g) は Brown 社製, 2', 3'-環状モノヌクレオチドおよび合成ホモポリマーは Sigma 社製のものを使用した。

2. ペーパークロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーは、試料を東洋濾紙 No. 51A に塗付して、次の溶媒系で下降法にて展開した。溶媒 1, イソプロパノール : 濃アンモニア : 水 (70 : 10 : 20)⁴⁾。溶媒 2, イソプロパノール : 濃塩酸 : 水 (170 : 41 : 39)⁵⁾。溶媒 3, 飽和硫酸 : 1M 酢酸ソーダ : イソプロパノール (80 : 20 : 2)⁶⁾。スポットはマナスル科学製の蛍光検査灯を使用して検出した。

III. 実 験 結 果

1. RNA の酵素分解

酵母高分子 RNA 50 mg に水 3.15 ml, 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 1.25 ml, 1% アルブミン溶

* 九州大学農学部農芸化学科

液 0.50 ml および RNase C 0.10 ml (163 単位) を加えて 37°C で反応させた。1, 3, 6 および 24 時間毎に 1.2 ml を取り出し、これにクロロホルム : オクチルアルコール混液 (9 : 1) 0.30 ml を加えて除蛋白した液を以下の実験試料とした。

2. 塩基特異性

分解液 1.0 ml を 0.1N 塩酸中 37°C で 2 時間処理⁷⁾ (酵素分解によって生じたかもしれない 2', 3'-環状ヌクレオチドを分解させる) 後, 7 M 尿素を含む DEAE-cellulose カラム⁸⁾ (1×17 cm) で分

Table 1. Time course of mononucleotides liberated by the action of RNase C on RNA

Incubation time (hours)	A ₂₆₀ units* at pH 7		Mononucleotides liberated (%)
	Total nucleotides**	Mononucleotides	
1	220	40	18
3	252	145	57
6	263	187	71
24	266	240	90

* One A₂₆₀ unit is the amount of nucleotide which gives an absorbancy of 1 at 260m μ in 1ml of solution in a 1-cm light path.
** Initial amount of RNase C digest.

離した。このカラムによって分解物は重合度 (正確にはリン酸の解離基数) の順に、しかも重合度の等しいヌクレオチドが一群となって溶出される。そこでモノヌクレオチドに相当する最初のピークだけを集め、Rushitzky と Sober の方法⁹⁾ に準じて DEAE-cellulose カラムで脱塩後、減圧濃縮して定量した。第 1 表に生成モノヌクレオチド量およびその生成率を示す。この条件下では、24 時間分解により全ヌクレオチド中 90 % がモノヌクレオチドとして遊離された。

次に上記のモノヌクレオチド画分約 300 μ g を二次元のペーパークロマトグラフィーで分離した。展開図の一例を第 1 図に示す。各スポットを切抜き 0.01 N 塩酸 5 ml を用いて抽出後、吸光度を測定して各モノヌクレオチド量を定量した。なお、各スポットの Rf 値およびこれらの pH2 と 12 における A₂₅₀/A₂₆₀, A₂₈₀/A₂₆₀ および A₂₉₀/A₂₆₀ の値は標準物質の数値¹⁰⁾ と一致した。第 2 表に各モノヌクレオチドの経時的生成率を示す。この表から、RNase C は RNA に作用して反応の初期ではグアニル酸を優先的に遊離させるが、後期では塩基特異性を示さないことが認められた。

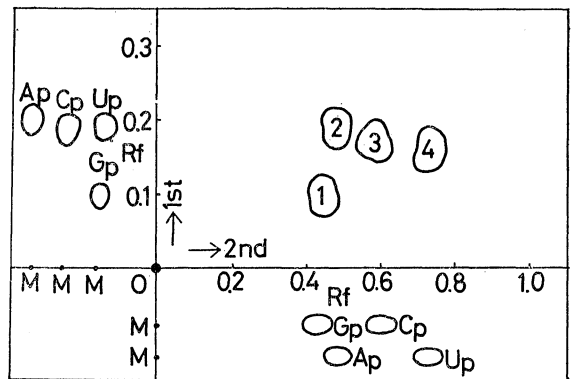


Fig. 1. Paper chromatography of a mononucleotide fraction. First dimension, solvent 1; second dimension, solvent 2. M, authentic mononucleotide markers. Abbreviations: A, G, C, and U indicate adenosine, guanosine, cytidine, and uridine, respectively. The letter p written to the right of the symbol for a nucleoside indicates 3'- or 2'-phosphate, or both. Spots 1 to 4 were identified as Gp, Ap, Cp, and Up, respectively.

3. 分解様式

前述の経時的分解液 0.1 ml (約 1 mg) を酸処理せずにそのまま 7 M 尿素を含む DEAE-cellulose カラム⁸⁾ (0.5×10 cm) に吸着させて、クロマトグラフィーを行なった (第 2 図)。1 時間分解

Table 2. Change of base preference during the course of digestion.

Incubation time (hours)	Mononucleotides liberated, Mole %*			
	Gp	Ap	Cp	Up
1	31	13	1	5
3	86	46	45	28
6	89	67	59	52
24	91	87	96	82

* Represented in mole per hundred moles of individual nucleotides.

物中には、種々の重合度のオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが生成していたが、3 時間以上の分解物中にはポリヌクレオチドは全くみられず、低分子オリゴヌクレオチドのみが生成していた。これは、RNase C がエンドヌクレアーゼであることを示している。

一方、第 2 図 A, B および C の最初のピークは、標準のヌクレオチドとモノヌクレオチドとのピークの間位置していたことおよび脱塩用の DEAE-cellulose カラム⁹⁾ に吸着されなかったことから 2', 3'-環状モノヌクレオチドと推定された。そこで酸処理⁷⁾ 後、溶媒 3 を用い

たペーパークロマトグラフィーにより 4 種 (アデニン, グアニン, シトシン および ウラシル) の 2'-(3'-) モノヌクレオチドを認めたので、このピークは 2', 3'-環状モノヌクレオチドの混合物であることが確認された。以上の事実から、RNase C 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ことが判明した。

4. 2', 3'-環状モノヌクレオチドの分解

上記 2, 3 の実験結果に基づいて、全モノヌクレオチド量 (環状モノヌクレオチド+3'-モノヌクレオチド) から環状モノヌクレオチド量を差引くことにより環状モノヌクレオチドの分解率を求めると、3 および 24 時間分解物中のそれはそれぞれ 9 および 10% であった。したがって、RNase C による環状モノヌクレオチドの分解速度は非常に遅いことが推定できる。そこで、各環状モノヌクレオチドを基質として、これらの RNase C による分解率を求めた。すなわち、環状モノヌクレオ

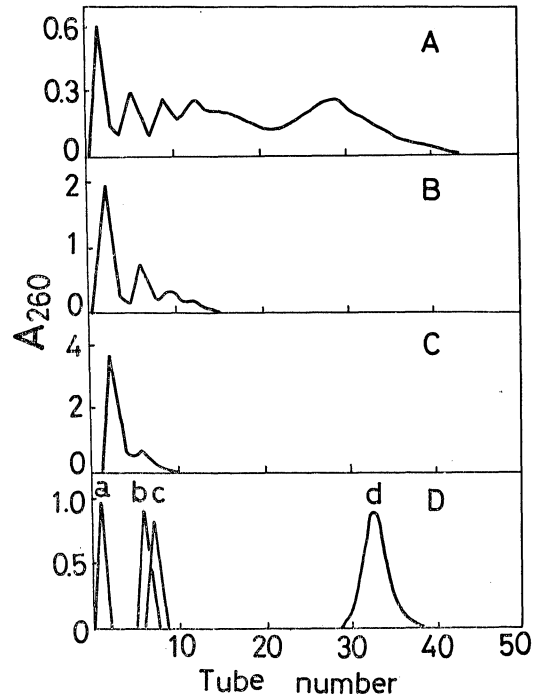


Fig. 2. Elution patterns of partially digested RNA by RNase C on DEAE-cellulose column (0.5×10cm). Linear gradient elution was made with 100ml each of 0.02 and 1.0M sodium acetate in 7 M urea, pH 7.5. Flow rate, 4ml/hr; 4ml/tube. A, B, and C were the 1-, 3-, and 24-hour digests, respectively. D, markers: a, adenosine; b, cytidylic acid; c, guanylic acid; d, sRNA.

Table 3. Hydrolysis of cyclic nucleotides by RNase C for 24 hours at pH 5.3 and 37°C

Cyclic nucleotide	% hydrolyzed to corresponding	
	3'-nucleotide	2'-nucleotide
Adenosine-2', 3'-cyclic phosphate	57	0
Guanosine-2', 3'-cyclic phosphate	10	0
Uridine-2', 3'-cyclic phosphate	6	0
Cytidine-2', 3'-cyclic phosphate	0	0

チド約 100 μg を含む水溶液 0.05 ml に 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 0.02 ml, 1% アルブミン溶液 0.02 ml, 水 0.01 ml および RNase C 0.10 ml (163 単位) を加えて 37°C で 24 時間作用させた。別に酵素の代わりに水を加えた溶液を同様に操作して対照とした。分解液の全量を濾紙に塗付し, 溶媒 3 を用いて展開した。2', 3'-環状モノヌクレオチド, 3'-モノヌクレオチドおよび 2'-モノヌクレオチドに相当する各スポットを切抜き 0.01 N 塩酸 5 ml を用いて抽出後, 吸光度を測定して環状モノヌレオチドの分解率を求めた (第 3 表)。本条件下では環状アデニル酸が最も分解され易く, 次に環状グアニル酸, 環状ウリシル酸の順で, 生成物は 3'-モノヌクレオチドであった。環状シチシル酸は分解されなかったが, さらに酵素量を増すかあるいは環状モノヌクレオチド分解の至適 pH をみつけ, その pH で作用させると分解されるかもしれない。

5. sRNA および合成ホモポリマーの分解

約 500 μg の sRNA, ポリアデニル酸 (poly A), ポリシチシル酸 (poly C) およびポリウリシル酸 (poly U) にそれぞれ水 0.14 ml, 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 0.05 ml, 1% アルブミン溶液 0.03 ml および RNase C 0.03 ml (49 単位) を加え, 37°C で 24 時間作用させた。分解液全量を濾紙に塗付し, 溶媒 1 を用いて展開した (第 3 図)。RNase C は sRNA, poly A, poly C および poly U のいずれにも作用してこれを分解したが, sRNA は分解し難いようである。

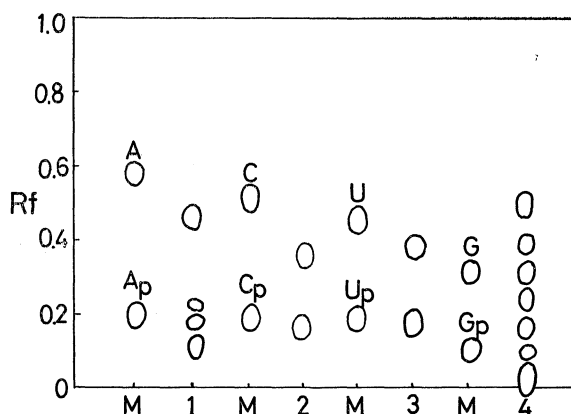


Fig. 3. Paper chromatography of the hydrolyzates obtained by the action of RNase C on poly A (1), poly C (2), poly U (3), and sRNA (4), developed in solvent 1. M, authentic nucleoside and nucleotide markers.

IV. 考 察

現在までに知られている植物起源の RNase はほとんどすべて塩基に対して厳密な特異性をもたないが, 塩基優先性 (Base preference) および環状モノヌクレオチドの分解などについては若干異なっている。すなわちエンドウの葉¹¹⁾, タバコの葉¹²⁾, 大豆の芽ばえ¹³⁾ の酵素および mung-bean の芽ばえの RNase M₁¹⁴⁾ はいずれも RNA を分解して 4 種の 2', 3'-環状モノヌクレオチドを

生成し、プリン環状モノヌクレオチドはさらに3'-モノヌクレオチドに分解されるが、ピリミジン環状モノヌクレオチドは分解されない。ryegrass の芽ばえ¹⁵⁾、ホウレンソウの葉¹⁶⁾、小麦の幼根¹⁷⁾ およびソテツの種子¹⁸⁾ の酵素はいずれも環状モノヌクレオチドを経て4種の3'-モノヌクレオチドを生成する。またトウモロコシの RNase A¹⁹⁾ は4種の環状モノヌクレオチドを生成するが、これらは分解を受けない。

米糠の酸性 RNase (RNase C) は ryegrass などの酵素と同様に RNA を分解して4種の2', 3'-環状モノヌクレオチドを経て3'-モノヌクレオチドを生成するものと考えられるが2', 3'-環状シチジル酸の分解については確認できなかった。さらに、本酵素はエンドヌクレアーゼであるが、RNA 分解の初期ではモノヌクレオチドとしてグアニル酸を優先的に遊離した。環状グアニル酸の遊離速度が早いことは ryegrass¹⁵⁾、ホウレンソウ¹⁶⁾ およびトウモロコシ¹⁹⁾ の酵素についても報告されている。

一方、植物にはこれら3'-ヌクレオチド生成型酵素の他に5'-ヌクレオチド^{20) 21)} および2'-ヌクレオチド²²⁾ を生成する酵素も知られている。しかし、以上に述べたような RNase の諸性質が植物にとっていかなる生理的意義をもつかということについては、いまだほとんど明らかでなく今後の研究にまつところが多い。

V. 要 約

米糠から精製された酸性 RNase の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', 3'-環状モノヌクレオチドは2', 3'-環状シチジル酸を除き、さらに3'-モノヌクレオチドに分解される。本酵素はエンドヌクレアーゼであるが、分解の初期ではモノヌクレオチドとしてグアニル酸を優先的に遊離させる。また本酵素は sRNA, poly A, poly C および poly U をも分解する。

終りに臨み、本研究に際し多くの御助言を頂いた九州大学農学部農芸化学科向井純一郎助教授に感謝する。

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) A.M. Crestfield, K.C. Smith, and F.W. Allen: J. Biol. Chem., **216**, 185 (1955)
- 3) R. Monier, M.L. Stephenson, and P.C. Zamecnik: Biochim. Biophys. Acta, **43**, 1 (1960)
- 4) W.E. Razzel and H.G. Khorana: J. Biol. Chem., **234**, 2105 (1959)
- 5) G.R. Wyatt: Biochem. J., **48**, 584 (1951)
- 6) R. Markham and J.D. Smith: *ibid.*, **49**, 401 (1951)
- 7) K. Sato-Asano: J. Biochem., **46**, 31 (1959)
- 8) R.V. Tomlinson and G.M. Tener: J. Am. Chem. Soc., **84**, 2644 (1962)
- 9) G.W. Rushizky and H.A. Sober: Biochim. Biophys. Acta, **55**, 217 (1962)
- 10) E. Volkin and W.E. Cohn: Methods Biochem. Anal., **1**, 304 (1961)
- 11) R. Markham and J.L. Strominger: Biochem. J., **64**, 46p (1956)

- 12) K. K. Reddi: *Biochim. Biophys. Acta.*, **28**, 386 (1958)
- 13) A. J. Merola and F. F. Davis: *ibid.*, **55**, 431 (1962)
- 14) T. L. Walters and H. S. Loring: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2870 (1966)
- 15) L. Schuster, H. G. Khorana, and L. A. Heppel: *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 452 (1959)
- 16) T. W. Tuve and C. B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3437 (1960)
- 17) S. Matsushita and F. Ibuki: *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, **17**, 29 (1959)
- 18) 原彰, 吉原和子. 渡部常樹: 鹿大農学部学術報告, **19**, 81 (1969)
- 19) C. M. Wilson: *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 324 (1963)
- 20) T. L. Walters and H. S. Loring: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2881 (1966)
- 21) 石井茂孝, 杉本洋, 横塚保: 日本農芸化学会誌, **41**, 340 (1967)
- 22) 片谷健一, 西本健市, 秋本政明, 川田寛: 同, **43**, 345 (1969)

Summary

The mode of action of an acid ribonuclease which has been prepared from rice bran is similar to that of several other plant ribonucleases, since the enzyme hydrolyzes ribonucleic acid to both purine and pyrimidine nucleoside 2', 3'-cyclic phosphates and has much more preference in the initial stages of digestion for guanosine 3'-phosphate linkages. The enzyme slowly cleaves mononucleoside 2', 3'-cyclic phosphates, except cytidine 2', 3'-cyclic phosphate, to their corresponding 3'-mononucleotides. The predominant action of the enzyme is endonucleolytic. The enzyme also hydrolyzes soluble ribonucleic acid and the synthetic polyribonucleotides such as polyadenylic acid, polycytidylic acid, and polyuridylic acid.