Sodium Desoxycholate による細菌核酸抽出に 関する基礎的研究

佐々木 彰

東北大学医学部細菌学教室 (主任 黒屋政彦教授)

〔受付: 9月7日 1955年〕

緒 言

おだやかな方法で、なるべく生体内の状態に近い核酸を抽出する事は、核酸の化学的並びに生物学的研究に当り重要な事である。

従来核酸抽出に当つては、Hammersten and Bang¹⁾ 及び Mirsky and Pollister²⁾ の食塩水抽出法がある。之等は何れも核酸を一度核蛋白として抽出し、その後蛋白部分を除去している。近来、表面活性剤の使用により核蛋白の蛋白部分を変性させ、核酸をいためる事なく、迅速に而も好収量に抽出する事が試みられ、既に Sodium dodecylsulfate を用いた Marko and Butler³⁾ の成果が発表されている。

一方細菌体内の核酸抽出については核酸と蛋白との結合が比較的強固である関係上表面活性剤の使用が一層必要と考えられる。1945年 Avery⁴⁾ 等は表面活性剤である Sodium Desoxycholate (以下 S.D.C.) によつて肺炎双球菌を処理し、高分子の状態で核酸を抽出し、化学的諸性状を検索し、更に生物学的には高分子 DNA が型転換物質の本態である事を明かにした。以来種々なる菌について、S.D.C. による処理が試みられ、インフルエンザ菌⁵⁾、赤痢菌⁶⁾、大腸菌¹⁰⁾ 及びチフス菌¹¹⁾ についても高分子状態の核酸抽出が報告されている。

菌体を S.D.C. で処理するに当つて、如何なる様相の下に S.D.C. が菌体に作用するかを探索し、それに基づいて如何なる条件で S.D.C. を作用させることが核酸抽出に対し最も好適であるかについて基礎的研究を行い、ある程度の成績を得たので報告する。

実 験

材料及び分析法

菌: チフス菌 No. 58 株 (以下 T-58) を馬肉汁寒天培地に接種し 37°C, 20時間培養して得た。

窒素分析: Micro Kjeldahl 法によつた。

燐量分析: Fiske & Subbarow 法に従い、光電比色

した (日立製, T.K.-120 S 光電比色計使用)。

Diphenylamin 反応: 各上清 7 cc に対し Dische に従い上清 1 に対し, Diphenylamin 試薬 2 を加へ加熱 5 分後取り出し、水道水冷却 10 分後赤色 Filter を用い光電比色し $-\log T$ を以て表示した。

比粘度測定: 各上清 5 cc を以て Ostwald 粘度計により 72 秒, 20°C $\pm$ 1°C にて測定し、蒸溜水のそれをもとにして比粘度を算出した。食塩濃度の変化する場合は予め該当食塩濃度液就て測定しその秒数を差引いたものを比粘度とした。

実験方法

T-58 の馬肉汁寒天培養菌を秤量し、0.01M Sod. citrate (NaOH にて pH 7.4 に修正) を加え、充分攪拌して均等浮游液とし、その窒素量を 0.323mg/cc, 0.567mg/cc 及び 0.847mg/cc となる如く調製し、次に S.D.C. (0.01M Sod. citrate に溶解, NaOH にて pH 7.4 に修正し表示する濃度の 2 倍のもの) の溶液を、菌浮游液と同量に加え、最終濃度が表示する如くなる様にした。菌浮游液と S.D.C. 溶液とを合し、よく振盪した後その一部を採取し直ちに 3,000 r.p.m. 30' 遠心し、その上清を 0' とし残液は 60°C 温浴中に沈め時々振盪しながら各時間毎にその少量を採取し、冷却後 3,000 r.p.m. 40' 遠心して得た上清について各時間毎の各種の測定を行った。一方対照として S.D.C. 溶液の代りに Sodium citrate を同量に加え、よく振盪した後 3000 r.p.m. 40' して得た上清についても同様の測定を行った。燐及び窒素量は原菌浮游液/cc 中のそれらを測つて 100 とし、各時間における上清の燐及窒素量はこれに対する比率 (%) で表した。但し燐量については各菌浮游液及び各上清の

SASAKI Akira: The fundamental study on the extraction of the bacterial nucleic acid by sodium desoxycholate. Department of Bacteriology, School of Medicine, Tohoku University, — Jap. J. of Bact. 11 (3), 193—197, 1956.

**第1図 種々な濃度のチフス菌浮游液に対するデゾ
オキシコール酸ソーダ (S.D.C.) 処理の影響**

a) 各時間上清中の窒素量 (全窒素量に対する
%を以て表す)

S.D.C. 0.2%, Sod. citrate 0.01M, pH 7.4,
60°C 加熱

チフス菌浮游液濃度:

○—○ 0.323mg, ●—● 0.567 mg
及び ×—× 0.847mg/cc N に相当。

**第1図 種々な濃度のチフス菌浮游液に対するデゾ
オキシコール酸ソーダ (S.D.C.) 処理の影響**

b) 各時間上清中の燐量 (全燐量に対する%を以
て表す)

S.D.C. 0.2%, Sod. citrate 0.01M, pH 7.4,
60°C 加熱

チフス菌浮游液濃度:

○—○ 0.323 mg, ●—● 0.567 mg,
×—× 0.847 mg/cc N に相当。

5%トリクロール醋酸上清中の無機燐量をも測り、この
量を全燐から差し引いた。従つて表示する燐量は有機燐
量を示している。

(I) S.D.C. 処理による菌浮游液の経時的変化

**第1図 種々な濃度のチフス菌浮游液に対するデゾ
オキシコール酸ソーダ (S.D.C.) 処理の影響**

c) 各時間上清の Diphenylamin 反応

S.D.C. 0.2%, Sod. citrate 0.01 M, pH 7.4
6.0°C 加熱

チフス菌浮游液濃度:

○—○ 0.323 mg, ●—● 0.567 mg,
×—× 0.847 mgN/cc に相当

**第1図 種々な濃度のチフス菌浮游液に対するデゾ
オキシコール酸ソーダ (S.D.C.) 処理の影響**

d) 各時間上清の比粘度

S.D.C. 0.2%, Sod. citrate 0.01 M, pH 7.4,
60°C 加熱

チフス菌浮游液濃度:

○—○ 0.323 mg, ●—● 0.567 mg,
×—× 0.847 mgN/cc に相当

T-58 の種々なる菌量 (0.847 mg/cc, 0.567 mg/cc
及び 0.323 mg/cc 窒素量) を S.D.C. 0.2%, pH 7.4
として 60°Cに加熱し、表示する 0' から 5時間に至る各
上清を得て、諸検索を行つた。

上清におけるN量は、何れの場合においても 60°C, 30'
加熱までに急激な上昇を示し、次第に定常的な値を示す

(第1図 a)。又磷量(第1図 b)も 60°C加温と共に急激な増加を示し, 20' に至ると殆ど最高に達する。この最高に達する速さは窒素のそれに比し早い。尚60°C加温 4時間及び5時間では各上清に無機磷が増加している。

各上清における Diphenylamin 反応も(第1図 c) 60°C加温と共に増大し, 30' に至るまでは上昇は急激であるが2時間を過ぎると定常的である。又比粘度(第1図 d)は加温と共に急激に上昇し, 1時間に至るまで上昇を続け, 以後恒常的となる。以上の成績は S. D. C. 0.2%, pH 7.4, 加熱 60°C の条件においては蛋白質, 磷, Diphenylamin 反応物質及粘性物質が 30' ~ 1時間の加熱により略々最高に達し, その後の加温はあまり影響がないことを示している。

(II) 食塩濃度による影響について

次に S.D.C. 0.2%, pH 7.4において食塩が存在した場合如何なる影響があるかを検討した。

即ち菌量 N mg/cc : 0.564 mg/cc において食塩濃度 2.0M, 1.5M, 1.0M, 0.5M, 0.25M, 0.125M及び食塩のない Sod. citrate のみの場合について, 60°C, 1.5時間加温し, その上清について検討した。

各上清におけるNは食塩の存在がない場合に最も高く, 食塩濃度の増加と共に僅かながら減少している(第2図)。又各上清におけるPはNの場合と異なり食塩濃度

第2図 食塩濃度による影響

●—● 各濃度上清の窒素量%
○—○ " 磷量 "
×—× " ディフェニールアミン反応
△—△ " 比粘度

S.D.C. 0.2%, Sod. citrate 0.01M, pH 7.4, チフス菌(0.564 mg/cc の窒素量に相当), 60°C, 1.5h.

0.125Mにおいて最も低くその増加と共に僅かながら増加している。之は食塩濃度 0.125Mにおいて核蛋白乃至核酸が最も溶解し難く, 蒸留水やそれ以上の食塩濃度に

おいては溶解度が高いことに基いていると思われる。

Diphenylamin 反応及び比粘度は共にPの増減と同様の傾向を示し, 食塩 0.125Mの場合が僅かに低く, その前後において高い値を示している。比粘度の場合食塩のみの対照を置いたことは勿論である。以上の成績で核酸の抽出をよくするには NaCl 0.125 M 附近を避け 0 又は 0.25M附近を取るのがよいことを知った。

(III) S.D.C. の濃度による影響

S. D. C. の濃度を10.0%, 7.0%, 5.0%, 4.0%, 3.0%, 2.0%, 1.0%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%及び0.02%と変え, 菌量 N : 0.549mg/cc とし pH 7.4 60°C, 1.5時間加温し, その上清について検討した。

各上清におけるN(第3図)は 0.1% S.D.C. までは

第3図 S. D. C. 濃度による影響

●—● 各濃度上清の窒素量%
○—○ " 磷量 "
×—× " ディフェニールアミン反応
△—△ " 比粘度

S.D.C. 0.2%, Sod. citrate 0.01M, pH 7.4, チフス菌(0.549mg/cc の窒素量に相当), 60°C, 1.5h.

低いが 0.1%から 2.0%に至るまでは急激に上昇し、以後10%まで漸増を続け, 10%に至ると 92.85%の高い値を示す。

又P量はN量と殆んど同様な傾向を示す。

Diphenylamin 反応は S.D.C. 0.1%までは低い値を示すが, 0.2~0.5%において急に増加し以後は S.D.C. 濃度の増加によつても殆んど変化がない。即ち, NやPの増加とは必ずしも相伴わない。

比粘度は S.D.C. 濃度 0.2%までは低いが 0.5~2.0%の間で急激に上昇し以後 5.0%まで略々同様であるが, 7.0%及び10.0%に至ると却つて減少を示している。最後の減少は恐らく溶出された蛋白質の変性によるものであろう。

上記の成績ことに Diphenylamin 反応の成績から

S.D.C. の濃度は 0.2～0.5% 位が適当でそれ以上にする事は却つて不純蛋白質が出て来る可能性があると思う。

(IV) pH による影響

S.D.C. 濃度 0.2%, 菌量 N: 0.321 mg/cc において, pH を種々に変化した場合如何なる影響があるかについて検討した。pH の修正は NaOH 及び HCl を用いて行い, 60°C 加温中は屢々 pH を検し夫々の pH を保持した。pH 6.6 以下の酸性ではデゾキシコール酸の析出が起り不適当である為 pH を 6.6, 6.8, 7.0, 7.4, 8.4 及び 9.4 とし, 60°C, 1.5 時間加温し, その各上清について検討した。

各上清における N は酸性側において低く, アルカリ側において高い (第 4 図)。

第 4 図 pH による影響

●—● 各濃度上清の窒素量 %
○—○ " 燐量 "
×—× " ディフェニールアミン反応
△—△ " 比粘度

S.D.C. 0.2%, Sod. citrate 0.01M, pH 7.4, チフス菌 (0.321mg/cc の窒素量に相当), 60°C, 1.5 h.

而して P, Diphenylamin 反応及び比粘度も略々同様であるが, pH 9.4 に至り比粘度は比較的高い値を示している。

そこで pH を更にアルカリ性にした場合に, 60°C, 10' 並びに 30' 加温して検討した。この場合 60°C, 10' 加温により菌体は殆ど溶解し遠心によつても菌体残渣は僅かしか認められない。又 60°C, 30' 加温では更に菌体残渣は少くなる。その上清における N は 94% 及び 97% の極めて高い値を示している。燐量については, 無機燐が増加して居り有機 P の増加は N の増加程著しくない。Diphenylamin 反応も亦稍高い値を示している。一方比粘度は最も著しい増加を示している。しかし 60°C, 30' 加温後 42 時間室温に放置した場合は急激に比粘度の低下が認められる。

以上のことから S.D.C. を 0.2% とし, つよくアルカリ性となれば殆ど全部の菌体成分が溶解するが, この場合蛋白質は変性する。核酸は強アルカリ性にするも著しく増加することなく pH 7.4 位で丁度良い。

考 察

① 動物組織からの高分子核酸抽出に当つては食塩濃度が重要な因子であるが¹¹⁾ 細菌細胞の核酸抽出においても食塩濃度 0.125M 附近では核蛋白乃至核酸の収量が低い。一方蒸留水では核酸量は 0.25M 以上の食塩水と同様であるが, 核蛋白以外の不純蛋白の混在がある。之を妨げる為には 0.25M 附近の NaCl 濃度を可とする。

② T—58 を S.D.C. で処理するに当つて, S.D.C. 濃度を一定にし (0.2%) pH を次第にアルカリ性にする時は上述の如く残渣なく菌体を溶菌せしめることになるが, これは, 必ずしも P 量及 Diphenylamin 反応の増加を来していない。従つて pH をアルカリ性にすることは高分子核酸を抽出するには必ずしも最もよい条件とは云い得ない。

③ S.D.C. は溶菌を起すが, 菌によつてはその際蛋白質の変性¹²⁾ を伴い, 例えば百日咳菌毒素の如きは著明な毒性の減少を示す¹³⁾。

もつと激しい場合は蛋白質は多くは水に難溶となる。尚 S.D.C. の存在下において強くアルカリ性となれば長時間の内には核酸も著しく粘性を失ひ低分子となる。

結 語

1) S.D.C. 0.2%, pH 7.4 とし使用チフス菌の菌量及 60°C 加温時間を種々に変え各時間毎の上清について窒素量, 燐量, Diphenylamin 反応及び比粘度を測定して, S.D.C. 処理による核酸抽出の良否を検討した。その結果この範囲の菌量では核酸抽出には 60°C, 30' ~ 1 時間の加熱で充分であることを知つた。

2) S.D.C. 処理に当つて食塩の存在が菌体核酸抽出に如何なる影響があるかについて検討したが, 0.125M の附近の食塩の存在は核酸の溶出を妨げる故之を避けた方がよく, 0.25M 附近の食塩は他の不純窒素の溶出を妨げる意味で適当であることを知つた。

3) S.D.C. 濃度を種々に変化させた場合, 濃度の高い方が一般菌体成分抽出にはよいが, 核酸そのものゝ抽出には 0.2 ~ 0.5% でよい事を知つた。

4) S.D.C. で菌体を処理するとき強いアルカリ性において行う時は, S.D.C. は低濃度で而も短時間で溶菌が完全であり, 高い比粘度を有する菌体成分が得られるが, この場合核酸は増加せず且つ菌体蛋白成分にも変性を来す虞がある。

5) 上の事実からチフス菌から高分子核酸を分離するには菌量 N mg 0.323 ~ 0.847 mg/cc の間では, S.D.C. 0.2 ~ 0.5%, pH 7.4, 60°C, 30' 加熱, NaCl 濃度は 0.125N 附近を避け, 0.25N 附近とするのが最も適当である。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導を賜った恩師黒屋教授並びに実験に当つて便宜を計らわれた木下氏に対し謝意を表する次第である。

参考文献

- 1) Hammersten, E.: Biochem. Z., 144, 383, 1924.
- 2) Mirsky, A. E. and Pollister, A. W.: J. Gen. Physiol., 31, 1, 1947.
- 3) Marko, A. M. and Butler, G. C.: J. Biol.

- Chem., 190, 165, 1951.
- 4) Avery, O. T. and McCarty, M.: J. Exp. Med., 83, 97, 1946.
- 5) Alexander, H. E. and Leidy, G.: J. Exp. Med., 93, 345, 1951.
- 6) 木下嘉一: 日細誌. 10, 463, 1955.
- 7) 青野義一, 中目幡雄: 日細誌. 8, 521, 1953.
- 8) 武田徳晴: 日細誌. 8, 441, 1953.
- 9) Schneider, M. D.: J. Bact., 63, 495, 1951.
- 10) Boivin, A.: Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol., 12, 7-17, 1947.
- 11) 江上不二夫編: 核酸及び核蛋白質, 上巻, 165, 昭和26年, 共立出版, 東京.
- 12) Anson, M. L.: J. Gen. Physiol., 23, 239, 1939.
- 13) 佐藤寿, 氷室功: 日細誌. 8, 829, 1953.