リボ核酸抽出に関する新しい試み

(昭和 43 年 10 月 15 日 受理)

秦 邦 男・筒井 芳 男・横田 金 吾*

高分子溶剤として特異な性状を有するハイドロトロピック溶液 (キシレンスルホン酸ナトリウム水溶液) を用い酵母 (*Candida utilis*) の RNA 抽出を試み, RNA が Na 塩の形で容易に抽出される事を認めた。例えばキシレンスルホン酸ナトリウム水溶液 (30 wt%) 中で生酵母もしくはそのエタノール前処理酵母を加温抽出すると (93°C, 3 時間), 粗 RNA (純度 70~80%) が 7~8% の収率で得られる。この場合, 抽出温度が高くなるにつれ, 粗 RNA の純度が高くなるが, 逆に収率は低下する。このような事実から, ハイドロトロピック溶液による RNA の抽出は, 大部分の RNA が先ずリボ核蛋白として抽出されるが, 温度効果によって二次的に蛋白との結合が切断されると推定される。

1 緒 言

近年核酸が持つ生物学的意義についての研究は急速な発展をみせ, 生物学, 生化学の中心テーマとなっているが, 一方, 工業的な立場から酵母中に含まれている核酸が, イノシン酸, グアニル酸などの調味料工業原料として注目されている。核酸の抽出方法については古くから多くの研究がなされているが, 著者らは高分子溶剤として特異な性状を有するハイドロトロピック溶液を用い酵母成分の抽出を試みた結果, 酵母核酸が容易に溶離することを認めた。本報ではその抽出方法についてとりまとめ報告する。

1.1 RNA の抽出方法

核酸を大別するとデオキシリボ核酸 (DNA), リボ核酸 (RNA) にわけられるが, 酵母の場合 DNA, RNA とともに含まれており, 大部分が RNA である。RNA はさらにその機能によって可溶性 RNA, メッセンジャー RNA およびリボゾーム RNA にわけられ, 量的にはリボゾーム RNA が最も多い。通常の抽出方法では各種 RNA の混合物が得られるが, 今回の実験も混合 RNA の抽出を目的とした。

多くの場合 RNA は細胞中で蛋白と強固に結合しているが, RNA の抽出単離をはかるには抽出時に蛋白との結合を切断し, さらに抽出される RNA の分解を抑制するために細胞中に含まれている核酸分解酵素を不活性化することが必要である。

現在 RNA の抽出方法として: ①希アルカリ水溶液による抽出¹⁾, ②中性塩濃厚水溶液²⁾, ③フェノール法³⁾, ④グアニジン塩酸法⁴⁾, 界面活性剤 (例: ドデシル硫酸ナトリウム) を用いる方法⁵⁾, ⑥希薄中性塩水溶液法⁶⁾, ⑦中性塩希薄水溶液中での加熱抽出⁷⁾ などの諸法が知られている。

上記の諸法のうち①~⑤は, 酵母中の蛋白を抽出時に変性除去し, RNA のみを抽出する方法であるが, ⑥, ⑦は RNA を最初リボ核蛋白の状態で抽出し, ついで熱もしくは試薬によって結合

を切断して RNA を単離, 精製する方法である。

RNA の溶離状態は希アルカリ水溶液を用いる①の場合, アルカリで核蛋白を分解し遊離した水に不溶の RNA を水易溶のアルカリ塩に変えて溶化するが, これに対しドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤を用いる方法は, RNA の溶離に際して活性剤が界面活性効果を示すと考えられる。また⑥, ⑦は蛋白の塩効果による溶化現象を利用したもので, 希薄な中性塩水溶液を用いて RNA をリボ核蛋白の状態で溶出させる。

1.2 ハイドロトロピー

前述の中性塩水溶液を抽出溶剤として用いた例, 界面活性剤を用いた例などから観ても, 水に難溶の, 例えば炭水化物, 高級アルコール, 蛋白質などの高分子物質をよく溶解するといわれているハイドロトロピック溶液が, 蛋白, 核酸を始め生体内に含まれている高分子諸成分の抽出溶剤としてすぐれた特性を示すことは想像に難くない。

ハイドロトロピーは 1916 年に Neuberg によって初めて発見された現象で⁸⁾, 塩析の逆である溶化とも言うべき現象であるが, pH には無関係で, 通常水 3 に対し 1 以上の塩が存在する時に生ずる。ハイドロトロピーに関する理論的な説明は, Neuberg らがとなえた溶質とハイドロトロピック塩が水に可溶な複合体を生成するのではないかとする説^{8,9)}, ハイドロトロピック溶液が一種の乳化剤として作用するのではないかとする Kuthy らの説¹⁰⁾, あるいは混合溶媒と同様の効果を示すのではないかなど, 多くの説が出されているが, 未だ確たる理論は得られていない。しかし, ハイドロトロピック溶液の有するその溶解力はきわめて有用であり, これを諸物質の抽出および分離に用いた例は多く, 卑近な例としてキシレンスルホン酸ナトリウムを用いた木材のハイドロトロピック蒸解がある¹¹⁾。

通常酵母諸成分の抽出をはかる場合, 生体組織が抽出に対して大きな抵抗を示すので, 抽出効果を高めるためには, 細胞の機械的, 物理的な破壊をあらかじめ行なうか, または抽出力のすぐれた溶媒を用いる必要があるが, 溶解力が大きいといわれているハイドロトロピック溶液の使用はこの点非常に興味が持たれる。

*1 Kunio HATA, Yoshio TSUTSUI, Kingo YOKOTA 十条製紙株式会社研究所秋田分室: 秋田市新屋島木町。

1) M. Holden, N. W. Pirie, *Biochem. J.*, 60, 46 (1955).

2) G. Clarke, et al., *Biochem. J.*, 11, 319 (1917).

3) K. S. Kirby, *Biochem. J.*, 64, 405 (1956).

4) E. Volkin, C. E. Carter, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1516 (1951).

5) E. R. M. Kay, A. L. Dounce, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4041 (1953).

6) C. B. Anfinsen, *J. Biochem.*, 221, 405 (1956).

7) J. N. Davidson et al., *Biochem. J.*, 52, 600 (1952).

8) L. Neuberg, *Biochem. J.*, 76, 107 (1916).

9) Weiland, Sorge, *Z. phys. Chem.*, 97, 1 (1930).

10) A. Kuthy, *Biochem. Z.*, 273, 380 (1931).

11) 秦, 菅泉, 山本, 工化誌, 62, 1596 (1959).

12) 渡辺 格, 三浦隆一郎, “実験化学講座 21, 生物化学(1)” p. 284, 丸善。

2 実験および実験結果

ハイドロトロピック塩のうち代表的なものとしてトルエン、キシレン、サイメン、ナフタリン等のスルホン酸ナトリウムおよび安息香酸、サルチル酸のナトリウム塩があるが、このうちサイメンの抽出能力が最もすぐれている。

最初、サイメンスルホン酸ナトリウムを用いて予備実験を行ない、RNA が抽出されることを認めたので、ついで比較的入手しやすく、また抽出力もサイメンスルホン酸ナトリウムにすぐれているキシレンスルホン酸ナトリウム（以下 X-S-Na と略）を使用して実験を行なった。抽出液の濃度は通常ハイドロトロビーに用いられる 30 wt% 前後の濃度を用いた。

2.1 X-S-Na 溶液による抽出操作

2.1.1 生酵母の抽出処理 酵母はパルプ廃液より発酵製造した *Candida utilis* を用いた。

生クリームの状態（固形分：13.0%）で酵母を採取し、シャープレス遠心脱水機で脱水、水洗を 2 回繰返し試料とした（水分：78~80%）。これに酵母（絶乾重量）に対し 1.8 倍の水を加えて希釈したあと、同じく 2.1 倍の X-S-Na を溶解してよく混和した。初期の pH は約 8.5 であるが、濃塩酸を少量加え、溶液の pH を 6.8~6.9 に調整後加熱抽出した。

抽出溶液中の X-S-Na 濃度および酵母濃度は、それぞれ 28.5 wt%, 1.6 wt% である。

抽出時の温度および反応時間は、RNA の溶離に対し大きな影響をおよぼすと考えられるが、これらの効果を知るために小試料を用いて各種条件下における抽出実験を行なった。抽出液を所定の方法で分別して RNA を単離し収量を測定した（表 1）。

表 1 処理時間および処理温度と粗 RNA 収率

No.	反応温度 (°C)	反応時間 (hr)	粗 RNA 収率 (%)
①-1	70±2	0.5	9.0
-2	"	1.0	9.7
-3	"	2.0	11.7
-4	"	3.0	9.4
②-1	100±5	0.5	7.4
-2	"	1.0	7.7
-3	"	2.0	9.2
-4	"	3.0	10.0

* 酵母処理量：6.5 g (O.D.), X-S-Na 溶液：30 ml, 反応液中の X-S-Na 濃度：30 wt%, 初期 pH：6.8.

その結果、抽出時間の延長とともに収量が増加し純度も高くなるが、3 時間程度で RNA の抽出量は最大となる。また抽出温度が低い場合、粗 RNA の収量は高温処理に比較して高いが純度は低く、さらに長時間処理しても純度はさほどあがらぬことを認めたので、抽出温度 92~95°C、処理時間 3 時間を標準条件として定め以後の実験を進めた。

抽出処理後水を加えて希釈し、残分酵母を遠心分離で除いた。残分酵母は水洗を 2 回繰返し、洗液を抽出液と混合して以後の実験に供した。

2.1.2 エタノール処理酵母の抽出 生酵母を試料として直接抽出する方法には多くの難点がある。

まず所定濃度のハイドロトロピック溶液を調整する場合、生酵母中に含まれている大量の水を考慮する必要がある、ハイドロトロピック塩を濃厚水溶液として添加するか、固形の状態で加えることになるので、混和が十分でなければ反応がきわめて不均一になる。さらに反応液量が増すため後処理がむずかしくなる。

また、酵母中に含まれている脂質成分、遊離のアミノ酸、リボ蛋白などが同時に溶出するが、RNA の単離の際に精製処理が不十分であれば、RNA 中に混在してくるおそれがある。

これらの事実を考慮すると、試料生酵母をあらかじめエタノールなどの水に易溶な揮発性の有機溶剤で置換脱水し、さらに、脂質部その他比較的低分子の部分を除去しておく方が後処理が容易で、他の有機成分の抽出単離の点でも都合がよい。

今回の実験では、生酵母をエタノールで前処理した。処理方法は、生酵母に酵母 (O.D) 100 g に対し 350 ml の 95 vol% エタノールを加えて混和後常温で抽出し遠心分離後、再び 300 ml のエタノールを加えて抽出する。抽出後の酵母は常温で風乾した。処理酵母量は試料酵母の 85~88% に相当する。

これに 30% の X-S-Na 水溶液を加えてハイドロトロピック法による抽出を行なった。抽出浴中における X-S-Na 濃度は 28.3 wt%, 酵母濃度は 2.7 wt% である。

抽出のプロセスを図 1 にまとめた。

注 1. (I): 生酵母の抽出 (II): エタノール、ハイドロトロビー 2 段抽出
注 2. 図中の百分率は試料酵母 (絶乾) 当りの収率 (図 2 も同様)

図 1 X-S-Na 溶液による酵母抽出

2.2 抽出液の分別及び RNA の精製

2.2.1 蛋白および RNA のエタノール分別 抽出液は淡黄色透明な液であるが、この中にはリボ核蛋白の分解物や糖、リボ蛋白、脂質などが含まれており、特に生酵母を抽出した場合は、脂質、アミノ酸などの低分子部分も混溶していると考えられる。

抽出液から RNA を単離するには、目的とする RNA の純度および特性を考慮して種々の方法が考えられているが、ここではできるだけ温和な、しかも簡便な方法を用いるべく、エタノール (95 wt%) を抽出液のほぼ倍量加えて蛋白とともに沈殿させた。

沈殿物は白色不定形物質で、遠心分離によって抽出液と分別した。

2.2.2 除蛋白および RNA の精製 RNA は水に不溶であるが、アルカリ水溶液には塩となって溶解する。

通常酸性アルコールを加えて RNA を遊離の酸として沈殿させるか、もしくはアルカリ水溶液で RNA 抽出するが、ハイドロトロビーの場合には、RNA が Na 塩の形で抽出されるので水に容易に溶解する。

エタノール沈殿物に水を加えて RNA-Na を溶解し水不溶の蛋白質を遠心分離で除き、さらにケイ藻土を通して分別した。

ついで口過後の抽出液に等量のエタノール (95 wt%) を加えて

RNA-Na を沈殿、遠心分離後、70% エタノールで2回洗浄し乾燥した。

図2に以上のプロセスを総括した。

図2 RNA 抽出液の分別

2・2・3 粗 RNA の収率および純度 粗 RNA の収率は、図2に示したように、供試酵母 (O・D) に対し約 7.4~8.0% であった。

この粗 RNA-Na を Ogur-Rosen 法¹²⁾ で分画し紫外吸収で定量した結果、RNA としての純度は 70~80% であった。したがって、酵母からの RNA の収率は 5.3~6.4% である。この値は、通常用いられている希薄中性塩溶液による加温抽出法と大体同程度の値である。

3 考 察

上述のように、ハイドロトロピック処理によって、酵母中の RNA が容易に抽出できることがわかったが、ここでは RNA のハイドロトロピーで問題とすべき諸点をあげ若干考察する。

1・2 で記したように、ハイドロトロピー現象については今のところ明確な説明はなされていない。Neuberg, Weiland, Sorge らは、溶質と塩との間に複合体が形成されるのではないかとしたが、この複合体の存在は化学的にも物理的にも証明されていない。しかし最近著者らは、木材のハイドロトロピック蒸解に関する研究中、蒸解廃液の中にハイドロトロピック塩と溶出した糖との比較的不安定な複合体の存在を認めている¹¹⁾。

ハイドロトロピック溶液では、大部分の水は塩に溶媒和しているため、水そのものの溶媒としての効果は小さく、塩濃度が高い状態であれば、塩に対し親和性を有する物質が溶液系内に入ると、塩が積極的に配位して溶質と複合体を形成し、溶質が可溶化すると考えられる。したがって物質の溶解性はハイドロトロピック塩に対する親和性に左右されると言えるが、蛋白、核酸の場合、ハイドロトロピック塩に対しプロトン受容体としての特性を示す官能基を多く含んでいるので、これらがハイドロトロピーを受けることは当然予想される。

通常、濃厚な中性塩水溶液 (例えば飽和食塩水) を生酵母に加えると、内部の浸透圧差によって細胞膜が破れ、プラモライズされた状態になることが知られている。しかしハイドロトロピーの場合は、塩濃度がきわめて高いにもかかわらず、抽出処理を行な

うと、あくまでも酵母の原型は保たれ、抽出が進むにつれて体積が縮少することが認められる。前述したように、ハイドロトロピック溶液中の水が塩と結合し、水自体の効果が抑えられた状態にあるため、ハイドロトロピック溶液が単なる塩の水溶液としてではなく、ある種の特性を具備した溶媒として作用するのではないかと考えられる。

抽出時の加熱処理は、細胞膜を形成する蛋白を変性させ、細胞内に含まれている諸成分の溶出を助長し、さらにヌクレアーゼなどの酵素の不活性化にも寄与すると考えられるが、特に興味をひくことは、抽出される RNA の純度に影響を与えることである。

温和な条件で抽出した粗 RNA の赤外吸収スペクトルを標品のそれと比較すると、1700~1600 cm^{-1} にわたる幅広い吸収が全体に弱く、特に 1680 cm^{-1} の吸収が弱い。これに対し蛋白特有の 1570~1500 cm^{-1} にいたるゆるやかな吸収が強くあらわれる。そして処理条件が厳しくなるにつれて、吸収は標品に類似してくるが、一方、低温処理の場合には処理時間が長くなっても高温処理ほど純度は上昇していない (図3)。

図3 RNA 抽出分の赤外吸収スペクトル

No.	①-1	①-2	①-3	①-4	②-1	②-2	②-3	②-4
抽出温度 (°C)	70	70	70	70	100	100	100	100
条件時間 (hr)	0.5	1.0	2.0	3.0	0.5	1.0	2.0	3.0

また粗 RNA の収率は低温処理の方が高温処理よりも高いが、これは抽出条件が温和な場合、今回行った精製方法では分離不能の不純物が含まれているためであり、抽出される RNA としての量は加温条件が 70~100°C ではほとんど差がないと言える (表1)。

このようなことから、ハイドロトロピック溶液のリボ核蛋白を分解する能力は小さく、RNA の大半は蛋白と結合した状態で溶出するが、加熱処理によって分解し脱蛋白反応が進むのではないかと推定される。

ハイドロトロピック溶液中では、溶質が塩によって保護されているので分子間の反応は抑制されるが、分子内での反応は進むと言われている。前述したリボ核蛋白の分解も、これにあてはまるが、遊離の状態で溶解している核酸や蛋白およびその他の溶質諸

成分も、加熱処理中に内部的な分解を生ずることは当然予想される。分子量の尺度と考えられる $\epsilon(P)$ を X・S・Na 抽出標品および市販工業用核酸標品について測定した(表2)。X・S・Na 抽出核酸は市販工業用核酸標品と同程度またはそれ以上の $\epsilon(P)$ を示しているが、分子量約 27000 の S-RNA の $\epsilon(P)$ が 6560 であり、市販標品の分子量が約 10000 であることを考えれば、かなり低分子化している。市販工業用 RNA の抽出は種々の中性塩類溶液中での加温抽出によるものと推定されるが、X・S・Na による

表2 RNA の $\epsilon(P)$ 値

試料	$\epsilon(P)$ 値 ^{b)}	平均鎖長 ^{c)}	分子量
市販工業用核酸標品 A	8380	28	10000
〃 B	7770	30	11000
X・S・Na 抽出 RNA ^{a)}	8190	—	—

a) エタノール前処理 X・S・Na 抽出法。

b) 0.005 Trisbuffer 中で 0.01 mol MgCl₂ (最終濃度) を添加し測定。

c) PMase による末端 P の定量による方法。

抽出の場合、3 時間の加温抽出を行なっているため、RNA の加熱分解による低分子化と考えられる。

今回の実験では RNA の収量、純度に主点を置き、苛酷な温度条件をとったため、前述のように加熱処理による RNA の崩壊が認められたが、ハイドロトロピック溶剤の特性から考えて他の溶剤よりもより安定な状態で抽出されと考えられ、温和な抽出条件で行なえば、RNA は比較的天然に近い状態で抽出される可能性がある。抽出条件ならびにそれに伴う RNA の性状については、稿をあらためて報告する。

RNA および蛋白以外に、約 5% 前後の成分が同時に抽出され、中には興味ある物質も含まれているが、ハイドロトロピック溶液による抽出操作は生体成分の抽出方法としてきわめて有用な方法と考えられる。

酵母よりの核酸抽出に関する速度論的研究

(昭和 43 年 10 月 12 日 受理)

高橋 貞夫・梅田 貞夫^{*1}

酵母よりの核酸抽出について、抽出速度式と、連続完全混合槽における定常、および定常状態にいたるまでの過程について理論的解析を行ない、実験結果と比較検討した。

抽出速度は、イ) 酵母よりの液境膜を通しての核酸の移動が律速であり、ロ) 酵母が非常に小さいために菌体内での核酸の濃度勾配は無視しえ、菌体内に均一に溶解しているとの仮定のもとに

$$\frac{dc}{d\theta} = kA_0(c_s - c)$$

が成立する。

これにもとづき連続完全混合槽について解析を行なえば、定常状態では第 n 槽での核酸濃度は、

$$\frac{c_s - c_n}{c_s} = \frac{1}{(1 + kA_0\theta_n)^n}$$

定常状態にいたるまでの過程で第 1 槽における濃度変化は、

イ) 空の槽内に流入しはじめてからオーバーフローしはじめるまでの期間については、

$$\frac{c_s - c_n}{c_s} = \frac{1}{kA_0\theta} (1 - e^{-kA_0\theta})$$

ロ) オーバーフローしはじめてから定常状態にいたるまでの期間については、

$$\frac{c_s - c}{c_s} = \frac{1}{(1 + kA_0\theta_n)} \left[1 + \left\{ \frac{1}{kA_0\theta_n} - \left(1 + \frac{1}{kA_0\theta_n} \right) e^{-kA_0\theta_n} \right\} \exp \left\{ \frac{-(1 + kA_0\theta_n)}{\theta_n} \theta \right\} \right]$$

で表わすことができる。

これらは実験結果と良く一致した。

このことは本実験条件での核酸抽出において、抽出速度は高分子核酸の酵母内での低分子化反応よりも、核酸の抽出液側境膜での移動が律速であると推測できる。

1 緒 言

酵母よりの核酸の調製については古くから数多くの研究がなされ、種々の調製法が案出されている。その代表的なものを述べれば、Clarke, Schryver¹⁾ は圧搾酵母を冷エタノール、熱エタノール処理の後、10% カセイソーダ水溶液で処理し核酸を抽出し

ており、Holden, Pirie²⁾ は 0°C で 1N カセイソーダにより抽出、塩酸で中和後残酵母を分離している。

Crestfield, Smith, Allen³⁾ は純度の高いドデシル硫酸ナトリウム 2% 水溶液により pH 6.5~6.7 (リン酸緩衝液) で熱抽出を行なっている。その他 Kirly⁴⁾, Gierer, Schramm⁵⁾ はフェノ

*1 Sadao TAKAHASHI, Sadao UMEDA 十条製紙株式会社 研究所秋田分室: 秋田市新屋島木町。

1) G. Clarke, S. B. Schryver, *Biochem. J.*, (London), 11, 319 (1917).

2) M. Holden, N. W. Pirie, *Biochem. J.*, (London), 60, 46 (1955).

3) A. M. Crestfield, K. C. Smith, F. W. Allen, *J. Biol. Chem.*, 216, 185 (1955).

4) K. S. Kirly, *Biochem. J.*, (London), 64, 405 (1956).