細菌アミラーゼに関する研究 (第 27 報)*

細菌アミラーゼの産生機構 (その 10)

酵素産生と核酸代謝との関係

福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典 (大阪市立大学理学部)

昭和 34 年 7 月 20 日 受理

1941 年 Caspersson 等⁽¹⁾は細胞の核酸量と蛋白合成との間に密接な関係があることを指摘したが, Spiegelman 等⁽²⁾や Creaser⁽³⁾ によって報告されたように核酸塩基アナログが酵素生成を阻害する事実もまた核酸の蛋白合成への関与を示唆するものであろう。また最近多くの人々によって活性化アミノ酸の蛋白質へのインコーポレーションの問題が取上げられているが, これ等の研究⁽⁴⁻⁶⁾は蛋白合成と核酸との関係を更に明確にするものと思われる。

著者等^(7,8)はさきに *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto の洗滌細胞を用いた実験で細菌アミラーゼの産生が 8-アザグアニン (8-AG) 或いはチオウラシル (TU) の添加によって阻害されることを報じたが, その後これ等核酸塩基アナログの酵素産生に及ぼす影響は炭素源として用いた糖の種類によって著しく異なること, また 8-AG が存在すると細胞はそれをリボ核酸 (RNA) の構成成分とすること等が判明したので, それ等の実験結果について報告する。

実 験 の 部

1. 実験方法

1) 供試菌, その培養条件, 洗滌細胞の調製法及びアミラーゼの測定法は前報⁽⁹⁾に準じた。振盪液に分泌される核酸塩基の紫外吸収は DU 型ベックマン分光光度計により, 供試細菌の酵素吸収はワールブルグ検圧計を用いて測定した。

2) RNA 塩酸分解物の調製法: M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml に乾物量として約 2 g の洗滌細胞を懸濁し, それに 2.0% ガラクトース液 40 ml, 1.0% ポリペプトン液 20 ml 及び 0.01 M Na-8-AG 溶液 40 ml (または蒸留水 40 ml) を加え, 37° で 4 時間振盪した後, 遠心分離によって細胞を集め, それを蒸留水にて 2 回洗滌した。ついでその細胞を予め冷却した 5% トリクロール醋酸 (TCA) 溶液 30 ml に懸濁し冷所 (5°) に 10 分間放置した後遠心分離してその上澄液を酸可溶性区分として分ち, 一方沈澱は 5% TCA 溶液にて 1 回, エーテルにて更に 2 回洗滌した後エーテル酒精混液 (1:1) 50 ml に懸濁して 10 分間煮沸した。冷却後不溶物を遠心分離によって集め, それを等容の 2 N 苛性カリ溶液に投じて室温に 24 時間放置した。後これに 60% 過塩素酸を加えて pH を 6.0 とし, 生ずる沈澱 (過塩素酸カリ) を濾別し, 濾液に過塩素酸を終濃度 5% になるよう加え, 生ずる沈澱 (デオキシリボ核酸及び蛋白質) を遠心分離によって除いた。上澄液を 5 N 苛性カリ溶液にて中和し, 生ずる沈澱 (過塩素酸カリ) を除いた後その濾液に等容の 2 N 塩酸を加え 100° にて 1 時間加熱分解した。冷却後分解物を減圧下に濃縮乾固し, それを少量の蒸留水に溶解して分析に供した。

3) RNA 塩酸分解物の濾紙クロマトグラフィ: 上記分解物を東洋濾紙 No. 131 に点滴し, それを pH 10 のアンモニア水を溶媒として上昇法により 6 時間展開した。濾紙上に展開された RNA 分解物は科研製遠紫外用フィルターを用いて検出し⁽⁷⁾, それを同時に行った標準核酸塩基類の濾紙クロマトグラフィと比較した。なおアデニン, グアニン等天然に存在するプリン及びピリミジン類は紫外線照射によって黒色のスポット (写真では白いスポット) を与えるが, 8-AG 及びそのヌクレオチドは紫色の特有の螢光 (写真では黒色のスポットとなり判定がやや困難である) を発するので, 天然の塩基類と容易に区別出来た。

II. 実験結果

1) 核酸塩基アナログによるアミラーゼ産生阻害: 前報⁽⁷⁾で報じたように乳糖炭素源の場合, アミラーゼ産生は M/400 Na-8-AG の添加によってある程度阻害されたが, M/75 TU によっては僅かに阻害されるにすぎな

* Studies on Bacterial Amylase. Part XXVII. Formation of Bacterial Amylase. (X) Relationships between the Enzyme Formation and the Nucleic Acid Metabolism.

By Juichiro FUKUMOTO, Takehiko YAMAMOTO and Daisuke TSURU (Institute of Polytechnics, Osaka City University)

第 1 表 アミラーゼ産生に及ぼす核酸塩基アナログの影響

細胞 80 mg, 糖 0.4%, 磷酸塩 M/12, 全容 12 ml, pH 7.0, 37°, 4 時間振盪

糖	—		+		—	
	—		—		+	
Na-8-AG (M/500)	—		+		—	
TU (M/75)	—		—		+	
糖	Q _{O₂}	アミラーゼ	Q _{O₂}	アミラーゼ	Q _{O₂}	アミラーゼ
—	16	5.8	14	4.7(19)*	16	5.8(0)*
グルコース	97	6.8	95	1.0(85)	94	3.0(56)
ガラクトース	54	22.5	53	13.0(40)	52	18.5(18)
マルトース	85	15.0	88	1.5(90)	84	5.3(65)
ラクトース	52	20.0	52	9.0(55)	50	13.0(35)

* 阻害率 = $\frac{a - (\text{塩基アナログ存在下の酵素産生})}{\text{塩基アナログ無添加時の酵素産生}(a)} \times 100$

第 2 表 窒素源存在下のアミラーゼ産生に及ぼす核酸塩基アナログの影響

実験条件は第 1 表に同じ。

糖	—		+		—	
	—		—		+	
Na-8-AG (M/500)	—		+		—	
TU (M/75)	—		—		+	
ポリペプトン(1mgN/ml)	+		+		+	
糖	Q _{O₂}	アミラーゼ	Q _{O₂}	アミラーゼ	Q _{O₂}	アミラーゼ
—	38	8.0	—	—	—	4.0(50)*
グルコース	120	34.0	117	2.0(94)*	115	5.9(83)
ガラクトース	80	42.0	78	5.0(88)	78	7.2(83)
マルトース	109	36.2	109	3.6(90)	105	4.7(87)
ラクトース	82	47.5	82	7.5(84)	80	7.8(84)

* 阻害率: 第 1 表参照

にはアデニン, グアニンの他にピリミジンのヌクレオチドと思われる 2 つのスポットが検出され, 一方 Na-8-AG 存在下に振盪した細胞の RNA の酸加水分解物中には上記 4 つのスポットの外に 8-AG (紫外線照射によって紫色の蛍光を発する) のスポットが検出された。

3) 細胞振盪液中に分泌される核酸塩基とその経時的变化: 著者等⁽⁷⁾はさきに供試菌の洗滌細胞を炭素源及び磷酸塩存在下に振盪するとかなりの量の遊離塩基が振盪液中に分泌され, その量はアミラーゼの生成とむしろ逆比例的の関係にあることを見出したが, その後グルコース及びガラクトースをそれぞれ炭素源として細胞を振盪し, その振盪濾液の示す紫外部吸収を経時的

第 1 図 8-AG 存在下に振盪した細胞の RNA

塩酸分解物の濾紙クロマトグラフィ

- A: 正常細胞の RNA の酸加水分解物
 B: Na-8-AG 存在下に振盪した細胞の RNA の酸加水分解物
 C: アデニン (a) 8-AG (b)
 D: シトシン (c) ウラシル (d)
 E: 酵母 RNA の酸加水分解物

かった。しかし供試菌の細胞呼吸を著しく増大させるグルコースやマルトースを炭素源とした場合にはアミラーゼ産生はそれ等核酸塩基アナログにより顕著に阻害された(第 1 表)。しかし第 1 表の実験を窒素源(ポリペプトン)の存在下で行った結果, この場合には糖の種類が如何にかかわらずアミラーゼ産生は上記塩基アナログによって顕著に阻害された(第 2 表)。

2) Na-8-AG 存在下に振盪した細胞の RNA 塩基組成: 前記の方法によって Na-8-AG 存在下に細胞を振盪し, その細胞の RNA を塩酸にて加水分解し, それについて濾紙クロマトグラフィ試験を行った。その結果を第 1 図に示す。即ち正常細胞の RNA の塩酸加水分解物中

第 2 図 振盪濾液による紫外部吸収の時間的变化

(細胞 80 mg, 糖 0.4%, 磷酸塩 M/12, pH 7.0, 全容 12 ml)

A: ガラクトース (30.0)* B: A+CP** (3.5)

C: グルコース (6.0) D: C+CP (0.1)

* 振盪 6 時間後のアミラーゼ/ml

** クロラムフェニコール (25 γ/ml)

に検討した結果(第 2 図), いずれの場合も振盪の初期からかなりの速度で遊離塩基を分泌することが判った. またその量は細胞の振盪時間と共に増大した(第 2 図に示す紫外吸収が遊離の核酸塩基によるものであることは濾紙クロマトグラフィやその抽出物の紫外吸収曲線によって証明された). また前報の結果⁽⁷⁾と同じく或る時期までの遊離塩基の分泌量はグルコース炭素源の場合或いはクロラムフェニコールを添加した場合に大であった.

考 察

第 1 図に示したように Na-8-AG 存在下に振盪した細胞は 8-AG を構成塩基の一つとする異常 RNA を生成することが明かになったが, このような異常 RNA の生成は当然細胞の種々の機能に影響を及ぼすと考えられ, その一つとして 8-AG によるアミラーゼ生成の阻害が現われるものと思われる. また細胞呼吸を著しく増大させるグルコースやマルトースを炭素源とした場合, Na-8-AG の酵素産生に対する阻害が顕著になる事実はいずれ等糖類炭素源に於ては細胞の核酸代謝が旺盛で, 従ってそれだけ異常 RNA の生成が増大するためと考えられる. なお窒素源無添加の場合グルコースはアミラーゼ産生に対し無効か或いはむしろ阻害的に働くが⁽¹⁰⁾, このことは本報の実験結果から推察されるように, グルコース炭素源では細胞の核酸代謝やその他の窒素代謝等アミラーゼ生成系以外の反応系が旺盛であるため, 細胞内のアミラーゼ素材がその方に利用されることを示唆している.

前報⁽⁷⁾及び本報の第 2 表に示したようにポリペプトン等の窒素源を併用した場合アミラーゼ産生は Na-8-AG の添加によって特に顕著に阻害された. この結果は恐らく窒素源の供給により細胞の種々の代謝が旺盛となり, それに並行して異常 RNA の生成もまた増大したためであろう. この事は窒素源存在下に振盪した細胞の RNA 量は窒素源なしに振盪した細胞のそれよりかなり大である事実⁽¹¹⁾からも妥当であると思われる.

洗滌細胞を炭素源存在下に振盪すると, 振盪の初期からかなりの速度で, 核酸構成塩基が振盪液中に分泌されていることが判った(第 2 図). 従って前報⁽⁷⁾で報じたように細胞振盪の途中で 8-AG を加えると, それによるアミラーゼ産生阻害が少くなるのは或いは細胞外に分泌された塩基ホモログによって塩基アナログの作用が消去されるためとも思われるが, このことについては別報に於て述べる.

要 約

Bacillus amyloliquefaciens Fukumoto の洗滌細胞を用いてアミラーゼ産生と核酸代謝との関係を検討した結果, 次のことが判明した.

- (1) アミラーゼ産生は核酸塩基アナログである 8-アザグアニン及びチオウラシルにより阻害される. しかしその阻害度は炭素源として用いた糖の種類によって異り, 細胞呼吸を増大させるグルコースやマルトースを炭素源とした場合に特に著しい.
- (2) またこれ等塩基アナログによるアミラーゼ産生の阻害は窒素源の存在によって著しく大となる.
- (3) Na-8-AG 存在下に生成される細胞 RNA 中には構成成分として 8-AG が含まれる.
- (4) 洗滌細胞を好氣的に振盪すると遊離状態の核酸塩基が振盪液中に蓄積して来る. その量は使用糖類の種類によって異なるが, いずれの場合も時間と共に増大する.

(1) T. Caspersson, H. Landström-Hydén, L. Aquilonius : <i>Chromosoma</i> , 2, 111 (1941).	(6) P. Berg, E. J. Ofengand : <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.</i> , 44, 78 (1958).
(2) S. Spiegelman, H. O. Halvorson, R. Ben-Ishai : A Symposium of Amino Acid Metabolism, p. 124 (1955).	(7) 福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典 : 本誌, 31, 807 (1957).
(3) E. H. Creaser : <i>Biochem. J.</i> , 64, 539 (1956).	(8) J. Fukumoto, T. Yamamoto, D. Tsuru : <i>Nature</i> , 180, 438 (1957).
(4) H. B. Hoagland, P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson : <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 24, 215 (1957).	(9) 福本寿一郎, 山本武彦 : 本誌, 31, 421 (1957).
(5) P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, L. I. Hecht : <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.</i> , 44, 73 (1958).	(10) 福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典 : 本誌, 31, 506 (1957).
	(11) 福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典, 覚前 貢 : 未発表.