[農化 第36巻, 第3号, p. 277~281, 1962]

微生物の生産するフォスフォジエステラーゼに関する研究 (第1報)*

5'-フォスフォジエステラーゼを有する菌株の検索方法について

杉本 洋, 岩浅 孝, 石山二郎, 横塚 保 (野田醤油株式会社中央研究所)

昭和36年8月24日受理

緒 言

微生物の生産する 5'-フォスフォジエステラーゼ (または 5'-リボヌクレアーゼ) に関しては *Penicillium citrinum*⁽¹⁾, *Asterococcus mycoides*⁽²⁾, *Azotobacter agile*⁽³⁾, *Clostridium acetobutylicum*⁽⁴⁾ の他, 広く各種の糸状菌, 放線菌, 及び細菌類⁽⁵⁾等にその存在が指摘されている. 著者等は主として糸状菌及び放線菌中, 5'-フォスフォジエステラーゼを有する菌株の検索方法として, 主としてペーパークロマトグラフィーによる方法を中心に検討を加えたので結果を報告する.

方法及び結果

(1) 酵母リボ核酸分解力の検定 種々の菌株中, 酵母の RNA を比較的強力に分解する能力を有する菌株の予備的選択方法として国中は濾紙ディスクを用い, 比較的簡便な操作で寒天板上で検定する方法を考案した⁽⁶⁾.

しかしながら, 原報では pH 4.0 においてこの操作を行なっているが放線菌では一般にその分解に適な pH が 6.0~8.0 附近に存在する菌株が多く, 糸状菌にもまたこれと類似した性質を示したり, 或いは極めて広い pH 領域に亘って同様な分解能を示す菌株があり, さらに中尾等によれば, 同一菌株でも分解時の pH 条件を変化させることによってその分解生成物も 3'-モノヌクレオチドまたは 5'-モノヌクレオチドに変化させる場合があるという⁽⁷⁾. そこで, pH 条件を変えてこの予備選択を行なうのは意味があることである. しかし例えば pH 6.0, 或いは pH 8.0 等で検定を行なう場合, 原報に準じた場合, 分解残余の RNA, oligonucleotide の沈澱が生成し難い等の障害を生じたので, 緩衝液の条件及びトリクロル酢酸濃度, 平板作製時の温度条件等を検討した結果, 第1表の方式に原報を改良し, ほぼ満足すべき結果を得た.

なお phosphate buffer 及び citrate buffer はそれぞれ, 前者は化学的に, 後者は酵素的に悪影響を生ずる場

第1表 予備選択用検定基調製条件

pH	4.0	6.0	8.0
緩 衝 液	M/10 酢酸ソーダ-酢酸	M/10 Tris-maleate-NaOH	M/10 硼酸塩混合液
トリクロル酢酸*	2.5%	10.0%	10.0%
平板作製温度**	—	50°>	50°>

* この濃度のトリクロル酢酸水溶液に酢酸ウラニウム 0.25% を溶解し沈澱試薬とする.

** pH 6.5 及び pH 8.0 においては寒天平板を作製する際, 可及的低温で行わなければ沈澱反応は不明瞭になる.

第2-1表 糸状菌用培地組成

グルコース	3.0%
ポリペプトン	1.0%
酵 母 RNA*	0.05%
KH ₂ PO ₄	0.05%
K ₂ HPO ₄	0.05%
CaCl ₂	0.02%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%
ビオチン, パントテン酸, ニコチン酸,	
チアミン, リボフラビン各 1γ/ml	
pH	6.0

* 東京化成製品

第2-2表 放線菌用培地組成

A培地: Waksman 培地	
グルコース	1.0%
ポリペプトン	0.5%
肉 エ キ ス	0.5%
NaCl	0.5%
pH	7.0
B培地:	
グルコース	1.0%
ポリペプトン	0.5%
コーンステイブ	1.5%
NaCl	0.5%
pH	7.0

* Studies on Phosphodiesterases produced by Microorganisms. Part I. On the Method for the Selection of the Microorganisms Possessing 5'-Phosphodiesterases.

By Hiroshi SUGIMOTO, Takashi IWASA, Jiro ISHIYAMA and Tamotsu YOKOTSUKA (Central Research Institute of Noda Shōyu Co., Ltd.)

第 3 表 ペーパークロマトグラフィー供試液調製法

合が多く使用を避けた。なお、酵素液としては振盪、または静置培養の培養濾液をそのまま使用し、培養日数は糸状菌 3~5 日、放線菌 2~3 日とした。それぞれの培地組成を第 2-1 表及び第 2-2 表に示す。なお、培地に少量の RNA を添加しているのは適応的に力価の上昇が見られる菌株が若干見られたからである。

(2) ペーパークロマトグラフィー供試液の調製

方法の概略を第 3 表に示す。本方法は Le Page のバリウム塩沈澱分割法⁽⁸⁾を改良したものである。関口⁽⁹⁾及び真野⁽¹⁰⁾はそれぞれ、本方法の欠陥として各種ヌクレオチド中、特に di, triphosphate の分割が不完全である点を指摘しているが、著者等の場合においてはこれらのヌクレオチドは殆んど無くオルソ磷酸の存在がスポットの検出を磷酸基の検出の形で行なう場合に多少問題になる程度で、第 3 表中、括弧内の濾別操作は省略しても差支えはなかった。また大村等が既に認めている如く⁽¹¹⁾、IR-120 樹脂の使用は共存カチオンの除去、従って ghost spot や tailing 等の防止に極めて効果的であって、この条件下ではウラシル及びウリジンの一部を除き混在する他の塩基やヌクレオサイドの大部分も吸着除去できるので、クロマトグラフィーに好結果をもたらすことも判明した。

(3) ペーパークロマトグラフィー展開溶剤の選択

ヌクレオチドのペーパークロマトグラフィー溶媒としては実に多種多様なものが文献等⁽¹²⁾にも見られるが、著者等の場合には AMP, GMP, UMP, CMP の 4 種のヌクレオチドの 2'-, 3'-, 5'-異性体、場合によってはこれに IMP が混在し、加えてこれらのヌクレオチドや塩基の若干の混入も予想され、これら各種の核酸関連物質を或る程度 R_F 値の相異から判別し得ること、そのために R_F 値の変動が少なく再現性に富むこと、多少の夾雑物がある場合でも tailing 等の障害を生じ難いこと、室温で使用可能であること等の条件の下に適当な溶媒

第 4-1 表 Markham の溶媒組成 (V : V : V)

A	飽和硫酸溶液 : 1M 酢酸ソーダ	: イソプロパノール = 80 : 20 : 2
A'	" : pH 3.6 0.1M クエン酸緩衝液	: " = 79 : 19 : 2
A''	" : pH 9.6 0.1M クエン酸緩衝液	: " = "
A'''	" : pH 5.6 0.08M クエン酸緩衝液	: " = "

第 4-2 表 緩衝液の相異による R_F 値の変動

ヌクレオチド	A	A'	A''	A'''
5'-IMP (Na)	0.30	0.30	0.29	0.32
2'-GMP (Na)	0.52	0.49	0.49	0.51
3'-GMP (Na)	0.45	0.42	0.40	0.42
2'-AMP	0.32	0.30	0.30	0.32
3'-AMP	0.21	0.19	0.23	0.19
5'-AMP	0.40	0.38	0.38	0.40
3'-CMP	0.74	0.73	0.73	0.72
3'-UMP	0.74	0.74	0.73	0.72

* 20°, 東洋濾紙 No. 51, 上昇法。

を選択した。以上の観点からして、テトラヒドロフルフリールを使用する Carpenter⁽¹³⁾ の溶媒がまず挙げられるのであるが、追試した結果 R_F 値が原報と甚しく相異し、各 R_F 値間の距離も少なく不適当であって使用を断念した。結局、種々検討した結果、東洋濾紙 No. 51 または No. 51A に組合せるに次の 2 種の溶媒の使用でほぼ目的を達し得た。

第 1 は硫酸飽和溶液及びイソプロパノールを主体とする Markham の展開剤 (A)⁽¹⁴⁾ でこの場合の R_F 値は

3'-AMP が最小で、それから充分に離れて 2'-及び 5'-AMP のスポットを得、他のヌクレオチド、塩基、ヌクレオไซด์類との R_F 値による判別も容易で、AMP の示す R_F 値を指標として分解物ヌクレオチドが 2'-、3'-及び 5'-異性体中いずれに属するか判定が可能であり、また R_F 値の変動も比較的少ない長所を有するが展開剤の性質上、濾紙を乾燥した後も、大量の硫酸が残留してスポットの検出は紫外線吸収による以外、方法が無く紙面上での各種の検出反応を行なうことが困難な欠点を有する。Markham は類似の展開溶媒を数種報告しているが緩衝溶液の条件を変化させて R_F 値の変動を実測したのが第 4-1 表、第 4-2 表である。この結果、緩衝溶液の相異はその R_F 値にさほどには決定的な影響を与えず、さらに数回試行を繰返した結果、 R_F 値が最も安定と思われる展開剤 (A) を使用することにした。第 2 の溶媒は Magasanik のイソ酪酸-アンモニア水溶媒 [イソ酪酸 : 0.5N-NH₄OH = 10 : 6 (pH 3.6)]⁽¹⁵⁾ で、Markham の溶媒とは逆に R_F 値は 2'-AMP が最大、次に 5'-AMP、さらに離れて 3'-AMP が良くまとまったスポットとして出現し、他のヌクレオチドの R_F 値は AMP よりもいずれも小さい。すなわち AMP のスポットの示す R_F 値に注目すれば、分解物中のヌクレオチドが 2'-、3'-及び 5'-異性体中いずれに属するか判定が可能であり、さらに加えてこの溶媒の長所は紫外線吸収でスポットを検出した後に溶媒を乾燥除去した紙面上で過ヨード酸化、モリブデン酸アンモンによる燐の検出等、各種の呈色反応が用い得てその判定を一層、確実にできることである。

一方、短所としてはイソ酪酸はやや不安定な物質であって使用の都度、蒸溜し精製しないと R_F 値の変動を招き易い。両溶媒を用いた各種のヌクレオチド、ヌクレオไซด์、塩基類及びその他関連物質の R_F 実測値の一覧を第 5 表に示す。

特に溶媒 B を用いた場合、過ヨード酸化に次ぐ Schiff の反応⁽¹⁶⁾及び Hanes and Isherwood⁽¹⁷⁾の改良法で

第 5 表 2 種の溶媒における R_F 値

試料	溶媒 A	溶媒 B
5'-AMP	0.40	0.50
2'-AMP	0.32	0.55
3'-AMP	0.21	0.46
5'-GMP	0.56	0.34
2'-GMP (Na)	0.52	0.31
3'-GMP (Na)	0.45	0.31
5'-CMP	0.80	0.43
2'-CMP	0.74	0.47
3'-CMP	0.74	0.47
5'-UMP	0.80	0.31
2'-UMP	0.74	0.36
3'-UMP	0.74	0.36
5'-IMP (Na)	0.68	0.30
ア ジ ノ シ ン	0.19	0.73
グ ア ノ シ ン	0.44	0.50
シ チ ジ ン	0.69	0.61
ウ リ ジ ン	0.67	0.51
イ ノ シ ン	0.38	0.48
ア ジ ニ ン 硫 酸 塩	0.17	0.87
グ ア ニ ン 塩 酸 塩	0.26	0.58
シ ト シ ン	0.64	0.76
ウ ラ シ ル	0.60	0.56
キ サ ン チ ン	0.00	0.49
ハイボキサンチン	0.41	0.56
R-5-P		0.25
グ ル コ ー ス		0.35
D-リ ボ ー ス		0.46
オ ル ソ 燐 酸		0.47

(東洋濾紙 No. 51, 20° 上昇法)

A : イソプロパノール : 飽和硫酸水 : 1M 酢酸ソーダ = 2 : 79 : 19

B : イソ酪酸 : 0.5N-NH₄OH = 10 : 6 (pH 3.6)

* 試料は Sigma Chemical Co., Zellstoffabrik, Waldhof Inc., GBI, NBC, 和光純薬, 東京化成, 第一化学薬品, 大木製薬の各製品を使用。

あるモリブデン酸アンモンによる燐酸基の検出⁽¹⁸⁾を行なっても、混在物による判定混乱の危険は殆んど無いことが判る。すなわち、紫外線吸収性のスポットで過ヨード酸化に次ぐ Schiff の反応で青紫色に発色し、さらに同じ紙面の裏面よりモリブデン酸アンモン

第 1 図 RNA 分解形式とペーパークロマトグラム

による有機磷の検出を行なった場合は最も確実であって、これらの反応を同時に満足させる物質は 5'-ヌクレオタイドということになる。モリブデン酸アンモンによる磷酸基の検出を行わない場合は、ヌクレオサイドの判別が困難になるが、実際問題として R_F 値でも区別は可能であるし、供試液の調製さえ正しければ、大量のヌクレオサイドが混入して判定を妨害することはまず無いと思われる。また、グルコースを初め各種の糖類や R-5-P 等の糖磷酸は Schiff の反応で赤色ないし赤紫色に発色し、ヌクレオタイドの発色を妨害せず、区別もまた容易である。

第 1 図は実際の濾紙面におけるスポットの位置関係を両溶媒について示したもので、B については Buchanan の過ヨード酸化に次ぐ Schiff の反応を行なったと仮定してある。

(4) 5'-ヌクレオタイドの検出 5'-ヌクレオタイドの判定は前述の如く AMP 異性体の R_F 値を指標として純品と同時展開、比較することにより判定が可能であるが、さらに Buchanan 等による過ヨード酸化と Schiff の反応の組合せによって一層確実になる。ただし本方法は原法に従えば Markham⁽¹⁹⁾ も認めている如く反応がすこぶる不安定で過敏の傾向があり、検討の結果次のように反応条件を弱くすることにより非常に好結果を得た。

すなわち、乾燥したペーパークロマトグラムに 1% メタ過ヨード酸ソーダを充分量噴霧し乾燥を防ぎつつ室温に 30 分以上放置後(乾燥した場合は蒸溜水を噴霧)、 SO_2 ガスで紙面を処理、漂白後直ちに Schiff の試薬を噴霧、室温で放置乾燥させれば約 1~2 時間後、白地に鮮やかな青紫色のスポットを得る。なお、一般に良く使用されるカルバゾール反応⁽²⁰⁾は著者等の検討した範囲内では微量の夾雑物のために呈色が不確実になるきらいがあり、適用を避けた。

(5) 5'-フォスフォジエステラーゼを有する菌株について 著者等は以上の方法により各地の土壌より分離した各種糸状菌、放線菌類に関して検索を行ない、5'-フォスフォジエステラーゼないし 5'-リボヌクレアーゼを有する糸状菌 7 株、放線菌 7 株を得た。なお、検索した菌株は全部で約 3000 株である。著者等はさらに Potter 等⁽²¹⁾の Gradient elution method による Dowex-1 (ギ酸型) カラムクロマトグラフィーを行ない、これら 14 菌株の酵母リボ核酸分解物がすべて 5'-ヌクレオタイドに限られることを分離、同定、確認した。これらの菌株中には酵母 RNA を定量的に短時間のうちに 5'-ヌクレオタイドにまで分解する菌株もあり、その酵素的性質等についても興味ある事実が見出されているが、詳細は次報にゆずる。

要 約

5'-フォスフォジエステラーゼないし 5'-リボヌクレアーゼを有する糸状菌及び放線菌の選択方法として、主としてその酵母 RNA に作用して生成するヌクレオタイドの異性体を同定するのにペーパークロマトグラフィーを用い、比較的、簡便かつ確実と思われる方法に関して検討を行ない、一方式を提示した。

著者等はこの方法を用いて土壤中より該当する糸状菌、放線菌 14 菌株を得た。

本報告を終了するに当り御懇篤な御指導を賜りました理研、坂口謹一郎先生、東大農学部、有馬啓教授、同応微研、池田庸之助教授、当研究所所長、茂木正利博士、貴重な菌株の御分譲を賜りました東大応微研第 1 研究部、阪大醸酵工学教室、北大応用菌学教室、財団法人醸酵研究所、都立八丈高校教官、日高章氏、本実験に御協力頂きました同室の石川道子嬢初め所内の各位、最後に本報告の発表を御許可されました本社首脳部の各位に厚く御礼申し上げます。

- (1) A. Kuninaka, S. Otsuka, Y. Kobayashi, K. Sakaguchi: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 239(1959).
- (2) P. Plakett: *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 664(1957).
- (3) A. Stevens, R. J. Hilmoe: *Federation Proceedings*, **18**, 332(1959).
- (4) 杉森恒武, 塚田陽二, 北代次郎, 片桐英郎: 日農化会大会シンポジウム講演要旨, p. 1(1961).
- (5) 大村栄之助 他: 日農化会関東支部第 2 回大

- 会シンポジウム講演要旨, p. 8(1960).
- (6) 国中 明: 本誌, **29**, 797(1955).
- (7) 中尾義雄, 緒方浩一: 日農化会関東支部第 2 回大会シンポジウム講演要旨, p. 9(1960).
- (8) G. A. Le Page: "manometric techniques and tissue metabolism", 1951, p. 185.
- (9) 関口豊三・生化学, **26**, 476(1953).
- (10) 真野嘉長: 同上, **27**, 62(1954).
- (11) 大村京生, 福士定雄: 本誌, **27**, 516(1953).
- (12) 佐藤清夫: 蛋・核・酵, **2**, 57(1957).
- (13) R. O. Carpenter: *Anal. Chem.*, **24**, 1203.

- (1952).
- (14) R. Markham, J.D. Smith : *Biochem. J.*, **49**, 401(1951).
- (15) B. Magasanik, E. Vischer, R. Doniger, D. Elson, E. Chargaff : *J. Biol. Chem.*, **186**, 37 (1950).
- (16) J. G. Buchanan, C. A. Dekker, A. G. Long : *J. Chem. Soc.*, 3162(1950).
- (17) C. S. Hanes, F. A. Isherwood : *Nature*, **164**, 1107(1949).
- (18) P. Boulanger, J. Montreuil : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 784(1951).
- (19) R. Markham : *Modern Method of Plant Analysis*, **4**, 269 (1955).
- (20) Z. Dische, E. Landsberg : *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 193(1957).
- (21) R. B. Hurlbert, H. Schautz, A. F. Brumm, V. R. Potter : *J. Biol. Chem.*, **209**, 23 (1954).
-