微生物の生産する核酸分解酵素に関する研究 (第 2 報)

Pellicularia 属菌の生産する phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) 粗酵素液の性状

藤村有信, 長谷川安弘, 金子安之, 土井新次 (名古屋大学農学部農芸化学科)

昭和 39 年 2 月 10 日 受 理

緒 言

第 1 報⁽¹⁾において *Pellicularia* sp. H-11 の 5'-ヌクレオチド生成におよぼす培養条件を検討し, 肉エキスあるいは $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を適量添加して培養することにより該酵素活性が高められることを報告したが, これに関連して本報では本菌から得た粗酵素液の性質について現在までに得られた結果を報告する。

実 験 方 法

1. 酵素液 グルコース, 5.0%; 肉エキス (ミクニ), 0.25%; ポリペプトン, 0.5%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; pH 6.0 の培地で *Pellicularia* sp. H-11 を 30°, 6 日間振盪培養して得られる培養液をあらかじめガーゼでろ過し, そのろ液を東洋汙紙 No. 2 でろ過した透明液を粗酵素供試液とした。

2. Phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) の測定 第 1 報と同様, 酵母 RNA の分解によって生ずる 5'-ヌクレオチドをハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼで分解し, 生ずる無機磷から求めた。

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加培養粗酵素液により RNA を分解後, 5'-ヌクレオチダーゼを作用させる前にこの RNA 分解液を Amberlite IR-120 で処理する場合は, この樹脂をグラスフィルターで吸引ろ過して水分をできる限り除去し, 小匙で約 0.5 ml を RNA 分解液に加えて振盪後, その上清を 5'-ヌクレオチダーゼ反応に用いた。この処理では 5'-ヌクレオチダーゼ反応前の無機磷は無処理の

場合と有意の差は認められなかった。

5'-モノヌクレオチド収量は RNA を過塩素酸で分解して得られる全磷から算出した。

3. ヌクレオチダーゼの測定 5'-および 3'-モノヌクレオチドを基質として, 粗酵素液の作用によって生ずる無機磷を定量してその活性を求めた。

実験結果および考察

I. Phosphodiesterase (5'-nucleotide forming)

1. 最適作用条件: ペロナール-酢酸, およびトリス緩衝液を用いて種々の pH ならびに温度における phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) 活性を検討した結果, 第 1 図および第 2 図に示したとおり, pH 6.0, 60° が最適条件と認められた。

2. pH に対する安定性: 粗酵素液を 1N-HCl または

第 1 図 作用 pH
 50 mg/ml RNA 0.4 ml
 粗酵素液 0.5 ml } 60°, 30 分
 緩 衝 液 3.1 ml

* Studies on Nucleases produced by Microorganisms. Part II. Properties of Phosphodiesterase (5'-Nucleotide Forming) Produced by *Pellicularia* sp.

By Yushin FUJIMURA, Yasuhiro HASEGAWA, Yasuyuki KANEKO and Shinji DOI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Nagoya University)

第2図 作用温度

50 mg/ml RNA 0.2 ml
粗酵素液 0.1 ml } 30 分
緩衝液 (pH 5.0) 1.7 ml

第3図 pH に対する安定度

NaOH と上記の緩衝液により種々の pH に調整し、室温に1夜放置後、該酵素活性を測定した結果、第3図のとおりであった。pH 5.0~6.0 付近では非常に安定であった。

3. 熱に対する安定性：粗酵素液を pH 5.4 で 37° および 60° で 10~120 分熱処理してその安定性を検討した結果、第4図に示したとおりであり、37° では120分後も全く失活は認められなかったが 60° では 30 分以後失活し 60 分後 40% の失活を示した。

II. ヌクレオチダーゼ

基質として 5'-AMP および 3'-AMP を用い、粗酵素液中のヌクレオチダーゼ活性の有無を検討した結果を第5図に示した。すなわち 3'-AMP はほとんど定量的に分解されて無機磷が放出されたが 5'-AMP は分解され

第4図 熱に対する安定度

RNA (50 mg/ml) 0.2 ml
粗酵素液 0.2 ml } 全量 2.0 ml
緩衝液 (pH 6.0) 1.6 ml

第5図 粗酵素液のヌクレオチダーゼ活性

全量 2.0 ml 37° { 0.01 M 5'-または 3'-AMP 1.0 ml
粗酵素液 0.1 ml または 0.2 ml
緩衝液 (pH 6.0) 0.9 ml または 0.8 ml

なかった。

III. RNA 分解における無機磷の生成

粗酵素液による RNA からの無機磷の生成は温度によって認められるほどの変化がなく、酵素量を増しても無機磷の増加は認められなかった。また作用 pH を変化させても無機磷の生成には変化が認められず、いずれの場合も生成する無機磷は RNA の全磷に対して 10% の値

であった。基質濃度を増せばそれに比例して無機燐の生成量も増加した。また、別の RNA 標品を基質とした場合、分解率は同等であるにもかかわらず、生成する無機燐は 5% 弱であった。acid phosphomonoesterase²⁾は NaF によって阻害されることが知られているが、本粗酵素による RNA からの無機燐量は NaF 0.001 M~0.1 M の存在では影響が認められなかった。以上のことから RNA からの無機燐生成量は 1 部は用いた RNA 自身に由来するものと考えられるが、なお不明の点があり、本酵素液の精製とともに再検討する。

IV. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加培養

第 1 報⁽¹⁾に報告したとおり、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% 添加培養地では無添加培養地に比べて 5'-フォスホジエステ

第 1 表 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加培養粗酵素液使用量
による 5'-ヌクレオチド生成量

	ハブ毒 5'-ヌクレオチ ダーゼによる P(O. D.)	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 無添加培養	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加培養
30 分 反 応*	0.138	0.286
2 時 間 反 応*	0.266	0.233

* 反応液組成

	30分反応	2時間反応
RNA (50 mg/ml)	0.2 ml	0.2 ml
粗 酵 素 液	0.1 ml	0.5 ml
緩 衝 液 (pH 6.0)	1.7 ml	1.3 ml

第 6 図 RNA の分解

pH 5.0, 60° A: RNA 分解% B: RNA からの無機燐

第 7 図 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ による 5'-ヌクレオ
チダーゼ作用の阻害
5'-AMP (0.01 M) 0.5 ml
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ } 全量, 2.0 ml
緩 衝 液 }

ラーゼ活性の高い酵素液が得られたが、この酵素液 0.5 ml を用いて 60°, 2 時間で RNA を分解した場合、第 1 表に示した通り、0.1 ml の酵素液で 30 分分解する活性測定用反応条件よりも生成する 5'-ヌクレオチドは小さい値を示した。このことは酵素液中に共存する Zn イオンにより、RNA の分解またはハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼが阻害されたものと考えられた。すなわち用いた酵素量が 5 倍であり、従って Zn イオンも 5 倍となり過剰になったことに起因すると考えられた。そこでまず Zn イオンによるハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼの阻害の有無を確認するため、5'-AMP の 0.01 M 溶液 0.5 ml に $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を種々の濃度に添加して 5'-ヌクレオチダーゼを作用させ、常法により遊離する無機燐を定量した。その結果は第 7 図のとおりであって、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05% 溶液) 0.02 ml [Zn 最終濃度, $1.14 \mu\text{g/ml}$ (1.75×10^{-5} M)] 添加まではハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼの阻害は現れず、0.05 ml [Zn 最終濃度, $2.84 \mu\text{g/ml}$ (4.37×10^{-5} M)] 以上の添加では阻害が現れた。酵素液 0.1 ml で 30 分、RNA を分解した場合はハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼ作用時の Zn 濃度は $1.42 \mu\text{g/ml}$ (2.18×10^{-5} M) であるから、酵素液 0.5 ml を用いて分解する場合はその 5 倍の Zn $7.1 \mu\text{g/ml}$ (1.1×10^{-4} M) が反応液中に存在することによって、ハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼが阻害され、5'-ヌクレオチドから遊離する燐は低い値を示す

ことが明かとなった。

次に RNA 分解反応における粗酵素液中の phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) および 5'-ヌクレオチド中の磷の測定におけるハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼに対する Zn イオンの影響を検討した。第 2 表は Zn 無添加培養粗酵素液を用い, (1) Zn を添加して RNA との反応を行いそのまま 5'-ヌクレオチダーゼを作用させた場合と, (2) Zn を添加して RNA と反応させた後 Amberlite IR-120 処理して溶存する Zn を除去してから 5'-ヌクレオチダーゼを作用させた場合, および (3) RNA 反応時には Zn を添加せず 5'-ヌクレオチダーゼを作用させる時に Zn を添加した場合について, 遊離される磷を測定比較した結果である。

(1) の場合は $2.84 \mu\text{g/ml}$ [最終濃度 $0.71 \mu\text{g/ml}$ ($1.1 \times 10^{-5} \text{ M}$)] の Zn 添加では酵素活性はむしろ対照より増加したが $5.7 \mu\text{g/ml}$ [最終濃度 $1.42 \mu\text{g/ml}$ ($2.2 \times 10^{-5} \text{ M}$)] 以上の添加では活性は低く現れた。しかし (2) の場合はすべて活性は増加した値を示した。

(3) の場合は 1.75×10^{-5}

M 以上の Zn 添加では活性は低く現れた。以上のことは AMP についての前実験とはほぼ一致し, 明らかに過剰の Zn によりハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼが阻害されること, および Amberlite IR-120 で処理することによりこの阻害は避けられることがわかる。また適量の Zn 添加では RNA の分解が促進されることが推定される。次に 0.05% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加培養酵素液について同様の実験を行った結果, 第 3 表のとおりであった。酵素液をそのまま用いる場合

第 2 表 RNA 分解および 5'-ヌクレオチダーゼ作用におよぼす Zn の影響 (1)

RNA 反応時		5'-ヌクレオチダーゼ反応時	5'-ヌクレオチダーゼによって遊離される無機磷 (O. D.)
0.05% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量 (ml)	Zn 濃度 (M)	Zn 濃度 (M)	
0			0.320
0.01	8.8×10^{-6}	2.2×10^{-6}	0.350
0.02	1.8×10^{-5}	4.4×10^{-6}	0.341
0.05	4.4×10^{-5}	1.1×10^{-5}	0.340
0.10	8.8×10^{-5}	2.2×10^{-5}	0.312
0.20	1.8×10^{-4}	4.4×10^{-5}	0.268
0.01	8.8×10^{-6}	Amberlite IR-120 処理	0.350
0.02	1.8×10^{-5}		0.350
0.05	4.4×10^{-5}		0.356
0.10	8.8×10^{-5}		0.355
0.20	1.8×10^{-4}		0.340
ZnSO ₄ ·7H ₂ O 無添加		0.05% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量 (ml)	Zn 濃度 (M)
		0.01	8.8×10^{-6}
		0.02	1.8×10^{-5}
		0.05	4.4×10^{-5}
		0.10	8.8×10^{-5}
		0.20	1.8×10^{-4}
RNA (50 mg/ml) 粗 酵 素 液 ZnSO ₄ ·7H ₂ O 緩 衝 液		0.2 ml 0.2 ml	全量 2.0 ml, 60°, 30 分

第 3 表 RNA 分解および 5'-ヌクレオチダーゼ作用におよぼす Zn の影響 (2)

実験 No.	RNA 反応組成						5'-ヌクレオチダーゼ反応時	5'-ヌクレオチダーゼにより遊離される無機磷 (O. D.)
	RNA	Enz. 1	Enz. 2	Mg	Zn	buffer	Zn 添加量 IR-120 処理*	
1	0.2	0.5	0	0	0	1.3	0	0.279
2	0.2	0.5	0	0	0	1.3	0.05	0.169
3	0.2	0.5	0	0.1	0	1.2	0	0.283
4	0.2	0.5	0	0.1	0	1.2	0.05	0.175
5	0.2	0.5	0	0.1	0.2	1.0	0	0.189
6	0.2	0.5	0	0.1	0.2	1.0	0	0.354
7	0.2	0.5	0	0.1	0.1	1.1	0	0.200
8	0.2	0.5	0	0.1	0.1	1.1	0	0.360
9	0.2	0.5	0	0	0.2	1.1	0	0.189
10	0.2	0.5	0	0	0.2	1.1	0	0.325
11	0.2	0	0.5	0	0	1.3	0	0.256
12	0.2	0	0.5	0	0	1.3	0	0.347

60°, 分解時間, 30 分

RNA : 50 mg/ml

Enz. 1 : Amberlite IR-120 (Na 形) で処理した粗酵素液

Enz. 2 : 無処理粗酵素液

Mg : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% 溶液

Zn : $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% 溶液

* + : Amberlite IR-120 処理, - : 無処理

表中の数字は ml.

第 4 表 RNA 分解および 5'-ヌクレオチダーゼ作用におよぼす Zn の影響 (3)

	5'-ヌクレオチダーゼにより遊離される無機磷 (O. D.)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O 無添加培養酵素液	0.100
(同上)+(0.05% ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 ml)	0.214
(同上)+(同上 RNA 分解後 IR-120 処理)	0.244
(同上)+(IR-120 処理酵素液)	0.076
ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.05% 添加培養酵素液	0.288

(実験 11, 12) は 5'-ヌクレオチダーゼの作用が阻害されるが, その作用前に Amberlite IR-120 で処理するとその阻害は除かれた. 酵素液をあらかじめ Amberlite IR-120 で処理した場合 (実験 1) は (実験 12) より酵素活性が低いが, これに $\text{Zn } 8.7 \times 10^{-5} \sim 1.75 \times 10^{-4} \text{ M}$ を添加して RNA を分解し, 分解終了後 IR-120 で過剰の Zn を除けば (実験 6, 8, 10) 酵素活性は (実験 12) とほぼ同一値となった. また上記の実験で Mg もやや効果があるようである.

ZnSO₄·7H₂O 添加および無添加培地で同一菌株を同時に培養して得られるそれぞれの酵素液について比較した結果を第 4 表に示した. 上記 2 種の培養酵素液で RNA を分解した場合, Zn 無添加培養の酵素液よりも添加培養の酵素液の活性は約 3 倍高い値であった. 前者に ZnSO₄·7H₂O 0.05% 溶液 0.1 ml を加えて (ZnSO₄·7H₂O 0.05% 添加培養酵素液 0.1 ml を用いた場合と Zn の最終濃度が等しい条件) 分解すると活性は 2 倍強に増加したが, 後者と同一値にはならなかった.

以上の結果から, Zn 添加培養酵素液の場合は, ハブ毒 5'-ヌクレオチダーゼ反応を行う前に Amberlite IR-

120 で過剰の Zn を除去しなければ酵素活性は低い値を示すこと, RNA の分解に Zn は促進的效果があることが認められたが, Zn 無添加培地中の肉エキス, ペプトン, その他に含有される Zn 量も無視できないと考えられ, この Zn 効果は単に phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) の活性化に役立っているのか, あるいはこの酵素の生成に必要なのか, あるいはまた別の原因によるものかは, 本酵素液の精製過程および精製標品についての検討をまたねばならない.

要 約

Pellicularia sp. H-11 の生産する phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) 粗酵素液について次のことを明らかにした.

(1) 本粗酵素液の phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) 作用は pH 6.0, 温度 60° が最適である.

(2) 本粗酵素液の phosphodiesterase (5'-nucleotide forming) は pH 5.0~6.0 で安定であり, 60°, 60 分の熱処理でその活性は 60% 残存する.

(3) 本粗酵素液中には 3'-ヌクレオチダーゼは含まれているが, 5'-ヌクレオチダーゼ活性はほとんど認められない.

(4) 本粗酵素液による RNA からの 5'-モノヌクレオタイドの生成は Zn イオン添加により高められる.

本研究の一部は日本農芸化学会中部支部第 34 回例会で講演した.

(1) 長谷川安弘, 中井孝雄, 金子安之, 土井新次 : 本誌, 38, 461 (1964).