リボ核酸またはポリウリジル酸をリン源としての

Ustilago zeae の培養*

柳田充弘, 内田庸子, 江上不二夫 (東京大学理学部生物化学教室)

昭和 39 年 6 月 2 日 受 理

緒 言

Glitz, Dekker⁽¹⁾ は, 黒穂菌 *Ustilago sphaerogena* が酵母 RNA を唯一の炭素源とする培地で, リボヌクレアーゼ T₁ によく似た, グアニル酸に特異的な細胞外リボヌクレアーゼを生産することを報告している。

著者らは, 同属の *Ustilago zeae* が, グルコースと無機塩のみの合成培地でも細胞外リボヌクレアーゼを生産し, またこの培地のリン源を酵母 RNA でおきかえると, 前述の培地の時よりもリボヌクレアーゼの活性は数倍増大し, ポリウリジル酸でおきかえた場合でも同様の現象が存在することをみいだした。またこの時のポリウリジル酸の消化のようすも研究したのであわせて報告する。

実験材料および方法

1. 菌株 *Ustilago zeae* (UAIA) 5346.

2. リボ核酸 培地用には酵母 RNA (東洋紡績大山工場製) を, *E. coli* のホスホモノエステラーゼで末端リンを除去したのを使い, ペーパークロマトグラフィー用には上記の RNA をフェノール法により精製したのを使った。

3. ポリウリジル酸 Chambers, Moffat^(2,3) らによるアミデート法で, 5'-UMP (武田薬品社製) から 5'-UDP を合成し, Beers⁽⁴⁾ の方法に従って, *Micrococcus lysodeikticus* のポリヌクレオチドホスホリラーゼを調製しポリウリジル酸を合成した。

合成ポリウリジル酸の分子量は, 末端リン量と全ヌクレオチド量のモル比からきめた。ポリウリジル酸の 1/250 (w/w) のホスホモノエステラーゼで, 0.1 M Tris (pH 8.1) 中で 37°, 18 時間反応させて, Fiske-Subbarow

法で遊離した末端リン量を定量した。ヌクレオチド量は 260 mμ の吸光度から計算して求めた。合成ポリウリジル酸の鎖の長さは, およそ 30 であった。分子量は約 1 万となる。

培地用として, 上述の方法で末端リンを除去したポリウリジル酸を調製した。

4. 培地および培養条件 培地としては, グルコース 5%, 硫酸アンモニウム 1%, 硫酸マグネシウム 0.04%, 塩化カルシウム 0.01% に, リン源としてそれぞれリン酸 1 カリウム 0.05%, リン酸 2 カリウム 0.05% を使ったものを培地 I, 酵母 RNA 0.1% を使ったものを培地 II, ポリウリジル酸 0.1% を使ったものを培地 III とする (前述のように末端リンはそれぞれ除去してある)。培養液は pH 7 に調整し, 100 ml にする。坂口フラスコで 30° で振盪培養する。菌は斜面培養から白金耳でとって接種した。

5. 生育度の測定 菌体濁度を測定した。培養液 1 ml を先の広いメスピペットで採り, 3,000 r.p.m., 10 分遠心して集めた菌体を Tween 80 水溶液 (100 ml の蒸留水に Tween 80 を 2 滴入れたもの) 5 ml に懸濁し 700 mμ の光学密度を測定した。光学密度が 0.5 以上のときは適当に希釈した。光学密度の測定値の 5 倍を ml 当たりの生育度とした。

6. リボヌクレアーゼ活性の測定および酵素単位, 比活性 Takahashi⁽⁵⁾ の方法に従った。リボヌクレアーゼ活性は培養液の遠心上清液を水で適当に希釈し, 0.1 ml を酵素液として測定した。DEAE セルロースで分画した部分精製標品は, 水で希釈すると活性の減少が認められたので, 0.1% ゼラチン水溶液で希釈した。

7. リボヌクレアーゼの DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー リボヌクレアーゼ T₁ の精製に用いられた Takahashi⁽⁵⁾ の方法に準じておこなった。

8. ペーパークロマトグラフィー 東洋濾紙 No. 51

* Culture of *Ustilago zeae* with RNA or Poly U as Phosphorus Source.

By Mitsuhiro YANAGIDA, Tsuneko UCHIDA and Fujio EGAMI (Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Science, the University of Tokyo)

A を使用し, 溶媒は次の 3 種の系を使用した.

溶媒 1 飽和硫酸アンモニウム: 酢酸緩衝液 0.1 M (pH 6.0): イソプロパノール (80:18:2) 上昇法.

溶媒 2 0.5 N アンモニア水: イソラク酸 (6:10) 上昇法.

溶媒 3 *n*-ブタノール: 水 (86:14) 下降法.

9. ポリウリジル酸の代謝産物の同定および定量法
適当な時間間隔をおいて採取した, 培地Ⅲの培養上清液 0.1 ml を溶媒 1, 3 で展開した. また溶媒 1 の各スポットは, 0.1 N 塩酸で 37°, 48 時間溶出し, 260 m μ の吸収をはかり定量した. 同時に紫外吸収スペクトルをとった.

なお, 培地Ⅰの培養上清液を同様にペーパークトグラフィで展開しても, 紫外吸収スポットは認められなかった.

実験結果

1. 培地Ⅰでのリボスクレアーゼ活性および生育度の時間変化

グルコースと無機塩だけの培地Ⅰで, pH 7.5 でのリボスクレアーゼ活性および生育度の時間変化を第 1 図に示す. 菌体は黄白色で, 培養後期の培養上清液は黄橙色になる.

2. 培地Ⅰでの菌体外リボスクレアーゼの DEAE セルロースによる分画およびこのフラクションの 2, 3 の性質

120 時間振盪培養した培養液の遠心上清液を 48 時間流水透析した液 30 ml を試料とした. 結果を第 2 図に示す. 活性の山は 1 つで, pH 4.5 の活性は pH 7.5 の活性の 1/4 である.

活性の極大のフラクションを 48 時間流水透析した液 (比活性 30) を用いて, 至適 pH, 熱安定性, 基質特異性等について予備的な実験を行った.

至適 pH は, 第 3 図に示すように pH 8~9 にある. ホウ砂緩衝液は阻害効果があるようである.

熱安定性については培養濾液 (pH 2.6) を 50°, 3 分間熱したら活性は

第 1 図 培地Ⅰでのリボスクレアーゼ活性および生育度の時間変化

○—○ Tris (pH 7.5) でのリボスクレアーゼ活性
△……△ 菌体生育度

完全になくなった. しかし透析や室温放置などでは活性の減少はみられなかった.

基質特異性については酵母 RNA を基質とした場合の分解産物を溶媒 1, 2 で展開した結果 (第 4 図) から, グアニル酸のホスホジエステル結合をよく切るというこ

第 2 図 培地Ⅰでのリボスクレアーゼの DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

Mixing Chamber 0.005 M Na₂HPO₄, 250 ml

Upper Chamber 0.25 M NaCl, 0.25 M Na₂HPO₄

●—● pH 7.5 でのリボスクレアーゼ活性
×—× pH 4.5 (酢酸緩衝液) でのリボスクレアーゼ活性
○……○ 流出液の 280 m μ の吸光度

第 3 図 pH 変化によるリボヌクレアーゼ活性の変化

- リン酸・クエン酸緩衝液
- トリス緩衝液
- △—△ グリシン・食塩・NaOH 緩衝液
- ×……× ホウ砂・NaOH 緩衝液

第 4 図 リボ核酸の分解産物のペーパークロマトグラフィー

左側は溶媒 I, 右側は溶媒 II

点をうった部分は塩酸蒸気によって蛍光が検出された部分。
反応溶液は Tris (0.1M) pH 8.1, 0.9ml, 酵素液 0.1 ml (酵素単位 16/ml) に RNA を 10 mg/ml になるように加える。

とがわかる。このフラクションをポリウリジル酸と反応させるとこん跡の UMP のスポットが認められる。

3. 培地 II, 培地 III での菌体外リボヌクレアーゼ活性および生育度の時間変化

RNA をリン源とした培地 (培地 II) およびポリウリジル酸をリン源とした培地 (培地 III) での生育度を第 5 図

に, リボヌクレアーゼの時間変化を第 6 図に, 培地 I との結果とあわせて示す。

生育は培地 I がもっともよく, つづいて培地 II, III の順であるが, 大差はなく培地 I は培地 III の 1.5 倍程度である。

pH 7.5 のリボヌクレアーゼ活性は, 培地 I は生育とおおむね同調するが, 培地 II, III は生育が定常状態に入

第 5 図 生育度の時間変化

- 培地 I での生育度
- △……△ 培地 II での生育度
- 培地 III での生育度

第 6 図 pH 7.5 のリボヌクレアーゼ活性の時間変化

- 培地 I
- △……△ 培地 II
- 培地 III

ってもふえつづける。定常期において培地Ⅱは培地Ⅰのおよそ5倍のリボヌクレアーゼ活性をもつ。これはリボヌクレアーゼの一種の誘導現象とみられる。

4. 培地Ⅲでのポリウリジル酸の消化のようす

培地Ⅲで、ポリウリジル酸がいつどのように消化されたかを調べるために、各時期の培養上清液を溶媒1で展開した。結果を第7図に示す。原点のスポットは(ポリウリジル酸)は44時間後には存在しない。この時期はリボヌクレアーゼ活性も、生育もともにまだほとんど観察されない時期である(第5図、第6図参照)。

培地にあらわれてくる代謝産物は R_F 0.5 付近のものと、 R_F 0.45 付近のものの2種であるが、これらは溶媒3のペーパークロマトグラフィー、紫外吸収スペクトルなどから、それぞれウリジン、ウラシルであることを同定した。第8図は各スポットの量的変化を示す。すなわちウリジンは50時間ごろに極大で、ウラシルは80時間以後およそ一定量をたもつ。

次にポリウリジル酸が細胞外リボヌクレアーゼによって消化されたかどうかをみるために、培養開始後20, 30, 44時間の培養濾液0.5 ml とポリウリジル酸を37°、

第7図 培地Ⅲの培養濾液のペーパークロマトグラフィー

第8図 培地Ⅲでの各スポットの量的変化

●—● ポリウリジル酸 ○……○ ウリジン
△—△ ウラシル

48時間反応させて溶媒1で展開したが、原点のスポットのみ存在した。以上からポリウリジル酸は菌体外リボヌクレアーゼによって消化されたのではなく、なんらかのかたちで菌体が直接関与しているのであろう。

考 察

Ustilago zeae が培地Ⅰ(グルコース・無機塩)で細胞外に生産するリボヌクレアーゼの部分精製標品をリボヌクレアーゼ T_1 と比較すると、酸性蛋白質であること、グアニル酸のホスホジエステル結合をよく切ること、至適 pH がアルカリ側にあること (T_1 では pH 7.5, この標品では pH 8~9) などの点でよく似ているが、熱耐性の点ではことなる。

培地Ⅰのリン源を RNA またはポリ U でおきかえると、培養液中のリボヌクレアーゼの活性は数倍増大するが、これは一種の誘導現象と考えられる。この酵素がグアニル酸のホスホジエステル結合を特異的に切る酵素であるならば、ポリウリジル酸のようなものによって誘導されることは興味ある問題である。それは今後検討されねばならない。誘導をひきおこす物質は必ずしも基質とはならないことは、 β -ガラクトシダーゼの誘導の例で古くから知られているが、これもその例であるかもしれない。またポリ U が分解されていることは、ポリ U を分解する酵素も同時に誘導されているのかもしれないことを示唆する。もし両者が同時に誘導されることが実証されれば、両酵素の生産が一つのオペロンに支配されているのではないと思われる。これらの問題は今後の実験にまたねばならない。

またこの誘導現象を利用するとリボヌクレアーゼを多量に得ることができる。国中の培地⁽⁶⁾(グルコース・ペプトンを含む)で培養した麴菌の培養液中にあらわれてくる pH 7.5 のリボヌクレアーゼ活性は酵素単位 5~10 で、培地Ⅲでの *Ustilago zeae* のそれはおよそ 80 で、10~15 倍活性が高い。添加する RNA が少量でよいこと (RNA を唯一の炭素源とすると生育が悪くなるから、RNA はリン源とした方がよい)、また麴菌の場合のように異種のリボヌクレアーゼ (T_2) を含まないようであるから、工業的にも意味があると考えられる。

培地Ⅲでポリウリジル酸は培養初期に培養上清液中からなくなるが、このとき菌体外酵素によって消化されたのではないようである。ポリウリジル酸の消化様式としては、ポリウリジル酸が細胞壁、細胞膜をそのまま透過し細胞内で消化されたのか、それとも細胞表層に存在する

酵素によって消化されたのかの 2 つの可能性が考えられる。

要 約

(1) 黒穂菌 *Ustilago zeae* は無機塩とグルコースだけの培地で生育し、細胞外リボヌクレアーゼを生産する。この酵素は DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって部分的に精製された。活性の山は 1 つで、比活性 30 のフラクションの至適 pH は 8~9 で、またグアニル酸ホスホジエステル結合をよく切る。

(2) *Ustilago zeae* は、末端リンのない RNA またはポリウリジル酸をリン源として利用し、無機リンをリン源とする場合と同じ程度に生育する。

(3) pH 7.5 のリボヌクレアーゼ活性は、リン源が RNA またはポリウリジル酸でおきかえられると数培増大する。ポリウリジル酸は生育が対数期にはいるまえに

培養濾液から消失し、代謝産物としてウリジン、ついでウラシルが培養液中にあらわれてくる。しかし、UMP は蓄積してこない。

この研究に協力していただいた三共株式会社研究所に深く感謝します。なお、この研究は文部省科学研究費によっておこなわれた。

- (1) D. G. Glitz, C. A. Dekker : *Fedr. Proc.*, **22**, 349 (1963).
- (2) R. W. Chambers, J. G. Moffat : *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 3752 (1958).
- (3) R. W. Chambers : *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 3032 (1959).
- (4) R. F. Steiner, R. F. Beers : "Polynucleotides", Elsevier Pub. Co. (1961).
- (5) K. Takahashi : *J. Biochem.*, **49**, 1 (1961).
- (6) 国中 明 : 本誌, **28**, 282 (1954).