Note

淡水底泥における DNA, RNA および核酸分解活性の分布

田畑真佐子・渡辺 昇・今川 直美・鈴木 静夫

Distributions of DNA, RNA and Nucleic Acid Decomposition Activity in Bottom Sediments

Masako TABATA, Noboru WATANABE, Naomi IMAGAWA and Shizuo SUZUKI

Abstract

The distributions of nucleic acids (DNA and RNA) and enzymatic activity of nucleic acid decomposition were measured for four water bodies. The DNA and RNA contents in the four sediments ranged from 3.6 to 81.4 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and from 1100 to 2318 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dry sediment, respectively. The contents were larger in the sediment of water bodies containing much chlorophyll-*a*. Phosphorus in the nucleic acid fraction accounts for 9-24 % of the total phosphorus in the sediments.

Enzymatic activity of nucleic acids decomposition was measured by incubating the sediment sample in which DNA or RNA was added artificially as substrate and chloroform as a growth inhibitor against microorganisms in the sediments. DNA was decomposed by the incubation with Ushigomebori sediment and RNA was decomposed by Ushigomebori and Teganuma sediments.

Gel chromatography of the incubation mixture showed that phosphorus-free low molecular weight compounds and ortho-phosphate were formed in the DNA or RNA decomposition. The decomposition of DNA and RNA was greater in weak alkaline conditions than acidic conditions, and increased with the rise of temperature.

Key words: DNA, nuclease, RNA, sediment

1. はじめに

リンは世界各地の湖沼での富栄養化現象の主要因とされており、底泥から湖水中へのリンの供給に関しても多くの研究がある(例えば MORTIMER, 1971; 細見・須藤, 1979; 小林・西村, 1988a, 1988 b)。しかし、それらの多くは無機態リンを対照としたものである。一方、自然界の有機態リンとして、森林や畑土壌中にはリン脂質、リンタンパク質類、リンアミド類、核酸類等の存在が確認されているので(スタム・モーガン, 1970)、湖沼の底泥にもこれらの存在が予想される。底泥中の有機態リンに関しては、海洋底泥における DNA の

分布と分解活性を調べた例(MAEDA and TAGA, 1973, 1974)や、底泥抽出物中の高分子の有機態リンの存在をクロマトグラフィーにより検討した例(SOMMERS *et al.*, 1972; 中島・金子, 1988)等があるが、わが国の淡水底泥における有機リン化合物の分布とそれらの分解活性に関する情報は乏しい。

著者らは有機態リンのうち核酸の DNA, RNA に注目し、いくつかの淡水域の底泥での分布及び核酸分解活性の調査を行ったので報告する。

2. 実験方法

2-1. 試 料

湖底泥は1988年、牛込濠（東京都新宿区、採取水深1.5 m、5月9日採取）、手賀沼（千葉県我孫子市、採取水深1 m、10月8日採取）、震生湖（神奈川県秦野市、採取水深8.5 m、6月29日採取）、赤城大沼（群馬県赤城山、採取水深10 m、7月8日採取）の湖心にてエクマンバージ採泥器を用いて採取した。底泥は4°C、3000 rpm (1000×g) で30分間遠心分離して間隙水を除去し、沈殿を試料とした。

2-2. 底泥の核酸、リンの定量法

底泥中のDNA、RNAの抽出は、STS法 (SCHNEIDER, 1946) に準じて行った。概要をFigure 1に示す。得られた核酸画分について、DNAはジアミノ安息香酸蛍光法 (DABA法) (THOMAS and FARQUHAR, 1978)、RNAはオルシ

ノール法 (SCHNEIDER, 1957) により定量した。また底泥の全リン量はANDERSENの方法 (1976) により定量した。

2-3. 沈降物の測定法

震生湖の湖心において、広口ビン（径7 cm×高さ15 cm）を水深1.5, 4, 8 mの位置に16日間吊し（1988年6月29日ー7月15日）、これに沈積した沈降物を補集した。この沈降物のDNA、RNA含量を2-2の方法で測定した。

2-4. 底泥のDNA、RNA分解活性の測定法

底泥7.5 g（湿重量）を三角フラスコに取り、これに静菌のためクロロホルム3.8 mlと20 mlの滅菌水を加え、25°Cで1時間放置した。その後15 mgのDNA (Sigma Type I) またはRNA (Sigma Type III) を添加し、滅菌水を加えて全量を75 mlとし、25°Cで振とうしながらインキュベーションを行った。経時的にその一部を抜き取り、3000 rpm (1000×g) で遠心分離後、その上

Fig. 1. Extraction procedure of DNA and RNA from sediment.

澄 5 ml に 15 % 過塩素酸溶液 1 ml を加え、4°C で 10000 rpm (7000×g) で遠心分離して未分解の DNA または RNA を沈殿させた。この上澄について 260 nm における吸光度の測定および基質が DNA の場合はデオキシリボースの定量 (MAEDA and TAGA, 1973), RNA の場合はリボースの定量 (SCHNEIDER, 1957) を行った。デオキシリボース (Sigma), リボース (Sigma) を用いて各定量法により検量線を作成し、これにより上澄中の DNA または RNA の分解物をデオキシリボースまたはリボース濃度として求めた。また同時に上澄のオルトリン酸も定量した (STRICKLAND and PARSONS, 1968)。空試験として底泥のみ、あるいは DNA, RNA のみをそれぞれ同様に操作した。活性値の算出にはこれらの値を各測定値から差し引いて補正した。

2-5. 底泥のホスファターゼ活性の測定法

底泥のホスファターゼ活性は *p*-ニトロフェニルリン酸を基質として用い、TABATABAI and BREMMER (1969) の方法により測定した。

2-6. 底泥による DNA, RNA の分解経過のゲルクロマトグラフィー

2-4 と同様に牛込濠底泥と DNA または RNA とを混合し 25°C で 24 時間インキュベーションした溶液の上澄 6 ml について、ゲルクロマトグラフィーを行った。カラムは、DNA の場合は Sephacryl S-200 (Pharmacia) (1.8×90 cm), RNA の場合は Sephadex G-50 (Pharmacia) (1.8×90 cm) を用い、溶出溶媒は 0.1 M ホウ酸緩衝液

(pH 8.6) を用いた。溶出液は 5 ml ずつ分取し、260 nm の吸光度測定とオルトリン酸定量 (STRICKLAND and PARSONS, 1968) を行い、さらに各溶出液にペルオキシ 2 硫酸カリウムを添加してオートクレープ処理をした後、オルトリン酸測定を行うことにより全リンを定量した。標準物質として DNA (Sigma Type I), RNA (Sigma Type III), adenosin-5' monophosphate (Sigma), adenin (Sigma), adenosin (Sigma) を用い、溶出位置を調べた。

3. 結果および考察

3-1. 底泥の DNA および RNA 含量

調査した 4 水域の底泥中の DNA 濃度、RNA 濃度、リン濃度を Table 1 に示した。MAEDA and TAGA (1973) は駿河湾底泥の DNA 濃度は 3.2-34.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 乾重量と報告しているが、今回の湖底泥の測定値もこれに近い値を示していた。1987 年に測定した 4 水域の表層水のクロロフィル濃度をあわせて示したが、それから判断すると、牛込濠、手賀沼は、富栄養化程度が高く、植物プランクトン生産が大きいのに対し、赤城大沼は富栄養化程度の低い湖と考えられる。牛込濠、手賀沼では底泥中の全リン量が赤城大沼に比べて著しく高かった。しかし、DNA と RNA の量は全リン量の大小とは対応していなかった。DNA や RNA にはリンが約 9 % 含有されていることから、底泥中の全リン量のうちの核酸由来のリンの占める割合を算出すると、9-24 % となった。

Table 1. DNA, RNA and total phosphorus contents in bottom sediments and newly sedimented matter.

Samples	DNA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt.)	RNA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt.)	Total phosphorus ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt.)	Nucleic acid-P ratio ^{a)} (%)	Chl- <i>a</i> ^{b)} ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$)
Sediments					
Ushigomebori (9 May. 1988)	81.4	2318	2547	9	114.5 (May)
Teganuma (8 Oct. 1988)	3.6	1268	1151	10	50.5 (October)
Shinseiko (29 Jun. 1988)	67.0	1100	709	15	29.3 (July)
Akagi-Ono (8 Jul. 1988)	22.5	2105	802	24	2.0 (July)
Newly sedimented matter ^{c)}					
at 1.5 m	34.9	5775	—	—	
4 m	158.0	6102	—	—	
8 m	165.0	7109	—	—	

^{a)} Nucleic acid-P ratio (%) = (Nucleic acid-P) × (Total-P)⁻¹ × 100.

Nucleic acid-P = (DNA + RNA) × 0.09.

^{b)} Chlorophyll-*a* concentrations in the surface layer measured in 1987.

^{c)} The newly sedimented matter was collected in Shinseiko from 29 June to 15 July 1988.

湖水中の DNA, RNA 濃度は、従来水中の生物量を示す一指標として用いられており (HOLM-HANSEN *et al.*, 1968; IWAMURA *et al.*, 1970), 前田・富岡 (1977) は日本の 15 湖沼水中の懸濁態 DNA, RNA 濃度を測定した結果、それぞれ $1.0\text{--}46.8\text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, $24\text{--}2086\text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ で、富栄養湖では貧栄養湖に比べて高濃度であったと報告している。湖水中の懸濁物の一部は徐々に底泥へ沈降して行くと考えられることから、水深 8.5 m の震生湖において上層 (水深 1.5 m), 中層 (4 m), 底層 (8 m) で 16 日間の沈降物を捕集し、その DNA および RNA 含量を測定した (Table 1)。上層, 中層に比べると底層での捕集物の方が DNA, RNA 含量が高い傾向があった。これは表層の植物プランクトンを中心とする懸濁物質が下層へ沈降している際に細菌や原性動物などの分解性微生物の付着を受けるためか、あるいは懸濁物質が沈降するときに核酸以外の構成物質がより速く分解を受けるためかもしれないが、今後の研究が必要である。

上記のような核酸を含む沈降物が底泥に蓄積していくので、底泥中の DNA, RNA は底泥に棲息している微生物に由来するものばかりでなく、水中から沈降してきた植物プランクトン遺骸等によるものも含まれていると考えられる。

3-2. 底泥中の DNA, RNA 分解活性

牛込濠の底泥による DNA, RNA の分解生成物の経時変化を Figure 2 と 3 に示した。DNA や RNA が分解されると、その構成成分からヌクレオチド、ヌクレオシドまたは塩基、糖類およびリン酸が生成されることが予想されるが、各インキュベーション溶液の上澄では、塩基成分に由来すると思われる 260 nm の吸収 (日本化学会, 1958) とデオキシリボースまたはリボース濃度が増加した。また同時に溶液中のオルトリン酸濃度が増加した。

Figure 4 と 5 に牛込濠底泥と DNA または RNA を 0 および 24 時間インキュベーションした溶液のゲルクロマトグラムを示した。DNA の場合、24 時間後には DNA のピークが減少し、低分子領域にリン濃度では $V_e \cdot V_0^{-1} = 2.5$, A_{260} では $V_e \cdot V_0^{-1} = 2.8, 3.2, 3.5$ のピークが出現した。これらのピークは底泥のみをインキュベーションした溶液のゲルクロマトグラフィーでは増加せず、DNA の分解産物と考えられる。 $V_e \cdot V_0^{-1} = 2.5$ のピークはオルトリン酸のピークであるが、他のピークはリンを含んでおらず標品のアデノシン等と溶出位置に近いことから、DNA 構成成分のヌクレオシド類あるいは塩基類が溶出されていると考えられる。DNA 画分とオルトリン酸画分以外にリンを含む画分は

Fig. 2. Decomposition of DNA during the incubation with Ushigomebori sediment at 25°C.

(a) Absorbance at 260 nm in the supernatant of the incubation mixture.

(b) Amount of deoxyribose (μg) released from Ushigomebori sediment (1g wet weight) during the incubation.

(c) Amount of ortho-phosphate (μg) released from Ushigomebori sediment (1g wet weight) during the incubation.

●—●: mixture of DNA and Ushigomebori sediment

○-----○: mixture minus DNA

△-----△: mixture minus sediment

Fig. 3. Decomposition of RNA during the incubation with Ushigomebori sediment at 25°C.

(a) Absorbance at 260 nm in the supernatant of the incubation mixture.

(b) Amount of ribose (μg) released from Ushigomebori sediment (1g wet weight) during the incubation.

(c) Amount of ortho-phosphate (μg) released from Ushigomebori sediment (1g wet weight) during the incubation.

●—●: mixture of RNA and Ushigomebori sediment

○-----○: mixture minus RNA

△-----△: mixture minus sediment

Table 2. Activities of DNA and RNA decomposition and production rate of orthophosphate during the incubation of bottom sediments.

Samples	Substrate DNA		Substrate RNA	
	Decomposition activity ^{a)}	Ortho-phosphate production ^{b)}	Decomposition activity ^{c)}	Ortho-phosphate production ^{b)}
Ushigomebori	15.5	1.07	6.29	1.70
Teganuma	N.D.	N.D.	0.34	0.25
Shinseiko	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Akagi-Ono	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^{a)} μg deoxyribose $\cdot \text{g}^{-1}$ wet sediment $\cdot \text{hr}^{-1}$

^{b)} μg ortho-P $\cdot \text{g}^{-1}$ wet sediment $\cdot \text{hr}^{-1}$

^{c)} μg ribose $\cdot \text{g}^{-1}$ wet sediment $\cdot \text{hr}^{-1}$

N.D.: not detected

Incubation temperature: 25°C

認められなかった。RNA の場合も同様に、インキュベーション後に RNA のピークは減少し、分解産物のオルトリン酸のピーク $V_e \cdot V_0^{-1} = 2.4$, およびリンを含まないヌクレオシド類と考えられるピーク $V_e \cdot V_0^{-1} = 2.9, 3.8$ が出現した。以上のように牛込底泥とのインキュベーションにより DNA または RNA は明らかに低分子化された。核酸を分解する酵素としては DNase, RNase, 双方を分解するヌクレアーゼがあるが (今堀・山川, 1984), こ

れらは核酸よりオリゴまたはモノヌクレオチドを生成する。一方、リン酸エステルを加水分解しリン酸を生成する酵素としてホスファターゼがあるが、これは DNA や RNA に直接作用しない。DNA, RNA と牛込底泥とのインキュベーションでオルトリン酸の生成が認められたことから、これらの分解過程では底泥中の DNase, RNase あるいはヌクレアーゼの作用のほかに、分解生成物のヌクレオチドからのオルトリン酸生成に参与す

Fig. 4. Gel chromatogram of DNA before (A) and after (B) 24 hours' incubation with Ushigomebori sediment at 25°C. Column: Sephacryl S-200 1.8×90cm Eluent : borate buffer (pH 8.6) ●—●: total phosphorus ○—○: A₂₆₀ ↓: elution point of standard compound a: DNA b: adenosine-5'-monophosphate c: ortho-phosphate d: adenosine e: adenine

Fig. 5. Gel chromatogram of RNA before (A) and after (B) 24 hours' incubation with Ushigomebori sediment at 25°C. Column: Sephadex G-50 1.8×90 cm Eluent : borate buffer (pH 8.6) ●—●: total phosphorus ○—○: A₂₆₀ ↓: elution point of standard compound a: RNA b: adenosine-5'-monophosphate c: ortho-phosphate d: adenosine e: adenine

Table 3. Effects of pH and temperature on DNA and RNA decomposition and orthophosphate production rate during the incubation of Ushigomebori sediment.

	Substrate DNA		Substrate RNA	
	Decomposition activity (relative rate %)	Ortho-phosphate production	Decomposition activity (relative rate %)	Ortho-phosphate production
pH 8.7 ^{a)}	100	100	100	100
7.7 ^{a)}	77	72	93	101
6.7 ^{a)}	63	11	55	23
Temperature				
25°C ^{b)}	100	100	100	100
15°C ^{b)}	15	36	58	57
5°C ^{b)}	0	4	15	10

^{a)} Incubation temperature 25°C.

^{b)} Incubation pH 8.7.

るホスファターゼ類の存在が予想される。牛込濠の試料について *p*-ニトロフェニルリン酸を基質としてホスファターゼ活性を測定したところ、pH 8.8,

7.7, 6.7 でそれぞれ 48.9, 38.5, 12.1 *p*-nitrophenol $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ wet sediment $\cdot \text{hr}^{-1}$ とアルカリ側でより活性が高いホスファターゼ活性が測定され

た。

4 水域の底泥による DNA, RNA の分解活性を Table 2 に示した。DNA, RNA の分解活性は 24 時間後の上澄中のデオキシリボース, またはリボースの濃度から算出した。また, オルトリン酸の生成速度を同様に算出した。DNA 分解活性は牛込藻の底泥にのみ, また RNA 分解活性は牛込藻と手賀沼底泥にのみ認められ, 震生湖, 赤城大沼の底泥では DNA および RNA 分解生成物を検出できなかった。DNA あるいは RNA の分解活性がみられた底泥では同時にオルトリン酸の生成がみられたが, DNA, RNA の分解がない底泥ではみられなかった。

牛込藻底泥を用いた DNA, RNA 分解に対する pH, 温度の影響を Table 3 に示した。DNA, RNA の分解活性はいずれも中性から弱アルカリ性で高かった。また, オルトリン酸の生成は DNA, RNA の分解に比べて pH の影響をより大きく受け, 中性, 弱アルカリ性に比べ弱酸性下では非常に低い活性であった。また, 温度が低いほど DNA, RNA 両分解活性は著しく減少し, オルトリン酸の生成もこれと対応して減少した。

以上述べたように, 本調査において淡水域底泥に DNA, RNA および核酸分解活性が見いだされた。核酸は構成成分としてリンや窒素を含むので, 底泥中で分解されて無機態のリンや窒素が生成し, それらが水中に回帰した場合には植物プランクトン等の栄養塩類として再び利用されることが予想される。従って底泥中の核酸濃度やその分解活性の測定は, 水域全体の栄養状態等を検討する上でも意義あると考えられる。今後さらに調査水域の数, 回数を増やし, 地域的, 季節的変動の詳細な調査や分解実験, 核酸の由来の検討等を行う必要があると考える。

摘 要

牛込藻, 手賀沼, 震生湖, 赤城大沼の底泥の DNA, RNA 濃度, および各底泥にクロロホルムを添加して静菌した状態下で, それらによる核酸の酵素的分解活性を測定した。底泥中の DNA, RNA 濃度はそれぞれ $3.6\text{--}81.4$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt.), $1100\text{--}2318$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt.) であり, 水中クロロフィル濃度が高い水域ほど両者の濃度は高かった。これら核酸画分のリンが底泥の総リンに占める割合は 9–24 % であった。

DNA 分解活性は牛込藻, RNA 分解活性は牛込藻, 手賀沼底泥に認められた。DNA または RNA と牛込藻底泥とのインキュベーション溶液の

ゲルクロマトグラフィーにより, インキュベーション過程で核酸が低分子化され, リンを含んでいない低分子化合物とオルトリン酸が生成することを確認した。牛込藻の核酸分解活性は弱アルカリ性およびインキュベーション温度が高いとき, より高かった。

文 献

- ANDERSEN, J. M. (1976): An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. *Water Res.*, 10: 329–331.
- HOLM-HANSEN, O., W. H. SUTCLIFFE Jr. and J. SHARP (1968): Measurement of deoxyribonucleic acid in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.* 13: 507–514.
- 細見正明・須藤隆一 (1979): 湖沼底泥からのリンの溶出に関する研究. *水質汚濁研究*, 2: 157–162.
- 今堀和友・山川民夫 (1984): 生化学辞典. 東京化学同人
- IWAMURA T., H. NAGAI and S. ICHIMURA (1970): Improved method for determining contents of chlorophyll, protein, ribonucleic acid, and deoxyribonucleic acid in planktonic populations. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 55: 131–147.
- 小林節子・西村肇 (1988 a): 好気下における底質からのリンの溶出に及ぼす錯形成物質の影響. *水質汚濁研究*, 11: 693–701.
- 小林節子・西村肇 (1988 b): 底質からのリンの溶出における Fe (II) とリン酸イオンの挙動. *水質汚濁研究*, 11: 755–764.
- MAEDA, M. and N. TAGA, (1973): Deoxyribonuclease activity in seawater and sediment. *Mar. Biol.*, 20: 58–63.
- MAEDA, M. and N. TAGA (1974): Occurrence and distribution of deoxyribonucleic acid-hydrolyzing bacteria in sea water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 14: 157–169.
- 前田修・富岡英通 (1977): 本州中部湖沼の夏季におけるけん濁態タンパク質および核酸の鉛直分布. *陸水雑*, 38: 109–115.
- MORTIMER, C. H. (1971): Chemical exchanges between sediments and water in the Great Lakes—speculations on probable regulatory mechanisms. *Limnol. Oceanogr.*, 16: 387–404.
- 中島淳・金子光美 (1988): 湖底泥中有機態リンの分子量分布. *陸水雑*, 49: 205–212.
- 日本化学会 (1958): 実験化学講座 24. 丸善株式会社.
- SCHNEIDER, W. C. (1946): Phosphorus compounds in animal tissues III A composition of methods for the estimation of nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 164: 747–751.
- SCHNEIDER, W. C. (1957): Determination of nucleic

- acids in tissues by pentose analysis. *Methods in Enzymology*, 3: 680-684.
- SOMMERS, L. E., R. F. HARRIS, J. D. H. WILLIAMS, D. E. ARMSTRONG and J. K. SYERS (1972): Fractionation of organic phosphorus in lake sediments. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 36: 51-54.
- スタム W.・モーガン J. J. (1970): 一般水質化学 下. 共立出版.
- STRICKLAND, J. D. and T. R. PARSONS (1968): A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Bd. Can.*, 167: 49-64.
- TABATABAI, M. A. and J. M. BREMMER (1969): Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1: 301-307.
- THOMAS, P. S. and M. N. FARQUHAR (1978): Specific measurement of DNA in nucleic acid using diaminobenzoic acid. *Anal. Biochem.*, 89: 35-44.
- (著者: 田畑真佐子・渡辺昇・今川直美・鈴木静夫, 東京理科大学薬学部, 〒162 新宿区市ヶ谷船河原町12; Masako TABATA, Noboru WATANABE, Naomi IMAGAWA and Shizuo SUZUKI, Faculty of Pharmaceutical Science, Science University of Tokyo, 12 Ichigaya Funagawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 162.)
- 1990 年 2 月 1 日 受付
1990 年 12 月 26 日 受理