

ニジマス幽門垂中のアルカリ性RNA分触酵素について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	井村, 孝嗣
巻/号	37巻8号
掲載ページ	p. 735-739
発行年月	1971年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ニジマス幽門垂中のアルカリ性 RNA 分解酵素について

井 村 孝 嗣

(1971 年 2 月 8 日受理)

Studies on Alkaline RNA-hydrolyzing Enzyme in the Pyloric
Caeca of Rainbow Trout

Koji IMURA*

Though a large number of nucleases have been investigated, little is known about the enzymes in fish. The present investigation was undertaken to elucidate the property and function of the nucleases in fish. As a first step in this programme, the RNA-hydrolyzing enzyme in the pyloric caeca of rainbow trout was studied. The frozen pyloric caeca was homogenized in 10 volumes of 0.25 M sucrose solution, and the homogenate was filtered through a gauze. The filtrate was used as the enzyme solution. The enzyme activity was estimated from readings obtained for absorbance at $260\text{m}\mu$ of the acid soluble degradates from RNA. In the pyloric caeca of rainbow trout, two kinds of RNA-hydrolyzing activities were observed. One of the activities was observed at the acidic pH (pH optimum 5.5) and the other at the alkaline pH (pH optimum 8.75). In this report, some properties of the alkaline RNA-hydrolyzing enzyme are described. The activity level of the enzyme is similar to that of the enzyme found in rat pancreas. This enzyme is very labile, but in the presence of Ca^{++} , the enzyme gets stabilized specifically to pH and heat. The enzyme is characterized by its marked stabilization with Ca^{++} .

核酸分解酵素に関する研究は種々の生物について数多くなされているが、魚類についての研究はきわめて少ないのが現状である。魚類の核酸分解酵素に関する研究は、魚類の核酸代謝を明確にする上において不可欠なことであり、比較生化学上重要である。堀口と柏田¹⁾はカツオの幽門垂中のリンの分布を調べ、核酸態のリンが低温においてさえ急速に減少することを見、この組織がかなり強力な核酸分解能を有していることを推定している。著者は魚類の核酸消化に関する基礎的知見をうるため、飼育試験に多く用いられているニジマスについて、その幽門垂中に存在する RNA 分解酵素を検索した。その結果酸性とアルカリ性にそれぞれ至適 pH をもつ 2 つの異なった RNA 分解活性をみいだした。本報告ではアルカリ性に至適 pH をもつ酵素の性質について報告する。

試料および方法

試料 即殺したニジマス *Salmo gairdneri f. irideus* より幽門垂をとり出し、 -20°C に凍結貯蔵したものを用いた。

酵素液の調製 凍結幽門垂を乳鉢中でよく碎き、組織の 10 倍量の 0.25 M ショ糖溶液を加えてホモゲナイズし、ガーゼで濾過した濾液を適当に稀釈して酵素液とした。

活性の測定 0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.75) 0.25 ml, 19 mM CaCl_2 溶液 0.1 ml, 水 0.3 ml の混液に酵素液 0.1 ml を添加して 30°C に 5 分間 プレインキュベーションし、12 mg/ml の RNA 溶液

* 北海道大学水産学部生物化学講座 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

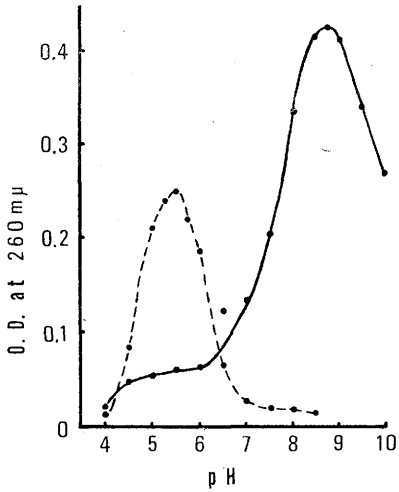


Fig. 1. Effect of pH on alkaline RNA-hydrolyzing activity in the presence of EDTA and Ca^{++} .

The assay system contained acetate buffer (pH 4.0~6.0), imidazol-HCl buffer (pH 6.5), Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0) and borate buffer (pH 9.5~10.0) 56.2 mM, CaCl_2 2 mM (●—●) or EDTA 21 mM (●.....●), RNA 2.4 mg and enzyme in a final volume 0.95 ml. The enzyme protein for EDTA system was 0.8 mg and for Ca^{++} system was 0.19 mg. Reaction time was 30 min for EDTA system and 20 min for Ca^{++} system at 30°C respectively.

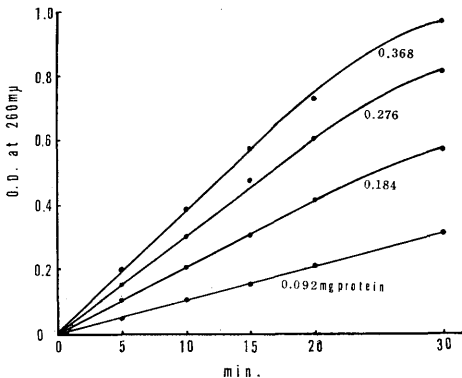


Fig. 2. Effect of protein concentration and reaction time on alkaline RNA-hydrolyzing activity.

Experimental condition was the same as in the text except that various reaction time were used.

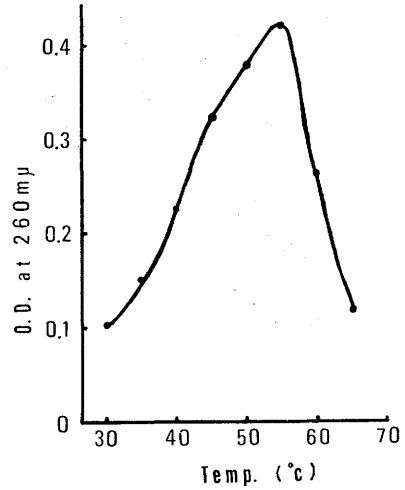


Fig. 3. Temperature-activity curve of the alkaline RNA-hydrolyzing enzyme.

Reaction time was 15 min at various temperatures.

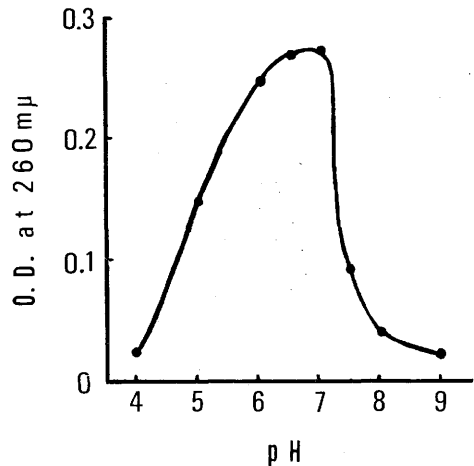


Fig. 4. pH stability of alkaline RNA-hydrolyzing enzyme.

After being maintained at different pH values at $0\sim 2^\circ\text{C}$ for 3 hours, enzyme reaction was carried out at the same conditions in the text.

0.2 ml を添加して 30°C で 20 分間反応を行なつた。ウラニル試薬 (0.75% 酢酸ウラニウムを含んだ 25% 過塩素酸) 0.2 ml を加えて反応をとめ、水中に 15 分間以上保つた後、沈澱を濾別し濾液 0.25 ml を 5 ml の水で稀釈して 260 m μ の吸光度を測定した。対照として反応時間 0 のものを取り、同様に処理して反応値より差し引いた。この測定法により稀釈液の吸光度が 1.0 を示したときの活性の強さを 1 酵素単位とした。

蛋白質の定量 牛血清アルブミンを標準物質としてビュレット法にて定量を行なつた。

結 果

ニジマス幽門垂の RNA 分解活性を検索した結果、Fig. 1 に示したように 2 種類の活性がみられた。このうち CaCl₂ の存在によつて pH 8.75 に最大活性を示すものを以後アルカリ性酵素と呼ぶことにする。この酵素は MgCl₂, MnCl₂, CuCl₂ などの存在のもとでは活性を示さなかつた。この酵素の蛋白濃度と反応時間をかけて、30°C における反応の進行をみた結果、Fig. 2 に示したように吸光度 0.6 以内で反応は直線的に進行しているので、以後の測定をすべてこの範囲内で行なつた。Fig. 3 はこの酵素の至適温度を示したものであるが、各温度での 15 分間の反応のもとでは 55°C 付近が至適温度であつた。この酵素の pH に対する安定性を Fig. 4 に示した。種々の pH で 0~2°C に 3 時間放置したときの結果であるが、pH 6~7 で安定であつた。また 10 時間放置した場合も同様の pH 域で安定であつた。この結果から理解されるとおり、この酵素は至適 pH 付近ではきわめて不安定であつた。しかしながら CaCl₂ を入れた活性測定システム中での反応が、酵素の不安定な pH であるにもかかわらず、直線的に進むことから考えて、Ca⁺⁺ による酵素の安定化の可能性が考えられる。そこで Ca⁺⁺ によつて酵素が安定になるか否かを pH 8.75 で調べた。まず Ca⁺⁺ の効果をみるために、0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.75) 0.2 ml, 19 mM CaCl₂ 溶液 0.1 ml および蒸留水 0.25 ml を加えた混液を調製した。また対照として上述の混液から CaCl₂ を除いたものを調製した。それぞれの混液に酵素液 0.1 ml (0.145 mg 蛋白) を添加して、0~2°C に放置し、一定時間後に活性測定システムと同一条件になるように CaCl₂, RNA, 蒸留水を適量加えて残存活性を測定した。えられた結果を Fig. 5 に示したが、Ca⁺⁺ の存在により酵素は明らかに安定化した。Ca⁺⁺ の存在しない混液に入れられた酵素は 40 秒後に Ca⁺⁺ を添加しても 25% 以下の活性しか示さ

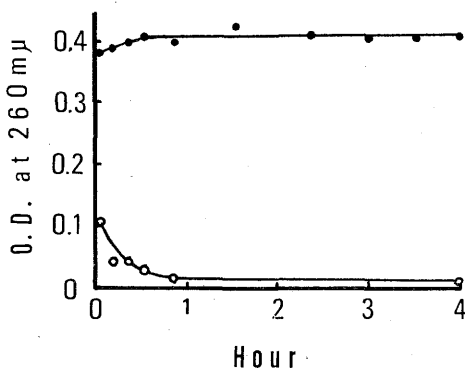


Fig. 5. Stabilization of alkaline RNA-hydrolyzing enzyme at pH 8.75 with Ca⁺⁺.

Experimental detail was explained in the text.

Ca⁺⁺ (●—●): Control (○—○)

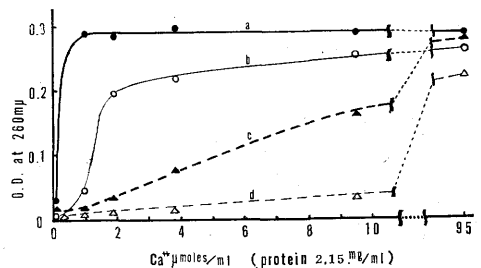


Fig. 6. Effect of Ca⁺⁺ concentration on stabilization of alkaline RNA-hydrolyzing enzyme at pH 8.75 and 4.0.

Enzyme solutions (2.15 mg protein/ml) were maintained under the various Ca⁺⁺ concentrations at pH 8.75 (Tris-HCl) or 4.0 (acetate) for 3 or 25 hours at 0~2°C. After the mixtures were adjusted at pH 8.75, enzyme reaction was carried out by the same assay system as in the text by using an aliquot of pH adjusted mixture.

a) pH 8.75, 3 hours: b) pH 8.75, 25 hours: c) pH 4.0, 3 hours: d) pH 4.0, 25 hours.

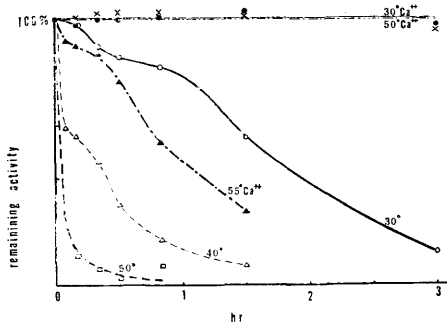


Fig. 7. Effect of heat on alkaline RNA-hydrolyzing enzyme in the presence or absence of Ca^{++} at pH 7.0.

Enzyme solutions (2.39 mg protein/ml) were heated under the various temperatures at pH 7.0 (Tris-HCl) in the presence of 19 mM Ca^{++} or none, after which pH was adjusted to 8.75, the remaining activity was estimated by the same assay system as in the text by using an aliquot of pH adjusted mixture.

に pH を 8.75 に調整し、残存活性を測定した。その結果を Fig. 6 に示したが、同じように酵素を失活させる pH であつても、酵素を安定に維持するに必要な Ca^{++} 濃度にはかなりの差があり、pH 4 の場合に比べて pH 8.75 の場合は非常に少量の Ca^{++} 濃度で効果があつた。pH 7 における酵素の熱安定性を示したのが Fig. 7 であるが、 Ca^{++} が存在しないと 30°C 3 時間の加熱でほとんど失活したが、 Ca^{++} が存在すると 50°C でもかなり安定であつた。酵素活性に対するキレート剤の影響を Table 1 に示した。EDTA、GEDTA の両キレート剤はいずれも酵素を完全に不活性化するが、あらかじめ過剰の CaCl_2 が存在するとキレート剤を入れても失活しなかつた。また MgCl_2 は酵素保護効果を全く示さなかつた。Table 2 にマウス膵臓 RNase とこの酵素の活性の強さを比較した。この酵素の比活性は試料により約 3 から 10 くらいま

Table 1. Effect of chelating agents on alkaline RNA-hydrolyzing activity at pH 8.75.

Chelating agents and cations in assay systems	Activity (%)
Ca^{++} 2 mM	100 (control)
Mg^{++} 2 mM	0
EDTA 2 mM	0
GEDTA 2 mM	0
Ca^{++} 4 mM, EDTA 2 mM	103
Mg^{++} 4 mM, EDTA 2 mM	0
Ca^{++} 4 mM, GEDTA 2 mM	105
Mg^{++} 4 mM, GEDTA 2 mM	0

なかつた。 Ca^{++} によりこの酵素が pH に対する安定性を増すということが明らかになつたので、次に pH の安定化におよぼす Ca^{++} の濃度の影響を調べた。この場合、至適 pH である 8.75 と酸性側で pH 8.75 と同じ程度に酵素を失活させる pH 4 について調べた。種々の Ca^{++} 濃度の緩衝液 (0.05 M) に酵素をさらし、0~2°C に放置した。3 時間および 25 時間後

Table 2. Comparison between alkaline RNA-hydrolyzing activity and RNase activity of mouse pancreas.

0.7 g of mouse pancreas was homogenized with 7 ml of 0.02 M acetate buffer (pH 5.0). After homogenate was centrifuged at 5000 rpm for 30 min, supernatant was used as enzyme solution. The assay system for mouse RNase contained 56.2 mM phosphate buffer (pH 7.4), 2.4 mg RNA and enzyme in a final volume 0.95 ml. The assay system for alkaline RNA-hydrolyzing activity was the same as in the text.

	Tissue weight (g)	Protein extracted (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Units of activity in 1 g of tissue
Mouse pancreas	0.7	35.1	8.1	406.2
Rainbow trout pyloric caeca	1.0	36.0	6.9	248.4

でのバラツキを示したが、ここではほぼ代表的値を示した。マウス膵臓 1g 中の RNase の全活性は 406.2 酵素単位を示した。一方幽門垂 1g 中の全活性は 248.4 酵素単位を示しこの値はマウス膵臓の活性の約 60% に相当した。

考 察

ニジマス幽門垂中のアルカリ性 RNA 分解酵素は Ca^{++} により安定化するという興味深い性質を示した。しかしながら EDTA, GEDTA 添加後あるいは透析後 Ca^{++} を添加することにより、この酵素を再活性化することが出来なかつたので Ca^{++} が触媒作用と直接関係を有しているか否かはわからなかつた。活性発現のために Ca^{++} を要求する RNA 分解酵素はいくらか知られている^{2, 3)}。そのうち Ca^{++} により活性化および安定化する酵素は、著者の知る範囲では pH 5 に至適 pH をもつ *Bacillus subtilis* の RNase⁴⁾ のみである。RASSKAZOV ら⁵⁾ はカラフトマスの RNase 活性を調べており、MENON and SMITH⁶⁾ はマスノスケの精巢ホスホジエステラーゼを研究しているが、 Ca^{++} による安定化については述べていない。従つておそらくこの Ca^{++} による酵素の安定化という性質は魚類の RNA 分解酵素の性質として普遍的なものではないと考えられるので、このアルカリ性 RNA 分解酵素は脊椎動物から発見された RNA 分解酵素としては新しい性質をもつた酵素といえよう。BARNARD⁷⁾ は脊椎動物の膵臓および幽門垂の RNase 活性の強さを比較しているが、魚類の活性は反すう動物、齧歯類、有袋類など非常に強い活性を有する動物に比較して、はるかに低い活性しか有していなかつたことをみているが、本酵素はラットと同程度 (BARNARD⁷⁾ のデータから計算して) の強い活性を有していることがわかつた。

要 約

ニジマス幽門垂中の RNA 分解酵素を検索し、アルカリ性に至適 pH を有する酵素の性質を研究した。この組織には pH 8.75 (至適 pH) でかなり強い活性を示す RNA 分解酵素が存在し、その強さはラット膵臓の RNase の活性に匹敵した。本酵素は至適 pH で全く不安定であるが、 Ca^{++} の存在により特異的に pH および熱に対して安定化した。EDTA, GEDTA の両キレート剤によつて不可逆的に失活した。

終りにのぞみ、御指導と御校閲の労をとられた北海道大学水産学部齋藤恒行教授に感謝致します。

文 献

- 1) 堀田吉重・柏田研一：本誌，19，733~736 (1953).
- 2) E. A. BARNARD: *Annu. Rev. Biochem.*, 38, 677~732 (1969).
- 3) 入江昌親：蛋白質核酸酵素，12，386~409 (1967).
- 4) M. NAKAI, Z. MIMA, T. YAMAZAKI, and A. TSUGITA: *J. Biochem.*, 57, 96~99 (1965).
- 5) V. A. RASSKAZOV, V. R. KHLYNIN, and G. D. BERDYSHEV: *Obmen Veshchestv Biokhim. Ryb, Akad. Nauk SSSR, Min. Ryb. Khoz. SSSR, Ikhtiol. Kom.*, 253~258 (1967).
- 6) K. M. J. MENON and M. SMITH: *Biochemistry*, 9, 1584~1592 (1970).
- 7) E. A. BARNARD: *Nature*, 221, 340~344 (1969),