

# 琉球大学学術リポジトリ

## オニヒトデ幽門盲嚢の DNA 分解酵素に関する研究(農芸化学科)

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語:<br>出版者: 琉球大学農学部<br>公開日: 2008-02-14<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 四方, 治五郎, 松本, 賢二, Yomo, Harugoro,<br>Matsumoto, Kenji<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4148">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4148</a>  |

# オニヒトデ幽門盲嚢のDNA分解酵素に関する研究

四方 治五郎\*・松本 賢二\*

---

Harugoro YOMO and Kenji MATSUMOTO : Studies on  
Deoxyribonucleases of *Acanthaster planci*

---

## I 緒言

デオキシリボ核酸 (DNA) を分解する酵素 (以下DNase と略称) に大きく分けて(1)エンドヌクレアーゼ (分子鎖の内部のホスホジエステル結合を加水分解するもの) と, (2)エクソヌクレアーゼ (分子鎖の末端に作用して, モノヌクレオチドを生成するもの) の2がある。これらDNase は微生物, 脊椎動物については多くの報告がある。無脊椎動物については肝臓<sup>4)</sup>, カニの精巣<sup>3)</sup>, アフリカマイマイの肝臓<sup>6)</sup>についてエンドヌクレアーゼの存在が報告されているが, エクソヌクレアーゼについてはその報告を見ない。

著者等はオニヒトデの幽門盲嚢において, 大腸菌のDNAエクソヌクレアーゼ II<sup>2)5)</sup> と若干の類似点を有するDNase を見出したので報告する。

## II 実験材料及び方法

### 1. 実験材料

オニヒトデ (*Acanthaster planci*) は沖縄近海において, 1978年に採取したものを, ただちに-20°Cで凍結保存した。

### 2. 試薬及びその他の材料

DNA (from salmon testes) はSigma社の製品 (Type III, # D1626) である。DNA (from calf thymus) はBoeringer Mannheim Gm bHから, デオキシアデノシンモノホスフェイト (d-AMP), デオキシシチジンモノホスフェイト (d-CMP) はYamasa Shyoyu Co. Ltd. から購入した。

### 3. DNase 活性の測定

DNase 活性の測定は特記しない限り, 次の条件で行った。反応混液 2 ml 中にpH 5.0, 0.1 M クエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液 1 ml, 0.1% DNA (from salmon testes) 0.5 ml, 酵素液 0.5

---

\* 琉球大学農学部

\*\* EDTA : エチレンジアミンテトラアセテート

琉球大学農学部学術報告 26 : 83 ~ 90 (1979)

ml を含んでいる。この混液を 37°C, 30 min インキュベートした後, 1 N 過塩素酸 4 ml を加えることによって反応を停止せしめ, 東洋濾紙 # 5 C にて濾過する。この濾液中の酸可溶ヌクレオチドを日立 100-10 型分光光度計を用い, 260 nm の吸光度を測定する。活性単位は上記条件下で OD<sub>260</sub> の増加 ( $\Delta OD_{260}$ ) 1.0 を生ずる酵素活性をもってした。

#### 4. 熱変性 DNA の調製

DNA (from calf thymus) を 10 mM EDTA\*\* の存在で, 95°C, 45 min 沸騰水中で加熱処理を行った。後氷水中にて急冷し, 次いで EDTA 濃度 0.025 % になるよう透析, 希釈をする。

#### 5. オニヒトデ DNase に依る DNA 分解物のゲル濾過

pH 5.0, 0.1 M クエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液 2 ml, 0.2 % DNA (from salmon testes) 1 ml, 酵素液 1 ml を含む反応混液を 37°C でインキュベートし, 75°C, 10 min 加熱して反応を停止し, 徐冷後この反応混液を Sephadex G-150 カラム (2×50cm) にのせた。溶出は 13 ml/hr で蒸留水を用いて行った。各画分は 5.2 ml として 260 nm の吸光度を測定した。

### III 実験結果

#### 1. 粗酵素標品の調製

-20°C で凍結保しておいたオニヒトデより, 水中で解剖し取り出した幽門盲嚢 (pyloric caeca) 50 g に pH 7.0, 0.05 M リン酸緩衝液 50 ml を加え 3 min ホモジェネートし, 更に同緩衝液を加え 15,000 rpm で 60 min 遠心分離を行う。この上清にアセトンを加え最終 85 % とする。得たる沈澱を乾燥して 8-10 g のアセトン粉末粗酵素標品を得た。これを PCAP と略称した。

#### 2. PCAP DNase の諸性質

##### 1) DNase 活性と酵素濃度 (Fig. 1)

酵素濃度 75  $\mu\text{g}/2\text{ ml}$  までの間では  $\Delta OD_{260}$  と使用酵素濃度の間に直線関係がみられた。

##### 2) DNase の作用に依る DNA 分解のタイムコース (Fig. 2)

PCAP 50  $\mu\text{g}/2\text{ ml}$  を用い 37°C, 2 hr まで時間を変えて分解度との関係を調べた。反応時間 40 min までの間時間と  $\Delta OD_{260}$  の間に直線関係が得られた。以上よりして以下の実験では特記しない限り 37°C, 30 min の条件で DNase の測定を行った。

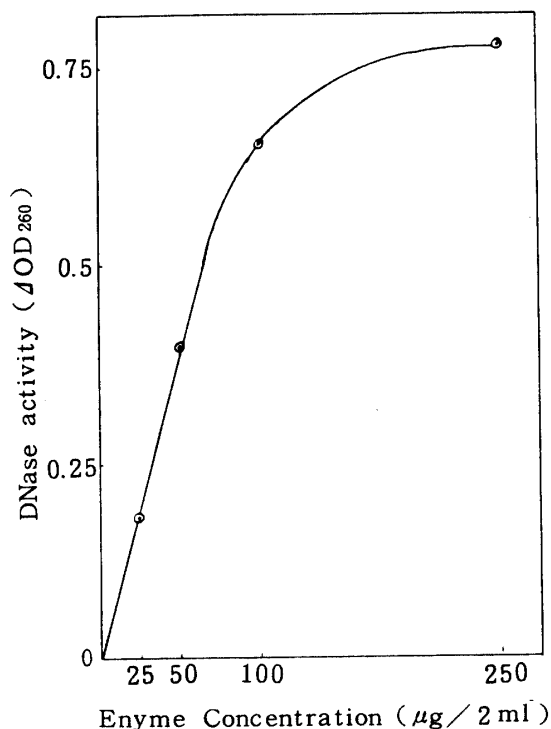


Fig. 1 Effect of DNase concentration on its activity

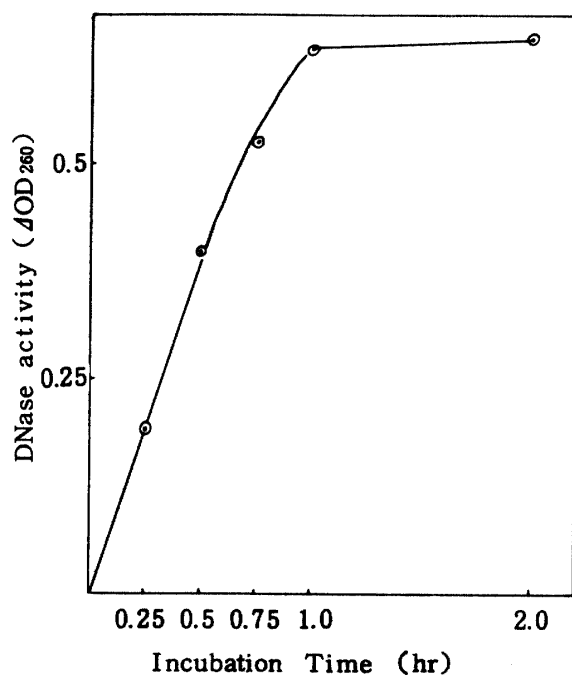


Fig. 2 Time course of DNA degradation by DNase.

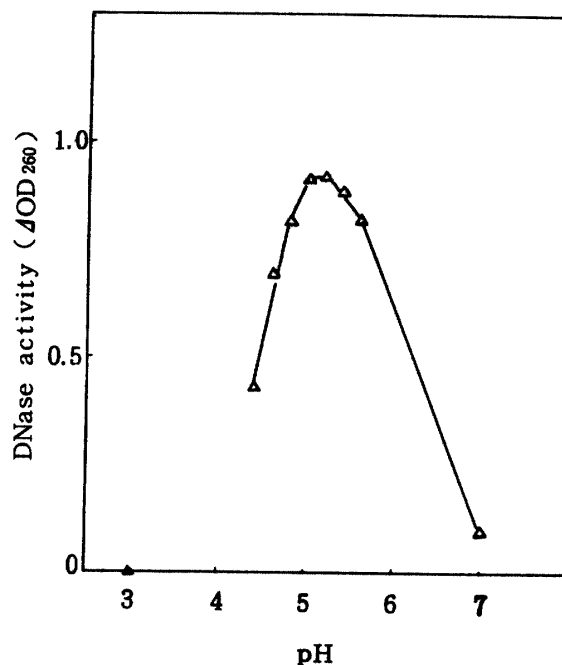


Fig. 3 Effect of pH on DNase activity.

3) DNase 活性に及ぼす pH の影響

pH 3.0, pH 7.0では殆ど活性が見られず, 至適pHの一つは5.0附近にあった。(Fig. 3)

4) 金属イオンのDNase 活性に及ぼす影響 (Table 1)

PCAPを50mMのEDTA溶液に対し透析し, 後酵素濃度が200 μg/ml, EDTA濃度が0.25 mMになるように調整する。このようにして得た酵素と, EDTAに対し透析しない酵素について, 金属イオンのDNase 活性に及ぼす影響を調べた (Table 1)。pH 5.0の0.5 M酢酸緩衝液に MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, (最終濃度 1 × 10<sup>-2</sup> M) を添加しDNase 活性を測定したが, 著しい金属イオンの影響は見られなかった。

Table 1. Effect of various metal ions on activity of DNase from *A. planci*

| Salt<br>(final concentration, 10 mM) | DNase activity (ΔOD <sub>260</sub> ) |                |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------|
|                                      | before dialysis                      | after dialysis |
| Acetate buffer (pH 5.0)              |                                      |                |
| Metal free                           | 0.586                                | 0.575          |
| MgCl <sub>2</sub>                    | 0.578                                | 0.700          |
| ZnCl <sub>2</sub>                    | 0.567                                | 0.546          |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0.720                                | 0.747          |

### 3. Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィ

精製の最初の段階としてPCAPをSephadex G-150カラムにかけた(Fig. 4)。予めpH 5.0, 0.01M, クエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液で平衡化したSephadex G-150カラム(3.8×130 cm)に, PCAP 1.4 gを26 mlの同緩衝液に溶かし載せ, 同緩衝液を用いて溶出した(流速25 ml/hr)。10 ml<sup>1</sup> づつの画分を集めてタンパク濃度とDNase活性を測定した。DNase活性は2つのピークに出現した。第1ピーク(Fr. #45-Fr. #59), 第2ピーク(Fr. #70-Fr. #100)を夫々集め, 硫酸アンモニウムを0.9飽和になる様加え, その沈澱を集めて夫々F-I, F-IIとした。

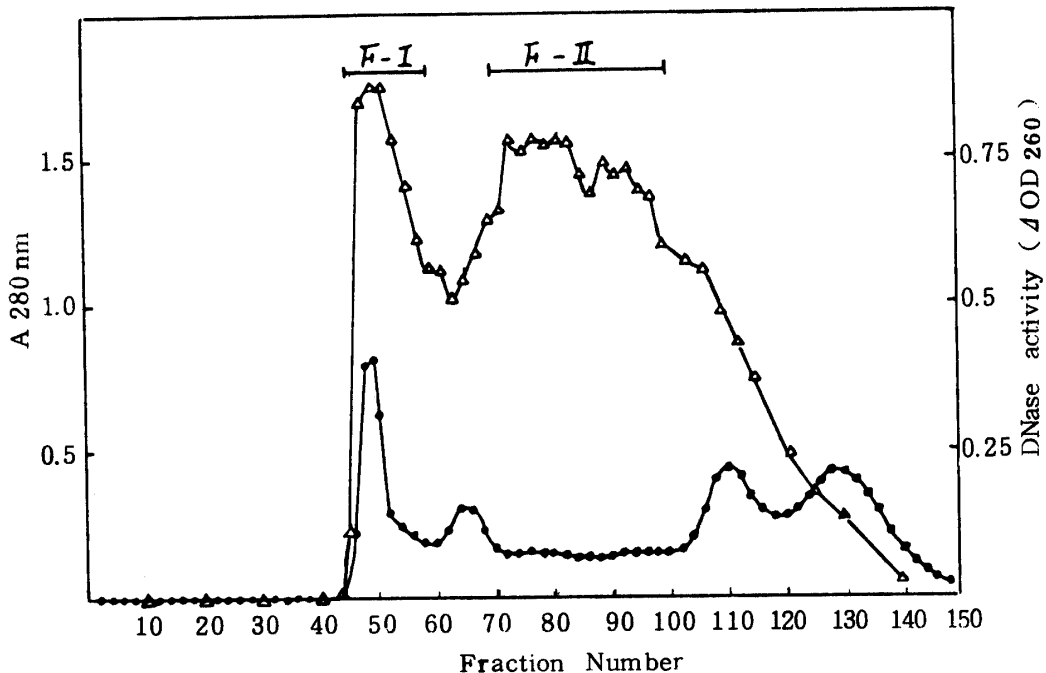


Fig. 4 Sephadex G-150 fraction of pyloric caecum acetone powder of *A. placi*. The solution (26.5 ml) was applied to a Sephadex G-150 column (38cm<sup>2</sup> × 130cm) which had been equilibrated with 0.01M citrate-phosphate buffer, pH 5.0. Fractions of 10 ml each were collected and analyzed for DNase activity (Δ) and measured at 280nm (●).

### 4. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィ

Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィに依り得られたF-II画分をDEAE-cellulose カラムクロマトグラフィにかけた(Fig. 5)。

予めpH 7.5, 0.01Mクエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液で平衡化したDEAE-cellulose カラム(2.5×30.6cm)にF-II画分12 ml(タンパク83mg)を載せ, 20 ml/hrの流速で同緩衝液で溶出した。Fr. #48でタンパクの溶出が始ど見られなくなったので, 同緩衝液を用い0-0.5M NaClのグラジエント溶出を行った。(各フラクション7 ml)。その結果 Fr. #85に活性ピークが得られたのでその画分(Fr. #68-Fr. #105)を集め硫酸アンモニウム0.9飽和で沈澱せしめた。

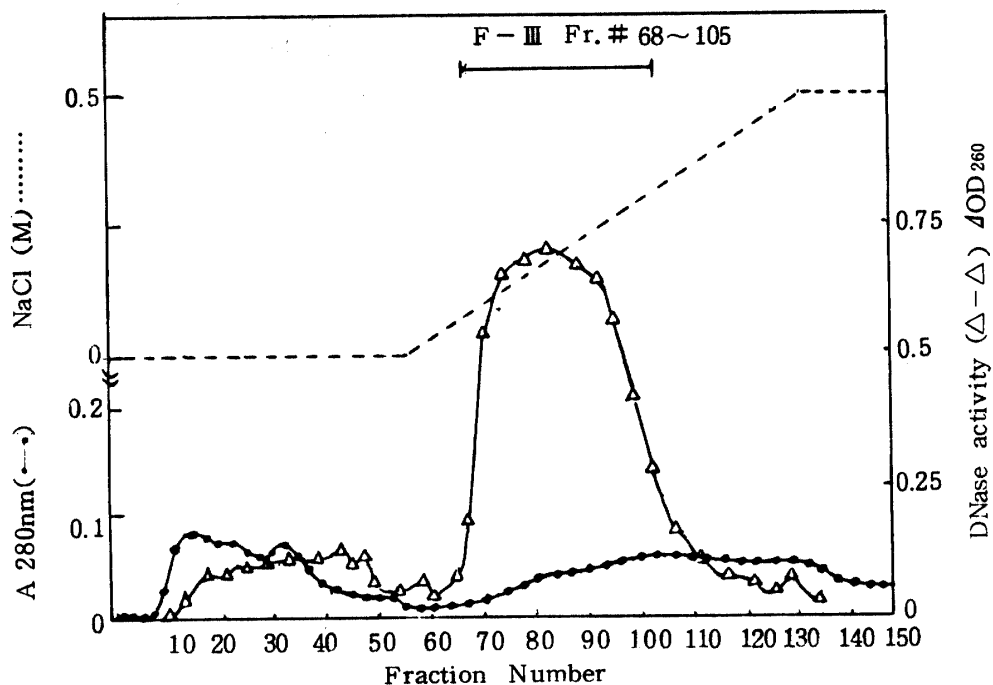


Fig. 5 DEAE cellulose column chromatography of the eluate from Sephadex G-150 column.

以上の結果をTable IIに要約した。本酵素精製の最終段階において比活性は約5倍まで上昇した。

Table 2. A summary of enzyme purification.

|                                      | Protein<br>( mg ) | Total<br>activity | Specific<br>activity | Purification |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|--------------|
| applied<br>sample                    |                   |                   |                      |              |
| Sephadex G-150 column chromatography |                   |                   |                      |              |
| PCAP                                 | 302.0             | 906.9             | 3.0                  | 1.0          |
| F-I                                  | 91.3              | 180.0             | 2.0                  | 0.6          |
| F-II                                 | 44.9              | 433.7             | 9.8                  | 3.2          |
| DEAE-cellulose column chromatography |                   |                   |                      |              |
| F-III                                | 9.5               | 146               | 15.0                 | 4.9          |

Table 3. DNase activity of *A. planci*  
DNase toward native and  
heat-denatured DNA.

| Enzyme | DNase activity ( $\Delta OD_{260}$ ) |                           |
|--------|--------------------------------------|---------------------------|
|        | Native DNA<br>(0.05%)                | Denatured DNA<br>(0.025%) |
| PCAP   | 0.030                                | 0.305                     |
| F-I    | 0.037                                | 0.225                     |
| F-II   | 0.038                                | 0.538                     |
| F-III  | 0.081                                | 0.465                     |

### 5. F-I, F-II, F-IIIの諸性質

#### 1) 熱変性DNAに対するDNAase活性

今まで用いて来た鮭精巢由来のDNAは熱処理して一重鎖とすると過塩素酸で沈澱しないので、本実験ではより高重合のDNAと思われる仔牛胸腺DNAを用いた。なおDNAase活性測定に際しては反応停止時に1N過塩素酸と共に、1%牛血清アルブミン2mlを加えた。その結果をTable IIIに要約した。即ち、いずれの画分も天然DNAより熱変性DNAに対し遥かに高いDNase活性を示した。

2) 至適pH F-IとF-IIでは差異が認められなかった。

3) 基質に対する作用様式

この目的のために、鮭精巢DNAとF-I, F-II, F-IIIと45 min, 4 hr 37°Cで反応せしめ、この反応混液を「実験材料及び方法5」に記載の方法でゲル濾過を行った。(Fig. 6はF-IIIを用いた結果であるがF-I, F-IIを用いた結果も著しい差は見られなかった。)即ち基質はFr.#9-Fr.#19の間

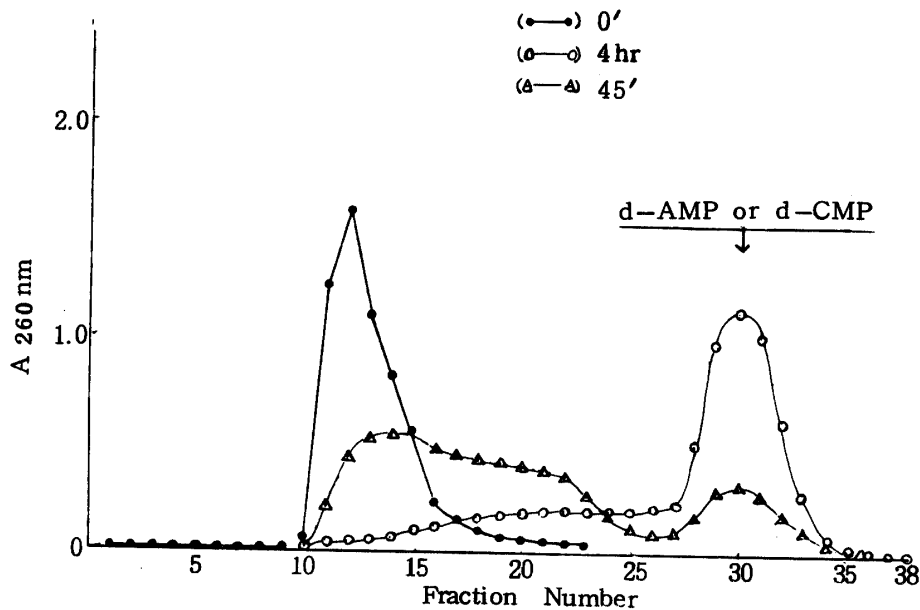


Fig. 6 Analysis of partially digested DNA by Sephadex gel filtration The incubation time is O (•), 45 min (Δ), 4 hr (⊙).

に溶出し、モノヌクレオチド(d-AMP及びd-CMP)はFr. # 29に出現した。45 min反応せしめた場合基質ピークは著しく低くなると共に、Fr. # 16-Fr. # 23にオリゴヌクレオチドと思われるショールダーが出現すると共に、モノヌクレオチドの出現が見られた。反応時間4 hrではオリゴヌクレオチドは殆ど消失し、モノヌクレオチドのピークのみが高くなった。このことは本酵素がエキソヌクレアーゼであることを強く示唆している。

#### IV 考察及び要約

1. 鮭精巣DNAとオニヒトデDNase(例えばF-III)の反応生成物をSephadex G-150のゲル濾過を行うと、反応初期よりモノヌクレオチドの生成が見られ、4 hr後には殆どモノヌクレオチドのみとなった。従ってこのDNaseは少なくともエキソヌクレアーゼの性質を有することは明らかである。

2. このオニヒトデDNase(例えばF-III)は仔牛胸腺より得た天然DNAを熱処理して得た一重鎖DNAを、天然二重鎖DNAの少なくとも約6倍程度強く分解した<sup>5)</sup>。

3. 上述の如くこのDNaseは天然の鮭の精巣DNAを強く分解した。このDNAは熱処理して一重鎖とすると過塩素酸で沈澱しなくなった。従ってこのDNAは仔牛胸腺DNAに比し低分子であると考えられる。事実Bollum<sup>1)</sup>も市販の鮭精液のDNA製品の一部分は低分子化していると述べている。従って本DNaseは比較的low molecular weightのDNAを分解することが出来ると考えられる。一方OlesenとKoerner<sup>2) 5)</sup>はバクテリオファージT<sub>2</sub>で誘導された大腸菌DNAエキソヌクレアーゼIVが肝臓ヌクレアーゼで一部分解された鮭精液DNAをその分解の程度が高まるにつれてより強く分解することを見出した。

従って以上の諸点において本酵素(F-I及びF-III)は大腸菌DNAエキソヌクレアーゼIV<sup>5)</sup>に似ているが、Mg<sup>++</sup>を必要としない点及び最適pHが5.0である点において異っている。

上記DNaseと鮭精巣DNAの反応生成物のSephadex G-150に依るゲル濾過において、反応初期にオリゴヌクレオチドの生成が見られた。これはこのDNaseの標品中に別のエンドヌクレアーゼが混在することを示すものであるのか、或いは単一のエキソヌクレアーゼが示すのであるかは今後のDNaseの精製により明らかにしていきたい。

#### V 参考文献

1. Bollum F. J. 1959 Thermal conversion of nonpriming deoxyribonucleic acid to primer, J. Biol. Chem. **234** : 2733-2734.
2. Boyer P. D. 1971 The Enzymes vol. 4 3rd Ed., P. 253-255, New York, Academic press.
3. Georgatos J. G. 1965 Specificity of alkali deoxyribonuclease from crab testes, Biochim. Biophys. Acta **95** : 544
4. Georgatos J. G. and O. Antonolgo 1966 Purification and specificity of a deoxyribonuclease of the hepatopancreas of *Octopus vulgaris*, J. Biol. Chem. **241**:2151.
5. Olesen A. E. and J. F. Koerner 1964 A deoxyribonuclease induced by infection with bacteriophage T<sub>2</sub>, J. Biol. Chem. **235** : 2935-2943.
6. Yanagawa H. 1977 Deoxyribonuclease A, a novel deoxyribonuclease highly active toward polydeoxyadenylic acid and polydeoxythymidylic acid from *Acanthia fulica*, J. Biochem. **82** : 519-528.



---

### Summary

A DNase was found in pyloric caecum of *Acanthaster planci*. It could hydrolyse natural DNA from salmon testes, which was thought to have comparatively low molecular weight, but could not hydrolyse natural DNA from calf thymus which could be hydrolysed by this DNase after being heat-denatured.

This DNase is considered an exonuclease, as judged from analysis by gel-filtration of the reaction product.