

# 琉球大学学術リポジトリ

## [原著]Deoxyribonuclease Iによる核酸初期分解生成物とb-form核酸との比較

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学保健学部 公開日: 2014-07-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井上, 文英, 中田, 福市, Inoue, Fumihide, Nakada, Fukuichi メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016345">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016345</a>

# Deoxyribonuclease Iによる核酸初期分解 生成物と b-form 核酸との比較

東京慈恵会医科大学 栄養学教室

井上文英

琉球大学保健学部 生化学教室

中田福市

## DNase I により生じた ph-DNA と b-form DNA との比較

Feulgen の方法<sup>1,2)</sup>で抽出した a-核酸溶液にウシ膵臓より抽出したパンクレアチンを作用させると、粘度が低下し a-核酸と性質の異なる b-核酸が得られる。その後 b-核酸の物理化学的性質が明らかにされ<sup>3,4,5)</sup>さらに Matsuda et al<sup>6,7)</sup>は基質核酸に対するパンクレアチンの酵素作用について研究し、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I, EC-3.1.4.5.)であることを明らかにし、かつ b-核酸は random coil structure であることを示した。DNase I の反応性についてはすでに明らかにされているが<sup>8)</sup>なかでも二価金属イオン (マグネシウム, マンガン, コバルト, カルシウム, ニッケル, ストロンチウム, カドミウム, 銅およびバリウム等) で活性化される<sup>9,10,11)</sup>とくにマグネシウムは最も活性化能が強く、一般に用いられている金属である。

DNase I による核酸の切断は反応条件によって影響されるが、ある程度の特異性がある。<sup>13)</sup>

今回我々は二重らせん構造を有する核酸を基質とし、Mg イオン濃度を極微量に保ち、弱酸性条件で DNase I を作用させて得られる初期生成核酸 (ph-DNA) の物理化学的性質と b-核酸とを比較検討した。

## 実験材料および方法

### 1) DNA:

A) 仔ウシ胸腺から温和な方法<sup>12)</sup>の変法で抽出精製して未変性核酸を得た。

B) 熱変性核酸は前記 A) の方法で得た核酸を、0.015M クエン酸ソーダを含む 0.15M NaCl (pH7.0) に溶解し、100°C15分加熱した後 0°C に急冷して得た。

### 2) ph-DNA:

未変性核酸を 1mg/ml の濃度に 0.15M NaCl (pH 7.0) で溶解し、この溶液に DNase I (ベーリンガー, Sephadex G-200 カラムで精製した標品) を終濃度 0.3mg/ml になるように加えて、30°C10分間振とうする。10分後直ちに EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を少量添加して反応をとめる。この反応液を Sephadex G-200 カラム (1.5cm×70cm) を用いて 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ソーダ (pH7.0) で溶出させ各フラクションは分光器で OD260 nm のメインピークを集めて凍結乾燥する。

### 3) 酸可溶性分画の測定:

核酸に DNase I を作用させた結果、核酸から遊離される酸可溶性物質を次の方法で測定した。反応混液 1.0 ml に再蒸溜水 0.5 ml を加えて攪拌後 3M 冷トリクロール酢酸 (TCA) を加え、0°C 5分間放置後、10K G10分遠心し上清を 20°C で 260nm の吸光度を読む。

### 4) ペーパークロマトグラフィー:

ワットマン No. 3, 5×35cm の濾紙を用いた。展開溶媒は 0.15M NaCl, pH7.0 ならびに 2M NaCl-1.0M NH<sub>3</sub>-0.01M リン酸緩衝液, pH11.0<sup>14)</sup> の 2 つの系を用いた。

染色は 0.5% トルイジンブルー O (メルク) の 50% メタノール溶液にて 30分間染色後水洗、さらに 5% モリブデン酸アンモン溶液中に 30分放置した後 60°C 乾燥器中で乾燥させた。

### 5) アガロースディスク電気泳動:

アガロース A-37 を最終濃度の 2 倍量蒸溜水に溶かし、同量の A 緩衝液 (終濃度 0.04M Tris-HCl, 0.02M 酢酸ソーダー 2mM EDTA, pH7.7) とエチジウムブロマイド (100μg/ml) を加えて電気泳動用

ゲルを作った。重合したゲルをディスク用ガラス管（一端はメッシュのこまかいナイロンネットの一片でとめる）に充填し、上端3mm程度の空間が出来るように調整する。

試料核酸0.7~2.0  $\mu\text{g}$  を10mM トリスHCl-0.5mM EDTA (pH 7.6) にショ糖濃度が5% (w/v) になるように加えた緩衝液0.05~0.25ml に溶解する。試料溶液をゲルに適用し27°C, 0.25mA/Tube, 1時間電気泳動した。電気泳動終了後ゲルを取出し、暗室にて紫外線を照射するとオレンジ色の蛍光帯として観測される。

#### 6) 融解曲線(深色効果) :

核酸をOD260nm が約0.5になるように0.15M リン酸緩衝液-0.015M クエン酸ソーダ, pH7.0 に溶解し, 20°Cより漸次升温し, 各温度におけるOD260nm を読み20°Cの時のODとの比を算出する。その比と温度との関係のみた。

すべての実験を通じ用いた水は, 再イオン交換水をガラス製蒸溜器で2回以上蒸溜して用いた。一般試薬のほとんどは半井化学の特級かまたは再結晶したものをを用いた。

### 実験結果と考察

未変性DNA, Feulgen's DNA および Gulland et al. の方法<sup>15)</sup>で抽出した Gulland's DNA を0.15 M NaCl, pH7.0の溶媒でペーパークロマトをおこなった結果, それぞれの Rf は図1に示したごとくいずれも原点にとどまるが, ph-DNA の Rf は0.95であり, b-核酸と同じRf値を示した。同一試料を2M NaCl-1.0M NH<sub>3</sub>-0.01M リン酸緩衝液 pH11.0の溶媒で展開した結果も同一であった。

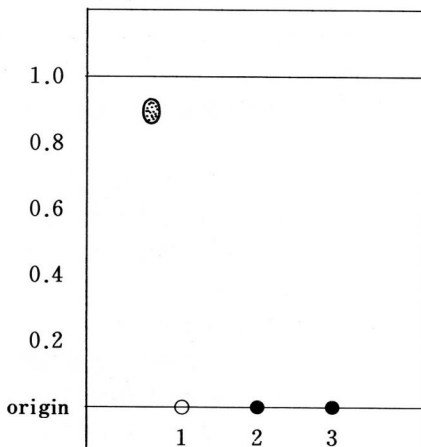


図 1

0.15M NaCl, pH7.0の溶媒における核酸のペーパークロマトグラフィー。

1. ph-DNA 2. 未変性DNA 3. 熱変性DNA

Bendich et al.<sup>14)</sup>は Feulgen's DNA を前記と同様組成の食塩-アミノ酸緩衝液を用いペーパークロマトをおこなっているが, その結果の Rf 値は我々の Rf 値より大きい。このことは Bendich et al. の抽出した DNA は, 抽出過程において核酸分子内に切れ目を生ずるような操作をした結果, 溶媒との親和性が増したためと思われる。

#### 融解曲線 :

二本鎖DNAは二本の鎖が互いに水素結合によって構造が保持されている。二本鎖DNAを除々に加熱すると, ある特定の水素結合から切れ, 核酸に特有の紫外外部吸収極大における吸光度が次第に上昇する。温度と相対吸光度との関係を図にあらわすと, シグモイド曲線が得られる。このシグモイド曲線は溶媒の塩濃度と塩基のグワニン(G)とシトシン(C)含有率などに依存する。すなわちDNAの構成塩基のうちアデニン(A)とチミン(T)は二本の水素結合で, またGとCは3本の水素結合で対をつくっていることは, ワトソン-クリック模型からわかる。このG, C含有率の高いDNAほど水素結合が切れにくいことによるものである。またシグモイド曲線は塩濃度に依存する理由として, ポリヌクレオチドは一種の polyelectrolyte と考えられ, 溶媒のイオン強度が塩基間水素結合に影響をおよぼすことが考えられる。一本鎖DNA(熱変性DNA)についての温度と相対吸光度との関係はシグモイド曲線とはならず, 直線的グラフが得られる。

ph-DNA は Gulland's DNA や未変性DNAと同様, シグモイド曲線が得られたが, b-核酸や熱変性核酸では直線グラフとなった。<sup>6,7,12)</sup>すなわちph-DNA は二本鎖構造であるのに対しb-核酸は一本鎖と考えられる。

#### ホルムアルデヒドとの反応性 :

b-核酸および ph-DNA を260nmの吸光度が0.5となるように0.15Mリン酸緩衝液(pH7.0)にそれぞれとかし, 3%ホルムアルデヒドを添加して37°C, 1時間振とうした。その結果b-核酸は260nmにおける吸光度が約30%増加し, 吸収極大の波長は263nmにshiftした。しかしph-DNAではホルムアルデヒドとの反応性を示さず, 吸収極大のshiftおよび吸光度の増加はみられなかった。ホルムアルデヒドはアミノ基が遊離している場合にのみ反応する。

したがってph-DNAは塩基-塩基対を作っていてアミノ基がふさがれていることを意味する。二本鎖DNAがホルムアルデヒドと反応しないこと,<sup>16)</sup>先

にのべた融解曲線の結果および ph-DNA 赤外吸収スペクトルにおいて  $1705\text{cm}^{-1}$  での dip が得られた<sup>12,15)</sup> ことから ph-DNA は二本鎖と考えられる。ph-DNA の出発物質である末変性核酸および Gulland's DNA もホルムアルデヒドとの反応性を示さなかった。

一方b-核酸はホルムアルデヒドと反応することから、遊離アミノ基を有し一本鎖となっているのであろう。

#### 酸可溶性分画：

図2はph-DNAを得る条件下での酸可溶性分画生成度と深色効果との相関図形である。酸可溶性分画は時間とともに増加するが、深色効果は約60分後から一定値となる。すなわち極微量のMg存在下ではDNAは限定分解されph-DNAとなる。しかし60分後にMgイオンを極少量添加すると、深色効果は増加しEDTAを加えると停止する。

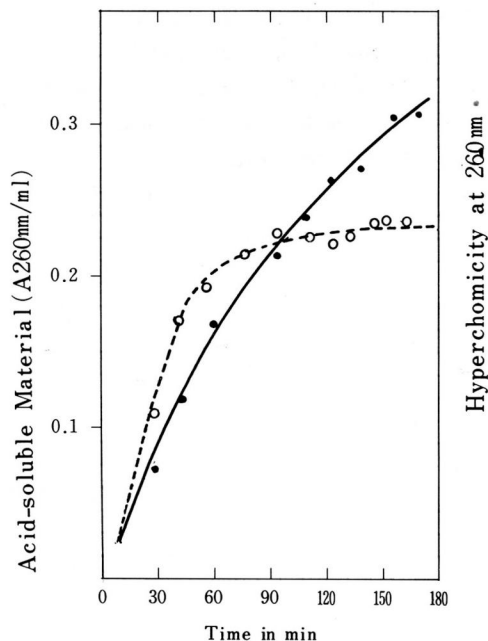


図2 酸可溶性分画の吸光度

(.....) 深色効果, (—) 酸可溶性物質

#### 分子の大きさ：

動物細胞のDNAは非常に大きな分子であって、精製過程で切断されるため、精製方法によって得られたDNAの分子量が異なり、現在の技術ではせいぜい $10^7$ のオーダーの分子量をもつDNAしか得られない。ph-DNAの原料である末変性核酸は、沈降速度係数  $S_{20w}^0$  と拡散係数  $D_{20w}^0$  から得た平均分子量

$1 \times 10^7$  であって Feulgen's DNA に比し天然に近い分子量であった。Feulgen's DNA とそれから得られたb-核酸の分子量の比は  $1 : 100$  であり、末変性核酸と ph-DNA の分子量の比は  $1 : 25$  であった。

融解曲線、ホルムアルデヒドとの反応性および赤外吸収スペクトルの実験結果から、ph-DNA は二本鎖構造をとり、b-核酸は一本鎖構造をとっている。

以上の結果を総括すると、DNAに対してDNase-1を作用させる際に、賦活イオンである  $\text{Mg}^{2+}$  濃度を極めて低い条件下で反応させると、限定分解され分子量的にも構造的にもb-核酸と異なるph-DNAが得られた。

このph-DNAの反応溶液中にさらに  $\text{Mg}^{2+}$  を微量添加すると、b-核酸が得られることから、我々の得たph-DNAはb-核酸の前駆体と考えられる。

二本鎖DNAにDNase-1が作用する機序の初期段階は、二本鎖のある特異的な部位で二本鎖を同時に加水分解し、二本鎖構造を保った断片に分れる。この段階で得られる断片がすなわちph-DNAであろう。次の段階は水素結合の切断により一本鎖となり(b-核酸)次々に加水分解が進行して最終的にオリゴヌクレオチド以下まで分解されるものと推測される。

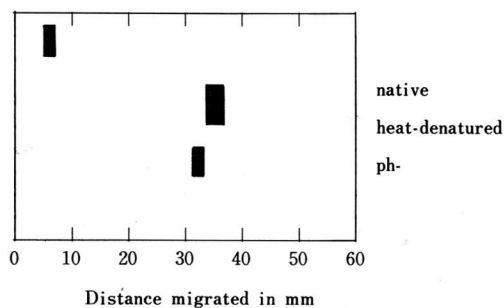


図3 アガロース・ディスク電気泳動図

#### 文 献

- 1) Feulgen, R.: Uber b-nucleinsaeure. Z. physiol. Chem. 91, 165-173, 1914.
- 2) Feulgen, R.: Z. Physiol. Chem. 237, 261-267, 1935.
- 3) Feulgen, R.: Die darstellung der b-thymonucleinsaeure mittels der nucleogelase. Z. physiol. Chem. 238, 105-110, 1936.
- 4) Signer, R., Caspersson, T., Hammarsten, E.: Molecular shape and size of thymonucleic acid. Nature 141, 122-128, 1938.

- 5) Yamazaki, N.: Studies on the physico-chemical properties of the so-called "b-nucleic acid". Natural Science Report Ochanomizu Univ. 11, 86-125, 1960.
- 6) Matsuda, M., Makino, K.: Feulgen's DNA the structure of DNA prepared by the method of Feulgen. Jikei Med. J. 11, 36-38, 1964.
- 7) Matsuda, M., Makino, K.: b-nucleic acid studies on so-called "b-nucleic acid". Jikei Med. J. 11, 39-48, 1964.
- 8) Junowicz, E., Spencer, J.H.: Biochem. Biophys. Acta 72-84, 1973.
- 9) Miyaji, T., Greenstein, J.P.: Cation activation of deoxyribonuclease. Arch. Biochem. Biophys. 32, 414-423, 1951.
- 10) Melgar, E., Goldthwait, D. A.: Deoxyribonucleic acid nuclease. 1. The use of a new method to observe the kinetics of deoxyribonuclease I, deoxyribonuclease II, and escherichia coli endonuclease I. J. Biol. Chem. 243, 4401-4408, 1968.
- 11) Melgar, E., Goldthwait, D. A.: Deoxyribonucleic acid nuclease. 11 The effects of metals on the mechanism of action of deoxyribonuclease I. J. Biol. Chem. 243, 4409-4416, 1968.
- 12) Inoue, F.: physicochemical studies of DNA partially hydrolyzed by pancreatic deoxyribonuclease. Jikei. Med. J. 20, 179-189, 1973.
- 13) Ehrich, S. D., Bertazzoni, U., Bernard, G.: The specificity of pancreatic deoxyribonuclease. Eur. J. Biochem. 40, 143-147, 1973.
- 14) Bendich, A., Rosenkranz, H. S.: A correlation between the sedimentation coefficient of deoxyribonucleic acid and its paper chromatographic migration. Arch. Biochem. Biophys. 94, 417-423, 1961.
- 15) Gulland, J. M., Jordan, D. O., Threlfal, C. J.: J. Chem. Soc. 1947. 1129-1130, 1947.
- 16) Frankel-Conrat, H.: Reaction of nucleic acid with formaldehyde. Biochim. Biophys. Acta 15, 307-309, 1954.

## Comparison of a b-form nucleic acid with an initial degradation product produced by deoxyribonuclease I

Fumihide Inoue

Department of Nutrition, The Jikei University School of Medicine

Fukuichi Nakada

Department of Biochemistry, College of Health Sciences, University of  
The Ryukyus

The purpose of this paper is to elucidate the hydrolytic processes and the physicochemical properties of the initial hydrolysate of thymus DNA by DNase I (EC-3.1.4.5) in the presence of a very low concentration of  $Mg^{2+}$ . By examining the increasing curve on the acid soluble material and hyperchromicity, the hydrolytic process of DNA was limited by DNase I under very low  $Mg^{2+}$  concentration. The partially hydrolyzed product (ph-DNA) did not show any spectral changes by the disruption of hydrogen bonds involving the reactive amino acid. Therefore, ph-DNA is considered to still retain a double helical structure. ph-DNA was obtained from the reaction mixture under hydrolytic condition and when more  $Mg^{2+}$  was added to the reaction mixture, the b-form DNA was produced.

It may be concluded that the ph-DNA is the initial degradation product of DNA obtainable by the action of DNase I in the presence of trace  $Mg^{2+}$ .