

氏 名	柴 野 裕 次 しば の ゆう じ
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 286 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON THE INTRACELLULAR DEOXY- RIBONUCLEASES IN <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (枯草菌の菌体内デオキシリボヌクレアーゼに関する研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 駒 野 徹 教 授 山 田 秀 明 教 授 門 田 元
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

近年、いくつかの微生物において、細胞内 DNA 分解酵素 (DNase) が数多く発見され、それらが DNA の代謝、形態変化、複製、修復、組換え等に重要な役割を果していることが明らかとなった。本論文は、著者が対数増殖後期の枯草菌の菌体内 DNase を検索し、新しく 2 種類のエキソヌクレアーゼが存在することを見だし、それぞれの成分を分離・精製してそれらの性質を明らかにし、生化学的役割について考察した結果を取りまとめたものである。

対数増殖後期の枯草菌 (M168TT) の細胞から粗酵素液を調製し、ポリエチレングリコールとデキストランの水性二相分配法により除核酸した後、硫酸分画した。得られたタンパク質画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なって、0.075 M のリン酸緩衝液で溶出されるヌクレアーゼ活性と 0.2 M のリン酸緩衝液で溶出されるヌクレアーゼ活性とを認め、前者を DNase A、後者を DNase B と命名した。

約 1,700 倍に精製された DNase A は、セファデックス G-100 やホスホセルロースカラムクロマトグラフィーでは単一ピークを示したが、ディスク電気泳動では 3 つのバンドを示し、活性は常にそれらの中のメインバンドと一致した。ゲルろ過法によって求めた分子量は約 35,000 であった。DNase A は未変性 DNA を熱変性 DNA の数倍の速度で分解した。両基質に対する活性は、至適 pH が共に 9.5 であること、及びディスク電気泳動法によっても同じ位置に活性が回収されることから、同一酵素によるものと結論できた。DNase A の反応は 2-5 mM の Mg^{2+} または 0.5-3 mM の Mn^{2+} を必要とし、SH 阻害剤により完全に阻害された。ATP などのヌクレオチド類は活性に影響を与えなかったが、高濃度の KCl は活性を阻害した。

DNase A による反応生成物は大部分がモノヌクレオチドであり、 $[^3H, 5'-^{32}P]$ DNA を基質とした時には、 ^{32}P が 3H より早く酸可溶性画分に遊離されてきた。このことは、本酵素が 2 本鎖 DNA の 5'-末端から 3'-末端方向にモノヌクレオチドを遊離しながら分解するエキソヌクレアーゼであることを示してい

る。紫外線照射 DNA を基質にすると、非照射 DNA の場合の約 50% を分解することができた。

一方、DNase B は約 1,400 倍に精製され、ディスク電気泳動的には単一ピークを示した。ゲルろ過法によって求めた分子量は約 200,000 で、 $S_{20,w}$ は 9.9S であった。ところが SDS-ゲル電気泳動法では分子量は約 56,000 と算出された。したがって本酵素は 4 個のサブユニットから成ると考えられる。DNase B は未変性 DNA を分解せず、熱変性 DNA を非常によく分解した。酵素は pH 7-7.5 で最大の活性を示した。反応は 2 価金属イオンによって促進されたが、この効果は絶対的なものではなく、2 価金属イオンが存在しなくとも約 30% の活性が残存し、EDTA 添加によっても活性は阻害されなかった。また SH 保護剤や SH 阻害剤によっても顕著な影響を受けなかった。ATP などのヌクレオチド類は活性に影響を与えなかったが、高濃度の KCl は活性を阻害した。

DNase B の反応生成物は、基質の 80% が酸可溶性になった時点でも テトラヌクレオチド以上のオリゴヌクレオチドであった。熱変性 [^3H , 5'- ^{32}P] DNA を基質とした時には、 ^{32}P が ^3H に先立って酸可溶性画分に遊離してきたが、このことは、本酵素が 1 本鎖 DNA を 5'-末端から 3'-末端方向にオリゴヌクレオチドを遊離しながら分解するエキソヌクレアーゼであることを示している。紫外線照射 DNA を基質にすると、非照射 DNA の場合の約 90% を分解することができた。

論文審査の結果の要旨

細胞内 DNA 分解酵素 (DNase) は DNA の複製、修復、組換え等に重要な役割を果しており、種類や特異性も多岐にわたっていることが明らかになってきている。著者は枯草菌の DNA 複製の終結期に近い対数増殖後期の細胞について、細胞内 DNase の種類と役割の解明を試みた。得られた結果は次の諸点に要約できる。

1. 除核酸した枯草菌 (M 168 TT) の粗酵素液の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行ない、0.075 M と 0.2 M のリン酸緩衝液で溶出される 2 種類のヌクレアーゼ活性を見出し、それぞれ分離・精製して DNase A, 及び DNase B と命名した。

2. ゲルろ過法で求めた DNase A の分子量は約 35,000 であり、DNase B の分子量は約 200,000 であった。しかし DNase B の SDS-ゲル電気泳動法で求めた分子量は約 56,000 であったことから、DNase B は 4 個のサブユニットから成っていると推定した。DNase A 及び B の至適 pH はそれぞれ 9.5 と 7.0-7.5 であり、また両活性は Mg^{2+} や Mn^{2+} などの 2 価金属イオン、及びメルカプトエタノールや還元型グルタチオンなどの SH 保護剤により促進されたが、NEM や PCMS などの SH 阻害剤では DNase A のみが強く阻害を受けた。このことから著者は、DNase A では SH 基が直接活性に関与しているものと推論している。両酵素活性に対して ATP を含むヌクレオチド類は何ら影響を与えないことも明らかにした。

3. DNase A は未変性 DNA を熱変性 DNA の数倍の速度で分解し、DNase B は熱変性 DNA のみを分解した。DNase A の分解産物は大部分がモノヌクレオチドであったが、DNase B のそれはオリゴヌクレオチドで、[^3H , 5'- ^{32}P] DNA を基質とした時、両酵素とも ^{32}P を ^3H よりも早く酸可溶性画分に遊離した。以上の結果から、著者は DNase A 及び B は共に DNA 分子の 5'-末端から 3'-末端方向に加水

分解するエキソヌクレアーゼであることを明らかにした。

4. 紫外線照射 DNA を基質にすると、DNase A は非照射 DNA を基質とした場合の約 50 %, また DNase B は約 90 %まで分解することができた。この結果は、DNase A 及びBは細胞内にあって DNA の修復に関与している可能性が強いことを示唆している。

以上のように本論文は、枯草菌の菌体内の2種類の DNase の分離・精製を行ない、それらの性質を明らかにしたもので、核酸の生化学、酵素化学、及び微生物生化学の分野に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。