

特異的リボ核酸の分離法I : メチル化フィブロイン カラムによる家蚕絹糸腺リボ核酸の連続溶出クロマ トグラフ

阿久根, 了
鹿児島大学農学部

向井, 純一郎
九州大学農学部農芸化学教室

<https://doi.org/10.15017/21562>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 19 (1), pp.53-58, 1961-11. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

特異的リボ核酸の分離法 I

メチル化フィブロインカラムによる家蚕絹糸腺
リボ核酸の連続溶出クロマトグラフ

阿久根了・向井純一郎

Studies on the isolation of a specific ribonucleic acid (I)

Gradient elution chromatography of silkworm
silk gland RNA on a methylated fibroin column

Satoru Akune and Jun-ichiro Mukai

高分子リボ核酸 (RNA) のクロマトグラフ分別剤としては現在セルローズの塩基性誘導体及び Dowex 樹脂等が広く用いられているが、それ等は温和な条件下においては回収率がかなり低い欠点がある。¹⁾ ヒストン^{2,6)} やメチル化アルブミン^{7,11,12)} を用いる方法は、その点では一段とすぐれた方法ではあるが、これ等も亦任意の蛋白質分子中の塩基性基を利用するだけの非特異的な方法であつて、ヌクレオチド配列の多様性による RNA 分子の高度の heterogeneity から考えると、その分別能にはおのずから限界がある。

著者等^{2,3)} は、家蚕後部絹糸腺内における絹フィブロインの生合成機作、特に特徴的なアミノ酸組成及び配列⁴⁾ を有するフィブロインに対応する特異的な RNA—広い意味で鑄型とも云える—を追求しつつあるが、如上の考察の結果から、フィブロイン生合成の場である後部絹糸腺 RNA のクロマトグラフ的分割、特にフィブロインに対応する特異的 RNA の分離の目的には、これを鑄型として合成されると一応仮定されるフィブロインそれ自体を交換或は吸着剤として用いる事が、生物学的見地からも原理的に最も妥当ではないかと思惟した。しかもフィブロインは従来のヒストンやアルブミンとは異つて、かなり単純なアミノ酸組成及び配列を有する線状蛋白質であると云う点においても興味深く、又純粋に多量に得やすいと言う利点に恵まれている。

一方、著者等は当学農学部蚕学教室の御厚意に依り、そこで系統を保存されている“セリシン繭家蚕”をフィブロイン合成能に対するコントロールとして使用する機会を得た。この遺伝子突然変異種 (通称 Nd-II) は、後部糸腺に於ける変異のために正常のフィブロインの合成分泌能を喪失し、その代りに非繊維性の正体不明の蛋白を合成する。^{5,14,16)}

斯くて著者等は、RNA へのイオンの親和性をます為にメチル化したフィブロインカラムを用いて、正常蚕及び Nd 蚕の後部絹糸腺 RNA のクロマトグラフを行なつた。

実験の部

I 後部絹糸腺リボ核酸の調製

家蚕 5 令 6 日目の後部絹糸腺を摘出して 0.8% 食塩水で洗い、ドライアイス上に投じて

凍結させ直ちに、或は -20°C に貯蔵した後、均質化剤として Ca-free Tyrode 液¹⁶⁾ を用いる木村、山名、柴谷¹⁷⁾ の改良フェノール法によつて調製した。ただし除多糖類操作を省略した。こうして所謂 pRNA 分画 (フェノール処理によつて解離放出される RNA 部分) と rRNA 分画 (残りの RNA 部分) を得た。前者の P 含量は 6.3%, 収量は新鮮組織 1 g 当り 7~10 mg であつた。本実験では pRNA のみを用いた。

II メチル化フィブロインの合成

常法¹⁸⁾ に依つてセリシンを除いて精練したフィブロイン繊維を 50 倍量の水酸化銅・エチレンジアミン液 (6:8) に溶解させて 3 分後に 1.25 N 醋酸にて中和し、無色透明になるまで水道水に対して透析したものを数倍容のメタノールに投じて沈澱させる。数回メタノールにて反復洗滌後、Fraenkel-Conrat 等⁹⁾ の方法によつてメチル化を行なつた。反応条件は、用いたフィブロインに対して 50 倍 V/W の無水メタノール、塩酸濃度 0.05 規定、温度 $22\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、時間は 1 週間である。この間毎日数回よく振りまぜる。上澄液を傾斜して除いた後ゲル状の白色沈澱をガラスフィルター上に集め、無水メタノールで数回洗つた後真空デシケーター中で吸引乾燥し、粉碎して 325 メッシュの篩を通す。こうして白色~淡黄色のメチル化フィブロイン粉末を得る。Fraenkel-Conrat 等によれば、この様な条件下では、蛋白質分子中の遊離-COOH 基は殆ど定量的にメチル化されるが、フェノール性-OH 基および-NH₂ 基は影響されないと云う。

III カラムクロマトグラフィー

この研究においては、*in vivo* に於けるフィブロイン-鑄型 RNA の間の特異的な相互作用を、単純なイオン強度又は pH プロットにおいて出来るだけ再現することを意図し、よつて正常蚕と Nd 蚕の後部絹糸腺 RNA のクロマトグラフにおける溶出パターンの精密な比較を行なうものである。したがつてその方式としては linear gradient elution system¹¹⁾ を採用した。実際の操作は以下の如く行なつた。即ちメチル化フィブロイン 0.5 g 及び Hyflo Supercel 2.5 g を蒸留水 15 ml 中に均一に懸濁させ、数回にかけて内径 1.0 cm のカラムに静かに注いで充てんし、約 20 ml の蒸留水を自然通過させる。この時流出液の吸光度は $D_{260\text{ m}\mu} \leq 0.05$ となつている。次いで 2 ml の蒸留水に溶かした 5 mg の RNA を静かに加えて吸収させた後に溶出を開始する。混合フラスコの組合せは、等レベル同一サイズの 250 ml 容量のポリエチレン瓶を、三方コックを真中に狭んだサイフォンチューブで連絡したもので、マグネチックスターラー上に静置された出口側フラスコからは細いビニールチューブを出してカラムに至る。通常は各 200 ml ずつの稀薄及び濃厚液から出発したが、それ等が流出し終つた後も必要に応じて、適当濃度の両成分液を適量補充して直線状濃度勾配を延長し、或は単に段階的に高濃度液に切り換える事によつて、RNA の溶出を促した。溶出速度は毎時約 6 ml で、溶出液はフラクションコレクターを用いて 3.2 ml ずつ分取し、260 m μ における吸光度を日立製分光光度計 EPU-2A 型を用いて測定した。

結果および考察

支配物質 RNA のクロマトグラフに於ける溶出パターンをもつて生物学的比較に触れよ

うとする場合には、回収が完全であることが必須である。本研究の当初は、前述よりもかなり強烈な条件 (0.1 N HCl, 35°C, 1 週間) のもとにメチル化を行なわせたものを用いたが、その結果、第 1 図に示す溶出パターンが得られた。即ち 200 ml の 0.02 M NaH_2PO_4 · 0.1 M NaClO_4 より 200 ml の 0.02 M Na_2HPO_4 · 0.1 M NaClO_4 への linear gradient elution によつては溶出がかなり困難であり、終了時の回収率は 21.6% にすぎなかつた (チューブナンバー 109)。そこで、更に 200 ml ずつの 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) · 0.1 M NaClO_4 より 0.02 M glycine-NaOH buffer (pH 11.0) · 0.1 M NaClO_4 への gradient elution によつて溶出を継続することによつて RNA の大部分 (90.2%, チューブナンバー 233) が溶離したが、なおついで 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) · 0.5 M NaClO_4 に切り換える事によつてはじめて溶離する部分が残つた (全回収率 105.1%, チューブナンバー 243)。即ちこのように烈しい条件下において合成されたフィブロインメチル化物は RNA との結合力が強く、はじめの連続溶出クロマトグラフにおける回収率が低いことがわかつた。しかもこの合成物は、前述のように、はじめのフィブロインから甚だしく変化した誘導体になつていたので、本研究の目的には適当ではないと考えられる。次に、遊離-COOH 基のみに選択的な、より温和な前述の条件下

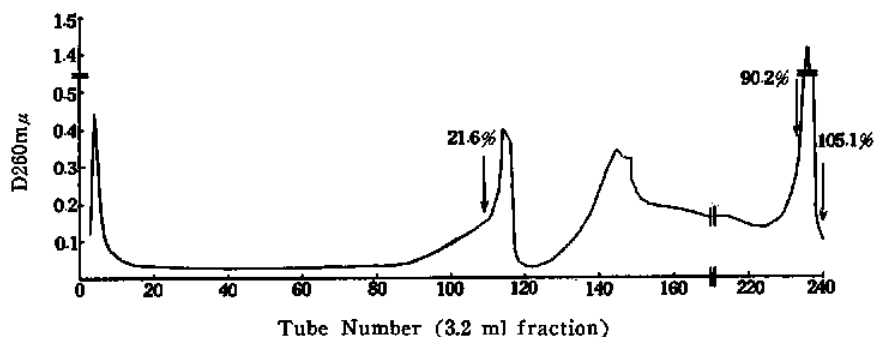


Fig. 1. Poor recovery of RNA from the column of methylated fibroin prepared under a drastic condition.

に合成されたメチル化フィブロインを用いて、同様の方法によつてクロマトグラフを行なうと、第 2 図の如き結果を得た。この場合には、RNA の安定性が充分に保たれる低イオン強度及び pH 4.75 (200 ml/ 0.01 M NaH_2PO_4) より pH 8.50 (200 ml/ 0.01 M Na_2HPO_4) の範囲における linear gradient elution により約 80% の回収率を示し、しかも最後に 0.05 M Na_2HPO_4 (pH 8.59) に切り換えて溶離させる事により完全に回収する事が出来た。しかも、このように濃度変化が徐々に直線状に起つている温和な生理的条件によるクロマトグラフにおいては、フィブロインとこれに対応する鑄型 RNA との間の *in vivo* における特異的相互作用——特に、重合されたフィブロイン分子の鑄型 RNA からの解離——を規定する複雑な諸要素のうち、少くとも pH およびイオン強度に関する二要素が近似的に再現され得たものと考えられる。こうして、正常蚕 (N-II) の後部絹糸腺 RNA は、メチル化フィブロインとの相互作用に関しては 3~4 成分に分別される事が判明し

た。この後部腺組織は、機能的に単純な絹糸腺の中でも特にフィブロインの合成分泌を行なう独特な場であるから、上の実験事実は面白い。

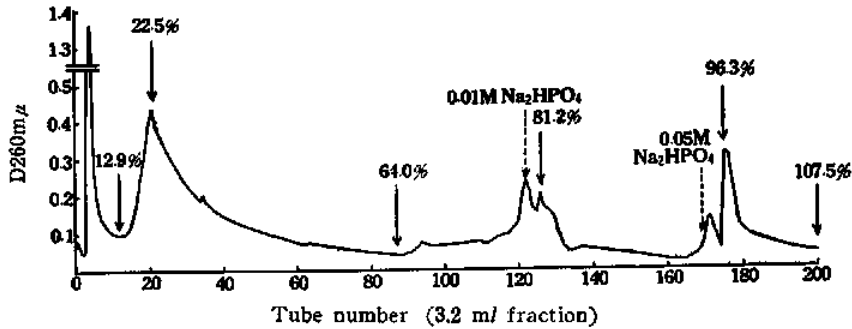


Fig. 2. Good recovery from the column of methylated fibroin prepared under a mild condition; RNA from the normal silkworm larvae (N-II).

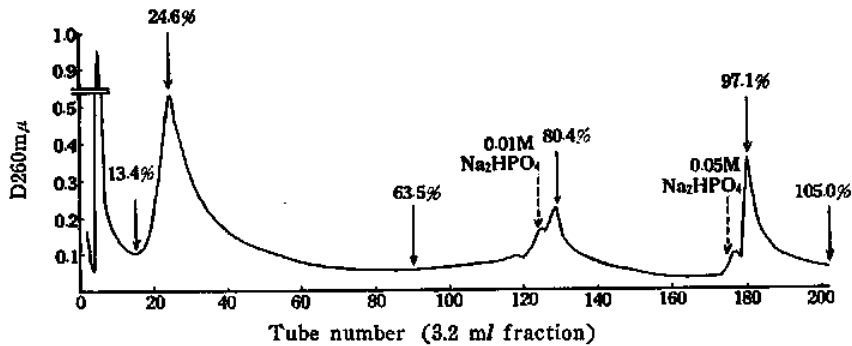


Fig. 3. Chromatographic condition the same as Fig. 2; RNA from the mutant silkworm larvae (Nd-II).

次に、はじめに述べたように、Nd-II 蚕 RNA の溶出パターンと比較した結果殆ど同一の相互作用パターンを与える事がわかった。即ち第2及び第3図に示されたように、第1、第2番目の両ピークの間 RNA の吸収が最低な所での回収率は N-II : 12.9%、Nd-II : 13.4%。第2の鋭いピークまでの回収率は N-II : 22.5%、Nd-II : 24.6%。第3のピークまでの間の吸収最低の所 (チューブナンバー N-II : 86, Nd- : 90) では N-II : 64.0%、Nd-II : 63.5%。溶出液を 150 ml の 0.01 M Na_2HPO_4 に切りかえてから 5, 6 本目に現われる小さいピークでは N-II : 81.2%、Nd-II : 80.4%。ついで 100 ml の 0.05 M Na_2HPO_4 に換えてから 6, 7 本目に現われるピークでは N-II : 96.3%、Nd-II : 97.1%。最後に N-II : 107.5%、Nd-II : 105.0% となった。

以上の結果から、少なくともこの実験において再生された相互作用に関しては、正常蚕と変異蚕の後部絹糸腺 RNA は区別され難いことが判明した。したがって、これだけではフィブロインに対応する特異的な RNA への手掛りは掴めない。正常蚕と変異蚕の後部絹糸腺における RNA 含量に著しい差異があることは既に明らかにされた。^{3,14)} ここに

Schneider 法¹⁷⁾にて定量した一例を掲げると第1表の通りである。それにも拘らず、両 RNA のメチル化フィブリン上でのクロマトグラフパターンが殆ど完全に一致することはむしろ奇妙と云わねばならないであろう。この点の説明は現在困難ではあるが著者等は種々考察中である。例えば極微量の Mg^{++} 又は

Table 1. RNA content in the posterior silk glands, as estimated by Schneider's method.

Strain	Phenotype	RNA-P/DNA-P
2822-3	N-II	18.0
	Nd-II	12.7
729-3	N-II	21.0
	Nd-II	15.9

Ca^{++} イオンの存在によつて、Ecteola-Cellulose カラム上での RNA のクロマトグラムが著しく改善され、再現性が増す事が知られている。⁶⁾ また週日熊本県蚕業試験場の稲神馨氏も助言されたように、フィブリンの-COOH 基のみをマスクする事によつても鑄型 RNA との特異的相互作用に必須な立体配置が突改される可能性は充分考慮すべきであろうし、したがつて、インタクトのフィブリンを用いて試みることも必要であろう。このことについては現在予備実験の範囲を出ないが、特定の条件を選ぶことによつて良好なクロマトグラムが得られる事が認められた。メチル化フィブリンは塩基性の誘導体であるが、フィブリンそのものは等電点 pH 3.4 付近の酸性蛋白質である。したがつて、この場合には前者に比べて RNA との間の人為的な静電作用が弱められる結果、相互作用が却つてより特異的に行なわれるのではないかと考えられる。

以上に述べたように、フィブリンと鑄型 RNA との間の特異的相互作用を、フィブリン部分メチル化物カラムによる後部絹糸腺 RNA の連続溶出クロマトグラフにおいて再現しようとした意図は、明確な結果をもつて達成されるには至らなかつたわけである。

しかしこの方法は、今後フィブリンそのものを用いる方法とともに、特異的 RNA 分子の単離精製法として原理的にユニークな、且つ将来性のある方法であると思われる。

要 約

(1) 家蚕幼虫 5 令 6 日の後部絹糸腺からフェノール法によつて調製された高分子 RNA は、フィブリン部分メチル化物-セライトカラムによる直線状濃度勾配連続溶出クロマトグラフにおいて 3~4 成分に分別される。その際回収はほぼ完全に行なわれる。

(2) フィブリンを合成分泌しうる正常蚕と不能な遺伝子突然変異蚕との間では、後部絹糸腺における RNA の含量には顕著な差があるにも拘らず、メチル化フィブリン-セライトカラムによるクロマトグラフにおける溶出パターンでは差異が殆ど認められない。

文 献

- 1) 赤堀四郎・成田耕造, 1957. 絹糸の構造, p. 93, 養賢堂, 東京.
- 2) 阿久根了・向井純一郎・村山晃, 1961. 日蚕雑, 30:73.
- 3) 阿久根了・向井純一郎, 1961. 日本農芸化学会大会シンポジウム, 福岡.
- 4) Bock, R. M. and Ling, N. S., 1954. Anal. Chem., 26:1543.
- 5) Brown, G. L. and Watson, M., 1953. Nature, 172:339.
- 6) Brown, G. L., 1955. Nature, 176:971.
- 7) Brown, R. A., Davis, M. C., Colter, J. S., Logan, J. B. and Kritchevsky, D., 1957. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 43:857.
- 8) Creaser, E. H. and Spencer, J. H., 1960. Biochem. J., 76:171.
- 9) Fraenkel-Conrat, H. and Olcott, H. S., 1945. J. Biol. Chem., 161:259.
- 10) 林 勝哉, 1957. 絹糸の構造, p. 340, 養賢堂, 東京.
- 11) Hershey, A. D. and Burgi, E., 1960. J. Mol. Biol., 2:143.
- 12) 木村孝一・山名清隆・柴谷篤弘, 1959. 生物科学, 11:145.
- 13) Lehman, L. S., 1955. Biochim. et Biophys. Acta, 13:132.
- 14) 待田行雄, 1961. 日本蚕糸学会大会, 京都, ならびに私信.
- 15) 三浦謙一郎・渡辺 格, 1958. 東大理工研報告, 12:147.
- 16) 仲野良男, 1951. 日蚕雑, 20:232.
- 17) Schneider, W. C., 1957. In Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Methods in Enzymology, 3:680.
- 18) 柴谷篤弘, 1959. 核酸シンポジウム, 京都.

Summary

A linear gradient elution chromatography of RNA of the posterior silk-gland of mature silkworm larvae was conducted on a methylated fibroin-celite column, in attempts at reviving the specific interaction *in vivo* between fibroin and a template RNA and also utilizing it to a unique method of isolating the protein-specific RNA.

RNA was shown thereby to be well fractionated into 3 or 4 components at a low ionic strength and in a mild pH range of ca. 4.8 to 8.6, with a 100% recovery.

However, contrary to authors' reasoning, no substantial difference could have been detected in respect of the elution pattern between RNAs obtained from the normal worm and from the mutant worm incapable of synthesizing fibroin.

Consequently, use of intact fibroin itself besides the methylated one was suggested as a more specific chromatographic interaction reagent. It is now under study with a partial success.

Agricultural Chemistry Institute,
Kyushu University, Fukuoka,
Japan