

## アミラーゼ生産菌のデオキシリボ核酸 III : アセトン乾燥菌体からの調整試験(3) 核酸様糸状夾雑物について

大村, 浩久  
九州大学農学部

渡辺, 健治

秋谷, 達司  
日本専売公社

<https://doi.org/10.15017/21602>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 20 (1), pp.41-46, 1962-10. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :



## アミラーゼ生産菌のデオキシリボ核酸 III

アセトン乾燥菌体からの調製試験 (3)  
核酸様糸状夾雑物について

大村浩久・渡辺健治・秋谷達司\*

Deoxyribonucleic acid of amylase-producing bacteria III.  
Trial of preparation from acetone-dried cells (3)  
On the nucleic acid-like fibrous contaminants

H. Omura, K. Watanabe and T. Akiya

アミラーゼ生産菌からの DNA 調製についてはアセトン乾燥菌体を用いて種々の方法を試験検討し、酵素リゾチームで菌体を処理して得たプロトプラスト、または完全な溶菌液から DNA を分離精製する操作が本菌にとつて一応適当したものであることを認めるとともに、調製に際して必要な核酸、核蛋白質、その他のものの諸性質について観察した。<sup>2,3)</sup> 即ち本菌の核酸及び核蛋白質も他の組織からのものと同じように 2 倍容のアルコールに添加することによつて沈澱し、また 2M NaCl 溶液中では核蛋白質は核酸と蛋白質とに分離し、後者はクロロホルム処理によつてゲルを生じて核酸から除かれる。しかしこの場合の分離は牛脾臓からのものように完全ではないので、クロロホルムによる除蛋白は十分には達成されない。一方酵母の場合<sup>4)</sup> とも異なつて粗沈澱を 10% CaCl<sub>2</sub> に溶かし 0.3 容のアルコールを加えた場合、DNA だけでなくかなりの量の RNA も沈澱してくるので、両核酸の分別は酵母のものほど容易には行なわれぬ。しかしこの CaCl<sub>2</sub> 溶液から得た沈澱を再び NaCl 溶液に溶かすと、これまでクロロホルム処理によつて除くことが出来なかつた蛋白質も分離し、重ねてクロロホルム処理を行なうことによつてゲルを生じ、殆ど完全に除かれるようになる等の特性が認められた。

一般に DNA を調製するには入手し易いこととともに DNA 含量の出来るだけ高い材料、例えば胸腺や脾臓或は精子等を用いることが望ましい。しかもこれらの組織のうちでも、とくに細胞核が DNA に富んでいるので予め核だけを分離して DNA の含量比をさらに

高くした後に核蛋白質を抽出するのが普通である。従つて RNA を比較的によく含み、その他の種々の成分も夾雑している細胞質部は既に除かれているので、不純物が混合する可能性はかなり避けられているが、このようにして得られる DNA 標品にも尚 RNA その他の成分が含まれている。これに対してとくに遺伝、ウイルス等、DNA の特異的な生理機能を追及する場合には DNA 含量の極めて低いものからも純粋に調製しなければならぬこともあり、細菌などはその例であつて、これまで多くの研究が行なわれてきた。アミラーゼ生産菌もこれに属するものであつて、脾臓などに比べて元来 DNA 含量は極めて低く、前報記載のように生菌の約 0.02% 程度の DNA 態構があるに過ぎない。その上に酵母と同様に RNA は比較的によく含まれていて DNA の 15 倍程度にも達している。しかも動物細胞の細胞核のように DNA が比較的に集中している顆粒だけを予め分離し、これから抽出するというような予備操作を行なうことも出来ず、菌全体の成分若くはせいぜいプロトプラストから DNA 成分を抽出しなければならぬので、これと同じ分割に多くの不純物も夾雑する可能性は非常に大きい。事実本菌から調製した DNA 標品は牛脾臓から同じ程度の操作段階で調製したものに比べて純度が著しく低かつた。

DNA ないし DNA 蛋白質は一般に白色糸状沈澱としてアルコールで沈澱することも代表的な特徴の一つであつて、調製操作では硝子棒に巻きつけて糸状沈澱だけを集める。これは DNA に富む部分を他の不純物から分離する簡便で然も有効な方法であつて、胸腺や脾臓の場合は勿論、一般に DNA を調製する場合にもつぱら利用される手段である。すなわちアルコールに加

\* 現勤務先：日本専売公社

えて生ずる沈殿のうち、糸状であることが DNA 沈殿を識別する一応の目安となっており、従つて得られた標品が白色糸状であることが DNA に関する一般概念からも望ましいのは当然である。しかし本菌の場合、糸状のものが必ずしも純度の高いものであるとは限らないことをすでに経験したが、さらにはなほだしい場合には DNA を殆ど含まない糸状標品が得られることもあり、過度に糸状沈殿ということにとらわれることは危険である。本報ではこの点に関する代表的な例を記載して調製及び使用に際しての参考に供したい。勿論 DNA 標品に混在する不純物のうち性質も似ており、その分離除去も困難であつて最も好ましくないものは RNA であつて本菌でも例外ではないが、これは総ての場合につねに考慮されているので本報では触れない。

### 実 験

DNA 調製に用いた菌体は前報のものと同じアセトン乾燥菌体であり、また種々の測定も前報記載のものに従つた。

アセトン乾燥菌体 10g を 0.14 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ混液 400 ml 毎に 2 回洗滌した後、pH

6.8 の 0.05 M 磷酸緩衝液-0.01 M クエン酸ソーダ混液 500 ml に懸濁した。これに 3 回再結した卵白リゾチーム湿潤標品 5g を加え 37°C で 22 時間反応させて溶菌させた。黄褐色の粘稠な溶菌液から前報に従つてアルコール沈殿、2M NaCl への溶解、クロロホルム除蛋白 (35 回反復処理)、アルコール再沈殿を行ない白色の糸状沈殿だけを硝子棒で集め、常法に従いアルコール濃度を逐次高めながら沈殿を洗滌するとともに脱水し、最後にエーテルで洗つた後減圧乾燥して 1098 mg の糸状標品を得た (これは前報の標品 IV-2a に対応する)。これを 10% CaCl<sub>2</sub> 200 ml にブレンダーを用いて溶かす。液は白濁しているので 10000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して不溶物を除いた。次に Chargaff 氏の方法に従い上澄液 200 ml に 0.3 容のアルコールを添加し生じた沈殿を 3000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して集める。これは DNA 標品 IV-2b 或は IV-3a 及び IV-3b に相当するものであつて DNA のほかにかなりの量の RNA も含まれた。沈殿を 0.3 容アルコールを含む 10% CaCl<sub>2</sub> で洗滌した後、さきの上澄液とこの洗滌液とを合せ、これにさらにアルコールを加えてその添加総量を CaCl<sub>2</sub> 溶液の 2 倍容とした。生じた沈殿を集め 200 ml の 2M NaCl に溶かし、再び

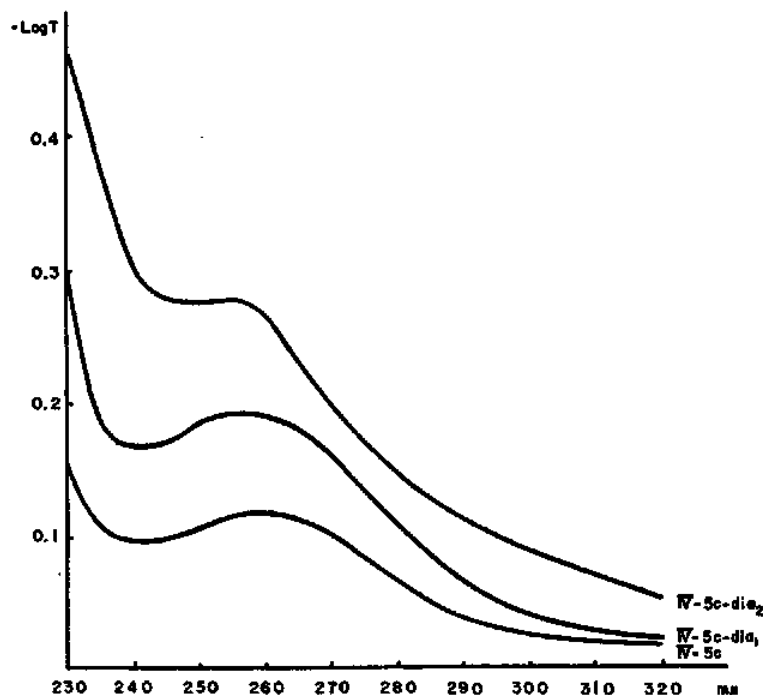


Fig. 1. Absorption spectra of Prep. IV-5c-dial<sub>1</sub> and IV-5c-dial<sub>2</sub>.

Table 1. Preparation IV-5c.

Preparation	Yield %	Wave length (m $\mu$ )		E (0.1%)			$\epsilon$ (P)*		P %		DNA† %	RNA† %
		Max.	Min.	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.	Inorg.	Org.		
IV-5c	4.23	259-256	242-239	0.118	0.098	1.20	43.6	36.2	0.4	8.39	trace	1.95

\* Figures were calculated on the basis of organic-P content.

† Figures are expressed by the amounts of DNA or RNA corresponding to the color intensity developed by Cysteine-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or Orcine-HCl reaction.

クロロホルム処理を繰り返して完全に除蛋白を行なった後（6回処理で完了）、重ねて遠心分離して上澄液 180 ml を得た。このうち 100 ml を直ちに 2 倍容アルコールに添加すると糸状沈澱を生じた。硝子棒に巻き付けて沈澱を集め常法により脱水乾燥して白色標品 235 mg を得た。これは前報の標品 IV-2c 或は IV-3c に対応するものであつて、便宜上標品 IV-5c とした。一方残りの 80 ml を 2 日間流水に透析した後 2 倍容アルコールに添加したが、沈澱を生じないで僅かに白濁するにとどまつた。しかし念のため透析液（標品 IV-5c-dia<sub>1</sub>）及び白濁アルコール溶液（標品 IV-5c-dia<sub>2</sub>）についても吸収スペクトルを測定し第 1 図に示した。

また第 1 表は標品 IV-5c の値であつて、その 0.1% 水溶液はオルシン-塩酸反応によつて若干呈色したが、システイン-硫酸反応は痕跡程度に過ぎず DNA は殆ど含まれていないことを示唆する。事実、この溶液の紫外外部に於ける吸光度は非常に低く、さらにこの標品の大部分が低分子のものであることは、流水透析によつて僅かに白濁する程度にアルコール沈澱性物質を残すに過ぎないまでに消失することからも明らかである。オルシン-塩酸反応から多少の RNA を含んでいることは推定されるが、これは 260 m $\mu$  付近に弱い吸収極大を示すスペクトルからも考えられる。いずれにしても呈色値から発色が総て RNA に基づくものとしても僅かに 2% に過ぎない。さらに厳密に云えば、吸収スペクトルも典型的な核酸のものとは異なり、極大部及び極小部はともに多少平坦であり、とくに極小部の波長は核酸のものよりはやや長波長側にずれている。透析液のスペクトルはとくに極大部の平坦域が 255 m $\mu$  付近を中心としてさらに顕著になり、その上に 240 m $\mu$  に明瞭な極小値が認められる。しかもこれにアルコールを加えると微白濁を生ずるにとどまることは上述の通りであるが、液が濁つたためにそのまま測定した紫外外部の吸収は 3 倍に稀釈されているにもかかわらず若干増加し、さらにスペクトルは 245 m $\mu$  付近から 258

m $\mu$  付近にかけて肩を生ずるに過ぎず、260 m $\mu$  の特徴ある吸収は認められなかつた。

本物質の本体については明らかでないが、比較的に有機磷を含むことは第 1 表から認められる。さらに中性付近の 0.2 M 磷酸緩衝液に溶かすと白色沈澱をかなり生じて明らかに核酸と異なる。一方 NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub> 等の塩類溶液には完全に溶解し何等の沈澱も生じない。また 0.2 M HCl にも溶けるが NaOH では僅かに沈澱の生成が認められた。

本標品 120 ml を 30 ml の塩類溶液に溶かし再び 2 倍容アルコールで沈澱させると寒天様のゲル沈澱と浮遊した糸状沈澱とにわかれた。糸状物だけを常法通り硝子棒で採り出し 4 ml の水に溶かし遠心分離して多少濁つた上澄液（標品 IV-5cf）と若干の不溶物（標品 IV-5cf'）とに分けられた。他方容器の底に固着した寒天状沈澱は傾瀉して上澄液を除いた後、改め

Table 2. Reprecipitates of Prep. IV-5c.

Fraction	Total-P* in r	Total-DNA† in r
Prep. IV-5cf	1852.0 (1.54%)	57.1 (0.05%)
Prep. IV-5cf'	228.0 (0.19%)	—
Prep. IV-5cg	721.6 (0.60%)	17.1 (0.01%)
Prep. IV-5cg'	40.4 (0.03%)	—

\* Figures are expressed by total amounts of P in 120 mg of Prep. IV-5c.

† Figures are expressed by the amounts of DNA corresponding to the color intensity developed by Cysteine-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaction.

These are the amounts of DNA in 120 mg of Prep. IV-5c.

120 mg of Prep. IV-5c were dissolved in 30 ml of salt solution and added it into 2 volumes of alcohol to precipitate. Glue-like precipitate and fibrous one were produced. Fiber was dissolved in 4 ml of water and centrifuged. Supernatant referred to as Prep. IV-5cf and insoluble matter as Prep. IV-5cf'. By the similar way, Prep. IV-5cg and Prep. IV-5cg' were obtained from glue-like gel precipitates.

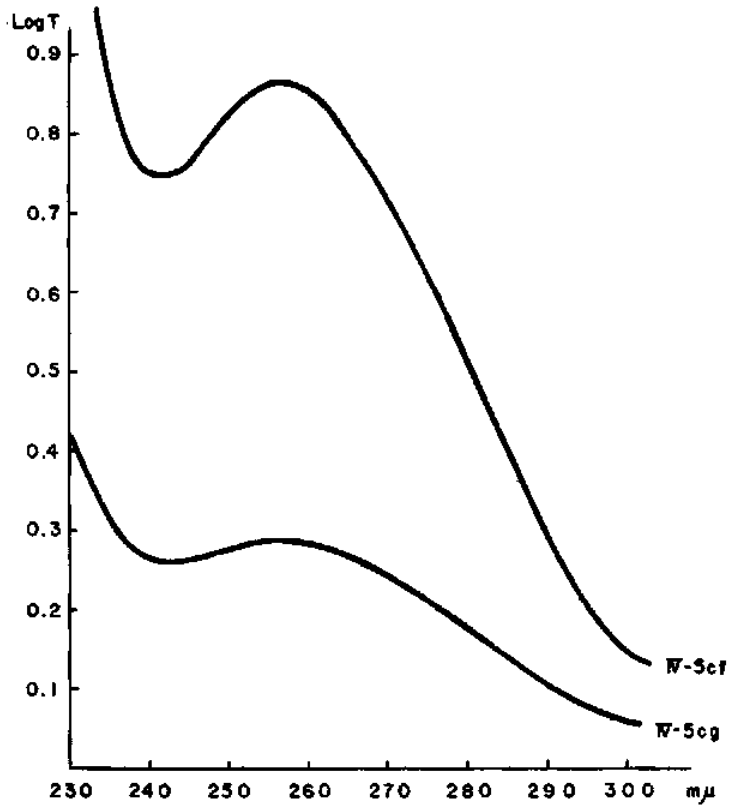


Fig. 2. Absorption spectra of reprecipitates from Prep. IV-5c.

Table 3. UV absorption of reprecipitates of Prep. IV-5c.

Fraction	Wave length (mμ)		E			ε(P)		Pr in 4 ml
	Max.	Min.	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.	
Prep. IV-5cf	256	242	0.864	0.746	1.16	57.8	49.9	1825.0
Prep. IV-5cg	256	242	0.292	0.262	1.11	50.1	45.0	721.6

て 4 ml の水を加えると大部分は溶解し(標品 IV-5cg) 若干の不溶物(標品 IV-5cf)を残した。これらの各部分は第 2 表に示すようにいずれも燐を含む。さらに第 1 表では 0.1% 溶液について測定したために、システイン-硫酸反応は痕跡にすぎなかつたが、標品 3% に相当する両溶液について改めて測定したところ多少の星色が認められたが、これから求めた DNA の全量は標品の 0.06% に過ぎなかつた。また全燐含量も原標品 IV-5c の約 2.4% であつて、残りは塩類溶液への溶解及びアルコール再沈により上澄液に溶けたまま除去されたことを示す。

また両上澄液の吸収曲線は第 2 図及び第 3 表に示す

ようにいずれも 256 mμ に弱い吸収極大を持つが、極小値は 242 mμ にあつて核酸のものとはかなり異なつてゐる。また極大値極小値の比も相当に小さい。すなわち第 1 図に示した標品 IV-5c あるいは透析液の紫外線吸収スペクトルは特に極大部が不明瞭であつて、若干の波長の範囲に亘つて平坦であつたが、再沈澱によつて多少精製された結果明瞭になつたものと考えられる。極小値はいずれの場合にも勿論核酸のものよりは長波長側にずれている。

吸収の値は糸状のものが高く寒天状のもの約 3 倍を示したが、測定は両分割の沈澱をそれぞれ 4 ml に溶かした原液について行なつたものであつて、両者の濃

度も異なっていると考えられる。事実、燐の含量も糸状部で寒天状部のほぼ 2.5 倍であつて  $\epsilon(P)$  には大差はないことが認められ、またシステイン-硫酸反応も第 2 表に示すように前者は後者の約 3 倍の強さを呈し、結局両者は吸収の点からは区別されなかつた。

他方核酸溶液が非常に高い粘性を示すのも代表的な特徴の一つであるので、標品 IV-5c について Ostwald 型粘度計を用いて、その水に対する相対粘度 ( $\eta_{rel}$ ) を 30°C で測定し、また比較のために還元粘度 ( $\eta_{sp}/c$ ) も算定した。

Table 4. Viscosity of aqueous solution of Prep. IV-5c.

Conc. in %	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025
$\eta_{rel}$	2.219	1.554	1.261	1.135	1.069
$\eta_{sp}/c$	1.53	1.36	1.31	1.35	1.38

同じアセトン乾燥菌体から種々の方法で調製した多くの DNA 標品の粘度については次報<sup>4)</sup>で述べるが、これらに比べても本標品の粘度は非常に低いことが認められた。

また牛脾臓 DNA をも含めて本菌の各 DNA 標品の粘度は塩類によつて著しく低下する。標品 IV-5c 溶液でも多少その傾向は認められるが、その程度もまた非常に弱いことが確かめられた。第 5 表は標品 IV-5c 0.8% 水溶液 1 ml と種々の塩類溶液 1 ml とを 30°C の恒温槽に浸した粘度計の中で混合した後測定したものである。

単一の塩類だけでなく緩衝液によつても同様に粘度の低下が起り、しかも pH によつてはそれ程著しい

相違が認められないことは、各種の DNA 標品の場合と同じ傾向を持つものであるが、勿論その低下度は低かつた。第 6 表は第 5 表に於けると同じ溶液について緩衝液の影響を測定した結果である。

## 考 察

細菌 DNA の調製はその核酸含量が低く、しかも細胞からの抽出がとくにむずかしいことから甚だ困難なものであるが、さらにすでに報告した通り得られた標品の純度も著しく低い。このことは抽出分離及び精製操作中に種々の溶媒や沈澱剤に対して DNA と似た挙動を示す物質が比較的が多いことを示唆するものと考えられる。従つて調製した標品を利用するに際しては特に注意しなければならない。

また一般に DNA の代表的な外観特徴として、これが白色糸状をなしているので調製に際しては純度の高いものであると同時に、糸状に得ることも一つの目標となつているかのような傾向が認められる。事実、動物の胸腺や脾臓等から DNA を調製する場合には、極めて容易に糸状に沈澱し、また操作中 DNase の作用を受けて解合されるとときには糸状を示さなくなるので、糸状を呈するということは DNA の純度が高く、しかも重合度の高いものであることを示す一つの指標となつている。従つて最近、細菌等 DNA 含量が低く、しかも抽出の困難な材料から核酸を調製する機会が多くなつてきたが、この場合も糸状に得ようとする努力が続けられているようであつて、“核酸を糸状に得ることが出来た”という報告をしばしば見受ける。しかし少なくとも本アミラーゼ生産菌の場合には糸状標品が必ずしも DNA 純度が高く粉末標品が低いとは

Table 5. Effect of some salts on the viscosity.

Salt	H <sub>2</sub> O	NaCl			KCl	CaCl <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	MgSO <sub>4</sub>
		0.1	0.01	0.001	0.1	0.1	0.1	0.05
Final conc. of salts, M								
$\eta_{rel}$	2.695	2.443	2.558	2.610	2.429	2.414	2.407	2.467
$\eta_{sp}/c$	2.12	1.80	1.95	2.01	1.79	1.77	1.76	1.83

Table 6. Effect of some buffers on the viscosity.

Buffer, in 0.1 M	H <sub>2</sub> O	A-P	Tris	Phosphate *		Acetate	HCl	NaOH†
		8.5	7.5	7.5	7.0	4.2		
pH								
$\eta_{rel}$	2.695	2.423	2.493	2.639	2.601	2.470	2.161	2.275
$\eta_{sp}/c$	2.12	1.78	1.87	2.05	2.00	1.84	1.45	1.59

A-P: Atkins-Pantin buffer, \* white precipitates formed; † became turbid,

限らないことはすでに報告したが、本報はその極端な場合であつて、殆ど核酸を含まない糸状沈澱が得られる場合もあるので、とくに注意しなければならない。もちろん DNA 糸状標品は重合度の高いもの或は調製中の変化の少ないものであるとは考えられる。しかしいづれにしても DNA の糸状沈澱性は一応の目安であつて、これを過信することは危険であると云わねばならない。

本実験で得られた標品の本体はもちろん明らかでないが、細胞壁或は細胞内に含まれる多糖類や低分子の有機燐化合物を主とするものではないかと思われる。このことは標品溶液を透析すれば殆どなくなることからも推測されるし、溶液の粘度が低いこともこれを示唆する。しかし得られた標品に極めて微量の DNA が残っているのか、このような不純物自体が糸状沈澱を形成するのか、或は痕跡程度に残つた DNA を中心として他の物質も糸状に沈澱するのかは明らかでない。なお、この場合その吸収スペクトルは厳密には DNA のものと若干異なるので、DNA の残存物と考えてよいかどうかは確実ではない。しかしいづれにしても再三述べたようにアミラーゼ生産菌から DNA を調製するに際しては糸状沈澱性を考慮しても差支えないが、過度にこれにとらわれることは望ましいものではない。

ことに留意しなければならない。

終りに貴重な菌株を分与され使用の許可を賜つた大阪市立大学福本寿一郎教授に心から御礼申し上げます。

## 総 括

アミラーゼ生産菌のアセトン乾燥菌体をリゾチームで溶菌し、DNA 調製操作に従つてアルコール沈澱、クロロホルム除蛋白を行なつて再びアルコールで沈澱し白色糸状部だけを集める。これを  $\text{CaCl}_2$  溶液に溶かしアルコール分別を行ない 0.3 ないし 2 倍容アルコール沈澱部分からも白色糸状沈澱を得た。

この標品は殆ど DNA を含まず、純度、紫外線吸収スペクトル、粘度等の試験によつても核酸とは異なるものであつた。

## 文 献

- 1) Chargaff, E. and Zamenhof, S., 1948. *J. Biol. Chem.*, **173**: 327.
- 2) 大村浩久・渡辺健治・徳永純一, 1961. *九大農学芸誌*, **18**: 381.
- 3) 大村浩久・渡辺健治, 1961. *九大農学芸誌*, **18**: 399.
- 4) 大村浩久・渡辺健治・藤嶋信政, 1962. *九大農学芸誌*, **20**: 47.

## Summary

Acetone-dried cells of amylase-producing bacteria were lysed by the action of the lysozyme at 37°C for 22 hours in the presence of DNase inhibitor. Lysate was added into 2 volumes of alcohol and the precipitates formed were dissolved in 2 M NaCl solution. Proteins were removed by treating with chloroform and white fibrous precipitates were deposited with alcohol. These precipitates were dissolved in 10%  $\text{CaCl}_2$  and DNA fraction was precipitated by adding 0.3 volumes of alcohol. After centrifuging, alcohol was further added into supernatant to reach 2 volumes of original  $\text{CaCl}_2$  solution. Thus, white fibrous precipitates were formed. This preparation resembles DNA. However, it was found that the precipitate contained almost no DNA and that its solution has low viscosity and different UV spectrum from real DNA solution.