

アミラーゼ生産菌のデオキシリボ核酸IV : アセトン 乾燥菌体から調製した標品水溶液の粘度

大村, 浩久
九州大学農学部

渡辺, 健治

藤嶋, 信政
徳山酸素工業株式会社

<https://doi.org/10.15017/21603>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 20 (1), pp.47-52, 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 IV

アセトン乾燥菌体から調製した標品水溶液の粘度

大村浩久・渡辺健治・藤嶋信政*

Deoxyribonucleic acid of amylase-producing bacteria IV.

On the viscosity of aqueous solution of various preparations prepared from acetone-dried cells

H. Omura, K. Watanabe and N. Fujishima

細菌から DNA を調製する方法についてはいろいろの報告があるが、菌の種類や性質に応じて最も適した手段が選ばなければならない。アミラーゼ生産菌もすでに報告したように²⁾ DNA 含量が極めて低く、生菌の約 0.2% 程度の DNA-糖が含まれているに過ぎず、これに対して RNA-糖はその 15 倍程度に多く、酵母と同様に RNA に富むものであつて DNA 調製材料としては望ましいものではなかつた。そのため本菌についても最も適した方法を見出す必要があるので、アセトン乾燥菌体を用いて多くの調製試験を行ない種々の粗標品を得た。これ等の試験に基いて本菌の場合、問題は最初の抽出操作にあつてリゾチーム処理ないしフェノール抽出が一応利用出来ることを認めたと³⁾ しかし一般に細菌の核酸は調製に際し蛋白質や細胞壁の成分を主とする多糖類等とは離れにくいと云われており、アミラーゼ生産菌の場合も例外ではなくて得られた核酸の純度は甚しく低かつた。ただ蛋白質はクロロホルム処理を回数多く反復して初めてゲルを全く生じなくなる程度に除かれるが、この状態でも尚かなりの蛋白が核酸成分中に残存し、ほぼ完全に除かれる牛脾臓等の場合と異なつてゐる。しかし、ここで DNA 区分をアルコールで沈澱した後、10% CaCl₂ に溶かしこれに 0.3 容アルコールを加えて再び沈澱させると、これまで堅く結合していた蛋白は濃食塩溶液中で解離されるようになるので、重ねてクロロホルム処理を数回行なうことによつて完全に除くことが出来るようになった。このようにしても DNA 標品に蛋白以外の多くの不純物が含まれるのを免れないことはすでに報告したように、それ等の収量、純度、吸収スペクトル、吸光度等の値から明らかである。DNA の特性の

一つとして、その溶液は極めて高い粘性を示し、従つて DNase 活性の測定法に基質 DNA の分解によつて起こる粘度の低下を追及する方法があり、我々も一つの方法として利用しているので、今回は種々の方法で得た DNA 標品についてその粘度を試験検討した。

実験及び考察

粘度の測定

Ostwald 型粘度計を用い DNA 溶液 2 ml について 30°C で測定した。近似的に水に対する相対粘度 $\eta_{rel} = t/t'$ (t : DNA 溶液の流下時間, 秒; t' : 同容の水の流下時間, 秒) として求め、また比較のために還元粘度 $\eta_{sp}/c = \eta_{rel-1}/c$ も算出した。ここで c は 100 ml 中の溶質の g 数であつて、粘性は必ずしも DNA だけに基くものではないと思われるので標品の純度を考慮することなく標品全体の量で計算した。

DNA, RNA 及び糖の測定

前報²⁾ 記載のようにそれぞれシステイン-硫酸反応、オルシン-塩酸反応及び江藤氏の方法¹⁾ を用いて定量した。

DNA 標品

前報²⁾ に述べた種々の標品を使用した。その外に標品 IV-6 a についても測定した。これはリゾチーム法によるものであつて比較的弱い酵素で長時間作用させた後、遠沈沈降物から抽出調製した。すなわち予め乳鉢で磨砕した細菌乾燥粉末 5 g を 400 ml の 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 7.2)-0.14M NaCl-0.01M クエン酸ソーダ溶液に懸濁し、これに凍結乾燥した卵白リゾチーム 100mg を加え 30°C に 1 晩振盪作用させた後 8000 r.p.m. で 20 分間遠心分離した。沈澱を 0.14 M NaCl で 2 回洗滌した後 2 M NaCl (0.01 M クエン酸ソーダ含有) 300 ml で 1 晩冷蔵抽出、8000 r.p.m.

* 現勤務先: 徳山酸素工業株式会社

Table 1. Preparation IV-6a.

Preparation	Yield %	Wave length		E (0.1%)			ε(P)		P %	DNA* %	RNA* %
		Max. mμ	Min. mμ	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
IV-6a	0.49	256	238	3.360	2.630	1.19	2829	2382	3.68	7.0	1.4

* Figures were expressed by the amounts of nucleic acids corresponding to the color intensity developed by Cysteine-H₂SO₄ or Orcine-HCl reaction.

Table 2. Viscosity of 0.05% aq. solution of various preparations.

Preparation	I-1a	I-2a	II-1a	III-1a	III-2a	IV-3a	IV-3b	IV-4a	IV-6a
DNA, %	12.1	7.1	2.9	19.3	11.0	21.4	27.9	4.3	7.0
RNA, %	2.3	8.2	0.9	2.3	1.9	4.5	6.5	1.0	1.4
η_{rel}	11.818	8.432	1.175	3.134	18.630	13.687	2.772	1.280	8.526
η_{sp}/c	108.18	74.32	1.75	21.34	176.30	126.87	17.72	2.80	75.26
Note	P	P	P	F	F	F	P	F	P

P: Powder; F: Fiber

で 30 分間遠心分離した抽出上清から常法に従い 2 倍容アルコールで沈澱し、再び 2M NaCl に溶かしクロロホルムで除蛋白後アルコールで沈澱、最後にアルコール及びエーテルで脱水乾燥し 24.5 mg の白色粉末として得た。この一般性質は第 1 表に示す通りである。

各種標品水溶液の粘度

各種 DNA 標品についてその粘度を 0.05% 水溶液で測定し、第 2 表に標品の純度とともに示した。

糸状標品が必ずしも DNA 含量の高いものであるとは限らないことはすでに述べたが、粘度に於ても同様であることが第 2 表から観察された。すなわち粉末標品 I-1a, I-2a, IV-6a 等が比較的に高い粘度を示すのに反し、糸状標品 III-1a や IV-4a が著しく低い粘性を持つことから明らかである。もちろん糸状標品でも III-2a 及び IV-3a の粘度は高く粉末標品 IV-3b の粘度は低く、一般に糸状、粉末状等標品の状態と粘度との間には共通した関係は認められない。

また DNA の含量の高いものが一般に高い粘性を示す傾向が認められるが、場合によっては必ずしもそればかりとは限らないことが I-1a と III-1a, 或は III-1a と III-2a ないし IV-3a と IV-3b との比較等から認められる。このことは調製に当つて核酸と同じ分割に沈澱する不純物もまた高い粘性を示すことを推定させる。しかも菌体を予め乳鉢で磨砕して調製した I-1a 及び I-2a が粉末標品にもかかわらず比較的に粘度が高く、またとくにフェノール処理だけで得た標品 III-1a

よりも、これに磨砕操作を組合せて調製した III-2a が DNA 純度は低いにもかかわらず著しく粘度が高かつた。これらのことから磨砕操作がこの高粘性不純物の夾雑混入を促す傾向があるように思われる。またリゾチーム法の場合、長時間酵素を作用させた完全な溶菌液から調製した標品 IV-3a の粘度は甚だ高く、これに対してごく短時間酵素処理して得たプロトプラストから抽出分離した標品 IV-4a の粘度は低かつた。さらに酵素活性の弱い状態で長時間作用させて調製した標品 IV-6a はこの中間であつて、これら標品が蛋白質を含まないこと及び上述の磨砕効果をあわせ考えると、少なくともこの粘性の高い夾雑物の一部は細胞壁の構成成分に由来するものと思われる。

粘度と濃度との関係

次に溶液を稀釈した場合の粘度の低下を測定した。第 3 表は代表的な標品についての測定値であつて、0.1% DNA 水溶液を原液とし水で逐次 2 倍宛稀釈しながら求めた相対粘度ならびに還元粘度である。稀釈によつて相対粘度が減少するのは当然であるが、これらの標品に於ては溶質量当りの比粘度を示す還元粘度も同様に低下した。溶液が稀薄になれば粘度もほぼ直線的に減少し第 1 図に示すように 8 倍ないし 16 倍稀釈から以下では直線的降下が見られた。ただこの場合理論的にはこれらの直線は相対粘度 1.0 に集中するはずであるが、実測値は 1.0 より若干低い値に指向する傾向を示した。もちろんこの原因、意義等は明らかで

Table 3. Decrease of viscosity by dilution.

Preparation	Dilution	Orig.	2	4	8	16	32	64
I-1a	η_{rel}	28.132	11.818	5.119	2.636	1.706	1.304	1.125
	η_{sp}/c	135.66	108.18	82.38	61.44	56.48	48.64	40.00
I-2a	η_{rel}	15.734	8.432	4.209	2.426	1.673	1.287	1.123
	η_{sp}/c	73.67	74.32	64.18	56.92	53.84	45.92	39.32
III-1a	η_{rel}	5.362	2.949	1.918	1.455	1.194	1.077	
	η_{sp}/c	21.81	19.49	18.36	18.20	15.52	12.48	
III-2a	η_{rel}	45.968	18.630	6.443	3.016	1.916	1.448	1.218
	η_{sp}/c	224.84	176.30	108.86	80.64	73.28	71.04	69.76
IV-3a	η_{rel}	37.709	13.687	5.142	2.612	1.674	1.334	1.159
	η_{sp}/c	183.55	126.87	82.96	64.84	53.92	53.44	50.88
IV-3b	η_{rel}	5.395	2.772	1.830	1.387	1.183	1.089	1.047
	η_{sp}/c	21.98	17.72	16.60	15.48	14.64	14.24	15.04
IV-4a	η_{rel}	1.516	1.280	1.156	1.086	1.038		
	η_{sp}/c	2.58	2.80	3.12	3.44	3.04		
IV-6a	η_{rel}	26.781	8.525	3.693	2.232	1.552	1.268	1.103
	η_{sp}/c	128.91	75.26	53.86	49.28	44.16	42.88	32.96

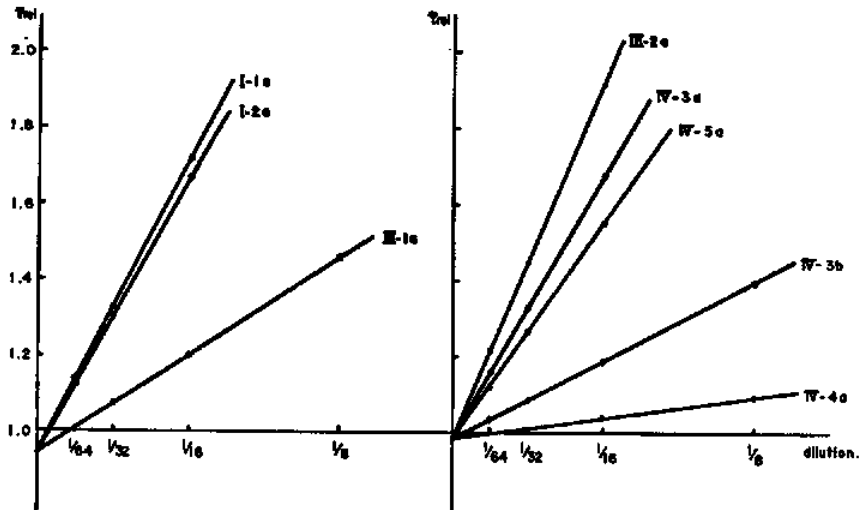
Original solution: 1 mg DNA preparation/ml H₂O

Fig. 1. Relative viscosities of preparations.

ないが、さらに少なくとも測定した諸標品では比較的に近い点 (0.94, 0.98) にそれぞれ集中する 2 つのグループに分けられるようであった。

食塩の影響

一般に蛋白質核酸等高分子物質の液溶が示す高い粘度が電解質を加えることによつて低下することは知られている。また DNA の調製に際しては、これまでもしばしば述べたように NaCl 溶液を使用するが、さら

に調製した DNA 標品を使用する場合には稀 NaCl 溶液等の塩類溶液に溶かし脱イオン水に溶かすと変性すると云われている。アミラーゼ生産菌から種々の方法で調製した DNA 標品に於ても同様であつて、その純度の如何にかかわらず水溶液の粘度は NaCl 添加によりかなり低下した。第 4 表は 0.05% DNA 水溶液 1 ml を Ostwald 粘度計の中で 1 ml の水または 0.02 M NaCl 溶液と混合した後その粘度を測定したもので

Table 4. Effect of NaCl on the viscosity of aq. solutions of DNA preparations.

Preparation	DNA %	Solvent	η_{rel}	η_{sp}/c
I-1a	12.1	H ₂ O NaCl	2.325 1.268	13.25 2.68
I-2a	7.1	H ₂ O NaCl	3.763 1.314	55.30 6.16
I-2b	7.4	H ₂ O NaCl	3.278 1.356	45.56 7.12
II-1a	2.9	H ₂ O NaCl	1.292 1.223	1.17 0.89
III-1a	19.3	H ₂ O NaCl	1.856 1.322	17.12 6.44
III-2a	11.0	H ₂ O NaCl	5.931 1.649	98.62 12.98
IV-2a	20.7	H ₂ O NaCl	4.927 1.787	78.54 15.74
IV-3a	21.4	H ₂ O NaCl	2.073 1.283	21.46 5.66
IV-6a	7.0	H ₂ O NaCl	3.137 1.436	42.74 8.72

I-1a : 0.1 % DNA 1 ml + 0.02 M NaCl (H₂O) 1 mlII-1a : 0.55 % DNA 1 ml + 0.02 M NaCl (H₂O) 1 mlOthers : 0.05 % DNA 1 ml + 0.02 M NaCl (H₂O) 1 ml

ある。

ここで例えば標品 III-2a と IV-2a とを比較する場合、前者は後者よりも DNA 含量は低いにもかかわらず、その水溶液の粘度は高く前述のように高粘性不純物の存在を明らかに示すが、さらに NaCl 添加による粘度の減少も甚しく、従つてこの夾雑物もまた NaCl 存在下では粘度の低下を来すものと推定される。類似のことは同じ DNA 純度の I-2a と IV-6a ないしはこれらと IV-3a との比較検討からも認められる。

また NaCl の濃度を低くすれば勿論粘度の低下度を減ずることは相対粘度及び還元粘度を示した第 5 表から明らかである。実験は第 4 表に準じて行なつた。NaCl 添加の影響は DNA 溶液の粘度の大小にかかわらず認められ 10⁻⁴M ないし 10⁻³M でも若干の粘度低下が起つた。さらに 10⁻²M 付近までは影響はかなり強いようであり、また粘度の高いものほど比較的に影響を受け易いように思われる。

その他の無機塩類の影響

このような粘度の低下は NaCl だけに限るものでないことは蛋白質等と同様であつて、他の塩類によつても観察されることは第 6 表に明らかである。

すなわち KCl や NH₄Cl、或は核酸の調製に於て DNA と RNA との大別用いる CaCl₂、もしくは

Table 5. Effect of concentration of NaCl on the viscosity.

Preparation	Conc. of NaCl, M	0	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
I-1a	η_{rel}	2.325	1.109	1.268	1.623	2.114	2.156
	η_{sp}/c	13.25	1.09	2.68	6.23	11.14	11.56
I-2a	η_{rel}	3.763	1.136	1.314	1.875	2.654	2.886
	η_{sp}/c	55.30	2.72	6.16	17.50	33.08	37.72
I-2b	η_{rel}	3.278	1.178	1.356	2.019	2.765	3.407
	η_{sp}/c	45.56	3.56	7.12	20.38	35.30	48.14
III-1a	η_{rel}	1.856	1.129	1.322	1.559	1.710	
	η_{sp}/c	17.12	2.58	6.44	11.18	14.20	
III-2a	η_{rel}	5.931	1.266	1.649	3.080	4.633	5.553
	η_{sp}/c	98.62	5.32	12.98	41.60	72.66	91.06
IV-2a	η_{rel}	4.927	1.342	1.787	3.175	4.615	4.744
	η_{sp}/c	78.54	6.84	15.74	43.50	72.30	74.88
IV-3a	η_{rel}	2.073	1.175	1.283	1.597	1.908	1.987
	η_{sp}/c	21.46	3.56	5.66	11.94	18.16	19.74
IV-6a	η_{rel}	3.137	1.186	1.436	2.044	2.735	2.951
	η_{sp}/c	42.74	3.72	8.72	20.88	34.70	39.02

I-1a : 0.1 % DNA 1 ml + NaCl 1 ml

Others : 0.05 % DNA 1 ml + NaCl 1 ml

Table 6. Effect of some salts on the viscosity.

Salt		H ₂ O	KCl		NH ₄ Cl		CaCl ₂		MgSO ₄	
Conc., M			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²
III-1a	η_{rel}	5.232	1.222	1.657	1.203	1.590	1.050	1.081	—	1.129
	η_{sp}/c	84.64	4.44	13.14	4.16	11.80	1.00	1.62	—	2.58
IV-3a	η_{rel}	4.194	1.201	1.504	1.190	—	1.087	1.092	1.116	1.135
	η_{sp}/c	63.88	4.02	10.08	3.80	—	1.74	1.84	2.32	2.70
IV-4a	η_{rel}	2.261	1.158	1.256	1.145	—	1.119	1.119	1.182	1.129
	η_{sp}/c	25.22	3.16	5.12	2.90	—	2.38	2.38	3.64	2.58

0.5% DNA aq. solution 1 ml + Salt solution 1 ml

Table 7. Effect of concentration of MgSO₄ on the viscosity.

Concentration, M		0	10 ⁻¹	5×10 ⁻²	10 ⁻²	5×10 ⁻³	10 ⁻³
IV-4a	η_{rel}	2.261	1.182	1.145	1.129	1.145	1.198
	η_{sp}/c	25.22	3.64	2.90	2.58	2.90	3.96

Table 8. Effect of some buffers on the viscosity.

Buffer		H ₂ O	A-P*	Tris	Phosphate		Acetate	HCl	NaOH
pH			8.5	7.5	7.5	7.0	4.0		
IV-3a	η_{rel}	4.194	1.194	1.243	1.218	1.224	1.187	1.027	1.172
	η_{sp}/c	63.88	3.88	4.86	4.36	4.48	3.74	0.52	3.44
IV-4a	η_{rel}	2.261	1.168	1.208	1.206	1.189	1.124	1.016	1.094
	η_{sp}/c	25.22	3.36	4.16	4.12	3.78	2.48	0.32	1.88

* Atkins-Pantin

0.5% DNA aq. solution 1 ml + 0.2 M Buffer 1 ml

DNase の賦活剤として活性測定の場合、常に添加される MgSO₄ 等いずれの塩によっても粘度の低下が惹き起こされた。その低下度は塩類の種類によっても多少の相違はあるが、むしろ塩の濃度が強く影響し、例えば KCl や NH₄Cl では NaCl と同様に濃度の減少によつて粘度の低下度は緩和された。しかし 2 価イオンを生ずる CaCl₂ や MgSO₄ の場合には若干問題があつて 10⁻¹M と 10⁻²M とでは殆ど差はなく、極端な場合には 10⁻²M の場合の方が 10⁻¹M の場合よりも却つて粘度が低かつた。

このことは DNase 賦活剤である MgSO₄ の場合に特に注意しなければならない。すなわち粘度法により活性を測定するに際し MgSO₄ の添加だけでも基質溶液の粘度が低下するが、しかもその添加量も特異的な影響を及ぼすものと推定させる。従つて MgSO₄ に対しても顕著な挙動を示した標品 IV-4a についてさらに詳細に MgSO₄ 濃度の影響を検討

した。

その結果、第 7 表に示すように溶液の粘度は 10⁻²M で最も低くそれより以下では再び影響は緩和されて粘度の低下度は少くなる。この傾向は CaCl₂ でも同様に認められた。

塩類による粘度の低下作用はまた単独の塩類だけでなく緩衝液等でも認められる。

例えば第 8 表に示すように本菌の DNase 測定に専ら利用する Atkins-Pantin 緩衝液 (H₂BO₃-NaCO₃·KCl) を始めトリス、磷酸塩、醋酸塩等の各緩衝液も pH の如何にかかわらず粘度の低下を惹起した。さらに極端な場合として HCl や NaOH 中でも同様の傾向が見られた。

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乾燥菌体から種々の方法で調製した DNA 粗標品水溶液の粘度について検討し若干の知見を得た。

糸状に得られた DNA 標品が必ずしも高い粘性を示すとは限らず、一般に糸状、粉末状等標品の状態と粘度との間には共通した関係は認められなかつた。また粘性発現が DNA 含量だけに直接比例するものではないこと、前処理として乳鉢磨砕操作または長時間リゾチーム処理を行なつて得た標品の粘度が高いことなどから夾雑物の一部も粘性発現に関与しているものと推定した。

水溶液を希釈するとその相対粘度は低濃度に於て直線的に減少するが、無限希釈外挿値は 1.0 に集中せずそれより若干低い値に指向する傾向を示した。また少なくとも供試標品では近接した点にそれぞれ集中する 2 群に分けられた。

DNA 標品を NaCl のような電解質溶液に溶かすと、その純度に関係なく NaCl 濃度に応じて水溶液の

場合よりは粘度は低下した。また NaCl の濃度約 10^{-3} M 付近までは影響が強いこと、高粘性標品ほど感受性の高いことが認められた。さらにこの場合、高粘性を示す一原因とみられる夾雑物も NaCl 溶液中では粘度を減少するものと推定された。

その他の電解質、KCl, NH_4Cl , CaCl_2 , MgSO_4 等でも多少の相違はあるが大體類似の傾向が認められた。しかし MgSO_4 或は CaCl_2 の場合、粘度低下度は必ずしもその濃度に比例せず 10^{-2} M でその影響が最も強かつた。このような電解質による粘度低下作用は単独の塩類だけでなく種々の緩衝液や HCl, NaOH によつても惹起された。

文 献

- 1) 江藤守穂, 1954, 九大農芸誌, 14: 543.
- 2) 大村浩久・渡辺健治・徳永純一, 1961, 九大農芸誌, 18: 381.
- 3) 大村浩久・渡辺健治, 1961, 九大農芸誌, 18: 399.
- 4) 渡辺健治, 1959, 九大農芸誌, 17: 269.

Summary

Viscosities of aqueous solutions of DNA preparations which had been isolated from acetone-dried cells of amylase-producing bacteria by several procedures were estimated. In general, viscosity had no relation with the fibrous appearance or powdery one of preparations. The high-DNA preparation made a solution of much higher viscosity than that from preparation of low-DNA content. However, in some cases, the viscosity of the later was higher than that of the former. This observation suggested that certain contaminants in preparation also contributed to the viscosity.

As usual, viscosity was reduced more or less by adding NaCl as well as by dilution. The effect of salt was maintained even in 10^{-4} or 10^{-5} M of final concentration, regardless of the viscosity of aqueous solution of DNA preparation. The rate of decrease of viscosity by NaCl tends to be much higher in the solution of higher viscosity than in that of low viscosity. The viscosity due to the contaminants cited above was presumed to be reduced by NaCl.

Similar reduction of viscosity was also observed by KCl, NH_4Cl , CaCl_2 , or MgSO_4 . Of course the viscosity was reduced usually much effectively in higher concentration of salts. However, in the case of MgSO_4 and CaCl_2 , the viscosity was the lowest in 10^{-2} M of final concentration. Some buffers, such as Tris, acetate, phosphate, A-T or even HCl and NaOH, also had the same ability to reduce the viscosity. These experiments must be called especially when we use the preparation obtained for some object, for example the substrate of the viscosimetric estimation of DNase activity.