

# Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berlinerの生産する菌体外毒素について : (2) DNA 依存RNA合成酵素反応に対する阻害機構

田中, 健治  
農林省食糧研究所

村上, 浩紀  
九州大学農学部

波多野, 昌二  
九州大学農学部

渡辺, 忠雄  
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/23113>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 26 (1/4), pp.545-549, 1972-03. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

## *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner の生産する菌体外毒素について

### (2) DNA 依存 RNA 合成酵素反応に対する阻害機構

田中 健治\*・村上 浩紀  
波多野 昌二・渡辺 忠雄

## On the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner

### (2) Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase reaction

Kenji Tanaka, Hiroki Murakami, Shoji Hatano  
and Tadao Watanabe

#### 緒 言

*Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner の生産する2種の菌体外毒素は家蚕に対して致死的に作用する。<sup>6)</sup> その作用は眠、蛹化などの蚕体の生理的变化と関連性があり、本毒素による家蚕フェノールオキシダーゼ活性への影響が酵素蛋白の阻害によるものでないこと<sup>6)</sup> などから、この毒素による致死的作用が代謝調節に関与していることが考えられた。この外毒素はアデニン、リボースおよびリンを含むヌクレオシド類であるので、代謝調節に中心的役割を果しているDNA依存RNA合成酵素への影響を推定し、2種の菌体外毒素のうち家蚕に対する毒力のより強いF-Iを用いて、これがRNA合成酵素におよぼす影響についてしらべ、その作用機構を検討した。

#### 実 験 方 法

1. 菌体外毒素：前報<sup>6)</sup>の方法により培養し、Sephadex G-10 によつて F-I, F-II に分離した。毒素成分のうち、家蚕に対して毒力のより強い F-I を用いた。毒素量は既述のように A260 mμ=1.0 を示す毒素溶液 1 ml を 1 単位とした。

2. RNA 合成酵素の精製：既報<sup>4)</sup>の方法により大腸菌 B 株から精製した。すなわち、対数増殖末期に集めた菌体をアルミナと共に破砕し、超遠心操作、プロ

タミン処理、硫酸アンモニウム処理さらに DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーを行なつて、菌体破砕液に比較して約 200 倍の活性を有する酵素標品を得た。この標品はい型として二本鎖 DNA が反応液中に存在しない場合には RNA の重合反応を行なうことはなかつた。

3. い型 DNA の調製：SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を仔牛胸腺細胞けん濁液に作用させたのち、塩化ナトリウム、塩化カルシウムで順次処理した。<sup>7)</sup> このようにして得た DNA 中、銅-フォリン法による蛋白含量は 1% 程度、オルシン-塩酸法による RNA 含量はこん跡程度であつた。

4. RNA 合成反応：合成反応液 250 μl 中には、Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.8) 60 μ moles, 硫酸 マグネシウム 2.5 μ moles, 硫酸マンガン 1.0 μ mole, β-メルカプトエタノール 1.25 μ moles, ATP (アデノシン三リン酸), GTP (グアノシン三リン酸), CTP (シチジン三リン酸) および <sup>14</sup>C-UTP (ウリジン三リン酸) のアンモニウム塩の各々 100 n moles, い型 DNA 14 μg, さらに酵素 80 μg を含んでおり、これを対照反応系とした。菌体外毒素による影響をしらべるときにも反応液の容量ならびに各成分の濃度は対照の場合と同様になるようにした。

反応温度は 37°C とし、所定時間経過後、その 25 μl をとり、冷 TCA (三塩化酢酸) 0.45 ml 中に加

\* 農林省食糧研究所。

え、酵素による重合反応によつて酸不溶性となつたポリリボヌクレオチドを沈澱させた。このとき沈澱を熟成させるために牛血製アルブミン (2.5 mg/ml) 0.2 ml を添加し、60分以上 0°C に放置した。

遠心操作によつて分離した上澄液を除去し、残つた沈澱に冷 5% TCA 1 ml を加え沈澱を洗滌する。この処理を 3 回くり返して得られた沈澱を 2 N アンモニア水溶液 0.3 ml で溶解させる。これをトルエン-PPO (2.5 ジフェニルオキサゾール) : エタノール = 5 : 3 の混液 10 ml に定量的に溶解させたのち、液体シンチレーションカウンター (Beckmann LS-250) で合成ポリリボヌクレオチド中の  $^{14}\text{C}$  量を測定して RNA 合成の経過を追跡した。

## 結果および要約

### 1. RNA 合成反応におよぼす毒素量の影響

毒素 (F-I) の RNA 合成反応に対する阻害能をしらべるために、種々の濃度の毒素を反応液中に添加して RNA 合成量の変化をしらべた。試薬の添加は、Tris 緩衝液、金属イオン、 $\beta$ -メルカプトエタノール、4種のヌクレオシド三リン酸からなる混合液に DNA、毒素、酵素を順次添加し、特記する他はすべてこの順序で行なつた。反応開始 15 分後の酸不溶分画中の放射能を対照のそれと比較した。

第 1 図に示すように、2.6 単位の毒素は RNA 合成

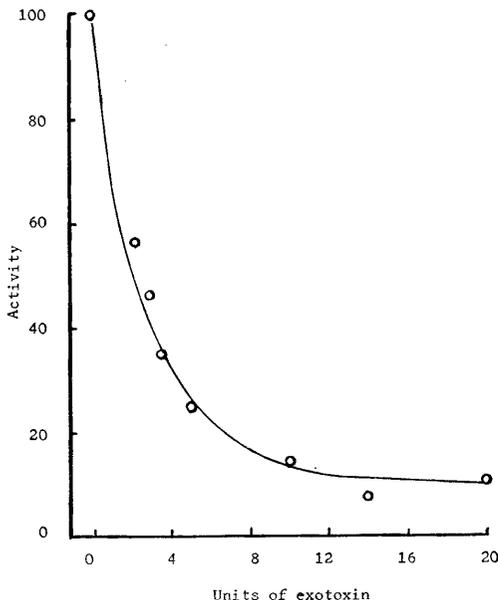


Fig. 1. Dependence of the inhibition of RNA synthesis on the concentration of exotoxin.

を 50% 阻害することができ、13 単位以上の濃度では阻害度はほぼ変化しなかつた。20 単位の毒素を加えても RNA 合成反応は対照の 10% 程度はなお認められた。

このように RNA 合成反応は高濃度の毒素によつてもなお完全には阻害されなかつたので、以後の諸実験において 13.3 単位の毒素濃度を最大阻害濃度として用い、さらに 2.6 単位の毒素を 50% 阻害を示す濃度として用いた。

この結果を家蚕への致死力、あるいはフェノールオキシダーゼ阻害に要する毒素量<sup>6)</sup>と比較する場合には、反応系中の関与する因子の複雑さ、量的な差異などを考慮しなければならないが、傾向としてはこの 3 種の反応の本毒素に対する感受性は、致死作用  $\cong$  RNA 合成阻害  $\gg$  フェノールオキシダーゼ活性阻害の順に弱くなると考えられる。

### 2. RNA 合成反応の阻害機構

#### (a) 反応途中での毒素添加

反応開始 10 分後に、最大阻害濃度である 13.3 単位になるように毒素を添加すると第 2 図のように、RNA 合成はただちに停止し、放射能のとりこみ量の増加は時間が経過しても認められなくなつた。

反応開始直後に毒素を添加した場合には合成反応は

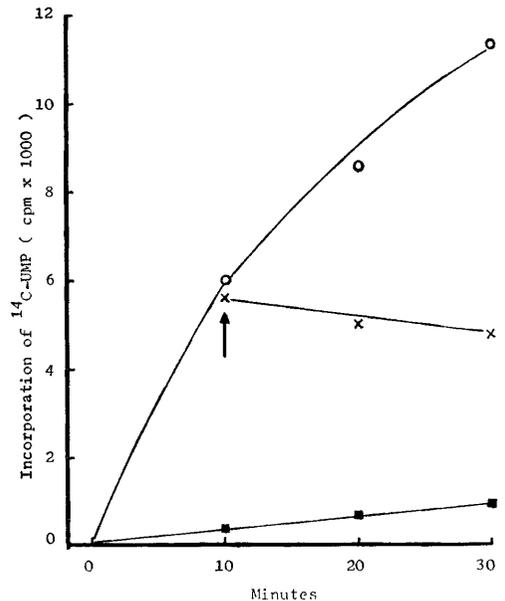


Fig. 2. Time-course of the inhibition of RNA synthesis by exotoxin.

Control ○—○, Toxin was added initially ■—■, or added at 10 min. (shown by the arrow) ×—×.

著しく阻害されたが、放射能のとりこみは徐々に増加して阻害が完全には起らないことが示された。より高濃度の毒素を用いても同様の経過をたどり、第1図の結果と合致した。

(b) 阻害反応の初期段階の解析

合成反応を60%阻害する3.3単位の毒素を用いて短時間の放射能のとりこみを観察すると第3図に示すように、反応開始2分後の付近でとりこみ速度に明らかな変化が生じた。6.6単位の毒素を用いた時にもほぼ同様のことが認められた。

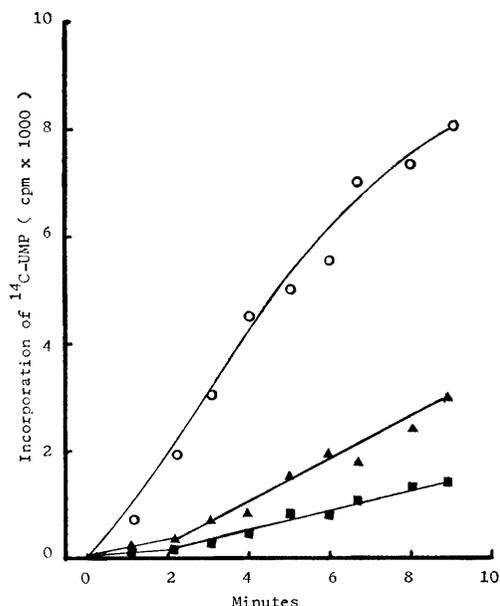


Fig. 3. Time-course of partially poisoned RNA synthesis in short time range.

Control ○—○, RNA synthesis was partially poisoned by 3.3 units ▲—▲, and 6.6 units ■—■ of toxin.

これらの事実は RNA 合成反応の初期段階の阻害を示唆すると考えられる。

Ponceau 3 R,<sup>4)</sup> riboflavin<sup>5)</sup> は合成反応系中のい型 DNA と相互作用をもつことによつて RNA 合成の初期段階を阻害する。一方 actinomycin D は DNA に結合して RNA の伸長を阻止するが、初期反応には影響しない<sup>5)</sup> ことが知られている。本毒素は (a) の結果から RNA の伸長反応を妨害し、さらには合成初期反応をも阻害することがわかった。これらの事実から、この毒素が DNA に対してでなく酵素の機能に対して影響をしていることが推定され、この推定の妥当性について以下の検討を加えた。

(c) 毒素と DNA あるいは酵素混液の保温前処理

DNA もしくは酵素を13単位の毒素液中で37°C、5分間保温したのち、合成反応系に加えた。このとき毒素濃度は50%阻害を示す2.6単位の希釈された。被毒合成反応系の放射能のとりこみ経過を第4図に示した。

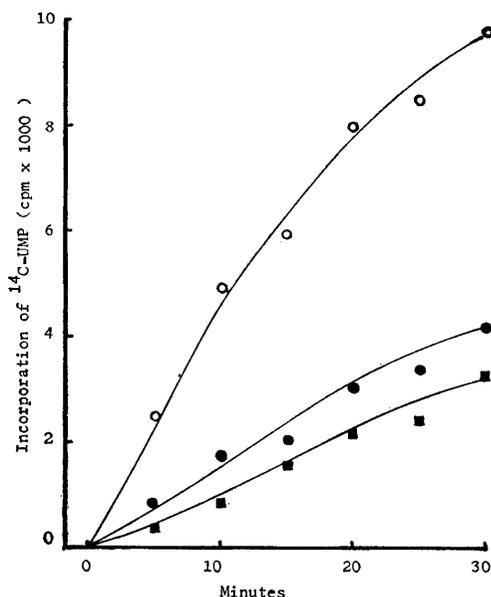


Fig. 4. Time-course of RNA synthesis by use of the previously poisoned enzyme or DNA.

Control ○—○, DNA ●—● or enzyme ■—■ was preincubated in 13 units of toxin. Then, each component was introduced into reaction system, in which toxin was diluted to 2.6 units.

最大阻止を示す13単位の毒素で前処理したにもかかわらず、合成反応系中に導入されて毒素が希釈され50%阻止濃度になると、毒素—DNA 保温区では41%、毒素—酵素保温区では36%の活性を示すようになった。なお同様の現象は Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> イオン存在下に酵素あるいは DNA を毒素と前処理しても認められた。このことは、毒素は高濃度でも酵素そのものに対しては作用しないか、または希釈によつて酵素への影響が弱まるかのいずれかであると考えられる。

(d) 部分被毒合成反応系への酵素あるいは DNA の再添加

50%の阻害を示す量の毒素をあらかじめ添加した合成反応系に酵素あるいは DNA を第5図に示した

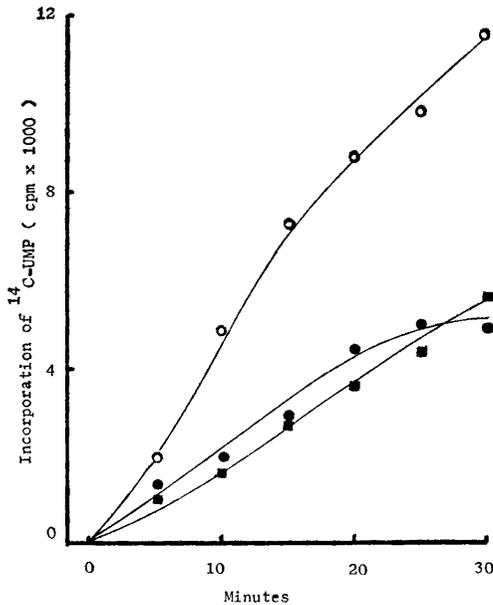


Fig. 5. Effect of excess addition of enzyme or DNA to the partially poisoned polymerase system.

Control ○—○, excess DNA (each time 14  $\mu$ g) ●—●, or excess enzyme (each time 80  $\mu$ g) ■—■ was added at 5 and 10 min. to reaction system.

ような時間に添加をくり返しても、放射能のとりこみに増加は認められなかった。

このことは本毒素の阻害作用が酵素蛋白のみに関与するものではないことを示している。

#### (e) 過剰の酵素および DNA による部分被毒合成反応系の活性回復

この実験に用いた標準 RNA 合成反応系は 80  $\mu$ g の酵素と 14  $\mu$ g の DNA を含んでおり、これは DNA 上の RNA 合成開始点 1 個あたり酵素 1 分子が対応している状態と考えられる。合成活性を 50% 低下させる濃度の毒素存在下に正常合成系の 3 倍量の DNA および酵素を用いて放射能のとりこみを観察すると、第 6 図に示したように RNA 合成が回復した。その際、3 倍量の DNA—酵素複合体をあらかじめ作ったものを用いても、通常の DNA、毒素および酵素の添加順で 3 倍量の DNA および酵素を加えても、両者の間に著しい差異は認められなかったが、後者では合成反応後期 (15 分以降) になると、とりこみ速度が低下した。

このことから本毒素は DNA—酵素複合体の形成を

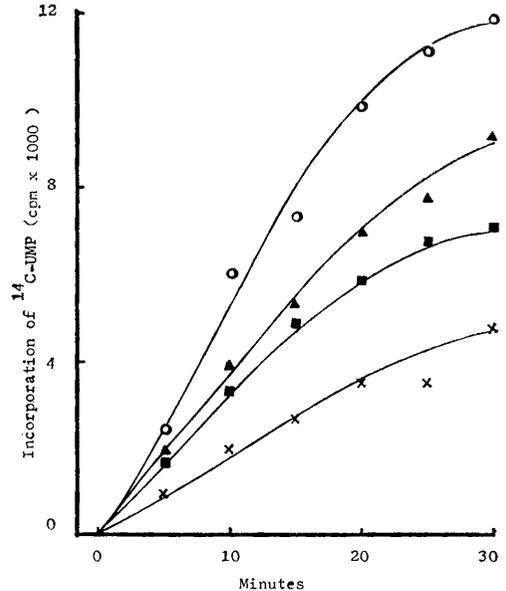


Fig. 6. Recovery of synthetic activity by the addition of excess DNA and enzyme.

Control ○—○, three times of DNA-enzyme complex ▲—▲, and three times of DNA and enzyme ■—■. And in this system toxin-concentration was 2.6 units. Incorporation-activity in the ordinary system which contained 2.6 units of toxin ×—×.

妨害することなく、この複合体に対して拮抗的に阻害を示すものと考えられる。

二本鎖 DNA をい型とする RNA 合成反応は遺伝情報の発現に中心的役割を果し、その反応は数種の素過程に区別される<sup>2)</sup>が、第一段階としては DNA の転写開始部位と酵素の複合体形成にあり、ついでプリンヌクレオチドの結合が<sup>3)</sup>これに続く。これら各々の段階において数種のサブユニットからなる合成酵素<sup>1)</sup>のコンフォメーションは逐次変化すると思われる。

これらを考慮すると本毒素は遊離酵素には作用することなく、酵素が DNA と複合体を形成してコンフォメーションに変化を生じた場合にのみ、初期に複合体と結合するヌクレオチドに対して拮抗的に阻害反応を示すと考えられる。

#### (f) 過剰の ATP による活性的部分的回復

通常の RNA 合成反応系にさらに 200 n moles の ATP を添加し、最大阻害を示す 13.3 単位の毒素共存下に放射能のとりこみをしらべると第 7 図に示すように部分的に活性の増加が認められた。

しかし ATP のかわりに UTP を過剰に加えたとき

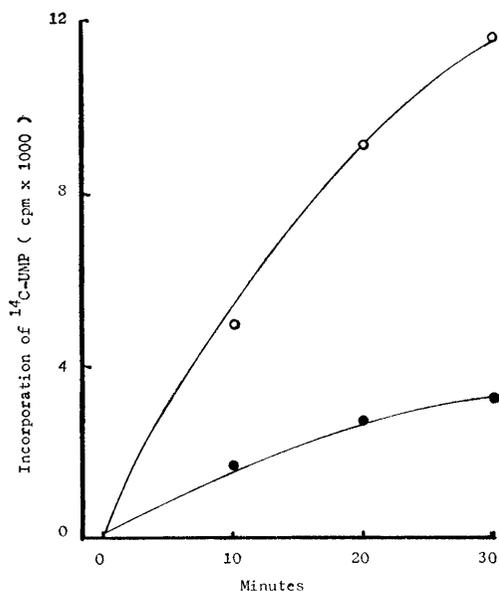


Fig. 7. Recovery of synthetic activity by the addition of more 200 n moles of ATP to the poisoned system.

Control ○—○ and more 200 n moles of ATP were added ●—●.

には活性の回復は認められなかった。

これらの事実は本毒素が DNA-酵素複合体と ATP の結合の段階に対して阻害効果をあらわすことを示唆していると考えられる。

### 要 約

*Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner の生産する二種の菌体外毒素のうち F-I について、その DNA 依存 RNA 合成酵素反応に対する阻害機構を検討して以下のことを明らかにした。

1. 本毒素は RNA 合成反応を阻害し、その程度は 2.6 単位で反応の 50%, 13.3 単位で最大阻害を示

した。しかしより高濃度の毒素を用いても完全に阻害は起らず、20 単位の毒素によっても約 10% の活性が残存していた。

2. この毒素によって阻害された合成反応系に DNA あるいは酵素のみを多量に加えても活性は回復しなかつたが、DNA および酵素を同時に加えたときには放射能のとりこみ量が回復した。

3. 毒素によって阻害された酵素反応系に多量の ATP を添加すると、DNA および酵素を過剰に加えても部分的な回復が認められた。

### 文 献

- 1) Burgess R. R and A. A Travers 1970 *Escherichia coli* RNA polymerase: purification, subunit structure and factor requirement. Fed. Proceedings 29 (2): 1164-1169.
- 2) 石浜明 1970 RNA ポリメラーゼの構造と機能のサブユニット. 蛋白質核酸酵素 15 (7): 738-751.
- 3) Maitra U., Y. Nakata and J. Hurwitz 1967 The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. XIV A study of the initiation of ribonucleic acid synthesis. J. Biol. Chem. 242 (21): 4908-4918.
- 4) 村上浩紀, 波多野昌二, 渡辺忠雄 1970 タール色素の RNA ポリメラーゼ反応におよぼす影響. 食衛誌 12 (4): 267-274.
- 5) Richardson J. P. 1966 The binding of RNA polymerase to DNA. J. Mol. Biol. 21: 83-114.
- 6) 田中健治, 貞包治夫, 村上浩紀, 波多野昌二, 渡辺忠雄 1972 *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner の生産する菌体外毒素について. (1) 毒素の分離ならびに家蚕におよぼす影響. 九大農芸誌 26(1-4): 537-544.
- 7) Yamafuji K. and H. Murakami 1968 Antitumour potency of lignin and pyrocatechol and their action on deoxyribonucleic acid. Enzymologia 35: 139-153.

### Summary

One of the exotoxin produced from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner having an inhibitory potency to RNA-synthesizing system *in vitro* was testified.

Mode of inhibition of the toxin F-I was investigated. RNA-synthesizing system which was inhibited by the toxin could not recover its activity even by the addition of a large amount of DNA or enzyme. The excess addition of both DNA and enzyme in one time or DNA-enzyme complex caused recovery of RNA synthesis. Excess of ATP was also effective to recover the activity partially.

It was assumed from these results, among many stages of RNA-synthetic reaction, that the toxin competitively inhibited the reaction in which purine nucleoside triphosphate molecules might connect to DNA-enzyme complex.