

食品添加物および食品中に含まれる諸物質 のRNAポリメラーゼ反応におよぼす影響

山 田 次 郎

The Effects of Food Additives and Some Compounds in Foods on RNA Polymerase Reaction

by

Jiro YAMADA

(Received July 12, 1977)

Summary

The effects of food additives and some compounds contained in foods on RNA-synthesizing reaction were studied by employing DNA dependent RNA polymerase purified from *Escherichia coli* by the method of Ishihama and Kameyama¹⁾.

5'-ribonucleotides strongly inhibited the polymerase reaction at 100 mM, especially, 5'-GMP and 5'-AMP inhibited 85-95 percent of the polymerase and as for other ribonucleotides 30-45 percent. They, however, did not inhibit the polymerase reaction at 10 mM. On food additives such as antiseptics as sodium sorbate, sodium salicylate and sodium dehydroacetate scarcely inhibited the polymerase reaction at 10 mM, although gallic acid, riboflavin and folic acid strongly inhibited at the same concentration. As for other compounds, such as caffeic acid, PCB and organotin compounds also intensely inhibited the polymerase reaction.

1 緒 言

われわれは生活に必要な栄養素を確保するために、毎日、食物を摂取している。それ故、食物はまず第一に栄養素の給源として考えられるべきであるが、また同時に、高度にその安全性についても考慮されなければならない。

元来、人間は自然界から得られたものを経験的に取捨選択して食物としてきた。またその取捨選択はほとんどが自然毒から生命を守るという立場から行われてきたが、近代文明の進歩、人口の激増、産業形態の多様化、工業の発展などにより自然界は大きく変化し、その結果、そこから生産、供給される食物は何らかの形で「汚染」を受けており、単に自然毒的発想では食物の取捨選択は困難になっている。更に人間の生活をより便利に、より豊かにという思想は食

物の領域にも波及し、化学工業の発展とあいまって「食品添加物」なる一群の化学物質が広範囲にわたって食品に添加混合されるようになった。

それ故、食物の安全性は総じて汚染化学物質、食品添加物の安全性という観点から論じられることとなり、その方面における学問研究が急速に発展しつつある。そこで著者は、本論文において、食品添加物および汚染物質の安全性を調べるひとつの方法として、遺伝情報発現に重要な役割を担っている DNA 依存 RNA ポリメラーゼ (DNA dependent RNA polymerase) を用いて種々の物質の本酵素に対する影響について検討し、若干の知見を得たので報告する。

2 実験材料および方法

1) 供試菌株および試薬

大腸菌は醗酵研究所 (大阪) からの分譲菌株を使用した。ポリペプトンは第五栄養化学(株)製を、胸腺 DNA, CTP, ATP, GTP はシグマ社製 (特級) を使用した。 ^{14}C -UTP (RC 社製, 比活性 50mCi/mM) と ^3H -UTP (NEN 社製, 比活性 20Ci/mM) は日本アイソトープ協会より入手した。

2) RNA ポリメラーゼの精製

RNA ポリメラーゼ (E.C. 2.7.7.6) 活性の存在は Weiss, Gladstone²⁾により1959年, ラッテの肝臓ホモジネート中に, ^{32}P -CTP を他の三種のヌクレオシドトリリン酸とともに酸不溶性画分に取込む酵素活性として初めて報告されたが, その後, 大腸菌において最も集中的に研究が行われ, 多くの精製法が報告されている^{1),3),4)}。本論文においては現在最も再現性が高いと考えられている Ishihama, Kameyama の方法³⁾を基礎にして大腸菌 B 株から RNA ポリメラーゼを精製した。

i) 酵素粗抽出液の調製

大腸菌 B 株の培地組成を Table 1 に示す。前培養として大腸菌 B 株一白金耳を坂口コルベン (培地150ml) に接種し 37°C, 24時間振盪培養した。次に, この培養液を坂口コルベン (培地

Table 1. Composition of the medium of *E. coli* type B.

NaCl	3 (g)
Glucose	1
Polypepton	10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.142
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.203
KH ₂ PO ₄	0.435
NaOH	0.10
Distilled water	1000 (ml)

150ml) に 5 ml づつ, 30本に分注し, 37°C, 24時間振盪培養した。更に, これを同一組成の培地 50 l に注入しジャーファーマンターを用いて約 6 時間培養した。培養条件は攪拌速度 250r.p.m., 温度 37°C, 通気量 9 l/min とした。培養終了後, 冷却下で連続遠心分離によって集菌し pH7.6 の 10mM トリス塩酸緩衝液, 10mM 塩化マグネシウム液に順次懸濁し, 菌体を洗浄した。得られた大腸菌塊 145 g にアルミナ (300メッシュ) 200 g を加え, 擂潰機で約 1 時間細胞破碎を行い, 少量の pH7.6 の緩衝液 J (10mM トリス-HCl, 10mM 塩化マグネシウム, 0.1mM EDTA を

含む)を加え、更に約30分間、糊状の粘性物を得るまで攪拌を続けた。次に400mlの緩衝液 I を加え1時間攪拌し酵素を抽出した。その後12000r.p.m., 20分間の遠心分離を行い未破碎細胞, 細胞破片などを除き, この上澄を更に25000r.p.m., 90分間遠心分離した。これは主にリボゾーム画分を除くのが目的であるが, この遠心分離後の上澄を粗抽出液とした。これに終濃度で10mM となるようにメルカプトエタノールを添加した。

ii) 酵素蛋白質の濃縮

粗抽出液のRNAポリメラーゼはDNAと複合体を作っているものと遊離状態のものとの両方があると考えられるので, 硫酸プロタミンを用いて酵素蛋白質を濃縮沈殿させた。硫酸プロタミン量は次式より算出した。

$$\text{硫酸プロタミン量 (mg)} = [\text{粗抽出液の O.D.260 値}] / 20 \times 0.8 \times \text{粗抽出液量}$$

なお硫酸プロタミンは約2%溶液とし水酸化カリウムで中和したものをを用いた。まず粗抽出液をゆるやかに攪拌しながら約10分間で硫酸プロタミン溶液を滴下した後, 30分間攪拌を続け, 次に12000r.p.m., 20分間遠心分離しその沈殿を0.05M硫酸アンモニウムを含む緩衝液 I で洗浄した後, 0.2M硫酸アンモニウムを含む緩衝液 I 130mlに溶解した。

iii) 硫安分画

硫安分画においては35%飽和~53%飽和までの画分を集め, この沈殿を0.05M塩化カリウムを含む緩衝液 I に溶解し同一緩衝液で2時間透析した後, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより酵素の精製を行った。

iv) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

透析により脱塩が完了した酵素溶液をDEAE-セルロースカラムに吸着させ, 少量の緩衝液 I で洗浄した後, 0.05~0.6M塩化カリウムを含んだ緩衝液 I でグラジェントを行いRNAポリメラーゼ蛋白質を溶出させた。これを再び硫安で濃縮し, 脱塩後, 透析液で全容を15mlとし, 更に等容のグリセリンを加えグリセリン50%溶液として酵素反応に使用した。

3) 酵素活性測定法³⁾

RNAポリメラーゼ活性は¹⁴C-UTP(あるいは³H-UTP)の酸不溶性画分への取込みで測定した。反応液組成をTable 2に示す。反応液を37°Cで一定時間(必要に応じて0分~50分間)イン

Table 2. Reaction system of RNA polymerase.

Tris-HCl buffer (pH 7.6)	30 (μ moles)
MgSO ₄	1.25
MnSO ₄	0.5
Mercaptoethanol	1.25
ATP	100
CTP	100
GTP	100
¹⁴ C-UTP (or ³ H-UTP)	800
KCl	300 (mM)
RNA polymerase	100 (μ g [*])
DNA	15 (μ g)
water	total 260 (μ l)

キュベートした後、迅速に冷10%TCA(トリクロロ酢酸)0.45ml, BSA(牛血アルブミン)250 μ gを加え十分振盪した。30~60分間、0℃に静置した後、3000r.p.m., 3分間遠心分離を行った。得られた沈殿を5%TCAで3回洗浄した後、0.2N水酸化アンモニウム0.3mlに溶かし、トルエンDPO-エタノール(5:3)溶液を10ml加え、液体シンチレーションカウンター(Beckman LS-250)でその放射活性を測定した。また反応の開始は 14 C-UTP(あるいは 3 H-UTP)添加時とした。

3 結果および考察

1) 精製酵素の比活性

RNAポリメラーゼのDEAE-セルロースカラムクロマトグラムをFig 1に示す。

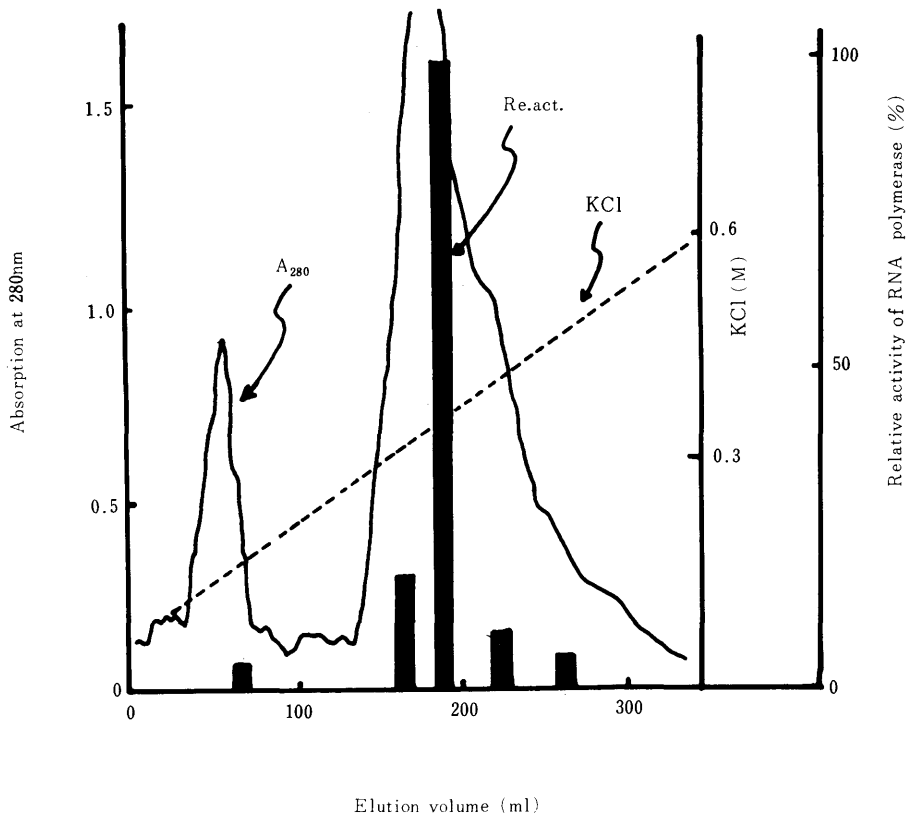


Fig.1. Chromatographic pattern of RNA polymerase on DEAE-cellulose column.

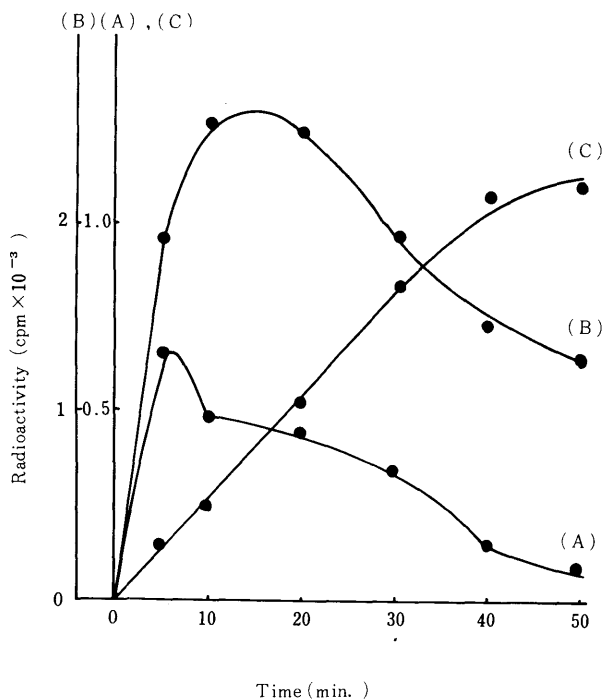


Fig. 2. Time-course of RNA polymerase reaction.
 (A) : Crude extract
 (B) : After ammonium sulfate fractionation
 (C) : After DEAE-cellulose column chromatography

Table 3. Purification of RNA polymerase from *E. coli* type B.

Step of Purification	Specific activity (U / mg protein) × 10 ⁻³
Crude extract	2.0
protamine sulfate treatment	13.2
Ammonium sulfate fractionation	106.6
DEAE-cellulose column chromatography	403.0

Elution volume 60mlと200ml付近に A₂₈₀のピークを検出したが、大部分のRNAポリメラーゼ活性は後者のピークに検出された。これは塩化カリウムのグラジェントの0.3M濃度の付近に相当する部分である。この酵素の反応の時間に対する直線性は40分まで認められた。(Fig. 2)

次に各精製段階での比活性を Fig. 2より算出すると Table 3の如くなった。酵素活性はユニット(U)で示したが、これはDNAの十分足りうる条件で37℃、60分間反応させた時に取込

まれる一種のヌクレオシドモノリン酸の $m\mu$ mole 数として算出した。(A, Bにおいてはこの程度の精製段階では反応開始後、短時間で RNAase などの影響を受けるので反応開始後10分間の取込みを60分間に換算したものをを用いた。) Table 3 で明らかなように最終的に得られた酵素は粗抽出液と比較して200倍の比活性を示した。これは以後の実験に十分供し得るものである。

2) RNA ポリメラーゼ反応に及ぼす核酸関連物質の影響

現在、食品工業において食品添加物として使用されている核酸関連物質に5'-ウリジル酸ナトリウム (5'-UMP), 5'-グアニル酸ナトリウム (5'-GMP), 5'-シチジル酸ナトリウム (5'-CMP), 5'-イノシン酸ナトリウム (5'-IMP) およびこれらを混合した5'-リボヌクレオチドナトリウムがある。いずれも調味料、呈味料として広く用いられており、ほとんどの場合、グルタミン酸と併用して使用され、その基準については決められていない。しかし一方薬品工業ではこれらと非常に構造的に類似した物質が抗生物質として利用されており⁹⁾, Cashel, Michael¹⁰⁾によってヌクレオチドによる RNA ポリメラーゼの阻害に関する報告もなされている。そこで著者は本節において、食品添加物に用いられているヌクレオチドをはじめとし、他の塩基、ヌクレオシド類の RNA ポリメラーゼ反応に及ぼす影響について検討した。酵素反応の測定は前述した方法で行い、反応時間は30分間とした。試験物質の濃度は特記しない限り $10^{-2}M$ (終濃度) とした。なお反応液は DNA, 試験物質, 酵素の順に添加し調製した。

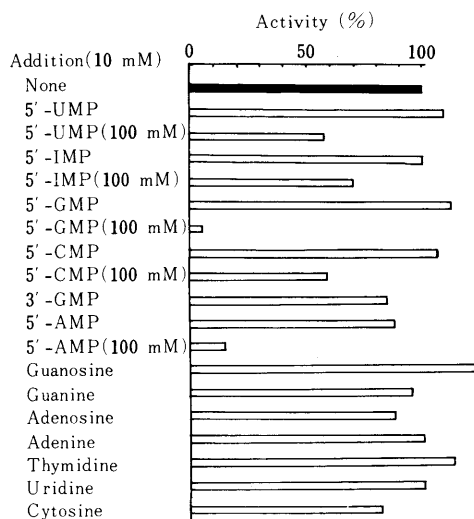


Fig. 3. The effects of some nucleotides, nucleosides and bases on RNA polymerase reaction.

実験結果を Fig. 3 に示す。 $10^{-2}M$ では 3'-GMP, アデノシンで10~15%程度の阻害, シトシン, 5'-AMP で20~25%の阻害が見られたが、大部分のものはほとんど阻害を示さなかった。次に5'-リボヌクレオチドについて $10^{-1}M$ で検討したところ、5'-GMP, 5'-AMP で85~95%という非常に高い阻害を示した。また 5'-UMP, 5'-IMP, 5'-CMP でも30~45%の阻害が見られた。

3) RNAポリメラーゼ反応に及ぼす食品添加物および各種物質の影響

村上、渡辺⁷⁾はRNAポリメラーゼ反応阻害をひとつの尺度としてタール系食用色素の安全性を再検討したが、現在使用されている食品添加物の中には他にも種々の角度からその安全性を再考すべきものが多いと考えられる。そこで著者は本節において、食品添加物の中から防腐剤をはじめとして種々の物質を選び、RNAポリメラーゼ反応への影響について検討した。更に、本来食品中に含まれ、生活の中に広く見出される物質や、汚染されて食品中に含まれてくる可能性がある2、3の物質についても同様の検討を行った。濃度はすべて $10^{-2}M$ とし、難溶性のものは微量のエタノールに溶解して実験に用い、同量のエタノールを添加したものをそのコントロールとした。酵素反応の測定、反応時間は前節と同様に行った。結果をFig.4に示す。ソルビン酸、サリチル酸などの防腐剤による影響はほとんど見られず、没食子酸、葉酸、カフェイン酸、クロロゲン酸、リボフラビン、有機錫化合物、PCB、亜硫酸塩などで50~90%の阻害が見られた。葉酸、リボフラビンはともに黄~黄橙色をした色素であるが、強い阻害を示し

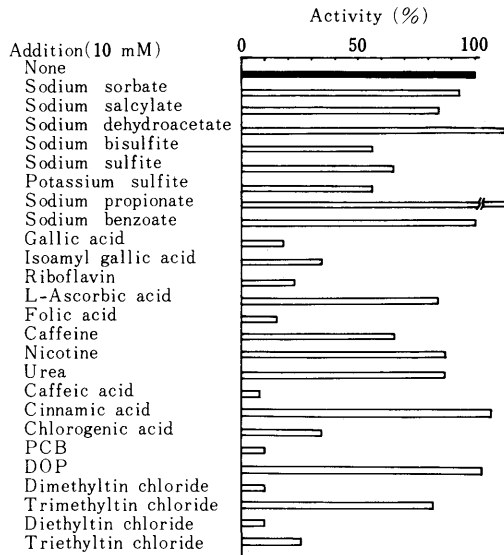


Fig.4. The effects of food additives and some compounds in foods on RNA polymerase reaction.

た原因としてこれら色素と蛋白質との相互作用、核酸との相互作用が考えられる。PCB (ポリ塩化ビフェニル、三塩化物)、DOP (ジオクチルフタレート)はともに現在の自然汚染の重要課題物質であると考えられるが、PCBについては、90%のRNAポリメラーゼ阻害が見られた。PCBに関しては生化学的分野、臨床医学的分野など多方面からその生体への作用機構が明らかにされつつあるが、自然界の汚染状況からみて、早急な総合的研究が必要だと思われる。また亜硫酸塩が50%程度の阻害を示したが、 $10^{-2}M$ 程度の濃度で亜硫酸塩は簡単にDNAを細断してしまう⁸⁾ので、それが阻害の原因ではないかと考えられる。

4 要 約

大腸菌B株よりRNAポリメラーゼを精製し、種々の物質について *in vitro* におけるRNA合成に及ぼす影響を検討し次の結果を得た。

1) 核酸関連物質では塩基、ヌクレオシド、モノヌクオタイドいずれにおいても 10^{-2} Mでほとんど阻害が見られなかった。モノヌクレオタイドは 10^{-1} Mで5'-AMP, 5'-GMPに85~95%, 5'-UMP, 5'-CMP, 5'-IMPに30~45%の阻害作用が見られた。

2) 食品添加物として使用されている各種防腐剤は 10^{-2} Mではほとんど阻害を示さなかった。亜硫酸塩、没食子酸、葉酸、リボフラビンなどで50~80%の阻害が見られた。更にカフェイン酸、クロロゲン酸、PCB、ジアルキル錫化合物などが40~90%の阻害を示した。

文 献

- 1) A. Ishihama, T. Kameyama: Biochem. Biophys. Acta., 138, 480(1967)
- 2) S.B. Weiss, L. Gladstone: J. Am. Chem. Soc., 81, 4188(1959)
- 3) J.J. Furth, J. Hurwitz, M. Anders: J. Biol. Chem., 237, 2611(1962)
- 4) M. Chamberlin, P. Berg: Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 81(1962)
- 5) R.J. Suhadolnik in "Nucleoside Antibiotics", Albert Einstein Medical Center, Philadelphia (1970)
- 6) Cashel, Michael: Cold Spring Harbor Symposia. Quant. Biol. 35, 407 (1970)
- 7) 村上浩紀, 波多野昌二, 渡辺忠雄, 食衛誌, 12巻, 267(1970)
- 8) H. Hayatsu, R.C. Miller: B.B.R.C., 46, 120(1972)