

*Bacillus subtilis*의 ATP 阻害 Ribonuclease에

관한 연구

이 택 수

샘표 식품 공업주식회사 연구실
(1975년 8월 5일 수리)

ATP-Inhibited Ribonuclease of *Bacillus subtilis*

Taik-Soo, Lee

Lab. of Sampyo Food Industrial Company

(Received Aug. 5, 1975)

SUMMARY

As a study on the ATP-inhibited ribonuclease of *Bacillus subtilis* the screening work for obtaining the ATP-inhibited ribonuclease negative mutant were carried out. And mutant strain was selected by the treatment of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). For the selected strain the enzyme purification and some physiological properties were examined and the results obtained were as follows.

1. Among tested 1817 strains with the treatment of NTG, 101 strain was selected as a mutant strain.
2. ATP-inhibited ribonuclease was tentatively purified by several independent column chromatography. The results with Sephadex G-75 column were 30 times purification, 99% recovery, and 20 times purification, 98% recovery, respectively.
3. ATP-inhibited ribonuclease was purified by 60 times through acid treatment, ammonium fractionation, and two successive chromatography.
4. The purified ribonuclease were shown to be effectively concentrated in ribonuclease content and to have reduced numbers of protein band on Disc electrophoresis.
5. This enzyme degraded single-stranded RNA to 2',3'-cyclic AMP, 2',3'-cyclic CMP, 2',3'-cyclic GMP, 2',3'-cyclic UMP and some unknown intermediates. The enzyme could not split double-stranded RNA.

서 론

*Bacillus subtilis*의 균체내 ribonuclease는 저농도의 ATP에 의하여 저해되고 있다는 사실이 알려져왔다. (1-4) 이와 같은 조절을 받는 가수분해 효소의 존재는 대단히 흥미깊은 일이나 아직 이들 효소

의 생리적 역할에 관한 보고는 거의 없다. 이러한 종류의 효소의 생리적 역할을 알기 위한 한 방법으로서 저자는 *Bacillus subtilis*로 부터 ATP 저해 ribonuclease negative mutant 취득을 시도했다. 동시에 본효소의 특성을 잘 알기 위하여 효소의 정제를 시도했다. 본보에서는 *Bacillus subtilis*로

* 본 연구는 1973~74년도 日本 UNESCO 장학기금에 의하여 東京大學 農學部農藝化學科에 체류중 이루어진 것임

부터 ATP 저해 ribonuclease negative mutant screening를 취득하는 작업과 아울러 본 효소의 몇가지 성질에 대하여 얻은 결과를 보고하는 바이나.

실험재료 및 방법

(1) 사용균주

Bacillus subtilis 168(try⁻, thy⁻) 및 *Bacillus subtilis* 101이 본 실험을 통하여 공시균으로 각각 사용되었다.

(2) 시 약

정제 RNA 및 Stranded RNA (poly I. poly c)는 ethanol 침전에 의한 extensive dialysis 법⁽⁵⁾에 의해 Yeast RNA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A. and Yamasa Co.)로부터 조제했으며, ATP, dATP, CTP, GTP, UTP, CDP, UDP, Pancreatic RNase A는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. ADP, GDP, 3',2'-GMP, 3',2'-CMP, 3',2'-UMP는 Boehringer und Shöne GmbH (Mannheim, West Germany)의 제품이며, 3',2'-AMP, 5'-AMP는 Daiichi pure Chemical Industries (Tokyo)로부터 5'-GMP, 5'-CMP, 5'-UMP 등은 Yamasa shoyu Co. (Choshi, Chiba, Japan)로부터 각각 구입하였다. Sephadex G-75 (100), DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex, blue dextran은 Pharmacia (Uppsala, Sweden)로부터, Amberlite IRC-50, myoglobin은 Rohm and Haas Co. (Philadelphia, Pa., U.S.A) 및 Miles Laboratories Inc. (Elkhart, Indiana)에서 각각 구입하였다.

(3) ATP-저해 ribonuclease negative mutant 취득

Bacillus subtilis 168(친주)을 N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine 처리(Tris malate buffer에 ml당 100r의 N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine를 첨가하여, 37°C에서 30분간 진탕처리)시켜 Schaeffer's medium에 부어 30°C에서 2~3일간 배양하여 배지상에 나타난 각각의 colony를 분리하였다. 분리된 각각의 colony를 4ml의 nutrient broth를 함유하는 소형 시험관에 접종하여 30°C에서 20시간 진탕배양시킨후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 cell을 수확했다. 수확된 cell에 100r/ml의 lysozyme solution 1ml를 첨가하여 30°C에서 20분간 용해시킨후 0.05M phosphate buffer에 용해한 RNA용액 1ml를 첨가하여 30°C 또는 42°C에서 30~60분간 반응시켰다. 반응 종료후

20% SDS용액 0.5ml를 첨가하여 15% TCA용액 1ml를 계속주가 시켜 반응을 정지시킨다. TCA 첨가에 의하여 대량의 침전을 생성하는 colony를 mutant로 선발했다. 대조구는 1mM ATP를 첨가한 외에는 시험구와 동일한 방법으로 실시했다.

(4) Ribonuclease 활성측정

Ribonuclease의 활성은 Schucher⁽⁶⁾의 신개변법에 의해 측정했다. 즉 0.6% yeast RNA 0.5ml, 0.2M phosphate buffer(pH 5.7 또는 6.8) 0.2ml, 증류수 0.2ml, 및 효소액 0.1ml를 함유하는 총반응액 1ml를 30°C에서 30분 작용시킨후 Hokin reagents (ethanol 935ml, 2N-NaOH 4ml, CH₃COOH 60ml의 혼합액) 4ml를 반응액에 추가하여 0°C에서 1시간 방치시켰다. 그후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 1ml를 조용히 채취해 4ml의 증류수로서 희석하여 잘혼합시킨후 260nm에서 OD를 측정하였다. 상기의 조건(0.6% RNA, 30°C, 30분)에서 260nm의 흡광도를 측정하여 나타나는 OD값을 ribonuclease 1 unit로 경하였다. 본실험의 전과정을 통하여 활성의 측정은 동일 sample에 대하여 2번씩 test하여 그 평균치로서 표시했다.

(5) 단백질 측정

Lowry⁽⁷⁾법에 의해 OD 660m μ 에서 흡광도를 측정 serum albumin을 standard로하여 검량선으로부터 구했다.

(6) Paper-disc agar plate method

직경 8mm, 두께 0.8mm의 paper discs (Toyo Kagaku Sangyo Co., Tokyo, Japan)를 각 효소액에 적서 RNA agar plate에 올려놓은 다음 37°C에서 24시간 반응시켜 효소반응후 paper discs를 제거하고 50ml Hokin reagent 또는 5% TCA 용액을 plate전면에 유입하여 효소작용을 정지시키면 활성부분은 투명한 ring을 나타내므로 투명도와 직경을 Vernier로 측정하여 활성부분을 check했다. 더욱 RNA agar는 0.2% RNA, 0.04M phosphate buffer (pH 5.7 또는 6.8), 30 μ g chloramphenicol, 1.5% agar를 일정한 혼합후 살균하여 30×22×2 cm의 glass sole plate에 응고후 사용했다.

(7) Ribonuclease의 정제

① 배양조건

일야 배양시킨 10ml의 *Bacillus subtilis*액을 1l의 nutrient broth액을 함유하는 5l의 rotary flask에 접종후 30°C에서 18~20시간 진탕배양하였다.

② 효소액의 조제

Cell을 8000×g에서 10분간 원심분리 하여 수집

하고 0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 2회 잘세정 후 세척시킨 cell은 동일 buffer 20ml로 현탁시켜 30°C에서 20분간 lysozyme처리와 sonic처리를 행하여 균체를 파괴시킨다 파괴되지 않은 cell 즉 cell debris, ribosomes 등은 10500×g에서 120분 원심분리하고 생성된 상등액은 100배 량의 Tris-HCl buffer로 일야 투석시켰다. 투석시킨 crude extract는 carbowax 600 solution 또는 colodion bog을 통한 ultra-filtration에 의한 투석으로 농축시켰다. 모든 crude extract는 사용전 -20°C에 저장하여 ribonuclease 활성측정에 사용하였다.

③ Acid treatment (pH 5침전)

Crude extract를 1-N CH_3COOH 로서 pH 5로 조정시켜 생성된 침전을 8000×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액에 1-N의 NH_4OH 로서 pH 7.5로 중화시킨다.

④ Fractionation with ammonium sulfate

고형 ammonium sulfate를 연속적으로 조용히 교반하면서 crude extract에 0.2포화시켜 4°C에서 일야 방치후 8000×g에서 10 분간 원심분리 시켰다. 얻어진 상등액은 더욱 고형 ammonium sulfate를 0.8포화시켜 일야방치후 동일한 조작으로 원심분리하여 생성된 침전을 수확하고 0.01 M Tris-HCl buffer에 용해하여 4°C에서 일야 투석시켜 사용했다.

⑤ Column chromatography

각종 column chromatography의 시행에 있어서 투석효소액 또는 그 농축효소액을 feed액으로 사용했다.

Amberlite IRC-50 column chromatography

pH 5.2의 0.1M acetate buffer로 완충된 Amberlite IRC-50 Column (2×45cm)에 10ml의 투석효소액을 주입시켜 정제 하였다. column은 400ml의 0.1M acetate buffer로 잘 세척하고 ribonuclease는 pH 6.5의 0.2M citrate sodium buffer로서 용출시켰다. 10ml씩 fraction collector로서 분획하여 ribonuclease의 활성을 측정했다.

Sephadex G-75(100) column chromatography

3ml의 농축효소액을 pH 7.5의 0.01M Tris HCl buffer로 완충시킨 Sephadex G-75(G100) column (2×45cm)에 주입하여 ribonuclease의 용출을 동일 buffer를 사용 4ml씩 fraction collector로 분획 ribonuclease 활성을 측정했다.

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

4ml의 농축효소액을 0.01M Tris-HCl buffer로 평

형화시켜 DEAE-Sephadex A-50 (2×45cm) column에 주입시켰다. column은 0.02M NaCl을 함유하는 400ml의 0.01M Tris-HCl buffer로 잘 세척하여 0.02M- 0.5M의 NaCl을 함유하는 Tris-HCl buffer로 ribonuclease를 용출시키고 10ml씩 fraction collector로 분획 ribonuclease 활성을 측정했다.

CM-Sephadex column chromatography

Sephadex G-75 column으로부터 얻은 부분적으로 정제된 효소액 60ml를 CM-Sephadex column (2×45cm)에 사용했다. CM-Sephadex의 경우는 pH 5.1의 0.05M acetate buffer로 평형화 시킨후 다시 400ml의 0.05M acetate buffer (pH 5.1)로 잘 세척시켜 0.05M NaCl을 함유하는 pH 7.0의 0.1M phosphate buffer를 써서 ribonuclease를 용출시켰다. 8ml씩 fraction collector로 분획 ribonuclease 활성을 측정했다.

(8) Disc electrophoresis

전기영동은 pH 8.0gel⁽⁸⁾을 사용하여 2mA/tube로서 2~3시간 행하였다. 40% sucrose를 함유하는 pH 7.0의 0.03M diethylbarbiturate Tris buffer의 시료 및 농축용 gel위에 sample 효소액 0.1ml를 추가했다. gel은 0.5% amide black 함유 20% 착산액으로 수회 염색시킨다. 염색시키지 않은 gel은 phosphate buffer를 함유하는 2% RNA 용액에 넣어 37°C에서 2시간 보존하여 RNA용액은 버리고 10% TCA용액을 부어 반응을 정지시켰다. ribonuclease 활성이 존재하는 부분에 투명한 ring이 발생한다.

(9) Thin layer chromatography

효소 분해 생산물의 분석을 목적으로 상승법 thin layer chromatography를 행하였다. 즉 0.6% RNA 0.25ml에 효소액 0.1ml를 추가하여 pH 6.8, 30°C에서 일정시간 각기 반응시켜 반응액각 10 μ l를 cellulose thin layer (20×20cm)에 spot하였다. 본 실험에서 authentic nucleotide를 standard로서 spot하였다. 또한 본 실험에 사용한 각용매의 조성은 solvent I : isopropanol-conc. NH_4OH -water (70:5:25 by vol.),⁽⁹⁾ solvent II : 80% Satd. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tert butanol-1M NH_4OH (200:3:1 by vol.)⁽¹⁰⁾로 구성되며 solvent I은 nucleoside 2',3'-cyclic monophosphates의 상호 분리를 목적으로 solvent II는 2',3'와 5'-AMP(or GMP)의 분리를 목적으로 각각 사용되었다. 분해생성물의 확인은 ultraviolet lamp를 조사하여 ultraviolet흡수 spot

가 나타나는 위치로서 확인 식별 하였다.

실험결과 및 고찰

(1) Screening for ATP-inhibited ribonuclease negative mutant

ATP-저해 ribonuclease negative mutant의 취득

을 위해 각종조건의 검토로서 NTG처리에 의해 분리되어진 각 colony의 ribonuclease 활성을 측정했다. 일차 screening의 결과는 Table 1과 같다.

시험된 1817주의 colony중에서 78주의 colony가 ribonuclease의 test결과 mutant후보로서 1차 선별되었다. 2차 screening은 1차 screening에서 기술

Table 1. First Screening of ATP-Inhibited Ribonuclease Negative Mutant

Number tested	Number of colony treated	Candidate number of mutant	Assay Temp°C	Assay time(min.)	Conc. of RNA(%)
1	105	1	45	45	0.3
2	214	10	44.5	45	0.2
3	206	3	44	60	0.15
4	89	7	42.5	60	0.2
5	165	5	42	60	0.2
6	90	15	44	60	0.2
7	201	4	42	45	0.3
8	198	1	37	60	0.6
9	53	1	30	60	0.4
10	194	9	30	60	0.4
11	154	14	30	60	0.4
12	148	8	30	60	0.4
Total	1817	78			

한 동일한 방법에 의하여 선정된 78주를 대상으로 했다. 이때 ribonuclease assay의 반응조건은 30°C 및 42°C로 구분하여 RNA농도를 0.4%로 고정시킨후 반응시켜 비교선정 했다. 시험된 78주의 균주중 14주가 타균주에 비해 ribonuclease활성이 저활성을 나타내어 최종 mutant후보로서 2차 screening되었다. 2차선정주의 ribonuclease활성, % inhibition, 활성비율 spectrophotometry에 의해 측정 한 결과는 Table 2, 3과 같다.

Table 3에서 나타난 결과와 같이 선별된 균주의 ribonuclease비활성, % inhibition등은 101균주를 제외하고는 타균주에서 높은 함량을 보였다. 선정

된 14주의 균주중 101 균주는 ATP첨가구에 있어서 control과 비교하여 유사한 탁도를 보였고 비활성이 낮은점으로 보아 ATP-저해 ribonuclease negative mutant로 선별되었다. 한편 101주와 친주의 성질을 비교 하기위하여 균체내 ribonuclease의 생육곡선 및 비활성을 비교 검토한 결과는 Fig.1과 같다. Fig.1에서 명확히 나타난바와 같이 친주의 ribonuclease의 비활성은 대수기의 말에 있어서 급히 상승하는 경향이였으나 반대로 101균주의 경우는 월등히 하강하는 경향이 있고 생육곡선에 있어서는 큰차이는 없었으나 친주의 편이 다소 생육이 왕성한 편이었다. 한편 *Bacillus subtilis* 101 균

Table 2. Second Screening of ATP-Inhibited Ribonuclease Negative Mutant

Strain No.	30°C	42°C	Strain No.	30°C	42°C	Strain No.	30°C	42°C
7	-+	-+	56	-+	--	101	--	--
6	-+	-+	60	-+	++	133	-+	++
42	-+	-+	66	-+	++	703	-+	++
49	--	-+	73	--	++	743	-+	++
381	-+	-+	96	-+	++			

* +: ribonuclease activity positive
 -: ribonuclease activity negative

Table 3. Ribonuclease Activity, Specific Activity and % Inhibition of Selected Strains

Strain No.	Protein mg/ml	RNase(unit/ml)		Spec. activity		ATP inh. RNase	Inhibition %
		-ATP	+ATP	-ATP	+ATP		
168(P)	2.92	0.102	0.036	0.349	0.123	0.226	85.7
7	3.01	0.234	0.036	0.423	0.013	0.660	96.9
42	40	1.286	0.064	0.321	0.016	0.305	95
49	28	0.674	0.076	0.241	0.027	0.214	88.7
56	9.1	0.098	0.05	0.107	0.006	0.101	95
73	34	1.018	0.095	0.299	0.028	0.271	90.7
96	4.44	0.145	0.04	0.326	0.01	0.325	97.1
101	2.8	0.142	0.078	0.051	0.028	0.023	45.1
133	3.46	0.079	0.05	0.228	0.015	0.213	93.7
703	3.85	0.08	0.024	0.208	0.062	0.146	70
16	6.19	0.098	0.034	0.158	0.055	0.103	65.3

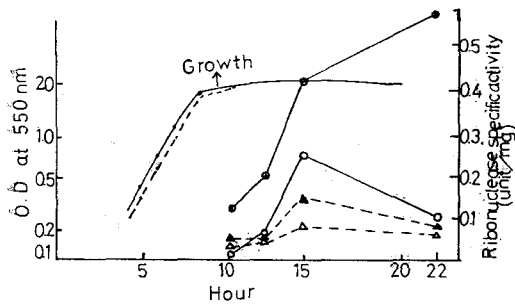


Fig. 1. Growth curve and ribonuclease level of 101 and parent strains.

- : Parent strain,
- : 101 strain
- : Parent strain(-ATP)
- : Parent strain(+ATP)
- ▲—▲ : 101 strain (-ATP)
- △—△ : 101 strain (+ATP)

주의 k_m 치와 k_i 치를 Lineweave-Burk법에 의해 plot한 결과는 Fig. 2와 같다. 본 101균주의 k_m 는 0.037%, k_i 치는 0.058 μ M를 각각 나타냈다. Bacillus subtilis 168 균주의 경우도 101주와 거의 유사한 수치를 나타내어 본 data는 생각한다. ATP-저해 ribonuclease negative mutant 실험결과 선정된 101균주는 Lineweave-Burk plot에서 parent주와 다소 유사치를 보였으나 그 비활성, ribonuclease 함량, 저해율, 생육곡선 등의 면을 종합할 때 ATP-저해 ribonuclease negative mutant라 고려되어진다. 본 결론 mutant의 취득에 있어서 본 방법의 난점은 단백질점의 생성을 방지할 목적으

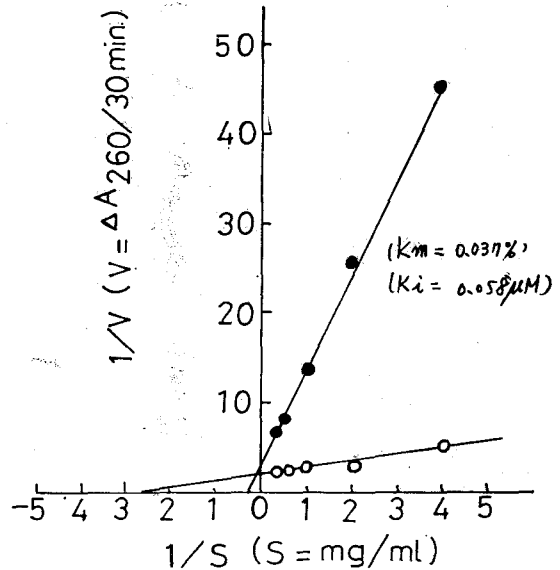


Fig. 2. Lineweave-Burk plots of yeast RNA concentration and initial reaction velocities in the presence and absence of ATP.

- : +ATP, ○—○ : -ATP

로 사용하는 SDS용액의 첨가로 인해 탁도의 판정시 RNA 침전의 양을 측정하는 것이 난점이라 들 수 있다. 그러므로 mutant 취득을 위한 한 방법으로서 pH 5침전치리에 의해 단백질을 제거하는 방법과 mutant 조작시 paper disc를 사용하여 ribonuclease 활성부분이 약한 colony를 선발 취득하여 활성을 비교측정 하는법 등이 고려되어 진다.

(2) The purification of ribonuclease

① One step purification by column chromatography

효소정제 과정의 제일단계로 mutant로 선발된 *Bacillus subtilis* 101의 효소를 사용하여 각각 상이한 수지층을 통과시켜 각 column의 종류별로 효소의 정제를 행하여 정제의 효능 및 수율을 비교 검토했다. Fig. 3~6 Amberlite IRC-50, Sephadex G-75 (100), DEAE-Sephadex A-50를 이용한 ATP 저해 ribonuclease의 column chromatogram의 결과를 나타낸 것이다. 본 실험의 결과에서 보는 바와 같이 DEAE-Sephadex A-50를 이용한 ribonuclease

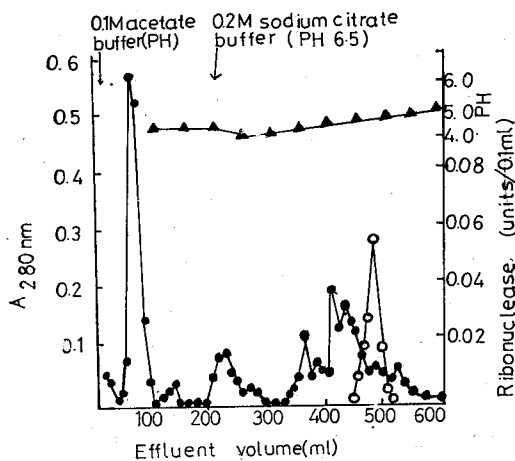


Fig. 3. Chromatogram of ribonuclease on Amberlite IRC-50.

●—● : A 280nm
○—○ : Ribonuclease activity
▲—▲ : pH

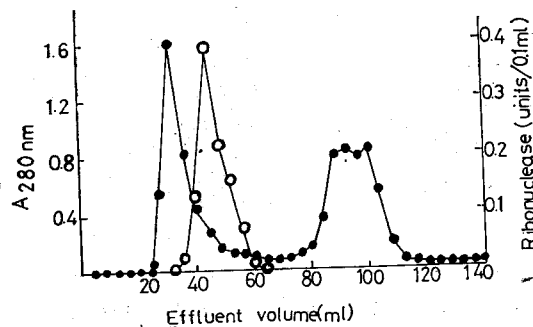


Fig. 4. Chromatogram of ribonuclease on Sephadex G-75

●—● : A 280nm
○—○ : Ribonuclease activity

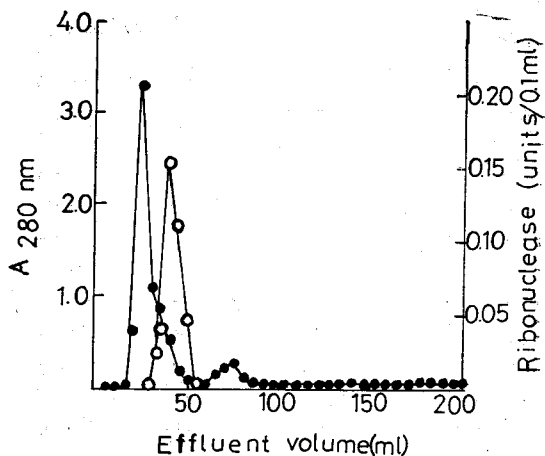


Fig. 5. Chromatogram of ribonuclease on Sephadex G-100.

●—● : A 280nm
○—○ : Ribonuclease activity

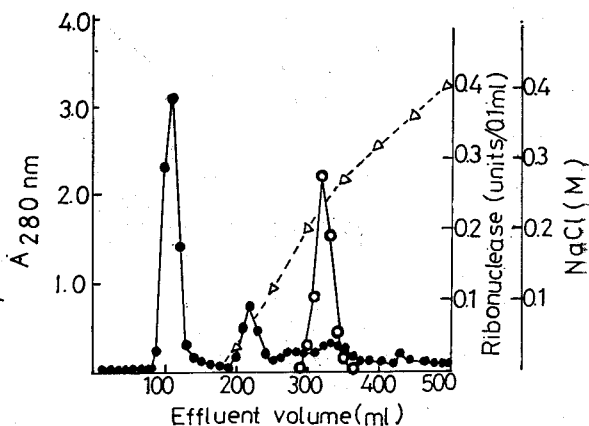


Fig. 6. Chromatogram of ribonuclease on DEAE-Sephadex A-50

●—● : A 280nm
○—○ : Ribonuclease activity
△—△ : Concentration of NaCl(M)

의 정제는 활성 fraction수가 feed fraction수에 비해 30배의 정제효과 및 99%의 회수율을 나타냈으며 Sephadex G-75 column을 이용한 경우는 feed fraction수에 비해 20배의 정제효과와 98%의 회수율을 각각 나타냈다. 반면 Amberlite IRC-50 column의 경우는 정제효과가 불량하였다. Fig. 7은 blue dextran, myoglobin, ammonium sulfate를 혼합용해 하여 Sephadex G-75 column에 주입하여 ribonuclease의 분리상태를 관찰한 결과이다. 본실

Table 4. One Step Purification of Intracellular Ribonuclease of *Bacillus subtilis*

Step	Feed solution		Peak fractions		Purification (times)	Recovery (%)
	Specific activity	Total units	Specific activity	Total units		
1. AmberliteIRC-50	1.91	43.6	5.45	10.8	2.8	24.7
2. Sephadex G-100	0.29	28	3.51	15.6	12	55.7
3. Sephadex G-75	0.65	32.1	13.3	31.5	20	98
4. DEAE Sephadex A-50	0.23	57.6	7.07	57.5	30	99
5. CM Sephadex	1.5	672	9.1	566	6	84.2

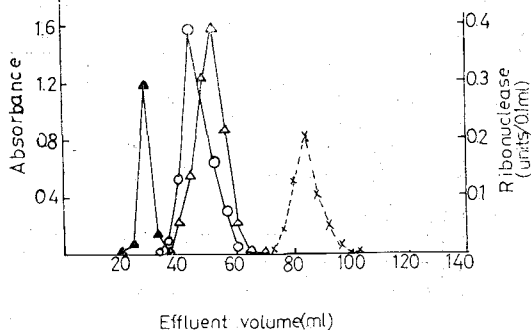


Fig. 7. Separation of blue dextran, myoglobin and ammonium sulfate on Sephadex G-75

- : Ribonuclease activity
- ▲—▲ : Blue dextran(OD, at 600nm)
- △—△ : Myoglobin(OD at 400nm)
- ×—× : Ammonium sulfate

험에 의하면 ribonuclease는 blue dextran과 myoglobin의 중간위치에 용출하였다. 각 column별에 의한 ribonuclease의 정제효능 및 수율을 종합한 결과는 Table 4와 같다.

이상의 결과를 종합하면 회수율과 정제의 효능 면에서 DEAE-Sephadex A-50 및 Sephadex G-75 column을 통한 개별정제는 양호한 결과를 보였으나 Amberlite IRC-50 column의 경우는 현저한 효

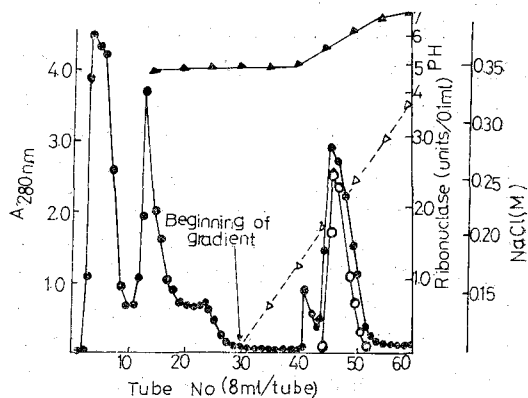


Fig. 8. Chromatogram of ribonuclease on CM-Sephadex.

- : A 280nm
- : Ribonuclease activity
- △—△ : Concentration of NaCl (M)
- ▲—▲ : pH

소의 실패때문에 정제 효과가 불량하였다. 또한 blue dextran, myoglobin등을 Sephadex G-75 column에 주입하여 분리상태를 봄으로서 대략적인 본 ribonuclease의 분자량을 추정한 결과 20000 정도로서 이는 sugi⁽¹¹⁾등의 실험결과와 유사하였다.

② Serial purification

Bacillus subtilis 101 cell을 다량배양하여 ATP-저해 ribonuclease의 정제를 대규모적 실험으로

Table 5. Serial Purification of Intracellular Ribonuclease of *Bacillus subtilis*

Step	Activity (units/ml)	Volume (ml)	Total units	Specific activity	Purification (times)	Recovery (%)
1. Crude extract	8.68	12540	108800	0.15	1.0	100
2. pH 5.0 Sup.	9.46	13320	126000	0.25	1.6	116
3. Ammonium sulfate	70.8	900	63700	0.35	2.3	585
4. Sephadex G-75	11.2	5100(60)	53700(672)	1.5	10(1.0)	49.4(100)
5. CM Sephadex	23.6	(24)	(566)	9.1	60(6)	(84.2)

(): These data were obtained from small scale experiment.

Ribonuclease activity was assayed at pH 6.8 as described in Materials and Methods.

시도했다. 대량배양에서 얻은 101균주의 cell 6.9kg (wet weight)을 pH 5.7의 0.01M Tris-HCl buffer 12l에 현탁하여 10°C, 2000 pound압력으로 Manton Gaulin Laboratory Homogenizer를 2회 통과시켜 cell을 파괴 시켰다. 파괴 되지않은 cell은 8000×g에서 10분간 원심분리하여 그 상등액(12.5l)을 pH 5침전(step 2) 및 유안염석(step 3)을 통하여 정제시켰다. 더욱 유안암모늄 염석에서 얻어진 상등액은 0.05M Tris-HCl buffer로서 평형화시켜 11.5×122cm의 Sephadex G-75 Column(step 4)에 적용시켰다. 예비실험의 결과 Sephadex G-75 column으로부터 얻은 활성 fraction 60ml를 pH 5.1의 0.05M acetate buffer로 평형화 하여 2×45cm의 CM-Sephadex(step 5)에 주입하여 정제한 결과는 Fig. 8 및 Table 5와 같다. 본 실험의 결과 *Bacillus subtilis* 101균주의 연속정제는 최초의 crude extract단계에 비하여 60배정도 정제되었다. 대량 정제 과정의 본 실험에서 Sephadex G-75 column을 이용할 경우 정제효과 및 수율이 one step purification에 비해 저하한 이유는 효소량의 overcharge 및 실패에 기인한다고 고려되어지며 동시에 본실험의 결과로 볼때 대규모적으로 본 효소의 정제를 시도할때 CM-Sephadex를 이용하면 양호한 결과가 얻어지리라고 생각되어진다.

(3) Purity

각정제 효소액의 전기영동은 Fig 9의 결과와 같

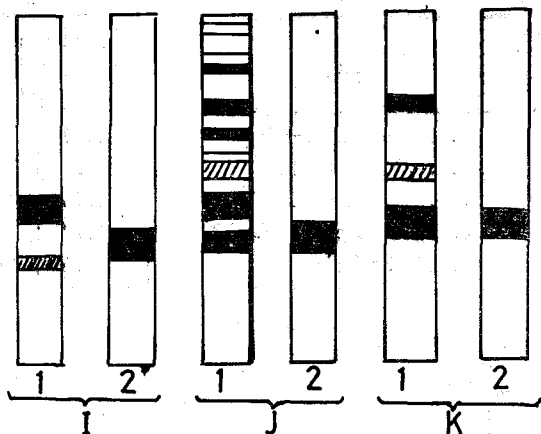
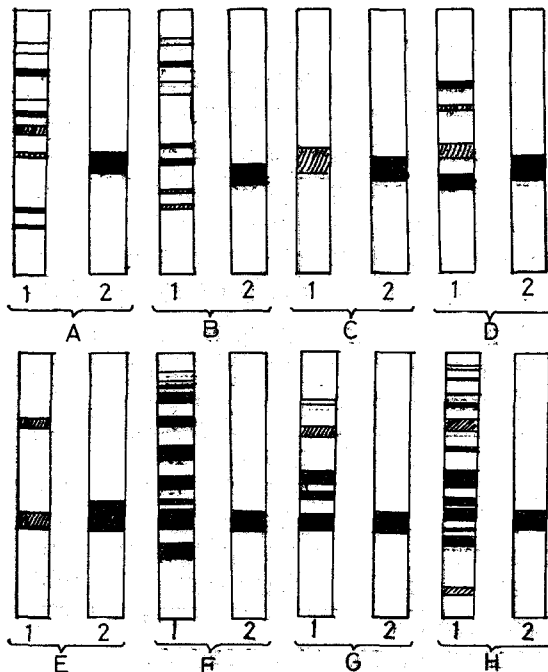


Fig. 9. Disc electrophoretic patterns

- A: Crude extract (Acid treatment)
- B: Feed solution (Sephadex C-75)
- C: Peak solution (Sephadex G-75)
- D: Feed solution (DEAE-Sephadex A-50)
- E: Peak solution (DEAE-Sephadex A-50)
- F: Feed solution (CM Sephadex)
- G: Peak solution (CM Sephadex)
- H: Feed solution (Sephadex G-100)
- I: Peak solution (Sephadex G-100)
- J: Feed solution (Amberlite IRC-50)
- K: Peak solution (Amberlite IRC-50)

No.1. of each sample shows the protein band of staining with 0.5% Amide Black in 20%acetic acid. No. 2. of each sample shows the band of ribonuclease as judged from activity staining.

이 20%초산함유 amide black염색액중에서 대담히 감소된 단백질의 pattern을 나타내었고 또한 RNA활성 염색에 의하여 판단된 것과같이 ribonuclease pattern에 상당하는 효율적인 정제효과를 나타냈다. 즉 activity stain에서는 crude extract 및 각정제 효소액에 하나의 단일한 ribonuclease의 pattern을 나타냈다. 본 실험의 결과로 판단할때 ATP-저해 ribonuclease의 정제도의 판정에 전기영동법은 큰 역할이 되고 있다.

(4) Substrate specificity

Bacillus subtilis 101을 사용하여 double stranded RNA(poly I. poly c)에 대한 가수분해 활성을 시험했다. pancreatic ribonuclease A를 control로 하여 ATP첨가 및 무첨가의 존재하에서 poly I. poly c의 소화여부를 시험할 결과에 Table 6에 나타난 것과 같이 본 효소는 poly I. poly c를 소화하지 않았다. 즉 pancreatic ribonuclease A는 이온 강도 0.1 이하에서 double stranded RNA를 분해

Table 6. The Double Stranded Ribonuclease Activity of *Bacillus subtilis*

	RNase	RNase C + ATP(1mM)	RNase A
ssRNA	0.152	0	0.527
dsRNA	0	0.020	0.339

* Substrate: Poly I. Poly c (final conc. 0.15%)

Control: Pancreatic ribonuclease (final conc. 100 γ /ml)

할수 없다는 사실을 알수 있었다. 본 실험의 결과로서 *Bacillus subtilis* 101 효소는 double stranded RNA를 분해할 수 없다는 사실을 최초로 알게 되었다.

(5) Reaction products

Bacillus subtilis 101의 ribonuclease에 의한 yeast RNA의 분해산물은 Fig. 10 및 11에 나타난 결과와 같다.

Solvent I을 사용하여 약 6개의 자외흡수 spot가 확인되었다. 그결과 A,B,C,D에 해당하는 각 Rf치는 2',3'-cyclic AMP, 2',3'-cyclic CMP, 2',3'-cyclic UMP, 2',3'-cyclic GMP에 각각 해당하였고 solvent II를 전개제로 사용하였을 시는 3개의 주된 반응 spot가 확인되었다. 즉 A,B,C에 해당하는 각 Rf치는 2',3'-cyclic UMP, 2',3'-cyclic GMP, 2',3'-cyclic AMP에 해당하였다. 위의 사실로서 본 효소는 cyclizing type이라는 것을 시사한다. 동시에 본효소는 Fig 10,11에 나타난 바와같이 ATP첨가에 의하여 효소의 반응이 완전히 저해된다는 사실이 또한 확인되었다. 본 실험결과에 의하면 분리된 반응 생성물은 2',3'-cyclic AMP, 2',3'-cyclic CMP, 2',3',-cyclic GMP, 2',3'-cyclic UMP와 몇가지 미지의 생성물로 검출되었는데 이는 sugi⁽¹¹⁾ 등의 결과와 거의 일치한 내용을 나타냈다. 본

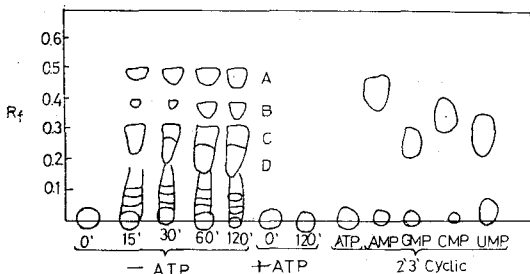


Fig. 10. Thin layer chromatogram of degradation products.

* Solvent: isopropanol: Conc. NH₄OH: Water (70:5:25)

// Reaction time (minutes)

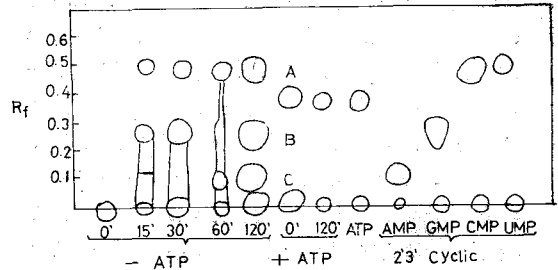


Fig. 11. Thin layer chromatogram of degradation products.

* Solvent: 80% S-atd. (NH₄)₂SO₄: tert-butanol: 1M NH₄OH (200:3:1)

// reaction time(minutes)

ribonuclease는 2',3'-cyclic monophosphate와 nucleosides로부터 Oligonucleotide의 합성과 RNA로부터 nucleosides 2',3',-cyclic monophosphate 조제를 위하여 적합한 것이라고 고려되어 진다.

요 약

ATP-저해 ribonuclease는 *Bacillus subtilis*와 같은 *Bacillus*속에서만 발견 되는 것으로서 이들 효소의 생리적 역할을 규명할 목적으로 *Bacillus subtilis* 균주를 사용하여 ATP저해성 negative ribonuclease변이주의 취득을 시도하고 선정된 균주가 생산하는 ribonuclease의 정제 및 몇 가지 성질에 대하여 실험한 결과는 아래와 같다.

1. *Bacillus subtilis*로부터 ATP-저해 ribonuclease negative mutant의 취득을 시도한 결과 시험된 1817주의 균중에서 101균주가 변이주주로 선정되었다.

2. 수개의 개별적인 column chromatography에 의하여 당균주가 생산하는 ATP-저해성 ribonuclease의 정제를 시도한 결과 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography을 이용한 경우는 30배의 정제 효과와 99%의 회수율을 나타냈고 Sephadex G-75 column의 경우는 20배의 정제 효과와 98%의 회수율을 각각 나타냈다.

3. pH 5침전, 유안염석, Sephadex G-75 및 CM Sephadex를 연속적으로 통과시켜 당효소에 대한대량정제 시험을 시도한 결과 최초의 step(crude extract) 과정에 비하여 60배의 정제효과를 나타냈다.

4. 본정제 효소액에 대하여 전기영동을 실시한 결과 비정제 효소액에 비하여 매우 감소된 수의 단백질 패턴을 나타냈다.

5. 당근주가 생산하는 ATP저해 ribonuclease는 single stranded RNA를 분해하여 2',3'-cyclic AMP, 2',3'-cyclic CMP, 2',3'-cyclic GMP, 2',3'-cyclic UMP와 몇종의 미지물을 생성하였고 또한 본 효소는 double stranded RNA를 분해하지 않았다.

끝으로 본 실험의 수행에 있어서 많은 지도와편의를 제공하여 주신 東京大學農學部 田村學造 教授님과 山崎眞狩 助教授님에게 깊은 사의를 포함과 동시에 시종격려와 후원을 하여주신 샘표식품공업주식회사 박규희 사장님과 박승재 전무님 김정규 상무님께 감사의 뜻을 포함합니다.

REFERENCE

1. M. Yamasaki and K. Arima, *Biochem. Biophys. Acta*, **139**, 202. (1967)

2. M. Yamasaki, K. Yoshida and K. Arima, *ibid.*, **209**, 463 (1970).

3. M. Yamasaki and K. Arima, *Biochem. Biophys. Acta*, **209**, 475 (1970).

4. M. Yamasaki, M. Sugi and G. Tamura, *Agr. Biol. Chem.*, **37**(11), 2595 (1973).

5. W. Frish-Niggemeyer and K.K. Reddi, *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 40. (1957)

6. R. Schucher and L.E. Hokin, *J. Biol. Chem.*, **210**, 551 (1954).

7. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

8. D.E. Williams and R.A. Reisfeld, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, Art. 2, 373. (1964)

9. R. Markham and J.D. Smith, *Biochem. J.*, **52**, 552. (1952)

10. N. Nakajima, K. Ichikawa, M. Kawada and E. Fujita, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **35**, 797. (1961)

11. M. Sugi, M. Yamasaki and G. Tamura, *Proceedings for Annual Meeting of Agricultural Chemical Society of Japan*, p 380 (1972).