

ウニの性決定に関する RNase の役割

Some relationship between the sex of sea urchin and the ribonuclease

三田明弘

麻布大学大学院環境保健学研究科

Akihiro Sanda

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract: It is generally impossible to sort male and female sea urchins before they reach maturity, i.e., while they are still in the immature stage. The ribonuclease (RNase) activity of the gonads of immature stage sea urchins consistently shows a constant activity level. Comparison of the RNase activity of the gonads of mature male and female *Hemicentrotus pulcherrimus* and *Anthocidaris crassispina* species at pH 5.0 showed that while its mean specific activity in the immature stage of female *H. pulcherrimus* increased rapidly from 7.35 units/mg to 62.79 units/mg, its activity in male *H. pulcherrimus* decreased from 7.35 units/mg to 1.90 units/mg. The same phenomenon was observed in *A. crassispina*. Base on its optimal pH, substrate specificity, and heat stability the RNase that exhibited these changes was determined to be an enzyme of the RNase T2 type. This enzyme is also thought to exert an influence on sex determination in sea urchins.

目 的

我々は下等動物のリボヌクレアーゼ (RNase) を調査している過程で、*Psamechinus miliaris* というウニから RNase の存在が Fernlund と Josefsson により報告されている¹⁾ ことを知った。そこで、ウニの生育過程における RNase の働きについて検討していた。なぜなら、ウニは成熟期と未成熟期という2つの大きな時期に分類できる。未成熟期においてはオスとメスの区別ができず、成熟期になり初めてオスとメスの区別がつくようになる。また、オスが次の時期にもオスとなるかははっきりせず、メスについても同じである^{2)~4)}。未成熟期から成熟期になる時に RNase 活性が変化するならウニの性とこの酵素が何らかの関係があることが示唆されることになる。そこで、我々はバフンウニとムラサキウニの成熟期と未成熟期の RNase 活性について測定し、この酵素の

性質も併せて検討した。

方 法

ウニの採集時期

実験に使用したウニについてはバフンウニは成熟期が3月であり、ムラサキウニの成熟期は7月である。それで、1月、3月、5月、7月、9月、そして11月にそれぞれのウニを採集した。そしてオス、メス、また未成熟をそれぞれ精巢をホモジネートし、RNase 活性を測定した。

タンパク質濃度の測定

ウニ精巢を 0.1 M 酢酸溶液でホモジネートし、4℃で 10,000 rpm で 20 分間、遠心分離した上清のタンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度の測定は Bio-Rad 社の Protein Assay Kit を使用した。スタンダードとしては牛血清アルブミンを用いて検量線を作成し

てその検量線よりタンパク質濃度を求めた。

RNase 活性測定法

ウニ精巢のホモジネート上清の RNase 活性測定は酵母 RNA を基質とし、未反応の RNA を過塩素酸と硝酸ランタンを用いて沈殿させる Redii⁵⁾ の方法に従って行った。次のようにして測定した。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に RNA (2.5 mg/ml) を溶かした液を基質溶液とする。そこに少量の酵素液を加え、37℃で適当な時間反応させる。そして、20 mM 硝酸ランタン含有 12% 過塩素酸 0.5 ml 加えて反応を停止させる。その後、3,000 rpm で 15 分 4℃で遠心して未反応の RNA を分離する。そして、上清 0.4 ml を 2 ml の蒸留水で希釈し 260 nm にて吸光度を測定する。この条件で吸光度を 1.0 増加させる時の酵素量を 1 単位とする⁶⁾。

ウニからの RNase の部分精製

バフンウニとムラサキウニの RNase の性質を見るために部分精製を試みた。それぞれのウニの精巢をホモジネートし 10,000 rpm で遠心分離した後に 0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.7) で平衡化してある Sephadex G-100 (3 × 120 cm) のカラムでゲルろ過する。この過程で、低分子化合物を分離することができる。(Fig. 1)

このようにして部分精製した酵素は分子量、至適 pH、熱安定性、そして基質特異性といった性質を見るのに使用した。

結果と考察

ウニの検体数は各個体 35 検体で行った。Fig. 2 に示す通り、バフンウニにおいては未成熟期と成熟期の RNase 活性は大きく変化している。未成熟期はどの時期を見ても平均的に比活性は 7.35 units/mg (SD1.44) であったのに対して、成熟期になるとオスは 1.90 units/mg (SD0.64) と減少してくる。それに対してメスは、62.79 units/mg (SD18.05) と大幅に増加することがわかった。オスはメスに比べ約 10% 以下の活性になる。この変化は成熟期になるとともに起きるようである。

ムラサキウニにおいては未成熟期は平均して 5.95 units/mg (SD1.03) であるのに対し、オスは

1.98 units/mg (SD1.15) と減少し、メスは 15.62 units/mg (SD2.10) と増加する。変化の程度はバフンウニとは少し違うが、オスは減少していき、メスは増加するという現象では一致していた。さらに Fig. 3 に示すように、こういった変化は成熟期に入る 1 か月前ぐらいから表れだし、成熟期が終了するとみられなくなる現象である。これはバフンウニとムラサキウニの両方でみられた現象である。

この現象が起きる理由についてははっきりしないが、ウニにおいては未成熟期には性が決定していない^{2)~4)} ことがこの時期の RNase 活性が一定値を示していることと関係があり、成熟期に性が決定するときに RNase 活性に変化が起きると考えられる。この酵素とウニの性の決定とは何らかの関係があると考えられる。

また、この変化を起こす RNase の性質について調べてみた。至適 pH はバフンウニとムラサキウニはともに pH 5.0 で *P. miliaris*¹⁾ と同様であった。そして 60℃での熱安定性を見たところ、バフンウニは *P. miliaris* と同じく不安定であって、5 分で失活してしまった。しかしムラサキウニは不安定であるが、10 分たっても 40% 程度の残存活性をもっていた。ムラサキウニには熱に安定性を促進する何らかの物質が存在しているらしい。

成熟期における部分精製した RNase のゲルろ過 (Fig. 1 a and b) から分子量を測定したところ、バフンウニの RNase の分子量はおおよそ 40 kDa と推定できた。ムラサキウニについては若干大きめのようである。

さらに、両ウニからの RNase の塩基特異性を見たものを Table 1 に示した。

両ウニからの RNase は部分精製のものであるが、塩基非特異的であることがわかった。ここにデータは示していないが、この酵素は EDTA では失活しないことが分かっている。ここまでの実験結果から、バフンウニおよびムラサキウニにおいて、成熟期のメスとオスで大きく変化する RNase は RNase T2 タイプの酵素であることがわかった。

バフンウニの RNase についての SDS-PAGE⁷⁾ を行った。その結果、活性染色⁸⁾ のデータから推定の分子量は 38 kDa であることがわかった。この値はゲルろ過のデータとも一致する。この分子量は一般的な

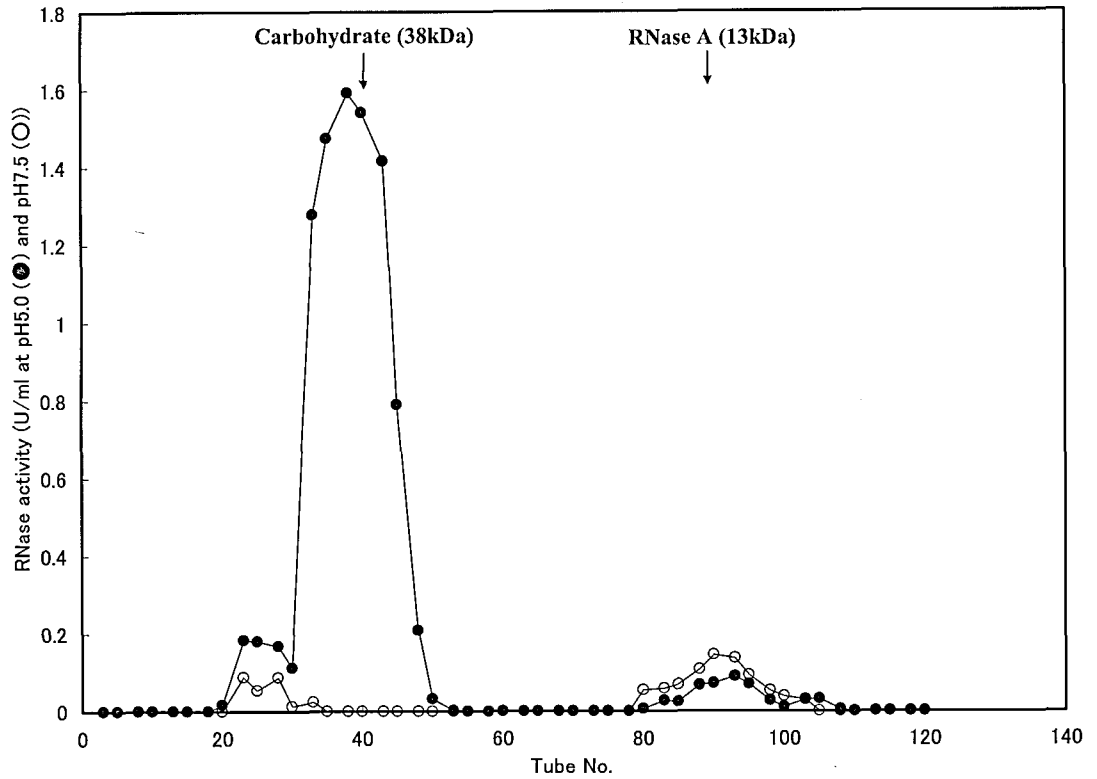
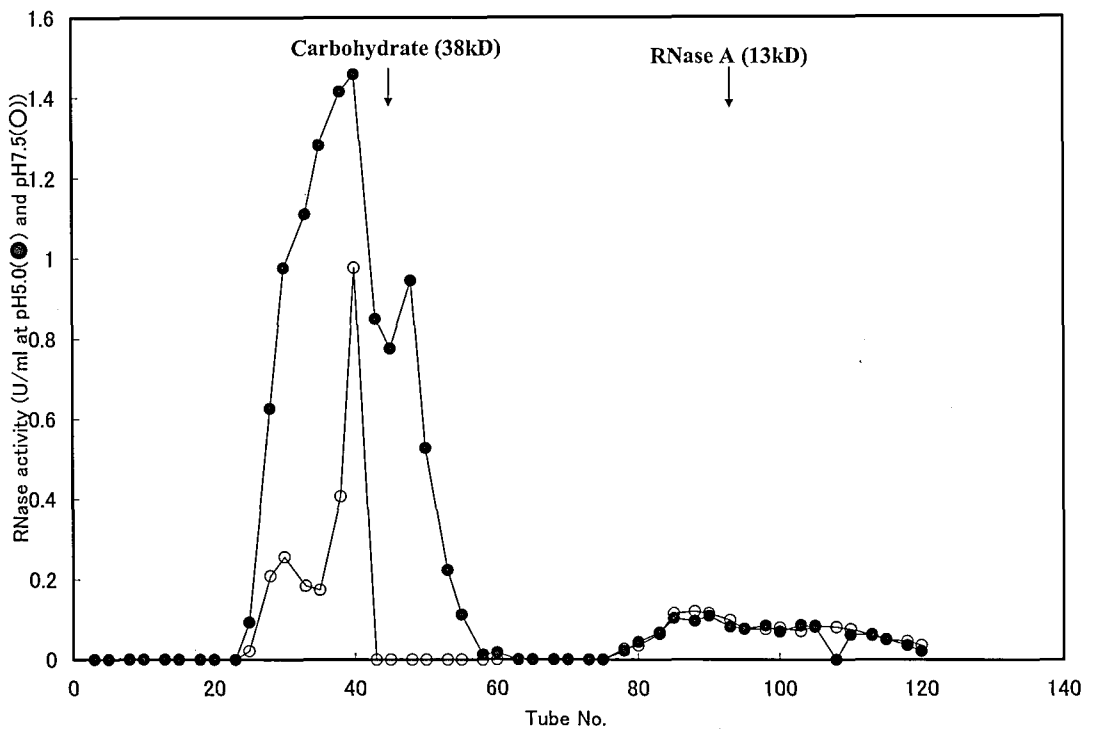
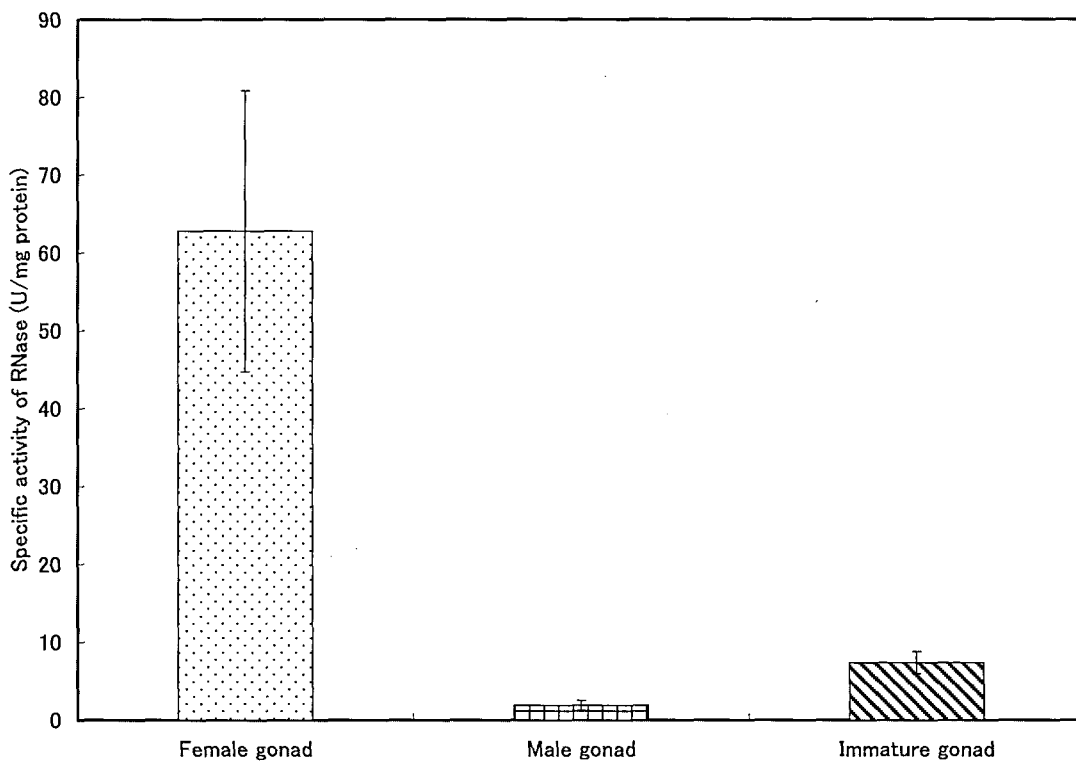
a) *H. pulcherrimus*b) *A. crassispina*

Fig. 1 Partial purification of sea urchin RNase by gel filtration.

On Sephadex G-100 (3 × 120 cm) was equilibrated with 0.1 M sodium acetate (pH 4.7). The column was eluted at a rate of 2 ml/min, and fraction of 6 ml each tube was collected. RNase activity at pH 5.0 (●) and pH 7.5 (○)
 a: female of *H. pulcherrimus*; b: female of *A. crassispina*

a) *H. pulcherrimus*



b) *A. crassispina*

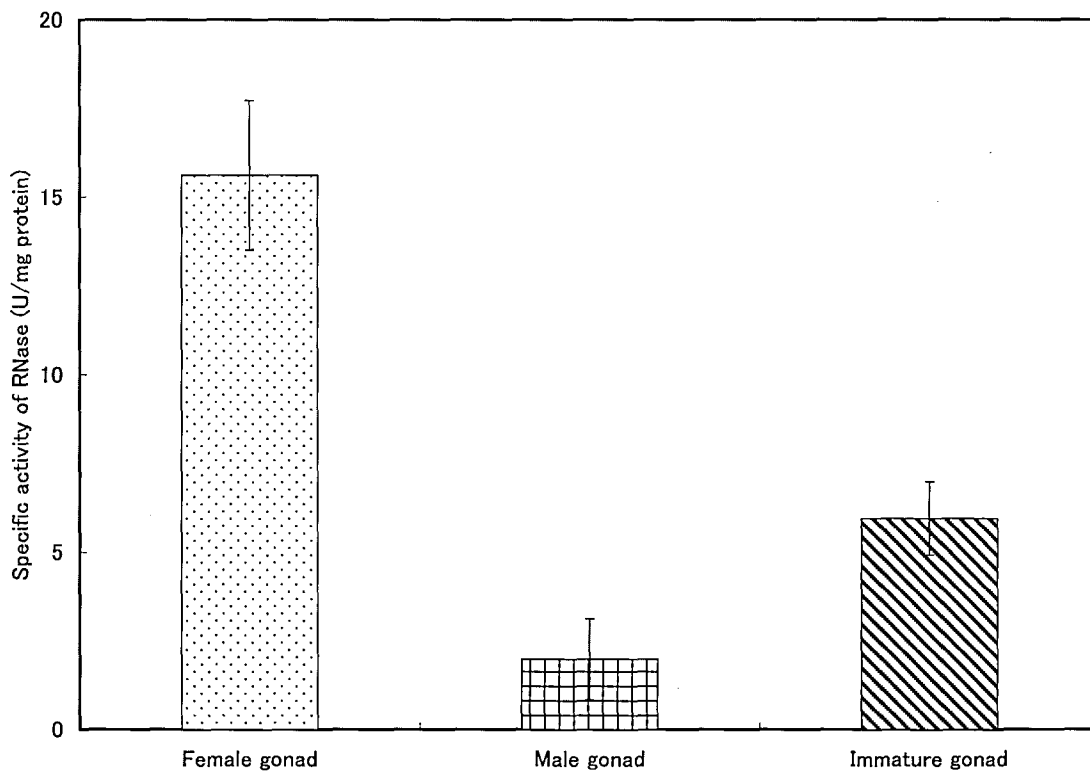
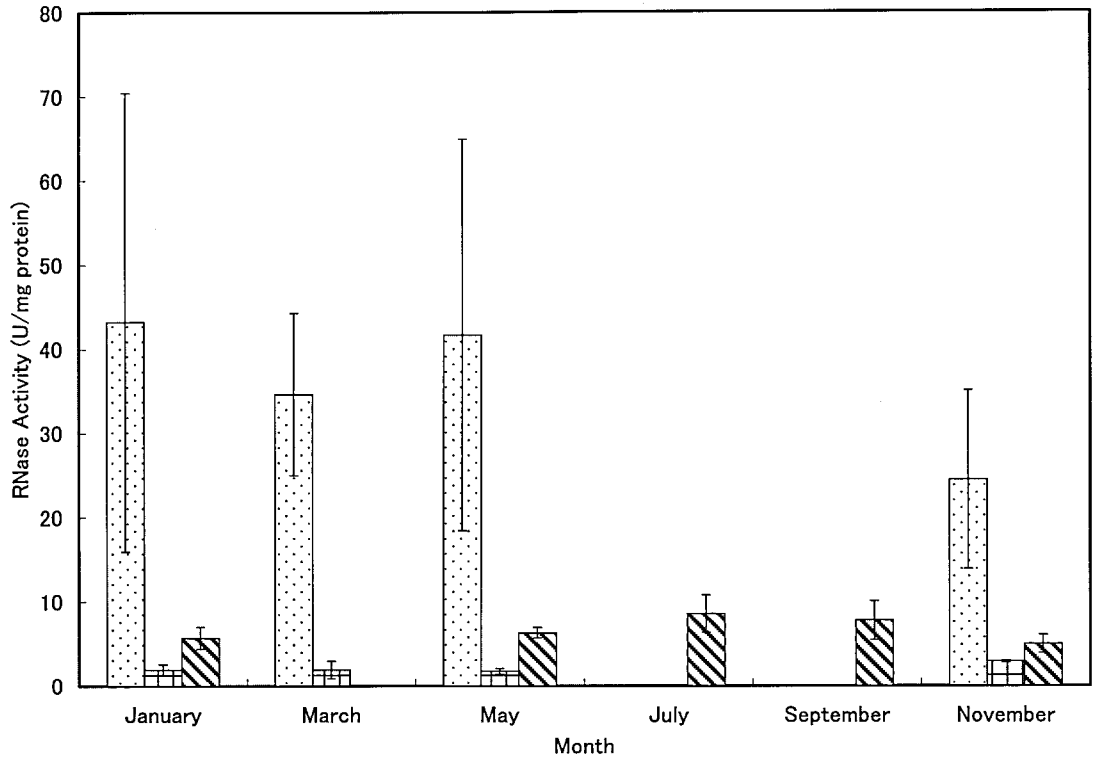


Fig. 2 RNase activity of *H. pulcherrimus* and *A. crassispina* in the mature stage and immature stage.

Measurement of RNase activity as described Material and Methods. The RNase activity of the sexes in the immature stage and mature stage could not be directly compared because of lack of knowledge on the genders of the samples.

▒ : Female gonad, ▣ : Male gonad, ▨ : Immature gonad

a) *H. pulcherrimus*



b) *A. crassispinia*

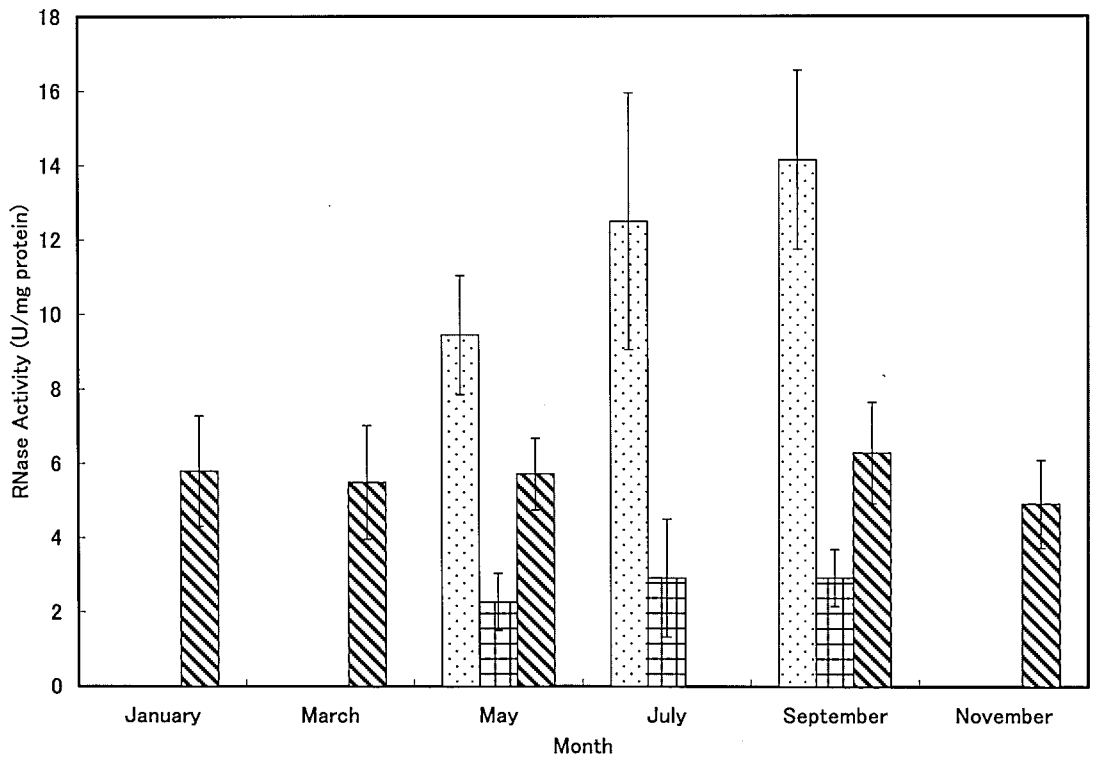


Fig. 3 Seasonal changes in the RNase activity of the gonads of *H. pulcherrimus* and *A. crassispinia*. Measurement of RNase activity as described Material and Methods. : Female gonad, : Male gonad, : Immature gonad

Table 1 Base specificity of the HEM and ANTO sea urchin RNases

	Ratio of the rate of homopolynucleotide hydrolysis to the rate of RNA hydrolysis				
	HEM		ANTO		RNase A
	female	male	female	male	
polyC/RNA	0.083	0.013	0.097	0.409	1.16
polyU/RNA	1.322	0.989	0.804	0.365	0.06
polyA/RNA	0.707	0.698	0.352	0.563	0
polyI/RNA	0.286	0.238	0.833	1.009	0

The rate of homopolynucleotide hydrolysis was measured in the same way as the rate of RNA hydrolysis. The rates were measured as increases in absorbancy per min at pH 5.0 under the experimental conditions described in the text.

RNase T2 タイプ⁹⁾ の酵素 (RNase Rh) の分子量 24 kDa と比べるとかなり大きい。また、ムラサキウニについては Sephadex G-100 のゲルろ過においては分子量が 40 kDa 以上になると予想される。(Fig. 1b) しかしながら、SDS-PAGE においては確認できていない。それはムコポリサッカライドやポリサッカライドが結合して分子量が大きくなるのではないかと予想される。そしてこのことが熱安定性がバフンウニや *P. miliaris*¹⁾ の RNase よりもよい結果になっていると考えられる。

このようにバフンウニとムラサキウニの精巢には RNase T2 タイプの酵素が存在し、この酵素は成熟期に大きくメスとオスで変化が起こることがわかった。

バフンウニとムラサキウニの RNase T2 タイプ類似の酵素のアミノ酸配列は決定していないが、この結果を支持するデータとして、バフンウニとムラサキウニに近縁のキタムラサキウニの登録されている mRNA 配列¹⁰⁾ から推定すると、RNase T2 タイプの酵素の活性中心を構成するアミノ酸がある程度の相同性を持って配列されていることが示されている。このことより、バフンウニとムラサキウニの成熟期にオスとメスで大きく変化する RNase は RNase T2 類似のものであると推定できる。これについてもさらに検討を加え、一次構造を決定していく。

バフンウニとムラサキウニのゲルろ過の図 (Fig. 1 a and b) を見ると今まで見つかっていなかった、分子量の小さい RNase の存在も確認できた。この RNase の分子量は Sephadex G-100 や SDS-PAGE の結果から 10 kDa 程度と予想される。そして含量は非常に少ない。それで、この酵素の性質についてははっ

きりとはわかっていないが、至適 pH は 7.5 付近にあることはわかっている。この酵素についてはさらに検討を加えていき、ウニ全体の RNase の役割をしらべていきたい。

結 論

(i) 我々はバフンウニとムラサキウニの 2 種から成熟期において、酸性に至適 pH を持ち、塩基非特異的な RNase が未成熟期の活性に比べメスは活性が急激に上昇し、オスは活性が低下することを見出した。

(ii) この 2 種のウニの RNase の性質は RNase T2 類似の酵素であり、*P. miliaris*¹⁾ からの RNase とよく似ていた。そしてこの酵素はウニの性の決定に関係しているように考えられた。

(iii) バフンウニからのこの酵素の分子量は SDS-PAGE で測定したところ 38 kDa で RNase T2⁹⁾ とよく似ていた。ムラサキウニの RNase の分子量はゲルろ過では 40 kDa 以上であることはわかるが、SDS-PAGE ではうまく測定できていない。なぜなら、この酵素にポリサッカライドやムコポリサッカライドが影響し、測定できないようである。しかし性質などから、この酵素も RNase T2 類似であると考えられることができる。

(iv) バフンウニとムラサキウニの RNase とウニの性の関係には明らかに重要な関連があると考えられる。ウニの成熟期には常に、未成熟期の活性に比べメスは急激に上昇し、オスは減少していく傾向がある。そして、未成熟期に戻って行くとまた両者とも活性は同じレベルになり、性は不明になる。我々は未成熟期から成熟期になり性が決定するまでの RNase の

活性の変化を追跡し、このRNaseがウニの性にどのようにかかわっているかについてさらに調べていきたい。

要 約

一般にウニは成熟期に入る前、つまり未成熟期ではオスとメスの区別ができない。その時期の精巢のRNase活性を測っても常に一定の活性値を示している。そこで、バフンウニおよびムラサキウニの一年間においてオスとメスおよび未成熟の精巢のRNase活性をpH 5.0で比較したところ、バフンウニでは未成熟期の平均比活性が7.35 units/mgであったものがメスでは62.79 units/mgと急激に上昇し、オスでは1.90 units/mgと減少した。この現象はムラサキウニにおいても観察された。そしてこの変化は成熟期に入る1ヵ月前ぐらいから起こり、また未成熟期へと変化していく。この変化するRNaseは至適pHや基質特異性や温度安定性などからRNase T2タイプの酵素であることがわかった。そして、この酵素がウニの性の決定に何らかの影響を及ぼすものと考えられる。

文 献

- 1) Fernlund, P. and Josefsson, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 373-382, (1968)
- 2) Yamamoto, M., Ishine, M. and Yoshida, M., *Zoological Science*, **5**, 979-988, (1988)
- 3) Sakairi, K., Yamamoto, M., Ohtsu, K. and Yoshida, M., *Zoological Science*, **6**, 721-730, (1989)
- 4) Mori, T., Tsuchiya, T. and Amemiya, S., *Biol. Bull.*, **159**, 728-736, (1980)
- 5) Redii, K. K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 110-118, (1975)
- 6) Irie, M., *J. Biochem.*, **62**, 509-518, (1967)
- 7) Irie, M., *Pharmacol. Ther.*, **81**, 77-89, (1999)
- 8) Blank, A., Sugiyama, R. H. and Dekker, C. A., *Anal. Chem.*, **120**, 267-275, (1982)
- 9) Uchida, T. and Egami, F., *J. Biochem.*, **60**, 115-132, (1966)
- 10) Baylor College Medicine Human Genome Sequencing Center, Genome sequence of sea urchin, XP_780287 and XP_794642,