

# RNA ポリメラーゼに対する Zn キレート剤： 1, 10-phenanthroline の作用

岡山大学医学部癌研生化学（指導：小田琢三教授）

美 澄 博 雅

（昭和53年12月26日受稿）

**Key words:** RNA ポリメラーゼ, Zn 結合酵素,  
Zn キレーター, 1, 10-フェナンスロリン

## 要 約

マウス腹水肉腫細胞より分離した RNA ポリメラーゼ I, II に対する亜鉛のキレート剤, 1, 10-phenanthroline (OP) の作用を検討した。

RNA ポリメラーゼ I 活性を50%阻害する OP 濃度は 2mM であった。RNA ポリメラーゼ II 活性は OP で阻害されなかった。RNA ポリメラーゼと OP とを予めインキュベートしても、阻害の程度は変化せず、OP を除去すると阻害は回復することから、OP はポリメラーゼ分子内に強く結合している亜鉛に可逆的に結合することが示唆された。OP は RNA ポリメラーゼ I の転写開始反応を選択的に阻害することが示唆された。核内でクロマチンに結合した RNA ポリメラーゼ I の活性も OP によって分離酵素と同程度に阻害され、OP の結合部位が、分離ポリメラーゼ I と同様に OP と結合できる状態にあることが示唆された。

## 結 言

ラット肝細胞の RNA ポリメラーゼ I, II やウニ卵細胞の RNA ポリメラーゼ I, II, III は亜鉛のキレート剤 1, 10-phenanthroline (OP) によって阻害され、亜鉛を含む酵素であると推定されている(1)。E. Gracilis(2,3) や Yeast(4,5,6) の RNA ポリメラーゼ I, II, III には 1~2.5 分子の亜鉛が結合していると報告されている。

RNA ポリメラーゼを OP で透析しても短時間には亜鉛をポリメラーゼから遊離できないことから(7)、酵素と亜鉛の結合は強固で、OP の RNA ポリメラー

ゼ活性阻害は酵素結合亜鉛に直接キレートすることによると考えられている(4)。小麦胚の RNA ポリメラーゼ II は亜鉛を含んでいるが、OP による即時的な阻害はなく、OP と長時間透析して亜鉛を除くと阻害が起ると報告されている(7)。以上のような RNA ポリメラーゼの分子種による OP の作用の違いはポリメラーゼ分子中の亜鉛へのキレーターの到達し易さが異なるためと推定される。この様に OP により RNA ポリメラーゼの構造と機能とを解析することが可能なので、本研究ではマウス腹水肉腫細胞より分離した RNA ポリメラーゼの DNA 転写活性に対する OP の作用について検討した。細胞内では RNA ポリメラーゼはクロマチンに結合しているため、OP のポリメラーゼ分子中の亜鉛への到達し易さが、遊離ポリメラーゼと異なる可能性もあるので、マウス腹水肉腫細胞の endogenous RNA ポリメラーゼ活性に対する OP の作用についても検討した。

## 材料および方法

1, 10-phenanthroline (OP) は Merk, analytical grade を使用した。マウス腹水肉腫細胞 (SR-C3H/He 細胞) は既報(8)に準じて C3H/He マウスに継代接種し 7 日目に採取した。

RNA ポリメラーゼ I, II の抽出分離は既報(9)に準じた。分離 RNA ポリメラーゼ活性は既報(8)によって測定した。標準の反応液は容量 0.1ml 中に 50 mM Tris-HCl, pH7.9 (37°C), 6mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM ATP, GTP, CTP 0.04mM [<sup>3</sup>H] UTP (1μCi), 1.0mM dithiothreitol, 0.05mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 7.5μg 仔牛胸腺 DNA を含む。

Endogenous RNA ポリメラーゼ活性は既報(8)によって腹水細胞を低張液で処理してヌクレオチドの透過性を可能にした細胞 (permeable cells) で測定した。OP は特に明記しない限り反応の開始前に反応系に加えた。

DNA は Burton (10)の方法で測定した。

### 結 果

Endogenous RNA 合成への 1, 10-phenanthroline の作用, permeable cells の endogenous RNA 合成は Table 1, Exp 1 のように RNA ポリメラーゼ I 活性のみが 2mM OP によって 50~60% 阻害された。OP で前処理した permeable cells を遠心洗滌し, 処理しない対照と比較した (Table 1, Exp 2) と同様、両者で

Table 1. Effect of 1,10-phenanthroline on *in situ* RNA polymerase activities in permeable SR-C3H/He cells.

	Polymerase	Control	Plus 1,10-phenanthroline	% to control
Exp. 1.	I	1372	657*	48
	II	926	850*	91
Exp. 2.	I	573**	650***	113
	II	241**	173***	72

Endogenous RNA polymerase I and II activities were assayed in permeable SR-C3H/He cells. Exp. 1, \* RNA polymerase I activity was assayed in the presence of 1,10-phenanthroline (1 mM). Exp. 2, \*\*, Control experiments done by pretreating the cells with buffer A (0.25 M sucrose, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7.9 at 4°C, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol).\*\*\*, permeable cells were suspended in buffer A containing 0.5 mM 1,10-phenanthroline, stood for 30 min at 4°C, then washed 3 times with buffer A by centrifugation.

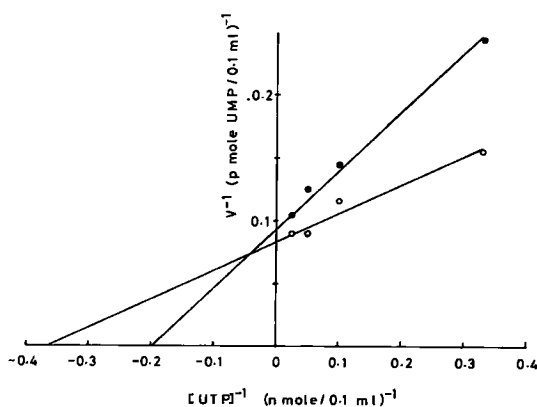


Fig. 1. Effect of UTP concentration on the inhibition of endogenous RNA polymerase I activity by 1,10-phenanthroline: Double-reciprocal plots of velocity versus UTP. Standard reaction mixtures containing permeable cells (equivalent to 200  $\mu$ g DNA) and 100  $\mu$ g of  $\alpha$ -amanitin were incubated in the presence (●—●) and absence (○—○) of 1, 10-phenanthroline (1 mM).

endogenous RNA ポリメラーゼ活性に違いは認められなかった。すなわち OP の RNA ポリメラーゼ I 活性の阻害は可逆的で、亜鉛の除去による阻害ではなく、酵素結合亜鉛への OP の可逆的な結合であることが示唆される。Fig. 1 は異なる基質濃度での OP の酵素活性に与える影響を示している。基質濃度が低いときに OP による endogenous RNA ポリメラーゼ I 活性の阻害が大きく、 $K_m$ 値は OP を添加しない時の 0.027 mM から 1mM の OP の添加で 0.05mM に変化するが、 $V_{max}$  の値は殆んど変化せず、OP による阻害は主として基質に対する競合的阻害と考えられる。

分離 RNA ポリメラーゼ活性に対する OP の作用, 分離 RNA ポリメラーゼは 1mM OP によって約 40% 阻害されき (Table 2). しかし RNA ポリメラーゼ II は 6% しか阻害されなかった。RNA ポリメラーゼ II の活性は亜鉛にキレート作用のない OP の誘導体である 2,9-dimethyl-1, 10-phenanthroline

Table 2. Effects of 1, 10-phenanthroline and 2,9-dimethyl-1, 10-phenanthroline on the activity of RNA polymerase isolated from SR-C3H/He cells.

Polymerase	c p m	Activity	
		% to control	
RNA polymerase I			
control	1882	100	
plus OP	1073	57	
plus MOP	1773	94	
plus MOP, and OP	1141	60	
PNA polymerase II			
control	2733	100	
plus OP	2577	94	
plus MOP and OP	2793	102	
plus MOP,	2619	96	

The activities of RNA polymerase I and II were assayed in the presence of: for plus OP, 1 mM 1, 10-phenanthroline; for plus MOP, 0.5 mM 2,9-dimethylphenanthroline; and for plus MOP and OP, 0.5 mM 2,9-dimethylphenanthroline and 1 mM 1, 10-phenanthroline.

Table 3. Effect of 1,10-phenanthroline on the activity of RNA polymerase I isolated from SR-C3H/He cells.

Condions	cpm	Activity	
		% to control	
Exp. 1.			
Control	23570	100	
1 mM OP before reaction	17896	75	
1 mM OP after 5 min	24700	104	
Exp. 2.			
Control	2900	100	
1 mM OP before initiation	1810	62	
Exp. 3.			
Control	3084	100	
1 mM OP after initiation	2826	92	

The activity of RNA polymerase I from SR-C3H/He cells was assayed under following conditions. Exp. 1, 1,10-phenanthroline (OP) was added to the assay mixture at the indicated time. Exp. 2 and 3, RNA synthesis was initiated by incubating a mixture containing RNA polymerase I, 7.5  $\mu$ g of calf thymus DNA and 0.4 mM of ATP and GTP at 37°C for 5 min. After the initiation, RNA synthesis was continued in the presence of 0.2 M ammonium sulphate and other nucleoside triphosphates containing [ $^3$ H]-UTP. In the the control, OP was omitted.

(MOP) によっては殆んど阻害されず (6%阻害), OP と MOP の両者を反応系に添加しても, OP 単独に比し阻害は増加しなかった。RNA ポリメラーゼ II の活性も MOP によって影響を受けなかった。

分離された RNA ポリメラーゼ I, II を 4 時間まで 20°C で 1.7mM OP とインキュベートした (Fig 2)。

この時間内では阻害の程度は変化せず, RNA ポリメラーゼ分子内の亜鉛のキレートによる除去は急速には進まないと考えられる, Fig 3 は異なる鋳型 DNA 濃度での 1mM OP の影響を示している。DNA 濃度が変化しても阻害の程度は変化しなかった。従って OP は DNA に対しては直接に作用していることが示

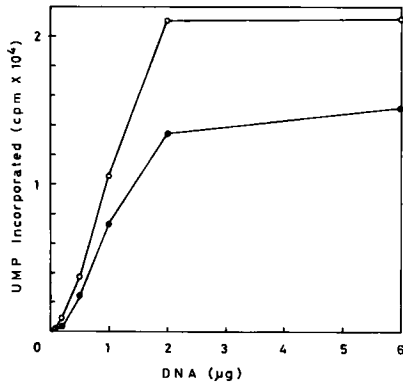


Fig. 3. Effect of DNA concentration on the activity of RNA polymerase I in the presence (●—●) or the absence (○—○) of 1 mM 1,10-phenanthroline. The indicated amount of calf thymus DNA was added to the standard reaction mixture.

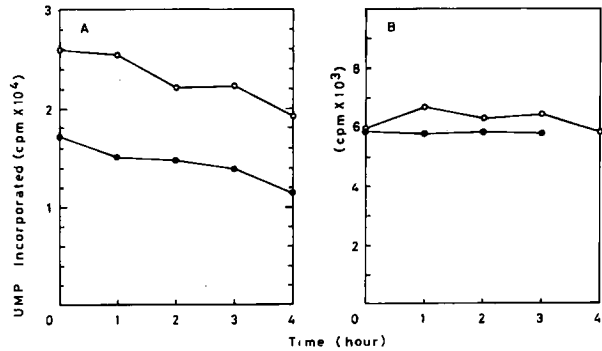


Fig. 2. Incubation of RNA polymerase isolated from SR-C3H/He cells with 1,10-phenanthroline. RNA polymerase I and II in a solution of 50 mM Tris-HCl, pH 7.9 at 25°C, 25% (v/v) glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA and, 6 mM 2-mercaptoethanol were incubated at 4°C for indicated period of time in the presence (●—●) or in the absence (○—○) of 1, 10-phenanthroline (1 mM). After the incubation RNA polymerase activity was assayed. (A), RNA polymerase I activity. (B), RNA polymerase II activity.

Table 4. Effect of preincubation of RNA polymerase I with ATP and GTP on the inhibition or RNA synthesis in the presence of 1,10-phenanthroline

Conditions	Activity	
	cpm	% to control
Exp. 1.		
Control	14780	100
OP before incubation	8850	60
Exp. 2.		
Control	17022	100
OP after incubation	11530	68

After incubation of RNA polymerase I with 0.4 mM of ATP and GTP at 37°C for 5 min, DNA and other nucleoside triphosphates containing <sup>3</sup>H-UTP were added and incubated for 10 min at 37°C. 1,10-phenanthroline (OP) was added before preincubation of RNA polymerase I with ATP and GTP or after preincubation of RNA polymerase I with ATP and GTP. In the control, OP was omitted.

唆された。

RNA ポリメラーゼ I で RNA 合成を開始してから 5 分後に OP (1mM) を加えた場合には RNA 合成の阻害は観察されなかったが、OP を RNA 合成の開始前に加えた場合には約 25% の阻害が見られた (Table 3, Exp1). このことから OP は RNA 合成の開始反応を阻害していることが示唆される。

RNA ポリメラーゼの反応はポリメラーゼの DNA への結合、プリンヌクレオチドの取り込みの開始、最初の phosphodiester 結合の生成、ヌクレオチド鎖の伸長反応に分けられる (11). RNA ポリメラーゼ I による RNA 合成をプリンヌクレオチドを取り込ませる段階で停止させ、その前後に OP を作用させた、新たな RNA 合成の開始反応は 0.2M 硫酸で阻害できる (9)

ので引き続き伸長反応を  $[^3\text{H}]$  UTP と他の基質の存在下で行った (Table 3, Exp 2, 3). プリンヌクレオチドによって RNA 合成を開始した後では OP による RNA 合成活性の阻害は10%以下であった (Table 3, Exp 3). しかしプリンヌクレオチドによる開始反応が起る前に 1mM OP を添加すると活性阻害は40%に達した (Table 3, Exp 2). この結果により OP は RNA ポリメラーゼ I による開始反応をプリンヌクレオチドの取り込みの段階で阻害することが示された.

ポリメラーゼ I とプリンヌクレオチドを 37°C 5 分インキュベートした後 OP (1mM) を加えさらに DNA と基質を加えた場合、対照に対して 32% の阻害が起った (Table 4, Exp 2). また逆にポリメラーゼ I に OP (1mM) を加えその後プリンヌクレオチドを加え 37°C で 5 分インキュベートした後で DNA と他の基質を加えたとき OP を加えない対照に比して 40% の阻害であった (Table 4, Exp 1). このように DNA とポリメラーゼと基質 (プリンヌクレオチド) の三者があらかじめ複合体を生成したときのみ OP の作用を受けないことが示された.

### 考 察

ラット肝 RNA ポリメラーゼ I, II および酵母 RNA ポリメラーゼ II は 1mM の OP と 25°C で 1 時間インキュベートすることにより活性が 1/2 以下に低下したと Valenzuela らは報告している(1). 本実験では OP による阻害は RNA ポリメラーゼ I にのみ観察された. *B. subtilis* の RNA ポリメラーゼも分子内に亜鉛を含んでおり, 1mM の OP によって活性が 40% 阻害されたと報告されている(12). SR-C3H/He 細胞の

RNA ポリメラーゼ I でもこれと同程度の阻害が見られた.

小麦胚芽の RNA ポリメラーゼ II は 7 分子の亜鉛と結合しているが, この亜鉛を 2.5mM OP に対して 1 日以上透析するとポリメラーゼの亜鉛が減少する(7). このポリメラーゼ II の反応系に OP を加えたときの即時的な阻害は 10% 以下であると報告されている(7). 以上のように OP を RNA ポリメラーゼの反応系に加えた場合に即時的に酵素の阻害の起る場合と起らない場合があり, その原因は RNA ポリメラーゼ分子内 Zn の存在状態にあり, OP に対して結合の可能性の高い場合と低い場合があると考えられる. このことは活性 RNA ポリメラーゼの亜鉛は OP に対して透析しても除去できず, ポリメラーゼを変性させて始めて透析で除き得る場合がある(13) ことから推定できる. SR-C3H/He 細胞の RNA ポリメラーゼ II はこのような場合に相当すると考えられる.

有核細胞の RNA ポリメラーゼでは OP が RNA 合成のどの段階に影響するかが明らかではなかった. 本実験ではヌクレオチド-酵素-DNA 複合体の形成段階を阻害することが示された. RNA ポリメラーゼ I 分子の亜鉛がこの段階に関与すると考えられる. Permeable cells の RNA ポリメラーゼの内在性活性も OP によって阻害されることから, この permeable cells では内在性 RNA ポリメラーゼ I による RNA 合成の開始反応が起っている可能性がある.

### 謝 辞

稿を終るに臨み御指導, 御校閲を賜った小田教授に深謝致します.

### 文 献

1. Valenzuela, P., Morris, R.W., Faras, A., Levinson, W. and Rutter, W.J.: Are all nucleotidyl transferases metalloenzymes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**, 1036—1041, 1973.
2. Falchuk, K.H., Ulpino, L., Mazus, B., and Vallee, B.L.: *E. Gracilis* RNA polymerase I: A zinc metalloenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 1206—1212, 1977.
3. Falchuk, K.H., Mazus, B., Ulpino, L., and Vallee, B.L.: *Euglena gracilis* DNA dependent RNA polymerase II: A zinc metalloenzyme. *Biochemistry* **15**, 4468—4475, 1976.
4. Auld, D.S., and Atsuya, I.: Yeast RNA polymerase I: A Eukaryotic zinc metalloenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 548—554, 1976
5. Lattke, H., and Weser, U.: Yeast RNA-polymerase B: A zinc protein. *FEBS (Fed Eur. Biochem. Soc.) Lett.* **65**, 288—300, 1976.

- 6 . Wandzilak, T.M. and Benson, R. W.: Yeast RNA polymerase III: A zinc metalloenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 247—252, 1977.
- 7 . Petranyi, P., Jendrisak, J.J., and Burgess, R.R.: RNA polymerase II from wheat germ contains tightly bound zinc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 1031—1038, 1977.
- 8 . Misumi, H., and Oda, T.: RNA synthesis in permeable mouse ascites sarcoma cells. *Acta Med. Okayama*, **33**, 141—148, 1979.
- 9 . Misumi, H. and Oda, T.: Characterization of RNA polymerases from Rous sarcoma virus-induced mouse ascites sarcoma cells. *Acta Med. Okayama* **33**, 91—102, 1979.
10. Burton, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**, 315—323, 1956.
11. Burgess, R.R.: RNA polymerase. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 711—740, 1971.
12. Halling, S.M., Sanchez-Anzaldo, F.J., Fukuda, R., Doi, R.H. and Meares, C.F.: Zinc is associated with the  $\beta$  subunit of DNA-dependent RNA polymerase of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **16**, 2880—2884, 1977.
13. Wandzilak, T.M., and Benson, R.W.: *Saccharomyces cerevisiae* DNA-dependent RNA polymerase III: A zinc metalloenzyme. *Biochemistry* **17**, 426—431, 1978.

**Effect of 1,10-phenanthroline on RNA polymerase  
from mouse ascites sarcoma cells**

**Hiromasa MISUMI**

Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University Medical School

(Director : Prof. T. Oda)

The effects of a zinc chelator, 1,10-phenanthroline on RNA polymerase from RSV-induced mouse ascites sarcoma cells were studied. RNA polymerase I was inhibited at the initiation step by 2 mM 1,10-phenanthroline. RNA polymerase II was not inhibited. The enzymes were not inhibited by a related compound, 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline, which is not a zinc chelating agent. The inhibition of RNA polymerase I was reversible. The chelating agent reduced the  $K_m$  value for nucleoside triphosphates and inhibited the RNA polymerase I at the first phosphodiester bond formation step. Endogenous RNA polymerase I activity in nucleotide permeable cells (prepared by treatment of SR-C3H/He cells in hypotonic buffer) was inhibited by 1,10-phenanthroline. The results suggest that RNA chain initiation at the first phosphodiester formation with RNA polymerase I occur in permeable SR-C3H/He cells.