

デオキシペントース核蛋白の抽出・精製
およびその化学的性状の研究

鈴木 撃 之

(1957年10月14日受理)

Studies on the Purification and Chemical Nature
of Deoxypentosenucleoproteins

Kenshi Suzuki

(Received October, 14, 1957)

ABSTRACT: The aim of the investigations reported in this paper is to shed the light on the chemical nature of deoxypentosenucleoproteins (DNP) composed of deoxyribonucleic acid (DNA) and basic protein such as protamine or histone. The descriptions of the experiments and discussions are divided into four sections.

In the first section the processes of the analytical methods used in the studies are described. Some comments are given on the determination of nucleic acids with the use of colorimetric methods.

In the second section the studies on the purification of DNPs are described. The DNPs purified were nucleoclupeine from herring soft roe, nucleosalmine from salmon soft roe, nucleoiridine from trout semen, and nucleohistones from calf thymus and from wheat germ. For the preparation of nucleoprotamine, sperm heads were collected and washed by centrifugation and extracted with strong saline. Nucleoprotamines were not extractable with distilled water. Calf thymus nucleohistone was extractable either with strong saline or with distilled water. Wheat germ nucleohistone was not extractable with distilled water but with 1.5 M saline. All DNPs were precipitated at the sodium chloride concentration from 0.14 M to 0.5 M.

In the third section some investigations on the chemical nature of DNPs are described. First: the results of the chemical analysis on the DNPs with respect to their nitrogen, phosphorus, and nucleic acid content. Nucleoprotamines contained from 60 to 70 per cent of DNA, calf thymus nucleohistone 46 per cent, and wheat germ nucleohistone 36 per cent respectively. Near the ten per cent of wheat germ nucleohistone could not be extracted with acid. Second: the dissociation of DNP into DNA and protein in strong saline solution. This was tested in three experiments; precipitation of DNA and non-precipitation of protein by the addition of ethanol into strong saline solution of DNP, dialysis and high speed centrifugation of strong saline solution of DNP. Third: the solubility of DNPs in saline of different strength. It was found from the solubility curves with

respect to DNA and to protein that DNPs were generally soluble in strong saline. Considerable part of protein was salted out as the salt concentration was increased. When the concentration of salt was decreased to 0.5 M—0.14 M, DNPs were not soluble at all. Fresh preparations of calf thymus nucleohistone were soluble in distilled water to give viscous solution. By the addition of small amount of salt fibrous mass was settled out. From these experiments the nature of the chemical bond between DNA and protein was deduced to be electrostatic in nature which must be weakened in the presence of high concentration of salt and strengthened as the salt concentration was reduced. In the latter case the recombination will be occur which results in the neutralization of the charged groups. And the solubility decreased greatly as the result of complex formation. This will provoke the formation of fibrous precipitate.

In the fourth section the studies on the interaction between DNA and basic proteins in 0.14 M saline and in distilled water are described. When DNA and basic protein were mixed in 0.14 M saline artificial DNA-protein complex was precipitated. This precipitation was found to be affected by several factors: concentration of both components, mixing ratio (protein: DNA), pH, and state of DNA. The shape of the curves, which show the amount and the composition of the precipitate formed, varied by the kind of basic protein used. The susceptibility of the DNA-protein complex of varying composition to the deoxyribonuclease (DNase) action was also studied. It was found that the susceptibility was decreased as the protein to DNA ratio was increased. In this case, also, the susceptibility was dependent on the kind of protein used. Protamine was most inhibitory and argine rich histone was least.

The interaction between DNA and basic protein in solution was studied in distilled water. The intensity of the ultraviolet light absorption of the mixture was increased above the sum of the both components. From the shape of absorption spectra this increase was thought to be the result of the the scattering light of the mixture. This was ascertained by light scattering experiments. Even the transparent mixture showed high extent of light scattering effect. From these experiments it was supposed that in distilled water DNA and basic protein interact to form some structure, the nature of which is still obscure. In this phenomenon the difference between basic proteins was apparent.

From the investigations described above it will be concluded that DNA and basic protein interact in weak salt medium or in distilled water and the bonds between these components are electrostatic in nature. And the nature of the DNPs is seemed to be dependent, at least in part, on the kind of the protein conjugated.

生体の中に核酸が始めて見出されたのはすでに十九世紀のことであるが¹⁾、その後多くの研究者達によりこれが生細胞には例外なく存在する物質であることが明らかになり、かつ、その化学構造もだんだんつまびらかにされてきた^{1),2)}。1935年には、W.M. Stanley が³⁾タバコ・モザイク・ウイルスを結晶化することに成功し、それが核酸を含む核蛋白質であることが明らかにされて以来³⁾核酸が生体細胞のみならず、ウイルスにも一般に含まれていることが明らかになつて、それ以後核酸の生体における意義は非常に重要なものであると考えられるようになった。現在、核酸には大別して二種類が知られている。一つは糖部分にペントースを含むペントース核酸で、他はデオキシペントースを含むデオキシペントース核酸である*。前者は主として細胞質と細胞核内の仁とに存在し、後者は細胞核にのみ局在している。これらの核酸の生体中における真の役割はまだ最終的には明らかにされていないが、生体の特異的な蛋白質の合成に関連して、生体の特異性の伝達という点で重要なはたらきをもっていることが、細菌の型転換因子についての研究⁴⁾や、バクテリオファージの増殖の研究⁵⁾などからだんだん明らかにされてきた。

ところで、核酸が生体中で活性を示す場合に、蛋白質がこれと何らかの関連をもつて始めて核酸のはたらきがあらわれるのではないかということが当然考えられる。事実、遺伝子がある場所といわれている細胞核のクロモゾームには、核酸のほかにヒストンおよび非ヒストン性の蛋白質が多量にあるし^{6),7)}、細胞質の PNA も大部分が蛋白質や脂質などと共に顆粒を形成して存在している⁸⁾。さらに動物性、および植物性ウイルスおよびバクテリオファージも、いづれも単離されたものは核酸と蛋白質を含んでいる。このような点から考えると、核酸の生物体内での役割を研究するためには、生物学的な実験と並行して核酸や核蛋白質の

化学的な研究をおこなうことが重要な意義をもつものと思われる。中でも、核酸が蛋白質とどのような相互作用をもつかをしらべることは、核蛋白の構造の解明にも、また核酸の生体中でのはたらきを理解するうえにも必要である。

著者の属する渡辺研究室では、以上のような目的をもつて核酸および核蛋白質の研究を数年来おこなつてきている。川出*は粘度、沈降など物理化学的方法により、DNA および DNP の分子形状、分子量の測定をおこない、さらに DNA の不均一性、および DNA とヒストンとの相互作用についての研究をおこなつた⁹⁾。宇井は細胞核内における DNA の counterpart としてのヒストンが、大きく二つの異つた分画に分けられることを見出し、電気泳動、沈降など主として物理化学的測定をおこなつてそれらの性質を研究している¹⁰⁾。また北村と三浦は川出と協同して高分子の PNA の研究をおこないつつあり、北村はすでにウシの肝臓から分子量が従来の方法によりえられたものよりもはるかに大きな PNA をえて、その分子状態や沈澱性の研究をした⁷⁾。三浦は塩基組成を主にして PNA の生化学的な研究をおこないつつある。

こういう情況のもとに著者は化学的な面から DNP の性状について研究をおこなつてきた。そのためにまず種々の生体組織からできるだけ温和な方法で DNP を抽出・精製することを研究した。その結果魚の精子、コウシ胸腺、および小麦胚の DNP は食塩の濃度を適当にえらぶことによつて抽出・沈澱の操作をおこなうことがわかつた。この結果を第二章に記す。つぎに、これらの DNP の化学的な性状を明らかにするために、化学分析をおこない、DNP の DNA および蛋白質量を測定して比較検討した。さらに、DNA と蛋白質とが濃い食塩水中では解離の傾向にあることを、透析の実験、および超遠心機を用いる実験などからたしかめ、この結果から DNP 中の DNA と蛋白質との間の結合が静電的な力によることが予想された。また種々の DNP の食塩水中への溶解性をしらべた。この結果、食塩濃度の変化により DNP の挙動にいちぢるしい相異があることがわかつた。以上の DNP の性状に関する実験結果を第

* 本報告では核酸・核蛋白質についてつぎのように略号を用いる。

DNA: デオキシペントース核酸

PNA: ペントース核酸

DNP: デオキシペントース核蛋白

DNH: デオキシペントースヌクレオヒストン

* 現住所: 京都大学ウイルス研究所

三章に記す。第四章、第五章には、それぞれ 0.1 M 食塩水および蒸留水中における DNA と塩基性蛋白質との相互作用についての研究結果をのべる。

0.14 M 食塩水中での相互作用の結果は人工 DNP 複合体の沈澱の生成という形でみられる。かかる複合体沈澱の形成に関連している種々の要因についての検討をおこない、また沈澱物に対するデオキシリボヌクレアーゼ作用をしらべて両成分の結合の形式および状態について考察をおこなった。蒸留水中での実験は、溶液状態における DNA と蛋白質との相互作用をしらべる目的でおこなった。しかしながらこの実験はごくうすい濃度でしかおこなえないので、主として紫外吸収の強度を測定した結果 DNA に塩基性蛋白質を加えると吸収強度は両者の吸収の和よりもはるかに増加する現象を見出した。この現象は溶液の散乱光の測定および紫外吸収曲線から、DNA と蛋白質との相互作用の結果生じた何らかの構造による散乱光のためにおこる現象らしいと考えられた。

以上の諸結果から、DNA と塩基性の蛋白質との間にはつよい相互作用が認められ、条件によつては複合体の沈澱を形成するが、ある場合には溶液状態でも両者によつて何らかの構造をもつものがつくられるのであらうと考えられた。これらの沈澱状態の（あるいは組織から抽出した DNP の）DNA—蛋白質複合体の微細構造や、溶液での状態などについてはまだ今後研究の余地は大いにあるが、今までにあげた諸結果はその研究のいとぐちを開いたものとして意味があると思われるのでとりまとめて報告する。

これらの研究をおこなうにあつては、渡辺格教授に全面的な御指導をたまわり、本報告を作るに際してもいろいろと御注意をいただいた。ここに深謝の意を表する次第である。また研究室の川出、宇井両氏とは、前にのべたように研究上密接な関係があり、著者の研究計画や研究結果について有益な討論をしていただいた。また本報告の作製にあつても御批判を仰いだ。ことに宇井信生氏からは本研究に必要なヒストンの試料をいただいた。そのほか、分析その他に種々御便宜をはかつて下さつた中村正好、北村とも子、三浦謹一郎諸兄姉と共に厚く感謝する。

なお、研究費の一部は文部省科学研究費、総合

研究“核酸および核蛋白質”研究班の経費によつた。

第一章

分析方法

前にものべたように、著者は主として種々の化学分析をおこなつて DNP の性状を研究した。それらのうちには文献に記載されている方法をそのまま応用して好結果をえたのもあるが、なかには多少の検討を要するものもあつた。報告中のおのおの実験について、いちいち分析方法を記すのはわずらわしいので、まず共通に用いた方法についてのべることにする。

I 窒素と磷

窒素分析にはマイクロエルダール法を用いた。分解の時の触媒には硫酸銅を用い、沸とう点を上げるためには硫酸カリの結晶を加えた。両方とも数回再結晶をおこなつた。水蒸気蒸溜により発生したアンモニアを飽和ホウ酸水溶液にうけ、標定した 0.01 N の塩酸で滴定する方法にしたがつた。

無機磷の分析は、報告中特にことわりのないかぎり King の方法¹³⁾にしたがつた。有機磷の加水分解は 60 ないし 70% の過塩素酸でおこない、モリブデン酸アンモンおよびアミノナフトールスルホン酸を加えて生じる青色を日立の光電比色計 (EPO—A 型) (赤色フィルター) または、ベツクマン DU 型分光光度計 (660 m μ) で比色した。5% ないし 50% の磷に対しよく直線関係がえられる。

II DNA, PNA の定量

DNA, PNA 量はそれらの糖部分の示す呈色反応をおこない比色によつてもとめた。これらの呈色反応はいくつか報告されているが、しらべた結果では PNA はオルシノールを用いる方法のうち Kerr, Seraidarian らの変法¹⁴⁾が検液や試薬の量の点で都合がよいのでこれを用い、かつ、試薬濃度を Miller ら¹⁵⁾にしたがい、それらの濃度のわずかな変動が発色のつよさにあたえる影響をできるだけ少なくするようにした。最終的にはつぎのようにした*。

* DNA もオルシノール反応で発色する。吸収の極大は PNA と同じ 670 m μ にあるが、そのつよさは PNA の約 1/6 である (第一表)。DNA が共存する時にはこの補正をしなくてはならない。

PNA を含む検液 2.0 cc に, Fe^{+++} を加えた濃塩酸 (濃塩酸 100 cc に $Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 0.047 g を溶す) 2.0 cc, さらにオルシノールのエチルアルコール溶液 (1.5 g/10 cc) 0.1 cc を加え, 沸とう水溶液中で 20 分間加熱し, 流水で冷してから 10 分後に比色した. 比色は 660 m μ でおこなった. PNA の 10 r/cc ないし 80 r/cc にわたってよく直線関係を満足する.

DNA はヂフェニルアミン法¹⁶⁾またはインドール法¹⁷⁾で測定した. 前者では DNA の 50 r/cc くらいの量の検液を必要とするが, 後者ははるかに感度がよく, 10 r/cc 以下でも定量が可能である. ギフェニルアミン法では DNA の 30 r/cc ないし 250 r/cc にわたり, インドール法では 5 r/cc ないし 25 r/cc にわたり直線関係を満足する. 上にのべた各呈色反応の比色の標準としてベックマンの DU 型分光光度計を用い, 1 cm の厚さのセルを使用した時の吸光度を第一表に示す. PNA にはコーボのリボ核酸⁶⁶⁾を, DNA にはコウシ胸腺のデオキシリボ核酸を, いずれも水溶液として使用した. 数値は全部核酸 1 r についての吸光度で示してある.

第1表 DNA, PNA の呈色反応溶液の比吸光度

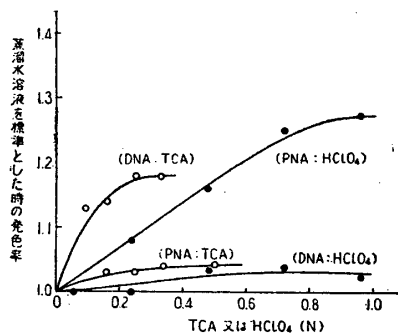
核酸	用いた反応	波長 (m μ)	核酸 1 r 当りの吸光度
PNA	オルシノール	660	0.0133
DNA	ヂフェニルアミン	600	0.0021
DNA	インドール	490	0.02*
DNA	オルシノール	660	0.00225

* 使用するクロロフォルムの状態により多少変動することがあるが, 同じクロロフォルムを用いればその都度の測定には差支えない.

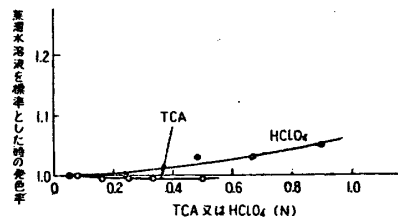
第一表に示した数値は核酸の水溶液を検液として用いた場合の値であるが, このあとにのべるように, 生体組織の核酸を DNA と PNA とに分画して定量する場合などでは, しばしば核酸の酸 (トリクロル酢酸 (TCA), または過塩素酸) 溶液を定量に用いなくてはならないことが多い. この場合に上述のように吸光度をはかってみると, その値がかなり増減することがわかった. 種々の呈色反応において酸濃度と, 吸光度との関係を第一図から第三図までに示す.

これらの図から, オルシノールによる呈色反応

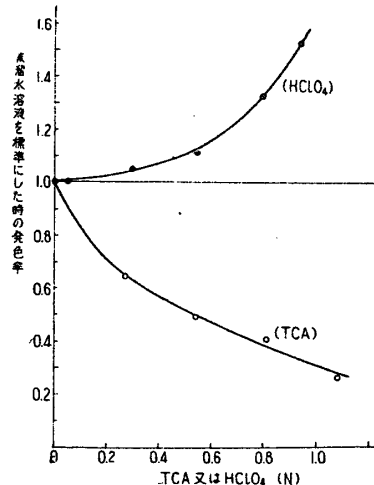
では, PNA に対しては過塩素酸が, DNA に対しては TCA が大きく発色増大の効果をもち, ギフェニルアミン反応では過塩素酸, TCA 共にあまりけん著な変化がみられないが, インドール反応では過塩素酸が著しく発色増加を示すのに対し, TCA は逆に発色を阻害することがわかった.



第1図 オルシノール反応に対する TCA および過塩素酸の影響



第2図 ギフェニルアミン反応に対する TCA および過塩素酸の影響



第3図 インドール反応に対する TCA および過塩素酸の影響

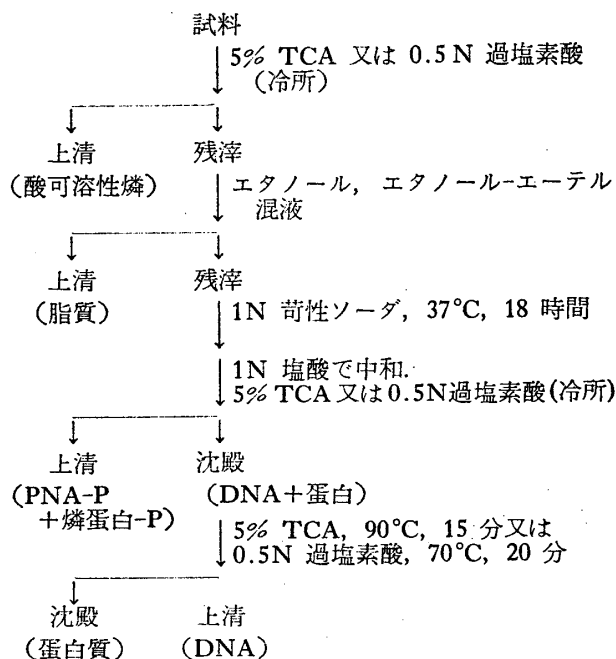
この結果, 核酸の検液にこれらの酸が含まれるときには相応な補正をおこなわなくてはならないことがわかった.

III 生体組織の燐化合物の分画定量

燐化合物の分画定量はサケ白子からとり出した

精虫分画 (第二章), および小麦胚 (第二章) についておこなつた. 分析方法は精虫分画の場合には Schmidt—Thannhauser 法¹⁸⁾を用い, 小麦胚の場合にはこれを改良した Moulé の方法¹⁹⁾にしたがつておこなつた. 前者では酸に TCA を用いたが, TCA が核酸の紫外吸収による定量を妨害するので, Moulé は TCA の代りに過塩素酸を用いた. 分析法の概略はつぎのとおりである.

秤量した試料に氷冷した 5% TCA もしくは 0.5 N 過塩素酸を加えてくりかえし抽出をおこなう. これらの遠心上清に酸溶性の磷がふくまれる. 抽出した残りのものをアルコールで洗い, さらにエタノール-エーテル混液 (3:1) で脂質を抽出する. つぎに 1 N 苛性ソーダに溶し, 37°C で 18 時間おき, 1 N 塩酸で中和してから, 5% TCA もしくは 0.5 N 過塩素酸を加えると DNA と蛋白質が沈澱し, PNA (実際にはアルカリで分解を受けてモノヌクレオチドになっている) と磷蛋白の磷が液に残る. 遠心分離でこれらをわかし, 沈澱部分をそれぞれの酸で洗つてから 5% TCA, または 0.5 N 過塩素酸と共に加熱すると DNA がとけて出る. これらの各分画について磷の定量または核酸の糖の比色分析, あるいは紫外吸収の測定 (後述) から DNA および PNA その他の分画の磷化合物の量をもとめる. 操作方法を図示するとつぎのようになる.



第4図 生体組織の磷化合物の分画定量法

磷の分析値から核酸量をもとめるのには, DNA には 10.1, PNA には 10.6 を掛けて算出した¹⁸⁾. また紫外吸収のつよさから DNA 量を算出する時には, 0.5 N 過塩素酸で 70°C, 20 分間加熱した条件で, 同じ溶媒中で 1γ DNA/cc 当り 0.0292 とした*.

IV ペーパークロマトグラフィによる DNA の塩基組成の分析

DNA には (PNA にも) 主として四種類のプリンあるいはピリミジン塩基誘導体がふくまれている. プリン塩基はアデニンとグアニンで, ピリミジン塩基はシトシンとチミンである (PNA にはシトシンとウラシル). 昔はこれらの塩基がおのおの等グラム分子づつふくまれているといわれていたが, 近年のペーパークロマトグラフィやイオン交換クロマトグラフィの技術の進歩にともない, この事実はすべての核酸には適用できないことが指摘された**. すなわち, DNA の塩基組成は, その DNA を抽出した生物の種により相異がみられることがわかり, かつ, 塩基の種類も上の四種だけではない例も見出された. たとえば, 多くの高等生物の組織から抽出した DNA にはごく少量の 5-メチルシトシンがふくまれており (小麦胚の DNA にはかなり多量にふくまれている²⁰⁾), 大腸菌のバクテリオファージのうちで, T₂, T₄, T₆ にはシトシンのかわりに 5-ヒドロキシメチルシトシンが入っていることがわかつた²¹⁾. このようなわけで, DNA の塩基組成をしらべることは, その同定の意味からも重要であるから, われわれは DNP からえられた DNA の塩基組成をペーパークロマトグラフィ法で分析した.

まず DNA を 12 N 過塩素酸で 100°C, 60 分間加熱し分解する²²⁾. 遠心分離して炭化物質を除き, この上清の一定量を用いて磷量をはかり, またペーパークロマトグラフィに用いた.

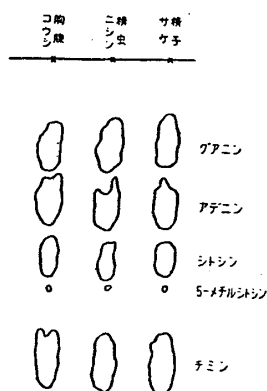
展開溶媒にはオクチルアルコール-2 N-塩酸系²³⁾を用いた. 紙は東洋濾紙の No. 5 A を使用した.

展開後濾紙を風乾し, 紫外線滅菌灯 (東京芝浦電気株式会社製, R-1510 A 型, 15 W) にフィル

* 通常の DNA を中性溶液中で測定した時の値にくらべて 35% ていど大きい.

** 分献 30) 参照.

ター*をつけて暗室で塩基の位置を直視し、その位置を切りとり、0.1 N 塩酸で抽出し、ベックマン分光光度計で定量した。クロマトグラムの写真をとるには、硝子板上に印画紙（富士フィルム、ペロナ4号）をおき、その上に風乾した濾紙を重ねこれらをセロファン紙でおおつて硝子板に密着せしめ、上記の紫外線灯で一定時間照射して感光せしめた。第5図にペーパークロマトグラムの一例を示す。



第5図 コウシ胸腺 DNA 加水分解物のペーパークロマトグラム

V その他の分析方法

紫外線吸収スペクトルの測定はいずれもベックマン DU 型分光光度計を使用しておこなつた。水晶のセルの液層の厚さは 10 mm である。

pH の測定にはベックマン G 型 pH メーターを使用した。

第二章

DNP の抽出・精製

生物組織から DNP をできるだけおだやかな方法で抽出するやり方は、現在までの知見では二通りある。一つは塩類をふくまない蒸留水を用いる方法で、もう一つは 1 M とか 2 M とかの高濃度の食塩水を用いる方法である。前者の方法は、古くは Lilienfeld²³⁾, Huiskamp²⁴⁾ らが用い、Carter らが²⁵⁾これを改良してから一般に DNP の抽出に用いられるようになって、最近では Doty ら²⁶⁾をはじめ多くの人びとが蒸留水による抽出をおこなつている。いつぼう食塩水による抽出は Bang が²⁷⁾これをはじめ、近く Mirsky ら²⁸⁾によ

り広くいろいろの組織から DNP を抽出するのに適当していることが明らかにされた。抽出された DNP は食塩濃度を 0.14 M にすると沈澱することもわかつた*。

しかしながら、DNP の種類により蒸留水では組織から抽出することができないものがある。われわれがニシン、サケ、ニジマスなどの魚の精子からヌクレオプロタミンを抽出する際に、これらの組織からは水で DNP を抽出することができないことが明らかになつたし、小麦胚からヌクレオヒストンを抽出するのにも水を用いることができなかった。したがつてこれらの場合にはいずれも 1 M 以上の高濃度の食塩水を用いて DNP の抽出をおこなつた。コウシ胸腺からは蒸留水でヌクレオヒストンを抽出することができる。

つぎに DNP の抽出・精製の操作上注意した点をあげると、まず操作中の DNA の酵素分解をなるべく少なくするために、DNA の分解酵素であるデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) の活性化物質として知られている Mg イオン³¹⁾を除くために、クエン酸ソーダをすべての溶液に 0.001 M から 0.05 M にわたつて加えた**。また同じような意味で操作中に温度を上げないように氷冷したり、冷室で操作をしたりした。さらに DNA や蛋白の分解を防ぐため、溶液の pH が中性から極端に酸性側またはアルカリ性側に外れないようにした。

I ニシン、サケ、ニジマスなどの魚精虫からヌクレオプロタミンの抽出・精製

日本で DNP の材料として容易に新鮮な状態がかつ多量入手しうるものとして、われわれはまずニシンの白子をかながえた。北海道の漁場でとれたニシンからすぐ白子を取り出し、ただちにドライアイスで凍結させ、そのまま東京にもちかへつて実験に供した。

まず白子を凍結したままで、肉ひき機にかけてこまかいかゆ状にし、0.05 M クエン酸ソーダで洗つてから蒸留水によつて DNP が抽出されない

* これらの詳細は分献 29) および 30) を参照されたい。

** Mg イオンはウシ膵臓の DNase には活性化物質としてはたらくが、たとえばコウシ胸腺の DNase には阻害的にはたらくともいわれる³²⁾。

* 科学研究所岩瀬英一博士よりいただいた。謝意を表する次第である。

かどうかをしらべてみたがこれは不成功であつた。つぎに 1M 食塩水にうかべて抽出したところ、粘度の高い抽出液がえられたが、これを6倍容の蒸留水中に注いで食塩濃度を 0.14M に下げても白い乳光を示すだけで Mirsky らの報告しているような²⁸⁾糸状の沈澱がえられなかつた。しかしながら、抽出に用いる溶媒を 2M 食塩水にしてみたところ蒸留水で 0.14M に食塩濃度を下げた時に糸状の沈澱ができることがわかつた。さらに 1M 食塩水の抽出液にクルペイン硫酸塩を少し加えてとかしてから水で 0.14M にうすめると糸状沈澱が生じることも明らかになつた。このことから、ヌクレオクルペインの抽出には 1M 食塩水を用いるのは不適當で、それは DNA と同時に抽出されるクルペインが不足しているために糸状沈澱を生じないのであらうと考えられた(この事実は第三章の DNP の溶解性の実験からはつきりした)。

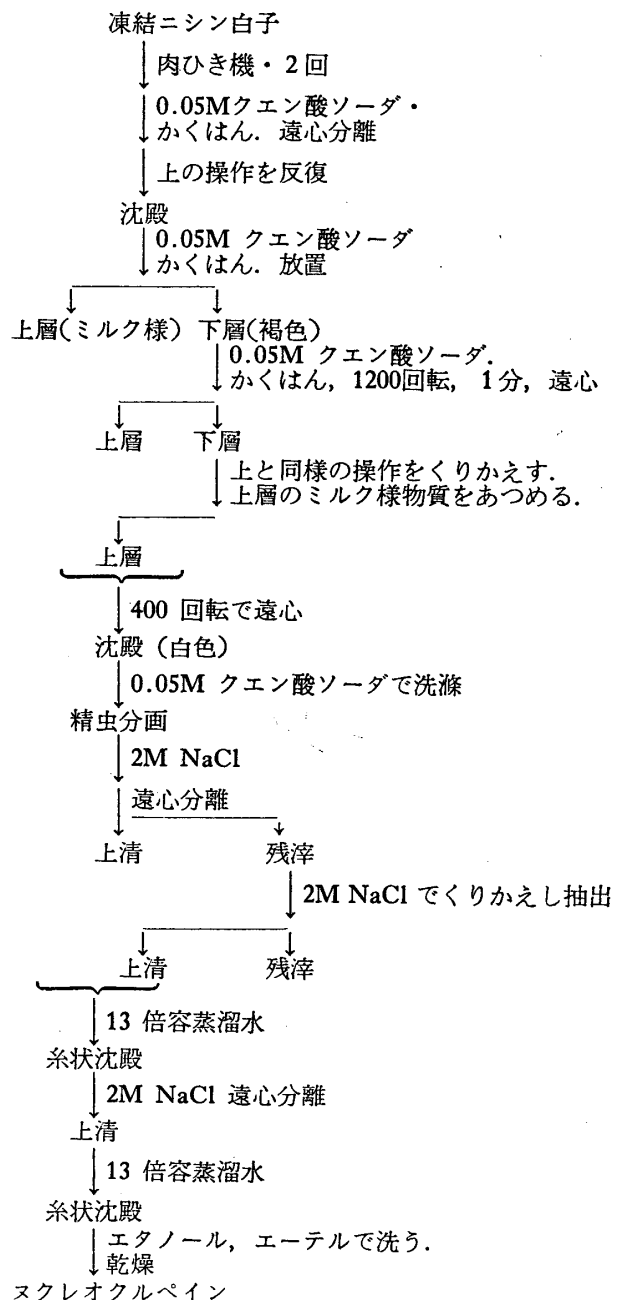
以上の予備実験の結果から、ニシン白子からヌクレオクルペインを抽出するには、2M 食塩水を用い、蒸留水で食塩濃度を 0.14M に下げて沈澱せしめればよいことがわかつた。つぎに実際の抽出精製操作の一例を示す³³⁾。

ドライアイスで凍結したニシン白子の 60g を肉ひき機を二回通してこまかいかゆ状にし、pH 7.0 に調整した氷冷 0.05M クエン酸ソーダ溶液で洗つた。第1回目はその 320cc を、第2回目には 250cc を用い、おのおの数時間ずつ冷所でかくはんし、遠心分離で洗液を分離した。第二回目の残溜物を 250cc のクエン酸ソーダにうかべ、よくかくはんしてから放置すると下層に褐色のあらい粒状のものが沈み、上に白色のミルク様の液がのこる。この上層を傾瀉でわけて毎分 4200 回転で 20 分間遠心分離すると純白に近い精虫核と思われるものが沈澱としてえられた。さきの下層の褐色の部分にはまだ精虫がふくまれているらしいので、これをクエン酸ソーダ溶液にうかべかくはんし、毎分 1200 回転で1分間くらい遠心分離すると、乳状の上層と下層の褐色部とにわかれる。上層は前と同様にして遠心分離で白色の精虫核をあつめ、下層からはさらに4回くりかえして精虫核を抽出した。あつめた精虫部分をさらにクエン酸ソーダ溶液で4回洗い、純白な物質がえら

れた(湿状で 8g)。

このようにしてえられた精虫分画に、160cc の 2M 食塩水 (0.01M クエン酸ソーダを含む) を加えると、白色物質はただちにくずれて、淡褐色、半透明な粘性のつよい溶液がえられた。数時間かくはんしてから 4200 回転で 20 分間遠心分離し、不溶物をさらに 2M 食塩水で抽出した。この二度の抽出に用いた 2M 食塩水は合計 220cc で、残つた物質は湿状で 2.5g であつた。

つぎにこの粘性のつよい抽出液を、0.001M のクエン酸ソーダを含む蒸留水 2800cc に少しずつ



第6図 ニシン白子からヌクレオクルペインの抽出・精製の操作法

注ぎ、先のまがつた硝子棒でかくはんすると、白い糸状の沈澱物が析出して硝子棒にからまる。最終の食塩濃度は 0.14M になつている。この糸状物と、母液をしばらく放置してえられた少量の沈澱とをあつめて、ふたたび 110 cc の 2M 食塩水にとかし、少量の不溶物を遠心分離で除いてから上清を 13 倍容の蒸留水中に注ぎこんで沈澱せしめた。このような溶解、再沈澱の操作を数回くりかえしてえた最後の沈澱を、はじめ 0.14M 食塩水で、ついで 60%、95% のエタノールでつぎつぎに洗い、つぎに無水エタノールで洗つてから最後に脱水エーテルで洗つてエタノールを除き、塩化カルシウムが入つているデシケーター中で減圧乾燥せしめた。純白のヌクレオクルペインがえられた。収量は 1.3 g であつた。以上の抽出・精製操作法を図示すると第 6 図のようになる。

つぎに数回の精製でえられた収量を第 2 表に示す。

第 2 表 ヌクレオクルペインの収量

実験番号	用いた凍結白子の重さ (g)	精虫核分画 (g, 湿状)	精製ヌクレオクルペイン (g)	白子に対する収率 (%)
1	50		0.8	1.6
2	284		1.4	0.5
3	60	1.3	1.3	2.1
4	500	9.5	9.5	1.9

われわれは、ニシン白子からヌクレオクルペインを抽出・精製した実験の経験にもとづいて、サケ白子³⁴⁾、ニジマス精液からヌクレオプロタミンの精製をこころみた。これらの組織からの DNP の精製操作法はニシンの場合とほぼ同じであつたからくわしいことは省略することにして、相異のあつた点について記すことにする。

第一は、精虫核分画を 2M 食塩水で抽出した粘度の高い溶液をきれいにするために、サケの特には長時間かけて冷室中でひだ附濾紙を用いて濾過するか、またはち密につめたガラスウールの層を通して吸引濾過してこの目的をほぼ達した。ニジマスの時には濾過にかえてスピコン L 型超遠心分離機で高速遠心した。回転数は毎分 15,000 ないし 17,000 回転で、時間は 40 分ないし 45 分であつた。

第二の点は、サケ白子の DNP の精製に三つの

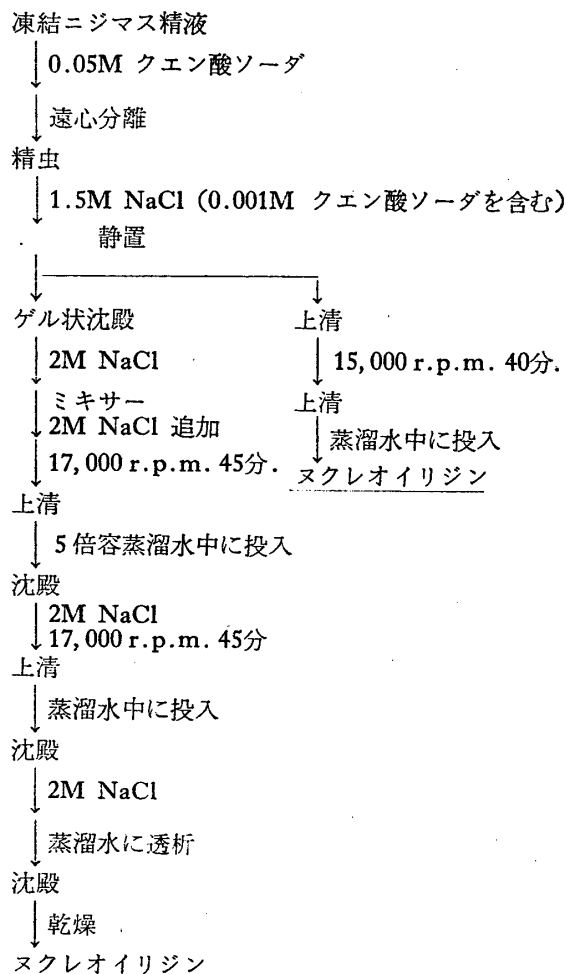
方法を用いたことである。第一の方法は、ヌクレオクルペインのところでのべたように溶解・再沈澱操作をくりかえす方法で、一例をあげると、0.7g の粗製 DNP を 400cc の 2M 食塩水にとかし遠心分離で不溶物を除いてから 13 倍容の蒸留水に注ぎこんで再沈澱せしめた。この操作を 3 回くりかえした。収量は 0.53 g であつた。(ヌクレオサルミン 1)。第二の方法では、DNP の沈澱操作をセロファン袋の中で透析をおこないながらおこなつた。すなわち、1.6 g の DNP を 800 cc の 2M 食塩水にとかし、ひだ附濾紙でこして透明にし、ついでセロファン袋に入れて 10 l の 0.001 M クエン酸ソーダ溶液に対して透析した。2 時間位たつと膜の内側に沈澱ができはじめ、24 時間後には凝集して糸状になつた。これをおつめて乾燥した (ヌクレオサルミン 2)。収量は 1.05 g であつた。第三は、クロロフォルムを用いる除蛋白操作で精製した。Sevag らによると³⁵⁾蛋白質溶液をクロロフォルムと、消泡剤として加えたオクチルアルコールと共にふると、蛋白質が変性してクロロフォルム-水の層の間に吸着されて不溶性のゲルとなることが報告されている。しかしながらプロタミンはこの方法で変性をうけず、とり除くことができないから³⁹⁾、プロタミンを含む DNP から、プロタミン以外の不純物としての蛋白質を除くには好都合であるように思われた。粗製 DNP の 0.85 g を 400 cc の 2M 食塩水にとかし、不溶物を除いてから、クロロフォルム-オクチルアルコール混液 (8:1) と共に振盪機で振つてプロタミン以外の蛋白を除いた。3 回くりかえすとクロロフォルム層と水溶液層の界面にできる蛋白ゲルはごくわずかになつた。最後の水溶液層を水に加えて DNP を沈澱せしめて乾燥した (ヌクレオサルミン 3)。収量は 0.65 g であつた。

つぎにニジマスの精液からヌクレオイリジンを精製した時の経過を概略的に記す*

養魚場でニジマス精液を採取し、ただちにドライアイスで凍結せしめた。その 174 g を 380 cc の 0.005M クエン酸ソーダでとかし、4000 回転で 30 分間遠心分離した。この時の沈降物を同じ

* この実験は川出 および 三浦との共同でおこなつた。なお精製法は川出の論文⁹⁾にも簡単に記されている。

溶液で三回洗い，えられた 6g (湿状) の精虫を 0.001 M クエン酸ソーダを含む 1.5 M 食塩水 1.5 l で抽出した。抽出物を静置して，上清をゲル状の沈降層から傾瀉でわかち，15,000 回転で 40 分間遠心分離した。この上清 1150 cc を蒸留水 5 l に投入して糸状の DNP を沈澱せしめた。ゲル状の部分は 2 M 食塩水 1.8 l と共に高速ミキサーで 2 分間かくはんし，これに 2 M 食塩水を追加して 3.6 l となし，かくはんしながら抽出した。つぎに 17,000 回転で 45 分間遠心分離し，上清 2800 cc を 5 倍容の蒸留水中に投じて DNP を沈澱せしめた。これを 2 M 食塩水 1.5 l にとかし 17,000 回転で 45 分間遠心分離した上清を同様に 5 倍容の蒸留水に加えて DNP を沈澱せしめ，もう一度 2 M 食塩水にとかしてからセロフアンの袋に入れ，蒸留水に対して透析し，えられた沈澱をエタノール，エーテルで乾燥した。収量は 1.1g であつた。以上の操作法を第 7 図に図式化して



第 7 図 ニジマス精液からヌクレオイリジンの抽出・精製法

示す。

II コウシ胸腺ヌクレオヒストンの精製³⁶⁾

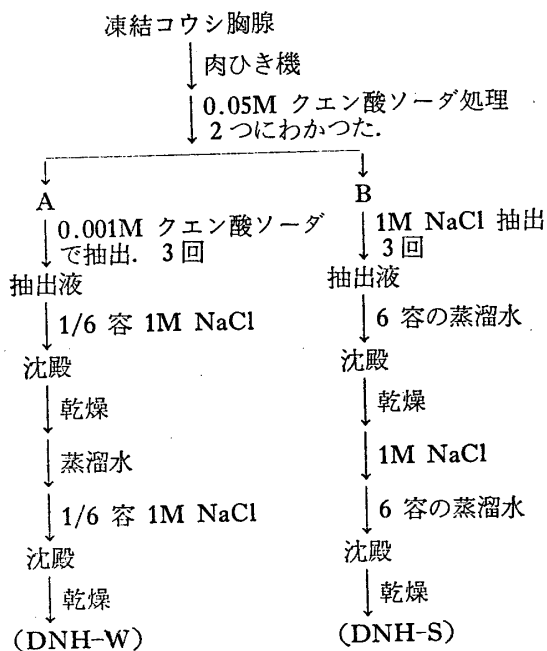
ト殺場でコウシ胸腺を採取し，ただちにドライアイスで凍結せしめた。これから脂肪や結締組織などを除き，まず肉ひき機でひいてから 5 ないし 6 倍容の 0.05M クエン酸ソーダ溶液にうかべ，高速度ミキサーで 30 分間処理した。えられたかゆ状物質を 3000 回転で 20 分または 4000 回転で 10 分間遠心分離し，沈降物を同じ方法で 0.05 M クエン酸ソーダを用いてくりかえし洗条した。かくしてえた洗条物 (100 g の胸腺からおよそ 100 cc を二つにわけ，一方は 0.001 M クエン酸ソーダで，他方は 1 M 食塩水 (0.001 M クエン酸ソーダを含む) で抽出した。

前者の場合には，各回 5 ないし 6 倍容のクエン酸ソーダ溶液を抽出に用いた。DNH は大部分第 2 回目と第 3 回目の抽出液にとけて出る。これらの抽出液をあわせて，その 1/6 容の 1 M 食塩水を加えて，食塩濃度を 0.14 M にするとゲル状の沈澱を生じる。これを 0.14 M 食塩水で洗い，つぎにエタノール，およびエーテルで洗つてから減圧乾燥した。1.5 g の粗製 DNH をえた。これを精製するには，粗製 DNH 1.0 g を蒸留水 800 cc にうかべ，とけてから 12,000 ないし 15,000 回転で 45 分間遠心分離した。上清やく 600 cc に，1 M 食塩水 100 cc を加え，生成した糸状物質をさらに一度 600 cc の蒸留水にとかし，高速遠心で不溶物を除いてから凍結乾燥した。0.6 g がえられた (TNH—Ⅱ W)。

1 M 食塩水抽出の場合には，各回 5 ないし 6 倍容の 1 M 食塩水を用いた。抽出液をあつめて 12,000 回転で 60 分間遠心分離した。粘性のつよい上清を 6 倍容の蒸留水中に注ぐと，糸状のゲル様沈澱を生成する。これを 0.14 M 食塩水で洗いエタノール，およびエーテルで洗つてから減圧乾燥した。精製には，この 1.0 g をやく 1 l の 1 M 食塩水にうかべ，よくとけたら粘性の高い溶液を 12,000 回転で 60 分間遠心分離して，澄明な上清を 6 倍容の蒸留水に注いで DNH を沈澱せしめた。この沈澱を 0.14 M 食塩水で洗つてから，エタノール，およびエーテルでつぎつぎに洗つて乾燥した，収量は 0.5 g であつた (TNH—Ⅱ S)。

以上のコウシ胸腺 DNH の精製法を図式的に示

すと第8図のようになる。



第8図 コウシ胸腺 DNH の抽出・精製

III 小麦胚*ヌクレオヒストンの精製³⁷⁾

コウシ胸腺や魚の精子の DNP を精製することは前にのべたようにわれわれの研究室で可能となったが、植物起原の DNP を調製した経験がなく、またこれに関しての文献もあまり多くない。そこでわれわれはその材料としてまず小麦胚をえらんだ。小麦胚の DNA は、5-メチルシトシンが比較的多量に含まれることによつて²⁰⁾塩基組成という点からみて特徴のあるものとして知られている。Mirsky ら³⁸⁾および Stedman ら³⁹⁾は、1M 以上の食塩水で小麦胚から DNP が抽出されうることを報告しており、Lipshitz らも⁴⁰⁾同様にして DNP を作った。ただし、Mirsky らや Lipshitz らはいずれも DNP の抽出に先立つて石油エーテルで脱脂操作をしているが、これは蛋白を変性せしめるおそれもあるがあまり好ましくない。そこでかかる操作をおこなわないで DNP の精製操作をおこなえないかどうかをしらべ、さらに、小麦胚の DNP については、抽出条件、沈澱条件などがまだはつきりしていないので、かかる諸点をつまびらかにした。

* 実験に使用した小麦胚は、日清製粉株式会社研究部から分与していただいた。市販の小麦胚と異り加熱処理をほどこしてない。同研究部の杉橋孝夫氏に厚く感謝する。

a) 抽出条件の選定

乳鉢でよくすつた小麦胚 50 g を 0.14M 食塩水でくりかえし抽出し、最後に 200 cc の同食塩水にうかべた。この均一な浮游液 5 cc (やく 1. g の小麦胚に相当する) に、種々の濃度の食塩水を 20 cc ずつ加え、2 時間振盪機でふつて抽出し、一夜冷室に保存してから、4000 回転で遠心分離して上清の窒素と燐の量をはかつた。第3表にその結果を示す。

第3表 小麦胚の DNP の抽出における食塩濃度の影響

食塩水の濃度	P/cc (γ)	N/cc (γ)	N/P
0*	8.0	59.5	7.5
0.04	3.5	23.5	6.7
0.14	1>	10>	—
0.52	19.5	128	6.6
0.90	24.3	143	5.9
1.5	30.2	175	5.8
2.1	27.3	208	7.6
3.0	28.2	189	6.7

* 蒸溜水で二回急いで洗い、ついで蒸溜水で抽出した。

この表から、燐の抽出量が 1.5 M 食塩水を用いた時に一番多い。そこで一応 1.5 M 食塩水を用いて DNP の抽出をおこなうことにした。

b) DNP の沈澱条件の選定

つぎに a でのべたおのおのの抽出液に蒸溜水を加えてゆくとときに、食塩濃度をどこまで下げた時に DNP が沈澱するかをしらべた。これら抽出液 1 cc に蒸溜水を 1 cc ずつ加えていつて、沈澱が生じ始めた時までに加えた蒸溜水の量からその時の食塩濃度を定めた。第4表にその結果を示す。

第4表 小麦胚ヌクレオヒストンの沈澱条件の選定

抽出に用いた食塩濃度 (M)	加えた水の量 (cc)*					沈澱ができた時の食塩濃度 (M)
	1	2	3	4	5	
0.52	+	+	+	+	+	0.26
0.90	-	+	+	+	+	0.30
1.5	-	-	+	+	+	0.38
2.1	-	-	+	+	+	0.5
3.0	-	-	-	+	+	0.5

* (+) の印は沈澱を生じた場合。(−) の印は生じなかつた場合。

第4表の結果から、食塩濃度をおよそ0.3Mにまで下げるとDNPが沈澱することがわかった。なお、蒸溜水の抽出液に食塩を加えて0.14Mにしても沈澱は生じなかつた。第3表にみられる蒸溜水抽出液中のわずかの磷と窒素がどのような性質のものであるかははつきりしていない。

c) ヌクレオヒストン精製の一例

以上にのべた結果から総合して、小麦胚からDNHを作るには、1.5M食塩水で抽出をおこない、抽出液に蒸溜水を加えて食塩濃度を0.3Mに下げたDNHを沈澱せしめればよいことが明らかになった。なお、予備実験から、DNHをエタノールとエーテルを用いて乾燥せしめると、食塩水にもとけにくくなるのがわかつたので*、蒸溜水浮游液から凍結乾燥せしめる方法をとつた。

小麦胚100gを乳鉢でよくすり細粉にした。これを各回500ccずつの0.14M食塩水でくりかえし抽出した。この抽出操作を6回くり返すと、小麦胚のPNAの92%がとり除かれる。最後にえられた遠心沈澱を500ccの1.5M食塩水にうかべ、一夜冷室でかくはんし、20,000g(13,000回転)で30分間遠心分離した。この上清はかなりにごつていた。この抽出操作を3回くりかえしたが、第1回目の抽出液に大部分のDNHが抽出されるのでこれだけを用いた。

抽出液200cc(全抽出液410cc中の半分)を蒸溜水800ccに少しずつ流しこむと、美しい糸状物が沈澱する。母液はにごつているが、沈澱を硝子棒にからませてとりあげ、0.14M食塩水で洗い、つぎにのべるような溶解・再沈澱の操作を4回くりかえした。沈澱を400ccの1.5M食塩水にうかべ、高速度ミキサーで3分間処理し、ついでServallの遠心機で45分間遠心分離してわずかの不溶物をのぞき、上清を1.6lの水にそそいで糸状沈澱を作らしめた。最後の沈澱を0.14M食塩水、ついで蒸溜水で数回洗い、200ccの蒸溜水にうかべ、ミキサーで均一な浮游液とし、そのまま凍結乾燥した。収量は0.97gであつた。

* Bernsteinら⁴⁰もウニ精虫で似たようなことを見出した。このDNPはアルコール沈澱をさせても、また乾燥させても水に対する溶解性を失なう。

IV DNPの抽出・精製に関する考察

DNPの精製に際してはつぎの二点に特に注意をはらつた。第一の点は、不純物の混在である。この場合不純物として考えられるのは、主として蛋白質とPNAである。これらの不純物の混入をなるべく少くするために、DNPの抽出に先立つて0.14M食塩水でくりかえし組織を洗つて、まずそれによつてとけて出る蛋白やPNAを除くことにした。この操作によつてPNAはかなり除かれるようであるが、その程度は組織によつて異なるかもしれない。たとえば、われわれはサケの白子からとり出した精虫分画(第一章、第一節)中の磷化合物の分画定量をおこなつてみた結果は第5表に示すように、PNAの磷は全磷のたかだか数%にすぎず、DNAの磷が90%以上を占めていることがわかつた。この結果は、この精虫分

第5表 サケ白子精虫分画の磷化合物の分画定量

磷化合物	乾燥精虫分画1g中に含まれる磷(mg)	全磷に対する割合(%)
酸可溶性磷	0.24	0.05
脂質	2.1	3.9
DNA	49	92
PNA+磷蛋白	2.0	3.8
合計	53.3	

画の抽出方法によつて、精虫以外の組織がよく除かれているか、または精虫以外の組織が混入していても0.14M食塩水による洗滌操作でPNAがよく除かれていることを示している。また小麦胚について分析した例では³⁷⁾、0.14M食塩水抽出をおこなう前の材料を分析すると、その磷化合物は第6表に示すような分布を示している。PNA

第6表 小麦胚の磷化合物の分画定量

磷化合物	小麦胚1g中にふくまれる磷(mg)	磷量に対する割合(%)
酸可溶性磷(全磷)	4.4	51
同上(無機磷)	1.5	18
脂質	0.76	0.9
PNA	1.23	14.3
PNA+磷蛋白	2.19	25.2
合計	8.58	

の磷は全磷量の1/4を占め、DNAの磷の倍近く

ふくまれているが、DNP の抽出に先立つておこなった 0.14M 食塩水による抽出操作でその 90% 以上が除かれていることがわかった。以上のような結果から、0.14 M 食塩水で洗う操作が非常に有効であつたことがわかる。Felix は⁴¹⁾、蒸留水で洗うと魚の精虫の尾にあたる細胞質の部分が除かれることを電子顕微鏡でたしかめ、また Mirsky らは³⁸⁾、胸腺細胞をホモジナイズしてから 0.14 M 食塩水で洗うとその細胞質が大部分とけて、DNA をふくむ核のクロモゾームがそのままの形で残るのをたしかめている。

第二の点は、精製操作中における DNP の分解をなるべく少くして自然状態のものをうるように努めたことである。このためには、操作を低温でおこなつて酵素作用を少くしたり、溶液の pH が中性からひどく外れることのないようにしたり生体物質の取扱いについての一般的な注意を払つた。また、DNase* の活性化物質といわれる Mg イオンを除くためにクエン酸ソーダをしばしば用いた。しかしながら、Mg イオンが DNase の活性化物質となるのはウシ臍臓の DNase に対してであつて、胸腺の DNase にはむしろ阻害的にはたらくという報告もある³²⁾。したがつてこのクエン酸ソーダの効果についてはまだ疑わしい点もあるようである。

つぎに DNP の抽出と沈澱についてのべる。多くの DNP は生体から 1 M 以上の食塩水で抽出されることが Mirsky らによつて報告された²⁸⁾が、コウシ胸腺の DNH は蒸留水で抽出することもできる^{25), 26)}、1 M 食塩水でも抽出できる。しかしながら、哺乳動物の精虫の DNP は蒸留水でも 1 M 以上の食塩でも抽出することができない。われわれはオウシ精液から精虫をあつめて両者の溶媒によつて DNP が抽出されないことを経験した。Mirsky らは²⁸⁾やはりオウシ精虫の DNP が食塩水で抽出できないと報告しているが、一般的に哺乳動物の精虫からは今までの方法では DNP が抽出されないらしい。

つぎに抽出された DNP を沈澱せしめるには食塩濃度を 0.14M 附近にまで下げればよい。大部分の DNP がかかる生体と等張の塩溶液中で不溶性なのは興味ある事実であるが*、われわれの経験では魚の精子からえられたヌクレオプロタミンは 0.5 M 食塩水中でもほとんど溶けなかつた。また小麦胚の DNP は 0.3 M 食塩水でもとけないことがわかつた(第三章)。したがつて DNP の沈澱には抽出液を適量の蒸留水に加えるか、あるいは蒸留水抽出液の時には食塩を加えて 0.14 M ないしは上に示した濃度にすればよい。

ここで一つ注意しなくてはならないことは、たとえばコウシ胸腺の DNH のように、蒸留水でも、1M 食塩水でも抽出可能な DNP について両方の操作でえられた DNH が同一であるかどうかということである。高濃度の食塩水を用いる利点として、1 M や 2 M 食塩水中では DNase 作用がよよく阻害されるから³¹⁾、操作中に DNA が酵素分解をうける危険性が少ないことが考えられる。しかしながら、第三章でのべるように、DNP が濃い塩類溶液中では DNA と蛋白とに解離していることが明らかになつている。したがつて、食塩濃度を下げて DNP が沈澱するときには、これらの再結合がおこることになる。この際、DNA と蛋白との間の結合が、自然状態の時の DNP とかわつてしまうかもしれないというおそれが多分にある。低い濃度の塩類溶液や、蒸留水中ではかかる解離現象がみられないから、DNase 作用に対する注意をおこなつて塩類のすくない溶媒で DNP を抽出することが望ましい。しかし、これは前にものべたようにすべての DNP に適当であるとはいえない。

蒸留水で抽出した DNP と、たとえば 1 M 食塩水で抽出した DNP との間には、今までわれわれが経験したかぎりではその分析値(第三章)、溶解性などについていちぢるしい差異がみられなかつたが、Crampton らは⁴⁵⁾ DNH が DNA と共沈をおこす現象において、DNH の熱処理による共沈現象の変化のしかたの程度が両者の間で異なることを見出した。また Bernstein らは⁴⁶⁾、ウ

* ネズミ肝についての実験では、細胞の DNase の 70% 以上はミトコンドリア分画にふくまれている^{42), 43)}。0.14M 食塩水による洗滌操作でかなりの DNase も除去されていると思われる。

* 増井は好塩菌の DNP が 0.14 M 食塩水には可溶性であることを報告している⁴⁴⁾。

ニ精虫の DNP に、水で抽出した時と、1M 食塩水で抽出した時とで、それらの蒸留水に対する溶解性の上で差異がみられると報告している。このようなことから考えて、両者の DNP の間には、その DNA や蛋白量の差はなくても、何らかの構造上の差があるのではないかということも考えられる。

つぎに、DNP の抽出・精製における一二の問題点について述べる。第一は、DNP の溶液の粘性についてである。DNP を 1M 以上の食塩水にとかすと、その抽出液は非常に高い粘性をもっている。この粘性は、食塩水中で DNA と蛋白とが解離して、DNA 分子がいわばはだかの状態になり、その分子の非対称性が高いために起こるのだともいわれているが⁴⁷⁾、コウシ胸腺を蒸留水で抽出しても粘度の高い抽出液がえられる⁴⁸⁾。抽出・精製に際してはこの高粘性の抽出液を残った不溶物とわけなくてはならない。スピコン L 型超遠心機のような高速回転の遠心分離機のない時代に調製したニシンやサケの精虫 DNP での経験では、ひだろ紙を用いて長時間かけて濾過することもできるが、ち密につめたガラスワールで吸引濾過をすることも一つの方法であつた。川出はうすい珪藻土の層を通して吸引濾過することにより好結果をえている⁹⁾。遠心分離で両者をわけるのは少なくとも毎分 10,000 回転以上の速度でおこなうのがよいようである。

第二の点は、DNP の抽出操作をおこなっている間にどの程度 DNP の分解がおこっているかということである。しかしながら、現在われわれは自然のままの DNP についての測定をおこなうことができないから、絶対的に分解のていどを知ることにはできない。DNP の粘度測定の結果も、研究者の間でかならずしも一致していない。DNP の高分子性を示す一つの事実は、DNP を抽出液から沈澱せしめた時に、それが糸状になることである。われわれの経験では、採取してから日がたつてから作ったニシン白子の DNP は糸状沈澱を作らなかつた。また、DNA とプロタミンを混ぜて人工的に DNP を作らせる実験(第四章)で、DNA を加熱処理すると早糸状沈澱を作らない。さらに、コーボの PNA とプロタミンを混ぜても糸状物とならない。このようなことから、DNP

が糸状沈澱を作るためには、ある程度以上の DNA の高分子性が保たれている必要があるだろうと思われる*。

第三章

DNP の性状

I DNP の化学的性質

DNP を溶液から沈澱せしめると、前章にのべたように糸状沈澱となるが、乾燥せしめても純白な糸屑のような軽いものとなる。まず種々の DNP を分析した結果から示すことにする。分析には、これらの乾燥試料を五酸化磷の入っているデシケーター中で、室温で減圧乾燥して恒量に到らしめた。第7表に分析値を示す。

この表から、魚の精虫から精製したヌクレオプロタミンは DNA を 60 ないし 70% 含むが、コウシ胸腺ヌクレオヒストンではおよそ 50%、小麦胚のヌクレオヒストンでは 35% 含まれていることがわかる。これら魚のヌクレオプロタミンについての分析値は、Felix がえた N:P の値 3.4 ないし 3.5 にくらべて⁴¹⁾、ヌクレペインでは少し大きく、ヌクレオサルミンではやや小さいようである。その原因はよくわからないが、あるいは抽出上の多少の相異などからおこることも考えられる。コウシ胸腺 DNH では、水 (0.001M クエン酸ソーダ) で抽出した試料 (3W) と、1M 食塩水を用いて抽出した試料 (3S) との間には分析上の差異がみとめられなかつた。この N:P の値 (4.0) は他の研究者達のえた値(第14表)に比べてまず妥当である。また小麦胚ヌクレオヒストンの N:P (5.3, 5.5)、および DNA 量 (35%) も、Stedman らのえた値³⁹⁾に一致している。これらの試料のうちあるものについて PNA の定量をおこなつた。ヌクレオプロタミンにはほとんど無視しうる程度の PNA しか認められなかつた。小麦胚 DNH には、沈澱操作を一度しかおこなわ

* 別の経験では、DNP の食塩溶液を蒸留水に加えると糸状沈澱になるが、逆に蒸留水を DNP 溶液に加えると糸状にならなかつたような場合もあつた。したがつて糸状沈澱の形成には、DNA の高分子性ということは必要な条件ではあつても十分な条件であるとは思われない。

第7表 DNP の分析結果

DNP	N (%)	P (%)	N : P	DNA (%)	PNA
ヌクレオクルペイン-4	20.6	5.4	3.8	63	無視しうるていど
" -5a	18.3	4.6	4.0	61	—
" -5b	20.9 _s	5.2	4.0	61	—
ヌクレオサルミン-1	20.3	6.3	3.2	70	無視しうるていど
" -2	19.4	6.2	3.2	70	"
" -3	20.0	6.1	3.3	69	"
ヌクレオイリジン 1a*	20.2	6.6	3.1	—	—
コウシ胸腺ヌクレオヒストン 3W	14.8	3.7	4.0	46	—
" 3S	14.4	3.6	4.0	46	—
小麦胚ヌクレオヒストン-2	14.4	2.6	5.5	34	無視しうるていど
" -3	11.7	2.2	5.3	35	"

* 北村の分析による。

なかつた粗製品に DNA の約 10% の PNA がみとめられたが、溶解・再沈澱操作を 4 回くりかえすとほとんど除かれていることがわかつた。

つぎに、DNP にふくまれている DNA の塩基組成についてのべる。DNA はこれらの DNP からおよそ Hammarsten のおこなつた方法⁴⁹⁾にしたがつて抽出・精製した^{50),37)}。そのあらまははつぎのとおりである*。

DNP を 1M, もしくは 2M 食塩水にとかし、えられた溶液を 2 倍容の 95% エタノール中に注いでゆく。糸状の物質がかくはん棒にからまつて析出する。このときの母液に坂口試薬を加えると著しく赤変する。えられた糸状物質をふたたび食塩水にとかし、エタノールによる沈澱をくりかえすと、だんだん蛋白がとれて、最後に坂口反応でほとんど蛋白の存在が認められないていどの DNA をうることができる。エタノールおよびエーテルで乾燥させた。場合によつては、DNP を 1M 食塩水にとかし、これに食塩を加えて飽和させて放置し、それからエタノールによる沈澱をおこなつたこともある。また大部分の DNA 試料は、クロロフォルムによる脱蛋白操作³⁵⁾をおこなつた。

第 8 表に DNA 塩基の分析結果を示す。

DNA の塩基組成は、同じ生物種からとつた DNA ではどれも一定であるといわれている。し

かし第 8 表の結果からみると、コウシ胸腺、サケ精虫、ニシン精虫の DNA の間には差がほとんどみられなかつた。小麦胚の DNA には、5-メチルシトンが多く含まれている。これらの分析結果は今まで報告された結果と³⁰⁾よく一致していた。

第 8 表 種々の DNP にふくまれる DNA の塩基組成*

DNA	アデニン	グアニン	シトシン	チミン	5-メチル シトシン
コウシ胸腺	0.28	0.22	0.20	0.29	0.02
ニシン精虫	0.29	0.21	0.22	0.29	0.03
サケ "	0.27	0.22	0.21	0.28	0.02
小麦胚	0.27	0.22	0.17	0.27	0.06

* 数字は一グラム原子の隣についてのモル数をあらわしている。

最後に DNP を酸で処理したときの結果をのべる。DNP を 0.1 ないし 0.2N の塩酸または硫酸で処理するとプロタミンやヒストンがとけて、DNA は固体のまま残る。ヌクレオプロタミンの時には、何回もくり返し酸処理をするととけ残つた DNA のほうの蛋白反応はほとんどなくなるが、ヌクレオヒストンでは若干の酸に不溶性な蛋白があるらしく思われた。たとえば、小麦胚ヌクレオヒストンを 0.2N 塩酸でくり返し抽出すると、DNH の蛋白窒素の 90% 以上が抽出される。しかし、9% くらいの蛋白窒素がどうしても抽出されず、DNA 分割が蛋白反応を示さないようにならない³⁷⁾、この酸で抽出されない蛋白の性質はしらべなかつたが、これは Stedman のいういわ

* 川出の報告⁹⁾にも DNA の精製方法がのべられている。

ゆる“クロモゾミン”⁵⁰⁾に当るのかもしれない、

II DNA と蛋白との解離

第7表の結果から、われわれが抽出・精製したDNPにはDNAが35%から70%ふくまれていることがわかったが、つぎに一二の試料について適当な条件下ではDNAと蛋白とが解離してわかることをしらべた結果をのべる。

1. Hammarsten 法⁴⁹⁾による分離⁵¹⁾

この方法は Hammarsten が DNA の精製のためにおこなつたものである。その骨子は、前にものべたように、DNP を 1M 食塩水にとかし、それにさらに食塩を加えて飽和せしめ、二週間放置してから濾過し、濾液を二倍容のエタノールに注いで DNA を沈澱せしめるという方法である。

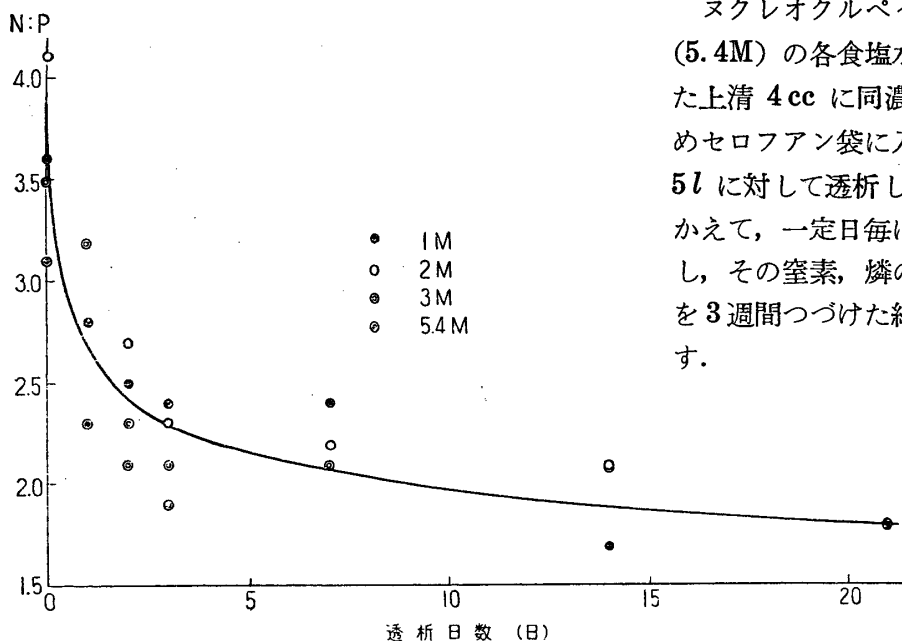
この時母液に蛋白がこのるが、かなりのヒストンは食塩を飽和させると塩析されて沈澱し、濾過のときにすでにかなり除かれているらしい。われわれはこれと似た方法で DNA を精製したが、それについてはすでにのべた。

2. 透析による分離⁵¹⁾

プロタミン分子はセロファン膜を通過するほどの大きさであるから¹¹⁾、もし DNP が高濃度の食塩水溶液中では DNA とプロタミンとに解離しているならば、この溶液を高濃度の食塩水に対して透析すると、小分子のプロタミンは膜外に出て、DNA が内側にのこるから両者を分離することができることになる。ヌクレオクルペインについてこの実験をおこなつた。

ヌクレオクルペインを 1M, 2M, 3M, 飽和(5.4M)の各食塩水 5cc にとかし、遠心分離した上清 4cc に同濃度の食塩水 5cc を加えてうすめセロファン袋に入れ、それぞれ同濃度の食塩水 5l に対して透析した。透析外液をときどきとりかえて、一定日毎にセロファンの内液をとり出し、その窒素、磷の分析をおこなつた。この透析を3週間つづけた結果を第9表および第9図に示す。

第9表から、内液の磷の量が終始ほぼ一定しているのに対して、窒素量は透析がすすむと次第に減少してゆく。したがって N:P の値はだんだん小さくなつて、三週間後にはほぼ一定



第9図 ヌクレオクルペインの食塩水溶液の透析

第9表 ヌクレオクルペインの食塩水溶液の透析

食塩濃度 (M)	透 析 日 数																				
	0 日			1 日			2 日			3 日			7 日			14 日			21 日		
	N	P	N/P	N	P	N/P	N	P	N/P	N	P	N/P	N	P	N/P	N	P	N/P	N	P	N/P
1	67	19	3.6	57	20	2.8	48	19	2.5	46	19	2.4	45	19	2.4	33	19	1.7	36	20	1.8
2	49	12	4.1	—	—	—	16	6	2.7	22	9	2.3	22	10	2.2	21	10	2.1	18	10	1.8
3	46	13	3.5	54	17	3.2	37	13	2.3	23	11	2.1	23	11	2.1	23	11	2.1	18	10	1.8
5.4	56	18	3.1	37	16	2.3	36	17	2.1	23	12	1.9	24	16	1.5	23	17	1.4	29	17	1.7

* N, P の値はすべて g/cc をあらわす。

第10表 超遠心分離機によるヌクレオクルペインの DNA とクルペインとの分離

上清の 上方から とり出 した量 (cc)	遠 心 管 1					遠 心 管 2				
	全 N (mg)	全 P (mg)	P/cc (mg)	クルペイン-N	N : P	全 N (mg)	全 P (mg)	P/cc (mg)	クルペイン-N	N : P
				cc (mg)					cc (mg)	
原 液			0.214	0.49	3.99			0.214	0.49	3.99
1	0.64	0.12	0.12	0.44	5.3	0.61	0.12	0.12	0.41	5.1
1	0.72	0.18	0.18	0.41	4.0	0.70	0.19	0.19	0.38	3.7
1.5	1.30	0.39	0.26	0.43	3.3	1.38	0.40	0.27	0.46	3.4
合 計	2.66	0.69			3.9	2.69	0.71			3.8

して 1.7 ないし 1.8 になる。この N:P の値は、DNA についての値に近い。この傾向は 1M から 5.4M まで食塩の濃度と関係なくみられ、これらの食塩水中ではプロタミンが DNA から解離して自由にうごきうる状態にあることを示している。内液に坂口試薬を加えると、透析前はもちろん強い反応を示すが、だんだん弱くなり、三週間たつとほとんど反応がみられなくなることからあきらかである。ヒストンはセロファン膜を通らないから、この方法によつて DNH の DNA とヒストンとを分けることはできない。

3. 超遠心機による分離⁵¹⁾

DNA の分子量は数十万から数百万にもおよぶ大きなものである⁹⁾が、プロタミン¹¹⁾やヒストン¹⁰⁾はこれにくらべるとはるかに小さい。したがつて高濃度の食塩水中で DNA とプロタミンあるいはヒストンとが、おたがいに解離しているならば適当な回転速度で遠心分離すると、DNA とこれら蛋白との分離がおこるはずである。われわれはヌクレオクルペインについてこの事実をたしかめた。

ヌクレオクルペインを 2M 食塩水にとかしこの溶液 3.5 cc づつを遠心管に入れ、空気駆動の超遠心分離機により、毎分 42,000 回転(130,000g)で 60 分間遠心分離した。遠心後、上清の上のほうから、1.0 cc, 1.0 cc, 1.5 cc づつを順にピペットでしずかにとり出し、その窒素と磷を分析した。遠心分離前のヌクレオクルペイン溶液は、1 cc 中に窒素 0.853 mg, 磷 0.214 mg を含み、3.5 cc では全窒素は 2.99 mg, 全磷は 0.749 mg N:P は 3.99 であつた。結果を第 10 表に示す。

この表から、まず磷が遠心管の下方に向つて濃く濃縮されていることがわかる。これは、遠心分離により DNA が沈降していることを示してい

る。窒素も下方に向い濃縮されてはいるが、クルペイン窒素を計算すると*、これは上層から下層にわたつてほぼ一定である。すなわち、クルペインの沈降はほとんどおこっていないことがわかる。この結果からみても、2M 食塩中では、DNA とクルペインとの解離がおこっているという事実が正しいように考えられる。

4. クロロフォルム法による分離

蛋白質の溶液をクロロフォルムと共にふると、変性して水-クロロフォルムの界面にゲルとなつて吸着される³⁵⁾。遠心分離すると上層の水溶液層と、下のクロロフォルム層とにわかれるが、吸着された変性蛋白が両者の界にゲルとなつて膜状に層をなす。このゲルはきわめて微量の蛋白の存在下にも形成されるので、試料中のごくわずかの蛋白の存在を確認することもできる**。

ヌクレオクルペインを 2M 食塩水にとかし、これにクロロフォルム-オクチルアルコール混液(50:15)を 1/4 容くらい加え、30 分間ふつてから遠心分離すると界面にわずかのゲルを作っている。この上層を吸い出し、上と同様の操作を 7 回くりかえした。ゲルは各回ごとにすくなくなつて、最後にはほとんど痕跡でいどしかみとめられなくなつた。各回ごとに DNP 溶液の窒素と磷を分析してみると、わずかに N:P がふえたようであるが(3.98 から 4.1 くらいまで)、あまりいちぢるしい変化はみられなかつた。この結果から、プロタミンはクロロフォルム処理によりゲルとして除くことができないことが明らかである。(この事実を逆にヌクレオプロタミンの精製に用い

* DNA-N=P×1.7, クルペイン-N=全N-DNA-N

** DNA 自体もいくぶんゲルを作るともいわれている。

た。第二章)ヌクレオヒストンの 1M 食塩水溶液を同様に処理すると、おびただしい量のゲルを作り、何回もくり返すとほとんど蛋白をふくまない DNA の溶液がえられる。

III DNP の溶解性

DNP の溶解性についての知見は、その抽出・精製の技術的な面においても重要であり、また DNP の性状を知る上からも意味深いことである。生体組織から DNP がどのような条件でとけて出るとかということは、前に第一章でのべたが、DNP が抽出されるかどうかということ、DNP 自体の溶解性とは、組織の構造や、細胞の状態などからかならずしも同じではないと考えられる。DNP の抽出・精製のところでのべたように、一般の動物組織の DNP は、1M 以上の食塩水、または蒸留水で抽出することができるから、DNP がこれらの溶媒には可溶性であることはたしかであるが、われわれは、ニシン白子からヌクレオクルペインを抽出・精製する折に、1M 食塩水と、2M 食塩水とで抽出した場合、抽出物の DNA とクルペイン量の比がちがうのではないかと思われる事実を見出した(第二章)。このため、DNP について、より一般的に DNP の溶解性と、食塩水濃度との関係をしらべてみなくてはならないと思わ

れた。物理化学的な意味で、DNP の溶解度を定義することは非常に困難である。その理由は、DNP の溶液が非常に粘度が高く、またゲル様の状態をとることもしばしばあるので、物理化学的な純溶液とそうでない状態とを区別することがむずかしいからであると思われる。そして、粘度の高い溶液を不溶物から分別するには高速度の遠心分離をおこなわなくてはならないが、あまり高速度にするとこんどはとけている DNA や DNP が沈降をおこす結果になる。

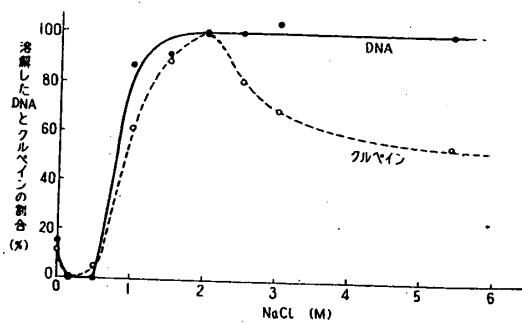
われわれは手許にある 4000 回転の遠心機を用いて、とけのこつた部分との分離をおこなつて DNP の溶解性の概略をしらべた。

1. ヌクレオクルペイン⁵²⁾

精製したヌクレオクルペイン 50 mg づつを遠心管に秤量し、そのおのおのに 0 M から飽和 (5.4 M) にいたる種々の濃度の食塩水 5 cc を加えて、密栓をして 7 時間振盪機で振盪し、一夜放置してから 30 分間、4000 回転で 20 分間遠心分離し、不溶物を除き、上清の窒素と燐の分析をおこなつた。第 11 表にその結果を示す。表中 DNA 量は燐量に 100/9 を掛けて算出して求めた。クルペイン量は全窒素から DNA-N を差引いた残りに 100/30 を掛けて求めた。DNA-N は DNA-P の

第 11 表 ヌクレオクルペインの食塩水に対する溶解性

試料	食塩濃度 (M)	溶解した全 N (mg)	同左全 P (mg)	同左全 DNA (mg)	同左全クルペイン (mg)	クルペイン DNA	N/P	溶解した DNA の割合 (%)	同左クルペインの割合 (%)	上清の状態	上清を水に加えた時の状況
1	0	0.945	0.185	2.5	2.0	0.80	5.11	7.8	11	強く乳濁	
	0.14	0.185	0.074	0.78	0.13	0.17	2.50	2.4	0.7	ほとんど透明	
	0.5	0.200	0.046	0.15	0.41	0.80	4.35	1.6	2.2	透明	
	1.0	4.60	1.50	17	6.7	0.39	3.07	53	35	透明・強粘性	乳濁
	1.5	10.1	3.00	33	17	0.52	3.37	103	89	同上	無定形沈殿
	2.0	10.7 ₅	2.91	32	19	0.59	3.70	100	100	同上	糸状沈殿
	3.0	7.95	2.96	33	9.9	0.30	2.69	103	52	やや乳濁・強粘性	無定形沈殿
2	0	1.06	0.305	3.4	1.8	0.53	3.48	15	11	強く乳濁	
	0.14	0.035	0	0	0.12			0	0.8	ほとんど透明	
	0.5	0.220	0	0	0.73			0	4.6	透明	
	1.0	5.95	1.75	20	9.7	0.49	3.40	87	61	透明・強粘性	少量の無定形沈殿
	1.5	7.40	1.91	21	14	0.67	3.88	91	88	同上	糸状沈殿
	2.0	8.10	2.03	23	16	0.70	3.99	100	100	同上	同上
	2.5	7.50	2.06	23	13	0.57	3.65	100	81	同上	同上
	3.0	7.05	2.15	24	11	0.46	3.28	104	69	弱乳濁・強粘性	無定形沈殿
5.4	6.10	2.04	23	8.8	0.38	2.99	100	55	強乳濁・ "	同上	



第10図 ヌクレオクルペインの食塩水に対する溶解性

1.7倍とした。第10図には、DNAとクルペインがそれぞれ何%食塩水にとけて出たかを示した。なお表中試料1はNを20.60%、Pを5.40%、試料2はNを20.95%、Pを5.19%含む。

これらの表と図とからつぎのことが明らかになった。(1)ヌクレオクルペインのDNAは、2M以上の食塩水にはほとんど全部とける。2M以下では、次第にとけ出かたが少なくなり、0.5Mではほとんどとけない。0.14Mでもとけ出ないが蒸溜水にはいく分(8~10%)とけ出る。(2)ヌクレオクルペインのクルペインは、2M食塩水でもつと多くとけて出るが、2M以上でも、2M以下でもとけ方が少なくなり、0.5M、0.14MではDNA同様にほとんどとけて出ない。(3)以上の結果として、とけ出るクルペインとDNAとの量の比は、2M食塩水の時にもつとも大きく、2M以上では徐々に減少する。(4)蒸溜水には、ごくわずかしかとけないが、明らかに0.14Mないし0.5M食塩水におけるよりも多量のDNA、クルペインがとけて出る。

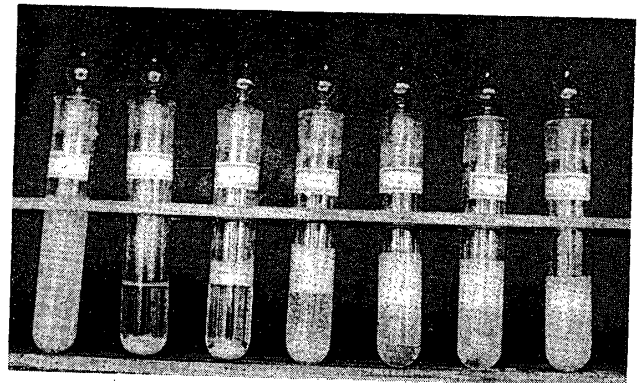
つぎに、これらの抽出液は、1M以上の食塩水で抽出したものはいずれも高い粘性を有している。3M以上になると抽出液がにごってくるのがみられた。5.4M食塩水ではつよくにごった液がえられた。これらの高濃度食塩水溶液を蒸溜水に加えて食塩濃度を下げると、2Mおよび2.5M食塩溶液は糸状沈澱を生じるが、1M食塩水溶液は沈澱をほとんど生成しないか、または生成してもわずかの無定形の沈澱しか作らなかつた。食塩濃度が3M以上にこくなつても、糸状沈澱を作りにくかつた。

ヌクレオクルペインを蒸溜水で抽出した時の現象はとくに興味深い。糸状のヌクレオクルペインを蒸溜水に1mg/ccていどに加え、つよく振る

と、これがこまかく切れて均一に分散し、半透明の粘性のつよい液がえられる。0.14Mないし0.5M食塩水では、いくらつよく振つてもDNPの糸はくずれないでひとかたまりになつている。この蒸溜水浮游液に食塩水を加えて、食塩濃度を0.14Mにするとただちに糸状に凝集して沈澱がおこる。また多量の蒸溜水を加えても糸状に凝集する。蒸溜水浮游液を4000回転で遠心分離すると、第11表に示したていどの窒素と磷とかが上清にみられ、大部分のDNPはゲル様の沈降物となる。遠心分離を10,000回転にして30分間おこなうと、えられた透明な上清にはやはり全DNPの数パーセントがとけていることがわかつた。このことから、ヌクレオクルペインはゲル化して蒸溜水に浮游する性質をもち、しかも、ある程度はとけるのではないかと思われる*。こういう現象は、ニシンの精虫を蒸溜水と共に振つた時には見られなかつた。

2. ヌクレオサルミン³⁴⁾

ヌクレオサルミンの溶解性の実験は、ヌクレオクルペインの場合と同様にしておこなつた。ヌクレオサルミンを種々の濃度の食塩水と振つた時の状態の写真を第11図に示す。0.14M食塩水、



左から蒸溜水、0.14M、0.5M、1.0M、2.0M、3.0M、5.4M各食塩水。

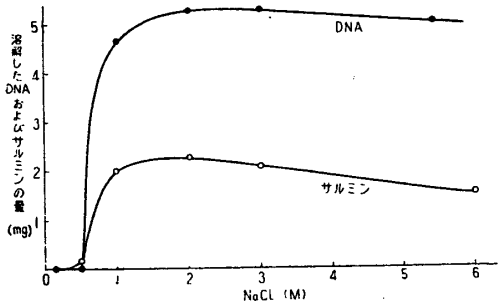
第11図

0.5M食塩水では何らの変化もみられないで、もとのままの糸状をたもつている。2M食塩水にはほとんど全部がとけて透明な溶液となるが、1M食塩水ではわずかに溶けないものがのこり、3M、

* Alexander は⁶⁴⁾、ヌクレオクルペインが水に可溶性であるが、とけるのには長い時間かかると報告している。われわれの経験ではヌクレオクルペイン、ヌクレオサルミン共に蒸溜水には一週間くらいかけてもあまり溶けなかつた。

5M の食塩水の溶液は白くにごっている。蒸留水と共にふつたときには、ヌクレオクルペインと同様に均一な半透明の浮游液がえられた。

つぎに、これらを 4000 回転で遠心分離してえられた上清の窒素と燐の分析をおこなつて、これらの値からとけ出した DNA とサルミンの量を計算すると第 12 図がえられる。



第 12 図

第 12 図の結果は、ヌクレオクルペインの時とほぼ同じで、0.14 ないし 0.5M 食塩水には DNA、サルミン共にとけ出ることがないが、2M 以上では DNA のとけ方はほぼ一定で、サルミンが、食塩濃度の増加と共にやや減つていように思われた。ヌクレオサルミンの蒸留水浮游液の興味ある性質もヌクレオクルペインのそれと同様であつた。ただ、ヌクレオサルミンの試料のほうが粘性がつよく、4000 回転の遠心分離ではほとんど沈澱がおこらなかつたので、その上清についての分析値は示してない。しかしながら、これを 10,000 回転で 60 分遠心分離するとゲル状の沈降物の上清に透明な溶液がえられたが、これには紫外吸収のつよさからおよそ数十% 程度の DNA をふくんでいることがわかり、多少の DNP は蒸留水にも可溶であるのではないかと考えられる。

3. コウシ胸腺ヌクレオヒストン

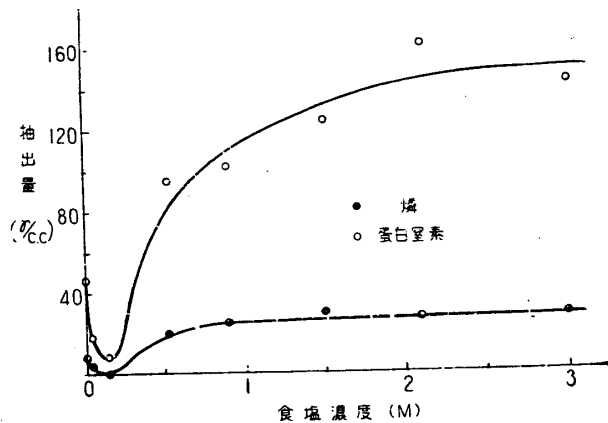
TNH-1 という試料を用いた。実験方法はヌクレオプロタミンでおこなつた時とまったく同様である。

まず蒸留水と共に振つた時には、溶液全体が均一なゼリー状の透明な粘性の高いものになつた。0.5M、0.14M にはまったく変化がみられない。この時の母液に DNA がふくまれていないことがジフェニルアミン反応によつて明らかであつた。1M、2M 食塩水にとかすと粘度の高い溶液がえられた。1M 食塩水を 6 倍容の蒸留水に加えると

糸状沈澱が生じるが 2M 食塩水溶液からは沈澱を生じることなく、全体が乳光を示すのみであつた。3M 食塩水にとかすわずかにごつた抽出液がえられるが 5M 食塩水による抽出液は透明であつた。これらの溶液はいづれも粘度は高く、DNA がとけ出ていることがわかるが、食塩濃度を下げても沈澱を生じない。これらの抽出液の DNA およびヒストン量を第 12 表に示す。

第 12 表 コウシ胸腺ヌクレオヒストンの溶解性

食塩濃度	N/cc (γ)	P/cc (γ)	N : P
0	312	81.6	3.8
0.14	10>	0	—
0.5	76	4.6	16.5
1.0	266	62.4	4.3
2.0	178	21.2	8.4
3.0	134	9.6	14.2
5.0	75	4.6	16.3



第 13 図 食塩水による小麦胚からの抽出

この結果をみると、このヌクレオヒストンの溶解性は、大体ヌクレオクルペイン、ヌクレオサルミンのそれと同様であるが、食塩濃度が 2M 以上になるとヒストンの抽出量にくらべて、DNA のとけ方の減少が大きい点で、ヌクレオプロタミンおよびヌクレオサルミンの溶解性と異つていようにも思われる*。また、これらの抽出液の食塩塩水

* これが本質的な差であるかどうかはよくわからない。DNP のとけ方は (DNA もそうであるが) 一般におそく、とけ方が少なかつたのは単に時間の問題であるかもしれない。プロタミンやヒストンのとけ方が、高濃度の NaCl 中で DNA よりも少ないことは時間の如何にかかわらず起る現象であるが、DNA のほうについてははつきりした実状がわかつていない。

濃度を 0.14M に下げた時の沈澱の生成は、ヌクレオプロタミンの時よりも鋭敏に DNH をとかけた食塩濃度に依存しているらしく、2M 以上の食塩の溶液からは沈澱を生じなかつた。第 12 表から、1M 食塩水にとかけた時の N:P が 4.3 であつたのにくらべて、それ以外の時には N:P がはるかに大きく、蛋白が多いのが明らかで、この DNA と蛋白の量的な変化が沈澱の生成にも影響しているのではないかと思われる (第四章参照)。

4. ニジマス精虫と小麦胚からの食塩水による DNP のとけ方

今までのヌクレオクルペイン、ヌクレオサルミン、およびコウシ胸腺ヌクレオヒストンについては、精製した試料について食塩水溶液に対する溶解性の研究をおこなつたが、ここにはニジマス精虫と小麦胚から、種々の濃度の食塩水で抽出した結果についてのべる。前にのべたように、組織からの DNP の抽出のされ方と、DNP 自体の溶解性とはかならずしも同じ傾向であるとはいえない。しかしながら、ニジマス精虫と、小麦胚から DNP の抽出のされ方をしらべた結果は、前のヌクレオプロタミンおよび胸腺ヌクレオヒストンでえられた結果と比べあわせてほぼ DNP 自体の溶解性を示しているであらうと思われるので参考としてここにのべることにする。

小麦胚の DNP を抽出する際の食塩濃度を決定するために、種々の濃度の食塩水で小麦胚を抽出した結果を第 13 図に示す。

ニジマス精虫を同様にしらべた結果を第 13 表に示す。

第 13 表 食塩水によるニジマス精虫からの DNP の抽出

食塩濃度	P/cc (γ)	N/cc (γ)	N:P
0	3.3	43	13
0.5	1.4	75	54
1.0	25	157	6.3
2.0	26	252	9.7
3.0	11	158	14.4
5.0	8.8	81	9.2

5. オウシ精虫について

哺乳動物の精虫からは蒸溜水でも、食塩水でも DNP を抽出することができないといわれる²⁸⁾³⁰⁾。

われわれはオウシ精虫を用いてこの事実をたしかめた*。精液をまず 4000 回転で遠心分離して精虫をあつめ、生理食塩水で数回洗つてから蒸溜水および 1M 以上 5M までの食塩水で抽出したけれどもいづれも DNP が抽出された傾向はまつたくみられなかつた。

IV DNP の性状についての考察

(1) DNP の高分子性

DNP を溶液から沈澱せしめると、おおむね糸状物質がえられる。これは DNP が高分子性のものであることを示す一つの証拠であると考えてよいと思う**。しかしながら第二章の脚註にのべたように、沈澱条件の如何によつては糸状沈澱とならないこともあるから、DNP が高分子であることはそれが糸状沈澱を形成するための必要条件であつても十分な条件であるとは思われない。Luck らは⁵³⁾ネズミの肝臓から糸状にならない DNH を作つた。これは細胞核を単離する時の溶媒の相異とか、抽出の出発材料に肝臓全体を用いないで細胞核を単離して用いるとかいうことによつてえられるが、糸状に沈澱する DNH とは若干その性質も異なるようである。

(2) DNP の組成

第 7 表にわれわれがえた数種の DNP の分析値を示してある。また 14 表には他の研究者によつて発表された値をも示して比較に便ならしめた。

これらの表から、ヌクレオプロタミンは DNA を 60% から 70% 近く含んでいることがわかる。ヌクレオサルミンの分析値はほぼ Felix がえた値⁴¹⁾と一致しているが、ヌクレオクルペインは Felix の値に比べて DNA が少し少なく、ヌクレオイリジンはやや多いようである。これらの少差は材料の相異によるとも考えられるし、あるいは、精製操作上の若干の相異によるためであるかもしれない。ヌクレオヒストンの分析値は比較的最近に発表された他の研究者の値とよく一致している。コウシ胸腺の DNH は DNA を約 50% 含んでいる。1M 食塩水を用いて抽出した試料と、

* 実験材料の入手に当つてお世話下さつた千葉大学 鶴上三郎教授に厚く感謝する。

** DNA よりも分子量の小さい PNA は塩基性蛋白質と糸状の複合体を形成しないこと、および加熱処理をした DNA も同様に糸状の複合体形成能を失うことについては第四章も参照されたい。

第14表 DNPのDNA含量(人工複合体および化学量論的中和複合体との比較)

DNP	N (%)	P (%)	N:P	DNA (%)	抽出方法*	備考	文献
ヌクレオクルペイン	19.9	5.06	3.9	62	NaCl	三試料平均値	本報告 (41)
	19.57	5.68	3.4	68	"	アルギニン:P=0.96	
			4.0	61		人工複合体	本報告
			3.8	63		計算された中和体	
ヌクレオサルミン	19.9	6.18	3.2	70	NaCl	三試料平均値	本報告 (41)
	19.52	5.65	3.4	68	"		
	19.2		3.5	66	"	アルギニン:P=0.96	(54)
			4.0	61		人工複合体	
			3.8	63		計算された中和体	
ヌクレオイリジン コウシ胸腺ヌクレオヒストン	20.2	6.6	3.1	72	NaCl		本報告 本報告
	14.8	3.7	4.0	46	aq.		
	14.4	3.6	4.0	46	NaCl		"
			3.7	48	aq.		(26)
	16.7	4.6	3.6	49	aq.		(25)
			4.2	43	aq.		(55)
	16.4		4.0	45	NaCl	アルギニン:P=0.26	(54)
	14.2~16.3	3.55~4.30	3.9	45	"		(38)
	14.8	3.7~3.8	3.9~4.0	45	"		(56)
			4.2	43	洗滌した核		(57)
			4.1	44	"	アルギニン:P=0.30	(58)
	15.6	3.7	4.2	43	"	(7)	
			28>		人工複合体 (アルギニンに富む分画)		
			40		" (リジンに富む分画)		
			31		計算された中和複合体 (アルギニンに富む分画)		
			50		" (リジンに富む分画)		
小麦胚ヌクレオヒストン			5.3	35	NaCl		本報告 (40)
				38	"		
				35	"		(59)

* NaCl は高濃度の NaCl で抽出したもの。aq. は蒸留水で抽出したもの。

蒸留水を用いた試料との間には差がみられなかつた。小麦胚のDNHはDNA 35%をいどを含んでおり、Lipshitzらや⁴⁰⁾ Stedmanら³⁹⁾がえた値とほぼ一致している。

DNPには以上のべた量のDNAを含んでいるが、その残りは蛋白質である。ヌクレオプロタミンはこれを塩酸で抽出するとプロタミンがほとんどすべて抽出され、残ったDNAの蛋白反応はほとんどなくなることから、蛋白は大部分プロタミンから成つていてと考えてよいと思われる。しかしながら小麦胚のDNHの蛋白窒素の10%弱はどうしても塩酸で抽出することができなかつた。

この結果はStedmanら³⁹⁾の結果とよく一致している。Davisonら⁵⁹⁾コウシ胸腺のDNPにも約7%の塩酸で抽出できない蛋白があることを報告しているが、これらの酸で抽出できない蛋白質はMirskyらがクロモゾームの中に見出した“residual protein”あるいはStedmanらが⁵⁰⁾ “chromosomin”と名付けた酸性の蛋白質にあつているのかもしれないと思われる。最近の研究ではヒストン自体もアミノ酸組成や分子量などのことなるいくつかの分画にわかれることが明らかにされている^{10), 60), 61), 62)}。

(3) 食塩水に対するDNPの挙動

種々の濃度の食塩水に対する DNP の溶解性を研究した結果から、食塩の濃度の変化によつてそのとけ方やまた溶液の性質がかなり異なることがわかつた。

高濃度の食塩水には DNP はいづれも可溶性である。しかしながらこの溶液中では DNA と蛋白とが解離する傾向がつよいことが透析による実験および超遠心分離機により、DNA の濃縮がおこるが蛋白の濃縮がおこらなかつたことを示した実験によつて端的に証拠立てられた。しかしながらその解離のていどは食塩の濃度により、また蛋白の種類によつて差があるようである。たとえば、ヌクレオクルペインでの実験では、1M 食塩水中でも大部分解離しているが、川出の研究では同濃度の食塩水中でコウシ胸腺の DNH のアルギニンに富むヒストン分画はほとんど解離しておらず、2M にするとほとんど解離をおこし、リジンに富むヒストン分画は 1M でも解離している⁹⁾。Petermann らは⁶³⁾ウシ脾臓の DNH で、Mirsky らは³⁷⁾コウシ胸腺の DNH でやはり高速遠心により 1M 食塩水中でのヒストンと DNA との解離現象を報告している。宇井は⁸⁷⁾かかる高速遠心の操作をヒストンの精製に用いている。Cohen は DNP の高濃度の食塩水溶液が示す高い粘性を食塩水中における DNA と蛋白との解離によるためであるとして説明した。

このように DNP が高濃度の食塩水中で両成分に解離する現象から考えると、両者の間の結合は DNA の磷酸基と蛋白の遊離アミノ基との間の静電力によつているものであらうと考えられる。

ヌクレオクルペインおよびヌクレオサルミンについての実験では高濃度の食塩水には DNP の DNA は比較的よくとけるが蛋白はとけ方が DNA より少ない。これは塩析の効果があるためであらう。蛋白のみについてしらべた結果では、プロタミンは 2.5M 以上、ヒストンでは 3M 以上になると塩析が始まることわかつた*。塩析して蛋白をと

* コウシ胸腺ヌクレオヒストンおよびニジマス精虫についての実験でも蛋白部分の塩析の効果がみられるが、DNA 部分もかなりとけ方が少なくなつたために、両成分の比についての傾向はヌクレオプロタミンの時と異つていた。この原因については未だ明らかにされていない。

り除く操作は DNA の精製に用いられている⁴⁹⁾。

食塩の濃度が 0.5M 以下に下がると DNP は非常にとけにくくなる。今まで経験した限りではすべての DNP は 0.5~0.14M の食塩水にはほとんど不溶であつた*。この結果は方法的に差があるが Frick や⁵⁶⁾ Crampton ら⁶⁵⁾の結果とも大体一致している。第四章にのべるが、DNA と塩基性蛋白質とを 0.14M 食塩水水中で混合すると両者の複合体を作つて沈澱が生成されることがわれわれの研究から明らかになつた。

食塩の濃度が 0.14M からさらに下がると、種類によつて差はあるがふたたび溶解性が増すようである。われわれは極端な場合として蒸留水に対するとけ方を研究した**。新鮮なコウシ胸腺 DNH の試料は可溶である。しかしヌクレオプロタミンは非常にわずかしか溶けないがその糸状の構造がすつかりくずれて均一な浮游液を作る性質をもっている。小麦胚の DNH も、また経年変化をおこしてとけにくくなつたコウシ胸腺の DNH にも同じような性質がみられた。こういう性質は食塩が 0.14M 存在すればまつたくみられないので、DNP に対する食塩の影響が明瞭にあらわれている。この浮游液はいづれも高濃度の食塩水に

* 好塩菌の DNP が 0.14M 食塩水にとけるらしいという増井の結果⁴⁴⁾があることは第二章で記した。

** DNP の溶解性に関しては、それが DNP の安定性と大いに関係があるように思われる。われわれの経験では、精製当時は蒸留水および食塩水によく溶けた DNH が、経年変化によつて何れの溶媒にもとけにくくなつてしまつたことがある。DNA 自体にはこういうことがあまりみられないから、この現象は蛋白が変性したためか、あるいは、DNA と蛋白との結合に何らかの変化がおこつたためであらうと思われる。Alexander は⁶⁴⁾、DNA とプロタミンとを混合して作つた DNP が時間がたつと水に対する溶解性を失うことを見出した。また抽出のときに時間をかけすぎるとヌクレオヒストンの水溶液がゲル化して単分散にならなくなるという Doty らの結果²⁶⁾も DNH の時間的な変化を示しているのかもしれない。小麦胚の DNH をエタノールとエーテルで乾燥せしめるとその溶解性はいちぢるしく悪くなる。Bernstein ら⁴⁶⁾は、ウニ精虫の DNP をエタノールを用いて沈澱せしめたり、一度乾燥させたりするとその水に対する溶解性が減少することを報告している。このような諸事実からも、DNP の溶解性の研究は非常に困難である。

溶した溶液と同程度あるいはそれ以上の粘性をもっている。またこれに食塩を加えるとただちに DNP が凝集して糸状に沈澱してしまう。この現象を説明するような実験はおこなっていないが、その理由の一つとして考えられることは、たとえば 0.14M 食塩水中では食塩が介在した形で糸状沈澱としての構造をとるが、食塩がない時にはこの構造がくずれて、別の構造を作るようになるのではないかということである。高濃度の食塩水溶液の示す粘性は DNA 自体の示すものであるらしいが、蒸留水中では解離現象は少ないからこれら浮游液のもつ粘性は DNP 分子、もしくはその集団が何らかの構造を作ることによるものであらうと考えられる。

第四章

DNA と塩基性蛋白質との相互作用

I 0.14M 食塩水中における人工複合体の生成

ニシン精虫からヌクレオクルペインを抽出・精製する実験中、われわれはその 1M 食塩水抽出液を蒸留水に加えて食塩濃度を 0.14M まで下げた時に、抽出液の粘性などから判断して明らかに DNA は抽出されているにもかかわらず DNP の沈澱が生成されないことを経験した。しかるに、この 1M 食塩水抽出液にクルペイン硫酸塩を少量加えてとからして蒸留水中に注ぐと糸状の沈澱が生じた。精虫を 2M 食塩水で抽出すると、今度は同じ操作でクルペインを加えなくても容易にヌクレオクルペインの糸状沈澱を作ることができた。この事実から、2M 食塩水と 1M 食塩水では抽出される DNA とクルペイン量が異なるのではないかと、また、その相異と、糸状沈澱の生成との間に何らかの関連があるのではないかということが予想された。前者の事実は前章の溶解性の実験(第 10 図)でほぼ明らかになつたので、つぎに DNA と蛋白質との量の比がそれらの沈澱性との間にどのような関連性をもつかについての実験をおこなつた。DNA と蛋白質とを、0.14M 食塩水中で種々の比で混合して、それらの沈澱量と混合比との関係をしらべた。また参考として PNA についても実験をおこなつた。

1. DNA-クルペイン系⁽⁶⁷⁾

使用した DNA は、ニシン白子から Hammarsten 法を多少改めて抽出・精製し、一応クロロフォルムによつてプロタミン以外の蛋白の除蛋白操作をおこなつたものである*。窒素と磷の含量はそれぞれ 14.9%, 8.66%, N:P=1.72 であつた。クルペイン硫酸塩はニシン白子を 1N 塩酸で抽出し、少量の硫酸を加えてからエタノールを加えて硫酸塩として沈澱させてから、水にとかし、ピクリン酸を加えてピクリン酸塩として沈澱せしめ、これを硫酸塩にかえて精製した。窒素 21.9% を含む。

DNA とクルペイン硫酸塩をそれぞれ 2M 食塩水に溶す。DNA 溶液は 1cc 中に磷 0.733 mg を含むから、DNA として 7.4 mg を含むことになる。クルペイン硫酸塩溶液は窒素 1.85 mg を含む、クルペイン 5.8 mg を含むことになる。

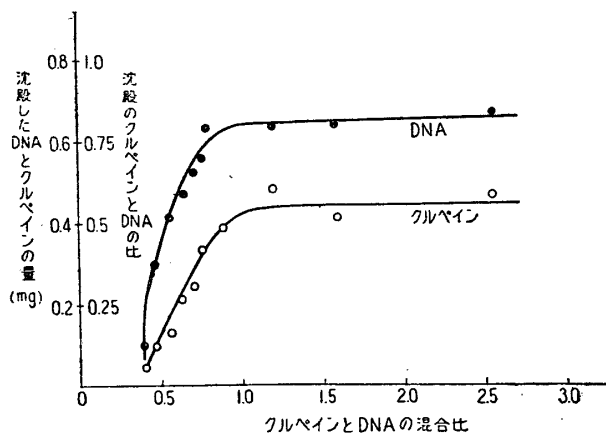
この DNA 溶液 1.0 cc づつを試験管にとり、そのおのおのに 0.1 cc から 2.5 cc にわたる種々の量のクルペイン溶液を加え、2M 食塩水で全容を 2.0 cc にした。(両者の合計が 2 cc 以上になるときはそのまま) この時には何らの変化もおこらない。これらに 25 cc ずつの蒸留水を加えると、ある管では糸状の沈澱を生じ、あるところでは沈澱がおこらない。食塩濃度はこの結果最終的に 0.15M ないし 0.26M になるが、かかる濃度範囲ではヌクレオクルペイン自体は不溶性である(第三章)。沈澱の生成したものを 3000 回転で遠心分離し、0.2M 食塩水で沈澱を洗い、2M 食塩水 5.0 cc にとからして窒素と磷の分析をおこなつた。また沈澱母液に坂口試薬を加えて反応のつよさをしらべた。この結果を第 15 表に示し、両成分の混合比と、沈澱した DNA およびクルペインの百分率との間の関係を第 14 図に示す。

これらの結果からつぎの諸点があきらかになつた。(1) DNA 7.4 mg に対してクルペインを、2.3 mg 以下加えたときにはほとんど沈澱を形成しない。すなわち、この比率では 0.15M 食塩水に可溶性である。この溶液は乳光を示している。(2) クルペインを、2.9 mg 以上 5.55 mg の間の量加えると沈澱を生じはするが糸状にはならず、かつ、クルペインが少ないと沈澱量も少ない。

* クロロフォルム法ではプロタミンを除くことができないことを前にのべた。

第 15 表 DNA-クルペイン人工核蛋白の生成

混合物 (DNA=7.4 mg)				沈 殿						母 液	
クルペイン溶液 (cc)	クルペイン (mg)	クルペイン DNA	N : P	P (mg)	N (mg)	N : P	DNA (mg)	クルペイン (mg)	クルペイン DNA	状 態	吸吸応
0.1	0.59	0.08	1.89							なし	卍
0.2	1.17	0.16	2.14							"	卍
0.3	1.75	0.24	2.39							"	卍
0.4	2.34	0.32	2.64							"	卍
0.5	2.92	0.39 ₅	2.77	0.114	0.312	2.74	1.03	0.44	0.32	無定形	卍
0.6	3.51	0.47 ₅	3.15	0.294	0.805	2.74	2.96	0.95	0.32	"	卍
0.7	4.09	0.55	3.40	0.404	1.17	2.90	4.08	1.29	0.32	"	卍
0.8	4.67	0.63	3.66	0.460	1.45	3.15	4.65	2.11	0.45	"	卍
0.9	5.25	0.71	3.91	0.520	1.65	3.17	5.25	2.43	0.46	"	卍
0.95	5.55	0.75	4.04	0.570	1.99	3.50	5.58	3.33	0.60	"	+
1.0	5.85	0.79	4.16	0.625	2.26	3.62	6.31	3.78	0.60	短糸状	+
1.5	8.78	1.19	5.43	0.620	2.58	4.16	6.26	4.83	0.72	糸 状	卍
2.0	11.7	1.58	6.70	0.625	2.46	3.94	6.31	4.42	0.70	"	卍
2.5	14.6	2.55	8.5	0.630	2.51	3.99	6.36	4.55	0.71	"	卍



第 14 図 DNA とクルペインの混合比と沈殿率

(3) 5.85 mg 以上のクルペインを加えると糸状沈殿を作る。これらの時には、加えるクルペインの量にかかわらず沈殿量は一定で、その DNA とクルペインの組成も一定である。すなわち飽和現象を示している。この一定組成の DNA-クルペイン複合体の組成は、DNA を約 60% 含み、ヌクレオクルペインの DNA 含量とほぼ一致する (第 7 表, 第 14 表)。第 15 表の坂口反応のつよさをみると、沈殿が無定形の状態から糸状に移行するときに弱くなつて、他のところではつよい。これはつぎのように説明されるであらう。DNA の一定量に対してクルペイン量が少ない時には沈殿がおこらないか、あるいはおこつても非常に不完全で、DNA と共にかなりの量のクルペインが母

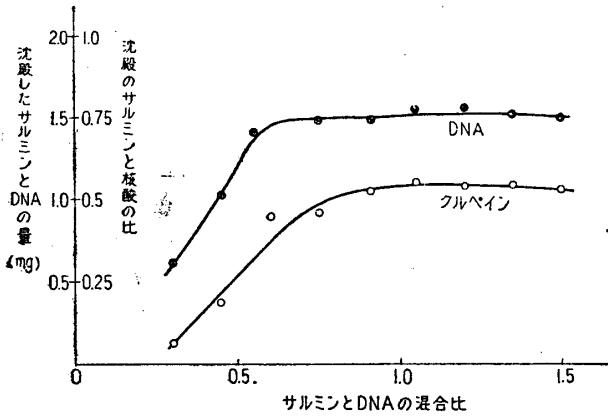
液に残る。クルペイン量が多くなると、こういう不完全沈殿の状態がだんだん少なくなつてクルペインが DNA とよく結合して沈殿するから母液のクルペインも少なくなる。しかるに、DNA と結合するクルペインの飽和量以上のクルペインを加えると、この分は結合しないで母液にのこるようになるからふたたび坂口反応がつよくなる。第 14 図にみられるように、クルペインの沈殿率はある混合比の点で最高になる。この点で、母液の坂口反応がもつとも弱くなることから上の説明が大体正しいように思われる*。

2. DNA-サルミン系⁶⁸⁾

実験に使用した DNA はクルペインとの相互作用の実験に用いたものと同じである。1.7 mg/cc の 2M 食塩水溶液を使つた。サルミン硫酸塩はサケ白子からクルペイン硫酸塩の精製と同じ方法で精製した。2.5 mg/cc の溶液を用いた。

実験方法もほぼ同じで、DNA 溶液 1.0 cc に、サルミン硫酸塩溶液を 0.1 cc から 1.0 cc にわたる種々の量加え、2M 食塩水で全容を 2.0 cc にし、これに蒸留水 10 cc を加えた。結果を第 15 図に示す。

* DNA とクルペインが 100% 沈殿する条件がありそうに思われたが、かかる点は見出せなかつた。こういう条件が非常に critical であつて、その点をおさえられなかつたことも一つの理由であるかもしれない。



第15図 DNA とサルミンの混合比と沈殿率

この図からみられるように、結果は DNA-クルペイン系でえられたものとはほぼ同一であった。すなわち、サルミンを DNA 量の 0.7 倍以上加えた時に明瞭な糸状沈澱を生じ、その DNA 含量は約 60% であった。DNA とサルミンとを 1:0.6 の比に混合した時に両者の沈澱率もつとも高く、DNA の 94%、サルミンの 89% が沈澱し、母液の坂口反応がもつとも弱かつた。サルミンがそれより少なくなると、沈澱が糸状にならず、かつ両成分の沈澱率も低くなる。さらにサルミンを加える量が少なくなると沈澱を作らなくなってしまう。

3. PNA-プロタミン系⁶⁹⁾

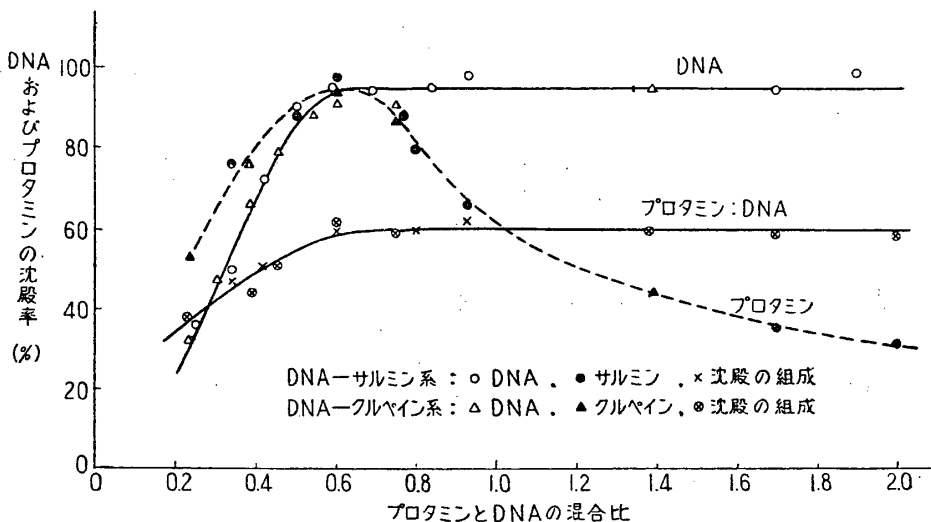
この実験では DNA のかわりに PNA を用いて比較研究をおこなつた。PNA は、コーボから Clarke-Schryver 法で抽出・精製したもの⁶⁶⁾を用いた。PNA-クルペイン系の実験では PNA の 3.7 mg/cc, クルペイン 2.8 mg/cc, PNA-サルミン系の実験では PNA 4.8 mg/cc, サルミン

4.1 mg/cc のいずれも 0.14 M 食塩水溶液を用いた。実験方法は前とほぼ同様であるが、今回は両成分を 0.14M 食塩にとかしたから、両者を混合するとただちに沈澱がおこる。これを遠心分離であつめ、0.14M 食塩水で洗い、その窒素と磷の分析をおこなつた。第 16 図に PNA とプロタミンの混合比と、両成分の沈澱率との関係を示してある。

この図から明らかなように、PNA およびプロタミンの沈澱曲線は、PNA-クルペイン、PNA-サルミン両系の実験で一致している。すなわち、この種の性質にはクルペインとサルミンとの間の相異がみられなかつた。またそれぞれの沈澱曲線の形は、DNA とプロタミンとの系についてえられたものとも類似していた。プロタミンを PNA の 60% くらいの量加えた時に両者の沈澱率もつとも高くなり、プロタミンをそれ以上加えると PNA の沈澱率は一定しているがプロタミンのそれは減少し、プロタミンの量が PNA の 0.6 倍以下では PNA, プロタミン共に沈澱率が急速に減少する。PNA の 0.2 倍以下のプロタミンを加えても沈澱がおこらない。沈澱物の組成はプロタミンを PNA の 0.6 倍以上加えた時には一定して PNA 含量が約 70% である。なお PNA はプロタミンとどのような比率で混合しても糸状沈澱がえられなかつた。

4. DNA または PNA とヒストンとの系⁷⁰⁾

つぎにヒストンと核酸との系について実験した。DNA, PNA の試料は前にのべたのと同じでそれぞれニシン白子およびコーボから抽出したも

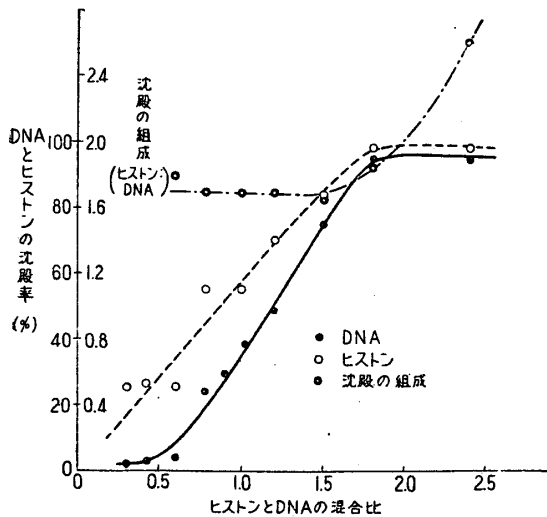


第16図 PNA プロタミンの混合比と、沈澱率との関係

のである。ヒストンはコウシ胸腺から抽出したものをを用いた*。前に記したようにコウシ胸腺ヒストンはいくつかの分画にわかれることが近年知られているが、実験に用いたヒストン 6A は比較的アルギニンに富む分画で、沈降定数は 1.9S であり、ヒストン 6B はリジンに富む分画で、沈降定数は 0.9S である。ヒストン 3 は全分画を含むと思われる試料である**。これらのヒストン分画は、コウシ胸腺をうすい硫酸で抽出し、これに加

第 16 表 核酸とヒストンとの人工核蛋白の生成

混合系	混合比 (ヒストン:DNA)	遠心分離前		遠心分離後 上清
		沈殿	母液	
DNA-ヒストン 6A	0.30~0.60	なし	白濁	白濁
	0.98~1.50	無定形	〃	〃
	1.80~2.40	糸状	〃	透明
DNA-ヒストン 6B	0.32~0.83	無定形	〃	白濁
	0.95	〃	透明	透明
	1.08~1.90	〃	〃	〃
DNA-ヒストン 3	0.29~1.46	糸状	白濁	白濁
	1.75~2.34	〃	〃	透明
PNA-ヒストン 3	0.27~0.38	なし(微量)	〃	透明
	0.55~1.37	無定形	〃	〃
	1.65~2.20	〃	〃	白濁



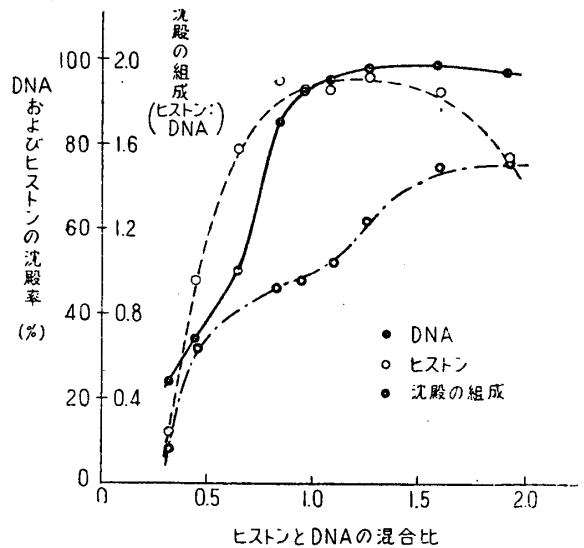
第 17 図 DNA とヒストン 6A の混合比と沈殿率

えるアルコールの量をかえて沈澱せしめることによつてえられたものである¹⁰⁾。

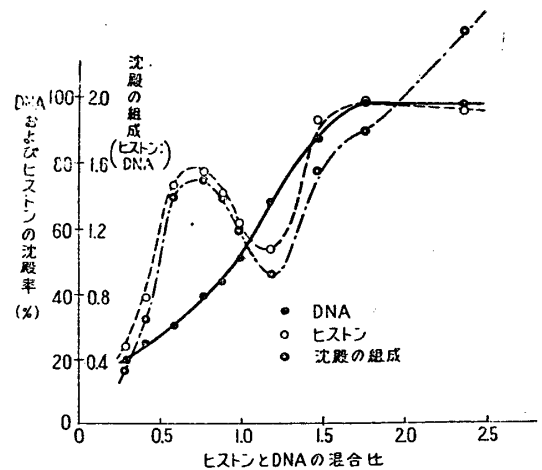
実験方法は前節でのべたのとほぼ同様である。両者を 0.14M 食塩水にとかして混合した。第 16 表に混合した時の見かけ上の所見を示した。第 17 図から第 20 図に核酸とヒストンとの混合比と、両者の沈澱率との間の関係を示してある。

これらの図からまず明らかなことは、核酸とヒストンとの沈澱曲線が、ヒストンの分画の相異によつて形にかなり変化がみられることである。しかしながら、第 19 図と第 20 図とから、核酸のほうの相異は同じヒストン試料ではほとんどみられないから、これらの変化がヒストンのほうのちがいがよつているもののように思われる。

まず沈澱曲線の形の点から比較してみる。第一



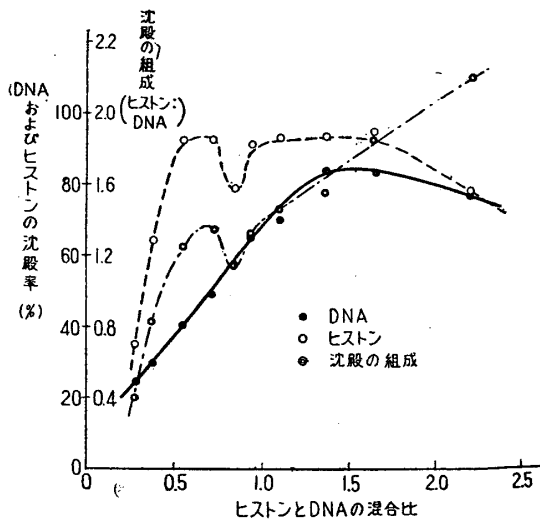
第 18 図 DNA とヒストン 6B の混合比と沈殿率



第 19 図 DNA とヒストン 3 の混合比と沈殿率

* 宇井が調製した。沈降定数の測定値も同氏によつてえられた結果である。

** アルギニンに富む分画とリジンに富む分画との比が大体 4 : 1 である (分献 62) も参照。



第 20 図 PNA とヒストン 3 の混合比と沈殿率

に、核酸とヒストンとの両者が最高沈殿率を示す混合比をみると、DNA-ヒストン 6A の系ではヒストン:DNA の比が 1.8 くらい、DNA-ヒストン 6B の系では 1.8 くらい、DNA-ヒストン 3 の系では 1.6 くらいである。ヒストン 3 の系でも 1.4 くらいである。ヒストン 3 を用いた実験では混合比 0.5 くらいのところに沈殿率の極大がみられた。第二は、核酸とヒストンの混合比をヒストン:DNA が 2.4 くらいまでしらべたが、その範囲でヒストンが DNA とほとんど結合してしまう例 (第 17, 19, 20 図) と、混合比の増加と共にヒストンの沈殿率が減少する例とが見られる。後者のような形はプロタミンを用いた時にえられたが、ヒストン 6B を用いた実験でえた形がこれと似ている (第 18 図)。ヒストン 6A および 3 は核酸の 2.4 倍もの量が DNA や PNA と結合しうる。しかしながらいづれの例でも、ヒストンが核酸の量に比べてずっと少ない時には、沈殿の生成量が少ないか、あるいはまったく沈殿ができないで乳光を示す液となる、この事実はプロタミンでの実験例と同じであった。

第 16 表から一般的に DNA とヒストンとを混合して両者の沈殿率が最高になり、母液に残る核酸とヒストンとの量があまり多くないときには沈殿母液が透明になるが、それ以外の時には白濁することがわかる。PNA はヒストンとどのような比率に混合しても糸状の沈殿はえられなかつた。

5. 核酸-塩基性蛋白質複合体の沈殿性に関する二三の要因について

以上の各実験で明らかのように、核酸と塩基性の蛋白質とを 0.14M 食塩水中で加え合せると、核酸-蛋白質の人工複合体を生成することがある。これらの実験中に、かかる複合体沈殿の生成にはいくつかの必要な条件がともなわなくてはならないことがわかつた。それらは、(1) 蛋白と核酸との混合比 (これについての実験をすでに示した) (2) 核酸と蛋白との濃度, (3) 溶液の pH, (4) 核酸の高分子性である。第五節ではこれらの実験結果を示す。なお、プロタミンとヒストンとではプロタミンが優先的に DNA と結合する結果がえられたのでその結果をのべる。

まず両成分の濃度の問題についてしらべた結果を示す。ヌクレオクルペインを 2M 食塩水にとかす。その濃度が 1cc 当り 10 mg, 5 mg, 2.5 mg, および 1 mg/cc の四種の溶液を作つた。これらの溶液に蒸留水を加えていつて、食塩濃度をどこまで下げた時に DNP の沈殿が生じるかをしらべた。その結果、10 mg/cc の溶液では食塩濃度が 1.1 M になると沈殿が始まり、5 mg/cc では 0.91 M, 2.5 mg/cc では 0.87 M, 1 mg/cc では 0.8 M でそれぞれ沈殿が始まる。すなわち、ヌクレオクルペインの濃度が低いときには、これを沈殿せしめるためには食塩濃度をより低くしなくてはならないことがわかつた。

つぎに DNA とクルペイン硫酸塩とをそれぞれ 2M 食塩水にとかし、その濃度を第 17 表に示すようにした。これらの DNA およびクルペイン溶液を等容ずつ加え合せ、蒸留水でうすめて食塩濃度を 0.14 M に下げた。沈殿の生じる状況を第 17 表に示す。

第 17 表 DNA-クルペインの沈殿生成と、濃度との関係

		DAN (%)		
		1.0	0.5	0.25
クルペイン硫酸塩 (%)	1.0	糸	糸	無定形
	0.75	〃	〃	〃
	0.5	〃	〃	〃
	0.25	無定形	無定形	〃
	0.1	乳濁	乳濁	〃

この表からつぎのことがわかった。DNA 濃度を一定にして、クルペイン濃度を低くすると沈澱しにくくなつてついに沈澱を形成しなくなる。クルペイン濃度が高くても DNA 濃度が低いとやはり糸状沈澱が生じない。さらに、DNA とクルペインの混合比が同じでも、濃度が低いと糸状沈澱を生じなくなる。これらの結果から、DNA-クルペインの沈澱（糸状沈澱）生成には両者の混合比と共にその濃度も影響していることがわかった。

つぎに溶液の pH の影響をしらべた。DNA とサルミン硫酸塩をそれぞれ 0.14 M 食塩水にとかし（約 2 mg/cc）、これに広域緩衝液^{7D}を加えて第 18 表のように種の pH をとらしめた。pH のほぼ同じ DNA 溶液とサルミン溶液とを加えてふたたび pH を測定した。この pH はそれぞれの溶液の pH とほとんど変わらない。第 18 表に沈澱生成の状況についての結果を示す。

第 18 表 DNA-サルミン人工核蛋白の沈澱性に対する pH の影響

pH	沈澱の状態	pH	沈澱の状態
1.6	乳濁	6.7	糸状
2.5 _s	"	8.8	"
3.9	糸状	9.8	"
4.8	"	11.6	乳濁

この表から pH が 4 から 10 の間では糸状沈澱の生成についてはまったく何らの関係もないが、それ以外の pH では糸状沈澱を作らず乳濁するだけであることがわかった。

つぎに DNA に加熱処理をした時の結果について記す。DNA の 0.14 M 食塩水溶液を種々の温度に 5 分間加熱し、冷やしてからサルミン硫酸塩の 0.14 M 食塩水溶液を加えた。

DNA 溶液を 70°C 以下で 5 分間加熱した場合には、未処理の DNA による時と同様に糸状沈澱を形成するが、90°C に加熱すると糸状沈澱は生じないで、一部は無定形の沈澱となり、一部は分散して白濁した。100°C で加熱すると 2 分間ですでに糸状沈澱を作りえなくなる。以上は pH 7 付近での実験であるが、DNA 溶液を第 18 表に示す pH の下で 63~64°C で 5 分間加熱すると、未処理の DNA が pH 3.9 で糸状沈澱を作るのに、

加熱処理で無定形の沈澱しか生じなくなつた。アルカリ側では加熱による変化がみられなかつた。なお、以上のようにして、サルミンに加えて糸状沈澱を作らない DNA は、その溶液にエタノールを加えても DNA の糸状の沈澱を作らない。

最後にプロタミンとヒストン 6A（アルギニン）に富む分画との混合溶液に DNA を加えた時の結果についてのべる。DNA、サルミン硫酸塩、およびヒストン 6A 硫酸塩をそれぞれ 0.14 M 食塩水にとかした。濃度は DNA が 1 mg/cc、蛋白は 2 mg/cc とした。A, B, C 三本の試験管にサルミンとヒストンの溶液を上順にそれぞれ 0.5 cc と 1.5 cc, 1.0 cc と 1.0 cc, および 1.5 cc と 0.5 cc ずつ加えて混合し、これに DNA 溶液 2.0 cc ずつを加えて沈澱を作らしめた。大部分の DNA は沈澱した。遠心分離してその上清をとり、その窒素量を測り、ついでこの上清の残りに 3 M のトリクロル酢酸を氷冷下に 0.4 容加え、生じた沈澱を遠心分離してその上清の窒素量を測定した。ヒストン 6A はトリクロル酢酸で沈澱するから、後者の窒素はプロタミン窒素と考えられ、前者との差がヒストンの窒素をあらわしている。このようにして DNA と結合物をつくつて沈澱しないで残つたプロタミンとヒストンの量をもとめた。第 19 表にその結果を示す。

もし DNA が、プロタミンとヒストンの混合比

第 19 表 プロタミンとヒストンとの混合溶液に DNA を加えた時の結果

混合量		混合比 ヒス：サル トン：ミン	沈澱量		沈澱比 ヒス：サル トン：ミン
サル ミン	ヒス トン		サル ミン	ヒス トン	
2.3	0.83	1 : 2.8	2.1	0.5	1 : 4.2
1.5	1.6 _s	1 : 0.91	1.4	0.35	1 : 4.0
0.76	2.5	1 : 0.30	0.6	1.2	1 : 5.0

と同じ割合でそれらと結合して沈澱したならば、上清に残つた両者の比もまたもとの混合比と同一になるべきであるが、19 表の結果から明らかのように、上清のプロタミンとヒストンとの比はもとの混合比にくらべてかなり小さい。このことは DNA との沈澱の形成に際してはヒストンよりもプロタミンが比較的優先的に結合することを示している。

II DNA-蛋白複合体に対する DNase 作用

今までのにべた実験から、0.14 M 食塩水中で DNA と塩基性蛋白質とを適当な条件の下で混合すると人工的に DNA-蛋白質複合体を形成することがわかった。本節では DNP の存在様式を研究するための一助として、蛋白と DNA の比率のことなつた人工の DNP 沈澱に DNase を作用させて、その DNA がどのくらい分解をうけるかをしらべた結果についてのべる。

使用した DNA はニシン白子から抽出・精製した (H-DNA-IX)。プロタミンおよびヒストンは前に記載したものと同じである。DNase は米国の Worthington Biochemical Corporation から輸入した結晶製品を使用した。

実験の方法は、DNA と蛋白質とをそれぞれ 0.14 M 食塩水にとかし (DNA は約 2 mg/cc, 蛋白はこの 2~3 倍量), DNA の一定量 (たとえば 1.0 cc) にいろいろな量の蛋白溶液を加えた。生じた沈澱を 0.14 M 食塩水で洗い、0.14 M 食塩水の 2 cc に浮べる。これに硫酸マグネシウムの 0.02 M 溶液 0.5 cc を加え、DNase 50 γ (0.05 cc, 1%ゼラチン溶液) を加えて 37°C で 1 時間酵素作用をおこなわせた。始めに混合した時に生じた沈澱の母液を分析して沈澱物の DNA と蛋白量をはかり、酵素分解後遠心分離してえた上

清を分析して溶解した DNA-P の量をはかつた。これらの分析値から DNA が何パーセント分解をうけたかを求め、この値と沈澱物の組成との関係がえられた。

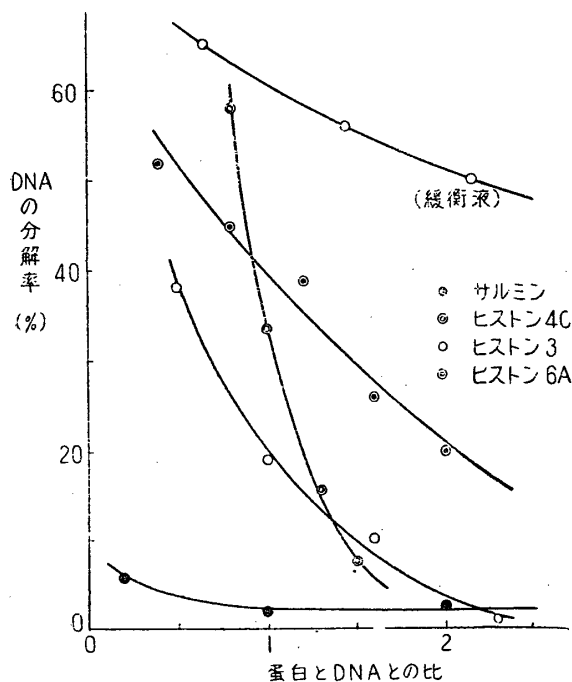
第21図にその結果を示す。ヒストン 4C はヒストン 6B と同じ分画でリジンに富むものである。

この結果からつぎのことが明らかになつた。

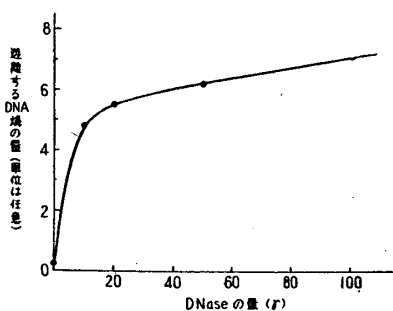
DNP の蛋白と DNA の量の比が大きくなると DNase に対する安定性が増し、同じ条件下でとけ出る DNA-P の量が少なくなる。この安定性の程度は用いた蛋白の種類によつてかなり相異がみられる。DNA-サルミン複合体では、DNA のおよそ 20% しかサルミンを含まないものでも、60 分間に 6% ていどしか DNA が可溶性にならないで、1:1 以上の複合体はほとんど DNase 作用をうけない。これに対して DNA-ヒストン 6A 複合体は、はるかに DNase 作用をうけ易く、DNA の 40% のヒストンをふくむ複合体では 50% 近くの DNA が可溶性になり、DNA の 2 倍以上のヒストンを有する複合体でもわずかながらこの作用がみられる。リジンに富むヒストン 4C およびヒストン 3 との複合体はこれら両者の中間の安定性を有して、ヒストンを DNA の 2 倍量以上を含む複合体は DNase 作用をうけないが、それ以下の時には 6A に近いていどの分解作用をうける。

コウシ胸腺から蒸留水および 1 M 食塩水で抽出・精製したヌクレオヒストン (TNH-3W, TNH 3S) についてしらべると、DNase 量 5 γ /cc で 90 分間にそれぞれ 20% ていど分解をうけていることがわかり、両者の間に大きな差異を見出すことはなかつた。またこの値は人工の DNA-ヒストン複合体での値とも大体一致しているが、中でもヒストン 3 の値とよく一致している。

第 22 図には DNase の量が沈澱状態の DNA の分解量とどのような関係にあるかを示した。基質は DNA-ヒストン 3 の人工複合体である。これは DNA の 2 mg/cc 0.14 M 食塩水溶液 1.0 cc に、6 mg/cc のヒストン 3A の 0.14 M 食塩水溶液 0.4 cc を加え、生じた沈澱を 0.14 M 食塩水で洗い、これに 0.14 M 食塩水 2.0 cc と硫酸マグネシウム溶液 (0.02M) 0.5 cc とを加えて浮遊せしめた。四本の試験管にそれぞれこの基質浮

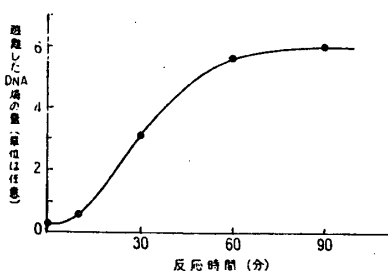


第 21 図 DNA-蛋白人口複合体の組成と、DNase 作用に対する安定性との関係



第 22 図 DNA-ヒストン人工複合体に対する DNase 作用. DNase 量の影響.

游液を入れ、一本はコントロールとし、他の三本におのおの 10r, 50r, 100r ずつの DNase を加え、37°C で 60 分間おいた。時間後ただちに遠心分離し、上清の燐を定量して DNA の分解率を測った。この図から DNase 20r までは急速に分解率の増加がみられるが、それ以上 100r に到るまで分解率の増加はゆるやかになつて酵素量と直線的な関係にあることがわかつた。したがつて 20r 以下の DNase を用いると分解率の誤差も大きい、われわれは 50r の DNase を用いたから、当面の問題に対しては充分な誤差範囲を保つことができたと思う。



第 23 図 DNA-ヒストン複合体に対する DNase の作用, 時間の影響

第 23 図には反応時間との関係をしらべた結果を示す。反応基質の作り方は第 18 図の実験と同様である。DNase 50r を用いた。6 本の試験管に基質浮游液を入れ、そのうち一本は対照として DNase を加えないで 90 分間 37°C に放置した。この対照の DNA 分解率は 0.7% であつたから、各時間毎の分解率からこの値を差引いた。(時間が短かければ対照の分解率はこれより小さいと思うが、結果としてはあまり大きな影響がないから 90 分の対照のみを用いた) 第 23 図から、酵素反応は 60 分間にほぼ完了しており、90 分まで時間

をのばしてもその差はわずかである。

以上の結果から、沈澱状態の DNP に対しても DNase 作用があつて、DNA が分解をうけることがわかつたが、なお一二の附加事項についてのべる。第一は酵素作用を 0.14 M 食塩水中でなく、0.05 M のヴェロナール緩衝液(食塩を加えてイオン強度を 0.14 にしてある) pH 7.5 の溶液中でおこなうと、DNA の分解率がかなり増加する傾向がみられたことである。第 21 図中にそれを示したが、同じヒストンとの複合体を 0.14 M 食塩水中で酵素分解をおこなわしめた時にくらべてかなり分解が進んでいることがわかる。第二は、DNA の分解と同時に蛋白の遊離があるていどおこるのでないかと思われることである。分析方法として燐と窒素の定量のみを用いたために、良い精度の結果はえれなかつたが、一例を示すと、DNA とヒストン 3 との同じ成分比の人工複合体を二つ作り、一方は酵素作用をおこなわないでその N:P の値をはかつた。この値は 6.6 であつた。もう一方は、DNase 50r を加えて 60 分間酵素作用を行なわしめて、前述のように DNA の分解率をもとめ、とけ残つた沈澱物の N:P もはかつた。分解率は 25% で、N:P は 7.1 であつた。これらの値から計算すると、ヒストン-N のおよそ 13% が遊離したことがわかつた。すなわち、DNA の分解にとりなつて、あるていどのヒストンが結合からはなれて遊離してくるのではないかと考えられる。

III 蒸留水中における相互作用

第一節には、0.14 M 食塩水中で DNA と塩基性蛋白質とを混合した時の複合体の沈澱形成の条件について研究した結果をのべたが、0.14 M 食塩水には、DNP も、また人工の複合体もきわめてとけにくく、溶液状態での研究をおこなうことができない。DNP は高濃度の食塩にはとけるが、この時には前にものべたように DNA と蛋白との解離への傾向がつよくて相互作用の力は弱いと思われるからこれもまた都合が悪い。そこで著者らは蒸留水溶液を用いてそれらの間の相互作用を研究した。新鮮なコウシ胸腺ヌクレオヒストンは蒸留水に可溶性であるが、DNA とヒストンを蒸留水中で混合すると、濃度がかかなり低くても(たとえば 100 分の 1 パーセント)すでに乳光を示し

第20表 DNA-ヒストン混合溶液の蒸留水中における紫外吸収のつよさ

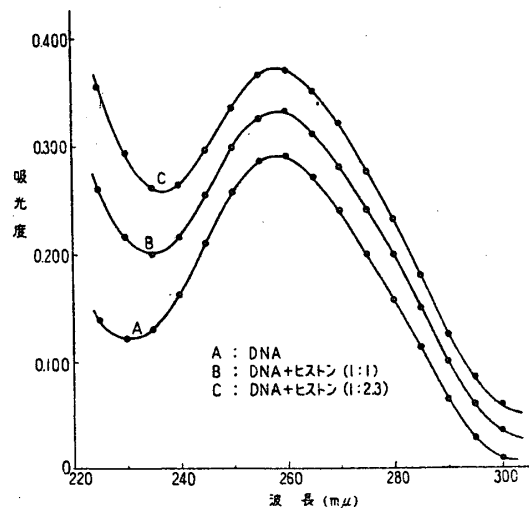
ヒストンとDNAの混合比	230 m μ				260 m μ			
	観察された吸収のつよさ	ヒストン自体による吸収	計算値*	吸収の増加率 (%)	観察された吸収のつよさ	ヒストン自体による吸収	計算値*	吸収の増加率 (%)
0	0.122	0	0.122	0	0.291	0	0.291	0
0.3	0.142	0.010	0.132	7.6	0.296	0.001	0.292	1.4
1.0	0.216	0.030	0.152	42.1	0.332	0.002	0.293	13.3
1.7	0.293	0.050	0.172	70.5	0.369	0.003	0.294	25.5
2.3	0.325	0.070	0.192	69.3	0.375	0.005	0.296	26.7

* DNAの吸収に、ヒストン自体の吸収を足した値。

たりする現象がおこり、濃度が高いと沈澱を形成する。しかしながら濃度をさらに低くして1000分の数パーセントにすると、ヒストンとDNAとの混合比を1:1以内におさえれば透明な混合溶液がえられる。DNAとプロタミンとを混合しても、そのていどの濃度ならば乳光を生じたりすることも無い混合溶液がえられる。しかしながら、濃度がこのように低くなると一般の化学的、あるいは物理化学的測定は非常に困難になつてくるが、DNAは紫外部につよい吸収をもち、しかもその測定には1000分の数パーセントがもつとも都合がよい。今までの報告では、DNAの紫外吸収は塩類や蛋白質などの電解質が共存する場合には、両成分の吸収の加成性が成立せず、一般に吸収が減少するといわれている^{76), 79), 80)}。しかしプロタミンやヒストンのような塩基性のつよい蛋白質についての実験がおこなわれていないので、著者らはヒストン3(全分画)、ヒストン6A(アルギニンに富む分画)、およびサルミンなどと、DNAを蒸留水中で混合して紫外吸収のつよさを測定した。

まず、DNAとヒストン3の1 mg/ccの蒸留水溶液を作り、セロファン製の袋に入れて冷室で24時間蒸留水に対して透析した。透析後これらの溶液を蒸留水でうすめてDNAのほうはおよそ20 γ /cc、ヒストンのほうはおよそ200 γ /ccとした。このDNA溶液3.0 ccに、ヒストン溶液を0.1 ccから2.0 ccにわたつて種々の量加え、蒸留水で全容を5.0 ccにした。ヒストンを含まないコントロールも作った。ヒストン溶液を0.7 cc以下加えた溶液は透明であるが、1.0 cc加えたものはわずかな乳光をもち、1.5 cc加えたものはかなりつよい乳光をもつている*。2.0 ccになると

乳光はやや弱くなる。これらのうち、乳光のみられない見かけ上透明な溶液の紫外吸収スペクトルを測定した。第24図にこの結果を示す。



第24図 DNA-ヒストン混合物の蒸留水中における紫外線吸収スペクトル

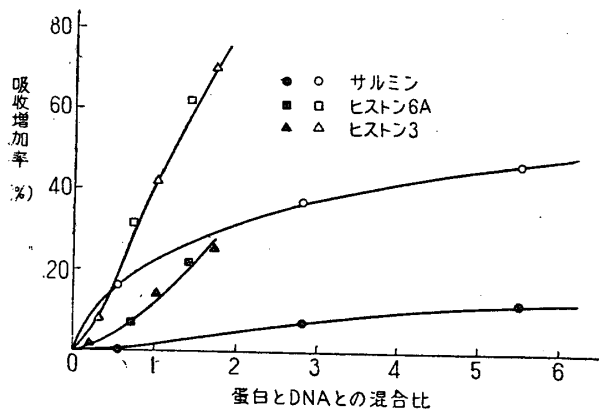
DNA自体の吸収スペクトルはこの図にみられるように230 m μ と260 m μ にそれぞれ吸収の極小と極大をもつている。しかしながら、ヒストンを加えた溶液のスペクトルは260 m μ の極大はほとんどかわらないが230 m μ の極小はかなり長波長側にずれる。さらにいちぢるしい事実は、ヒストンの量がふえると共に吸収のつよさが増加することである。この増加は、ヒストン自体の吸収の補正をしてもなお非常にけん著である。第20表にこの増加率を260 m μ と230 m μ で測定した結果を示す。

つぎにDNAとヒストン6Aとについて同様

* DNA-ヒストン複合体は、ヌクレオヒストンと異つて蒸留水中にあまり溶けにくい。濃度を濃くすると乳光もいちぢるしく、さらに沈澱を作るようになる。

の実験をおこなった。DNA 自体の吸収のつよさは、蒸留水中では pH によつて鋭敏に影響されるので溶液の pH をいちいち測定したが、透析したおのおのの溶液、これらをうすめて両者混した溶液いづれも pH は 6.6₅ から 6.7₅ の間で一致していた。吸収スペクトルの形の変化には第 20 図とほぼ同様の傾向がみられた。ヒストンと DNA との混合比が 2.1 以上になるとわずかな乳光を示すようになる。230 mμ および 260 mμ での吸収の値はやはり増大している。ヒストン : DNA が 1.4 のとき、230 mμ と 260 mμ での増加率はそれぞれ 62% および 22% であつた。他の混合比における増加率は前のデータと一緒に第 25 図に示す。

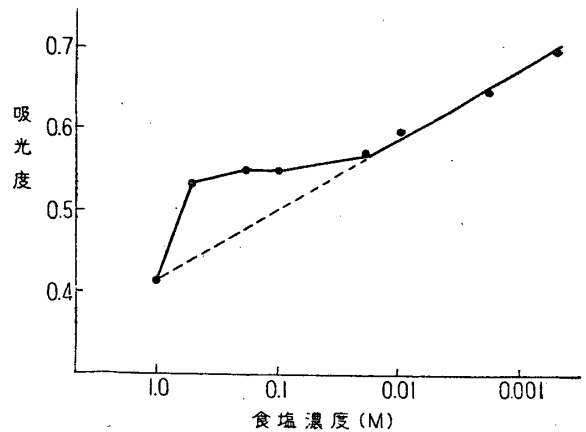
つぎにヒストンの代りにサルミンを用いて同様の実験をおこなった。サルミンと DNA とを混合する時、その混合比が 0.55 までは溶液は透明であるが、1.5 では乳光を示し、2.8 以上では乳光がふたたびごく微弱になる。紫外吸収スペクトルに示される傾向は前の場合と似ている。しかし、その吸収増加率はヒストンにくらべて少ないことが明らかであつた。第 25 図にこの結果も図示してある。



第 25 図 ヒストンあるいはプロタミンを加えることによつておこる DNA の紫外吸収増加率 (白印 260 mμ, 黒印 230 mμ)。

第 25 図からつぎのことが明らかである。第一は、ヒストン 3 とヒストン 6 A の場合に、紫外吸収増加率と、DNA との混合比との関係が一致していることである。第二は、サルミンによる増加率がヒストンに比べてずつと少ないことである。

つぎに DNA とヒストンの混合溶液に食塩水を加えてその 260 mμ での吸収の変化をしらべた。0.03% の DNA の蒸留水溶液に大体同じ濃度のヒストン水溶液を等容加え、さらにこれに種々の濃度の食塩水を加えてから紫外吸収の測定をおこなつた。食塩濃度が 1 M 以上では溶液は透明で、0.5 M から 0.1 M の間ではごくわずかな乳光がみられ、それ以下ではまた透明である。結果を第 26 図に示した。



第 26 図 DNA-ヒストン混合水溶液の紫外吸収のつよさに対する食塩の影響

この図をみると、1 M 食塩水中ではその 260 mμ での紫外吸収のつよさは DNA のそれに大体ひとしく (厳密にはヒストンの吸収との加成性がなり立っているがヒストンの吸収はこのていどの濃度ではごく弱い)、0.5 M までの間で急に増加し、0.02 M から以下では大体食塩の濃度の対数に逆比例して増加する。この直線部分をのばすと 1 M の吸収の点を通る。このことから、DNA-ヒストン混合水溶液の紫外吸収は、食塩濃度の対数に逆比例するものようで、これは Blout らが⁷⁶⁾ DNA 溶液を用いた実験結果と類似している。ただし、ヒストンが共存すると 0.10 M から 0.5 M くらいの間は沈澱するまでにはいたらないが比較的大きな粒子を生じ、その結果とくに散乱がよくなつて直線から外れて大きな値がえられたのであらうと思われる*。

これらの結果から考えられることは、DNA とヒストンあるいはプロタミンとの混合によりおこ

* DNA の 1 M 食塩水溶液の紫外吸収はその蒸留水溶液に比べて少ない。

る紫外吸収の増大現象は、両者が結合して溶液内にかなり大きな粒子状のものを生じ、その散乱効果によるのではないかということである。このことを明らかにする目的でまず粘度の測定をおこなった。実験の精度の点からは DNA 濃度を少なくとも 1/100% にすることが望ましいが、この濃度の DNA 水溶液にヒストンの水溶液を加えると、ヒストン量が少なくてもにごりを生じたり乳光を呈したりして実験ができなかつた。そこで定性的な傾向を知るに止めて、DNA の 0.002% ていどの水溶液についてヒストンを加えた時と加えない時で粘度の変化を見た。その結果、ヒストン: DNA がおよそ 1 の時には溶液の比粘度が 0.015 であるのに対して、ヒストンを加えると 0.011 になり、何回かの実験で大体粘度低下の傾向が明らかのようにあつた。この結果は、今までの他の研究者の報告にみられる傾向⁴⁷⁾⁶⁴⁾と一致しており、蛋白が DNA と結合をおこした結果 DNA 分子よりも対称性の高い分子ができたか、あるいは両者の相互作用の結果として DNA 分子の変形を来したためであると思われる。

つぎに DNA とヒストンとの混合溶液の散乱光のつよさを測定した結果をのべる*。DNA はニシン精虫より精製した試料で、1 mg/cc に蒸留水にとかし、24 時間蒸留水に対し冷室で透析した。これを 30 倍に蒸留水でうすめた。ヒストンは 6A という分画 (アルギニンに富む) を蒸留水にとかし、DNA と同様にして約 30 r/cc の溶液とした。これらの溶液を 1:1, 1:0.7, 1:0.5, にそれぞれ混合し、蒸留水で一定量にして DNA 濃度を 15 r/cc にそろえた。別に DNA とヒストン溶液での測定もおこなつた。散乱光の測定は Brice-Phoenix 1000 D 型散乱測定装置でおこなつた。第 21 表にその結果を示す。表中の R_G は 436 m μ での 0° 方向 (透過光) と 90° 方向 (散乱光) のつよさの比を示す値で、蒸留水のみでの測定値をおのおのから差引いたものである。

この表から、DNA 濃度は同じでもヒストンが加わると散乱光が目立つて増大することが明らかである。散乱光のつよさは波長の 4 乗に逆比例するから、紫外部での散乱光はこれよりずっと大き

第 21 表 DNA とヒストンとの混合水溶液の散乱

No.	ヒストン DNA との混合比*	R_G	DNA 溶液を単位とした時の相対値
1	0 (DNA 溶液)	7.0×10^{-3}	1.1
2	0.5 : 1	10.9×10^{-2}	15.5
3	0.7 : 1	32.2×10^{-2}	40.6
4	1 : 1	54.3×10^{-2}	77.4
5	ヒストン溶液	3.0×10^{-2}	4.2 ₅

* 1, 2, 5 の溶液は完全に透明。3, 4 の溶液にはごくわずかな乳光がみられる。

く、前にのべた紫外吸収の増加現象には散乱の効果が大いに関係しているものと思われる。

VI DNA と塩基性蛋白質との相互作用についての考察

DNA と塩基性物質との相互作用は、かなり多くの物質についてしらべられている。蛋白質としてはヒストン⁶²⁾、プロタミン⁶⁴⁾、あるいはリゾチーム⁷⁶⁾、DNase⁷⁷⁾などで、これらは DNA と沈澱性の複合体をつくる性質がある。このほか、人工の塩基性高分子であるポリリジン、ポリヒスチジンも塩基性蛋白質と類似の挙動をとることが知られている⁸⁶⁾。またローザニリン、アミノアクリジン、メチルグリーンなどの色素類、ストレプトマイシン、および La のような金属陽イオンとの間にもつよい相互作用がある³⁰⁾。

われわれはヒストンまたわプロタミンと DNA との相互作用を、両者を混合することによつておこる現象を化学的に研究することにより明らかにした。DNA と塩基性蛋白質との相互作用は溶媒のイオン強度によつていちぢるしく左右される。第三章ですでのべたように、高濃度の食塩水中では両成分は解離現象を示していることが種々の実験から明らかであつて、かかる条件下では両者の間の相互作用はごく弱いものと考えてもよいと思われる。

食塩水濃度を 0.14 M まで下げるとと大部分の DNP が不溶性になつて沈澱するが、DNA と塩基性蛋白質とをこの濃度の下で混合すると以下にのべるような条件がそろえば両者の結合物が糸状沈澱を形成することが明らかとなつた。われわれはまず 0.14 M 食塩水中で DNA とヒストンあるいはプロタミンが複合体を作つて沈澱するために必要な種々の条件について研究をおこない、生成さ

* 散乱の測定は宇井信生氏にいただいた。

れた人工複合体に DNase を作用せしめてその化学的性質について検討した。さらに、蒸留水中で両成分を低濃度で混合して沈澱を形成せずに溶けている状態でも両者の間に相互作用が認められることがわかった。

1) 0.14 M 食塩水中での結果の考察

今のべたように、DNA と塩基性蛋白質との間の相互作用のていどは、溶媒の食塩濃度によつていちぢるしく影響をうけるが、0.14 M 食塩水中で両者を混合して人工的に DNA-蛋白質複合体沈澱を作らせる実験結果から、沈澱の生成についてはなおつぎのような要因が関与していることがわかった。

1. 溶液の pH
2. DNA, 蛋白質それぞれの濃度.
3. DNA の分子状態.
4. DNA と蛋白との量の比 (混合比).

まず DNA と蛋白質との混合比と沈澱形成との関連性について、われわれは蛋白質としてクルペイン (第 14 図), サルミン (第 15 図), およびヒストンの諸分画 (第 17, 18, 19 図) を用いて研究し、参考として DNA のかわりに PNA を用いた実験もおこなつた (第 16 図, 第 20 図). これらの実験結果からえられた結論は、DNA の (あるいは PNA の) ある量に対して、それに適当な量以上の蛋白を加えると DNA-蛋白の人工複合体が糸状沈澱としてえられるが、蛋白が過少であると沈澱が不完全で、糸状沈澱とならなかつたり、乳濁するに止まつたりし、また沈澱量も少ない。第二章でのべたが、ニシン精虫の 1M 食塩水抽出液に蒸留水を加えて食塩濃度を 0.14 M に下げた時に DNP の沈澱がみられなかつた現象は、おそらくは抽出された DNA とクルペインとの量の間の不均衡性によるものであらうと思われる*。

われわれがえた結果と類似した結果を DNA とサルミンを水溶液で混合した実験⁶⁴⁾, および DNA とポリリジンのような合成塩基性高分子とを水中で混合した実験⁷²⁾ でえたことを外国の研究者が報告している。いづれの場合にもわれわれがえた結

* 蛋白質が DNA に対して過剰になつても沈澱の形成を阻げる場合があるように思われる (第 12 表参照)。

論のように、両成分の量の比率がどちらか一方にかたよると一般的に沈澱の形成がおこりにくくなる。われわれの結果では DNA の代りに PNA を用いても DNA とほぼ同様の結果がえられた。このような点からみると上にのべたような性質は一般的に酸性の高分子である核酸と、塩基性高分子物質とに共通的な性質であるように思われる。ただし、両成分の混合比と、沈澱量との関係を示す曲線の形は蛋白の種類によつて異なる。クルペインとサルミンの間には格別の差異がみられないが、これらのプロタミン、ヒストンのアルギニンに富む分画、およびヒストンのリジンに富む分画などの間には明らかな差が認められた。この差は、主として核酸に対する蛋白質の最大結合量の相異によるものと思われるが、この点についての考察はのちにのべる。

DNA と塩基性蛋白質とを混合して糸状の人工複合体を形成するときには、それらの量の比の関係のほかにも第 17 表にみられるように両成分の濃度が関係をもち、濃度の低いところでは糸状沈澱をつくらない。また、第 18 表の結果から、pH が極端に酸性か塩基性かにかたよつているときにも糸状沈澱を作らない。さらに、DNA を加温処理したり、酸もしくはわアルカリ処理をすとも早糸状沈澱を作らなくなることから、DNA の分子状態も関連しているようである。DNA よりもはるかに分子量の小さいコーボの PNA⁶⁵⁾ は糸状沈澱を作らないが、ウシ肝臓からグアニジン法⁷³⁾ で精製した高分子の PNA⁷³⁾ とプロタミンとから作られた沈澱は DNA と、コーボの PNA との中間的な状態である。このような事実からも核酸の分子状態との関連性が推察できる。

以上の点から考えると、DNA とプロタミンあるいはヒストンとの結合は両者の解離基による静電的相互作用の結果であるものと思われる。溶媒の塩類濃度が低くなると、DNA の磷酸基および蛋白の遊離アミノ基との間の相互作用がよまり、結合がおこつて溶解度が減少して沈澱が生成するのであらう。両成分の量の間に不均衡性がある時には、電荷の中和が完全におこらないために沈澱形成がおこりにくいと考えられる。

2. 塩基性蛋白質の結合量

第 14 図, 第 15 図, および第 18 図から DNA

に対してのプロタミンおよびヒストン 6B の最大結合量が実験的にもとめられている。第 14 表からこれらの値は、DNA の量 1 に対してクルペインとサルミンでは 0.67, ヒストン 6B では 1.5 である。ヒストン 6A については最大結合量はあまりはつきりしないが、DNA の 2.5 倍くらいと思われる。

DNA と蛋白との結合がそれらの解離基によつておこなわれ、かつそれらが 1:1 の結合をするものとして塩基性蛋白質の結合量を計算し上に示した実験値と比較してみる。まずクルペインとサルミンのアルギニン含量はそれぞれ 87%, 88% で⁷⁴⁾、アルギニン以外には塩基性アミノ酸を含んでいない。いつぼう DNA のモノヌクレオチドの平均分子量を 330 として計算すると、アルギニンの分子量は 174 であるから、DNA とクルペインあるいはサルミンとの結合比はそれぞれ 1:0.61 および 1:0.60 となり、上に示した実験的な最大結合量およびヌクレオクルペイン、ヌクレオサルミンの分析値 (第 14 表) とほぼ一致している。この値はまた Felix や⁴¹⁾ Vendrely ら⁵⁴⁾ の分析値ともほぼ一致しているが、厳密には第 14 表にみられるように生体から精製したヌクレオプロタミンのプロタミン量は実験的にもとめた最大結合量、あるいは上述の計算値よりもいくらかプロタミンが少ないようである (文献 54 および 64 参照)。

ヒストンについての計算は、それが数種の塩基性アミノ酸残基を含み、かつ、酸性アミノ酸残基も有しているからプロタミンに比べてはかにかえにくい。ヒストンの各分画のアミノ酸組成の分析値に Daly らのえた値⁶²⁾を用い、プロタミンの時と同様の計算をおこなうと、アルギニンに富む分画と、リジンに富む分画との DNA に対する当量結合物の N:P はそれぞれ 4.0 および 4.2 と算出される。この値はコウシ胸腺ヌクレオヒストンの分析値とはよく一致しているが (第 7 表)、人工複合体の N:P (アルギニンに富む分画ではおよそ 6, リジンに富む分画では 4.4) ことにアルギニンに富む分画のそれとはまったく一致しない。したがつてこの分画と DNA との結合は前記のべた仮定のみでおこなわれていないと考えられるが、リジンに富む分画の最大結合量が、アルギ

ニンに富む分画のそれに比べてかなり少ないことと、両分画の塩基性アミノ酸の数との間には定性的には平行関係が見出される*。

3) 人工複合体に対する DNase 作用

DNA と蛋白質との人工複合体に DNase を作用せしめた結果 (第 21 図), 一般的には蛋白質を含む割合が少ないほど DNase 作用をうけ易いことが明らかになった。この現象は DNA 分子の DNase 作用をうける場所が蛋白によつておおわれてしまうために作用をうけにくくなるものと考えれば理解できる。この DNase の阻害作用は蛋白の種類により異なるが、このことについては後にのべる。Bakay らは⁵⁵⁾コウシ胸腺ヌクレオヒストンに DNase を 24 時間作用せしめたがそれでもなお DNA を完全に分解することができなかつた。この結果はわれわれの実験結果とも一致している。Davison らは⁵⁶⁾コウシ胸腺ヌクレオヒストンの DNA には遊離のリン酸基が 10% くらい残つていて、これがトルイジンブルーのような塩基性色素と結合することができると報告している。DNase もそれ自体 DNA と結合して複合体を作るが⁷⁷⁾ (Mg イオンが存在しないとき), 蛋白量の少ない DNA-蛋白複合体にも DNase がこの空いているリン酸基にまず結合をおこして作用するのではないかと考えられる。

4) 蒸留水中における相互作用

DNA と塩基性蛋白質の濃度が比較的高いときには、それらを蒸留水中で混合すると沈澱を生じる⁶⁴⁾。しかしながら濃度をごくうすくすると透明な混合溶液がえられる。われわれはこの透明な混合溶液の紫外吸収のつよさが、両成分それぞれの吸収の和よりも大巾に増加していることを見出した。吸収の増加率は短波長側でことにいちぢるしく (第 25 図), かつ、DNA やヒストンそれら自体の吸収がほとんどない 300 m μ 以上でもかなりの吸収がみられるよとから考えて、この吸収増加はおそらく散乱光に由来するのではないかと考え

* DNA と結合するヒストンの遊離アミノ基の数を、その塩基性アミノ酸残基と、酸性アミノ酸残基との差と考えると、アルギニンに富む分画は DNA の約 2.2 倍、リジンに富む分画は 1.0 倍と結合しうる。この値は実験的にもとめられた最大結合量 (第 14 表参照) に比較的近い。

られたが、これは散乱の測定を Brice-Phoenix の装置で測定した結果 (第 20 表) DNA とヒストンの混合溶液が非常につよい散乱効果を有することが明らかになつてたしかめられたか。かかるつよい散乱を示すのは、おそらくは蒸留水中で DNA と塩基性蛋白質との相互作用の結果、比較的大きな粒子状のもの*が生じていることを暗示していると思われる。

DNA 自体の吸収のつよさは、pH、塩類の存在、あるいは DNA の分子状態など多くの要因によつて変化するので⁷⁸⁾きわめて複雑であるが、蛋白質が共存すると吸収の減少がみられるといわれている^{76), 79), 80)}***。Blout らは⁷⁶⁾、食塩でも、蛋白質でもかかる紫外吸収の減少する現象から、その原因が電解質一般の性質によるものと考えている。われわれの測定では、まったく反対に吸収増加現象がみられたが、これはかりに真の吸収減少の効果があつたとしても、相互作用によつて生成された粒子による散乱効果がこれを上まわつているためであると考えられる。最近 Klammerth も⁸¹⁾、DNA とヒストン混合溶液の紫外吸収にかなりの増が認められることを報告している***。

5) DNA との相互作用に関して認められた蛋白質間の相異

以上にのべた DNA と種々の塩基性蛋白質との相互作用についての実験結果から、量的な面で蛋白質にそのアミノ酸組成や分子状態と相互作用のつよさとの関連性があるように思われるのでそれについての考察をおこなう。結論的には、クルペインとサルミンとはアミノ酸組成にもそれほどちがいがなく今までの結果からは DNA との相互作用についての差も見出せなかつたから、これらはプロタミンとして一括すると、リジンに富むヒストン分画がプロタミンと、アルギニンに富むヒストン分画との中間的位置を占めているといわれる。このことはつぎの諸結果から推定さ

れた。(1) 0.14M 食塩水中における DNA との人工複合体の沈澱曲線の形が、ヒストン 6A およびヒストン 3 (アルギニンに富む。第 17, 19 図) にくらべてヒストン 6B (リジンに富む。第 18, 19 図) はプロタミンでえた曲線と類似している。この場合ヒストン 3 に含まれる多少のリジンに富む分画*の性質は、アルギニンに富む分画の性質によつておおわれてあきらかではない。(2) DNA-蛋白質複合体に対する DNase の作用のていどからみると、やはり同様のことがいえる(第 21 図)。この場合ヒストン 3 の示す性質はそのうちに含まれている多少のリジンに富む分画の影響を大きくうけていることがわかる。(3) 蒸留水中で DNA と混合することによつて現われる紫外吸収の増加現象については、ヒストンは 3 はヒストン 6A とまったく同じ程度で、この際はリジンに富む分画の影響がまったくあらわれていない。(4) 0.14M 食塩水中で DNA と混合する時に生成される沈澱の感じは、アルギニンに富むヒストンではかなり粗いが、リジンに富むヒストンではプロタミンの時と似て比較的ち密な感じがある。

以上の点から考えると塩基性蛋白質と DNA との結合、あるいは結合体の性質は蛋白質の有する電荷と、分子の大きさとの関係がありそうに思われる。第 19 表の結果から、アルギニンに富むヒストン分画とプロタミンとが共存する時には**、それらの量の比にかかわらずプロタミンが優先的に DNA と結合することがわかる。このことから DNA との結合に関しては蛋白質の電荷の大きいほうが優先して、分子量の大きさはこのていどの差ではあまり関係しないように見える。人工複合体に対する DNase 作用をしらべた実験からは、電荷密度の大きいものほど DNase の阻害作用がよよく、電荷密度が小さく、分子量の大きなものは阻害作用が少ない。しかしながら、蒸留水中における DNA との混合溶液の紫外吸収増加現象には分子量の大きさが関係しているらしい。このことはかかる吸収増加現象が光の散乱効果によるものであろうという推論と矛盾しないと考えられる。

* 実際に粒子であるかどうかは実証していないが、それに近いようなものであると思われるのでここでは一応粒子ということばを用いた。

** Davies は⁷⁹⁾ DNA とヒストンの混合溶液の紫外吸収には加成性がなり立つと報告している。

*** この論文には溶媒の記載がないがおそらく水であろうと思われる。彼は、散乱光の補正をしてもなお吸収の増加が認められるといっている。

* およそ 20% くらいであろうと思われる⁸²⁾。

** アルギニンに富むヒストン分画、リジンに富むヒストン分画、およびプロタミンの分子量はそれぞれ 37,000, 8,400, ca 5,000 という結果が宇井によつてえられている^{10), 11)}。

結 び

この報告でのべられている研究結果をまとめるとつぎのようになる。

(1) ニシン, サケ, およびニジマスのような魚の精虫からは DNP を 1.5 ないし 2 M 食塩水で抽出することができる。1 M 食塩水を用いるのはあまり好ましくないようであつた。小麦胚からは 1.5 M 食塩水で DNH を抽出できる。これらの DNP は蒸留水を用いては抽出できなかつた。コウシ胸腺の DNH は 1 M 食塩水でも, 蒸留水でも抽出が可能であつた。以上の DNP はいづれも食塩濃度を 0.5 M ないし 0.14 M にまで下げると沈澱するので, これによつて DNP の精製をおこなうことができた。オウシ精虫からは蒸留水でも食塩水でも DNP を抽出することができなかつた。

(2) 上に記した DNP は, DNA と塩基性の蛋白質(プロタミンかヒストン)とから成つていて, その分析結果から, ニシン精虫の DNP (ヌクレオクルペイン) は DNA を約 60% ふくみ, サケ精虫およびニジマス精虫の DNP (それぞれヌクレオサルミン, ヌクレオイリジン) は DNA を約 70% 含んでいる。コウシ胸腺の DNH では DNA が 46%, 小麦胚の DNH では 35% 含まれる。これらの分析値は他の研究者のえた値と大差なく, まず妥当な値であると思われる。

(3) DNP の DNA と蛋白質とは高濃度の食塩水中では解離している。このことは透析, 超遠心機などの実験によりたしかめられた。

(4) DNP は一般的にいうと 1 M 以上の食塩水には溶解する。ただし, 食塩濃度がこくになると蛋白質が塩析されてとけにくくなる。この溶解性の状況は DNP の種類によつて多少の相異がみられた。食塩濃度が 0.5 M から 0.14 M の間では DNP はきわめてとけにくい。蒸留水にはコウシ胸腺の DNH はとけるが経年変化してとけなくなることが多い。ヌクレオプロタミンもわずかしかとけないが, とけにくくなつた DNH 同様に蒸留水中では均一な浮游液をつくる。0.14 M ないし 0.5 M 食塩水中ではこの現象がみられない。

(5) DNA とヒストンまたはプロタミンを 0.14 M 食塩水中で混合すると両者の結合した複

合体を作つて沈澱する。沈澱の生成は, 両者の濃度, pH, 蛋白質と DNA との混合比, DNA の分子状態の如何などの要因によつて影響をうける。両成分の結合比はまたこれらの要因によりかわりうるが, 適当な条件下では DNA と蛋白質がそれぞれの磷酸基およびアミノ基が中和しあうような量の比の複合体を形成する。この人工複合体と, 生体からえられた DNP との組成をくらべてみると, ヌクレオプロタミンでは計算した人工の中和複合体にくらべてわずかに DNA が多く, ヌクレオヒストンはかなり多い。その結果, ヌクレオプロタミンやヌクレオヒストンは酸性の遊離解離基をもつていると思われる。

(6) DNA-蛋白質の人工複合体に DNase を作用させると, DNA が分解される度合は複合体の蛋白質と DNA の量の比, および蛋白質の種類によつて大いに異なる。一般的には蛋白質量が DNA に比べて多いほど DNase 作用を妨害する程度が大きく, 電荷密度の高いプロタミンやリジンに富むヒストン分画にこの阻害度が大きく, 電荷密度が小さく, 分子量の大きなアルギニンに富むヒストン分画は阻害度が小さい。

(7) DNA と塩基性蛋白質との相互作用は蒸留水中でもみられる。両者の濃度があるていど以上高ければ沈澱現象をおこすが, 濃度が低くてとけている状態でも紫外吸収の加成性がなり立たないでかなりのていどの吸収増加現象がみられる。食塩添加によりこの吸収は食塩濃度の対数に逆比例して減少する傾向がある。DNA の粘度は蛋白質を加えると減少するらしく, また散乱光が蛋白質を加えると強くなる結果から, さきの紫外吸収の増加現象は蒸留水中に生成された比較的大きな DNA-蛋白質複合体粒子による散乱によるためであろうと思われる。

以上の諸結果を総合すると DNA と塩基性蛋白質との相互作用, さらに DNase の性状がかなり明らかになつたように思われる。すなわち, 両者はお互に荷電の性質のことなつた高分子電解質で, 第一近似的には両者の電荷の中和という形で相互作用がみられる。人工的にもかかる中和複合体を作りうるが, 生体からとり出した DNP は一般的にこの中和複合体よりも蛋白質量が少なく酸性基が遊離状態でのこされているものようであ

る。DNA と蛋白とが高分子の電解質であるから相互作用の結果三次元の構造を作りやすく、濃度がこければ糸状の沈澱となり、うすくても強い乳光（散乱光）を示すような粒子にまで発達しやすい。

研究室の川出は、沈降や粘度の測定によつて DNA や DNP の精製過程での変化および DNA とヒストンやプロタミンとの相互作用を物理化学的に研究してきたが⁹⁾、その結果で著者がこの報告でのべた実験結果が矛盾することなく説明されることが多い。

DNP の問題に関してこれからの化学的および物理化学的な研究で着目しなくてはならないと思われることは、第一は近年になつて DNA の側にも蛋白の側にもその精製された試料の不均一性が証明されていることである。現に、この報告でものべたように、ヒストンには宇井をはじめとして^{10), 11)}、何人かの研究者達によりアミノ酸組成が異なる分画にわけられることが見出され、かつ、それらの分画は分子量、会合性、あるいは DNA との相互作用の強さなどの点でも性質が異なることが明らかになつている。いつぼう、DNA についても、Bendich⁸²⁾ あるいは Main ら⁸³⁾によつて化学的にその不均一性がはつきりしてきたようである。このような事実から、DNA と塩基性蛋白との相互作用がそれらの分画同志でいろいろと異なつていることがあるかもしれないと予想される。たとえば川出は DNA とヒストン I とには 1 M 食塩水中でつよい相互作用がみられるが、ヒストン II との間にはほとんどみられないことを見出した⁹⁾。本報告で著者も DNA との相互作用の点でヒストンの分画の間に差があることを見出した。両方の分画についてこのような研究をおしすすめると、両者の間には予想もしなかつたような新しい相互作用の形態がみられるようになるかもしれない。

第二の点は PNA と蛋白との問題である。著者が今まで実験をおこなつたかぎりでは、PNA とヒストンやプロタミンとの間の相互作用には DNA とくらべて特に目新しい事実は見出せなかつた。しかしながら、著者の属している渡辺研究室でもすでに研究をおこなつているが、近年は PNA の抽出・精製法も改良されて数十万の分子

量をもつ高分子の PNA がえられるようになり⁷³⁾ また塩基組成が多少異なる分画にわけられることもできるようになつた⁸⁴⁾。このような状況のもとでの実験がまだ行なわれていないのでなお今後研究の余地が残されていると思う。

第三の点は、天然に見出される DNP の中には、DNA と塩基性蛋白との複合体とみられるもの以外のものがあることである。たとえばトリ型結核菌からとり出した DNP の蛋白は塩基性ではなく、高濃度の食塩水中でも解離の現象を示さない⁸⁵⁾。さらにウイルス類にも塩基性の蛋白質らしいものは見出されていない。このような DNA と酸性蛋白とが生体の中でどのような状態で存在しているかということについての研究は今までほとんどなされていないのでまったく不明であるが、将来生物化学として重要な研究となりうると思う。なお、PNA と蛋白との結合体が今まで生体から単離された例もあるが、この蛋白質はやはり酸性であつて、DNA と酸性蛋白とで形成されている DNP と同様に細胞の構造や生理作用、さらにはウイルスの構造などを解いてゆくうえにもその研究が要望されている。

文 献

- 1) 江上不二夫編：“核酸及び核蛋白質”，上巻，下巻，共立出版株式会社（1951）。
- 2) E. Chargaff, J. N. Davidson, (ed): “Nucleic Acids” Vols. 1 and 2. Academic Press. (1955).
- 3) W. M. Stanley: Science, **81** (1935) 644.
- 3a) F. C. Bawden, N. W. Pirie, J. D. Bernal, J. F. Fankuchen: Nature, **138** (1936) 1051.
- 4) O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty: J. Exp. Med., **79** (1944) 137.
- 5) A. D. Hershey, M. Chase: J. Gen. Physiol., **36** (1952) 39.
- 6) A. E. Mirsky, H. Ris: J. Gen. Physiol., **31** (1947) 1.
- 7) H. Ris, A. E. Mirsky: J. Gen. Physiol., **31** (1947) 7.
- 8) G. H. Hogeboom, W. C. Schneider: in “Nucleic Acids” Edited by E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press Vol. 2 (1959) 199.
- 9) 川出由己: 東京大学理工学研究所報告, **10**(1956)

- 149.
- 10) 宇井信生: *Biochim. et Biophys. Acta*, **22** (1956) 205.
- 11) 宇井信生: 東京大学理工学研究所報告, **8** (1955) 255.
- 12) 渡辺格, 宇井信生: 東京大学放射線化学研究所報告, **5** (19) 17.
- 13) E. J. King: *Biochem. J.*, **26** (1932) 292.
- 14) S. E. Kerr, K. Seraidarian: *J. Biol. Chem.*, **159** (1945) 211.
- 15) G. L. Miller, R. H. Golder, E. E. Miller: *Anal. Chem.*, **23** (1951) 903.
- 16) F. Seibert: *J. Biol. Chem.*, **133** (1940) 593.
- 17) G. Ceriotti: *J. Biol. Chem.*, **198** (1952) 297.
- 18) G. Schmidt, S. J. Thannhauser: *J. Biol. Chem.*, **161** (1945) 83.
- 19) Y. Moulé: *Arch. Sci. Physiol.*, **1** (1954) 241.
- 20) G. R. Wyatt: *Biochem. J.* **48** (1951) 581.
- 21) G. R. Wyatt, S. S. Cohen: *Nature*, **170** (1952) 1072.
- 22) G. R. Wyatt: *Biochem. J.*, **48** (1951) 585.
- 23) L. Lilienfeld: *Z. physiol. Chemie*, **18** (1893) 473.
- 24) W. Huiskamp: *Z. physiol. Chemie*, **32** (1901) 145.
- 25) R. O. Carter, J. L. Hall: *J. Am. Chem. Soc.*, **62** (1940) 1194.
- 26) P. Doty, G. Zubay: *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 6207.
- 27) I. Bang: *Z. physiol. Chemie*, **30** (1900) 509.
- 28) A. E. Mirsky, A. W. Pollister: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **28** (1942) 344.
- 29) 渡辺 格, 鈴木撃之: 江上不二夫編 “核酸及び核蛋白質” 上巻, 共立出版 (1951) 165 頁.
- 30) E. Chargaff: “Nucleic Acids” edited by E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, **Vol. 1** (1955) 307.
- 31) M. Kunitz: *J. Gen. Physiol.*, **33** (1950) 349, 363.
- 32) G. Schmidt: “Nucleic Acids” edited by E. Chargaff, J. N. Davidson, **Vol. 1**. Academic Press, (1955) 555.
- 33) 渡辺 格, 鈴木撃之: 日化誌, **72** (1951) 578.
- 34) 鈴木撃之, 渡辺 格: 日化誌, **73** (1952) 778.
- 35) M. G. Sevag, D. B. Lackman, J. Smolens: *J. Biol. Chem.*, **124** (1938) 425.
- 36) 鈴木撃之: 日化誌, **77** (1956) 1098.
- 37) 鈴木撃之: 日化誌, **78** (1957) 1058.
- 38) A. E. Mirsky, A. W. Pollister: *J. Gen. Physiol.*, **30** (1946) 117.
- 39) E. Stedman, E. Stedman: *Philosoph. Trans. Royal Soc. London, Ser. B*, **235** (1951) 565.
- 40) R. Lipshitz, E. Chargaff: *Biochim. Biophys. Acta*, **19** (1956) 256.
- 41) K. Felix: *American Scientist*, **43** (1955) 431.
- 42) G. H. Hogeboom, W. C. Schneider: “Nucleic Acids” edited by E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, **Vol. 2**, (1955) 199.
- 43) J. Rotherham, D. D. Schottelius, J. L. Irvin, E. M. Irvin: *J. Biol. Chem.*, **223** (1956) 817.
- 44) 増井正幹: 日本生化学会総会にて講演, 昭和 32 年 7 月, 京都府立医大.
- 45) C. F. Crampton, E. Chargaff: *J. Biol. Chem.* **226** (1957) 157.
- 46) M. H. Bernstein, D. Mazia: *Biochim. Biophys. Acta*, **11** (1953) 59.
- 47) S. S. Cohen: *J. Biol. Chem.*, **158** (1945) 255.
- 48) M. H. Bernstein: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **42** (1956) 703.
- 49) E. Hammarsten: *Biochem. Z.*, **144** (1924) 383.
- 50) E. Stedman, E. Stedman: *Nature*, **152** (1943) 267.
- 51) 渡辺 格, 鈴木撃之: 日化誌, **72** (1951) 83.
- 52) 渡辺 格, 鈴木撃之, 北村とも子: 東京大学放射線化学研究所報告, 第 5 号 (1950) 6.
- 53) J. M. Luck, D. W. Kupke, A. Rhein, M. Hurd: *J. Biol. Chem.*, **205** (1953) 235.
- 54) C. Vendrely, A. Knobloch, R. Vendrely: *Biochim. Biophys. Acta*, **19** (1956) 472.
- 55) B. Bakay, J. J. Kolb, G. Toennies: *Arch. Biochem. Biophys.*, **58** (1955) 144.
- 56) G. Frick: *Biochim. Biophys. Acta*, **3** (1949) 103.
- 57) J. A. V. Butler, P. F. Davison, D. W. F. Janus, K. V. Shooter: *Biochim. Biophys. Acta*, **13** (1954) 224.
- 58) P. F. Davison, J. A. V. Butler: *Biochim. Biophys. Acta*, **21** (1956) 568.
- 59) P. F. Davison, D. W. James, K. V. S. Shooter, J. A. V. Butler: *Biochim. Biophys. Acta*, **15** (1954) 415.

- 60) J. A. V. Butler, P. F. Davison, D.W.F. James, K. V. Shooter: *Biochem. J.* **57** (1954) 24.
- 61) C. F. Crampton, S. Moore, W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, **215** (1955) 787.
- 62) M. M. Daly, A. E. Mirsky: *J. Gen. Physiol.*, **38** (1955) 405.
- 63) M. L. Petermann, C. M. Lamb: *J. Biol. Chem.*, **176** (1948) 685.
- 64) P. Alexander: *Biochim. Biophys. Acta*, **10** (1953) 596.
- 65) C. F. Crampton, R. Lipshitz, E. Chargaff: *J. Biol. Chem.*, **206** (1954) 499.
- 66) 渡辺 格, 磯晃二郎: *日化誌*, **71** (1949) 280.
- 67) 鈴木撃之: *東京大学理工学研究所報告*, **4** (1950) 231.
- 68) 鈴木撃之, 渡辺 格: *日化誌*, **73** (1952) 825.
- 69) 鈴木撃之, 渡辺 格: *日化誌*, **74** (1953) 689.
- 70) 鈴木撃之: *日化誌*, **77** (1956) 1098.
- 71) H. T. S. Britton, R. A. Robinson: *J. Chem. Soc.*, (1931) 458, 1456.
- 72) E. L. Grinnan, W. A. Mosher: *J. Biol. Chem.*, **191** (1951) 719.
- 73) 北村とも子, 渡辺 格: *日化誌*, **77** (1956) 1287.
- 74) R. J. Block, D. Bolling: *Arch. Biochem. 6* (1945) 419.
- 75) 安藤鋭郎, 岩井浩一: “核酸及び核蛋白質” 江上不二夫編, 上巻, (1951) 378.
- 76) E. R. Blout, A. Asadourian: *Biochim. Biophys. Acta*, **13** (1954) 161.
- 77) V. S. Shapot: *Biokhimiya*, **17** (1952) 299. *Chem. Abstr.*, **46** (1952) 10238 b.
- 78) G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson: “Nucleic Acids” Edited by E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, **Vol. 1**, (1955) 493.
- 79) H. G. Davies, M. P. B. Walker: *Prog. Biophys. Chem.*, **3** (1953) 195.
- 80) F. B. Seibert: *Discussions Faraday Soc.*, **13** (1953) 251.
- 81) O. Klammerth: *Z. Naturforsch.*, **12b** (1957) 186.
- 82) A. Bendich, P. J. Russel, Jr., G. R. Brown: *J. Biol. Chem.*, **203** (1953) 305.
- 83) R. K. Main, L. J. Cole: *Arch. Biochem. Biophys.*, **68** (1957) 186.
- 84) 三浦謹一郎, 鈴木撃之: *Biochim. Biophys. Acta*, **22** (1956) 565.
- 85) E. Chargaff, H. F. Sidel: *J. Biol. Chem.*, **177** (1949) 417.
- 86) P. Spitnik, R. Lipshitz, E. Chargaff: *J. Biol. Chem.*, **215** (1955) 765.
- 87) 宇井信生: *Bull. Chem. Soc. Japan*, in the press.
- 88) 宇井信生: *Biochim. et Biophys. Acta*, in the press.