

リボ核酸の分割分別に関する研究

三浦 謹一郎, 渡 辺 格

(1958年2月15日受理)

Studies on the Fractionation of Ribonucleic Acids

Kin-ichiro MIURA and Itaru WATANABE

(Received February 15, 1958)

ABSTRACT: In studying the heterogeneity of ribonucleic acid (RNA), we have fractionated RNA preparations by several mild methods.

Yeast RNA prepared by the method of Clarke and Schryver, whose molecular weight is about 20,000, was fractionated by the use of an ion-exchange resin, Dowex-2 chloride form. Elution was carried out by the stepwise increase in the concentration of sodium chloride up to 5M. Differences in molecular weight, which was determined by the surface film method, but not in nucleotide composition were found among the fractions thus obtained. It was suggested that the molecular size of a fraction determines the ease with which it was eluted by different concentrations of salt. By this method and with this preparation of RNA, we have been unable to obtain the RNA fractions with different nucleotide compositions.

Then, cellulose treated with epichlorohydrin and triethanolamine (ECTEOLA) was tested as an ion-exchanger for fractionating RNA. The results obtained were essentially same as in the case of Dowex-2, but the adsorption of RNA on ECTEOLA adsorbent and the recovery of the eluted RNA from it were a little better than in the case of the resin.

Recently, it has been found in our laboratory that highly polymerized RNA can be precipitated from neutral aqueous solution by high concentration of sodium chloride or by relatively low concentration of magnesium chloride. Highly polymerized yeast RNA prepared by the method of Crestfield, Smith, and Allen was fractionated by the precipitation with neutral salts. The fraction soluble in the concentrated salt solution was rich in its guanine and cytosine contents. It seemed that the easily precipitable fraction had higher molecular weight than the soluble one.

Thus it is now possible to fractionate any size of RNA into several fractions by the combination of the two methods, i. e. the fractional elution from ion-exchanger and the fractional precipitation with neutral salts.

I. 序

核酸はすべての生物細胞からウイルスに至るまで自己増殖を行う系に含まれていて特異性の伝達に重要な役割を果していると考えられる。核酸はその糖成分がデオキシリボースであるデオキシリボ核酸 (DNA) と糖成分がリボースであるリボ核酸 (RNA) の 2 種類に大別される。多くの細胞においてその特異性は DNA から RNA に伝えられ、これがさらにタンパク質に伝えられるという考え方をとると都合のよい場合が多い^{1),2)}。このような関連がある場合に特異性はおそらく DNA, RNA, タンパク質のそれぞれ、あるいはそれら相互のある種の結合体の構造のうえに反映しているに違いない。これらの物質それぞれの構造や機能についての知識を求めることは自己増殖系の特異性の伝達の機構を知るためにはぜひとも必要なことである。しかし核酸の研究はタンパク質の研究にくらべてかなりおくれしており、とくに RNA において甚だしい。そこで RNA の本態をきわめることは重要なことと思われるが、その一步としてわれわれは生物学的にみられる RNA の多様性が化学的立場からどのように説明できるかを一つの問題として取り上げてみた。

RNA はタンパク質の生合成に密接な関係をもつ物質であるが、その関与の仕方については種々の考え方がある³⁾。ある人々は RNA はタンパク質のアミノ酸配列順序をきめる鑄型としての役割を果していると考え、ある人々はペプチドの重合に必要なエネルギー供与体として役割を果すものではないかと考えている。Gale³⁾によればタンパク質の種類によつて RNA の同時合成を必要とするが、あるタンパク質の生成には RNA の同時合成は必要ではなく、抽出した RNA を添加することによつてタンパク合成が促進されるというようにその働き方もいろいろであることが考えられる。しかしいずれの場合にしても細胞のなかで合成される RNA はすべて同一であるかどうかは疑問で、むしろ種々なタンパク質に対応して特異的な RNA が多種類できていると考えられよう。

また、植物ウイルスや動物ウイルスでは感染時に RNA が支配的行動をとつて遺伝性を規定しているように見えるが、こういった場合の RNA は

普通細胞の中にある RNA とはかなり異つた性質のものであるとしてもやはりそれぞれのウイルスに特異的な性質を荷つていることはたしかである。そのほかの場合にもある特定の生物学的機能についてみた場合にその機能に特異的な RNA の存在が暗示されていることもあるし、種々な機能に対応させて RNA の多様性を考えなければならぬことも多い^{4),5),6),7)}。

一種類の細胞をとりあげて細胞核やミトコンドリアやマイクロゾームなどの顆粒に分割してみると RNA はこれらの各顆粒分割に見出される。このような細胞内の異つた場所にある RNA はそれぞれどのような性質をもっているだろうか。塩基組成分析の結果からはあまり相互には異ならないという人もあるが⁴⁾、多くの場合細胞内の RNA の塩基組成はおしなべて一色であるとは考えられない^{8),9),10),11),12)}。また、細胞内の RNA は代謝的にも不均一であることも知られている^{11),13),14),15),33)}。

このように種々な面から天然の RNA の多様性が考えられている。RNA の化学構造をみると塩基の組成やヌクレオチドの配列順序を考えても十分に多種類の RNA が存在する筈であるが、さらに高分子としての分子内や分子間の二次的結合を考慮した高分子構造においても変化に富むということはありうる。そこで実際に生物学的な多様性が化学構造上のどのような点に関係しているかを調べるための一つの行き方としてなるべくおだやかな方法で天然の状態のまま RNA を抽出してこれがどのような RNA 分子の集まりであるかを調べ、性質の異つたものをできるだけきれいに分別することを試みるという行き方があると思われる。RNA の化学構造の研究もこの方向の仕事の発展なしではむずかしいであろう。

RNA のような高分子電解質の調製品をとり上げてこれが均一であるかどうかは普通のコロイド物質の均一度の検定をする場合のように物理化学的方法ではいづらか調べられていた。RNA の溶液に超遠心力をかけて沈降状況を調べたり、拡散速度や電気泳動における挙動などがみられていて^{16),17),18),19),20)}、場合によつては試料がかなり不均一なときもあるが、性質の異つた分割を分別するということはできなかつた。Schramm²¹⁾は濾紙上で RNA の電気泳動を行つて分別を行い、

Hakim²³⁾ は electrophoresis convection によつて二三の分割に分別したが、これらの方法では分別するにも適用範囲がせまくて限度がある。

化学的方法としては Chantrenne²³⁾ が酸性アルコールによる分別沈澱を試みて、調製した RNA 標品が不均一であることを唱えて以来、Bacher と Allen²⁴⁾ や Mallet と Lamanna²⁵⁾ も酸性溶媒などによる分別沈澱を試みてきた。また、Khouvine ら²⁶⁾ はリボ核タンパクを酸性溶媒によつて分別沈澱させてからこれらの各分割核タンパク中の RNA を分析してその不均一さを論じている。RNA が酸やアルコールによつて沈澱しやすいためにこれらの分別操作では酸やアルコールが分別沈澱剤として用いられているが、RNA は酸に触れることによつてかなり変化をすることが考えられるので²⁵⁾ 分別操作の過程で試料 RNA が変化してしまうおそれがあり、そのために分別そのものまで意味のない操作をくり返している恐れが多分にある。そればかりでなく、これらの研究者の用いた RNA は抽出法にもかなり過激な条件が用いられている場合が多く、かなり分解した RNA 標品を扱っている恐れがないとはいえない。Ghuysen と Desreux²⁷⁾ は比較的温和な条件と思われる pH 5.5 で分別抽出することによつて酵母の RNA を分別して、分子量的には不均一であるが塩基組成があまり不均一でないことを見出した。しかしこのような点はその後さらに能率のよい分別法で、しかも天然の状態に近い RNA を用いて調べることはほとんど行われていなかった。

タンパク質のように構成アミノ酸の種類も多くて種類のちがう分子が相互にかなりちがった性質をとれる場合とは異り、RNA では種類のちがった分子があつても相互にあまりにもよく似ているらしい。また、酵素活性のようなはつきりした活性の目印がないこと、結晶しないことなどの困難さがこの RNA という鎖状高分子の分別をむずかしくしている。しかし、このような難点を克服し、今まで RNA の分別に試みられてきた方法とは違つて温和な条件下でさらに鋭い分別を行う方法を考え、また RNA もなるべく温和にとり出したものを試料として分割分別を行わねばならないだろう。

著者らは中性の pH でイオン交換樹脂、または

イオン交換繊維を利用した分別的溶離法と中性塩による分別沈澱法を始めて RNA の分別に用い、RNA 試料を分子量的に、あるいは塩基組成的に異つた分割に分割することができたのでここにこれらの結果をまとめることにしたい。ここでは他の多くの研究のある酵母の RNA を主として試料としたが、これは材料的にも得やすかつたためでもある。

最近吸着剤を利用したクロマトグラフが高分子物質の分離にもかなり使われている。Brown と Watson²⁸⁾ は塩基性タンパク質であるヒストンを珪藻土に吸着させたものに DNA を低い濃度の食塩水に溶かして注入してやると DNA は吸着され、順次食塩濃度を高めて行くと少しずつ分別的に溶離されることを見出した。このとき彼等は比較的分子量の市販の RNA は全く吸着されずに素通りしてしまうことを観察している。RNA ではまだ吸着剤による分別は行われていなかった。タンパク質などの高分子物質で相互にかなり性質の似通つたものでもイオン交換樹脂を用いれば温和な条件下にかなりよく分別できることを見出されてきつたあつたが、RNA は高分子電解質であるのでイオン交換樹脂で分別できるだろうと考えた。イオン交換樹脂であれば常に同一のものを入手することができ、使用方法も比較的簡単で、再現性などは他の一般の吸着剤にくらべてかなり高い筈である。種々の条件を検討した結果陰イオン交換樹脂 Dowex-2 を用いて RNA を吸着させ、食塩水を溶離溶媒として用いて分子量が 2~3 万程度のもので分別的に溶離させることができた。分別された RNA は分子量と塩基組成を調べたところ塩基組成的にはあまり相異がないが、分子量的には分布があることを知つた。この際少量の分別された試料の分子量を測定するために表面膜法を用いる工夫をした⁵¹⁾。この実験をほぼ終えた頃イオン交換繊維が出現し、このものはイオン交換樹脂より物質の吸着量が大きく、吸着、溶離の再現性が高いことや樹脂などにくらべて不純物の混入が少ないことなどの利点をもつことが知られた。Bendich ら²⁹⁾ はさつそくこれを DNA の分別に用いたところ非常によい回収率で分別的に溶離させることができた。著者も RNA の分別を試みたが、イオン交換樹脂の場合より回収率が若干

よくなる程度で、一旦吸着した RNA を 100% 温和な条件下に溶離することはできなかつた。しかし、このイオン交換繊維を用いる方法は分子量数万以下の小さな RNA の分別には非常に有効な方法であることを知つた。

イオン交換樹脂やイオン交換繊維などによる吸着、溶離によつては分子量の高い RNA を分別できなかつたが、近年高分子量の RNA が中性の塩類溶液で沈澱する場合があることが知られるようになってきたので^{(19), (20), (21), (22), (24)}、塩の濃度などを適当に加減すれば高分子量の RNA を分別的に沈澱させることができるのではないかと考えて試みたところ、適当な塩を用いれば高分子量 RNA も分割分別されることがわかつた。こうして分割に分けられたものは分子の大きさが異なるが、塩基組成的にもかなり異つた分割があることが見出された。

RNA が天然にどれほどの分子量をもっているものであるかは明らかでない。低分子量のものが活性をもつていて、高分子量のもの低分子量のものが会合したいわば貯蔵物の形であるのだろうか。高分子量のもの活性をもつているのであつて、低分子量のものは分解産物か前駆体であるのだろうか。あるいは実際生細胞中には低分子量の RNA も高分子量の RNA も存在していてもそれぞれある種の機能を果しているのであろうか。そのような問題は現状でははつきりしないがこういった問題の解決のためにも RNA のよい分割分別法が必要である。ここに得られた二種類の RNA をいくつかの分割に分つことができる。ここには以上の研究の経緯をまとめることにする。

この研究をまとめるに当りいろいろと御援助をいただいた当研究室の鈴木學之*、川出由己**、北村とも子の諸兄姉に深く感謝する。また、当研究所安藤鋭郎教授と石井信一氏にはいろいろ討論していただいたので厚く感謝の意を表したい。

研究費の一部は文部省科学研究費、とくに総合研究“核酸および核蛋白質”研究班の経費によつた。

II. 試料及び方法

II・1 試料

ここでの研究には主として酵母の RNA が用いられたが、その他数種の材料からの RNA も用いられた。酵母の RNA は古くから多くの人々がいろいろ性質をしらべ、調製品 RNA としてはあたかも代表的なもののように考えられている。それは材料としても得やすいことと酵母細胞中の RNA/DNA の量比が他の材料に比べて圧倒的に高い値を示すために DNA の混入をかなりよく避けて抽出できることによると思われる。いずれにしても調べられている多くの性質を参照できるといふ点では他の調製品 RNA の追従を許さない。しかし、RNA ではまだこれが絶対的によい方法だといえる調製法がなく、材料によつても調製の難易はまちまちである⁽²⁵⁾。これらの調製法の検討改善は当研究室でも北村が中心となつて川出、三浦が協力して進めてきたが、これらの問題はまた別の機会にまとめられるであろう。

ここでの研究では最在最も温和に調製されると考えられる方法によつて調製された RNA を主として用いたが、比較のために別の方法による試料もいく種類か用いた。

用いた RNA, DNA 試料の塩基組成分析は II 3 に記す方法によつて行つたが、分析結果は第 1, 2, 3 表にまとめた。

第1表 ウシ肝 RNA の塩基組成

調製品番号*		9 b	9 d	10a	10b
塩基組成	グアニン(G)	1.63	1.69	1.67	1.79
	アデニン(A)	1.00	1.00	1.00	1.00
	シトシン(C)	1.76	1.64	1.68	1.70
	ウラシル(U)	0.99	0.98	0.95	1.05
塩基比	G/C	0.93	1.03	0.99	1.05
	A/U	1.04	1.02	1.06	0.95
	G+U/A+C	0.96	1.02	0.98	1.05
	Pu/Py***	0.97	1.03	1.02	1.01
	G+C/A+U	1.73	1.69	1.72	1.70
分析回数		4	6	4	6

* 全部接頭に RNA, BL- がつく。

** アデニンを 1.00 とした場合のモル比で表す。

*** Pu: プリン; Py: ピリミジン。

* 現在 国立放射線医学総合研究所

** 現在 京都大学ウイルス研究所

第2表 酵母 RNA の塩基組成

調製品の種類*		市 販 品			渡 辺 研 究 室 の 調 製 品					
		キ リ ン 科 研			Merck	2A-1	6	7	8	9
		K1	K2	K3						
塩** 基 組 成	グアニン(G)	1.06	1.08	1.08	1.16	1.04	1.02	1.01	1.03	1.02
	アデニン(A)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	シトシン(C)	0.74	0.79	0.79	0.85	0.77	0.82	0.78	0.77	0.80
	ウラシル(U)	0.99	1.04	1.03	0.91	0.91	1.01	1.01	1.01	1.00
塩 基 の 比	G/C	1.43	1.36	1.36	1.36	1.35	1.24	1.30	1.34	1.27
	A/U	1.01	0.96	0.97	1.10	1.10	0.99	0.99	0.99	1.00
	G+U/A+C	1.18	1.18	1.18	1.11	1.10	1.12	1.13	1.15	1.12
	Pu/Py***	1.19	1.14	1.14	1.23	1.21	1.10	1.13	1.14	1.12
	G+C/A+U	0.91	0.92	0.92	1.06	0.95	0.92	0.89	0.90	0.91
分 析 回 数		5	10	8	5	5	12	19	5	5

* 種類名の接頭にはすべて RNA, Y- がつく。

** アデニンを 1.00 とした場合のモル比で表わす。

*** Pu: プリン; Py: ピリミジン。

第3表 DNA 試料の塩基組成

試 料	塩 基 組 成*			
	グアニン	アデニン	シトシン**	チミン
DNA, H-1b	0.89	1.00	0.79	1.01
DNA, I-1a	0.76	1.00	0.78	0.93

* アデニンを 1.00 とした場合のモル比で表わす。

** 5-メチルシトシンを含む。

酵 母 RNA

Y-K1, Y-K2, Y-K3

キリン科学研究所黒岩芳郎博士が熱によりタンパクを変性除去することを主体とした Clarke, Schryver の方法³⁶⁾ に多少の修正をした方法でビール酵母から抽出調製された標品。K3 はこれをさらに武田薬工研究所杉野幸夫氏がクロロフォルム-ゲル法で除タンパク操作を行って精製された標品。

Y-Merck

Merck 社製の市販酵母 RNA を名古屋大学江上研究室でナトリウム塩として精製された標品。Merck 社での調製はおそらくアルカリ抽出を行ったものと思われる。

Y-2A-1

渡辺研究室で渡辺, 磯¹⁸⁾ が Clarke, Schryver の方法³⁶⁾ によつてビール酵母から抽出, 調製し,

十分にクロロフォルム-ゲル法をくりかえして除タンパクした標品。

Y-6, Y-7, Y-8, Y-9

だいたい Crestfield, Smith, Allen の方法³⁰⁾ に準拠してパン酵母から調製した標品。Crestfield らの方法はドデシル硫酸ナトリウムを用いて短時間の加熱処理によりタンパクの変性除去を行い、かつリボヌクレアーゼ活性を全く押えうるといふ。この方法で得られた RNA は分子量が高く、高濃度食塩水によつて沈殿するので、これを利用した再沈殿操作のくり返しによつて精製した。6, 7 は川出と北村³³⁾ が, 8 は川出が, 9 は北村と三浦が調製した。

ウシ肝 RNA*

BL-10

屠殺直後のウシの肝をドライアイスで凍結し、実験室に持ち帰り、ほぼ Grinnan, Mosher の方法³⁷⁾ に従つて調製された RNA。肉ひきでひいた材料を低温で 0.2M 低度の食塩水で抽出し、細胞質抽出液を得る。これに塩酸グアニジンを 4M になるように加え、pH 7 に調整して 37~40° に 1 時間保つてタンパクを変性させる。その後 2° に冷やすと RNA とタンパク質の複合体が得られ

* 主として北村が調製した¹⁹⁾。一部未発表。

る。これを 0.14M NaCl に浮かし、90~100° に 2~3 分間加熱してただちに 0° に急冷して RNA とタンパクの分離をしやすくする。その後クロロフォルム-ゲル法によつて除タンパク操作を行うことを数回くりかえす。BL-10 の場合にははじめ得られた RNA を BL-10a とし、残った RNA とタンパク質の複合体に新しく食塩水を加えてから熱処理をふたたび繰返したのちクロロフォルム除タンパクを行った。この 2 回の熱処理で得られた RNA を BL-10b とした。

BL-9

ウシ肝のホモジネートをフェノール (50%) で 40° 1 時間抽出する。水層に RNA が抽出されるが、フェノール層をさらに水抽出したものを合せてエタノールを加えて RNA を沈澱させた。この RNA には多糖類が混在しているが、再溶解してから 0.05M MgCl₂ で沈澱したものを BL-9b とし、沈澱しない分割を La 塩で沈澱させてから Na 塩の形に変えた標品を BL-9d とした。

ニジマス精子 DNA, DNP*

東京都水産試験所奥多摩分場でいただいたニジマス精液をただちに凍結して実験室に持ち帰り、2M 食塩水で抽出したのち水でうすめて沈澱に得たデオキシリボ核タンパク (DNP, I-1a), およびこれを 2M NaCl に溶かして珪藻土で濾過後エタノールで沈澱させて得た DNA (DNA, I-1a)。これらの標品は三浦, 鈴木, 川出の共同によつて調製されたが、詳しい方法は文献 43, 44, 45 に譲る。

ニシン精子 DNA, 子ウシ胸腺 DNA, 子ウシ胸腺 DNP*

ニシン精子から高濃度食塩水 (1M または 2M) で抽出したのち、主としてクロロフォルム-ゲル法で除タンパクした標品 (H-1b⁴⁶⁾). 子ウシ胸腺からとり出した標品 (T-2a⁴⁸⁾). 子ウシ胸腺 DNP (T-2)** は 1M NaCl により抽出され、水でうすめて沈澱に得た標品⁴⁹⁾. 渡辺研究室で宇井, 鈴木, 磯, 川出らが調製した標品である。

II・2 分割分別の方法

* DNP: デオキシリボ核タンパク。

** デオキシヌクレオヒストンであるから宇井⁴⁸⁾, 川出⁴⁹⁾ の文献には TNH-2 と記されている。

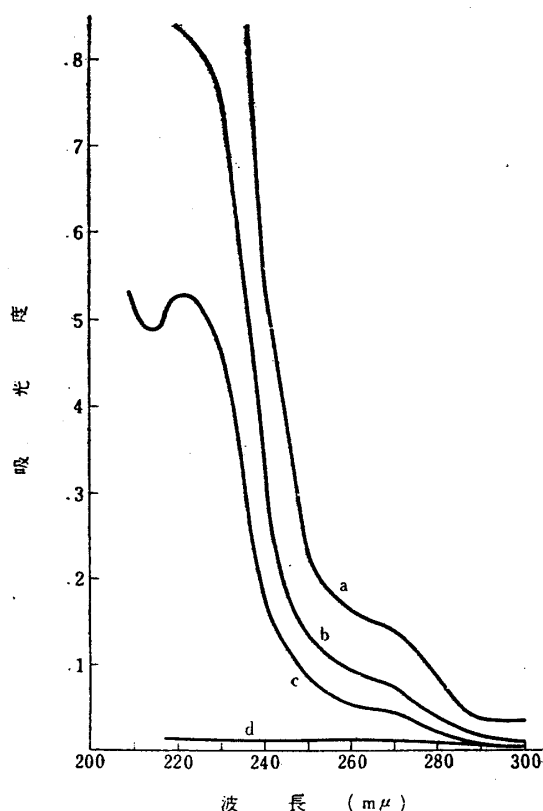
イオン交換樹脂による方法

まず入手しうる数種の代表的イオン交換樹脂を用いてこれらに対する RNA の挙動を調べた。用いた樹脂の種類は第 4 表にまとめた。なるべく吸着量を多くするため粒度の細かい樹脂を用いることにし、大体 200~400 メッシュのものを用いた。使用に先立つて一般に行われているように 1N の酸, アルカリ及び水による洗滌をくりかえす。し

第 4 表 本研究で使用したイオン交換樹脂

名 称	種 類	交 換 基
Dowex-50	強酸性カチオン交換	-CH ₂ SO ₃ ⁻
Amberlite XE-58	弱塩基性アニオン交換	-NH ₃ ⁺
Dowex-2	強塩基性アニオン交換	-NR ₂ R' ⁺
Dowex-1	強塩基性アニオン交換	-NR ₃ ⁺

かし、後に述べるように、ここではかなり濃い食塩水を溶媒として使うことが多いが、このような洗滌だけでは濃い食塩水を用いたときかなり不純物が溶出してきて扱いにくい。RNA の挙動は 260 mμ の紫外吸収によつて調べるが樹脂に濃い

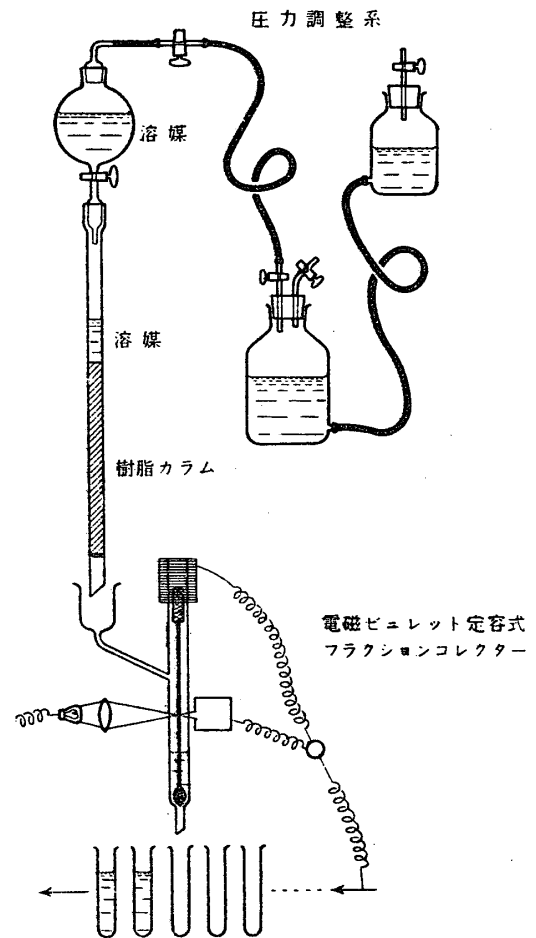


第 1 図 Dowex-2 の食塩水洗液の紫外吸収

食塩水を流すと第1図 a~c の如く紫外部にかなり吸収の深い不純物が流出してくる*ために RNA の吸収が妨害され、正確な濃度が求めにくい。この不純物を除去するためには充分量の濃い食塩水で洗わなければならない。そのためには酸、アルカリ、水による洗滌 No. 3 のガラスフィルターをはめこんだカラム(第2図), またはガラスウールを 1~2cm の厚さにきつくつめたカラムに樹脂を移し、樹脂 10cc 当り 3l から 5l の 1M NaCl を流し続けて洗う。流速は1分1滴前後でよく、長時間かけて洗う。流出液の紫外吸収を検査するとはじめ第1図 a~c のような不純物の流出がみられるが、ついにこのようなものの流出がなくなり、d の如くなる。この洗滌を終えたら水で十分に洗い、交換基を希望の型に変えて水洗する。RNA の吸着溶離の状況を調べるためにまずバッチ試験を行つた。0.25g の樹脂を遠心管にとり、RNA の 0.1% 溶液(通常 0.1~0.2M 食塩水を溶媒にした)を一定量加えてよくかきまわしたのち軽く遠心する。吸着、溶離が平衡に達する時間はかなり早い、この試験を行うときには 10~30 分後に遠心を行うことにした。上澄液を静かにピペットでとり出す。上澄液に RNA の紫外吸収がなければ、RNA は樹脂に吸着されたわけであるから次に一定量の溶媒を再び加えてよくかきまわし、10~30 分後に遠心する。再び上澄液をとり出して紫外吸収を調べ、この溶媒によつて溶離された RNA 量を調べる。このような操作によつてどのような溶媒の場合に RNA が樹脂に吸着され、どのような溶媒によつてどれだけ溶出するかを調べた。RNA はできるだけ温和に扱うことに特に留意し、たとえば pH に関しては 4~9 の範囲で溶媒を選び、温度もせいぜい室温程度ですべての操作を行うようにした。

III-1 に述べるように温和な条件下で RNA の樹脂への吸着、溶離を行わせるためにアニオン交換樹脂 Dowex-2, 200~400 メッシュ、架橋度 10%, C1 型で、種々の濃度の食塩の水溶液を基本とした溶媒系を用いて実験を行うことにした。実験は樹脂をカラムに詰めてカラムクロマトグラ

* カチオン交換樹脂ではこのような心配はほとんどないからこの点に特に留意することはない。



第2図 イオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフ

フする方が充分な分別ができ、種々の便宜もあるのでバッチ試験の後選ばれたこの系でカラムクロマトグラフを行つた。カラムは第2図に示すような形に上質のガラスで作られたものを用いた。洗つた樹脂を水に懸濁して No. 3 のガラスフィルター上に静かに流し込み 適当な高さの樹脂柱を作る。吸着、溶離は径と高さの関係にはそれほど敏感でないが、なるべく同じような比になるように調整した。通常の実験には内径 10mm から 16mm のガラス管を用い、標準的には大体 10cm × 1cm² の大きさのカラムにした。柱の樹脂上面が水平で一様に詰つたら静かに水を流して洗う。念のために 1M NaCl で洗い、水で洗つてから 0.2M NaCl を流し、そこから実験にとりかかる。カラムに詰めてから洗滌や溶出を行う場合には溶媒を変えるとき以外は樹脂柱上に 2~5cm の溶媒が常にあるようにして上部の分液ロートから溶媒がその上にたれるようにする。流速は分液ロートの上蓋を圧力調整器にゴム管で継ぎ、圧力を加減することによつて調節した。圧力調整器は水圧差

を利用した簡単なものである。流速は $1\text{ml}/1$ 時間でも $1\text{ml}/3$ 分でも溶離曲線に本質的な変化はないが、 $1\text{ml}/10$ 分 ($0.1\text{ml}/\text{cm}^2/\text{分}$) の流速を大体標準とした。溶媒を変えるときは分液ロートをとおり外し、カラム上の溶媒が自然流出してなくなつたときに静かにピペットでカラム上に次の溶媒を載せる。このときカラムの形をくずさぬようにすることが大事である。流出液は適量ずつ試験管に集めた。この操作は自働フラクションコレクターによるのが便利であるので多くの実験の場合に用いた*。溶出液中に含まれる RNA 量は通常は II.3 に述べる如く紫外吸収によつて調べた。

実験は通常 0.2M 食塩水で洗つたカラムに試料 RNA 溶液** を適量 (下に述べる吸着限界量以内の量) 流して試料を吸着させてから溶離溶媒を流し、順次溶媒を変え乍ら各試験管内流出液中の RNA 量を調べ、溶出曲線を描くことによつておこなつた。分別した分割について立ち入つて種々の性質などを調べようという場合には試料の量もかなり多くして実験を行わなければならない。RNA のこの樹脂への吸着量の限界は樹脂 10c.c に対して 3.5mg であつてそれ以上の RNA は吸着されないことを知つたから、この範囲内で試料量に応じてカラムの大きさも比例的に大きくしなければならない。たとえば各分割の塩基組成分析までしようという場合に RNA 35mg ほどを試料にしようとする 100ml ほどのカラムを用意することになるが、このような場合には内径 25mm ほどのガラス管に樹脂カラムを作つて用いた。

種々の性質を調べるために溶出液中の RNA を一度固体にして集めることが必要な場合には次の如くした。溶出液の中で $260\text{m}\mu$ の吸光度 E が 1 (RNA にして約 0.004%) 以上の主な分割を集め、溶媒中の高濃度の塩を除くために 10 倍容の蒸留水に対して 1 日 (数時間でよい) 透析***

* ここで用いたフラクションコレクターは一定容量を自働的に分取する仕組みで、本研究所田村孝章氏の指導になる東京科学精機の製品を用いた。

** 通常 RNA $1\text{mg}/1\text{ml}$ 0.2M NaCl 溶液を用いた。

*** Visking のセロファン膜を用いた。

したのち 0.1N HCl で pH を $3\sim 4$ に合わせ* 少量の NaCl 濃溶液を添加し、 3 倍容のエタノールを加えると RNA が沈澱に得られる。冷所に 1 夜置いて沈澱の析出を完全にしてから遠心して沈澱を集め、エタノールで洗い、エタノール・エーテル、エーテルで順次洗つてから塩化カルシウム上で真空に引いて乾かす。

イオン交換繊維による方法

Peterson, Sober の方法⁵²⁾ にならつてアニオン交換繊維 ECTEOLA を作つて用いた。基礎繊維には東洋濾紙-濾紙粉末を用いた。イオン交換繊維の用法はだいたいにおいてイオン交換樹脂の場合と同じようにしたのでここには省略するが、イオン交換樹脂の場合のように念入りに食塩水で洗うことは省いてよい。ECTEOLA からはここで用いるような溶媒によつては紫外吸収性の不純物は流出しない。イオン交換繊維に対する RNA の吸着量の限界は同容積のイオン交換樹脂の場合の 3 倍以上はあるので 1ml のイオン交換繊維カラムに対し RNA 1mg の割合で吸着させて実験した。また試料 RNA はイオン強度 $\mu=0.02$ のリン酸塩緩衝液 (pH 7.5) に約 0.1% に溶かして用いた。

中性塩を用いた分別沈澱による方法

高い分子量の RNA は食塩、硫酸マグネシウム硫酸アンモニウムなどによつて沈澱するが、沈澱に必要な塩濃度は塩の種類によつて異なる。これを調べ、RNA の濃度があまり低いと沈澱しにくいことなどが観察されたことはすでに当研究室の川出、北村によつて報告された⁵³⁾。それらの結果にもとづいて塩濃度を適当に変えてゆけばある一つの RNA 試料を分別的に沈澱させようと考え、このための条件をよく検討して実施した。分別に好適な塩濃度を予め定めて下記の方法で分割分別を行つたが、このための塩濃度をきめるためにとつた実験方法もほぼ下記の方法に準拠している。

RNA 試料をうすい食塩水 (0.01N NaCl) に約 0.3% 程度の濃さに溶かし、これに濃い塩溶液を加えて所要の塩濃度になるようにする。これを

* 試料が多い場合はよいが、少ない場合は pH をこの程度の酸性にしないと沈澱が生じないので止むを得ずこの程度の pH にしたが、これ以下の pH にすることは好ましくない。

0~2° に1日おいてから遠心した。遠心は 5,000 r.p.m.* 程度で行つたが、ときには沈澱の分別をよくするために 15,000 r.p.m. で行つた。上澄をとり分けてこれの 258 m μ における紫外吸収を測定して RNA の濃度 (上澄に残つた RNA の濃度) を求める。この上澄の塩濃度は沈澱を生じさせる前の塩濃度と同じであるとしてこれに濃い塩溶液を一定量加えて次の沈澱を起すための所要濃度に達するようにする。ここで再び 0~2° に1日おいてから遠心して、生じた沈澱と上澄を分別する。この操作を必要なだけ繰り返すことによつて分別的に沈澱を得ることができる。一方、得られた各沈澱は 0.01 M NaCl に溶かしてセロファン膜に入れ、0.01 M NaCl に対して一夜透析し、この溶液を各分割の試料溶液として性質を調べた。塩基組成分析などのために試料を固体にする必要があるときには 2.5 倍容のエタノールを加えて沈澱させ、エタノール・エーテル混液、エーテルで洗つてから塩化カルシウム上で真空に引いて乾燥した。

塩基組成分析の場合には各分割試料が 2mg 以上はあるようにしたいので分別沈澱操作の途中での損失や他の性質を調べる必要を考慮して 20~50 mg の試料を用いて分割を行つた。

II・3 分析法

核酸の濃度をきめる方法

核酸は構成成分としてプリン-, ピリミジン-塩基を含んでいるために紫外部において特長ある吸収曲線を描く。260 m μ 附近に吸収極大があり、単位重量当りの吸光度がかなり大きいから検出し易い。そこでこの附近に吸収のない溶媒を用いた場合には核酸溶液の紫外吸収の吸光度を測定すれば簡単に核酸の濃度を測定できる。測定はすべて Beckman DU 型分光光度計により、溶液層の厚さ 1.0 cm の水晶セルを用いて行つた。試料溶液を適当に稀釈してから吸光度を測定したのち稀釈倍数をかければ試料溶液の吸光度が求まる。260 m μ の吸光度 $E_{260m\mu}$ は RNA が 1% に溶けている中性の塩溶液に対して 250 とつて比例計算すれば RNA の濃度を概算できる³⁵⁾。正確に濃

度をきめる必要がある場合には各 RNA 試料のリン 1 原子当りの吸光係数を $\epsilon(P)$ の値を求め、一方正確にその試料中のリン量を測定し^{*}、この両者からその RNA の 1% 溶液の E の値を算出して用いた。正確を期するときにはなるべく E が 0.3~0.7 の範囲になるように稀釈して E を測定した。

分割分別などの実験を行う場合には相対的な量比だけを問題にすればほとんど用が足りるので、便宜的に次のようにして RNA 量を比較した。試料溶液の容量が同一の場合には 260 m μ の吸光度 E をそのまま比較すればよく、容量がまちまちの場合には $(E_{260m\mu}) \times (\text{容量})$ の値を相互に比較した。

DNA 試料の場合は $E_{260m\mu}^{1\%} = 200$ として濃度を概算した。

塩基組成分析法

RNA の分析法を検討したがこれについては別の機会に述べることとし、ここにはこの研究で用いた分析法の概要を記すに止める。

乾いた RNA 試料 10 mg をガラス共栓つき小試験管にとつて 0.5 ml の 1 N HCl を加え^{**}、沸騰水浴中で、1 時間加熱水解する。加水分解された液をそのままガラス毛細管で濾紙につけてクロマトグラフする。濾紙は東洋 No. 53 を用い、イソプロパノール-塩酸 (イソプロパノールに関して 65%, HCl に関して 2 N になるようにする⁴⁰⁾) を溶媒として展開する。展開後乾かしたら水銀燈 (東芝殺菌燈, R-1510 A, 15 W) に紫外線フィルター^{***} をかけて得られる 2537 Å の紫外線によつて塩基成分を検出し、それぞれの場所を切り抜いて 0.1 N HCl 4 ml で抽出する。ときどき振盪して 5 日後に静かに液を比色計のセルに移し、ブランクに対して特定の波長での吸光度を測定する。比色計はベックマン DU 型光電比色計を使用した。こ

* リン量は King の方法³⁹⁾ によつて行つた。比色は Beckman DU 型分光光度計を用い、660 m μ で行つた。

** 試料は 1 mg 以上用いればよいが試料量によつて 1 N HCl の量は比例計算量だけ用いる。

*** 科学研究所岩瀬英一博士からいただいたもの、および Corning Glass 社の No. 9863 を使用した。ここに岩瀬博士に厚く感謝の意を表する次第である。

* 毎分の回転数。

の方法ではプリン塩基として、ピリミジンはヌクレオチドの形で定量されるが、後者が若干分解するのでこれに対して 5% の補正を施した吸光係数³⁹⁾を用いて計算した。

RNA の塩基組成の表わし方はいろいろあるがここではアデニンを 1.00 として各塩基をモル比で表わすことにした。誤差は $\pm 3\%$ 程度である。

DNA の塩基組成は 72% HClO_4 で 100°, 1 時間加熱分解して生じる塩基成分を RNA の場合と同じ方法でペーパークロマトグラフして分析した⁴⁰⁾。

II・4 分子の大きさの測定法

分割分別された試料などやつと数 mg ほどの少量の試料 RNA の分子量を算出することは沈降、粘度、拡散などの測定や光散乱の測定などから正確に求めることはなかなかむずかしいので表面膜による分子量の測定法が使えないのではないかと考えて検討した。さいわい分子量数千から数万程度の RNA に対してはかなり正確な値が求まることがわかった³¹⁾のでこの方法を用いることにした。概要は次の通りであるが、詳しくは文献 51 を参照されたい。核酸試料の 0.1% 溶液をつくり、これを活性炭で精製した 2M 食塩水上にマイクロピペットで静かに拡げると核酸の表面膜ができる。この膜を徐々に押し縮めながら表面膜の面積と表面圧を測定して分子量を計算した。

巨大分子では分子量を測定するまでもなく沈降速度の測定から沈降定数を求めてこれを比較すれば分子の大きさをかなり簡単に比較することができるので、極端に分子の形が変化しない場合にはしばしば行われることであるが、ここでも便宜的に沈降定数の比較を行った。沈降定数の測定、算出は川出、北村により行われた。方法の詳細は文献 43 を参照されたい^{**}。

III. 結果及び考察

III・1 イオン交換樹脂による分割分別*

樹脂と溶媒の選択

できるだけ温和な条件のもとに RNA が一旦樹脂に吸着され、次に溶離される適当な条件を探し

た。RNA はイオン化し得る基をいく種類かもちが、温和に扱うためには中性の pH で扱わねばならず、中性の pH 領域ではほとんど第二リン酸基のみしか解離していない。従つて RNA 分子のイオンとしての挙動を考えればアニオン交換樹脂が役に立つことが考えられる。しかし、巨大分子であるから樹脂に対する吸着には単にイオン交換のみによらず、van der Waals 力などによる要因が複雑に効いていると思われる。そのため全く理論的に最適な条件を選ぶことが不可能であるので経験的に適当な条件を探さねばならなかつた。

カチオン交換樹脂には中性溶液中で RNA が吸着されることは期待されなかつたが、念のため試みたところ強酸性カチオン交換樹脂 Dowex-50 には中性溶液からでは全く吸着されなかつた。

弱塩基性アニオン交換樹脂 Amberlite XE-58 では OH 型の場合は RNA は吸着されないが、Cl 型にすれば完全に吸着する。一旦吸着した RNA は高濃度の食塩溶液あるいはリン酸塩やホウ酸塩で pH を 7~8 に緩衝させた食塩溶液、あるいはオリゴヌクレオチドの分離にしばしば使われるギ酸や酢酸などの稀薄溶液、あるいはアルキルスルホン酸系 detergent などで溶出を試みても全然溶離せず、1N NaOH を用いればはじめて溶出することがわかつた。しかし、このようなアルカリに触れば RNA は分解することはよく知られた事実であるから実際にはこの溶媒は使用できない。このように弱塩基性アニオン交換樹脂には RNA は全く吸着されないか、または完全に吸着されてしまつて温和な溶媒では溶出されないから分割分別の目的にはこの樹脂を使うことはできない。

強塩基性アニオン交換樹脂としては Dowex-1 と Dowex-2 の二種類を用いてみた。この両者に対する RNA の吸着、溶離の状況は本質的には大きな違いがないが、Dowex-1 は塩溶液中で著しく収縮し、水中では膨潤するので溶媒の塩濃度などの変化によつて均一なクロマトグラフを行えなくなる恐れもあるので主として Dowex-2 で研究した。Dowex-2 では OH 型で RNA の吸着は不完全だが、吸着された RNA は 1M NaCl で溶離された。しかし、この樹脂では各イオンの樹脂に対する親和性の系列をみると OH^- イオン

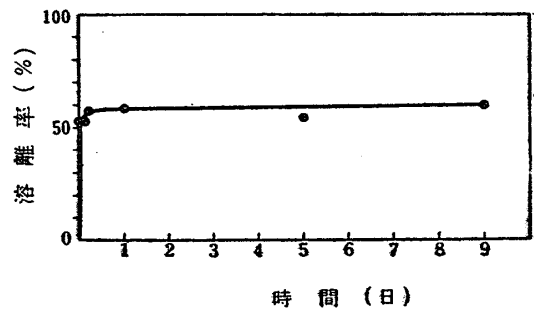
* 一部は文献 41 にすでに発表した。

** 沈降定数は Svedberg 単位 (S) で表わす。

の親和性がごく小さいことが特徴で、 $\text{Cl}^- \rightarrow \text{OH}^-$ となつているから OH^- 型にして、あとで Cl^- を含む液を流せば、 OH^- が容易に溶離して液をアルカリ性にしてしまう。それゆえ上の場合吸着された RNA は溶媒がアルカリ性になつたために溶離したのであり、RNA 自身は多少とも分解していると考えられる。OH 型以外の型として Cl 型を選んでみた。核酸の研究は食塩水を溶媒として行われている場合が多いのでこれを使うことは何かと都合がよい。そこで本研究でも食塩溶液でことがうまく運ぶ条件を探することを一つの行き方としているが、この場合も食塩溶液を溶離溶媒として使うことを考えると樹脂をはじめから Cl 型を選ぶことは当然考えられる。実際 Cl 型以外にもギ酸型など二三の条件を選んで試みたが、Cl 型の場合より秀れた実験条件を掴むことはできなかつた。Cl 型では濃度 0.2M 以下の食塩水によつて RNA は完全に Dowex-2 に吸着される。吸着された RNA は高濃度の食塩水で洗うと溶離する部分がかかなりあることがわかつたので、調べた樹脂のうちでは分割分別の目的に最も役立つと考えられたのでこれを用いることにした。溶離の溶媒としては食塩を 0.3M 以上のいろいろな濃度の溶液としたものを用いたが、pH を若干変化させるために M/15 のリン酸緩衝液か M/20 のホウ酸緩衝液中に食塩を一定濃度に溶かし、食塩溶液としての pH を 7~9 に変えたものも用いた。これらの場合 NaCl に代えてカチオンを RNA と不溶

性の沈澱を作らない K^+ や Li^+ などでおきかえてみても NaCl の場合より秀れた実験条件が見当らなかつた。そのほか detergent 溶液を用いたり、溶媒に透電率の低いアルコールを混じて用いてもみたが、食塩溶液よりも溶離の際の秀れた条件を見出すことはできなかつた。

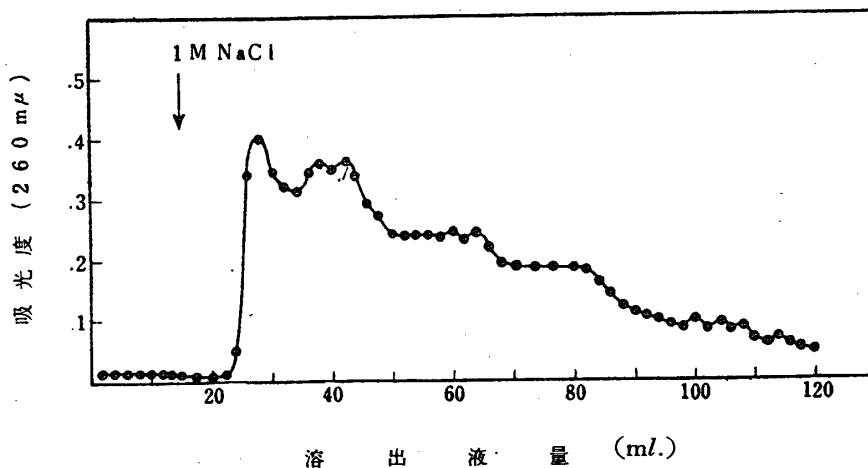
Dowex-2 を用いるとき架橋度は 10% のものを用いた。これには特別な理由があるわけではない。本来ならば種々の架橋度のものを比較してみなければならなかつたが、揃えることができなかつた。しかし、Dowex-1 で架橋度 2% のものを用いた場合ピークが鋭くならず、だらだらするので (第 3 図参照)、これはさきに述べたような Dowex-1 の大きな伸縮性によるのかもしれないが、実際にピークの鋭い方が分別が鋭くなつて好都合と考え、ここでは主に Dowex-2 の架橋度 10% のものを用いた。



第 4 図 RNA の Dowex-2 への吸着-溶離平衡
溶媒: 1M NaCl
試料: RNA, Y-K2

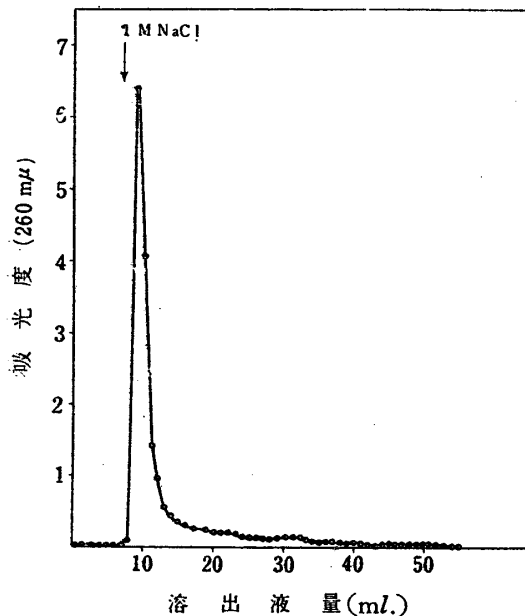
分割分別

溶離平衡の状況を見るために RNA, Y-2A-1 を Dowex-2 Cl 型に吸着させたのち 1M NaCl と混じてバッチ法で溶出の状況を時間を追つて調べてみた。第 4 図に示すように吸着したもののうち 1M NaCl によつて溶離してくるものの割合を百分率で表わすと約 60% は直ちに溶離してその後 9 日経ても同じであるから溶媒を変えた場合の溶離平衡に達する時間はかなり短く、また長時間一定であるこ



第 3 図 Dowex-1 (架橋度 2%) による RNA, Y-1 のクロマトグラフ—1M NaCl による溶離。
カラム: 18.5cm×1.1cm²(水); 11.8cm×1.1cm²(1M NaCl)。
試料: RNA, Y-K1, 2.5mg。

とはこれらの操作が RNA に損傷を与えないことを示すばかりでなく、樹脂と溶離液への分配があまり任意なものではないことを示すものであろう。ある溶媒での溶出率をバッチ法で調べてもカラムによつてしらべても大体同一になる。

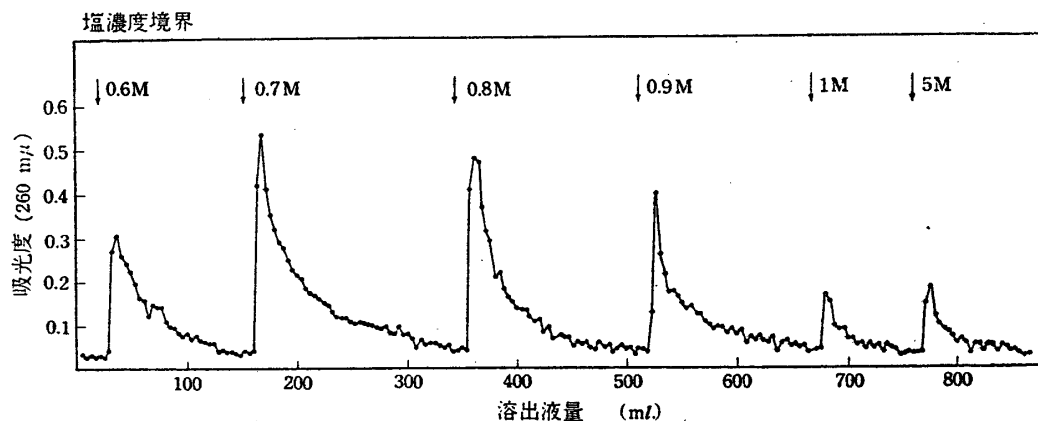


第5図 1M NaCl による Dowex-2 からの RNA の溶離
カラム: $8.5\text{cm} \times 1.1\text{cm}^2$
試料: RNA, Y-K2, 3mg.

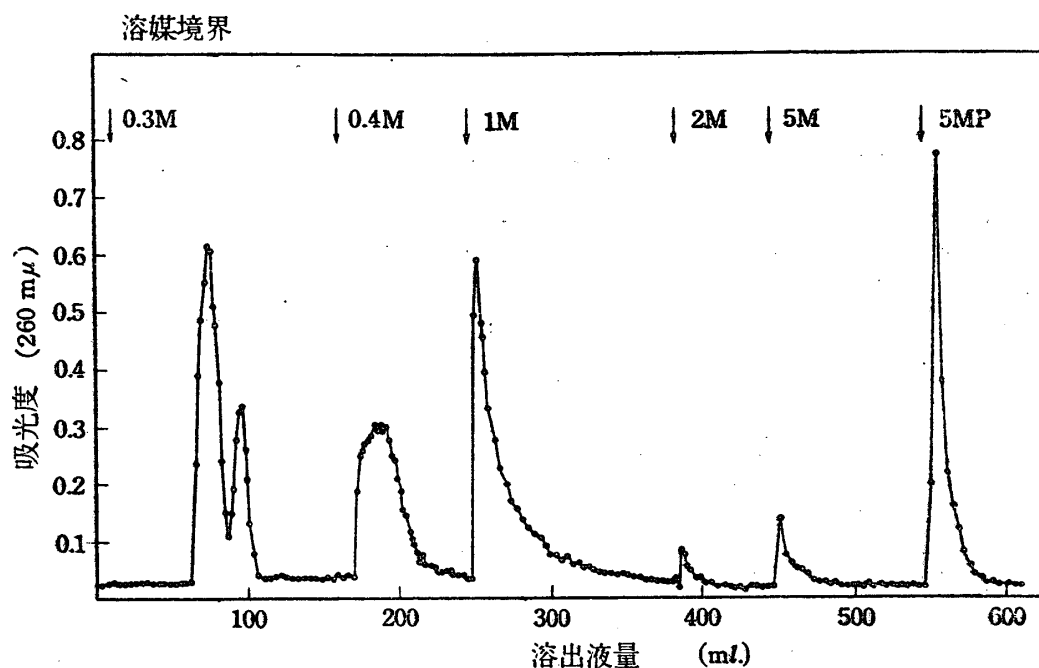
カラムによる実験を試みると、たとえば、RNA, Y-K2 の場合、吸着後直ちに 1M NaCl によつて溶離を試みると第5図に示す如く約 40% が鋭いピークとなつて溶離して来る。また、あらかじめ 1M NaCl に試料を溶かしてカラムにかけ、引き続き 1M NaCl を流しているると約 40% は全く素通りで溶出してくる。この試料をカラムに吸

着させたのちいきなり 1M NaCl を流さないで濃度の低い溶媒を流してみると 0.5M 以下の濃度の食塩溶液によつては全然溶離しないが 0.6M にすると若干量溶出した。次に 0.7M, 0.8M, ……と順次食塩濃度を上げるとそのたびに若干量ずつ溶離してきて第6図に示すような溶離曲線が得られたが、溶出したこれら各分割の総和は吸着させた試料の約 40% になつた。このようにいきなり 1M 溶媒で流したとき溶離されてきたものの回収率は段階的に 1M まで塩濃度を上げてきた場合の回収率と等しいから、ある濃度で溶離されるものの中にはそれ以下の濃度で溶離されるものをすべて含むことになる。それ故溶媒の塩濃度をだんだんに高めれば回収率を高めることができ、溶媒の塩濃度を適当に区切つて行けばいくつかの分割を分かちとることができる。実際第6図, 7図, 8図にみられるようにカラムに試料をつけた後溶媒の塩濃度または pH を順次段階的に上げてゆくとそのたびに RNA の溶出がみられる。普通食塩を水に溶かすと pH が 5.6 であるが、溶離溶媒として用いるとき pH を少しずつでも上げてやればそれに応じてやはり幾分かずつの RNA の溶出がみられる。

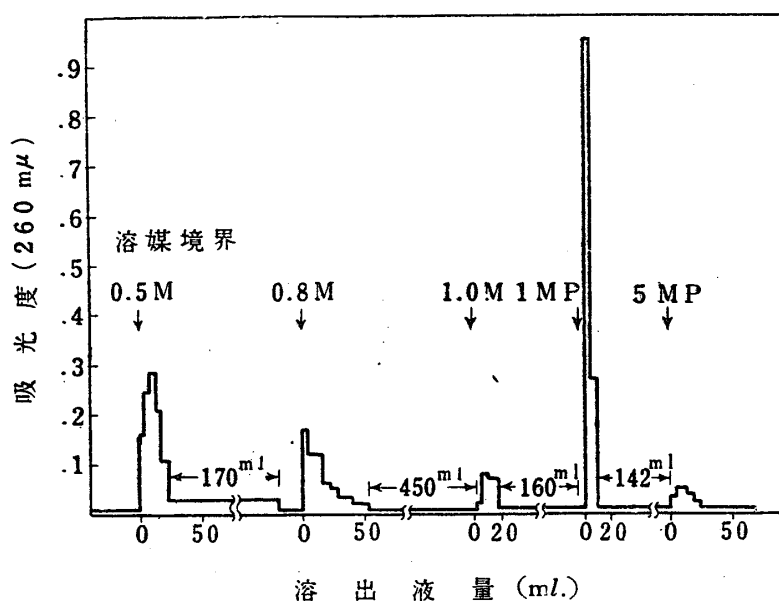
このように一つの RNA 調製品をいくつかの分割に分けることができるが、各区分がたしかに性質の異つたものであり、再現性があることを確かめなければならない。同じ試料を分割したときはほぼ同じパターンが得られることやさきにも述べた如く高濃度または高 pH の溶媒ではそれ以下の濃度または pH で溶出する量の総和が溶離してく



第6図 食塩溶液 (リン酸塩で pH 7.2 に緩衝した) による Dowex-2 からの RNA の段階的溶離
カラム: $14\text{cm} \times 2\text{cm}^2$. 試料: RNA, Y-K2, 8mg.



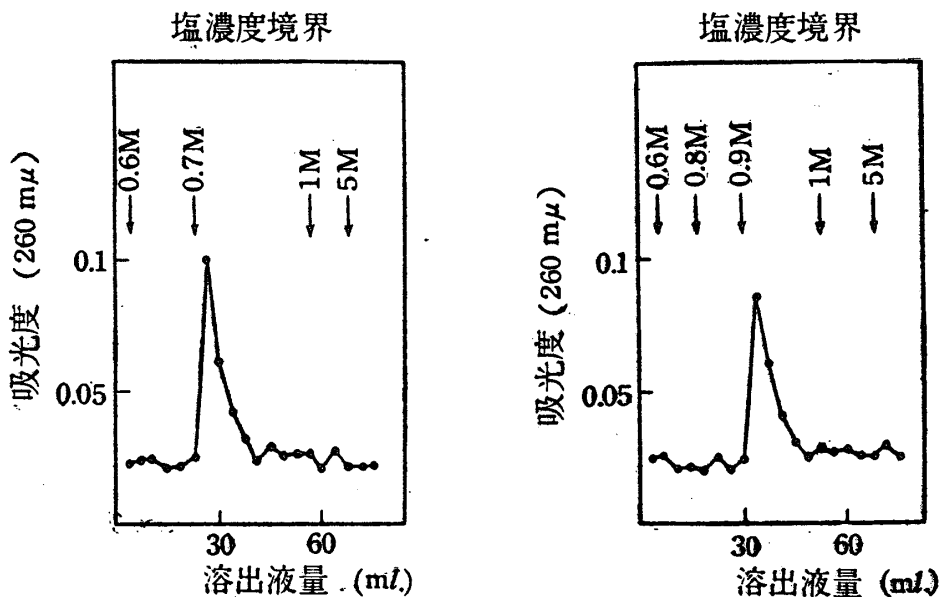
第7図 食塩溶液 (pH 5.6) による Dowex-2 からの RNA, Y-2A-1 の段階的溶離
 5MP: リン酸塩で pH 7.2 に緩衝させた 5M NaCl. カラム: 12.5cm×1.1cm².
 試料: RNA, Y-2A-1, 3.8mg.



第8図 食塩溶液による Dowex-2 からの RNA, Y-Merck の段階的溶離
 1MP, 5MP: リン酸塩で pH 7.2 に緩衝させた 1M NaCl, 5M NaCl.
 カラム: 6.5cm×1.1cm².
 試料: RNA, Y-Merck, 2mg.

ることによつても各分割がそれぞれ特異的なものであることは察せられるが、さらに直接これを調べるために特定の分割を選んで再クロマトグラフしてみた。第9図に示した如く、第6図で 0.7M NaCl で流出した分割を塩濃度を 0.2M に下げて再びカラムにかけると溶媒の塩濃度を 0.7M にするまではなにもものも溶出してこないが、0.7M に

すると始めて溶出し、その後溶媒の塩濃度を上げてももはやなにも溶出ししない。同じようなことはたとえば第6図で 0.9M NaCl で流出した分割についてもみられる。このように特定の分割を選べばいつもその分割は特定の塩濃度で溶離するから各分割はそれぞれ各塩濃度に特異的であることがわかる。ただこのように再クロマトグラフを行



第9図 第6図で 0.7M NaCl(A), 0.9M NaCl(B) で溶離した
分割それぞれの再クロマトグラフ
カラム: 4.6cm×0.95cm².

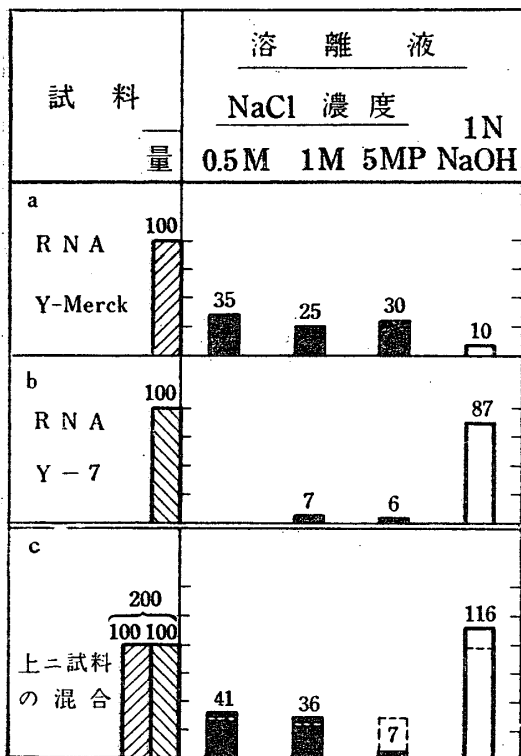
つた場合に回収率がほぼ 50~60% に止まることには問題が残るが、その解釈はむずかしい。

次の項に述べるように RNA が樹脂から溶離される率は試料の種類によつて異なる。もし異つた種

類の RNA 試料を混じて同時に吸着、溶出を試みた場合に得られる溶離曲線や各塩濃度における溶出率が混合しないで単独に夫々の試料を吸着溶離した場合の和になればそれぞれの試料の各塩濃度での溶出分割がすべて特異的なものであると考えられよう。二つの RNA 試料として低分子量の酵母 RNA, Merck と高分子量の RNA, Y-7 を等量混合して Dowex-2 で分割分別をしてみた結果を第 10 図に示す。この二試料を夫々単独に分割分別をした場合 (第 10 図 a, b) から予想される混合した場合の溶出量は点線で示したが、実測はそれほどひどく外れてはいなかつた。したがつて各分割は各塩濃度に固有な分割であつて、他の試料と混合しても溶出がほとんど左右されないことがわかる。

溶出率

RNA 試料が各塩濃度または各 pH でどれだけ溶出するかは試料の種類によつてかなりまちまちである。いま溶媒の塩濃度と pH を三段階に区切つて溶出率を種々の試料について比較してみると第 5 表の如くなる。この表ははじめ 0.5M NaCl (pH 5.6) で流出するものの割合を調べ、次に 1M NaCl (pH 5.6) を溶媒にしたとき流出するものにはじめ 0.5M で流出したものも含めて全回収率として表わしてある。従つてはじめ 0.5M NaCl を溶媒とせず、いきなり 1M NaCl を溶媒



第10図 高分子量 RNA と低分子量 RNA 二試料混合の場合の Dowex-2 よりの溶離率(%)
5MP: リン酸塩緩衝液により pH 7.2 とした 5M NaCl. C の図の点線は a の場合と b の場合を加え合わせて予想された値。

第5表 種々の RNA 試料が Dowex-2 より 溶離されるときの全回収率

試料 RNA	分子量	食塩溶液による溶離の全回収率			
		塩濃度	0.5M	1M	5M
		pH	5.6	5.6	7.2*
モノヌクレオチド混合物**	350		100	100	100
Y-Merck	6,000		35	60	90
Y-K3	16,000		0	30	75
Y-K2	20,000		0	40	65
Y-2A-1	25,000		25	60	70
Y-6	200,000		0	10	17
BL-9b	300,000		0		15

* リン酸塩によつて緩衝させた。

** RNA, Y-K1 を 0.3N KOH で 37°, 18時間加水分解したのち、冷やして HClO₄ によつて中和した混合物の上清。

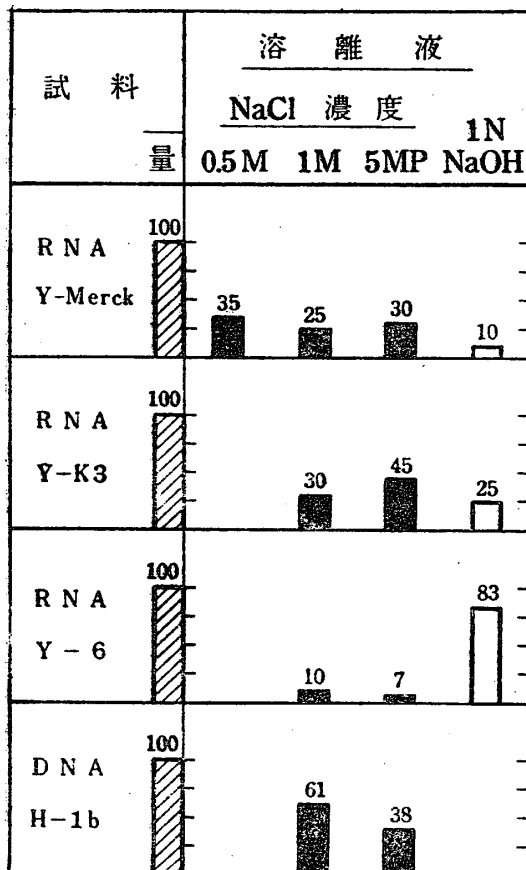
構わない。即ちいきなり 5M NaCl (pH 7.2) で溶出した場合の回収率としてもよいし、0.5M NaCl (pH 5.6), 次いで 1M NaCl (pH 5.6) で溶離してから 5M NaCl (pH 7.2) で溶離したものの総和ととつてもよい。さて第5表には各試料の分子量をも並べて掲げたが、分子量が高いものほど溶離回収率が悪い傾向があることがわかつた。この関係をグラフ化して書くと第11図の如くなる。

分子量 2~3 万程度までの大きさの RNA 試料であれば温和な条件下に 60% 以上の回収率で溶離できるので分割分別も充分行うことができる。しかし、分子量 20 万から 30 万の高分子量 RNA となると溶出率が非常に少なくて実際には分割分別はこの方法ではできない。のちに述べるように高分子量の RNA は濃い食塩水によつて沈澱してしまうことが知られてきたが、高分子量 RNA が濃い食塩水によつて溶出しなないのは溶媒に溶けないからであろう。しかしこの場合にも 1M NaCl や 5M NaCl (pH 7.2) で溶出するものが若干あるのはこれらの試料がもともと不均一で、そのような少量の特別な分割を含むためかもしれないし、pH 7.2 の場合にはリン酸塩緩衝液を用いているので単に食塩水だけを用いる場合とは異つた溶離効果があるのかもしれない。

DNA では分子量数十万のものでもこの系でほとんど 100% の回収率で溶離される。DNA は通常濃い食塩水によく溶けるから高分子 RNA とは事情が異なる(第11図参照)。この系において分子量が高いと回収率が悪いということは RNA についてだけいえることであつて、単なる分子の大きさだけの問題ではなく、RNA の性質の特殊性によるのかもしれない。これらの点からも高分子構造において DNA は RNA とかなり異なることが想像される。

各分割の分子量との関係

RNA では分子量の低い試料ほど溶出し易いことを知つたが、樹脂を用いていくつかに分割した場合に各分割の分子量が違つかどうかをさらに直接調べてみた。各分割に分別した場合には試料の量が少いので特別な方法に頼らなければならなかつた。ここでは表面膜による分子量測定法が役立つ



第11図 各種 RNA, DNA 試料の Dowex-2 よりの溶離率 (%)

5MP: リン酸塩緩衝液により pH 7.2 とした 5M NaCl

としたときに溶出する割合と考えてよい。同じようなことをリン酸緩衝液で pH 7.2 にした 5M NaCl による回収率の場合についても当てはめて

つた。RNA, Y-K3 を樹脂に吸着させ、3種類の溶媒で分別的に溶離して得られた3分割について分子量を測定した結果を第6表に示す。各分割は明らかに分子量が異なり、低いイオン強度、低い pH で溶離するものほど分子量が低いということを確認することができた。

第6表 イオン交換樹脂により得られた RNA, Y-K3 の各分割の表面膜法により求めた分子量

分 割	分子量
RNA, Y-K3 (未分割)	16,200
Dowex-2 より	
0.6M NaCl (pH 5.6) で溶出する分割	7,300
1M NaCl (pH 5.6) "	15,300
1M NaCl (pH 7.2*) "	21,200

* リン酸塩によつて緩衝させた。

各分割の塩基組成

各分割の分子量が異なるとしてもまた他の性質においても相違があるかもしれない。RNA を化学的に性格づけようとするときまずとり上げられるのは塩基組成であつて、少量の試料でもかなり精確な値を求められるので分割分別したものの塩基組成を調べてみた。RNA, Y-K2 を樹脂に吸着させ、3種類の溶媒で分別的に溶離して得られた3分割について塩基組成分析を試みた結果を第7表に示す。各分割にごく僅かの差異があるが、分析誤差をほとんど超えない程度であるのでむしろイオン交換樹脂で分別した酵母 RNA の各分割の塩基組成にはほとんど差異がみられないと結論すべきであろう。

Clarke, Schryver の方法で調製された酵母

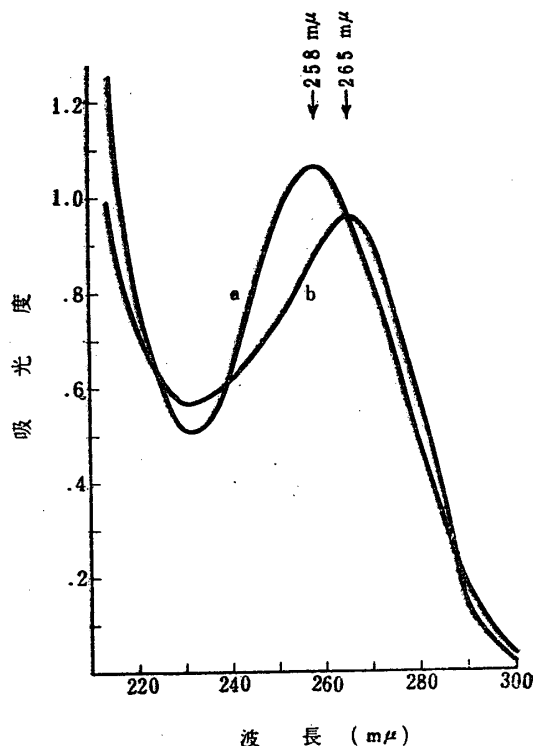
第7表 イオン交換樹脂により得られた RNA, Y-K2 の各分割の塩基組成

試 料 分 割	塩 基 組 成**			
	グアニン	アデニン	シトシン	ウラシル
RNA, Y-K2 (未分割)	1.08	1.00	0.76	0.99
Dowex-2 より				
1M NaCl (pH 5.6) で流出する分割	1.02	1.00	0.84	0.98
1M NaCl (pH 7.2*) "	1.02	1.00	0.74	0.91
5M NaCl (pH 7.2*) "	1.00	1.00	0.74	0.94

* リン酸塩によつて緩衝させた。

** アデニンを 1.00 とした場合のモル比で表わす。

RNA は分子量 1 万 ~ 3 万程度であるが、これらの試料をイオン交換樹脂から溶離しようとするとき通常は 0.5M NaCl によつては溶離する分割がないが、RNA, Y-2A-1 の場合には若干溶離する分割があり、これは第7図に示されたように 0.3M NaCl や 0.4M NaCl でさらに分別される。通常溶離すべき分割は溶媒を変えると hold-up-volume* を超えると直ちに鋭いピークとなつて溶離するが、この 0.3M, 0.4M NaCl で流出



第12図 酵母 RNA, Y-2A-1 の 0.5M 以下の NaCl 濃度で Dowex-2 から溶出する分割のなかの特定分割の紫外吸収 (b), a は未分割の Y-2A-1.

* 樹脂中に保持される液量。

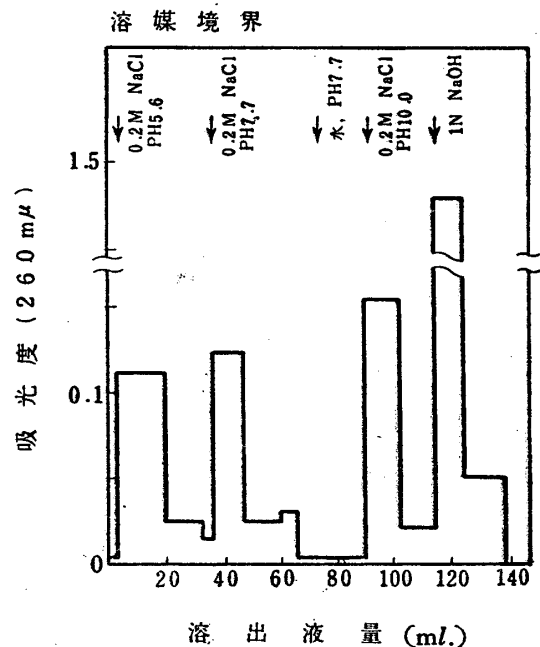
する区分は hold-up-volume を超えて出ることやピークが単一でないことなどが見られて 0.5M 以上で流出する区分とは性質がかなり違っている。このような分割のうちある特定の分割の紫外吸収曲線は第 12 図 b に示した如く 265 m μ 附近に吸収極大があり、通常の RNA の紫外吸収 (12 図 a) とはかなり異なっていて恐らくシチジル酸に富んだポリヌクレオチドであると思われる。このように塩基組成の異つた RNA 分子も一試料中には含まれる場合があると思われるが、ここで見られた場合のように低濃度の溶媒で溶離するかなり分子量の低いと思われる分割の場合にはそれが試料調製の際の分解産物であるかもしれない。

III・2 イオン交換繊維による分割分別

イオン交換繊維 ECTEOLA に RNA が吸着され、適当な条件下に溶離する状況は本質的にはイオン交換樹脂 Dowex-2 の場合にみられたこととあまり変りはない。吸着量が少くも 3~5 倍程度には大きいことや低い濃度の食塩水溶媒による回収率が高いことなどの点が多少異なる。しかし、これらの点を紫外吸収性不純物の流出が全くないことなどと考え合わせると RNA の分割分別においてはイオン交換樹脂よりむしろ秀れているといえるかもしれない。

RNA は 0.2M NaCl によつて一部分流出するので試料を吸着させるためにはうすいリン酸塩緩衝液を用いた。こうして RNA は ECTEOLA に完全に吸着される。交換基の型は OH 型にした方が Cl 型にした場合よりも溶離の際の回収率が若干よいようである。溶離溶媒にはイオン交換樹脂の場合にならつて食塩溶液を用いたが、0.1M から段階的に塩濃度を上げてゆくと、試料ごとに違うが、一部分ずつ溶離してくる。低分子 RNA では 0.2M ですでに 70~80% の溶離がみられる。Dowex-2 において温和な条件下にやつと得られた全回収率は ECTEOLA ではほぼ 0.2M NaCl で到達してしまう。塩濃度を 0.5M に上げればまた若干量の溶離がみられるが、NaCl だけによつて流出する分割はこの濃度までで出切つてしまい、もはや濃度を上げて出でこない。このことは 0.5M までで回収率の悪い高分子 RNA の場合にとくにはつきりわかるが、これは高分子量

RNA が高濃度食塩水に溶けにくいことによるのであろう。溶媒に水またはごくうすい緩衝液を用い、pH だけを変化させて pH 10 まで変えてもほんの少しずつしか溶離しないが、食塩を加えて 0.2M または 0.5M として pH を上げてゆくと少しずつ新しい分割の流出がある。このように塩濃度を 0.1M~0.5M, pH を 5.6~8 まで段階的に変化させればいくつかの分割を得ることができる。これ以上 pH を上げることは RNA の分解をひき起すと思われるから実際には使えないが、1N NaOH を流せば残つた RNA が流出する。このようにして得られた溶離曲線の一例を第 13 図に示す。



第 13 図 ECTEOLA からの RNA の段階的溶離
カラム: 4cm×1.1cm².
試料: RNA, Y-7, 1mg.

溶離溶媒を 0.1M, 0.2M, 0.5M 食塩溶液, リン酸塩緩衝液で pH 7.2 とした 0.5M 食塩溶液で順次溶離した場合の全溶出量を二三の試料について調べた結果を第 8 表にまとめてみよう。イオン交換樹脂の場合のように分子量の低い試料ほど溶離回収率が高いので溶離溶媒の濃度, pH が低くて溶離するものほど分子量が低いと思われる。全回収率をみるとどの試料についても Dowex-2 のときより高く、分子量 2 万程度までの大きさの RNA ならほとんどが溶離されてしまうから、この程度の大きさの RNA の分割分別には Dowex

第8表 種々の RNA 試料が ECTEOLA より溶離される時の全回収率

試料 RNA	分子量*	食塩溶液による溶離の全回収率				
		塩濃度	0.1M	0.2M	0.5M	0.5M
		pH	5.6	5.6	5.6	7.2**
Y-K3	16,000		5	75		90
Y-7	(250,000)		0	17	21	32
BL-10a	(300,000)		0		25	

* () の分子量は不均一さなどのためにあまりはつきりした値ではない⁵³⁾。

** リン酸塩によつて緩衝させた。

-2より秀れている。そのような場合には溶媒の塩濃度や pH をさらに細かく切つて行けばよく、とくに塩濃度 0.1M~0.2M の間を細分することによつて多くの分割に分けうると思われる。しかし高分子量の RNA の場合には Dowex-2 の場合より溶離の回収率が高くなつていゝとはいへ、30%程度の回収率ではこの方法を実際に分割別に使うことはむずかしい。これらの点に関しては同様の結果が Bradley と Rich⁵⁴⁾ 仁井谷ら⁵⁵⁾ および Commoner ら⁶⁾ によつても最近得られた。

DNA は ECTEOLA から温和な溶媒によつてほとんど大部分が溶離されるので、分割別にはかなり有効であつて、Bendich らは種々の DNA 試料を分割別して多くの興味ある結果を得ている^{29), 56), 57)}。これに引きかえ RNA はうゑに述べた如く充分な分割別は分子量 2 万以下の比較的小さな RNA についてしか行えない。分子量の高い DNA が充分に溶離されるのであるから、高分子量の RNA が充分に溶離されないことは分子量だけの問題ではなくて RNA に特別な構造のために起るのかもしれないことはさきのイオン交換樹脂の場合にも III・1 で述べたが、ここでの ECTEOLA の場合の結果についても考えられる。

III・3 中性塩による沈澱性を応用した分割別*

核酸は銅塩やランタン塩などの重金属イオンの塩によつて不溶性の沈澱を生ずることは古くから知られていた。食塩や硫酸アンモニウムなどの塩によつては沈澱しないと考えられていた。実際

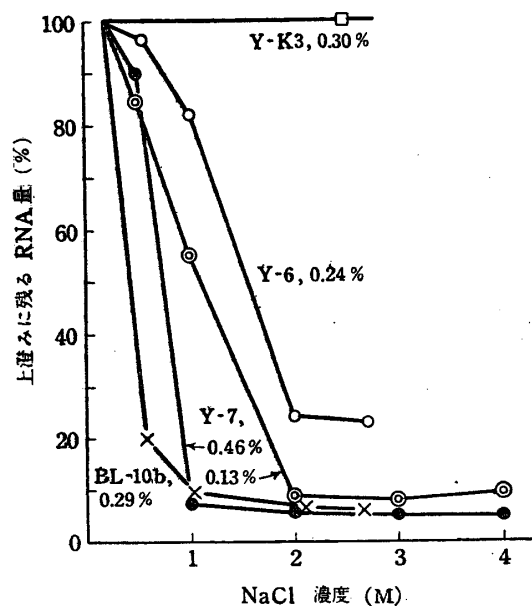
* 一部は文献 47 に発表。

DNA はごく普通にはこれらの塩溶液にはよく溶けているし、RNA でも溶解するものと解釈されていた。しかし、近年分子量の高い RNA が得られるようになったところ、これらは高濃度食塩水^{30), 32)} や硫酸アンモニウム塩³¹⁾ など^{19), 34)} によつて沈澱することが知られるようになった。これまで RNA がこれらの塩溶液に溶けると思われていたのはこれまで扱つていた RNA 試料が低分子量のものであつたためらしい。渡辺研究室においても川出、北村はこれらの点に関して詳しく研究し、その一部はすでに報告した⁵³⁾。

このようなアルカリ金属塩、アルカリ土金属塩やアンモニウム塩などによる RNA の沈澱は不溶性ではなく、中性の適当な溶媒に再び溶かすことが可能である。従つて沈澱させるときも中性塩を用いれば、一旦沈澱させてから再溶解という操作までを含めてかなり温和な条件下に仕事を進めることができる。

分子量の高い RNA は III・1, 2 に述べたようにイオン交換体によつて温和に分割別することはできなかつたが、このような中性塩による沈澱性を利用すれば条件を選んで分別的な沈澱を行わせることによつて温和に分割別することも可能であると考えて研究を進めたところ、以下に述べるような結果が得られた。

一般に中性塩の濃度の高いほど RNA の沈澱量



第14図 食塩による種々の RNA 試料の沈澱率⁵³⁾ 2°, 24 時間後 (BL-10b のみは 2 時間後)

は多くなるが、塩のカチオンの種類によつて異なる。2価カチオンの塩の方が1価カチオンの塩よりも低濃度でRNAを沈澱させ易い。種々の試料についてNaClの濃度を変えたときの沈澱率を調べた結果を第14図にまとめた。分子量2万足らずの酵母RNA, Y-K3はNaCl濃度2.5Mまで調べたが、全く沈澱しない。これにひきかえ分子量数十万の他の試料はNaCl濃度2M以下でほとんど沈澱してしまう。この場合に分子量の高いものほど塩濃度の低い方で多量沈澱する傾向がみられる。これらの点から沈澱のし易さということが分子量と平行関係をもつように思われる。

塩濃度を順次高めて、ある一つのRNA試料を分別的に沈澱させ、得られた各分割のRNAの分子量を求めれば上に考えたような傾向を確かめることができよう。しかし、中性塩によつて沈澱するRNAは分子量数十万のものであるから表面膜法によつて僅かの分子量の差を出すことが難かしい大きさである。ここでは超遠心力場における沈澱の模様を調べて分子の大きさの違いを調べることにした。酵母RNA, Y-6を2M NaClによつて沈澱する分割と沈澱しない分割の二つに分別しそれぞれの0.2M NaCl中での沈澱定数を求めた結果を第9表に示す。この試料は分別する前には4S程度の小さい成分と10~12S程度の大きな成分を含んで不均一であることが認められるが、2M

第9表 酵母RNA, Y-6の分別沈澱による各分割の沈澱定数

試料	沈澱定数	比率*
RNA, Y-6 (未分割)	4.3S 10S 11.5S	(3:4:3)
2M NaCl 上清分割	4.1S	
2M NaCl 沈澱分割	4.3S 12.0S	(1:4)

* 各沈澱定数の成分の量比。

NaClで沈澱を落した上清のRNA分割には10~12S程度の大きな成分を含まれず、4S程度の小さな成分しかなかった。これに反して沈澱の分割には4S程度のものが若干残るが、12Sの成分の比率が未分割のときよりずつと高くなっている。このように沈澱し易さと分子の大きさの間には平行関係があるようである。この点に関しては別の溶媒で溶解度と分子量の間に平行関係のあることがMallete, Lamannaによつてもみられている²⁵⁾。

分子量の高いRNA試料に分子量の低いRNAをまぜてNaCl濃度を高めると沈澱の量は予想値よりも少く、高分子量RNAの沈澱が低分子量RNAの添加によつて妨害されていることがわかった。しかし、このような現象はMgCl₂を用いた場合にはみられない。また、RNA試料の濃度がうすいと沈澱すべき量だけ沈澱しにくくなるので同一の試料で同じ沈澱割合を得るためには同じRNA

第10表 分別沈澱により分別したRNA, Y-6各分割の塩基組成

試料分割	塩基組成**				分析回数
	アデニン	グアニン	シトシン	ウラシル	
RNA, Y-6 (未分割)	1.00	1.02	0.82	1.01	12
1M NaCl 沈澱 68%	1.00	1.05	0.77	0.98	5
1M NaCl 上清 32%	1.00	1.12	0.86	1.00	5
計算した全体平均*	1.00	1.07	0.81	0.98	
2M NaCl 沈澱 85%	1.00	1.05	0.76	0.99	6
2M NaCl 上清 15%	1.00	1.27	1.10	0.95	7
計算した全体平均*	1.00	1.08	0.81	0.98	
0.017M MgCl ₂ 沈澱 46%	1.00	0.99	0.77	1.00	7
0.020M MgCl ₂ 沈澱 18%	1.00	1.02	0.82	1.04	7
0.020M MgCl ₂ 上清 36%	1.00	1.08	0.88	1.01	8
計算した全体平均*	1.00	1.03	0.82	1.01	

* 各分割の塩基組成に各分割の比率をかけて計算した未分割試料の塩基組成。

** アデニンを1.00とした場合のモル比で表わす。

第 11 表* 分別沈澱により分別した RNA, Y-8 各分割の塩基組成

試料分割	塩基組成				分析回数
	アデニン	グアニン	シトシン	ウラシル	
RNA, Y-8 (未分割)	1.00	1.03	0.77	1.01	5
0.015 M MgCl ₂ 沈澱 7%	1.00	1.01	0.75	1.00	5
0.017 M MgCl ₂ 沈澱 14%	1.00	1.04	0.77	1.01	5
0.019 M MgCl ₂ 沈澱 18%	1.00	1.02	0.76	1.02	5
0.024 M MgCl ₂ 沈澱 29%	1.00	1.01	0.77	0.99	5
0.024 M MgCl ₂ 上清 32%	1.00	1.03	0.81	0.99	5
計算した全体平均	1.00	1.02	0.78	1.00	

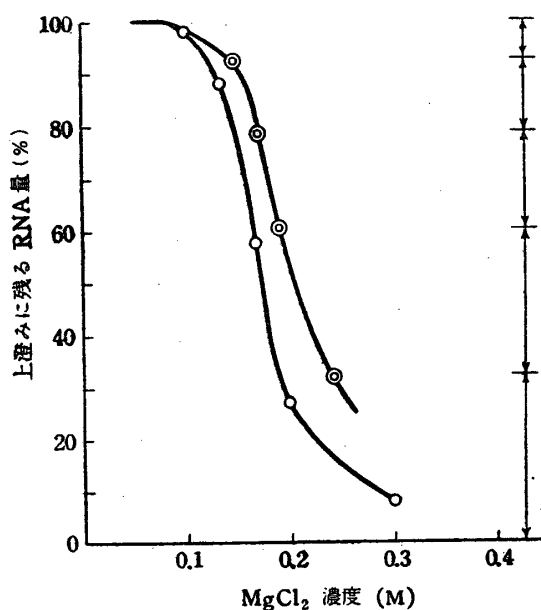
* 表についての注意は第 10 表と同じ。

濃度で実験を行わなければならない。このような点を考えると各試料を分別的に沈澱していく種かの分割に分けて行く場合でもある特定の塩濃度間で沈澱する分割はそのときの RNA 濃度によつて異つたものであるかもしれない。このような点ではイオン交換体による分割分別で各分割がきわ立つて特異的なものであるという事情とは若干趣きを異にする。

分割する操作が常に同じ線できつちりと一つの RNA 試料を分別するというを分別沈澱法で行うことはむずかしいが、とにかく中性塩によつて高分子量の RNA を分割分別することができることがわかつた。この分割分別法では分子の大きさによる分別を行つているらしいが、各分割の化

学的性質の相異を調べてみることにした。

酵母 RNA, Y-6, および 8 を NaCl や MgCl₂ で分別沈澱させ、得られた各分割の塩基組成分析を行つた結果を第 10 表, 第 11 表にまとめた。第 11 表の RNA, Y-8 の分別操作を行つたときの沈澱率は第 15 図に示した。高濃度の NaCl でも溶けている分割 RNA はグアニンとシトシンを多く含むことがみられる。NaCl 濃度が 1M のときより 2M のときの方が可溶分割が少なくなつてグアニンとシトシンが多いという傾向が顕著になる。一方, MgCl₂ でかなり細分しても相互にあまり塩基組成の差がないこともみられるから酵母 RNA では大部分はほぼ一定の塩基組成をもっているが、一部分かなり組成の違つた分割があることを想像させる。MgCl₂ による分別ではこのような分割をあまり濃縮できなかつたが、Y-6 の場合には最も溶解易い分割の方にやはりグアニンとシトシン含量が高い。この場合には 3 分割で塩基組成が異なるようにみえるが、Y-8 で細分した第 11 表の例をみると各分割ともほぼ一定の塩基組成をとつていて相互にほとんどちがいがなく、系統的な変化もない。Y-8 という試料が塩基組成的に非常に均一であるためかもしれないが、MgCl₂ で分割したときの最も可溶性の分割の量比がかなり多く分別されてしまつたので、塩基組成の異つた少量の成分があつたとしてもその存在が最も可溶性分割の塩基組成に反映しなかつたのかもしれない。あるいは、たとえグアニンとシトシンに富んだ分子が Y-8 中にあつたとしても MgCl₂ による分別沈澱では各分割にばらばらに散らばつてしまつてこのような分子をある特定の分割に集める



第 15 図 MgCl₂ による RNA, Y-8 の沈澱率 (2 回の実験) 右側の区間は第 11 表における分け方を示す。

ことができないのかもしれない。

III・4 RNAの分割分別法についての考察

本研究ではRNAを分割分別するために二つの方法を考案した。一つはイオン交換体による吸着、溶離を用いたもので、一つは中性塩による分別沈澱によるものである。この二つの方法はいずれも非常におだやかな条件下にすべての操作を行うことができるから操作の途中でRNAの分解が起つている心配はかなり少ない。序にも述べたようにこの研究が行われる前にRNAを分割分別するためにとられていた酸性溶媒による分別沈澱法などは操作の途中でRNAの変化(分解や変性)を起す危険が多分にあつたが、この報告に述べた方法によつてこの点は全く改善されたと考えられる。

イオン交換樹脂を用いて分割分別する方法とイオン交換繊維を用いる方法は原理的には同じものと考えられるが、吸着能力が大きいことや回収率がやや高いことなどの点で今後実際にRNAの分割分別に応用する場合にはイオン交換繊維を用いた方がよいように思われる。この二つのイオン交換体を用いる方法では分子量数万程度までの大きさのRNAしか分別できないけれども分子量数千から分子量数万程度のポリヌクレオチドをおおよそ分子量的に分別する方法としてはイオン交換体による分割分別法はかなり有用になるであろう。この程度の大きさのポリヌクレオチドを分別する方法は今後RNAの構造の研究になくしてはならないものであるし、またこの程度の大きさのポリヌクレオチドで生物活性をもつものがあればそれらを濃縮してその活性を研究するような場合にもぜひ必要なものとなるであろう。リボヌクレオチドではヌクレオチド重合度の低いオリゴヌクレオチドの分別はすでにイオン交換樹脂による方法がVolkin, Cohn⁵⁹⁾によつて確立されているが、さらに大きさの上ではそれに連続して数万程度までの分子量のポリヌクレオチドがイオン交換体によつて分別できることがわかつたわけである。

分子量が数万以上のRNAをイオン交換体から温和な条件下に溶出させることはできなかつたが、分子量数万以上のRNAも中性塩による分別沈澱の方法によつて分割分別できることがわかつた。分子量20,000程度のRNAは高濃度の食塩

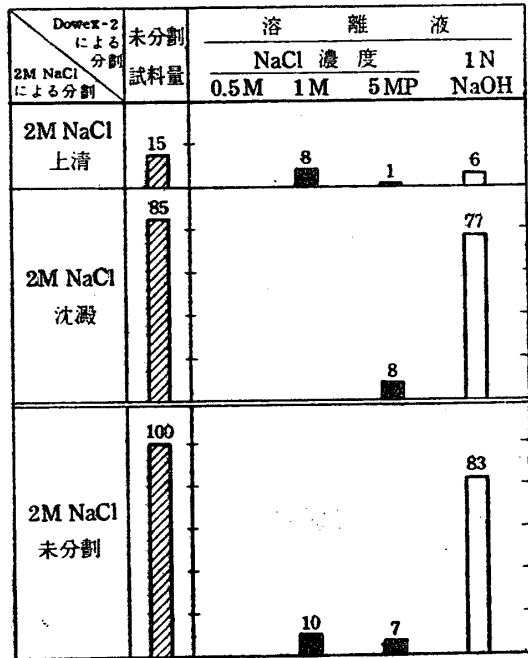
水によつて全く沈澱しないにもかかわらず、分子量数万以上のRNAは沈澱してしまうから分子量数万という境界でRNAを大きく分別することができる。これは食塩水でなくても適当な濃度の中性塩によつても行うことができる。さらに、分子量数万以上のRNAは塩濃度を適当に区切れれば分別的な沈澱をさせて分割分別することができる。

RNAの分割分別に際してイオン交換体による方法と中性塩による方法は分割分別しうるRNAの分子の大きさに関してそれぞれ限界があるが、この両者を適当に組み合わせれば現在一口にRNAと呼ばれる分子量数千から百万ぐらゐの間のポリヌクレオチドをすべて分割分別することができる。もちろんRNAと呼ばれるものが無数の種類の分子の集まりであるとしたらその個々の分子を分別し得うというのではないが、それでも任意にかなり数多くの分割を分別することができるようになったといえよう。

イオン交換体による方法も中性塩による方法も分子量的にRNAを分割分別しているようにみえるが、分子の大きさ以外の要因によつての分別も実際には起つていのではないだろうか。RNAは複雑な高分子であるからイオン交換体による吸着、溶離にしても単なるイオン交換のほか吸着剤に対するvan der Waals力などによる吸着などの要因がどのようにかみ合わさつていかわからないし、中性塩による分別の方法にしても特定のイオンや塩がRNAになんらかの特異的な結合を起すことがあつてそれが分別沈澱にどう響いているかなどといった点はまだよくわからない。RNAの多様性を漠然と考えてもたしかに分子の大きさだけのほか分子の化学組成や分子の形などの点に相異が考えられるが、それらすべてが存在する場合でもこれらの分別方法がそのどれか一つの要因だけによつていとは考えられない。むしろ種々な要因がかみ合わさつて分別されたのであろうが、分子量的な差異というのがどちらの分別法の場合にも大きく現われてしまつたのであろう。従つてこの二つの分別方法は内容的にはかなりちがつた分別方法であると考えの方がむしろ妥当かもしれない。

イオン交換による分割分別方法と中性塩による分割分別方法は用いる対象のRNAの分子量によ

つてそれぞれ限度があることになるが、この二つの分別方法を直接比較しておくことも必要であろう。そこで平均分子量の高い酵母 RNA 標品 Y-6 をまず 2M NaCl によつて沈澱するものとしないうものに分別し、そのそれぞれを Dowex-2 のカラムによつてクロマトグラフして比較してみた。



第 16 図 高分子量 RNA を 2M NaCl により分別した分割の Dowex-2 からの溶離率(%)
5MP: リン酸塩で pH 7.2 に緩衝させた 5M NaCl

その結果を第 16 図のようにまとめてみた。2M NaCl によつて 85% が沈澱し、15% が上清に残る。この上清、沈澱どちらの分割もカラムにかけた場合に 0.5M 以下の濃度の食塩水によつては溶出しない。この両者の差が最も顕著な点は上清分割の約半分はカラムから 1M NaCl によつて溶出するのに沈澱分割の方は全く溶出するものがないという点である。そして上清分割ではリン酸塩緩衝液で pH を 7.2 とした 5M NaCl によつて約 60% 溶離させるのに反し、沈澱分割は約 10% しか溶離しない。このことは上清分割の方が分子の大きさは小さく、沈澱分割の方は大きいという事実となんら矛盾はない。2M NaCl によつて分けた両分割ともにカラムでは pH 7.2 の 5M NaCl で溶出する分割と 1N NaOH によらなければ溶出しない分割とが量比こそちがうが両方とも存在する。従つてこの二つの分別方法は雑把に分子量の異なる分割を分けるという点では似てい

るが、やはり互に異質な方法といわねばならない。

なお、第 16 図でわかるように 2M NaCl で沈澱分割と上清分割に分別してからそれぞれをカラムにかけたとき各溶離液で溶出する分割の和が 2M NaCl によつて予め分別せずにカラムで分割したときの各分割の量に大体等しいことはそれぞれの方別方法が十分に再現性をもっていることを示すものであろう。

III・5 RNA 試料の不均一さについての考察

調製された RNA 標品は分子量が数千から百万程度の大きさのものまでいろいろある。III・4 に述べたように異つた方法ではあるが、二三の方法によつてとにかくこの範囲の大きさのポリヌクレオチド試料をいくつかつの分割に分別することができた。試みた試料はどれも多くの分割に分別されたが、これは以上述べてきたような検討によつて全くでたらめな分割が行われていたとは思えない。そこで用いた試料 RNA はすべてなんらかの点で不均一であると考えられた。

平均分子量の大きな試料も小さな試料もともに分子量的にかなり不均一であるように思われる。酵母の RNA で比較的温和にとり出されたと考えられる Crestfield らの方法による Y-6~9 の試料についてみると、第 9 表にもあげたようにはつきり大きさの異なる少くも二種類の群があることがわかる。このどちらもが天然の細胞内での状態のまま—あるいは天然の状態にきわめて近い状態で抽出されたものだとすると非常に興味深い。酵母細胞のなかの RNA には大きさのかなり違つた少くも二種類の群があることになるからで、そのそれぞれの機能はおそらくおお幅に異つたものであると考えられるからである。Grinnan と Mosher³⁷⁾ は種々の細胞質分割から温和に RNA を抽出しようとしたさいにマイクロゾーム分割からは分子量の高い(沈降定数 7S 程度はある) RNA を抽出できたが、ミトコンドリア分割からは分子量の低い(沈降定数 2~4S 程度の) RNA しか抽出できなかつたという。マイクロゾームとミトコンドリアではたとえ同じ RNA があつてもその存在様式や RNA 以外の物質の影響によつて抽出のされ方は異なるかもしれないけれども、もともとこの二つの顆粒の RNA は大きさが異つてい

ることは充分考えられる。しかし、こういつた点については直接の証明は何も得られていないから本研究で得られたような RNA 試料の分子量的な不均一さが細胞内における状態をそのまま反映したのものとして比較することはできない。むしろこういつた点は今後研究方法の改善に伴ってだんだん明らかになることと思われる。

分割分別された RNA の化学的性質を調べる第一歩として塩基組成を調べたが、この結果について若干の考察を加えよう。平均分子量が数千から数万程度までの比較的分子量の低い酵母 RNA はいくつかの分割にわたって塩基組成はほぼ同じような値をとつていた。このように分子量的に不均一であつても塩基組成はあまり異らないという結果は同程度の大きさの酵母 RNA 試料について Ghuyssen と Desreux²⁷⁾ が分別抽出によつて得た実験結果と非常によく一致する。

試料によつては非常に低分子量の分割にシチジル酸に富むと思わせるようなスペクトルを示す分割もあつたが、おそらくこれは調製過程における分解産物であろうと思われた。一方、かなり温和に調製された Crestfield らの方法による高分子量の RNA, Y-6~9 では III・3 で考えられたように大部分は同じような塩基組成の分子であるが、一部分は分子の大きさもいくらか小さくてグアニンとシトシンの含量が大部分のものよりもかなり多い分子であるように考えられる。このグアニンとシトシンの多い分子は1種類であるか、あるいは何種類もあつて、ある分子はグアニンだけを特に多く含む、ある分子はシトシンだけを特に多く含むようなものであるかは全くわからない。このような塩基組成がかなり異つた分割が分解産物であるということはこの RNA の調製過程からはあまり強く考えられることではないから天然にもこのような塩基組成の分割があつたと考えると興味深い。ところで Crestfield らの方法では RNA を精製するために途中ですでに 1M NaCl によつて 1~2 回沈澱をくり返して沈澱の RNA を集めているのである。こうして得られた RNA がまた再び 1M NaCl によつて分割分別されるということはむしろ不思議なことである。調製過程の途中での 1M NaCl による沈澱の所で分別がいい加減に起つていたためか、あるいは高分子量の RNA か

ら低分子量のある“単位”が比較的簡単に離れるということがあつて調製後の RNA 標品の 1M NaCl 分割分別のときすべてが沈澱せずに上清分割が遊離してくるということなのか、現在のところはつきりしない。両方の可能性が一緒になつて現われた現象かもしれないが、高分子量の RNA も比較的 low molecular weight の“単位”からなるというように考えると都合のよい実験事実もある。

RNA, Y-9 を調製するとき 1 回目の 1M NaCl 沈澱を去つた上清からアルコール添加によつて得た RNA はたしかにグアニンとシトシンが多い(第12表参照)*。この RNA は Crestfield らの方法によれば最後の調製品には入つてこない(Y-9 には入らない)のであるからこの方法では調製にさいしてかなり分割分別を行つてしまつていことになる。

第12表 Crestfield らの調製法で高分子量 RNA を調製するとき 1M NaCl で沈澱しない分割の塩基組成

RNA 試料	塩基組成*			
	グアニン	アデニン	シトシン	ウラシル
Y-9 精製時に 1M NaCl で沈澱しない分割	1.15	1.00	1.18	0.96
Y-9	1.02	1.00	0.80	1.00
Y-K3	1.08	1.00	0.79	1.03

* アデニンを 1.00 とした場合のモル比で表わす。

さて、このように酵母の RNA には平均の塩基組成とはかなり異つた分割があるが、その残りの大部分はほぼ同じような塩基組成であるようにみえる。これをさらに細かく分別して行つて個々の分子まで分別した場合には数多くの種類の塩基組成の分子に分けられるかもしれない。しかし、また個々の分子は相互にあまり異つた塩基組成を持たないかもしれない。もしも後者であるとしたらこの研究で得られたように分子量数千から分子量数十万の RNA までが大體において同じ塩基組成を示すことは次のように解釈することもできるのではないだろうか。ある特定の塩基組成の分子量数千ぐらいの“単位”というものがあつて、これ

* 同様な結果が最近 Davis, Allen⁴²⁾ によつて報告された。彼等によればこの RNA にはいままでも発見されていなかった新しい塩基が他の RNA よりもかなり多く含まれているという。

がいろいろな程度に重合しているのではないかと。けれども実際の RNA 調製品は分子量的にはその平均分子量をはさんで連続的に分布をもっているようにも思われるからある特定の“単位”というものを考えることがあまり意味を持たないかもしれない。結局ここでの結論としては酵母の RNA は塩基組成的にも不均一であるが、大部分はさらにいくつかの分割に分けてもあまり塩基組成に差が見出せないということを述べるに止めねばなるまい。

ウシの肝の RNA, BL-9 は調製の過程で $MgCl_2$ で分割分別を行つていて (II・1 参照), 沈澱し易い 9b と沈澱しにくい 9d が調製品として得られ, 沈澱定数は 9b が 8S, 9d が 3S 程度であつてかなり分子の大きさが違うのに塩基組成が似ていること (第1表参照) をつけ加えておこう。ウシ肝の場合には多くの実験例がないからあまり考察を進めることはできないが, 分子量的にばらつきがあつても大部分の分割が塩基組成的にあまり相違がないということは酵母 RNA だけにみられることでもないように思える。

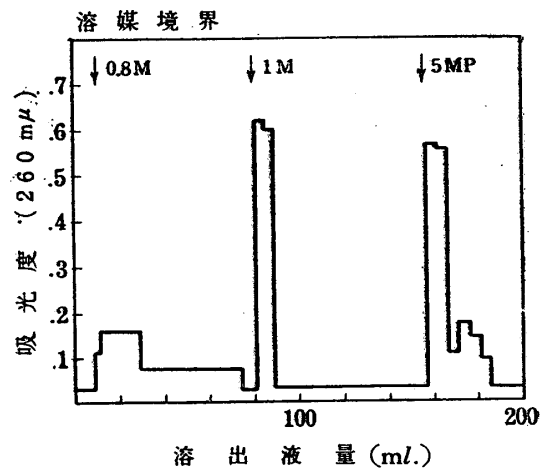
ここで得られた結果はすべて調製され RNA 標品に関するものであつて, 扱つた標品が果して天然状態のものであつたかどうかという点についての問題は何度も述べたように依然として残る問題である。この点は今後生物活性を持つた RNA を扱うことや調製法の検討, 改善などによつて解決されると思われる。

付記 III・6 イオン交換樹脂による DNA の分割分別

イオン交換樹脂を用いて RNA の分割分別を行おうとしたとき吸着の状況などを比較するために DNA の樹脂への吸着, 溶離の様子を少し調べた。DNA のイオン交換樹脂による分割分別の記載はほとんどないといつてもよい状態なのでここに簡単に触れておく。

弱塩基性陰イオン交換樹脂 Amberlite XE-58 では非常によく吸着され, 温和な条件下での溶離ができないことは RNA の場合と同じであつた。強塩基性陰イオン交換樹脂 Dowex-2 に対する挙動はやはり RNA の場合に似ているが, 温和な条件下にほぼ完全に溶離して回収することができ

る。0.5M 以下の塩濃度の食塩水に RNA を溶かし, II・2 で RNA について述べたと同じような方法で Dowex-2, Cl 型カラムにかけると DNA は完全に吸着される。溶離液を流し続けて行くと塩濃度が 0.5M 以下では DNA の溶出は全く認められないが塩濃度をそれ以上に段階的に上げてゆくと濃度を変えるたびに若干ずつの溶出があり, さらに pH を 8 附近まで上げるとそれに応じて溶出がみられる。このような溶出を行つた場合の溶離曲線の一例を第 17 図に示す。



第17図 食塩溶液による Dowex-2 からの DNA の段階的溶離

5MP: リン酸塩で pH 7.2 に緩衝させた 5M NaCl

カラム: 4.0cm × 1.1cm²

試料: DNA, H-1b, 1mg.

溶出率は DNA, H-1b の場合に

0.5M NaCl では 0%,

1.0M NaCl (pH 5.6) では 61%,

5M NaCl (pH 7.2) では 99%

に達する。このように温和な条件下にほぼ 100% の回収が行われる。DNA の場合には高濃度食塩水によつて塩析されることなく, よく溶けているので高濃度食塩水による回収率が高くなつていくことに不思議な点はない。RNA の場合と違って数十万の分子量のものがこのように楽に溶出できることはすでに III・1 でも述べて第 11 図で対比してみた。

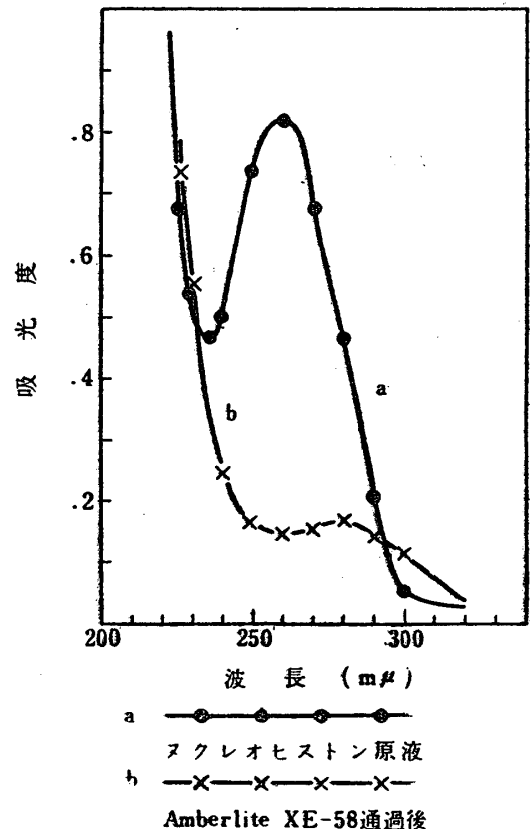
このように, イオン交換樹脂による分割分別の方法は温和な条件で DNA を分割分別できる一つの方法であることがわかつた。しかし, DNA を扱うことは本研究の目的でもなく, また DNA の分割分別は他の方法によつてもかなりの成果が

得られているので (たとえば文献 28, 29, 60~62 など) イオン交換樹脂による DNA の分割分別はあまり立ち入っては研究しなかつた. Bendich らがイオン交換繊維 ECTEOLA を用いて行つた実験は原理的にはここで述べたイオン交換樹脂による分割分別と同じであるが, DNA の吸着量が高いことなどの利点があるから実際には Dowex-2 を用いるよりは好都合と思われる. ECTEOLA による DNA の分割分別は DNA の不均一性の研究に用いられている^{50), 56), 57), 58)}.

付記 III・7 イオン交換樹脂を用いて核酸とタンパク質を分離する試み

イオン交換樹脂を用いて核酸を分割分別しようと試みたとき, DNA や RNA が種々な樹脂に対してどのような挙動をとるか調べた. そのなかで DNA も RNA も弱塩基性陰イオン交換樹脂 Amberlite XE-58 には非常によく吸着され, 1M や 2M の濃さの食塩水などでは容易に溶離してこないことがわかつた. そこで核タンパク質などから核酸だけを除去してしまいたいようなときこの樹脂を使うと, ある程度目的が達せられるのではないかと考え, この樹脂にヌクレオヒストン溶液を流してみた. 用いた試料はウシ胸腺ヌクレオヒストン DNP, T-2 で, 1M NaCl 溶液として充分濃い食塩水で洗つた XE-58, Cl 型カラムに注入し, 1M NaCl を流し続けながら流出液の紫外吸収曲線やヒストンの定性試験を試みた.

第 18 図 a に示した如く試料溶液の紫外吸収は 260m μ に吸収極大, 238m μ に極小をもち, 280m μ 近辺にややふくらみのある典型的なヌクレオヒストン型の吸収曲線である. カラムからの流出液の紫外吸収は b に示した如く, 核酸にもとづく吸収は全然ないとみられ, 280m μ に小さな吸収極大が認められ, これは有核アミノ酸を含むタンパク質であることが考えられる. 一方, このカラムからの流出液にヒストンの定性試験としてアンモニア水を加えると沈澱が出ること, ピクリン酸を加えると沈澱が出るのがみられるが, ミロン反応は陰性であつた. これはミロン反応の感度が低いためであろうが, 流出液中にはヒストンが含まれていると考えられる. これらのことから, ヌクレオヒストン溶液を XE-58 (Cl 型) にかける



第 18 図 ヌクレオヒストンを Amberlite XE-58 にかけて 1M NaCl を流したときの紫外吸収

と DNA は全く吸着されたままヒストンのみが溶離されるように思われる. ただし, この場合ヒストンの全部が溶離されているか, 一部が溶離されているのかは定量してみないのでつきりしない.

同様なことはヌクレオプロタミンの場合にも観察された. 用いた試料はマスの精子のデオキシリボ核タンパク, ヌクレオイリジン DNP, I-1a である. この場合カラムからの流出液中には核酸は含まれていないが, 紫外吸収曲線はやはり 280m μ に吸収極大をもつ. ヌクレオイリジン試料には有核アミノ酸がペーパークロマトグラフによつてはあるかないかはつきりしない位の少量であることと, この場合感度が悪かつたが坂口反応に陰性であつたことなどからヌクレオイリジンのタンパク部分が一度に流出したかどうか疑問視された. しかし, いずれにしてもデオキシリボ核タンパク質は 1M NaCl にとかつて XE-58 のカラムを通せば, 核酸部分だけは樹脂に吸着されて除去されてしまうことはつきりした. 1M NaCl 中ではデオキシリボ核タンパク質は通常大部分は DNA

とタンパクに解離しているが、このようにほとんど完全に解離している条件下でないこの方法で核酸だけを撰択的に樹脂に吸着させることはできないかもしれない。けれどもこの樹脂の核酸吸着能力は強いから多少条件の検討を加えれば、少量の核酸を含む試料から除核酸したい場合などには利用されうると考えられる。リボ核タンパクの場合にも応用の途があるであろう。また、核酸試料中の除タンパクをしようという場合にカチオン交換体で充分によくタンパク質を吸着する能力のあるものを選べば少量のタンパク質まで除くことができるかもしれない。

IV. むすび

この研究の主な結果を総括すると次のようになる。

できるだけ温和に生物材料から抽出、調製した RNA を温和な条件下に分割分別する方法を研究した。陰イオン交換樹脂 Dowex-2 を Cl 型にして RNA を吸着させ、食塩水を基本にした溶離溶媒を用いて塩濃度や pH を変化させることによつて RNA を分別的に溶離させることができた。分子量 2~3 万程度までの大きさの RNA はこの方法で分割に分けることができるが、分子量的に不均一であることがわかった。溶媒の塩濃度が低く pH も低くて溶出するものほど分子量が小さいことがみられる。分割された少量の RNA 試料の分子量をできるだけ簡便に求めるために表面膜法によつて求めることを試みた結果、この方法は他の信頼すべき方法とよく一致する値を与えるので⁵⁾この方法によつて分割分別した試料の分子量を求めた。

Clarke, Schryver 法で調製した酵母 RNA を Dowex-2 によつて分別した各分割の塩基組成は相互にほとんど相違がなかった。

分子量 2~3 万程度までの大きさの RNA の分割分別は Dowex-2 を用いて非常に再現性高く行うことができるが、イオン交換繊維 ECTEOLA を調製してこれによつて分別的な溶離を行つても同じように分割分別することができる。ECTEOLA は樹脂よりも RNA の吸着能が大であるから実際には ECTEOLA を用いる方が都合がよいであろう。

分子量の高い数万から百万に達するほどの大きさの RNA は中性塩によつて沈澱させることができることが最近わかつてきたので、NaCl や MgCl₂ などを種々な濃度にして RNA を分別的に沈澱させることを試みた結果、この方法によつて高分子量の RNA も分割分別できることを知つた。酵母から Crestfield, Smith, Allen の方法で抽出、調製した分子量 20~30 万の RNA をこの方法で分割分別した。沈澱し易いものほど分子量が大きいようで、この試料も分子量的に不均一であることがわかった。高濃度の食塩水にも溶けている分割があつて、これにはグアニンとシトシンに富んだ分割が濃縮されている。すなわち、この試料は塩基組成的にも不均一であつて、大部分は平均の塩基組成に近いが、一部分の分割 RNA のグアニンとシトシン含量が多いように推定された。

イオン交換樹脂 Dowex-2 やイオン交換繊維 ECTEOLA で分割分別する方法と中性塩による分割分別は質的には異つた分別方法であり、適用範囲も異なるが、両者を適当に組み合わせることによつて分子量数千から百万程度までの RNA 標品いずれの場合にも分割分別を温和に行うことができるようになった。

以上のように所期の目的に至る RNA の分割分別の方法の研究を行う道すがらこれに関連して二三の知見が得られたのでこれを III-6, III-7 に追加した。イオン交換樹脂 Dowex-2 によつて DNA が 100% の回収率で分別的に溶離されることを利用して分割分別できることを知り、また、DNA が陰イオン交換樹脂 XE-58 に非常によく吸着して容易に離れないことを利用してデオキシリボ核タンパクのタンパクを DNA からきれいに分別しうる方法を見出したことを記した。

以上の研究の結果充分とはいえないかもしれないが、RNA をかなり温和に分別する方法を手中にすることができた。そこで次に進むべき方向としてはできるだけ天然状態の RNA をとり出すことに気を配りながら RNA の構造についての知見を深めて行くことと RNA の生物学的機能が構造上のどのような点と関聯をもっているかを調べて行くことが考えられる。特殊な生物学的機能を持った RNA を選んでこの RNA の特異性を化学

的立場から研究することにもわれわれは一步を踏み出しているが、このような一面から生物現象の解明に寄与できるのではないかと考えている。

文 献

- 1) J. Brachet, "The Nucleic Acids—Chemistry and Biology", (ed. by E. Chargaff, J. N. Davidson) New York, **II** (1955) 475.
- 2) S. L. Lockingen, A. G. DeBusk: Proc. Natl. Acad. Sci., **41** (1955) 925.
- 3) E. F. Gale, J. P. Folkes: Nature, **173** (1954) 1223.
- 4) A. W. Bernheimer: Biochem. J., **53** (1953) 53.
- 5) T. Minagawa: Biochim. Biophys. Acta, **16** (1955) 539.
- 6) B. Commoner et al: Nature, **178** (1956) 767.
- 7) M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson: Biochim. Biophys. Acta, **24** (1957) 215.
- 8) G. de Lamirande, C. Allard, A. Cantero: J. Biol. Chem., **214** (1955) 519.
- 9) P. S. Olmsted, C. A. Vilee: J. Biol. Chem., **212** (1955) 179.
- 10) G. W. Crosbie, R. M. S. Smellie, J. N. Davidson: Biochem. J., **54** (1953) 287.
- 11) V. G. Allfrey, A. E. Mirsky: Proc. Natl. Acad. Sci., **43** (1957) 821.
- 12) S. Osawa, K. Takata, Y. Hotta: Biochim. Biophys. Acta, **25** (1957) 656.
- 13) K. Moldave, C. Heidelberger: J. Am. Chem. Soc., **76** (1954) 679.
- 14) V. G. Allfrey, A. E. Mirsky, S. Osawa: Nature, **176** (1955) 1042; J. Gen. Physiol., **40** (1957) 451.
- 15) R. Logan, J. N. Davidson: Biochim. Biophys. Acta, **24** (1957) 196.
- 16) E. L. Grinnan, W. A. Mosher: J. Franklin Inst., **255** (1953) 347.
- 17) E. Volkin, C. E. Carter: J. Am. Chem. Soc., **73** (1951) 1516.
- 18) I. Watanabe, K. Iso: J. Am. Chem. Soc., **72** (1950) 4836.
- 19) 北村とも子, 渡辺 格: 日本化学雑誌 **77** (1956) 1287.
- 20) 渡辺 格, 宇井信生: 東大研報告 No. 5 (1950) 17.
- 21) G. Schramm, B. v. Kerekjarto: Z. Naturforsch., **7b** (1952) 589.
- 22) A. A. Hakim: J. Biol. Chem., **225** (1957) 689.
- 23) H. Chantrenne: Bull. Soc. Chim. Belg., **55** (1946) 5.
- 24) J. E. Bacher, F. W. Allen: J. Biol. Chem., **184** (1950) 511.
- 25) M. F. Mallette, C. Lamanna: Arch. Biochem. Biophys., **47** (1953) 174.
- 26) Y. Khouvine, H. de Robichon-Szulmajster: Bull. Soc. Chim. Biol., **34** (1952) 1050, 1056.
- 27) J. M. Ghuyssen, V. Desreux: Bull. Soc. Chim. Belg., **61** (1952) 181.
- 28) G. L. Brown, M. Watson: Nature, **172** (1953) 339.
- 29) A. Bendich, et al.: J. Am. Chem. Soc., **77** (1955) 3671.
- 30) A. M. Crestfield, K. C. Smith, F. W. Allen: J. Biol. Chem., **216** (1955) 185.
- 31) H. Fraenkel-Conrat, R. C. Williams: Proc. Natl. Acad. Sci., **41** (1955) 690.
- 32) J. S. Colter, R. A. Brown: Science, **124** (1956) 1077.
- 33) J. Sacks, P. D. Hurley, J. M. Young, Jr.: J. Biol. Chem., **214** (1955) 723.
- 34) S. K. Dutta, A. S. Jones, M. Stacey: Biochim. Biophys. Acta, **10** (1953) 613.
- 35) 渡辺 格, 三浦謹一郎: "実験化学講座", (日本化学会編) 東京, **23** (1957) 245.
- 36) G. Clarke, S. B. Schryver: Biochem. J., **11** (1917) 319.
- 37) E. L. Grinnan, W. A. Mosher: J. Biol. Chem., **191** (1951) 719.
- 38) E. J. King: Biochem. J., **26** (1932) 292.
- 39) R. Markham, J. D. Smith: Biochem. J., **49** (1951) 401.
- 40) G. R. Wyatt: Biochem. J., **48** (1951) 584.
- 41) K. Miura, K. Suzuki: Biochim. Biophys. Acta, **22** (1956) 565.
- 42) F. F. Davis, F. W. Allen: J. Biol. Chem., **227** (1957) 907.
- 43) 川出由己: 東大理工研報告, **10**, No. 12 (1956)
- 44) 川出由己: 日本化学雑誌, **78** (1957) 376.
- 45) 鈴木撃之: 東大理工研報告, **11**, No. 14 (1957).

- 46) 渡辺 格, 鈴木撃之, 宇井信生, 磯 晃二郎:
日本化学雑誌, **74** (1953) 571.
- 47) K. Miura, T. Kitamura, Y. Kawade: *Biochim. Biophys. Acta*, **27** (1958) 420.
- 48) N. Ui: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **30** (1957) 822.
- 49) R. S. Cox: *Biochim. Biophys. Acta*, **24** (1957) 822.
- 50) S. Osawa, T. Sakaki: *Biochim. Biophys. Acta*, **25** (1957) 195.
- 51) 三浦謹一郎, 今堀和友, 渡辺 格: 日本化学雑誌, **78** (1957) 276.
- 52) E. A. Peterson, H. A. Sober: *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 751.
- 53) 川出由己, 北村とも子: 日本化学雑誌, **78**] (1957) 1801.
- 54) D. F. Bradley, A. Rich: *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 5898.
- 55) 仁井谷久暢: 第6回核酸シンポジウム, 大阪, 1956年9月講演 (蛋白質・核酸・酵素, **1** (1956) 62).
- 56) A. Bendich, H. B. Pahl, S. M. Beiser: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **21** (1956) 31.
- 57) A. Bendich, H. B. Pahl, G. B. Brown: "The Chemical Basis of Heredity", (ed. by W. D. McElroy, B. Glass) Baltimore (1957) 378.
- 58) M. Friedkin, H. Wood, IV: *J. Biol. Chem.*, **220** (1956) 639.
- 59) E. Volkin, W. E. Cohn: *J. Biol. Chem.*, **205** (1953) 767.
- 60) E. Chargaff, C. F. Crampton, R. Lipshitz: *Nature*, **172** (1953) 289.
- 61) R. K. Main, L. J. Cole: *Arch. Biochem. Biophys.*, **68** (1957) 186.
- 62) L. S. Lerman: *Biochim. Biophys. Acta*, **18** (1955) 132.