芳香族レダクトン-Cu²⁺ 混液の酸化反応と ホモポリリボヌクレオチド鎖の切断*

白畑実隆, 村上浩紀, 生田久人**, 山田耕路, 篠原和毅, 大村浩久
(九州大学農学部食糧化学工学科, **日清食品株式会社)

昭和 52 年 3 月 15 日 受 理

Oxidative Reaction of Aromatic Reductone and Cu²⁺ Mixture and Breakage of Homopolyribonucleotide Chains (Studies on the Function of Reductones Part XXV)

Sanetaka SHIRAHATA, Hiroki MURAKAMI, Hisato IKUTA**,
Koji YAMADA, Kazuki SHINOHARA and Hirohisa OMURA
*Institute of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka ; ** Nisshin Food Products Co. Ltd.,
Yodogawa-ku, Osaka*

Effects of homopolyribonucleotides on the Cu²⁺-catalyzed oxidation of noradrenaline and the concomitant breakage of homopolyribonucleotide chains were examined.

1. Poly A, poly G and poly C remarkably stimulated the oxidation of noradrenaline at pH 5.7. At initial stage of the reaction, poly G was the most powerful stimulant, and poly C was more active than poly A. However, as poly G and poly A gradually suppressed the oxidation after the prolonged reaction, poly C exhibited the most stimulative potency on the oxidation in a 2-hour reaction. Poly U had no effect on the oxidation of noradrenaline.

2. Sephadex G-100 gel filtration revealed that poly C was most remarkably broken by noradrenaline-Cu²⁺ mixture. Poly A or poly G was obviously less sensitive to the mixture. Poly U was scarcely broken by noradrenaline and Cu²⁺. It was suggested by the use of Sephadex G-75 and G-200 that poly C having the average molecular weight of 2500 K daltons broken to the fragments whose molecular weights were extensively distributed, however, the most abundant molecular species were still highly polymerised (more than several tens K daltons).

3. The amount of the oxidized noradrenaline bound to homopolyribonucleotides was a molecular per 3~7 nucleotides for any homopolyribonucleotide.

(Received March 15, 1977)

食品成分中のレダクトン類が核酸切断能や抗腫瘍能を有し、また、それらの生理活性が Cu²⁺ の共存下で著しく強められることが知られている。われわれは、植物食品に存在するカテコール類（タンニン類）や、チロシンあるいはフェニルアラニンから代謝されて生成するカテコールアミンなどの一連の芳香族レダクトンによる核酸切断機構を解明する過程において、核酸および核酸成分

が Cu²⁺ 共存下に芳香族レダクトンの酸化を促進することを見出し、その性質および反応機構について検討を加えてきた⁽¹⁻⁴⁾。芳香族レダクトンの酸化におよぼす効果は核酸や核酸成分の種類により、それぞれ異なっていた。本報では、これらの酸化反応と核酸の切断作用との関連を明らかにするために、芳香族レダクトンの中でノルアドレナリンを用い、Cu²⁺ による酸化反応におよぼすホモポリリボヌクレオチド（以下、ポリヌクレオチ

* レダクトン類の機能に関する研究（第 25 報）。

ド) の効果およびこの酸化反応によってひきおこされるポリヌクレオチド鎖の切断現象をしらべた。

実験材料および方法

1. ポリヌクレオチド ポリリボシチジル酸 (ポリ C), ポリリボウリジル酸 (ポリ U), ポリリボアデニル酸 (ポリ A) およびポリリボグアニル酸 (ポリ G) はすべて K 塩として用いた。ポリ A は Sigma 社から, 他の 3 種のポリヌクレオチド類は Behringer Mannheim 社から購入した。ポリ G 以外のポリヌクレオチドは 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.9) に溶解した。ポリ G は分子内水素結合が強く, 溶解性が低いため, 2.5 mM Na_2HPO_4 - 5 mM NaH_2PO_4 (HMP) 緩衝液 (pH 6.7) に溶解した。HMP 緩衝液中での各ポリヌクレオチドの対応するモノヌクレオチドあたりの分子吸光係数⁽⁵⁾ (ポリ C: $\epsilon_{287} = 6.5 \times 10^3$, ポリ U: $\epsilon_{260} = 9.2 \times 10^3$; ポリ A: $\epsilon_{257} = 10.5 \times 10^3$, ポリ G: $\epsilon_{252} = 9.0 \times 10^3$) が知られている。本実験では, ポリ C, ポリ U およびポリ A を酢酸緩衝液に溶解して使用したので, これら 3 種のポリヌクレオチドの酢酸緩衝液中での分子吸光係数を求める必要がある。そのために, まずこれらのポリヌクレオチドの水溶液を調製し, これに HMP 緩衝液あるいは酢酸緩衝液を加えたときの吸光値を求め, 比例計算により酢酸緩衝液中での各ポリヌクレオチドの分子吸光係数 (ポリ C: $\epsilon_{270} = 6.4 \times 10^3$, ポリ U: $\epsilon_{260} = 9.3 \times 10^3$, ポリ A: $\epsilon_{252} = 9.4 \times 10^3$) を算出した。この数値をもとにして, 反応液中の各ポリヌクレオチド数を同一にした。

2. ポリヌクレオチド切断反応 反応液の組成は 8.55×10^{-4} M ポリヌクレオチド, 2.5×10^{-2} M ノルアドレナリン (Fluka 製) および 2.5×10^{-4} M CuSO_4 とし, 37°C で 2 時間反応させた。反応時間中, 経時的にノルアドレナリンの酸化に伴う 490 nm の吸光度の増加を分光光度計 (日立分光光度計 200-10 型) により追跡した。各ポリヌクレオチドのモル数はモノヌクレオチドのそれに換算した値である。また, 反応液の緩衝液は, ポリ G の場合は $1/2 \times$ HMP, 他の 3 種のポリヌクレオチドを用いたときは 50 mM 酢酸緩衝液を使用した。反応終了後, 反応液の pH を測定し, ゲル濾過により, 切断によるポリヌクレオチドの分子量分布の変化を観察した。

3. ポリヌクレオチドに結合した酸化ノルアドレナリン量の推定 ノルアドレナリンの酸化によって生じるノルアドレノクロームはポリヌクレオチド- Cu^{2+} 混液中

では 2 時間の保温によってももはやポリヌクレオチドと結合せず, しかもさらに酸化されることもないようであった。したがって, ポリヌクレオチドに結合している酸化ノルアドレナリンは一電子酸化反応によって生じたノルアドレナリンセミキノンラジカルからノルアドレノクロームに至るまでの分子種であると考えられる。これらの分子種は不安定であり, 遊離の形で得ることが困難であるので直接, 結合状態の酸化ノルアドレナリンの分子吸光係数を求めることにした。 ^3H -ノルアドレナリン ($6.64 \mu\text{Ci}/\text{mmole}$) を含むポリ C- Cu^{2+} 混液を前項と同一の反応組成で 2 時間保温した。反応後, 低分子化したポリ C と結合した酸化ノルアドレナリンを非結合型の酸化ノルアドレナリンなどの低分子物質から Sephadex G-100 を用いて分離した。ポリヌクレオチドに結合した酸化ノルアドレナリン画分を集め, 凍結乾燥後, 一定量の酢酸緩衝液に溶解した。酸化ノルアドレナリンを結合したポリ C は 320 nm に吸収の肩をもっていた。ポリ C はこの波長領域に吸収を示さないので, 320 nm の吸収は酸化ノルアドレナリンのみに由来している。そこで, この溶液の 320 nm での吸収を測定したのち, その放射能を計測した。比放射活性に対する吸光値の割合から, セミキノンと仮定した結合型酸化ノルアドレナリンの分子吸光係数を $\epsilon_{\text{max}}: 1.1 \times 10^4$ と算出した。酸化ノルアドレナリンを結合した各種ポリヌクレオチド溶液について 320 nm での吸光値を測定し, この分子吸光係数を使用してこの酸化物の含量を算定した。一方, ポリヌクレオチド溶液中のヌクレオチド含量は対応する未処理ポリヌクレオチドの吸光値を用いて算出した。

4. ポリヌクレオチドのゲル濾過 ポリヌクレオチド切断反応に用いたと同種の緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム ($1.6 \times 88 \text{ cm}$) に反応液 2 ml を添加し, 同一の緩衝液で溶出した。また, 対照として CuSO_4 液のみで処理したポリヌクレオチド溶液も同様の条件で濾過した。これらの場合の溶出速度は 0.23 ml/min であった。

上述の切断反応によって最も分解されるポリ C については, その様相を詳細に解析するために Sephadex G-75 および G-200 を用いて高濃度尿素存在下で濾過を行なった。カラム ($1.8 \times 150 \text{ cm}$) 中のゲルを 7 M 尿素を含む 1 M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 8.5) で平衡化したのち, 2 ml の反応液を添加し, 尿素-重炭酸アンモニウム溶液で溶出した。流出速度は G-75 では 0.34 ml/

min, G-200 の場合は 0.093 ml/min であった。また, void volume (V_0) を知るために高分子胸腺 DNA を用い, inner volume (V_1) の測定には NaCl を使用した。切断されたポリヌクレオチド断片の溶出容積 V_e から $K_d = (V_e - V_0)/V_1$ を計算し, Hohn ら⁽⁶⁾ の検量曲線より, 切断ポリヌクレオチドの分子量を推定した。

結果および考察

1. ノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液の酸化反応に及ぼすポリヌクレオチドの効果

ノルアドレナリンの酸化反応に及ぼすポリヌクレオチドの効果を Fig. 1 に示す。2 時間反応終了時の pH は, ポリ C, ポリ U, ポリ A では 5.7, ポリ G では 5.6 であ

Fig. 1. Effect of Homopolyribonucleotides on the Cu^{2+} -catalyzed Oxidation of Noradrenaline.

The mixture (polynucleotides: 8.55×10^{-4} M, noradrenaline: 2.5×10^{-2} M and CuSO_4 : 2.5×10^{-4} M, respectively) was incubated in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.9) except for poly G in 1.25 mM Na_2HPO_4 -2.5 mM NaH_2PO_4 (1/2×HMP) buffer (pH 6.7) at 37°C. Oxidation of noradrenaline was followed at 490 nm. After a 2-hr reaction, pH of the reaction mixture was measured and each mixture showed pH 5.6~5.7. Control solution was composed of noradrenaline and Cu^{2+} . Control: ●—●, poly A: ▲—▲, poly G: ■—■, poly C: △—△, poly U: □—□.

った。使用した酢酸緩衝液の pH は 5.9 であったが, 調製したノルアドレナリン溶液がおおよそ pH 5 であったことと, CuSO_4 溶液が酸性であったため反応混液の pH が 0.2 ほど低下した。また, ポリ G では HMP 緩衝液の濃度が低いため, 緩衝能が弱く, 結果的に他のポリヌクレオチドの場合と同様な pH になったものと思われる。

ポリ U は酸化反応にはほとんど影響しなかった。ポリ A, ポリ G およびポリ C は反応初期 2 分以内に大きく酸化を促進したが, その後, 酸化速度は低下し, ポリ A は 60 分, ポリ G は 100 分後にはノルアドレナリン- Cu^{2+} のみの酸化度よりも低くなった。ポリ A よりもポリ G の方が酸化促進の程度は強かった。これは, すでに示したように⁽²⁾, アデニンとグアニンではアデニンの方が酸化促進能が強かったことと異なっている。しかし, ヌクレオチドではグアノシンの方がアデノシンよりも酸化促進能が強く, モノヌクレオチドでは AMP と GMP は同程度の効果を示した。アデニンの場合を除けば, 塩基, ヌクレオチドおよびモノヌクレオチドでは反応初期の急速な酸化促進効果は認められず, その効果は比較的ゆるやかにあらわれた。一方, DNA やアプリン酸およびアピリミジン酸では反応初期に急速な酸化促進が認められた⁽¹⁾。ポリ A, ポリ G およびポリ C においても初期の急速な酸化促進が生じたことから, 高分子核酸分子のコンホメーションやスタッキングによる塩基の規則的な配列がその強い酸化促進能に関与していることが推定される。ポリ U がほとんど酸化促進能を示さないことは, ウラシルの pK_a が, アデニン, グアニンおよびシトシンに比べて高いために, 中性および酸性領域では Cu^{2+} との錯体が形成されにくいこと, また, IR 測定⁽⁷⁾ では, ポリ A, ポリ G およびポリ C には室温下で塩基間のスタッキングが認められるのに対し, ポリ U ではほとんど認められないことと関連しているであろう。ポリ A およびポリ G では反応後期には酸化抑制能が認められた。これは, ポリ A やポリ G が Cu^{2+} と比較的強固な錯化合物を形成し, ノルアドレナリンの酸化に利用される Cu^{2+} をキレートしてしまうためと考えられる。ポリ C では, 初期の急速な酸化促進後, 対照と同程度の酸化速度で進行し, 60 分以後はその差が縮まってきたが, 対照との酸化程度の逆転は生じなかった。

2. Sephadex G-100 によるポリヌクレオチド鎖切断の検出

ノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液処理による各ポリヌクレ

オチドの Sephadex G-100 ゲル濾過パターンの変化を Fig. 2 に示した。各図中、対照ポリヌクレオチド、すなわち、 Cu^{2+} のみと混合保温したものの溶出経過を紫外吸収によって追跡すると●—●で表わされる。いずれのポリヌクレオチドの場合でも鋭い単一のピークとなり、これらが Sephadex G-100 粒子内に拡散できないほどの高分子であることを示唆している。一方、これらのポ

リヌクレオチドをノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液で処理すると、紫外吸収による溶出パターンは△—△で示すようになった。溶出分画番号 45~60 付近の強い紫外吸収は反応液中の遊離のノルアドレナリンあるいはその酸化物に由来するものである。したがって、ノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液で切断され低分子化したポリヌクレオチド断片に基づく紫外吸収は分画番号 15~40 程度の範囲に

Fig. 2. Elution Patterns of Homopolynucleotides Treated with Noradrenaline- Cu^{2+} Mixture by a Sephadex G-100 Column.

Reaction mixture (2ml) was applied on a column (1.6×88 cm). Elution was performed with acetate buffer except for poly G which was filtered in HMP buffer under room temperature. Each fraction volume and elution velocity were 4.2ml and 0.23 ml/min, respectively. Ultraviolet absorbance was measured at maximum wavelength of each polynucleotide.

UV absorptions of polynucleotides treated with Cu^{2+} (control): ●—●, and polynucleotides treated with noradrenaline- Cu^{2+} : △—△. A prominent peak at fraction number 45~60 in each elution pattern was on account of free noradrenaline and the oxidized products. Oxidized noradrenaline bound to depolymerized polynucleotide fragments was detected by the absorbance at 490 nm: □—□.

ある。また、□—□で示されるように、ノルアドレナリン-Cu²⁺ 混液処理したポリヌクレオチド断片には可視部吸収も認められ、酸化ノルアドレナリンがポリヌクレオチドに結合していることが推定された。ただし、ポリ C の場合には分解が著しく、多分子種に分布したため、1 分画あたりのヌクレオチド含量が低く、したがって、この操作では可視部吸収はほとんど検出できなかった。各ポリヌクレオチドにおよぼすノルアドレナリン-Cu²⁺ 混液の効果を調べると、ポリヌクレオチドの中で、ポリ C が最もよく分解された。反応後、ポリ C はす抜け画分にはほとんどなくなり、低分子画分にピークが移動した。ポリ A およびポリ G ではす抜け画分に 54% および 72% それぞれ残存した。ポリ A がノルアドレナリンの溶出位置までの広範な分子量分布をもつ低分子画分に分解されるのに対し、ポリ G は比較的高分子断片が生成した段階で反応が停止するように思われる。ポリ U ではまったく切断が認められなかった。

このように、ノルアドレナリン-Cu²⁺ 混液処理ではポリ C が最も切断を受けやすく、これは酸化反応においてもポリ C が最も強い酸化促進能をもつことと一致する。ポリ A およびポリ G ではポリ C の場合ほど著しい切断は起らなかった。これはポリ A およびポリ G においては初期の著しい酸化促進能に続いて酸化抑制能があらわれることと関連があると考えられる。また、ほとんど酸化促進能を示さないポリ U では切断もまったく認められなかった。これらのことは、芳香族レダクトンの酸化反応におよぼすポリヌクレオチドの酸化促進効果とホスホジエステル結合の開裂が深く結びついていることを推定させる。ノルアドレナリン-Cu²⁺ 混液によるポリヌクレオチド鎖の切断の程度がポリヌクレオチドの種類により大きく異なることは、DNA あるいは RNA において切断を受けやすい特定の塩基配列部位が存在する可能性を示唆する。著者ら⁽⁹⁾は、芳香族レダクトン-Cu²⁺ 混液によりアプリン酸が特異的に分解されることから、DNA において、ピリミジンクラスターが特異的に切断されることを推定した。また、その切断様式が主としてシチジル酸を切り出すものであるとしている。今回の実験はこれらの結果を支持するものである。

3. Sephadex G-75 および G-200 によるノルアドレナリン-Cu²⁺ 混液処理ポリ C の分離

Sephadex G-100 による分離では検量曲線が得られていないため、分子量の推定ができなかった。Hohn ら⁽⁶⁾

は Sephadex G-75 の場合について、1M 重炭酸アンモニウム (7M 尿素を含む) を用いて検量曲線を得ている。そこで、37°C、2 時間ノルアドレナリン-Cu²⁺ 混液処理をしたポリ C を、Sephadex G-75 を用いて彼らと同一の条件で分離した。また、対照として Cu²⁺ のみで処理をしたポリ C を同様にゲル濾過した。Fig. 3 (a) に示すように、Sephadex G-75 では約 44% がす抜け画分に溶出してきた。また、低分子画分は漸次減少しており、*K_d* 値から分画番号 35 のポリ C 断片は 2.1×10^4 程度の分子量であると推定される。前項で示したように、Sephadex G-100 を用いた場合はす抜け画分にはポリ C 断片はほとんど認められず、UV 吸収のピークは低分子画分に移行した。Sephadex G-75 による分子量の推定から、Sephadex G-100 において認められたピークは少なくとも数万以上の分子量を有すると考えられる。Sephadex G-75 の場合と同様な条件で Sephadex G-200 を用いて分離したものが Fig. 3 (b) である。G-200 の場合の検量曲線は得られていないが、7M 尿素を用いて溶出したため、分子間の相互作用は少なく、G-75 の場合と同様に分子量にしたがって分離されているものと考えられる。G-100 において認められたピークはさらに広がっており、高分子部分においても広範な分子量分布をもつ断片に切断されていることを示している。なお、前項で述べたように、本図において NaCl の溶出位置にみられる強い紫外吸収ピークは遊離のノルアドレナリンおよびその酸化物に基づくものである。アクリルアミドゲル電気泳動を用いた切断の解析では、平均分子量 2.5×10^6 のポリ C がおよそ 2×10^5 程度の平均分子量をもつ広範なポリヌクレオチド断片に切断された。

4. ポリヌクレオチド中の酸化ノルアドレナリンの結合量

前項で分離して得た酸化ノルアドレナリンを結合したポリヌクレオチド分解物溶液はそのままでは可視部吸光度が低く、酸化ノルアドレナリンの結合量を計算できない場合もあった。そこで、このヌクレオチド画分を集め、脱イオン水に透析して脱塩した後、凍結乾燥を行ない、ポリ G の場合は HMP 緩衝液、他の 3 種のポリヌクレオチドの場合は酢酸緩衝液に再溶解して 320 nm およびおのおののポリヌクレオチドが示す極大波長での紫外部吸収を測定した。

本法によって、ノルアドレナリン-Cu²⁺ 混液によって部分分解を受けたポリヌクレオチド断片中の酸化ノル

Fig. 3. Elution Pattern of Poly C Treated with Noradrenaline- Cu^{2+} on a Sephadex G-75 and G-200 Columns.

Reaction mixture was separated by a column (1.6×150 cm) equilibrated with 1 M ammonium bicarbonate containing 7 M urea. Elution velocity was 0.34 ml/min for Sephadex G-75 (a) and 0.093 ml/min for Sephadex G-200 (b), respectively. Each fraction volume was 3.7 ml. DNA and NaCl were also applied on the both columns. Eluted points of these markers were shown by arrows. In (a), molecular weight of polynucleotide fragmented by the reaction was estimated by the method of Ref. 7, using the equation $Kd = (V_t - V_0)/V_1$. V_t means elution volume of the fragmented polynucleotides. V_0 indicated the void volume, which was obtained by elution of highly polymerized DNA. Inner volume (V_1) was detectable by the filtration of NaCl. Molecular weights of the fraction 35 and 40 were shown by bold arrows, respectively. UV absorption of poly C treated with Cu^{2+} : ●—●, and poly C treated with noradrenaline- Cu^{2+} : ▲—▲. A prominent absorption at fraction number 85~100 in (a) and (b) was on account of free noradrenaline and the oxidized products, as depicted in Fig. 2.

ドレナリン量を推定するためには、いくつかの前提条件がある。酸化ノルアドレナリンに関して、その1つは、ポリヌクレオチドと結合しているノルアドレナリンのすべてが酸化型であることである。ノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液で DNA を処理すると酸化ノルアドレナリンの他に還元型のそれも含まれていることが知られている⁽¹⁾。部分分解されたポリ C に結合した ^3H -ノルアドレナリンは 5% TCA (トリクロル酢酸) によって完全に除去され、濾紙電気泳動によって TCA 上清中にはノルアドレノクロームなどのノルアドレナリン酸化物は存在したが、還元型ノルアドレナリンは検出されなかった。このことは、ポリ C に結合したノルアドレナリンの大部分が酸化型であることを示唆していた。また、酸化ノルアドレナリンは 1 分子種のみから構成されているのではなく、酸化反応の進行にしたがって、セミキノンからさらに 4 個

のプロトンが引き抜かれたノルアドレノクロームに至る一連の化合物の混合物である可能性がある。したがって、これらの化合物の存在比により酸化ノルアドレナリンの分子吸光係数は若干の変動が生じるであろう。

一方、溶液中のポリヌクレオチドの吸光度は塩基のスタッキング等の安定化作用によって、対応するモノヌクレオチドの和のそれよりも約 30% 程度低くなっている⁽⁹⁾。このことは、ポリヌクレオチドの分解度によってモノヌクレオチドあたりの吸光値が変化しうること示唆している。ノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液によって低分子化したポリ C 断片の分子量は前述のように少なくとも 10^4 程度であった。このポリヌクレオチド中のリン原子あたりの紫外吸収度は未処理ポリ C ($\text{MW} \approx 2.5 \times 10^6$) のそれとほとんど変化がなかった。このことは 10^4 程度のポリヌクレオチド分子の高次構造の紫外吸収におよぼす

Table I. Amount of the Oxidized Noradrenaline Bound to Homopolyribonucleotides

Homopolyribonucleotides	Nucleotides per bound oxidized noradrenaline
Poly A	7
Poly G	3
Poly C	5
Poly U	6

Polynucleotide fraction treated with noradrenaline- Cu^{2+} mixture was collected by Sephadex G-100 gel filtration as shown in Fig. 2. The fraction was dialyzed against deionized water, then lyophilized and redissolved in acetate buffer except for poly G in HMP buffer.

Content of each nucleotide was measured by UV absorption. Molecular weight of mononucleotide in each polynucleotide was calculated as follows; XMP-K- H_2O (X: A, G, C or U), then molecular weight of mononucleotide in poly A, poly G, poly C and poly U were 367, 363, 343 and 344, respectively. Molar extinctions of mononucleotides in corresponding polynucleotides used for the calculation were the values in acetate buffer. In case of poly G, the value was estimated in HMP buffer. These values were shown below; poly A: 9.4×10^3 , poly G: 9.0×10^3 , poly C: 6.4×10^3 and poly U: 9.3×10^3 .

Content of oxidized noradrenaline bound to each depolymerized nucleotide fragment was measured by the absorption at 320 nm, since the absorption of oxidized noradrenaline was higher at 320 nm than at 490 nm. Molar extinction of oxidized noradrenaline was 1.1×10^4 (λ : 320 nm) in acetate buffer. The value was calculated by the comparison of number of oxidized ^3H -noradrenaline bound to depolymerized poly C with optical density at 320 nm of corresponding oxidized noradrenaline.

影響が 10^6 程度の高分子ポリヌクレオチドと異なっていないことを示している。還元型ノルアドレナリンは 280 nm に吸収極大 (ϵ_{max} : 3.5×10^3) をもっている。処理ポリ C と未処理ポリ C の 280 nm での分子吸光係数がほぼ等しかったことは、この低分子化したポリヌクレオチド中には還元型ノルアドレナリンはほとんど存在していないことを推定させる。

これらを考慮して各ポリヌクレオチドへの酸化ノルアドレナリンの結合量の概算値を Table I に示す。それによれば、ポリ A では 7、ポリ G では 3、ポリ C では 5 およびポリ U では 6 スクレオチドにそれぞれ 1 個程度の割合で酸化型ノルアドレナリンが結合していることになる。これらの結果から、ポリ G への酸化型ノルアドレナリンの結合量は他の 3 種のポリヌクレオチドに対する場

合よりもいくらか多いと考えられる。すでに、仔牛胸腺 DNA をノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液で処理した場合の DNA への酸化型ノルアドレナリンの結合量は 10 スクレオチドに 1 個程度であると推定したが⁽¹⁾、今回の結果はこの値とはほぼ一致する。ノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液によるポリヌクレオチド切断反応では、ポリヌクレオチドの種類によってその感受性が顕著に異なる。しかし、酸化型ノルアドレナリンのポリヌクレオチドへの結合量の多寡はその感受性の差を説明しうるほど著しくはなかった。したがって、酸化型ノルアドレナリンのポリヌクレオチド鎖への結合とその切断反応には、必ずしも深い関連はないと推定される。

要 約

Cu^{2+} 共存下でノルアドレナリンの酸化反応におよぼすポリヌクレオチドの効果およびその反応に伴うポリヌクレオチド鎖の切断現象を調べた。

(1) Cu^{2+} によるノルアドレナリンの酸化は pH 5.7 で、ポリ A、ポリ G およびポリ C により反応初期に大きく促進された。その程度はポリ G が最も著しく、ついでポリ C で、ポリ A の効果は比較的弱かった。しかし、ポリ G およびポリ A は反応の進行に伴って酸化抑制効果があらわれ、したがって、2 時間反応後にはポリ C が最も大きな促進効果を示した。ポリ U は酸化反応にほとんど影響を与えなかった。

(2) Sephadex G-100 によるゲル濾過から、ポリ C がノルアドレナリン- Cu^{2+} 混液により最も著しい切断を受けることが明らかとなった。ポリ A およびポリ G ではゲルをす抜けする高分子部分がかかり残存した。ポリ U では切断はまったく認められなかった。また、Sephadex G-75 および G-200 を用いたゲル濾過から、ポリ C の切断により主として数万以上の分子量をもつ断片が生成するが、その分子量分布は非常に広いことが推定された。

(3) 酸化ノルアドレナリンのポリヌクレオチドへの結合量はいずれの場合でも 3~7 スクレオチドに 1 個程度であった。

- (1) 白畑実隆, 村上浩紀, 大村浩久: 九大農学芸誌, 29, 1 (1974).
- (2) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農化, 49, 401 (1975).
- (3) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農化, 49, 475 (1975).
- (4) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農

- 化, **50**, 193 (1976).
- (5) P. Cohen and C. Kidson : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 458 (1969).
- (6) T. Hohn and H. Schaller : *Biochim. Biophys. Acta*, **138**, 466 (1967).
- (7) E. W. Small and W. L. Peticolas : *Biopolymers*, **10**, 1377 (1971).
- (8) K. Yamafuji, H. Murakami and M. Shinozuka : *Z. Krebsforsch.*, **73**, 195 (1970).
- (9) V. I. Danilov and S. N. Volkov : *Biopolymers*, **14**, 1205 (1975).
-