報 文

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 54, No. 7, pp. 517~525, 1980]

ガンマ線照射による DNA 塩基, デオキシヌクレオシド およびデオキシヌクレオチドの変化

小林 光, 白井和雄
(日本大学農獣医学部農芸化学科)

昭和 54 年 7 月 4 日 受理

Change in DNA Bases, Deoxynucleosides and Deoxynucleotides by γ -Irradiation

Tsuya KOBAYASHI and Kazuo SHIRAI
Department of Agricultural Chemistry, College of
Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Setagaya-ku, Tokyo 154

Aqueous solutions of DNA bases, deoxynucleosides, deoxynucleotides, and mixtures of DNA base and deoxyribose were γ -irradiated in the presence of air or in nitrogen atmosphere. Each solution was prepared at a concentration of 5×10^{-4} M.

UV absorption spectra were measured directly on the test solutions, while the remaining substances and unaltered liberated bases were determined after paper chromatographic separation. The UV absorption spectra were not always depressed with decreases in remaining substances when treated with higher irradiated dose level. Adenine and cytosine appeared to be more stable in free form than in deoxynucleoside or deoxynucleotide form in nitrogen atmosphere.

Ammonia and inorganic phosphate were also determined. Ammonia formation was low from thymine, thymidine and thymidine monophosphate, which have no amino group in their side chains. It will be noted that nitrogen in ring scarcely contributes to ammonia formation. Inorganic phosphate formation from nucleoside of pyrimidines was greater than from that of purines.

It was observed by CD spectrometry that the conformation change of deoxycytidine by γ -irradiation was greater than that of deoxycytidine 5'-monophosphate. (Received July 4, 1979)

緒 言

生物体に放射線を照射すると、細胞の致死あるいは変異が起る。その主な原因の一つは核酸が変化を受けるためと考えられているが、核酸は複雑な構造を有する高分子化合物であり、また一方では致死あるいは変異を引き起こせる放射線の線量は比較的少量であるため、放射線化学的な核酸の変化と致死、あるいは変異発生の関係を解明することは困難である。

本実験では、その関係解明のためのきわめて基礎的な段階として、DNA の構成成分である塩基、デオキシヌ

クレオシドおよびデオキシヌクレオチドに、かなり大線量の γ 線を照射した場合における変化を調べるとともに、これら核酸構成成分の γ 線に対する安定性を比較した。

核酸の放射線分解に関しては、すでに多数の報告がある⁽¹⁻⁷⁾。Scholes ら⁽¹⁻⁴⁾は、酵母の RNA、胸腺の DNA などの水溶液に X 線を照射した後、アンモニア、パンスライク窒素、無機リン酸、酸性物質、遊離塩基などの定量を行った結果より、リン酸エステルの結合ならびにグリコシド結合の切断、および核酸塩基の脱アミノ反応と開環などが起るとしている。また、Scholes らは同時に、

水溶液において核酸にX線を照射した場合と、過酸化水素と第一鉄塩より化学的に生成させたヒドロキシ・ラジカルを作用させた場合の反応が類似していることより、イオン化放射線による反応はヒドロキシ・ラジカルの間接作用であることを示唆している。また、Scholes らは、DNA のX線照射の際に認められる粘度の低下は水素結合の開裂により起るとしている。

核酸構成成分の放射線に対する安定性についての報告は、Barron ら⁽⁵⁾、久保田ら⁽⁶⁾および Schachinger ら⁽⁷⁾のものがある。これらの報告は、いずれも塩基の型の場合が最も安定性が小であるとの結果を示しており、Barron らはその結論において、“ペントースやリン酸の付加により分子が複雑になるに従ってイオン化放射線に対する抵抗性は増大する”と記している。しかしながら、これら報告の実験では、Barron らおよび Schachinger らはX線を照射した検体溶液についてそのまま測定した紫外吸収スペクトルの吸光度より残存量を算出しており、久保田らは γ 線照射した検体溶液についてペーパークロマトグラフィーを行って残存試料と分解生成物を分離定量しているが、検体溶液濃度にかかなりの差があり、いずれも問題点があると考えられる。

そこで、本実験では検体濃度を同一にし、照射後直接紫外吸収スペクトルを測定する一方、残存成分をペーパークロマトグラフィーで分離した。また、それぞれの照射検体について、アミノ酸自動分析計を用いてアンモニア生成量の定量を、デオキシヌクレオチドについては遊離する無機リン酸の定量を行った。デオキシシンチジンおよびデオキシシンチジン 5'-モノリン酸については、円偏光二色性スペクトルの測定によりコンフォーメーションの変化についても調べた。

実験方法

1. 試料 本実験に用いた試料は、Table I に示す13種類である。これら試料はいずれも Sigma 社製で、照射実験に先立って紫外吸収 (UV) スペクトルの測定を行い、おのおの極大吸収における分子吸光係数を求め純度を確認した。

2. 照射検体の調製 一部は、それぞれの試料を3回蒸留水を用いて 5×10^{-4} M の水溶液とし、別々に 10 ml 容のガラスアンプルに 8 ml ずつ注入し、そのまま熔封した。他の一部は、あらかじめ 30 分間窒素通気した3回蒸留水で同様に調製し、アンプルに注入後ヘッドスベ

Table I. Samples Used in This Experiments

DNA base	Adenine (Ade) Guanine (Gua) Cytosine (Cyt) Thymine (Thy)
Nucleoside	Deoxyadenosine (dAdo) Deoxyguanosine (dGua) Deoxycytidine (dCyd) Thymidine (dThd)
Nucleotide	Deoxyadenosine 5'-monophosphate (dAMP) Deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP) Deoxycytidine 5'-monophosphate (dCMP) Thymidine 5'-monophosphate (dTMP)
Deoxyribose	dRib

ースを窒素置換して熔封した。塩基 + dRib の検体は、それぞれの試料について最終濃度を 5×10^{-4} M に調製した。ただし、Gua は水に難溶であるため、Gua 単独および Gua + dRib 検体は 0.1 N 塩酸溶液である。

3. 照射条件 照射は 16 kCi の ^{60}Co - γ 線照射装置を用いた。照射線量は各検体について、空気存在のもの、ならびに窒素置換を行ったものともに、0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 および 2.0 メガラド (Mrad) の6段階である。この際の線量率は、0.3 Mrad 照射以下のものについては 3.6 krad/min で、0.5 Mrad 照射以上のものについては 9.4 krad/min である。

4. 照射検体の UV スペクトルの測定 各段階の照射検体を 10 倍に希釈し、自記分光光度計 (島津 MPS-5000) により UV スペクトルを測定した。

5. 照射後の残存あるいは遊離生成塩基、残存ヌクレオシドおよび残存ヌクレオチドの分離定量 これらの塩基、ヌクレオシドならびにヌクレオチドの分離定量は、ペーパークロマトグラフィーによった。すなわち、照射塩基については、検体の 1 ml を Whatman No. 1 濾紙 25×35 cm の半分の部分に直線状に繰返しスポットし、他の半分の部分には同種の非照射の検体を同様な方法でスポットし展開した。照射ヌクレオシドおよび照射ヌクレオチドについても上記と同様に行い、濾紙の 1/3 の部分にそれぞれ検体を、次の 1/3 の部分に同種の非照射の検体を、残りの部分に同種の非照射塩基の検体をスポットし展開した。

展開後、紫外線ランプの下で検出される非照射検体の

Table II. Parameters for Paper Chromatography and Extraction, and Wavelength at Which Absorption Was Measured for Determination

Substance	Developing solvent	Eluent	λ at which measured ($=\lambda_{max}$) (nm)
Ade	dil. NH_4OH (pH 10) ⁽⁸⁾	0.1N HCl	263
dAdo		H_2O	260
dAMP		H_2O	260
Gua	<i>tert</i> -Butanol : methylethylketone : H_2O : NH_4OH (40 : 30 : 20 : 10) ⁽⁹⁾	0.1N HCl	249
dGuo		0.1N HCl	249
dGMP		0.1N HCl	249
Cyt	<i>tert</i> -Butanol : methylethylketone : H_2O : NH_4OH (40 : 30 : 20 : 10) ⁽⁹⁾	0.1N HCl	276
dCyd		0.1N HCl	280
dCMP		0.1N HCl	280
Thy	Upperphase from a mixture of ethylacetate : H_2O : formic acid (60 : 35 : 5) ⁽⁹⁾	0.1N HCl	265
dThd		0.1N HCl	267
dTMP		0.1N HCl	267

クロマトグラム上の吸収帯または蛍光帯の部分と、照射検体のクロマトグラムのそれに対応する部分を切り取り、それぞれ細切し試験管に入れ、溶出溶剤を 10 ml ずつ加え、30°C で 24 時間放置して溶出させた。それぞれの溶出液について UV スペクトルを測定し、最大吸収波長における吸光度を求め、非照射検体の吸光度との比率から照射検体中の残存量あるいは遊離塩基量を算出した。

同種類の塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドの各系列についての展開溶剤、展開後切り取った部分よりの溶出溶剤および定量値計算のために吸光度を読んだ波長（最大吸収波長）は、それぞれ Table II に示すとおりである。これらの分離定量の実験は同一検体について 4 回繰返した。

6. アンモニアの定量 γ線照射により生成するアンモニアの定量は、アミノ酸自動分析計（日立 KLA-5 型）により行った。

7. 無機リン酸の定量 γ線照射によりデオキシヌクレオチドから遊離する無機リン酸の定量は、Chen ら⁽¹⁰⁾の方法に基づいて行った。すなわち、照射検体に 10% アスコルビン酸、2.5% モリブデン酸アンモニウムおよび 6N 硫酸を加え、37°C で 1.5 時間反応させた後、660 nm における吸光度より無機リン酸量を算出した。

8. dCyd と dCMP の円偏光二色性 (CD) スペクトルの測定 最適条件での CD スペクトルを得るため、照射後の検体をおのおの原液の 3/10 の濃度にし、10 mm セルを用いて測定した。希釈には 5 回蒸留水を用いた。測定は JASCO J-20 自記旋光分散計を用いて行い、分

子楕円率の算出は次の式によった。

$$[\theta_k] = \frac{\theta_\lambda}{C \times l} \times 100, \quad \theta_\lambda = \pm H \times S$$

ただし、 $[\theta_k]$: ポジティブ極大波長における分子楕円率、 θ_λ : 楕円率 (deg), C : 濃度 (mol/l), l : セルの光路長 (cm), H : 記録紙の読取り値 (cm), S : スケール (deg/cm) である。照射後の検体の dCyd および dCMP 残基モル濃度 C は、同一検体についてペーパークロマトグラフィーにより分離定量した濃度を用いた。測定は、同一検体について 3 回繰返した。

実験結果

1. 照射検体の UV スペクトルの測定結果

室素置換したものについて測定した UV スペクトルは、Fig. 1 a) ~ d) に示したとおりである (Fig. 1 の吸光度は原液換算した値である)。

どの系列の場合も、線量の増加とともに概して吸光度は減少し、極大波長はシフトした。4 種の塩基系列の中で、Gua 系列および Cyt 系列では変化が顕著であった。ただし、Gua は塩酸溶液であるため、他のものと比較はできない。

照射線量の増加と吸収スペクトルの低下の関連は必ずしも一様でなく、Ade 系列では 1.0 Mrad を超えると Ade では低下が著しいが、dAdo および dAMP ではそれほど顕著ではなかった。

Cyt 系列において、Cyt, dCyd および Cyt+dRib の 1.0 と 1.5 Mrad 照射を比較すると、1.5 Mrad のほうが吸光度が増加していた。Thy 系列においても 1.0 Mrad

Fig. 1. UV Transient Absorption Spectra of γ -Irradiated Solutions in Nitrogen Atmosphere. a) Adenine series, b) Guanine series, c) Cytosine series, d) Thymine series. The numerals on the lines represent irradiated doses in Mrad.

および 2.0 Mrad 照射で同様の傾向が認められた。

2. 残存・遊離生成塩基, 残存ヌクレオシドおよび残存ヌクレオチドの分離定量結果

前記の条件で行ったペーパークロマトグラフィーにおける各塩基, ヌクレオシド, ヌクレオチドの R_f ならびに非照射検体についての回収率は, Table III に示した

Table III. Observed R_f of Each Sample on Paper Chromatogram and Recovery Estimated with Unirradiated Solution

Substance	R_f	Recovery(%)
Ade	0.38	98
dAdo	0.54	99
dAMP	0.94	99
Gua	0.22	97
dGuo	0.35	98
dGMP	0.04	96
Cyt	0.55	96
dCyd	0.66	96
dCMP	0.09	98
Thy	0.37	96
dThd	0.25	98
dTMP	0.03	98

Fig. 2. Yield of Ammonia by γ -Irradiation from Aqueous Solutions of Bases, Nucleosides and Nucleotides in Nitrogen Atmosphere. —○—, Ade; —□—, dAdo; —△—, dAMP; —●—, Gua; —■—, dGuo; —◆—, dGMP; —□—, Cyt; —○—, dCyd; —□—, dCMP; —■—, Thy; —■—, dThd, —■—, dTMP.

とおりである。

R_f は, Chargaff ら⁽⁶⁾および Fink ら⁽⁹⁾の報告とよく一致している。

定量の結果より算出した残存率を Table IV に示す。一般にどの系列の場合も, おおのこの残存率は, 窒素置換下で照射したほうが空気存在下のものより大であった。しかしながら, Gua 系列および Thy 系列の一部では, その値が逆転しているものもある。

4 種の系列の中で, Ade 系列は, Cyt 系列および Thy 系列より残存率は大きであった。Thy 系列では, いずれも残存率はきわめて小である。

ヌクレオシドおよびヌクレオチドからの遊離生成塩基の比率は, 窒素置換下および空気存在下とも Ade 系列が多く, 次に Cyt 系列であった。

ヌクレオチドからのヌクレオシドの生成は認められなかった。

3. アンモニアの定量結果

γ 線照射によるアンモニアの生成量を, 窒素置換を行ったものについて定量した結果は, Fig. 2 に示したとおりである。

Fig. 3. Yield of Inorganic Phosphate by γ -Irradiation from Aqueous Solutions of Nucleotides in Nitrogen Atmosphere. ○, dAMP; ●, dGMP; □, dCMP; ■, dTMP.

Table IV. The Percentage of Remained Base, Nucleoside(Ns) and Nucleotide(Nt) and of Unaltered Liberated Base (Ualtd. Librtd. B) after γ -Irradiation

Solution irradiated	Base, Ns, Nt, or unaltd. librtd. B	Irradiated dose (Mrad)							
		in N ₂ atmosphere				in the presence of air			
		0.1	0.5	1.0	2.0	0.1	0.5	1.0	2.0
Ade	Base	90	50	46	18	84	44	8	n0
dAdo	Ns	84	22	6	2	68	22	4	n0
	Unaltd. librtd. B	4	14	18	10	8	20	10	n0
	Total	88	36	24	12	76	42	14	n0
dAMP	Nt	80	32	12	n0	74	24	12	n0
	Unaltd. librtd. B	n0	2	2	2	2	2	2	n0
	Total	80	34	14	2	76	26	14	n0
Ade+dRib	Base	94	60	50	28	90	64	44	10
Gua ^a	Base	98	92	70	n0	72	44	14	n0
dGuo	Ns	58	14	4	n0	80	18	2	n0
	Unaltd. librtd. B	0	0	0	0	2	0	0	0
	Total	58	14	4	n0	82	18	2	n0
dGMP	Nt	94	64	34	10	78	38	16	n0
	Unaltd. librtd. B	n0	2	2	0	0	n0	n0	0
	Total	94	66	36	10	78	38	16	n0
Gua+dRib	Base	84	72	52	18	64	38	16	2
Cyt	Base	78	40	12	n0	58	8	4	n0
dCyd	Ns	52	n0	0	0	44	4	n0	0
	Unaltd. librtd. B	n0	4	2	0	4	8	2	n0
	Total	52	4	2	0	48	12	2	n0
dCMP	Nt	70	14	n0	0	46	6	n0	0
	Unaltd. librtd. B	n0	n0	n0	0	n0	n0	n0	0
	Total	70	14	n0	0	46	6	n0	0
Cyt+dRib	Base	66	18	6	n0	72	22	8	n0
Thy	Base	52	0	0	0	44	0	0	0
dThd	Ns	42	0	0	0	40	0	0	0
	Unaltd. librtd. B	n0	0	0	0	n0	0	0	0
	Total	42	0	0	0	40	0	0	0
dTMP	Nt	56	16	n0	0	48	n0	n0	0
	Unaltd. librtd. B	n0	n0	2	0	0	n0	n0	0
	Total	56	16	2	0	48	n0	n0	0
Thy+dRib	Base	58	n0	0	0	62	10	0	0

^a Gua and Gua+dRib were dissolved in 0.1N HCl.

n0: nearly 0; detected on paper chromatogram by fluorescence inspection lamp (254 nm), not determined after extraction. 0: not detected on paper chromatogram.

All solutions had 5×10^{-4} M of solute as initial concentration. The percentage of remained substances shown above are averages of four runs respectively. Any Ns from each corresponding Nt was not detected.

Gua を除外して、アンモニアの生成量が多いものは、0.5 Mrad および 1.0 Mrad 照射の場合 Cyt 系列, Ade 系列, Gua 系列, Thy 系列の順であり、2.0 Mrad 照射の場合, dAdo 以外では Ade 系列, Cyt 系列, Thy 系列の順であった。Thy 系列では、アンモニアの生成量はきわめて少なかった。

dCMP および dCyd のアンモニアの生成は、照射線量の増加とともに緩くなる傾向があった。一方、Thy

系列を除くその他のものは、ほぼ直線的に増加している。Thy 系列は生成量がきわめて少ないため、その傾向はつかみにくい。

4. 無機リン酸の定量結果

γ 線照射により遊離する無機リン酸の定量結果のうち、窒素置換した検体について測定した結果は、Fig. 3 のとおりであった。

無機リン酸の生成量は、dTMP > dCMP > dAMP >

Table V. Circular Dichroism of Aqueous Solutions of dCyd and dCMP after γ -Irradiation

Solution irradiated	Irradiated dose(Mrad)	λ (nm)	$[\theta] \times 10^{-4}$	$[F]$	$[\lambda_0](nm)$
dCyd	0	272	+0.946	41	236
	0.05	272	+0.966	45	236
	0.1	272	+1.045	47	236
dCMP	0	278	+0.946	42	237
	0.05	278	+0.950	43	237
	0.1	278	+0.952	43	237

Conditions: aqueous solution, pH 6.4 for dCyd and 4.7 for dCMP; temperature, 15°C.

dGMP の順であり、ピリミジン塩基系列での生成量はプリン塩基系列のそれより多い。

5. dCyd と dCMP の CD スペクトルの測定結果

γ 線照射による dCyd と dCMP のコンフォメーションの変化を、窒素置換の場合について測定した結果は、Table V に示したとおりである。

γ 線照射により、dCyd および dCMP のいずれにおいても、*anti* 型から *syn* 型への転移は起らなかった。おのおの極大波長での極大値は、dCyd, dCMP いずれも照射線量の増加とともに大きくなっており、その割合は dCyd のほうが dCMP よりも大きい。

考 察

γ 線照射を行った各検体溶液の UV スペクトルは、線量の増加に伴って概して吸光度が減少した。塩基単独の場合はもとより、デオキシヌクレオシドおよびデオキシヌクレオチドの場合でも、糖ならびにリン酸は UV 吸収がないので、吸光度の減少は塩基自身あるいは塩基成分が放射線分解により減少したことを示すと考えられる。しかしながら、一方、ペーパークロマトグラフィーにより残存成分あるいは遊離生成した塩基を分離定量した結果と比較すると、一致しない場合があった。すなわち、見かけ上の吸光度はあまり減少していないが、分離定量した残存量はかなり少ない場合があった。

吸光度と残存量の不一致の例としては、次のものがある。Fig. 1 a) において、dAdo の 1.0 および 2.0 Mrad 照射の吸光度は Ade のそれぞれの線量照射のものより大であるが、Table IV の残存率では、dAdo のヌクレオシドのままのものと遊離未変化塩基の合計は 1.0 および 2.0 Mrad 照射で 24 および 12% で、Ade の 46 および 18% よりも小となっている。

これは、Ade の分解生成物のうちに吸光度の大なるも

の、そして吸収極大が Ade と異なるものがあるために、残存量が減少したわりには吸光度は減少せず、吸収極大がシフトしたものと推定される。

Ade の放射線分解生成物に関する報告としては、Hemmen ら^(11,12)のものがある。Hemmen らは、 ^{14}C で標識した Ade の水溶液に無酸素下で γ 線照射を行った後、ゲルクロマトグラフィーにより 6 種の分解生成物の存在を認め、ペーパークロマトグラフィーおよびマスペクトルにより、その中の 4 種について構造を決定した。構造決定したものの中の一種、6-amino-8-hydroxy-7,8-dihydropurine の UV スペクトルが図示されているが、それによれば pH 6.1 で吸収極大は 283 nm 付近で、Ade のそれよりかなり長波長側である。吸光値の記載はないが、Ade の構造と類似していることより推定すれば、吸光度もほぼ Ade のそれと同程度であろう。このような分解生成物が数種類混在する結果、Ade が減少しても、照射検体の UV スペクトルは見かけ上さほど低下しないものと考えられる。

著者らの別の実験において、 γ 線照射 Ade よりガスクロマトグラフィーによる分析を行った結果、ヒポキサンチン⁽¹³⁾を、 γ 線照射 Cyt よりウラシル、5-ヒドロキシウラシル、6-ヒドロキシウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン⁽¹⁴⁾を検出している。

また Fig. 1 c) において、1.0 Mrad 照射の Cyt の吸収スペクトルは 0.5 Mrad 照射より高い。しかしながら、Table IV の残存率は 1.0 Mrad 照射では 12% で、0.5 Mrad 照射の 40% より小である。

このように、UV スペクトルの低下の傾向と残存量減少の傾向とは必ずしも一致せず、したがって塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドの安定性を吸光度より判定することは問題があると考ええる。

Table IV の残存率より、窒素雰囲気中で照射した場合の Ade の安定性を遊離型、ヌクレオシド型およびヌクレオチド型について比較すると、次のとおりである。遊離型は 0.1 Mrad で 90%、0.5 Mrad で 50%、1.0 Mrad で 46%、2.0 Mrad で 18% 残存しているのに対し、それぞれの線量で、遊離生成したものとヌクレオシド型あるいはヌクレオチド型で残存するものとの合計は、ヌクレオシドでは 88%、36%、24%、12%、ヌクレオチドでは 80%、34%、14%、2% で、いずれも遊離型よりも少ない。同様な比較を Cyt 系列で行うと、遊離型は 78%、40%、12%、ほとんど 0% に対し、ヌ

クレオシドでは 52%, 4%, 2%, 0%, ヌクレオチドでは 70%, 14%, ほとんど 0%, 0% で, やはり遊離型よりも少ない。

空気存在下での照射では, Ade 系列, Cyt 系列いずれにおいても, 残存率の低下が速くなるとともに遊離型, ヌクレオシド型, ヌクレオチド型の間の差が小となり, 安定性はほぼ同程度であった。

Thy 系列では, 窒素雰囲気中ならびに空気存在下で線量の増加に伴う残存率の低下が著しいため, この照射条件では安定性の比較は困難である。Gua 系列では, 窒素雰囲気中で遊離の型で存在する Gua の残存率が高いが, これは希塩酸溶液であるため, ヌクレオシドあるいはヌクレオチドの型のものとは比較しにくい。

これらの結果を総合すると, Ade および Cyt は, 窒素雰囲気中の照射では遊離の型で存在する場合のほうが, ヌクレオシドあるいはヌクレオチドの型で存在する場合よりも安定である。空気存在下の Ade と Cyt, および Thy は, 窒素雰囲気中, 空気存在下のいずれにおいても, 遊離型とヌクレオシドおよびヌクレオチド型の間には放射線に対する安定性の差はなく, 少なくとも Barron らの結論のような傾向は認められなかった。

dRib の共存により, 遊離の型で存在する塩基の安定性が増大する場合があった。すなわち, Table IV の結果より, 空気存在下で Ade, Cyt および Thy は, 塩基単独の場合よりも dRib が存在する場合のほうが, 比較的大線量照射で残存率がともに 0 となる場合を除いて, 安定性は大きかった。しかしながら逆に, 窒素雰囲気中における Gua と Cyt の場合には, dRib が共存することにより残存率は低下した。

安定性が増大した空気存在下の Ade, Cyt, Thy の場合には, それらの dRib 共存時の残存率は, それぞれのヌクレオシドと遊離生成塩基の残存率の合計と比較してもやはり大である。このことより, dRib がこれら塩基の安定性の増大に寄与するならば, それはヌクレオシドとして結合した型においてではなく, 遊離の型においてであると考えられる。水溶液中における放射線分解は, ヒドロキシルラジカルなどによる酸化的反応で, 酸化的ラジカルの生成は水中の溶存酸素によって増加する。したがって, C1 位がアルデヒドである遊離の dRib が塩基よりも先にヒドロキシルラジカルと反応する結果, 塩基を保護し, その効果が空気存在下においてより大きく現われたものと推察する。しかしながら, 窒素雰囲気中で

dRib の共存により Gua および Cyt の分解が促進される理由については不明である。

4つの DNA 塩基系列のうち, γ 線照射によるアンモニア生成量は, Thy 系列が著しく少なく, ほとんど 0 に近い。一方, Thy 系列は γ 線照射に対してきわめて不安定で, 残存率は 0.5 Mrad 以上はほとんど 0 である。分解が著しいにもかかわらず, アンモニア生成量が僅少であるのは, Thy はアミノ基の側鎖をもたないためと考える。すなわち, Thy 以外の塩基系列において生成するアンモニアは, 側鎖のアミノ基の離脱によるものと考えられ, Thy は γ 線照射により容易に分解するが, 環の中の窒素はアンモニアにはきわめてなりにくいことを示している。

Scholes ら⁽⁸⁾は, 核酸についてとともに, Ade, Gua, Ura およびキサンチンについても, その X 線照射水溶液からのアンモニアの生成量を測定している。この報告では, Ade, Gua については濃度および pH の変化とアンモニア生成量との関係の追究であるので, 測定値をそのまま本実験の結果と比較することはできない。Ura については, pH 7.0 での結果が報告されており, Ura と Thy は構造が類似していても側鎖にアミノ基をもたないので, 本実験の Thy の結果と傾向は比較できる。Scholes らも, Ura からのアンモニアの生成量は僅少であるとしている。ただし, Scholes らのアンモニア定量は, ネスラー試薬による呈色より算出したものである。

要 約

それぞれ 4 種の, DNA 塩基, デオキシヌクレオシド, デオキシヌクレオチドおよび DNA 塩基とデオキシリボースの混合物 (いずれも $5 \times 10^{-4} M$) に空気存在下ならびに窒素置換のもとで, 0.05 Mrad より 2.0 Mrad の間で 6 段階の線量のレベルの γ 線照射を行った。

照射検体の UV スペクトルの低下と, ペーパークロマトグラフィーによる残存成分の分離定量値の比較検討の結果, Ade 系列および Cyt 系列においては, 窒素雰囲気中での照射の場合, 塩基は遊離型のほうがデオキシヌクレオシドならびにデオキシヌクレオチドの型で存在するよりも安定であった。これは, 従来の報告とは逆の見である。そして, UV スペクトルの低下の傾向と残存量減少の傾向は, 必ずしも一致しないことがわかった。

Thy 系列において, いずれの型の場合でも, Thy の放射線分解はかなり急速であるにもかかわらず, アンモ

ニアの生成が僅少であったことより、環の中の窒素はアンモニアにはきわめてなりにくいことがわかった。

無機リン酸の生成からみたデオキシヌクレオチドの安定性は、プリン塩基を有するもののほうが大であった。

CD スペクトルの測定結果に基づく、dCyd と dCMP のコンフォーメーションの変化の比較では、dCyd のほうが大であった。しかしながら、両者とも *anti* 型から *syn* 型への転移は起らない。

本研究を行うにあたり、種々ご教示をいただいた理化学研究所放射線生物学研究室主任研究員松山晃博士に感謝いたします。また、実験を行ううえで有益なご助言をいただいた同研究室岡沢精茂博士、ならびに r 線照射装置の使用に際し、ご援助下さった同研究室中野和城技師に対し感謝いたします。CD スペクトル測定計の使用に際しては、高分子化学研究室坪山セイ博士に御援助をいただいた。ここに謝意を表します。

本研究の一部は、昭和 53 年度日本農芸化学会大会において発表した。

(1) G. Scholes, G. Stein and J. Weiss : *Nature*,

164, 709 (1949).

(2) G. Scholes and J. Weiss : *ibid.*, 166, 640 (1950).

(3) G. Scholes and J. Weiss : *Biochem. J.*, 53, 567 (1953).

(4) G. Scholes and J. Weiss : *ibid.*, 56, 65 (1954).

(5) E. S. G. Barron, P. Jonson and A. Cobure : *Radiat. Res.*, 1, 410 (1954).

(6) 久保田穰, 渡辺悦生 : 日水誌, 33, 769 (1967).

(7) L. Schachinger and B. Heindl : *Atomkern-energie*, 24, 43 (1974).

(8) G. R. Wyatt : "The Nucleic Acid," Vol. 1, ed. by E. Chargaff and J. M. Davidson, Academic Press, Inc., New York, N. Y., 1955, p. 252.

(9) K. Fink and W. Adams : *J. Chromatogr.*, 22, 118 (1966).

(10) P. S. Chen, Jr., T. Y. Toribara and H. Warner : *Anal. Chem.*, 28, 1756 (1956).

(11) J. J. van Hemmen and J. F. Bleichrodt : *Radiat. Res.*, 46, 444 (1971).

(12) J. J. van Hemmen : *Nature (London)*, *New Biol.*, 231, 79 (1971).

(13) 小林 光, 白井和雄 : 日本農芸化学会昭和 54 年度大会にて発表。

(14) 小林 光, 白井和雄 : 農化, 10, 355 (1979).