核酸の構造におよぼす γ 線照射の影響—II γ 線照射による DNA の変化について

久保田 穰・渡辺 悦生

(1964 年 4 月 25 日受理)

Effect of γ -Irradiation of the Structure of Nucleic Acid—II.

Change of Deoxyribonucleic Acid

Minoru KUBOTA and Etuo WATANABE*

The present study was carried out to elucidate the effect of γ -irradiation on the structure of deoxyribonucleic acids (DNA) prepared from milts of several fishes; skipjack, mackerel, sea bream, and three-lined grunt. Aqueous solutions of the DNAs were irradiated in the presence of air, and examined for changes by measurements of ultraviolet absorption spectra, viscosity, specific rotation, and the amounts of ammonia formed and phosphate liberated.

Results obtained are summarized as follows:

1) Hyperchromicity in ultraviolet absorption spectrum was observed when the solutions of DNAs were irradiated with doses of 5×10^3 R and 10^4 R (Table 2).

2) On irradiating with doses above 5×10^3 R, the amounts of ammonia formed and phosphate liberated from DNA increased, gradually in the former, and abruptly in the latter (Table 4).

3) Viscosity and specific rotation of DNA solution dropped to near zero on irradiation with doses above 5×10^3 R, irrespective of the fish species (Figs. 3 and 4),

4) Skipjack DNA showed a sharp peak in sedimentation pattern. However, on irradiating with a dose of 10^5 R, the peak turned somewhat broader (Plate 1).

From these results, together with those in the previous paper, the effect of γ -irradiation on fish DNA could be concluded as follows:

On irradiating with a dose of 5×10^4 R, fish DNA begins to suffer the partial scission of main molecular chain and the breakdown of hydrogen bond contributing to maintain the helical structure. On irradiating with a dose of 10^5 R, the DNA undergoes further scission and breakdown in intra- and intermolecular regions. On irradiating with about the same dose, some components, base ring and ribose, of the DNA, seem to be broken successively after the scission of ester and glycosidic linkages.

前報¹⁾においては、核酸を構成する塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドおよび糖が γ 線照射によつてどのように分解するかについて研究したが、ついでデオキシリボ核酸 (DNA) の構造におよぼす γ 線照射の影響を明らかにする目的で、数種の魚精巢より抽出した DNA に γ 線を照射し、紫外吸収スペクトル、アンモニア量、遊離リン量、粘度、比旋光度、および沈降定数の変化を測定し、核酸の構造におよぼす γ 線照射の影響を推論した。

実験方法

試料 カツオ *Euthynnus pelamis*, サバ *Scomber japonicus*, イサキ *Parapristipoma trilineatum*,

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. of Fisheries, Minato-ku, Tokyo)

マダイ *Pagrus major*, の各精巢から KAY らの方法²⁾ によつて DNA を調製し, 0.2% 水溶液を作つて供試した。

試料の純度検定および塩基組成 リボ核酸 (RNA) 量, たん白質量, 総 N 量および総リン量をそれぞれ ZAMENHOF の変法³⁾, ミクロビュレット法³⁾, ケルダール法, および ALLEN 法⁴⁾ を用いて測定した。また上記試料をそれぞれ 50 倍に希釈して, $\epsilon(P)_{260}$ を求めた。塩基組成は MORSHAK らの方法⁵⁾ にしたがつて, 60~70% 過塩素酸で分解し, ペーパークロマトグラフ法⁶⁾ (展開剤はイソプロパノール・塩酸・水; 65:17:18) を用いて測定した。

照射方法 試料の照射は前報¹⁾ どおりである。このときの照射線量は紫外吸収スペクトルの変化, アンモニアの生成, およびリンの遊離についての研究に対しては 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 1.5×10^6 , および 2×10^6 R, 粘度の変化に対しては 5×10^3 , 10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 8×10^4 , 10^5 および 5×10^5 R, また比旋光度の変化に対しては 5×10^3 , 10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 8×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , および 2×10^6 R, 沈降定数の変化に対しては 5×10^4 , 10^5 R にした。

測定法 アンモニア量およびリン量は前報¹⁾ にしたがつて測定した。また上記試料を 50 倍に希釈して, 紫外吸収スペクトルの変化を測定した。

粘度測定 上記試料の 4 ml に 1 M 食塩水溶液 1 ml を加えて, 0.2 M 食塩溶液 (このときの DNA 濃度は 0.16 %) として, $20 \pm 0.01^\circ\text{C}$ で OSTWALD-FENSKE 粘度計を用いて固有粘度を測定した。

比旋光度の測定 LIPPICH's Polarimeter (ERMA 光学 KK) を使用して測定した。温度 20°C . $\epsilon = 15$, $C = 0.2\%$, $l = 20$ cm, として比旋光度は次の式より算出した。

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000X}{cl} \quad (X \text{ は実測値})$$

沈降定数の測定 上記試料のうち, カツオ精巢 DNA を以下のように調製して, 分析用超遠心機 (日立製 UCA-1 型) により測定した。すなわち, 上記試料の塩濃度を 0.2 M に調製し, DNA 濃度を未照射のもの

Table 1. Assay of DNA

	DNA prepared from the milt of fish			
	Skipjack	Sea bream	Mackerel	Three-lined grunt
Content of Impurity ³⁾ (%) { RNA	below 1	below 1	below 1	below 1
Protein	below 1	below 1	below 1	below 1
Total nitrogen Content (%)	12.0	13.0	12.0	13.0
Total phosphorus Content (%)	7.3	7.6	7.0	7.5
N/P	1.64	1.70	1.73	1.73
Molar absorptivity $\epsilon(P)_{260}$	9310	8940	9160	8860
Composition of Bases { Guanine	21.0	21.2	20.8	20.7
(moles/100 gram-atoms) { Adenine	29.4	28.4	29.6	27.0
phosphorus { Cytosine	21.0	20.1	21.4	22.8
{ Thymine	28.5	30.1	28.2	29.3
$\frac{\text{Adenine} + \text{Thymine}}{\text{Guanine} + \text{Cytosine}}$	1.38	1.42	1.37	1.29
$\frac{\text{Guanine}}{\text{Cytosine}}$	1.00	1.05	0.97	0.91
$\frac{\text{Adenine}}{\text{Thymine}}$	1.03	0.94	1.05	0.92

0.12%, 5×10^4 および 10^5 R 照射したものは 0.19% とした。整定回転数 51150 rpm, 操作中のローター温度 17~18°C であった。

結果および考察

調製した DNA の純度検定結果, および塩基組成を Table 1 に示した。塩基組成からあきらかなように, いずれもいわゆる AT 型で, 4 種の塩基の組成は魚種によつてほとんど差を示さないように思われる。ただ $\epsilon(P)_{260}$ の値が一般にいわれている値より少し高く, このことから, 調製した DNA が多少低分子になつてゐることが予想される。

紫外吸収スペクトルの変化, および 2600 Å 付近における吸収極大の変化をそれぞれ, Fig. 1, および Table 2 に示した。

Fig. 1. Effect of γ -irradiation on the ultraviolet absorption spectra of DNA prepared from the milt of fish.

— control, --- dose 1×10^6 R

Table 2. Effect of γ -irradiation on the absorption maximum around 2600 Å of DNA prepared from the milt of fish.

Figures are expressed as the ratio of the absorbance of absorption maximum to that of control.

	Dose (R)							
	control	5×10^3	10^4	10^5	5×10^5	10^6	1.5×10^6	2×10^6
Mackerel DNA	100	101	104	101	90.8	85.0	84.3	80.8
Sea bream DNA	100	101	106	100	90.9	84.9	82.3	75.0
Skipjack DNA	100	102	101	97.7	93.1	82.9	81.9	75.0
Three-lined grunt DNA	100	103	105	97.7	93.0	81.4	82.5	73.2

Table 2 からわかるように, いずれの場合でも $5 \times 10^3 \sim 10^4$ R 照射では吸収度がいくぶん増加することが認められた。一般に DNA の吸光度は構成ヌクレオチドの吸光度の和として計算された値より 40% 前後低いといわれている⁷⁾。したがつて, DNA 中の水素結合が切れて, 規則的なラセン構造が破壊されたものと思われる。

一方, この照射線量では, リンの遊離やアンモニアの生成 (Table 3, Table 4) はほとんど認められないから, γ 線照射による一種の変性のようなものであろう。リンやアンモニアは 10^4 R 以上の照射においては, 線量の増加とともに増加するが, 遊離のリン量は生成アンモニア量よりも急激な増加を示した。これは γ 線

Table 3. Formation of ammonia by γ -irradiation from aqueous solution of DNA prepared from the milt of fish.

Figures are expressed as the ratio (%) of ammonia-N to total-N content.

	Dose (R)							
	control	5×10^3	10^4	10^5	5×10^5	10^6	1.5×10^6	2×10^6
Mackerel DNA	0	0	0	0.14	0.61	1.25	1.59	1.67
Sea bream DNA	0	0	0	0.20	0.45	1.27	1.42	1.82
Skipjack DNA	0	0	0	0.23	0.40	1.03	1.25	1.79
Three-lined grunt DNA	0	0	0	0.24	0.30	1.17	1.35	2.02

Table 4. Formation of inorganic phosphate by γ -irradiation from aqueous solution of DNA prepared from the milt of fish.

Figures are expressed as gram atoms phosphorus per 100 gram atoms phosphorus of DNA.

	Dose (R)							
	control	5×10^3	10^4	10^5	5×10^5	10^6	1.5×10^6	2×10^6
Mackerel DNA	0	0	0	trace	0.07	0.56	0.86	1.39
Sea bream DNA	0	0	0	trace	0.07	0.41	0.62	1.24
Skipjack DNA	0	0	0	trace	0.05	0.55	0.74	1.51
Three-lined grunt DNA	0	0	0	trace	0.04	0.53	0.65	1.36

照射による DNA の内部構造の破壊がはじまったことを示すもので、このことは粘度測定の結果 (Fig. 2, Fig. 3) からいえることである。

Fig. 2 から、いずれの魚種でも 5×10^4 R あたりから粘度の濃度依存性が急激に低くなり、また Fig. 3 より、 10^5 R 照射で粘度がほとんどなくなってしまうことが認められる。 10^5 R 照射した場合の比旋光度の減少 (Fig. 4, Fig. 5) がそれほどでもないことを考えると、 10^5 R 位の照射により、主鎖の切断が起こったものと考えられる。

Fig. 2. Effect of γ -irradiation on reduced viscosity (η_{sp}/c) of DNA prepared from the milt of fish

Fig. 3. Effect of γ -irradiation on intrinsic viscosity ($[\eta]$) of DNA prepared from the milt of fish.

Fig. 4. Effect of γ -irradiation on specific rotation ($[\alpha]_D^{20}$) of DNA prepared from the milt of fish.

Fig. 5. Effect of γ -irradiation on specific rotation ($[\alpha]_D^{20}$) and intrinsic viscosity ($[\eta]$) of DNA prepared from the milt of fish.

●—● specific rotation, ○—○ intrinsic viscosity

Plate 1. Sedimentation diagrams of irradiated solution of skipjack milt DNA. Photographs indicate sedimentation after 20, 40, and 60 minutes.

主鎖の切断, つまり低分子化はカツオ精巢 DNA の沈降図 (Plate 1) から容易に認められる。DNA の沈降図は鋭い界面を示し, 沈降係数の濃度依存性が非常に大きいことが知られている。Plate 1 にあげたカツオ DNA も未照射の場合には極めて鋭い界面を示しているが, 照射量を増すとその界面の鋭さは小さくなる。つまり, 5×10^4 R 照射するとピークはわずかではあるが左右非対称となり DNA が分断されたことがわかる。さらに 10^5 R 照射すると, 鋭い界面はゆるやかとなり, DNA はかなり分解され, 沈降係数の濃度依存性が低下したものと予想され, このことは還元粘度の変化について観察された傾向と一致する。

以上のことから, デオキシリボ核酸 (DNA) に γ 線を照射するとき, その構造に次のような変化が生じるものと推論される。

まず DNA のラセン構造を構成する主鎖の切断とともに, ラセン構造の保持に役立っている水素結合の一部が切れはじめ, つづいて, 主鎖の細切断とともに, ラセン構造が保持できなくなり, その後はじめて, 核酸構成成分の分解, 環の開裂などが生じるものと思われる。一方, カツオ, タイ, イサキ, およびサバを比較してみると, 紫外吸収スペクトルの変化, アンモニア生成量, 遊離リン量, 粘度変化, および比旋光度の変化ともみな全く同様な傾向を示し, 魚種間の差は全くないといつてもよいと思われる。

最後に, 起遠心沈降実験を行なうにあたっては, 東海区水研の神名孝一氏にご懇篤な指導をたまわりました。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) 久保田穰・渡辺悦生: 本誌, **33**, 769~774 (1967).
- 2) E. R. M. KAY, N. S. SIMMONS, and A. L. DOUNCE: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1742~1746 (1952).
- 3) S. ZAMENHOF: in "Method in Enzymology" (S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, ed.), Vol. **3**, 696~704, Academic Press, New York (1957).
- 4) R. J. L. ALLEN: *Biochem. J.*, **34**, 858~865 (1940).
- 5) A. MARSHAK and H. J. VOGEL: *J. Biol. Chem.*, **189**, 597~605 (1951).
- 6) G. R. WYATT: *Biochem. J.*, **48**, 584~590 (1951).
- 7) 大沢省三・高木康敬・竹村彰祐・磯晃二郎・関口睦夫: 核酸—その生物学, 化学, 物理学, 初版, 517, 広川書店, 東京 (1963).