

アルカリ処理デソキシリボ核酸の再重合

江藤, 守総
九州大学農学部農芸化学教室

<https://doi.org/10.15017/21451>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 16 (3), pp.411-417, 1958-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

アルカリ処理デオキシリボ核酸の再重合

江 藤 守 総

Repolymerization of alkali-treated desoxyribonucleic acid

Morifusa Eto

一般にリボ核酸 (RNA) はアルカリに不安定で、1 規定の苛性アルカリを 37°C で 10 数時間作用させる事によつて完全にモノヌクレオチド迄分解されるが、デオキシリボ核酸 (DNA) は比較的安定で、この処理によつても尚鉍酸によつて沈殿する。この事を利用して両核酸を分別的に定量する方法が Schmidt 及び Thannhauser⁸⁾ によつて提出されている。著者^{2,3,9)} は先に家畜の核酸について報告したが、DNA 標品に RNA の混在が認められたので、これが分別にこの方法を利用した。²⁾ 本報ではこの様な処理で DNA がどのような変化を受けるかを、牛脾より得た高重合 DNA を用い、粘度法と超速心沈降法によつて検討した。Zamenhof と Chargaff¹⁰⁾ は DNA もこの処理である程度分解するが、中和すると元の DNA とは異なる著しい Thixotropy を示す物体に再重合する事を認めた。著者も之とはほぼ同様な現象を確め、更に、固有粘度より得られる該重合物の軸比は元の DNA の約半分であるが極めて巨大な粒子に迄重合している事を認めた。

実験及び結果

牛脾 DNA の調製

対照とする intact DNA として新鮮牛脾より Petermann 等の方法⁶⁾ に従つて分子量 656,000 の DNA を得た。

アルカリ処理 DNA の調製

牛脾 DNA 100 mg を 3 ml の N-KOH に溶解して 30° に 15 時間放置し、氷冷後 30% 醋酸で pH 4 とし、同容のアルコールを加えるとほぼ定量的に短糸状の白色沈殿を生じた。これをアルコール及びエーテルで洗つて減圧乾燥した。

アルカリ処理 DNA の再重合

アルカリ処理 DNA を 0.14 M-NaCl に溶解し (約 0.5%) 少量の稀 NaOH で pH 6.5 とし、30° の恒温槽内で粘度を測定*した。図 1 に示す様に粘度は急速に増加し、約 30 分で一定となる。Intact DNA ではこの様な現象は認められず常にほぼ一定である。

無処理 DNA の安定性

Intact DNA を 0.02 M-NaF+0.025 M-NaCl 水溶液に溶解し (0.06%, pH 5.5) 30° に 2 日間置き、この間 30° で粘度を測定した。粘度は極めて徐々にしか変化しない (表 1)。

* 粘度の測定には常に Ostwald 粘度計を用いた。

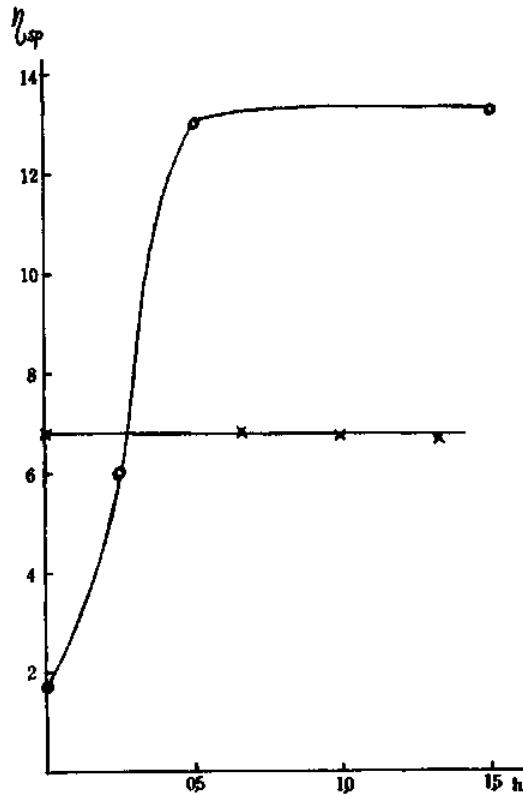


Fig. 1. Repolymerization of alkali-treated DNA.
 ○—○ Alkali-treated DNA (0.5%) ×—× Intact DNA (0.1%)

Table 1. The stability of DNA.

Day	0	1	2
η_{rel}	2.84	2.63	2.45

DNA conc.: 0.06%, pH 5.5. Temp.: 30° C.

アルカリ処理重合 DNA の Thixotropy

重合 DNA 溶液を粘度計内で速やかに減圧、加圧を繰返す事によつて細管内を上下させる (10 回/2 分) と、粘度は急速に減少する。これを静置すれば粘度の増加が起こる。Intact DNA ではこの様な現象は認められない (図 2)。

重合 DNA の粘度に対する温度の影響

アルカリ処理 DNA を 0.05 M-NaCl に溶解 (0.3%) し 30° に 4 時間置いて重合させた後 1 日冷蔵庫に置いたものと intact DNA の 0.05 M-NaCl 溶液 (0.1%) について、15° から 5° 間隔で 50° までの相対粘度を測定した。同一試料について低温から順次測定した。30° 迄は試料を恒温槽につけたままとし、30 分を要して 5° 昇温せしめた。30° 以上は、槽の昇温時には試料を室温 (約 20°) に置き、測定前に 7 分間恒温に置いた。

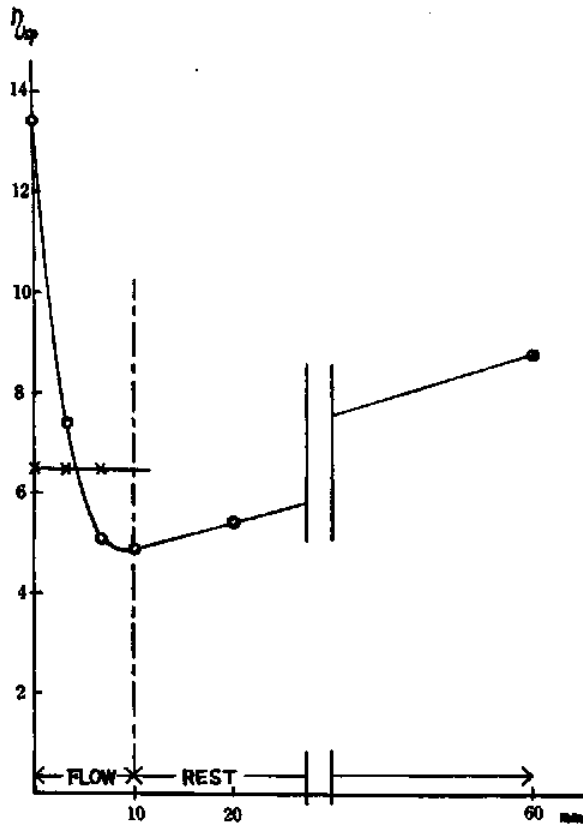


Fig. 2. Thixotropy of alkali-treated repolymerized DNA.
 ○—○ Alkali-treated DNA (0.5%) ×—× Intact DNA (0.1%)

アルカリ処理 DNA では 30° まで相対粘度が温度と共に上昇し、30° から 40° の間で減少し、次いで再び上昇した。Intact DNA の相対粘度は温度に関係せず一定である (図3)。

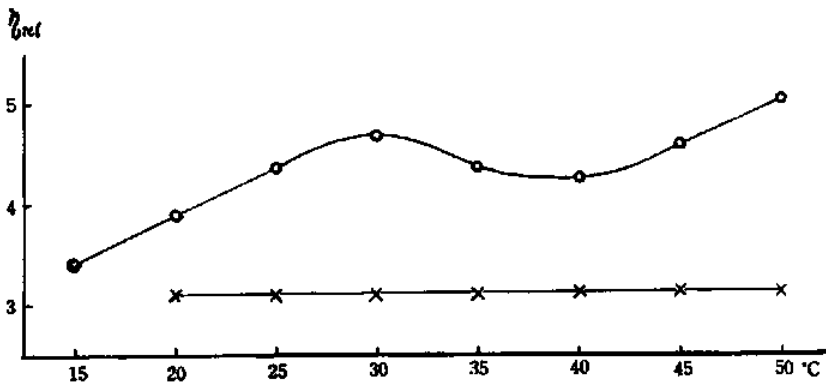


Fig. 3. The effect of temperature upon the viscosity of alkali-treated repolymerized DNA.
 ○—○ Alkali-treated DNA (0.3%) ×—× Intact DNA (0.1%)

再重合 DNA の固有粘度

30° に 4 時間置いて再重合させ、1日冷蔵庫に置いたアルカリ処理 DNA の 0.05M-NaCl 溶液の粘度を 0.4% 以下種々の濃度*で 30° に於て測定した。

容積固有粘度 $[\eta]_r$ は次式で表わされる。

$$[\eta]_r = \lim_{\varphi \rightarrow 0} (\eta_{sp}/\varphi)$$

或いは

$$[\eta]_r = \lim_{\varphi \rightarrow 0} (\ln \eta_{rel}/\varphi)$$

但し、 φ は溶質の容積濃度で重量濃度 c (g/100 ml) 及び偏比容積 V と次の関係がある。

$$\varphi = cV/100$$

ここで V は 0.55¹⁾ と仮定した。

図 4 より $[\eta]_r = 1100$ となる。之を固有粘度と軸比 p の関係を示す Simha の棒状粒子

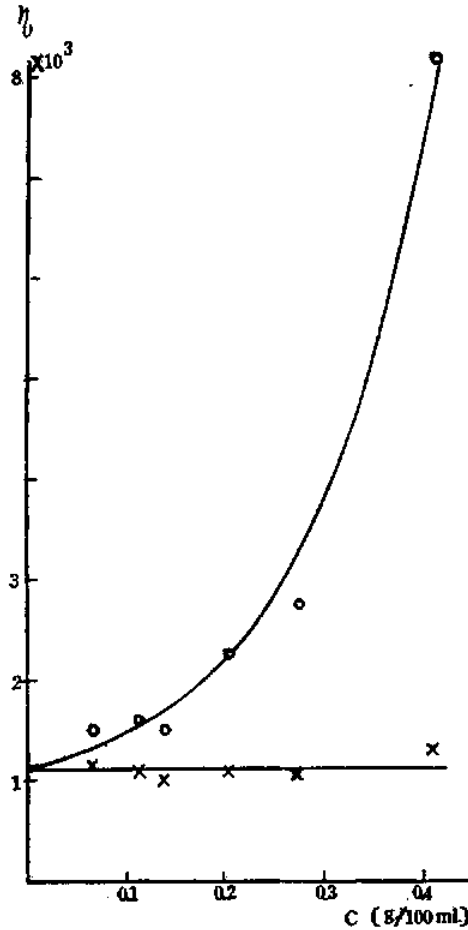


Fig. 4. The viscosity of alkali-treated repolymerized DNA.

○—○ η_{sp}/φ ×—× $\ln \eta_{rel}/\varphi$

* 濃度は有機物の測定値より算定した。

に対する式¹⁾

$$\frac{\eta_{sp}}{\varphi} = \frac{p^2}{15(\ln 2p - 3/2)} + \frac{p^2}{5(\ln 2p - 1/2)} + \frac{14}{15}$$

に当てはめると軸比は約 140 となる。

同様にして, intact DNA については $[\eta]_v = 3500$, 軸比 280 を得る (図 5)。

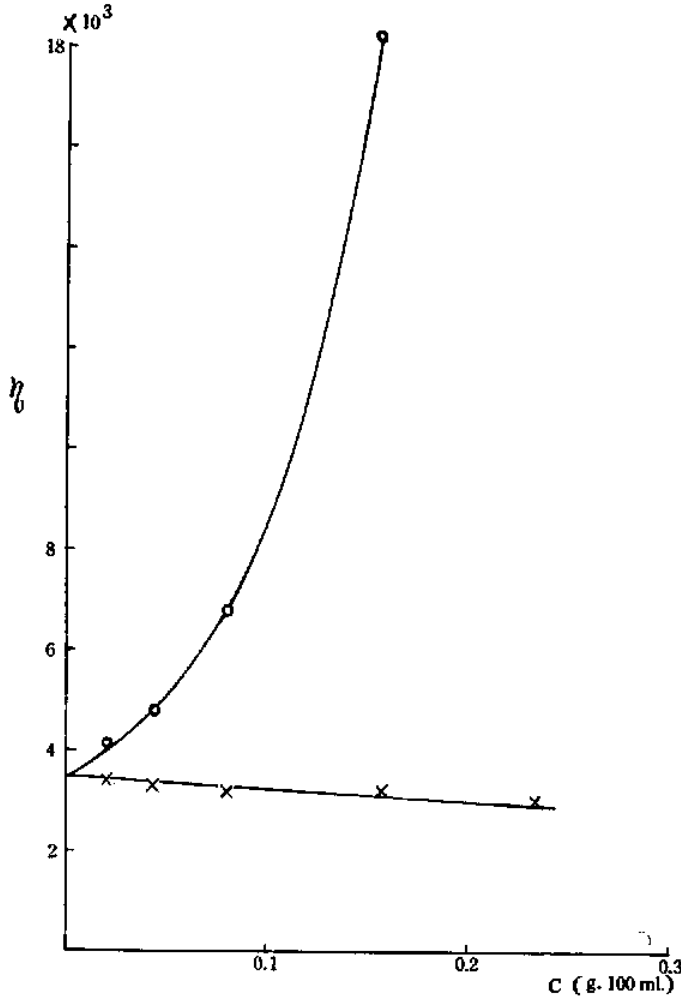


Fig. 5. The viscosity of intact DNA

○—○ η_{sp}/φ ×—× $\ln \eta_{rel}/\varphi$

沈降実験

スピニコ E 型超遠心機を使用し, 56,100 rpm で沈降実験を行つた。

分子量 M は沈降恒数 S_{20w} と摩擦比 f/f_0 とより次式で表わされる。⁵⁾

$$M = 2.45 \times 10^{22} V^{1/2} \left[\frac{f}{f_0} \cdot \frac{S_{20w}}{1 - 0.9982 V_{20}} \right]^{3/2}$$

f/f_0 は Perrin によれば, 細長い廻転楕円体について軸比 p と次の関係にある。

$$f/f_0 = (1-p^2)^{1/2} / p^{2/3} \log\{[1+(1-p^2)^{1/2}]/p\}$$

軸比は固有粘度より Simha の式で与えられているので分子量が算出される。Intact DNA の 0.1% 溶液は $S_{20,w}$ が 8.40×10^{-18} となり、分子量は 656,000 と算定された。一方、アルカリ処理 DNA を 0.14M-NaCl に溶解し (0.5%) 30° に保つて再重合させたものは極めて早く沈降し、底にゲル状に圧縮されているらしく底の方に殆んど動かない鋭いピークを生じ、沈降恒数の測定は不能であつた。

考 察

Schmidt-Thannhauser のアルカリ処理⁶⁾を受けた牛脾 DNA は勿論ある程度迄分解しているが、これを溶解して中性附近に保てば、速やかに粘性を増して再重合する。然しこの重合物は元の DNA と全く異り、その結合は極めて弱いらしく、顕著な Thixotropy を示す。又、粘度に対する温度の影響も非常に特徴がある。一般に相対粘度は変性その他特別の変化が起これぬ温度範囲では、intact DNA がそうである様に、一定であるが、アルカリ処理再重合 DNA では、30° 以下では相対粘度が温度と共に増加する。即ち、再重合 DNA では粒子の配向による構造粘性があり、昇温に供う Brown 運動の為に配向が妨げられ相対粘度が増すものと考えられる。この様な例は著しく会合したタバコモザイクウイルスについて認められている。⁷⁾ 然るに 30° から 40° の間で粘度が減少するのは、この重合物の弱い結合が熱運動によつて破壊されるものと考えられる。Chargaff 等¹⁰⁾は、熱で解重合させた牛胸腺 DNA を同様に再重合させたものについて、30° から 40° に於ける粘度の低下を認めている。

この様に弱く結合した重合体の軸比は intact DNA の約半分であるが重合度は極めて大きいらしく、沈降法ではその分子量を求める事が出来なかつた。

綜 括

アルカリ処理した DNA は中性溶液で再重合する。この重合物と無処理 DNA とを粘度法と沈降法とによつて比較した。再重合物は軸比が無処理 DNA の約半分であるが、重合度は極めて高い。然しその結合は弱わく容易に解合する。

超遠心沈降実験に便宜をはかれた九州大学農学部林勝哉氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 江上不二夫, 1953. "核酸及び核蛋白質", 上: p. 232.
- 2) 江藤守総, 1954. 九大農学雑誌, 14: 543.
- 3) 江藤守総, 1955. Ibid., 15: 345.
- 4) Mark, H., Tobolsky, A. V., 1950. "Physical chemistry of high polymer systems", p. 284.
- 5) 水島, 赤柳, 1954. "蛋白質化学", 2, p. 858.
- 6) Petermann, M. L. and Lamb, C. M., 1948. J. Biol. Chem., 176: 685.
- 7) Robinson, J. R., 1939. Proc. Roy. Soc., 170 A: 519.
- 8) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J., 1945. J. Biol. Chem., 161: 83.

- 9) 矢野, 江藤, 山藤, 1954. 九大農製報, 12: 25.
10) Zamenhof, S. and Chargaff, E., 1950. J. Biol. Chem., 186: 207.

Summary

The writer^{2,3,4)} has investigated the nucleic acids of silkworms. In these studies, he²⁾ applied the alkali treatment, which was proposed by Schmidt and Thannhauser,³⁾ for separation of deoxyribonucleic acid (DNA) from contaminated ribonucleic acid in the crude DNA preparation of the insects. In the present paper, how this treatment affects the physical properties of DNA was investigated using bovine spleen DNA. The alkali-treated DNA was obtained as white and somewhat thready material. The viscosity of its neutral solution raised rapidly showing its repolymerization (Fig. 1). The repolymerized DNA was compared with the original intact DNA in its viscosity and sedimentation. The axial ratio of repolymerized DNA calculated in accordance with Simha's equation from its volume fraction intrinsic viscosity $[\eta]_v$ (Fig. 4) was 140 and one-half of that of intact DNA (Fig. 5). The molecular weight, however, seemed to be very much larger in the repolymerized one than the intact one. The sedimentation constant S_{20w} of the intact DNA was 8.40×10^{-13} and gave molecular weight 656,000 referring to the datum in viscosity-measurement. While, the repolymerized DNA sedimented too rapidly to measure the constant. The binding power in the repolymerized DNA might be feeble, because the repolymerized DNA was easily depolymerized by warm (Fig. 3) and showed thixotropy (Fig. 2) similarly to the observation of Zamenhof and Chargaff.¹⁰⁾

Agricultural Chemistry Institute,
Kyushu University,
Fukuoka