



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	仔牛胸腺DNPにおける放射線作用の初期過程。電子スピン共鳴法による研究。
Author(s)	桑原, 幹典
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	乙第1471号
Issue Date	1977-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32528
Type	doctoral thesis
File Information	1471.pdf



仔牛胸腺 D N P における放射線作用の初期過程。電子スピン共鳴法による研究。

桑 原 幹 典

北海道大学 獣医学部 獣医放射線学講座

目次

1	要約	1
2	序論	3
3	実験方法	12
4	結果と考察	21
5	総論	56
6	文献	64
7	図表	70

仔牛胸腺 D N P における放射線作用の初期過程。電子スピン共鳴法による研究。

北海道大学獣医学部 桑原幹典

1. 要約

この研究はデオキシリボヌクレオプロテイン (D N P と略称) における放射線作用の初期過程を明らかにするために行われた。この目的を達成するため、仔牛胸腺 D N P を乾燥状態においてγ線照射し、電子スピン共鳴法 (E S R 法) により研究した。D N P および D N P の構成成分である D N A と蛋白質 (ヒストン) をγ線照射し、E S R 観察を行ったところ、D N P と D N A のスペクトルはそれぞれ8重の微細構造をもちしかも互いに良く似たスペクトルであった。蛋白質のスペクトルは前者と全く異っていた。この結果はγ線照射された D N P において、フリーラジカルが優先的に D N A において形成されたことを意味している。D N P においては蛋白質の

方がDNAよりも多く含まれている。また、DNPからDNAと蛋白質を分離し、それぞれについてラジカル収率を調べたところ蛋白質の方がDNAよりも高いラジカル収率を示した。それ故、このDNA部分におけるラジカルの局在を説明するため一つの仮説を考えた。すなわち、DNPがγ線照射されたとき電離により蛋白質部分において放出された電子がDNA部分のオへ移動し、その結果、DNA部分におけるラジカルの局在が引き起こされたという仮説である。この仮説はDNP凍結水溶液やDNP-プロフラビン複合体の実験により証明された。さらに、DNP-Ca⁺⁺複合体の実験から、蛋白質部分において生じた電子の50%がDNAへ移動することも明らかにされた。かくて、本研究により、DNPにおいて電離に始まり、ラジカル形成に至るまでのいわゆる放射線作用の初期過程が明らかにされた。さらに本研究はDNPにおいてラジカルが形成される時の蛋白質の役割につ

いても明らかにした。すなわち、従来蛋白質がDNAを電離放射線から防護しているという考えが提出されていたが、本実験はこの考えとは反対に、蛋白質はDNAの損傷を増大させる様に働くという結果を与えた。

2. 序論

放射線生物学とは放射線が生物におよぼす作用を研究する学問領域である。放射線による生物への障害の生起過程を追跡する場合、放射線の吸収から生物学的障害までの複雑な一連の反応を、4つの時間的段階（物理的段階、物理化学的段階、化学的段階、生物学的段階）にわけて考える¹⁾ (Dertinger と Jung, 1970)。物理的段階では放射線のエネルギーが物質に伝達される。この過程ではおもに励起またはイオン化が引き起こされる。光の場合その吸収は物質の吸収スペクトルと一致した波長だけで起こり（選択的吸収）、単色光の場合はそのエネルギーに相当した励起状態だけが生ずる

る。これに反し、放射線では物質の種類に無関係にほぼその量に応じて吸収される（非選択的吸収）。また、照射される放射線のエネルギーが一定であっても種々のエネルギーのイオンや励起状態が作られる。この段階において作られた一次生成物は、非常に不安定で、自発的もしくは近くの分子との衝突によって反応性の強い二次生成物をつくる。この物理化学的段階で起こる反応は単一の反応であることもあるし、複雑な一連の反応からなることもある。系はこの段階を経て熱平衡に達する。熱平衡に達した後、化学的段階が始まる。物理化学的段階において生成された二次生成物（励起およびイオン分子）はこの化学的段階において中性のラジカルあるいは安定な生成物に転換する。反応性の強いラジカルは互いに、またはまわりの物質と反応を起こし、物質の分子的变化を引き起こす。生物体内に起こる分子的变化がどのようなタイプのものかであり、系に何らかの変化が惹起され

生物的段階を経て最後に生物作用として観察されることになる。放射線作用の初期過程とは化学的段階の終了までに起こる反応過程をいう。本研究では化学的段階における中性ラジカル形成までの過程を研究対象としている。物理的段階を実験的に調べることは實際上困難であるので、本実験においてこの段階における研究は何らおこなわれていない。物理化学的・化学的段階における定性的・定量的研究に対してはESR法が有効である。これにより系における一次および二次生成物がラジカル性であるならば、その存在を確認できるし、水素原子の様な拡散性のラジカルの存在も確認できる。また電子や正孔の分子内・分子間移動も追跡でき、それらの最終到達部位の同定も可能になる。さらにカチオンおよびアニオンラジカルが中性のラジカルに転換する時のその機構も解明されることができる。ESR法は最終的にこの比較的寿命の長い中性ラジカルの同定に使用される。

放射線生物学の研究の理想としては、以上の4つの時間的段階で起るすべての反応過程を明らかにしなければならない。本研究では化学的段階における中性ラジカル形成までのいわゆる初期過程を明らかにする目的で行われた。それは以下の理由による。生体高分子特に核酸や蛋白質のような物質に電離放射線が照射されると、ある特定部位に局在したラジカルの形成が観測される。放射線によるエネルギー付与が無差別であるはずなのに、得られる結果はあたかも放射線のエネルギーがラジカル生成部位においてだけ吸収された様な結果を与える。これは電子や正孔などの移動、拡散性ラジカルの反応などによるものであり、また生体高分子の組成や構造上の特徴の反映でもある。DNAやシスチンを含む酵素などの一部の物質についてはほぼ解明されている。本研究において取り扱われているDNPについては、いまだ完全な解答は得られていない。DNPにおけるラジカル形成

の機構を物理化学的段階から化学的段階に到る反応過程を調べることにより明らかにしようとする試みは、生体分子への放射線の特徴的な作用を知る一つの重要な手掛りを与えるであろう。

生体分子に生じたフリーラジカルが放射線による障害を表わすものであることは次の様な研究により証明されている。トリプシンの電離放射線による不活性化の温度依存性とフリーラジカル生成の温度依存性が一致すること²⁾ (Henriksen, 1966), 5-ブロモウラシル置換DNAにおいて、そのラジカル収率が通常のDNAのそれよりも高く、さらに5-ブロモウラシル置換DNAを持つバクテリオファージT₁のγ線致死効率が通常のバクテリオファージT₁のそれよりも高いこと^{3,4)} (Müllerら, 1963; HotzとZimmer, 1963) などがあげられることができる。

電離放射線の作用に直接作用と間接作用とがある。生物が放射線により障害を受ける場

合、一つは生物体を構成する物質（特に核酸や蛋白質）その自体による放射線エネルギーの吸収とそれによって一連の反応が開始され分子的变化が引き起こされる場合であり、もう一つは生物体に含まれる水分子により吸収された放射線のエネルギーがOHラジカル、水素原子、水と電子などの拡散性のラジカルを生じ、これらのラジカルが生体分子と反応を起こし、生体分子の変化を引き起こす場合と、大別して二つの異なった方法により作用を受ける。前者を放射線の直接作用といい、後者を間接作用という。生物体内におこる分子的变化がどちらの作用によって引き起こされたかにはかゝらず、その変化は生物学的段階を経て最終的に生物作用として観察されるようになる。

本研究は内容を直接作用の初期過程にのみ限定している。間接作用のもつ放射線生物学的な重要性は当然であり、今後の課題でもある。しかしながら、生物の放射線致死作用に

おける直接作用の占める割合は間接作用の占める割合とほとんど同じであり⁵⁾(Okada, 1970), 酸素や放射線増感剤による放射線増感作用と直接作用との関係の重要性も指摘されている^{6,7)}(Teoule と Cadet, 1975; Ewing ら, 1974)。さらに、胸腺細胞をX線照射したとき、DNAに鎖切断が引き起されるが、その末端基を調べたところ、その原因の多くが直接作用によるものであることも明らかにされている⁸⁾(Coquerelle ら, 1973)。以上の様に、直接作用が生物体に与える効果は極めて重大であり、今後とも研究が為されていかなければならないものである。本研究が直接作用に主要な目的を置いたのも以上の様な考えからである。しかしながら、放射線の生物作用の全体像は間接作用に対する研究を加え合せた上で明らかにされるものであると考えられる。

一般に細胞内において放射線の標的となる物質(放射線の感受性の最も高い物質)は細胞核、とりわけDNAである。この事実は一

メーバを使用したの照射細胞核の移植手術の実験⁹⁾(Ord と Panielli, 1956), 5-ブロモウラシル置換DNAを持つマウスリンパ球腫細胞を使用したの照射実験¹⁰⁾(Fox, 1968), 放射性リン(³²P)をDNAのリン酸基に取り込ませた入ファージやE. coliにおける³²Pのβ崩壊による致死作用を調べた実験¹¹⁾(Ogawa と Tomizawa, 1967) などにより証明されている。それ故, 放射線生物学においてDNAを研究することは必然的な課題であり, しかもDNAに及ぼす放射線の効果について非常に多くの研究が為されてきているのも事実である。

本研究は実験試料としてDNPを取り上げた。その理由は次のようなものである。(1)高等生物ではDNAは蛋白質(ヒストン性蛋白質と酸性蛋白質)と密に結合してDNP分子を形成している。したがって, 高等生物への電離放射線の作用機構を研究する場合には, DNP分子全体を電離放射線の一つの標的と考えることが条件として必要になってくる。

(2) D N P が照射されたとき、蛋白質が D N A に対し如何なる役割をはたしているかを知ることには興味があるところである。特に D N A への電離放射線の直接作用と間接作用に対し蛋白質のはたす役割は何かを知る必要がある。なぜならば、蛋白質の役割を知ることが D N A に対する電離放射線の直接作用・間接作用それぞれの効果を見積ることを可能にするからである。(3)電離放射線と D N P との相互作用の研究は電離放射線の生物作用という本研究の目的を越えて、新しい視点に立った D N P 研究の方法を与える。

電離放射線の作用の初期過程の研究方法として、E S R 法、パルスラジオリシス法、ルミネッセンスの動力学的解析法、パルスポーログラフ法、生化学的方法などが挙げられよう。これらの方法から得られる情報を全て集約した上で始めて放射線作用の初期過程の全体像が把握されることが出来る。E S R 法のみに従った本研究は、それゆえ、D N P

に対する放射線作用の初期過程のすべてを明らかにするといったものではない。他の方法により得られている知見を補った上で始めて一つの結論が下されるものである。しかしながら、上述した様に生物分子ラジカルの持つ重要性から考えて、ESRにより追求されることのできるラジカル形成の機構の研究は、それだけであっても重要な情報をもたらしてくれるものと考えられる。

DNPに対する放射線直接作用の初期過程の研究については、現在まですでにいくつか報告されている。最初は Alexander¹²⁾ (1961) によって行われたもので、彼らはサケ精子からヌクレオプロタミン、DNA、プロタミンをそれぞれ抽出し、γ線照射後それぞれのESRスペクトルを測定し、比較検討したものである。77°Kでの実験ではヌクレオプロタミンのスペクトルはDNAのそれと一致し、300°Kでは異っていた所から、彼らは77°Kでは蛋白質からDNAへエネルギー移動が起るものと

結論した。その後、Ormerod¹³⁾ (1965), Lenherr と Ormerod¹⁴⁾ (1968) の実験は 300°K でもヌクレオプロタミンと DNA のスペクトルが一致することを示し、このような DNA 上におけるラジカル局在の原因を説明するため、彼らは電子移動説¹³⁾、電離あるいはエネルギー移動説^{12, 14)}を唱えた。一方、仔牛胸腺 DNA を使用した Van de Vorst¹⁵⁾ (1965) の実験によれば、DNA のスペクトルは蛋白質（ヒストン）のそれに類似しており、ラジカルが蛋白質上に局在しているのが観測された。それゆえ、彼らはヒストンが DNA を放射線から防護していると指摘した。ヌクレオプロタミンでは DNA 部分にラジカルが局在し、ヌクレオヒストン（仔牛胸腺 DNA）ではヒストン部分に局在するといった相反する結果が報告されたのである。ヌクレオプロタミンは DNA 70%、プロタミン 30% で構成されており、ヌクレオヒストンは DNA 40% で、蛋白質 60% で構成されている。それゆえ、ヌクレオプロタミンでは DNA

A型のスペクトル，又クレオヒストンではヒストン型のスペクトルが得られたとしても，それらのDNAと蛋白質の含量からみても，は当然な結果なのかも知れないし，ましてや，エネルギー移動など考慮する必要もない様に思われる．本研究を行った一つの理由にはこの事を再検討する意味も含まれている．最近，Olastら¹⁶⁾ (1973) は芽香族アミノ酸とDNA塩基との複合体をDNP分子の一つのモデルとして実験を行い，塩基上に優先的にラジカルの形成が観測されることから，彼らはアミノ酸から塩基へのスピン移動説を提唱した．その他，DNAの鎖切断を指標として，DNPとDNAを比較した報告もなされている¹⁷⁾ (Lücke-Huhleら，1970) 。

このような知見が報告されている状況の中で，本研究は仔牛胸腺DNP (蛋白質60%，DNA40%) を実験材料として行われた．まず，この様に蛋白質含量の多い試料においててもDNA部分にラジカルの優先的な局在が観測

されるかどうか検討された。そして次に、如何なる機構によつてその様なラジカルの局在が可能になるのか研究された。すでに、DNAにおいては、電離により放出された電子の挙動というものがDNAラジカル形成の機構を支配していることが明らかにされている¹⁸⁾¹⁹⁾ (Sevilla, 1971, Hartig & Dentinger, 1971)。それゆゑ、本研究も以上の考之に従つて、DNA中に生じた電子の挙動を追跡することにした。電子の最終到達部位が何であるかを明らかにしていくことにより初期過程の具体的な内容を知るという方法をとった。

3. 実験方法

1). 実験材料

用いられたチミン、チミジル酸、シチジル酸、仔午胸腺DNA、仔午胸腺ヒストンはシグマ社製のものである。フロフラビンは和光純薬、ポリ-レージン塩酸塩は蛋白質奨励会からそれぞれ購入して使用した。実験のい

くつかの部分には購入したDNAおよびヒストンが用いられたが、大部分の実験には仔牛胸腺より Kay ら²⁰⁾ (1952) の方法により抽出されたDNA, 同いく胸腺より Spelsberg と Hnilica²¹⁾ (1970) あるいは Bonner ら²²⁾ (1968) の酸抽出法により調製されたヒストンが用いられた。

DNP は Zubay と Doty²³⁾ (1959) の方法により抽出単離された。DNA と蛋白質の定量は各々 Burton²⁴⁾ (1956) の方法と Lowry ら²⁵⁾ (1951) の方法に従って行われた。調製されたDNAには蛋白質は1% (重量) 以下しか含まれていなかった。ヒストン中のDNAは何ら検出されなかった。DNP ではDNA / 蛋白質 (重量比) = 1.0 / 1.5 であった。再構成DNP はDNA とヒストンを用い Bonner ら²²⁾ (1968) の方法により作製された。DNA とヒストンの混合の最初の割合はDNA / ヒストン = 1.0 / 1.25 (重量比) であった。遠心で凝固ゲルを除いた後、可溶性DNP として得られた試料を分析したところDNA / ヒストン = 1 であった。

DNA とポリリジンの複合体 (以下 DNA・poly-lysine とかく) は次の様にして調製された²⁶⁾ (Kuwabara と Yoshii, 1976)。DNA とポリリジンを DNA リン酸基とポリリジンアミノ基のモル比が等しくなるようにして, 1 M NaCl - 0.01 M 7 エン酸ソーダ溶液 (pH 7.0) に溶かす。その溶液は 0.4 M NaCl - 0.01 M 7 エン酸ソーダ溶液中で 4 時間, 0.15 M NaCl - 0.01 M 7 エン酸ソーダ溶液中で 1 時間透析し, 最後に 0.7 mM リン酸緩衝液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.8) 中で 32 時間透析した。試料調製中に生じたゲルは 10,000 g の遠心により取り除かれた。調製された DNA・polylysine は, それに対する昇温融解曲線の結果から, 構造の安定性を保持していた。

第二の過程は, DNA, DNP, DNA・polylysine およびヒストンとフロフラビンとの複合体を作製することであった。方法は以下の通りである²⁶⁾ (Kuwabara と Yoshii, 1976)。フロフラビンを 0.7 mM リン酸緩衝液に溶かす。D

N A , D N P , D N A · polylysine の場合には、
 これらの溶液を強く攪拌しながらプロフラビン
 溶液を少しずつ加える。この場合、加えら
 れるプロフラビンの濃度 (D) は D N A リン
 酸基の濃度 (P) とのモル比で $P / D = 40 / 1$,
 あるいは $P / D = 400 / 1$ になる様に計算さ
 れた。ヒストンの場合は、ヒストン中のアミ
 ノ基の濃度 (NH_2) をアルギニンとリジン含
 量から計算し²⁷⁾ (philips, 1968) , プロフラ
 ビンとのモル比で $NH_2 / D = 40 / 1$, $400 / 1$
 になる様にしてプロフラビンが加えられた。
 D N A を含む試料においてリン酸基、ヒスト
 ンにおいてアミノ基それぞれの濃度をプロフ
 ラビンを加えるときの指標としたのは、D N
 P 中で D N A リン酸とヒストンアミノ基が化
 学量論的に等しく、しかもそれらの静電的な
 結合が D N P を構成する一つの重要な因子に
 なっていることが指摘されているからである。

第3に D N P - Ca^{++} 複合体の調製を行った。
 $CaCl_2$ を 0.7 mM リン酸緩衝液に溶かし、D N

P 溶液を強く攪拌しながら除々に加え、白濁を生じない様にした²⁸⁾(Kuwabara ら, 1974)。加えられた Ca^{++} 濃度は DNA リン酸基に対し $\text{Ca}^{++}/\text{P} = 1/10$ である。DNA- Ca^{++} 複合体の場合も同様にして調製された。なお、DNA 中のリン酸基の含量は 9.3 % であった。

以上の様に調製された試料の一部は電子顕微鏡によりその構造が調べられ、またすべて試料は ESR 実験のために供された。以下において電子顕微鏡による観察法と ESR による測定法を述べる。

2). 電子顕微鏡による観察法

(i). ネガティブ染色法による観察法²⁹⁾(Nakanishi ら, 1974)

この場合、DNA 試料についてのみ観察が行われた。調製された DNA 溶液をさらに 2 倍希釈し (約 0.5 mg/ml)、4 % シリコタンゲンステン酸ソーダを等量加え混合する。数分後、混合液をカーボン蒸着膜がはらいたグリッドの上に一滴落とし、室温で乾燥し、透

走査電子顕微鏡 (J E M - 7 と H U - 12 A 型) を用いて観測された。

(ii) フリーズ・エッチング S E M 法による観察法^{30, 31)} (Nakanishi ら, 1975, Nakanishi ら, 1976)

この場合、観察は D N A, ヒストン, D N P および再構成 D N P について行われた。この実験は Nei ら³²⁾ (1974) により考案されたフリーズ・エッチング S E M 法と呼ばれる方法に従い、特殊な付属装置を取り付けた走査電子顕微鏡により行われたものである。すなわち、 0.1 mg/ml の濃度を持つ溶液 0.01 ml を薄い銅板 ($5 \times 7 \text{ mm}$) の上に落とし、その銅板を液体窒素により冷却されている液体フロン 22 の中にすばやく入れて溶液を凍結させる。凍結試料はすぐに鏡体に取り付けられている凍結乾燥室に入れられ、 -100°C に保ちながら 10^{-5} torr の圧力で凍結試料の表面の氷を昇華させる。氷の表面に露出された溶質に金を蒸着させ、 20 kV の加速電圧で観察する。使用された走査電子顕微鏡は J S M

50 A 型である。

3), ESR 法による実験^{26, 28, 33)} (Kuwabara と Yoshii, 1976, Kuwabara *s*, 1974, Kuwabara *s*, 1973)

(i) 乾燥状態における実験

調製された DNA, ヒストン, DNP, 再構成 DNP, DNA · polylysine, あるいはフロフラビンとの複合体および Ca^{++} との複合体すべての溶液は液体窒素により凍結され, 凍結状態のまま真空乾燥装置により乾燥された。乾燥終了後, 試料は ESR 測定用石英チューブに移され, 再び真空装置を用いて 10^{-6} torr の高真空下で封入された。チミジル酸の場合は 0.7 mM のリン酸緩衝液に一度溶かし, それを同様に凍結乾燥し, 石英チューブに封入した。これらの乾燥試料を γ 線照射する時は次のようにした。石英チューブの一端において試料を照射し, もう一つの端を鉛により遮蔽する。照射後試料を遮蔽されていた部分に移動させる。この方法により, ESR スペクトル

を測定するときに石英チューブに起因するスペクトルが混入するのを防いだ。

(ii) 凍結水溶液状態における実験³⁴⁾ (Kuwabara, 未発表)

まず最初に、水溶液中に溶解している酸素を除くため、窒素ガス (99.95%) を用いてバブリングを30分間行った。窒素置換された試料溶液は液体窒素で凍結され、γ線照射された。照射後、凍結溶液は鉛で遮蔽されていたもう一つの端に液体窒素中で移動させられ、液体窒素温度下での測定用デュワービンを用いて観察された。

(iii) 昇温によるESRスペクトルの変化の観察

昇温によるESRスペクトルの強度と形状の変化を観察するため、乾燥状態、凍結水溶液状態いずれを問わず、試料は液体窒素中 (77°K) でγ線照射され、その後液体窒素とイソペンタンを混合して113°Kから273°Kまでの間の温度を任意に作り、それに3分間浸し、再び液体窒素温度に戻しスペクトル測定を行

なった。

(iv) 中性ガラス状水溶液におけるチミンの実験³⁵⁾ (Kuwabara, 未発表)

3 回蒸留水にチミン 10^{-3} M, LiCl 12 M, $K_4Fe(CN)_6$ 10^{-2} M 溶かし, 30 分間窒素ガスバブリングした後, ESR 測定用石英チューブに 0.3 ml 入れる。チューブを液体窒素中に入れ 77°K に冷却させる。溶液は透明なガラス状態になる。77°K に試料を保ちながら 254 nm の紫外線を照射する。77°K で ESR スペクトル測定後, (iii) の方法に従い昇温によるスペクトルの形の変化を記録した。

(v) ESR スペクトルの測定

ESR スペクトルは X-バンドスペクトロメータを用い一次微分曲線として記録された。外部磁場は 100 kH_z, 2.0 ガウスの磁場により変調された。スペクトルのランデ因子 (g-値) は M_n^{++} のスペクトルを同時に測定することにより決定された。試料のラジカル収率 (G 値) は diphenyl-pyryl-hydragyl と群青を標

準試料として、一次微分曲線の一次モメントを測定するかあるいは積分器により積分して、その強度を測定するかいずれかの方法を取った。

(VI) 線量測定

^{60}Co γ 線線源の線量率はフリック線量計を用い、酸素飽和の状態では測定された。酸素飽和は高い線量に至るまでの測定を可能にした。単位は rad/h として求められ、吸収線量を表わす。この線量率から照射に必要な線量のための照射時間が決定された。

4. 結果と考察

1). 電子顕微鏡による観察

図1にネガティブ染色法によるDNPの電子顕微鏡写真を示す。観察されたDNPの基本構造は糸状構造である。直径は約 $600 \text{ \AA}$ から $1800 \text{ \AA}$ に及ぶ、平均は約 $1000 \text{ \AA}$ である。この糸状構造を持つDNPはDNP糸と呼ばれる。電子顕微鏡の直接倍率は10,000倍で

ある。

次に、フリーズ・エッチング SEM 法により観察された結果を示す。図 2 A は D N P の走査電子顕微鏡写真である。基本構造はやはり糸状構造より成っている。平均直径約 $850 \text{ \AA}$ の繊維がラセン状に回旋して平均直径約 $2100 \text{ \AA}$ の糸状構造を形成しているのが観察される。D N A は平均直径約 $220 \text{ \AA}$ の細い糸状構造である (図 2 B)。しかしながら、しばしば D N A 系が数本以上集合して束を形成している部分もみられる。ヒストンの場合は幅が $700 \sim 2000 \text{ \AA}$ のテープ状構造、または糸状構造 (直径 $300 \sim 500 \text{ \AA}$) が不規則にもっり合っているのが観察され、構造上における規則性はない (図 2 C)。再構成 D N P は本質的には D N P と類似構造を有している。すなわち直径約 $700 \text{ \AA}$ の繊維がラセン状に回旋して平均直径約 $1400 \text{ \AA}$ の糸状構造が形成されている (図 2 D)。こゝで二つの問題がある。第一の問題点は、ネガティブ染色法により観察さ

れた場合 $1000 \text{ \AA}$ の直径を持つ繊維であったのが、フリーズ・エッチング SEM 法では直接 $2100 \text{ \AA}$ とその大きさに相違があったことである。第二の問題点はフリーズ・エッチング SEM 法において観察された DNP と再構成 DNP の繊維の太さにおいて約 $700 \text{ \AA}$ の差があることである。第一の点については以下のことがいえる。従来多くの研究者により様々な方法でクロマチンの電子顕微鏡による観察がなされてきている³⁶⁾ (DuPraw, 1970)。ネガティブ染色法による DNP 観察像はその形状と大きさにおいて従来報告されてきたクロマチンの像と本質的に同じである。その意味では本研究の DNP はクロマチンと呼んでもさしつかえないかも知れない。一方フリーズ・エッチング SEM 法では DNP は水を含んだ状態にあるため、試料の膨潤がひきおこされている可能性があり、さらに金蒸着がされているためその大きさにおいて約 2 倍の像を与えたものと思われる。しかしながら形状において両

者に本質的な差はない。今後含水状態で観測された電子顕微鏡像が多く報告されることが望まれる。第二の点については、再構成 D N P では構成蛋白質はヒストンのみであり、D N P では全体の 20% にも相当する酸性蛋白質が含まれており、そのため 2 つの D N P における大きさの差が生じたのではないかと想像される。ただし、再構成 D N P の形状は D N A とヒストンとも異なり、D N P のそれと類似している。それゆえ、D N A とヒストンを用いた再構成の実験は、両者により作り出される構造が本質的にネイティブな構造を再現しうるものであることを実証している。したがって、再構成 D N P は単に D N A とヒストンの結合物であるというよりは、正確にその構造においてネイティブなものを反映しているという点において本研究での使用価値が十分に認識される。大きさにおける両者の差はさらに酸性蛋白質をも含む再構成系での実験により検討されるものと思われる。

2). E S R による実験

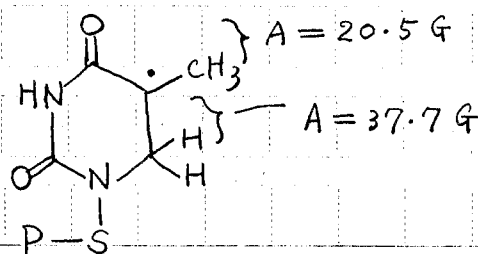
i). D N A および関連物質の E S R 実験

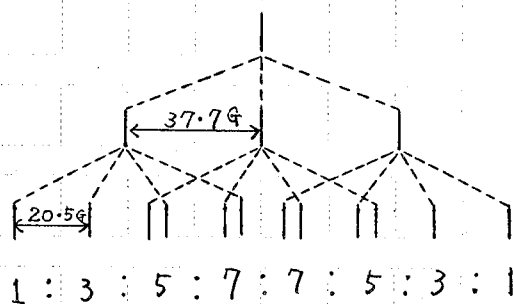
図 3 に乾燥 D N A を用い、照射された γ 線の線量と E S R シグナルの強度との関係をプロットしたものを示す。実験は室温にて行われた。ラジカルの生成は 1.2×10^6 rad 位まで線量に対し直線的に比例する。この傾きから G 値が求まる。この実験から最適の照射条件を 10^6 rad とした。それゆえ、本研究における多くの実験では 10^6 rad 照射した後、E S R 測定が行われた。

図 4 に同じく乾燥 D N A を用いて、室温での γ 線照射後の時間経過とそれによるラジカル濃度の減衰との関係を調べた結果を示す。照射後 15 分以下での測定は実験の都合上不可能であった。ラジカル濃度の減衰は時間に対し比較的ゆるやかである。定量的な実験の場合には照射後 60 分以内で行った。

こゝで、D N P の実験に先立って、D N A とその構成成分について基礎的な研究を行ったのでそれを記載する。図 5 に乾燥粉末チミ

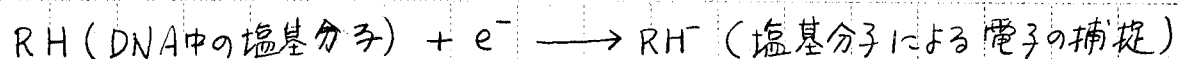
ジル酸, シチジル酸, 乾燥 DNA の室温にお
 ける ESR スペクトルを与える。チミジル酸
 と DNA には共通した 8 重の微細構造が観察
 され, シチジル酸の場合は 1 重のスペクトル
 で特徴ある微細構造への分離はない。DNA
 のスペクトルはこのチミジル酸とシチジル酸
 のスペクトルの単純な重ね合せにより再現で
 き, アデニル酸, グアニル酸からの寄与はな
 い³⁷⁾ (Gregori ら, 1972)。それゆえ, DNA に
 みられる 8 重のスペクトルはチミンに局在し
 たラジカルの吸収によって与えられたもので
 あることがわかる。なお, チミジル酸の場合
 ラジカルは塩基部分に¹⁹⁾ (Hartig と Dentinger, 1971),
 シチジル酸では糖部分に³⁸⁾ (Gordy, 1968) 局在
 していることが知られている。チミンの微細
 構造は次の様な構造を持つラジカルの吸収に
 よるものである³⁹⁾ (Pershan ら, 1964)。

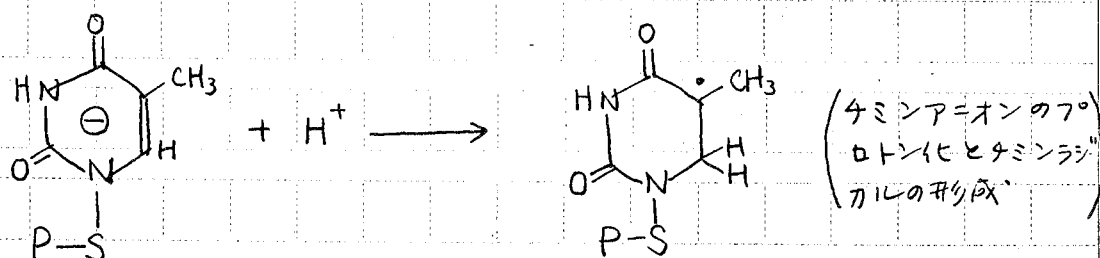
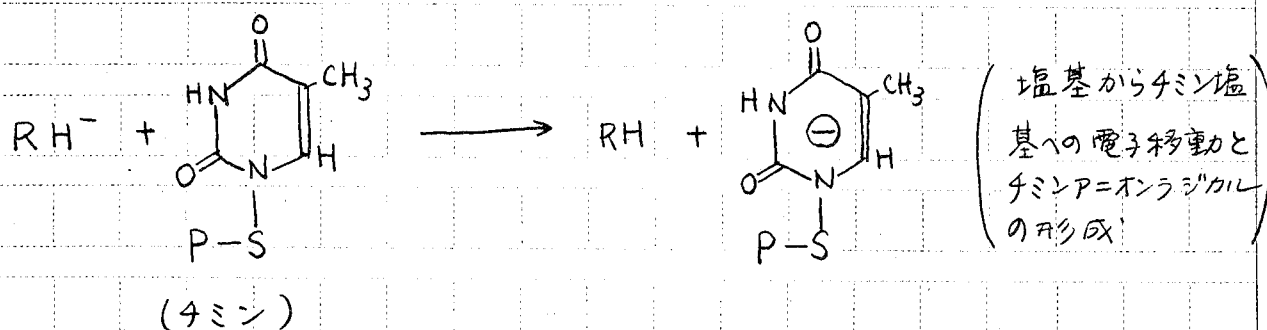




このラジカルは結果的にはチミンの C-6 部位に H 付加が起り、それにより C₅ と C₆ 間の 2 重結合が切れ、C-5 部位に生成されたものである。C-6 部位の等価な 2 個の H により共鳴吸収は 37 ガウスの 3 重微細構造に分離され、さらにそれぞれが等価な 3 個の H (メチル基) により約 20 ガウスの 4 重の微細構造に分離される。スペクトルの中央の 4 つの微細構造が重なるため、結局 8 重に分離したスペクトルとなる。

このラジカル種を与える機構については現在まで一通りの考え方が提出されている。第一の考え方は Ormerod¹³⁾(1965) により提案されたもので、以下の反応機構による。

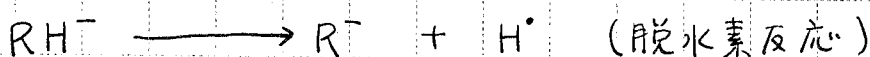
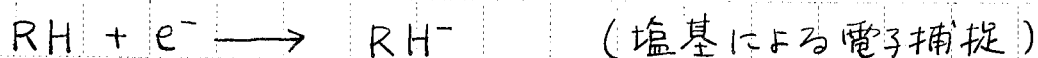
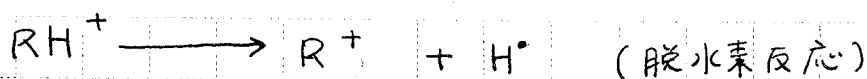
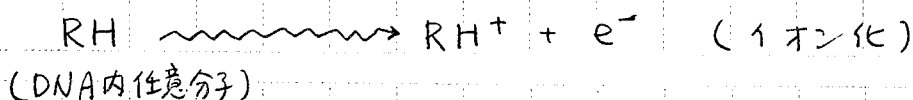




つまり、4ミン塩基への電子の局在とそれによるア=オンラジカルの形成、さらにC-6部位へのプロトン付加による中性ラジカル形成が基本過程とされている。この4ミンラジカルは 5,6-dihydro-5-thymyl radical と名称された。プロトンはDNAの結合水があるいはDNA分子内から供給されるとされている。ここで重要なことは、DNA内の塩基部分に捕捉された電子が塩基間を移動して4ミン部分に到達するという機構である。Pullman と Pullman⁴⁰⁾ (1963) の計算によれば、しかしながら、4ミンは必ずしも他の塩基に比べてきつだった

電子親和性はない。

一方, Herak と Galogaza⁴¹⁾ (1969) により次の様なもう一つの機構が提出された。

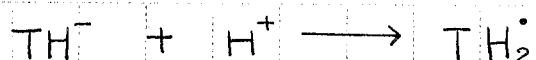
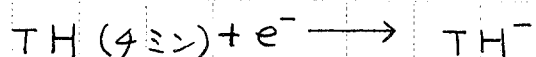
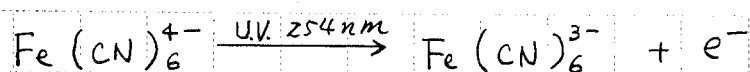


以上の考えは水素ガスの放電により生成された $\text{H}^\bullet$ を DNA に曝露させ, その時に生じたラジカルを ESR で測定し, その得られた結果から来ている。しかしながら, Beibezahn と Dentinger⁴²⁾ (1973) の正確な実験により, $\text{H}^\bullet$ 曝露の実験は電離放射線照射の場合のモデル実験にはなり得えないことが示され, その考え方が否定されている。

前者の機構が正しいことは Lenherr と Ormerod¹⁴⁾ (1968), Hartig と Dentinger¹⁹⁾ (1971), Sevilla と Mohan⁴³⁾

(1974) 等により証明されているが、こゝでは著者自身の検証を示す。

10^{-3} M チミン, 10^{-2} M $K_4Fe(CN)_6$, 12 M LiCl を含む水溶液を $77^\circ K$ で紫外線 (254 nm) 照射する。この時次の反応が起こることが期待される。



したがって、この系ではチミンアニオンラジカルとプロトン化後のチミンラジカルが ESR により観察されるはずである。図 6 a はチミン分子を含まない系のスペクトルである。これはガラス状媒質中に捕捉された電子 (e^-_{trap}) によるもので良く知られているものである。図 6 b はチミンを含む系の場合で、中央部分に 2 重線とその両側に 8 重線とが重ね合わってスペクトルが観測された。 e^-_{trap} のスペクトルは観測されない。2 重線の分離幅は約 15 ガウスである。チミンアニオンが形成された

時, スピン密度の46%がc-6部位に局在する

(18) (Sevilla, 1971)。McConnell の経験式

$$A = Q_{\text{CH}}^H \cdot \rho$$

により, $\rho_{\text{calc.}} = 0.46$, $Q_{\text{CH}}^H \approx 24$ ガウスを代入して,
 $A_{\text{calc.}} = 11$ ガウスが得られる。スペクトルはc-6
 部位の1個のHにより11ガウスの分離幅の2
 重線になる。実験から $A_{\text{obs.}} = 15$ ガウスが得ら
 れ, その時 $\rho_{\text{obs.}} = 0.625$ で正確には一致しない。

しかしながら, 他にスピン密度が高く局在す
 る部位は存在しないので, 図6bの2重線は
 c-6部位でのスピン密度の局在によるスペク
 トルと考えてさしつかえない。図6cに77°K
 から170°Kへ昇温し, その後再び77°Kで測定
 した時のスペクトルを示す。スペクトルは8
 重線であり, これはチミンア=オンがプロト
 ン化されて5,6-dihydro-5-thymylラジカルに転換
 されたことを示している。図6bですでにプロ
 トン化されたラジカルも一部観測されている。
 以上の実験からチミンア=オン形成とプロ
 トン化の過程が明らかにされた。次にチミ

10^{-2} M, プロフラビン 10^{-3} M を含む系で実験を行った。プロフラビンはチミンより高い電子親和性を有している⁴⁰⁾ (Pullman と Pullman, 1963) ので, チミンからプロフラビンへ電子移動が起るものと予想される。図 6 d は 77°K でのスペクトルである。スペクトルは明らかにチミンア=オンラジカルによるものであり, これはチミンの濃度がプロフラビンの濃度よりも高いことによる。これを 183°K へ昇温したときのスペクトルを図 6 e に示す。この時チミンによる 8 重線は観測されなかった。図 6 f は 77°K におけるプロフラビンのみのスペクトル, 図 6 g はそれを 183°K へ昇温した時のスペクトルである。図の e と g を比較して明らかな様に, チミンからプロフラビンへ電子移動が起ったのがわかる。すなわち, チミンに捕捉された電子が昇温過程においてプロフラビンにより除去されたため, 8 重線と与える 5,6-dihydro-5-thymyl ラジカルが観測されなくなったものと解釈される。以上, 中性カウ

ス状水溶液の実験から、チミンの8重線を与えるラジカルが出来るためには、チミンによる電子捕捉 $\rightarrow$ ア=オンラジカルの形成 $\rightarrow$ ア=オンラジカルのプロトン化 $\rightarrow$ 中性チミンラジカルの形成、という過程を経る必要があることがわかった。

以上の結果から、DNAあるいはチミジル酸に γ 線照射して得られた8重のスペクトルはその前駆体としてチミンア=オンラジカルが関係していることが明らかである。結局、電離により放出された電子が最終的にチミンに捕捉されるということがDNAにおけるラジカル形成における重要な機構の一つである。 γ 線照射の場合カチオンラジカルも生ずる。これについては後に議論する。

ii). DNPとその関連物質のESR実験

こゝからDNPの実験結果を述べる。上述の基礎研究の結果に基づいて議論を進める。図7に乾燥DNP, DNA, ヒストンの 10^6 rad照射後のESRスペクトルを示す。実験

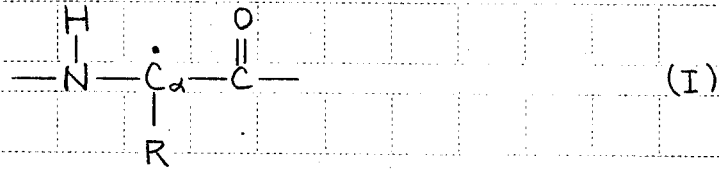
はすべて室温で行われた。G値はDNPで1.6,
 DNAで1.0, ヒストンで2.2であった。三
 つのスペクトルを比較してみると, DNPの
 スペクトルは明らかにDNAのそれに類似の
 もので, しかも8重線も観測される。このこ
 とはDNP中に生じたラジカルの多くがDN
 A部分に局在していることを示している。ヒ
 ストンのスペクトルは2重線である。ここで,
 DNPについて考察すると, DNP中のDN
 Aと蛋白質の存在比が $\text{DNA} / \text{蛋白質} = 1.0 / 1.5$
 で蛋白質の方が多い, しかもG値でも蛋白質
 の方が2倍以上大きい。それゆえ, もしDN
 P中にラジカルが生成されるとき, DNA部
 分と蛋白質部分それぞれに独立に生成される
 と考えると, スペクトルは当然ヒストン類似
 のスペクトルが観測されるはずである。実験
 結果はこの考えと完全に逆であった。DNA
 類似のスペクトルが得られたということは吸
 収されたγ線のエネルギーが結果的にDNA
 ラジカル形成のために使用されたことを意味

している。一般にγ線によるイオン化はランダムであり、DNA部分であろうと蛋白質部分であろうと等しく起るので、イオン化後の電子や正孔の再配置過程において不均一な分布が生ずる。DNPの場合、DNAへの不均一な分布が起り、その結果DNA部分でのラジカルの局在が起ったものと思われる。またDNPにおける電子や正孔の不均一分布はDNAと蛋白質との特異的な結合を通して可能になったものと思われる。この実験事実をより明らかにするために、再構成DNP、混合DNP (DNAとヒストン粉末を1:1の割合で単に機械的に混合したもの) のスペクトルを観測し比較した。図8aは再構成DNPのスペクトルであり、明らかにDNA型のスペクトルである。一方混合DNPはヒストン型のスペクトルである (図8b)。混合DNPの場合はヒストンの高いラジカル収率のためスペクトルはヒストンのスペクトルを示したものであると思われる。したがって、DNAが蛋

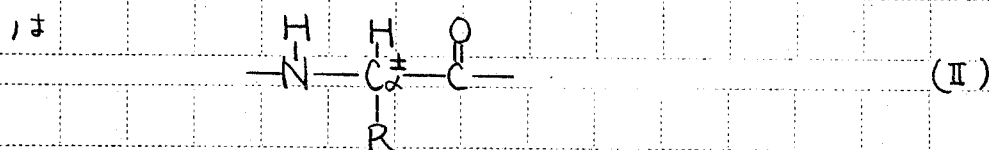
白質と特異的に結合している場合 (DNP と再構成 DNP) に限り, DNA 上でのラジカルの局在が観測される。DNA 部分での局在がイオン化後の電荷の再配置段階での不均一な分布が原因であるとし, しかも DNA 型ラジカルとしての 8 重のスペクトルはその前駆体としてチミンアニオンラジカルが関与しているという事実を考え合わせると, イオン化により放出された電子の多くが DNA 特にチミン塩基に局在し, その結果が DNA 部分でのラジカルの局在が引き起されたのではないかと容易に想像される。すなわち, 蛋白質部分で放出された電子が DNA と蛋白質の特異的な結合を介して DNA 部分へ移動した結果によるものであると考えられるのである。

こゝでヒストンのスペクトルについて述べる。ヒストンの 2 重線はヒストンに限らず全ての蛋白質が照射された時共通して観測されるものである。それゆえ, これはヒストン特有のものではない。2 重線はポリペプチドの

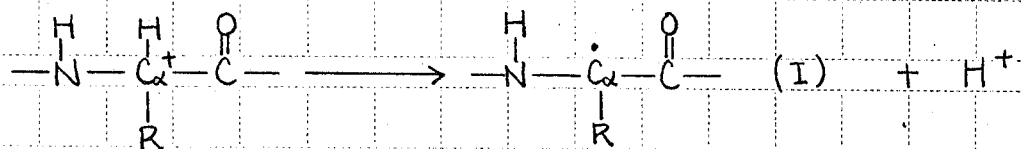
主鎖のα炭素に存在するラジカル



の吸収によるものである^{44,45)} (Drew と Gordy, 1963; Holroyd ら, 1970)。蛋白質におけるラジカル生成の機構については個々のアミノ酸についての知見からでは完全な解答が得られない。あくまで蛋白質全体で考えなければならぬ。現段階において正確にいえることは次のことである。低温において観測されるラジカル種



型のもので、昇温と共にα炭素のプロトンが脱離して



(I) 型のラジカルに転換する。α炭素に局在していた電子は分子内を移動してイオウ原子と芳香族アミノ酸の環に捕捉される⁴⁶⁾ (波多野, 1967)。ヒストンにはイオウはほとんど存在

しないので電子は芽香族アミノ酸の側鎖環に捕捉される。ヒストンの2重線の両側に肩が存在するが認められるが、LimingとGordy⁴⁷⁾(1968)の芽香族アミノ酸のESR実験を考之合わせると、この肩は明らかに芽香族アミノ酸に局在したラジカルの吸収によるものであり、そのラジカルは芽香族アミノ酸の側鎖環による電子捕捉がその原因になっているものと思われる。

乾燥DNPにおいて生じたラジカルの多くがDNA部分に局在しているということはずで述べたが、そのことはDNPに生じたラジカルがDNAラジカルと同じ性質を持っていないければならないことを意味する。そこで乾燥DNP, DNA, ヒストンを77°Kで照射し、その後昇温過程を繰り返し、それによって引き起されるラジカル濃度の減衰を調べた。図9に昇温過程におけるG値の変化を示す。各温度での測定は、その温度に試料をセットし、3分後再び77°Kに戻し行なわれたもので

ある。昇温によるラジカル減少の様式はDNPとDNAで似かよっており、ヒストンでは全く異なっている。時間と温度をパラメータとしたこの実験からラジカル減衰の活性化エネルギーはDNPとDNAで 2.4 Kcal/mol 、ヒストンで 2.0 Kcal/mol であった。この実験はDNPラジカルとDNAラジカルが同質のものであることを意味しており、このことからDNPラジカルの多くがDNAラジカルであることが示唆される。

照射DNPにおいてラジカルがDNA部分に局在しており、それが蛋白質部分からDNA部分への電子移動の結果によるものであると仮定したが、その仮定を実証するため以下2つの実験を行った。

(Ⅲ) 凍結水溶液における実験

0.7 mM のリン酸緩衝液中に溶かされているDNP, DNA, ヒストン溶液を 77°K で凍結させ、その状態を保持したまゝ γ 線照射し

た。溶液は凍結前 N_2 ガスにより置換し O_2 を除去した。77°K で測定されたスペクトルはいずれの試料においても水の分解産物である OH ラジカルの存在を示している (図 10a, 11a, 12a)。このスペクトルが OH ラジカルによるものであるということは Dibdin⁴⁸⁾ (1967) と Brivati⁴⁹⁾ (1967) による氷の ESR 実験から決定されている。これら凍結水溶液を昇温すると OH によるシグナルは完全に消え、溶質によるシグナルが現われて来る (図 10b, 11b, 12b)。凍結水溶液の場合、たとえ 77°K で OH ラジカルの存在が認められるけれども、それらは昇温過程において溶質とはほとんど反応しない。水分子から放出された電子のみが溶質と反応する^{14,50)} (Lenherr と Ormerod, 1968; Sanner, 1965)。それゆえ、昇温過程において観測された溶質のスペクトルは溶質による電子捕捉の結果を表わしており、これらのスペクトルの観測は水分子から放出された電子が最終的に溶質のどの部位に捕捉されるかを知る情報を与えてく

れる。77°KではOHによる吸収が大き過ぎるので、溶質に捕捉された電子によるスペクトルの観測は困難である。DNPとDNAの凍結水溶液を143°Kに昇温し、再び77°Kで測定したのが図10b, 11bである。いずれもスペクトルは2重線(13ガウスの分離)である。これらの2重線はすでに述べた様にチミンア=オンによるものである。DNPの様に蛋白質が多量に存在しているにもかゝらず電子の捕捉部位はチミン塩基である。これらの試料をさらに183°Kへ昇温して得られたスペクトルが図10c, 11cである。より高い温度に昇温された結果、チミンア=オンがプロトン化され、5,6 dihydro-5-thymyl ラジカルが生じ、いわゆる8重線のスペクトルが観測されるようになる。ヒストンの場合、溶質のスペクトルは1重線であり、昇温過程における変化もわずかであった。図12bに155°Kへ昇温したときのスペクトルを与える。このスペクトルからはラジカルが如何なる部位に生じているか正確

に決定できないが、乾燥ヒストンのスペクトルに比べて、芳香族アミノ酸に生じたラジカルによる吸収がより顕著であることは十分に認識される。以上の実験から、DNP水溶液において水分子から放出された電子の最終局在部位がチミン塩基であることが明らかとなった。したがって、この実験は乾燥DNPにおいてイオン化により放出された電子がたとえDNP分子そのものから放出された場合であつたとしても、その電子の最終到達部位はDNAであり、さらにDNA内のチミン塩基であることを実証するものである。すなわちこの結果は蛋白質部分において放出された電子がDNA部分へ移動するという意味を含んでいる。

(iv). フロフラビンとの複合体における実験
二番目の実験としてDNP他関連物質とフロフラビンとの複合体を試料とし電子移動の機構の知見を得るための実験を行った。

DNA, DNPのラジカル形成における電

子の役割については以上述べた様に明らかになっ
 ったが、それならばもし電子を除去する物質が
 DNAあるいはDNP分子内に存在する様な試料を
 用いた場合には、当然化学シグナルは観測され
 ないはずである。その様な考えから、DNP-プロ
 フラビン、DNA-プロフラビン、ヒストン-プロ
 フラビンの各複合体を作り、 γ 線照射後のESRス
 ペクトル測定を行った。プロフラビンはDNAお
 よびDNP水溶液中に加えられたとき、インター
 カレーションによりDNAの塩基の重なり部分に
 入り込む^{51,52)} (Peacocke と Skerrett, 1956 ;
 Gittelson と Walker, 1967)。このことはプロ
 フラビンの可視光吸収における $\lambda_{\max}$ が440nm
 から460nmへ移動することにより容易に認め
 られる。プロフラビンはまたDNAの塩基分子
 やすべてのアミノ酸分子いずれよりも電子親
 和性が高い^{40,53,54,55)} (Pullman と Pullman, 1965 ;
 Amber と Neta, 1967 ; Balazs S, 1968 ; Williams,
 1975)。したがって、DNA-プロフラビン、

D N P - プロフラビン複合体の場合には、プロ
 フラビンがラジカル形成に影響を与えるこ
 とが予想される。一方、ヒストン-プロフラ
 ビン複合体の場合には $\lambda_{\max}$ の変化は全くみら
 れず、ヒストンとプロフラビンの相互作用が
 非常に弱いことが判った。それゆえ、たとえ
 ヒストン-プロフラビン複合体を試料として
 用いたとしても、そのラジカル形成にはプロ
 フラビンがほとんど影響を与えないであらう
 と予想される。図13にDNA-プロフラビン
 複合体で得られたESRスペクトルを示す。
 図13 a はDNAだけのスペクトル、b は P/D
 $= 400/1$ の複合体のスペクトル、c は P/D
 $= 40/1$ の複合体のスペクトルである。プロ
 フラビンの濃度が増加するにつれて8重のス
 ペクトルすなわちチミンラジカルが減少して
 行くのがわかる。図14にDNP-プロフラビ
 ン複合体を用いたときの結果を示す。図15の
 スペクトルはさらにESR装置の感度をあげ
 て測定したものである。この場合も8重線の

減少がプロフラビン濃度の増加と共に進むのが観測される。以上の実験は、DNAやDNPにおいて本来チミンに局在するはずの電子がインタカレートされているプロフラビンにより除去されてしまい、その結果プロフラビンラジカルが形成されていることを示している。特にDNPにおいて観測された結果は次のように解釈されることができる。すなわち、DNA部分で放出された電子はそのままDNA部分において捕捉されるが、蛋白質部分において放出された電子はDNA部分へ移動する。DNA部分に集った電子は塩基間の電子的な相互作用を介して移動し、最終的にプロフラビン分子に局在する。しかしながら、DNP-プロフラビンの場合、蛋白質からプロフラビンへの直接的な電子移動の機構が存在しているかも知れない。この可能性はヒストン-プロフラビン複合体での実験で検討されることができる。結果はヒストンのスペクトルがプロフラビン存在のため大きく影響を受

けていることを示した(四六)。ヒストンとプロフラビンの相互作用が非常に弱いので、プロフラビンの存在がヒストンラジカル形成にほとんど影響を与えないものと考えられたが、得られた結果はそうではなかった。それゆえ、この結果はDNP-プロフラビン複合体において、蛋白質部分からプロフラビンへの直接電子移動できることを示唆しているし、さらにDNP-プロフラビン複合体での実験結果が蛋白質からDNAへの電子移動の直接証拠になり得ないこともまた示唆している。このような疑問を解消するため、DNA-ポリリジン複合体にプロフラビンを加えた試料で実験を行なった。DNA-ポリリジン複合体ではDNAのリン酸基はリジンのアミノ基により完全にマスクされて電氣的に中和されている。プロフラビンは溶液中ではカチオンとしてふるまうが、DNA-ポリリジン複合体に加えられた場合、DNAのリン酸基がマスクされているため静電的な引力は生じない。

結局プロフラビン は DNA にインターカレートされないことになる。このことは可視光吸収スペクトルになんらの変化も生じないことから容易に知ることができる。それゆえ、DNA-ポリリジン-プロフラビン複合体を用いて実験を行うならば、蛋白質(ポリリジン)部分に生じた電子が DNA 部分へ移動するかあるいはプロフラビンの方へ移動するかを知ることができる。図 17 に DNA-ポリリジン複合体と DNA-ポリリジン-プロフラビン複合体において得られた ESR スペクトルを示す。両者において相違はほとんど観測されない。そればかりか両者に共通して 8 重線が観測された。最初の観測はプロフラビンがほとんど影響を与えていないことを示しているし、後の観測は DNA 上でのラジカルの局在を示している。結局、この系では蛋白質部分に生じた電子は DNA の方へ移動するか、プロフラビンの方へは移動しないことが示された。プロフラビンは DNA-プロフラビン

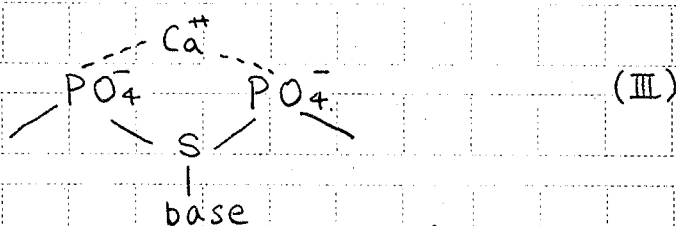
複合体のようにDNA内にインターカレート
されている場合に限リ、電子除去剤としての
役割をはたすことが出来る。したがって、D
NP-フロフラビン複合体で観測された8重
線の消失は蛋白質からDNAへの電子移動、
DNA内における塩基からフロフラビンへの
電子移動、フロフラビンラジカルの形成、の
一連の反応の結果によるものであり、蛋白質
からフロフラビンへの直接の電子移動の結果
によるものではない。

以上、凍結水溶液での実験、フロフラビン
複合体での実験から、γ線照射されたDNP
において蛋白質部分に生じた電子がDNA部
分に移動し、その結果DNAにラジカルが局
在するということが実証された。

DNP-フロフラビン複体のスペクトル
において $g = 2.0012 \pm 0.0014$ の所に肩がみられ
る(図14b, c)。この肩はDNA-フロフラ
ビン複体のスペクトルにおいては観測され
ない(図13c)。したがって、この吸収はフ

ロフラビンにより除去されることが出来ない
ラジカル, すなわちヒストン部分に残っている
ラジカルの吸収によるものであると結論さ
れる。この観測はDNPにおいて生じたラジ
カルのすべてがDNAに局在しているのでは
ないことを示している。すなわち電子移動は
部分的であることを意味している。それゆえ,
次にどのくらいの電子が蛋白質からDNAへ
移動することが出来るかを知るための実験を
行なった。

一般にDNP中のDNAはその半分が蛋白
質と結合しており, 残りの半分は露出された
状態になっている⁵⁶⁾ (Miura & Ohba, 1968)。水溶液状
態のDNPに Ca^{++} を加えると, Ca^{++} の一部は露出
状態のDNAのリン酸基部分にイオン結合し,



型の結合, すなわち Ca^{++} が2個のリン酸基によ
ってキレートされた様な構造を取るようにな

る。 Ca^{++} を含む D N P 水溶液に電離放射線を照射 (1000 rad) すると, D N A と蛋白質間の結合のゆるみが引き起こされ, 新たに D N A のリン酸基が露出してくる。そのとき, そのままで D N A に結合しえなかった残りの Ca^{++} がその露出されたリン酸基に結合し, やはり (Ⅲ) 型のイオン結合を生ずる。この結合は線量と共に増加する⁵⁷⁾ (Yoshii と Tchae, 1966)。 Ca^{++} が D N A と蛋白質の中間に入り込んで (Ⅲ) 型の複合体を形成するということは, 一旦ゆるんだ D N A と蛋白質間の再結合を阻止してしまうことを意味する。いゝかえりならば, Ca^{++} と電離放射線との相乗作用は D N A と蛋白質間の非可逆的な解離を引き起し, 必然的に両者間の結合距離を増加させる。そこで, もし乾燥 D N P で観測された蛋白質から D N A への電子移動がこの両者間の結合距離に依存して, 移動の程度が変化すると考えるならば, Ca^{++} と X 線照射 (低線量) により前処理された D N P と正常 D N P とで電子移動の程度に差が生

ずるであろう。そしてそれは ESR スペクトルにおける変化として観測されるはずである。そこで、次の様な 3 種類の試料を用意し実験に供した。

(1) 正常 DNP 溶液

(2) 0.2 mM CaCl_2 を加えた DNP 溶液

(3) 0.2 mM CaCl_2 を加えた後、X 線を 1000 rad 照射した DNP 溶液

これら 3 つの試料は凍結乾燥後石英チューブに入れられ、 10^{-6} Torr で封じられた。試料に 10^6 rad γ 線照射し、ESR スペクトルを測定した。図 18(a) に (1) の試料、(b) に (2) の試料より、(c) に (3) の試料より得られたスペクトルを示す。図 18(d) はそれぞれのスぺクトルを ESR の感度を上げて記録したものである。図 18(a) にある Y は DNP において観測される 8 重線の第 2 番目と第 7 番目のピーク間の高さを表わしており、この Y をもって DNP 中の DNA ラジカル濃度の指標とした。これらのスペクトルの観測から次の二つのことが判明した。第

一に γ の値が DNP, DNP- Ca^{++} , DNP- $\text{Ca}^{++} + 1000 \text{ rad}$ 照射の順に減少している事, 第二に図 18(b), (c) において矢印で示した様に新しいシグナルが出現したことである。この二つの観測は互いに密接に関係している。第一の観測結果は先に述べた考之が正しい事を意味している。すなわち, Ca^{++} の存在と X 線照射のため DNA と蛋白質間の結合距離が増加し, それにより蛋白質から DNA への電子移動が阻止され, 結局 DNP 中の DNA ラジカルの濃度が減少してしまったのである。この事を逆にいえば, 蛋白質部分でのラジカル濃度が増加することを意味している。第二の観測結果はこの事を証明している。図 18(b), (c) の新しいシグナルは蛋白質ラジカルの吸収に起因するものであり, 先の DNP-プロフラゼン複合体のスペクトル (図 14 b, c) において認められた肩に対応するものである。

DNA のスペクトルにおいて測定される γ 値を DNA 濃度 100% として, 図 18(a), (b),

(c) における Y 値を測定し, それぞれの試料における DNA ラジカル濃度 R (%) を計算した。表に三つの試料についての G 値と R 値を与える。正常 DNP でラジカルの 90% が DNA ラジカルであるが, DNP - Ca^{++} 複合体の場合 90% に, DNA - Ca^{++} + 1000 rad の場合 76.5% に DNA ラジカル濃度が減少している。今, こゝで蛋白質部分において生じた電子の DNA へ移動する割合を q , DNA へ移動した電子のうちで DNA ラジカルを形成するものゝ割合を p とすると, 次の式が成立する。

$$a(1-q) \cdot G_{\text{protein}} + R \cdot G_{\text{DNA}} = G_{\text{DNP}} \times 100$$

$$R = (a \cdot p \cdot q \cdot G_{\text{protein}} + b \cdot G_{\text{DNA}}) / G_{\text{DNA}}$$

こゝで, G_{protein} は蛋白質のラジカル収率で 2.4, G_{DNA} は DNA のそれ で 1.0, a は DNP 中の DNA 含量 (重量%) で 60% であり, b は同じく蛋白質含量で 40% である。表に与えられている G 値と R 値を使って計算すると, 正常 DNP では $q = 0.50$, DNA - Ca^{++} では 0.41, DNP - Ca^{++} + 1000 rad では 0.35 であった。 p

はすべての試料において 0.70 と求められた。

g 値は次の様に解釈される。

(1). 正常 DNP における $g = 0.50$ は蛋白質部分において生成された電子の半分が DNA に移動することができする。

(2). DNA - Ca^{++} における $g = 0.41$ は本来露出された状態にある DNA のリン酸基へ Ca^{++} が結合しただけのものにすぎないのに、それだけでも電子の移動の割合は減少する。

(3). DNP - Ca^{++} に X 線照射が加えられた時には、 Ca^{++} の存在により DNA と蛋白質との非可逆的解離が引き起され、そのため DNA と蛋白質間の距離が大きくなり、35% の電子しか移動できなくなってしまった。

$P = 0.7$ という値は蛋白質から DNA へ移動した電子の 70% の部分がチミンラジカル形成に寄与するということを意味している。30% の電子が消失した理由は明らかではない。

DNA 内に生じた正孔と再結合した結果によるのかも知れない。DNP の理論的な G 値は

次式から計算されることができる。

$$G_{\text{calc.}} = G_{\text{DNA}} \times 0.4 + G_{\text{protein}} \times 0.6$$

$G_{\text{DNA}} = 1.0$, $G_{\text{protein}} = 2.3$ を代入して, $G_{\text{calc.}} = 1.8$ となる。観測された DNP の G 値は 1.6 で計算された値よりも小さい。この原因の一つが 30% にもおよび電子の消失にあるのではないかと思われる。

この実験において DNA ラジカル濃度を評価するため Y を測定したが, この Y の測定が正しい DNA 濃度を与えているか否か検討する必要がある。この Y を選んだ理由は, DNA の 8 重線の 2 番目と 7 番目の微細構造部分には蛋白質ラジカルによる吸収が存在しないと判断したからである。そこで, Y の測定が正しく DNA ラジカル濃度を与えることを示すため, DNA とヒストンの ESR スペクトルを用いて, DNP のスペクトルを再現する方法を試みた。表により $\text{DNP} - \text{Ca}^{++} + 1000 \text{ rad}$ 照射の場合 DNA ラジカル濃度が 76.5% であるので, DNA のスペクトルとヒストンのス

スペクトルを 76.5 : 23.5 の割合で重ね合わせ、
スペクトルの合成を行った。合成されたスペ
クトルと図 18(c) のスペクトルを比較したのが
図 19 a, b である。両者のスペクトルは充分
に一致した。DNP 中の DNA ラジカル濃度
を見積るために Y を測定して用いたが、その
方法が正しいことをこの再構成されたスペク
トルは示している。

総論

以上、研究された内容をまとめると次のよ
うになる。

- (1)、電子顕微鏡による観察は DNP が糸状構
造を有しているを示した。ヒストンと DNA
を用いた再構成の実験において、再構成 D
NP はネイティブな DNP の構造を再現した。
- (2)、4 ミンの中性ガラス状低温水溶液の ES
R 実験から、4 ミンによる電子捕捉とア・オ
ンラジカルの形成、ア・オンラジカルのプロ
トン化とそれによる 5,6 dihydro-5-thymyl ラジカ

ルの形成, 以上の機構が明らかにされた。そしてそのラジカル種が8重線スペクトルを与えるものであることも判明した。

(3)、DNPのESRスペクトルはその構成成分であるDNAとヒストンのスペクトルとの比較から、DNA型のスペクトルであることが明らかとなった。DNP, DNAいずれのスペクトルもタミンラジカルの存在を示す8重線を与えた。

(4)、蛋白質(ヒストン)のG値はDNAのそれよりも大きく、しかもDNPにおいては蛋白質の含量の方が多い。それにもかゝらずDNPのスペクトルがDNAのスペクトルに類似していたのは、蛋白質部分において放出された電子がDNA部分に移動し、それによりDNA部分にラジカルが形成されたからである。この移動はDNAと蛋白質の結合を通して行われることが出来る。

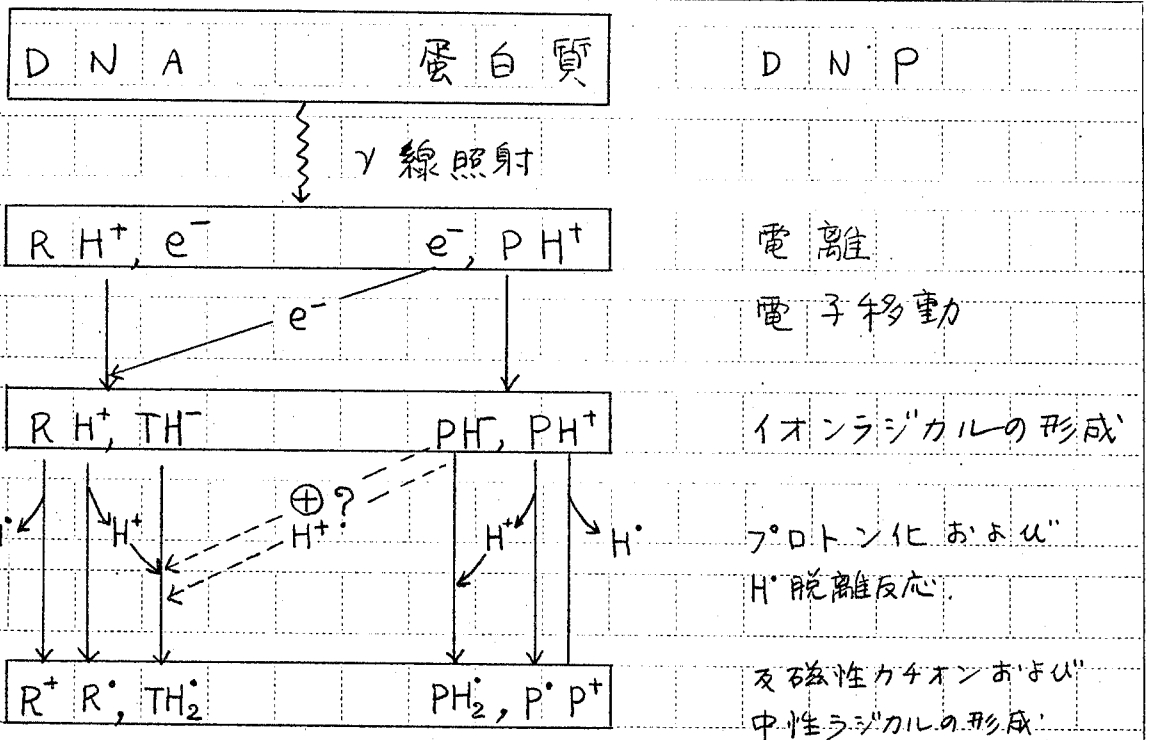
(5)、蛋白質からDNAへの電子移動の事実は凍結DNP水溶液やプロフラビン-DNP複

合体での実験により証明された。

(6) DNP-Ca⁺⁺複合体での実験から蛋白質部分において放出された電子のうち50%の電子がDNAに移動し、さらに移動した電子の70%がチミンラジカル形成に寄与する。

本研究において乾燥状態におけるDNPに対する電離放射線的作用の初期過程が明らかにされた。γ線によりDNP内に無差別に電離が引き起され、その後放出された電子は蛋白質とDNAの結合を通して移動し、最終的にはDNA内のチミン塩基に集中する。電子を捕捉したチミンはアニオンラジカルになり、さらにプロトン化されて中性ラジカルに転換し損傷となる。電離後の正孔については何ら研究を行なわなかったが、すでに報告されている論文を参照すると次のような過程を経るものと推測される。DNAに生じた正孔は主として7'アニンに局在する⁵⁸⁾(Gräslundら, 1975)。蛋白質に生じた正孔は主鎖のα炭素に局在する⁴⁶⁾(波多野, 1967)。正孔を捕捉した部位にお

いとは、その後、 H^+ が脱離してその部位にラジカルを残す場合と、 H^+ が脱離して反磁性カチオンを与える場合と二つの異った反応が進行する。グアニンカチオンの場合には H^+ 脱離反応の方が優先している⁵⁹⁾(DertingerとHartig, 1971)。グアニンカチオンが H^+ 脱離して反磁性カチオンに転換した場合ESRの吸収はおこらないが、DNAやDNPにおいて特にグアニンに由来するスペクトルは観測されなかった。このことからわかるように、グアニンに局在した正孔が中性のラジカル種に転換する量は非常に少ないものと考えられる。一方蛋白質のα炭素部位において正孔が捕捉されると、 H^+ 脱離反応が引き起され、 $\dot{C}_\alpha$ 型のラジカルを残す。このラジカル種は2重のESRスペクトルを与える。DNP-フロラゼン複合体、DNP- C_α 複合体において観測された蛋白質ラジカルの存在は明らかに $\dot{C}_\alpha$ 型ラジカルの形成を示している。そこで、DNPにおけるラジカル形成の模式図を示す。



こゝで、 RH はDNAのヌクレオチド、 TH はチミジル酸、 PH は蛋白質のアミノ酸を表わす。γ線照射されたDNPにおいて確実に観測されることのできたラジカル種は $TH_2^{\cdot}$ (5,6 dihydro-5-thymyl (ラジカル)) と $P^{\cdot}$ (α炭素ラジカル) の2種類である。他に数種類のラジカルが形成されているものと思われるが、本実験では解明されていない。また蛋白質からDNAへの正孔とプロトンの移動についても正確な解答は得られなかった。

結局、γ線照射されたDNPにおいて、本実験はDNAにラジカルが優先的に形成され

ることを示し、その原因が蛋白質からDNAへの電子移動によるものであることを明らかにした。このことはDNAが蛋白質と結合している時には、DNA単独の状態にあるときよりもより多くの損傷を受けるということを意味している。放射線の間接作用が主な原因となる場合、すなわち、DNAを水溶液状態で照射した実験の場合には、DNAは蛋白質により放射線から防護される⁶⁰⁾(Hayashiら, 1974)。したがって、生細胞が放射線照射されたとき、細胞核内でDNAと結合している蛋白質(主としてヒストン)は2つの相反する役割を果たすであろう。すなわち電離放射線の直接作用に対してはDNAの損傷を増大させるように働き、間接作用に対してはDNAを防護するように働く。こうした蛋白質のもつ性質については、今後物理化学的、生化学的、細胞レベルでの実験など多様な方法を用いることにより確証されていくべきものであると考える。

1972年に Lillcrap と Fielden により電子線照射後の DNP からのルミネッセンス発光スペクトルが観測された⁶¹⁾ (Lillcrap と Fielden, 1972)。

1.6 μsec の電子線パルスを DNP に照射し、1 msec 後の発光スペクトルを観測したところ 475 nm にピークがあった。同様に DNA とヒストンについて観測したところ、DNA では DNP と同じ 475 nm に、ヒストンでは 415 nm にそれぞれピークをもつ発光スペクトルが得られた。さらにルミネッセンス光の収率を測定したところ DNP で 0.8, DNA で 0.7, ヒストンで 2.3 であった。以上の結果から彼らは次のように結論した。すなわち DNP, DNA における 475 nm の発光スペクトルは DNA の三重項励起状態 (T_1) を反映していると考えられるので、電子線照射された DNP ではヒストン - DNA 間で三重項 - 三重項のエネルギー移動が起こっており、その方向はヒストン $\rightarrow$ DNA である。またエネルギー移動の効率は約 40% である。

以上の結果はESRによる本研究の結果と比較して、あらゆる面で驚くべき類似性を有している。以下表にまとめると、次のようになる。

実験法	ESRおよびルミネセンス発スペクトルにおける類似性	原因	ラジカルおよびルミネセンス収率 DNP DNA ヒストン	電子およびエネルギー移動の割合
ESR	DNP=DNA (4ミリラジカル)	電子移動	1.6 1.0 2.2	50%
ルミネセンス	DNP=DNA (475nm)	三重項励起エネルギー移動	0.8 0.7 2.3	40%

DNPにおける電子移動と励起エネルギー移動は独立にかつほぼ同時に起っているものと思われる。いずれにせよ上の2つの実験結果は、DNAがヒストンと結合している時、電離放射線のエネルギーをより多く受けることを示しており、逆にヒストンの受ける損傷はDNAにより弱められていることを示している。

文 献

1. Dertinger, H. and Jung, H : Molecular Radiation Biology, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1969)
2. Henriksen, T : Radiat. Res. 27, 694 (1966)
3. Müller, A., Köhnlein, W. and Zimmer, K.G. : J. Mol. Biol. 7, 92 (1963)
4. Hotz, G. and Zimmer, K.G. : Int. J. Radiat. Biol. 7, 75 (1963)
5. Okada, S. : Radiation Biochemistry, vol. I, P 77, Academic Press, New York (1970)
6. Teoule, R. and Cadet, J. : Int. J. Radiat. Biol. 27, 211 (1975)
7. Ewing, D., Fielden, E. M. and Roberts, P. B. : Radiat. Res. 58, 481 (1974)
8. Coquerelle, T., Bopp, A., Kessler, B. and Hagen, U. : Int. J. Radiat. Biol. 24, 397 (1973)
9. Ord, M. J. and Danielli, J. F. : Quart. J. Microscop. Sci. 97, 29 (1956)
10. Fox, M. : Int. J. Cancer 3, 382 (1968)
11. Ogawa, H. and Tomizawa, J. : J. Mol. Biol. 30, 1 (1967)
12. Alexander, P., Lett, J. T. and Ormerod, M. G. : Biochim. Biophys. Acta 51, 207 (1961)

13. Ormerod, M. G. : Int. J. Radiat. Biol. 9, 291 (1965)
14. Lenherr, A. D. and Ormerod, M. G. : Biochim. Biophys. Acta 298 (1968)
15. Van de Vorst, A., Richir, M. and Krsmanović-Simić, D. : C. R. Acad. Sci. Paris 261, 5682 (1965)
16. Olast, M. and Bertinchamps, A. J. : Int. J. Radiat. Biol. 24, 589 (1973)
17. Lücke-Huhle, C., Braun, A. and Hagen, U. : Z. Naturforsch. 25b, 1264 (1970)
18. Sevilla, M. D. : J. Phys. Chem. 76, 626 (1971)
19. Hartig, G. and Dertinger, H. : Int. J. Radiat. Biol. 20, 577 (1971)
20. Kay, E. R. M., Simmons, N. S. and Doance, A. L. : J. Am. Chem. Soc. 74, 1724 (1952)
21. Spelsberg, T. C. and Hnilica, L. S. : Biochim. Biophys. Acta 228, 202 (1971)
22. Bonner, J., Chalkley, G. R., Marushige, K., Ohlenbusch, H., Olivera, B. and Widholm, J. : Methods in Enzymology Vol. 12, B, P3, Academic Press, New York (1968)
23. Zubay, G. and Doty, P. : J. Mol. Biol. 1, 1 (1959)

24. Burton, K. : Biochem. J. 62, 315 (1956)
25. Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R, J. : J. Biol. Chem. 233, 1407 (1951)
26. Kuwabara, M. and Yoshii, G. : Biochim. Biophys. Acta 432, 292 (1976)
27. Phillips, O. M. P. : Histones and Nucleohistones, P12, Plenum Press, London (1971)
28. Kuwabara, M., Kato, S. and Yoshii, G. : J. Radiat. Res. 15, 219 (1974)
29. Nakanishi, Y. H., Kuwabara, M. and Yoshii, G. : J. Radiat. Res. 15, 166 (1974)
30. Nakanishi, Y. H., Kuwabara, M. and Nei, T. : J. Electron Microscopy 24, 123 (1975)
31. Nakanishi, Y. H., Kuwabara, M., Yoshii, G. and Nei, T. : Experientia 32, 30 (1976)
32. Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Hasegawa, M. : J. Electron Microscopy 23, 137 (1974)
33. Kuwabara, M., Hayashi, M. and Yoshii, G. : J. Radiat. Res. 14, 198 (1973)
34. Kuwabara, M. 未発表

35. Kuwabara, M. 未発表
36. DuPraw, E. J. : DNA and Chromosomes, Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York (1970)
37. Gregoli, S. and Bertinchamps, A. : Int. J. Radiat. Biol. 21, 75 (1972)
38. Gordy, W. : Ann. New York Acad. Sci. 158, 100 (1968)
39. Pershan, P. S., Shulman, R. G., Wyluda, B. J. and Eisinger, J. : Physics 1, 163 (1964)
40. Pullman, B. and Pullman, A. : Quantum Biochemistry, P215, Interscience Publishers, New York (1963)
41. Herak, J. N. and Galogaza, V. : Proc. Natl. Acad. Sci. 64, 8 (1969)
42. Weibezahn, K. F. and Dertinger, H. : Int. J. Radiat. Biol. 23, 447 (1973)
43. Sevilla, M. D. and Mohan, P. A. : Int. J. Radiat. Biol. 25, 635 (1974)
44. Drew, R. and Gordy, W. : Radiat. Res. 18, 522 (1963)
45. Holroyd, R., Glass, J. and Riesz, P. : Radiat. Res. 44, 59 (1970)
46. 波多野博行 : 放射線化学 2, 98 (1967)

47. Liming, F. G. Jr. and Gordy, W. : Proc. Natl. Acad. Sci.
60, 794 (1968)
48. Dibdin, G. : Trans. Faraday Soc. 63, 2098 (1967)
49. Brivati, J. A., Symons, M. R. C., Tindling, D. J. A.,
Wardale, H. W. and Williams, D. O. : Trans. Faraday Soc.
63, 2112 (1967)
50. Sanner, T. : Radiation Research 25, 586 (1965)
51. Peacocke, A. R. and Skerrett : Trans. Faraday Soc.
52, 261 (1956)
52. Gittelson, B. L. and Walker, I. O. : Biochim Biophys.
Acta 138, 619 (1967)
53. Amber, M. and Neta, P. : Int. J. Appl. Radiat. Isotopes
18, 493 (1967)
54. Balazs, E. A., Davies, J. V., Phillips, G. O. and Scheefele,
D. S. : J. Chem. Soc. (c), 1429 (1968)
55. Whillans, D. W. : Biochim. Biophys. Acta 414, 193 (1975)
56. Miura, A. and Ohba, Y. : Biochim. Biophys. Acta 145,
436 (1967)
57. Yoshii, G. and Tchoe, Y.-T. : Int. J. Radiat. Biol.
10, 485 (1966)

58. Gräslund, A., Ehnberg, A., Rupprecht, A., Tjälldin, B.
and Ström, G. : Radiat. Res. 61, 488 (1975)
59. Dertinger, H. and Hartig, G. : Int. J. Radiat. Biol. 21,
279 (1972)
60. Hayashi, M., Kobayashi, T. and Yoshii, G. : Biochim.
Biophys. Acta 366, 288 (1974)
61. Lillicrap, S. C. and Fielden, E. M. : Int. J. Radiat.
Biol. 21, 137 (1972)

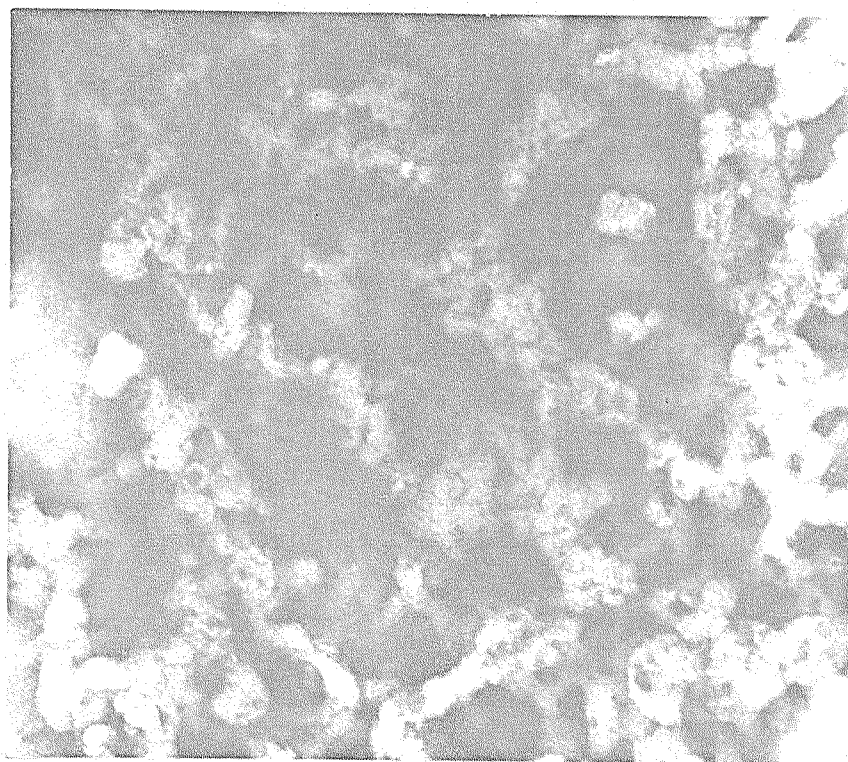
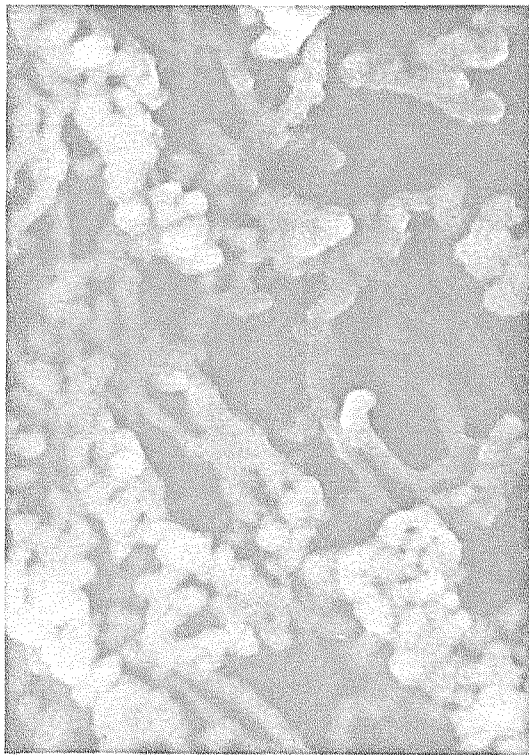
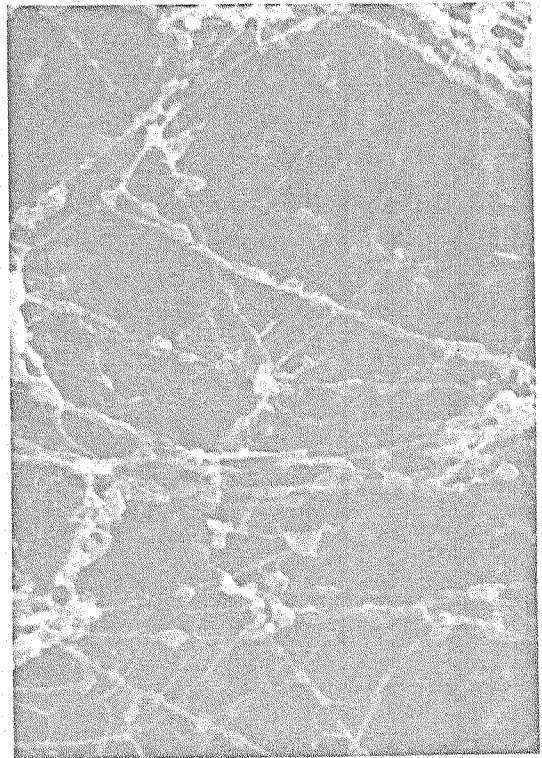


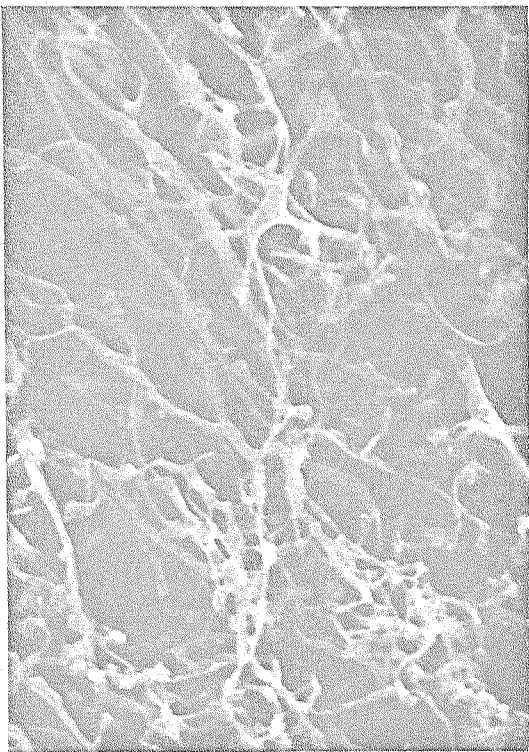
図1 仔午胸腺より抽出単離されたDNPのネガティブ染色透過電顕像。×50,000
溶質の濃度0.5mg/ml。



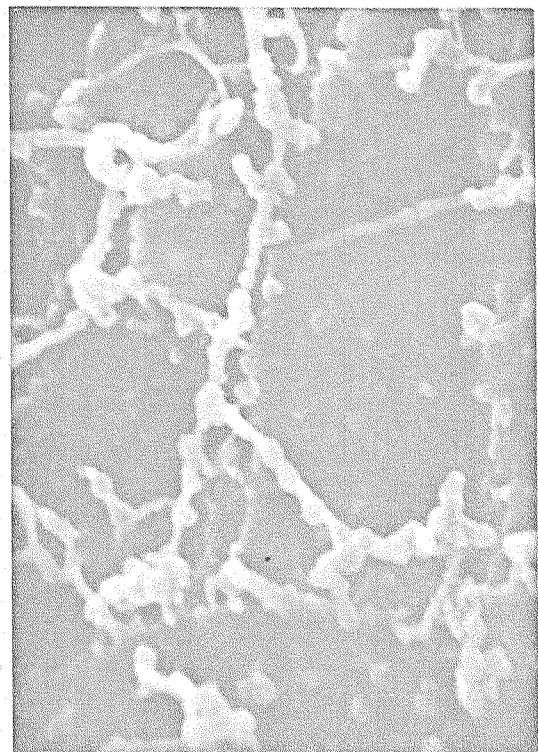
(a)



(b)



(c)



(d)

図2 フリーズ・エッチング・SEM法による走査電顕像。
 (a) DNP, (b) DNA, (c) ヒストン, (d) 再構成DNP。
 溶質の濃度 0.1 mg/ml 。 $\times 15,000$

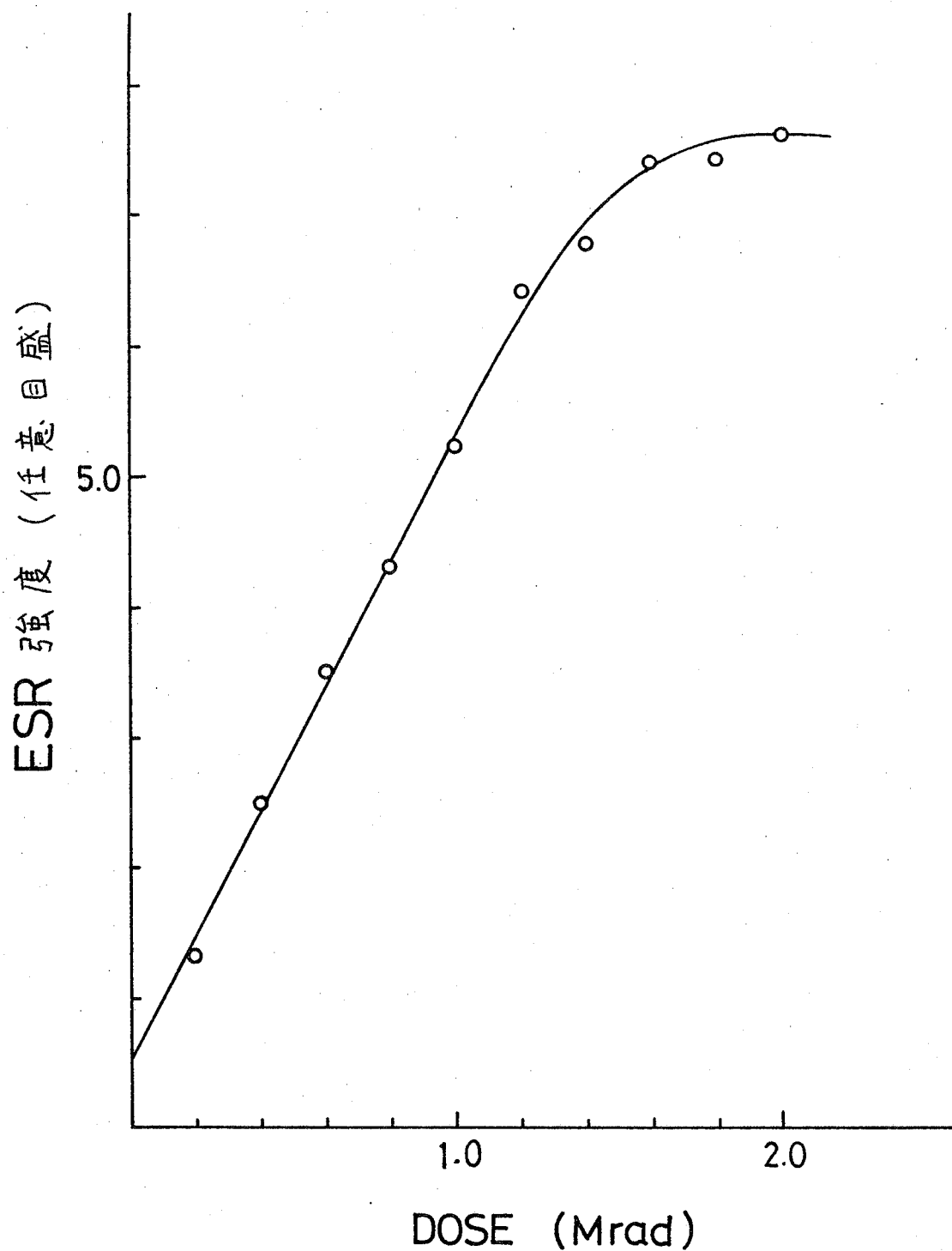


図3 DNAに照射されたγ線の線量とESRシグナルの強度との関係

E S R 強度 (任意目盛)

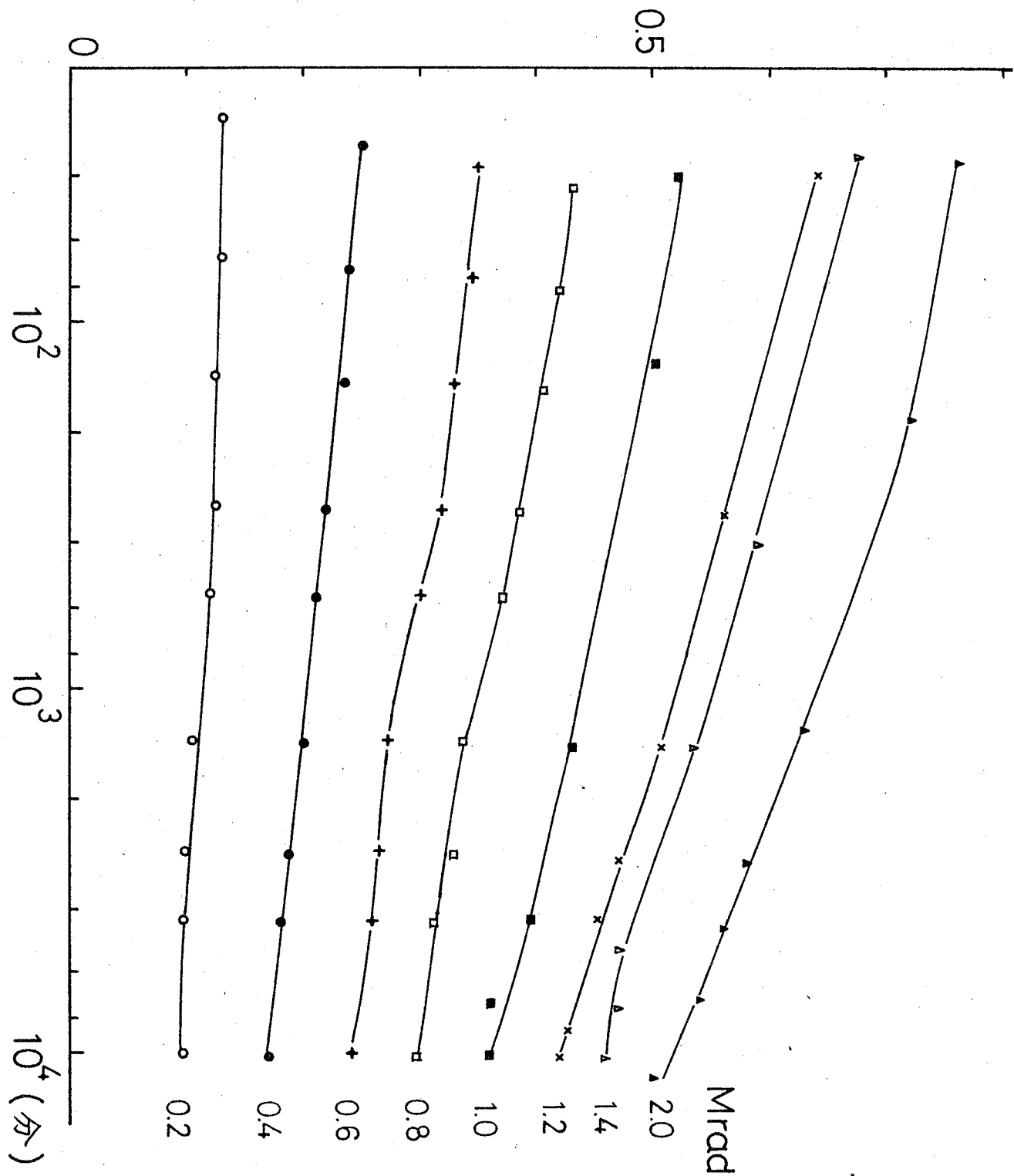


図4 ヲ線照射後のDNAのラジカル濃度の変化

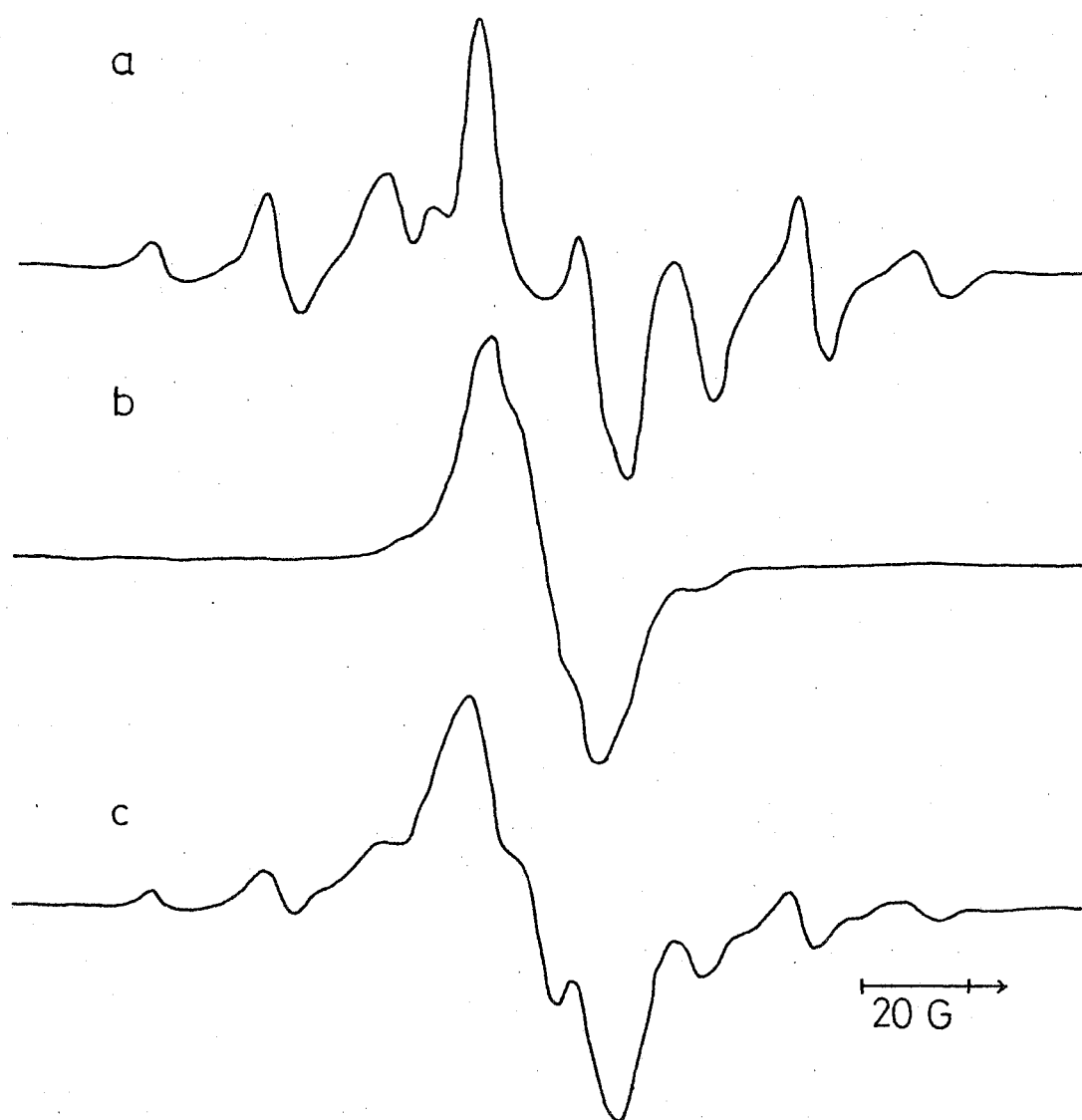


図 5 γ 線照射されたチミジル酸(a), シチジル酸(b), DNA(c)のESRスペクトル。
試料は乾燥, 無酸素状態で照射された。
照射, 測定共室温にておこなわれた。
照射線量 10^6 rad。

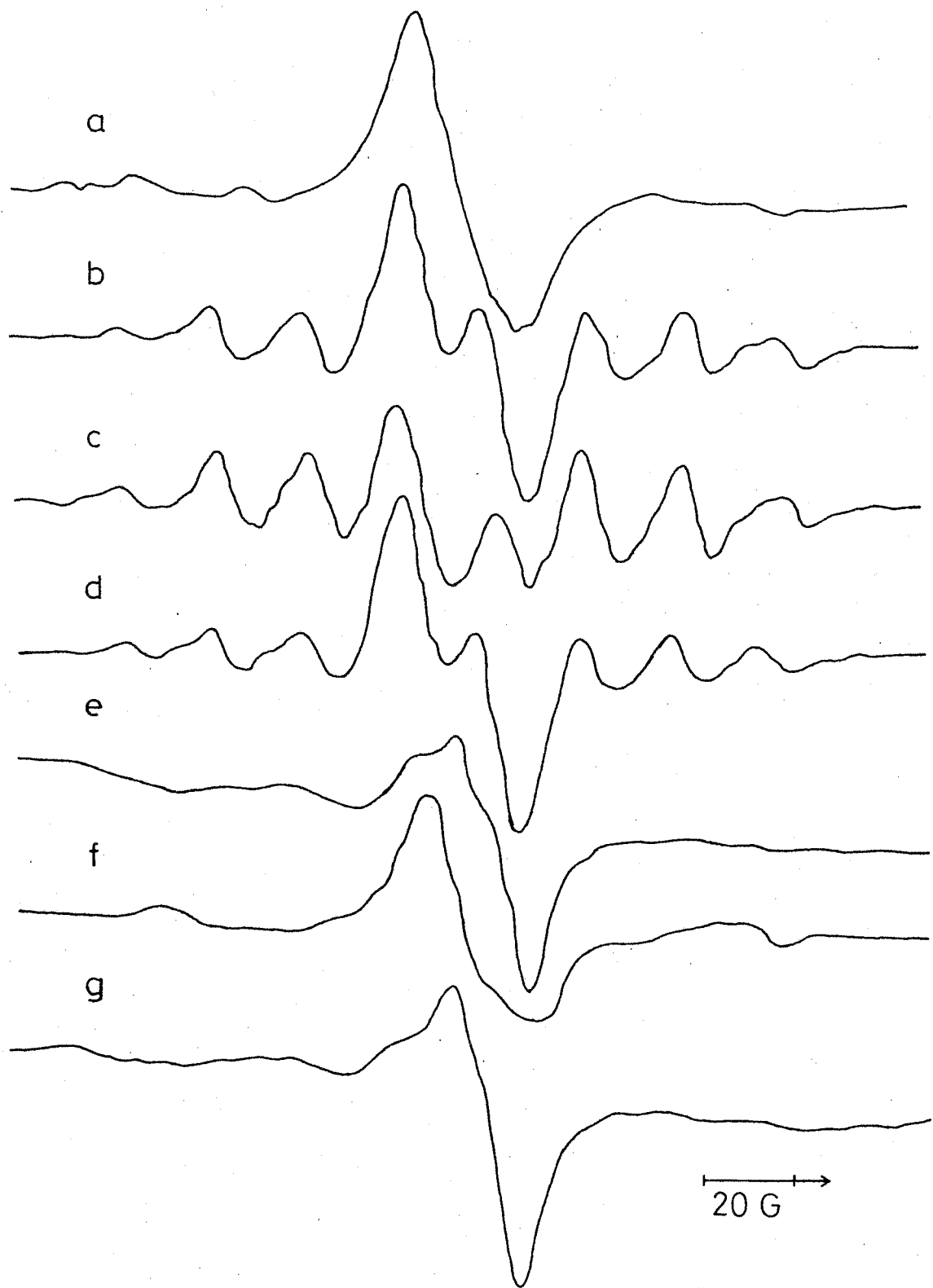


図6 中性ガラス状水溶液 (77°K) における ESR スペクトル。(a) チミンを含まない場合、77°K で測定。(b) チミンを含む溶液を 77°K で測定。(c) (b) を 170°K に昇温し、再度 77°K で測定。(d) チミンとプロフラビンを含む系、77°K で測定。(e) (d) を 183°K へ昇温し、77°K で測定。(f) 77°K でのプロフラビンのみを含む系の測定。(g) (f) を 183°K へ昇温し、77°K で測定。

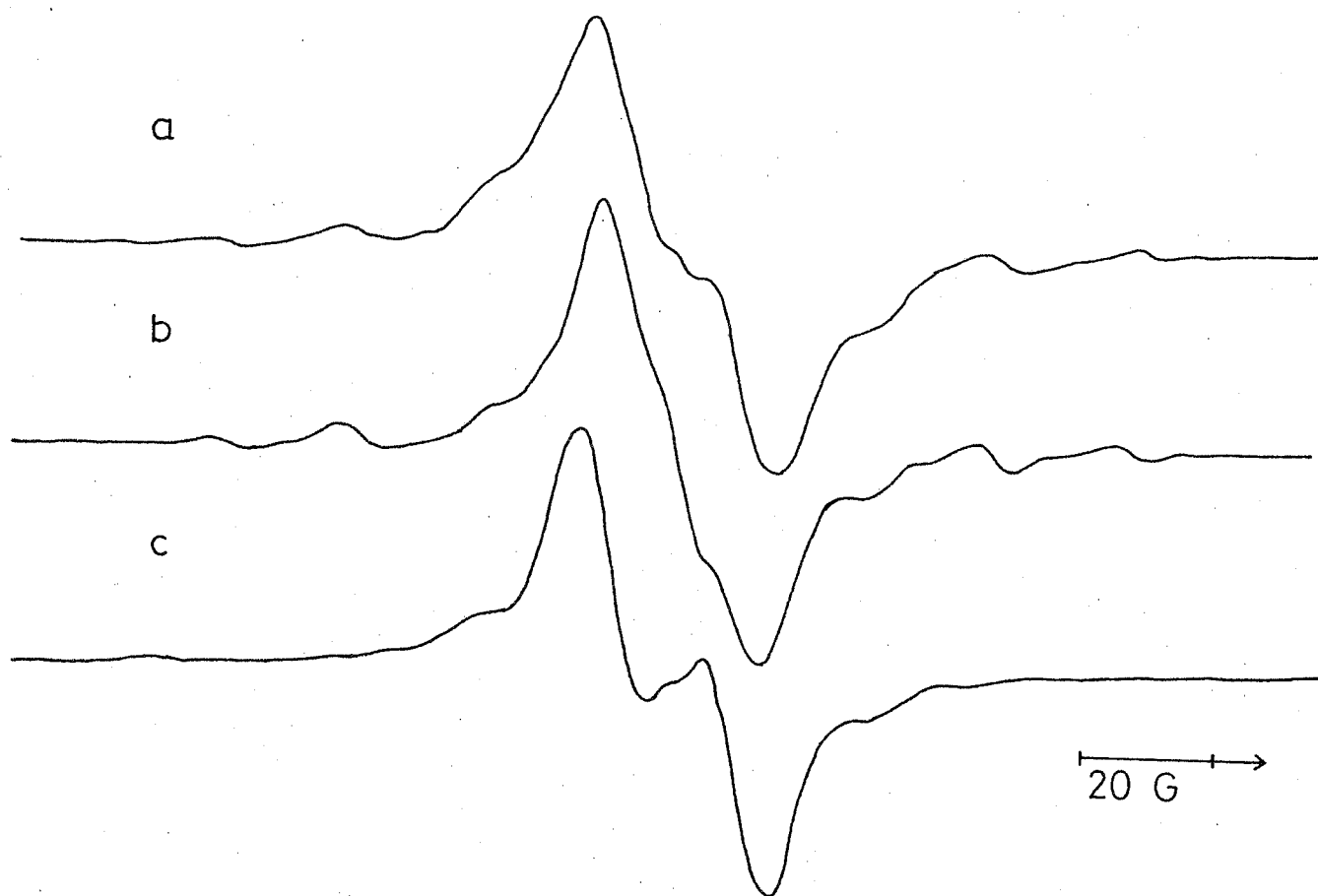


図7 γ 線照射された仔牛胸腺DNP(a), DNA(b), ヒストン(c)のESRスペクトル。乾燥無酸素下。照射, 測定共室温。照射線量 10^6 rad。

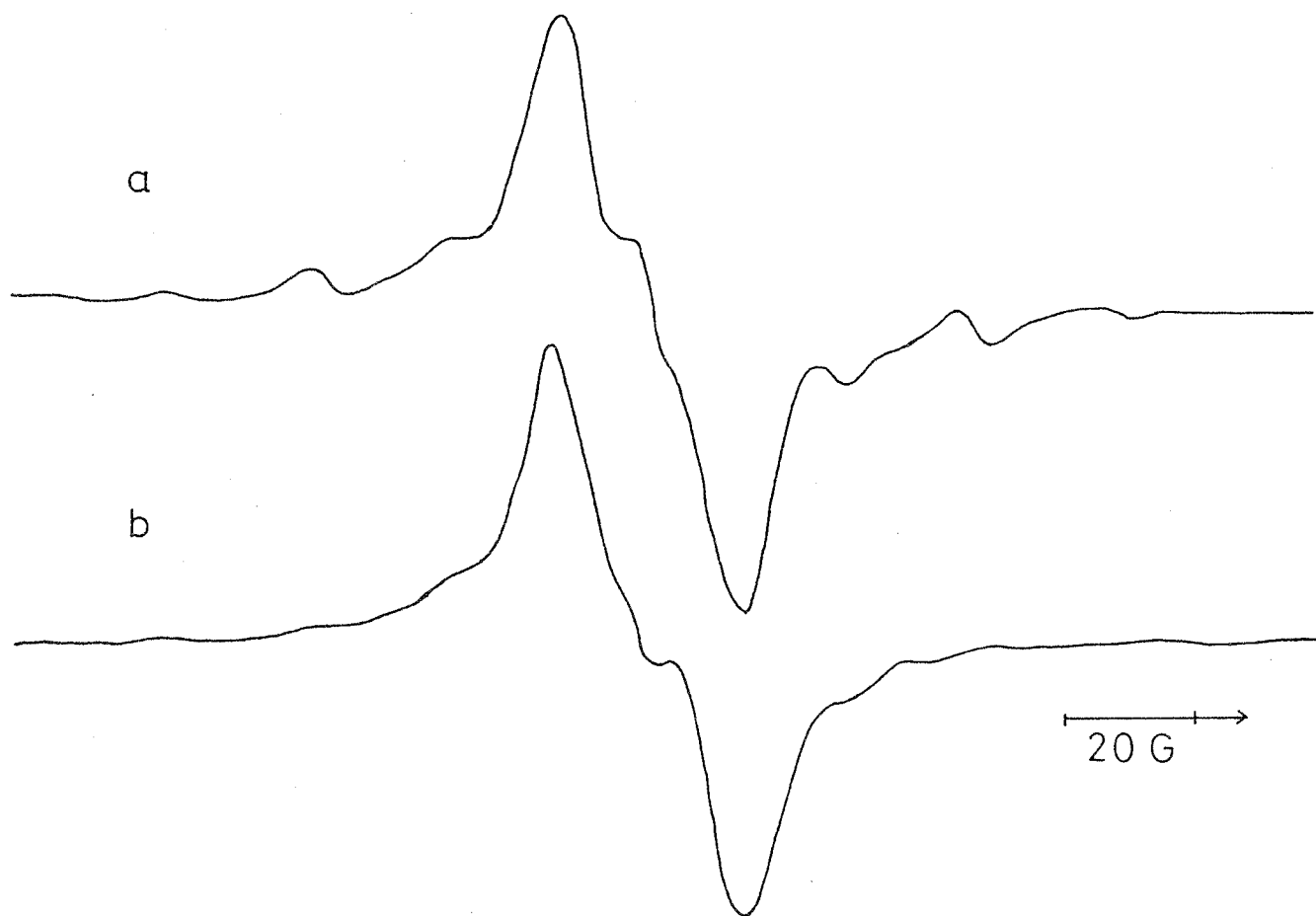


図 8 γ 線照射された再構成DNP ($\text{ヒズン}/\text{DNA} = 1$) (a),
 混合DNP ($\text{ヒズン}/\text{DNA} = 1$) (b) の ESR スペクトル。
 乾燥無酸素下。測定、照射室温。照射線量 10^6 rad 。

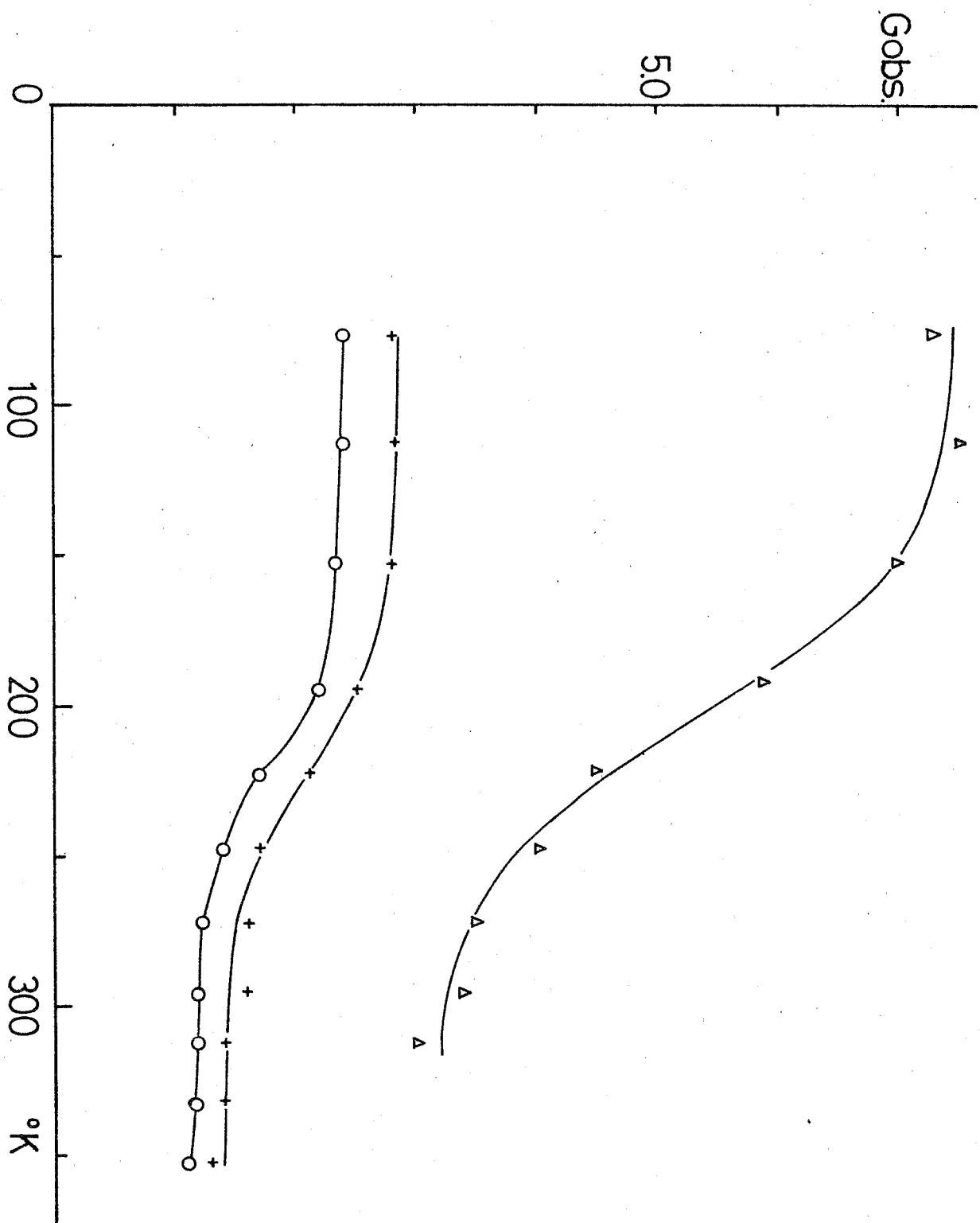


図 9 昇温過程における G 値の変化
 ○—○— DNA; +—+—+— DNP; △—△— エリトソ

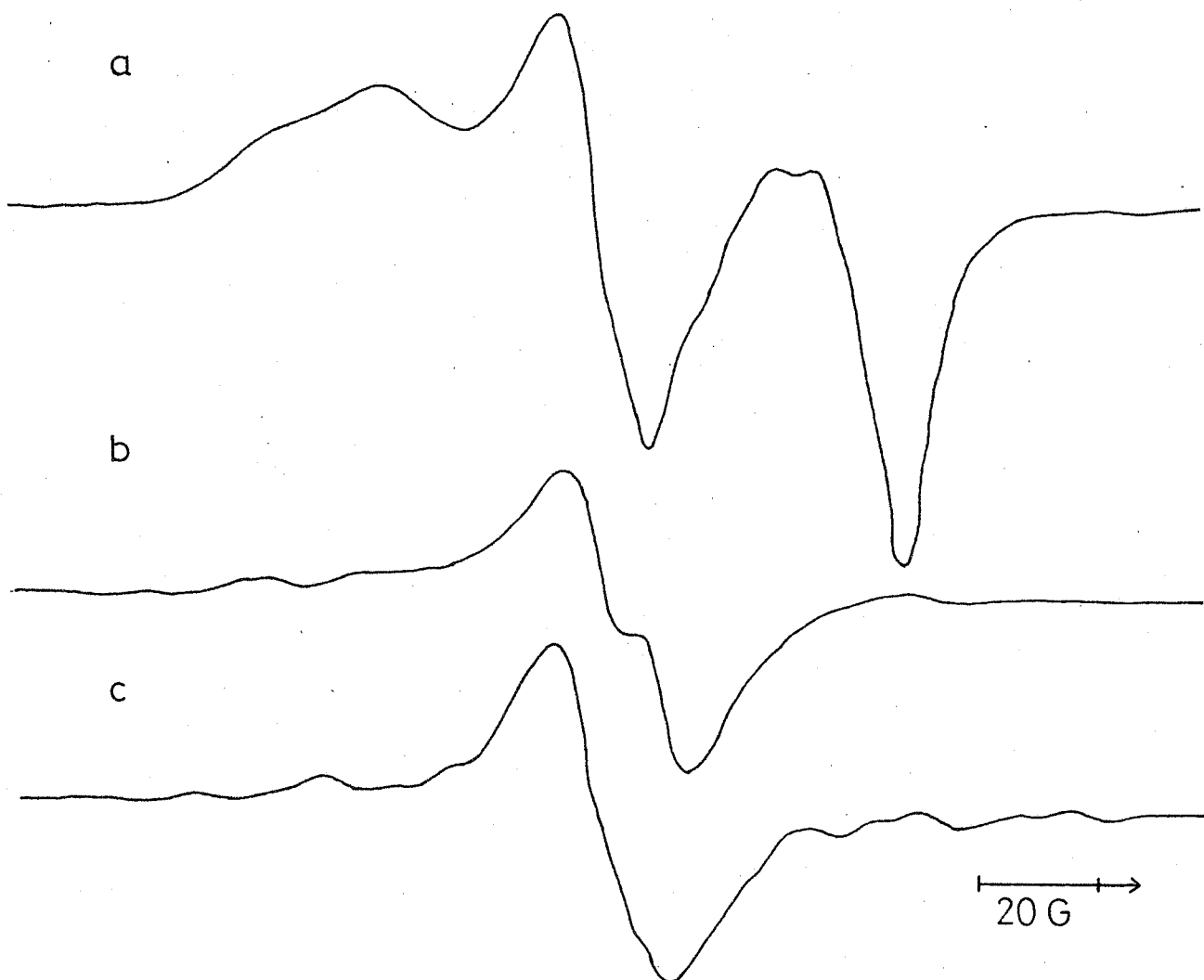


図10 DNP凍結水溶液のESRスペクトル。(a) 10^6 rad γ 線照射後77°Kで観察。ESR装置の利得7.9。(b) 143°Kに昇温した後、再び77°Kで測定。(c) さらに183°Kに昇温した後、77°Kで測定。(b),(c)ともESRの利得は32である。 N_2 ガス飽和条件下。溶質の濃度2%。

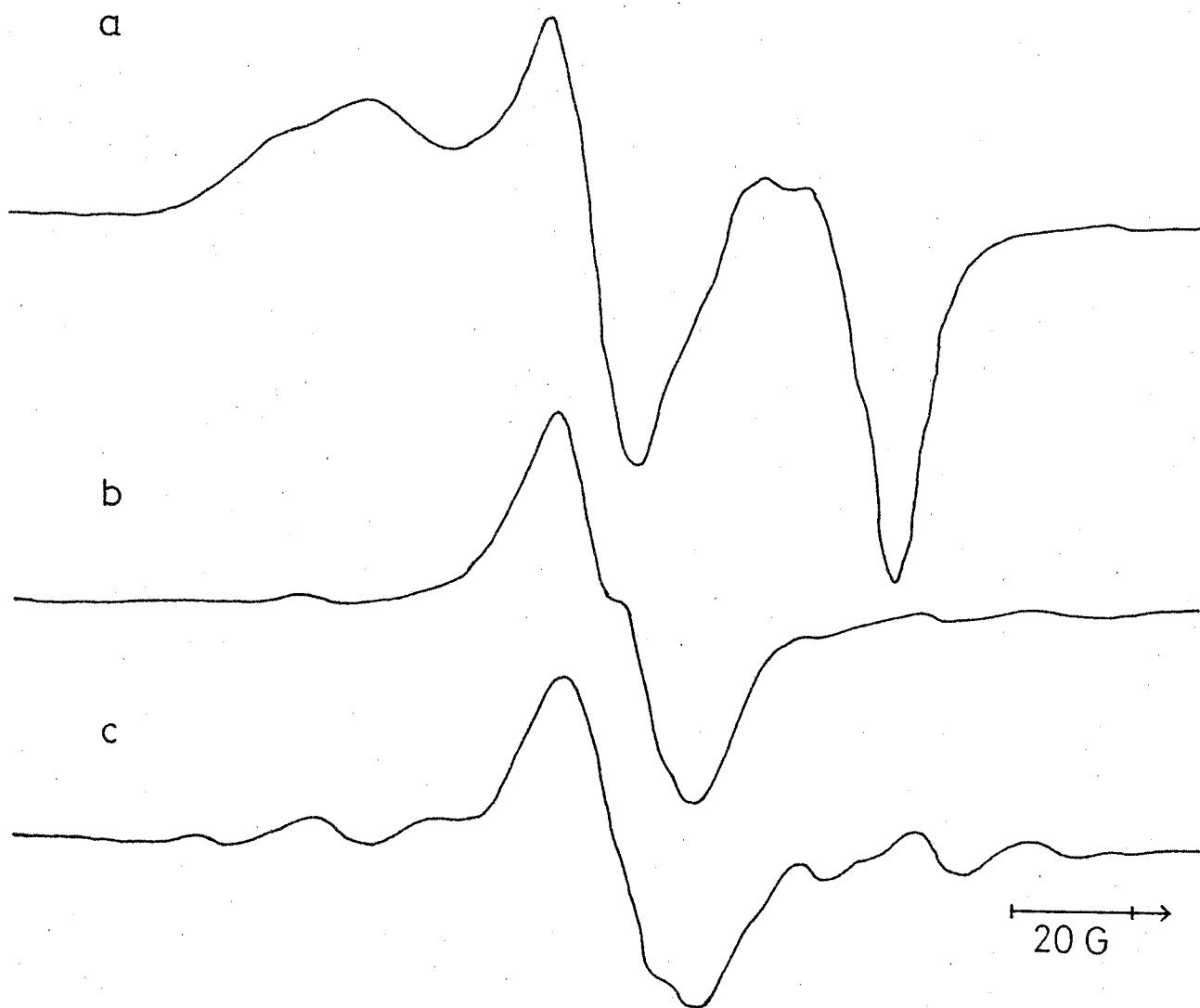


図11 DNA凍結水溶液のESRスペクトル。(a) 77°K , ESR利得20。(b) $77^{\circ}\text{K} \rightarrow 143^{\circ}\text{K} \rightarrow 77^{\circ}\text{K}$, ESR利得50。(c) $77^{\circ}\text{K} \rightarrow 143^{\circ}\text{K} \rightarrow 183^{\circ}\text{K} \rightarrow 77^{\circ}\text{K}$, ESR利得50。 N_2 ガス飽和条件, 照射線量 10^6 rad , 照射温度 77°K , 溶質の濃度2%。

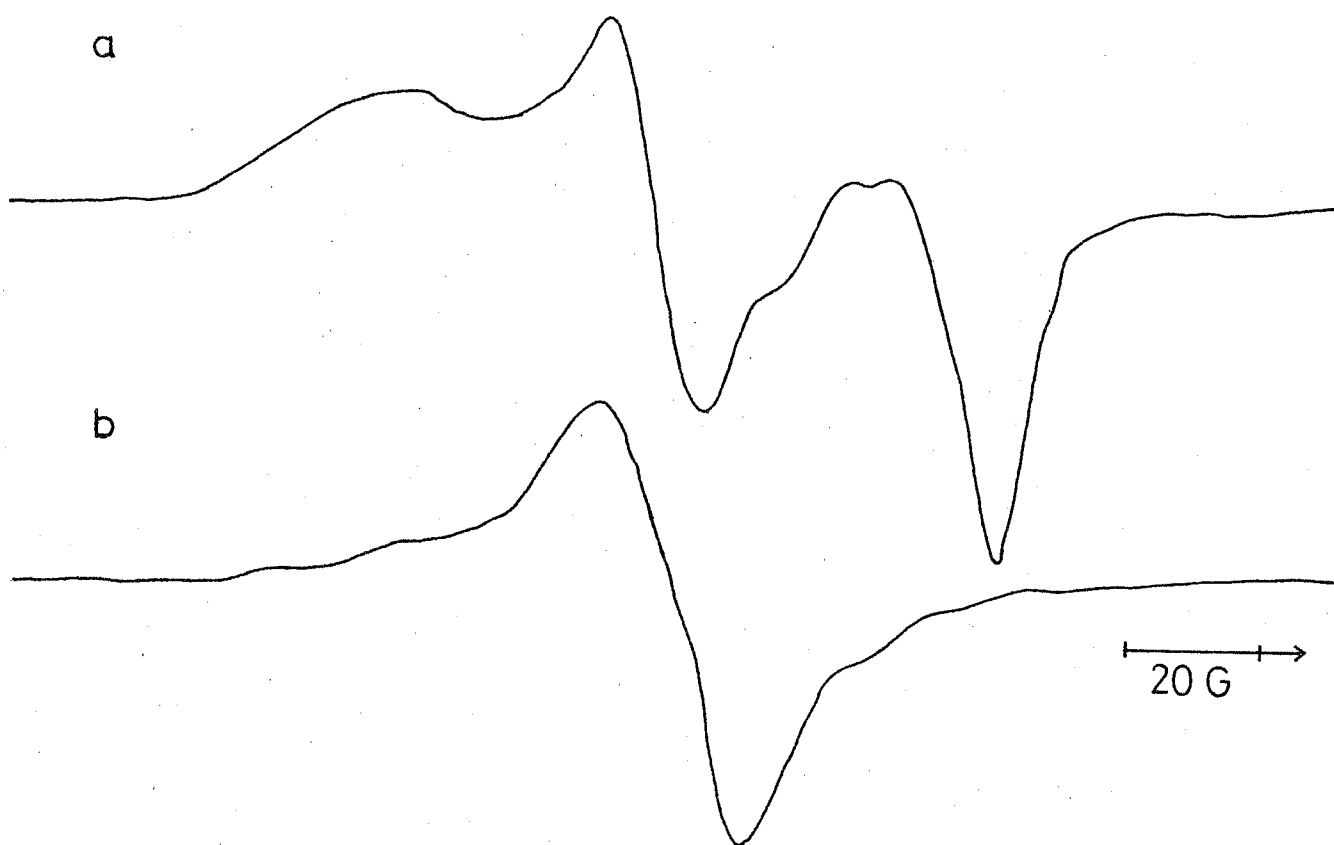


図12 ヒストン凍結水溶液のESRスペクトル。(a) 77°K, ESR利得20。(b) 77°K→153°K→77°K, ESR利得50。N₂ガス飽和条件, 照射線量10⁶rad, 照射温度77°K, 溶質の濃度2%。

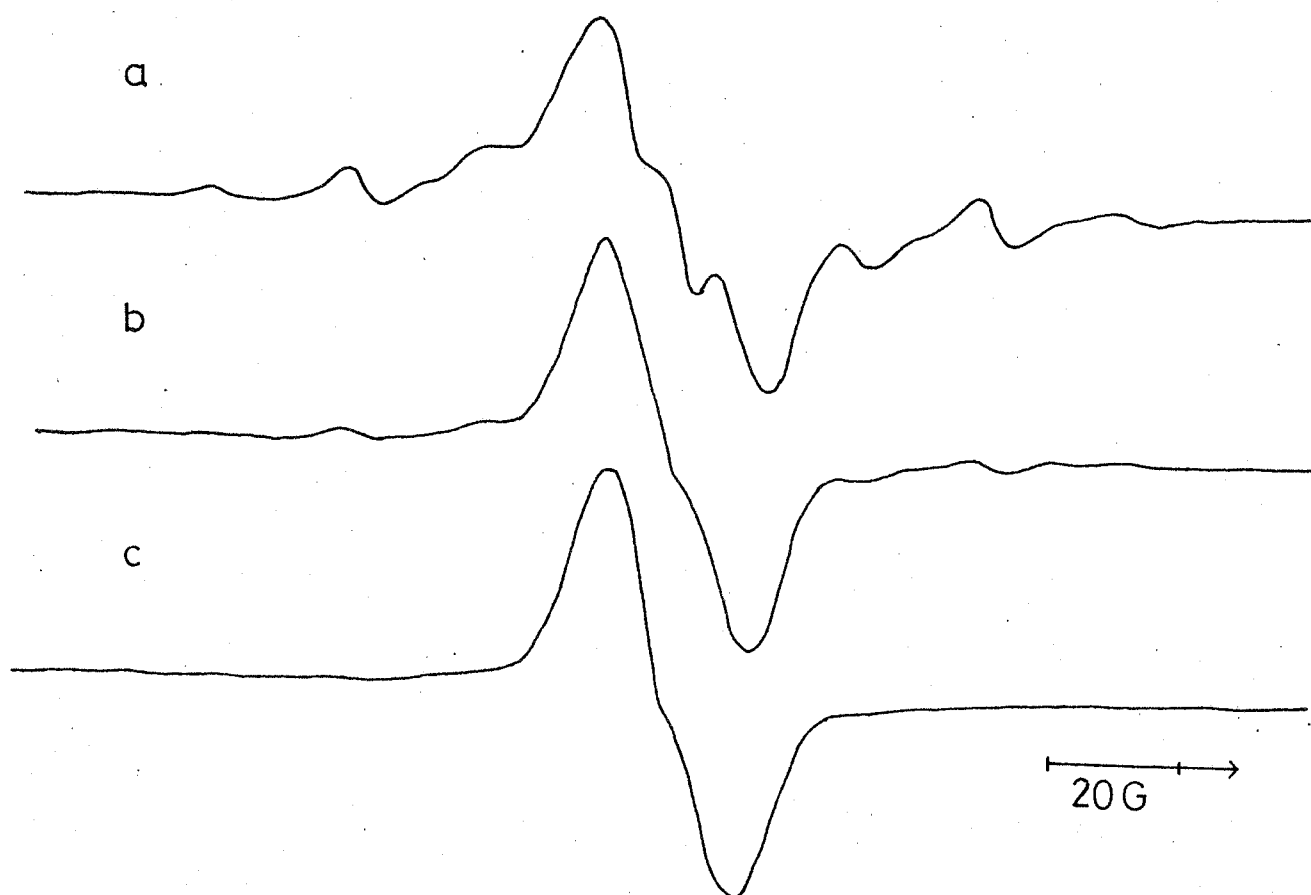


図 13 γ 線照射された (a) DNA, (b) DNA-7°ロフラビン複合体, $P/D=400/1$, (c) DNA-7°ロフラビン複合体, $P/D=40/1$, の ESR スペクトル。乾燥無酸素。照射線量 10^6 rad。照射・測定室温。

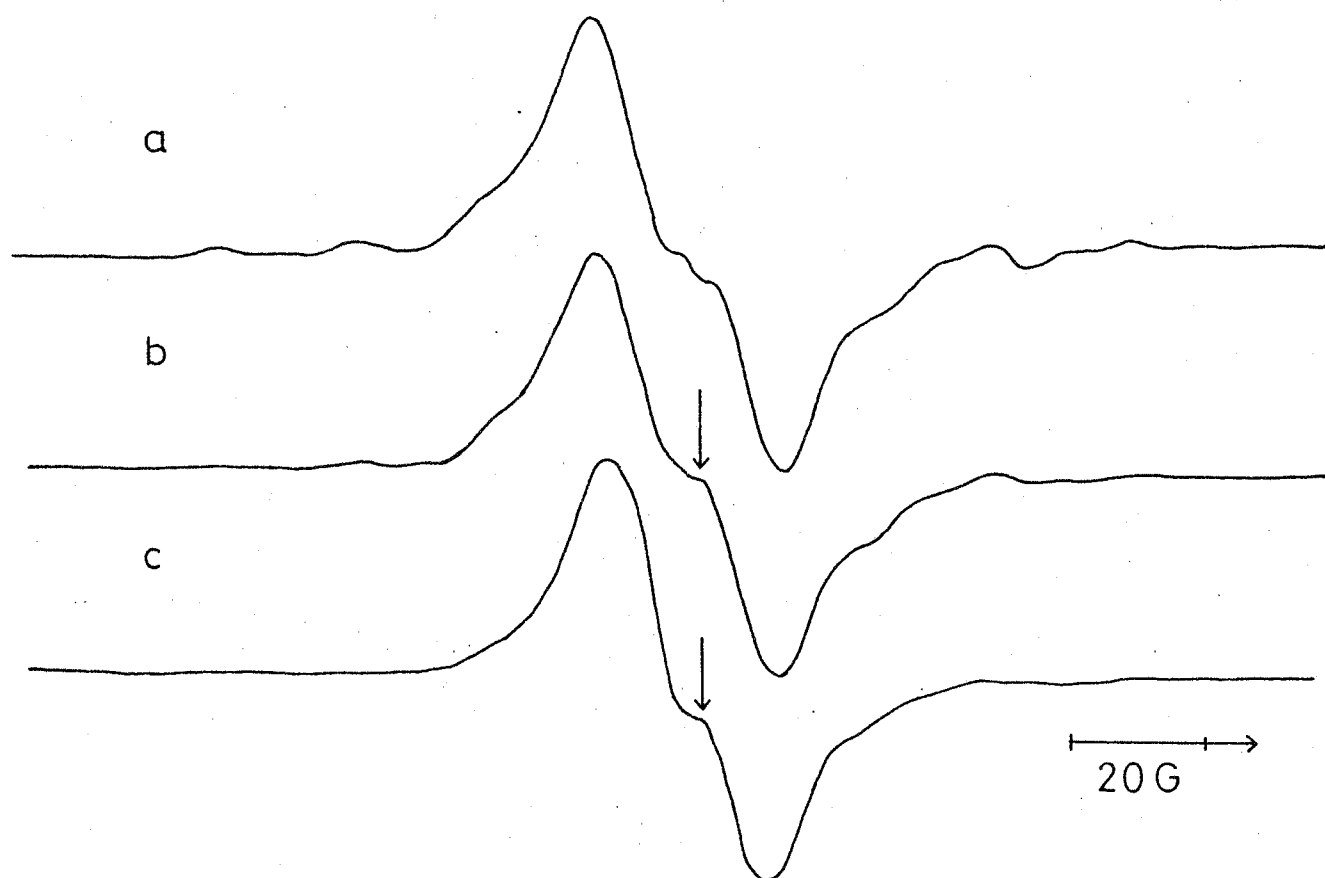


図14 γ 線照射された (a) DNP, (b) DNP-7°Dフラビン複合体, $P/D = 400/1$, (c) DNP-7°Dフラビン複合体 $P/D = 40/1$ の ESR スペクトル。乾燥無酸素。照射線量 10^6 rad。照射・測定室温。矢印は $g = 2.0012 \pm 0.0004$ における吸収を示す。

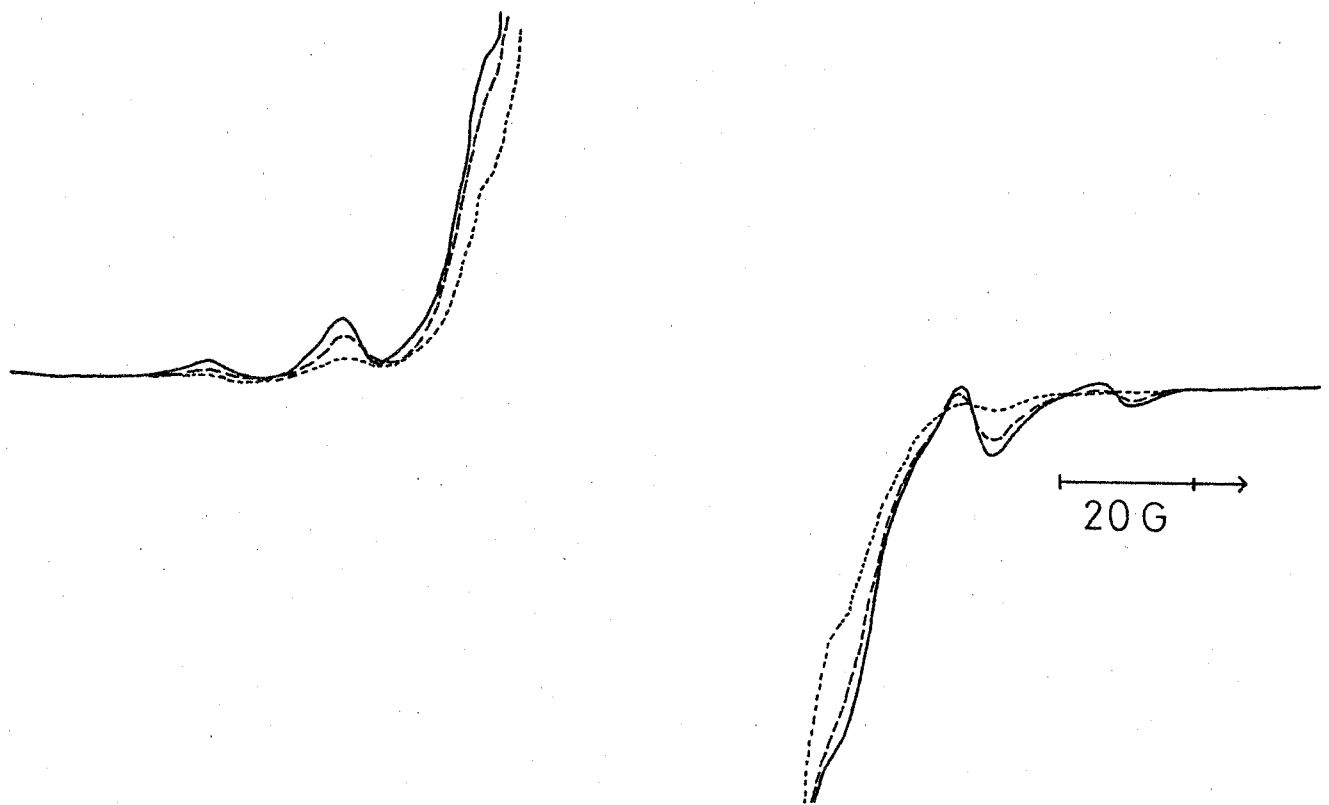


図 15 γ 線照射された DNP および DNP-フロフラビン
 複合体の ESR スペクトル。—— DNP, ----
 DNP-フロフラビン複合体, $P/D = 400/1$,
 - · - · - DNP-フロフラビン複合体 $P/D = 40/1$ 。
 ESR 装置の利得は図 14 の場合の 10 倍。

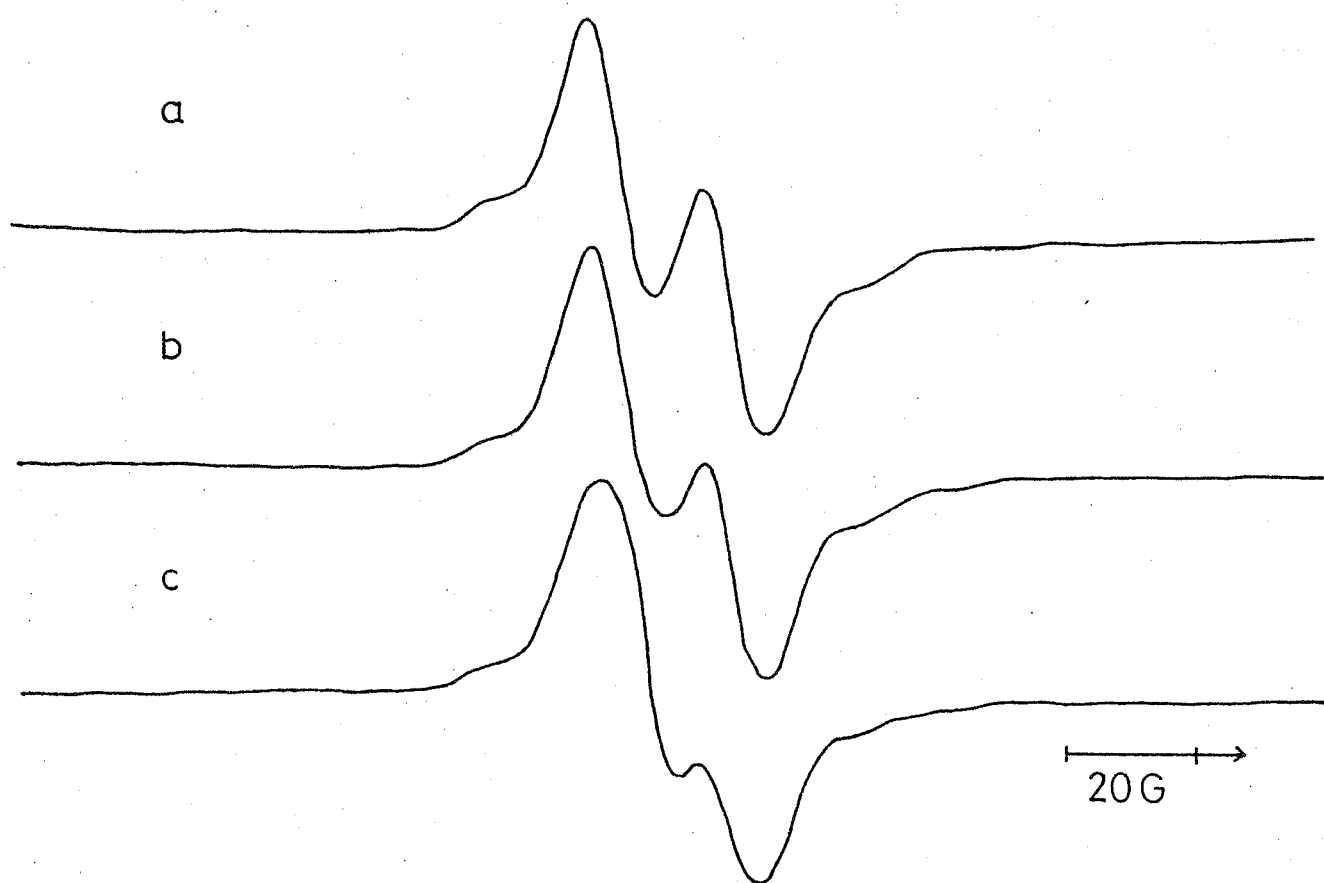


図 16 γ 線照射された (a) ヒストン, (b) ヒストン-プロフラビン複合体, $\text{NH}_2/\text{D} = 400/1$, (c), ヒストン-プロフラビン複合体, $\text{NH}_2/\text{D} = 40/1$, の ESR スペクトル。乾燥無酸素。照射線量 10^6 rad。照射・測定室温。

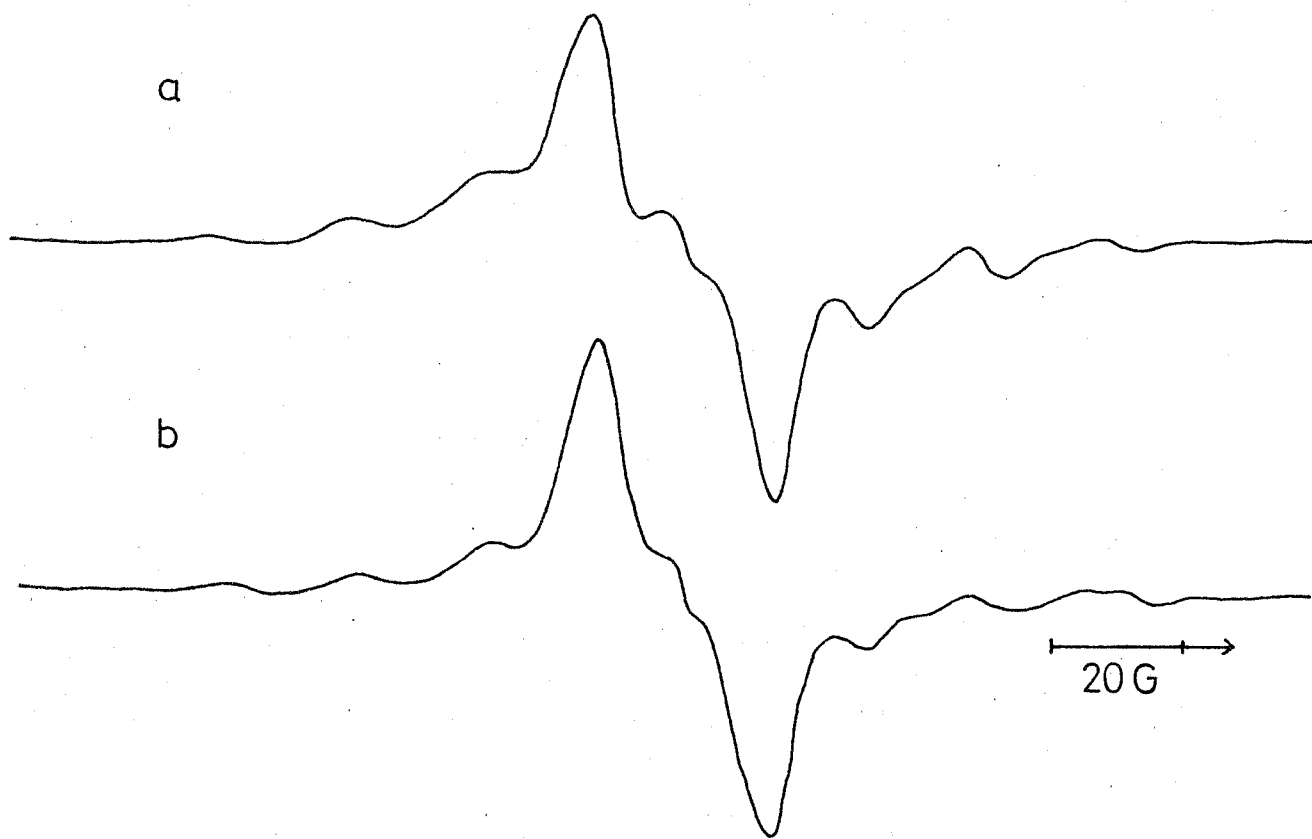


図17 γ 線照射された (a) DNA-ポリリジン複合体, (b) DNA-ポリリジン-プロフラビン複合体, $P/D = 40/1$, のESRスペクトル。乾燥無酸素。照射線量 10^6 rad。照射・測定室温。

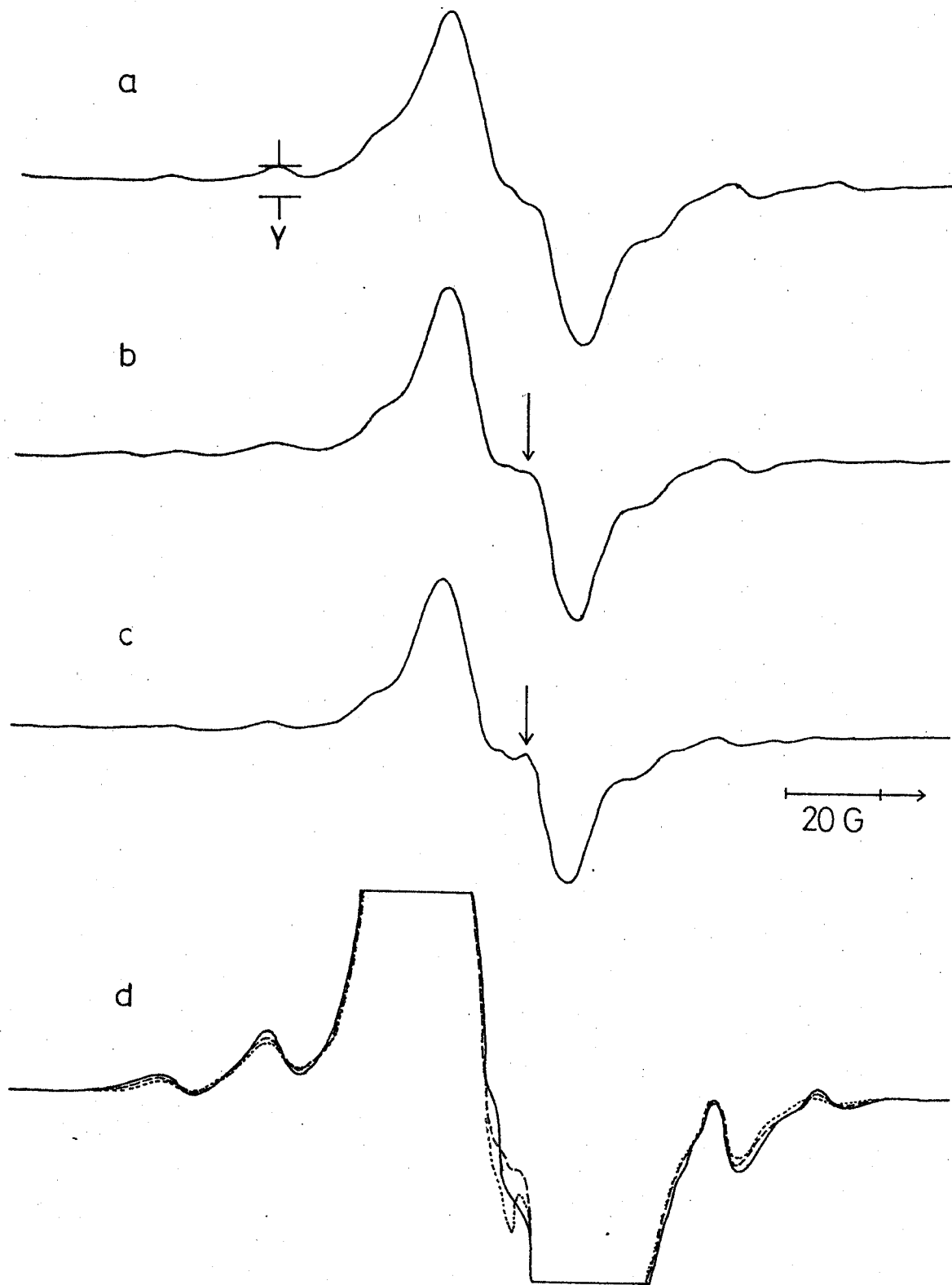


図 18 γ 線照射された (a) DNP, (b) DNP- Ca^{++} 複合体, (c) DNP- Ca^{++} 複合体 + 1,000 rad, の ESR スペクトル。矢印は新しいシグナルの出現を示す。(d) ESR 装置の利得を 10 倍にして測定。—— DNP, ---- DNP- Ca^{++} 複合体, DNP- Ca^{++} 複合体 + 1,000 rad。

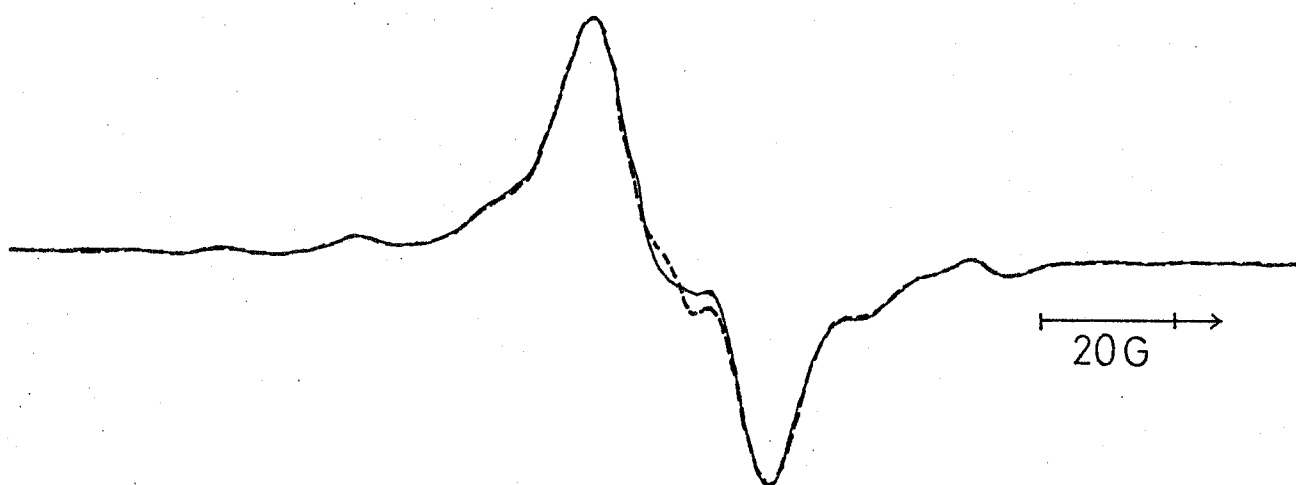


図 19 (a) ——— γ 線照射された DNP-Ca^{++} + 1,000 rad の ESR スペクトル, (b) ----- DNA スペクトル 76.5%, ヒストン スペクトル 23.5% の割合で合成されたスペクトル。

Samples ¹⁾	R(%) ²⁾	G _{DNP}
DNP	90.2	1.60
DNP-Ca ⁺⁺	80.5	1.65
DNP-Ca ⁺⁺ + 1,000 rad	76.5	1.70

表 Ca⁺⁺ の存在するときと存在しないときの
DNP のラジカル収率 (G 値)。1) Ca⁺⁺
の存在するときと存在しないときあ
るいは 1000 rad の X 線を照射され
た DNP と照射されない DNP はすべ
て凍結乾燥され、ラジカルを生成す
るため 10⁶ rad の γ 線照射された。
2) R は DNP 中の DNA ラジカル濃度の
DNA だけのときの DNA ラジカル濃度に対する
パーセントである。

本学位論文は北海道大学獣医学部吉井義一教授の御指導下におきまして行なわれた著者の研究結果をまとめたものであります。研究を進めるにあたり終始相変らぬ御指導と御理解を賜わりました吉井義一教授に厚く御礼を申し上げます。

また本研究に多大な興味と理解を持ち、研究を進めるにあたり熱心に御援助下さいました北海道大学獣医学部中西省助教授、試料調製にあたり生化学的な技術を教之下さいました秋田農業短期大学小林孝雄助教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本学位論文をまとめるにあたり、適切な御教示を戴き、また研究内容につきまして親切な御批判と御助言を賜わりました北海道大学応用電気研究所山崎勇夫教授、北海道大学理学部八木康一教授、北海道大学薬学部水野義久教授に謹しんで御礼の言葉を述べさせて戴きます。