

# 北海道工業開発試験所報告

REPORTS OF THE GOVERNMENT INDUSTRIAL  
DEVELOPMENT LABORATORY, HOKKAIDO

第40号

昭和61年3月

特別研究報告書

オゾンによる核酸の分解に関する研究

工業技術院

北海道工業開発試験所

特別研究報告書

オゾンによる核酸の分解に関する研究

研究期間

昭和57年度 ～ 昭和59年度

研究担当者

神力就子・石崎紘三・横田祐司・池畑 昭

# オゾンによる核酸の分解に関する研究

## 序

近年、分子生物学や遺伝子工学などの発展によって、遺伝子組換え技術を駆使した研究が盛んに行われるようになってきている。それに伴って、これまでに存在しなかった病原性微生物を作り出す危険性も増大しており、そのため、この遺伝子組換え実験には内容に応じて徹底したバイオハザード防御対策が求められ安全キャビネットやセイフティルームの性能の改良・向上の研究が必要とされている<sup>1)</sup>。著者らは殺菌・分解剤に、酸化破壊力の優れたオゾンを用いることを着想し、遺伝子組換え操作を念頭に遺伝子核酸のオゾンによる分解機構を解明することを本特別研究の課題とした。

オゾンによる殺菌の歴史をふりかえると、その殺菌作用は Ohlmüller によって1892年、はじめて報告されたと言われている。その後 Calmette および Roux が1899年、フランスのリール市の水道水の殺菌効果を確認して以来、1900年代初頭にはフランスのニース市において飲料水の殺菌にオゾンが用いられるようになり、以来、ヨーロッパにおいてはオゾン殺菌は長い歴史を有している<sup>2)</sup>。その間、殺菌またはウイルス不活性化の速度論のデータは実用性の観点から数多く報告されてきた。しかし殺菌または不活性化機構の研究はそれに比べてはるかに少い。それはオゾンに限らず他の殺菌剤についても同様であるが、その解明が分子生物学レベルの研究を必要としたからに他ならない。

殺菌剤、不活性化剤が第一義的に微生物細胞のどこに作用して死に至らしめているかを知ることは一般的には非常に難しい問題である<sup>3)</sup>。確かに、電子伝達の酵素系に作用するシアン、あるいは細菌細胞壁の合成を阻害するペニシリンのように作用点が特定されている殺菌剤あるいは増殖阻害剤もあるが、多くの場合その作用は複雑であり、第一義的な作用は特定されていない。とりわけ過酸化水素、オゾン、塩素、過マンガン酸カリウムのような酸化作用をもった殺菌剤の作用点については良く分っていない。著者らは微生物細胞あるいはウイルス中の DNA または RNA と、オゾンの反応機構を明らかにすることが殺菌機構の解明のために特に重要と考え研究を開始した。言うまでもなく核酸は生命現象の発現のために最も基本的な物質であり、その破壊は細胞の死あるいは変異を意味する。逆に完全な殺菌または不活性化は核酸の修復不可能なまでの破壊によって成立するとも言える。たとえばウイルスにおいてはタンパク質コートが破壊されても内部の RNA または DNA が無傷ならば感染性を有すること<sup>4)</sup>、また溶菌によって細胞から流出した核酸が生細胞に再びとりこまれ、突然変異などの原因となり得るからである<sup>5)</sup>。

以上述べた観点から以下のとおりオゾンによる核酸の分解に関して検討を行った。第1章から第3章においては RNA 構成成分や転移 RNA などのオゾン分解反応の基礎的解明を行い、酵母フェニルアラニン転移 RNA やタバコモザイクウイルス RNA のオゾンによる活性の喪失の機序の解明を試みた。第4章から第6章においては DNA 構成

成分のオゾン反応性を速度論的に検討し、その反応様式を明らかにするとともに、DNA二重らせん構造の変性を考察した。さらに細胞内に通常存在するDNAの形態であるスーパーコイル構造のDNAへのオゾン反応性を検討した。以上の基礎的な解明を基に第7章から第9章においては殺菌、不活性化およびその機序の検討を行った。ここでは大腸菌、タバコモザイクウイルス、細菌胞子をとりあげた。

なお本研究は北海道大学薬学部の協力を得て遂行された。著者らは昭和40年度より「オゾンによる泥炭水およびマンガン含有排水の処理」の特別研究を行い、以来排水のオゾン処理については10数年の実績を有している。その知見と技術を本特別研究にいかしたわけであるが、核酸、微生物の処理については新に踏みこんだ分野であった。したがって技術の習得をはじめとしていくつもの困難があったが、同学部の協力によって研究を前進させることができた。ここに深く感謝する次第である。

#### 参 考 文 献

- 1) 科学技術会議 “諮問第8号「遺伝子組換え研究の推進方策の基本について」に対する答申”, 1979, pp. 11—12.
- 2) たとえば, R. N. Kinman, “Ozone in Water and Wastewater Treatment”, ed. by F. L. Evans, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1972, p. 123; 衛生常設調査委員会, 水道協会誌, 53, 42 (1984).
- 3) 柳田友道, “微生物科学” 第2巻, 学会出版センター, 東京, 1981, p. 437.
- 4) H. Fraenkel-Conrat, P. C. Kimball, 三浦謹一郎他訳, “ウイルス学”, 東京化学同人, 東京, 1985, p. 73.
- 5) D. B. M. Scott, E. C. Leshner, *J. Bacteriol.*, 85, 567 (1963).

# オゾンによる核酸の分解に関する研究

## 目 次

序

第1章	リボ核酸構成成分のオゾン分解	7
第2章	酵母 RNA, 酵母フェニルアラニン tRNA および タバコモザイクウイルス RNA のオゾン分解	13
第3章	オゾンによるマウスプロリン tRNA およびマウスイソロイシン tRNA の分解様式	20
第4章	デオキシリボヌクレオチドのオゾン反応速度とその反応様式	31
第5章	仔ウシ胸腺 DNA 二重らせん構造のオゾン処理による不安定化	38
第6章	オゾンによるプラスミド DNA の分解様式	43
第7章	オゾンによる大腸菌の殺菌と菌体内プラスミドに及ぼすオゾンの影響	57
第8章	オゾンによるタバコモザイクウイルスの不活性化機構	63
第9章	ガス状オゾンによる <i>Bacillus</i> 属胞子の殺菌	69
	まとめ	76
	英文要旨	78

# 第1章

## リボ核酸構成成分のオゾン分解<sup>1, 2)</sup>

### 1 緒 言

オゾンの利用に関してはすでに序で述べたようにヨーロッパにおいて上水の殺菌剤として長い歴史を持っている。一方アメリカや日本では塩素処理を行っているが、最近河川水などを上水源とした場合、トリハロメタンなどが生成し、その発癌性が問題となるためオゾンの使用が見直される機運にある。これらを背景にオゾンによる殺菌の速度論的な研究は実用性の観点から多数行われてきた<sup>3)</sup>。また大気汚染源としてオゾンの動植物組織や細胞へ与える影響に関する研究も多い<sup>4)</sup>。さらにその突然変異原性に関する研究も多数に及んでいる<sup>4, 5)</sup>。これらの中には核酸あるいは核酸と関連づけた研究が報告されているが、いずれも核酸の変化をマクロ的に捉らえたものであり、したがって著者らは核酸とオゾンの反応性をよりミクロな分子レベルから解明していくことに研究の目標をおいた。核酸構成成分のオゾン反応性を検討したものとしては古くは Christensen ら<sup>6)</sup>が UV 吸収の減少を報告し、Prat ら<sup>7)</sup>がオゾンと X 線照射による核酸塩基の分解を比較検討した。その後、Scott<sup>8)</sup>、大村ら<sup>9)</sup>がオゾンによる核酸物質の UV 吸収の変化、糖量の変化などを追跡しヌクレオシド、ヌクレオチドのオゾンによる分解に関する考察を一步進めたが、しかしこれらの研究は予試験的な域をまぬがれず、また系統的なものとは言えなかった。著者らは本章において RNA を構成する塩基、リボヌクレオシドおよびリボヌクレオチドのオゾン反応性を詳細に検討することとした。

### 2 実 験

#### 2.1 試 薬

核酸塩基、リボヌクレオシド、リボヌクレオシド 5'-リン酸、D-リボースおよび D-リボース 5'-リン酸 (R5P) は Sigma Chemical 社製を使用した。また他の試薬は市販特級品を使用した。

#### 2.2 オゾン処理

実験に使用したオゾン処理システムは図 1 に示

すとおりである。反応容器は 200 ml 用円筒型ガラス製ガス吸収器で、溶液中へのガスの分散はガラス製ボールフィルターを通して行われた。オゾン濃度は紫外線吸収方式オゾン濃度計で常時監視し、濃度を一定に保つように発生器を調整した。オゾン処理は反応物質濃度 1 mM の溶液 200 ml にオゾン濃度  $2 \pm 0.1$  mg/l のオゾン-酸素混合気流を流速 330 ml/min で注入する条件で行った。溶液は 0.05 M  $H_3BO_3$ -NaOH 緩衝溶液系で初期 pH を 7.8 に調整したが、反応の進行にともない pH が多少低下し、反応終了時には 7.5~7.6 になった。なお反応は室温 (ca. 22°C) で行った。分析用の溶液は適時反応容器底部のコックを通して採取し、残留オゾンを除くために窒素ガスで約 2 分間ばっ気した後、分析に供した。

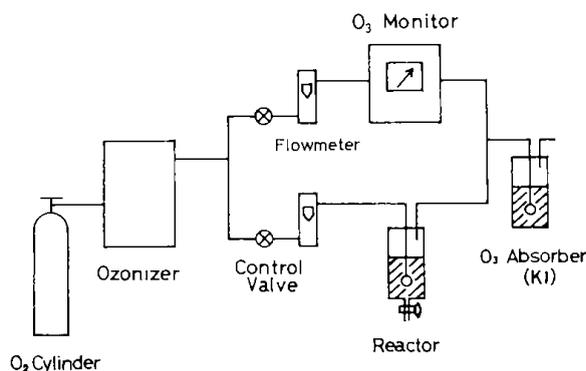


Fig. 1 Experimental ozonization system

#### 2.3 分析方法

塩基とリボヌクレオシドおよびリボヌクレオチドは高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法によって定量した。使用した装置は日立 635 型 (UV 吸収検出器) を用いた。塩基とリボヌクレオシドの分析では陽イオン交換カラム (日立 #2618,  $\phi$  4 mm  $\times$  500 mm) を用い、溶離液を 0.2 M  $CH_3COONa$ 、流速を 0.8 ml/min とした。リボヌクレオチドでは陰イオン交換カラム (日立 #2632,  $\phi$  4 mm  $\times$  500 mm) を用い、溶離液を 0.1 M  $NaCl$ -0.005 N  $HCl$ 、流速を 1 ml/min とした。いずれもカラム温度は 50°C とし、264 nm で検出した。

D-リボース、R5P およびリボヌクレオシド、リ

(8)

ボヌクレオチドの糖部分の定量はオルシノール-硫酸法による吸光分析法<sup>10)</sup>で行った。この方法では試料を強酸と煮沸処理するため、プリン塩基と結合したりボースの N-グリコシド結合が切断され、プリンヌクレオシドやプリンヌクレオチド中のリボース部分が定量される。ピリミジンヌクレオシドおよびピリミジンヌクレオチドではその N-グリコシド結合が酸加水分解に安定なため、この方法ではリボース部分は定量できない。しかし結果で述べるようにオゾンによって塩基部分が部分的にでも分解したピリミジンヌクレオシドまたはピリミジンヌクレオチドは酸熱処理で N-グリコシド結合が切断されるようになり、リボース部分が反応した。したがってこの方法で、オゾンによりピリミジン塩基部分が分解され、N-グリコシド結合が不安定になったものが検出できる。また本法では D-リボースと R5P の発色の強さが異なり、660 nm における分子吸光係数は R5P の方が 1.36 倍高かったため、オゾン処理したりボヌクレオチド中のリボースの定量には D-リボース標準液による検量線を用い、一方リボヌクレオチド中のリボースの定量には R5P 標準液による検量線を用いた。これはリボヌクレオチドの場合、後述するようにオゾン処理によるリン酸基の脱離速度は非常に小さく、オルシノール-硫酸試薬と反応する化学種はほとんど R5P とみなされたためである。リボースが遊離しているか他に結合しているかにかかわらず、本法で定量されたりボース濃度を  $R_{(orcinol)}$  で表わす。

遊離のリン酸イオンはモリブデン酸アンモニウム-塩化第一すず法による吸光分析法<sup>11)</sup>により定量した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 核酸塩基のオゾン分解

5つの塩基、すなわちウラシル(U)、シトシン(C)、チミン(T)、アデニン(A)およびグアニン(G)のそれぞれの水溶液のオゾン処理による濃度経時変化を図2に示した。また D-リボースの分解も点線で示してある。初濃度はそれぞれ 1 mM であるが、

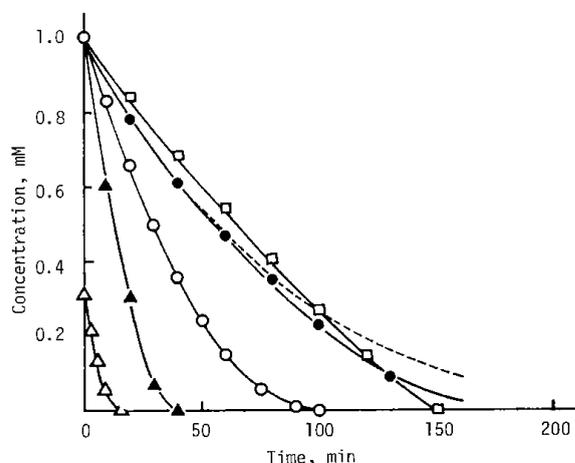


Fig. 2 Degradation of nucleobases and D-ribose

—□—, adenine; —●—, cytosine; —○—, uracil; —▲—, thymine; —△—, guanine; -----, D-ribose

Table 1 Retention Times (min) of Nucleobases, Ribonucleosides, Ribonucleotides and Their Ozonization Products on HPLC<sup>a)</sup>

Nucleobases <sup>b)</sup>	Products of each nucleobase <sup>b)</sup>	Nucleosides <sup>b)</sup>	Products of each nucleoside <sup>b)</sup>	Nucleotides <sup>c)</sup>	Products of each nucleotide <sup>c)</sup>
U 4.0		Urd { 2.2 <sup>d)</sup> 2.6		UMP 5.8	
C 5.6	1.6, 2.9	Cyd 3.6		CMP 1.5	
G 10.0	1.5, 2.0, 2.6	Guo 6.2	1.5, 2.0	GMP 11.2	
A 8.8	1.4	Ado 5.5	1.4, 2.1, 3.4, 8.8	AMP 2.1	1.4 <sup>e)</sup>
T 6.2	1.4				

a) Retention times ( $R_t$ ) of products appearing at the half-life time of degradation of the parent material are shown. Taking the starting height of the parent material as 100, the  $R_t$  of peaks exceeding 2% are given. Peaks below 2% were neglected.

b) Applied to a cation-exchange column.

c) Applied to an anion-exchange column.

d) Uridine-borate complex formed in borate buffer.

e) Contained adenine as judged by using a cation-exchange column.

グアニンは中性溶液への溶解度が低く、初濃度 0.32 mM で実験した。塩基の分解の速さの順序は  $G \approx T > U > C > A$  であった。

HPLC 分析によっていくつかの反応生成物のピークが検出された。しかしこれらのほとんどは 260 nm 付近の吸光度を失い小さいピークとして出現し、親ピークとはっきり区別された。これら若干の UV 吸収を示す分解生成物の保持時間 (Rt) を表 1 に示した。これらはそれぞれの親化合物が初濃度の約 50% に減少した時にクロマトグラムに現れていたものの中から、ピーク高さが親化合物の初期ピーク高さの 2% を越えていたものである。反応生成物の同定は行っていないが、塩基が 260 nm 付近の吸光度の小さい化合物に分解されてゆくことや、Kolonko ら<sup>12)</sup> による核酸塩基類縁物質のオゾン分解機構から、シトシン、ウラシルおよびチミンのピリミジン核では 5, 6 位の二重結合が、アデニンおよびグアニンのプリン核では 4, 5 位の二重結合がオゾンによって攻撃を受け、環が開裂すると考えられる。

### 3.2 リボヌクレオシドのオゾン分解

次に 4 つのリボヌクレオシド、すなわちウリジン (Urd)、シチジン (Cyd)、アデノシン (Ado) およびグアノシン (Guo) の分解経時変化を図 3 に示す。分解の速さの順序は相当する塩基のそれと同じであったが、アデノシンの分解はアデニンより遅くなった。塩基の場合と同様に HPLC によって検出

された反応生成物のピークの Rt 値を表 1 に示す。シチジンとウリジンでは親化合物の初期ピーク高さの 2% を越えるような生成物ピークは検出されなかった。グアノシンでは 2 つのピークが検出されたが、これらと同じ Rt 値をもつ生成物ピークがグアニンからも検出されているので、グアニン部分の分解による生成物と考えられる。アデノシンの場合は 4 つの生成物ピークが検出された。このうち Rt 8.8 分のピークはアデニンとみなされる。すなわちアデノシンでは他の 3 つのヌクレオシドとは異なり、N-グリコシド結合が切断されてアデニンが遊離してくることが分った。また Rt 1.4 分のピークはアデニンの分解生成物中にもみられることから、遊離したアデニンが分解してできた生成物と考えられる。

リボヌクレオシドについてはリボース部分の分析も行った。上述の結果と合わせて分解過程を検討したが、結果はリボヌクレオチドの場合と類似していたのでリボヌクレオチドの項でまとめて討論する。

### 3.3 R5P のオゾン分解

図 4 に R5P の分解とそれとともなって遊離してくるリン酸イオンの経時変化を示す。同じオゾン処理条件における D-リボースの分解速度 (図 2) と比較すると、R5P の分解速度が緩慢であることが分る。このことは R5P では 5 位炭素の 1 級水酸基がリン酸基で保護されているためと考えられる。

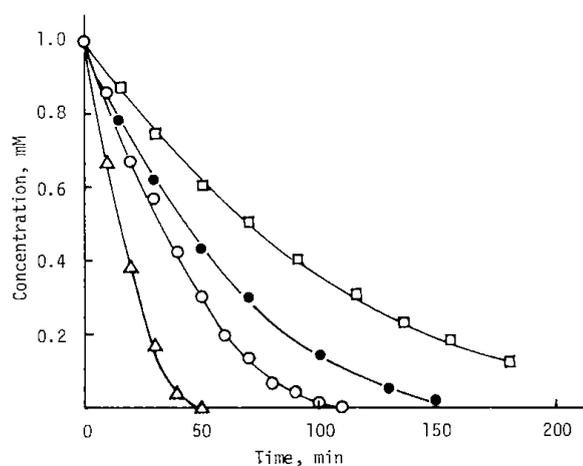


Fig. 3 Degradation of ribonucleosides

—□—, adenosine; —●—, cytidine;  
—○—, uridine; —△—, guanosine

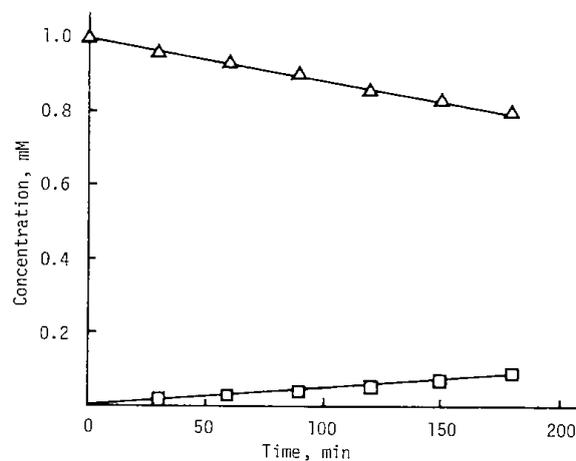


Fig. 4 Degradation of D-ribose-5-phosphoric acid

—△—, R5P; —□—,  $PO_4^{3-}$

(10)

### 3.4 リボヌクレオチドのオゾン分解

4つのリボヌクレオチド、すなわちウリジン5'-リン酸(UMP)、シチジン5'-リン酸(CMP)、アデノシン5'-リン酸(AMP)およびグアノシン5'-リン酸(GMP)の分解経時変化を図5に示す。分解速度の順序は相当する塩基のそれと同じである。またHPLCで検出できた反応生成物ピークのRt値を塩基、リボヌクレオチドの場合と同様に表1に示す。さらに糖および遊離リン酸イオンの分析結果を含めたオゾン分解パターンを各ヌクレオチドについて図6に示す。これらの結果を総合してリボヌクレオチドのオゾン分解過程を以下に考察する。

まずUMPの分解では遊離のウラシルもウリジンも検出されなかった(表1)。また遊離のリン酸

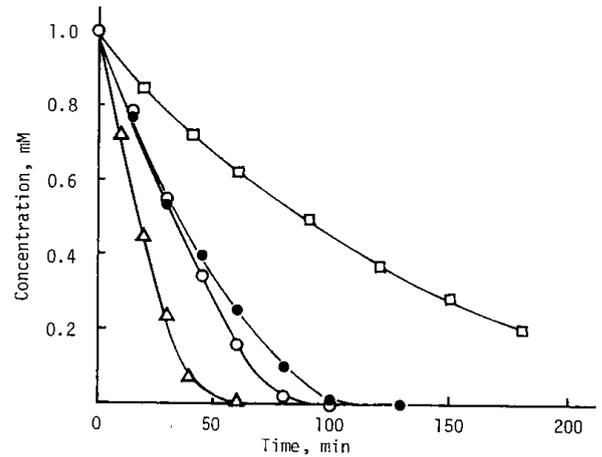


Fig. 5 Degradation of ribonucleotides

—□—, AMP; —●—, CMP; —○—, UMP; —△—, GMP

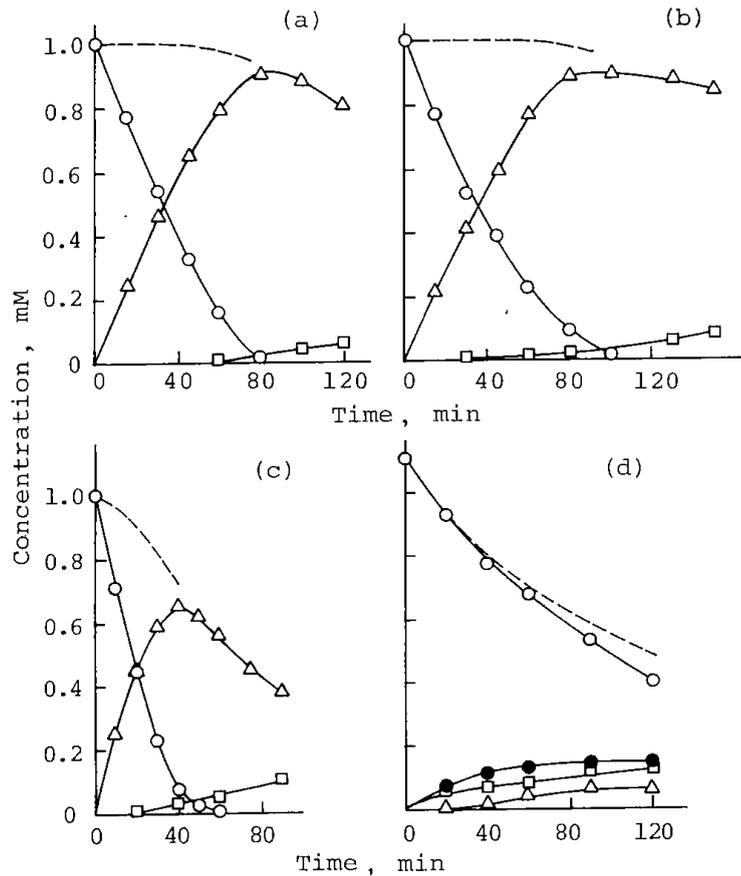
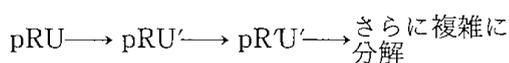


Fig. 6 Degradation of UMP(a), CMP(b), GMP(c) and AMP(d)

—○—, residual nucleotide (pRN); —△—, ribosyl moiety except for that included in residual nucleotide (pRN'); ..... , total sugar (pRN + pRN'); —●—, free adenine; —□—, free phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ )

イオンも UMP が消滅する直前まではほとんど検出されなかった(図 6 a)。さらにオゾン処理約40分までは残存 UMP 濃度と  $R_{(\text{orcinol})}$  (図 6 a,  $\Delta$ 印)の和,すなわち総リボース濃度(図 6 a, 点線)は 1 mM で一定であった。このことは UMP は減少するが分解生成物はリボース部分が分解を受けていないものであることを意味している。すなわち  $R_{(\text{orcinol})}$  として検出される物質は UMP のウラシル部分のみがある程度分解されたオゾン反応生成物と考えるので pRU' と表わす。ここで p はリン酸基, R はリボース部分, ダッシュ (') はその部分がオゾン分解を受けたことを示す。なお塩基を一般的に表わす時には N を用い,したがってヌクレオチドは pRN と表記する。さて pRU' は前述のようにウラシルの 5, 6 位の二重結合がオゾンに攻撃されやすいため生成したと考えられる。そのため 5, 6 位二重結合を含む共役系が失われ,結果として pRU' の N-グリコシド結合の安定性が低下し酸加水分解を受け,オルシノール-硫酸法で検出されたと判断される。UMP ではこのようにオゾン処理の初期には塩基部分のみが変化したが,処理時間が長くなるにつれ総リボース濃度および pRU' 濃度も低下し始め,さらにその速度は遅いが,リン酸基も遊離し始めた。以上をまとめると UMP の主要な分解過程は次のように表わされる。



次に CMP の分解経時変化を図 6 b に示す。分解速度が UMP より遅いが,分解過程は UMP の場合と全く同様に考えられる。

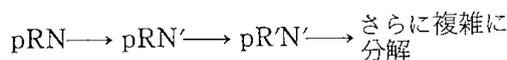
GMP においても遊離のグアニン,グアノシンは検出されなかった(表 1)。またリン酸基の遊離速度も小さかった(図 6 c)。リボース部分の分解は UMP や CMP に比べて速く,反応の初期から総リボース濃度は減少したが,GMP 自体の分解はそれよりはるかに速かった。これらの結果から GMP の分解過程も基本的には UMP のそれと同じであり,初め pRG'(図 6 c,  $\Delta$ 印,  $R_{(\text{orcinol})}$  から pRG' の量を差し引いた値)を生ずるが,pRG' から pR'G' への変化が UMP などに比べて速いと解釈される。ここで注意しておきたいのは pRG' から pR'G' への変化が R5P の分解(図 4)よりもはるかに速いことである。GMP のグアニン部分の分解がリボース部分の不安定化をもたらしていると考えられるが,そ

の理由は明らかではない。

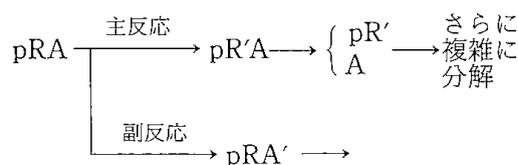
AMP の分解様式は他とかなり異なっている。アデノシンの場合と同様に生成物の中にアデニンとみなされるピークが検出され,アデニンが遊離してくることが分った(図 6 d)。また総リボース量の減少速度は AMP 自体の減少速度に近似していた。リン酸基の遊離速度も UMP, CMP, GMP と比べてかなり速い。これらの結果から AMP ではアデニンの構造が安定であるため,まずリボース部分がオゾンの攻撃を受けて pR'A が生ずると考えられる。リボース部分の変化は N-グリコシド結合およびリン酸-糖結合の不安定化をもたらし,アデニンやリン酸が遊離してくるものと考えられる。30分後には pRA' で表わされる分解物も少量ではあるが生成しているので, pRA  $\longrightarrow$  pRA' の分解経路も副次的に起こっていると思われる。なお AMP のリボース部分が X 線照射によって分解され,その結果としてリン酸基が遊離してくることが報告されているが<sup>13)</sup>,本報の結果はこれに類似していて興味深い。

以上考察した 4 つのリボヌクレオチドのオゾン分解過程をまとめると次のように表わすことができる。

UMP, CMP, GMP では



AMP では



なおりボヌクレオチドの分解過程はリン酸基の遊離を除けば相当するリボヌクレオチドの分解過程と全く同様に考えることができた。これまでオゾンは X 線,放射線と類似の作用をすると言われてきた<sup>14)</sup>。その理由として,ともに  $\cdot\text{OH}$  ラジカル反応が関与していると考えられているからである。しかし,上記の結果は X 線照射による分解過程<sup>15)</sup>とされているものと異なっており,中性溶液におけるオゾン反応がラジカル反応であるかどうか検討の必要がある(第 4 章で検討される)。

## 4 結 論

本章においては RNA 構成成分のオゾン分解反応について検討した。塩基の分解速度の順序は G (T) > U > C > A であり、リボヌクレオシド、リボヌクレオチドの分解速度の順序も相当する塩基のそれと一致することが分った。また UMP, CMP, GMP では塩基部分が最初に分解されることが分り、これらのことから RNA とオゾンが反応するときにはグアニン残基が最も分解され易いことが示唆された。

## 引 用 文 献

- 1) K. Ishizaki, N. Shinriki, A. Ikehata, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 868 (1981).
- 2) N. Shinriki, K. Ishizaki, A. Ikehata, A. Nomura, T. Yoshizaki, *Ozone: Science and Engineering*, **3**, 49 (1981).
- 3) R. N. Kinman, "Ozone in Water and Wastewater Treatment" ed. by F. L. Evans, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1972, pp. 123-143; 衛生常設委員会, 水道協会誌, **53**, 42 (1984).
- 4) 神力就子, "総説—オゾンの細胞および細胞構成物に及ぼす影響", 北海道工業開発試験所報告, 31号, 1983, pp. 15-22.
- 5) C. Hamelin, L. Poliquin, Y. S. Chung, *Rev. Can. Biol.*, **40**, 305 (1981); H. Dubeau, Y. S. Chung, *Mutat. Res.*, **102**, 249 (1982).
- 6) E. Christensen, A. C. Giese, *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 208 (1954).
- 7) R. Prat, Cl. Nofre, A. Cier, *Ann. Inst. Pasteur*, **114**, 595 (1968).
- 8) D. B. M. Scott, "Aquatic Applications of Ozone," ed. by W. J. Blogoslawski and R. G. Rice, The International Ozone Institute, New York, 1975, pp. 1-12.
- 9) 大村浩久, 堤 将和, 有吉浩一, 石北隆一, 諸岡正敏, 九大農学芸誌, **27**, 211 (1973).
- 10) A. H. Brown, *Arch. Biochem.*, **11**, 269 (1946).
- 11) APHA-AWWA-WPCF "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 14th Ed., American Public Health Association, Washington, D. C., 1976, pp. 479-480.
- 12) K. J. Kolonko, R. H. Shapiro, R. M. Barkley, R. E. Sievers, *J. Org. Chem.*, **44**, 3769 (1979).
- 13) M. Daniels, G. Scholes, J. Weiss, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3771 (1956).
- 14) R. Brinkman, H. B. Lamberts, T. S. Veninga, *Lancet*, **1**, 133 (1964) and references cited therein; R. E. Zelac, H. L. Cromroy, W. E. Bolch, B. G. Dunavant, H. A. Bevis, *Environ. Res.*, **4**, 325 (1971) and references cited therein.
- 15) G. Scholes, G. Weiss, *Biochem. J.*, **53**, 567 (1953); G. Hems, *Nature*, **186**, 710 (1960).

## 第2章

# 酵母RNA、酵母フェニルアラニンtRNAおよびタバコモザイクウイルスRNAのオゾン分解<sup>1,2)</sup>

### 1 緒 言

第1章において核酸に対するオゾンの作用を解明する最初の段階としてRNA構成成分のオゾン分解性を検討し、グアニン塩基が最も速やかに分解することを見いだした。またリボヌクレオチドの分解過程を明らかにした。本章においてはまず4つのリボヌクレオチド混合系において各ヌクレオチドの分解速度を比較し、次いで標題にある3種類のRNAに対するオゾンの作用を検討した。

RNAはリボヌクレオチドが3'位および5'位でリン酸ジエステル結合によって重合した高分子である。このような高分子においてもやはりグアニン残基が最も速く分解されるのか否かは興味のある点である。鎖切断に関していえばDNA鎖は放射線照射によって切断が頻繁に起こることが知られており<sup>3,4)</sup>、オゾンによっても生ずることが報告されている<sup>5,6)</sup>。すなわち、現象的に一致しているため、オゾンはradiomimeticガスといわれている由縁である。しかし、第1章では糖の破壊は塩基の破壊より遅れ、糖-リン酸結合の切断はさらに遅れることを報告した。RNAで果たして鎖切断が生じるであろうか。この点については酵母RNAと酵母フェニルアラニン転移RNA(以後tRNA<sup>phe</sup>と略記)を用いて検討した。またRNAはウイルスあるいは生体内において種々の生化学的機能を担っているが、オゾン分解と活性との関連をtRNA<sup>phe</sup>とタバコモザイクウイルスRNA(TMV-RNA)を用いて調べた。

以上に述べた3点、すなわち(1)RNAにおけるオゾンの主要な作用点、(2)ヌクレオチド鎖の切断の有無、(3)RNAのオゾン分解と不活性化との相関性、を明らかにすることが本章の主な目的である。

### 2 実 験

#### 2.1 試薬および試料

リボヌクレオチド5'-リン酸(AMP, GMP, CMP,

UMP)はSigma Chemical社製を使用した。酵母RNAはBoehringer-Mannheim社製のを2.4に述べるゲルろ過法により分画し、分子量約15000の画分を集めて使用した。酵母tRNA<sup>phe</sup>と[<sup>14</sup>C]フェニルアラニンはそれぞれBoehringer-Mannheim社製およびNew England Nuclear社製のものを使用した。アミノアシル-tRNAシンセターゼは酵母からMiyazakiら<sup>7)</sup>の方法により調製した。TMVは*Nicotiana tabacum* L. var. White BurleyのTMV感染葉の搾汁液から超遠心分画法<sup>8)</sup>によって分離精製し、5°C以下で保存した。TMV-RNAは使用直前に保存TMVからフェノール-ベンツナイト法<sup>9)</sup>によって調製した。TMVおよびTMV-RNAの濃度は260nmにおける吸光度によって定めた。ヌクレアーゼP<sub>1</sub>はヤマサ醤油から購入した。他の試薬は市販特級品を用いた。

#### 2.2 オゾン処理

試料のオゾン処理に用いた装置は第1章の図1と同じである。オゾン処理条件は以下のとおりである。

リボヌクレオチド混合溶液および酵母RNA: 総ヌクレオチド濃度1mMのリン酸塩緩衝液(40mM, pH 6.9) 200mlにオゾン濃度0.5±0.05mg/lのオゾン-酸素混合気流を330ml/minで注入した。反応温度は室温(ca. 22°C)である。

tRNA: 1.2mgのtRNA<sup>phe</sup>を含むリン酸塩緩衝液(10mM, pH 6.9) 6mlにオゾン濃度0.1±0.01mg/lのオゾン-酸素混合気流を70ml/minで注入した。反応温度は約2°Cである。

TMV-RNA: 10mgのTMV-RNAを含むリン酸塩緩衝液(40mM, pH 6.9) 40mlにtRNA<sup>phe</sup>と同条件でオゾンを注入した。

#### 2.3 リボヌクレオチドとRNAの分析

リボヌクレオチドは日立635型高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用い第1章と同条件で分析した。3種類のRNAはヌクレアーゼP<sub>1</sub>を用いて加水分

(14)

解後モノヌクレオチドとして、HPLCで分析した。加水分解は、試料溶液 1 ml に 5  $\mu$ g/ml のヌクレアーゼ P<sub>1</sub> を含む酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) 1 ml を加え、この混合溶液 (pH 5.5) を一晚 37°C に保つ条件で行った。RNA 溶液中に含まれるリン酸イオンはヌクレアーゼ P<sub>1</sub> の作用を多少阻害するが、本条件下では RNA は完全に分解された。一例として tRNA<sup>Phe</sup> の加水分解生成物の HPLC クロマトグラムを図 1 に示す。ピーク a, b, d, e はそれぞれ CMP, AMP, UMP, GMP に対応している。またピーク c は tRNA の微量成分であるプソイドウリジン 5'-リン酸 ( $\Psi$ MP) と考えられる。しかし、同じく微量成分である 5-メチルシチジン (m<sup>5</sup>C), 7-メチルグアノシン (m<sup>7</sup>G) などの修飾ヌクレオシド 5'-リン酸は設定した HPLC 条件では分離ピークとして現われず、それぞれの前駆体であるヌクレオチドのピークと

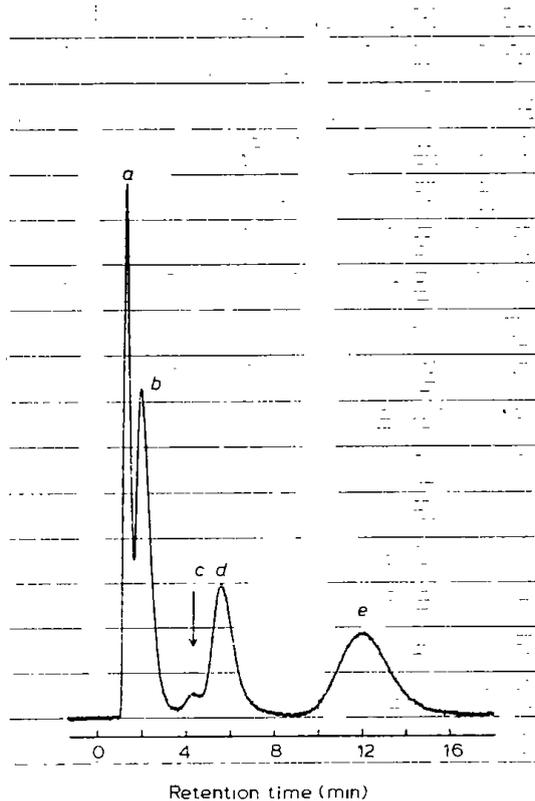


Fig. 1 High-performance liquid chromatogram of ribonucleotides obtained from yeast phenylalanine tRNA by enzymic hydrolysis with nuclease P<sub>1</sub>

a, CMP and related nucleotides; b, AMP and related nucleotides; c,  $\Psi$ MP; d, UMP and TMP; e, GMP and related nucleotides

重なっていると考えられる。ジヒドロウリジン 5'-リン酸は UV 吸収検出器では検出されない。定量値から構成モル比を計算すると CMP, AMP,  $\Psi$ MP, UMP, GMP はそれぞれ 18.2, 18.9, 2.2, 12.9, 21.8 となり、チミン, Y 塩基のヌクレオシド 5'-リン酸はそれぞれ UMP, AMP の各ピークに含まれるとすると理論値に一致していた。

#### 2.4 ゲルろ過とゲル電気泳動

酵母 RNA はゲルろ過により精製した。市販品約 80 mg を少量のアルカリ性の Tris 緩衝液に溶かし、これを Sephadex G-50 のカラム ( $\phi$  4.6  $\times$  50 cm) に供した。溶出は 0.01 M Tris-0.05 M NaCl 緩衝液 (pH 7.45) を用い、流速は 2 ml/min である。主ピーク溶出液を減圧濃縮し、冷水で透析した後、凍結乾燥し、乾燥イースト RNA 56 mg を得た。その組成モル比は AMP, GMP, CMP, UMP について 25.0, 26.0, 25.5, 23.5% であった。

オゾン処理酵母 RNA の分子量分布の測定はオゾン処理試料 10 ml を減圧下濃縮してこの一定量を Sephadex G-50 カラム ( $\phi$  2.2  $\times$  50 cm) に供し 0.5 ml/min の流速で溶離して行った。

tRNA<sup>Phe</sup> のヌクレオチド鎖の切断の有無はゲル電気泳動法により判定した。オゾン処理 tRNA<sup>Phe</sup> はエタノール沈殿で回収し、この一部を 8 M 尿素 3  $\mu$ l に溶かし、色素液 (30% sucrose-1% BPB-TEB 緩衝液) 1  $\mu$ l を加えて電気泳動用試料とした。ゲルは 1 mM EDTA および 7 M 尿素を含む Tris-ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.3) 中で調製した 12% ポリアクリルアミドゲル (20  $\times$  20  $\times$  0.1 cm) を用い、160 V の定電圧で 1.5 時間泳動を行った。染色は、0.1% メチレンブルー-5% 酢酸溶液で行った<sup>10)</sup>。

#### 2.5 アミノ酸受容能の測定

各オゾン処理時間 tRNA<sup>Phe</sup> 溶液の各々について 2.5, 5, 10  $\mu$ l を用い、Miyazaki ら<sup>7)</sup> の条件で反応液総量を 100  $\mu$ l としてアミノ酸受容能を測定した。この方法で 0.065 nmol 未処理 tRNA<sup>Phe</sup> は 63000 cpm の [<sup>14</sup>C] フェニルアラニンを受容した。

#### 2.6 TMV-RNA 感染力の検定

オゾン処理 TMV-RNA 溶液を 0.5 ml 採取し、直ちにベントナイト懸濁水 (25 ml/ml) 0.5 ml と混合して混入してくる酵素による RNA の分解を防止した<sup>11)</sup>。次いでこの混合溶液に 0.1 M リン酸塩緩衝

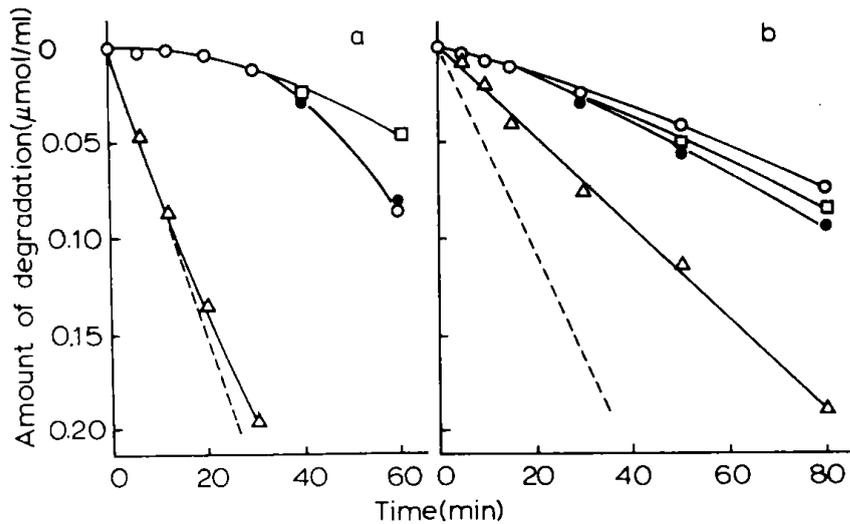


Fig. 2 Degradation of the mixture of 5'-ribonucleotides (a) and yeast RNA (b)

Starting concentration of AMP, GMP, CMP and UMP : (a) 310, 230, 180 and 280  $\mu\text{M}$ ; (b) 250, 260, 255 and 235  $\mu\text{M}$ ; —□—, AMP; —△—, GMP; —○—, CMP; —●—, UMP; ·····, the sum of four nucleotides degraded

液(pH 7.0)を加えて3.5倍に希釈して検定試験の試料とした。検定試験は *Nicotiana glutinosa* L.の葉を用いる半葉法(一枚の葉の半分に試料溶液,他の半分には対照溶液を接種する)に従い<sup>12)</sup>, 3日後に生ずる壊疽病斑数で感染力を測定した。1試料につき約20枚の葉を使用した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 リボヌクレオチド混合溶液および酵母 RNA のオゾン分解

第1章においてはリボヌクレオチドからのリン酸基の遊離を測定するためにホウ酸塩緩衝液中(pH 7.8)でオゾン処理を行った。本章ではリン酸塩緩衝液(pH 6.9)を用いたので,まず個々のリボヌクレオチドのオゾン分解速度を比較して緩衝液の影響を調べた。分解速度の順序は  $\text{GMP} > \text{UMP} > \text{CMP} > \text{AMP}$  で第1章に述べた結果と同様であった。

次に4つのリボヌクレオチドを混合した溶液をオゾン処理した。各ヌクレオチドの初濃度はその比が TMV-RNA の構成ヌクレオチド比に近似するようにした。図2 aにその結果を示すが,分解速度を比較しやすいように,縦軸は分解量を下向きにとってある。図から明らかなように反応初期には GMP のみが分解しており,他のヌクレオチドは GMP がほとんど消失してから分解が速まった。この分解速度の大きな差は個々のヌクレオチドを単独でオゾン処理した時の分解速度の差(第1章図

5)とはかなり異なっている。すなわちガス中から溶液中に吸収拡散されるオゾンの大部分を反応速度の大きい GMP が優先的に反応,消費してしまうために,分解速度の差がより拡大されたと解釈される。この点をより定量的に考察するためには各ヌクレオチドとオゾンの均一反応速度を比較する必要がある(第4章において検討される)。

酵母 RNA においてもグアニン残基が他よりはるかに速く分解している(図2 b)。しかしその速度は混合溶液の GMP に比べかなり遅い。RNA ではリボヌクレオチドが鎖状につながっており,また塩基間の水素結合によって複雑な高次構造を取っている。このためオゾンと個々の塩基との接触確率がモノマーの混合溶液の場合に比べて減少すると考えられる。さらにグアニン部分のスタッキングなどの効果によってオゾンの攻撃を受けにくくなっていると考えられる。これらが RNA の場合の分解速度低下の原因と考えられる。オゾン反応によって分子鎖が切断されるかどうかということは,不活性化の原因として大きな問題である。そこで10, 15, 30, 50, 80分間オゾン処理された酵母 RNA のゲルろ過を行った。図3で分るようにオゾン処理15分まではピーク高さは減少しているがピーク位置の変動はなく,分子量分布に変化はないことが判明した。この時全ヌクレオチドの約8%が分解しているので(図2 b),ピーク高さは塩基部分の分解に基づく吸光度の低下によるものと考

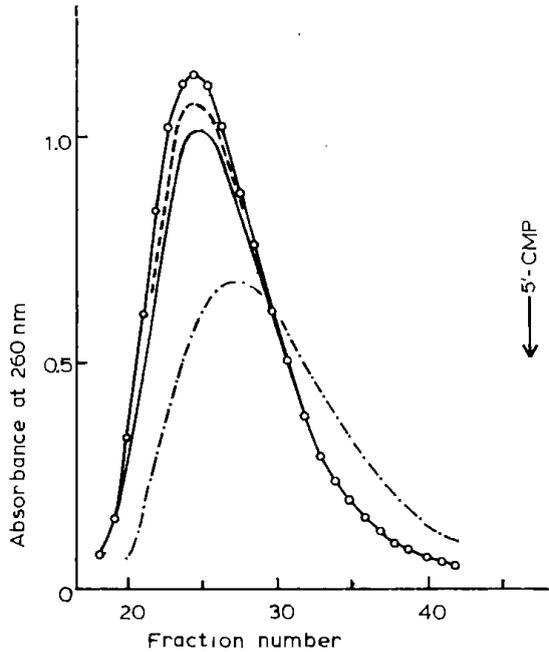


Fig. 3 Gel chromatograms of ozonized yeast RNA

Sample was the same as in Fig. 2b. The same volume of each sample was applied to a column (Sephadex G-50; column size, 2.2 × 50 cm). —○—, zero time; ----, 10 min; —, 15 min; - · - ·, 80 min

えられる。したがって反応の初期には RNA のヌクレオチド鎖の切断は生じていないと結論できる。しかし反応時間が長くなるとゲルクロマトグラムのピーク位置は少しずつ移動し、ヌクレオチド鎖の切断もある程度起こっていることを示している。より正確に鎖切断の有無の検討が必要であるのでこれは 3.2 で行った。

### 3.2 酵母 tRNA<sup>Phe</sup> のオゾン分解

酵母 tRNA<sup>Phe</sup> は塩基配列の確定しているヌクレオチド数76の RNA である。その構造は図4の通りである。まずオゾン処理による構成ヌクレオチドの分解とアミノ酸受容能の変化を調べた。微小変化を観測するためにオゾン濃度を可能な限り下げ (0.1 mg/l), 流速も下げて処理した。表1にその結果を示したが、ヌクレオチドの分解個数は tRNA<sup>Phe</sup> 1分子あたりのものである。ここにおいてもグアニン残基が最も速く分解されているのが明らかである。ウリジン残基およびプソイドウリジン残基はオゾン処理30分で初めて分解が観測された。予

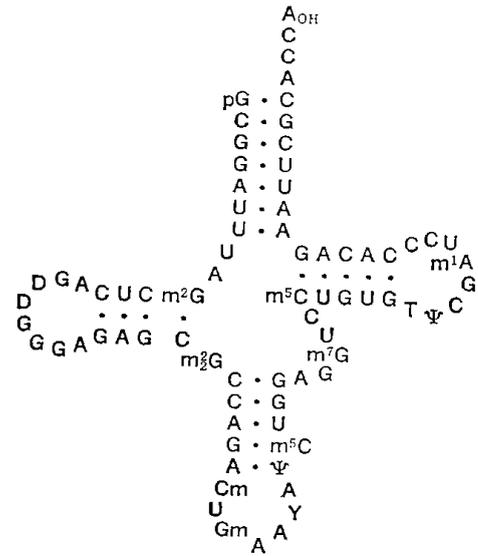


図4 酵母フェニルアラニン tRNA<sup>8)</sup>

想外の結果はアデニン残基である。アデノシンは4つのリボヌクレオシドのうち最も安定なはずであるが、20分で分解が始まっている。おそらく微量成分(m<sup>1</sup>A または Y)の反応性が高く、これが AMP の減少として定量されたためと考えられる。フェニルアラニン受容能は10分のオゾン処理で初期値の45%までに下がった。この時分解されているものはグアニン残基、平均1.1個だけである。受容能がほとんど失われた30分では平均4.8個の塩基(そのうちグアニン残基は3.2個)が分解されていた。この中のオゾン処理20分および30分の tRNA<sup>Phe</sup> についてその鎖切断の有無を検討した。12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果(図5)はこれらが未処理の tRNA<sup>Phe</sup> と同じ移動度の単一バンドであることを示した。20分および30分におけるヌクレオチドの分解率はそれぞれ3.3%および6.3%であり、反応の初期には鎖切断が生じていなかったことが確認できた。これらの結果からヌクレオチド鎖切断は tRNA<sup>Phe</sup> のアミノ酸受容能喪失の直接の原因ではなく、ヌクレオチドの部分的分解、特に最もオゾンの攻撃を受けやすいグアニン残基の分解が受容能喪失の主要な原因であると推定される。なおこれまで、オゾンによる不活性化を X線照射による場合と同様に・OH ラジカル反応とみなし<sup>13)</sup>、ヌクレオチド鎖切断が先行するとみなすような考えが見うけられたが、今回の結果はこれを否定するものである。グアニン塩基の分解が先行するというこの我々の知見はさらに詳細に確認する必要がある(第3章において検討される)。

Table 1 Degradation of Yeast Phenylalanine tRNA with Ozone

Phenylalanine tRNA was ozonized for 10, 20 and 30 min under the conditions described in Experimental Section. The degradation amount was estimated by HPLC after enzymatic hydrolysis and the amino acid acceptor activity was also measured. The molar ratios of nucleotides in intact phenylalanine tRNA were calculated as 21.8, 18.9, 2.2, 12.9 and 18.2 for GMP, AMP, ΨMP, UMP and CMP, respectively. 0.065 nmol intact phenylalanine tRNA accepted 63000 cpm [<sup>14</sup>C] phenylalanine.

	Ozonization time (min):	Number of degraded nucleotides			
		0	10	20	30
GMP		0	1.1	2.2	3.2
AMP		0	0	0.3	1.0
ΨMP		0	0	0	0.3
UMP		0	0	0	0.3
CMP		0	0	0	0.0
[ <sup>14</sup> C] phenylalanine acceptor activity (%):		100	45.0	8.3	3.6

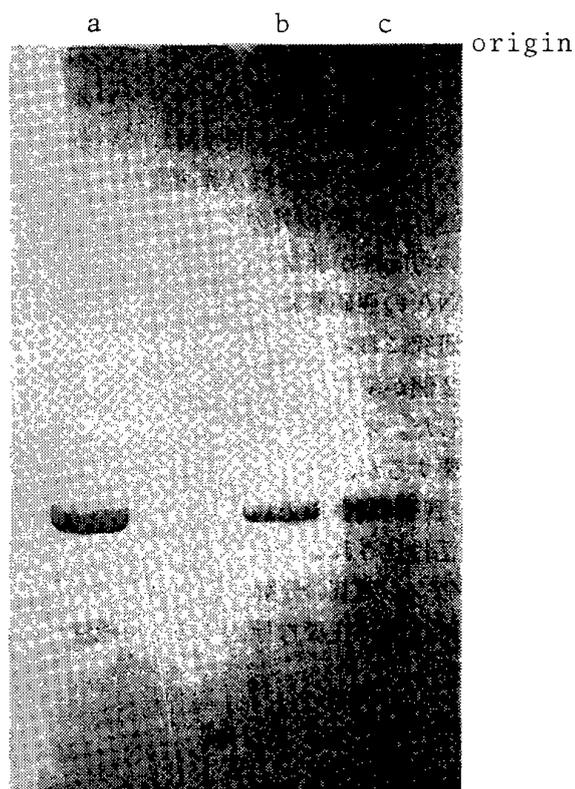


Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis of phenylalanine tRNAs treated and untreated with ozone

a, untreated; b, treated for 20 min; c, treated for 30 min

### 3.3 TMV-RNA のオゾン分解

TMV-RNA は約6400ヌクレオチドの一本鎖RNAで、その分子量は約 $2 \times 10^6$ である<sup>14)</sup>。TMVは初めて結晶として単離されたウイルスであり、またその安定性ゆえに多くの生化学的、生物学的特性についての先駆的研究に用いられてきた<sup>15)</sup>。例えば必須な感染因子はウイルス粒子ではなく、内部のRNAのみであることが明らかになったのはTMVを用いた実験による。また化学物質による突然変異誘発の最初の対象となったのもTMVおよびTMV-RNAである。TMVに対するオゾンの作用については由崎ら<sup>16)</sup>が初めて検討し、塩素に比してその不活性化作用が強いことを明らかにした。ここではTMV-RNAのオゾンによる分解と不活性化の関連性を調べた。

まず図6 aにはTMV-RNA構成ヌクレオチドのオゾンによる分解量の経時変化を示した。縦軸は図2と同様に分解量を下向きにとってある。感染力検定のためにオゾン濃度および流速を下げたので、オゾン処理20分間では分解量は測定できなかったが、経時とともにこの場合もグアニン残基が他よりはるかに速く分解していることが明らかとなった。次にヌクレオチド分析に使用した試料溶液の一部を用いて感染力検定試験を行った(図6 b)。TMV-RNAの感染性はオゾン処理の初期から急速に減少し、30分では感染性が失われた。一方

(18)

Table 2 Standard Deviation of Analysis of TMV-RNA

	CMP	AMP	UMP	GMP	Total
Mean value $\bar{X}$ (mM)	0.149	0.237	0.234	0.204	0.824
$\Sigma (X-\bar{X})^2$	$8 \times 10^{-6}$	$10 \times 10^{-6}$	$9 \times 10^{-6}$	$68 \times 10^{-6}$	$118 \times 10^{-6}$
Number N	20	21	26	19	19
Variance $\sigma^2 (= \Sigma/N)$	$0.4000 \times 10^{-6}$	$0.4761 \times 10^{-6}$	$0.3462 \times 10^{-6}$	$3.5789 \times 10^{-6}$	$6.2105 \times 10^{-6}$
Standard deviation $\sigma$ (mM)	$6.32 \times 10^{-4}$	$6.90 \times 10^{-4}$	$5.88 \times 10^{-4}$	$1.89 \times 10^{-3}$	$2.49 \times 10^{-3}$
Standard deviation 100 $\sigma/\bar{X}$ (%)	0.42	0.29	0.25	0.93	0.30
Number of nucleotide	1152	1843	1818	1587	6400
Standard deviation (number)	4.8	5.3	4.5	14.8	19.2

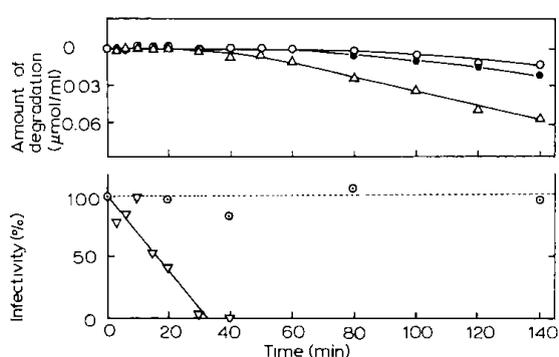


Fig. 6 Inactivation and degradation of TMV-RNA

Starting concentration (sum of four nucleotides),  $860 \mu\text{M}$ ; —○—, AMP, CMP; —△—, GMP; —●—, UMP; —▽—, infectivity of ozonized TMV-RNA; —○—, control

コントロール実験では TMV-RNA をオゾンを含まない酸素気流で処理したが、140分処理の限りでは感染性の低下はなかった。感染性が失われたオゾン処理30分においては、GMP 量の減少がわずかに認められたが他のヌクレオチドは変化していない(図 6 a)。この時点においてヌクレオチド鎖の切断が生じていたかどうかは明らかではない。しかし酵母 RNA や酵母 tRNA<sup>phe</sup> の実験結果から推察すると、ヌクレオチドの分解がごくわずかであるこの時点での鎖切断の可能性は非常に少ないと考えられる。したがって鎖切断が不活性化の直接の原因ではないと考えられる。

それでは核酸塩基の分解の方はどうであろうか。30分ではヌクレオチドはほとんど変化していない

が、より細かく検討するためには分析誤差を考慮する必要がある。表 2 に TMV-RNA の加水分解から HPLC 分析までの全操作を含めた分析精度を示す。相対標準偏差は AMP, CMP, UMP では 0.4% 以下、GMP では 0.93% であった。したがって TMV-RNA を構成する約 1590 個の GMP のうち最大 15 個がオゾン処理 30 分以前に分解している可能性がある。分析精度のみからは他のヌクレオチドも 30 分以前にそれぞれ最大 5 個分解している可能性はある。しかし 30 分以降の分解速度から考えると、30 分以前では GMP 以外のヌクレオチドは分解されていない可能性が非常に高い。Schuster ら<sup>17)</sup> は TMV-RNA の亜硝酸による化学修飾と不活性化を論じた研究において、約 6000 個のヌクレオチドのうち 2 個が変化すると不活性化されることを明らかにした。オゾンによる不活性化機構はさらに検討を要するが、分析で検出できるレベル以下のグアニン残基 (15 個以下) の変化によって TMV-RNA が不活性化されることは十分に考えられる。したがってグアニン残基の分解がオゾンによる TMV-RNA の不活性化の主要な原因である可能性が高いと考えられる。

#### 4 結 論

本研究の結果を緒言で述べた目的にそってまとめると以下ようになる。

(1) 酵母 RNA, 酵母 tRNA<sup>phe</sup>, TMV-RNA いずれにおいてもグアニン残基が最も速く分解された。第 1 章の結果もふまえてオゾンの主要な作用点はグアニン残基と考えられる。

(2) 酵母 RNA, 酵母 tRNA<sup>phe</sup> とともにオゾン処理

の初期において、グアニン残基が分解されていても、ヌクレオチド鎖の切断は生じなかった。

(3) 酵母 tRNA<sup>phe</sup> および TMV-RNA の分解と不活性化の関連をみると、1～数個のグアニン残基がオゾンにより破壊された時点で、すでに 50%以上不活性化されていた。この時ヌクレオチド鎖の切断はまだ生じていない。したがってグアニン残基の破壊が不活性化の主要な原因であると考えられる。

#### 引用文献

- 1) N. Shinriki, K. Ishizaki, A. Ikehata, A. Nomura, T. Yoshizaki, *Ozone: Science and Engineering*, **3**, 49 (1981).
- 2) N. Shinriki, K. Ishizaki, A. Ikehata, T. Yoshizaki, A. Nomura, K. Miura, Y. Mizuno, *Biochim. Biophys. Acta*, **655**, 323 (1981).
- 3) G. Scholes, J. Weiss, *Biochem. J.*, **53**, 567 (1953) and references cited therein; D. S. Kapp, K. C. Smith, *Radiation Res.*, **42**, 34 (1970) and references cited therein.
- 4) 高木康敬, 三浦義彰編, “核酸”, 朝倉書店, 東京, 1970, pp. 382-395.
- 5) C. Hamelin, F. Sarhan, Y. S. Chung, *Experimentia*, **34**, 1578 (1978).
- 6) G. De Mik, I. De Groot, *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 6 (1978).
- 7) M. Miyazaki, M. Kawata, S. Takemura, *J. Biochem.* (Tokyo), **60**, 519 (1966).
- 8) 日本生化学会編, “生化学実験講座 2, 核酸の化学 III”, 東京化学同人, 東京, 1977, pp. 516-517.
- 9) H. Fraenkel-Conrat, B. Singer, B. Singer, A. Tsugita, *Virology*, **14**, 54 (1961).
- 10) T. Ikemura, J. E. Dahlberg, *J. Biol. Chem.*, **248**, 5024 (1973).
- 11) B. Singer, H. Fraenkel-Conrat, *Virology*, **14**, 59 (1961).
- 12) F. O. Holmes, *Bot. Gaz.*, **87**, 39 (1929).
- 13) R. Brinkman, H. B. Lamberts, T. S. Veninga, *Lancet*, **1**, 135 (1964) and references cited therein; R. E. Zelac, H. L. Cromroy, W. E. Bloch, B. G. Dunvant, H. A. Bevis, *Environ. Res.*, **4**, 325 (1971) and references cited therein.
- 14) 岡田吉美, 現代化学, No. 81, 12 (1977).
- 15) H. Fraenkel-Conrat, P. C. Kimball, 三浦謹一郎他訳, “ウイルス学”, 東京化学同人, 東京, 1985, pp. 69-78.
- 16) 由崎俊道, 池畑 昭, 野村邦夫, 北海道教育大学紀要(第二部 B), **26**(2), 5 (1976).
- 17) Von H. Schuster, G. Schramm, *Z. Naturforschung.*, **13b**, 697 (1958).

### 第3章

## オゾンによるマウスプロリンtRNAおよび マウスイソロイシンtRNAの分解様式<sup>1-3)</sup>

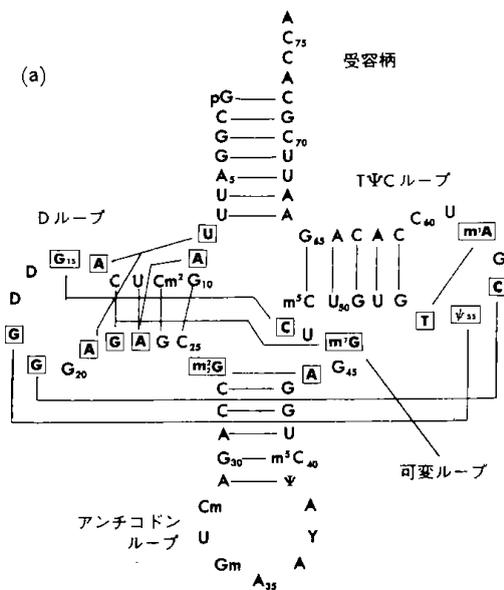
### 1 緒 言

第2章においては3種類のRNAのオゾン分解反応を検討し、いずれの場合もグアニン残基が最も速く分解することが分った。またRNA中の数個のグアニン残基のみが分解されているとみなされる時点で、酵母フェニルアラニン tRNA (tRNA<sup>Phe</sup>) のアミノ酸受容能やタバコモザイクウイルス RNA の感染能がほとんど失われていることを見出した。本章においては標記の2種類の tRNA のオゾン分解性を検討し、これにより tRNA のヌクレオチド鎖上におけるオゾンの作用点を明らかにすることを試みた。

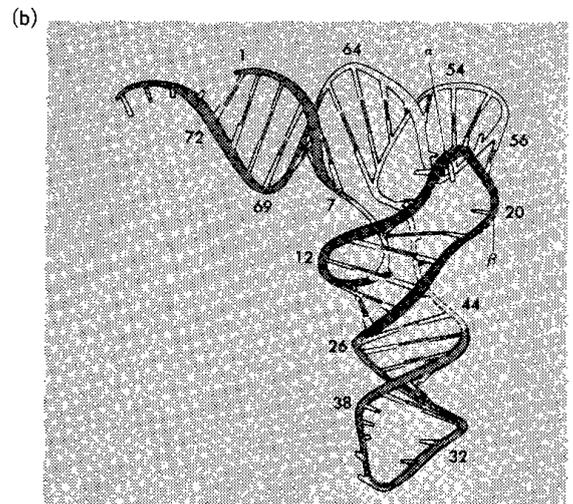
周知のごとく核酸は単純な形体の鎖状高分子ではなく、分子内水素結合によって複雑な高次構造を形成している。またその高次構造が核酸の生化学的機能と深く関連している。このことは一般に

73~93ヌクレオチドから成る小さな核酸である tRNA においても同様である。これまでに250種もの tRNA の一次構造(塩基配列)と二次構造が決定されているが、二次構造としてはすべての tRNA が図 1a に示されるようなクローバーリーフ形構造をとっている<sup>4)</sup>。さらに酵母 tRNA<sup>Phe</sup> の結晶について、X線解析によっていわゆる L 字形の三次構造(図 1b)が明らかにされている<sup>5)</sup>。他のいくつかの tRNA についても X線解析が試みられており、解析はまだ不完全ながらも基本的には酵母 tRNA<sup>Phe</sup> と類似の三次構造をとると考えられている<sup>4,6)</sup>。そこで著者らはマウス腎細胞から得たプロリン tRNA (tRNA<sup>Pro</sup>) およびイソロイシン tRNA (tRNA<sup>Ile</sup>) を用いて検討を行った。

核酸の高次構造はこれまで種々の化学修飾剤を用いて検討されているが、オゾンを用いた例はない<sup>7)</sup>。一般に tRNA は 1 分子の中に20個前後のグア



酵母フェニルアラニン tRNA の三次元的相互作用を示す。塩基を結ぶ実線は水素結合を表す。(a)通常のクローバー葉型構造。



酵母 tRNA<sup>Phe</sup> 分子の鎖の折りたたまれ方を示す模式図。リボース-リン酸主鎖は連続した太いひもで描かれてあり、その間の色の橋わたしは水素結合を表す。1 個だけの塩基はわざと短い棒で表してある。tRNA 分子ごとにヌクレオチド数の違う可変領域は点線の部分である。Dループの中の可変部分2つはそれぞれ  $\alpha$  と  $\beta$  で示す。アンチコドンは図の下側に、アミノ酸受容末端は左上側にある。ヌクレオチドの番号は図 2 a と同じ。Dループとその柄に当る部分は灰色に、TΨCループは白色で表している (Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71, 4970 (1974) より引用)。

図 1 tRNA の構造<sup>5)</sup>

ニン残基があるが、配列はそれぞれが異なっている。そのことはそれらの三次構造上の位置がはっきり異なってくることになる。これまでの研究でオゾンはグアニン残基を選択的に攻撃することを明らかにしたので、高次構造との関連でオゾン反応がどのような位置で起るかは興味のあるところである。本研究の実験対象に選んだ tRNA<sup>Pro</sup> では、三次構造上外側に露出しているアンチコンドロンループに 3 個のグアニン残基が連続して配列している。一方、tRNA<sup>Ile</sup> ではアンチコンドロンループにグアニン残基はない。また tRNA<sup>Pro</sup> では D ループに 4 個連続してグアニン残基の配列があり、一方 tRNA<sup>Ile</sup> では D ループにグアニン残基が 2 個連続して配列している (図 7, 8 参照)。実験手法としては <sup>32</sup>P で標識した tRNA を用い、Sanger 法により分析してオゾンによる分解位置と分解率を解析した。

## 2 実 験

### 2.1 試料と試薬

[<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup> (2 種のアイソアクセプター tRNA の混合物) および [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Ile</sup> は原田らの方法<sup>9)</sup> により、マウス腎細胞から抽出分離して調製した。リボヌレアーゼ T<sub>1</sub> (RNase T<sub>1</sub>) は三共製を、またリボヌクレアーゼ A (RNase A) は Sigma Chemical 社製を用いた。他の試薬は市販特級品を用いた。

### 2.2 オゾン処理

小型試験管に試料溶液 2 ml を入れ、これにオゾン濃度 0.1 ± 0.01 mg/l のオゾン-酸素混合気流を流速 70 ml/min で注入した。試験管は氷水中で冷却し、オゾン通気時の溶液温度は約 2°C であった。オゾン発生および濃度監視システムは第 1 章第 1 図のものと同じである。試料溶液 1 ml 当りの構成成分は約 30000 cpm に相当する [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup> または [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Ile</sup>、共沈用 tRNA として酵母 tRNA 100 μg, 10 mM Mg<sup>2+</sup> および 0.15 M NaCl である。オゾン処理は 2, 4, 8, 16 および 32 分間行った。

### 2.3 tRNA の加水分解と生成フラグメントの分析

オゾン処理および未処理の [<sup>32</sup>P]tRNA は RNase A または RNase T<sub>1</sub> で加水分解した。加水分解生成物は Sanger のフィンガープリント法により分析した。その方法は原報<sup>9)</sup> や成書<sup>10)</sup> に詳しく書かれているのでここでは要点のみにとどめる。オゾン

処理 tRNA はエタノール沈澱で回収し、少量の水に溶解してから二分し、それぞれをパラフィルム上で乾固した。その各々に RNase A または RNase T<sub>1</sub> 溶液 (1 mg/ml - 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 1 mM EDTA) 3 μl を加え、キャピラリー中で 37°C, 30 分保温して加水分解した。分解生成物を二次元ろ紙電気泳動に供した。一次元目の泳動は酢酸セルローステープ (3 × 40 cm) を用い、緩衝液 (7 M 尿素 - 0.1 M 酢酸 - 10 mM EDTA, pH 3.5) 中、定電圧 5 KV で約 10 分間泳動した。二次元目は DEAE-ろ紙 (20 × 60 cm) を用い、これに一次元目分離オリゴヌクレオチドを移しとった後、7%ギ酸溶液中、定電圧 1.5 KV で 2 時間泳動した。このろ紙を X 線フィルムに感光させてフィンガープリントを得た。次に泳動ろ紙上のフラグメントのスポット部分を切り抜き、Beckman LS-230 型シンチレーションカウンターで放射活性を測定、各スポットのオリゴヌクレオチドの放射活性 (あらかじめ含有する P の数で除した値) を P 1 個当りの放射活性 (総放射活性を構成ヌクレオチド数で除した値) で除することによりモル比を算出した。この定量法の分析精度を理論生成モル比 1 のフラグメント (表 1 ~ 4 参照) について検定した。その結果は [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup> の RNase A および RNase T<sub>1</sub> 加水分解物について、分析値の標準偏差はそれぞれ 9.1% と 6.8% であった。また [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Ile</sup> の RNase A および RNase T<sub>1</sub> 加水分解物について、標準偏差はそれぞれ 6.7% と 9.9% であった。

### 2.4 ゲル電気泳動

1 mM EDTA および 7 M 尿素を含む Tris-ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.3) で調製した 12% ポリアクリルアミドゲル (20 × 20 × 0.1 cm) を用いて tRNA の電気泳動を行った。tRNA は 0.1% メチレンブルー - 5% 酢酸溶液で染色した<sup>11)</sup>。

## 3 結 果

### 3.1 RNA 鎖の切断

塩基配列の分析に先立ち、オゾン処理により tRNA のヌクレオチド鎖が切断するかどうかを、第 2 章と同様に 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって調べた。その結果 tRNA<sup>Pro</sup> と tRNA<sup>Ile</sup> ともに 32 分までのオゾン処理では泳動パターンは変化せず、鎖切断は生じていないことが分かった。

(22)

### 3.2 tRNA<sup>Pro</sup> のオゾン分解\*1

#### 3.2.1 フィンガープリントの解析

図2に1例として未処理およびオゾン処理16分の<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup>を、RNase Aで加水分解した場合のフィンガープリントを示す。またフィンガープリント上の各スポットに対応するフラグメントの塩基配列と生成モル比を表1に示す。RNase Aはピリミジン特異性を有し、3'末端にピリミジンヌクレオチドを有するフラグメントを生成する。そのため図7に示したtRNAの塩基配列から、どのような加水分解フラグメントが何分子生ずるかが予測できる。表1の理論モル比は1分子の未処理tRNA<sup>Pro</sup>から生ずる各フラグメントの予測数である。未処理tRNA<sup>Pro</sup>から得られた実験値はこの理論値とかなりよく一致していた。なおフラグメント中のN>pの記号は末端が2', 3'環状リン酸であるヌクレオチドを意味する。これは、RNase Aによる加水分解反応(後述のRNase T<sub>1</sub>の場合も同じ)においては、2', 3'環状リン酸体を経て3'-リン酸体を生ずるが、ヌクレオチドによっては反応が遅いため2', 3'環状体のまま残ったものである<sup>10)</sup>。

図2と表1からオゾン処理によるフラグメントの変化をみると、まずフラグメントa-14\*2, a-15, a-15', a-21が16分ですでに消滅していた。またa-12はモル比が著しく減少した。その他のフラグメントはあまり変化していなかった。変化の大きいフラグメントがGの構成割合が高いオリゴヌクレオチドであることは表1から明らかである。これはグアニン残基がオゾンにより優先的に分解されたためと考えられるが、グアニン部分が分解されたフラグメントはフィンガープリント上で明瞭なスポットになっては現われなかった。図2bのスポット12, 13および16の周辺の黒ずんでいる部分に、オゾンによって変化を受けた種々のフラグメントが重なっているものと推定される。この推定の根拠として、別に行った<sup>32</sup>P]GMPのオゾン分解生成物のフィンガープリントによる分析の結果、いくつかの分解生成物のスポットはすべて未分解

GMPの近傍にあったことが挙げられる。

次に<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup>を16分オゾン処理し、RNase T<sub>1</sub>で加水分解したときの結果を図3と表2に示す。RNase T<sub>1</sub>はグアニン特異性を有し、3'末端にグアニル酸をもつフラグメントを生成する。図3bの場合、t-6, t-21などの微弱なスポットの強度を高めるために、電気泳動の試料量を図3aの場合に比べて多くした。そのためt-3, t-4などのオゾン処理によって変化しないスポットは図3bの方が図3aよりも強く現れている。オゾン処理によって減少の著しいフラグメントはt-1+t-1', t-6, t-9, t-11, t-21などである。これらはRNase Aのときと同じくGの割合が高いフラグメントである。図3bのt-14, t-29周辺の黒づんだ部分は図2bの場合と同様に、部分的に分解したグアニン残基を含むいくつかのオリゴヌクレオチドのスポットが重なった場所と考えられる。RNase T<sub>1</sub>はグアニンヌクレオチドに特異的な酵素であるため、オゾンにより修飾されたグアニン残基ではその識別が不可能となり、加水分解できなくなる。その結果、ヌクレオチド鎖は切断されないまま長いオリゴヌクレオチドとして残ると考えられ、これらが泳動開始場所付近にとどまっていると考えられる。

#### 3.2.2 オゾンの作用位置

3.2.1においてオゾン処理16分の試料についてモル比の変化を表1, 2に示したが、他の処理時間の試料についても同様の解析を行った。図4にアンチコドンループ、TΨCループおよび可変ループから派生するフラグメントのうち、オゾン処理によって変化したフラグメントのモル比の経時変化を百分率で表示した。また、それぞれのフラグメントのtRNAの二次構造上の位置も示した。

まずアンチコドンループであるが、t-9は16分ですでに消滅していた。一方、t-9と38位G(tRNA<sup>Pro</sup>鎖上の位置、図7参照)で重なっているa-4は16分ほとんど変化しなかった。このことはt-9消失の原因が38位Gではないことを意味する。ところが38位Gが含まれるもう一つのフラグメントt-21は16分で初期値の約25%にまで減少した。一見矛盾

\* 1 塩基配列の略記号：A, アデノシン；C, シチジン；G, グアノシン；U, ウリジン；I, イノシン；T, チミジン；m<sup>1</sup>A, 1-メチルアデノシン；t<sup>6</sup>A, N-[9-(β-D-リボフラノシル)-プリン-6-イルカルバモイル]スレオニン；m<sup>5</sup>C, 5-メチルシチジン；m<sup>1</sup>G, 1-メチルグアノシン；m<sup>7</sup>G, 7-メチルグアノシン；m<sup>8</sup>G, N<sup>2</sup>-メチルグアノシン；m<sup>3</sup>G, N<sup>2</sup>, N<sup>2</sup>-ジメチルグアノシン；D, 5, 6-ジヒドロウリジン；Ψ, プソイドウリジン；U\*, 構造未定の修飾ウリジン；N, 一般的にヌクレオチドを表すが図7では未知ヌクレオチドを表す；N<sub>m</sub>, 2'-O-メチルヌクレオチド；pN, リン酸基が5'側にあることを表わす；N<sub>p</sub>, リン酸が3'側にあることを表わす；N>p, 2', 3'環状リン酸ヌクレオチド

\* 2 フラグメントの略記号：RNase A加水分解物のフィンガープリント上のスポット番号に対応してa-1, a-2のように表す。RNase T<sub>1</sub>の場合はt-1, t-2のように表す。

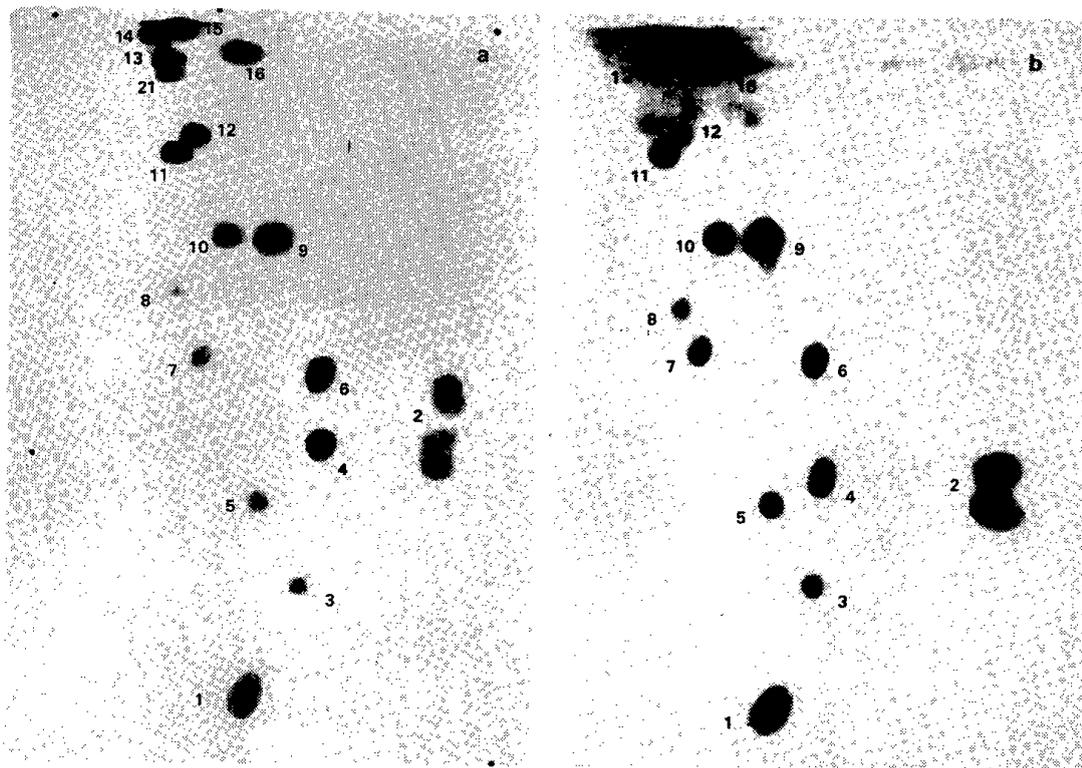


Fig. 2 Fingerprints of RNase A digestion products of intact  $[^{32}\text{P}] \text{tRNA}^{\text{Pro}}$  and 16 min-ozone-treated  $[^{32}\text{P}] \text{tRNA}^{\text{Pro}}$

Panels a and b depict autoradiograms of oligonucleotides derived from intact and treated  $[^{32}\text{P}] \text{tRNA}^{\text{Pro}}$ , respectively. The numbers follow the numbering system used in Table 1.

Table 1 Oligonucleotides Produced by RNase A Digestion of Intact  $[^{32}\text{P}] \text{tRNA}^{\text{Pro}}$  and 16min-Ozone-Treated  $[^{32}\text{P}] \text{tRNA}^{\text{Pro}}$

Spot No.	Sequence	Molar ratio		
		Theor.	Untreated	Treated
1	Up, $\Psi\text{p}$	5-6	5.3	5.9
2	Cp, $\text{m}^{\text{e}}\text{Cp}$	14	13.7	13.8
3	Um-Cp	1	1.0	1.1
4	G-Cp	2	2.2	2.3
5	A-Up	1	1.1	1.0
6	A- $\text{m}^1\text{A}$ -A-Up	1	0.97	1.0
7	$\text{m}^2\text{G}$ -Up	1	1.2	1.0
8	$\text{U}^*\text{m}$ -Up	0-1	0.62	0.64
9	G-A-G-Cp+G-G-A-Cp	2	2.1	2.1
10	G-A-Up	1	1.3	1.3
11	$\text{m}^1\text{G}$ -G-Up	1	1.1 <sub>s</sub>	1.0
12	pG-G-Cp	1	0.95	0.26
13	G-G-G- $\Psi\text{p}$	1	0.68	1.0
14	I-G-G- $\text{m}^1\text{G}$ - $\Psi\text{p}$	1-0	0.46	0
15	A-G-G-G-G-Dp	0-1	0.35	0
15'	A-G-G-G-G-D>p	1-0	0.15	0
16	G-A-G-A-G- $\text{m}^7\text{G}$ -Dp	1	1.0 <sub>s</sub>	1.1
21	G-G- $\text{m}^1\text{G}$ - $\Psi\text{p}$	0-1	0.72	0

(24)

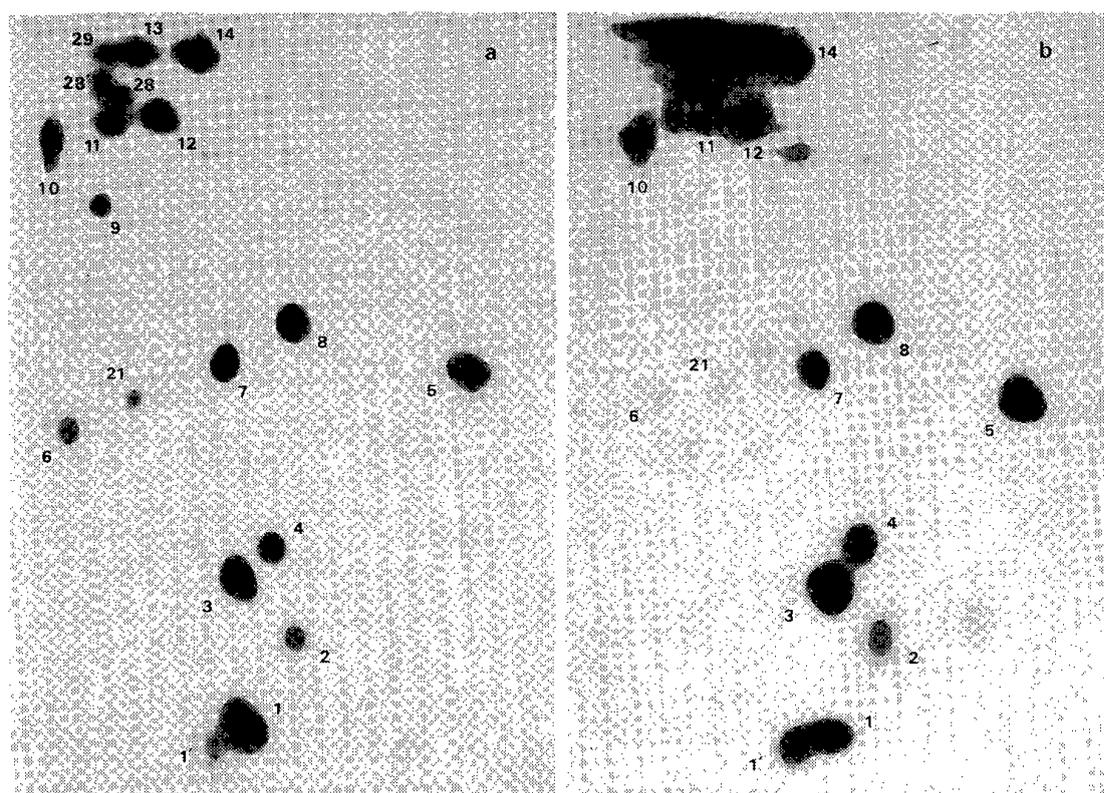


Fig. 3 Fingerprints of RNase T<sub>1</sub> digestion products of intact [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup> and 16 min-ozone-treated [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup>

Panels a and b depict autoradiograms of oligonucleotides derived from intact and treated [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup>, respectively. The numbers follow the numbering system used in Table 2.

Table 2 Oligonucleotides Produced by RNase T<sub>1</sub> Digestion of Intact [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup> and 16min-Ozone-Treated [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Pro</sup>

Spot No.	Sequence	Molar ratio		
		Theor.	Untreated	Treated
1+1'	Gp+G>p	9-11	7.8	3.6
2	C-Gp	1	0.97	0.94
3	A-Gp	3	3.0	3.2
4	A-C-Gp	1	0.93	1.0
5	C-C-C-C-A <sub>OH</sub>	1	0.98	0.87
6	pGp	1	0.82	0.22
7	C-Um-C-m <sup>2</sup> Gp	1	1.0	0.62
8	m <sup>7</sup> G-D-m <sup>5</sup> C-m <sup>5</sup> C-C-Gp	1	0.77	0.71
9	m <sup>1</sup> G-Ψ-Gp	0-1	0.40	0
10	U-U-m <sup>1</sup> Gp	1	1.2	0.88
11	D-A-U-Gp	1	1.0	0.23
12	U-C-Ψ-A-Gp	1	1.2	1.1
13	A-U-U-C-U-C-Gp	1	1.0	1.3
14	Ψ-Ψ-C-A-m <sup>1</sup> A-A-U-C-C-C-Gp	1	1.0	1.0
21	Ψ-Gp	1-0	0.48	0.12
28+28'	C-U*m-U-Ip+C-U*m-U-I>p	0-1	0.35	0.25
29	C-Ψ-U-N-Gp	1-0	0.36	0.38

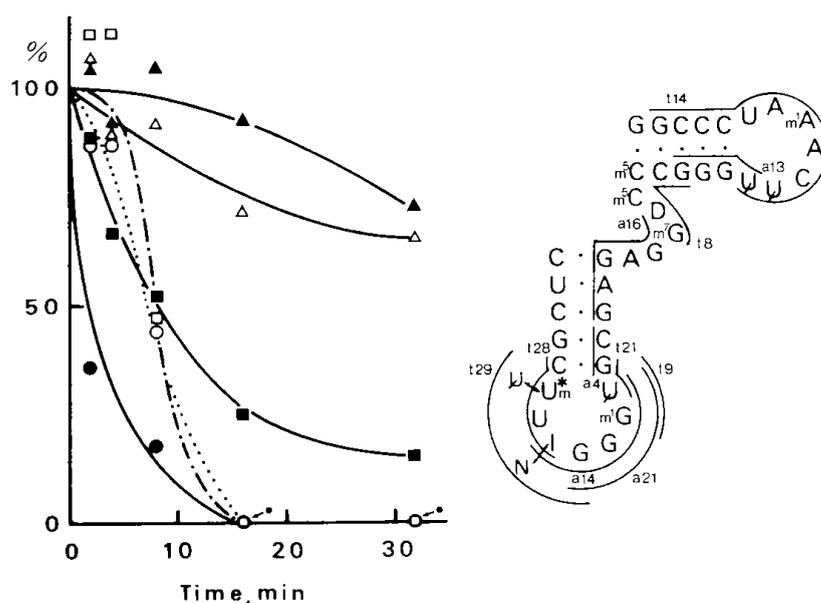


Fig.4 Degradation of anticodon and common regions of tRNA<sup>Pro</sup> with ozone

a and t before the fragment number mean that they are derived by RNase A and T<sub>1</sub> digestion, respectively.

●, a 21; ○, a 14; t 9; ■, t 21; △, t 28 + t 28'; ▲, t 8

しているように見えるこれらの結果は次のように考えると解釈できる。すなわち、36位 m<sup>1</sup>G がオゾン分解されたために RNase T<sub>1</sub> によって識別されず、36位 m<sup>1</sup>G と37位 Ψの間が切断されなかった。その結果、t-21(Ψ-Gp)フラグメントの生成量が減少したと考えられる。したがって t-9 消失の主要な原因は 36位 m<sup>1</sup>G であると判断された。それでは16分では36位 m<sup>1</sup>G の何%ぐらいが分解されているのであろうか。t-9 は未処理 tRNA<sup>Pro</sup> 1分子からは約 0.4分子生成するが、これが 100%消失したので元の tRNA<sup>Pro</sup> 1分子当り36位 m<sup>1</sup>G の分解個数は 0.4である。また t-21 は未処理 tRNA<sup>Pro</sup> からは約 0.5分子生成するが、分解率は16分で 75%なので、tRNA<sup>Pro</sup> 1分子当りの分解個数は 0.38である。36位 m<sup>1</sup>G の分解は t-9 と t-21 のそれぞれの生成に影響するので加成性が成り立つと考え、合せて 0.8個、すなわち約 80%の 36位 m<sup>1</sup>G が分解したと推定される。

フラグメント a-14 と a-21 も16分で 100%消失したが、それらには 2個の G と 1個の m<sup>1</sup>G が含まれている。このうち34位 G は t-29 にも含まれているが、t-29 は32分でもほとんど変化しなかった。t-29 の生成モル比は約 0.4なので、34位 G の少なく

とも 40%は変化していないことになる。また a-21 の減少は m<sup>1</sup>G を含む t-9 の減少よりもはるかに速かった。したがって a-14 と a-21 の消失は主に 35位 G の分解によると判断される。

t-28+t-28'のモル比は16分では約 25%減少した。このフラグメント中の C, U, I はオゾン分解速度の比較的遅いヌクレオシドなので<sup>\*3</sup>、オゾンは 31位 U<sup>m</sup> を分解していると推定される。また未処理 tRNA<sup>Pro</sup> から生ずる t-28+t-28'のモル比は 0.35なので31位 U<sup>m</sup> の分解率は約 10%と見積られる。

次に TΨC ループと可変ループについて考察する。ここでは t-8 が32分で約 22%減少したのみで、16分で分解しているフラグメントはほとんどなかった。t-8 には45位 m<sup>7</sup>G と50位 G が含まれているが、同じ45位 m<sup>7</sup>G を含む a-16 が32分でもほとんど変化しなかったので、50位 G が16分以後に主に分解されたと考えられる。52位 G は t-14 が32分でも変化しなかったので分解されてないと判断される。すなわち、もし52位 G が変化したならば a-4 のときと同じ理由によって 52位 G と 53位 Ψの間が切断されず、t-14 の生成が減少すると考えられるからである。なお 51位 G の分解の程度については、a-13 のスポットがオゾン処理によって生じた未知

\*3 第1章参照, また I(イノシン))については別途実験を行ったがオゾン分解速度は C と同程度であった。

(26)

のフラグメントのスポットと重なってしまったため不明である。

D ループについても同様の解析を行った(図 5)。a-15+a-15' は16分で消滅した。t-11 も16分でおおよそ 80%分解していた。これは18位 G の分解が 80%に達していることを意味する。t-12 の減少は緩慢であった。すなわち15位 G の分解は16分で 10%程度であり、結論として16~18位 G の分解の程度が大きいと判断された。この部分では G が 4 個連続しているため RNase T<sub>1</sub> による加水分解によって GMP モノマーを生ずる確率が高い。このため16~18位 G の分解は t-1+t-1' が16分で約 50%減少したことの主要な原因と思われる(表 2)。

5' 末端, 3' 末端では t-6 と a-12 の分解率がほぼ一致していた(表 1, 2)。したがって 5' 末端の G が16分で 70%分解していると結論される。a-7 の減少は16分で約 10%であった。これは 5 位 m<sup>2</sup>G の分解に起因すると考えられるが, t-7 の減少が16分で約 40%であることから 2 位 G が 30%は分解していると考えられる。3' 末端の 75 位 A<sub>OH</sub> を含む t-

5 もわずかながら減少していた。このフラグメントはオゾン分解速度の遅い C と A のみを含んでいるが, この部分は他と対を形成していない 1 本鎖であり, 三次構造でも外側に位置しているためにオゾンの攻撃を受けやすいのではないかと推定される。

以上に述べた解析結果から, オゾン処理16分における分解の様式と程度を図 7 にまとめて示した。

### 3.3 tRNA<sup>Ile</sup> のオゾン分解

未処理およびオゾン処理16分の [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Ile</sup> について, フラグメントの塩基配列と生成モル比を表 3 と表 4 に示す。また D ループ, 可変ループおよび TΨC ループ領域から派生するフラグメントの経時変化を図 6 に示す。図 6 と 図 4, 5 を比較すると, 全体的にみて tRNA<sup>Ile</sup> の分解が tRNA<sup>Pro</sup> に比べて遅いことが分る。オゾン処理16分で比べると, tRNA<sup>Pro</sup> ではすでにいくつかのフラグメントが 100%消失しているのに対し, tRNA<sup>Ile</sup> では減少速度の大きいフラグメントでも 40~70%の減少にとどまっている。

D ループでは 15 位 G を含む a-10' が 16 分で約 20%減少したので, 15 位 G は約 20%分解したとみなされる。一方, t-14 が 16 分で約 50%減少した。15 位 G の影響を考慮すると t-14 に含まれる 18 位 G の分解は 30~50%と見積られる。19 位 G の分解については本報の解析法では評価できない。しかし, 三次構造上の位置や 16 分での GMP モノマー(t-1) の減少の大きさを考え合せると, 19 位 G も 18 位 G と同程度分解しているものと推定される。また t-9 は 16 分で約 65%減少した。この原因としては 47 位 m<sup>7</sup>G または 50 位 G の分解が考えられる。もし 50 位 G の分解率が大きければ隣の t-2 の生成が妨害されるはずだが, t-2 は約 10%しか減少していない。したがって m<sup>7</sup>G の分解が主原因と考えられるが, t-9 の生成もまた 46 位 G の分解によって影響されるので分解率は割引いて考えねばならない。46 位 G が含まれる t-6 は約 45%分解していた。結局, 47 位 m<sup>7</sup>G の分解率は 20~65%と見積られる。

次に a-17 は 16 分で約 65%減少した。またこれと 52 位 G が重複している t-2 は 10%しか減少していない。したがって 53 位または 54 位 G がかなりの程度分解している可能性がある。しかし, 以下に述べるようなやや複雑な推論により 54 位 G の分解率は小さいと判断した。まず t-16 と 2 つの t-15(U-

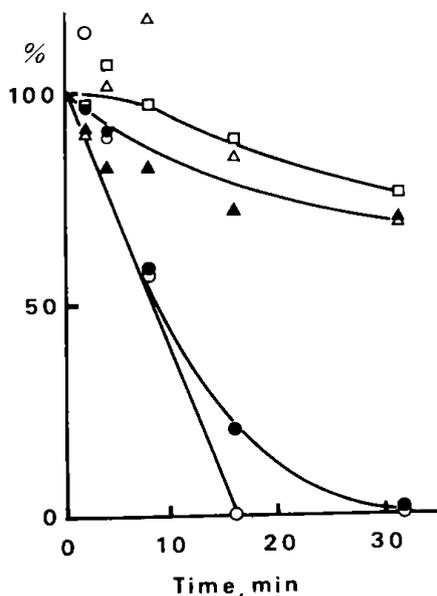
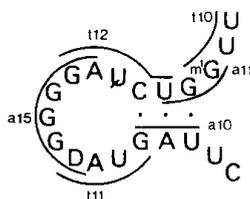


Fig. 5 Degradation of D-region of tRNA<sup>Pro</sup> with ozone

○, a 15 + a 15'; ●, t 11; △, a 11; ▲, t 10; □, t 12



**Table 3** Oligonucleotides Produced by RNase A Digestion of Intact [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>11e</sup> and 16 min-Ozone-Treated [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>11e</sup>

Spot No.	Sequence	Molar ratio		
		Theor.	Untreated	Treated
1	Cp, m <sup>5</sup> Cp	11	12.5	12.4
2	A-Cp	2	2.3	2.2
3	G-Cp	3	3.5	3.0
4	A-m <sup>2</sup> G-Cp	1	1.1	1.1
5	t <sup>6</sup> A-A-Cp	1	1.0	0.95
6	m <sup>2</sup> G-Ψp	1	0.68	0.35
8	G-m <sup>1</sup> A-Up	1	1.3	1.8
9	G-Up	1	1.3	1.4
10	I-A-Up	1	1.3	1.2
10'	A-G-Dp	1	1.2	0.96
11+11'	A-G-A-G-Cp+A-A-G-m <sup>7</sup> G-Dp +A-G-A-G-C>p+A-A-G-m <sup>7</sup> G-D>p	2	2.3	1.7
13	G-G-Up+G-G-Dp+G-G-Ψp	3	3.1	2.1
14	pG-G-Cp	1	0.84	0.81
15	G-G-G-Cp	1	0.58	0.51
17+17'	G-G-G-Tp+G-G-G-T>p	1	1.0	0.38

**Table 4** Oligonucleotides Produced by RNase T<sub>1</sub> Digestion of Intact [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>11e</sup> and 16 min-Ozone-Treated [<sup>32</sup>P]tRNA<sup>11e</sup>

Spot No.	Sequence	Molar ratio		
		Theor.	Untreated	Treated
1+1'	Gp+G>p	8	10.1	5.7
2	C-Gp	1	1.2	1.1
3	C-C-A-C-C-A <sub>OH</sub>	1	1.0	1.0
4	C-C-Gp	1	0.84	0.63
5	A-Gp	1	0.96	0.57
6	C-C-A-A-Gp	1	0.87	0.47
7	pGp	1	0.72	0.45
8	Ψ-Gp	1—0	1.1	1.1
9	m <sup>7</sup> G-D-m <sup>5</sup> C-Gp	1	0.89	0.31
10+10'	C-U- <i>I</i> p+C-U- <i>I</i> >p	1	1.1	1.2
11	U-A-C-Gp	1	0.82	0.63
12	m <sup>1</sup> A-U-C-C-C-C-Gp	1	0.99	0.81
13	C-U-C-A-Gp	1	0.93	0.76
14	D-D-Gp	1	1.0	0.49
15+16	U-U-A-m <sup>2</sup> Gp+D-D-A-Gp +T-Ψ-C-Gp	3	2.3	1.9
17	A-U-t <sup>6</sup> A-A-C-Gp	1	0.94	0.86
22	C-m <sup>2</sup> Gp	1—0	0.41	0
24+24'	C-m <sup>2</sup> G-Ψ-Gp+C-m <sup>2</sup> G-Ψ-G>p	0—1	1.0	0.53

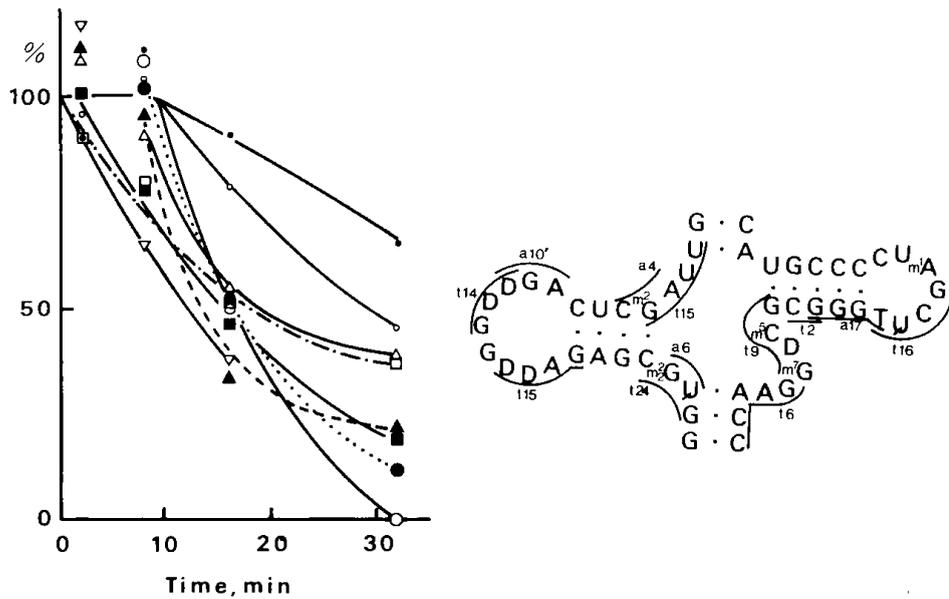


Fig. 6 Degradation of tRNA<sup>Ile</sup> with ozone

▽, a17; ○, a6; ●, t24 + t24'; ■, t14; ▲, t9; □, t7; △, t6; ○, a10'; ●, t2

U-A-m<sup>2</sup>Gp と D-D-A-Gp) はフィンガープリント上のスポットが重なってしまい、単独の放射活性を測ることができなかった。そして3つを合計した強度の減少率は16分で約20%であった。未処理 tRNA<sup>Ile</sup> のこれら3つのフラグメントの合計モル比は2.5なので、tRNA<sup>Ile</sup> 1分子当りにすると3つのフラグメント合計で50~60%減少していることになる。この中で U-U-A-m<sup>2</sup>Gp (t-15) については、塩基配列が一部重複している a-4 が変化しなかったため U-U-A-m<sup>2</sup>Gp も変化していないと考えられる。また D-D-A-Gp (t-15) はその生成が19位 G の分解により妨げられていると考えられるので、30~50%減少していると推定される。したがって50~60%の差、すなわち10~30%の減少は t-16 の減少によるとみなされる。そこで t-16 の減少の原因は58位 G の分解か、または54位 G の分解による t-16 生成の阻害のいずれかと考えることができる。しかし、t-12 が16分で約20%減少していたので、t-16 減少の原因はほとんど58位 G の分解に帰属することができる。その結果54位 G の分解率は小さいと判断された。なお a-8 は16分では放射活性が増加し解析には使用できなかったが、アニリン-酢酸溶液処理により58位 G で切断が生じたこと<sup>3)</sup>は、上記の解析結果を補強するものと考えられる。

5' 末端の解析を同様に行った。1位 G については t-7, a-14 の経時変化にバラツキが多かったが、得られたカーブから20~30%の分解と判断された。その他については詳細な検討は省略するが、5位および69位 G が20~30%、また27位および30位 G が30~50%分解していると推定された。70位および71位 G の変化は、これらを含む a-15 のスポットがオゾン処理生成物である未知のフラグメントのスポットと重なったために評価できなかった(表3)。しかし、前述のように t-1 の減少率がかなり大きいので、a-15 部分の G もある程度分解している可能性がある。

図8に tRNA<sup>Pro</sup> の場合と同様にオゾン処理16分の tRNA<sup>Ile</sup> の分解の様式と程度を示す。

#### 4 考 察

本研究の結果は図7, 8に要約される。これらの図を見てまず明らかなのは塩基対を形成していないループ領域の G の分解が著しいことである。特にアンチコドンループと D ループに3または4個連続した G を持つ tRNA<sup>Pro</sup> の場合に顕著である。ループ領域は図1bの三次構造から分るように外側に露出した部分であるため、オゾンと接触確率が高いことが考えられる。しかし、同じように外

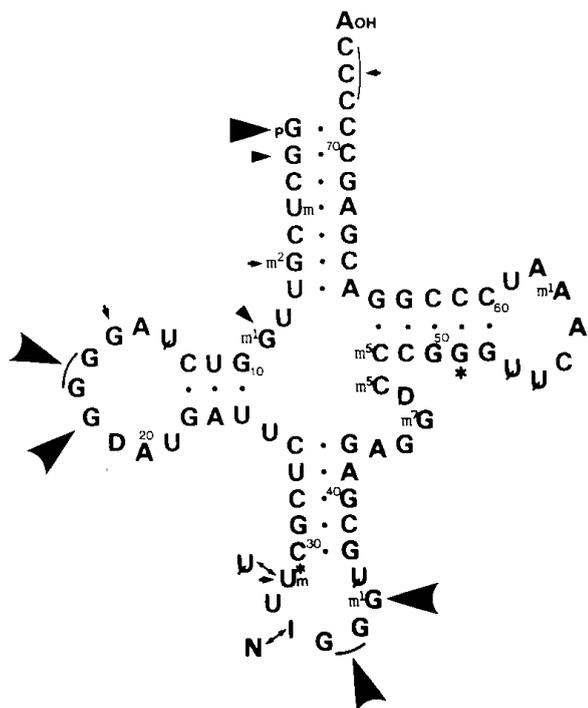


Fig. 7 The mode of degradation of mouse tRNA<sup>Pro</sup> with ozone

\* The change of this guanine moiety is unknown. The extent of degradation:  $\blacktriangleright$ , ~100%;  $\blacktriangleright$ , ~70%;  $\blacktriangleright$ , 20~30%;  $-$ , ca. 10%.

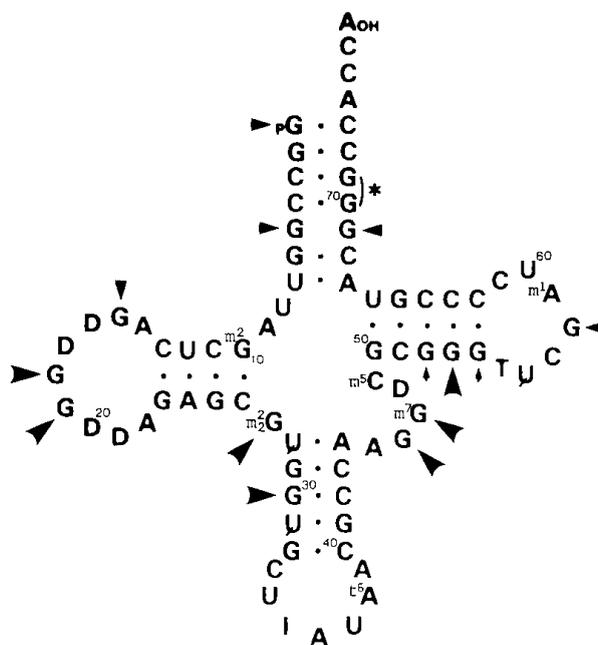


Fig. 8 The mode of degradation of mouse tRNA<sup>Ile</sup> with ozone

\* The changes of these guanine moieties are unknown. The extent of degradation:  $\blacktriangleright$ , ~60%;  $\blacktriangleright$ , 20~30%;  $-$ , ca. 10%.

側に露出している3'末端部(受容柄部)は、反応性の低いCとAのみから構成されているために分解率が小さかったと考えられる。

tRNA<sup>Ile</sup>の分解は全体的にみてtRNA<sup>Pro</sup>に比べて遅かった。その分解はループ領域のほかに、ステム領域にも及んでおり、同じ程度分解されているのが特徴的である。このことはコモンステム(tRNA<sup>Pro</sup>では50位付近、tRNA<sup>Ile</sup>では52位付近)の3個連続したGの分解を2種のtRNAについて比較すれば一層明白である。おそらく、tRNA<sup>Pro</sup>では溶液中に溶け込んできたオゾンの大部分がループ領域のグアニン残基と反応して消費されてしまうのに対して、tRNA<sup>Ile</sup>ではループ領域にGが少ないため、オゾンが内部まで浸透してゆき、ステム領域のグアニン残基とも反応するためと推察される。なお、これ程のGの分解があってもヌクレオチド鎖は切断されていなかった。これらの結果は第2章における不活性化機構の見解を補強し、支持するものである。

tRNA<sup>Pro</sup>とtRNA<sup>Ile</sup>に関する著者らのその後の

研究<sup>3)</sup>で、オゾン処理tRNAをアニリン-酢酸溶液で処理すると、強く修飾を受けているグアニン残基位置で鎖切断が生じることを確認した。この生成フラグメントをゲル電気泳動で分離してフィンガープリント法で分析することにより、オゾンの作用位置についてさらに明確な知見を得た。その結論は図7、8にまとめた本章の結果と基本的に同じであった。すなわち鎖切断の生じた位置はtRNA<sup>Pro</sup>ではアンチコドンおよびDループの3または4個連続したGの所であり、これらの分解が著しいことが判明した。なおアンチコドンループの方がDループより切断が早かった。一方、tRNA<sup>Ile</sup>のアニリン-酢酸処理による反応はtRNA<sup>Pro</sup>に比べて遅く、切断したGの位置もランダムであったが、このことは図8に見られるようにオゾンによる損傷の程度が低いことと一致している。

## 5 結 論

オゾンのtRNAに対する主要な作用位置はループ領域のグアニン残基であり、またそれらがかなり

(30)

分解されていても鎖切断は生じていないことが判明した。ループ領域は高次構造で外側に露出した部分であり、オゾンとの反応確率が高いことが推定される。またループ領域のグアニン残基のなかでも、3または4個連続しているような配列が最もオゾンの攻撃を受けやすいことが判明した。

#### 引用文献

- 1) N. Shinriki, K. Ishizaki, A. Ikehata, K. Miura, T. Ueda, N. Kato, F. Harada, *Nucleic Acids Research, Symposium Series*, No. 10, 211 (1981).
- 2) N. Shinriki, K. Ishizaki, K. Miura, T. Ueda, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3601 (1983).
- 3) K. Miura, T. Ueda, N. Shinriki, K. Ishizaki, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 651 (1984).
- 4) 横山茂之, 宮澤辰雄, “核酸の化学と分子生物学”, 日本化学会編, 化学総説 No. 46, 学会出版センター, 東京, 1985, pp. 185-186.
- 5) J. D. Watson, 三浦謹一郎他訳, “遺伝子の分子生物学(上)”第3版, 化学同人, 京都, 1977, pp. 352-355.
- 6) R. W. Schevitz, A. D. Podjarny, N. Krishnamachari, J. J. Hughes, P. B. Sigler, J. L. Sussman, *Nature*, **278**, 188 (1979).
- 7) “Procedures in Nucleic Acid Research”, Vol. 2, ed. by G. L. Cantoni and D. R. Davies, Harper & Row, New York, 1971, pp. 643-664.
- 8) F. Harada, G. G. Peters, J. E. Dahlberg, *J. Biol. Chem.*, **254**, 10979 (1979).
- 9) F. Sanger, G. G. Brownlee, B. G. Barrell, *J. Mol. Biol.*, **13**, 373 (1965).
- 10) 日本化学会編, “新実験化学講座 20, 生物化学II”, 丸善, 東京, 1978, pp. 809-818.
- 11) T. Ikemura, J. E. Dahlberg, *J. Biol. Chem.*, **248**, 5024 (1973).

# 第4章

## デオキシリボヌクレオチドのオゾン反応速度と その反応様式<sup>1)</sup>

### 1 緒言

第1章から第3章にかけてはRNAのオゾン反応性について検討したが、本章から第6章まではDNAのオゾン反応性について述べる。本章においてはまずDNA構成成分であるデオキシリボヌクレオチドのオゾン分解反応について検討した。

デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドの違いはいうまでもなく糖部分の2'位の水酸基の有無である。この水酸基の有無がしばしば2種のヌクレオチド、ひいてはDNAとRNAの化学的あるいは生化学的反応性の差を引き起こす<sup>2)</sup>。例えば一般にデオキシリボヌクレオチドの塩基-糖間の結合は酸加水解に対してリボヌクレオチドのそれより不安定である。逆に、DNAの3'→5'ヌクレオチド結合はRNAのそれよりもアルカリ加水分解に対してはるかに安定である。一方、グアノシンとデオキシグアノシンの過硫酸イオンによる酸化では反応速度、生成物ともに大きな差はないことが報告されている<sup>3)</sup>。本章の目的の第一番はデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドではオゾン反応性が異なるか否かを確かめることである。具体的には、第1章で4種のリボヌクレオチドの分解過程を明らかにしたが、デオキシリボヌクレオチドも同様の過程で分解するか否かを検討した。

目的の2番目はヌクレオチドに対するオゾンの作用機構をより明確にすることである。Brinkmanら<sup>4)</sup>はヒト血液中のオキシヘモグロビンに対するオゾンの作用が紫外線やX線の作用と類似であることから、オゾン放射線類似(radiomimetic)物質とみなした。それ以来、生体物質に対するオゾンの反応が放射線と同じラジカル反応機構であると結論づける研究が多い<sup>5)</sup>。核酸とオゾンの反応についてもすでに言及したように、ヌクレオチド鎖の切断が生ずることから放射線類似の反応機構とする考え方が強い。しかし、前章までの著者らの研究結果はこれに対して否定的であり、グアニン残基に対するオゾンの直接反応(イオン反応)が支配

的であると考えている。本章ではこの点を更に詳しく検討した。

第3番目の目的はデオキシリボヌクレオチドとオゾンの水溶液中における反応速度を知ることである。これまでの研究ではガス吸収法によりオゾン処理し、ヌクレオチドの変化を測定した。この方法では反応速度の大小関係は知ることができるが、溶液中における反応速度の大きさを知ることができない。これは気相から溶液中へのオゾンの拡散速度の影響が大きいためである。RNAとオゾンの反応においてそのグアニン残基と他の残基との分解速度の差は(第2章参照)、第1章に示した各リボヌクレオチドの分解速度の差から考えられるよりもはるかに大きかった。おそらく溶液中の反応速度の差が反映されているのであろう。したがって、溶液内均一反応速度を知ることにより核酸とオゾンの反応をより定量的に把握できると考えられる。以上の3点を主な目的として本研究を行った。

### 2 実験

#### 2.1 試薬

デオキシリボヌクレオチド5'-リン酸はSigma Chemical社製を使用した。他の試薬は市販特級品を使用した。

#### 2.2 オゾン処理

デオキシリボヌクレオチドのオゾン分解過程の検討は第1章2.2で述べたのと同じ装置を用い、同じ実験条件で行った。すなわち初濃度1mMのヌクレオチド水溶液(0.05M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH緩衝液, pH 7.8) 200 mlに、オゾン濃度2±0.1 ml/lのオゾン-酸素混合気流を流速330 ml/minで注入した。反応は室温(ca. 22°C)で行った。

#### 2.3 反応の化学量論比の測定

初濃度1mMのヌクレオチド水溶液(40mM リン酸塩緩衝液, pH 6.9) 100 mlに2.2と同条件で

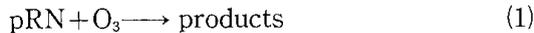
(32)

オゾン-酸素混合気流を注入した。反応前後のヌクレオチド濃度および注入オゾン濃度と出口オゾン濃度からヌクレオチドとオゾンの物質収支を計算し、化学量論比を求めた。注入オゾン濃度は2.2と同様にUV吸収方式のオゾン濃度計で測定した。出口オゾン濃度は出口ガスを3%ヨウ化カリウム溶液に吸収させ、遊離ヨウ素をチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する方法<sup>6)</sup>により求めた。

#### 2.4 反応速度の測定

ピリミジンヌクレオチドとオゾンの中性水溶液中における反応速度はストップフロー分光光度計(ユニオン技研 RA-1200型)を用いて測定した。通常このような測定では1つの反応成分を大過剰にする擬一次反応条件が用いられるが、本実験ではそれが適用できなかつた。その理由はヌクレオチド、オゾンともに260 nm付近に吸収ピークを持ち、吸収スペクトルの重なりが大きいためである。そこで、ヌクレオチド濃度をオゾン濃度よりも小過剰にして反応させ、データは二次反応速度式によって解析した。解析法は以下のとおりである。

ヌクレオチド(pRN)とオゾンが(1)式に従う等モル反応で進行するとき、二次反応速度式は(2)式のように表される。



$$\frac{1}{[\text{pRN}]_0 - [\text{O}_3]_0} \ln \frac{[\text{O}_3]_0 [\text{pRN}]_0}{[\text{pRN}]_0 [\text{O}_3]} = kt \quad (2)$$

ここでkは二次反応速度定数である。光路長1 cmの吸収セルを用いて吸光度変化を測定したが、そのとき吸光度Aは(3)式で表される。

$$A = \epsilon_{\text{pRN}} [\text{pRN}] + \epsilon_{\text{O}_3} [\text{O}_3] \quad (3)$$

ここで $\epsilon_{\text{pRN}}$ および $\epsilon_{\text{O}_3}$ はそれぞれヌクレオチドおよびオゾンの測定波長におけるモル吸光係数である。次に反応の化学量論比から(4)式が得られる。

$$[\text{pRN}]_0 - [\text{pRN}] = [\text{O}_3]_0 - [\text{O}_3] \quad (4)$$

(3)および(4)式を(2)式に代入して整理すると(5)式が得られる。

$$\ln \frac{A + \epsilon_{\text{O}_3} C_0}{A - \epsilon_{\text{pRN}} C_0} = C_0 kt + \ln \frac{[\text{pRN}]_0}{[\text{O}_3]_0} \quad (5)$$

ここで $C_0 = [\text{pRN}]_0 - [\text{O}_3]_0$ である。吸光度の時間

変化を(5)式で整理してグラフ化し、直線の勾配から速度定数kを求めた。

ストップフロー法ではそれぞれの反応成分を含んだ2つの溶液を急速混合することにより反応を開始させる。本実験では一方はヌクレオチド溶液で、80 mMリン酸塩緩衝液でpH 6.9に調整した。他の一方はオゾン溶解水である。オゾン溶解水は氷水中で冷却した水にオゾン-酸素混合気流を注入してオゾンを飽和させて調製した。反応は $15 \pm 1^\circ \text{C}$ で行った。吸光度変化はヌクレオチドの吸収極大波長( $\lambda_{\text{max}}$ )で測定した。 $\lambda_{\text{max}}$ における $\epsilon_{\text{pRN}}$ の値は文献値<sup>7)</sup>を用いた。 $\epsilon_{\text{O}_3}$ の値はHoignéら<sup>8)</sup>が報告している方法とほぼ同様の方法で測定した。この方法により求めたオゾンの260 nmにおける $\epsilon_{\text{O}_3}$ は $2930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であったが、この値は文献値<sup>8),9)</sup>とほとんど一致している。オゾン溶解水中のオゾン濃度は反応開始の直前に吸光光度法(260 nm)により測定した。

#### 2.5 相対反応速度の測定

4つのヌクレオチドとオゾンの反応の相対速度は競争反応法によって測定した。2つのヌクレオチドを含む溶液にオゾンを加えて競争反応を行わせるとき、相対反応速度定数、 $k_{\text{rel}}$ は(6)式で表される<sup>10)</sup>。

$$k_{\text{rel}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{\log [\text{pRN}_2]_0 / [\text{pRN}_2]}{\log [\text{pRN}_1]_0 / [\text{pRN}_1]} \quad (6)$$

ここで $k_1$ と $k_2$ はそれぞれヌクレオチド1およびヌクレオチド2のオゾンとの二次反応速度定数である。(6)式はオゾンとそれぞれのヌクレオチドとの反応が他方に影響されない二次反応であること、および他の副次的な反応が無いという仮定のもとに成り立っている。実験方法は基本的にはWilliamsonら<sup>10)</sup>の方法と同じである。すなわち、2つのヌクレオチドを含む溶液5 mlを試験管に入れ、これにオゾン溶解水2 mlを加えて混合した。反応前後における各ヌクレオチドの濃度を測り、(6)式から $k_{\text{rel}}$ を求めた。混合溶液中の各ヌクレオチドおよびオゾンの初濃度はそれぞれ0.2~0.3 mMおよび0.15~0.25 mMであった。2つのヌクレオチド初濃度の合計は常にオゾン初濃度より大きくなるようにした。 $k_{\text{rel}}$ はpH 2.5~12の間で測定した。pHはヌクレオチド溶液に緩衝溶液を加えて調製した。緩衝溶液はリン酸、リン酸二水素ナトリウム、

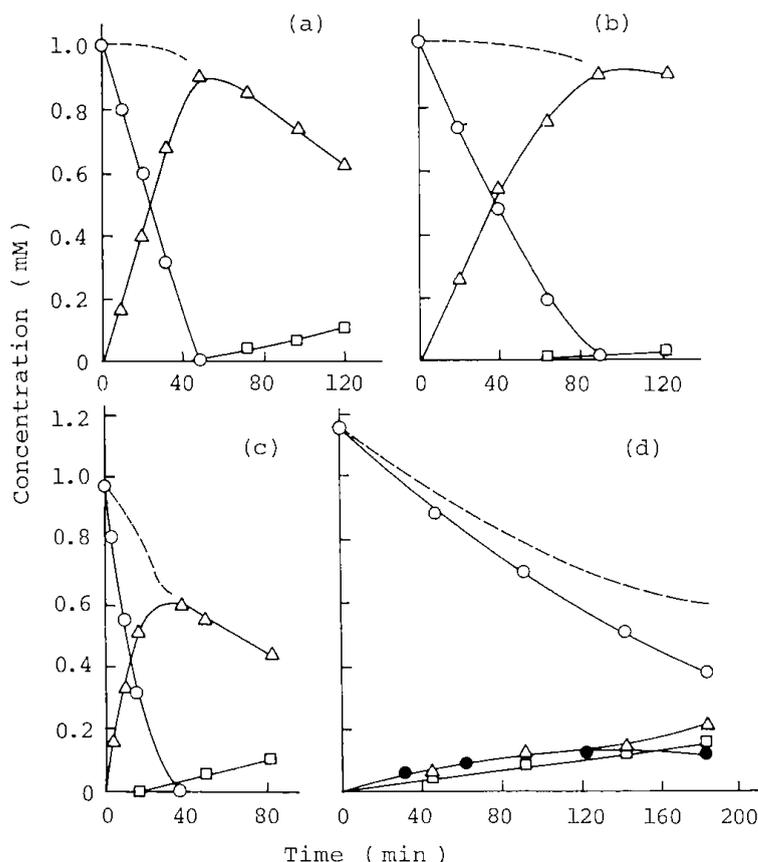


Fig. 1 Degradation of dTMP (a), dCMP (b), dGMP (c), and dAMP (d) with ozone at pH 7.8

○—○, residual nucleotide (pRN); △—△, deoxyribose moiety except for that included in residual nucleotide (pRN); -----, total sugar (pRN + pRN); ●—●, free adenine; □—□, free phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)

リン酸水素二ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを種々の割合で混合して調整した(ヌクレオチド溶液中のリン酸塩濃度: 40 mM)。反応はすべて 15 ± 0.5°C で行った。

## 2.6 分析方法

デオキシリボヌクレオチドはPNH<sub>2</sub>-10カラム(4 mmφ × 25 cm, 島津製)を用いる高速液体クロマトグラフ法(日立635型使用)により定量した。デオキシリボースはジフェニルアミン-酢酸法<sup>11)</sup>により定量した。リン酸イオンの定量方法は第1章2.3に述べた方法と同じである。

## 3 結果

### 3.1 デオキシリボヌクレオチドの分解過程

2'-デオキシシチジン5'-リン酸(dCMP), 2'-デオキシチミジン5'-リン酸(dTMP), 2'-デオキ

シグアノシン5'-リン酸(dGMP)および2'-デオキシアデノシン5'-リン酸(dAMP)のオゾン分解パターンを図1に示す。この図と第1章図6を比較してみると, dCMP, dGMP および dAMP の分解パターンはそれぞれ CMP, GMP, AMP の分解パターンと類似していることがわかる。さらに dTMP の分解パターンは UMP のそれと類似している。ただし, 分解速度は dTMP の方がかなり速かった。また dAMP の分解速度は AMP のそれに比べて遅かった(dAMP の半減期は AMP の半減期より約 40%長い)。

これらの結果からデオキシリボヌクレオチドもリボヌクレオチドの場合に示したと同様の過程でオゾン分解すると考えられる。すなわち dCMP, dTMP, dGMP では塩基部分がまず分解され, 次いで糖部分の分解やリン酸基の脱離が生ずる。一方, dAMP では糖部分の分解の方が塩基部分より

(34)

速い。また N-グリコシド結合が切れてアデニンが遊離する。

### 3.2 反応の化学量論比

化学量論比の測定結果をまとめて図2に示す。dCMP, dTMP および dGMP では反応率 20~80% の広範囲にわたって化学量論比( $\Delta$ nucleotide/ $\Delta$ ozone)が1に近い値をとっており、反応がほぼ等モル反応で定量的に進んでいることを示している。これに対して dAMP では化学量論比は0.5~0.4であり、複雑な反応機構であることを示唆している。

### 3.3 二次反応速度定数

ストップフロー分光光度法による反応速度の測定は dCMP と dTMP についてのみ行った。これは dAMP と dGMP では反応生成物に基づく吸光度が測定波長においてかなり大きく、精度の高

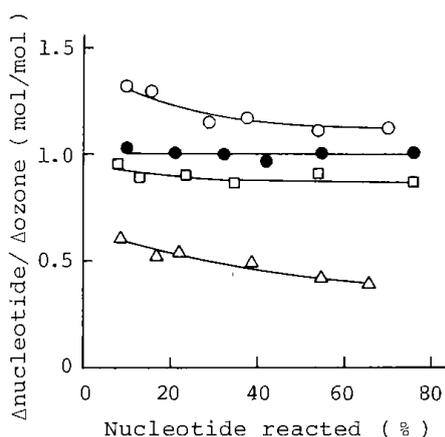


Fig. 2 Observed stoichiometries of the nucleotide-ozone reactions at pH 6.9

□—□, dCMP; ●—●, dTMP;  
○—○, dGMP; △—△, dAMP

い測定が不可能であったためである。一方, dCMP と dTMP では反応生成物による妨害が無かった。

実験結果の1例として図3に dTMP とオゾンの反応における吸光度変化と、(5)式で整理した二次反応式プロットを示す。反応開始後1秒以内では二次反応式プロットは良い直線性を示している。反応開始後1秒でオゾン濃度は初期値の約1/3に減少しているので、全反応過程の60~70%は(5)式が適用できたことになる。dCMP の反応も二次反応式プロットが同様に良い直線性を示した。直線の勾配から求めた二次反応速度定数の値を表1にまとめた。いずれも2~3回の測定の平均値である。比較のためにチミンおよびシトシンとオゾンの反応速度を同様に測定した。その結果も合わせて表1に示す。

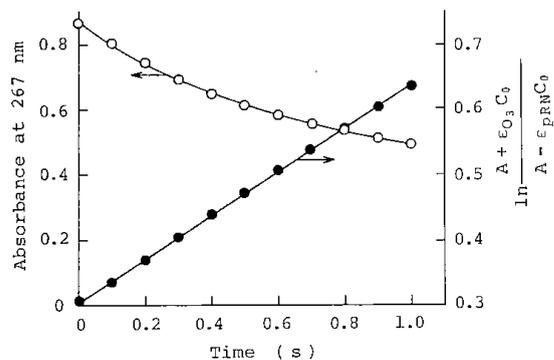


Fig. 3 Change in absorbance (○) and second-order plot (●) of dTMP-ozone reaction at pH 6.9 and 15°C

$[dTMP]_0 = 0.080 \text{ mM}$ ;  $[O_3]_0 = 0.059 \text{ mM}$

Table 1. Second-Order Rate Constants of the Reactions of Ozone with Deoxyribonucleotides and Nucleobases

Compound	$k$ $M^{-1}s^{-1}$
dTMP	$1.6 \times 10^4$
dCMP	$1.4 \times 10^3$
Thymine	$2.3 \times 10^4$
Cytosine	$0.93 \times 10^3$

pH, 6.9; temp.,  $15 \pm 1^\circ C$ ;  $[nucleotide]_0 = 0.06 - 0.10 \text{ mM}$ ;  $[base]_0 = 0.06 - 0.10 \text{ mM}$ ;  $[O_3]_0 = 0.05 - 0.07 \text{ mM}$

### 3.4 相対反応速度

相対反応速度  $k_{rel}$  の測定には2つの目的がある。一つにはストップフロー法で測定できなかった dAMP および dGMP のオゾン反応速度のおよその値を知ることである。他の一つは  $k_{rel}$  の pH 依存性およびそれに対するラジカル捕捉剤の効果を測定することにより、ラジカル反応の寄与の程度を知るためである<sup>8),12)</sup>。図4には3組のヌクレオチドペアについて  $k_{rel}$  の pH 依存性を示す。(6)式からわかるように  $k_{rel}$  の測定は  $k_{rel}$  が1前後の値をとるとき最も精度が良い。したがって図4の  $k_{rel}$  が0.1以下の測定値にはかなりの誤差(～30%)を伴っている。

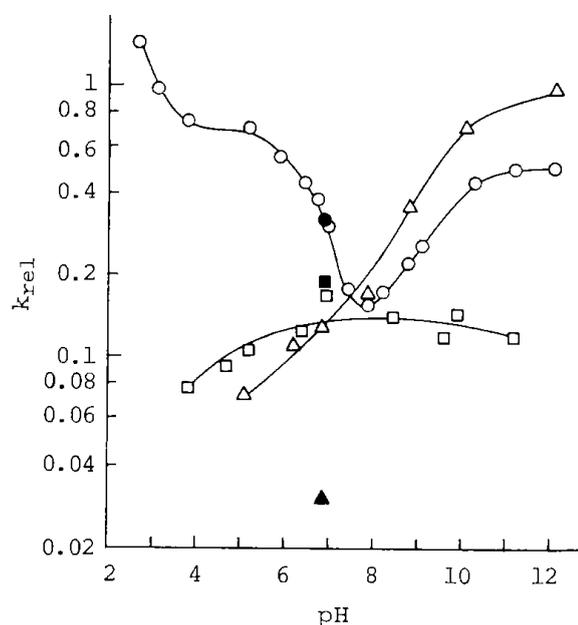


Fig. 4 Variations of relative rate constants,  $k_{rel}$ , with pH at 15 °C

○—○, dTMP/dGMP; ●, dTMP/dGMP with 100 mM *tert*-butanol;  
□—□, dCMP/dTMP; ■, dCMP/dTMP with 100 mM *tert*-butanol; △—△, dAMP/dCMP; ▲, dAMP/dCMP with 100 mM *tert*-butanol

さて、dTMP/dGMP の pH 6.9 における  $k_{rel}$  値 0.31 と dTMP の速度定数から dGMP のおよその速度定数が推定できる。dTMP の速度定数は表1に示してあるので、これを用いると dGMP の pH 6.9, 15°C における速度定数として  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  が得られる。同様に dAMP/dCMP の  $k_{rel}$  と dCMP の速度定数から dAMP の速度定数として  $2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  が得られる。また、dCMP/dTMP の  $k_{rel}$

を表1の速度定数から計算すると0.09になるが、図4の pH 6.9 における値は0.12である。全く独立した測定法から得られた  $k_{rel}$  のこの2つの値はかなり良く一致しているといえる。したがって、上に述べた dGMP と dAMP の速度定数も概算値としては使用できる値と思われる。

次に、ラジカル捕捉剤として *tert*-ブタノールを反応系に添加して  $k_{rel}$  に与える影響を調べた(図4)。pH 6.9 において3組のヌクレオチドペアの系に 100 mM の *tert*-ブタノールを添加したが、dTMP/dGMP と dCMP/dTMP 系では  $k_{rel}$  はほとんど変わらなかった。一方、dAMP/dCMP 系では  $k_{rel}$  は大幅に減少した。これはラジカル捕捉剤の添加によって dAMP の反応速度が低下したためと考えられる。

## 4 考 察

dCMP と dGMP のオゾン分解過程はそれぞれ CMP および GMP と類似していた。また dTMP の分解過程は速度は異なるが UMP のそれに類似していた。すなわち、dCMP, dGMP, dTMP においてはオゾンはまず最初に塩基部分を攻撃するために、糖部分がリボースからデオキシリボースに変わってもほとんど影響がないことを意味している。dAMP では AMP と同様に糖の方が速く分解されるが、dAMP の分解速度が AMP のそれよりもかなり遅くなったのは糖部分の違いが影響していると考えられる。

中性水溶液中のオゾン反応速度を dCMP と dTMP についてはストップフロー法で測定し、dAMP と dGMP については競争反応法により概算した。各ヌクレオチドの速度定数を比較すると、ガス吸収法による各ヌクレオチドの分解速度(図1)の差から予測されるよりはるかに大きな反応速度の差があることがわかる。例えば dAMP および dCMP の反応速度は dGMP の反応速度のそれぞれ 1/200以下、および1/20以下である。また dCMP と dTMP の速度定数はそれぞれシトシンとチミンの速度定数と近似していた(表1)。このことはこれらのヌクレオチドにおけるオゾン反応の位置が塩基部分であることの傍証であるとともに、対応するリボヌクレオチドの速度定数も同程度であることを示唆する。GMP およびグアニンの速度定数も dGMP のそれと大差ないものと推定される。RNA のオゾン分解において、反応の初期にはほとんど

(36)

選択的といってもよい程 GMP の分解が速かったが、このことは GMP と他のリボヌクレオチドの反応速度の大きな差を考えると理解できる。オゾンと各種有機化合物の水溶液中における反応速度データが最近多数報告されているが<sup>13),14)</sup>、核酸関連物質については本研究のデータが最初である。

水溶液におけるオゾン反応はオゾン分子が直接関与する反応と、オゾンの自己分解によって生じるヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )を主とするラジカル関与の反応の、2種類の反応から成り立っているとみなされる<sup>12),15)</sup>。オゾンからの $\cdot\text{OH}$ ラジカルの生成は $\text{OH}^-$ イオンによって促進される。Hoignéら<sup>9)</sup>はある2つの有機化合物のオゾン反応の相対反応速度が pH の増加とともに1に近い値をとることを多くの系において見出した。これは、pH が増加するにつれて基質特異性の小さい $\cdot\text{OH}$ ラジカル関与の反応が支配的になるためと解釈されている。

本章においても Hoigné らと同様の手法で  $k_{\text{rel}}$  の pH 依存性を測定した。dTMP/dGMP および dCMP/dTMP 系の  $k_{\text{rel}}$ -pH 曲線は Hoigné らが示したラジカル反応を含む系の  $k_{\text{rel}}$ -pH 曲線の形とは異なっている。それに対して dAMP/dCMP の曲線はラジカル反応を含む系の曲線に類似している。また dAMP/dCMP 系ではラジカル捕捉剤の効果が大きかったのに対して、他の2つの系では効果がほとんどなかった。さらに反応の化学量論比は dCMP, dTMP および dGMP では等モル反応と考えてもよい値を示したが、dAMP では等モルからは大きく離れた値をとった。これらの結果を総合すると dCMP, dTMP および dGMP とオゾンの反応ではラジカル反応の寄与はほとんどなく、オゾン分子が塩基部分とかなり定量的に反応すると判断される。塩基部分における反応位置は第1章で述べたようにシトシンとチミンでは5,6位の二重結合、グアニンでは4,5位の二重結合と推定される。一方、dAMP ではラジカル反応の寄与が大きいと判断される。dAMP では糖部分が主に分解されるとみなされるが、糖部分にはオゾン分子が直接反応しやすい二重結合や求核性原子<sup>16)</sup>がないので、ラジカル反応が支配的になると考えられる。これらのことは対応するリボヌクレオチドの場合にも同様に当てはまると考えられる。

以上の検討結果から、オゾンが DNA や RNA に作用するときには反応速度の大きいグアニンまたはチミン残基とまず反応するために、ラジカル反

応の寄与の程度は非常に小さいものと考えられる。したがって、ラジカル反応が関与すると考えられるヌクレオチド鎖切断は、少なくとも反応の初期にはほとんど生じないものと推定される。この点は RNA についてはすでに確認されたが、DNA については次章以降で検討する。

## 5 結 論

本研究の結論を緒言で述べた目的に沿ってまとめると次のようになる。

- (1) デオキシリボヌクレオチドの分解過程は対応するリボヌクレオチドの分解過程と類似している。
- (2) dCMP, dTMP および dGMP では塩基部分に対するオゾン分子の直接反応(イオン反応)が支配的であり、一方、dAMP では $\cdot\text{OH}$ ラジカルによる糖部分の分解が支配的である。
- (3) デオキシリボヌクレオチドの中性水溶液中のオゾン反応速度を測定し、または概算値を推定した。dGMP と dAMP では200倍以上の反応速度の差があることが分った。

## 引 用 文 献

- 1) K. Ishizaki, N. Shinriki, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3601 (1984).
- 2) 池原森男, 上田 亨, 大塚栄子, “核酸有機化学”, 化学同人, 京都, 1979, pp. 217-223.
- 3) R. C. Moschel, E. J. Behrman, *J. Org. Chem.*, **39**, 2699 (1974).
- 4) R. Brinkman, H. B. Lamberts, *Nature*, **181**, 1202 (1958).
- 5) D. B. Menzel, *Annual Rev. Pharmacol.*, **10**, 379 (1970).
- 6) APHA-AWWA-WPCF, “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, 14th Ed., American Public Health Association, Washington, D. C., 1976, pp. 455-457.
- 7) 日本生化学会編, “生化学データブック(I)”, 東京化学同人, 東京, 1979, pp. 1032-1034.
- 8) J. Hoigné, H. Bader, *Water Res.*, **10**, 377 (1976).
- 9) M. L. Kilpatrick, C. C. Herrick, M. Kilpatrick, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1784 (1956).
- 10) D. G. Williamson, R. J. Cvetanović, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3668 (1968).
- 11) 福井作蔵, “還元糖の定量法”, 学会出版センター, 東京, 1969, pp. 99-100.

- 12) J. Hoigné, H. Bader, *Science*, **190**, 782 (1975).
- 13) J. Hoigné, H. Bader, *Water Res.*, **17**, 173 (1983).
- 14) J. Hoigné, H. Bader, *Water Res.*, **17**, 185 (1983).
- 15) J. H. Espenson, H. Taube, *Inorg. Chem.*, **4**, 704 (1965).
- 16) P. S. Bailey, *Chem. Review*, **58**, 925 (1958).

# 第5章

## 仔ウシ胸腺DNA二重らせん構造のオゾン処理による不安定化<sup>1,2)</sup>

### 1 緒 言

DNAはデオキシリボヌクレオチドがホスホジエステル結合でつながった鎖状高分子である。DNAは通常二重らせん構造をもっており、その2本鎖がアデニン(A)に対してはチミン(T)、グアニン(G)に対してはシトシン(C)という特異的塩基対によって結びつけられている。さらに、生体細胞やウイルスのDNAは二重らせん全体がさらによじれた超らせん構造(スーパーコイル)を形成している<sup>3)</sup>。したがって、DNAは通常1本鎖であるRNAとは異なった三次構造をもっているといえる。また、第4章でも述べたように、その化学的性質もRNAとは異なる場合が多い。DNAのオゾン分解に関するこれまでの研究については、第1, 2章および4章の緒言で言及したが、その多くはオゾンによりDNA鎖の切断が生ずることを報告している。しかし、前章までに述べた著者らの研究結果は、DNAにおいても鎖切断に先立ってグアニンまたはチミン残基の破壊が起こることを示唆している。

本章においては仔ウシ胸腺DNAを用いてDNAに対するオゾンの作用を検討した。すなわち、RNAの場合と同様にDNA鎖上の4つのヌクレオチドの分解速度を比較し、また鎖切断の有無を検討した。さらに、酵素による加水分解速度と二重らせん融解温度の変化を調べ、DNA二重らせん構造に及ぼすオゾンの影響を検討した。

### 2 実 験

#### 2.1 試料と試薬

仔ウシ胸腺DNAはMiles-Seravac社製のものを使用した。ヌクレアーゼP<sub>1</sub>、およびヌクレアーゼS<sub>1</sub>はそれぞれヤマサ醤油、および生化学工業製のものを使用した。ショ糖はSchwarz Mann社より購入した。他の試薬は市販特級品を使用した。

#### 2.2 オゾン処理

オゾン処理に使用した装置は第1章第1図のも

のと反応容器を除いては同じである。反応容器には中型試験管を用い、これにDNA溶液20mlを入れ、オゾン-酸素混合気流をガラス製ボールフィルターを通して注入した。注入ガス中のオゾン濃度は $0.1 \pm 0.01$  mg/l、ガス流速は70 ml/minである。仔ウシ胸腺DNAは0.15 M NaCl-40 mM リン酸塩緩衝液(pH 6.9)に溶解し、濃度は0.54 mg/lである。

#### 2.3 分 析

##### 2.3.1 加水分解とヌクレオチドの定量

オゾン処理DNAおよび未処理DNAはヌクレアーゼP<sub>1</sub>またはヌクレアーゼS<sub>1</sub>で加水分解し、生成した5'-モノヌクレオチドを高速液体クロマトグラフ(HPLC)法で264 nmで定量した(装置: 日立635型)。分離カラムは陰イオン交換カラムPNH<sub>2</sub>-10(4 mmφ×25 cm, 島津製)を使用し、カラム温度は40°Cとした。溶離液としては0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 3.5)を用い、流速は1 ml/minである。

ヌクレアーゼP<sub>1</sub>による1本鎖DNA、2本鎖DNAあるいはオゾン処理したものの完全加水分解はDNAと酵素の重量比(DNA/ヌクレアーゼP<sub>1</sub>)が40以下、pH 5.5(20 mM リン酸塩緩衝液)、50°Cで60分保温の条件で行った。一方、ヌクレアーゼP<sub>1</sub>による加水分解速度の測定にはDNAと酵素の重量比が54、pH 5.5、37°C保温の条件下で行った。この条件では未処理2本鎖DNAおよび熱変性1本鎖DNAの加水分解速度は、ヌクレアーゼP<sub>1</sub> 1 mgあたりそれぞれ0.045および1.27 μmol・mg<sup>-1</sup>・min<sup>-1</sup>であった。

ヌクレアーゼS<sub>1</sub>による加水分解は文献<sup>4)</sup>記載の条件で行った。すなわち、3600 U(酵素活性単位)のヌクレアーゼS<sub>1</sub>、0.12 mM Zn<sup>2+</sup>、210 mM NaClを含む溶液200 μlをオゾン処理DNA溶液200 μlと混合した(混合液のpH 4.5)。次にこの混合溶液を45°Cで90分間保温した。この条件では熱変性DNAは約70%しか加水分解しなかった。しかし、200 μl溶液中の熱変性DNA量が0.010~0.108

mg の範囲では、DNA 量と加水分解生成物であるモノヌクレオチド量との間には良い比例関係が成り立ったのでこれを検量線として用いた。なお、熱変性 DNA は DNA を 95°C で 15 分間熱処理し、その後、直ちに氷水中で冷却して調製した。

### 2.3.2 マロンジアルデヒドの定量と融解温度の測定

DNA のオゾン処理によって生成するマロンジアルデヒドはチオバルビツール酸法<sup>9)</sup>によって定量した。蛍光分光光度計は日立 650-10S 型を使用した。

DNA の融解温度 ( $T_m$ ) は日立 124 型分光光度計により測定した。

### 2.4 ショ糖密度勾配遠心法

オゾン処理 DNA または未処理 DNA の溶液 500  $\mu$ l を 2.1 M NaCl-15 mM EDTA-0.9 M NaOH 溶液 250  $\mu$ l と混合し、この混合溶液を 12.5 ml の 5~20% 直線型ショ糖密度勾配液上に重層した。ショ糖溶液には 0.7 M NaCl-5 mM EDTA-0.3 N NaOH を用いた。試料を重層したショ糖密度勾配は Beckman L2-65B 分離用超遠心機, SW40 ローターを用いて 30000 rpm, 4°C で 15 時間遠心した。遠心後、溶液を 300  $\mu$ l に分画し、各分画溶液は 400  $\mu$ l の水と 90  $\mu$ l の 1N HCl を加えた後、260 nm で吸光度を測定した。

## 3 結果と考察

### 3.1 仔ウシ胸腺 DNA のオゾン分解

仔ウシ胸腺 DNA, およびこれを熱処理した熱変性 DNA をオゾン処理して各構成ヌクレオチドの濃度変化を測定した (図 1)。対照実験ではオゾンを含まない酸素ガスを同条件で注入したが、120 分後においてもヌクレオチド濃度は変化しなかった。未変性 DNA のオゾン処理による 4 つのヌクレオチド残基の分解速度の大きさは  $dGMP \approx dTMP > dCMP \approx dAMP$  の順序であった。一方、熱変性 DNA の場合には  $dTMP \gg dGMP > dCMP \approx dAMP$  の順序であった。これらの分解速度の順序は第 4 章で測定したデオキシリボヌクレオチドのオゾン反応速度の順序 ( $dGMP > dTMP > dCMP > dAMP$ ) とは異なっている。特に顕著なのは、熱変性 DNA において  $dTMP$  が  $dGMP$  よりはるかに速く分解している点である。RNA のオゾン処理では、リボヌクレオチドの量として測定された分解速度の順序はモノリボヌクレオチドの分

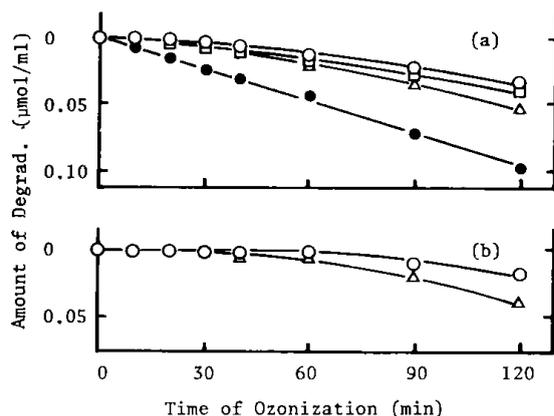


Fig. 1 Degradation of mononucleotide constituents of calf thymus DNA

a: heat-denatured DNA; —○—, dCMP; —□—, dAMP; —△—, dGMP; —●—, dTMP. b: native DNA; —○—, dCMP, dAMP; —△—, dGMP, dTMP

解速度の順序と一致していた。未変性の DNA においてその順序が異なっているのは DNA が 2 本鎖を形成していることに基因すると考えられる。特に G-C 対の方は 3 対の水素結合を形成しているため結合力が強く、A-T 対より安定である。したがって、オゾンと塩基部分との反応速度は、 $dGMP$  ではモノヌクレオチドのときより遅くなり、その結果  $dTMP$  とほぼ等しくなり、 $dCMP$  も  $dAMP$  とほぼ等しくなったものと考えられる。次に熱変性 DNA の場合であるが、DNA を熱処理することにより塩基対間の水素結合は安定性を失い、水素結合が切れて、2 本鎖はばらばらになる<sup>9)</sup>。1 本鎖になった DNA の中ではチミン塩基の積み重ね (stack) 能がグアニン、アデニン塩基に比べて相対的に弱いいため、チミン残基は DNA 1 本鎖の高次構造の相対的に外側に位置してくるであろう。そのため、熱変性 DNA ではチミン残基が特にオゾンの攻撃を受けやすくなり、 $dTMP$  が  $dGMP$  よりも分解速度が大きくなったものと考えられる。

### 3.2 DNA 鎖の切断

次にオゾン処理によって DNA 鎖が切断するか否かを検討した。その方法の 1 つはマロンジアルデヒドの検出である。マロンジアルデヒドは DNA の放射線照射<sup>7)</sup>、および DNA に対する 6-メルカプトプリンの光力学作用<sup>8)</sup> やブレオマイシンなどの抗腫

(40)

場物質の作用<sup>9)</sup>によって生成することが知られている。マロンジアルヒドは DNA のデオキシリボース残基がヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )などのラジカルによって破壊される結果として生成するものである<sup>7-9)</sup>。そのためマロンジアルデヒド生成量を測定することにより DNA 鎖の切断をある程度定量的に評価できる。仔ウシ胸腺 DNA のオゾン処理によって生成したマロンジアルデヒド量を図 2 に示す。縦軸の生成量は百分率で表しているが、これは DNA のすべてのデオキシリボース残基から、それぞれ 1 分子のマロンジアルデヒドが生成したときの生成量を 100% として計算したものである。図から分るようにオゾン処理 20 分まではマロンジアルデヒドはほとんど検出されなかった。20 分を過ぎる頃から生成が始まったが、120 分でも生成量は 0.2% に過ぎない。

DNA 鎖切断を調べる他の方法として、DNA のアルカリ性シヨ糖密度勾配遠心を行った。図 3 にその結果を示す。横軸の右側が遠心管底部、すなわち高密度側の画分である。密度勾配遠心のピーク位置は DNA 分子の密度によって決まり、分子量には関係しない。したがって、2 本鎖 DNA が熱処理やアルカリ処理によって 1 本鎖に解離すると密度が減少するため<sup>10)</sup>、ピーク位置が低密度側に移動する。図 3 の結果をみると、アルカリ性シヨ糖密度勾配遠心パターンはオゾン処理開始直後から変化し、ピーク位置が低密度側に移動している。比較のために中性シヨ糖密度勾配遠心も行ったが、この場合にはオゾン処理 30 分でも未処理 DNA の遠心パターンと変わりがなかった。この結果は次のように解釈することができる。すなわち、中性シヨ糖密度勾配遠心パターンが変化していなかったことは鎖切断が生じているかもしれないが、少なくとも相対する位置では鎖切断が生じていないことを示している。一方、アルカリ性でのパターンは鎖切断があった可能性も示唆するが、塩基部分が分解した DNA のリン酸ジエステル結合は加水分解を受けやすくなるので、その部分で DNA 鎖切断が生じたものとも考えられる。後者の考えはオゾン処理 tRNA をアニリン-酢酸溶液で処理したとき鎖切断がオゾンによって分解した塩基の位置で起こっていることをすでに証明したので<sup>11)</sup>、これに依っている。ところで、図 1 によれば未変性 DNA ではオゾン処理 30 分以内ではヌクレオチドの減少はほとんど観測されていない。しかし第 2 章でも述

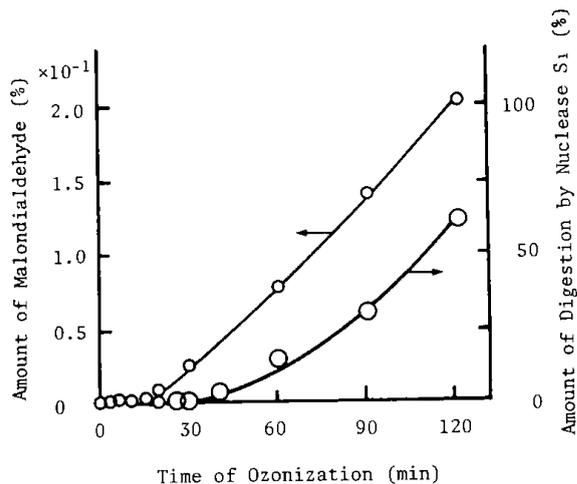


Fig. 2 Time courses of malondialdehyde formation and nuclease S<sub>1</sub> digestion of ozone-treated calf thymus DNA

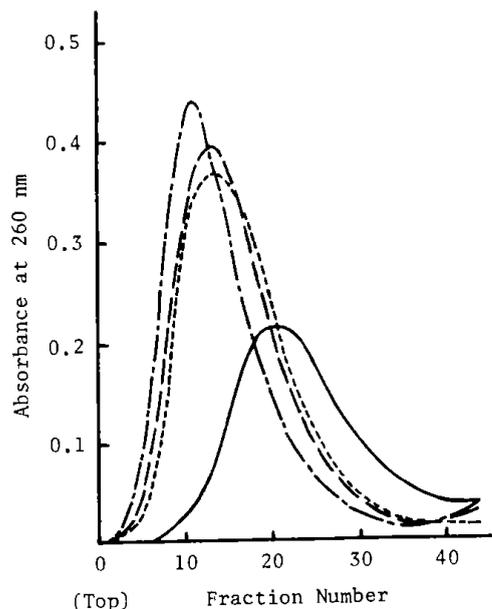


Fig. 3 Alkaline sucrose density gradient centrifugation patterns of ozone-treated and untreated calf thymus DNA

....., 0 min; —, 3 min; — —, 10 min/ ozone-treated DNA. Neutral sucrose density gradient centrifugation patterns of untreated DNAs (10, 20 and 30 min) were all the same (shown by —).

べたように核酸の構成ヌクレオチドの分析には分析誤差を伴っている(本章の場合、標準偏差が約 1%)。このためオゾン処理 30 分でも検出限界内で、すでにいくつかのグアニンおよびチミン残基が分解していると考えられる。したがって、上記の結

果と、20分以内ではマロンジアルデヒドの生成が認められない結果から、アルカリ性ショ糖密度勾配遠心の結果は、オゾン処理の初期(0~20分)ではDNA鎖の切断は起こらず、オゾンは主にグアニンおよびチミン残基と反応していると結論できる。

### 3.3 $T_m$ の測定と酵素水解

オゾン処理によってDNAのグアニンおよびチミン残基が分解されるとすれば、分解された部分ではA-TおよびG-C塩基対を形成し得ず、2本鎖構造が部分的には1本鎖になった状態になることが予想される。このことは当然DNAの融解温度( $T_m$ )に影響を与えるであろう。図4に $T_m$ の変化

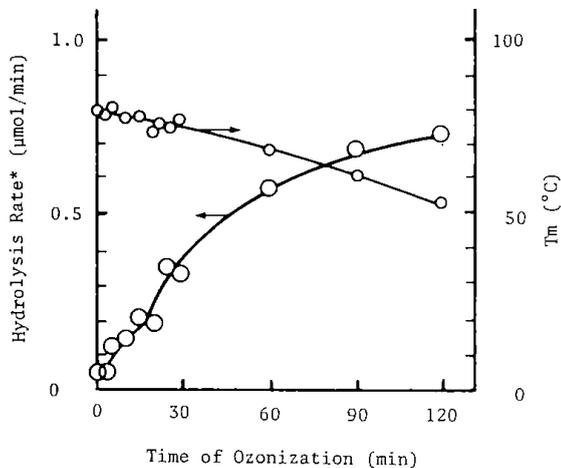


Fig. 4 Melting temperature and rate of hydrolysis<sup>a)</sup> of ozone-treated calf thymus DNA

a) The amount ( $\mu\text{mol}$ ) of phosphodiester linkage hydrolyzed in 1 min by 1 mg of nuclease  $P_1$  at  $37^{\circ}\text{C}$  and  $\text{pH } 5.0$ . The rate of hydrolysis of denatured DNA was  $1.27 \mu\text{mol}/\text{min}$ .

を示した。予想されたように $T_m$ はオゾン処理初期から減少しており、2本鎖の安定性が低下していることを示した。

またヌクレアーゼ  $S_1$  によるオゾン処理DNAの加水分解率とヌクレアーゼ  $P_1$  によるDNAの加水分解速度を測定した。ヌクレアーゼ  $S_1$  は1本鎖核酸部分のみを分解するエンドヌクレアーゼである。またヌクレアーゼ  $P_1$  による加水分解速度は熱変性DNAが未変性DNAに比べて約200倍速い<sup>12)</sup>。図2および図4に示した結果をみると、ヌクレアーゼ  $P_1$  による加水分解速度はオゾン処理開始直後から

増加しているのに対して、ヌクレアーゼ  $S_1$  による加水分解は30分までは全く起こっていない。 $T_m$  測定の結果と合わせてこれらの結果から次のことが示唆される。すなわちオゾン処理初期においては、グアニンおよびチミン残基の分解によって塩基対形成の水素結合が部分的に切断され、結合力が弱められる。しかし、2本鎖構造はまだヌクレアーゼ  $S_1$  の作用を受け付けられない程度に安定に保たれている。

オゾン処理も30分以後になるとヌクレオチドの減少も明らかになり(図1)、またマロンジアルデヒドが検出されるようになりDNA鎖切断が発生してくることが示される(図2)。ヌクレオチドの減少がすべて塩基部分の分解に基づくものとする、120分ではDNAの全塩基の7%が分解したことになるが、この時点におけるDNA鎖の切断は約0.2%にすぎない。これに対して、ヌクレアーゼ  $S_1$  水解で確認したDNAの1本鎖部分は30分以降急激に増加し、120分で60%にも達している(図2)。したがって、オゾン処理が進むにつれてDNAはグアニンおよびチミン残基がさらに分解され、遂には2本鎖構造が解消された部分がDNA鎖上に数多く発生した、一種の変性または弛緩の状態に変化したと考えられる。

## 4 結 論

仔ウシ胸腺DNAのオゾン処理の実験結果および考察を次のような結論にまとめることができる。

(1) DNAを構成する4つのヌクレオチドの分解速度の順序は未変性DNAでは  $\text{dGMP} \approx \text{dTMP} > \text{dCMP} \approx \text{dAMP}$  であり、熱変性DNAでは  $\text{dTMP} \gg \text{dGMP} > \text{dCMP} \approx \text{dAMP}$  であった。この順序はモノヌクレオチドのオゾン処理の場合の分解速度とは異なっていた。これは未変性DNAの場合、2本鎖構造によりグアニンおよびシトシン残基の方がチミンおよびアデニン残基よりも安定化されているためと考えられ、また熱変性DNAではチミン部分のstack効果が相対的に弱いと考えられる。

(2) DNA鎖の切断はRNAのときと同様にオゾン処理初期には生じなかった。

(3) オゾン処理によるDNA二重らせん構造の変化は、まずグアニンおよびチミン残基の分解によって塩基対が局部的に切断され、これがさらに進行して、ヌクレアーゼ  $S_1$  の作用可能な1本鎖部分を

(42)

含む一種の変性または弛緩の状態を経由して、ついに鎖切断が生じてくるものと考えられる。

#### 引用文献

- 1) N. Shinriki, K. Ishizaki, K. Miura, N. Goto, T. Ueda, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 11, 245 (1982).
- 2) N. Shinriki, K. Ishizaki, S. Sato, K. Miura, K. Sawadaishi, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3636 (1984).
- 3) 今本文男, “核酸の化学と分子生物学”, 日本化学会編, 化学総説 No. 46, 学会出版センター, 東京, 1985, pp. 43-45.
- 4) W. D. Sutton, *Biochem. Biophys. Acta*, **240**, 522 (1971).
- 5) K. Yagi, *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
- 6) J. D. Watson, 三浦謹一郎他訳, “遺伝子の分子生物学(上)” 第3版, 化学同人, 京都, 1977, pp. 115-116.
- 7) N. S. Krushinskaya, M. I. Shalnov, *Radiobiol.*, **7**, 24 (1967).
- 8) 岡野定輔, 堀江 孝, 小原弘子, 本橋 登, 薬学雑誌, **100**, 342 (1980).
- 9) L. Giloni, M. Takeshita, F. Johnson, C. Iden, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8608 (1981); I. Saito, T. Morii, T. Matsuura, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 12, 95 (1983).
- 10) 日本生化学会編, “生化学実験講座 2, 核酸の化学 III”, 東京化学同人, 東京, 1977, p. 236.
- 11) K. Miura, T. Ueda, N. Shinriki, K. Ishizaki, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 651 (1984).
- 12) M. Fujimoto, K. Kuninaka, H. Yoshino, *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1555 (1974).

## 第6章

# オゾンによるプラスミドDNAの分解様式<sup>1~5)</sup>

### 1 緒 言

第5章においてオゾンにより仔ウシ胸腺 DNA のグアニンおよびチミン残基が分解され、結果その水素結合が破壊され、ついにはヌクレアーゼ  $S_1$  が作用可能となるような二重らせん構造の緩んだ DNA になること、しかも数個の塩基の分解が確認される時でも DNA のヌクレオチド鎖の切断は生じていないことを報告した。一方、細胞内の DNA は通常、Watson-Crick の二重らせんモデル(相補性の塩基配列を持つ二本の鎖が、直線状の軸のまわりに二重らせんを描く構造)とは異なり、ヒストン等のタンパク質との相互作用やトポイソメラーゼの作用により、らせん軸は直線状ではなく曲線となって、さらに高次のらせん構造を形成していることが明らかになってきた。このような構造はスーパーコイル構造と呼ばれ、高次構造上特定領域の構造が変化し易いため、DNA の複製、組換え、転写の調節に重要な役割を果たしていると考えられる<sup>6)</sup>。したがってオゾンの核酸への影響を論ずるには、このスーパーコイル DNA へのオゾン反応性を検討することが必須と考えられる。

著者らはこのスーパーコイル DNA の典型例としてプラスミド DNA を取り上げた。プラスミド DNA には、図 1-a に示すように環状二本鎖 DNA がス

ーパーコイルを形成している閉環状 DNA (ccDNA) とスーパーコイル構造が解消されている開環状 (ocDNA) (図 1-b) の 2 種類の形態がある。ccDNA の DNA 鎖の一個所にでも切断が生じると即座にスーパーコイル構造が解消されて ocDNA に変化する。この 2 種の形態はゲル電気泳動上で移動度が異なり、完全に分離した 2 本のバンドとして観察されることから、オゾン分解反応におけるプラスミド DNA の形態変化を容易に観察できると考えた。そこで遺伝子組換え技術のベクターとして開発された人工プラスミドの 1 つである pBR322<sup>7)</sup> を用いてオゾンの影響を検討した。

### 2 実 験

#### 2.1 試 薬

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  は New England Nuclear 社より購入した。Agarose Type I (Low EEO), Agarose Type II (Medium EEO) は Sigma Chemical 社より購入した。Agarose EP 「TAKARA」(低融点アガロース) は宝酒造より購入した。TOYOPEARL HW-75S は東洋曹達工業より購入した。Sephadex G-50 (Fine) は Pharmacia 社より購入した。制限酵素 Alu I, Ava II, EcoR I, Hae II, Hae III, Hap II, Hha I, Hinf I は宝酒造より、FnuD II は New England Biolab 社より購入した。Alkaline Phosphatase, T4 Polynucleotide Kinase は宝酒造より、Nuclease  $S_1$  は三共より、Lysozyme は P. L. Biolab 社より、RNase A は Sigma Chemical 社よりそれぞれ購入した。Kodak X-Omat RP フィルム, X 線フィルム用増感紙は Eastman Kodak 社より購入した。またポラロイド 667 (ポジフィルム), ポラロイド 665 (ポジ&ネガフィルム) を使用した。

#### 2.2 プラスミド pBR322 ccDNA の調製

大腸菌の培養は Norgard の方法<sup>8)</sup> に従った。プラスミド pBR322 DNA を保持している大腸菌 HB101 株を LB 培地\*1 100 ml に植え、一晚 37°C で振とう培養した。次に 4.9 l の M9+CA 培地\*2 に

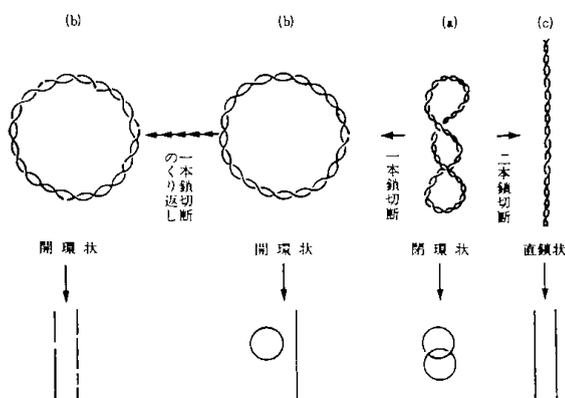


図 1 閉環状、開環状および線状 DNA の模式図  
上段は二本鎖、下段は変性した場合の鎖の  
分かれ方を示す。

(44)

植えつき、通気下 37°C で培養を続け、約 2 時間後 550 nm における吸光度が 0.7~0.8 になった時点で 750 mg のクロラムフェニコールのエタノール溶液 10 ml を加えた。さらに通気下 37°C で最低 16 時間培養を続けた。培養液を氷冷し、集菌した。5 l の培養液から約 7 g の大腸菌を得た。

プラスミド DNA の調製は M9 培地 1 l から得られた大腸菌当たり Nogard の方法<sup>8)</sup> の半分の試薬容量を用いて行った。得られた粗プラスミド溶液は、使用するまでエタノール沈殿の状態にして、-20°C で保存した。

ゲルろ過による ccDNA の精製<sup>9)</sup> は粗プラスミド DNA を 2 ml の TE-2 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-1 mM EDTA) に溶解し、この溶液 (1440 OD<sub>260</sub> 単位) を予め緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-0.1 mM EDTA) で平衡化しておいた TOYOPEARL HW-75S カラム (φ2.5×98 cm) に供して行った。分画サイズ 3.3 ml、流速 10 ml/h で同緩衝液で溶出させた。各フラクションの UV 吸収を測定し、OD<sub>260</sub> が 0.5 以上の部分について 1.0% アガロースゲル電気泳動によりそのパターンを分析した。ccDNA のみを含むフラクション 30 分を 3 本ごとにまとめ、エタノール沈殿により ccDNA を回収し、650 μl の TE 緩衝液 (1 mM Tris-HCl (pH 7.5)-0.1 mM EDTA) に溶解した後、小試験管に移し 50 μl の 4 M NaCl と 1.4 ml のエタノールを加えて -20°C で保存した。ccDNA は約 6 mg (大腸菌培養液 1 l につき約 1.2 mg) 得られた。

### 2.3 ccDNA のオゾン分解

遠心管 (Corning 15 ml 用) に 975 μl の各種溶媒 (水, 0.15 M NaCl) と 25 μl の ccDNA 溶液 (2 μg/μl) を入れて冷却した。この遠心管に毛細管のついたアダプターを接続し、冷却下オゾン含有酸素気流 (オゾン濃度 0.05±0.01 mg/l、流速 70 ml/min) を一定時間 (2, 5, 10 分間) 試料溶液に注入した。試料はエタノール沈殿により回収し、沈殿を 100 μl の TE 緩衝液に溶解し、4°C で保存した。

### 2.4 オゾン処理 DNA の分析

電気泳動用試料は 0.5 μg の DNA 量に相当する液量を取り、色素液 A (30% sucrose-0.25% BPB) を約 2 μl を加えて調製した。液量が 10 μl に満たない試料には水を加え最低 10 μl にし、1.0% アガロースゲル (17×15×0.2 cm) 電気泳動に供した。アガロースゲル (Agarose Type II) は TAE 緩衝液 (40 mM Tris-AcOH (pH 8.3)-5 mM AcONa-1 mM EDTA) に溶解して作成した。50 V の定電圧で 2~3 時間、前泳動を行って電流を一定にさせた後、試料液を添加し 50 V の定電圧で 5~6 時間泳動を行った。泳動緩衝液には TAE 緩衝液を用いた。泳動終了後ゲルはエチジウムブロマイド溶液 (0.5 μg/ml 以上) で染色し、水で洗浄後 UV ランプ (366 nm) を照らし、写真撮影した。

### 2.5 オゾン処理で生成した ocDNA の分析

#### 2.5.1 オゾン処理で生成した ocDNA の単離

各種溶媒でオゾン処理した DNA 100~300 μg を予め 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-0.1 mM EDTA 緩衝液で平衡化しておいた TOYOPEARL HW-75S カラム (φ1.6 cm×65 cm) に供し、同緩衝液で溶出させた (分画サイズ 1 ml、流速 6 ml/h)。各フラクションの UV 吸収を測定し、OD<sub>260</sub> が 0.2 以上の画分をそれぞれ 200 μl まで濃縮した後、エタノール沈殿により回収し、1.0% アガロースゲル電気泳動により分析し、ocDNA のみを含むフラクションを 4°C で保存し、実験試料とした。

#### 2.5.2 オゾンによる鎖切断位置のアイソトープ標識

ocDNA 4 μl (2 μg) を AP 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) 94 μl に加えた後、バクテリアのアルカリホスファターゼ 2 μl (0.2 units) を加え 65°C、1 時間インキュベートした後、酵素を除き、エタノール沈殿により回収した。この沈殿を水 16.5 μl に溶解し、リン酸化用緩衝液 (0.5 M Tris-HCl (pH 7.6)-0.1 M MgCl<sub>2</sub>-50 mM DTT) 2 μl, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 1 μl (10 μCi), T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 0.5 μl (3 units) を加え 37°C で 2 時間インキュベ

\* 1 LB 培地 (100 ml)

Bactotrypton 1.0 g, Yeast Extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を水に溶解し、NaOH 溶液で pH 7.2 に調整後オートクレーブした。

\* 2 M9+CA 培地 (4.9 l)

M9 salt (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g, NaCl 2.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 5 g) 溶液 500 ml, Casamino Acids 25 g, 水 4180 ml を混合後、オートクレーブした。この溶液に予め滅菌しておいた、20% グルコース 100 ml, 0.1 M MgSO<sub>4</sub> 50 ml, 0.01 M CaCl<sub>2</sub> 50 ml, 塩酸チアミン溶液 (1 mg/ml) 20 ml を加えた。

ートした。反応終了後これをエタノール沈殿により回収し、TE 緩衝液 100  $\mu$ l に溶解した後、予め TE 緩衝液で平衡化しておいたセファデックス G-50 カラム ( $\phi$ 8 mm $\times$ 20 cm) に供し、最初に溶出してくる放射活性のある部分を分取した。減圧下で濃縮し、キャリアーとして ccDNA 1  $\mu$ g を加えた後エタノール沈殿により標識 DNA を回収した。試料を約 10000 cpm/ $\mu$ l になるように TE 緩衝液に溶解した。

### 2.5.3 制限酵素による消化と 2.5%アガロースゲル電気泳動

ゲルろ過で精製した ocDNA 2  $\mu$ l (1  $\mu$ g) あるいはコントロールの ccDNA 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g) を RE 緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 7.5)-70 mM MgCl<sub>2</sub>-70 mM 2-メルカプトエタノール), 200 mM NaCl, 水と混合し全量を 49  $\mu$ l とし、37°C で 5 分間加温した後、制限酵素を 1~1.5  $\mu$ l (数 units) 加え 37°C で 12 時間インキュベートした。反応液からエタノール沈殿により回収し、これを 10  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解し、1  $\mu$ l の 30% sucrose を加えて 2.5%アガロースゲル (17 $\times$ 15 $\times$ 0.2 cm) 電気泳動用の試料とした。ゲルの作成、緩衝液は 2.4 と同様である。80 V の定電圧で 2~3 時間、前泳動を行って電流を一定にさせた後、試料を添加し 100 V の定電圧で 2.5~3 時間泳動を行った。

## 2.6 塩基配列分析

### 2.6.1 塩基配列分析用フラグメントの調製

(1) 第 1 段階目の制限酵素消化とアイソトープ標識

オゾン処理により生成した ocDNA と配列分析のコントロールとする ccDNA のそれぞれ 2  $\mu$ g を 2.5.3 に従い Hap II (6 units) あるいは Hinf I (6 units) で消化した。消化物を 98  $\mu$ l の AP 緩衝液に溶解し、2.5.2 と同様にアルカリホスファターゼ処理をした。回収した沈殿は水 14.5~15.5  $\mu$ l に溶解し、リン酸化用緩衝液 2  $\mu$ l, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 2  $\mu$ l (20  $\mu$  Ci) あるいはコントロール DNA の場合は 3  $\mu$ l (30  $\mu$  Ci), T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 0.5  $\mu$ l (3 units) を加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。反応終了後、エタノール沈殿により回収し 2.0%低融点アガロースゲル電気泳動用の試料とした。

(2) 2.0%低融点アガロースゲル電気泳動(ゲル厚さ 1 mm) とフラグメントの抽出

アガロース (Agarose EP「TAKARA」) を TAE

緩衝液に溶解し、ゲルを作製した。30 V の定電圧で 2~3 時間、前泳動を行って電流を一定にさせた後、試料を添加し 70 V の定電圧で 3.5 時間泳動を行った。泳動終了後ゲルのオートラジオグラフを行った。目的のフラグメント (Hap II はフラグメント C, Hinf I はフラグメント B と C) を切りだしエッペンドルフチューブに入れ 200  $\mu$ l の TE-2 緩衝液を加え、65°C で数分間加温して再融解させた。これをフェノール処理し、エタノール沈殿により回収し、制限酵素消化の試料とした。

(3) 第 2 段階目の制限酵素消化とフラグメントの抽出

Hap II フラグメントは Hinf I (6 units) で、Hinf I フラグメントは Hap II (6 units) で 2.5.3 に従い消化した。(1) の電気泳動用試料調製の操作に従って沈殿を処理し、2.0%低融点アガロースゲル電気泳動を(2)の操作に従って行い、目的とするフラグメントを得た。5' 末端標識フラグメントは Hap II-Hinf I で  $5 \times 10^4$  cpm 前後、Hinf I-Hap II では  $5 \times 10^5$  cpm 前後が得られた。

### 2.6.2 Maxam-Gilbert 法による 4 種類の塩基特異的反応<sup>10)</sup> および DNA 鎖の切断

コントロールの 5' 末端標識フラグメント (25  $\mu$ l) を 5 等分し A+G および T+C の反応には G および C の反応の 1.5 倍量、最低  $3 \times 10^4$  cpm を用いた。反応はすべてエッペンドルフチューブ中で行った。各塩基特異反応の終了した 4 つの試料およびオゾン処理 DNA からの標識フラグメント (Maxam-Gilbert 法の G+A の反応に用いたのと同じカウント数) の試料に 100  $\mu$ l の 1 M ピペリジンを加えて溶かし、90°C で 30 分間加熱した。反応終了後冷却して凍結乾燥し、残渣に水 20  $\mu$ l 加えて溶解し再び凍結乾燥した。この操作をさらに最低 1 回繰り返した。3  $\mu$ l の色素液 P (90%ホルムアミド-TEB 緩衝液-0.1%XC-0.1% BPB) を加えて溶解し、塩基配列分析用のポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。

### 2.6.3 塩基配列分析用のポリアクリルアミドゲル電気泳動

TEB 緩衝液 (89 mM Tris-89 mM ホウ酸-2.5 mM EDTA)-7 M 尿素を用いて長さ 80 cm (厚さ 0.5 mm) のポリアクリルアミドゲルを作成した。また長さ 40 cm (厚さ 0.5 mm) の 9% および 6% のポリアクリルアミドゲルを作成した。6% (80 cm) では 2500 V の定電圧で約 5 時間泳動し、9% (40 cm) で

(46)

は1500 Vの定電圧で約2時間泳動し、6%(40 cm)では1200 Vの定電圧でBPB マーカーがゲルの下端に到達した時に泳動を終了した。泳動緩衝液はTEB 緩衝液である。

### 3 結果と考察

#### 3.1 ccDNA のオゾン分解反応による形態変化

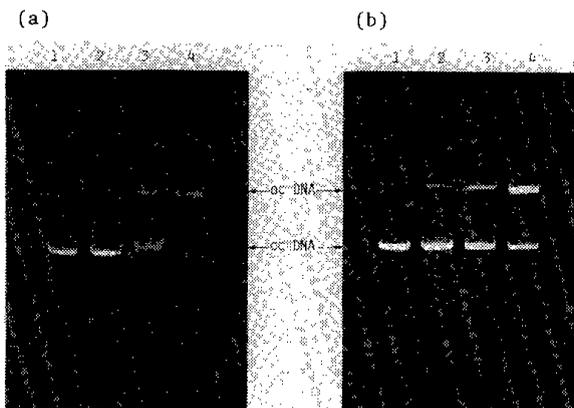


Fig. 2

Agarose gel electrophoretic patterns of pBR 322 DNAs treated with ozone in the absence (a) and the presence (b) of NaCl

1, untreated; 2, treated for 2 min; 3, treated for 5 min; 4, treated for 10 min

図2に示したように1.0%アガロースゲル電気泳動でccDNAは少量のオゾンとの接触でスーパーコイル構造が解消されて開環状(ocDNA)になることが認められた。これまでRNA, DNAについてオゾン処理の初期に鎖切断が生じないことを確認している<sup>11-13)</sup>ので、このccDNAのオゾンによる挙動は極めて興味あるものである。念のため酸素ガスのみを同様に通じてocDNAが生じていないことを確認したので、この鎖切断がオゾン処理に起因することは確かである。反応溶媒として水と0.15 M NaClの二種類を用いたが塩非存在下ではオゾン処理10分間でccDNAは消失しており、塩非存在下処理の方が変化が速いことが分る。また塩非存在下ではオゾン処理5分から10分の試料では、ccDNA, ocDNA, lDNAとは明らかに異なる幅広いバンドが出現していた。これはオゾンによりDNAの構造に変化が生じスーパーコイル構造のtwisting numberが変化したccDNAであると考えられる。すなわちすでに述べたように、塩基部分へのオゾンの攻撃でヘリックス上で水素結合が不可能な状態となり、DNAの構造に変化が生じ、電気泳動上では移動度が異なるccDNAバンドを与えたと判断される。この移動度の異なるccDNAバンドの出現はccDNAの切断現象がオゾンのDNAの

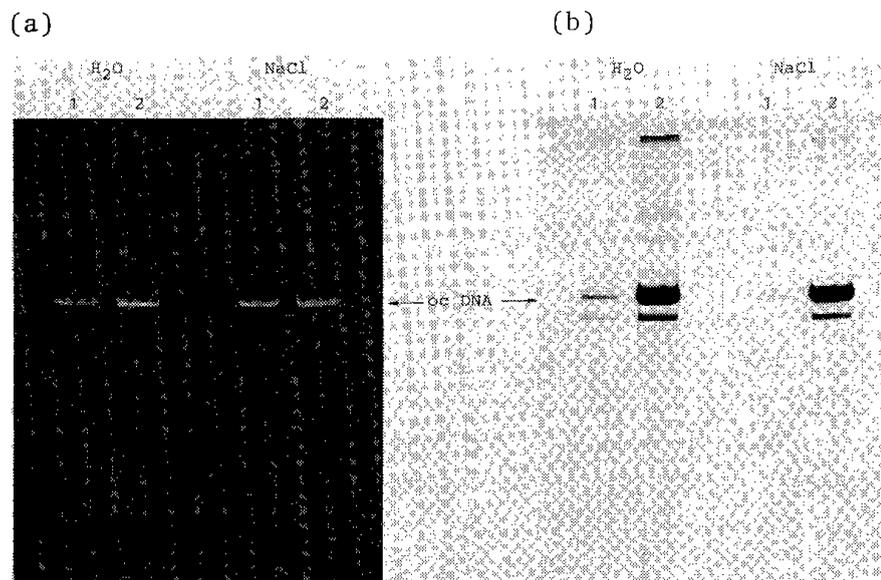


Fig. 3 Labeling of 5'-terminals of the strand cleavage sites of ozone-treated pBR322 DNA

a, detected by staining with ethidium bromide; b, detected by autoradiograph: 1, untreated with alkaline phosphatase before labeling; 2, treated with alkaline phosphatase

糖部への攻撃によるものではないことを示唆しているといえる。鎖切断の機構の詳細な検討を以下に述べる。

### 3.2 オゾン分解により生じた ccDNA の鎖切断位置の分析

#### 3.2.1 $^{32}\text{P}$ による鎖切断位置のアイソトープ標識

オゾン分解部位を限定するために ocDNA を  $^{32}\text{P}$  によりアイソトープ標識をした。その 1.0% アガロースゲル電気泳動オートラジオグラフの結果(図 3)は ocDNA がメインバンドとして観察され、目的通りアイソトープを ocDNA のオゾンによる鎖切断部位に導入できた。レーン 1 に示したように、アルカリホスファターゼによる脱リン酸化処理をせずにリン酸化を行うと  $^{32}\text{P}$  リン酸化の導入の程度が低いことが分かる。すなわち鎖切断部位は 5' 末端に大部分のリン酸が残るように切断されていると考えられる。

#### 3.2.2 標識 ocDNA の制限酵素による分析

標識した試料を制限酵素 Hae III と Hap II で消化し、2.5% アガロースゲル電気泳動を行った。図 4 の 1 が pBR322, 2 が NaCl 存在下のオゾン処理 DNA, 3 が NaCl 非存在下のオゾン処理 DNA である。A はエチジウムブロマイドによる染色結果, B はそのオートラジオグラフである。B のオートラジオグラフではレーン 2 において明らかなように NaCl 存在下のオゾン処理由来 ocDNA の各バ

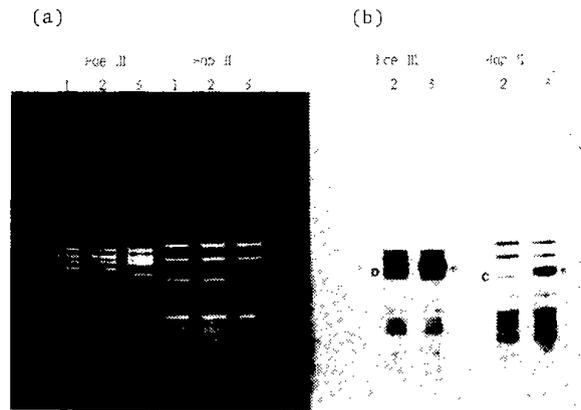


Fig. 4 Restriction patterns of  $^{32}\text{P}$ -labeled, ozone-treated pBR322 DNAs

a, detected by staining with ethidium bromide; b, detected by autoradiograph; 1, untreated; 2, ozone-treated in the presence of NaCl; 3, ozone-treated in the absence of NaCl; \* indicates the major bands newly appeared.

ンドは一樣に標識されておりこの結果から NaCl 存在下では鎖切断が全領域にわたって起きていることが分った。一方、レーン 3 に示された NaCl 非存在のオゾン処理 DNA の場合は A のエチジウムブロマイド染色において消失しているバンドの上部に (\*印のついた)主バンドが出現しており, NaCl 非存在下ではオゾンによる反応が選択的に特定の

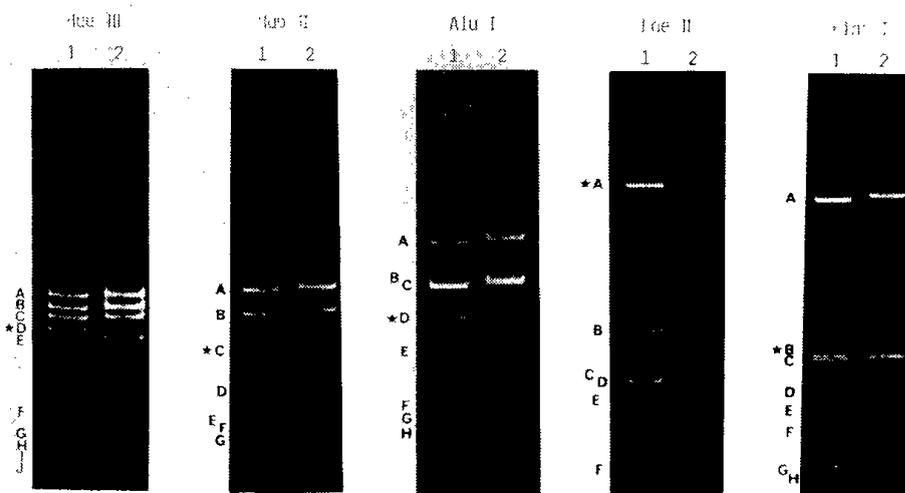


Fig. 5 Agarose gel electrophoretic patterns of digests of ozone-treated pBR322 DNAs with restriction enzymes

1, untreated; 2, ozone-treated for 10 min in the absence of NaCl

(48)

場所に起きていることが判明した。そこで塩存在下、非存在下の反応様式を別々に検討した。

### 3.2.3 塩非存在下でオゾン処理由来 ocDNA の各種制限酵素による分析

NaCl 非存在下でオゾン処理を10分間行って得た ocDNA について種々の制限酵素を駆使して pBR322 DNA の全領域を分析し、図5に各種制限酵素で消化したものの2.5%アガロースゲル電気泳動結果を示した。レーン1は未処理 DNA のフラグメントパターン、レーン2はオゾン処理由来 ocDNA のパターンである。\*印のついているフラグメントに対応するバンドが消失していることが観察される。この現象がスーパーコイル DNA 特有のものであることは pBR322 DNA を EcoR I 消化で得られる *I* DNA を用いて検討して確かめた。

特定の一つのフラグメントが消失する現象を明らかにするために、オゾン処理5分間と10分間の試料について分析した。NaCl 非存在下でオゾン分解反応を行った場合、図2で示したように、5分間の反応では ccDNA が残っているのに対し、10分間の反応では完全に ocDNA に変化している。この2つの試料について制限酵素 Hinf I で消化し、2.5%アガロースゲル電気泳動を行い、その結果を図6に示した。オゾン処理5分の試料では、消失

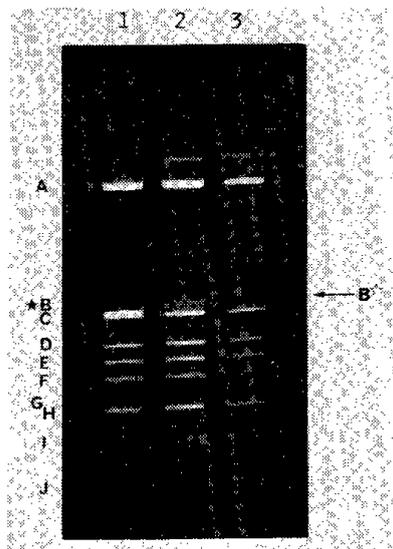


Fig. 6 Agarose gel electrophoretic patterns of Hinf I digests of ozone-treated pBR322 DNAs in H<sub>2</sub>O

1, untreated ; 2, ozone-treated for 5 min ;  
3, ozone-treated for 10 min

バンド(B★)の上部に新たなバンド(B☆)が出現しているのが観察された。この新たなバンドの出現位置つまりフラグメントの移動度は、未消化のフラグメントに相当しない。しかし仔ウシ胸腺 DNA のオゾン分解において反応が進むと分解部位周辺の二重らせん構造が変化することが、ヌクレアーゼ P<sub>1</sub> 水解の結果から明らかにされていること<sup>13)</sup> から、オゾン分解反応で観察されたバンドは、オゾンにより損傷を受けた塩基部を含み、フラグメントのヘリックス構造が変化し電気泳動上の移動度が本来のものより遅れたと考えられ、消失したフラグメント由来であると推測される。処理時間の長い10分間の試料では、ccDNA はすべて ocDNA に変化しており、オゾン分解反応は構造変化を生じた領域に集中して進行し、ある領域内の DNA の分解が進んでいると考えられる。そのためフラグメントはさらに著しい構造変化を生じゲル電気泳動上観察できない程、幅の広いバンドになったと推測される。以上のように NaCl 非存在下のオゾン分解反応で観察されたフラグメントの消失現象は、オゾンにより損傷を受けた塩基部を含むフラグメントの二重らせん構造が変化したために生じたことであると考えられる。

制限酵素で分析した結果を図7の pBR322 DNA の制限酵素地図にまとめた。点を打った領域は各種制限酵素で消化した際、消失したフラグメント

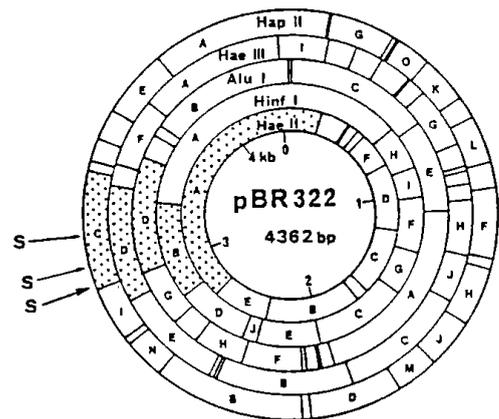


Fig. 7 Restriction map of pBR322 DNA

Dotted regions indicate the disappeared fragments from the digests of ozone-treated DNA (-NaCl). The capital S with an arrow indicates the sites sensitive to unlease S<sub>1</sub>.

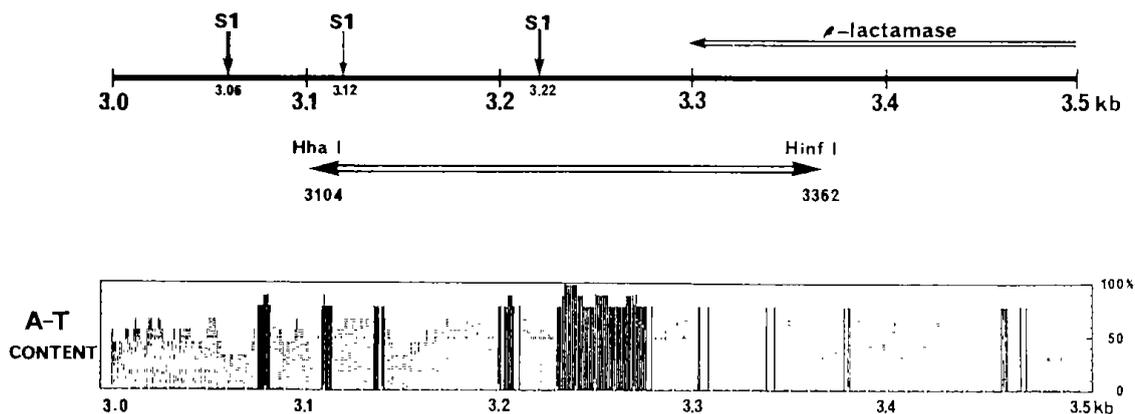


Fig. 8 Ozone-cleavage sites and the graph of A-T content

A-T content, the number of A and T/9 nucleotides ( $\times 100\%$ ); solid lines, the number of A and T  $> 7$  ( $7/9 \times 100\%$ )

を表している。S印はLilley<sup>14)</sup>により報告されているヌクレアーゼ  $S_1$  による切断部位を示しており、NaCl非存在下でのccDNAに対するオゾン分解反応により消失した制限酵素フラグメントはヌクレアーゼ  $S_1$  切断部位を含むフラグメントと一致していることが判明した。

図8にpBR322 DNAのEcoR I切断位置から3.0-3.5 kbpの領域について拡大した図を示した。Lilleyの報告しているヌクレアーゼ  $S_1$  切断部位は、感受性の高い順に3.06, 3.22, 3.12 kbpに位置している<sup>14)</sup>。制限酵素による分析結果からオゾンの反応部位は、3.06 kbpの  $S_1$  感受性部位の下流の、3104 bpのHha I切断位置から3362 bpのHinf Iの切断位置の領域にあると判明した。また(A+T)含量のグラフも示したが、これは対象とする塩基の前後4塩基、計9塩基中の(A+T)の含量をあらわし、7個以上になる位置を実線で示してある。このグラフから明らかなようにオゾン反応領域内に、(A+T)に非常に富む部分(3.23~3.28 kbp)が存在していることが分る。

### 3.3 オゾン分解反応の高次構造及び塩基配列特異性

3.2.3で、塩非存在下のオゾン分解反応により生じた鎖切断部位が存在する領域を限定することができた。しかしオゾンによる鎖切断はオゾンにより塩基部の分解が進み構造が最も不安定になっている部分で生じていると考えられる。また制限酵素分析で観察されたように、オゾンにより鎖切断

部位周辺の構造が著しく変化していると考えられる。これらのことからオゾンにより分解を受けている塩基は鎖切断位置に加え、その周辺にも存在していると推測される。また塩存在下のオゾン分解反応では鎖切断が全領域にわたって生じており、その位置を特定することができなかったが、塩存在下オゾン処理DNAの塩基配列分析を行えばそのオゾン分解の様式をさらに詳細に調べ得ると考えた。

オゾン処理した仔ウシ胸腺DNAをアルカリで扱うとヌクレオチド鎖の切断が観察された<sup>13)</sup>。したがってオゾンにより分解を受けた塩基を有するヌクレオチド部位で $\beta$ -脱離反応によるリン酸ジエステル結合の開裂を引き起こしていると推定される。そこでオゾン処理して得たocDNAをアルカリ処理してオゾンにより分解を受けた塩基の位置に人為的に鎖切断を起こすことが可能であると考えられる。すなわち塩基部のオゾン分解反応はMaxam-Gilbert法における塩基特異的の化学修飾反応に相当し、続いて第2段階目のピペリジンによる鎖切断反応を行えばオゾン分解を受けた塩基の位置で切断が生じたDNA断片を得ることができると考えられる。一方コントロールとして未処理DNAから相当する領域を含むフラグメントを調製し、Maxam-Gilbert法による4種類の塩基特異的の化学修飾反応(G, A+G, T+C, C)を行いそれぞれの塩基修飾部位で切断が生じているさまざまな鎖長のDNA断片を調製する。このものとオゾン処理由来のDNA断片を同時にsequencing gel上で

(50)

電気泳動し、オゾン処理由来の DNA 断片と同じ移動度のものをコントロールとした Maxam-Gilbert 法により得た DNA 断片から解読することにより、オゾン部位を読みとることができると考えた。3.3.1 では 3.0~3.4 kbp の領域の分析結果について述べ、3.3.2 では 1.5~2.0 kbp の領域の分析結果について述べる。

### 3.3.1 3.0~3.4 kbp の塩基配列分析

3.2 で述べたように塩非存在下のオゾンによる DNA 鎖切断部位は、3.23~3.28 kbp の (A+T) に富む領域内に存在していることを明らかにした。また Lilley の報告によればこの上流にヌクレアーゼ S<sub>1</sub> 感受性部位が 3 カ所 (3.06, 3.12, 3.22 kbp) 存在しており cruciform 構造の存在が示唆されている<sup>14)</sup>。したがってこれらの両方の部位を含む領域 (3.0~3.4 kbp) の分析を行った。

#### (1) 塩基配列分析用フラグメントの調製

配列を分析すべきフラグメントを得るための制限酵素の選択はコンピューターを利用して行った。図 9 に示したように upper strand 側は 3044 bp の Hap II 切断位置から下流方向、lower strand 側は 3365 bp Hinf I 切断位置から上流方向の塩基配列を行えば、オゾン分解領域を含む領域の塩基配列を行うことになる。2.6 に従って得られた第 1 段階目制限酵素消化によるフラグメントは両 5' 末端がアイソトープ標識されているので、第 2 段階目の制限酵素消化として Hap II フラグメントの場合

は Hinf I でさらに消化して upper strand 側の 5' 末端のみ標識されたフラグメントを調製した。これに対して Hinf I フラグメントの場合は Hap II で消化して lower strand 側の 5' 末端のみが標識されたフラグメントを調製した。なおフラグメントの 5' 末端をアイソトープ標識する際、DNA 鎖上に存在するオゾンによる切断部位の 5' 末端も標識される可能性がある。しかしアルカリホスファターゼによる 5' 位脱リン酸化反応の温度を 65°C から 37°C に下げて酵素活性を抑制するとオゾンによる切断部位の脱リン酸化の効率が悪くなり、したがってオゾンによる切断部位へのアイソトープの導入の効率は極めて悪くなるのでフラグメントの両 5' 末端について比活性の高い試料が調製でき、配列分析には問題とならない。

オゾン処理 DNA の塩基配列分析は、ccDNA のオゾン分解反応を H<sub>2</sub>O, 0.15 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> の 3 種類の溶媒中 2°C で行ったものと、H<sub>2</sub>O, 10 mM MgCl<sub>2</sub> の溶媒中 20°C で行ったもの 5 種類について行った。

#### (2) 塩基配列分析

図 10 に upper strand 側 Hap II (3044) - Hinf I (3362) の塩基配列分析の結果のオートラジオグラフを示した。図 11 に lower strand 側 Hinf I (3365) - Hap II (3046) の塩基配列分析の結果のオートラジオグラフを示した。

(a) 塩, 温度の影響 — 塩非存在下 (H, H') と塩存

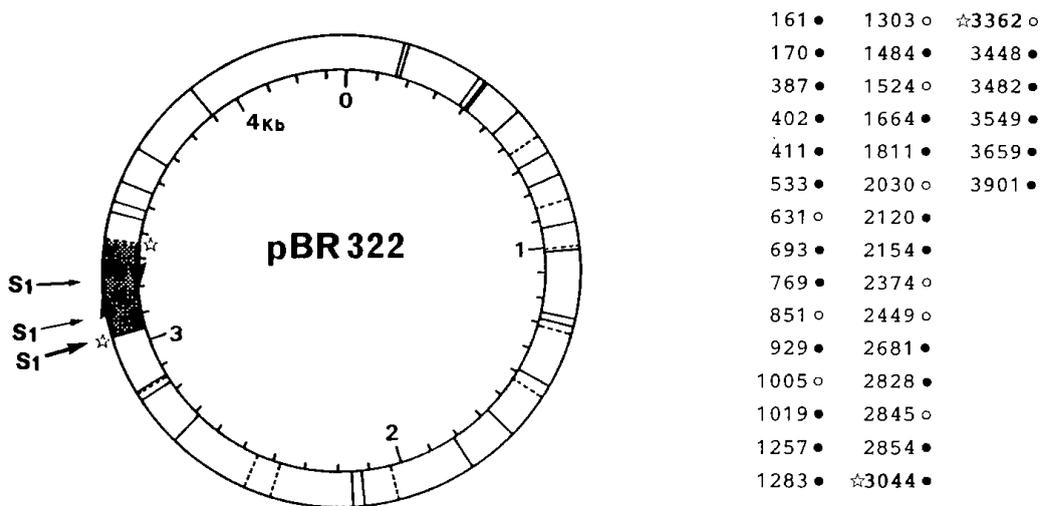


Fig. 9 Restriction sites of Hap II and Hinf I digestions of pBR322 DNA

Recognition sequences, CCGG and GANTC; No. of cleavage sites, 36; ●, Hap II cleavage site; ○, Hinf I cleavage site



Fig. 10 Sequence analysis of Hap II-Hinf I (3044-3362) regions of intact and ozone-treated pBR322 DNA

H, treated in the absence of salt at 2°C; M, treated in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub> at 2°C; H', treated in the absence of salt at 20°C; M', treated in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub> at 20°C; N, treated in the presence of 0.15 M NaCl at 2°C

在下(M, M', N)のパターンが著しく異なっていることが明らかであり, 3.2.3の制限酵素の分析結果と同様に, ccDNAのオゾン分解反応に対して塩が著しい影響を与えていることがこの結果から明

らかである。塩として MgCl<sub>2</sub>(M)と NaCl(N)を用いた場合相違は観察されず, 反応温度を 2°C(H, M)から 20°C(H', M')に上げてても大きな差が見られないことから, ccDNAのオゾン分解様式に対して MgCl<sub>2</sub>と NaClの違いや温度による影響がないことも判明した。

(b) 塩非存在下オゾン処理した DNA の分析——図 10の H および H' のレーンのパターンから, オゾンにより分解を受けている塩基は, 3104 の Hha I 切断位置の下流の 3120 bp 以降に位置していることが明らかである。この結果は, 3.2.3の制限酵素により分析した結果と一致している。図 10 (upper strand) と図 11 (lower strand) の塩非存在下のオゾン処理 DNA (レーン H) の結果を図 12 にまとめた。それぞれの図から解読した範囲は図 12 のそれぞれの strand 上の S (配列解読開始点) の位置から E (配列解読終了点) の位置までである。図 13 から明らかのように 3120 bp 以降のほとんどすべてのチミン残基が分解を受けており, 特に (A+T) に富む領域 (3.23–3.28 kbp) 内ではチミン残基の分解が優先している。この領域の外ではグアニン残基の分解も生じていることが判明した。

以上の結果, 塩非存在下の場合スーパーコイル pBR322 ccDNA ではこの (A+T) に富む領域の二重らせん構造が緩んでおり, オゾンはこの部分のチミン残基に対して速やかに反応していることを明らかにすることができた。

(c) 塩存在下オゾン処理した DNA の分析——図 11 は塩存在下オゾン処理した DNA (M, M', N) の塩基配列分析が極めて特徴的なパターンを示しており, 3120, 3220 bp 付近が最も分解を受けている結果が得られた。図 13 には図 11 の lower strand の 3203–3238 bp の範囲を拡大したものを示した。3208–3233 bp の位置の塩基配列は inverted repeat sequence になっており, この部分の分解パターンを解読した結果を図の右に示した。図は cruciform 構造を形成する lower strand 側のヘアピン構造を示している。その結果分解を受けている塩基は, この inverted repeat sequence が cruciform 構造を形成した場合に生じるループ部分に位置するチミンとグアニン残基であることが判明した。このことから塩存在下のオゾン分解反応は極めて構造特異的に進行していることが明らかとなった。図 14 は図 11 の lower strand の 3107–3139 bp の範囲を拡大したものである。3112–3134 bp の位置

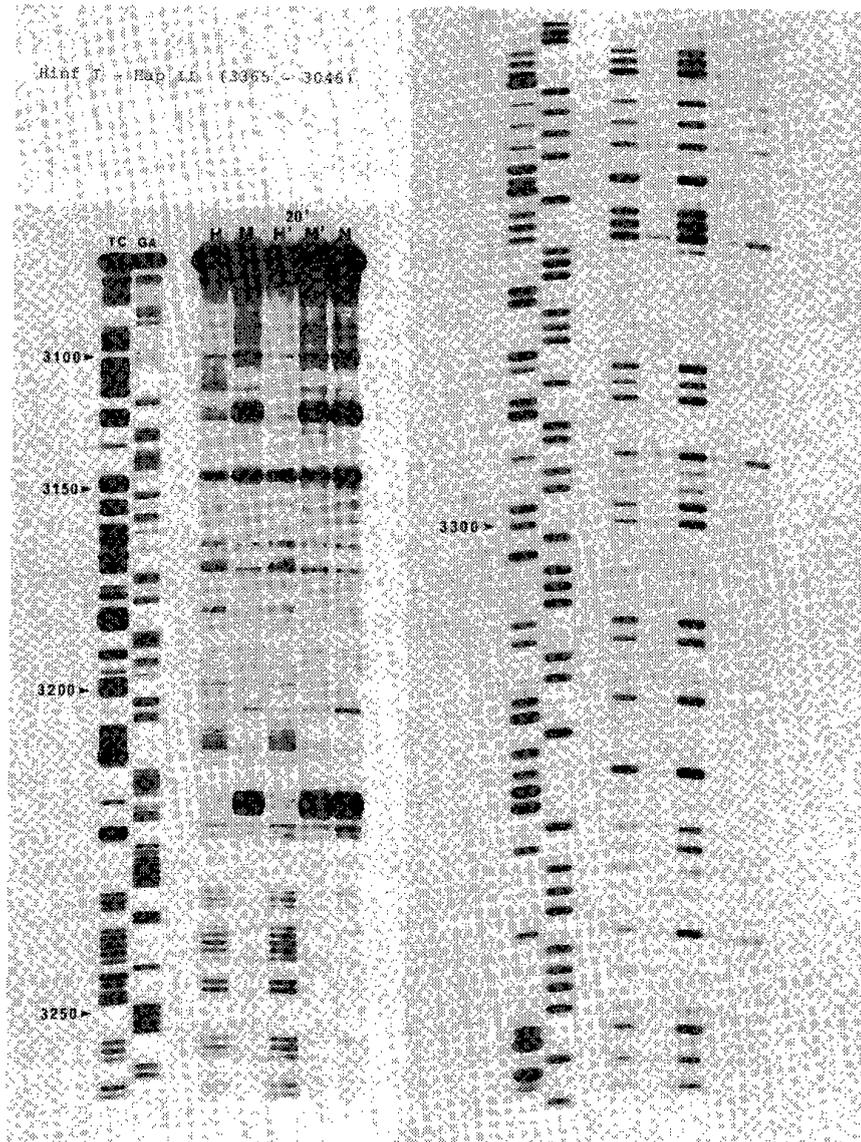


Fig. 11 Sequence analysis of Hinf I-Hap II (3365-3046) regions of intact and ozone-treated pBR322 DNA

H, treated in the absence of salt at 2°C; M, treated in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub> at 2°C; H', treated in the absence of salt at 20°C; M', treated in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub> at 20°C; N, treated in the presence of 0.15 M NaCl at 2°C

の塩基配列も inverted repeat sequence になっており、この部分の分解パターンを解読した結果分解を受けている塩基は、inverted repeat sequence が cruciform 構造を形成した場合に生じるループ部分に位置するチミンとグアニン残基であることが判明した。

まとめると、塩存在という生理的条件下の場合スーパーコイル pBR322 ccDNA 上では cruciform 構造が形成されていること、およびオゾン分解反

応は cruciform 構造を形成した際生じる一本鎖ループ部分に優先して起きていることを明らかにすることができた。

### 3.3.2 1.5~2.0 kbp の塩基配列分析

3.2.2 において、塩存在下ではオゾン分解反応がプラスミドの全領域にわたって起きていることを明らかにした。そこで 3.0~3.4 kbp の領域以外の領域におけるオゾン分解反応の様式を明らかにするために、塩存在下および塩非存在下でのオゾン

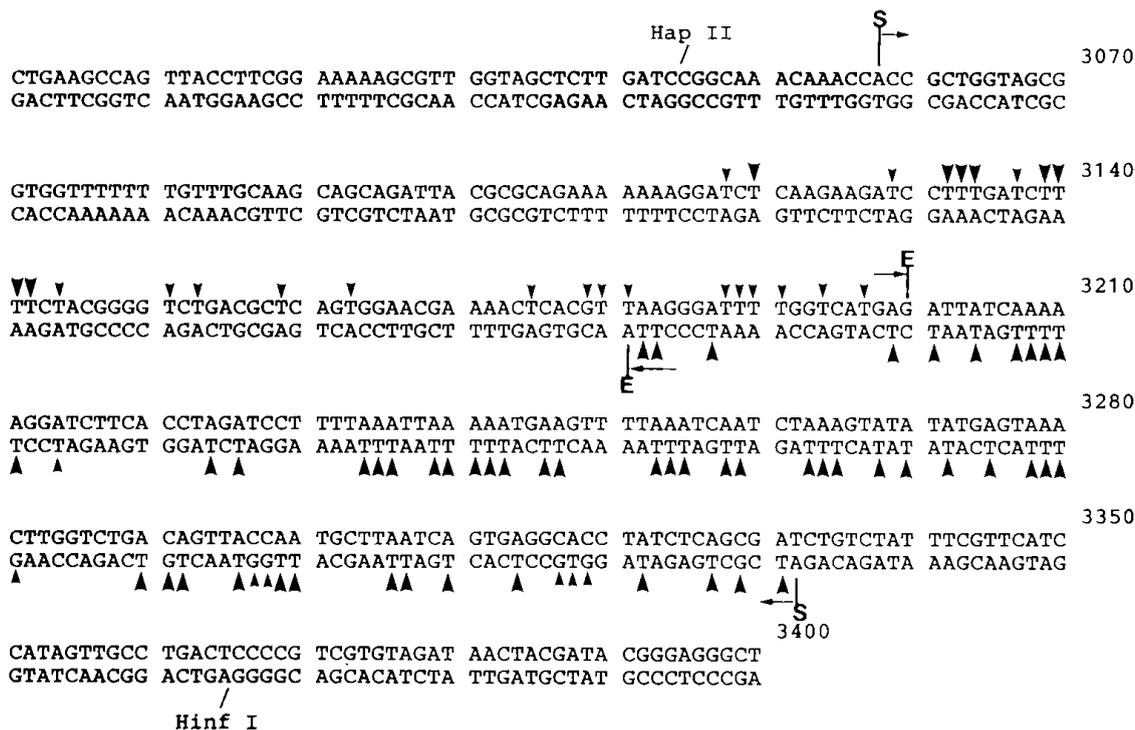


Fig. 12 Ozone-degradation sites in Hap II-Hinf I (3044-3362) regions of pBR322 DNA

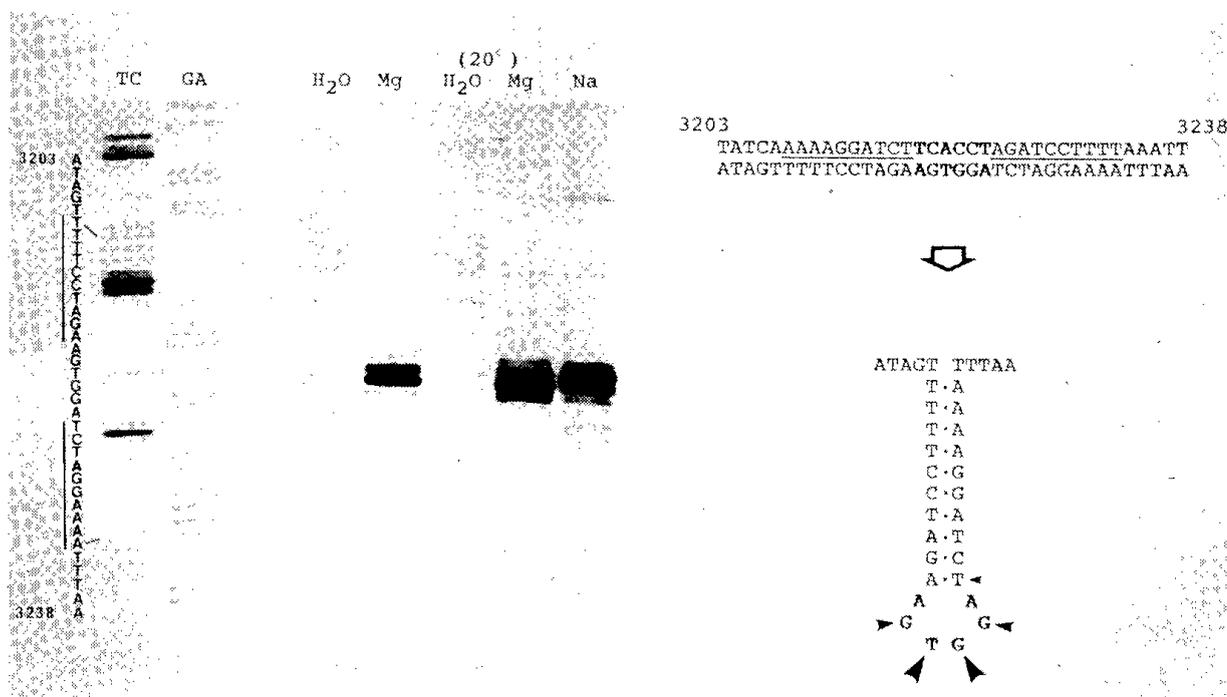


Fig. 13 Ozone-degradation sites in lower strand (3203-3238 bp) of pBR322 DNA

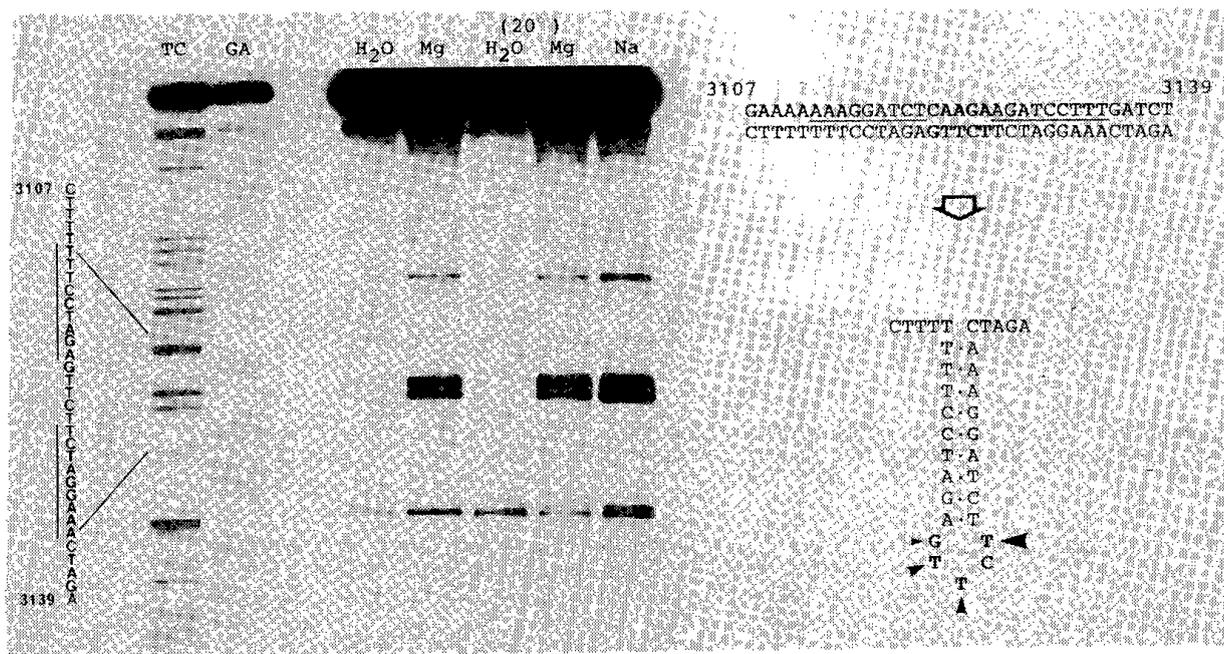


Fig. 14 Ozone-degradation sites in lower strand (3107-3139 bp) regions of pBR322 DNA

処理により得られた ocDNA の upper strand 側の 1524 bp の Hinf I 切断位置から下流方向の領域 (図 9) および lower strand 側の 2033 bp の Hinf I 切断位置から上流方向の領域の塩基配列分析を行った。その結果を図 15 に示した。レーン H には塩非存在下のオゾン処理 DNA からの結果が示されており、両方の strand において塩基部の分解はほとんど観測されず、1930 bp 付近にチミンクラスターが存在しているにもかかわらず分解は起きていないことが判明した。このことは塩非存在下の場合 3.23-3.28 kbp の (A+T) に富む領域が最もオゾンの攻撃を受けやすい構造をとっており、オゾンがこの領域に対して集中して反応していることを裏付けている。

一方塩存在下のオゾン処理 DNA の場合の結果をレーン N に示した。いくつかのチミン塩基の分解が観測され、特に G-T-T と G-T-A という配列の中央のチミン残基が優先して分解を受けていることが判明した。塩存在下のオゾン処理では、3100-3300 bp の領域に形成される cruciform 構造に対して特異的なオゾン分解反応が起きるのが他の領域の G-T-T, G-T-A という塩基配列に対しても選択的に反応が起きることが判明した。オゾンのような小分子がこのような 3 塩基を認識しているとは考えにくく、この塩基配列部分の構造が特殊である可能性が考えられ極めて興味深い。

塩基配列特異性を有する制癌剤のうち、プレオマイシン<sup>15)</sup>、マイトマイシン<sup>16)</sup>などは G-T という配列部分に対し特に選択的に損傷を与えることが報告されている。マイトマイシン C の反応機構はグアニン塩基部に対する付加に始まるが、この小分子が G-T 配列を認識する機構については不明である。プレオマイシンの反応機構についてはこれまで活性酸素の糖部へのラジカル反応であり、塩基配列特異性はプレオマイシンのビスチアゾール部分のインターカレーションによるものと考えられている<sup>17)</sup>。しかし G-T 配列にインターカレーションしたこの近傍で発生する活性酸素が特異的に唯一の部位に反応するとは考えにくい。このプレオマイシンの塩基配列特異性を説明する新しい反応機構が、最近首藤らにより提唱された<sup>18)</sup>。それによるとプレオマイシンの DNA 鎖切断は活性酸素の糖部へのラジカル反応ではなく、塩基部の酸化によって生じ、活性酸素自体の反応に塩基配列特異性がある可能性があると考えられている。オゾンは活性酸素種の一つであり、このオゾンが G-T-T および G-T-A に配列に選択的に反応していることから、著者らは彼らの提唱する反応機構を支持するものである。オゾン、プレオマイシン (活性酸素種)、マイトマイシン C の塩基配列特異性は試薬自体の性質ではなく、この G-T 塩基配列自体の構造に特殊性が存在していると考えられる。

Hinf I - Hap II (2033 - 1813)

Hinf I - Hap II (1524 - 1664)

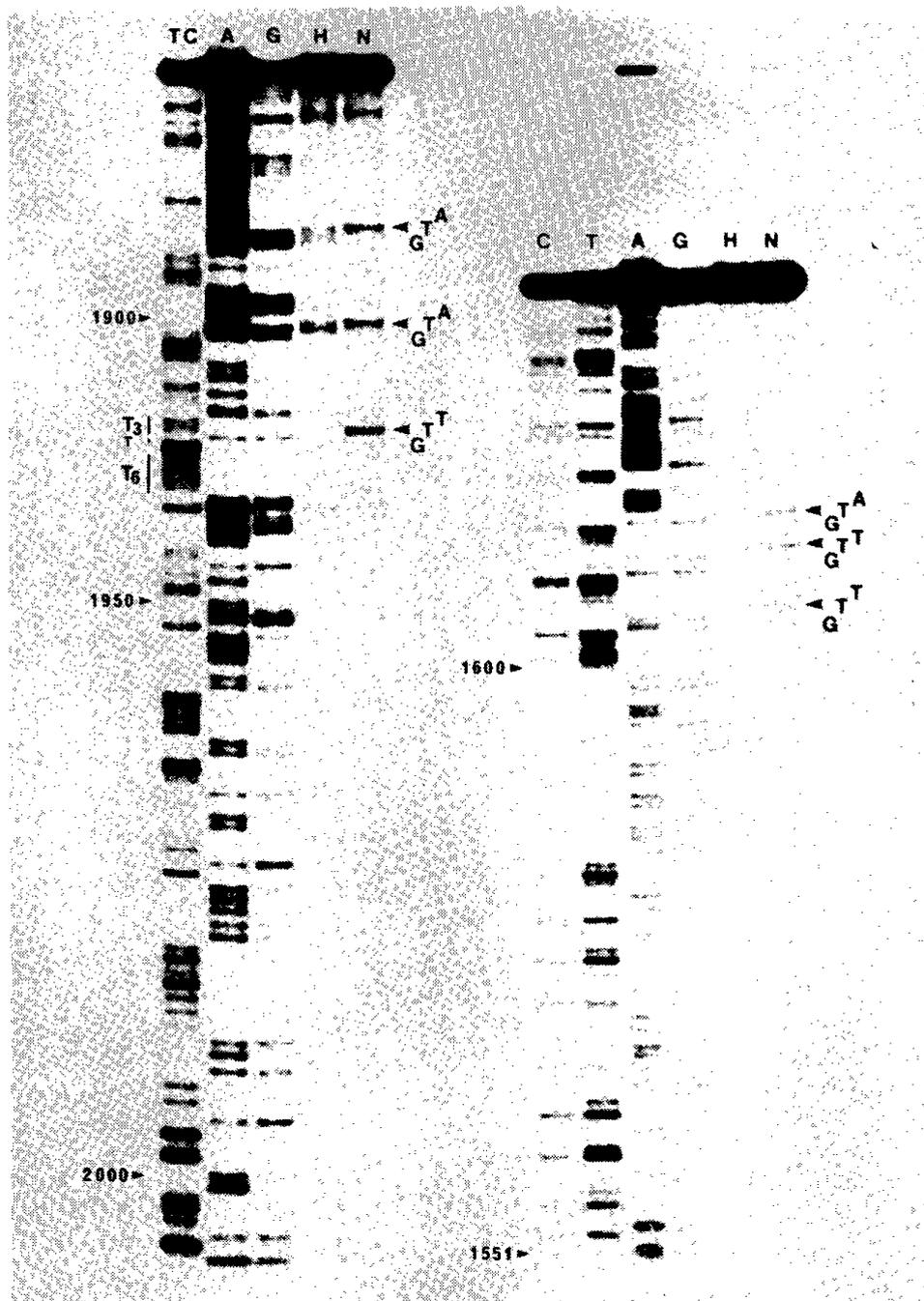


Fig. 15 Sequence analysis of upper strand (1524-1664 bp) regions and lower strand (2033-1813 bp) of ozone-treated pBR322 DNA

H, ozone-treated in the absence of salt ; N, ozone-treated in the presence of NaCl

仔ウシ胸腺 DNA のオゾン分解では、グアニン残基の分解もチミン残基同様起きている<sup>13)</sup>が、この塩基配列分析ではグアニン残基部位での切断はほとんど観察されていない。これについて次のように推測した。オゾンの塩基部の分解はグアニン塩基の 4-5 位の二重結合部分、チミン塩基の 5-6

位の二重結合部分への付加反応に始まると考えられる<sup>19)</sup>。グアニンのこの二重結合部分はピリジン環とイミダゾール環を構成しているためオゾンによる分解反応はチミンに比べ複雑に進むと考えられ、ピペリジン処理に対して安定な分解物が存在する可能性がある。このため、塩基配列分析で検

(56)

出されないと考えられる。一方、DNAの二重らせん構造においてチミンの5-6位は、グアニンの4-5位に比べヘリックスの外側に面している。このためチミンの5-6位は二重らせんDNA中でオゾンの攻撃を受けやすい位置に存在している。さらに今回のccDNAのオゾン分解では仔ウシ胸腺DNAの時より反応条件を弱め、オゾンのDNA構造に対する選択性が上がり、チミンの5-6位の分解が優先して起きていると考えられる。

#### 4 結 論

以上をまとめると以下のようなになる。すなわち、仔ウシ胸腺DNAのオゾン処理で最初にチミン、グアニン残基が破壊され鎖切断は二次的に生ずると報告したが<sup>13)</sup>、スーパーコイル構造をとっているプラスミドのオゾン処理による鋭敏な鎖切断もまたチミン、グアニン残基の破壊に起因する二次的な切断であることが判明した。なお、その極めて速い鎖切断は、塩基部の分解によってその近辺の二重らせん構造の不安定化が起こった時、ccDNAがもつ torsional stress がそれに加わってその stress を解消するために塩基分解部位の5'側あるいは3'側のリン酸ジエステルの加水分解が引き起こされているためと考えられる。また、プロリン tRNA のオゾン分解でループ部分の塩基が反応性に富むことを報告した<sup>12)</sup>がこの点も同じ結果であった。さらにスーパーコイル構造に対して高次構造上極めて特異的にオゾン反応が進行することを明らかにした。この知見から、オゾン分解反応をスーパーコイルDNAの高次構造解析の化学的手法としても利用できると思われる。

#### 引 用 文 献

- 1) K. Miura, K. Sawadaishi, N. Shinriki, K. Ishizaki, T. Ueda, Proceedings of Symposium "Ozone and Biology", International Ozone Association, Rennes, April, 1984.
- 2) K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 15, 151 (1984).
- 3) K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 7183 (1985).
- 4) 沢田石一之, 北海道大学学位論文, "オゾン分解によるDNAの高次構造解析" (1985).
- 5) K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 16, 205 (1985).
- 6) R. D. Wells, T. C. Goodman, W. Hillen, G. T. Horn, R. D. Klein, J. E. Larson, U. R. Muller, S. K. Neuendorf, N. Panayotatos, S. M. Stirdivant, "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", Vol. 24, Academic Press, New York, 1980, p. 167.
- 7) J. G. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, 77 (1979).
- 8) M. V. Norgard, *Anal. Biochem.*, **113**, 34 (1981).
- 9) 吉永光一, 日本農芸化学会大会講演要旨(1982).
- 10) A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 560 (1977); A. M. Maxam, W. Gilbert, "Methods in Enzymology", Vol. 65, Academic Press, New York, 1980, p. 499.
- 11) K. Ishizaki, N. Shinriki, A. Ikehata, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 868 (1981); N. Shinriki, K. Ishizaki, A. Ikehata, T. Yoshizaki, A. Nomura, K. Miura, Y. Mizuno, *Biochim. Biophys. Acta*, **655**, 323 (1981).
- 12) N. Shinriki, K. Ishizaki, K. Miura, T. Ueda, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3601 (1983); K. Miura, T. Ueda, N. Shinriki, K. Ishizaki, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 651 (1984).
- 13) N. Shinriki, K. Ishizaki, S. Sato, K. Miura, K. Sawadaishi, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 3636 (1984).
- 14) D. M. J. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 6468 (1980).
- 15) A. D. D'Androa, W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3608 (1978); M. Takeshita, A. P. Grollman, E. Ohtsubo, H. Ohtsubo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5983 (1978).
- 16) K. Ueda, T. Nomano, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6673 (1984).
- 17) A. P. Grollman, M. Takeshita, *Adv. Enz. Regul.*, **18**, 67 (1980).
- 18) 首藤紘一, 橋本祐一, 遠藤泰之, 岡本敏彦, 昭和59年度, 科学研究費補助金, 研究成果報告書, (1985).
- 19) K. J. Kolonko, R. H. Shapiro, R. M. Barkley, R. E. Sievers, *J. Org. Chem.*, **44**, 3769 (1979); K. Ishizaki, N. Shinriki, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3601 (1984).

## 第7章

# オゾンによる大腸菌の殺菌と菌体内のプラスミド に及ぼすオゾンの影響<sup>1)</sup>

### 1 緒 言

近年オゾンが上水や排水の殺菌剤として有用であることが認められ、また一方ではオゾンが大気汚染物質として極めて有害であることが判明したため、生物や有機物に対するオゾンの反応性が注目を集めてきている<sup>2)</sup>。しかしながら分子レベルでのオゾンによる変化を研究したものは多くはなく、最近になって生体分子に対するオゾンの作用の基礎的な研究が深められようとしている<sup>3)</sup>。細菌やウイルスに対するオゾンの最初の作用点は細胞膜あるいはカプシド、外被であるが、これらの構成成分である不飽和リピドやタンパク質のオゾン反応性が Scott ら<sup>4)</sup>、Mudd ら<sup>5)</sup>、Goldstein ら<sup>6)</sup>により初めて報告された。ウイルスの不活性化機構については第8章でふれるので、ここでは細菌のオゾンによる殺菌機構を概論するが、上記細胞膜への攻撃に加えて、オゾンは細胞膜を通過して内部へ浸透していく過程でその間に存在する酵素に損傷を与え、不活性化していくことも知られている<sup>7-9)</sup>。さらに染色体 DNA や RNA その他の細胞物質を損傷することが考えられる。この中で染色体 DNA の損傷は殺菌機構として重要な位置を占めると考えられる。大腸菌のオゾンによる殺菌に関連してこの点について検討した報告<sup>10-12)</sup>があるが、これらは細胞内 DNA の変化を間接的にしか検討し得なかった。DNA の損傷、特に鎖切断がオゾンによって生じているかどうかを Chaney が末梢血管血液細胞について検討したが、DNA の鎖切断がオゾンによるものとの確認はできないで終わっている<sup>13)</sup>。著者らはオゾンによる核酸の分解機構をこれまで検討し<sup>14-18)</sup>、その集大成として DNA が生体中で通常に存在している形態であるスーパーコイル DNA のオゾンによる分解様式を第6章において検討した。すなわち、著者らが提唱したとおりグアニン、チミン残基がオゾンにより破壊され、その結果、鎖切断が起こることを確認した<sup>19-21)</sup>。この反応は極めて迅速に生じるので現象的にはオゾンが直接に

鎖切断を起こしているかのように見える。すなわちオゾンにより閉環状プラスミド(ccDNA)が、1箇所の鎖切断により開環状プラスミド(ocDNA)になる現象は極めて鋭敏であるので、これを指標として大腸菌をオゾンで殺菌した時の内部の DNA のオゾンによる損傷の程度を計ることができると考えた。さらにこのことが究極的には大腸菌のオゾンによる殺菌機構の解明につながると考え、以下の検討を行った。

### 2 実 験

#### 2.1 大腸菌 HB101 株の培養

プラスミド pBR322 を保持する形質転換大腸菌 HB101 株を用い、これを Norgard の方法<sup>22)</sup>により培養した。大腸菌を LB 培地(第6章2.2参照)で 37°C 一晚、前培養し、これを M9 培地(第6章2.2参照) 200 ml に植え継いだ。この M9 培地を 37°C で振とう培養し、550 nm における吸光度( $A_{550}$ )が 0.7 になったとき直ちに氷水中に30分間保ちその成長を止めた(およそ7分以内で成長は止まる)後、その半分をコントロールとし、残る半分をオゾン処理し、その後それぞれを大腸菌の生存検定試験に供した。*in vivo* プラスミドのオゾンによる変化の検討には、培養液 200 ml の  $A_{550}$  が 0.7 に達した時この懸濁液に 20 mg のクロラムフェニコールを加え、ひきつづき17時間以上培養したものをを用いた。すなわちこのようにしてプラスミド pBR322 のみを増幅した大腸菌 HB101 株懸濁液の半分をオゾン処理に供し、残る半分をコントロールとし、プラスミド抽出の試料とした。

#### 2.2 オゾン処理

大腸菌 HB101 株懸濁液 100 ml を三角フラスコに入れこれを氷水中に保って激しく攪拌した。その表面へオゾン濃度  $10 \pm 0.5$  mg/l のオゾン-酸素混合気流を流速 670 ml/min で吹きつけた。バブリング法は試料液が発泡するため採用しなかった。コントロール実験として同じ条件下、酸素ガスのみ

(58)

を通じた(control I)。また、M9 培地そのものを40分間オゾン処理し、これに LB 培地で前培養した大腸菌懸濁液を  $A_{550}$  が0.7になるように添加し、氷水中に静置して生菌数の変化を測った(control II)。この実験は、培地成分がオゾンにより分解する可能性があるため、その分解生成物が大腸菌の生存に影響しないかどうかを調べたものである。

### 2.3 大腸菌 HB101 株の生存検定試験

大腸菌 HB101 株懸濁液の適量をペトリ皿に入れその上に Nutrient Agar(+アンピシリン, -アンピシリン)を加えて混合し、37°C、24時間培養後、コロニーを計数した。

### 2.4 プラスミド pBR322 の抽出とその精製

Norgard の方法<sup>22)</sup>を1/10スケールで行った。大腸菌懸濁液 200 ml を 2 分し、一方はオゾン処理した後、各々を集菌した。100 ml から得た菌体に 5 ml の WL 緩衝液(25 mM Tris-HCl(pH 8.0)-10 mM EDTA)を加えゆっくり振とうして懸濁、さらに 5 ml 加えて遠心して集菌した。これに 1 ml の WL 緩衝液を加え一晩 4°C に保った後、3 ml の WL 緩衝液を加え、ガラス棒で穏やかに均一に菌を分散させた。これに 1 ml のリゾチーム液(1 mg/ml-WL 緩衝液)を加え静かに攪はん後氷冷した。数分後、溶液が粘性を示し緩やかなゲル状になったところで 3 ml の 0.4%デオキシコール酸ナトリウム溶液と 3 ml の 4% Brij-58 溶液を加え、均一になるまでゆっくり交互に左右に傾斜をする方法で攪はんした。これに 1.2 M NaCl 1 ml を加え(終濃度 0.1 M)均一にした後、29000 rpm、2°C で、30分間遠心(日立 70P-72型分離用超遠心機)して抽出液およそ 12 ml を得た。この細胞抽出液に終濃度 1 M になるように 0.63 g の NaCl を加え、12 ml のクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)を加え、激しく振とうした。これを 6000 rpm 10分間遠心して水層を得た。有機層に 1~1.5 ml の WL 緩衝液を加え逆抽出し水層を合し、2 倍量のエタノールを加えて -20°C で一晩放置した。生じた沈殿を 9000 rpm、4°C で 20分間遠心して集めた。このようにして得られた粗プラスミドの収量はコントロールで平均 2.80 mg であった。粗プラスミドは実際に使用する直前までエタノール沈殿の状態とし -20°C で保存した。

粗プラスミドの精製はゲルろ過法によって行われた<sup>23)</sup>。粗プラスミドの半量(約 1.5 mg)を 500  $\mu$ l

の TE 緩衝液(1 mM Tris-HCl(pH 7.5)-0.1 mM EDTA)に溶解し、予め緩衝液(10 mM Tris-HCl(pH 7.5)-0.1 mM EDTA)で平衡化した TOYOPEARL HW-75S カラム( $\phi$ 1.6 cm $\times$ 65 cm)に載せ同緩衝液で溶出した。分画サイズは 1.1 ml、流速は 5.5 ml/h である。各フラクションの 260 nm における吸光度を測定しクロマトグラムを得た。コントロールの粗プラスミド中のプラスミド含有率は平均 4.2%であった。クロマトグラムのピーク分離のために必要な  $A_{260}$  が 0.03 以上の画分をエペンドルフチューブに移し冷却し、凍結濃縮しておよそ 200  $\mu$ l とした後、これに 4 M NaCl を 10  $\mu$ l と 2.5 倍量の冷エタノールを加え、混合後 -80°C に 15 分おき、冷却下、12000 rpm、15分遠心して沈殿を得た。これを適量の TE 緩衝液(およそ 20  $\mu$ l 以下)に溶解し、1.0%アガロースゲル電気泳動の試料とした。

### 2.5 1.0%アガロースゲル電気泳動

粗プラスミドおよびゲルクロマトグラフィー各画分中のプラスミドの存在状態の検定に 1.0%アガロースゲル(16 $\times$ 15 $\times$ 0.2 cm)電気泳動法が用いられた。ゲルはアガロース Type II を TAE 緩衝液(40 mM Tris-AcOH(pH 8.3)-5 mM AcONa-1 mM EDTA) 60 ml に溶解して作成した。55 V の定電圧で 1 時間、前泳動を行って電流を一定にさせた後、試料液を添加し 55 V の定電圧で 5 時間泳動を行った。泳動用試料は 40% sucrose 3  $\mu$ l に DNA 1  $\mu$ g になるように DNA 液を加え、水で全量 18  $\mu$ l としたものを用いた。泳動後、ゲルはエチジウムブロマイド溶液(0.5  $\mu$ g/ml 以上)で染色し、水で洗浄後 UV ランプ(366 nm)を照らして写真撮影した。

## 3 結 果

### 3.1 オゾン処理大腸菌 HB101 株の生存検定試験

大腸菌 HB101 株の生存検定試験の結果を図 1 に示した。初濃度はおよそ  $2 \times 10^8$  個/ml である。酸素ガスのみの吹きつけによるコントロール実験では大腸菌の生存に変動はなかった。また培地中の栄養物がオゾン分解され、その分解生成物が大腸菌の生存に影響を与える可能性があるためこの点を検討したが、何ら影響はなかった。さらにプラスミドのアンピシリン耐性が損なわれているかどうかを検討する目的で検定培地には+アンピシリンと-アンピシリンの二種類を用いたが、両者

に差はほとんどなく、生き残っているもののアンピシリン耐性は損なわれていないことが判明した。

### 3.2 プラスミド増幅大腸菌 HB101 株のオゾン処理とプラスミド DNA の抽出

クロラムフェニコール処理でプラスミドを増幅した大腸菌の懸濁液を 2 分し、一方は低温で保存、プラスミド抽出に供し、残る一方を氷水冷却下、オゾン処理した。得られた粗プラスミドおよびゲルクロマトグラフィーで精製された単離プラスミドのオゾン処理時間による収量変化を図 2 に示す。収量はコントロールの収量に対する比として示してある。

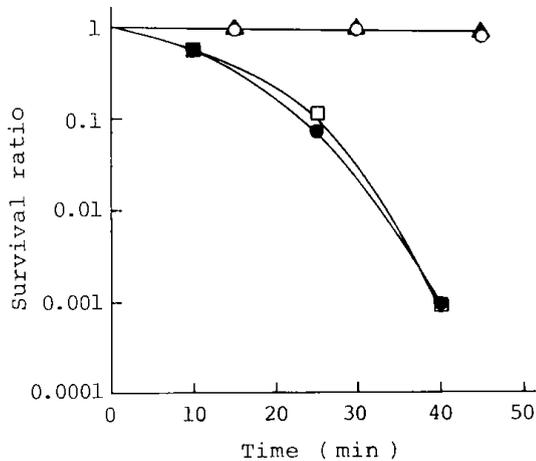


Fig. 1 Effect of ozone on survival of *E. coli* at 0~1°C

▲, *E. coli* was treated by ozone-free oxygen (control I); ○, *E. coli* was kept in ozone-treated M9 medium (control II); ●, *E. coli* was treated by ozone and incubated in Nutrient Agar (-ampicillin); □, *E. coli* was treated by ozone and incubated in Nutrient Agar (+ampicillin)

### 3.3 プラスミド増幅大腸菌のオゾン処理によるプラスミド DNA *in situ* の変化

すでに我々は単離プラスミド ccDNA のオゾン処理を行い、少量のオゾンとの接触で DNA 鎖の一方の鎖が一箇所切断されて ocDNA に転化することを報告した<sup>19-21)</sup>。したがって大腸菌のオゾン処理によってオゾンが内部へ浸透しているならばプラスミドについても上記現象が観察されるはずである。得られた粗プラスミドの 1.0% アガロース電気泳動

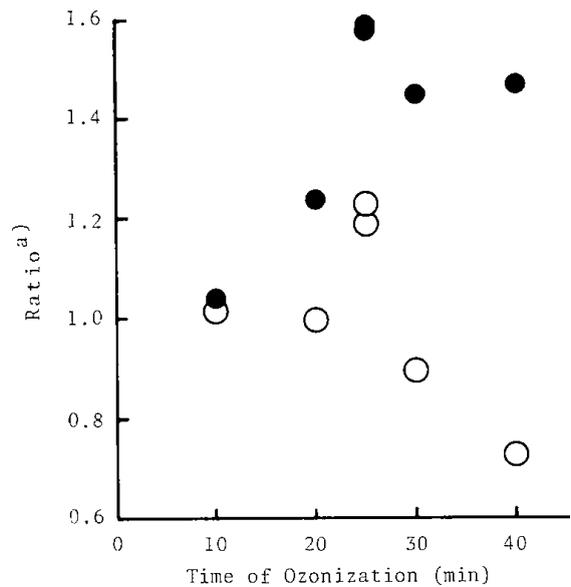


Fig. 2 Effect of ozone on yields of plasmid DNA from *E. coli*

a) yield ratio

$$= \frac{\text{yield from ozone-treated } E. coli}{\text{yield from intact } E. coli}$$

●, isolated plasmid; ○, crude plasmid

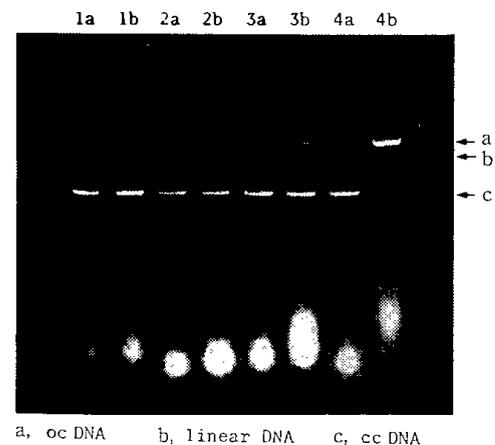


Fig. 3 Morphological changes of pBR322 DNAs in ozone-treated *E. coli*

(a) control and (b) ozone-treated for: 1, 10 min; 2, 20 min; 3, 30 min; 4, 40 min

結果を図 3 に示す。オゾン処理、未処理の a, b は必ず同一培養バルクから得た大腸菌を用いた。1~4 はオゾン処理時間が 10, 20, 30, 40 分のものである。a と b の比較でオゾン処理時間の増加で ccDNA から ocDNA への転化量が増加していることが分る。また直線状 DNA も増加している。オゾン処理 40 分では ccDNA はかすかになり、ocDNA

(60)

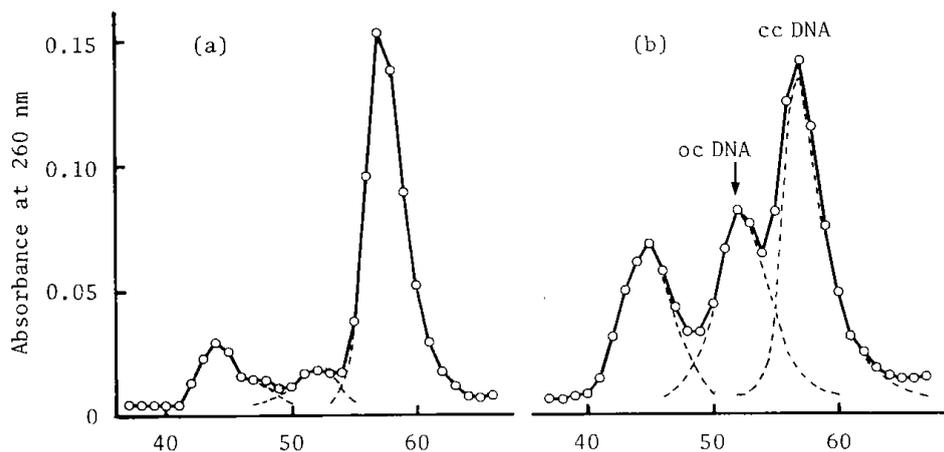


Fig.4 Gel filtration chromatograms of pBR322 DNAs in intact *E. coli* (a) and 25 min-ozone-treated *E. coli* (b)

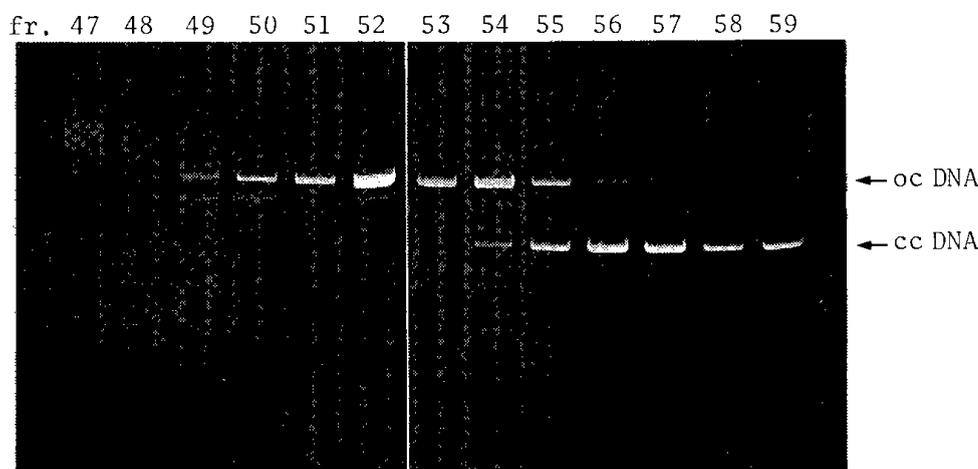


Fig.5 Agarose gel electrophoresis of pBR322 DNA fractionated by gel filtration on TOYOPEARL HW-75 S

pBR322 DNA was extracted from 25 min-ozone-treated *E. coli*.

が主バンドになっている。また ocDNA よりゆっくり移動するバンドもオゾン処理時間とともに増加しスミアーになっていくことが見いだされる。これらの変化はチミンおよびグアニン残基の破壊による鎖切断を伴った分解によると考えられる<sup>19-21)</sup>。これら粗プラスミドを TOYOPEARL HW 75S を用いるカラムクロマトグラフィーで分離精製を行ったが一例としてオゾン処理25分の大腸菌から得た粗プラスミドとコントロールから得たものとのクロマトグラムを図4の a, b に示した。オゾン処理では ocDNA とその他の形態のプラスミド DNA のピークが明らかに増加している。これらのピークのピーク分離(破線で示している)はフラクションから得られたプラスミドの 1.0%アガロースゲル電気泳動の結果(図5)で判定して行った。オゾン処理前(a)の ccDNA とその他のプラスミドの存在

比はピーク面積比で 1 : 0.32であったので、この存在比を基にオゾン処理25分の各ピークの面積比から ccDNA の ocDNA などへの転化率を求めた。大腸菌内各プラスミドの存在比は培養のバルクごとで若干変動するため転化率計算にあたっては必ず同一培養バルクごとで比較計算した。求められた転化率から ccDNA の残存率を図6に示したが、オゾン処理40分では ccDNA はほとんどなくなっていることが分る。

#### 4 考 察

大腸菌のオゾンによる殺菌キネティクスに関する報告は多いが、オゾン殺菌機構について基礎的な考察をしたものはすでに述べたように少ない。大腸菌をオゾン処理した場合、細胞膜が損傷を受けることはすでに述べたが、そのことによって細

胞膜の分子内力に変化を来し<sup>24,25</sup>、細胞膜の機能を変化させる<sup>26,27</sup>ことが考えられる。さらにオゾン処理が進めば細胞内容物が漏れて出るようになり、最後には溶菌する<sup>4,12,28</sup>。しかし本実験では大腸菌の大部分が死滅するオゾン処理40分でも集菌が可能で、さらにプラスミド抽出が普通に行い得たことから溶菌に至るほどの細胞膜の損傷はないと判断される。一方、ccDNAの転化に見られるようにオゾンが細胞膜を通過して細胞質に作用していることが明瞭になった。しかし、ccDNAの転化は大腸菌の殺菌より時間的に遅れて生じていた。この原因として、オゾン浸透に対する細胞膜の抵抗や、オゾンと反応しやすい細胞質によるオゾンの消費が挙げられよう。今後細胞膜損傷の詳細な検討や、酵素系への影響の検討が必要であると考えられる。

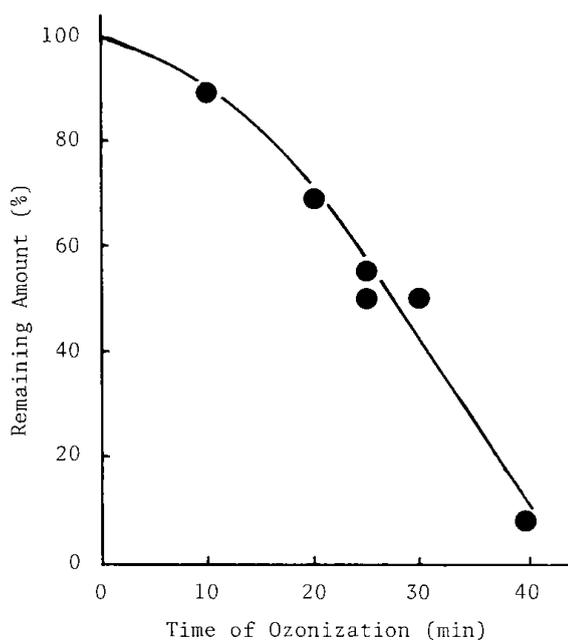


Fig. 6 Disappearance of ccDNA of pBR 322 plasmid in *E. coli* during the ozone treatment

今回の実験では大腸菌のオゾン殺菌の初期メカニズムは明らかにできなかった。しかしプラスミドDNAが細胞内に侵透してくるオゾンによって損傷を受け、時間とともに損傷プラスミドが増加していく事実が明らかにされた。このことから染色体DNAのオゾンによる損傷が当然考えられる。今回の報告はこれまで直接に細胞内での核酸の損傷を正確に測った報告がなかったのに対し、オゾンによる核酸の *in situ* の変化を明らかにした点で意

義があると考えられる。

#### 引用文献

- 1) N. Shinriki, K. Ishizaki, Y. Takahashi, K. Sawadaishi, K. Miura, Proceedings of 7th Ozone World Congress, International Ozone Association, Tokyo, September, 1985, pp. 218-223.
- 2) N. Shinriki, K. Ishizaki, A. Ikehata, T. Yoshizaki, A. Nomura, K. Miura, Y. Mizuno, *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 323 (1981) and references cited therein.
- 3) W. A. Pryor, M. M. Dooley, D. F. Church, *Adv. Mod. Environ. Toxicol.*, **5**, 7 (1983) and references cited therein.
- 4) D. B. M. Scott, E. C. Leshner, *J. Bacteriol.*, **85**, 567 (1963).
- 5) J. B. Mudd, R. Leavitt, A. Ongun, T. T. McManus, *Atmos. Environ.*, **3**, 669 (1969).
- 6) B. D. Goldstein, O. J. Balchum, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**, 356 (1967).
- 7) D. B. Menzel, *Arch. Environ. Health*, **23**, 149 (1971).
- 8) M. Kuroda, F. Sakiyama, K. Narita, *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 641 (1975).
- 9) H. Tamaoki, F. Sakiyama, K. Narita, *J. Biochem. (Tokyo)*, **83**, 771 (1978).
- 10) G. De Mik, I. De Groot, *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 6 (1978).
- 11) C. Hamelin, F. Sarhan, Y. S. Chung, *Experientia*, **34**, 1578 (1978).
- 12) C. Hamelin, F. Sarhan, Y. S. Chung, *Biochem. Biophys. Res.*, **77**, 220 (1977).
- 13) S. G. Chaney, Report EPA-600/1-81-031; Order No. PB81-179-277 (1981).
- 14) K. Ishizaki, N. Shinriki, A. Ikehata, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 868 (1981).
- 15) N. Shinriki, K. Ishizaki, K. Miura, T. Ueda, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3601 (1983).
- 16) K. Miura, T. Ueda, N. Shinriki, K. Ishizaki, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 651 (1984).
- 17) K. Ishizaki, N. Shinriki, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3601 (1984).
- 18) N. Shinriki, K. Ishizaki, S. Sato, K. Miura, K. Sawadaishi, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3636 (1984).
- 19) K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda,

(62)

- K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 15, 151 (1984).
- 20) K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 7183 (1985).
- 21) K. Sawadaishi, K. Miura, E. Ohtsuka, T. Ueda, K. Ishizaki, N. Shinriki, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 16, 205 (1985).
- 22) M. V. Norgard, *Anal. Biochem.*, **113**, 34 (1981).
- 23) 吉永光一, 日本農芸化学会大会講演要旨, (1982).
- 24) S. V. Knev, G. V. Kaler, V. K. Matus, S. M. Yakubovskii, *Vestsi Akad. Navuk BSSR, Ser. Biyal. Navuk*, **1982**, 54.
- 25) V. K. Matus, A. M. Mel'nikova, I. M. Okun, I. M. Slobozhanina, S. V. Konev, *Vestsi Acad. Navuk BSSR, Ser. Biyal. Navuk*, **1980**, 125.
- 26) R. L. Heath, P. E. Frederick, *Plant Physiol.*, **64**, 455 (1979).
- 27) D. A. Johnson, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **121**, 1031 (1980).
- 28) D. B. M. Scott, "Aquatic Applications of Ozone" ed. by W. J. Blogoslawski and R. G. Rice, International Ozone Institute, New York, 1975, pp. 1-15.

## 第8章

# オゾンによるタバコモザイクウイルスの 不活性化機構<sup>1)</sup>

### 1 緒 言

第7章の緒言においてオゾンが水処理、環境問題の観点で近年、注目を集めていることにふれた。本章ではオゾンによるウイルスの不活性化を取り上げるが、このことは水処理において特に重要な問題である。すなわち現在使用されている塩素殺菌法が、ある種のウイルスの不活性化には不十分といわれている<sup>2)</sup>ので、塩素より酸化力の強いオゾンのウイルスに対する効果を検討することは必要かつ重要であろう。最近ではオゾンによるウイルス不活性化の速度論的研究は比較的多くみられるようになってきたが、不活性化機構に関する研究は少ない。ウイルスが増殖していく過程にはいくつかの段階があり、不活性化機構の解明には、(a) タンパク質外被のオゾンによる損傷と中の核酸との相互作用や、(b) ゲノム RNA または DNA のオゾンによる損傷の検討が必要となる。バクテリオファージ  $\phi$ X174 のオゾンによる不活性化ではタンパク質コート<sup>3)</sup>の損傷により脱タンパク質コートが不能となることが不活性化の原因であると報告された<sup>3)</sup>。ファージ  $f_2$  ではタンパク質コート<sup>4)</sup>の損傷により宿主への吸着不能と内部 RNA の部分不活性化<sup>4,5)</sup>、 $T_4$  ではタンパク質コート<sup>6)</sup>の損傷による DNA の放出<sup>6)</sup>が原因とされている。ポリオウイルス type-2 もタンパク質コート<sup>7)</sup>の損傷で不活性化される<sup>7)</sup>。ポリオウイルス type-1 は主として RNA の損傷が不活性化の原因と報告されている<sup>7)</sup>。著者らはタバコモザイクウイルス (TMV) を取り上げてその不活性化機構を検討したが、これは TMV が化学的、物理的変性を起こす要因に対して抵抗性が強いので、ウイルスのオゾン処理の1つの指標になるのではないかと考えたことによる。TMV は長さ 300 nm、直径 16 nm の棒状ウイルスで、中心が 8 nm の中空になっている構造を取っており、95% (w/w) がタンパク質で構成されている (図1)。すでに第2章において、TMV-RNA の失活がグアニン残基の優先的破壊に基づくことを明らかにした<sup>8)</sup>。また

タンパク質コートの破壊が TMV の不活性化の原因ではないことを示唆する結果を得たこともすでに報告した<sup>10)</sup>。しかし、タンパク質コートに保護された RNA がどのようにオゾンによって変性するかは、別途検討する必要があることをその時指摘した。そこで今回は TMV から mRNA を取りだし、これをトリチウム標識し、これを用いて TMV タンパク質と再構成してトリチウム標識 TMV (TMV\*) を作り、これを用いてオゾンによる TMV の不活性化機構の検討を行った。

### 2 実 験

#### 2.1 試 料

TMV は Japanese common strain OM を用いた。TMV を10日間感染させた *Nicotiana tabacum* L. var White Burley の葉の搾汁液からポリエチレングリコールで沈殿物を得、これを超遠心分画法 (日立 70P-72型分離用超遠心機) で精製した<sup>11)</sup>。TMV のタンパク質は酢酸法<sup>12)</sup>で、TMV の RNA

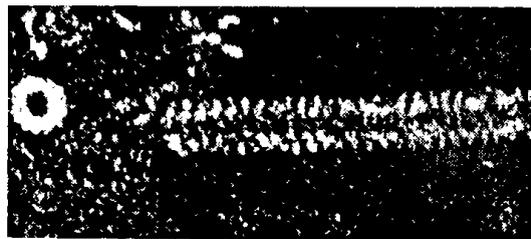


写真: R. W. Horne, N. Nagington, A. P. Waterson

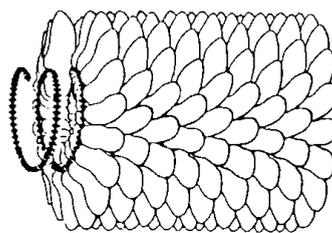


図1 タバコモザイクウイルスの構造<sup>9)</sup>

(64)

はフェノール-ベントナイト法<sup>13)</sup>を参考にして抽出、最終的にベントナイトを超遠心で除去して精製 RNA を得た。分子量マーカーとしての 28S, 18S 各 RNA はラット肝から常法<sup>14)</sup>に従って調製した。アガロースタイプ II は Sigma Chemical 社製を、アクリルアミド, N, N-メチレンビスアクリルアミドは Eastman Kodak 社製を使用した。過硫酸アンモニウムは和光純薬より, N, N, N, N-テトラメチルエチレンジアミンは半井薬品より購入した。Stains-all は Eastman Kodak 社より購入した。NaB[<sup>3</sup>H]<sub>4</sub> および Aquasol-2 は New England Nuclear 社製を使用した。トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)は Sigma Chemical 社より, ショ糖は Schwarz Mann 社よりそれぞれ購入した。

## 2.2 1.2%アガロースゲル電気泳動

TMV-RNA の鎖長の確認のために 1.2%アガロースゲル(20×20×0.1 cm)電気泳動を行った。ゲルの作成には Woo ら<sup>15)</sup>の方法を基本に 50 mM クエン酸塩緩衝液(pH 3.5)-6 M 尿素-10%グリセリンを用いた。作成ゲルは 4°C に 2.5 時間放置した後、使用した。6~7 μg の試料を載せ、定電流 15 mA で 4~5 時間泳動後、Stains-all で染色した。またトリチウム標識 TMV-RNA(TMV-RNA\*)の鎖長の確認のために 1.2%アガロースディスクゲル(φ4 mm×6 cm)電気泳動を行った。ゲル作成条件、試料量、泳動緩衝液は上記と同じである。泳動はアガロースゲル 1 本につき 2 mA の定電流で 5 時間行った。泳動後ゲルをゲルスライサーで厚さ 2 mm のスライスとし、これをバイアル瓶に入れて加温、ゲルを溶解し、シンチレーター液 Aquasol-2 を 5 ml 加えて、Beckman LS-230 型液体シンチレーションカウンターでその放射活性を測定した。

## 2.3 トリチウム標識

完全鎖長の TMV-RNA を用いて RajBhandary<sup>16)</sup>, 大野<sup>17)</sup>らの方法でトリチウム標識した。

## 2.4 再構成とその粒子の精製

TMV-RNA\* と、予め調整してあった TMV-タンパク質を 0.1 M リン酸塩緩衝液中(pH 7.0)で混合し、25°C に 20 時間保持して再構成を行い TMV\* を得た<sup>18)</sup>。再構成粒子は 8.8~23.8%(w/v)の直線型ショ糖密度勾配遠心法で分画された<sup>18)</sup>。ショ糖は 10 mM リン酸塩緩衝液(pH 7.2)に溶解、容量は遠

心管 1 本 36.7 ml である。これに粗 TMV\* のおよそ 8 mg(0.5 ml)を供し、Beckman L2-65B 分離用超遠心機、Rotor SW27 を用いて 2°C, 24000rpm で 2.5 時間、遠心を行った。引続く分画は 1 フラクション 25 滴(0.98 ml)とした。勾配作成および分画は Toyo ALC-2L 型液層自動形成分取装置を用いた。続いて日立 HV-12A 型電子顕微鏡により完全粒子であることを確認した画分を集め 4°C で 16 時間、水に対し透析した。完全粒子の TMV\* はポリエチレングリコール沈殿法で回収され、10 mM リン酸塩緩衝液(pH 7.4)に懸濁、-30°C で保存した。

## 2.5 オゾン処理

TMV または TMV\* 1 mg を 40 mM リン酸塩緩衝液 100 ml に懸濁させた液を試験管(φ, 15 mm)に取り、氷水中で冷却下、液面にオゾン-酸素混合気流(オゾン濃度 5, 20, 40 mg/l)を流速 330 ml/min で吹きつける方法でオゾン処理を行った。従来のバブリング法は発泡が激しいため採用しなかった。オゾン処理された TMV は感染力検定試験に、またオゾン処理された TMV\* は RNA\* の分析に供された。

## 2.6 TMV 感染力の検定

オゾン処理 TMV 懸濁液を 0.1 M リン酸塩緩衝液(pH 7.0)で TMV 濃度 1~6 μg/ml に希釈し、およそ 20 枚の *Nicotiana glutinosa* L. の葉を用いる半葉法に従ってそれぞれ接種し<sup>19)</sup>、3 日後に生ずる壞疽病斑数で TMV の感染力の検定をした。

## 2.7 オゾン処理 TMV\* から RNA\* の抽出

オゾン処理 TMV\* 1 mg からの RNA\* の抽出は微量化されて行われた。すなわちオゾン処理懸濁液をエッペンドルフチューブに移し、洗液と合わせて 100 μl とし、80%フェノール液を同量加え 8 分間ミキサーで振とうし、8000 rpm, 4°C で 20 分間遠心して得られた水層約 100 μl に 80%フェノール液とクロロホルムを各同量加えて同様の操作を繰り返した。得られた水層をクロロホルムで 2 回洗浄した後、クロロホルムを完全に除いた水層に 4 M NaCl を加え(終濃度 0.2 M), 2.5 倍量の冷エタノールを加えて冷却した。RNA\* はエッペンドルフ底部先端に沈殿として回収し、Aquasol-2 を 5 ml を加えてその放射活性を測定した。一方、コートタンパク質を含むフェノール処理廃液の放射活性も

同様に測定した。

## 2.8 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

オゾン処理 TMV\* のフェノール処理で得られる不溶性物質の分析のために、上部に 0.7 cm 長さの 3%ポリアクリルアミドゲルを載せた 10%ポリアクリルアミドディスクゲル(φ4 mm×10 cm)を用いて電気泳動を行った。ゲルの作り方および泳動緩衝液などは Laemmli の方法<sup>20)</sup>に従った。フェノール処理廃液中の不溶性物質はエーテルで洗浄、その後、1% SDS(20 mM Tris - HCl(pH 7.0)- 1 mM EDTA)を 25 μl 加え 60°C で30分間加温して溶液とし、半量をゲル電気泳動に供した。BPB マーカーが 3%ゲルを通して 10%ゲルに入るまでの間(約 15分間)は泳動電流はゲル 4 本につき 5~5.5 mA に保ち、その後 7.5~8 mA で65分間泳動した。染色は Coomassie Brilliant Blue R-250 で行った。泳動後ゲルをゲルスライサーで厚さ 2 mm のスライスとし、これをバイアル瓶に入れ、33%過酸化水素水 0.6 ml を加え 80°C で 2 時間加温してゲルを溶解し、Aquasol-2 を 5 ml 加えて放射活性を測定した。

## 3 結 果

### 3.1 トリチウム標識 RNA による再構成 TMV の調製

10日間接種タバコ葉から得られた TMV の処理で得た TMV-RNA は 1.2%アガロース電気泳動法により 1 本のバンドであることが確認された(図 2)。この TMV-RNA 約 30 mg を 5 回に分けて NaIO<sub>4</sub> 酸化をし、NaB[<sup>3</sup>H]<sub>4</sub> による還元を行い、約 26 mg の TMV-RNA\* を得た。放射活性は平均 753 cpm/μg であった。この方法で TMV-RNA の 5' 末端および 3' 末端ヌクレオチドのリボースの 2', 3' 位の OH が酸化、還元されてトリチウムで標識される(図 3)。この TMV-RNA\* の純度の検定のため約 7 μg を 1.2%アガロースディスクゲルに供し、泳動後ゲルを厚さ 2 mm にスライスしたものについて放射活性を測定した(図 4)。これより TMV-RNA\* は各種鎖長のものがゲル全長にわたって分布していることが判明した。この段階での TMV-RNA\* の精製は困難であったので、このまま TMV タンパク質と再構成を行ったが、未精製 TMV-RNA\* 10.56 mg から TMV\* 123.5 mg を得た。収量は理論量の 58.5%であった。この中の

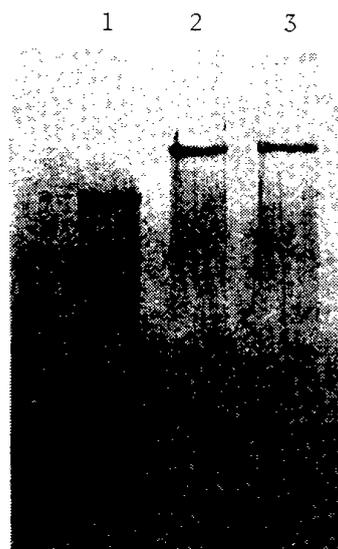


Fig. 2 Agarose gel electrophoretic patterns of purified TMV-RNA

1, markers of molecular weight (a, 28 S RNA ; b, 18 S RNA) ; 2, 3, TMV-RNA

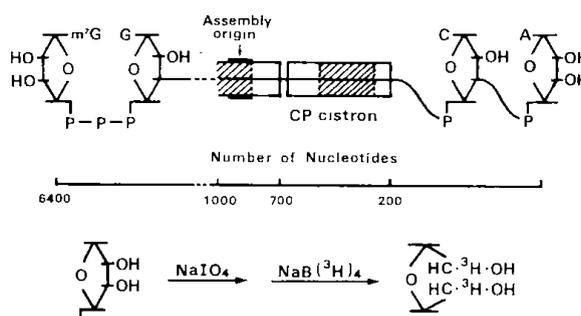


Fig. 3 Structure of TMV-RNA and labeling of its terminals by the NaIO<sub>4</sub>-NaB[<sup>3</sup>H]<sub>4</sub> method

TMV\* 80.2 mg を 8.8~23.8% (w/v) ショ糖密度勾配法で分画、精製した。電子顕微鏡により大多数が正常長さであることを確認した画分から得た TMV\* は 14.2 mg であった。その放射活性は 24.0 cpm/μg TMV\* であった。

### 3.2 オゾン処理 TMV\* の RNA\* の回収

再構成して得た TMV\* を用いてオゾン処理を行った。オゾン処理条件は、a) オゾン濃度 0.1 mg/l -10分、流速 100 ml/min b) 1 mg/l-10分、流速 100 ml/min c) 2 mg/l-10分、流速 100 ml/min d) 5 mg/l-10分 e) 20 mg/l-10分 f) 40 mg/l-30分 g) 40 mg/l-60分であった。微量オゾン処理

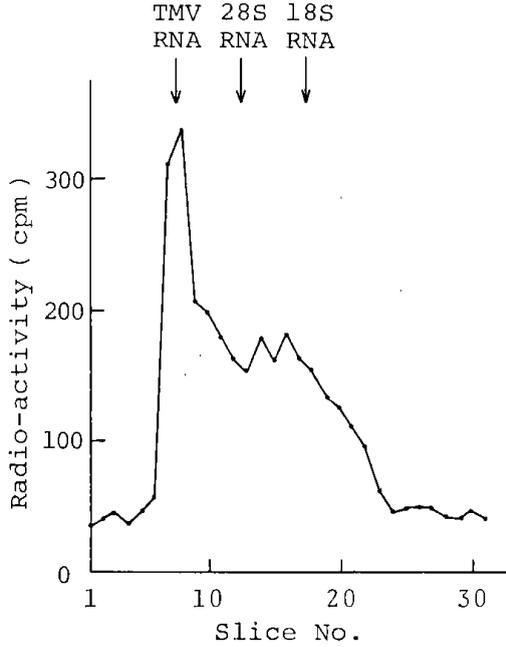


Fig. 4 Profile of agarose disk gel electrophoresis of [ $^3\text{H}$ ]-labeled TMV-RNA

による変化を追跡するため a)~c) についてのみオゾン濃度を下げ、流速も 100 ml/min に下げた。図 5 に RNA\* の回収率を示した。横軸は流速 330 ml/min で吹きつけた時のオゾン処理の強さの程度を表すためにオゾン濃度と接触時間の積で示した。一方、TMV をオゾン処理してその感染性の変化をみた。この結果を RNA\* の回収率とともに図 6 に示した。

### 3.3 オゾン処理 TMV\* のタンパク質コートの分析

図 5 に示したように、フェノール抽出においてタンパク質を含む廃液の放射活性がオゾン処理時間とともに増加することが判明した。そこで 20 mg/l-10分、40 mg/l-10分、40 mg/l-20分のオゾン処理 TMV\* について廃液中の不溶性白色物質を取り出し、その放射活性を測った。オゾン 40 mg/l-20分で処理では TMV\* の 3%程度が RNA\* として検出されたに過ぎず不溶性物質の中に放射活性の 86% が存在すると計算された。この不溶性物質を 1% SDS で処理しても不溶解物が残ったため、これをさらに 0.3 M KOH で 37°C に一晩保ち分解溶解した。SDS 溶解物と KOH 溶解物の放射活性はほぼ 1:1 で不溶性物質の半量が 1% SDS に不溶解のものであった。オゾン処理 20 mg/l-10分、40 mg/l-10分処理では不溶性物質の放射活性はそれぞれ全体の約 12%、55%と計算されたが、この不溶性物

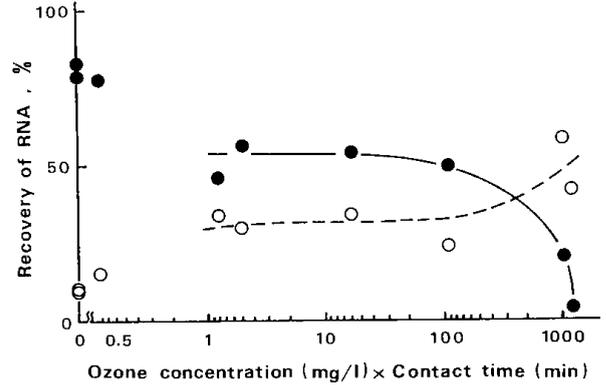


Fig. 5 Recovery yields of RNA from ozone-treated TMV

Starting concentration of [ $^3\text{H}$ ]-labeled TMV, 1 mg/100  $\mu\text{l}$  (24000 cpm); gas flow rate, 330 ml/min; —●—, [ $^3\text{H}$ ]-labeled RNA extracted (RNA\*); —○—, [ $^3\text{H}$ ]-labeled RNA linked to coat protein

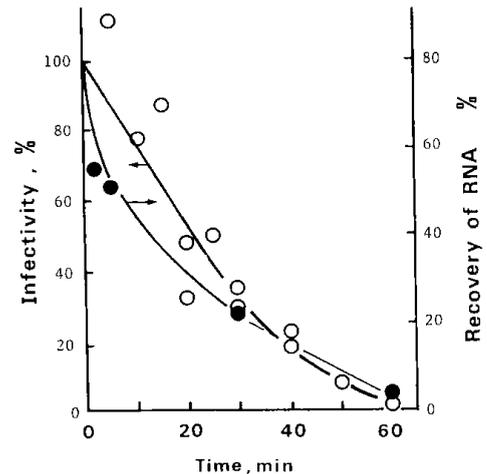


Fig. 6 Inactivation of TMV and change in recovery yield of TMV-RNA by ozone treatment

Ozone concentration: 40 mg/l; the other conditions are the same as those in Fig. 5.

質はすべて 1% SDS 液に溶解した。これら 1% SDS 溶解液をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。図 7 にその写真を示す。ゲルスライスによる放射活性の検出では、3%ゲルのトップ近くの TMV-RNA\* による放射活性ピークの他に 10%ゲルにピークが 3 本、あるいは 1 本、あるいは 5 本というふうに出された。これらの再現性は一様でなくランダムであったが、これにより少なくともコー

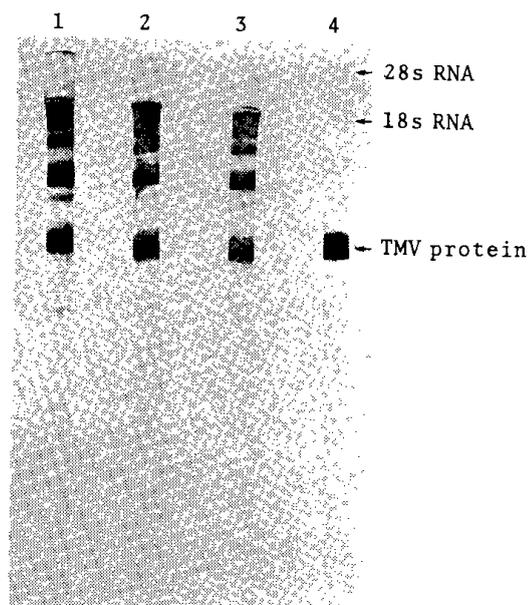


Fig. 7 Polyacrylamide disk gel electrophoretic patterns of unsoluble fractions produced by the phenol extraction of ozone-treated TMV\*

\* reconstituted by using [ $^3\text{H}$ ]-labeled TMV-RNA. Ozonization conditions : gas flow rate, 330 ml/min; ozone concn., (1) 20 mg/l-10 min, (2) 40 mg/l-10 min, (3) 40 mg/l-20 min. (4) control, TMV protein and 28s and 18s RNA as molecular weight markers

トタンパク質と RNA\* が交差結合していたことは明らかである。1 例として、40 mg/l-20分処理のものポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動による放射活性パターンを図 8 に示す。

#### 4 考 察

すでに述べたように著者らはオゾンによる TMV-RNA の活性喪失はグアニン残基の破壊に基づくことを推定した<sup>9)</sup>。またタンパク質コートの破壊は、少なくとも TMV 不活性化の時点ではコートを構成するアミノ酸のうちトリプトファン<sup>90%</sup>、チロシンの 50%、システインの 50% が破壊されているのみ<sup>10)</sup>、これらの分布 (1 サブユニット当たりトリプトファンで 3 個、チロシンで 4 個、システイン 1 個) がコートの中央部分から表面にかけてであること<sup>21)</sup>、さらにチロシン 4 個についてはなお半分は未破壊で残っていることなどから、オゾ

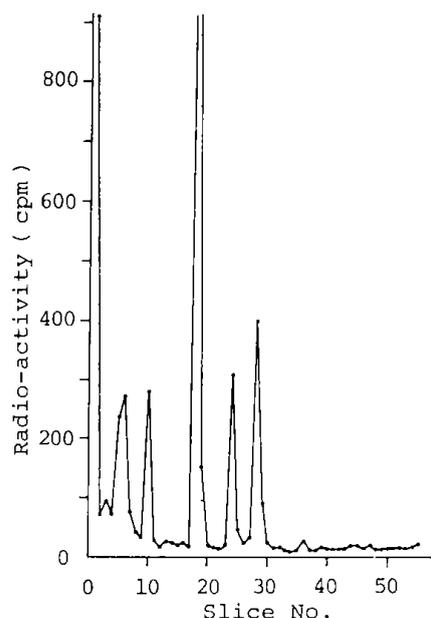


Fig. 8 Profile of gel electrophoresis of No.3 disk in Fig. 7

ンの侵入はタンパク質コートを突き抜けて RNA に達しておらず、TMV の不活性化と直接関係ないことを推論した<sup>10)</sup>。すなわち、第 3 章においてオゾン反応の特性として、オゾン反応性の高いものがある限りオゾンは優先的にそのものと反応することを明らかにした<sup>22)</sup> が、このことから、未反応のチロシンが 50% も残っている事実はオゾンがタンパク質コートの厚さの中程より奥にはまだ侵入していないと解釈されるからである。今回、TMV\* をオゾン処理し、RNA\* の回収率の検討を試みた。図 5 に示すようにオゾン処理量の増加、特にオゾン濃度 20 mg/l で 10 分処理 ( $200 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 以上の処理量では RNA\* の回収率は急激に落ち、それに対応してフェノール処理廃液の放射活性の増加がみられた。このことはフェノール廃液中の不溶性物質の 1% SDS 溶出画分のポリアクリルアミドゲル電気泳動結果からも確認された。すなわちタンパク質の存在を示した図 7 の写真および RNA\* の断片の存在を示している図 8 の放射活性分布パターンから判断されるようにタンパク質-RNA\* の断片の存在が明らかに認められた。またオゾン 40 mg/l-20 分処理で得られるフェノール処理不溶性物質の放射活性のおよそ半分<sup>9)</sup>に相当するものが 1% SDS 不溶性であり、0.3 M KOH でようやく分解され、溶解したことからみても、40 mg/l-20 分処理ではオゾン損傷 RNA\* は強くタンパク質

(68)

と交差結合していることがうかがえる。またこの時の感染性の低下を図6に示したが、感染性の低下とともにRNA\*の回収率が低下していることが明らかである。以上を総合して、TMVの不活性化の機構はオゾンがタンパク質コートを通り抜けるより速くTMVの両端の穴から侵入するオゾンによって、RNAの両端部分のグアニン塩基が最も速くオゾンにより損傷を受けると考えられる。この損傷したグアニン塩基がタンパク質と交差結合してタンパク質コートを脱ぎ捨てにくくすることがTMVの感染力の低下の原因と推定される。

#### 引用文献

- 1) N. Shinriki, K. Ishizaki, K. Miura, T. Ueda, F. Harada, T. Yoshizaki, Proceedings of Symposium "Ozone and Biology", International Ozone Association, Rennes, April, 1984.
- 2) R. S. Engelbrecht, "Advanced Wastewater Treatment" JRGWP Seminar, ed. by Japan Research Group of Water Pollution, Tokyo, 1976, pp. 109-143.
- 3) G. De Mik, I. De Groot, *J. Hyg., Camb.*, **78**, 199 (1977).
- 4) C. K. Kim, D. M. Gentile, O. J. Sproul, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 210 (1980).
- 5) O. J. Sproul, R. M. Pfister, C. K. Kim, *Wat. Sci. Tech.*, **14**, 303 (1982).
- 6) V. W. Rieser, J. R. Perrich, B. B. Silver, J. R. McCammon, "Forum on Ozone Disinfection" ed. by E. G. Fochtman, R. G. Rice and M. E. Browning, International Ozone Institute, New York, 1977, pp. 186-192.
- 7) D. Roy, P. K. Y. Wong, R. S. Engelbrecht, E. S. K. Chian, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 718 (1981).
- 8) R. W. Horne, "生命と分子II, ウイルス" ed. by R. H. Haynes and P. C. Hanawalt, 三浦謹一郎他訳, 東京化学同人, 東京, 1973, pp. 34-35.
- 9) N. Shinriki, K. Ishizaki, A. Ikehata, T. Yoshizaki, A. Nomura, K. Miura, Y. Mizuno, *Biochim. Biophys. Acta*, **655**, 323 (1981).
- 10) 神力就子, 石崎紘三, 池畑 昭, 北海道工業開発試験所報告, 29号, 1983, pp. 92-101.
- 11) 日本生化学会編, "生化学実験講座2, 核酸の化学III", 東京化学同人, 東京, 1977, pp. 516-517.
- 12) H. Fraenkel-Conrat, *Virology*, **4**, 1 (1957).
- 13) H. Fraenkel-Conrat, B. Singer, A. Tsugita, *Virology*, **14**, 54 (1961).
- 14) 日本生化学会編, "生化学講座2, 核酸の化学I", 東京化学同人, 東京, 1975, pp. 135-137.
- 15) S. L. C. Woo, J. M. Rosen, C. D. Liarakos, Y. C. Choi, H. Bush, A. R. Means, B. W. O'Malley, *J. Biol. Chem.*, **250**, 7027 (1975).
- 16) U. L. RajBhandary, *J. Biol. Chem.*, **243**, 556 (1968).
- 17) T. Ohno, M. Sumita, Y. Okada, *Virology*, **78**, 407 (1977).
- 18) Y. Otsuki, I. Takabe, T. Ohno, M. Fukuda, Y. Okada, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 1913 (1977).
- 19) F. O. Holmes, *Bot. Gaz.*, **87**, 39 (1929).
- 20) U. K. Laemmli, *Nature*, **277**, 680 (1970).
- 21) A. C. Bloomer, J. N. Champness, G. Bricogne, R. Staden, A. Klug, *Nature*, **276**, 362 (1978).
- 22) N. Shinriki, K. Ishizaki, K. Miura, T. Ueda, F. Harada, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3601 (1983).

## 第9章

# ガス状オゾンによる*Bacillus*属細菌胞子の殺菌<sup>1,2)</sup>

### 1 緒 言

オゾンは水の殺菌剤としての長い歴史をもっており、水中の殺菌やウイルスに対する強い殺菌または不活性化作用が広く認められている<sup>3,4)</sup>。しかし、気相あるいは固体表面殺菌剤としてのオゾンの利用は食品保存の分野で多少の使用例はあるが<sup>5)</sup>、非常に限られている。現在、気相殺菌剤としては例えば医療器具や使い捨て医療器具の殺菌にはエチレンオキシドや $\gamma$ -線照射が、また微生物実験用安全キャビネットや病院のクリーンルームの殺菌にはホルマリンくん蒸や紫外線照射が用いられている。しかし、殺菌操作の複雑さや、使用後の換気に長時間を要するなどの問題点がある。また後者の例に関連して、最近の遺伝子組換え技術の急速な普及に伴い遺伝子操作によって生ずる恐れのあるバイオハザードの完全防御対策が求められており、その一つの方法として実験に使用する安全キャビネット等の簡便で効果的な殺菌法が求められている<sup>6)</sup>。オゾンの強い殺菌作用や最近のオゾン発生システムの進歩を考えるとオゾンを気相殺菌剤としてこれらの目的に使用することが可能と考えられる。

ガス状オゾンの殺菌作用に関して、早くには Elford ら<sup>7)</sup>が 0.05  $\mu\text{g}/\text{l}$  程度の低オゾン濃度でもある種の病原性細菌に対して殺菌効果があることを報告している。また最近では、Masaoka ら<sup>8)</sup>が病院のクリーンルームの殺菌にホルマリンとオゾンを使用して比較し、操作の簡易さや使用後の換気の容易さから実用的にはオゾンが有利であると結論している。しかし、オゾン殺菌のデータは他の気相殺菌剤に比べて未だ非常に乏しく、利用拡大を図るためにはさらに多くのデータの蓄積が必要である。本研究もこの目標に沿ったものであり、ガス状オゾンの殺菌作用をより明らかにすることを目的としている。実験対象とした微生物は *Bacillus* 属細菌の胞子である。胞子は薬剤や熱、放射線などに対する抵抗性が栄養細胞に比べてはるかに

高く、そのため各種殺菌法の殺菌効果の評価には主に細菌胞子が用いられている。

### 2 実 験

#### 2.1 供試菌株

以下に示す *Bacillus* 属の 6 菌株を実験に使用した。*Bacillus subtilis* IFO 3134 および *B. subtilis* IFO 13721 (*B. globigii*)：財団法人 発酵研究所 (大阪) から分譲を受けた；*B. subtilis* NCTC 10073：National Collection of Type Cultures (London) より分譲を受けた；*B. cereus* AHU 1357, *B. licheniformis* AHU 1532 および *B. megaterium* AHU 1374：北海道大学農学部より分譲を受けた。

これらのなかで IFO 13721 と NCTC 10073 はエチレンオキシド殺菌の指標菌 (biological indicator) として汎用されている菌株である<sup>9)</sup>。

#### 2.2 胞子懸濁液の調製

供試菌は Nutrient Broth (Difco) を用いて 37°C で 12~20 時間、前培養した。この前培養液を胞子形成用寒天培地上に塗抹し、37°C で 3~4 日間培養して胞子を形成させた。胞子形成用培地は下記の 3 種類を用いた。培地 A：Nutrient Agar (Difco), 23 g；MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g；蒸留水, 1 l。培地 B<sup>10)</sup>：Nutrient Agar (Difco), 23 g；KCl, 1 g；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 g；CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.074 g；MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.002 g；FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.00028 g；蒸留水, 1 l。培地 C<sup>11)</sup>：Nutrient Agar (Difco), 23 g；Yeast Extract (BBL), 0.5 g；MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.2 g；CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1 g；MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.01 g；蒸留水, 1 l。培地 A は *B. subtilis* IFO 13721 と *B. subtilis* NCTC 10073 に、培地 B は *B. licheniformis* と *B. megaterium* に、また培地 C はその他の 2 菌株に用いた。

胞子形成後、培地表面の集落をかき取り、滅菌水に懸濁し、80°C で 10 分間熱処理した。次いで残存する栄養細胞を除去するためリゾチーム (懸濁液

(70)

中の濃度：1 mg/l), およびドデシル硫酸ナトリウム(懸濁液中の濃度：10 mg/l)でそれぞれ 37°C, 10 分間処理した。次いで懸濁液を遠心分離と滅菌水への再懸濁を 5 回繰り返して洗浄し, 最終的には  $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$  spores/ml の孢子懸濁液を得た。この懸濁原液は使用時まで 5°C で保存した。

### 2.3 孢子保持試料の作製

孢子はろ紙片(東洋ろ紙 No. 525,  $3.2 \times 1$  cm)に保持してオゾン処理したが, 一部の実験ではガラス繊維ろ紙片(東洋ろ紙 GA-200,  $3.2 \times 1$  cm)に保持した。すなわち孢子を  $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$  spores/ml 含む希釈懸濁液 50  $\mu$ l をろ紙片上に滴下し, 安全キャビネット内で約 2.5 時間乾燥した。このろ紙片を湿度を一定に保ったデシケータ中, 室温で 3 日間以上保存して調湿してからオゾン処理実験に供した。デシケータ中の相対湿度(RH)の調整には下記の飽和塩溶液とシリカゲルを用いた<sup>12)</sup>。90% RH: 塩化バリウム, 75% RH: 塩化ナトリウム, 54% RH: 硝酸マグネシウム, <1% RH: シリカゲル。ガラス繊維ろ紙の場合も同様の操作を行った。

### 2.4 殺菌試験装置

図 1 に実験装置の概略を示す。殺菌試験チャンバーは一種のグローブボックスであり, 主要部は

透明塩ビ製である。またこれには試料出し入れ用のパスボックスが付いている。チャンバーには 3 つのガス流(図 1 の P, Q, R)を混合して導入した。オゾンを含んだ酸素(P)は空気(Q)によって希釈され, さらに湿度調整のため水中を通して加湿された空気(R)が加えられた。なお酸素の流速は 3 つのガス流速の和の 7% に調整したので, チャンバー内の酸素濃度は約 26% (v/v) である。パスボックスは他の空気流(S)によって常時換気された。すべての空気流は除菌のため 0.45  $\mu$ m メンブランフィルターを通した。チャンバーおよびパスボックスからの流出ガスはオゾン分解塔を通して排出された。

チャンバー内のオゾン濃度は紫外線吸収型オゾン濃度計によってモニターした。オゾン濃度は設定値の  $\pm 2\%$  以内で一定に保つことができた。温度と湿度はチャンバー内につるした Assmann 式通風乾湿計で測定した。湿度は空気(Q)と加湿空気(R)の混合比を変えることにより, または加湿空気を通過させる水の温度を変えることによって調節した。予備実験で湿度が孢子の不活性化速度に極めて大きな影響を与えることがわかったので, 頻繁な湿度測定と調節を行った。それによって湿度は設定 RH  $\pm 2\%$  RH で一定に保つことができた。チャンバー内の温度は主に室温によって変化したので, 室温を調整することによりチャンバー内を 22  $\pm$

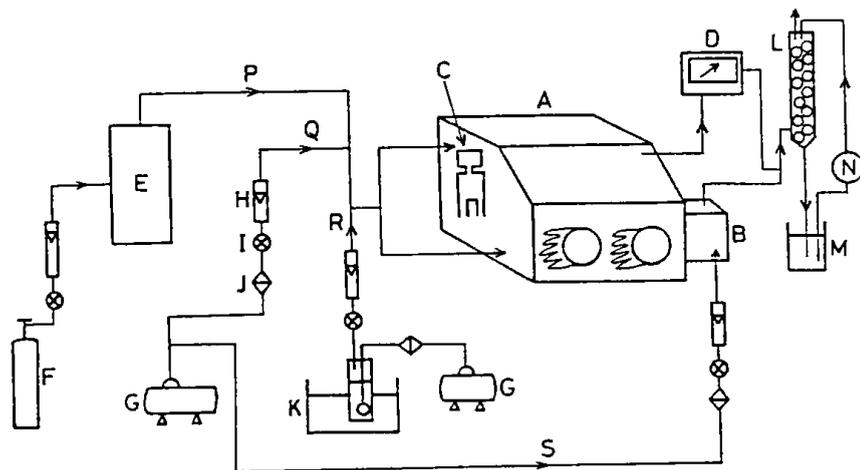


Fig. 1 Experimental apparatus

A, test chamber; B, pass box; C, Assmann psychrometer; D, ozone meter; E, ozonizer; F, oxygen cylinder; G, air compressor; H, flow meter; I, control valve; J, membrane filter; K, water bath; L, ozone decomposer (Raschig rings packed); M, solution containing KI and  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; N, liquid pump; P, Q, R, and S, gas streams

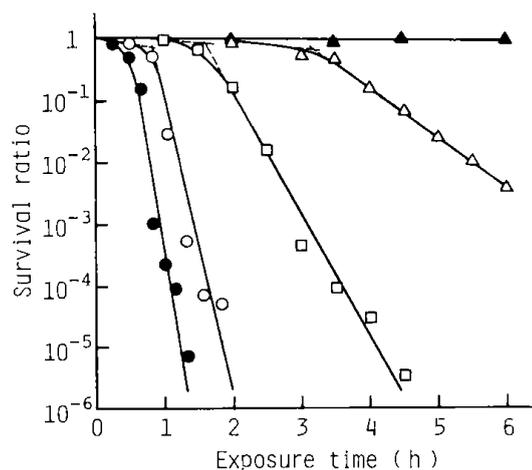


Fig 2 Survival curves of spores of *B. subtilis* IFO 3134

Spores were conditioned at 54 % RH and exposed to 3.0 mg/l ozone on filter paper at RH of: —●—, 95 %; —○—, 90 %; —□—, 80 %; —△—, 70 %; —▲—, 50 %.

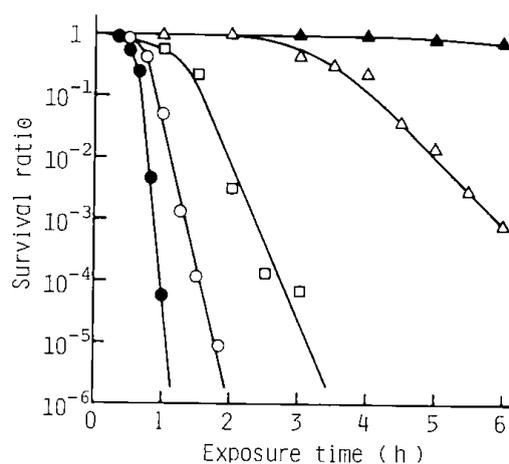


Fig 3 Survival curves of spores of *B. licheniformis* AHU 1532

Spores were conditioned at 54 % RH and exposed to 3.0 mg/l ozone on filter paper at RH of: —●—, 95 %—○—, 90 %—□—, 80 %; —△—, 70 %; —▲—, 50 %.

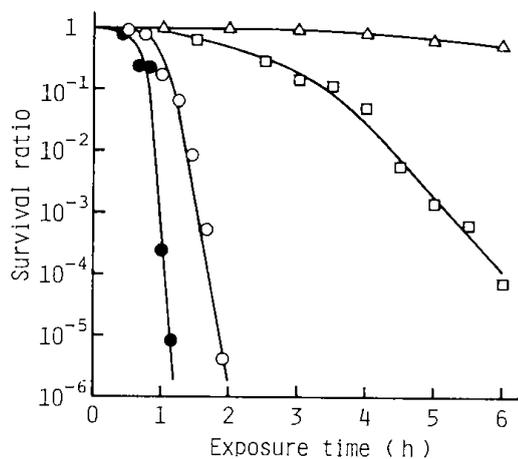


Fig 4 Survival curves of spores of *B. megaterium* AHU 1374

Spores were conditioned at 54 % RH and exposed to 3.0 mg/l ozone on filter paper at RH of: —●—, 95 %; —○—, 90 %; —□—, 80 %; —△—, 70 %.

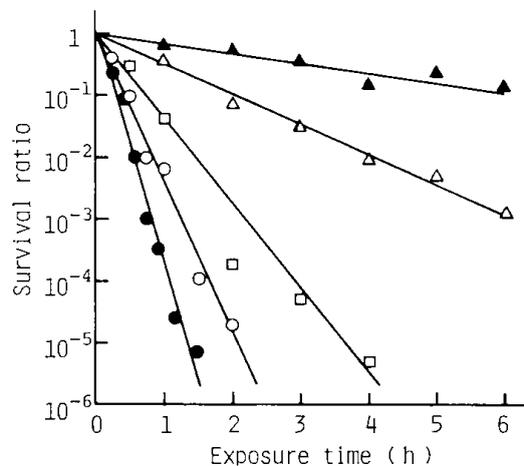


Fig 5 Survival curves of spores of *B. cereus* AHU 1357

Spores were conditioned at 54 % RH and exposed to 3.0 mg/l ozone on filter paper at RH of: —●—, 95 %; —○—, 90 %; —□—, 80 %; —△—, 70 %; —▲—, 50 %.

1°C に保った。

## 2.5 オゾン処理と生菌数の測定

殺菌試験チャンバー内のオゾン濃度、湿度および温度が所定の値で一定になった後、ペトリー皿に入れた孢子保持ろ紙片14~20枚をパスボックス

を通してチャンバー内に導入してオゾンにさらした。各サンプリング時に2枚ずつの試片を取り出した。ろ紙片は0.05%の界面活性剤(Tween 80)を含む生理食塩水中で激しく攪はんして破碎し、胞子を洗い出した。この洗い出し液を適宜希釈してからその0.2~0.7 ml をペトリー皿に移し、Tryptic

(72)

Soy Agar(Difco)を混合し、固化させた。これを37°Cで15~48時間培養し、形成したコロニー数から生菌数を求めた。

### 3 結 果

#### 3.1 胞子の生存曲線と湿度の影響

*B. subtilis* IFO 3134の胞子を54% RHで調湿し、これを種々のRHで3.0 mg/lのオゾンで処理したときの生存曲線を図2に示す。図から明らかのようにオゾン処理初期には殺菌の誘導期があり、その後は指数関数的に生菌数が減少した。湿度の影響は極めて顕著である。50% RH以下では殺菌効果がほとんど無く、湿度の上昇とともに殺菌速度が急速に増加した。また誘導期は湿度の上昇とともに短くなった。これと類似の生存曲線が得られた2菌株の結果を図3と図4に示す。また図示しないが*B. subtilis* IFO 13721と*B. subtilis* NCTC 10073でも類似の生存曲線が得られた。生存曲線の形が少し異なったのは*B. cereus*である(図5)。この胞子では誘導期がほとんどなく、初めか

ら指数関数的に生菌数が減少した。しかし湿度の影響は他と同様に顕著であった。

6菌株の各RHにおける不活性化速度をD値(decimal reduction value)と誘導期の長さで表わして表1にまとめた。D値は殺菌処理の分野で汎用される用語<sup>13)</sup>で、ある殺菌条件で生菌数を1/10に減少させるに要する時間、あるいは放射線量などを表わす。表1の場合は表の下に示した実験条件におけるオゾン処理時間を表わしている。D値は生存曲線の対数減少期の勾配から求めた。また誘導期の長さは例として図2の点線で示したように、誘導期と対数減少期の外挿線の交点の時間と定義づけた。D値と誘導期の長さはともに小さければ小さい程殺菌が容易になり、また胞子のオゾンに対する抵抗性が小さいことになる。これらの値は菌株によって差異があるが、高RHの場合はその差は比較的小さい。特にRH 90以上での*B. subtilis*の3株のD値と誘導期の長さは非常に近似している。しかしRHが下るにつれてD値の菌株による差が大きくなっている。

Table 1 Inactivation of Spores by Ozone at Different Humidities\*

Strain	D-value (Duration of lag phase) min (min)			
	95 % RH	90 % RH	80 % RH	70 % RH
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	8.5(34)	13(50)	30(100)	72(200)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 13721	7.5(35)	12(60)	36(115)	176(240)
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10073	7.5(48)	12(65)	46(110)	370(250)
<i>Bacillus cereus</i> AHU 1357 <sup>+</sup>	15 (-)	23(-)	42(-)	123(-)
<i>Bacillus licheniformis</i> AHU 1532	5.8(36)	13(41)	24(75)	55(200)
<i>Bacillus megaterium</i> AHU 1374	3.8(52)	9.5(66)	50(190)	>400(280)

\* Spores conditioned at 54% RH were exposed to 3.0 mg/l ozone on filter paper.

<sup>+</sup> No lag phase was observed.

#### 3.2 調湿 RH の影響

3.1で述べた実験では胞子はすべて54% RHで調湿してからオゾン処理した。次に調湿のRHを変化させてみた。図6に*B. subtilis* IFO 3134の胞子を用いた実験結果を示す。図から明らかのようにオゾン処理時のRHが一定ならば、調湿RHが高くなる程誘導期が短くなっている。しかし対数減少期の勾配は調湿RHが変わってもほとんど変化してない。すなわち他の条件が一定の場合対数減少期のD値は調湿RHには影響されず、オゾン

処理時のRHのみに依存することを示している。また、たとえ90% RHで調湿してもオゾン処理時のRHが55%と低ければほとんど殺菌効果が無いこともこの結論を裏付けている。

#### 3.3 オゾン濃度の影響

*B. subtilis* NCTC 10073の胞子を用いて0.5~3.0 mg/lの範囲でオゾン濃度の影響を調べた(図7)。オゾン濃度の増加とともに誘導期が短くなり、また対数減少期のD値も小さくなった。図7 bはオゾン濃度に対してD値の逆数をプロットしたも

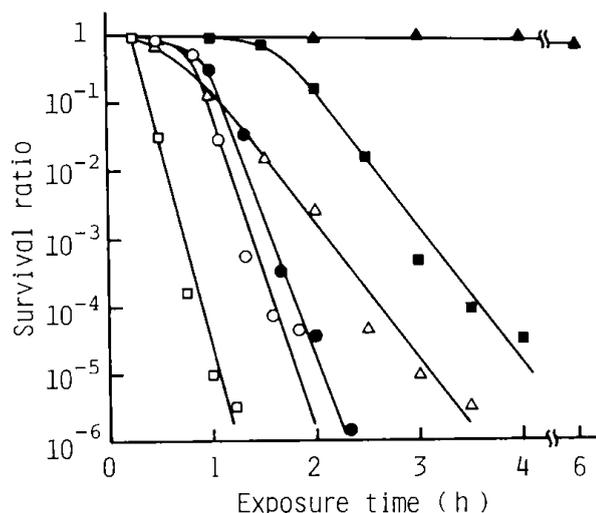


Fig. 6 Effect of conditioning RH on survival of spores of *B. subtilis* IFO 3134

Spores were exposed to 3.0 mg/l ozone on filter paper. Spores were conditioned and exposed at the following RH's:

	conditioned at:	exposed at:
—□—	90 %	90 %
—○—	54 %	90 %
—●—	<1 %	90 %
—△—	90 %	80 %
—■—	54 %	80 %
—▲—	90 %	55 %

ので、ほぼ直線関係が得られ、D 値がオゾン濃度におよそ反比例することを示している。また D 値の逆数は対数減少期の殺菌速度に相当するので、殺菌速度がオゾン濃度に比例すると表現することもできる。類似の結果が *B. subtilis* IFO 13721 の孢子を用いた実験でも得られた。

### 3.4 保持担体の影響

孢子の殺菌剤や放射線に対する抵抗性は保持担体によっても影響を受ける<sup>14)</sup>。これまで述べた実験では孢子はすべてろ紙上に保持していた。そこでこの実験では孢子をガラス繊維ろ紙上に保持してろ紙の場合と比較してみた。図 8 に *B. subtilis* NCTC 10073 の孢子を用いた実験結果を示す。誘導期の長さは 2 つの担体において大差はないが、対数減少期の D 値は明らかにガラス繊維ろ紙を用いた方が大きな値となっている。すなわちガラス繊維ろ紙上の方が孢子の抵抗性がより強いことを示している。ガラスのような非吸湿性物質表面の孢子の方がろ紙のような吸湿性物質表面の孢子よりも抵抗性が大であるという結果は、エチレンオキサイド殺菌においても報告されている<sup>15)</sup>。しかし、その原因については明らかではない。孢子が付着

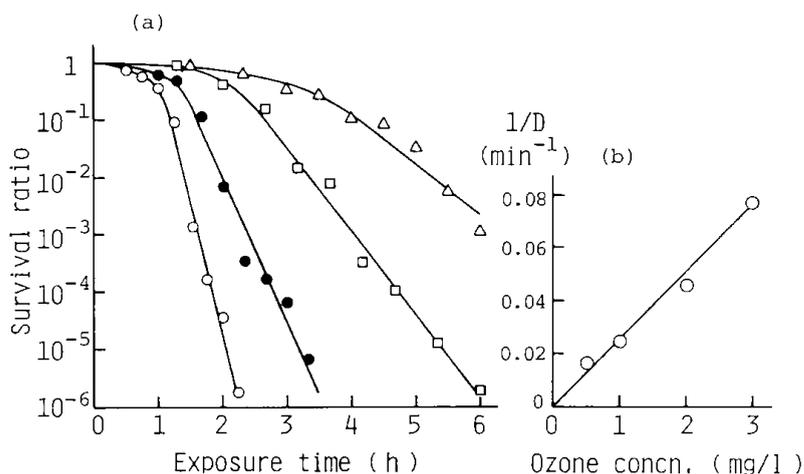


Fig. 7 Effect of ozone concentration of survival of spores of *B. subtilis* NCTC 10073

Spores were conditioned at 54 %RH and exposed to ozone at 90 %RH on filter paper. Ozone concentrations are (in (a)): —△—, 0.5 mg/l; —□—, 1.0 mg/l; —●—, 2.0 mg/l; —○—, 3.0 mg/l.

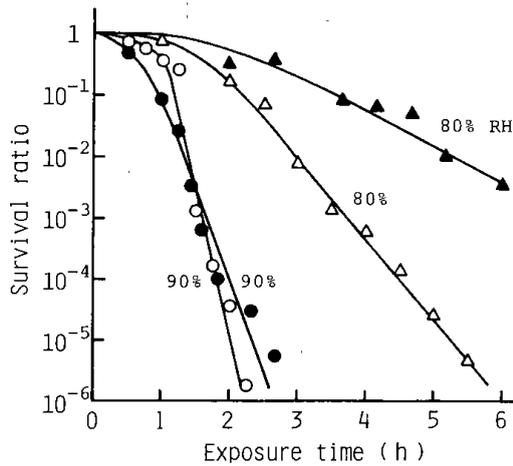


Fig. 8 Effect of carrier material on survival of spores of *B. subtilis* NCTC 10073

Spores were conditioned at 54 % RH and exposed 3.0 mg/l ozone at 90 % RH or 80 % RH on: —○—△—, filter paper ; —●—▲—, glass fiber filter.

している表面の材質によって殺菌速度が異なるのは実用上は大きな問題であるが、図8からわかるように90%RH以上では材質によって大差は無い。

#### 4 考 察

ガス状オゾンによる孢子の殺菌作用は湿度に大きく依存し、RHが高くなるにつれて殺菌速度が急速に大きくなった。孢子の殺菌速度が湿度によって影響を受けるのは他の気相殺菌剤においても同様である。 $\beta$ -プロピオラクトンの場合にはオゾンと同様にRHが高ければ高い程殺菌速度が大きい<sup>16)</sup>。一方、エチレンオキシドとホルマリンでは最適RHがあり、エチレンオキシドでは30~50%RH<sup>15,17)</sup>、ホルマリンでは80~90%RH<sup>18,19)</sup>で最も殺菌速度が大きいと報告されている。

殺菌初期の誘導期も他の殺菌剤においてもしばしば観測されている<sup>19,20)</sup>。かなり長い誘導期の存在は孢子の表層にオゾンの孢子内部への浸透を妨げる厚い障壁があるためと考えられる<sup>21)</sup>。*B. subtilis*、*B. licheniformis*などの孢子では栄養細胞の細胞質に相当するコアー(core)をコルテックス(cortex)が包み、さらにその上を厚いスポアコート(spore coat)が取り囲んでいる。また*B. cereus*の孢子ではスポアコートの外側にさらにエキソスポリウム(exosporium)という層が存在するが、スポアコートは*B. subtilis*などに比べて薄い。スポアコートは

*B. subtilis* などでは孢子全体の体積の約50%を占めるが、これを除去しても放射線や熱に対する抵抗性はあまり変わらないことが知られている<sup>21,22)</sup>。したがってオゾンによりスポアコートが破壊あるいは変性されたとしても、それが不活性化の直接の原因とはなり得ず、スポアコートは主にオゾン拡散の障壁としての働いていると考えられる。RHの上昇により誘導期が短くなること、また50%RH以下ではほとんど殺菌されないことは、孢子の表層構造を通して内部へオゾンが浸透してゆくためにはある程度以上の水分の存在が必須であることを示唆している。調湿RHを変化させても対数減少期のD値にはほとんど影響がなかったが、これは対数減少期に達する前に孢子表層の水分含量がオゾン処理時のRHと平衡になってしまうためと考えられる。また*B. cereus*の孢子では他の5菌株と違って誘導期がほとんど無かった。この原因は明らかではないが、*B. cereus*孢子の表層構造が他のそれと異なっていることと関連している可能性がある。

本研究ではオゾン濃度3.0 mg/lの条件でほとんどの実験を行ったが、この程度の濃度は小さな部屋やキャビネットをオゾン殺菌する場合には実用的にも達成可能である。しかし、効率的な殺菌のためにはオゾン濃度とともに湿度をかなり高く維持する必要がある。どの程度のRHが必要かは殺菌目的によって異なってくる。例えば使い捨て医療器具などの殺菌では菌が残存する製品の確率を $10^{-6}$ 程度を目標にしている<sup>23)</sup>。殺菌前の生菌数を製品1個当たり $10^2 \sim 10^6$ とすれば、 $10^{-6}$ を達成するためには生存率を $10^{-8} \sim 10^{-12}$ にする迄殺菌しなければならない。もし3 mg/lのオゾンで数時間の処理でこの生存率を得るためには、表1のD値や誘導期の長さから考えて90%RH以上の湿度が必要である。またそこまで低い生存率を要求されない場合でも、少なくとも80%RH以上の湿度が必要である。このような考察からオゾンによる孢子殺菌の実用的な条件はRH80%以上でオゾン濃度1~5 mg/lと考えられる。

この濃度を他の殺菌剤の実用的な濃度と比較してみると、エチレンオキシドでは400~1000 mg/l (30~50%RH)<sup>15,17)</sup>、ホルマリンでは3~10 mg/l (80~90%RH)<sup>18,19)</sup>、 $\beta$ -プロピオラクトンでは0.2~2 mg/l (>70%RH)<sup>16)</sup>である。したがって濃度を基準にして孢子殺菌作用の強さを比較すれば、

$\beta$ -プロピオラクトン>オゾン $\geq$ ホルマリン $\gg$ エチレンオキシドとなる。このようにオゾンの殺菌力は現在汎用されている気相殺菌剤のそれに比べてかなり強いほうに位置する。また殺菌操作の簡易性という点において緒言でも述べたようにオゾンはいくつかの利点をもっている。すなわちオゾン発生システムは電氣的制御が容易なので操作のほとんどを自動化することが可能である。またそれによって作業員が殺菌剤にさらされる危険性を軽減できる<sup>8)</sup>。さらに、ホルマリンやエチレンオキシドは吸着性が強いので、殺菌処理後換気しても殺菌剤が長時間残留するのに対してオゾンは容易に除去できる<sup>8,24)</sup>、また排オゾンは金属酸化物触媒などを用いて無害な酸素に分解して排出できる<sup>25)</sup>。

一方、オゾンの短所としてはオゾンは非常に腐食性の強いガスである<sup>17)</sup>、浸透性が弱いのでカーペットで覆われた床などの殺菌が難しい<sup>8)</sup>などが挙げられる。前者については、近年多数の耐オゾン性材料が開発されており上水や排水のオゾン処理に広く用いられていることを考えると<sup>26)</sup>、実用的にはほとんど問題がないと思われる。また後者の欠点は湿度や処理時間の増加で補ってゆく必要がある。

以上に述べたようなオゾンの殺菌力の強さや操作上の利点からみて、気相殺菌剤としてのオゾンの使用が十分可能であると考えられる。例えば、緒言の中でも例として挙げた安全キャビネットやクリーンルームの殺菌への使用が最も可能性が高いと考えられる。今後さらに多くのデータを集めて、実用化のためのより完全な殺菌条件を確立してゆく必要がある。

#### 引用文献

- 1) K. Ishizaki, N. Shinriki, A. Ikehata, H. Matsuyama, Proceedings of 7th Ozone World Congress, International Ozone Association, Tokyo, September, 1985, pp. 212-217.
- 2) K. Ishizaki, N. Shinriki, H. Matsuyama, *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 67 (1986).
- 3) R. G. Rice, C. M. Robson, G. W. Miller, A. G. Hill, *J. Amer. Water Works Assoc.*, **73**, 44 (1981).
- 4) A. D. Venosa, *J. Water Pollut. Control Fed.*, **55**, 457 (1983).
- 5) M. Horváth, L. Bilitzky, J. Hüttner, "Ozone", Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 305-312.
- 6) 科学技術会議, "諮問第8号「遺伝子組換え研究の推進方策の基本について」に対する答申", 1979, pp. 11-12.
- 7) W. J. Elford, J. van den Ende, *J. Hygiene*, **42**, 240 (1942).
- 8) T. Masaoka, Y. Kubota, S. Namiuchi, T. Takubo, T. Ueda, H. Shibata, H. Nakamura, J. Yoshitake, T. Yamayoshi, H. Doi, T. Kamiki, *J. Appl. Microbiol.*, **43**, 509 (1982).
- 9) 今井 紘, 医科器械学, **53**, 327 (1983).
- 10) P. Schaeffer, J. Millet, J. P. Aubert, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 704 (1964).
- 11) P. S. Myers, A. A. Yousten, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 1205 (1980).
- 12) 高分子学会高分子と吸湿委員会編, "材料と水分ハンドブック", 共立出版, 東京, 1968, pp. 240-259.
- 13) A. D. Russell. "The Destruction of Bacterial Spores", Academic Press, London, 1982, pp. 38-46.
- 14) 佐藤健二, 細瀬和成, 木川秋子, 医科器械学, **48**, 278 (1978).
- 15) G. L. Gilbert, V. M. Gambill, D. R. Spiner, R. K. Hoffman, C. R. Phillips, *Appl. Microbiol.*, **12**, 496 (1964).
- 16) R. K. Hoffman, B. Warshowsky, *Appl. Microbiol.*, **6**, 358 (1958).
- 17) 文献 13), p. 233.
- 18) Committee on Formaldehyde Desinfection, *J. Hygiene*, **56**, 488 (1958).
- 19) R. K. Hoffman, D. R. Spiner, *Appl. Microbiol.*, **20**, 616 (1970).
- 20) A. H. Dadd, G. M. Daley, *J. Appl. Bacteriol.*, **49**, 89 (1980).
- 21) 柳田友道, "微生物科学", 第3巻, 学会出版センター, 東京, 1982, pp. 85-95.
- 22) 文献 13), pp. 7-8.
- 23) 棉貫 詰, 實川佐太郎, 榊原欣作編, "滅菌法・消毒法", 第2集, 文光堂, 東京, 1979, pp. 110-111.
- 24) D. H. Akey, *J. Econ. Entomol.*, **75**, 387 (1982).
- 25) C. Coste, "Ozonization Manual for Water and Wastewater Treatment", ed. by W. J. Maschelein, John Wiley & Sons, Chichester, 1982, pp. 204-208.
- 26) F. Damez, 文献 25), pp. 140-142.

## ま と め

本研究はバイオハザード防御にオゾンを用いることを主要な目的として、核酸に対するオゾンの作用を基礎的に検討し、またウイルス、細菌、細菌孢子などに対するオゾンの不活性化作用を検討したものである。本研究で得られた結果を以下に要約する。

- (1) 中性水溶液中におけるヌクレオチドのオゾン分解様式を明らかにした。グアニン、ウラシル、シトシンおよびチミンのヌクレオチドではオゾンの直接反応(イオン反応)によって塩基部分が分解された。一方、アデニンヌクレオチドでは主として・OHラジカルによる糖部分の分解が支配的であった。
- (2) 各ヌクレオチドのオゾンによる分解速度を比較した。リボヌクレオチドの分解速度の順序はGMP>UMP>CMP>AMPであり、デオキシリボヌクレオチドではdGMP>dTMP>dCMP>dAMPであった。デオキシリボヌクレオチドについては反応速度定数を決定または概算した。dGMPとdAMPでは反応速度に200倍以上の差があることが分った。
- (3) RNAのオゾン分解様式を明らかにした。RNAではグアニン残基が他に比べてはるかに速く分解した。特に、RNAの高次構造の外側に露出しているループ領域に3個または4個連続して配列したグアニン残基が最もオゾンの攻撃を受けやすいことが判明した。
- (4) RNA鎖の切断はオゾン反応の初期には生じないことが分った。また鎖切断以前のグアニン残基が数個分解した時点でtRNAのアミノ酸受容能やTMV-RNAの感染能が喪失することが分り、鎖切断がRNA失活の直接の原因ではないことが判明した。
- (5) 仔ウシ胸腺DNAとオゾンの反応ではグアニンおよびチミン残基が迅速に分解した。塩基部分の分解は鎖切断を引き起すが、鎖切断に先立って、二重らせん構造のG-C, A-Tの水素結合が破壊されて生成した1本鎖部分を含む一種の弛緩状態が作り出されることが明らかになった。
- (6) DNAが細胞内で通常存在する形態のスーパーコイル構造をとっているプラスミドDNAのオゾン

反応も(3)および(5)で述べたと同様の結果を示した。特徴的なこととして普通の二重らせんDNAより鋭敏に鎖切断が生じた。これは塩基部分の破壊で構造不安定になったところへ、スーパーコイルのtorsional stressがかかったためと考えられる。

- (7) 大腸菌のオゾン処理により細胞内部に存在するスーパーコイルプラスミドDNAに鎖切断が生じることが判明した。*in vivo*でDNAの鎖切断を実験的に確かめた意義は大きい。これを指標として大腸菌の殺菌と細胞内DNAの変性の関連性を検討した。
- (8) タバコモザイクウイルスのオゾンによる不活性化機構を検討した。また*Bacillus*属細菌孢子の殺菌速度を種々の条件下で測定し、オゾンが気相殺菌剤としても強い殺菌作用をもつことが判明した。

以上のように著者らは核酸のオゾン反応性に関して新しい知見を得、核酸に対するオゾンの作用機構を明確にすることができた。またオゾンが水溶液中ばかりではなく気相殺菌剤としても使用可能なことを示した。核酸を紫外線照射やホルマリンで処理した場合、2量体やメチロール体(核酸塩基の骨格は保存されている)が生成して核酸は失活する。これに対してオゾンではグアニン、チミン塩基の骨格部分の破壊が生じた。このような大きな破壊はバイオハザード防御のためには効果的と考えられる。また、オゾンは空気と電力からその場で生産することができ、しかもその制御が容易である。そのためオゾンによる殺菌、分解法は気相、水相いずれにおいても自動化が可能であり、残留オゾンも金属酸化物や活性炭を用いて分解することができるので環境を汚染しないなどの利点がある。したがって、今後オゾン殺菌法が本研究で解明した殺菌、あるいは核酸分解の基礎的検討結果に基づいて、バイオハザード防御に用いられることを期待するものである。

付け加えるに、近年オゾンが大気汚染の主要原因物質の一つとして認識されており、環境中のオゾンの生体への作用が関心を集めている。また最近、“ozone therapy”と呼ばれるオゾンを用いた

皮膚炎、潰瘍などの治療法がヨーロッパなどで始まっている。本研究の成果はこれらの分野においても寄与できるものと考えている。

#### 謝 辞

本研究を進めるにあたり、一貫して多大な研究上の便宜とご助言、ご指導をいただいた北海道大学薬学部上田亨教授、三浦一伸博士に深く感謝申し上げます。

適切なお助言、ご協力をいただいた北海道大学薬学部水野義久元教授、大塚栄子教授、野村哲士

助教授、沢田石一之博士に深謝致します。

タバコモザイクウイルスを提供していただき、また感染力検定にご協力いただいた北海道教育大学由崎俊道教授に、貴重なお討議をいただいた東京大学理学部岡田吉美教授および国立がんセンター原田文夫博士に、また助言いただいた当所松山英俊主任研究官に深謝致します。

なお実験にご協力いただいた栗山光永、小田島圭子、佐藤祥子、加養勤子、近藤美代子、後藤直子、角地淳二、高橋芳恵、安田優子の諸氏に心から感謝申し上げます。

## Mode of Degradation of Nucleic Acids with Ozone

(FY 1982—1984)

Nariko Shinriki, Kozo Ishizaki  
Yuji Yokota, Akira Ikehata

Ozone has been used in disinfection of water for years, and recently many new areas of its applications have been explored or are being investigated. The disinfection of biological safety cabinets and bio-clean rooms by ozone seems likely to be one of these applications. However, much information regarding the kinetics and the mechanism of destruction of biohazards by ozone is required to establish the new disinfection systems. Apart from the utilization, the effects of ozone on biochemical substances have received much recent attention because ozone is recognized as a major component of photochemical smog. Our three-year research project has therefore been centered on the reactions of ozone with nucleic acids. The inactivation of tobacco mosaic virus (TMV), *Escherichia coli* and *Bacillus* spores by ozone was also investigated. The conclusions of the studies are the following:

- (1) The orders of reactivity with ozone for ribonucleotides and deoxyribonucleotides in neutral aqueous solution were GMP > UMP > CMP > AMP and dGMP > dTMP > dCMP > dAMP, respectively.
- (2) When nucleotides of cytosine, uracil, guanine and thymine are ozonized, the base moieties are first degraded by the direct attack of molecular ozone. In the case of adenine nucleotides, the sugar moieties are predominantly degraded by radical reactions involving  $\cdot\text{OH}$  radicals which are formed by the decomposition of ozone.
- (3) When RNAs are ozonized, GMP is degraded much faster than the other nucleotides. Sequence analysis of ozonized tRNAs showed that the degradation occurs preferentially at the guanine moieties in loops which are located in the most exposed regions of the ordered structure. In particular, the guanine moieties in consecutive sequences, such as -GpGpGpGp- and -GpGpm<sup>1</sup>Gp-, are the most susceptible to ozone.
- (4) The amino acid acceptor activity of yeast phenylalanine tRNA was reduced by ozone to 45% of its original value when only about one guanine moiety per tRNA molecule was degraded, while no cleavage of polynucleotide chain was observed at that time. Tobacco mosaic virus RNA also lost its infectivity at the early stage of ozonization when only few guanine moieties were degraded. Therefore, the inactivation of RNAs by ozone is most likely caused by the preferential degradation of guanine moieties.
- (5) The order of reactivity with ozone for four nucleotides in calf thymus DNA was dGMP  $\simeq$  dTMP > dCMP  $\simeq$  dAMP. No strand scission of DNA was observed at the early stage of ozonization when several guanine and/or thymine moieties had been degraded. As the ozonization proceeded, the strand scissions and also the susceptibility of double-helical structure to nuclease S<sub>1</sub> became detectable.
- (6) The ozonization of supercoiled pBR322 plasmid DNA resulted in the conversion of closed circular DNA (ccDNA) to open circular DNA (ocDNA). Restriction analysis of the resulted ocDNA showed that the preferential degradation of guanine and/or thymine moieties causes strand scissions of ccDNA, followed by the conversion of ccDNA to ocDNA.

- (7) The ozonization of *E. coli* harboring pBR322 plasmid DNA also caused the conversion of ccDNA to ocDNA *in situ*. The conversion rate was slower than the inactivation rate of *E. coli*.
- (8) The results of ozonization of TMV reconstituted by [<sup>3</sup>H]-labeled RNA revealed that the degradation of guanine moieties of RNA is most likely to be the major cause of the inactivation of TMV by ozone.
- (9) The kinetics of inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone was studied under various conditions. Results showed that ozone is an effective gaseous disinfectant for the disinfection of biological safety cabinets and bioclean rooms.

---

北海道工業開発試験所報告  
第40号

昭和61年3月23日印刷

昭和61年3月31日発行

発行所 工業技術院北海道工業開発試験所  
札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号  
電話 011 (851) 0151  
印刷所 協進印刷株式会社  
札幌市東区北23条東7丁目  
電話 011 (751) 3860

---

**REPORTS OF  
THE GOVERNMENT INDUSTRIAL DEVELOPMENT  
LABORATORY, HOKKAIDO**

No. 40 March 1986

**MODE OF DEGRADATION OF NUCLEIC ACIDS WITH OZONE**

Nariko Shinriki

Kozo Ishizaki

Yuji Yokota

Akira Ikehata

Published by

The Government Industrial Development Laboratory, Hokkaido  
2-16 17 Chome, Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo, Japan