

“b 核酸に関する物理化学的研究”

山崎 順 啓**
お茶の水女子大学 理学部 化学教室Studies on the physico-chemical properties
of the so-called “b-nucleic acid”

Nobuhiro Yamazaki

Faculty of Jikei-kai School of Medicine Minato-ku, Tokyo

Abstract

As is already known high molecular D·N·A is digested by ordinary pancreatin with a gradual fall of the viscosity which stops after 26 hours. The degree of solubility in the acid of low molecular D·N·A (b-nucleic acid) thus obtained is about the same as the parent D·N·A.

As a result of my experiment by ultraviolet absorption spectra, migration rate of paper electrophoresis and measurement of acidity, the b-nucleic acid seems to be a kind of depolymerized substance of D·N·A which is cut off by the pancreatin at certain points of the polymer chains.

For the purpose of finding out the true nature of the b-nucleic acid, the difference between D·N·A and b-nucleic was further investigated by experiments with chemico-physical properties such as sedimentation, diffusion, lightscattering, and viscosity.

The results of these experiments are as follows:

- 1) Sedimentation constant (with Spinco Model E ultracentrifuge)
 - parent D·N·A : $S_0 = 28.8 \times 10^{-13}$ (cm/sec)/(dyne/g)
 - b-nucleic acid : $S_0 = 3.5 \times 10^{-13}$ (cm/sec)/(dyne/g)
- 2) Diffusion constant (with Neurath type cell)
 - parent D·N·A : $D_0 = 0.2 \times 10^{-7}$ cm²/sec
 - b-nucleic acid : $D_0 = 3.3 \times 10^{-7}$ cm²/sec
- 3) Light scattering
 - parent D·N·A : $M^{*1)} = 200 \sim 1000 \times 10^4$
 $R^{*2)} = 3000 \text{ \AA}$
 - b-nucleic acid : $M = 4 \sim 10 \times 10^4$
 $R = 600 \text{ \AA}$
- 4) Viscosity (with ubbelohode viscometer)

* 本研究の要旨は昭和 34 年 7 月第 99 回日本生化学会関東部会, 同年 10 月第 8 回核酸シンポジウム, および昭和 35 年 3 月第 1160 回成医会例会において報告された。

** 所属: 東京慈恵会医科大学第一外科教室 (1959 年度お茶の水大研究生)

parent D·N·A : $[\eta]^{*3)} = 2 \sim 3$

b-nucleic acid : $[\eta] = 0.3$

5) Molecular weight calculated from Sedimentation constant and Diffusion constant

parent D·N·A : $M = 700 \times 10^4$

b-nucleic acid : $M = 6 \times 10^4$

As a result of the above experiments it was found out that the b-nucleic acid is a lower molecular D·N·A which was separated into small pieces of about 1/100 of the original D·N·A, having a more uniform, symmetrical shape than the original D·N·A. It was also found out that when these small pieces of b-nucleic acid were put into a saline solution, they were not affected by each other as the parent D·N·A. The next problem is to find out the pure enzyme in the pancreatin which cuts the D·N·A chain at certain points and to find out where it cuts the chain.

*1) M : Molecular Weight

*2) R : End to end distance

*3) $[\eta]$: Intrinsic Viscosity

第 1 章 緒 言 Introduction

デオキシリボ核酸 deoxyribonucleic acid (以下 D·N·A と略す) に関しては現在、非常に多方面からしかも細部にまでわたっての研究が進められており、その化学的物性的性格、生物学的特色およびその機能はもちろん、遺伝学や細菌学との関連性にまでその分野をひろげようとしている。焦点を DNA の構造に関する研究にしぼってみても、非常に多くの研究者たちにより新しい面がつつぎと開拓されつつあるが、その骨子である各 Nucleotide の構造も明かにされ、かつそれ等の DNA 中における基本結合様式も決定された。その結合様式によって生成した長い polynucleotide が Watson-Crick¹⁾ のいう如く、二重螺旋構造をなして存在することについては、その後の合成 polynucleotide の研究からほぼ確かめられている。また各 nucleotide の sequence についていえば、これは各種の DNA の生理的意義と密接に関連しているものでまたその意味では DNA 化学の最終の目標の 1 つであることは疑をいれないが、今日なおほとんど不明といってよい。

このようにある面では非常に解明されている反面、DNA に関する未解決の重要問題も決して少なくない。ここでとりあげた b-核酸の問題もそうした未解決の問題を解く一つの鍵を提供するものと言へよう。1894 年 Kossel および Neumann²⁾ により非凝固性の核酸として b 胸腺核酸 (以下 b 核酸と略す) の存在が初めて認められたが以後 Feulgen によってその仕事はうけつがれた。すなわち 1935 年彼は牛胸腺 DNA に pancreatin を作用させることにより非凝固性でしかもいろいろな点で parent substance とは性格の異なる b 核酸なるものが得られることを見ており³⁾ その後辻の研究により⁴⁾ DNA (Feulgen 法により抽出) が b 核酸に変化する場合の特色として 1) 粘度の低下は著しいが 2) 脱リン酸脱塩基は認められず 3) 塩酸による沈澱性が減せず 4) しかも酸度の上昇がない等の事実があげられた。また彼は真鱈白子核酸を Neumann Feulgen 法で抽出した場合、牛脾臓 DNA のときと全く同一条件で行ったにもかかわらず得られた DNA は粘度低く b

核酸の性格を示すことを報告しており⁵⁾、このことは b 核酸の性状をもつ DNA が天然にも存在する可能性を暗示している。

著者は前述の pancreatin の作用は Kunitz により分離された DNase I の作用とはやや異った酵素作用によるものではないかとの考へのもとに再びこの問題を取りあげ、すでに藤沢らとの協同研究によりその粘度変化、酸溶性画分の消長、メチルグリーン色素に対する親和性、および酸度の変化等については若干検討を加えてあり⁶⁾、その他牛腸粘膜 phosphatase による無機磷発生の比較、紫外線吸光度の差異、濾紙電気泳動による易動度測定等の結果からも b 核酸は DNA の解重合物質であろうという結論に達している。

ここでは、次の段階として物理化学的方法を用い b 核酸および DNA の分子量、分子の大きさ、分子形等につき両者を比較検討して、b 核酸の輪郭をより正確に書き出すため、沈降、拡散、光散乱、粘度等の実験を行なった。

第 2 章 試 料 Materials

この実験に用いた DNA はすべて Feulgen 法に準じて抽出した牛脾臓 DNA でこれに日本薬局法パンクレアチンを 30 時間作用させて b 核酸を得た(この 30 時間という時間は前実験において⁶⁾、粘度低下を経時的に観察し pancreatin の酵素反応が 24 時間から 30 時間で平衡に達することを確認して定めた)。

1) ウシ脾臓 DNA の分離精製 (Feulgen, 辻の法^{3,4)}) まず超大型ビーカーに水 10 l と氷醋酸 10 ml を入れて沸騰せしめ、手掌大に切った新鮮な牛の脾臓約 4.0 kg を入れて 20 分間強く煮沸せしめた。その後湯を捨て脾臓の被膜を手で除き、肉挽機にかけ挽潰した後、これに水を加えて 4.0 kg とした。これを 4 l のビーカーに移し木の棒で良く攪拌し粥状とした後、480 g の醋酸曹達を加え沸騰水浴中に入れさらに攪拌しながら 80°C に温度を上昇せしめた(この間 30~40 分を要する)。この際水を容れた蒸発皿で容器の口を蓋い水分の蒸発を防止した。80°C において 33% 苛性曹達を 248 ml 加えると内容は一時粘稠となるが間もなく流動性となり赤褐色に変化した。30分後に 120 g のタルクを加え次に 30% 醋酸約 320 ml を加えて湯浴内で中和せしめた。

その後数ケのパーナーを用いてアスベスト金網上で強熱し攪拌しながら内容を沸騰せしめ、その際泡の立つのを防止するために 80 ml のイソアミールアルコールを加え再び煮沸した。次いでこの容器を沸騰水浴上に移し、攪拌を止めて加熱をつづけ、30 分後に上澄液を保温漏斗を用いて目の細かい布で濾過し、内容を 10 l の容器にとり、残渣には 50 ml の水を加えて煮沸し再び濾過して濾液を合せた。冷却すればゲル化するので容器を直火にて 80°C に加熱し攪拌しながら 8 l の熱アルコールを加え、直ちに核酸曹達の白色の沈澱を折出せしめ、これを大型ビーカーに移し 30 分後帯褐色の上澄液を傾斜し、残渣に水 160 ml エチルアルコール 320 ml および醋酸曹達の濃溶液 11 ml を加えて攪拌し 2 重の濾紙で吸引濾過した。さらにこの沈澱を濾紙とともに細く切り、500 cc のフラスコに入れ 250 cc の水を加えて水浴上で加熱溶解せしめた。これに醋酸曹達 50 g と沸騰石数ケを加え沸騰水浴上にて冷却器をつけず 4 時間加熱せしめ、これを襲付き濾紙にて熱漏斗で濾過し残渣に水 120 ml を加えて煮沸後濾過し濾液を合わせた。これを 80°C に加熱し、上から熱アルコール 1000 ml を加える場合、初めは注意し良く攪拌しながら徐々に加え核酸ソーダを絮状の沈澱または塊状として容器の底に沈澱せしめた。30 分間放置した後母液

を傾斜し去り、水浴水にて加温しエチルエーテルを蒸発せめた。残渣に熱湯 400 ml を加えて加温溶解し 500 ml のフラスコに移し沸騰水浴上で 15 分間加熱し生じた僅かな沈澱は熱漏斗で濾別した。その濾液に醋酸曹達 4.0 g を加えてさらに加熱し熱時に攪拌しながら冷アルコールを混濁の生ずる程度にまで加え、冷却したのちこれに 800 ml のエチルアルコールを加えて完全に核酸曹達を析出せしめた。これらの沈澱を集め無水アルコール中に約 10~12 時間放置して脱水を行なった。その後アルコールを代えて乳鉢中で細く碎きさらに脱水し遠沈、上清を捨て沈澱物をエーテルで洗滌したる後に硫酸デシケーター中にて乾燥せしめた。以上の処理方法により約 14 g の白色粉末を得た。

2) 除蛋白法 (Sevag 法)⁷⁾

上述の如く Feulgen, 辻の方法に準じて得た DNA をさらに Sevag 法により除蛋白を行なった。すなわち DNA 5.5 g を約 690 ml の水に溶解しそれに 10% NaCl 水 60 cc を混和し chloroform-amylalcohol (3:1) 240 ml を加えて mixer を用い約 150 秒間攪拌した。その後 3000 rpm 30 分の遠沈操作を行うことによりこの液は 3 層に分離した。すなわち上に核酸溶液の水層、中間に帯状の蛋白沈澱層、下に Chloroform-amylalcohol 層を見る。この核酸を含む水層をピペットにて吸いとり 2 容のアルコールにそそぐと白色絮状沈澱を生じた。この沈澱物を 70%, 80%, 90% アルコールにて順次洗い最後に無水アルコール、エーテルにて脱水し硫酸デシケーター中にて乾燥せしめた。以上の操作により 3.87 g の製精 DNA を得た。

3) b 核酸の製精および除蛋白

Sevag 法ですでに除蛋白を行った Feulgen 法 DNA 1.5 g を水 188 ml に溶解しこれに日本薬局法パンクレアチン 2.0 g/5 ml の遠心上清 3.8 cc を加え、トルオール数滴を加えて 30 時間 37°C にて incubation を行った。30 時間後 10% NaCl 溶液 15 ml を加えて混和後、クロロホルムアミールアルコール (3:1) 60 cc を加えミキサーで 150 秒攪拌しこれを 3000 rpm 30 分遠沈して水相についてさらに 2 度この除蛋白操作をくりかえし上清を 2 容のアルコール中に注ぐと白色絮状沈澱を生じた。これを遠心分離して沈澱物を集め 70%, 80%, 90% アルコールで順次洗い最後に無水アルコール・エーテルで脱水して硫酸乾燥器中で乾燥し 830 mg の白色粉末を得た。

4) 透析および凍結乾燥

Feulgen 法 DNA および b 核酸を各々 3% の濃度の水溶液としセロファン袋に入れ水

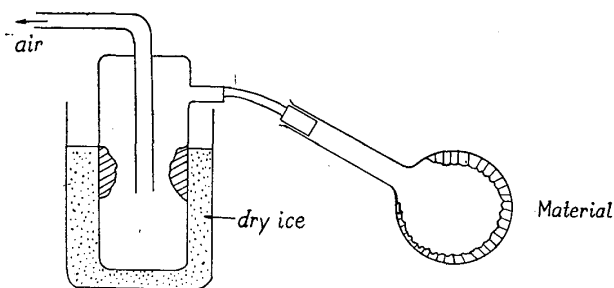


Fig. 1 Apparatus for Freeze-drying

槽内にて透析を行った。氷室にて透析中、外液をしばしば新しい蒸溜水にとりかえて、3 日間の後に内液をとりだし、球形のフラスコに移しドライアイス中で回転しながら凍結させた。つぎにフラスコ壁に凍結した DNA を乾燥するため図 (1) の如き装置により水分をとりのぞいた。

凍結乾燥後は密封しデシケーター中に保存し種々の実験に供した。

5) 試料の化学分析と二、三の性質

Feulgen 法 DNA および b 核酸はいづれも乾燥状態では綿状を呈し、その色は DNA

はやや黄褐色をおびた白色で一方 b 核酸はほとんど純白に近い白色を示した。

蒸留水に対する溶解度はともに良好で DNA は粘調なる溶液となり b 核酸はこれに比べてはるかに粘調性の低い溶液となる。

1%程度の NaCl 水に対しては Feulgen DNA は溶解度が小さく pH 7 程度では長時間の磁性攪拌器による攪拌によっても完全には溶解せず水溶液の pH をアルカリにて 9 以上に上げると完全に溶解する。しかしはじめに塩を加えない水溶液にしておきその後で高濃度の NaCl を加えることにより自由な濃度の NaCl 溶液を作ることができた⁸⁾。これに対して b 核酸は初めから 1%程度の NaCl 水に対して良く溶解した。

窒素、磷の分析; 窒素定量法には消化法 (Miller etc) とヨードメトリー法 (M. Levy & A.H. Palmer) を組合わせた方法を用い、磷定量には Amidol を用いる比色法 (Allen 法) を用いた⁹⁾。その結果 DNA は N : 12.29%, P : 7.12%, N/P : 1.71, b 核酸は N : 11.33%, P : 6.75%, N/P : 1.68% の値を得た。この値を他の実験者のそれと比較したのが表 (1) である。

表 (1)

Feulgen 法DND および b 核酸分析値			
	P (%)	N (%)	N/P
脾 DNA (山崎)	7.12	12.29	1.71
脾 DNA (内田)	6.70	11.10	1.66 ¹⁰⁾
b 核酸 (山崎)	6.75	11.30	1.68
b 核酸 (辻)	8.51	16.22	1.71 ⁴⁾
b 核酸 (内田)	8.40	14.65	1.74 ¹⁰⁾

紫外吸収曲線: DNA および b 核酸の紫外吸収曲線を E(p) すなわち 1 l 中に磷 1 グラム原子を DNA 溶液の吸光度に換算してグラフにしたのが図 (2) である。

その外ピウレット反応, tetrabromophenolphthalein ethyl ester 反応は DNA および b 核酸ともに陰性であった。

第 3 章 実験および結果 Experimental and Results

[A] 沈降測定 Measurement of Sedimentation Velocity.

I 沈降理論^{1) 2)}

a) 沈降実験について

超遠心機を用い、溶液中の分子に熱運動エネルギーよりはるかに大きな遠心力を作用させると粒子は力場方向に沈降をおこす。この沈降にともない溶液中にできる濃度勾配の時間的变化をみることにより、各物質に特有な沈降速度を規定する定数、すなわち沈降定数を求めることができる。この値と拡散定数とより分子量を計算するためにこの実験を行っ

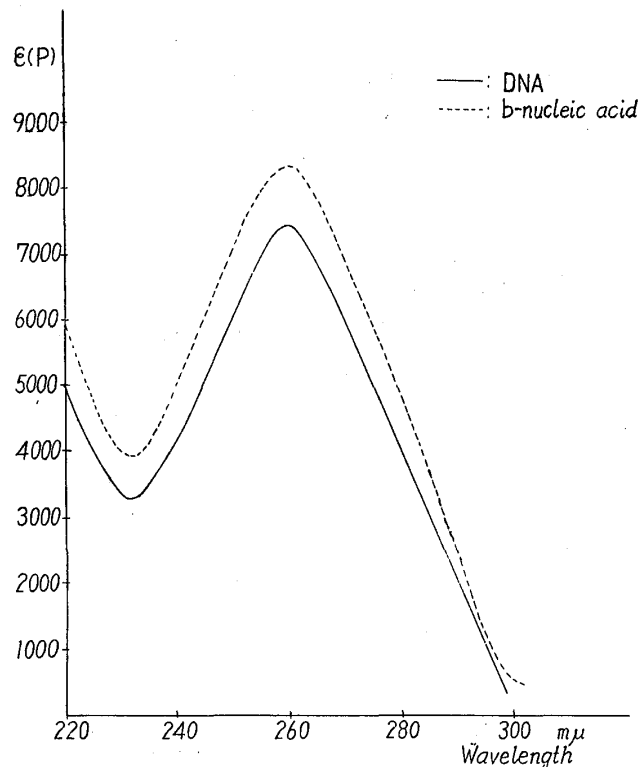


Fig. 2 Absorption Spectra of DNA and b-nucleic acid

た。

b) 沈降定数

遠心力場の方向 x に dt 時間に沈降する距離 dx とすれば沈降速度 dx/dt は次の式で表わされる。

$$\frac{dx}{dt} = s \omega^2 x \dots\dots\dots (1.1)$$

s : 比例定数 ω : 回転角速度 x : 中心からの距離

この s を沈降定数と呼び (1.1) 式に示される如く比例定数としてあたえられる。この式は

$$s = \frac{dx}{dt} / \omega^2 x \dots\dots\dots (1.2)$$

と書かれる。この s の持つ意味は単位遠心力場内の溶質分子の沈降速度であって x としては特定の粒子に着目できないから界面の位置をとる。(1.2) 式を積分すると次の式が得られる。

$$s = \frac{\log(x_2/x_1)}{\omega^2(t_2-t_1)} \dots\dots\dots (1.3)$$

ここで x_1, x_2 は時刻 t_1, t_2 における界面の位置を示す。この式は $x_2/x_1 < 1.4$ の範囲では 1%以内の精度で次の近似式が成立つ。

$$s = \frac{2(x_2 - x_1)}{(x_2 + x_1)\omega^2(t_2 - t_1)} \dots\dots\dots (1.4)$$

この (1.3) または (1.4) 式を用いある時間間隔で撮影した沈降図形の界面移動度より沈降定数を算出した。

c) 標準状態への換算

以上のようにして求められる沈降定数はそれぞれ異なった温度における値である。

遠心力場のなかで分子量 M なる分子が沈降する場合、遠心力 : $M(1-\bar{v}\rho)\omega^2x$ と溶媒による摩擦抵抗力 $f_s(dx/dt)$ とが等しくなり

$$M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2x = f_s\left(\frac{dx}{dt}\right) \dots\dots\dots (1.5)$$

の式が成立つ。

\bar{v} : 分子の偏比容 ω : 角速度 x : 回転軸から界面までの距離 ρ : 溶媒の比重

f_s : モル当りの沈降摩擦係数

この式を書き直すと

$$\frac{1}{\omega^2x} \frac{dx}{dt} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{f_s} = s \dots\dots\dots (1.6)$$

となる。すなわち沈降定数は上式に示すように $M(1-\bar{v})$ に比例し摩擦係数 f_s に反比例するが式の中の偏比容, 溶媒比重, 摩擦係数はそれぞれ温度の函数である。偏比容は温度によってそれほど影響をうけないから一応一定とみなしても比重は温度によってかなり変化し, 沈降摩擦係数 f_s は粘度に比例するから温度に関係する。したがって測定した沈降定数を一定の標準状態での値に換算しなければならない。そのために普通 20°C の純水に等しい密度粘度をもつ溶媒を仮想してこれを標準状態にとり実験で得られた沈降定数 S_t を次の式で換算した。

$$s_{20}^{\omega} = st \cdot \frac{\eta_t^{\omega}}{\eta_{20}^{\omega}} \cdot \frac{\eta_t}{\eta_t^{\omega}} \cdot \frac{1 - V_{20} \rho_{20\omega}}{1 - V_t \rho_t} \dots \dots \dots (1.7)$$

ここで $\frac{\eta_t^{\omega}}{\eta_{20}^{\omega}} = \frac{\text{H}_2\text{O at } t^{\circ}\text{C の粘度}}{\text{H}_2\text{O at } 20^{\circ}\text{C の粘度}}$ $\frac{\eta_t}{\eta_t^{\omega}} = \frac{\text{溶媒 at } t^{\circ}\text{C の粘度}}{\text{H}_2\text{O at } t^{\circ}\text{C の粘度}}$
 V_t : 溶質の at $t^{\circ}\text{C}$ の偏比容 $\rho_{20\omega}$: $\text{H}_2\text{O at } 20^{\circ}\text{C}$ の密度
 V_{20} : 溶質の at 20°C の偏比容 ρ_t : 溶媒 at $t^{\circ}\text{C}$ の密度

d) 沈降定数の単位

沈降定数の次元は時間であるが実用単位として Svedberg 単位 : S が現在多く用いられている。この定義は

$$S = 10^{-13} \text{ (cm/sec)/(dyne/g)}$$

$$= 10^{-13} \text{ (cm/sec)/(単位力場)}$$

e) 沈降定数の濃度依存性

標準状態に換算された沈降定数は一定溶媒中でその物質に特有の値であるが測定に用いた溶液の濃度によって変化することが多い。したがって沈降定数と拡散定数とを組合せて分子量を計算するためには溶質粒子間になら相互作用のない理想溶液における沈降定数の値を用いなければならない。そのためにいくつかの濃度での測定値を濃度 0 に外挿する方法をとった。

f) 荷電効果

DNA のように溶質が電荷をもつ粒子の場合には、相互作用のために沈降速度に誤差が生じる。この効果は媒質のイオン強度の小さいほど大きくなる傾向があるのでイオン強度の高い溶媒を用いなければならない。この実験においては 1% NaCl 水を用いた。

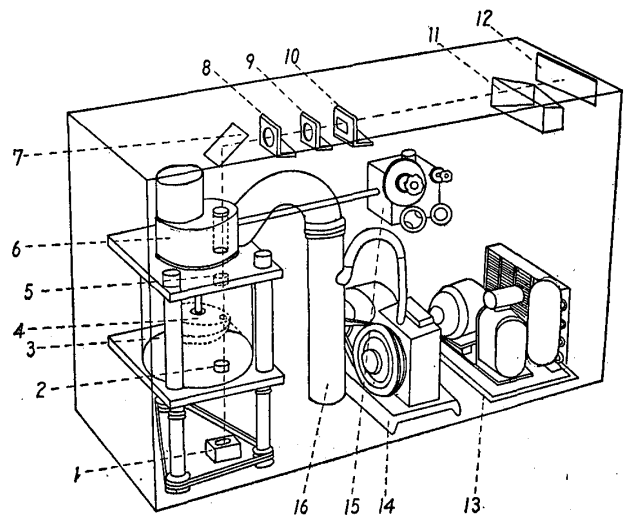
II 装置

a) 構成要素

この実験に用いたのは Spinco E 型超遠心機であるが一般に分析用超遠心機の構成要素は次の部分からなっている。すなわち 1) 駆動部 2) 試料用ローター 3) 測定セル 4) 測定用の光学系等であり、その付属装置として真空ポンプ、回転計、回転数自動制御装置、ローター温度測定装置等がありその配置は図(3)に示す如くである。

b) 駆動方式

Spinco 型の場合は交流整流子電動機と増速歯車による方式をとっており、この利点は直接商用周波電源



- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1 Light Source | 9 Camera Lens |
| 2 Lower Collimating Lens | 10 Cylindrical Lens |
| 3 Vacuum Chamber | 11 Half-Surfaced Mirror |
| 4 Interchangeable Rotor | 12 Photographic plate |
| 5 Upper Collimating Lens | 13 Refrigeration Unit |
| 6 High Speed Drive Unit | 14 Mechanical Vacuum Pump |
| 7 Full-Surfaced Mirror | 15 Speed and Camera Control Gear Box |
| 8 Schlieren Diaphragm | 16 Oil Diffusion Pump |

Fig. 3 Schematic perspective of model E Ultracentrifuge

を使えることと総合効率が最もよいことであるが欠点としては駆動部の振動の大きなことである。したがって機械を操作する場合、特に回転数を上げる時に注意を払った。

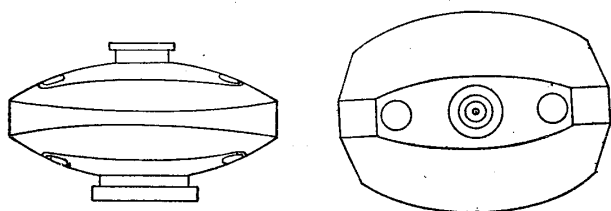


Fig. 4 Rotor

測定溶液を入れるセルも 65 mm に統一されている。

d) 測定セル

測定溶液を入れるセルはジュラルミン製の両面平行の円板に図(5)の如く回転軸に対し

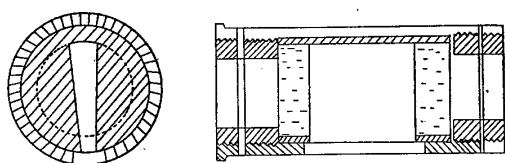


Fig. 5 Cell

て扇形の孔をあけたもので、その上下を石英の円板でおさえ、金属製の筒に入れて締めて組上げる。円板の間にはプラスチックのパッキングを入れて試料の洩出を防ぐ、溶液槽の型が扇型なのは溶質粒子を半径方向に正常に沈降させるため、この二辺の延長が回転軸

に一致しないと粒子は側壁に向って沈降し、その結果対流を生じるのでセルをローターに入れる場合には方向を正確にきめた。組立てたセルに入る液層の長さは 5 mm 厚さは 15 mm, セル中央から回転軸までの距離は 65 mm である。

e) 光学系

Spinco E 型の光学系は Philpot, Svensson によるシュリーレン円筒レンズ法(これについては拡散の項でくわしく述べる)で沈降により生ずる界面の濃度変化に伴う光の屈折率の変化を観測するものでこの方法の利点は任意のときに濃度勾配曲線の全体を直視できることである。ただし超遠心法で観察する界面はわん曲面であるから、この界面の曲りを沈降図形のうゑに目立たせないためになるべくスリットの幅は狭いものを用いた。

f) ローターの温度測定装置

ローター温度を正確に測ることは測定誤差を小さくするために必要であり、この実験における Spinco E 型の場合はローターの回転前後に直接ローターに熱電対をふれて温度を測る方法をとった。

III Spinco E 型超遠心機の操作と沈降定数計算法

1) 実験操作

a) 測定セルの組立て

セルを組む場合そのしめ方が弱すぎたりパッキングにゴミがついていたりまた凹凸あるものを用いたりすると回転中に溶液がもれる。また逆にしめすぎると沈降図形がゆがんだり回転中にガラスが破損したりするのでセルの組立にはこうした点で充分注意を払った。

b) 温度測定

沈降測定の前々2回行ないその平均をもって測定時の温度とした。すなわち資料をセルに入れローターに挿入しローターをシャフトにとりつけてから遠心機の向って右側上部にとりつけてある温度計の目盛をよむ、次にローターの下部に thermojunction を挿入し温

c) 分析用ローター

図(4)に示すような外見のもので軽合金製である。2個の円孔の一方に試料溶液をいれた測定セルを挿入し、他方にはカウンターバランスを挿入する。回転軸から円孔の中心ま

度スイッチをゼロの目盛に合わせ針のふれを読む…… a つづいてスイッチを free couple に合わせて針のふれを変む…… b この $b-a/2$ の値を温度計で読んだ目盛の数に加えた値をその沈降測定前の温度とした。沈降終了後同様の操作により温度を測定し平均をとり測定温度とした。

(例)	Initial Temp (沈降前)	Terminal Temp (沈降後)
	Temp : 20.8	Temp. : 25.6
	free c : +0.5	free c : -3.8
	Zero : 0	Zero : -0.1
	$20.8 + \frac{0.5-0}{2} = 21.1$	$25.6 + \frac{-3.8-(-0.1)}{2} = 23.7$
	$\frac{21.1 + 23.7}{2} = \frac{44.8}{2} = \underline{22.4}$	

c) Chamber の冷却真空操作

温度測定が終了後 Chamber を上にあげ、冷却装置スイッチを入れて Chamber を冷却した。次に Chamber 内を真空にするため初めロータリーポンプを用い続いて Diffusion ポンプで 10^{-4} 位まで真空度を高めた。

d) 回転開始

まず回転数をきめ、Time switch を入れる。回転は変圧器の電圧をあげることにより予定の回転数に達せしめた。

e) 沈降図形の観察

まづ水銀ランプ (光源) の冷却水を通してから光源のスイッチを入れ viewing screen より沈降図形を観察した。普通、沈降図形は図(6)の如き形を呈する。

回転中にセルの組み方が悪かったり、ガラスが破損したりして内の溶液が漏れた場合には沈降図形の上に見えている液の表面 (メニスカス) が低下して遂には認められなくなる。こうした場合には測定をつづけることは不可能となり回転をただちに中止した。ごくわずかな漏れなら液面が少しずつ低下するだけであるから回転開始とともにこの点に注意して沈降図形をよく観察した。

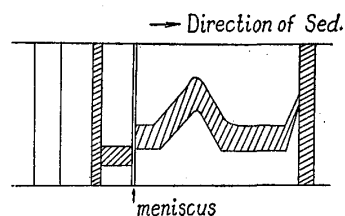


Fig. 6 Pattern of Sedimentation followed with Philpot-Svensson optics.

f) 撮影

予定の回転数に達し洩れてないことを確めて界面が液面からはっきり離れ、ピークがほぼ対象的になってから撮影を開始した。撮影の間隔時間と露出時間を定めれば自動的に撮影されてゆくが間隔の時間は機械の具合で多少ずれる場合があるのでストップウォッチによる補正を行なった。

g) 記録

まづ温度であるがこれは温度測定のところでも述べたように遠心前後2回 Temp, Zero, free couple の3つを記載した。次に撮影を開始してから Bar angle, Time, Interval, 補正の4つを順次記録した。Bar angle とは投影角度を変えることにより沈降図形のピークを鋭利化するために回すスイッチの目盛のヨミである。これはピークの頂点をはっきりさ

せるためだけのものでもスクリーンから見ていて適当に調節した。Time は撮影ごとの正確な時刻でシャッターが開いた時に時計で読み記録した。Interval とは撮影と撮影の間隔時間で、補正はその長短を補正するためストップウォッチで計った何分何秒の読みと Interval の差である。

実験例

昭和 34 年 2 月 20 日

Sample : 3% b 核酸

回転数 : 59780

Initial Temp

Terminal Temp

Temp : 19.8

28.8

free couple : + 0.6

- 4.4

Zero : - 0.2

- 0.1

	Bar	Time	Interval	補正
1	5	12.42'	8'	0
2	5	12.50	"	0
3	5	12.58	"	0
4	5	13.06	"	0
5	5	13.14	"	0

2) 沈降定数計算法

撮影した沈降図形のフィルムを写真引伸し機にかけ 1 資料 5 回 (時には 4 回) の各々の

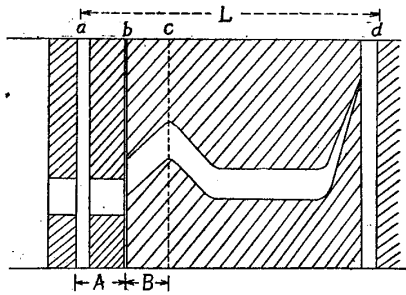


Fig. 7

図形について図(7)における L, A, B の長さを測定した。このためには図(8)に示す如くグラフ用紙を用い a 線を一定の線に合わせ、 b, c, d 各線の移動をしておきその長さを求めた。

St を算出するために必要な量は Eq (1.3) よりローター中心からピークの頂点すなわち c までの距離の時間の経過につれての変化の割合を知ることであるがそれを計算するため次の方法をとった。まづ測定した各 L の長さを 2 で割りその各 $L/2$ より A の値を引いた数の平均を求め $\dots \text{mean}(L/2 - A)$, 次に 6.5 cm (用いたローターの回転中心より $L/2$ までの距離) より $L/2 - A$ の平均値を $M (=2.13)$ (この装置の拡大率) \times 引伸しの倍率) で割った値を引いた数を求めこれを O_m とする。すなわち $O_m = 6.50 \text{ cm} - \text{mean}(L/2 - A)/M$, この O_m は回転中心よりメニスカスまでの距離の平均値をあらわす。また各 B の長さを M で割りこの値を b とする。 $b = B/M$, 次に $O_m + b$ を各々計算しそれを x とする。この各 x の常用対数の値を求めそれぞれ値をそれに相当する時間に対してグ

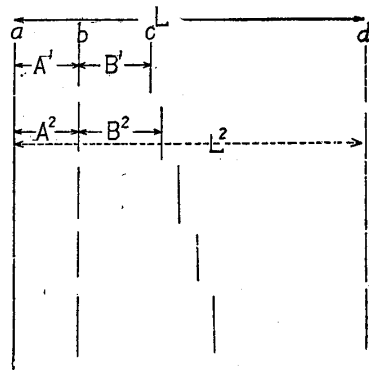


Fig. 8

ラフに目盛りその各点を縫う直線の正切 (tangent) を α とする。この α に factor を掛

けたものが求むる St ($t^\circ\text{C}$ における沈降定数) である。

$$\text{ここで factor} = \frac{2.303}{60 \times \omega^2} \quad \omega^2 = (\text{R.P.M.})^2 \times \frac{(2\pi)^2}{3600}$$

$$= (\text{R.P.M.})^2 \times 0.01096$$

例) 試料: DNA 1.2% (No. 16)

回転数: 59780

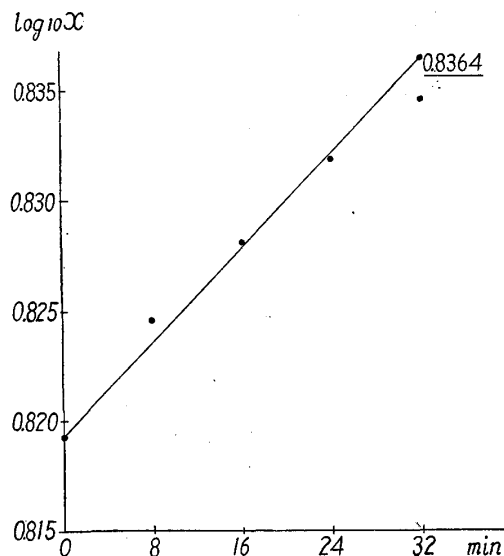
	L	$L/2$	A	$L/2 - A$
1	20.52	10.26	2.85	7.41
2	20.50	10.25	3.00	7.25
3	20.50	10.25	3.12	7.13
4	20.65	10.33	3.34	6.99
5	20.58	10.29	3.52	6.77

平均 7.11

	B	$b(=B/M)$	$x(O_m + b)$	$\log_{10} x$
1	8.39	0.628	6.596	0.81928
2	9.47	0.709	6.677	0.82458
3	10.21	0.764	6.732	0.82814
4	10.98	0.822	6.790	0.83187
5	11.53	0.863	6.831	0.83448

$$M = 2.13 \times \text{引伸し倍率} = 13.36$$

$$O_m = 6.5 - \text{mean}(L/2 - A)/M = 5.968$$



$$0.8364 - 0.8200 = 0.0164$$

$$St' = \frac{0.0164}{32} \times 0.979 \times 10^{-9} = 5.02 \times 10^{-13}$$

以上の方法で St は求められたが S_{20}^{ω} を算出するため(1.7)式を用いて補正を行った。

$$\text{すなわち} \quad S_{20}^{\omega} = St' \cdot \frac{\eta_t^{\omega}}{\eta_{20}^{\omega}} \cdot \frac{\eta_t}{\eta_t^{\omega}} \cdot \frac{1 - V_{20} \rho_{20\omega}}{1 - V_t \rho_t}$$

であるが $\frac{1 - V_{20} \rho_{20\omega}}{1 - V_t \rho_t}$ の項は偏比容は温度によりほとんど影響されずまた溶媒に用いた 1% NaCl の密度も普通の温度では 20 度における H_2O の密度とあまり違わない。したがって実際問題としてはほとんど誤差範囲に入るのでこの項を 1 とみなし水の t 度の比粘度および溶媒すなわち 1% NaCl の比粘度のみを St にかけて S_{20}^{ω} を算出した。

IV 沈降実験の結果

1) 沈降界面の形および沈降定数

a) 試料濃度の差異

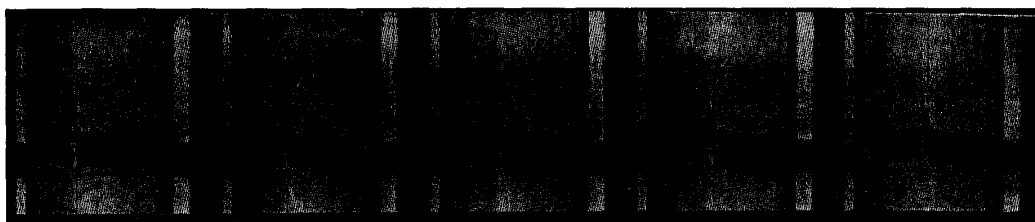
Feulgen 法 DNA と b 核酸の沈降測定の場合至適濃度をきめるため最初 1% 前後にて実験を行ったところ DNA はこの濃度でシャープな沈降図形が得られるに反して b 核酸はこの程度の濃度では拡散現象が早くおきるために測定が不可能なことがわかった。した

がってより高い 2% 3% 4% の 3 濃度で実験を行った。一方 DNA は 1.2% 1.0% 0.8% の濃度で沈降図形を得た。

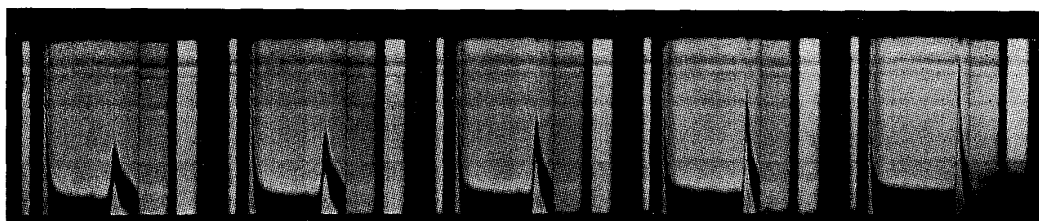
b) 沈降図形



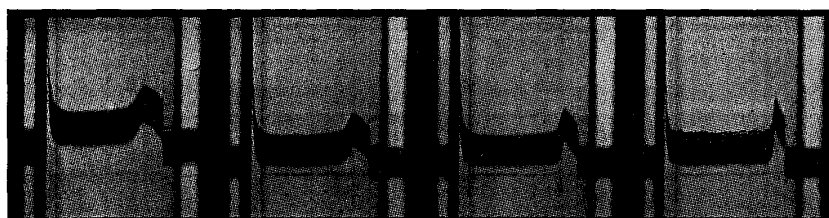
(1) 1% DNA



(2) 0.8% DNA



(3) 3% b-nucleic acid



(4) 2% b-nucleic acid

Fig. 9 Sedimentation of DNA and b-nucleic acid, followed with PS optics

図(9)は DNA および b 核酸の代表的な沈降写真を示したものであるがこの図からも判る如く DNA は単一のピークではなく分子量の多少異なった物の混合したものであろうということが想像される。一方 b 核酸は単一のピークを示し、また図形の形も DNA は鋭利な界面を画くに反し b 核酸は界面の拡がり大きい。

c) 沈降定数

2) 沈降定数の濃度 0 えの外挿

濃度 0 での沈降定数 S_0 を定めるため DNA および b 核酸の各濃度に対する S_{20}^0 をプロットしたのであるが各 3 濃度ずつしか測定してないため低濃度における S_{20}^0 の値が得られずこのまま 0 え外挿することはやや誤差が大きいと思われる。特に DNA の場合以 0.8

Table 2

i) DNA (Feulgen 法抽出)		
1.2%	$t = 19.1^{\circ}\text{C}$ $St = 5.02 \times 10^{-13} \text{ cm/sec}$ $S_{20}^{\omega} = 5.02 \times 1.03 \times 1.01$	$= 5.23 \times 10^{-13}$
1.0%	$t = 23.0^{\circ}\text{C}$ $St = 11.68 \times 10^{-13} \text{ cm/sec}$ $S_{20}^{\omega} = 11.68 \times 0.94 \times 1.02$	$= 11.10 \times 10^{-13}$
0.8%	$t = 21.0^{\circ}\text{C}$ $St = 13.34 \times 10^{-13} \text{ cm/sec}$ $S_{20}^{\omega} = 13.34 \times 0.98 \times 1.014$	$= 13.21 \times 10^{-13}$
ii) b 核酸		
4.0%	$t = 22.4^{\circ}\text{C}$ $St = 2.6 \times 10^{-13} \text{ cm/sec}$ $S_{20}^{\omega} = 2.6 \times 0.95 \times 1.015$	$= 2.51 \times 10^{-13}$
3.0%	$t = 26.5^{\circ}\text{C}$ $St = 3.09 \times 10^{-13} \text{ cm/sec}$ $S_{20}^{\omega} = 3.09 \times 0.86 \times 1.015$	$= 2.70 \times 10^{-13}$
2.0%	$t = 26.4^{\circ}\text{C}$ $St = 3.43 \times 10^{-13} \text{ cm/sec}$ $S_{20}^{\omega} = 3.43 \times 0.87 \times 1.015$	$= 3.03 \times 10^{-13}$

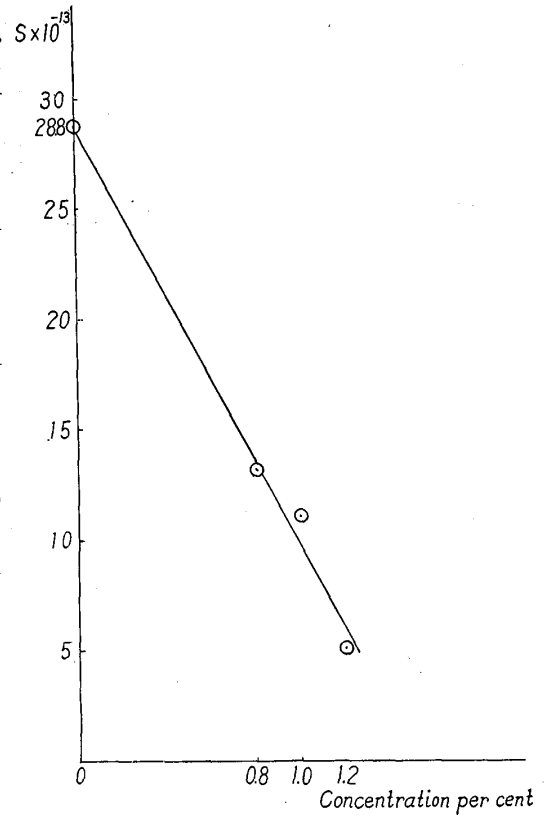


Fig. 10(a) Extrapolation of Sedimentation Constant of DNA.

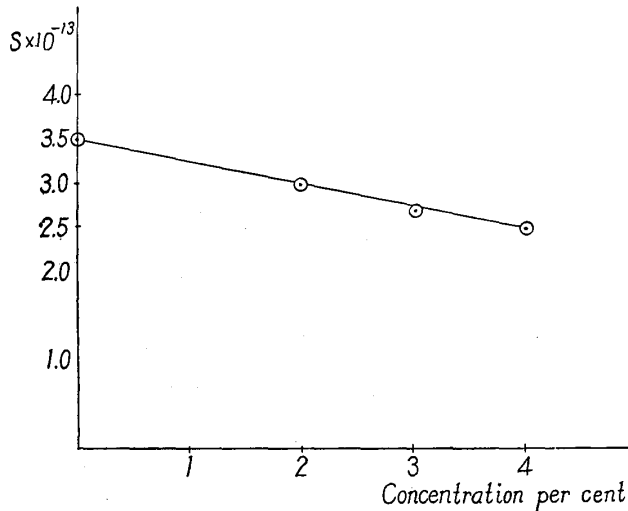


Fig. 10(b) Extrapolation of Sedimentation Constant of b-nucleic acid

%以下においては S_{20}^{ω} は上に凹の曲線上にのり直線により外挿した値より大きい値を示すと考えられる。b 核酸の場合は DNA にくらべてより満足な外挿値と思われるがこれは S の値が低いためであろう。

結局同一条件で DNA および b 核酸両者を比較する目的で直接外挿を行い図 (10) に示す如く、DNA $S_0 : 28.8$, b 核酸 $S_0 : 3.5$ の値を得た。

[B] 拡散 Diffusion

I 拡散理論^{13) 14)}

a) 拡散について

2種の液体 (たとえば溶液と溶媒)

を静かに重ね合わせると最初鋭い界面をつくって接しているがやがて対流その他の力の影響がなくても時間とともに界面が拡がってくる。すなわち混り合ってしまう。これは

溶質分子の Brown 運動によるものでこの現象を拡散 (Diffusion) と呼びその早さは物質により一定で分子の量, 大きさ, 形によって左右される。したがってこの拡散現象を一定の装置を用いて記録しこれを数学的に解析すれば溶質分子の性格を知ることができるわけでここで問題となるのは各物質 (この実験では DNA および b 核酸) の拡散速度を規定する定数—拡散定数である。これを求め, 沈降実験より得た沈降定数との組み合わせにより分子量が決定できるわけである。

b) 拡散定数

2種の液体を断面積 A の水平面をもって重ね合わせた場合, 微小時間 dt に拡散する溶質の量 ds は次の式であたえられる。

$$ds = -DA(dc/dx)dt \dots\dots\dots (2.1) \quad \text{Fick の第1法則}$$

すなわち dc/dx (濃度勾配) に比例し D という比例定数によって規定される。この D が拡散定数と呼ばれ各溶質に特有な値を示し分子量の計算に関係する数である。次に液内のある位置での濃度の時間的变化とその点の濃度勾配との関係は

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left[D \frac{\partial c}{\partial x} \right] \dots\dots\dots (2.2)$$

の式であらわされこれは Wiener-Boltzmann の方程式と呼ばれる。また拡散定数が濃度によらず一定とすれば,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \dots\dots\dots (2.3)$$

となりこれが Fick の第2法則である。

上の式をこの実験法に従い自由拡散という条件で解く場合, 濃度 c_1 および c_2 の溶液が $x=0$ で接しているとし濃度を位置 x と時間 t の函数であると考えると

$$c(x,t) = c_2 + \frac{c_2 - c_1}{2} \left[1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{x/\sqrt{4Dt}} e^{-\xi^2} d\xi \right] \dots\dots\dots (2.4)$$

となる。ここでは任意の x における濃度, ξ は任意積分変数である。

この (2.4) 式を x について微分すればこの実験から得られる屈折率勾配に比例する濃度勾配と拡散時間との関係が得られる。すなわち

$$\frac{dc}{dx} = \frac{c_2}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \dots\dots\dots (2.5)$$

となり溶液の屈折率が濃度と正比例の関係にあれば

$$\frac{dc}{dx} = \frac{n_2 - n_1}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \dots\dots\dots (2.6)$$

と書きなおすことができる。ここで n_2 は溶液の, n_1 は溶媒の屈折率を示す。

式 (2.6) で示された如く シュリーレン法で得た拡散曲線の x 軸の座標とその高さすなわち変位の関係を解析したものは濃度勾配に比例し一定の数学的操作によって拡散定数が求められることは明らかである。

c) 拡散定数計算法

屈折率法の光学系で得られた曲線の性質にもとづいて拡散定数を計算するため種々の方法がある。

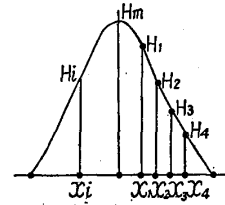
1) 変曲点法 (Maximum ordinate method)

H_i はガウス曲線の変曲点として $H_i = \frac{H_m}{\sqrt{e}}$ で求められこの H_i の x 座標の値より

$$D = \frac{x_i^2}{2t} \cdot F \dots\dots\dots (2.7)$$

であたえられる。

$$F \text{ は拡大率補正係数} = \frac{1}{(\text{拡大率})^2}$$



2) 逐次解析法 (Method of successive analysis)

x 軸を x_1, x_2, \dots , と分割し, この各々の高さを H_1, H_2 として次の如く計算する。

$$D_x = \frac{x_2^2 - x_1^2}{4t \ln(H_1/H_2)} \cdot F \dots\dots\dots (2.8)$$

3) 面積法 (Maximum ordinate-area method)

式 (2.6) において $x=0$ のところで dc/dx は最大値となり, これを H_m とすれば

$$H_m = \frac{n_2 - n_1}{2\sqrt{\pi Dt}}$$

曲線 T の面積 A は $n_2 - n_1$ に比例するから

$$D_A = \frac{A^2}{4\pi t H_m^2} \cdot F \dots\dots\dots (2.9)$$

4) 統計的方法 (Statistical method or Moment method)

$$D_M = \frac{\sigma^2}{2t} \cdot F \quad \sigma = \sqrt{m_2} \dots\dots\dots (2.10)$$

m_2 を求めるには曲線を一定間隔の垂線 ω で切り次の式で計算する。

$$m_2 = [(\sum x_i^2 H_i / N) - (\sum x_i H_i / N)^2] \omega^2 \quad N = \sum H_i$$

この実験においては (3) (4) の方法で計算した結果両者の誤差が少ないところから (3) の面積法を用いた。

d) 拡散時間の補正

セルを操作して界面を作るときには必ず動揺がおき界面が多少とも乱れを生じることが多く界面を作った時間は事実上 At だけの時間拡散が進んだ状態と考えねばならない。このような拡散時間の補正の方法はいろいろあるがここで用いたのは面積法の計算において初め A^2/H_m^2 を計算しこれをグラフ上で t に対してプロットして求めた。

e) 標準状態への換算

実験によって求められた拡散定数はその時の温度における数であり測定に用いた溶媒の粘度および測定温度に関係するので一定の標準状態における値に換算されねばならない。この場合も沈降定数と同様に 20°C の水を標準状態とし換算は次の式によって行った。

$$D_{20}^\circ = Dt \cdot \frac{\eta_t^\circ}{\eta_{20}^\circ} \cdot \frac{\eta_t}{\eta_t^\circ} \cdot \frac{293}{273+t}$$

D_t : 実験から直接算出された拡散定数

t : 測定温度 ($^\circ\text{C}$)

$$\frac{\eta_t^\circ}{\eta_{20}^\circ} \cdot \frac{\text{H}_2\text{O at } t^\circ\text{C の粘度}}{\text{H}_2\text{O at } 20^\circ\text{C の粘度}} \quad \frac{\eta_t}{\eta_t^\circ} \cdot \frac{\text{溶媒 at } t^\circ\text{C の粘度}}{\text{H}_2\text{O at } t^\circ\text{C の粘度}}$$

f) 拡散定数の濃度依存性

溶質粒子が互いに独立に運動すると考えられる理想溶液では拡散定数は濃度に無関係に一定であるが実際には測定濃度によって値が多少変化する。濃度依存性は溶質粒子間の相互作用によるものと考えられ粒子形状が非対象なものほど著明である。拡散の場合もやはり濃度 0 への外挿値を用いた。

g) 荷電効果

水溶液中で解離する物質を純水中で拡散させると電荷の影響により真の値とは異なった拡散定数を示す。この影響は中性塩を加えることにより誤差範囲以下になるので本実験においては 1% NaCl 溶液を溶媒として用いた。

II 装置

拡散現象の時間的変化を測定するためには、1) 溶液と溶媒を接触させるセルと 2) 拡散距離 x の函数である濃度および濃度勾配を記録測定する装置と 3) セルの温度を一定に保せる恒温槽の3つが必要である。この実験においてはセルは日立製 Neurath 型セル、濃度勾配の記録および恒温槽としては Tiselius 型電気泳動装置のシュリーレン光学系およびその恒温槽を用いた。

a) Neurath 型セル

Neurath が Schumeister のスライド型セルを改良したもので図 (11) の如く左右にず

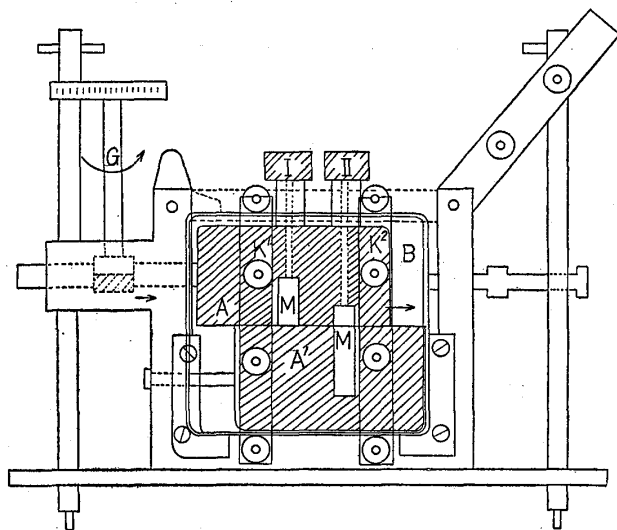


Fig. 11 Neurath Type Cell

らすことのできる上下2つのブロックからなり上に溶媒、下に溶液を入れ一方をずらせて、重ね合わせることで非常にシャープな安定した界面をつくることができ、低分子高分子とも使用できる。図(11)において B は厚さ 10 mm 程度の光学的平面ガラスで反対側にもう 1 枚ある。この間にステンレンで作られた金属ブロック A および A' があり K₁, K₂ という金属製トメ金により固定される。これは反対側にも同じく 2 つある。I は溶媒の注入孔、II は溶液の注入孔である。G は上のブ

ロック A を右方に移動させ、上下のミゾ M, M' を重ねるためのハンドルである。

b) シュリーレン光学系¹⁴⁾

この実験に用いた Tiselius 型電気泳動装置のシュリーレン光学系は philpot および

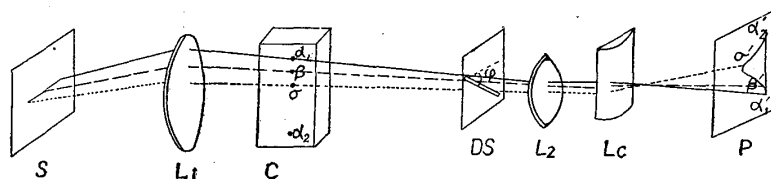


Fig. 12 Schema of Schlieren Cylindrical Lens Method

Svensson によって使用された円筒レンズ法である。これは溶液中の屈折率勾配 dn/dx の軌跡が拡散曲線（理想的な場合 Gauss 曲線になる）として乾板上につくられるものであり図(12)に示すように対角線スリット D_s を使用しさらにレンズ L_2 の後方に、光軸が垂直な円筒レンズを装置したものである。水平スリット S をでた光束はシュリーレンレンズ L_1 および拡散セル C を通り S の像を対角線スリット D_s の面上に結び写真レンズ L_2 はセル C の像を乾板 P 上に結ぶ。そして円筒レンズ L_c は D_s の像を乾板上に結ぶように調節する。セルの中で $dn/dx = 0$ の部分を α_1 で示すところを通過してきた光は D_s 上に水平な S の像を結びまたセルの下方で α_2 （ここでも $dn/dx = 0$ ）を通過してきた光もやはり D_s 上で α_1 と同じ点に像をむすぶ。すなわち濃度勾配が 0 なら屈折率勾配も 0 であり拡散曲線上の x 軸としてあらわれるが、 β または σ の $dn/dx > 0$ の部からの光は下部にわん曲し D_s 上で矩形の光束を生じ α_1, α_2 の D_s 上の結像点より下部で結像する。この光は円筒レンズにより α_1', α_2' の線よりも水平方向にはづれた β' または σ' に結像され、その結果セルのなかでの拡散方向の屈折率勾配曲線と全く相似な曲線を得ることができる。この円筒レンズ法は実験中直接肉眼で屈折率勾配曲線を観測できる点非常に便利であるが充分収差を除いた円筒レンズが得がたいので精度が若干劣ると言われている。

c) 恒温装置

Tiselius 型電気泳動装置の恒温槽を用い、水道水が一定温度であることを利用し水槽中に水道水を緩かに流しておきその中にセルを設置して測定を行なった。

III 拡散実験法および拡散定数計算法

1 実験操作

a) 資 料

拡散測定に用いる溶液はあらかじめ溶媒に対して透析をしておき溶媒中の他の成分（たとえば電解質）の濃度差をなくしておかねばならない。この実験においては前日に溶液をつくりセロファン袋に入れ一晩透析を行った。

b) セルの組立て

組立てにあたってまづセルの上下2つのステンレスブロックと両面からはさむ平面ガラスをアルコールでよく清拭した。これは前の実験で塗ったグリースをよく拭きとりまた水分もとりのぞく意味で念入りに行った。もし水分が残っているところに試料を入れて実験を行うとそのデータは正しい値を示さないことになる。ミゾの内面および注入口は耳鼻科で使う綿棒を用いた。ガラス板もグリースその他で汚染されていると光学系に支障をき

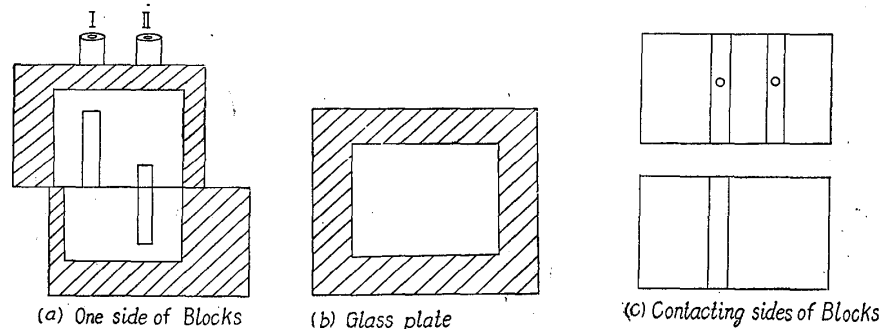


Fig. 13 Main parts of Neurath Type Cell

たし測定がうまくゆかないのでこれもよく清拭した。アルコールの後でエーテルで再び拭き乾燥した後、下のブロックを金属の外ワクにとりつけネジで固定した。次に上のブロックの下面と下のブロックの上面、すなわちブロック同志の接触面 (図 13c) にうすくグリスをのばし静かに重ね合わせる。この場合図 13a に示す如く上のブロックの浅い方のミゾと下のブロックのミゾとを合わせた。その後、図 13a, b の斜線の部分すなわちブロック側面の周辺部とガラスの周辺部にグリスを塗布した。これは溶液および溶媒の漏出を防ぐために行うものであるがブロックをずらした場合グリスが光学系に影響しないように塗る際に注意を払った。次に上のブロックの上面についているステールのバネを上から金属のトメ金でおさえ上のブロックを下ブロックにつよく密着させて固定する。最後に2枚のガラス板でブロックを前後面からおさえ各面2枚ずつの金属板とその板1枚につき4本のネジでしめてブロックの両面にガラス板をしっかり固定した。この時しめ方が不均等だと内容が漏出する恐れがある。

要するに下のステンレスブロックをネジで外ワクに固定しておき上のブロックを上面からトメ金でまた前後面のガラス板を4枚の金属板とネジで固定してセルが組上るわけである。

c) 試料の注入

以上のようにしてセルが組上ったら、よく洗滌し完全に乾燥してある2本の注射ピストンに15 cm 程の注射針をつけて、透析すみの溶媒および溶液を各々吸上げ、上のミゾに溶媒、下のミゾに溶液を入れるため、Iの注入口より溶媒 (1% NaCl)、IIの注入口より溶液 (DNA または b 核酸) を静かに注入した。こうしてセルに資料を入れた時に注意しなければならないのは、溶液および溶媒中に気泡ができないようにすることである (ミゾの部に多少グリスがにじみ出てくるとこの部に気泡ができやすい)。気泡ができた場合は細い針金を注入口から入れてその気泡をとりのぞいた。その後ブロックを多少動かして (図 (11) の G をまわす) 新しく気泡ができるか否かを見て、もし気泡ができれば同様操作によりとりのぞいた。これは大切なことで気泡をそのままにしておき実験を行うと正しく拡散が行われぬ。

d) 恒温槽内での操作

セルに溶液、溶媒を入れ、気泡のないのをたしかめ二つの注入口にグリスを塗った栓をして、そのセルを恒温槽に入れ、水道のコックをまわし恒温槽内にゆっくり水道水が流れるようにしてから約30分間そのまま放置した。これは界面を作った時に局部的な温度差があると対流を生じて拡散が乱されるから溶液、溶媒の温度を一定にするためである。約30分の後、光学系の中途に装置してある反射鏡を用いてセルを観察しながら、振動を極力与えないようにして、ゆっくりとセルの上のブロックをずらし溶媒柱と溶液柱を重ね合わせ鋭い界面を作らしめた。この界面ができた時刻を時計で正確によみ、同時にストップウォッチを動し始めた。

e) 図形の観察

溶液溶媒のつくる鋭い界面は光学系を通して拡散曲線として観察され理想的な場合には、Gauss 曲線となる。実験が失敗な場合には、観察しているうちにこの曲線がゆがんだり波をうったりしてくづれてしまう。この場合はただちに中止した。逆に初め多少のゆらぎがあっても数分経るとほぼ正常な曲線にもどる場合もあった。したがって界面を作っ

てから 30 分位はよく観察し曲線が安定するか否かを見定めて実験をつづけるか否かを決定した。

f) 撮 影

界面がうまくできたらその拡散曲線を一定の時間ごとに 4 回フィルムにおさめなければならないがこの間隔は定まっているわけではなく、拡散がすすむにつれて曲線が平坦になってゆく度合を観察してシャッターを開いた。この実験では大体 1 時間 30 分から 3 時間の間隔で撮影を行った。露出時間は 15 秒位が適当である。またこの曲線のピークの高さを加減する Bar angle は曲線下の面積を計算する関係上一つの試料に関しては初から終りまで一定に保った。

g) 記 録

Diffusion の実験で記録したことは初界面の時間, Bar angle, 各撮影の時間, その時のストップウォッチの読み, 温度および露出時間の 6 である。

初界面の時間は溶媒溶液を合わせて界面をつくった時刻で, 時計で読んだ何時何分を書き, 次に撮影を開始するときピークの具合を Bar で調節し, この目盛を記録した。また撮影のシャッターを開く時刻を分まで記録し同時に初界面をつくった時動かしはじめたストップウォッチの何分何秒の読みをしるした。温度は恒温槽に入れてある温度計でよみ最後に露出時間も記録した。

実験例 Diffusion 実験 昭和 34 年 2 月 22 日

試 料: 1% b 核酸

初界面: 11.07 am

	Bar	Time	Stop.	Temp.	Exp.
1	15	1.07 pm	0	11.3	15 sec
2	15	2.45	8	11.2	15
3	15	4.07	0	11.2	15
4	15	5.37	0	11.1	15

2 拡散定数計算法

普通用いられる計算法は統計的方法 D_M と面積法 D_A の 2 つであるが前者の方がやや正確だと言われている。しかし実際に 2 つの方法で計算して両者を比較するとあまり差がないので簡単な後の方法を用いて計算した。

まづガラス乾板に撮影した拡散曲線を写真の引伸し機にかけ拡大しグラフ用紙にそのまま写しとる。次にその帯状の曲線の中央を通る線をひき図(14)の如くピークの頂点の X 軸を 0 とし右を(+), 左を(-)として 1 mm ずつの中央線までの高さを 0 になるまで記載した。

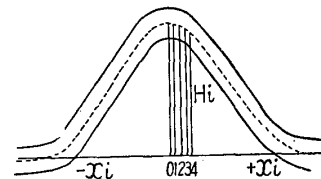


Fig. 14 Diffusion Pattern

i) 統計的方法

$$D_M = \frac{\sigma^2}{2t} \times F \text{ であたえられる。}$$

t : 初界面より撮影までの時間(秒)に補正の $4t$ を加えたもの

$$\sigma = [m_2' - (m_1')^2] \times \omega^2$$

$N = \sum H_i$: これは最高(0の位置)の H_i より左右 1 mm ごとに計った高さ H_i の総和で常に(+)にでる。

$m_1' = \frac{\sum x_i H_i}{N}$: $\sum x_i H_i$ は左右 1 mm ずつに区切った目盛の数にその高さを掛けた数の総和で右側は(+)左側は(-)にでる。

$m_2' = \frac{\sum x_i^2 H_i}{N}$: $\sum x_i^2 H_i$ は 1 mm ずつに区切った数の2乗にその高さを掛けた数の総和で左右ともに(+)にでる。

$\omega = 0.1$ (cm) $\omega^2 = 0.01$: 区切った長さの2乗である。

$$F = \text{拡大率補正係数} = \frac{1}{(\text{拡大率})^2}$$

x_i	H_i	$x_i H_i$	$x_i^2 H_i$	$-x_i$	H_i	$-x_i H_i$	$x_i^2 H_i$
0							
1							
2							
⋮							
Σ	+	+	+	Σ	+	-	+

このような表を書いて
計算を行った。

ii) 面積法

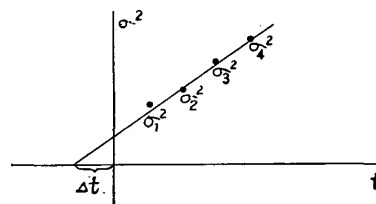
$$D_A = \frac{A^2}{4\pi t H_m^2} \times F \text{ であたえられる。}$$

$$A = N \times \omega$$

H_m : 曲線頂点の縦座標

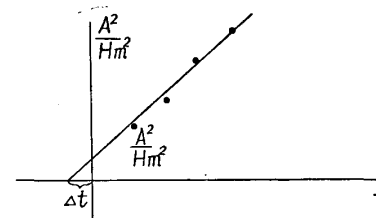
iii) Δt の求め方

D_M 法においては σ^2 まず計算して x 軸に時間をとり y 軸に σ^2 をとってその点を縫う線をひき x 軸と交る点を求めて Δt を得た。



D_A 法においては A^2/H_m^2 を計算してこれを時間 t に対して目盛り同様にして Δt を求めた。

以上の方法により一資料につき4つの D_A の値が得られたわけであるが特別に値がはずれたものをのぞき、この4つを平均してその値をその濃度における Dt とした。



IV 拡散実験の結果

a) 試料濃度

始め1%の試料を用いて DNA および b 核酸の拡散実験を行ったが b 核酸の方は1%を最高濃度として順次稀釈した試料で実験が行えるに反し Feulgen 法 DNA は1%前後

では8時間位経っても曲線がなお非常にシャープで測定が不可能であることがわかった。そこで濃度をずっと低くし、0.2, 0.1, 0.08, 0.06 の4濃度で実験を行い *b* 核酸は1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%の試料を用いて測定を行った。この至適濃度の違いからも *b* 核酸は

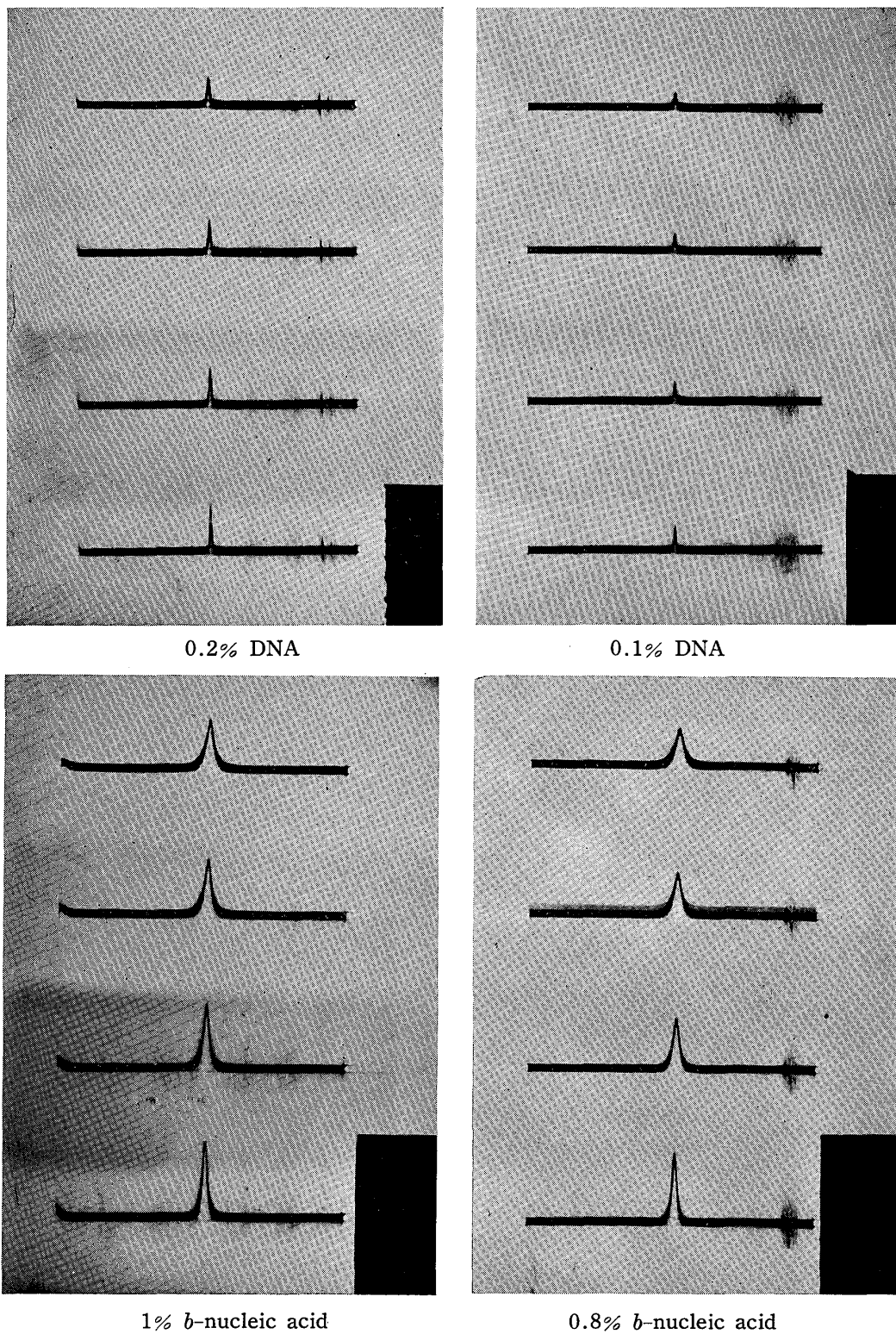


Fig. 15 Diffusion Patterns of DNA and *b*-nucleic acid followed with *P. S* optics.

DNA にくらべてはるかに低分子化しており、また粒子の形状も非対称性が減少していることが想像される。

b) 拡散曲線

図(15)に示したのは DNA および b 核酸の代表的な拡散曲線の写真であるがこのように両者に著しい相違がみられる。しかしいずれも拡散曲線の非対称性はごく少い。

c) 拡散定数

i) DNA (Feulgen 法抽出)		
0.2%	$t : 10.0^{\circ}\text{C}$ $Dt = 0.078 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 0.078 \times 10^{-7} \times 1.0107 \times 1.3077 \times \frac{293}{283}$	$= 0.1068 \times 10^{-7}$
0.1%	$t : 15.0^{\circ}\text{C}$ $Dt = 0.118 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 0.118 \times 10^{-7} \times 1.0127 \times 1.1404 \times \frac{293}{288}$	$= 0.1383 \times 10^{-7}$
0.08%	$t : 14.8^{\circ}\text{C}$ $Dt = 0.160 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 0.160 \times 10^{-7} \times 1.0126 \times 1.1465 \times \frac{293}{287.7}$	$= 0.1894 \times 10^{-7}$
0.06%	$t : 17.0^{\circ}\text{C}$ $Dt = 0.142 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 0.142 \times 10^{-7} \times 1.0135 \times 1.0828 \times \frac{293}{290}$	$= 0.1576 \times 10^{-7}$
ii) b 核酸		
1.0%	$t : 11.2^{\circ}\text{C}$ $Dt = 1.248 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 1.248 \times 10^{-7} \times 1.011 \times 1.264 \times \frac{293}{284.2}$	$= 1.644 \times 10^{-7}$
0.8%	$t : 8.5^{\circ}\text{C}$ $Dt = 1.543 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 1.534 \times 10^{-7} \times 1.01 \times 1.366 \times \frac{293}{281.5}$	$= 2.202 \times 10^{-7}$
0.6%	$t : 9.0^{\circ}\text{C}$ $Dt = 1.695 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 1.695 \times 10^{-7} \times 1.01 \times 1.346 \times \frac{293}{282}$	$= 2.394 \times 10^{-7}$
0.4%	$t : 10.0^{\circ}\text{C}$ $Dt = 1.927 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ $D_{20}^{\circ} = 1.927 \times 10^{-7} \times 1.011 \times 1.308 \times \frac{293}{283}$	$= 2.638 \times 10^{-7}$

d) 拡散定数の濃度 0 への外挿

DNA および b 核酸の拡散定数 D_{20}^0 を濃度 0 へ外挿する場合各々 4 濃度ずつ測定してあるために外挿値は信頼できるものとする。とくに b 核酸はプロットが大體直線上に乗っており、図 16 b に示す如くその外挿値 3.25 を得た。DNA は 0.08% の D_{20}^0 の値が他のものにくらべて高すぎるので外挿値はやや正確性をかくが図 16 a に示す如く 0.2 附近の値であることは間違いない。こうしたことから DNA は b 核酸にくらべて不均一性が大きいと思われる。

[C] 分子量計算 Calculation of Molecular Weight

沈降および拡散実験により両定数が求まったので、この 2 つより DNA と b 核酸の分子量を算出するため Svedberg の関係式を用いた。この式は 2 つの定数を摩擦係数を仲介として結びつけたもので

$$f_D = \frac{RT}{D_0}$$

$$f_s = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{S_0}$$

R : ガス定数

T : 絶対温度

\bar{v} : 偏比容

ρ : 溶媒の比重

f_D : 拡散摩擦係数

f_s : 沈降摩擦係数

$f_D = f_s$ とおくことにより

$$M = \frac{S_0 RT}{D_0(1-\bar{v}\rho)}$$

であたえられる。

DNA 分子量

S_0 : 28.3×10^{-13}

D_0 : 0.2×10^{-7}

$$M = 2.44 \times 10^{10} \times \frac{28.8 \times 10^{-13}}{(1 - 1.01 \times 0.55) \times 0.2 \times 10^{-7}}$$

$$\doteq 730 \times 10^4$$

b 核酸分子量

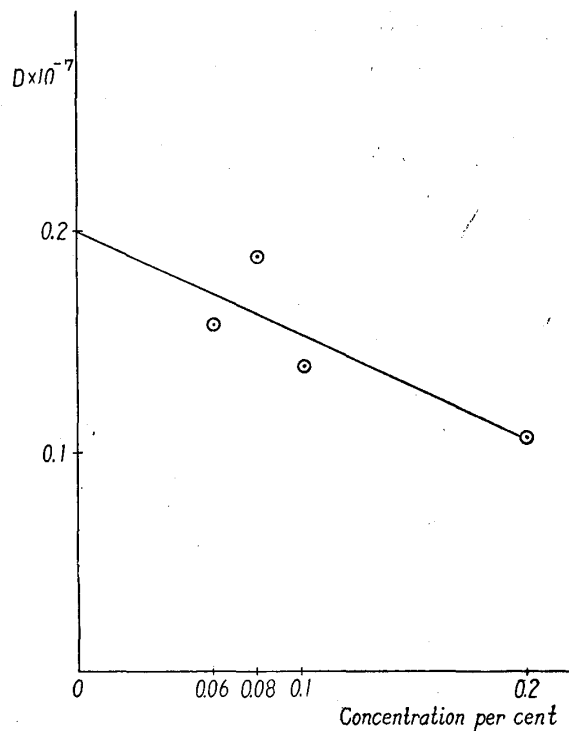


Fig. 16(a) Extrpolution of Diffusion Constant of DNA

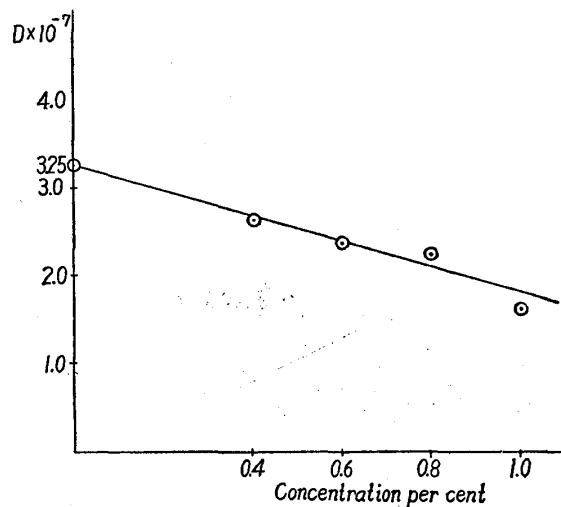


Fig. 16(b) Extrapolation of Diffusion Constant of b-nucleic acid

$$S_0 : 3.5 \times 10^{-13} \quad D_0 : 3.25 \times 10^{-7} \quad M = 2.44 \times 10^{10} \times \frac{3.5 \times 10^{-13}}{(1 - 1.01 \times 0.55) \times 3.25 \times 10^{-7}} = 5.972 \times 10^4$$

[D] 光散乱 Light Scattering

I 光散乱理論¹⁵⁾¹⁶⁾

a) 光散乱について

可視光線が透明な液体中を通るとき光が散乱されて見えることはチンダル現象としてよく知られている。このような散乱は媒質(今の場合には溶液)が完全に均質ならば起らない。しかし実際の溶液では肉眼的に均一な溶液でも溶媒の密度や溶質の濃度の“ゆらぎ”(熱的な動揺)によって光の波長から見れば不均一になっている。そしてこのような不均一が溶液に存在することが光散乱の原因なのである。したがって分子量の大きい分子はこの濃度のゆらぎが大きくて光を強く散乱する。このことは分子量が大きいと浸透圧が小さく濃度の局部的な大きい偏りを許しているためであってここに浸透圧との関係、ひいては溶液の熱力学的な性質との結びつきがでてくる。散乱光の強さは、溶質粒子が光の波長に比べて充分小さいか否かにより非常に異なるので 1) 小さい粒子の溶液による光の散乱と 2) 大きい粒子による光の散乱の二つに分けて考察されている。この実験においては DNA をあつかう関係上後者に属する。すなわち分子のある方向の長さが光の波長の 1/20 程度より大きくなると同じ粒子の各部からの散乱光が互に干渉して強度が減り方向によっても異なるようになるので小粒子による光散乱の式が成立しなくなる。大きな粒子の場合には色々な方向からの角度分布を解析することにより、はじめて分子の形と大きさを得ることができ、また光が散乱されれば直進する光は当然その分だけ失われるから散乱光度の測定のために“にがり度”(入射光の 1 cm あたりの減衰)を測っても同じことであるが散乱光度の方が角度分布の測定ができ、より広い意味をもっているのでこの実験においてはその方法を用いた。この光散乱法の特徴は絶対測定ができること、測定の時間が短かくてすむこと、また測定の自由度が多いために分子の拡がりや形に対する知識が得られること等であり、すでに沈降および拡散実験から得た DNA と b 核酸の分子量を再検討しあわせて両分子の大きさを知るためこの実験を行った。

b) 散乱光の Reduced Intensity : R_θ

溶媒と溶質(一種類)からなる二成分系溶液に強さ I_0 の平行な自然光が入射されたとする。この入射光線に対して θ の角度の方向で観察された場合、単位体積からの散乱光の強さ : $i\theta$ soln から溶媒による $i\theta$ solv を引いたもの $i\theta (=i\theta \text{ soln} - i\theta \text{ solv})$ が溶質分子に関係する量である。この散乱点から r の距離で測定が行われたとすると Reduced Intensity : R_θ は次の如く定義される。

$$R_\theta = i\theta/I \cdot r^2 \cdot 1/(1 + \cos^2 \theta) \dots \dots \dots (4.1)$$

ここで $(1/1 + \cos^2 \theta)$ は自然光が散乱された場合に偏光になることに対する補正の項である。

c) Reduced Intensity と分子量および分子の大きさとの関係

溶質による光の散乱を理論的に考える場合 Debye 等の熱力学的な扱い方や Zimm の分子論的な方法があるがこれらに入ってくる量は分子量、形、大きさ、光学的な特性、および溶液中でとなりの分子との間の作用である。この場合の理論的計算は分子内の各散乱

点の分布を仮定し、各散乱点からの光の干渉効果を考慮しておのこの角度 θ について積分すればよく Debye, Zimm 等によって行われた。その結果 Reduced Intensity は次の如くなる。

$$R_{\theta} = KC [MP(\theta) - 2A_2 M^2 (P)C] \dots \dots \dots (4.2)$$

式中で第一項は同じ分子から出た散乱光の影響 (internal interference) 第二項は異なる分子によるもの (external interference) に相当している。

ここで $K = (2\pi^2/N\lambda^4)n_0^2(dn/dc)^2$

- M : 溶質の分子量
- C : 溶質の濃度 (g/ml)
- λ : 入射光の真空中での波長
- n_0 : 溶媒の屈折率
- n : 溶液の屈折率
- A_2 : 分子の第 2 ヴィリアル係数
- dn/dc : refractive index increment と呼ばれ各物質によって測定される定数

$P(\theta)$ は Particle scattering factor と呼ばれ、分子の形や大きさに関係して角度分布を与える函数である。この函数は分子の周囲との作用は考えずに分子内での干渉だけを考慮したもので Random Coil, 棒状分子, 球形分子については計算されており次の如くなる。

Random Coil : $P(\theta) = 2/x^2 [e^{-x} - (1-x)] \dots \dots \dots (4.3a)$

$x = (8\pi^2 R^2/3\lambda^2) \sin^2(\theta/2)$ R : 末端距離

棒状分子 : $P(\theta) = 1/x' \int_0^{2x'} (\sin \omega/\omega) d\omega - (\sin x'/x')^2 \dots \dots \dots (4.3b)$

$x' = (2\pi L/\lambda) \sin(\theta/2)$ L : 分子の長さ

球形分子 : $P(\theta) = [3/x''^3 (\sin x'' - x'' \cos x'')]^2 \dots \dots \dots (4.3c)$

$x'' = (2\pi D/\lambda) \sin(\theta/2)$ D : 分子の直径

(4.2) 式は第一項が第二項より小さいとして変形でき、次のような簡単な式になる。

$$KC/R_{\theta} = 1/M \cdot P(\theta)^{-1} + 2A_2 C \dots \dots \dots (4.4)$$

以上の (4.4) および (4.3) 式より実際に分子量および分子の大きさを計算する。

d) 分子量の計算

分子が小さい時には $P(\theta)$ はあらゆる角度で、ほとんど 1 になるので (4.4) 式の左辺 (KC/R_{θ}) を濃度 0 に外挿することにより分子量が直ちに求められる。しかし分子の大きさが入射光の波長の 1/20 程度より大きくなるときは $P(\theta)$ は θ に無関係ではなくなってくる。ここで都合のよいことには $P(\theta)$ は $\theta=0$ で 1 になる函数である。しかしこの角度では入射光に邪魔されて測定ができないので実験ではいくつかの濃度においてそれぞれの角度分布を測定し、濃度および角度をそれぞれ 0 に外挿する方法をとる。実際には Zimm の理論にしたがって θ のかわりに $KC + \sin^2 \frac{\theta}{2}$ に対して plot していわゆる Zimm plot から求める。この Zimm plot の角度 0 の濃度 0 への外挿点と濃度 0 の角度 0 への外挿点は一致する。すなわち分子量はこの濃度 0 角度 0 の外挿点の縦軸との intercept の値の逆数であたえられる。

なお分子が分子量に分布をもっている場合は測定される分子量は重量平均として求められる。

e) 分子の大きさの計算

(4.3) 式を x について展開して $P(\theta)^{-1}$ を求めると第 1 項は 1 になり、第 2 項は x^2 の

項でこの係数が (4.4) 式からもわかるように Zimm plot の角度分布の傾斜を与える。この傾斜と外挿点から分子の大きさは媒質中の入射光の波長 λ' ($=\lambda/n$) の函数として各々次のようになる。

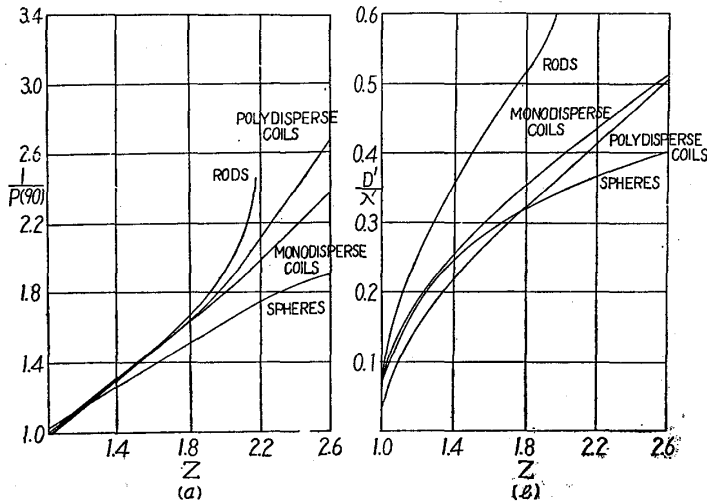
$$\text{Random Coil} : \overline{R}^2 = 9/8 \cdot \lambda'^2 / \pi^2 \frac{\text{initial slope}}{(Kc/R_0)_{c=0}} \dots\dots\dots (4.5a)$$

$$\text{棒状分子} : \overline{L}^2 = 9/4 \cdot \lambda'^2 / \pi^2 \frac{\text{initial slope}}{(Kc/R_0)_{c=0}} \dots\dots\dots (4.5b)$$

$$\text{球形分子} : \overline{D}^2 = 5/4 \cdot \lambda'^2 / \pi^2 \frac{\text{initial slope}}{(Kc/R_0)_{c=0}} \dots\dots\dots (4.5c)$$

すなわち濃度0の角度分布の slope を intercept で割り constant を各々の型を想定して掛けるわけである。

分子の形については原理的には Reduced Intensity の角度分布を検討することによ



(a): Relation between $P(90)$ and $[Z]$
 (b): Relation between L/λ and $[Z]$

Fig. 17

ってこれを推定できる訳であるが、精度の点で一般に困難であって実際には同じ種類の分子の分子量の異なるものに対して分子の大きさを測定して、これらの関係から分子形を推定するか、あるいは他の方法例えば沈降速度の測定等を併用しなければならない。また Zimm plot は角度分布を広い範囲で多くの点をとって測定したのであるが分子形がわかっているれば、2つの点の Reduced Intensity, R_{θ_1} , R_{θ_2} の値を正確に測定し、理

論値との比較から分子の大きさを求めることができる。普通 90° に対して対称の位置である $\theta_1 = 45^\circ$ $\theta_2 = 135^\circ$ を用いてその比: $R_{45}/R_{135} = Z$ を dissymmetry と呼ぶ。これから $(1-Z)^{-1}$ を濃度0に外挿した値すなわち intrinsic dissymmetry: $[Z]$ を求め図(17a)より想定された分子形にもとずいて $P(90)^{-1}$ が得られ、これと (4.4) 式から分子量が計算でき、また図(17b)より L/λ' ($L = R, L$ あるいは D) が得られこれから分子の大きさが求められる。

II 装 置

測定の対象となるものは各角度に溶液の単位体積から散乱される光の強さと入射光の強さとの比であり、このための装置として散乱光の強度を求める光度計および測定する溶液を入れるセルが必要である。この実験においては島津光電式光散乱光度計および Erlenmyer 型セルを用いた。

a) 島津光電式光散乱光度計

この光度計は図(18)に示す如き構造を持ち、左端 A は光源で 200 W の超高圧水銀燈

を用いて附属の定電圧装置により一定の電圧にしてから点燈用電源装置により点燈される。L₁ は集光レンズで A の像をスリット S の上に結ばせる。S からでた光はコリメーティングレンズ L₂ により平行光線になりニュートラルフィルター F₁ を通り一定の明るさの光となる。次に分光フィルター F₂ (violet, green, yellow, ultraviolet の 4 種あり) により特定の波長だけが透過されダイアフラム D₁, D₂, D₃ によって平行光束となりセルに入る。P は偏光補正のための偏光板で, T はセルを通過した光による反射を防ぐ吸収装置である。セルに入った光は溶質粒子によって散乱され, この光を受光部の光電子増倍管 M で受け, 入射光量に比例した光電流をおこす。この光電流は検流計に導かれてミラーを振らせ, そのふれを充分拡大したものがガルバノメーターの影像となる。なお受光部の反対側にある F₃ は回転角が 0° 附近になった時入射光が直接受光部に入り増倍管に損傷をおこさないための装置である。受光部はセルを中心にして入射光に対して 0~135° までの範囲にどの角度にも回転でき, その調節は蓋をあけなくても外部の目盛板をまわして行える。

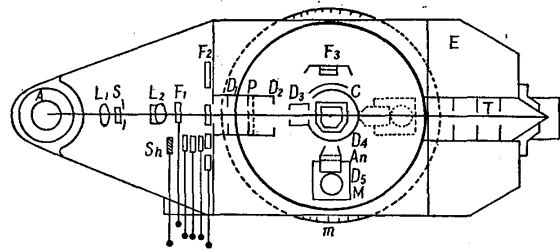


Fig. 18 Light scattering Electric photometer

b) Erlenmeyer Cell

図(18)に示したのは “dissymmetry Cell” と呼ばれ 45°, 90°, 135° が測れるセルであるが, この実験では Zimm plot を書くために Erlenmeyer Cell を用いた。このセルは図(19)に示すように円筒形に近い Erlenmeyer flask を接着剤で正方形の金属板につけたもので同筒の中心が受光部の回転中心に一致していなければならない。このために精製した fluorescein 水を, この実験に使用したセルに入れ $\theta=30^\circ$ から 135° の間にわたって測定し, この蛍光の強度に $\sin \theta$ を乗じたもの, すなわち発光部分の体積の補正を行ったものが θ によらず一定の値をとるか否かを見た。その結果満足すべき結果を得たのでこのセル No 4 を用い, すべての実験を行った。また R_θ の計算に必要な Cell constant : S は正方形の標準溶液槽では 1 であるが Erlenmeyer Cell を用いたのでこれに対する補正をつぎの順序で行った。まず Ludox (Du Pont のシリカゾルの商品名) 溶液を再蒸留水で適当に薄めて正方形標準溶液槽で $\theta=90^\circ$ における散乱光の強度と入射光の強度の比 $\left(\frac{G_{90} F_0}{F_{90} G_0}\right)_{Sq., Ludox}$ を測り, これを Erlenmeyer Cell に移して同様 $\left(\frac{G_{90} F_0}{F_{90} G_0}\right)_{Er., Ludox}$ を測定する。同じ操作を溶媒に用いた再蒸留水について行い次の式により S を求めた。

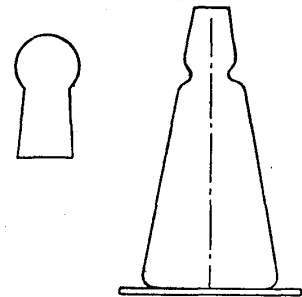


Fig. 19 Erlenmeyer Cell

$$S = \frac{\left(\frac{G_{90} \cdot F_0}{F_{90} \cdot G_0}\right)_{Sq., Ludox} - \left(\frac{G_{90} \cdot F_0}{F_{90} \cdot G_0}\right)_{Sq., Water}}{\left(\frac{G_{90} \cdot F_0}{F_{90} \cdot G_0}\right)_{Er., Ludox} - \left(\frac{G_{90} \cdot F_0}{F_{90} \cdot G_0}\right)_{Fr., Water}}$$

III 光散乱実験法および計算法

1) 実際的的操作

この光散乱実験は非常にデリケートな実験でセルの持ち方一つ間違えてもデータが無意味になる場合さえある。特に試料にゴミがある場合には重大な誤差の原因となり、ある媒質の光散乱のつもりがゴミの光散乱を測定しており、ゴミの分子量を出す結果にさえなりかねない。したがって溶液および溶媒の精製には充分留意した。

a) 容器の洗浄

高分子とほぼ同様の大きさを持つゴミが入ってくる原因は色々あるらしいが、その一つに水滴が落ちて水面を乱すことがあげられる。したがって容器を洗浄するのに用いる再蒸溜水は図(20)に示すような接続部の少ない蒸溜装置によつて作りこれでセルを洗浄した。この装置では冷却器から受容器の底までガラス棒が通っていて凝結した水がこれを伝って落ちていくようになっている。この方法でつくった再蒸溜水はほとんどゴミを含まないから Detergent であらかじめ洗浄したセルを最後に 10 回以上この水で洗った。セルの内での攪拌は磁気攪拌器を用いたのであらかじめ攪拌子

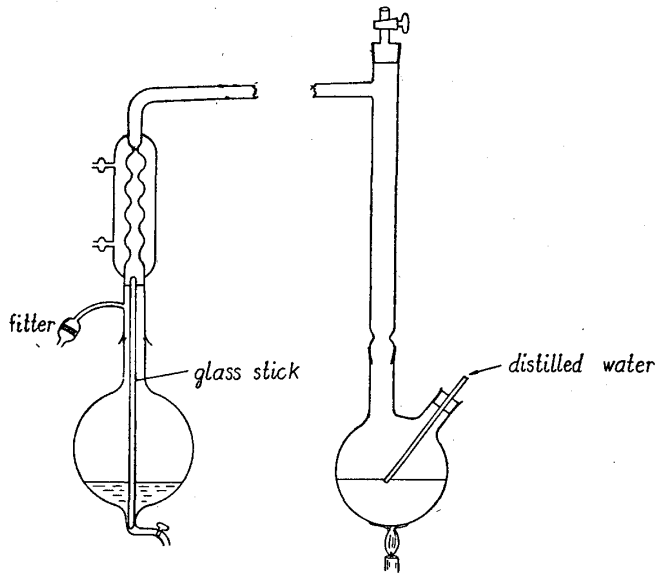


Fig. 20 Apparatus for Redistillation

を入れておき、これの攪拌によつて洗浄した。洗浄後再蒸溜水を入れ R_{45} と R_{135} との比すなわち dissymmetry を測定してその値が 1.00 に近くなるまで Cell の洗浄をつづけた。

b) 溶液吸上げピペットの洗浄

測定する溶液を（この場合は DNA あるいは b 核酸を遠心した後に）吸上げるピペットの洗浄は最初クロム硫酸、カセソーダ高濃度液で行った後、蒸溜水、再蒸溜水で仕上げるわけであるが、ピペットのゴミが完全にのぞけたか否かをたしかめるために次の方法を用いた。すなわちセルが完全に洗えて中の再蒸溜水の R_{45}/R_{135} がほぼ 1.00 になった時にその水を静かに吸上げ、再びセルにもどしその後再び Dissymmetry を測定した。ピペットが汚れている場合にはただちに 1.00 より大きくなる。そして吸上げてもどしたセルの再蒸溜水の Dissymmetry が 1.00 に近づくまで洗浄を行った。

c) 溶媒の精製

用いた溶媒は 1% および 1 モルの NaCl 溶液であるが、この精製には ultrafine glass filter を用い吸引濾過法によりゴミをとりのぞいた。この場合もフィルターをセルの壁に着け、濾過された溶媒は壁を伝って流れ絶対に液面に落さぬよう操作した。

d) 溶液の精製

DNA および b 核酸の一定濃度に溶解したものを超遠心機にかけてゴミを落した。す

でに沈降速度の測定をしてあるので資料中の分子濃度が影響を受けないように回転数と時間を 20000 (R. P. M), 30 分に定めて超遠心機にかけた。所定の回転時間が経ってローターが止ったら、ただちに図(21)の如き方法で静かに上部の液をピペットに吸上げた。この場合セル内壁の外側面にゴミが附着しているのでローターの中心側へピペットの先端をむけてセルに挿入した。この吸上げピペットは再蒸溜水の後で精製した溶媒で洗滌した直後に用いるが器壁にのこる溶媒による濃度誤差はゴミによる誤差にくらべて無視できる程度である。

e) 散乱光度の測定法

以上の方法で完全に洗浄された Erlenmeyer Cell に精製された溶媒 (NaCl 溶液) を約 6 分

程満たし最初この溶媒についての測定を行った。角度分布は 0, 135, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30 と測り各角度のガルバの読みを 2 回ずつ記録しその平均をとった。測定後そのまますぐその重量を計り、続いてピペットに吸上げてある溶液の約 1/4 量を器壁を伝わらせて溶媒中に入れた。これを磁性攪拌機で 10 分程攪拌し溶液による光散乱のガルバの読みを溶媒と同じ角度分布について記録した。この操作をさらに 3 回行って合計 4 回ですべての溶液を測定し終るようにした。そしてその度ごとに重量を計り、後で計算により濃度を決定した。なお溶液の測定で小角度になっていくとガルバのふれが大きくなるが、その場合には適当なフィルターを入れて測定しその番号を記載した。測定の際角度分布の 0° のときには Erlenmeyer Cell を台から外して測り、セル中の攪拌子は測定の時つねに同じ場所にあるようにした。また全部の測定が終るまではセルのガラス壁には手を触れないようにし、持つ場合には必ずフラスコの首を持つように留意した。

一方この実験で用いた島津光散乱光度計をあつかう場合には

- 1) ガルバーの 0 点を安定させるために光源のスイッチは約 30 分から 1 時間前に入れる。
- 2) ガルバを点燈しておき光電子増倍用電源スイッチを F から -B にしてからは光度計の上のふたを絶対あけてはならない。
- 3) 各濃度で測る場合はじめ 90° で測定したときガルバのふれが 10~20 になるようにアッテネーター粗調節装置の数をきめてから測定を始め、その濃度の溶液の測定中はこの数を角度により変えてはいけない。

等に気をつけた。

2) 計算法

Zimm plot を書くに必要な値は R_θ の角度分布であり、次の式であたえられる。

$$R_\theta = B \cdot \alpha \cdot 4J_\theta \cdot \sin \theta / (1 + \cos^2 \theta) \cdot S$$

この式の中で実験データに関係があるのは $4J_\theta$ だけでこれは受光部を $\theta = 0$ に置いた場合のガルバの読み G_0 とそのとき挿入した Filter の透過率 F_0 、角度 θ に置いたときのガルバの読み G_θ とそのとき挿入した Filter の透過率 F_θ を溶液と溶媒について測

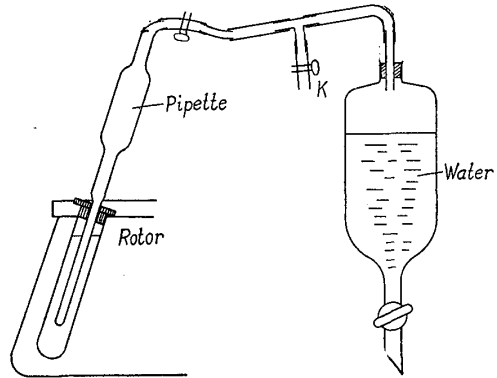


Fig. 21

定して

$$4J_{\theta} = \left(\frac{G_{\theta} \cdot F_{\theta}}{F_{\theta} \cdot G_{\theta}} \right)_{\text{soln}} - \left(\frac{G_{\theta} \cdot F_{\theta}}{F_{\theta} \cdot G_{\theta}} \right)_{\text{solv}}$$

の式で計算される。それ以外はすべて定数で B は装置に特有な定数、 α は入射光の強度のとき入る working standard に関する定数、 $\sin \theta$ は光源の体積補正、 $(1 + \cos^2 \theta)$ は散乱光が偏光になることに対する補正であり、 S は前に述べた Cell constant である。

実際用いた数値をあげると $\alpha : 0.0268$, $B : 0.0941$, $S : 1.66$ で、また Zimm plot を書く場合には K_0/R_0 を計算する必要がある、その場合の定数 K は水溶液で、測定波長 $\lambda = 436 \mu$ の場合 4.07×10^{-7} である。

溶液の濃度の計算は、セルの重量： a 、セル＋溶媒の重量： b 、セル＋溶媒＋溶液の重量： c を測定して 原溶液の% $\times \frac{(c-a) - (b-a)}{(c-a)}$ の式で計算した。

IV 光散乱実験の結果

a) 計算

DNA および b 核酸の G_{θ} (ガルバにあらわれた散乱光の強度の読み) の角度分布を測定してみた

表 4 光散乱の結果

		Solvent	pH	分子量	R (end to end distance)
DNA (Feulgen 法 により抽出)	1)	0.17 M NaCl	9.0	200×10^4	3200 Å
	2)	0.17 M NaCl	10.0	200×10^4	2600 Å
	3)	1.0 M NaCl	9.98	77×10^4	1000 Å
	4)	0.2 M NaCl	5.3	1000×10^4	4100 Å
b 核酸	1)	0.17 M NaCl	5.45	4×10^4	650 Å
	2)	1.0 M NaCl	9.3	10×10^4	500 Å

DNA はあきらかに Zimm plot が書けるに反して b 核酸の方はプロットが横になてしまい濃度 0、角度 0 への外挿が不可能であることが判ったので分子量および分子の大きさの計算法は DNA と b 核酸で各々異なった方法を用いた。すなわち DNA は Zimm plot を書き、その intercept の位置より分子量を、各角度の濃度 0 の plot の $\theta = 0$ への外挿線の傾斜より分子の大きさを求めた。b 核酸の方はまず G_{45} と G_{135} より dissymmetry をもとめ $c=0$ に外挿した値から図 (17a) における分子形を random coil と想定して、 $\frac{1}{P(90)}$ より $\frac{K_0}{R_{90}} = \frac{1}{M} \times \frac{1}{P(90)}$ の関係式を用いて分子量を得た。また図 (17b) より D'/λ' の値を求め λ' (溶液中での波長) を掛けることにより D' (分子の大きさ) を求めた。

b) 分子量および分子の大きさ

この実験においては solvent の NaCl の濃度および pH の分子量および分子の大きさにおよぼす影響を見るため、DNA は異なる 4 つの条件により b 核酸は 2 つの条件により測定しその結果は表 (4) に示す通りである。また DNA の Zimm plot は図 (22) に示した。

表に見るとおりこの光散乱法によって得た分子量は、すでに沈降定数と拡散定数から計算した分子量と、DNA は 10^6 のオーダーに、b 核酸は 10^4 のオーダーに値があるという点で一致をみた。

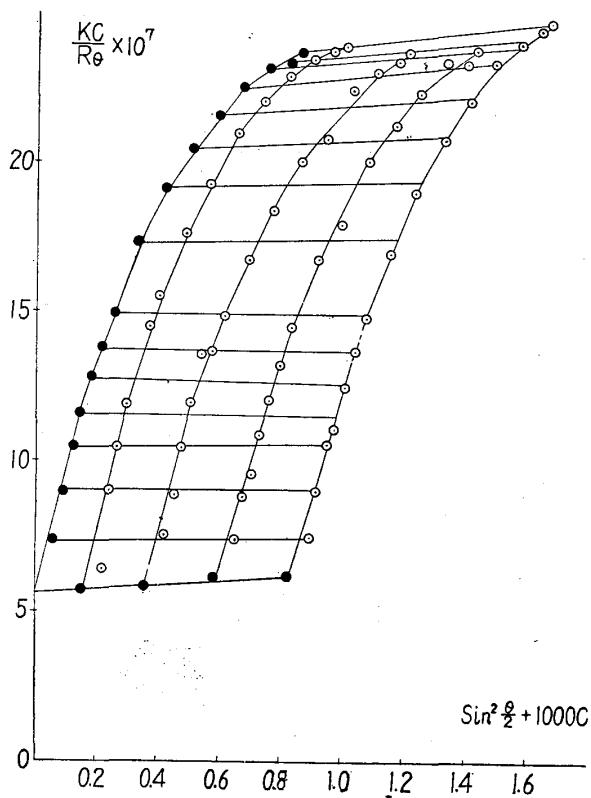


Fig. 22(a) DNA Zimm plot (1) pH : 9 Solv : 0.17M NaCl

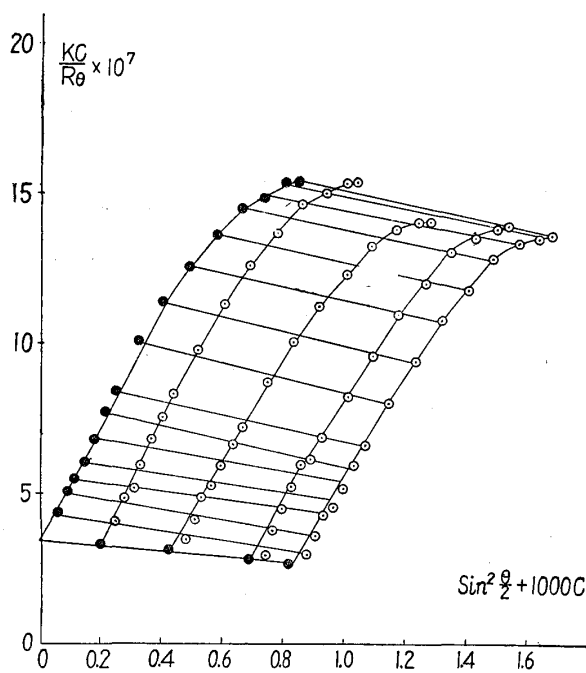


Fig. 22(b) DNA Zimm plot (2) pH : 10 Solv : 0.17M NaCl

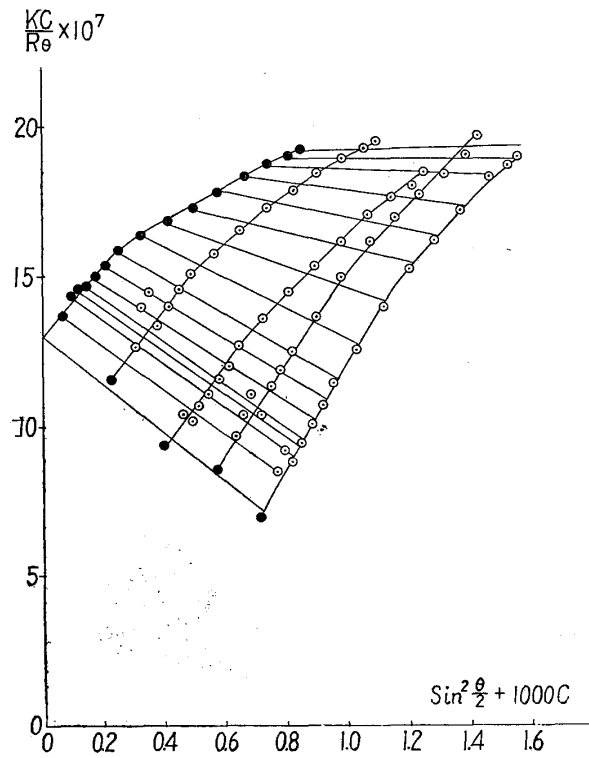


Fig. 22(c) DNA Zimm plot (3) pH : 9.98 Solv : 1 M NaCl

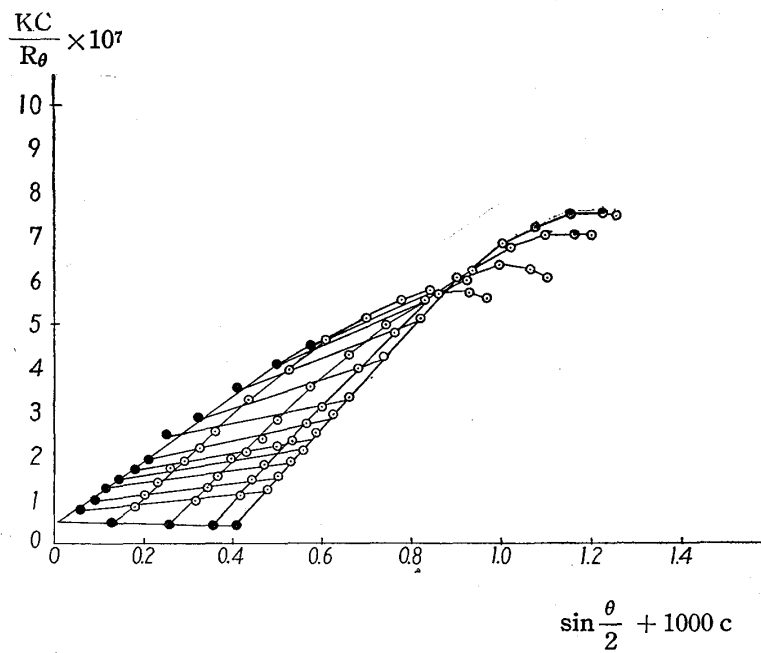


Fig. 22(d) DNA Zimm plot (4) pH : 5.3 Solv : 0.2M NaCl

(E) 粘 度 Viscosity

I 粘度係数および実験式¹⁸⁾

この実験において用いた ubbelohde の粘度計は毛細管粘度計の一種で、測定しようとする一定量の液体が毛細管を流れる時間を測って粘度を求めるような構造をもっている。

今粘度計の毛細管部分の半径を r , その部の長さを l , 粘度計内の液面の高さの差を h ,

t 時間に流れる液量を v とすると粘度 (係数) は

$$\eta = \frac{\pi g h \rho r^4}{8 l v} t \dots\dots\dots (5.1)$$

と定義される。ここで ρ は溶液の密度, g は重力の定数をあらわす。これは Hagen-Poiseuille の法則からみちびかれた式である。この式の中で粘度計に入れる液量を一定にするとすれば ρ と t をのぞく他はすべて定数となり

$$\eta = K \rho t \dots\dots\dots (5.2)$$

と現わされる。今ここで測定するのは溶液 (DNA および b 核酸) の粘度の絶対値ではなくて溶媒の粘度を基準とした比粘度およびそれから導かれる還元粘度またその還元粘度を濃度 0 に外挿した固有粘度であり, 比粘度 η_{sp} は溶媒の粘度係数を η_0 , 溶液の粘度係数を η であらわすと

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\rho_t - \rho_0 t_0}{\rho_0 t_0} \dots\dots\dots (5.3)$$

と定義される。ここで ρ は溶液の密度, t はその流下時間, ρ_0 は溶媒の密度と t_0 はその流下時間である。しかし溶液の濃度を十分に低めることにより $\rho/\rho_0=1$ になるので

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \dots\dots\dots (5.4)$$

として計算して比粘度を求めることができる。またこの比粘度をいくつかの濃度で測定し各比粘度の数をその時の濃度で割ったもの, すなわち

$$\eta_{sp}/c = \frac{t - t_0}{t_0} / c \dots\dots\dots (5.5)$$

を還元粘度と定義しこの還元粘度を濃度に対してプロットし濃度 = 0 に外挿したもの, すなわち

$$[\eta] = \left[\frac{t - t_0}{t_0 c} \right]_{c \rightarrow 0} \dots\dots\dots (5.6)$$

を固有粘度と定義する。

II 装 置

粘度測定には 1) 粘度計と 2) 恒温槽が必要であり, この実験においては ubbelohode 粘度計を用いた。

a) 粘度計 (ubbelohode 粘度計)

図(23)に見るような構造をもち大きくわけて3つの部分からなる。I の口は溶液および溶媒を入れるためのもので球部 K は順次稀釈していくときに必要な容積をもっている。

II の口はゴム管がついていてそれがクリップでとめてあり, 毛細管 (m) に吸上げるときには閉じ, 粘度測定するときには開けられるようになっている。この真中のガラス管は溶液溶媒混和の際の送風管である。

III の口にもゴム管がついていて, この先に液を吸上げたり押し出したりするためのゴム球のガラス管がつけられる。a, b, c の各線は時間を測定するためのしるしであり, 螺線部の m の部分が毛細管になっている。なお球

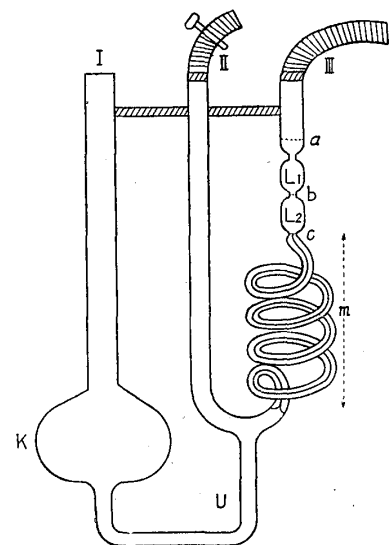


Fig. 23 Ubbelohode viscometer

部 L_1 , L_2 の容積は約 1.5 cc であり, 毛細管の直径は 0.7 mm である。

b) 恒温槽

この実験に用いた恒温槽の恒温範囲は $25^{\circ}\text{C} \pm 0.02$ である。

なお粘度計のとりつけは, 恒温槽の攪拌機の振動が影響しないように独立の支持台を用いて行った。

III 粘度測定法

a) 粘度計の洗浄

粘度計は毛細管の部分があり単に管腔のゴミをとりのぞくばかりでなく, 溶媒が 0.2 M NaCl なので壁に水との親和性をもたせるためにも充分の洗浄を行なった。まずクローム硫酸を満して一昼夜おき次に濃カセーソーダ液を満して一昼夜おいた。その液を捨て水道水を満しては I II III の各口より水流ポンプにて吸引洗滌し, 次に再蒸溜水を 3 回とおしてから完全に乾燥させた (始め洗滌の最後にアセトンを用いたところ, これが多少残っていたためにデーターの誤差が大きくなって失敗したので水のみでの洗浄にかえた)。

b) 溶媒および溶液の汙過

試料にゴミが入っていると, たとえ肉眼的に見えなくても必ず流下時間に長短を生じ, 実験が失敗するので完全に洗浄乾燥してある No 4 のガラスフィルターを用いて溶媒および溶液を吸引汙過した。

c) 流下時間の測定

恒温槽が 25°C になるまで待ち粘度計を支持器にとりつける際, 垂直になるように注意した。

最初, 汙過した溶媒 (0.2 M NaCl) を I の口よりピペットで注入し (この場合に量は適当でよい) やや時間をおいてから II の口にあるゴム管をクリップで閉じておき III の口のゴム管にゴム球のガラス口をとりつけて陰圧にすることにより溶媒を a 線の上まで吸上げる。吸上ったら II のクリップをあけ III のゴム球をとり去って溶媒を毛細管を通して自然に沈下せしめる。液のメニスカスの頂点が a 線に一致した時, ストップウォッチを動かし時間を測りはじめ, メニスカスの頂点が c 線に一致したときにストップウォッチを止めることにより流下時間を測定した。この方法を 3 回繰返して行って平均をとつた。溶媒が測定し終わったら粘度計をよく洗滌して乾燥させる。

次に再び粘度計を恒温槽にとりつけて, 今度は溶液を正確に 3 cc ピペットで吸上げ粘度計に入れ溶媒同様に流下時間を 3 回測定した。その後 1 cc, 2 cc, 4 cc, 10 cc の順に溶媒を加え 4 段階に稀釈された溶液について流下時間を各 3 回ずつ測定した。この場合まず毛細管内に残っている溶液を III の口よりゴム球で加圧することにより完全に u 部および K 部まで流下させ, そこへ溶媒を I 口より注入した。注入したら II の口よりガラス線維をつめた管をはさんで空気を送り溶液溶媒を完全に混和せしめ, その後 III 口より陰圧吸引して稀釈された液を a 線の上まで吸上げ, すぐに加圧して u K の部まで溶液を流下せしめた。これは稀釈溶液を毛細管および a 線上まで通過させることにより壁についている前回測定の高濃度溶液を完全に溶媒と混和せしめるためであらためて, その混和した液を a 線まで吸上げ流下時間を測定した。要約すると

- 1) 最高濃度溶液を a まで吸上げ流下時間測定
- 2) II 口をとじ III 口より加圧して毛細管中の溶液を u , K 部に全部流下せしめる

- 3) I口より溶媒注入
- 4) II口より空気を送り混和
- 5) II口を閉じIII口より吸引
- 6) III口より加圧液を u , K まで流下せしめる
- 7) 稀釈された第2の溶液の流下時間測定

の順で測定を行った。

d) 記録および計算

この実験で記録すべき事項は濃度および各流下時間で3回ずつ測定し濃度は $1/10^4\%$ まで、時間は $1/10$ 秒まで記載した。なお1濃度で3回の結果が1秒以上の誤差ある時にはその実験は中止した。比粘度および還元粘度の計算は式 (5.4) と (5.5) によって行い外挿により固有粘度を求めた。

IV 粘度測定の結果

1) DNA の粘度

溶媒 : 0.2 M NaCl pH : 6.25 測定温度 : 25°C

	Solvent	Time 1	2	3	平均
	Solvent	3分 51.3秒	3.51.2	3.51.2	231.2秒
① 0.0517% DNA	3cc	4. 17.4	4.17.7	4.17.6	257.6
② 0.0388% "	①+ 1cc	4. 9.6	4. 9.5	4. 9.8	249.6
③ 0.0259% "	②+ 2cc	4. 3.8	4. 3.7	4. 3.9	243.8
④ 0.0155% "	③+ 4cc	4. 0.0	4. 0.2	4. 0.1	240.1
⑤ 0.0078% "	④+10cc	3. 57.6	3.57.3	3.57.7	237.5

濃度 : c

- ① 0.0517%
- ② $0.0517 \times \frac{3}{4} = 0.0388\%$
- ③ " $\frac{3}{6} = 0.0259\%$
- ④ " $\frac{3}{10} = 0.0155\%$
- ⑤ " $\frac{3}{20} = 0.0078\%$

比粘度 η_{sp}

$$\frac{257.6 - 231.2}{231.2} = 0.1142$$

$$\frac{249.6 - 231.2}{231.2} = 0.0795$$

$$\frac{243.8 - 231.2}{231.2} = 0.0545$$

$$\frac{240.1 - 231.2}{231.2} = 0.0384$$

$$\frac{237.5 - 231.2}{231.2} = 0.0272$$

還元粘度 η_{sp}/c

$$\frac{0.1142}{0.0517} = 2.209$$

$$\frac{0.0795}{0.0388} = 2.049$$

$$\frac{0.0545}{0.0259} = 2.104$$

$$\frac{0.0384}{0.0155} = 2.477$$

$$\frac{0.0272}{0.0078} = 3.487$$

固有粘度 $[\eta]$: 2.5

2) b 核酸の粘度

溶媒：0.2 M NaCl pH：5.7 温度 25°C

	Solvent	Time 1	2	3	平均
	Solvent	3分 54.3秒	3.54.3		234.3秒
① 0.8059% b 核酸	3cc	4. 44.9	4.45.2	4.45.6	285.2
② 0.6045% "	①+ 1cc	4. 32.1	4.32.7	4.32.3	272.4
③ 0.4030% "	②+ 2cc	4. 19.2	4.19.2		259.2
④ 0.2418% "	③+ 4cc	4. 9.1	4. 9.0	4. 9.1	249.1
⑤ 0.1209% "	④+10cc	4. 2.2	4. 2.2		242.2

濃度：c

- ① 0.8059%
- ② $0.8059 \times \frac{3}{4} = 0.6045\%$
- ③ " $\times \frac{3}{6} = 0.4030$
- ④ " $\times \frac{3}{10} = 0.2418$
- ⑤ " $\times \frac{3}{20} = 0.1209$

比粘度： η_{sp}

$$\frac{285.2 - 234.3}{234.3} = 0.217$$

$$\frac{272.4 - 234.3}{234.3} = 0.163$$

$$\frac{259 - 234.3}{234.3} = 0.106$$

$$\frac{249.1 - 234.3}{234.3} = 0.0632$$

$$\frac{242.2 - 234.3}{234.3} = 0.0337$$

還元粘度： η_{sp}/c

$$\frac{0.217}{0.806} = 0.269$$

$$\frac{0.163}{0.605} = 0.269$$

$$\frac{0.106}{0.403} = 0.263$$

$$\frac{0.0632}{0.2418} = 0.261$$

$$\frac{0.0337}{0.1209} = 0.279$$

固有粘度 $[\eta]$: 0.26

第 4 章 考 察 Discussion

以上4つの実験結果を解析し DNA および b 核酸の比較を行なった。

沈降実験においてまず認められることは両者の沈降図形にあらわれた明らかな相違である。

一般的に沈降界面の形状は溶質の拡散、均一性ならびに沈降定数の濃度依存性の3つの因子により左右されるが¹⁹⁾、沈降図形からすぐ理解される如く DNA のピークが1つでないことはこの抽出法による DNA が2つ以上の分子量をもった成分の混合物であることを物語っており、言換えれば不均一な DNA であることを示す。しかし、この2成分は比較的近い沈降定数を持っていることが計算され、大きい山をもって沈降定数を定めた。またピークの鋭いことは濃度依存性が大きいことを示している。このことは S_{20}^0 を濃度に対し

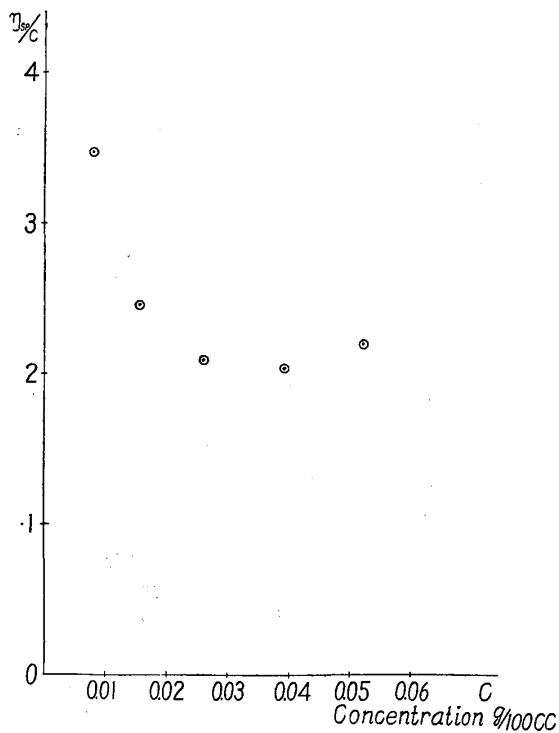


Fig. 24(a) Extrapolation of Reduced viscosity of DNA (Intrinsic viscosity)

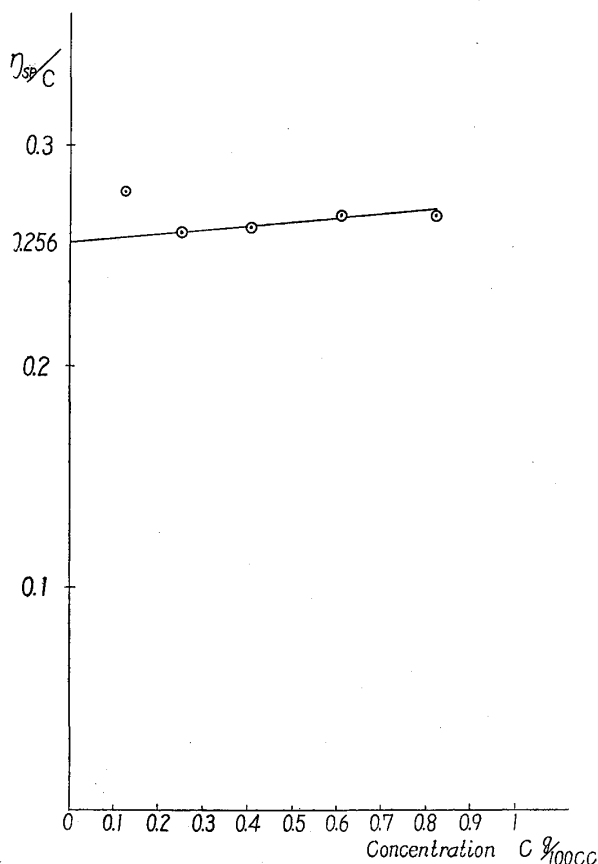


Fig. 24(b) Extrapolation of Reduced viscosity of *b*-nucleic acid (Intrinsic viscosity)

てプロットした，図(10)において，濃度0に近づく程 S_{20} の値が大きくなり上に凹な曲線をえがく傾向がみられることによりはつきり裏づけされた。また沈降時間にともない界面のひろがる度合は著明でなく，拡散速度のおそいことをあらわしている。しかし他の抽出法例へはガランド法によって抽出したDNAに比べると1%前後の濃度における沈降図形としては多少界面の拡がり方が早く，やはり不均一性がやや大きいことは認めざるを得ない。

b 核酸の沈降図形においてはピークは一つでありその形はDNAにくらべて，はるかになだらかになっている。このことは濃度依存性がないことを示すものであり S_{20} を濃度に対して plot してみるとほぼ直線上にのり，しかも傾斜がゆるやかなことから確認された。また界面が時間とともにすみやかに不鮮明化することは拡散速度が早いことに主な原因があると解されるが，しかし**b**核酸の中には沈降定数のゴクわずかず異なる成分が連続的に分布している可能性もある。また界面の鋭さは濃度に比例しそのひろがり S_0 の大きさに反比例することが認められており，DNAは1%，0.8%，1.2% **b**核酸は，4，3，2%の濃度で測定したにかかわらずDNAの界面は鋭く**b**核酸の界面のひろがり大きい事実はDNAの S_0 : 28.8，**b**核酸の S_0 : 3.5の差によるものと考えられる。次に拡散曲線およびそれから求められた D_0 を比較すると，DNAの拡散測定の至適濃度が0.2，0.1，0.08，0.06であるに反し，**b**核酸は1.0，0.8，0.6，0.4という大きい値を示し， D_0 の値もDNAが0.2，**b**核酸が3.25という結果を得たことから拡散測定の至

濃度は D_0 に比例するといえる。また濃度依存性は一般に溶質分子間の相互作用および非対称性に由来するといわれており、DNA と b 核酸の D_{20}^0 を各々濃度にプロットして比較してみると図(16)に見る如く DNA の方が傾斜も大きく、しかも直線からはずれる度合いも大きい。このことから b 核酸は DNA にくらべて粒子の自由度が高く、しかも形が均一で対象性が大きいことを示している。

沈降および拡散実験から得られた各定数より算出した分子量を比較すると DNA は約 700×10^4 、b 核酸は約 6×10^4 という値を示し DNA 1 ケの分子が 1/100 程度に解重合されたことを物語っている。この分子量は試料がやや不均一なので重量平均 $M_w \left(\frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \right)$ と z 平均 $M_z \left(\frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} \right)$ の中間の値を示すものである。

光散乱からは分子量および分子の大きさが求められ分子量の結果は沈降、拡散両定数から算出した値とほぼ一致する。この実験においては NaOH を加えることにより pH を変えて分子量を測定したが pH により多少分子の大きさが異なり、それに比例して大きさも変ることが見られた。この理由として考えられることは DNA においては 100~200 万程度、b 核酸の場合は数万が一つの単位であって、それがゆるい電気的結合によって 2 次的に結びつけられているが H^+ イオンの影響によって、低分子化するのであろうと考えられる。

最後に各分子形を比較するために行った粘度測定より各固有粘度を算出したが、その結果 DNA、b 核酸ともに想像したよりはるかに低い値が示された。とくに DNA の $[\eta]$: 2~3 の値は数百万の分子量をもつ粒子としては、非常に低く分子形が球形に近いことを暗示している。また Hermann 等がより mild な方法で抽出した DNA に熱を加え変性させると始め高かった固有粘度がこの程度にまで下ることを報告しており²⁰⁾、この実験に用いた DNA の低い固有粘度は、Feulgen 抽出法に由来すると考えることも可能である。

第 5 章 結 論 Conclusion

Feulgen, 辻の法により抽出した DNA およびそれに pancreatin を作用させて得た b 核酸につき、沈降、拡散、光散乱、粘度の測定を行い、両者を物理化学的性格を中心にして種々な角度より比較検討を行った。その結果

1. 沈降実験より
 - DNA S_0 : 28.8×10^{-13} (cm/sec)/(dyne/g)
 - b 核酸 S_0 : 3.5×10^{-13} (cm/sec)/(dyne/g)
2. 拡散実験より
 - DNA D_0 : 0.2×10^{-7} cm²/sec
 - b 核酸 D_0 : 3.25×10^{-7} cm²/sec
3. 両定数よりの分子量
 - DNA : 700×10^4
 - b 核酸 : 6×10^4
4. 光散乱実験より

DNA 分子量：200~1000×10⁴

DNA 分子の大きさ：3000 Å
(End to end distance)

b 核酸分子量：4~10×10⁴

b 核酸分子の大きさ：600 Å
(End to end distance)

5. 粘度実験より

DNA 固有粘度：2~3

b 核酸固有粘度：0.26

の値を得た。

以上の結果および沈降図形，拡散曲線，光散乱強度の角度分布の解析より次のことが考察された。すなわち Feulgen DNA は球形に近い形のやや不均一な，しかも濃度依存性の高い分子で粒子間の相互作用は大きい。b 核酸は比較的均一な濃度依存性の低い粒子間の自由度が高い解重合体である。

以上で DNA が b 核酸に変化した場合の物理化学的相違は明にされたが DNA のどの結合が Pancreatin の中の如何なる酵素により切離されるかを解明することが今後著者等に残された課題であろう。

謝 辞

本稿を終るにあたり終始御指導を賜り，種々御助言を頂きました高田善教授，慈大生化学牧野堅教授に深甚なる謝意を表します。

また拡散実験の機会をあたえていただいた東京工業大学柴田生化学研究室内の諸氏，沈降実験に際して Spinco E 型超遠心機の使用を快諾していただいた農業技術研究所松中昭一氏並びに佐藤技師，光散乱および粘度測定に直接御指導を贈り，また本誌に記載の使を与えられたお茶の水女子大学立花太郎教授，和田昭允講師に衷心より感謝の意を捧げます。

引用文献

- 1) Watson, J. D., Crick, F. H. C.: Nature, 171, 737 (1953)
- 2) Neuman, A., Kossel, A.: Arch. physiol. u. Anatom. physiol. u. Anatom. physiol. Abt., 195 (1894): Arch. physiol., 552 (1899).
- 3) Feulgen, R.: Z. physiol. Chem., 91, 165 (1914).
Feulgen, R.: Z. physiol. Chem., 237, 261 (1935).
- 4) 辻 正一: 生化学, 18, 404 (1944).
- 5) 辻 正一: 日本生化学会誌, 18(4), 413 (1944).
- 6) 山崎順啓他: 生化学, 31, 8, 699 (1959).
- 7) M. G. Sevag, D. B. Lackmann and J. Smoleus: J. Biol. Chem. 124, 425 (1938).
- 8) Paul. Doty and Barbara H. Bunce: J. Amov. Chem. Soc. 74, 5030 (1952).
- 9) 江上不二夫他: 核酸および核蛋白質 上巻. 156 (1951) 共立出版.
- 10) 内田: 生化学, 25, 101 (1953).
- 11) 赤堀四郎他: 蛋白質化学 2, 363 (1954) 共立出版.
- 12) 黒崎重彦他: 実験化学講座, 8, 221 (1959) 丸善.

- 13) 赤堀四郎他: 蛋白質化学, 2, 380 (1954) 共立出版.
- 14) 稲垣 博他: 実験化学講座, 8, 177 丸善 (1959).
- 15) 赤堀四郎他: 蛋白質化学, 2, 400 (1954) 共立出版.
- 16) 和田和允: 化学と工業, 10, 7 (1957).
- 17) P. Doty and R. F. Steiner: J. Chem. Phys. 18, 1211~1220 (1950).
- 18) 黒岩章晃他: 実験化学講座 8, 123, 丸善 (1959).
- 19) 川出由己: 理工学研究所報告, 第 10 卷 12 号, 149 (1956).
- 20) JAN HERMAN: Solution properties of DNA (1958).