

# 岡山醫學會雜誌

第 61 年 第 3 號 (第 661 號)

昭和 24 年 4 月 30 日 發行

## 綜 說

### 最近外國文献に現れた核酸の 細胞化學と私の KES\*

岡山醫科大學病理學教室

教授 醫學博士 濱 崎 幸 雄

近代的の大研究は決して1分科だけの智識ではなしとげられない。必ずや互に關連する多數分科の權威を動員して之に當らなければならぬ。私はその最もよい例として最近歐米に於ける核酸の細胞化學的研究の一端を御紹介したい。これは實に細胞學、胎生學、生化學、遺傳生物學、光化學等多方面の科學者が精根を傾けその研究道程の交叉點に於て核酸細胞化學の殿堂が建設されつゝある。此の研究は第二次戰爭直前から戰爭中にかけて目ざましい進歩をとげた爲に吾々は今日の狀態では當時の文献を十分に手に入れることが出來ないので、其の研究業績の全貌を知るに甚だ困難である。併し緒方(富)、柴谷氏等の懸命な努力で貴重な文献が段々集り凡そ全貌が明かとなつた。廣汎な之等の文献中には明瞭に決定した結論の他に多數の「除外による歸結」や假説が入りみだれている爲に其の業績の意味づけとか、又派生事項については國內學者の意見は必ずしも一致していない。又吾々 KES の研究成績と相反するものもある。例えば柴谷は「デソキシリボ」核酸性物質は核外に存し得ないと解している。之は此の方面の研究には猶十分な研究の餘地が残されている

證據であつて、戰爭の爲に立ち後れのした國內學者に取つてはむしろ喜ばしい事である。

核には特異な磷含有性蛋白の存する事が古くから知られているが、長い間本態不明であつた。

Hammarsten 及び Kossel によつて先づ系統的の研究が行はれ之が核蛋白と呼ばれる事になつた。Miescher は膿球を人工的に消化して一新物質を發見した。之は核に殆ど限局して存するものであるところから Altmann は之を核酸と名付けた。即、核酸と言ふ名稱は明に後に言う「デソキシリボ」核酸に相當する呼び名であつた。ところが後に酵母から一種の核酸が發見せられてから、前者を動物核酸、後者を植物核酸となし夫々動植物細胞に特異な存在と考えられた。然し之は誤りであつて、動植物核の核蛋白は共に Miescher, Kossel の核酸が主成分をなし植物性核酸は主として細胞の原形質内にあり核内には極く少量に存することが明かとなつた。兩種核酸の化學構造上の相違は五單糖と「ピリミジン」塩基の種類が違ふだけでよく似ているから前者は「デソキシリボ」核酸(胸腺核酸、「チモ」核酸)と言ひ後者は「リボ」核酸(酵母核酸)と

\* Ketoenolsubstanz: 細胞質内に現れる低分子「デソキシリボ」核酸を主成分とする物質。

言っている。然し前記の様に「リボ」核酸は核には甚だしく主として原形質の中に分布しているのであるとすれば、形態學的立場からすると之を「核酸」と呼ぶのは好ましくない。又歴史的の立場からしても「核酸」は「デオキシリボ」核酸のみに用い、「リボ」核酸は別の名前(例えば副核酸 paranucleic acid)を用いるべきであろう。

核とは関係なく原形質内に一種の核酸があると言い出したのは多分 A. Meyer に始まるらしい。彼は之を Volutin と名付けた。その他神経細胞の Nissl 小體、腺細胞の好塩基性物質、又丸井が Thionin 染色で肝細胞内に證明した Nissl 様物質が核酸であろうと言う考えは古くからあつた。次で Massing は「ウニ」の未受精卵の胞體には多量の核酸が存在することを發表した。此れら核酸は 1928 年頃(即、Feulgen 反應發見)までは動物性核酸と思はれていた。何故となればそれ迄は動物細胞中には植物性核酸はないと考えていたからである。近年 Caspersson (1941) 等及び天野、古賀(昭 15 年)によつて紫外線顯微鏡應用の研究が始められた。但、前者は核酸の極大吸収に一致して  $2600 \text{ \AA}$  の線を用い、後者は「プリン」體が示す極大吸収  $2750 \text{ \AA} \sim 2800 \text{ \AA}$  の線を用いて實驗を行つたが兩者の成績に於ては大差を見ない。然も寫眞の數と精巧さに於ては後者に於て一日の長を認めなければならぬ。實驗の結果古來問題とされた上記原形質の好塩基性物質は著しい紫外線吸収性を示した。併し紫外線吸収性だけでは「リボ」核酸(RNA)か、「デオキシリボ」核酸(DNA)かの區別がつかない。そこで Caspersson は Feulgen 反應に目をつけたのである。之よりさき Feulgen (1928) は Schiff の「アルデヒド」反應を組織化學反應に應用して、DNA の特殊檢出法を發見した。その原理は昇汞固定「パラフィン」切片を  $60^{\circ}\text{C}$  に加温した定規鹽酸で處置して切片内の DNA 核酸の水解を起させ、「アルデヒド」基の出現に乗じて、「フクシン」亞硫酸の無色鹽基を作用させ、「アルデヒド」に因る「フクシン」色の再現を檢す

るのである。濱崎は DNA (Merk 製)、RNA (同)、「ヌクレオチド」、「クレオシド」の卵白塗抹標本を作り固定後 F. 反應を行つたところ、DNA 以外のものはすべて陰性に終つた。

DNA であつても微細粉末は、温鹽酸加水分解のときに溶けて流れ粗大な粉末だけが反應を現した。此の事實は本反應を評價する場合に最も顧慮すべき成績である。即、F. 反應は DNA の特殊反應である事は認められても、組織内にある少量の遊離 DNA 乃至 depolymerized DNA、殊にその分解産物は水解操作の時に融けて反應に與り得ない。従つて呈色を起す主體は理化學的に抵抗の強い核蛋白乃至高度に重合された DNA (色質及び染色體の DNA) である。DNA は現在のところ化學的純粹に取り出す事は甚だ困難である。Merk 製のものも又最近柴谷氏から分與されたものも(註 1)、共に多量の蛋白質を含有するので純粹な DNA とは見做し得ない。従つて之に F. 反應が陽性に出ることがあつても、それは純粹な核酸が  $60^{\circ}\text{C}$  温鹽酸に溶けない證據とはならない。Caspersson, Bery 等も F. 反應と紫外線顯微鏡寫眞像とを比較して 2 つの成績は大體一致するが F. 反應では水解操作のときに色質顆粒の大部分は溶解され、粗大な色質素も膨化して一部は消失すると言っている。以上の成績から考えると組織切片で見られる F. 反應は核蛋白乃至は重合 DNA 中に含まれる DNA のみが反應するので遊離 DNA 乃至は depolym. DNA は此の反應に與り得ない、従つて F. 反應陽性の場合には DNA の確證となるが反應陰性の場合にはその存在を否定し得ないのである。

尙 Stedman, etc. (1943, 1944) は F. 反應操作中に酸水解によつて DNA が溶けて「フクシン」亞硫酸と反應して色素が出来る。此の色素によつて組織の他の酸性蛋白が無選擇に染色されるとなした。又浦上(昭 14)は水解に用いる鹽酸の爲に組織等電點が強く鹽基性側に移動せしめられるために原形質の染色が著しく抑制され、核の染色が比較的明瞭に

なるものであると、その特殊性を強く疑つた。併し之等陽性成績の否定は濱崎(昭15)の追試によつて誤りであることが明かとなつた。

ところが其の後 J. Brachet (1947) は再び F. 反応の特異性を強調し、殊に温鹽酸の障碍作用をも否定した。即、純粹な自然界の「チモ」核酸を Zenker 固定の後「アガール・パラフィン」に包埋して切片となし、之に F. 反応を行うと強い反応が現れたと言う。併し彼の言う pure native thymonucleic acid と稱するものがどの程度のものか知る事が出来ないが Merk 製乃至は柴谷製と同様に蛋白反應陽性のものとすれば吾々の意見の反證にはならない。此の疑いは彼が次の様な的是はずれた實驗をしている事から益々濃厚になる。即、鳥の赤血球や分離した細胞核を 60°C の HCl に 5 分間浸して置いても HCl 中に DNA を證明することが出来なかつた事を反證として擧げている。吾々は遊離 DNA 殊に單核酸が温鹽酸にとける事を問題にしているのであつて色質中にある核蛋白の DNA が溶けるとは考えていない。單核酸が 60°C の HCl にとけないと言う事が實證されない以上濱崎の意見が尊重されなければならない。

Caspersson は前記の紫外線顯微鏡で寫し出した原形質内の吸収性物質は、組織標本に於て F. 反應陰性である所から此の核酸は RNA であるとした、併し注意せなければならない事は、此の實驗によつて原形質内では RNA のみが存して DNA 乃至はその分解産物は少しも存しないと言う證明は出来ていないのである、なぜとなれば低分子 DNA は F. 反應操作中に溶けて流失するからである。

F. 反應の評価を高からしめる爲には原法の固定法を改良して DNA の融解を出来るだけ妨ぐ事が肝要である。濱崎(昭24)は薄い組織片を無水「アルコール」で十分固定したのち Cr 合濟固定を行ひ之を切片として F. 反應を試みた。果せるかな核の呈色は原法に較べて著しく強まり核液、核小體にも弱い反應が現れ又原形質も無定形、斑紋状或は顆粒状に弱い反應が現れる。然もその呈色度は KES の

分布とよく一致する。更に、切片を豫め「ヌクレオチダーゼ」で處置しておくとも F. 反應は原法と同様の呈色に減じ、又 DNA 性物質(KES)は全く消失することを確めた。即、F. 原法で反應陰性と思はれた部分にも DNA 性物質の存することが實證せられた。

次に J. Brachet は「チオニン」、「ピロニン」、「トルイジン」青等の鹽基性「アニリン」色素で強い好鹽基性を現す細胞質を「リボヌクレアーゼ」で處理すると好鹽基性が失はれ同時に紫外線吸収性がなくなるので、之が RNA である確證とした。

併し、此の際にも細胞質中に DNA 性物質が全く存しないと言う確證は行つていない。紫外線吸収性が消失したと言うことも慎重に判斷せなければならない。紫外線顯微鏡寫眞は通常新鮮な組織を凍結切片として用いるのであるから之に「リボヌクレアーゼ」を作用せしめたとすると 60°C に加温する操作の間に單核酸類は勿論非特異性に溶かされる事は疑いない(註2)。「ホルマリン」固定を行つても薄い切片ならば大きな違いはない。「クローム」又は、昇汞合劑固定を行つてなければ單核酸は残らないのである。古賀論文(昭15)の附圖を詳細に検討すると兎の肝臓の「アルコール」固定では紫外線吸収像は全く RNA の分布に一致するが之を、「オルト」の固定にすると RNA は大部分失はれて顆粒状の陰影が現れる。之は濱崎の Cr. KES (DNA 性物質)の分布に類似する。更に昇汞固定の寫眞を見ると RNA の像はあと形もなく消えて核膜に接して小さい顆粒が少數に現れ、又散在性に 30~50  $\mu$  に及ぶ不規則な大塊が出来ている。之は濱崎の Hg. KES に全く一致する像である。念の爲に申し添えたい事は、濱崎の KES 證明の爲の固定を行つた組織細胞は原形質の好鹽基性は完全に失はれている事であつて、普通の鹽基性色素「チオニン」や「ピロニン」は勿論 KFJ 法以外のどんな染色法でも KES を染色する事は出来ないのである。

次に起つた問題は超遠心沈澱法である。新鮮組織を十分にすりつぶして液化し水(Bra-

chet) 又は磷酸鹽緩衝液(Chantrenne, 1946)で抽出すると組織内の RNA の 80% がこの中に移行する。之を先づ普通に遠沈して粗い細胞や核の破壊物及び 1~2  $\mu$  の顆粒(主に絲粒體)を除き、その上澄を超速沈する。超速沈の沈渣は主として 50~200  $\mu\mu$  の超顯微鏡的な細顆粒からなり主成分は RNA であつた。此の顆粒中小さいものは殆ど純粹な RNA かなるが、大きいものは複雑になり色々な酵素(呼吸酵素や水解酵素)を含み蛋白合成の基本であると解せられた。色々ちがつた組織を材料として用いても此の顆粒の多い少いはあるが性質には變りがなかつた。J. Brachet, etc. は之を Virus 状のものであらうと言つてゐる。扱てこの記載を見ると又も DNA は細胞質中に存しなかつたと早合點される恐れがあるが、問題は取りすてられた 1~2  $\mu$  迄の粗い顆粒である。濱崎、門は此の點に疑をもち二十日鼠の肝臓及び腎臓を上記の様に十分すりつぶし先づ 1 分 3000 廻轉の早さで粗い細胞崩壊物を除き、次に上澄を毎分 10000 廻轉で遠沈を行つた。その沈澱を「のせ硝子」に塗抹して Cr 合劑、Cu 合劑及び Hg 合劑で固定して夫々 KES の染色を行つた。Hg 固定では 1~2  $\mu$  球状或は桿状の光澤の鈍い顆粒が緻密に無數に認められる。之は絲粒體に他ならない。その間に少數の 0.5~2  $\mu$  の不整形の呈色顆粒が認められる。Cr 固定では多數の濃紫色の KEG が證明せられ、大さは 0.5~3  $\mu$  類圓形、稜角形、「コンマ」状、時には融合して少しく大きい不整形の顆粒となつたものが認められる。Cu 固定も同様の所見があるが、やゝ顆粒は少く時々 3~4  $\mu$  滴状中空性の顆粒が現れた。Baryt 水の分別を行つて見ると顆粒の殆ど凡ては消失した。

動物を絶食に陥らすと肝臓等などの RNA が急激に減少する。此の事は Berg や丸井、新井も氣付いていた様である。最近 Brachet, Davidson (1946), etc. は急性飢餓を行つて核酸を定量して肝の核酸絶対量は減少する。そして之は主として RNA が減少するもので DNA は殆んど變らないと報告した。之は恐

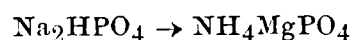
らく多核酸を定量したので「ヌクレオチード」や「ヌクレオシード」は検査しなかつたものと思はれる。濱崎、小西が家兎について行つた亞急性の飢餓では肝細胞の原形質の DNA 性物質(KES)は糖や脂肪より遙かに後れて段々に少くなり、5 日頃に著減又は消失する。そして消失するのは専ら外來性の KES であつて内生性のもは目立つた變化はない。勿論此の頃迄は核色質の量は變らない。併し 10 日以上に及び死直前になると核に退行變性が現れ内生性 KES は少しく増加し、その大部分は脂褐素に變る。此の時期になると明かに色質の量が減少するのである。急性飢餓の時は原形質内の RNA 及び DNA 性物質の犠牲に於て核の DNA が保存せられ、慢性飢餓となると死前には核の DNA も消耗を來すものと解せられる。最近放射性磷( $^{32}\text{P}$ )を盛に核酸研究に應用しはじめた(Havesy 1947, Hammarsten 1946, Davidson etc. 1944)。此の場合注射された  $^{32}\text{P}$  は RNA に多く入り DNA に入る事は比較的少い。その率は肝では 33:1、脾では 3:1、腸では 2:1 となつた。肝は RNA が甚だ多く肝組織全核酸量の 70~75% をしめる。併し脾では反對に RNA が少くて 44% である。このような關係を十分心得て磷轉換實驗成績を詳價しなければならぬ。殊に肝臓の實驗のみを取り上げると DNA には代謝がかけているのではないかと誤認される恐れがある(Campbell, 1948, 柴谷)。兎角内臓に於ては磷轉換率は RNA に強く DNA に弱いことは確かであるが鼠全身組織を平均すると RNA のそれは DNA の 1.6 倍にしか達せないのである(Hammarsten & Havesy 1946)。P 轉換率が DNA に低いことを全部 DNA の代謝に結びつけて説明することは危険である。肝臓の場合でも無機  $^{32}\text{P}$  の代りに核色質から取つた  $^{32}\text{P}$  を用いると核に入る  $^{32}\text{P}$  が著しく充まり兩種核酸の轉換率の差に甚だしい相違がなくなるのである。Ahlström, etc. (1946)は DNA の P 轉換が起りにくいのは核内の DNA は高度に重合され又核膜で封入されている爲であらうと解した。殊に肝の如く

上皮性細胞の核膜は厚く二重壁を有し(濱崎, 辻, 時岡, 昭 24 年)原形質内物質の無闇な侵入を許さない. 試みに蛙の有核赤血球に燐や「アルカリ」液で障碍が與えられると核網の色質は早く變化し Feulgen 反應を失うが核膜のそれは容易に變化しない(時岡, 昭 23). 更に後文にも述べる如く DNA は短波輻射線に甚だ敏感であるから僅かの放射能をもつ P に對しても無反應で核膜が之を通過せしめるとは考えられない. 従つて  $^{32}\text{P}$  と  $^{31}\text{P}$  の轉換から核内  $^{31}\text{P}$  の代謝を想像することは許されても之を斷定する事は出来ない.

以上の様に最近の細胞化學方面では興味の中心を RNA におき之を對象として研究を行いその結果かゞやかしい陽性成績をあげたに拘らず DNA はやゝ疎外された形であり, それかあらぬか DNA の検出は多くは陰性に終り或はその検出に積極的な努力を拂ておらない, 言いかえると高々「DNA を原形質内には検出出来なかつた」と言うまでで, 「DNA は原形質内には存在しない」とは明瞭に主張されてない. 此の點一部日本の核酸研究者間には(市川, 柴谷等 昭 24)誤解があるようである. 吾々の見るところでは少くとも今日迄に原形質中の DNA 性物質の存在を否定する確證はあがつていない. それに反して吾々の行つている原形質内 DNA 性物質の研究は明瞭な陽性の成績を得ているのである. かゝる場合陰性の成績は陽性の成績の前に光りを失うのが當然である.

最後に吾々が現在までにあげた原形質中に DNA 性物質(KES)が存在すると言う事に對する生化學的の實驗的確證を簡單にのべて此の稿を結びたい. 固定法を改良して F. 反應陽性物質を原形質内に證明した. 此のものは, 「イクレオチダーゼ」の作用によつて KES と共に消失する事は既に述べた. 次に二十日鼠に  $200\sim 600\text{r}$  照射を行うと甚だ速かに KES と核の DNA は殆ど同時に消失し又同時に恢復する. しかも此の場合 RNA は減少しない. そして其期間中は原形質内に F. 反應陽性物質が増加する. 此の所見は Brachet, Errera の試験管内實驗と一致する.

次に吾々は一定の方法で肝臓から KES を抽出した. 抽出液には蛋白を混じらないから核蛋白の分解は起らなかつた事は確である. 此の抽出物は今のところ純粹なものでないから, 他の物質を混えないとは言えないが石炭酸「フクシン」沃度法を行つて見るとその主成分は KES であることは明かである. 此の物質には アダムヒルガーの紫外線吸収「スペクトル」からして「グアニン」核の存在が證明された. 「アデニン」核の吸収線は出なかつたが之は尙實驗を繰返して見る必要がある, 「ペントーゼ」反應(Tollens)も陽性であり, 「イクレオチダーゼ」を作用さすと,



が生産される事が證明せられた. 更に此の抽出物質の生物學的作用を検したところ乳酸菌増殖因子(Lcf)を可成多量に有し貧血にも一定の効果が認められ, Stackstad が分離した葉酸と非常によく似た性質及び組成を持つている. Stackstad (1941)の葉酸と言うのは「グアニン」系の單核酸である. F. 反應は陰性とあるが, 之が DNA 系物質でないと言う證據にならぬ事は既にのべた通りである.

註 1. 柴谷氏は脾からとつた depolym. DNA は最初 F. 反應陽性であるとしたが再度の實驗で陰性と訂正した. (私信による)

註 2. 尙最近柴谷氏は「リボヌクレアーゼ」は低分子核酸に對しては特殊性を現さないとした. (私信による)  
即, 原形質内 DNA 性物質(KES)も亦「リボヌクレアーゼ」に消化せられるわけである.

かくして私と柴谷氏等との間に横たわつた DNA 分布に關する見解の相違は本年 1 月來數回にわたり手紙で隔意ない意見の交換を行い又お互に相手方の意見を尊重して補足的に實驗をも反覆して, 此の稿を終る時には低分子 DNA は變化のない細胞質内にも存在すると言う點で意見が全く一致した. 氏の慎執明快な質議應答によつて私は化學的に大に啓發される所があつた. こゝに謝意の一端をあらわしておきたい.