

亜硫酸の DNA およびタンパクに対する作用

Effects of bisulfite on DNA and proteins

代表研究者 岡山大学薬学部教授 早津彦哉
Prof., Faculty of Pharmaceutical Sci., Okayama Univ. Hikoya HAYATSU

協同研究者 国立がんセンター研究所放射線研究部長 田ノ岡 宏
Head, Dept. of Radiation Biol., National Cancer Center Res. Inst.
Hiroshi TANOOKA

岡山大学薬学部助手 根岸和雄
Assist., Faculty of Pharmaceutical Sci., Okayama Univ. Kazuo NEGISHI

In order to gain insight into the action of bisulfite (a solution form of SO_2) towards living organisms, it is important to investigate reactivities of bisulfite towards biological materials. A considerable amount of knowledge has become accumulated on the reactions, under a variety of conditions, between bisulfite and nucleic acids and proteins. However, relatively little is known about the reactivities of bisulfite to these molecules at neutral pH values. The following results have now been obtained.

(1) Bisulfite reacts with thymine and its nucleotides at pH 7 to form, reversibly, 5,6-dihydrothymine-6-sulfonate. Sodium salt of this compound was isolated pure, and the kinetics of reversion to thymine was investigated. It was found that the reversion was general-base-catalyzed: Sulfite and phosphate ions, for example, were highly efficient catalysts to convert this 5,6-dihydro derivative into thymine. Therefore, in biological settings, where general bases are abundant, any bisulfite-adduct of thymine formed in DNA would be expected to readily revert to thymine.

(2) Bisulfite reacts with 5-hydroxymethylcytosine very rapidly to form cytosine 5-methylsulfonate. The sulfonate was isolated as crystals and characterized. The 5-hydroxymethylcytosine residues in double stranded T2 DNA were reactive towards bisulfite. This contrasted sharply with the inactiveness of cytosines to bisulfite when the cytosines are located in the double helical structure of DNA.

(3) Chain cleavage of DNA by the action of bisulfite-oxygen. During the autoxidation of bisulfite, free radicals are formed which can attack DNA and lead to chain cleavage of this macromolecule. It was found that a bisulfite solution as low as $10^{-4}M$ concentration can bring about this reaction. This was demonstrated by allowing DNA from phage lambda to react with sodium bisulfite at pH 7 and 37°C for 30 min, followed by sedimentation analysis in an alkaline sucrose gradient.

(4) Cooperative actions of bisulfite and nitrogen nucleophiles. When cytosine was treated with a mixture of bisulfite and semicarbazide, the addition of bisulfite across the 5,6-double bond of cytosine was followed by an amine-exchange at position 4, to give 4-semicarbazido-2-ketopyrimidine-5,6-dihydro-6-sulfonate as a sole product. This type of reactions took place also with hydroxylamine, methoxyamine and hydrazine as the amine component. Treatments of phage lambda with these bisulfite-amine mixtures resulted in efficient inductions of clear mutations as well as in extensive killing of the phage. The actions of bisulfite and the amines were cooperative in the sense that either bisulfite or the amine alone did not cause such extensive effects on the phage.

The reaction of bisulfite-semicarbazide with cytosine is single-strand specific, and therefore was expected to serve as a probe for nucleic acid conformations. This reaction was used to investigate whether tRNA changes its conformation upon aminoacylation. The

results obtained with three species of tRNA have indicated that the conformations do not change when the molecule is aminoacylated.

(5) Analysis of the reaction between tryptophan and bisulfite-oxygen was carried out. Tryptophan was found to react easily with $10^{-2}M$ bisulfite in the presence of air to give a mixture of products. Five out of seven compounds produced were characterized. The major product was α -dioxindolylalanine.

(6) Inactivation of phage lambda by the bisulfite-oxygen system is a quite rapid process. The cause of the inactivation has now been elucidated. It was the inactivation of phage coat protein but not that of the phage DNA.

(7) The cell to substratum adhesion of Chinese hamster cell line Don was found to be severely damaged by treatment of the cells with a balanced salt solution containing 30 mM sodium bisulfite.

研究目的

亜硫酸は、大気中の二酸化イオウ、食品添加物としての亜硫酸塩、医薬品の安定剤としての亜硫酸塩などに由来して人間に接触する。我々は1970年に亜硫酸が緩和な条件下で核酸塩基シトシンを脱アミノ化してウラシルに導くことを見いだし、その反応機構を明らかにした。この事実から、亜硫酸が突然変異誘起能をもつことが予測できたが、実際バクテリオファージ・ラムダに対し亜硫酸を働かせると突然変異が誘起されることを見いだした。この変異作用は pH 5~6, 37°C. 1~3 M NaHSO₃ で起こる。

本研究では、主として中性領域での亜硫酸の核酸およびタンパクに対する作用に焦点をしばっていく。これは環境科学的立場からみると生体への作用は中性領域でのそれが重要だからである。DNA への作用としては、(1) 中性亜硫酸イオン溶液中でのチミンへの反応とその生物学的意義、(2) 低濃度亜硫酸イオンが酸素と反応して生ずるフリーラジカルの核酸への反応性の研究、(3) 亜硫酸イオンとアミンとの共同的作用の研究、などがある。またタンパクへの作用としては、(1) 亜

硫酸と酸素とから生成するフリーラジカルのタンパク損傷作用の解明、(2) その作用の基礎的面的解明のためトリプトファンとの反応の機構を研究する、などを進める。

研究成果

1. 亜硫酸イオンとチミンとの反応の解析

中性水溶液中では亜硫酸イオンの DNA への作用は主としてチミン塩基の 5,6-2 重結合への可逆的な付加である。そこで、チミンに対する NaHSO₃ の反応の機構を詳しく調べた。

我々はすでにチミン (1) への亜硫酸イオン付加により 5,6-ジヒドロチミン-6-スルホン酸 (2) が生成することをウラシルと亜硫酸イオンとの反応からの類推および UV, NMR から結論していた。しかし、2 の単離に成功していなかったために 1→2 の反応および 2→1 の逆反応の解析はできなかった。そこでまず 2 を単離することを試みこれに成功した。チミンを NaHSO₃ と pH 7 で反応液にエタノールを加えて沈殿を集め、これを繰り返して、水-エタノール沈殿を行なって 2 を得た。また 2 は反応液を 70% エタノールを溶媒とした濾紙クロマトグラフィーで分離することによ

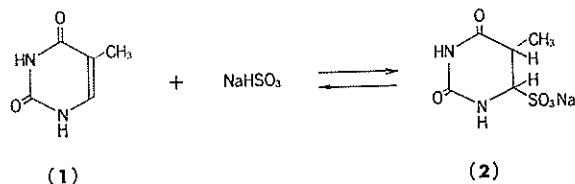


Fig. 1.

って、元素分析的に純粋な物質として得ることができた。こうして得た 2 について性質を調べたところ、従来非常に不安定であろうと思われていたこのものが、水溶液中で安定であることがわかった。しかしながら、一般塩基の存在下では速やかにチミン (1) を復生することもわかった。例えば、亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) やリン酸イオン (HPO_4^{2-}) は、中性条件下で 2 を 1 に戻す、効率の高い触媒である。この 2→1 の反応速度を測定したところ、塩基濃度に比例した。また、1 への NaHSO_3 の付加の速度は $[\text{NaHSO}_3]^2$ に比例した。1→2, 2→1 のそれぞれの反応速度を測定した結果から 1⇌2 の平衡点が計算できる。これと実測した平衡点とを比べたところ両者はよく一致した。また、反応の律速段階を知るため、5- ^{14}C チミンを用いて 2 を合成し、これが 1 に戻る速度を 5-[^3H] チミンから得た 2 のそれと比較した。結果は 5- ^{14}C 化合物の方が 4.1 倍遅かったので、2→1 の反応の律速段階は、5 位のプロトンの移動にあると結論した。これらの結果から、1⇌2 の反応のメカニズムは、Fig. 2 に示すようであることがわかった。

1⇌2 の平衡は反応液の pH が 4.5—7.5 の間で、pH が低いほど 2 に傾く。pH に依存しない平衡定数は、 $[\text{1}]/[\text{2}] [\text{HSO}_3^-] = 0.61 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ (25 °C) であった。平衡に達するまでの時間は、中性

付近で最も早かった。

ポリヌクレオチドに対して亜硫酸イオンが中性で働く場合、チミン残基が 2 に変化し、これは塩基濃度の低い環境では安定に保たれることが予想される。この可能性をさぐるため、ファージラムダを 1 M NaHSO_3 , pH 7 の溶液中 4°C, 18 日間放置したがファージの失活は起きなかった。ラムダ DNA は 2 本鎖であるため、1→2 の反応が起きないことが考えられるので、1 本鎖 DNA のファージ $\phi \times 174$ を同じ条件で処理する実験を現在行なっている。

2. 亜硫酸イオンと 5-ヒドロキシメチルシトシンとの反応

5-ヒドロキシメチルシトシン (3) は T2 などのファージの DNA 中に存在している。通常の DNA ではシトシンがあるが、T2 などではシトシンがなくて、代りに 3 あるいは 5 位- CH_2OH 基に糖残基がさらについた形をしている。亜硫酸塩を 3 に働かせたところ、通常の脱アミノ化反応は起こらず、迅速に 5 位のヒドロキシメチル基に反応して、シトシン-5-メチレンスルホン酸 (4) が生じた。この反応は、pH 4.5 が至適であった。4 を結晶として単離し、構造決定することができた。4 をさらに NaHSO_3 で処理すると非常にゆっくりと脱アミノ化が起きた。さらに、T2 DNA に対して NaHSO_3 を働かせたところ、DNA 中

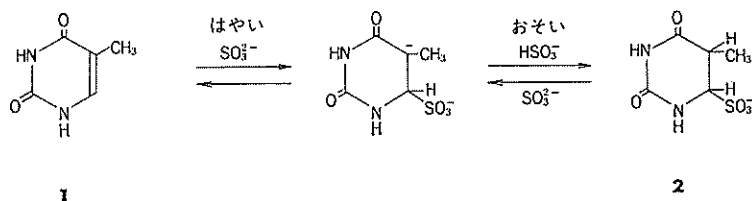


Fig. 2.

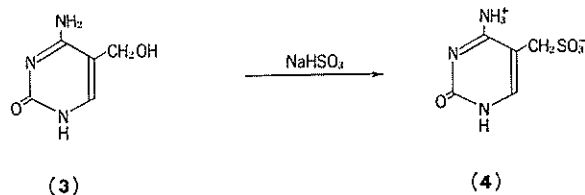


Fig. 3.

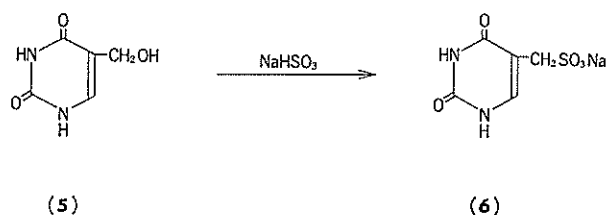


Fig. 4.

の 5-ヒドロキシメチルシトシン残基が 4 に変化したが、興味あることに、2 本鎖 DNA の状態でも反応が進行し、その反応速度は変性 T2 DNA (1 本鎖) での反応速度よりやや小さい程度であった。これは、シトシンの亜硫酸による脱アミノ化反応が 2 本鎖 DNA では起きず、1 本鎖 DNA だけに起こることと対照的であった。恐らく、3→4 の反応は 5 位側鎖に対する反応なので、DNA の 2 本鎖構造の内部まで亜硫酸イオンが入りこむ必要がなく、反応がスムーズに進むのであろう。T2 DNA の、5-ヒドロキシメチル基は酵素的にグルコシル化されることが知られている。このことから考えて、ヒドロキシメチル基は DNA の外側に露出していると想像されるが、上記の化学反応が起きることは、この考え方の化学的根拠を与えた。

5-ヒドロキシメチルウラシル (5) も同様に反応して、5-メチレンスルホン酸 (6) を与える (図 4)。しかしこの場合の反応の速度は、3→4 のそれに比べてずっと小さかった。

3→4 の反応が、迅速に、かつ 2 本鎖 DNA でも起きることは、5-ヒドロキシメチルシトシンが DNA 中に存在すると、亜硫酸が DNA を攻撃する際の最もよいターゲットとなることが予測される。高等動物の DNA 中には未だ 5-ヒドロキシメチルシトシンは発見されていないが、もし微量のこの塩基が存在すれば、そこは亜硫酸に対して弱点になるであろう。この意味で、種々の DNA 中の 5-ヒドロキシメチルシトシンの存在の有無を探ることは興味ある課題であり、今後研究してゆきたいと考える。

3. 亜硫酸-酸素による DNA の損傷

我々は 1972 年に NaHSO_3 ($10^{-2} M$) が酸素の存

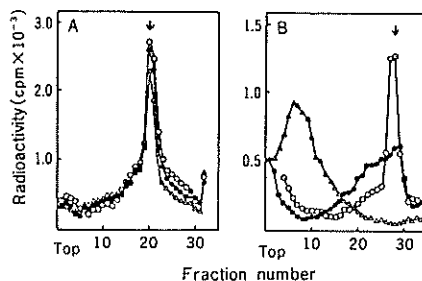


Fig. 5. Alkaline sucrose density gradient centrifugation patterns of DNA samples. (A) ^{32}P -Labeled λ phage was treated with $5 \times 10^{-4} M$ bisulfite at 37°C as described in the legend to Fig. 1. The DNA was released from the phage by treatment with EDTA ($8 \times 10^{-2} M$) at pH 11.3 (Davison and Freifelder, 1966) and centrifuged. Time 0, $\circ-\circ$; 30-min-treated (survival, 0.094), $\bullet-\bullet$; 120 min-treated (survival, 0.0064), $\Delta-\Delta$, (B) ^{32}P -Labeled λ DNA was treated with bisulfite as in (A) at 20°C for 30 min, made alkaline, and centrifuged. Treated with $10^{-4} M$ bisulfite, $\bullet-\bullet$; $10^{-3} M$ bisulfite, $\Delta-\Delta$; no bisulfite, $\circ-\circ$. The arrows indicate where the marker ^3H -labeled λ DNA sedimented.

在下 DNA の鎖切断を行なうことを見だし、報告した。この反応は中性水溶液中、室温で速やかに進行するため、亜硫酸の持つ DNA 損傷能としては最も強い反応の型であるといえる。そこで、この鎖切断反応が亜硫酸イオン濃度をもっと低くしても起きるかどうかを調べた。 λ ファージの 2 本鎖 DNA (32 P ラベル) に対し、 $10^{-3} M$ および $10^{-4} M$ NaHSO_3 , pH 7 を 20°C , 30 分間働かせた後、アルカリ性 λ 糖密度勾配遠心分離によって調べた。結果は Fig. 5 B のようになり、 $10^{-4} M$ NaHSO_3 でも分離パタンの変化が認められ、

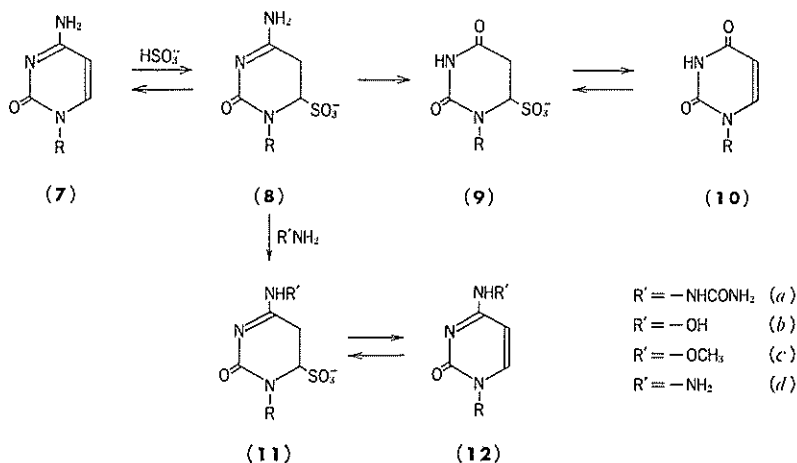


Fig. 6.

鎖切断に導かれていることがわかった。

この反応は酸素を必要とし、窒素ガス中では起こらないことから、 $\text{SO}_3^{2-} + \text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{SO}_3^- + \cdot\text{O}_2^-$ の式で生ずるフリーラジカルによって起きるものであると考えられる。これらのラジカルが DNA 上に与える損傷の化学的本体はまだわかっておらず、今後の研究課題として残されている。

4. 亜硫酸と各種アミノ化合物の混合試薬の DNA への作用

亜硫酸が核酸中のシトシン残基 (7) に働いて、5,6-ジヒドロシトシン-6-スルホン酸 (8) を生じ、これが脱アミノ化反応によって、5,6-ジヒドロウラシル-6-スルホン酸 (9)、さらにはウラシル (10) に変化することは、すでに 1970 年に発表した (Fig. 6)。この反応は、現在多くの研究者によって、(1) CG \rightarrow TA 塩基対変換突然変異の誘起を行なう方法として、また (2) 核酸の 1 本鎖部分に選択的に反応することを利用した核酸のコホモーション検定法として使われている。この反応は pH 5 で最も早く起こり、高濃度の NaHSO₃ を用いて、37°C で数時間を要する反応である。ところで、ある種のアミノ化合物が反応液中に共存すると、反応の経路が変わり、シトシンの 4 位のアミノ基が外からのアミンと置き換った 11 を非常に速やかに生成することがわかった。すなわち、セミカルバジド (H₂NHNCONH₂) が存在すると 11a が定量的に生成する。また、ヒドロキシルア

ミン (NH₂OH) では 11b、メトキシアミン (NH₂OCH₃) では 11c、ヒドラジンでは 11d が生ずる。これらのうち、11a と 11d は容易に HSO₃⁻ を放って 12a、12d にそれぞれ変化するが、対照的に 11b と 11c は全く安定であって、12 の型の化合物に変化しない。

Fig. 7 にシチジンを 1 M 亜硫酸ナトリウム-1 M セミカルバジド混合試薬で処理したときの反応速度を示した。37°C, pH 5 で 30 分間反応すると、ほぼ完結していることがわかる。図にはまた、1 M 亜硫酸ナトリウム液だけで処理した場合、および 1 M セミカルバジド液だけで処理した場合を示してあり、これらはいずれの場合も反応速度

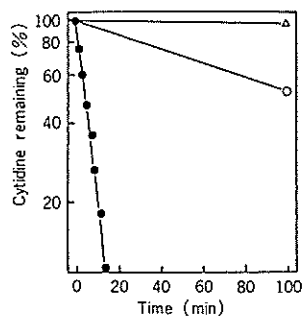


Fig. 7. Modification of cytidine at pH 5 and 37°. (●) With 1 M semicarbazide-1 M bisulfite; (Δ) with 1 M semicarbazide (○) with 1 M bi-sulfite.

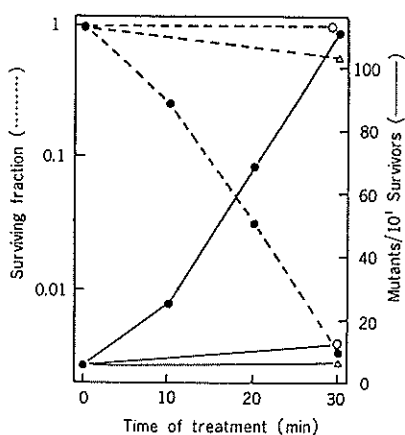


Fig. 8. Mutation and inactivation of bacteriophage lambda. (●) 1 M Semicarbazide-1 M bisulfite; (Δ) 1 M semicarbazide; (○) 1 M bisulfite. Incubations were at pH 5 and 37°.

は混合試薬の場合よりもずっと小さい。

興味あることに、ラムダフェージを 1 M NaHSO₃-1 M H₂NHNCONH₂ で処理すると、クリア変異が高率で起こることがわかった。Fig. 8 で示すように、処理時間の延長とともに変異頻度が上昇してゆく。一方、1 M NaHSO₃ 単独または 1 M H₂NHNCONH₂ 単独でフェージを処理した場合は、変異頻度はごくわずかしか上昇しない。また、フェージの失活についてみてみると、同様なことがわかる。すなわち、NaHSO₃ と H₂NHNCONH₂ とが共存すると、それぞれが単独である場合に比べて、はるかに強い失活作用を持つことがわかる。これらの現象は Fig. 7 で示したシトシンの化学反応性とパラレルであり、従ってラムダフェージの DNA 上で 7→11 の反応が起こっていると推測される。

11a→12a の反応はリン酸イオン (HPO₄²⁻) で触媒される。これは前に説明したチミン-NaHSO₃ 付加物 2 からチミン 1 への変化の場合と同じである。そこで、ラムダフェージを NaHSO₃-H₂NHNCONH₂ 混液で処理し、次いでリン酸緩衝液で処理してみた。Fig. 9 に示すように、初めの処理で失活したフェージが、リン酸処理によって急速に再活性化されることがわかっ

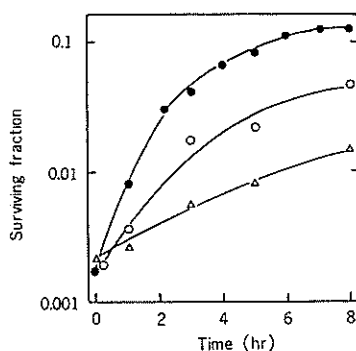


Fig. 9. Phosphate-dependent reactivation of lambda following treatment with semicarbazide-bisulfite. Incubations were at pH 7 and 37°. (●) In 1 M Na-phosphate; (○) in 0.2 M Na-phosphate in the presence of 0.8 M NaCl; (Δ) in 0.1 M tris HCl in the presence of 1 M NaCl.

た。この再活性化の速度は、リン酸塩の濃度に依存していることも観察された。

同様な NaHSO₃ とアミンの共同的作用による変異誘起と失活は、アミンとしてヒドロキシルアミン、メトキシアミンおよびヒドラジンをを用いた場合にも見られた。さらに、リン酸塩で後処理することによる再活性は、NaHSO₃-NH₂NH₂ 混合試薬の場合には見られたが、NaHSO₃-NH₂OH と NaHSO₃-NH₂OCH₃ の場合は見られなかった。これらの結果は、すべて Fig. 6 の 7→11 の反応およびリン酸イオンが触媒する 11→12 の成否によって説明できる。後者に説明を加えるならば、ヒドロキシルアミンとメトキシアミンの場合は 11→12 が進行しないから再活性化は起きないのであって、セミカルバジドとヒドラジンの場合は 11→12 の反応の進行とともに活性化が起こったと推測される。11 の構造には、大きなアニオン-SO₃⁻ がピリミジン環 6 位に存在するため、DNA 中に 11 残基が生成すると、致命的なのであろう。

最近、1 本鎖 DNA を持つフェージ φ×174 を用いて NaHSO₃+Amine の実験を行ない、失活の速度、およびリン酸塩処理による再活性化を調べた。その結果は 2 本鎖フェージであるラムダの場合とよく似ていて、ただ失活の速度が φ×174

の場合ラムダのそれより 10~50 倍大きい点だけがちがっていた。これは、亜硫酸イオンの 1 本鎖部分選択性とよく合っている。

NaHSO₃-H₂NHCONH₂ 混合試薬が速やかに核酸の 1 本鎖部分のシトシンを修飾して 12a に変化させる性質は、核酸のコンホメーションを調べるのに有効であると期待された。そこで、アミノ酸からペプチドを生合成する際の tRNA の二次構造の変化をこの化学修飾法を用いて追求した。tRNA にアミノ酸が結合すると、結合前のコンホメーションとは異なるコンホメーションに tRNA が変化するという報告があるが、一方ではそのようなコンホメーション変化はないとする報告もある。そこで ³²P ラベルした大腸菌-tRNA^{Leu}, tRNA^{Phe} および酵母 tRNA^{Phe} を用い、それぞれアミノ酸の結合前後での NaHSO₃+セミカルバジドにより修飾されるシトシンの位置を調べた。結果は Fig. 10 に示すようになった。いずれの tRNA の場合も 3'-末端 CCA およびループ部分の C のうちの限られたものが修飾を受けるが、アミノ酸の結合の有無にかかわらず修飾の位置は変らなかった。とくに、TφC ループの C はリボソームとの結合部位とされており、アミノ酸の結合によって expose されるという報告もあるが、修飾を受けないことがわかった。これらの結果から、tRNA はアミノ酸の結合によってコンホメーション変化を起こすことはない結論された。

5. 亜硫酸-酸素系のトリプトファンに対する作用

亜硫酸が酸素で酸化を受ける際に生ずるフリーラジカルが DNA を攻撃して、鎖切断に至らせることを、すでに述べた。これらラジカルがタンパクにも損傷を与えるであろうと考えられる。アミノ酸レベルでのこれらラジカルとの反応についてもほとんど知られていないのが現状である。わずかに、メチオニンがメチオニンスルホキサイドに変化することが Yang および我々の研究でわかってきた。そこでトリプトファンとの反応性および反応生成物について研究した。トリプトファン (0.025 M) の中性リン酸緩衝溶液 (Mn²⁺, 0.00025 M 存在) に亜硫酸ナトリウムを添加し (0.01 M) 空気を通じると、亜硫酸の酸化が急速に起きるとともにトリプトファンの分解が起きる。亜硫酸ナトリウムを 10 分ごとに加えて反応を進めるとともに、反応液の一部をとって、高速液体クロマトグラフィーで分析した。10 時間後にはトリプトファンは完全に消失した。反応生成物は、トリプトファンの光酸化反応などで生成することが知られている種々の物質と高速液体クロマトグラフの溶出位置、吸収スペクトルの比較によって決定した。主生成物は α-dioxindolylalanine であり、その他に少なくとも 6 種の物質が生ずる。そのうちで構造が明らかになったものは 4 種であり、Fig. 11 に示してある。

亜硫酸-酸素系で生ずるフリーラジカルが反応

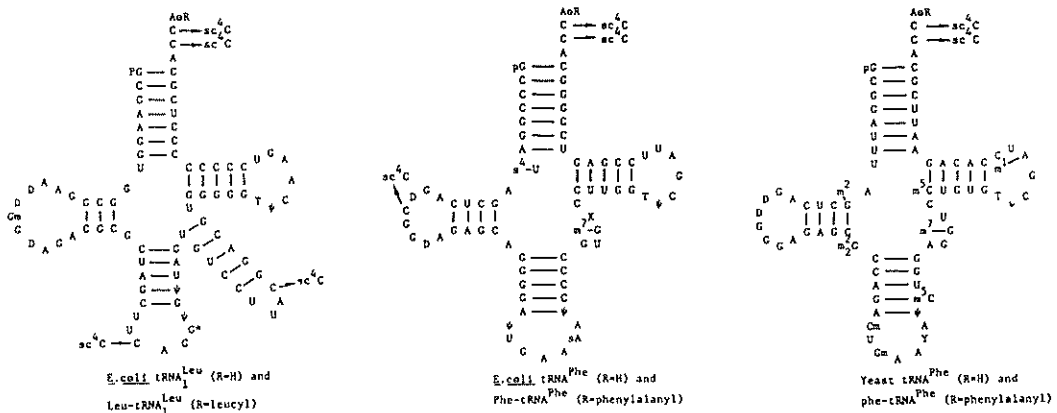


Fig. 10.

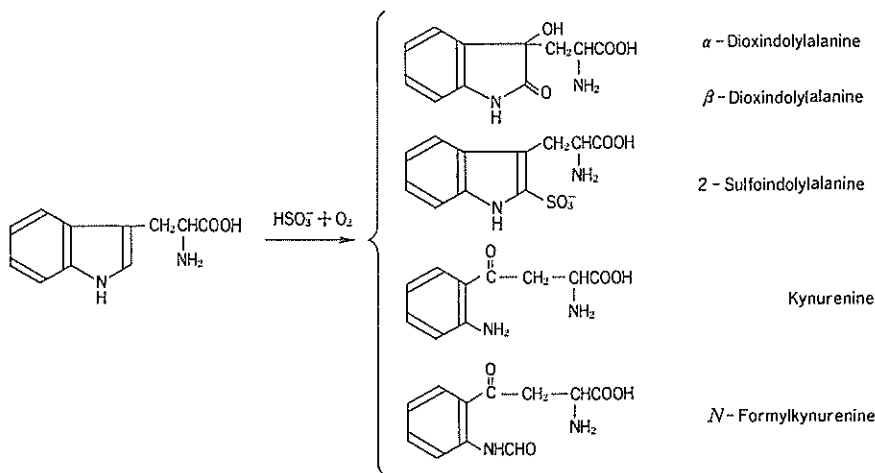


Fig. 11.

するアミノ酸は調べたかぎりメチオニンとトリプトファン以外にはない。シスチンは SO_3^{2-} イオンと反応してジスルフィド結合が切れるが、これはイオン反応であって、ラジカル反応ではない。

6. 亜硫酸-酸素によるファージラムダの被覆タンパクの損傷

希薄な NaHSO_3 溶液 (中性) にファージラムダを懸濁しておくと、急速なファージ失活 (プラーク形成能の失活) が観察された。Fig. 12 に示すように、 $10^{-4} M$ NaHSO_3 中で 37°C , 1 時間処理により 90% が失活する。この失活の原因はラムダ粒子中の DNA の失活か、あるいは被覆タンパクの宿主大腸菌への吸着能や DNA 注入能の失活であろうと考えられる。そこで、処理後ラムダ粒子から DNA を抽出し、鎖切断が起こっているか否か、またトランスフェクション能が失なわれているかどうかを調べた。さらに一方、ラムダファージの宿主吸着能、DNA 注入能の変化を調べた。その結果、DNA は全く損傷を受けていないこと (Fig. 5 a), それに対してタンパクが失活していることが明らかになった。

7. 亜硫酸塩の培養動物細胞への影響

チャイニーズハムスター由来の培養細胞 Don を用いて、亜硫酸ナトリウムの影響を調べた。プラスチック皿上で 2 時間前培養した細胞を、

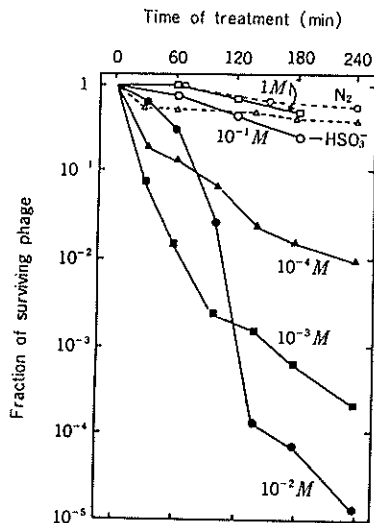


Fig. 12. Effect of bisulfite on bacteriophage λ . Bacteriophage λ CI857Sam7 was treated with bisulfite in the presence of air and Mn^{2+} ion. Bisulfite, $10^{-4} M$, \blacktriangle — \blacktriangle ; $10^{-3} M$ bisulfite, \blacksquare — \blacksquare ; $10^{-2} M$ bisulfite, \bullet — \bullet ; $10^{-1} M$ bisulfite, \circ — \circ ; $1 M$ bisulfite, \square — \square ; without bisulfite, \triangle — \triangle . Mn^{2+} ion ($5 \times 10^{-4} M$) was contained in these mixtures. Bisulfite, $10^{-2} M$, without Mn^{2+} under nitrogen atmosphere \circ — \circ .

NaHSO₃ を含む塩類溶液で 1 時間処理した後、コロニー形成能を調べたところ、30 mM NaHSO₃ 処理によって大きな減少が見られた。その原因を追求した結果、NaHSO₃ 処理の間に細胞がプラスチック皿からはがれてしまうことがわかった。NaHSO₃ の代わりに Na₂SO₄ を用いたのでは、このような現象はみられないので、亜硫酸は細胞の接着能に損傷を与えることが結論された。

8. まとめ

亜硫酸が核酸およびタンパクにおよぼす影響について、化学的ならびに生化学的に研究し、その一端を明らかにし得た。今後は、本研究で得られた知見を生かして人間の健康に関する基礎的諸問題に取り組んでゆこうと考える。最後に、3年間にわたって助成金を下さった日産科学振興財団に厚く御礼を申し上げる。

発表論文

- 1) H. Hayatsu: Bisulfite Modification of Nucleic Acids and their Constituents. "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", Academic Press (New York), 16, 75-124 (1976).
- 2) H. Hayatsu: Reaction of Cytidine with Semicarbazide in the Presence of Bisulfite. A rapid Modification specific for Single-Stranded Polynucleotide. *Biochemistry*, 15, 2677-2682 (1976).
- 3) M. Shiragami and H. Hayatsu: A rapid Reaction of Bisulfite with 5-Hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res., Sp. Publication 2*, S31-S34 (1976).
- 4) I. Kudo, A. Miura and H. Hayatsu: Effects on Bacteriophage λ of Free Radicals Generated by Autooxidation of Bisulfite. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 271-274 (1977).
- 5) H. Hayatsu and A. Kitajo: Cooperations of Bisulfite and Nitrogenous Compounds in Mutagenesis. "Progress in Genetic Toxicology", 285-292 (ed. by D. Scott, B. A. Bridges and F. H. Sobels, North-Holland Biomedical, Amsterdam) (1977).
- 6) H. Hayatsu: Cooperative Mutagenic Actions of Bisulfite and Nitrogen Nucleophiles. *J. Mol.*

Biol., 115, 19-31 (1977).

- 7) H. Hayatsu, A. Kitajo and K. Negishi: Formation of Dimeric Compound in the Modification of Cytosine with Hydrazine-bisulfite. *Nucleic Acids Res.*, 3, 51-55 (1977).
- 8) K. Negishi, F. Harada, S. Nishimura and H. Hayatsu: A rapid Cytosine-specific Modification of *E. coli* tRNA_{1^{Leu}} by Semicarbazide-bisulfite, a probe for Polynucleotide conformations. *Nucleic Acids Res.*, 4, 2283-2293 (1977)
- 9) I. Kudo, A. Miura and H. Hayatsu: Inactivation of Bacteriophage λ during the Aerobic Oxidation of Bisulfite. *Environmental Research*, 16, 205-215 (1978).
- 10) H. Hayatsu: Cooperative Mutagenic Actions of Bisulfite and Hydroxylamines. *Mutation Res.*, 54, 211 (1978).
- 11) H. Hayatsu: Reactions of Bisulfite, an Environmental Chemical, with Nucleic Acids and Other Biological Substances. *Pure & Appl. Chem.*, 50, 1063-1068 (1978).
- 12) K. Negishi, S. Nishimura, F. Harada and H. Hayatsu: Chemical modification study of aminoacyl-tRNA conformation. *Nucleic Acids Res.*, 6, 899-914 (1979).
- 13) H. Hayatsu and M. Shiragami: Reaction of Bisulfite with the 5-Hydroxymethyl Group in Pyrimidines and in Phage DNAs. *Biochemistry*, 18, 632-637 (1979).
- 14) I. Kudo, H. Hayatsu, A. Yokoiyama and Y. Kuroda: Effect of bisulfite on cell-to-substratum adhesion of Chinese hamster cells in culture. *J. Pharm. Dyn.*, 3, 74-79 (1980).
- 15) A. Itadani, M. Shiragami, R. Kawada, Y. Wataya and H. Hayatsu: Sulfite ion catalyzed reversion of 5,6-dihydrothymine-6-sulfonate to thymine—A general base catalyzed reaction. *J. Chem. Soc., Perkin I*, in press.
- 16) 工藤一郎, 早津彦哉: 亜硫酸塩とピリミジンヌクレオチドの反応について, 有機合成化学協会誌, 34, 369 (1976).
- 17) 早津彦哉: 環境変異原の検出の実例と対策—亜硫酸及び次亜塩素酸の突然変異誘起性, 公害と対策, 12, 418 (1976).
- 18) 早津彦哉: 亜硫酸塩と生体構成物質との反応, 化学の領域, 32, No. 4, 69-76 (1978).
- 19) 早津彦哉: 硫黄酸化物—亜硫酸の生体成分との相互作用—「環境汚染物質と毒性無機物質編」(南江堂), 165-172 (1980).