

## 置換 DNA/RNA 塩基の光反応の研究

(東工大院理工) ○鈴木 正、原田洋介、小林高志、倉持 光、市村禎二郎

【序】DNA 塩基の炭素骨格に N 原子を導入したアザ DNA 塩基や、カルボニル基の酸素を S 原子で置換したチオ DNA 塩基は、その励起状態ダイナミクスが通常の DNA 塩基とは大きく異なることが最近の我々の研究で明らかになってきた。特にチオ塩基およびそのヌクレオシド・ヌクレオチドは、通常の DNA は吸収帯をもたない UVA 領域 (320–400 nm) の光に活性であり (図 1)、そのため特定の DNA のマーキングや、あるいは癌細胞の選択的破壊など多方面への応用の可能性から、光生物・光医学の分野において近年注目を集めている。本研究では、チオまたはアザ置換 DNA/RNA 塩基とその誘導体について、励起状態からの緩和・反応ダイナミクスについて報告する。

【実験】過渡吸収法は、励起光として Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザーの第三高調波 (355 nm、パルス幅 5 ns)、またはエキシマーレーザー (XeCl 308 nm, KrF 248 nm) を用い、励起光照射によって生成した過

渡種の吸収を Xe ランプの白色光によりモニターした。試料溶液は Ar ガスで溶存酸素を置換した

後、測定中はセル中をフローさせた。測定は全て室温で行った。一重項酸素による発光スペクトル、および寿命は近赤外蛍光寿命測定装置 (浜松ホトニクス C7990) を用いて測定した。

【結果と考察】アセトニトリル溶液中における 4-thiothymidine (S<sup>4</sup>-TdR) の過渡吸収スペクトルを測定した (図 2)。335 nm 付近に光励起による基底状態の親分子の減少に伴う強いブリーチングが観測され、同時に 400–600 nm にわたってブロードな吸収帯が観測された。この吸収帯は、酸素やヨウ化カリウムによる消光実験から、最低励起三重項 (T<sub>1</sub>) 状態によるものと帰属した。

時間分解熱レンズ (TRTL) の測定を行った。Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザーの第三高調波 (355 nm) 照射によって得られた TRTL 信号を図 3 に示す。TRTL

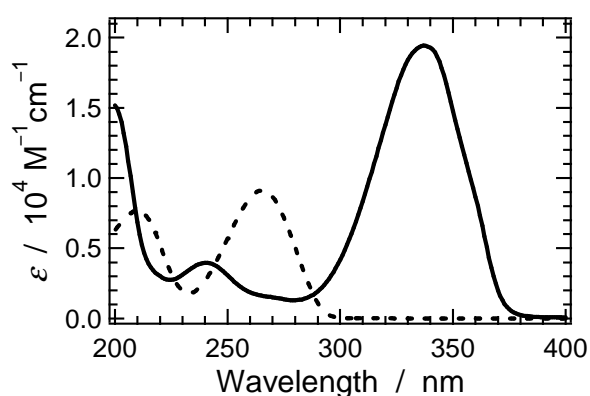


図 1. S<sup>4</sup>-TdR (実線) および TdR (破線) のアセトニトリル中での吸収スペクトル。

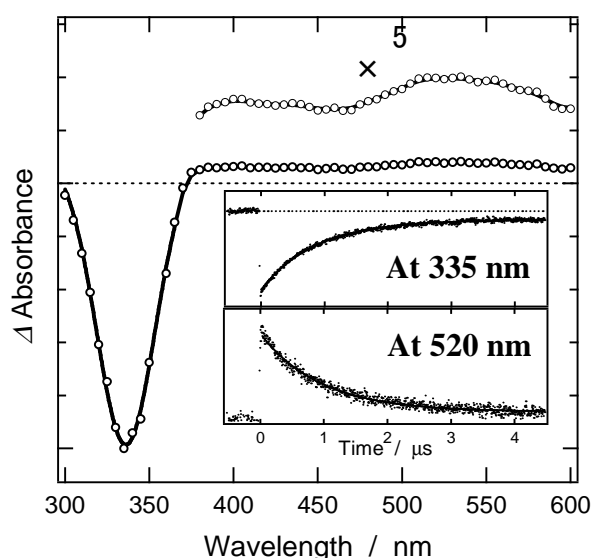


図 2. 355 nm 励起光照射直後におけるアセトニトリル溶液中の S<sup>4</sup>-TdR (0.43 mM) の過渡吸収スペクトル。挿入図は 335 nm および 520 nm での過渡吸収強度の時間変化と解析結果

信号には、励起光照射直後に立ち上がる成分 ( $U_F$ ) と、 $6.7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  の時定数で立ち上がる成分 ( $U_S$ ) の2成分が観測された。ここに、三重項消光剤であるヨウ化カリウム (KI) を加えると、 $U_S$  成分の信号強度の増加と立ち上がり速度が速くなることがわかった。すなわち、 $U_S$  成分は  $S^4\text{-TdR}$  の励起三重項状態 ( $^3S^4\text{-TdR}^*$ ) の失活に伴う熱による信号であること、また、励起三重項状態からの反応があることが明らかとなった。次に、熱変換効率 (励起エネルギーに対して無放射緩和により放出する熱量の割合) が1である2-ヒドロキシベンゾフェノン参照物質として用いて TRTL 信号強度を比較することによって、

$^3S^4\text{-TdR}^*$  の失活に伴う放出した熱量を定量した。リン光スペクトルから決定した三重項状態のエネルギー  $E_T$  の値から、励起三重項状態への項間交差の量子収率 ( $\Phi_{ISC}$ ) を  $1.0 \pm 0.10$  と見積もった。通常の DNA 塩基およびヌクレオシドは励起一重項状態の寿命が著しく短く ( $\tau < 1 \text{ ps}$ )、項間交差や光化学反応の量子収率が非常に小さいことを考えると、 $S^4\text{-TdR}$  の高い  $\Phi_{ISC}$  の値は極めて特異的である。また、励起三重項状態の寿命が  $1 \mu\text{s}$  と比較的長いことから、 $S^4\text{-TdR}$  は DNA 中において、(1) 他分子への増感反応 (エネルギー移動反応)、特に溶存酸素への光増感による活性酸素種の生成、(2) 単分子的あるいは、分子間での光反応により損傷を与える可能性がある。

アルゴン飽和および酸素飽和したアセトニトリル溶媒中で  $S^4\text{-TdR}$  の TRTL 信号を測定したところ、酸素飽和下で新たな熱の成分 ( $U_\Delta$ ) が観測された (図4)。  $U_\Delta$  成分の立ち上がりの時定数は、光子計数法で得られた一重項酸素  $O_2 (^1\Delta_g)$  の寿命 ( $\tau = 42 \mu\text{s}$ ) と一致することから、 $^3S^4\text{-TdR}^*$  から溶存酸素への光増感反応により  $O_2 (^1\Delta_g)$  を生成し、 $U_\Delta$  成分はその  $O_2 (^1\Delta_g)$  の減衰に伴う熱成分であると帰属した。また、 $O_2 (^1\Delta_g)$  生成の量子収率 ( $\Phi_\Delta$ ) を  $0.50 \pm 0.10$  と見積もった。  $O_2 (^1\Delta_g)$  を含む活性酸素種は生体内で様々な化学反応を起こし、重大な疾患を招くとされている。本研究により、 $S^4\text{-TdR}$  の光励起により高収率で  $O_2 (^1\Delta_g)$  を生成することが明らかになり、 $S^4\text{-TdR}$  が DNA 中で損傷を引き起こす増感剤として作用することが明らかとなった。

他のチオ及びアザ誘導体についても知見が得られたので、緩和機構についても報告する。

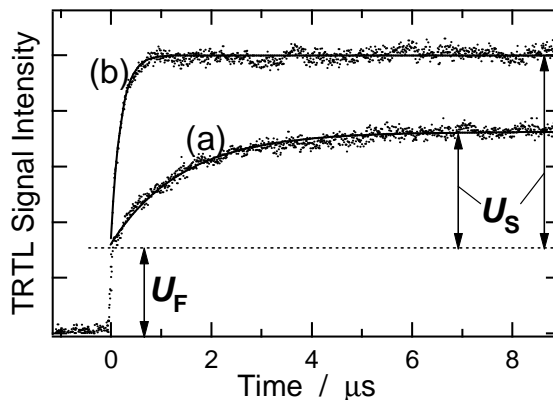


図3. アセトニトリル溶液中における  $S^4\text{-TdR}$  (0.36 mM) - (a) KI (0 mM)、(b) KI (0.31 mM) の 355 nm 励起によって得られた TRTL 信号。実線は一次の指数関数での解析結果。

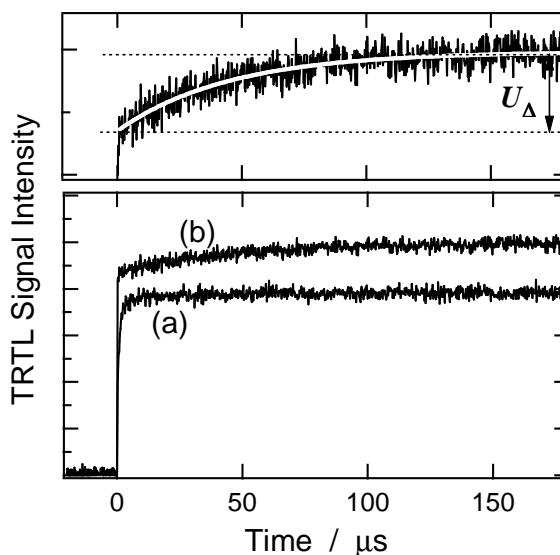


図4.  $S^4\text{-TdR}$  (0.36 mM) の (a) アルゴン飽和、(b) 酸素飽和したアセトニトリル溶液中での 355 nm 励起によって得られた TRTL 信号。