

## 溶液中の金微粒子へのレーザー照射で生ずる超高温領域による DNA の選択的分解

( (株)コンポン研<sup>\*</sup>, 東大<sup>\*\*</sup>, 豊田工大<sup>\*\*\*</sup>) 武田佳宏<sup>\*</sup>, 真船文隆<sup>\*\*</sup>, 近藤 保<sup>\*\*\*</sup>

【序】溶液中の金微粒子に対して、微粒子が吸収する波長のパルスレーザーを照射すると、金微粒子が多光子吸収し、電子励起される。この電子励起エネルギーは電子 - フォノン緩和により熱に変換され、熱エネルギーは金微粒子周囲の溶媒へと拡散し、金微粒子近傍に超高温高压領域を生成する。一方、金微粒子とタンパク質の相互作用などを用いて、タンパク質を金微粒子近傍に配置することができる。レーザー照射によって生成する超高温高压領域によるタンパク質の選択的分解が可能である [1]。本研究では、標的 DNA と相補配列を持つプローブ DNA を金属微粒子表面に固定し、これと標的 DNA とハイブリダイゼーションさせ、金属微粒子と標的 DNA を相互作用させた。これに、レーザー照射し、選択的に標的 DNA を分解することを試みた。

【実験】標的 DNA と塩基対を形成するように設計したプローブ DNA の結合した直径 15 nm の金微粒子を作製した。これを標的 M13 mp18 ssDNA (以下 ssDNA) と非標的のλDNA を含む溶液に添加し 24 時間放置した。プローブ DNA は標的 ssDNA のみにハイブリダイゼーションし、金微粒子は標的 ssDNA に特異的に配位するが、非標的λDNA には配位しない。この溶液を 1/100 に薄めて光学セルに入れ、ナノ秒パルスレーザー (パルス幅 10 ns、繰り返し周波数 10 Hz) を照射した。その後、ssDNA とλDNA の量をそれぞれの 3'末端付近を増幅するプライマーを用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

【結果】図 1 にレーザー照射後に溶液中に残った DNA の量をレーザー照射しなかった場合の DNA の量に対する相対値として示す。赤と青の棒はそれぞれ ssDNA とλDNA の量を示す。ssDNA に関しては、レーザー強度が 1.0 mJ/pulse 以下では、その量はほとんど変化しないが、1.5 mJ/pulse と 4.5 mJ/pulse の間では、レーザー強度と共に量が徐々に減少し、6.0 mJ/pulse 以上ではほとんどの ssDNA が破壊されていることがわかった。またλDNA に関しては、7.5 mJ/pulse 以下ではその量はほとんど変化しないが、7.5 mJ/pulse 以上では、約 20%程度のλDNA が破壊されていることが分かった。以上よりレーザー強度が 1.5 mJ/pulse 以上 4.5 mJ/pulse 以下の時は標的 ssDNA のみが選択的に分解されることがわかった。

【考察】プローブ DNA と標的 ssDNA との間のハイブリダイゼーションによる安定化エネルギー (ハイブリッド形成エネルギー) は - 54 kcal/mol なので、常温では、この 2 つの DNA の解離反応はほとんど起こらない。よってハイブリッド形成反応は 2 次反応で近似できる。この近似のもとで、このプローブ DNA と標的 ssDNA のハイブリッド形成反応の速度定数 [2] を用いた計算から、24 時間放置後では、ほぼ 100%の標的 ssDNA がプローブ DNA とハイブリッドを形成していると考えられる。また、一つのレーザーショットで照射される金微粒子は、全体の金微粒子の 0.18%と見積もることができる。レーザー照射中に溶液はスターラーで攪拌されているので、 $t$  秒後にレーザー照射されずに溶液中に残っている金微粒子の割合は、

$$\frac{C(t)}{C(0)} = \exp(-0.18 \times t) \quad (1)$$

となる。ここで、 $C(t)$ は  $t$  秒後の金微粒子の量を表わす。15 分後には  $C(15\text{min})/C(0) = \exp(-162)$

~0 となり、溶液中の金微粒子全部が照射されたことになる。以上から、すべての標的 ssDNA は金微粒子に配位しており、これらのハイブリッドはすべてレーザー照射され、ssDNA は選択的に破壊されたことがわかった。

次に DNA が分解される超高温高压領域の大きさを算出した。λDNA は金微粒子には配位せず、溶液中に分散している。レーザー照射領域に含まれる金微粒子は超高温高压領域を生じ、その領域に入っていたλDNA を破壊する。それと同時に金微粒子は断片化する。ここで金微粒子の量の時間変化 (1) を使い、λDNA 破壊の時間依存性を表わす式 (2) を導出した。

$$\frac{N(t)}{N(0)} = \frac{1}{\left[1 - \exp\left(\frac{10 \times V_2 V_3 C_0}{V_1 \times 0.18}\right)\right]} \left\{1 - \exp\left[\frac{10 \times V_2 V_3 C_0}{V_1 \times 0.18} \exp(-0.18 \times t)\right]\right\} \quad (2)$$

ここで、 $N(t)$  は  $t$  秒後のλDNA の量を表わす。また、光学セル中の溶液の体積を  $V_1$ 、溶液中のレーザーが照射されている領域の体積を  $V_2$ 、1 個の金微粒子近傍に生じる高温高压領域の体積を  $V_3$  とする。7.5 mJ/pulse 以上のレーザー照射強度の時、15 分間で約 20% のλDNA が破壊されていることから、式 (2) を用いて、金微粒子近傍に生じるλDNA が分解される領域の直径として約 100 nm と算出した。超高温高压領域の寿命が数十ナノ秒程度であるので、高温のみで DNA 分解されるためには、少なくとも 500 以上の温度上昇が必要と考えられる。レーザー照射終了直後の金微粒子からの熱拡散による温度をシミュレーションした結果、7.5 mJ/pulse 照射の場合は 500 以上の領域の直径は 50 nm 程度であった。一方、超高温高压領域における圧力の伝播に関しては温度領域よりも数倍程度大きな領域まで到達することが知られている。よって、今実験では、超高温高压領域の高温だけでなく、超高温高压領域からの圧力の伝播によっても標的 ssDNA やλDNA が破壊されたと考えられる。

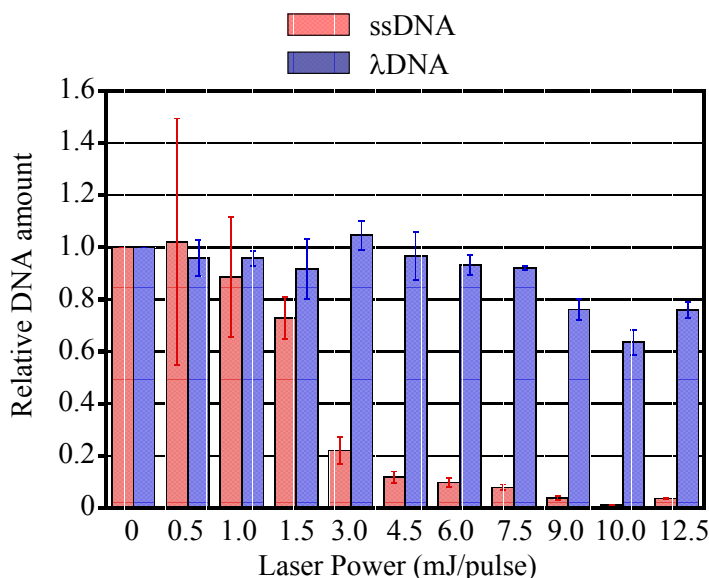


図1 レーザー照射後に溶液に残った DNA の量

[1] Takeda, Y.; Kondow, T.; Mafuné, F. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2393.

[2] Takeda, Y.; Kondow, T.; Mafuné, F. *J. Phys. Chem. C* 液中に **2008**, *112*, 89.