

1Pa060 近赤外ラマン分光法によるDNAへのintercalationの機構研究
(東大院理) ○勇崎健郎、濱口宏夫

[序] 平面的な芳香族分子はDNA塩基対の間に入り込むことが知られており、この現象はintercalationと呼ばれている(図 1)。入り込む分子(intercalator)はDNAにintercalationすることでDNAの修復、複製を阻害する。これは発ガン、制ガンの機構のひとつであると考えられており、非常に興味深い。抗ガン剤として、実際の医療現場で用いられているintercalatorも存在する。

本研究では典型的なintercalatorとして知られているethidium bromide(以下EBと略する)を用いて、DNAとの複合体の構造について調べた。intercalatorの多くは可視光を吸収するので、DNAとintercalatorの複合体のラマンスペクトルの測定は、強い蛍光のためにこれまでは非常に困難であった。しかし本研究では励起光に近赤外の波長の光をもちいることによって、蛍光の回避が可能になり、S/N の良い複合体のラマンスペクトルを得ることに成功した。近赤外ラマン分光法は、「構造の違いを敏感に反映する」、「*in vivo*で測定が可能」、「試料が微量で済む」、「不純物質からの蛍光が避けられる」、といった多くの特質から、生体物質への応用が大変有用であると考えられる。この手法を用いることで、生化学的手法とは違ったアプローチが可能であり、これまでにない新たな知見が得られることが期待される。

[実験]ラマン散乱の励起光としてはNd:YAGレーザーの基本波(1064 nm)を用いた。レーザーを試料に垂直に照射し、180 度方向に散乱される光を分光器で波長分解した後、光電面にInGaAsP/InPを用いた近赤外イメージンテンシファイア付CCDで検出した。検出器にはおよそ 100 ns のゲートがかけてある。試料は市販のDNA(Calf Thymus由来)をそのまま用いた。DNAの濃度が 20 mg/ml(塩基対濃度で 0.0303M)となるようにEB水溶液に溶かし、複合体溶液を調製した。またEBとDNAの濃度比を、さまざまにかえた試料を作製し、それぞれについてラマンスペクトルの測定を行った。

[結果]まず測定したDNA水溶液とDNA固体のラマンスペクトルを示す。上段のスペクトルはDNA水溶液のラマンスペクトルからバックグラウンドとして純水のスペクトルを引いたものである。DNAの二重らせんには構造多型があることが知ら

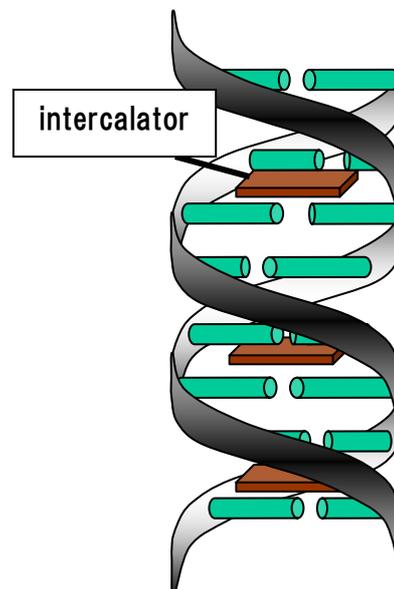


図1. DNA - intercalator複合体

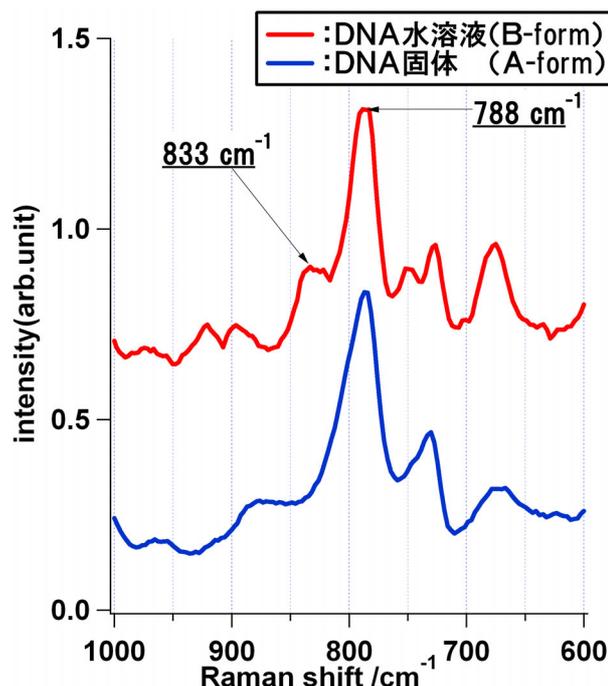


図2. 固体DNAとDNA水溶液のスペクトル

れており、固体ではA-form、水溶液中ではB-formをとることが知られている。B-formではA-formと比べらせん半径が小さく、らせん一巻きあたりの塩基対の数が少ない。ラマンスペクトルにその違いが現れており、DNAの構造の違いが、ラマンスペクトルを測定することによって捉えられることがわかる。DNA水溶液のスペクトルで見える 833 cm^{-1} 付近のピークは、 PO_2 逆対称伸縮振動であり、 788 cm^{-1} のピークは PO_2 対称伸縮振動である。これらはDNA鎖の骨格のものであり、DNAの構造の違いを大きく反映している部分であるといえる。本研究ではこの領域に着目し、DNAにEBがintercalateすることによって、スペクトルがどのように変わるかを捉える

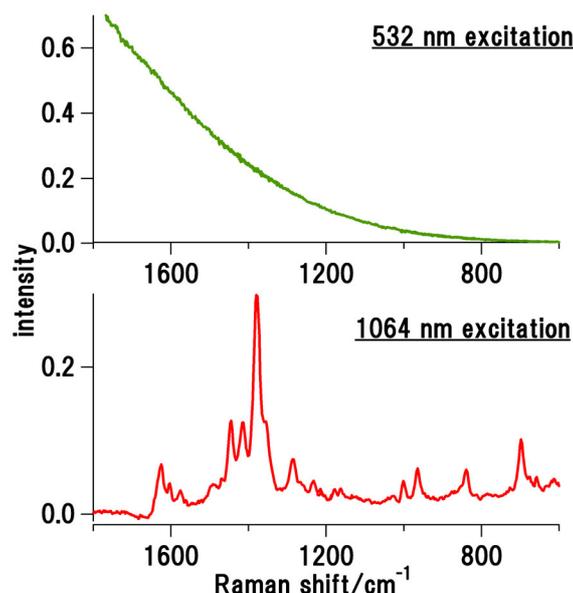


図3. 532 nmと1064 nmの比較

実験を行った。異なる励起波長で測定したEB水溶液のラマンスペクトルを図3に示す。可視光である532 nm 励起でラマン測定を行うと、図3の緑のスペクトルのようにその強い蛍光によりラマンのピークは見えない。しかし1064 nm 励起にすることで蛍光が回避でき、図3の赤のようなラマンスペクトルが得られることがわかる。つまり1064nmにすることで、いままでは不可能であったDNA-EB複合体のラマンスペクトルの測定が可能になるわけである。

図4のスペクトルはDNA-EB複合体のスペクトルから、同条件で測定した同濃度のEB水溶液のスペクトルを引いて得られたものである。これをさまざまな濃度比(DNA塩基対濃度:EB濃度=1:20,1:15,1:12.5,1:10,1:8,1:5)に対して行い、それらを図に示した。1:20では 830 cm^{-1} のピークはまだ見えており、DNAがB-formをとっていることがわかる。しかし1:15→1:12.5あたりからそのピークがやや低波数側にシフトしているように見える。さらに 790 cm^{-1} の対称伸縮振動のピークが徐々に太くなって、固体中で見られるようなA-formに近くなっていることがわかる。

現在、装置を改良することで、よりS/Nの良いスペクトルが得られることを目指している。またintercalatorの種類を変えてみたり、濃度比をかえることによって、さらにラマンスペクトルがどう変わっていくかを研究していく予定である。

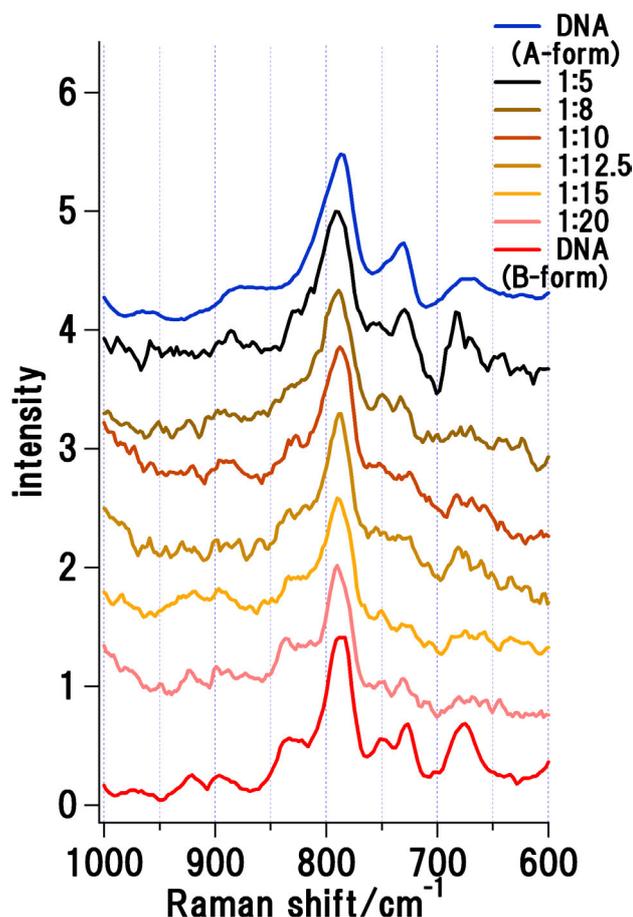


図4. DNA複合体のラマンスペクトル