

近赤外ラマン分光法を用いた薬剤による DNA の B 型から A 型への構造転移

(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 することで発がん、制がんに関わっており非常に興味深い。実際に医療現場で抗がん剤として用いられている intercalator も存在し、医学的に発がん性が指摘されているものも数多く存在する。しかしその機構、特に DNA と intercalator の複合体の水溶液中での構造に関しては未解明な部分が多く残されている。

本研究では intercalator として知られており、DNA の染色剤としても広く用いられている ethidium bromide (以下 EB と略) を用い、DNA と EB の複合体の構造を近赤外ラマン分光法で調べた。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強度を大幅に抑えることができ、S/N の良い DNA-intercalator 複合体のラマンスペクトルを得ることに成功した。図 2 は EB 水溶液を 532 nm 励起で測定したスペクトルと、1064 nm 励起で測定したスペクトルを比較したものである。EB は可視光を吸収してしまうため、図 2 のように非常に強い蛍光が発生しラマンスペクトルを得ることはできない。しかし近赤外励起にすることで十分な S/N 比のラマンスペクトルが得られるようになる。

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」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、90 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グ intensified CCD で検出した。試料を調製するのに用いた DNA は市販の Calf Thymus 由来のものをそのまま使用し、intercalator である EB も市販されているものを使用した。

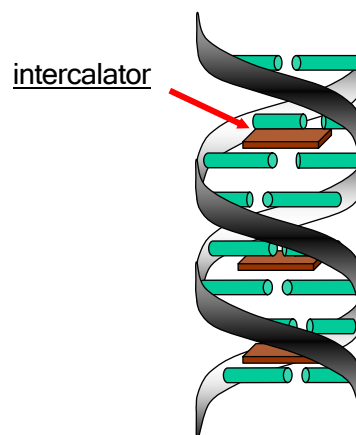


図1. DNA-intercalator複合体

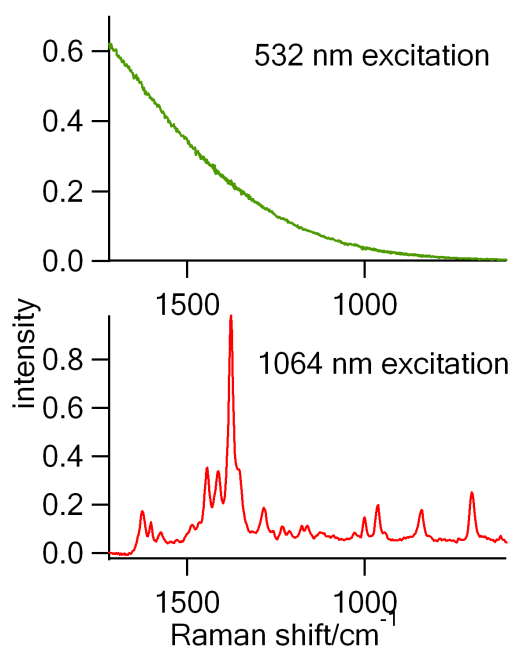


図2. 532 nm励起と1064 nm励起の比較

水溶液の調製の際の水としては milli-Q をオートクレーブにかけたものを用いた。DNA-EB 複合体の調製では DNA の濃度が 20 mg/ml(塩基対濃度で 0.0303M)となるように EB 水溶液に溶かした。EB と DNA の濃度比が EB:DNA=1:3,1:4,1:5,1:7.5,1:10,1:15,1:20,1:30 であるものを調製し、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】

図3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。引き算を行う際にはEBのピークが消えるように係数をかけてある。これらの実験を様々な濃度比に対して行い、それらを図に示した。図の一番下はEBを含まないDNA水溶液のスペクトルである。また一番上はDNAの固体のスペクトルである。DNAはその置かれている環境に応じて構造多型があることが知られている。一般的に、DNAは水溶液中ではB型という構造を取っており、固体中ではA型という構造をとっていることが分かっている。このA型とB型の構造上の違いがラマンスペクトルにも反映されており、835 cm⁻¹付近と800 cm⁻¹付近のピークがA型とB型を見分けるマーカーバンドとなっている。これらのピークは、DNAのデオキシリボース環をつなぐ骨格鎖(5'C-O-P-O-C3')のPO₂伸縮振動に由来すると考えられている。これらのピークに注目して図3を見ると、濃度比1:20あたりまではDNAがB型であることがわかる。しかしそれ

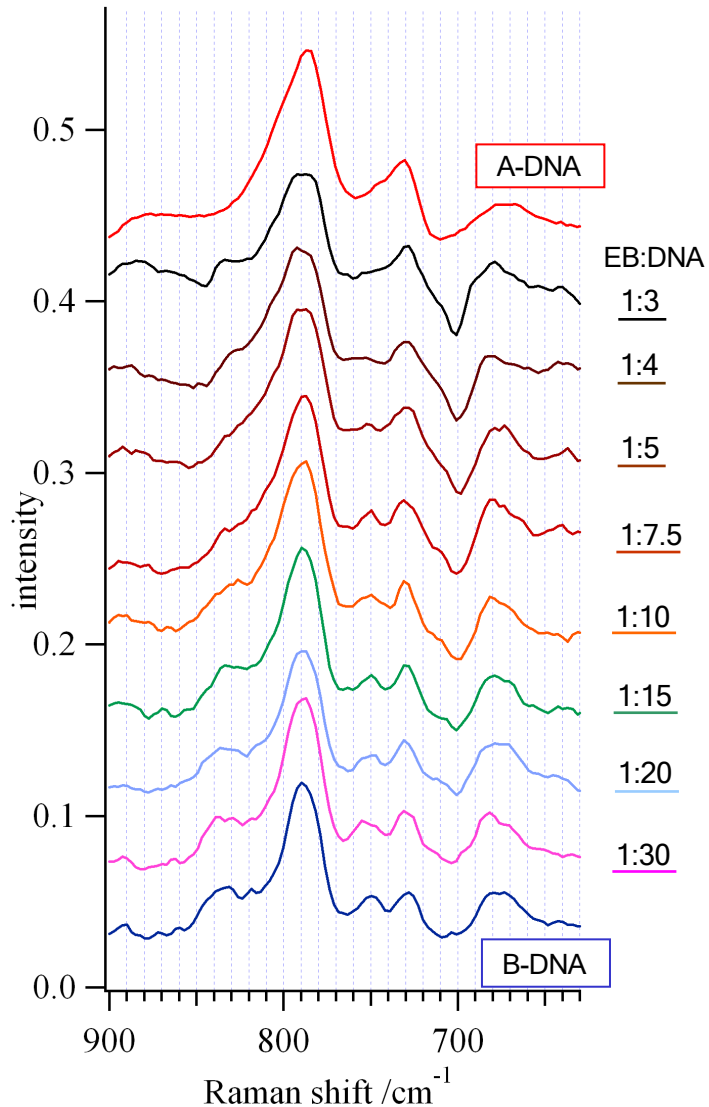


図3. DNA-EB複合体のラマンスペクトル

よりEBの濃度が濃くなっていくと835 cm⁻¹のピークが次第に減っていき、さらに800 cm⁻¹のピークがブロードになってA型のスペクトルに近づいていくことが分かる。750 cm⁻¹のピークはDNA骨格鎖のデオキシリボース環と塩基のチミンに由来するバンドとして考えられている。このピークに注目するとEBの濃度が濃くなるにつれ強度が減少し、1:3の濃度比ではほぼA型と等しくなっていることが分かる。これらのことからEBがDNAへintercalationすることでDNAの構造がB型からA型のな構造へと転移することが分かる。またDNA-EB複合体のラマンスペクトルから、同条件で測定したDNA水溶液を引くという解析を行った結果、805cm⁻¹付近にピークが見え、EBの濃度比とともに強度が増加していくことが分かった。このピークも一般的にはA型に特徴的なピークであると考えられており、この解析結果もDNAがEBによりA型へと転移していることを示している。