

「DNA と色素との相互作用」*

京都大学理学部

赤坂 一之

I 緒 言

DNA と色素との相互作用は発がんや突然変異の分子機構の一端を担うものとして興味もたれている¹⁾。色素と DNA との結合は、通常のいわゆる共有結合による強い化学結合ではなく、比較的弱い分子間力による一種の分子会合と考えられる。現在までの種々の実験結果に基づく、色素分子の DNA への結合には大まかにいって次の二種がある²⁾(**図1**参照)。

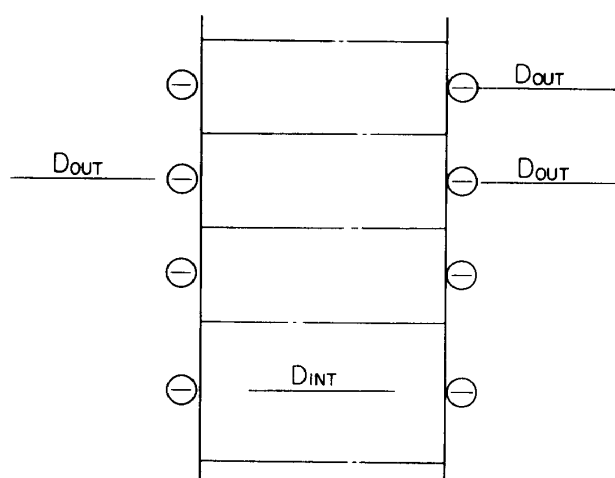


図1 DNA-色素結合の模式図

D_{OUT} は表面のリン酸基に結合した色素分子
 D_{INT} は塩基間にインターカレートした色素分子

(1) DNA 表面の負に荷電しているリン酸基への正に荷電した色素分子の弱い静電力による結合(結合エネルギー $< 6\text{kcal/mole}$)。

(2) DNA の塩基間への色素分子のインターカレーション(挿入)による強い結合(結合エネルギー $= 6\sim 9\text{kcal/mole}$)^{3,4)}。

特にインターカレーションは色素の生理活性の発現と密接に関連しており重要である。

DNA と色素との相互作用において問題となる第一の点は、インターカレーションによる強い結合にはいかなる力が作用しているかということである。即ち、DNA との静電相互作用をほとんどもたない中性(無荷電)の色素でも結合し得るか。結合し得るとすれば、その結合エネルギーは、DNA との静電相互作用をもち得る荷電色素のそれと比べてどれ位小さいか。

DNA と色素との相互作用において問題となる第二の点は、インターカレーションの過程がどのようにして起るかということである。即ち、色素のリン酸基との静電的結合とインターカレーションの律速過程とその速さ等の問題である。第一の点は分子間相互作用に敏感な電子スピン共鳴(ESR)法を用いて、第二の点は迅速反応の追跡に有力なストップフロー(SF)法を用いて研究した。

II 中性色素の結合

電氣的に中性の炭化水素(例ベンツピレン)が本当に DNA と結合するのかどうか、は論争の歴史をもっている⁵⁾。永田らは実際に特異的相互作用があることを流動二色性から証明した⁶⁾。筆者らは ESR 法を用いることにより中性の色素ラジカルが DNA に結合することを示した⁷⁾。即ち、水にとけない固体の中性ラジカル N-メチルフェナジル-2-ニトリル(MPCN \cdot)を DNA 溶液と buffer 中で数時間以上振とうさせると、MPCN \cdot のマイクロクリスタル状態を示す鋭い一

* この報告は Henry H. Dearman (ノース・カロライナ大), 広海啓太郎, 迫田満昭, 波多野博行(以上京大理)の諸氏との協同研究によるものである。

重線(巾2 Gauss)が両方に観測される(図2 a, b)が, DNA 溶液ではさらに, 巾広い一重線(巾15 Gauss)が重なって観測される。遠沈によって未反応のマイクロクリスタルが除かれると巾広い一重線のみが残る(図2 c)。この最後のスペクトルは, MPCN・ラジカルの ESR の超微細構造が, 高分子である DNA との結合による線巾増大のため見えなくなったとしてのみ理解されるもので, 電氣的に中性の色素ラジカルが DNA に一分子ずつ分れて結合することを示し

ている。ESR の吸収強度から10塩基対当り1個の MPCN・が結合していることが分る。

III 荷電色素と中性色素の結合比較⁹⁾

IIの結果は, DNA との静電相互作用をほとんどたない中性の色素でも DNA と結合することを示した。このことは中性色素が DNA 塩基の間に押し入ってはまりこんだ, いわゆるインターカレーションの形で DNA と結合すると考えると, 塩基との van der Waals 相互作用や電荷移動型相互作用で説明できる。

正に荷電した色素がインターカレートするとこの van der Waals エネルギー等の他に, 静電エネルギー(やはりリン酸基とのクーロンエネルギー)が加わるため結合はより強固になることが予想される。

このことをみるため, 前記 MPCN・(中性)と MPCNH⁺ (MPCN・にプロトンのついたもの)の DNA に対する結合エネルギーを10%アセトン中での ESR による Scatchard Plot の方法⁹⁾で求めた。MPCNH⁺ の結合エネルギーは 8.7 kcal/mole, MPCN・のそれは 6.2kcal/mole で, 明らかに荷電色素の結合自由エネルギーは大きく, その差 2.5kcal/mole (全体の3割弱)が荷電色素がインターカレートしたときの静電エネルギーの寄与を示すものと考えられる。

IV 色素-DNA の結合過程¹⁰⁾

色素-DNA の結合過程をみるために, 色素としてアクリジンオレンジ(AO)を用いた。これは AO が DNA 表面でリン酸基と結合するときには二量体として結合し易く, その光吸収がモノマーとしてインターカレートするときのそれと著しく異なることを利用して, 二種の結合をスペクトル的に分離して観測できるためである。

DNA/色素の比を変え波長を変えて, 色素溶液と DNA 溶液混合後の光吸収変化を SF 法で測定すると

i) 速い変化($t_{1/2} < 1\text{msec}$)と遅い変化($t_{1/2} = 2\sim 3\text{msec}$)とがあり, 前者は AO が DNA 表面のリン酸に結合するときのスペクトル変化に, 後

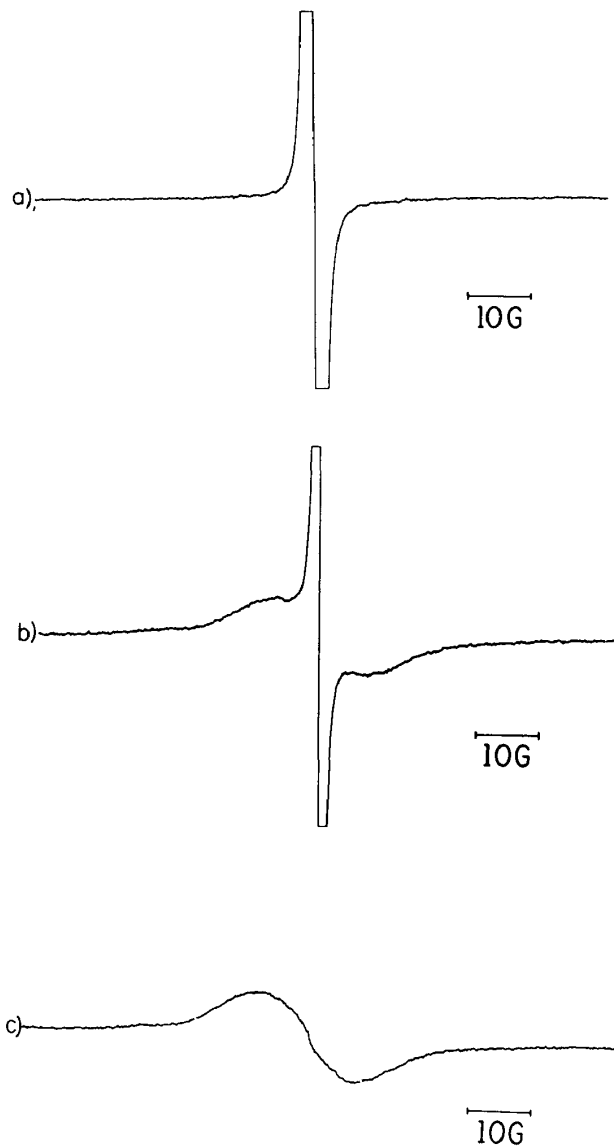


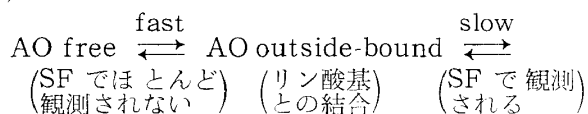
図2 pH 10 ($[\text{Na}^+] = 10^{-3}\text{M}$) の N-メチルフェナジール-2-ニトリル水溶液の室温 ESR スペクトル

- a) 固体 MPCN・を buffer のみと混合
- b) 固体 MPCN・を DNA 溶液と混合
- c) b)を遠沈したものの上澄

者はリン酸基に結合した AO がインターカレートするときのスペクトル変化に似ている。

ii) 遅い変化の速さは DNA, 色素の濃度によらずほぼ一定である。

iii) しかしイオン濃度の増加と共に速くなる。以上 3 つの結果から AO と DNA との結合過程は次のように二段階におけると考えられる, 即ち,



AO intercalated

特にイオン濃度の増加とともに AO outside-bound → AO intercalated の過程が速くなることはこの過程が正の色素と負のリン酸基の分離によって律速されていることを示すものであり, 逆に, 色素が塩基間に入り込むために必要な DNA 分子の伸長が律速ではないことを示唆している。

文 献

- 1) 伊藤隆他:「蛋白質・核酸・酵素」, 12, 555, (1967)
- 2) A.R. Peacocke and J.N.H. Skerrett: Trans. Farad. Soc. 52, 261 (1956)
- 3) L. Lerman: J. Mol. Biol. 3, 18 (1961)
- 4) A. Blake and A.R. Peacocke: Biopolym. 6, 1225 (1968)
- 5) E. Boyland and B. Green: Brit. J. Cancer 16, 347 (1962); Liquori et al., J. Mol. Biol. 5, 527 (1962)
- 6) C. Nagata et al., Biopolym. 4, 409 (1966)
- 7) K. Akasaka and H.H. Dearman: Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 377 (1969)
- 8) K. Ishizu, H.H. Dearman, M.T. Huang, and J.R. White: Biochemistry 8, 1238 (1969)
- 9) K. Akasaka and H.H. Dearman: to be published.
- 10) M. Sakoda, K. Hiromi, and K. Akasaka: to be published.