

DNA 鎖中にトラップされるホールおよび アニオン部位の存在

大阪大学産業科学研究所 小林一雄・山上隆平・田川精一

In early stage of radiation-induced DNA damage, high-energy radiation ionizes nucleic acid bases, generating positive holes and electrons within DNA strand. Identification of the DNA sites that trap holes and electrons is essential to understanding the process of DNA damage caused directly by ionizing radiation. The positive holes are trapped at guanine (G) sites with lower oxidation potential on the DNA helix. Similarly the electron trap sites favoring efficient transport of excess electrons in DNA may be present.

Key words: DNA, radiation damage, hole, electron transfer, proton transfer

1. はじめに

DNA の放射線照射によって誘起される過程は、放射線損傷という放射線生物学の中心的課題のみならず、DNA のような規則正しい構造を持つ分子集合体における放射線化学としてイオン化、エネルギー付与、電子移動、クラスター損傷など興味ある問題点を提起してくれる。放射線照射により DNA がイオン化されると、ホールと電子が生成し、それらは DNA 鎖の 4 種の核酸塩基にランダムにトラップされ、せいぜい 1~6 塩基対移動するものと思われていた^{1), 2)}。ところが、DNA 鎖中に生成したホールは、その酸化還元電位に従い、安定な部位へ核酸塩基による π スタックを通じてかなり長距離移動する。その際に、アデニン (A)-チミン (T) 間あるいは

グアニン (G)-シトシン (C) 間相補鎖による安定化、塩基間の重なりによる安定化、配列に依存した電荷移動機構、さらに電荷移動に伴う脱プロトン化、それによって阻害される電荷移動等の要因により、特定の部位に電荷移動し、損傷はそのトラップされた部位からの反応によることが明らかになってきた。DNA 配列に大きく依存した損傷部位の存在は、ホットスポットとして突然変異を受けやすい部位の存在としてとらえることができる。

一方、電子に関しては最近までよく分かっていなかったが、新しい進展があった。本稿では最近のこの分野における進展と、我々のパルスラジオリシスの結果、また量子化学計算結果に基づく議論についても紹介したい。

2. ホール移動における配列依存性

DNA はグアニン (G), アデニン (A), シトシン (C), チミン (T) の 4 種類の塩基から構成されている。G は酸化電位が最も低く、二本鎖内に正電荷のホールができると、そのホールが塩基間を移動し、G 間を行ったり来たりしながら、長距離移動すると説明されている^{3), 4)}。このことは光増感剤を位置特異的に結合した DNA を光照射した後に、光増感剤から遠く離れた位置での G の酸化損傷の実験により確認された。約 200 Å, 塩基対数にして約 60 もの長距離にわたって移動する例も見つかっている⁴⁾。また G が 2 個、3 個と連続する配列では G 単独よりも連続した G 同士のスタッキング相互作用によりイオン化ポテンシャルがさらに低下することが、量子化学計算結果より提案された⁵⁾。また、種々の配列における G を含む 5 量体あるいは 3 量体のイオン化ポテンシャルの値が求められた^{6), 7)}。その結果、5'-XGY-3' 配列において、隣接する 3' 側塩基よりも、5' 側塩基がブ

Migration and Trapping of Hole and Excess Electrons in Double-Stranded DNA

Kazuo KOBAYASHI, Ryuhei YAMAGAMI, and Seiichi TAGAWA
(The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

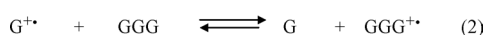
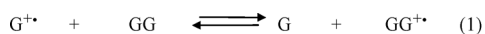
〒567-0047 茨木市美穂が丘 8-1

TEL: 06-6879-8501, FAX: 06-6876-3287

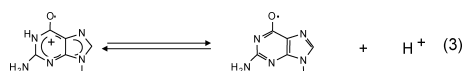
E-mail: kobayasi@sanken.osaka-u.ac.jp



リン塩基か (A または G), ピリミジン塩基 (T または C) により G のイオン化ポテンシャルが大きく変化するという結果が得られている。低いイオン化ポテンシャルを持つ配列部位で、最もホールがトラップされやすく、最も損傷を受けやすい部位としてとらえられ、その損傷を受けやすい配列とイオン化ポテンシャルの間には良い相関関係が得られている⁶⁾。しかしながら、次式に示す DNA 鎖内での G と GG あるいは G と GGG 間の電荷移動速度より求めた式 (1) および (2) の自由エネルギーの変化値 ΔG は 0.052 および 0.077 eV と求められ、それらの計算値 0.23 および 0.444 eV よりはるかに小さい値を示した⁸⁾。この実験値より、ホールの安定化エネルギーはそれほど大きいものでなく、特定のサイトにトラップされず、G 間を移動しながら平衡状態にあると見なされる。



ホールトラップされた $G^{+\bullet}$ は脱プロトン化し (式 (3)),



さらなる不可逆反応により酸化損傷を受けると考えられている⁹⁾。G が三つ連続した配列のイオン化ポテンシャルが最も低く一電子酸化を受けやすいが、酸化損傷部位は 5'-GGG-3' の三つの G に選択性が存在することが報告されている¹⁰⁾。隣接する 5'側の塩基 (X) が C の場合は一番目の G が、T の場合は真ん中の G が選択的に分解される。この実験結果は、ラジカルカチオン状態では GGG 全体に正電荷とラジカルスピンの非局在化し、脱プロトン化したラジカルではラジカルスピンは特定の G 部位に局在化していると説明され、このことは量子化学計算により支持された。一方、最近筆者らの以下に述べるパルスラジオリシスの実験により、それを支持する結果を得た¹¹⁾。すなわちパルスラジオリシス法により生成する水和電子と $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ との反応により生成する $\text{SO}_4^{\bullet-}$ を酸化剤として用いると、G ラジカルカチオン ($G^{+\bullet}$) が最初に生成し、500 ns 後には脱プロトン化したラジカル $G(-\text{H})^{\bullet}$ が得られる¹²⁾。得られたスペクトルを種々の配列のオリゴヌクレオチド (ODN) で調べた結果、二本鎖 ODN で生成する $G^{+\bullet}$ のスペクトルは free の $G^{+\bullet}$ とは明らかに異なることが分かった。この違いは、 $G^{+\bullet}$ が相補鎖の水素結合している C と相互作用によるものと考え

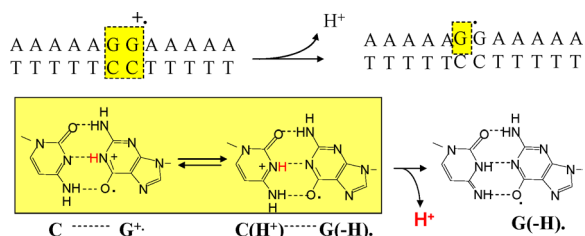
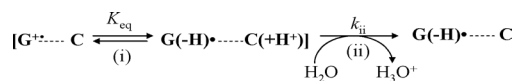


図 1 ODN 中に生成した G カチオンラジカルからラジカルへの移行過程の模式図

られ、過渡的には電荷が C にまで非局在化しているという実験結果を支持している¹³⁾。また隣接の配列を変えて調べたところ、 $AG^{+\bullet}A$, $TG^{+\bullet}T$, $CG^{+\bullet}C$ において $G^{+\bullet}$ のスペクトルに差が見られなかったのに対して、G が連続した配列において顕著に現れ、400~450 nm における吸収ピークは $G < GG < GGG$ の順に長波長シフトしていることが確かめられた。それに対して $G(-\text{H})^{\bullet}$ のスペクトルは、free の $G(-\text{H})^{\bullet}$ と一致し、また配列によるはっきりした差が見られなかった。これらの結果より、ラジカルカチオンのスピンの GGG 全体に非局在化しているのに対して、脱プロトン化後の $G(-\text{H})^{\bullet}$ のスピンは特定の G のみに局在していることが明らかにされた (図 1)。

DNA 鎖中に生成した $G^{+\bullet}$ の脱プロトン化は、以下の式で示す過程からなると考えられる。すなわちラジカルカチオン生成後、G から C へのプロトン移動 (step i), プロトン化した C から溶媒である水への移動 (step ii) から成る。ここで (i) の過程の平衡定数を K_{eq} , G C 間プロトン移動の速度定数を k_i , k_{-i} , k_{ii} を溶媒への脱プロト



スキーム I

ンの速度定数とする。G の N1 から C の N3 へのプロトン移動は 10^{14} s^{-1} 程度のかなり速い過程と思われるので、スキーム I における律速過程は (ii) の脱プロトン過程となる ($k_{ii} \ll k_i$)。したがって ($k_{ii} < k_{-i}$) とすると、見かけの脱プロトンの速度定数 $k = k_{ii} K_{eq}$ で表すことができる。

G と水素結合している C の 5 位に電子供与基である CH_3 基あるいは電子吸引基 Br を導入すると、625 nm で観測される脱プロトン化の速度は大きく変化した (図 2)。この置換基による速度定数の差はスキーム I に示す C の脱プロトンしやすさを反映している。すなわち C

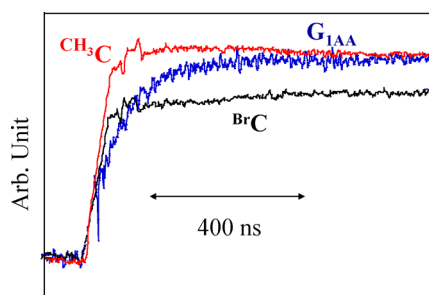


図2 625 nm で観測される CH_3C および BrC を含む ODN G カチオンラジカルの脱プロトン過程

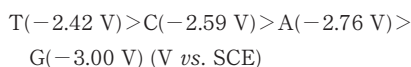
の $\text{pK}_a[\text{CH}_3\text{C} (\text{pK}_a=4.6), \text{C} (\text{pK}_a=4.3), \text{BrC} (\text{pK}_a=2.8)]$ と $\text{G}^{+\cdot}$ の pK_a 3.9 の差より求めた K_{eq} は $\text{CH}_3\text{C}, \text{C}, \text{BrC}$ でそれぞれ 5, 2.5, 0.08 となり、それぞれ求めた見かけの脱プロトンの速度定数の比とよく一致することからも、 $\text{G}^{+\cdot}$ の脱プロトン化がスキーム I で進行していることが証明された。

また脱プロトン過程における溶媒である D_2O 同位体効果が見られ、この値 ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}}=3.3$) は free の dG の同位体効果 (1.7) より大きかった。このことは、DNA に強く結合しているプロトンが脱離していく過程が関わっていることを示唆している。さらに溶媒の水分子の関与についても、末端に G を含む ODN で脱プロトン過程が著しく速くなることから、 $\text{G}^{+\cdot}$ から $\text{G}(-\text{H})^{\cdot}$ への変換過程は $\text{G}^{+\cdot}\cdots\text{C}$ からの脱プロトン化であることがわかった。

興味あることに、脱プロトン過程は配列に依存して変化することが分かった。予想に反して、G, GG, GGG 間でその差は予想ほどに大きくなく、むしろ G に近接する塩基がプリン塩基かピリミジン塩基かが重要な因子であった。その脱プロトンの速度定数は $\text{CGC} > \text{TGT} > \text{AGA} > \text{AGG} > \text{GGG}$ の順に変化した。この差は先に述べたその配列における G のイオン化ポテンシャル^{6), 7)} と良い相関関係が見られ、ラジカルカチオンの安定性によると思われる。

3. 電子移動における配列依存性

DNA 鎖中に生成した过剩電子の挙動については、ホール移動と比較して、よく分かっていない。特に、直接分光的手法により、電子の移動を追跡した研究例はほとんどないと言ってよい。核酸塩基の還元電位の値より、ピリミジン塩基である $\text{C}^{\cdot-}$ および $\text{T}^{\cdot-}$ が電位がプリン塩基より大きく、電子移動のキャリアーとして働くと考えられている。その還元電位は以下のとおりである¹⁴⁾。



$\text{C}^{\cdot-}$ はその pK_a が 12 以上で中性領域では直ちにプロトン化し、ラジカル $\text{C}(\text{H})^{\cdot}$ が生成すると報告されており^{15), 16)}。現在まで水溶液中で $\text{C}^{\cdot-}$ をとらえた例はない。したがって、C に電子が付着すると、直ちにラジカルが生成することから、それ以上の電子移動は起こりにくいと考えられている。それに対して、 $\text{T}^{\cdot-}$ はその pK_a が 6.8 であり¹⁵⁾、また筆者らのパルスラジオリシスの結果より、そのプロトン化の速度がマイクロ秒領域で観測できる比較的遅い過程であるため (pH 7.0 で見かけの速度定数は $4.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$)、DNA 鎖における電子移動は $\text{T}^{\cdot-}$ がキャリアーとして働くと考えられている。

これまで DNA における过剩電子移動の研究の大部分は、低温凍結下での γ 線照射後の ESR 測定の結果によるものであった。77 K 以下で DNA に照射すると、電子の約 80% が C にトラップされる^{17)~19)}。130 K まで昇温すると T に電子がトラップされた ESR シグナルが観測され、最終的に 6 位の T にプロトン化された 5,6-dihydrothymine 5-yl radical が得られる。この実験結果はいったん C にトラップした電子は昇温することにより T へ移動していることを示しており、この電子移動は 2 塩基対程度であると報告されている。ここでの問題点は、C および T が電子をトラップ後のプロトン化過程である。Stagstuen ら²⁰⁾ は 10 K にて単結晶の C に γ 線照射後得られる ESR および ENDOR より、C の N3 位がプロトン化したラジカルを同定しており、 $\text{C}^{\cdot-}$ のプロトン化はこのような低温においても起こっている。一方 $\text{T}^{\cdot-}$ のプロトン化は昇温して見られる現象であり、この過程は不可逆過程と見なされている。

電子捕捉剤をインターカレートさせた DNA に、低温凍結下で γ 線照射後の ESR 測定すると、塩基にトラップされた電子の捕捉剤への移動が観測される。この系では電子捕捉剤はランダムに存在しているが、この電子移動は 77 K では距離に依存した超交換機構で進行し、170 K 以上に昇温すると、ホッピング機構で電子移動することが示されている²¹⁾。

室温における DNA の電子移動は、ODN に光増感剤を位置特異的に結合させ、光照射により DNA 鎖に電子を生成させ、光増感剤から離れた位置に、電子移動後のアニオンを化学的にトラップすることによる解析が行われてきた。以下に示すチミンダイマー ($\text{T}-\text{T}$)²²⁾ あるいは Br 化したウリジン (U) を ODN に結合させ²³⁾、チミンダイマーあるいは Br-U に電子が付着して開裂する

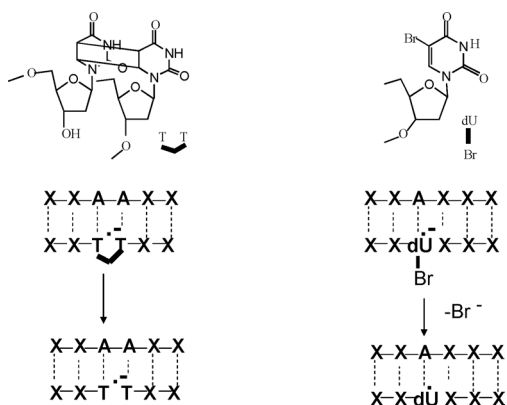


図3 ODN アニオン移動の化学的トラップ法

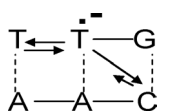


図4 ODN 中のアニオン移動の模式図

ODN の分解を追跡することにより DNA 鎖内での電子移動を追跡している (図3)。その結果, チミンダイマー用いた場合は距離, 配列に依存せず, 24 Å 以上離れた部位への電子移動が観測されている。ここで電子付着後のチミンダイマーの開裂の速度が 10^6 s^{-1} と報告されていることから²⁵⁾, DNA 中での電子移動速度は 10^6 s^{-1} 以下と見積もられている。それに対して Br-dU を用いた場合, 電子移動は距離および配列に依存した。この両者の実験結果の違いは, 電子をトラップしたチミンダイマーは効率良く開裂せず, さらなる電子移動が指摘されている。電子移動による研究では Br-dU を用いた手法が広く使われている^{26), 27)}。これら手法を用いた種々の配列の ODN での実験から分かったことは, G-C 配列が含まれると, その移動効率約 1/2-1/4 に減少することである。このことは C⁻ のプロトン化が電子移動を阻害すると結論しており, 現在考えられている DNA 鎖中の電子の移動は図4の模式図で示される。しかしながら, いずれの実験法においても, 光照射による生成物分析であり, どれぐらいの距離をどの程度の速度で電子が移動するかについては全く不明であり, 今後の実験が待たれる。

筆者らはパルスラジオリシス法により水和電子と種々の配列の ODN との反応結果生成するラジカルアニオンのスペクトルを追跡することにより, 電子がどこの部位にトラップされるか考察した。まず基本となる4種の塩基と水和電子との反応後の生成物の吸光係数を決定し

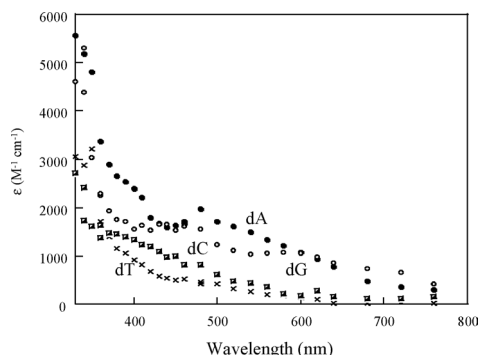


図5 pH 7.0 において dA, dT, dC, dG の水和電子との反応により得られるスペクトル

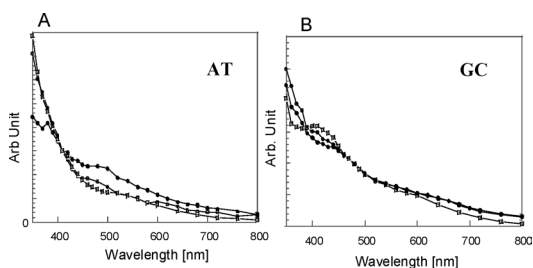
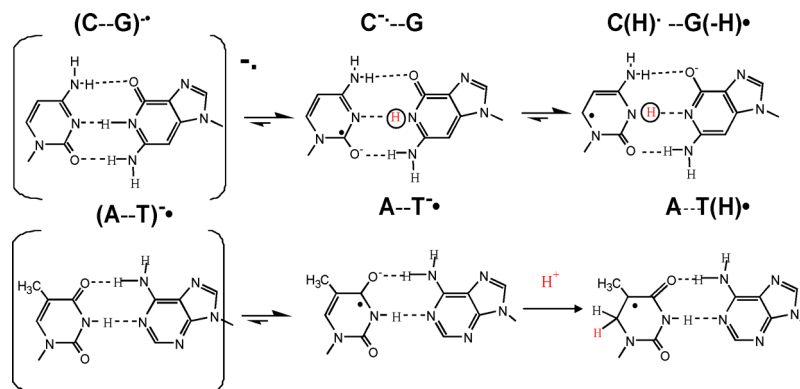


図6 (A): パルス後 400 ns に得られる二本鎖 AT (●), 一本鎖 AT (○), T (□). (B): 二本鎖 GC (●), 一本鎖 GC (○), C (□) のスペクトル

た (図5)。アニオンのキャリアーとなる C および T のの吸光係数は A および G のそれに比べて小さく, 短波長側にしか吸収が見られないのに対して, G および A は 500~600 nm 領域に吸収が見られることに注目したい。

GC のみの配列 (GC), AT のみの配列 (AT) を持つ ODN 二本鎖と, control 実験として一本鎖の水和電子との反応によって得られるスペクトルを比較した。その結果を図6に示す。ODN 一本鎖 AT は dT のラジカルアニオンと一本鎖 GC は dC ラジカルと同様のスペクトルを与えた。これらの一本鎖の結果は, 還元電位の低い A から T, G から C への電子移動が起こり, 最終的に C あるいは T に電子が移動したスペクトルを与える。それに対して二本鎖 ODN の場合それぞれ特徴あるスペクトルが見られた。AT ははっきりした 500 nm 付近にピークを持ち, 800 nm までの長波長に吸収が見られた。また 500~600 nm の吸収は A ラジカルアニオンの寄与が考えられる。一方 ODN GC のスペクトルは, dC のスペクトルと類似したスペクトルが得られたが, 400~450 nm に見られる吸収は GC のほうがやや長波長シ

DNA 鎖中にトラップされるホールおよびアニオン部位の存在



スキーム II DNA 2 本鎖中に生成する GC および AT ラジカルアニオンの反応模式図

フトした。二本鎖 ODN の観測されるスペクトルは相補鎖の水素結合している A または G との相互作用によるものと考えられ、電荷が非局在化した状態が示唆される。また GC のスペクトルは C からプロトン化後のものであると説明できる。しかしながら AT においては dT と、GC においては dC と本質的には変わらないことから、不対電子は GC においては C に²⁶⁾、AT においては T に局在化しており²⁷⁾、量子化学計算の結果とも矛盾しない。

AT ではこの後プロトン化による吸収変化が見られ、この pH 7.0 における速度定数 ($4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) は free の dT ($4.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$) と比べて 1 桁近く遅く、ODN のプロトン化を受ける部位の違いを反映しているものと思われる。以上のことから GC および AT のアニオン生成はスキーム II のようにまとめることができる。

4. おわりに

DNA の放射線照射するとランダムに活性種が生成するのでなく、ホールについては特定の配列にトラップされることが明らかにされた。それに対して過剰電子については最近までよく分かっていなかったが、ホールとは違った興味ある挙動を示すことが分かってきた。今後直接分光学的手法により、電子の移動を追跡した研究が望まれる。

最後に本稿を執筆にあたり貴重なご批判、ご意見をいただいた京都大学大学院工学研究科の伊藤健雄先生、大阪大学産業科学研究所の川井清彦先生、ならびに田川研究室の皆様、さらに執筆の機会を与えていただいた放射線化学会誌編集委員の皆様には謝意を表します。

文 献

1) M. Yan, D. Becker, S. Summerfield, P. Renke,

and M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem.*, **96**, 1983 (1992).
 2) R. A. Spalletta and W. A. Bernhard, *Radiation Research*, **130**, 7 (1992).
 3) K. Nakatani, C. Dohno, and I. Saito *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10854 (1999).
 4) P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Z. Kan, and G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8353 (1999).
 5) H. Sugiyama and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7063 (1996).
 6) I. Saito, T. Nakamura, K. Nakatani, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12686 (1998).
 7) A. A. Voityuk, J. Jortner, M. Bixon, and N. Rösh, *Chem. Phys. Lett.*, **324**, 430 (2000).
 8) F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, and Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12037 (2000).
 9) Y. Yoshioka, Y. Kitagawa, Y. Takano, K. Yamaguchi, T. Nakamura, and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8712 (1999).
 10) M. Misiaszek, C. Crean, A. Joffe, N. E. Geacintov, V. Shafirovich, *J. Biol. Chem.*, **279**, 32106 (2004).
 11) K. Kobayashi, R. Yamagami, and S. Tagawa, *J. Phys. Chem. B*, in press.
 12) K. Kobayashi and S. Tagawa *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10213 (2003).
 13) F. Shao, M. A. O'Neill, and J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17914 (2004).
 14) C. A. M. Seidel, A. Schulz, and M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.*, **100**, 5541 (1996).
 15) R. Huber, T. Fiebig, and H. A. Wagenknecht, *Chem. Commun.*, 1878 (2003).
 16) S. Steenken, S. J. P. Telo, H. M. Novais, and L. P. Candeias *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4701 (1992).

- 17) W. A. Bernhard, *J. Phys. Chem.*, **93**, 2187 (1989).
- 18) M. Yan, D. Becker, S. Summerfield, P. Renke, and M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem.*, **96**, 1983 (1992).
- 19) P. M. Cullius, P. Evans, and M. E. Malone, *Chem. Commun.*, 985 (1996).
- 20) E. Sagstuen, E. O. Hole, W. H. Nelson, and D. M. Close, *J. Phys. Chem.*, **96**, 8269 (1992).
- 21) A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovkii, Z. Cai, and M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 1128 (2000).
- 21) C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1763 (2002).
- 22) C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.*, **11**, 1871 (2005).
- 23) M. P. Scannel, G. Prakash, and D. E. Falvey, *J. Phys. Chem. A*, **101**, 4332 (1997).
- 24) T. Ito and S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11480 (2003).
- 25) B. Elias, F. Shao, and J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1152 (2008).
- 26) N. A. Richardson and S. S. Wesolowski, III, Schafer, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10163 (2002).
- 27) N. A. Richardson, S. S. Wesolowski, III, Schafer, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 848 (2003).