波長可変紫外ピコ秒レーザーによるDNA塩基の選択光反応の可能性の検討

Study of Selective Action on Nucleic Acid Components Induced by High-Power picosecond UV Laser Pulses

黒田裕介^{*}, 黒田寛人^{**}, 田中佑一, 金光義彦,
竹本忠良^{***}, 田辺一郎

Yusuke Kuroda^{*}, Hiroto Kuroda^{**}, Yuichi Tanaka,
Yoshihiko Kanemitsu, Tadayoshi Takemoto^{***}, Ichiro Tanabe

^{*}産業医科大学第一外科, ^{**}東京大学物性研究所, ^{***}山口大学第一内科

^{*}University of Occupational and Environmental Health
^{**}Tokyo university ^{***}Yamaguchi university

ABSTRACT

The term "Selective action" means that molecules or part of molecules of same type undergo considerable changes under laser irradiation. It is said that such changes can be caused by photoionization or photodissociation with subsequent chemical reactions. We measured the change of optical density on the components of nucleic acid using Nd-YAG (λ ; 266 nm, pulse duration; 15 ps, repetition; 0.5 Hz, peak power; 2 GW/cm²) as reported by Letohkov et.al. But, we could not detect the change of optical density induced by high-power picosecond ultraviolet laser pulses. The life time of excited singlet state might be shorter than that supposed by Letohkov et.al and the short life time leads the very low quantum yield product on Nd-YAG FHG irradiation.

1. はじめに

近年、レーザー技術の急速な進歩により、極短パルス波長可変、高強度の光源が容易に得られるようになった。これら高性能レーザーの出現により物質の選択光反応の可能性が提案されている。選択光反応とは、混合物中の特定の分子を選択的に励起し、その後におこる光イオン化や分子解離などの化学反応を利用して特定の分子のみを化学的に変化、分離させる方法である。この方法は U^{238} と U^{235} のレーザー同位体分離と同一の方

法でレーザー医学ではよく知られた方法であり、近年活発に議論されはじめた。DNA構成塩基であるAdenine(A), Guanine(G), Thymine(T), Cytosine(C)は紫外域に吸収スペクトルをもつが、その吸収スペクトルは各塩基でかなり重っており定常光励起による選択励起の可能性はない。しかし電子励起状態の寿命がピコ秒～サブナノ秒の時間領域で異なっている可能性がある。したがってA, G, T, Cを波長可変レーザーで励起し、ついでピコ秒単位の時間遅延を与えた第Ⅱのレー

ザー光により光イオン化離すれば、A,G,T,Cの選択的光反応が生じる可能性をLetohkovら¹⁾2),³⁾は示唆した。彼等はNd-YAG第4高調波(FHG)266nmを用いてA,G,T,Cの一部で分離を得たと報告しているが、その他の報告はなく実験の確認や解析は皆無である。さらに波長可変化、ピコ秒時間分解などによる光反応の動的挙動の解明や生成過程の解析までには至っていない。このように提案に比して実験、解析ともに進んでいないが、この方式は今後の研究を発展させれば原理的にはDNAの選択的反応切断、融合等をピコ秒紫外レーザー光で行える可能性をもっており、遺伝子工学や生体のレーザー制御にとって大きな意味をもつと考えられる。我々はこの考え方に基き、波長可変紫外ピコ秒レーザーを用いて実験事実の確認とその動的挙動の解明と反応制御を行う事を目的に実験を行った。

2. 実験装置および方法

実験Ⅰ：波長可変Nd-YAGレーザーの第4高調波(FHG,266nm, pulse巾15ps, repetition 0.5Hz, peak power, 2GW/cm²)を用いて容量0.8mlの石英cellにA,G,T,C水溶液(1×10⁻⁴mol/l)を0.5ml入れレーザー光で励起し(spot径0.25cm²)、励起前および励起後の吸収スペクトルを日立2波長自己分光器556型で測定しレーザー照射による吸収スペクトルの変化を検討した。照射時間は5', 10', 15', 30'とし照射後日立2波長自己分光器556型で吸収スペクトルを測定した。

実験Ⅱ：使用レーザー、石英cellおよび各塩基水溶液の条件は実験Ⅰと同様であるが、レーザー光励起と同時にMercury lamp 253.7nmをプローブ光として励起レーザー光路と交差するように照射し、プローブ光をMonochrometerで分光しPhoto Multiplierで電気信号に変換させX-Y recorderに記録し、Nd-YAG FHG照射による吸収強度の時間変化を測定した。(Fig.1)

Fig. 1. Block diagram of Laser system

3. 実験結果

Nd-YAG FHG (λ: 266 nm) 照射前、照射後に吸収スペクトルを測定する実験Ⅰでは、分光器プローブ光の石英 cell への照射角度などの測定条件の同一化が困難で、測定結果に誤差が大きく測定方法自体に問題を含んでいると考えられた。そのためNd-YAG照射光路に交差するようにプローブ光を入れ、石英 cell を移動さず事なくレーザー光照射による吸収強度の変化を同時に測定する実験Ⅱを行った。Nd-YAG FHG (λ: 266 nm) 照射による吸収強度の変化を60分間PMで電気信号に変換させ記録したが、プローブ光253.7nmではFHG照射前と60分照射後とで吸収強度の差はみられなかった。レーザー光のspot径が0.25cm²と大きいため励起強度が低くなりphoto decompositionが生じていない可能性を考えさらに励起強度をあげるためspot径を0.1cm²としばり同一条件でNd-YAG FHG (λ: 266 nm) 照射を施行したが、Mercury lamp 253.7nmのプローブ光の吸収強度にはFHG照射前と60分照射後とに差はみられなかった。(Fig. 2)

Fig. 2

Absorption change of Thymine on YAG FHG radiation

4. 考 案

Kryukov, Letohkov 達は高出力紫外レーザー照射により、DNAの構成塩基であるAdenine (A), Guanine(G), Thymine(T), Cytosine(C)に光イオン化分解を生じさせ、差吸収を求めAdenineとUracilの混合水溶液においても選択的に個々の塩基を励起しようとして、"Selective Action on Nucleic Acid Component"を提案しその方法として高出力紫外レーザーによるTwo-step Excitationを提唱した。彼等はTwo-step (or Multistep) excitationを行う事によりsinglet state S_1 を経て高準位のelectronic stateに励起出来るとし、そこで光イオン化分解が生じ非可逆性の変化が生じるとしている。(Fig.3)彼等はこのTwo-step excitationのパラメーターとしてelectronic levels structure, intensity of irradiation life time of intermediate electronic state, absorption cross-sections from the ground and excited intermediate state, quantum yield of chemical reactions from highly lying electronic statesをあげ、レーザーの条件として高出力紫外パルスレーザーが必要であるとし、Nd-YAG 266 nm, 1 GW/cm^2 以上の出力でTwo-step photoreactionが生ずるとしている。DNA塩基の選択的励起について考えてみると、常温で

Fig 3. The schema of stepwise excitation of the electronic state

の S_1 の励起状態の寿命は 10^{-12} 秒前後と非常に短いと推定されている。選択的励起に必要なレーザー励起光の強度評価をThymineについて行えば、下記の計算より

$$P \gtrsim \frac{h\nu}{\sigma T_1}$$

T_1 : S_1 の寿命 ($\sim 1 \text{ ps}$)

σ : 吸収断面積

$$\text{Thymine: } \sigma = 2.8 \times 10^{-17} \text{ cm}^2 \text{ (at } 2600 \text{ \AA)}$$

$$P \gtrsim 2.7 \times 10^9 \text{ W/cm}^2$$

レーザー光の励起強度が $2.7 \times 10^9 \text{ W/cm}^2$ 程度あれば十分に S_1 levelへ励起する事が可能と考えられる。又Two-step excitationにおける各levelのpopulation (Fig. 4)のrate equationは下記の如く表わされる。

$$dN_0/dt = -\sigma_1 I (N_0 - N_1) + N_1/\tau_1 + N_2/\tau_2 \text{ (式1)}$$

$$dN_1/dt = \sigma_1 I (N_0 - N_1) - N_1/\tau_1 - \sigma_2 I N_1 \text{ (式2)}$$

$$dN_2/dt = \sigma_2 I N_1 - N_2/\tau_2 - N_2/\tau_{\text{chem}} \text{ (式3)}$$

Fig 4

optical densityの変化($\Delta D/D$)は下記の如く表わされる。

$$\Delta D/D = -\varphi N_0 \frac{\sigma_1 \sigma_2 I}{1/\tau + (\sigma_1 + \sigma_2) I} \cdot E \text{ (式4)}$$

φ : 光化学反応の量子収率

$$\varphi = \left(\frac{1}{\tau_{\text{chem}}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\tau_{\text{chem}}} + \frac{1}{\tau_2} \right)^{-1}$$

E : 全 photon 入射量

(1), (2), (3), (4) 式より

① レーザー光の励起強度が弱く $S_0 \rightarrow S_1$ が飽和しない時の $\Delta D/D$ は

$$\Delta D/D = -\varphi \sigma_1 \sigma_2 I \tau_1 \cdot E$$

② レーザー光の励起強度が強く $N_0 \simeq N_1$ の時の $\Delta D/D$ は

$$\Delta D/D = -\frac{\varphi}{2} \frac{\sigma_1 \sigma_2}{\sigma_1 + \sigma_2} \cdot E$$

として与えられる。この反応にとり重要な事は第一励起状態 S_1 における励起寿命であり、吸収が重なっている場合でも S_1 level の寿命の長短により反応選択性が出てくる可能性がある。 S_1 level の励起寿命が短くても、 S_1 level の寿命より短いパルスで励起すれば Two-step excitation を行う事ができ、反応選択性は向上すると考えられる。現在までのところ、予想に反して Kryukov 達と同一の照射条件（波長、出力、レーザー光 spot 径）でも A, G, T, C に明確な選択的光化学反応を確認できていない。この事は Letohkov 達が考えているより S_1 level の寿命の短い事を示唆し、寿命が短い事により Two-step excitation における量子収率の低い事を意味していると考えられる。ただし、より強度の強い領域で反応が生じている可能性があり、 S_1 level の寿命より短いパルスレーザーでかつ 1 パルスあたりの励起強度の大きな高出力紫外パルスレーザーを使用するなど、照射条件、照射方法、差スペクトル測定法などに今後検討を加え理論的には実現可能と思われる選択的光励起を実験的に確認していく予定である。将来のレーザー医学、細胞レベルの医学のためには DNA 構成塩基である A, G, T, C の光物性的な差異について実験事実の蓄積と詳細な検討が必要と思われる。

5. 結 語

高出力紫外パルスレーザーを用いた DNA 構成塩基における選択光反応について実験および理論的検討を行った。現在までのところ明確な選択的光化学反応を確認出来ていないが、理論的には実現可能でかつ遺伝子工学や生体制御に重要な意義

をもつと思われ、今後さらに検討を加える必要があると考える。

Reference

- 1) Letohkov V. S. : Tunable Laser and Applications, eds. A. Mooradian, T. Jaeger and P. Stokseth (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976), p 122
- 2) Kryukov P. G. et. al : Multiquantum Photoreactions of Nucleic Acid Components in Aqueous Solution by Powerful Ultraviolet Picosecond Radiation, Chem. Phys. Lett. : 61 ; 375-379 ; 1979
- 3) Angelov D. A. et. al : Selective Action on Nucleic Acid Components by Picosecond Light Pulses, Appl. Phys. : 21 ; 391-395 ; 1980