ポリヌクレオチドの紫外電気二色性

(昭和40年6月15日受理)

白井 道雄†

デオキシリボ核酸(DNA)およびポリアデニン酸(poly A)の紫外電気二色性を 10000 V/cm の電界強度まで測定した。測定は単発ク形波パルスを用いて行なったので、二色性の生成過程の解析も同時に行なうことができた。DNA, poly A は約 700 V/cm の電界強度で、偏光紫外スペクトルの吸収強度が一定値に達する。すなわち配向は飽和するが、このときの分子軸に平行と垂直な遷移モーメントの比は、DNA, poly A に対してそれぞれ 0.63(260 mμ), 0.90(252 mμ)となった。また二色性の生成過程は単一の緩和時間で解析することができ、瞬間的に加えた電場により分子を配向させる場合は、分子の変形がほとんど起っていないことがわかった。この解析から各分子の回転拡散定数、長さ、電気的分極率の値が得られた。

1 緒言

高分子溶液の紫外流動二色性はすでに測定されて、分子の配向の平衡状態における紫外二色比が得られている^{1,2)}。しかし配向の程度が低いため、分子の光学的性質との関係を得ることが困難である。電場により配向させる場合は配向の飽和が得られこの困難は除かれる。さらに電場は瞬間的に加えたり除いたりできるため、二色性の生成、消滅過程も観測することができ、これから分子の形および光学的、電気的性質のより豊富な知見が得られる。またこの配向過程の解析から外力による分子の変形も知られる。

デオキシリボ核酸(DNA)については分子が配向した薄膜の状態では偏光紫外スペクトルが観測されているが³⁾、本研究では DNA, ポリアデニン酸(poly A)の溶液における配向状態での測定を行ない、同時に配向の機構の解析から分子の光学的、電気的定数を得た。

2 理論

分子を偏長楕円体で近似し、その長さ、短軸の長さをそれぞれ $2a, 2b$ とする。また高分子全体としての遷移モーメントを μ とし、その分子軸に平行および垂直の成分を μ_a, μ_b とする。 μ は高分子内の各吸収基の遷移モーメントの 1 次結合である。分子吸光係数 ϵ は μ^2 に比例するので、つぎのようにおく。

$$\epsilon = A\mu^2$$

A は振動数を因子として含む定数である。

分子の軸が y, z 軸となす角を θ, θ' とし、光は x 方向から入射し、電場 E が z 方向に加えられるものとする。 z 方向すなわち電場に平行および垂直な偏光に対する分子吸光係数を $\epsilon_{\parallel}, \epsilon_{\perp}$ とすれば

$$\epsilon_{\parallel} = A(\mu_a^2 \cos^2 \theta + \mu_b^2 \sin^2 \theta)$$

$$\epsilon_{\perp} = A(\mu_a^2 \cos^2 \theta' + \mu_b^2 \sin^2 \theta')$$

$E=0$ のときは $\epsilon_{\parallel} = \epsilon_{\perp} = \epsilon_0$ となり

$$\epsilon_0 = (A/3)(\mu_a^2 + 2\mu_b^2) \quad (1)$$

$\Delta\epsilon_{\parallel} = \epsilon_{\parallel} - \epsilon_0, \Delta\epsilon_{\perp} = \epsilon_{\perp} - \epsilon_0$ とおけば

$$\Delta\epsilon_{\parallel} = (2A/3)(\mu_a^2 - \mu_b^2)\Phi \quad (2)$$

$$\Delta\epsilon_{\perp} = -(A/3)(\mu_a^2 - \mu_b^2)\Phi \quad (3)$$

ただし

$$\Phi = \int_0^{\pi} [(3 \cos^2 \theta - 1)/2] f(\theta, t) \cdot 2\pi \sin \theta d\theta \quad (4)$$

$f(\theta, t)$ は規格化された配向の角度分布関数で角 θ と電場を加えるか、または除いてからの時間 t の関数である。 $\Delta\epsilon_{\perp}$ は $\Delta\epsilon_{\parallel}$ の $-1/2$ 倍になるだけであるから $\Delta\epsilon_{\parallel}$ に関する計算のみを行なう。

電場が十分強く、配向が飽和したときの $\Delta\epsilon_{\parallel}$ を $(\Delta\epsilon_{\parallel})_s$ とすれば⁴⁾、

$$(\Delta\epsilon_{\parallel})_s = (2A/3)(\mu_a^2 - \mu_b^2) \quad (5)$$

ポリヌクレオチドのような高分子電解質の場合、電場において分子を配向する力は分子表面のイオンの移動による誘起双極子に基づくが⁴⁾、このイオンの移動による電気的分極率の分子軸に平行、垂直の成分を α_a, α_b とすれば、電場による回転力 M は次のようになる。

$$M = -(\alpha_a - \alpha_b)E^2 \sin \theta \cos \theta$$

電場が強く回転ブラウン運動の影響が無視できる場合の Φ の値⁵⁾を用いれば(2)式から

$$\frac{\Delta\epsilon_{\parallel}}{(\Delta\epsilon_{\parallel})_s} = \frac{1}{1 - e^{-y}} \left(1 + \frac{1}{2}e^{-y} - \frac{3 \tan^{-1} \sqrt{e^y - 1}}{2\sqrt{e^y - 1}} \right) \quad (6)$$

$$y = [2(\alpha_a - \alpha_b)E^2 \theta] / kT$$

ただし θ は回転拡散定数である。また二色性の立ち上り曲線の最初の勾配は

$$\left[\frac{d(\Delta\epsilon_{\parallel})}{dt} \right]_{t=0} = \frac{2(\alpha_a - \alpha_b)\theta(\Delta\epsilon_{\parallel})_s E^2}{5kT} \quad (7)$$

二色性と遷移モーメントの関係は(1), (5)式から

$$\frac{(\Delta\epsilon_{\parallel})_s}{\epsilon_0} = 2 \frac{\mu_a^2 - \mu_b^2}{\mu_a^2 + 2\mu_b^2} \quad (8)$$

分子吸光係数に関する上記の諸式は、濃度をかけることによって光学密度 D についても成立する。

3 実験

3.1 試料

DNA は牛の胸腺の DNA で Sigma Chemical Co. 製, lot no. 348-0710 である。また poly A は Miles Chemical Co. 製, lot no. 13423, 沈降定数 11.30 のものである。DNA は pH 8 のトリス塩酸塩緩衝液に溶かし、poly A は pH 7 の酢酸ナトリウム緩衝液に溶かして、pH 5 に下げた。この状態では poly A はヘリックスになっている⁶⁾。

4) 白井, 日化 80, 18(1965)。

5) C. T. O'Konski, K. Yoshioka, W. H. Orttung, *J. Phys. Chem.* **63**, 1558 (1959)。

*1 分子は長軸が電場に平行になるように配向するものとする。

6) J. R. Fresco, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3928(1957)。

† Michio SHIRAI 東京大学教養学部化学教室, 東京都目黒区駒場

1) L. F. Cavalieri, B. H. Rosenberg, M. Rosoff, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5235(1956)。

2) A. Wada, *Biopolymers* **2**, 361(1964)。

3) A. Rich, M. Kasha, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 6197(1960)。

3.2 電気二色性の測定

電気二色性の測定装置を図1に示す。光学系はモノクロメーター(A)(伊藤超短波株式会社製)、カルサイト偏光子(B)、白金電極を挿入したセル(C)、光電子倍增管 PM 49 からなっている。光電子倍增管の出力は増幅器(E)により増幅され、シンクロスコープ(H)(岩崎通信機株式会社製、二現象シンクロスコープ DS-5153)に入る。高圧ク形波パルス発生装置(F)とノコギリ歯状波発生装置(G)はシンクロスコープの前面にとりつけたカメラのシャッターと同期しているので、ク形波パルスが加えられた際の偏光紫外線に対する透過光の変化が記録される。

図1 電気二色性測定装置

4 結 果

NaDNA 溶液の偏光面が加えた電場に平行な場合の測定結果を図2に示す。波長は $260\text{ m}\mu$ である。また、NaDNA の濃度は $2.0 \times 10^{-2}\text{ g/l}$ で、トリスの濃度は 10^{-3} mol/l である。実線は電場を加えたときの透過光の強度の変化で、シンクロスコープへの出力電圧で表わされ、点線は加えたパルス電圧で、極板間隔は 2 mm であるから電場の強さはこの値の5倍になる。この両曲線が同時に撮影される。配向が定常状態に達したのち、一度閃みを生ずるが、これに相当するものは電気後屈折の測定にも現われている⁷⁾。しかしその原因は明らかでない。二色性の消滅曲線は立ち上りにくらべてゆるやかであり、分子間相互作用の強いことを示している。poly A に対しても同様の形をした曲線が得られた。

図2 パルスと電気二色性シグナル

電場を加えないときの透過光の強さを I 、電場を加えたときのその変化を ΔI とすれば、相当する光学密度の変化 ΔD は $\Delta D = -\log[1 + (\Delta I/I)]$ になる。したがって偏光面が電場に平行あるいは垂直の $\Delta D_{\parallel}$, $\Delta D_{\perp}$ の時間変化曲線が、図2のような測定曲線から得られる。電場を加えないときの光学密度 D_0 ももちろん得られる。

$\Delta D_{\parallel}$ の定常値の加えた電場に対する変化を図3に示す。 $\Delta D_{\parallel}$ は電場 E の弱い範囲では E^2 に比例する。これは(2)式において E の小なるときは $\phi = (\alpha_a - \alpha_b)/15 kT \cdot E^2$ になる⁸⁾ことから明らかである。しかし E の大きくなるとともに $\Delta D_{\parallel}$ は飽和を示しはじめ 7000 V/cm 付近で飽和値に達する。このときの $(\Delta D_{\parallel})_s$ の値を表1にあげる。 E が大きいときの ϕ の値は $[(\alpha_a - \alpha_b)E^2]/(2 kT)$ の関数として計算されている⁹⁾ので、これを用いて図3を解析すれば $(\alpha_a - \alpha_b)$ の値が得られる。この計算結果も表1にあげてあり、分子が大きく、かつ細長い大きい値になる。

●: DNA ($2.0 \times 10^{-2}\text{ g/l}$, 10^{-3} mol/l トリス緩衝液, pH 8)
○: poly A ($1.7 \times 10^{-2}\text{ g/l}$, 10^{-3} mol/l 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 5)

図3 $\Delta D_{\parallel}$ の電場依存

図1から得られる $\Delta D_{\parallel}$ の時間変化曲線は(6)式によって解析される。その解析結果を図4に示す。図中の理論曲線は単一の θ のものである。 θ の値が分子全体の回転に相当するとすれば、これから Perrin の式⁸⁾を用いて分子の長さが計算できる。このとき短軸の長さ $2b$ を仮定しなければ長軸の長さ $2a$ が計算できないが、DNA, poly A のように $a \gg b$ の場合は a の計算値が b の仮定値によってあまり変わらない。 $b = 10\text{ \AA}$ と仮定したときの 2α の値が表1にあげてある。二色性の消滅曲線は長くすそを引き、単純な式では解析されない。図4から DNA に対して $[d(D_{\parallel})/dt]_{t=0} = 2.7 \times 10^3\text{ sec}^{-1}$ なる値が得られ、(7)式を用いて $(\Delta D_{\parallel})_s$ を計算すれば 2.0 となり、強電場における $\Delta D_{\parallel}$ の定常値である表1の $(\Delta D_{\parallel})_s$ の値と一致する。

$(\Delta D_{\parallel})_s$ の値を種々の波長において測定すれば表2にあげた値となる。これから(8)式を用いれば μ_a/μ_b の値が得られるが、これは分子内の遷移モーメントの方向を表す値で表2にあげてあ

8) A. Peterlin, H. A. Stuart, *Z. Physik* **112**, 129(1939).9) F. Perrin, *J. Phys. Radium* **5**, 497(1934).7) N. G. Stellwagen, M. Shirai, C. T. O'Konski, *Biophys. J.* 印刷中.

●: DNA, ○: poly A
濃度, D_0 は図3, 表1と同じ。

図4 二色性の立ち上り曲線の解析

表1 DNA, poly A の諸定数

	$(\Delta D_{ })_s$	D_0	$\alpha_a - \alpha_b$ (cc)	Θ (sec ⁻¹)	$2a$ (Å)
DNA	0.199	0.400	2.04×10^{-14}	33.2	9500
poly A	0.065	0.481	1.60×10^{-14}	66.1	7000

表2 $(D_{||})_s$, μ_a/μ_b の波長依存 (D_0 は表1と同じ)

波長 (mμ)	$(D_{ })_s$		μ_a/μ_b	
	DNA	poly A	DNA	poly A
240	0.119	0.046	0.64	0.90
250	0.182	—	0.63	—
252	—	0.065	—	0.90
260	0.199	0.066	0.63	0.88
270	0.170	0.049	0.62	0.87
280	0.114	0.024	0.61	0.85
290	0.048	—	0.61	—

る。DNA, poly A とともに μ_a/μ_b の値は各波長においてほぼ一定である。

偏光面が加えた電場に垂直の場合も測定を行なったが, これは $D_{\perp}$ が $D_{||}$ の $-1/2$ 倍になることを確かめて, 測定装置が正しく働いていることを知ったのみである。

5 考 察

低分子溶液に対して電気二色性の測定が Czekalla ら¹⁰⁾によって行なわれたが, この場合は配向の程度が小さいので分子の吸収スペクトルの偏光性を計算するのが困難である。高分子は配向の程度が大きいが, 流動二色性の測定におけるように²⁾配向の途中で変形する可能性がある。DNA のような分子は剛性をもたないので, このような問題の考察にも適する。DNA 分子は溶液においても Watson-Crick¹¹⁾ のヘリックスをなしている¹²⁾と考えられるが, 屈曲性をもっている¹³⁾。したがって配向分子の偏光スペクトルから得られるものは分子中の基の平均の方向であって, 屈

曲性に関する知識である。剛性の分子に対してはもちろん励起子帯の偏光性が知られる。

図1の二色性の立ち上りと消滅曲線はいちじるしく非対称であるが, これは強電場により配向させる場合は予想されることである。その消滅曲線は非常にゆるやかであって, これを解析するには多数の緩和時間を考えなければならない。しかし立ち上り曲線は図4に示されるように単一の緩和時間で解析される。そうしてその解析から得られる分子の長さは 9500 Å で, 明らかに分子全体の配向に相当する。このことは強電場により短時間に配向させる場合は分子内の部分的配向, すなわち分子の変形がほとんど起らないことを示している。しかし配向分子が回転ブラウン運動により無秩序の状態にもどるときには, 分子間の相互作用により緩和時間の分布が広がる。

DNA 分子の電場における配向は, リン酸の対イオンであるナトリウムイオンが分子表面を移動して生ずる誘起双極子によると考えられる。すなわちナトリウムイオンは DNA あるいは poly A 分子の表面を比較的自由に移動することができ¹⁴⁾, 電場が加わればポテンシャルの低い方へ動いていく。しかしこの移動にはナトリウムイオン間の静電斥力, 対イオンを失ったリン酸基からの静電引力, および拡散による復元力があるから, 電場を除くともとのような分布にもどる。この機構による分極率が表1にあげられているように 10^{-14} cc の程度になる。この大きい電気的分極率のために比較的弱い電場で配向の飽和に達する。

DNA の 260 mμ 付近の吸収帯は塩基の $\pi-\pi^*$ 遷移によるものであるから, その遷移モーメントは塩基の面内にある。Watson-Crick 模型では塩基の面は DNA 分子の長軸に垂直に配向しているから $\mu_a=0$ であって, (8)式から $-(\Delta D_{||})_s=D_0$ となる。また DNA 分子が完全に無秩序なコイルであると仮定すれば, 電場を加えて配向させても二色性は起らない。すなわち $(\Delta D_{||})_s=0$ であるから, (8)式から $\mu_a=\mu_b$ となる。すなわち μ_a/μ_b の値は DNA 分子が完全剛性のヘリックスであれば 0 となり, 完全に無秩序のとき 1 となるので, 屈曲性の程度を知る尺度となる。表2の DNA の 0.6 という値は少々屈曲したヘリックスの状態を表わす。poly A はより屈曲の程度が大きい。塩基の面が DNA 分子の長軸となす角の平均値を計算するには, 塩基面内での遷移モーメントの方向を知る必要があるが, これは知られていないので角の平均値は計算できない。配向の飽和における $(\Delta D_{||})_s$ の値は二色性の立ち上り曲線から得られる値とほぼ一致するので, 電場による分子の変形はほとんど起っていないことがわかる。

$n-\pi^*$ 遷移が 280~290 mμ 付近にあるものと予想され³⁾, これは塩基の面に垂直な遷移モーメントをもつ。表2に示された μ_a/μ_b の値は各波長でほぼ一定で, 上記のことは確かめられなかった。分子の屈曲性が大きいため, 完全配向においても弱い吸収帯の偏光性については結論が得られない。剛性の分子に対して本方法を適用すれば, 電子状態に関しても興味ある知見が得られると思われる。

(1965 年 4 月, 日本化学会第 18 年会講演)

10) J. Czekalla, G. Wick, Z. Elektrochem. **64**, 1221(1960); **65**, 727(1961).

11) J. D. Watson, F. H. C. Crick, Nature **171**, 737(1953).

12) V. Luzzati, F. Mason, J. Mol. Biology **3**, 185(1961).

13) D. O. Jordan, "The Chemistry of Nucleic Acids" Butterworth & Co. Ltd., Washington D. C. (1960)p. 193.

14) G. Zubay, P. Doty, Biochim. Biophys. Acta **28**, 47(1958).