N-ヘテロ芳香族の電子的性状 (第 57 報¹⁾) 抗腫瘍性色素 Nile Blue A と
デオキシリボ核酸 (DNA) との分子間相互作用

岡野定輔, 堀江 孝,^{2a)} 本橋 登^{2b)}
東北大学薬学部,^{2a)} 明治薬科大学^{2b)}

Electronic Properties of N-Heteroaromatics. LVII.¹⁾ Intermolecular Interaction
of the Anti-tumor Dye Nile Blue A and Deoxyribonucleic Acid (DNA)

TEISUKE OKANO, TAKASHI HORIE^{2a)} and NOBORU MOTOHASHI^{2b)}
Pharmaceutical Institute, Tohoku University^{2a)} and Meiji College of Pharmacy^{2b)}

(Received December 22, 1975)

Studies were made on the intermolecular interaction of the oxazine dye Nile Blue A and calf-thymus deoxyribonucleic acid (DNA). It was concluded from these experimental results that two modes of interaction, ionic binding of the basic dye and the phosphate group of DNA, which leads to metachromasis of the dye, and intercalation of the dye between adjacent base-pairs of the macromolecule, are taking part in the binding of Nile Blue A and DNA: (1) When this dye was mixed with DNA at pH 7.0, intensity of its characteristic absorption bands (α and β bands) decreased, and new absorption bands appeared in the vicinity of 550 nm (γ band) and 668 nm (δ band). (2) The γ -band was produced when the molar ratio of [Dye]/[DNA-P] was greater than 1, while the δ -band was produced when this molar ratio was smaller than 1. (3) Flow dichroism spectrum of the δ -band indicated that the Nile Blue A molecule was oriented perpendicularly to the longer axis of the double helix of DNA; dichroism was not observed with a mixture of this dye and heat-denatured DNA. (4) The γ absorption band was also produced by the mixed system of Nile Blue A and potassium poly(vinylsulfonate): no spectral change was observed with a monomeric vinyl sulfonate. (5) Mixed systems of Nile Blue A and a high concentration of purine nucleosides or mononucleotides exhibited a larger δ band than the systems in which corresponding pyrimidine derivatives were involved. (6) Larger spectral changes were produced by the interaction systems of Nile Blue A and purine homopolynucleotides than by the systems in which pyrimidine homopolynucleotides were involved. (7) Viscosity and melting temperature of DNA increased with increasing concentration of this dye added.

オキサジン色素の中には強い抗腫瘍性を示すものがあることが知られている。³⁾ 著者等は生物活性をもつ各種の化合物について、作用機構を解明する観点から、DNA などの生体高分子との分子間相互作用を検討してきたが、本報では抗腫瘍性オキサジン色素の代表的なものである Nile Blue A (9-diethylamino-5-imino-5H-benzo [a] phenoxazine, 以下 NBA と略す) とコウシ胸腺 DNA との分子間相互作用を検討した結果について報告する。吸収スペクトル法、流動二色法、および粘度法を用い、また DNA のほかに DNA の単位モノマー (ヌクレオサイド、ヌクレオタイド)、ホモポリヌクレオタイド、およびビニルスルホン酸塩 (ポリビニルスルホン酸カリウム (PVSK)、ビニルスルホン酸ナトリウム) と NBA との相互作用をあわせて検討した結果、NBA の DNA-P に対するモル比が 1 より小さいときは、NBA は DNA 分子の隣接する塩基対の間に intercalate したかたちで DNA と結合し、またこのモル比が 1 より大きくなると、NBA は DNA のリン酸基とのイオン結合によって、

1) 第 56 報: 奈良武志, 田中照夫, 岡野定輔, 薬剤学, 「投稿中」.

2) Location: a) Aobayama, Sendai; b) Yatocho, Tanashi, Tokyo.

3) J.F. Riley, *Cancer Res.*, **8**, 183 (1948); M.R. Lewis, P.P. Goland, H.A. Slaviter, *ibid.*, **9**, 736 (1949); M.L. Crossley, C.M. Hofmann, P.F. Dreisbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 584 (1952); R.F. D'yachkouskaya, I.I. Parkkomenko, L.S. Vasil'eva, N.I. Surkova, N.G. Shuppe, N.P. Konovalova, G.N. Bogdonov, N.M. Emanuel, *Farmakol. Toksikol.*, **32**, 84 (1969).

DNA の長鎖上に分子が配列したかたちで DNA と結合することを明らかにすることができた。

実 験 の 部

試薬 NBA 塩酸塩は E. Merck 社 (Darmstadt) の製品を用いた。DNA 標品は高重合のコウソウ胸腺 DNA (Na^+ 塩, Sigma Type I, Lot No. 73C-9500) を Sigma 社 (St. Louis) から購入した。本品の $\epsilon(P)$ は 6650 (259 nm) であった。Polyguanylate (Na^+ 塩, Poly G と略す), polyadenylate (K^+ 塩, Poly A), polycytidylate (K^+ 塩, Poly C), および polyuridylate (NH_4^+ 塩, Poly U) は Miles Laboratories (Elkhart) の製品を用いた。Deoxyguanosine 5'-phosphate (dGMP), deoxyadenosine 5'-phosphate (dAMP), deoxycytidine 5'-phosphate (dCMP), および deoxythymidine 5'-phosphate (dTTP) (以上いずれも Na^+ 塩) は Sigma 社の試薬を用いた。Deoxyguanosine (dG), deoxyadenosine (dA), deoxycytidine (dC) は Nutritional Biochemicals 社 (Cleveland) の試薬, deoxythymidine (dT) は興人社の試薬を用いた。PVSK (重合度 $\{n\}$ 1500) は半井化学薬品の特級試薬を, またビニルスルホン酸ナトリウムは東京化成の試薬を用いた。クエン酸ナトリウムおよび NaCl は試薬特級品を用いた。水は新鮮な再蒸留水を, またエタノールは 95 v/v % のものを蒸留して使用した。

溶液 緩衝液はクエン酸ナトリウム ($5.0 \times 10^{-4}\text{M}$)–NaCl ($7.0 \times 10^{-3}\text{M}$) 混液 (pH 7.0) を用いた。溶液のイオン強度 (μ) は NaCl を用いて調整した。DNA 溶液はまず 1.0 mg/ml 濃度のものをつくり, これを stock solution とし, 必要に応じて緩衝液で希釈した。DNA を変性するには, DNA 溶液を 30 分間沸とう水中におき, ついで室温にまで急冷した。すべての溶液はスペクトル測定以前は遮光した。

吸収スペクトルの測定 吸収スペクトルは室温 (約 20°) で日立 EPS-3T 型自記分光光度計によって記録した。とくに断わらない限り, 光路長 1 cm のセルを使用した。差スペクトルの場合は, サンプル側に NBA と DNA の混合液, レファレンス側にサンプル側と同温度, 同濃度の NBA 溶液をおいて測定した。

流動二色スペクトルの測定 島津 QV-50 型分光光度計に, 付属の流動二色装置を取り付けて, DNA を含む溶液を G (速度勾配) $= 3000 \text{ sec}^{-1}$ で流動させ, 偏光子で偏光された透過光を測定した。

粘性の測定 ウペローデ型粘度計 ($k=0.005$) を用い, $25^\circ \pm 0.01^\circ$ の恒温槽中で溶媒および溶液の粘性率を測定し, 比粘度 (η_{sp}) を求めた。

DNA の融解温度 (T_m) の測定 日立 EPS-3T 型自記分光光度計に, 付属の恒温セルホルダーを装着して, 260 nm で測定した。

結 果

NBA の吸収スペクトル

Fig. 1 に pH 7.0 における NBA の吸収スペクトルの濃度による変化を示す (NBA の pK_a は $9.7 (24^\circ)^{4)}$ で, 中性溶液中では図に示したようなカチオン型をとる)。図から明らかなとおり, NBA の濃度が増加すると, 640 nm 付近に吸収極大 (λ_{max}) をもつ吸収帯 (以下 α 吸収帯とよぶ) の強度は減少し, これに対応して 592 nm 付近の吸収帯 (β 吸収帯) の強度が増加した。

Fig. 2 (A), (B), および (C) に, NBA の吸収スペクトルの 640 nm (α 吸収帯の λ_{max}) および 592 nm (β 吸収帯の λ_{max}) での吸収強度の, 溶液のイオン強度 (μ), 温度 (T), およびエタノール濃度 ($[\text{EtOH}]$) による変化を示す。Fig. 2 (A) に明らかなとおり, 溶液のイオン強度の増加にともなって, α 吸収帯の強度は減少し, β 吸収帯の強度は増加した。Fig. 2 (B) に明らかなとおり, 溶液の温度が上昇するにしたがって, α 吸収帯の強度は増加し, β 吸収帯のそれは減少した。また Fig. 2 (C) に明らかなとおり, 溶液のエタノール濃度が増加するのにもなって, α 吸収帯は強度を増し, β 吸収帯は強度を減少した。

上記の実験 (Fig. 1 および Fig. 2) においては, いずれの場合もスペクトル曲線が 610 nm および 670 nm 付近に等吸収点を形成するのが見られた。ここに観察されたと同様のスペクトル変化は多くの塩基性色素において認められており,⁵⁾ 観察されたスペクトルの挙動から, α および β 吸収帯はそれぞれ NBA の単体および二量体の吸収に帰属することができる。

DNA による NBA の吸収スペクトルの変化

Fig. 3 に, NBA のモル濃度 ($[\text{NBA}]$) を一定 ($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$) とし, 共存する DNA のリンのモル濃度 ($[\text{DNA-P}]$) を変化したときの NBA の吸収スペクトルの変化を示す。図から明らかなとおり, 低濃度 ($[\text{DNA-P}] = 9.14 \times 10^{-6}\text{M}$) の DNA の添加によって, NBA の α および β 吸収帯はただちに強度を著明に減少し, 同時に β 帯よ

4) S. Woisławski, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5201 (1953).

5) E.I. Valko, *Colloid Chem.*, **6**, 594 (1946).

Fig. 1. Concentration Dependence of the Absorption Spectrum of NBA at pH 7.0

Concentration of NBA: curve 1, 2.0×10^{-6} M; curve 2, 2.0×10^{-5} M; curve 3, 2.0×10^{-4} M
Optical path of cells used: for curve 1, 100 mm; for curve 2, 10 mm; for curve 3, 1 mm

Fig. 3. Change of Absorption Spectrum of NBA in the Presence of Various Concentrations of DNA

Concentration of NBA was 2.0×10^{-5} M.

Curve	DNA-P] (10^{-5} M)
1	0
2	0.9
3	1.8
4	5.5
5	9.1
6	18.3
7	91.4

場合に比較してスペクトル変化は全般に小さかった (図省略).

Fig. 4 に, NBA-DNA 系の, NBA を対照とした差スペクトルを示す. 図の低濃度 ($[DNA-P] = 9.14 \times 10^{-6}$ M) および高濃度 ($[DNA-P] = 9.14 \times 10^{-4}$ M) の DNA の場合のスペクトル曲線から, γ および δ 吸収帯の吸収極大がそれぞれ 550 および 668 nm 付近にあることが明らかである. またこの図から, γ 帯の差スペクトルの吸収

Fig. 2. Plots of Absorbance of the α and β Bands of NBA against Ionic Strength (μ), Temperature (T), and Ethanol Concentration

Concentration of NBA was 2.0×10^{-5} M. Absorbance was determined at 640 and 592 nm for α and β bands, respectively.

Fig. 4. Difference Spectra of NBA-DNA vs. NBA Systems

Concentration of NBA was 2.0×10^{-5} M. Concentration of DNA-P (10^{-5} M): curve 1, 0.9; curve 2, 1.8; curve 3, 5.5; curve 4, 9.1; curve 5, 18.3; curve 6, 91.4. The inserted graph shows plot of ΔA values at 550 nm (for γ band) and 668 nm (for δ band) against logarithm of the molar ratio of NBA and DNA-P

り短波長部の吸収強度が増加し, この領域に新しい吸収帯 (以下 γ 吸収帯とよぶ) が出現するのが見られた. DNA の濃度が増加すると, 一度現われた γ 吸収帯は強度を減少し, これに対応して α 帯より長波長部の吸収強度が著明に増加し, この付近に新吸収帯 (δ 吸収帯) が出現するのが認められた. DNA を熱変性した場合は, 未変性 DNA の

Fig. 5. Effect of Temperature on the Difference Spectra of NBA-DNA vs. NBA Systems

temperature: curve 1, 20°; curve 2, 30°; curve 3, 40°; curve 4, 50°; curve 5, 60°; curve 6, 70°; curve 7, 80°; curve 8, 90°
 A: [NBA] = 2.0×10^{-5} M, [DNA-P] = 4.2×10^{-6} M
 B: [NBA] = 2.0×10^{-5} M, [DNA-P] = 4.2×10^{-4} M

Fig. 7. Change of Absorption Spectrum of NBA in the Presence of Various Concentrations of PVSK

Concentration of NBA was 2.0×10^{-5} M. concentration of PVSK (w/v%): curve 1, 0; curve 2, 0.0001; curve 3, 0.001; curve 4, 0.1; curve 5, 1.0

Fig. 6. Flow Dichroism and Absorption Spectra of Mixture of NBA and DNA

concentration: NBA, 5.0×10^{-4} M; DNA-P (for native or denatured DNA), 9.1×10^{-3} M

Fig. 8. Plots of Specific Viscosity (η_{sp}) and Melting Temperature (T_m) of DNA against Molar Ratio of Added NBA and DNA-P

Broken line shows plot for mixture of NBA and heat-denatured DNA. Arrows indicate η_{sp} and T_m of solution of native or denatured DNA. Concentration of DNA-P (for native and denatured DNA) was 9.1×10^{-3} M.

強度 (ΔA) が最大である DNA 濃度が α 帯のそれは最小, δ 帯の吸収強度が最大である DNA 濃度で β 帯のそれは最小であることが注目される。

Fig. 4 の挿入図に NBA と DNA-P のモル比の対数を横軸とした, 550 nm (γ 帯の λ_{max} の位置) および 668 nm (δ 帯の λ_{max} の位置) の ΔA 値 (縦軸) のプロットを示す。図から, ここに示した濃度条件の範囲で, $[NBA]/[DNA-P] < 1$ の条件下では δ 吸収帯が現われ, かつその強度はこの比が大きいほど小であること, および $[NBA]/$

[DNA-P]>1 のときは γ 吸収帯が現われ、その強度はこの比が大きいほど大であることが明らかである。

Fig. 5 (A) および (B) に、それぞれ室温で γ および δ 吸収帯が明瞭に現われる濃度条件下で温度変化をしたときの、NBA-DNA 系の NBA を対照とした差スペクトルを示す。図に明らかなとおり、 γ または δ 吸収帯のいずれに関しても、吸収帯の ΔA は温度の上昇とともに減少し、90° では γ または δ 吸収帯はほとんど消失した。DNA が實際上熱変性しない温度範囲 (20—50°) では、スペクトル曲線は 605 nm 付近に等吸収点を形成した (Fig. 5 (B))。これらの変化は可逆的で、高温 (90°) で一度消失した γ および δ 吸収帯は、液温を徐々に室温にまで下げるときは、いずれも再び現われた (ただし強度は加温以前より小)。これらの結果は、NBA と DNA との結合が弱い可逆的な結合であることを示す。

以上の実験結果から、NBA と DNA は成分モル比に応じて互いに移行する二様の結合様式で結合することが明らかである。以下これらの結合様式について解析する。

流動二色法による検討

吸収スペクトルに δ 吸収帯が明瞭に現われる濃度条件下での NBA-DNA 系の流動二色スペクトルを Fig. 6 に示す。図には同一濃度条件下での NBA-DNA 系の吸収スペクトルもあわせて示した。図に明らかなとおり、吸収スペクトルの δ 帯の吸収極大に一致する位置 (668 nm) に極大をもつ流動二色スペクトルが得られた。次式 (1) で表わされる ΔE は負の値となった。ただし、 $E_{//}$ は DNA の長軸に平行な NBA 分子の吸光度、 $E_{\perp}$ は DNA

$$\Delta E = E_{//} - E_{\perp} \quad (1)$$

の長軸と直角方向にある NBA 分子の吸光度である。DNA を熱変性したときは、二色スペクトルはほとんど認められなかった (Fig. 6, 破線)。これらの流動二色スペクトルの測定結果は、後に述べるように (「考察」の部参照)、NBA が DNA (未変性) の二重らせん構造中の塩基対の面に並行して配置されていることを指示している。

PVSK による NBA の吸収スペクトルの変化

Fig. 7 に、NBA の濃度を一定 ($2.0 \times 10^{-5} \text{M}$) とし、これに各種濃度の PVSK を加えたときの、混合系の吸収スペクトルを示す。図から明らかなとおり、低濃度 (0.0001%) の PVSK の存在によって、NBA の α および β 吸収帯は著明に吸収強度を減少し、これにともなって β 帯より短波長部の吸収強度が増加し、PVSK の濃度を高めると (0.001%), 550 nm 付近に λ_{max} をもつ γ 吸収帯が出現するのが観察された。PVSK の濃度をさらに高くすると、この領域の吸収強度は減少し、 β 吸収帯が再び現われるのが見られた。NBA に PVSK と同一のアニオン濃度のビニルスルホン酸ナトリウムを加えたときは、スペクトル変化は全く観測されなかった (図省略)。これらの事実は、前記 NBA-DNA 系の場合も含めて、 γ 吸収帯は NBA と鎖状ポリアニオン型高分子が結合するときに現われるものであることを示す。

流動二色スペクトルの測定、および PVSK を用いた上記の実験から、 γ および δ 吸収帯の性質がほぼ明らかとなったが、さらに下記の検討を行った。

NBA による DNA の粘性および融解温度の変化

吸収スペクトルに δ 吸収帯が明瞭に現われる濃度条件下で、DNA 濃度を一定とし NBA 濃度を変化したときの、溶液の比粘度 (η_{sp}) および DNA の T_m 値の変化をそれぞれ Fig. 8 (A) および (B) に示す。図に明らかなとおり、溶液の比粘度および T_m 値は、NBA の濃度増加とともに、いずれもほぼ直線的に増大した。また、Fig. 8 (A) に破線で示したように、変性 DNA を用いたときは、比粘度は NBA の濃度増加とともに減少した。

Fig. 9. Difference Spectra of NBA-Deoxyribonucleotide vs. NBA Systems

Concentration of NBA was $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$. Concentration of nucleotides: curve 1, $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$; curve 2, $5.0 \times 10^{-3} \text{M}$; curve 3, $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$

Fig. 10. Effect of Homopolynucleotides on the Absorption Spectrum of NBA

Concentration of NBA was 2.0×10^{-5} M. Concentration of homopolynucleotide-P: curve 1, 1.7×10^{-5} M; curve 2, 2.1×10^{-4} M; curve 3, 4.1×10^{-3} M. Broken lines show absorption spectrum of NBA (2.0×10^{-5} M).

モノマーレベルでは全く観測されなかったことが注目される。

Fig. 10 (A, B, C, D) に、NBA の濃度を一定とし、各種濃度のホモポリヌクレオチド (Poly G, Poly A, Poly C, Poly U) を加えたときの吸収スペクトルを示す。図に明らかなとおり、NBA-Poly G 系のスペクトル変化は NBA-DNA 系のそれに類似して、ポリマー (ポリヌクレオチド) に対する色素のモル比が小さいときは δ 吸収帯が、またこのモル比が大きくなると γ 吸収帯が出現するのが観察された。NBA-Poly A 系においては、ポリマーの濃度が高いときに δ 吸収帯が出現したが、ポリマーが低濃度の場合にも γ 吸収帯はほとんど認められなかった。NBA-Poly C 系および NBA-Poly U 系においては、ポリマーが低濃度のとき γ 吸収帯が現われたが、ポリマーが高濃度の場合にも δ 吸収帯は認められなかった。

考 察

上記においては、まず NBA-DNA 系の吸収スペクトルの観察から、両分子間に二様の結合様式による相互作用が生起することが明らかとなったので、その後の検討で種々の手段を用いて NBA と DNA の分子間相互作用のあり方を解析した。

NBA と DNA の結合の仕方に二様のものがあることは、相互作用系が短波長および長波長領域に 2 種の吸収帯 (γ および δ 吸収帯) を出現したことによって指示された。これらの吸収帯は、NBA と DNA の濃度比に応じて互に移行する性質のもので、 $[NBA]/[DNA-P] > 1$ の濃度条件は γ 吸収帯の出現に、また $[NBA]/[DNA-P] < 1$ の条件は δ 吸収帯の出現に有利であることも明らかとなった。

まず γ 吸収帯に関しては、DNA と同様に鎖状高分子電解質である PVSK をモデルとした実験によって、NBA-PVSK 系が NBA-DNA 系における同様に、 γ 吸収帯を与えることが明らかとなった。PVSK の単位モノマー (アニオン) であるビニルスルホン酸ナトリウムと NBA との混合系、および DNA の単位モノマーであるヌクレオチドまたはモノヌクレオチドと NBA との混合系においては、 γ 吸収帯は全く認められなかった。これらの事実は、 γ 吸収帯の出現が NBA と高分子との相互作用に特有のものであることを指示する。オキサジン系の塩基性色素の色调が、鎖状高分子電解質との相互作用によって変化することはいわゆるメタクロマジーとして知られていることで、NBA-PVSK 系および NBA-DNA 系において見られた α および β 吸収帯の γ 吸収帯への移行はいずれも高分子による NBA のメタクロマジーと見られる (高濃度の PVSK の存在で γ 吸収帯が β 吸収帯に移行したのは、同様の条件下の色素-高分子系にしばしば見られる、いわゆるメタクロマジーの逆行である)。すなわち、NBA-DNA 系の γ 吸収帯は、DNA のリン酸基とのイオン結合によって DNA 鎖上

モノおよびポリヌクレオチドによる検討

Fig. 9 (A, B, C, D) に、NBA と 4 種のデオキシリボヌクレオチド (dGMP, dAMP, dCMP, dTMP) の各々との混合系の、NBA を対照とした差スペクトルを示す。図に明らかなとおり、NBA-dGMP 系および NBA-dAMP 系においては、ヌクレオチド濃度がかかなり高い場合に、 δ 吸収帯が出現し、その強度はヌクレオチドの濃度減少とともに減少した。NBA-dCMP 系および NBA-dTMP 系においても高濃度のヌクレオチドの存在によって、 δ 吸収帯が現われたが、その強度はプリンヌクレオチドが関与した場合に比較して著しく小さかった。

デオキシリボヌクレオチド (dG, dA, dT, dC) と NBA との相互作用系は、それぞれ対応するモノヌクレオチドと NBA との相互作用系とほとんど同様のスペクトル変化を与えた。ポリマーレベル (下記) では観測される γ 吸収帯が、

に規則的に配列し、多分子会合をした NBA の電子遷移に由来するものと考えられる。

NBA-DNA 系において高分子の濃度を高くするときは、NBA-PVSK 系の場合と異なり、メタクロマジーの逆行は見られず、 γ 吸収帯が強度を減少するとともに、長波長部に新しい吸収帯が現われた。この新吸収帯 (δ 吸収帯) の出現機構は下記のように解析される。

DNA 溶液を高速で流動させるときは、この鎖状高分子を一定方向に配向させることができ、DNA に結合する化合物を加えて溶液に単色光を入射させ、透過光を偏光子によって偏光して化合物の吸光度を測定するときは、DNA に対する化合物の配向の仕方に応じて、吸光度に差を生ずることになる。⁶⁾ NBA-DNA 系について、 δ 吸収帯の流動二色スペクトルを測定した結果は、DNA の長軸に直角方向に振動する光の吸光度 ($E_{\perp}$) の方が長軸方向に振動する光の吸光度 ($E_{\parallel}$) より大きく、その差 (ΔE) は負の値となった。したがってこの濃度条件では、NBA 分子は DNA の長軸と直角方向、すなわち DNA の塩基面に平行に配向して結合しているものと考えられる。DNA が変性すると、溶液の二色性がほとんど消失したことは、DNA の二重ラセン構造が正常に保持されていることが、実験条件での NBA と DNA との相互作用に有利であることを示す。

吸収スペクトルに δ 吸収帯が現われる濃度条件で、NBA-DNA 系の比粘度変化を観測した結果は、NBA の存在によって DNA の粘性が増加することが明らかとなった。この事実は、Lerman⁷⁾ がアクリジン系色素と DNA との相互作用系において認めていると同様に、色素が DNA の塩基対の間に intercalate したために塩基対間の間隔が広がり、DNA の二重ラセンの骨格が長軸方向に伸長した結果と考えられ、上記の流動二色スペクトルの実験結果とともに、実験条件において NBA が DNA の相隣る塩基対の間に intercalate されたことを強く指示する (色素の存在で変性 DNA の粘性が低下することは、アクリジンオレンジの場合も同様で、変性 DNA の場合は色素は intercalate せず、DNA のリン酸基の荷電を中和する結果、DNA が軸方向に短縮すると考えられている。⁸⁾

粘性測定と同一の濃度条件で、NBA の存在によって DNA の T_m 値が増大することが観察されたが、平面的な分子が DNA の塩基対結合間に intercalate するとき T_m 値が上昇することは、各種の化合物について認められており、⁹⁾ 小分子の intercalation の結果、DNA が二本鎖の解離に対して安定化したためと考えられる。

DNA の単位モノマー (核酸構成塩基、ヌクレオサイド、モノヌクレオタイド) は高濃度において、塩基部分が疎水結合によって stack して会合体をつくることが知られている。¹⁰⁾ またこのような会合体の塩基と塩基の間に色素 (アクリジンオレンジ) が入り込んだかたちで結合することも報告されている。¹¹⁾ 現在の研究においても、高濃度のヌクレオタイドまたはヌクレオサイドと NBA との混合溶液において、 δ 吸収帯が出現するのが認められた。この事実は、 δ 吸収帯が、塩基と塩基の間にはさまれて振動を受けた NBA の電子遷移に由来することを指示するもので、上記の intercalation モデルはこの実験結果によっても支持される。なお、 δ 吸収帯の強度が、NBA-プリン系における場合の方が NBA-ピリミジン系における場合より大きかったことは、色素と塩基との疎水結合に、プリン塩基の方がピリミジン塩基より有利であることを示す。

ホモポリヌクレオタイドの高次構造の詳細は現在十分には知られていないが、Poly A, Poly C, および恐らく Poly G も室温、中性溶液中で塩基が相互に stack した構造をとるものと考えられている。¹²⁾ 使用したポリヌクレオタイドのうち、Poly G は NBA の吸収スペクトルに対して DNA ときわめて類似した挙動を示し、NBA-Poly G 系においては γ および δ 吸収帯の出現が明瞭に観察され、両吸収帯の消長と成分モル比の関係も NBA-DNA 系の場合に類似していた。NBA-Poly A 系では δ 吸収帯は明瞭に観察されたが、 γ 吸収帯はほとんど認

6) C. Nagata, M. Kodama, Y. Tagashira, A. Imamura, *Biopolymers*, **4**, 409 (1966); L.S. Lerman, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **49**, 94 (1963).

7) L.S. Lerman, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64**, Suppl., 1 (1964).

8) D.S. Drummond, N.J. Pritchard, V.F.M. Simpson-Gildemeister, A.R. Peacocke, *Biopolymers*, **4**, 971 (1966).

9) N.F. Gersch, D.O. Jordan, *J. Med. Biol.*, **13**, 138 (1965).

10) P.O.P. Ts'o, I.S. Melvin, A.C. Olson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1289 (1963); P.O.P. Ts'o, S.I. Chan, *ibid.*, **86**, 4176 (1964); S.I. Chan, M.P. Schweizer, P.O.P. Ts'o, G.K. Helmkamp, *ibid.*, **86**, 4182 (1964).

11) S. Yamabe, *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 148 (1969).

12) V.A. Bloomfield, D.M. Crothers, I. Tinoco, Jr., "Physical Chemistry of Nucleic Acids," Harper & Row, New York, Evanston, San Francisco and London, 1974, pp. 95-102.

められなかった。この原因は明らかでないが、Poly A の高次構造の関係で、NBA の規則的な配列ができなかったためと考えられる。ピリミジンを構成塩基とする ホモポリヌクレオチド (Poly C, Poly U) と NBA の混合系においては、 γ 吸収帯は認められたが、 δ 吸収帯はほとんど認められなかった。 δ 吸収帯の出現についての、プリンポリヌクレオチドとピリミジンポリヌクレオチドの間のこのような効果の差異は、前記モノマーレベルでも見られたように、プリン塩基の方がピリミジン塩基より NBA と会合体をつくりやすいことによると考えられる。

結 語

抗腫瘍色素である NBA と DNA の間には、両者の成分モル比に応じて互いに移行する二様の様式の結合（メタクロマジーにつながるイオン結合と塩基対間への intercalation）が生起することが明らかとなった。これらの結合様式はいずれも DNA の一次および二次構造と密接に関連しており、特異性の高い結合といえるであろう。NBA が DNA とこのようなかたちで結合する事実は、NBA の生物作用機構を解明してゆく上で無視し得ないと考えられる。

謝辞 本研究は一部、1975 年度文部省ガン特別研究費によった。本研究に協力された田中美雪、柿崎禎子の両氏に深謝する。