

九州大学中央分析センター

31

センター  
ニュース

平成 2 年 12 月

目 次

|  |    |
|--|----|
| 分析機器解説シリーズ(31) . . . . .                       | 1  |
| 円偏光二色性   |    |
| トピックス . . . . .                                | 9  |
| メチジウム - スペルミン - セファロースを利用した<br>生体試料からのDNAの迅速分離 |    |
| 中央分析センター工学分室防災心得 . . . . .                     | 12 |
| お 知 ら せ . . . . .                              | 15 |

1. 円旋光二色性とは

旋光性とは、直線偏光の偏光面を回転する性質のことである。直線偏光は左右の円偏光の重なったものと考えることができる。ある媒質中で、左右円偏光の波長  $\lambda_L$  と  $\lambda_R$  の大きさが異なり、位相差  $\delta$  を生じた場合、電場ベクトルの合成はもとの偏光に対して  $\delta/2$  だけ回転する(図1)。

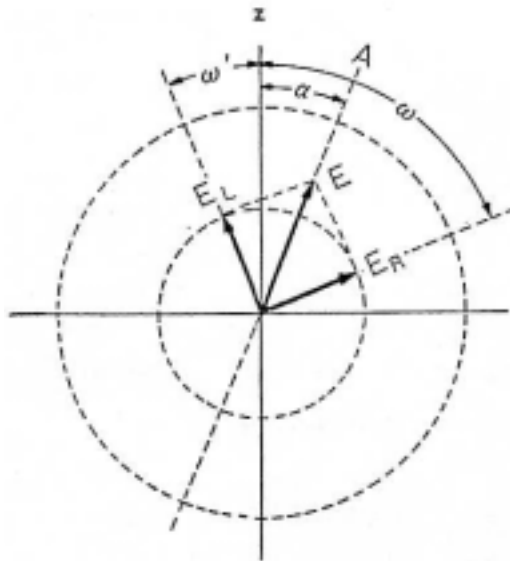


図1. 平面偏光波の回転

$\delta/2$  は、観測される回転角  $\alpha$  に等しい。

$$\alpha = \delta/2 \dots\dots(1)$$

又、長さ  $l$  のセルの中を進む間に生じる位相差は、(2)式で与えられる。

$$\delta = 2\pi l(1/\lambda_L - 1/\lambda_R) \dots\dots(2)$$

$$\left. \begin{aligned} \lambda_L &= \lambda/n_L \\ \lambda_R &= \lambda/n_R \end{aligned} \right\} \dots\dots(3)$$

左右の円偏光に対する屈折率を  $n_L$ 、 $n_R$  とし、真空中の光の波長を  $\lambda$  とすると、(3)式が成立する。従って、(1)、(2)、(3)式より次式が導かれる。

$$= 1/ \cdot (n_L - n_R) \cdots \cdots (4)$$

即ち、左右の円偏光に対する屈折率  $n_L$  と  $n_R$  が異なる時、旋光性が現れることになる。

一方、左右の円偏光に対する屈折率  $n_L$  と  $n_R$  が異なるのは、左右の円偏光に対する吸光係数  $L$  と  $R$  が異なるためであり、 $L$  と  $R$  の異なる現象を円偏光二色性(Circular Dichroism、以下 CD と略)という。旋光性と円偏光二色性は必ず同時にあらわれる現象であり、これをコットン効果という。コットン効果を示す吸収帯を光学活性な吸収帯と呼ぶ。

## 2. 装置の概要

CD は左右の円偏光に対する吸光係数の差であるから、左右の円偏光を交互にだす装置が必要である。円偏光を出すには 1/4 波長板を用いる。日本分光の CD スペクトル測定装置 (J500) の概略を図 2 に示した。この装置では平面偏光波を左右の円偏光に分解するのに、電氣的複屈折効果 (ポッケル効果) を利用したポッケルセルが使用されている。ポッケル効果とは、非等方性結晶からなる平行板に適当な大きさの電圧を垂直に分けると、その結晶の光学的性質が変化することである。ポッケルセルは、結晶(リン酸二水素アンモニウムやリン酸二水素カリウムが用いられる)の Z 軸に垂直な面で切断した Z・カットプレートと 2 枚の熔融石英板でグリセリンを介してサンドイッチ状にはさんだものである。このセルの Z 軸方向に適当な電圧をかけると、1/4 波長板として働く。平面偏光を Z 軸の方向に通過させ電圧の符号を逆転させると、左右の円偏光が得られる。加える電圧は波長によって決まっているので、適当な電圧を選ぶことにより、全波長にわたって左右の円偏光が得られることになる。交流電源によってポッケルセルに電圧を加えて左右の円偏光を作り、サンプルセルを通過した円偏光による電流を同期整流することによって、左右の円偏光に対する吸光係数に比例した値を求めることができる。

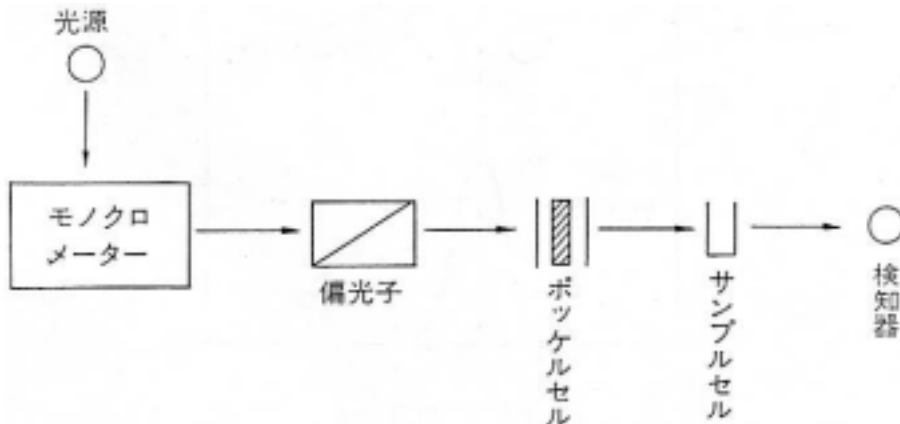


図 2 . 円偏光二色性スペクトル装置の原理図

### 3. 円偏光二色性スペクトル

吸収スペクトルと同じ波長領域で用いられる CD スペクトルは、光学活性物の立体化学、特に絶対構造及び立体配座について重要な情報を与えるものとして注目され、発展してきた。

図3は、光学活性吸収帯における CD スペクトルと吸収スペクトルとの関係を示したものである。分子が回転し、ランダムに配向し、双極子 - 双極子相互作用に起因するような影響が無視できる場合、(a)のようなコットン効果を示す。一方、発色団 - 発色団相互作用が大きな役割を果たしているような系においては、(b)のような分裂型コットン効果を示す。これは以下のように考え

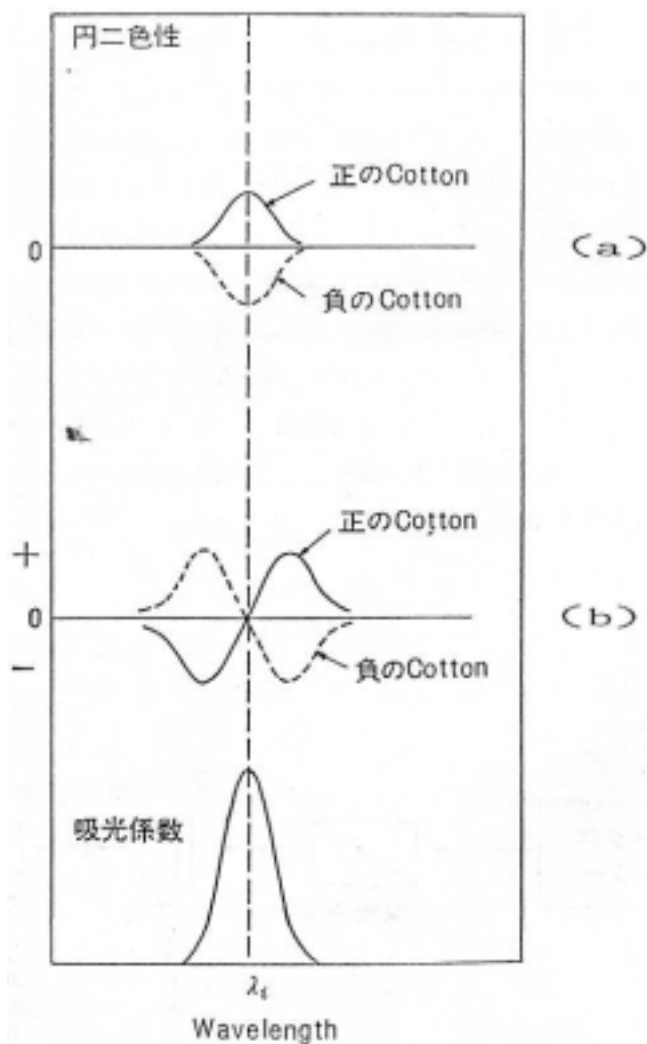


図3. 光学活性吸収帯におけるコットン効果

ると理解しやすい。即ち、2個の等価な発色団(i と j)がシグマ結合によってある方向に結合している分子を考える。まず、2個の発色団は光エネルギーを吸収し励起状態へ遷移する。この場合、発色団 i が励起した状態の確率は発色団 j が励起した状態の確率に全く等しい。更に、2個の発色団 i と j の励起状態は、非局在化することにより系全体の励起状態を形成する。この非局在化する励起状態を“励起子”と呼び、励起子の非局在化を“助起子相互作用”という。この励起子相互作用の概念は、イオン性あるいは分子性結晶の電子スペクトルの分野において導入され、1940年代の終わりになって Davydov によって分子励起子論として拡張された<sup>1)</sup>。

次に分子励起子論から分裂型コットン効果を説明する。等価な2個の発色団 i と j からなる二発色団系において、各発色団の波動関数は(5)と(6)式によって表現できる。ただし、各発色団は、励起 0 a を行い、i と j の発色団間に軌道の重なりはないものと仮定する。

$$\text{基底状態： } i_0 \quad j_0 \cdots \cdots \cdots (5)$$

$$\text{励起状態： } i_a \quad j_a \cdots \cdots \cdots (6)$$

次に  $H_i$  と  $H_j$  を各グループ i と j の独自のハミルトニアン演算子とし、 $H_{ij}$  が二つのグループ i と j 間の相互作用エネルギー項とした場合、系全体のハミルトニアン演算子は次式で示される。

$$H = H_i + H_j + H_{ij} \cdots \cdots \cdots (7)$$

このハミルトニアン演算子を波動関数  $\psi$  と作用させ配置空間で積分すると、基底状態における系全体のエネルギー  $E$  が得られる。

$$E = \int \psi^* H \psi \, d\tau \cdots \cdots \cdots (8)$$

(8)式より次の固有値と固有関数が得られる(誘導過程は省略、詳細は文献2)を参考)。

$$\text{状態： } E = E_a - V_{ij} \quad a = 1/\sqrt{2} \cdot (i_a \quad j_0 - i_0 \quad j_a) \cdots \cdots (9)$$

$$\text{状態： } E = E_a + V_{ij} \quad a = 1/\sqrt{2} \cdot (i_a \quad j_0 + i_0 \quad j_a) \cdots \cdots (10)$$

(9)及び(10)式は、分子励起子の基本的概念である。即ち、二発色団系の一重励起状態が、 $\psi_+$  と  $\psi_-$  の二つのエネルギー準位に分裂する。これが励起子相互作用である<sup>2)</sup>。二つの分裂したエネルギー準位( $\psi_+$  と  $\psi_-$ )への励起は、互いに符号の相反する二つの極値をもつ CD 曲線を与える。 $\psi_+$  と  $\psi_-$  状態にエネルギー差  $2V_{ij}$  があることを Davydov 分裂という。また、 $V_{ij}$  は二つの発色団間の相互作用エネルギーである(図4)。

実測の CD スペクトルでは、第一コットン効果が第二コットン効果よりも強く鋭いという不均衡がしばしば生じる(図5)。この現象は、二つの励起状態( $\psi_+$  と  $\psi_-$ )の旋光強度の絶対値が等しいとして、コットン効果の曲線に左右対称なガウス分布を当てはめる限り説明はできない。そこで以下のように解釈する。一般に励起子相互作用に基づく分裂型コットン効果の磁気遷移モーメントは、二つの電気遷移モーメント(いわゆる吸収スペクトル)の相互作用に基づいている。実際、吸収スペクトルの波長依存は非対称の形をとる。これは、電子励起におけるフランク・コンドン

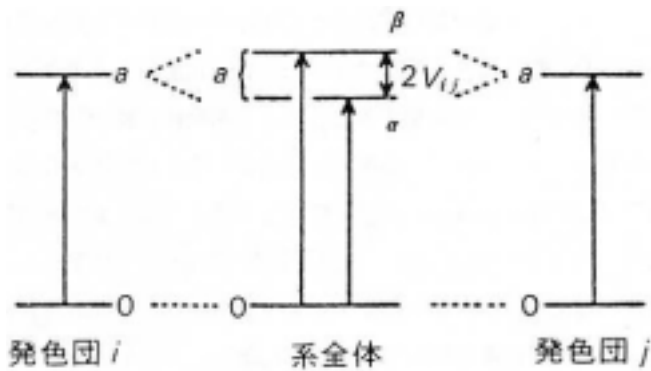


図4. 2個の発色団 i と j 間の励起子相互作用によって励起状態は二つのエネルギー準位 (  $\alpha$  と  $\beta$  ) に分裂する。

の効果によるものである。即ち、長波長側は傾斜が急で、短波長側はなだらかである。したがって Davydov 分裂による符号の異なる二つの曲線を加算すると長波長側は鋭いコットン効果、短波長側は幅広く弱いコットン効果が得られる ( 図5 )。

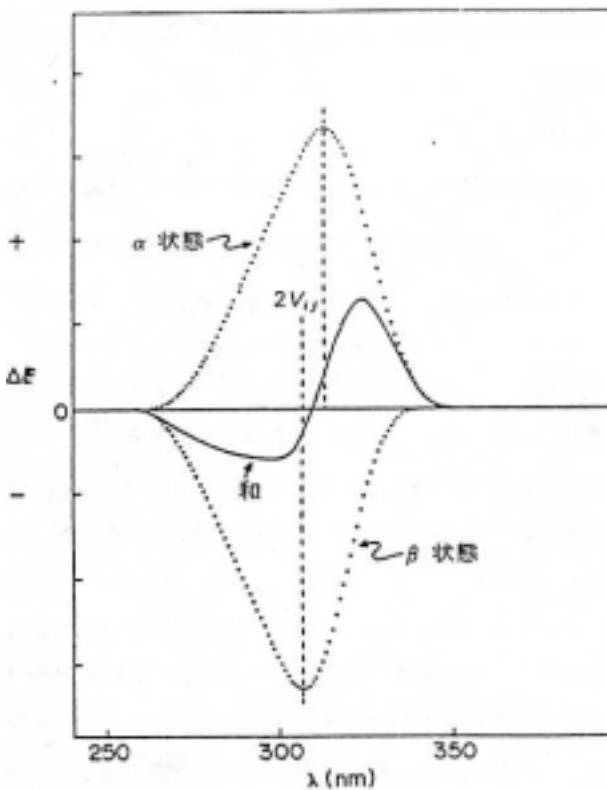


図5. 非対称な形の成分 CD 曲線 ( 点線 ) を加算すると非対称な二つの極値をもつ曲線 ( 実線 ) が得られる。

#### 4. 測定例と応用

CD スペクトルは、不斉化合物であることの確認、更にその三次元構造、すなわち、立体構造を研究するのに非常に有効である。

不斉要素としては、点、軸、面不斉の他に、化合物の特殊な高次構造に由来するものがあげられる。ここに二例を示す。

##### 1) 光学活性三置換カリックス[4]アレーン

カリックス[4]アレーンは、p-置換フェノールとホルムアルデヒドとの縮合により合成される環状テトラマーである。この化合物の水酸基に4種(少なくとも3種)の異なった置換基を導入すると図6に示したように一对の鏡像体になると思われる。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの温度変測定から、カリックス[4]アレーンはC<sub>4</sub>対称性をもち、室温付近で“Cone”構造の分子内反転が容易に起こることが明らかとなっている。従って、光学活性体としての分離には、この“Cone”構造間の動的変化を止めるための化学修飾を行わなければならない。

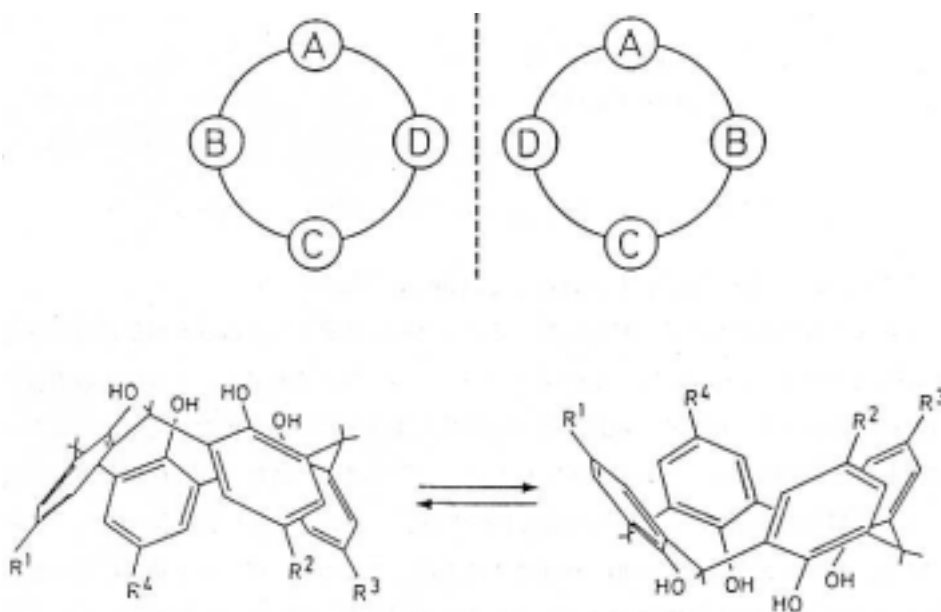


図6. 非対称置換カリックス〔4〕アレーン及び立体配座変換

著者らは、試行錯誤の結果、R<sup>1</sup>に2-ピリジルメチル基、R<sup>2</sup>にn-プロピル基を導入する際、“Cone”構造のカリックス[4]アレーン<sub>1</sub>を立体特異的に合成することに成功した。HPLCによる光学分割を行いCDスペクトルを測定したところ、両対掌体は254nm及び286nmに励起極大を示す分裂型のコットン効果を示した(図7)。<sup>3)</sup>これは、がJックスアレーンの空孔並びに

その周辺領域が不斉空間として作用することを示唆する。

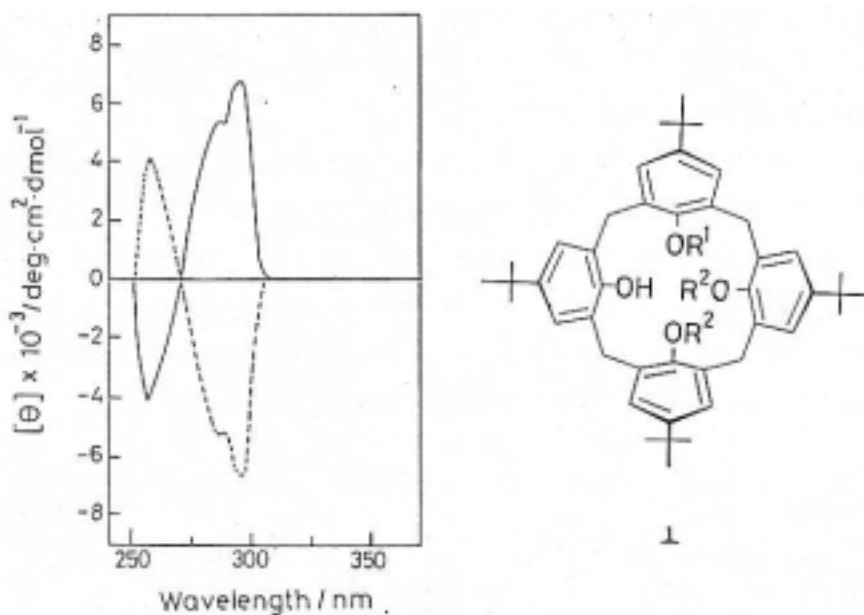
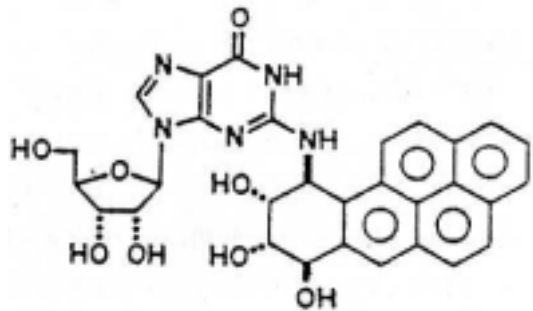
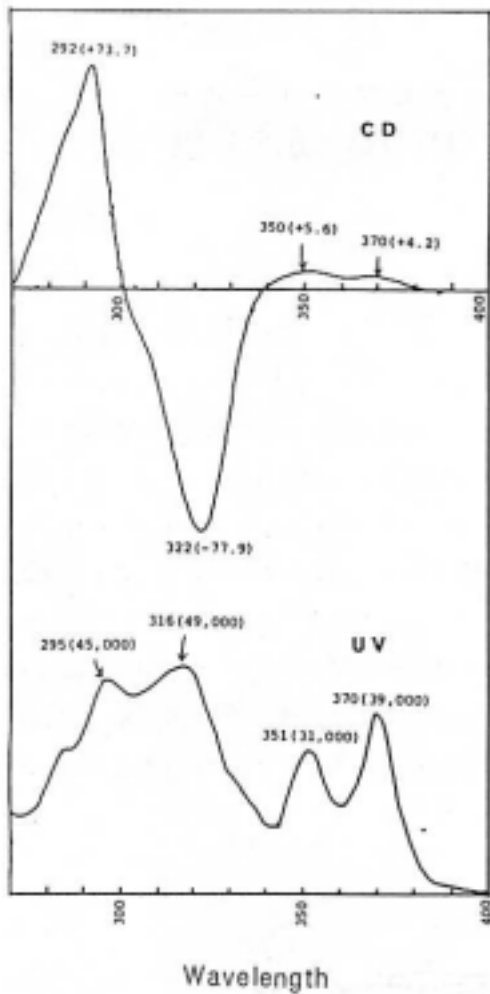


図7. (+)、(-) 1のCDスペクトル、25℃、ヘキサン

## 2) グアノシン - ベンゾ[a]ピレン付加体 2 の pKa の決定<sup>4)</sup>

発がん性芳香族炭化水素 - 核酸付加体の結合部位を決定するには核酸塩基部分の pKa 値の決定が必要である。pKa 値は、一般に吸収スペクトルで求められるが、化合物 2 の場合、ピレン発色団の吸収が非常に強く、核酸塩基の吸収帯と重なるため、正確な値を求められない。これに対し、2 の CD スペクトルはピレンとグアニン発色団間の励起子相互作用により分裂型のコットン効果を示す(図8)。この分裂型 CD 特性は、ピレン発色団の吸収極大波長にその極値を示すが、グアニン発色団との相互作用によるものであるから、グアニン基の電荷の変化を反映する。250nm における CD スペクトルの変化を pH に対してプロットすることにより、二つの解離定数 pKa = 2.1 及び 9.1 (10% aq MeOH 中)を得た。





2

図8. グアノシン - ベンゾ[a]ピレン付加体2のCD及びUVスペクトル(50% aq MeOH)

## 文献

- 1) A. S. Davydov, Zh. Eksp. Teor., 18, 210 (1948)
- 2) A. S. Davydov, "Theory of Molecular Excitons", M. Kasha, M. Oppenheimer Jr. 訳  
McGraw-Hill, New York (1962)
- 3) K. Iwamoto, A. Yanagi, T. Arjamura, T. Matsuda, S. Shinkai, Chem. Lett., 1990, 1901.
- 4) K. Nakanishi, H. Kasai, H. Cho, R. G. Harvey, A. M. Jeffery, K. W. Jennette, I. B. Weinstein,  
J. Am. Chem. Soc., 99, 258 (1977).

## トピックス

### メチジウム - スペルミン - セファロースを 利用した生体試料からのDNAの迅速分離

工学部 竹 中 繁 織

現在遺伝子操作を行っている研究室では、DNAの検出にエチジウムブロミドが用いられている。これは、エチジウムブロミドがDNAにインターカレーションによって強く結合すると同時にその蛍光強度が適当な条件下50 - 100倍増強するからである<sup>1)</sup>。インターカレーションとは、平面的な芳香族分子がDNAの隣接塩基対間に平行挿入する現象である(図1)。これはエチジウムブロミド以外にも種々の薬物、発ガン性物質、変異原性物質、色素などにも知られており、インターカレーションによりDNAと相互作用する化合物をインターカレータと呼んでいる<sup>3)</sup>。インターカレータの中には、DNAとの相互作用において塩基配列選択性を示すものも知られている。これらのことからインターカレータをアフィニティークロマトグラフィー用リガンドとしてDNAの分離に利用することが期待され、我々のグループも含めこれまでいくつかの研究グループにより活発に研究されている<sup>4)</sup>。例えば、アクリジンイエローをリガンドとしたカラムを用いて閉環状DNAを直鎖状DNAと開環状DNAとの混合物から分離精製する手法は一般的な生物化学実験の手引書にも取り上げられるようになった。

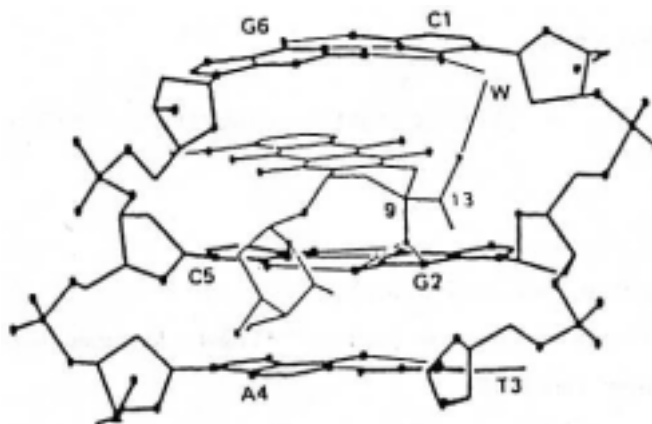
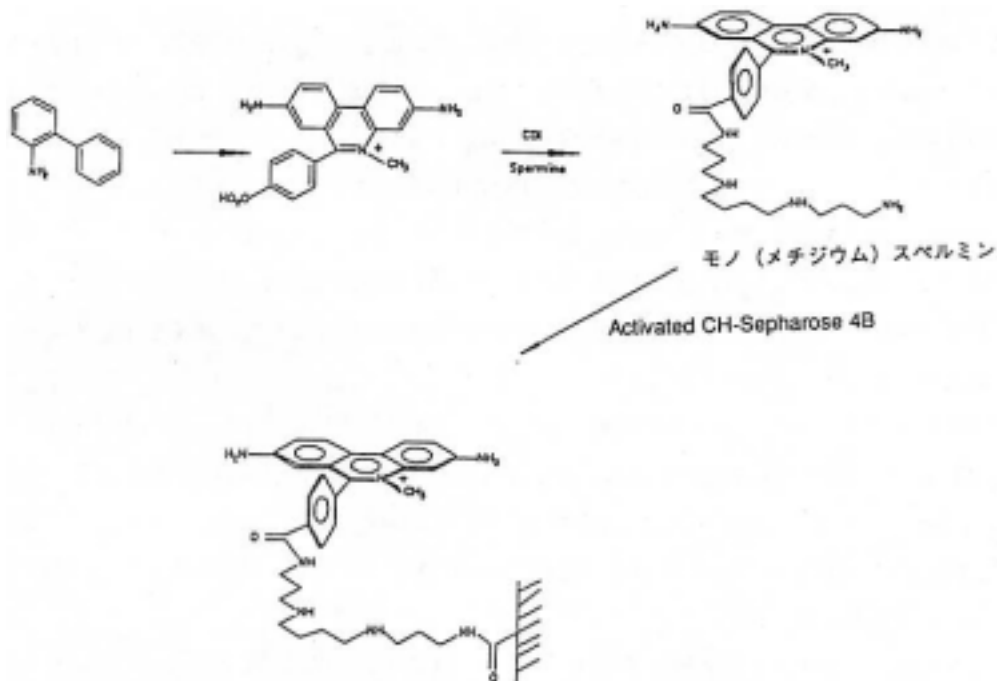


図1. d(CpGpTpApCpG) - ダウノマイシン複合体の結晶構造2)。



最近、BRL 社の Harding ら<sup>5)</sup>は DNA 捕集試薬としてのメチジウム - スペルミン - セファロースを発展させている。この試薬は微量のヒト血清、尿、培養細胞、全血などから DNA のみを捕集でき、またこの試薬により調製された DNA は、ドットプロットハイブリダイゼーション、PCR、ジデオキシ DNA シークエンシングなどにもそのまま利用できる。遺伝子操作を行っている研究者にも最近注目されてきているようである。本稿では、この試薬について紹介したい。

メチジウムは、エチジウムプロミドと同様のインターカレータである。したがってメチジウム - スペルミン - セファロースは、インターカレータをリガンドとした DNA 捕集用ゲルと見なせる。図 2 にその合成法を示す。捕集試薬は、モノ(メチジウム)スペルミンのアミノ基部分をファルマシア製セファロースゲル(Activated CH-Sepharose 4B)のカルボキシル基と反応させることにより調製されている。モノ(メチジウム)スペルミンのゲルへの修飾量について Harding<sup>5)</sup>は議論していないが、用いたゲルは 1ml の膨潤ゲル当り 10 - 14  $\mu\text{mol}$  修飾が可能であるので修飾量もそれぐらいであろう。

この試薬を用いた試料細胞からの DNA 捕集法は次のとおりである。まず、試料細胞を界面活性剤 Brij35 で可溶化し、同時に proteinaseK で DNA に結合しているタンパク質を分解する。この溶液に捕集試薬を加え、30 分間攪拌する。12000  $\times$  g で 30 分遠心後、ペレットとなった捕集試薬 -

DNA 複合体を TE 緩衝液で洗浄する。捕集された DNA は、0.5M NaOH または 0.1M KOH を加えることにより捕集試薬から溶出させることができる。これによってアルカリ変性した一本鎖 DNA が得られる。また、捕集試薬は RNA とともに結合しているが、この条件では RNA は分解される。

50  $\mu$ l のヒト血清や尿、100 個の培養細胞、50  $\mu$ l の全血を用いてこの試薬からドットプロットハイブリダイゼーション、PCR に利用するのに十分な DNA を得ることができる。また、この試薬により HBV (ヒト B 型肝炎) ウイルスを含むヒト血清や尿から捕集した DNA は、ドットプロットハイブリダイゼーションにより 0.7pg の HBV ウイルス DNA が検出可能であった。すなわち、これまでの遺伝病やウイルス感染症などの遺伝子検査の際に必要な DNA 調製をこの試薬を用いることによって迅速化することができると期待される。

予備実験より(1)この試薬 50  $\mu$ l で 1  $\mu$ g 以上の DNA と安定な複合体を形成し、アルカリ条件下で捕集された DNA の 90%以上を回収することができること、(2)また、少量の DNA を溶液量にかかわらず(10ng/500  $\mu$ l から 5  $\mu$ g/30  $\mu$ l まで)捕集できること、(3)その際に 3M 以下の NaCl、0.5M 以下の EDTA、0.1 - 1% (v/v) の SDS、1% の TritonX - 100 などが共存していても影響されないことなどが明らかとなった。

この試薬は、まだ改良する余地は残されているが、有機合成を専門とする者でもこのような試薬の開発などを通して DNA の分離・分析化学に寄与できる道はまだ残されているようである。

## 文 献

- 1) J. B. LePecq, C. Paolettj, *Anal. Biochem.*, 17, 100 (1966).
- 2) G. J. Quigley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7204 (1980).
- 3) W.D.Wilson, *Intercalation Chemistry*, M.S.Whittingham, A.J.Jacobson, Ed., Academic Academic Press, NewYork, pp445 - 501 (1982).
- 4) (a)J.M.Egly, E.Boschetti, *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 9, 445(1982). (b)W.S.Vincen III, E.S.Goldstein, *Anal. Biochem.*, 110, 123(1981). (c)W.Muller et al, *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 9,437(1982). (d)E.Loucks et al., *Nucl. Acids Res.*, 6,1869(1979). (e)P.E.Nielsen et al.,*Biochemistry*, 27,67(1988). (f)M.Takagi, S.Takenaka, *Supramolecular Assemblies*, Y.Murakami, Ed.,*Collective Report on Special Research Project*, pp99 - 108(1990).
- 5) (a)J.D.Hording et al.,*Nucl.Acids Res.*,17,6947(1989) (b)R.Beebe, G.Gebeyehu, *Focus*, 12, 77(1990).

なお、エチジウムのゲルへの固定化と生体液や細胞分解物からの DNA の抽出や分画に関する研究は N.A.Fedrov らによりすでに報告されている (*Biokhimiya*, 49, 1708 (1984)) .

## 中央分析センター工学分室防災心得

(平成2年10月25日 中央分析センター工学分室委員会決定)

中央分析センター工学分室(以下「工学分室」という。)に所属する者並びに工学分室を実験利用する者(学生及び研究生を含む。)は、センター建物内において次の事項を遵守しなければならない。

### 1. 一般的心得

- (1) 機器使用時は、測定室出入口扉の札で在・不在を明示しておくこと。
- (2) 退出時及び長時間不在にする場合には、所定の電源スイッチを切り、戸締りと火気の安全を確認すること。
- (3) 平日午後5時以後(土曜日は午後0時30分以後、日曜日、祝祭日等の休日は終日)に工学分室測定室に在室する者は、工学分室責任者並びに利用責任者の承認を得た上で、別記様式の「時間外在室届」を同日午後3時(土曜日は午前11時、休日の場合は前日の提出期限時刻)までに工学分室事務室に提出すること。
- (4) 時間外在室中に測定室を一時不在にする場合には、必ず施錠すること。
- (5) 消火器具、消火栓、火災報知機、非常電話、避難器具の設置場所を確認しておくと共に、これらの操作法についても熟知しておくこと。
- (6) 測定室内(廊下も含める)では絶対に喫煙しないこと。
- (7) 工学分室測定室内においては、事故発生時に迅速な避難ができるように安全な履物を着用すること。

### 2. 機器利用者の心得

- (1) 機器利用における事故防止並びに測定室の効率的使用を図るため、常に実験台上、測定室内外の整理及び整頓に努めること。
- (2) 引火性物質、劇毒物や爆発性物質等の危険薬品、揮発性の悪臭物質、刺激性物質等を使用せざるを得ない場合には、前もって工学分室職員の承認を得た上で使用すること。また、同室者にもその使用を周知させること。
- (3) 揮発性の悪臭物質あるいは刺激性物質を発生する可能性のある試料の測定は避けること。また、やむを得ずそのような試料を測定室内において使用する場合は、悪臭物質あるいは刺激性物質が室内に漏れ出さない状態に保つこと。
- (4) 危険物質あるいは有害物質を取り扱う実験においては、使用に先立って次項に示すような想定される事故の対策及び処置を検討し、必要な薬品、器具等を準備しておくこと。

引火性物質に対する消火方法。

劇毒物に対する除害・洗浄方法。

揮発性の悪臭及び刺激性物質に対する洗気・除害方法。

- (5) 測定室内に持ち込む危険薬品等は必要最低限にし、測定終了後は直ちに持ち帰ること。
- (6) 有害物質を含む有機及び無機廃液は、必ず持ち帰って処理すること。
- (7) 時間外測定並びに無人運転を行う場合には、測定室出入口扉にその旨を表示し、「時間外在室届」を提出すること(別記「時間外在室届」提出の際の注意事項参照)。
- (8) 高圧ガス容器を使用又は保管する場合には、転倒を防ぐ適切な措置を講じること。
- (9) 実験用電気配線には、使用電力に充分耐える性能の電線を使用し、必要な場合には漏電防止のためのブレーカを付けること。
- (10) 放射性同位元素等を使用する場合には、工学分室職員に連絡し、必要な指示を受けること。
- (11) 危険薬品を取り扱う実験に際しては、上記(1)～(10)項の注意事項に加えて、次の事項を遵守すること。

測定中は必ず防災眼鏡を着用すること。

金属ナトリウム、カリウム、有機金属化合物等の禁注水性試薬は、使用后必ず適切な専用容器に安全に保管すること。

引火性の低沸点物質の取扱い並びに冷蔵庫等の密閉室中での保存には特別の注意を払い、防災に努めること。

ドラフト設備内でのガス栓、水道管、及び電気配線の腐食に対する保守に不断の注意を払うこと。

- (12) 高電圧・高電流、高圧、高温、極低温等を伴う装置、レーザー光源、重量物等を取り扱う実験、大形実験装置の組み立て及び工作作業等を行う場合には、上記(1)～(10)項の注意事項に加えて、次の事項を遵守すること。

大形実験装置の組み立て、重量物を取り扱う場合等には、安全靴とヘルメットを着用し、安全に留意すること。

水銀灯、レーザー光源等の強力な光線を取り扱う実験においては、遮光眼鏡を着用すること。

### 3 実施

この心得は、平成2年10月25日から実施する。

#### \* 「時間外在室届」提出上の注意

平日午後5時以後(土曜日は午後0時30分以後、日曜日、祝祭日の休日は終日)に工学分室測定室に在室する者は、工学分室責任者並びに利用責任者の承認を得た上で、同日午後3時(土曜日は午前11時、休日の場合は前日の提出期限時刻)までに工学分室事務室に提出すること。

時間外在室届提出の際に測定室の鍵を借り受けること。なお、鍵は翌日の午前11時までに返却すること。

時間外在室中は、利用責任者が使用室及び装置の管理の責任を負うこと。

緊急時の連絡先は、夜間連絡が可能な電話番号(自宅等)を記入すること。

別記：「時間外在室届」様式

中央分析センター工学分室時間外在室届

|                  |                   |    |
|------------------|-------------------|----|
| 利用責任者<br>( 教 官 ) | 所 属               |    |
|                  | 氏名・職              | 印  |
|                  | 連 絡 先             | 内線 |
| 装置利用者            | 所 属               |    |
|                  | 氏名・身分             |    |
|                  | 連 絡 先             | 内線 |
| 使用室名             |                   |    |
| 使用装置名            |                   |    |
| 試料の危険性           |                   |    |
| 在室期間             | 平成 年 月 日( ) 時 分 ~ |    |
|                  | 月 日( ) 時 分        |    |

|            |      |  |
|------------|------|--|
| 緊急時<br>連絡先 | 職員氏名 |  |
|            | 電話番号 |  |

|             |        |
|-------------|--------|
| 工学分室<br>処理欄 | 受付 No. |
|-------------|--------|

## お 知 ら せ

### 1．平成2年度特別設備費概算要求について

中央分析センター工学分室(箱崎地区)から提出してありました上記の要求「誘導結合プラズマ質量分析装置」が認められました。機種は横河電機(株)製 PMS2000 であり、装置の搬入は平成3年3月の予定です。詳細は次号でお知らせします。

### 2．平成2年度教育研究学内特別経費について

中央分析センター(筑紫地区)から「低温度領域における物質の構造変化の研究」というプロジェクト名で要求してありました上記の経費が認められました。詳細は追ってお知らせします。