

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12755

研究課題名(和文)DNA超らせんダイナミクスの1分子レベル解析

研究課題名(英文)Single molecule level analysis of dynamics of super-coiled DNA

研究代表者

川井 清彦(Kawai, Kiyohiko)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50314422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内においてDNAは、2重らせんをほどくように(2本の鎖の巻きつき回数を減らすように)ねじられた状態で存在していて、このようなねじれは負の超らせん(negative super coil)と呼ばれます。本研究では、負の超らせんによりDNAがほどけた際に生じると考えられている、DNA 3重鎖構造を1分子レベルで検出する方法を開発しました。光をあてると光る蛍光分子と呼ばれる分子が、蛍のように点滅する現象=蛍光のblinkingを操ることにより可能となりました(KACB法:Kinetic Analysis based on the Control of fluorescence Blinking)

研究成果の概要(英文)：In our body, DNA takes a negatively-supercoiled structure. It is suggested that negative-supercoil induces strand dissociation that leads to the formation of triple helix DNA. In this project, in order to investigate the dynamics of negatively-supercoiled DNA, we developed a method to detect the formation of the DNA triple helix structure at the single molecule level.

研究分野：核酸化学・光化学・生物有機化学

キーワード：DNA supercoil fluorescence blinking 1分子測定

1. 研究開始当初の背景

2重らせん構造を有するDNAは、線上でひずみの無い状態では、約3.6 nm (10.5塩基対) 辺り1回の割合で互いに右巻きに巻きついている。生体内においてDNAは、2重らせんをほどくように(2本の鎖の巻きつき回数を減らすように)ねじられた状態で存在し、このようなねじれは負の超らせん(negative super coil)と呼ばれる。負の超らせんによりDNAはよりほどけやすくなり、ひずみの無い状態と比較してよりダイナミックに運動していると予想される。これにより、局所的に塩基対が解離したDNAほつれ構造、より長い塩基対解離に伴い生じうるDNA3重らせん等、DNA局所構造の形成が促進されていると考えられるが、これら現象にリアルタイムでアプローチ可能な分析手段が無く、DNA超らせんのダイナミクスは明らかになっていない。われわれは、蛍光分子を1分子レベルで見たときに現れる物理化学現象である蛍光の点滅過程(fluorescence blinking)に注目し、蛍光分子を核酸中に導入し、核酸構造を用いて蛍光点滅の制御を試み研究を行っている。これまでに、DNA内電荷移動を蛍光点滅により1分子レベル観測することに成功している(Kawai et al. *Nature Chem.*, **1**, 156 (2009), *JACS*, **133**, 15568 (2011))。一方、われわれはDNAの柔軟性により電荷移動速度が大きく変化することを見出した(Kawai et al. *JACS*, **134**, 9406 (2012))。これら結果をふまえ、負の超らせんによりDNAのゆらぎが促進される過程を、1分子レベル蛍光点滅観測法(Kinetic Analysis based on the Control of fluorescence Blinking: 以下KACB法により抽出できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

DNA超らせんのダイナミクスがわかれば、生体内により近い状態でDNAの物性が明らかになる。遺伝子発現や、修復などはDNAとタンパク質の相互作用により引き起こされ、DNA過渡構造形成と密接に関わっていると予想される。DNAのほつれや3重鎖などの過渡構造のダイナミクスがわかれば、DNA過渡構造の形成がDNA-タンパク質相互作用にどのように関連しているのかを紐解く手がかりが得られ、DNA過渡構造をターゲットとした、トリプレットリピート病等の遺伝子疾患の治療薬開発に有用となる見込が得られるのではと期待される。

3. 研究の方法

本課題では、極微量の蛍光分子修飾プラスミドDNAを測定対象として、DNA超らせん

のからまりあい数を1分子レベル蛍光点滅観測に基づきリアルタイムで分析する手法の開発を目指した。KACB法により、局所的なほつれに伴い生成する3重鎖構造形成のダイナミクスを観測し、超らせん構造とこれら局所構造の相関の解明に挑む。具体的には、蛍光分子(Cy3、Cy5、R6G、ATTO 655等)を位置特異的に導入した、DNAを化学合成する。共焦点顕微鏡を用いた蛍光相関分光法により、蛍光の点滅を観測し、DNAの負の超らせんにより生じる、3重鎖構造、ヘアピン構造と2本鎖構造を区別して観測するKACB法を開発する。

4. 研究成果

DNA超らせんの結果生じるDNA3重鎖構造を1分子レベルで検出するため、光照射により光異性化反応が進行し、生じる異性体がOFF状態となるシアニン系蛍光分子Cy3、Cy5のblinkingに注目した。スタッキングなどにより、立体障害から熱逆異性化速度が遅くなるほど、blinkingにおけるOFF状態の持続時間=OFFが長くなることを利用して、核酸構造分析を検討した。ここで、熱逆異性化速度は、OFFの逆数により表される(1/OFF)。核酸構造に、Cy3、Cy5の構造を重ね合わせると、Cy3の分子の大きさがDNA3重鎖構造の断面の大きさと同程度であることがわかった(図1)。これにより、立体障害により3重鎖構造特異的にCy3の異性化反応が遅くなる、すなわち、三本鎖構造特異的に τ_{OFF} が長くなるのではと考えた。

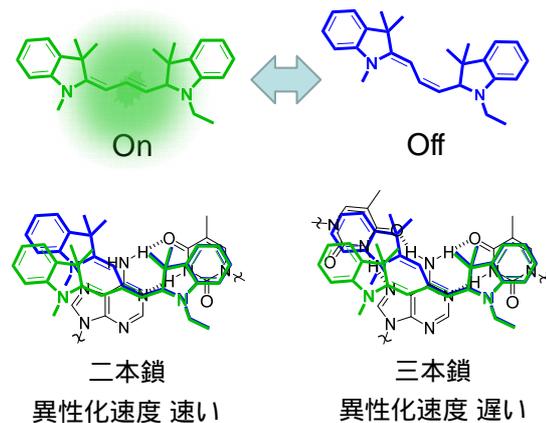


図1: 蛍光分子Cy3の光異性・熱逆異性化に基づくblinkingの制御・活用によるKACB法を利用した、DNA3重鎖構造の検出。Cy3は2重鎖構造と比べ、3重鎖構造においてより強くDNA鎖と相互作用し、立体障害のためCy3の熱逆異性化速度が遅くなる。これにより、blinkingが2重鎖構造に比べゆっくり進行するのではと考えた。

Cy3 の blinking を 2 重鎖構造、3 重鎖構造と比較したところ、2 重鎖構造と比較して、3 重鎖構造では τ_{OFF} が約 8 倍長くなるのがわかり、Cy3 の blinking を観測することにより、超らせんにより誘起される 3 重鎖構造の検出が可能であることが示された (図 2)。

ここで、アデニンの 8 位にアミノ基を導入して、Hoogsteen 水素結合の数を増加すると、OFF が三本鎖構造特異的に顕著に増加した。一方、アデニンの 2 位にアミノ基を導入し、通常の Watson-Crick 水素結合を増やしたところ OFF に大きな変化は観測されなかった。熱融解温度 (T_m) 測定から、熱力学的安定性からは測定温度においてすべての配列においてほぼ 3 重鎖状態にあることから、3 重鎖構造の有無だけでなく、その剛直性・ゆらぎに関して Cy3 の蛍光の blinking により調べられることを提唱した。

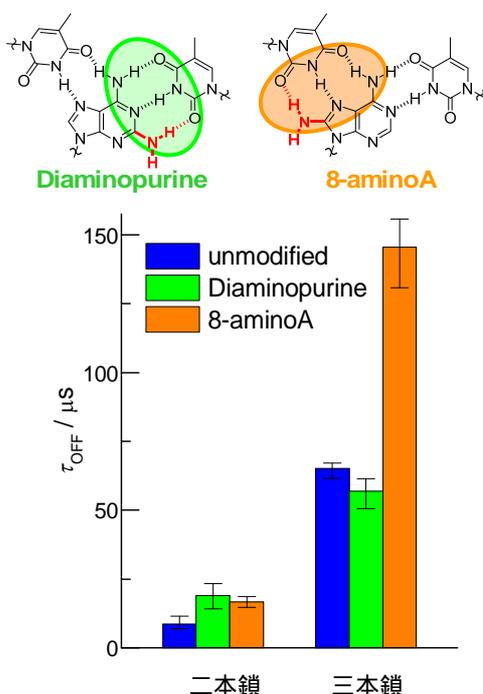


図 2 : blinking を OFF より評価。二重鎖構造と比べ、三重鎖構造では、熱逆異性化速度が遅くなり、OFF が顕著に長くなった。アデニンの 2 位にアミノ基を導入することによりワトソンクリック結合を、8 位にアミノ基を導入することによりフーグスティン結合を安定化したところ、三重鎖構造形成で鍵となるフーグスティン結合を安定化した時にのみ、OFF が顕著に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- Triple helix conformation-specific blinking of Cy3 in DNA, K. Kawai*, A. Maruyama, *Chem. Commun.*, **51**, 4861-4864 (2015)
 - DNA microenvironment monitored by controlling redox blinking, K. Kawai*, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima, *ChemPhysChem.*, **51**, 4861-4864 (2015)
 - BODIPY-labeled fluorescent aptamer sensors for turn-on sensing of interferon-gamma and adenine compounds on cells, A. Tsuchiya, S. Hashim, S. Ise, T. Furuhashi, K. Kawai, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, S. Sando, *Anal. Sci.*, **32**, 543-547 (2016)
 - Single-molecule monitoring of the structural switching dynamics of nucleic acids through controlling fluorescence blinking, K. Kawai*, T. Miyata, N. Shimada, S. Ito, S. H. Miyasaka, A. Maruyama*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *43*, 15329-15333.
- 〔学会発表〕(計 8 件)
- 川井 清彦, 真嶋 哲朗, 丸山 厚, 生体分子上で起こる反応の速度を 1 分子レベルで測る, 第 19 回生命化学研究会, 2016 年 8 月 1 日, 下関(ホテル西長門リゾート)
 - 川井 清彦, 真嶋 哲朗, 丸山 厚, 蛍光 blinking を利用した核酸構造転移の 1 分子レベル観測, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 9 日, 金沢(石川県立音楽堂)
 - K. Kawai, K. Higashiguchi, T. Majima, A. Maruyama, Conformational Changes of DNA Monitored by Controlling the Fluorescence Blinking, ISANC2016 The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016 年 9 月 29 日, 熊本(熊本大)
 - 川井 清彦, 蛍光の blinking を自在に操る分子技術の創出, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 11 月 16 日, 船堀(タワーホール船堀)
 - 川井 清彦, 1 分子の核酸からその構造を調べる, ケミカルバイオロジー Mini-symposium at KIT, 2017 年 1 月 16 日, 京都(京工繊大)
 - 川井 清彦, 核酸を利用した蛍光 blinking の理解・制御と 1 分子分析への応用, 関西大学先端科学技術推進機構研究部門別発表会 (第 54 回), 2017 年 3 月 2 日, 吹田(関大)
 - K. Kawai, T. Majima, A. Maruyama, DNA Structural changes monitored by

controlling the fluorescence blinking”,
The 15th Conference on Methods and
Applications in Fluorescence
(MAF2017), 2017年9月13日, Bruges,
Beigium (Concertgebouw)

8. 川井 清彦, 蛍光の blinking 観測による
核酸構造の 1 分子分析, 第 98 回日本化
学会春季年会 (2018), 2018 年 3 月 22
日, 船橋 (日大)

〔その他〕

ホームページ等

研究成果は、下記ホームページにて随時公開
している。

日本語：

[http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/
kawairesearch.html](http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/kawairesearch.html)

英語：

[http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/
kawairesearch-e.html](http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/kawairesearch-e.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川井 清彦 (KAWAI, Kiyohiko)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50314422

(2)連携研究者

丸山 厚 (MARUYAMA, Atsushi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：40190566