

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03088

研究課題名(和文) DNA高次構造転移の1分子実時間観測

研究課題名(英文) Real-Time Single-Molecule Observation of DNA Conformational Changes

研究代表者

川井 清彦 (KAWAI, KIYOHICO)

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者がこれまで進めてきた、蛍光点滅現象(blinking)の理解・制御・活用に基づいた1分子レベル分析・診断法(Kinetic Analysis based on the Control of the fluorescence Blinking: KACB法)を発展させ、DNA高次構造転移の1分子観測法を確立した。酸化・還元反応によるblinkingの制御により、DNAのヘアピン、二本鎖、B型、A型の各構造の1分子識別を達成し、これにより新たなDNA1分子検出法を開発した。blinkingパターンの時間変化を追跡し、機能的RNAの構造転移の1分子検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した、KACB法は、様々な分子の1分子検出、そして、その分子のダイナミクスに関する情報の抽出を可能に、様々な、1分子分析、診断法の開発へとつながる基盤技術として期待される。2014年にノーベル化学賞が贈られた、超解像顕微鏡の開発においては、1つ1つ蛍光分子から点を描き、点描画のように高解像度の画像が得られる。本研究では、蛍光分子から点を描くだけでなく、各蛍光分子から発せられる情報をもマッピング可能な技術へと発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a single-molecule analysis and diagnosis method based on the understanding, control, and utilization of fluorescence blinking (KACB method).

By controlling the blinking by oxidation/reduction reactions, we achieved single molecule discrimination of DNA hairpin, double-stranded, B-type, and A-type structures, and developed a new method for single molecule detection of DNA.

By tracking the temporal change of blinking pattern, we succeeded in single molecule detection of structural transition of functional RNA.

研究分野：核酸化学、光化学、生物有機化学

キーワード：DNA 高次構造 1分子検出 構造転移 速度 蛍光 blinking

1. 研究開始当初の背景

DNA は、ワトソン・クリックにより解明された右巻きの B 型と呼ばれる 2 本鎖構造だけでなく、溝の深さが異なる A 型構造、逆巻きの左巻き Z 型構造、そして、3 本鎖、4 本鎖、ヘアピン構造など、様々な高次構造（最近では非標準構造とも呼ばれる）を形成することが知られる。これら高次構造の熱力学的安定性は、DNA 配列に大きく依存することが調べられている。したがって、DNA 高次構造も配列情報を反映して形成されると考えられ、遺伝子発現における DNA 高次構造の役割に関して注目が集まっている。これまでの研究により、プロモーター領域に 4 重鎖を形成しやすい配列（潜在的 4 重鎖形成配列）が数多く見出されており、4 重鎖形成が転写活性と密接にかかわっていることが示唆されている。また、トリプレットリピート病と呼ばれるハンチントン病などの疾患において、複製中にヘアピン構造が形成されることが原因の 1 つとして指摘されている。このように、DNA の高次構造は、細胞内の遺伝子発現の調節を通して種々の疾患と関連していることが示唆されている。高次構造転移はタンパク質との相互作用をトリガーとして、過渡的にダイナミックに起こると考えられるが、有効な観測手法が存在せず機構の多くは不明であった。

2. 研究の目的

DNA-タンパク複合体などの貴重な生体試料のダイナミクス観測にあたり、1 分子蛍光観測法が有効な手段となってきた。これまでの 1 分子蛍光観測法は、生体分子間の結合解離による蛍光の ON-OFF、あるいは、生体分子の大きな構造変化に伴う FRET 効率変化（FRET 効率が半分となる蛍光分子間の距離は 50 Å 程度）の観測に基づき、様々な知見を我々に提供してきた。しかしながら、これら現象に基づく 1 分子観測では、長鎖 DNA 中に生じる部分的なわずかな構造変化を読み出すことは難しい。研究代表者は、蛍光分子 1 つ 1 つを見たときに顕著となる蛍光点滅現象（blinking）の理解・制御・活用に基づいた 1 分子レベル分析・診断法の開発を進めてきた（**K**inetic **A**nalysis based on the **C**ontrol of the fluorescence **B**linking: **KACB** 法）。本課題では、KACB 法の改良により、DNA 高次構造転移の 1 分子観測法の確立に取り組んだ。rKACB 法を用いて、DNA のヘアピン、二本鎖、B 型、A 型の各構造の 1 分子識別を達成し、核酸構造転移の 1 分子リアルタイムモニタリングを達成することにより、構造転移ダイナミクスの測定法を確立する。

3. 研究の方法

blinking を用いた観測を達成するためには、種々の物理化学反応が進行する速度を理解して制御することが必要となる。本課題では、分子間酸化・還元反応（**redox reaction**）に基づく KACB 法（rKACB）の開発に取り組む。まず、アンサンブル系においてハイスループット蛍光相関分光（FCS）装置を用いたスクリーニングにより、種々の条件（蛍光分子：Alexa 488, R6G, TAMRA, ATTO 532, ATTO 647N, ATTO 655、酸化剤：・還元剤、各 DNA 高次構造）が酸化・還元に基づく blinking に与える影響を調べ、目的とする DNA 高次構造転移ごとの最適な観測条件を見出す。平行して、1 分子観測系（蛍光顕微鏡、表面固定化法、測定・解析法等）の最適化を行い、DNA 高次構造転移の 1 分子実時間観測を可能とする KACB 法を確立する。高次構造転移のリアルタイム観測への応用の評価として、2 構造間で構造転移し機能することが知られる preQ1 riboswitch の構造転移の 1 分子観測を行い、その転移ダイナミクスを明らかにする。

4. 研究成果

図 1 に示す、種々の蛍光分子、および、種々の酸化剤における酸化・還元による blinking 反応の制御法を検討した。それぞれの蛍光分子を 1 本鎖、および、2 本鎖に導入した場合の blinking 挙動を比較したところ、Alexa 488, TAMRA, ATTO 532, ATTO 647N では、両者では

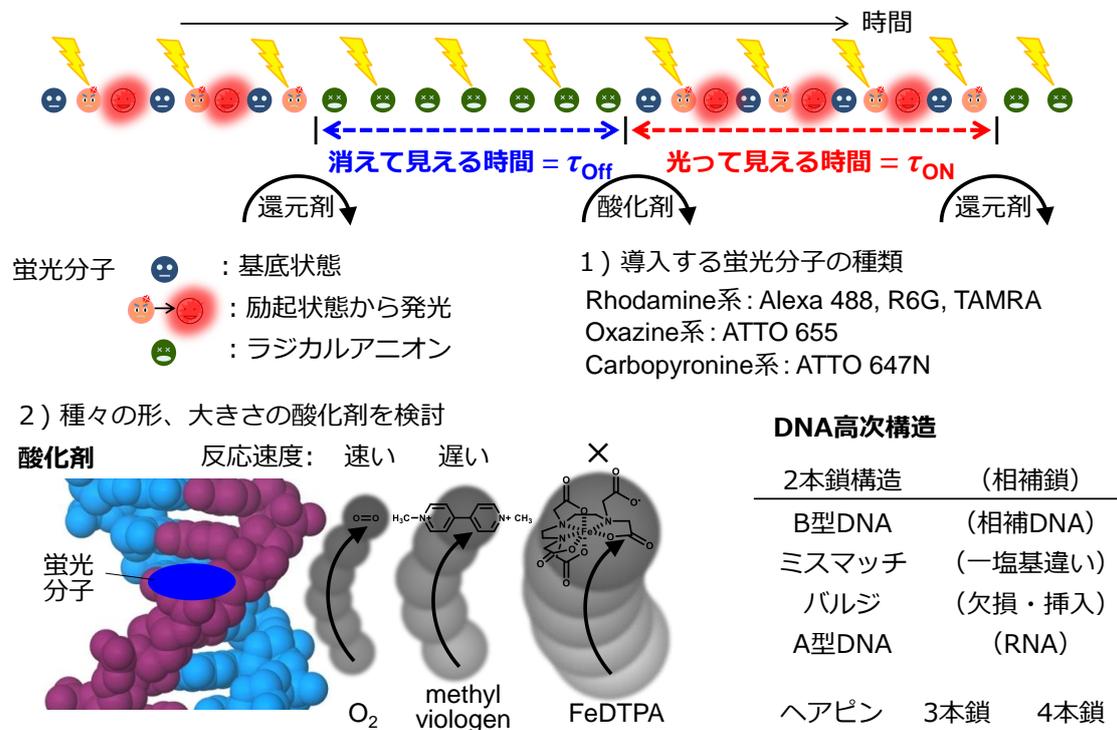


図 1. 酸化還元反応の制御による blinking。分子間反応速度が、蛍光分子が溶媒にさらされているほど速くなることを利用して、DNA 高次構造転移の 1 分子観測を達成する。

とんど blinking パターンに差が無く、これら色素が核酸構造と相互作用せず、常に溶液に突き出していることが示された。一方、R6G, ATTO 655 においては、2 本鎖構造中において blinking がよりゆっくり進行することが示され、ATTO 655 では 20 倍の差が見られた。これにより、核酸の 1 本鎖、2 本鎖構造の読みわけにおいては、用いた色素の中では ATTO 655 が最も優れていることがわかった¹。

次に、DNA をガラス基板上に固定し、酸化・還元反応による blinking の 1 分子観測を確立した。モレキュラービーコンタイププローブに蛍光分子 ATTO 655 を導入することにより、DNA のヘアピン-2 本鎖状態の構造の 1 分子レベルでの読み分けに成功した²。これは同時に、たった 1 つの DNA を検出する活気的な技術開発の達成を意味する。さらに、rKACB 法を抗原-抗体反応の 1 分子観測に応用した。蛍光分子 TAMRA を修飾した 2 本鎖 DNA をガラス基板上に固定し、TAMRA を抗原とする抗 TAMRA 抗体=5G5 の有無が blinking に与える影響を観測したところ、5G5 存在下では 7 倍程度遅く blinking が進行し、rKACB 法を抗原-抗体反応の 1 分子観測に適用できることが示された。

最後に、rKACB の時間変化を観測することによる、核酸構造転移の 1 分子観測に応用した。2 状態の構造 A、B の平衡として存在し、構造転移を引き起こし機能することがわかっている機能性 RNA である preQ1 リボスイッチのダイナミクスの測定を行った。最長 2 分にわたる rKACB の観測に成功し、速い blinking 対応する構造 A、遅い blinking に対応する構造 B の時間的な変化を観測し、preQ1 の構造転移速度の測定に始めて成功した (構造 A の持続時間の逆数が、構造転移速度 A→B に相当)。preQ1 分子存在下で速度が変化し、構造転移の平衡が変化することをわずか 40 分子の測定により明らかにした³。

<引用文献>

- (1) Miyata, T.; Shimada, N.; Maruyama, A.; Kawai, K. Fluorescence Redox Blinking Adaptable to Structural Analysis of Nucleic Acids. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 6755-6761.
- (2) Kawai, K.; Miyata, T.; Shimada, N.; Ito, S.; Miyasaka, H.; Maruyama, A. Single-Molecule Monitoring of the Structural Switching Dynamics of Nucleic Acids through Controlling Fluorescence Blinking. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 15329-15333.
- (3) Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Maruyama, A. Single-Molecule Study of Redox Reaction Kinetics by Observing Fluorescence Blinking. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 1001-1010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawai Kiyohiko, Maruyama Atsushi	4. 巻 26
2. 論文標題 Kinetics of Photoinduced Reactions at the Single Molecule Level: The KACB Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202000439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Xu Jie, Miyamoto Shunichi, Tojo Sachiko, Kawai Kiyohiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Sulfonated Pyrene as a Photoregulator for Single Stranded DNA Looping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 5075 ~ 5084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202000184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai, Kiyohiko; Miyata, Takafumi; Shimada, Naohiko; Ito, Syoji; Miyasaka, Hiroshi; Maruyama, Atsushi	4. 巻 56
2. 論文標題 Single-Molecule Monitoring of the Structural Switching Dynamics of Nucleic Acids through Controlling Fluorescence Blinking	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 15329-15333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201708705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Xu Jie, Tojo Sachiko, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Dynamics of Single Stranded RNA Looping Probed and Photoregulated by Sulfonated Pyrene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 8002 ~ 8008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.202002231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Kiyohiko, Fujitsuka Mamoru, Maruyama Atsushi	4. 巻 54
2. 論文標題 Single-Molecule Study of Redox Reaction Kinetics by Observing Fluorescence Blinking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 1001 ~ 1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.0c00754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 川井 清彦
2. 発表標題 核酸1分子を見つける、調べる
3. 学会等名 第22回生命化学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川井 清彦
2. 発表標題 蛍光blinking制御によるRiboswitch構造変化の1分子観測
3. 学会等名 日本分析化学会第68回年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyohiko Kawai
2. 発表標題 Single-Molecule Level Monitoring of Nucleic Acids Conformational Changes by Controlling the Fluorescence Blinking
3. 学会等名 -System Figuration European-Japanese Workshop, Zabrze (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyohiko Kawai, Takafumi Miyata, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama
2. 発表標題 Single-Molecule Level Analysis of Nucleic Acids Structure by Controlling the Blinking
3. 学会等名 ISNAC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川井 清彦、宮田 貴史、嶋田 直彦、丸山 厚
2. 発表標題 rKACB法による核酸構造の1分子分析
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川井 清彦、丸山 厚、真嶋 哲朗
2. 発表標題 DNA STRUCTURAL CHANGES MONITORED BY CONTROLLING THE FLUORESCENCE BLINKING
3. 学会等名 The 15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井清彦
2. 発表標題 蛍光のblinking観測による核酸構造の1分子分析
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会 (2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyohiko Kawai
2. 発表標題 Single-molecule level analysis of DNA by controlling the fluorescence blinking
3. 学会等名 The 7th International Mini-symposium on Advanced Coordination Chemistry, Strasbourg (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyohiko Kawai
2. 発表標題 Fluorescence blinking adaptable to structural analysis of nucleic acids
3. 学会等名 Physical Chemistry Colloquium, Munich (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本核酸化学会、杉本 直己	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究紹介：現象を調べ、わかったことを積極的に活用することを目指しています！
https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/kawai_research.pdf
 Single-molecule level analysis
https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/kawai_research-e.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	丸山 厚 (Maruyama Atsushi) (40190566)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関