

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620113

研究課題名(和文)水溶液中における単一DNA分子のキラリティ変化の超高感度リアルタイム測定法の開発

研究課題名(英文)Development of the real-time ultrasensitive detection method for the chirality change of single DNA molecules in aqueous solutions

研究代表者

塚原 聡 (Tsukahara, Satoshi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50207338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：市販の円二色性(CD)の測定装置の検出方法を変更し、励起波長を変えながら蛍光強度を検出する蛍光検出円二色性測定(FDCD)の基礎検討を行った。

平成25年度に、タンパク質のFDCD検出では、偽シグナルが現れることがわかった。平成26年度の検討により、偽シグナルの強度は、検出器の設置場所に依存することがわかった。

以上の結果に基づき、偽シグナルの出にくい検出器の設置場所を選んだ。その結果、蛍光ラベル化したアミノ酸では、LとDで互いに正負が鏡像関係のFDCDシグナルが測定され、測定方法の正当性が確認できた。さらに、蛍光ラベル化したタンパク質でも本来のFDCDシグナルを測定することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence detected circular dichroism (FDCD) is one of the detection methods of the chirality of substances with a high sensitivity. In the present study, FDCD spectra were investigated with a conventional circular dichroism (CD) spectrophotometer.

In 2013, the FDCD spectra of some proteins in aqueous solutions were measured, but they contained artificial signals significantly. In 2014, it was clarified that the intensity of the artificial signals depended on the position of the detector of the CD spectrophotometer. From these results, the detector was placed at the position where the minimum artificial signals were obtained. The FDCD spectra of amino acids labeled with a fluorescent dye were measured, and the FDCD spectra of mirror image were obtained for L- and D-amino acids. Furthermore, intrinsic FDCD spectra of a protein labeled with a fluorescent dye in aqueous solutions were successfully obtained.

研究分野：分析化学

キーワード：蛍光検出円二色性 キラリティ 生体関連物質

1. 研究開始当初の背景

物質のキラリティは、生命現象を司る基本的かつ重要な性質である。多くの科学者がその謎に興味を持ち、その解明を目指してきている。一方、錯体化学や有機化学の分野においても、キラリティは多くの注目を集め、昔から現在に至るまで、多くの合成や物性に関する研究が蓄積されている。物質のキラリティの一般的な分析法は、光吸収性を有しない物質では旋光性、光吸収性を有する物質では吸収円二色性 (Circular Dichroism; CD) の測定である。しかし、その感度は一般に低く、通常、高濃度の溶液を用いて測定される。

ところで、DNA は、生命活動の主要な役割を担っている。基板上に固定された DNA については、電子顕微鏡や STM, AFM といった手法により多くの研究例があるが、溶液中の DNA は速い拡散が起こるために、その測定は限定的なものしか存在しない。しかし、生体中の DNA は、固体状態ではなく溶液中で働くため、溶液中の DNA の挙動の研究が重要である。そのような観点から、申請者らは、これまで水溶液中や液液界面内といった固定されていない状態の単一 DNA 分子の動的挙動 (ダイナミクス) にこだわり、光学顕微鏡を用いて in situ (その場) 測定を行ってきた。

DNA は、その右回りの螺旋構造 (B form) に起因するキラリティを有しているが、ある陽イオンの添加などにより逆向きの螺旋構造 (Z form) になり、キラリティの反転が生じることが知られている。DNA のキラリティの変化は、生命現象に直結する事象であり、その研究自体も極めて興味深い。

2. 研究の目的

1 の背景から、申請者は、(1) 超高感度なキラリティの計測法の確立、(2) 水溶液中の単一 DNA 分子のキラリティ変化のリアルタイム測定、に焦点を絞り、2 年間で以下のように当該研究を進める。(1) キラリティの計測では、円偏光を高感度かつ高安定性で扱う必要がある。そのために、主に 1 年目は、蛍光円二色性を測定するための装置を自作する。(2) 単一 DNA 分子の存在やその形態変化は、これまで高い分解能を有する蛍光顕微鏡の画像から判断してきたが、その蛍光顕微鏡に (1) で作製した装置を組み込み、単一 DNA のキラリティ変化を顕微蛍光画像から評価できるシステムを作製し、種々の条件下で実験を行う。これによって、単一 DNA 分子の螺旋構造が反転したり元に戻ったりする機構も明らかにしたい。

3. 研究の方法

本研究は、本研究は 2 年の期間内に、以下のことを行う。

(1) 蛍光円二色性を用いた超高感度なキラリティの計測法の確立 当該研究室は、蛍光 CD を測定することも可能な円二色性の装置

を現有している。現在、すでにこの装置を用いて、吸収 CD や蛍光 CD の測定の予備実験を始めている。

平成 25 年度は、まずこの円二色性の装置を用いて、DNA のキラリティを評価するための蛍光色素の選定を行う。DNA は、その中心に核酸塩基 (A, G, C, T) があり、そこへインターカレートする蛍光試薬が多数知られている。また、DNA 分子の外側の主溝や副溝に付着する蛍光試薬も多く存在する。これらを用いて染色した DNA について、吸収 CD および蛍光 CD を精密に測定し、DNA のキラリティを評価するために最適な蛍光色素を決定する。

続いて、レーザーを光源とした超高感度蛍光 CD の装置を自作する。当該研究室は、波長 473 nm, 532 nm, 632.8 nm, 808 nm などのレーザーを所有しており、それらを蛍光色素に合わせて有効に用いる。また、本申請研究では、一般の円二色性の装置に採用されている光弾性変調器 (PEM) を用いずに、液晶チューナブルフェイズリターダー (PR) を用いて、右円偏光および左円偏光を交互に得る。それらの励起光を試料に照射し、発生する蛍光を出来るだけ多く検出器で取得する。その際、効率の低下を招くので、分光器は用いずに、光学フィルター (BF) を検出器の前面に配置して、励起光を除去する。液晶チューナブルフェイズリターダーの制御器からのシグナルをトリガとして、検出器 (光電子増倍管またはフォトダイオード) に接続したデータ処理機 (ロックインアンプ、デジタルオシロスコープなど) により、右円偏光と左円偏光を用いたときの蛍光強度の差を超高感度に検出する。

(2) 水溶液中の単一 DNA 分子のキラリティ変化のリアルタイム測定 まず、平成 25 年度に自作した超高感度蛍光 CD の装置を用いて、市販の円二色性の装置との感度の比較を行い、単一 DNA 分子の蛍光 CD が検出可能であることを確認する。

申請者らは、これまで拡散過程や相間移動過程、電気泳動過程における単一 DNA 分子の形態変化 (主にランダムコイル - グロビュール転移) を、高い分解能を有する蛍光顕微鏡を用いて in situ 測定を行ってきた。本申請研究においても、現有の蛍光顕微鏡と超高感度デジタル CCD カメラを用いる。(1) で開発したシステムのうち、試料を蛍光顕微鏡上に配置したサンプルに、検出器を超高感度デジタル CCD カメラに変える。またデータ処理機に、パーソナルコンピューターを用い、液晶チューナブルフェイズリターダー (PR) の制御器からのシグナルをトリガとして超高感度デジタル CCD カメラを作動させ、顕微蛍光画像を取得する。光弾性変調器 (PEM) と異なり、PR は、一定時間、右円偏光と左円偏光の状態を保持できるため、楕円偏光や直線偏光などの他の偏光成分をわずかにしか含まない。そのため、PEM を使用する際にしば

しば問題になる擬似的なシグナルによる妨害がほとんどない。この切り替えのタイミングと、顕微蛍光画像の取得のタイミングを合わせることで、各円偏光を励起光とした画像が得られる。R1 と R2 の平均画像 $[(R1+R2)/2]$ と L1 の差が、単一 DNA 分子の蛍光 CD 画像に対応する。これらを、時間とともに測定することで、単一 DNA 分子のキラリティの変化を計測できることになる。なお前述のように、PEM の切り替えの周波数は、20 ~ 50 kHz と極めて高く、その意味でも本申請研究のシステムに適合しにくい。液晶チューナブルフェイズリターダーの切り替えの周波数は、1 ~ 100 Hz であり、画像化の周波数（例えばビデオレートは 30 Hz）と適合が良い。

本システムの構築後には、様々な条件下で、単一 DNA 分子のキラリティ変化を計測する。例えば、スペルミンなどの有機陽イオンを加えると、DNA 分子は逆向きの螺旋構造 (Z form) になることが知られている。まず、この現象を単一 DNA 分子について精査する。その際、螺旋構造の変化の速度に特に注目したい。この情報は、多分子を用いた測定では平均化されて隠れており、単一分子測定でのみ得られるものである。また、DNA 分子はポリエチレングリコール水溶液中でグロビュール状態になるが、昇温することで、ランダムコイル状態に形態変化を起こす。このような形態変化とキラリティ変化の関係についても明らかにする。さらに、互いに相補的な一本鎖 DNA 同士が会合して二本鎖 DNA になる際のキラリティの発現速度も極めて興味深い研究テーマである。これらの実験を蓄積し、緻密な解析を丹念に行うことによって、単一 DNA 分子の螺旋構造変化の機構を明らかにしたい。

最後に、すべての実験を通して得た単一 DNA 分子のキラリティ変化の結果や知見を多角的に考察し、本研究を総括する。

4. 研究成果

市販の円二色性(CD)の測定装置を用いて蛍光を検出する蛍光検出円二色性測定 (Fluorescence Detected Circular Dichroism; FDCD) の基礎検討を行った。この装置は、通常の光吸収の円二色性 (吸収 CD) のスペクトルを測定するものであるが、検出方法を変えることで、励起波長を変えながら、蛍光強度を検出することができる。

平成 25 年度に、タンパク質の FDCD 検出では、偽シグナルが現れることがわかったので、平成 26 年度はその原因と解決法についてより詳しく検討した。そのために、蛍光物質であり、互いに鏡像異性体の関係にあるキニーネとキニジンをまず用いた。その結果、偽シグナルが現れる最大の原因は、溶液中で分子回転が遅いことによる蛍光異方性であることがわかった。さらに、偽シグナルの強度は、検出器の設置場所にも依存することがわかった。

上記の結果および光学計算に基づき、偽シグナルの出にくい検出器の設置場所を選び、蛍光ラベル化したアミノ酸およびタンパク質の FDCD 測定を行った。その結果、蛍光ラベル化したアミノ酸では、L と D のアミノ酸で互いに正負が鏡像関係の FDCD シグナルが測定され、測定方法の正当性が確認できた。さらに、蛍光ラベル化したタンパク質でも本来の FDCD シグナルを測定することが可能であった。

以上の成果を基に、今後より高い感度で CD 測定を行うことが可能になる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Satoshi TSUKAHARA, Rintaro KOBAYASHI, Terufumi FUJIWARA, "In Situ Microscope Measurements of the Formation of Nanometer-Sized Gold Particles at the Dodecane/Water Interface through the Direct Reduction of Aqueous tetrachloroaurate(III) by Hydrophobic dl- α -Tocopherol in the Presence of 1,10-Phenanthroline," *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.*, **21**, 119-127 (2014). 査読有
DOI: 10.15261/serdj.21.119
2. Yuya TOYOKAWA, Satoshi TSUKAHARA, Terufumi FUJIWARA, "A Spectroscopic and Microscopic Study on the Extraction Behavior of a Probe Dye, Neutral Red, by Aerosol OT in the Isooctane/Water System," *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.*, **20**, 29-38 (2013). 査読有
DOI: 10.15261/serdj.20.29
3. SHINOMORI, Naoki; TSUKAHARA, Satoshi, "Microscope Measurements of Lateral Diffusion of Fluorescent Rhodamine B at Toluene/Water Interface by Total Internal Reflection-Fluorescence Recovery after Photobleaching," *Chem. Lett.*, **42**, 444-446 (2013). 査読有
DOI: 10.1246/cl.121223
4. TSUKAHARA, Satoshi; TSURUTA, Tsuyoshi; FUJIWARA, Terufumi, "Surface tension determination through measurements of resonance oscillation of a small surface using dielectric force by a localized alternating current electric field," *Analyst*, **138**, 2110-2117 (2013). 査読有
DOI: 10.1039/C3AN36260D

[学会発表](計 8 件)

1. 立本 絵里, 塚原 聡, "液液界面における金ナノ粒子の会合ダイナミクスの顕微測定", 第 32 回溶媒抽出討論会, 名古屋大学 ES 総合館(名古屋市), 2013 年 11 月 22 日 ~ 23 日.

2. 歳實 萌, 塚原 聡, "液液界面における長鎖アルコール単分子膜の相転移挙動の in situ 顕微蛍光測定", 第 32 回溶媒抽出討論会, 名古屋大学 ES 総合館(名古屋市), 2013 年 11 月 22 日 ~ 23 日.
3. 塚原 聡, "液液界面で特異的に起こる現象の in situ 顕微測定", 日本分析化学会第 62 年会, 近畿大学(東大阪市), 2013 年 9 月 10 日 ~ 12 日. (招待講演)
4. 加藤 諒, 片山 和也, 塚原 聡, "蛍光検出円二色性 (FD CD) 測定法を用いたタンパク質のキラリティの高感度検出の検討", 日本分析化学会第 62 年会, 近畿大学(東大阪市), 2013 年 9 月 10 日 ~ 12 日.
5. Satoshi Tsukahara, "Surface Tension Determination through Microscope Measurements of Resonance Oscillation of Small Liquid Surface Using Periodic External Forces", 日本分析化学会第 63 年会, 広島大学(東広島市), 2014 年 9 月 17 日 ~ 19 日. (招待講演)
6. 諏訪 雅頼, 中塚 由加里, 塚原 聡, "水溶液と界面を形成する 4-シアノ-4'-ペンチルビフェニル液晶のアンカリングエネルギー測定", 日本分析化学会第 63 年会, 広島大学(東広島市), 2014 年 9 月 17 日 ~ 19 日.
7. 歳實 萌, 塚原 聡, "液液界面における界面活性剤単分子層の相転移挙動の in situ 顕微蛍光測定", 日本分析化学会第 63 年会, 広島大学(東広島市), 2014 年 9 月 17 日 ~ 19 日.
8. 八木 真二, 篠森 直樹, 塚原 聡, "液液界面微小集合体を示す極微な光吸収量の超高感度分光測定と解析", 日本分析化学会第 63 年会, 広島大学(東広島市), 2014 年 9 月 17 日 ~ 19 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :

権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕
 ホームページ等
 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 分析化学研究室
<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/tsukahara/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚原 聡 (TSUKAHARA Satoshi)
 大阪大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号 : 50207338

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :