

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K13980

研究課題名(和文) DNA 2重鎖と脂質ラフトモデル膜を用いた微弱磁場イメージング・システムの構築

研究課題名(英文) Creation of an imaging system for weak magnetic fields using DNA duplexes and lipid raft model membranes

研究代表者

岡 芳美 (OKA, Yoshimi)

大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号：30470115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：青色光受容体タンパク質クリプトクロムの磁気センシングに着目して、微弱磁場をセンシングできる人工システムの構築を目指した。生体と同様の反応経路を辿るフラビンの1重項励起状態からのフラビン・トリプトファン(Trp)・1重項ラジカルペア形成過程の実現、最終的な3重項ラジカルペアの長寿命化の実現、巨大一枚膜の脂質ラフト相(厳密には、脂質ラフトモデル膜の秩序液体相)を反応場とする顕微下イメージングが可能なシステムについて検討した。パルミトイル修飾したTrp含有ペプチド核酸(PNA)と(比較的水溶性の高い)フラビンを含む相補DNAの2重鎖と脂質ラフトモデル膜を用い、モデル系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における人工系の構築は、構造-磁気センシング機能の相関を明らかにできる一助になると考える。生体のタンパク質と同様の反応経路を辿る人工系を構築できたことは重要な知見である。生物の磁気受容機能解明につながるだけでなく、その現象(地磁気程度の微弱磁場のセンシング)を利用できる(役に立つ)材料、システムへと展開するための研究の第一歩として意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on magnetic sensing of blue light photoreceptor protein cryptochrome, I aimed to build an artificial system capable of imaging a weak magnetic field. Such a systems that follows the same reaction pathway as in biological systems, i.e., formation of the singlet radical pair between flavin and tryptophan (Trp) from singlet excited flavin and longevity of the final triplet radical pair, and that allows to visualize the reaction under microscope by using lipid raft phases of giant unilamellar vesicles (strictly, liquid-ordered phases of lipid raft model membranes) as reaction fields, were investigated. Using hybrids between Trp-containing palmitoylated peptide nucleic acid (PNA) and its complementary DNA containing (relatively water-soluble) flavin, partitioned into lipid raft model membranes, the targeted system was successfully constructed.

研究分野：機能物性化学

キーワード：ラジカルペア クリプトクロム・モデル 脂質ラフトモデル 顕微下 光誘起電子移動反応 フラビン DNA ペプチド核酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

地磁気は、水や空気とともに健康に深く関わる環境要因であり、動物の磁気受容の解明は、感覚生物学の最重要課題の1つと考えられている。渡り鳥は、網膜内に高感度磁気レセプターを持つことによって、地磁気を利用して方角を間違えることなく渡りを行うことができると考えられており、この高感度磁気センサーとして、青色光受容体タンパク質クリプトクロムがはたらく可能性が強く示唆されている。その機構は、クリプトクロム中のフラビンアデニンヌクレオチド (FAD) が青色光により励起されたとき、アミノ酸 (トリプトファン、Trp) との間で電子移動が起こり、その結果生じるラジカルペアのために、磁場による反応効率の差として検出できると推定されている。今までに、ラジカルペアの磁気センシングに関して、完全な人工系 (カロテン-ポルフィリン-フラレン) の報告や天然のタンパク質を再構築した系の報告がある。生体系のフラビントタンパク質においては、一連の光化学反応の初期段階でフラビンの1重項励起状態からのフラビン-Trp・ラジカルペア形成が報告されている。その後のラジカルペアの1重項-3重項転移は、微弱磁場に対して特異的に進行する。この過程は、従来の人工系では実現できておらず、3重項励起状態のフラビンを經由しラジカルペア形成に至ることが報告されていた。精密設計、合成のアプローチによって、よりリアルなタンパク質の磁気センシング・モデル系が構築できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

青色光受容体タンパク質クリプトクロムの磁気センシングに着目して、微弱磁場をセンシング、さらにイメージングできる可能性がある人工システムの構築を目指した。DNAモデルシステムを用いれば、反応ユニットの精密設計が可能で、末端のパルミトイル修飾により脂質ラフトモデル膜への分配、すなわち顕微鏡下のイメージングが可能となると考えた。具体的には、生体と同様の反応経路を辿るフラビンの1重項励起状態からのフラビン-Trp・1重項ラジカルペア形成過程の実現、最終的な3重項ラジカルペアの長寿命化の実現、巨大一枚膜の脂質ラフト相 (厳密には、脂質ラフトモデル膜の秩序液体相) を反応場とし、フラビンの蛍光評価によって磁場の顕微鏡下イメージングが可能なDNAモデルシステムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

脂質ラフトモデル膜のマイクロドメインに分配するペプチド核酸 (PNA) - DNA 2重鎖中のフラビンと Trp を対象とし、フラビンを青色光で励起したときに Trp から電子移動が起こるようにモデル系を設計した (図1)。

(PNA - DNA 2重鎖も評価を行ったが、4. 研究成果に後述するような結果となり、本目的のモデル系としては適さないことが分かった。DNA - DNA 2重鎖については、合成が困難なこともあり、イメージングまで到達できるモデル系を構築することを優先し、比較的容易に構築できる PNA - DNA 2重鎖を重点的に検討する方針に途中で切り替えたため、モデル系として評価できていない。)

PNA - DNA 2重鎖系に関する研究方法を以下に記した。

(1) まず、N末端のリシン (Lys) にジパルミトイル修飾した PNA と Alexa Fluor 488 を修飾した相補鎖 DNA が脂質ラフトモデル膜のドメインに分配するか、顕微鏡下でイメージングができる可能性があるかどうかを調べた。DOPC/DPPC/Chol (2:2:1) の組成を持つ脂質ラフトモデル膜をエレクトロフォーメーション法により作製した、その際に、既知の無秩序液体相に分配する蛍光プローブ Texas Red-DHPE を混合し、秩序液体相 (lo)、無秩序液体相 (ld) のどちらに分配するか評価できるようにしておいた。作製したベシクル懸濁液に、パルミトイル修飾 PNA と Alexa Fluor 488 修飾 DNA を加え、室温で1日静置した後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した (励起波長は、Alexa Fluor 488 : 488 nm、Texas Red-DHPE : 561 nm を用いた)。DNA 鎖中の Alexa Fluor 488 の蛍光消光が、PNA 鎖中の Trp によって起こるか、その蛍光強度を定量的に評価できるか検討した。4. 研究成果に後述するように、プリミティブな系が構築できていることを確認した。

(2) (1)の結果を受け、Alexa Fluor 488 をフラビンに置き換え、図1のような系の構築を進めた。結果的に、フラビン骨格が疎水的なため、リンカー部位で親水性を補えるようなリンカー構造の探索を必要とした。水溶性のリボフラビンとグルタル酸無水物を出発原料として、比較的親水的なカルボン酸構造を持つフラビン分子を合成した。活性カルボン酸とした後、受託合成により、3'-末端にリンカーを介して修飾されたアミノ基とアミド結合で連結した DNA オリゴマー (フラビン修飾 DNA) を得た。

(3) (1)と同様に、エレクトロフォーメーション法で巨大一枚膜構造をもつ脂質ラフトモデル膜を調製し、PNA - フラビン修飾 DNA 2重鎖の膜ドメインへの分配について、共焦点レーザー

顕微鏡を用いて評価した（励起波長は、フラビン：488 nm）。図1のような PNA - DNA 2重鎖中でフラビンの蛍光消光を評価する際に、（大気雰囲気下では、フラビンの光安定性に問題があり評価できなかったため）不活性ガス雰囲気下で観察できるようにセットアップした。

(4) Trp 含有 PNA - フラビン修飾 DNA 2重鎖における磁気センシング評価（ラジカルペアの反応機構と寿命評価）を、青色光ナノ秒パルスレーザー（励起波長：450 nm、レーザーパワー：~2 mJ）を用いた時間分解電子スピン共鳴（ESR）測定により行った。この評価については、分子科学研究所の機器センター施設利用により遂行した。

4. 研究成果

(1) Trp 含有 PNA - Alexa Fluor 488 修飾 DNA 2重鎖

脂質ラフトモデル膜を利用し、マイクロドメイン場における核酸類縁体相補鎖間の光誘起電子移動を可視的に観測できるシステムを構築した。エレクトロフォーメーション法で調製した巨大一枚膜（GUV）の l_o 相（マイクロドメイン）に選択的に分配する Trp（電子ドナー）含有 PNA と電子アクセプター（Alexa Fluor 488）を修飾した相補 DNA を用いて、顕微鏡下の電子アクセプターの蛍光消光を観測した。コントロールとの比較により、蛍光寿命（ダイナミクス）も含め、定量的に評価できた。

(2) Trp 含有 PNA - フラビン修飾 DNA 2重鎖（図1）

リボフラビンとグルタル酸無水物を出発原料とするフラビン分子の合成により、フラビン修飾 DNA の水溶性の向上、PNA との 2重鎖形成、脂質ラフトモデル膜の l_o 相への分配を達成した。

コントロール実験との比較から、顕微鏡下で相補 PNA 鎖中の Trp によるフラビン蛍光消光を評価できた。

Trp 含有 PNA - フラビン修飾 DNA 2重鎖を用い、5 °C における 10%DMSO 水溶液中での時間分解 ESR 測定で、光励起 1.8 μ s 後に、3450 G 付近の磁場領域において発光（E）/吸収（A）の分極パターンが観測できた。この結果は、反応中間体としてラジカルペアが生成しており、1重項状態を前駆体とするタンパク質と同じ反応経路を辿っていることを示唆し、モデル系の構築に成功したと考えられる。ラジカルペアの寿命は、現状でも比較的長寿命であるが、さらに、生体系で電子移動に関与すると報告されているアミノ酸（Trp 3 連、Tyr、Asn）の精密配置が可能である。

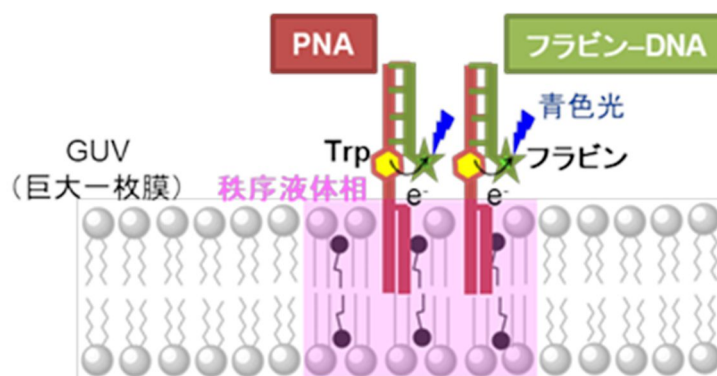


図1. 本研究で構築した磁気イメージングシステムの模式図

(3) PNA - フラビン修飾 PNA 2重鎖

PNA 2重鎖が脂質ラフトモデル膜に与える影響について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて時間経過を追跡した。パルミトイル修飾 PNA が l_o 相に分配している状態で、（フラビン修飾）PNA を添加した直後（ l_o 相に分配）から 10 分程度で l_o - l_d 相界面が局所的に破壊されていくことを発見した。その過程で、小胞化とプローブの凝集する（元々、 l_d 相に分配していた標識プローブも界面に集積してくる）ことを観測した。この現象は、コントロール実験との比較から、PNA/PNA 2重鎖の再分配と再分配により形成される l_o - l_d 相界面の大きい曲率に誘起されるのではないかと考えられる。本研究の PNA 2重鎖は膜活性ペプチドとみなせるので、生細胞を用い時間的空間的に詳細に検討すれば、膜機能の解明に貢献できる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miura Tomoaki, Maeda Kiminori, Oka Yoshimi, Ikoma Tadaaki	4. 巻 122
2. 論文標題 Gigantic Magnetic Field Effect on the Long-Lived Intermolecular Charge-Separated State Created at the Nonionic Bilayer Membrane	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 12173 ~ 12183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b08389	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 Oka Yoshimi, Shishino Hisae	4. 巻 2
2. 論文標題 Fluorescence Imaging of Disrupted Interfaces between Liquid-Ordered and Liquid-Disordered Domains by a Flavin-Labeled PNA Duplex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 2912 ~ 2915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.7b00581	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 Oka Yoshimi, Shishino Hisae	4. 巻 46
2. 論文標題 Fluorescence Quenching of Alexa Fluor 488-labeled DNA by Complementary Trp-containing PNA Partitioned in Liquid-ordered Domains	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.170755	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡 芳美
2. 発表標題 Synthesis and Characterization of Flavin-(Trp) ₃ Molecular Tetrad Related to Protein Magnetic Sensor
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oka Yoshimi
2. 発表標題 Construction of Artificial Flavoproteins in a Mimicking Cell Membrane as a Reaction Field
3. 学会等名 The 20th RIES-HOKUDAI International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 芳美
2. 発表標題 新規合成フラビン分子の自己集合化と脱プロトン化、Cs(I)との錯形成
3. 学会等名 第13回分子科学討論会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 芳美
2. 発表標題 Construction of Artificial Flavoproteins in a Mimicking Cell Membrane as a Reaction Field
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oka Yoshimi
2. 発表標題 Probe Aggregation into the Interfaces between Mimicking Raft and Non-Raft Domains, Induced by Peptide Nucleic Acid (PNA) Duplexes
3. 学会等名 The 256th ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡 芳美、宍野 久枝
2. 発表標題 フラビンラベルしたペプチド核酸二重鎖による秩序 - 無秩序液体相界面の破壊現象における蛍光観察
3. 学会等名 第21回液晶化学研究会シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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