

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655155

研究課題名(和文) モレキュラービーコンの一分子レベル観測

研究課題名(英文) Monitoring the function of molecular beacon type probe at the single molecule level

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：様々な蛍光分子を種々の位置に修飾したDNAを化学合成し、蛍光相関分光(FCS)測定により、蛍光分子の発光挙動を1分子レベルで見たときに観測される発光の点滅(=blinking)において蛍光分子が光っていない時間(=OFF time)からモレキュラービーコンの1分子レベル観測を試みた。OFF timeは、蛍光分子が溶媒から遮蔽されて、蛍光分子の三重項励起状態と酸素の反応速度が遅くなるほど長くなることがわかった。これにより、蛍光分子をモレキュラービーコンのループ部位に導入することにより、検出したいターゲット鎖をblinkingの観測により1分子レベルで検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：DNA site specifically modified with fluorescent molecule were synthesized. The lifetime of a fluorescent molecule in the triplet excited state was measured, which is reflected in the duration of the off time during the blinking of the fluorescence (tOFF). tOFF was determined by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). It was demonstrated that the more a fluorescent molecule is exposed to a solvent, the faster its triplet excited state is quenched by molecular oxygen, resulting in a decrease of tOFF. DNA conformational change between a duplex and hairpin structure, function of the molecular beacon type probe, was successfully monitored by the blinking triggered by the changes in the solvent accessibility of the fluorescent molecule.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA 一分子観測 生物有機化学 蛍光相関分光 blinking 三重項励起状態

1. 研究開始当初の背景

モレキュラービーコンは、片方の末端に蛍光分子、もう一方の末端にクエンチャーを有する 1 本鎖 DNA プローブである。通常はヘアピン型構造を形成し、蛍光分子とクエンチャーが近接するため蛍光が消光されているが (閉状態) 相補鎖存在下により二本鎖が形成されると (開状態) 蛍光強度が増加することを利用して相補的な遺伝子を検出することができ、遺伝子診断やライブセルイメージングなどに幅広く応用されている。極めて一般性の高いプローブであることから、産業界を含む非常に多くの研究者により、高感度かつ高精度なモニター法の開発が試みられている。より高感度にモレキュラービーコンをモニターする手法として、1 分子レベルでの蛍光観測法がある。しかしながら、蛍光強度は蛍光分子の光退色等の様々な理由により変化し、十分な精度が得られないという問題が残されていた。

2. 研究の目的

モレキュラービーコンは蛍光強度によりモニターされてきたが、速度定数に基づく測定はより再現性が高く、より高精度なモレキュラービーコン開閉の観測を可能にする着想した。分子 1 つ 1 つを見たい際に顕著となる現象に基づいた分析法を開発すれば、極微量の試料、究極的には 1 分子からの情報読み出しが可能になると期待される。そのような現象の中から、傾向の点滅過程 (= blinking) に注目し、モレキュラービーコン型プローブの 1 分子レベルで検出することを目的とした。蛍光分子の励起三重項状態、あるいはラジカルアニオン状態と、酸素や種々の添加物との反応速度に依存して引きこされる blinking に着目し、速度定数の違いに基づきモレキュラービーコンを 1 分子レベルでモニターする、高感度かつ高精度な新手法を開発する。

3. 研究の方法

様々な位置にアミノリンカーを有する DNA を設計・合成し、一分子蛍光観測が可能な種々の蛍光分子のスクシンイミド活性エステルとの反応により DNA 中に導入する。T_m測定により各 DNA の熱力学的安定性を調べ、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS) を用いて一分子レベルでの蛍光測定を行い、傾向の blinking を観測する。蛍光分子励起三重項状態、ラジカルアニオン状態と溶液中の酸素との反応速度を決定する。分子間反応は、蛍光分子の溶媒接触表面積に大きく影響を受けるため、モレキュラービーコンの開閉に伴い、蛍光分子の溶媒接触表面積が大きく変化し、分子間反応速度の差としてモレキュラービーコンの機能を読み取ることがキーとなる。DNA の構築・FCS 測定による評価、のサイクルを繰り返し、blinking の仕組みを理解し制御することによ

り、モレキュラービーコン型プローブの機能を 1 分子レベルでモニター可能な、高感度かつ高精度な新手法を開発する。

4. 研究成果

蛍光分子として、Alexa 532、TAMRA、Alexa 633 などの蛍光色素を用いて、種々の位置にこれら蛍光分子を修飾した DNA を化学合成した。蛍光相関分光 (FCS) 測定により、蛍光の blinking において蛍光分子から発光が消えている時間 (= OFF time) からモレキュラービーコンの 1 分子レベル観測を試みた。しかしながら、これら蛍光分子を用いた場合、項間交差速度が遅く三重項励起状態がモレキュラービーコンの構造変化に伴う蛍光分子周辺的环境変化が明確に観測されない、還元状態と酸素との反応速度が遅すぎる (> 1 ms) 等の問題に直面した。検討に伴い、蛍光分子として Rhodamine 6G を用いたところ、1 分子レベル蛍光観測において三重項励起状態生成に伴う blinking が観測され、以下 Rhodamine 6G を蛍光分子として用いて、三重項励起状態の生成・減衰に伴い観測される傾向の blinking について調べた。

Rhodamine 6G をアミノリンカー (X) を介して、一本鎖構造、二本鎖構造、そしてヘアピンのループ部位に導入した DNA を合成し、blinking を観測した (図 2)。X を用いること

一本鎖 : TCAAGGCAA**X**ATGCGTACA

二本鎖 : TCAAGGCAA**X**ATGCGTACA
AGTTCCGTT-TACGCATGT

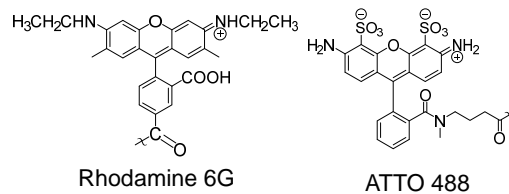
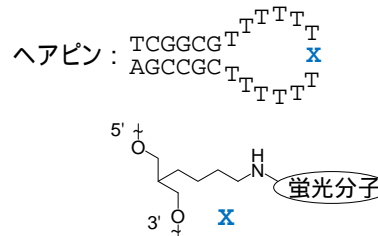


図 1. 蛍光分子を導入した DNA 配列、アミノリンカー (X) および蛍光分子 Rhodamine 6G と ATTO 488 の化学構造。

により、二本鎖中では蛍光分子が核酸塩基対間にスタックし溶媒から遮蔽されることを狙った。一方、一本鎖構造やヘアピン構造のループ部位では、溶媒にさらされると考えた。blinking において、OFF time は、二本鎖構造に比べ、1 本鎖やヘアピンループ部位に Rhodamine 6G が導入された場合、すなわち、Rhodamine 6G が溶媒にさらされているほど、

短くなることがわかった。そこで、モレキュラービーコンタイププローブのヘアピン部位に Rhodamine 6G を導入することにより、ターゲット非存在下では Rhodamine 6G が溶媒にさらされ、OFF time が短くなるのに対し、ターゲット存在下では二本鎖中に埋もれることにより、OFF time が長くなり、OFF time の測定により、一分子レベルでモレキュラービーコンタイププローブの機能を観測することに成功した(図2)。しかしながら、ター

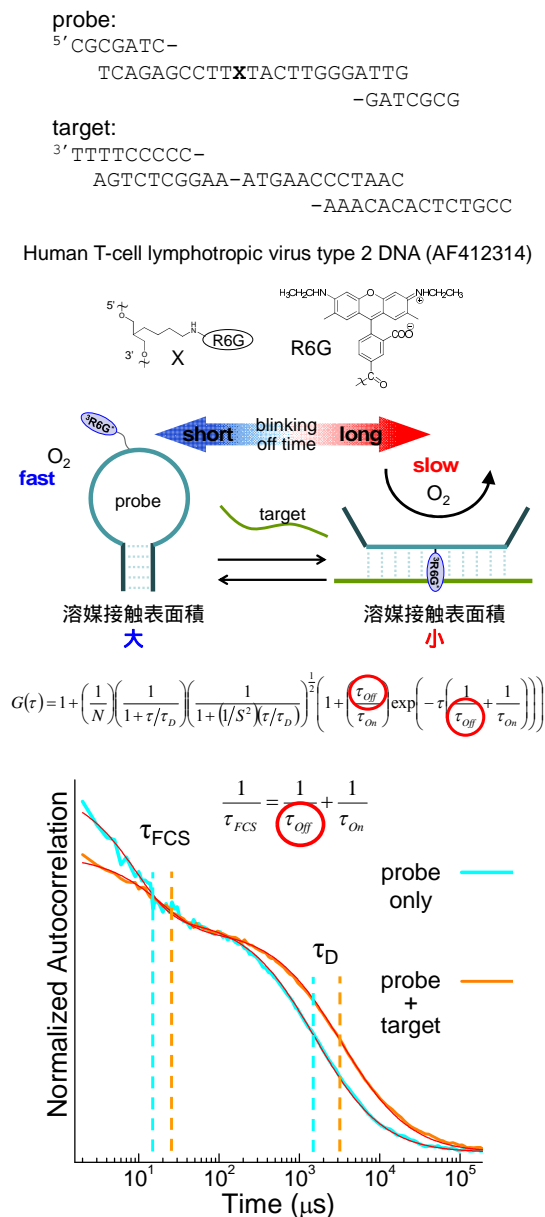


図2. モレキュラービーコン型プローブのFCS測定によるターゲットDNA鎖の検出。ターゲットDNA鎖の有無により、Rhodamine 6Gの三重項励起状態と酸素の分子間反応速度の増減に伴いOFF timeが変化し、OFF time測定により1分子レベルでその機能追跡が可能であることが示された。

ゲットの有無によるOFF timeの差が小さいという問題点が浮かび上がった。そこで、分

子中に負電荷を帯びたスルホン酸基を二つ有する ATTO 488 を用いたところ、このような構造依存性は見られずすべての配列で短い off time が得られた。これにより、Rhodamine 6G は、構造によらずある程度近傍の核酸塩基とスタックし溶媒から遮蔽される傾向にあるのに対し、ATTO 488 は常に溶媒に突き出していることがわかった。蛍光分子の疎水性/親水性を調節することにより、より感度良くモレキュラービーコン型プローブの機能を追跡可能な蛍光分子を設計することが示された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計11件)

- Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Atsushi Maruyama, Detection of single-nucleotide variations by monitoring the blinking of fluorescence induced by charge transfer in DNA, *ChemBioChem*, 査読有, 14, 2013, 1430-1433. DOI: 10.1002/cbic.201300380
- Tadao Takada, Yuta Kawano, Akane Ashida, Mitsunobu Nakamura, Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Kazushige Yamana, Synthesis and charge transferability of DNA possessing a naphthalimide photosensitizer at an extrahelical position, *Tetrahedron Letters*, 査読有, 54, 2013, 4796-4799. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.06.140
- Yasuko Osakada, Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Kinetics of charge transfer through DNA across guanine-cytosine repeats intervened by adenine-thymine base pair(s), *Bulletin of Chemical Society of Japan*, 査読有, 86, 2013, 25-30. DOI: 10.1246/bcsj.20120224
- Yasuko Osakada, Kiyohiko Kawai, Takashi Tachikawa, Mamoru Fujitsuka, Kazuki tainaka, Shozo Tero-Kubota, Tetsuro Majima, Generation of singlet oxygen during photosensitized one-electron oxidation of DNA, *Chemistry A European Journal*, 査読有, 18, 2012, 1060-1063. DOI: 10.1002/chem.201101964
- Man Jae Park, Mamoru Fujitsuka, Haruhiro Nishitera, Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Excess electron transfer dynamics in DNA hairpins conjugated with *N,N*-dimethylaminopyrene as a photosensitizing electron donor, *Chemical Communications*, 査読有, 48, 2012, 11008-11010. DOI: 10.1039/C2CC36054C
- Man Jae Park, Mamoru Fujitsuka, Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Excess-electron injection and transfer in terthiophene-modified DNA: terthiophene as a photosensitizing electron donor for thymine, cytosine, and adenine, *Chemistry A European Journal*, 査読有, 18, 2012, 2056-2062. DOI:10.1002/chem.201103663

Kiyohiko Kawai, Mitsuo Hayashi, Tetsuro Majima, Hole transfer in LNA and 5-me-2'-deoxyzebularine-modified DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, 134, 2012, 9406-9409. DOI: 10.1021/ja302641e

Kiyohiko Kawai, Mitsuo Hayashi, Tetsuro Majima, HOMO energy gap dependence of hole-transfer kinetics in DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, 134, 2012, 4806-4811. DOI: 10.1021/ja2109213

川井 清彦, 分子の輝き方から情報を読み出す - 1 分子レベル蛍光観測による DNA 内電荷移動測定 -, 社団法人日本化学会生体機能関連部会 NEWS LETTER, 査読無, 26-4, 2012, 8-11. <http://seitai.chemistry.or.jp/newsletter/NL26-04.pdf>

Man Jae Park, Mamoru Fujitsuka, Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Direct measurement of the dynamics of excess electron transfer through consecutive thymine sequence in DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, 133, 2011, 15320-15323. DOI: 10.1021/ja2068017

Kiyohiko Kawai, Matsutani Eri, Atsushi Maruyama, Tetsuro Majima, Probing the charge-transfer dynamics in DNA at the single-molecule level, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, 133, 2011, 15568-15577. DOI: 10.1021/ja206325m

[学会発表](計 14 件)

川井 清彦, 蛍光分子の溶媒接触表面積に基づく blinking, 日本化学会第 94 回春季年会, 2014 年 3 月 30 日, 名古屋(名古屋大学)

Kiyohiko Kawai, Detection of Single-Nucleotide Variations by Monitoring the Blinking Triggered by Charge Separation in DNA, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013 年 11 月 14 日, 横浜(神奈川大学)

川井 清彦, Blinking 観測による DNA 1 塩基違いの検出, 光化学討論会 2013, 2013 年 9 月 12 日, 松山(愛媛大学)

川井 清彦, DNA 内ホール移動における電荷非局在化, 日本化学会第 93 回春季年会, 2013 年 3 月 24 日, 草津(立命館大学)

川井 清彦, DNA 内空間を介したホール移動の高速化, 高次空間の創発と機能開発第 9 回公開シンポジウム, 2013 年 3 月 14 日, 神戸(シーサイドホテル舞子ピラ)

Kiyohiko Kawai, Single molecule level DNA analysis based on charge transfer measurement, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 2012 年 11 月 28-29 日, 東京

(東京工業大学)

Kiyohiko Kawai, Hole-transfer dynamics determined by DNA flexibility, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2012 年 11 月 16 日, 名古屋(名古屋大学)

Kiyohiko Kawai, Dynamics of Hole Transfer through DNA across Guanine-Cytosine Repeats, 4th International Symposium on Emergence of Highly Elaborated π -Space and Its Function, 2012 年 11 月 13 日, 浜松(浜名湖ロイヤルホテル)

Kiyohiko Kawai, Hole Transfer through DNA: Mechanism and Single-Molecule Level Analysis, Japan-India Bilateral Seminar on Supramolecular Nanomaterials for Energy Innovation, 2012 年 10 月 14 日, 高松(アルファあなぶきホール)

川井 清彦, DNA の柔軟性がホール移動速度に与える影響, 光化学討論会 2012, 2012 年 9 月 14 日, 東京(東京工業大学)

川井 清彦, DNA 内ホール移動速度の核酸塩基 HOMO レベル依存性, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 2012 年 9 月 6 日, 札幌(北海道大学)

Kiyohiko Kawai, CHARGE TRANSFER DYNAMICS IN DNA AT THE SINGLE MOLECULE LEVEL, XX International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2012 年 8 月 6 日, Montreal (Canada)

川井 清彦, DNA の柔軟化による DNA 内ホール移動の高速化, 高次空間の創発と機能開発第 8 回公開シンポジウム, 2012 年 7 月 19 日, 加賀(ホテルアローレ)

川井 清彦, HOMO レベル改変による DNA 内電荷移動の高速化, 日本化学会第 91 回春季年会, 2012 年 3 月 26 日, 名古屋(名古屋大学)

[図書](計 4 件)

Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Springer-Verlag, Inc., Photoinduced charge-separation in DNA, Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids, in press.

川井 清彦, 朝倉書店, DNA の光損傷・光回復, 光化学の事典, 印刷中.

川井 清彦, シーエムシー出版, HOMO ギャップ改変および柔軟化による DNA 分子ワイヤーの構築, 高次空間の創発と機能開発, 2013, 245 (213-216).

Kiyohiko Kawai, Tetsuro Majima, Springer-Verlag, Inc., Kinetics of long-range oxidative electron transfer through DNA, Radical and radical ion reactivity, in nucleic acid chemistry, 2011, 458(129-142).

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