

研 究 報 告 書

「蛍光の blinking を自在に操る分子技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研 究 者: 川井 清彦

1. 研究のねらい

光を吸収し蛍光を放つ蛍光分子は、情報を読み分けるツールとして対象物質の標識に用いられ、病理臨床検査、遺伝子診断、生体イメージング、そして分子生物学の基礎研究など、様々な分野で活用されている。対象物質ごとに異なる色(波長)で発光する蛍光分子を結合して発光を観測することにより、どのような物質が、どこに、どれくらい存在するかがわかる。近年の蛍光観測技術の発展に伴い、1 つ1つの蛍光分子から放たれる蛍光を観測することが可能となってきた。1 分子レベル蛍光観測は、極微量の試料、究極的には 1 分子からの情報の読み出しを可能にする。しかしながら、1 分子蛍光観測を行なうためには、高価で特殊な装置と熟練した技術が必要となり、その利用は基礎研究レベルにとどまっている。その大きな要因として、狙った蛍光標識からの発光を、バックグラウンドノイズに由来する背景光から区別することが難しいことが挙げられる。これは、蛍光標識を光らせるために光を照射(光励起)する際、蛍光標識した対象物質以外の物質・分子から放たれる光が、発光効率は低いものの無数に存在することにより、非常に大きなバックグラウンドノイズとなるためである。分子1つ1つに着目した際に重要となる、初めて現れる個々の分子の物理化学反応を基盤とした分析法を開発すれば、正確に 1 分子からの蛍光を区別して観測可能になると期待される。本研究では、1 分子蛍光観測において顕著となる物理化学現象の一例として、分子から放たれる光の点滅挙動「分子の輝き=blinking」に着目した。1つの蛍光分子を繰り返し光励起して、何らかの化学変化により蛍光分子が光を吸収しても発光できない無発光状態に移行すると、元の状態に戻るまでの間、蛍光分子からの発光が観測されなくなり、blinking が起こる。このような現象は、複数の分子から発せられる蛍光を観測している時には現れず、1 分子レベル蛍光観測に特徴的な現象である。本研究では、DNA をプラットフォームとして用いて、蛍光分子やクエンチャー等を様々な空間配置に固定したDNAを有機合成化学的手法により構築した。1 分子蛍光観測により、blinking を生じるメカニズムを各素反応の速度定数に基づいて理解し、得られた知見を利用して blinking を自在に制御する分子技術の創出を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

蛍光の blinking を自在に制御可能とするため、blinking が起こる仕組みをまず理解し、得られた知見をもとに制御・活用することに取り組んだ。blinking は、光を照射しても発光できない OFF 状態が $1 \mu\text{s}$ より長く持続して存在し、かつ、繰り返し生じることにより観測される(図 1)。本研究では、項間交差に伴い生じる励起三重項状態、光電子移動による還元状態、そして光異性化により生じる異性体を OFF 状態とする blinking に注目した。DNA をプラットフォームとして用いて、DNA 鎖の任意の位置にアミノリンカーを導入可能なアミダイト体を合成し、DNA 自動合成機に基づくプログラムされた同時多数合成を利用して、蛍光分子を様々な空間配置に固定した DNA ライブラリーを構築した。DNA は配列に応じて様々な高次構造を形成することができ、1 本鎖、ヘアピンループ、2 本鎖、バルジ構造、3 本鎖構造中に蛍光分子を配置し、周囲の環境が blinking に与える影響を調べた。蛍光相関分光法を用いて blinking を観測し、OFF 状態の持続時間 $= \tau_{\text{OFF}}$ を測定し、blinking の仕組みを各素反応の速度定数に基づき説明することを目指した。励起三重項状態を OFF 状態とする blinking においては、励起三重項状態の優れた消光剤である溶存酸素分子との分子間反応により ON 状態が再生される。蛍光分子が溶媒に突き出しているほど τ_{OFF} が短くなる、すなわち、反応が速く進行することを見出した。還元剤(犠牲酸化剤:リン酸化ビタミンC(VcP))存在下で励起三重項状態をラジカルアニオン状態へと変換し、かさ高い金属錯体の酸化剤 FeDTPA との電子移動反応による blinking に置き換えたところ、核酸構造の変化に伴い τ_{OFF} をより大きく変化させることに成功した。次に、トランス体で発光し、シス体では発光しない蛍光分子 Cy3 の blinking を検討した。Cy3 を DNA の様々な構造に導入したところ、三本鎖構造特異的に熱逆異性化速度が遅くなり、 τ_{OFF} が長くなることを見出した。アデニンの 8 位にアミノ基を導入し、三本鎖構造を熱力学的に安定化したところ、 τ_{OFF} がさらに長くなることが見出され、蛍光分子周辺の剛直性により Cy3 の blinking を制御できることが示された(論文2)。

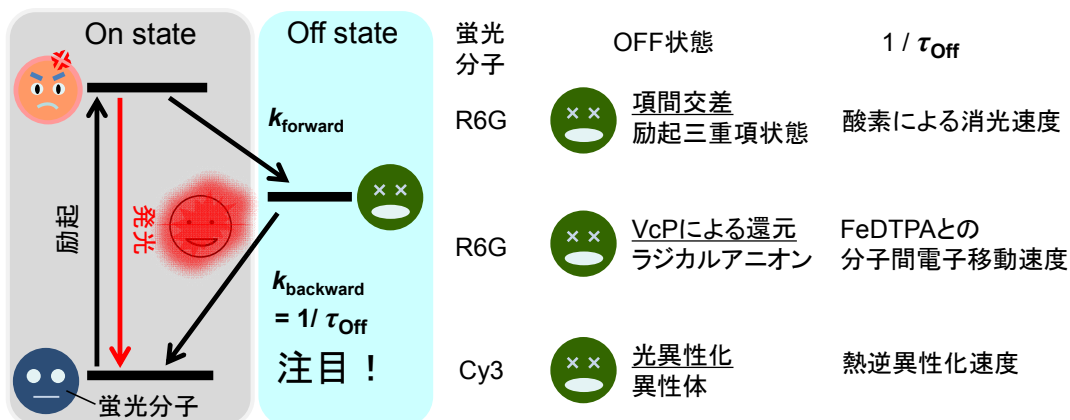


図 1. 蛍光の blinking が起こる仕組み。光照射に伴い、蛍光分子の励起・発光サイクルが繰り返し起きている状態が blinking における ON 状態。光照射していても、発光できない状態が blinking における OFF 状態となる。各 OFF 状態に応じて、OFF 状態の持続時間の逆数から様々な反応速度を決定できる。

(2) 詳細

研究テーマA「分子間反応による blinking」

多くの蛍光分子において、励起三重項状態を OFF 状態とする blinking が起こる。励起三重項状態は比較的長寿命であるが、空気飽和下の溶液中では主にその優れた消光剤である酸素とのエネルギー移動反応(消光反応)により、発光可能な ON 状態へと戻る。本テーマでは、分子間反応が蛍光分子の置かれた環境「どれくらい溶媒にさらされているか、遮蔽されているか」に基づく blinking の制御を検討した。DNA をプラットフォームとして用いて、蛍光分子を DNA 中に導入し、DNA 高次構造変化が blinking に与える影響を調べた。ヘアピンループ部位にアミノリンカーを介して、蛍光分子 R6G を固定し、ループ部位に相補的な配列が無い場合、蛍光分子は溶媒へと突き出すが、相補鎖が存在し二本鎖が形成されると蛍光分子は DNA 二本鎖にインターカレートして溶液から遮蔽されるように分子設計した。狙ったように、OFF 状態の長さ(τ_{OFF})は二本鎖中で長くなり、蛍光分子の周囲の環境により、分子間反応に由来する blinking を制御できることが示された(論文1)。

次に、還元剤(犠牲酸化剤)存在下で励起三重項状態をラジカルアニオン状態へと変換し、ラジカルアニオンを OFF 状態とする blinking の制御を検討した。励起三重項状態に由来する blinking では酸素分子の分子サイズが小さいため、蛍光分子周囲の環境変化に伴う blinking パターンの変化は 2 倍未満と小さかった。そこで、かさ高い金属錯体を酸化剤として用いることにより、より大きな blinking パターンの制御を試みた。種々の条件検討の結果、還元剤としてリン酸化ビタミン C (VcP)、酸化剤として FeDTPA を用いることにより、酸化還元に由来する blinking を制御することに成功した。狙ったように、DNA の構造変化により生じる蛍光分子周辺環境の違いにより、blinking パターンをより大きく変化可能となった(図 3、論文3)。

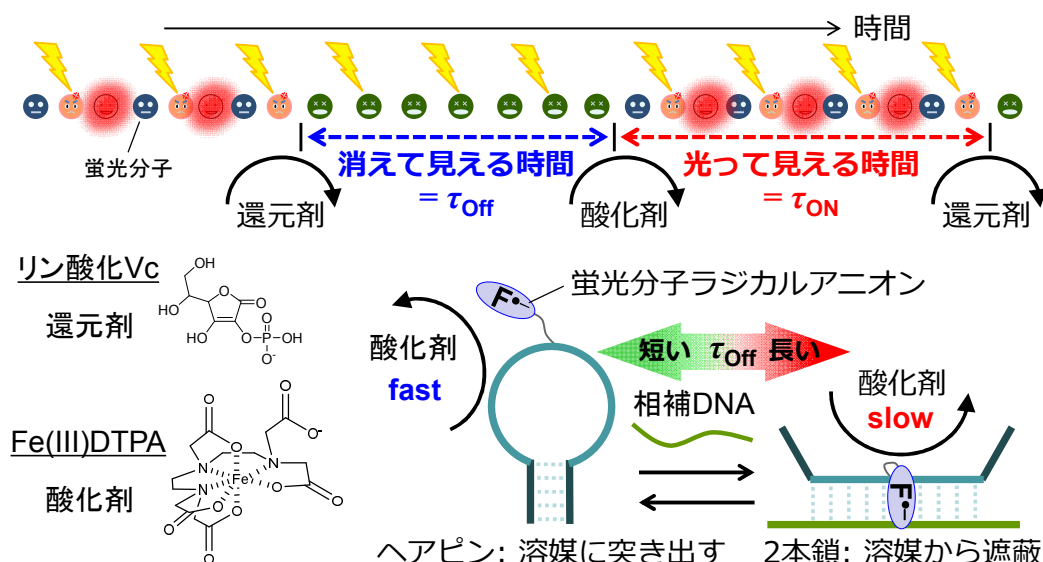


図 3. 蛍光分子の分子間酸化・還元反応に基づく blinking。

研究テーマ B「光異性化反応による blinking」

光励起により生じる異性体が無蛍光性=OFF 状態となる blinking 挙動を示す蛍光分子 Cy3

に注目し、blinking パターンの制御を検討した。OFF 状態は熱逆異性化反応により ON 状態へと戻り、 $1/\tau_{\text{OFF}}$ が熱逆異性化速度に対応する。Cy3 の構造を核酸構造に重ね合わせると、その分子構造がちょうど DNA 三本鎖構造の断面図と同程度であることを見出し、Cy3 の異性化反応が立体障害により三本鎖構造特異的に遅くなるのではと考えた。狙ったように、 τ_{OFF} は三本鎖構造特異的に長くなり、 π スタッキングにより光異性化に伴う blinking を制御可能であることを見出した。三本鎖構造の安定化が blinking パターンに与える影響を調べたところ、アデニンの 8 位にアミノ基を導入し三本目の鎖と二本鎖の結合をより強くすると、 τ_{OFF} が三本鎖構造特異的に顕著に増加した。一方、二本鎖を安定化するアデニンの 2 位のアミノ基は blinking に大きな影響を及ぼさなかった。これにより、構造の剛直性により光異性化に伴う blinking パターンを制御できることが示された(図 3、論文2)。

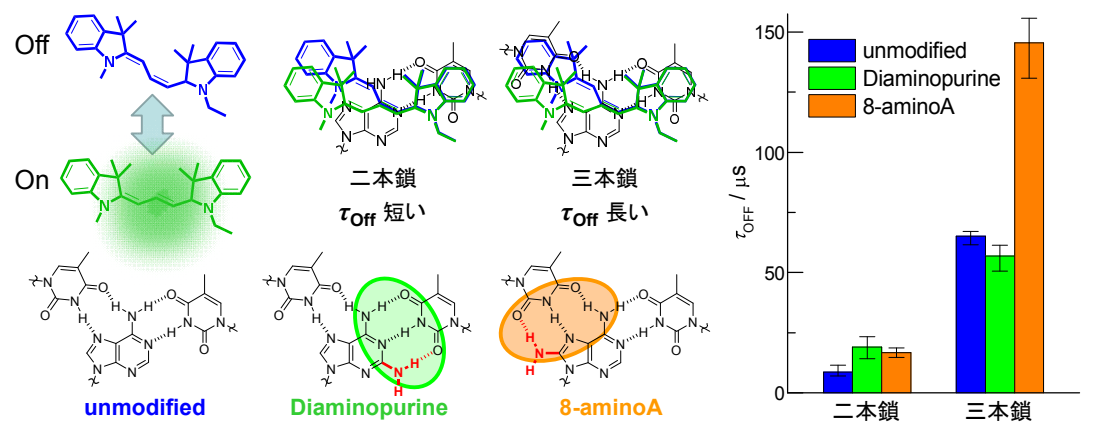


図 3. 蛍光分子 Cy3 の光異性化反応による blinking

3. 今後の展開

本研究により blinking の仕組みの理解が進み、様々な点滅パターンで blinking する分子創製のコセプトがいくつか確立された。これにより、blinking により 1 分子として識別可能な分子標識の開発が期待される。blinking は蛍光分子周辺の環境に応じて変化することが明らかになったが、これは言い換えると、蛍光分子が置かれた周囲の環境情報を blinking 観測により調べられることを意味する。生体分子にとどまらず、様々な対象物の物性や機能を蛍光分子修飾により 1 分子レベルで探求可能になると期待される。blinking 現象が超解像顕微鏡の観測原理に取り入れられているように、blinking している分子は極めて近い位置に存在していても識別可能であり、高い分解能で現象を理解するツールとしての発展にも期待が持たれる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

DNA をプラットフォームとして用いて蛍光分子を様々な環境下に配置することにより、蛍光分子の blinking を支配する種々の化学反応に関する知見が深まった。この際、複数の蛍光分子の合成、および、簡便に blinking 観測可能な機器の購入に研究費を効果的に活用した。これにより、任意の blinking パターンで発光する蛍光分子を開発する分子技術の創出につながった。blinking する蛍光分子で対象物を標識することにより、1 分子としての識別・検出が可能と

なると期待される。また、blinking パターンが周囲の環境に応じて変化することが明らかになり、blinking 観測により蛍光分子の置かれた周囲の環境情報が得られることが示された。これにより、blinking 観測に基づく 1 分子分析・診断法へと発展することが期待される。

一方、実際に 1 分子検出で可能であることを実証する実験は現在進行中であり、早期の達成が望まれる。目標の一つとして掲げた、より高感度に blinking の観測を可能とする複数の蛍光分子の共同的な発光を制御する分子技術に関しては、1 名での研究実施体制では有機合成を十分に展開できず今後の課題となった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

小規模の研究実施体制の中、同時並列合成可能なDNA合成機の利用に着目し、受託合成を利用して蛍光分子周辺の環境を様々に変化させた種々の分子ラブラリーを構築した。簡便にblinking観測可能な機器を設計・導入して蛍光のblinkingを分光学的に追跡することにより、blinkingを制御する上で重要となるいくつかの仕組みが明らかになった。分子創製に基づきblinkingを理解し、制御・活用する研究分野はほぼ未開拓の状況にあり、分析・診断において究極の目標の一つとなる1分子測定を可能とする分子技術としての発展が望まれる。1分子を対象とした測定が可能となれば、低コスト、短時間での分析・診断を可能とする新しい分野が開拓されると期待され、特に医療分野における診断時間の短縮、コストの削減、新たな治療選択の創出などの波及効果が期待される。1分子分析・診断の実証に関する成果は発展途上段階にあるが、近い将来に発表できるものと期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. K. Kawai, T. Koshimo, A. Maruyama, T. Majima. Blinking triggered by the change in the solvent accessibility of a fluorescent molecule. *Chem. Commun.* 2014, 50 10478–10481
2. K. Kawai, A. Maruyama. Triple helix conformation-specific blinking of Cy3 in DNA. *Chem. Commun.* 2015, 51, 4861–4864
3. K. Kawai, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima. DNA microenvironment monitored by controlling redox blinking. *ChemPhysChem*. 2015, 16, 3590–3594

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. 核酸の反応・動きを 1 分子レベルで調べる
生体分子工学部門主催 PROS セミナー、松山(愛媛大)、2016 年 6 月 10 日.
2. DNA の構造を蛍光の点滅=blinking で調べる:1 分子分析を目指して
第 36 回 歯工学連携講演会、小倉(九工大)、2015 年 11 月 11 日.

3. 蛍光 blinking 観測による核酸構造の 1 分子レベル分析
The 36th CMS Seminar、福岡(九州大)、2015 年 6 月 25 日.
4. DNA 内電荷移動を蛍光の blinking で見る
第 8 回分子ナノテクノロジーセンター講演会、姫路(兵庫県大)、2015 年 3 月 6 日.
5. 核酸配列 1 塩基違いの 1 分子レベル識別
名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センターシンポジウム
『ケミカルバイオロジーの最前線』、名古屋(名大)、2014 年 11 月 21 日.
6. 蛍光の blinking から核酸構造を読む
第 16 回 NMMS セミナー、名古屋(名大)、2014 年 9 月 19 日.
簡便な Blinking 観測を可能とする蛍光相関分光装置の開発