

報告番号	乙 第 7400 号
------	------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Study on Structural Analysis of Nucleic Acids and Energy Migration between Identical Chromophores by using Orientation-dependent FRET System (配向依存 FRET システムを使用した核酸構造解析と同種色素間エネルギー移動に関する研究)

氏 名 河合 隼人

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、配向依存型の FRET システムを設計し、またそれを使用して、天然および非天然核酸の構造解析と、同種色素間におけるエネルギー移動機構の実験的な解明を行った。

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は光励起された Donor 色素から Acceptor 色素へエネルギーが移動する光化学現象であり、そのエネルギー移動の有無を利用した生体分子の検出や相互作用解析などに幅広く用いられている。このエネルギー移動効率(FRET 効率)は蛍光色素間の距離及び配向に依存することが知られている。しかし一般に色素の配向制御は困難であり、多くの場合 FRET の距離依存性のみが利用されてきた。特に色素の想定外な配向での固定化を防ぐために、長いリンカーを介して色素を結合させ、色素が自由に運動可能な環境とすることで、配向依存性を最小限に抑える設計もしばしば見られる。

一方で、DNA は強固な二重らせん構造を形成し、かつ適切に色素を導入することで色素の配向も制御できるため、FRET の配向依存性を利用するのに効果的な足場として機能する。その中でも D-threoninol を介して DNA 二重鎖内に色素を導入する手法は、色素配向を制御しつつ任意の色素を任意の位置に容易に導入することができ、FRET 効率の距離依

存性と配向依存性を観察可能な FRET システムを設計することが可能になる。

その中において本研究では、この距離と配向が制御された FRET システムの応用を目指した。1 つ目には、FRET 効率から溶液中における核酸の構造パラメータを解析して、溶液中における核酸構造情報の取得に関する検討を行った。2 つ目には、一般的に FRET の色素ペアとして用いられる異なる色素ではなく、同種色素間におけるエネルギー移動の詳細な検討を行った。

本論文は全 5 章から構成されている。各章の要旨を以下に示す。

第 1 章 研究の背景及び目的

第 1 章では、本研究の背景と目的について記した。FRET の理論式や FRET の距離と配向依存性についてまとめるとともに、DNA を用いた距離と配向に依存する FRET システムに関する先行研究や従来の核酸構造解析についてのまとめとその課題を挙げた。また同種色素間のエネルギー移動の重要性やその検討を行う上での課題も挙げた。

第 2 章 配向依存 FRET システムを用いた nick および gap を含む DNA 二重鎖の構造と柔軟性の解析

DNA の構造と柔軟性の違いは、DNA 結合タンパク質による認識に重要な役割を果たす。第 2 章では、Pyrene 及び Perylene を D-threosinol を介して DNA 二重鎖内に導入した FRET システムの距離と配向依存性を利用することで、nick および gap を含む DNA 二重鎖の溶液中における構造と柔軟性を解析する新しい手法について記した。その配列設計を Fig.1 に示す。いずれの検討においても Pyrene と Perylene 間の塩基対数を変化させた際の FRET 効率の変化を利用して解析を実施した。

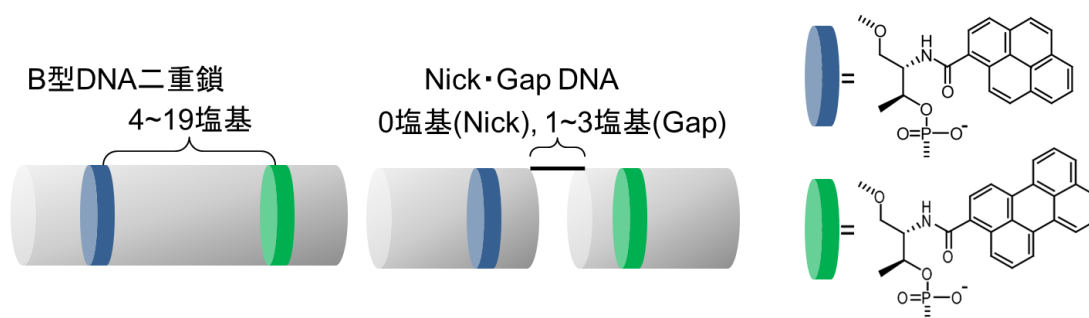


Fig 1. Schematic illustrations of canonical and nicked/gapped duplexes and chemical structures of donor and acceptor.

最初に標準的な B 型 DNA 二重鎖の構造パラメータを分析した。蛍光スペクトルより算出された FRET 効率の実験値は、一般的に報告される核酸構造パラメータに基づいて計算された理論値とよく一致し、本システムを用いることで溶液中における核酸構造情報を容易に取得することが可能となることを示した。

次に、nick および gap を含む DNA 二重鎖について解析をした。nick を導入した場合、B 型 DNA 二重鎖と同様の配向依存性が観察されるものの、若干ながら配向依存性が弱まる傾向を示した。このことから、DNA 二重鎖の柔軟性が増加していることが示された。

1~3 塩基の gap を導入した DNA の解析も実施した。1 塩基の gap 導入では nick と比較して色素配向が変化するのみに留まっていたものの、2 塩基 gap では nick と比較して配向依存性がさらに弱まり、3 塩基 gap となると配向依存性は観察されなかった。このことから gap の導入により DNA 二重鎖の柔軟性は高まり、3 塩基 gap では二重鎖どうしがスタックせず自由に運動できることが示唆された。

第 3 章 Perylene-Cy3 FRET システムを用いた光反応性 DNA の構造解析

第 2 章で示した Pyrene-Perylene ペアを用いた構造解析は有用な手法ではあるが、2 点課題が存在した。1 つはフェルスター半径が約 11 bp と短く、長鎖の DNA の構造解析が行えない点、もう 1 つは Pyrene の励起光が 345 nm と短波長であるため、紫外光を吸収する分子、特に紫外光励起で反応する分子を含む DNA の構造解析は困難である点である。そこで第 3 章では、Donor に Perylene、Acceptor に Cy3 を利用し、よりフェルスター半径が長く可視光で励起可能な新たな FRET システムの開発と、このシステムを利用して紫外光反応性分子である Stilbene を導入した DNA の構造解析を目指した。

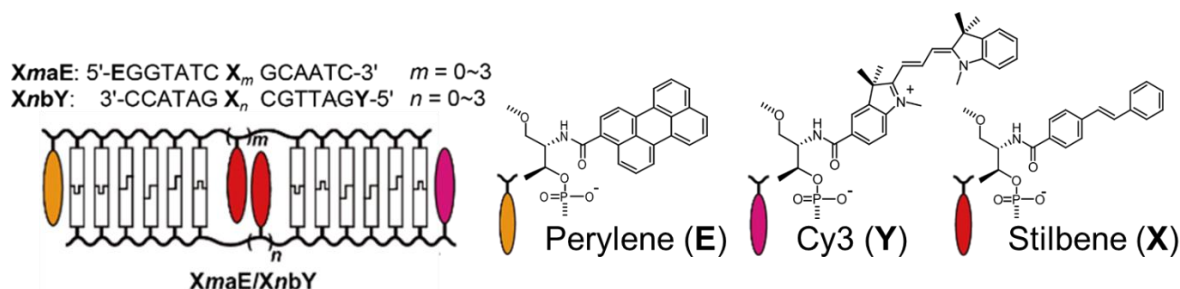


Fig 2. Schematic illustrations of analyzed duplexes. Chemical structures are also shown.

最初に DNA 二重鎖に Perylene と Cy3 を D-threoninol を介して導入し、FRET の配向依存性が観察されるかどうか検証を行った。蛍光色素間の塩基対数を 12~19 に変化させ蛍光スペクトル測定を行い、Perylene の蛍光強度の変化から FRET 効率を算出した。結果、FRET の距離に加え配向依存性が確認され、色素配向が厳密に制御されていることが示された。また FRET 効率の実験値は一般的な B 型二重らせん構造の構造パラメータを元に計算した理論値と一致した。Perylene-Cy3 を用いた FRET システムにおいても核酸構造解析が可能であることが明らかとなった。

次にこの開発した FRET システムを利用して DNA 二重鎖中における Stilbene 会合体の構造解析を行った。Stilbene の数を 1~6 に変化させ蛍光スペクトル測定を行い、FRET 効率を算出した(Fig.2)。FRET 効率は Stilbene の数の増加に伴って単調に減少しており、配

向が変化していないと考えられた。FRET 効率の実測値は Stilbene が平行なはしご状に会合しているとした理論曲線と一致し、Stilbene はらせんをまかず平行に積み重なった構造であることが示唆された(Fig.3)。

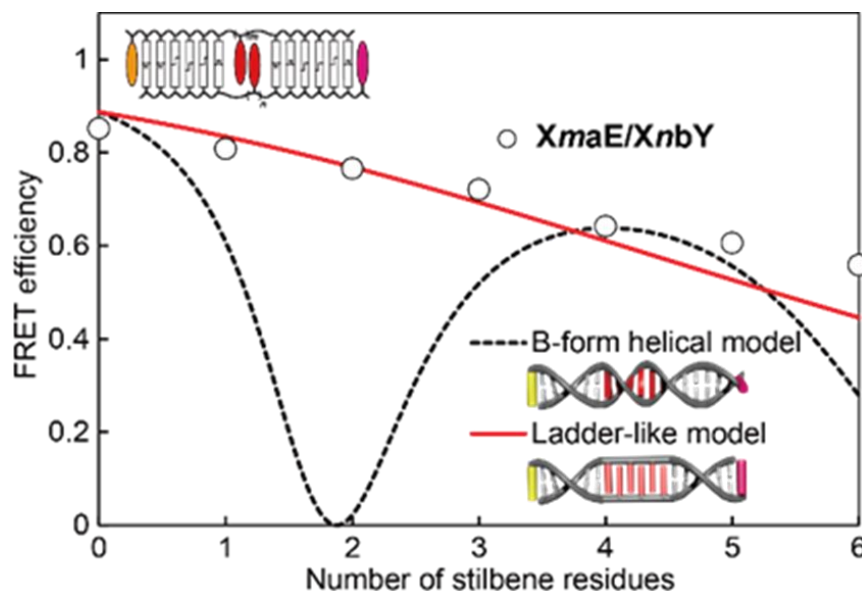


Fig 3. FRET efficiencies of **XmaE/XnbY** duplexes. Theoretical curves calculated based on the B-form helical model (dotted line) and the ladder-like model (red line) are also shown.

D-threoninol を介して Stilbene が 2 分子導入された DNA 二重鎖は、紫外光照射による [2+2]光二量化反応により二重鎖間が架橋されることが知られている。この反応前後における DNA 構造変化についての FRET を用いた解析も併せて行った。反応前後で FRET 効率はほぼ変化せず、二重らせん構造をほぼそのまま保ちながら二重鎖が架橋されている事が示唆された(Fig.4)。

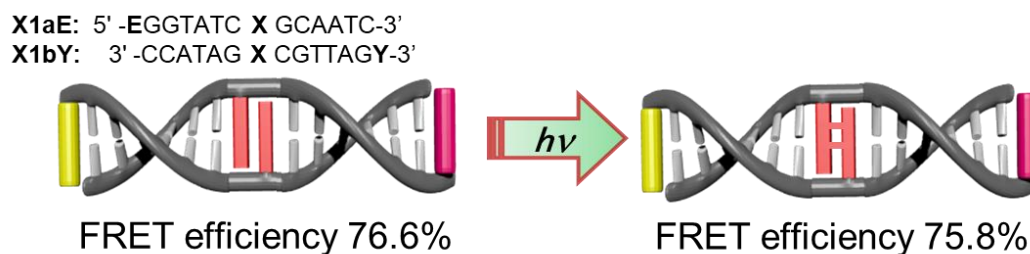


Fig 4. Schematic illustrations of stilbene-modified DNA (**X1aE/X1bY**) before and after UV light irradiation.

第4章 DNAを用いた同種色素間におけるエネルギーマイグレーションの研究

同種色素間のエネルギーマイグレーションは天然の光合成において極めて重要な過程である。しかし異種色素間での FRET と異なり、同種色素間でエネルギーが移動しても Donor 発光と Acceptor 発光を区別できない。このため実験的な機構の解明を困難にしており、エネルギーマイグレーションは異種色素間における FRET 理論と同一の理論で説明可能であるか不明であった。そこで第4章では、配向依存型 FRET システムを構築可能な DNA 骨格を採用し、さらに D-threoninol を介して蛍光色素に加え消光色素を導入することによって、同種色素間のエネルギー移動に関する詳細な検討を行った。

配列設計を Fig.5 に示す。DNA 二重鎖中に蛍光色素として Perylene を 2 分、そのうち 1 分子の正面に消光色素として Anthraquinone を 1 分子導入した。これにより Anthraquinone と隣接した Perylene は消光し、さらにもし Perylene 間でエネルギー移動が発生した場合、Anthraquinone と離れた Perylene も消光すると考えられる。またこの Perylene の蛍光の消光度からエネルギー移動効率を算出できると考えた。Perylene 間の塩基対数を 2~13 まで変化させる事で、色素間の距離や配向がエネルギーマイグレーション効率に与える影響を実験的に検討した。

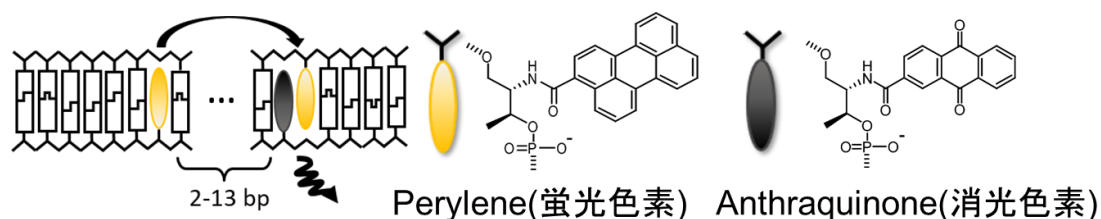


Fig 5. Schematic illustrations of duplexes containing perylene and anthraquinone.

蛍光スペクトル測定及び蛍光寿命測定の結果からエネルギーマイグレーション効率を算出したところ、Perylene 間の塩基対数の増加に伴ってマイグレーション効率は減少し、更に単調に変化せず極小極大が観察された。このことはマイグレーション効率が Perylene 間の距離変化だけではなく、配向の変化に依存していることを示している。さらにこのエネルギーマイグレーション効率の実験値と FRET 理論に基づいた理論値を比較したところ、両者は非常に良い一致を示した(Fig.6)。

Perylene 間でのエネルギーマイグレーションは異種色素間における FRET 理論と同一の理論で説明可能であることを実験的に明らかにする事に成功した。

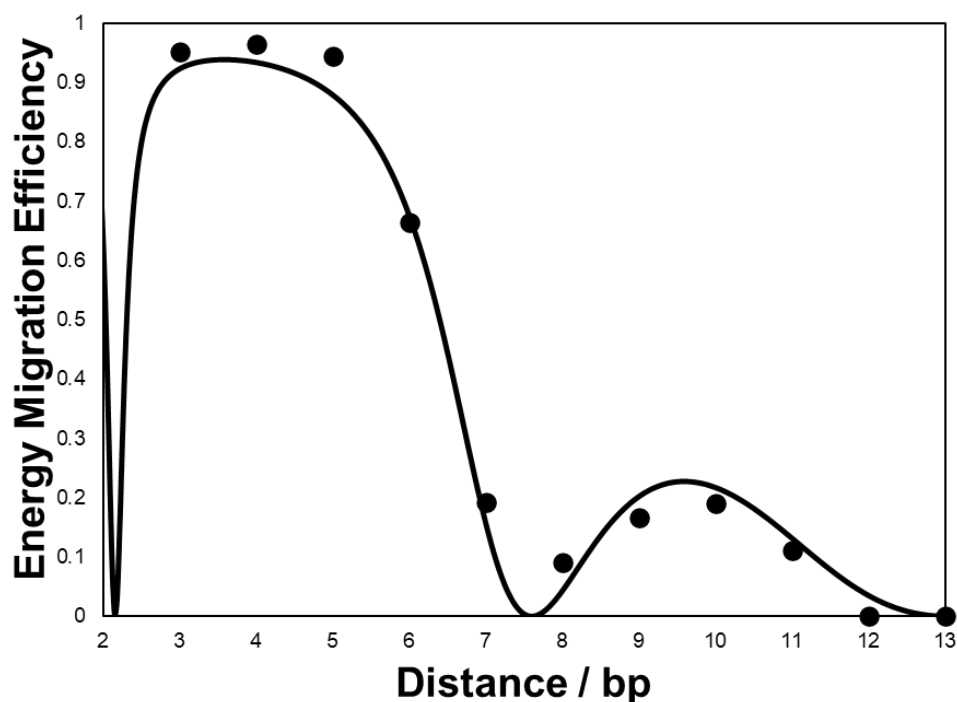


Fig 6. Energy migration efficiency of duplexes containing perylene and anthraquinone. Experimentally obtained efficiencies from lifetimes are shown. The theoretically curve calculated assuming random orientations is shown.

第5章 2つの Pyrene 間の homo FRET の定量分析

第5章では、第4章と続いて同様の設計を用いて、同種色素間のエネルギー移動 (homo FRET) の検討について記した。第4章との大きな違いとして、蛍光色素として Pyrene を採用し、他の同種色素間でのエネルギーマイグレーションも FRET 理論で説明可能かどうかの調査を目的とした。更に消光色素として採用する Anthraquinone は Pyrene-Anthraquinone 間での異なる色素へも FRET が起きる色素ペアであり、FRET が起きる環境においても、Pyrene-Pyrene 間のエネルギーマイグレーションが発生し、かつ FRET 理論で説明可能かどうか調査するために検討を行った。

蛍光スペクトル測定及び蛍光寿命測定の結果から、Pyrene-Anthraquinone 間での FRET の影響を除いたうえでの Pyrene 間のエネルギー移動効率の実験値と FRET 理論に基づいた理論値を比較したところ、両者は非常に良い一致を示した(Fig.7)。

Pyrene 間でもエネルギーマイグレーションは発生し、かつ異種色素間での FRET が同時に発生した場合でも、FRET 理論で説明可能なエネルギーマイグレーション(homo FRET)を正しく評価できることを実験的に明らかにした。

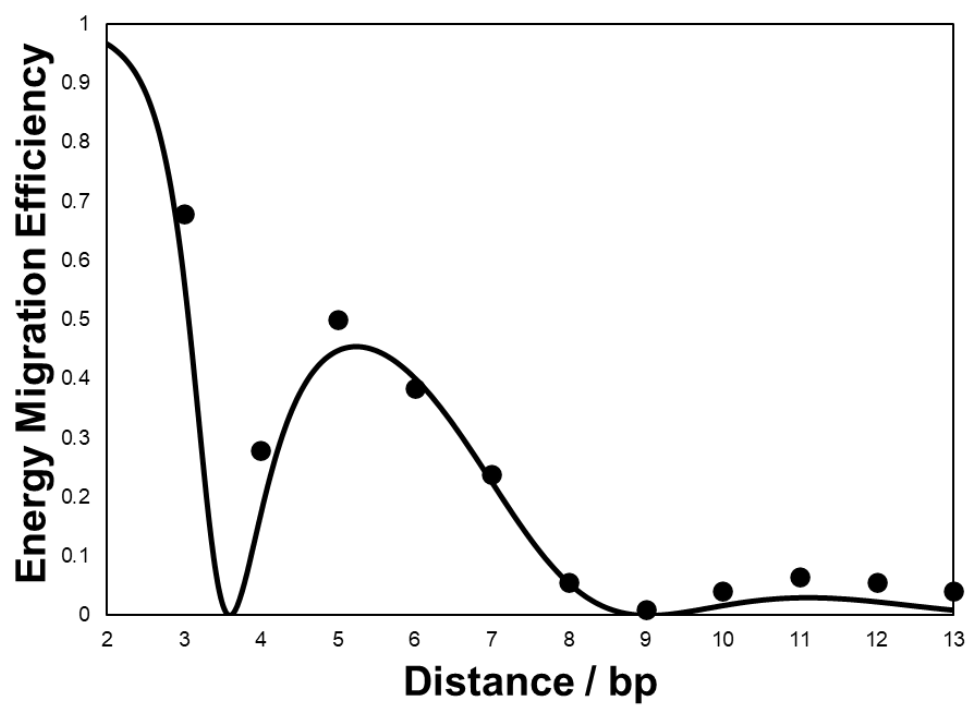


Fig 7. Energy migration efficiency of duplexes containing Pyrene and anthraquinone. Experimentally obtained efficiencies from lifetimes are shown. The theoretically curve calculated assuming random orientations is shown.