

28. 光揺らぎ観測による点変異 1 分子診断

東京工業大学生命理工学院 教授 川井 清彦

概要

我々は、1 分子から放出される蛍光が分子の化学反応に伴って点滅する現象（blinking）に着目し、この規則的な光の揺らぎパターンを利用して、無数の発光輝点の中から 1 分子を見つけ出し、そのパターンに基づく 1 分子分析および診断を達成してきました。特に、DNA 分子内の電子移動による蛍光分子の酸化・還元に伴う blinking を利用した点変異診断に取り組み、細胞ブロックから作成した病理切片上で mRNA の 1 分子その場点変異診断を報告しました。しかし、適用可能な配列が非常に限られており、汎用性に限界がありました。本課題では、より広範な対象に対して測定可能で、かつ、blinking が安定して長時間観測されるロバストな 1 分子診断法の開発に取り組みました。具体的には、分子間電子移動による酸化・還元 blinking を用いた点変異診断を行いました。従来の研究で使用していた蛍光分子 R6G を、光耐久性が高く、1 分子測定が可能で、さらに核酸の一本鎖と二本鎖構造の違いをより明確に読み取ることができる ATTO 655 に置き換えることにより、点変異を 1 分子レベルで検出することに成功しました。DNA 内電子移動系では、blinking の観測時間が最長でも 10 秒程度であるのに対し、分子間電子移動を利用することで 10 分以上の blinking を観測でき、従来の方法と比較して数十倍安定した点変異検出系を構築することに成功しました。

背景および目的

近年の顕微鏡観測技術の発展に伴い、分子 1 つ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、顕微鏡観察において背景光を完全に排除することは難しく、単に輝点を見つける、すなわち「光るか光らないか」という情報のみで 1 分子を検出し、分析・診断することは困難である。代表者は、1 分子から放たれる蛍光が分子の化学反応に伴って点滅する現象＝ブリンキングに注目し、この現象を活用した 1 分子分析・診断法の開発に取り組んできた。ブリンキングは、その規則的な光の揺らぎパターンを利用して、背景光や無数の発光輝点の中から 1 分子を検出し、さらにそのパターンから反応速度を測定することにより、電子移動反応や分子運動などの反応速度の違いを解析することで 1 分子分析・診断を可能にする（引用文献 1）。代表者は、核酸中の電子移動速度が配列に大きく依存することを報告している。昨年、細胞ブロックから作成した病理切片において、プローブ DNA と細胞内の mRNA から形成されたハイブリッド中の電子移動速度をブリンキングによって 1 分子レベルで測定し、1 分子その場点変異診断を達成した（引用文献 2）。しかしながら、核酸中の電子移動は測定可能な配列に限られ、核酸の酸化損傷によりブリンキングの観測可能時間が数秒程度と短いため、汎用性に限界があった。本研究では、より広範な対象に対して測定可能で、かつブリンキングが安定して長時間観測できる、ロバスト性の高い 1 分子診断法の開発に取り組む。

方法

溶液中に酸化剤と還元剤を共存させると、蛍光分子との間で連続的な分子間電子移動による酸化・還元反応が進行し、その結果としてブリンキングが生じる（主要文献3）。この条件では、蛍光分子の光退色につながる反応活性種である三重項励起状態、ラジカルアニオン状態、およびラジカルカチオン状態が1 μ s 以内に速やかに消去されるため、蛍光分子の光耐久性が大きく向上する。分子間電子移動は分子衝突反応によって進行するため、核酸に結合した蛍光分子周辺の構造変化がブリンキングパターンに変化をもたらす。本課題では、点突然変異が蛍光分子周辺の環境変化を引き起こすことを利用し、ブリンキング測定に基づく点突然変異の検出に取り組む。

結果および考察

1分を超えて1分子蛍光 blinking が観測され、かつ核酸の1本鎖と2本鎖を読み分けることが可能であることを報告している蛍光分子 ATTO655 を修飾したプローブ核酸を合成した。還元剤としてリン酸化アスコルビン酸、酸化剤として FeDTPA を用いて ATTO655 を blinking させ、blinking 速度を測定した。1分子測定で現在大きな課題となっているのは、観測される速度の大きな不均一性である。プローブ核酸／ターゲット核酸の完全相補二本鎖では、ガウシアン分布に近い反応時定数の分布が観測された。興味深いことに、プローブ核酸／一塩基欠損変異ターゲット DNA から形成された二本鎖 DNA では、完全相補二本鎖で観測された時定数とは異なる2つのガウシアン状のピークが観測された。当初の計画では、blinking 速度の違いに基づいて変異を読み分ける予定であったが、速度が2成分あることによって、より明確な読み分けが可能であることが示唆された。

反応時定数の不均一性の原因は未だ不明であるが、今回、一塩基欠損を持つターゲット核酸で観測された2つのピークは、分オーダーの観測時間内において安定な2つの核酸コンフォメーションの存在を示唆している。このコンフォメーション間の構造転移の有無、そしてもし存在すればその速度を明らかにすることは、基礎科学的に非常に意義があり、現在詳細な検討を進めている。

(完)

引用文献

- 1) Kawai, K.*, Maruyama, A., Kinetics of photoinduced reactions at the single-molecule level: The KACB Method, *Chemistry - A European Journal*, 26 (35), 7740-7746 (2020).
- 2) Fan, S., Xu, J., Osakada, Y., Hashimoto, K., Takayama, K., Natsume, A., Hirano, M., Maruyama, A., Fujitsuka, M., Kawai, Kumi*, Kawai, K.*, Electron transfer kinetics through nucleic acids untangled by single-molecular fluorescence blinking, *Chem*, 8 (11), 3109-3119 (2022).
- 3) Kawai, K.*, Fujitsuka, M., Maruyama, A., Single-molecule study of redox reaction kinetics by observing fluorescence blinking, *Accounts of Chemical Research*, 54 (4), 1001-1010 (2021).
- 4) Miyata, T., Shimada, N., Maruyama, A.*, Kawai, K.*, Fluorescence Redox Blinking Adaptable to Structural Analysis of Nucleic Acids, *Chemistry - A European Journal*, 24 (26), 6755-6761 (2018).
- 5) Kawai, K.*, Miyata, T., Shimada, N., Ito, S., Miyasaka, H., Maruyama, A.*, Single-Molecule Monitoring of the Structural Switching Dynamics of Nucleic Acids through Controlling Fluorescence Blinking, *Angewandte Chemie, International Edition*, 56, 15329-15333 (2017)