

DNA中の電荷移動



技術解説

高田 忠雄*, 真嶋 哲朗**

Charge transfer in DNA

Key Words : DNA, charge transfer, single-molecule imaging, photocurrent

1. はじめに

DNA はアデニン - チミン(A-T)とグアニン - シトシン(G-C)の核酸塩基対の面と面が重なったスタック構造をとっている生体分子である(図1)。DNAの立体構造が解明されて以降, DNA中を電荷が移動するかもしれないという概念は, 40年以上も前から持たれていた。しかしながら, 1990年代に入るまでDNA中の電荷移動に関する詳細な研究は行われていなかった。

1990年代になってDNA合成技術が発展し, 比較的容易に修飾DNA合成が可能となったので, DNA中の電荷移動の研究が大きく進展した。電子ドナー性およびアクセプター性の分子を共有結合でDNAの任意の位置に導入し(化学修飾), ドナー分子とアクセプター分子間の距離や核酸塩基配列を変えることによって, DNA中の電荷移動特性が分子レベルで調べられるようになった。1993年にカルフォルニア工科大学のBartonらのグループは, DNA中の

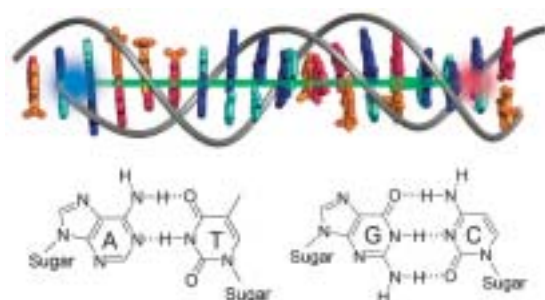


図1. DNA構造と電荷移動.

電荷移動が距離にほとんど依存しないことを報告した¹⁾。この研究に端を発し, DNA中の電荷移動が著しく注目を集めるようになった。DNAが2nmの紐状物質であることから, DNAをナノサイズの電線(DNA分子ワイヤー)としたナノエレクトロニクスを確立できるのではとの要望があり, 様々な分野から多くの研究者がDNA中の電荷移動の研究に参入し, 精力的に研究が行われてきた。DNAの相補的な塩基配列認識を利用して, 微細構造やパターンがナノレベルで制御可能であるため, 従来とは全く異なった新しいナノテクノロジーのデバイスとしての応用が期待されている。

Lewisらは, ループ部分にアクセプター分子のスチルベンを修飾したヘアピン型DNAを設計し, スチルベンとG塩基との間の光誘起電子移動の距離依存性を調べ, 電子移動速度は比較的強く距離に依存する結果を報告した²⁾。それ以前の報告では修飾分子の位置が不明瞭であり, そのために電子移動速度が距離に依存しないという結果になっていたのではないかと指摘されていた。構造が明確なDNAにおいての研究から, DNAは電子移動のための媒体としては, 共有結合鎖に比較して優れているが, 分子ワイヤーの性質は有していないと結論付けられた。

当初期待された, 長距離にわたって電子的相互作用



*Tadao TAKADA

1977年2月生
大阪大学大学院工学研究科・分子化学専攻
後期課程修了(2004年)
現在, 大阪大学産業科学研究所(真嶋研究室)博士研究員 工学博士 光化学, 核酸化学
TEL: 03-6879-8496
FAX: 03-6879-8499
E-mail: takada45@sanken.osaka-u.ac.jp



**Tetsuro MAJIMA

1952年7月生
大阪大学大学院工学研究科・石油化学専攻
後期課程修了(1980年)
現在, 大阪大学産業科学研究所 教授
工学博士 光化学, 放射線化学
TEL: 06-6879-8495
FAX: 06-6879-8499
E-mail: majima@sanken.osaka-u.ac.jp

用がある分子ワイヤーの性質を DNA は有していないことが明らかになってきたが、その一方で、DNA の特徴を反映した様々な興味深い電荷移動特性が見出されてきた³⁾。DNA 中の電荷移動は、基礎的な電子・電荷移動の化学から、遺伝子の損傷、ナノデバイス、マテリアルサイエンスまで幅広い分野に関連しているので、様々な研究分野で注目を集めているトピックスの一つである。したがって、DNA 中の電荷移動の特性や電荷の反応性を分子レベルで理解することは極めて重要である。本稿では、我々の研究グループがこれまで行ってきた DNA 中のホール移動の機構、速度論について概説し、特に、一分子レベルの DNA 中のホール移動の観測、ホール移動を利用したバイオセンシングなどへの応用や将来性について紹介する。

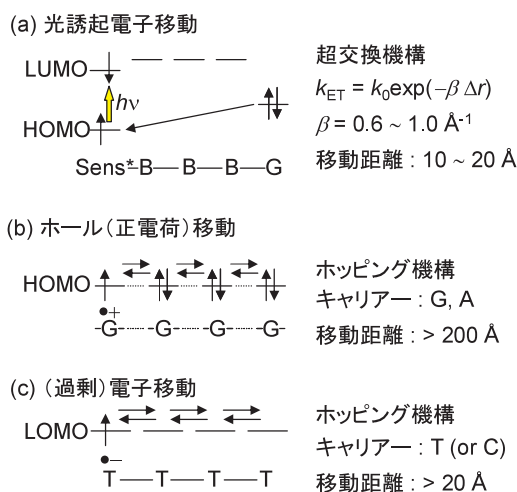


図 2 . DNA 中の電荷移動の分類 .

2 . DNA 中の電荷移動

DNA 中の電荷移動は図 2 に示すように、光誘起電子移動、ホール (正電荷) 移動と (過剰) 電子移動に分類される。光エネルギーを駆動力とした光誘起電子移動において、その速度の距離依存性を表すパラメータ (β) は $0.6 \sim 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ と求められている⁴⁾。この値は、電子移動速度は塩基の数が一つ増えるごとに、10分の1程度減少することを示しており、DNA を媒体とした電子の直接的な移動はあまり効率的ではなく、分子ワイヤーとは言えないことを意味している。

一方、光電子移動反応や酸化反応によって生じた正電荷 (ホール) は、DNA 中を自由に長距離 (10 nm

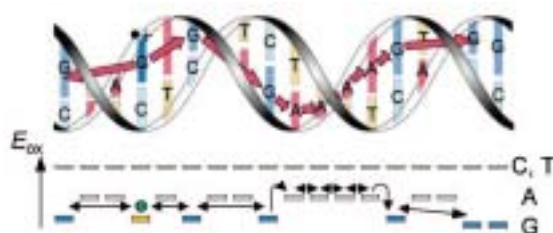


図 3 . 多段階ホールホッピングによる長距離ホール移動 .

以上) 移動することが分かってきた⁵⁻⁷⁾。現在では、ホールの多段階ホッピング機構が、DNA 中の長距離ホール移動を合理的に説明できる最も簡単な反応機構として受け入れられている (図 3)⁶⁾。この機構では、ホールは酸化電位の最も低い G に捕捉され、G 間をホッピングすることで長距離移動すると考えられている。

光誘起電子移動およびホール移動に比べて、一電子還元によって生じた過剰な電子の移動には不明な点が多い。最近になって、過剰電子が T 上をホッピングによって効率よく移動することを示唆する研究が報告されたが^{8,9)}、速度論的な研究報告についてはほとんど例がなく、十分な理解が進んでいないのが現状である。

3 . DNA 中のホール移動の機構とその速度

DNA 中に生じたホールは、DNA の π -スタック構造を通じて長距離移動する。我々の研究グループは、DNA 中に生じたホールが、どのような速度で移動するのか、どのような配列で効率よく移動するのか、電荷移動を支配する因子は何かなどを明らかにするために、レーザーを用いた時間分解測定法によるホール移動の実時間観測を行い、ホール移動の機構および速度を調べてきた¹⁰⁻¹⁴⁾。

レーザー時間分解測定法は化学反応の時間変化の実時間観測が可能であり、速度を決定する有力な手法である。図 4 にレーザー励起によって予想される反応機構を示した。電子ドナー分子となるナフタリイミド (NI) を 355 nm のナノ秒レーザーパルスで励起を行い DNA 中にホールを注入すると、ホールは近傍の G に捕捉される。NI と近傍の G が十分離れるように設計しておくこと、電荷の再結合が非常に遅くなる。結果として、生じたホールは DNA 中を自由に移動する。逆の末端にホールアクセプター分子であるフェノチアジン (PTZ) を修飾しておくこと、

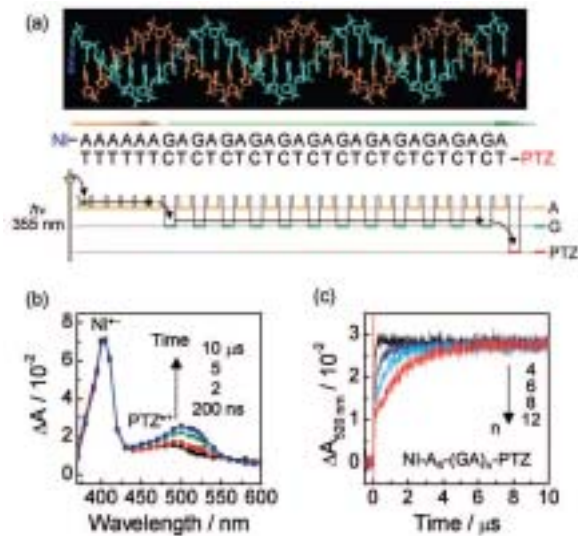


図4. レーザー時間分解過渡吸収法によるDNA中のホール移動の実時間観測.

ホールがPTZに捕捉されてPTZラジカルカチオン(PTZ^{•+})が生じる。この過渡種の生成を時間分解過渡吸収法で観測することによって、DNAの末端から逆の末端までホールが移動する速度の直接決定を行った¹³⁾。

レーザーパルスによってNiを励起すると励起直後はNiラジカルアニオンに帰属される400nmの吸収のみが観測され、それに遅れてPTZ^{•+}に帰属される520nmの吸収の生成が観測された(図4b)。PTZ^{•+}の生成は、Niに近接するAに生じたホールがPTZまで移動してきたことを意味する。GAおよびGTの繰り返し配列において、ホールは10nmの距離をそれぞれ数マイクロ秒、数十マイクロ秒かけて移動することが分かった(図4c)。ホール移動速度と距離との関係を解析した結果、DNA中に生じたホールは、確かにG塩基間をホッピングして移動することが明らかとなった。

4. 一分子蛍光測定によるDNA中の電荷移動の観測

一分子計測法は近年急速に普及してきた比較的新しい実験手法である。生体分子の反応素過程の解析やコンフォメーション変化を一分子レベルで観測することが可能であり、これまで調べることが困難であった現象を理解、解明するための手法として広く用いられている。一分子計測法では、個々の分子を直接観測するため、反応同期をとる必要がなく、反応の中間状態やダイナミクスを調べるのに適してい

る。また、一つの分子からその情報を読み出すことが出来るという点で、究極のセンシング技術である。このように一分子計測法は非常に優れた技術であるが、これまでDNA中のホール移動の研究には適応されてこなかった。我々は、ホール移動による蛍光色素の酸化反応を利用することで、一分子レベルでのDNA中のホール移動の観測法を確立することに成功した¹⁵⁾。

ホールを受け取ることは、その分子自身が一電子酸化を受けることである。これは、ホール移動によって遠隔分子の酸化反応が誘起されることを意味する。そこでホール移動による蛍光色素の酸化を利用することにした。DNAの末端に電子アクセプターとなるNi、逆の末端に蛍光色素(FI:TMRもしくはAlexa532)をラベルしたDNAを設計・合成した。UV照射によってNiを励起するとDNA中にホールが注入され、生じたホールが蛍光色素まで到達すれば色素は酸化されて酸化物(Flox)となり発光しなくなる。すなわち発光シグナルがonからoffへと変化すると予測される。この原理に基づいて、蛍光色素の蛍光応答からDNAを移動するホールを一分子レベルで検出した(図5)。

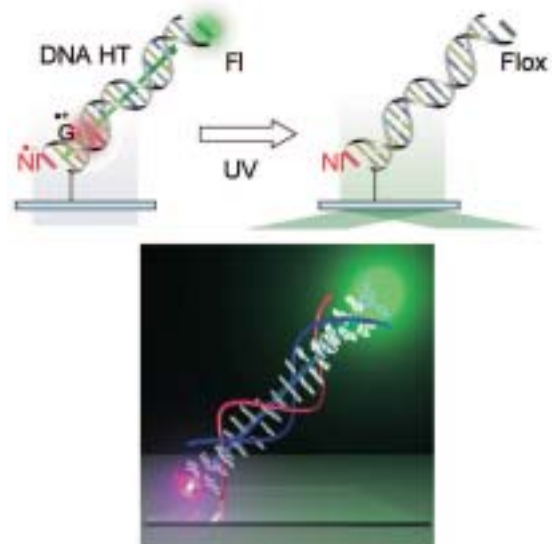


図5. 一分子蛍光法によるDNA中のホール移動の観測とイメージ図。Niはナフタルイミド、FIはTMRもしくはAlexa532を示す。

修飾DNAは、ビオチン-アビジン結合を通じてガラス基板に固定し、全反射蛍光顕微鏡を用い単一分子蛍光イメージングを行った。UV照射前(図6a)

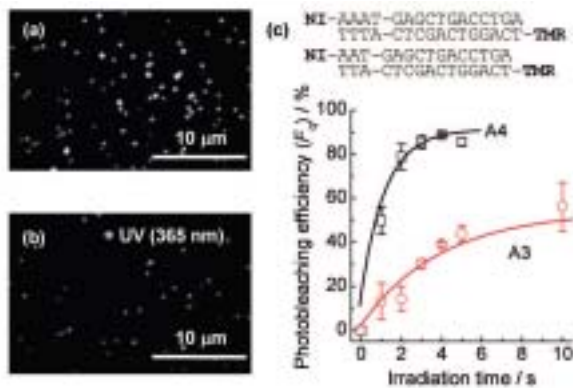


図6. 一分子蛍光法による DNA 中のホール移動の観測とイメージ図.
(a) 照射前, (b) 照射後の蛍光イメージ.
退色効率 $F_q = 1 - N/N_0$. N_0 および N はそれぞれ UV 照射前後の輝点数.

の修飾ガラスのイメージングを行ったところ, DNA 一分子からの輝点が数多く観測された. UV 光照射を行うと, これらの輝点は効率よく消失した (図 6 b). この輝点数の変化, すなわち蛍光色素の退色は DNA 中のホール移動によって誘起された結果であり, したがって一分子レベルでホール移動を観測したことになる. 照射時間に対する退色効率 (F_q) を調べたところ (図 6 c), NI と近傍 G との間の AT 塩基対の数が 4 の場合では数秒の UV 照射で退色が起こるのに対し, AT 塩基対が 3 つの場合では退色効率が低いことが分かった. この結果は, 一分子蛍光イメージングによってホール移動の塩基配列依存性を明らかにできることを示している.

次に, ホール移動のミスマッチ依存性を, 本手法を用いて観測した. マッチ配列 (A4-1) に対して, A-C ミスマッチを異なる位置に有する 3 種の DNA (A4-2-4), T-C ミスマッチ (A4-5) を持つ DNA について検討した (図 7). マッチ配列に比べて, A-C ミスマッチを有する A4-2 と A4-3 ではミスマッチによる蛍光色素の退色の大幅な抑制が観測された. 同様に T-C ミスマッチにおいても抑制効果が見られた. 一方, 蛍光色素に近い位置に存在する A-C ミスマッチでは抑制効果は観測されなかった. そこで, このミスマッチ検出法を用いて, 乳がんに関連する BRCA1 の SNP (一塩基多型) の識別を行った (図 8). マッチ配列 (R:G) の場合, 退色効率 F_q は $72 \pm 8\%$ であるのに対し, ミスマッチ配列 (R:A) では F_q は $34 \pm 9\%$ と退色が大幅に抑制された. この結果は, 実

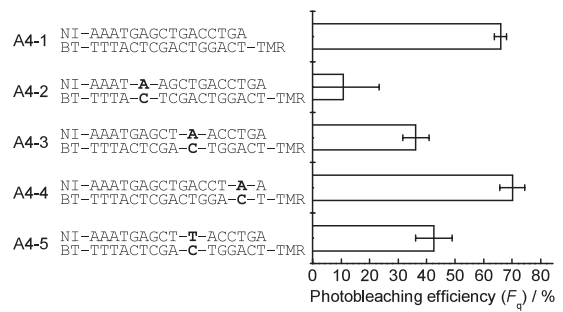


図7. DNA中のホール移動による蛍光色素(TMR)の退色のミスマッチ依存性.

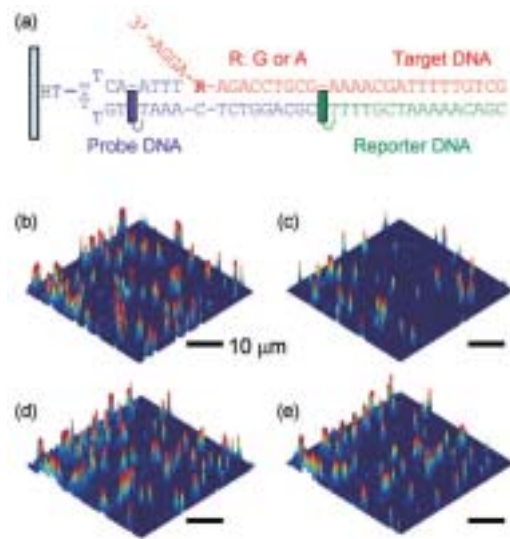


図8. DNA中のホール移動を利用した単一分子蛍光イメージングによる一塩基識別.
Probe DNA, Reporter DNA にはそれぞれ NI と TMR を修飾した.
(a) R の位置に G もしくは A を持つターゲット DNA と相補的塩基対形成させた DNA.
(b, c) R:G (マッチ) 配列の照射前後の蛍光イメージ. (d, e) R:A (ミスマッチ).

際のターゲット DNA の SNP 検出が可能であることを示している.

以上, ホール移動によって蛍光色素の酸化反応を誘起することで, DNA 中のホール移動の検出一分子蛍光測定により可能であること, さらにはミスマッチ検出ができることが分かった. 本手法は, DNA-タンパク複合体におけるホール移動の研究など, より生体系に近い環境下においてホール移動を調べるのに適している. 酸化ストレス下にある細胞内の遺伝子において, 定常的にホールが発生し, 酸化的損傷を受けている. 酸化によって生じたホールは遺伝子上を移動していると推測されるが, その現象自

体に生物学的な意味, すなわちホール移動によって何らかの生体プロセスが誘起されるのかどうか, については全く理解されていない. 我々が確立した一分子蛍光イメージングを用いた本手法は, これらの課題を明らかにするための有力な手法になると考えている.

5. DNA 光電流デバイス

電気化学測定は電極と分子との間の電子移動を検出する手法であり, 当然 DNA 中の電荷移動の化学への利用が可能であり, これまで様々な応用的研究が試みられてきた. DNA 中の電荷移動の現実的な応用として, ミスマッチや病原体などの電気化学的検出が挙げられる¹⁶⁾. 電気化学測定法は, 測定感度が高く, 装置が安価なことも大きな利点であり, 実際の医療現場での利用が可能で測定手法であると期待されている.

DNA 光電流デバイスは, 電荷移動現象を利用したバイオセンシング技術の開発などに応用できる. DNA を金基板上に固定した電極において, 光電流が発生する研究例がいくつか報告されているが^{17,18)}, その発生機構はまだ十分には理解されていない. そこで, 我々は, これまでに得られた知見に基づいて, 電荷移動機構が光電流発生とどのような関係にあるかについて詳細に調べた. 金電極上に電子ドナーとなる光増感剤(NI)を修飾した DNA を固定し, 様々な配列における光電流測定から, 光電流発生効率が電荷分離の収率, 電荷移動速度, 再結合速度とどのように関係しているかを明らかにした¹⁹⁾.

NI と SH 基を修飾した DNA を Au-S 結合を介して金基盤に固定し, 365nm の光の照射によって得られる光電流の観測を行った(図9). NI と近傍 G の間の AT 塩基対の数 (n) を変化させて, 電荷分離状態の生成収率と再結合速度を制御し, また, GA および GT 繰り返し配列によってホール移動速度を制御し, これらの速度論パラメータと光電流の関係を調べた. 光電流強度と n との関係を図10に示した. NI と G が近接している場合 (n=0-2) では, 光電流が全く観測されなかった. GA 配列では n=3 から強い光電流が観測され始めた. この結果は n の増加によって再結合が遅くなり, ホール移動速度が再結合速度よりも速くなることで光電流が生じたことを示している. n=4 まで光電流は増加し, その後

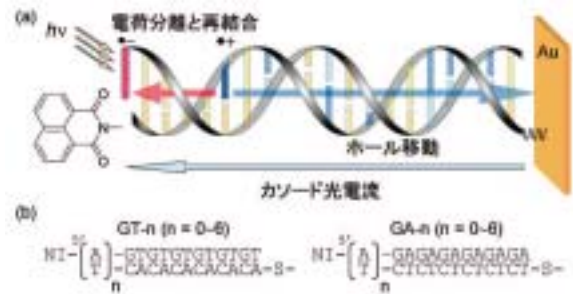


図9. (a) 金電極に固定したNI修飾 DNA における光電流発生. (b) DNA 配列.

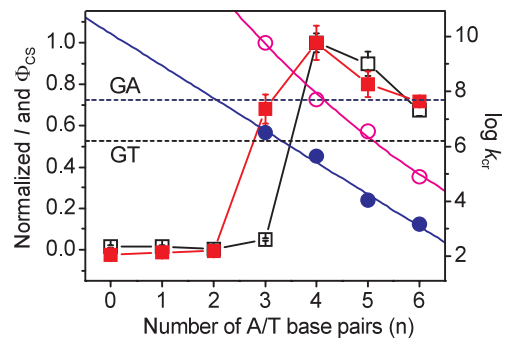


図10. 電荷再結合, 電荷分離収率, 電荷移動に対する光電流強度(I)の関係. 光電流強度(GA配列: \square , GT配列: \circ), 電荷再結合速度 (k_{cr}/s^{-1} , \circ), 電荷分離収率 (Φ_{cs} , \square). 点線は GA および GT 繰り返し配列のホール移動速度を示す.

は初期の電荷分離収率に対応して減少した. 一方, GT 配列ではホール移動速度が遅いため, n=3 では光電流が観測されなかった. n=4 以上では, ホール移動速度が再結合速度よりも速いので, GA 配列と同等の光電流強度を示した. これらの結果から, 光電流強度はホール移動速度と再結合速度との関係に大きく依存することが明らかとなった.

6. 総括

1993年以降, 我々の研究グループを含め様々な分野の研究者が DNA 中の電荷移動というトピックスに参入し, 様々な角度から精力的に研究が行われてきた. 我々はレーザー時間分解過渡吸収法を用いてホール移動の実時間観測を行い, 長距離ホール移動の速度を直接決定することに成功した. G 間のホッピングによるホールの長距離移動は配列に依存するが, マイクロ秒からミリ秒まで, 比較的遅い時間領域で起こることを明らかにした.

我々が確立した単一分子計測法による DNA 中の

ホール移動の観測手法は、修復酵素やヒストンタンパクに結合したDNAなど、様々な状態にあるDNA中のホール移動を調べるための有力な手法になると考えている。今後はホール移動の生物学的役割・機能の解明を目指した研究へと展開していく予定である。光電流機構に関する研究では、電荷再結合と電荷移動の競争によって光電流強度が支配されていることを実証した。この知見はDNA光電流デバイスを作製する上で重要であり、より優れたデバイス作成に繋げたい。

現在では、DNA中の電荷移動機構の大部分が明らかとなってきた。今後、DNA中の電荷移動の興味は、電荷移動に基づいたデバイスやバイオセンサーなどへの応用、生体における電荷移動の生物学的意義などへと移っていくと予想している。

なお、本稿に示した我々の研究成果の多くは、産業科学研究所の川井清彦准教授、藤塚守准教授らと共同で行ったものであり、各氏に感謝致します。

References

- (1) Murphy, C. J.; Arkin, M. R.; Jenkins, Y.; Ghatlia, N. D.; Bossmann, S. H.; Turro, N. J.; Barton, J. K., *Science* **1993**, 262, 1025.
- (2) Lewis, F. D.; Wu, T. F.; Zhang, Y. F.; Letsinger, R. L.; Greenfield, S. R.; Wasielewski, M. R., *Science* **1997**, 277, 673.
- (3) Grinstaff, M. W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3629.
- (4) Lewis, F. D.; Letsinger, R. L.; Wasielewski, M. R., *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 159.
- (5) Hall, D. B.; Holmlin, R. E.; Barton, J. K., *Nature* **1996**, 382, 731.
- (6) Giese, B., *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 631.
- (7) Schuster, G. B., *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 253.
- (8) Wagenknecht, H. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2454.
- (9) Breger, S.; Hennecke, U.; Carell, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1302.
- (10) Kawai, K.; Osakada, Y.; Sugimoto, A.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 2386.
- (11) Osakada, Y.; Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 18072.
- (12) Takada, T.; Kawai, K.; Cai, X. C.; Sugimoto, A.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1125.
- (13) Takada, T.; Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 14002.
- (14) Takada, T.; Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 3835.
- (15) Takada, T.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 11179.
- (16) Boon, E. M.; Salas, J. E.; Barton, J. K., *Nature Biotech.* **2002**, 20, 282.
- (17) Okamoto, A.; Kamei, T.; Saito, I., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 658.
- (18) Gill, R.; Patolsky, F.; Katz, E.; Willner, I. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4554.
- (19) Takada, T.; Lin, C.; Majima, T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6681.

