

論文の内容の要旨

論文題目 Developments of Bioanalyses for DNA and Protein by Combination of
 Gold Nanoparticles and Laser Techniques
(金微粒子とレーザーを組み合わせた DNA とタンパク質の分析法の開発)

氏名 武田 佳宏

1、序

本学位論文では、生命科学で用いる新しい分析法の基礎になりうる成果を目指して研究を行った。金属微粒子技術、レーザーなどの物理化学的手法を有機的に組み合わせながら分析の極微量化と迅速化を軸に、研究を展開した。

1) 溶液中の蛍光色素の単一分子検出と分光のための共焦点蛍光顕微鏡の開発 共焦点蛍光顕微鏡装置の油浸対物レンズを用いてアルゴンイオンレーザーを色素溶液中に絞り込み、色素からの蛍光シグナルの光子計数をおこなった。色素溶液の濃度を 10^{-10} M 程度に下げていくと、観測領域にブラウン運動で入ってきた色素分子が励起光吸収と蛍光放出を繰り返し、 10^8 個 s^{-1} の光子を放出することが観測された(蛍光バースト)(図1)。さらにダイクロックミラーを用いて、溶液中の単一色素分子からの蛍光シグナルを、蛍光スペクトルの中心に対して短波長側と長波長側とに選別し、別々の光検出器で光子計数をおこなった。

2) 単一分子 DNA の高次構造変化を検出する計測法 カバーガラス上に伸長固定化された DNA において、そのワトソニックリック塩基対面は伸長方向に対して垂直にそろっているため、塩基対面の方向エントロピーは溶液中の自由な DNA よりも低い。固定化伸長 DNA の高次構造が変化すると、塩基対面の方向がばらつき、方向エントロピ

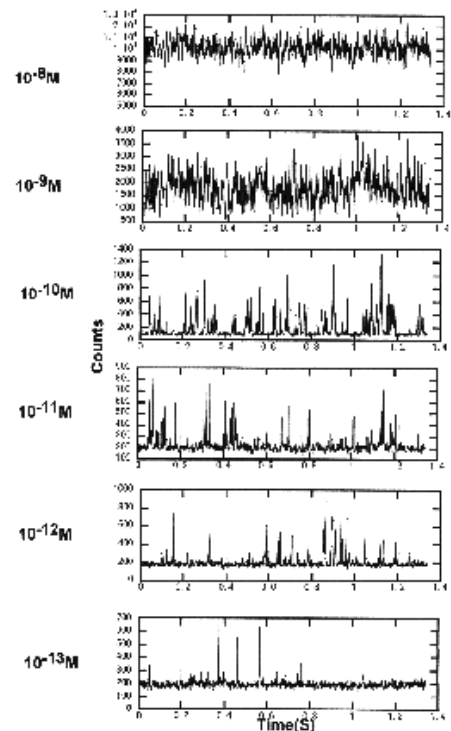


図1 蛍光バーストの濃度依存性

ーが増加する（方向エントロピー生成）。この方向エントロピー生成量は DNA にインターカレーションした TOTO-1 色素の配向変化によって検出する。これを DNA 上にマッピングすることにより、DNA 中の高次構造変化の位置を決定する。

3) 生体高分子の計測と反応に有用な金属微粒子をプローブとして用いる技術の開発 蒸留水中に金プレートを置き、Nd:YAG の基本波 1064 nm をレンズで絞り、プレート表面に焦点をあわせてスパッタリングを行うことにより水中にゼータ電位がほぼ 0 の金微粒子を作製した。またクエン酸による還元法で合成した金微粒子を分散した水溶液に、末端をアルカンチオール化したプローブ DNA を添加し、金微粒子に結合したプローブ DNA(バルキープローブ)を作成した。

4) 金属微粒子へのレーザー照射により生成する超微小領域プラズマを反応場として用いる方法論（ナノ反応場）の開発 金属微粒子の表面プラズモン共鳴波長に近い波長のレーザーを溶液中の金属微粒子に照射した。金属微粒子の多光子吸収励起が起これ、金微粒子の温度は $10^4 \sim 10^5$ K まで上昇し、金属微粒子からシード電子が放出される。この電子が周囲の原子分子と衝突してイオン化し、電子なだれを起こす（プラズマ状態）。この領域は数十 nm から数百 nm と考えられる。

2、グリセロール気液界面における色素分子のダイナミクス

(発表論文 3)

グリセロールにローダミン 6G (R6G) を 2.5×10^{-9} M 溶解し、その半球液滴をカバーガラス上に形成した。光軸方向に対物レンズの位置を上下することにより、励起レーザー光の焦点位置を調節して、観測位置（液滴の気液界面、内部、など）を選択し、R6G 分子を単一分子レベルで蛍光検出した（図 2）。内部にある R6G 分子からの蛍光バースト高は 40 カウント以下である。一方、気液界面にある R6G 分子の蛍光バースト高は 40 カウント以上のものが多く、R6G は凝集体を形成している。この凝集体中の R6G 分子の数は $\sim 7.5 \times 10^2$ となる。蛍光バーストの時間発展を解析した結果、R6G 分子の半球グリセロール液滴内部での拡散係数 $D_b = 1.1 \times 10^{-12}$ m²/s、界面における凝集体の拡散係数は $D_s = 1.6 \times 10^{-11}$ m²/s であり、内部の拡散係数の 15 倍の大きさであることがわかった。

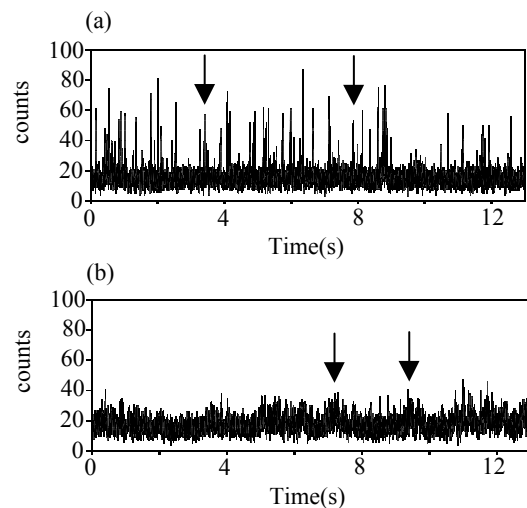


図 2 対物レンズの各位置での蛍光バースト (a) 気液界面 (b)グリセロール溶液内部 単一 R6G 分子の蛍光バーストの一部を矢印で示す

3、エントロピー生成マッピング法の開発—DNA と DNA 作用因子の相互作用検出

(発表論文 1)

TOTO-1 色素をインターカレーションした DNA をカバーガラス上に伸長固定化した。この DNA へのヒストンの作用によるエントロピー生成量を DNA 上にマッピングし、相互作用位置を決めた。ヒストンタンパク質と DNA とが相互作用している領域では、ヒストンタンパク質がその周りに DNA をまきつけるので、引き伸ばされて揃っていた DNA 塩基対面の向きがばらばらになり、TOTO-1 色素の蛍光強度の励起光偏光面角度依存性が消失する（図 3）。この領域におけるエントロピー生成量は 0.65 cal/mol K であった。一方、ヒストンタンパク質が結合していない部分は偏光面依存性が保たれており、その向きが塩基対面のレベルで揃っていることがわかる。この相互作用していない領域ではエントロピー生成量は ~ 0 cal/mol K であった。

4、3次元 DNA ネットワークの構築

(発表論文 2)

TOTO-1 色素分子をインターカレーションした λ DNA の溶液に CaCl_2 を加え、 λ DNA を不溶化し、 λ DNA がカバーガラスの表面に吸着、固定化されやすくした。この λ DNA の溶液を蛍光顕微鏡用の 2 枚のカバーガラスを重ねた隙間にしみ込ませた。次に、牛胸腺ヒストン

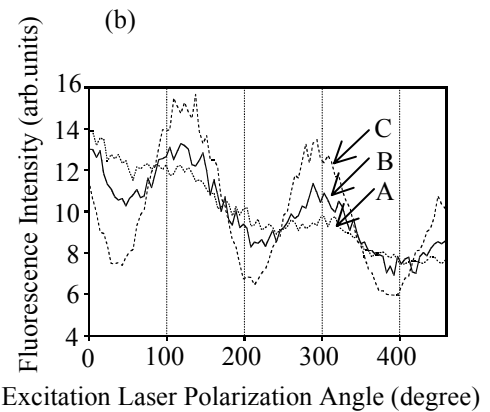
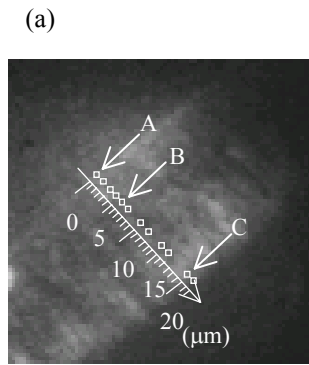


図 3 (a) TOTO-1 色素をインターカレーションした DNA をガラス基板の上に伸長し、ヒストン蛋白質を相互作用させてから 1 時間後の蛍光顕微鏡像 (b) (a)中の領域 A、B、C の蛍光強度の励起光偏光面角度依存性

タンパク質の溶液をカバーガラスの隙間にしみ込ませ、3次元 DNA ネットワーク構築をした。倒立型レーザー蛍光顕微鏡の対物レンズの位置を変えながら、TOTO-1 色素分子の蛍光像を観察し、3次元 DNA ネットワークが構築されていることを確認した。また 3次元 DNA ネットワークの構造解析の結果、連結点の部分では、ヒストンタンパク質と λ DNA とが結合して、ヒストンオクタマータンパク質の周りに DNA がまきついた構造になり、 λ DNA の塩基対面の方向がばらばらになっており、2次元ネットワークの DNA バンドルの部分は偏光角依存性があることから、DNA バンドルがその方向に伸ばされていることがわかった。

5、金微粒子結合プローブ DNA のハイブリダイゼーション反応に対する標的 DNA の立体障害の効果

(発表論文 6)

ハイブリダイゼーション反応の標的 DNA は 7249 塩基の一本鎖の DNA である。プローブ DNA I は標的 DNA の中心部位と塩基対を組むように、プローブ DNA II は標的 DNA の端と塩基対を組むように設計し、DNA I と II のバルキープローブを作成した (バルキープローブ I と II)。標的 DNA とバルキープローブ DNA I または II のハイブリダイゼーション反応速度定数は $k_{b1} = (3.92 \pm 0.53) \times 10^2 / \text{mol} \cdot \text{s}$ または $k_{b2} = (1.66 \pm 0.26) \times 10^4 / \text{mol} \cdot \text{s}$ と求められた (図 4)。 k_{b2} は k_{b1} の 42.2 倍大きい値となった。これは標的核酸の立体障害によりバルキープローブ I はバルキープローブ II よりも、標的 DNA のハイブリダイゼーション部位に接近しにくく、ハイブリダイゼーション反応が抑制されるためと考えられる。さらに、ハイブリダイゼーション反応速度定数に関する定量的なモデルを構築し、微粒子に結合していないプローブ DNA I と DNA II (スモールプローブ I と II) のハイブリダイゼーション反応速度を求めた。その結果 DNA I の場合は $k_{s1} = 1.12 \times 10^5 / \text{mol} \cdot \text{s}$ 、DNA II の場合は $k_{s2} = 2.29 \pm \times 10^5 / \text{mol} \cdot \text{s}$ となり、ハイブリダイゼーション反応の速度比

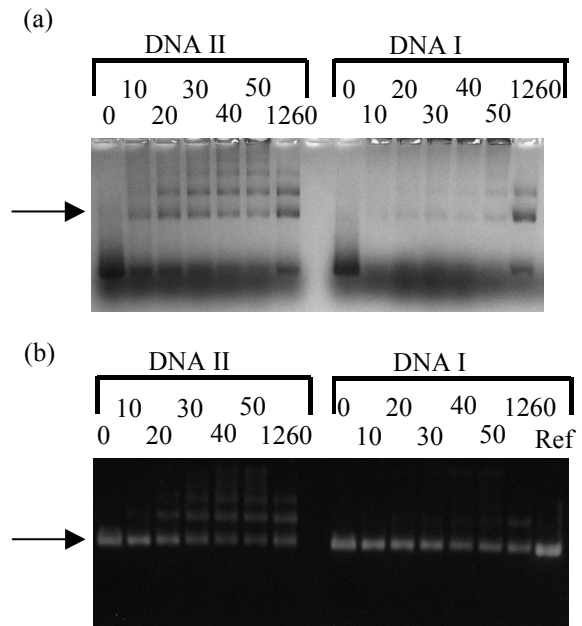


図 4 ハイブリダイズの確認のためのアガロースゲル電気泳動写真(a) このゲルに UV 照射したときのゲルの写真(b) ゲルの上部は保温時間 (分) Ref は標的 DNA のみ

は $k_{s2}/k_{s1}=1.36$ 倍となった。このように、バルキープローブを用いることにより、標的部位の位置によるハイブリダイゼーション反応速度の差を拡大することができた。

6、金微粒子へのレーザー照射により生じるナノプラズマを用いたタンパク質の分解

(発表論文5)

リゾチームとレーザースパッタリング法で合成した金微粒子を含む溶液を光学セルに入れ、溶液の pH を 11.0 または 4.9 に調整した。これに、波長 532nm のパルスレーザーを照射し、ナノプラズマを生成した。その後、リゾチーム分解量の定量をおこなった。リゾチームの等電点は 11.0 であるため、溶液の pH を 11.0 に調整した場合にリゾチームの持つ総電荷量が 0 に近くなり、リゾチームが凝集体を形成し金微粒子の疎水性表面に吸着し、ナノプラズマによる分解効率が高くなる一方、溶液の pH を 4.9 にした場合にはリゾチームは溶液中で電荷を帯び単分散しているためナノプラズマによる分解効率は低い。さらに 2 種類のタンパク質 (リゾチーム、BSA) を混合した溶液の pH を変えてレーザー照射をおこなった。pH を 11.0 にした場合はリゾチームが選択的に分解され、pH を 4.9 にした場合は、等電点の近い BSA が選択的に分解された。(図5)

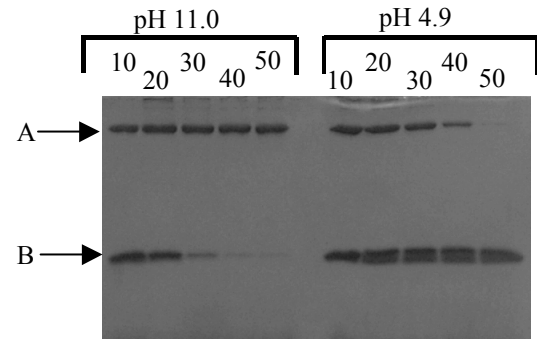


図5 溶液の pH を 11.0 または 4.9 に調整した場合のタンパク質の分解量の検出のための SDS ゲル電気泳動の写真 矢印 A は BSA、矢印 B はリゾチームのバンド ゲルの上部はレーザー照射時間 (分)

7、金微粒金のレーザーアブレーションによる金属 - DNA 複合体の形成

(発表論文4)

λ DNA、金微粒子、塩化カルシウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを混合した溶液に波長 532 nm、17 mJ/pulse のパルスレーザーを照射した。レーザー照射後の可視紫外吸収スペクトルには 360 nm 付近に新たな吸収が観測された。このピークは、DNA の塩基部分とアミンと Au(III) イオンとの間の配位結合が形成され生成した新しい配位複合体 (Au(III)(DNA-base)₂(amine)L) におけるアミンの窒素原子上の孤立電子から Au イオンへの $p \rightarrow d$ 電荷移動吸収 (LMCT) に帰属できた。この反応の機構を次のように推定した。まず、多価陽イオンが DNA の負に帯電したリン酸基に結合することによって DNA が中性化され、これが金微粒子の表面に疎水性相互作用で吸着し DNA-金微粒子縋れを形成する。さらにナノ反応場中の硬い酸である Au (III) イオンが必須因子として添加したアミン類の窒素原子と反応し、さらに DNA 塩基部分の窒素部分と金微粒子の表面近傍で反応する。

8、まとめ

本研究では、位置特異的な単一分子検出のための共焦点蛍光顕微鏡を開発し、グリセロール溶液の内部と気液界面における単一色素分子の蛍光シグナルを分けて検出した。また、塩基対の方向エントロピー生成の量を DNA 上にマッピングすることにより DNA 中の DNA 結合因子の相互作用位置を決定する新規な計測法を開発した。さらにこの方法を 3 次元 DNA ネットワークの構造解析に適応した。また嵩高いプローブ DNA のハイブリダイゼーション反応速度の測定によりハイブリダイゼーションの位置の計測が可能となった。また金微粒子にパルスレーザーを照射し、ナノ反応場を生成した。このナノ反応場によりタンパク質を選択的に断片化する反応やナノ反応場に生成する微粒子構成原子のイオンと DNA との配位錯合体の形成反応を見出した。