

## 2P120

### 単一 DNA ヘアピンのナノ秒コンフォメーションダイナミクス検出に向けた高時間分解光子計数装置の構築

(阪大院・基礎工) ○梶 貴博, 伊都 将司, 宮坂 博, 岩井 成憲

【序】 DNA や蛋白質などの生体高分子の動的な過程は、これまで分子集団を対象とした分光法や核磁気共鳴法、X 線結晶構造解析法などによって研究が行われてきた。そのような中、個々の分子ごとのミクロスコピックな性質の違いを明らかにする手法として、単一分子分光法が近年発展しつつある。これにより、生体高分子の溶液中での静的なコンフォメーションの不均一な分布に加えて、個々の分子の動的なコンフォメーションのゆらぎについても明らかとなることが期待できる。単一分子内における動的な変化を検出する手法としては、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用する方法が広く用いられている。FRET の速度はドナー色素とアクセプター色素間の距離の 6 乗の逆数に比例することから、分子内の色素をラベルした部位間の距離の変化を精度よく検出できる。これまでに、単一分子レベルで FRET を計測することで、生体高分子のコンフォメーションの分布とその動的な変化を捉えた研究が報告されている [1]。

本研究では、高時間分解時間相関単一光子計数装置を用いることで、これまで行われてきた単一分子 FRET を用いた研究よりも高い時間分解能である、ナノ秒オーダーでの生体高分子の動的な過程を明らかにすることを目的としている。実験試料には、温度変化によってドナー・アクセプター間距離が変化する DNA ヘアピンを用いる。このような手法で生体高分子のナノ秒ダイナミクスを計測した報告としては蛋白質のアンフォールディングのダイナミクスを調査したものなどが挙げられるがその数は多くなく [2, 3]、本手法を発展させることで、今後様々な生体分子の動的な過程、例えば酵素の反応過程の解明などにつながると期待できる。

【実験】 本研究で構築した装置を図 1 (a) に示す。波長 488 nm の連続発振 Ar イオンレーザーを、倒立顕微鏡の対物レンズによってサンプル溶液中に集光する。実験装置は共焦点光学系となっており、 $10^{-9}$  M 程度の DNA 溶液を用いることで、溶液中に存在する単一 DNA 分子からの蛍光の検出が可能となる。集光スポットにおいて、ドナーおよびアクセプターから発せられた蛍光は、ダイクロイックミラーによって分離された後に、ドナーからの蛍光についてはさらに強度比 50 : 50 で分割するビームスプリッターで分けられ、時間分解能が 4 ピコ秒である時間相関単一光子計数 (TCSPC) モジュールに接続した 2 台の APD (アバランシェフォトダイオード) によって検出される。これにより、ドナーからの光子強度の時間変化をナノ秒オーダーで検出することが可能となる。アクセプターからの蛍光は、もう 1 台のカウンティングボード (時間分解能 12.5 ナノ秒) に接続した APD によって検出する。カウンティングボードからの計測開始トリガー信号を

TCSPCモジュールに入力しこれら装置の同期をとることで、ドナーおよびアクセプターからの蛍光強度の時間変化をマイクロ秒オーダーで合わせて解析することが可能となる。実験に用いたDNAヘアピンの構造を図 1.(b)に示す。ドナーおよびアクセプター色素として、FluoresceinとATTO 655 をDNAの塩基部分と 3' 末端部分にそれぞれ修飾している。DNAヘアピンの融解温度は室温程度となるように設計しており、融解温度以上でDNAヘアピンの2本鎖部分が解離する。

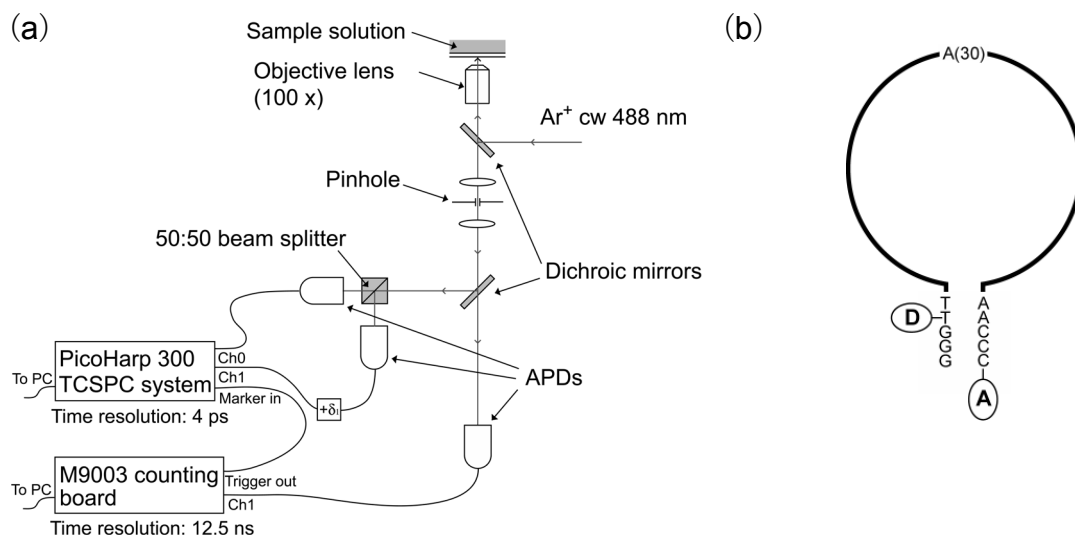


図 1. (a) 実験装置、(b) DNAヘアピンの構造

【結果と考察】実験装置の評価を行うにあたり、 $50 \mu\text{W}$ の $\text{Ar}^+$ レーザーを $2.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ のFluoresceinおよびDNAヘアピン水溶液（ $30 \text{ mM}$  pH7.0 リン酸緩衝液、 $0.1 \text{ M}$  NaCl）中に集光し、蛍光を50:50のビームスプリッターで分割し2台のAPDで検出を行った。2台のAPDに到達した光子の時間差のヒストグラムを計算したものが図2である。その

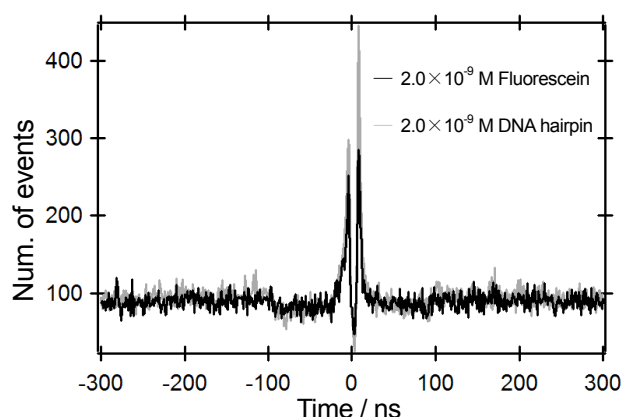


図 2. Fluorescein および DNAヘアピン水溶液のコインシデンス測定結果

結果、 $t = 0$ においてイベント数が他の時間より少ない、フォトンアンティバンチングが観測された。これにより本装置によって単一分子レベルでの検出が可能であることが確認された。発表では、コインシデンス測定結果を解析することで各温度におけるDNAヘアピンのダイナミクスについて考察を行う。