

光応答性 DNA の二重鎖形成および解離反応の時間分解検出

(京大院理¹、名大院工²) 中曽根祐介¹、大威英晃²、神谷由紀子²、
浅沼浩之²、寺嶋正秀¹

Time-resolved study on duplex formation and dissociation of photoresponsive DNA

(Kyoto Univ.¹, Nagoya Univ.²) Yusuke Nakasone¹, Hideaki Ooi², Yukiko Kamiya²,
Hiroyuki Asanuma², Masahide Terazima¹

【序】近年、アゾベンゼンを利用した光応答性 DNA が開発され、遺伝子発現の光制御や光駆動型 DNA ナノマシンの開発など様々な面で応用が期待されている[1]。アゾベンゼンは二つのベンゼン環がアゾ基で繋がった構造を持ち、光照射によって *cis-trans* 異性化反応を示す。*trans* 体は紫外光領域に、*cis* 体は可視光領域に吸収を持つため、励起波長を選ぶことで *trans* 体・*cis* 体を選択的に異性化することができる。このアゾベンゼンを DNA の側鎖にリンカーを介して導入すると、*trans* 体は隣接する塩基対間にインターカレートし、スタッキング相互作用により二重鎖を安定化する一方、*cis* 体は非平面構造を持つため立体反発を生じ二重鎖を不安定化する (T_m が下がって一本鎖に解離する)。したがってアゾベンゼンの構造異性化を利用することで可逆的に二重鎖の形成および解離を光制御でき、応用性の高い技術として注目を集めている (図 1)。アゾベンゼンの異性化反応は光励起後数ピコ秒程度で完了する超高速反応であり、反応収率や異性化のメカニズムもよく調べられている。しかし、異性化後に DNA 二重鎖が形成・解離する過程を時間分解で捉えた研究例はない。そこで本研究ではその分子機構を明らかにすべく、過渡回折格子 (TG) 法により会合・解離ダイナミクスを調べた。

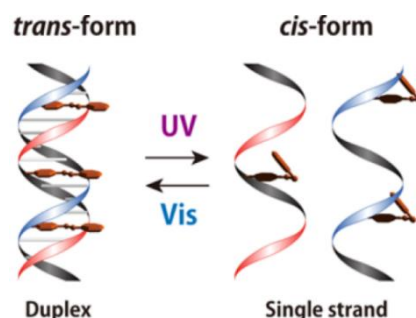


図1 アゾベンゼンの光異性化を利用した DNA 二重鎖の形成・解離制御

【実験】アゾベンゼンを一つ組み込んだ 12 塩基からなる合成 DNA (*Azo*-DNA) と、*Azo*-DNA と相補的な配列を持つノーマルな DNA を用意した。これらを混合した試料と、比較用として *Azo*-DNA のみを溶かした試料を用いて測定を行い、アゾベンゼンの異性化反応および二重鎖の形成・解離過程を検出した。TG 測定では *trans* 体あるいは *cis* 体を適切な光照射によって蓄積した後、*trans* 体から *cis* 体への異性化反応は YAG レーザーの 3 倍波 (355 nm) で、*cis* 体から *trans* 体への異性化反応は色素レーザー (462 nm) でトリガーした。プローブ光にはダイオードレーザー (840 nm) を使用し、測定温度は T_m 付近である 55 度に設定した。

【結果】 *trans* 体から *cis* 体への異性化による解離反応ダイナミクス

図 2 に相補鎖を含む試料について紫外光励起 (*trans* 体→*cis* 体) により得られた TG 信号を示す。40 μ s 付近に熱拡散信号、2~40 ms 付近に立ち上がりと減衰からなる分子拡散信号が観測された。屈折率変化の符号関係より立ち上がりが生成物、減衰が反応物の拡散信号と同定され、*trans*

体から *cis* 体への異性化によって拡散係数の増加を伴う反応が誘起されることがわかった。この拡散係数変化は相補鎖を含まない試料では観測されなかったことから、異性化によって不安定化した二重鎖が解離する過程を捉えたものと同定した ($D_{\text{reactant}} = 2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s} \rightarrow D_{\text{product}} = 3.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)。さらに格子波数を変えて測定した結果、分子拡散信号の強度が時間とともに増大する様子が観測され、拡散係数の時間変化を捉えることに成功した。詳細な解析の結果、拡散係数変化(解離反応)の速度は $670 \text{ } \mu\text{s}$ と見積もられた。また相補鎖を含まない試料との比較により、アゾベンゼンの異性化反応の収率が二重鎖に組み込まれることによって大きく減少することがわかった。これは二重鎖内では異性化に必要な空間が確保できないためと考えられる。

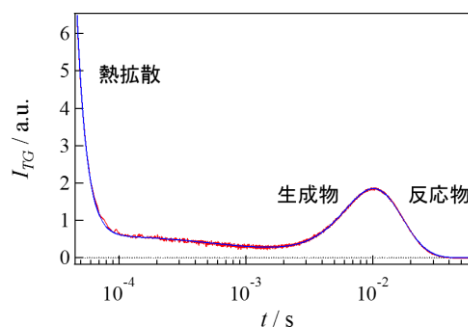


図2 相補鎖を含む試料を紫外光励起することで得られたTG信号

cis 体から *trans* 体への異性化による会合反応ダイナミクス

図3に相補鎖を含む試料を可視光励起(*cis* 体→*trans* 体)することで得られた TG 信号を示す。

図2と同様、熱拡散信号および分子拡散信号が観測されたが、屈折率変化の符号関係より分子拡散信号の立ち上がり成分が反応物、減衰成分が生成物の拡散であると同定された。つまり拡散係数の減少が光誘起されており、アゾベンゼンの異性化によって引き起こされた会合反応を捉えたものと解釈できる ($D_{\text{reactant}} = 3.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s} \rightarrow D_{\text{product}} = 2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)。解離反応と同様、分子拡散信号の時間発展を解析することで会合反応速度を見積もることを行い、DNA 濃度が $400 \text{ } \mu\text{M}$

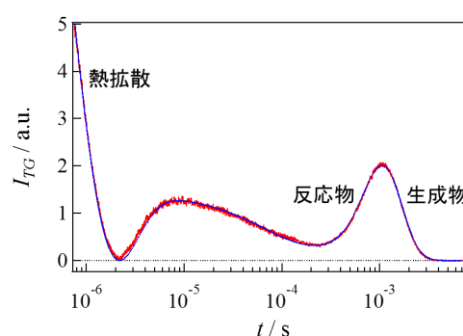


図3 相補鎖を含む試料を可視光励起することで得られたTG信号

μM の条件では光励起後 3.8 ms の時定数で会合することがわかった。さらに DNA 濃度を変えて

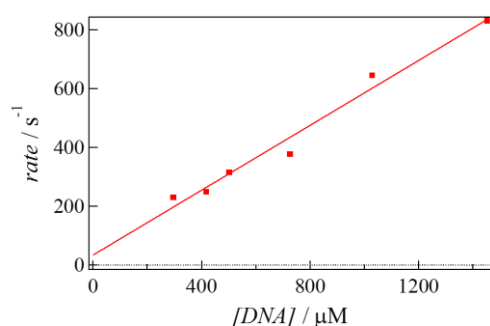


図4 会合反応速度のDNA濃度依存性

測定した結果、図4に示すように反応速度と濃度に線形関係があることがわかった。これは観測した反応が二分子反応であることを示しており、二重鎖の形成過程を捉えたことを確認する結果となった。図4の傾きおよび切片はそれぞれ平衡における会合・解離の速度定数に対応しており、これらを個別に見積もることに成功した(会合速度定数: $5.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数: 34 s^{-1})。会合反応速度は拡散律速反応より遅く、DNA 相補鎖との適切な配向での衝突が会合反応に必要なことを示している。

本討論会ではこれらの結果を基に DNA 二重鎖の形成・解離機構について議論する。

参考文献

1. Kamiya et al. *Acc Chem Res.* 2014 ; 47(6):1663-72.