

気液界面に吸着する蛍光核酸にみられる分子構造変化

学習院大理

○浅見祐也, 高橋佳南子, 戸村太亮, 河野淳也

Molecular structural change of fluorescent nucleic acid induced by adsorption onto air/water interface

○Hiroya Asami, Kanako Takahashi, Taisuke Tomura, Jun-ya Kohno

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University, Japan

【Abstract】 Fluorescent biomolecules have been used for sensing the characteristic states like their aggregation, attachment onto target molecules, and hydrophilic/hydrophobic environments. Recently, a number of fluorescent biomolecules act as effective tools for monitoring such characteristic states through Förster resonance energy transfer (FRET). However the development of new fluorescent molecules and spectroscopic techniques is still needed to improve their sensitivity and resolution. In this study, we have developed a novel millisecond time resolved fluorescence spectroscopy using aqueous droplets and applied the method to a study on a molecular structural change of fluorescent peptide nucleic acid (5FAM-PNA) at the air/water interface. The obtained fluorescence spectra indicated that characteristic structural change between nucleobase and fluorescent chromophore proceed in the course of the adsorption onto the droplet interface. In the quantum chemical calculation, the molecule, 5FAM-PNA(X) (X=Guanine), formed a stable intramolecular hydrogen bond in the gas phase, which explains well our experimental result.

【序】 生体分子をベースとした蛍光分子は、生体中で生じる様々な生命活動の検出や、生体環境の変化を検出する手段として利用できる。このため、多種多様な分子が既に開発されている。これらは通常、顕微分光と FRET を利用して蛍光の場所/時間依存性を測定するプローブ分子として用いられる。しかし医薬分野への応用を見据えた場合、より高感度・高分解能で観測可能な新たな蛍光プローブ分子の開発は必要不可欠である。この課題を克服するためには、蛍光プローブ分子の開発と蛍光検出手法の開発を同時並行で進めることで、今までに無い物性を持つ蛍光分子を生み出すアプローチが大変有効であると考えられる[1]。

本研究では、水液滴と蛍光修飾したペプチド核酸(PNA)を用いて、ミリ秒時間分解蛍光スペクトルの測定を行った。この測定では、液滴生成直後の時間を 0 として励起レーザー光が照射されるまでのタイミングを変化させることで、ミリ秒オーダーの時間分解を行っている。我々は既に液滴内で共振増強されたラマン散乱光を用いてミリ秒オーダーの時間分解スペクトルの測定に成功しているため、本実験でも同様の手法を利用した[2]。特にこの液滴を使用した実験では、バルクでの分光計測に比べて溶液界面からの信号が観測されやすいため、液滴内部から液滴界面へ移動する際に生じる分子構造の動的な変化を観測できる点に大きな利点がある。この情報は蛍光スペクトルの波長シフトとして観測されるが、これは分子から発せられた蛍光が液滴界面付近で全反射を繰り返しながら周回し自己吸収を繰り返すことで、蛍光スペクトルの極大値の波長がシフトすることに由来する。本研究はこれを利用し、5FAM-PNA が液滴界面に吸着する際に生じる構造変化をミリ秒時間分解蛍光スペクトルを用いて観測した。この結果、液滴界面でのみ特異的な水素結合構造を形成する蛍光 PNA が存在す

ることが明らかになった。

【方法】 図 1 に示すように、最も単純なプリン塩基型の PNA 単量体に蛍光基 5-カルボキシフルオレセイン(5FAM)を縮合させた 5FAM-PNA(X) (X=A,G A: アデニン, G: グアニン)を汎用のペプチド固相合成法を用いて合成した。5FAM-PNA(X)水溶液(130 μ M)を 10 Hz でピエゾ素子駆動させた液滴ノズルから直径 60 μ m 程度の液滴として射出した。射出された液滴に可視のパルスレーザー光(3 mJ/pulse, X=A: 493 nm, X=G: 478 nm)を照射し、液滴中に溶解した標的分子を励起した。励起分子由来の蛍光を対物レンズと平凸レンズで集光し、分光器に導入した。この時、励起レーザー光の散乱光をカットするため、カラーフィルター(Y52)を分光器手前に設置した。

【結果・考察】 図 2 に観測された蛍光スペクトルのピーク重心位置の波長を液滴生成からの経過時間に対してプロットした。この結果、5FAM-PNA(A)では蛍光スペクトルの重心位置が時間経過でほぼ線形にシフトする様子が観測された。これは 5FAM-PNA(A)が徐々に液滴界面に吸着することに伴い、溶媒効果が減少することで生じるシフトと考えることができる。一方、5FAM-PNA(G)では液滴生成から 9 ms までは 5FAM-PNA(A)とほぼ同様の波長シフトを生じるが、9~13 ms にかけて急激な長波長シフトを示すことが明らかになった。このことは、5FAM-PNA(G)では液滴界面の吸着に伴い、分子構造の変化が生じている可能性を示唆している。そこで、液滴内部をバルク溶液中、液滴界面を溶媒効果の無い気相中に近似し、量子化学計算を用いてそれぞれの安定構造を見積もった。(図 3) その結果、5FAM-PNA ではペプチド鎖中に生じる水素結合パターンにより、Folding 型と Extending 型という 2 種の安定構造を生じることが分かった。また 5FAM-PNA(A)ではこれら両者の安定性が液滴内部と界面で大きく変化しないのに対して、5FAM-PNA(G)では液滴界面で Folding 型が非常に安定化する傾向がみられた。これは、PNA 中のグアニン塩基に存在する 2 位のアミノ基と 5FAM の 5 位のカルボニル基との間で生じる分子内水素結合の安定化の効果が気相中で非常に大きいことに由来すると考えられる。

【参考文献】 [1] T. E. Tomov, R. Tsukanov, Y. Glick, Y. Berger, M. Liber, D. Avrahami, D. Gerber, E. Nir, *ACS Nano*, **11**, 4002 (2017). [2] Y. Kihara, H. Asami, J. Kohno, *J. Phys. Chem. B*, **121**, 4538 (2017).

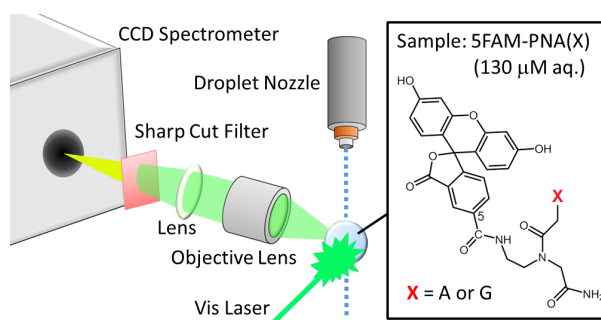


Fig. 1. Experimental set up and sample information. The part of base in the PNA molecule indicates as X. In this work, the two types of bases, adenine (X=A) and guanine (X=G), were used.

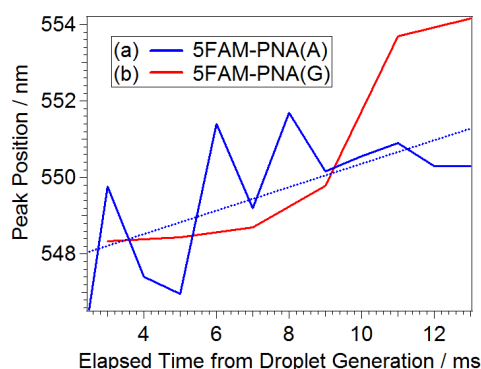


Fig. 2. Fluorescent peak position of the droplet of 5FAM-PNA aq. vs elapsed time from droplet generation. (a) 5FAM-PNA(A) (blue), (b) 5FAM-PNA(G) (red). The dashed line indicates the linear approximation for (a).

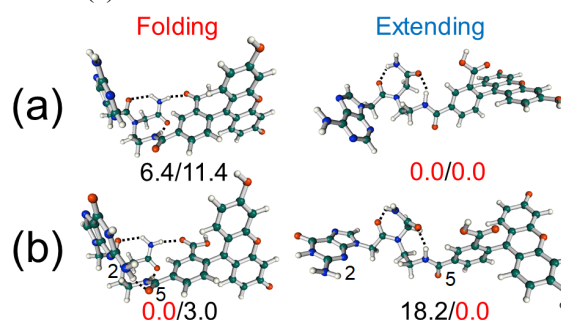


Fig. 3. Two types of stable structures in (a) 5FAM-PNA(A), (b) 5FAM-PNA(G). The relative stabilization energies in the gas phase and aqueous solution have been evaluated at the B3LYP/6-31++G(d,p) level. The polarizable continuum models (PCM) have been used for the evaluation of aqueous solvent effect. The left values indicate the stabilization energies in the gas phase, and the right values indicate those in the aqueous solution. The most stable structures are indicated by red values.