

DNA および脂質二重膜近傍のナノスケールイオンマッピング

Nanoscale ion mapping near DNA and lipid bilayers

所属機関： 東京大学 代表研究者氏名：内山 聖一

研究期間： 2021年10月24日～2021年12月1日

区分：個人 A

滞在研究機関： School of Chemistry and Chemical Engineering,
Queen's University Belfast, BT9 5AG, Belfast, UK

共同研究者等： Prof. A. Prasanna de Silva

In this project, I performed nanoscale ion mapping near DNA and lipid bilayers using a series of fluorescent anthracene and benzofurazan compounds. These compounds consist of a fluorophore (anthracene or benzofurazan), an anchor to attach to DNA or lipid bilayers, a H^+/Na^+ binding site and a position controlling moiety to determine their position near DNA and lipid bilayer structures. In fluorescence titrations of DNA or lipid bilayer solution, a dissociation constant for the binding site and ions can be determined by changes in fluorescence intensity as a parameter for local ion concentration. Also, the information concerning nanoenvironmental polarity at the position where each sensor was located was evaluated from the maximum emission wavelength. By collecting data using multiple fluorescent ion sensors, nanoscale ion mapping near DNA and lipid bilayers were conducted.

海外研究活動概要

細胞膜に代表される三次元構造体は、独自のナノ環境を創り出す。そしてそのナノ環境を探ることは、生命現象の神秘を解き明かす上で不可避な課題である。例えばそれは、Peter Mitchell が化学浸透圧説によるノーベル化学賞を受賞した 1978 年から 40 年以上にもわたって、脂溶性膜近傍における H^+ イオン濃度勾配が、生物エネルギー論の主たるテーマであり続けることにも表れている。しかしながら、三次元構造体における位置特異的なナノ環境の報告は、蛍光センサーを利用して計測した膜近傍の極性勾配に限られており、 H^+ イオン、 Na^+ イオンのようなイオンに対する濃度計測は不可能であった。

これに対して研究代表者である内山は、滞在研究機関の de Silva 教授との先行共同研究において、膜近傍における位置調節部位を導入した蛍光 H^+ イオンセンサーを 33 種類、蛍光 Na^+ イオンセンサーを 6 種類それぞれ合成し、モデル膜であるアニオン性、中性、カチオン性の各ミセル近傍における H^+ イオン濃度、 Na^+ イオン濃度のマッピング成功した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 4667; *Angew. Chem. Int. Ed.*,

2016, *55*, 768; *Chem. Eur. J.*, **2019**, *25*, 8522)。

本研究課題では、これらの先行研究をさらに発展させ、計測対象の三次元構造体を DNA および脂質二重膜であるベシクルへと拡張する。de Silva 教授らにより新たに合成された 4 種類の DNA に結合する蛍光 Na^+ イオンセンサーを用いて DNA 近傍の Na^+ イオン濃度を計測するとともに、これまでに内山が開発した中から 4 種類の蛍光 H^+ イオンセンサーを用いて、カチオン性、アニオン性ベシクル近傍の H^+ イオン濃度の計測を試みた。

成果

①DNA 近傍の Na^+ イオン濃度マッピング：試料としてウシ胸腺由来およびサケ精液由来の DNA を購入し、de Silva 研で合成された 4 種蛍光 Na^+ イオンセンサー (Na^+ 補足部位としてベンゾクラウンエーテル、蛍光団としてアントラセン、DNA 結合部位としてナフタレンアンモニウム構造を備える) を用いて、DNA 近傍における Na^+ イオン濃度依存的な蛍光強度変化を観察した。蛍光センサーと Na^+ イオンの見かけの結合定数は DNA 存在時に有意に増加しており、

これはDNA近傍にてNa⁺イオンが局所的に濃縮されていることを明確に表す世界初となるデータである。滞在先のQueen's大学にて4種蛍光Na⁺イオンセンサーを用いた全ての計測実験を完了しており、基本的なデータ分析の方法、指針をde Silva教授とのディスカッションで決定した。これらに基づいて、現在は得られたデータの詳細な解析を進めている。

②ベシクル近傍のH⁺イオン濃度マッピング:ベシクルはアニオン性のDHP (dihexadecyl phosphate) およびカチオン性のDODAC (dimethyldioctadecylammonium chloride) を選択し、50°C、2~4時間の超音波照射によって目的とするベシクル溶液を調製した。調製した溶液に対して、直径30~50 nm程度のベシクルが存在していることを、電子顕微鏡による観察ならびに動的光散乱法により確認した。さらに、個々の蛍光H⁺イオンセンサーが、それぞれの親疎水性に応じて膜近傍の異なった場所に存在し得ることを中性子反射率測定により確認した。また、ベシクル溶液を用いた蛍光滴定において、蛍光H⁺イオンセンサーの存在が、ベシクル膜構造のサイズや形状に影響を与えていないことを小角X線散乱の測定により確認した(いずれも国内での実験)。アニオン性DHPベシクルを用いたH⁺イオン濃度マッピングでは、検討に用いた蛍光性H⁺イオンセンサーのpKaがいずれも水中の値と比較して0.4~0.9正にシフトしており、ベシクル近傍のナノ環境においてH⁺イオンが10^{0.4}~10^{0.9}倍(2.5~7.9倍)濃縮されていることが明らかになった。一方、最大蛍光波長から見積もることのできる蛍光H⁺イオンセンサーの位置は、使用したセンサーの種類によって大きくは変わっておらず、DHP分子のリン酸基と蛍光センサーの間にイオン-双極子相互作用などの強い引力が働いていることが分かった。カチオン性のDODACベシクルを用いたH⁺イオン濃度マッピングでは、最も親水性の高い蛍光センサーを利用した際に、水中のpKa値

と変化が無かったものの、蛍光センサーの疎水性が増すにつれてpKaが負に3.5~4.0シフトしていた。また、蛍光センサーの疎水性が増加するほど、蛍光滴定における最大蛍光波長が短波長側にシフトしていた。この結果は、疎水性が増すに連れて、蛍光H⁺イオンセンサーの存在位置がベシクル膜の内部に近づくこと、ベシクル内部ではカチオン性基による静電相互作用と、誘電的な効果が競争的に働くことにより、H⁺イオンが少なくとも10^{3.5}~10^{4.0}倍(3,162~10,000倍)希釈されていることを表している。得られた測定結果を基にde Silva教授とディスカッションを重ね、本研究が世界初となる脂質二重膜近傍のイオン濃度マッピングの実例となることを確認した。さらにこの成果は、脂質二重膜近傍における蛍光イオンセンサーの位置調整の初めてとなる実例でもある。効果的なこれらの成果の発表を目指して、現在、その方法を検討中である。

今後の展望

DNA近傍のNa⁺イオン濃度マッピングに関しては、計画した全ての実験を既に終えており、結果も良好であることから、今後はde Silva教授の主導のもと、研究成果のまとめと論文発表を行う予定である。ベシクル近傍のH⁺イオン濃度マッピングに関しても、研究仮説通りの良好な結果が得られたため、まずは、新型コロナウイルスの沈静化を待って自ら学会発表を行いたい。さらに帰国後の現在は、脂質二重膜構造をより生体試料由来に近づけることを目的として、HeLa(ヒト子宮頸がん)細胞を使用した細胞膜近傍のH⁺イオン濃度マッピングを計画しており、2022年夏までにはその実験を終了させたい。その後、これらの細胞実験データならびに解析結果を包括した形で、内山主導のもと、論文発表を行う予定である。