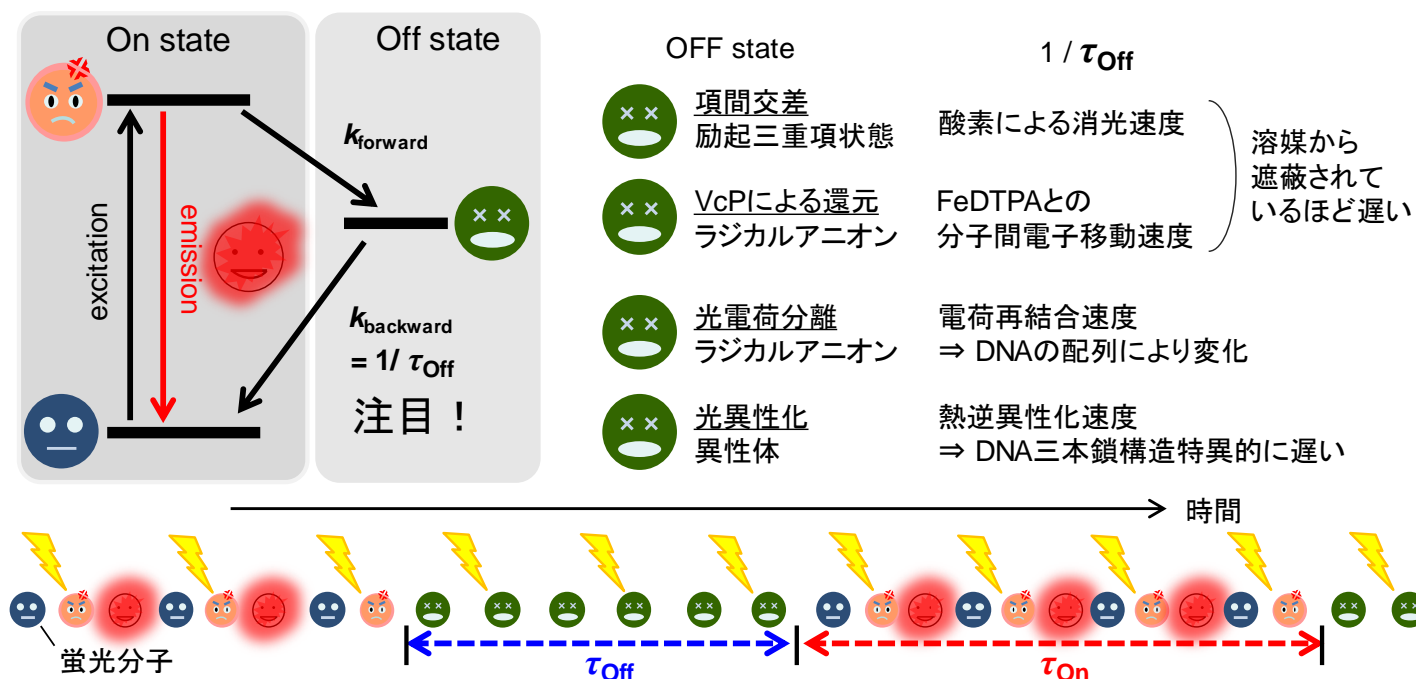


# 研究紹介：現象を調べ、わかったことを積極的に活用することを 目指しています！



光を吸収し光を放つ蛍光分子は情報を読み分けるツールとして、病理臨床検査、遺伝子診断、生体イメージング、そして分子生物学の基礎研究など、様々な分野で使われています。私たちは、分子を1つ1つ見た時にはじめて気付くような分子の光り方、輝き方に注目すれば、1分子を区別してはっきりと見つけれられるだろうと考えました。そこで、1分子レベル特有の現象、蛍光の点滅=blinkingに注目して研究をしています。

・blinking って何？

blinking は1つの分子に注目し、その分子に光を繰り返しあてて何度も発光させることにより観測されます。良く使われている良く光る蛍光分子は、普通は光を吸収して得たエネルギーをまた光として発してもとに戻ります。でも、何らかの反応が起こって分子の状態が変わると、しばらく光ることが出来なくなることがあります。多くの分子がいる場合、光ることができない分子の存在は気付いてもらえませんが、1つの分子に注目すると見えてきます。分子に光をあてて、分子が光ってまたもとにもどる。このサイクルが繰り返されている時が blinking の<on 状態>です。分子が化学反応により、光をあてても光ることができなくなっている時が blinking の<off 状態>になります。on 状態、off 状態が繰り返されることにより蛍光の点滅として観測されます。

日本語の総説: [生命化学研究レター, 58, 5-10 \(2019\).](#)

英語の総説: [Chem. Eur. J., 26, 7740-7746 \(2020\).](#)

英語の総説: [Accounts Chem. Res., 54, 1001-1010 \(2021\).](#)

・blinking が観測されるためには？

消えている状態＝off 状態が、**1)可逆的に生じること**。すなわち、またもとの光ることができる状態に戻れることが大事です。でないと消えたままになってしまいます。

また、off 状態が、**2)しばらくの間存在できること**、が必要です。1つの分子を何度も光らせますが、次の光子が来る前に、またもとの光ることができる状態に戻ってしまっていたら、たとえ off 状態ができていても私たちはそれに気付くことはできません。しばらくの間と言っても、off 状態である時間が 1 マイクロ秒より長ければ blinking を観測できます。

・blinking の点頻度や消えている時間はどのように決まるの？

**点滅頻度**は off 状態になる頻度によって決まります。頻度高く off 状態へとなる分子は、on 状態の時間が短くなります。

**消えている時間の長さ**＝off time は off 状態である時間の長さで決まります。off 状態で長く存在する分子は、off time が長くなります。

・blinking ってここがすごい！

1. なんとと言っても 1 分子レベルで見つけられるところです！極微量のサンプルを用いた分析・診断、究極的なゴールとして 1 分子からの情報読み出しを目指しています。

2. 私が blinking を好きなのは、いろいろな速度を調べることができるからです。しかも、マイクロ秒 ( $10^{-6}$  秒) の、時間分解能で！ off 状態が蛍光分子を光ることが出来なくする分子(消光剤)と結合している状態だとします。その場合、off time から結合している時間の長さがわかります。この時間の逆数が解離速度になります。off 状態が電荷分離状態の場合、off time が電荷分離寿命になり、その逆数が電荷再結合速度になります。通常このような現象をマイクロ秒の時間分解能で調べるためには過渡吸収測定が用いられ、多くのサンプルが必要となります (> 1  $\mu$ M 200  $\mu$ L)。blinking は 0.1 nM 20  $\mu$ L 程度、実に 10 万分の 1 の量で測れます！

blinking を、制御・活用することによって、1 分子レベル分析・診断法 (**K**inetic **A**nalysis based on the **C**ontrol of the fluorescence **B**linking: **KACB** 法)を開発し、いろいろな生命化学現象を明らかにしていくことを目指して研究をしています。

・速度はどうやって求めるの？

蛍光相関分光 (FCS: **F**luorescence **C**orrelation **S**pectroscopy) を用います。1 分子レベルの解析は、装置が複雑で、再現性が出にくいのでは。と思われるかもしれませんが、FCS はいくつか装置として販売されていて、簡単に測定することができます。東工大丸山厚先生の研究室の、オリンパス社製 MF20 では、384-well にサンプルを分注するだけで後は機械がすべて測定してくれます。1 サンプルあたり、10 sec  $\times$  5 回などの条件で測定しており、2 時間もあれば 100 サンプル以上のスクリーニングができます。一方、温度変化測定などを行いより現象を詳しく調べるため、ハンドメイドの FCS 装置も用いています。こちらの装置は、基礎工学研究科の宮坂博先生の研究室の伊都将司先生のご指導により構築させていただきました。この装置を用いることにより、本当にたった一つの分子の blinking を追跡することができます。

・これまでに発表してきた blinking の論文

off 状態 = 蛍光分子が電子を受け取って、還元された状態    off time = 電荷分離寿命

DNA をうまく設計すると、DNA 内電荷分離過程を蛍光の点滅としてみることができます。プラス電荷(ホール)が DNA 内を移動する速度は配列によって変わるので、点滅を見れば配列情報がわかります！

[J. Am. Chem. Soc., 133, 15568–15577 \(2011\).](#)

[日本語の解説、8~11 ページです](#)

[ChemBioChem, 14, 1430-1433 \(2013\).](#)

謝辞:本研究は 科研費『課題番号:24350084: RNA の編集、化学修飾情報の1分子レベル解析技術の開発』、『課題番号:21750170: DNA 内光電荷分離寿命に基づく DNA 情報の読み出し』の助成を受けたものです。

off 状態 = 励起三重項状態    off time = 励起三重項寿命 (酸素との分子間反応)

水溶液中には励起三重項状態の優れた消光剤である酸素がいます。励起三重項状態と酸素の反応が速く進むほど、励起三重項の寿命は短くなります。蛍光分子が溶液に突き出しているほど酸素との反応が速く進み、寿命が短くなることを見出し、DNA のヘアピンと二本鎖の構造変化を1分子レベルで見ることができました。

[Chem. Commun 50, 10478-10481 \(2014\).](#)

off 状態 = 還元状態    off time = 還元状態の寿命 (酸化剤との分子間反応)

上述の励起三重項と酸素との反応では、ヘアピンから二本鎖へと DNA 構造が大きく変わるにもかかわらず、off time 2 倍未満と小さいものでした…。ここで、酸素分子の分子サイズが小さいため、蛍光分子が DNA 二本鎖に埋没していても分子間反応が比較的容易に進行するのではと考えました。還元剤(犠牲酸化剤)存在下で励起三重項状態をラジカルアニオン状態へと変換し、かさ高い金属錯体の酸化剤 FeDTPA との電子移動反応による blinking に置き換えたところ、よりはっきりと構造変化を見ることができました。

[ChemPhysChem 16, 3590-3594 \(2015\).](#)

蛍光分子を結合した1分子の RNA の blinking を観測し続けることにより、リボスイッチの構造変化の1分子観察に成功し、構造変化のダイナミクスを明らかにしました。

[Angew. Chem. Int. Ed., 56, 15329-15333 \(2017\).](#)

本手法を様々な蛍光分子で試し、B 型、A 型らせんの読みわけ、抗原-抗体相互作用の1分子観察を達成しました。

[Chem. Eur. J., 24, 6755-6761 \(2018\).](#)

謝辞:本研究は 本研究は独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ『蛍光の blinking を自在に操る分子技術の創出』、科研費『課題番号:23655155: モレキュラービーコンの1分子レベル観測』、『課題番号:16H01429: 弱い過渡的相互作用をトリガーとした RNA の1分子イメージング』、『課題番号:17H03088: DNA 高次構造転移の1分子実時間観測』の助成を受けたものです。

## off 状態＝励起三重項状態    off time＝励起三重項寿命（TTET）

二つの蛍光分子間で起こる、一重項－一重項のエネルギー移動＝FRET は、幅広く使われています。一方、エネルギー移動は三重項－三重項＝TTET でも進行します。FRET は、比較的長距離（～100 Å）でも起こるのに対し、TTET は分子間衝突が必要となります。このため、TTET を観測することにより、ある 2 地点が衝突する速度を求めることができます。光による分子の分解を防ぐことが知られている「1,4,5,8-cyclooctatetraene (COT)」を、安定化剤、兼、三重項エネルギーアクセプターとして用いることにより、TTET 速度の 1 分子測定に成功しました。動きを調べたい、例えば生体分子に蛍光分子と COT を結合することにより、蛍光分子と COT を衝突させるような生体分子の運動速度を求めることができます。

[Angew. Chem. Int. Ed., 60, 12941-12948 \(2021\).](#)

[https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210414\\_1](https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210414_1)

謝辞:本研究は 科研費『課題番号:17H03088: DNA 高次構造転移の 1 分子実時間観測』の助成を受けたものです。

## off 状態＝光異性化状態    off time＝熱逆異性化速度の逆数

蛍光分子 Cy3 はトランス体で発光しますが、シス体では発光しません。私たちは、Cy3 の分子の大きさが DNA の三本鎖構造の断面図と同程度であることに注目し、Cy3 を DNA のいろいろな構造に導入して見ました。三本鎖構造において、異性化速度が遅くなり、on/off time 伴に長くなることを見出しました。ここで、アデニンにアミノ基を導入して、Hoogsteen 結合を安定化すると、on/off time がさらに長くなり、Cy3 を用いて、3 本鎖構造の有無だけでなく、その剛直性＝どれくらいゆらいているのか、に関して調べられるのでは！と提案しました。

[Chem. Commun. 51\(23\) 4861-4864 \(2015\).](#)

謝辞:本研究は独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ『蛍光の blinking を自在に操る分子技術の創出』の助成を受けたものです。

## 過渡吸収測定、生成物分析を用いた少し前の研究:

### ・DNA の中を電気が流れるの？

私たちは長い間、遺伝情報をつかさどる DNA の中を電気が流れるのか？化学の言葉で言うと、どれくらい速くプラスの電荷(ホール)が移動するのかを調べてきました。DNA は四つの塩基で構成されていますが、そのうちで一番酸化されやすいグアニン(G)塩基を飛び石として、長い距離移動することを明らかにしました！

[J. Am. Chem. Soc., 123\(50\), 12688-12689 \(2001\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 125\(23\), 6842-6843 \(2003\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 126\(4\), 1125-1129 \(2004\).](#)

[Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 101\(39\), 14002-14006 \(2004\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 128\(34\), 11012-11013 \(2006\).](#)

[Angew. Chem. Int. Ed., 45\(1\), 120-122 \(2006\).](#)

[Chem. Eur. J., 13\(8\), 2386-2391 \(2007\).](#)

[Chem. Eur. J., 14\(12\), 3721-3726 \(2008\).](#)

[Acc. Chem. Res., 46\(11\), 2616-2625 \(2013\)](#)

一方で、材料にはそのままでは使えない・・・ことを明らかにしてしまったのです。仕組みがわかったので、化学の力を使って情報を失わない程度に(A-T、G-Cの塩基対形成能を保持して)分子を少しだけ変えてやれば、DNAをワイヤーとして使えるはずだ！という論文をいくつか報告しました。

[Nature Chem., 1\(2\), 156-159 \(2009\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 132\(2\), 627-630 \(2010\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 134\(10\), 4806-4811 \(2012\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 134\(22\), 9406-9409 \(2012\).](#)

電荷が移動する速度は配列によって大きく変わることがわかってきました。速度を測れば、発ガンの原因となる突然変異や、どの薬を飲めば効くのかを決めたりする、配列中の1塩基の違い(一塩基多型:SNPs)を読むことを示しました！でも、測定には非常に多くのDNAが必要で、診断や分析にはとても使えません・・・そこで、blinkingに注目し、現在に至っています。2010年のJACSでは、光触媒的にヨウ素を発生させる、すなわち、情報を増幅して検出できる！ということも示しました。複雑な現象を紐解いて、小学生で習うヨウ素でんぷん反応で検出を！というのがこの研究のコンセプトです。高校の先生になることが決まっていた学生さんに、自分の生徒さんたちに研究を紹介して欲しいと言う思いで、母(川井美登子:南山国際高校・中学校で化学の先生をしていました)からもらった高校の化学の便覧を見ながら学生と決めたテーマです。学生に研究を好きになって欲しいと言う思いもありました。ヨウ素でんぷん反応を使わなければ当然感度をもっと上げることができます。でも、世界的にはあまり受けていません、、、アメリカの著名な化学者に<ヨウ素でんぷん反応って何？>って聞かれてその謎が解けました。

[Chem. Eur. J., 11\(13\), 3835-3843 \(2005\).](#)

[Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 103\(48\), 18072-18076 \(2006\).](#)

[Nucl. Acids Res., 36\(17\), 5562-5570 \(2008\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 132\(40\), 14216-14220 \(2010\).](#)

## ・DNAは光でどのように傷つくの？

太陽光を浴びると、DNAに傷がつきます。DNAの傷は老化や発ガンの原因になり、防がなければなりません。一方、光でガン細胞のDNAを壊すことができれば、ガンを死滅させることができます(光化学療法とよばれます)。光でどのようにしてDNAが傷つくのかを知ることが大事です。私たちは、光を吸収する分子(光増感剤)がDNAのアデニン(A)が並んだ配列に結合すると、プラスとマイナスの電荷がわかれた電荷分状態を生じ、DNAが酸化され壊れることを明らかにしました！電荷分離状態の寿命が長くなるほど、DNAはよく壊れました。最終的に壊れるのは、一番酸化されやすいGなのですが、Gのすぐ近くに光増感剤が結合すると、逆に壊れないのです。Aをいくつか介して結合することにより、効率よく損傷することがわかりました。Aがならんだ配列の近くのGが壊れることが、発ガンの原因になっている可能性を提唱しました。また、どのような光増感剤が体に悪いのか(⇔DNAを壊すのに優れているのか)についての一般則も見出しました:光を吸収して、2番目に酸化されやすいAを酸化できること。でも、一旦還元された後は、電子をすばやく酸素へ渡す必要があり、還元電位は酸素よりもより負であること。簡単に言うと、酸化力が弱すぎず、強すぎず、ちょうど良いことが大事なのです。

[J. Am. Chem. Soc., 125\(52\), 16198-16199 \(2003\).](#)

[Chem. Biol., 12\(9\), 1049-1054 \(2005\).](#)

[Chem. Commun., 1476-1477 \(2005\).](#)

[Chem. Commun., 3918-3920 \(2006\).](#)

[J. Phys. Chem. B, 111\(9\), 2322-2326 \(2007\).](#)

[Chem. Commun., 46\(19\), 3277-3279 \(2010\).](#)

[J. Phys. Chem. B, 114\(31\), 10195-10199 \(2010\).](#)

[Chem. Eur. J., 18\(4\), 1060-1063 \(2012\).](#)

A が連続した配列に光増感剤が結合しないと、光をあてても DNA は簡単には壊れないことがわかりました。どうやったら、もっと積極的に DNA を壊せるのか?? 私たちは、二つの色の光をあてることにより、DNA を効率よくつぶせることを見出しました! 一つ目の光で光増感剤を励起し、電荷分離を起こします。二つ目の光で、還元された光増感剤を励起して、溶媒へと電子を弾き飛ばします。これにより、もとの状態に戻ってしまう電解再結合が起こらず、DNA が壊れるのです。(DNA はそれほどすぐれた電子移動媒体ではないので、再結合より溶媒への電子放出が優先したのです。もともとは電子移動を見ようとしていた系なのですが、あれれ、電子は DNA 中を流れずに溶媒に飛んで行ってしまった、、、ん!? ってことは、DNA を効率よく壊せるのでは? と現象を調べ活用した論文です)

[Angew. Chem. Int. Ed., 43\(18\), 2460-2463 \(2004\).](#)

・DNA ってどんな風に動いているの?

DNA は動くことによって機能します。どんな動きをしてどんな構造になっているのか? 私たちは、酸化されたピレンがもう 1 つのピレンと安定なダイマーラジカルカチオンを形成することに着目しました。ピレンを DNA に二つ結合し、そして、酸化します。酸化がよーいドン! になり、ダイマーカチオンができる速さを測れば、どれくらいの速さで動いているかがわかります。また、めったにおこらないような構造変化も、ダイマーカチオンでつかまえることによりくなるほど、こんな風にも動いているんだ・・・> と言うことを調べられます。ピレンをタンパク質に二つ結合すれば、光をトリガーとして結合を形成できるジスルフィド結合のモデルになるはず。。。でしたが、学生が卒業して永らく冬眠しています。

[J. Am. Chem. Soc., 125\(4\), 912-915 \(2003\).](#)

[J. Phys. Chem. B, 108\(35\), 13547-13550 \(2004\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 127\(38\), 13232-13237 \(2005\).](#)

ピレンは疎水性が高すぎますが、親水性を増した誘導体でもできることを示しました。

[Chem. Eur. J., 26, 5075-5084 \(2020\).](#)

・水素結合を介して DNA の酸化をコントロールできるか?

私が育った齋藤烈先生の研究室では、DNA 中の G 塩基が縦に重なると酸化されやすくなることを明らかにしていました。そこで、横、つまり、水素結合はどうなのだろう・・・と考え、研究を始めました。相補塩基のシトシン(C)と水素結合を形成すると酸化されやすくなること、そして、C に電子吸引基や電子供与基を導入して、酸化されやすさを調節できることを示しました。この研究は、私が D3 時代に考えたものです。齋藤研の計算ソフトで、まず理論の検証から始めました。ある朝大学に行くと、<川井君ごめん、しばらく計算できない・・・>とのことで卒業を迎えてしま

い、齋藤研で発表することはできませんでした。。阪大では計算できずに、結局えいやっとはじめたのですが、すでに真嶋研究室にあった装置でデータを出すことができました。修飾 DNA を作る設備が無い中、モノマーを使って良いスタートが切れた思い出のテーマです。このあと、隣の研究室の谷澤克行先生に DNA 合成機をお譲りいただき、上記修飾 DNA の研究がスタートします。当時、谷澤研は真嶋研の隣で、一緒にバーベキューをしていた日に、当時は助教授でおられた黒田先生に紹介いただいたのを覚えています。久しぶりに合成機を見たときは嬉しかったですね～これで勝負できるぞと。初めて九大先導研の丸山厚先生の研究室で MF20 (blinking の観測に必要な装置)を見たときも、心が躍ったのを覚えています。

[Angew. Chem. Int. Ed., 39\(23\), 4327-4329 \(2000\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 124\(14\), 3586-3590 \(2002\).](#)

[Chem. Commun., 2840-2841 \(2003\).](#)

[J. Am. Chem. Soc., 126\(40\), 12843-12846 \(2004\).](#)

---

## ・学生時代の研究 左巻き Z-DNA の構築とハロウラシルの光反応(思い出話です)

杉山弘先生が行われていたハロウラシルの光反応を Z 型 DNA で調べるのが私のテーマでした。回生は、DNA を Z 型にする 8 メチルグアニアミダイトの合成。修士からは、ハロウラシルの光反応、そして、8 メチルグアニンを使って DNA を左巻きにすることを熱力学的に検証しました。4 回生の後期半年は中條善樹先生のもとにいましたが、帰ってくるとく川井、でるた G には強いのか? >と先生に聞かれました。緊張していたので、<なんだでるた G って、今度はどんな置換基をつけるのだろう・・>としばらく(10 秒くらい)真剣に考えたのを覚えています。溶媒接触表面積で議論する経済的水和という概念や、疎水的水和はエントロピー的に不利、なんてことを、CD を測定させていただいていた砂本研にあった本で勉強させていただきました(杉山先生から教えていただいたのですが、記憶違いで杉山先生の本だったのかもしれませんが。。)。Tm や CD 測定が楽しくて、研究が面白くなりだした頃です。M1 からず～～と続けていたハロウラシルの光反応は D2 後半になりようやく進展します。つまり、ちっとも進まなかったわけです・・・日曜の夜が辛かったですね、、どうすれば良いのかわからなくて。でも、月曜の朝起きるとくそうだ、これ試してみよう>となって、一応完全な手詰まりになることはありませんでした(試みはほとんど失敗でしたので、限りなく手詰まりでしたが)。CREST で導入された ESI により謎がとけることとなります。初めて装置の威力を目の当たりにしました。ハロウラシルのヨウ素原子が塩素原子に置き換わっているのがわかりました。杉山先生が移られた東京医科歯科大学に出張して、そこでひたすら測定したのを覚えています。そして、別目的で入れた NaI がパーオキシサイドの還元剤として働き、機構解明に至り論文になりました。実は、齋藤先生から早い段階で<還元剤を入れなさい>と指導を受けていたのです、、報告したときの齋藤先生のほらみろと言う笑顔が忘れられません。。何もおっしやられませんでしたね。いろいろな先生に対し何度か思ったことはあるのですが、あの日が一番思いました<手のひらで転がっているだけだ・・>と。

あまりにハロウラシルの光反応の機構解明に時間がかかっていたので、いつまでたっても博士論文が書けないと思い、保険としてアデニンの 8 位にアミノ基を導入した誘導体を合成し、論文を書かせていただきました。Hoogsteen 水素結合を増やし、三本鎖構造を安定化することができました。ただ、大目標の Hoogsteen パラレル二重鎖の構築にはいたりませんでした。アデニンの 8 位にメチル基を導入した誘導体も Z 型を安定化できることを確認したのですが、論文にしま

せんでした。JACS レベルでは無いし、論文も 1 報書かせてもらったので、本職に戻らなければいけない。。と考えていました。今思うと、論文にすべきでした。トリメチルアルミニウムの反応溶液を、エバポの水浴に落としてすごく怖い目に合ったのに。。。素早く拾い上げ、口を自分から遠い方向に向けることができ大事にはいたりませんでした。エバポの水浴に落としたのはこれが最初で最後です・・危険な試薬を使っていて、特に慎重にと思ったのがあたとなったのでした。ちゃぽんと落とした後、飛び散るまでの間、0.3 秒くらいでしょうか・・・あの間が今でも覚えています。ちなみに、保護基は違いますが、8 アミノアデニンアミダイトは Glenresearch から買えるようになっています。私の論文は引用されていません。。。悲しいですね。

[Nucleic Acids Res., 24, 1272-1278 \(1996\)](#)

[Tetrahedron Lett., 39, 5221-5224 \(1998\)](#)

[J. Am. Chem. Soc., 121, 1391-1392 \(1999\)](#)

[Tetrahedron Lett., 40, 2589-2592 \(1999\)](#)

[Tetrahedron Lett., 40, 5721-5724 \(1999\)](#)

[博士論文\(電子化されていて誰でも見られるとは長い間知らなかったです・・・\)](#)

#### ・学生時代の研究 : 三塩化ホウ素と末端ジイン類のハロボレーション重合

学科の決まりにより、4 回生の後期は齋藤研を離れ、重合化学講座の中條善樹先生にご指導いただきました。いろいろなジイン類を合成し、三塩化ホウ素と重合する、と言う研究です。アイデアもなくひたすらジインとの組み合わせを試ただけで、できたポリマーの評価法もちゃんと勉強しなかったのが、全く進みませんでした。。。他分野を経験するには私の能力では早過ぎました。。教科書に出てくるようないろいろな有機合成、そして、蒸留はたくさんしました。

その他:

さきがけ研究者を兼任しておりました

[蛍光の blinking を自在に操る分子技術の創出](#)

EYELA で記事にしてもらいました！

[DNA を使った光電荷分離の研究: 研究室を盛り上げる良き兄貴役](#)

中学生、一般の方々に講演しました！

[光で生命を見る ~ 研究はきらきらした芸術！ ~](#)

父の書いた本の紹介です

[生命を知るための基礎化学- 分子の目線でヒトをみる](#)

---

Contact Info. 川井清彦

〒567-0047 大阪府茨木市美浦ヶ丘 8-1

国立大学法人 大阪大学 産業科学研究所

励起材料化学研究分野 居室 F-451

TEL: 06-6879-8496

E-mail: kiyohiko@sanken.osaka-u.ac.jp