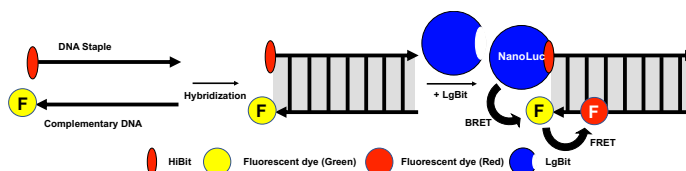


## 鎖置換反応を利用した DNA 足場 BRET システムの動的制御

○高野史章・南出悠貴・仁木智哉・田花汐理・葛谷明紀（関西大化学生命工）

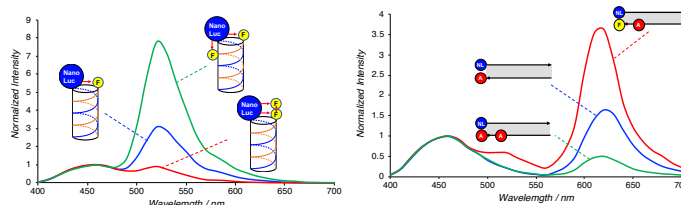
**Dynamic control of DNA scaffolded BRET system using strand displacement reaction.** (Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University.) TAKANO Fumiaki, MINAMIDE Yuki, NIKI Tomoya, TABANA Shiori, KUZUYA Akinori.

蛍光色素で標識を行う顕微鏡観察法では、強い励起光の照射に伴う蛍光色素の退色や細胞毒性が問題になる。発光タンパクを励起源として用いれば、これらの問題を回避することができる。しかし、発光タンパクの波長は基質に依存して固定されている。そこで、発光タンパクと蛍光タンパク質を適切なリンカーを介して融合タンパク質として波長変調することが考えられる<sup>1)</sup>。この生体発光共鳴エネルギー移動 (BRET) システムでは、効率的なエネルギー異動が可能な反面、多大な労力を伴う遺伝子組換え実験によるリンカーの配列、長さの最適化が必要である。本研究では、DNA をリンカーとした BRET/FRET システムを活用した多色発光システムを開発した。まず DNA をハイブリダイゼーションさせることで BRET を誘導した。次いで、DNA に複数の蛍光色素を導入し、さらに長波長へ変調することができる。これにより RGB 発光が可能となり 3 つの DNA 複合体濃度を調整することでマルチカラーな発光を自在に選択できる系を実現した。また、ハイブリダイゼーション、鎖置換反応を利用することで色調の変化をリアルタイムで観察した。



**Fig 1.** Multi-color bioluminescence using DNA as a linker.

NanoLuc (Nluc) 発光タンパクのスプリット体のうち、小断片側のペプチド鎖 (HiBit) を 5' 末端に結合した HiBit-DNA を合成し、それと相補な FAM 修飾 DNA とハイブリダイゼーションさせた。その後、大断片側 (LgBit) 溶液を加え発光タンパクを DNA 末端で再構築した<sup>2)</sup>。これに Furimazine を加えた結果、発光スペクトルおよび iPhone による撮影により BRET が観察された。このことは、二本鎖 DNA 末端で蛍光色素を発光タンパクの近傍に局在化させていることで BRET の誘導に成功した。また、赤色発光も Alexa594 を用いて同様に行った。より鮮明な緑色発光させるために、DNA に FAM を連続導入 (2FAM) したところ、分子同士の衝突により消光した。そこで、FAM 同士の衝突を考え、2 分子の FAM が二重螺旋の反対側に位置するように 4 塩基離して、2 分子目の FAM を鎖内に導入 (FAM Int FAM) した結果、予想通り FAM 蛍光を抑えることに成功した。結果として青色と緑色の発光強度比は FAM 1 分子の 2.9 と比較して 8.8 と大幅に向上した (Fig 2A)。より鮮明な赤色発光では 2 つのアプローチを試みた。1 つ目は FAM を一旦経由してその後、FAM と Alexa の間で FRET を起こさせる系。2 つ目は、2 分子の Alexa で直接エネルギーを受け取る系である。結果として FAM 経由で BRET と FRET を組み合わせることで、青色と赤色の発光強度比が向上し、より鮮明な赤色が得られた (Fig 2B)。RGB の 3 つの DNA 濃度を調整し、マルチカラーな発光として、白色および水色、黄色、ピンク色発光実現できたことから、3 つの DNA 濃度を調整するだけでマルチカラーな発光を自在に選択できることが確認できた。また、鎖置換反応により緑色から赤色へ変化している様子が発光スペクトルおよび動画から観察できた。



**Fig 2.** (A) Normalized intensity of (green) FAM Int FAM, (blue) FAM, (red) 2FAM. (B) Normalized intensity of (red) FAM Int Alexa594, (blue) Alexa594, (green) Alexa594 Int Alexa594.

- 1) S. Sihuai, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, *17*, 1704.
- 2) A. S. Dixon, et al., *Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.