

論文の内容の要旨

論文題目 A study on design of highly conductive nucleosides for high precision DNA sequencing based on single molecule electronics

(単分子伝導度計測に基づく高精度な核酸配列決定の実現に向けた高導電性核酸塩基の設計に関する研究)

氏名 古畑 隆史

第1章. 諸言

近年、DNAの超高速な配列解析を実現する手法として、量子シーケンサーと呼ばれる手法が有望視されている。本手法は、ナノメートルからサブナノメートルスケールに制御された金属のギャップ電極を用いて電氣的に核酸塩基を検出する単分子伝導度計測の発展的手法である。ギャップ間を核酸塩基が通過すると、核酸塩基の導電性に依りて異なる強度のトンネル電流が流れる。その強度差が十分であれば、電流強度の変化から核酸塩基の同定を行うことができる。また、核酸塩基の電気伝導特性をトンネル電流から直接読み出すため、従来では直接検出が困難であった核酸塩基の化学修飾を一塩基分解能で検出可能な潜在能力を持つ。

一方、本手法には実応用に向けた大きな課題があった。それは、導電性の近い核酸塩基を識別できないことである。これは、各核酸塩基に由来するトンネル電流値が大きな分散を持ち、導電性が近い場合には互いに分布が大きく重なるためである。例えば、標準的な4種の遺伝暗号 (dA, dT, dG, dC) のみに着目しても、dAはその他核酸塩基との導電性が近く、トンネル電流強度の差に基づいた正確な識別が難しかった。

本研究では、核酸塩基の識別精度の低さの要因となる導電性の類似性に着目し、その克服を目指して、高導電性核酸塩基の設計指針の確立と創出を試みた。酵素反応や化学反応により、特定の核酸塩基を標準核酸塩基に比べて高い導電性をもつ構造に置換することができれば、解析対象となる核酸塩基間の導電性の差異を拡張し、正確な識別が可能となる。本論文は全5章により構成され、第1章では量子シーケンサーの現状、及び課題を緒言として述べる。また、第2章から第4章については、単分子電気伝導の物理化学的メカニズムに基づいた高導電性核酸塩基の設計と量子シーケンサーによる核酸塩基識別精度の向上に向けた研究について、結果と考察を交えて記述する。第5章では、今後の展望も含め本研究を総括する。以下、各章の内容について概述する。

第2章. 核酸塩基の物性—導電性相関の系統的評価と4種遺伝暗号の識別促進に向けた高導電性核酸の応用

4種の標準核酸塩基の中でも、特に、dAはdCやdGと類似した導電性を持つため、その識別が難しい。本章では、dAを高導電性の類縁体に酵素的に置換することで、4種遺伝暗号間の導電性の差異を拡張する戦略を目指した。標準核酸塩基の導電性は $dT < dC \leq dA < dG$ の順である。そこで、中間的な導電性を有するdAをdGに比べて更に高い導電性を持つ類縁体に置換できれば、4種の識別は容易になると考えた。

まず、高導電性核酸塩基の設計指針として、核酸塩基の導電性と電気化学物性の相関について検証を試みた。トンネル電流は核酸塩基を介した確率的な電子移動過程と言える。このメカニズムから考察すると、金のフェルミ準位と最も近いエネルギー準位を持つ分子軌道を介した経路が、最も電子移動のエネルギー障壁が低いと考えられる。そこで、核酸塩基の分子軌道の中で、最も軌道準位が金のフェルミ準位に近い最高被占軌道 (HOMO) に着目し、その軌道準位 (HOMOレベル) と導電性の相関を、HOMOレベルの異なる一連の非天然核酸塩基について導電性を評価することで系統的に検討した。その結果、核酸塩基の導電性について、HOMOレベルが金のフェルミ準位に近づくほど高くなる傾向を見出した。

続いて高いHOMOレベルを有するdAの類縁体として、dAのプリン環7位のN原子をC原子に置換したdzdAに着目し、dT, dC, dGとの導電性の比較を行った。dzdAは、DNA合成酵素による取り込みがdAと同等の精度、効率で行われるdA類縁体である。ギャップ間距離0.6 nm、ギャップ間の印加電圧0.1 Vの条件で測定を行い、シグナル電流値から求められるコンダクタンス値を導電性の指標として比較した。その結果、dzdAはdCに比べて24%、標準核酸塩基の中でも最も高い導電性を有するdGと比べても15%高いコンダクタンス値を示すことがわかった。この値は、標準核酸塩基の中で最も差異の大きいdTとdGの差である17%に匹敵する値であり、dzdAとその他核酸塩基の効率的な識別が期待できる。一方、標準のdAでは、dCとdGそれぞれに対して4%しか差異がなかった。以上から、量子シーケンサーによる効率的な4種遺伝暗号の識別に向け、dAから酵素的に置換可能な高導電性dA類縁体 (dzdA) を用いて、4種遺伝暗号の導電性の差異を大きく拡張できることが示された。

第3章. 化学ラベルによる電子物性制御戦略に基づいた核酸塩基修飾の検出

本章では、HOMOレベルに着目した高導電性核酸塩基の設計戦略を拡張し、核酸塩基上の化学修飾の検出を促進する戦略を提案する。核酸塩基修飾は、遺伝子発現のエピジェネティック制御や変異原性に関わり、細胞機能と密接に結びついている。導電性から化学物性の差異を直接読み出す量子シーケンサーは、化学修飾を持つ核酸塩基を一塩基分解能で解析する有力な手法となりえる。化学反応により修飾核酸塩基の導電性を制御し、標準核酸塩基との導電性の差異を拡張できれば、その検出を大きく促進できると期待される。

以上から、本研究ではdTの重要な酸化ストレス産物である5-formyl dU (5fdU) をモデルとし、官能基変換反応による修飾核酸塩基の検出促進を目指した。5fdUの導電性の向上にあたり、formyl基と1,2-phenylenediamineとの間で起こる酸化的benzimidazole形成反応に着目した。本反応

により、電子吸引力を持つformyl基は広い π 共役系を有するbenzimidazoleへと変換され、結果として生じるBzIm-dUは高いHOMOレベルと導電性が期待される。0.6 nmのギャップ電極を用いて単分子伝導度計測を行った結果、5fdUは標準核酸塩基の中で最も導電性の低いdT、及び最も導電性の高いdGと比較した場合においても、コンダクタンスの差異は10%以下であり、標準核酸塩基との識別は困難であることが示唆された。一方、BzIm-dUのコンダクタンスは、dTに比べて40%、dGに比べても20%高い値を示し、導電性の差異が大きく拡張されていることが示された。また、本反応は、5fdUに対して定量的に進むことが実験的にも確認されている。以上、官能基変換反応によるHOMOレベルの制御により、対象核酸塩基間の導電性の差異を拡張し、核酸塩基修飾の検出を促進できる可能性が示された。

第4章. 金-核酸塩基相互作用に着目した高導電性核酸塩基の分子設計とその応用

第3章までで、HOMOレベルに基づく高導電性核酸の開発とその応用可能性を検討してきた。一方で、単分子導電性を支配する要因は、電子移動を媒介する分子軌道のエネルギー準位だけでなく、金電極と分子の電子雲の重なりが重要である。そこで、本章では金と核酸塩基の相互作用に焦点を当て、高導電性核酸塩基の設計戦略の拡張を試みた。

高導電性核酸の開発のため、金電極との強い相互作用が期待される、シアノ基 (-CN)、エチニル基 (-CC)、アミノ基 (-NH₂) の三種の官能基を pyrimidine 環 5 位に導入した dU 誘導体を設計し、導電性の評価を行った。その結果、-CC 修飾をした EtdU で特に高い導電性を示すことを見出した。一方、-NH₂ 修飾を施した AmdU ではその高い HOMO レベルと金親和性の-NH₂ 修飾にも関わらず、EtdU よりも低導電性であった。さらに、EtdU を標準核酸塩基と比較をした結果、dT と比べて 60%、dG と比べても 27% 大きな導電性を示した。以上から、核酸塩基に金親和性官能基を導入することで、核酸塩基の高導電化が可能であることが示唆された。これまでに、EtdU は遺伝暗号“T”として酵素的に DNA 鎖に導入可能なことが知られており、配列解析やイメージングによる DNA 複製の解析において、ゲノム DNA の複製領域を標識するための分子プローブとしても使われてきた。従って、将来的に EtdU は量子シーケンサーによる DNA 複製の単分子解析を実現する分子プローブとしての応用も期待できる。

第5章. 結言

以上、本研究では量子シーケンサーの応用可能性の拡張に向け、(1) 核酸塩基の HOMO レベル、(2) 金電極と核酸塩基の電子雲の重なりの 2 つの化学的観点に基づく高導電性核酸の設計を行った。第 2 章では 4 種遺伝暗号の識別、第 3 章では修飾核酸塩基の検出、第 4 章では DNA 複製の解析、への応用が期待できる核酸塩基構造を見出すに至った。本研究で示した単分子電気伝導の原理に基づく分子設計戦略は、量子シーケンサーの原理的な課題であった核酸塩基間の導電性の類似性を打開し、その応用可能性を高める戦略を提示するものである。今後、本化学戦略を、DNA の金ギャップ電極間における通過速度や方向を制御するナノテクノロジー、及び得られたトンネル電流シグナルの効率的な解析を可能とする情報科学技術と組み合わせることにより、量子シーケンサーによる正確な DNA 配列解析が実現できると期待される。