OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on Electron Transfer Kinetics in DNA and RNA by Monitoring Single-Molecule Fluorescence Blinking
Author(s)	范, 姝亜
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91909
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (FAN SHUYA)	
Title	Studies on Electron Transfer Kinetics in DNA and RNA by Monitoring Single-Molecule Fluorescence Blinking （1分子蛍光ブリンキング観測によるDNAおよびRNA中の電子移動に関する研究）

Abstract of Thesis

Electron can migrate along DNA over long distances due to the π-staked structure formed by aromatic base pairs in DNA. An electron transfer in DNA could occur in the molecular system with donors (D) and acceptors (A) separated by bridging (B) nucleobases of different lengths, which makes DNA highly anticipated in the fields of nanoelectronics, biosensor devices, and electrochemical sequencing techniques. Extensive studies on electron transfer (ET) in DNA by ensemble-averaged measurements disclosed the basis of ET, which advanced DNA applications. However, such measurements obscured the underlying single-molecule science of ET reactions and consumed large quantities of samples, which is incongruent with tiny and precious biological samples.

Playing a key role in fluorescence-based analysis, ET kinetics can be investigated by fluorescence techniques. A single fluorophore-modified molecule occasionally undergoes photoinduced ET, hole migration, and charge recombination during the repeating excitation and emission process upon a continuous laser. This resulted in fluorescence fluctuations between a fluorescence-emissive state and a non-emissive state, which is the so-called blinking. The non-emissive state, *i.e.*, the OFF state, corresponds to the charge-separated state, and its lifetime was evaluated as τ_{OFF}. ET rate (k_{ET}) was determined by the inverse of the lifetime of τ_{OFF}. The duration of the emissive ON state was defined as τ_{ON}.

In this dissertation, the ET kinetics in DNA was investigated at the single-molecule by monitoring fluorescence blinking. A series of ATTO655-modified DNA oligonucleotides with different numbers of intervening bases between fluorophore and hole trap, deazaguanine, was designed. The ET rate for each sequence was measured by monitoring fluorescence blinking at the single-molecule level and the systematic study of distance-dependent ET in DNA up to 27 Å was demonstrated. An unexpected great heterogeneity in the ET rate of DNA was observed. Several possible origins were examined and discussed to understand the heterogeneity more deeply. Blinking behavior of fluorescent molecules with different blinking rates, which depends on the τ_{OFF} and τ_{ON}, was proved to reveal the single-molecule kinetics. The blinking patterns were controlled using DNA as a platform by monitoring blinking triggered by intramolecular ET. The distance between the fluorophore and hole trap was fixed to be 17 Å in a series of DNA oligonucleotides. A-T and G-C base pairs were used to regulate the τ_{OFF} and τ_{ON} of a blinking molecule for controlling blinking patterns. Kinetics modeling of intramolecular ET was presented for precise control of blinking patterns. It was believed to increase the biomolecular targets that can be simultaneously detected by controlling the blinking patterns in addition to the conventional fluorescence intensity and emission wavelength. For application purposes, the established single-molecule blinking measurement was applied to pathological specimens prepared from cell blocks of cultured cells. A probe was properly designed to target the R132H mutation of IDH1 gene, which is related to glioma. The probe successfully discriminated the mutation in both synthetic RNA and in the pathological sections, raising a possibility of a new therapeutic approach during surgery. Throughout this dissertation, the system of investigating ET kinetics in DNA and RNA at the single-molecule level was successfully established. With this method, the ET rate of a single molecule could be properly determined by monitoring fluorescence blinking. This systematic study will not only allow for a deeper understanding of ET reaction mechanisms but also provide possibilities for advancing biochemical diagnosis and analysis.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（ FAN SHUYA ）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	藤塚　守
	副 査　教授	正岡　重行
	副 査　教授	松崎　典弥
	副 査　教授	木田　敏之
	副 査　教授	安田　誠
	副 査　教授	生越　専介
	副 査　教授	鳶巣　守
	副 査　教授	菊地　和也
	副 査　教授	伊東　忍
	副 査　教授	平野　康次
	副 査　教授	家　裕隆
	副 査　教授	芝田　育也

論文審査の結果の要旨

DNA塩基の芳香環が形成するπスタック構造により、電子はDNAに沿って長距離を移動することができる。DNAの電子移動は、ドナー（D）とアクセプター（A）が異なる長さの介在塩基（B）で隔てられている分子系で起こり、ナノエレクトロニクス、バイオセンサー、電気化学的シーケンサーなどの分野への応用が期待されている。DNAの電子移動については、アンサンブル平均法による研究が盛んに行われ、電子移動の基礎が明らかにされている。しかし、このような測定では電子移動反応の1分子化学が不明であり、また、貴重な生体試料を大量に消費するという問題点がある。

蛍光を用いた分析法により、電子移動の速度論を調べることができる。蛍光分子を修飾したDNAは、CWレーザーによる励起と発光を繰り返す過程で、光誘起電子移動、ホール移動、電荷再結合を起こすことがある。その結果、蛍光発光状態と非発光状態との間で蛍光が揺らぐ、いわゆるブリンキングが起こる。非発光状態、すなわちOFF状態は電荷分離状態に相当し、その寿命はOFF状態の持続時間、τOFFとして評価することができる。電子移動速度（k_{ET}）は、τOFFの寿命の逆数として求められる。また、発光しているON状態の持続時間をτONと定義している。

本論文では、蛍光ブリンキングをモニターすることにより、１つ１つのDNA中の電子移動速度を調べている。第一章では、蛍光分子とホールトラップであるデアザグアニンとの間に介在する塩基の数が異なる一連の蛍光分子ATTO655修飾DNAオリゴヌクレオチドを設計し、各配列の電子移動速度を蛍光点滅よりモニタリングし、1分子測定することで27Åに及ぶDNAにおける距離依存的な電子移動速度の系統的測定を達成している。DNAの電子移動測定において、予想外の大きな不均一性が観察されることより、この不均一性をより深く理解するために、いくつかの要因を検討し、議論している。第二章では、蛍光分子のブリンキング挙動は、τOFFとτONに依存することより、DNAをプラットフォームとして用いて、蛍光分子とホールトラップの間の距離を17Åに固定し、A-TとG-Cの塩基対の数を変化させたサンプルに対し、分子内電子移動をトリガーとするブリンキングをモニターすることで、ブリンキングパターンをDNA配列により制御できることを示している。分子内電子移動の数値解析を行い、ブリンキングパターンをDNA内電子移動により精密に制御できることを明らかにしている。従来の蛍光強度や発光波長に加え、ブリンキングパターンを制御することで、同時に検出できる生体分子ターゲットを増やすことができることを示している。第三章では、確立した1分子ブリンキング計測を、培養細胞のセルブロックから作製した病理標本の診断に適用している。神経膠腫に関連する IDH1 遺伝子 R132H 変異をターゲットとしたプローブを設計および合成し、合成RNA、病理標本上のmRNAの両方において変異を識別することに成功し、術中迅速診断により、新たな治療選択を与える可能性を示している。本論文を通じて、DNAやRNAにおける電子移動速度を1分子レベルで調べる系の確立に成功している。

以上のように、本論文の体系的な研究は、電子移動反応機構の理解を深めるだけでなく、生化学的分析・診断の進展につながる可能性がある。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。