

レーザー加熱による 2 本鎖 DNA の部分的開裂

機械工学専攻 40250 渡辺隼 指導教官: 鷲津正夫 教授

研究の背景

近年, DNA の塩基配列の解読は盛んに行なわれているが, 1 度に解読できる長さは数百塩基ほどである. そこで, 塩基が多い場合の解読には様々な制限酵素を用いて DNA を断片化することで解読している. その際, DNA の断片化は水溶液中で行なわれるため, DNA 断片は元の塩基配列のどの位置にあったのかという情報を失ってしまう. 全体を再構築する際には, 解読された DNA 断片の重なり部分を用いるが, この方法では DNA が長くなればなるほど時間がかかることになる. そこで, 元位置の情報を持った DNA 断片を回収することが出来れば, 解読の時間は大幅に短縮される.

研究の目的

元位置の情報をもった DNA 断片の回収方法の 1 つに局所的な DNA の複製があるが必要なことは以下の 2 点である.

DNA の任意の位置にアクセスできること.

DNA の複製を取れること

: DNA は溶液中ではランダムコイル状になっている. そのため, 任意の位置にアクセスすることが出来ず, DNA を伸張させて固定する必要がある. その方法として本研究室で行なわれている静電伸長法を用いることで, DNA は電極間に伸長固定することが可能である.

: DNA の複製方法としては PCR がある. DNA を 94 °C 以上に加熱すると DNA は 1 本鎖に解離する. 温度を下げ, プライマーと呼ばれる短い DNA 断片を複製する DNA の一端に結合させ, そのプライマーを複製開始として酵素 (DNA ポリメラーゼ) により DNA が複製される. つまり, DNA を局所的に加熱することによって部分的に開裂させて複製することが出来れば, 位置情報をもった DNA 断片を取り出すことが可能となる.

本研究の目的は, 位置情報をもった DNA 断片を取り出す際に必要となる局所 PCR を行なうことである. その際に必要となる DNA の局所的な開裂の手法を開発する.

DNA の切断抑制

水に吸収スペクトルを持つ赤外レーザーを顕微鏡に入れ、100倍対物レンズを用いて絞り、局所加熱を行なう。先に述べた伸張固定法を用いることにより、顕微鏡下において DNA を任意の位置で局所加熱することが可能となる。

昨年までの同研究においては、ほとんどの DNA がレーザーを照射した際に切断してしまうことが問題となっている。その原因として挙げられるのは、蛍光色素が励起される際に発生する酸素ラジカルの発生による DNA 鎖の切れ目(ニック)の発生、レーザーを照射する際に発生する対流が考えられたため、本研究では還元剤をより強いものを作用させ、また、照射時間を短いパルスで行なうことにより切断の抑制を試みた。その結果、DNA の切断を抑制することが出来た。

蛍光の瞬間的消光及び回復

切断されなかった DNA の観察を行なったところ図1のような局所加熱位置での瞬間的な消光および蛍光の回復が見られた。今回 DNA を可視化するために用いた蛍光色素は、DNA の 2 本鎖のみを染色する色素であるため開裂部分では蛍光の消光が観察されると考えられる。しかし、温度上昇による蛍光色素自身の褪色によるものも否定されないため部分的な開裂が起きない条件で同条件の実験を行なった。

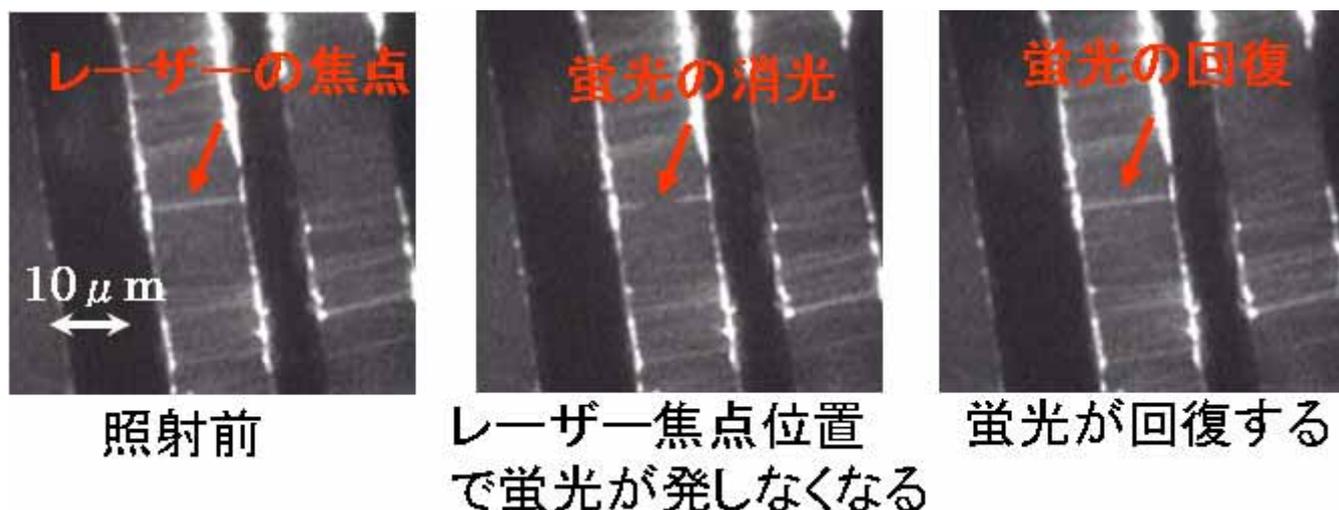


図 1. レーザー照射の際の瞬間的消光及び蛍光の回復

ガラス基板に吸着させることによる部分的開裂の抑制

Mg イオンの架橋作用を用いて DNA をガラス基板上に吸着させた後に DNA にレーザーを照射したところ図 2 のように蛍光の変化が観察されなかった。DNA をガラス基板上に吸着させた以外の条件は全く同じであるため先の観察結果は DNA の部分的開裂によるものと結論された。

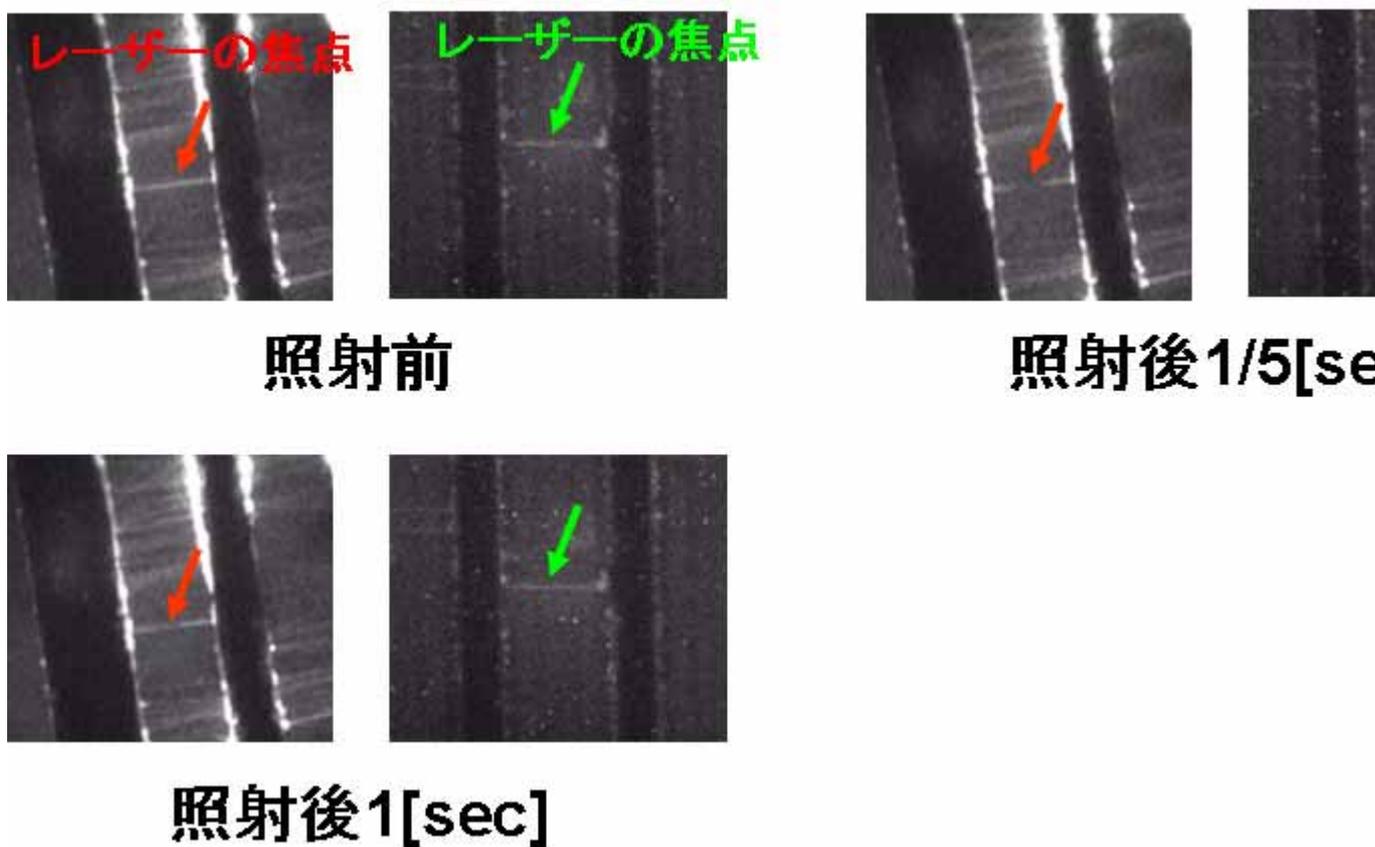


図 2. レーザー照射の際の蛍光変化 (左:吸着なし 右:吸着あり)

結論

DNA の切断を抑制させた結果、DNA を部分的な開裂を観察することが出来た。以上の結果は、局所 PCR への道を開くものと考えられる。