

微細流路を用いたゲノムDNAの高次構造制御

鷺津・小穴研究室 工学部機械工学科 60193 金子大二
指導教員 小穴英廣講師

1. 背景

DNAは負に帯電した高分子で、細胞内ではポリカチオンに結合し、凝縮構造を取っている。DNAは1価塩が加わると脱凝縮状態になるという性質をもっており、そこにポリカチオンを加えることで再び元の凝縮状態となることができる。このDNAの凝縮と脱凝縮は可逆的であり、このことが遺伝子の読み出しを制御していると考えられている。凝縮、脱凝縮状態の変化をDNAの高次構造変化と言い、近年この高次構造変化のメカニズムに関する研究が行われている。

昨年度の本研究室では、長さ1 mm程度の長いDNAを対象として、凝縮、脱凝縮過程の観察を試みた。結果、凝縮、脱凝縮過程を観察できたが、その定量的解析には至っていない。

2. 目的

長さ1 mm程度の、長いDNAの高次構造変化の時間変化を定量的に解析する。

3. 方法

1価塩を加えるとポリカチオンがDNAに作用する力が弱まるので、DNAは脱凝縮する。ポリカチオンや塩の溶液をDNAに加えるため、図1のような4個の溶液導入ポートを備えた微細流路を作製した。流路内には大量のピラーを配置し、DNAをそこにトラップする。ピラーの流れ方向の間隔は2 mmと長く、これは長いDNAがピラーにトラップされても、DNAの末端が次の列のピラーに当たらないようにするためである。

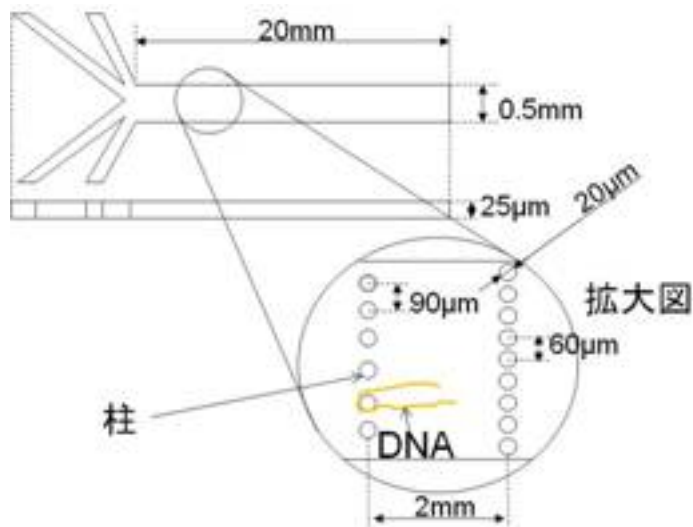


図1 微細流路

溶液導入ポートにはそれぞれ、酵母から取り出したDNA溶液（長さ約1 mm）を2 MのNaClに溶かしたもの、1mMのスペルミジン水溶液（3価のカチオン）、蒸留水、500 mMのNaCl水溶液の入った容器を接続し、各溶液を流す。1 mMのスペルミジンはDNAを完全に凝縮させ、500 mMのNaClはDNAを完全に脱凝縮させることが分かっている。各溶液にはDNAと結合する1 μ Mの蛍光色素(YO-PRO-1)と1 mMの還元剤dithiothreitol(DTT)が含まれている。実験手順は以下の通りである。

- ① ピラーにDNAを引っ掛け、流れによって伸ばす。
- ② 蒸留水を流し、塩を流路中から流し去る。
- ③ スペルミジン溶液を流し、DNAを凝縮させる。凝縮部分は明るい輝点となって見えるので、その動的変化を経時観察する。
- ④ DNAが完全に凝縮したら、1価塩を流すことで脱凝縮させ、もう1度同じDNAで凝縮過程を観察することもできる。

4.実験結果

輝点が末端に1個生じて凝縮、輝点が末端に最初でき、末端に近いほうから順に複数個輝点が生じて凝縮する(図2) という2種類の凝縮過程を観察することができた。

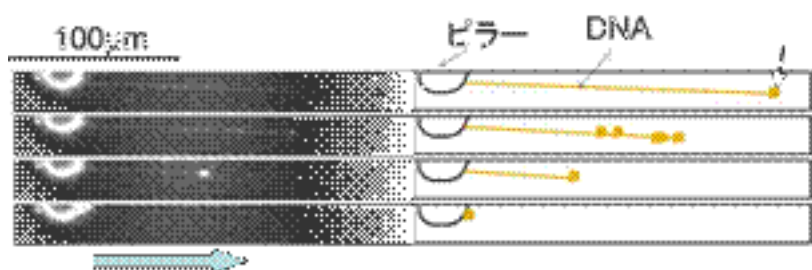


図2 複数個輝点ができるDNAの凝縮過程

これらの凝縮過程から言えることは、DNAが凝縮するときには、最初に末端から凝縮が進行するということと、複数個輝点が生じる時には、末端の方から順番に凝縮が生じているということである。

ここで、どの輝点でDNAの凝縮が進行しているのかを調べるために輝点の輝度を測定した。凝縮が進行している輝点はDNAの密度が上昇し、輝度が大きくなると考えたからである。結果、DNAの途中で生じた輝点でも、DNAの凝縮が進行していることが判明した。

5.考察

DNAの凝縮力は均一なため、流体からの抗力によって生じるテンションの大きさが、どこからDNAが凝縮し始めるのかを決定していると考えられる。具体的には、テンションの大きさは、DNAのピラー付け根部分ほど大きくなり、末端にある部分ほど小さくなる。したがって、末端が受けるテンションが最も小さいので、末端から凝縮し始めるのは妥当と言える。末端の方から順番に輝点が生じるのも同様の理由だと考えられる。

複数個輝点ができるのは、DNAは凝縮するにつれて全長が短くなるため、テンションが全体的に小さくなり、DNAの途中で凝縮が進行しやすくなるためであると考えられる。

複数の輝点がDNA上に存在する場合、凝縮が最も進行しやすいのは末端の輝点だと考えられる。これは、末端の輝点で凝縮が進行するときには、輝点にかかる抗力のみによって凝縮すればよいが、途中の輝点で凝縮が進行する場合、それよりも末端側にある輝点にかかる抗力と、輝点間にあるDNAにかかる抗力、自身にかかる抗力の全てによって凝縮しなければならないからである。しかし、輝度測定の結果より、途中の輝点でもDNAの凝縮が進行していた。したがって流体の抗力だけが、凝縮過程を決定する要因ではないことがわかった。他の要因として、凝縮部のできやすさが、DNAの塩基配列と相関があるという可能性が指摘されている。