

# DNA 複製開始領域の単分子オプティカルマッピング

## The single molecular optical mapping of *oriC* region

66870 森泰啓

指導教員 鷺津正夫 教授

**概要** : 本研究の目的は、Mb サイズのゲノム DNA に存在する *oriC* 領域を単分子レベルで可視化することである。巨大な DNA について、単分子のまま特定の遺伝子配列の位置情報を得るには DNA の伸張方法と配列の検出に工夫が必要である。ここでは DNA の伸展に光ピンセットを用い、配列の検出には PNA プローブを使用し、*oriC* の可視化を試みた。結果、非特異吸着が見られたが、伸展した DNA 上に Qdot の蛍光を観察した。

### 1. はじめに

これまで、DNA 解析技術の分野では、DNA 上に存在する特定遺伝子配列の空間的位置を決定するための技術開発がなされてきた。染色体 DNA 上で遺伝子の位置を知ることは遺伝子発現の制御などを解明する上で重要である。また、ある種の遺伝病にはおいては、特定の遺伝子配列が欠失したり転座したりすることがその原因であり、欠失・転座・増幅などを迅速に検出することは遺伝子診断にも有用な技術である。これらの技術として挙げられる代表的な例は Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) や fiber FISH である。

FISH では、細胞から単離した染色体 DNA に特定の遺伝子配列を認識する蛍光プローブを結合させ、配列の空間的位置を調べることができる。しかし、染色体 DNA は通常、DNA 折りたたみタンパク質などによって凝縮しており、蛍光顕微鏡での観察だと空間分解能は数十 $\mu\text{m}$  が限界で、遺伝子の詳細な位置を知ることが不可能だった。

この問題を解決する技術として次に用いられるようになったものが fiber FISH である。fiber FISH では空間分解能の問題を解決するために分子コーミング法と呼ばれる手法を用いて DNA を伸張し、ガラス基板上に固定化することで、空間分解能が数 $\mu\text{m}$  から 1 $\mu\text{m}$  まで上昇し、より詳細な遺伝子の位置を知ることができるようになった。しかし、分子コーミング法にも問題がある。この DNA 展開方法では DNA に強い力学的ストレスがかかるため、長くても 700 kbp までの DNA しか伸張・固定できず Mb サイズの DNA では断片化してしまうのである。

そこで本研究では、Peptide nucleic acid (PNA) プローブの導入による the origin site of chromosomal replication (*oriC*) 領域の蛍光標識と、光ピンセットを用いた DNA の伸展という 2 つの手法を導入した。PNA は DNA オリゴマーに比べて低温での配列認識が可能でゲノム DNA を傷つけずに標識できる。また光ピンセットは DNA を把持して高塩濃度溶液中を移動させ、流体的抗力で DNA を穏やかに伸展させることができる。この 2 つの手法を用いれば、Mb サイズのゲノム DNA を断片化させることなく、特定の遺伝子配列を顕微鏡下で直接観察できると思われる。そこで、KOD1 という超好熱始原菌のゲノム DNA に存在する *oriC* 領域の空間的位置を、顕微鏡下で直接オプティカルマッピングすることを試みた。

## 2. 実験原理・方法

### 2.1. 実験に用いた細胞

本実験で用いた超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1(京都大学今中研究室より)は 2,088,737 bp (約 700  $\mu\text{m}$ )に及ぶ単一のゲノム DNA を細胞中にもち、DNA はカチオン性ヒストン様タンパク質によって折りたたまれた状態で存在する。KOD1 細胞は超純水による浸透圧ショックで容易にバーストする。このとき DNA は細胞膜成分と結合したままで溶液中へ漏出する。細胞膜成分は周囲の溶液と比べて屈折率が高いため、光ピンセットで把持することができる。さらに DNA 細胞膜複合体を把持したまま高塩濃度溶液中を引きずり回すと、DNA から折りたたみタンパク質が穏やかに解離する。この状態で DNA を移動させ続けると、流体的抗力で DNA を穏やかに伸展することができる[1]。また、KOD1 のゲノム DNA の全配列は過去の研究ですでに解明されており、特定配列を持った PNA が結合する位置が分かるため、結合が特異的なものかどうかの判定が容易である。

### 2.2. PNA オリゴマーと Qdot

2 種類の PNA オリゴマー(PNA-1, PNA-2)をプローブとして使用した。ホモピリミジン PNA はホモプリン DNA と DNA-PNA 複合体を形成することが知られている(Fig.1, [2])。また、PNA は DNA の糖-リン酸骨格をペプチド結合に置換した化学物質で、DNA と違い負の電荷を持たないため静電反発が起きず Tm 値が高い。そのため穏やかな温度条件で複合体を形成しやすく、従来の方法よりもゲノム DNA を傷つけずに配列認識ができると考えられる。この性質を利用して KOD1 の *oriC* 領域中に存在するホモプリン配列を認識する。設計・使用した PNA-1、PNA-2 はホモピリミジン配列に限定されるため、PNA-1 はゲノム DNA の *oriC* ともう一つの別のサイト、計 2 ヶ所を認識する設計である(Fig. 2. 参照)。一方、PNA-2 は *oriC* ではないもう一方のサイトのみを認識する。PNA-1, PNA-2 は両末端に biotin 修飾されており、使用した蛍光標識 Qdot 655 streptavidin conjugate (em = 655 nm)とアビジンビオチン結合するようになっている。

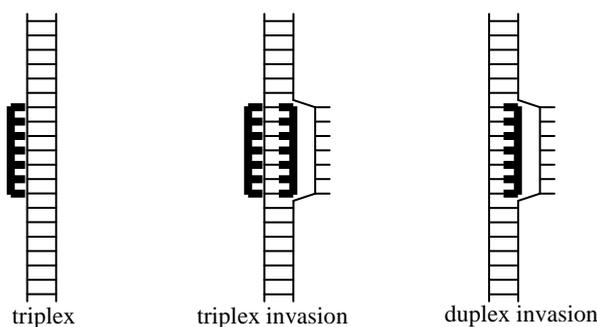


Fig. 1. PNA-DNA 複合体の結合モデル. 太線が PNA、細線が DNA を表す。他の triplex-forming-oligonucleotides (TFOs) と違って、PNA は duplex invasion の様式で結合しやすい。

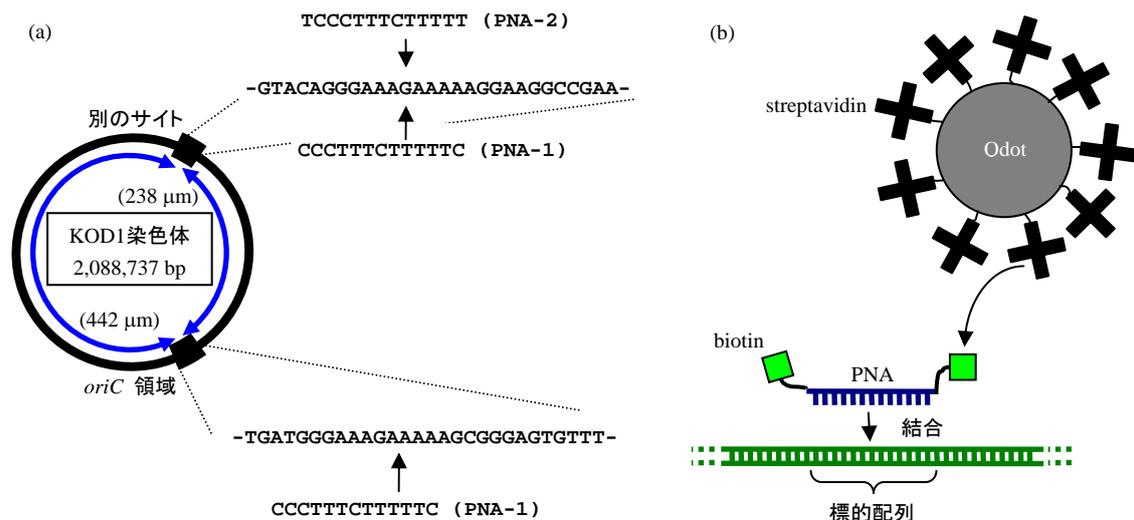


Fig. 2. 標的配列の物理地図. (a) PNA-1 は *oriC* 領域ともう一つ別のサイトに結合する。これは、*oriC* が持つホモプリン配列と同じ配列がもう一つ存在するからである。PNA-2 は *oriC* とは別のサイトのみに結合する。この結合の違いは別のサイトが *oriC* よりも長いホモプリン配列を持つからである。(b) PNA は DNA と相補的塩基対を形成して結合する。PNA の両末端はビオチン修飾されており、Quantum dot (Qdot) 655 streptavidin conjugate とアビジンビオチン相互作用によって結合する。

### 2.3. PNA 結合の検証

PNA が DNA の標的配列に対して結合するか、ゲル電気泳動の移動度変化で検証した。まず、*oriC* 中に存在するホモプリン配列を含む DNA オリゴマー(50 mer) 2 種類を用意し、二本鎖 DNA(50 bp) を合成する。そして PNA と DNA をインキュベーションしてから、6% Agarose で電気泳動する。その後、10,000 倍希釈 SYBR Green で DNA バンドを可視化した。

### 2.4. 染色体 DNA の Qdot 標識

KOD1 細胞を超純水で希釈しバーストさせる。このときゲノム DNA が溶液中に漏出する。破裂後、TE バッファーを加えてインキュベーション(37°C)。この後 PNA を加え、PNA-DNA 複合体形成のためインキュベーション(37°C)。インキュベーション後、遊離している PNA を除去するために、遠心分離してから上澄液を TE バッファーで置換するという作業を繰り返した。その後、Qdot を加えアビジンビオチン反応を起こすためにインキュベーション(室温)。最後に、溶液中に遊離している Qdot を除去するために遠心分離と上澄液の置換を行ってから、dithiothreitol (DTT) と YO-PRO-1 (ex = 491 nm, em = 509 nm) を加えた。YO-PRO-1 は二本鎖 DNA を可視化する蛍光色素で、DTT は YO-PRO-1 が消光するまでの時間を延ばす還元剤である。

### 2.5. 染色体 DNA の伸展と蛍光観察

蛍光標識されたゲノム DNA を高空間分解能で観察するため、Fig.3.のような単純な流路と光ピンセットを使用した。流路は二枚のカバーガラスとスパーサーから構成されている。この流路の一方の口から DNA サンプル溶液を注入し、もう一方から高塩濃度溶液を注入した後、nail polish でシールした。その後、観察対象の DNA 細胞膜複合体を光ピンセットでトラップし、高塩濃度溶液中へ移動させながら DNA の伸展と蛍光標識した Qdot の蛍光輝点を観察した。

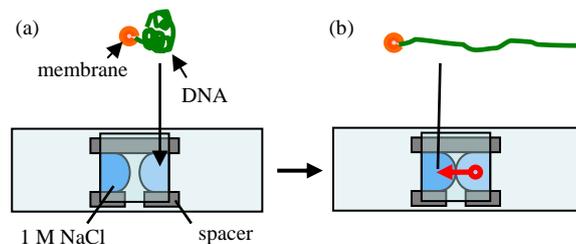


Fig. 3. (a) Qdot 標識された DNA 溶液を流路の片端から入れ、1 M NaCl 溶液をもう一方から入れる。このとき DNA は折りたたまれた状態である。(b) DNA 溶液と NaCl 溶液を接触させた後、DNA を光ピンセットで把持して移動させる。これにより DNA を折りたたんでいたタンパク質が解離し、流体的抵抗によって DNA が穏やかに伸展する。

塩溶液には DNA 可視化のための YO-PRO-1 と、消光防止剤として dithiothreitol (DTT)を加えた。

### 3. 実験結果・考察

#### 3.1. PNA の *oriC* 領域への結合

*oriC* 領域中に存在するホモプリン配列を含む dsDNA (50 bp)への PNA 結合を、電気泳動の移動度変化によって検証した。DNA に対する PNA の比率が大きくなるにつれゲル上方へバンドが 2 段階シフトしている様子が観察された。Fig. 1.で述べた通り、PNA は 1 本、または 2 本の分子が dsDNA と複合体を形成するため、DNA 20 bp ladder と比較しておよそ 60 bp, 70 bp 程度の場所にバンドが現れることは PNA の結合様式から考えて妥当である。これにより PNA と DNA の複合体形成が確認できた。

#### 3.2. 染色体 DNA の蛍光マッピング

Fig. 4. は、染色体 DNA を光ピンセットで引きずっている最中の蛍光像である。実験では、部分的に伸展した DNA 上に Qdot の蛍光輝点を確認した。Qdot 輝点は概して光トラップ点の近くと、光トラップ点から 5  $\mu\text{m}$  ほど離れた DNA 上で確認された。PNA-1 は染色体 DNA の 2ヶ所を認識するように設計されているため、この結果は理論上推測できていたことである。また、観察においては Qdot 輝点が 1 つだけというケースも散見された。これは、PNA が DNA もしくは Qdot と結合しなかったからであると考えられる。しかし、一方で PNA-2 を用いた場合や PNA を用いなかった場合でも、Qdot が DNA に結合している様子が観察された。このときの輝点も概して DNA 細胞膜複合体の近傍に存在した。これは Qdot 表面の streptavidin と DNA 細胞膜複合体のいずれかの成分が非特異的吸着を起こしたためと考えられる。この問題を解決するために我々は、Qdot との結合時に DNA サンプル溶液を 1 M NaCl の濃度に調製して、静電的な非特異吸着を防ぐことを試みたが、この方法では吸着を防ぐことはできなかった。

現在このように、非特異吸着が起こるとい問題が生じているが、DNA-PNA-Qdot 複合体が形成されているケースもあることは観察から推測される。実際、PNA の存在下では、PNA 非存在下に比べて Qdot 輝点が観察される確率がおおよそ 20 % 高くなっているからである。

また、非特異吸着を防ぐために別の方法を試みた。過去の生物学的研究から KOD1 細胞中には Streptavidin Binding Protein (SBP)が存在することが知られている。これにより Qdot 表面の streptavidin が結合してしまった可能性がある。そこで、DNA に事前に streptavidin を加えインキュベーションして

SBPの結合サイトを塞いだ後、biotinを加えstreptavidinの余った結合サイトを塞ごうとした。しかし、この場合でも非特異吸着はなくならなかった。

そこで、新たに別の手順の蛍光標識を試みた。PNAは事前にQdotと結合させておき、KOD1細胞はstreptavidinでSBPを塞いでおいてからDNAとPNA-Qdotを結合させるというものである。新たに片末端のみbiotin修飾したPNA-1', PNA-2'を用意して事前にQdotと結合させてからstreptavidinでブロックしたDNAにPNA-Qdot複合体を作用させた。しかしこの実験でも、多少の改善は見られ非特異吸着が観察される例は減ったものの、非特異吸着を完全に防ぐことはできなかった。

#### 4. 結論

KOD1ゲノムDNAのoriC領域中に存在するホモプリン配列へのPNA結合をゲル電気泳動で確認し、単分子レベルでの蛍光マッピングを行った。しかし、現時点では非特異吸着と選択的結合を顕微鏡下では識別できない状態である。目下、この識別を行うべく研究中である。

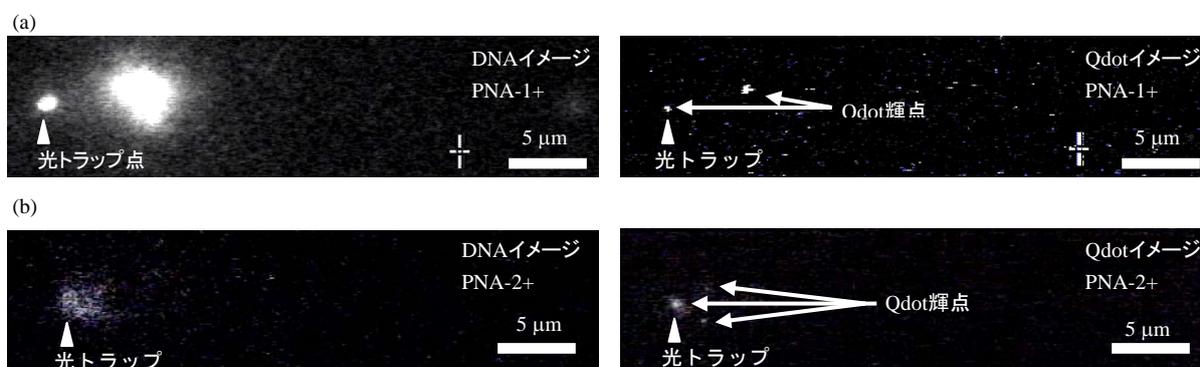


Fig. 4. KOD1のゲノムDNAをYO-PRO-1とQdotで染色し、伸展している蛍光画像。左2枚がYO-PRO-1によるDNA像で、右2枚がDNA上で観察されるQdotの蛍光輝点である。写真では光トラップしたKOD1細胞を把持して左方向へ移動させている。(a) PNA-1を用いた蛍光標識によりQdotの輝点が2つ観察される。一つは光トラップ点近傍、もう一つはトラップ点から5 μmほど離れたところである。(b) PNA-2を用いた蛍光標識。理論上、Qdot輝点はDNA上に一つしか存在しないはずであるが、ここでは3つの輝点が観察される。これは非特異吸着が起きていると思われる。

#### [参考文献]

- [1] Oana, H., Kubo, K., Yoshikawa, K., Atomi, H., Imanaka, T., *Appl. Phys. Lett.* **85**, 5090 (2004)
- [2] Ganesh, K. N., Nielsen, P. E., *Curr. Org. Chem.* **4**, 931 (2000)