

分子手術に向けた DNA の1分子接合

渡邊力也

1. 研究背景

DNAの接合反応とは2つ以上の相補的なDNA断片をつなぎ合わせる酵素反応であり、広く遺伝子操作などで用いられる技術である。既存の生化学的技術では個別のDNAやそのDNA上の特定の遺伝子をターゲットにした操作を行うことが不可能であり、全ての反応はランダムに発生する。もし、この反応を特定の分子や遺伝子に対して起こすことができれば、遺伝情報の解析や改変の飛躍的な効率化が期待できる。本研究では物理的な操作技術を応用し、DNA接合反応を狙った分子に対して施す技術を開発する。この技術は将来的には医療分野への応用も考えられ、本COEのバイオ・医療イノベーションプロジェクトの特色である「医療を目的としたナノ・マイクロメカトロニクスとバイオテクノロジーの融合」に密接に関係している。

2. 研究内容

DNAには、位置の関数としての塩基の種類により遺伝情報が記録されている。しかしながら、従来の水溶液ベースの生化学は、「位置」に関する情報を生かす手段を持たない。もし、水溶液中の特定のDNA分子や、その分子上の特定の位置を指定した操作を行うことができれば、遺伝情報の解析や改変の飛躍的な効率化が期待できるであろう。この点に鑑み、われわれは、物理的手段を用いた分子の特定位置に対する操作(=分子手術)に関する研究を進めてきた(図1)特に、文献[1]の研究では、DNA単分子を伸長固定しておき、ここにDNA切断酵素を固定した微粒子を光ピンセットを用いて押し当て、DNAと微粒子の接点のみにおいて酵素反応を生じさせることにより、狙った位置でDNAが切断できることを実証した。しかしながら、「手術」という意味では逆反応であるところの接合(ライゲーション)を単分子レベルで行うことが必要である。本研究ではその接合反応を単分子レベルで実現したので以下に報告する。

DNAの接合反応は2段階の反応で構成される。1)DNA断片同士の物理的な接触、2)DNA ligaseによる接触面におけるリン酸エステル結合の形成。我々は光ピンセットを用いてDNA断片同士の物理的な接触を促した。また、酵素反応場の溶液条件を効率良く変化させる必要がある為、図2に示すリソグラフィで作製した微細流路とシリッジポンプを組み合わせた実験系を使用した。

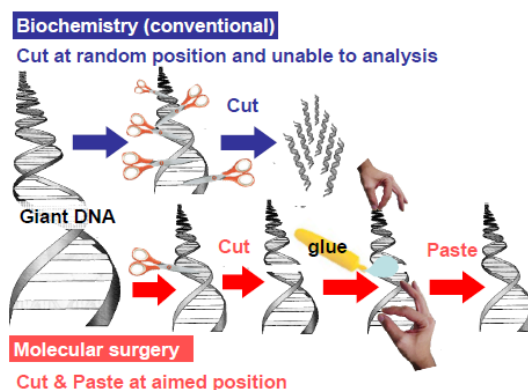


図1 DNA分子手術のモデル

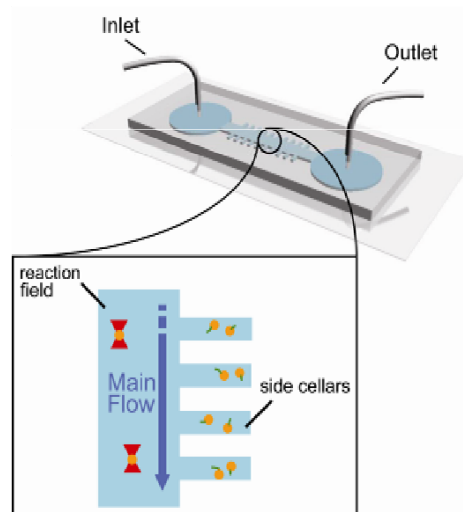


図2 微細流路のモデル図

実験手法のモデル図を図3示す。両末端がビオチン化された λ DNA (48502bp, length: 16 μ m)を流路の床であるアビジンがコートされたガラス基板に固定する。次にアビジンがコートされたビーズ($\phi=2\mu$ m)を光ピンセットの操作用プローブとして λ DNAのガラス基板に固定されていない末端に固定する。光ピンセットで λ DNAを介してガラス基板上にアンカーされているビーズを操作すると、アンカー点から最大14 μ m動かすことができた(図4A)。この長さは λ DNAの長さとはほぼ一致した。次に微細流路内に制限酵素 *Bg*III とその反応溶液を導入し、分子手術の一旦である任意のDNAの切断を行った。*Bg*IIIは λ DNAを7分割することが知られており、末端の断片の長さは3.3 μ mと0.14 μ mである。DNAの切断が完了すると光ピンセットで操作しているビーズは物理的に自由になり、ビーズとガラス表面には相補的なDNAの断片が1本ずつ結合している状態になる。切断後のビーズ-DNA複合体は主流路の側面から分岐している小部屋へ回収する。この小部屋は溶液交換時の主流路の流れの影響を受けない。更に溶液交換で流路内にDNA Ligaseとその反応液を導入し、DNAの接合を行った。光ピンセットを用いて回収したビーズ-DNA複合体を主流路へ移動させ、ガラス表面上に固定されている相補的なDNA断片と物理的に接触させると1分子レベルでDNAが接合される様子が観察された。ビーズを光ピンセットで操作し接合後のDNAの長さを測定すると制限酵素で切断された長さから期待される長さとも一致した(図4B)。

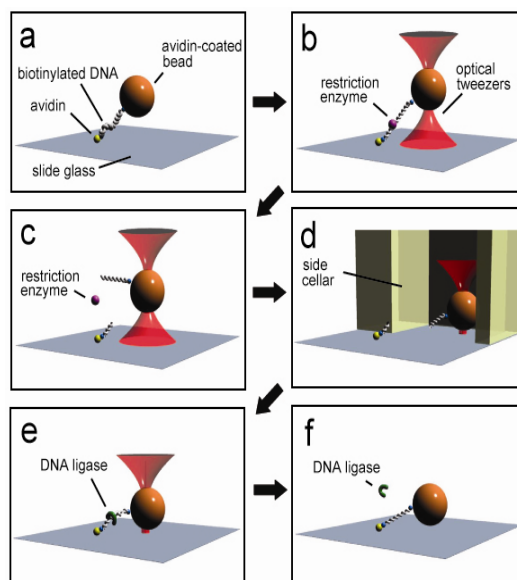


図3 1分子ライゲーションの実験手法

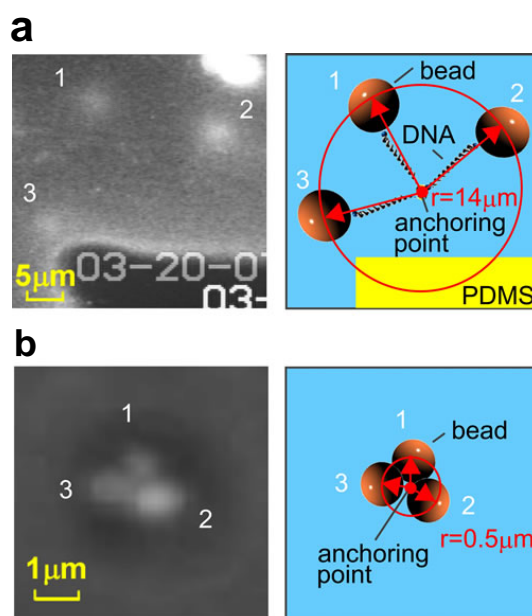


図4 1分子ライゲーションの結果

3. 文献

- (1) T. Yamamoto, O. Kurosawa, H. Kabata, N. Shimamoto and M. Washizu
 "Molecular surgery of DNA based on electrostatic micromanipulation"
IEEE Transaction IA, Vol.36, No.4, p.1010-1017 (2000)