

直鎖状高分子末端の反応性の1分子観察

One-molecule observation of chain-end reaction of straight chain polymer

37-116814 岩井隆

指導教員 鷲津正夫教授

概要：本研究は直鎖状高分子である DNA 分子の末端の反応性に注目し、異なる分子サイズ・様々な塩濃度環境下においてその反応性の相関をエバネッセント顕微鏡1分子観察によって実験的に明らかにすることを目的として行われた。ガラス基板にストレプトアビジンを固定した領域に片端にビオチンが修飾された DNA 分子溶液を導入し、エバネッセント顕微鏡により経時観察を行った。分子末端の反応性を識別する実験的工夫をし、観察画像から反応性を定量化する方法を確立した。その結果、10.3kbpDNA 分子は 1.8kbpDNA 分子に比べ分子末端の反応性が低いこと、塩濃度を大きくするにつれ分子末端の反応性が低下することが分った。

1. はじめに

直鎖状高分子は、溶液中では溶媒分子のブラウン運動の影響により、様々な分子折れ曲がり状態（コンフォメーション）をとることが知られている。溶液中ではランダムコイルと呼ばれる状態で存在しており、形状を激しく変化させている。分子の任意の1部位に注目すると、その部位は分子表面に露出する状態になったり、分子内部に埋もれる状態になったりと分子全体の形状の変化に応じて状態変化していると考えられる。

本研究は DNA 分子の分子末端に注目し、実験を行った。固体表面と DNA 分子の末端の反応をエバネッセント顕微鏡によって1分子観察することにより、分子末端が分子表面に露出する頻度を定量化することを目指した。分子末端が分子表面に露出する頻度は、分子サイズが異なる場合や様々な塩濃度環境下によって違いが生じると予測される。

2. DNA1 分子観察の方法

図1は実験原理の模式図である。ストレプトアビジンとビオチンは非常に強い特異的結合力を示すことが知られている。そのため本研究では、ストレプトアビジンが修飾された Qdot655 と片

端にビオチンが修飾された DNA 分子（分子サイズは 1.8kbp と 10.3kbp の 2 種類）を用いて実験を行った。DNA 分子は SYBR-gold を用いて染色している。DNA 分子末端は基板表面と反応すると、その他の表面上を動き回る分子とは違い、輝点はその反応位置に固定されて観察される。DNA 分子と Qdot655 は異なる波長域により選択的に観察を行うことができるため、本研究では動き回らず固定された DNA 分子の輝点と Qdot655 の輝点が一致する際、特異的結合力による DNA 分子末端の反応が生じていると判断する。尚、ガラス基板表面への非特異的な吸着を防ぐため、BSA 分子によってブロッキング処理を行っている。本研究は倒立型顕微鏡をベースにしたエバネッセント顕微鏡によって経時観察を行った。

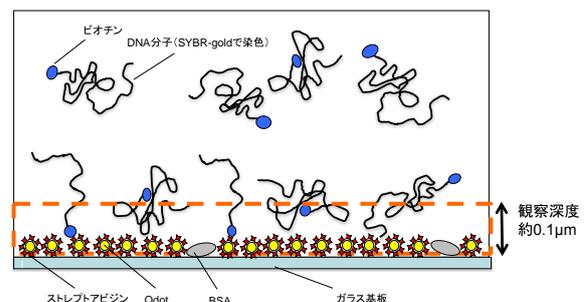


図1 実験原理の模式図

エバネッセント顕微鏡は、蛍光キューブ 1 (B 励起対応) によって DNA 分子のみを、蛍光キューブ 2 (Y 励起対応) によって Qdot655 と DNA 分子を観察することができる。表面部の観察を始めるにあたり、まずキューブ 2 で基板上一面に広がる Qdot の輝点を手がかりにガラス基板表面に焦点を合わせた。その後キューブ 1 にし、DNA 分子のみに注目し観察を行った。

3. DNA 分子末端の反応性の定義

エバネッセント顕微鏡の観察深度は約 $0.1 \mu\text{m}$ である。一方、1.8kbpDNA 分子、10.3kbpDNA 分子の分子末端間距離の理論値はそれぞれ $0.32 \mu\text{m}$ 、 $0.85 \mu\text{m}$ である。そのため、エバネッセント顕微鏡による観察において、輝点として観察視野内に映り込む DNA 分子は全て基板表面近傍にあると仮定する (図 1 の赤枠点線を参照)。

図 2、表 1 に示すように、エバネッセント顕微鏡で観察される DNA 分子がとりうる状態は、ランダムコイル状態でブラウン運動をしている状態 x と分子末端が反応した状態 n の 2 通りであると言える。

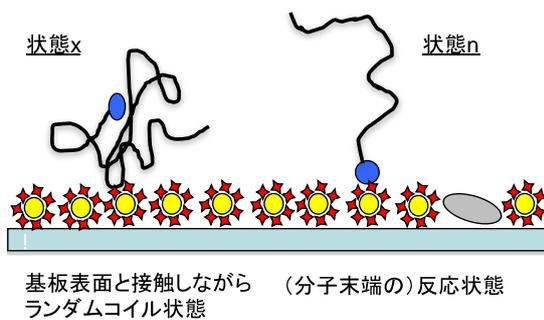


図 2 エバネッセント顕微鏡観察で観察される DNA 分子がとりうる状態

表 1 状態 x 、状態 n の特徴と定義

	状態 x	状態 n
観察における特徴	ブラウン運動 (浮遊している)	一カ所に固定 (10.3kbp は尾ひれがひらひらという特徴がみられる)
時刻 t におけるカウント (45 μm \times 45 μm の観察範囲)	$X(t)$ [個/観察面積]	$N(t)$ [個/観察面積]

本研究では固体反応表面に対する DNA 分子末端の「反応性」の定義を、状態 x から状態 n へのなりやすさと定義する。サンプルに DNA 分子溶液を導入した時刻を $t = 0$ とし、時刻 t におけるエバネッセント顕微鏡による固体表面観察でカウントした状態 x の DNA 分子の個数を $X(t)$ 、状態 n の DNA 分子の個数を $N(t)$ とする。それぞれ、 $45 \mu\text{m} \times 45 \mu\text{m}$ の観察面積でのものである。尚、DNA 分子とガラス基板との非特異的吸着の可能性を排除するため、別の蛍光キューブにて同一位置の Qdot 観察画像の輝点との位置の一致を確認し、状態 n を識別した。

この時、反応性パラメーター λ [1/分] を下記の通り定義した。

$$dN(t)/dt = \lambda X(t) \quad (1)$$

エバネッセント顕微鏡による経時観察によって、状態 x 、状態 n それぞれの観察における特徴を元に、観察画像から $X(t)$ 、 $N(t)$ を定量化し、反応性パラメーター λ を算出することを目的に実験を進めた。異なるサイズの DNA 分子、様々な塩濃度環境下において、反応性パラメーター λ による分子末端の反応性の定量化を行った。

4. DNA1 分子観察デバイスの構成

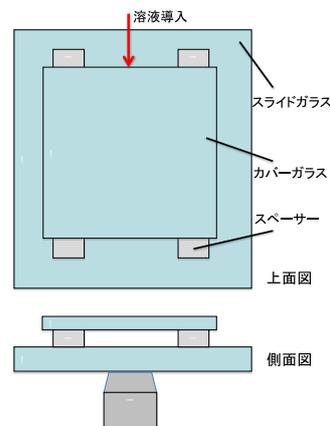


図 3 実験デバイスの模式図

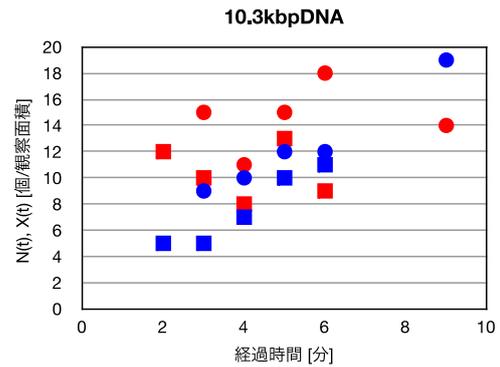
(カバーガラス:1.8mm \times 1.8mm、シリコンゴムスペーサー厚さ:0.2mm、スペーサー間隔:2mm、スライドガラス厚さ:0.12~0.17mm)

図3は実験で用いたデバイスの模式図である。図に示す溶液導入部位から順にストレプトアビジン(Qdot)溶液、MilliQ水、BSA溶液、MilliQ水、DNA分子溶液(DNA、10mM Tris-HCl、50mM DTT、SYBR-gold、H₂O)をスぺーサー間に導入した。溶液の導入は、図3の赤矢印が示す位置に溶液を垂らし、対する出口にキムワイブをあてることで液を吸い取る毛細管現象を利用した。ストレプトアビジン、BSAは溶液導入後、しばらく静置することでタンパク質-基板表面の間における疎水性相互作用により、基板表面に固定した。DNA分子溶液導入後、デバイスを顕微鏡にセットし、スぺーサー間の領域を倒立型対物レンズにより観察を行った。

5. 反応性パラメーターλの導出方法

図4は10.3kbpDNA分子(0.01nM、NaCl濃度0mM)に関する実験の結果である。2回経時観察を行い、各経過時間におけるN(t)、X(t)をグラフにプロットした。N(t)、X(t)はそれぞれ青点、赤点で、また、1回目、2回目はそれぞれ丸点(○)、四角点(□)で表している。反応性パラメーターλを概算する方法を、図4に示す1回目の実験結果を例に述べる。

図5に示すDNA分子の状態遷移モデルを考え、近似計算を行う。溶液中のDNA分子の状態はエバネッセント領域の状態x、状態nに加え、バルク領域でランダムコイル状態のもの(状態yと呼ぶことにする)の3パターンに分けることができる。ストレプトアビジンとビオチンの結合力は非常に強力であるため、状態nになったDNA分子は基板表面から外れる可能性は低い。DNA分子が切れる場合、ビオチン反応基がないものになるため、本議論では扱わない。図5に示す通り、DNA分子の状態の遷移は経路①、経路②、経路③であると考えられる。図4の結果から、本解析が対象とする時間スケールである10分以内では、状態nの個数は高々20個ほどであり、状態xは10個前後となっている。



● N(t) 1回目 ● X(t) 1回目 ■ N(t) 2回目 ■ X(t) 2回目
図4 経過時間と各観察値(N(t), X(t))の関係

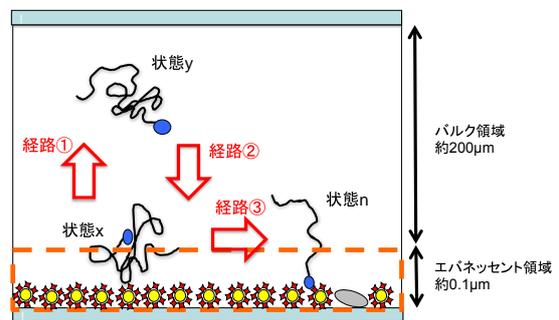


図5 DNA分子の状態遷移モデル

一方、バルク領域にある状態yのDNA分子数は溶液濃度が0.01nMであることから約2500個と概算される。経路③を経るDNA分子数が経路①、経路②のものに比べ非常に少ないため、状態xと状態yを経る分子数は平衡状態であると近似することができる。以上の議論からX(t)は一定と考える。

反応性パラメーターλを式(1)により概算するにあたり、dN(t)/dtは初めの点と最後の点(例えば、図4の1回目では(3, 9), (9, 19))を結んだ傾きから求める。また、X(t)は各値の平均から求める。図4の1回目の結果から、dN(t)/dt=1.7、X(t)=14.6となり、λ=0.12となる。以下、λの導出は全て同様な方法で行っている。

6. 実験の結果と考察

本研究の実験は、大きく分けて2つの実験目的を元に行った。

6.1 塩濃度変化と反応性の関係

本実験の目的は、塩(NaCl)濃度を大きくすると、DNA分子が凝縮状態に近づくことから、分子末端が分子表面に露出する頻度が低下するという仮説の検証である。本実験では10.3kbpDNA分子に対し、NaCl濃度0mM、50mM、100mM、200mMのそれぞれの溶液条件に対して反応性観察の実験を行い、その結果から反応性パラメータ λ を概算した。結果は図6に示す通りである。

図6の結果から、NaCl濃度が0mM、50mM、100mMの条件では、1回目・2回目の実験から算出した λ の値が近いものとなっており、実験の再現性が確認される。また、0mM、50mMの λ に対し100mM、200mMの λ は約1/2倍ほどの値になっている。DNA分子は溶液中ではマイナスに帯電して存在している。溶液中のNaCl濃度を大きくするにつれて、溶液中のNa⁺イオンが多くなり、DNA分子内部に生じていた斥力が緩和される。その結果、DNA分子のコンフォメーションが凝縮状態に近づき、分子末端の分子表面へ露出する頻度が減り、分子末端の反応性が低下したと考えられる。

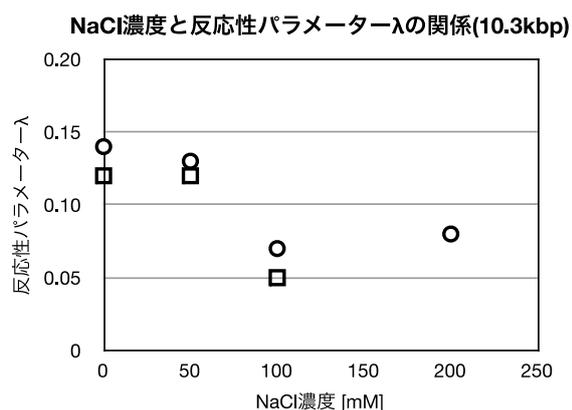


図6 NaCl濃度と反応性パラメータ λ の関係 (10.3kbpDNA ○:1回目, □:2回目)

6.2 分子サイズと反応性の関係

本実験の目的は、分子サイズが大きいDNA分子は小さいDNA分子に比べ、分子末端が分子表面に露出する頻度が低いという仮説の検証である。本実験では、10.3kbpDNA分子(0.01nM, 0mM NaCl)・1.8kbpDNA分子(0.1nM, 0mM NaCl)それぞれに対して反応性観察の実験を行い、その結果から反応性パラメータ λ を概算した。結果は表2に示す通りである。

表2 分子サイズと反応性パラメータ λ の関係

	10.3kbpDNA	1.8kbpDNA
反応性パラメータ λ	0.05	0.17

直鎖状高分子の広がり指標の一つである分子末端間距離 R の理論値はそれぞれ、 $R_{10.3} = 0.85 \mu\text{m}$, $R_{1.8} = 0.32 \mu\text{m}$ となっている[1]。分子全長 L はそれぞれ、 $L_{10.3} = 3.4 \mu\text{m}$, $L_{1.8} = 0.61 \mu\text{m}$ である。そのため、分子全長に対する広がり指標の割合(R/L)が、10.3kbpDNA分子のものが1.8kbpDNA分子の約1/2倍と大きく異なっている。以上の理論計算から、上記の仮説が予測されていた。表2の結果から、分子サイズが大きい10.3kbpDNA分子は小さい1.8kbpDNA分子に比べ分子末端の反応性が低いことが分かった。

図6の10.3kbpDNA(0mM NaCl)と表2の10.3kbpDNAの結果を見比べると λ は、同一の実験条件・方法にもかかわらず大きく異なっている。これは、活性度の異なるストレプトアビジンを使用し、基板の表面の反応性を変えたためである。

7. まとめ

分子末端の反応性を識別する実験的工夫をし、反応性を定量化する方法を確立した。

10.3kbpDNA分子は1.8kbpDNA分子に比べ分子末端の反応性が低いこと、塩濃度を大きくするにつれ分子末端の反応性が低下することが分かった。

参考文献

1)村橋俊介, "高分子化学", (2007) pp.145-159.

