3PD037

集束レーザー局所加熱によるDNAチップからの
DNA選択回収

○安田賢二¹, 岡野和宣², 五嶋淳³, 野崎貴之³, 石渡信一³
(東大総合文化¹, 日立中研², 早大理工³)

分子生物学の基礎となる細胞や組織からの特定DNAの分取精製は、DNAライブラリからのクローニングを行うことによることが常である。DNAライブラリーを得る新しい方法として、マイクロチップを用いることができれば、従来のような大腸菌培養がいらなくなり、わずか数cmのなかに分子生物学的な情報を保存できる。しかし、これには、チップに捕捉した数万のDNA断片を選択的に分離回収する手段が必要である。そこで、集束レーザー光によってDNAチップ上の特定の領域を局所加熱してDNAを回収する選択回収法を考案し、その有効性を確認したので報告する。本方法は、対物10倍の顕微鏡で確認したDNAチップ上の特定領域を、顕微鏡系に組み込んだ集束IRレーザー(1053nm)によって90から100℃に加熱することにより、DNAチップ上のプローブDNAに捕捉された試料DNAを熱解離させ、基板表面から分離回収する技術である。DNAチップは表面にCrを蒸着することで、レーザー光を吸収し熱に変換できる構造とした。プローブDNAはCr表面にシランカップリング反応を用いて共有結合されている。レーザー集束光を照射すると幅10μmの分解能でDNAチップ上の試料DNAを可逆に熱解離し回収することが可能であることを確認した。チップ表面から解離した試料DNAを回収し、PCR増幅したところ、DNAチップ表面に固定したのと同じサイズを持つDNAを確認できた。また、定量解析から本手法によって(36×36)nm²あたり1本の試料DNAを分離回収することが可能であることがわかった。このように、本手法ではDNAチップ上に捕捉したDNAを順次回収できるので、遺伝子発現頻度計測やDNAの変異を計測するデバイスとして強力な手法となると考えている。

K. Yasuda, K. Okano, J. Goshima, T. Nozaki, S. Ishiwata: Focal extraction of surface-bound DNAs from a microchip using photo-thermal denaturation.

3PD038

分子コンピュータを用いた
遺伝子発現計測

○尾曲克己、倉田憲一、西田奈央、陶山明
(東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻)

ゲノム解析の成果により、様々な生物の全塩基配列情報が蓄積されてきている。今後、この配列情報を用いた遺伝子の機能解明が重要な課題となる。その中でも遺伝子発現ネットワークを解明することは生命現象を理解する上で最も重要である。このネットワークは数千から数十万種類の複数の遺伝子から成り立っている。そのため、遺伝子発現を並列的、高速で計測するデバイスとしてDNAチップが注目されている。

現在のDNAチップは数千から数十万種のcDNA、oligonucleotideを高密度で集積しなければならない。また、調べる対象ごとにDNAチップを作成しなければならないので、汎用性がない。

そこで、当研究室では低集積度で、かつ、汎用性のあるDNAチップを用いて遺伝子発現計測を行う方法を開発した。この方法は配列情報をDNAコンピューティングで適切に情報変換し、それをDNAチップ上で検出するというものである。

今回はDNAコンピュータを用いた遺伝子発現計測の方法について説明する。

K.Omagari K. Kurata N. Nishida A. Suyama ;
Gene expression analysis using molecular computing

3PD039

物理的手法で切断したDNAの回収と増幅

○黒澤修、岡部敬一郎、石田亘広、加畑博幸*、
嶋本伸雄**、鷺津正夫* (株)アドバンス、
*京大・工・機械工学、**国立遺伝学研究所)

1.はじめに 筆者らは、基板上に伸長固定したDNAを一端から順次切断し、その断片を配列解析して、元のDNAの配列を連続的に決定する手法の開発を行っている。これまでに、静電力と移動メニスカスを用いたDNAの伸長固定法および犠牲層エッチングに基づくDNAキャリア断片の回収法の開発を行ってきた。本年度は、DNAキャリア上に伸長固定したDNAをAFM探針で物理的に切断し、回収した切断断片をPCR増幅することで、DNA切断片の存在確認を行った。

図1: DNAのモレキュラーサージェリー

図2: プライマーの認識部位と増幅断片

図3: 切断・回収したDNAのPCR解析

2.実験及び結果 まず、図1に示すように、電極端に伸長固定したλDNAの末端およびDNAキャリア層をAFM探針で切断した後、キャリア断片ごと基板から剥離して、DNA切断片の回収を行った。次に、DNA切断片を、図2に示すプライマーでPCR増幅した。

伸長固定したDNAには、一端と他端の区別がないため、図1のように切断した場合、PCR増幅されるDNA断片は、プライマー-LRから増幅される2つのバンドとして得られることとなる。図3はPCR解析の結果である。Mは200bpのDNAラダー、Cはテンプレート数20本のλDNAで、1から6が切断・回収したDNAサンプルである。レーン4,6には、1222bpと1470bpの2本のバンドのみしか増幅されておらず、切断したDNAの回収ができていないことが判明した。

ただし、レーン2,5に見られるような目的以外の断片の混入を如何に抑えるかは、今後の課題である。

O.Kurosawa, K.Okabe, N.Ishida, H.Kabata, N.Shimamoto, M.Washizu:
The Recovery and Amplification of DNA fragments Cut by Physical Means.

3PD040

グルコシルトランスフェラーゼ反応の一分子イメージング

○加世田国与士¹、横田浩章²、石井由晴²、福井一博³、
児玉孝雄⁴(¹工技院 融合研、²1分子過程プロジェクト、
³岡大 歯、⁴九工大 情報工)

グルコシルトランスフェラーゼ(GTF)はデキストラン(DX、α-1,6-グルカン)鎖上に多数のα-1,3-分岐を形成してDXを不溶化する(Fukui et al. 1982)。DXに対して高い親和性を持つGTFがある分岐サイトから別のサイトに移動するメカニズムを解析する為に、全反射蛍光顕微鏡による一分子イメージング(TIRFM)解析を行った。GTF分子は遺伝子操作でC端にシステインを導入後、tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMR)による蛍光標識(GTF-TMR)、あるいは、ビオチン化(GTF-BIO)を行った。DXは、過ヨウ素酸酸化処理後、2-acetamido-4-mercaptoputanoic acid hydrazideを用いて、SH基の導入を行い、酵素と同様に蛍光標識(DX-TMR)およびビオチン化(DX-BIO)を行った。これら化学修飾を施した酵素およびデキストランは、基本的な機能を保持していた。ストレプトアビジン被覆カバーガラス表面にGTF-BIOを固定化し、DX-TMRの一分子観察を行った。ショ糖非存在下では、ガラス表面に長時間(1-8min)結合している多くのDXとガラス表面と結合/解離をくり返しているDXが認められた。一方、ショ糖存在下では、ほとんどのDXは、ガラス表面と結合/解離をくり返していた。結合/解離をしているDXについて、dwell timeのヒストグラムを解析した結果、ショ糖はDXの解離速度を増大することが判明した。GTF-TMRの一分子観察(ガラス表面にDX-BIOを固定化)においても、ショ糖による解離速度の増加が認められた。これらの結果は、酵素反応進行中のGTFは、DXに対して低い親和性を持つことを示唆している。

K. Kuniyoshi, H. Yokota, Y. Ishii, K. Fukui, and T. Kodama:
Single molecular imaging of glucosyltransferase reaction