1P221

スライディングにおけるRNAポリメラーゼのDNA-groove tracking の検証

○十川 久美子、嶋本 伸雄（遺伝研・構造生物学研究セ・超分子機能）

転写には、RNAポリメラーゼがプロモータに特異的に結合することが必要である。RNAポリメラーゼはDNA上を1次元に拡散（スライディング）し、拡散する空間を圧縮して、効率よくプロモータに到達することが知られている。このときDNAのらせんの溝に沿って塩基対をなぞりながら移動するのか（groove tracking）、らせん軸に平行に移動するのか不明である。最近のRNAポリメラーゼとDNAの転写開始複合体についてのX線結晶解析の結果では、DNAとの相互作用の大部分を司る σ サブユニットがDNAのmajor grooveに入っており、スライディング複合体が類似の相互作用をするならば、groove trackingの可能性が考えられる。我々は、groove trackingの存在を検証するために、DNA1分子操作の技術を用いて、RNAポリメラーゼと相互作用しているDNA1分子の動きを観察する実験系を構築し、測定している。

実験系の概略は、以下の通りである。プロモータを含まないDNAフラグメントをミクロンサイズのビーズに固定し、その表面を微小蛍光ビーズでマークし、DNAフラグメントのねじれ回転をビーズの回転として測定できるようにする。DNAフラグメントを結合した蛍光マーク付きビーズを光ピンセットで保持し、ガラス表面に固定したRNAポリメラーゼをDNAでなぞるとき、groove trackingしている場合には、ビーズの回転が蛍光により観察できる。測定により、ビーズが回転することを観察することができた。その結果が統計的に有意であるかを判定できるように実験系の改良を行っており、コントロール実験と合わせてその結果を報告する。

K.Sakata-Sogawa and N.Shimamoto : Detection of DNA-groove tracking during sliding of RNA polymerase

1P223

固定化DNA-ISFETを用いたDNA複製反応の実時間モニター

○熊谷 英郷、妙摩 貞茂、伏見 譲（埼玉大・工）

本研究の最終目的は、DNAポリメラーゼによる複製反応に伴う水素イオン濃度変化を、ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) pHセンサによって実時間モニターすること [Sakurai,T. and Husimi,Y., *Anal. Chem.*, **64**,1996-7(1992)] を基礎とする小型高速DNAシーケンサーの開発にある。

ISFET pHセンサのゲート表面に固定化したプローブDNAに、未知配列を含む一本鎖DNAの5'末端近傍をハイブリダイゼーションさせ、さらにその3'末端近傍にユニバーサルプライマーをハイブリダイゼーションさせる。そこにDNAポリメラーゼとともに4種のdNTPを順次流すことで、どの塩基を流した時にDNA伸長反応が起こるか（Pyro-sequencingの原理と同じ）をISFETからの電気的な出力として検知することが可能であろう。この方法は大規模並列処理に適している。

(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilaneにより基板にメルカプト基を導入し、3'チオール5'FITC化DNAとのジスルフィド結合によりプローブDNAを固定化した（一方、アミノ化DNAを用いる方法は非特異的吸着量が多かった。）。蛍光光度測定により固定化DNA量を定量した。その固定化量は、ISFETゲート表面であるチ化ケイ素を基板とした場合においても理論検出限界固定化量[10^{-3} molecules/ μm^2]の10倍であることがわかった。次にISFET（新電元（株）より贈与）ゲート表面にセルフライミニング構造を持つ一本鎖テンプレートDNAを固定化し、その複製反応をDNAポリメラーゼ（Klenow Fragment）とdNTPによって行ったところ、反応に伴う水素イオン濃度変化による電気的シグナルを観測することができた。

H.Kumagai, S.Taema, and Y.Husimi : Real-time monitoring of DNA replication reaction with DNA immobilized ISFET

1P222

DNAコンピューティングによる遺伝子発現計測

○西田 奈央¹、涌井 昌俊²、徳永 勝士²、陶山 明^{1,3}（¹東大院・総文・生命、²東大院・医・人類遺伝、³東大院・理・物理）

DNAコンピューティングはDNA分子反応の持つ超並列性を利用して、小さいサイズではあるがNP完全問題を解くことに成功した。数学的問題を解く正確さを持つDNAコンピューティングを使い、生物学的問題である遺伝子発現解析を行う手法を確立したので報告する。

DNAコンピューティングによる遺伝子発現解析は以下のようにして行われる。まず始めにトータルRNAやcDNAといった遺伝情報をDNAコンピューティング用の内部コードに相当するDNAコード化数（DCN）へ一対一に変換する。このDCNは相補的な配列とだけ安定な結合をし、それ以外のDCNとは安定な結合をしないDNA配列である。加えて、全てのDCNはTmが揃えられており、自己二次構造を取らないなど性質を最適化してある。続いて全てのDCNに共通に用意されているプライマー配列を用いてPCRをかけ、DCNの1様増幅を行う。最後に各DCNに書かれているコード化数を読み出し、結果を視覚化するためにDNAチップで解析する。このDNAチップのプローブは各コード化数に対する相補鎖であり、チップからのシグナルを読み取ることで元の遺伝情報を知ることができる。

従来のDNAチップは対象とする生物、遺伝子群が変わるたびに用意しなければならなかった。しかしこの手法では、対象に対して自由にDCNを割り振ることができるので、ここで使われるDNAチップは対象に依存しないユニバーサルDNAチップと呼べる。また、DCN配列を使うことで、DNAコンピューティングの過程は定量的かつ特異的に進む。これにより従来のDNAチップでは知ることのできない発現量の絶対量が分かるようになった。さらに、DNAチップを用いずに遺伝子の発現状態の論理関係を判定、探索することもできる。

N.Nishida, M.Wakui, K.Tokunaga and A.Suyama : Gene expression analysis by DNA computing

1P224

放射光を利用した真空紫外円二色性分散計の開発と応用

○松島 洋輔¹、松尾 光一¹、福山 剛之¹、仙波 伸也²、深沢 知行³、月向 邦彦¹（¹広島大院・理、²広島大・放射光、³日本分光（株））

円偏光二色性(CD)は、生体物質の構造解析法として広く利用されているが、市販のCD分散計では、水や大気的光吸収などにより190nm以下の真空紫外領域でCDスペクトルを測定することは困難である。この問題を克服するため、我々は広島大学放射光科学研究センター(HISOR)のBL-15の放射光を利用して、溶液中で140nmまでのCDスペクトルが測定可能な真空紫外円二色性分散計(VUVCD)の開発を行ってきた。しかし、生体物質の構造解析のためには、ノイズレベルが高いなどいくつかの課題が残されている。今回は、S/N比の改良のため光量の増加をめざして、ビームラインの大規模な再整備を行った。また、VUVCD端末機のMgF₂窓の除去などにより、光量を約一桁増加させることができた。これによりS/N比が倍近くに改善されるとともに、分解能も0.04nmと以前の1nmに比べて大きく向上した。本装置の評価を含めて、種々のアミノ酸のVUVCDスペクトルを測定した。LおよびD型アミノ酸は正、負の対称なスペクトルを示し、alanine, valine, isoleucine, leucineのスペクトルでは、200nmと180nm付近に正のピークが観測され、それらのCD強度は順に増加するとともに短波長側へシフトすることが確認された。さらに、スペクトルの温度依存性を測定するため、バルチュ素子を用いて温度可変装置を開発した。放熱媒体として液体窒素を用いることにより、真空中で-50～70℃の温度範囲でスベーパー型試料セルの温度を可変できることに成功した。この装置は、試料セルの光路長が極短長(12～20mm)であるため、サブゼロの低温においても試料が凝固せず、蛋白質の低温変性の測定も可能にしている。本発表では、いくつかの生体物質のVUVCDスペクトルを紹介し、本装置の現状と今後の課題、生体物質の構造解析への応用性について報告する。

Y.Matsushima, K.Matsuo, T.Fukuyama, S.Senba, T.Fukazawa, and K.Gekko : Development of vacuum-ultraviolet circular dichroism spectrophotometer using synchrotron radiation