2P241

物理的切断回収による DNA 解析とその高収率化

○黒澤 修^{1,2,3}、加畑 博幸³、鷲津 正夫³ (1 生研機構、2(株)アドバンス、3 京大・工・機械工学)

DNA の望みの部分を物理的手段により切り出して解析する手法は、従来の試験管ベースの生化学と異なり、位置情報を保存した DNA 解析を実現することが期待される。筆者らは、昨年度の研究において、DNA を静電伸長配向して基板上に固定し、その一部分を AFM 探針をナイフとして用いて切断回収する手法の実証を行った。しかしながら、回収の見かけ上の収率が悪いことが問題点として残った。この収率の悪さの原因が、物理的切断を行う際の可視化に用いる蛍光色素自体あるいは励起光によるものではないかと考え、これらの影響を調べたところ、1) インターカラーで染色した DNA を一旦乾燥させてしまうこと、および、2) 強い励起光を長時間照射すること、が DNA に分子損傷を与え、収率を悪化させることが判明した。そこで、DNA の末端のみに十分明るい蛍光ラベルを施して、弱い励起光の下で切断作業を行うこととした。末端染色には、DNA ポリメラーゼのヌクレアーゼ活性を用いて 3'→5' の消化を行い、同じ酵素のポリメラーゼ活性を用いてこれを埋め戻す際に FITC-dUTP を取り込ませる手法を用いた。一端あたり 75 分子の FITC を取り込ませることにより、従来の 1/16 の励起光強度での DNA の可視化が可能になった。これを用いて DNA の切断回収を行ったところ、1 回あたり数百分子の無損傷 DNA が回収された。今後、この断片の両端にアダプター配列を付加し、それを足がかりとして PCR 増幅することにより、切断回収 DNA のクローニングを行う予定である。この研究は、生研機構新事業創出研究開発事業「遺伝子の分子レベル操作技術」の開発の助成を受け行われたものです。ここに謝意を表します。

O. Kurosawa, H. Kabata, M. Washizu : DNA analysis based on physical dissection - improvement of the process yield -

2P243

シリコンマイクロチップを用いたタンパク質の結晶化

○井上 茂、鈴木 功一、秋岡 幸司、竹本 雄一、山西 良樹、山出 善章 (住友金属工業)

タンパク質の立体構造は、生化学的な機能および性質を理解する上で重要な情報を提供する。原子レベルでの立体構造を得るには、現在のところ X 線結晶構造解析が最も有力な手段である。そのため、良質で十分なサイズのタンパク質結晶が必要となる。

タンパク質の結晶化にはハンギングドロップ法やシッティングドロップ法などの蒸気拡散法が多く用いられ、少量のサンプルを結晶化させる効率的な方法として確立されている。しかし、結晶化条件の決定には多量のスクリーニング試験が必要で、析出条件が見つからない場合もある。

今回、半導体微細加工技術を応用してタンパク質結晶化用シリコンマイクロチップを作製し (図参照)、タンパク質結晶化実験に使用した。シリコンマイクロチップとタンパク質分子との相互作用により結晶化が促進される等の効果が期待される。また、チップ使用に際しては特別な試薬や処理を必要とせず通常の沈殿剤が使用でき、ドロップのセッティングはシッティングドロップ法と全く同様に行える。

数種類のタンパク質について結晶化実験を実施してチップの効果を調べた。詳細は発表当日報告する。

S. Inoue, K. Suzuki, K. Akioka, Y. Takemoto, Y. Yamanishi and Y. Yamada : Macromolecular Crystallization Assisted by Silicon Microchip

2P242

GFP ファージによる特定の細菌の高感度検出法

○船津 高志^{1,2}、谷山 忠義^{3,4}、田島 貴司⁴、並木 秀男⁴ (1 早大・理工・物理・生命理工、2 科技园・さきがけ研究 21、3 国立感染症研・免疫部、4 早大・教育・生物)

We developed a rapid, sensitive and convenient method for detecting a specific species of bacteria using GFP-phage, a bacteriophage carrying the gene of green fluorescent protein. As a model system *E. coli* was detected using GFP-λ TriplEx phage. *E. coli* infected with GFP-phage could be detected by the fluorescence of GFP after 4-6 hr incubation. The results show that even one bacterium in the specimen could be detected under fluorescence microscopy with a sensitive cooled CCD camera. When *E. coli* and *M. smegmatis* were mixed in a solution containing GFP-phage, only *E. coli* was infected indicating the specificity of this method. This method has following advantages 1) no need to purify bacteria from biological samples; 2) infection of GFP-phage to bacteria is specific; 3) very high-sensitive detection of GFP within infected bacteria; 4) exogenous substrates and cofactors are not required for fluorescence. Thus, this method can be applicable for any bacteriophage-bacterium system.

T. Funatsu, T. Taniyama, T. Tajima, H. Namiki : Rapid and sensitive method for detecting specific bacteria by means of GFP-phage

2P244

チトクローム c' の結晶成長機構に関する研究

○渡邊 博義¹、中村 裕彦²、依田 真一²、山中 亜利³、Ostermann Andreas⁴、栗原 和男⁴、茶竹 俊行⁴、田中 伊知郎⁴、新村 信雄⁴、高妻 孝光¹ (1 茨城大理、2 NASDA、3 JSF、4 原研先端研)

生命現象の基本構成単位である蛋白質の機能を解明するためには、蛋白質の立体構造を理解することが重要である。立体構造の決定法には、単結晶を用いる X 線および中性子線による結晶構造解析が有効な手段であり、多くの生体分子の立体構造が明らかにされつつある。しかし、その基礎となる単結晶の育成方法については確固たる手段は乏しい。蛋白質の結晶成長機構を理解して結晶化領域を特定することにより、制御された結晶育成を行い、より高品質の結晶を得ることができるものと考えられる。本研究では、*Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB11015 から単離精製したヘム蛋白質チトクローム c' の結晶成長を調べ、中性子線結晶構造解析用の大型高品質結晶の作製を試みると同時に、結晶品質との相関についても検討した。溶解度曲線は、蒸気拡散法で結晶が形成した後の蛋白質濃度と、結晶を硫酸アンモニウム溶液に溶解させた場合の蛋白質濃度を吸収スペクトルにより求め溶解度曲線とした。得られた溶解度曲線をもとに、蛋白質濃度 20 ~ 80 mg/ml、硫酸アンモニウム濃度 1.01 ~ 1.82 M の範囲で結晶化条件を設定し、マイクロバッチ法により結晶化領域を調べた。硫酸アンモニウム濃度が 1.82 M では、結晶化開始と同時に多数の結晶が生成することが認められた。蛋白質濃度 20 mg/ml、硫酸アンモニウム濃度 1.21 M では、約 2 週間後に長軸が 1 mm 以上の 6 角プリズム晶の結晶が 2 個生成した。また、得られた結晶化領域マップをもとに、大型結晶の作製を試みたところ、得られた結晶は大きさが 1.5 mm×1.2 mm×0.8 mm であった。得られた結晶を用いて中性子結晶回折実験をおこなったところ分解能 2.8 Å で構造解析を行うことに成功した。

H. Watanabe, H. Nakamura, S. Yoda, A. Yamanaka, A. Ostermann, K. Kurihara, T. Chatake, I. Tanaka, N. Niimura, and T. Kohzuma : Study on the crystal growth of cytochrome c'