2P321

DNA 塩基対を形成する水素結合 1 個の特性

○廣島 通夫^{1,2}、徳永 万喜洋^{1,2,3} (¹ 理研・免疫センター、² 遺伝研、³ 総研大)

DNA1 分子を引き伸ばし、塩基対中の水素結合の破断を 1 個ずつ分解して計測することに、高感度の分子間力顕微鏡 (IFM) を用いて成功した。

AFM などのプローブ位置が外力で変化する従来の計測法とは異なり、IFM は光の輻射圧を用いて、外力に影響されずカンチレバー位置を制御する。さらに市販の数十倍の感度をもつカンチレバーにより、塩基対レベルを超え、水素結合の破断を検出できる分解能を達成した。試料 DNA は、5 個の塩基対を含む 6 塩基を単位とした周期配列を持つ。周期配列に対応した力-距離曲線の周期領域を、相互相関を用いて平均し最終的な力-距離曲線を得た。

塩基対の破断を示す力-距離曲線には、G-C に 3 個、A-T に 2 個の力のピークが存在した。異なる配列で計測しても同じ結果であった。力のピーク 1 個が水素結合 1 個の破断であることを示している。

水素結合 1 個のエネルギーは、 $5.4 \pm 1.7 \text{ pN} \cdot \text{nm} = 1.3 \text{ kT}$ で一定であった。G-C と A-T の 1 塩基対のエネルギーは 3:2 で、水素結合の個数を反映していた。従来の多塩基測定値から推定された、1 塩基あたりのエネルギーは $3 \sim 20 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ であり、今回の結果と一致している。

従来の計測では、G-C と A-T の破断力は 3:2 と推定されていた。しかし、我々の結果では、G-C と A-T の間で力の差は見られず、ともに平均 $12 \pm 2 \text{ pN}$ であった。一方、周囲の配列により、力の大きさに違いが見られた。これらは、水素結合のエネルギーが一定という今回の知見、即ち、破断距離と力が反比例することにより説明できる。

以上、周囲の配列により破断する距離や力の大きさは変わるが、エネルギーは一定であり、1 個の水素結合のエネルギーは 1.3 kT である。

M.Hiroshima and M.Tokunaga : Characteristics of single hydrogen bonds of DNA base pairs detected by intermolecular force microscopy

2P323

金微粒子を用いた一細胞レベルでの超微量発現遺伝子定量解析法

○金 賢徹¹、吉良 敦史²、河野 博信¹、松村 和典¹、折田 一樹¹、老川 康大¹、岡野 和宣¹、安田 賢二¹ (¹ 東大院・総合文化、² (株) アルバック・技術開発部)

[背景] 個々の細胞の特性は、細胞内に発現している多種の分子の量と細胞内局在分布の時空間的变化により制御されると考えられている。特定の分子の発現量や空間分布の変化と細胞のダイナミックな特性変化を結び付けて理解するためには、個々の細胞の表現型と、細胞内の mRNA、タンパク質等の発現状態の両方を定量的に測定するための手段を開発する必要がある。このような必要性から、我々は個々の細胞内の mRNA 発現状態を、細胞内での空間分布を保ったまま、PCR 等の増幅作業を行うことなく定量的に 1 分子レベルで計測する新規手法の開発を行っている。[方法] 本手法では、様々な大きさの金微粒子に、粒子径に応じて異なる種類の一本鎖プローブ DNA をそれぞれ固定したものを、細胞内に発現する遺伝子を検出するための標識として用いた。作製した金微粒子プローブが相補的な配列を持つ細胞内の特定 mRNA に結合した後、金微粒子の数とその位置分布を直接数えることにより mRNA の数と空間位置の精度を定量的に評価した。金微粒子数の定量化とサイズの識別を行うために、本研究では走査型電子顕微鏡と原子間力顕微鏡の、二つの異なる検出手段を用いて評価を行った。[結果] はじめに、金微粒子表面にプローブ DNA を安定且つ再現性良く固定化する方法を検討した。次に、作製した金微粒子プローブが標的遺伝子に対してのみ特異的に結合する選択性の評価を、モデル基板上で行った。評価の結果、金微粒子表面に固定したプローブ DNA が相補的な配列を持つ DNA をほぼ 100% の選択性を持って認識することを確認した。これらを踏まえた上で、個々の細胞内に発現する mRNA を、空間分布を保ったまま定量的に検出することを試みた。発表では一細胞レベルでの遺伝子発現解析において、本手法を用いて得られた結果と可能性、問題点について議論したい。

Kim,H., Kira,A., Kohno,H., Matsumura,K., Orita,K., Oikawa,K., Okano,K., Yasuda,K. : Quantitative Analysis of Expressed Rare Messages in Single Cell Level using Gold Nano-Particles

2P322

均一なプローブ固定化用表面としての蒸着重合によるポリ尿素膜の評価

○吉良 敦史¹、金 賢徹²、岡野 和宣²、安田 賢二² (¹ (株) アルバック・技術開発部、² 東大・院・総合文化)

DNA チップは遺伝子発現解析に用いられる強力なツールであるが、極微量のターゲットに対して定量的な解析を行うためにはプローブ密度の均一性の改善など更なる高感度化が必要である。このための方法の一つとして、基板上に固定化する target-DNA をハイブリダイゼーション反応効率の最も良い密度で空間的配置することが考えられる。従来、DNA チップ基板表面はシランカップリングを基本としたもので、固定化に用いる官能基の密度を制御することは困難である。そこで我々は蒸着重合によるポリマー膜を応用した。本発表では、3,5-diaminobenzoic acid (DBA) のカルボキシル基を官能基としてその間隔を 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI) の長さ (約 2 nm) で制御したポリ尿素薄膜を評価した。Si 基板上に厚さ 10 nm の DBA-HDI ポリ尿素膜を成膜後、金ナノ微粒子 (ϕ 20 nm) に 5' 末端チオール基、3' 末端アミノ基の ssDNA を修飾した DNA プローブを DBA のカルボキシル基とアミンカップリングにより結合させた。走査型電子顕微鏡による観察の結果、 $254 \text{ 粒子}/\mu\text{m}^2$ の密度で均一に金ナノ微粒子が分布しているのに対し、コントロールサンプルでは $1 \text{ 粒子}/\mu\text{m}^2$ 未満であることが分かった。一方でシランカップリング基板においては、基板に結合した金ナノ粒子の数には DBA-HDI ポリ尿素膜に比べ大きな差異は見られなかったが、その分布においては不均一であることが分かった。この結果、脂肪族のポリ尿素膜は非常に均一な機能性を示し、表面に対する非特異吸着を防ぐことが確認され、我々の方法が DNA チップに限らず生体分子マイクロアレイにおける高感度化のための表面技術としての可能性を示している。結果、考察等の詳細については本会にて報告する。

A. Kira, H. Kim, K. Okano, K. Yasuda : Evaluation of a polyurea thin film by vapor deposition polymerization as the surface for uniform probe immobilization

2P324

金ナノ粒子への SH-ssDNA 修飾法とその評価

○河野 博信¹、吉良 敦史²、金 賢徹¹、岡野 和宣¹、安田 賢二¹ (¹ 東大・院・総合文化、² (株) ULVAC)

細胞内遺伝子の発現状態を高速で網羅的に検出する方法として DNA チップが広く用いられている。しかし検出に蛍光色素標識を用いた従来の DNA チップでは、検出感度の低さや定量的再現性の乏しさ、蛍光エネルギー移動に起因する多重標識の限界の点で課題が残っていた。また元来、細胞間で情報に差異の無いゲノム解析用途で開発された手法を基盤としている為、実際のチップ上の発現計測では多数の細胞の平均的な遺伝子発現情報しか得られず、一細胞毎に細胞内の遺伝子発現状態を解析することは困難であった。そこで我々は、蛍光色素に替えて金属微粒子を新たに識別標識として用い、その粒径や組成比 (ドーブ元素) の違いにより定量的にマルチラベル化することを考案した。しかし、金属微粒子は塩濃度等の溶媒変化によって容易に不可逆的な凝集を起こすので、分散を保つためにはファンデルワールス引力よりも静電的斥力の方が常に大きくなければならない。そこで本研究では、5' 末端側にチオール基が導入された一本鎖 DNA (以下 SH-ssDNA) を金ナノ粒子へ安定に修飾する方法の確立及びその評価を行った。まず、金ナノ粒子へ SH-ssDNA を修飾する際の溶液の塩濃度が吸着量に及ぼす影響を調べるために、溶液中 NaCl が 0M~1M という条件で SH-ssDNA 吸着量を見積もった。その結果 SH-ssDNA を金ナノ粒子表面に最密に吸着させようとした場合、最低 500mM 程度の NaCl が必要であることがわかった。さらに SH-ssDNA の吸着量は長さにも依存し、ある長さまでは長さに応じて吸着量は減少することがわかった。これらの結果をもとに、今後は吸着した SH-ssDNA のハイブリダイゼーション効率も考慮した上で SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子を用いたターゲット遺伝子の一分子レベル直接計数法を確立していく予定である。

H.Kohno,A.Kira,H.Kim,K.Okano and K.Yasuda : Method and its evaluation of SH-ssDNA modification onto gold nanoparticle