〔シンポジウム：ナノテクノロジーの生体分析への応用〕

ナノテクノロジーによる DNA 分子のマニピュレーション

加地 範匡・馬場 嘉信

SUMMARY

Human genome sequencing has been finished and the post genome sequencing era has come. To accelerate the post genome sequencing research including proteome analysis, improvements are needed to move current dideoxy sequencing to more rapid sequencing time based on more revolutionary methods such as single DNA molecule analysis. The technique of single DNA molecule manipulation is essential for realizing single genome analysis. We, here, propose one of the novel methods to manipulate DNA molecule using agarose gel and alternative current electric field. These techniques which are based on nanotechnology will be applicable to the single genome analysis.

Key words: single DNA molecule, nanotechnology, stretching, AC fields, Agarose gel.

はじめに

昨年2月、ヒトゲノムのドラフトシーケンスが発表され、研究者の関心は一気にポスト・ゲノムシーケンス研究へと移ってきた。これらポスト・ゲノムシーケンス研究を展開していく上で最も基盤となるゲノム情報を確立することは必要不可欠であり、マイクロチップ・ナノチップを用いた超微量・超高速 DNA 解析や、さらに dideoxy 法によらない革新的なシーケンシング法であるナノポアを用いたアプローチ、質量分析計によるもの、1分子レベルでの解析技術の開発¹⁾が重要である。

我々は、このうち特に1分子レベルでの DNA 解析技術の開発をターゲットとし、その実現のために必要不可欠である1分子レベルでの DNA マニピュレーション方法についての研究を続けている。

DNA の伸張現象を利用した DNA マニピュレーション

真核生物の染色体 DNA は、塩基性タンパク質であるヒストンと結合して、高度に凝縮されたクロマチン構造を形成しており、また、DNA 単体でも染色体 DNA のような数十 kbp 以上の長さを有する場合は溶液中においてランダムコイル状態で存在する。そのため、このような状態から塩基配列情報を直接得るのは困難である。そこで、このような凝縮もしくはランダムコイルで存在する DNA を伸張させることにより、目的とする遺伝子の物理的位置を可

視化できれば、より高速なゲノム解析が可能になると考え、種々の DNA を引き伸ばすためのマニピュレーション方法が開発されてきた²⁻⁹⁾。しかし、これらの方法の多くは、神業的な実験テクニックを必要としたり、染色体 DNA はもちろんのこと、せいぜい数十 kbp までの DNA しかマニピュレートできなかったりした。そこで、我々が見出した DNA の伸張現象¹⁰⁾、すなわちアガロースゲル中における長鎖 DNA に交流電場を印加すると DNA が電場方向に伸張するという現象を利用することにより、高速かつ簡便に染色体 DNA を伸張させることができないか検討を行った。

実 験

1. 試薬・装置

サンプルとしては T4 DNA (165.6 kbp) とパルスフィールドゲル電気泳動にて染色体ごとに分離した酵母 *S. cerevisiae* 染色体を、インターカレート型蛍光色素である YOYO 1 にて染色したものをを用いた。Fig. 1 に示すような小型のゲル電気泳動装置をカバーガラス上に作製し、DNA を伸張させるための媒体となるアガロースゲルをセットした後、蛍光顕微鏡を用いて 100 倍の対物レンズを通して電場印加時の DNA の挙動を観察した。

2. 結 果

アガロースゲル中に存在する T4 DNA に、0.1 Hz から 100 Hz までの各周波数の sin 型交流電場を印加した際

Manipulation of DNA molecules by nanotechnology.

Noritada Kaji, Yoshinobu Baba; 徳島大学薬学部薬品物理化学教室, 科学技術振興事業団 CREST

Correspondence address: Yoshinobu Baba, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, 1-78, Shomachi, Tokushima 770-8505, Japan.

略号一覧: *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*.

第 52 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

Fig. 1. Schematic diagram of experimental setup.

Two Pt-electrodes were placed with the distance of 1 or 0.5 cm in the miniature cell. Sinusoidal electric fields generated by a multifunction synthesizer were applied between the electrodes through a high-speed power amplifier bipolar power supply.

Fig. 2. Stretching of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA, consisting of 225 to 2,200 kbp fragments, under an AC field (200 V/cm, 10 Hz) in 1% agarose gel.

A) Fluorescence image of *S. cerevisiae* chromosomal DNA. B) Schematic drawing corresponding to the fluorescence image.

の挙動を観察した結果、10 Hz 前後の周波数でのみ DNA の伸張が見られた。また、50 V/cm から 600 V/cm の各電場強度下での DNA の挙動を観察したところ、300 V/cm までは電場強度に比例して伸張時の DNA の最大径が大きくなる傾向が見られたが、それ以上では安定して伸張させることが難しく、その値は小さくなった。さらに、0.5% から 3.0% までの各アガロースゲル濃度下で同様に

実験を行ったところ、ゲル濃度には特に関係なく伸張が観察されたが、アガロースゲルの非存在下（緩衝溶液中）では、このような伸張現象は全く見られなかった。これらのことより、アガロースゲル中における DNA の伸張現象は、外部電場の周波数に大きく依存した現象であり、ゲル繊維と DNA との相互作用に基づいていることがわかった。T4 DNA よりもさらに長い酵母 *S. cerevisiae* 染色体

の場合はその分子量に比例して、10 Hz 前後の定常電場の印加のみでは、伸張中にゲル繊維にトラップされる頻度が高くなるために完全な伸張は難しく、いったん 3 Hz 程度のより低い周波数にまで下げ、再び 10 Hz 程度にまで周波数を漸増させるといふ周波数を変化させる操作により、ゲル繊維との絡み合いが解消されることもわかった。さらに、一度伸張した DNA は、その分子量によらず 10 Hz 前後の周波数で安定に伸張状態を保つことが可能であった。これらの結果をもとに伸張に成功した一例を Fig. 2 に示した。

3. 考 察

Mbp オーダーの長さを有する染色体 DNA のような巨大 DNA の電気泳動の際には、DNA がゲル繊維にトラップされ泳動されなくなることが知られている¹¹⁾。ここで報告している DNA の伸張現象においても、DNA の分子量の増加に伴って伸張過程でゲル繊維にトラップされて伸張しない分子が数多く見受けられた。このようなゲル繊維によりトラップされた状態を解消するには、外部電場の周波数を変化させることが有効であったが、これは DNA がゲル繊維によりトラップされて定常に達した状態を、非定常電場の印加により解消できるためと考えている。

なぜアガロースゲル中における DNA に 10 Hz 前後の交流電場を印加すると伸張するのかは、一番興味深い点であり、Fig. 3 の実験事実をもとに我々が提唱している伸張のモデルを示す。ポリマー中における DNA の挙動は、チューブモデルを用いて描写することができる場合が多く¹²⁾、今回はこのモデルをアガロースゲル中における DNA の挙動に対しても適用して説明する。チューブモデルにおいては、アガロースゲルのポアサイズで規定されるサイズのチューブに拘束された空間を DNA は運動すると仮定する。今回は Fig. 4 に示すように、折れ曲がり DNA 分子内に一か所だけある最も簡単な場合を想定して考える。電場が折れ曲がりの先端方向に印加された場合、DNA はチューブの中を折れ曲がりの先端方向に向かって泳動され (Fig. 4-1)、チューブの先端の壁に衝突すると行き場を失い、その結果、DNA セグメントのたまりが生じる (Fig. 4-2)。次に、電場の方向が切り替わると DNA 全体がチューブの中を反対方向に泳動され、先ほど生じた DNA セグメントのたまりがひとかたまりとなり長い方の腕のチューブに泳動される (Fig. 4-3)。チューブの折れ曲がり部分で DNA が引っかかり、DNA セグメントのたまりが引き伸ばされると再びもとの V 字型に戻るのだが、DNA セグメントのたまりが生成・解消したために、長い方の腕はより長く引き伸ばされることになる。このサイクルを繰り返すことにより、最終的に Fig. 4-4 に示すように長い方の腕が短い方の腕を引っぱるようになり伸張すると考えられる。

Fig. 3. Stretching process of T4 DNA in 1% agarose gel.
An electric field (10 Hz) was applied in the horizontal direction.

おわりに

染色体 DNA のような長鎖 DNA は、ピペット操作等の物理的剪断力により容易に切断されてしまうためにインタクトなまま扱うのは難しく、染色体 DNA を細胞から抽出する際も、細胞膜の溶解からヒストンの消化までの一連の操作はすべてアガロースゲル中で行われる。そのことをふまえて考えると、ここで紹介した DNA 伸張法は、細胞からの抽出・マニピュレーションをすべて同じ媒体の中で行うことができるため、染色体レベルの DNA マニピュレーションには最適である。

Fig. 4. Schematic diagram of sequential steps in the DNA stretching process in a wide tube.

また、アガロースゲルのポアサイズは、濃度 1.0% のときで約 500 nm と見積もられており、近年の半導体集積化技術の急速な進歩に伴い、ゲルのようなナノメートルオーダーのストラクチャーを、人工的に作製することが可能となってきた。そこで、従来から電気泳動の分野で多用されてきたゲルやポリマーに代わるナノストラクチャーを利用することにより、より詳細にこの DNA 伸張現象を高分子物理学的見地から研究することが可能になると同時に、光ピンセット・AFM 等のナノツールを組み合わせることで、より自由に DNA 分子をマニピュレーションすることが可能になると考えられる。このようなナノテクノロジーを組み合わせることにより、究極の 1 分子ゲノム解析も近いうちに可能になると期待される。

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業、経済産業省地域新生コンソーシアム研究開発事業、文部科学省科研費の援助を得て行った。

文 献

- 1) Initial Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.

- 2) 上田正則, 馬場嘉信. 長鎖 DNA をひきのばす! 生物物理 2000; 40: 48-51.
- 3) Ueda M, Baba Y, Iwasaki H, Kurosawa O, Washizu M. Direct observation of deoxyribonucleic acid anchored between an aluminum electrode and a cantilever of atomic force microscope. *Jpn J Appl Phys* 1999; 38: 6568-9.
- 4) Ueda M, Yoshikawa K, Doi M. Stretching of long DNA under alternating current electric fields in a concentrated polymer solution. *Polym J* 1997; 29: 1040-3.
- 5) Ueda M, Yoshikawa K, Doi M. Molecular motion of long deoxyribonucleic acid in a concentrated polymer solution depending on the frequency of alternating electric field. *Polym J* 1999; 31: 637-44.
- 6) Michalet X, Ekong R, Fougereousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A. Dynamic molecular combing: Stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 1997; 277: 1518-23.
- 7) Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* 1996; 271: 795-9.
- 8) Schwartz DC, Li X, Hernandez LI, Ramnarain SP, Huff EJ, Wang Y. Ordered restriction maps of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes constructed by optical mapping. *Science* 1993; 262: 110-4.
- 9) Yokota H, Sunwoo J, Sarikaya M, van den Engh G, Aebersold R. Spin-stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy. *Anal Chem* 1999; 71: 4418-22.
- 10) Kaji N, Ueda M, Baba Y. Molecular stretching of long DNA in agarose gel using alternating current electric fields. *Biophys J* 2002; 82: 335-44.
- 11) Gurrieri S, Smith SB, Bustamante C. Trapping of megabase-sized DNA molecules during agarose gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 453-8.
- 12) Doi M, Edwards SF. The theory of polymer dynamics, Clarendon, Oxford. 1986.

要 旨

さらなるゲノム解析の高速化のために、革新的なゲノム解析方法である 1 分子ゲノム解析を目指して、そのために必要とされる DNA 分子のマニピュレーション技術の開発を行った。今回紹介した方法は、アガロースゲル中の DNA 分子に 10 Hz 前後の周波数の交流電場を印加すると、DNA 分子が電場方向に伸張するという現象を利用したものである。この伸張現象を、高分子物理学的な見地から説明するとともに、これを利用することにより、最終的には 100 万塩基対を超える染色体 DNA をも伸張させることに成功した。この方法は、従来法に比べて非常に簡便でより高速に染色体 DNA を伸張させることができるため、1 分子ゲノム解析への可能性が示唆された。