〔ワークショップ：ここまでのプロテオミクス研究技術とその応用〕

DNA を見てさわって動かす！ 生体分子可視化・計測法でわかること

森居隆史・岡田孝夫

SUMMARY

Visualization and measurement of biomolecules based on an atomic force microscope (AFM) allow us to observe individual molecules in their native form. Because the measurement can be performed in buffer solution and it does not require fluorescence labeling or staining. This technique could be applied for the detection of bound site of MutS protein to DNA successfully. Recent developments in AFM technology such as a low noise nano-positioning sensor for closed-loop operation have opened the door to new era of single molecule manipulation. We demonstrate that we can take aim at a portion of DNA adsorbed on mica substrate and we can fish it up with an AFM tip.

Key words: AFM, DNA, force curve, single molecule manipulation.

1. はじめに

1986年にG. Binnigら¹⁾によって開発された原子間力顕微鏡 (AFM) は、微小なカンチレバー (片もち梁) を用いて、カンチレバー先端に取り付けられた微小な針 (探針) と試料との間に働く力をカンチレバーの微小変位として検出し、試料上で探針を水平走査することによって試料表面の凹凸形状を可視化する方式の顕微鏡であり、原子レベルの高い空間分解能を持つことが知られている。AFMは、電子顕微鏡と異なり、必ずしも真空を必要とせず、大気中だけでなく溶液中でも用いることができるユニークな特長を有する顕微鏡である。

(株) 生体分子計測研究所はAFMをベースとした生体分子可視化・計測法をコアテクノロジーに1999年に設立されたナノバイオベンチャーである。生体分子可視化・計測法によると、DNAなどの生体分子を蛍光色素などで標識することなく、そのままに、長さの計測、形状や構造の可視化をナノメートルの分解能で行うことができる。(株) 生体分子計測研究所は2002年9月よりAFMの最新技術を搭載した米国アサイラムリサーチ社の分子間力プローブ顕微鏡

MFP-3Dの輸入販売を行っている。

ここでは、まず、生体分子の可視化・計測法の応用例として、DNA-蛋白質複合体の解析を紹介し、次に、クローズドループ制御などAFMの最新技術によって可能になった「DNAを見て、触って、動かす」単一分子マニピュレーション技術について紹介する。

2. DNA-蛋白質複合体²⁾

MutSはDNA修復系で働く酵素で、DNAの1塩基から4塩基のミスマッチ部位を認識して結合する。1066 bpのDNA鎖に、アビジンでラベルした5'末端から883および884 bpの位置にCTからGCの変位を加え、人工的にミスマッチを形成して、MutSを結合させた。このMutS-DNA複合体をマイカ基板上に固定して、AFMで可視化した結果をFig. 1に示す。矢印で示した位置にMutS蛋白質が結合している。多くのサンプルから得られたMutS-DNA複合体の可視化像について、アビジンからMutSまでのDNAの長さを計測し、統計処理することによって、MutSの結合位置として 868 ± 30 bpが求まった。この方法は現段階では精度が電気泳動法に及ばないものの、微量の試料でも測定が可能である点や、

Looking, touching and moving DNA molecules-Knowledge obtained from the method of visualization and measurement of biomolecules.

Takashi Morii, Takao Okada; (株) 生体分子計測研究所

Correspondence address: Takashi Morii; Research Institute of Biomolecule Metrology Co., Ltd., 807-133 Enokido, Tsukuba, Ibaraki 305-0853, Japan.

略語一覧: AFM, Atomic Force Microscope; LVDT, Linear Variable Differential Transformer.

第54回日本電気泳動学会総会

(受付2004年7月27日, 受理2004年10月25日, 刊行2005年3月15日)

Fig. 1. AFM image of MutS protein-DNA complexes.

Bright arrows indicate MutS proteins bound to DNA molecules. And dark arrows indicate avidin bound to termini of DNA molecules.

2000 bp 以上の長鎖 DNA にも有効である点などの長所がある。

3. クローズドループ制御 AFM

AFM の走査には通常、チューブ型の圧電素子(ピエゾ)が用いられる。チューブ型を用いると単一の素子で X, Y, Z の 3 軸の走査ができるという利点があるが、軸間の干渉に因る歪みの問題があった。MFP-3D は、従来のチューブ型圧電素子の代わりに、XY 軸の走査用にフラットスキャナーを採用し、Z 軸スキャナーと分離することによって、軸間の相互干渉を排除した。

軸間の干渉による歪みのほかに、圧電素子の本来の物性

として、圧電素子の伸縮に伴うヒステリシス現象とクリープ現象による非線型歪みが存在する。この歪みの問題を解決するためには、圧電素子の伸縮を位置センサーを用いて直接測定して圧電素子に印加する電圧にフィードバックする方式(クローズドループ)の制御が有効であることが従来から知られていたが、位置センサー自身が発するノイズによって空間分解能が制約されるという課題があった。アサイラム・リサーチ社は、従来のキャパシタンス方式の位置センサーよりも低ノイズの差動トランス(LVDT)方式の位置センサーを開発し、クローズドループ制御による高い直線性と空間分解能との両立を実現した。MFP-3D には、X, Y, Z の 3 軸すべてに LVDT 位置センサーが搭載される。

4. 溶液中で DNA を可視化・操作

制限酵素で断片化した λ -DNA をマイカ基板上に固定し、バッファ溶液中で可視化した像を Fig. 2 (A) に示す。DNA の可視化像上で指定した位置(1 および 2)において、AFM の探針を DNA に接近させ、針先を DNA に押し付けることによって針先に DNA を付着させて、次に DNA を引っ張り上げる方法で DNA を引き伸ばし、DNA の延伸距離-張力の特性曲線(フォースカーブ)を測定した。測定位置の再現性は、前述のクローズドループ制御によって保証されている。フォースカーブ測定の結果を Fig. 3 に示す。グラフの横軸は Z 軸 LVDT 位置センサーによって計測した延伸距離であり、縦軸はカンチレバーの変位から求めた張力である。カンチレバーには長さ 60 μm の金蒸着された窒化シリコン製カンチレバー(オリンパス BioLever)を使用し、サーマル法³⁾によってカンチレバーのバネ定数の較正を行った。フォースカーブには 2 本鎖 DNA の B 型から S 型への構造転移(B-S 転移)⁴⁾に特徴的な B-S プラットーと呼ばれ

Fig. 2. AFM image of λ DNA digest adsorbed on a mica substrate.

The images were taken before (A) and after (B) force curves were made.

Fig. 3. The force-extension curves of DNA.

The upper graph was obtained at the point 1 in Fig.2 (A) and the lower graph was at the point 2.

る平坦な部分が見られる。DNA にニックがある場合は B-S 転移は張力が約 70 pN で起き⁴⁾、DNA にニックが無い場合は約 110 pN で起きる^{5, 6)}。さらに張力が約 150 pN 以上になると S-DNA から 1 本鎖 DNA への転移が起きる (melting transition)⁷⁾。張力が DNA の針先 (またはマイカ基板) への付着力を超えると、DNA が針先 (またはマイカ基板) から外れるため、カンチレバーの撓みが解消されて、張力がゼロに戻る。

Fig. 3 (B) のフォースカーブには、DNA がマイカ基板から段階的に剥がれたことによる張力の瞬間的な変化を示す形状が現われている (Jump 1 および Jump 2)。Fig. 2 (B) はフォースカーブ測定後に同じ領域を再度、可視化した像であり、Fig. 2 (A) と比較すると、DNA 鎖のフォースカーブ測定に関与した部分が切断されて失われたことがわかる。また、Fig. 2 (A) と Fig. 2 (B) とで DNA の太さが異なるのは、フォースカーブ測定の際に探針を試料に押し付けたことによって、探針の曲率半径が大きくなったことが原因と考えられる。

DNA 分子の力学的な性質、すなわち、DNA のフォースカーブの形状は、DNA と相互作用するインタカレータ分子の存在によって影響を受けることが知られている⁸⁾。DNA のフォースカーブ測定は、薬と DNA の相互作用を単一分子レベルで研究する高感度な手法として注目されている⁹⁾。

5. おわりに

AFM をベースとする生体分子可視化・計測法を用いると DNA やタンパク質などの生体分子間の相互作用を単一分子レベルで調べることができる。クローズドループ制御など AFM の新技術は、定量性の大幅な向上をもたらした。測定及び解析の自動化や高速走査が開発されることによって、近い将来に AFM 測定のスループットが数桁向上することが考えられ、本手法がプロテオミクスに役立つ技術として広範に利用されることが期待される。

文 献

- 1) Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986;56:930-933.
- 2) Tanigawa M, Gotoh M, Machida M, Okada T, Oishi M. Detection and mapping of mismatched base pairs in DNA molecules by atomic force microscope. *Nucleic Acids Research* 2000;28:e38.
- 3) Hutter JL, Bechhoefer J. Calibration of atomic microscope tips. *Rev Sci Instrum* 1993;64:1868-1873.
- 4) Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* 1996;271:795-799.
- 5) Léger JF, Romano G, Sarkar A, Robert J, Bourdieu L, Chatenay D, Marko JF. Structural Transitions of a Twisted and Stretched DNA Molecule. *Phys Rev Lett* 1999;83:1066-1069.
- 6) Morii T, Mizuno R, Haruta H, Okada T. An AFM study of the Elasticity DNA molecules. *Thin Solid Films* 2004; 464-465:456-458.
- 7) Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol* 1999;6:346-349.
- 8) Anselmetti D, Fritz J, Smith B, Fernandez-Busquets X. Single Molecule DNA Biophysics with Atomic Force Microscopy. *Single Molecules* 2000;1:53-58.
- 9) Krauthauer R, Pope LH, Schrader TE, Allen S, Gaub HE. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy. *FEBS Lett* 2002; 510:154-158.