



Title	自己相関蛍光法による制限酵素断片数の評価
Author(s)	金城, 政孝
Citation	電子科学研究, 3, 75-77
Issue Date	1996-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24352">https://hdl.handle.net/2115/24352</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_P75-77.pdf



# 自己相関蛍光法による制限酵素断片数の評価

細胞機能素子研究分野 金城 政 孝

自己相関蛍光法 (FCS) は極微小領域における蛍光分子の分子運動に由来する光の「ゆらぎ」から、分子の大きさと分子数を直接測定する方法である。遺伝子は DNA 分子が結合して、全体として巨大な構造体を構成しているが、特異的な配列を認識して切断する制限酵素を用いると、遺伝子の配列に従ってその切り出される断片の長さや数が決まってくる。この時の分子数の増加を FCS により観察し、その定量化を試みた。

## 1. はじめに

特定の遺伝子配列を認識して DNA の共有結合を切断する酵素は制限酵素と呼ばれ現在約 500 種類が知られている。制限酵素が認識する配列はおもに四つから十数個の連続した DNA 塩基であり、従ってその配列の中の一つの DNA が突然変異などで変化するとそのサイトでは切断が起こらなくなる。この性質を利用する事で、遺伝子間の相違を見つける事が行われている。我々の遺伝子は DNA のつながりであり、その総数は約 3 ギガ塩基対である。人は姿や行動の違いからお互いに違う事が認識できるが、実際、遺伝情報も個人個人ですべて違っており、数百塩基から千塩基に一つの違いがあるといわれている。この DNA 配列に違いのある箇所と特定の制限酵素の認識配列が一致すると切断された長さや数に相違が出てくる。これを RFLP (restriction fragment length polymorphism) と呼び、例えば、血縁関係や系統関係の検出に利用されている。RFLP の検出には一般にゲル電気泳動法がよく利用されているが、この方法は、比較的簡単な装置だけで行える反面、定量化が難しい事や非常に複雑な操作と二日程度の時間が必要とされるような短所がある。ヒトゲノム計画のような大規模な遺伝子や個体群を解析するということが必要になってきている現在、今までの方法に変わるまったく新しい方法の開発が望まれている。筆者はこれまでに FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) の開発を進めており、

この測定法を DNA-DNA ハイブリダイゼーション法に応用し特定の DNA 配列の検出に利用してきた<sup>[1,2]</sup>。FCS 法は極微小領域における蛍光分子の分子運動の「ゆらぎ」の測定と解析をとおして、分子の大きさや形状と分子数を直接測定する方法であり、その簡便性と必要とされる試料量の少なさなどから、生物材料を扱う時に非常に有利であると考えられている<sup>[3]</sup>。

本研究は FCS 法が微小領域における単一分子検出法として利用できることに着目し、長鎖 DNA を制限酵素で切断した時の分子数増加過程を FCS により観察し RFLP の定量化を試みた。

## 2. 相関蛍光分光測定

アルゴンレーザー (514.5 nm, <0.5 mW) を倒立型蛍光顕微鏡の光源として用い、試料の蛍光強度の変化をピンホールを備えた光電子増倍管で検出しそれをデジタルコリレーターによりデータの蓄積と解析を行った。

用いた DNA 試料は一本鎖 M 13 mp 18 DNA を鋳型として用い、DNA ポリメラーゼとローダミンで修飾した塩基 (Rhodamine-dUTP) を含む基質を用いて合成した二本鎖 M 13 mp 18 DNA (7250 塩基対) である。制限酵素は HaeIII, HgaI, BsmA 1, BspM 1 を用いた。それぞれの酵素の認識配列と M 13 における切断サイトとその時の鎖長を図 1 に示す。酵素反応は全量 5  $\mu$ l で行い、FCS 法によって分子数の増加を観察した。一般に観察視野の平均分子数 (N) と蛍光の相関

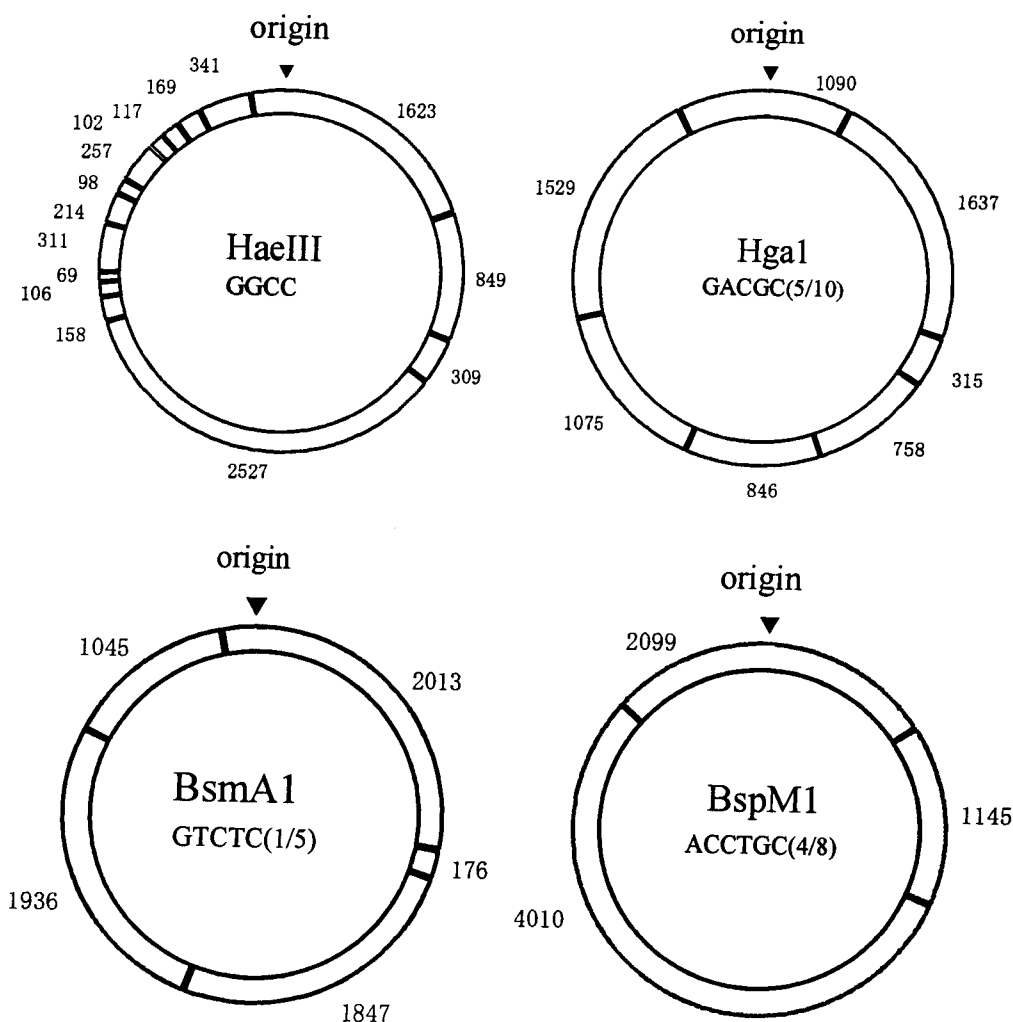


図1 M13 mp 18 DNA の制限酵素地図。  
各制限酵素の名前と認識配列を DNA サークルの中に示す。数字は酵素により切断された時の DNA 鎖長を示す。

関数  $G(\tau)$  は  $\tau = 0$  において、 $G(0) = 1/N$  の関係にある事が知られている<sup>[4]</sup>。しかし、この実験では酵素反応中に切断遊離してくる DNA 断片はそれぞれ異なる蛍光強度を持っている。ここで先に述べたような蛍光ラベルの方法では蛍光色素は DNA の塩基配列のうちアデニン塩基に均等にラベルされることから、各制限酵素断片の蛍光強度は DNA 鎖長 ( $n_{bp}$ ) に依存すると考える事ができる。さらに、各断片の数の分布は図1に示したが、同じ長さ (鎖長) の断片はない。つまり、各成分比は1対1である。このような条件下で上記の関係は次のようにあらわす事ができる。

$$G(0) = \frac{\sum n_{bp}^2}{N(\sum n_{0bp})^2} \quad (1)$$

さらに、切断された M13 DNA の割合を  $\Phi$  とすると、

$$G(0) = \frac{1}{N} \left\{ \sum \left( \frac{n_{bp}}{n_{0bp}} \right)^2 \Phi + (1-\Phi) \right\} \quad (2)$$

として評価する事が可能となる。ここで  $n_{0bp} = \sum n_{bp}$  であり、完全長の M13 DNA を示す。

### 3. 結果・考察

4種類の制限酵素で M13 DNA を切断した時の切断活性を式(2)に従って求め、その結果を図2に示した。本研究で使用した酵素は大まかに2つのグループに分

ける事ができた。HaeIIIとBsmAIは比較的速やかにM13 DNAを分解したがHgaIとBspMIは40時間かかったことが示された。この違いが何に依存するかはこれらの結果からすぐ結論を出すことはできないが、興味深いことに反応の遅かった酵素は何れも認識サイトと切断サイトが4から10塩基離れていることが共通の性質としてあげられる。この部分に蛍光色素の結合した塩基が挿入され立体障害により酵素活性を押えた可能性が考えられる。これを確認するためにはさらに多くの制限酵素を比較する必要があるであろう。

蛍光強度の重みを付けた自己相関関数を用いることにより、様々な断片長を含む溶液での分子数カウントが可能であることを示すことができた。また、一つの測定が一分間程で終わることは、現在のゲル電気泳動法による分析に比べて格段に早く、多くのサンプルを扱うスクリーニングへの応用が考えられる。

本研究においては分子の動的な性質を反映する拡散定数については考慮していない。それらを考慮することでさらに分子運動を含めた詳しい解析方法が可能に

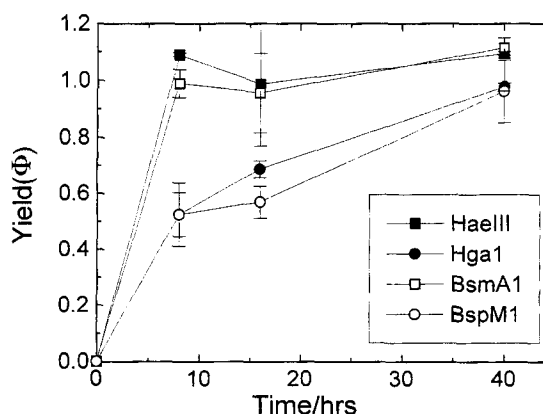


図2 M13 mp18 DNAを制限酵素で切断した時のFCSより求めた収率。平均±SD

なるものと考えている。

## 謝 辞

この研究の遂行に当たり有益な助言をいただいた西村吾朗氏（超分子分光）に深く感謝いたします。

## 【参考文献】

- [1] Kinjo, M. and Rigler, R.; Nucleic Acids Res. 23 (10), 1795-1799 (1995)
- [2] 金城政孝, 小山富康 日本バイオレオロジー学会誌 10 (2), 74-83 (1995)
- [3] 金城政孝 化学, 50 (9), 556-559 (1995)
- [4] Rigler, R., Mets, Ü., Windengren, J. and Kask, P.; Eur. Biophys J. 22, 169-175 (1993)