



Title	遺伝子の動きを見る
Author(s)	金城, 政孝
Citation	電子科学研究, 4, 96-98
Issue Date	1997-02
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24386">https://hdl.handle.net/2115/24386</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_P96-98.pdf



# 遺伝子の動きを見る

細胞機能素子研究分野 金城 政 孝

蛍光相関分光法は蛍光のゆらぎから分子数と分子量を知る方法である。遺伝子は DNA モノマーがつながってできた長いポリマー分子である。その中の特異的な配列を認識し切断する制限酵素を用い、切り出される DNA フラグメントの分子数の定量化を行ない、その方法を応用して遺伝子の変異を調べる方法を確立した。また、今後の発展として遺伝子一分子マニピュレーションについて考えてみた。

## はじめに

細胞の基本的な情報は遺伝子にすべて記載されている。この遺伝子は DNA の配列から成り立ちその配列順序が直接情報を含んでいる。そのため我々自身の遺伝子をはじめ、線虫、酵母などのモデル生物や我々の生活に関係の深いイネなどの重要な作物の全遺伝子配列を決めることは世界的なプロジェクトであり、かつ各国がしのぎを削っている<sup>[1]</sup>。

このような中で我々は蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy) と制限酵素を組み合わせ、遺伝子配列の差違を簡便に決定する方法を開発してきた。FCS は溶液中のフェムト ( $10^{-15}$ ) リットルオーダーと言う極微小容量における分子の「数ゆらぎ」が引き起こす蛍光の「強度ゆらぎ」の解析をもとに分子数の変化と分子の大きさを検出する方法である。そこで、遺伝子上の認識部位が変異を起こし、それにより長い DNA 分子が切断されるかされないかを、分子数の変化として捕らえようと試みた。次にその方法を簡単に述べる。

## 分子カウント

遺伝子は先にも述べたように、DNA モノマーが連続的につながった非常に長いポリマー分子である。この切れ目なく作られた DNA ポリマーは基本的に 1 分子である。しかも単純な繰り返しのポリマーではなく、ひらがなだけで書かれた句読点のない長い伝記物語にたとえられるかもしれない。さて、遺伝子 (DNA ポリ

マー) を 1 分子とすると、遺伝子中の特定の配列 (認識サイト) を認識して切断する制限酵素の活性は、このような 1 分子を切断して複数の分子にする過程として考えることができる。認識サイトと切断サイトをここで便宜的に同一と考えると、遺伝子上の認識サイトの数に従い制限酵素で切り分けられる遺伝子フラグメントの数が決まることになる。幾つかある認識サイトの一つが突然変異で変化すると、それに従い切り離されるフラグメントの数に変化が起きる。この方法による遺伝子変異の検出法は制限酵素断片長多型 (RFLP) と呼ばれ、現在ゲル電気泳動法がその検出法の主流となっている。この方法は比較的簡単な装置で行える反面、煩雑な操作と検出するまでにある程度時間が必要なこと、さらに定量化が困難なことが欠点と言える。

これに対して我々は制限酵素により切り離される遺伝子フラグメントの数の変化を直接 FCS を用い、いわゆる「分子カウント」をおこなうことで遺伝子配列の相違を見つけだす方法を提唱した<sup>[2]</sup>。さらに M13 DNA と pUC19 DNA を用いた実験を行い<sup>[3]</sup>、実際に切断されてくる DNA フラグメントの数の解析を通して、この方法の現実的な利用方法、特に大規模遺伝子集団への応用等に向けての可能性を示した (図 1)。

## 単一分子トラッピング

FCS はブラウン運動が引き起こす数ゆらぎと、それが引き起こす蛍光の強度のゆらぎを測定していることはすでに述べた。ゆらぎの評価のためにはある測定時間が必要であり、このとき、ここで言うゆらぎはその

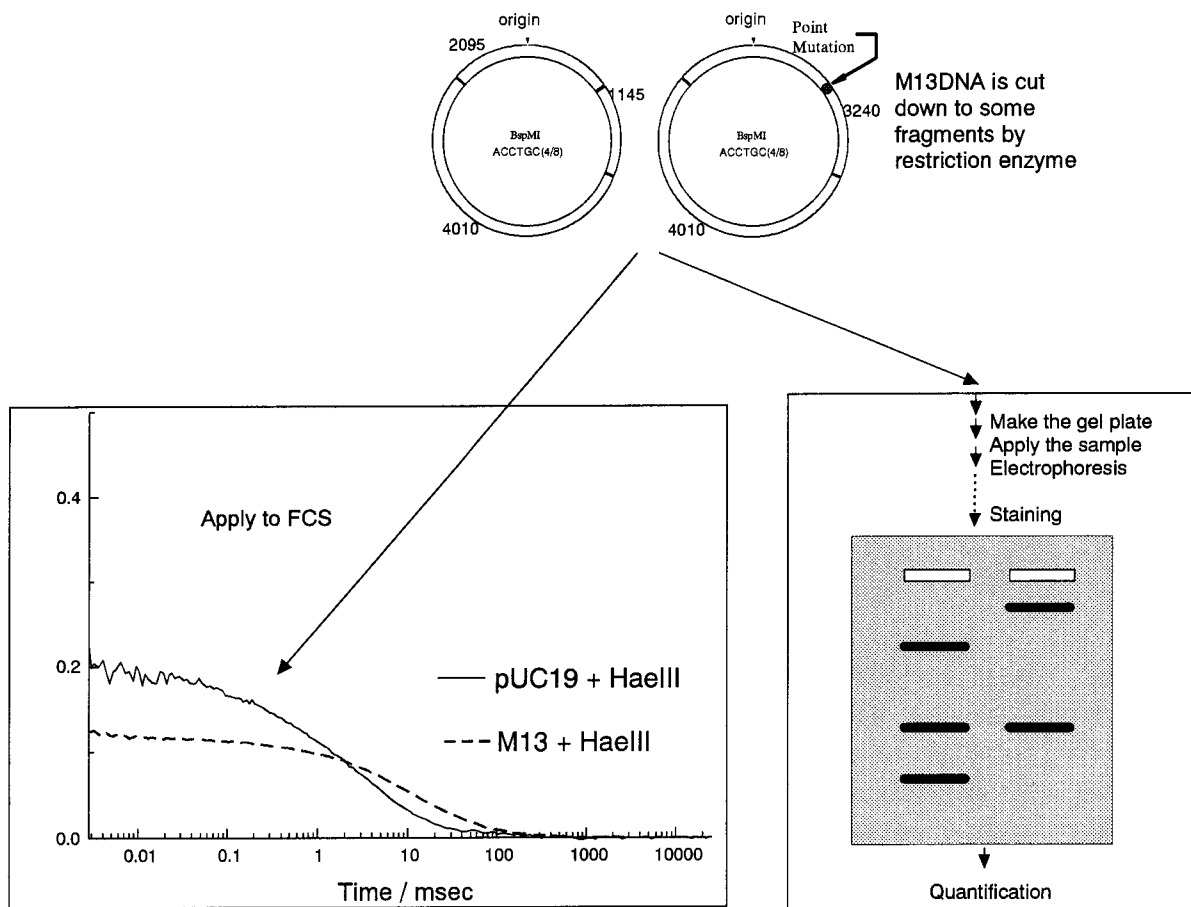


図1 FCS を用いた制限酵素断片長多型の検出方法とゲル電気泳動法による比較

時間における統計的な性質を示していることになる。従って FCS で観測される分子の数もその領域における平均的な分子数を実は示している。

細胞の中には通常 1 つの核がありその中に遺伝情報を含むいくつかの遺伝子 (DNA ポリマー) が存在している。つまり、核の中には各種 1 分子の DNA ポリマーが存在していると言える。生体の最小単位である細胞一個を研究対象としようとする、遺伝子研究の究極は分子一個のマニピレーションが必要とされるだろう。

FCS の持つ光学系は 1 分子蛍光を検出することが可能である。そこで我々は単一分子マニピレーションと分子カウント法を組み合わせた方法を検討した。これは現在まだ計画中のものであるが、ここにそのアウトラインを示し、批判を仰ぎたい。

DNA の荷電はリン酸基と塩基に由来するが分子全体としてはリン酸基が主となる。そのため全体として

は棒状の形状を持ち、マイナスチャージがその長さに比例する粒子とみなせる。その動きを電氣的にコントロールすることはそれ程困難ではない。正負二つの電極間を蛍光修飾を施した M 13 DNA が移動する様子をビデオに捕らえることは可能である (本研究にてビデオ発表)。単一遺伝子をさらに効率良くコントロールするために 8 個の電極を用意し、これを数ミクロン幅の交差するマイクロチャンネルの中心にセットする (図 2)。DNA ポリマーは最初チャンネルの両端にかけられた電圧に従い、中心の広場まで運ばれ、ここで、8 個の電極によりトラップされる。次に図の上下にあるチャンネルからは例えば、制限酵素や DNAase などの核酸修飾蛋白質が溶液の流れによって運ばれてくる。DNA は既に電氣的にトラップされているので溶液の流れで洗い流されることはない。ここで示した広場に FCS の焦点をあわせておくことで、一個の遺伝子が酵素により修飾を受け、分子の大きさや数が変化

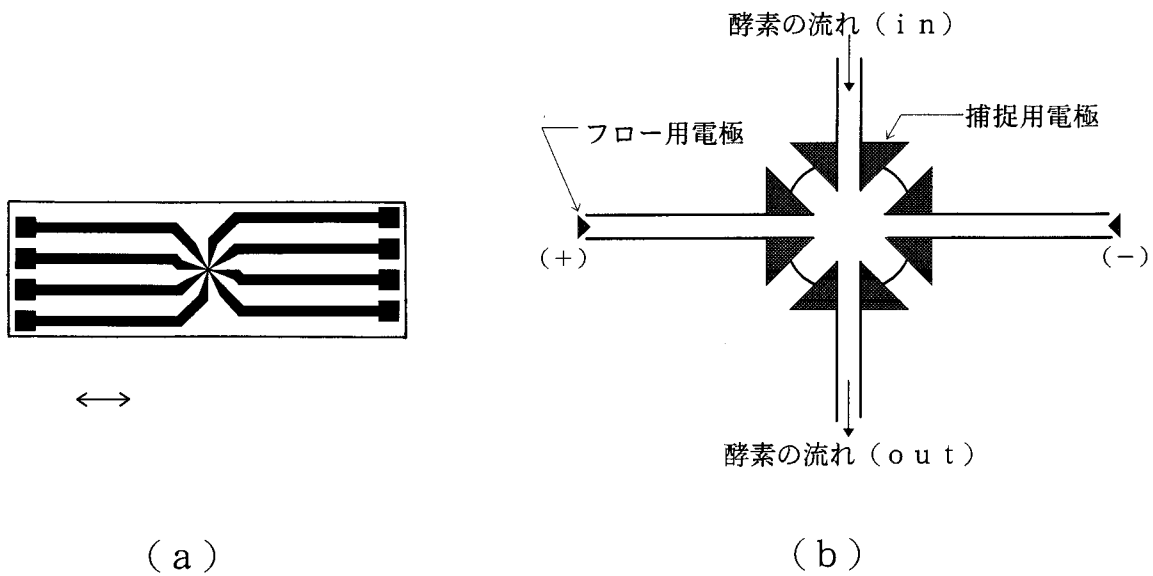


図2 DNA分子電場トラッピング装置の模式図。(a)電極を付けたスライドガラス。矢印は10 mmを示す。(b)トラッピング部の拡大。

していく様子が定量的に観察されるであろう。さらに分子の大きさに応じた拡散速度に電場をかけるタイミングをあわせて、必要な長さだけのDNAを集めたりする、分子ソーティングが可能になるものと考えられる。

### 終わりに

細胞の機能を研究するために、単一分子検出法を用いることは数年前には夢のような話だった。それが既に細胞を構築する幾つかの分子で単一分子レベルの

研究がなされつつある<sup>[4]</sup>。今日の基本的な光学と電子技術を用いれば様々な生体分子の単一分子操作が可能であろう。残りは何を知りたいかである。

### 謝 辞

pUC 19 DNA は医学部中央検査部西平順博士より頂きました。また、電極作成には安川電機つくば研究所工藤成史博士に協力を頂きました。両博士に深謝申し上げます。

### 【参考文献】

- [1] 服部正平 細胞工学 14, 675-681 (1995)
- [2] 金城政孝 電子科学研究 3 75-77 (1995)
- [3] Kinjo M. & Nishimura G. Prog. Biophys, molec Biol. 65, 197 (1996)
- [4] Experimental Techniqu of Physics 41(2), Special Issue: Single Molecule Detection (1995), <http://www.chem.ethz.ch/sms/>, <http://smd-server.lanl.gov/>