

2005 年 2 月 18 日

環境・生命工学専攻	学籍番号	983812
申請者氏名	小松 旬	

指導教官氏名	桂 進司 水野 彰
--------	--------------

論文要旨 (博士)

論文題目	Handling Method of Intact Chromosomal DNA Based on Electrostatics (静電気力を応用した染色体 DNA のハンドリングに関する研究)
------	---

近年の生体分子の単分子操作・観察技術の発達、生体分子間相互作用の解析や単一生体分子の力学特性の計測など、従来の試験管内で多分子の集団を対象とした実験では解析できなかった新たな知見を得るために応用されている。2001 年の全ヒトゲノムのドラフトシーケンスの解析の終了以来、タンパク質等の機能解析に重点が注がれている背景の中で上記のような研究が活発に行われる一方で、我々の社会に役立つ生物種のゲノム解析も進められている。現在のゲノム解析法 (ショットガン法) は、断片化によって完全長のゲノム DNA の配列を 1000 塩基程度の単位までランダムに細分化し、各断片の配列を元のゲノム DNA の順序に再構築していくという手法をとる。このため、ゲノム上の指定位置のみの DNA 断片の配列解析は不可能であり、全ゲノム配列の構築も解析装置の個数と性能を上げることで時間を短縮している。こうした解析法の欠点の解決法として、単分子操作技術を応用した DNA 分子の位置情報を維持したままの解析法が提案されている。この方法によって情報の再構築プロセスを省略できると考えられるので、ゲノムシーケンスの高速化が可能になるときたされる。しかしながら、ゲノムサイズの DNA 分子は長大であるため、さまざまな処理プロセスの間に必然的に断片化を起こしてしまう。

この論文では、断片化を抑制した細胞からの DNA の取り出しと、指定位置及び末端からの順序情報を維持したままの解析のための伸長固定法について記述する。一般的に染色体 DNA の細胞からの取り出しはせん断を防ぐためにゲル中で行われるが、個々の DNA 分子をゲル内で操作することは困難なので、溶液中に回収する必要がある。あらかじめゲル内で DNA 分子のグロビュール相転移を伴うことで断片化の抑制は可能であるが、電気泳動法による抽出はグロビュール化した DNA に対しては効果がなく、また相転移の際にゲルマトリクスと絡んで相転移が完全に起こらない、そして酵素的なアガロースの分解も阻害されるという問題があった。そこで、DNA 分子をポリエチレングリコール (PEG) 溶液に電気泳動で回収し、その反対方向から PEG 溶液中で DNA の相転移を促進する低分子カチオンを電気泳動で供給することを試みた。その結果、せん断力の主要原因である攪拌を行わずに DNA 分子をアガロースゲルから回収し、グロビュール相転移へと導くことができた。この現象は、蛍光顕微鏡でのリアルタイム解析で明らかになった。酵母染色体 DNA 分子の回収においては、回収された染色体 DNA の顕微鏡画像よりグロビュール相転移が確認され、パルスフィールドゲル電気泳動によって、ゲルから取り出された染色体 DNA 分子が元のサイズ分布と同一であることが確認された。

また、従来までの DNA 分子の伸長固定法では何らかの形で DNA 分子を基板等に固定する必要があったが、ここでは凍結した水溶液中に DNA 分子を閉じ込めるという方法について研究した。溶液が凍結する際の固液界面の移動によって DNA 分子の伸長が起こることを蛍光顕微鏡下でリアルタイム観察することで明らかにした。また赤外線レーザーを凍結溶液に照射することで局所的に融解を起こし、その位置を操作することで DNA 分子のパターン固定を行った。これらをさらに発展することで、単分子操作に基づく染色体 DNA の伸長固定、さらには高速ゲノムシーケンスが可能になると期待される。