

2015年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 安田 充 (理工学研究科尾崎研究室)

研究課題 近赤外分光を用いた DNA 電気泳動ゲルの非染色イメージング法の開発

研究期間 2015年4月1日～2016年3月31日

研究成果概要

【背景・目的】分子量に応じて DNA を分離できるアガロースゲル電気泳動法は、遺伝子組み換え技術を利用する生物医学の分野で汎用されている。その原理は、負に帯電したリン酸基をもつ DNA が正極側に引き寄せられる電気特性と、DNA 鎖が長いほどゲルの網目構造に絡まりやすく移動速度が遅いという原理に基づく。一般に、分離した DNA の分子量は泳動後にゲルを蛍光染色することで見積もることができる。しかし、DNA 染色剤は変異原性や発がん性をもつものが多く、取り扱いには細心の注意を要する。この問題を解決するため、分子振動の光吸収特性により、スペクトルという形で分子情報をもたらす近赤外分光に着目した。

近年では、従来のポイント測定から2次元測定へと展開した近赤外分光イメージング技術が発展し、2次元像の各ピクセルにそれぞれ1つのスペクトルを格納したデータが取得できるようになった。このようなデータ形式により、波長ごとに画像を作成できるため、試料表面の2次元組成分析に利用されている。この近赤外分光イメージング法をアガロースゲル電気泳動に適用すれば、染色することなく、ゲルのイメージングが可能となり、さらに近赤外スペクトルが DNA の分子情報をもたらすため、ゲル中 DNA の組成分析や構造解析も実現できると考えた。

そこで本研究では、電気泳動ゲルの新たなイメージング法として、近赤外分光を用いた DNA 電気泳動ゲルの非染色イメージング法の開発を目的とした。

【実験】実験プロトコルを図1に示す。サケ精液由来の DNA (500–1,000 bp) をサンプルとして使用し、TAE (Tris-Acetate-EDTA) バッファー (pH 8.0) で溶解させた。調製した1~20 wt%の DNA サンプルの電気泳動を、一般的なアガロースゲル電気泳動法に従って行った。まず TAE バッファーを加えた粉末アガロースを加熱して融解させ、それを型に流し込み、ゲル化するまで室温で放置することで1%のアガロースゲルを作製した。つぎに、TAE バッファーで満たした泳道槽に、作製したゲルを浸漬し、ゲルの各ウェル内に DNA サンプルを流し込み、数十分間、電気泳動した。泳動後はゲルを超純水で濯ぎ、60°Cの乾燥機で乾燥させた。

近赤外分光イメージング装置として、測定波長領域が1,000–2,350 nmである住友電気工業社

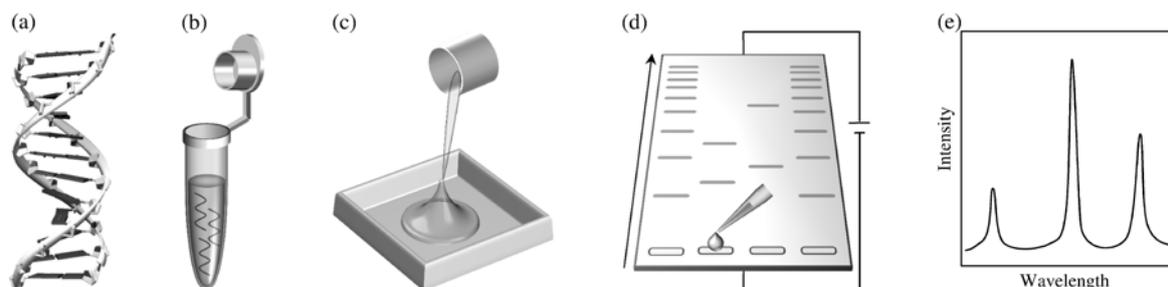


図1. 実験プロトコル. (a) DNA の分子構造, (b) DNA サンプルの調製, (c) アガロースゲルの作製, (d) DNA の電気泳動, (e) 近赤外スペクトルの測定.

製の近赤外組成イメージングシステム Compovision を使用した。Compovision はアガロースゲルのような数 cm×数 cm の広範囲領域を数秒でスキャンできる高速分光イメージング装置である。この Compovision を用いて、乾燥させたアガロースゲルをスキャンした。

【結果・考察】近赤外分光イメージング法では波長ごとに画像を作成できるため、最初に DNA のバンドが最も見やすい最適な波長を決定した。特定波長の吸光度でゲル画像を作成したところ、DNA と思われるバンドが観測された。本来、バンド部分には DNA が存在するため、ゲル部分よりも DNA の分だけ吸光度が高くなる。つまり、バンド部分とゲル部分の吸光度の差が大きいくほど、バンドは見やすくなる。そこで、バンド部分とゲル部分のスペクトルを差分したところ (図 2a)、波長 2,280 nm 付近で吸光度の差が最大となり、この波長領域が DNA バンドの観測に最適であることがわかった。以降は 2,280 nm 付近の波長を使ってゲル画像を作成した。

つぎに、観測されたバンドが DNA に由来するかを調べるために、10 wt% の DNA サンプルを用いて様々な泳動時間で電気泳動を行った。泳動時間の増加に伴い、バンドの移動距離が増大していることが確認できる (図 2b)。この移動距離を定量的に評価するため、ウェル部分からバンド部分までを画像のピクセル数としてカウントし、泳動時間ごとにプロットした。検量線の相関関数から、バンド部分の移動距離は泳動時間に応じてほぼ直線的に増大した。これは負に帯電した DNA が電氣的に正極側に引き寄せられ、その引き寄せられる時間が長いほど、DNA の移動距離が長くなったためと考えられる。

バンドが DNA に由来する場合、バンド部分の吸光度は DNA の濃度に応じて変化するため、今度は一定の泳動時間で様々な濃度の DNA サンプルを泳動した。DNA 濃度が高いほど、バンドが見やすくなっているのが確認できる (図 2c)。そこで、先ほどと同様に、バンド部分の吸光度を DNA 濃度ごとにプロットし、検量線を作成した。バンド部分の吸光度は DNA 濃度に依存してほぼ直線的に増大した。これは DNA 濃度が高くなるにつれ、バンド部分に含まれる DNA 量が多くなり、その結果、吸光度が増大したことによるものと考えられる。

さらに、泳動後にゲルを乾燥させずに、従来の蛍光染色法を用いてゲルを染色したところ、近赤外分光イメージング法とほぼ同じ位置でバンドが観測された (図 2d)。蛍光染色剤は通常、DNA の二本鎖に結合する。バンド部分から蛍光が観測されたということは、そこに DNA が存在することを意味するため、バンドは DNA に由来することがわかった。したがって、本研究では、近赤外分光を用いた DNA 電気泳動ゲルの非染色イメージング法の開発に成功した。

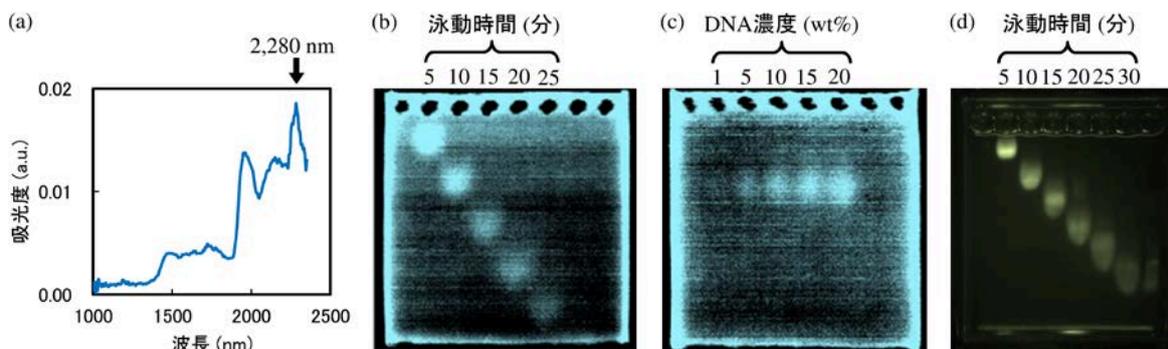


図 2. 実験データ。(a) バンド部分とゲル部分の差分スペクトル、(b) 様々な泳動時間で泳動したゲル画像、(c) 様々な DNA 濃度で泳動したゲル画像、(d) Novel Green で染色したゲルの蛍光画像。

研究業績リスト

【学術論文】

1. M. Z. Brela, M. J. Wójcik, M. Boczar, Ł. Witek, M. Yasuda, and Y. Ozaki, “Car–Parrinello molecular dynamics simulations of infrared spectra of crystalline vitamin C with analysis of double minimum proton potentials for medium-strong hydrogen bonds,” *The Journal of Physical Chemistry B* 119, pp7922–7930 (2015).

【著書】

1. 秋元卓央, 安田充, “ヘルスケアを支えるバイオ計測『第4章 技術開発：蛍光増強効果をもつナノ構造基板を用いたタンパク質の高感度検出』”, シーエムシー出版 (2016年3月に発行予定).

【総説】

1. 秋元卓央, 安田充, “蛍光増強効果をもつ薄膜干渉基板のバイオセンサーへの応用”, *Journal of the Japan Society of Colour Material* 88, pp181–186 (2015).

【国際会議での発表】

1. ○M. Yasuda, T. Akimoto, and Y. Ozaki, “A novel DNA electrophoresis analysis using near-infrared spectroscopy,” The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), ANYL 979, Hawaii, USA, December 15–20 (2015).
2. ○M. Yasuda, T. Akimoto, and Y. Ozaki, “Enhanced Raman Spectroscopic immunoassay using an optical interference mirror slide,” The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), ANYL 855, Hawaii, USA, December 15–20 (2015).
3. ○M. Yasuda and T. Akimoto, “Development of a high-contrast fluorescence microscopy based on polarization techniques using an optical interference mirror slide,” The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), ANYL 302, Hawaii, USA, December 15–20 (2015).

【国内学会での発表】

1. ○安田充, 秋元卓央, “薄膜干渉基板を用いた高コントラスト蛍光増強イメージング”, 日本分析化学会 第64年会, D2004, 9月9日–9月11日, 福岡県 (2015).
2. ○安田充, 秋元卓央, 尾崎幸洋, “薄膜干渉基板を用いたタンパク質の高感度ラマン分光分析”, 日本分析化学会 第64年会, P3161, 9月9日–9月11日, 福岡県 (2015).
3. ○安田充, 秋元卓央, “薄膜干渉基板を用いた蛍光増強DNAマイクロアレイ”, 第76回 応用物理学会秋季学術講演会, 15p-2A-10, 9月13日–9月16日, 愛知県 (2015).
4. ○安田充, 秋元卓央, 尾崎幸洋, “薄膜干渉基板を用いたラマン分光法に基づくタンパク質検出感度の評価”, 第76回 応用物理学会秋季学術講演会, 13p-PB4-9, 9月13日–9月16日, 愛知県 (2015).
5. ○安田充, 秋元卓央, 尾崎幸洋, “DNA電気泳動の近赤外分光分析”, 第31回近赤外フォー

ラム, P-42, 11月25日-11月27日, 茨城県 (2015).

6. ○安田充, 苔口祐佳, Dian Marlina, 尾崎幸洋, “近赤外分光法を用いた様々な生体物質のスペクトルライブラリの構築”, 第31回近赤外フォーラム, P-17, 11月25日-11月27日, 茨城県 (2015).
7. ○安田充, 秋元卓央, 尾崎幸洋, “薄膜干渉基板を用いた高感度ラマン分光免疫アッセイ”, 第63回 応用物理学会春季学術講演会, 20p-P11-4, 3月19日-3月22日, 東京都 (2016).
8. ○安田充, 苔口祐佳, 秋元卓央, 尾崎幸洋, “近赤外分光法に基づくDNA電気泳動ゲルの非染色イメージング”, 第63回 応用物理学会春季学術講演会, 20a-W323-3, 3月19日-3月22日, 東京都 (2016).
9. ○安田充, 苔口祐佳, 秋元卓央, 尾崎幸洋, “近赤外分光法を用いた非染色DNA電気泳動イメージング”, 日本化学会 第96春季年会, 2B3-16, 3月24日-3月27日, 京都府 (2016).

【獲得した研究資金】

1. 独立行政法人 日本学術振興会
事業名 : 平成27年度 科学研究費助成事業 学術研究助成基金助成金
研究種目 : 若手研究 (B)
研究題目 : 薄膜干渉型ナノ構造基板を用いた腫瘍マーカーの高感度ラマン分光バイオセンシング
助成金額 : 4,160,000円
実施期間 : 平成27年度 ~ 平成28年度
研究代表 : 安田充 (研究分担者無)
2. 一般財団法人 鷹野学術振興財団
事業名 : 平成27年度 研究助成
研究題目 : 超薄膜がもたらす高感度ナノバイオチップの開発
助成金額 : 1,700,000円
実施期間 : 2016年1月 ~ 2017年12月
研究代表 : 安田充 (研究分担者無)
3. 公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団
事業名 : 平成27年度 奨励研究助成
研究題目 : ナノ薄膜干渉基板を用いた多項目同時・蛍光増強免疫アッセイ
助成金額 : 1,500,000円
実施期間 : 2016年4月 ~ 2017年3月
研究代表 : 安田充 (研究分担者無)