

2014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 DNA 電気泳動ゲルの近赤外分光イメージング

研究 期 間 2014年6月1日～2015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用いる生物医学の分野で汎用されている。その原理は、図 1 に示すように負に帯電したリン酸基をもつ DNA が電場内で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引っかか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 の分子量はゲルを蛍光染色することで調べることができる。しかし、変異原性や発がん性をもつ DNA 染色剤は取り扱いに危険を伴う、0.5～1 時間程度の染色時間を要する、紫外励起光は DNA に損傷を与えるなど、多くの問題が山積している。これらの問題を解決するために、近赤外分光法に着目した。

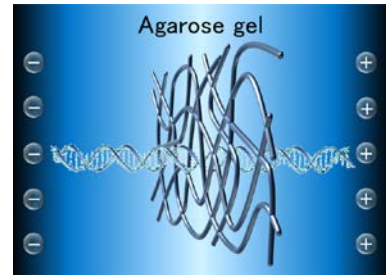


図 1. アガロースゲル電気泳動法を用いた DNA の分離

近赤外分光では分子の光吸収特性から分子情報が得られるため、染色することなく DNA の詳細な分析を可能にするとともに、取り扱いの危険性や染色時間、DNA の損傷といった問題も解決できる。さらに近年では、近赤外分光イメージング法を用いた 2 次元イメージングシステムが開発され、電気泳動ゲルの広範囲スキャンも可能となっている。

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、DNA 電気泳動ゲルの近赤外分光イメージング法の確立を目的とした。本法は将来的に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いたタンパク質の 1 次元分離のみならず、その発展系として等電点と分子量の 2 段階分離に基づく 2 次元電気泳動法を用いた血中タンパク質の網羅的分離・解析といった医療現場での血液検査やプロテオーム解析における効率化やコストパフォーマンスを改善し、より実用化に近い新技術の提供、ならびにバイオ分析分野の発展に貢献することが期待される。

【実験】

実験プロトコルを図 2 に示す。DNA サンプルとして、大腸菌の SOS 応答に関連する *lexA* 遺伝子を使用した [1]。SOS 応答は、DNA が紫外線等により損傷を受けた際に、それを修復しようと

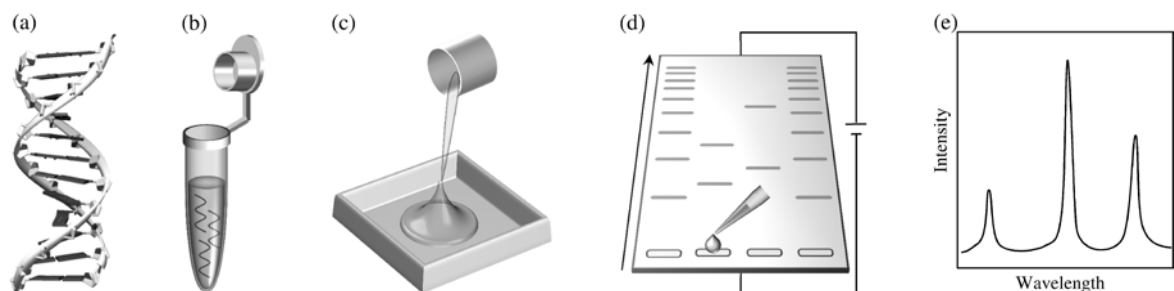


図 2. 実験プロトコル. (a) DNA の分子構造, (b) PCR による DNA の増幅, (c) アガロースゲルの作製, (d) DNA の電気泳動, (e) 近赤外スペクトルの測定.

する機構を指す [2]。具体的には、細胞内単鎖 DNA と RecA タンパク質の複合体が LexA リプレッサータンパク質の自己プロテアーゼ活性を促進し、それが 2 つのペプチドに切断されてリプレッサーとしての機能を失うため、SOS レギュロン遺伝子群の発現が誘導され、DNA 修復が起きる。この SOS 応答に関連する約 700 bp の *lexA* 遺伝子は大腸菌から抽出し、PCR で増幅した。

つぎに、粉末アガロースに TAE (pH 8.0) バッファーを加え、加熱して粉末を融解させ、それを型に流し込み、固まるまで室温で放置することで 0.5~2%まで数種類のアガロースゲルを作製した。TAE バッファーで満たした泳道槽に、作製したゲルを入れ、ゲルの各ウェル内にローディングバッファーと混合した分子量マーカー及び DNA サンプルをそれぞれ流し込んだ。数十分間の泳動後、ゲルを純水で数回濯ぎ、近赤外イメージングシステム (Compovision, 住友電気工業) を用いてゲルを画像化した。また DNA サンプル、バッファー、アガロースゲルの近赤外スペクトルを、近赤外分光装置 (Spectrum One NTS, PerkinElmer) で測定した。

【結果・考察】

最初に、*lexA* 遺伝子が PCR で増幅されているかどうかを、従来の蛍光染色法を用いて確認した。その結果を図 3 に示す。レーン①は分子量マーカー、レーン②は DNA サンプルである。700 bp 付近に DNA の強いバンドが観測された。*lexA* 遺伝子は約 700 bp であるため、このバンドから *lexA* 遺伝子の抽出及び増幅に成功した。

つぎに、DNA のスペクトル解析に影響を与える可能性のある TAE バッファーとアガロースゲルの近赤外スペクトルを測定した。これらのスペクトル形状は水のスペクトルとほぼ一致し、水に特徴的な 5,000 と 7,000 cm^{-1} 付近に強いピークが観測された。一方、図 4 に示す DNA サンプルの近赤外スペクトルでは、5,000 と 7,000 cm^{-1} 以外に、4,400 と 5,900 cm^{-1} 付近に大きなピークが観測された。これは DNA に帰属するピークと考えられる。したがって、DNA のスペクトル解析には 4,400 と 5,900 cm^{-1} が最適であることがわかった。

一般に近赤外領域では水の吸収が大きいため、光路長、つまりゲルの厚みを薄くする必要がある。そこで、コの字型にカットしたシリコーンゴムシートを 2 枚のガラスプレートで挟み、隙間からアガロースゲルを流し込むことで、縦×横×厚みが約 5 cm×5 cm×1 mm の特殊なアガロースゲルを作製した。このゲルを用いて DNA の電気泳動を行ったが、現時点では DNA のバンドが確認されていない。そのため、今後は泳動後のゲルを乾燥させて、近赤外スペクトルを測定し、その結果を基に、乾燥させる前のゲルの近赤外スペクトル、2 次元イメージング像の作成へと順次移行し、DNA 電気泳動ゲルの近赤外イメージング法を確立する。

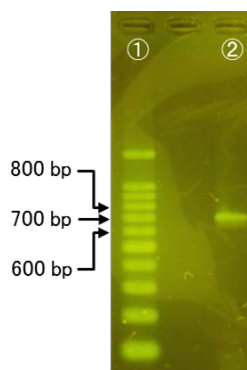


図 3. DNA の電気泳動

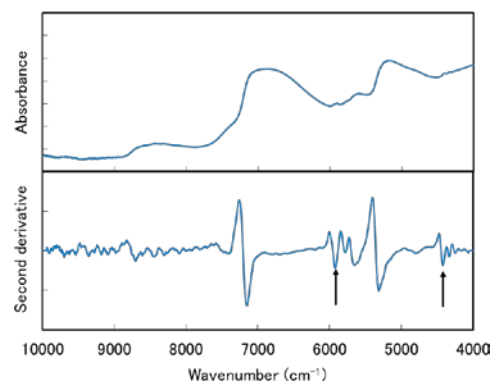


図 4. DNA サンプルの近赤外スペクトル

【参考文献】

- [1] K. C. Giese *et al.*, *J. Mol. Biol.* 377, pp148–161 (2008).
- [2] H. Etoh *et al.*, *Anal. Sci.* 27, pp1179–1183 (2011)

研究業績リスト

著書

1. 安田充 “分光法シリーズ2 近赤外分光法：付録『様々な物質の近赤外スペクトル』” 講談社 (2015) (in press).

国際会議

1. ○ M. Yasuda, T. Akimoto, and Y. Ozaki, “Stain-free DNA analysis based on near-infrared spectroscopy using agarose gel electrophoresis,” Biomedical Molecular Imaging 2014, Taipei, Taiwan, November 6-8, #13 (2014).

学会発表

1. ○ 安田充, 秋元卓央, 尾崎幸洋 “近赤外分光法を用いた新規DNA電気泳動分析法の開発” 日本化学会 第95春季年会, 1PB-047, 3月26日-3月29日, 千葉県 (2015).
2. ○ 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イムノアッセイのための基礎研究” 第62回 応用物理学会春季学術講演会, 12a-P10-4, 3月11日-3月14日, 神奈川県 (2015).
3. ○ 安田充, 秋元卓央, 尾崎幸洋 “近赤外分光に基づくDNA電気泳動分析法の開発” 第30回記念近赤外フォーラム, 0-04, 11月26日-11月28日, 茨城県 (2014).
4. ○ 安田充, 曾采薇, 石垣美歌, 尾崎幸洋 “栽培液成分の近赤外分光分析” 第30回記念近赤外フォーラム, P-37, 11月26日-11月28日, 茨城県 (2014).
5. ○ 川崎翔矢, 石垣美歌, 古川大貴, 石川大太郎, 安田充, 尾崎幸洋 “近赤外イメージングを用いたメダカ受精卵の分析” 第30回記念近赤外フォーラム, P-48, 11月26日-11月28日, 茨城県 (2014).

研究助成金

1. 公益財団法人 山陽特殊製鋼文化振興財団 (平成26年度 学術研究助成)
研究題目 : 分光分析に基づく疾病診断用ヘルスケアチップの開発
助成金額 : 500,000円
実施期間 : 2014年10月~2015年9月
研究代表 : 安田 充 (関西学院大学 大学院理工学研究科 博士研究員)