

※課題番号 : F-12-RO-0001  
※支援課題名 (日本語) : ナノ空間による生体高分子 1 分子の疑似 2 次元解析  
※Program Title (in English) : Video-rate direct observation of single circular DNA molecules with circular shape using nanochip  
※利用者名 (日本語) : 平野 研  
※Username (in English) : Ken Hirano  
※所属名 (日本語) : 産業技術総合研究所 健康工学研究部門  
※Affiliation (in English) : Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

#### ※概要 (Summary) :

これまで、蛍光顕微鏡を用いたリアルタイム直接観察による DNA 1 分子計測では、その研究のほとんどが直鎖状の DNA 分子を扱っている。そして、環状 DNA 1 分子を解析している例でも、「輪」として観察している例は皆無に等しいのが現状である。そもそも、環状 DNA は直鎖 DNA と並び、生体内に存在する重要な DNA 形態であるにも関わらず、環状 DNA 1 分子については、ほとんどリアルタイム直接観察とそれによる 1 分子計測がなされていない。それ故に、環状 DNA を基にした核酸酵素の機能解析や DNA 形態変化のダイナミクスなどの 1 分子解析が未解決のまま残されている。そこで、本研究では、ナノチップを用いて巨大環状 DNA 1 分子を「輪」としてリアルタイム観察する手法を検討した。環状 DNA 分子が有する慣性半径以下に空間を制限することで、DNA 分子の空間的な広がりを制限し、擬似的に 2 次元で DNA 1 分子を直接観察することが可能になると考えた。環状 DNA 分子が有する慣性半径は、nm オーダーであることから、nm の深さを持つナノチャンネルが最適なツールとなり得ると考え、ナノテクノロジープラットフォーム事業で作製したナノチップを用いた。

#### ※実験 (Experimental) :

実験では、208kbp 環状 DNA を巨大環状 DNA サンプルとして用い、蛍光顕微鏡を行うため、蛍光色素 YOYO-1 により染色した。TE buffer 溶液中に、蛍光退色を遅延するための  $\beta$ -メルカプトエタノールと共に当該環状 DNA を混合した後、その液滴をナノチップ中に導入した。電子ビーム露光装置と RIE エッチング装置を用いて作製したナノチップは、DNA 慣性半径前後の広い範囲を検討するために、400nm 以下

の深さのチャンネル有するものを使用した。蛍光顕微鏡は、Nikon 社製 TE-2000 を用いた。リアルタイムに環状 DNA のダイナミクスを計測するために、超高感度 EM-CCD カメラ (浜松ホトニクス) により動画記録を行った。

#### ※結果と考察 (Results and Discussion) :

実験では、深さ 400 nm 以下のナノチャンネルを用いて、208 kbp の巨大環状 DNA を観察した。その結果、ナノチャンネルの深さに相関して、輪を拡げることが可能となった。拡がった環状 DNA の輪は、輪の形で円周がブラウン運動しているため、完全な半径 (DNA 長から求められる最大半径) とまではいかないまでも、ナノチップによる疑似 2 次元空間により、巨大環状 DNA 1 分子を輪としてリアルタイムに観察することが可能となった。今後は、リアルタイムに巨大環状 DNA 1 分子を観察する当該技術を用いて、環状 DNA における生体高分子のイベントの解明や巨大環状ポリマーとして高分子物理学における理論との整合性など、当該新規手法による新たな知見の取得と蓄積へ発展させて行きたい。

#### ※その他・特記事項 (Others) :

なし

#### 共同研究者等 (Coauthor) :

馬場嘉信、笠間敏博 (名古屋大学大学院工学研究科)

福山正隆、佐藤旦 (広島大学)

#### 論文・学会発表

#### (Publication/Presentation) :

(学会発表)

1. 平野 研、石堂智美、村瀬至生、笠間敏博、馬場嘉信、「リアルタイムで観る巨大環状 DNA 1 分子の「輪」、第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡) 2012 年 12 月 12 日