Osaka University Knowledge Archive

Title	Studies on the Dynamics of Single DNA Molecules in the Aqueous Two-Phase System Measured by Fluorescence Microscopy
Author(s)	片山, 和也
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52315
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　片山　和也　）	
論文題名	Studies on the Dynamics of Single DNA Molecules in the Aqueous Two-Phase System Measured by Fluorescence Microscopy （顕微蛍光測定による水性二相系での単一DNA分子のダイナミクスに関する研究）

論文内容の要旨

【緒言】

2種類の高分子を水に溶解させることにより，両相とも水を80－90%含む水溶液からなる二相系が形成される。この系は，水性二相系と呼ばれ，DNAやタンパク質などの分配系として広く研究されてきた。

一方，DNA分子は，通常，紐状に伸びたランダムコイル状態であるが，溶液中に共存する金属イオンなどの陽イオンやpolyethylene glycol (PEG) などの疎水的な高分子の影響によって，小さく折りたたまれたグロビュール状態へ形態変化を起こす。

本研究では，PEGとデキストランによる水性二相系に陽イオンとしてMg^{2+}を添加した系を用い，DNA分子の液液界面での形態変化と制限酵素によるDNA分子の分解反応の関係に注目し，単一DNA分子の*in situ*顕微蛍光測定を行った。この水性二相系は，上相にPEG，下相にデキストランを多く含む。PEGはデキストランよりも疎水的な性質を持つため，今後，上相を疎水相，下相を親水相と称する。

【実験】

PEG (分子量 7,400－10,200)，デキストラン (平均分子量 500,000) による水性二相系に$MgCl_2$を0－20 mMの範囲で添加した。また，DNA分子には，4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) でラベル化した48,500塩基対のλDNAを用い，制限酵素には，λDNA を38ヶ所切断するBsp1286 Iを用いた。水性二相系を調製した後，それぞれの相を分取し，DNA分子を疎水相のみに3.4×10^{-5} μg/μL になるように加えた。また，制限酵素は，両相に同じ濃度になるように加えた。自作の薄層二相マイクロセルの下層に親水相，上層に疎水相を入れて再接触させることによって液液界面を作成し，液液界面における単一DNA分子の形態および蛍光強度の経時変化を顕微蛍光法により測定した。なお，本研究で用いる1 Uとは，30°Cにおいて2.0×10^{-2} μg/μLのλDNAを1時間で完全に分解する制限酵素の濃度である。

【結果】

制限酵素を加えなかった場合，液温が15°C，Mg^{2+}濃度が12.5 mMのとき，DNA分子は，疎水相でグロビュール状態であった。また，液液界面では，グロビュール状態のDNA分子の吸着が観測された。この状態から，30°Cに昇温したとき，液液界面に吸着したDNA分子のみがグロビュール状態からランダムコイル状態へ形態変化を起こした。制限酵素を加えた場合，15°Cでは，液液界面に保持されたグロビュール状態のDNA分子の蛍光強度は変化しなかったが，30°Cに昇温するとDNA分子の形態変化に伴い，蛍光強度が減少した。図1のように，制限酵素の濃度が2.5 mU/mL以下の場合，蛍光強度の減少速度は制限酵素の濃度に依存した。また，一部がランダムコイル状態のDNA分子が観測されたことから，形態変化の速さは分解速度よりも速いと考えられる。一方，制限酵素の濃度が2.5 mU/mL以上の場合，蛍光強度の減少速度は制限酵素の濃度に依存しなかった。また，ランダムコイル状態の部分が観測されなかったことから，形態変化の速さは分解速度よりも遅いため，分解速度が形態変化によって制限されたと考えられる。

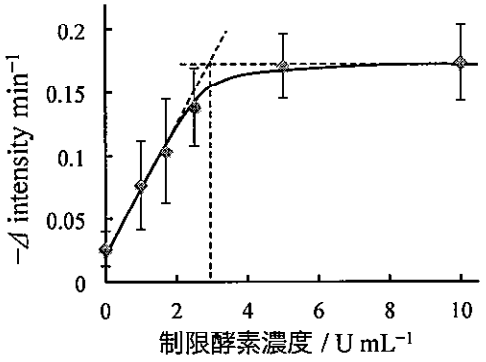

図1　種々の濃度の制限酵素存在下における単一DNA分子の蛍光強度減少速度

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　片山　和也　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	塚原　聡
	副 査　教授	水谷　泰久
	副 査　教授	中澤　康浩

論文審査の結果の要旨

2種類の高分子を水に溶解させることにより，両相とも水を 80－90%含む水溶液からなる二相系が形成される。この系は水性二相系と呼ばれ，DNA やタンパク質などの分配系として広く研究されてきた。ところで，DNA 分子はリン酸基を多く有するため，分子内反発により，通常，紐状に伸びたランダムコイル状態になる。しかし，溶液中に共存する金属イオンなどの陽イオンや polyethylene glycol (PEG) などの疎水的な高分子の影響によって，小さく折りたたまれたグロビュール状態へ形態変化を起こすことが知られている。塩基対数が大きい DNA 分子の場合，このような形態は，高解像度の光学顕微鏡で直接区別することができる。そこで本研究では，PEG とデキストランによる水性二相系に，陽イオンとして Mg^{2+}を添加した系を用い，DNA 分子の液液界面における形態変化と制限酵素による DNA 分子の分解反応の関係に注目し，単一 DNA 分子の in situ 顕微蛍光測定を行った。この水性二相系は，上相に PEG，下相にデキストランを多く含む。PEG はデキストランよりも疎水的な性質を持つため，上相を疎水相，下相を親水相と称することにする。

PEG（分子量 7,400－10,200）とデキストラン（平均分子量 500,000）による水性二相系に，$MgCl_2$ を 0－20 mM（1 M = 1 mol/dm^3）の範囲で添加した。また，DNA 分子には，4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) でラベル化した 48,500 塩基対のλDNA を用い，制限酵素には，λDNA を 38 ヶ所切断する Bsp1286 I を用いた。水性二相系を調製した後，それぞれの相を分取し，DNA 分子を疎水相のみに 3.4×10^{-5} μg/μL になるように加えた。また，制限酵素は，両相に同じ濃度になるように加えた。自作の薄層二相マイクロセルの下層に親水相，上層に疎水相を入れて再接触させることによって液液界面を作成し，液液界面における単一 DNA 分子の形態および蛍光強度の経時変化を，顕微蛍光法により測定した。なお，本研究で用いる 1 U とは，30°C において 2.0×10^{-2} μg/μL のλDNA を 1 時間で完全に分解する制限酵素の濃度である。

制限酵素を加えなかった場合，液温が 15℃，Mg^{2+}濃度が 12.5 mM のとき，DNA 分子は，疎水相でグロビュール状態であった。また，液液界面では，グロビュール状態の DNA 分子の捕捉が観測された。この状態から，30℃に昇温したとき，液液界面に捕捉された DNA 分子のみがグロビュール状態からランダムコイル状態へ形態変化を起こした。制限酵素を加えた場合，15℃では，液液界面に保持されたグロビュール状態の DNA 分子の蛍光強度は変化しなかったが，30℃に昇温すると DNA 分子の形態変化に伴い，蛍光強度が減少した。さらに，制限酵素の濃度が 2.5 mU/mL 以下の場合，蛍光強度の減少速度は制限酵素の濃度に依存した。また，一部ランダムコイル状態の DNA 分子が観測されたことから，形態変化の速さは分解速度よりも速いと考えられる。一方，制限酵素の濃度が 2.5 mU/mL 以上の場合，蛍光強度の減少速度は制限酵素の濃度に依存しなかった。また，ランダムコイル状態の部分が観測されなかったことから，形態変化の速さは分解速度よりも遅いため，分解速度が形態変化によって制限されたと考えられる。以上のように，水性二相界面における DNA 分子の形態変化速度と酵素による分解速度の間に，明瞭な関係を得ることに成功した。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。