

課題演習 B8 DNA の折り畳み転移

加渡大貴

2008年3月14日

1 実験の目的

水溶液中の DNA に低分子多価カチオンを加えていくと分子内で不連続な転移が起こることが知られている。つまり DNA 鎖はカチオン濃度が低いときにはランダムに配置できるコイル状態をとるが、ある濃度領域を境にそれよりカチオンが高濃度になるとコンパクトに凝縮されたグロビュール状態をとるのである。今回の実験では DNA の長さが変わったとき転移点がどうなるのかを調べてみる。

2 折り畳み転移の原理

低分子多価カチオンは DNA の負電荷部位と非局所的に結合するため、DNA 分子内の荷電を均一に中和する。これは未中和の負電荷をもつセグメントを均一に生じることにもなる。DNA 分子内の電荷の中和が進むと負電荷セグメントの 2 体間・3 体間相互作用でそれぞれ弱い引力・弱い斥力が生じ、これが不連続転移の原因となる。

3 実験内容

3.1 用いた試薬等

- DNA
 - ・ T4-DNA(166kbp) 10 μ M
 - ・ λ -DNA(48.5kbp) 10 μ M
- 蛍光色素
 - ・ DAPI 10 μ M
- 緩衝液
 - ・ Tris 100mM(pH : 7.4)
- カチオン
 - ・ SPD3+(spermidine-trihydrochloride3+) 1 μ M

3.2 手順

1. 上記の試薬と純水を混合し、[SPD(3+)]=0 μ M, 総量 500 μ l の試料を作る。

2. 同様に必要な [SPD(3+)] の溶液を作り、蛍光色素が DNA になじむまでしばらく時間を置く。
3. 各試料を蛍光顕微鏡で観察し、その映像を録画する。
4. 録画した画像を画像解析する。具体的には各 DNA 分子に着目し最も広がっているときの長軸長を測定する。
5. これらを T4-DNA, λ -DNA いずれについても行い比較してみる。

4 データ

実際に得られたデータは次のとおり。

表 1. T4-DNA のデータ

SPD(3+)	平均長	標準偏差	最大長	最小長
0	3.41	0.60	4.85	1.65
50	3.49	0.58	5.01	2.14
100	3.61	0.61	5.56	2.25
160	2.53	1.10	4.59	0.40
170	0.57	0.14	1.05	0.38
190	0.48	0.11	0.70	0.27
250	0.62	0.11	0.85	0.45

表 2. λ -DNA のデータ

SPD(3+)	平均長	標準偏差	最大長	最小長
0	1.38	0.28	2.65	0.91
50	1.50	0.25	2.07	0.70
100	1.50	0.25	2.40	0.93
160	1.45	0.54	2.30	0.31
180	0.51	0.09	0.71	0.32
200	0.50	0.08	0.69	0.35
250	0.59	0.08	0.74	0.40

単位はそれぞれ [SPD(3+)] が μ M, 長さが μ m.

これをグラフ化したものが次のとおり。

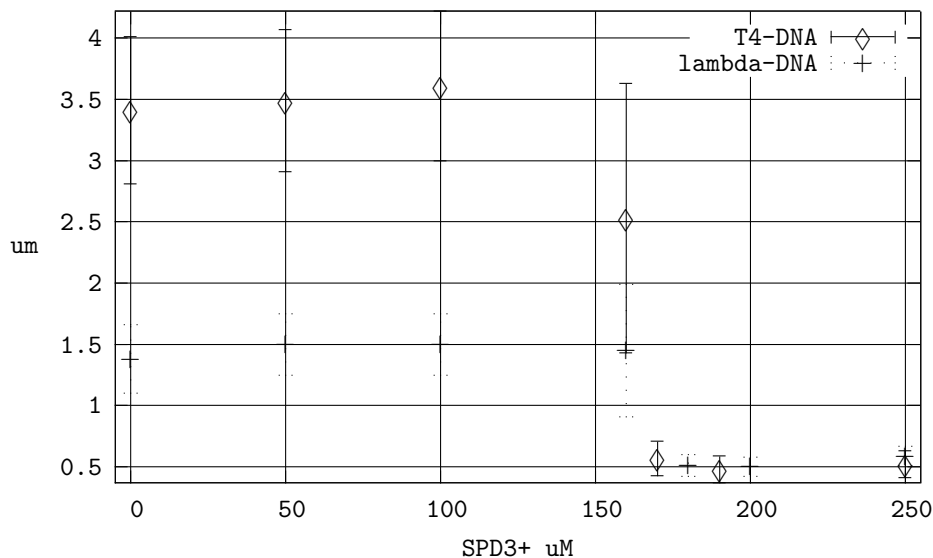


図 1. SPD3+ による DNA の折り畳み転移

5 考察など

まずコイル状態についてであるが、理論的には長さが $\frac{166}{49} = 3.4$ 倍になると長軸長はその $3.4^{0.6} = 2.1$ 倍になるはずである。各 DNA について得られたデータのコイル状態での長軸長の平均値についてみると、 $\frac{3.50}{1.46} = 2.4$ 倍になっているのでまずまずの結果が出ているといえるであろう。実際の DNA は光が当たったりすると切れてしまったりするので、理論値とのずれはこの影響も受けていると思われる。

次に一番の関心事である転移点についてであるが、共存領域が $160\mu\text{M}$ 付近にあるということ以外、残念ながら今回の実験では明確な見解は得られなかった。何度か同じ実験を繰り返したがその都度結果がわずかに異なるいう状態であった。これは温度などの条件が厳密に管理できていなかったことや実験の操作などに不慣れであったことが考えられる。

グロビュール状態での長軸長はどちらもほぼ同じであるがこれは蛍光のにじみの効果によるものと考えられる。グロビュール状態では DNA 分子はブラウン運動をするので、にじみの効果を排除して考えるには Einstein-Stokes の関係式と拡散係数に関する式から流体力学的半径を求めてやれば良い。具体的には、次の 2 式

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad \langle x^2 \rangle = 4Dt$$

(D : 拡散係数, k_B : ボルツマン定数, T : 絶対温度, η : 溶媒粘度, R : 流体力学半径, x : 変位, t : 時間) から D を消去すれば R を求められる。しかし手元にあった映像データは流れが発生している場面が多く、また数も統計が取れるほど十分無かったため断念しました。

6 まとめ

結局一番知りたかったことがあやふやなままだったことは残念でしたが、折り畳み転移という面白い現象をこの目で観察できたのは興味深かったです。実験自体は初めてでは無かったのですが、主体的に実験することの大変さ、難しさというものも味わえました。

実験回数をふやしたり、さらに異なる長さの DNA を調べてみたりすれば明確な結果が得られたかもしれません。また、異なるカチオンでの転移現象との違いや、クーン長のオーダーでの転移現象などはどうなっているのだろうなどという新たな課題も見つける事ができました。収穫のある経験になったと思います。

7 謝辞

最後になってしまいましたが、不勉強な私に親切に指導して下さった荒木さんと吉川研の皆様、ほんとうにありがとうございました。