

3. 染色体 DNA ファイバー化展開

電気浸透流 (Electro Osmotic Flow, 以下 EOF とする) とは, 外部から印加された電界により発生する溶液流のことである。EOF とマイクロ構造体を組み合わせた染色体 DNA 展開デバイスを図 1 に示す。

ガラス基板上にマイクロポケット・マイクロピラーと呼ぶ微小構造体がフォトリソグラフィによりパターンニングされている。マイクロ構造の周囲には 4 枚の電極を配置してある。本デバイスは 1) 細胞配置、2) DNA 展開、3) DNA 液中保持の 3 つの機能を 1 つのチップ上に集積したものである。

DNA 展開の手順を図 2 に示す。

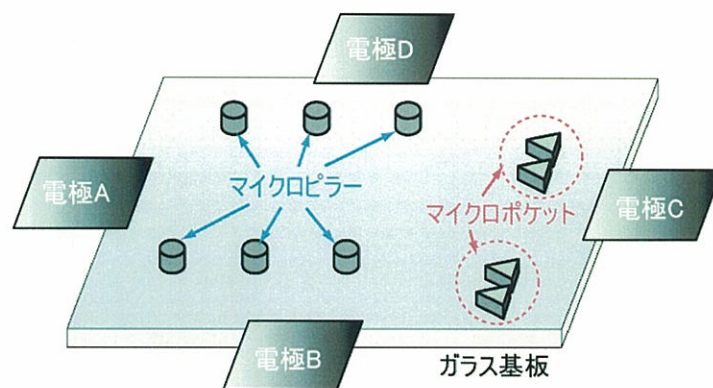


図 1. 染色体 DNA 展開デバイス模式図

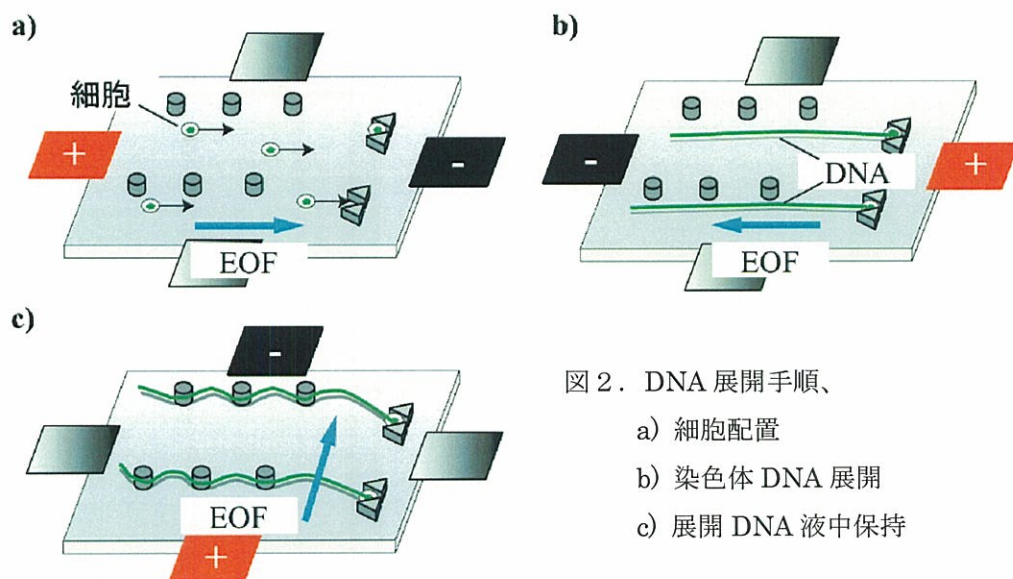


図 2. DNA 展開手順、

- a) 細胞配置
- b) 染色体 DNA 展開
- c) 展開 DNA 液中保持

- 1) デバイスに細胞懸濁液を滴下し、電圧を印加し EOF を発生させる(図中右方向)。これにより細胞がマイクロポケットに入り込み、トラップされる。
- 2) トラップされた細胞を破壊し、内部の染色体 DNA を露出させる。EOF を図中左に向かって発生させ、流体力により染色体 DNA をファイバー状に展開する。
- 3) EOF を図中上向きに発生させ、DNA をマイクロピラーに接触させる。マイクロピラー表面には予め表面修飾により正に帯電させ、DNA (負に帯電) を静電的に吸着させる。これにより、展開 DNA ファイバーがマイクロピラー間で溶液中に浮かんで保持される。

本デバイスは従来法の問題点を以下のように解決することが期待される。

- 1) 細胞 1 個レベルで基板上に配置することにより、展開 DNA ファイバーの位置を制御可能。
- 2) EOF を用いることで DNA にかかる力を調節することができ、断片化が防止される。
- 3) DNA ファイバーは溶液中に浮かんだ状態である。したがって、解析プローブのアクセスが確保される。これにより、プローブの結合効率の向上が期待される。

最初に細胞配置の結果を図 3 に示す。マイクロポケットにそれぞれ 1 個ずつ細胞がトラップされ、細胞 1 個レベルでの配置に成功した。

細胞からの染色体 DNA 展開の結果を図 4 に示す。展開された染色体 DNA の長さは 0.8mm に達し、これは従来法の上限值の 3 倍以上の長さである。EOF を用いることで DNA の断片化が防止されたことが要因と考えられる。

染色体 DNA の液中保持の結果を図 5 に示す。染色体 DNA を展開後、マイクロピラーに接触させたところ、展開 DNA がマイクロピラーに吸着し、マイクロピラー間で保持された。

以上の結果から、細胞配置・DNA 展開・DNA 液中保持が可能なが確認された。本研究では、実際に展開された染色体 DNA へ FISH を行うことで、遺伝子位置を可視化できることを確認している。前述の DNA 展開法と FISH を組み合わせることで、遺伝子位置の高分解能観察が可能となり、遺伝子診断への応用に繋がることが期待される。

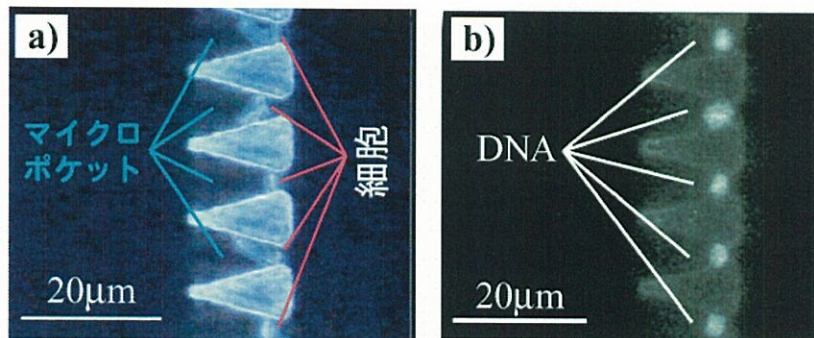


図 3. 細胞配置結果 a) 位相差観察像, b) DNA 蛍光観察像

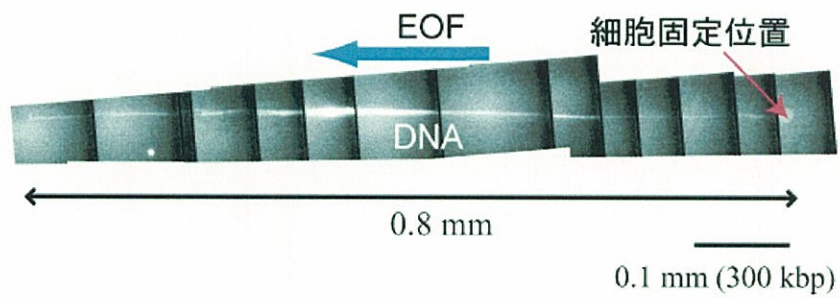


図 4. 展開染色体 DNA 蛍光観察像

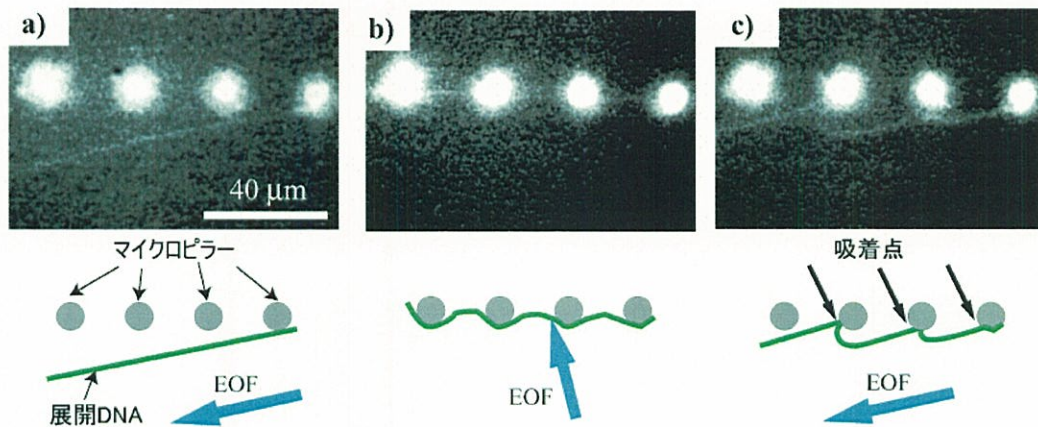


図 5. 染色体 DNA ファイバー液中保持結果 (左: 蛍光観察像, 右: 模式図), a) 染色体 DNA の展開, b) 染色体 DNA とマイクロピラーの接触, c) DNA 吸着の確認

5. 1 分子生物学における染色体 DNA 分子操作

DNA1 分子操作技術は生物学分野でも研究が進められてきた。現在まで、DNA1 分子を溶液中で自由に操作することで、DNA の物性評価やタンパク質との相互作用の解析が行われてきた。しかし、対象となる DNA は数 10 μm 長程度までの短いものに限られる。短い DNA は DNA の物性や局所的に起きる現象を解析することには適しているが、染色体スケールで起きる現象を解析することは不可能である。染色体 DNA のような非常に長い DNA は断片化しやすいために 1 分子で操作する技術は未だ確立されていない。

染色体 DNA1 分子を溶液中で自由に操作することができれば、染色体スケールで起きる DNA 高次構造変化などの現象を解析することが可能になると期待される。このことはエピジェネティクスに重要な知見をもたらすであろう。そこで、本研究では染色体 DNA1 分子を溶液中で操作するためのツールを開発した。

6. 光駆動微小構造体を用いた DNA1 分子操作

染色体 DNA1 分子を操作するため、釣針状微小構造体（マイクロフック）をファトリソングラフィーにより作製した（図 6）。

染色体 DNA を展開した後、マイクロフックの集団を溶液に分散し、集光したレーザーを導入する（図 6 参照）。そのとき、マイクロフックは光ピンセットの原理によりレーザー焦点位置に 1 個だけ捕捉される。光ピンセットの特徴として、マイクロフックのような縦長の構造の場合、長手方向がレーザー光軸方向と一致する。したがって、マイクロフックは基板に対して垂直に立ち上がった状態で捕捉される。レーザー焦点位置を動かすことでマイクロフックを移動し、展開された染色体 DNA に接触させる。DNA はマイクロフックの開口部から入り込み鉤型構造によりマイクロフックに把持される。レーザー焦点位置を移動することによってマイクロフックを介して染色体 DNA をその場で操作することが可能となる。

マイクロフックは染色体 DNA の一部分を操作することには適しているが、長大な染色体 DNA 1 分子を丸ごと液中で操作することは困難である。そこで、展開された染色体 DNA を糸巻き状の微小構造体（マイクロボビン）で巻取り、コンパクトにして操作するという手法を考案した（図 7 参照）。

二本のレーザー光を導入し、光ピンセットによりそれぞれの焦点位置にマイクロボビンを 1 個ずつトラップし、一方のレーザーを回転させる。これにより、染色体 DNA はマイクロボビン間に巻き取られる。マイクロボビンごと移動することにより、染色体 DNA の「丸ごと」操作が可能となる。マイクロボビンから染色体 DNA を外すときは、巻き取り時とは逆方向にマイクロボビンを回転させることでマイクロボビンからリリースする。

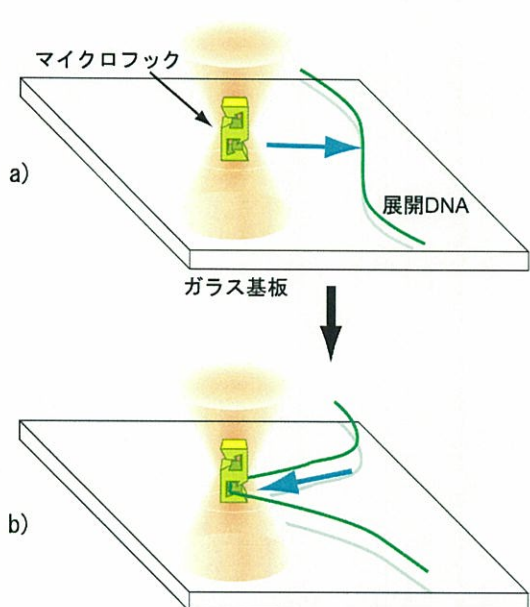


図6. マイクロフックによる DNA 操作,
a) マイクロフックのトラップ b) マイクロフックによる展開 DNA の捕捉・操作

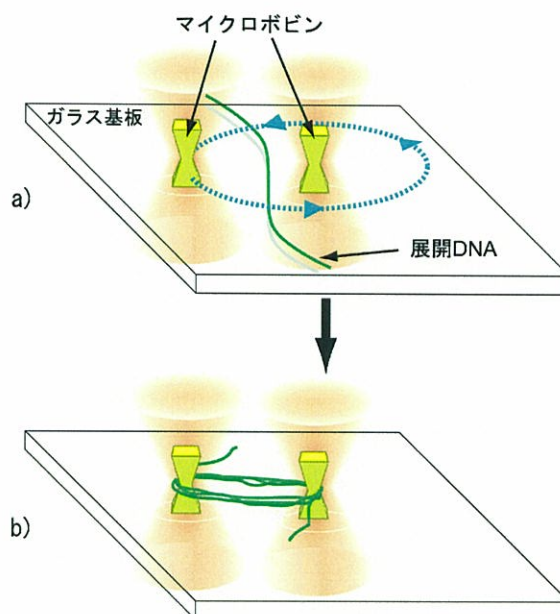


図7. マイクロボビンによる DNA 巻取り,
a) マイクロボビンのトラップと巻取り,
b) マイクロボビン間で巻き取られた染色体 DNA。

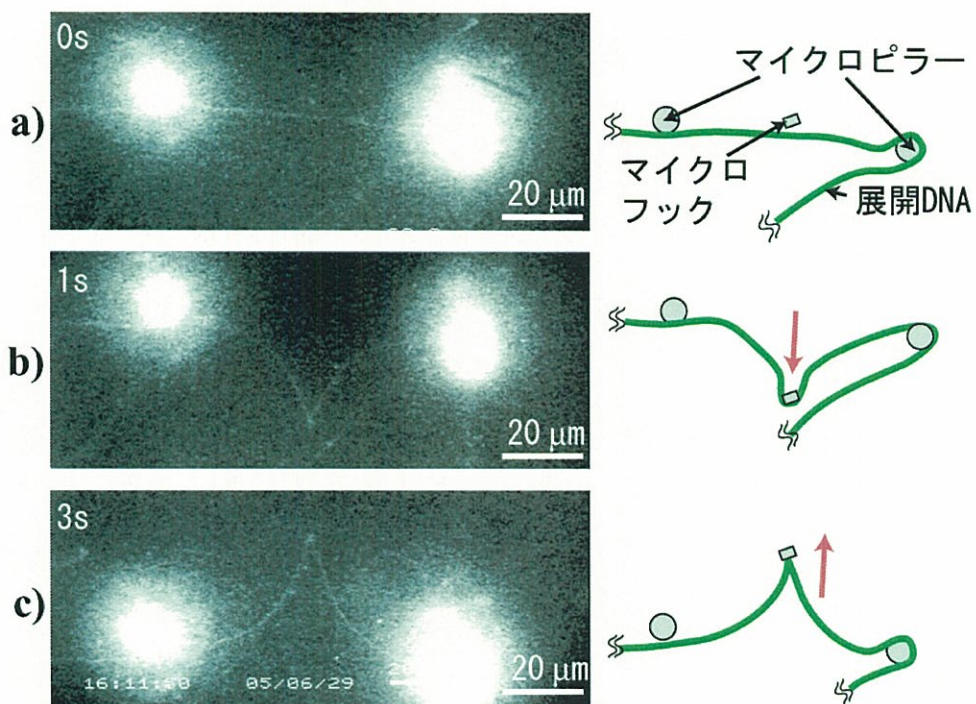


図8. マイクロフックによる DNA 操作、赤丸はレーザートラップされたマイクロフックの位置を示している。 a) 展開 DNA と光ピンセットでトラップされたマイクロフックの初期位置, b) マイクロフックの展開 DNA への接触, c) 展開 DNA の捕捉

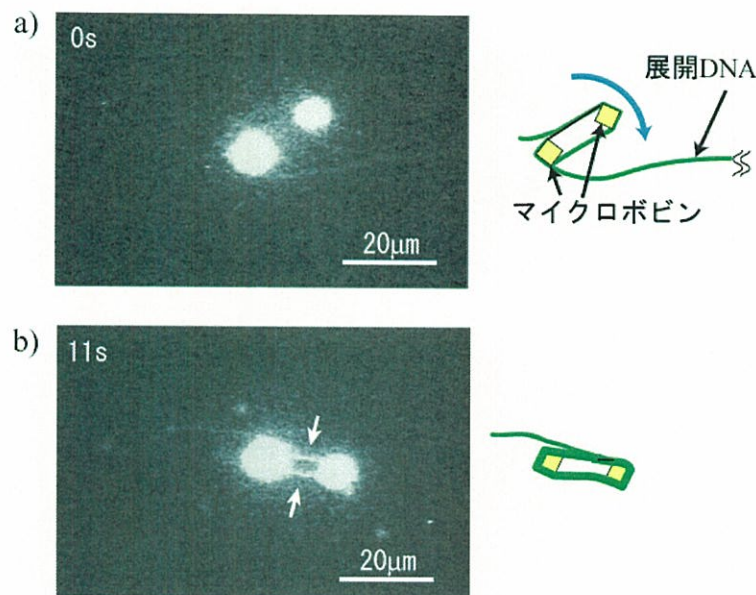


図9. マイクロボビンによる DNA の巻取り a) 展開 DNA の巻取り開始時, b) 巻取り完了時、
白矢印はマイクロボビン間に巻き取られた DNA

マイクロフックによる染色体 DNA 操作の結果を図8に示す。大量のマイクロフックの中から1個をレーザートラップした。続いて、図中下方向にマイクロフックを移動することで展開 DNA に接触させた。その後、マイクロフックを、DNA から離す方向に移動したところ（図中上向き）、DNA はマイクロフックから離れることなく、マイクロフックに引きずられるように操作された。

マイクロボビンによる染色体 DNA の巻取りの結果を図9に示す。2つのレーザー焦点位置にそれぞれ1個ずつマイクロボビンをトラップし、写真中右上のマイクロボビンを時計回りに回転させた。マイクロボビンの回転と共に DNA が巻き取られ、最終的に完全に DNA が巻き取られた。

ここで述べた染色体 DNA の部分・全体操作を組み合わせることにより、染色体 DNA1 分子の自在な操作が実現されると考えられる。

7. 結論

本論文はマイクロ加工・操作技術を用いた染色体 DNA の液中操作手法を提案した。1つは遺伝子診断の実現を目的として、電気浸透流とマイクロ構造体を組み合わせ、染色体 DNA を液中でファイバー状に展開するというものである。もう1つは、生物学への応用を目的として、光ピンセットで駆動された微小構造体を用いて、染色体 DNA 1分子を液中で自在に操作するというものである。ここで開発された種々の技術は、従来法にはなかった技術的価値を持つ。本技術を用いることで、簡便・迅速な遺伝子診断技術の開発、及び染色体 DNA1 分子レベルでの機能解明への道が開けるものと期待される。