

論文の内容の要旨

論文題目 マイクロ加工技術を用いた染色体 DNA の液中分子操作

氏名 寺尾 京平

1. 研究の背景

本論文は、染色体 DNA と呼ばれる、染色体を構成する巨大な DNA 分子を顕微鏡下・溶液中で操作する技術に関するものである。この技術開発の目的は、1 分子を対象にした新たな DNA 解析ツールの実現にある。

近年、医学分野では遺伝子疾患の診断ツール、基礎科学分野では生体分子間相互作用解明のための実験ツールとして DNA 分子操作に関する報告がされてきた。DNA 操作技術の医学・生物学での利用が試みられる一方で、半導体微細加工技術を利用したマイクロマシニング技術の進歩により、微小な物体を操作・解析するための技術が開発してきた。本論文では、近年開発が進められてきたマイクロ加工・操作技術を利用して、遺伝子診断と生物学に対して新たな DNA 操作技術の提案を行なう。

2. 遺伝子診断における DNA 分子操作

DNA は直鎖状分子であり、その長さは真核生物の場合、mm-cm オーダーに達する。DNA は、細胞核内で数 μm にまで折りたたまれ染色体として存在している。つまり染色体は DNA 鎖が高度に折りたたまれた「糸鞠」状構造体である。

遺伝情報が詰め込まれた染色体は、遺伝子に起因する疾患の情報が含まれている。このため、染色体を検査することは医療において有用な知見をもたらすと考えられる。実際に、染色体中の特定塩基配列に蛍光プローブを結合させる FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization) 法により遺伝子疾患を検出する診断が行われている。しかし、染色体は DNA 鎖の糸鞠のために、染色体を対象にした FISH は空間分解能が低い ($300\mu\text{m}$ 程度)。それに対して、糸鞠の染色体 DNA をファイバー状に展開すれば、サブミクロン長の高い空間分解能が得られる。これにより遺伝子異常（転座や欠失）を検出することが可能となる。

1994 年に DNA 展開技術 Molecular Combing 法が開発され、上記の DNA 展開の重要性が認識されるようになった。しかし、Molecular Combing 法に代表される従来の染色体 DNA 展開操作は、展開 DNA ファイバー位置が制御不能、DNA が断片化する、プローブの結合効率が低いという欠点があり、遺伝診断ツールとしての DNA 展開操作が普及するには至っていない。本論文では、上記の問題点を解決するため、マイクロ加工技術と電気浸透流を組み合わせた新たな DNA 展開手法を開発した。

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ーによりパターニングされている。マイクロ構造の周囲には 4 枚の電極を配置している。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。

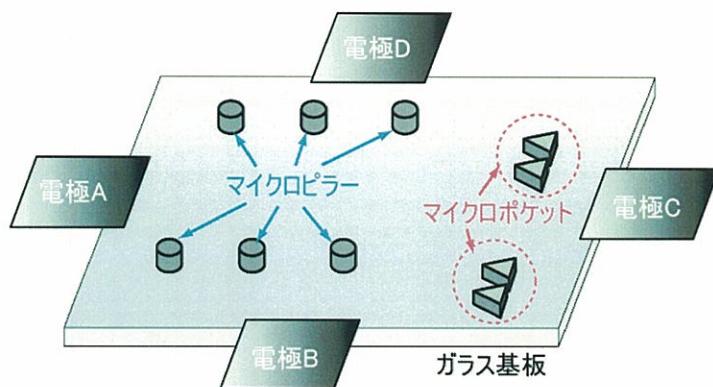


図 1. 染色体 DNA 展開デバイス模式図

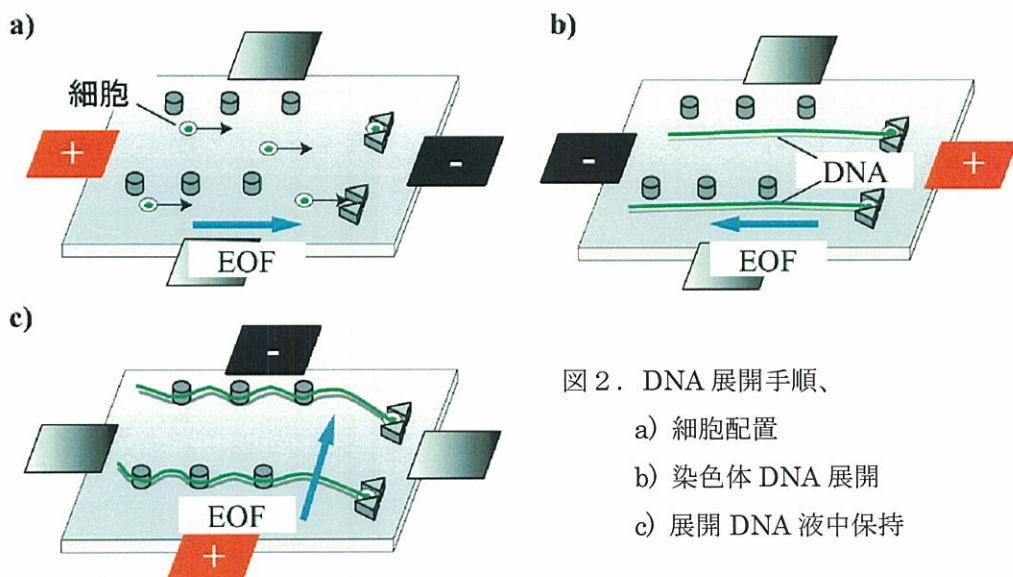


図 2. DNA 展開手順、

- 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値の 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 液中保持が可能なことが確認された。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。

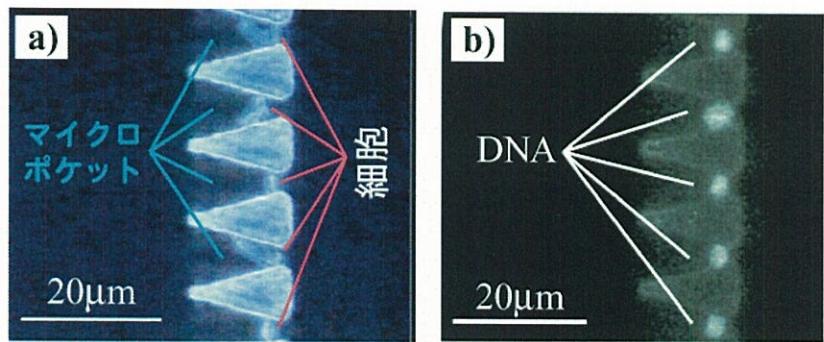


図3. 細胞配置結果 a) 位相差観察像, b) DNA 蛍光観察像

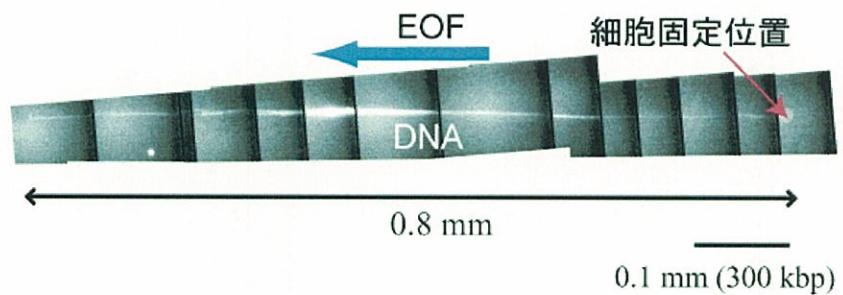


図4. 展開染色体DNA 蛍光観察像

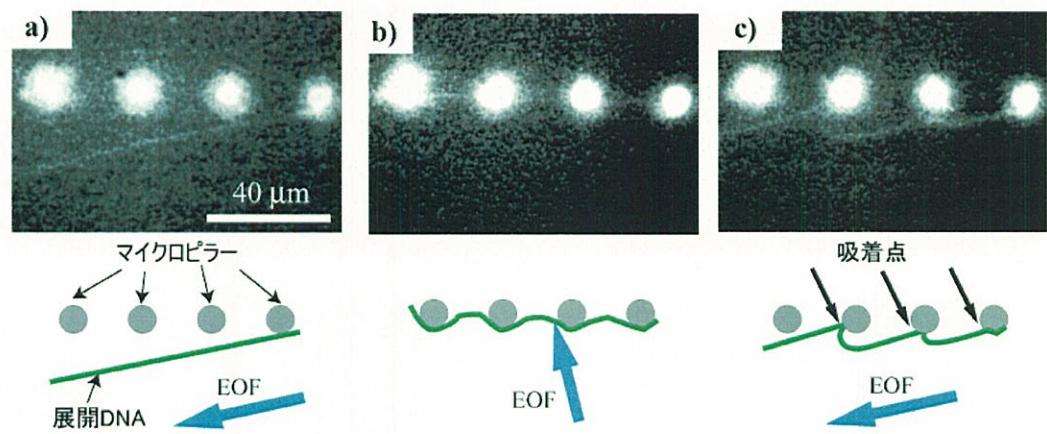


図5. 染色体DNA ファイバー液中保持結果（左：蛍光観察像、右：模式図）, a) 染色体DNAの展開, b) 染色体DNAとマイクロピラーの接触, c) DNA吸着の確認

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。今まで、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なわれてきた。しかし、対象となる DNA は数 $10 \mu\text{m}$ 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も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。

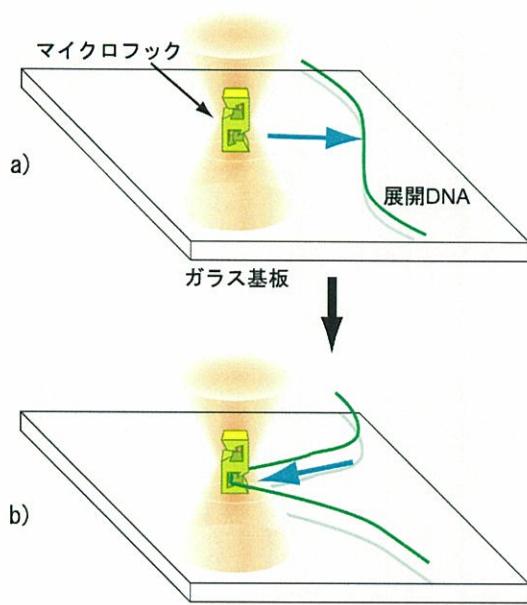


図6. マイクロフックによるDNA操作,
a) マイクロフックのトラップ b) マイクロ
フックによる展開DNAの捕捉・操作

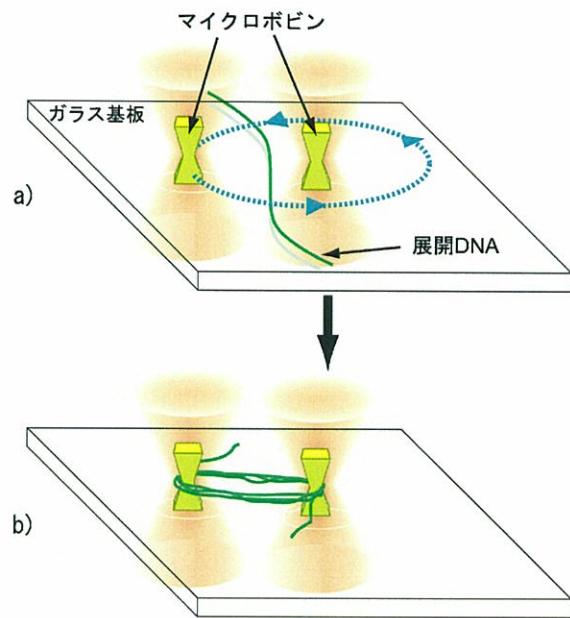


図7. マイクロボビンによるDNA巻取り,
a) マイクロボビンのトラップと巻取り,
b) マイクロボビン間で巻き取られた染色体
DNA。

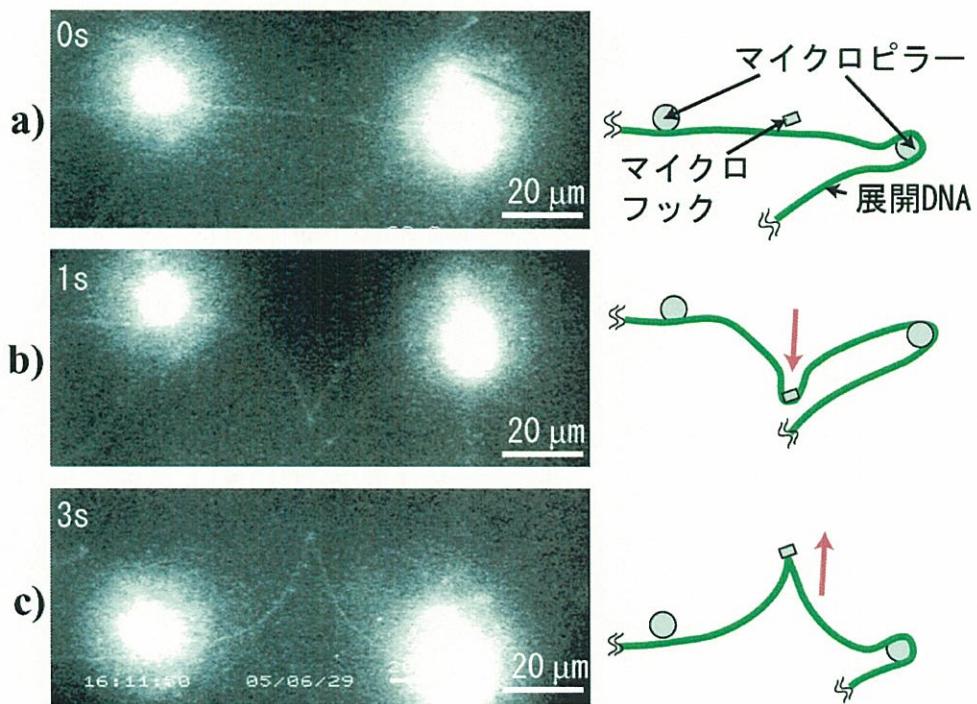


図8. マイクロフックによるDNA操作、赤丸はレーザートラップされたマイクロフックの位置
を示している。 a) 展開DNAと光ピンセットでトラップされたマイクロフックの初期位置, b)
マイクロフックの展開DNAへの接触, c) 展開DNAの捕捉

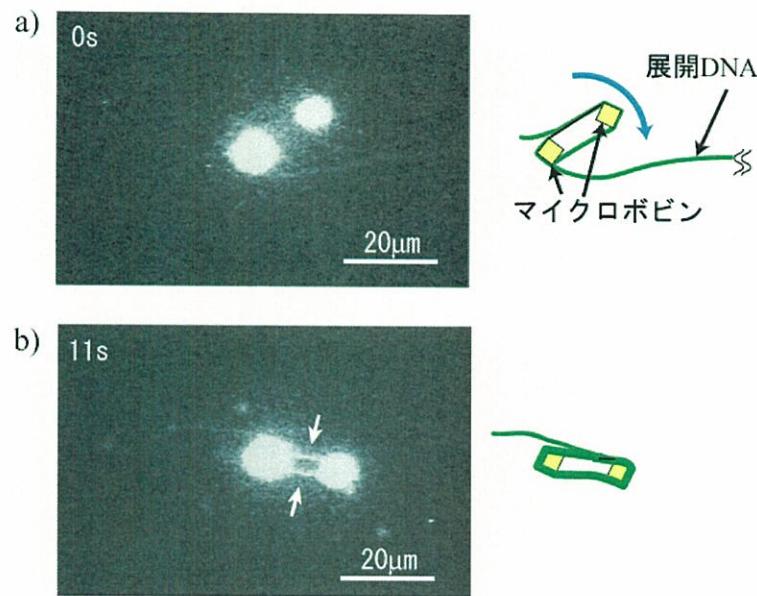


図9.マイクロボビンによるDNAの巻取り a) 展開DNAの巻取り開始時, b) 巒取り完了時、
白矢印はマイクロボビン間に巻き取られたDNA

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DNA1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。