

分子手術のための DNA 固定法の研究

機械工学専攻 46180 福家真史 指導教員:小穴英廣 講師

1.はじめに

従来の生化学的手法において DNA は水溶液として集団で扱われるため、特定分子の特定位置を指定して操作を加えることは困難である。これに起因して、例えば DNA 配列の解読等では、そのプロセスにおいて煩雑な手間と時間を経なければならない。これに対し、DNA を固体表面に固定してしまえば、分子の任意位置にアクセスできるので、分子の特定位置への操作(分子手術)が可能となり、プロセスの軽減、DNA 解析等の高速化へとつながる。

この分子手術において、酵素を固定化したプローブを用いれば、DNA 分子の特定位置の酵素的切断、さらには特定部位をメチル化するなどの部位特異的分子修飾への応用も期待される。このような酵素反応を用いた分子手術においては、酵素の活性部位と DNA とがきちんと嵌合される必要がある。例えば、DNA が固体表面に全面的に吸着していると、固体表面が立体障害となり反応が阻害される可能性がある。

そのために、DNA を両端部のみで固定し、固体表面に吸着することなく DNA を空間中に保持し、DNA 切断酵素を固定化したプローブを押しあてて DNA の任意位置を切断する手法が実証されている[1]が、このような状態で固定された DNA に対し、1箇所切断を生じさせると、両端部でのみ固定されているがゆえに、DNA はエントロピー弾性により縮み、伸長し固定された状態を維持することができない。例えば、酵素固定化プローブにより DNA を切断し、切断片を回収するためには、切断が生じてでも伸長し固定された状態を維持でき、かつ酵素との相互作用が可能である DNA 固定法が必要とされる。

この目的で、本研究では、Fig.1 のように微細な凹凸構造上に伸長 DNA を固定する、DNA 多点固定法の開発を行った。この固定法によれば、DNA は複数の凸部で固定され、凹部上では空間中に浮いた状態で保持されるため、酵素と相互作用できる状態で DNA を保持しつつ、1箇所切断が生じてでも伸長された固定状態を維持することが可能となる。さらに、切断後、固定点をレーザーアブレーション等で剥離させることにより DNA 断片を回収することが期待される。

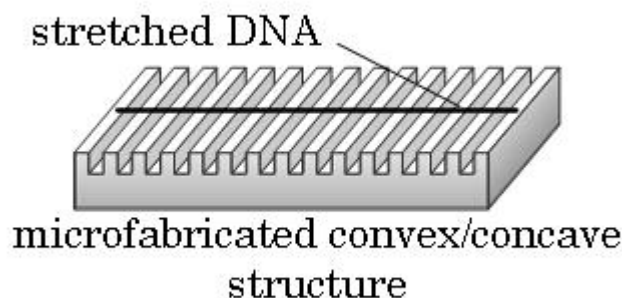


Fig.1 Immobilization of stretched DNA on microfabricated convex/concave structure.

2. 微細凹凸構造の作製

ネガレジスト SU-8 (MicroChem. Corp.) を使用し、フォトリソグラフィーによりスライドガラス上に凹凸の鋳型となる構造を得る。この上に PDMS (KE-106, 信越シリコン) を滴下し、スライドガラスをかぶせ、硬化させた後に鋳型から剥離することにより、スライドガラス上に凹部幅 $1.5 \mu\text{m}$ ・ピッチ $4.5 \mu\text{m}$ ・高さ $1.5 \mu\text{m}$ の PDMS 微細凹凸構造をもつ基板を作製した。

3. 微細凹凸構造上への DNA の固定

3.1 微細凹凸構造上での DNA 静電伸長及び固定

得られた微細凹凸構造上に伸長 DNA を固定させるべく、次の 2 通りの方法を試みた。

1. 微細凹凸構造上にフローティングポテンシャル電極[1]を作製し、電界により DNA を伸長させた状態で両端部をとなりあう電極エッジに固定する
2. 微細凹凸構造上に平行ギャップ電極を作製し、電界により DNA の一端を電極エッジに固定した後、molecular combing 法を用いて DNA を凹凸上に伸長固定する[2]

しかしながら、の方法では凹凸によって電界が歪み、DNA が凸部にトラップされ伸長せず (Fig.2)、の方法では molecular combing 法による DNA 伸長時に、メニスカスフォースにより DNA が凹部引き込まれて切断されてしまう (Fig.3)、という結果を得た。

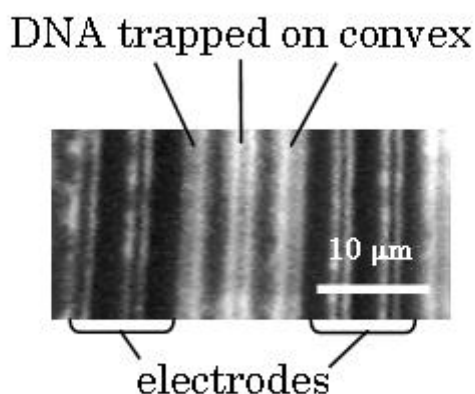


Fig.2 Dielectrophoresis of DNA on convex/concave.

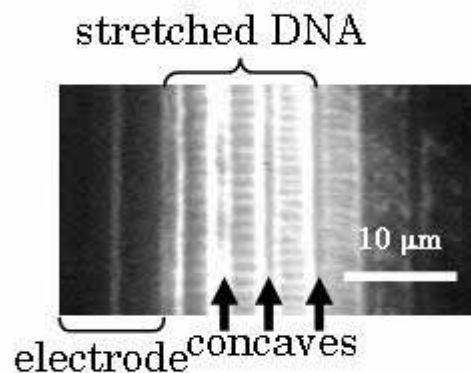


Fig.3 Immobilized DNA on convex/concave stretched by molecular combing.

3.2 伸長 DNA の転写法による固定

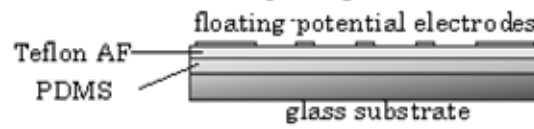
3.2.1 伸長 DNA の転写法

前節の結果より、微細凹凸構造上で直接 DNA の伸長および固定を行うことは困難であることが判明した。そこで、あらかじめ別の基板に DNA を伸長して仮固定しておき、その DNA を転写する技術を開発した。手順を Fig.4 に示す。

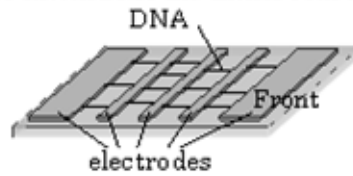
この手法においては、ガラス上へ DNA の転写を行う際に、基板同士の密着性のために転写用基板の PDMS 層が必要である。ただし、PDMS 微細凹凸構造のように転写される側の基板が弾性変形できる素材であれば、それにより密着性が確保できるため、転写用基板の PDMS 層は不要となり、スライドガラス上に直接電極を作製したのみの基板を用いても、PDMS 表面へ転写を行うことができると考えられる。

ただし、PDMS 表面は疎水性であり DNA との親和性が低いため、DNA を転写することができない。DNA を転写するためには、PDMS 表面にアミノシランのような正電荷を持つ分子を修飾することが有効と考えられるが、我々は、PDMS 表面を酸素プラズマ処理するだけでも DNA を吸着できることを新たに見出した。Fig.5 は酸素プラズマ処理した PDMS 上に DNA を転写したものであり、PDMS 上に伸長された DNA を並列に固定することに成功した。酸素プラズマ処理をした PDMS 表面に DNA が吸着する原理については、現時点では明らかではない。

a) The device for transfer-printing of stretched DNA.



b) Apply voltage to stretch DNA and anchor both ends.



c) Press against aminosilvanized glass and then remove.



d) Transfer DNA onto glass substrate.

transfer-printed stretched DNA

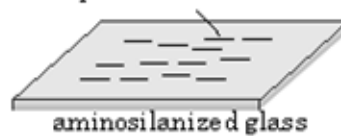


Fig.4 The process of transfer-printing for stretched DNA.

transfer-printed stretched DNA

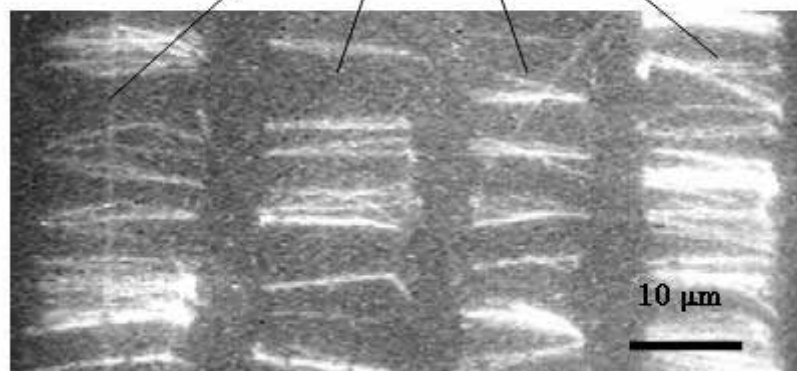


Fig.5 Transfer-printed DNA on oxygen plasma-treated PDMS.

3.2.2 微細凹凸構造上への伸長 DNA の転写

以上の手法を用いて, PDMS 微細凹凸構造上へ伸長 DNA を転写したものを Fig.6 に示す. 図中縦方向に凹凸がはしっており, 明るく見えている部分が凸部である. この上に横方向に伸長された DNA が並列に固定され, DNA の多点固定が実現された.

4. 酵素を用いた DNA の分子手術

固定された DNA に対し, 制限酵素 HhaI (TAKARA BIO INC., 1.6 U/ μ l) を作用させた. 先述したとおり, DNA が基板の上に吸着していると酵素は作用できないが, 逆に, このような多点で固定された DNA に対しては, 特にプローブ等を用いなくとも, 凹部上で空中に保持されている部位にのみ, 特異的に酵素を作用させることができると考えられる. Fig.7 が酵素を作用させた後のものであるが, 凸部上の DNA はそのまま残り, 凹部上の DNA のみが酵素により消失するのが観察された. これにより, 制限酵素によって定義される切断点をもつ DNA 断片が, 凸部上に得られることが確認された.

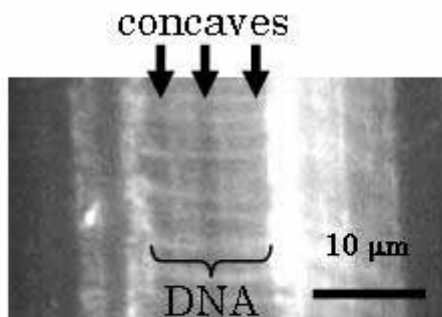


Fig.6 Transfer-printed DNA on microfabricated convex/concave structure.

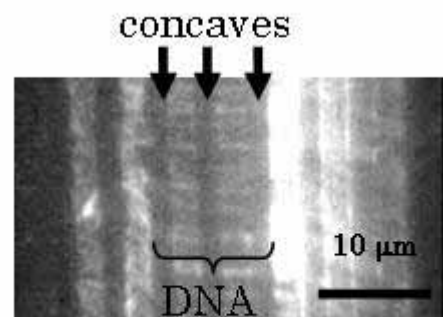


Fig.7 After restricted enzyme reaction with DNA.

5. 結論

酵素を用いた分子切断手術を実現するためには, DNA が酵素と相互作用な状態で固定でき, かつ切断を行っても伸長状態が維持できることが必要である. 本研究では, この目的のため, 微細凹凸構造を用いた DNA 多点固定法の開発を行った. 得られた結果は, 以下に要約される.

1. 凹部幅 1.5 μ m · ピッチ 4.5 μ m · 高さ 1.5 μ m の凹凸構造の両側に電極を持つ微細構造を作製し, 静電伸長固定法を用いて, 微細凹凸構造上への伸長 DNA の固定を実証した. しかしながら, 凹凸により電界が歪み DNA が伸長されず, molecular combing 法を用いて伸長させて

- も, DNA は, メニスカスフォースにより凹部に引き込まれて切断されてしまうことが判明した.
2. PDMS 層上に電極を配置し, ここに静電伸長固定した DNA を, 別の基板の上に転写する手法を開発した.
 3. 上記手法を用いて, 伸長 DNA の微細凹凸構造上への転写を行い酵素を用いた分子手術を実証した. 酵素作用後に凸部上の DNA のみが残ることから, 凹部にのみ特異的に制限酵素が作用し, 切断点の分子構造が明らかな DNA を断片が凸部上に得られることが確認された.

参考文献

1. T. Yamamoto, O. Kurosawa, H. Kabata, N. Shimamoto and M. Washizu: "Molecular Surgery of DNA Based on Electrostatic Micromanipulation", IEEE Trans. Ind. Applicat., Vol.36, No.4, pp.1010-1017, 2000.
2. 黒澤修・鷺津正夫:「マイクロシステムを用いた DNA 特定部位の取得」, 電学論 E, 123, 4, pp.112-117, 2003.