

微細流路内での細胞からの DNA の単離と高次構造制御

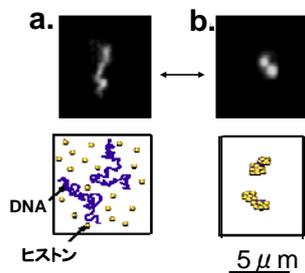
大内真紀 指導教員 小穴英廣講師

1. 序論

細胞の中には、その大きさに比べて非常に長い DNA が入っている。例えば分裂酵母は、直径約 $2\mu\text{m}$ の核の中に全長約 4mm の DNA が入っている。この長い DNA を微小空間に格納するため、DNA は、ヒストン等のカチオン性物質によりコンパクトに折り畳まれている。この DNA 折り畳み制御と遺伝子発現には関係があることが示唆されており^[1]、近年、そのメカニズムを解明するため、蛍光顕微鏡を用いた観察による研究が行われている。その結果、溶液中で広がった状態（以下ランダムコイル状態、Fig.1a）の DNA の高次構造が、多価カチオン等の凝縮剤を溶液に加えることで、小さく折り畳まれた状態（以下凝縮状態、Fig.1b）に不連続に転移することが明らかにされている^[2]。

しかし、現在の DNA 観察手法は、DNA 一分子の周辺の溶液条件を逐次変えて、DNA が高次構造変化する過程を見ることはできない。また、全長数 mm 程度の長い DNA を扱って観察した例もほとんどない。これは、溶液中の DNA 一分子のマニピュレーションが困難で、溶液交換が難しいこと、長い DNA は攪拌操作やピペット操作によるせん断力で断片化されてしまうことが原因である。

そこで本研究では、長い DNA 単分子の高次構造変化を経時観察するための技術開発を行った。



a.ランダムコイル状態の DNA b.凝縮状態の DNA

Fig.1 T4-ファージの高次構造変化

吉川祐子ら *Eur. J. Biochem.* (2001)

2. 研究の方針

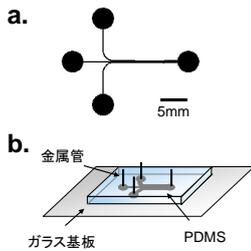
本研究では、DNA が存在する場の溶液の種類を変える必要がある。そこで、微細流路に複数の溶液を圧力導入して実験場とした。この方法を用いると、実験場に「流れ」が生じるが、流入する溶液を切り替えたり、複数の溶液を混ぜ合わせたりできるため、実験場の溶液の交換が容易である。また、流体の種類を選ばずに安定した流れを作るので、溶液濃度や流速などの条件が安定した実験場を得ることができる。この流路の中で、DNA を折り畳んでいるヒストンを取り除いてランダムコイル状態にし、多価カチオン溶液下に DNA を置いて凝縮状態に高次構造変化させようと考えた。そのためには、課題が二つある。一つは長い DNA を断片化せずに流路に導入することで、3章で言及する。もう一つは、「流れ」のある実験場で DNA が流れて顕微鏡視野から外れないようにすることで、4章で言及する。

3. 細胞からの DNA の単離

2章で述べた一つ目の課題である、長い DNA の断片化を防ぐため、細胞を DNA の容器として利用し、流路に導入した後 DNA を取り出そうと考えた。細胞から DNA を取り出すためには、界面活性剤と塩で細胞膜と核膜を破壊する必要がある。そこで、細胞を流路中の界面活性剤と塩が流れる場へ移動させて、膜破壊をした。細胞の移動は、レーザーによって微粒子を捕捉できる光ピンセットで行った。

3.1. 実験装置と試料

微細流路は、ソフトリソグラフィーによって、PDMS に、太さ $200\mu\text{m}$ 深さ $120\mu\text{m}$ の3本の流路が、1本に合流する形状の溝 (Fig.2a) を作製し、ガラス基板でふたをして作製した (Fig.2b)。流体の導入は、シリンジポンプにセットしたシリンジからシリコンチューブを通して行った。微細流路は、光ピンセットシステムと組み合わせ、光学顕微鏡下で観察できるようにした (Fig.3)。試料は、DNA の全長が約 4mm の分裂酵母を用い、細胞膜が破れた状態で流路に導入した。DNA を用いた実験の前に、流路に色水とビーズを流し、流路内で層流ができること、光ピンセットでビーズをトラップできることを確認した。



a. 微細流路の形状 b. 微細流路の全体図
Fig.2 微細流路の概略図

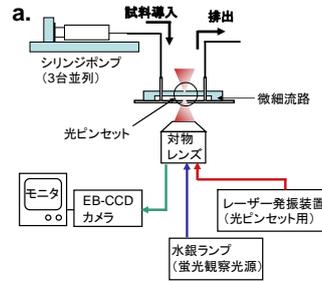


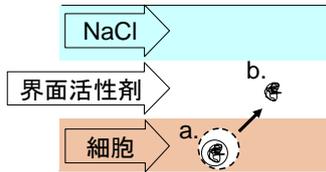
Fig.3 実験装置概略図

3.2. 実験手順

細胞、界面活性剤、塩の溶液を流路に流して層流にし、それぞれの溶液が隣接する場を作った。流れてきた細胞を光ピンセットでトラップし(Fig.4a)、細胞膜と核膜を破壊するために移動させた(Fig.4b)。

3.3. 実験結果と考察

膜を破壊するために、細胞を界面活性剤と塩の流れる場に移動すると、光ピンセットでトラップしている物体から、紐状のものが流れの中で伸びていく様子が観察された。これは、界面活性剤と塩が、膜を破壊して DNA をむき出しにした後、DNA を折り畳んでいるヒストンに作用して DNA から外したため、DNA の一部がほどけて流体の力で引き伸ばされたと考えられる (Fig.5)。この結果により、流路中で細胞から DNA を単離できることが分かった。



a. 細胞膜が破れた細胞 b. 膜が破壊された後の DNA
Fig.4 DNA の移動の模式図

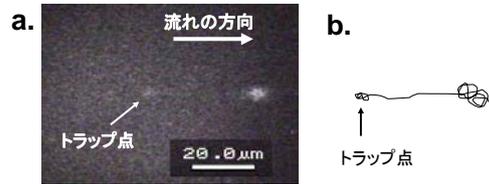


Fig.5 部分的にほどけて伸長された DNA(a. 蛍光像 b. 模式図)

4. ピラーを用いた DNA の保持

高次構造変化の観察のため、DNA を折り畳むヒストンを外してランダムコイル状態にする必要がある。しかし、ランダムコイル状態の DNA は光ピンセットでは保持できない。そのため、2章で述べた二つ目の課題の、流路中で DNA を保持する機構が必要である。長い DNA を溶液中で保持する方法として、微細な突起（以下ピラー）を作製し、ランダムコイル状の DNA を引っ掛け、流体の力で引き伸ばす方法がある^[3]。そこで、流路中にピラーを作製し、DNA を展開する実験を行なった。

4.1. 実験装置と試料

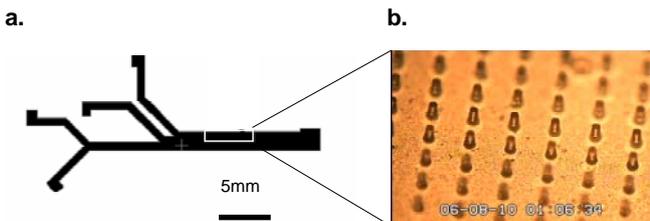
PDMS によって微細流路の途中に、直径 $20\mu\text{m}$ のピラーを、およそ $100\mu\text{m}$ 間隔で作製した (Fig.6)。この実験の目的は、流路中に作製したピラーによって DNA が保持できることの確認であるため、試料は DNA の断片化を許容し、ランダムコイル状態の DNA を利用した。

4.2. 実験手順

ランダムコイル状態の DNA が含まれる溶液を、流路に導入した。

4.3. 実験結果と考察

DNA がピラーに引っかかり、流体の力によって伸長され、保持される様子が観察された (Fig.7)。この結果によって、流路中のピラーでランダムコイル状態の DNA を保持できることが分かった。



a. 流路の形状 b. 流路中にあるピラー (明視野像)
Fig.6 ピラーのある流路

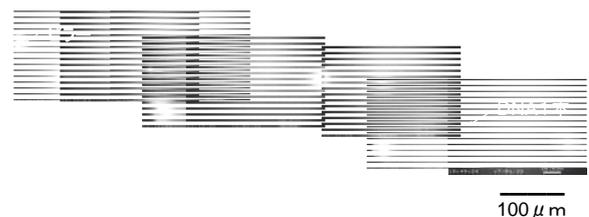


Fig.7 DNA がピラーで展開される様子 (蛍光像)

5.DNA の展開と高次構造制御

ランダムコイル状態の DNA が伸長され、ピラーに保持された状態で高次構造変化の観察を行った。ランダムコイル状態の DNA は、溶液中に多価カチオンが一定濃度以上含まれると、凝縮状態へと転移する。そこで、ランダムコイル状態の DNA の周りの溶液を、多価カチオンを含む溶液に交換し、凝縮させ、さらに、溶液をもとに戻して、DNA をランダムコイル状態にした。

5.1.実験装置

3章の実験で、流路壁面に DNA が吸着し、蛍光観察時のバックグラウンドが上昇して、一本に伸長された DNA が見えにくくなった。そのため、流路壁面にタンパク質吸着防止剤であるポリマーを塗布した。流路には、ランダムコイル状態の DNA を含む溶液、多価カチオンのスペルミジン、純水を接続した。

5.2.実験手順

流路にランダムコイル状態の DNA を含む溶液を流して伸長、保持した。その後、DNA を含む溶液の導入を止め、DNA を凝縮させるスペルミジンを通した。DNA の凝縮を確認後、スペルミジンの導入を止め、純水を流して、溶液を DNA がランダムコイル状態のときのものに戻した。

5.3.実験結果と考察

スペルミジンを通して、DNA の周りの溶液環境を変えると、DNA の自由になっている一方の端部から輝点が、DNA を保持しているピラーの方へ移動してゆくのが見えた (Fig.8)。この輝点は、DNA が凝縮している部分と考えられ、スペルミジンの作用で、流体の力に逆らって DNA が端部から凝縮したと考えられる。次に、溶液を純水に交換すると、縮んだ DNA が再び伸びる様子が観察された。これは、DNA の周りからスペルミジンが取り去られ、もとのランダムコイル状に戻り、流体の力で引き伸ばされたものと考えられる。また、この現象は、同じ DNA で数回繰り返して観察可能であったことから、高次構造変化が可逆的で、制御可能なものであることが示された。



Fig.8 DNA が高次構造変化する様子
(蛍光像。2秒ごとに撮影。矢印は凝縮部分。点線は、DNA が存在するが見えない部分。)

6.結論

本研究では、DNA の高次構造変化を観察するための要素技術を開発し、実際に観察を行なった。その結果、以下の三点を実現した。

1. 観察の溶液条件が制御可能な微細流路中で、光ピンセットを用いて細胞から DNA を単離した。
2. DNA を伸長、保持する機能を持つ微細流路を作製した。
3. 伸長、保持した DNA の周りの溶液条件を変えて高次構造を制御した。

[1]中村桂子ほか:”細胞の分子生物学” ニュートンプレス(2004)

[2]吉川研一ほか:”DNA の折り畳み”,アイピーシー (2003)

[3]K.Terao ほか:”Extending chromosomal DNA in microstructures using electroosmotic flow” J.Phys:Condens Matter18(2006)