

マイクロ加工技術を用いた染色体 DNA の液中分子操作 Manipulation of Single Chromosomal DNA Molecules Using Microfabrication Techniques

寺尾京平 指導教員 鷲津正夫教授

Kyohei TERAO (Professor Masao WASHIZU)

Keywords: DNA, Electroosmotic flow, Optical tweezers, Molecular manipulation, FISH

1. はじめに

DNA は直鎖状の高分子であり、その長さは mm-cm オーダーに達する。DNA は塩基性のタンパク質と複合体を形成し数 μm にまで折り畳まれて染色体として存在する。遺伝子地図作製などの染色体 DNA 解析において、長大な染色体は長さ $1\mu\text{m}$ 以下にまでまず断片化される。得られた断片それぞれを解析し、断片の情報を再構築することで染色体 DNA 全体の解析を行なっている。しかし、この過程において断片化された DNA の位置情報が失われてしまうため、再構築のプロセスには膨大な手間を要する。

それに対して染色体 DNA を断片化することなく解析することができれば、再構築のプロセスを省略することが可能となり解析の効率化に繋がると考えられる。また、従来短い DNA の解析に限られてきた 1 分子生物学の分野においても長大な染色体 DNA を解析できれば、従来法では解析が困難であった染色体スケールで起きる現象に関して知見を得ることができよう。

長大な DNA を解析する手法として、FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization) が知られている。DNA は相補的な塩基配列を持つ DNA と結合し 2 本鎖を形成する性質を持つ。FISH はこの性質を利用し、標的となる配列と相補的な配列を持つ蛍光 DNA プローブを解析対象の DNA に結合させ、結合位置を蛍光顕微鏡下で観察することで、標的配列の位置を決定する [1]。

染色体 DNA 1 分子を顕微鏡観察し、位置を明らかにするためには DNA を高い空間分解能で観察する必要がある。しかし、DNA が凝縮した「糸鞠」である染色体では $0.3\mu\text{m}$ 程度の低い空間分解能しか得られない [2]。それに対して糸鞠の染色体を解いてファイバー状に展開することが出来れば、その分解能は顕微鏡の光学分解能のみに依存し、サブミクロンの高い空間分解能が得られる [3]。

DNA 展開法として Molecular Combing 法が知られている。しかし、この方法は DNA の切断が生じ $240\mu\text{m}$ 程度までしか展開できない [4]、再現性が低い、展開 DNA が基板に固着するため解析プローブのアクセシビリティが低い [5] という問題が指摘されている。そこで、本研究では、上記の問題点を解決する新たな染色体 DNA 展開法の開発を行った。

2. 染色体 DNA の液中展開

本研究で開発した染色体 DNA 展開デバイスを図 1 に模式的に示す。フォトリソグラフィでパターンニングすることでガラス基板表面に微小な柱状構造 (マイクロピラー) 及び微小なポケット状構造 (マイクロポケット) がアレイ状に作製されている。微細構造を囲むようにして 4 枚の白金電極を配

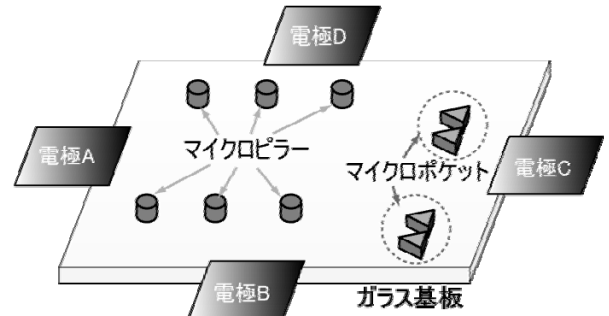


図 1 染色体 DNA 展開デバイス
Fig.1. DNA extension device

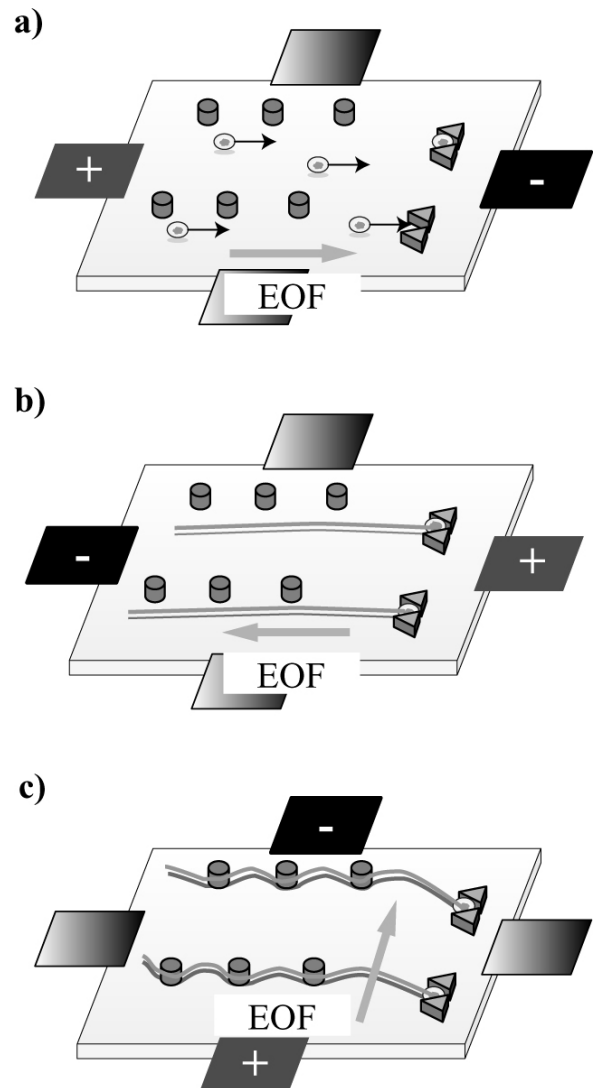


図 2 DNA 展開手順, a) 細胞配置, b) DNA 展開, c) DNA 液中保持
Fig.2. DNA extension process. a) cell positioning, b) DNA extension, c) DNA anchoring

置する。手順を図 2 に示す。まず、細胞懸濁液をデバイスに滴下し数分間静置することで細胞を自重によりガラス表面まで沈降させる。続いて電圧を印加する（電極 A を正極、電極 C を負極）。これにより電気浸透流 (EOF: Electroosmotic flow) が図中右向きに発生する。この溶液流により、細胞がマイクロポケットに搬送され、マイクロポケットに入り込む。マイクロポケットのサイズは細胞 1 個のみを捕捉するよう設計する。これによりマイクロポケット 1 個につき細胞 1 個がその場で捕捉される。その後一端溶液を乾燥することで細胞を基板に吸着固定する。タンパク質分解酵素を滴下し、細胞を破壊する。これにより内部の染色体 DNA が解かれ展開可能な状態になる。細胞配置時とは逆向きに電気浸透流を発生させることで解けた染色体 DNA は流れにより引き伸ばされファイバー状に展開される。展開完了後、電圧を印加する電極対を切り替え（電極 B を正極、電極 D を負極）図中上向きに電気浸透流を発生させる。これにより展開 DNA がマイクロピラーに接触する。マイクロピラー表面には予め正電荷を付与しておく。それにより、DNA（負に帯電する性質を持つ）はマイクロピラーに接触すると静電相互作用によりピラー表面に吸着する。これによって展開された染色体 DNA はマイクロピラー間に安定に保持することが可能となる。

このデバイスは前述の問題点を以下のように解決することが期待される。

染色体 DNA はマイクロポケットに配置された細胞から展開されるため、個々の細胞から展開された染色体 DNA ファイバーを観察することができる。このことは再現性の向上に繋がると期待できる。また、電気浸透流は印加する電圧を調節することで流速を制御し、染色体 DNA の断片化を防ぐことが可能であり、より長い DNA を展開できると考えられる。最終的に展開された染色体 DNA はピラーを除いて溶液中に浮かんだ状態のため、解析プローブのアクセスが確保され解析効率の向上が期待できる。

3. 染色体 DNA 展開結果

本研究では、真核生物のモデル生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 972 株を試料として用いた。

細胞配置の結果を図 3 に示す。溶液乾燥後の観察像を示している。マイクロポケット 1 個につき細胞 1 個がトラップされ、溶液乾燥後もマイクロポケットに残留していることが確認された。

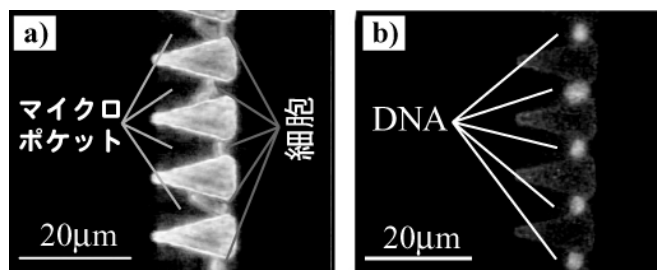


図 3 細胞配置結果, a)位相差観察像, b)蛍光観察像
Fig.3. Results of cell positioning, a) phase contrast image, b) fluorescence image

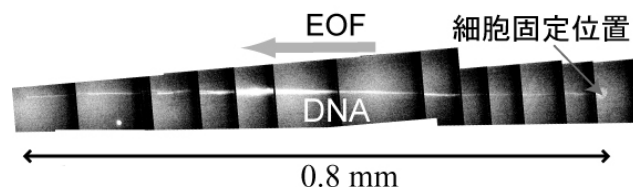


図 4 DNA 展開結果 (蛍光観察像)
Fig.4. Results of DNA extension (fluorescence image)

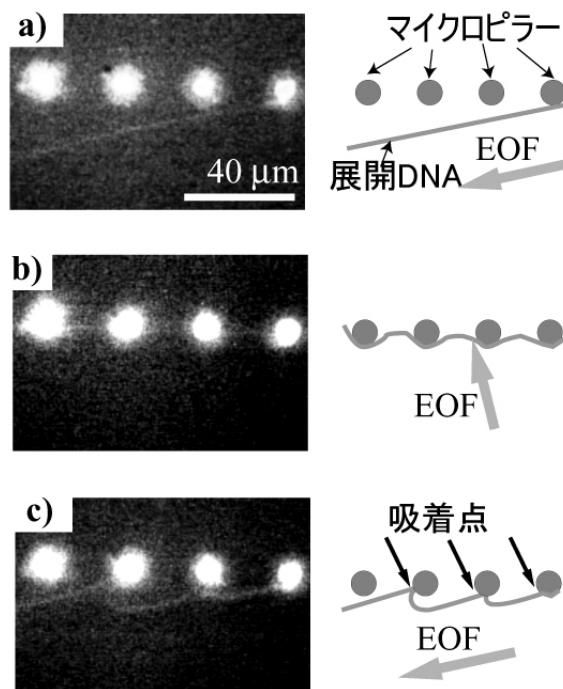


図 5 DNA 保持展開結果 (蛍光観察像), a) DNA 展開, b) DNA とマイクロピラーの接触, c) 懸架された染色体 DNA

Fig.5. Results of DNA anchoring (fluorescence images), a) DNA extension, b) contact between DNA and micropillar, c) anchored DNA

続いて、染色体 DNA の展開結果を図 4 に示す。電気浸透流印加後、数分経過した後の観察像を示している。展開された染色体 DNA の長さは 0.8mm であり、これは従来法の上限值と比較して 3 倍程度長い。電気浸透流の流速の調節により断片化が防がれ、長大な DNA を展開することが可能になったと考えられる。

展開 DNA の液中保持結果を図 5 に示す。DNA を電気浸透流により展開後 (図 5.a), 流れの向きを変え、展開された DNA をマイクロピラーに接触させた (図 5.b). 展開 DNA はマイクロピラー側壁に沿って接触しピラー間でたわむ様子が観察された。その後、展開 DNA をマイクロピラーから離す方向に電気浸透流の向きを変えたところ、DNA はピラーから剥がれることなく吸着し、ピラー間でたわんだ状態であった。このことから DNA はピラー表面に吸着し、その他の部分は溶液中に浮かんだ状態で保持されたことが確認できる。このような液中保持により解析プローブの結合効率の向上が期待される。

本デバイスは従来の方法よりも長い DNA が展開されたものの、用いた染色体 DNA の完全長の半分程度までしか展開されていない。これは DNA 上に DNA を凝縮させるタンパク質が残留していることに起因する。染色体 DNA を完全に展開する方法については本デバイスを応用することで実現可能である。本デバイスを応用した完全展開について結果を図 6 に示す。これはゲル中でタンパク質が完全に消化されたゲル電気泳動用の試料を用いることで達成された。展開された DNA の長さは 1.7mm であり、用いた酵母染色体の完全長とほぼ等しい。現在まで mm オーダーの DNA を液中で完全に展開する技術は報告されておらず、本デバイスによる展開が初めての例である。

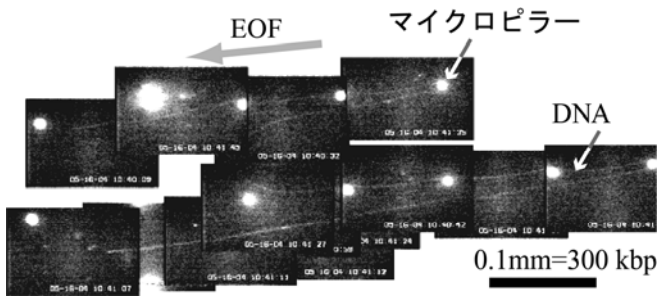


図 6 完全展開された染色体 DNA (蛍光観察)
Fig.6. Complete extension of a chromosomal DNA molecule of *S. pombe* (fluorescence image)

4. 染色体 DNA1 分子操作

完全に染色体 DNA1 分子を展開できたことから、FISH に留まらず 1 分子を対象にした様々な解析の実現に繋がると期待される。例として、DNA-タンパク質間相互作用の直視解明への応用が挙げられる。現在まで 1 分子観察に基づく DNA-タンパク質間相互作用の解明は 10 μ m 程度の比較的短い DNA でのみ報告されている。従って今までは局所的に起きる現象の観察に限られてきた。染色体 DNA のような長大な DNA を 1 分子で自在に操作することができれば、局所的な現象の観察に限られてきた 1 分子解析を染色体スケールで起きる現象の観察にまで拡張することが可能になると考えられる。そのような現象の例としては DNA 高次構造の変化や DNA 複製などが挙げられる。そこで、本研究では、染色体 DNA1 分子解析への応用を目的として、染色体 DNA1 分子を溶液中で自在に操作することが可能な実験ツールの開発を行った。

本研究では光ピンセットで駆動された微小構造体による物理的な染色体 DNA の操作手法を提案する。図 7 に DNA 展開操作の模式図を示す。微小な釣針状構造体(マイクロフック)を微細加工により作製し、染色体 DNA を電気浸透流で展開後、マイクロフックを溶液に分散する。その後、集光したレーザーを導入すると光ピンセットの原理により、マイクロフックがレーザー焦点位置に捕捉される。マイクロフックは縦長の構造をしており、このような構造は長軸方向がレーザー光軸方向と一致することが知られている[6]。従って、マイクロフックは基板に対して「立った」状態でトラップされる。レーザーを操作することにより、マイクロ

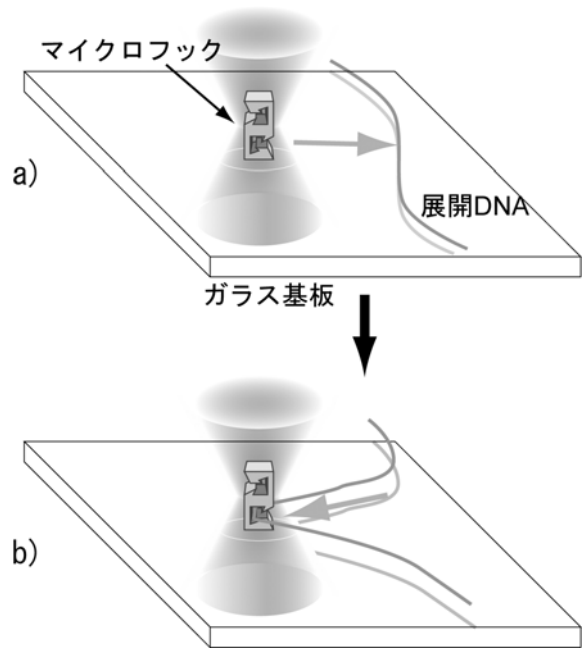


図 7 マイクロフックによる DNA 操作, a) DNA・マイクロフック初期位置, b) DNA 把持
Fig.7. DNA manipulation using a microhook, a) initial positions of DNA and microhook, b) grasping DNA by optically-driven microhook

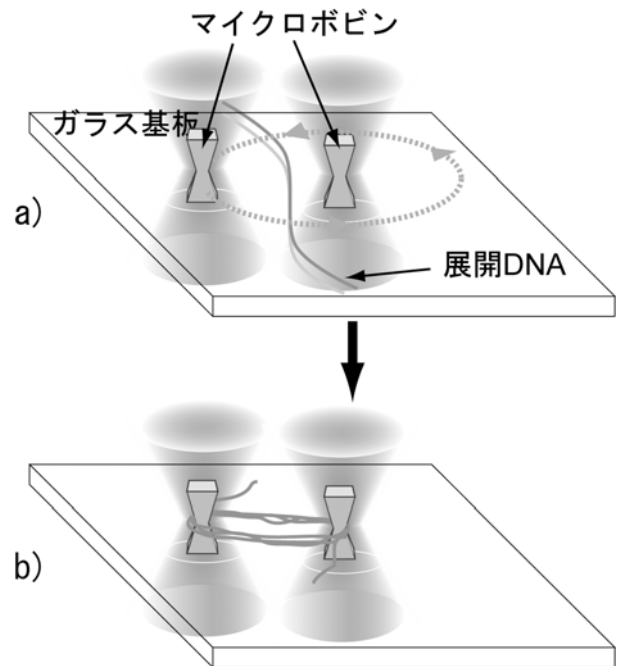


図 8 マイクロボビンによる DNA 操作, a) DNA・マイクロボビン初期位置, b) DNA 巻取り
Fig.8. DNA manipulation using microbobbins, a) initial positions of DNA and microbobbins, b) winding DNA by optically-driven microbobbins

フックを移動させ、展開 DNA と接触させる。そのとき、DNA はマイクロフックの開口部から入り込み把持される。従って、レーザーを操作することによって、マイクロフックを介して間接的に染色体 DNA を操作することが可能になると考えられる。

マイクロフックは展開 DNA の任意の位置をつまんで部分的に操作することに適しているが、長大な染色

体 DNA1 分子を「丸ごと」操作することは困難である。そこで、染色体 DNA を一端コンパクトに巻取り、DNA を「丸ごと」溶液中で移動させた後、巻き戻すという手法を考案した (図 8 参照)。巻き戻すには微小な糸巻構造体 (マイクロボビン) を用いる。DNA 展開後、マイクロボビンを溶液中に分散する。その後、2 本の集光したレーザーを導入し、それぞれの焦点位置にマイクロボビンを 1 個ずつ捕捉する。マイクロボビンはマイクロフック同様基板に対して立った状態でトラップされる。マイクロボビンを展開 DNA に接触させた後、レーザーを操作し、一方のマイクロボビンをもう一方の周りで回転させる。この回転運動により展開された染色体 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させれば、染色体 DNA1 分子丸ごとの操作が可能になると考えられる。マイクロボビンからの染色体 DNA のリリースは巻き取り時とは逆方向にマイクロボビンを回転させれば良い。

マイクロフックによる DNA の部分操作とマイクロボビンによる DNA 丸ごと操作を組み合わせることで、染色体 DNA1 分子を溶液中で自在に操作することが可能になると期待される。

5. 染色体 DNA1 分子操作結果

マイクロフックによる染色体 DNA 操作の結果を図 9 に示す。レーザートラップされたマイクロフックを染色体 DNA に接触させると、染色体 DNA がマイクロフックに捕捉され、マイクロフックを介して染色体 DNA を操作することに成功した。

マイクロボビンによる染色体 DNA 巻取りの結果を図 10 に示す。マイクロボビンを回転させると染色体 DNA が次第に巻き取られ最終的にマイクロボビン間に完全に巻き取られた。この後、マイクロボビンを逆方向に回転させることで巻き取られた DNA を巻き戻し最終的にマイクロボビンからリリースすることに成功した。

長大な染色体 DNA1 分子を溶液中で自在に操作する技術はこれまでになかったため、今回開発した染色体 DNA 操作ツールは、1 分子解析において新たな解析手法をもたらす事が期待される。

6. おわりに

本研究では染色体 DNA 解析の実現を目指し、種々の DNA 操作手法の開発を行った。遺伝子位置決定技術 FISH への応用を目的として、微小構造を有した電気浸透デバイスを作製し、

- ・ 細胞 1 個レベルでの基板表面への配置
- ・ 断片化することなく染色体 DNA を展開
- ・ 染色体 DNA を液中で安定に保持

を実現した。また、染色体 DNA-タンパク質間相互作用解明のための実験ツールとして、以下の染色体 DNA1 分子自在操作ツールを提案した。

- ・ マイクロフックによる染色体 DNA 部分操作
- ・ マイクロボビンによる染色体 DNA 全体操作

これらの技術は従来法にはなかった技術的価値を持ち、それぞれの分野における基盤技術となることが期待される。

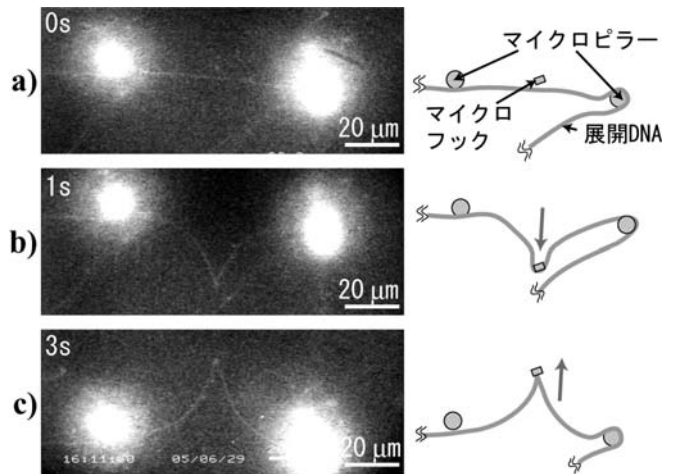


図 9 DNA 保持展開結果 (蛍光観察像), a) DNA 展開, b) DNA とマイクロピラーの接触, c) 懸架された染色体 DNA

Fig.9. Results of DNA anchoring (fluorescence images), a) DNA extension, b) contact between DNA and micropillar, c) anchored DNA

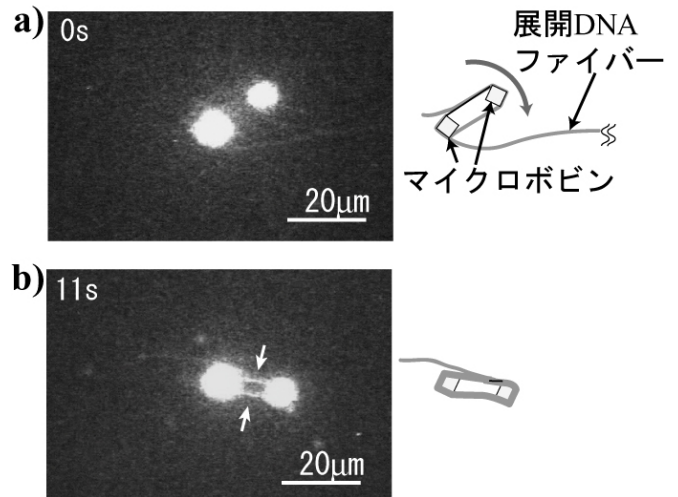


図 10 DNA 保持展開結果 (蛍光観察像), a) DNA 展開, b) DNA とマイクロピラーの接触, c) 懸架された染色体 DNA

Fig.10. Results of DNA anchoring (fluorescence images), a) DNA extension, b) contact between DNA and micropillar, c) anchored DNA

参考文献

- [1] Trask BJ, *Trends Genet.*, 7,5 p. 149, 1991
- [2] Trask BJ, *Meth. Cell Biol.*, 35, p. 3, 1991
- [3] Heng HH, Squire J, and Tsui LC, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 20, p. 9509-9513, 1992
- [4] Conti C and Bensimon A, *Genomics*, 80, p.135, 2002
- [5] van de Rijke et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 48 p.743, 2000
- [6] Gauthier RC, Ashman M, and Grover CP, *Applied Optics*, 38, p.4861, 1999