

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20560044

研究課題名（和文） DNAの磁気泳動分離

研究課題名（英文） Magnetic separation of DNA

研究代表者

山本 勲 (YAMAMOTO ISAO)

横浜国立大学・工学研究院・教授

研究者番号：40242383

研究成果の概要（和文）：磁場と電場の複合場において、電磁場が与える4つの力、すなわちトルク、クーロン力、ファラデー力、ローレンツ力を受けるDNAの運動について観測し、理解した。その応用として、磁化率の違いによるDNAの電気磁気力泳動分離に成功した。配向モデルのシミュレーションおよび泳動モデルの定式化を行った。

研究成果の概要（英文）：We studied the four forces, torque (Coulomb force, Faraday force and Lorentz force) under the influence of the magnetic and the electric field for DNA. The motion of the gel in the gel observed is understand. The separation is succeeded according to the magnetic susceptibility. The orientation model is simulated and the migration model is formulized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理一般・工学基礎 ・ 応用物理学一般

キーワード：DNA、磁気分離、強磁場、電気泳動、磁気力、磁場配向

1. 研究開始当初の背景

(1) 磁場中で物質は、その磁化率の符号に応じて、磁場から遠ざかる方向または吸い寄せられる方向へ力を受ける。この磁気力は強磁性物質の分離へすでに適用されており、弱磁性物質についてもわずかな磁化率の差を利用して物質を正確に分離できる可能性を秘めている。強い磁場を用いることで、これまで不可能であった弱い磁性の物質（常磁性体や反磁性体）の分離-濃縮が試みられてきている。これまでの研究で、磁気による分離の可能性が不明だった物質群に対して、その分離

の可能性を探り、磁気泳動のメカニズムを追求するとともに、磁場を用いた新しい分離方法を探索して来た。その一つにDNAの電気磁気泳動分離がある。

(2) DNAの分離は寒天ゲルに埋め込んだDNAを電気泳動して分離するという手法が唯一であり、一般的である。この手法はDNAを長さ毎に分離する手法であるが、二重らせんと異なる形状でありながら同じ電気泳動速度を示すDNAを分離することはできず、またDNAを構成する4つの塩基の成分比には無頓着である。DNAの

磁気的な特徴は、2重らせんが塩基対 (A-TペアかG-Cペア) で成り立っており、それぞれが水素結合の様子が異なるために同じ長さのDNAでも塩基対の成分比によって磁化率が異なることである。さらに、DNAの磁化率には異方性があるために磁場中では磁力線に垂直に配向する点が挙げられる。

(3) このことより磁場を用いた分離には2つの優れた点が挙げられる。第一に、DNAは磁場中で塩基対の構成比に依存する磁化率を有し、相応する磁気力を受けるので、DNAの塩基対構成比による分離が可能であること。第二に、磁気異方性によって磁場中で配向が起こるので、同一電気泳動速度のためにこれまで分離できなかったDNA同士を分離できることである。実際に、これまでの研究では、寒天ゲル中に仕込んだDNAは、配向すると同時に強磁場中で磁場から遠ざかる向きに磁気力を受けるために、泳動速度が変化することを見出している。

(4) 10テスラ級の強磁場による高分子ゲルの分子配向制御の研究を行ってきた結果、配向させたゲルは光学的特性や粘弾性などの機械的な特性に異方性が出現した。¹⁾ 配向ゲルを用いてさまざまな大きさの分子を電気泳動させたところ、電気泳動速度が低下し、配向方向依存性があることを見出した。さらなる応用を探る際に、DNAが磁場に垂直に配向することを知った。磁場中で泳動を行った結果、磁場によって配向しやすい大きなDNAほど、泳動速度に大きな減少があることから分かった。さらに、2重らせんと1重のDNAで泳動速度に対する磁場効果が大きく異なる傾向を捉え、磁気泳動分離の可能性と発展性を捉えた。

(5) 強い磁場をどのように応用するかを国内の研究者はもとより、アメリカ、フランス、オランダの強磁場施設の研究者は探っており、その競争は激しい。中国でも強い磁場を有する施設の整備が進んでいる。現段階では日本が半歩リードしているとはいえ、優位を保つためには新しい研究の展開が必要である。

2. 研究の目的

(1) 強磁場がDNAに及ぼすと考えられる力は、DNAの磁気異方性によるトルクと、勾配磁場下での磁気力であり、さらに磁場中のDNA電気泳動では電流と磁力線の向きが平行でない場合にローレンツ力が働く。本研究ではこれらの磁場効果を追求することにより、DNAの磁気力泳動の基本的なメカニズムを明らかにし、磁場

を用いた新しいDNAの分離手法を確立することを目的とする。

(2) DNAの磁場による配向挙動をシミュレーションにより理解する。

3. 研究の方法

(1) 13Tの強磁場を発生する現有の超伝導マグネットポア(100mm)にセットできる小型の電気泳動槽を作製した。静電力、磁場配向、磁気力、ローレンツ力による速度変化を効果的かつ精密に捕捉できる測定系を構築した。

(2) DNAの磁場配向による電気泳動速度の変化への影響と、磁気力による泳動速度変化を追及し、磁場配向と磁気泳動の独立性/関連性を定量的に見極めた。さらに、DNAの種類による磁化率と磁気異方性の違いを効果的に利用できる磁気力場を用いて磁気泳動を行い、新しいDNAの分離手法としての磁気力泳動の有用性を調査した。

(3) コンピュータシミュレーションにより弱磁性微粒子が静磁場および回転磁場下で磁場配向する様子を調査した。

4. 研究成果

(1) (20-2) 磁気力のみによってDNAを泳動し、分離を試みた結果、強い磁気力の働く高勾配磁場下では無電圧でもDNAが泳動するであろうとの予想に反して、 $B \cdot dB/dz = 3274 \text{ T}^2/\text{m}$ の磁気力場(2~3時間)でもDNAは磁気力のみでは泳動しなかった。また、10Hzの交流電場を補助的に用いても泳動しなかった。

磁気力は静電引力に比較して比較的弱いので、DNA泳動パターンに顕在化させるには支持体ゲルの濃度が低い方が有利であることをつきとめた。この知見により、低濃度極限の0.25wt.%アガロースゲルを支持体として採用し、96時間の磁気力泳動を5°CのTAEバッファを用いて試みた結果、 $B = 6.4 \text{ T}$, $|B(dB/dz)| = 420 \text{ T}^2/\text{m}^{-1}$ では泳動せず、 $B = 9.1 \text{ T}$, $|B(dB/dz)| = 583 \text{ T}^2/\text{m}^{-1}$ では1kb~15kbのサイズのDNAが分離せずに3mm程度泳動することを見出した。5T以上で配向が飽和していると考えられるので、磁気力DNA泳動について磁気力場の閾値が存在し、その値は $500 \text{ T}^2/\text{m}^{-1}$ 程度であることを明らかにした。

これより、磁気分離に直流電場を補助として用いる必要があることを明らかにした。

(2) 磁場と電場が平行な $B \parallel E$ 条件で、DNAに磁気力を作用させるように勾配磁場中で電気磁気泳動させ、磁気力場($B \cdot dB/dz$)をパラメータにして泳動速度に対する磁気力

効果を測定した結果、正負の磁気力は DNA を加速または減速することを明らかにした。

無磁場、均一磁場、勾配磁場中で DNA の泳動測度を調査した。泳動速度は、磁場外、均一磁場、正勾配磁場中の順で減少した。正勾配中での磁気力による泳動速度の減少はゲル濃度 1.5% で最大 15.8% に達した。

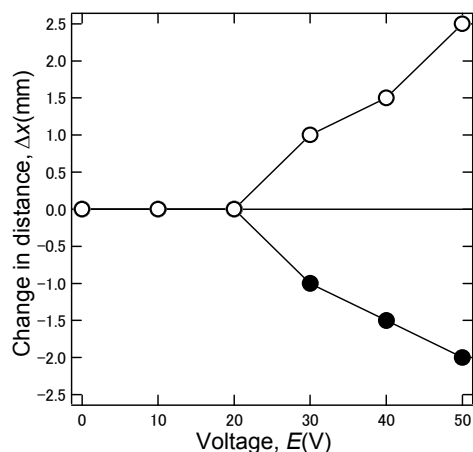


Fig. 1. 正負勾配磁場中での 10kbDNA の泳動距離変化の泳動電圧依存性。 $B = 7.1 \text{ T}$, $t = 2\text{h}$. $\pm 59.2 \text{ Tm}^{-1}$ の勾配磁場中では、DNA は勾配を下る際に (○) 加速され、登る際には (●) 減速する。磁気力効果は閾値 20V であらわれる。

(3) 磁場と電場を直交させた $B \propto E$ 条件で、 $\mathbf{B} \times \mathbf{E}$ 方向への働くローレンツ力による DNA 磁気分離を試み、以下の知見を得た。無磁場での電気泳動に比較して、磁場中での電気泳動では泳動速度が 70% まで低下した。同時に、ローレンツ力がかかる方向へ $\tan \theta = 0.10$ までの角度で軌道が変化した。ローレンツ力効果を顕在化させる泳動電圧閾値が 286~429 V/m の範囲に存在することを発見した。

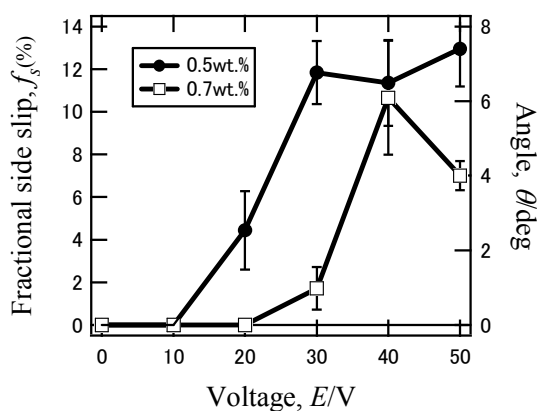


Fig. 2. 横ずれ率と泳動角度の泳動電圧依存性。電圧 $E = 40\sim 50\text{V}$ の泳動では、一定の方角に向かって泳動すると考えられる。

泳動角度 θ は、低濃度の 0.5%ゲルの方が大きかった。

磁場勾配や泳動電圧を制御することにより、磁場勾配による磁気力とローレンツ力を分離して観測する手段を確立したが、ローレンツ力を DNA 磁気分離に用いることが困難であると結論した。

(4) 電気磁気泳動における磁気力による DNA の軌道の変化を追求した結果、弱い横電場 ($E = 870 \text{ Vm}^{-1}$) と強い横磁場 ($|B(dB/dz)| = 583 \text{ T}^2\text{m}^{-1}$, $B = 9.1\text{T}$) が直交する $B \propto E$ 条件で、鉛直方向にかかるローレンツ力による DNA 泳動を無視できる閾値以下の電気泳動電圧条件で電気磁気泳動を行った。1 kb~15 kb のサイズの DNA を 5°C で 50 分間泳動した結果、大きなサイズの DNA ほど、また泳動電圧が低いほど軌道変化が大きく、磁気力のかかる方向へ $\tan \theta = 0.11\sim 0.28$ の軌道変化を観測した。

磁気力方向への磁気分離の有効性を調査するために、異形状 DNA の分離に関して、これまで用いてきた 2 本鎖直鎖状 (2 重螺旋) DNA と、一本鎖直鎖状 DNA (M13mp18, 7249 bp)、プラスミド環状 2 本鎖 DNA (pUC18, 2686 bp) の分離を試みた。一本鎖 DNA は 5 kb の、プラスミドは 2 kb の 2 本鎖 DNA と同じ泳動速度を示す。 $B \perp E$ 条件で電気泳動を行い、磁気力方向への泳動距離の泳動電圧依存性を測定した。クーロン力による泳動距離に対する磁気力泳動距離の割合は約 3% であり、磁気力効果が現れる電場強度の閾値は 182~364 V/m であった。前項(3)の結果と同程度であった。

(5) $B \perp E$ 条件で長周期交流矩形波電場を用いることで磁気力による DNA の分離を試み、磁場勾配を下る向きの DNA の泳動を観測した。泳動電圧と泳動時間を適切に設定することで DNA バンドに濃淡が現れ、DNA サイズによる磁気分離の兆候を得た。また、矩形波周期による泳動の様子の違いも観測された。

13 T 超伝導マグネットの勾配磁場位置を使用し、磁束密度 $B = 9.1 \text{ T}$ 、磁気力場 $B(dB/dz) = 583 \text{ T}^2\text{m}^{-1}$ となる位置に泳動槽を設置し、交流矩形電場を印加して、DNA の磁気力泳動を行った。最大の泳動速度 $429 \mu\text{m/h}$ は、電場強度電圧 0.926 V/mm 、支持体のアガロースゲル濃度 0.5 wt.% で得られた。この速度はゲル濃度 0.7 wt.% での実験の約 3 倍であり、電界強度 0.556 V/mm における速度の実験値の約 3 倍であった。また、磁気力場の値の減少に従い泳動速度も減少した。

長周期の交流矩形電場を補助的に使い、環状 DNA (pUC18, 26 kbp) と同じ泳動速度の 1.8 kbp 直鎖状 DNA の磁気力分離を試みた。混合した DNA を 20 時間泳動した後に観測した

ところ2つのバンドに分離した。泳動距離の比は3:2であり、それぞれのDNAがうける磁気力に対応した。

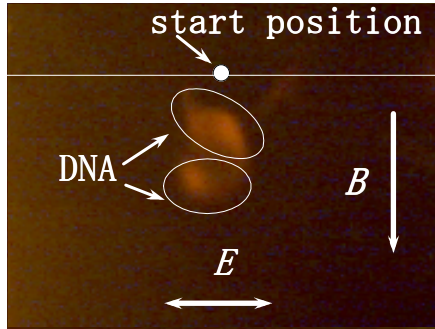


Fig. 3. 磁場中 DNA の分離

(6) 磁場中でのDNAの泳動モデルを提唱した。磁場配向に起因する抵抗増加による泳動速度低下と磁気力による泳動速度変化をパラメータに加え、 $B \perp E$ 条件での電気磁気泳動挙動をモデル化した。

$$v_E = \frac{qE}{R_v} \exp(-KC) \quad (1)$$

$$v_B = \sqrt{\frac{\chi_{DNA} - \chi_{TAE}}{\mu_0 R_i} B \frac{dB}{dz} V} \exp(-KC) \quad (2)$$

ここで式(1)と(2)はそれぞれ電場方向と磁場方向への泳動の終端速度であり、 q はDNAの電荷、 E は電場、 R_v は粘性抵抗、 K はDNAのサイズと形に依存する係数、 C はゲル濃度、 χ はDNAとTAEバッファの体積磁化率、 μ_0 は真空の透磁率、 R_i は慣性抵抗、 $B dB/dz$ は磁気力場、 V はDNA体積である。両式の比 v_E/v_B は100-1000程度と見積もられ、実験結果を再現する。

(7) 磁場配向に関して、磁場中でのDNAの速度変化は磁気力とDNAの磁場による配向による。磁場中での磁場配向の様子を計算機シミュレーションで評価した。試料回転による一軸配向の様子を調査した結果、条件を選べば低回転速度でも容易に磁場配向することを明らかにした。

異方的反磁性磁化率を有する物質の磁場による配向を計算機シミュレーションを行い、回転磁場中で異方的磁化率をもつ弱磁性粒子の配向挙動をする様子について計算機シミュレーションした。磁気エネルギーと室温の比に関連する量 α が15以上であれば、角周波数 ω が3以上の回転磁場により、換算時間 τ が3以下で配向することが分かった。通念以上に早い時間で配向が完了するという知見を得た。

3軸性異方的磁化率をもつ弱磁性粒子が回

転磁場中で配向する様子について計算機シミュレーションした。回転磁場の方向に応じて磁束密度が変化する楕円磁場では、磁化容易軸 χ_1 および困難軸 χ_2 を磁氣的に配向させることは比較的簡単であるが、中間的な磁化軸 χ_3 を磁場配向させることは困難である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Shun Ozawa, Daiki Kurosaka, Isao Yamamoto and Tadashi Takamasu, DNA Electromagnetophoresis under the condition of magnetic fields perpendicular to electric fields, Jpn. J. Appl. Phys, 査読有, Vol. 50, 2011, 1100238 (3頁) .

DOI: 10.1143/JJAP.50.070212

② Masuhiro Yamaguchi, Shun Ozawa and Isao Yamamoto, Dynamic behavior of magnetic alignment in rotating field for magnetically weak particles, Jpn. J. Appl. Phys, 査読有, Vol. 49, 2010, p. 080213 (3頁) .

DOI: 10.1143/JJAP.49.080213

③ Masuhiro Yamaguchi, Shun Ozawa and Isao Yamamoto, Rotational diffusion model of magnetic alignment, Jpn. J. Appl. Phys. 査読有, Vol. 48, 2009, p. 063001 (7頁) .

DOI: 10.1143/JJAP.48.063001

④ Masuhiro Yamaguchi, Shun Ozawa, Kyohei Ogawa and Isao Yamamoto, Rotational Diffusion Model of 2-Dimensional Magnetic Alignment, J. Phys: Conference series, 査読有, Vol. 156, 2009, p. 012007 (3頁) .

DOI: 10.1088/1742-6596/156/1/012007

[学会発表] (計25件)

① 島崎泰至, 小澤瞬, 今井大雅, 山本勲, 交流電場補助によるDNAの磁気分離, 第59回応用物理学関係連合講演会 (2012年3月25日, 早稲田大学)

② Masuhiro Yamaguchi, Shun Ozawa, Isao Yamamoto and Tsunehisa Kimura, Rotational diffusion model of magnetic alignment: general consideration and application, 4th Int. Conf. Magneto- Science (ICMS 2011), (2011年10月11日, 上海, 中国)

③ Shun Ozawa, Yasuyuki Shimazaki, Taiga Imai and Isao Yamamoto, 2D DNA electro-magnetophoresis aided by AC electric fields, 4th Int. Conf. Magneto-Science (ICMS 2011), (2011年10月10日, 上海, 中国)

④ Isao Yamamoto, Shun Ozawa, Yasuyuki Shimazaki, Chiharu Tanaka, Tadashi Takamasu, Application of high magnetic field to magnetic separation of DNA, Rotational diffusion model of magnetic alignment:

- general consideration and application, 4th Int. Conf. Magneto-Science (ICMS 2011), (2011年10月10日, 上海、中国)
- ⑤ 小澤瞬、島崎泰至、今井大雅、山本勲、交流電場補助による2次元DNA電気磁気泳動、第6回日本磁気学会年会(2011年9月27日、東京大学山上会館)
- ⑥ 小澤瞬、島崎泰至、今井大雅、山本勲、交流電場補助による2次元DNA電気磁気泳動、第72回応用物理学会学術講演会(2011年9月2日、山形大学)
- ⑦ 小澤瞬、黒坂大希、島崎泰至、山本勲、高増正、交流電場を用いた2次元DNA電気磁気泳動、第58回応用物理学関係連合講演会、講演奨励賞受賞講演(2011年3月24日、神奈川工大)
- ⑧ Shun Ozawa, Daiki Kurosaka, Chiharu Tanaka, Isao Yamamoto and Tadashi Takamasu, DNA migration under the magnetic field, Pacificchem2010, (2010年12月17日, Hawaii, USA)
- ⑨ 小澤瞬、黒坂大希、島崎泰至、山本勲、高増正、勾配磁場中における2次元電気泳動、第5回日本磁気学会年会(2010年10月22日、九州大西新プラザ)
- ⑩ 黒坂大希、小澤瞬、田中千晴、島崎泰至、山本勲、勾配磁場を用いたDNA電気泳動、第5回日本磁気学会年会(2010年10月22日、九州大西新プラザ)
- ⑪ 小澤瞬、黒坂大希、島崎泰至、田中千晴、山本勲、高増正、磁気力を用いた2次元DNA電気泳動、第71回応用物理学会学術講演会(2010年9月14日、長崎大)
- ⑫ 黒坂大希、小澤瞬、田中千晴、島崎泰至、山本勲、高増正、勾配磁場を用いたDNA電気泳動、第71回応用物理学会学術講演会(2010年9月14日、長崎大)
- ⑬ Shun Ozawa, Daiki Kurosaka, Chiharu Tanaka, Isao Yamamoto and Tadashi Takamasu, DNA Migration using Magnetic Force, The 4th International Workshop on Materials and Processing in Magnetic Fields (MAP4), (2010年5月11日, Atlanta, USA)
- ⑭ 小澤瞬、黒坂大希、田中千晴、山本勲、高増正、磁気力を用いたDNA泳動、第57回応用物理学関係連合講演会(2010年3月17日、東海大)
- ⑮ 山本勲、黒坂大希、田中千晴、小澤瞬、高増正、高磁場を用いたDNA電気泳動、第57回応用物理学関係連合講演会(2010年3月17日、東海大)
- ⑯ Masuhiro Yamaguchi, Shun Ozawa and Isao Yamamoto, Kinetics of Magnetic Alignment in Rotating Fields Studied by Rotational Diffusion Model, 3rd Int. Conf. Magneto-Science (ICMS 2009), (2009年11月29日、Nijmegen, Netherlands)

- ⑰ Shun Ozawa, Daiki Kurosaka, Chiharu Tanaka, Isao Yamamoto and Tadashi Takamasu, DNA Electroromagneticphoresis under the Condition of $B//E$, 3rd Int. Conf. Magneto-Science (ICMS 2009) (2009年11月27日、Nijmegen, Netherlands)
- ⑱ 黒坂大希、小澤瞬、田中千晴、山本勲、磁場中電気泳動におけるローレンツ力効果II、第4回磁気学会年次大会(2009年11月13日、信州大)
- ⑲ 小澤瞬、黒坂大希、田中千晴、山本勲、高増正、勾配磁場中におけるDNA磁気泳動、第4回磁気学会年次大会(2009年11月13日、信州大)
- ⑳ 山口益弘、小澤瞬、山本勲、回転磁場による磁気配向の動的挙動、第4回磁気学会年次大会(2009年11月13日、信州大)
- ㉑ Masuhiro Yamaguchi, Shun Ozawa and Isao Yamamoto, Magnetic Alignment with and without Diffusion, 日本学術振興会アジア研究教育拠点事業「材料電磁プロセッシングの世界拠点の構築」オープンプラスタ講演会(2009年9月18日、名古屋大)
- ㉒ 黒坂大希、小澤瞬、田中千晴、山本勲、磁場中DNA電気泳動におけるローレンツ力効果II、第70回応用物理学会学術講演会(2009年9月9日、富山大)
- ㉓ 小澤瞬、黒坂大希、山本勲、磁場中DNA電気泳動におけるローレンツ力効果、第56回応用物理学関係連合講演会(2009年3月30日、筑波大)
- ㉔ 小澤瞬、黒坂大希、山本勲、磁場中DNA電気泳動におけるローレンツ力効果、第3回日本磁気学会年次大会(2008年10月1日、弘前大)
- ㉕ 小澤瞬、黒坂大希、山本勲、 $B \perp E$ 条件下でのDNA電気泳動、第69回応用物理学会学術講演会(2008年9月5日、中部大)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 勲 (YAMAMOTO ISAO)
 横浜国立大学・工学研究院・教授
 研究者番号：40242383

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者