

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760648

研究課題名(和文)高精度・多検体同時解析可能な巨大DNAコーミング法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel molecular combing method for high throughput analysis of giant DNA molecule

研究代表者

栗田 弘史 (KURITA, Hirofumi)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70512177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では分子生物学・ナノエレクトロニクスなど広範囲での応用が期待される巨大DNA分子伸張固定および多検体同時解析を可能にする新規分子コーミング技術の開発を目的とした。従来の分子コーミング法では気-液界面の移動の際に分子が基板に伸張固定されていたが、本研究課題では油-液界面を用いることで周辺雰囲気に依存しない分子コーミングが可能であるかどうか検討した。その結果、これまでほとんど調べられていなかった現象である油-液界面移動に伴うDNA伸張固定の可能性が見出された。微細流路を組み合わせることで集積化は原理的に可能であり、本研究で提案する手法の実現可能性が示されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Molecular combing is a powerful method for aligning giant DNA molecules and used in a wide range of applications from molecular biology to nanoelectronics. The purpose of this study is development of a novel molecular combing method for high throughput analysis of giant DNA molecules. The conventional molecular combing is based on the force applied at the air/water interface. This study proposes to use the oil/water interface to stretch and immobilize giant DNA molecules. As a result, by combining the oil/water interface and a microfluidic channel, the proposing molecular combing was achieved. This combing method based on the novel concept is expected to be a new tool in high throughput analysis of genomic DNA.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：DNA伸張固定 分子コーミング

1. 研究開始当初の背景

分子コーミング (Molecular Combing) とは、溶液中に DNA 分子を浮遊させ、溶液に基板を浸して一定の速度で引き上げ、基板が気-液界面を通過する際に、DNA 分子を櫛 (Comb) 状に基板表面に伸張固定する方法である。この方法は、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる染色体マッピングの高解像化に貢献した。また、蛍光標識ヌクレオチドを用いて細胞内 DNA 複製を行い、その後その細胞からゲノム DNA 取り出し、分子コーミングにより伸張固定した DNA を観察すると、DNA 複製フォークの進行を可視化でき、進行速度が解析できる。さらには DNA の配列特異性を利用し、ナノ微粒子配列のためのテンプレートや、ナノエレクトロニクスにおける配線ツールとして DNA が注目されており (DNA ナノワイヤ)、分子エレクトロニクス領域においても分子コーミングが利用されている。分子生物学的手法としての分子コーミングのアドバンテージは、時間と労力を要する巨大 DNA の解析が DNA 1 分子レベルで容易に行えることである。しかし、この方法は複数の要因が DNA の伸張や固定される分子数に影響を及ぼす。また従来法では顕微鏡視野と比較すると桁違いに広い範囲に 1 種類の試料しかコーミングできないため非効率的である。上記の問題点を解決すれば分子コーミング法がより広範囲かつ実用性の高い手法になり得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、上記の欠点を解決すべく、油中微小水滴に着目した。その代表例がエマルジョンであり、Water-in-Oil エマルジョンは、油中に水溶液滴が分散している状態であり、微小液滴の一つ一つをマイクロリアクターとして利用できる。油中水滴の微小反応系には試料・試薬使用量の低減・反応ボリュームが小さいことによる反応時間の短縮といったメリットがある。分子コーミング法と組み合わせ、油中水滴に目的の DNA を封じ込めて分子コーミングを行うことで、同時に多検体の DNA を伸張固定することが可能であると着想した。微小な水滴を用いることで従来法と比較して検体を集積化できると同時に、水滴を油中に閉じ込めることで周辺雰囲気依存しない再現性の高い手法になり得ると考えた。従来は気-液界面の移動に伴う DNA の伸張固定であったが、本研究課題で提案するものは水-油界面の移動に伴うものであり、これまでにほとんど調べられていない現象であり学術的に興味深い。

3. 研究の方法

(1) 油中液滴と moving droplet 法による分子コーミング

研究代表者らは、数十  $\mu\text{l}$  程度の少量の蛍光

染色 DNA 溶液を斜めに傾けたガラス基板表面にスポットし、液滴を滑らせることにより気-液界面を移動させて DNA を伸張固定する方法 (moving droplet 法) を開発している (図 1)。この方法ではサンプル溶液量を従来法よりも低減できるだけでなく、滑り落ちた液滴を回収でき、再度分子コーミングに用いることができる。ここで用いる蛍光染色 DNA 溶液の代わりに、蛍光染色 DNA を内包した液滴を分散させたオイルをガラス斜面で滑降させて分子コーミングできるか検討した。

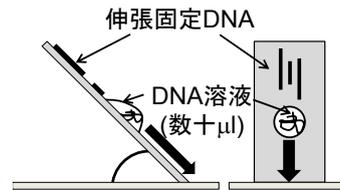


図 1: moving droplet 法による分子コーミング

(2) マイクロ流路中に形成した単一油-液界面の移動による分子コーミング

続いて従来分子コーミングでの気-液界面移動の代わりに、油-液界面移動によって分子コーミングが可能かどうかを検証した。そこで基礎的な特性が解析しやすいように、PDMS を用いて作製した微細流路内部に単一の油-液界面を形成し、マイクロシリンジポンプを用いてその界面移動速度を制御しつつ蛍光染色した DNA を伸張固定できるかどうか検討した (図 2)。界面移動速度、DNA 溶液特性 (DNA 濃度、pH、塩濃度)、油-液界面特性 (界面活性剤、界面への DNA の吸着)、オイル特性 (粘度、比重) およびガラス表面特性 (親水・疎水) をパラメータとして分子コーミングを行い、それぞれ蛍光顕微鏡観察により DNA 観察を行った。

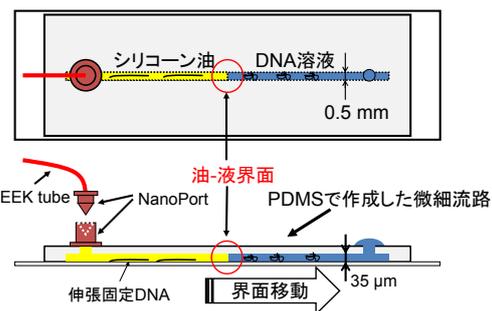


図 2: マイクロ流路中に形成した単一油-液界面の移動による分子コーミング

(3) 分子コーミング法の応用: 大気圧プラズマジェット照射による DNA 損傷の 1 分子解析

研究代表者らは、長鎖 DNA の鎖長を 1 分子レベルで計測して切断頻度を求める方法論を確立している。分子コーミング法の応用用途の開拓を目的として、大気圧低温プラズマ照射により水溶液中長鎖 DNA に導入される DNA 切断を、分子コーミングにより伸張固定した DNA 断片の 1 分子鎖長計測と簡便な数理モデルを利用して定量的に計測した。大気圧プラズマの医療応用に関する研究は急速に進展しており、分子レベルでの生体高分子への影響評価が強く求められているため研究対象として選択した。実験にはアルゴンプラズマジェットを用い、滅菌水に懸濁した DNA にプラズマジェットを照射した (図 3)。その後 DNA を精製・蛍光染色・ガラス基板上に分子コーミングで DNA を伸張固定し、蛍光顕微鏡で観察した。ここでは照射時に加える抗酸化剤の切断抑制効果に注目して実験を行い、水溶液中に生成されるラジカルによる DNA の切断を解析した。

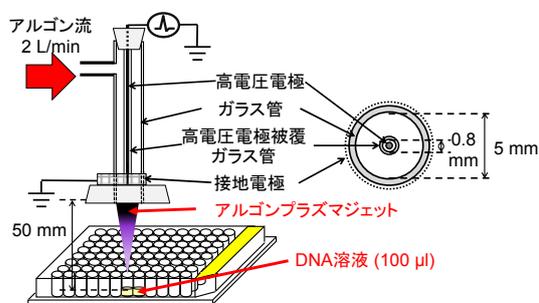


図 3: 大気圧プラズマジェットによる DNA 切断

#### 4. 研究成果

##### (1) 油中液滴と moving droplet 法による分子コーミング

図 1 に示す moving droplet 法で DNA 溶液の代わりに、DNA を内包した液滴を分散させたオイルをガラス斜面上で滑降させて分子コーミングを試みた。液滴サイズ・オイルの種類および粘度・ガラスの傾斜角・ガラスの表面の親水性などを変化させてさまざまな条件で実験を実施したが、いずれの条件においても液滴とガラス表面の接触面積が非常に小さく、本研究で検討した範囲では従来の moving droplet 法に対するアドバンテージを持った長鎖 DNA の伸張固定に適さないことが示された。そこで油-液界面移動によって分子コーミングが可能であるかどうか次に示すマイクロ流路を用いた方法で検証することにした。

##### (2) マイクロ流路中に形成した単一油-液界面の移動による分子コーミング

図 2 に示した方法で微細流路中に形成した界面の様子を図 4 に示す。ここでは流路全体を観察するため流路幅の狭い (50  $\mu\text{m}$ ) のものを用いている。このときマイクロシリリングポンプを用いて界面移動速度を制御できた。設

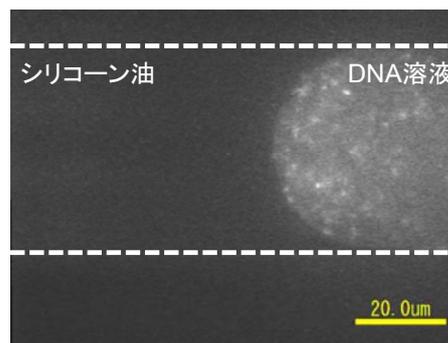


図 4: 油-液界面移動の蛍光顕微鏡観察  
点線はマイクロ流路を示す。このときガラス底面にフォーカスが当たっていないので固定化 DNA は観察されない。

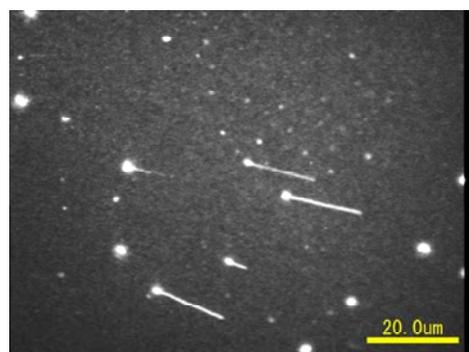


図 5: マイクロ流路中に形成した単一油-液界面の移動による分子コーミング

定流量を変化させると界面形状が変化し、流路断面積に応じた設定流量を定める必要があった。また設定流量が大きすぎると安定した流れが形成できず、界面が不安定となり DNA の伸張固定には不適であった。また流路幅を極端に狭くすると流量も小さくせざるを得なくなった。

図 5 にマイクロ流路中に形成した単一油-液界面の移動による分子コーミングで伸張固定された DNA の蛍光像を示す。ここでは  $\lambda$ DNA (48.5 kbp, 物理長約 16.5  $\mu\text{m}$ ) を試料として用いている。図に示すように油-液界面移動によって DNA を伸張固定できることが示された。従ってこれまでほとんど調べられていなかった現象である油-液界面移動に伴う DNA 伸張固定の可能性が見出されたことになる。また、集積化の観点で油中微小液滴の利用を考えていたが、微細流路を用いることでも集積化は原理的に可能であり、本研究で提案する手法の実現可能性が示されたと考えている。

##### (3) 分子コーミング法の応用: 大気圧プラズマジェット照射による DNA 損傷の 1 分子解析

図 6 に大気圧プラズマにより断片化した DNA を分子コーミングにより伸張固定して得られた蛍光像を示す。図は抗酸化剤としてグルコースを図中に示す濃度で添加した例

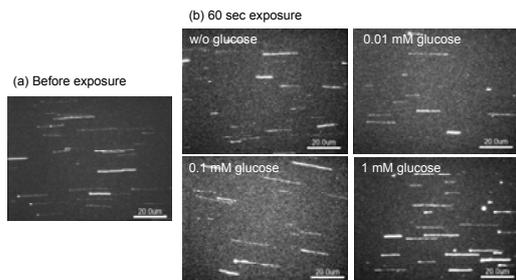


図 6: 大気圧プラズマ照射により断片化した DNA の分子コーミング

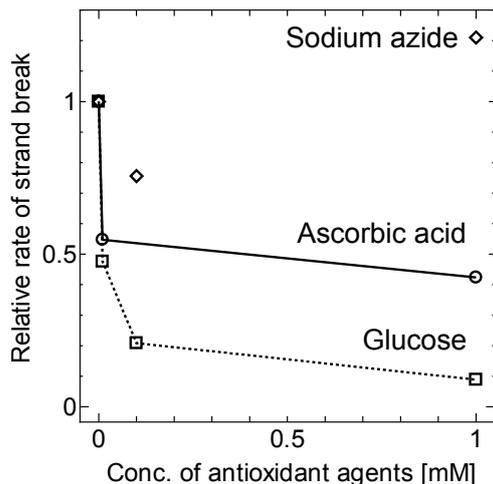


図 7: 各種抗酸化剤の DNA 切断抑制効果

である。この蛍光像を用いて DNA 鎖長を計測し、簡便な数理モデルを用いて切断頻度を計測した。グルコース以外に 2 種の薬剤に対して同様の実験を行い、添加剤なしに対する相対的な切断頻度を求めた (図 7)。照射時の DNA 溶液にアスコルビン酸やグルコースなど抗酸化効果のある物質を加えると切断頻度が顕著に低下した。このことから DNA の切断には OH ラジカル等の寄与が考えられた。そこで上述の ESR スペクトル強度と数理モデルで推定した DNA 回数との関係を調べたところ、強い相関関係が見られた。現在のところ OH ラジカルとの関連のみであるが、今後他の因子についても同様の測定を行うほか、知見の多い放射線照射との比較を進めることでプラズマ照射による DNA 切断のメカニズムに寄与できると考えられる。またプラズマ照射後の溶液での実験も進めている。

#### 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 10 件)

- ① Hirofumi Kurita, Mika Shimizu, Kaori Sano, Tomoko Nakajima, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Radical reaction in aqueous media injected by atmospheric pressure

plasma jet and protective effect of antioxidant reagents evaluated by single-molecule DNA measurement", Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, vol. 53, 05FR01 (4 pp.) (2014) DOI:10.7567/JJAP.53.05FR01

- ② Atsushi Asada, Hironori Aoki, Hirofumi Kurita, Angela Antoniu, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "A novel gene transformation technique using water-in-oil droplet in an electrostatic field", IEEE Transactions on Industry Applications, 査読有, Vol. 49, pp. 311-315 (2013) DOI: 10.1109/TIA.2012.2229452

[学会発表] (計 58 件)

- ① Hirofumi Kurita, Kaori Sano, Tatsuya Takata, Tomoko Nakajima, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Quantitative evaluation of DNA strand breaks induced by oxidative radicals based on single-molecule DNA measurement", The 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRRI 2014), Kyoto, Japan, 2014 年 3 月 24 日
- ② Hirofumi Kurita, Kaori Sano, Mika Shimizu, Tomoko Nakajima, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Analysis of DNA damage and cellular responses induced by atmospheric pressure plasma jet exposure", 8th International Conference on Reactive Plasmas and 31st Symposium on Plasma Processing, Fukuoka, Japan, 2014 年 2 月 3 日
- ③ Hirofumi Kurita, Tomoko Nakajima, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Analysis of radical reaction by non-thermal atmospheric pressure plasma exposure using single-molecule DNA measurement", 2013 JSAP-MRS Joint Symposia, Kyotanabe, Japan, 2013 年 9 月 17 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 外来物質導入装置および外来物質導入細胞の製造方法

発明者: 水野彰, 沼野利佳, 栗田弘史

権利者: 国立大学法人豊橋技術科学大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-271810

出願年月日: 24 年 12 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://ens.tut.ac.jp/electrostatics/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗田 弘史 (KURITA, Hirofumi)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70512177