

# 主 論 文 の 要 約

論文題目    サイズ排除型分離チップを用いた  
大分子量 DNA の高速分離解析に関する研  
究  
(Study on fast separation analysis of  
large DNA molecules by size exclusion  
chromatography-based microchip)

氏    名    東   直輝

## 論 文 内 容 の 要 約

本研究では、サイズ排除クロマトグラフィの原理を用いた電気泳動マイクロチップ(SEC型分離チップ)によって、大分子量 DNA の高速分離を実現することを目的としている。

多くの抗菌薬に対して耐性を獲得した細菌(薬剤耐性菌)のまん延が国際社会の脅威となっている。薬剤耐性菌は抗菌薬が多用される病院内において発生しやすく、感染が発生した場合、院内および院外への感染拡大を防ぐため、細菌の遺伝子型に基づいて、早急に感染経路を特定する必要がある。現状では、検体から採取した細菌からゲノム DNA 分子を抽出し、制限酵素を用いて特定の塩基配列の部分で切断した DNA 断片群について、サイズ毎に分離し、この分布を同定することで遺伝子型を判別する。一般的な DNA 分離解析技術はゲル電気泳動法であり、天然の高分子ゲルの網目構造を分子ふるいとして用いる。しかし、細菌の DNA 断片は 10 kbp 以上の大分子量 DNA であるため、この方法では分離に数日かかる点が問題である。そのため、感染対策の迅速化のため、高速な大分子量 DNA の分離解析技術の確立が求められている。

マイクロ化学チップは、化学分析に必要な操作を 1 つのマイクロ流路内に集積化した技術であり、バイオ分子を高速かつ高精度に解析できる。また、微細加工技術を用いて作製するため、構造や寸法の制御ができ、解析性能の設計が可能である。マイクロ流路内で DNA 分子を電気泳動させて解析する電気泳動マイクロチップを用いた DNA 分離解析では、ナノピラー、ナノスフィア、ナノウォールなどのナノ構造を分子ふるいとして用いた方法がある。しかし、これらは、DNA 分子を構造に“引っ掛けて”分離するため、断裂しやすい大分子量 DNA の分離においては精度が低下する可能性がある。また、電気泳動と誘電泳動を併

用したマイクロチップが提案されている。誘電泳動とは、不均一の電場を印加すると、粒子内の分極がアンバランスとなり、電場の強い方へと移動する現象である。DNA 分子の誘電率のサイズ依存性によって、誘電泳動力がサイズ毎に異なることを利用して分離する。この方法では、DNA 分子を構造に“引っかけない”で分離できるが、電気泳動と誘電泳動との併用は複雑であり、モデル化が難しい。

本研究では、サイズ排除クロマトグラフィの原理 (Size exclusion chromatography: SEC) に基づいたマイクロチップ (SEC 型分離チップ) によって大分子量 DNA を高速分離することを試みた。本原理は、DNA 分子の拡散係数がサイズによって異なることを利用しており、DNA 分子はランダムコイル状のまま分離部を泳動するため、大分子量 DNA の断裂が起こりにくい。また、小分子量 DNA の分離に関する理論モデルが提案されており、理論解析による分離予測が可能である。本チップの分離部は、障壁が多数配列した構造をしており、DNA 分子は電気泳動によって分離部を泳動しながら、ブラウン運動によって障壁間の隙間に確率的に進入する。小さい DNA 分子は、ブラウン運動が大きく隙間に進入する確率が大きいので、分離部の終端に設置した検出部までの到達に時間がかかる。一方、大きい分子は、早く検出部に到達する。DNA 分子を蛍光染色し、検出部において蛍光強度を測定すると、サイズに応じたピークが検出され、サイズ分布が特定できる。分離精度の評価の指標には、分離能 ( $= (\text{ピーク時間の差}) \div (\text{ピークの幅の和})$ ) を用いた。

SEC 型分離チップを用いた大分子量 DNA の分離には二つの課題がある。第 1 の課題は、検出のピーク高さの低下である。大分子量 DNA の分子の直径は数  $\mu\text{m}$  であるため、分子のサイズに合わせて障壁構造を大きくする必要がある。しかし、大きな障壁構造では、DNA 分子の泳動方向の幅も大きくなるので、検出時のピーク高さが低下する。第 2 の課題は、大分子量 DNA はブラウン運動が小さく隙間に進入しにくいので、ピーク時間の差が縮小することである。これらの二つの課題により、大分子量 DNA の分離は達成されていなかった。

本研究では、第 1 の課題を解決するため、ナノスリットを用いた DNA 分子の濃縮によってピークの高さを増加することを提案した。ナノスリットは DNA 分子の直径よりも小さな数十  $\text{nm}$  の隙間とする。電圧の印加によってナノスリット方向に泳動した DNA 分子は、ナノスリットを通過できないので、スリット手前にトラップされ、濃縮される。分離部に導入する直前に DNA 分子を濃縮することで、DNA 分子の供給量を増大させることができるので、検出時のピーク高さを増加できる。第 2 の課題を解決するため、理論解析によって最適な泳動電圧を算出することを提案した。まず、拡散係数の小さな大分子量 DNA が隙間に進入する確率を増大させるため、低電圧で泳動する。低電圧による泳動によって、分子の泳動速度が小さくなるので、隙間に進入できる時間が十分に大きくなり、進入確率が向上する。これにより、ピーク時間の差が増加し、分離能が向上する。しかし、電圧を低くしすぎると、分離時間が増加し、DNA 分子の自己拡散によって、ピークの幅が増加するので、分離能が低下する。したがって、分離能を最大にする最適な泳動電圧があることが考えられ、これを理論解析によって算出することとした。

まず、第1の課題の解決策であるナノスリットを用いたDNA分子の濃縮について、濃縮量を表すモデルを提案し、理論解析によって濃縮の実現可能性と濃縮量を最大にする最適な印加電圧の算出を行った。理論解析から、濃縮量が時間経過につれて飽和し、飽和時の濃縮量  $N(\infty)$  は、単位時間あたりにナノスリット手前に流入する量  $k$ 、ナノスリットを流出するのにかかる時間  $\tau$ 、ナノスリットを抜ける確率  $p$  を用いて  $k \cdot \tau / p$  で得られることを示した。ナノスリットを抜ける確率  $p$  は、DNA分子の熱運動エネルギーとエネルギー障壁の大きさの比としてボルツマン分布を仮定した。30 nm のナノスリットで、48 kbp のDNA分子を用いて、確率  $p$  の印加電圧と温度の依存性を実験的に検証し、確率  $p$  を定量化した。求めた確率  $p$  を用いて、理論解析によって飽和時の濃縮量  $N(\infty)$  を最大にする最適な印加電圧を算出した。ナノスリットを形成した濃縮チップを作製し、理論解析結果の妥当性を実験的に検証した。濃縮チップは、反応性イオンエッチングと集束イオンビーム加工を併用したプロセスによって作製され、30 nm のナノスリットを形成したチップの作製に成功した。理論解析によって算出した最適な印加電圧は、実験結果と概ね一致し、モデル式の妥当性と有効性が示された。また、最適な印加電圧によって、48 kbp のDNA分子を300秒で15倍濃縮することに成功した。

次に、第2の課題を解決するため、理論解析による泳動電圧の最適化を行った。小分子量DNAの理論モデルを基にして、大分子量DNAの分離を解析する理論モデルを提案し、分離能の泳動電圧依存性を検証した。理論解析に必要なパラメータを実験的に求めた。これらを用いて算出した分離能と泳動電圧の関係から、泳動電圧が20 V付近で分離能が最大になることを示した。

第1の課題の解決策であるナノスリットを用いたDNA分子濃縮と第2の課題の解決策である理論解析による泳動電圧の最適化の結果に基づいて、48 kbp と166 kbp の大分子量DNAの分離実験を行った。反応性イオンエッチングと集束イオンビーム加工の併用プロセスによって、分離チップを作製した。作製したチップを用いて、大分子量DNAの分離に初めて成功した。分離に必要な時間は3100秒であり、従来法のゲル電気泳動法の分離時間(数日)と比較して、高速に分離できた。この結果から、本研究で提案したSEC型分離チップによる大分子量DNAの分離の有効性と、ナノスリットを用いたDNA分子濃縮と理論解析による泳動電圧の最適化の2つの解決策の有効性を示した。

分離時間の更なる短縮をねらいとしてパルス電圧を用いた泳動を試みた。大分子量DNAはブラウン運動が小さいので、分離するためには隙間に進入できる時間を十分に大きくする必要がある。そのため、直流電圧による分離では、低電圧による泳動によってDNA分子を分離できた。しかし、低電圧による泳動では、DNA分子の泳動速度が小さくなるので、分離時間が長くなった。一方、パルス電圧による泳動では、隙間に進入できる時間は電圧オフの時間  $t_{\text{off}}$  と同等であるため、泳動電圧と独立に設定できる。そこで、電圧オフの時間  $t_{\text{off}}$  をDNA分子が隙間に進入できるほど十分に大きくしたまま、泳動電圧を大きく設定することで、分離時間の短縮につながると考えた。分離能と分離時間の  $t_{\text{off}}$  依存性の理論解析に

よって、分離の実現と分離時間の短縮の両方を満たす  $t_{\text{off}}$  の値を算出した。泳動電圧 100 V,  $t_{\text{off}} = 0.2$  秒のパルス泳動条件によって、48 kbp と 166 kbp の DNA 分子を 1600 秒で分離できた。これは、低電圧 20 V による分離の実験結果と比較して、半分程度の分離時間であり、パルス電圧による分離時間の短縮に成功した。

本研究によって、SEC 型分離チップによる大分子量 DNA の高速分離の実現可能性が示された。ナノスリットを用いた DNA 分子の濃縮と理論解析による泳動電圧の最適化は、大分子量 DNA の分離の課題に対する有効な解決策であった。本チップの分離原理は、ブラウン運動のサイズ依存性に基づいており、DNA 分子はランダムコイル状を維持したまま泳動する。すなわち、構造に引っかけないで分離できるので、大分子量 DNA の断裂が起こりにくい。さらに、本チップによる分離時間は、従来のゲル電気泳動法と比較して高速であった。したがって、SEC 型分離チップによる細菌の遺伝子型判別が確立されれば、従来のゲル電気泳動法に代わる高速、簡便な方法として、網羅的かつ迅速な薬剤耐性菌の感染対策につながる事が期待される。