

マイクロ加工技術を応用した深海用 DNA 精製デバイスの開発

A Microfabricated device for DNA purification toward realization of deep-sea in situ gene analysis

松 永 真 之*・福 場 辰 洋*・藤 井 輝 夫*

Masayuki MATSUNAGA, Tatsuhiro FUKUBA and Teruo FUJII

1. はじめに

深海環境には多様な微生物が棲息することが知られている。例えば、深海底の熱水噴出孔に棲息する硫黄酸化バクテリアは、熱水中の硫化水素等の酸化による化学エネルギーを用いて無機物から有機物を合成し、熱水付近における食物連鎖の生産者の役割を担っている。これらの微生物群集の挙動を明らかにすることは、深海環境の生態系を理解する上で重要な意味を持つ。分子生物学的手法に基づく遺伝子解析は、そのような微生物群集の詳細な解析に最もよく用いられる手法の一つである。従来、深海探査船等を用いてサンプルを採取し、これを船上もしくは実験室に持ち帰り、そうした解析を行うのが通常の解析手法である。しかしながら、採取から解析に至るまでのタイムラグやコンタミネーション、さらには深海環境と地上環境との違いによるサンプル変性の問題等が指摘されている。これらの問題を解決するために、サンプル採取から遺伝子解析までの一連のプロセスを自動化した、現場型の遺伝子解析システムの開発が強く望まれている。

遺伝子解析を行うにあたっては、その前処理として、DNA を微生物から取り出し精製する操作 (DNA 精製操作) を行う必要がある。例えば代表的な遺伝子解析手法の一つである PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いる場合、DNA サンプルは界面活性剤や塩類等の反応阻害物質を含まない状態にしておかなければならない。一般に DNA 精製においては、微生物細胞を破碎 (細胞破碎) した後に、DNA のみを選択的に取り出す抽出操作を行うと同時に、不要なタンパク質や細胞膜等の細胞残渣及び下流の遺伝子解析の際に反応を阻害しうるような物質の除去を行い、純粋な DNA サンプルを得る。高度な遺伝子解析を深海の現場で行うためには、これら一連の操作を自動的に行う手段を用意する必要がある。

一方、マイクロ流体デバイスは、化学・生化学に関する分析操作の自動化、機能の集積化、装置の小型化を実現しうる技術として、近年注目を集めている。この技術は、半

導体産業で培われたマイクロ加工技術を応用してデバイスを製作し、化学・生化学における反応や分析操作に応用する技術であり、 μ TAS (Micro Total Analysis Systems)、または“Lab on a Chip”と呼ばれる^{1,2)}。

本研究では、小型で深海調査船等に容易に搭載可能な現場型遺伝子解析システムの実現を目指し、マイクロ流体デバイスを用いて DNA 精製に必要な一連の操作を自動的に行う方法の研究を進めている。本稿では、ガラスビーズによる DNA の固相抽出をデバイス上で行うことによって、DNA 精製操作を実現する方法について述べる。

2. DNA 固相抽出・精製操作

タンパク質や細胞膜を含む溶液から DNA のみを抽出する手法は様々あるが、中でもシリカベースの樹脂やビーズを用いて DNA の固相抽出を行う手法³⁻⁵⁾は、従来の遠心分離機等の装置を用いて行う DNA 抽出法と比べて、操作が簡便であり、純度の高い DNA が得られる。またこの手法を用いれば、液相抽出では困難な塩類の除去などの精製操作や濃縮操作も合わせて行うことができ、操作後の DNA サンプルを直接遺伝子解析に用いることが可能である。

固相抽出操作は、以下のような手順からなる。1) 高濃度の陽イオンを含む水溶液中で、DNA をシリカ表面に吸着させる。2) タンパク質や細胞膜等の不純物等を洗い流す。3) 陽イオン濃度の低い水溶液中に DNA をシリカ表面から溶出させる。以上のようにして DNA の抽出が可能となる。図 1 に DNA 抽出デバイス上における抽出操作の概略図を示す。テーパ構造を有する流路に対して、流路幅の太い方から細い方へ向かって溶液を流し、ガラスビーズを流路内に保持することによって、上記の固相抽出操作を行う。ガラスビーズを入口ポートより流路内に導入し、テーパ構造で塞ぎ止める (図 1 B)。ガラスビーズを導入した後に、Tris-EDTA バッファ (TE バッファ) で初期洗浄を行う (図 1 C)。続いて、塩化ナトリウムを用いて高陽イオン濃度としたサンプル DNA 溶液を導入し、ガラスビーズに DNA を吸着させる (図 1 D)。その後エタノールを導入して洗浄を行う (図 1 E)。最後に TE バッファを

*東京大学生産技術研究所 海中工学研究センター

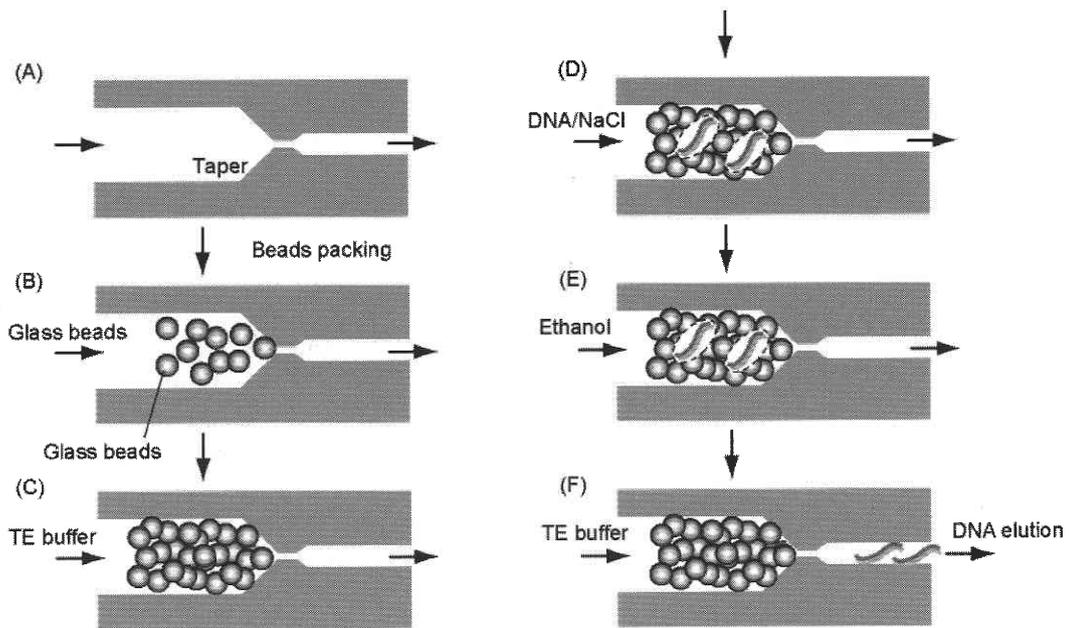


図1 DNA抽出デバイスを用いたDNA抽出プロトコル. A:マイクロ流路内のテーパ構造. B:ガラスビーズの流路への導入. C:ビーズを保持した後に, TEバッファで初期洗浄. D:塩化ナトリウム水溶液に溶かしたDNA溶液の導入およびDNAの吸着. E:エタノールによるガラスビーズの洗浄. F: TEバッファを導入しDNAの溶出・回収.

用いてDNAを溶出・回収する(図1F).

3. デバイスの設計と製作

本研究では, 前項で述べたガラスビーズ保持のためのマイクロ流路を有するチップ(マイクロ流路チップ)をシリコンゴム(polydimethylsiloxane: PDMS)を用いて製作する. マイクロ流路構造の具体的なデザインを図2に示す. 流路の深さは全て $200\ \mu\text{m}$ とし, ガラスビーズを充填する太い部分の流路幅を $500\ \mu\text{m}$ とした. また, 直径 $10\sim 30\ \mu\text{m}$ のガラスビーズを堰き止めるため, 細い部分の流路については, 一旦幅を $10\ \mu\text{m}$ に絞った後, 下流では幅 $100\ \mu\text{m}$ となる構造とした. 以上のマイクロ流路チップに加えて, DNA溶出の効率を上げるため, 加熱用のヒータと温度センサを設けたガラス基板(温度制御チップ)を製作し, 図2の点線部分が加熱されるようにマイクロ流路チップと貼り合わせて使用するものとした. 図3にヒータと温度センサのデザインを示す. 長方形のヒータ構造($2.5\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$)の近傍に温度センサを配置し, 点線で囲まれた部分を必要な温度に保つことが可能である.

図4にマイクロ流路チップと温度制御チップの製作工程を示す. マイクロ流路チップについては, ソフトリソグラフィ法を用いて, PDMS(DowCorning Asia Corp., Japan)製のチップに流路の溝を形成する. シリコン基板上に超厚膜の感光性樹脂(SU-8; MicroChem Corp., USA)をスピコート法により塗布し, 露光, 現像することによりマイクロ流路構造の反転型(凸型)を形成する(図4(A1, A2)). 続いて, PDMSの離型を容易にするため, CHF_3 プラズマ

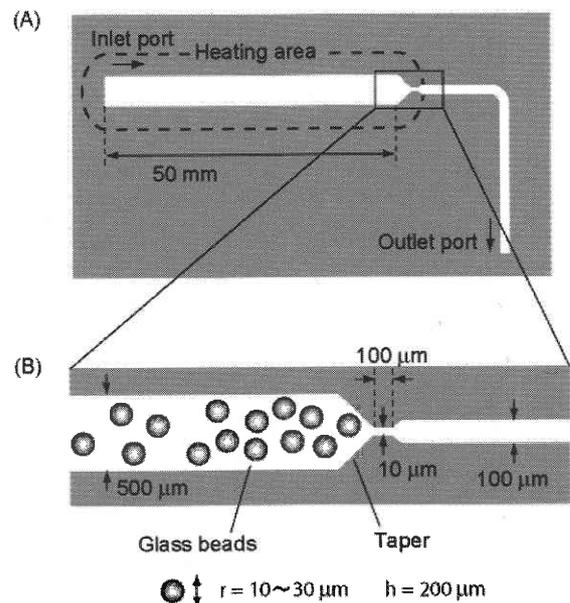


図2 DNA精製デバイスの概略図. A:ガラスビーズを流路に保持するためのテーパ構造. 流路深さはすべて $200\ \mu\text{m}$ である. 点線は, 温度制御チップを用いて温められる範囲を示している. B: Aでのテーパ構造の拡大図.

による表面処理を反転型に対しておこなった後に, 未重合のPDMSを流し込み, 150°C で15分間加熱して重合・硬化させる(図4(A3)). 硬化したPDMSを反転型から剥がし取り(図4(A4)), 入口と出口ポートにそれぞれ穴あけをした後に, ガラス板($35\ \text{mm} \times 65\ \text{mm} \times$ 厚さ $0.15\ \text{mm}$)にPDMSを薄くコーティングしたチップと接着してマイ

クロ流路チップを完成させる (図4(A5)). 製作した反転型は繰り返し利用可能であるため, 再現性良く, 低コストに流路構造を得ることができる^{6,7)}. 温度制御チップについては, フォトリソグラフィによってガラス基板上的ITO薄膜をパターンニングし, これをヒータ及び温度センサとして用いる (図4(B1, B2)). 出来上がったマイクロ流路チップと温度制御チップの位置をあわせ, 互いに貼り合わせる (図4(C)). 以上のようにして製作したデバイスを金属製のホルダに固定した後, 温度制御チップの配線を行う. 図5に製作した2種類のチップと完成したデバイス全体の写真を示す.

温度制御チップ上に形成したITO製の温度センサを, RTD (Resistive Temperature Sensor) として用いるために

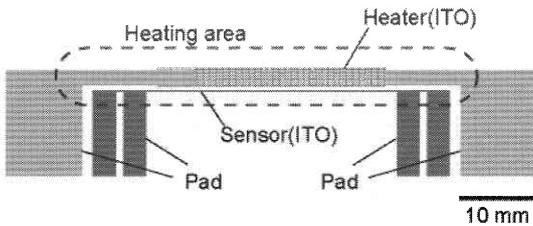


図3 DNA精製デバイスのヒータと温度センサとのデザイン. 溶液の加熱を行うために長方形のヒータ構造を製作し, その近傍に温度センサを配置する. 点線は, ヒータによって温められる範囲を示している. 薄膜抵抗体 (ITO) をヒータ (薄い灰色) とセンサ (濃い灰色) として用いるためにパターンニングした.

は, 抵抗値と温度計測値との間のキャリブレーションを行う必要がある. 製作した温度センサの抵抗値を 40, 60, 80, 100°C の温度条件下で測定したところ, 図6Aに示すようなデータが得られた. この抵抗値と温度の関係をプロットとした結果 (図6B) から, 換算式 ($R = 4.0T + 6213$, R: 抵抗値 [ohm], T: 摂氏温度 [°C]) を得た.

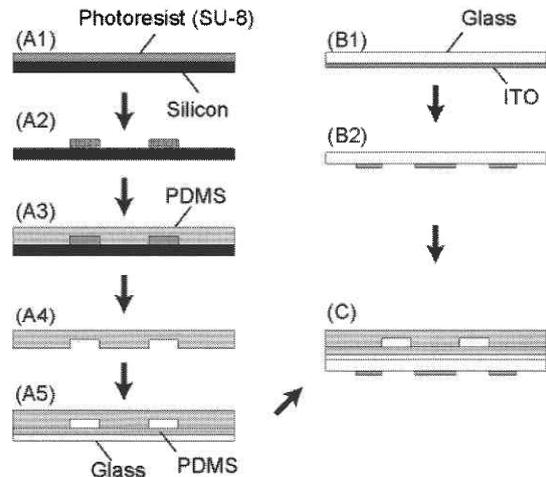


図4 デバイスの製作工程. A1-5: モールドイング法によるPDMS製マイクロ流路チップ製作. B1-2: フォトリソグラフィ技術による温度制御チップの製作. C: マイクロ流路チップと温度制御チップの組み合わせ.

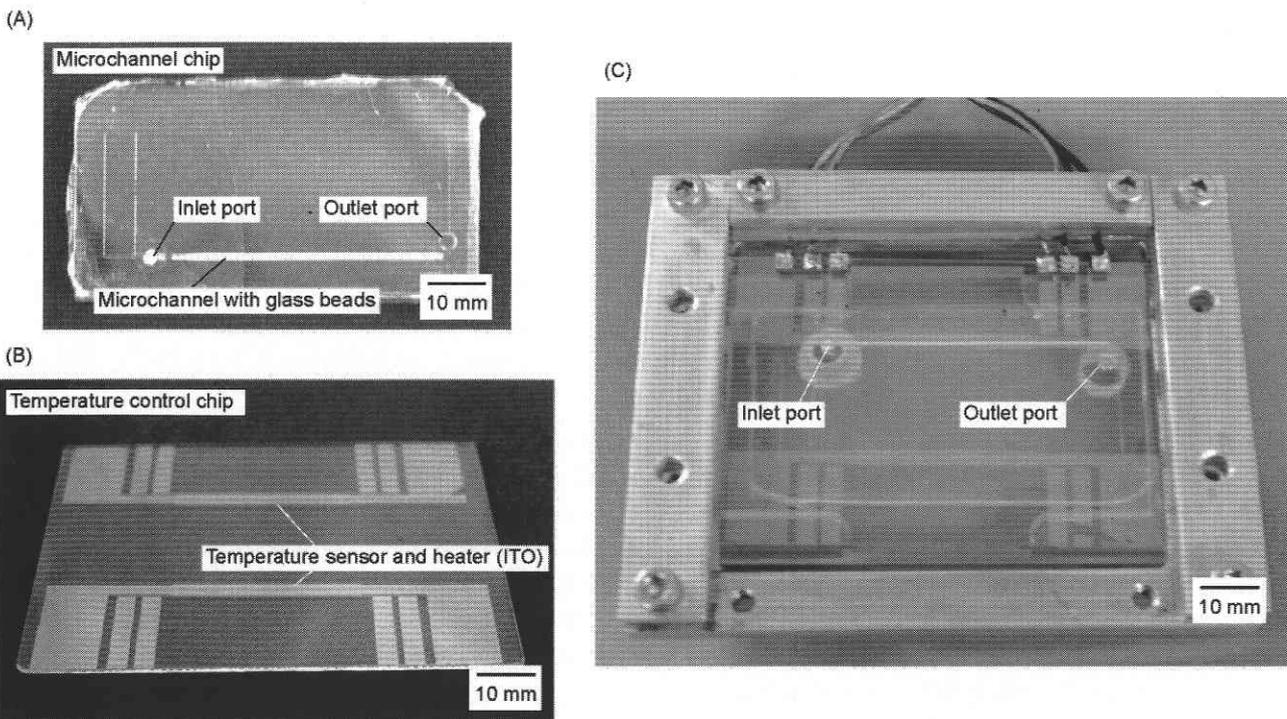


図5 DNA精製デバイスの写真. A: マイクロ流路チップ. B: 温度制御チップ. C: DNA精製デバイス. ジグを用いて2つのチップを組み合わせて温度制御チップに配線を行い, デバイスとした. なお温度制御チップには二セットのITO製ヒータと温度センサが配置されている.

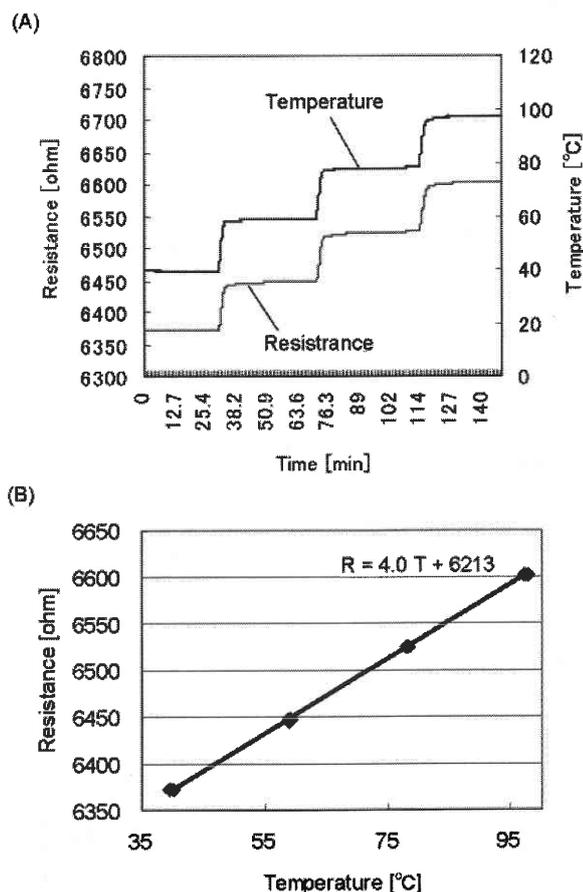


図6 温度制御チップのキャリブレーション結果。A：40, 60, 80, 100°Cの温度条件下での温度センサの抵抗値測定。B：Aでの結果による抵抗値と温度の換算式。

4. DNAの抽出・精製実験

製作したデバイスを実際に用い、以下のような手順でDNAの抽出・精製実験を行う。まずシリジポンプ(BeeHive; Biochemical Systems Inc., USA)を用い、流速10 $\mu\text{l}/\text{min}$ で流路内に直径10–30 μm のガラスビーズ(Polyscience Inc., USA)を導入する。流路表面へのガラスビーズの付着を防ぐため、ガラスビーズは10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液と混合した状態で流しこみ、ガラスビーズのみを流路内に塞ぎ止める(図7)。ガラスビーズの重力による沈下の影響を避けるため、この操作は、マイクロデバイスならびにガラスビーズを導入するためのシリジポンプを垂直に固定した状態で行う。なお、デバイス内部に保持されるガラスビーズの総量(総表面積)を見積もるため、ガラスビーズを導入する前後のデバイス重量を計測しておく。

ガラスビーズをデバイス内に導入した後、TEバッファ(Tris-EDTA buffer solution (pH 8.0), Nacalai Tesque Inc., Japan)で初期洗浄を行う。サンプルDNAとして1 μg の λDNA (Takara Bio Inc., Japan)を用い、ここではあらかじめ

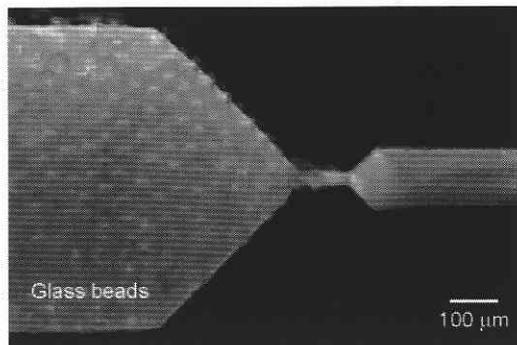


図7 ガラスビーズを充填した流路の顕微鏡写真。

め抽出条件に合わせて高陽イオン濃度溶液としてサンプル溶液の調製を行う。すなわち、サンプルDNAを塩化ナトリウム水溶液と混合し、DNAを含む5.4 M NaCl水溶液を100 μl 用意する。このサンプル溶液を50 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速でマイクロ流路内に導入し、出口ポートに排出された溶液はすべて除去する。これに続いて50 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速でエタノール100 μl を導入して洗浄を行い、同様に排出されたエタノールを除去する。最後にTEバッファ50 μl を50 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で流路内部に導入し、DNAの溶出操作を行い、出口ポートから排出されるDNAを含むTEバッファを回収する。ここでは、DNA溶出効率の温度依存性を確認するため、温度制御チップによって50°Cの温度条件でも溶出操作を行い、室温(25°C程度)での結果と比較する。アガロースゲル電気泳動によってDNA精製の確認を行うと同時に、分光光度計(Gene Spec I, Naka Instruments, Japan)を用いた吸光度測定によって、DNAの定量を行う。

5. 実験結果と考察

図8に精製されたDNAサンプルについて、アガロースゲル電気泳動および吸光度測定を行った結果を示す。ゲル電気泳動の結果(図8A)から、サンプルとして用いた λDNA は、ガラスビーズに一旦吸着され、その後、(1)室温、(2)50°C、の温度条件で溶出されることが確認された。またDNAを含まない溶液を用いた場合(N)には、DNAの溶出は検出されなかった。吸光度測定による結果(図8B)によると、溶出DNA濃度はそれぞれ(1)5.30 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、(2)6.95 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、(N)0.15 $\text{ng}/\mu\text{l}$ と計測され、DNA溶出時の溶液温度を上げることで、DNAの溶出量が増加することが確認された。DNAを含まない溶液を用いたにもかかわらず、DNAの溶出が見られた原因として、1)ガラスビーズ表面に残留していたDNAの溶出、2)DNA溶液に混入したエタノールもしくは塩化ナトリウムによる測定誤差、が考えられる。ここでは、吸光度測定から直接得られた値から(N)の値を差し引いて溶出DNA濃度(1: 5.15 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、2: 6.80 $\text{ng}/\mu\text{l}$)とした。得られるDNA溶液

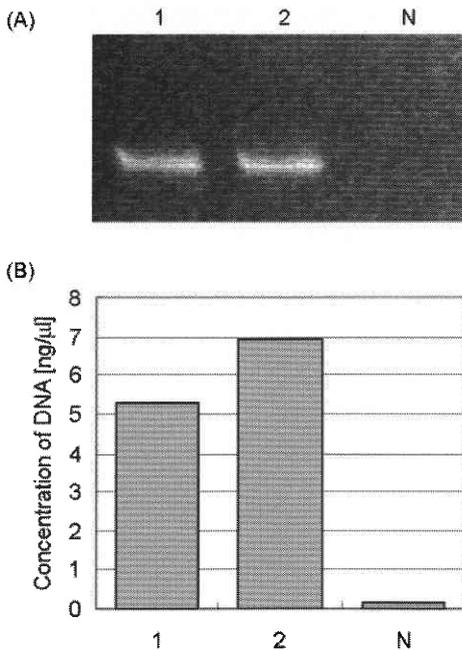


図8 DNA精製デバイスによる結果。ガラスビーズに吸着したλDNAを、(1) 室温、(2) 50°C、の温度条件で溶出した。NはDNAを含まない溶液を導入したときの結果である。A：アガロースゲル電気泳動写真。B：分光光度計を用いた吸光度測定によるDNA濃度。

の総量は50 μlであるため、DNAの溶出量は、(1) 258 ng、(2) 340 ng、と計算された。一般的にPCRに用いるDNA量は、数百ngであるので、遺伝子解析の前処理としては、十分な量のDNAの精製が実現された。

一方、マイクロ流路内に保持されたガラスビーズの総重量は、合計5つのデバイスについて計測を行い、その平均値は6.0 mgであった。これにより、流路に保持したガラスビーズの総表面積の平均は3.6 cm²と算出される。この値を用いれば、本デバイスにおいて使用したガラスビーズのDNA吸着効率は、94 ng/cm²と算出される。

本デバイスの応用としては、温度とガラスビーズの量に依存して精製DNAの回収量を変えることが考えられる。すなわち、精製後のDNAの用途に応じて流路設計を変え流路に保持するガラスビーズ量を変化させることで、必要に応じた量のDNAを回収することが可能である。また、今回DNAを含まない溶液を用いた場合にDNAの混入が見られたことについては、改善の余地がある。1) DNAの

溶出時間を長くする、もしくは、毎回の操作毎にDNA分解酵素を流す等の方法によりガラスビーズ表面に残留したDNAを取り除く、2) 洗浄液の濃度や量を変えることによって、DNA溶液への塩化ナトリウムやエタノールの混入を防ぐ、等の方法が考えられる。

6. おわりに

本稿では、深海における現場型遺伝子解析を可能とするための前処理を実現する目的で、マイクロ加工技術を応用したデバイスを製作し、そのデバイス上においてガラスビーズを用いたDNA抽出に加え、溶液交換を行うことによってDNAを精製する操作を実現した。その性能を評価したところ、PCR法による遺伝子解析に十分使用可能なサンプルの調製が行えることが明らかになった。深海の環境から直接採取したサンプルに対して遺伝子解析を行うためには、本稿で述べたデバイスの機能に加えて、サンプル中のサイズの大きな不純物を除去した後に、そこに含まれる細胞を溶解する操作を行う必要がある。今後は、そのような機能をデバイスに盛り込む方法を検討し、DNA精製に必要な全ての機能を有するデバイスとして完成させる予定である。

(2004年10月25日受理)

参 考 文 献

- 1) T. Laurell, J. Nilsson, K. Jensen., K. Jensen, D.J. Harrison, J.P. Kutter, "Proceedings of μTAS 2004 8th International Conference on Miniaturized Systems in Chemistry and Life Sciences," 2004.
- 2) T. Fujii, "PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications," *Microelectronic Engineering*, **61-62**, 907, 2002.
- 3) B. Vogelstein, D. Gillespie, "Preparative and analytical purification of DNA from agarose," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, No. 2, 615, 1979.
- 4) K.A. Melzak, C.S. Sherwood, R.F.B. Turner, C.A. Haynes, "Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions," *J. of Colloid and Interface Science*, **181**, 635, 1996.
- 5) R. Lakshmi, V. Baskar, U. Ranga, "Extraction of Superior-Quality Plasmid DNA by a Combination of Modified Alkaline Lysis and Silica Matrix," *Anal. Biochem.*, **271**, 109, 1999.
- 6) E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Bibuyck, "Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks," *Science*, **276**, 779, 1997.
- 7) D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, "Rapid Prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane)," *Anal. Chem.*, **70**, 4974, 1998.