

学位論文題名

細胞および DNA の電気泳動に関する研究

～自動細胞電気泳動装置の開発ならびに単色ラベルによる DNA 塩基配列決定～

学位論文内容の要旨

序言

電気泳動法は生化学やバイオテクノロジーにおいて最も頻繁に使用される分析技術の一つであるが自動化は遅れている。特にその検出・測定方式は電気泳動分析に特有の課題が多く、従来あまり研究されてこなかった。本論文は、筆者による細胞電気泳動（第Ⅰ部）および DNA シーケンシング電気泳動（第Ⅱ部）の検出・測定法についてのさまざまな提案と、実験によるその有効性の検証とをまとめたものである。

第Ⅰ部 自動細胞電気泳動装置の開発

第1章 研究の背景と目的

細胞を適当な電解質溶液中に懸濁させ、これに電界をかけると、細胞は表面のゼータ電位に比例した速度で移動する。このときの細胞の速度を測定するのが細胞電気泳動法である。この方法は表面電荷の探索や臨床診断等に応用されているが、その測定は大部分手動で行われているのが実情である。自動測定の試みとしてはレーザー・ドップラー法、画像処理法、回転格子型空間フィルタ法があるが十分な研究とはいえない。第Ⅰ部では、筆者が臨床応用を目的に開発した自動細胞電気泳動装置について述べる。

第2章 測定原理

本章では開発した装置の光学系と信号処理系について述べた。測定法は静止格子型空間フィルタ法である。この方法の特長は、光学系の安定性が非常に良いことと、光源がコヒーレントでなくてもよいことである。光源には初めて半導体レーザーを使用、ビームを絞る事によって測定視野を狭くし、泳動管内の速度分布に起因するスペクトルの広がりを防いでいる。また、細胞電気泳動で初めて、フーリエ変換式のデジタルフィルタを採用、外来およびデータ処理由来のノイズを除去している。

第3章 泳動セル

泳動セルでは、泳動電流のジュール熱による対流発生と電極部での電気分解による泡発生による泳動の乱れを防ぐため、電極をセロハン膜によって仕切り、また泳動管内径を0.7mmと細くしている。その結果、0.17Mのリン酸バッファー（導電率17.6mS/cm）に38V/cmまでの電位勾配をかけることが出来た。

第4章 測定結果および応用

本章では測定結果を示した。まず、本装置での各種粒子の測定値を手動装置の測定値と比べると、極めて良い一致を示した。また、混合物の泳動ではピークの分離や、混合比を変化させた場合の平均値の直線的な推移が確認された。

本装置は開発後、いくつかの研究室で応用研究に用いられた。この中で、細胞アフィノフォレシス、抗血清作用下のヒト赤血球の泳動、微小変化型ネフローゼ患者の血清の研究、腎移植患者の血清成分の分析の研究等の成果が上がっている。

第5章では第Ⅰ部で得られた結果を要約した。

第Ⅱ部 単色ラベルによる DNA 塩基配列決定

第1章 研究の背景と目的

DNAの塩基配列を決定する方法として、現在広く用いられているのはサンガー法とよばれるもので、これはその最終段階でアクリルアミドゲル電気泳動の泳動パターンを超高感度で検出することを必要とする。この検出には、従来ラジオアイソトープ法が用いられてきたが、これを、被曝のないレーザ蛍光式に代え、さらにサンプル投入後の泳動・バンド検出・配列決定までを自動化したものが蛍光DNAシーケンサである。

蛍光DNAシーケンサはその方式によって「4色素1泳動路法」と「1色素4泳動路法」の2つに分けることができる。このうち、1色素4泳動路法は、(1)高感度、(2)泳動しながらのサンガーフラグメントの観察が可能、という特長を持つ。しかし、(i)泳動ゲルの幅が約4倍必要なため光学系の設計が難しい、(ii)泳動路間の移動度差による誤差を生ずる恐れがある、という欠点がある。

一方、従来開発されたDNAシーケンサをその光学系よりみると、走査型、ガルバノミラーによる表面入射型、ゲル側方入射型、の3つに分類できる。このうち、走査系はS/Nとゲルの大きさの自由度の点で、1色素法シーケンサには最も適しているが、光軸ズレがおきやすいという問題がある。

筆者は、上記の背景に鑑み、1色素4泳動路法をもとに、新しく(a)走査光学系用の自動光軸調整機構と(b)泳動路間の移動度差を補正するアルゴリズムを考案し、それによって上記法の問題点を解決した。また、筆者はこれら(a)、(b)を搭載したDNAシーケンサを開発し、良好な配列決定成績を得た。筆者は更に、(a)に多少の変更を加えることで、これが蛍光性のガラスに対しても使用できることを確かめた。

第2章 走査光学系における光軸の自動調整

本章では筆者の考案した光軸自動調整機構について述べた。この光学系では、励起光を偏向させるミラーをコンピュータにより移動可能なように作られている。動作は、走査を止め励起光を動かしてその時の検出器の出力をみると、光軸が一致したときには光電子増倍管の出力が極大になることを利用、泳動前に走査の数点でこの極大にあたる励起光位置を検出、泳動中はこの値に従い走査に同期して励起光を動かすことで光軸ズレを防ぐものである。

考案した光学系を用いて、蛍光DNAプライマーの泳動信号を受信した実験では、220mmの走査幅に対して、光軸ズレを防ぎ、信号強度を一定にできた。

第3章 泳動路間の移動度差の補正

本章では筆者の考案した泳動路間の移動度差補正のアルゴリズムについて述べた。原理は短いDNAバンドの出現時刻のズレを利用して、泳動路間の移動度差を較正するもので、その特徴は一旦計算した較正係数で実際の信号を較正してみて矛盾の有無をチェックするルーチンを持っていることである。

このアルゴリズムを、M13mp18のシーケンシング信号に適用した結果、補正前に存在したピークの重なりが、補正後ではきれいに分離された。また、さまざまなゲル位置に投入した多くのサンプルでの補正結果では平均誤読率が1/5以下に減少した。

第4章 開発したDNA塩基配列決定装置の概要

本章では前記の光学系とアルゴリズムを搭載したDNAシーケンサについて述べた。このシーケンサは1色素法の特長であるサンプル濃縮無しの前処理や泳動中のバンド確認などの性能を示し、同時に走査光学系の特長である薄いゲルが使えることによる塩基長450程度までの生信号バンドの分離を示した。また、このシーケンサで投入量換算0.5 μ g (0.2pmol)のM13mp18をT7で前処理したものを分析したところ500塩基以上、投入量換算0.2 μ g (0.11pmol)のプラスミドpUC18をTthでサイクルシーケンシングしたところ400塩基以上まで正解であった。

第5章 蛍光を発するガラスに挟まれたゲルよりの蛍光検出

本章では第2章に書いた光軸調整機構をソーダガラスに挟まれたゲルに応用することについて述べた。ソーダガラスは大型の平板が容易に入手できるためゲルを挟む材料として優れているが、それ自身が蛍光を発するため、蛍光検出DNAシーケンサでは今まで用いられていなかったものである。

光学系の変更部分は、対物視野をきわめて狭くしたことと、光軸の一致を認識する基準を光検出器出力の極小（以前は極大）にしたことである。実験によると、M13mp18をT7処理した場合では2-3 μ gに、pUC18をTth処理（サイクルシーケンサ）した場合では1 μ gに、それぞれ鑄型量を増加することによって、サンプル濃縮なしに塩基長300以上のDNAバンドの信号が得られた。

第6章では第II部の結果を要約した。

結語

本論文全体として成果を要約した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 加茂直樹
副査 教授 栗原堅三
副査 教授 大塚栄子
副査 助教授 三宅教尚

学位論文題名

細胞およびDNAの電気泳動に関する研究
自動細胞電気泳動装置の開発ならびに単色ラベルによる
DNA塩基配列決

電気泳動分析法は生化学、バイオテクノロジー、臨床検査等において最も頻繁に使用される分析技術の一つであるが、測定方式に依存する特有の問題があり、従来研究がなされてなく自動化が遅れている。DNAシーケンシング電気泳動の自動化は現在必要とされているものであり、診断に細胞電気泳動を用いることが学問上有効であるが自動化が出来ないため、診断の実用化出来ないでいる。本論文は細胞電気泳動とDNAシーケンシング電気泳動の自動化に向けて研究を行なったものである。

本論文は3部からなる200ページの論文である。第1部は細胞電気泳動装置の開発を取り扱っている。細胞を適当

な電解質溶液に懸濁し電界をかけると、細胞はある速度で泳動する。泳動速度は細胞表面の荷電状態を反映するので、表面電荷の探索や臨床診断に用いられている。この測定は大部分手動で行なわれており、大変な労力である。第1章はこのような研究の背景と過去の自動化の試みを総括している。申請者は目的を臨床応用に限り、自動化を試みる事とした。このためには、(1) リンガー液のような高伝導度の電解質溶液中で測定できることが必要、(2) 自動的に泳動速度が算出できることは必要であるが、電気浸透流による補正を行なった真の値は必要ではなく、正常細胞とガン細胞との相対値を知ることが出来れば十分であること、(3) 取り扱いが容易なこと等を考慮しなければならない。第2章と3章では、申請者の考案した測定原理および泳動セルについて述べている。第4章において、満足すべき実験結果が得られた事を報告している。本装置の開発後、いくつかの研究室で応用研究がなされている。第5章では第1部の要約である。

第2部は単色ラベル法によるDNA塩基配列の自動決定装置に関するものである。蛍光シーケンサはその方式によって「4色素1泳動路法」と「1色素4泳動路法」の2つに分けることが出来る。1色素4泳動路法は、(1) 高感度、(2) 泳動しながらのサンガーフラグメントの観察が可能という利点を持つ。しかしながら、(1) 泳動ゲ

ルの幅が4色素1泳動路法に比べて、約4倍必要であるため、光学系の設計が難しい、泳動路間の移動度差による誤差生じる恐れがある、という欠点を持つ。第1章で、申請者はこのような研究の背景を述べ、1色素4泳動路法に内在する欠点を克服するためには、どのような改良が必要かを考察している。それらは、(1) 走査光学系用の自動光軸調整機構の導入と(2) 泳動路間の移動度の差を補正するアルゴリズムの確立であるとの結論となった。第2章では、申請者の考案した光軸の自動調節機構について述べてある。第3章は泳動路間の移動度の差を補正するアルゴリズムについて述べている。第4章では、第2、3章でのべた光学系とアルゴリズムを搭載したDNAシーケンサについて述べている。1色素法の特長であるサンプル濃縮なしの前処理や泳動中のバンド確認可能などの性能を示し、同時に走査光学系の特長である薄いゲルが使えることによる塩基長450程度以下までの生信号分離能を示した。また、このシーケンサで投入量換算0.5 μg (0.2 pmol) の M13mp18をT7で前処理をしたものを分析したところ500塩基以上、投入量換算0.2 μg (0.11 pmol) のプラスミド pUC18をTthでサイクルシーケンシングしたところ400残基以上まで正解であった。多数のDNAの塩基配列を決定するためには大きな泳動板が必要であり、ソーダガラスを使用せざるを得ないが、ガラスが蛍光を発する事が妨害すること

が予想される。ところが、第2章で述べた光軸調整機構に若干の改良を加える事で、ソーダガラスでも十分検出できることを第5章で示している。実験によると、M13mp18をT7処理した場合には2~3 μ gに、pUC18をTth処理（サイクルシーケンス）した場合には1 μ gに、それぞれ鋳型量を増加することによって、サンプル濃縮なしに塩基長300以上のDNAバンド信号が得られた。

第3部は成果の要約である。このように、申請者は表題の電気泳動法に於て、検出・測定法について様々な提案を行ない、実験によってその有効性を検証したものであり、博士(薬学)を授与するに十分であると認めた。