

学 位 論 文 題 名

Microfluidic Devices for Fraction Collection of single strand DNA Fragments

(一本鎖DNA 分取用マイクロチップに関する研究)

学位論文内容の要旨

Fraction collection of select components from a complex mixture plays a critical role in biomedical research, environmental analysis, and biotechnology. High-throughput and high-purity fraction collection is always required both in the application and research of gene express profile and lab-on-a-chip. Recently, it is attractive for the analysis of DNA fragments of interest from select polymerase chain reaction (PCR) products generated by high coverage gene expression profiling (HiCEP) methods. Few automated fractionation systems are currently established, as the development of methods to capture high-purity fragments of interest has been hampered by difficulties in cross-contamination of multiple collections, insufficient separation and fast mobility.

Fraction collection of single strand DNA fragments uses the electrophoresis theory, which applies an electric field to charged objects in a solution and makes them to get into motion in capillaries or microfluidic devices. Microfluidic devices allow us to undertake the separation, fraction collection, with very high efficiency of DNA molecules. (Chapter 2)

The use of microfluidic chips has attracted great attention as microchips offer several advantages including portability, speed to analysis, ability to multiplex, and compatibility with other techniques. The microfluidic devices for fraction collection of DNA fragments are designed using CAD and fabricated using photolithography technique. By setting up the optical tracking of DNA, preparing of DNA sample carefully, the experiment for fraction collection is run. With determination of the recovery by PCR and CE analysis, the resolution of fraction collection can be demonstrated. (Chapter 3)

In response to improve the resolution and reduce the cross-contamination in the collection of multiple target fragments with short running time, two methods were developed using lab-on-a-chip techniques in this thesis. The first method demonstrates a new structure and collection procedures for multiple target collection successively with an electrophoretic separation run. Thoroughly isolated extraction channels were used for each selected target to reduce the risk of cross-contamination between targets due to cross-talk of extraction channels. Three single strand DNA (ssDNA) fragments were isolated successively and collected successfully. Analysis on the influence of the delay on multiple collections demonstrated that high-throughput may be possible by further improvement of transfer. (Chapter 4)

The fraction collection of DNA fragments for studying gene expression, like HiCEP has also suffered from technical difficulties, including those related to the accurate capture of fast moving targets and pure collection under conditions of insufficient separation. The second method introduces a new concept of simultaneous space sampling for capturing targets in complicated situation, like overlapping fragments. Ten parallel extraction channels which covered 1.5 mm long sampling ranges were used to facilitate the capturing of fast moving fragments. Furthermore, the space-sampling extraction made

it possible to acquire pure collection, even from partly overlapping fragments that had been insufficiently separated after a short electrophoretic run. Three fragments differed in size by one base, were simultaneously collected. (Chapter 5)

We realized on-chip successive collections of selected ssDNA fragments using isolated extraction channels. Using isolated extraction channels decreases the possibility of cross-contamination from targets due to sharing the same extraction channel. We successfully solved technical difficulties using a novel simultaneous space-sampling method that realized the collection of select ssDNA fragments differing in size by just one base by using a separation length of only 70 μm . The use of a wide sampling range decreased the difficulty of capturing rapidly moving fragments. Moreover, it provided the capacity for high-resolution collection at insufficient separation lengths. This property is useful for high-throughput and high-resolution applications. Furthermore, this method provides a roadmap for the reconstruction of the separation to explore the separation mechanism. These fractionation-integrated electrophoretic microfluidic device will also provide an important reference and could become a new and powerful analytical tool for bioanalysis and related applications.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 澤 弘 明
副 査 教 授 平 田 拓
副 査 准教授 上 野 貢 生

学位論文題名

Microfluidic Devices for Fraction Collection of single strand DNA Fragments

(一本鎖DNA 分取用マイクロチップに関する研究)

近年、疾病の診断や予防を図るために信頼性の高い遺伝子診断技術の開発に期待が寄せられている。最も一般的な遺伝子診断技術としては DNA マイクロアレイが挙げられるが、蛍光色素の非特異的な吸着などによるエラーが多いことやハイブリダイゼーションを検出するため検出感度・再現性に限界があるなどの欠点を有する。放射線医学研究所の安倍真澄研究グループは、新しい遺伝子診断技術として、HiCEP (High Coverage Expression Profiling) と呼ばれる DNA の塩基配列情報の有無に関わらず、試料間で転写発現レベルに差異がある遺伝子をキャピラリー電気泳動により高い再現性と感度で網羅的に比較検討・検出する技術を開発した。この方法の最も優れた点は、DNA マイクロアレイのようにあらかじめ塩基配列を知っておく必要がなく、多数の発現した遺伝子を電気泳動により塩基数の違いに基づいて分離し、網羅的に検出できる点である。また、リアルタイム PCR を用いているため遺伝子の発現量を定量することができる。これらの特徴により、1.2 倍程度の比較的小さい遺伝子発現変化でも高精度に検出できるため、新しい遺伝子診断法として応用が期待されている。また、HiCEP 法は DNA 分取技術を利用すれば、必要に応じて目的遺伝子配列を解析することもできる。そのため、発現した遺伝子を疾患ごとにデータベース化することが可能になる。従来は、スラブゲル電気泳動を用いて HiCEP 産物を分離し、カッターナイフなどで目的 DNA 断片周辺のゲルを切り取って抽出し、PCR で増幅した後 DNA シーケンサーにより塩基配列を決定していた。しかし、この原始的とも言える遺伝子分取法では、分離能が低いために実験者によって結果が異なることや、その自動化も困難であることから、新しい DNA 分取技術の開発が求められていた。

放射線医学研究所の安倍グループは、キャピラリー電気泳動装置 (DNA シーケンサー) を改造して DNA を分取する方法を試みたが、流路の両端に高電圧を印加した状態で目的遺伝子を抽出する方法論の開発は困難を極めた。そのような研究背景から、マイクロ流路を自在に設計できるマイクロチップ電気泳動が新しい遺伝子分取法のキーテクノロジーとして期待され、放射線医学研究所安倍真澄研究グループと本論文の著者の指導教官である北海道大学電子科学研究所三澤弘明研究グループとの共同研究が 2007 年から始まった。本論文の著者は、博士後期課程に進学する以前、2008 年 2 月から、北海道大学電子科学研究所の学術研究員として約 2 年 2 ヶ月間、マイクロチップ電気泳動を用いて HiCEP 産物を高精度に分取する技術の開発に携わり、三澤弘明教授の指導のもと、長い分離流路 (30 cm) がもつ高い分離能力を利用して 1 塩基の分解能で目的の DNA 断片を分取する技術の開発に成功したメンバーの一人である。しかし、本技術は高い純度で DNA 断片を分取する方法ではあるものの長い分離流路を使用しているためゲルの充填時間や分離時間が長く、スループットが低いという問題があった。本論文の著者は、2010 年 4 月に博士後期課程に入学した以降、分取したい鎖長の異なる複数の 1 本鎖 DNA、マルチターゲット DNA、を高い純度で分取する方法論を確立するとともに、比較的短い分離時間で HiCEP 産物を 1 塩基の分解能で分取する

技術を開発することを目的に研究を進めた。

著者は、石英ガラス基板上にフォトリソグラフィ/ウェットエッチング法により幅 55 μm 深さ 25 μm のマイクロ流路を任意の設計で作製する技術の開発に成功した。マルチターゲット DNA を分取するために、目的 DNA 断片を分取するための抽出流路を分離流路に対して垂直に 3 本それぞれ独立に 155 μm のピッチで配置した。重要な点は、抽出流路に最適な電場を印加することにより目的以外の DNA 断片が抽出流路に混入しないように制御した点である。しかも、著者は物質移動(拡散・電気泳動によるマストランスファー)と電場の分布を考慮したシミュレーションにより最適な流路の設計や印加する電場の大きさをあらかじめ計算して実験に反映させることに成功した。これにより、3 つの抽出流路をそれぞれ利用して、94% 以上の純度で電気泳動クロマトグラムのピークが隣接していない段階的マルチターゲット DNA の分取を実現した。さらに、著者は比較的短い分離時間で HiCEP 産物を 1 塩基の分解能で分取する技術を開発するため、10 本の抽出流路を分離流路に垂直に 160 μm のピッチで配列した楕形抽出流路形状のマイクロチップを設計し、実際に 10 分という比較的短い時間で隣接するピーク(1 塩基差)を 84% 以上の純度で分取する方法論の開発に成功した。従来の分取方法は、段階的に DNA を分取することから、時間的に分取を行う方法であったが、本法の特徴は、10 本の分離流路を利用した同時空間サンプリングによる分取方法で、時間と空間の両方の効果を利用することにより短い分離流路でも短時間、且つ高分解能に DNA を分取することが可能になるといった特徴を有する。これにより、オーバーラップした隣接する 1 塩基差の DNA 断片を分取することが可能になり、時間と空間の両方を利用した独創的な遺伝子分取システムを構築することに成功した。従来の 30 cm 長の分離流路を用いた場合は、ゲルの充填時間に 1 時間以上、分離時間に 50 分を要した分取実験が、わずかそれぞれ 10 分以内に行うことが可能になったことも将来的な応用を考慮した上で重要な研究成果を上げたものと言える。なお、従来の分取方法では 26% 以下の純度でしか分取できなかったサンプルをわずか 10 分の分離時間で、分取後 PCR により塩基配列を決定することが可能な 84% という高い純度で分取することに成功したことは HiCEP のデータベース化を推進する上で有用な方法を導出したと評価された。

これを要するに、著者は、マルチターゲット DNA を段階的に高い純度で分取する方法論の開発のみならず、比較的短い分離時間で HiCEP 産物を 1 塩基の分解能で分取する技術の開発に世界で初めて成功した。これらの研究から得られた知見は、HiCEP 産物を網羅的に分取して塩基配列を決定することにより発現した遺伝子のデータベース化に資することのみならず、タンパク質や細胞の分取にも応用が可能であることから、生命科学の幅広い研究分野に大きく貢献するものと考えられる。よって著者は、北海道大学博士(情報科学)の学位を授与される資格のあるものと認める。