

電気泳動による線虫 *C.elegans* の染色体 DNA の分離 (CHROMOSOME)

代表研究者： 小林英三郎*¹

共同研究者： 石井直明*²、広川 健*³、長岡俊治*⁴

*¹ 城西大学 理学部、*² 東海大学 医学部、*³ 広島大学 工学部、*⁴ 宇宙開発事業団

Free flow electrophoresis of a nematode *C. elegans* DNA was carried out using a Free Flow Electrophoresis Unit (FFEU) on the spacelab of a space shuttle flight STS65/Colombia. The electrophoresis experiment were performed by payload specialists under microgravity. During the experiment, the house keeping data of the FFEU and the electrophoretic migration profiles by a UV detector were down-linked and monitored at POCC (Payload Operations Control Center) of MSFC (Marshall Space Flight Center, Alabama) according to the real-time down-link system. Separation profiles of migration markers observed as the three dimensional electropherogram (3DEP) were very stable in comparison with that obtained on the ground, indicating that disturbance of electrophoretic migration caused by thermal convection did not occur under microgravity. Furthermore, the 3DEP made it possible to assess the separation behavior of the samples and then to request the necessary sample fractions to be collected by payload specialists. Post-flight analyses of the component DNA of the fractionated samples revealed that the DNAs were separated effectively into two peaks: one of them contained seven folds of a DNA component estimated by a *sod-4* gene probe against an *unc-6* probe on linkage group III and X, respectively, after the amplification by the PCR method. The others were the same in that ratio. These results suggested that this separation technique was suitable for separating biological macromolecules such as DNAs, and the separation efficiency of the FFE under microgravity environment was very high.

実験の目的、意義

無坦体電気泳動 (FFE: Free Flow Electrophoresis) は、分離槽に充填物を使わずに電気泳動を行うので、低分子物質はもとよりタンパク質、核酸などのような高分子をはじめ、超分子や細胞顆粒などの巨大サイズの物質の分離には特に有用である。¹⁾ 近年、生体情報物質である DNA の単離は分子生物学の重要な技術になり急速に発展しており、解析対象の DNA 断片は 1M base pair を超えている。これら巨大 DNA の分離には Pulse Field Gel Electrophoresis により分離することが試みられているが²⁾、ゲル坦体を用いた電気泳動ではゲルマトリックスの空間サイズに限界があるので、染色体および染色体 DNA などの粒子や巨大分子を分離すること、および DNA 再構成実験や DNA 配列実験に必要な十分な量を得ることは困難である。一方、FFE は CFFE (Continuous Free Flow Electrophoresis) と呼ばれ、電気泳動原理に基づく分離方法の中で、大量処理にはもっとも適した方法である。³⁾ 我々はこの FFE の pH 勾配を形成する分離原理 IEF (Isoelectric Focusing)⁴⁾ を用い、染色体 DNA の巨大断片の大量分離を目的としている。地上では pH 勾配を形成させるため高電圧を与えると、分離槽内で起こる熱対流は避けることが出来ず、低電圧では長時間の泳動を余儀なくされる。これに対し微小重力環境下では熱対流がないので高電圧での電気泳動が可能で効果的な電

気泳動分離が期待出来る。

FFEでの分離試料として線虫(*Chaenorhabditis elegans*: *C. elegans*)染色体DNAを選んだ。線虫 *C. elegans* は動物の基本体制である生殖機能、神経系、筋肉、消化器官などを有し、細胞系統樹が完成している。^{5, 6)} この虫は雌雄同体が基本であるが、一方、X染色体不分離により雄が出現するため両者の掛け合わせにより遺伝的解析ができ、また雌雄同体からは劣性突然変異体が分離してくるため遺伝子地図の作成が容易である。*C. elegans* の染色体は雌雄同体で5AA+XOであり、また半数体DNA含量は100 Mbでヒトの1/30であるので、ヒューマングenom計画に先駆け、完全なDNA配列を決める適切な候補となるべき生体でもある。⁷⁾ さらに *C. elegans* の遺伝子の多くは広範囲にわたり哺乳類の遺伝子と類似していることも、この生物を先駆候補として取り上げる理由である。FFEによりDNAを分離する技術は、真核生物の完全なDNA配列決定および機能の解明に大きく貢献することになる。

宇宙で行う生命科学の実験は生物あるいは生体試料を地上に持ち帰り分析することが多い。宇宙での実験機会が少ないことを考慮すると、オンボードアナリシスにより得た結果を即座に解析し、そのプロジェクトの行われている間に研究の展開をはかることが必要である。さらに実施が間近い宇宙ステーションでの研究においても、その期間が長いことから、オンボードアナリシスでの結果を踏まえて研究の効率的な展開をはかる必要がある。FFE装置は微小重力環境を利用する効率の高い分離装置となるばかりではなく、オンボードアナリシスに対応できる生体試料の分離・分析の”キー・システム”として機能することが期待できる。

実験の方法と試料

無坦体電気泳動装置 (FFEU: Free Flow Electrophoresis Unit)

今回の計画で使用したFFEU装置は宇宙開発事業団が開発し、三菱重工業神戸造船所で製作されたもので、主な仕様を次に示す。

FFEUタイプ	泳動槽内寸法	供給電力	分画本数
FM (Flight Model)	100 × 60 × 4.0	600 V × 100 mA	60
BBM (Bread Board Model)	100 × 60 × 1.0	600 V × 100 mA	60

FFEU/FMは電気泳動槽厚を4 mmとし、電気泳動槽器壁で生じる電気浸透流を軽減すること、および電気泳動分離緩衝液の層流を安定にすることを目的に、無坦体電気泳動原理の理想に近づく装置として設計されている。しかしながらこの装置を地上で使用するとジュール熱発生による熱対流が大きく、効果的な分離実験を行う電圧での電気泳動を行うことが出来ない。地上で行う電気泳動最適条件を検討するための基礎実験には電気泳動槽厚が1 mmの熱勾配が小さいBBMを用いた。またFMは飛行実験搭載実機であるが、電気泳動実験計画の最終検討および飛行後実験にも使用した。

3D エレクトロフェログラム (3DEP: Three Dimensional Electropherogram)

FFEU装置は電気泳動槽下部に電極間方向と平行に512チャンネルの吸光度モニター(254 nm)を装備しているため、電気泳動分離挙動を10秒置きに観測することができる。FFEUから発生する信号はFFEUサブユニットのディスプレイ上で、X軸をモニターチャン

ネル方向(分取ポート番号5から55に対応)、およびY軸を吸光度としたエレクトロフェログラムとして表示されるが、10秒置きにリフレッシュされるので連続した電気泳動の状態変化を観察することは困難であった。

この問題を解決し、電気泳動状態をより詳細に解析するために新たに3DEPプログラムを開発した。⁹⁾ このプログラムはFFEUサブユニットに用いられたX軸、Y軸に加え10秒ごとのエレクトロフェログラムをZ軸(時間軸)とした3次元グラフで表わしたエレクトロフェログラム(3DEP)を表示するものである。無加電および加電状態のサンプルの流下安定性を初めとし電気泳動状態の過渡現象、サンプルの分離状況など時間的変化をもとに電気泳動を的確に判断することができる。3DEPはFFEU/FMおよびFFEU/BBMを使用した地上実験で検証し、飛行実験時のPOCC(Payload Operations Control Center)において、スペースシャトルからダウンリンクされるデータをリアルタイムで受信し3DEPに表示する速度を維持できるものとした。プログラムはノート型パーソナルコンピュータ NEC/98 Note nx/c上で実行し、これをFAM(FFEU Absorption Monitor)として用いた。ダウンリンク・データサンプリングから3DEP表示までは1.8秒とデータ間隔10秒以内に納まり、余剰時間でデータのハードコピーを得ることができるなど、今回の目的に十分適合するものとした。さらにこのシステムは小型なポータビリティが高いコンピュータであり、プログラムもMS-DOS上で作成してあるので、他の支援ソフトともデータの互換性が高く、オンボードアナリシスに対応するものである。

宇宙実験用DNAサンプルおよび泳動緩衝液の調製

今回のスペースシャトルの飛行計画は13日間と長期にわたるので、全ての装置、器具、および溶液は無菌的扱いをし、さらに溶液は気泡および溶存気体の除去を行った。

線虫のDNAは0.5g(wet wt.)の成虫をProtease K、phenol/chloroform、RNaseで順次処理し、エタノール沈殿を行いTE緩衝液に溶解した。電気泳動用DNAサンプルにはマーカーであるアデノシンとNADPをそれぞれ5mM加えた。DNAの終末濃度は、33.3 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、pHは6.05、電気伝導率は440 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ であった。DNAサンプル溶液3mlを脱気後サンプルカセットに充填し、2本を宇宙実験用とした。分離回収用のセパレーションチューブ30本には、DNase阻害剤である10mM EDTAを0.5mlずつ充填した。電気泳動分離用緩衝液は0.01% HPMCおよび0.3% ampholite(Pharmalite 2.5-5)からなり、pHは3.87、電気伝導率は87 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ であった。この溶液1.5Lをデガッサーで脱気した後メンブランフィルターを通しバッファタンクに充填した。サンプルカセット、セパレーションチューブおよびバッファタンクはスペースシャトル発射17時間前に搭載した。

DNAの検出と分析

無担体電気泳動に用いるDNAサンプルは低濃度であり、分離されたものは通常の方法では検出が困難であるのでPCR(polymerase chain reaction)法を用いた。DNA組成を評価するため2種類のDNAプローブであるリンケージグループIIIの*sod-4* gene(Cu, Zn-superoxide dismutase)およびリンケージグループXの*unc-6* gene(*netrin*)^{9, 10)}を使用した。DNAサンプル450 μl をエタノール沈殿で濃縮後、20 μl のTE緩衝液に溶解した。この溶液の2 μl を30 μl のPCR反応溶液を用いThermal Sequencer(TSR300; IWAKI, Funabashi, Japan)で増幅した。PCR生成物は水平ゲル電気泳動装置(Mupid-2, Cosmo-Bio, Tokyo, Japan; gel size: 52 \times 62mm)を用い1.5%のagarose gel(H14 agarose gel; Takara, Shiga, Japan)で泳動を行った。このゲルをエ

チジウムブロマイドで染色後、蛍光発色像を撮影(665 Positive/Negative film; Polaroid)した。ネガティブフィルムを ULTRO-SCAN 2202 Laser Densitometer (LKB Co. Ltd.)で走査し、参照サンプル DNA との濃度比から PCR 生成物の DNA 量を推定した。

電気泳動

無担体電気泳動装置を用いた分離原理には ZE (Zone electrophoresis)、FSF (Field step focusing)、ITP (Isotachopheresis) および IEF (Isoelectric focusing) の各方法があるが、今回は IEF の原理に基づく分離法を用い染色体 DNA の分離を目的とした。

無担体電気泳動装置 VAP11 を使用し、両性電解質の混合物であるキャリアーアンフォライトによる pH 勾配形成能を調べたところキャリアーアンフォライト濃度は 0.3 % が妥当であると判断した。この条件を用い、FFEU/BBM による DNA の分離実験を行ったが、電気泳動槽および検出器周辺に気泡が滞留し、泳動緩衝液の流れが定常的にならないことが判明した。これは電気泳動槽の壁の溶媒への濡れ性が悪いためと判断し、界面活性作用がある HPMC (Hydroxypropylmethyl cellulose) を 0.01 % 使用し濡れ性の改善を行った。また HPMC は電気浸透流を低減するので FFEU/FM を用いる飛行実験でも使用することにした。

FFEU/FM 利用実験地上予備実験

IML-2 計画で実施する飛行実験では FFEU 分取ポート数 60 に対し、搭載される冷凍庫に収納制限があり、持ち帰ることができる分取容器は 30 分取ポートに相当する 30 本である。地上実験と飛行実験では電気泳動分離挙動が異なることが予測されるので、持ち帰る分画を FFEU の吸光度データダウンリンクデータで判断する必要がある。FFEU の検出器感度は低いのでマーカーとして NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) およびアデノシンを用い DNA の泳動挙動を判断した。

一方、飛行実験はクルータイムが限られているので DNA の電気泳動実験は約 80 分となった。緩衝液流下速度は 3 cm/min およびサンプル流速 2.5 cm/min に固定し、泳動電圧は 200 V および 300 V の 2 条件で予備実験を行った結果から、より分離状態が良好な電圧条件を選ぶことにした。実験 1 ではサンプルを最初に無加電の条件で流下し、その後泳動電圧 200 V、無加電条件、および泳動電圧 300 V の条件で順次電圧条件を変え泳動電圧に依存する分離挙動を判断することにした。実験 2 では実験 1 で選択した分離状態が良好な泳動電圧で加電し、槽内が温度平衡になった後サンプルを流下し電気泳動を行い分離状態を確認する事、実験 3 では予備実験である実験 2 と同じ条件で電気泳動を行い 3DEP でのマーカーの泳動挙動から DNA が含まれる分取ポート 30 箇所を選び回収する計画をたてた。(図 1)

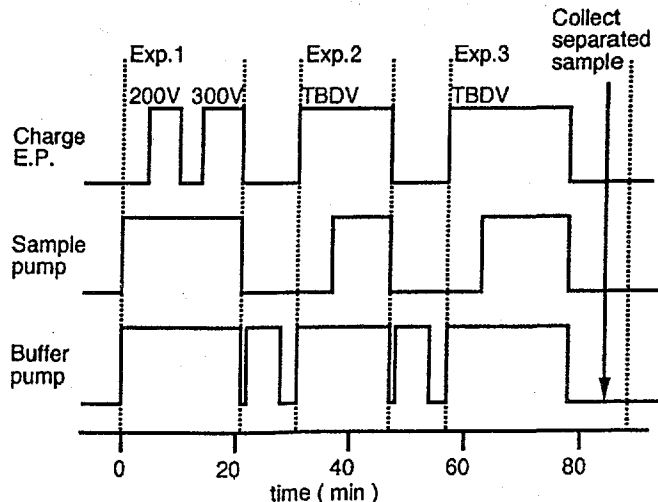


図 1 Schematic operation of the separation of *C.elegans* DNA by FFEU on spacelab. TBD V in experiment 2 and 3 should be determined after judging the electrophoretic behavior of the experiment number 1.

この実験計画は FFEU/BBM を用いその一部を検証した後、 FFEU/FM を用い地上実験として検証した。実験 1 の電気泳動電圧の条件検討(図 1 Exp.1)の結果を図 2 に示す。無加電では比較的安定した流下状態を示すが 100 秒後に電気泳動電圧を 200 V とすると NADP は

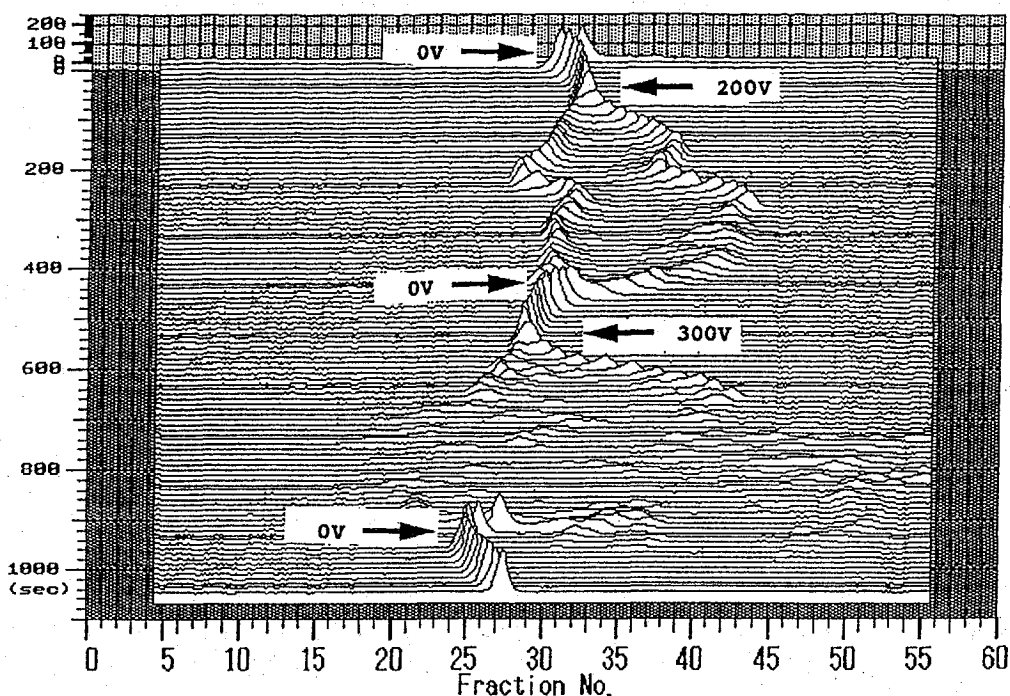


図 2 3DEP of DNA sample by FFEU on the ground. Electrophoresis was carried out on buffer flow rate 3 cm/min and sample flow rate 2.5 cm/min and migration voltage was changed at 200 V and 300 V indicated in the figure, respectively. The DNA sample contained *C. elegans* DNA and also contained 10 mM of adenosine and 10 mM of NADP as markers. The buffer for electrophoresis consisted of 0.01 % HPMC and 0.3 % ampholite (Pharmalite 2.5-5).

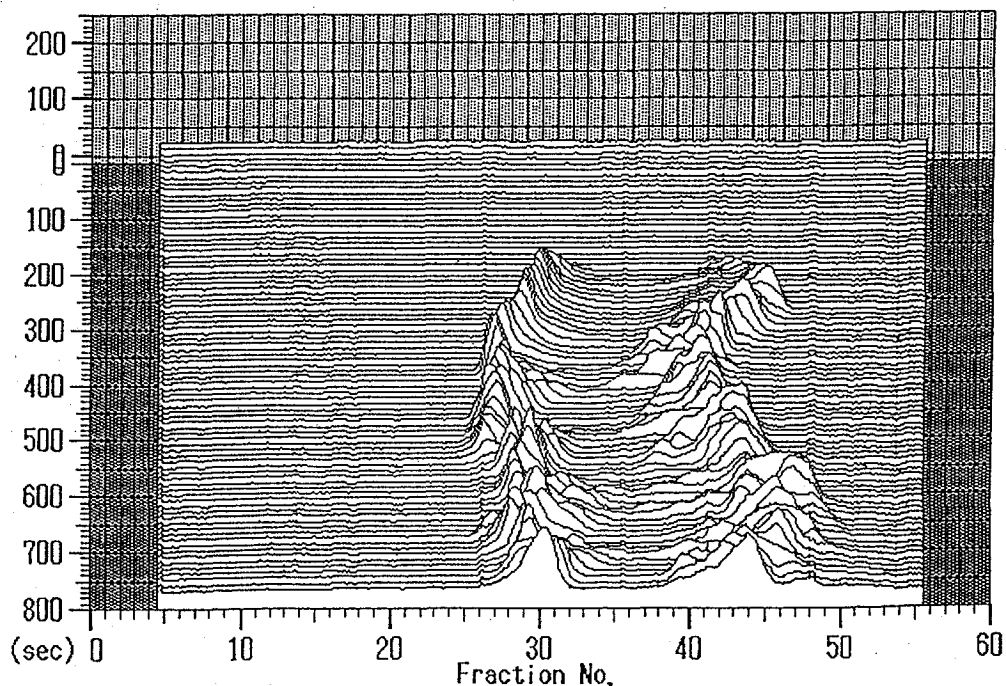


図 3 3DEP of DNA sample by FFEU on the ground. Electrophoresis was carried out on buffer flow rate 3 cm/min and sample flow rate 2.5 cm/min and migration voltage was 200 V. Other experimental conditions are the same as described in the legend to Figure 2.

陽極に移動し、アデノシンは殆ど移動せず約 90 秒後に定常状態が見られたがその後 200 秒間はやや平行移動する現象が見られた。400 秒後に通電を停止すると NADP およびアデノシンの両ピークは中央に戻り、再度 300 V に加電すると 200 V の場合と同様にマーカーピークは両極に向かって移動するが、全体にピークの形状は乱れ泳動挙動は明確ではなくなった。実験 2 は 200 V で 6 分間加電し電気泳動分離槽を熱的平衡とした後にサンプルを流下した。(図 3) NADP およびアデノシンの両マーカーの吸収が広がり全体が不安定であった。これらの泳動状態が不安定であるのは熱対流によるものと思われるが、飛行実験では微小重力下であり熱対流がないので実験 1 の 300 V の条件でもより安定した電気泳動的分離が行われると期待できる。実験 3 は実験 2 と同じ条件で電気泳動を行いブランジャーポンプが最大量を引ききるまでの時間である 21 分後に泳動を終了した。この泳動パターンは実験 2 と同様であり、マーカーの泳動挙動から DNA は最大でも分取ポート番号 25 から 54 までの範囲内に泳動していると考えられるのでこれを採取し、 -40°C で保存した。またサンプルインジェクションポートの確認のため無加電で実験を行いメインピークが 33 番であることを確認した。このサンプルも分画したサンプルと同様に保存し、実験の方法と試料に述べた PCR 法により増幅し DNA の検出を行った。実験 3 で得られたものは 39 番が最大値を与えたが、46 および 47 番にも若干の DNA が検出され、また無加電実験で得られたサンプルは 33 番に DNA を検出した。

これらの結果から今回の電気泳動実験で採取すべき DNA 分画は 2 つのマーカーに挟まれた部分を回収すればよいことになり、持ち帰ることが出来るセパレーションチューブの本数 30 本に収まる。飛行実験ではリアルタイムでダウンリンクされるデータの 3DEP からマーカーの電気泳動挙動を判断し、回収すべき番号を要求出来る事になった。

ここで実施した FFEU/FM 利用実験に基づき飛行実験の最終計画を決定した。

飛行実験の結果

実験装置の修理に基づく飛行実験の計画変更

今回の飛行実験で大幅に実験計画の変更を余儀なくする装置の不具合が起きた。FFEU 本体の熱交換を行うスペースラブとの間に配管された冷却水循環系である。本体の立ち上げは温度制限が設けられているので、冷却水の循環がなく全てが停止した。圧力計などをモニターした結果から冷却水中に気泡が入っていることが予想されたのでこれを除去するため軌道上で修理 IFM (In-Flight Maintenance) が行なわれた。配管をはずすことは水がスペースラブ全体へ飛散する危険性もあり作業は注意深く進められ長い時間が必要となった。IFM を 6 回試み修理は成功し、電気泳動実験が可能となったが、クルータイムおよびフリードリフトを確保するため電気泳動実験は後日行うことになった。実験時間は大幅に減少したので、3 回行う電気泳動実験(図 1)は分離サンプルを回収する実験(図 1 の Exp. 3)1 回のみ縮小された。

電気泳動実験

DNA の電気泳動実験は MET (Mission Elapsed Time) 09/14:30 に再開した。図 1 に示す Exp. 3 の TBD V となっている電圧を 200 V とし、分離サンプルの回収をおこなう電気泳動実験を行った。実験終了までの 1770 sec 間の、バッファーおよびサンプルポンプ作動を示す電

流値および電気泳動電圧とその電流値を図4に示す。計画ではバッファを送り出すと共に加電する予定であったが230 sec遅れている。500 secで電気泳動バッファを送り出し、730 secで200 Vを加電した。電流値は9 mA程度から徐々に上昇を続け、1500 secで約12 mAに達した。この間サンプルは900 sec(加電後170 sec)に注入開始し、電気泳動終了まで流し続けた。POCCにおいてダウンリンク・データサンプリングされたUVモニター信号を3DEPに展開し(図5)、軌道上で行われている電気泳動実験のマーカの分離挙動を判断した。後述するように電気泳動槽内に気泡が滞留していたことが考えられるが、Fr.5~15の範囲に、2つのピークの安定した泳動状態が見られた。これらのピークはマーカ

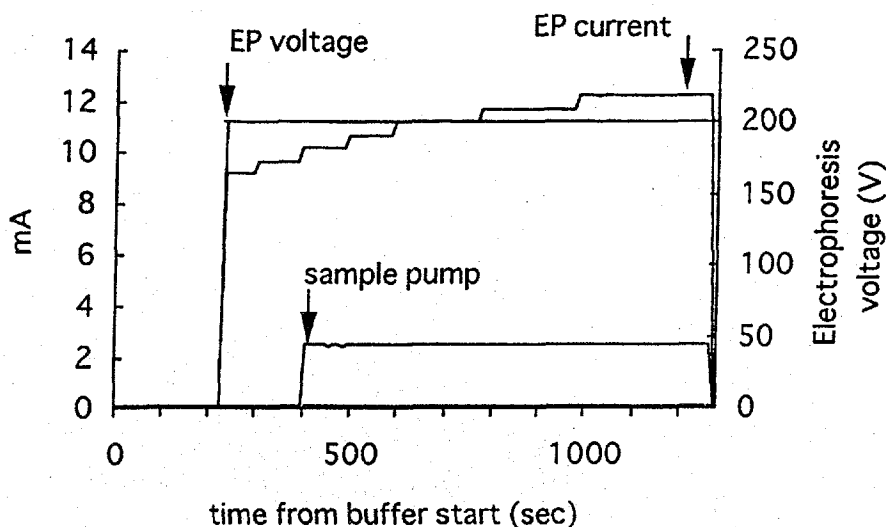


図4 The monitoring of the FFEU operations. X axis is expressed in sec from the buffer pump started. EP voltage and EP current show V and mA of the circuit on the electrophoresis. The arrow of sample pump means the loading time of the DNA sample.

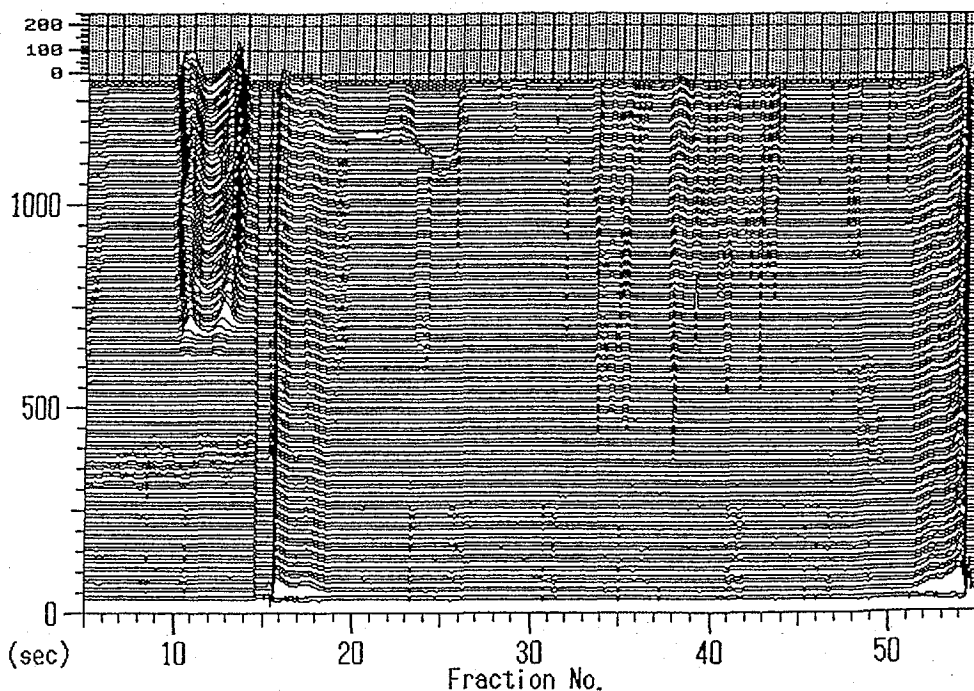


図5 The 3DEP of the DNA sample on the spacelab. The experimental conditions are the same of the figure 3.

によるものであり、この高さと同面積の変動は小さく半値巾も 1 mm と効果的な泳動が行われた。さらに DNA も地上実験と同様にこれらマーカーの間に泳動したと考えられるので、3DEP での見かけの分画中央番号である Fr.12 および理論的分画中央番号である Fr.30 をはさむ分画番号 Fr.22 ~ 50 の計 30 本をセパレーションチューブに分取し、帰還するまでの間、冷凍庫 (-20 °C) に保存した。

電気泳動実験分画サンプルの DNA 分析

電気泳動で分離したサンプルの回収は手順どおり行われたが、30 本のセパレーションチューブの溶液量は大きくばらついた。(図 6) 一部溶液が失われているなど分離したサン

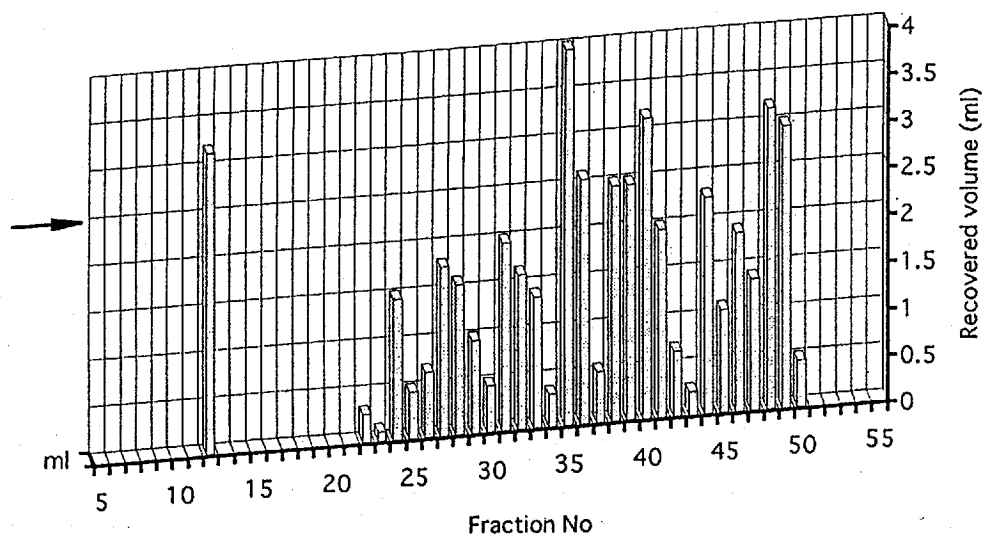


図 6 Recovered volume of separated sample after the chromosome DNA experiment on the spacelab. An arrow indicates a desired volume.

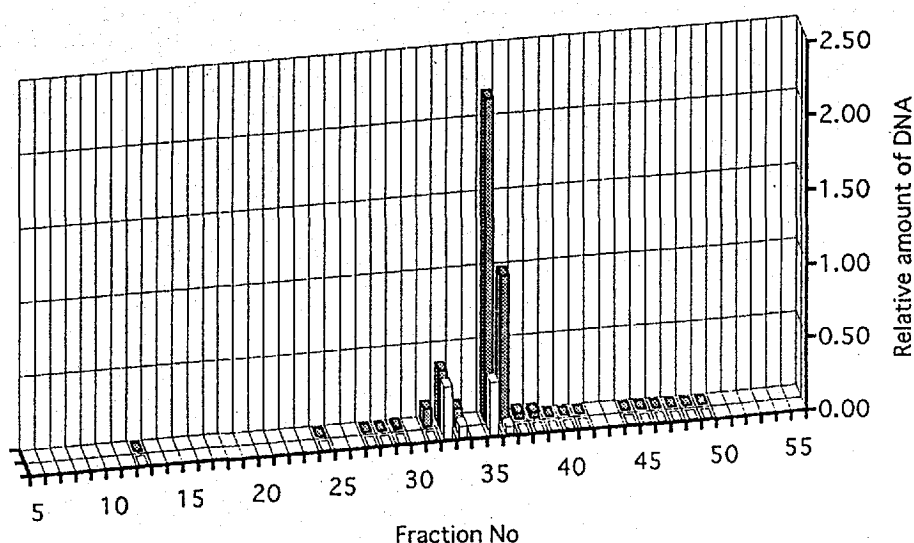


図 7 Relative DNA contents in the fractionated samples by the electrophoresis on the spacelab. The amounts of DNA are estimated by the densitometry of the photograph of the gel resulting the products of PCR. The DNA samples are analyzed by using PCR method with the two probes: backs are a *sod-4* gene and fronts an *unc-6* gene, respectively. All the data are normalized to those values of the control samples.

ブルの回収操作にあるいは装置の機能に不明な点もあるが、溶液量 1.0 ml 以上のものを選び PCR 法による DNA の分析を行った。プローブ遺伝子として *sod-4* および *unc-6* gene を用い検出した DNA 量を図 7 に示す。DNA 含量が最大のもは Fr.35 であり *sod-4* gene により検出されたものは *unc-6* で検出されたものの 7 倍の結果を得た。これに対し第 2 番目の含量を持つ Fr.32 はそれぞれのプローブ遺伝子による検出量はほぼ等しい結果を得た。DNA 成分は電気泳動分離槽中の 3 mm の間隔で泳動分離され、これら 2 つの異なる種類の DNA 成分を含む分画に分離したと推定できる。また、マーカーとして使用したアデノシンおよび NADP はそれぞれ Fr.28 と Fr.38 にピークを持つ 10 mm の間隔で検出できた。従って、気泡混入のため分離槽の実効空間が小さくなってはいたが、効果的な分離が行われたと考えられる。

解析と考察

気泡の滞留

今回の実験で最大の障害は冷却水循環系に気泡が入っていたことであつたが、気泡除去作業にともない新たな問題が生じた。飛行電気泳動実験結果でも指摘したが、電気泳動槽内に気泡が滞留していたことが考えられる。本実験の後で行われた pituitary および antibody の実験においてもここで述べた現象が見られたので、3DEP で観測された異常な吸収は泳動サンプルによるものではなく、電気泳動槽内の気泡の界面による光の屈折現象がモニターの信号として現れたと考えられる。これらの異常性を比較した吸光度モニターのリファレンス信号を図 8 に示す。

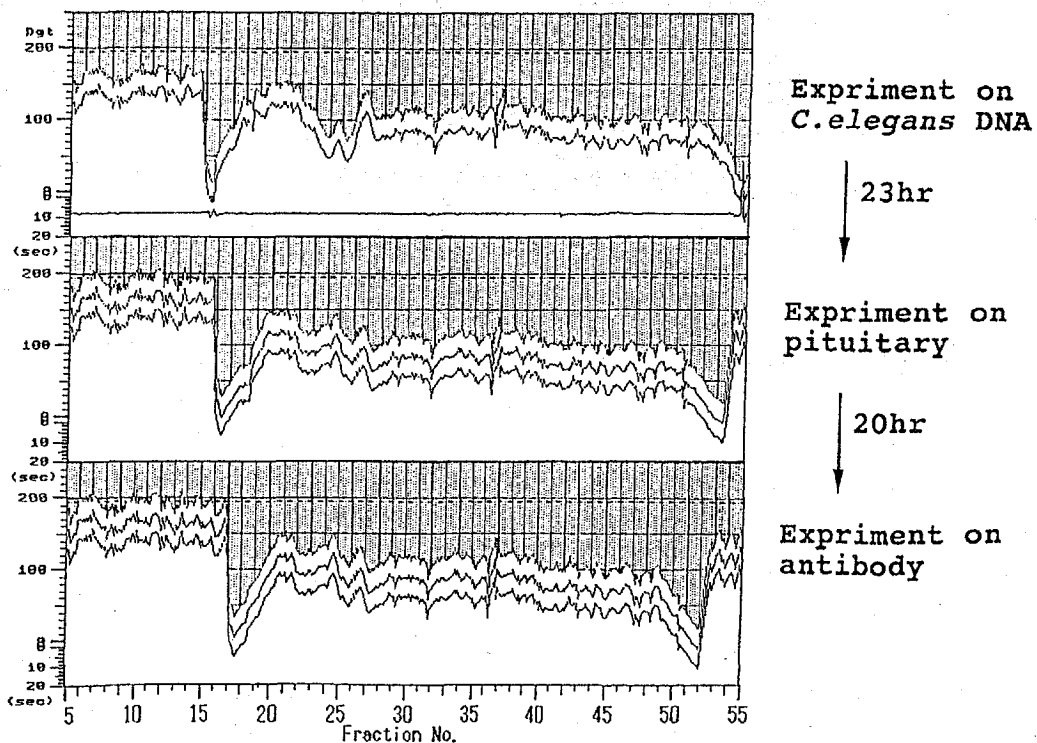


図 8 Transmittance changes of UV monitor of FFEU during the experiments of CHROMOSOME, PITUITARY and ANTIBODY on the spacelab.

コロンビア号が帰還した直後に KSC で、装置と使用溶液の重量計測、および UV モニターを使用した電気泳動槽内の気泡界面位置から推定する 2 つの方法により気泡の体積を計算したところ、共に約 12 ml の気体が電気泳動槽内に存在していたと推定できた。この体積の気体が飛行実験で Fr.17 ~ 18 と Fr.45 ~ 52 の位置に気泡の界面をつくったと考えられる。スペースシャトルより回収した FFEU/FM を宇宙開発事業団宇宙実験棟に搬送し、気体混入のシュミレーションを行った。FFEU/FM のサンプリングポートにサンプル採取ジグを取り付けたほかは全て飛行実験で用いたものと同じものを使用し同じ条件で実験を行った。FFEU/FM 本体を泳動槽が水平になるよう設置し、約 12 ml の空気をサンプルインジェクションポートより注入した。UV モニター上に気泡が移動するよう水平位置を微調節しながら吸光度データを測定した 3DEP を図 9 に示す。図の谷になっている位置は気泡の界面であり、スペースシャトルで行った実験結果と同様な 3DEP を得た。このパターンは僅かな振動でも変化し、地上ではその位置を安定にする事は難しいが、微小重力下ではかなり安定しており、図 8 に示したように数十時間同じ位置に滞留していた。

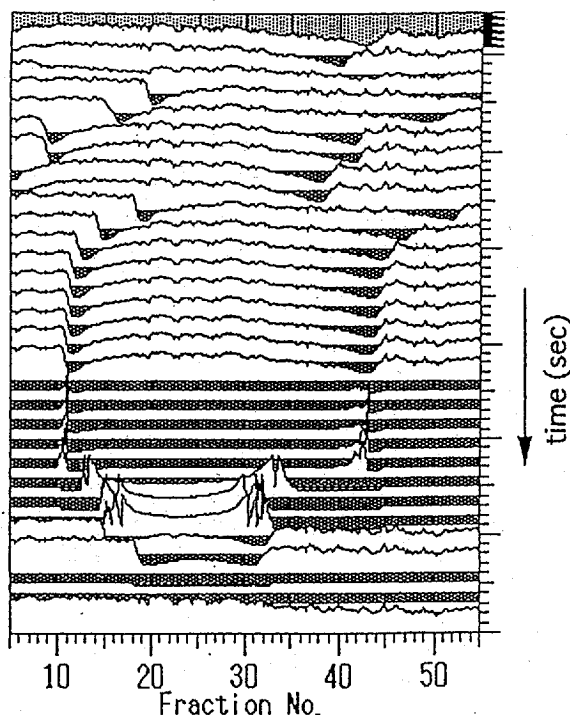


図 9 Transmittance changes of UV monitor of FFEU on the simulation experiments of the bubble.

電気泳動槽に気泡が滞留していたことが今回の電気泳動実験の障害であることが明らかになった。IFM の作業はバッファリザーバーと電気泳動槽を結合しているクイックディスクコネクタを外す必要があり、再度結合したとき気体が少量づつ混入し、結果として 12 ml の気泡が混入したことを地上で再検証してある。しかしながら、12 ml の気体が電気泳動分離槽厚 4 mm の間隙に真円の気泡を作ると直径は約 60 mm となり、電気泳動分離槽の幅全てを覆うことになる。これに対し、混入した気体は検出器の箇所、気泡の直径が 40 mm (体積 5 ml) から最大でも 50 mm (体積 8 ml) であると 3DEP から判断できるので、気泡は真円の形状とはなっていなかったかまたは検出器の箇所以外にも気泡が滞留していた可能性もある。

地上実験との比較

FFEU/FM を用いた地上実験(図 3)と宇宙の微小重力下で行われた今回の実験を比較する。地上では、移動度が小さいアデノシンは泳動槽のほぼ中央(サンプルインジェクションポートの理論的溶出位置)である Fr.30 に、また移動度が大きい NADP は Fr.45 付近にそれぞれ泳動されている。この場合、ピークの形状は電気泳動が進行していく間に大きく変化し一定の形状を保たないばかりでなくこれらのピークは蛇行しており、熱対流の影響を大きく受けていることが分かる。

これに対して、飛行実験では電気泳動槽内に気泡が滞留していたが、Fr.5～15 の範囲では安定した2つのピークの泳動状態が見られた。先に述べたようにこの実験では無荷電でのサンプルの移動状態を観測できなかったが、PITUITARY および ANTIBODY での無荷電でのサンプルの移動状態を確認する実験結果から Fr.12 がその位置であることが判明した。Fr.5～15 範囲での電場が安定していると考えれば、この2つのピークはマーカーであり、Fr.10 および Fr.13 はそれぞれ NADP およびアデノシンである。

微小重力下でのマーカーの泳動挙動(図 5、Fr.5～15)および地上でのマーカーの泳動挙動(図 3、Fr.27～47)の電気泳動状態をより詳細に比較した 3DEP を図 10 に示す。この図の最前面に示したエレクトロフェログラムは図中のそれぞれの泳動状態の吸光度を平均し示したものであり、分取容器に回収されるサンプルの吸光度に相当する。ここでは各電気泳動の 200 sec のみを比較してあるが、微小重力下でのピークの半値幅はフラクション 1 本即ち 1 mm に相当し、サンプルインジェクションポートの管径が 0.5 mm であることを考え合わせると拡散も少なく、当初の予測どおり微小重力下では熱対流の影響はほとんどないと見積られる。気泡が電気泳動槽に混入して実効的な電気泳動の場が狭くなっていたにもかかわらず、本サンプルは今回の電気泳動の条件で明確な DNA 成分の分離がされたと推定できる。

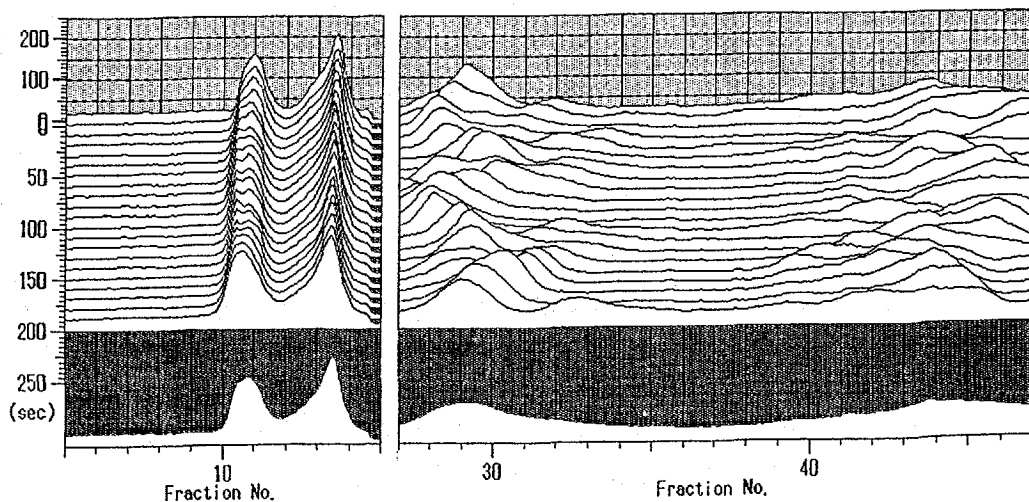


図 10 Comparison of electrophoresis of the DNA sample by FFEU on the spacelab and on the ground. The left side figure is expanded around fraction No.10 of Figure 5, on the spacelab, experiment and the right side from fraction No.30 to 40 of Figure 3, on the ground.

おわりに

微小重力環境で FFEU を使用し、*C. elegans* の DNA 混合物から 2 種類の DNA の効果的な分離を行うことが出来たが、今回の計画が全て成功したとは言い難い。気泡が電気泳動分離槽に滞留したことおよび実験時間が短縮され電気泳動条件の比較が出来なかったことである。さらに回収サンプルが予定量より少なく、ここで示したプローブ遺伝子以外のプローブ遺伝子による DNA の分析、マーカーサンプルの回収率の測定、分画サンプルの電気伝導率の測定および pH 勾配形成状態を調べることが出来なかったことである。

しかしながら宇宙環境での電気泳動状態を地上でリアルタイムで観測し、分離すべきサンプルをリアルタイムで要求できたこと、気泡が滞留し限定された電気泳動の場ではあったが熱対流の影響を受けず電気泳動を行うことが出来たこと、および地上と宇宙での全ての実験過程でサンプルへの汚染が少なかったことなどであるが、これらの実験結果と実験の作業手順の成果は、今後宇宙での電気泳動による分離の研究を推進すると考えている。

今回の計画で最大の難関は気泡の混入から始まった。電気泳動装置冷却水に気泡が発生した原因は明らかでないが、電気泳動分離槽への気泡混入はインフライトメンテナンス (IFM) の際起きたことが強く推定される。微小重力環境で気泡を取り扱うことは非常に困難でありその除去方法は確立されていない。生命科学では生物を生育することや生化学物質を分離分析する際には常に水溶液を使用するので、微小重力下での液体の移動に伴い混入あるいは発生する気泡の除去方法などの対応技術を早急に取り纏める必要がある。また生命科学で多用されるプラスチック器具などを含めた機材の生物試料適合性や表面処理方法など微小重力環境における表面張力の効果をさらに十分考慮した宇宙実験用機器の設計が必要である。

スペースラブでの実験に際して、IFM による装置の修復が出来なければ全ての実験機会が失われるところであった。IFM を成功させた Mr. Hieb と Mr. Halsell に、また実験手順を大幅に変更したにもかかわらず確かな実験操作を行ってくれた Dr. Thomas と Dr. Chiao の諸氏およびスペースシャトルのクルーに、また IFM の実施を強く支援してくれた NASA の関係者に深く感謝します。なお、この研究の一部は宇宙科学研究所宇宙基地利用基礎実験費で賄われている。

参考文献

- 1) Hannig, K. and Heidlich, Hans-G. *Free-Flow Electrophoresis: An Important Preparative and Analytical Technique for Biology, Biochemistry and Diagnostics*, GIT VERLAG, Darmstadt (1990).
- 2) Clifton, M. J. and Sanchez, V. *Chromatography (Tokyo)*. 16, 1-6 (1995).
- 3) Rickwood, D. and Hames, B. D. *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A practical approach, Second Edition*, IRL Press Limited, Oxford, New York, Tokyo (1990).
- 4) Vesterberg, O. *Acta Chem. Scand.* 23, 2653-2660 (1969).
- 5) Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77, 71-94 (1974).
- 6) Sulston, J. In *The nematode Caenorhabditis elegans*, ed. by W.B. Wood, Cold Spring Harbor Laboratory (1988). 123-155.
- 7) Wilson, R. et al. *Nature*. 368, 32-38 (1994)
- 8) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. IML-2 登載 FFEU の BBM を用いた電気泳動一第 2

次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上基礎実験 - 第9回宇宙利用シンポジウム
プロシーディング (1992). 151-154.

- 9) Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G. and Hedgecock, E. M. *Neuron*. 9, 873-881 (1992).
- 10) Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M. and Tessier-Lavigne, M. *Cell*. 78, 409-424 (1994).

外部発表

- 1) 小林英三郎, 石井直明. 電気泳動による線虫の染色体の分離. 第7回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1990). 403-408.
- 2) 高島宗彦, 小林英三郎, 石井直明, 奥山典生. 無担体電気泳動による線虫の染色体の分離. 第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1990). 49-50.
- 3) 小林英三郎, 石井直明. 電気泳動による線虫の染色体の分離. 平成2年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1991. 4). 221-225.
- 4) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 無担体電気泳動装置による染色体 DNA の分離と検出 - 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上実験. 第8回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1991). 124-127.
- 5) 小林英三郎, 松田 徹, 松野 巖, 石井直明. 無担体電気泳動における DNA の分離挙動. 第11回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1991). 61-62.
- 6) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫の染色体 DNA の分離. 平成3年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1992. 4). 185-188.
- 7) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. IML-2 登載 FFEU の BBM を用いた電気泳動 - 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上基礎実験 - 第9回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1992). 151-154.
- 8) 小林英三郎, 藤倉裕一, 目黒和良, 石井直明. 無担体電気泳動による DNA の分離 3. 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) 登載 FFEU の BBM を用いた電気泳動. 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1992). 69-70.
- 9) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫の染色体 DNA の分離. 平成4年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1993. 4). 263-266.
- 10) 小林英三郎, 山本顕吾, 石井直明, 広川 健, 長岡俊治. IML-2 登載 FFEU の FM を用いた電気泳動 - 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上基礎実験 - 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1993). 45-48.
- 11) 小林英三郎, 郷間 尚, 稲垣宗彰, 石井直明, 長岡俊治. 無担体電気泳動による DNA の分離 4. 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) 搭載 FFEU の FM を用いた電気泳動. 第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1993). 89-90.
- 12) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫の染色体 DNA の分離. 平成5年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1994. 4). 367-370.
- 13) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. STS65 / コロンビアでの無担体電気泳動による線虫 DNA の分離実験. 第11回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1994). 17-20.
- 14) 小林英三郎, 山本顕吾, 安田佳代, 石井直明, 長岡俊治. 無担体電気泳動による DNA の分離 5. スペースシャトル - コロンビアでの電気泳動. 第14回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1994). 97-98.

- 15) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫染色体 DNA の分離. 平成 5 年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1995. 4). 347-354.
- 16) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健, 長岡俊治. IML-2 における無坦体電気泳動による分離実験 - 飛行後解析 -. 第 12 回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1995). 138-141.