「ゲノムの構造と機能」
平成11年度採択研究代表者

馬場　嘉信

（徳島大学薬学部　教授）

「ナノチップテクノロジーの創製とゲノム解析への応用」

１．研究実施の概要

本プロジェクトにおいては、DNA検出部を含むゲノム解析の全基本プロセスの集積化を実現するナノチップテクノロジーを創り、21世紀に向けて新技術である一分子ゲノム解析技術や単一細胞中のプロテオーム解析技術を開拓することが目標である。

ナノチップテクノロジーは、PCRマイクロチャンバー、マイクロチャンネルアレイ、DNA分離用ナノストラクチャーおよびDNA検出用のCCDチップを同一チップ上に全て実現するもので、従来法の数百倍の能力を有するゲノム解析技術である。本年度は、マイクロチャンネルアレイの設計と作成、マイクロチャンネル中でのDNAの泳動挙動解析、マイクロチャンネルを用いたDNAフラグメント解析の高速化、ゲノムサンプルの収集とSNPs解析、マイクロスケール反応系の設計についての研究を進めた。その結果、ゲノム解析に必要な基本プロセスのマイクロ化とDNA解析を１分以内に達成できるシステムを開発した。今後は、ミリ秒オーダーのDNA解析を達成するためのマイクロチップの設計、PCR高速化のためのマイクロ反応システムの設計・開発、DNAの高感度検出システムの開発を進め、高いスループットを有するDNA解析システムの開発を目指して研究を進める予定である。

２．研究実施内容

本年度は、下記の課題について研究を進め、以下のような成果を得た。

Ａ．マイクロチャンネルアレイの設計と作成

電気泳動を用いたDNA解析用プラスチック製マイクロチャンネルアレイを実現するための超微細加工技術の確立を目的として研究進めた。加工方法として、シンクロトロン放射光から抽出した波長数Ａ のX線によるX線リソグラフィー技術を加工材料にはPMMA（ポリメチルメタクリレート）を用いた。第1ステップとして新規に考案した移動マスクX線リソグラフィー法によって側壁に傾斜をつけた幅10～50μm、深さ50～100μmのチャネル加工予備実験を行った（図１）。その結果、側壁傾斜角度は75°～90°の範囲で制御可能であることが明らかとなった。また移動マスクX線リソグラフィを行うためのX線露光チャンバと排気系

の設計・製作を行った。

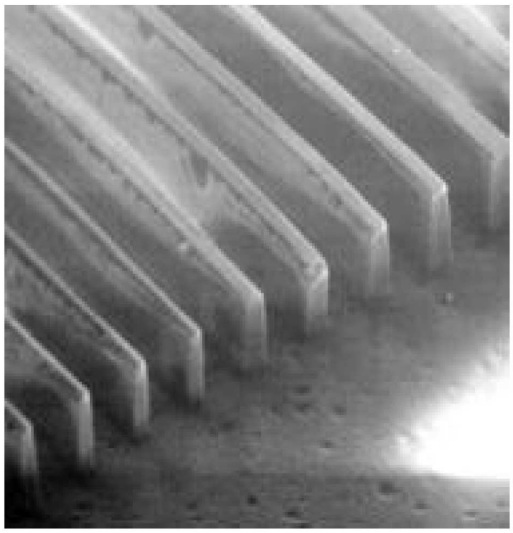

図１　試作したマイクロチャンネルアレイ（幅50μm、深さ100μm）

B．マイクロチャンネル中でのDNAの泳動挙動解析

超高速DNA解析を達成するために、マイクロチャンネル中でのDNAの泳動挙動を詳細に解析し、DNA解析の条件を検討した。課題Aにより作成したマイクロチップを用いて、レーザー共焦点顕微鏡のシステムを基礎に、マイクロチャンネル中を泳動するDNA分子のイメージングシステムの開発に成功した。このイメージングシステムを用いて、種々の条件下でのDNAの泳動挙動を詳細に調べ、高分子物理的理論を用いて解析した。これらの情報を基礎として、DNA解析の速度を理論的に予測し、１分以内にDNAを解析できる条件を見いだした。

C．マイクロチャンネルを用いたDNAフラグメント解析の高速化

DNA分子イメージングのデータに基づいた予測より得られた種々の条件下でマイクロチップによるDNA解析を行い、超高速DNA解析技術を確立することを目的として、マイクロチャンネルを用いたDNAの電気泳動解析を行った。その結果、幅50μm、深さ20μmのマイクロチャンネルの場合、わずか10 mm程度の長さがあれば、特定のDNAの解析が可能であることを見いだした、さらに、その際の解析時間は、数十秒程度であった（図2）。

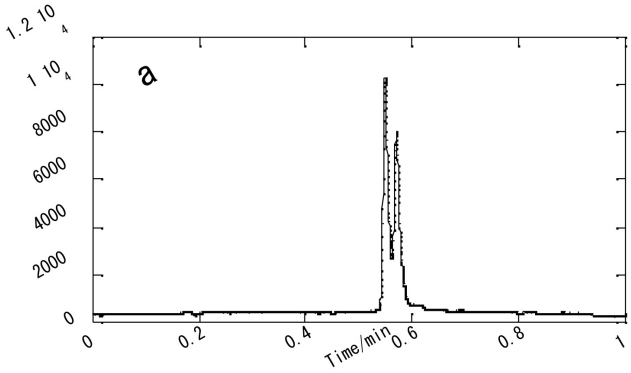

図２　30秒前のDNA解析（トリプレットリピートDNAと分子量マーカーの分離）

D．ゲノムサンプルの収集とSNPs解析

現在、愛媛県下を中心に5,000人からインフォームドコンセントを得て、ゲノムサンプルを収集している。現在までに、3,000人からゲノムDNAを収集した。これらのサンプルについて、多因子病の責任遺伝子を同定する過程で必要なSNP（singlenucleotide polymorphism）のタイピング法とハプロタイプの作成法について検討した。解析のモデルとした遺伝子はアンジオテンシン変換酵素（ACE）遺伝子の1種のSNPの結果から、コンピュータープログラムであるHAPLOを利用してハプロタイプを作成した。日本人での頻度が５％以上のハプロタイプは２種類のみであり、英国人に５％以上の頻度で認められた２種のハプロタイプは、日本人では認められなかった。利用した血縁関係のない個人から、ハプロタイプを作成する方法は、今後のゲノム解析には有用であると考えられた。

E．マイクロスケール反応系の設計

本年度は、ゲノム解析に必要なPCRとキャピラリー電気泳動による分離検出とを同一チップ上で行う方法について、基礎的な検討をおこなった。具体的には、当研究室で従来より開発を進めているPDMS（ polydimethylsiloxane）を材料とするマイクロチップ上に、PCRを行うためのチャンバ構造を形成し、その中での反応の可能性について検討した。チャンバ内に必要な溶液類を注入したのち、既存の装置内で熱サイクルを行った結果、目的のDNA断片（λDNA）が増幅されることを確認した。さらに、マイクロチップに対して直接的に熱サイクルを行うため、ペルチェ素子による温度制御システムを構築した。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Y. Kiba and Y. Baba Unusual Capillary Electrophoretic Behavior of Triplet Repeat DNA J. Biochem. Biophys. Methods, 1999, 41, 143- 151.

○Y. Endo, C. Yoshida, and Y. Baba DNA Sequencing by Capillary Array Electrophoresis with Electric Field Strength Gradient J. Biochem. Biophys. Methods, 1999, 41, 133- 141.

○M. Ueda, Y. Baba, H. Iwasaki, O. Kurosawa, and M. Washizu Direct Observation of Deoxyribonucleic Acid Anchored Between an Aluminum Electrode and a Cantilever of Atomic Force Microscope Jpn. J. Appl. Phys., 1999, 38(11), 6568- 6569.

○M. Ueda, H. Abe, H. Kuayma, H. Nakanishi, A. Arai, and Y. Baba Imaging of Injection and Separation Processes of DNA on a Microfabricated Capillary Electrophoresis Chip Bioimages, 1999, 7(4), 157- 161

○M. Ueda, Y. Kiba, H. Abe, A. Arai, H. Nakanishi, and Y. Baba Fast Separation of Oligonucleotide and Triplet- repeat DNA on a Microfabricated Capillary Electrophoresis Device and Capillary Electrophoresis Electrophoresis, 2000, 21(1), 176- 180.

○馬場嘉信マイクロチップ・ナノチップテクノロジーによる超高速DNA解析蛋白

質・核酸・酵素,2000, 45(1), 76- 85.
○馬場嘉信 ゲノム解析のハイスループットスクリーニングファルマシア,2000, 36(1), 24- 28.
○馬場嘉信 マイクロ化電気泳動チップを用いたDNA分析電気化学分析の可能性電気化学,2000, 68(3), 197- 201.
○Hong, J. W., Fujii, T., Seki, M., and Endo, I.: Optimization of DNA Separation by Capillary Gel Electrophoresis on a Microfabricated Polymer Chip, Chemical Engineering Symposium Series, Vol. 65,(2000.1)pp. 177- 180