

「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電鋳による鋳型作成技術とホットエンボシングによるプラスチックの成型技術を確認し、マイクロチャンネルアレイの微細加工技術を確認した。また、ナノチップ開発のために、ゲノム解析に必要なナノ微細加工技術の開発を進めた。さらに、マイクロチャンネル中での DNA の挙動についての有限要素法によるコンピュータシミュレーションを可能にし、昨年度までに蓄積した実験データを基に、DNA 解析の最適条件を確認した。また、PCR 等の反応とマイクロチップ電気泳動を1枚のチップ上に集積化するシステムの開発を進め、昨年度の PCR に続いて、等温遺伝子増幅法である LAMP 法のマイクロチップ化と無細胞タンパク質合成のマイクロチップ化に成功した。さらに、これらのシステムの性能評価のために、昨年度までに収集したゲノムサンプルの高血圧関連候補遺伝子の SNPs 解析技術開発を進めた。また、本研究課題で開発したシステムの実用化・市販化のために、マイクロチャンネルアレイ電気泳動装置の開発と評価を進めた。

今後は、マイクロチャンネルアレイ電気泳動による SNPs 解析技術開発その他の多型解析技術開発に特に注力していく予定である。さらに、ナノチップ開発のためのナノ微細加工を進め、ナノチップによる DNA 解析を実現するための研究を進める。また、より集積度の高いシステムの開発と一分子ゲノム解析技術を開発するための基礎研究を進める予定である。

### 2. 研究実施内容

#### 1) マイクロチャンネルアレイの作成と DNA の泳動挙動解析

移動マスクX線露光システムにより、まず、プラスチック上に微細加工を行い、マイクロチップを基に Ni メッキにより鋳型を作成する技術を確認した。さらに、この鋳型から、ホットエンボシング(熱圧

成型)によりプラスチック上にマイクロチャンネルアレイを形成できる技術の開発を行った。これらの研究により、多量のマイクロチップを高い精度で作成する基盤技術を確立した。

試作したマイクロチャンネルアレイの各チャンネル中での DNA の泳動挙動を有限要素法に基づいたマイクロ流体ディクスのシミュレーションソフトによりシミュレーションした。また、同じ条件下で、DNA のマイクロチャンネル中での挙動をイメージングした。これらの結果をもとに、ゲノム解析に最適化したマイクロチャンネルアレイの設計と作成を行った。

#### 2) マイクロチャンネルによる DNA 解析の高速化とナノ構造体の試作

収集したゲノムサンプルの高血圧関連遺伝子の多型解析を進めるために、マイクロチャンネルアレイ電気泳動により、RFLP (restriction fragment length polymorphism)に基づく SNPs 解析を行った。その結果、50 ng/mL のゲノムサンプルから数分で多型解析を行うことができるようになった。さらに、超微細加工技術によりマイクロチップ上に 200-500 nm のナノ構造体の試作を行い、DNA の電気泳動挙動を1分子レベルで観察することに成功した。

#### 3) マイクロチップ・ナノチップテクノロジーのゲノム解析への応用

昨年度に続いてゲノムサンプルを収集し、約 5,000 人の臨床データの収集および DNA の抽出、保存を行った。これらのサンプルについて、既存技術による病因遺伝子の同定、SNP 同定等を進めた。また、これらのサンプルについて、上述のマイクロチャンネルアレイ電気泳動により SNPs 解析を進め、マイクロチャンネルアレイ電気泳動による SNPs 解析条件の最適化と既存方法との比較を行い、マイクロチップテクノロジーの実用化にむけた基礎データを蓄積しつつある。

#### 4) マイクロスケール反応系の開発

本年度は、昨年度に製作を検討した PDMS(polydimethylsiloxane)とガラスとからなるハイブリッド構造のマイクロチップを用い、ゲノム解析に必要な遺伝子増幅 (PCR: polymerase chain reaction) 反応に加えて、生体外蛋白質合成反応を行うことを試みた。具体的には、50mm×70mm のマイクロチップ上に反応体積 1 $\mu$ L の反応チャンバを7つ設け、ガラス基板上に形成した ITO (Indium Tin Oxide) を材料とするヒーター及びセンサを用いて、温度制御を行う方法について検討を行った。実際に、チャンバ内温度を37 $^{\circ}$ C一定に保ちながら生体外蛋白質合成反応を行い、昨年度の検討時と同様に、GFP (Green Fluorescent Protein) および BFP (Blue Fluorescent Protein) の遺伝子を各チャンバに導入して合成反応を行った結果、遺伝子に対応する蛍光が実際に観測されることを確認した。また、マイクロチップ上での等温遺伝子増幅 (LAMP 法) を実現することに成功した。

#### 5) マイクロチップ・ナノチップの実用化に向けた研究・開発

本研究課題において得られた成果をもとに、島津製作所および日立電子エンジニアリングより、それぞれ市販のゲノム解析装置を開発するための研究・開発を進めた。これらの成果等により、日立電子エンジニアリングから 12 本のマイクロチャンネルアレイをチップ上に実現したチップ電気泳動装置を市販することができた。また、この装置の応用領域を広げるために、遺伝子の多型解析、プロテオーム解析技術の開発を進めた。さらに、島津製作所からは、全自動型マイクロチャンネル電気泳動型ゲノム解析装置の実用化についての研究・開発を進め、来年度から受注生産という形で市販装置を開発することができた。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 馬場グループ

- ① 研究分担グループ長名 馬場 嘉信(徳島大学薬学部 教授)
- ② 研究項目 研究全般の計画立案と実施、DNA 分離・検出の集積化を担当  
マイクロチャンネルアレイの作成と DNA の泳動挙動解析  
マイクロチャンネルによる DNA 解析の高速化とナノ構造体の試作  
マイクロチップ・ナノチップテクノロジーのゲノム解析への応用  
マイクロスケール反応系の開発  
マイクロチップ・ナノチップの実用化に向けた研究・開発

#### (2) 田畑グループ

- ① 研究分担グループ長名 田畑 修(立命館大学理工学部 教授)
- ② 研究項目 マイクロチャンネル加工を担当  
マイクロチャンネルアレイの作成と DNA の泳動挙動解析

#### (3) 藤井グループ

- ① 研究分担グループ長名 藤井 輝夫(東京大学生産技術研究所 助教授)
- ② 研究項目 前処理・反応システム集積化を担当  
マイクロスケール反応系の開発

#### (4) 三木グループ

- ① 研究分担グループ長名 三木 哲郎(愛媛大学医学部 教授)
- ② 研究項目 ナノチップテクノロジーの評価とゲノム多型解析への応用を担当  
マイクロチャンネルによる DNA 解析の高速化とナノ構造体の試作  
マイクロチップ・ナノチップテクノロジーのゲノム解析への応用

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

##### 馬場チーム

- 田淵真理、馬場嘉信 : The Separation Carrier for High-Speed Proteome Analysis by capillary Electrophoresis. Electrophoresis 2001,22(16), 3449-3457
- 加地範匡、上田正則、馬場嘉信 : Direct Measurement of Conformational Changes on DNA Molecule Intercalating with a Fluorescence Dye in an Electrophoretic Buffer Solution by Means of Atomic Force Microscopy, Electrophoresis,2001,(16),3357-3364
- 平野研、馬場嘉信、松澤有希子、水野彰 : Manipulation of Single coiled DNA molecules by laser clustering of microparticles, Applied Physics Letters, 2002, 80(3), 515-517
- 加地範匡、上田正則、馬場嘉信 : Molecular Stretching of Long DNA in Agarose Gel using Alternating Current Electric Fields, Biophysical Journal, 2002, 82(1), 335-344.
- 田淵真理、日野真美、篠原康雄、馬場嘉信 : Cell-Free Protein Synthesis on a Microchip

Proteomics, 2002, 2, 430-435.

- 馬場嘉信 : マイクロチップ電気泳動法によるゲノム多型解析とプロテオーム解析. 電気化学, 2001, 69(9), 706-710.
- 馬場嘉信 : 遺伝子・ゲノム医療に向けたマイクロマシンの技術戦略. 日本機械学会誌, 2001, 104(11), 30-33.
- 馬場嘉信 : 21世紀に臨む情報化学. CISCJ Bulletin, 2001, 19 (1), 14.
- 馬場嘉信 : ヒト・ゲノム- その解析計画の向こうに見えるもの. 生命化学研究レター, 2001, No. 5,3-5.
- 馬場嘉信 : ポストゲノムの解析ツール マイクロチップ. Millipore News, 2001, 37, 1-3.
- 馬場嘉信 : ゲノムサイエンスへの期待. BME, 2001, 15(19), 17-23
- 馬場嘉信 : ナノテクノロジーで変わる 21 世紀の医療:ナノチップテクノロジー. Access, 2001, 16(6), 36-38.
- Y. Baba, K. Otsuka, and A. Shibukawa (Guest Editors): The Special Issue on SCE 2000 Proceedings. Electrophoresis, 22(16), 3357-3513, 2001.
- P. Youinou, V. Studer, A. Pepin, A. Lebib, Y. Chen and Y. Baba : Nanoimprint fabrication of DNA electrophoresis chips. Proceedings for u-TAS 2001, 201-202, 2001.
- 馬場嘉信 : 21 世紀に挑む新たな生命化学研究. 生命化学研究レター, 2001, No. 6, 1.
- 馬場嘉信 : マイクロチップ技術のゲノム解析、DNA 鑑定への応用. 日本鑑識科学技術学会誌, 2001, 5
- Y. Baba : Micro and Nanotechnology for Genomic/Proteomic Analysis. The Chemical Record, 2002,
- Y. Baba : Genomics. Anal. Bioanal. Chem., 2002, 372, 14-15,
- 馬場嘉信 : ナノチップテクノロジーを用いた DNA 分析. Jpn. J. Electrophoresis, 2001, 45(),
- 馬場嘉信 : バイオチップによるゲノム・プロテオーム解析. 表面, 2001,
- L. Zhang, F. Dang, Y. Baba : Chip-based separation of DNA. J. Pharm. Biomed. Anal., 2002

#### 藤井チーム

- 山本貴富喜、藤井輝夫、野島高彦、洪ジョンウク、遠藤勲 : “タンパク質合成用ハイブリッドマイクロリアクターの開発”、電気学会論文誌E、Vol.121-E、No.4、pp.163-168 (2001)
- Hong, J.-W., Hosokawa, K., Fujii, T., Seki, M., and Endo, I. : “Microfabricated Polymer Chip for Capillary Gel Electrophoresis”, Biotechnology Progress, Vol.17, Issue 5, pp.958-962 (2001)
- 藤井輝夫 : “集積型マイクロリアクターチップ”、ながれ、Vol.20、No.2、pp.99-105(2001)
- 藤井輝夫 : “集積型マイクロリアクターによる生体外蛋白質合成”、化学工業、Vol.52、No.11、pp.33-36(2001)

- 藤井輝夫 : “生化学分野におけるマイクロマシン技術の可能性”、生化学、Vol.73、No.11、pp.1338-1340(2001)

三木チーム

- Tabara Y, Kohara K, Nakura J, and Miki T. : Risk factor-gene interaction in carotid atherosclerosis: effect of gene polymorphisms of rennin-angiotensin system. *Journal of Human Genetics* 46: 278-284, 2001
- Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T, Doi T, Tokunaga H, and Konishi I. : An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and the common carotid atherosclerosis. *Journal of Human Genetics*. 46: 506-510, 2001
- Yamamoto Y, Kohara K, Tabara Y, and Miki T. : Association between carotid arterial remodeling and plasma level of circulating hepatocyte growth factor. *Journal of Hypertension* 19: 1975-1979, 2001
- Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, and Miki T. : Genotype-specific association between circulating soluble cellular adhesion molecules and carotid intima-media thickness in community residents: J-SHIP study. *Hypertension Research* 25: 31-39, 2002

(2) 特許出願

国内特許 4 件

外国特許 2 件