

「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。

本年度は、タンパク質解析に最適のマイクロチップを開発し、タンパク質を15秒以内に解析することに成功した。さらに、DNA解析のための“ナノボール”（コア重合ミセル）およびナノ構造体を開発し、それぞれのナノテクノロジーにより10–60秒以内にDNAを解析できる技術を確立した。本研究課題において得られた成果をもとに、島津製作所から、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を受注生産という形で市販装置を開発することができた。また、ナノスケール反作用デバイスについて、その性能と高め、100nLほどの反応体積を持つリアクターを温度制御ユニットと集積化したマイクロリアクターアレイを製作し、蛍光タンパク質などのタンパク質が合成することに成功した。

既知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析に関して、4000名程度の血圧の臨床データと遺伝子の関連を解明した。また、未知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子を同定するために選別した血圧の高い群と低い群、各々150人を対象にしたゲノムワイドスクニングを約1300のマイクロサテライトマーカーによって行い、未知の高血圧関連候補遺伝子がこれらのマイクロサテライトマーカーの近傍に存在していることが示唆された。

今後は、中間評価結果に基づき、ナノテクノロジーの有効性を活用したテーマにターゲットを絞り込み、ナノテクノロジーを基盤とした集積型チップの開発および革新的なチップの開発を進め、アメリカの基本特許を凌駕しうる新しい技術の開発と世界的な主導権を握ることのできる分野の研究を中心に進める。

2. 研究実施内容

馬場グループ

馬場グループは、ナノ微細加工技術を用いて、ゲノム解析の基本プロセスを集積化するために、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、マイクロチップを用いたDNA、タンパク質の反応系の開発、

一分子DNA解析技術の研究、マイクロチップ・ナノチップの実用化に向けた研究・開発などの研究を進めた。

昨年度までは、DNAの高速解析の条件を確立した。本年度は、タンパク質の解析についても、シミュレーションに基づいて、最適のマイクロチップを設計・作成し、解析条件の最適化を行った。その結果、5-200 kDaの範囲のタンパク質を15秒以内に解析することに成功した。また、この方法を白血病細胞の熱ショックアポトーシス解析に適用し、アポトーシスの際に高発現する4種類のタンパク質を同定した。

従来、マイクロチャンネル中のDNA・タンパク質解析に用いられていたゲル・ポリマーにかわって、東大片岡教授、京大吉川教授と共同で、“ナノポール”（コア重合ミセル）を開発し、この新規ナノ材料が、DNA解析に応用できることを明らかにした。特に、従来困難であった数千塩基以上のDNAの解析を短時間（1-3分）で実現することに成功した。

さらに、超微細加工技術によりサブマイクロメートルオーダー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。1分子DNAのナノ構造体中での挙動解析から、DNA解析に適用可能なナノ構造体を設計・試作した。このナノ構造体を用いることにより、10万塩基のDNAを10秒以内に解析できる条件を確立した。

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。日立電子エンジニアリングから市販されているチップ電気泳動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（全自動型としては世界初）の実用化についての研究・開発を進め、本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。さらに、来年度秋から、島津製作所より市販を開始する予定である。これまで本研究において出願してきた特許のうち、数件は、島津製作所および日立へのライセンス契約を進めている。

田畑グループ

本年度は、シンクロトロンから放射される波長3~5ÅのX線を用いたX線露光及びチップ接合技術（サーマルボンディングおよびアドヒーズブプリンティング）を駆使して、10本のマイクロチャンネル（幅50μm、深さ50μmの垂直壁を有する矩形断面、ピッチ100μm）を集積化したポリマーチップ（27mm×65mm）と3層シートを積層化した立体マイクロチャンネルポリマーチップを製作し、蛍光試薬の電気泳動を行なうことによって、高アスペクトマイクロチャンネル断面形状が分離効率に及ぼす影響について考察した。

本年度は、マイクロチャンネルの内壁にダイナミックコーティングを施し、電気浸透流を抑制させることによって、さらなる分離効率の向上を図り、同時に高アスペクト比を有するマイクロチャンネルの優位性を証明した。また、YOYO-1標識した2種類のオリゴDNA分子の電気泳動も行ない、DNA分析用次世代型新規ナノチップデバイスを開発するための基礎データを取得した。

現在、さらなる多種類のオリゴDNA分子の高性能分離実験を展開中である。

藤井グループ

今年度は、これまで進めてきたナノスケール反応用デバイスについて、温度制御のための較正を精密に行うことによって、その性能を高め、各種のタンパク質について無細胞系の合成反応が行えることを確認した。具体的には、100nLほどの反応体積を持つリアクターを温度制御ユニットと集積化したマイクロリアクターアレイを製作し、蛍光タンパク質などのタンパク質が合成することに成功した。さらに、蛋白合成の効率を向上するため、翻訳反応において重要な役割をはたすリボソームを基板上に固定化する方法について検討を行った。固定化を行う構造として新たにナノタワー構造を考案し、その製作方法と化学処理による固定化方法の開発に着手した。現状では、蛍光ラベルしたリボソームがナノタワー構造の頂点部分に固定化できることを確認した段階であるが、今後はタンパク質合成反応の系を組み合わせ、反応の効率化、反応メカニズムの観察などへと展開する予定である。

三木グループ

本研究では大規模かつ臨床データの整った集団を対象に、既知および未知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子を統計学的に選別することを目的とした。また、地域の住民や企業の従事者など、非選択的な集団を対象として、高血圧や動脈硬化など、心血管系疾患発症の大きなリスクとなる因子に対して、遺伝的要因の関与を、環境要因や他の危険因子との相互作用の観点から明らかにすることも本研究の目的とした。

既知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析に関して、起立性の血圧変化のデータの揃った約400名から成る集団において、ACE、AGT、AT2R1、GNAS1、GNB3の5種類の遺伝子を調べ、GNAS1、GNB3の多型と起立性の血圧変化との相関を示した。この結果は交感神経に関係する遺伝子が起立性低血圧の発症に関連していることを示唆するものである。血圧とともに主要な交絡因子に関するデータの揃った約2400名と約800名から成る2つの集団において、高血圧に関してEDN1の多型とBMIとの相互作用が示された。また、AGT多型と高血圧との相関および高血圧に関するAGT多型と飲酒との相互作用が示された。さらに、BDKRB2多型と高血圧との相関および高血圧に関するBDKRB2多型と飲酒との相互作用が示された。

一方、未知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子を同定するために選別した血圧の高い群と低い群、各々150人を対象にしたゲノムワイドスクリーニングを約1300のマイクロサテライトマーカーによって行っている。本年度にはこれまでのスクリーニングによって選別された2種類のマイクロサテライトマーカーと高血圧との相関を主要な交絡因子に関するデータの揃った約2400名から成る集団において検証した。その結果、D10S537と高血圧との相関および高血圧に関するD10S537と中性脂肪との相互作用が示された。またD8S1179と高血圧との相関および高血圧に関するD8S1179と喫煙との相互作用が示された。これらのマイクロサテライトマーカーの近傍には既知の高血圧候補遺伝子が存在しないことから、未知の高血圧関連候補遺伝子がこれらのマイクロサテライトマーカーの近傍に存在していることが示唆された。

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. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

馬場チーム

- M. Hino, Y. Shinohara, K. Kajimoto, H. Terada, and Y. Baba
Requirement of Continuous Transcription for Synthesis of Sufficient Amount of Protein by Cell Free Rapid Translation System
Protein Expression and Purification, 2002, 24, 255-259.
- M. Tabuchi and Y. Baba
The Novel Injection Method for High-Speed Proteome Analysis by Capillary Electrophoresis
Electrophoresis, 2002, 23(7), 1138-1145.
- R. Tachibana, H. Harashima, T. Ishida, Y. Shinohara, M. Hino, H. Terada, Y. Baba and H. Kiwada
Effect of cationic liposomes in an in vitro transcription and translation

system

Biol. Pharm. Bull., 2002, 25(4), 529-531.

- M. Jabasini, L. Zhang, A.A. Ewis, J. Lee, Y. Nakahori, and Y. Baba
Fast Analysis of DNA Polymorphisms on the Human Y Chromosome by Using
Microchip Electrophoresis
Electrophoresis, 2002, 23(10), 1537-1542
- M. Ueda, T. Hayama, Y. Takamura, Y. Horiike, and Y. Baba
Translocation of a Long DNA Chain Passing Through a Nanofabricated Pore
Bioimages, 2002, 10(1), 9-18.
- L. Zhang, F. Dang, Y. Tanaka, and Y. Baba
Stepwise Gradient of Linear Polymer Matrices in Microchannel Electrophoresis
for High Resolution
Separation of DNA
Electrophoresis, 2002, 23(14), 2341-2346.
- M. Ueda, T. Hayama, Y. Takamura, Y. Horiike, and Y. Baba
Investigation of the Possibility of Geometrical Electrophoresis
Electrophoresis, 2002, 23(16), 2635-2641.
- F. Xu, M. Jabasini, and Y. Baba
DNA Separation on Microchip Electrophoresis Using Low Viscosity
Hydroxypropylmethylcellulose-50
Solutions Enhanced by Polyhydroxy Compounds
Electrophoresis, 2002, 23 (20), 3608-3614.
- M. Ueda, Y. Takamura, Y. Horiike, and Y. Baba
Molecular Detection in a Microfluidic Device by Streaming Current
Measurements
Jpn. J. Appl. Phys, 2002, 41(11A), L1275-L1277.
- M. Jabasini, F. Xu, F. Dang, T. Shinka, Y. Nakahori, and Y. Baba
Range of Separation of a Potential Tool for Bioseparation, Microchip
Electrophoresis System, for DNA Polymorphisms on the Human Y-Chromosome
Anal. Sci., 2003, 19(1), 175-176.
- Satoru Ueno, Akira Shibata, Ayako Yorimitsu, Yoshinobu Baba and Naoki Kamo
Redox potentials of the oriented film of the wild-type, the E194Q-, E204Q-
and D96N-mutated bacteriorhodopsins
Biochim. Biophys. Acta, 2003, 1609, 109-114.
- Y. Kiba, L. Zhang, and Y. Baba
Anomalously Fast Migration of Triplet Repeat DNAs in Capillary
Electrophoresis in Polymer Solutions

Electrophoresis, 2003, 24(3), 452-457.

- F. Dang, L. Zhang, H. Hagiwara, Y. Mishina and Y. Baba
Ultrafast and High-Sensitive Analysis of Oligosaccharides on a Microchip with
Light Emitting Diode Confocal Fluorescence Detection
Electrophoresis, 2003, 24(4), 714-721.
- M.R. Almofti, H. Harashima, Y. Shinohara, A. Almofti, Y. Baba, and H. Kiwada
Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery: Biophysical Effect on Mechanism of
Internalization
Archives Biochem. Biophys, 2003, 410, 246-253

田畑チーム

なし

藤井チーム

- Fujii, T.,
PDMS-based Microfluidic Devices for Biomedical Applications,
Microelectronic Engineering, Elsevier, vol. 61-62C (2002) pp 907-914
- Yamamoto, T., Nojima, T., and Fujii, T.,
PDMS-Glass Hybrid Microreactor array with Embedded Temperature Control
Device. Application to Cell-Free Protein Synthesis, Lab on a Chip, Vol. 2,
No. 4 (2002) pp.197-202

三木チーム

- Abe M, Nakura J, Yamamoto M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M,
Kohara K and Miki T.
Association of GNAS1 gene variant with hypertension depending on smoking
status.
Hypertension 40:261-265, 2002
- Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y and Miki T.
An interaction between systolic blood pressure and angiotensin-converting
enzyme gene
polymorphism on carotid atherosclerosis.
Hypertens Research 25:875-80, 2002
- Ogimoto A, Hamada M, Nakura J, Miki T and Hiwada K.
Relation between angiotensin-converting enzyme II genotype and atrial
fibrillation in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy.
Journal of Human Genetics 47: 184-189, 2002

○ Tabara Y, Kohara K and Miki T.

Polymorphisms of genes encoding components of the sympathetic nervous system but not the renin-angiotensin system as risk factors for orthostatic hypotension.

Journal of Hypertension 20: 651-656, 2002

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：5件（研究期間累積件数：10件）