

「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。

ナノ構造体を活用したDNAの新規解析技術の研究と開発を進め、ナノ構造体のサイズ、形状などとDNA分子の挙動との関連を明らかにした。これらの知見をもとに、ナノ構造体としてナノボールやナノピラーを新たに作成し、100塩基から20万塩基までのDNAを数秒で解析できることを明らかにした。さらに、ナノテクノロジーを活用することにより、DNAを解析するために大きなチップは必要ではなく、1 mm以下のサイズのチップにおいてもDNA解析が可能であることを明らかにした。さらに、ナノテクノロジーを利用することにより、1分子DNAを効率的にマニピュレートする技術を開発し、1分子DNAの多型解析およびシーケンシングを達成するための基本的な技術確立した。また、サンプル前処理、反応、解析などを集積化したチップの開発を行った。

ナノチップの応用を目指して、約8,000人のゲノムサンプルとその詳細な臨床情報を収集し、TaqMan法を中心として、ダイレクトシーケンス法やPCR-RFLP法、プライマーエクステンション法などにより、代表的なゲノム多型のタイピングを行い、さらに、臨床情報とゲノム多型の関連や相互作用を解析し、疾患と遺伝子多型の関係を明らかにした。

今後は、さらに、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す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、ナノテクノロジーを基盤とした集積型チップおよび革新的なナノチップの開発、ならびにナノチップの実用化に向けた研究を進めた。

昨年度までに開発したプラスチックチップ作製技術を用いて、DNAの制限酵素切断反応とDNA解析を集積化したチップおよび、等温遺伝子増幅法であるLAMP法とDNA解析を集積化したチップを開発した。さらに、タンパク質解析と細胞培養、タンパク質抽出、酵素処理などを集積化したチップの開発を行った。これらの研究成果により、ゲノム情報やプロテオーム情報を基盤とした疾患の診断、細菌の検出などを可能にするチップの開発に成功した。

ナノ構造体を活用したDNAの新規解析技術の研究と開発を進め、ナノ構造体のサイズ、形状などとDNA分子の挙動との関連を明らかにした。その結果、ナノ構造体の大きさが、ランダムコイル状のDNAの慣性半径より小さい場合に、ナノ構造体とDNAとの相互作用が効果的に発生することを明らかにした。また、ナノ構造体中のDNAの物性を測定し、拡散係数が通常の水中より数分の1に低減していることを見いだした。また、これらの知見をもとに、ナノ構造体としてナノボールやナノピラーを新たに作成し、100塩基から20万塩基までのDNAを数秒で解析できることを明らかにした。さらに、ナノテクノロジーを活用することにより、DNAを解析するために大きなチップは必要ではなく、1 mm以下のサイズのチップにおいてもDNA解析が可能であることを明らかにした。さらに、ナノテクノロジーを利用することにより、1分子DNAを効率的にマニピュレートする技術を開発し、1分子DNAの多型解析およびシーケンシングを達成するための基本的な技術確立した。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。

田畑グループ

本年度はLIGAプロセスで製作したマイクロチップの外部に検出用作用電極として金メッシュ電極を設置して、ヒドロキノンをはじめ幾つかの酸化・還元性化合物について電気泳動・検出を試みた。微量検出を行うために必要な全量電解を達成するために、マイクロチャンネルをチップ端に露出させ、そのチャンネル端に近接して検出電極として孔径50μmの金製メッシュを設置した。電気化学検出により陽イオンサンプルであるフェリシアン化カリウム、陰イオンサンプルであるコバルトフェナントロリンのエレクトロフェログラム測定を試みた結果、良好な酸化・還元電流が観察され、イオン価数が正負のいずれでも検出可能であること、検出ピークは明確であること、全量電解されていること、サンプル濃度とピーク高は良好な直線関係を示すこと、が確認された。これらの基礎実験結果より、金製メッシュ電極を検出電極とするマイクロチャンネルチップの電気化学検出法は次世代型新規ナノチップデバイスの検出法として有望であることが明らかとなった。

藤井グループ

本年度は、ナノスケールでのタンパク質合成反応において、反応の効率化と制御性を向上するためリボソームを固定するためのナノデバイスの開発を行うにあたり、昨年度に考案したナノ構造と固定化方法を再検討し、高効率でリボソームをナノ構造上に固定するデ

バイスの開発をおこなった。昨年度のナノ構造へのリボソームの固定法のように、従来の分子固定法は拡散律則の受動的な手法、すなわち分子が拡散によって基板に接した瞬間の化学的あるいは物理的な結合を利用したものであるため、固定化の高速化には貴重なサンプルの濃度を上げる他なく、無駄なサンプルの消費という点において高効率化とは相入れない手法であった。我々は積極的に外力を与えて分子を操作することによって固定に導く、より効率的な能動的固定法の検討を行い、静電力とナノサイズの電極構造を利用して、高効率かつナノ領域の任意の部位のみに分子を固定する手法の開発に成功した。具体的には、FIB-CVD(Focused Ion Beam-Chemical Vapor Deposition)法を利用してリアクタ内にナノ電極を作製し、そこに生ずる高周波高電界による誘電泳動力でリボソームをナノ電極上に引き寄せて固定することに成功した。今後、ナノ電極上に固定したリボソームを用いてタンパク質合成のメカニズムの解明を行うと共に、一分子反応・分析ナノデバイスの開発へと展開していく予定である。

三木グループ

本グループでは、他グループによって作成されたナノチップテクノロジーを有用度や効率の観点から評価し、ナノチップテクノロジーのゲノム多型解析への応用を目指して、その基盤を確立することを目的としている。そのため、解析に必要な多くのゲノムサンプルを収集し、既存の方法論によって代表的なゲノム多型を解析した。具体的には約8,000人のゲノムサンプルとその詳細な臨床情報を収集し、TaqMan法を中心として、ダイレクトシーケンシング法やPCR-RFLP法、プライマーエクステンション法などにより、代表的なゲノム多型のタイピングを行い、さらに、臨床情報とゲノム多型の関連や相互作用を解析し、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 遺伝子多型と血清MCP-1レベルとの関連や、angiotensin-converting enzyme (ACE) 遺伝子多型と症候性ラクナ梗塞レベルとの関連、beta3 subunit of G proteins (GNB3) 遺伝子多型と心血管障害危険因子（高血圧、肥満、糖尿病、高中性脂肪血症）の集積との関連などが示唆された。

3. 研究実施体制

馬場グループ

- ①研究分担グループ長：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

田畑グループ

- ①研究分担グループ長：田畑修（京都大学大学院 工学研究科 教授）
- ②研究項目：ナノチップ・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

藤井グループ

- ①研究分担グループ長：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

三木グループ

- ①研究分担グループ長：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) 論文発表

馬場チーム

- F. Xu, M. Jabasini, S. Liu, and Y. Baba
Relationship between Width and Migration Time Used in Double-Stranded DNA Separation by Microchip Electrophoresis
Analyst (IF=2.292), 2003, 128, 589-592.
- F. Dang, L. Zhang, M. Jabasini, N. Kaji, and Y. Baba
Characterization of Electrophoretic Behavior of Sugar Isomers by Microchip Electrophoresis Coupled with Videomicroscopy
Anal. Chem. (IF=5.094), 2003, 75 (10), 2433-2439.
- M. Tabuchi, Y. Kuramitsu, K. Nakamura and Y. Baba
A 15-seconds Protein Separation by Employing Hydrodynamic Force on a Microchip
Anal. Chem. (IF=5.094), 2003, 75(15), 3799-3805.
- H. Noguchi, M. Ueda, Y. Baba, and M. Takasu
Anisotropic Friction Model of DNA Electrophoresis in Polymer Solutions: Comparison with Direct Observations
J. Polymer Sci.: Part B(IF=1.221), 2003, 41, 1316-1322.
- M. Tabuchi, Y. Kuramitsu, K. Nakamura and Y. Baba
Rapid Subpicogram Protein Detection on a Microchip without Denaturing

- J. Proteome Res. (IF has not yet been reported), 2003, 2, 431-435.
- G. Hashiguchi, T. Goda, M. Hosogi, K. Hirano, N. Kaji, Y. Baba, and H. Fujita
DNA Manipulation and Retrieval from an Aqueous Solution with Micromachined Nanotweezers
Anal. Chem. (IF=5.094), 2003, 75 (17), 4347-4350. Accelerated Articles
 - R. Bakalova, H. Ohba, Zh. Zhelev, M. Ishikawa, Y. Shinohara, and Y. Baba
Cross-talk between Bcr-Abl tyrosine kinase, protein kinase C and telomerase - a potential reason for resistance to Glivec in chronic myelogenous leukemia
Biochemical Pharmacology (IF=3.542), 2003, 66, 1879-1884.
 - K. Kajimoto, T. Daikoku, F. Kita, N. Yamazaki, M. Kataoka, Y. Baba, H. Terada, and Y. Shinohara
PCR-Select Subtraction for Characterization of Messages Differentially Expressed in Brown Compared with White Adipose Tissue
Molecular Genetics and Metabolism (IF=2.476), 2003, 80, 255-261.
 - N. Kaji, M. Ueda, and Y. Baba
Stretching of Megabase-Sized DNA Molecules by Tuning Electric Field Frequency
Appl. Phys. Lett. (IF=4.207), 2003, 83(16), 3413-3415.
 - M. Ueda, M. Takai, K. Taniguchi, Y. Takamura, Y. Horiike, Y. Baba
Fluorescence modulation of long DNA molecules adsorbed onto a microelectrode surface
Appl. Phys. Lett. (IF=4.207), 2003, 83(24), 5086-5088.
 - M. Ueda, K. Taniguchi, Y. Takamura, Y. Horiike, Y. Baba
Fluorescence Emission Control of Long DNA Molecules Adsorbed on Microelectrode Surfaces by External Voltage
Jpn. J. Appl. Phys. (IF=1.280), 2003, 42, 788-790.
 - N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, and Y. Baba
Fast Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chip under Direct Current Electric Field
Anal. Chem. (IF=5.094), 2004, 76 (1), 15-22.
 - A. Unami, Y. Shinohara, K. Kajimoto, and Y. Baba
Comparison of Gene Expression Profiles Between White and Brown Adipose Tissues of Rat by Microarray Analysis
Biochemical Pharmacology (IF=3.542), 2004, 67 (3) 555-564.

- Z. Zhelev, H. Ohba, R. Bakalova, V. Hadzhimitova, M. Ishikawa, Y. Shinohara, Y. Baba
Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells, without any influence on the viability of normal lymphocytes
Cancer Chemotherapy and Pharmacology (IF=1.928), 2004, 53, 267-275.
- M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, and Y. Baba
Nanospheres for DNA Separation Chips
Nature Biotech. (IF=12.822), 2004, 22(3), 337-340.
- I. Khalil, S. Futaki, M. Niwa, Y. Baba, N. Kaji, H. Kamiya, and H. Harashima
Mechanism on improved gene transfer by N-terminal stearylization of octaarginine: Enhanced cellular association by hydrophobic core formation
Gene Therapy (IF=5.616), 2004, 11, 636-644.
- R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, T. Kubo, M. Fujii, M. Ishikawa, Y. Shinohara, and Y. Baba
Antisense inhibition of bcr-abl/c-abl synthesis promotes telomerase activity and upregulates tankyrase in human leukemia cells.
FEBS Lett. (IF=3.912), 2004, 564(1-2): 73-84.
- M. Ueda, T. Hayama, Y. Takamura, Y. Horiike, T. Dotera, Y. Baba
Curvature Entropy Trapping of Long DNA under Hydrodynamic Flows In Microfluidic Devices
Jpn. J. Appl. Phys., 2004, Vol.43, No.4A, pp1649-1650

田畑チーム 該当無し

藤井チーム 該当無し

三木チーム

- Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Kohara K and Miki T.
Association of endothelin-1 gene variant with hypertension.
Hypertension 41:163-167, 2003.
- Kohara K, Fujisawa M, Ando F, Tabara Y, Niino N, Miki T, and Shimokata H.
MTHFR gene polymorphism as risk factor for silent brain infarcts and white matter lesions In Japanese general population: NILS-LSA study.
Stroke 34:1130-1135, 2003.
- Chen Y, Nakura J, Jin JJ, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Tabara Y, Yamamoto Y,

Igase M, Bo X, Kohara K and Miki T.

Association of the GNAS1 gene variant with hypertension is dependent on alcohol consumption.

Hypertens Res 26:439-444, 2003.

- Wu Z, Nakura J, Abe M, Jin JJ, Yamamoto M, Chen Y, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Bo X, Kohara K and Miki T.

Genome-wide linkage disequilibrium mapping of hypertension in Japan.

Hypertens Res 26:533-540, 2003.

- Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Chen Y, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Bo X, Kohara K and Miki T.

Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension.

Hypertens Res 26:547-552, 2003.

- Babaya N, Ikegami H, Fujisawa T, Nojima K, Itoi-Babaya M, Inoue K, Nakura J, Abe M, Yamamoto M, Jin JJ, Wu Z, Miki T, Fukuda M and Ogihara T.

Association of I27L polymorphism of hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene with high-density lipoprotein cholesterol level.

J Clin Endocrinol Metab 88:2548-2551, 2003.

- Tabara Y, Kohara K, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, Kondo I and Miki T.

Polymorphism of MCP-1 gene is associated with plasma level of MCP-1 but not with carotid intima-media thickness.

Hypertens Res 26:677-683, 2003.

- Yamada Y, Ando F, Niino N, Miki T and Shimokata H.

Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese.

J Hum Genet 48:469-475, 2003.

- Morishima A, Ohkubo N, Maeda N, Miki T and Mitsuda N.

NF B regulates plasma apolipoprotein A-I and HDL-cholesterol through inhibition of PPAR .

J Biol Chem 278: 38188-38193, 2003.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：8件）