

「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作製技術の精査を進め、プラスチックおよびガラス上にマイクロチャンネルアレイを作成するための基本条件を確立した。さらに、マイクロチャンネル中でのDNAの泳動挙動についての詳細な検討により、様々なサイズのDNAの最適解析条件を確立した。また、マイクロチップを用いた、高速DNA解析の技術を確立し、SNP同定とSNP検出の高速化に成功した。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、タンパク質の反応系の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、ゲノムサンプルの収集とその動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の同定を進めた。また、本研究課題で開発したシステムの実用化・市販化に向けて、企業との共同研究を進めた。

今後は、SNP解析のための高速マイクロチップ電気泳動の実用化とマイクロチャンネルアレイを用いた高スループットゲノム解析技術の研究開発に特に注力していく予定である。さらに、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

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

X線露光システムを用いたマイクロチャンネルアレイの設計・製作基礎技術の確立を目的とし、移動マスクX線露光システムの構築とマイクロチャンネル加工プロ

セスの開発を行った。移動マスクX線露光システムはプロトタイプが完成した。X線露光により幅100 μ m、深さ50 μ mの十字構造のアクリル製シングルマイクロチャンネルを形成し、紫外線硬化樹脂でカバー接合し、泳動実験を行なった。その結果、disodium fluoresceinとfluorescein-5-sulfonic acidの良好な分離を示す2つのピークが得られることを確認した。現在、超高速DNA解析用チップ製作を目的として、露光システムおよびチップ加工プロセスの改善を行なっている。

B．マイクロチャンネル中でのDNAの泳動挙動解析

上記課題Aで試作したマイクロチップのチャンネル中でのDNAの泳動挙動を昨年度開発したイメージングシステムにより解析し、DNAの泳動挙動を高分子物理的な理論を用いて解析した。また、このイメージングデータを基に、FlumCADソフトによるシミュレーションを行い、DNAの解析条件を最適化した。その結果、100塩基対程度までのDNAであれば10秒以内、500塩基対までのDNAであれば40秒以内、1000塩基対程度までのDNAであれば70秒以内に解析できる条件を確立した。

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

上記課題Bで確立したDNA解析条件に基づいて、マイクロチップを設計・試作し、種々の標準DNAサンプルの解析を行った。その結果、1000塩基までのDNAを70秒程度で解析することに成功した。また、内部標準のDNAマーカーを用いることにより、DNAのサイズを正確に決定し（精度1-3%、正確さ2-5%）、その濃度を定量できる（精度5-10%、正確さ10-30%）ことを明らかにした。さらに、この方法を、高血圧関連遺伝子のSNP同定に応用した。さらに、がん遺伝子であるk-ras遺伝子のSNP検出に応用し、マイクロチップ上でのSSCP(single strand conformation polymorphism)に基づくSNP検出に成功した。さらにその際の時間はわずか1分程度であった。

D．ゲノムサンプルの収集とSNPs解析

現在までに5つのサブグループから成る約4500人の臨床データの収集およびDNAの抽出、保存が完了した。既知の24種類以上の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析した結果、ACEと随時血圧、入院後の血圧、心血管系危険因子の有無との相関、APOE及びDBHと起立性の血圧変化との相関、頸動脈硬化に関してACE及びAPOEと年齢との相互作用を見出した。

さらに、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、収集の完了している約2700人のサブグループの中から血圧の高い群と低い群を対象にしたゲノムワイドスキャンで、約20個の候補遺伝子領域を探し出した。

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遺伝子増幅（PCR：polymerase chain reaction）

反応とキャピラリーゲル電気泳動による分離検出とを同一チップ上で行う際に、チップの構造そのものにヒータならびに温度センサを組み込む方法について検討を行った。具体的には、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考え、ガラス基板上に2層のITO (Indium Tin Oxide) を材料とする透明電極構造およびアルミニウムの結線を形成し、外部から電源を供給することによって、PCR反応を行うためのチャンバを局所的に加熱することを試みた。ヒーター機能付きハイブリッド構造の性能評価のため、チャンバ内温度を37℃に一定に保ちながら生体外蛋白質合成反応を行いGFP (Green Fluorescent Protein) およびBFP (Blue Fluorescent Protein) を合成し、蛍光観察によって実際に蛋白質が合成されることを確認した。

F. マイクロチップ・ナノチップの実用化に向けた研究・開発

現在、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・開発を進めており、具体的な実用化・製品化に向けた共同研究をそれぞれの会社と個別に進めている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

M. Ueda, Y. Kiba, H. Abe, H. Kuyama, A. Arai, H. Nakanishi, and Y. Baba Fast Separation of Oligonucleotide and Triplet-repeat DNA on a Microfabricated Capillary Electrophoresis Device *Anal. Sci.*, 2000, 16, 657-658.

M. Ueda, H. Nakanishi, O. Tabata, and Y. Baba Imaging of a Band for DNA Fragment Migrating in Microchannel on Integrated Microchip *Mat. Sci. Eng. C.*, 2000, 12, 33-36.

Y. Shinohara, T. Ishida, M. Hino, N. Yamazaki, Y. Baba, and H. Terada Characterization of Porin Isoforms Expressed in Tumor Cells *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 6067-6073.

M. Ueda, Y. Endo, H. Abe, H. Kuyama, H. Nakanishi, A. Arai, and Y. Baba Field-Inversion Electrophoresis on a Microchip Device *Electrophoresis*, 2001, 22(2), 217-221.

C. Yoshida, Y. Endo, and Y. Baba Enhanced Throughput for DNA Sequencing by Capillary Array Electrophoresis with Electric Field Strength Gradient *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, 13(1), 99-103.

馬場嘉信 ジーン・ウォーズのゆくえ ヒト・ゲノム計画の向こうに見えるもの
化学が果たす役割 *化学*, 2000, 55(4), 22-26.

上田正則、馬場嘉信 長鎖DNAを引き伸ばすっ！*生物物理*, 2000, 40(1), 48-51.

馬場嘉信 SNPs解析からゲノム医療へ *BioIndustry*, 2000, 17(8), 5-12.

- 馬場嘉信 マイクロチップ・ナノチップ技術によるゲノム解析 Jpn. J. Electrophoresis, 2000, 44, 85-89.
- 馬場嘉信 21世紀の分析化学の役割「はかる」 遺伝子を測る ぶんせき, 2000(10), 602-606.
- 馬場嘉信 マップ・ナノチップテクノロジーによる次世代DNA解析技術の開発 実験医学『ゲノム医科学とこれからのゲノム医療』, 2000, 18(12), 1595-1601.
- Y. Baba Development of Novel Biomedicine based on Genome Science Eur. J. Pharm. Sci., 2001, 13(1), 3-4.
- 馬場嘉信 新たな創薬戦略を創出する次世代ゲノム・プロテオーム解析技術 ファルマシア, 2001, 37(1), 46.
- 馬場嘉信 「DNAチップ応用技術」 第12章 SNPs解析 松永 是 監修 シーエムシー (2000) , pp. 124-133.
- Y. Baba Capillary Affinity Gel Electrophoresis in Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids Vol. 2, K. Mitchelson and J. Cheng (Editors) Humana Press, Totawa, 2001. pp.347-354.
- Y. Kiba and Y. Baba Analysis of Triplet Repeat DNA by Capillary Electrophoresis in Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids, K. Mitchelson and J. Cheng (Editors) Humana Press, Totawa, 2001. pp. 221-229
- Y. Baba and J. Landers (Guest Editors) The Special Issue on Miniaturization II Electrophoresis, 2001, 22(2), 185-372.
- M. Shionoya, H. Harashima, and Y. Baba (Guest Editors) Special Issue on Molecular Design and Drug Delivery of Genetic Drugs Eur. J. Pharm. Sci., 2001, 13(1), 1-103.
- Y. Kiba and Y. Baba Nucleic acids, oligonucleotides, and DNA, CE in Encyclopedia of Chromatography J. Cazes (Editor) Marcel Dekker Publisher, (2001) , pp. 556-560
- Y. Baba DNA sequencing studies by CE in Encyclopedia of Chromatography J. Cazes (Editor) Marcel Dekker Publisher, (2001) , Chap. 94, pp. 259-261
- 馬場嘉信 (Guest Editor) マイクロ化学システム 特集号 電気学会論文誌E, 2001, 121-E, 157-191
- 白石晴樹、川中智司、松田十四夫、田畑修、池田重良「感光性エポキシ樹脂をエッチングマスクとして用いる電気泳動マイクロチップの作製」分析化学、Vol. 49, No.12、 pp. 1037-1041, 2000
- Hong, J.-W., Fujii, T., Seki, M., Yamamoto, T., and Endo, I. : Integration of Gene Amplification and Capillary Gel Electrophoresis on a Polydimethylsiloxane-glass

Hybrid Microchip Electrophoresis, Vol.22, No.2 (2000) pp.328-333

山本貴富喜、藤井輝夫、野島高彦、ホン・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の開発 電気学会論文誌E (センサ・マイクロマシン部門誌) (2000) accepted

藤井輝夫：生化学反応を行うマイクロリアクター ペトロテック、Vol. 23, No. 11 (2000.11) pp.932-938

Uemura, K., Kohara, K., Nakura, J., and Miki, T. Deletion polymorphism of ACE gene is associated with higher blood pressure after hospitalization in normotensive subjects. Hypertens. Res. 23 : 201-205. (2000)

Uemura, K., Nakura, J., Kohara, K., and Miki, T. Association of ACE I/D polymorphism with cardiovascular risk factors. Hum. Genet. 107 : 239-242. (2000)