

次世代 DNA マイクロアレイシステムの開発

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

ゲノムプロジェクトの進行につれ、次々に新規の遺伝子が同定されてきているが、これらの機能を効率よく解析する技術として次世代 DNA マイクロアレイシステムを緊急に開発する必要がある。このため新規金属錯体を基本構造とする核酸染色試薬を合成し、これを時間分解蛍光検出法と組み合わせた新しいセンシング原理を追求するとともに、大量のゲノム情報を迅速に処理し、かつ高感度に検出するための装置工学技術の開発・改良が急務となる。本課題では、新しい蛍光ラベリング法およびセンシング法の原理の確立とそれによるマイクロアレイシステムの実証を行う。さらに、これに並行して新センシングシステムにも対応できる定量化アレイヤーと遅延蛍光用イメージアナライザーから構成される大容量高速マイクロアレイシステムを試作開発し実用化を目指す。

第 I 期の目標は、マイクロアレイシステムの試作機を開発することであり、第 II 期の目標は、試作機の実用化のための評価を行うことである。

2. 研究概要

1. チップ画像化のための新しい染色法の開発に関する研究 (早稲田大学)

松本らは、ユロピウムなどの希土類金属錯体の分子設計により超強蛍光剤や長寿命蛍光剤を開発してきた。これらを DNA マイクロチップ上に形成された二本鎖核酸部分の染色に適用する。これらは従来の蛍光試薬 (Cy3 や Cy5) に比べ長寿命蛍光を持つため、時間分解蛍光測定法を適用すればバックグラウンドを大幅に低減させることができる (蛍光性夾雑物は、一般に短寿命蛍光であるので高感度化が達成できる)。また、分子構造によって自由に発光波長を設計できるので正常型と異常型のゲノムに異なった希土類金属錯体を導入すれば競合染色も可能である。以上の観点から種々分子設計した金属錯体を基本骨格とした核酸染色試薬の合成研究を行う。また、これらの蛍光物質を核酸に結合させ、最終的な標識アナログを作る。また、チップ画像化に必要な DNA の定量的スポットティングを行うための基礎化学的な研究として、固定化反応及び固体表面でのハイブリダイゼーションプロセスの解析を行う。

- (1) DNA マイクロアレイ検出用遅延蛍光性金属錯体の開発
- (2) 核酸修飾法の検討と評価
- (3) 定量的 DNA 固定化の検討

- (4) 固定化 DNA の効率的ハイブリダイゼーションの検討
2. 二本鎖核酸特異的染色システムの開発に関する研究 (九州大学)

DNA マイクロアレイ上の核酸の特異的染色法としてゲノム断片や mRNA などを蛍光色素で化学修飾する方法が一般的である。原理的には DNA マイクロアレイ上に形成された二本鎖核酸領域のみを染色することも考えられるが、これに最適な染色剤は知られていない。竹中らは、これまで電気化学活性縫い込み型インターカレーターを用いて二本鎖 DNA 領域の電気化学的染色法を開発してきた。ここでは、松本らの開発した希土類金属錯体を縫い込み型インターカレーターに導入した分子を種々合成する。合成分子の二本鎖核酸への特異性を高速反応解析装置によって速度論的に評価する。特に、ここで開発する分子は、DNA 二本鎖 (ゲノム断片の場合) や DNA-RNA 二本鎖 (mRNA の場合) に対し高い選択性を有する必要がある。優れた染色剤開発のため分子構造が異なった一連の改良型分子を合成する。合成分子の分離精製の迅速化のために高速液体クロマトグラフィーの分析システム及び分取システムを利用する。最終的には合成した一連の染色剤を用いて基板上の一本鎖、二本鎖核酸領域の遅延蛍光染色能の評価を行う。

- (1) 二本鎖特異的遅延蛍光性インターカレート染色剤の合成研究
- (2) 合成染色剤の核酸識別能の評価
- (3) 固定化二本鎖核酸に対する合成染色剤の染色能の評価
- (4) 染色剤の高性能化の検討

3. 遅延蛍光用スキャナーの開発 (日本レーザー電子株)

本研究では、DNA マイクロアレイの検出部として遅延蛍光検出器を組み込んだイメージアナライザーが必要となる。このため共焦点レーザースキニング型のスキャナーをベースに、レーザーパルスとリレイ回路を組み込んだ遅延蛍光検出系を持つスキャナーを開発する。また CCD を用いた高速イメージアナライザーの開発を理研と協力して行う。

4. 改良型 DNA マイクロアレイシステムの開発に関する研究 (理化学研究所)

現行のマイクロアレイシステムとそれを構成する技術には、処理の高速性、信頼性、再現性等について装置工学的にみて多くの未開発、不十分な点がある。本研究では、現行の装置を活用しつつ、新しい染色技術に対応できる工学的に洗練された DNA マイクロアレイシステムの開発を行い、高速性・定量性に優れた競争力の高い装置の開発を目指す。すなわち、チップ上の DNA の定量化に必要なリソグラフィック基板の開発と従来システムの応用、リソグラ

フィック基板用のアレイヤーの開発と、高速イメージアナライザーの開発を日本レーザ電子と協力して行う。さらに、新しい技術と従来法との比較による feasibility テストを行い、評価する。

- (1) 定量化を目指したリソグラフィック基板の開発
- (2) リソグラフィック基板の応用研究
- (3) 改良型アレイヤーの開発
- (4) 高速イメージアナライザーの開発
- (5) マイクロアレイシステム化の研究

3. 年次計画

本プロジェクトでは、DNA二本鎖に特異的に結合する縫い込み型インターカレーターに、ユウロピウムなどの遅延型蛍光物質を組み合わせた新しい染色剤を開発し、これを使った次世代マイクロアレイシステムの技術開発を行い、

最終的に実用化することを目指す。

第Ⅰ期の3年間では、第一に二本鎖核酸特異的染色剤（縫い込み型インターカレーター）開発し、両者を結合して遺伝子チップ染色用の遅延蛍光性インターカレート染色剤を合成する。遅延蛍光測定用にレーザースキャン方式とCCD方式のイメージアナライザーを開発することを目指す。これと並行して上記染色法式に必要なチップ上のDNAの定量化を目指した、リソグラフィック基板の開発を行うとともに、アレイヤーを改良し、定量的スタンピング方式を確立する。これにより次世代マイクロアレイシステムの基本方式を確立する。

第Ⅱ期の2年間は、第Ⅰ期で確立したシステムを用いた実用化を目指す。すなわち、現有システムを用いた（Cy3, Cy5）方法との比較研究を実サンプルを用いて行いながら、本システムの実用性を明らかにする。

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
1. チップ画像化のための新しい染色剤の開発に関する研究		実証研究		実用化研究	
(1) DNA マイクロアレイ検出用遅延蛍光性金属錯体の開発	合成研究				
(2) 核酸修飾法の評価		物理化学的評価			
(3) 定量的DNA固定化の検討		合成品の核酸修飾法の開発と評価			
(4) 固定化DNAの効率的ハイブリダイゼーションの検討		定量法の開発	評価	効率化・信頼性の向上	
2. 二本鎖核酸特異的染色システムの開発に関する研究		実証研究		実用化研究	
(1) 二本鎖特異的遅延蛍光性インターカレート染色剤の合成研究	試作染色剤の合成	改良型染色剤の合成			
(2) 合成染色剤の核酸識別能の評価		溶液サンプルでの評価			
(3) 固定化二本鎖核酸に対する合成染色剤の染色能の評価		定性的評価	定量的評価		
(4) 染色剤の高性能化の検討				合成法の改良	
3. 遅延蛍光用スキャナーの開発	試作		製品設計	実用化試験	評価
4. 改良型DNAマイクロアレイシステムの開発・研究		実証研究		実用化研究	
(1) 定量化を目指したリソグラフィック基板の開発	試作		評価		
(2) リソグラフィック基板の応用研究	(転写部)	(検査部)			
(3) 改良型アレイヤーの開発		CY-3	CY-5の適用		
(4) 高速イメージアナライザーの開発	予備試験	製作・評価	サンプル製造と評価		
(5) マイクロアレイシステム化の研究		予備試験	試作・評価	システム化と評価	
所要経費(合計)	191百万円	231百万円			

4. 平成12年度における実施内容と達成目標

1. チップ画像化のための新しい染色法の開発に関する研究

DNAの標識化剤として利用する蛍光性希土類錯体の開発を行う。DNAの検出試薬として最適な性質を有する錯体を合成する。すなわち、錯体の安定性が高く、発光強度が強く、その発光が長寿命であるというような性質を持つ錯体の開発を目指す。

また、希土類錯体を標識化剤として利用したガラス基盤上でのDNAは、ハイブリダイゼーション反応を確立する。具体的には、標的DNAを希土類錯体で直接に標識化したり、あるいはストプトアビジン-ビオチン相互作用を利用して間接的に標識化し、ハイブリダイゼーション反応を行う。そしてこの過程で希土類錯体の標識化剤としての性能を評価する。一方で、九大で開発の進められている縫い込み型インターカレータと希土類錯体の結合体を標識化剤として利用したハイブリダイゼーションアッセイの条件検討も行う。

2. 二本鎖核酸特異的染色システムの開発に関する研究

前年度一連の前駆体が合成できたので、本年度はこれらの前駆体に松本らが開発した蛍光色素を連結し、一連の最終染色剤を得る。得られた染色剤の基本的性質を調べる目的で一本鎖、二本鎖核酸に結合時の蛍光スペクトル挙動、速度論的解析を検討する。これによって染色剤としての最適染色剤の分子構造を検索する。水溶性で多環系の分子を精製するのは難しい。最適染色剤が見つければ大量合成法と簡便な単離・精製法を検討するが、本年度に限れば多数の誘導体を種々合成しその中から最適分子を検索する必要がある。そのためには、高速液体クロマトグラフィー

(HPLC)による精製が必修である。これなしには合成段階のみで多大な時間を費やすことになる。また、合成した分子の特性(二本鎖選択制の度合い、蛍光色素の性質)などを評価するためにコンピュータモデリングも必修である。申請コンピュータシステムを用いて染色剤の最適化を計る。

3. 遅延蛍光用スキャナーの開発(日本レーザ電子㈱)

平成12年度は前年度に試作した遅延蛍光スキャナーのテスト・評価を更に進めつつ、その結果によって改良を実施していくと共に装置としての完成度を高めていく。一方で実用化システムへの開発に向けた構想も積み上げていき、次年度製品設計につなげていく。

又、本年度は前年度に試作した遅延蛍光スキャナーの評価によって得られた知見(励起光の強度と蛍光発光強度の関係 etc)を用いて面照射によるCCDイメージャーに要求される仕様と達成目標に対する構想、設計を行い、理研と協力して、その試作を行う。その評価については、次年度に予定すると共に、CCDイメージャーと前年度に開発した遅延蛍光スキャナーのどちらが実用化に適するかを評価していく。

4. 改良型DNAマイクロアレイシステムの開発・研究

定量性のあるスタンピングを可能とするため、DNA固相化技術及びマーキング技術を含めたリソグラフィック基板の開発を行う。DNAを定量的に末端で結合する固相化法の検討実験及びその手法の基板への適用実験を行いながら、共焦点レーザー顕微鏡により、リソグラフィック基板上に高精度、高密度にスタンピングできるよう、位置合わせ機構を有する新型DNAアレイの開発を行い、DNAマイクロアレイのモデル系の試作を行う。

II 平成12年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. チップ画像化のための新しい染色法の開発に関する研究	早稲田大学	松本和子
2. 二本鎖核酸特異的染色システムの開発に関する研究	九州大学	竹中繁織
3. 遅延蛍光用スキャナーの開発	日本レーザ電子㈱	米田勝實
4. 改良型DNAマイクロアレイシステムの開発・研究	理化学研究所	田代英夫

Ⅲ 研究推進委員会

委 員	所 属
[プロジェクト内委員]	
○松 本 和 子	早稲田大学 理工学部教授
竹 中 繁 織	九州大学 大学院工学研究科助教授
田 代 英 夫	理化学研究所 工学基盤研究部長, 主任研究員
米 田 勝 實	日本レーザ電子(株) 代表取締役社長
[プロジェクト外委員]	
中 村 春 木	大阪大学 蛋白質研究所附属生体分子解析研究センター教授
中 村 祐 輔	東京大学 医科学研究所教授
林 崎 良 英	理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター主任研究員

(注：○は研究推進委員長)

Ⅳ 研究連絡会議

委 員	所 属
竹 中 繁 織	九州大学 大学院工学研究科助教授
田 代 英 夫	理化学研究所 工学基盤研究部長, 主任研究員
松 本 和 子	早稲田大学 理工学部教授
米 田 勝 實	日本レーザ電子(株) 代表取締役社長