

# 次世代 DNA マイクロアレイシステムの開発

研究代表者：松本 和子（早稲田大学理工学部）

## 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 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ラーター）を開発し、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ラーター染色剤を合成する。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方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（Cy 3, Cy 5）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。

### 2. 研究内容及び目標

#### 1. 高感度検出法の追求に関する研究（早稲田大学）

第 I 期で開発した長寿命蛍光性希土類錯体よりも、さらに蛍光特性が優れた希土類錯体を開発する。そしてこの化合物をインターカラーターに結合させた希土類錯体インターカラーターを開発し、これを用いて固相担体上での DNA ハイブリダイゼーション反応を詳細に検討し、応用適性に関する総合評価を行う。また、希土類錯体の蛍光特性に最適化し、積算効果により高感度化された DNA マイクロア

レイ検出装置の開発を並行して行い、希土類ラベル剤の優位性を実証する。

- (1) DNA 検出用蛍光性希土類錯体の開発
  - (2) 蛍光性希土類錯体インターカラーターの開発
  - (3) 固相担体上での DNA ハイブリダイゼーション反応の検討
  - (4) 希土類錯体蛍光検出システムの開発
- #### 2. 二本鎖 DNA 特異的染色剤の高度化に関する研究（九州大学）

第 I 期で合成したプロトタイプの本鎖鎖 DNA 特異的染色剤の高度化を行なう。特に、染色部として有機色素を導入したものを中心に検討を行なう。さらに、理研から供給されるリソグラフィック基板マイクロアレイを用いた評価を行なう。これによって本システムの最終評価を行なう。特にインターカラーターとペプチドとの連結系での予備検討で優れた性能を有する染色剤が合成できているのでこれについても検討し、二本鎖 DNA 特異的染色剤の優位性を実証する。

- (1) アントラセン縫い込み型インターカラーターを基本骨格とした高性能染色剤の合成
  - (2) ペプチドポリインターカラーターを基本骨格とした高性能染色剤の合成
  - (3) リソグラフィック基板チップへの適用の問題点の解決
- #### 3. デジタルアレイの開発に関する研究（理化学研究所）

第 I 期で開発したリソグラフィック基板及び高精度スタンピング技術を用いて、高速解析を可能とするデジタルアレイの開発を行う。また、開発した基板を用いたマイクロアレイを、各研究分担者間で相互に評価できるように、マイクロアレイの供給体制を確立し、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、本システムの優位性を実証する。

- (1) リソグラフィック基板マイクロアレイの評価技術の確立と供給
  - (2) 高機能リソグラフィック基板の確立
  - (3) 高速・高密度 DNA アレイヤーの開発
  - (4) デジタルアレイ検出・解析システムの開発
- #### 4. 実チップの応用試験による次世代マイクロアレイシステムの評価に関する研究（青山学院大学）

理研リソチップ方式で作製した実マイクロアレイを実用試験し、システムの実用性を検証する。具体的には変異原・環境化学物質試験用 cDNA マイクロアレイを理研と共同して作製し、マウス・ラットの個体レベル実験系及び培養細胞系を用いて、化学物質による遺伝子発現変化を解析す

る過程において、理研リソチップと市販のチップとを比較し、次世代マイクロアレイシステムの優位性を検証する。

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。

### 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

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度	備考
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				I期終了
(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			
2. 高感度検出法の追求に関する研究				実用化研究		内容変更
(1) DNA検出用蛍光性希土類錯体の開発						
(2) 蛍光性希土類錯体インターカレーターの開発						
(3) 固相担体上でのDNAハイブリダイゼーション反応の検討						
(4) 希土類錯体蛍光検出システムの開発						
3. 二本鎖核酸特異的染色剤の開発に関する研究		実証研究				I期終了
(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						
4. 二本鎖DNA特異的染色剤の高度化に関する研究				実用化研究		内容変更
(1) アントラセン縫い込み型インターカレーターを基本骨格とした高性能染色剤の合成						
(2) ペプチドポリインターカレーターを基本骨格とした高性能染色剤の合成						
(3) リソグラフィック基板チップへの適用の問題点の解決						I期終了
5. 遅延蛍光用スキャナーの開発		試作	製品設計			

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度	備考
6. 改良型 DNA マイクロアレイシステムの開発・研究		実証研究				
(1) 定量化を目指したリソグラフィック基板の開発	試作(転写部)	(検査部)	評価			
(2) リソグラフィック基板の応用研究		cy-3	cy-5の適用			
(3) 改良型アレイヤーの開発	予備試験	製作・評価	サンプル製造と評価			
(4) 高速イメージアナライザーの開発		予備試験	試作・評価			
(5) マイクロアレイシステム化の研究						
7. デジタルアレイの開発に関する研究				実用化研究		内容変更
(1) リソグラフィック基板チップの評価技術の確立と供給						
(2) 高機能リソグラフィック基板の確立						
(3) 高速ハイブリステーションの開発					改良・最適化	
(4) デジタルアレイ検出・解析システムの開発					改良・最適化	
8. 実チップの応用試験による次世代マイクロアレイシステムの評価に関する研究				実用化研究		新規
所要経費(合計)	191百万円	231百万円	245百万円	266百万円		

#### 4. 平成14年度における実施内容と達成目標

##### 1. 高感度検出法の追求に関する研究

これまでに開発してきた希土類錯体の蛍光特性の改良を目指し、新しい錯体の分子設計を行う。ここでは、希土類イオンとの錯解離定数が小さく、かつ錯形成時に励起波長をできる限り長波長側に持つ物質の開発を目指す。そして九州大学と共同で希土類錯体インターカラーターの分子設計と合成を進め、核酸ハイブリダイゼーションを高精度・高感度に検出する手法の完成度を高める。これらの実験研究と並行して、開発された希土類錯体インターカラーターの蛍光特性に適した検出性能を持つ検出システムを開発する。検出システムの中核として、固相担体上に微量スポットされた希土類錯体を高感度に時間分解検出できる高感度遅延蛍光スキャナーを試作する。希土類錯体インターカラーターの実用性を実証する。

##### 2. 二本鎖 DNA 特異的染色剤の高度化に関する研究

これまでの知見を踏まえ2つの方針で染色剤の高度化と

リソグラフィック基板マイクロアレイを用いた評価を行なう。縫い込み型インターカラーター骨格としては、分子内エネルギー移動や電子移動による消光が起こらない色素の組み合わせにて検討を行なう。アントラセン縫い込み型インターカラーターが有効であることを昨年度の終わりに示すことが出来たのでこれを基本骨格とする染色剤にて最終的な高性能化を行なう。ペプチド骨格にインターカラーター色素を複数個組み合わせた染色剤を開発する。すでに本分子設計により二本鎖特異性を有し、かつ、二本鎖 DNA に結合すると蛍光強度が増大する染色システムが開発できているが、AT 含量の高い DNA に限ったものであった。これをすべての塩基含量に対して等しく発蛍光する分子を開発する。これら二つの系に対してリソグラフィック基板マイクロアレイを用いて二本鎖 DNA 特異的染色剤の実用性を実証する。

##### 3. デジタルアレイの開発に関する研究

デジタルアレイの開発のために、高反射ミラー型リソグ

ラフィック基板に対応し、スポット位置の自動認識機能を有するデジタルスキャナーの開発を行い、アレイ画像データからの自動解析手法の研究を行う。開発した基板を用いたマイクロアレイを、実サンプルにて評価できるように、マイクロアレイの供給体制を確立する。さらに、スタンプ領域と非スタンプ領域に異なる表面処理が可能なリソグラフィック基板の優位性を利用し、高密度マイクロアレイ用基板の技術開発及びそれに対応した高速高密度 DNA アレイヤー、高精度針の開発を行う。リソグラフィック基板、デジタルアレイの実用性を実証する。

#### 4. 実チップの応用試験による次世代マイクロアレイシステムの評価に関する研究

理研リソグラフィック基板方式で作製した実マイクロアレイ（変異アレイ）の実用試験を行う。マウスの個体レベル実験系で、変異がん原物質、非がん原毒性物質の3系統

の物質について評価する。マウスに単回あるいは短期間投与し、投与後4時間後と28日後に標的臓器とその他の臓器を摘出し、mRNAを抽出する。Cy3, Cy5でラベルした逆転写cDNA鎖を合成し、マイクロアレイにハイブリダイズして、発現の増加または減少した遺伝子を検出する。検出時期が投与4時間と28日で適当か検討する。また、一部の組織からはタンパク質分画を抽出して、mRNAのみでなく実際にタンパク質の発現が変化していることをウェスタンブロット法で確認する。

一方、培養細胞系では、内分泌攪乱物質による遺伝子発現の経時変化をオリゴヌクレオチド型理研リソグラフィック基板マイクロアレイを用いて解析するとともに、変化の認められた遺伝子については、この実験系の特色を生かして、定量的PCR法、*in situ*ハイブリダイゼーション法との比較を行う。

## II 平成14年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 高感度検出法の追求に関する研究	早稲田大学	◎松本和子 竹中繁織
2. 二本鎖DNA特異的染色剤の高度化に関する研究	九州大学	
3. デジタルアレイの開発に関する研究	理化学研究所	田代英夫 降旗千恵
4. 実チップの応用試験による次世代マイクロアレイシステムの評価に関する研究	青山学院大学	

(注：◎は研究代表者)

## 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 部長, 主任研究員
降旗千恵	青山学院大学 理工学部 教授
[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, 理化学研究所 遺伝子多型センター チームリーダー
林崎良英	理化学研究所 ゲル科学総合研究センター プロジェクトディレクター, 生体分子機能研究室 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 部長, 主任研究員
松 本 和 子	早稲田大学 理工学部 教授
降 旗 千 恵	青山学院大学 理工学部 教授