

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レータ）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レータに結合させた希土類錯体インターカレータを開発し、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レータの開発
 - (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二本鎖 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。特にインターカレータ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レータ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 (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、次世代マイクロレイシステムの優位性を検証する。

い込み型インターカレータに、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縫

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タ染色剤の合成研究	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				実用化研究		内容変更
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						
5. 遅延蛍光用スキャナーの開発		試作	製品設計			I期終了

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				I期終了
(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		cy3	cy5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				改良・最適化		
(3) 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	227百万円	

4. 平成15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

前年度試作した遅延蛍光検出装置の実用化を検討する。具体的には、新規金属錯体をラベル化剤として用い、核酸のハイブリダイゼーションシグナルの検出を従来の有機蛍光ラベル化剤を使用した方法と比較し、実用性を判定する。上記の目標を達成するため、マイクロアレイ基材の選択、ラベル化反応条件、ハイブリダイゼーション条件の検討等を行なう。また、観察する対象としては、ゲノムのSNP検出等を計画している。

2. 2本鎖DNA特異的染色剤の高度化に関する研究

二本鎖核酸特異的インターカレータをリソグラフィックDNAマイクロアレイへ適用して製品化する段階での問題点を洗い出し、これを最適化する。これによってこれまで合成した二本鎖核酸特異的インターカレータの高性能化やキット化を行う。アントラセン型縫い込み型インターカレータは現在高性能のものが得られているが、水溶液中での安定性に問題がある。そこで、不安定化の原因となっている

リンカー連結部の分子構造を改変したものの合成を引き続き行い、このインターカレータのマイクロアレイへの評価も行う。

3. これまでに研究開発してきたデジタル検出可能で定量性を追求するデジタルアレイ技術を生かし、解析する対象・事象にあわせて遺伝子を選別した Selected Gene Array (SGA) の開発を行い、実サンプルによる実用性の実証を行う。九州大学、早稲田大学と共同で、新規開発した二本鎖核酸検出試薬によるマイクロアレイ検出システムを完成させる。青山学院大学と共同で神経突起およびシナプス変化検索用SGA(シナプトチップ)と変異関連遺伝子搭載SGA(変異原チップ)を対象を絞り、搭載するプローブコンテンツの選別を平成14年度に引き続き行い、リソグラフィック基板を用いたSGAの作製及び評価を共同で行う。九州大学、早稲田大学と共同で、二本鎖核酸検出試薬のマイクロアレイ上での評価実験ならびに実験プロトコルの最適化を行い、新規開発色素によるマイクロアレイ検出システムを完成させる。新規開発色素のアプリケーション

ンとして、発現解析・SNP解析等への応用を検討する。これらの共同評価を進めるために必要なリソグラフィック基板及びSGAは、理研から九大、早大、青学大に供給を行う。

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

理研リソチップ方式で、変異がん原物質スクリーニング用トキシコジェノミクスチップおよび神経系の回路形成状態を判定するシナプトチップの二種類の実用チップを作製し、実際にラットまたはマウスの系に適用してその実用性を実証するとともに、他の遺伝子発現解析手法（例えばリアルタイムPCR法）との比較・検討を行う。トキシコジェ

ノミクスチップについては市販毒性試験用チップとの比較評価も行う。トキシコジェノミクスチップについては、マウスに変異がん原物質等を投与して、標的臓器からmRNAを抽出して、逆転写してcDNAとし、蛍光色素で標識した後、理研リソチップ方式作製実用チップと自動核酸対合反応装置を用いて対合させ、自動解析マイクロアレイ蛍光検出装置で測定して、理研リソチップ方式作製実用チップの実用性を実証する。シナプトチップについては、マウス小脳の生後発育系および培養ラット大脳皮質細胞系を材料として、mRNAを抽出し、同様に標識、対合実験を行う。

II 平成15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	早稲田大学理工学部	◎松本和子
2. 二本鎖DNA特異的染色剤の高度化に関する研究	九州大学大学院工学研究科	竹中繁織
3. デジタルアレイの開発に関する研究	理化学研究所工学基盤研究部	田代英夫
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	青山学院大学理工学部	降旗千恵

(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
田代英夫	理化学研究所 工学基盤研究部 部長, 主任研究員
竹中繁織	九州大学 大学院工学研究院 助教授
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
松 本 和 子 田 代 英 夫 竹 中 繁 織 降 旗 千 恵	早稲田大学 理工学部 教授 物理化学研究所 工学基盤研究部 部長, 主任研究員 九州大学 大学院工学研究院 助教授 青山学院大学 理工学部 教授