

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19310086

研究課題名 (和文) 自律型マイクロチップによる PCR レス・SNP タイピング

研究課題名 (英文) PCR-less SNP typing on an autonomous microchip

研究代表者

細川 和生 (HOSOKAWA KAZUO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：00373366

研究成果の概要：

独自の自律型マイクロチップを活用して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 不要の遺伝子一塩基多型 (SNP) 識別技術を確立することを目的とし、2 種類の方法を検討した。電気泳動によって標的 DNA を選択的に濃縮する方法では、感度に限界があった。固相反応によって標的 DNA を捕捉し、化学的に増幅する方法では、分析時間 25 分で高感度に (百万コピー程度) SNP 識別でき、後者の方法が大いに有望であることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：マイクロチップ，電気泳動，DNA，一塩基多型，テラーメイド医療，増幅

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報は DNA の塩基配列に埋め込まれている。ヒトはほとんどの塩基配列を共有しているが、ところどころに個人差がある。なかでも一塩基の入れ替わりは頻繁に見られ、一塩基多型 (SNP) と呼ばれる。患者の SNP を調べることにより、個人に合った最適な医療、すなわちテラーメイド医療が可能になると考えられている。

SNP を大量にタイピング (識別) する技術は、研究開始の時点ですでに成熟し、遺伝学研究に活用されていた。一方テラーメイド医療では、少数の SNP でも良いから迅速

かつ簡便に識別したいという大きなニーズがあった。にもかかわらず、こうしたニーズに応える技術は十分に研究されていなかった。特に、ほとんどの SNP タイピング技術はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に依存しており、時間がかかる一つの要因になっていた。

2. 研究の目的

独自技術である「自律型マイクロチップ」を活用することにより、PCR その他酵素反応を一切経ることなく、ゲノム DNA から目的の SNP を 20 分以内に識別することを

目的とした。

3. 研究の方法

(1) 電気泳動による方法

試験用の標的として、ヒト *K-ras* 遺伝子コドン 61 の周辺 15 塩基正常配列 (WT) と一塩基変異配列 (MT) を用意した。これらの末端を蛍光標識した。分離媒体として、MT と相補なプローブ DNA をグラフトしたポリメチルアクリルアミド (PDMA) を合成した。幅 100 μm 、深さ 25 μm の直線型マイクロ流路を製作した。マイクロ流路にサンプル溶液と分離媒体の溶液を充填した後、電圧をかけて標的 DNA を分離媒体の方向に泳動した。分離媒体への入り口部分における MT の濃縮挙動を蛍光強度によって評価した。

(2) 固相反応による方法

まず末端をビオチン標識した 21 塩基の DNA を標的として条件の最適化を行なった。標的と相補的な 30 塩基のプローブ DNA をガラス基板に固定化した後、幅 100 μm 、深さ 25 μm の Y 字型流路を加工した PDMS 基板を接合してマイクロチップを完成した。流路にサンプルを注入して標的 DNA を補足した後、増幅試薬 (蛍光標識アビジンとビオチン化抗アビジン抗体) を注入することにより信号増幅した。

次にサンドイッチ法を適用して、非標識 56 塩基 DNA 中の SNP 識別を試みた。標的配列はヒト *CYP2D6* 遺伝子とした。上記と同様に標的 DNA を捕捉し、さらに SNP 識別用のビオチン標識プローブを結合させた後、増幅を行なった。

4. 研究成果

(1) 電気泳動による方法

電気泳動による方法は、本研究の申請時に提案した方法である。まず泳動時間について検討した。1 nM ~ 10 nM の標的 DNA 濃度において、濃縮率の時間変化を調べたところ、いずれの場合も 3 分ほどで濃縮率は横ばいとなってほとんど増加を見せなくなった。した

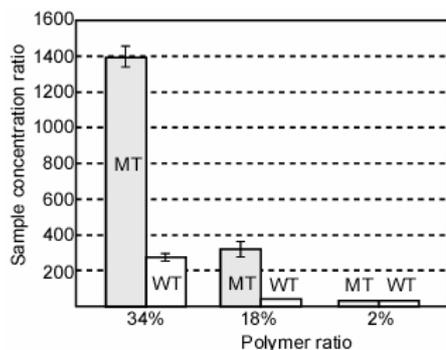


図 1 . PDMA 濃度の影響

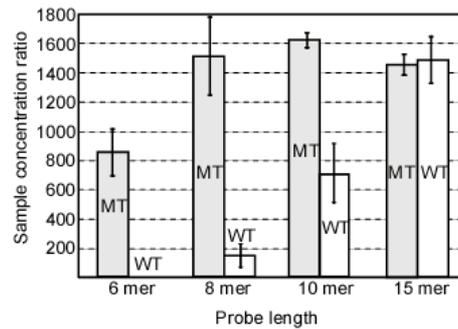


図 2 . プローブ鎖長の影響

がって以後の実験では泳動時間を 3 分に固定した。次に分離媒体中の PDMA 濃度について検討した。標的 DNA 濃度を 10 nM、プローブ長さを 8 塩基とした。結果を図 1 に示す。相補鎖 MT の濃縮率は PDMA 34% では 1400 倍、18% で 320 倍、2% で 35 倍であった。PDMA 濃度が低いと、プローブが無視できない速度で泳動してしまうため、濃縮率が低下すると考えられる。以後の実験には、技術的な上限濃度である 34% の PDMA を用いた。

次に、プローブ鎖長を変えて濃縮実験を行なった。結果を図 2 に示す。最高濃縮率とマッチ/ミスマッチ (MT/WT) 選択比は以下のとおりであった。プローブ 6 塩基では 860 倍 (選択比 > 20)、8 塩基で 1400 倍 (選択比 10)、10 塩基で 1600 倍 (選択比 2.3)、15 塩基で 1400 倍 (選択比 1.0)。プローブ鎖長を伸ばすと選択比が悪化することは予想していたが、濃縮率が上がらないのは意外で、原因ははっきり分からない。

(2) 固相反応による方法

電気泳動による方法では、本研究の申請時に想定していたほどに濃縮率が上がらず、必要な感度が得られそうもないので、方針を変え、固相反応に信号増幅を組み合わせた方法を試みた。図 3 にこの方法の概念図を示す。Y 字型マイクロ流路の壁面にプローブ DNA が固定化されており、そこにビオチン化された標的 DNA (Sample) が捕捉される。この時点である程度の濃縮が行なわれる。次に増幅試薬として蛍光標識アビジン (F-SA) と

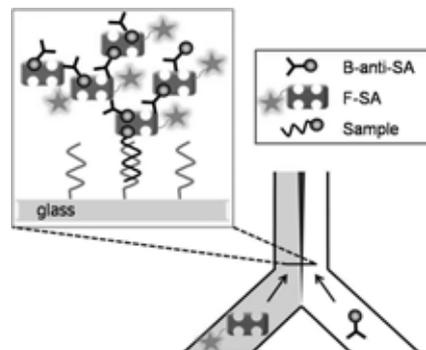


図 3 . 固相反応による方法

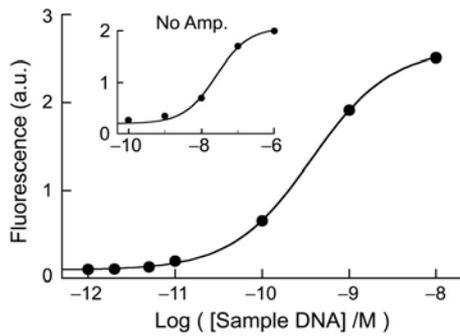


図4 . ビオチン化DNAの検量線

ビオチン化抗アビジン抗体 (B-anti-SA) を別々の入り口から供給すると、これら増幅試薬が標的DNA分子上に樹状構造を形成するので、信号が増幅される。

まず末端をビオチン標識した21塩基のDNAを標的として条件の最適化を行なった。得られた最適条件は以下のとおりである。ブロッキング剤：カゼイン1%とSDS0.02%の混合物; [F-SA]：2.5 μg/mL; [B-anti-SA]：25 μg/mL; 増幅時間：7分。この条件で実験したビオチン化DNAの検量線を図4に示す。検出限界は1.7 pMであった。これは信号増幅をしなかった場合(図4に小さく図示)に比べて1000倍以上高感度だった。

上記の最適化された増幅条件を用いて、非標識DNAのSNP識別実験を行なった。標的が非標識であるため、サンドイッチ法を適用した。すなわち、正常型(WT)と変異型(MT)に共通な部分を基板上のプロープに結合させた後に、ビオチン標識したSNP識別用プロープを結合させ、次に図3に示すような増幅を行なった。測定した蛍光強度は次式で識別因子(DF)に換算した： $DF = (S1 - S2) / (S1 + S2)$ 。ここでS1, S2はそれぞれWT結合プロープ, MT結合プロープを用いた場合の蛍光強度である。(流路構造を工夫し、両者を同時に測定した。)DFは-1から1の値をとり、理想値はWTで1, MTで-1である。SNP識別用プロープの最適化を行なった結果、鎖長10塩基、濃度1 μMの場合に最も良い結果が得られた。この場合の検量線を図5に示す。図中のアスタリスク(*)

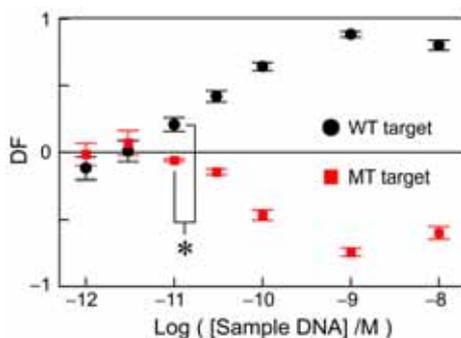


図5 . SNP識別の検量線

はSNP識別が可能だった最低濃度を示しており、10 pMであった。上述したビオチン標識サンプルの検出限界(1.7 pM)と比べると、SNP識別のために特異性を上げた分、感度が若干犠牲となったことが分かる。検出に要した時間は5分間のブロッキングを含めると25分であった。

このマイクロチップで使用する試料体積はわずか1 μLであるので、上記検出限界をDNA分子数に換算すると $10^6 \sim 10^7$ コピーである。これはヒト血液0.1~1 mLに含まれるDNA分子数と同等であるので、この血液サンプル中のDNAを完全に抽出、濃縮できれば、本マイクロチップによるPCRレス・SNPタイピングが原理的には可能である。しかしながら、臨床に必要なとされる信頼性を確保するためには、さらに研究を重ねて検出限界を改善することが必要と考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

1. Aishan Han, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Phosphate-affinity electrophoresis on a microchip for determination of protein kinase activity, *Electrophoresis* 査読有, *in press*

2. Naoki Sasaki, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Alternating current cloud point extraction on a microchip for preconcentration of membrane-associated biomolecules, *Lab on a Chip* 査読有, 9(9), 1168-1170, 2009

3. Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Spatial distribution of laminar flow-assisted dendritic amplification, *Lab on a Chip* 査読有, 9(3), 464-468, 2009

4. Yasunobu Sato, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Detection of non-cross-linking interaction between DNA-modified gold nanoparticles and a DNA-modified flat gold surface using surface plasmon resonance imaging on a microchip, *Colloids and Surfaces B* 査読有, 62(1), 71-76, 2008

5. Aishan Han, Akira Inoue, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Use of helper oligonucleotides in affinity capillary electrophoresis on a microchip for detection of single-nucleotide polymorphisms, *Analytical Biochemistry* 査

読有, 371(1), 124-126, 2007

6. Kazuo Hosokawa, Masaki Omata, Mizuo Maeda; Immunoassay on a power-free microchip with laminar flow-assisted dendritic amplification, *Analytical Chemistry* 査読有, 79(15), 6000-6004, 2007

[学会発表](計25件)

1. 鈴木健二, DNA ナノ構造体による金ナノ粒子上でのオリゴDNA 固定化位置の制御, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 27 日, 船橋

2. 韓愛善, マイクロチップアフィニティー電気泳動によるキナーゼ活性の測定, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 27 日, 船橋

3. 細川和生, マイクロチップ用の新規信号増幅法 LFDA とその高感度 DNA センサーへの応用, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 27 日, 船橋

4. 細川和生, Characterization of laminar flow-assisted dendritic amplification, *The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (μ TAS 2008)*, 2008 年 10 月 12 日, San Diego, USA

5. 佐々木直樹, AC electrokinetic phase separation, focusing and concentration in microchannel, *The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (μ TAS 2008)*, 2008 年 10 月 12 日, San Diego, USA

6. 韓愛善, SNP 検出のためのマイクロチップ電気泳動における補助 DNA の利用, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10 日, 福岡

7. 佐々木直樹, 交流動電相分離とその濃縮操作への応用(2): 濃縮機構の検討, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10 日, 福岡

8. 佐藤貴寛, 自律駆動マイクロチップと新規信号増幅法を利用した DNA センサー, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10 日, 福岡

9. 細川和生, マイクロチップ用の信号増幅法 LFDA における増幅産物の空間分布, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10 日, 福岡

10. 佐々木直樹, 交流動電相分離とその濃縮操作への応用, 第 17 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2008 年 5 月 10 日, 福岡

11. 韓愛善, 補助 DNA を利用したマイクロチップ電気泳動による SNP 検出, 第 17 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2008 年 5 月 10 日, 福岡

12. 細川和生, 自律駆動マイクロチップと新規信号増幅法を利用した迅速かつ高感度なイムノアッセイ, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 26 日, 東京

13. 鈴木健二, 脂質膜コート微粒子充填カラム内での帯電脂質の電気泳動分離, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 26 日, 東京

14. 細川和生, 高感度マイクロチップイムノアッセイ用の新規信号増幅法 LFDA, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会, 2007 年 12 月 11 日, 横浜

15. 佐藤保信, Non-cross-linking interaction between DNA-modified gold nanoparticles and a DNA-modified gold flat substrate, *1st Asian Biomaterials Congress*, 2007 年 12 月 7 日, つくば

16. 細川和生, Laminar flow-assisted dendritic amplification for ultrasensitive immunoassay on a microchip, *1st Asian Biomaterials Congress*, 2007 年 12 月 7 日, つくば

17. 細川和生, Ultrasensitive immunoassay on a power-free microchip with laminar flow-assisted signal amplification, *The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (μ TAS 2007)*, 2007 年 10 月 8 日, Paris, France

18. 細川和生, 新規信号増殖法 LFDA を用いたマイクロチップイムノアッセイ, 日本化学会第 1 回関東支部大会, 2007 年 9 月 27 日, 八王子

19. 佐藤保信, 金平板と金ナノ粒子に固定化された二本鎖 DNA 間の相互作用の解析と応用, 第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月 19 日, 名古屋

20. 細川和生, 新規信号増幅法 LFDA によるマイクロチップイムノアッセイの高感度化, 東京コンファレンス 2007, 2007 年 8 月 29 日, 千葉

21. 佐藤保信, 金ナノ粒子と金平板上の二本鎖 DNA 間に働く相互作用の解析, 第 1 回化学センサー・バイオセンサーおよび計測技術合同ワークショップ, 2007 年 7 月 13 日, 横浜

22. 細川和生, マイクロチップイムノアッセイのための新規信号増幅法LFDA, 第 1 回化学センサー・バイオセンサーおよび計測技術合同ワークショップ, 2007 年 7 月 13 日, 横浜

23. 井上明, 自律型マイクロチップを用いた精密溶液充填, 第 15 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2007 年 5 月 25 日, 仙台

24. 佐藤保信, 金平板と金ナノ粒子に固定化された異種の二本鎖 DNA 間に働く相互作用の解析と応用, 第 15 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2007 年 5 月 25 日, 仙台

25. 細川和生, 新規信号増幅法LFDAを用いた高感度なマイクロチップイムノアッセイ, 第 15 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2007 年 5 月 25 日, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 和生 (HOSOKAWA KAZUO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号: 00373366