

## 自己評価報告書

平成23年 5月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20241032

研究課題名(和文) エピジェネティクス解析のための1分子ゲノムDNAメチル化検出デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of single genome DNA methylation detection device for epigenetic analysis

研究代表者

馬場 嘉信 (Baba Yoshinobu)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：30183916

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・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：エピジェネティクス, マイクロ・ナノデバイス, DNA伸張, 1分子計測

## 1. 研究計画の概要

がんをはじめとした生活習慣病の診断には、従来、1塩基多型 (SNPs) など先天的なゲノム変化の検出に精力が注がれてきた。しかし、生活習慣病リスクの高い成人・高齢者においては、環境因子・生活習慣などによる後天的なゲノム変化であるエピジェネティクスを解析することが特に重要であることが最近明らかにされてきている。現在、エピジェネティクス解析には煩雑な行程と多大な時間を必要とする。本研究では、代表的な後天的ゲノム変化であるゲノムDNAメチル化について、マイクロ・ナノ空間の特性を生かすことで、精密な細胞操作と1分子ゲノム操作および超高速・超高感度メチル化検出反応を実現できるデバイスを開発し、単一細胞からPCR無しに1分子ゲノムDNA上のメチル化検出を行い、現行技術より数十倍の高速化と正確さを兼ね備え、かつメチル化の部位まで同定できる解析システムを実現する。

## 2. 研究の進捗状況

ゲノムDNAメチル化の1分子検出を達成するために、細胞よりゲノムDNAの抽出、ゲノムDNAの伸張およびメチル化部の蛍光標識、検出という各操作手法の開発が重要である。これまでにDNAの伸張方法の検討およびメチル化検出方法の検討を実施した。研究方法および得られた成果報告に関しては以下のとおりである。1分子DNAの伸張法に関しては、DNAの基板表面への吸着を抑制し、かつ流体存在下で伸張する方法の開発を検討した。その結果、DNAの末端および基板表面をそれぞれ、ピオチン、アビジンで修飾し、DNAの吸着抑制のために基板表面を血清アルブミンでコーティングするこ

とで、DNAの片末端のみを基板に固定化することに成功した。この手法をマイクロ流体デバイスに適用し、エタノールによるDNAの凝縮過程を観察した結果、エタノール濃度により凝縮スピード、凝縮後のDNAの長さに変化が観測された。さらに、様々なエタノールの濃度勾配を形成可能なマイクロ流体デバイスを作製した結果、一度の操作によりエタノールがDNAの凝縮に及ぼす影響をリアルタイムで観測することに成功した。一方で流体を利用しないDNAの伸張方法 (molecular combing) によりDNAの伸張を試みた。伸張方法、基板表面およびDNAの処理方法を検討した結果、基板表面にDNAを伸張・固定化することに成功した。

続いてメチル化部位検出のためにメチル化部位に特異的に結合するたんぱく質を量子ドットで標識することを試みた。反応条件・精製方法の検討の結果、メチル化結合タンパク-量子ドット複合体の形成を確認した。また、メチル化DNAのモデル試料作製のためにDNAのメチル化方法について検討を実施した。このように本年度までにDNAの伸張方法およびメチル化検出試薬の作製に成功しており、当初の計画以上に進展している。

## 3. 現在までの達成度

進捗状況で記載のとおり①当初の計画以上に進展していると思われる。

## 4. 今後の研究の推進方策

当初の計画通り、細胞からのゲノムDNAの抽出を試み、これまでに開発してきた手法を組み合わせ、1分子ゲノムDNAメチル化検出デバイスの作製に取り組む。

5. 代表的な研究成果

(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9件)

(1) Hiroshi Suzuki, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi and Yoshinobu Baba, REAL-TIME OBSERVATION OF DNA CONFORMATIONAL TRANSITIONS AT A SINGLE-MOLECULE LEVEL BY MICROFLUIDIC DEVICES, Micro Total Analysis System 2010, 2010, 1880-1882. 査読あり

(2) Hiroshi Suzuki, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, and Yoshinobu Baba, A SINGLE MOLECULE ANALYSIS FOR THE CONFORMATIONAL TRANSITION OF DNA USING MICROFLUIDICS, Micro Total Analysis System 2009, 2009, 827-829. 査読あり

(3) Kentaro Fujiyoshi, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi and Yoshinobu Baba, REAL-TIME MONITORING OF CONFORMATIONAL TRANSITION OF DNA AT A SINGLE MOLECULE LEVEL IN MICROFLUIDIC DEVICES, Micro Total Analysis System 2008, 2008, 441-443. 査読あり

〔学会発表〕(計33件)

(1) Tatsuki Sano, Yukihiro Okamoto, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, High efficient extraction of DNA in blood plasma using microfluidic devices, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Honolulu, HI, USA; 15-20 December 2010

(2) 鈴木博詞, 加地範匡, 岡本行広, 渡慶次学, 馬場嘉信, マイクロ流体デバイスを利用した DNA コンフォメーション変化の1分子解析, 日本化学会第90春季年会, 近畿大学東大阪キャンパス, 東大阪; 2010年3月26-29日.

(3) 鈴木博詞, 加地範匡, 岡本行広, 渡慶次学, 馬場嘉信, マイクロ流体デバイスを利用した DNA 構造転移の1分子解析, 第20回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 金沢エクセルホテル東急, 金沢; 2009年11月8-9日

〔図書〕(計7件)

(1) 加地範匡, 岡本行広, 渡慶次学, 馬場嘉信 DNA 前処理/PCR チップ, 「バイオチップ実用化ハンドブック」, エヌ・ティー・エス, 2010, 506-511.

(2) 岡本行広, 馬場嘉信 ナノバイオデバイスによる分析・診断医学構築と予防早期医療創成, 化学のフロン

ティア 新しい地平をひらく分析の最前線, 化学同人, 2009, 29-36.

(3) 岡本行広, 加地範匡, 渡慶次学, 馬場嘉信, ナノテクノロジーを利用した超高性能 DNA 解析手法, マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオ分析, 技術教育出版社, 2009, 199-206.