

(5) ゲノムフロンティア開拓研究

1. 研究の概要、成果の概要

①研究概要

「次世代DNAマイクロアレイシステムの開発」

(H11年度~H15年度)

平成13年度予算額： 2.4億円

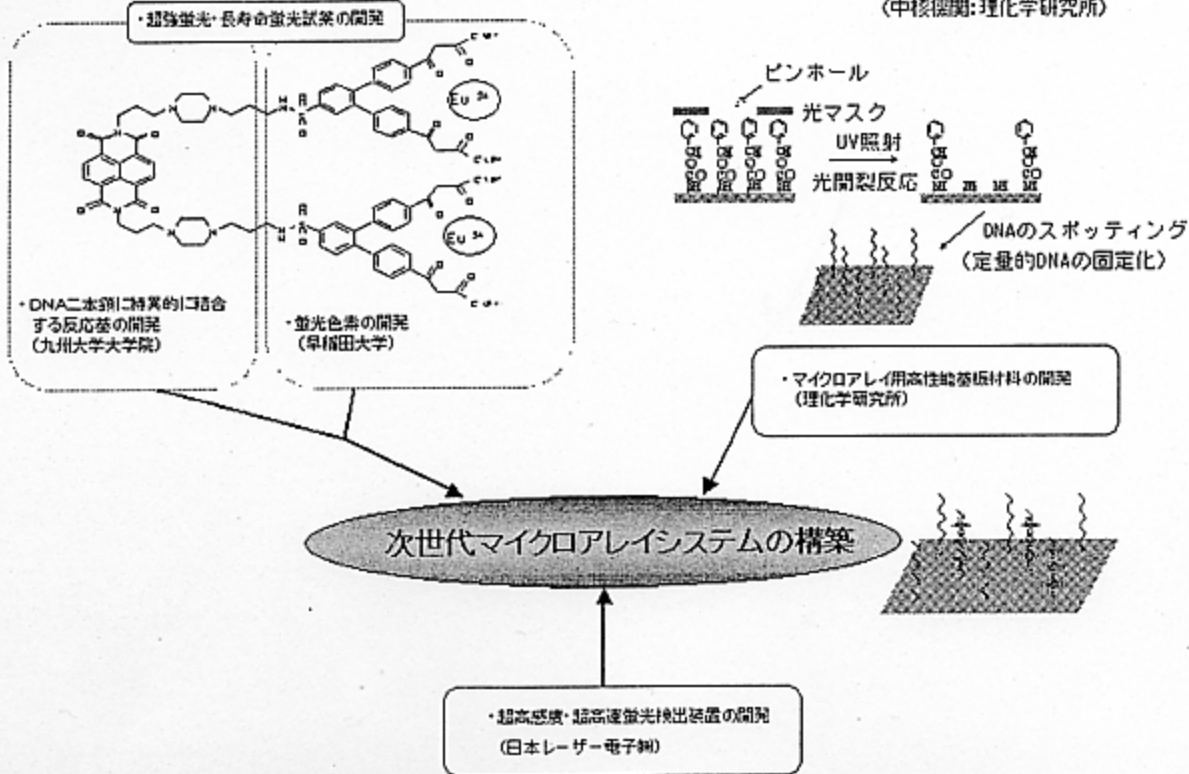
研究代表者：松本和子（早稲田大学） 研究体制：理化学研究所（中核機関）他3機関

研究の概要・目標	諸外国等の現状	研究進展・成果がもたらす利点
<p>1. 何をを目指しているのか 遺伝子を効率よく解析するため、従来の手法とは発想の異なるマイクロアレイシステムの開発を目指す。</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>I期の目標： ●マイクロアレイシステムの試作機を開発する。 II期の目標： ●試作機の実用化のための評価を行う。</p> </div> <p>2. 何を研究しているのか 新規金属錯体を基本構造とするDNA結合試薬を合成し、これをレーザーによる蛍光検出法と組合せ、高感度に検出するための技術の開発を行う。</p> <p>3. 何が新しいのか 独自の高性能蛍光色素と化学的特異性に優れた結合部分を組合せた手法、及び定量性に優れた独自のDNA固定化法は、これまで例がなく、DNAを高感度、高速に検出する技術が確立される。</p>	<p>1. 現状及び我が国の水準</p> <p>国内においては、マイクロアレイ作成装置及び検出装置が市販されているが、原理も含め、すべて米国を中心とした輸入品であり、米国が先行している状況である。</p>	<p>1. 世界の水準との関係 マイクロアレイにおいては、各段階で特徴的な手法が利用されているが、特に、本課題で開発される手法は新しい手法であり、要素技術について日本独自の特許を獲得することができる。</p> <p>2. 波及効果 核酸ハイブリダイゼーションの原理に基づいているこの手法を用いることによってがんのメカニズム解明や疾病診断技術等に適用される。</p>

②研究体制

次世代DNAマイクロアレイシステムの開発

(中核機関:理化学研究所)



③所要経費

科学技術振興調整費 ゲノムフロンティア開拓研究推進制度
「次世代DNAマイクロアレイシステムの開発」
所要経費一覧

研究項目	研究担当機関（研究担当者）	所要経費
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	早稲田大学理工学部（松本和子）	216,057
2. 二本鎖核酸特異的染色システムの開発に関する研究	九州大学大学院工学研究院（竹中繁織）	102,967
3. 遅延蛍光用スキャナーの開発	日本レーザー電子株式会社（米田勝實）	66,844
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）	280,517
5. 研究推進		1,554
合 計		667,939

④研究成果の概要

研究目標を達成するため、3つの研究項目に分割し、4人の分担者によってプロジェクトを実施した。以下各研究項目の成果と研究全体の成果に分けて記す。

(1) 遅延蛍光性インターカラー染色剤の開発

(a) 希土類錯体インターカラーの評価

希土類イオンとしてEu³⁺とTb³⁺を選択し、これを保持する錯体としてBHHCTとBPTAを利用した。両者の組合せを用いて、インターカラーであるナフタレンジイミド（NDI）に結合させることができた。この結果、遅延蛍光性染色剤として以下の成果を得た。

(BHHCT-Eu³⁺)-NDIは2本鎖DNAに特異的に吸着することを明らかにし、さらにこの染色剤により、1本鎖と2本鎖の識別ができることが分かった。また予め2本鎖につけたFITC色素の蛍光量との相関性実験を行った結果、Eu³⁺の発光強度からDNAハイブリダイゼーション量を測定できる可能性が示唆された。一方、静電効果を利用したBHHCT-NDI-NH₄⁺や(BPTA-Tb³⁺)-NDIは2本鎖DNAの特異的検出には不適であった。

(b) 従来型色素標識をしたインターカラーの開発

希土類色素は高感度であるが、励起波長、蛍光波長とも通常マイクロアレイに使用されているcy3、cy5と大きく異なる。インターカラー方式を従来型マイクロアレイに拡張する可能性を検討するため、FITC-NDIを合成した。FITC-NDIには、溶液中に独立して存在するときは非蛍光性であるが、2本鎖DNAに結合すると蛍光強度の大幅な増加を示すことを明らかにした。従って、2本鎖特異的染色剤として利用できる可能性が高く、現在評価実験中である。また遅延蛍光性を持つエオシン色素を用いたエオシン-NDIの合成にも成功した。

(2) 遅延蛍光スキャナーの開発

次世代DNAマイクロアレイの検出部として共焦点型レーザースキャナーとCCD型イメージャーを試作し、その評価を行った。

(a) 共焦点型スキャナーの試作と評価

従来型の共焦点スキャナーにレーザーパルスとディ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した。励起光源としてHe-Cdレーザー（波長325nm）を用いた。レーザー光をチョッパでパルス化した。遅延蛍光素子であるTb³⁺及びEu³⁺をスタンピング装置を使用してスライドガラス上に濃度別にスポットして検出感度を調査した。Tb³⁺の最低検出濃度は100μMであったが、Eu³⁺は検出できなかった。Xeフラッシュランプによる励起エネルギーの増強と遅延時間の短縮を行ったが、感度アップは見られたが、Eu³⁺は検出できなかった。

(b) 遅延蛍光CCDイメージャー試作機の試作と評価

上記のスキャナー方式では検出感度と測定スピードに問題があったので、高いS/N比及び測定時間の短縮を目的としたCCDカメラを用いた遅延蛍光イメージャーの開発を行った。本機では、励起光源にXeフラッシュランプを用い光量を増加し、また2段のイメージンテンシファイアをもつ高性能CCDカメラを使用し、これを蛍光顕微鏡と組み合わせてイメージャーとして試作した。

Tb³⁺及びEu³⁺をスタンピング装置を使用してスライドガラス上に濃度別にスポットして検出感度を調査した。Tb³⁺、Eu³⁺ともに最低検出濃度は10μMであった。この結果は現在のところcy3、cy5系の色素と同等の感度が得られたことを示している。

(3) 定量的スポッティング法の開発

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、再現性など装置工学的に見て未開発であり、不十分な点が多くある。この認識に基づき、本課題で開発する新しい遅延蛍光性染色剤に対応できる新しいDNAマイクロアレイシステム技術の開発を行うとともに、当該技術の現行のマイクロアレイへの拡張性も視野に入れ開発を行った。

開発手順は、①アレイ上のDNAの定量化に必要なリソグラフィック基板を作製する装置の開発を行う。②リソグラフィック基板に定量的にDNAをスタンピングするための高精度位置合わせ機構を有する改良型アレイヤーの開発を行う。③改良型アレイヤーにより、リソグラフィック基板に高精度、高密度にDNAプローブをスタンピングし、一定量のDNAを固定化したDNAマイクロアレイの製作と定量的性の評価を行うことである。現在までの開発成果は、

(a) リソグラフィック基板作製方式の確立と作製装置の試作開発

DNAマイクロアレイの定量的計測を可能とするため、リソグラフィック技術を使ってスライドガラス上の特定部位にのみDNAを固相化できるリソグラフィック基板の作製手法の開発とリソグラフィック基板作製装置の試作を行った。結果として、レーザー照射とプロキシミティークontakt方式によるスライドガラス用リソグラフィックパターン作製装置を試作した。この装置を使って種々の化学反応を組合せ、試行錯誤した結果、アビジンを微少パターン状にスポット配置したDNAマイクロアレイ用スライドガラスを作製することができた。これにより、ビオチン標識したオリゴDNAを±6-8%のばらつきで、固定化することができた。さらに副次的効果として、アルミ膜による高反射ミラーをDNA固相化部位に有するリソグラフィック基板（高反射型ミラー基板）の作製手法を開発し、蛍光増強や部位の極小化、視認性向上ができることがわかった。これらの技術的特色を生かして、デジタル型チップという高機能性チップの新しいコンセプトを得ることができた。

(b) 改良型DNAアレイヤー装置の試作開発

従来型アレイヤー開発の技術をベースに上記リソグラフィック基板のスポットパターン位置に正確にスポットできる改良型DNAアレイヤーを試作した。その結果、DNAを過剰量スポットすることにより、正確なパターンで各スポット毎一定量のオリゴDNAを固定化できることを示した。

⑤研究成果公表等の状況

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0 件	0 件	3 (4) 件	7 件
国外	(2) 件	0 件	0 件	2 件
合計	2 件	0 件	7 件	9 件

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載)

【特許出願等】 7 件 (国内 5 件、国外 (2) 件)

【受賞等】 0 件 (国内 0 件、国外 0 件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテ-71	サブテ-72	サブテ-73	合計
Nucleic Acids Research	5.396	(1)			5.396
Analytical Sciences	1.094	(1)			1.094
主要雑誌小計					6.490
発表論文合計		(2)			6.490