

I. 「染色体の構造と機能解明のためのナノデバイスに関する総合研究」

(H12年～H14年)
研究代表者:牛木辰男他 8機関

研究の概要・目標

1 何を目指している

精密工学、マイクロマシン、計測工学、細胞生物学、分子生物学、解剖学、バイオメトリクスなどの多分野の専門家を集結させ、染色体の3次元微細構造と遺伝子発現の関連を解明するための、新たなナノ解析法および操作技術の開発を行い、次世代のゲノム機能解析法の確立を目指す。

(3年後の目標)

新しい染色体ナノ解析法の確立と、染色体の高次構造の解明

(6年後の目標)

染色体ナノ操作技術の確立と、それによるゲノム機能解析・操作法の開発

2 何を研究しているのか

- ・染色体解析のためのナノテクノロジーの新たな開発
- ・新しいナノテクノロジーの染色体解析への展開
- ・ナノ染色体解析のための支援技術の開発

3 何が新しいのか

遺伝子(DNA)の高次構造としての染色体の構造と機能の関連を直接的にナノレベルで解析できる手法はこれまで存在しなかった。本研究では最新のナノテクノロジーの応用により、ゲノムの構造と機能を立体的に解析し、改変操作を行う技術を開発する。

染色体: DNAに多種の構成要素(ヒストンタンパクなど)が結合して構築される高次の構造体。

諸外国の現状等

1 現状

生物の遺伝子発現制御には、DNAの修飾、不活性化など、いくつもの複雑な過程が介在している。これらの現象はDNAの塩基配列だけでは説明できず、DNAや周囲のタンパクの立体配置と深く関与していることがわかっている。しかし、現状では染色体の3次元微細構造解析に適した決定的な研究法が存在しないまま、この領域の研究が取り残されている。

2 我が国の水準

遺伝子の一次構造(DNAの塩基配列)解析技術については欧米、とりわけ米国にほぼ独占されているが、染色体のようなタンパク質との複合高次構造の解析技術については、まだ各国とも手つかずの状態といえる。一方、プローブ顕微鏡の技術開発をはじめとしたナノデバイス技術について、わが国は基礎研究、応用研究、装置の開発のいずれも世界の先頭集団に位置する。特にこうしたナノテクノロジーの手法を生物学分野に応用する試みについては、わが国が最もリードしている。

プローブ顕微鏡: 微小な探針(プローブ)で物体の表面をなぞり、プローブと物体との間に働く相互作用を検出し、コンピュータによって画像化する顕微鏡の総称。1981年に発明されたトンネル顕微鏡や1986年に発明された原子間力顕微鏡、光プローブを用いた光プローブ顕微鏡などがある。分子から原子レベルでの観察が可能である。

ナノデバイス技術: ナノメートル(1mmの100万分の1)の大きさで、物質を操作する工業技術の総称。

研究進展・成果がもたらす利点

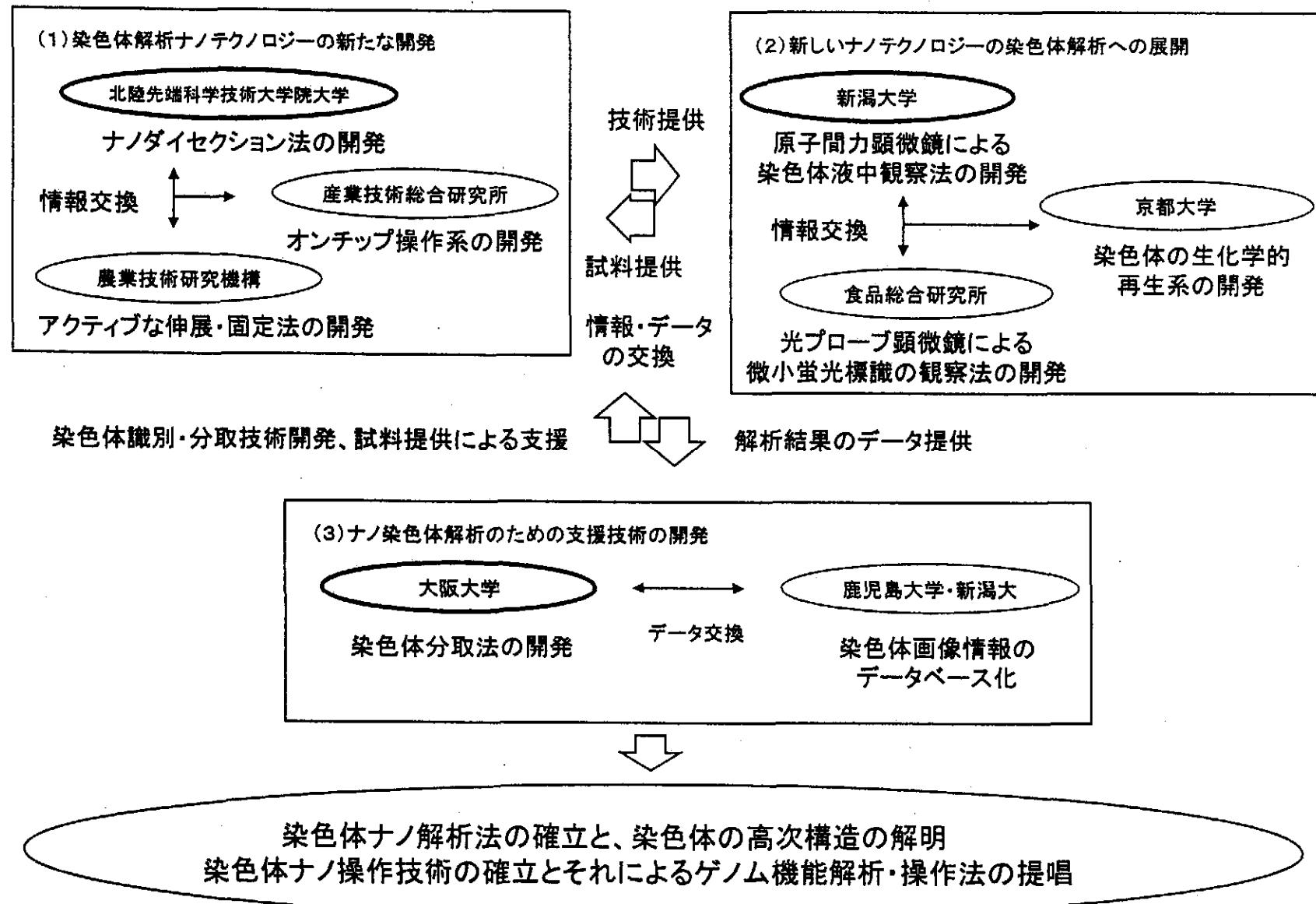
1 世界との水準の関係

現在、ゲノム解析研究は、おもにDNAの塩基配列解析を中心に世界各国で活発に進められているが、それより高次のゲノム構造機能解析のプロジェクトは、まだほとんどみあたらない。しかしこの分野は次世代のゲノム研究の中心になることが予想される。そこで日本が得意とするナノデバイス技術を応用し、従来の研究手法を強力に補完するゲノムの高次構造情報解析・操作の新技法を開発する。

2 波及効果

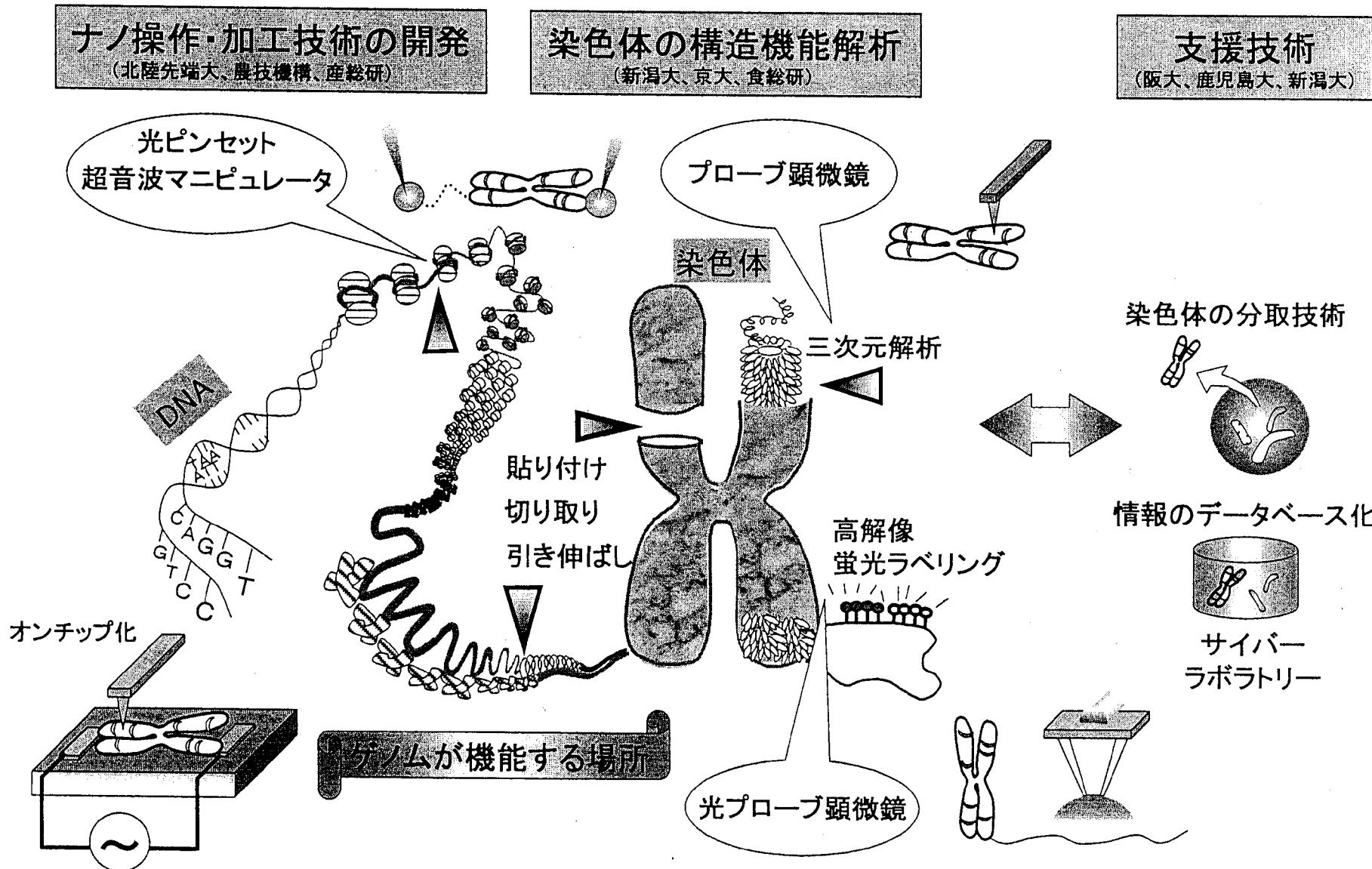
本研究の最終目標は、目的の遺伝子の染色体上の位置を立体的かつ微細なレベルで特定し、個別の遺伝子を直接操作できる基盤的技術を創出することにある。その結果、従来の遺伝子解析・遺伝子組換え法とは異なる種々の独創的新技術(たとえば新しいクローニング法、染色体チップ、染色体の加工)の創出につながり、バイオテクノロジー産業、さらに生命科学における日本独自の主導的技術として発展していく可能性がある。また、染色体チップを用いた薬剤開発や新しい遺伝子診断など遺伝子医療分野への応用も期待できる。

「染色体の構造と機能解明のためのナノデバイスに関する総合研究」の研究体制



「染色体の構造と機能解明のためのナノデバイスに関する総合研究」のコンセプト:

ゲノムの機能の現場を可視化し操作する新技術



II.

第Ⅰ期研究における所用経費
「染色体の構造と機能解明のためのナノデバイスに関する総合研究」

(単位:千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	平成11年度	平成12年度	平成13年度	所用経費
1. 染色体解析ナノテクノロジーの新たな開発						
(1)ナノ構造体変換技術の開発	独立行政法人農業技術研究機構	乙部和紀	18,717	26,171	23,914	68,802
(2)染色体ナノ操作法の開発	北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科	民谷栄一	39,530	41,181	40,767	121,478
(3)オンチップ染色体ナノハンドリングシステムの開発	独立行政法人産業技術総合研究所	井上貴仁	21,673	26,551	23,872	72,096
2. 新しいナノテクノロジーの染色体解析への展開						
(1)染色体の生化学的完全再構成系の開発	京都大学大学院生命科学研究科	竹安邦夫	21,659	26,164	23,863	71,686
(2)原子間力顯微鏡による染色体高次構造の解析	新潟大学大学院医歯学総合研究科	牛木辰男	77,098	47,887	45,400	170,385
(3)光プローブ顯微鏡による染色構造機能の解析	独立行政法人食品総合研究所	大谷敏郎	21,458	26,112	24,464	72,034
3. ナノ染色体解析のための支援技術の開発						
(1)染色体分取技術の開発	大阪大学大学院工学研究科	福井希一	33,531	58,452	38,455	130,438
(2)染色体画像情報のデータベース化に関する研究	鹿児島大学理学部	宮本旬子	21,790	26,141	12,095	60,026
	新潟大学医学部附属病院	赤澤宏平	0	0	11,822	11,822
4. 研究課題の推進	文部科学省研究振興局		752	448	448	1,648
合 計						780,415

III. 研究目標の概要・成果の概要

課題名：染色体の構造と機能解明のためのナノデバイスに関する総合研究

研究代表者：牛木辰男（新潟大学大学院医歯学総合研究科）

【研究成果の概要】

1. 「染色体解析ナノテクノロジーの新たな開発」

- (1) 「ナノ構造体変換技術の開発」では、種々のナノデバイスを染色体の伸展に応用した結果、マイクロニードル（先端部直径1μm以下）による伸展・力学特性測定法を確立した。これによりガラス基板上に固定された染色体のセントロメアおよびテロメア領域を部位選択的に伸展することを可能にした。また、これにより染色体伸展時の力学的応答（所要牽引力）を計測し、ガラス基板上に固定されたオオムギ染色体が伸展する際の所要牽引力が2000～3000nNであることを明らかにした。さらに、ここで開発したマイクロニードルによる伸展・力学測定装置に力覚フィードバック装置をユーザーインターフェースとして利用するためのソフトウェアも開発した。そのほか、基板上での溶液流動を利用したDNA伸展、固定技術も新たに開発した。
- (2) 「染色体ナノ操作法の開発」では、特定染色体の特定部位を切断操作する技術を開発する目的で、AFMを用いた染色体の切断条件を検討した。その結果、従来のコンタクトモード切断法とは異なるタッピングモード切断法を開発し染色体の鋭利な切断を可能にした。適正な条件（振幅減衰率-1.0以下、操作速度 0.003Hz）では、染色体の切断幅は染色体表面から内部にかけて、徐々に細くなり 50nm程度となった。さらに、切断した染色体断片のPCRを行い、断片から遺伝子增幅が可能なことを確認した。この染色体断片を効率よく利用するために「染色体チップ」の作製を予定しているが、その基盤技術に関しては、チップ作製技術を確立するとともに、このチップを PCR、タンパク合成反応に適用可能であることを示した。
- (3) 「オンチップ染色体ナノハンドリングシステムの開発」では、チップ上で染色体の個別輸送、選別などを可能にするためのオンチップデバイスを開発することを目的としている。そこで今期はシリコン、石英材料からなるマイクロ流体デバイスを作成し、染色体1個の輸送特性を高解像度顕微鏡技術により評価した。その結果、染色体を電界を用いて輸送する方法を開発した。すなわちマイクロ流体デバイスが 10mm程度の流路長であれば 10 ボルト以下の電源電圧で染色体を輸送できることがわかった。また、マイクロ電極を用いて染色体に交流電界を印加し、その周波数に対する応答挙動を観察した結果、染色体の種類により応答が変化することを発見した。さらに染色体の種類によらず 4 Hz 以上の交流電場により染色体が固定化できることも示された。これらの結果は、コンパクトな染色体ソーターが作成できる可能性が示すものである。

2. 「新しいナノテクノロジーの染色体解析への展開」

(1) 「染色体の生化学的完全再構成系の開発」については、基本的なヌクレオソームファイバーの再構成を確立するとともに、テロメア特異蛋白がDNAに結合してつくるTループ構造、コンデンシン複合体の分子構造、セントロメア特異DNAとコアヒストンによる再構成線維、大腸菌のヌクレオイドの解析を行ない、30nmファイバーの再構成のための基礎データを得た。また、再構成に必要な未知の蛋白等の検索の目的で、中課題(3)の単離染色体に対するモノクロナル抗体の作製を試みた。

(2) 「原子間力顕微鏡による染色体高次構造の解析」については、原子間力顕微鏡(AFM)による染色体観察に適した試料作製法と測定法(大気中、液中、真空中)を検討し、大気中観察法の基本手技を確立するとともに、染色体の液中AFM観察を可能にした。また、ここで確立した観察法により、各種化学処理標本(Gバンド・Qバンド染色や大貫の低張処理を施した染色体)の三次元微細構造解析を行い、染色体内でのクロマチン線維の基本配列様式を解明した。

(3) 「光プローブ顕微鏡による染色体構造機能の解析」については、光プローブ顕微鏡による染色体観察法を検討した。特に大麦の染色体の試料作製法を改善し、光プローブ顕微鏡により分裂中期染色体の形状像と蛍光像の同時観察を可能にした。また光プローブ顕微鏡に適したFISH法の検討を行い、その手法をおおむね完成させた。

なお、本サブテーマのメンバーは中課題(1)の染色体伸展標本や(3)で得られた単離染色体の評価を行い、その改善に寄与した。

3. 「ナノ染色体解析のための支援技術の開発」

(1) 「染色体分種技術の開発」については、まず染色体を「材料」として取り扱うための支援技術については、20種類に及ぶ単離、固定、分取法を比較検討し、ヒトおよびムギ染色体を単離するため、細胞同調培養からインタクトな染色体の単離までの一貫したシステムを開発した。さらに研究分担者の個々の研究目的に応じた染色体を供給するために必要な技術的基盤も確立した。

結果、染色体の単離および他の研究分担者への安定的供給は目標どおり達成し、現在特段の要望がない限り、月2回、全小課題分担者に動物および植物染色体を「材料」として送付する体制を整備した。2002年7月末で各研究分担者に染色体を送付した回数は30回に達する。更に、小課題分担者から寄せられた特定目的に応じた染色体の分取、供給も可能とした。

(2) 「染色体画像情報のデータベース化に関する研究」については、染色体画像情報用サーバシステムに必要な基本仕様の設計を行った上、データ形成、システム検討、データ投入仕様等を決定し、試験的運用されており、サーバ構築は基本的に終了した。

画像データベースおよび染色体関連情報に関する、公開可能な400点の画像を含む4000点の染色体画像と1500点以上の文献・ホームページアドレス情報を集積し、現在アノテーションなど第Ⅰ期におけるデータベースの公開を目指して整備を進めている。

IV.

研究成果公表等の状況<課題全体>

課題名（研究代表者）：染色体の構造と機能解明のためのナノデバイスに関する総合研究
(牛木辰男)

【研究成果発表等】(平成14年10月28日現在)

	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	件	24 件	143 件	167 件
国外	43 (12) 件	16 件	66 件	125 (12) 件
合計	43 (12) 件	40 件	209 件	292 (12) 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のこと)

【特許出願等】 9件 (国内 9件、国外 0件)

1. DNAの高分解能計測を目的とした基板表面修飾法、乙部和紀・中尾秀信・林英樹・大谷敏郎、平成13年7月26日、特願2001-225410
2. 毛細管を用いた液滴制御に基づく高分子パターン作製方法、乙部和紀、平成13年7月26日、特願2001-225404
3. ポリマー被覆カーボンナノチューブ、乙部和紀・中尾秀信・林英樹・二瓶史行、平成14年6月3日、特願2002-160931
4. 微小集積型反応評価システム、民谷栄一・示村悦二郎（北陸先端科学技術大学院大学・学長）、平成13年11月22日、特願2001-356971
5. 偏心回転テーブル装置とそれを用いた処理装置・民谷栄一、(株)スギノマシン、北斗科学産業(株)、平成12年10月26日、特願2000-326912
6. スポッティングノズル、民谷栄一、(株)スギノマシン、北斗科学産業(株)、平成14年2月20日特願、2002-42422
7. スポッティング装置、民谷栄一、(株)スギノマシン、北斗科学産業(株)、平成13年8月31日特願 2001-262780
8. DNAを伸長、固定する方法、大谷敏郎・杉山滋・吉野智之・佐宗めぐみ、平成14年10月2日、特願2002-289855 (2002).
9. DNAの伸長固定法、大谷敏郎・杉山滋・吉野智之、平成14年10月2日、特願2002-289848 (2002).

【受賞等】 2件 (国内 2件、国外 0件)

1. 産学連携推進いしかわ賞貢献賞(平成12年) 北陸先端大 民谷栄一
2. 遺伝学会ベストペーパー賞、(平成13年9月) 大阪大 村上庸子、若生俊行、福井希一

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	サブテーマ 3	合計
Nucleic Acids Research.	6.373	1			1
Nano Letters		1			1
Anal. Chem.	4.532	1	1		2
Ultramicroscopy	1.890		4		4
Biosens. Bioelectronics.	2.714	1			1
Mater. Sci. Eng. C.	0.905	1			1
Curr. Biol.	7.460		1		1
Phys. Rev. Lett.	6.668		1		1
Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	10.896		2		2
Biochemistry	4.114		1		1
J. Electron. Microsc.	0.556		3		3
Jpn. J. Appl. Phys.	1.249		1		1
Ital. J. Anat. Embryol.			1		1
Develop. Cell			1		1
Arch. Histol. Cytol.	1.097		3		3
Mol. Gen. Genet.	2.472			2	2
Plant Cell	11.081			1	1
Cytologia				2	2
Euphytica	0.765			1	1
J. Plant. Res.	0.954			1	1
Theor. Appl. Genet.	2.438			1	1
Plant. Mol. Biol.	3.592			2	2
Chromosome. Res.	1.835		1	1	2
Chromosoma	3.286			1	1
Planta	3.349			1	1
Med. Inf. Internet. Med.	1.909			1	1
J. Med. Syst.				1	1
Compt. Methods. Programs. Biomed.	0.559			1	1
Review of Scientific Instruments	1.352		1		1
J. Virology	5.622		1		1
主要雑誌小計					
発表論文合計		5	22	16	43