

別紙1 研究報告書表紙

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「1分子PCRデバイスの開発」に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 野地 博行

平成17(2005)年 4月

研究報告書目次

目 次

総括研究報告

「1分子PCRデバイスの開発」に関する研究 野地博行

1. 研究目的	-----	3
2. 研究方法	-----	4~5
3. H16年度研究結果	-----	6
4. 考察	-----	7
5. 健康危険情報	-----	7
6. 研究発表	-----	7

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
（総括）研究報告書

「1分子PCRデバイスの開発」に関する研究

（主任）研究者 野地博行 東京大学 生産技術研究所

研究要旨 本研究では、1分子イメージング技術とマイクロ加工技術を組みあわせることで、1分子レベルでのPCR検出を可能とする新しいデバイス開発を行う。H16年度は、ほぼ計画通り研究は進展し、フェムトリットルチャンバーを用いた超高感度PCR検出が可能であることを実証できた。さらに、マイクロヒーティングデバイスの作成とその評価も順調に進んでおり、H17年度の統合化に向けて準備が整った。しかし、予備的な実験においていくつか乗り越えるべき予想外の問題もある。H17年度はこれに本格的に取り組むことになる。

A. 研究目的

「我々が独自に開発した超微小の反応チャンバーとマイクロヒーターを利用して、1分子PCRと増幅DNA長の計測を両立したシンプルなデバイスを開発する。」これが、本研究の目的である。PCRは遺伝子診断等に広く利用されている手法であり、既にその反応の改良・デバイスの開発等が多数なされているにもかかわらず、1分子単位での反応観察の例は無い（1分子由来のDNA増幅はいくつか報告されているが、計測は分子単位ではない）。その理由は、PCRが90℃以上の高温で行われることに加え、DNA鎖同士の解離会合のためにDNAを固定化できないために、1分子イメージングに適さないことが挙げられる。これまで、我々は生体分子の1分子イメージング実験や、マイクロ加工を利用して超微量溶液チャンバー（フェムトリットルチャンバー）とマイクロヒーターの開発を行ってきた。本研究では、PCR試薬と一緒にDNA1分子をフェムトリットルチャンバーに閉じ込め、これをマイクロヒーターで加熱してPCRを1分子単位で計測するデバイスを開発する。さらに、増幅されたDNAの1分子イメージからその長

さを直接計測する方法を確立することで、電気泳動などを必要としないシンプルなデバイスを実現する。これによって、ハイスループットの最小・最速PCRが可能となる。また、1分子可視化の過程でPCRの反応の素過程が明らかになることも期待され、その反応機構に基づいた改良も可能となる。

B. 研究方法

【H16年度】下左図Aで、フェムトリットルチャンパーの作成方法を示す。シリコン基板上にマイクロメートルの微小かつ均一な円柱を作成し、これを鋳型としてシリコンゴム (PDMS)の表面にマイクロパターンを作成する(左下図のB)。鋳型DNAやPCR試薬を含む水溶液をガラスプレート上にまき、その上からPDMSシートを押し付けることで、試料がマイクロパターンとガラスの間(チャンパー)に閉じ込められる(右下写真)。その体積は $1\mu\text{m}^3$ の場合、1フェムトリットルとなる。チャンパーに閉じ込められたDNA1分子は、PCR反応を阻害しない蛍光色素(SYBR Green)で標識し、そのブラウン運動観察が可能であることは確認済みである。また、このチャンパーが95度まで安定で、その後の1分子観察に影響が無いことも確認した。H16年度は、赤外線カメラや温度に依存して蛍光量に変化する量子ドットの蛍光イメージングを用いて、チャンパーを加熱するヒーターの性能(温度精度・速度・再現性)などを評価する。また、ガラス基板に蒸着した金属パッドを利用してIH加熱(Inductive heating)なども試す予定でもある。試料は、実験室で使用している精製プラスミドDNA等とする。マイクロヒーターやIH加熱の装置を蛍光イメージングと両立させるために、倒立型蛍光顕微鏡を購入し改造する必要がある。

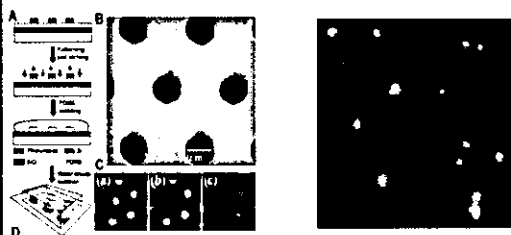


図1：フェムトリットルチャンパーの作成方法(A)と、その電子顕微鏡写真(B)。(C)は、フェムトリットルチャンパー中に閉じ込めた蛍光色素がチャンパー間でリークしないことを蛍光褪色回復

法で検証している。右図：フェムトリットルチャンパーに閉じ込めたDNA分子の蛍光像。チャンパーの輪郭は見えないが、DNA分子はチャンパー内部だけでブラウン運動を行う。DNA分子の数が1~3であることが顕微鏡で確認できる。

【H17年度】

H17年度は、マイクロヒーターとフェムトリットルチャンパーを本格的に統合化し、1分子PCRの可視化を実証する。また、本研究では、単にPCR反応の1分子観察を行うだけでなく、増幅したDNA断片の長さの決定も同時に行う技術も開発する。そこで、本年度では、この測定方法の検討も行う。まず、最も簡単なのは増幅したDNA断片の総蛍光量から見積もることを行う方法であろう。DNAは、各塩基対間にスタックする蛍光色素で標識されるため、その総蛍光色素量からDNA長が求まるはずである。また、DNA長はその拡散係数からも求められるため、蛍光DNAのブラウン運動計測も行う。また、東大・工学研究科の鷲津らのグループによって開発された「交流電界を用いたDNA分子伸張技術」の応用も検討する。フェムトリットルチャンパーの前後から交流電界を与え、チャンパー内部のDNAを引き伸ばすことで直接長さを計測する。これら3つの方法で、計測精度や計測感度について検討し、最も再現性・精度の良いものを決定する。ここでは、定量的にDNAの蛍光量を計測する必要がある。そこで、蛍光色素1分子イメージングで内外の研究室で実績のある浜松ホトニクス社のEB-CCDカメラを購入する。

【H18年度】

実際の試料は、血液などの精製されていないものであるため、1分子PCRに対する生体試料の混入の影響を検討する。どれほど試料の精製度が必要なの

かを調べなくては、実際の前処理等の条件が決まらない。そこで、通常のPCRにおける実験動物の血液などからの試料調整の各ステップで、1分子PCRを実行することでその条件検討を行う。また、H17年度におけるDNA長の1分子計測を自動化し、ハイスループット化するために、非圧縮で画像をPCにとりこみ解析をするための独自プログラムを作成する。このために、備品として画像取り込み・解析装置を購入し、改変する。



C. H16年度研究結果

本年度は、以下に詳しく述べるとおり、ほぼ計画通りに研究が進んだ。

① 1分子DNAイメージングと高効率PCRを両立する反応条件検討

DNA蛍光標識に用いられる蛍光試薬SYBR Greenは、高濃度ではPCRを阻害する。しかし、1分子イメージングでは、蛍光輝度を上げるために高濃度SYBR Greenが望まれる。そこで、各SYBR Green濃度における、1分子イメージングとPCR反応効率を検証した。その結果、この2つを満たすためには5kbpのDNAフラグメントに関して、原液の1/20000~1/30000希釈溶液が最適であることが明らかになった（SYBR Green原液濃度はメーカー非公開）。

② 顕微鏡観察用微小チャンバーにおけるPCR反応の検出

通常の反応チューブ内でPCRを1サイクルのみ行い、その際のDNA増幅をフェムトリットルチャンバーを用いて確認した。その結果、図1で見られるように、PCR前後でチャンバー中に捉えられたDNA分子数の増加が確認された。1から4サイクルで同様の計測を行い、PCRの初期反応の効率が42%であると求めることに成功した。これによって、本プロジェクトが掲げる「超高感度検出」に関して実証できたものとする。現在、超微小反応チャンバー中におけるPCRを検討中である。

③ マイクロヒーターの開発とその評価

今後、上述のPCRをイメージングする場合、サンプルチャンバーを局所的にヒートアップする必要がある。そこで、直径100ミクロン程度のマイクロヒ

ーター(図2)を作成し、その温度精度を評価した。その結果、23℃から90℃の範囲で、精度5℃以内かつ時定数約3秒の応答速度で微小空間の温度制御に成功した。

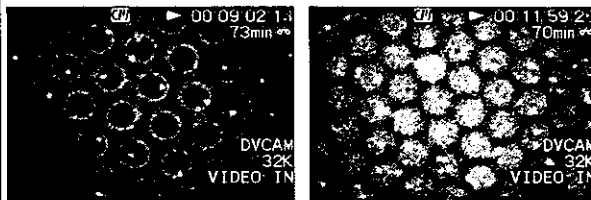


図2：フェムトリットルチャンバーを用いたPCR1サイクル後のDNA増幅。PCRを通常のチューブ中で1サイクルのみ行い、その前後のDNA量をカウントした。前は0.5分子/チャンバーであったのに対し、サイクル後は0.8分子/チャンバーとなった。反応効率は、4サイクルまでの平均で求め42%となった。

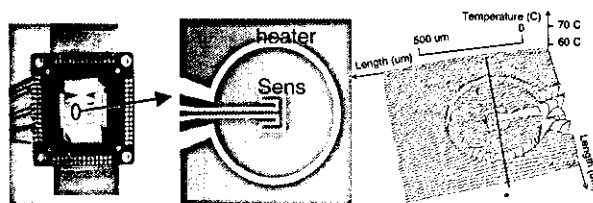


図3：マイクロヒーター：ガラス基板上に、直径100ミクロンのニッケルのパターンを作成し、ここに通電させジュール熱を発生させることで局所ヒートアップを実現した。その際の温度勾配(右)を赤外線カメラによって評価し、ヒーター内部ではほぼ均一とみなしてよいことが分かった。

D. 考察

上述の通り、H16年度はほぼ計画通りに研究が進行した。ただし、上述の「①1分子DNAイメージングと高効率PCRを両立する反応条件検討」で記したとおり、1分子イメージングと高効率PCRを両立する条件が予想よりも狭いことが分かった。H17年度は、まずはこの条件でのPCR実験を推進するが、これと平行してPCR後の蛍光ラベルに関する実験も行ったほうが良いと思われる。このためには、PCR後に蛍光色素を導入する新しい方法論の開発が必要である。また、上述の「②顕微鏡観察用微小チャンバーにおけるPCR反応の検出」と「③マイクロヒーターの開発とその評価」が予定通り進展したため、H17年度はこれを統合する。はじめに、フェムトリットルチャンバー中における温度測定を行う。H16年度に既に予備的実験を行っており、蛍光性の量子ドットを用いた温度計測に成功している。H17年度はこれを精度良く行う。その後、実際にチャンバー中におけるPCRを目指す。これに関しても予備的実験を行っているが、ヒートイングすることによるサンプルの基板付着が問題となっている。H17年度は、この非特異的吸着の問題に取り組まなければならない。BSAなどのブロッカーの使用とともに、チャンバーやガラス表面の化学修飾を検討しなければならないであろう。

E: 結論

総じて計画通りである。しかし、計画段階では予想していなかった問題点がいくつか発見されている。これには、1分子DNAイメージングとP

CRを両立するための条件が難しいこと、高温化におけるDNAの基板への非特異的吸着などである。H17年度はこれに本格的に取り組まなければならない。この問題解決が達成されれば、H17年度中に本プロジェクトが掲げる1分子PCRが達成される可能性がある。

F. 健康危険情報

本研究では、試料は全て精製済みのものを*in vitro*で使用し、デバイス作成においても有害なものを使用しないため、特に報告事項は無い。

G. 研究発表

研究プロジェクト発足1年目につき、特に報告すべき論文発表、学会発表は無い。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許所得・実用新案等

なし