

200500202 A

別添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17年度 総括研究報告書

主任研究者 野地 博行

平成18（2006）年 3月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告	
1分子PCRデバイスの開発に関する研究	----- 1
野地 博行 大阪大学 産業科学研究所	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 9

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・分担）研究報告書

1分子PCRデバイスの開発に関する研究  
研究者 野地 博行 大阪大学産業科学研究所 教授

研究の要約

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と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。独自に開発したフェムトリットルチャンバーを用いてDNA分子を可視化し、マイクロヒーティングデバイスによって反応に必須な温度制御を行う。これまでDNA1分子を1サイクルのPCRで検出した報告はなく、実現すれば最小・最速のPCR検出となる。

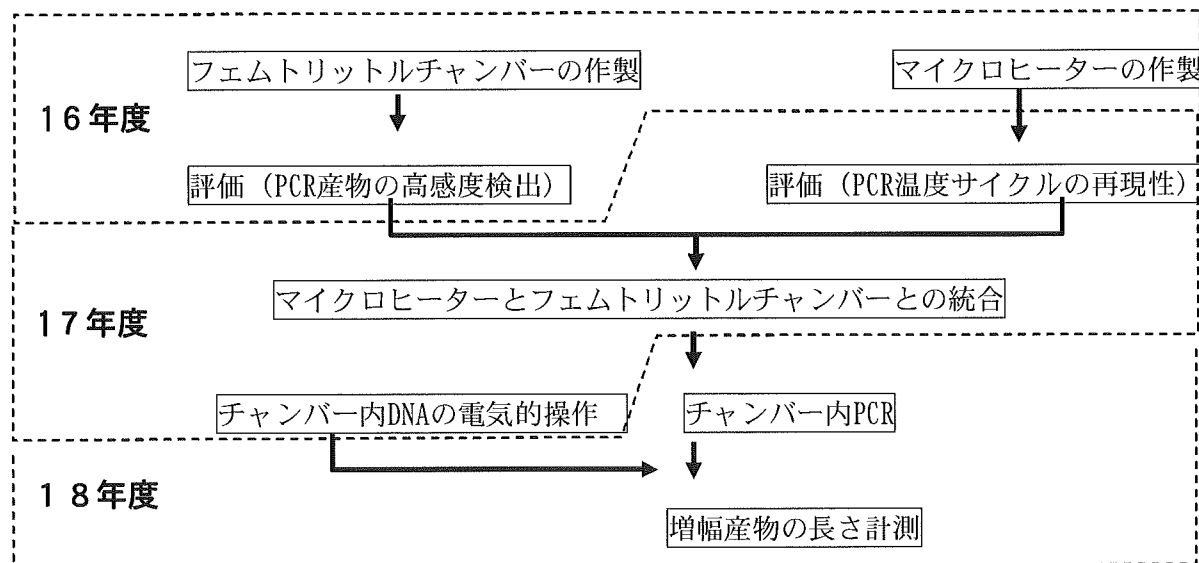
研究の概要（

【研究の目的】

「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。

【全体の研究計画】

本研究における全体の計画をまとめると下図のようになる。



【H16年度の研究】

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分子の可視化に必要な蛍光色素SYBRGreenについて濃度条件の検討を行った。その結果、原液の1/20000~1/30000の濃度範囲においてPCRを阻害せず、かつ容易にDNA分子を可視化できることが明らかになった。

2) 超高感度PCR検出方法の確立

PCR反応を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、既存の方法では検出できなかったわずかなDNA増幅を検出することに成功した。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。

### 3) マイクロヒーターの開発

1分子のPCRをイメージする場合、サンプルチャンバーを局所的にヒートする必要がある。そこで、直径400 $\mu$ m程度のヒーターをNi薄膜によって作成し、その温度精度を評価した。その結果、空気中で23℃から90℃の範囲で、精度5℃以内かつ約3秒の応答速度で微小空間の温度制御に成功した。

#### 【H17年度の研究】

##### 1) マイクロヒーターを用いたPCRサイクルの再現

マイクロヒーターを用いて、PCR温度サイクルを水溶液中で再現した。ヒーター表面を高分子膜（バリレン膜）によってコーティングすることで、ヒーターの耐久性が向上し30回以上の繰り返し使用が可能であることが明らかとなった。

##### 2) フェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとの統合化とDNA1分子の変性

フェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとを組み合わせ、DNA分子を可視化しつつ、DNAに対して温度制御を行える系を確立した。この系を用いることで、DNA1分子を変性し、その様子を可視化することに成功した。

##### 3) チャンバー内DNAに対する電気的操作

増幅したDNAの長さを計測するためには、チャンバー内DNAに対して交流電界を印加する必要がある。このような電気的な操作を行う前段階として、本年度ではチャンバーに閉じ込めたDNAに対して一定電流を流し、DNAのブラウン運動を電気的に制御可能か検証した。この結果、チャンバー内DNAは0.1mA以上の電流によってブラウン運動が抑制され始め、0.3mA以上で完全に抑制されることがわかった。この結果から、フェムトリットルチャンバーと電気的操作とが両立可能であることがわかった。

#### 研究の目的、必要性及び期待される成果

上述した通り、本研究の目的は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、というものである。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。17年度までにフェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとの統合に成功した。18年度では、このシステムを応用して1分子DNAからのPCR検出を試みる。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、この目的を達成するために開発した要素技術を応用して、PCR以外の有用な生化学反応・サンプルの前処理などについても併せて検討を行う。

PCRは医療分野、特に感染症の診断に盛んに応用されている。また、食品分野においても0-157の検出に応用されるなど、社会的有用性の極めて高い生化学反応である。本研究で開発するフェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとを組み合わせたデバイスは、PCRの反応系および検出系を担う「プラットフォーム」に相当する。したがって、既存のPCRを利用した細菌検出系はすべて、応用可能な対象となりうる。本デバイスを応用することで、既存の細菌検出系をより高い感度、より迅速な検出、より微量な測定系に改善できるものと期待される。

#### この研究に関連する国内・国外における研究状況及びこの研究の特色・独創的な点

PCRをマイクロデバイス上で行う方法は、大別すると主に2つとなる。一つ目は、本研究と同様にマイクロチャンバーを用いた系で、反応体積の微小化に特化した研究が多数なされている。現在報告されている中で、最も体積が小さいチャンバーは86pLである (Hidenori Nagai, \* Yuji Murakami, Yasutaka Morita, Kenji Yokoyama, and Eiichi Tamiya Analytical Chemistry, Vol. 73, No. 5, March 1, 2001)。これに対し本研究では、約1/1000に相当する70 fLのチャンバーを用いており、この体積でPCRが実現すれば世界最小のPCRとなる。また、これまで報告されている研究では、体積の微小化に成功しているものの、検出時間の短縮化には成功していない。前述の論文では、検出までに160分と長時間を要している。これはチップ全体を既存のヒートブロックによって加熱するという方法をとっているためである。本研究ではこの点を考慮し、チャンバー近傍のみを迅速に温度制御可能なマイクロヒーターを採用しており、反応時間の大幅な短縮が期待される。

次に、PCRチップの流れとして挙げられるのが、フロースルー型PCRチップである。これは、3つの温度域のヒートブロックと、その上に交差して配置された流路によって構成されている。流路は繰り返しヒートブロックを往復しており、PCRに必要な3ステップの温度制御を、反応液を流路に流すことによって容易に行うことができる。この種類のチップでは流速を上げることで反応時間を短縮できるため、迅速検出法として多数の報告がなされている。現在、最速のPCR検出は500bpのDNA断片を1.7分で増幅可能である (Hashimoto, M.; et al. *Lab Chip* 2004, 4, 638-645)。しかし、これまでの報告では反応時間の短縮は実現しているものの、反応体積は $\mu$ Lスケールと非常に大きく、かつ初期DNAとして $10^7$ 分子以上を必要としている。一方、本研究ではシングルサイクルでDNAの増幅を検出するため、検出までの時間はフロースルー型チップと同程度の1~2分に短縮できるものと期待される。さらに、分子レベルで可視化が可能であるため、初期DNA量も非常に少なく、かつ体積はfLオーダーと極めて微量である。以上のように、本研究は必要体積、反応時間、検出感度のすべてにおいて既存の方法を上回る可能性を持つ。

#### 当初の研究計画に照らした本研究事業の進捗状況

本プロジェクトにおける当初計画は、以下の通りである。

H16年度：PCR条件の検討、マイクロチャンバーを用いた超高感度検出、マイクロヒーター開発

H17年度：マイクロチャンバーとマイクロヒーターとの統合、マイクロチャンバー内におけるPCRの実証

H18年度：増幅DNAの評価方法の検討、生体試料を出発物質とした1分子PCRの検討

本年度までの研究は、以下に詳しく述べるとおり、一部若干の遅れはあるもののほぼ計画通りに進行した。

##### 【H16年度の成果】

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の検討

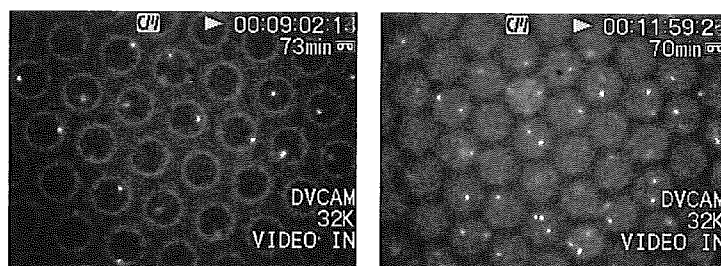
DNA分子の可視化に必須な蛍光色素SYBRGreenについて濃度条件の検討を行った。その結果、原液の1/20000~1/30000の濃度範囲においてPCRを阻害せず、かつ容易にDNA分子を可視化できることが明らかになった。

## 2) 超高感度PCR検出方法の確立

PCR反応を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、既存の方法では検出できなかったわずかなDNA増幅を検出することに成功した。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。

図1

マイクロチャンバーを用いたPCR1サイクル後のDNA増幅。反応前(左)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。



## 3) マイクロヒーターの開発

一分子DNA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ティングする必要がある。そこで、直径400 $\mu$ m程度のヒーターをNi薄膜によって作成し、その温度精度を評価した。その結果、空气中で23 $^{\circ}$ Cから90 $^{\circ}$ Cの範囲で、精度5 $^{\circ}$ C以内かつ約3秒の応答速度で微小空間の温度制御に成功した。

### 【17年度の研究】

#### 1) マイクロヒーターを用いたPCRサイクルの再現

マイクロヒーターを用いて、PCR温度サイクルを水溶液中で再現した。ヒーター表面を高分子膜(パリレン膜)によってコーティングすることで、ヒーターの耐久性が向上し30回以上の繰り返し使用が可能であることが明らかとなった。

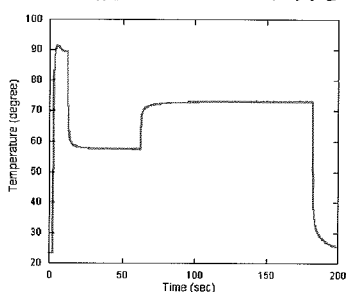


図2. マイクロヒーターによって再現されたPCRサイクル

マイクロヒーター上にMOPS-KOH Buffer (pH7) を乗せ、これを加熱した。PCRに必要な、変性(90 $^{\circ}$ C以上)、アニーリング(60 $^{\circ}$ C付近)、伸張反応(72 $^{\circ}$ C)という3つの温度ステップを再現することに成功した。

#### 2) フェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとの統合化とDNA1分子の変性

フェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとを組み合わせ、DNA分子を可視しつつ、DNAに対して温度制御を行える系を確立した(図3左)。

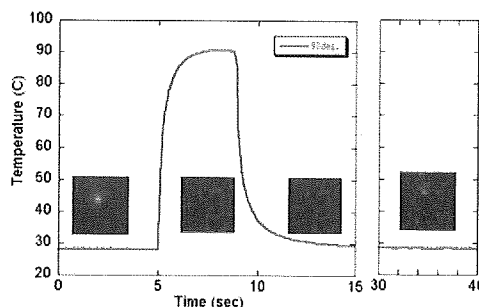
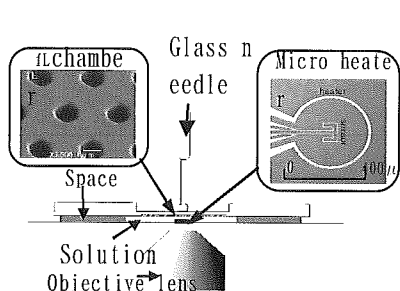


図3 フェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとの統合とDNA分子の変性

上記のシステムを用いてDNA分子に対して熱パルスをかけたところ、変性温度 ( $T_m$ ) 以上でDNAの変性をダイレクトに観察することに成功した(図4右)。しかし、パルスの短時間の加熱では観察に支障がないものの、伸張反応時のような長時間の加熱(2分間)ではDNAのチャンバー内壁への吸着、チャンバー内溶液の蒸発など当初予想できなかった問題が明らかとなった。これに対して18年度では、チャンバー材質の検討および内壁コーティング素材の検討を行う予定である。すでに、チャンバー素材として親水性の高分子であるポリアクリルアミドや機密性の高いガラスなどが検討対象として選定されており、チャンバーの作製も試みられている。

### 3) チャンバー内DNAに対する電気的操作

増幅したDNAの長さを計測するためには、チャンバー内DNAに対して交流電界を印加する必要がある。このような電気的な操作を行う前段階として、本年度ではチャンバーに閉じ込めたDNAに対して一定電流を流し、DNAのブラウン運動を電気的に制御可能か検証した。この結果、チャンバー内DNAは0.1mA以上の電流によってブラウン運動が抑制されはじめ、0.3mA以上で完全に抑制できることがわかった(図5)。この結果から、フェムトリットルチャンバーと電気的操作とを両立可能であることがわかった。

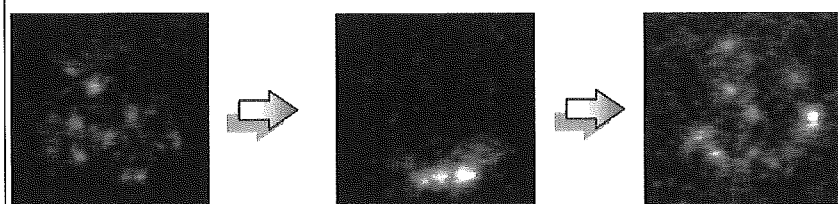


図5 チャンバー内DNAの電気的操作  
通電によって自由に動いていたDNAが下方に寄せられ、通電の停止後は元のように自由にブラウン運動を続ける。

研究計画・方法及び倫理面への配慮(研究計画については、変更点及び当該年度に重点的に取り組む部分について下線を付して明示すること)

#### 【本年度までの研究で明らかとなった課題】

これまでの研究から、当初予想していなかった2つの問題が明らかとなった。

- 1) チャンバー内壁へのDNAの非特異的な吸着
- 2) チャンバートリックスからの水蒸気の透過による反応液の蒸発

いずれの問題も、PCRに強く影響し反応を停止させる。次年度からは、これら明らかとなった課題に本格的に取り組む。

また、これまでの研究からチャンバー内に閉じ込めたDNA分子を電気的に自由に移動させることが可能であることがわかった。これは、増幅したPCR産物のDNA長を直接計測する際に応用可能である。またこれに加えて、チャンバー内への電気的なイオン輸送、一分子DNAの電気泳動、細胞抽出液からのDNA分子の抽出などさまざまなデバイスへの発展が考えられる。これらは、本システムの応用用途を大幅に拡張することにつながることから、これらについても併せて取り組む。

#### 【次年度の計画】

- 1) フェムトリットルチャンバーの材質検討

これまでの研究では、PDMS(ポリジメチルシロキサン)というシリコンゴムを用いてチャンバーの作製を行ってきた。このシリコンゴムは成型が容易であり生化学反応との相互作用が弱く有用性が高いとされているものの、その一方で多孔質性であり水蒸気を透過する性質を持つ。チャンバー内の水溶液が長時間の加熱に伴って蒸発する現象は、このPDMSの水蒸気透過性によるものと考えられる。そこで、次年度ではPDMSに代わるチャンバー材質を探索する。すでに、気密性の高いガラスや水による完全膨潤が可能なポリアクリルアミド樹脂によって、チャンバー作製が試みられている。

- 2) チャンバー内壁の修飾およびコーティングの検討

DNAのチャンバー内壁への非特異的吸着は、PCRを著しく阻害する。このDNAの吸着を防止するために、内壁の修飾あるいはコーティングを検討する。チャンバーの材質がガラスである場合、PEG（ポリエチレングリコール）を用いて修飾が可能である。PEGを用いることでDNAの吸着を非常によく防止できることが知られている。チャンバー内のコーティングとしては、MPCポリマーによるコーティングを検討している。MPCポリマーは生体膜を模倣した吸着防止用の脂質単分子膜であり、タンパク質をはじめDNAの吸着も大幅に低減できることが知られている。

以上、1)および2)の方法を組み合わせることで、蒸発と吸着の問題をクリアし、チャンバー内のDNAに対するPCRを実現する。

### 3) 電氣的ポテンシャルとフェムトリットルチャンバーを用いた一分子DNAアッセイ

これまでの研究から、チャンバー内のDNAに対し電氣的なポテンシャルをかけることで、DNA分子を自由に移動させられることが明らかとなった。この原理は、DNAに限らず電荷を持った物質すべてに当てはまる。したがって、フェムトリットルチャンバーにDNAを閉じ込め、その後、 $Mg^{2+}$ をチャンバー内に導入する、といった物質の輸送・交換が可能になるものと期待される。 $Mg^{2+}$ はPCRをはじめ制限酵素反応など生化学反応の開始因子として使用できる。このことから、これまで開始時間の特定が難しかった一分子DNAの制限酵素反応を詳細に観察・解析できるものと考えられる。制限酵素反応はPCR後の処理としても応用可能であり本実験システムの拡張にもつながるため、これについても併せて取り組む。

さらに、この電氣的な操作はPCRの前処理として細胞からDNAを抽出する際にも応用できる。細菌のゲノムDNAは非常に大きいためポリアクリルアミドなどの高分子のマトリックス内には入り込めない。一方、細胞混入液に多数混入しているタンパク質は、そのサイズが小さいためにマトリックス内に入り込む。この両者の違いを利用して、細胞抽出液からDNAを分離抽出することが可能であるものと考えられる。これらの反応系は、PCRとの統合によって抽出からアッセイまでを行えるトータルシステムへと発展する可能性があり、併せて取り組むこととする。

### 4) 交流電界によるDNA長の直接計測

PCRによって増幅した産物は、そのブラウン運動の解析によってある程度の同定が可能と考えられる。しかし、より確かな検出方法として交流電界によってDNAを伸張させ、ダイレクトに長さを計測する方法が考えられる。この方法を用いることで、反応と検出をチャンバー内で同時に行うことが可能となる。

### 倫理面への配慮

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。



研究成果の刊行

書籍・雑誌

- 1) Arata, FH, Rondelez, Y., Noji, H., Fujita, H. Temperature alternation by an on-chip microheater to reveal enzymatic activity of beta-galactosidase at high temperatures. **Anal Chem.** **2005** 77:4810-4.
- 2) Ishizuka, K., Rondelez, Y., Arata, FH., Fujita, H., Noji, H. Imaging of heat denaturation of single DNA molecules in femtoliter chambers on a micro heating device; Toward a single-molecule detection of PCR *Micro TAS Proceedings* 2005 785-787
- 3) 一分子PCR : 一分子DNAの増幅反応をイメージングする  
石塚康司、新田英之、田端和仁、竹内昌治、藤田博之、野地博行 電気学会研究会 センサマイクロマシン準部門総合研究会 2005, 59-63