

200609015A

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 野地 博行

平成19 (2007) 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 野地 博行 大阪大学 産業科学研究所 | ----- 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 8 |

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要な温度制御を行う。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。

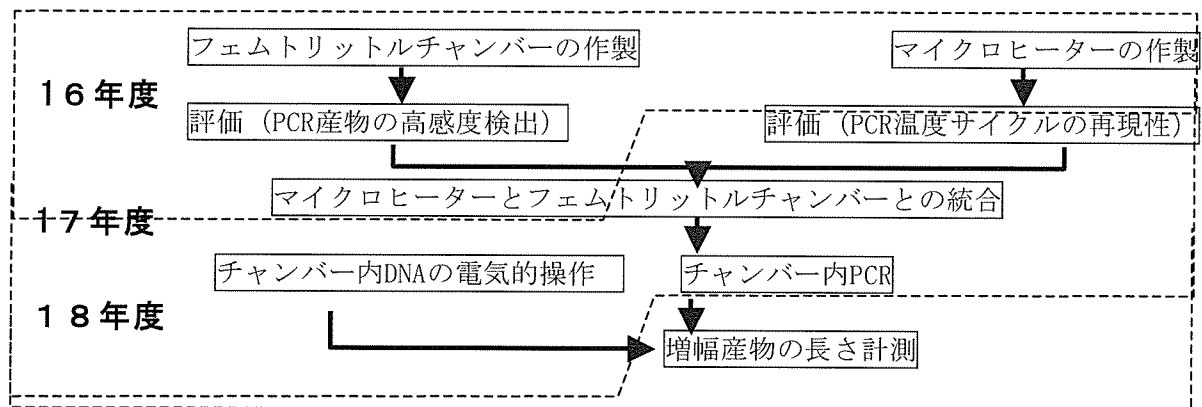
研究の概要（

【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。



【FY16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

ある。そこで、直径400 μ 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°Cから90°Cの範囲で、精度5°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。

【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（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。

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。

【H18年度の研究】

1) 1分子のDNA長の直接決定

本デバイス内にDNA1分子を閉じこめて、交流電界を印可することにより、DNAを伸張させることに成功した。また、伸張させたDNAのビデオイメージから、その長さを計測し、誤差3%以内でDNA長を決定する手法を確立した。

2) デバイス内での1分子DNAに対する制限酵素反応

チャンバー内に閉じこめた1分子のDNAに対し、制限酵素処理を行い、リアルタイムで、DNAが切断されていく様のイメージングに成功した。また、切断断片のDNA長を直接計測することに成功した。従来では、DNAの切断→DNA長の決定に2-3時間の時間を要したが、本研究の成功により、30分以内でそれが可能となった。

3) 油：水エマルジョンを用いたPCR反応

チャンバーを用いずに1分子PCRを実現するため、油：水エマルジョン中の直径数マイクロメートルの液滴中にDNAを閉じこめてPCR反応を行った。顕微鏡上での反応を行うにあたり、サーマルサイクラー上でエマルジョン中のPCR反応を行ったところ、PCRサイクルとともにDNA由来の蛍光強度の増加が確認された。さらに、このエマルジョン溶液を幅1mm、高さ1mm程度のPDMS流路内に導入し、マイクロヒーターと組み合わせて顕微鏡上で、PCR反応を行ったところ、DNAの増幅が確認された。

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°C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ティングデバイス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70fL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 μL 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

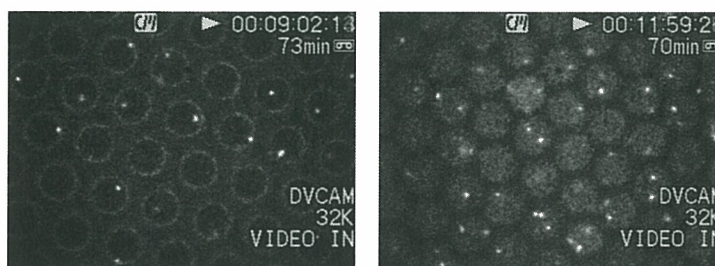
DNA分子の可視化に必須な蛍光色素SYBRGreenについて濃度条件の検討を行った。その結果、原液の1/20000~1/30000の濃度範囲においてPCRを阻害せず、かつ容易にDNA分子を可視化できることが明らかになった。

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

1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トアップする必要がある。そこで、直径400 μ 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 $^{\circ}$ 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。

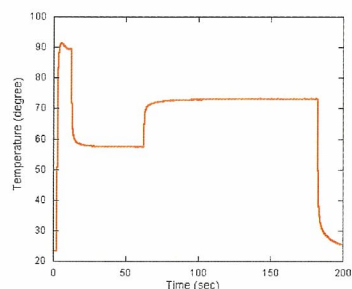


図2. マイクロヒーターによって再現されたPCRサイクル
マイクロヒーター上にMOPS-KOH Buffer (pH7) を乗せ、これを加熱した。PCRに必要な、変性 (90 $^{\circ}$ C以上)、アニーリング (60 $^{\circ}$ C付近)、伸張反応 (72 $^{\circ}$ C) という3つの温度ステップを再現することに成功した。

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分子を可視化しつつ、DNAに対して温度制御を行える系を確立した (図3左)。

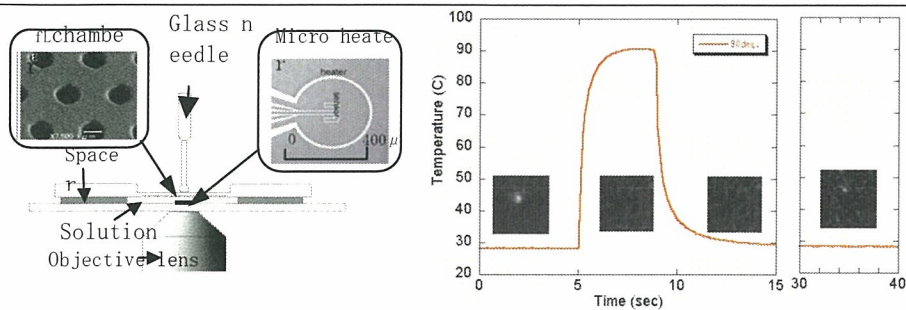


図3 フェムトリットルチャンバーとマイクロヒーターとの統合とDNA1分子の変性

上記のシステムを用いてDNA1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。

【H18年度の研究】

1) 1分子のDNA長の直接決定

本デバイス内にDNA1分子を閉じこめて、交流電界を印可することにより、DNAを伸張させることに成功した。また、伸張させたDNAのビデオイメージから、その長さを計測し、誤差3%以内でDNA長を決定する手法を確立した。(図5)

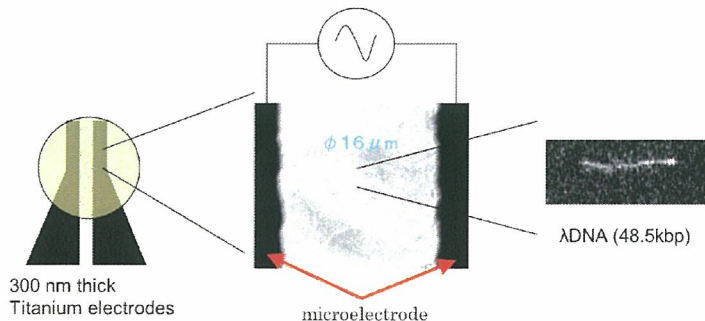


図5 マイクロチャンバー内でのDNAの伸張
チタン電極間にアクリルアミド製マイクロチャンバーを配置し、1kV/cm, 1.5kHzの交流電界を印可することでチャンバー内に閉じこめられたDNAを伸張させる。図5右の写真は、チャンバー内で伸張させたDNAの顕微鏡写真である。

2) デバイス内での1分子DNAに対する制限酵素反応

チャンバー内に閉じこめた1分子のDNAに対し、制限酵素処理を行い、リアルタイムで、DNAが切断されていく様のイメージングに成功した。また、切断断片のDNA長を直接計測することに成功した。従来では、DNAの切断→DNA長の決定に2-3時間の時間を要したが、本研究の成功により、30分以内でそれが

可能となった。(図6)

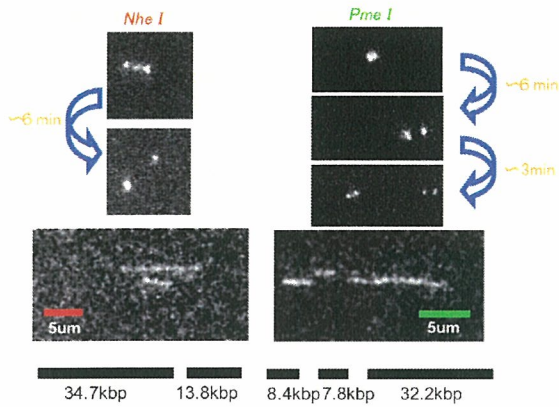


図6 チャンバー内での制限酵素処理と切断断片の長さ決定 上記システムを利用し、DNA1分子と制限酵素をチャンバー内に閉じこめ、Mg溶液を外部から添加することにより、反応を開始させる。反応終了後、交流電界を印可することでDNAを伸張させて長さ決定を行った。図中では、NheIとPmeIでの切断例を示す。切断断片の長さは、電気泳動により決定された長さとはよく一致する。

3) 油：水エマルジョンを用いたPCR反応

チャンバーを用いずに1分子PCRを実現するため、油：水エマルジョン中の直径数マイクロメートルの液滴中にDNAを閉じこめてPCR反応を行った。顕微鏡上での反応を行うにあたり、サーマルサイクラー上でエマルジョン中のPCR反応を行ったところ、PCRサイクルとともにDNA由来の蛍光強度の増加が確認された(図7左)。さらに、このエマルジョン溶液を幅1mm、高さ1mm程度のPDMS流路内に導入し、マイクロヒーターと組み合わせて顕微鏡上で、30回のPCR反応を行ったところ、DNAの増幅が確認された(図7右)。

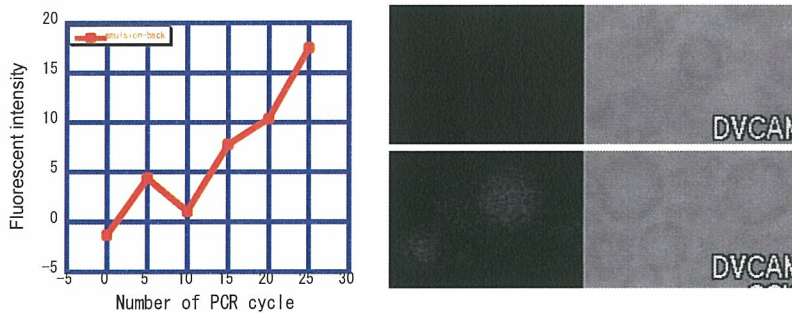


図7 エマルジョンを用いたPCR反応

油；水エマルジョン内にDNAとPCR用の酵素を閉じこめて、サーマルサイクラー上でPCR反応を行った(左)。その結果、サイクル数の増加とともに、DNAに由来する蛍光輝度の増加が確認された。そのエマルジョンを用いて、マイクロヒーターによって、顕微鏡上でPCR反応を行った。写真上段左は、反応開始前の蛍光像。上段右は反応開始前のエマルジョンの透過像。写真下段はPCR反応後の写真を示す。このように、PCRサイクル終了後には、個々のエマルジョンが、染色されたDNA由来の蛍光によって明るく光っているのが分かる。

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)

本年度は本研究計画の最終年度であったため、この研究計画の達成度や、今後の展望について述べる。

【本計画の達成度】

本研究計画の目的は、「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。」であった。このため、この計画の最終目標は1分子のDNAからPCR反応を行い、それをイメージングすることである。しかしながら、研究計画当初では予想できなかったような、チャンバー内壁へのDNAの非特異的な吸着や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、マイクロヒーターの高さ方向への温度勾配などの問題が頻発した。本計画を通して、これら問題にまじめに取り組むことによって、現段階では、チャンバー内壁への非特異的吸着の問題以外はすべて解決している。その例として、進捗状況の項でも述べたが、非特異的吸着が少ないエマルジョンを用いたPCR反応では、顕微鏡上でマイクロヒ-

ターを用いてPCR反応の再現に成功している。このため、当初の計画であるチャンバー内でのPCR反応を実現するため、チャンバー内壁への非特異的吸着を押さえるために、チャンバー表面の表面処理や、チャンバー材質の検討を精力的に行っている。本研究提案の実施において、研究期間内に1分子PCRの実現まで至らなかった点をもっとも悔やまれるが、それを実現するための環境を整えることはできたと考えている。このため、今後も本研究計画の達成に向けて取り組んでいきたいと考えている。

【今後の展望】

本研究で開発された、マイクロヒーターや、マイクロチャンバーを用いて、様々な新しい研究が生まれている。その例をいくつか紹介していきたい。

1. マイクロヒーターを用いた、局所的な酵素反応の制御を行う研究。

温度に反応してゲル化するポリマーを利用してゾルーゲル転移によって酵素分子の動きを制御する研究で、現在論文投稿準備中である。

2. マイクロチャンバーを利用して、多剤排出トランスポーターの活性測定。

院内感染のもとである多剤耐性菌が薬剤耐性を獲得する原因となっている、多剤排出トランスポーターの活性測定に成功し、それら、薬剤耐性菌に対する薬剤のスクリーニング系に有効活用できることを示せた。

3. マイクロチャンバーを利用したサルモネラ菌の迅速検出

食品検査で義務づけられている、サルモネラ菌の迅速検出が可能であることも明らかとなった。

このように、本研究から得られた成果を利用して、様々な研究が進行中であり、それらは、社会的、学術的にも意義がある物になっている。今後は、当初目的の達成を軸に、このような派生的な研究に関しても遂行し、本研究計画の有効性を実証していきたい。

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, H.F., Noji, H. and Fujita, H. Motion control of single F1-ATPase rotary biomolecular motor using microfabricated local heating devices. *APPLIED PHYSICS LETTERS* **88** pp. 83902-2006.
2. Arata, H.F., Low, P., Ishizuka, K., Bergaud, C., Kim, B., Noji, H. and Fujita, H. Temperature distribution measurement on microfabricated thermodevice for single biomolecular observation using fluorescent dye *Sensors and Actuators, B: Chemical* **117(2)** 339-345 2006.
3. Liza Lam, Koji Ishizuka, Shouichi Sakakihara, Hiroyuki Noji. Restriction Enzyme Assay in Femtoliter Microchamber. Proceeding for 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro Total Analysis Systems) 2006, Vol. 2, pp. 1429-1431.