

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

マイクロバイオプロット分析システムの開発

### 2. 氏名

佐藤 記一

### 3. 研究のねらい

サザンプロット分析(以下、サザン分析)は DNA を、ノーザンプロット分析(ノーザン分析)は RNA を電気泳動分離後、膜に転写したのち特定の配列を有したプローブ DNA と相補的結合(ハイブリダイゼーション)をさせて、目的とする DNA や RNA が存在していることを証明する実験法である。同様に、ウェスタンプロット分析(以下、ウェスタン分析)はタンパク質を SDS 電気泳動によりサイズ分離した後、抗体と特異的結合をさせて、目的とするタンパク質の存在確認を行う分析法である。これら三つの手法はいずれも電気泳動によって多数の物質が混在する試料をサイズ分離した後、特異的結合によって目的成分のみを検出するものであり、共通の技術を基にしている。基礎医学、分子生物学や生化学など生命科学に関して、遺伝子レベルやタンパク質レベルでの解析や遺伝子組み換えなどを利用している研究では、目的とする遺伝子やタンパク質が存在している(もしくはいない)ことの証明として、必ずこれらの分析法が利用されている。そのため、当該研究分野において最も重要かつ利用頻度の高い必須の分析手法といえる。

しかしながらこれらの分析法には共通する問題点が存在する。最も大きい問題は、分析にかかる時間が長いということである。電気泳動分離に1~数時間程度、そのあとのプロット分析・ハイブリダイゼーションに一晩かけるのが一般的であり、それ以外の操作も加味すると最低24時間程度は必要となる。また、これらは熟練を要する煩雑な手作業で行われており、これが研究の効率を低下させている。そこで本研究では、分析時間の大幅な短縮と煩雑な手作業を減らすことをめざし、プロット分析に必要な分離、結合、検出のすべてのプロセスを一枚のチップ上で行えるマイクロシステムの開発を試みた。マイクロチップシステムはサンプル量や試薬量の削減だけでなく、様々なプロセスの高効率化と時間の短縮、一枚のチップ上に複数のプロセスが集積化可能といった特徴があり、これら性質をうまく活用すれば従来法に比べて飛躍的に優れた分析法が開発できると考えられる。

### 4. 研究成果

#### **連続型サザン分析法の開発**

サザン分析を実現するためには、DNA 断片を電気泳動分離し、目的の配列を有する断片のみをプローブ DNA と結合させる必要がある。そこで、電気泳動流路の下流に結合領域をつなげたチップを作製し、電気泳動された試料が分離された順にプローブに接触する方法を考案した。図1に

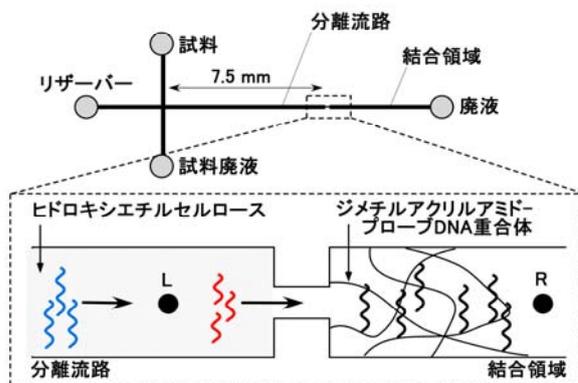


図1 連続型マイクロサザン分析法の原理  
分離流路で分離されたDNA断片が結合領域にはいるとすぐにプローブと結合し、下流へ泳動されなくなる。従って検出点LとRで得られたエレクトロフェログラムの差から標的DNAを知ることができる。

示すような流路を持つチップをシリコンゴムの一種であるPDMSとスライドガラスを用いて作製し、流路中央のくびれから左側を分離流路、右側を結合領域とした。分離流路は分離ポリマーとしてヒドロキシエチルセルロースの溶液を満ち、結合領域には結合ポリマーとして一本鎖のプローブDNAを固定化したジメチルアクリルアミドの溶液を充填した。ここで、あらかじめ蛍光標識した一本鎖DNA断片試料を電気泳動分離すると、分離流路内でDNA断片はその大きさに応じて分離され、小さい断片から順にくびれ部に到達する。多くの断片は結合領域に入ってもそのまま下流へと泳動されるが、プローブDNAと相補的結合する配列を有したDNAのみが結合領域の先端部でプローブDNAと結合してそこにとどまる。従って、くびれ部の左右で取得したエレクトロフェログラムを比較することにより、標的DNAを同定することができ、その泳動時間からDNAの大きさを知ることができる。

実際に72merと118merのDNA断片を泳動して実験したところ、図2に示すとおり、標的DNA断片のみがくびれ部の少し下流、検出点Cでゲルに固定化され、その右側の検出点Rには標的DNAは到達しておらず、想定したとおりの結果を得ることができた。また、バクテリオファージ由来DNAの制限酵素消化物断片を同様に分析したところ、サイズ分離を実現しながら標的DNAのピークを同定することに成功した(図3)。本方法ではわずか2分足らずで分離から、相補的結合、検出まで実現しており、従来法に比べて大幅な分析時間の短縮と操作の簡便化を実現することができた。

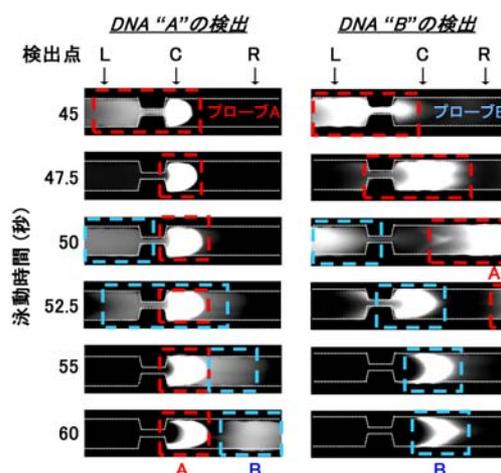


図2 連続型マイクロサザン分析法による分析結果  
A,B二種類のDNA断片を分析した結果。左はAに右はBに対するプローブが固定化されており、標的のDNAだけが結合する。

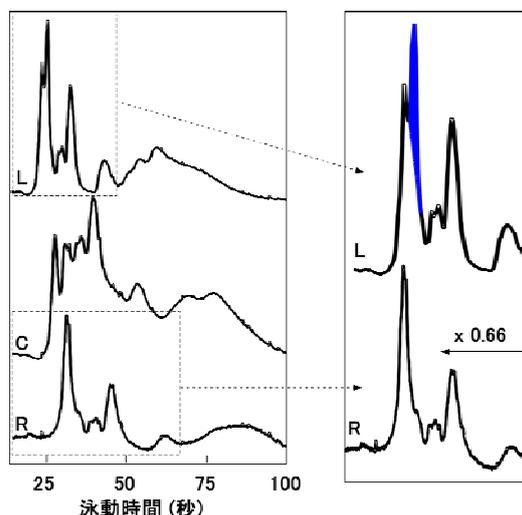


図3 ファージDNA断片の分析結果  
φX174のDNAをHaeIIIで断片化したものを試料として、118mer断片に対するプローブで検出した。右図に青で示したピークは検出点Lのみで検出されたことから、標的DNAのピークであると同定できる。

## 二段階サザン分析法の開発

前述の連続法では簡便迅速な分析を実現したが、試料中に夾雑物が多く、標的DNAが非常に少ない場合には2つのエレクトロフェログラムの差を見るといった方法ではピークの判別が困難になることが考えられる。そこで、標的 DNA 断片のみを検出可能な方法を考案した。この方法は従来法同様、分離と結合を別々に行う2段階法であり、通常分離流路の他に結合反応も行う幅広流路を有している(図4)。分離流路と幅広流路の上側には分離ポリマー溶液を、幅広流路の下側には結合ポリマー溶液をそれぞれ満たす。まず試料 DNA 断片は分離領域内でサイズ分離され、次に電場の向きを90度変えることにより、そのバンドパターンを維持したまま、結合領域に運ばれる。多くの断片は結合領域に入ってもそのまま出口へと泳動されるが、プローブ DNA と相補結合する配列を有した DNA のみ、結合領域の上部でプローブ DNA と結合してそこにとどまる。これにより、標的 DNA 断片のみが流路内で検出され、その左右方向の位置からサイズが推定できる。

これを実現するためには、幅広流路内で試料バンドを広げることなく一方方向に泳動することが必要となるため、幅広流路の各辺に多分岐電場制御用流路を作製し、これにより幅広流路内に平行電場を形成することにより良好な分離を実現した。実際にこのチップを用いてバクテリオファージ由来 DNA の制限酵素消化物断片を分析したところ、一段階目の電気泳動分離により、幅広流路内で各バンドの良好な分離を実現した。さらに、下方方向に向けて泳動すると、多くのバンドが出口に向かって泳動されていくのに対し、標的DNA断片である118mer断片のみが結合領域の上端付近に固定化され、検出することができた(図5)。本法では分離に2分、結合反応に3分の合計5分で分析することが可能であり、従来法に比べて大幅な時間の短縮と操作の簡便化を実現した。今後、さらなる操作性と再現性の向上、試料としてより大きな DNA 断片の分離を実現することにより、新たなサザン分析法として実用的なものになると期待される。また、本法は試料をRNAに変えることにより、そのままノーザン分析法に応用可能であり、さらに幅広い利用が期待できる。

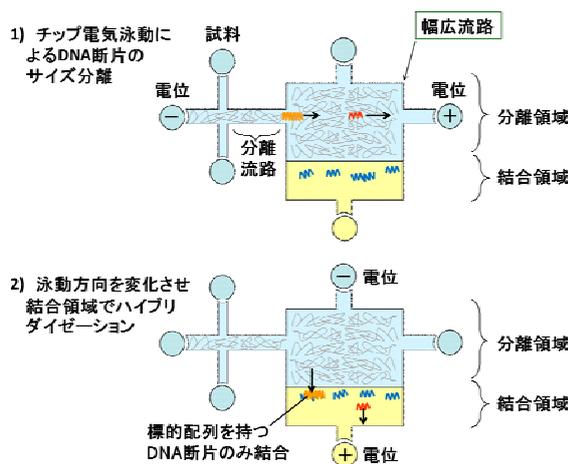


図4 二段階マイクロサザン分析法の原理  
水色の部分にはヒドロキシエチルセルロース、黄色の部分にはジメチルアクリルアミド-プローブDNA重合体を満たす。

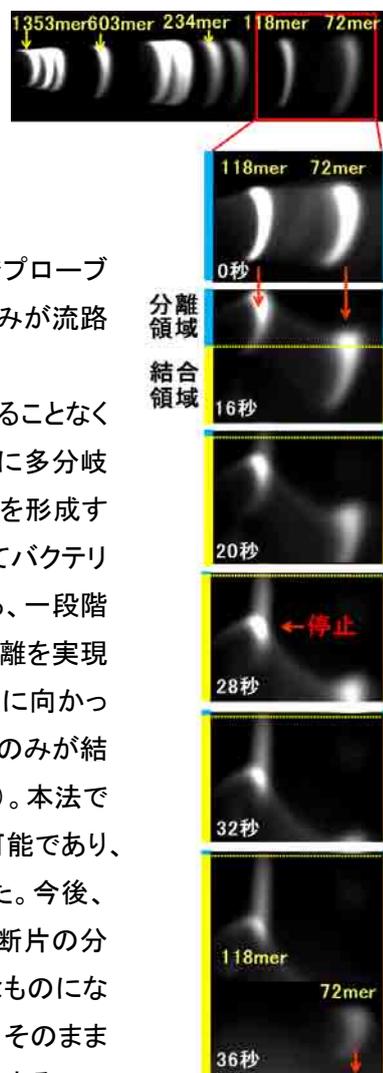


図5 ファージDNA断片の分析結果  
試料とプローブは図3と同じ。

## ウェスタン分析のためのタンパク質のマイクロチップ SDS電気泳動法の開発

前述の分析原理をそのまま用い、プローブ DNA の代わりに抗体を用

いればタンパク質のウェスタン分析を実現できると考えられる。しかし、DNA の分離分析とは異なり、SDS で変性したタンパク質をポリマー溶液を用いて PDMS チップでサイズ分離した報告はなく、まず分離法の確立が最初の課題となる。

高分子をポリマー溶液中で電気泳動分離するとき、溶液自体が動くこと分離能が損なわれるため、電気浸透流を完全に止める必要がある。また、PDMS 壁面へのタンパク質の吸着を防ぐことも必要である。そこでこれらを解決するために、PDMS 内壁を 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーで修飾した。これによりタンパク質の吸着と、通常の条件での電気浸透流の発生は大幅に低減した。しかしながら、SDS とポリマーの両方を含む泳動液を満たし、電圧を印加すると溶液が流れることを見いだした。これは電気浸透流とは異なる原理による溶液自体の泳動と考えられ、この発生を抑えることはできなかった。

各種条件検討の結果、MPC 修飾した PDMS チップにおいて、SDS 及びポリエチレンオキドを含む泳動液を用いて SDS 変性タンパク質のサイズ分離を実現した(図6)。最もよく利用される分子量領域において泳動速度と分子量に関して良好な検量線を得ることができた。今後、この下流部に抗体を固定化した抗原抗体反応部を接続することによって、ウェスタン分析システムを実現できるものと期待できる。

### 5. 自己評価

本研究は核酸およびタンパク質を試料とした分析法を開発するものであり、それぞれ電気泳動分離部と選択的結合部からなる。核酸を標的とした分析では新規の分析法を 2 種類開発することに成功したが、タンパク質については分離部のみが実現し、結合部の開発には至らなかった。従って、全体の進捗状況としては 70%程度と考えられる。

しかしながら開発できたシステムは分離性能と再現性の点において当初期待したほどの性能は有していなかった。これは、本技術の最も基幹となるチップ電気泳動が再現よく制御できていないことによると考えられる。従って、2 つの新規分析手法についての原理検証には実現したものの、実用可能な技術開発という観点で考えると、未だ道半ばの状態であるといえるだろう。

### 6. 研究総括の見解

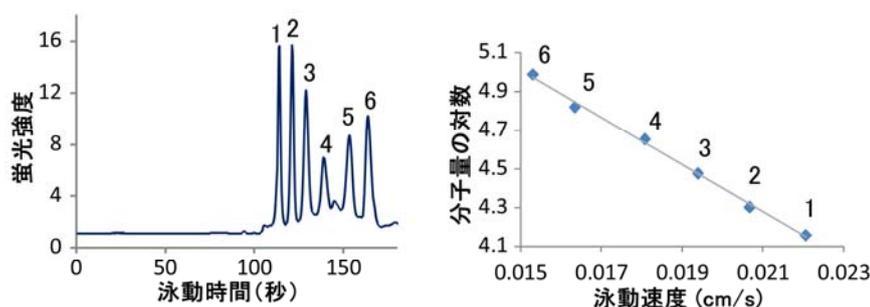


図6 マイクロSDS電気泳動によるタンパク質の分離結果

1:  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa), 2: trypsin inhibitor (20.1 kDa), 3: carbonic anhydrase (30.0 kDa), 4: ovalbumin (45.0 kDa), 5 BSA (66.0 kDa), 6 phosphorylase b (97.0 kDa)

生化学研究で広く利用されているサザンブロットリング法、ノーザンブロットリング法、及びウェスタンブロットリング法のそれぞれについてマイクロチップ化による迅速分析法の実現を目的としたチャレンジングな提案である。主たる成果は次の3点である。

1. 試料を電気泳動分離した後に標的DNAを相補的DNAと結合させ 蛍光イメージングする連続型サザン分析法を考案し、従来法に較べて大幅に操作が簡便で高速なマイクロチップ電気泳動法の開発に成功した。
2. DNA をサイズ分離した後に全成分を分離方向とは直角方向に同時に電気泳動させ標的 DNA のみをハイブリダイゼーションで識別する構成の2段階マイクロサザン分析法を考案し、夾雑物の多い実用条件でも高精度な分析が可能なマイクロチップ電気泳動法の開発に成功した。
3. SDS 変性タンパク質の PDMS マイクロチップ電気泳動分離法に取り組み、タンパク質の非特異吸着の防止及び電気浸透流の抑制に成功し、ウェスタンブロットリング分析のマイクロチップ化の実現の可能性を示した。

これらの成果は9件の学会で発表された。

三種のブロットリング分析法をマイクロチップ電気泳動を利用して実現するための基盤技術の開発に取り組み、チップ材料や電気泳動液条件の最適化、多分岐電場制御用流路の作成など創意工夫を重ねて、3種のブロットリング法実現の可能性を示したことは高く評価される。汎用性の高い計測分析技術であり、チップ化が実現すれば分析時間の大幅な短縮、操作の簡便化、超微量分析が可能となり、生命科学研究の促進に大いに貢献することが期待できる。分離度の改善による高精度化、実試料を用いて実証実験を重ね更なる検討を行うとともに、現存のゲル電気泳動よりも使いやすく、高効率手法の開発に結びつくように研究を推進して欲しい。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

#### (1) 学会発表

##### 口頭発表(国内)

- ・ 佐藤 記一・青野 圭祐・加地 範匡・馬場 嘉信・吉村 悦郎、2段階マイクロサザンハイブリダイゼーション法の開発、第70回分析化学討論会、2009

##### ポスター発表(国際)

- ・ Kiichi Sato, Hajime Harada, Yasuyuki Sakamoto and Etsuro Yoshimura, "Development of a Microfluidic Southern Hybridization Analysis System", The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2008)、2008
- ・ Kiichi Sato, Keisuke Aono, Noritada Kaji, Yoshinobu Baba and Etsuro Yoshimura, "Rapid two-step Southern hybridization analysis using a microchip", The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2009)、2009
- ・ Kiichi Sato, Keisuke Aono, and Etsuro Yoshimura, "Microchip-based Two-Step Southern Hybridization Analysis", Pittcon 2010、2010

- Kiichi Sato, Keisuke Aono, and Etsuro Yoshimura, "Development of a Rapid Two-Step Micro Southern Hybridization Analysis System", 25th International Symposium on Microscale Separations (MSB 2010), 2010