

論文の内容の要旨

論文題目 Development of Microfabricated Genetic Analysis Systems:

Integrated PDMS (polydimethylsiloxane) Microchip for PCR and CGE

(微細加工による遺伝子解析システムの開発:

PCR と CGE のための集積型 PDMS マイクロチップ)

氏 名 洪 鍾 昱

半導体製造技術を応用してマイクロスケールの微細構造を形成するマイクロファブリケーションの研究が盛んに行われている。こうした技術を用いて製作したマイクロチップ上で、化学または生化学的な分析を行うマイクロチップ分析法は、従来の大型分析装置に比べ、サンプル量の減少、分析時間の短縮など多数のメリットを有するだけでなく、分析プロセスを連続化、自動化し、かつコンパクトなシステムを実現する方法として大きな期待が寄せられている。

本研究は、ヒト・動物・植物・微生物等の遺伝的分析を一つのチップ上で行い、その情報をリアルタイムで収集することが可能な遺伝子解析用マイクロ生化学システムの開発に関する研究である。この研究では、遺伝子の増幅 (PCR) とキャピラリゲル電気泳動 (CGE) を一つのチップ上で行うマイクロチップの製作、そして、マイクロチップ上での PCR を行うための温度調節システム、マイクロチャンネルの中で微量液体をハンドリングするためのマイクロ流体システム、及び、電気泳動などの方法

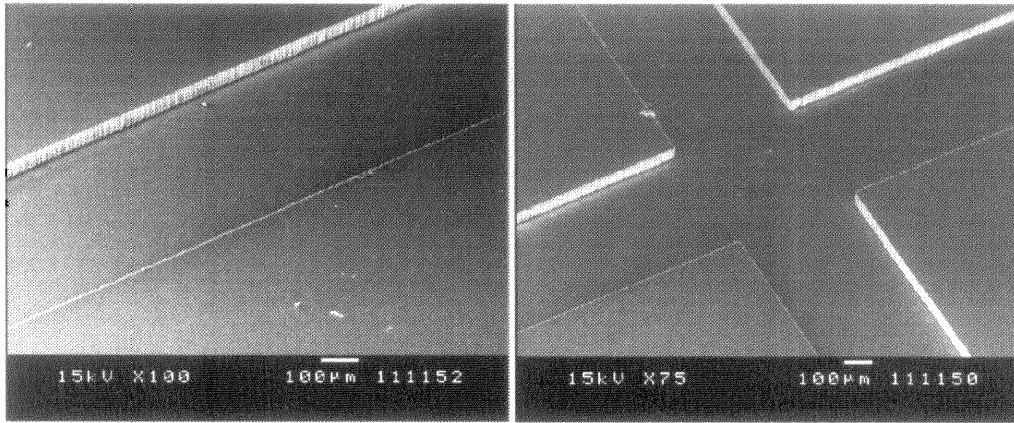


Fig. 1. Scanning electron micrographs of the channels on the PDMS microchip. Linear shape (left) and cross shape (right).

で分離をした遺伝子を検出するためのマイクロ検出システムなどのシステム構築、等が含まれている。特に、本研究では、今までマイクロチップの材料としてよく使われてきたシリコン基盤やガラス基盤を用いずに、安価で加工が容易なシリコン高分子である PDMS (polydimethylsiloxane) をメイン材料とした hybrid PDMS-glass チップを製作し、周辺の構成要素と組み合わせて全体システムの構築を試みた。

まず、マイクロマシン技術を利用した『マイクロキャピラリゲル電気泳動』に関する研究を行った。マイクロ構造の中で生化学反応を行った場合、数マイクロリットラ (μL) 以下の反応生産物を分離、分析する必要がある。この場合、スラブゲル電気泳動または HPLC 等の方法が利用できると思われるが、この従来の方法では反応生産物質の量が少ないため、実際的な分離、分析にはさまざまな問題点がある。そこで、本研究では、サブマイクロリットラ (sub- μL) オーダの反応生産物の分離、分析方法としての応用が期待される『マイクロキャピラリゲル電気泳動』の装置の開発及びその中で生体物質の分離、分析方法について検討を行った。特に、PDMS を利用してマイクロキャピラリゲル電気泳動用のチップを開発した (Fig. 1)。そして、このチップ上の数百 μm 幅のチャンネルにゲルを充填する技術を確立した。このマイクロチップ上のマイクロチャンネルに、バブルまたはムラのないきれいなゲルを充填することは、極めて難しいことがよく知られていた。そこで、本研究では、プラズマ法などを用いてマイクロチャンネルの表面の性質の改良し、充填するゲルの濃度および温度、ゲルを充填するときの環境条件などのパラメータを調べて、マイクロチャンネルの中にゲルを充填する方

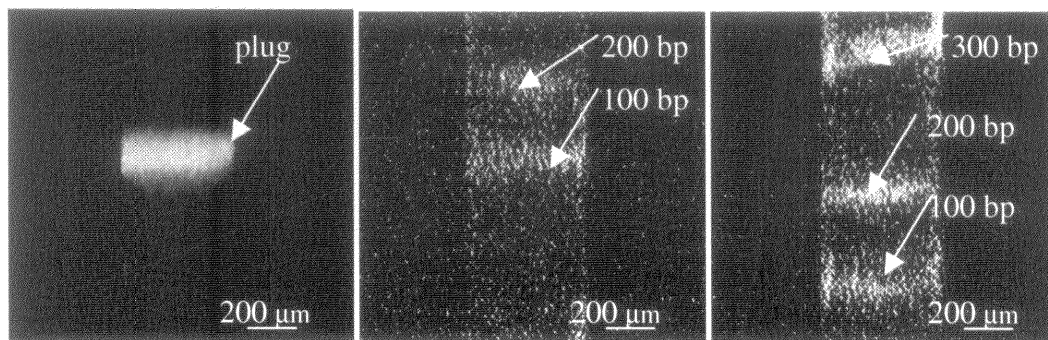


Fig. 2. *Images of moving bands of DNA molecules in a microchannel of the PDMS microchip. Microchannel was filled with agarose gel. DNA ladder sample was injected at 71.4 V/cm for 1 sec. (left). After flushing the intersection with buffer, electricity was applied for separation (center and right).*

法を明らかにした。さらに、ゲルを充填したマイクロキャピラリゲル電気泳動用のチップを利用して、100 bp から 1 kbp までの DNA 分子を 120 秒以内に、そのサイズ別に分離することに成功した (Fig. 2)。また、2.5 nL という非常に微量なサンプル量で DNA の分離をすることができた。

次に、マイクロマシン技術を利用した『マイクロリアクターシステム』に関する研究を行った。マイクロリアクターを用いることで、高価な試薬や廃液の減量、高い界面-体積比に基づく高い熱伝導・物質移動・分解能の実現、集積化・並列処理および複製による大量生産を可能になることが期待される。また、生体物質、触媒、プロセスの効率的なスクリーニングを、集積化されたマイクロリアクターチップで構築することも可能となる。本研究では、生化学反応用のマイクロリアクターチップの設計・製作、マイクロ生化学反応のための温度コントロールシステムの構築を行った。マイクロ生化学反応としては DNA 分子の増幅反応である PCR (Polymerase Chain Reaction) を選択して検討を行った。初めに、PCR 反応用の PDMS と glass の hybrid マイクロチップを開発した。そして、このチップ上でのマイクロ反応を行うために、ペルチェ素子とパソコンを用いた温度コントロールシステムを構築した。このマイクロリアクターチップを用いることにより、 λ DNA の 500 bp gene をターゲットとして、目的遺伝子の PCR による増幅の確認に成功した。

最後に、マイクロチップ上での PCR 反応による生成物を、同じチップ上で CGE によって分析するために、PDMS を base としたチップを設計・製作した。このチップを用いることにより、PCR 反応後、反応生成物を CGE によって同じチップ上で分析することが可能となる、『集積型遺伝子解析システム』の開発に成功した。

本研究は MEMS (Microelectromechanical Systems)、バイオテクノロジー、生物化学工学等の分野を融合した学際的な研究として重要な意味をもつ。また、ヒト・動物・植物・微生物の特定の遺伝子をチップ上で PCR により増幅し、引き続いて同じチップ上で CGE による分析を可能とする『集積型遺伝子解析システム』を、PDMS をベースとする安価な材料と簡便な手法で作製することに成功したことは、科学的にも産業的にも極めて大きな波及効果が期待できる。