

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer: Development of Advanced Measurement and Analysis Systems (AMED-SENTAN)

研究開発課題名： (日本語) 高感度エピゲノム解析のためのマイクロ化学システムの開発
(英語) Microchemical System for Highly Sensitive Epigenome Analysis

研究開発担当者 (日本語) 大学院医学研究院 教授 伊藤 隆司
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Medical Sciences, Professor, Takashi Ito

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

研究開発分担者 (日本語) マイクロ化学技研(株) 専務取締役 田澤 英克
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Microchemical Technology Co., Ltd., Executive Director, Hidekatsu Tazawa

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科 准教授 馬渡和真
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, University of Tokyo, Associate Professor, Kazuma Mawatari

II. 成果の概要 (総括研究報告)

前年度までの検討に基づいて、クロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-Seq) と全ゲノムバイサルファイトシーケンス法 (WGBS) のライブラリ作成に必要な微量単位操作 (MUO) を一枚のホウケイ酸ガラス製チップ上に全て集約した「統合チップ」のデザインを完了した。この統合チップの特徴は、免疫沈降やシリカあるいは可逆的固相固定化法 (Solid Phase Reversible Immobilization; SPRI) によるDNA精製などの固液操作を同一流路中で繰り返し実施可能な点にある。このデザインの採用によって、「ChIP モジュール」「アダプター付加モジュール」「バイサルファイト処理モジュール」など機能毎にマイクロチップを設計する予定であった当初計画とは対照的に、全てのチップのデザインを統一することが出来た。この統合チップは、次世代シーケンサー用ライブラリの調製だけでなく、様々なアプリケーションに利用可能な汎用性の高いものとなると期待される。

統合チップの作成と並行して、マイクロ流路に高精度に自動送液を行う「プロトタイプ機」の構築も終えた。本プロトタイプ機の特徴は、高精度空圧ポンプの出力を内部容量が極めて小さい流路切換バルブを介して多重化することによって、送液精度の確保とポンプ実装に要するコストの圧縮を同時に実現した点にある。結果的に、最大 70 種類の試薬から 6 種類を同時にチップ内に送液可能なシステムを安価に構築することが出来た。

統合チップとプロトタイプ機を用いた送液の条件検討が完了したことを受けて、これらを用いたチップ上でのエピゲノム解析用ライブラリ調製の検討に着手した。但し、ChIP-Seq は MUO 数が多くて複雑なため、失敗の原因検証が困難になると予想された。そこで、実験操作が比較的単純なエピゲノム解析手法である ATAC-Seq を最初のアプリケーションとして選択し、チップ上でのライブラリ調製に関する経験を蓄積するとともにシステムに潜在する問題点の洗い出しを行った。結果的に、約 100 個の Hela 細胞から ATAC-Seq ライブラリが調製できた。ATAC-Seq の基盤であるタグメンテーションによる非固定クロマチン DNA へのアダプター導入は、ChIP-Seq のアダプター付加手法としても利用可能である。一方、WGBS に関しては、バイサルファイト変換に必要なシリカビーズを用いた DNA 精製操作の検証を、単純なダム構造のみを有するモデルチップのマニュアル制御によって進めた。本システムでは、ライブラリ調製の工程によってサイズの異なるマイクロビーズを同一チップに充填排出する必要がある。この難題に対しては、流路の最適化などの独自の解決方法を開発して、全く支障のない充填排出を実現した。WGBS は ChIP-Seq 以上にライブラリ調製時に多数の MUO を必要とするため、人手による送液制御によってその全工程を行うことは不可能であった。統合チップとプロトタイプ機の開発によって初めて、チップ上での WGBS ライブラリ調製の原理検証が可能な実験環境が整備された。

Based on the achievements by the last fiscal year, we completed the design of a borosilicate glass chip that integrates all the micro unit operations (MUOs) indispensable to prepare libraries for chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) and whole-genome bisulfite sequencing (WGBS). This integrated chip is unique in that it can iteratively perform solid-liquid operations, including immunoprecipitation and silica- or Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI)-based DNA purification. Consequently, we successfully unified the chip designs for individual functional modules, in contrast to the initial plan to design distinct chips for “ChIP module”, “Adaptor-tagging module”, “Bisulfite treatment module” and so on. We expect that the integrated chip is useful for not only library preparation for next generation sequencing but various other applications, thus serving as a universal chip.

We also completed the construction of a prototype machine that automatically injects liquid to the micro-channels of the chip with high precision. This prototype machine is unique in that it can multiplex the outputs of high-precision pneumatic pump via an ultra-small volume switching valve, thus achieving both high-precision in liquid control and low cost in pump implementation. Consequently, we succeeded in an economical construction of a machine that can simultaneously inject a maximum of 6 selected from 70 reagents to the integrated chip.

Construction of the integrated chip and the prototype machine allowed us to initiate optimization of on-chip library preparation for epigenome analysis. Since ChIP-Seq is a complex procedure with multiple MUOs, it is likely difficult to identify the causes of failure in experiments. We thus decided to test ATAC-Seq, which is rather simple in its operation, as the first application of on-chip library

preparation to accumulate various practical experiences and figure out hidden problems in our system. Consequently, we succeeded in ATAC-Seq library preparation from ~100 HeLa cells. ATAC-Seq is based on the tagmentation of unfixed chromatin DNA, which can be used as an adaptor-tagging method for CHIP-Seq. For WGBS, we used a model chip, which was equipped only with a simple dam structure and controlled manually, to examine the silica bead-based DNA purification, which is an indispensable step for bisulfite conversion. In this system, microbeads of different sizes have to be injected to and then ejected from the same chip at different steps of on-chip library preparation. We developed a unique solution of this challenging issue, including further channel optimization, to realize trouble-free injection/ejection. Since WGBS requires more MUOs in library preparation than CHIP-Seq, it is impossible to conduct its entire step with manual liquid control. The integrated chip and the prototype machine have, for the first time, provided us with an environment to test the principle of on-chip WGBS library preparation.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
 1. 高感度エピゲノム解析のための細胞前処理用マイクロ化学システムの開発, 口頭, 田澤英克, 竹井寛子, 三浦美希, 三浦史仁, 馬渡和真, 北森武彦, 伊藤隆司, 第 76 回分析化学討論会, 2016/5/28, 国内

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
 1. ゲノム科学と 21 世紀の生命科学, 伊藤隆司, 福岡県生物部会研修会, 2016/10/16, 国内. 福岡県内の高等学校の生物教諭を対象に, 最近のゲノム科学関連の動向を生命倫理問題も含めて高校生に分かり易く伝えて貰うための講義を行い, 討論および研究室見学を実施した。

- (4) 特許出願
なし