



技術解説

ゲノムサイエンスから生まれたDNAチップ技術

金子嘉信*

DNA chip technology coming out of the genome science

Key Words : DNA chip, DNA microarray, transcriptome, SNP detection, nanobiotechnology

1. はじめに

ITバブルがはじめて経済状態の悪化に拍車がかかり、不況の中からもなかなか立ち上がれないでいる日本であるが、IT革命の恩恵は確実に生物学の分野に浸透してきている。生物がもつ1セットの遺伝情報をゲノムと呼んでいるが、そのゲノムを通して生物を理解するゲノムサイエンスはその恩恵を受けているものの1つである。ヒトゲノムプロジェクトに象徴されるゲノムサイエンスはゲノム解析技術の飛躍的な発展をもたらし、さらにポストゲノムシーケンスの研究としてトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームというような細胞内のすべての転写物、すべてのタンパク質、すべての代謝物という意味の用語を生み出し、「すべて」を研究対象とするアプローチに展開している。そして、生み出される膨大な量のデータを処理するためにコンピュータを活用するバイオインフォマティクスや生物をたくさんプロセスから成り立つシステムとして理解するシステムバイオロジーといった新しい学問分野の発展を取り込んでおり、科学技術基本計画においても重点的に推進すべき科学技術分野のうちの1つとして指定されているライフサイエンスの大きな柱の1つになっている。ここではこのゲノムサイエンスから生まれた新しい技術の一つ、DNAチップと呼

ばれる技術^{1,2)}について紹介する。DNAチップはマイクロ技術の結晶ともいえるが、最近では盛んに研究が進められているナノ技術を取り入れることも始まっており、ナノバイオテクノロジーへの道にもつながっている。

2. DNAチップとは

ガラスあるいはシリコンの基板上に高密度に非常に多種類のDNAを整列配置し、固定したものを「DNAチップ」と呼んでいる。その基本的な利用法は、あらかじめ試料から調製、蛍光標識したDNAあるいはRNA断片を用いてハイブリダイゼーション反応をDNAチップ上で行い、DNAチップに固定されているDNAと標識核酸との塩基の相補性による雑種分子形成の結果、DNAチップ上に結合した蛍光量を蛍光レーザー顕微鏡測定装置で測定し、試料中の特定の核酸量を知るというものである(図1)。多種類のDNA分子のハイブリダイゼーションを一挙に検出できることから、ゲノムの全塩基配列が完了した出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)細胞内の遺伝子発現パターン解析、つまり転写物のクラスター

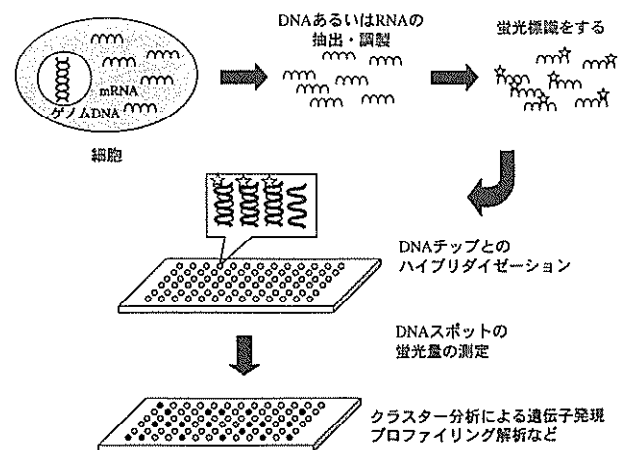


図1 DNAチップ測定概念図



* Yoshinobu KANEKO
1956年3月生
1983年大阪大学大学院・工学研究科・醗酵工学専攻博士後期課程・単位取得退学
現在、大阪大学・大学院工学研究科・応用生物工学専攻・ゲノム機能工学研究室、助教授、工学博士、酵母遺伝学・ゲノム工学
TEL 06-6879-7422
FAX 06-6879-7421
E-Mail kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

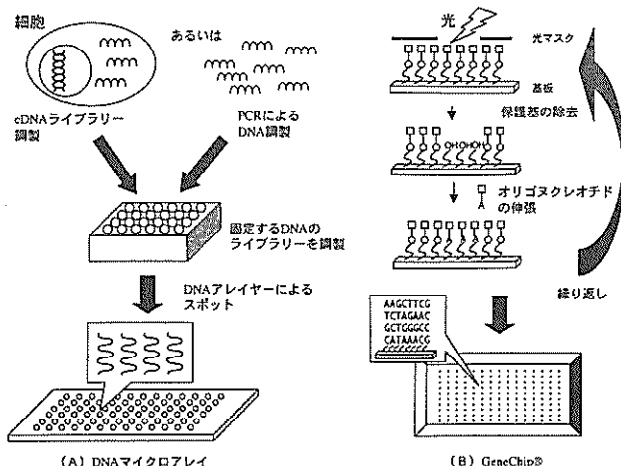


図2 DNAマイクロアレイとGeneChip®の作製方法概略

分析によるプロファイリングに応用され、まずトランスクリプトーム研究の手法として注目を浴びた。現在、よく使用されているDNAチップには作製方法の違いから2種類が知られている。1つは米国スタンフォード大学のP. Brownたちが開発したDNAチップ³⁾で、DNAマイクロアレイ(DNA microarray)と呼ばれている(図2A)。顕微鏡用スライドガラスの上にスポッターあるいはアレイヤーと呼ばれる装置で自動的にDNAを直径約50 μ mのスポットとして100~200 μ m間隔に並べることが可能である。したがって、スライドガラス1枚には3~4万個のDNAスポットを並べることができるといわれており、ヒトの遺伝子をすべて固定することも可能のようである。約6,000個の遺伝子をもつ出芽酵母のDNAマイクロアレイの例では、14 \times 14のDNAスポットのブロックが8列4行整列されて、全部で6,272スポットが1枚のスライドガラス上に配置されている。試料から標識核酸を作製するときに異なる発色をする蛍光物質を利用することにより、緑色や赤色のシグナル、2つが重なったときの黄色シグナルというように異なる条件下での発現プロファイルの比較を同一のDNAチップで行うことができる。また、固定するDNAを最初から一本鎖DNAにしたり、合成オリゴDNAを固定する場合にオリゴDNAの一端とスライドガラスにそれぞれ官能基をつけて反応させ、共有結合させるなどしてハイブリダイゼーションの再現性を高める改良も行われている。

もう1つのDNAチップは、光リソグラフィーを用いた半導体作製技術と光によって脱保護できる保護

基をもつアミデート試薬を利用して基板上的極小ブロック内に直接オリゴヌクレオチドを合成、固定するタイプである^{4,5)}。米国Affymetrix社はGeneChip®という商標登録されているDNAチップを製造している。シリコン基板に「光マスク」と呼ばれる遮光板をかぶせて露光させる作業を繰り返し、基板にヌクレオチドを1分子ずつ積み上げてオリゴDNAを合成していく(図2B)。20~40塩基のオリゴDNA分子を数万種類も基板上に合成することが可能である。GeneChip®ではハイブリダイゼーションから検出までのシステムとして、ヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエ、酵母、大腸菌、シロイヌナズナのチップがアマシャム・バイオサイエンス社から販売されている。こちらの解析法では標識核酸の蛍光は単色しか使用していないが、ミスマッチハイブリダイゼーションを検出できる解析になっている。

最近ではアジレント・テクノロジーズ社が、両タイプのDNAチップをプリンターのインクジェット技術を利用して製造している。

3. DNAチップの開く世界

今のところ、DNAチップによる解析は遺伝子発現プロファイリング、いわゆるトランスクリプトーム解析が中心となっている。出芽酵母を例に挙げると、グルコース培地培養経過での遺伝子発現⁶⁾、減数分裂・胞子形成過程での遺伝子発現⁷⁾、リン酸条件に応答する遺伝子発現⁸⁾、ゲノムの倍数性による遺伝子発現⁹⁾などのプロファイリングから始まり、各種変異株と野生型株での遺伝子発現プロファイル比較が行われている。また、それらのデータを利用してすべての遺伝子間の制御機構ネットワークを明らかにしようと研究が進められている²⁾。我々のグループも九州大学大学院農学研究院の久原 哲先生と田代康介先生の協力を得て、出芽酵母のプロテインホスファターゼ遺伝子破壊株の発現プロファイル解析を進めている。細胞の中にはセリン、スレオニン、チロシンというアミノ酸残基のいくつかにリン酸が結合したリン酸化タンパク質が存在している。このリン酸化タンパク質は細胞のさまざまな生理機能の発現に重要な働きをしている。たとえば、浸透圧や接合フェロモンといった環境刺激に応答するため、そのシグナル伝達系を構成しているタンパク質にリン酸化修飾がかかっていることが明らかにされている。プロテインキナーゼという酵素がタンパク質

にリン酸基を結合しているが、その逆反応を行うプロテインホスファターゼという酵素も存在している。そして、出芽酵母には全部で32個のプロテインホスファターゼ遺伝子があることがわかっている。我々はこの32遺伝子の破壊株を作製し、それぞれの遺伝子破壊株の遺伝子発現プロファイルをすべて調べようとしている。1,000個以上の遺伝子についてその転写量が増加している破壊株として、今までに*cna1*破壊株、*ppt1*破壊株、*ycr079w*破壊株および*pph22*破壊株が候補となっている。この4株に共通して転写量の増加している遺伝子は388個で、出芽酵母全遺伝子を100の細胞機能カテゴリーに分類したとき、mRNAの転写や細胞分裂、核に関与している遺伝子が多いことがわかってきた。

トランスクリプトーム解析ではなく、標識DNAとして小断片化したゲノムDNAを用いることにより、菌種の同定やゲノム構造の解析にもDNAチップは利用できる。出芽酵母では、DNAチップのハイブリダイゼーションパターンの違いによって区別できる菌株どうしの二倍体から得られる子嚢胞子のゲノムにどの程度遺伝子組換えが生じているかを調べることができる¹⁰⁾。ビールなどの醸造酵母は育種が行われ、ゲノム構造が変化していることがわかりつつある。こうしたゲノムレベルでの改変を育種技術に結びつけるために、我々は染色体工学、ゲノム工学の技術の開発を進めている。その中で、ゲノム欠損、重複領域検出、異数二倍体検出をDNAチップで行うことを考えている。

医療分野では、薬剤投与による遺伝子発現プロファイルへの影響や疾患と遺伝子発現プロファイルとの関連などの解析に利用され、診断や疾患遺伝子の同定への応用が考えられている¹¹⁾。また、一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) など個人遺伝情報と疾患あるいは薬剤効果などの関係が明らかになるにつれ、診療分野での利用が広がってくると予想される。ガン遺伝子の同定、薬剤の選択、副作用の予防、医薬品の開発(ゲノム創薬)の上で重要であると言われている。また、1,400個のストレス関連遺伝子をDNAチップ化してストレス評価に利用する新しい挑戦も始まっている¹²⁾。

あるタンパク質がゲノム上のどんな領域で結合相互作用をしているかを検出する方法としてCHIP-on-chipと称される解析技術もある。調べたいタンパク質の抗体により、染色体DNAに結合している

状態のタンパク質複合体を免疫沈降で集めてきた後、含まれるDNA断片をDNAチップで同定しようという方法である。DNAチップに固定するDNAはトランスクリプトーム解析の場合とは違って、遺伝子間の発現制御領域部分のDNAである。

現在、PCRによる食品や環境中微生物の同定が可能になってきているが、この分野にもDNAチップの利用が可能である。病原微生物の同定は特に重要であり、多種類の病原微生物を一挙に検出するシステムとしては有効だと思われる。

4. DNAチップビジネス¹³⁾

日経バイオビジネス2002年3月号のDNAチップの特集記事によると、DNAチップを生み出した米国ではすでにDNAチップ事業の再編が始まり、生き残り段階になっているらしい。ビジネスとして成立するためにはDNAチップによって何を検出・測定するのかが問題となり、利益を生むと思われる医療診断用チップ作製には患者の病理組織を入手する必要があるため、かなりの費用等が必要となるらしい。日本では米国より少し遅れた状況で、実用化に向けてグループを組んで参入し始めたという状況らしい。

C型肝炎治療のインターフェロン治療効果をDNAチップで予測する場合を紹介してみる。C型肝炎の国内の患者は約200万人で、インターフェロン(INF)を用いて治療される場合、C型肝炎ウイルスがうまく排除される例は患者全体のせいぜい40%くらいである。ジェー・ジー・エスはDNAマイクロアレイ型のDNAチップで、肝生検のサンプルから肝臓内の309種の遺伝子発現を調べ、発現パターンをクラスター解析してINFの治療効果を予測している。東芝はINFの効果に関連するMxAタンパク質遺伝子やマンノース結合レクチン遺伝子などのSNPを搭載した電気化学チップを開発している。

抗ガン剤などの治療方針選択のためのDNAチップが開発されているが、実用化に近いDNAチップは感染症診断チップや病原細菌の同定のようなものである。日立ソフトは血液サンプルから約70種の細菌を同定するDNAチップを発売する予定らしい。また、結核菌を含む3種の抗酸菌とクラミジアの同定にはすでにPCRによる遺伝子検査が保険適用になっていることで、昨年4月には、日清紡が結核菌の抗菌薬耐性を検出する「オリゴアレイ」発売しており、SRLは結核菌も含めて14種の抗酸菌を同定するDNAチップ

を開発している。

5. 新しいタイプのDNAチップ^{1,14,15)}

米国ノースウェスタン大学のC. A. Markinら¹⁴⁾はハイブリダイズしたDNAを蛍光量で検出するのではなく、電気抵抗の変化で検出するDNAチップを報告している(図3)。光リソグラフィー合成技術でシリコン基板にSiO₂を1μmコーティングして、succinimidyl 4-(maleimidophenyl)-butyrate(SMPB)で修飾し、微小間隔(20μm)の電極をのせたチップにalkylthiol化した標的プローブオリゴDNA(捕捉鎖)をSMPBとの反応で電極間に固定している。この捕捉鎖は検出したいDNA(標的DNA)の一端に結合するようにしてあり、二本鎖形成したDNAを検出するため、次に標的DNAのもう一方の端に結合できる配列をもち、Auナノ粒子(直径13nm)に結合しているオリゴDNAとハイブリダイズさせる。捕捉鎖、標的DNA、Auナノ粒子オリゴDNAが結合すると電気伝導度が増加する。標的DNAの識別感度は通常ハイブリダイゼーションの温度によりコントロールされるが、Auナノ粒子オリゴDNAを用いたシステムでは温度以外にNa⁺塩濃度でよりシャープに調節可能で、報告では炭疽病菌致死因子遺伝子配列27塩基の検出目的で、1塩基のミスマッチを検出できるように条件検討している。実際の検出はハイブリダイゼーション後、洗浄して銀エンハンサー溶液(硝酸銀とヒドロキノンの溶液)処理を行い、洗浄と窒素ガス乾燥後、電気抵抗を測定する。通常

のDNAチップの共焦点蛍光顕微鏡とCy3プローブのシステムでは約5pMが限界であるが、このAuナノ粒子オリゴDNAシステムでは50nM~500fM濃度の標的を検出できる。

日本のTUM研究所はElectrochemical array chip(ECA Chip)という電気化学DNAチップを開発している。チップの電極上のDNAプローブとサンプルDNAがハイブリダイズすると、電気化学的検出リガンドとして加えているフェロセン化ナフタレンジイミドがインターカレーターとして働き、ハイブリダイズした二本鎖DNAに特異的に結合する。そして、二本鎖になっているスポットでは電気化学的反応により電気シグナルが得られる。また、ミスマッチが存在する二本鎖ではリガンドの結合数が減少するため、見かけのDNA融解温度差が増大する。したがって、加熱により1塩基の違いの二本鎖形成をコントロールすることが可能で、実際にガン抑制遺伝子であるp53遺伝子のSNP検出に成功している。

同じく電気化学DNAチップでは、米国のMotorola Clinical Micro Sensors社が「e-Sensor」を開発している。36個の電極に捕捉用プローブを張りつけたDNAチップで、フェロセンを導入した検出用プローブとのサンドイッチにより、サンプルのDNAやRNAとハイブリダイズが起こると電極での電流に差が生じる仕組みである。

中空糸繊維にプローブ入りのゲルを充填し、その繊維を0.5インチ四方に最大3000本配列させて樹脂で固定し、その集束繊維を薄くスライスしてスライドガラスにのせてチップ化した繊維集束型DNAチップを三菱レイヨンが開発している。価格が1/10になるらしい。

米国のNanogene社はハイブリダイゼーション時にプローブを固定した電極に電位をかけることにより、ハイブリダイゼーション時間を短縮し、また、ミスマッチ検出を効率化する「NanoChip」を作製している。マイナスに帯電したDNAは電極にプラス電位をかけることにより、プローブのある電極に濃縮され、ハイブリダイゼーションの効率が上昇するわけである。また、二本鎖形成させたあと逆の電位をかけると二本鎖の解離が促進されて、ミスマッチのある二本鎖ほど不安定になるのでSNP検出が効率化される。2色の蛍光で標識したレポーターオリゴDNAが、電極に固定したプローブに結合したサンプルのDNAに結合するようにし、調べたいSNP

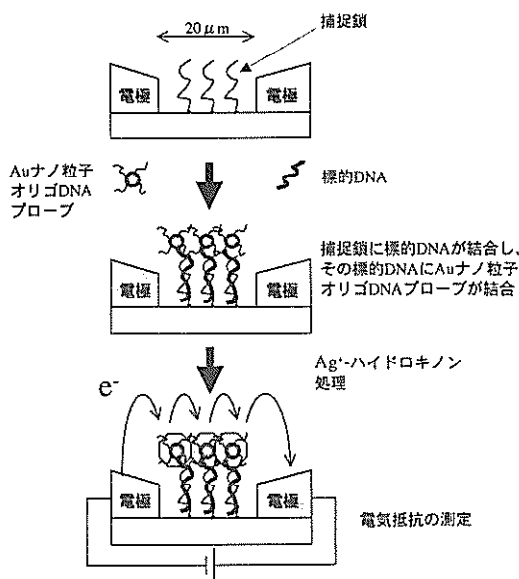


図3 Auナノ粒子プローブDNAチップの検出原理

と相補的なレポーターオリゴDNAは電荷をかけてもはずれないが、置換があるレポーターオリゴDNAの方ははずれるように条件を調整する。結合した蛍光を測定してSNPを検出するシステムである。

最後に缶詰用ブリキ大手の東洋鋼板が開発した「ジーンダイヤ」¹⁵⁾と呼ばれるDNAチップを紹介する。結晶構造の炭素で被膜したシリコン基板上にDNAを高密度に固定しているダイヤモンドチップである。被膜させる際に高周波や熱を加えることで、炭素は基板上でダイヤモンドと同じ結晶構造を取る。各炭素原子からはあまった腕が基板に対して垂直方向に伸びるので、この腕にDNAを結合させることにより、基板に対して1本1本のDNAが垂直となり、1mm²に1,000億個のDNA分子を固定できる。また、DNA分子が共有結合で強く固定されているので、熱を加えても外れない。DNA試料の保存という今までのDNAチップとは違う利用法が提案されている。3mm角のジーンダイヤ1個でDNA1サンプルを保存できるので、5cm角のチップ1枚に100サンプルを保存できる。そして、PCRの鋳型として利用することも考えられている。複数種類のDNAを秩序正しく固定することはできないが、チップに固定したDNAをそのまま増幅できる。スライドガラス大のブラックアルマイト処理をしたアルミ板上の16個のくぼみ一つ一つに診断用プローブを固定した1mm角のジーンダイヤを入れておく。これに検体サンプルを加えてシールで密閉し、PCRを行って遺伝子を検出する。

6. おわりに

DNAチップはゲノムサイエンスの成果と融合し、これからのゲノムサイエンスを支える技術の1つであり、多種類あるいは微量の核酸をハイスループットに検出できる技術であるが、実験そのものを指先にのる程度の小さなチップの上でやっしまおうというラボチップテクノロジーあるいはオンチップテクノロジーという技術も実現し始めている。ガラスや石英、プラスチックなどのチップ基板の上に半導体技術を応用して数十 μ m程度の幅の溝を掘り、もう1枚の平板チップを張り合わせると溝がキャピラリーの役目を果たす。そこに電解質溶液を満たして電圧をかけると、電気浸透流の働きで液が流れる。溝のデザインと溝に満たす溶液、印加電圧により液体の

流れや電気泳動の向きを自由にコントロールして、ポンプ、バルブ、注入、分離、分注、反応などの機能をチップ上に集積することが可能になる。すでにAgilent Technologies社のAgilent 2100バイオアナライザの1.8cm角のガラスチップ上で、核酸やタンパク質の電気泳動が2分足らずで完了し、データはすべてデジタルデータとして処理される。ゲノムサイエンス、バイオインフォマティクス、ナノテクノロジーがさらに発展することにより、1つの細胞を対象にしてその中で起こるさまざまな生命現象を実際に分析できる日が来るのもそう遠くないかもしれない。

参考文献

- 1) 竹中繁織：生命化学のニューセントラルドグマ（杉本直己 編），pp.85-94，化学同人(2002)
- 2) 久原 哲：ゲノム機能，発現プロファイルとトランスクリプトーム（松原謙一 編），pp.25-39，中山書店(2000)
- 3) Schena, M. et al. : Science, 270 : 467-470 (1995)
- 4) Fodor, S.P. et al. : Science, 251 : 767-773 (1991)
- 5) Pease, A.C. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 : 5022-5026(1994)
- 6) DeRisi, J.L. et al. : Science, 278 : 680-686 (1997)
- 7) Chu, S. et al. : Science, 282:699-705(1998)
- 8) Ogawa, N. et al. : Mol. Biol. Cell, 11 : 4309-4321(2000)
- 9) Galitski, T. et al. : Science, 285 : 251-254 (1999)
- 10) Winzeler, E.A. et al. : Science, 281 : 1194-1197(1998)
- 11) 竹政伊知朗，門田守人：ゲノム機能，発現プロファイルとトランスクリプトーム（松原謙一 編），pp.83-101，中山書店(2000)
- 12) 六反一仁ら：バイオインダストリー，19 : 19-24 (2002)
- 13) 日経バイオビジネス2002年3月号，pp.37-49 (2002)
- 14) Park, S.-J. et al. : Science 295 : 1503-1506 (2002)
- 15) 日経バイオビジネス2001年11月号，p.41(2001)