

# ライフサイエンスを担うDNAチップの開発

## Development of the DNA chips supporting life science

株式会社 山武

堀口 康子

Yasuko Horiguchi

株式会社 山武

石川 尚弘

Naohiro Ishikawa

株式会社 山武

黒岩 孝朗

Takaaki Kuroiwa

株式会社 山武

秋山 淳

Jun Akiyama

株式会社 山武

小原 太輔

Daisuke Obara

株式会社 山武

五所尾 康博

Yasuhiro Goshō

### キーワード

ゲノム、遺伝子、DNAチップ、gemkey™、遺伝子型、ポストゲノム、ジェノタイピング

多様な生物種のゲノムが解読され、遺伝子の機能探索が盛んに行われる中でDNAチップは生体分子のセンシングデバイスとして必要不可欠なツールになっている。現在市販されているDNAチップは、各生物種の全遺伝子機能の網羅的定量／定性解析を目的としたものであり、利用には専用装置と特殊試薬を用いた煩雑な作業を要する。本稿では、専用装置や特殊試薬を用いずに簡便な操作で目的遺伝子を検出できる業界初の応用研究向けカスタムDNAチップ「gemkey™」の開発について報告する。

As the genomes of a diverse range of species are being deciphered, and as the functional exploration for genes continues ardently, the DNA chip has become an integral tool as a biomolecular sensing device. The DNA chips which are currently on the market have been designed for the comprehensive quantitative and qualitative analysis of all gene functions in various species. Using the chips usually requires complicated procedures which utilize special-purpose devices and special reagents. This paper reports on the development of "gemkey™" DNA chips. These custom-built chips for applied research are the industry's first which enable target genes to be detected using simple operations and without the use of any special-purpose devices or special reagents.

### 1. はじめに

2003年(平成15年)にヒトゲノム解読完了宣言がなされ、世界の注目を集めたことは記憶に新しい。全ての生物は、生命の設計図“ゲノム”に織り込まれている遺伝子情報に基づいてタンパク質を作り出して生命活動を恒常に営んでいる。現在ライフサイエンスの世界では、遺伝子や遺伝子産物(タンパク質)そのものの機能や構造が研究され、個体による遺伝子の違いが生命活動に与える影響や、影響を与える遺伝子のタイプ(遺伝子型)が着々と解き明かされようとしている。そして解明された多くの情報の中から役に立つものを医療や健康、環境、食品などの分野で利用しようとする動きが活発になってきている。

例えばガンの原因遺伝子の有無や生活習慣病の発症誘導・抑制に関わる遺伝子変異が明らかになると、遺伝子の有無や変異によって起こる事象に対応した薬剤開発が行え、遺伝子型によって高効果・低副作用の薬を患者ごとに選択できるよう

になると期待されており、病気の予防・治療・予後管理の方法に大きく寄与するものになる。このような遺伝子の多様性を研究している最先端では、ジェノタイピングと言われる遺伝子の有無、変異の「同定」作業が行われている。従来は大掛かりな実験装置を用いて少数サンプルずつ繰り返し作業を行い、データを集めましたが、一度の作業で大量サンプル処理を行えるようにしたものがDNAチップである。

### 2. DNAチップとは

DNAチップとは、数mm～数cm四方のガラスやプラスチック基板の上に遺伝子を検出するためのプローブDNA(以下プローブ)を数千～数万種類整列させたものである。原理としてはDNA配列を構成している4種類の塩基がA(アデニン)はT(チミン)と、C(シトシン)はG(グアニン)と特異的に結合して二本鎖を形成する性質を利用して、血液や組織、培養細胞などから調整したサンプルがチップ上のプローブに特異的に結合し、結合した部分を蛍光や化学発光などのセンシング法で検出す

ることによりサンプル中の遺伝子の量や型を調べることができる。

一般的に利用されているDNAチップは多種多様な遺伝子の状態を同時に検出する“網羅解析用”であり、解析は発現解析とジェノタイピングの二つに大きく分類される。発現解析とは遺伝子の発現量から罹患の状態や投薬の効果などを解析するものであり、ジェノタイピングとは先に述べたが、遺伝子配列の欠損・挿入・置換などの変異を調べ、変異に起因する病気や罹患しやすさなどを解析するものである。図1.に遺伝子のDNA配列の置換と欠損の例を示した。

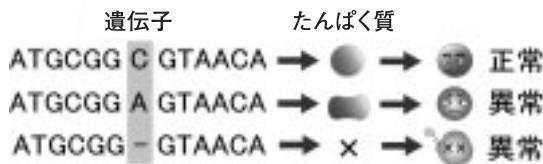


図1. 遺伝子多型の例

左から7番目の塩基が[C]である場合:正常, [A]の場合:合成タンパク質の形状変異, [- (欠損)]の場合:タンパク質合成されず

DNAチップは一実験で得られるデータ量が多いことから利用価値の高いツールであるが、従来のDNAチップは1チップ上に数万種ものプローブを高密度に搭載しているため、目視で結果を確認することは不可能である。サンプル反応後にプローブに結合したサンプルの蛍光標識を高解像度蛍光スキャナーで検出、解析ソフトによって解析しなければならない。そのため実験を行う前に専用装置やソフトを用意する必要があり、これがボトルネックとなり研究分野に広く浸透しているとはいえない。

また、各研究者が実際に研究対象としている生物や遺伝子を調べるために個別用途に応じたチップが望まれているが、市販品のほとんどが遺伝子の種類が固定されたものであり、個別用途にはコストや納期の面で十分に対応できていない。

### 3. gemkey開発の狙い

従来のDNAチップがどのようなものであるかは前章で述べたとおりである。医療や健康、食品などの分野において有用な遺伝子の研究が活発になり、基礎研究分野に加えて遺伝子情報を検査に利用するための応用研究分野でのDNAチップの需要が見込まれており、また、DNAチップに求められるニーズが多様化していることを背景に「初期設備投資を必要とせず“手軽に”, “必要な時”, “必要な枚数”を使ってターゲット遺伝子の情報を収集できること」を製品仕様としたDNAチップの開発に着手した。



図2. gemkey

具体的には、次のコンセプトによるジェノタイピングに特化した製品を目指した。

- ・ 小ロットオーダーに対応したカスタム生産
- ・ 短納期
- ・ 目視発色検出

開発したgemkeyの写真を図2.に示した。

gemkeyは、フランス原子力エネルギー庁の研究機関であるCEA-Letiが開発した「チップ上でのDNA合成」技術に基づいているが、この合成技術に基づく製造の自動化は難しく、実用化は困難であると考えられていた。これを実現したのが、山武が持つMEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術と、一個流しの生産装置技術である。

オンデマンドでプローブを搭載できる基板とプローブ合成技術、および自動合成装置については4章、gemkey上で結果を発色確認する検出技術については5章にて詳細記述する。

## 4. 技術の特徴

### 4.1 ホスホアミダイト法によるDNA合成

gemkeyのDNA合成法として採用した固相ホスホアミダイト法による代表的な合成サイクルを図3に示す。

1. 脱トリチレーション工程: 図4では、DNAの3'末端が基板に共有結合で固定化されており、5'末端はDMT基(ジメトキシリル基)により保護されている。脱トリチレーション工程では、酸溶液により、DMT基の脱保護を行う。DMT基がなくなつた5'末端は、OH基となる。
2. カッピング工程: 脱トリチレーション工程により形成した5'末端のOH基に対し、DNA塩基モノマーの3'末端をリン酸エステル結合させる。DNA塩基モノマーの3'末端は三価のリン酸アミダイト誘導体になっており、5'水酸基はやはりDMT基で保護されている。
3. キャッピング工程: カッピング工程で未反応の5'末端は、次回以降の合成が進まないようにOH基をアセチル化することでキャッピングし不活性化する。

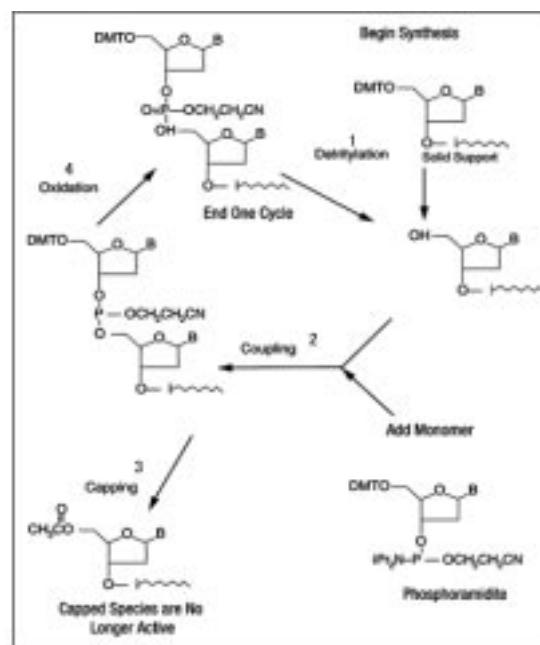


図3. ホスホアミダイト法によるDNA合成サイクル

4.酸化工程:カップリング工程で得られた3価のリン酸エステル結合を酸化し、酸や塩基に対し、より安定である5価のリン酸エステル結合とする。

1~4の合成サイクルを繰り返すことで、DNAは1塩基ずつ伸ばされ、所定の配列を持ったDNAが合成される。

#### 4.2 ポリマーマスク法によるチップ上のDNA合成

DNAをチップ上で合成する方法はこれまでにさまざまな方法が検討されている。反応する場所を選択する方法は異なるものの、共通しているのはチップ上でDNAをパラレル合成できるという特徴である。gemkeyに採用されたポリマーマスク法によるDNAチップの合成法の特長は、gemkey専用の試薬と合成方法を用いることなく、合成手法として1990年初めに確立された固相ホスホアミダイト法がそのまま利用できることにある。この結果、99%以上の高いステップ収率（1塩基を合成する1ステップにおいて、合成されたDNAのなかで目的とする塩基の成分比率）が特徴である。これまでに報告されたチップ上のDNA合成のステップ収率は、事例により大きな差がある。合成試薬をインクジェットにより合成反応領域にのみ塗布する方式でのステップ収率は、94%~98%であったと報告されている。光で塩基の脱保護を行う方法でのステップ収率は92%~94%、表面張力を用いた方法でのステップ収率は、A, G, C, Tの塩基により異なるが、97%~99%の範囲で報告されている。gemkey上でのDNA合成では、専用の親水性ポリマーを反応させたくないスポットにディスペンス塗布し反応場所を選択している。この親水性ポリマーは、5'末端の保護基であるDMT基を酸で脱保護する工程（図3）において、酸を近寄らせない保護膜とし

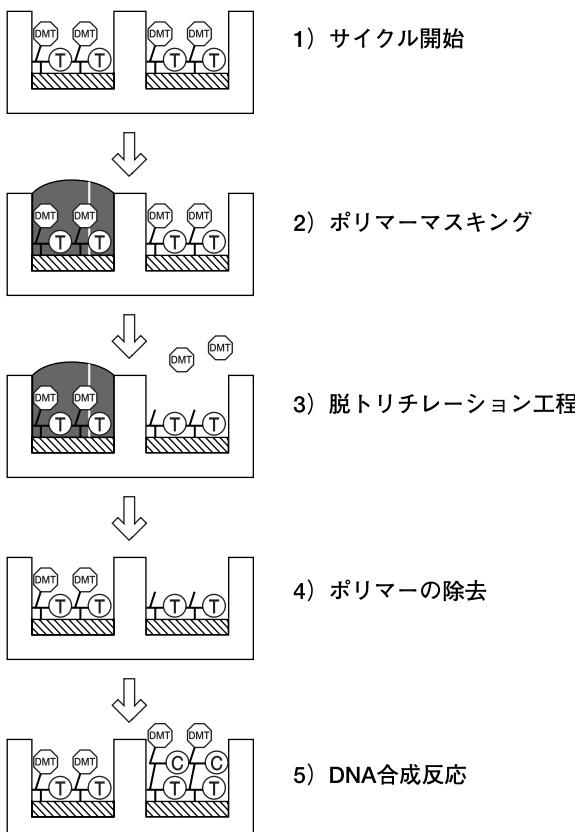


図4. ポリマーマスク法による塩基のカップリング工程フロー

て機能するため、ポリマー塗布したスポットでは塩基のカップリング反応が起こらない。

ポリマーマスク法による塩基のカップリング工程フローを図4に示す。

- 1) サイクル開始: チップ表面にはDNAが合成されるウエルが並んでいる。それぞれのウエルにプローブが合成される。図5の初期状態では全てのウエルに短いDNAが固定化されている。固定化されたDNAの5'末端はDMT基で保護されている。
- 2) ポリマーマスキング: DNA合成を行う領域以外のウエルにポリマーを塗布し、脱トリチレーション反応が起こらないようマスキングする。
- 3) 脱トリチレーション工程: 酸溶液をチップ表面に流し、酸性としDMT基を脱保護させる。ポリマーを塗布したウエルではDMT基の脱保護反応は起こらない。
- 4) ポリマーの除去: 有機溶剤をチップ表面に流し、ポリマーを除去する。
- 5) DNA合成反応: ホスホアミダイト法のカップリング工程を行う。工程3)でDMT基が脱保護されたウエルでのみDNA合成反応が起こる。続いてキャッピング工程及び酸化工程を行う。

これら5工程を繰り返すことにより、任意のウエルのDNAの5'末端に塩基A, G, C, Tを1段ずつ設計どおりのレイアウトでプローブをパラレル合成することができる。すべてのオリゴDNAが合成された後で、塩基部のアミノ基の脱保護を行い、チップが完成する。

#### 4.3 gemkey<sup>TM</sup>DNAチップの構造

gemkeyは1×1cm、厚さ0.5mmのガラスチップである。その表面にはプローブを固定化するための反応領域が並んでいる。反応領域は、円形のウエルとなっており、ウエルの直径は600μmである。1チップあたりの反応領域の数は、81個である。反応領域の底部は酸化シリコンが露出しており、シラン化処理工程により酸化シリコン基板にシランリンカーを共有結合させる。シランリンカーの末端には反応の開始点となる水酸基が付加されており、これ以降のDNAのホスホアミダイト合成に最適な表面となっている。この構造により、プローブは反応領域の底面だけに合成されることになる。

gemkeyの外観を図5に、反応領域の断面模式図を図6に示

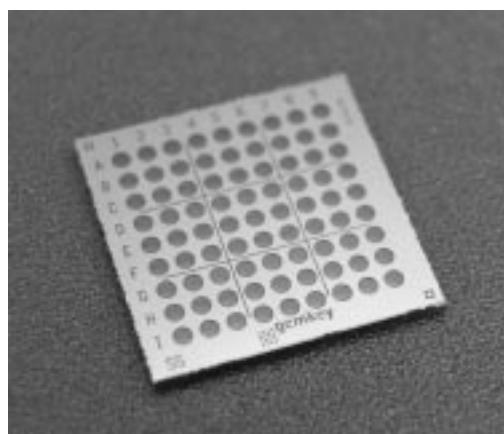


図5. gemkey外観

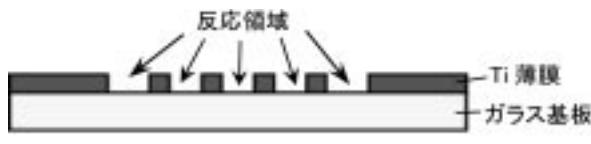


図6. gemkeyの断面模式図

す。チタン薄膜により酸化シリコンの反応領域がマスキングされている。チタン薄膜によりプローブの丸いスポット領域が見やすくなり、発色による目視検出に適した構造となっている。またチップ表面には3スポットごとにラインが入れてあり、縦の列はアルファベットにより表記され、横の行は数字によりスポット位置が表記されている。

#### 4.4 DNAチップ製造工程の自動化

gemkeyのための自動製造装置は、大きく3つの機能を持つステージを組み合わせて構成されている。開発された自動製造装置の写真を図7に示す。

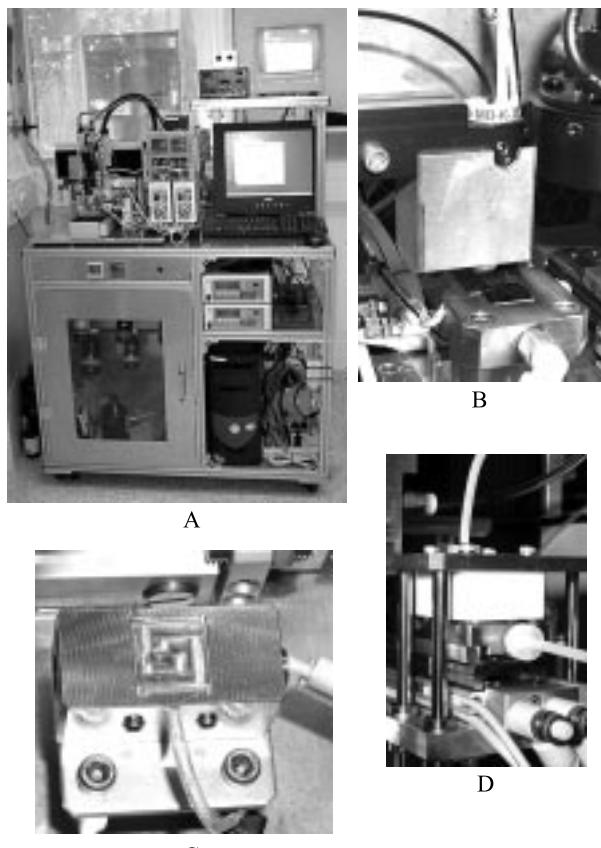


図7. DNAチップ自動製造装置 (A:全体図 B:ポリマー塗布ステージ C:加熱ステージ D:合成ステージ)

各ステージの機能は、以下のとおりである。

- 1) ポリマー塗布: ディスペンサを用いてチップ上の反応領域にポリマーを塗布する。ポリマーの塗布量は数百pL単位でコントロールされている。(図7-B)
  - 2) 加熱によるポリマー乾燥: チップを加熱用ステージへ移動し、加熱されることでポリマーが乾燥される。(図7-C)
  - 3) DNA合成反応: チップは合成ステージへと移動し、開閉式のリアクタを用いてチップ表面に試薬が流される。リアクタの中でDNA合成反応とポリマーの除去作業が行われる。(図7-D)
- これら3つのステージ間を繰り返し移動することで、チップ上

にプローブが逐次合成される。

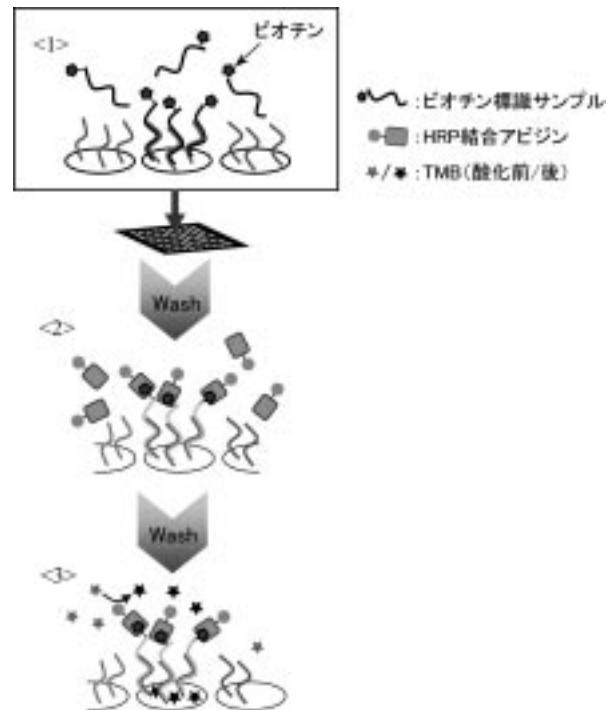
現在では、この装置をもとに、さらに生産性、プロセス再現性を高めたgemkey生産に最適化な全自動製造装置が開発された。

#### 5. DNA検出技術

gemkeyは、「目視で結果を確認」できることを目指し製品開発された。なぜなら従来のように蛍光による検出では高価な高解像度蛍光スキャナーや蛍光試薬、数値化・解析ソフトウェアが必要となり、手軽に、簡便に利用できるツールにはなりえないからである。このため、gemkeyと一般試薬のみで遺伝子型を判別できる方法を確立する必要があった。

非特異的な発色がなく、かつ蛍光検出と同等以上の感度を持つ検出技術を開発する上でチップ上の色素固定が大きな課題であったが、様々な発色物質と反応方法を検討した結果、次のような検出技術の開発に成功した。

方法としては、まずサンプル調整時にサンプルをBiotin(ビオチン)で標識する。標識したサンプルをDNAチップ上の相補的なプローブと特異的に結合反応させる。反応後に洗浄を行い、サンプルのBiotin標識に対してHRP(Horse Radish Peroxidase)酵素を結合したAvidin(アビジン)を反応させる。AvidinはBiotinに対して非常に強い親和力を有し、不可逆的かつ特異的に結合する。最後にHRPの基質としてTMB(Tetra Methyl Benzidine)を用いて青く呈色させる。図8.に検出までの操作の流れを示す。



- 〈1〉 ビタミンの一種であるビオチンで標識したサンプルDNA溶液でgemkey表面を覆い、プローブと反応させる
- 〈2〉 HRPを結合したアビジン溶液でgemkey表面を覆い、サンプルに付いているビオチンと反応させる。
- 〈3〉 TMB溶液でgemkey表面を覆い、静置しながらHRP酵素により酸化されたTMBが青色に発色するまで反応させる。

図9にサンプルと相補的な配列を持ったスポットのみ特異的に青く発色している例を示す。発色は容易に目で見て確認できる。

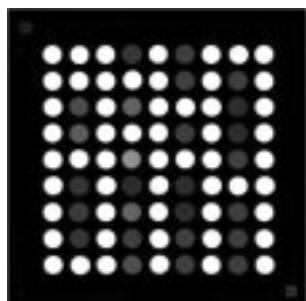


図9. 検出結果の例

図10に、ある遺伝子の多型を検出した例を示す。これはSNP (Single Nucleotide Polymorphism, 一塩基遺伝子多型)といわれ、遺伝子配列中でたった一つの塩基が通常の塩基と異なるものに置換されている遺伝子の多型である。DNAチップ上での検出が難しい多型であるが、明瞭にどのタイプかを判別することができる。

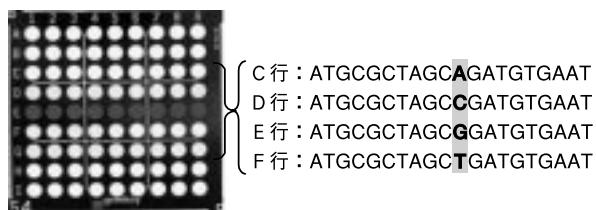


図10. SNP検出の例

C～Fの行にはSNP検出のための異なる配列のプローブが合成されている。各行、横一列(1～9)同じプローブが合成されている。E行で相補的な塩基が検出されており、1～9の列でその再現性が確認できる。

## 6. おわりに

オンデマンドカスタムDNAチップ「gemkey」は、ライフサイエンスの基礎研究から医療や健康、防疫、食品などの遺伝子情報を検査に利用する応用研究という広い分野において利用価値の高い遺伝子センシングツールになることを期待している。これまでのDNAチップとは違う市場を目指すため、ユーザーの声を聞くことが一層重要であり、その声をgemkey自身の性能に反映させていく予定である。

## 参考文献

- Serge, L. B. and Radhakrishnan P. I. (1992) Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach, *Tetrahedron* 48, 2223-2311
- Maskos, U. and Southern, E.M. (1992) Oligonucleotide hybridization on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesized in situ. *Nucleic Acids Res.*, 20, 1679-1684.
- Fodor, S.P.A., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. and Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251, 767-773.
- Blanchard, A.P., Kaiser, R.J., and Hood, L.E. (1996) High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors & Bioelectronics* 11, 687-690.
- Hughes, T.R. et al. (2001) Expression profiling microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnology* 19, 342-347.
- Butler, J.H. et al. (2001) In situ synthesis of oligonucleotide arrays by using surface tension. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 8887-8894.

## 謝辞

gemkeyの基本となる技術の共同開発では、CEA-Leti, Biology and Healthcare Systems部門のJean Chabbal部門長, Dr.Françoise Vinet, Claude Vauchier, Antoine Hoang, Frédérique Mittlerの皆さんに全面的な支援をいただいたことを感謝いたします。

## 商標

gemkey™は株式会社山武の登録商標です。

## 著者所属

堀口 康子	研究開発本部 エマージングテクノロジーセンター
黒岩 孝朗	研究開発本部 エマージングテクノロジーセンター
小原 太輔	研究開発本部 エマージングテクノロジーセンター
石川 尚弘	研究開発本部 エマージングテクノロジーセンター
秋山 淳	生産技術開発センター 自動化技術グループ
五所尾 康博	研究開発本部 エマージングテクノロジーセンター