③ マイクロチップテクノロジーによる 超高性能 DNA 解析. 電気化学検出の集積化

馬場 嘉信

1 はじめに

10 年前にアメリカ, ヨーロッパ, 日本を中心に開始されたヒト・ゲノム解析計画は, 今年春にヒト・ゲノムの 90% をカバーする塩基配列のワーキングドラフトが完成する予定となり, 第一の目標であったゲノムシーケンシングの終了が目前に迫ってきた¹⁻³⁾. ゲノムシーケンシングにおいては, 30 億塩基の配列が解明されデータベース化されるが, ポストゲノムシーケンシング時代には, 個人個人のゲノムの違いを調べるゲノム多型解析, ゲノムから遺伝子を同定し機能を調べるゲノム機能解析, 遺伝産物であるタンパク質の発現プロファイル・翻訳後修飾・相互作用などを調べるプロテオーム解析などが主要な課題となる. これらの研究により, 疾患に関連した遺伝子の情報が蓄積され, 疾患のメカニズム解明が進むとともに, 個人の疾患感受性遺伝子や薬剤感受性遺伝子などの特徴が明らかにされ, 個人個人にあわせた医療としてのオーダーメイド医療が確立されるものと期待されている.

ゲノムシーケンシング時代においては, 384 本あるいは 96 本のキャピラリーを並列化したキャピラリーアレイ電気泳動にもとづく DNA シーケンサーに代表されるように, ゲノム解析技術の急速な進歩が促進された⁴⁻⁶⁾. しかし, ポストゲノムシーケンシング時代においては, 21 世紀のオーダーメイド医療の実現に向けて, ゲノム解析技術の更なるハイスループット化が強く求められている. このような時代の流れに呼応して, コンピュータの半導体集積化技術によって培われてきた微細加工技術に基づく新たなゲノム解析技術が開発されてきた⁷⁻¹³⁾. 既に, マイクロアレイ技術 (DNA チップ) やマイクロチップ型電気泳動システムは, 装置が市販されるようになってきたが, さらに, 最先端の超微細加工技術を駆使して, Fig. 1 に示すように, ゲノム解析の基本プロセスである細胞からの DNA 抽出, PCR などの反応, 分離, ハイブリダイゼーション, レーザー誘起蛍光検出, 電気化学検出などを全て指先大のチップ上に集積化する試み

も進んでいる^{7-10, 13-16)}. このように, ゲノム解析の基本プロセスが高度に集積化したシステムが開発できれば, 持ち運び可能な小型の DNA 解析装置を実現することが可能になる. 本稿では, 半導体集積化技術を利用した次世代のゲノム解析技術の最先端の研究動向を紹介する.

2 PCR と DNA 分離のマイクロ化

ゲノム解析は, 従来, ゲル電気泳動によるプロッティング, DNA シーケンサー, PCR 等を基盤的な技術として用いてきた. さらに最近, マイクロアレイ (DNA チップ), キャピラリーアレイ電気泳動等の高性能ゲノム解析装置が開発されている. しかし, 半導体集積化技術の急速な進歩に伴って, 一枚の小型チップ上に, マイクロアレイ, PCR, 電気泳動などを全て集積化できる方法が開発されようとしている. ゲノム解析の基本プロセスを集積化するため用いられる微細加工技術の最も代表的なものは, 光リソグラフィー・化学 (ウェット) エッチングである. この方法では, まず, ガラス板の表面にフォトレジストを被膜する. 次に, 作りたいチャンネルや反応チャンバーの形に穴をあけたマスクを作成し, ガラス板の上に乗せて光を照射する (光リソグラフィー). この操作により, ガラス板のフォトレジストがマスクの穴の形に従って除かれ, ガラス表面が露出する. さらに, ガラスを HF-HNO₃ 系などの酸で処理することで, 断面が台形のマイクロチャンネルを形成することができる (化学 (ウェット) エッチング). このような技術により, 幅が数 μm ~ 100 μm , 深さが数 μm ~ 数 10 μm の微細加工が可能である.

さらに, この方法以外にも, ウェットエッチングのかわりに, CF₄ ガス等を用いて微細加工を行うプラズマエッチング, 反応性イオンエッチング (RIE) 等のドライエッチング, シンクロトロン放射光を利用した LIGA (Lithographie Galvanoformung Abformung) プロセス, レーザーアブレーション, マイクロモールディング等の技術が開発されてきた. 特に, LIGA プロセスや RIE では, アスペクト比 (深さ/幅) の高い, 断面が長方形のマイクロチャンネルを形成することが可能で, かつ, 深さ 200 μm 程度の構造体の形成にも応用する事が出来るなどの利点を有している.

微細加工技術により作製したマイクロチャンネル中の流れを利用することにより, PCR のような DNA の酵素反応が, チップ上で実現されるようになってきた¹⁷⁾. これは, マイクロチャンネルを適切に設計することで, PCR に必要な温度変化の繰り返しをサンプルを流しながら実現したもので, 微小空間で反応させることにより, わずか, 5 分のサイクリング時間でさえも, 検出可能な程度の DNA を増幅することに成功している. これは, 従来の PCR より, 10 倍以上の高速

Fig. 1 Integrated genome analysis system.

化を達成している。

さらに、PCRの反応を小型の反応チャンバー中で実現するシステムも試みられている (Fig. 2)¹⁸⁾。このシステムでは、PCRによりDNAを増幅するマイクロチャンバーを微細加工技術で作製し、PCRに必要な温度変化をマイクロヒーターと温度センサを組み込むことにより実現している。反応チャンバーを小さくすることにより、短いサイクリング時間で、PCR産物を生成している。

微細加工により作製したマイクロチャンネルを用いて、電気泳動の高速化を実現するシステムの開発も進んでいる。マイクロチャンネル中を移動する蛍光ラベル化したDNAをレーザー誘起蛍光検出するために、レーザー共焦点顕微鏡のシステムを利用し、高感度検出システムを開発した (Fig. 3)¹⁹⁻²²⁾。さらに、DNAの電気泳動による分離条件の最適化に関する情報を得るために、マイクロチャンネル中を移動する、DNAのバンドをイメージングするシステムを開発した。このシステムを用いることにより、Fig. 3に示すようにマイクロチャンネル中のサンプルバンドの挙動を詳細に調べることが可能になり、DNAの高速解析の条件設定が可能になってきた。

このイメージングシステムを用いて、調べた条件により、DNAを分離したところ、Fig. 4の上図のとおり、40秒程度でDNAの解析が可能であることが分かった。さらに、DNAの分離に必要な最小限なチャンネルの長さを調べたところ、Fig. 4 (下図) に示すように、わずか、6 mm程度のチャンネル長であっても、小さいDNAフラグメントであれば分離できることが分かった。この分離に要する時間は、わずか数秒程度であった。このように、イメージングシステムによりDNA解析の条件を最適化することで、超高速DNA解析を実現できるものと期待される。

Fig. 2 Microfabricated PCR device and PCR cycle.¹⁸⁾

Fig. 3 Microfabricated capillary electrophoresis chip and imaging of a Band for DNA.²¹⁾

Fig. 4 Fast separation of DNA.²¹⁾

3 DNA 分離のアレイ化とレーザースキャニング DNA 検出

マイクロチャンネル型電気泳動は、以上のように分離の超高速化を達成することが明らかとなった。しかし、Fig. 3の装置では、一度に一つのサンプルしか解析できないので効率

が悪い。そこで、マイクロチップ上に、キャピラリーを複数並べたようなキャピラリーアレイとよばれる回路を設計できれば、一度に多数のサンプルを超高速に解析できるものと期待される。Mathies らのグループは、マイクロチップ型マイクロチャンネルアレイ電気泳動を開発した (Fig. 5)¹¹⁻¹³。まず、光リソグラフィと化学的エッチングにより、ガラスチップ上にキャピラリーアレイ電気泳動用のチャンネル (幅

50 mm, 深さ 8 mm) を 48 本アレイ化している。しかも、マイクロチャンネルアレイ部分を 10 mm 間に密集させ、レーザーのスキャン距離を極限まで小さくしている。それに対して、サンプルの導入部分は、96 サンプル分が、幾何学模様のように設計されており、一つの泳動チャンネルで、2 種類のサンプルを一定時間間隔をおいて解析できるように設計されている。このシステムでは、検出部以外の必要部分が全てガラスチップ上に実現している。分離用チャンネルには非架橋ポリアクリルアミドを満たし、もう一枚のガラス板で覆いマイクロチャンネルアレイを作製する。検出部としては、共焦点レーザー誘起蛍光検出装置を用い、マイクロチップ上をスキャンしながらマイクロチャンネルアレイ全体を検出する。このシステムを用いることにより、96 サンプルの DNA の解析が 5 分以内で実現されている。さらに、Mathies らは、96 本のマイクロチャンネルを放射線上に配列し (Fig. 5)、ロータリーレーザー型検出器を開発して、96 本のマイクロチャンネル中の DNA を検出できるシステムを開発した (R. A. Mathies, 私信)。

これらの例のように、マイクロチャンネルをアレイ化することにより、DNA の分離を多数マイクロ化することが可能になった。しかし、これらの例では、レーザー型蛍光検出装置が必要であり、検出部分は、従来のキャピラリーアレイ電気泳動やスラブゲル電気泳動と同様のものが必要であり、マイクロ化・集積化を達成することは不可能である。

これらのシステムにより、マイクロチャンネル中の DNA シークエンシングを最適化したところ²³⁾、Fig. 6 のように、570 塩基までのシークエンシングをわずか 20 分で実現している。従って、100 本程度のキャピラリーアレイを利用すれば、1 時間あたり 170,000 塩基の配列が決定できると期待される。これを、1 日 20 時間自動運転し、1 年に 300 日解析を行ったとすると、年間に 1 台の装置で、10 億塩基のシークエンスが可能である。ヒト・ゲノムは、30 億塩基なの

48 Channel, 96 Sample

96 Channel, 96 Sample

Fig. 5 Microfabricated capillary array electrophoresis chip and laser scanning detection system.¹³⁾

Fig. 6 Fast DNA sequencing.²³⁾

で、わずか3台の装置で1年間でヒト・ゲノムの解析が完了することになる。マイクロチップ型マイクロチャンネルアレイ電気泳動は、現在のDNAシーケンサと比較して100倍以上の高速化を達成できる非常に魅力的な新技術であり、21世紀のポスト・ゲノムシーケンシング時代のゲノム解析技術の主流になるものと期待されている。

4 高度集積化 DNA 解析チップ

マイクロマシーニング技術は、電気泳動やキャピラリーアレイ電気泳動などの単独分析法のマイクロチップ化のみならず、様々な分析法、サンプル前処理法などを単一のチップ上に実現した統合型マイクロデバイスの出現を促進した。

同じマイクロチップ上に、キャピラリー電気泳動のみならず、PCRをも同時に実現した、マイクロデバイス技術が開発され、1分以内に遺伝子解析が実現できることが示された²⁴⁾。この例では、既に開発されていたマイクロPCRとマイクロチップ化したキャピラリー電気泳動を巧みに組み合わせ、マイクロPCRシステムにより増幅されたDNA断片が、マイクロチャンネル中を通過して、分離用チャンネルに導入されるように設計されている。マイクロデバイス技術では、PCR増幅に要する時間もかなり短縮する事が可能である。最終的には、遺伝子は、キャピラリー電気泳動的に解析される。さらに、同じマイクロチップ上に、複数のPCR用反応層を作製し、同時に4種類のPCR生成物を増幅・分離できるシステムが開発された (Fig.7)^{25,26)}。図に示すように、4

種類のPCR生成物は分子量マーカとともに、わずか3分以内に解析されている。また、マイクロ流体技術を応用して、ナノリットーオーダーのサンプル中のDNA解析に必要な基本プロセスを高度に集積化したシステムが開発され、DNAの解析に成功している¹⁴⁾。

このように、マイクロチップ化により、従来行われていた、サンプルの前処理・反応およびその解析を同時に進行させることが可能になり、しかも、システムの超小型化が達成できる。さらに、このシステムをコンピュータの集積回路のように、集積させることができれば、一台の装置で、多種類の検体を別々の反応と別々の分析法で並行して同時に解析できるようになることが考えられる。このようなシステムが実現されれば、将来、臨床検査の現場で活用されるものと期待される。

5 ポータブル遺伝子解析システム—電気化学検出への期待

以上、述べてきたマイクロデバイスシステムにおいては、サンプルの前処理、反応、解析等を非常に小型のマイクロチップ上に全て実現可能であったが、検出部分は、全て、レーザー誘起蛍光検出装置を用いており、従来の大きさのままであった。そこで、検出部分もマイクロチップ化するために、マイクロ電極をチップ上に作製したシステムが、開発された (Fig.8)²⁷⁾。これは、電気泳動用のチャンネルの出口に電気化学検出用のマイクロ電極を設計し、分離と検出をマイクロチップ化に成功した最初の例である。このシステムを用いることにより、マイクロチャンネル中で電気泳動的に分離されたDNAフラグメントは、バックグラウンドとして $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ を使用して間接的な電気化学検出によりDNAの解析に成功している。

このシステムは、検出部分を含めてもコンピュータ用のDVD-ROMドライブ程度のサイズしかなく、持ち運び可能な世界最初のDNA解析装置となった。このような装置により、従来大学病院のような大規模施設でのみ可能であった疾患の遺伝子診断が、中小規模の病院においても可能になるものと期待される。さらに、将来は、在宅においても、体温計と同様に各自の遺伝子異常のモニタリングに応用できるものと予測されている。また、火星をはじめとした地球外生命の探索のために、探査衛星にこのシステムを搭載し、地球外におけるDNA調査への利用も予定されている。

このように、従来のレーザー誘起蛍光検出では不可能であった、DNA検出の集積化が、電気化学検出により可能になった。電気化学検出は、従来よりバイオセンサなどをはじめ、小型の検出装置として活用されている。今後、DNA検出においても、より高感度な電気化学検出系が開発されることにより、ゲノム解析技術の小型化に多大なる貢献をなすものと期待される。

6 おわりに

以上述べたように、半導体集積化技術の進歩に伴って、ゲノム解析技術のマイクロチップ化が促進された。さらに、同一のチップ上に複数の分析法あるいはサンプルの前処理法を統合した集積型マイクロデバイスシステムも開発されている。今後、これらの技術がさらに発展することにより、研究室あるいは検査室等で行われているゲノム解析が全て一つのチップ上で行える日が来ることを期待したい。

Fig. 7 Microfabricated device for the integration of PCR and capillary electrophoresis.²⁶⁾

Fig. 8 Microfabricated capillary electrophoresis chip with integrated electrochemical detection.²⁷⁾

文献

- 1) M. Wedman, *Nature*, **398**, 177 (1999).
- 2) 田村浩司, 宮城島利一, *ファルマシア*, **35**, 1053 (1999).
- 3) Y. Baba, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **8**, in press (2000).
- 4) 馬場嘉信, 蛋白質・核酸・酵素, **38**, 2243 (1993).
- 5) 馬場嘉信, 医学のあゆみ, **183**, 285 (1997).
- 6) R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **71**, 31 A (1999).
- 7) Y. Baba, *Integrated Microfabricated Device Technologies: Advances in Genomic, Drug Discovery, and Clinical Diagnostic Applications* (Eds. M. H. Heller and A. Guttman),

Marcel Dekker Publisher, New York (1999).

- 8) 馬場嘉信, 化学, **54** (10), 24 (1999).
- 9) 馬場嘉信, *ファルマシア*, **36**, 116 (2000).
- 10) 馬場嘉信, 蛋白質・核酸・酵素, **45**, 76 (2000).
- 11) A. T. Woolley and R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11348 (1994).
- 12) A. T. Woolley, G. F. Sensabaugh, and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **69**, 2181 (1997).
- 13) P. C. Simpson, D. Roach, A. T. Woolley, T. Thorsen, R. Johnston, G. F. Sensabaugh, and R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2256 (1998).
- 14) M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishanan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo, and D. T. Burke, *Science*, **282**, 484 (1998).
- 15) M. Ueda, O. Tabata, and Y. Baba, *Trans. IEEJ*, **119-E**, 460 (1999).
- 16) T. Fujie, K. Terasoma, O. Tabata, and Y. Baba, *Trans. IEEJ*, **119-E**, 482 (1999).
- 17) M. Y. Kopp, A. J. de Mello, and A. Manz, *Science*, **280**, 1046 (1998).
- 18) S. Kondo, N. Morimoto, K. Hori, E. Shinohara, and K. Kano, *Trans. IEEJ*, **119-E**, 448 (1999).
- 19) M. Ueda, H. Oana, Y. Baba, M. Doi, and K. Yoshikawa, *Biophys. Chem.*, **71**, 111 (1998).
- 20) M. Ueda, H. Nakanishi, O. Tabata, and Y. Baba, *Mat. Sci. Eng. C*, in press (1999).
- 21) M. Ueda and Y. Baba, *Electrophoresis*, in press.
- 22) Y. Kiba and Y. Baba, *Electrophoresis*, in press.
- 23) S. Liu, Y. Shi, W. W. Ja, and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **71**, 566 (1999).
- 24) A. T. Woolley, D. Hadley, P. Landre, A. J. de Mello, R. A. Mathies, and M. A. Northrup, *Anal. Chem.*, **68**, 4081 (1996).
- 25) L. C. Waters, S. C. Jacobson, N. Kroutchinina, J. Khandurina, R. S. Foote, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **70**, 158 (1998).
- 26) L. C. Waters, S. C. Jacobson, N. Kroutchinina, J. Khandurina, R. S. Foote, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **70**, 5172 (1998).
- 27) A. T. Woolley, K. Lao, A. N. Glazer, and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **70**, 684 (1998).

●著者プロフィール

氏名: 馬場 嘉信 Yoshinobu BABA
 所属: 徳島大学薬学部薬品物理化学教室・科学技術振興事業団CREST (〒770-8505 徳島市庄町 1-78)
 役職: 教授
 趣味: 無し