DNA プローブアレイを用いた DNA 断片回収

正 員 岡野和宣 (日立製作所) 非会員 陳 鋼 (日立製作所)
 非会員 小原賢信 (日立製作所) 正 員 梶山智晴 (日立製作所)
 非会員 安田賢二 (東京大学) 非会員 石渡信一 (早稲田大学)

Recovery of DNA Fragment from a DNA Probe Array

Kazunori Okano, Member (Hitachi, Ltd) Gang Chen, Non-member (Hitachi, Ltd)
 Yoshinobu Kohara, Non-member (Hitachi, Ltd) Tomoharu Kajiyama, Member (Hitachi, Ltd)
 Kenji Yasuda, Non-member (the University of Tokyo) Shin'ichi Ishiwata, Non-member (Waseda University)

Molecular biology is moving rapidly towards the stage of functional genomics in which rapid preparations of expressed messages (mRNA) will be required. If a DNA library is constructed on a solid support (DNA probe array) and any kind of expressed messages can be individually recovered from the probe array, DNA probe array will become a very useful method. Consequently, we developed a DNA preparation method using a DNA probe array that utilizes photo-thermal denaturation to recover specific DNA. The protocol for preparing DNA probe array was investigated to realize the stable immobilization of DNA probes on the surface of solid support. We used a glass plate coated with Cr (5-10 nm thick). The Cr surface was modified with 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane to introduce active residues that can couple with amino residues at the 5' termini of DNA probes. The Cr surface acts as a photo-thermal transducer. The preparation method of DNA uses infrared (1053-nm) laser irradiation to thermally denature and release DNA immobilized in a specific area of a DNA probe array. Different DNA fragments fixed in place on the DNA probe array could be separately recovered. There were enough quantities of recovered DNA that can be amplified by using PCR.

キーワード: DNA プローブアレイ, レーザー, 光熱変換法, PCR

Keywords: DNA probe array, laser, photo-thermal denaturation method, Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. はじめに

生命現象は多種類 (ヒトでは約 10 万種) の遺伝子が相互に働きを調節し合って成立している。ゲノム計画⁽¹⁻⁴⁾により, いろいろな生物のゲノム配列を解明することができる。現在では, ゲノム配列の微細な変異が生体に与える影響や, 生体機能を遺伝子の発現の総体として捕えることが重要な課題となっている⁽⁵⁾。多種類の遺伝子の量を同時に測定できる方法としてガラス基板表面に多種類の DNA プローブを種類毎に区画して並べた DNA プローブアレイが開発され,

遺伝子発現解析に有効であることが示されている⁽⁶⁻⁷⁾。DNA プローブアレイの限界の一つは, 遺伝子スーパーファミリー⁽⁸⁾やオルタナティブスプライシングのような類似配列を持つ遺伝子を分離検出することが困難な点にある⁽⁹⁾。実際に生体内の遺伝子発現をモニターし, 遺伝子間の制御機能を調べるには, 類似配列を持つ遺伝子でも分離して計測することが必要である。解決策としては, DNA プローブアレイ上の各プローブスポットにおけるハイブリダイゼーション温度を精密にコントロールすることで微妙な配列の違いを検出する試み⁽¹⁰⁾や, チップ上に捕捉した類似遺伝子

群を基板から回収し、他の分析手法で解析する方法⁽¹¹⁻¹⁶⁾が提案されている。チップ上に捕捉した発現遺伝子群をマルチキャピラリーアレイ電気泳動装置で直接分析すれば、手間をかけずに個々の発現遺伝子の量を正確に知ることができると考えている。一般的なマルチキャピラリーアレイ電気泳動装置の検出感度は0.05~0.5 amol/バンドである⁽¹⁷⁾。これに対し、DNAプローブアレイの各スポットにハイブリダイズすることのできるDNA量は0.01 amol/ μm^2 なので⁽¹¹⁾、0.1 mm径のスポットには最大75 amolの発現遺伝子をトラップできることになる。感度面で見ると、実用的な分析が可能と考えられる。この原理に基づきDNAプローブアレイにハイブリダイズしたDNAをキャピラリーに電界注入して解析する一連の特許⁽¹³⁻¹⁶⁾が米国で成立しているため、実際にデバイス化されることが期待される。このためには、DNAプローブアレイの個々のプローブスポットにハイブリダイズしたDNAを遊離させる必要がある。

筆者らはレーザーで微小領域を過熱変性して各スポット上のDNA断片を回収する方法を報告してきた(図1)⁽¹¹⁻¹²⁾。この方法に用いるDNAプローブアレイデバイスは、透明なガラス基板上に5-10 nm厚の光-熱変換層を持っている。

図1 分取用DNAマイクロアレイの概念

Fig. 1. Schematic illustration of preparative DNA probe array. The recovered DNA fragments can be used for the template of PCR and cloning.

DNAプローブはクロム表面に直接化学結合で強固に固定されている。回収したい配列のDNAプローブを固定したスポットにレーザーを当てると、クロム層がレーザー光を吸収して熱に変換する。レーザーは10 μm に絞られているので、特定のプローブスポットのみを過熱することができる。こ

うして特定プローブ上の発現遺伝子群のみを熱変性し溶液中に回収することができる。ここで問題となるのが、DNAプローブの固定法である。本報告では、光-熱変換層に用いる金属とプローブの固定法について検討し、実際にDNAを回収した結果について報告する。

2. DNAプローブアレイの作成法

本研究のDNAプローブアレイは、光-熱変換層として金属蒸着面を持ち、その上にDNAプローブを固定した構造となっている。このため、1) 金属蒸着面が安定で、経時的に変化しない、2) 均質で高密度のDNAプローブを固定できる、3) 固定したDNAプローブが試料とのハイブリダイゼーションや洗浄操作で剥離しない、4) 光吸収によって局所発熱源として使用できる、5) 蛍光顕微鏡やレーザースキャナーで観測できるように半透明であるとの条件を満たす必要がある。光吸収体に金属を用いたのは、シランカップリング反応でDNAプローブを容易に固定できるからである。利用できるシランカップリング反応とそれに続くDNAプローブの固定法の一覧を図2に示す。

図2 無機質表面へのDNA固定

Fig. 2. Immobilization of DNA probe on the surface of inorganic materials.

一般的にハイブリダイゼーション反応においては、プローブDNA鎖の空間的な自由度を確保する必要があり、DNAプローブの末端を利用して固定する方がハイブリダイゼーシ

オン反応において有利と考えられる。DNA プローブの 5' 末端に導入できる残基としては、アミノ基とスルフィド基とリン酸基が一般的である。基板側に導入できる反応残基としては、アミノ基、スルフィド基、グリシドキシ基（エポキシ基）がありうる。本報告では、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランを用いてアミノ基と反応するグリシドキシ基を基板表面に導入し、5' 末端をアミノ化した DNA をプローブとして固定した。グリシドキシ基とアミノ基の反応で得られる結合は安定な部類にはいる。

実際に、クロムとアルミニウムを 5 nm 厚に蒸着した基板にプローブ DNA を固定した結果について述べる。DNA プローブアレイでは、ハイブリダイゼーション反応における 95℃でのプローブと試料 DNA の変性と、室温から 55℃でのアニーリングの行程の間に、金属蒸着表面に固定したプローブが脱離しないことが条件となる。また、pH 条件や試料 DNA に含まれる化学物質に対して安定であることが必要である。クロムとアルミニウムを蒸着した基板で比較した結果、クロムでは安定に DNA プローブを固定することができた(図 3)。アルミニウムはハイブリダイゼーション溶液で溶解してしまうため、DNA プローブを固定することができなかった。

図 3 DNA 固定における金属材質の影響
Fig. 3. Surface effect of (A) glass plate, (B) chromium coated glass, and (C) aluminum coated glass on an immobilization of DNA. Each surface was treated with 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane. The DNA having an amino residue at 5' terminus and a fluorophore at 3' terminus was coupled with glycidoxy residue on the surface of plate. Photographs (A), (B), and (C) were fluorescence images. Photograph (D) was a phase-contrast image of the chromium-coated glass and the aluminum coated glass. The aluminum was detached from the glass surface into buffer solution, whereas the chromium was remained.

クロム蒸着面に対する DNA プローブ固定反応の pH 依存性を図 4 に示す。グリシドキシ基とアミノ基の反応ではアミノ基の電子対がグリシドキシ基の炭素を攻撃することによるので、pH8.5~9 で良好な結果が得られた。pH=9.5~10 ではグリシドキシ基の加水分解が支配的になる。以上の結果から、DNA プローブアレイの作成プロトコルを以下のように決定した。

図 4 プローブ DNA 固定の pH 依存性

Fig. 4. Effect of pH on immobilization reaction of probe DNA on the surface of Cr-coated glass plate. A 10 μ M of single stranded DNA (20 mer) having an amino residue at 5' terminus and a fluorophore at 3' terminus was coupled with glycidoxy residue on the surface of plate. The fluorescence intensity profile of the DNA immobilized plate was measured by scanning fluorescence microscope. The pH conditions were indicated in the figure.

1) DNA プローブ固定用基板の作成

- ①スライドガラス基板 (24×60 mm) を 1 M の KOH で 10 分間超音波洗浄した後、超純水で十分に洗い、150℃で乾燥させる。
- ②クロムを 5~10 nm になるようにガラス表面に蒸着し、DNA プローブ固定用の基板とする。
- ③クロム蒸着した基板を 1% の 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランと酸触媒である 0.02% 酢酸を含む 80% エタノール水溶液に 25 分間浸漬し、続いて反応を完結するために 5 分間超音波をかける。
- ④純水とエタノールで洗浄した後、120℃で 30 分間過熱する。
- ⑤直径 8 mm の穴をあけた厚さ 0.4 mm の半導体用発砲体両面テープ(東映工業)を表面に貼りつけてハイブリダイゼーション反応部を形成する。

2) DNA プローブの固定

- ①終濃度として 1×10^{-5} M の種々 DNA プローブを含む 7.5% グリセリン (乾燥防止用) と 0.15 M NaCl を含

む 0.05 M ホウ酸緩衝液 (pH8.5) 30 nI をカルテシアン社のソレノイドバルブ式インクジェットアレイヤ (QUAD PixSys, Cartesian Technologies, USA) で 1 mm 間隔に滴下する。

②水をふくむガーゼを敷いた加湿チャンバ中で 25℃の条件で 2 時間放置する。

③未反応のグリンドキシ基をブロックし、過剰の DNA プロブを除去するために、10 mM の Lys と 0.01% の SDS と 0.15 M NaCl を含む 0.05 M ホウ酸緩衝液 (pH8.0) で 5 分以上かけて洗浄する。続いて水洗しエアーブローで洗浄液を除去する。

④0.01% の SDS と 0.3 M NaCl を含む 30 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (2×SSC, pH7.0, 60℃) で洗浄し、非特異吸着した DNA プロブを除く。

3) ハイブリダイゼーション反応

①試料 DNA 溶液 (条件検討には $2 \sim 50 \times 10^{-8}$ M を使用, 0.01% の SDS と 0.75 M NaCl を含む 75 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (5×SSC, pH7) に溶解) 20 μ l をハイブリダイゼーション反応部にみだし、乾燥防止のためポリカーボネートフィルムでカバーする。

②95℃で 30 秒間加熱し、プロブと試料 DNA を変性させる。

③45℃で 30 分間アニールさせ、DNA プロブアレイ上のプロブと試料 DNA をハイブリダイズさせる。この行程は必要に応じ 10 分間から 8 時間の範囲で行う。

④未反応の試料 DNA を 0.01% の SDS を含む 2×SSC pH7 で洗浄して除く。

3. DNA プロブアレイ表面からの DNA の回収

作成した DNA プロブアレイを図 5 に示す。ここでは、観察を容易にするためにプロブ相補鎖 DNA の 5' 末端にスルホローダミン 101 を標識してある。溶離回収液として 2 mM の EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 20 μ l をチャンバー (8 mm ϕ × 0.4 mm) に満たし、特定スポットに連続発振の YLF レーザー (1053 nm) を照射し熱変性させた。レーザーパワーは基板面で 10 mW と高出力であるため、レーザー照射時にプロブアレイ表面から蛍光体が拡散する様子と、表面の蛍光が無くなるのが観測された。また、時々レーザー照射部から気泡が発生した。蛍光消失が起きるのは約 10 μ m の範囲であるので、この範囲で DNA 変性温度 (T_m) 以上に溶液温度が上昇したと考えられる。レーザー径に対し、DNA プロブ固定範囲の方が広いので、レーザーをスキャンしてスポット全体を加熱した。レーザー照射した部分からの蛍光が観察されなかったことから、2 本鎖 DNA が熱変性してスルホローダミン 101 で標識した相補鎖 DNA が溶離液中に拡散したと考えられる。このとき、隣接する DNA スポットに変化はなかった。

図 5 DNA プロブアレイからの DNA 回収

Fig. 5. Recovery of a DNA from a DNA probe array. Different DNA fragments were fixed in place on the DNA probe array. Photographs were the fluorescence images of the probe array surface before (photo A) and after (photo B) laser irradiation. The top of right spot (area i-c) was heated by 10 mW YLF laser (1053 nm).

回収した溶液は 10~16 μ l であった。回収液中の DNA を PCR 増幅して、電気泳動を用いて DNA のサイズと純度を確認めた (図 6)。PCR は擬陽性増幅を少なくするため、ホットスタート法を用いた (プラチナ PCR スーパーミックス, GIBCO)。回収した溶液 2 μ l を 25 μ l スケールで PCR 増幅した。反応サイクルは熱変性 94℃30 秒間、アニール 62℃30 秒間、ポリメラーゼ反応 72℃60 秒間のサイクルが 35 回であった。回収した DNA のサイズのメインピークは、各スポットに固定した DNA のサイズと一致していた。この結果は、クロム蒸着基板を用いた DNA プロブアレイの各スポットにレーザーを当てることで DNA の回収が実際にうまくいくことを示している。いくつかの擬陽性増幅産物由来のピークが観察されるため、メインピークの割合は 60~67% であった。擬陽性増幅産物のうち a', b', c' はメインピークの DNA サイズと一致することから、隣接するスポットからのコンタミネーションと考えられる。ピーク x と y は DNA 固定試料中に増幅されるべきサイズの DNA が無いので、PCR 時のプライマーミスマッチに由来する擬陽性産物と考えられる。近傍のスポットからの漏れこみに関しては、スポット間距離の最適化や、各スポット間の熱の伝達を防止する工夫をすることにより低減できると考えている。

4. まとめ

本報告では、クロム金属蒸着面をもつ半透明基板に DNA プロブを固定するプロトコールと、作成した DNA プロブアレイ表面に捕捉した DNA を利用する方法について述べた。クロム蒸着面を光-熱変換器として利用したが、電気伝導性のクロムは電極としても利用することができる。電極を持つ DNA プロブアレイとしては、ナノジェン社が開発中の物が有名である⁽¹⁸⁾。報告によれば、電極表面に高分子の拡散層を設け、その表面に DNA プロブを固定した構造をしている。DNA はリン酸ジエステル結合でヌクレオチドが多数つながった構造をしているので、中性付近の水溶液中ではマイナスに荷電している。このため、DNA プロ

ープアレイの表面電極をプラスに荷電させることでプローブスポット近傍に試料 DNA を濃縮することができる。この技術は、固体表面でのハイブリダイゼーション速度を格段に早くすることができる。電極による DNA ハンドリングとレーザー照射による加熱を組み合わせることで、任意の発現遺伝子を分取することができるようになり、遺伝子発現の機能解析への利用が期待できる。

図 6 DNA プローブアレイから回収した DNA 断片の電気泳動パターン

Fig. 6. Electropherograms of DNA fragments recovered from DNA-probe-array. The DNA fragments recovered from different spot of A, B, and C on the DNA probe array were amplified with PCR and analyzed by electrophoresis. The different peaks a, b, and c were separated from DNA probe array. Peaks a', b', and c' were contamination of each other. The peaks x and y were false positive products of PCR.

謝辞

本研究の成果の一部は、文部省科学研究費 (11559016 (石渡), 11878129 (石渡), 12206028 (安田)) の助成を受けて行われた。

(平成 12 年 8 月 30 日受付, 平成 13 年 1 月 4 日再受付)

文 献

- (1) Consortium TF: "The flybase database of the drosophila genome projects and community literature", *Nucleic Acids Res.* 27, 85-88 (1999).
- (2) D.W. Meinke, J.M. Cherry, C. Dean, S.D. Rounsley, and M. Koornneef: "Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis", *Science* 282, 679-682

(1998).

- (3) M. Marra, L. Hillier, T. Kucaba, M. Allen, R. Barstead, C. Beck, A. Blistain, M. Bonaldo, Y. Bowers, L. Bowles, M. Cardenas, A. Chamberlain, J. Chappell, S. Clifton, A. Favello, S. Geisel, M. Gibbons, N. Harvey, F. Hill, Y. Jackson, S. Kohn, G. Lennon, E. Mardis, J. Martin, R. Waterston, et. al.: "An encyclopedia of mouse genomes", *Nature Genet.* 21, 191-194 (1999).
- (4) F.S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland, L. Walters, and the members of the DOE and NIH planning groups: "New goals for the U.S. human genome project: 1998-2003", *Science* 282, 682-689 (1998).
- (5) D.J. Lockhart, H. Dong, M.C. Byrne, M.T. Follettie, M.V. Gallo, M.S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, and E.L. Brown: "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays", *Nature Biotech.* 14, 1675-1680 (1996).
- (6) M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, and P.O. Brown: "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray", *Science* 270, 467-470 (1995).
- (7) M.J. Marton, J.L. DeRisi, H.A. Bennett, V.R. Iyer, M.R. Meyer, C.J. Roberts, R. Stoughton, J. Burchard, D. Slade, H. Dai, D.E. Jr. Bassett, L.H. Hartwell, P.O. Brown, and S.H. Friend: "Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays", *Nature Medicine* 4 1293-1301 (1998).
- (8) D.-K. Choi, T. Ito, Y. Mitsui, and Y. Sakaki: "Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cell", *Gene*, 223, 21-31 (1998).
- (9) P.T. Spellman, G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein, B. Futcher: "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization", *Mol. Biol. Cell*, 9, 3273-97 (1998).
- (10) 梶山智晴・村川克二・宮原裕二: 平成 12 年 電気学会大会講演論文集 pp1263-1266.
- (11) K. Yasuda, K. Okano, and S. Ishiwata: "Focal extraction of surface-bound DNA from a microchip using photo-thermal denaturation", *Biotechniques*, 28, 1006-1011 (2000).
- (12) K. Okano, K. Yasuda, and S. Ishiwata: "Position-specific release of DNA from a chip by using photothermal denaturation", *Sensors and Actuators*

B, 64, 88-94 (2000).

- (13) "Separation of polynucleotides using supports having a plurality of electrode-containing cells", USP 05434049.
- (14) "Device for separating polynucleotides having a plurality of electrode-containing cells and movable collecting capillary", USP 05607646.
- (15) "Polynucleotide capturing support for capturing, eluting and collecting polynucleotides in a sample solution", USP 05817506.
- (16) "Polynucleotide separation method and apparatus therefore", USP 06093370.
- (17) 神原秀記:「光による遺伝子解析」光アライアンス, 9, 1-6 (1998).
- (18) J. Cheng, E. L. Sheldon, L. Wu, A. Uribe, L. O. Gerrue, J. Carrino, M. J. Heller, and J. P. O'Connell: "Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips", *Nature Biotech.*, 16, 541-546 (1998).

岡野 和宣

(正員) 1956年9月8日生まれ。1980年3月東京理科大学理学部化学学科卒業。1982年3月東京工業大学理工学研究科化学専攻終了。同年(株)日立製作所中央研究所入社。タンパク質の二次元電気泳動解析手法, DNA断片高感度検出法, 遺伝子発現プロファイルやDNA断片間の変異を網羅的に解析する手法の研究, 大規模全長 cDNA 配列解析に従事。

陳 鋼

(非会員) 1961年11月30日生まれ。1984年7月中国延辺大学医学部卒業。1989年12月同大学大学院修士課程修了。1999年6月東京慈恵医科大学医学部医学博士課程修了。1999年11月より日立製作所中央研究所において難読DNA配列解析法の研究に従事。

小原 賢信

(非会員) 1969年5月24日生まれ。1992年3月東京大学工学部化学工学科卒業。1994年3月東京大学工学系研究科化学工学専攻修士課程修了。同年4月(株)日立製作所中央研究所入社。キャピラリーDNA シーケンサーの研究開発に従事後, 現在DNAビーズアレイの研究に従事。

梶山 智晴

(正員) 1966年10月2日生まれ。1992年3月筑波大学大学院修士課程理工学研究科終了。同年(株)日立製作所中央研究所入社。X線デジタルラジオグラフィ, 生化学分析装置, 遺伝子検出技術の研究開発に従事。現在, 日立製作所計測器事業部にて新世代のDNAチップの研究開発に従事。

安田 賢二

(非会員) 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系助教授。筋収縮メカニズム, 細胞内記憶のメカニズムの研究, 生体物質ハンドリング法の研究などの生物物理, 超音波物性の研究などに従事。

石渡 信一

(非会員) 早稲田大学理工学部物理学教授。生体分子モーターに関する一分子, 分子集合体, 細胞にわたる顕微解析, 筋収縮構造と機能の解体と再構築, 線維状重合体の形成機構, 自励振動収縮機構などの生物物理学研究に従事。