●特集 センシングと膜

DNAチップー電気化学的DNAチップを中心としてー

石森義雄

株式会社東芝研究開発センター 〒212-8582 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1

DNA Chip — Focusing on the Electrochemical DNA Chip —

Yoshio Ishimori

Corporate Research & Development Center, Toshiba Corporation,
1, Komukai-Toshiba-cho, Saiwai-ku, Kawasaki 212-8582, Japan

DNA chips have been much interested in the detection and the analysis of genes because the sequence of human genome has been determined in the worldwide human genome project. GeneChip (Affimetrix Co.) is the most popular DNA chip. But it is very expensive and needs a huge fluorescence detection equipment. We have been developing an electrochemical gene detection method, named as DNA sensor, for the sake of supplying an easy and cheap device of the gene detection. In recent years, we have focused on the application of the DNA sensor to DNA chip aiming at the bed-side diagnosis of genes. We introduce here the outline of the DNA sensor and the electrochemical DNA chip for the assessment of Interferon therapy in hepatitis c patients.

Key words : DNA/chip/electrochemical/intercalator/DNA binder/HCV

1. はじめに

ヒトゲノムが完全に解読されたという発表が行われたことを記憶されている読者も多いと思う。ゲノムとは遺伝子の1セットを意味しており、核の染色体の中に存在している。遺伝子はアデニン (A), グアニン (G), シトシン (C), チミン (T) の4種類の塩基と核酸及びリン酸からなる高分子化合物であり、その塩基の配列が決定されたということである。遺伝子は言わば「生物の設計図」である。生物はこの設計図に基づき、必要に応じて機能分子であるタンパク質を適量作りだし、

生命活動を維持している。発現される遺伝子の種類や量に異常が起こるとガンなどの疾病になる。そしてウイルスや細菌などの異物が体内に入り、免疫機能により排除できない場合に風邪などの感染症になる。従って、特定の遺伝子の発現状況や体内に侵入した細菌などの遺伝子を計測できれば、ヒトの健康状態を正確に把握できるようになると考えられる。これが医療分野における遺伝子解析あるいは遺伝子検査の意義である。

従来の遺伝子解析法では、例えば電気泳動により遺伝子の分子量に基づいて分類し、続いてニトロセルロースなどのフィルタに遺伝子を写し取っ

Table 1 Comparison of DNAchip with conventional filter method

Item	Filter	DNAchip
surface	porous	non-porous
substrate	heterogeneous	homogeneous
constitution	free	fixed
applicable to microfabrication	no	yes
applicable to lithography	no	yes
mass production	no	yes
sample concentration	low	high
reaction rate of hybridization	low	high
reagent volume	large	small
data acquisition	slow	speedy

た後、特定の遺伝子と反応するDNAプローブという短い遺伝子（予め蛍光分子などで標識してある）を反応させて目的とする遺伝子の有無及び定量を行っている。一方、予め多種類のDNAプローブをガラスやシリコンの基板上に固定化し、蛍光分子で標識した試料遺伝子を反応させる手法がある。これがDNAチップと呼ばれている手法である（Table 1）。代表的なDNAチップは、米国・アフィメトリックス社の「GeneChip」であるが、1cm²角のチップに1万種類以上のDNAプローブが固定化されている。このチップの最大の特徴は、DNAプローブのシリコン基板上への固定化法であると考えられる。すなわち、フォトリソグラフィを利用して1塩基ずつ基板上に積み上げることによりDNAプローブを合成しているのである。Fig.1にその工程を模式的に示す。ところが「GeneChip」は、高感度な蛍光検出を行うためにレーザーによる大型の蛍光検出器（数千万円）が必要であり、1チップで5万円以上とチップ自体も高価であるという欠点がある。近年、「GeneChip」とは異なるDNAプローブ固定化法を用いた廉価なDNAチップが開発されているが、いずれも試料遺伝子の蛍光標識（この蛍光標識剤も高価である）が必要であり、高感度な蛍光検出器を使用しなければならない。そこで我々は、試料遺伝子の標識が不要で、かつ小型で廉価な検出器による遺

伝子検出を目指し、電気化学的な遺伝子検出法（遺伝子センサ）を開発した。ここでは、遺伝子センサ開発の経緯とDNAチップとしての実用化の現状について概説する。

2. 遺伝子センサの検出原理

ある決まった塩基配列を持つ遺伝子を検出する方法として、DNAプローブ法と呼ばれる手法（DNAプローブを用いて目的とする遺伝子を検出・解析する手法）がある。前述のフィルタ法や「GeneChip」では、前者では標識する遺伝子がDNAプローブであるのに対し、後者では試料遺伝子という違いはあるものの、両者とも正にこの手法を応用している。遺伝子センサのアイデアも、基本的にはこのDNAプローブ法の応用である。電極上でDNAプローブ法を行って電気化学的に目的遺伝子を検出できないか、と考えたのである。遺伝子センサの原理を模式的にFig. 2に示す¹⁾。

まず、検出対象遺伝子と特異的に反応するDNAプローブを電極上に固定化する。次に、この電極を試料遺伝子が入っている液に漬けると、電極上で遺伝子同士が反応して遺伝子ハイブリッドが形成される（ハイブリダイゼーション反応と呼ばれる）。言わば、DNAプローブで電極上に検出対象遺伝子を釣り上げるのである。この段階で

Fig. 1 Schematic diagram of the preparation of DNA probes on GeneChip.

Fig.2 Principle of DNA sensor.

電気信号が取り出せれば良いのだが、残念ながら殆ど電気信号は得られないことが予備実験の結果明らかになった。そこで我々は、DNAバインダと呼ばれる二本鎖DNAと優先的に結合する物質に着目した。この物質は核酸挿入剤とも呼ばれ、古くから遺伝子や細胞の核を染める物質として使われて来たものである。市販品だけでも数十種類があるが、染色用として使われているので、色素

(類似)化合物が多く、電気化学的に活性な物質は知られていなかった。そこで、市販されているDNAバインダのサイクリックボルタンメトリ(試料溶液に電圧を掛け、それを変化(スイープ)させたときに流れる電流を測定する電気化学分析法)を行ってみたところ、いくつかの物質が電気化学的に活性であることが分かった²⁾。電気化学応答の一例として、ヘキスト33258という代表的

Fig.3 Cyclic Voltamogram of Hoechst 33258.

なDNAバイндаのサイクリックボルタモグラムをFig. 3に示す。

第3のステップとして、電極上で形成された遺伝子ハイブリッドに、上述の電気化学的に活性なDNAバイндаを作用させ、その物質から得られる電気化学信号を指標にして検出対象遺伝子を測れば、定量検出ができるだろうというのが遺伝子センサの原理である。DNAバイндаを使う理由は、単に遺伝子ハイブリッドの量を電気化学信号に変換して、試料遺伝子の標識を不要にするだけではない。一つの遺伝子ハイブリッドに多数のDNAバイндаが結合するので、信号の増幅が期待でき、高感度化に繋がる可能性が高いと期待されるからである。なお電極上で形成された遺伝子ハイブリッドは、加熱やアルカリ処理により解離して元の状態に戻るはずであるが、DNAプローブが完全に再生される保証が得られないため、遺伝子センサは使い捨て型での使用になる。

3. 遺伝子センサの作製と原理確認実験

B型肝炎ウイルス（HBV）の検出を目的にして、HBV遺伝子と特異的に反応できるDNAプローブを選択し、5'末端にイオウ原子を導入した。使用したDNAプローブは [5'-CGTCCCGTCG-GCGCTGAATC-3'] の塩基配列を持つ。こうしたDNAプローブは、市販のDNA合成機で簡単に合

成できるが、近年は多数の外注業者が合成依頼を廉価で受けてくれるため、こうした業者を利用する方が便利である。イオウ原子を末端に導入したのは、金とイオウとの親和力を利用して金電極表面にDNAプローブを化学的に結合させるためである。遺伝子センサの作製法は、いたって簡単である¹⁾。開発初期の遺伝子センサを例にすると、まず、研磨した棒状の金電極（直径=0.3 mm, 断面積=7×10⁻⁴cm²）を上記DNAプローブ溶液（250ng/mL）中に室温で1時間浸漬し、次に緩衝液などで十分に洗浄して未反応のDNAプローブを除去する。これだけで、HBV遺伝子を測定するための遺伝子センサが作製できるのである。

実際の肝炎患者血清からのHBV遺伝子の検出に先立ち、HBV遺伝子を組み込んだプラスミド（環状の小さな遺伝子、pYRB259と命名）を用いて原理確認実験を行った。本プラスミドは、自治医科大学より入手した。また電気化学測定は、Bioanalytical Systems社製の電気化学アナライザ（モデルBAS-100B）を用い、市販の2室セルで実施した [参照電極；Ag/AgCl（東亜電波製）、対極；白金（4.9 cm²）]。所定量のプラスミドを含む40 μLの試料液（遺伝子反応用の専用緩衝液を使用）を作製し、ここへ上記遺伝子センサを1本ずつ浸漬する。43℃で1時間放置し、電極上で遺伝子ハイブリッドを形成させる。反応後、電極をイオン交換水で洗浄して、0.1mol/LのDNAバイнда（ここでは上記ヘキスト33258を使用）溶液中に再び浸漬する。室温暗所で5分間放置した後、リン酸緩衝液（pH7.0）で十分洗浄し、DNAバイнда由来の電気信号（ヘキスト33258の場合は酸化電流値）を測定する。測定結果をFig. 4示す。

図の横軸は、40 μL中に含まれるプラスミドの数を表わし、縦軸はヘキスト33258由来の酸化電流値を示している。プラスミドが入っていない場合でも110nA程度の電流値が得られているが、これは、ヘキスト分子が金電極表面及びDNAプローブにも非特異吸着されているためである。この結果から、測定値のパラッキは大きいものの10³から10⁷コピー/40 μLの範囲でHBV遺伝子を測定

Fig.4 Calibration curve of pYRB259 using DNA sensor.

できることが明らかになった [回帰直線: $y = 9.6x + 86.2$; 相関係数: $r = 0.97$]. 遺伝子センサによる電気化学的な遺伝子検出が可能であることが原理的に示されたのである. なお電流値のバラツキが大きいのは, 電極が手作りであることに大きく関係していると思われる.

ところで, 遺伝子センサの検出特異性はどうか? HBV遺伝子でのデータではないが, *v-myc*という発癌遺伝子を組み込んだプラスミド (pVM623) を用いて得られた結果をFig. 5に示す¹⁾. ここでは*v-myc*と特異的に反応するDNAプローブ (20塩基対) を使用している. この図では横軸の濃度単位がg/mLになっているが, 検出限界は上記HBVの場合とほぼ同一である. ここで注目して頂きたいのは, 図中白丸で示しているpUC119のデータである. このプラスミドは, pVM623のプラスミドから*v-myc*部分を取り除いたものであり, 使用したDNAプローブとは反応しないはずである. 図から明らかなように, pUC119と反応させた場合には電流値の増加は全く認められなかった. すなわち遺伝子センサでは, 検出対象遺伝子に対して特異性の高いDNAプローブを使えば, 特異性の高い遺伝子検出ができることが分かったのである. なおこの実験では, 試

Fig.5 Calibration curve of target DNA (pVM623) and Control DNA (pUC119).

料遺伝子を加えない場合でも128 nAの電流が得られた. 上記pYRB259のプラスミドでは110 nA程度であったので, 約20 nA高い電流値となっている. これについては, DNAプローブ固定化条件の違いにより電極へのDNAプローブ固定化量に差が出たためと考えられた.

4. 患者血清中のHBV遺伝子の測定³⁾

前述のプラスミドでの原理確認実験では, プラスミド以外の物質は含まれていない条件であった. しかし実際の患者血清中には, ウイルス以外に蛋白質や脂質など多種類の夾雑物が混入している. こうした夾雑物が電極表面に吸着されると, 試料遺伝子やDNAバイナグとの反応を阻害し, 最終的に電気化学応答に著しい影響を与えるものと思われる. 事実, 10^3 倍に希釈した血清でも, 殆ど金電極からの電気化学応答が得られなくなってしまった (未発表データ). これは, 血清中に含まれる蛋白質の正の荷電と金電極の負のゼータ電位とが相互作用するためであることが分かっている. そこで患者血清での評価に先立ち, 血清中から遺伝子だけを抽出する手法についてまず検討することにした. 牛胸腺DNAを遺伝子のモデル

として用い、市販の遺伝子抽出キットの遺伝子回収率及び再現性について評価した。その結果、米国Qiagen社が製造しているQIAampという血液からの遺伝子抽出キットが最も優れていることが明らかになった。本稿の論旨から外れるので詳細な比較データは省略するが、QIAampキットでは、 $22\mu\text{g}$ の牛胸腺DNA（ 0.2mL の血清中）から平均して $18.7\mu\text{g}$ （回収率：85%）が回収された（変動係数=3.3%，実験数=11）。また、抽出液中の血清蛋白質の混入は1万倍希釈以下であることも酵素免疫分析の結果から判明した。従って今回の患者血清での評価では、全てQIAampキットで遺伝子抽出したものを試料とした。なお、遺伝子抽出に要する時間は20分間程度である。また患者血清は、東京・大井町の東芝病院から入手した。

遺伝子抽出した52試料について、半定量法である競合PCR（C-PCR）法と遺伝子センサでの結果を比較した。遺伝子センサの検量線としては、Fig. 4を使用した。結果をFig. 6に示す。

10^3 から $10^8/40\mu\text{L}$ の範囲で、回帰直線； $y = 0.57x + 2.16$ ，相関係数； $r = 0.75$ という相関関係であった。C-PCR法は、遺伝子濃度を桁で示す程度の定量性しかないので、この程度の相関でもかなり高いものと推定された。因みに、現在市販されている定量的な遺伝子検出法である分岐プローブ法でも、C-PCR法との相関係数は0.70である（C型肝炎ウイルス遺伝子の場合）⁴⁾。なお図中の点線は、遺伝子センサの検出限界濃度を示している。

5. チップ型電極作製の試み⁵⁾

前述の通り、遺伝子センサの測定値にはかなり大きなバラツキがあり、その原因の一つとして手作業による電極作製があると考えられる。また遺伝子センサは使い捨て型であるので、実用化のためには均一で低コストの電極作製方法を検討しなければならない。従来、遺伝子センサに使ってきた棒状金電極の断面は $\phi = 0.3\text{mm}$ であり、電極精度に大きく影響を及ぼす因子として電極面積と

Fig. 6 Correlation between DNA sensor and c-PCR method in the case of the HBV-DNA measurements (52 patients' sera).

表面状態が考えられる。電極の面積精度をマイクロオーダーで出せ、しかも表面状態が均一になる製造法という観点から、我々は半導体製造プロセスの適用を考えた。すなわち、金を蒸着あるいはスパッタリングで基板の上に積層し、この上を絶縁性皮膜で覆い、電極とする部分だけ精度良く穴を開けようという発想である。こうした目的には、半導体製造プロセスの一つのフォトリソグラフィ技術が適しているのである。具体的には、まずバイレックスガラス基板（ $\phi = 3$ インチ，厚さ=1.0 mm，コーニング社製）の上にチタンと金を続けてスパッタリングする（膜厚は、それぞれ500 Å及び5000 Å）。チタンを間に挟むのは、ガラスと金の密着性が悪いからである。次に絶縁層となる光レジスト（AZ4620A，ヘキスト社製）を塗布し（膜厚は、 $4\mu\text{m}$ ），電極部分のみ光を照射して除去してから 200°C で30分間焼成する。最後に、個々のセンサの大きさに切り出せば完成である。このようにして作製されるチップ型電極を模式的にFig. 7に示す。電極面積及び表面状態を評価するために、各チップ型電極の陰極電流を 0.5mol/L 硫酸中で測定することにした。結果の一例

Fig.7 Structure of chip-type DNA sensor.

をFig. 8に示す。大きな陰極電流が得られており、表面状態が清浄で均質であることが分かる。またこの時の電流値のバラツキは、 $CV=1.16\%$ ($n=40$) と電極面積のバラツキも小さいことが明らかになった。製造工程は全て機械化され、大量に均一な電極が作製できるため、低コストでの電極供給の可能性が出てきたのである。

6. 電気化学的DNAチップ

現在C型肝炎の治療には、インターフェロン (IFN) が広く用いられているが、全患者の30%程度にしか有効でないとされている。東芝病院研究部でIFNの治療効果と患者遺伝子との関係を検討した結果、MxAと呼ばれる遺伝子内の一つの塩基 (一塩基多型; SNP) がGであるかTであるかにより治療効果に大きな差があることを見出した。すなわち、染色体中のMxAのSNPがTであればIFN治療が有効になる可能性が高いのである。従って東芝製DNAチップでは、MxAのSNP判定を中心として他のいくつかのSNPを同時に判定できるようにし、高確率で治療効果が予測できると考えられる。

本DNAチップの特徴は、①検出対象遺伝子を高価な蛍光物質などで標識する必要がないので検出コストを低く抑えることができる、②チップ自

Fig.8 Cyclic voltamogram of chip-type gold electrode.

身も半導体製造技術を応用することで大量に安価に製造できる、③更に電気化学検出装置は、レーザー搭載の蛍光測定装置と比較して小型で安価なものになるので、今後のポイント・オブ・ケア (医療現場での診断) に最適な装置になると期待される、などである。

一方SNP判定操作を自動化するため、Fig. 9に示すようなチップとモジュール及び自動化装置を作製した⁶⁾。Fig. 9のチップ基板にはDNAプローブを固定化するための電極が100個ほど形成され、電気化学測定を行うための参照電極や対極も配置されている。このモジュールに試料遺伝子 (患者ゲノムの増幅産物) を注入し専用装置にセットすると、洗浄やDNAバイナ液添加、電気化学計測という一連の操作が自動的にできるようになっている。試料注入から結果判定まで約1時間である。電気化学的なDNAチップは純国産技術である。そこで我々は、今回のC型肝炎テラメイド治療用のDNAチップ開発に全力をあげ、早急にDNA診断領域での電気化学的DNAチップの実績作りを図りたい。併せて、他の疾病関連のSNP判定に向けたDNAチップ開発を急ぎたいと思っている。

7. おわりに

以上、我々が開発を進めてきた電気化学的簡易遺伝子検出法; 遺伝子センサの原理、DNAチッ

Fig.9 Photographs of electrochemical DNA chip and fully- automated analyzer.

プとしての実用化の検討状況などを紹介してきた。遺伝子センサは、遺伝子の種類に拘らず簡単に速く、しかも低コストで特定の遺伝子を検出できる。上記HBV遺伝子での結果から判断すると、現状の感度では直接患者血清から検出することは難しい。しかし、DNAチップによるSNP解析のように、PCR法などの遺伝子増幅法で試料遺伝子が予め増やせる検査では測定感度はあまり問題にはならず、測定時間が短い、操作が簡便、チップや装置のコストが廉価などの利点を積極的に生かせると思っている。

今回紹介した例は医療応用のみであったが、DNAチップは食品や環境分野などの他分野でも適用可能であり、チップ上に固定化するDNAプローブの種類を適宜選択すれば良いと考えられる。今後我々も様々な分野で役に立つチップ作りを目指したいと思っている。

文 献

- 1) Hashimoto K, Ito K and Ishimori Y : *Anal. Chem.*, **66** 3830 (1994)
- 2) Hashimoto K, Ito K and Ishimori Y : *Anal. Chim.*

Acta, **286** 219 (1994)

- 3) Hashimoto K and Ishimori Y : *Proceedings of the 16th International Symposium on Preparing for Clinical Care Analyses in the 21st Century*, 215 (1996)
- 4) Sherman KE, O'Brien J, Gutierrez AG, Harrison S, Urdea M, Neuwald P and Wilber J : *J. Clin. Microbiol.*, **31** 2679 (1993)
- 5) Hashimoto K, Ito K and Ishimori Y : *Sensors and Actuators : B. Chemical*, **46** 220 (1998)
- 6) Hashimoto K and Ishimori Y : *Lab on a Chip*, **1** 61 (2001)

(受付2003年11月20日 掲載決定12月3日)

著者略歴

石森義雄 (いしもり よしお)

1982年 東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程修了 (工学博士).
1982年 (株)東芝入社, 研究開発センターにてバイオセンサなどの研究開発に従事し、現在に至る。

専門：バイオテクノロジー、バイオセンサ。

現在 研究開発センター、環境技術ラボラトリー、研究主幹、技術士 (生物工学部門)。