ナノテクノロジーの導入によるバイオテクノロジーの新展開

Nanotechnology-driven biotechnological research and development

北陸先端科学技術大学院大学

民谷 栄一 Eiichi TAMIYA

Key words: biosensor; AFM; microchip technology; combinatorial biotechnology; on-chip bio-device

1. はじめに

バイオナノテクノロジーを実現するためのツールとして、図1にも示すようないろいろな方法や利用が考えられている。例えば、ナノ領域で観測しようとするためには電子顕微鏡や走査型プローブ顕微鏡といった手法が有力である。筆者らも原子間力顕微鏡を用いた遺伝子、タンパク質の構造に関する研究を展開し、それらに基づいた新たな原理のバイオセンサーの開発についても検討している。また、SNOMといった走査型プローブ顕微鏡により、光情報と原子間力情報を併せ持つ方法によるナノ解析をも実現している。特に細胞内のGFP分子をマーカーとした解析や

染色体のナノ構造の解析にも展開している^{1)~5)}。さらにこうした顕微鏡以外にナノ領域を観測する方法として、エバネセント光を用いて一分子計測などにも利用されている。

一方、ナノスケールの構造体を利用してバイオの解析に利用する研究も重要である。筆者らは、半導体の技術を用いてピコリットルの微小の容積を有するチャンバーアレイを作製し、これを用いて遺伝子ライブラリーやタンパク質ライブラリーを作製するためのバイオチップの開発を行っている。また、ナノスケールで精密に作成されたチャンネル構造を利用してゲル電気泳動を模倣した微細なシリコンピラによるDNAの分離が実現している。ナノマテリアルとして代表的なカーボンナノチューブを原子間力顕微鏡のチップの先端部に用いてより精密に生体材料の構造を観察する試みもある。すでにこれを用いてDNAの二本鎖の構造が観測できることも明かとなっている。その他、ナノパーティクルやナノ量子ドットなども生体の解析に用いられている。例えば、ナノ粒子のサイズを制御することによって蛍光波長を変化させる試みも実現している。これは、標識剤への利用が検討されている。

生体機能を有する機能分子を設計、創成するためには、コンビナトリアルライブラリーやモレキュラーインプリント合成法などを用いて分子レベルからボトムアップし、ナノ機能を実現しようとする設計創成法の研究も行われている^{6)~9)}。

また、チップ上に細胞や組織といった生体材料を精密に配置したり、ネットワーク形成を誘導するためのパターンニングなどの技術が重要である。一方、こうしたナノツールを用いて測定のみならず操作を行うことも行われている。例えば、光ピンセットの原理を利用してナノ粒子の動きを制御したり、原子間力顕微鏡を用いて細胞や染色体の移動や切断分離したりすることも可能である。筆者らもヒト染色体をターゲットとして、ナノ領域での切断にも成功し、新たな染色体の解析ツールの提案も行っている¹⁰⁾。

(1) ナノ直接観察

EM——SEM, TEM

SPM——AFM, STM, SNOM, SNOAM

エバネセント場 (分子プローブを介して)

蛍光標識分子 (抗体、遺伝子)

細胞内観察 GFP-ターゲット分子融合遺伝子、

FRET 標識など

(2) ナノ構造体の利用

ピコチャンパーアレイ——バイオライブラリーのハイスループット解析

ナノチャンネル構造——キャピラリー電気泳動分離

ナノギャップ電極、ナノ周期構造——バイオセンサー

QNT などの利用——AFMの分解能向上

ナノドット、ナノ粒子、ナノバーコード

(3) ナノ設計・創成

生体情報変換機能を担うナノ機能分子、分子プローブ設計

分子進化コンビナトリアルライブラリー——ペプチド、核酸、糖類など

生体分子、細胞の配置、パターンニング

(4) ナノ操作

光プローブ, SPM

細胞、染色体操作 (移送、切断など)

図1 ナノバイオテクノロジーのためのナノツール

2. ナノテクノロジーが新たなバイオセンサー開発を支援

ナノテクノロジーを利用して進められているバイオセンサーへの展開について示す。バイオセンサーは今まで血糖値やホルモンなどを現場で測定できる装置としてすでに市販されているが、これからのバイオセンサーを開発するうえで、ナノテクノロジーやマイクロチップテクノロジーは必要不可欠となっている。

ここで特にナノテクノロジーとしては、分子設計や分子創成など、一分子解析や操作がナノテクノロジーの有力な利点として挙げられる。ここでは DNA センサーを開発するために利用された原子間力顕微鏡の事例を示す。筆者らは電極を用いた方法で遺伝子を検出する新しい原理を明らかにしている。これは、電極に特定の DNA を固定することなく、溶液中に行う特定の DNA と相互作用する電気化学的活性を有するバインダーとの相互作用を利用して測定するものである。電気化学的結果から特定の DNA が増加すると電流値が減少することが明らかになった。この原因について、原子間力顕微鏡を用いて調べてみると DNA と電気化学的活性化と DNA との間に相互作用が見られ、最終的には凝集を引き起こすことが観測された (図 2)。この凝集体は約 10 ナノメートル程度の大きさであることがわかり、DNA や電気化学性物質がその凝集体に数多く含まれていることも明らかとなった。こうしたナノ凝集体が形成されることにより、電気化学的な応答に大きな変化をもたらしたということが明らかとなった。このようにナノツール、ナノ解析を行うに可能な原子間力顕微鏡を用いて新たなバイオセンサー計測方法が明らかにできた。現在この原理に基づいて現場で測定可能な DNA センサーの開発が

進められている。^{11)~13)}

3. オンチップバイオデバイスの新展開

半導体集積化技術に代表されるチップテクノロジーを利用すると、各種機能ユニットを一体化したシステムをチップ上に設計、作製することができる。これは、今まで示したバイオセンサー以外にも各種のバイオテクノロジー基盤技術へと展開できる。例えば、ここでは、筆者らが行っているオンチップ遺伝子増幅/タンパク合成システムや細胞チップなど新たなバイオデバイスの開発例について示す^{14)~25)}。特定遺伝子の増幅を行い、膨大なサンプルの迅速な同時分析を目指して、高度に集積化した微小型 PCR デバイスを作製した。半導体微細加工技術を用いてこのデバイスを作製し、容量 85 pL の反応チャンバーを 2500 個/cm² の集積度でシリコンウエハー上に配置した (図 3)。基板材料のシリコンは優れた熱伝導性を持ち、微小化によりサンプル自身の熱容量は減少するため、従来の装置に比べ、温度コントロールが高速になると期待される。このマイクロチャンバーアレイを 3 個のヒートブロック上に 5 s ずつ交互に置いて加熱した。この方法により 40 サイクルを 15 min で実行できた。従来の汎用の PCR 装置と比べて、反応時間全体を約 5 分の 1 以下に短縮できた。周期的に各チャンバーを配置した高密度なアレイを用いることにより、試料溶液の滴下分散による一分子および一細胞単位での配置も可能である。

また、こうしたチップを *in vitro* タンパク質合成系に適用することも可能である。筆者らは、大腸菌由来の細胞抽出液を用い、発現タンパク質には、GFP を用いて検討し、すでに発現を確認している (図 3)。こうしたタンパク質合成チップは、DNA ライブラリーをあらかじめ、チップ上

図 2 新しい遺伝子センシングの原理と AFM によるナノ観測

図 3 マイクロチップ技術を用いたバイオセンサー/バイオデバイス研究例 (民谷ら)

図 4 オンチップバイオテクノロジーの研究分野

に作製しておけば、このシステムでタンパク質にまで変換し、機能評価までも一度に行うことができ、ポストゲノムシーケンスに向けてのタンパク質機能解析の手法としても期待できると考える。

次に細胞チップの例を示す。神経細胞は、ニューロンや

グリア細胞が複雑にネットワークを形成し、これによって高度な機能が発現維持されている。こうした神経細胞に作用する薬剤のスクリーニングには、細胞レベルで一度に多くの薬剤の効果を調べるのが要求される。こうしたハイスループットスクリーニングを行うためには、集積化され

た神経細胞チップの作製が重要である。ここでは、神経細胞チップの作製ならびにそれを用いた薬剤の評価を行った。神経細胞チップは、フォトリソグラフィーとウェットエッチングを用いて、シリコン基板上に作製した。リアクター部は、一辺 $500 \times 500 \mu\text{m}$ 、深さ $200 \mu\text{m}$ のものを $24 \times 52 = 1248$ 個を基板上に集積化した。脳神経細胞に KCl 刺激や Ca^{2+} レセプター阻害剤を与え、それにより変化する細胞内 Ca^{2+} の変化を Ca^{2+} 指示薬である FLUO3-AM を使って観察した。チャンバー内の細胞を 3 日間培養したところ、マイクロチャンバー内にはグリア、ニューロン細胞ともに接着し、ネットワークが形成されていることが確認できた。次に、これらのマイクロチャンバー内の細胞ネットワークに KCl 刺激を与え、細胞内 Ca^{2+} を観察したところ、KCl 刺激後に蛍光強度の変化が観察された。コノトキシン GVIA (N タイプの Ca^{2+} チャンネル阻害剤)、アガトキシン IVA (P タイプの Ca^{2+} チャンネル阻害剤)、コノトキシン MVIIC (P/Q タイプの Ca^{2+} チャンネル阻害剤) を用いて蛍光観察を行った。その結果、アガトキシン IVA とコノトキシン GVIA では KCl 刺激による蛍光強度の抑制が観察されたが、コノトキシン MVIIC では観察されなかった。このように神経細胞チップを用いることでドラッグスクリーニングが可能であることが示された。

以上のように、筆者らは、チップテクノロジーのバイオ分野への展開を図るためのオンチップバイオテクノロジー

のコンセプトを提案している (図 4)。

参考・著者らの論文

- 1) *Optical Review*, **3**(6B), 470-474 (1996).
- 2) *Analytical Chemistry*, **69**(18), 3697-3701 (1997).
- 3) *Nucleic Acids Research*, **25**(8), 1662-1663 (1997).
- 4) *J. Biochemistry*, **130**, 367-376 (2001).
- 5) “ナノ光工学ハンドブック”, 朝倉書店, 2002.
- 6) “化学フロンティア, コンビナトリアルバイオエンジニアリング”, 化学同人, 2003, pp. 175-179.
- 7) *BIO INDUSTRY*, **18**(6), 64-72 (2001).
- 8) 生物工学会誌, **79**(9), 367-370 (2001).
- 9) 高分子, **7**, 442-444 (2000).
- 10) *Arch. Histology and Cytology*, **65**(5), 472-479 (2002).
- 11) 総合臨床, **50**(3), 433-437 (2001).
- 12) *New Technology Japan*, **29**(6), 11-17 (2001).
- 13) *Electrochemistry*, **69**(12), 1013-1016 (2001).
- 14) *Analytical Chemistry*, **73**, 1043-1047 (2001).
- 15) *Analytical Chemistry*, **73**, 373-378 (2001).
- 16) *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 1009-1014 (2001).
- 17) *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 1015-1019 (2001).
- 18) *Materials Science and Engineering C*, **12**, 67-70 (2000).
- 19) *Materials Science and Engineering C*, **12**, 77-81 (2000).
- 20) “Micro Total Analysis Systems 2002,” Vol. 1, Kluwer Academic Publishers, 2002, pp. 242-244, pp. 479-481, pp. 515-517, pp. 862-864.
- 21) “Micro Total Analysis Systems 2000,” Kluwer Academic Publications, 2000, pp. 191-194, pp. 123-126.
- 22) 化学, **57**(12), 37-38 (2002).
- 23) 次世代バイオセンサー, **12**(1), 6-9 (2002).
- 24) 現代化学 3 月号, **372**, 23-30 (2002).
- 25) *BME*, **15**(10), 8-16 (2001).