ポーラスガラスを用いたプローブオンキャリア型 DNA チップ

塚 原 俊 文^a

^a 北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス系(〒923-1292 石川県能美市旭台 1-1)

Probe-on-Carrier DNA Chip by using Porous Glass

Toshifumi TSUKAHARA^a

^a School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology (1-1, Asahidai, Nomi-shi, Ishikawa 923-1292)

Keywords : SNPs/Single Nucleotide Polymorphisms, Genotype, Probe

1. 遺伝子型と SNPs

ヒトであれ、様々な動物であれ、また植物や細菌、ウイルスであれ、それぞれの生物の形質は前世代から次世代に引き継がれる。その引き継がれるモノ、或いはその情報が遺伝子であり、基本的にはある生物の個体を構成する全ての細胞は同一の遺伝子を持っており、その「ひとそろい」はゲノムと呼ばれている。最近では「もの作りの DNA」とか「企業の DNA」という言い方がされるように、遺伝子の本体が DNA であることは多くの人の常識となっている。DNA には A, C, G, T の 4 種類の塩基が存在しており、その並び順(配列)が遺伝情報で、RNA やタンパク質の構造やその発現に関する情報となっている。DNA は相補的な二本鎖を形成しているので、その大きさを塩基対で表すが、ヒトのゲノムは約 30 億塩基対である。

ゲノム解析の結果では、ヒトとチンパンジーのゲノムの差異は 1% 未満とされている。即ち、たとえ人種が異なっても遺伝子の差はほとんどない。しかしながら、皮膚の色や身長や体型だけでなく、知能や運動能力、さらには特定の病気に罹りやすいか否か、といった様々な性質(形質)がある程度は遺伝することは多くの人にとって周知のこととなってい

る。病気の罹りやすさにはもちろん生活習慣等による後天的要因も多く含まれるが、遺伝的要因が関連していることは様々な例で示されており、このようないわゆる「体質」が遺伝することも周知のことである。

ニュースなどで、糖尿病やアルツハイマー病、高血圧などのリスクファクター遺伝型が見つかったと報道されることがある。これらの多くが一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphisms : 以下 SNPs)と呼ばれているものである。SNPs は遺伝子の特定の箇所で行き起こる一塩基の相違で、例えば 1% 以上というように、集団内である程度まで存在している相違のことである。1% 以上の頻度を示す SNPs は 30 億塩基対のヒトゲノム中に約 300 万ヶ所あるとされている(図 1 参照)。例えば飲酒と喫煙を好む二人の男性がいたとして、数十年後に片方は重い病気を患うが、もう一方はいたって元気というような違いも、それぞれの「体質」≈ SNPs の相違によると考えられる(図 2 参照)。

図 1 SNPs とは

図 2 SNPs と体質

SNPs は、疾患に対する感受性の違いの根源とも考えられており、様々な疾患でその疾患の重症度と密接に関連していることが示されている。また、例えば、APOE (アポリポタンパク質 E) 遺伝子の SNPs は、アルツハイマー病への高いリスクと関連していることも示されている。さらに SNPs は薬物の代謝速度や特定の治療法に対する反応にも影響することが分かっている。つまり、たった一塩基の遺伝子の違い (SNPs) によって様々な疾患への罹りやすさや、ある薬品が身体に与える影響の度合等が異なる。従って、各患者で事前に判別した SNPs 情報を元に、一人ひとりの患者に対して薬物反応性などの体質や病気の質の違いを考慮に入れて、薬害の危険性が少なく、より効果的な治療を行うという、オーダーメイド型医療が将来の医療として展望されている。イレッサをはじめとした様々な抗ガン剤による副作用被害が SNPs と深く関わっていることが示されており、すでに事前の遺伝子型診断によって薬の副作用や過剰投与を防ぐ試みが様々な医療機関で始まっている。

オーダーメイド医療ではベッドサイド診断など、早急な診断結果の提示が必要である。また、手技に慣れない臨床現場の者でも解析可能であることも必要である。当然ながら、ある程度の網羅的解析も必要になるであろう。従って、1SNP 当たりのコストが低く、何処でも誰でも迅速に、容易にかつ大量の遺伝型解析が可能なオリゴヌクレオチド型の DNA チップの利用が期待されている。しかし、従来型の DNA チップは作製に大きなコストが必要で、これまでは一枚数万円と高価なのが現状であった。そこで我々は、高精度多孔質ガラスを核酸合成用担体として利用した、次世代型の臨床遺伝子型判定用 DNA チップの実現を目指し、担体一体型のままガラスプレート上に接着、集積化したプローブオンキャリア法によって従来の DNA チップの持つ問題点を克服して、安価で高精度な DNA チップの開発を目指して研究を行ってきた。

2. プローブオンキャリア法

プローブオンキャリア法は、従来の固相法を用いた化学的 DNA 合成法を利用しつつ逆転の発想で考案した方法である。固相担体表面に化学的に合成した DNA 断片を、そのまま DNA 検出用のプローブとして基板上に集積化し、DNA チップとするものである。固相担体と一体化したオリゴヌクレオチドプローブである「プローブオンキャリア」を従来のオリゴ DNA と同様に合成し、固相から遊離させずに、合成したプローブを担体と一緒にそのままスライドグラス等に固着させることによって DNA チップを実現する (図 3, 図 4 参照)。具体的には、高度に細孔径の均一化を計った微小多孔質ガラスを合成用の固相担体として用いるということがポイントである。細孔径が均一で、表面形状も平坦な多孔質ガラスを担体として用いることで、化学反応が均一に進み、精度の高い DNA 鎖の合成が可能になる。通常の固相担体と同様に、シランカップリングを介して第一塩基を担体に固定し、ホスホアミダイト法で DNA 鎖を伸長合成する。DNA 鎖合成が終わった担体をスラリー状に懸濁し、そのままプローブオンキャリアとしてスライドグラスに直接、高密度に配列・固定すればオリゴヌクレオチド型 DNA チップを作製できる。

図 3 Probe-on-Carrier 型 DNA チップの概念図

図 4 Probe-on-Carrier 型 DNA チップの作製法

実際には基板とするスライドガラス上に接着剤をスピンコートして延ばし、その上にスラリー状にしたプローブオンキャリアをスポットする。基板に接着していないプローブオンキャリアは超音波洗浄によって取り除き、加熱処理によって固定化すればプローブオンキャリア型 DNA チップが完成する。(図 4 の下を参照)

本法では、オリゴヌクレオチドを合成時の担体から切り離す必要がなく、一方で DNA を固定化するための官能基導入を必要としない。従って、安価で簡便でより設計の自由度が高いオリゴヌクレオチド型 DNA チップの作製が可能となる。さらに、DNA 合成には従来のホスホアミダイト法による固相合成が利用できるため、オリゴ DNA 合成が日常化したことによって高度化してきた DNA 合成の技術とノウハウを利用して、DNA プローブの高純度合成を極限近くまで向上することができるという利点もある。実際、本法では 99.8% の選択的縮合率で核酸鎖合成が可能であるので、20 塩基プローブでは 95% 以上の精度という高い信頼性と設計の自由度をもつプローブの合成が可能となっている。つまり、従来型に比べて高精度の SNPs 解析が可能となる。

3. プローブオンキャリア型 DNA チップの検証

これまでに、プローブオンキャリア用の担体として高度に細孔径の均一化を図った無蛍光の微小多孔質ガラスを開発した。この多孔質ガラスに官能基を導入して核酸合成用担体とし、通常のオリゴヌクレオチド合成と同様の手順でプローブオンキャリアを合成することができる。SNPs 判定の可否を判定するため、p53 遺伝子を標的として DNA チップの検定を行った。野生型および二種類の一塩基変異体の三種類のセンス鎖のオリゴヌクレオチドを合成した。これをスライドガラス上に配列固定して DNA チップとし、蛍光標識した三種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、洗浄後に残存した蛍光を調べた結果を図 5 に示す。図で明らかのように、三種類のプローブオンキャリアは、それぞれの蛍光アンチセンスプローブオリゴヌクレオチドと最も良く結

合し、他のオリゴヌクレオチドにはほとんど結合しなかった。この結果は、プローブオンキャリアを固定化することで SNPs 判定用の DNA チップを簡便に作製することが可能であることを示している。

我々はさらに、細胞由来 DNA を元に蛍光標識したターゲットサンプルを用いても同様に一塩基変異が検出可能であることを確認している。しかし現在までのところ、生体サンプルを用いた場合には S/N 比が低下し、さらなる改良が必要であることが明らかとなっている。そこで、プローブオンキャリア製法を見直し、これまでに様々な検討を行った。多孔質ガラスの細孔径、リンカーの種類および密度によって S/N 比が変化するかどうかを調べたところ、これらを変化させることによって変異体検出の S/N 比が変わることが明らかとなり、プローブオンキャリアの改良の可能性が示された。さらに、プローブオンキャリア合成の最適化のため、核酸合成の固相となる多孔質ガラス担体のリンカーの種類・密度及び脱保護剤の検討も行った。その結果、疎水的な 16-Hydroxydecanoic リンカーを用い、非水系の MeNH₂/THF で脱保護することで、従来の 1/20 程度まで脱保護時の DNA 脱落を抑制することに成功している。このような方法で作製したプローブオンキャリアは、より高精度に SNPs 判定に利用できることが確認できている。さらに、リンカー密度の最適化も可能となり、より高精度の DNA チップ開発に向けた改良が可能となった。

4. SNPs 判定用プローブオンキャリア型 DNA チップの改良

高い精度で正確な SNPs 検出を可能とするために、検出法の改良も行っている。化学的 DNA 結合法を用いて標的塩基特異的に 2 本の DNA 鎖間で共有結合を形成させ、検出精度と感度を飛躍的に向上する方法の開発に成功した。またハイブリダイゼーションを検討し、DNA 合成時に適切な保護基を利用することによって、脱保護なしで標的核酸と高効率でハイブリダイゼーションすることも明らかになった。この

p53 tumor suppressor gene

Wt: GGCATGAACGGGAGGCCCAT

HSC-4: GGCATGAACCAGAGGCCCAT

Ca9-22: GGCATGAAC TGGAGGCCCAT

図 5 Probe-on-Carrier 型 DNA チップによる SNPs 判定

“Protected DNA Probes (PDP)” 法は DNA チップの精度をより高めるだけでなく、作製プロセスの簡素化によりコスト削減にも貢献すると期待されている。

一方、従来型の非定形・粉体プローブオンキャリアではプローブ量の均一化が困難で、結果として定量性がさほどなかった。そこで、定形・薄片型プローブオンキャリアを作製することでプローブ量を均一化することに挑戦した。まず母材ガラスを用いて薄板状あるいは円柱状に加工し、熱処理によって分相した後に切断することによって定形の薄片を作製できる。次にこれを酸・アルカリ処理によって化学エッチングし、多孔体とする方法で薄片型プローブオンキャリアを作製した。図 6 に実際に作製した円盤状の多孔質ガラスの外見写真を示す。薄片状ガラスは化学的エッチングを行う際に、個々の衝突によって破損しやすいが、円盤状ガラスは衝撃に強い形状のためか、化学エッチング行程によってもほとんど破損せず、良好な定形プローブオンキャリアが作製できることが判明した。今後、より微小な定形プローブオンキャリアを開発するための検討が必要であるが、これまでの研究で定形・薄片型プローブオンキャリア作製が可能であることが示

された。定形・薄片型プローブオンキャリアの実現によって定量性の向上のみでなく、プローブデリバリー効率も向上することが期待され、DNA チップ作製のコストをより一層削減することが可能となると考えている。

5. プローブオンキャリア型 DNA チップによる発現解析用 DNA チップの可能性

医薬品副作用の低減という観点では、CYP 遺伝子群など薬物代謝に直積関与する遺伝子群では SNPs のみだけでなく、mRNA の発現量も重要である。しかしながら、網羅的な遺伝子発現解析には従来、比較的長鎖の相補的プローブによるマイクロアレイを用いた方が良いとされている。これは、低発現遺伝子をもしっかりと補足するためには、鎖長が短く結合力の低いプローブより、ある程度鎖長を長くすることによって相補鎖への結合力を高めた方が良いという理由によるもので、実際に従来型の遺伝子発現解析用マイクロアレイ作製には、50 塩基以上の長鎖オリゴヌクレオチドが多く使用されている。そこで我々は、プローブオンキャリア法で 50 塩基以上の DNA 合成が可能であるか否かを検証した。DNA 合成用担体として普及している ABI 社製 Cross-Linked Polystyrene 担体と、我々が開発した Genoglass 担体を用いて、120 塩基のオリゴヌクレオチド配列 (taaccgggga ttctgtacat gcattgagct ctctcattgt ctgtgttagag tggatatactt gggaatataa aggaggtgac caaatcagtg tgaggaggtg gatttggtct ctctgctct) を定法により合成した結果が図 7 である。Genoglass 担体は、細孔径の平均 100 nm または 200 nm の製品を、Cross-Linked Polystyrene 担体は細孔径の平均 100 nm 相当の製品を用いている。合成 DNA 鎖を切り出し後、アガロースゲル電気泳動(図 7 左)と、HPLC (図 7 右)によって分析した。それぞれ、(1)は細孔径の平均 100 nm を持つ Genoglass, (2)は細孔径の平均 200 nm を持つ Genoglass, (3)は細孔径の平均 100 nm 相当の Cross-Linked Polystyrene の結果である。電気泳動結果では、細孔径平均 100 nm または 200 nm を持つ Genoglass では、長鎖オリゴヌクレオチドが効率良く合成できていることを示す 120 塩基付近(←)の濃いバンドが検出できた。しかし、Cross-Linked Polystyrene では、120 塩基付近の微弱なバンドしか検出できなかった。さらに詳しく調べるため HPLC を用いて分析し、目的産物の回収率を求めたところ、細孔径平均 100 nm または 200 nm を持

図 6 円盤状 Probe-on-Carrier の作製法

図 7 合成した長鎖 DNA の PAGE, HPLC による分析結果

つ Genoglass では、120 塩基長の長鎖オリゴヌクレオチドを高効率で回収することができた(回収率はそれぞれ、1.89%, 3.17%)。しかし、従来の担体である Cross-Linked Polystyrene では、長鎖オリゴヌクレオチドをわずかししか回収することができなかった(回収率 0.19%)。

以上の結果より、担体として Genoglass を用いることで長鎖オリゴヌクレオチドを効率良く合成できることが確認できた。特に 200 nm の細孔径平均は 100 nm の細孔径平均より高いプローブ純度を示し、より大孔径の Genoglass が担体として優れていることが示された。従って、より大孔径の Genoglass を DNA 合成用担体として用いることによって、プローブオンキャリア法を利用した遺伝子発現解析用 DNA マイクロアレイの作製が可能であることが判明した。これまで、SNPs と遺伝子発現の両方を同時に解析できるデバイスは開発されていないが、プローブオンキャリア法を用いることで、超安価に網羅的な SNPs と遺伝子発現の両方の解析が同時に可能なデバイスの開発も可能となったと考えている。

(Received June 26, 2017)

参考資料

- 1) dbSNP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

- 2) The Chipping Forecast II. *Nature Genetics* 2002; supplement, vol. 32.
- 3) D. Bowtell, J. Sambrook (eds.); *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003).
- 4) T. Tsukahara, H. Nagasawa ; *Sci. Techno. Adv. Materials*, **5**, 359 (2004).
- 5) G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo ; *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 5081 (1997).
- 6) E. LeProust, H. Zhang, P. Yu, X. Zhou, X. Gao ; *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2171 (2001).
- 7) A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Sakamoto, K. Miyata, H. Taguchi, H. Nagasawa, T. Tsukahara, T. Watanobe, Y. Maki, K. Seio, M. Sekine ; *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1952 (2008).
- 8) A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, H. Nagasawa, T. Tsukahara, M. Sekine ; *Tetrahedron Letters*, **48**, 5147 (2007).
- 9) A. Ohkubo, K. Tanaka, H. Taguchi, K. Seio, H. Nagasawa, T. Tsukahara, M. Sekine ; *Bioorg Med Chem Lett.*, **17**, 5969 (2007).
- 10) T. Tsukahara, H. Nagasawa, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, H. Suzuki ; Malaysia-Japan International Symposium on Advanced Technology 2007, Nov. 13-15, Kuala Lumpur, Malaysia (2007).
- 11) USP 6,897,021 Reactive probe chip, composite substrate and method for fabrication of the same
- 12) 特許4110221 反応検出チップ及びその作製方法