

## 最近の技術から

# 青緑色レーザーと生化学

神 原 秀 記

(株)日立製作所中央研究所 〒185 国分寺市東恋ヶ窪 1-280

### 1. はじめに

DNA (deoxy nucleic acid)を中心としたバイオ分野が急速に発展し、生命現象が分子のレベルで解明されはじめ、遺伝子操作による種々物質の生産、DNAを用いた病気の診断と治療などが現実のものとなってきた。従来、<sup>32</sup>P 標識を用いるオートラジオグラフィーがDNA分析に用いられてきたが、(1)取扱いに特別な施設を必要とする、(2)<sup>32</sup>Pは半減期が14日と短く、入荷に合わせて実験を準備する必要がある、など不便な点が多く、レーザー誘起蛍光法を用いた装置（蛍光顕微鏡、レーザー顕微鏡、ゲルスキャナー、セルソーターあるいはDNAシーケンサーなど）が普及してきている<sup>1-3)</sup>。これらはバイオ分野では大型で高価な装置であり、小型化、低価格化が望まれている。ここでは最も基本的な装置であるDNAシーケンサーを例にこの分野で必要とされるレーザー像と半導体レーザーへの期待を述べる。

### 2. DNA シーケンサーの概要

DNAは糖リン酸骨格に4種の塩基（A：アデニン、C：シトシン、G：グアニン、T：チミン）が配列して、遺伝情報をなしている。この配列を調べる装置がDNAシーケンサー（図1）である<sup>4)</sup>。これはレーザー光源、ゲル電気泳動分離部、波長分離検出部およびデータ処理部からなる。分離には2枚のガラス板（40 cm × 25 cm）の隙間0.2～0.4 mmにポリアクリルアミドゲルを作り用いる。DNA塩基配列決定では特定部位を始点として種々長さのDNA断片を作る。末端塩基ごとに異なる発光波長の蛍光体でDNA断片を標識し、図示したような断片群を得る。ゲルの上部に蛍光標識されたDNA断片を載せ電気をかけると短いDNA断片ほど早く泳動するので一定時間経過すると長さ一塩基の差ごとにバンド状に分離する。泳動始点から20～30 cm下流をゲル側面から平面に沿ってレーザー照射（径0.2 mm以下）し、そこを通過するDNA断片からの蛍光を検出し短いDNA断片から順次その末端塩基を知ることがで

きる。

ゲル泳動板中の泳動路は30～50本でレーザー照射する領域の長さは10～15 cmである。計測時間はDNA断片の泳動速度で決定され、DNA鎖長400～600塩基で5～12時間である。最近、内径が0.1 mm以下の毛細管にゲル充填し、これを多数本並べて用いる方式が発達してきている。この場合は通電によるゲル発熱を小さくできるので、大きな泳動電圧を使用でき、計測時間を20分～2時間に短縮することができる。また泳動路あたりの幅を0.2 mmと小さくできるので計測領域の幅を1～2 cmへと小さくでき、次世代装置のキー技術として注目されている<sup>5)</sup>。蛍光は複数のバンドパスフィルターを用いて波長選別受光される。検出には光電子増倍管あるいは冷却CCD (charge coupled device) カメラなど

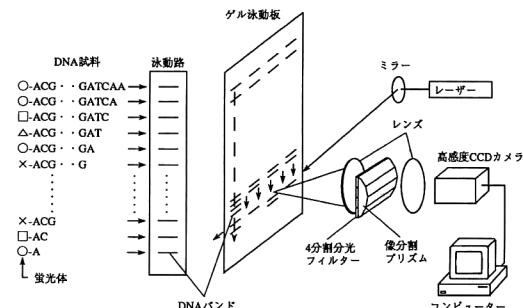


図1 DNA シーケンサーの模式図

表1 DNA 標識蛍光体の例

蛍光体名	励起極大波長 (nm)	発光極大波長 (nm)
FITC	488	520
Succinyl Fluorecein	484 507	512
〃		536
Cy 3	552	565
TRITC	554	573
Cy 3.5	581	596
XRITC	580	604
Texas Red	594	620
Cy 5	650	667
Cy 5.5	678	703

が用いられる。検出器の分光感度は波長700 nm以上で低くなり、またゲルからなる背景蛍光は短波長側で大きくなるので実用的な蛍光検出波長領域は500~700 nmである。図の例はプリズムを用いて照射領域の線状蛍光像を4本の蛍光像に像分割し、異なるバンドパスフィルターを通して冷却CCDで受光した例である。

DNAシーケンサーは塩基配列決定の他、試料中の種々DNA断片の長さを計測し、遺伝子診断や生物種の分類に用いられたり用途は広い。標識蛍光体の例を表1に示した。有機蛍光体は光照射で消光しやすいものが多く<sup>6)</sup>、強いレーザーを用いても蛍光強度は増大せず、5~30 mWのレーザーで十分である。

### 3. レーザー光源

DNAシーケンサーでは4種の蛍光体を用いたがDNA診断などではできるだけ多くの試料を異なる蛍光体で標識し蛍光の色で各物質を識別し、計測することが望まれている。一方、有機蛍光体の励起極大波長と発光極大波長の差は20~30 nmで、発光スペクトルの半値幅は30 nmである<sup>7)</sup>。多くの場合、励起光波長から約80 nm以内に発光極大をもつ蛍光体は比較的効率よく励起可能であり、蛍光体を種類ごとに分離検出するためには相互に30 nmくらい離れた方がよい。このため1つの光源で励起できる蛍光体は2~3個となる。そこで多色計測にはいくつかのレーザーと蛍光体を組み合わせて用いるのがよい。

従来、計測に用いられてきたのは空冷Ar<sup>+</sup>レーザー(488 nm, 515 nm)など小型のガスレーザーである。これはAr<sup>+</sup>レーザーで励起でき水溶性で生体関連物質と結合可能な蛍光体が多くあり、容易に入手できるからである。最近、小型で低価格の黄色He-Neレーザー(594 nm)が市販され、これとTexas Redを標識蛍光体として用いるシステムや、新しい蛍光体Cy-5と赤色He-Neレーザー(633 nm)を組み合わせたシステム、あるいは赤色半導体レーザー(780 nm)と近赤外蛍光体を用いた小型のシステムが実用化され始めている<sup>8)</sup>。しかし、これら赤色レーザーでは使える蛍光体の種類も限られており、高性能な小型計測装置の実現には青緑半導体レーザーが望まれる。例えば460 nmのレーザーが開発されるとYAG倍波(532 nm)および赤色レーザー(630 nm)と組み合わせ、7色以上の蛍光体の使用が可能となり、種々試料の同時比較検出が可能になる。この場合YAG倍波レーザーの低価格化も必要である。また、500 nm前後のレーザーはAr<sup>+</sup>レーザーの代りとし

て広く使用可能であり、600 nm前後のレーザー(He-Neレーザー594 nmなど)と組み合わせて5~6種の蛍光体励起に有効である。540~550 nmの低価格レーザーができれば630 nmあるいは660 nmの赤色半導体レーザーと組み合わせ低価格DNAシーケンサーの開発が可能である。

このように400~600 nmの波長帯のどの波長のレーザーが開発されても多波長蛍光計測の範囲を広げるもので歓迎される。Ar<sup>+</sup>レーザーからHe-Neレーザーに代っただけで重量が120 kgから30 kgへ、容積が1/3になった。装置のいっそうの小型化低価格化は単にレーザーが小型低価格になっただけでは実現しない。しかし、CCDを中心とする検出素子の発達と前述したキャビラリーアレイのように泳動部、および泳動電源を小型にし得る技術の発達で光源さえ小さくなれば、重量・容積でさらに1/3程度にでき、生化学分野で待ち望まれている簡便なDNAテスターともいえる小型のDNA計測装置が実現し得るところまでできている。

### 文 献

- U. Landegran, R. Kaiser, C. T. Caskey and L. Hood: "DNA diagnostics-molecular techniques and automation," *Science*, **242** (1988) 229~237.
- A. Chranback, M. J. Dunn and B. Radola, eds.: *Advances in Electrophoresis 6* (VCH Publishers, New York and Weinheim, 1993).
- D. L. Taylor, A. S. Waggoner, R. F. Murphy, F. Lanni and R. Birge, eds.: *Application of Fluorescence in Biological Sciences* (Alan R. Liss, Inc., New York, 1986).
- L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent and L. E. Hood: "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis," *Nature*, **321** (1986) 674~679.
- S. Takahashi, K. Murakami, T. Anazawa and H. Kambara: "Multiple sheath-flow gel capillary-array electrophoresis for multicolor fluorescent DNA detection," *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1021~1026.
- H. Kambara, K. Kawamoto and K. Nagai: "Photo-destruction of fluorophores and optimum conditions for trace DNA detection by automated DNA sequencer," *Electrophoresis*, **13** (1992) 542~546.
- R. Y. Tsien and A. Waggoner: "Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry," *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, ed. J. Pawley (Plenum Press, New York, 1990) pp. 169~178.
- L. R. Middendorf, J. C. Bruce, R. C. Bruce, R. D. Eckles, D. L. Grone, S. C. Roemer, G. D. Sloniker, D. L. Steffens, S. L. Sutter, J. A. Brumbaugh and G. Patonay: "Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus," *Electrophoresis*, **13** (1992) 487~494.

(1995年6月30日受理)