

DNA 解析と光技術

牧野 徹・狩野 恭一

ヒトゲノムは 30 億対の DNA から構成されていて、今後 2~5 年以内にすべての配列が明らかになると予想されている。同時に数百にもおよぶヒト以外の哺乳類、植物、細菌やウイルス等のゲノム配列も決定されようとしている。分子生物学者らは多数の完全な遺伝子配列を手に入れることになるだろう。また、決定された配列情報の機能解析を目的とするポストゲノムのフェーズでは多様な生物の全遺伝子機能解析の国際的競争がすでに始まっている。この競争は非常に多くの解析をどのような手段で迅速に行うかを意味している。このような多数の解析はいかにしてなし得たらよいのであろうか。

分子生物学の進歩を基盤とした革新的分析装置とゲノムインフォマテックス技術（コンピューターとデータベースによって遺伝子機能をネットワークとして理解するための技術）によって、10 万ともいわれている多数の遺伝子の機能を迅速に解析することが可能となる。具体的にはポストゲノムプロジェクトにおいて革新をもたらし、さまざまな条件下において細胞内ではいかなる遺伝子群が発現、抑制されるかを定量的解析する手法である、遺伝子発現解析（gene expression analysis）を実用化するものである。このような方法論を可能にした決定的な技術は、DNA チップや DNA マイクロアレイ技術と微弱蛍光検出に適した共焦点レーザースキャニングシステムである。

DNA 解析技術の研究、開発が目指す当面の課題は、大量生産されたシーケンスデータ（配列情報）をもとに、そこに書き込まれた情報を解読し、新規遺伝子の機能解析やさらにはそれら遺伝子が全体として相互に関連しながら形成する遺伝情報との関連性を推定・検証するために有効な

ツールを研究者に提供することである。本稿では、DNA チップに代表されるチップテクノロジーにとって必須の、微弱蛍光検出の現状と今後の発展動向について解説を行う。

1. チップテクノロジーの現状

DNA チップまたは DNA マイクロアレイとは、小型のシリコンもしくはガラス基板上に多種・多数の DNA オリゴ鎖や cDNA (complementary DNA) 等 (cDNA 断片である expression sequence tag: EST や open reading frame: ORF などのポリヌクレオチドを含む) が集積されたものであり、半導体のリソグラフィ技術やマイクロドット技術によって作製される。厳密には DNA チップと DNA マイクロアレイとは作製方法が異なるために区別する必要があるが、いずれも形態的には相同であるため、ここでは DNA チップと DNA マイクロアレイを合わせて DNA チップと呼ぶことにする。

DNA チップは DNA シーケンシングをハイブリダイゼーションによって高速決定する方法 (sequencing by hybridization: SBH)¹⁾ により実現する手段として考案され、期待もされていた。しかし、実際には高速シーケンシングよりも変異解析、遺伝子発現解析、多型解析への応用に使われていることが多いのが現状である。

DNA チップによる DNA 解析はどのような流れで行われているのかを説明する。図 1 に示すように解析対象をもとに作製したライブラリー (cDNA, EST ライブラリー等) をシリコンまたはガラス基板上に固相化していく。図 2 は現在使用中の DNA アレイヤーであるが、チップ上にライブラリーサンプルを点着する装置である。このような装置を用いることによって数千種類の DNA を固相化できる。次に発現頻度解析の場合は細胞、組織等から mRNA (mes-

オリンパス光学工業株式会社バイオメディカルリサーチセンター
(〒192-8512 八王子市久保山町 2-3)
E-mail: t-makino@ot.olympus.co.jp

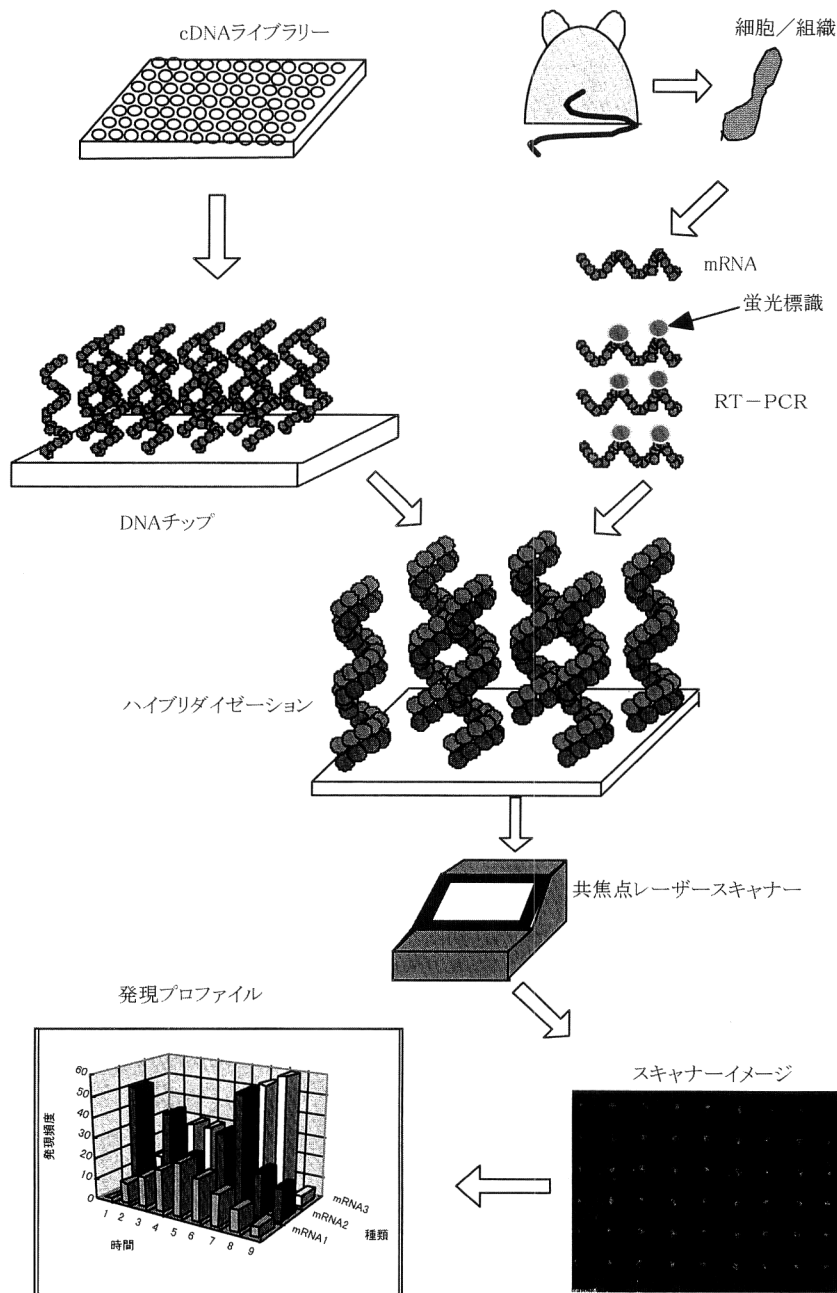


図1 DNAチップによるmRNA発現頻度解析例。発生・分化の過程，疾患によって発現レベルが変動する遺伝子の発現頻度はDNAチップ技術を用いることによって網羅的に解析できる。

senger RNA) を抽出し，逆転写PCR (polymerase chain reaction) 反応等によって蛍光プローブdNTP (deoxynucleotide triphosphate) を組み込みながらのPCR増幅を行う。ここで先に作製したDNAチップ上でハイブリダイゼーション反応を行い，DNAチップ検出器で蛍光測定を行う。得られた蛍光データは専用の画像処理ソフト (ImaGene™ など) で処理され，擬似カラー表示されることが多い。

DNAチップを用いた遺伝子発現解析の典型的な応用と

しては，2蛍光標識による相対的発現頻度差の解析がある。具体的な例として，正常肺組織と肺腫瘍組織とに発現しているmRNAの発現頻度差を解析する場合をみてみよう。正常，腫瘍組織からmRNAを調製し異なる蛍光色素 (Cy3やCy5を用いることが多い) で標識する。DNAチップ (図3(a)) 上で競合的ハイブリダイゼーションを行って，両方の蛍光を測定し比較を行う。同一の遺伝子スポット上で競合的ハイブリダイゼーションが行われるため，各々の蛍光スポットを測定して画像解析を行うと図3(b)

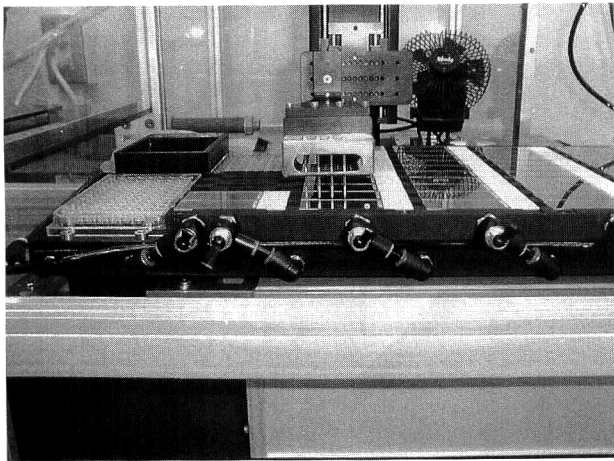


図2 DNAアレイヤー. Catesian 社 PixSys 7500 システム. 150 μm のドットサイズが可能である.

に示すような擬似カラー画像が得られる. 図3(b)において, 正常組織, 腫瘍組織で発現量の多い遺伝子スポットはそれぞれ緑, 赤色に表示される. 発現量が等しい場合には黄色に表示される. 以上のように, DNAチップ上の蛍光スポットのパターンを計測することによって, 正常組織と腫瘍組織のどちらか一方もしくは両方に発現している mRNA の種類を相対的ではあるが知ることが可能である. DNAチップ上に集積する DNA の種類が1万種類あるならば, 一度に1万種類すべての比較解析を行うこともできる.

DNAチップ解析は図4に示されるような共焦点レーザー光学系による蛍光スキャンニング装置で行われる. 共焦点レーザー光学系は, 高感度で定量性にすぐれた方法であるが, 最も重要な利点は共焦点検出を行うことによってバックグラウンドに存在するさまざまな蛍光性汚染物質 (エアロダスト, 繊維クズ, 手の油など) からの蛍光が除けることである. DNAチップ上のスポットは非常に薄く, わずかに10 μm 程度であるため, 共焦点検出によるバックグラウンドノイズ除去効果は非常に高い.

DNAチップ上のスポットは25~200 μm の直径を持ち, 平均すると100 μm 程度で, 蛍光強度のダイナミックレンジは 10^{-9} ~ 10^{-14} W くらいある. 測定領域はスライドガラスを基板としたもので25 \times 75 mm と大きく, この領域を5~10 μm の分解能でスキャンする必要がある. このようなDNAチップを共焦点レーザースキャンニングシステムで読み取る場合の問題点は, スキャンニング方式と集光レンズの性能である. 検出器を CCD カメラにした場合はスキャンする必要がないため機構は簡便になる. 必要とされる CCD カメラのピクセルサイズとしては, スポットサイズを100 μm とすると5~20 μm である. しかし, 十分な

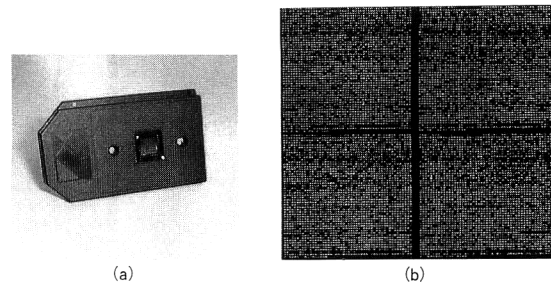


図3 DNAチップと検出結果. (a) Affymetrix社のGeneChip™. 約65,000種類のオリゴプローブが光リソグラフィ法によってシリコン基板上に合成されている. (b) 検出は共焦点レーザーシステムで行っている.

精度で測定するためにピクセルサイズは経験的には計算値の1/6~1/10程度が望ましい. また CCD カメラの場合, スポット領域全体を観察することになるので, 集光レンズの開口数 (NA) は小さくなり, さらに S/N を上げるため冷却型 CCD カメラを用いることが必須となる. 検出器が PMT (photomultiplier) である場合はメカニカルスキャンしなければならないが, PMT は本質的に CCD カメラよりも高感度で集光レンズの NA も 0.9 程度のものが使用できるので高感度検出が可能となる. したがって, 市販されている共焦点レーザーシステムほとんどがメカニカルスキャン方式で PMT を検出器としている.

現状では上記の検出システムで十分対応が可能であるが, 今後スポット密度が増してスポットサイズが小さくなった場合は, 空間分解能, 検出感度, スキャン時間なども従来のスキャナーよりも高いものが要求されるだろう. 次の章では次世代の検出システムの可能性があると考えられる光検出技術について述べる.

2. 新しい検出技術による高感度検出の可能性

不均一反応系である DNA チップ上でのハイブリダイゼーション反応は反応速度が遅いため, 反応容器内でのハイブリダイゼーション反応に比べて数十分の一も反応効率が悪く, 高い蛍光検出感度が要求される. 市販されている共焦点レーザーシステム感度は0.1~1分子/ μm^2 が一般的で, スポットサイズを100 μm とすると800~8000 DNA 分子を測定することになる. 実際には反応効率が1%程度であるから 8×10^4 ~ 8×10^5 分子くらいの分子数が反応溶液中に必要である. したがってそれ以上の高感度検出が必要な条件下では共焦点レーザーシステムでは不十分になると予想される.

次に今後高感度計測が期待される, 蛍光相関分光法と表面増強ラマン散乱法によるDNA検出技術について述べる.

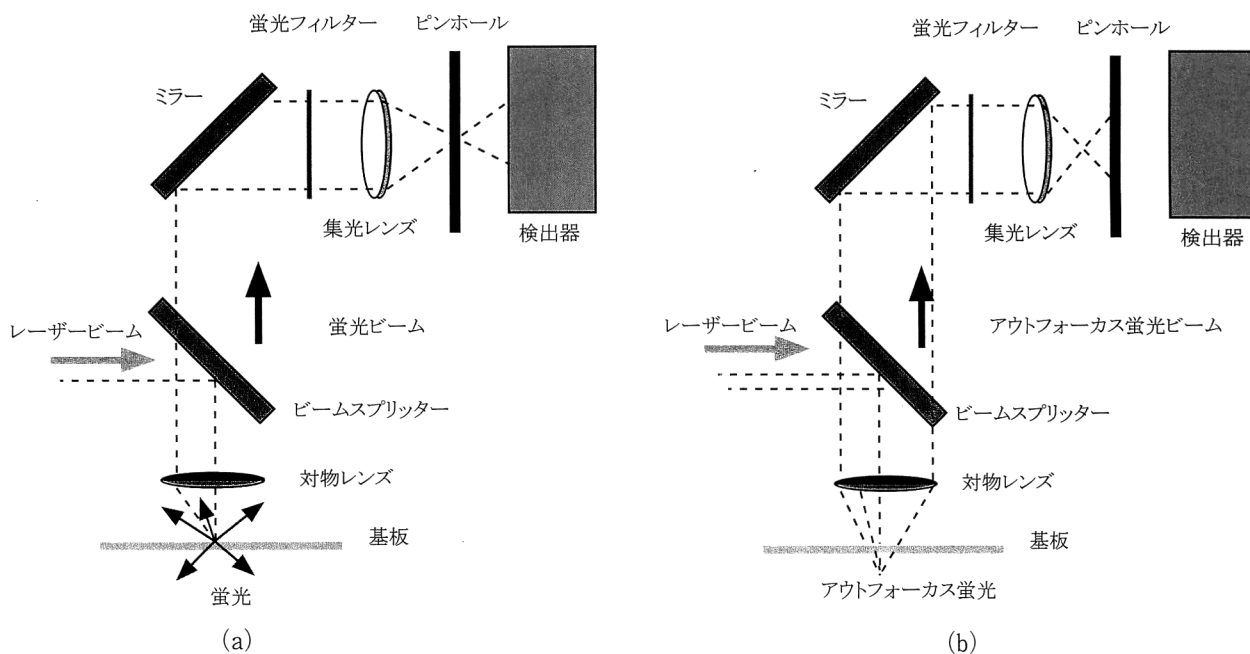


図4 共焦点レーザースキャナー光学系。(a) 蛍光スポットにフォーカスしたとき蛍光ビームはもっとも効率よく検出器に到達できる。(b) アウトフォーカスの場合、バックグラウンド蛍光の影響が除去される。

2.1 蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy: FCS) による DNA 検出

極微小領域に存在する数個～数十個の蛍光分子を測定する技術として、最近蛍光相関分光法が注目されている。基本的な原理と実験は70年代にすでに報告^{2,3)}されていたが、分子生物学分野への応用は数年前から Rigler^{4,5)}らによって行われている。FCSは観察領域内での単一分子検出を物理的分離過程なしにリアルタイムで行うことができる特徴があるため、注目されている。FCSは極微小領域に存在する少数の蛍光分子のブラウン運動に伴う蛍光ゆらぎから、分子の数、大きさを測定する方法である。

蛍光相関分光装置の模式図を図5(a)に示す。構成としては共焦点レーザ顕微鏡とほとんど同じで、共焦点領域からの蛍光発光をAPD (avalanche photo diode) 等の高速高感度検出器で受光したのち、デジタル相関器によって自己相関をもとめて解析するものである。溶液中の測定領域は図5(b)に示すように円柱状となり、大きさは直径(W)が約400 nm、軸長(Z)が約2 μm 、体積はフェムトリットル (10^{-15} l) の領域となる。フェムトリットル領域には10 nM濃度のときで、平均6個 ($10^{-15} \times 10^{-8} \times 6 \times 10^{23}$) の分子しか存在しないことになる。しかしこのフェムトリットル領域で蛍光分子は図5(b)に示したように絶えずブラウン運動によって出入りしているため、分子数は一定しておらずゆらいでいる。したがって蛍光分子の数ゆらぎに伴って蛍光強度もゆらぐことになる。数ゆらぎと蛍

光強度ゆらぎの関係は分子の大きさと数とに関連づけることができる。具体的には蛍光強度ゆらぎの自己相関関数を計算することによって、図6のような自己相関関数グラフが得られる⁶⁾。図6に示すように、相関関数の値が大きくなるほど観察領域内の分子数は減少し、カーブのプラトー域が伸びるほど動きの遅い大きな分子であることがわかる。現在FCSを用いて、DNA鎖長の変化や酵素活性反応過程の解析等が多数報告されている。

上述のようにFCSはターゲット分子が自由運動するような場合においてはきわめて有効な方法であるが、DNAチップ上の固定されているDNAハイブリッドの検出に応用することが可能と考えられる。DNAチップではこれまでみてきたように通常ターゲットDNAが固相化されていて、蛍光標識されたプローブDNAとハイブリダイゼーション後に洗浄を行い、乾燥状態で共焦点レーザースキャナーによる測定が行われる。一方FCSは蛍光標識プローブの反応時のブラウン運動によるゆらぎ測定であるために、ハイブリダイゼーション後の洗浄、乾燥過程を経ずにウェット状態での測定が可能である。FCSの物理的分離過程なしに測定できる特徴をDNAチップの検出にも生かすことができる。

溶液中の自由な運動ではなく固体表面へ固相化した単一DNA分子の構造変化解析⁷⁾や2次元平面での単一DNA分子検出に関する研究が現在盛んに行われている。これらの検出メソッドが確立することによって、FCSが将来集

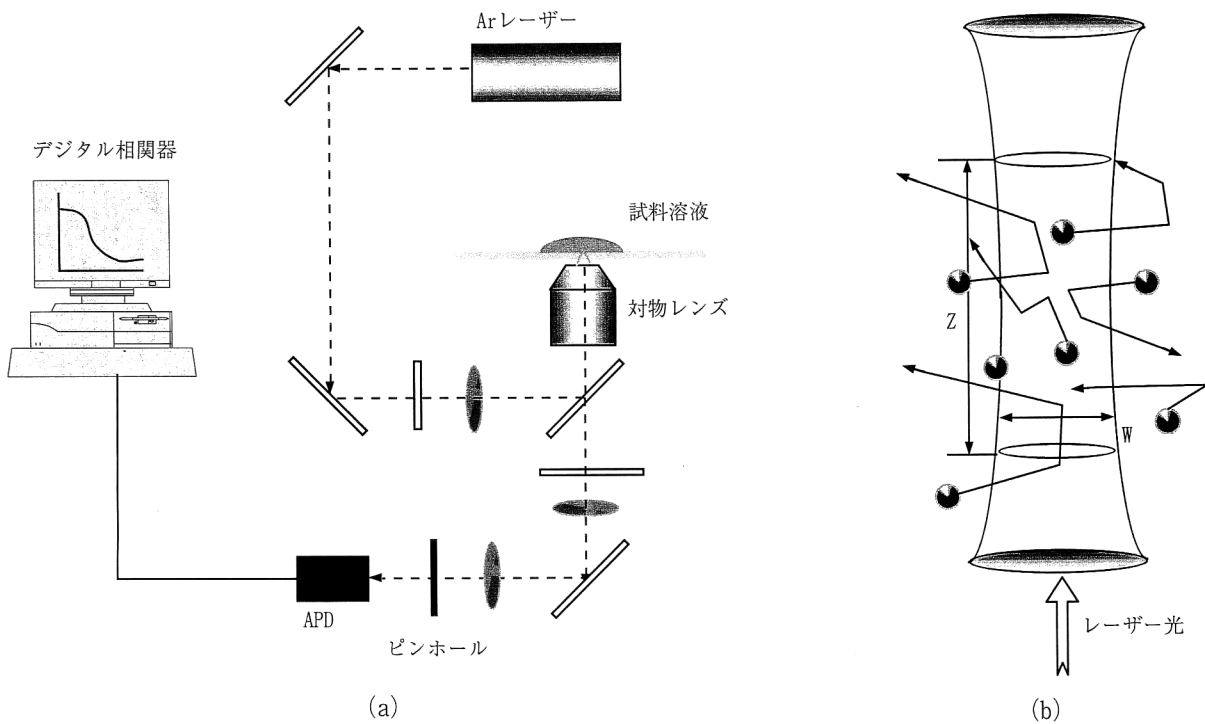


図5 FCS光学系。(a) FCS検出システムの模式図。(b) 測定領域の模式図。40倍の対物レンズを使用したとき、測定領域は軸長 Z 、直径 W で表される。蛍光分子 (●) はブラウン運動によって測定領域内を出入りする。

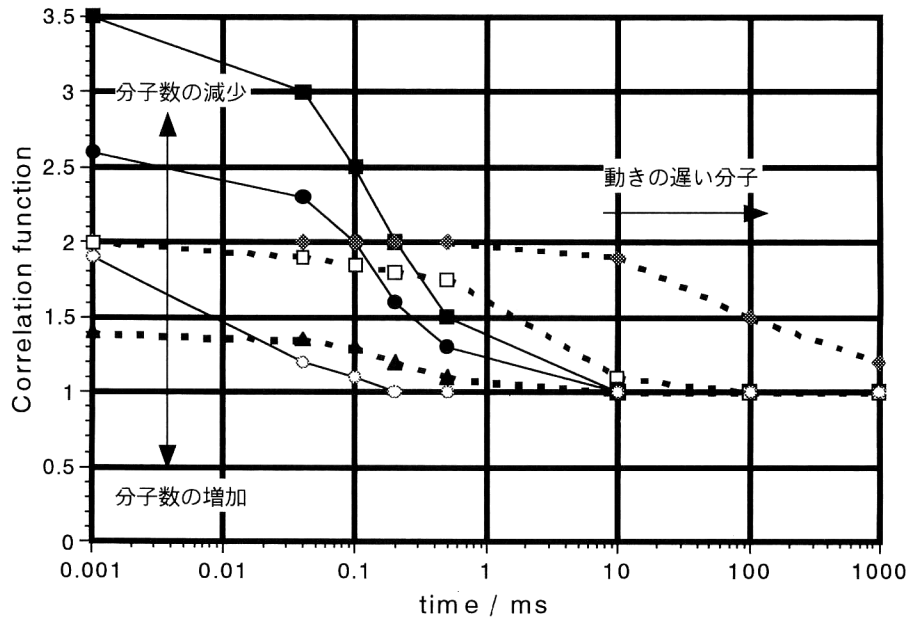


図6 自己相関関数とゆらぎの関係。実線は観察視野内に存在する平均分子数変化を表している。平均分子数が減少すると自己相関関数の振幅は増加する。点線は観察している分子の大きさの変化を表している。分子の大きさが大きくて拡散速度が減少すると自己相関関数曲線は右側にシフトする。

積化された DNA チップ検出方法の有力候補になると考えられる。

2.2 表面増強ラマン散乱法 (surface enhanced Raman scattering: SERS)

一般のラマン散乱は、光が粒子にあると粒子の振動に

よって散乱波長が入射波長からシフトする散乱現象であり、粒子を構成する物質によりシフト量が異なるため物質の同定、物性変化等が検出できる。しかしながらラマン散乱は、入射光強度に対して蛍光の場合は強度が 10^{-16} であるのに対して、約 10^{-30} と非常に弱いことが知られてい

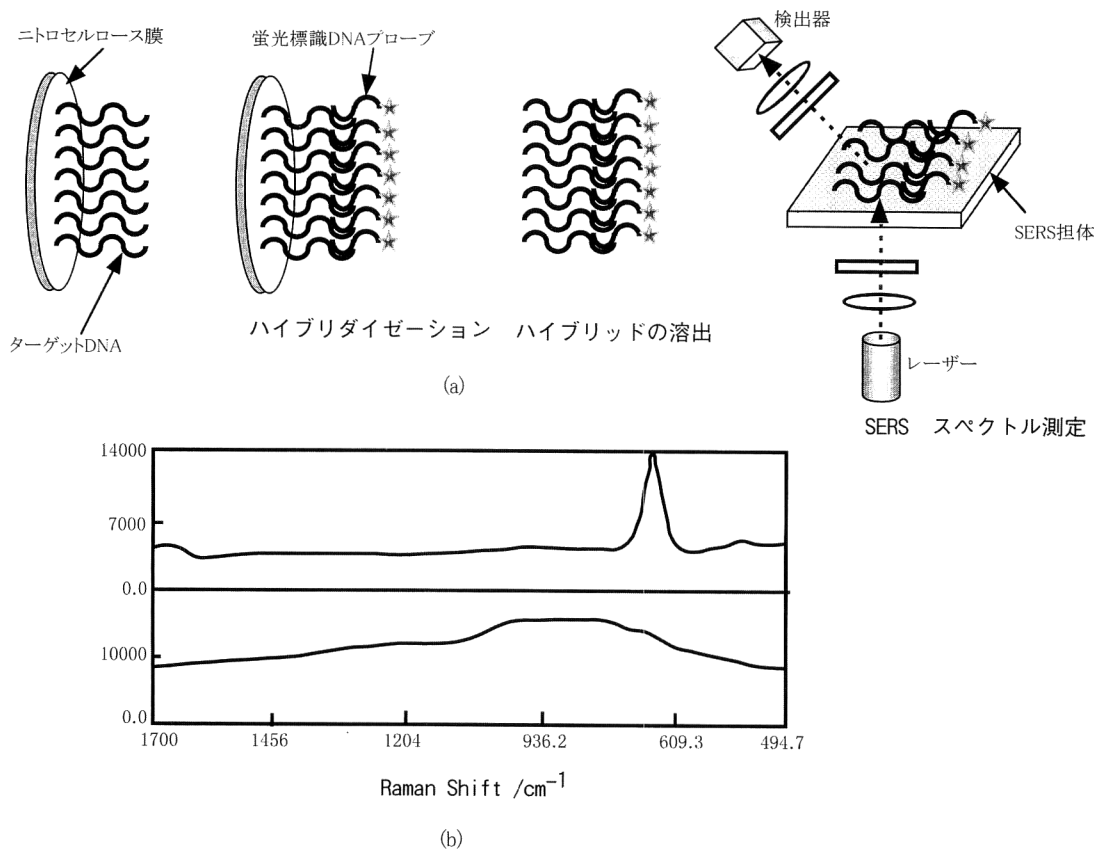


図7 SERS法によるDNAハイブリッド測定。(a) 蛍光標識したDNAハイブリッドはガラス基板にアルミナ粒子および銀蒸着した担体上でSERSスペクトル測定する。(b) DNA測定結果の例。図の下側はDNAハイブリッドを乗せていない担体からのSERSスペクトル。DNAハイブリッドが存在する場合、 609.3 cm^{-1} 付近に鋭いピークを生じた。

る。ところが対象物質に 100 nm 程度の粒径の銀粒子を付加することによってラマン散乱強度を 10^{14-15} も増強できる。この現象を表面増強ラマン散乱と呼んでいる。表面増強ラマン散乱をバイオ分野へ応用した報告はすでに1980年代 Vo-Dihn⁸⁾ らによってなされているが、最近になって Nie⁹⁾, Vo-Dihn¹⁰⁾ らによって単一分子検出技術としてDNAハイブリッドへの応用が報告されている。Vo-Dihnらが検討したDNAハイブリダイゼーション検出を図7(a)に示す。

SERS法によるDNAハイブリッドの測定を行うためにはSERS担体を用いる必要がある。SERS担体とは、アルミナ粒子を分散させた水溶液をスライドガラス上に薄く塗布した後、膜厚 100 nm の銀を蒸着したものである。はじめに、ニトロセルロース膜に固相化したcDNAと蛍光標識DNAプローブとのハイブリダイゼーションを行う。次にニトロセルロース膜からDNAハイブリッドを 0.1 N NaOH を含むSSC (sodium chloride, sodium citrate) 溶液で洗浄して遊離させる。DNAプローブとのハイブリッド溶液をSERS担体に滴下してSERS測定を行うと図7(b)のようなラマン散乱スペクトルが得られる。明らか

にDNAハイブリッドに依存したピークがみられる。

NieらはSERS法でDNAハイブリッドを検出するための最適条件の検討を行っている。Vo-Dihnらは平板状のSERS担体を使っていたが、Nieらは直径 100 nm 程度の粒子を担体とすることで 530 nm の入射波長でラマン散乱が増強することを見いだした。この条件下で 10^{14-15} の増強効果を得ている。さらに、ラマン散乱増強効果は銀粒子の形状にも依存する結果を得ている。彼らによれば、入射光の偏光状態と銀粒子の形態がラマン散乱の増強効果に変化を生じさせることを見いだした。棒状粒子の場合は、 $s \cdot p$ 偏光軸と棒状粒子の長軸方向が一致するときには散乱強度は増すが、偏光軸と棒状粒子の短軸方向が一致した場合は増強効果が生じない結果を得た。

表面増強ラマン散乱法によるDNA測定はまだ緒についたばかりであるが、1990年代後半になって報告例が増えてきている。ラマン散乱測定では蛍光測定と異なり吸収、蛍光波長のバンド幅が非常に小さいため (1 nm 以下の場合もあるが十分分解可能である)、少なくとも 2000 cm^{-1} のスペクトル間隔があれば 1000 個のスペクトルを分離することが可能である。このことは、 10 個程度のスペクトル

ルのオーバーラップがあったとしても 100 個のスペクトルを区別することができるため、100 種類の DNA プローブを同時に解析できることを意味している。

3. 今後の展望

DNA チップ技術は、ポストゲノムプロジェクトにおいて必要不可欠の技術と位置づけられている。現状では、DNA チップ作製装置や検出装置なども外国製品がほとんどで、国産品は数社にとどまっている。しかしながら、チップテクノロジーの基本となる要素技術は、かつて日本が世界をリードした半導体製造関連技術に近いものである。今年の 1 月に「バイオテクノロジー産業の創造に向けた基本方針」が 5 省庁合意のもとで閣議決定されたように、わが国も本格的にバイオ分野に取り組むことになった。近い将来、チップ製造技術はむろん、検出技術に関しても世界をリードするような技術が提案されることを期待したい。

本研究開発は産業科学技術研究開発の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構から委託を受けて実施したものである。

文 献

- 1) R. Drmanac, I. Labat, I. Brukner and R. Crkvenjakov: "Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: Theory of the method," *Genomics*, **4** (1989) 114-128.
- 2) M. Ehrenberg and R. Rigler: "Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations," *Chem. Phys.*, **4** (1974) 390-401.
- 3) D. Magde and W. W. Webb: "Fluorescence correlation spectroscopy. III. Uniform translation and laminar flow," *Biopolymers*, **17** (1978) 361-376.
- 4) M. Eigen and R. Rigler: "Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** (1994) 5740-5747.
- 5) R. Rigler: "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology," *J. Biotechnol.*, **41** (1995) 177-186.
- 6) 金城政孝: "蛍光相関分光法による 1 分子検出", *蛋白質 核酸 酵素*, **44** (1999) 1431-1438.
- 7) S. Wennmalm, L. Edman and R. Rigler: "Conformational fluctuations in single DNA molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (1997) 10641-10646.
- 8) T. Vo-Dihn, M. Y. K. Hiromoto, G. Begun and R. L. Moody: "Surface-enhanced Raman spectrometry for trace organic analysis," *Anal. Chem.*, **56** (1984) 1667-1670.
- 9) S. Nie and S. T. Emory: "Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering," *Science*, **275** (1997) 1102-1106.
- 10) T. Vo-Dihn, K. Houck and L. Stokes: "Surface-enhanced Raman gene probes," *Anal. Chem.*, **66** (1994) 3379-3383.

(1999 年 7 月 19 日受理)