

# バイオチップを利用した分析法

## — DNA チップを中心に —

竹 中 繁 織

1枚の小さなチップ上で、莫大な数の遺伝子やタンパク質を迅速に解析できる時代になってきた。基礎研究では簡便な分析ツールとして、臨床現場では診断用として、高性能なバイオチップの開発が求められている。ここでは、DNAチップを中心に測定原理と技術動向を解説し、プロテインチップから糖鎖チップまで広がるチップテクノロジーの現状を概観する。

バイオチップを利用すれば、サンプル中に存在する分析対象物の多種類同時分析（ハイスループット分析）が可能となる。バイオチップの中でDNAを分析対象とするDNAチップは、細胞刺激によって発現量が変化する遺伝子群や、がんに関係する遺伝子群の同時解析などを可能にしてきた。また、病気や薬の副作用に関係する遺伝子群を、迅速かつ簡便に検出する診断用DNAチップも発展してきている。現在、DNAチップの概念を拡張したプロテインチップや糖鎖チップの研究

も行われるようになってきた。ここでは、これらのバイオチップの調製法と原理について、DNAチップを中心に化学者の立場から解説する。

### DNAチップの原理と現状

バイオチップは、分析対象物（ターゲット）と相互作用する分子（リガンド）を基板上に固定化したものである。基板上に固定化されたりガンドにターゲットがどれだけ結合したかを調べることによって、サンプル中に含まれるターゲットの分析が可能となる。多種類の異なったリガンドを基板上に集積化することによって、サンプル中の多種類のターゲットを同時に分析できるようになる（ハイスループット分析）。ここでは、バイオチップのリガンドとしてDNAを固定化し

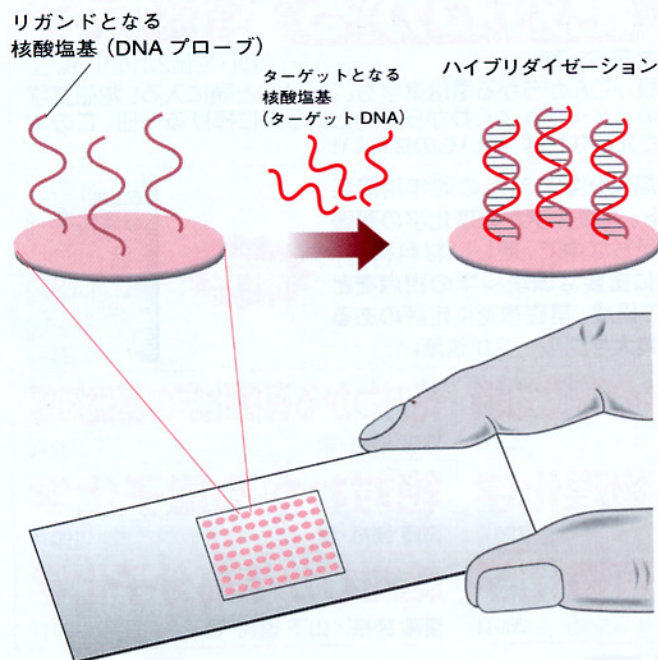
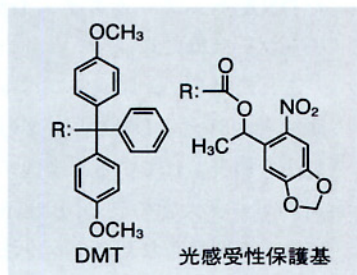


図1 DNAチップを用いた遺伝子分析の原理

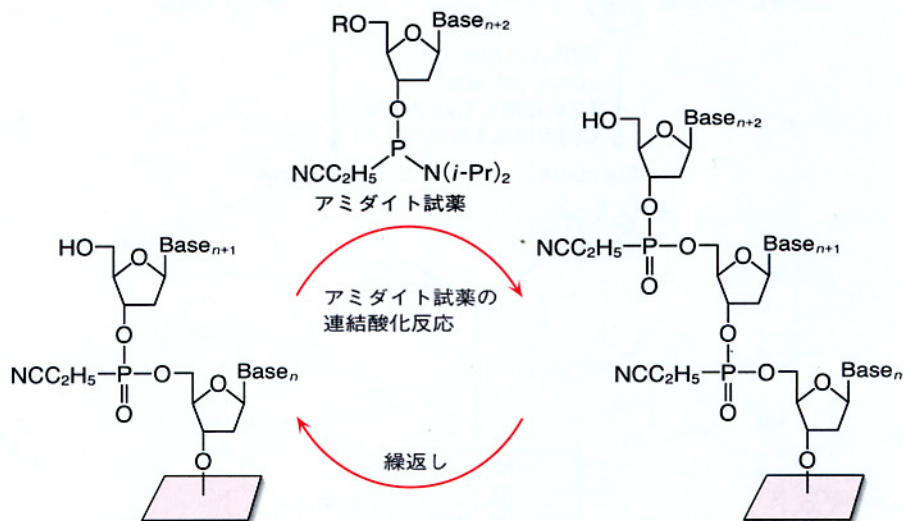
表1 DNAチップの作製法

DNAチップ作製法		会社などの例
基板上でのDNA合成	物理的マスク	Oxford Gene Technologies社 (英)
	フォトリソグラフィーを利用した方法	Affymetrix社 (米)
	デジタルマイクロミラーデバイスを用いた方法	Febit biotech gmbh社 (独)
	インクジェットを利用した方法	Agilent Technologies社 (米)
	電気化学的手法	CombiMatrix社 (米)
調製したDNAを基板へ固定化する方法	スポット法	P. O. Brown (スタンフォード大)
	インクジェット法	Cartesian Technologies社 (米)
	バブルジェット法	キャノン (日本)



通常用いられる5'-ヒドロキシ基の保護基DMTの代わりに光感受性保護基を用いることによってDNAチップが調製される。

図2 基板上でのホスホアミダイト法によるDNA合成の原理



たDNAチップを中心に解説する。

DNAチップの概念を図1に示した。DNAは、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)とよばれる四つの核酸塩基が結合したデオキシリボースが、リン酸エステル結合によってつながった直線状高分子(一本鎖DNA)であり、この核酸塩基配列が遺伝情報を担っている。AとT、GとCとの特異的水素結合によって一本鎖DNA同士が巻きついて、二重らせん構造をもつ直線状高分子(二本鎖DNA)を形成する。AとT、GとCとの特異性は高いので、ターゲットのDNA配列と相補するDNA断片(DNAプローブ)をリガンドとして用いることにより、ターゲットDNAの有無を分析することができる。二本鎖DNAの形成(ハイブリダイゼーション)は、ターゲットDNAとDNAプローブとの共存下で加熱して、ゆっくりと冷やすだけで達成される。集積化DNAプローブを利用すれば、サンプル中にどのようなDNA群がどれだけ存在しているかを分析できる。また、DNAチップの集積を高密度化することによって、サンプル量を少なくできるメリットがある。DNAチップ技術が提案されてからほぼ10年になり、DNAチップの作製法とDNAチップを用いた分析法は、かなり集約されつつある。

### DNAチップの作製法

まず、DNAチップの作製法について述べる。これまで報告されてきたDNAチップの作製法を表1にまとめた。基板上の特定の場所でDNAを合成する方法と、合成したDNAを基板上の特定の場所に固定化する方法とに大きく分けられる。基板上でのDNA合成は、DNAの自動合成に用いられる

ホスホアミダイト法を利用して行われている。図2に基板上でのホスホアミダイト法によるDNA合成の原理を示した。ここで合成される比較的短いDNA断片は、オリゴヌクレオチドとよばれている。

DNA合成は、基板上のDNAの5'末端のヒドロキシ基にアミダイト試薬を連結させたのち、新たに生じた5'末端のヒドロキシ基に順次アミダイト試薬を連結させることにより行われる。この反応を基板上の特定の微小面積で行うことにより、高密度のDNAチップが調製されている。

DNAプローブ溶液のスポッティング用のピン

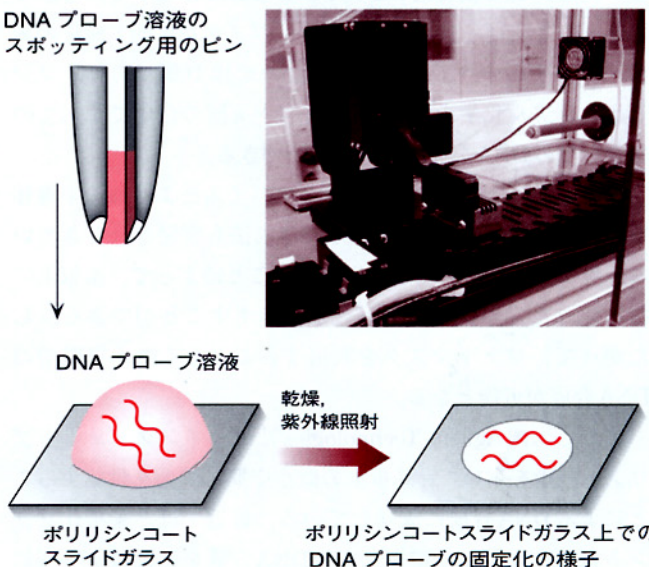


図3 スポッティングによるDNAの基板上への固定化の概念とDNAマイクロアレイ



ブの蛍光イメージングが行われている (図4)。DNAサンプルへの色素の導入は、酵素的に色素の導入されたウリジン三リン酸 (Cy3-dUTP または Cy5-dUTP) を DNA サンプルに取込ませることによって行われている。Cy3 と Cy5 とによる蛍光標識は、競合ハイブリダイゼーションによる遺伝子の発現解析において多用されている (図4)。この方法は、基準となるコントロール細胞と調べたいテスト細胞の間の遺伝子発現の違いを、細胞中に存在する mRNA の種類と量によって分析する手法である。図4に示したように、まずコントロール細胞から得られた mRNA を、安定な cDNA (相補的 DNA) へ変換するときに Cy3 を導入する。また、テスト細胞からの cDNA 調製の際に Cy5 を導入する。同じ細胞数から同じ操作によって得たそれぞれの cDNA を等量混合して、DNA チップ上でハイブリダイゼーション反応を行う。もし、コントロール細胞とサンプル細胞とで発現量が同じ遺伝子であれば、その cDNA は Cy3 と Cy5 とが等量混合されたものに対応する蛍光シグナルが得られる。しかし、サンプル細胞がコントロール細胞に比べ発現量が多い場合は Cy5 の蛍光量が強くなるし、逆に発現量が少ないと Cy3 の蛍光シグナルが強くなると考えられる。したがって、DNA チップ上の二つの蛍光強度の相対的な変化を調べることで、サンプル細胞中の遺伝子の発現パターンを知ることができる。このような競合ハイブリダイゼーションによる遺伝子の発現解析は、基板上への DNA プローブの定量的固定化が達成されていないスポット式 DNA チップに対して有効である。

一方、基板上で DNA を合成する DNA チップでは、比較的定量的に DNA プローブ量の制御が達成されているので、単一の蛍光色素を利用した解析が行われている。たとえば Affymetrix 社の DNA チップでは、蛍光色素としてフィコエリスリンを利用している。

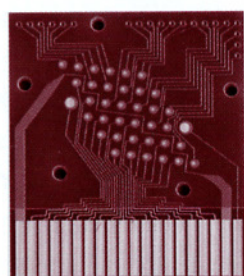
この DNA チップ検出においては、ビオチンとアビジンの特異的な結合を利用する。まずビオチン導入ウリジン三リン酸 (dUTP) によりビオチンを DNA サンプルに取込ませる。つぎに DNA チップ上に固定化されたビオチンに対してフィコエリスリンを標識したストレプトアビジン

ンと作用させることによって蛍光標識を達成している。

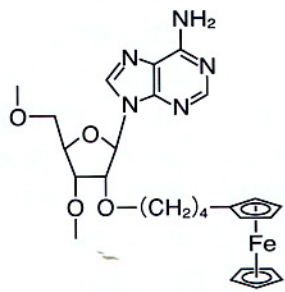
### DNA チップを用いた遺伝子解析

蛍光標識 DNA サンプルのハイブリダイゼーション後の DNA チップにおける蛍光画像から、どのような遺伝子がどれだけ存在するかといった情報が得られるが、これらのデータがどこまで信頼性があるか、また遺伝子のどのような変化が見られているかを整理する必要がある。高密度 DNA チップを利用すると莫大なデータが得られるため、この整理にはコンピューターの利用が不可欠である。この解析法はバイオインフォマティクスの一つの分野として発展している。

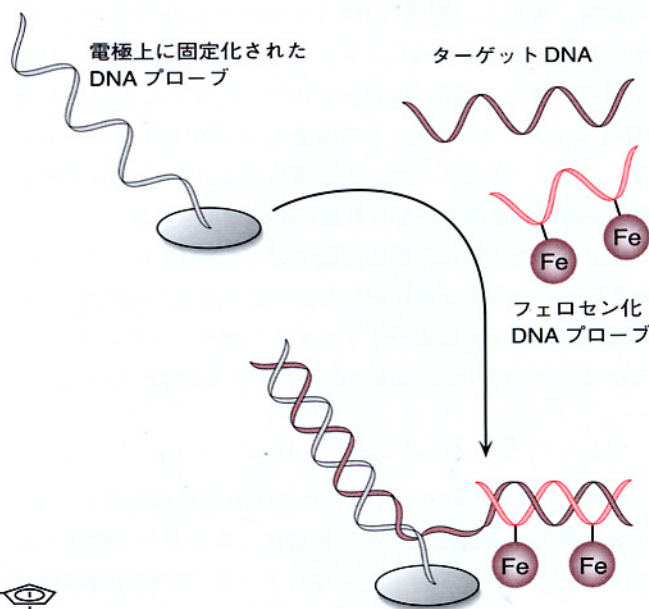
二本鎖 DNA の形成は、DNA プローブと相補鎖をもつサンプル DNA によって行われることは先に述べた。しかし、その配列の一部が異なった (たとえば一塩基だけ異なった) 場合においても、条件によっては二本鎖形成が行われる。この場合に形成された二重らせん DNA はミスマッチ塩基対をもつことになる。これは、完全な二重らせん DNA (フルマッチ DNA 二重らせん) に比べ若干安定性は劣る。このフルマッチとミスマッチ二重らせん DNA の熱的安定性の差を利用した DNA 配列の変化 (遺伝子変異) の解析が、DNA チップを用いて行われている。特に、一塩基の違いは SNP (single nucleotide polymorphism, 一塩基多型) とよばれており、その分析は重要となってきた。SNP はヒトゲノムにおいて 100 万から 300 万カ所存在するといわれ、ヒトを



モトローラ eSensor (カタログより)

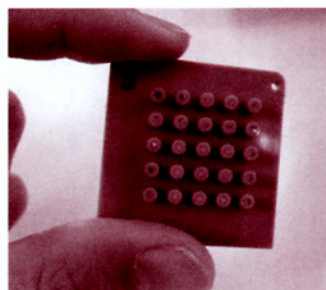
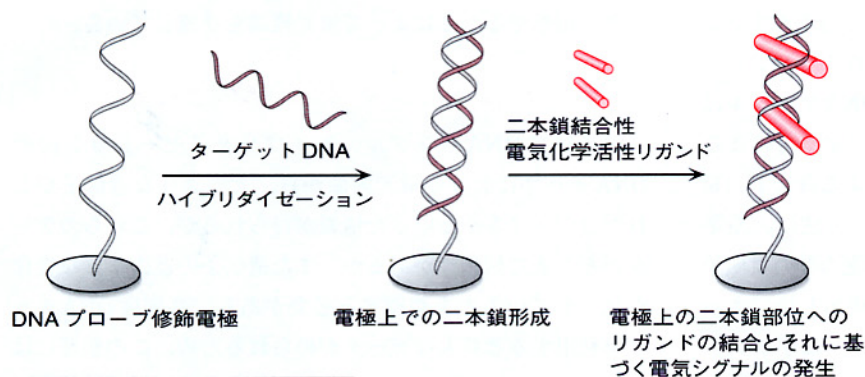


フェロセン化 DNA プローブの部分構造



サンドイッチ法によるターゲット DNA の検出 (ターゲット DNA のみ電極上の DNA プローブとフェロセン化 DNA プローブが結合する)

図5 フェロセン化 DNA プローブを利用した電気化学 DNA チップの例



ECA (Electro-Chemical Array) チップ  
(TUM ジーン社製)

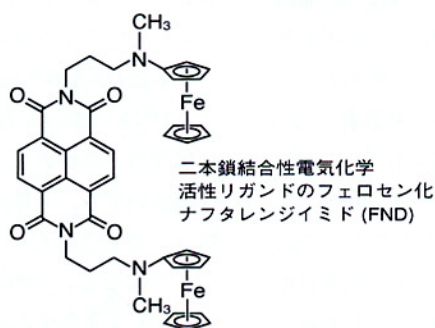


図6 DNA結合性電気化学活性リガンドとしてのFNDの構造と  
それを利用したDNAの電気化学的検出例

特定する遺伝子の高密度マーカーとしての利用が期待されているからである。最近では、個人の遺伝的背景による糖尿病や高血圧などの生活習慣病、個人による薬効の違いなどに関係したSNPが見いだされてきている。Affymetrix社は、複数個の類似した配列のDNAプローブとのハイブリダイゼーション反応を行うことによってSNP検出の精度を高めている。また、米国Nanogen社は、電極上に固定化したDNAプローブへDNAサンプルをハイブリダイゼーション後、フルマッチとミスマッチ二重らせんDNAとが負電場で電極から離れる際の差を利用してSNP検出を達成している。

以上述べたように、高密度に集積したDNAチップを用いた遺伝子の大規模な解析が最近ますます活発に行われ、がんに関する遺伝子の探索やインフルエンザウイルスのタイピングなど、数え切れないぐらいの研究例が報告されている。

### 臨床診断をめざした電気化学的DNAチップ

高密度DNAチップを利用した遺伝子解析の成果として、病気に関連する遺伝子や生活習慣病、薬効などに関連するSNPなど多くの情報もたらされている。これらの情報が将来のテーラーメイド医療に果たす役割は大きいものと期待される。これを実現する臨床診断用DNAチップにおいては、携帯可能なぐらいコンパクトな装置であると同時に、迅速かつ簡便に測定できることが必要である。これを実現

するものとして、電気化学的手法によりDNAを検出する電気化学DNAチップシステムが期待されている。これは、電気化学的検出システムだと装置を小型化できる可能性があり、電気化学的であれば計測濃度範囲が広く、装置的な増幅によりさらに高感度化が期待されるなどの理由による。先に述べたCombiMatrix社やNanogen社は、電極上へのDNAプローブの固定化法やSNP認識の高精度化をめざしたものであった。これに対して、電気化学的手法によるDNAチップの検出システムが現在活発に研究されている。これまでの研究例を大まかにまとめると、DNAチップ上で形成される二本鎖DNAへ直接的または間接的に電気化学的シグナル部位を導入し、その電気化学的応答量によって分析が行われている。たとえば、米国モトローラ社はフェロセン修飾DNAを用いて、図5に示すDNAプローブ修飾電極上でのサンドイッチ

アッセイにより電気化学的検出を達成している。ターゲットDNAが存在する場合のみ、フェロセン化オリゴヌクレオチドが電極上のDNAプローブを介して電極上に濃縮される。濃縮されたフェロセンの酸化還元電流を測定することにより、ターゲットDNA量を見積もることができる。

一方、二本鎖結合性の電気化学活性リガンドを利用したDNAチップの電気化学的検出が達成されている。図6に示したように、DNAプローブ修飾電極とサンプル中にあるターゲットDNAのハイブリダイゼーションによって電極上に二本鎖DNAが形成される。これに二本鎖結合性の電気化学活性リガンドを添加すると、電極上の二本鎖部位に濃縮される。この濃縮量をリガンドの酸化還元に伴う電流によって見積もることができる。図6に示したフェロセン化ナフタレンジイミド (FND) は、二本鎖DNAへ縫い込み型インターカレートすることにより、安定な複合体を形成することが知られている。これを利用すれば、バックグラウンドとなる未反応の一本鎖DNAのシグナルを軽減することが可能である。このタイプの電気化学的DNAチップは、DNAの溝結合性試薬であるヘキストを利用した東芝やFNDを利用したTUMジーン（現在は凸版印刷）によって商品化が行われている。

### DNAチップからプロテインチップへ

DNAプローブを基板上に高密度に集積化したものがDNA

チップであった。これによってサンプル中の多種類のDNAの同時解析が可能となった。これを拡張し、DNAプローブの代わりにペプチドやタンパク質を固定化することによりプロテインチップを調製できる。図7にプロテインチップの分類と応用例を示した。臨床診断で利用されている種々の抗体を固定化した抗体チップ、タンパク質やペプチドを固定化したチップ、酵素の基質を固定化したチップなどが知られている。これらのプロテインチップを利用することにより、タンパク質-タンパク質、抗原-抗体、タンパク質-薬物、酵素-基質などの相互作用がハイスループットで分析できると期待されている。また、特にペプチドチップは、抗体の認識するエピトープや特定のタンパク質に結合する抗体、さらにはプロテアーゼ阻害剤の探索に利用できると期待されている。このようにプロテインチップは、プロテオーム研究の重要なツールを提供すると期待されるが、現在発展途上である。この理由はDNAの場合に比べ、1) チップ上にタンパク質やペプチドなどを固定化する方法が確立していないことや、2) タンパク質の活性を損なわずに簡便に蛍光色素を導入する方法が確立されていないことによる。これまで知られている基板へのタンパク質の固定化法は、

- 1) DNAチップで行われていたポリリシンコートスライドガラスへの抗体のスポット（物理吸着）によるもの
- 2) ニッケル錯体で表面修飾された基板に対するオリゴヒスチジンタグを介したタンパク質の結合
- 3) アクリルアミドとポリエチレングリコールとのグラフトポリマーをコートしたスライドガラスのポーラス層内へタンパク質を取込ませる方法

などが知られている。米国シカゴ大学の M. Mrksich らによるポリエチレングリコール修飾自己組織化単分子膜（SAM）への化学結合による方法も知られている。最近、浜地格ら（京都大学）によって、小分子ゲル化剤を利用したタンパク質の固定化法が考案されている（本誌2005年2月号、p.55参照）。

また、DNAチップを利用してプロテインチップを作製する手法が報告されている。この手法は、図8のようにまずタンパク質またはペプチドとDNAとを連結したコンジュゲートを作製する。つぎにDNAチップ上にこのコンジュゲートを加えてハイブリダイゼーション反応を行う。これによってコンジュゲートは、DNAチップ上の相補的な部分と二本鎖を形成し、DNA配列に基づいた特定の場所に固定化されることになる。図8ではコンジュゲートC、DがDNAチップ上のA、Bとそれぞれ二本鎖を形成している。このようにコンジュゲートのDNAは、DNAチップの特定の場所にタンパク質を固定化するためのバーコードと考えることができる。こ

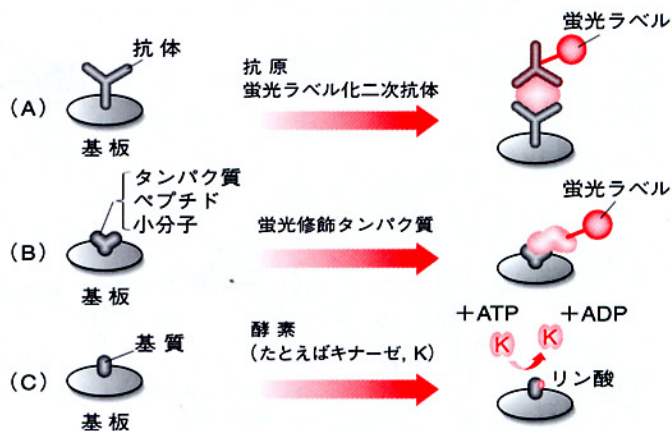


図7 プロテインチップの応用例

こで示した手法はDDI（DNA-directed immobilization）法とよばれている。この手法は、これまで確立されたDNAチップの拡張なので利用価値は高いものと期待される。しかし、DNAとタンパク質またはペプチドを連結する一般的な手法の確立が必要となる。

抗生物質のピュロマイシンを連結させたmRNAを用いてタンパク質を発現させると、発現タンパク質はmRNAとのコンジュゲートとなる。これを利用すれば、タンパク質-DNAコンジュゲートと同様な手法により、タンパク質をチップ上に固定化できる。これは米国Phylos社によって実用化されている。また、インテインを利用したタンパク質-DNAコンジュゲートの調製法が確立されている。インテインは遺伝子から発現する際に両末端のタンパク質同士をつなぐ性質があるので、このメカニズムを利用すればタンパク質-DNAコンジュゲートが得られる。

### バイオチップのこれから

現在、DNAチップからプロテインチップ、さらには糖鎖

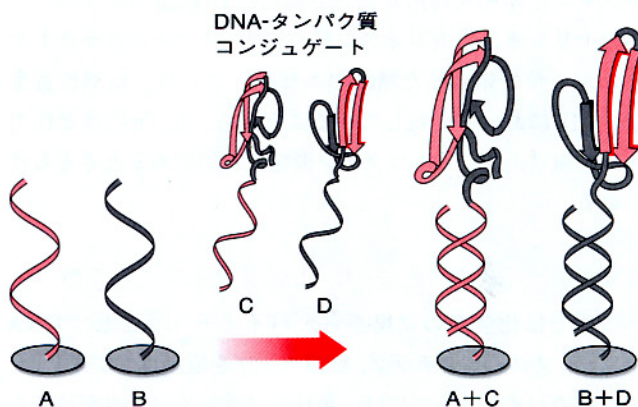
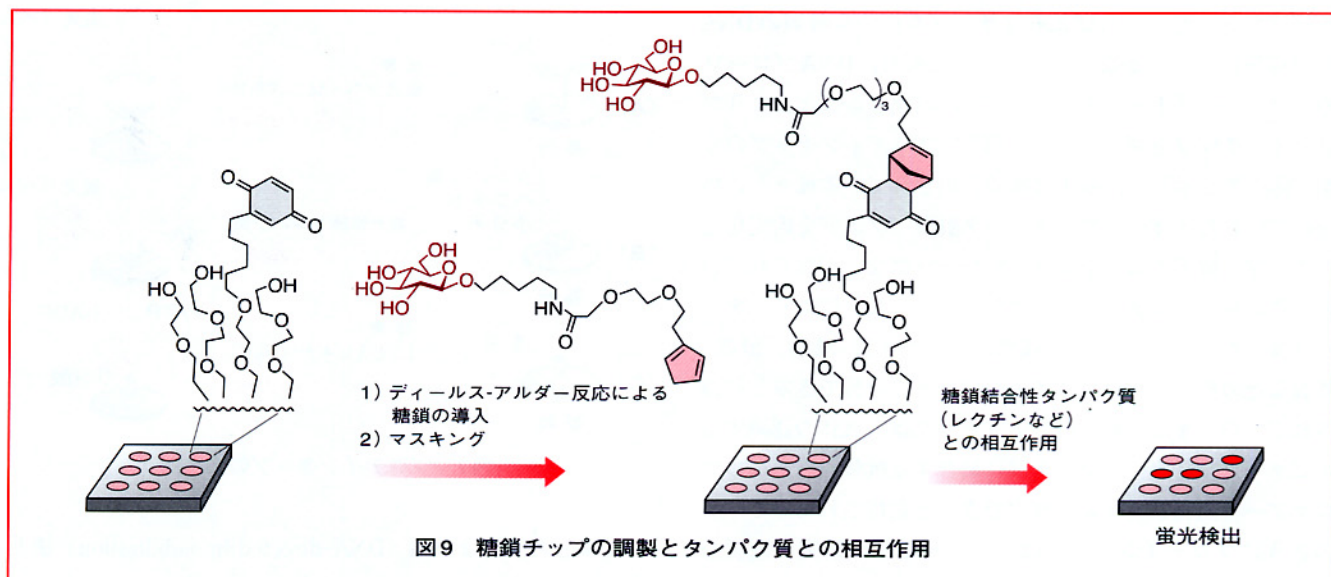


図8 DNAチップからプロテインチップへの変換（DDI法）



チップ、細胞チップの構築とそれを利用した解析も活発に行われている。特に糖鎖チップは、糖鎖が細胞表面の認識に関与しており、糖鎖の働きを利用した医薬品の開発が期待されるなどの観点から、今後ますます重要になってくると考えられる。Mrksichらは、ディールス-アルダー反応を利用した基板への糖鎖リガンドの固定化法を開発した(図9)。まず、基板上に糖鎖リガンド連結可能な成分(1%)と非特異的吸着をマスクする成分(99%)の混合物を固定化した。これにペンタジエニル基をもつ糖鎖を加えることにより、ディールス-アルダー反応によって迅速かつ定量的に糖鎖が基板に固定化されている。この糖鎖アレイは粘着性タンパク質であるフィブリノーゲンに対して、非特異的吸着はまったく示さなかった。しかし、ターゲットの糖鎖結合タンパク質のコンカナバリンAというレクチンとは特異的結合が観察されている。このことは、本手法による糖鎖チップの有用性を示すものと考えられる。最近、糖鎖チップを利用して抗Tn抗体やレクチンとの相互作用が報告された。Tn抗原(ポリペプチドのセリンまたはトレオニン残基にN-アセチルガラクトサミンが $\alpha$ 位で結合した糖鎖のエピトープ)は、病原性寄生虫、HIVにおいて発現していることから、抗Tn抗体と作用する糖鎖は、これらのワクチン開発に有用であると考えられている。

### おわりに

ここでは化学者の立場から、バイオチップとしてDNAチップ、プロテインチップ、糖鎖チップを取上げて解説した。これらのバイオチップには、現状では改善すべき点が多く残されている。しかし、これらの利用によって、これまでに

重要な知見がもたらされている。今後、高性能バイオチップの開発が達成できれば、生命現象を理解するためのツールを提供できるのみならず、臨床診断用に役立つチップが実現できると期待される。ここで得られる成果は、人類に多大の恩恵をもたらすことは疑いない。

### 参考文献

1. 佐々木博己, 青柳一彦編, 「DNAチップ実験まるわかり」, 羊土社(2004); DNAチップを実際に利用している研究者の立場から書かれており, DNAチップの現状を知るためには有用である。TUMジーンの電気化学DNAチップの解説もある。
2. M. Schena, "Microarray Analysis", Wiley-Liss(2003); DNAチップに関して, 原理から応用まで化学的な原理を含めた基礎から書かれている。
3. 杉本直己著, "遺伝子化学", 化学同人(2002); DNAチップとハイブリダイゼーションの物理化学的意味合いがきちんと書かれている。
4. 村上康文, "マイクロアレイ技術, DNAチップ技術の現状", 現代化学2000年7月号, p.60; バイオの立場から見たDNAチップの解説。
5. 油谷浩幸, "創薬におけるDNAチップの利用", 現代化学2001年11月号, p.24; Affymetrix社のDNAチップを用いた研究を解説。
6. E. Palecekほか編, "Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics", Elsevier(2005); 電気化学的バイオチップに関して最新の解説。