

# ナノチップテクノロジーの創製とゲノム解析への応用

馬場嘉信 (CREST・徳島大学薬学部)

田畑 修 (立命館大理工)、藤井輝夫 (東大生研)、三木哲郎 (愛媛大医)

## はじめに

ヒトのゲノムシーケンシングがほぼ終了し、今後の重要な研究課題として、それぞれの個人によるゲノム情報の違いであるゲノムの多型 (多様性) 解析、ゲノム機能解析、プロテオーム解析が焦点となってきている。ゲノム多型性は、ゲノム上に210万カ所あると考えられている塩基の配列の違い (1塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism)) を解析することで調べることが可能で、個人の性格、能力、体格、病気へのかかりやすさ、薬に対する感受性、薬の副作用などと関連していると考えられている。従って、SNP解析は、ゲノム医療、ゲノム創薬の分野において極めて重要である。しかし、ゲノム創薬における臨床試験の段階で、年間100億回以上のSNP解析が必要であるという推定もあり、より高性能のゲノム解析・SNP解析技術の開発が強く求められている。ゲノム・シーケンシング時代には、96あるいは384本のキャピラリーアレイを用いたシーケンサーが新たに開発され、ヒト・ゲノムの解析を強力に進めたが、ポスト・ゲノムシーケンシング時代には、次世代ゲノム解析技術として、半導体集積化技術に基づいたマイクロチップ・ナノチップテクノロジーが期待を集めている。

既に、DNAチップ・マイクロアレイやマイクロCE (capillary electrophoresis) チップなどのマイクロチップ型ゲノム解析技術が誕生してきたが、半導体集積化技術の急速な進歩に伴って、微細加工は、マイクロ領域からナノ領域に移行しつつあり、一枚の小型チップ上に、マイクロアレイ、PCR、電気泳動などを全て集積化できる方法も開発されようとしている。さらに、ナノ加工技術を用いたナノチップテクノロジーや究極のゲノム解析技術である1分子ゲノム解析の創製をめざした研究も進んでいる。コンピュータの革命的進歩を促した半導体技術は、ゲノム解析のハイスループット化にも重要な役割を果たそうとしている。

## マイクロチップ・マイクロアレイから高度集積化システムへ

現在、我々は、最先端の微細加工技術を駆使し、指先サイズのチップ上にナノストラクチャーを有するデバイスを開発し、極微量あるいは一分子のゲノムDNAの抽出、PCR、シーケンシング、SNP解析等の集積化を実現する次世代DNA解析技術であるナノチップテクノロジー、ナノスケールラボを創製することをめざし研究を続けている。これは、ゲノム情報に必要な、血液等の細胞からのDNAの抽出、ゲノムDNAからの遺伝子の増幅反応、遺伝子の分離、検出などの基本プロセスを、わずか数cm角程度のマイクロチップ上に実現する技術である。

この次世代DNA解析技術を実現するために、プラスチックのチップ上に、シンクロトロン放射光を利用した方法で、PCR用マイクロチャンバーおよびマイクロチャンネルアレイを作製した。マスクをプラスチック上におき、上からシンクロトロン放射光を照射することにより、高いアスペクト比 (深さ/幅) のマイクロ構造体を作成可能である。円形の反応容器は、わずか0.08  $\mu\text{L}$  (80 nL)の遺伝子サンプルの抽出、反応 (PCR) 等に用いることができる。さらに、DNAの電気泳動のために、幅50  $\mu\text{m}$ 、深さ100  $\mu\text{m}$ のマイクロチャンネルを20本作製した。20本のマイクロチャンネルであっても、わずか1.5 mmの幅で作製することができるので、7 cm程度の幅のマイクロデバイス中に1000本のマイクロチャンネルを作製可能である。

また、我々は、マイクロチャンネル中を移動するDNAを高感度にイメージングできるシステムを開発した。これによって、マイクロチャンネル中のDNAの泳動挙動を詳細に知る事が出来るよう

になり、DNAの高速解析が可能になってきた。このイメージングシステムを用いて、DNAの分離に必要な最小限のチャンネル長を調べたところ、わずか5-30 mm程度のチャンネルでDNAを解析できることが分かった。このシステムにより、PCRのフラグメント解析は30-90秒以内、k-ras遺伝子のSNPs解析は60-120秒以内に達成できることを実証した。また、複数チャンネルをアレイ化したマイクロチップのレーザースキャナーも開発しており、現在、これらの結果に基づいて、企業と共同で市販装置の開発を進めている。PCRの高速化についても基礎研究を進め、500塩基のコントロールサンプルのPCRについては、5-10分程度で高速増幅可能なことを実証した。

### ナノチップ・三次元微細加工から一分子DNA解析へ

半導体集積化技術およびナノテクノロジーの急速な進歩に伴って、ナノメートルオーダーの超微細加工技術の開発が進んでおり、2012年には、微細加工は、サブナノメートルオーダーの原子レベルに到達すると予想されている。さらに、三次元のマイクロ構造体やナノ構造体の精密微細加工技術の開発も進み、今までにないマイクロチップ・ナノチップを用いたDNA解析技術の開発が期待されている。

我々は、新規ナノチップを開発するために、マイクロチップによるDNA解析を進め、数kbp以下のサイズのDNAを解析する場合は、10-500 nmのナノストラクチャーを作成することが必要であることを明らかにした。この結果に基づき、電子線あるいはプラズマを用いた微細加工により、ガラスまたはプラスチック上に、100-500 nmのナノストラクチャーを作成することに成功した。将来は、このようなナノストラクチャーを有するナノチップテクノロジーが、DNA解析の重要なキーテクノロジーになるものと期待されている。

また、ナノチップテクノロジーを活用した究極の単一分子ゲノムDNA解析技術であるナノスケールラボに関する研究も進めている。従来、1分子のDNAのマニピュレーション・解析には、光ピンセットやオプティカルマッピングが用いられてきたが、アルミニウムのマイクロ電極を用いて、DNA分子を直接マニピュレートし、ベルト状に配列させたうえで、DNAの一端を電極上に固定化し、もう一端をアルミニウム薄膜を蒸着したAFMプローブの先に固定化することに成功した。これを利用することにより、そのDNAを動かしたり、引っ張ったりすることが可能になった。さらに、マイクロチップ上のDNA分子を非修飾でかつ非接触的にマニピュレートするシステムの開発に成功した。このような、1分子のDNAのマニピュレーション技術と超微細加工技術等を組み合わせることにより、1分子レベルのゲノムDNAを解析する技術の開発も夢ではない。

### 参考文献

1. Vener, J. C. *et al. Science* **291**, 1304-1351 (2001).
2. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
3. Baba, Y. *Integrated Microfabricated Device Technologies: Advances in Genomic, Drug Discovery, and Clinical Diagnostic Applications* (eds. M.H. Heller & A. Guttman), (Marcel Dekker, 2001).
4. 馬場嘉信. *ファルマシア*, **36(1)**, 24-28 (2000).
5. 馬場嘉信. 「DNAチップ応用技術」, シーエムシー, (2000).
6. 馬場嘉信. *蛋白質・核酸・酵素*, **45**, 76-85 (2000).
7. 馬場嘉信. *化学*, **55(4)**, 22-26 (2000).
8. 馬場嘉信. *BioIndustry*, **17(8)**, 5-12, (2000).
9. 馬場嘉信. *実験医学『ゲノム医科学とゲノム医療』*, 1595-1601, (2000).
10. 上田正則, 馬場嘉信. *生物物理*, **40(1)**, 48-51 (2000).
11. 馬場嘉信. *ぶんせき*, **2000(10)**, 602-606 (2000).
12. 馬場嘉信. *ファルマシア*, **37(1)**, 46 (2001).