

フォトニクスベースツールの進歩によって 拡大するゲノミクスの可能性

ジェフ・ヘクト

レーザー誘起蛍光はヒトゲノム解読において重要な役割を果たした。今や、さらに高度なフォトニックシステムがシーケンシングコストを削減し、ゲノム研究と合成生物学に新たな可能性を与えている。

ゲノミクス、すなわちゲノムの遺伝地図作成、解析、そして研究は、10年前のヒトゲノム解読の成功以来、幸運が続いている。急速な技術改良はシーケンシングコストを削減し、データ品質を高めた。米国の国立ヒトゲノム研究所は、1人の完全なゲノム解読コストが2001年9月の9500万ドルから2011年10月には7700ドルまで削減されたと報告している。米国学術研究会議が8月に発表した「光学とフォトニクス：我が国の主要な技術」（「Harnessing Light 2.0」としても知られる）によれば、新しい世代の機器は数年後に1000ドルまでコストダウンされそうだ⁽¹⁾。

ゲノミクスへの多額の投資を支える駆動力はゲノムの理解が医療診断と治

療に革命をもたらすだろうという期待である。一方、ゲノム研究はすでに基礎科学において成功を収め、進化論的關係についての主要な疑問に答えを出し、現代ヨーロッパ人の遺伝子の数パーセントがネアンデルタール人由来であることを明らかにしている。

フォトニクスはこの進歩を後押しした。1970年代のDNAシーケンシングは、DNAフラグメントを放射性リンで標識化し、それらをゲル電気泳動で分離する非常に遅いプロセスであり、1日に1000塩基対以下しか識別することができなかった。この速度で30億塩基対の全ヒトゲノムの配列を決定するとしたら約8000年かかる。

放射性標識を蛍光標識に置き換え、

分離法を改良することで、1980年代にはその能力が10倍になった。さらなる前進が加わり、配列決定速度が1日に20～30億塩基対に高められ、同時にコストが削減された。そして、遺伝物質を操作し、DNAの生のビルディングブロックから生きた生物の遺伝子、染色体、または遺伝子型全体を合成する新しいレーザー技術が登場した。

DNAシーケンシングの基本

DNAは互いに巻きついた2本のスクレオチド鎖からなる二重螺旋である。これは、バックボーン鎖に結合し、もう1つのバックボーン鎖上の第2の塩基とも水素結合を形成する「塩基」配列として遺伝子をエンコードする。塩基

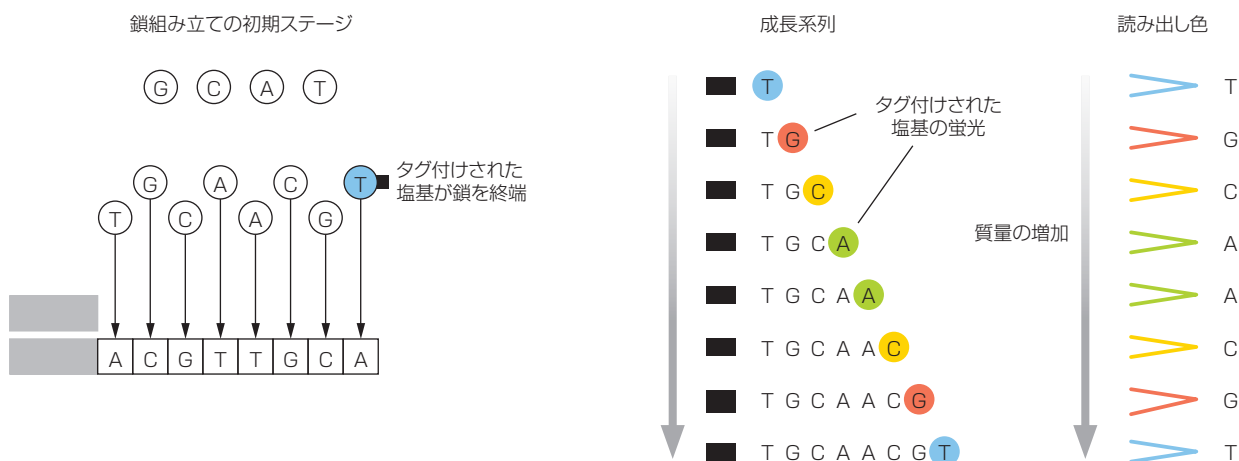


図1 サンガープロセスにおいて相補的な鎖を組み立てることによるDNAシーケンシング。無標識塩基は、蛍光色素を運ぶ標識化塩基が鎖を終端させるまで、1つずつ蓄積される。これらの鎖は質量によって分離され、光で励起されて各標識付けされた終端塩基の独特な蛍光を放射する。最終配列は出発鎖に相補的である。

アデニン(通常Aで表す)はチミン(T)に結合し、シトシン(C)はグアニン(G)に結合する。この選択的結合は2本のDNA鎖を相補的にするので、1本の鎖をデコードすれば第2の鎖の配列識別が可能になる。塩基配列は遺伝子をエンコードし、遺伝子は生物体内で生物学的機能を実行するが、既知の機能をもたない他のDNAストレッチも存在する。

DNAシーケンシングは、どの塩基がその鎖に結合しているかを識別する方法を必要とする。初期には、放射性元素で塩基を標識化する方法で行われていたが、異なる波長の蛍光を発する色素で塩基を標識化するようになって、このプロセスは大幅に簡素化された。センサは、レーザまたは他の光源

でDNAを照明して発生する色を記録することによって、そこに存在する塩基配列を読み出す。

このプロセスの光学部分は比較的単純である。この研究の大部分はDNAを塩基毎に分析する化学的方法の開発に向けられている。一般に、まず染色体を2本の鎖に分離し、次に数百から数千の塩基を含むランダムな長さの断片に分割する。それから、これらのフラグメントを大きな容積内に並べ、コンピュータを使ってフラグメントが互いに縫い合わされるように重複DNA配列を適合させ、遺伝子または染色体の全体を配列する。

詳細は技術間で大きく異なるが、シーケンシング研究の良い例は、英ケンブ

リッジ大学(University of Cambridge)のフレデリック・サンガー(Frederick Sanger)氏が1970年代に開発したチェーン・ターミネーション法である。1本鎖DNA断片の多数の複製に対して、二重螺旋を生成するための相補的鎖組み立てに必要なA、C、G、およびT塩基を混合する。この混合物は改質によって特殊に変形された1塩基を含み、それがさらに多くの塩基の付加を防止することによってその鎖を終端させ、識別用の標識を運ぶ。

これによって、異なる長さのさまざまなDNA鎖が生成され、その各々が最終塩基識別用の色素で標識化されている。図1に示されるように、これらはまず質量によって分離され、次いで、



All about Photonics

Optimize Optics for Optical Innovation.

オールアバウトフォトンクス。
光業界のあらゆる可能性のために。



先端光技術の国際総合展
INTERNATIONAL OPTOELECTRONICS EXHIBITION 2013
InterOpto® 2013
主催：一般財団法人 光産業技術振興協会



光+バイオ・医療の専門展
BioOpto Japan 2013
Conference + Exhibition
主催：株式会社 ICS コンベンションデザイン



レーザによる先端加工の専門展
LaserTech 2013
主催：株式会社 ICS コンベンションデザイン



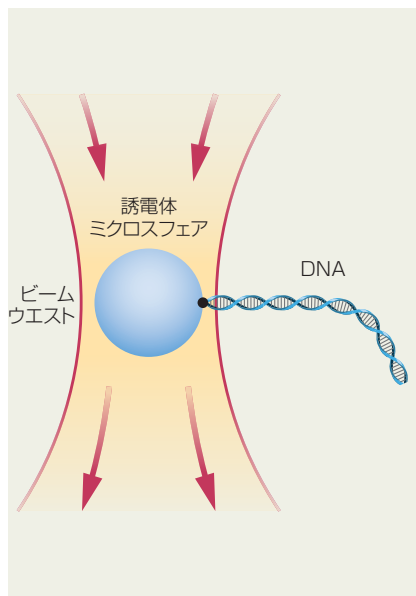
高輝度LEDの専門展
LED JAPAN Conference & Expo
Strategies in Light.
The Leading Events for the Global LED and Lighting Industry
主催：株式会社 ICS コンベンションデザイン
PennWell Corporation

次回展 開催決定！ 2013.10.16 Wed.-18 Fri. パシフィコ横浜

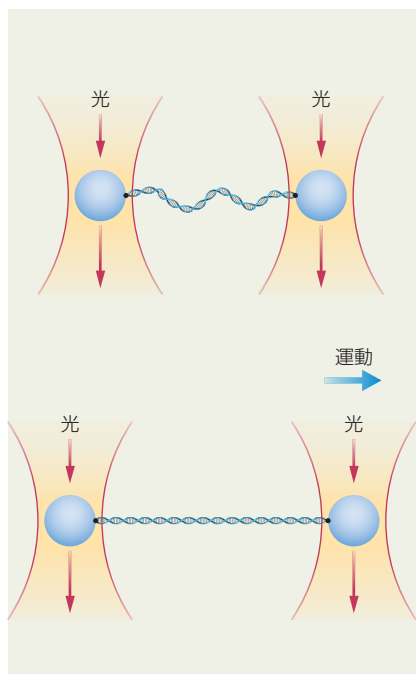
Pacifico Yokohama

展示会についての
お問い合わせ・お申し込み

展示会運営事務局 〒101-8449 東京都千代田区猿樂町1-5-18 千代田ビル TEL: 03-3219-3643 FAX: 03-3219-3628
✉ interopto@ics-inc.co.jp | bioopto@ics-inc.co.jp | lasertech@ics-inc.co.jp | led@ics-inc.co.jp



光ピンセットはビーム・ウエストで誘電体マイクロスフェアを保持する。結合したDNA鎖に注意。



光ピンセットによって保持されたマイクロスフェアにDNAの端を接着させて、スフェアを離れた方向に動かすことにより、DNAを引き延ばすことができる。

図2 高NA光学系(図には示されていない)はレーザー光をビームウエストに高強度で集める。ここでは、光力が誘電体マイクロスフェアを上図の位置に保持する。DNAは、このマイクロスフェアに結合して、ビーム焦点を移動させることによって動かすことができる。もし、DNA鎖の両末端が光ピンセット内に保持されたマイクロスフェア対に結合されたならば、下図で示されるように、焦点の移動によってDNA鎖を引き伸ばせる。

照射されて、独特な蛍光から塩基配列が読み出される。Laser Focus World 2001年5月号の特別レポート⁽²⁾で報告されているように、1990年代の初期に、質量の分離ステージがゲル電気泳動からキャピラリー内高分子ゲルに転換され、その結果、ヒトゲノム解析プロジェクトは大いに加速された。さらなる改良も加わり、今や、この伝統的なプロセスは最高99.999%の正確さで約1000塩基対を読み出すことができ、シーケンシングコストも1000塩基対あたり0.50ドルの低さになった⁽³⁾。

ゲノムプロジェクトの完了後、新しい世代のシーケンシング技術が、より短いDNA鎖ではあるが、さまざまな化学と大規模な並列処理を使って、さらに速いシーケンシング速度を達成した。そのいくつかは塩基の識別に蛍光標識とレーザー照明を利用し、他はアデノシン三リン酸(ATP)からルシフェラーゼへのエネルギー移動を利用する⁽⁴⁾。

MALDIと質量分析

この新しいシーケンシング法は大規模プロジェクト用に設計されているが、たった数個の遺伝子を含む短いDNAを迅速にシーケンシングするというのではコスト効率が悪すぎる。古いサンガー技術は選択肢になるが、いくつかのシーケンス読み出しに問題がある。それらの限界を克服するために、米コロンビア大学(Columbia University)のチュンメイ・キュー氏(Chunmei Qiu)の研究チームは、蛋白質の質量分析に使われているマトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)と呼ばれる技術を適用した。

MALDIは紫外(UV)または赤外(IR)レーザーを使って繊細な生体分子を含むホットブルームを生成し、飛行時間質量分析用にそれらをイオン化する。

これはサンガープロセスに従わないDNA鎖の配列も決定することができる。これまでのところ、彼らは最高37までの塩基をもつ鎖のシーケンシングを実証した⁽⁵⁾。

光ピンセットとDNA操作

レーザー光もまた、光ピンセットを使って生体分子を操作することができる。図2に示されるように、開口数が1.2以上のレンズまたは顕微鏡対物レンズによって強く収束されたレーザービームはそのビームウエストで高強度で集光され、高い電場勾配を形成する。そして、これがビーム中心へと誘電体物体を引き寄せる。この効果はビーム中心近くに物体を保持する力のバランスを生み出し、近赤外(NIR)波長域で透明な生体材料に対して最もよく機能する。ビームを移動させると、ビームとともに物体も移動する。

裸のDNA分子は光の波長に比べて小さく、それらを保持して操作することは困難だが、図2にも示されているように、それらはより大きいサイズのビーズに結合させることができる。こうすれば、転写や他の細胞過程においてDNAに加わる力を研究することが可能になる⁽⁶⁾。昨年、米ミシガン大学の研究チームは、一定力の光ピンセットを使って、DNAの機械的性質に与える配列変動の効果に関する研究を報告した⁽⁷⁾。ケンブリッジ大学の研究チームは光ピンセットを使用してナノキャピラリー内のDNA分子の研究を行った⁽⁸⁾。

合成生物学とDNAのレーザー印刷

これまで、レーザーピンセットは実験室機器のままであったが、ひそかに起業した、米カンブリアン・ゲノミクス社(Cambrian Genomics)による刺激的な提案、「DNAレーザー印刷」は、光操

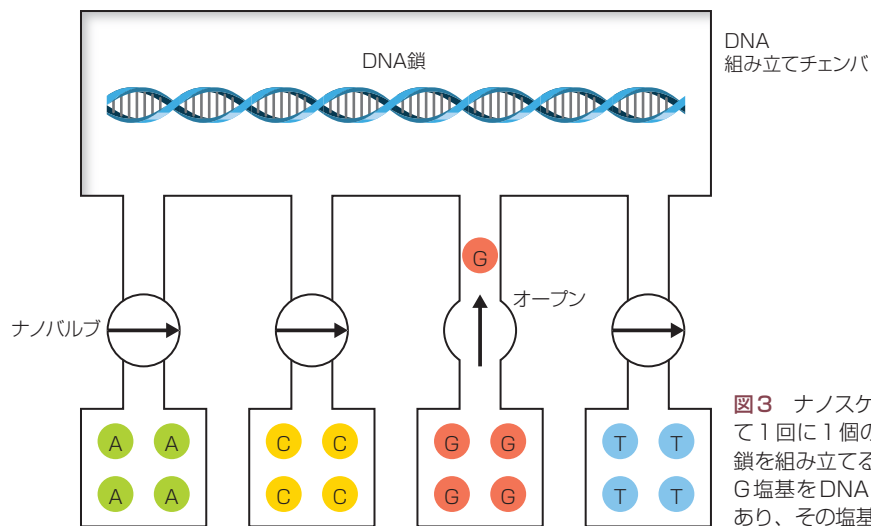


図3 ナノスケール流体系は、バルブの開閉によって1回に1個の塩基を追加することによってDNA鎖を組み立てるだろう。この図では、ナノバルブがG塩基をDNA組み立てチェーンバに挿入した瞬間であり、その塩基はDNA鎖に結合するだろう。

作によるDNA組み立てに関して興味深い問題を投げかけている。

これは熱い論議を呼ぶ分野の一部、いわゆる「合成生物学」であり、ここでは、分子生物学者が、既存の生物体に挿入するか、または新しい生物体を作り出すために、短い配列または個々の塩基からDNA分子を組み立てる⁽⁹⁾。これまでのこの分野における最も顕著な成功は、2年前にJ・クレイグ・ベンター研究所 (J. Craig Venter Institute) が自然のゲノムのコピーに基づいて実施した、いわゆる「最初の合成細胞」の創成である⁽¹⁰⁾。しかし、このプロセスは超低速で、間違いを起しやすく、コスト効率が極めて悪い。

カンブリアン・ゲノミクスは、さらに改良を加え、初期合成後のDNAを再配列させることによって誤り率をほとんど0に減らそうと試みている⁽¹¹⁾。CEOのオーステイン・ハインツ氏 (Austen Heinz) は短い電話インタビューで、当社は100塩基対の配列検証済みストリングを印刷することができたと記者に語った。彼は詳細を明らかにしながらなかったが、「あなた方はあなた方自身で[それら]を見つけ出すことができるだろう」と語った。

ハインツ氏の過去の出版物を検索す

ることによって、わずかな手掛かりを得た。彼は、会社を設立する前に、韓国ソウル大学校 (Seoul National University) でクォン・スンファン氏 (Sunghoon Kwon) と共に光流体システムの研究を行っていた。ハインツ氏はUVを使用した光流体バルブを通る流れの制御と題する論文⁽¹²⁾の共著者である。図3に示すように、この技術はDNA合成

に有用だが、印刷ではない。実際に、塩基対の長さがわずか約0.3nmであるため、どのようにして光がそれらを個々に操作することができたのか想像は困難である。

カンブリアン・ゲノミクスがその約束を果たせるか否かは時間が解決するだろうが、この分野が全体として注目に値することは明らかだ。

参考文献

- (1) G. Overton, "SPIE and OSA applaud National Academy Optics and Photonics report (Harnessing Light 2)," Laser Focus World online (Aug. 14, 2012); <http://bit.ly/MX38cI>.
- (2) V. Coffey, "DNA sequencing provides the key to the map of man" in "Special Report: Exploring the Genome," Laser Focus World, 37, 5, 137-145 (May 2001); <http://bit.ly/S7kQ8Q>.
- (3) J. Shendurel and H. Ji, "Next-generation DNA sequencing," Nature Biotechnol., 26, 1135 (Oct. 2008); doi:10.1038/nbt1486.
- (4) M. Kircher and J. Kelso, "High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations," Bioessays, 32, 524-536 (2010); doi:10.1002/bies.200900181.
- (5) C. Qiu et al., "Design and synthesis of cleavable biotinylated dideoxynucleotides for DNA sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry," Analyt. Biochem., 427, 193-201 (2012); doi:10.1016/j.ab.2012.04.021.
- (6) D.J. Stevenson, F. Gunn-Moore, and K. Dholakia, "Light forces the pace: Optical manipulation for biophotonics," J. Biomed. Opt., 15, 041503 (July/August 2010).
- (7) K. Raghunathan et al., "Mechanics of DNA: Sequence Dependent Elasticity," Proc. SPIE, 8097, 80970C (2011); doi:10.1117/12.895297.
- (8) O. Otto, L.J. Steinbock, and U.F. Keyser, "Nanocapillaries and Optical Tweezers for Studies on DNA in Confinement," Proc. SPIE, 8097, 80970B (2011); doi:10.1117/12.894703.
- (9) Synthetic Biology web site, <http://syntheticbiology.org>
- (10) D. Gibson et al., "Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome," Science, 329, 52-56 (2010); doi:10.1126/science.1190719.
- (11) S. Kotler, "Holy Genetically-Engineered Organisms Batman - Synthetic Biology Has A Banner Month!" Forbes online (July 17, 2012); <http://onforbes.com/PsUr7I>.
- (12) S.H. Lee et al., "Active Guidance of 3D Microstructures," Small, 6, 2668 - 2672 (2010); doi:10.1002/smll.201001248.