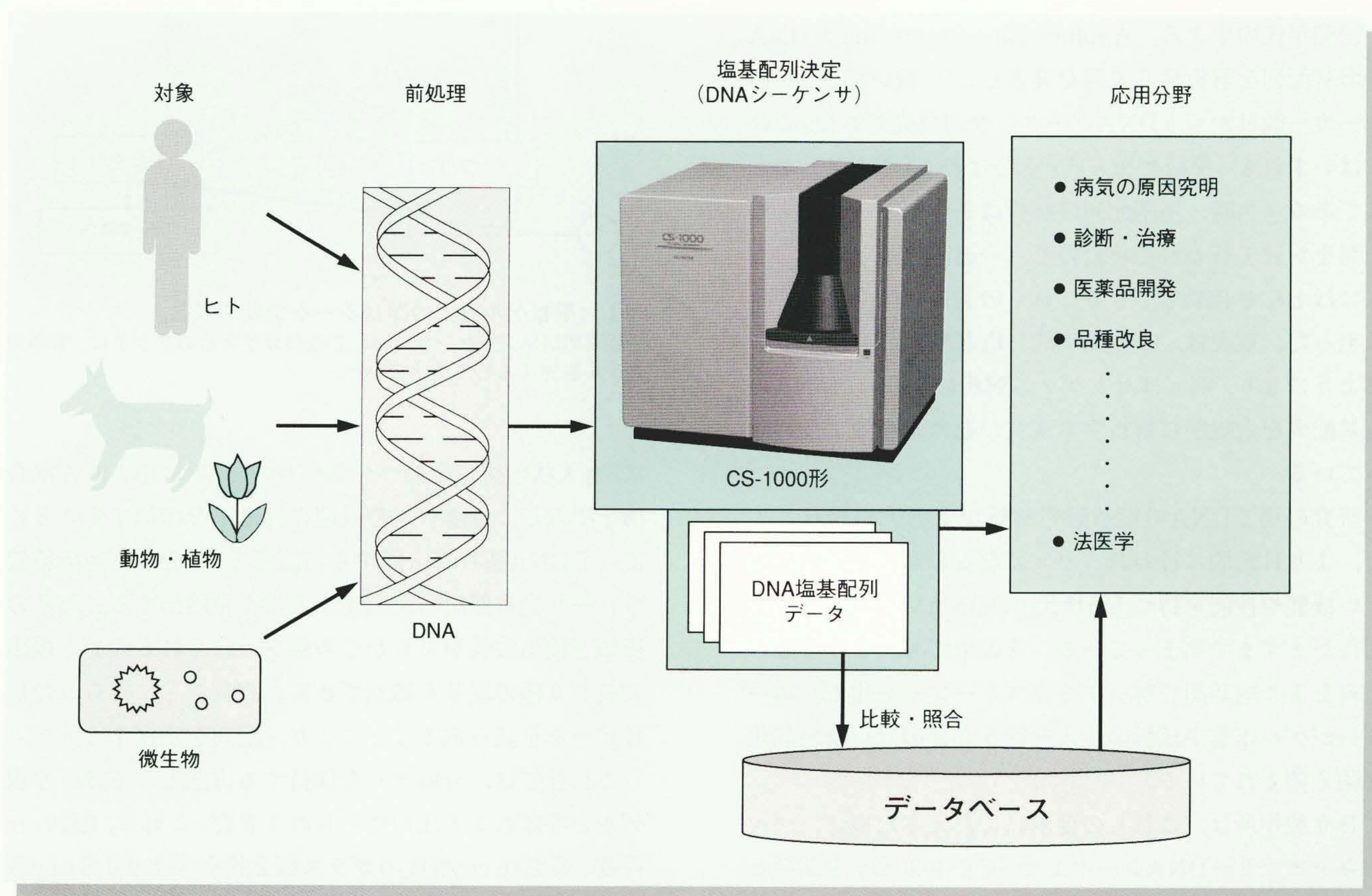


多数試料のDNA配列を連続自動で解析する マルチキャピラリーDNAシーケンサ「CS-1000形」

High-Throughput Multi-Capillary DNA Sequencer

今井一成 Kazumichi Imai 釜堀政男 Masao Kamahori
高橋 智 Satoshi Takahashi 小原賢信 Yoshinobu Kohara



注：略語説明 DNA (Deoxyribonucleic Acid；デオキシリボ核酸)

DNA塩基配列の決定とその応用分野

すべての生物の遺伝情報は、DNAの塩基配列で決定される。DNAの塩基配列を大量に解析し、病気の診断や治療などに役立てようとする時代が到来している。

1980年代の中ごろに、遺伝情報を担うDNA(デオキシリボ核酸)の塩基配列を自動的に解析するDNAシーケンサが登場してから、DNAの塩基配列決定量は飛躍的に増大した。現在では、生物学など学術上重要な知見を得ることはもちろんのこと、将来の遺伝子レベルでの病気診断・治療や医薬品開発などに向けて、さまざまな生物でそれらのDNAのすべての塩基配列を決定するという計画が進行中である。この中では、DNAの大量解析のために、短時間に多量の試料を解析する「高スループット」で、かつ、試料注入などで人手のかからない「全自動」

の装置の実現が強く望まれている。

日立製作所は、これらの要求にこたえるDNAシーケンサとして、従来の「平板ゲル方式」に代えて、独自の「マルチキャピラリーゲル方式」のDNAシーケンサ「CS-1000形」を開発した。この装置は、1回で48試料の解析が同時にでき、連続して5回分の試料を自動的に注入するオートサンプラを持っている。朝と夕方に2回試料をセッティングし、それぞれの昼夜の連続運転を行えば、1日で最大480試料のDNAの塩基配列解析が可能となる。

1 はじめに

親から子へ、子から孫へと受け継がれるすべての遺伝情報は、細胞の核の部分に存在するDNA(デオキシリボ核酸)という物質の構造に担われている。さらに詳しくは、DNAを構成するアデニン、チミン、グアニンおよびシトシンと呼ばれる4種類の塩基が、どのような配列構造をしているのかが遺伝情報の源泉となっている。

1980年代の中ごろ、Applied Biosystems Inc.が¹⁾DNAの塩基配列を解析する装置を発表した¹⁾。続いて、ほかのメーカー数社からもDNAシーケンサが発売された。これらはいずれも「平板ゲル方式」と呼ばれるDNAシーケンサである。当時、塩基配列の解析は手作業で数日から1週間をかけて行われていたので、一連の作業を1日のうちにほとんど自動でできるこれらの装置は広く普及するに至った。現在は、より効率的に塩基配列の解析ができるようになり、例えばヒトゲノム解析のように、DNAの塩基配列を大規模に解析する研究が進められるようになっている。

研究の場でDNAの塩基配列解析がより大規模に、また、より日常的に行われるようになるにしたがって、新しい機能や性能を持つ「新世代」のDNAシーケンサへの期待がますます高まっている。その中でも、より多数の試料をより短時間で解析する高スループット化や、ユーザーがゲル作業や試料の注入を行う必要のない全自動化が強く望まれている。

日立製作所は、これらの要求にこたえるために、マルチキャピラリーDNAシーケンサ「CS-1000形」を開発した。CS-1000形では、従来の平板ゲル方式に代えて、独自に開発した「マルチキャピラリーゲル方式」を採用した²⁾。

ここでは、「CS-1000形」の装置構成と特徴について述べる。

2 平板ゲル方式のDNAシーケンサ

従来の平板ゲル方式のDNAシーケンサの概念を図1に示す。DNAの塩基配列を決定する処理ステップでは、前処理によって試料を1塩基ずつ長さの異なるDNA断片混合物としたものを準備する。このDNA断片には、4種類の塩基ごとに蛍光波長の異なる色素が結合している。このDNA断片混合物をDNAシーケンサで解析する。DNAシーケンサでは、「電気泳動法」と呼ばれる方法でDNA断片をその長さによって分離する。電気泳動法と

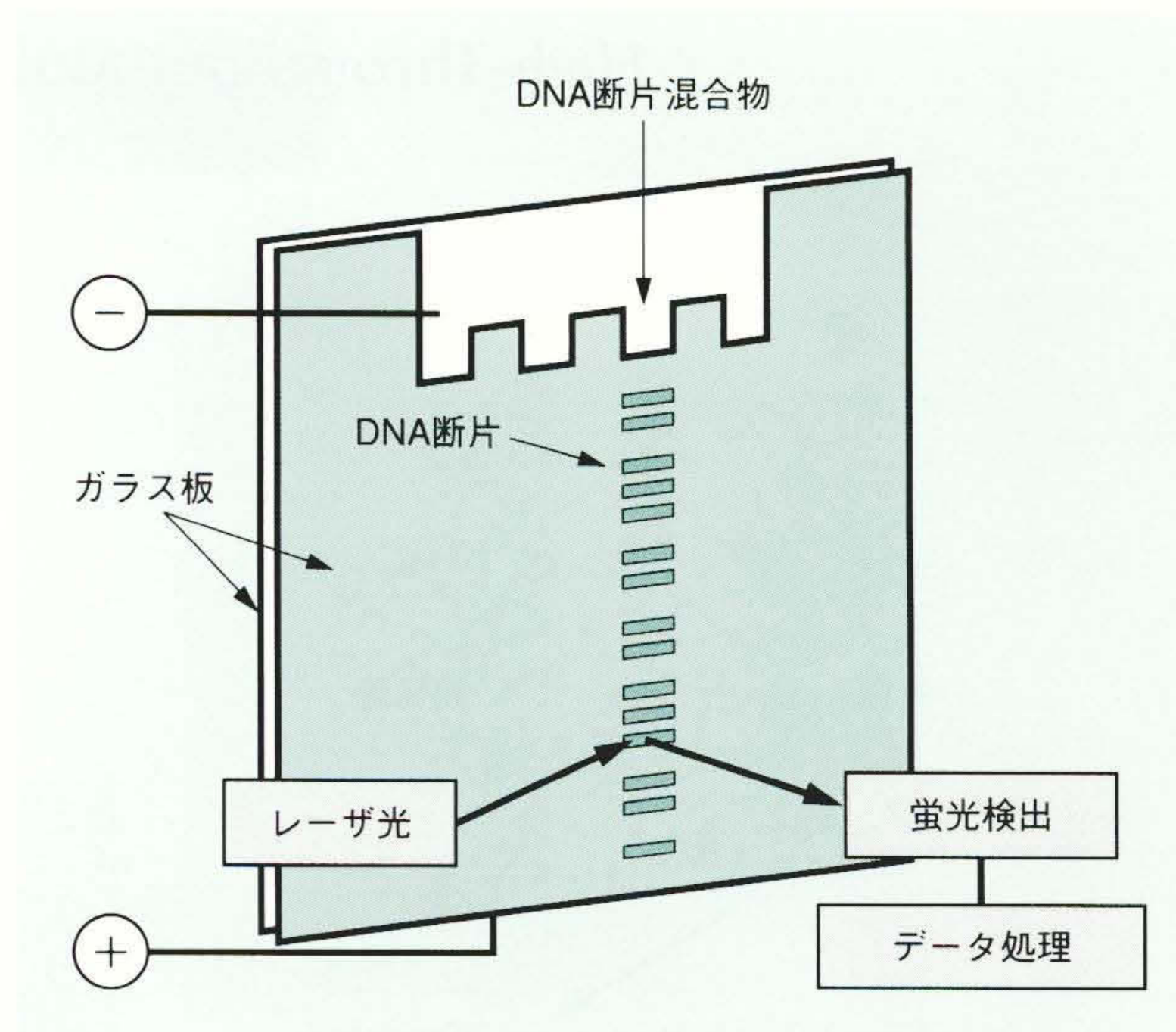


図1 平板ゲル方式のDNAシーケンサの概念

従来のDNAシーケンサでは、2枚のガラス板のすきまに、分離用のゲルを充てんして用いていた。

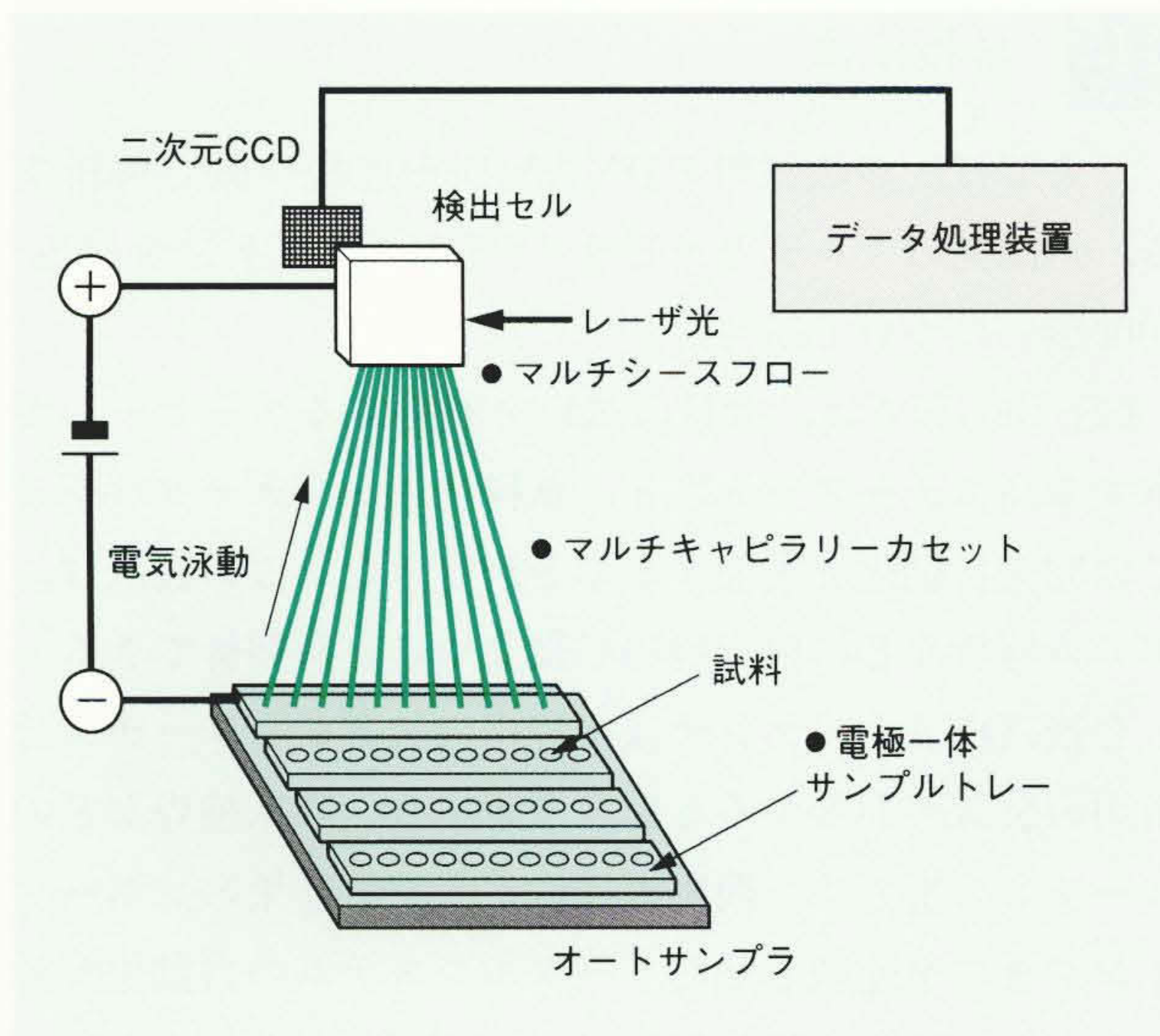
は、寒天状の構造を持つ分離ゲルの一端にDNA断片混合物を注入し、分離ゲルの両端に高電圧を印加することによってDNA断片を分離する方法である。分離ゲルの終端でレーザー光を照射し、発生する蛍光を検出する。塩基の種類と検出波長があらかじめ対応づけられるので、検出波長で4種の塩基を識別できる。波長ごとに得られた信号ピークを読み取ることにより、配列を決定する。

これまでは、分離ゲルを保持する方法としては、平板ゲルと呼ばれる方法が用いられてきた。これは、幅20 cm程度、長さ40 cm程度のガラス板2枚をすきま0.3 mm程度に設置し、このすきまに分離用ゲルを充てん、作製して用いる。分析のたびにガラス板の洗浄から始めているので、ゲルを作製し終えるのに約3時間の手作業を要する。また、泳動時のサンプリングにも、細いすきまを脆(ぜい)弱なゲルと水層の界面をねらって、10 μ L程度の微量な試料を注入しなければならないので、ここでは熟練と慎重さが要求される。分析量が増大して頻度が高くなるにしたがって、これらの作業が大きな負担になっていた。

3 CS-1000形の概要

3.1 構成

CS-1000形の分離検出部の機能構成を図2に示す。ゲルを支持する方法として、平板ゲルに代えて、内径0.1 mm以下の「キャピラリー」と呼ぶ細いガラス管を用い



注：略語説明 CCD (Charge Coupled Device；電荷結合素子)

図2 CS-1000形の分離検出部の機能構成

サンプルトレイ中の試料をキャピラリーに自動的に導入する。キャピラリーで分離し、上部の検出セルで蛍光検出する。

る。これを多数本(48本)まとめた「マルチキャピラリーカセット」を構成して使用する。

あらかじめ反応調製したDNAシーケンシング用試料をサンプルトレイに注入し、オートサンブラに置く。オートサンブラが自動的に動き、試料をキャピラリーに自動的に導入する。48試料の注入、分離が、すべて同時に行われる。

キャピラリー中で電気泳動、分離されたDNA断片は、検出セルに到達する。検出セルにレーザー光を照射し、発生する蛍光を検出する。検出部では、新たに開発したマルチシースフロー技術²⁾を採用し、これを二次元のCCDで検出する。検出信号は、データ処理装置に送られて処理される。

各構成部分の詳細について以下に述べる。

3.2 ゲル充てん済みマルチキャピラリーカセット

専用のマルチキャピラリーカセットにはあらかじめ分離媒体を充てんしており、ユーザーはゲルを作製することなく、直ちに使用できる。このカセットは、消耗品としてメーカーから供給される。したがって、従来の平板ゲルのように、使うたびに2、3時間かけてゲルを作製する必要がない。48本のキャピラリーを1個のカセットとして扱えるので、交換などの取り扱いも簡単である。また、分離ゲル自体には、実績のある従来の平板ゲルと同じ架橋型ポリアクリルアミドを用いて、高い分離性能を保っている。

3.3 自動試料注入のための電極一体サンプルトレイ

この装置では、専用のサンプルトレイを採用している。微量な試料でもまちがいに試料導入が行われるように、電極を底面に設けた。最少必要量4 μL でも、エラーなく電極が試料液に接触する。試料をサンプルトレイの各ウェルに注入した後、トレイを試料移動台(オートサンブラ)に載せるだけの操作で、移動台がキャピラリー位置に自動的に移動し、試料を電氣的にキャピラリーに注入する。

装置には、5回の測定分のサンプルトレイを載せることができる。自動測定を設定するだけで、最大5回の測定が無人で連続して行われる。測定中の操作が不要なので、特に夜間時の運転に有効となる。これは、従来法から改良された大きなメリットである。

3.4 マルチシースフローによる48本キャピラリーの同時レーザー照射

高感度検出を実現するには、48本のキャピラリーを同時にレーザー照射するのが有効である。このため、この装置では、新開発の「マルチシースフロー方式」を採用した。マルチシースフロー方式の概念を図3(a)に示す。キャ

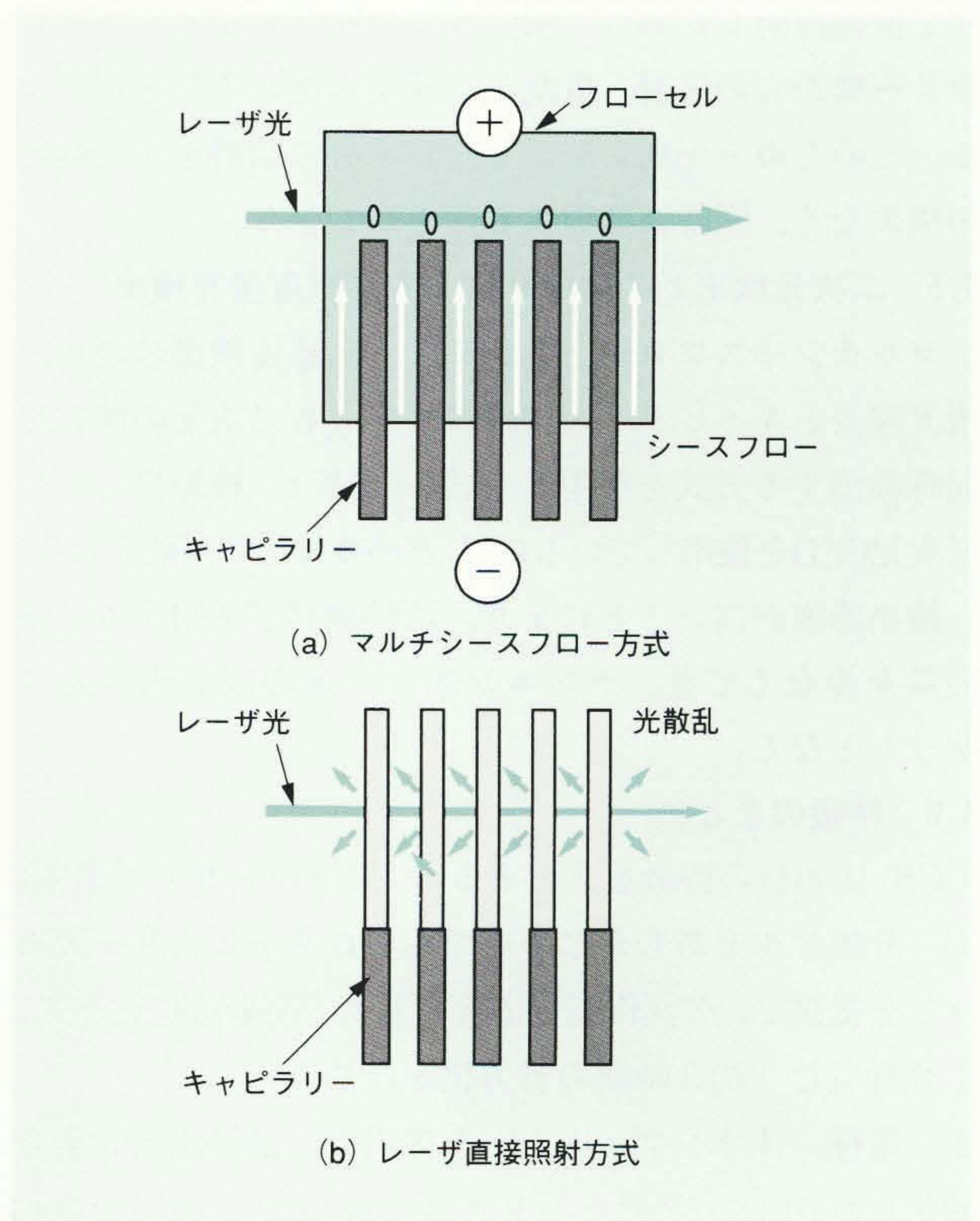


図3 レーザ光照射方式の比較

CS-1000形で採用している「マルチシースフロー方式」では、多数本のキャピラリーからの試料を同時に照射できる。直接照射では、均等に照射できない。

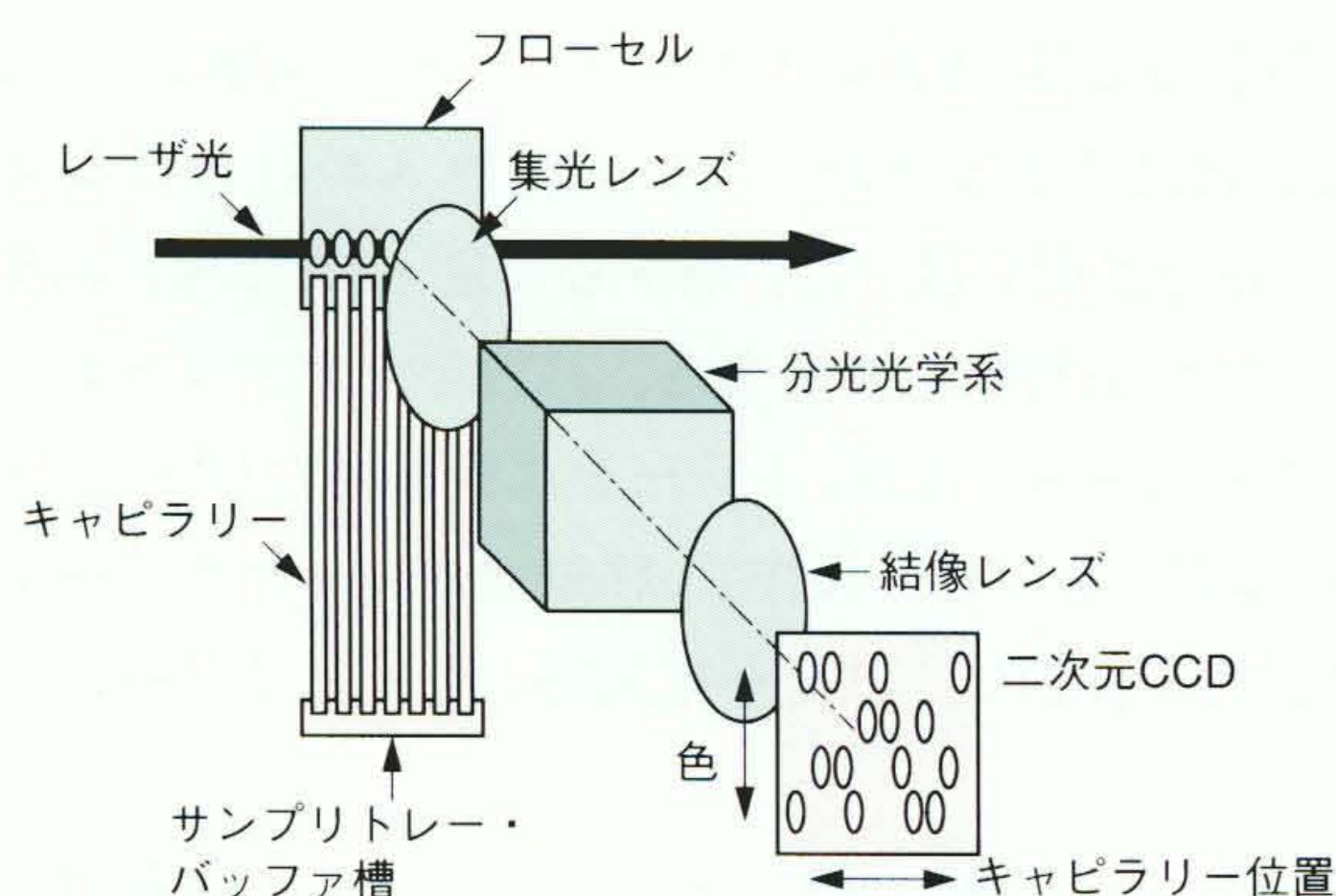


図4 二次元検出の光学系

シースフローセル中の各試料の発光は、二次元CCD面上に結像する。各キャピラリーの位置ごとに、4種の塩基に対応した色のスポットが検出される。

ピラリをフローセル中に挿入した位置に置き、これを包み込むようにフローセル内に一定速度の流れ(シースフロー)を作る。キャピラリーからしみ出たDNA断片は、この流れに乗って、広がらずに進む。レーザー光は、キャピラリーの先端から離れた位置、すなわちキャピラリーの外側で照射される。したがって、キャピラリーにレーザーを直接照射した場合〔同図(b)〕に妨害となる、キャピラリー壁からの反射、散乱の影響から逃れることができる。このため、一列に配置した48本分の試料を、光強度の損失なく、同時に照射することができる。

3.5 二次元検出との組合せによる高感度蛍光検出

マルチシースフローとあわせて、高感度検出のため、蛍光波長とキャピラリー位置に対応する二次元の情報を同時検出する方式を採用した(図4参照)。検知器として二次元CCDを使用しているため、高感度検出が可能となる。

検出感度が高いことにより、試料調製で使用する試薬の量を少なくでき、ランニングコストの面で大きなメリットとなる。

3.6 特徴のまとめ

CS-1000形の特徴をまとめると、以下のとおりである。

- (1) 分離ゲルをあらかじめ充てんしたキャピラリーカセットを提供し、ゲル作製を不要にした。従来法に比べて、1分析当たり約3時間の省力化となる。
- (2) 電極一体サンプルトレイを採用し、試料注入を全自動化した。1回の試料セットで最大240試料の分析を自動運転で行い、夜間の運転も容易にした。
- (3) 新開発のマルチシースフロー方式を採用した高感度検出により、試薬使用量を低減することができる。

4 おわりに

ここでは、多数試料のDNA配列を連続自動で解析する、新開発のマルチキャピラリーDNAシーケンサ「CS-1000形」について述べた。

CS-1000形では、大量の試料を解析するユーザーが要求する高スループット性と、試料注入からデータ解析までの完全自動化を実現することができた。この装置は、ゲノム解析などの研究現場で役立つことが期待できる。

今後、DNAシーケンサは研究用の装置からルーチン分析用の装置へ発展するものと予想する。臨床検査などのルーチン分析では、前処理操作から解析結果のレポートニングまでを連続させたトータルシステムの自動化が必要となる。CS-1000形で開発した技術を、このような将来技術につなげていく考えである。

参考文献

- 1) C. R. Connell, et al.: Automated DNA Sequence Analysis, BioTechniques, 5, 342-348(1987)
- 2) H. Kambara, et al.: Multiple-Sheathflow Capillary Array DNA Analyzer, Nature, 361, 565-566(1993)

執筆者紹介



今井一成

1980年日立製作所入社、計測器事業部 環境システム設計部 所属
現在、DNAシーケンサの開発に従事
日本臨床化学会会員、日本分子生物学会会員
E-mail: imai@cm.naka.hitachi.co.jp



高橋 智

1983年日立製作所入社、計測器事業部 バイオメディカルセンタ 所属
現在、DNAシーケンサの開発に従事
日本分析化学会会員、日本分子生物学会会員
E-mail: takahashi_st@cm.naka.hitachi.co.jp



釜堀政男

1985年日立製作所入社、中央研究所 メディカルシステム部 所属
現在、DNAシーケンサの研究開発に従事
日本化学会会員、日本分析化学会会員、日本電気泳動学会会員、日本生化学会会員
E-mail: kamahori@crl.hitachi.co.jp



小原賢信

1994年日立製作所入社、中央研究所 メディカルシステム部 所属
現在、DNAシーケンサの研究開発に従事
日本分子生物学会会員
E-mail: y-kohara@crl.hitachi.co.jp