

オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社の 128 ポアチップ。

STANDARD AND PORES

ナノポアはスタンダードになれるか

NATURE Vol.456(23-25)/6 November 2008

次世代の遺伝子塩基配列解読機はナノポア方式となるのだろうか? Katharine Sanderson が報告する。

DNA 塩基配列の解読は、進歩の著しい技術である。2008 年 4 月には、454 ライフサイエンス社（米国コネチカット州ブランフォード）が 100 万米ドル（約 9000 万円、以下すべて、ドル = 米ドル、1 ドル = 90 円で換算）足らずのコストでジェームズ・ワトソンの全ゲノム配列を 2 か月で解読した¹。また、2008 年の *Nature* 11 月 6 日号では、イルミナ社（米国カリフォルニア州サンディエゴ）が、その 4 分の 1 のコストと 8 週間という期間でヒトゲノムを解読したと発表している²。企業は今、DNA 塩基配列解読技術のさらなる先進化、高速化、低コスト化をめざしてしのぎを削っている。

多くの人は、個々の DNA 断片を増幅せずに解読する「一分子」塩基配列解読法が理想であると考えている。この方法なら、増幅によりエラーが入り込む余地がな

いからである。パシフィック・バイオサイエンス社（米国カリフォルニア州メンローパーク）は、蛍光標識をした塩基を使って酵素が DNA を組み立てるところを監視するという方法により、その種のサービスを提供する計画を発表している。しかし、米国立ヒトゲノム研究所（NHGRI；メリーランド州ベセスダ）が最も多くの資金を投入した解読法は、DNA が微細な孔を通るところを解読する「ナノポア塩基配列解読法」である。ヒトゲノムを 1000 ドル（約 9 万円）で解読する技術を開発するために同研究所が投じた計 6800 万ドル（約 61 億円）の研究資金のうち、4000 万ドル（約 36 億円）がこの技術の開発にあてられた。オックスフォード大学（英国）の化学生物学者である Hagan Bayley は、そのうちの 420 万ドル（約 3 億 8000 万円）を受け取った。彼は、

この資金を使って研究を行い、その成果を基礎としてオックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社を設立した。同社は現在、実用的なナノポア塩基配列解読機の開発に最も近いところにいる。

NHGRI の技術開発計画を取り仕切る Jeffrey Schloss によれば、ナノポア塩基配列解読法は、同研究所がこれまでに支援したことのある塩基配列解読法の中で唯一、細胞から抽出した DNA を増幅したり、修飾したり、蛍光タグなどの高価な試薬を用いたりせずに、その塩基配列を直接解読できる可能性のある方法であるという。オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社の最高経営責任者である Gordon Sanghera は、最終的には自社の技術が「世界を制覇」することを望んでいる。けれども彼は、厳しい競争に直面している。パシフィック・バイオサイ

エンシーズ社やコンプリート・ゲノミクス社（米国カリフォルニア州マウンテンビュー）をはじめとして、ゲノム塩基配列解読の分野でトップに立とうという野心をもつ企業は少なくないからである。Schlossによれば、ナノポア塩基配列解読法が見込みどおりの成功を収められるかという点につき、科学界はまだ懐疑的であるという。その理由は単純明快だ。「パシフィック・バイオサイエンス社やコンプリート・ゲノミクス社には DNA 配列を解読したという実績がありますが、ナノポア法にはそれがないからです」。

ナノポアが DNA 塩基配列解読法の基盤になりうることを初めて示した、初期の知見の1つは1996年に得られた。ハーバード大学の生物物理学者 Daniel Branton のチームが、DNA がナノポアを通り抜けるときに、その孔を通るイオンの流れが乱されることを利用して DNA の存在を検出できることを明らかにしたのである³。

Branton らが調べたのは、 α -ヘモリンという七量体の膜タンパク質の輪が形成する孔だった。これは、感染性細菌の黄色ブドウ球菌が、ほかの細胞を攻撃するときにその膜に開ける孔と同じものである。彼らの研究成果は、4種類の塩基が孔を通り抜けるときには、この孔を通るイオンの流れにそれぞれ異なる変化が生じるため、この変化を電気信号として読み取れば、通過した塩基の種類がわかることを示唆していた。

小さな始まりから

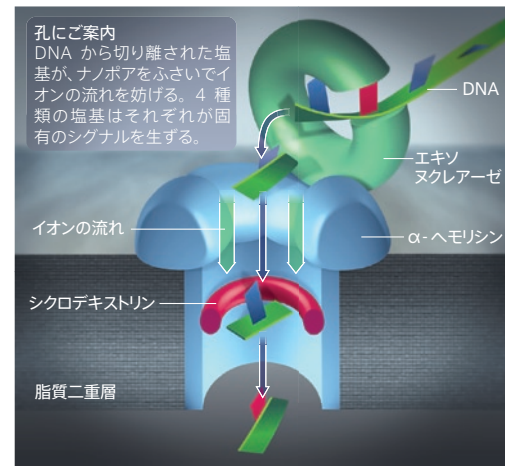
Bayley と Sanghera が 2005 年にオックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社を設立した当初は、DNA やその他の分子の検出システムとなるナノポアを開発することを目標としていたが、同社はすぐに DNA 塩基配列の解読法に専念するようになった。Bayley には 20 年にわたってナノポアを研究してきた経験があり、Sanghera にはアボット研究所で働いていた時代に蓄積したビジネスのノウハウ

があった。同社が調達した 3500 万ドル（約 32 億円）はすべて個人および機関投資家からのものであり、そのうち 2000 万ドル（約 18 億円）は 2008 年 3 月期に調達された。

Bayley は 2006 年に、個々の塩基をナノポア中で十分長く保持することができれば、塩基の種類を識別できることを示した⁴。ハワード・ヒューズ医学研究所ジェネリア・ファーム研究キャンパス（米国バージニア州アシュバーン）の応用物理・計測学グループに所属する Tim Harris は、「この研究は、1 個の遊離ヌクレオチドが識別可能なシグナルを生じるという点で画期的でした」と語る。

個々の塩基を孔の中で十分長く保持してイオンの流れを乱させる必要があるなどの理由から、現時点では、DNA を立て続けにナノポアに送り込むことはできない。そこで Bayley らは、遺伝子工学と化学を利用してナノポアに 2 つの改変を施すことで、塩基配列を検出できるようにした。彼らはまず、孔の入り口にエキソヌクレアーゼを配置した。この酵素は、上を流れている溶液に含まれる DNA 分子の末端を捕捉し、塩基をひとつひとつバラバラにして、孔の中に導き入れる（右上の図参照）。その先にはシクロデキストリンの環状分子をはめ込んで、孔のくびれをさらに細くした。塩基が孔を通り抜けるためにはこの部分を押し分けていく必要があり、その際、ヌクレオチドのリン酸基がシクロデキストリンと短時間だけ結合して孔をふさぐ。4種類の塩基はそれぞれ大きさが異なり、シクロデキストリンのところに停滞する時間も、孔のふさぎ方も違ってくるため、固有のシグナルが測定される。

「この方式の最大の長所は、一分子技術であるがゆえに、DNA の増幅もクローン化もする必要がないという点です」と Bayley は話す。蛍光タグも不要であり、理論的には試料の調製は最低限で済む。Bayley はさらに、「ゲノム DNA を直接解読しているため、原理的には、4種類



の塩基のほかに修飾塩基も識別できるはずですよ」という。オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社の未発表データによれば、同社のシステムは4種類の塩基をよりよく識別できるだけでなく、5-メチルシトシン（シトシンが化学的に変化したものであり、遺伝子の調節に広く関与している）も検出できるという。

2008年5月、技術の進歩に十分な手応えを感じた同社は、次世代の塩基配列解読システムを開発するという意向を発表した。同社はまた、ナノポア研究の第一人者たちから粛々と知的財産権を吸い上げており、Branton やカリフォルニア大学サンタクルーズ校（米国）の David Deamer および Mark Akeson らとライセンス契約を結んでいる。ウェルカム・トラスト・サンガー研究所（英国ケンブリッジ）で塩基配列解読技術の研究を主導する Harold Swerdlow は、「彼らは競争をなくそうとしているのです」と語る。

重大な問題

オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社は、このプロジェクトをめぐる最大の関心事については明言を避けている。それは、「この段階から実用的な多チャンネル式配列解読機へのスケールアップを、どのようにして進めていくつもりなのか？」ということである。同時に使える孔は何個まで増やせるのだろうか？ それにより、

DNAの塩基配列をどのくらいの速さで解読できるようになるのだろうか？ なによりも、いつになったら配列解読データが得られるようになるのだろうか？

同社の研究室に置かれた初期の試作品は、完成にはほど遠いように見える。別々のDNA断片を解読する128個の孔を搭載できる10平方センチメートルのチップからは、試料を送るプラスチックのチューブと、電子機器が入った箱につながるむき出しの配線が伸びている。完成品がいつできて、どのようなものになるのかという詳細については、同社の関係者は固く口を閉ざしている。時期と内容を具体的に予告しておいて、期待を裏切ったり、逆に期待以上の結果を出したりすることを避けたらという。「当社のような企業は、軽々しく予告するわけにはいかないのです」とSangheraはいう。「企業戦略と

して、極めてむずかしいところです」（コラム「過熱する売り込み合戦」を参照）。

Swordlowは新しい企業のすべてから話を聞いている。「誰が本当のことを知っているのか、判断するのは極めて困難です」と彼はいう。「どの談話にも、多かれ少なかれ噂話のようなところがあります」。彼は、オックスフォード・ナノポア・テクノロジー社については楽観視しているが、確信はもてずにいる。気にかかるのは、配列解読に必要な試薬が、何らかの形で生体膜を破壊してしまうのではないかという点であるという。

塩基配列解読を専門とするNABsys社（米国ロードアイランド州プロビデンス）という新興企業の最高経営責任者であるBarrett Breadyは、「私自身も、ナノポアを利用した直接的な配列解読には疑わしいところがあると思っています」と話す。

その疑いの根底には、この方式に固有のむずかしさがあるという。「4種類の塩基の差は、実のところわずかな数の原子の違いにすぎないのです。さまざまな原因によって生じるノイズのなかから、その差を検出しなければならないのです」。

NABsys社は、ブラウン大学（米国ロードアイランド州プロビデンス）の物理学者Xinsheng Sean Lingが2004年に設立した企業であり、オックスフォード・ナノポア・テクノロジー社と同じくナノポアを利用した塩基配列解読技術を研究しているが、実用化にはさらに遠い段階にあるように見受けられる。Lingとその同僚の科学者John Oliverは、2007年にNHGRIから2件で合計132万ドル（約1億2000万円）の研究費を受け取った。彼らが考えているのは、シリコンチップにあげたナノポアに、6塩基長のプローブを

過熱する売り込み合戦

昨年10月初旬にコンプリート・ゲノミクス社（米国カリフォルニア州マウンテンビュー）が「ヒトの全ゲノムを5000ドル（約45万円）で読む」ことを発表したのを聞いたJim Hudsonは、同社がその約束を果たせるのか疑問に思った。彼は、ハドソンアルファ・バイオテクノロジー研究所（米国アラバマ州ハンツビル）の共同設立者にして代表者であったので、その週の会合で同社の代表者らと顔を合わせたときに、数千米ドルの現金が入った封筒を差し出して、自分のゲノムを読んでほしいと依頼した。「『ひとつ頼むよ』ってね」とHudsonは語る。

コンプリート・ゲノミクス社

の代表者らは封筒を受け取るうとせず、その価格で実際に注文を受けているわけではなく、実現は2009年になると説明したという。Hudsonやほかの多くの科学者は、同社が本当にその約束を守れるのかどうか、いまだに疑問を捨てきれずにいる。

低価格で超高速の次世代DNA塩基配列解読法を世に出すという企業の発表と、それを裏づけるデータとの間には、隔たりが生じている。これまで、塩基配列解読技術の市場は学術研究機関に限定されていたが、1000ドル（約9万円）でゲノムを解読できるようになれば、バイオテクノロジー企業や製薬関連企業をこ

の市場に引きつけられるようになるかと期待されている。この新市場で地歩を築きたい配列解読企業は、投資家の関心を獲得しつつ、誇大宣伝による信用失墜を回避するというむずかしい舵取りを求められている。

ヘリコス・バイオサイエンス社（米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）は、2005年12月に、1日でヒトの全ゲノム配列を解読できるだけの潜在能力をもつ技術でバクテリアファージのゲノムを解読したことを発表した。同社はその後、ベンチャーキャピタルから4000万ドル（約36億円）を調達し、2007年5月の新規株式公開時には約4600万

ドル（約41億円）を調達した。しかし、解読機の不具合で計画が大幅に遅延し、その間に競合他社がヒトゲノムの解読に成功したと発表してしまった。ヘリコス社がヒトゲノムを解読できるのはまだまだ先であると考えられ、売り上げもほとんどないため、2008年1月に17ドル（約1500円）を超える高値をつけていた株価は、同10月には60セント（約54円）まで下落した。最高科学責任者のPatrice Milosによれば、同社は問題を解決済みで、2009年2月の「ゲノムの生物学と技術の進歩に関する会議（AGBT会議）」で新たなデータを発表する予定であるという。

とびとびに結合させた 10 万塩基長のゲノム DNA 断片を通していく方法である。このとき、既知の配列をもつ多様なプローブのライブラリーを使用する。DNA が孔を通り抜ける際に、プローブが結合した点がチップ中の電流によって検出され、電流値どうしの時間差からプローブの位置が特定される。このようにして多数の断片にプローブを結合させると、その配列からゲノムの全体像が組み立てられるというわけである。しかし Bayley は半信半疑である。「(タンパク質は) オングストロームの精度で操作することができますが、今日の技術では、プラスチックや窒化ケイ素にあけた孔を同じ精度で操作することはできないからです」。Harris は、NABsys 社の試料調製法には DNA の操作が含まれており、容易ではないと指摘する。「ゼロに近いコストで迅速に実施しなければなら

ない解析法にしては、試料処理が厄介すぎるように思われます」。

オックスフォード・ナノポア・テクノロジー社に技術供与しているハーバード大学の分子遺伝学者 George Church は、塩基配列解読法の開発競争を勝ち抜くのは、価格が最低で処理能力が最高の装置を開発した企業だろうと考えている。Church によれば、パシフィック・バイオサイエンス社などはデジタルカメラを利用して蛍光標識塩基の色の変化を読み取る配列解読方式の開発を進めており、この方式がナノポア方式に打ち勝つのではないかという。「デジタルカメラは、パソコンに処理できる限界に近いデータフロー速度で、数百万ビットの情報を集めることができます」。こうしたカメラは需要が非常に多いため、極めて低価格になっている。「超並列イオンチャンネルモニターでは、そうは

いかないでしょう」。

Schloss によれば、NHGRI はナノポアを利用した塩基配列解読法を長期目標とらえているという。「我々が 2004 年にこの計画を立ち上げたとき、DNA の配列解読にナノポアを利用するという目標が達成されるには 10 年かかるだろうと考えていました」。Sanghera はもっと大胆である。「我々の製品はすぐれたものになるでしょう。わざわざ技術の高さを売り込まなくても、データがおのずとそれを雄弁に物語るでしょう。すべてはそこから始まります」。

Katharine Sanderson はロンドンの *Nature* 記者。

1. Wheeler, D. A. *et al. Nature* **452**, 872-876 (2008).
2. Bentley, D. R. *et al. Nature* **456**, 53-59 (2008).
3. Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. & Deamer, D. W. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 13770-13773 (1996).
4. Astier, Y., Braha, O. & Bayley, H. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1705-1710 (2006).

この分野で有力企業がもう 1 社台頭してきたこともヘリコス社の痛手となった。パシフィック・バイオサイエンス社 (米国カリフォルニア州メンローパーク) は、かねてから DNA を複製する DNA ポリメラーゼという酵素を利用した新しい塩基配列解読法を開発していたが、2008 年 2 月に米国フロリダ州マルコ島で開催された AGBT 会議で発表したデータによりセンセーションを巻き起こした。それは、約 150 塩基対長の DNA 断片の配列解読を行ったという発表にすぎず、10 分足らずでヒトの全ゲノムの配列を解読するという最終的な目標に比べれば小さな一歩にすぎなかったが、目に見えるデータを出したことで科学界からの信用を獲得し、2008 年 7 月の時

点でベンチャーキャピタルから 1 億ドル (約 90 億円) を調達することに成功した。

コンプリート・ゲノミクス社の思いがけない登場には、この分野では前代未聞の大胆さがあった。同社は 6 ~ 9 か月後に配列解読コストを 5000 ドル (約 45 万円) に下げたことを約束したが、発表後もデータを一切開示しておらず、将来の顧客をやきもきさせている。ベイラー医科大学ゲノム配列解読センター (米国テキサス州ヒューストン) の所長である Richard Gibbs は、コンプリート・ゲノミクス社の発表がマスコミをにぎわせていたちょうどそのころ、ある民間の資金提供者から大規模ながんゲノム配列解読研究への出資をとりつけたところだったが、新しい企業はるかに低

価格でゲノム配列を解読しようとしているのに、あなたのところはなぜ 1 ゲノム当たり 35 万ドル (約 3200 万円) も必要なのかと尋ねられてしまったという。Gibbs は昨年の 10 月にコールドスプリングハーバー研究所 (米国ニューヨーク) で開かれた会合で、「科学者である皆さんには、このジレンマをおわかりいただけるでしょう」と話した。

コンプリート・ゲノミクス社の最高経営責任者である Clifford Reid は、同社も 2 月の AGBT 会議でデータを発表し、システム生物学研究所 (米国ワシントン州シアトル) の Lee Hood との研究で得た親子の塩基配列を明らかにする予定であると語る。

別の情報筋によれば、同社は現在 1 ゲノム当たり 2 万ドル

(約 180 万円) も請求しているうえ、最低 5 ゲノムの発注が必要で、6 か月も待たなければならないという。Reid によれば、現在の単価は各注文の規模に基づいて決まっており、同社の処理能力が上げれば単価は下がってくるという。

「当社が非現実的な期待をさせているとは思っていません」と Reid は話す。「しかし、当社の技術が破壊的なものであるがゆえに、多くの人々をむずかしい立場に追い込んでしまったとは思っています。科学・医学界にあって、この種の破壊に対処することは重大な問題の 1 つです」。科学者側からは、実際に配列を見るまでは対処すべき破壊などほとんどないという声が聞かれる。

Erika Check Hayden