

7. バイオ関連分析機器

概説**(1) バイオ関連分析機器の特徴**

バイオテクノロジーの分野で使われる機器は多種多様である。もともとラボ用機器と同じ物が使われ、その後バイオ用として特化したものもある。その特徴は

微量分析である。：微量な反応生成物などを分離精製する。遺伝子組換えで取り扱うDNAの大きさは0.1~5 μ g程度である。

反応温度は37 $^{\circ}$ で、生体の体温に近い。

自動化：検出、分析、合成などを自動的（ロボットもある）に行う。

特別な施設を使う場合がある。：安全のため外部と遮断するためのクリーンルーム・ベンチなど。

試薬とのタイアップ：機器の開発だけでなく特定の専用試薬が不可欠の場合がある。

バイオテクノロジーでは、先ず基礎技術である「組換えDNA技術」「細胞融合・培養技術」を用いて、微生物、動物細胞、植物細胞などを作る。次に、微生物や細胞を用いて培養装置（バイオリアクター）を構築し、目的物（例えば成長ホルモン、インスリン（インシュリンともいう）など）を生産する。この過程で使用される装置は、電子顕微鏡、質量分析計、核磁気共鳴装置、培養装置から、DNA合成装置、ペプチド合成装置、サーマルサイクラ、表面プラズモン共鳴装置、DNAシーケンサ、ペプチドシーケンサ、コロニートランスファー、セルソータなどさまざまである。

(2) 組換えDNA技術の研究機器

遺伝子操作に用いられる装置は、安全キャビネット、微生物破碎装置（酵母の膜は硬いので、その破碎には特別な機器が必要）、抽出装置、超遠心分離機、電気泳動装置、デンストメータ、分光光度計、コロニーカウンタ、サーマルサイクラ、ペプチドシーケンサ、アミノ酸分析計、高速液体クロマトグラフ、液体シンチレーションカウンタ、DNAシーケンサ、DNA合成機、X線結晶解析、核磁気共鳴装置、発酵装置などがある。

(3) 動植物細胞融合・培養技術の研究機器

この分野では、電気泳動装置、クリーンベンチ、インキュベーター、電気細胞融合装置、セルソータ、フローサイトメーター、炭酸ガスインキュベーター、マイクロマニピュレーター、マイクロインジ

エクター、ラジオアイソトープ実験装置、イメージアナライザー、培養装置、プログラム式低温冷却冷蔵庫などの極低温冷凍装置などがある。

(4) 培養装置(バイオリアクター)と関連研究機器

オートクレープ、インキュベーター、振とう培養機、菌自動移植システム、クリーンベンチ、コロニーカウンタ、ジャーファーメンター、溶存酸素センサー、真空冷凍乾燥機、フラクションコレクター、エアリフト式培養装置、ホローファイバー式培養装置、灌流培養装置

(5) プロテオーム解析用研究機器

プロテオーム解析は、生命活動のある瞬間に存在するタンパク質の全体像を把握し、次の瞬間における全体像と比較することを基本戦略としている。先ず必要となるのは目的とするタンパク質の分離全体像である。これにはタンパク質混合物の高い分離能での分離：通常二次元電気泳動法やHPLCが使われる。分離したタンパク質の高感度での同定。：ペプチドマスフィンガープリンティング（PMF）法である。画像解析が行われる。次にタンパク質、ペプチドの構造解析が行われる。この際LC-MSが使用される。

二次元電気泳動装置、各種画像解析装置、分析用HPLC、分取用HPLC、ペプチドシーケンサ、表面プラズモン共鳴装置、質量分析計などが使用される。最先端の研究分野であり、新機種の開発やデータベースや解析ソフトなどが進展するものと思われる。

7.1

ペプチド合成装置 Peptide Synthesizer

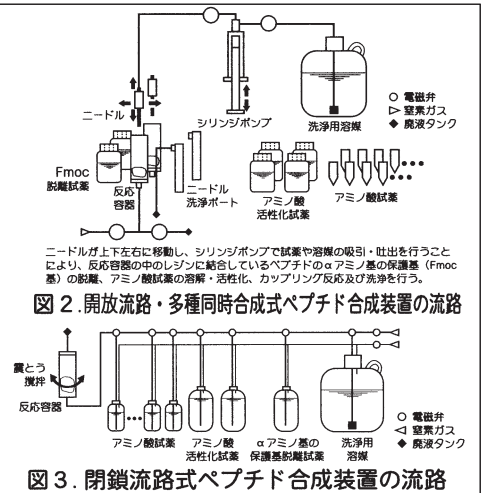
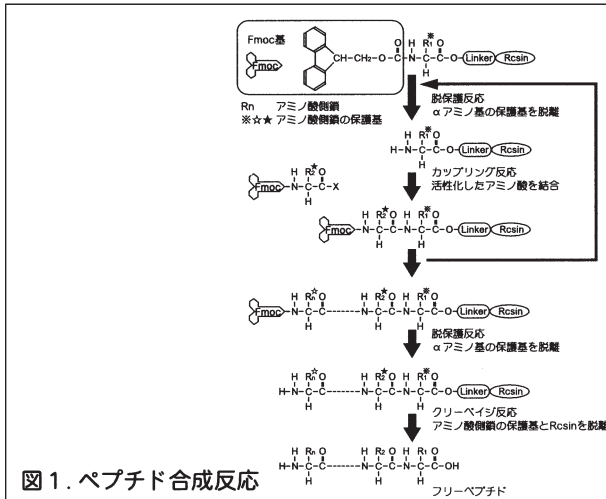


図 3. 閉鎖流路式ペプチド合成装置の流路

概要 ペプチド合成装置で用いられる固相合成法は、1963年に、R. B. Merrifieldにより開発されたもので、ペプチドのC末端カルボキシル基を固相支持体(レジン)に共有結合させ、N末端方向に順次アミノ酸を結合し、ペプチドを合成するものである。

ペプチド合成装置には、1度に1種類のペプチドを合成するものと多種類を同時に合成するものがあり、一般的に前者は閉鎖型流路で合成量が多く(数十~数千 μmol)、後者は開放型で1種類あたりの合成量が少ない(数~数十 μmol)。閉鎖型の装置は、反応溶液を振とう攪拌するパッチ方式と反応溶液をリサイクルする連続フロー方式がある。

原理と特徴 合成に用いられるアミノ酸試薬は自己重合や副反応を防止するため、 α -NH₂基と測鎖官能基に保護基が導入されている。反応容器にセットされるレジンには、あらかじめ第一アミノ酸(合成するペプチドのC末端アミノ酸)を固定したものをを用いることが多い。合成は、 α -NH₂の保護基をはずす脱保護反応とアミノ酸のCOOH基を活性化し結合させるカップリング反応を交互に繰り返すことで行われる。2つの反応の間には反応試薬を除く洗浄が行われる。このとき、固相合成法ではフィルタを用いてレジンに固定されているペプチドと反応溶液を簡単に分離することが可能なため自動合成に適している。このようにして合成されたペプチドは、C末端にレジンが、測鎖官能基に保護基が結合した状態であ

り、合成後レジンと保護基を切り離すクリーベージ反応を行う必要がある。クリーベージ反応の条件はペプチドのアミノ酸配列によって異なるため、通常は装置外で用手法によって行われる。

アミノ酸を1個結合するのに必要な時間は20~120分で合成法や装置の洗浄効率によって異なる。

合成法には α -NH₂基の保護基の種類によりFmoc法とtBOC法の2種類があり、また、アミノ酸の活性化法によりさらに細かく分かれている。現在は、クリーベージの条件が穏やかで安全なためFmoc法が使用されることが多い。

合成されるペプチドの長さも目的によって異なるが、アミノ酸数個~数十個のものが多い。

用途 合成ペプチドの主な使用目的

- (1) ヒト由来など天然物の入手が困難なペプチド。
 - (2) ウイルス由来など天然物の入手や取り扱いに危険を伴うペプチド。
 - (3) 天然のペプチドの一部を他のアミノ酸に置換した人工的なペプチド。
 - (4) 天然のタンパク質の部分的機能を研究するため一部分だけが必要な場合。
 - (5) 非天然アミノ酸などを組み込んだペプチド。
 - (6) 特定の部分を化学的に修飾したペプチド。
 - (7) 特異抗体作成のための抗原に用いるペプチド。
- 特に、(3)(4)では長さやアミノ酸配列が少しずつ異なった多数の合成ペプチドが必要である。

7.2.1 プロテインシーケンサ Protein Sequencer

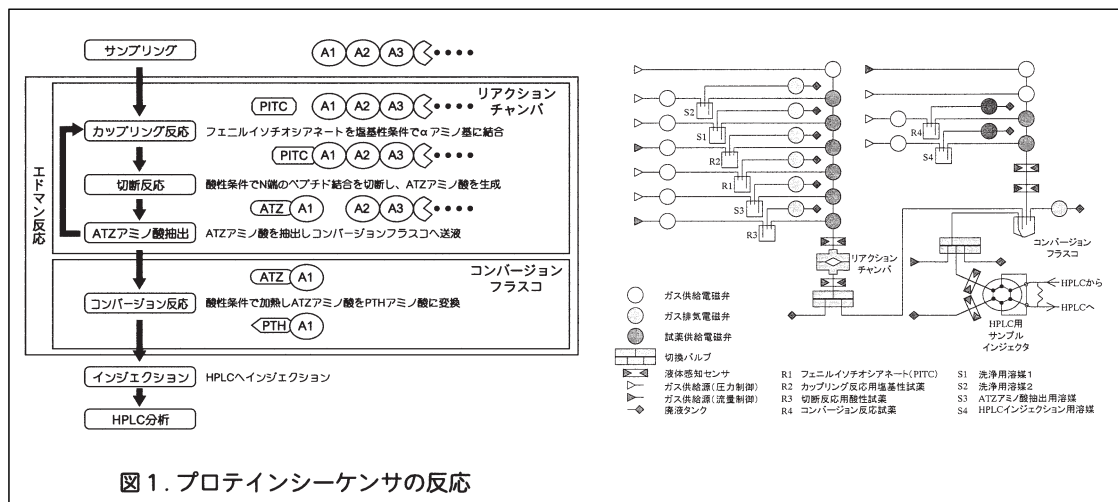


図1. プロテインシーケンサの反応

概要 プロテインシーケンサは、タンパク質(プロテイン)のアミノ酸配列(シーケンス, 一次構造)を自動的に解析する装置で, アミノ酸をN末端から順次一つずつ切断する反応を行う部分と切断されたアミノ酸を分析同定する部分で構成されている。

アミノ酸の切断法は, 1950年にスウェーデンのエドマンが確立したもので, エドマン反応(分解)と呼ばれる。切断されたアミノ酸は自動的にHPLCによって分析され, アミノ酸の種類が同定される。エドマン反応は当初, 切断されたアミノ酸と残りのタンパク質の分離を液相抽出で行う液相法であったが, 大量の試料と熟練を必要とした。また, タンパク質をフィルムなどに共有結合させ切断されたアミノ酸との分離や洗浄の際のロスをなくした固相法も開発されたが, 試料によって共有結合の効率が低い場合があり, あまり用いられていない。

現在の主流は, 非共有結合(疎水結合やイオン結合)によってタンパク質をフィルタやカラムに吸着させ, カップリング反応や切断反応の試薬をガス状で供給する気相法及びその変法である。

原理及び特徴 エドマン分解では, まずタンパク質のN末端アミノ基にフェニルイソチオシアネートを結合させる(カップリング反応)。次に, 酸性条件にすると, 結合した試薬が一番近いペプチド結合と反応してN末端のアミノ酸だけが切断される(切断反応)。これを繰り返すとアミノ酸をN末端から一

つずつ切断することができる。

切断されたアミノ酸は ATZ - アミノ酸となるが, 不安定なため PTH - アミノ酸に転換(コンバージョン反応)し自動的にHPLCに導入して分析同定する。

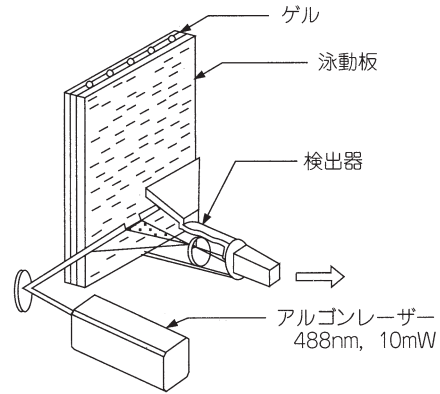
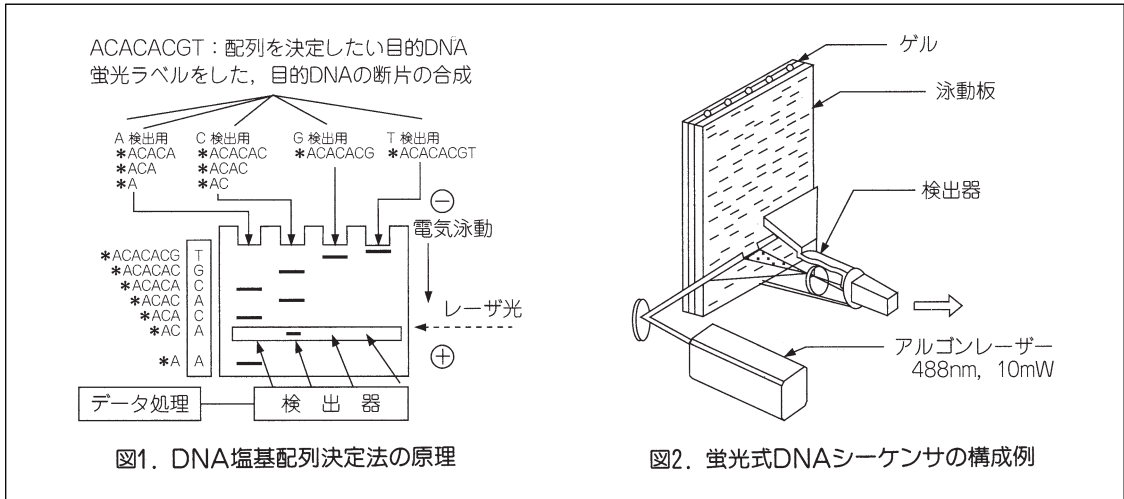
気相法では, 数~数十pmolで解析ができ, 1pmol以下での解析例もある。分子量10万の場合, 1μg以下で分析できることになる。アミノ酸一つを切断するのに必要な時間は30~50分程度で, コンバージョン反応とHPLC分析は次のエドマン反応と並行して行うことが可能である。解析可能なアミノ酸数は試料によって異なるが20~50個程度である。

また, 電気泳動で分離したタンパク質をフィルムに転写(プロットング)し, 目的のタンパク質が吸着した部分を切り取ってそのまま配列分析を行う手法もよく使用される。

但し, N末端のアミノ基が修飾(ブロック)されている場合はエドマン反応を行うことができず分析できない。

用途 タンパク質のアミノ酸配列情報は, NMRやX線結晶解析によるタンパク質の立体構造や機能の研究にとって重要であるばかりでなく, そのタンパク質に対応する遺伝子の塩基配列を推定し, その遺伝子を分離するための情報としても重要である。したがって, 生命科学, 医学, バイオテクノロジー分野の研究にとって最も重要な基礎情報のひとつといえることができる。

7.3.1

DNAシーケンサ
DNA sequencer

概要 DNA塩基配列の解析は 対象となる適当な長さのDNAを均一に増幅する過程，それを鋳型に，一塩基ずつ長さの異なるDNA断片群を合成する過程 DNA断片群を電気泳動により，長さによって分離し，そのパターンを読み取る過程により行われる。DNAシーケンサは，DNAを蛍光試薬で標識することにより，この過程を自動化したもので，電気泳動装置，光検出装置，およびデータ解析用のコンピュータにより構成される。

原理及び特徴 図1は，DNA塩基配列解析法の1例を示したものである。試料DNAを鋳型にし，ジデオキシ法（サンガー法）によりDNAポリメラーゼで一塩基ずつ長さの異なるDNA断片群を合成する。合成されるDNAは片側の末端もしくはその近傍に蛍光団を結合することにより標識される。蛍光標識されたDNA断片をポリアクリルアミドゲル中で電気泳動させて長さに応じて分離する。泳動始点から一定の距離の位置をレーザーで照射し，そこを通過する蛍光標識DNAからの蛍光を測定することにより，通過する順序から塩基配列が解析される。図2は，装置の一例を示す略図である。

蛍光標識法には，4種類の塩基に対してそれぞれ発光波長の異なる4種の蛍光試薬を用いる方式と，同一蛍光試薬で4種の塩基を標識する方式とがあり，それぞれ特徴がある。

(1) 4種の蛍光試薬で標識する方式とその特徴

4種の蛍光試薬により標識する法の場合，塩基種を蛍光波長の違いにより識別するので，4種の断片群を混合して，単一泳動路上で分離できる。従ってこの方法は，一回の泳動で解析できる試料数が多く，多数の試料を処理するのに適している。

一方，4種の蛍光試薬を使用した場合，蛍光スペクトルに重なりが生じ，また4種の塩基間で電気泳動の移動度が異なってくるので，塩基配列の決定に複雑なデータ解析が必要である。

(2) 1種の蛍光試薬で標識する方式とその特徴

この方法では，塩基種毎に異なる泳動路を用い，塩基種の識別は，蛍光の発する泳動路の違いにより行う。従ってこの方法は，一度に解析できる試料数が，4色法に比べ少ない。

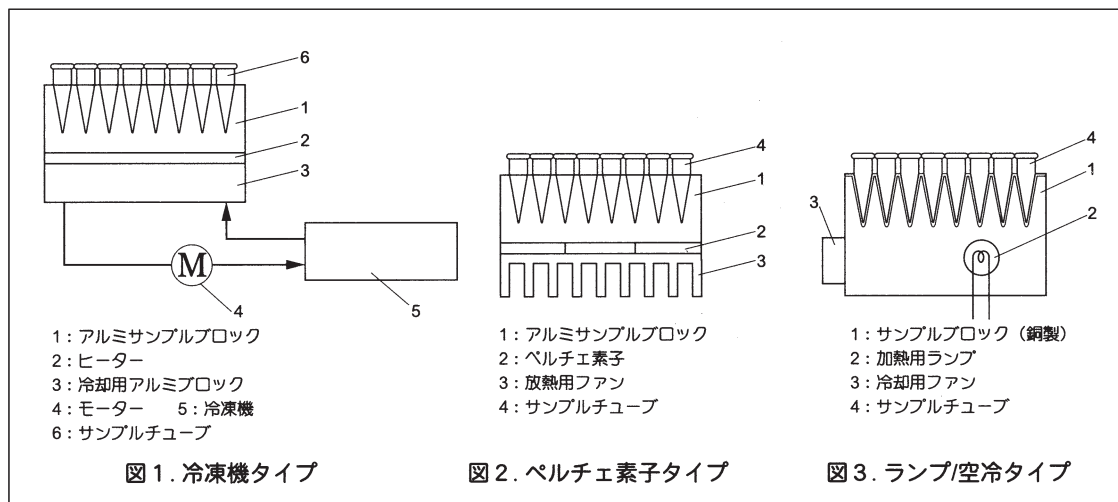
一方，この方法では，レーザーの発光波長と蛍光体の吸収スペクトルに最適な組合せのものを使用できるので，高い検出感度が得られ，微量DNAの解析に適している。

その他，機械化されているとは言い難いが，蛍光試薬の代わりに放射性同位体で標識し，フィルムに感光させて読み取る方式も従来から使われている。

用途 現在は，ほとんど分子生物学の基礎研究に用いられている。近い将来，感染症，遺伝病等の診断分野，個人の同定，血縁関係の判定等法医学分野へ応用が期待される。

サーマルサイクラ

Polymerase Chain Reaction (PCR)



PCRの概要 PCR (Polymerase Chain Reaction) は、DNAを増幅する方法として、遺伝子工学から生まれた技術である。DNAは、ポリヌクレオチド鎖が水素結合した2本鎖構造をとっているが、水素結合なので、高温では2本鎖が解離(熱変性)して1本鎖になり低温では再結合(アニーリング)して2本鎖に戻る。熱変性で1本鎖にしたDNAに、短い本鎖オリゴヌクレオチド(プライマ)をアニーリングさせ、耐熱性酵素「Taq DNAポリメラーゼ」を作用させると、プライマを起点としてDNAが複製され、2本鎖DNAができる。PCRは、この「熱変性(94℃)プライマのアニーリング(40~65℃)Taq DNAポリメラーゼによる複製(72℃)」を25~35回繰り返し、目的のDNAを100万倍に増殖する方法である。

サーマルサイクラの概要 PCRは通常、 $2 \sim 0.5$ mlのチューブ内で行われ、サーマルサイクラのサンプルブロックはこのチューブを24~96本セットできる。96穴マイクロプレートをそのまま使用できる装置もある。サーマルサイクラは、プログラブル・インキュベータであり、PCRの温度サイクルを正確に制御・再現し、かつチューブ間の温度隔差を最小限に抑えることが必須条件である。温度制御方式は、大きく分けて以下の3種類がある。

1: 冷凍機タイプ(図1): アルミ製のサンプルブロックをヒーターと冷凍機で制御するタイプ。加熱冷却パワーが大きいので、容量の大きいアルミブロック

を制御することができ、温度均一性の良い安定した制御を行うことができる。ブロック中の温度むらを小さくするため、冷却水路や、ヒータ・温度センサの位置などに各メーカーはノウハウを競う。ただしコンプレッサや冷却水モータを使用するため、装置のサイズが大きくなりがちである。

2: ペルチェ素子タイプ(図2): ペルチェ素子を用いてサンプルブロックの加熱冷却を行うタイプ。ペルチェ素子の加熱冷却パワーに限界があるので、アルミブロックはなるべく容量を小さくする必要がある。ブロック中の温度むらを小さくするために、ブロック形状や、ペルチェ素子・温度センサの位置などに各社ノウハウを競う。小型化でき、電気制御による優れた温度コントロールが可能であるが、温度の上昇・下降を繰り返すため、ペルチェ素子の品質によっては故障しやすくなる。

3: ランプ/空冷タイプ(図3): 加熱にランプ、冷却にファンを用いるタイプ。サンプルブロックは、熱伝導に優れた銅を用い、最大限に容量を小さくする。小型化できるが、温度むらが出やすく制御が不安定で、室温プラス5℃程度までしか下げられない。

その他 高温時の水分蒸発によるPCR反応液の濃縮・枯渇を防ぐため、あらかじめ反応液上面にミネラルオイルを添加するが、現在では、サンプルブロック上部を反応液温度よりも高く保ち還流を防ぐ方式、いわゆるノンオイルタイプが主流になっている。

7.4

バイオセンサ Biosenser

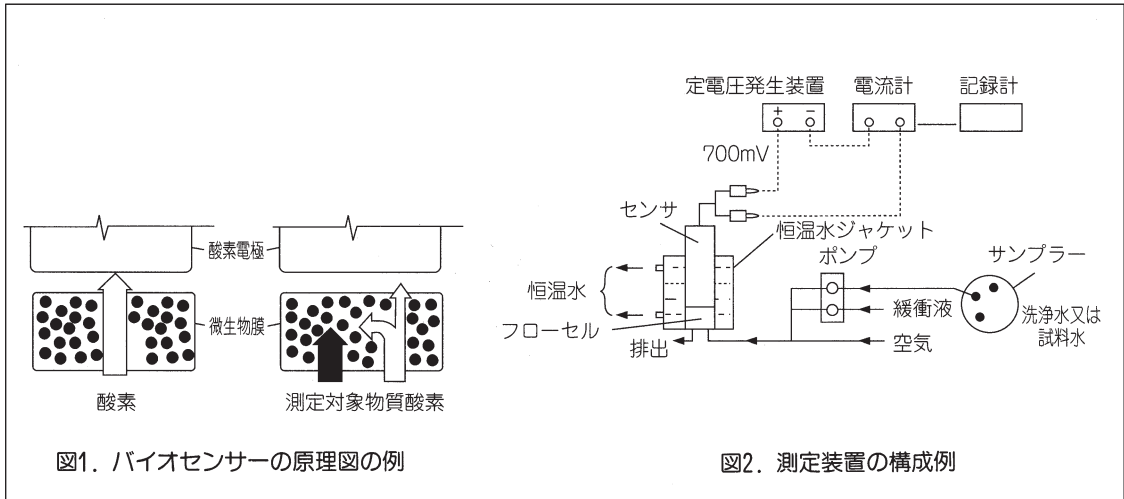


図1. バイオセンサーの原理図の例

図2. 測定装置の構成例

概要 バイオセンサーは、特定の物質を選択的に生物化学的に酸化などをさせる微生物膜や酵素膜と、ポーラログラフ式隔膜形酸素電極を組み合わせた生化学センサーである。一般にはこの、バイオセンサーと恒温槽、緩衝液、定電圧発生装置、電流計等を組み合わせて測定に供する。

原理及び測定方法 バイオセンサーは、微生物や酵素を固定化した感応膜を、ポーラログラフ式隔膜形酸素電極の先端に密着した構造となっている。

試料水中にこのセンサーを浸すと、感応膜に浸透した試料水中の測定対象物質が酸化され、酸素が消費される。このため酸素電極に達する酸素量は、測定対象物質の濃度に対応して減少する。従って酸素電極の出力の減少量から、その濃度を知ることができる。図1にこの原理図の1例を示す。また、微生物や酵素は化学物質に対して選択性を持っており、さらに感応膜をガス透過性膜で覆えば、揮発性物質だけを透過させることができる。これによって、バイオセンサーに高い選択性を持たせることができる。

図2に測定装置の構成例を示す。測定方法としては、ピーカー測定と流れ測定の2通りがあるが、一般に測定の効率化、および微生物膜の安定性を考慮して、流れ測定で行うことが多い。測定装置は、測定温度を一定にする、サンプルのpHを中性にする、サンプル中の溶存酸素濃度を一定にする、と

いう点を考慮して、バイオセンサー、恒温水ジャケット付きフローセル、ポンプ等から構成されている。測定の際には、洗浄水、標準液および試料水を交互に送液し、途中で緩衝液と合流させる。同時に空気を送り込み、酸素が飽和している状態にする。バイオセンサーで検出された酸素濃度に対応する電流値は、電流計で表示される。

用途 現在微生物センサーとしては、BOD、エチルアルコール、酢酸、亜硫酸等、酵素センサーとしては、グルコース、L-アスコルビン酸、L-乳酸、L-グルタミン酸等がある。各々のセンサーの主な用途は以下の通りである。

BOD：工場排水、下水処理水、エチルアルコール・酢酸：食品工業、発酵工業の工程管理、食品中の分析、亜硫酸：ワイン、果汁等の酸化防止、各種発酵食品の品質管理、グルコース・L-乳酸：食品中の分析、医療分野、L-アスコルビン酸：食品中の分析、L-グルタミン酸：生化学研究、食品中の分析等の用途がある。

この他にも、製品化の可能性の高いものが何種類もあり、より応用範囲が広がるものと思われる。