

ナノバイオチップによる DNA 分離

NEC 基礎・環境研究所

馬場 雅和・佐野 亨・井口 憲幸・飯田 一浩・阪本 利司・川浦 久雄

Separation of DNA Molecules using Nanobiochip

Masakazu Baba, Tohru Sano, Noriyuki Iguchi, Kazuhiro Iida,
Toshitsugu Sakamoto, Hisao Kawaura

Fundamental and Environmental Research Laboratories, NEC Corporation

1. はじめに

分子・原子を含むナノメートルサイズの性質を利用する技術であるナノテクノロジーと、DNA や蛋白質等の生体物質を取り扱う技術であるバイオテクノロジーとが融合したナノバイオテクノロジーに大きな注目が集められている。ナノバイオテクノロジーは、アプローチの方向性において大きく二つに大別される。一つは、ナノテクを用いて生体分子を解析するナノからバイオへのアプローチである。他方は、ナノメートルサイズの生体分子がもつ自己組織化能などの利点を用いるバイオからナノへのアプローチである。我々は、電子ビームリソグラフィを基盤としたナノテクを用いて生体分子を解析するナノバイオテクノロジーの開発を行っている。最近の電子ビームリソグラフィ技術では、レジスト材の進歩により生体分子と同程度のサイズである 10 nm レベルのパターン形成¹⁾が可能となっており、我々はその高い加工精度を生かした新しい生体分子解析技術の開発を目指している。

〒305-8501 茨城県つくば市御幸が丘 34
TEL 029-850-1154
FAX 029-856-6139
E-mail: m-baba@aj.jp.nec.com

我々が目標としている生体分子は主に DNA や蛋白質である。例えば、DNA のサイズは塩基対により形成される 2 重らせんの太さとして直径約 2 nm である。その長さは塩基数に依存し、1000 塩基対 (1 kbp: kilo base pair) では約 340 nm となるが、液中にある場合、その形状は慣性直径 150 nm のランダムコイル状になっている²⁾。また、蛋白質のサイズは、3 次元的な構造 (フォールディング構造) を配している状態では直径数 nm 以下のものが大半である。これらの大きさは先ほど述べたナノテクノロジーによる 10 nm の加工レベルと同程度の大きさである。

これらの生体分子の解析に用いられる代表的な技術として、サイズによる分離技術がある。DNA の解析では様々な処理で断片化された後の塩基数を調べることにより重要な情報を得ることができ、塩基数を反映するサイズにより分離する技術が用いられる。また蛋白質解析の場合、多種の蛋白質混合サンプル (血液中には 1 万種類あると言われている) から目的蛋白質を解析するための精製ステップにおいて、その一つの性質であるサイズで分離する技術が用いられる。このサイズ分離技術の代表的なものにゲル電気泳動とクロマトグラフィがあげられる。

ゲル電気泳動ではポリアクリルアミドやアガロースといったポリマーをゲル状に固めたゲル分離材が用いられる。DNA はポリマーが絡み合って形成された網目のポア構造の中を流れ、大きく長い DNA はゲル分離材中で強い相互作用を受けその移動度は遅く、小さく短い DNA は弱い相互作用を受けその移動度は早い。このようなふるい型の原理によりゲル電気泳動において DNA はそのサイズに従って分離される。また、サイズ排除型クロマトグラフィ (SEC 型クロマトグラフィ : size exclusion chromatography) では細孔を有する球状のビーズ (多孔質ゲルと呼ばれる) が分離材として用いられる。ビーズが充填されたカラムの中では二つの大きさのポア構造が形成されている。一つが、ビーズとビーズの間隙により構成される大きなポア構造であり、他方は、ビーズ表面にある細孔により構成される小さなポア構造である。分子がカラムの中を流れる時、小さなポア構造より大きな分子は大きなポア構造のみを流れその移動度は早い。一方、小さなポア構造より小さな分子は小さなポア構造に侵入しトラップされるためその移動度は遅い。このような SEC 型の原理によりクロマトグラフィにおいて分子はゲル電気泳動とは逆の順番でサイズにより分離される。

我々は、これらのポリマーやビーズのような自然形成で作製された分離材の代わりにナノテクノロジーにより作製された人工ナノ構造を分離材として用いるナノバイオチップを開発している。自然形成による分離材に対し、人工ナノ構造分離材は、使用前の分離材の調整が不要であり再現性や安定性が高い。さらにシリコン、ガラス、プラスチックなどの半導体製造で用いられる材料で作製されているため、様々な流体素子との集積化が期待される。

このような研究は既に幾つか報告されている。W. D. Volkmuth らは直径 $1\ \mu\text{m}$ のピラーアレー ($1\ \mu\text{m}$ の間隙) を作製し、その中を流れる DNA (100 kbp) の動きを観察している³⁾。本

構造ではふるい型原理に基づいた分離が行われていると考えられる。その後、S. W. Turner らは 100 nm の間隙を有するピラーアレーに 2 種類の大きさの DNA を流し、一分子観察によりそれらの移動度が異なることを示した。やはりふるい型原理に基づく分離が行われているものと考えられるが、DNA の性状が 2 種類の分子で異なるため、分子の塩基数と移動度の相関が異なっている⁴⁾。

我々は、電子線リソグラフィ技術を用いてタイプの異なる人工ナノ構造分離材を有する電気泳動チップを作製し、それぞれのナノ構造により異なる DNA のバンド分離結果を得た。その結果、ナノ構造のデザインにより分離モードの制御が可能であることを見出した。本稿では、近年の研究成果^{5),6)}について紹介する。

2. ナノ構造とその動作原理

我々が開発している 2 種類のナノ構造を用いた分離材の動作原理を図 1 を用いて説明する。図 1(a) は均一なピラーアレーにより構成された単純ピラー構造である。この構造を流れる分子は、ゲル電気泳動と同様の原理で大きな分子ほど強いトラップ作用を受け、その結果、小さな分子ほど早く流れるふるい型分離が行われる。図 1(b) は、短冊状の壁を並べることで形成された広い間隙と狭い間隙を有する SEC 構造である。この構造を流れる分子は、ブラウン運動を伴って前進し、狭い間隙より大きな分子は広い間隙だけを流れるため早く流れ、狭い間隙よりも小さい分子は狭い間隙にトラップされながら遅く流れる。その結果、SEC 型クロマトグラフィと同様な原理で、大きな分子ほど早く流れる SEC 型分離が行われる。

3. チップの作製方法と電気泳動実験方法

人工ナノ構造を分離材として有する電気泳動チップを図 2 に示した方法を用いて作製した。

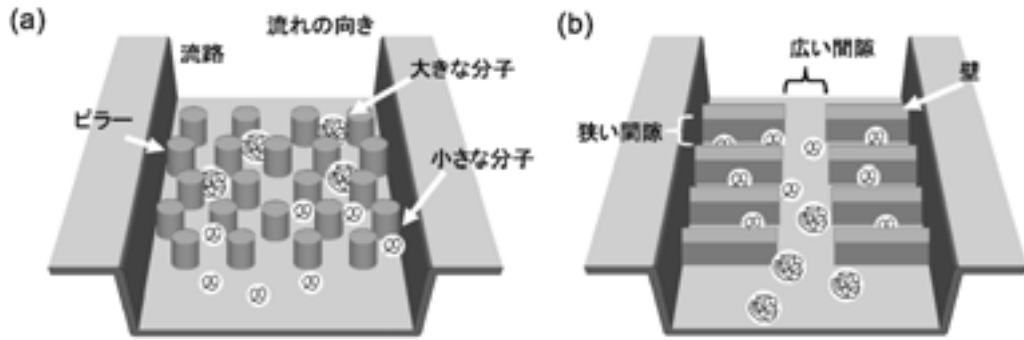


図1 人工ナノ構造による分子分離
 (a) 単純ピラー構造, 小さな分子が早く流れるふるい型分離
 (b) SEC 構造, 大きな分子が早く流れる SEC 型分離

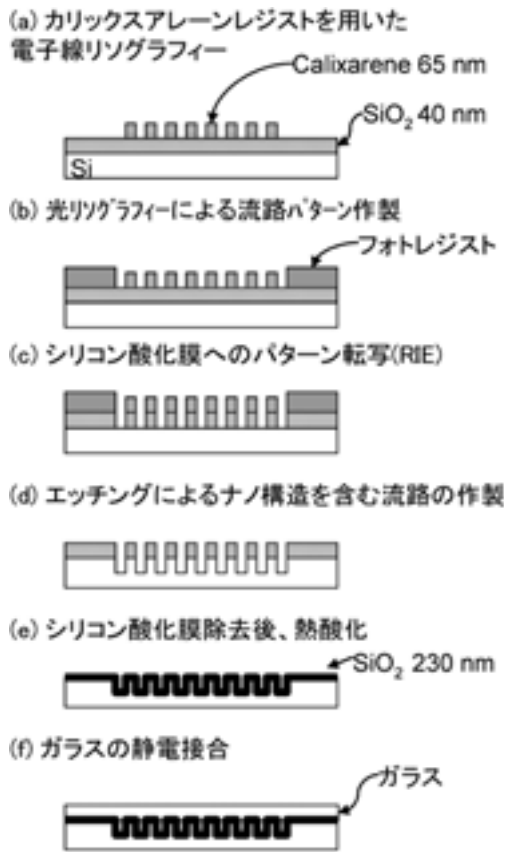


図2 電気泳動チップの作製プロセス

基板は熱酸化 (40 nm) 後の Si (100) 基板を用いた。その表面に高分解能電子ビームレジスト

(calixarene¹⁾) を塗布し電子ビームによりナノ構造パターンを描画した (図 2(a))。現像後, 電子ビームレジストパターンを溶解しないフォトレジストを塗布し十字型の流路パターンを露光した。これら 2 種類のレジストによる複合パターンをマスクとして熱酸化膜を RIE 装置 (CF₄+CHF₃ ガス) によりドライエッチングした。有機洗浄および酸洗浄によりレジスト除去後, 熱酸化膜のパターンをマスクとしてシリコンを ECR 装置 (HBr+O₂ ガス) によりドライエッチングし, 深さ 360 nm のシリコンナノ構造を有する流路を形成した。電気的絶縁のために 230 nm の熱酸化を行った後, ふたとしてパイレックスガラスを静電接合しチップを作製した。図 3 は静電接合したガラス-Si 基板をナノ構造領域で割り断面を観察した SEM 写真である。直径 150 nm のピラーが間隙 150 nm 隔てて並んでおり, ピラーとガラスの間には隙間なくふたがされていることが分かる。ふたにはあらかじめ 4 つの穴が空けられており, 電圧はその穴を通じて印加される。溶液を導入するために, この 4 ヶ所にはガラス管リザーバを接着した。

電気泳動チップには, 一定量のサンプル溶液をナノ構造領域に導入する流路構造が必要である。そのため, 図 4 のようなサンプル溶液を導く導入路と, ナノ構造領域を有する分離路と

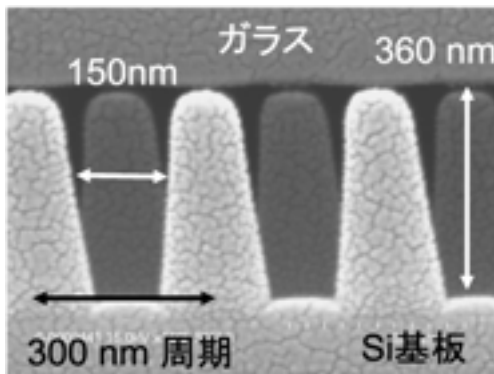


図3 静電接合した後の断面 SEM 写真
(SEM 観察のための金属コートあり)

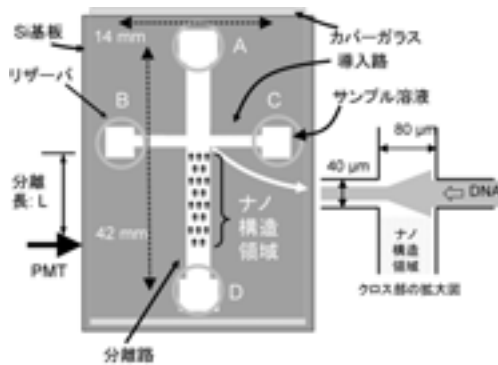


図4 電気泳動チップの模式図

で構成される十字型チップがデザインされている。流路の寸法は、導入路幅：40 μm 、分離路幅：80 μm 、深さ：360 nm である。リザーバ (A, B, C, D) に設けた白金電極を通じて電圧を印加する。

電気泳動による分離実験について説明する。まず、流路全体をバッファ溶液 (1 x TBE, 0.5 % MPC ポリマー⁷⁾ 含有) で満たした後、C リザーバに蛍光色素 (YOYO1) で染色した DNA サンプル溶液を入れる。次に、BC 間に電圧を印加しサンプル溶液を C から B の方向に電気泳動により移動させ導入路に満たす。次に、BC 間の印加を止め、AD 間に電圧 (V_E) を印加し、ナノ構造領域に十字型流路のクロス部に

存在したサンプルを導入する。この導入された一定量のサンプルをプラグと呼んでおり、その体積は 1 pL である。インジェクションされたサンプルプラグは、その中に含まれる DNA 分子の大きさに従ってナノ構造分離材により分離されバンドを形成する。実験は、2, 5, 10 kbp の 2 本鎖 DNA 分子が混合されたサンプルを用いて行われた。これらの分子の慣性直径はそれぞれ 190, 320, 460 nm である。バンド分離の様子は CCD により一分子観察され、また、分離長： L (~ 8 mm) の位置で光電子増倍管 (フォトマルチプライヤー管：PMT) により蛍光強度の時間変化として測定された。

4. 実験結果

図5および図6は単純ピラー構造、SEC構造におけるナノ構造の SEM 写真と、電気泳動結果である。グラフは PMT 信号を縦軸に、プラグをインジェクションした時間からの経過時間を横軸にしてプロットされている。作製された単純ピラー構造は図5(a)のように 250 nm ピッチで並ぶナノピラーで構成され、ピラーとピラーの間隙は約 150 nm である。図5(b)の電気泳動結果のように、サイズによる明瞭な分離結果が得られた。また、CCD 観察によりそれらのピークを構成する分子の大きさを確認し、2-5-10 kbp の順で、サイズの小さな分子ほど短時間で検出され、より大きな泳動速度を持つことが分かった。本結果は、本構造がふるい型分離モード (小さな分子ほど速度が大きい) を持つことを示している。

次に、SEC型分離を実証するため、図6(a)の長さ 2 μm の短冊状の壁を並べた SEC 構造を作製した。狭い間隙は 400 nm、広い間隙は 1070 nm である。この構造は今回用いた DNA 分子の大きさに合わせて設計されている。すなわち、5 kbp 分子 (直径 320 nm) の分子が侵入できるように狭い間隙を 400 nm とした。また、溶液中で数 μs のブラウン運動する分子が

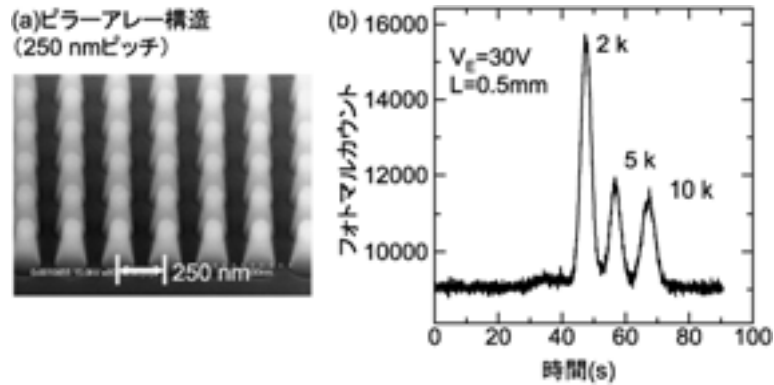


図5 (a) 単純ピラー構造のSEM写真, (b) 2, 5, 10 kbpのDNA分子サンプルの電気泳動分離結果 (印加電圧 = 30 V, 分離長 = 0.5 mm)

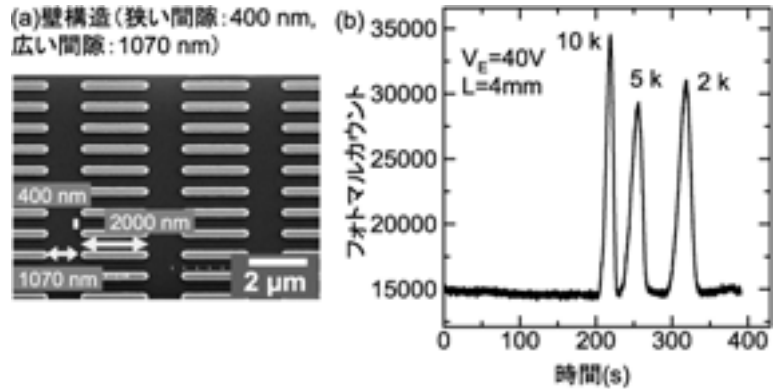


図6 (a) SEC構造のSEM写真, (b) 2, 5, 10 kbpのDNA分子サンプルの電気泳動分離結果 (印加電圧 = 40 V, 分離長 = 4 mm)

狭い間隙に頻度高く入ることができるように広い間隙は $1\mu\text{m}$ とした。図6(b)に電気泳動結果を示す。本構造において10-5-2 kbpの順で分子が検出され、大きな分子ほど泳動速度が大きい結果を得た。また、CCD観察により、狭い間隙(400 nm)より大きい10 kbp分子は広い間隙のみを流れるのに対し、間隙より小さい2, 5 kbp分子はブラウン運動しながら広い間隙と狭い間隙の両方を流れることが分かった。本結果は、本構造がSEC型分離モード(大きな分子ほど速度が大きい)を持つことを示している。2 kbpと5 kbp分子の両方が狭い間隙に侵

入できるにもかかわらず、互いの分離が可能であることは、狭い間隙への入りやすさや間隙からの出やすさが分子サイズで異なるためと考えられる。

SEC構造の特徴として、大きな分子が先に流れるためナノ構造が詰まりにくいという利点が考えられる。実際、これら二つの構造に48 kbp(直径990 nm)分子を流したところ、単純ピラー構造ではナノ構造領域の入り口で分子の目詰まりが観察されたが、SEC構造ではこのような現象は無かった。

本実験では分離構造や印加電圧等の実験条件

最適化は行われていない。分離構造により分離性能が大きく影響を受けるだけでなく、印加電圧条件やサンプル濃度によっても分離性能は異なる。これらの最適化については今後の課題である。また、単純ピラー構造と SEC 構造の間での分離性能や処理速度の差異についても、今後の詳細な調査を通じ明らかにして行く必要がある。

5. ま と め

DNA やタンパク質をサイズで分離する構造として、従来提案されている単純ピラー構造に加え、SEC 構造を提案した。それらのナノ構造を分離材として用いた電気泳動チップを作製し、ふるい型および SEC 型の DNA バンド分離データを取得し、基本動作を実証した。本研究はナノ構造のデザインにより分離モードや分離分子範囲等の制御が可能であることを示している。我々のナノ構造分離材は自然形成による分離材と異なり様々な大きさ（間隙）を有するものを自由に作製することができ、タンパク質

から細胞まで様々な生体分子の分離に用いられると期待される。また、他の流体素子との集積化が可能となり解析装置の縮小化（チップ化）、解析の高速・並列処理化が実現され、プロテオミクス・診断などの分野での利用が期待される。

参 考 文 献

- 1) J. Fujita, Y. Ohnishi, Y. Ochiai and S. Matsui, *Appl. Phys. Lett.* **68**, 1297 (1996).
- 2) 喜羽百合子, 二宮美千代, 馬場嘉信, *Chromatography* **20**, 27 (1999).
- 3) W. D. Volkmuth and R. H. Austin, *Nature (London)* **358**, 600 (1992).
- 4) S. W. Turner, A. M. Perez, A. Lopez and H. G. Craighead, *J. Vac. Sci. Technol. B* **16**, 3835 (1998).
- 5) M. Baba, T. Sano, N. Iguchi, K. Iida, T. Sakamoto and H. Kawaura, *Appl. Phys. Lett.* **83**, 1468 (2003).
- 6) 川浦久雄, 馬場雅和, 飯田一浩, 佐野 亨, 井口憲幸, 阪本利司, *応用物理* **72**, 1404 (2003).
- 7) K. Ishihara, H. Oshida, Y. Endo, T. Ueda, A. Watanabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.* **26**, 1543 (1992).