

ナノ構造体を用いた DNA 解析

1. 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻
2. 名古屋大学予防早期医療創成センター
3. 名古屋大学プラズマナノ工学研究センター
4. 産業技術総合研究所健康工学研究センター
5. 自然科学研究機構分子科学研究所

安井隆雄¹, 加地範匡^{1,2}, 岡本行広^{1,2}, 渡慶次学^{1,2}, 馬場嘉信^{1~5}

Nanostructures for DNA analysis

Takao Yasui¹, Noritada Kaji^{1,2}, Yukihiko Okamoto^{1,2}, Manabu Tokeshi^{1,2},
Yoshinobu Baba^{1~5}

1. Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University
2. MEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering, Nagoya University
3. Plasma Nanotechnology Research Center, Nagoya University
4. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
5. Institute for Molecular Science

1. はじめに

近年、ヒトゲノム解析の進展により、オーダーメイド医療やゲノム創薬など、医療・創薬の変革が進んでいる。さらに、病気の診断と治療に基づく医療から、遺伝子診断などによる病気の予知・予測に基づく予防医学・ヘルスケアへのシフトが起こりつつある。予防医療を行うために、生体試料から効率良くかつ正確に病気の原因となる生体分子を分離・同定することが極めて重要になってきている。また、この技術を臨床応用することにより、がん発症の危険因子となりうる遺伝子の発見につながることも期待

されている。臨床診断においては、取り扱う試料中に複数の生体分子が存在するために、生体分子解析過程自体の高速化・ハイスループット化・自動化が要求されている。しかし、現在の生体分子解析には、電気泳動・HPLCなどが用いられているが、解析に長時間必要なことや煩雑な操作を必要とするために、解析過程自体の高速化・ハイスループット化・自動化という要求を満たすことが極めて困難である。このような状況の中で、従来の実験室で行う一連の前処理操作などを半導体微細加工技術によって作製された一枚の基板（チップ）上に集積する『 μ TAS (micro total analysis systems)』という概念が、1990年にManzらにより提唱された¹⁾。この概念に従って、試験管やフラスコ、マイクロチューブで行われてきた生化学分析をチップ上に作製した微細流路（マイクロチャネ

〒464-8603 名古屋市千種区不老町
TEL 052-789-4664
FAX 052-789-4666
E-mail: babaymtt@apchem.nagoya-u.ac.jp

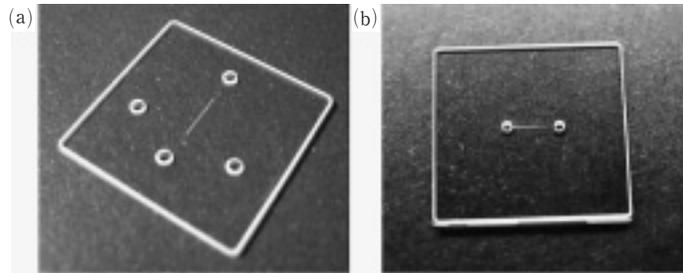


図1 石英製ナノピラーチップ
(a)電気泳動用チップ (b)single-particle tracking用チップ

ル)内で行うことにより、省試薬化や高速化、並列処理、自動化を達成することが可能となった。

そのような中、1992年にプリンストン大学のAustinらは、シリコン上にマイクロ構造体を作製しDNAを分離した²⁾。この報告以来、多くのマイクロ・ナノ構造体が微細加工技術を用いて作製され、それらの構造体によるDNA解析例が報告されている^{3),4)}。さらに、これらのマイクロ・ナノ微細加工された構造体は、従来技術では実現できなかった規則性を有しているため、DNA解析においてこれまで知られていなかった現象も併せて報告されている。最近では、ナノ微細加工技術の発展により、生体分子と同程度の大きさを持つ規則的なナノ構造体の作製が可能となっており、分析化学の新しい研究分野であるナノバイオ計測と呼ばれるナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合領域が注目されている⁵⁾。ナノバイオ計測は、予防医療につながる遺伝子診断にとどまらず、大変幅広い研究領域への展開が期待され、多くの実用化を目指した研究開発が展開されている。その中でも、ナノ空間の特性に基づいた独創的なアイデアによる遺伝子診断法が多数研究開発され、従来の方法では実現できないようなDNA解析法が報告されている⁶⁾。このような研究背景のもと、本稿では、筆者らのグループが石英チップ上に作製したナノピラーと呼ばれるナノ構造体を利用したDNA解析について概説する。

2. ナノピラーチップの作製

筆者らは、微細加工技術を利用して、ナノピラーチップデバイスを開発した(図1)⁹⁾。ナノピラーチップデバイスは、光透過性、耐熱性、耐薬品性、高絶縁性、加工の容易さなどから石英ガラスを用いて作製されている。最近では、生体分子の分析の観点やチップ自身のコストの面からプラスチック製のチップや加工が容易なシリコン製のチップを用いている研究例も多い。しかし、環境への負荷を低減しなければならない昨今では、プラスチック製のチップが大量の廃棄物になるのが問題になる可能性もある。また、コストについてもプラスチックは、一旦、金型を作製すれば、大量に同一デザインのチップを作製でき、安くなるが、デザインの異なるチップを少~中量生産する場合には、それほど安くはならない。石英ガラス製のチップの場合には、リサイクルして再利用が可能のため、コスト的にもどちらが有利であるかどうかは検討する余地があるだろう。シリコン製のチップは、加工が容易な反面、高電場を印加すると絶縁破壊が生じるという欠点や、シリコン自体が光透過性を持たないことによる実験系の制限などのデメリットを持っている。これらより、使用する試薬や反応条件によって最適なチップ材料というものが存在するので、一概にどれが良いとは言えないが、石英ガラスは幅広い用途に使用できる優れた材料であると言える。

ナノピラーチップデバイスは、厚さ0.5 mm

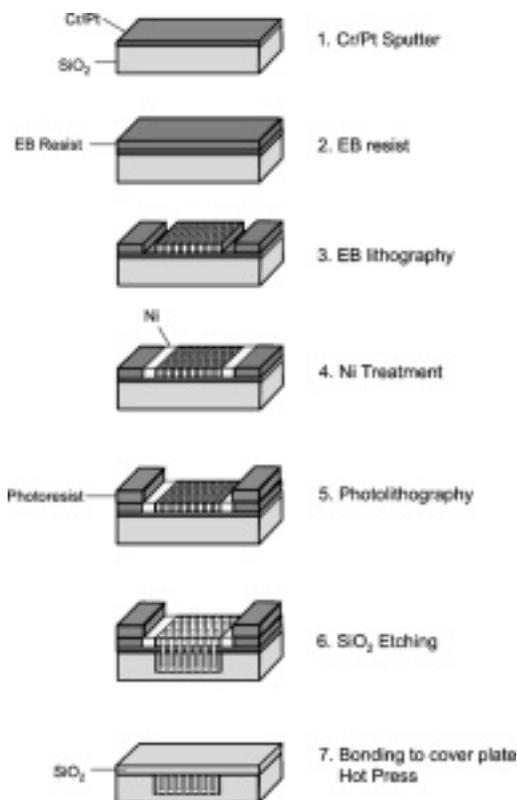


図2 ナノピラーチップの作製法
(文献9より許可を得て掲載。)

の石英基板上に電子線リソグラフィとフォトリソグラフィを組み合わせて作製する(図2)。まず、基板上にCr/Pt層をスパッタによって形成した後、その上にポジ型電子線レジストをスピコートにより塗布する。次に、ナノピラーのパターンを電子線リソグラフィにより作製した後、パターン内にNiを電鍍する。ポジ型フォトレジストをスピコートにて塗布した後、マイクロチャネルのパターンをフォトリソグラフィにて作製し、NLD(neutral loop discharge)を用いた反応性イオンエッチングによりCF₄を用いて石英基板をエッチングする¹⁰⁾。この時のそれぞれのエッチング速度は、Niが21.5 nm/min、石英が238 nm/minであり、Niに対して石英は約12倍の選択性を持っている。最後に、レジストなどを除去し、フッ酸に浸漬後、厚さ0.13 mmの石英製カバーガ

ラスを熱圧着することで、マイクロチャネル中にナノピラーが作製されたナノピラーチップデバイスが完成する。これまでに、2種類のナノピラーの配列パターンを作製することに成功しており¹¹⁾、直径500 nm・高さ4,000 nmのナノピラーを泳動方向に対して45°の角度で配列した斜形型ナノピラーチップデバイスと泳動方向に対して並行に配列した矩形型ナノピラーチップデバイスである。ナノピラーチップデバイスでは、ナノピラーそれ自体が分離媒体として働くために、従来必要であったゲルやポリマー溶液を必要としない。また、ナノ微細加工技術を用いて作製されているために、天然高分子では決して達成されなかったポアサイズの精密制御も可能にしている(図3)¹²⁾。

3. ナノピラーチップによるDNA解析

前述のようにして作製したナノピラーチップデバイス中に、緩衝溶液を導入し、長鎖DNA解析に適用したところ、従来法では分離が困難とされている長鎖DNAを、直流電場下でわずか7秒~200秒で完全に分離できることを実証した⁹⁾。例えば、十万塩基対までのDNAであれば200秒程度、数万塩基対までのDNAであれば60秒程度でDNAの分離分析を行うことができる(図4)。また、性能指数であるこれらの分離能と理論段数は、1.45-2.69と0.7-2.1×10⁶であり、従来のゲル電気泳動と比べ何ら遜色なくDNAを分離できることを示した。

ナノピラーによるDNAの分離メカニズムを解明するために、ナノピラー中でのDNAの高次構造変化を、DNAの1分子イメージングによって解析を行った。図5はナノピラー間の間隔500 nmのナノピラーチップデバイスにλDNA(48.5 kbp)とT4 DNA(165.6 kbp)を外電場の印加により導入し、DNAがナノピラー領域を泳動する様子のスナップショットである。それぞれのDNAの慣性半径は、520 nm(λDNA)と970 nm(T4 DNA)と見積もることができる¹³⁾。本来、DNAは水溶液中で

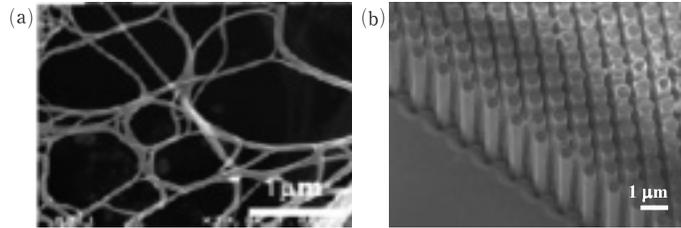


図3 (a)ナノファイバー, (b)ナノピラーの電子顕微鏡写真
(文献12より許可を得て掲載。)

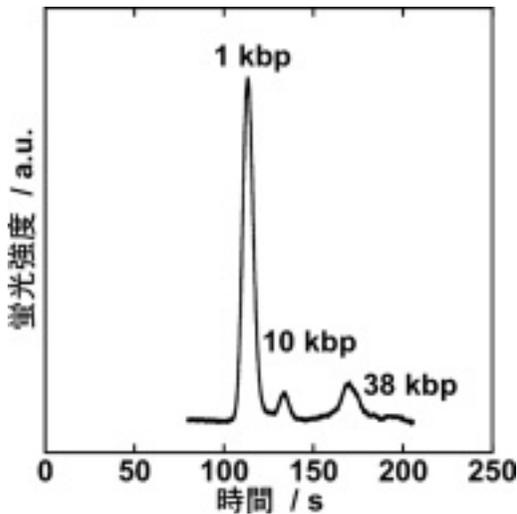


図4 ナノピラーチップを利用したDNA解析
kbpはDNAのサイズで1000塩基対を示す。

はランダムコイル状態をとっているが、DNAの慣性半径よりも小さいナノ空間であるナノピラー中にT4 DNAを外部電場の印加により導入すると、T4 DNA分子は、ナノピラーに捕捉されつつ伸長することが明らかになった。さらに、伸長したDNAはナノピラーから脱離しランダムコイル状態に戻り、再び、ナノピラーに捕捉されつつ伸長する。一方で、ナノ空間と同程度の慣性半径の大きさを持つDNAを導入すると、ランダムコイル状態を示す球形の高次構造を保ちつつナノピラーに衝突を繰り返して電気泳動するために、DNAの塩基対の長さの違いによりDNAをサイズ分離可能であることが判明した。また、DNAの慣性半径の大きさに合わせてナノピラーが作り出すナノ空間を

厳密に制御することにより、従来の方法では、不可能であった超高速分離を達成した。

4. ナノピラー中での水の物性

ナノピラーのようなナノ空間では、水の物性がバルク中とは大きく異なるために、DNAの分離分析に大きな影響を及ぼす可能性が示唆されている¹⁴。サブミクロンスケールの制限された空間では、水分子の物性がバルク中とは異なるということがNMR等を駆使して詳細に調べられている¹⁵。筆者らは、ナノピラーが作り出すナノ空間における水の物性をビーズのブラウン運動の観測より検証した。純水中に分散させた直径50 nmの蛍光ビーズをナノピラーチップデバイスに導入し、蛍光ビーズのブラウン運動からsingle-particle trackingを行った。その際、蛍光ビーズのZ軸(深さ)方向への動きを無視し、2次元のブラウン運動とみなして蛍光ビーズの軌跡を計測し、ナノ空間における水の粘度を算出した。平均二乗変位より算出した拡散係数を用いて、Einstein-Stokesの式より溶媒である水の粘度を求めると、バルク中での理論値より3倍程度高いことが明らかになった。ナノピラーと蛍光ビーズの相互作用やZ軸方向の動きを考慮していないために、正確な粘度の議論をすることはできないが、ナノ空間における水の粘度はバルク中の粘度よりも高いと考えられる。この結果は、ナノスケールの空間ではマクロスケールの空間とは異なる現象が存在することを示唆する結果である。

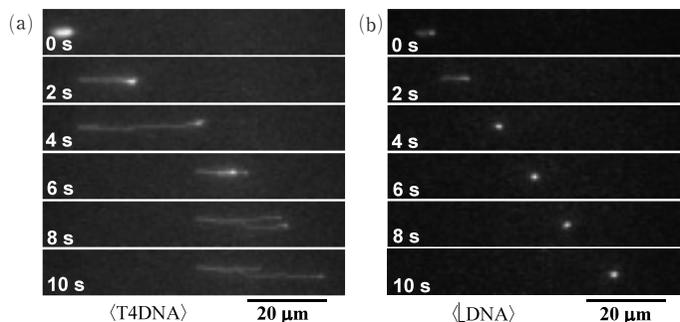


図5 ナノピラー領域における「(a) T4 DNA (b) λDNA の1分子観察
(文献9より許可を得て掲載。)

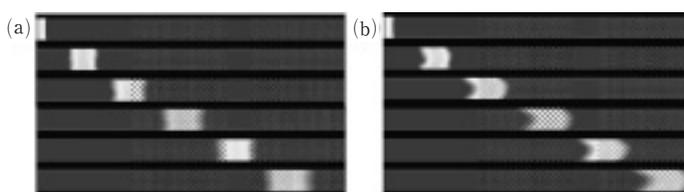


図6 荷電粒子の電気泳動に関するシミュレーション
(a) 電気浸透流の影響を考慮しない場合。
(b) 電気浸透流の影響を考慮した場合。
(文献16より許可を得て掲載。)

5. ナノピラー中での電気浸透流

ナノピラーのようなナノ空間では、ナノピラー表面の電位やナノ空間での特異な電場プロファイルも DNA 分離に影響を及ぼす¹⁶⁾。従来のゲルやポリマーの分子鎖の直径と比べると、ナノピラーの直径はかなり大きい。分子鎖の直径が数十 nm 程度であるのに対して、ナノピラーの直径は 500 nm である。このような非常に大きいナノピラーをマイクロチャンネル中に配置すると、分子鎖の時では無視できていた電場プロファイルの乱れが生じるようになる。幅 25 μm のマイクロチャンネルの中に直径 500 nm のナノピラーを間隔 500 nm で何本も配置すると、ナノピラー周辺の電場プロファイルは大きく乱れ、電場勾配が生じる。このような電場勾配は、電気浸透流に影響を与え、電気浸透流が非常に複雑なプロファイルになる。図 6 は、空間内の電位を計算して、Navier-Stokes の式から電気浸透流の流れを計算した後、荷電粒子を

電気泳動した際のシミュレーション結果である。電気浸透流の存在下では、DNA のバンドが放物線状に変形することが判明した。本来の電気浸透流の流れは、栓流（プラグフロー）であるために¹⁷⁾、マイクロチャンネル中に存在するナノピラーとナノピラーが生み出す電位勾配差が、電気浸透流に影響を及ぼしていることを示唆する結果である。実際、低イオン強度の緩衝溶液を用いた場合は、電気浸透流が比較的大きいため DNA のバンドが放物線状となり、分離能の低下が確認された。一方で、高イオン強度の緩衝溶液を用いた場合は、低イオン強度に比べ電気浸透流が抑制され、DNA は良好なバンド形状を維持して泳動されるために、分離能の低下は確認されなかった。以上のことより、ナノピラーチップのようなナノ構造体を有するマイクロチャンネルにおいては、電場プロファイルへの影響と、その大きな比表面積から生じる電気浸透流の影響を抑えることが、分離能を向上させるために必須であることが明らかになった。

6. おわりに

本稿では、ナノピラーチップデバイスによるDNA解析について紹介した。最近では、筆者らは、ナノピラーの配置や間隔をより精密に制御することにより、DNAの高次構造変化の制御がより自在にできるようになり、本稿で紹介したDNA解析よりさらに高性能なDNA解析技術が開発できることを明らかにしつつある¹⁸⁾。また、ナノピラーチップデバイスがタンパク質の分離解析に応用できることも判明してきた¹⁹⁾。ここ数年のナノ微細加工技術の著しい進歩により、ナノ構造体を自在に作製することが可能となってきたため、今後は、さらに狭いピラー間隔や最適なナノ構造体を作製することでDNAの分離能のさらなる向上が見込める。将来的には、現在我々が開発を進めているナノピラーデバイスが、ナノ空間特有の現象を利用した新しい臨床診断ツールとして発展することが期待される。

文献

- 1) A. Manz, N. Graber and H. Widmer: *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1**, 244 (1990).
- 2) W. D. Volkmuth and R. H. Austin: *Nature*, **358**, 600 (1992).
- 3) J. Fu, R. R. Schoch, A. L. Stevens, S. R. Tannenbaum and J. Han: *Nat. Nanotechnol.*, **2**, 121 (2006).
- 4) C. C. Striemer, T. R. Gaboriski, J. L. McGrath and P. M. Fauchet: *Nature*, **445**, 749 (2007).
- 5) 馬場嘉信監修: “ナノテク・バイオ MEMS 時代の分離・計測技術 (シーエムシー出版)” (2006).
- 6) 三原久和, 小島英理, 馬場嘉信編: “ナノバイオ計測の実際 (講談社)” (2007).
- 7) M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, and Y. Baba: *Nature Biotech.*, **2004**, **22**(3), 337-340.
- 8) 安井隆雄, 馬場嘉信: *ぶんせき*, **9**, 464 (2008).
- 9) N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike and Y. Baba: *Anal. Chem.*, **78**, 15 (2004).
- 10) Y. Chinzei, M. Ogata, H. Shindo, T. Ichiki and Y. Horiike: *J. Vac. Sci. Technol. A*, **16**, 1519 (1998).
- 11) R. Ogawa, N. Kaji, S. Hashioka, Y. Baba and Y. Horiike: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **46**, 4 B, 2771 (2007).
- 12) M. Tabuchi, Y. Baba: *Anal. Chem.*, **77**, 7090 (2005).
- 13) P. G. de Gennes: “Scaling Concepts in Polymer Physics (Cornell University Press)” Ithaca, NY (1979).
- 14) N. Kaji, R. Ogawa, A. Oki, Y. Horiike, M. Tokeshi and Y. Baba: *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 759 (2006).
- 15) T. Tsukahara, A. Hibara, Y. Ikeda and T. Kitamori: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **119**, 1199 (2007).
- 16) N. Kaji, A. Oki, R. Ogawa, Y. Takamura, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, M. Tokeshi and Y. Baba: *Israel J. Chemistry, Wolf Prize Recipient, Prof. Richard N. Zare Special Issue*, **47**, 161 (2007).
- 17) P. H. Paul, M. G. Garguilo and D. J. Rakestraw: *Anal. Chem.*, **70**, 2459 (1998).
- 18) T. Yasui, N. Kaji, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Tokeshi, Y. Horiike and Y. Baba: *The proceedings of μ TAS 2007*, **2**, 1207 (2007).
- 19) T. Yasui, N. Kaji, M. R. Mohamadi, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Tokeshi, Y. Horiike and Y. Baba: *The proceedings of μ TAS 2008*, **1**, 432 (2008).