

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H05950・19K21109

研究課題名(和文) ナノ構造による1分子操作と光学的超解像法を組み合わせたDNA 1分子サイズ分析法

研究課題名(英文) Linearization of a single DNA molecule using a nanoslit and size measurement using super-resolution imaging method

研究代表者

東 直輝 (Azuma, Naoki)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：50823283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌の迅速な感染拡大対策のためには、DNAサイズ分析法によって高速かつ高精度にDNA分子の遺伝子型を判別する必要がある。しかし、これまでのDNAサイズ分析法は、分析に一定量のDNA断片が必須であったため、培養により細菌の数を増加していたが、これに数日を要していた。本研究では、DNA 1分子で分析を可能とすることで培養工程が不要な新規サイズ分析法の提案を目的とした。申請者は、微細加工技術を用いて作製した微小流路内でDNA 1分子を伸長・固定し、光学的超解像法を用いてそのサイズを高精度に測定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微小流路内におけるDNA 1分子の伸長・固定と光学的超解像法による高精度なサイズ測定を実現した。本研究で得られた研究成果は、従来のゲル電気泳動法やマイクロチップ電気泳動法とは原理が全く異なる新しいサイズ分析法を確立するための基盤的な知見となるものである。本分析法によって、分析に多数のDNA分子を必要とせず、DNA 1分子でサイズ分析ができるため、細菌の培養が不要となり、分析時間が飛躍的に短縮でき、薬剤耐性菌の迅速な感染対策の実現が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to quickly prevent the spread of drug-resistant bacteria, it is necessary to quickly and accurately identify the genotype of DNA of the bacteria by size measurement method of DNAs. In the case of conventional methods for size measurement of DNAs, although the number of bacteria was increased by culturing because it required a large number of DNAs for the analysis, but the process of culture took several days. The purpose of this study was to propose a new method of size measurement for a single DNA molecule. Linearization of a single DNA molecule in a microchannel created by using microfabrication technique and accurate size measurement of the DNA using super-resolution imaging method were achieved.

研究分野：ナノ計測，バイオ計測，マイクロ・ナノデバイス，ナノトライボロジー

キーワード：DNAサイズ分析 マイクロ流体デバイス 超解像イメージング DNA 1分子操作 DNA 1分子伸長・固定

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌により、2050年には感染による年間死者数が世界で1000万人を上回るとされている。耐性菌による感染が発生した際には迅速な感染拡大対策が要請される。それには、細菌の遺伝子型の高速な判別が必須であり、DNAのサイズ分析法が用いられる。細菌のDNAを制限酵素により特定の塩基対部で切断し、断片化したDNAのサイズ分布から塩基配列の違いを検出することで、細菌の遺伝子型を判別する。これまではゲルの網目構造を分子ふるいとして利用するゲル電気泳動法が用いられてきた。しかし、この方法では、細菌のDNAを断片化した 10×10^3 bp以上の大分子量DNA断片では、DNA分子が断裂しないように低速で泳動する必要があるため、分析に数日を要していた。さらに、分析には一定量のDNA断片が必須であった。DNA増幅法であるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は誤って増幅することも多いため、一般に培養により細菌の数を増加するが、これもまた数日を要していた。一方で、微小流路内にマイクロ・ナノ構造を形成したマイクロチップ電気泳動法が提案され、数分から数時間の高速なサイズ分析が可能となった。しかし、この方法でもなお、培養工程が分析時間短縮のボトルネックとなっていた。

申請者は、DNA1分子でサイズ分析できれば、培養が不要になり、大幅な高速化が可能になると着想した。それには、DNA1分子を伸長・固定し、そのサイズを精密に測定できればよい。しかし、DNA分子はランダムコイル形状がエントロピー的に安定なため、特に大分子量DNA1分子の伸長・固定は難しい。また、1塩基対(bp)間の距離は0.34 nmであり、高速なサイズ測定は容易でない。非破壊で高速測定可能な光学的手法が望まれるが、通常の光学顕微鏡では、回折限界によって数百 nmの面内分解能すなわち 10^3 bpの分析精度が原理限界である。DNA1分子の伸長・固定および高精度なサイズ測定ができれば、DNAサイズ分析の飛躍的な高速化が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、微小流路内におけるDNA1分子の伸長・固定と光学的超解像法によるDNA1分子の高精度なサイズ測定を実現し、新規サイズ分析法を提案することを目的とした。本研究の方法は、従来のゲル電気泳動法やマイクロチップ電気泳動法のように、分析に多数のDNA分子を必要とせず、細菌の培養が不要となり、分析時間が飛躍的に短縮でき、薬剤耐性菌の迅速な感染対策が実現できる。

3. 研究の方法

本研究では、申請者が提案した微小流路内におけるDNA1分子の伸長・固定と光学的超解像法による高精度なサイズ測定の実現可能性を示すため、下記の(1)-(3)の実験を行った。

(1) 申請者はまず、申請当時に提案した方法である、微小流路内に形成した分子の直径よりも小さな隙間である“ナノスリット”を用いてDNA1分子の伸長・固定を実現することを試みた。微細加工技術を用いて、微小流路内に深さ30 nmのナノスリットを形成したチップデバイスを作製した。流路内に緩衝液を導入し、電圧を印加することでDNA1分子を泳動した。ナノスリットの深さはランダムコイル状のDNA分子よりも小さいため、DNA分子はナノスリットに進入するとともに伸長された。しかし、ナノスリットを用いた方法では、DNA1分子を完全に伸長することが困難であった。さらに、緩衝液中のDNA分子のランダム運動によって、流路内で伸長したまま固定することが困難であった。

(2) (1)の結果から、申請者は、微小流路内のDNA1分子を伸長・固定を達成するため、流路内の圧力流れと気液界面の移動を用いたDNA1分子の伸長・固定法を試みた。図1は本研究で作製したチップの全体図と微小流路の断面図を示す。ポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いて、高さ2 μm 、幅100 μm の直線状の微小流路をもつチップデバイスを作製した。DNA1分子は圧力流れによってリザーバAから流路内に導入した(図1①)。リザーバAから圧力印加によって空気を導入して流路内に気液界面を形成し、印加する圧力を変えることで気液界面の移動を制御した(図1②)。ガラス表面の気液界面の毛細管力は移動方向と同じ方向に働くため、気液界面がDNA1分子に達すると、気液界面の移動に伴って毛細管力によってDNA1分子が伸長され、ファンデルワールス力によってガラス表面に固定された(図1③)。DNA試料として蛍光分子であるYOYO-1を結合した48.5kbp-DNA(最大長さ21 μm)を用いた。気液界面が完全に移動した後に、蛍光顕微鏡によって流路内に伸長・固定されたDNA分子の蛍光画像を取得し、蛍光画像からサイズを測定した。

(3)(2)の方法によって流路内に伸長・固定したDNA1分子について、光学的超解像法を用いて高精度なサイズ測定を試みた。光学的超解像法の1つであるSTORM(Stochastic optical reconstruction microscopy)を応用した。図2にSTORMを用いたDNA1分子のサイズ測定の手順を示す。流路

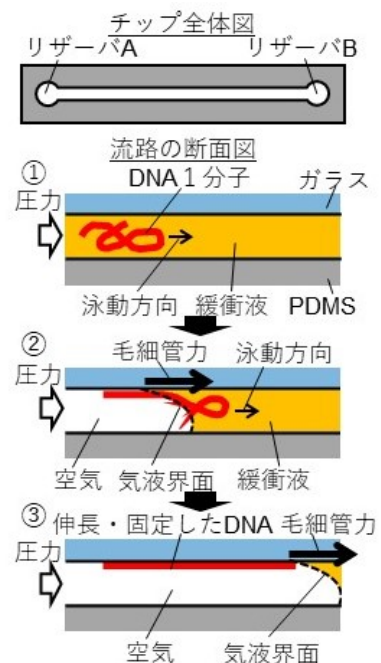


図1. 微小流路内のDNA1分子伸長・固定のためのチップデバイスとその方法。DNA1分子はランダムコイル状が安定のため、流路内で操作して伸長・固定するのは難しいが、本手法によって達成した。

内に伸長・固定された DNA 1 分子に結合した YOYO-1(蛍光分子)に強いレーザー光を当てることで全ての YOYO-1 をいったん発光させ無蛍光状態にした(退色). その後, 退色させた蛍光分子のうち一部の YOYO-1 分子のみを, 弱い光で確率的に発光させ(発光), 発光した分子の位置を特定した. この方法では, YOYO-1 分子を個別に発光させることで, 一つ一つの位置を回折限界(数百 nm)を超えた精度で特定できるので, 超解像が実現される. この退色・発光サイクルを繰り返すことで, DNA 1 分子に結合した YOYO-1 分子一つ一つの位置を決定した. 全退色・発光サイクルで得られた画像を再構成することで YOYO-1 分子の位置を特定し, DNA 1 分子のサイズを測定した.

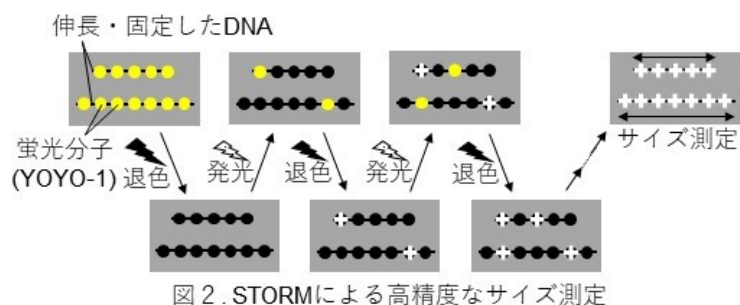


図2. STORMによる高精度なサイズ測定

4. 研究成果

申請者は, 緩衝液で満たした深さ 30 nm のナノスリットに DNA 1 分子(48×10^3 bp)を導入させ, ランダムコイル形状の DNA 分子を伸長することに成功した. 伸長率は 50~60% を達成した. しかし, この方法では, DNA 1 分子を完全に伸長することは困難であった. さらに, 緩衝液中の DNA 分子のランダム運動によって, 流路内で伸長したまま固定することも困難であった. 一方で, 微小流路内に形成した気液界面を移動した際の毛細管力を用いた DNA 1 分子の伸長・固定を試みた. 図3は, PDMS チップ内の 2 μ m 深さの流路で, 圧力印加による気液界面の移動を用いて DNA 1 分子(48×10^3 bp)を伸長・固定し, 伸長方向の輝度分布を測定した結果である. 申請者は, 流路内の気液界面の移動によって DNA 1 分子を伸長・固定することに成功した. 伸長率は 90% を達成し, ナノスリットを用いた方法と比較して高精度な DNA 1 分子の伸長・固定を達成した.

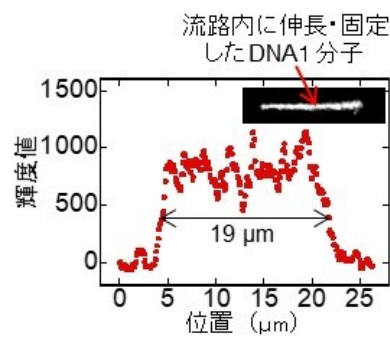


図3. 流路内で伸長・固定した DNA 1 分子と伸長方向の輝度分布

図4(a)(b)は, 流路内で伸長・固定した DNA 1 分子について, 通常の蛍光イメージングによって取得した蛍光画像と STORM によるイメージングによって取得した蛍光画像を比較した結果である. それぞれの蛍光画像について点線の輝度分布を取得した結果を図 5(a)に示す. それぞれの輝度分布を正規分布でフィッティングすることで決定した半値幅を面内分解能として比較した結果, STORM によるイメージングの面内分解能は 100 nm であり, 通常の蛍光イメージングの面内分解能(450 nm)よりも 4.5 倍高精度な結果が得られた. DNA 分子の 1 塩基対(bp)間の距離は 0.34 nm であることから, サイズ測定の精度を通常の蛍光イメージングの 10^3 bp から 10^2 bp にまで一桁向上することに成功した. STORM の面内分解能は輝度値の SN 比で決まるため, 高精度なカメラを使用することでさらなる精度向上が期待できる. 図 5(b)は図 4(b)の枠内の輝度分布を測定した結果である. 輝度値のピークは YOYO-1 分子一つ一つの位置を示していると考えられ, 一番左と右の輝度値のピークの距離を DNA 1 分子のサイズとして測定した結果, 15.4 μ m と測定することに成功した.

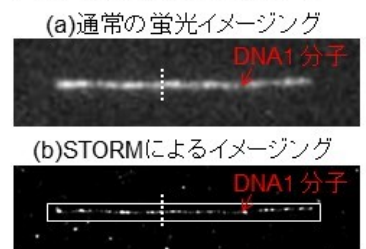


図4(a)流路内に伸長・固定した DNA1 分子の通常の蛍光イメージングの結果と(b)STORMによる超解像イメージングの結果

上述のように, 本研究では, 微小流路内における DNA 1 分子の伸長・固定と光学的超解像法による高精度なサイズ測定を実現した. 本研究で得られた研究成果は, 従来のゲル電気泳動法やマイクロチップ電気泳動法とは原理が異なる新しいサイズ分析法を確立するための基盤的な知見となるものである. 本分析法によって, 分析に多数の DNA 分子を必要とせず, DNA 1 分子でサイズ分析ができるため, 細菌の培養が不要となり, 分析時間が飛躍的に短縮でき, 薬剤耐性菌の迅速な感染対策が実現できる.

<引用文献>

- ① M. J. Rust et al., Nature Methods 3, 793 (2006).
- ② C. Flors et al., Nature communications 10, 2201 (2009).

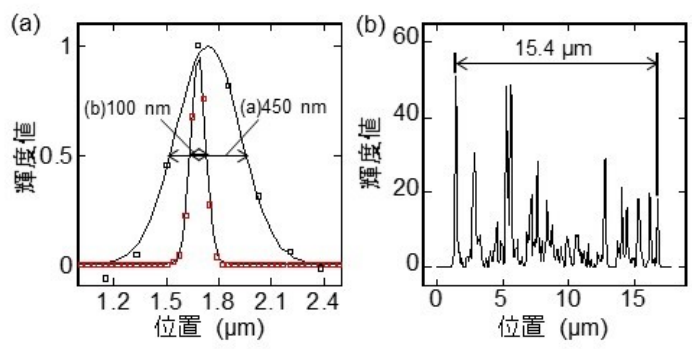


図5(a)通常と超解像イメージングの面内分解能の比較 (b)STORMによるDNA1分子のサイズ測定結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoki Azuma, Shintaro Itoh, Kenji Fukuzawa, Hedong Zhang
2. 発表標題 Measurement of Trapping Time of DNA Molecule in Nanofluidic Entropy Trap using DNA Concentration
3. 学会等名 32nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 直輝, 福澤 健二, 伊藤 伸太郎, 張 賀東
2. 発表標題 ナノスリットによるDNA 分子濃縮における理論 モデルを用いた印加電圧の最適化
3. 学会等名 IIP2019情報・知能・精密機器部門(IIP部門)講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東直輝, 福澤健二, 伊藤伸太郎, 張賀東
2. 発表標題 DNA分子濃縮を用いたナノ隙間手前の分子のトラップ時間の測定
3. 学会等名 第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 直輝, 浅井 泰平, 福澤 健二, 伊藤 伸太郎, 張 賀東
2. 発表標題 DNA 1分子サイズ測定のための微小流路内の気液界面の移動を用いた分子の伸長・固定 ~分子伸長率の気液界面の移動速度依存性~
3. 学会等名 IIP2020 情報・知能・精密機器部門 (IIP部門) 講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----