

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710129

研究課題名（和文） NILとUVLの融合によるタンパク質配置とDNAの大量並列解析

研究課題名（英文） Protein patterning and parallel analysis of DNA molecules by integrating nanoimprint lithography (NIL) and UV lithography (UVL)

研究代表者 横川 隆司

(YOKOKAWA RYUJI)

京都大学・大学院工学研究科・マイクロエンジニアリング専攻・助教

研究者番号：10411216

研究成果の概要（和文）：本研究では、 λ DNAの両端をジゴキシゲニン（DIG）とビオチンで修飾し、モータタンパク質であるキネシンの運動により λ DNAを1分子ずつ操作するための分子系を構築した。キネシンコートガラス上での微小管の運動時に、微小管上のアビジン分子と λ DNAの一端のビオチン分子が結合することで、 λ DNAが伸長される様子を観察することに成功した。伸長した分子に対して制限酵素反応を行い、 λ DNAが切断される様子を1分子で観察した。また、この分子系を所望の位置に配置し、高効率で反応を観察するためのデバイス開発も行った。マイクロ・ナノ灌流チャネルをナノインプリントリソグラフィ（NIL）とUVリソグラフィ（UVL）の融合により製作し、送液システムの統合、タンパク質アッセイをおこなう技術を確立した。

研究成果の概要（英文）：We modified two ends of λ DNA by digoxigenin (DIG) and biotin for single molecule manipulation. One end labeled with DIG was immobilized on the glass surface coated by anti-DIG antibody, and the other end labeled with biotin was manipulated by gliding microtubules modified with streptavidin. After stretching λ DNA, a restriction enzyme was applied to visualize cleaving of the DNA molecule at single molecule level. To achieve highly parallel and massive DNA manipulation, we fabricated micro/nano scale perfusable multi-scale channel structures. Integration of nanoimprint lithography (NIL) and UV lithography (UVL) realized such a complex and multi-scale structures. It was evaluated by implementing a pressure-driven flow system and protein assay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,400,000	720,000	3,270,000
平成22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,830,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学

キーワード：ナノインプリント, MicroTAS, MEMS, 分子操作, DNA

1. 研究開始当初の背景

キネシン-微小管系に代表されるモータタンパク質をアクチュエータとして利用す

る研究は、2000年頃から国内外で注目されるようになってきた。電気・機械的な駆動源を要するマイクロアクチュエータと異なり、

モータタンパク質は ATP の加水分解により化学エネルギーを利用して 1 $\mu\text{m/s}$ 程度の速度で運動する。また、モータタンパク質の大きさは数 10 nm であり、マイクロアクチュエータ微細化の限界を突破するツールとして注目されている。

これまでに、我々のグループも含め、主に人工物（マイクロビーズ、シリコン片など）の搬送とマイクロデバイス内でのモータタンパク質の運動観察がおこなわれてきた。しかし、モータタンパク質がナノメートルスケールであることを有効に利用して、ナノメートルスケールの特定の分子を操作する分子系は確立していない。そこで、今後当該分野においては、駆動分子であるモータタンパク質と対象分子が 1 対 1 レベルで機能を発現するアクチュエータシステムを構築する必要がある。

分子系の構築と同時に、このようなバイオアッセイを可能にするマイクロ・ナノデバイスの開発も必要である。サブマイクロスケールの構造内に生体分子を封じ込めるだけでアッセイが可能な場合は、既に 1 分子かつ高効率でアッセイが実現されている。しかし、一般のアッセイではタンパク質の固定と洗浄を繰り返す必要があり、圧力送液による灌流システムが必要となる。そこで、サブマイクロスケールであっても、確実にタンパク質溶液を送液でき、マイクロチャンネル内に分子系を構築することのできるデバイスの開発が望まれている。

2. 研究の目的

以上の様な背景から、我々のグループでは本補助金の支援を受け二つの方向から主題である「NILとUVLの融合によるタンパク質配置とDNAの大量並列解析」にアプローチした。一つは、遺伝子工学的に分子改変が容易な DNA 分子をモータタンパク質で 1 分子操作し、伸長した分子に対し制限酵素反応を行う。このボトムアップ的アプローチによりモータタンパク質の分子操作ツールとしての機能を示す。もう一つは、この分子反応系を所望の場所に配置し高効率でその反応を観察するためのプラットフォームとなるデバイス開発である。これはトップダウン的アプローチである。

前者の分子系については、これまで取り組んできた DNA の修飾技術を応用し、より高効率な分子操作系の確立を目指した。また、後者のデバイス開発に着いては、UVL で製作したマイクロ構造をインターフェースとして利用して、NIL で製作したナノ構造への送液、灌流

技術を確立することを目的とした。最終的に両者を融合し、デバイス内で DNA を操作・伸長し、制限酵素による 1 分子解析を実現することを目標として研究を推進するした。

3. 研究の方法

(1) λ DNA 両端の分子修飾

本研究でマニピュレーションの対象とする λ DNA の両端を、異なる分子で修飾することにより個別に操作できるよう準備をおこなう。 λ DNA を制限酵素 (NruI) で処理し、両端から得られる DNA 断片を回収、それぞれをビオチンと DIG で修飾した後、新たにインタクトな λ DNA にライゲーションをおこない結合する方法を検討した。ビオチンと DIG が導入されたことをメンブレンプロットングにより確認した。

(2) 分子システムの検討と DNA のマニピュレーション

従来の試行実験において DNA の操作効率が悪いことが問題点であった。よって、上記 (1) の DNA 分子の改変方法に加え、モータタンパク質の分子系構築方法の改善によって克服することを検討した。そこで、準備したタンパク質と DNA を用いて、カバーガラスで作ったフローセル内に図 1 (A) の分子系を構築し操作効率を評価した。検討項目として、キネシンを用いて微小管を搬送するグライディングアッセイが高効率でおこなわれているか、DNA の抗 DIG 抗体—ジゴキシンの結合による固定、もう一端のビオチン—アビジン—ビオチン化微小管の結合の個別評価とそれによる DNA の伸張効率の評価をおこなった。具体的には、どのような順序でタンパク質を基板に導入するのが最も効率的に DNA の固定と操作をおこなうことができるか十分に検討した。複数のタンパク質を導入したときに、キネシンと微小管の相互作用を妨げることのないタンパク質の導入順序、DNA の非特異的吸着を避けるガラス処理、タンパク質濃度、バッファ条件などを検討し最適化することを目指した。

伸長した DNA に対して、制限酵素 XhoI に

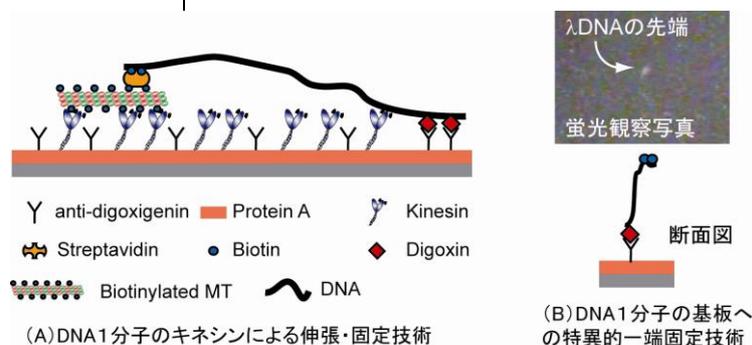


図 1 : DNA 1 分子操作のための分子系

よる処理を行い DNA の切断を可視化した。一般に、伸長した DNA に対し、制限酵素処理を行うことで分子解析を行うアプローチは多く報告されており、本研究において DNA の伸長技術を検証するための有効な手段であると考えた。DNA は両端のみが固定されているため、切断後の DNA を伸長した状態で観察することができない。そこで、本研究では伸長後アガロースゲルにより伸長状態を保持した。XhoI は λ DNA 内に一か所のみ制限酵素サイトを有するため、その切断を確認することが容易である。

(3) ナノインプリントリソグラフィ (NIL) と UV リソグラフィ (UVL) を併用したマルチスケール流体デバイスの作製

図 1 のようなキネシンにより微小管が搬送されるグライディングアッセイをベースとした分子システムでは、図 2b に示すように微小管の動きはランダムになってしまう DNA をアレイ化することができない。そこで、微小管の動きを一方向に規定するため、キネシンを幅 500 nm 程度に配置して微小管の運動を制限することを目指した。このための技術として、当初はキネシンのみを基板上にサブマイクロスケールでパターンニングすることを検討した。しかし、キネシンをパターンニングした境界において、微小管の連続運動を保つことができず、確実にマイクロ・ナノ構造でその動きを制御することとした。

このため、ナノインプリントリソグラフィ (NIL) により、幅 75 nm - 2 μ m、深さ 1 μ m のラインアンドスペース (チャンネルアレイ) を SU8 に転写後、このチャンネルアレイに送液するためのマイクロチャンネル (深さ 50 μ m、幅 250 μ m、長さ 5 mm) を UV リソグラフィ (UVL) により同じく SU8 を用いて製作した。これによって、シリコン基板上に SU8 を構造体が完成し、これを PDMS に転写後、カバーガラスに接合してアッセイを行った。アッセイには、圧空制御による圧力送液技術を導入し、複数のタンパク質溶液を導入する灌流を可能とした。以上により、ナノ～サブマイクロのチャンネルアレイとマイクロチャンネルが融合したマルチスケールのチャンネルシステムを実現する。

4. 研究成果

(1) λ DNA 両端の分子修飾

従来の試行実験で確立した実験方法を再検討し、メンブレンプロットングにより λ DNA が確実にビオチンと DIG で修飾出来ていることを確認した。ビオチン化および DIG 化の際のインキュベーション時間の最適化により、プロットングによりこれまでの試行実験で得られた以上のラベル率が達成できていることを確認した。これにより、 λ DNA の修

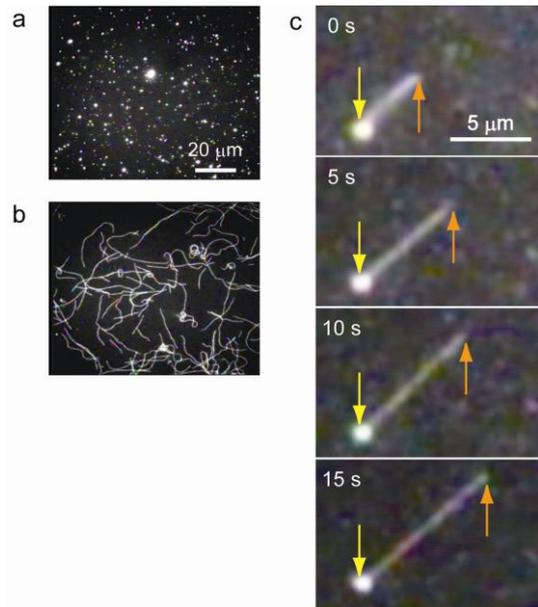


図 2 : a) DIG 端における DNA 分子の固定. b) タンパク質導入後 (文中⑦) における微小管運動. c) DNA 伸長の様子.

飾については以降の実験に用いることができると考えた。

(2) 分子システムの検討と DNA のマニピュレーション

具体的なタンパク質導入順序について、図 1 の分子系に必要なタンパク質の導入順序を変え最適化を行った。同時に導入タンパク質濃度の検討も行った。結果的には下記の順序が最適であった。

- ① 1 mg mL⁻¹ protein A/G
- ② 200 μ g mL⁻¹ anti-digoxigenin
- ③ 70 μ g mL⁻¹ Kinesin
- ④ 3 μ g mL⁻¹ digoxin/biotin-labeled DNA
- ⑤ 0.01 mg mL⁻¹ Streptavidin
- ⑥ 0.4 mg mL⁻¹ Biotinylated microtubules
- ⑦ 1 mM ATP in BRB80 (oxygen scavenger: 36 μ g mL⁻¹ catalase, 4.5 mg mL⁻¹ glucose, 216 μ g mL⁻¹ glucose oxidase, 1 % β -mercaptoethanol)

中でも、②～⑥の導入順序については考えられるあらゆる順序を検討して、上記の順序が最適であることが分かった。

基板上で伸長した DNA に対し、アガロースゲルを押しつけることにより DNA を固定した。この状態でモータータンパク質による伸長は停止し、図 2c のような DNA 伸長状態を保持できた。その後、ゲルの上から制限酵素 XhoI を浸透させることで DNA の切断を 1 分子レベルで経時的に観察することができた。その時の様子を図 3a に示す。比較の為、アガロースゲルにより物理的に DNA を伸長した後、制

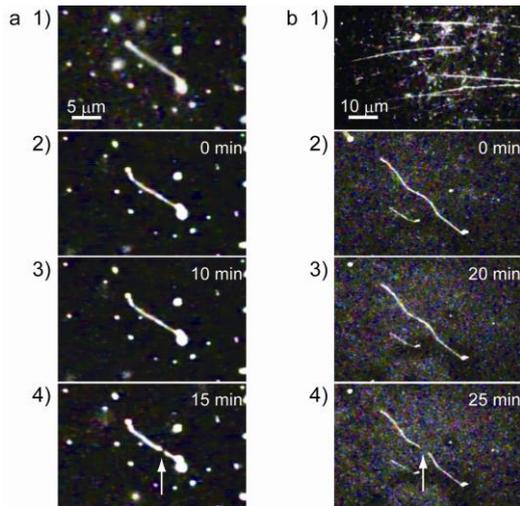


図 3 : 制限酵素 *XhoI* による伸長後の DNA の切断. a) DNA を伸長固定後, $t = 0 \text{ min}$ において *XhoI* を導入した. 経時的に DNA が切断される様子を観察した. b) 比較実験として, アガロースゲルによるせん断力を用いた DNA の伸長後, 同様に *XhoI* により切断した. 同等の時間スケールで切断が起こることが分かる.

限酵素処理した場合の様子を図 3 b に示す. いずれも, *XhoI* による切断を確認することができた.

(3) ナノインプリントリソグラフィ (NIL) と UV リソグラフィ (UVL) を併用したマルチスケール流体デバイスの作製

プロセスでは, まず NIL によってチャンネルアレイ構造を成型し, その後 UVL を行うため, この順序のプロセスに材料が適応していなければならない. このような材料として, 本

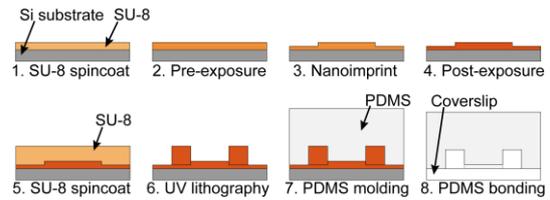


図 4 : NIL と UVL の融合プロセス

研究では SU-8 を選定した. SU-8 の硬化には UV 光の照射が必要であり, 従来の光ナノインプリント法を適用することが考えられる. しかし, この方法で成型を行った場合, 成型後のモールドに残った SU-8 残滓をモールドに損傷を与えることなく洗浄することは非常に困難であり, 一つのモールドで多数のサンプルを成型する NIL の趣旨に反したものになってしまう. そこで本研究では, Si モールドによる加圧前に露光を行い (プレ露光), 部分的に架橋硬化の進んだ SU-8 に対して加圧を行うプロセスを採用した. このプロセスは紫外線補助熱ナノインプリント法と呼ばれている. この方法では, 成形後のモールドに残る SU-8 残滓が完全には架橋硬化していないため, Si モールドへの損傷を抑えつつ, SU-8 の洗浄が可能である.

本研究で行った灌流デバイスの作製プロセスは図 4 に示す通りである. Si 基板上に厚膜ネガティブフォトレジスト SU-8 を塗布し (図 4-1), SU-8 に対して加圧前の弱露光 (プレ露光) (図 4-2) を行った後, NIL によってチャンネルアレイ構造を成形する (図 4-3). 成形後に露光量の不足分を補うための露光 (ポスト露光) (図 4-4) を行ってパターンを硬化させた後, チャンネルアレイ構造上で SU-8 の UVL を行うことでマイクロ構造を成形する (図 4-5, 6). 成形した SU-8

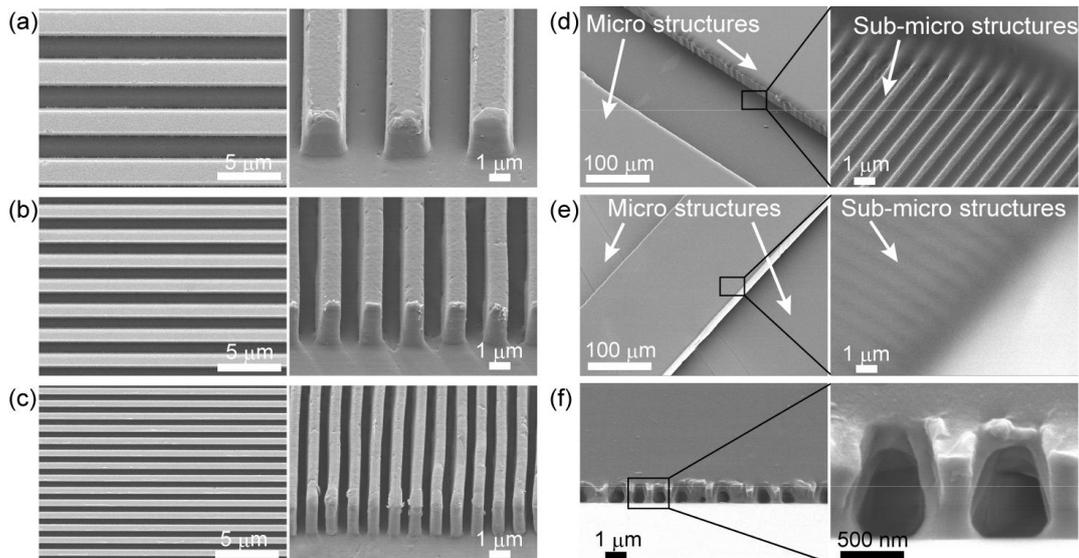


図 5 : NIL と UVL により製作した SU8 の母型(a-d), 転写した PDMS(e), およびガラス接合後のチャンネル断面の様子(f).

のマルチスケールチャネル構造を PDMS でモデルディング (図 4-7) し, カバーガラスで封止することでデバイスを完成する (図 4-8).

NIL によって得られた母型となるチャネルアレイ構造を図 5 a-c に示す. また, これらのアレイ構造上にマイクロチャネル構造を製作した後の SEM 写真を図 5 d に示す. さらにこれを PDMS に転写した後の様子を図 5 e に, 最終的にカバーガラス状に接合したチャネルアレイの断面図を図 5 f に示す. これらの顕微鏡観察によって所望のチャネルアレイとマイクロチャネルが製作できていることが分かる.

得られたデバイスにインレット, アウトレットを介して, 空圧制御による圧力送液実験系を接続した. チャネルアレイ左右に配置したマイクロチャネルから水と蛍光溶液を導入できることを確認し, 交互に送液することで灌流が可能であることも示した.

以上から, (1) および (2) のボトムアップ技術により分子系の構築とその機能性を示すとともに, (3) のトップダウン技術により分子配置場としてのデバイスを製作した. 本研究費の助成期間内に両者を融合するには至らなかったが, 現在デバイス内でのタンパク質アッセイを行っており, 本研究の目的とする新規分子系の構築と極微量溶液の灌流デバイスの融合が実現した. 引き続き, デバイス内でのアッセイの結果を評価することでその有用性を示すことを目指す.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① K. Terao, Y. Kitazawa, R. Yokokawa, A. Okonogi, H. Kotera, "Open-Access and Multi-Directional Electroosmotic Flow Chip for Positioning Heterotypic Cells," *Lab Chip*, vol. 11, pp. 1507-1512, 2011. (査読有)
- ② M. C. Tarhan, R. Yokokawa, C. Bottier, D. Collard and H. Fujita, "A Nano-Needle/Microtubule Composite Gliding on a Kinesin-Coated Surface for Target Molecule Transport," *Lab Chip*, vol. 10, pp. 86-91, 2010. (査読有)
- ③ R. Yokokawa, Y. Manta, M. Namura, Y. Takizawa, N. C. H. Le and S. Sugiyama, "Individual evaluation of DEP, EP and AC-EOF effects on λ DNA molecules in a DNA concentrator," *Sens. Actuators, B*, vol. 143, pp. 769-775, 2010. (査読有)
- ④ C. Bottier, J. Fattaccioli, M. C. Tarhan, R. Yokokawa, F. O. Morin, B. Kim, D. Collard and H. Fujita, "Active transport of oil droplets along oriented microtubules by kinesin molecular motors," *Lab Chip*, vol. 9, pp. 1694-1700, 2009. (査読有)
- ⑤ N. C. H. Le, R. Yokokawa, D. V. Dao, T. D. Nguyen, J. Wells, and S. Sugiyama, "Versatile Microfluidic Total Internal Reflection (TIR)-based Devices: Application to Microbeads Velocity Measurement and Single Molecule Detection with Upright and Inverted Microscope" *Lab Chip*, vol. 9, pp. 244-250, 2009. (査読有)
他 5 件

[学会発表] (計 20 件)

- ① R. Yokokawa, Y. Sakai, A. Okonogi, I. Kanno, and H. Kotera, "Number of Kinesin Molecules Involved in a Bead Transport Measured by Microfluidics and Mechanical Modeling," MEMS 2011, pp. 1365-1368, Cancun, Mexico, Jan. 23 - 27, 2011. (Poster)
- ② M. Yokokawa, K. Fujimoto, M. Kitamura, R. Yokokawa, and H. Kotera, "Dual Q-Dot Transport on Microtubule Array with Polarity Defined by Nanotracks and Microtubule Motility Control," MEMS 2011, pp. 1349-1352, Cancun, Mexico, Jan. 23 - 27, 2011. (Poster)
- ③ H. Kotake, R. Yokokawa, I. Kanno, and H. Kotera, "Selective Kinesin and Dynein Immobilization and Electrical Microtubule Manipulation for Bidirectional Microtubule Motility," MEMS 2011, pp. 1373-1376, Cancun, Mexico, Jan. 23 - 27, 2011. (Poster)
- ④ 磯辺 岳, 横川 隆司, 神野 伊策, 小寺 秀俊, "UV リソグラフィとナノインプリントリソグラフィの融合によるマイクロ・ナノチャネルの作製," 第 22 回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, pp. 92, 名古屋, 2010 年 11 月 17-18 日.
- ⑤ 井出 克志, 横川 隆司, 神野 伊策, 小寺 秀俊, "ガラスチャネル内における電界印加による微小管の運動方向操作," 第 22 回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, pp. 91, 名古屋, 2010 年 11 月 17-18 日.
- ⑥ 小竹 宏紀, 横川 隆司, 神野 伊策, 小寺 秀俊, "自己組織化単分子膜を用いたモータタンパク質の付着制御による微小管運動極性制御," 第 22 回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, pp. 85, 名古屋, 2010 年 11 月 17-18 日.
- ⑦ M. C. Tarhan, R. Yokokawa, L. Jalabert, D. Collard, and H. Fujita, "Biomotor-Based

- Nanotransport System Constructed by Pick-and-Place Assembly of Individual Molecules," IROS 2010, pp. 5628-5633, Taipei, Taiwan, Oct. 18-22, 2010. (Oral)
- ⑧ 横川 雅俊, 北邨 益飛, 横川 隆司, 小寺 秀俊, "マイクロ・ナノ構造を用いた微小管の個別極性配向と並列ナノ操作技術の確立," 第 27 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, pp. 34-39, 2010 年 10 月 14 日
- ⑨ 横川 隆司, 酒井 佑典, 小此木 孝仁, 小寺 秀俊, "非特異的キネシン吸着ビーズのせん断流を用いた付着力測定法の検討," 第 27 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, pp. 434-439, 島根, 2010 年 10 月 14 日
- ⑩ R. Yokokawa, Y. Sakai, A. Okonogi, I. Kanno, and H. Kotera, "Force Measurement and Modeling for Motor Proteins between Microsphere and Microfluidic Channel Surface," MicroTAS2010, pp. 372-374, Groningen, The Netherlands, Oct. 3-7, 2010. (Poster)
- ⑪ 小竹 宏紀, 横川 隆司, 神野 伊策, 小寺 秀俊, "電気泳動力によるモータタンパク質運動の双方向化に関する検討," 日本機械学会 2010 年度年次大会, pp. 135-136, 名古屋, 2010 年 9 月 5-8 日
- ⑫ Y. Sakai, R. Yokokawa, A. Okonogi, and H. Kotera, "Adhesion Force Measurement of Protein-Coated Microspheres Using Shear Stress in a Microfluidic Channel," APCOT2010, pp. 101, Perth, Australia, Jul. 6-9, 2010. (Poster)
- ⑬ M. C. Tarhan, R. Yokokawa, L. Jalabert, D. Collard, and H. Fujita, "Isolating Microtubules between Parallel Walls for Single Molecular Capturing Process," APCOT2010, pp. 55, Perth, Australia, Jul. 6-9, 2010. (Oral)
- ⑭ 小竹 宏紀, 横川 隆司, 神野 伊策, 小寺 秀俊, "モータタンパク質の選択的付加による微小管輸送方向制御," 平成 22 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会, pp. 57-61, 東京, 2010 年 6 月 17-18 日.
- ⑮ M. Kitamura, R. Yokokawa, and H. Kotera, "Parallel Microtubule Array with Defined Polarity and Selective Microtubule Immobilization in Nanochannels," ASME-ISPS, pp. MI-B5, Santa Clara, USA, Jun. 14-15, 2010. (Oral)
- ⑯ M. C. Tarhan, C. Bottier, R. Yokokawa, D. Collard, and H. Fujita, "Carriers for Molecular Capturing in a Motor Protein-Based Transport System," ASME-ISPS, pp. MI-B4, Santa Clara, USA, Jun. 14-15, 2010. (Oral)
- ⑰ M. C. Tarhan, R. Yokokawa, L. Jalabert, C. Bottier, D. Collard, and H. Fujita, "Kinesin Motion at Microtubule Crossings of a Nano Transport System - Precise Analysis Realized by Single Molecular Handling and Assembly -," MicroTAS2009, pp. 1533-1535, Jeju, Korea, Nov. 1-5, 2009. (Poster)
- ⑱ C. Bottier, J. Fattaccioli, M. C. Tarhan, R. Yokokawa, B. J. Kim, D. Collard, and H. Fujita, "Kinesin-Driven Oil Droplets Used as Carriers for Transportation of Solid Particles," MicroTAS2009, pp. 1521-1523, Jeju, Korea, Nov. 1-5, 2009. (Poster)
- ⑲ M. C. Tarhan, L. Jalabert, R. Yokokawa, C. Bottier, D. Collard, and H. Fujita, "Nano Monorail for Molecular Motors: Individually Manipulated Microtubules for Kinesin Motion," TRANSDUCERS2009, pp. 2164-2167, Denver, USA, Jun. 21-25, 2009. (Oral)
- ⑳ K. Wada, M. C. Tarhan, C. Bottier, D. Collard, H. Fujita, and R. Yokokawa, "Fabrication and Characterization of Multiple Nanowires Using Microtubule Structures," TRANSDUCERS2009, pp. 1337-1340, Denver, USA, Jun. 21-25, 2009. (Poster)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/ry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 隆司 (YOKOKAWA RYUJI)

京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻・助教

研究者番号：10411216

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

笠原 賢洋 (かさはらまさひろ)

立命館大学生命科学部・准教授

研究者番号：70361748