

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13324

研究課題名(和文) DNA Highwireを足場にしたナノデバイスの超高密度実装

研究課題名(英文) High-density packaging of nano-devices using DNA highwires as scaffolds

研究代表者

寺尾 京平 (TERAO, Kyohei)

香川大学・工学部・准教授

研究者番号：80467448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、DNA分子で構成される複数種のナノデバイスを、超高密度に実装する技術を開発する。研究代表者がこれまでに実現したDNA分子の非侵襲操作技術を利用することにより、DNA分子をマイクロピラー電極基板間を橋渡す状態で献花し、溶液中にDNA highwireと呼ぶ新たな1次元構造体を形成する。これをナノデバイスの実装足場として利用することにより、従来は散在していたDNAデバイス同士を高密度・高精度に実装する。研究期間内にDNA Highwire形成までは到達できなかったものの、実現に必要な要素技術のうち微小構造体の開発に集中的に取り組み、効率的なDNA操作を達成した。

研究成果の概要(英文)：We propose a packaging technology using DNA molecules as scaffolds for realizing high-density and precise arrangement of DNA nano-devices. Single DNA molecules are extended and immobilized between micro-electrodes to form "DNA highwires". In this project, we focused on a DNA manipulation technique under a fluorescence microscope for forming DNA highwires. We successfully manipulated single DNA molecules using two microstructures driven by two laser beams, where we handled them like 'chopsticks'. We evaluated the dimensions and the shapes of microstructures, intended for holding single DNA molecules between them efficiently. We have found that the geometry of the structure is dominant parameter for effective handling of single DNA molecules. This manipulation technique allows the imaging of single DNA molecules with its intact state, which will lead to fabrication of DNA nanosystems.

研究分野：マイクロ・ナノ工学

キーワード：ナノ構造形成 DNA 1分子操作

1. 研究開始当初の背景

DNA は自己組織化能を有した柔軟な分子ワイヤである。近年、DNA 分子の塩基配列を工夫することにより3次元ナノ構造や、ナノロボット、ナノ回路、ナノバイオセンサを作製する革新的な技術が提案されている。しかし、溶液中で撈拌することで自己組織化により構造が形成されるため、それぞれのDNA ナノデバイスがばらばらに散らばっており、さらに単独で機能するものに現状では限られている。

一方で代表者は独自技術としてミリメートル長の巨大な DNA 分子を非侵襲的に1分子ずつ液中で操作することに成功している。その研究過程で、長い DNA 分子を直線状に溶液中で把持することで、1次元の足場として利用し、DNA ナノデバイスを配置する、つまり高密度に実装するという着想に至った(図1参照)。

これまで適切なマニピュレーション技術がないために、DNA 1分子はナノデバイス実装の足場として利用されることはなかった。しかし、マイクロ領域とナノ領域を繋ぐことのできる柔軟な線材であり、また、塩基配列の相補性による自己組織化という特徴的な機能を持つことから、ナノ領域の実装基材としての有用性は非常に高い。この特徴を生かすため、DNA 分子を直線状に配置制御すること、ナノデバイスが360度全方向からアクセスできるように「綱渡りの綱(Highwire)」状にすることが本研究の提案である。

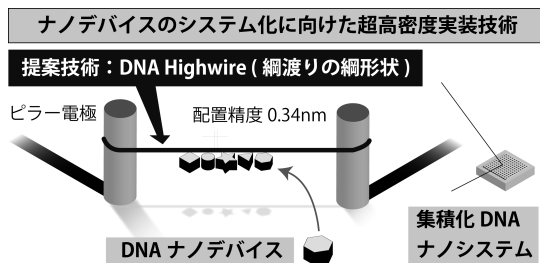


図1 DNA Highwire の概念

DNA Highwire を足場として、DNA ナノ構造やロボット、回路といったナノデバイスを塩基配列の相補性を利用して狙った位置に実装することが可能になれば、配置精度は、塩基のピッチで決まり、0.34 ナノメートルと極めて高い精度が得られる。また、浮かんだ状態であることから DNA の塩基配列に対して360度全方向からアクセスできるようになり、ナノデバイスの配置に自由度が生まれるだけでなく、デバイスの結合効率が大幅に向上することが見込まれる。様々な機能を有したナノデバイスが高密度に電極間に集積することで、高度な機能を持ったDNA ナノロボット、DNA ナノエレクトロニクス、DNA ナノバイオセンサが生まれることが期待される。これまで単

独機能であったナノデバイスが集積的に繋がることで高度なシステムになるとともに、マイクロ電極を介したマイクロデバイスとのインターフェースが生まれることから、外部との入出力が可能になることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、複数のピラー電極間に、DNA 分子を基板から浮かんだ状態で懸架する技術を実現することを目指す。これを DNA Highwire と名付け、ナノデバイス配置のための1次元実装基材とする。具体的には、操作実績のある0.1から1ミリメートル長のDNA 分子を光ピンセットと微細構造体により操作し、3次元的金マイクロピラー電極アレイに接合、得られたDNA Highwire に塩基配列の相補性を利用してナノデバイスを結合させ、超高密度実装を達成することを目指す。本研究期間内において、上記の達成に必要な要素技術の開発に取り組んだ。

DNA Highwire を足場として、これまで存在していた様々な機能を有したナノデバイスを超高密度に実装することで、DNA ナノテクノロジー分野に新たなシステム化の方法論を確立する。これは、単独では機能することのできないICチップやMEMSデバイスが電極基板上に適切に実装されることでシステムとして高度な集積機能を獲得することに相似している。これまでの単独動作ナノデバイスから高度なDNA ナノシステムが集積化されれば、新原理に基づく物理量センサ、生体分子分析システム、分子ロボットなどの高度な集積化システムがナノ領域で実現できる可能性が生まれる。

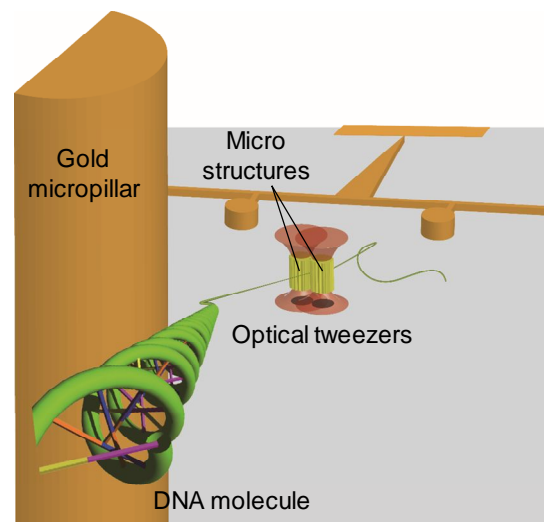


図2 DNA Highwire の形成

3. 研究の方法

光ピンセットでトラップされた微小構造体を「箸」のように利用し、DNA を操作することで、金マイクロピラー電極間に懸架する。金電極表面はアミノ基により正に帯電させることで負に帯電したDNA 分子を静電的に

固定することができる。電極に固定された DNA 分子は電極接触部を除き、溶液中に浮かんだ状態で懸架される。

以上の DNA Highwire 形成を実現するため次の要素技術開発に取り組んだ。(1) 微小構造体の微細加工プロセスによる作製、(2) レーザー操作光学系の制御システムの構築、(3) DNA を固定するためのアミノ基修飾金マイクロピラー電極基板の作製、(4) DNA 分子の効率的な操作に向けた微小構造体の開発、について取り組み、最終的な DNA Highwire を達成することを目指した。本研究期間内では、(4) の開発における新たな課題の解決に注力することになったため、最終的な Highwire 形成まで達成することはできなかったが、一部の要素技術は完成し、他のものは以前よりも高度化することに成功した。

4. 研究成果

(1) ナノ構造体の作製

これまでの DNA 操作の実績に基づき、様々な長さの DNA 分子を安定に捕捉し操作できるナノ構造体のデザインを決定し、電子線リソグラフィと紫外線リソグラフィを組み合わせた作製法により 100 万個程度一括形成し、リフトオフ法により水溶液中に回収する。素材には紫外線感光性レジスト SU8 を使用し、本期間内で安定して作製することが可能になった。

(2) レーザー光学系制御システムの開発

配線操作に必要な 2 軸の光ピンセット光学系をすでに構築している。本期間では 1 軸のレーザーをガルバノミラーにより操作できるようにし、それを走査することでトラップした構造体の姿勢調節を可能にした。

(3) アミノ基修飾金マイクロピラー電極の作製

ピラー電極と電源をつなぐ平面電極パターンをガラス基板上に作製した上に金ピラー電極を作製する。基板上に SU-8 を用いて紫外線リソグラフィによりマイクロピラーを作製する。ピラーを電極として機能させるため、スパッタリングによりピラー表面を金で被覆した。垂直壁面部分は SEM 及び ED S による分析により、金により完全に被覆されていることを確認した(図 3)。金でピラー表面を被覆する理由は、化学的に安定なだけでなく、金-チオール結合を利用した化学修飾を行うベースとして、利用できるためである。金表面へのアミノ基の固定及び、他の様々な分子(酵素、抗体)の固定については表面プラズモン共鳴測定を用いて評価し、良好に固定されていることを確認した。

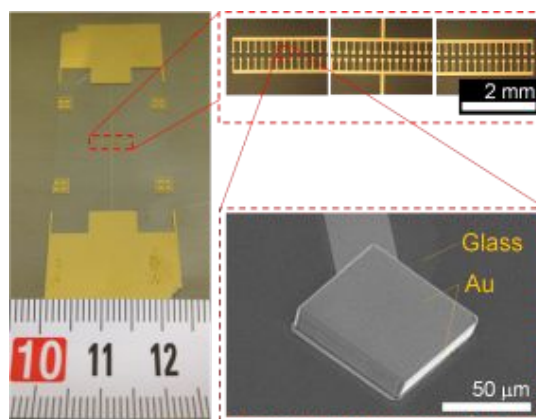


図 3 金マイクロピラー電極基板

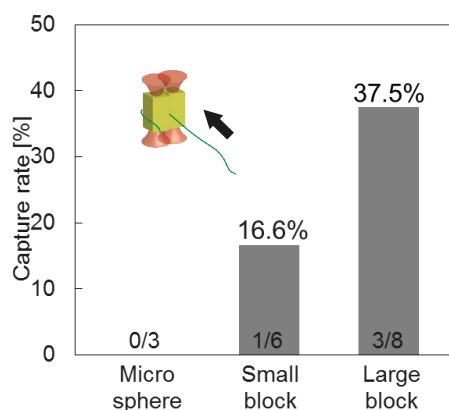


図 4 微小構造体サイズと DNA 捕捉率の関係

(4) DNA 分子の効率的な操作に向けた微小構造体の開発

操作時の粘性抵抗による微小構造体トラップ姿勢の変化とトラップからの脱離現象の観察から最大トラップ力、安定したトラップ姿勢が得られる限界速度を決定し、その発生力・速度以下の領域で配線操作を行うこととした。DNA には操作実績を有しているゲノムマーカー用の 0.1 - 1 ミリメートル長の市販の DNA サンプルを使用した。蛍光顕微鏡下でリアルタイム 1 分子観察を行いながら、DNA 操作実験を行った。その結果、DNA の操作にばらつきが生じ、懸架に十分な操作性が得られなかった。懸架における操作性で重要な因子は 2 点あり、一つは微小構造体で DNA を挟み込む際の捕捉率である。構造体を近づけると、溶液流により DNA がすり抜ける現象が多く見られた。もう一つは操作長である。構造体間で捕捉することに成功した場合でも、DNA を操作し伸長する際に、粘性力により DNA が微小構造体間からすり抜けると、懸架に必要な距離を伸長することができない。したがって、これらの課題を解決するため、まず捕捉率の向上を目指し、微小構造体のサイズ検討を行った(図 4)。結果として、市販のマイクロビーズでは捕捉できず、また、比較的小さな構造体では DNA がすり抜け、16.6%しか捕捉することができなかった。一方でサイズを大きくしたものについて

は 37.5% の捕捉率が得られ、効率が向上した。さらに大きくすることは微小構造体のトラップ自体が困難になること、ピラーや基板との干渉が生じやすくなることから、今回のサイズを以降に実験に使用した。

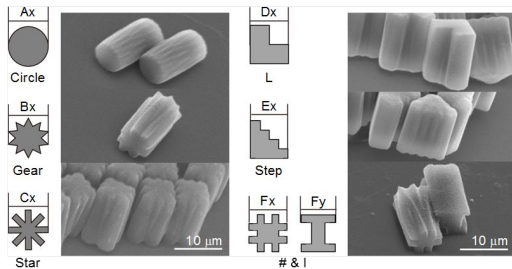


図 5 微小構造体形状の検討

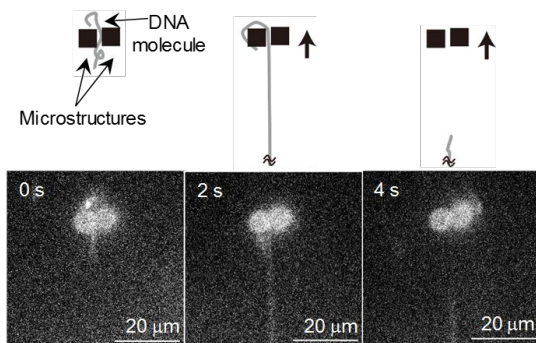


図 6 微小構造体による DNA 伸長

続いて、操作長の向上を達成するため微小構造体の形状について様々なものを作製し（図 5）操作長を調査した。DNA 操作の結果、良好に DNA を捕捉することができ（図 6）一部の形状については、操作長が 3 倍程度に向上した（図 7）。

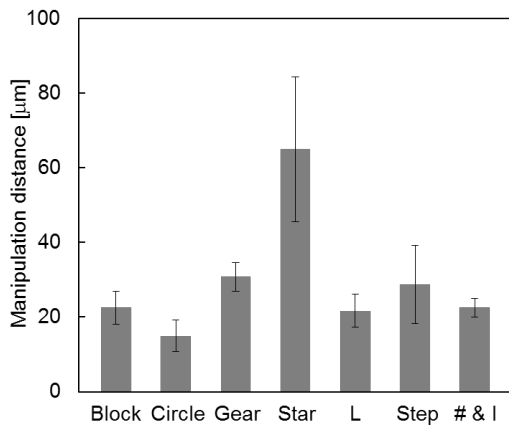


図 7 形状と操作長の関係

本検討により、表面に微細な凹凸を作製し、その微小空間内に DNA を捕捉することで操作長が向上することが示された。そこで、さ

らに構造体表面にナノサイズの凹凸形状を付与することで、捕捉率・操作長の向上を試みた。また、表面のナノ構造化は表面積の向上につながり、微小構造体表面への機能性分子の固定の際には、固定化量の増大につながる。微小構造体の高機能化を将来的に進める上でも有用な要素技術となりうる。

SU8 構造作製時に酸素プラズマ処理を行うことにより、表面にブラシ状のナノ構造が得られることが明らかになっている。本特性を利用して、微小構造体表面にナノ構造を形成した（図 8）。形成した微小構造体は蛍光顕微鏡下では向きが判別できず、どの面にナノ構造が形成されているか、操作時に知ることができない。そのため、微小構造体を 2 層に分け、1 層目を作製するときと 2 層目を作製するときで温度条件を変えて作製するプロセスを考案した。それにより、各層の自家蛍光を調節し、蛍光顕微鏡下で、微小構造体の向きを可視化した（図 9）。

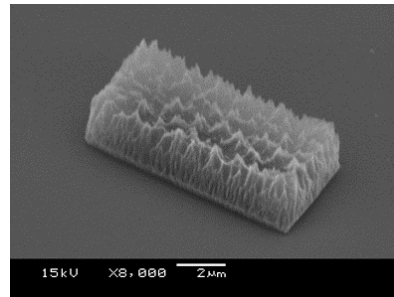


図 8 微小構造体ナノ凹凸表面の形成

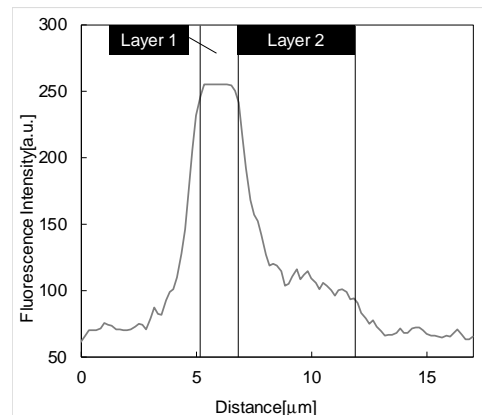
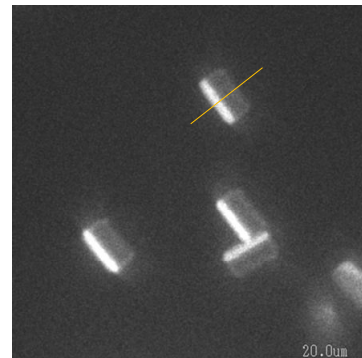


図 9 微小構造体 2 層化による姿勢の可視化

以上に示したように微小構造体による DNA 操作性の向上に取り組み、課題の解決と新たな要素技術の開発に注力した。そのため、本研究期間内には最終的な Highwire 形成に至ってはいない。今後、これらの技術を組み合わせることで目標の達成に向けた開発をすすめたい。また、今回作製した技術である光駆動微小構造体へのナノ形状の付与と、姿勢の可視化と調節は、今後、微小構造体を高機能化する上で有用な技術と考えている。将来的には光駆動微小構造体表面に機能性高分子を修飾することで、DNA Highwire の切断・接合などの分子加工に利用することが可能になると期待される。

<参考文献>

- [1] K. Terao, M. Washizu, H. Oana: "On-Site Manipulation of Single Chromosomal DNA Molecules by using Optically Driven Microstructures", Lab on a Chip, 8(8), 1280-4 (2008).
- [2] K. Terao, H. Kabata, M. Washizu: "Extending chromosomal DNA in microstructures using electro-osmotic flow", Journal of Physics: Condensed Matter, 18(18), S653-63 (2006).

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2件)

- [1] K. Terao, C. Masuda, R. Inukai, M. Gel, H. Oana, M. Washizu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, F. Oohira: "Characterization of optically-driven microstructures for manipulating single DNA molecules under a fluorescent microscope", IET Nanobiotechnology, 査読有, 13, 124-128 (2016)
- [2] K. Terao, S. Hiramatsu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, F. Oohira: "Fast protein detection from raw blood by size-exclusion SPR sensing", Analytical Methods, 査読有, 7, 6483-6488 (2015)

(学会発表)(計10件)

- [3] K. Terao, S. Kondo, N. Miyanishi, H. Takao, F. Shimokawa: "Electrokinetic-assisted SPR sensing with Kretschmann configuration", Pittcon 2017, 840-1P, 2017/3/5-9, Chicago, USA.
- [4] R. Inukai, H. Takao, F. Shimokawa, K. Terao: "On-Site Manipulation of Single DNA Molecules Using Optically-Driven Microchopsticks", Proceedings of 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2017), 585-588, 2017/1/22-26, Las Vegas, USA.
- [5] R. Inukai, C. Masuda, H. Takao, F. Shimokawa, H. Oana, M. Washizu, K. Terao: "Development of Optically-Driven Microchopstickes for Manipulating Single Chromosomal DNA Molecules", Proc. of International Conference on Single Cell Research 2016, 109, 2016/11/16-17, Tokyo, Japan.
- [6] D. Dohi, K. Hirano, K. Terao: "Molecular Quoits in Microfluidic Channel for Imaging Dynamics of Single Circular DNA Molecules", Proc. of 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016), 1095-1096, 2016/10/9-13, Dublin, Ireland.
- [7] 土肥大輝, 平野研, 寺尾京平: "マイクロピラー構造を用いた環状 DNA 一分子トラップ技術の開発", 2016年度第40回静電気学会全国大会, 2016/9/29-30, 群馬大学 桐生キャンパス, 群馬.
[静電気学会 HRSB 賞受賞]
- [8] 土肥大輝, 平野研, 寺尾京平: "環状 DNA の一分子動態観察に向けたマイクロ流体デバイスの開発", 平成28年電気学会 E 部門総合研究会, 2016/6/29-30, 金沢市文化

ホール, 石川.

- [9] K. Terao, K. Imai, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, S. Matsuoka, H. Kotera: "Analysis of the intercellular communication in a pancreatic β cell cluster by microfluidic stimulation to single cell", Pacificchem 2015, 2275616, 2015/12/15-20, Honolulu, Hawaii.
- [10] 犬飼亮, 増田千洋, 高尾英邦, 下川房男, 小穴英廣, 鷺津正夫, 寺尾京平: "1 分子解析を目指した DNA1 分子物理操作に関する研究", 第 38 回日本分子生物学会年会, 4T21L-12, 2015/12/1-4, 神戸ポートアイランド, 神戸.
- [11] T. Oda, T. Suzuki, H. Takao, F. Simokawa, K. Terao: "Microfluidic parallel extraction of chromosomal DNA molecules from single cells", Pacificchem 2015, BIOL1096, 2015/12/15-20, Honolulu, Hawaii.
- [12] 犬飼亮, 高尾英邦, 下川 房男, 鈴木孝明, 寺尾京平: "光駆動微小構造体を用いた巨大 DNA 分子液中配線技術の提案", 電気学会第 32 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 30am2-PS-122, 2015/10/28-30, 朱鷺メッセ, 新潟.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bntech.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 京平 (TERAO, Kyohei)

香川大学・工学部・准教授

香川大学・微細構造デバイス統合研究

センター・副センター長

研究者番号: 80467448