

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：55401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13769

研究課題名(和文) DNAインピーダンスを利用したDNA分解酵素センサの開発

研究課題名(英文) Development of deoxyribonuclease sensor using DNA impedance

研究代表者

氷室 貴大 (Himuro, Takahiro)

呉工業高等専門学校・電気情報工学分野・特命准教授

研究者番号：70803964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微細な間隔を有する2つの電極間に固定化したDNAを利用して、心筋梗塞の診断マーカーとして期待されるDNA分解酵素を計測するデバイスを開発した。まず、ガラス基板上に微細な間隔を有する2つの薄膜電極を形成し、その上にPDMS製のマイクロ流路を構築した。静電配向を利用してDNAの伸長固定を行った後に、マイクロ流路を通じてDNaseを導入し、DNA切断に伴うインピーダンスの増加を計測することにより、DNase検出を試みた。DNAの抵抗成分の増加比とDNase濃度との相関を調べた結果、低濃度のDNase反応においても抵抗値の増加が確認され、その増加比はDNase濃度が高いほど大きくなることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したデバイスは、手のひらサイズで使用できるものであり、極微量のサンプルから測定対象を検出することが可能である。本実験においては、医療診断マーカーとして期待されるDNA分解酵素を極微量血液から検出するセンシングデバイスを実現することが可能であることが示唆された。つまり、本研究の成果は、簡便で高感度な医療診断技術に発展することが期待でき、社会的な波及効果は高いと考えられる。さらには、DNA折り紙などの技術と組み合わせることで、計測する生体分子に選択性を持たせることも可能となり、様々な生体分子を対象としたアレイ型血液検査デバイスを構築できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of application to biosensors, we newly characterized the electrical properties of the DNA molecules. The electrical properties were investigated with complex impedance plot obtained from electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements. From the complex impedance of the DNA molecules, an equivalent circuit was obtained as a series connection of two parallel circuits consisting of the resistances and the parasitic capacitances. The DNA molecules which were immobilized and evaluated in this study can be applied to electrical detection of deoxyribonuclease (DNase), enzyme for nonspecific DNA cleavage, which is a candidate biomarker for acute myocardial infarction. When DNase solutions with various concentrations were introduced, we succeeded to obtain a definite correlation between impedance increase ratio and DNase concentration in the range of 0.00001 to 0.1 unit/ μ l.

研究分野：バイオマイクロデバイス

キーワード：マイクロデバイス DNA DNA分解酵素 インピーダンス計測 静電配向 マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

DNA は精巧な分子認識能や自己組織化機能を有しており、様々なナノ構造体を構築することが可能である。例えば、1本鎖の長い DNA と短い DNA を自己組織化により編み込めば、DNA 折り紙と呼ばれるナノ構造体を作り出すことが可能である。さらに、DNA が、ある条件下では電流を流すことや特定の生体分子と自発的に結合する機能を持っており、これらの特徴をうまく利用することで DNA を医療分野へ活用することが期待されている。

一方、DNA 分解酵素 (Deoxyribonuclease, DNase) は、DNA のホスホジエステル結合を非特異的に加水分解する酵素であり、生体内の細胞や組織の中だけでなく、血液や尿などの体液中、人体皮膚表面、ひいては大気中や水道水中など様々な場所に存在する。この DNase の血中濃度は心筋梗塞など特定の疾病に深く関与していることから、診断マーカーとして注目されている。つまり DNase 計測センサの開発によって、これらの疾病の早期診断が実現すると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、DNA が有する電気的特性を利用し、DNase を高精度に検出するセンシングデバイスの開発を試みる。DNA は細長く柔軟性のある分子であるため、通常は複雑に絡まったランダムコイル状態を形成しており、さらには、その電気的特性の詳細が未だ明らかにはなっていない。そのため、DNA をバイオセンサへ活用するためには、DNA を電極間に伸ばしつつ固定化し、その電気的特性を明確にする必要がある。

そこで、本研究では、2つの電極間に交流電場を形成することで静電的に DNA を操作することとした。この手法によれば、電界強度と印加周波数により DNA の挙動を操作することが可能となり、電極の形状や配置を工夫することで、DNA を任意の位置へ伸長固定することができる。また、本研究においては、交流インピーダンス法を用いることにより DNA の電気的特性を評価し、その等価回路を推定した。そして、バイオセンサへの活用として、DNase を計測対象とした検証実験を行い、酵素反応前後で DNA の電気的特性に変化が生じるかを調査した。

3. 研究の方法

本研究においては、マイクロ流路と静電配向 (交流電界下の DNA の分極作用に基づいた力が生じる現象) を利用することで微細な電極間に DNA を伸ばしつつ固定化する。そして、DNA が固定化された電極間のインピーダンス変化を利用して、心筋梗塞等の診断マーカーである DNA 分解酵素を簡便かつ高感度に計測する技術を構築する。その具体的な方法について以下に記す。

(1) 静電配向用デバイスの設計及び製作

静電配向用デバイスの概要図を図 1

(a) に示す。本デバイスは、ガラス基板上に製作されたアルミ製薄膜電極と PDMS (シリコン樹脂) 製のマイクロ流路から構成される。まず、30 mm 角のガラス基板上に真空蒸着装置により厚さ 200 nm のアルミニウムを成膜した。その後、フォトリソの塗布と紫外線露光、及び現像処理を行い、ウェットエッチングにより電極パターンを形成した。このとき、対向する電極は先端鋭利型とし、電極間に設ける先鋭箇所の数により、DNA が固定化される場所を制限できるようにした。また、本実験では長さが 16 μm の λ DNA を用いるため、先鋭部分の間隔が 14 μm となるように設計した (図 1 (b))。マイクロ流路は幅 500 μm 、深さ 50 μm とし、PDMS (polydimethylsiloxane) を用いて製作した。そして、14 μm の電極間隔をマイクロ流路で覆うように PDMS を貼り付けてデバイスを完成させた。

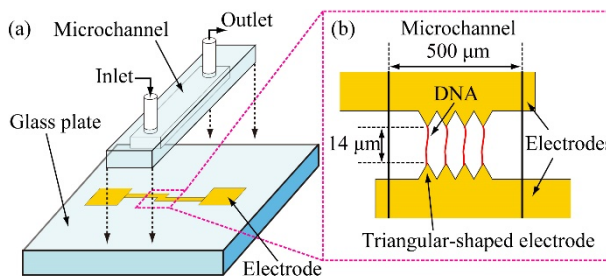


図 1 静電配向用デバイスの概要図

(2) DNA 分解酵素 (DNase) の検出方法

本デバイスを用いて、予め多数の DNA を電極間に設置しておけば、DNase の濃度に応じて DNA の切断量が変わると考えられるため (図 2)、酵素反応前後での DNA のインピーダンス変化を読み取ることができれば、DNase を定量化することが可能になると考えられる。この原理を利用して、固定化した DNA に対して種々の濃度の DNase 溶液を導入し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応させ、酵素反応前後

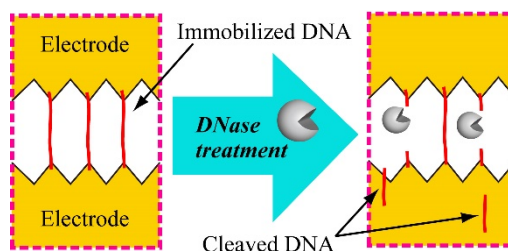


図 2 DNA 分解酵素検出の原理

での電極間のインピーダンスを比較した。

4. 研究成果

(1) DNA の電気的特性評価

まず、初期電位を 0 V とし、そこから 1 V まで直線的に掃引したときの応答電流を測定することで、DNA の電流-電圧特性を評価した。本実験では、DNA が並列に 4, 8, 12 箇所固定化されるような電極形状（先鋭数が 4, 8, 12）を用いて、DNA が固定化される前（流路内に超純水のみが満たされている場合）と DNA を固定化した後での比較実験を行った（図 3）。DNA が固定化される前は、印加電圧を上昇させても電極間を流れる電流値にほとんど変化は見られないが、DNA が固定化されると、非線形的に電流が増加していることがわかる。また、電極間に設けた先鋭数に応じて電流値が変化しており、先鋭数が多くなるほど電流が流れやすくなっていることもわかる。これらの結果から、DNA の伸長固定により、電極間に流れる電流値が飛躍的に上昇すること、また、固定化される DNA の本数に応じてその応答電流値に変化が生じることが確認された。

次に、12 個の先鋭数を有する電極形状を用いて、交流インピーダンス法により得られる電極間の特性について調べた。周波数を 100 Hz から 5 MHz まで掃引した際に得られたインピーダンスの実数成分を横軸に、虚数成分を縦軸に取ったグラフを図 4 (a) に示す。DNA 固定化前の特性は、大きな半円の一部分がプロット上に現れている。プロット上に半円が現れている場合、その等価回路は抵抗 R とコンデンサ C の並列回路で表すことができ（図 4 (b)）、これが超純水中の電極間の特性と言える。ここで、電極間に DNA が固定化されると、インピーダンスの曲線が変化し、高周波側に小さな半円が出現していることがわかる。このことから、DNA 固定化後の等価回路は抵抗 R とコンデンサ C の並列回路が 2 つ直列に連なった形になると推測され（図 4 (c)）、DNA が固定されることで現れる小さな半円（高周波側の曲線）は DNA のインピーダンスを表していると考えられる。

(2) 送液流量の最適化

マイクロ流路を用いて溶液を送液する際、その送液速度が速すぎると、DNase の有無に関わらず電極間の DNA が剥離してしまう可能性がある。そのため、送液流量の最適化を試みた。本実験では、図 4 (c) に示す等価回路中の抵抗成分 R_1 に着目し、この抵抗値の変化を読み取ることで、電極間の DNA に変化が生じたかを評価した。先鋭数 8 個の電極間に

DNA を伸長固定した後、1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で超純水を送液し続けた際に得られた電極間のインピーダンス変化を図 5 に示す。これより、高周波側に現れる半円の大きさが送液時間と共に大き

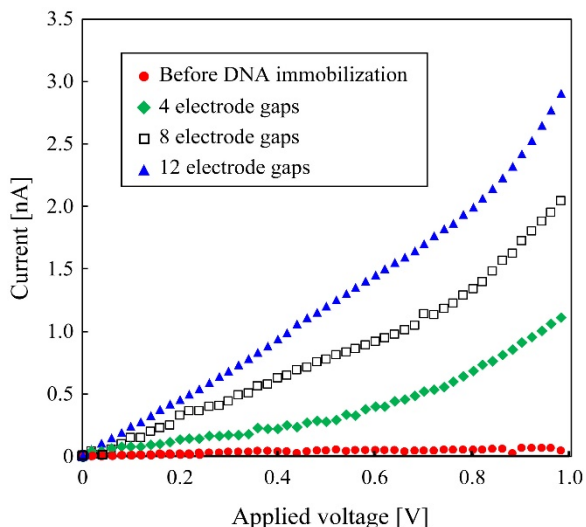


図 3 DNA 固定化前後の電極間の電流-電圧特性

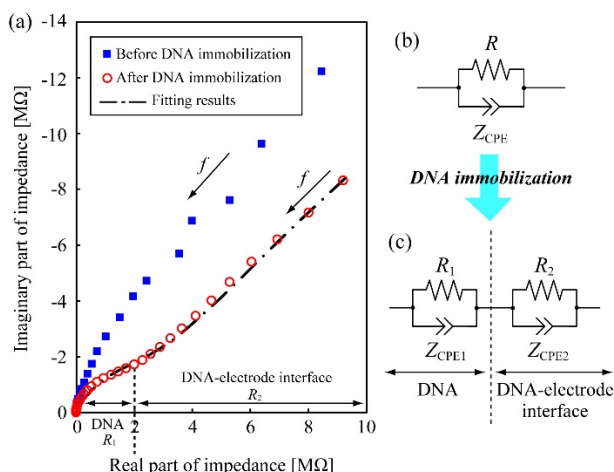


図 4 12 個の先鋭箇所を有する電極を用いた DNA 固定化前後の複素インピーダンスプロット及びその等価回路

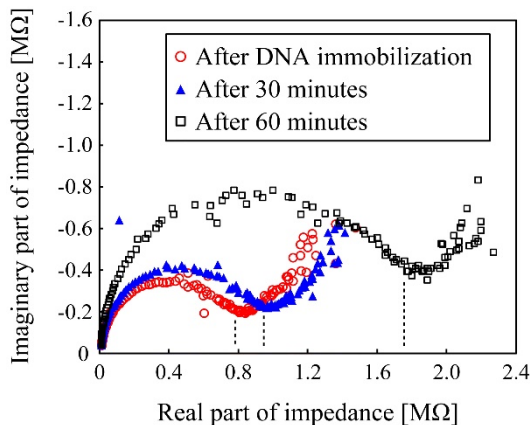


図 5 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ で純水の送液操作を行った際の電極間の複素インピーダンスプロット

くなっていることがわかる。 R_1 の値と比較しても、DNA 固定化直後は 760 k Ω 、送液 30 分後は 890 k Ω 、1 時間後は 1.7 M Ω となっており、特に 30 分後から 1 時間後にかけて抵抗値が増加していることがわかった。これは、1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量では、固定化された DNA がその状態を維持することができず、徐々に電極間から剥がれていることを示唆している。さらに流量を 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ から 5.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の間で変化させ、送液開始時の抵抗成分を R_0 、送液 n 分後の抵抗成分の値を R_n とし、 R_n/R_0 によりその増加比を算出した。各流量に対する増加比の経時変化を表したグラフを図 6 に示す。その結果、5.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量では、送液開始 10 分後で既に 2 倍程度の大きな抵抗値の増加が確認され、DNA の剥離が示唆された。また、0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量においても 1 時間かけて送液操作を行うとわずかに抵抗値が増加することがわかり、一方で、0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量では、抵抗値は全く変化しないことが確認された。このことから、本デバイスを用いる際の最適な送液流量は 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ であると判断された。

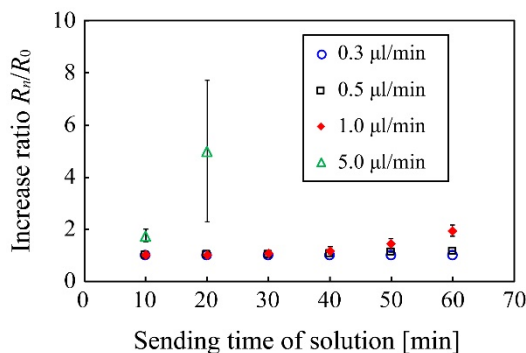


図 6 送液時間に対する抵抗値増加比の変化

(3) DNase の検出

先鋭数 12 個の電極間に DNA を伸長固定した後、 10^{-4} unit/ μL の DNase 溶液を 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で導入した。これにより、固定化された DNA が酵素反応により切断され、電極間のインピーダンスが変化すると考えられるため、酵素反応前後の電極間の特性を調べた。その比較結果を図 7 に示す。電極間に DNA を固定化した後（酵素反応前）の特性は、これまでに述べた結果と同様に、高周波側において小さな半円が確認された。ここで、DNase 溶液を導入すると、この特性が変化し、半円がわずかに大きくなっていることがわかる。推測される DNA の抵抗値で比較しても、DNA 固定化後は 280 k Ω だったのに対して、DNase 溶液導入後には、この値が 980 k Ω 程度に変化していることがわかった。これを増加比 (R_3/R_1) で表すと 3.5 倍となる。送液操作による影響はないと考えられるため、これは、電極間に固定化された DNA が DNase により切断されたことによって生じた増加と考えられる。つまり、本デバイスを用いたインピーダンスの計測により、DNase の検出が可能であることが示唆された。

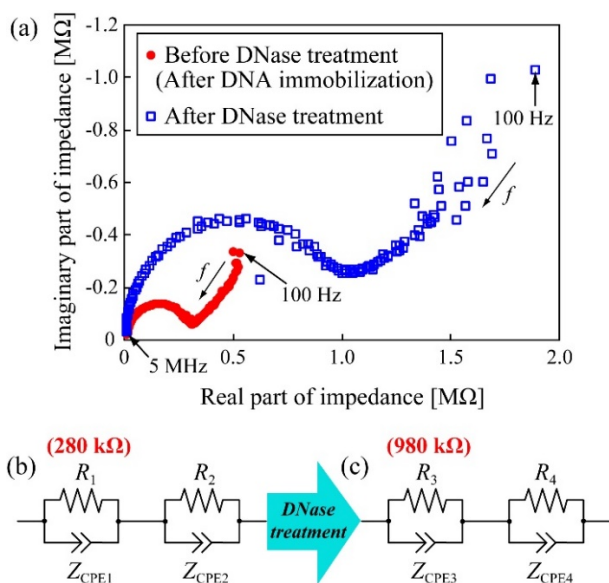


図 7 DNase 溶液 (10^{-4} unit/ μL) 導入前後の先鋭型電極間の複素インピーダンスプロット

さらに本デバイスを用いて、DNase の濃度条件を 10^{-1} unit/ μL から 10^{-5} unit/ μL まで変化させ、1 デバイスにつき 1 濃度の条件で同様の計測を行った。DNA の抵抗値の増加比 (R_3/R_1) と DNase 濃度との相関を示したグラフを図 8 に示す。その結果、DNase 濃度が高いほど抵抗成分の増加比が大きくなることを確認した。このことより、本デバイスから得られる電極間の電気的特性と DNase 濃度との間には明確な相関があることがわかった。

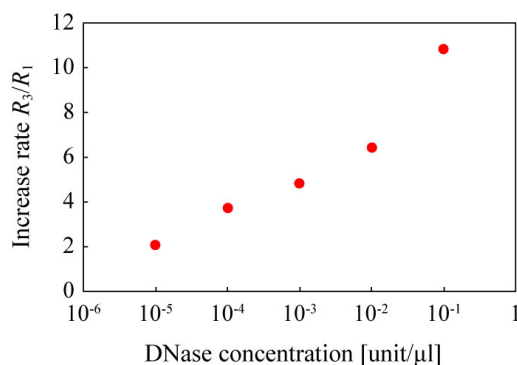


図 8 DNase 濃度と抵抗値増加比との相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahiro Himuro, Shota Tsukamoto, Yoji Saito	4. 巻 48
2. 論文標題 Electrical Evaluation of DNA Stretched and Immobilized Between Triangular-Shaped Electrodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Electronic Materials	6. 最初と最後の頁 1562 ~ 1567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11664-018-06899-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahiro Himuro, Yoji Saito	4. 巻 50
2. 論文標題 Assessment of Deoxyribonuclease Activity Using DNA Molecules Immobilized Between Microelectrodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Electronic Materials	6. 最初と最後の頁 537 ~ 542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11664-020-08596-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takahiro Himuro, Shota Tsukamoto, Yoji Saito
2. 発表標題 Electrical detection of deoxyribonuclease using DNA molecules immobilized between microelectrodes
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Himuro, Shota Tsukamoto, Yoji Saito
2. 発表標題 Deoxyribonuclease Detection by Measuring Electrical Impedance of DNA Molecules
3. 学会等名 The 8th Annual World Congress of Advanced Materials 2019 (WCAM 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氷室貴大, 塚本翔太, 齋藤洋司
2. 発表標題 マイクロ流路中の電極間に固定化したDNAによるセンシングデバイスの開発
3. 学会等名 電気学会 センサ・マイクロマシン部門大会 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本翔太, 氷室貴大, 齋藤洋司
2. 発表標題 DNAの電気的特性を利用したDNA分解酵素センサの開発
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氷室貴大, 塚本翔太, 齋藤洋司
2. 発表標題 微細電極間に固定化したDNAを用いたDNA分解酵素の測定
3. 学会等名 日本機械学会 2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Himuro
2. 発表標題 Development of Deoxyribonuclease Sensor Using DNA Molecules Immobilized Between Microelectrodes
3. 学会等名 22th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 氷室貴大
2. 発表標題 先鋭電極間に伸長固定したDNAの電気的特性評価
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 氷室貴大
2. 発表標題 微細電極間に伸長固定したDNAの電気的特性評価
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 氷室貴大
2. 発表標題 先鋭電極間に伸長固定したDNAの電気的特性評価
3. 学会等名 日本機械学会 2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本翔太
2. 発表標題 微細電極間に伸長固定したDNAの電気的特性評価
3. 学会等名 日本材料科学会主催平成30年度学術講演大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------