

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710115
 研究課題名（和文） DNAの分離分析に及ぼすナノ空間の幾何学的影響の解明
 研究課題名（英文） Geometrical influences of nanospace on DNA separation

研究代表者
 加地 範匡 (KAJI NORITADA)
 名古屋大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：90402479

研究成果の概要：

本研究は、超微細加工技術にて作製したナノピラーチップを用いて、精密に制御されたナノ空間の幾何学的特性がDNAの分離分析へ及ぼす影響について詳細は検討を行った。その結果、ナノ空間の幾何学的パターンが、DNAの分離モードを支配していることを明らかとし、その分離メカニズムの理論的モデルを構築した。さらにこのナノピラーチップをDNAだけではなく、タンパク質への分離に応用することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

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 ・ マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学システム、ナノ構造体

1. 研究開始当初の背景

2004年のヒトゲノムシーケンスの完全解読に引き続いて、イヌやチンパンジーのドラフトシーケンス解読が完了し、ポストゲノムシーケンス研究であるプロテオミクス研究などが精力的に進められている。このように、現在の生物学的研究はオミクス研究が中心であるが、このようなオミクス研究を進めるにあたっては、いかに信頼できるゲノムデータなどを高速かつ低コストで入手するのかということが重要である。申請者は、早い時期からその重要性を認識し、現在まで

に、従来の μ TASによるDNA解析法に、ナノテクノロジーにより作製したナノパーティクル(M. Tabuchi et al., Nanospheres for DNA Separation Chips, *Nature Biotechnology*, 22 (2004) 337-340.) やナノ構造体(N. Kaji et al., Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 15-22.) を応用した新しいDNA分離法の開発を行ってきた。このナノ構造体をDNA分離媒体として用いた研究においては、従来の高分子を用いる方法では困難であった長鎖DNAの高速

分離を達成することに成功している。このようなマイクロ・ナノ構造体を用いた DNA 分離の研究は、世界的にみても他に 2 グループでしか研究が行われておらず (プリンストン大学の R. H. Austin らのグループ、コーネル大学の H. G. Craighead らのグループ)、非常に独創性の高いものである。これまでにこれらのグループにおいては、マイクロチャネル内に深さの異なる領域を交互に配置したエントロピートラップと呼ばれる DNA 分離手法 (J. Han et al., Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array, *Science*, 288 (2000) 1026-1029.) の開発、ナノ構造体 (M. Cabodi et al., Entropic recoil separation of long DNA molecules, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 5169-74) やナノチャネル (J. O. Tegenfeldt et al., From the cover: The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels, *Proceedings of National Academy of Science USA*, 101 (2004) 10979-83.) をマイクロチャネル内に配置することで、ナノ空間における DNA のダイナミクス解明が試みられてきた。

このような研究背景のもと、現在までの申請者の研究において、DNA の泳動挙動がマイクロチャネル内に配置した柱状ナノ構造体、ナノピラーの幾何学的パターンに応じて反転することを見出しつつある。これは、直径 500 nm のナノピラーを 300 nm の間隔でマイクロチャネル内に交差状に配置した場合、DNA は分子ふるい効果により分子量の小さいものから順に泳動されたのに対して、同じサイズのナノピラーを同じ間隔で DNA の泳動方向に対して平行に配置した場合、分子量の大きい DNA が先に泳動されたという結果に基づくものである。これが本申請の着想の原点となっており、もしこのようなナノピラーの幾何学的パターンにより DNA の分離能をコントロール出来るのであれば、従来のナノピラーチップよりも大幅なスループットの向上が期待できる。ただし、DNA の分離能向上を実現するにあたっては、同時に DNA のナノ空間中におけるダイナミクスをより詳細に解明していく必要がある。これは、従来の J. O. Tegenfeldt らの研究からも明らかのように、ナノ構造体中においては、P. -G. de Gennes により確立された高分子理論 (Scaling concepts in polymer physics) とはその挙動が必ずしも一致しないからである。この点について、特に申請者はナノ構造体の化学的状態 (表面荷電) が大きな影響を与えていると考えており、ナノ空間中における DNA そのものの高分子物理的性質に、ナノ構造体表面との化学的相互作用を定量的に含めることで、ナノ空間における DNA のダイナミクスを明らかにしていく。

2. 研究の目的

ナノピラーチップを用いた DNA の分離においては、本申請のメインテーマである幾何学的パターンのみならず、ナノピラーの直径・間隔・高さ、さらにはナノピラー表面の化学的状態 (表面荷電) が影響を与えると予想される。本研究では、これらの基礎的パラメータ (直径・間隔・高さ) を、作製における技術的限界である 100 nm から 1,000 nm までの間で順次検討した後、溶液の pH をコントロールすることでナノピラー表面の荷電の影響を定量的に評価し、最終的に純粋なナノピラーの幾何学的パターンが電気泳動下における DNA のダイナミクス (持続長、緩和時間) へどのような影響を与えているのかを、1 分子 DNA の直接観察により解明する。このダイナミクスの解明過程で得られた知見をもとに、DNA の分離分析のスループット向上、特に幅広いサイズ領域に適用可能なチップデザイン的设计・製作を行い、評価する。また、DNA のみならずタンパク質分離への応用 (SDS-PAGE をナノピラーチップで実現) も検討し、実現を図る。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するためには、(1)ナノ構造体特有の問題点、(2)幾何学的パターン以外のパラメータ、(3)幾何学的パターン、④DNA 分離へのナノ構造体最適化とタンパク質分離への応用、を検討することが必要であり、最終的にはこれらを生体高分子分離デバイスとして機能させ、ナノ空間における基礎物性値の取得を目指す。初年度は、まず(1)~(3)の研究を行う。

(1)ナノ構造体特有の問題点の検討

申請者は、現在までの研究において、ナノ構造体を用いるが故の問題点をいくつか明らかとしてきているが、さらに詳細に検討を進めることで、幾何学的影響に絞って検討できるように準備を進め、解決を図る。現在までに明らかとしてきた問題点の一例として、従来のマイクロチャネルと比較して比表面積が劇的に増大し、界面の形状も複雑なため、電気浸透流の影響が従来法では予測できないこと、また、ナノピラーの直径を一定に保ったままナノピラーの間隔を小さくしただけでは、DNA の分離能は向上しないこと、さらにナノピラー中を洗浄するための決め手となる方法がないことなどがある。これらの問題点を解決し、実現しようとするには、電気浸透流の発生そのものを抑制する、ナノピラーの直径を、間隔に応じて細くする吸着防止効果のあるコーティング剤を添加するなどが考えられる。電気浸透流に関しては、緩衝溶液のイオン強度の調整により、ある程度の抑制が可能であることが分かってきたが、それでも DNA 分離の再現性は十分とは言え

ない。そこで、コーティング剤の適用を検討する。このコーティング剤としては、ノースウェスタン大学の A.E. Barron 教授のグループが開発した、電気浸透流を効果的に抑制するペプチド構造を模倣した高分子 (A.R. Statz et al., *New peptidomimetic polymers for antifouling surfaces*, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 7972-7973) をナノピラーチップ用に最適化することを計画している。A.E. Barron 教授は、マイクロチップ電気泳動における分離媒体や表面修飾高分子の研究における世界的権威であり、申請者のナノ構造体を用いた DNA 分離の研究に多大な関心を抱いておられるので、必要な情報を交換しながら、共同して研究を進めていく予定である。初年度は、A.E. Barron 教授がすでに開発しているペプチド構造を模倣した高分子や、温度応答性高分子をナノピラーチップに適用し、適用可能な濃度や温度、圧力といった高分子側の条件出しを行いながら、適用可能なナノ構造体のサイズなどの検討も行う。

(2)幾何学的パターン以外のパラメータの検討

上述のペプチド構造を模倣した高分子は、吸着層が非常に薄いためナノピラー直径にほとんど影響を与えることなく、電気浸透流の抑制が可能である。そこで、この過程において、幾何学的パターン以外のパラメータ (ナノピラーの直径・間隔・高さ、表面荷電状態) の検討も同時に行う。

(3)幾何学的パラメータの検討

幾何学的パラメータとして、ナノピラーをマイクロチャンネルに対して平行 (0°) に並べた並列型、 15° 、 30° 、 45° 傾けた交差型を用意し、その影響を検討する。温度応答性高分子 (A. P. Sassi et al., *Electrophoresis of DNA in novel thermoreversible matrices*, *Electrophoresis*, 17 (1996) 1460-1469) は、温度依存的にそのサイズを調整可能なため、ナノピラーに吸着させた後に高分子鎖を架橋させてやることにより、擬似的に幾何学的配置を変えることが出来る。よって、この温度応答性高分子を用いることにより、幾何学的パターンが DNA のダイナミクスに与える影響をより詳細に検討することが可能となる。初年度の研究遂行においては、申請者は A.E. Barron 教授に高分子の合成において協力を仰ぐ。

最終年度は、初年度に行ったナノ構造体特有の問題点の解決法と DNA のダイナミクスの検討から得られた知見をもとに、DNA 分離のためのナノ構造体の最適化と、分離可能な分子量領域を検討し、DNA 分離デバイスとして評価を行う。また、マイクロチャンネル内を仮定して構築した流体力学シミュレーションを用いてナノ空間内の流体力学シミュレーションを行い、実測値との比較から粘性や

誘電率といった基礎物性値の比較検討を行う。さらにこのデバイスのタンパク質への応用も検討し、ナノピラーチップの解析対象サンプルの拡充を目指す。

(4)DNA 分離へのナノ構造体最適化とタンパク質分離への応用

基本的には初年度に得られた知見をもとにナノ構造体の最適化を進めるが、コーティング剤を用いて電気浸透流を防ぐため、これらの高分子溶液をナノ構造体に適用する際、その粘性の高さがナノ構造体への適用を妨げる大きな要因となることが予想される。そこで、あらかじめ粘性の高い高分子溶液を、ナノ空間中に適用した際の流体力学シミュレーションを行うことで、その流体挙動を予測し、ナノ構造体の最適化を行う。この際、高分子のナノ構造体表面の修飾効率と耐性に留意することで、高分子と石英表面との相互作用形式についても検討を行う。

ナノ構造体の作製は、今なお時間と労力を要するものであることに変わりはない。ゆえに、最適と考えられるデザインを、出来るだけ作製前に絞り込むことが、本研究を効率的に進める上での鍵となる。そこで申請者は、流体力学シミュレーションソフトウェアを最大限に活用することで、ナノ構造体の最適候補構造を、事前に選定することとしている。ただし、このソフトウェアは、マイクロ流体を対象に設計されているため、ナノ流体を正確に再現することが出来るかは不明である。そこで、得られた実験結果と比較検討することで、ナノ空間の基礎物性値の取得を試み、これら既存のソフトウェアの境界条件に新たに追加していく。

4. 研究成果

初年度は、(1)ナノ構造体特有の問題点の検討、(2)幾何学的パターン以外のパラメータの検討、(3)幾何学的パターンの検討を行い、特にナノ構造体特有の電気浸透流、ナノピラーの間隔が分離へ与える影響、そして並列型を用いた場合の DNA 分離メカニズムの解明について新しい知見を得た。

(1)ナノ構造体特有の問題点の検討

マイクロチャンネル内にナノ構造体が存在する場合、比表面積の増大と同時に複雑な構造に起因する電気浸透流の増大と複雑化が予測される。そこでナノ構造体中の電気浸透流について実測したところ、ナノ構造体により形成される空間が小さくなればなるほど、電気浸透流も減少することを明らかにした。

(2)幾何学的パターン以外のパラメータの検討

本年度は特にナノピラーの間隔に着目し、100, 300, 500, 700, 1000 nm の間隔を有するナノピラーを作製して、DNA 分離能への影響を検討した。その結果、間隔が小さくなるにつ

れて分離度が上昇することを突き止め、分離条件の最適化により 100 bp から 48.5 kbp の DNA フラグメントを 60 秒程度で分離することに成功した。

(3)幾何学的パターンの検討

並列型に配置されたナノピラーでの DNA 分離結果を元に、新しいナノウォール構造を作製し、その分離メカニズムについて検討した。その結果、ナノピラー構造とナノピラーのないマイクロチャネルとの界面が、分離に大きな影響を及ぼしていることを明らかとした。また、DNA 1 分子のナノ空間におけるダイナミクス観察により、ナノウォール構造中では DNA のサイズに関わらず、ほぼ同一の泳動速度で移動していることを明らかとした。

最終年度は、初年度に行ったナノ構造体特有の問題点の解決法と DNA のダイナミクスの検討から得られた知見をもとに、(4)DNA 分離のためのナノ構造体の最適化と、分離可能な分子量領域を検討し、DNA 分離デバイスとして評価を行った。また、(5)マイクロチャネル内を仮定して構築した流体力学シミュレーションを用いてナノ空間内の流体力学シミュレーションを行い、実測値との比較から粘性や誘電率といった基礎物性値の比較検討を行った。さらに、(6)このデバイスのタンパク質への応用も検討し、ナノピラーチップの解析対象サンプルの拡充を目指した。

(4)ナノ構造体の最適化と分離可能な分子量領域の検討

初年井の結果より、ナノピラーの間隔は狭ければ狭いほど、分離能が高くなることが分かっていた。しかしながら間隔が 100 nm のナノピラーを用いると、DNA 分子がナノピラー領域の手前でつまることが多かったため、300 nm のものを使用して検討したところ、100 bp から 48.5 kbp のものを分離できることが明らかとなった。さらに、1 kbp 以下とそれ以上の分子量領域においては、分離能の電場依存性が異なることを見出した。

(5)ナノ空間内での粘性や誘電率といった基礎物性値の比較検討

ナノ空間中での電気浸透流の測定結果より、ナノ空間中では水の粘性が上昇して誘電率が下がることを示唆する結果が得られた。これはナノ空間内では比表面積が大きくなるため、溶液中のイオンが壁面に強く引き寄せられることに起因すると考えられた。

(6)タンパク質への応用

マイクロチャネル内へのナノピラーの配置により、電気浸透流を抑制することができ、さらに石英表面の電荷により SDS 変性タンパク質の吸着を効果的に抑制することが出来たため、数 kDa から 100kDa 程度の分子量を有するタンパク質の分離に成功した。

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] (全て査読有り) (計 7 件)

- (1) Mohamadi, M. R.; Kaji, N.; Tokeshi, M.; Baba, Y., Dynamic Cross-Linking Effect of Mg(2+) To Enhance Sieving Properties of Low-Viscosity Poly(vinylpyrrolidone) Solutions for Microchip Electrophoresis of Proteins. *Anal. Chem.*, **2008**, *80* (1), 312-316.
- (2) Mohamadi, M. R.; Yasui, T.; Kaji, N.; Tokeshi, M.; Baba, Y. Quantitative evaluation of dynamic coating on plastic microchips for preventing protein adsorption, *The proceedings of μ TAS 2008*, **2008**, *1*, 495-497.
- (3) Yasui, T.; kaji, N.; Mohamadi, M. R.; Ogawa, R.; Hashioka, S.; Tokeshi, M.; Horiike, Y.; Baba, Y. Nanopillar chips arranged in tilted array pattern for fast separation of DNA and proteins, *The proceedings of μ TAS 2008*, **2008**, *1*, 432-434.
- (4) Kaji, N.; Oki, A.; Ogawa, R.; Takamura, Y.; Nishimoto, T.; Nakanishi, H.; Horiike, Y.; Tokeshi, M.; Baba, Y., Influences of Electroosmotic Flows in Nanopillar Chips on DNA Separation: Experimental Results and Numerical Simulations. *Israel Journal of Chemistry*, **2007**, *47* (2), 161-169.
- (5) Kaji, N.; Tokeshi, M.; Baba, Y., Single-molecule measurements with a single quantum dot. *Chem. Rec.*, **2007**, *7* (5), 295-304.
- (6) Kaji, N.; Tokeshi, M.; Baba, Y., Quantum dots for single bio-molecule imaging. *Anal. Sci.* **2007**, *23* (1), 21-4.
- (7) Yasui, T.; Kaji, N.; Ogawa, R.; Hashioka, S.; Tokeshi, M.; Horiike, Y.; Baba, Y. DNA separation by square patterned nanopillar chips, *The proceedings of μ TAS 2007*, **2007**, *2*, 1207-1209.

[学会発表] (計 7 件)

- (1) N. Kaji, DNA and protein separations by nanopillar array structures, Fifth International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE5), 2009年3月16日, 宮崎
- (2) 加地範匡, ナノ空間を利用した生体高分子解析法の開発, 第39回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2008年11月8日, 名古屋
- (3) N. Kaji, Non-equilibrium DNA transport in nanopillar chips toward high-throughput

DNA separation, Micro- and Nano Technologies in Medicine - a Swedish-Japanese collaborative workshop -, 2008年10月22日, Uppsala, Sweden

- (4) 加地範匡, ナノ空間における DNA のダイナミクス, ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム, 2008年6月12日, 三島
- (5) 加地範匡, 微小空間における1分子酵素反応の解析, 第69回分析化学討論会, 2008年5月16日, 名古屋
- (6) N. Kajii, Separation Sciences with Nano-fabricated Structures, 日本化学会第88年会春季年会, 2008年3月29日, 東京
- (7) N. Kajii, DNA molecular behavior in nanowall array structures, Microscale bioseparations methods methods for systems biology (MSB2008), 2008年3月10日, Berlin, Germany

[図書] (計 3 件)

- (1) 加地範匡, 馬場嘉信, テクノシステム、MEMS/NEMS 工学大系、印刷中

- (2) Kajii, N.; Tokeshi, M.; Baba, Y., RSC Publishing, Nanopillars and nanoballs for DNA analysis, 2009, 179-191

- (3) 加地範匡, 馬場嘉信, シーエムシー出版、バイオインダストリー、2007、20-24

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加地 範匡 (KAJI NORITADA)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：90402479