

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200034

研究課題名（和文） DNAチップエレクトロニクスの創製とナノバイオセンシング

研究課題名（英文） Development of DNA-Chip-Based Electronic Devices for Nanobio Sensing Applications

研究代表者

中野 幸二 (NAKANO KOJI)

九州大学・工学研究院応用化学部門・准教授

研究者番号：10180324

研究成果の概要（和文）：本研究では、DNA自己組織化膜に電気伝導性の修飾を施し、分子認識情報の読み出しが可能なDNA分子デバイスについて検討した。そのなかで、DNA二重らせんをin-situにて化学修飾できるソラレン化合物、原子間力顕微鏡を利用したDNAアフィニティー反応の1分子検出、同じく一塩基多型アッセイ、さらには分岐構造DNA二重らせんからの dendritic 形成を利用したボトムアップ超分子ナノ材料などの成果を得た。引き続き、DNA dendritic 材料をくし型電極に組み込むことで、分子情報応答性のバイオ分析デバイスを確立する研究を継続している。

研究成果の概要（英文）：DNA-based molecular device that is capable of responding to biological molecular recognition events was tackled for futuristic nano-, bio-device developments based on in-situ electroconductive modification of DNA self-assembly. Some direct or indirect assistance necessary to the goal were successfully developed: novel psoralen compounds that enable versatile functionalization of DNA duplexes by covalent conjugation, single-molecule assay for various DNA affinity reactions including single-nucleotide polymorphism using atomic force microscope, new-types of bottom-up, supramolecular DNA nanomaterials based on dendrimer formation of three-way junction DNA, and etc. We are committed to taking on the challenges by installing the DNA dendrimer materials into interdigitated array electrode to provide state-of-the-art, molecularly responsive devices adaptable to various bioanalytical purposes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	19,400,000	5,820,000	25,220,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ナノバイオ・DNA・自己組織化・分子認識・バイオセンサー・遺伝子センサー・分子エレクトロニクス・走査プローブ顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの終了から僅か5年、DNA二重らせんの発見者J. D. Watson博士の全ゲノム配列が報告された(Nature (London), 452, 872, 2008)。これでC. Venter博士と併せて、個人が特定されているゲノム配列の事例は2件となった。特にWatson博士のケースはわずか2ヶ月で終了し、従来の1/100の低コスト(約100万ドル)で達成された。DNAシーケンシングで得られる情報は、他の方法で得られる情報と比較すると圧倒的に質が高く、かつ情報量も多いので、高速化、低コスト化は新たな需要を生み出すであろう。このような状況のもと、個人のゲノムを低コストで解析することを目標に「1000ドルゲノム」が提唱されるに至った。

ここで、遺伝子分析の主流が、正攻法ともいえるDNAシーケンシングへと舵切られたことで、従来の遺伝子センサーや1塩基多型(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)タイプピンは終焉を迎えたともいえる。しかし遺伝子の全体像が明らかになったいまこそ、限られた遺伝子を対象に低コストで、簡単迅速に解析できる技術や装置が正しく評価されるべきである。またそのような効率の良い検査法を導入することで初めて、ヒトゲノム解析の成果を本当に有効に利用できるであろう。周知のように、血糖値や肝機能検査と比較してDNA検査のコストは著しく高い。加えて、現状の遺伝子センサーは実用の医療診断レベルに達していない問題もある。

2. 研究の目的

申請者は、金表面でのDNAの自己組織化を利用した固定化法を開発することで、DNA結合性薬物に対するバイオセンサーを世界先駆けて実現した。その後、科学技術振興機構「さきがけ」において、DNA二重らせんをベースにした1分子ナノワイヤーの研究に従事した。これにより、オリゴヌクレオチドの抵抗率が、酸化還元活性な低分子とコンジュゲートを形成させることで劇的に低下することを発見している(図1, 化学, 59, 34, 2004)。この研究成果は、DNAの構造や基本的な性質を保ったまま、その電気伝導度を任意に制御できることを示した点で画期的といえる。言い換えれば、エレクトロニクス回路にDNAの分子認識機能を実装することが可能なので、従来の分子素子の範疇に止まらないバイオ分子デバイスの実現を強く示唆する。

3. 研究の方法

本研究では、DNA自己組織化膜やDNAデンドリマーなどの超分子構造体に電気伝導性の修飾を施し、電気的(直流・交流)、

あるいは電気化学的な情報の読み出しが可能なDNA分子回路について検討する。さらに、DNA特有の分子認識機能を回路に組み込んで情報応答性を持たせる工夫、およびDNA二重らせん1分子レベルで回路化し集積する試みを通じて、ハイスループットバイオ分析デバイスに発展させてゆく。このような取り組みを通じて、高性能・高信頼性のDNAチップの実現に取り組み、それら技術の総体として、「DNAチップエレクトロニクス」の創製を目指す。

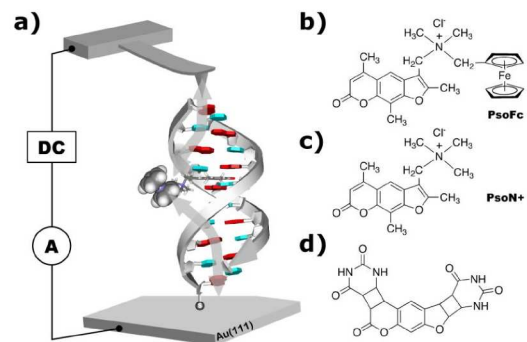


図1. 電気伝導度測定原子間力顕微鏡(AFM)の模式図(a)とソラレン誘導体の構造(b, c)。DNAに取り付けたフェロセニル基が電子移動を媒介することでAFMチップ(Pt蒸着)と金基板との間に電流が流れる。なお(d)は、ソラレンが核酸塩基と光架橋反応した際に形成する構造を示している。

4. 研究成果

(1) 新しいソラレン化合物の合成と原AFMを用いたDNA二重らせんとの結合反応の1分子解析

DNA二重らせんに電気伝導性を付与することのできる低分子修飾剤として1)フェロセン、2)鉄(II)-フェナントロリン、3)コバルト(II)-フェナントロリン、および4)N,N,N'-トリメチルアンモニウムメチレン基で修飾した対照物質を合成した。いずれもの化合物も、ソラレン部位がDNA二重らせんにインターカレーションするだけでなく、UV照射に伴い核酸塩基と光架橋反応を起こす。これを利用して、任意のDNA二重らせんから酸化還元活性な低分子コンジュゲートを得ることに成功した。

一方、ソラレンは代表的なインターカレータでもあるので、インターカレーションに伴うDNAの構造変化を1分子レベルで解析する方法を提案した。すなわち、あらかじめ任意の結合平衡に達せしめたDNA-ソラレン複

合体溶液をいくつか準備し、これに光照射することで非解離性の DNA コンジュゲートに転換した。これを AFM により可視化し、1 分子単位で分子長を測定することでらせんの巻き戻し角を決定した。結果は、粘度測定や沈降現象の解析法など、従来から知られていた方法と良く一致した。

(2) AFM イメージングを利用した DNA ハイブリダイゼーションの 1 分子可視化検出法

本研究で検討する DNA チップでは、表面の DNA 自己組織化膜の構造が重要になるが、これまでは分光法による検討のみで、AFM などにより可視化した例はなかった。そこで、高い空間分解能が得られる非接触タイプの AFM を使い、DNA 自己組織化膜を 1 分子レベルで観察することを試みた。その過程で、モレキュラービーコン DNA 自己組織化膜を使い、ターゲット DNA との結合によるループ構造の解消を 1 分子レベルで観察することに成功した。通常、AFM は DNA 1 分子レベルの分解能を持たない。しかし、DNA のコンホメーション変化と組み合わせることで AFM による可視化検出が可能であることを初めて示した。これをもとに、検出のためのラベル化を必要としない、DNA ハイブリダイゼーション検出プラットフォームを提案した (図 2)。

DNA のコンホメーション変化を利用した 1 分子アッセイ法については、引き続き検討し 1 塩基多型 (SNPs) 解析にも成功している。プローブ DNA に stem-loop 構造をもたせ、これをターゲット DNA とのポリメラーゼ反応のテンプレートにする。ポリメラーゼは、フ

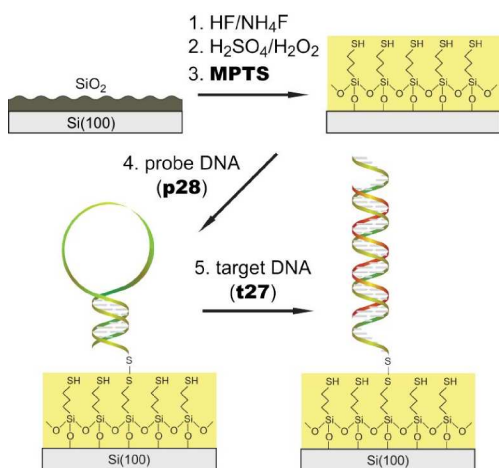


図 2. モレキュラービーコン DNA からの自己組織化膜形成とターゲット DNA 検出スキーム。ループ構造の解消を 1 分子レベルでイメージングしてハイブリダイゼーション検出をする。

ルマッチ DNA だけと反応して両者を連結する。これにより stem 部位の安定性が大幅に向上するので、loop 構造が保存されるようになる。SNP 試料ではプローブ単独と変わりがないので、loop 構造が容易に解消する。これを AFM で可視化することで、ラベルフリーで SNP 検出が可能であることを示した。また、プラスミド DNA に見られる環状構造も、DNA にユニークで、かつ AFM で可視化できる特徴がある。環状構造を検出タグ構造に持つ DNA プローブについても報告している。

(3) 分岐構造 DNA 二重らせんからの dendroliamer、および dendroliamer 自己組織化膜生成

新しい Bottom-up 型の DNA ナノマテリアルとして、分岐構造 DNA 二重らせんを単位ユニットに用いて、従来にはない DNA dendroliamer を作製することに成功した。すなわち、3 種類の 26 量体オリゴヌクレオチドを用いて、DNA 分岐構造の一種である Thee-Way Junction (TWJ) ユニットを形成させた。TWJ ユニットは、末端が自己相補的な 1 本 DNA となっており、これが付着末端となって dendroliamer を形成することを見いだした。DNA dendroliamer は、大きさが 1 μm 程度と、単一の分子がつくる会合体としては例外的に大きい(会合数は約 10^6)。それだけではない。Dendroliamer の付着末端と相補的なオリゴヌクレオチドを添加すると、複数個の dendroliamer ビーズが結びつくことも分かった。(図 3)。

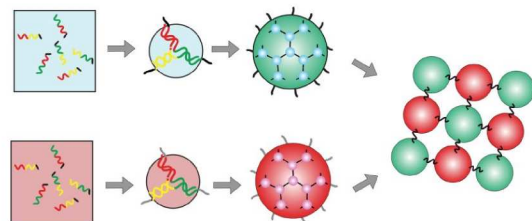


図 3. TWJ ユニットからの DNA dendroliamer 形成とバインダーオリゴによる DNA ナノ粒子の会合体形成。

ここで、TWJ ユニットは、通常二重鎖 DNA と同じく、水素結合で結びついているだけなので高温になると解離してしまい、安定して用いることができない。そこで、付着末端には光架橋性のソラレン分子を導入し、共有結合性の dendroliamer を形成するように工夫した結果、固体表面の化学修飾にも応用できることがわかった。原子間力顕微鏡観察、エリプソメトリー、および赤外分光法などに

より検討した結果、TWJ ユニットは直径 50 nm 程度の半球ドーム型のデンドリマー超構造を与えることがわかった。また、水晶振動子センサーを用いた微小重量測定から、第4世代のデンドリマーに成長することを確認している。このような DNA デンドリマーの例は過去に報告がなく、Bottom-up 型の DNA 超分子材料として大変有望である。

	Sequence(5'-3')
ODN1	AAG CTT ATA TAC GCG CCG CGC TAT AT
ODN2	AAG CTT ATA TAG TCC TGC GCG TAT AT
ODN3	AAG CTT ATA TAG CGC GAG AAC TAT AT

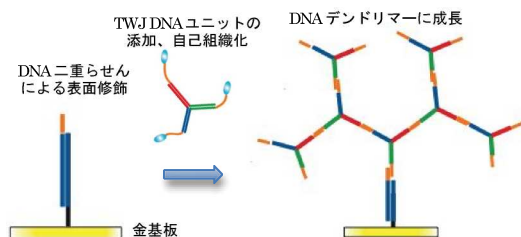


図4. DNAの塩基配列と電極上でのデンドリマー形成. 色分けした相補鎖が違いに二重らせんとなって分岐構造を形成する。TWJユニットに相補的な配列を持ったDNA二重らせんから自己組織化膜を作製すると、これを足掛かりにして、基板表面でTWJユニットがDNAデンドリマーを形成する。

(4) DNAデンドリマー自己組織化膜の電流-電圧特性

上記のDNAデンドリマー超分子膜を、線長2.4mm、線幅・ギャップ長2μmのラインアンドスペース電極(くし形電極、電極対65個)と組み合わせて電圧-電流特性を評価した。電極ギャップ間にDNAデンドリマーを形成させ、真空下で測定したところ、±10Vの印加で60pA程度のオーミック応答を示し、センシングデバイスに適した特性を持つことがわかった。さらに、前項で述べたフェロセニルソラレンを用いて、DNAデンドリマーにin-situで化学修飾すると、電気伝導性は大きく向上した。なおデンドリマーへのフェロセン導入は光電子分光法、各種電気化学測定により確認できている。

以上の成果をもとに、研究の最終段階であるin-situ電気伝導性修飾の実験に着手した。原子間力顕微鏡を用いたディップペン法を中心に各種検討したが、カンチレバーでDNAを損傷してしまうことが多く、残念ながら良好な結果を得るには至っていない。しかし、当該の研究により新しいDNAナノ材料の開

発に成功し、また基本的な実験系が確立できたので、引き続き実験を継続している。

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21件)

- ① J. Shimada, T. Maruyama, M. Kitaoka, H. Yoshinaga, K. Nakano, N. Kamiya, M. Goto, Programmable protein-protein conjugation via DNA-based self-assembly, *Chemical Communications*, 査読有, 2012, in press.
- ② T. Yamasaki, F. Mito, Y. Ito, S. Pandian, Y. Konoshita, K. Nakano, R. Murugesan, K. Sakai, H. Utsumi, K. Yamada, Structure-Reactivity Relationship of Piperidine Nitroxide: Electrochemical, ESR and Computational Studies, *J. Organic Chemistry*, 査読有, Vol. 76, No. 2, pp. 435~440 (2011年1月).
- ③ 中野幸二, 原子間力顕微鏡 (AFM) で生体分子を見る, *化学と工業*, 査読無, 64巻6号, 460-461 (2011).
- ④ K. Nakano, H. Yamanouchi, H. Yoshinaga, N. Soh, T. Imato, Label-free DNA detection platform based on atomic force microscopy visualisation: characterising the molecular-recognition-triggered conformational changes of an immobilised receptor oligonucleotide probe, *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 46, No. 31, pp. 5683-5685 (2010).
- ⑤ K. Nakano, Y. Katsumi, N. Soh, T. Imato, An atomic force microscopy assay of intercalation binding, unwinding and elongation of DNA, using a water-soluble psoralen derivative as a covalent binding probe molecule, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有, Vol. 83, No. 3, pp. 273-275 (2010).
- ⑥ N. Kamiya, Y. Shiotari, M. Tokunaga, H. Matsunaga, H. Yamanouchi, K. Nakano, M. Goto, Stimuli-responsive nanoparticles composed of naturally occurring amphiphilic proteins, *Chemical Communications*, 査読有, No. 35, pp. 5287-5289 (2009).
- ⑦ K. Nakano, H. Matsunaga, M. Murata, N. Soh, T. Imato, Synthesis of Circular Double-Stranded DNA Having Single-Stranded Recognition Sequence As Molecular-Physical Probe For Nucleic Acid Hybridization Detection Based On Atomic Force Microscopy Imaging, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 25, No. 8, pp.

993-998, (2009).

[学会発表] (計 12 件)

- ① K. Nakano, DNA Dendrimer Self-Assembly for Nano-Biosensing Applications, The 2011 Global COE International Symposium on Future Molecular Systems, 2011, Fukuoka, Japan
- ② K. Nakano, K. Nakamura, T. Kimura, H. Yoshinaga, N. Soh, T. Imato, Positive-feedback-mode scanning electrochemical microscopy imaging of DNA-grafted benzoquinone polymer cast film for micrometer-sized hybridization biosensor applications, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010, Honolulu, USA.
- ③ K. Nakano, T. Kimura, H. Yoshinaga N. Soh, T. Imato, Potentiometric Gene Sensor based on EMF Generation from Redox-Labelled Oligonucleotide Probe Pair, Faraday Discussion 149: Analysis for Healthcare Diagnostics and Theranostics, Edinburgh, UK, 2010.

[図書] (計 2 件)

- ① K. Nakano, "Scanning Electrochemical Microscopy Imaging of DNA Arrays for High Throughput Analysis Applications", N. Eliaz Ed. "Modern Aspects of Electrochemistry. Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine II", Springer, New York, pp. 105-142, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: "Potentiometric Gene Sensor Based on EMF Generation from a Redox-Labeled Oligonucleotide Probe Pair"

発明者: K. Nakano, T. Kimura, T. Imato

権利者: K. Nakano, T. Kimura, T. Imato

種類: US Patent Provisional Application

番号: 61/375946

出願年月日: 2010 年 8 月 23 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.cstf.kyushu-u.ac.jp/~imatolab/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 幸二 (NAKANO KOJI)

九州大学大学院・工学研究院・准教授

研究者番号: 10180324