

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300168

研究課題名(和文) DNA 鋳型ナノワイヤを利用した血液検査デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of a Blood Testing Device Using DNA-templated Nanowires

研究代表者

安田 隆 (YASUDA, Takashi)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：80270883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAを金属被覆することでナノワイヤを形成する技術確立し、その電気的特性を評価した。まず、ナノチャネル中の微小電極間に単分子DNAを伸長固定し、これを金属被覆することで単一ナノワイヤを形成した。次に、1本鎖DNAを金属被覆せずに、2本鎖DNAのみを特異的に金属被覆できることを実証した。さらに、部分的に金属被覆したDNAを利用してDNA分解酵素を測定する技術を構築した。そして、マイクロ流路中での毛細管力を利用して全血から血漿のみを迅速かつ簡便に抽出し、流路中でタンパク質を検出する技術を構築した。

研究成果の概要(英文)：A novel process of nanowire formation was developed using metallization of DNA molecules, and electrical property of the fabricated nanowires was evaluated. First, a single DNA molecule was stretched and immobilized between two electrodes in a nanochannel, and a single nanowire was formed by DNA metallization. Next, we demonstrated that our technique permits double-stranded DNA molecules to be specifically metallized while not permitting metallization of single-stranded DNA molecules. Moreover, a novel technique for deoxyribonuclease (DNase) detection was developed using partially-metallized DNA nanowires. Also, we succeeded in extracting plasma from whole blood easily and rapidly using capillary force in a microchannel, and developed a method for detecting specific proteins in the extracted plasma.

研究分野：バイオマイクロデバイス

キーワード：ナノワイヤ DNA 金属被覆 マイクロ流路 DNA分解酵素 血液検査

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA は高度な自己組織化能力と優れた分子認識能をもつため、DNA の塩基配列を制御することで様々なナノ構造体を形成することができ、機能性材料を構築するための鋳型分子として注目されている。さらに、DNA には電気伝導性があるため、様々な構造形成を可能とするナノ配線材料としての利用が期待されている。しかし、DNA の伝導性は、金属材料と比較すると極めて低く、塩基配列や実験条件によって大きく異なる。そのため、DNA を電気化学的に金属被覆することで、DNA を鋳型とした金属ナノワイヤの構築を目指す研究が盛んに行われている。

(2) 一方、半導体加工などのマイクロ加工技術を利用して、ガラスやプラスチックなどの基板にマイクロ流路等を形成し、その微小空間を利用して医療分析を行う研究が盛んに行われている。特に分析対象が血液である場合には、一つのデバイス内において、血球と血漿を分離し血漿のみを抽出し、極めて微量な血漿から目的とするタンパク質等を検出する技術が必要となる。さらに、これをポイント・オブ・ケア検査に応用するためには、デバイス周辺機器を含めたシステム全体の小型化を図り、高度な専門的知識や熟練技術を必要としない操作法や検出法を構築することが必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ流路中で微量血液から血漿のみを分離抽出し、血漿中に含まれる DNA 分解酵素（急性心筋梗塞等のバイオマーカー）の活性を DNA 鋳型ナノワイヤのインピーダンス変化として検出する血液検査デバイスを構築することである。そのために、DNA 分解酵素検出に適した DNA 鋳型ナノワイヤの形成法を確立するとともに、マイクロ流路中での血漿抽出法の性能向上を図り、これらの要素技術を融合し、一つのマイクロデバイス内で機能させるためのシステム化技術を構築する。

3. 研究の方法

(1) DNA 鋳型ナノワイヤ 1 本の電気的特性を評価するために、ナノチャネル中の微小電極間に単分子 DNA を伸長固定し、これを金属被覆することで単一ナノワイヤを形成した。まず、集束イオンビームを用いてシリコン基板上に幅 500nm のナノチャネルを構築した後に、2 つの金電極を間隔 15 μm で形成し、その上に PDMS 製のマイクロ流路を配置した。マイクロ流路内に DNA 溶液を導入し、毛細管力により単分子 DNA をナノチャネル中に侵入させた。そして、電極間に 1MHz、振幅 10V の交流電圧を印加することで、DNA を電界方向へ伸長させるとともに電極上へ静電的に固定化した。次に、ナフタレンジイミドの両末端に還元基を有するインターカレータを流路

内に導入し、ナフタレンジイミドを DNA の 2 本鎖間に挿入して、還元基を DNA 表面に配置した。最後に、銀イオンを含むトレンス試薬を導入することで、還元基により DNA 近傍の銀イオンを還元し、銀を DNA 表面に析出させた (図 1)。

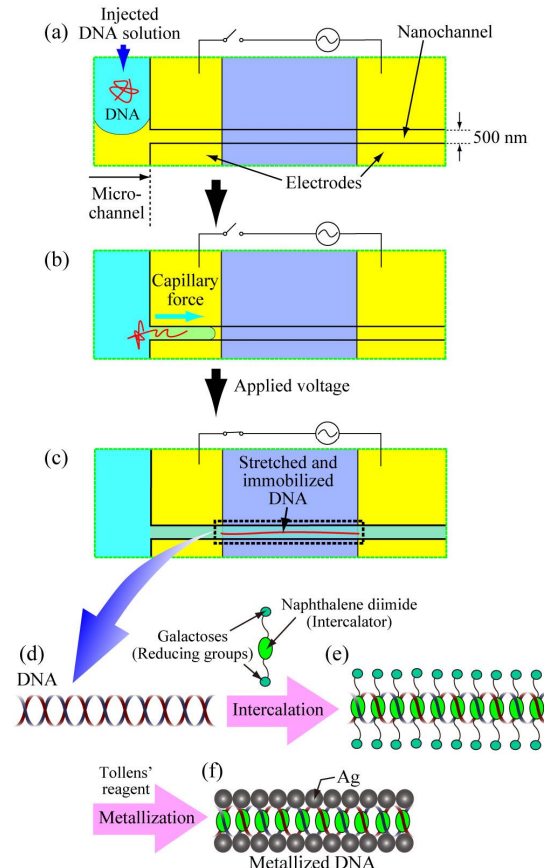


図 1 ナノチャネルを利用した DNA の金属被覆

(2) 本研究で用いる DNA 鋳型ナノワイヤ形成法は、ナフタレンジイミドの両末端に還元基を有するインターカレータを DNA の 2 本鎖間に挿入することで還元基を DNA に沿って配列させ、その後に DNA の近傍で銀イオンを還元することで DNA を金属被覆するものである。したがって、本手法によれば、1 本鎖 DNA を金属被覆せずに、2 本鎖 DNA のみを特異的に金属被覆することができるはずである。これを実証するために、以下のようにして、同じ鎖長 (約 2 μm) の 1 本鎖と 2 本鎖の DNA に対して金属被覆処理を行い、インピーダンス評価と AFM 観察を行った。まず、ガラス基板上に 1 μm の間隔を持った Au 電極を作製し、マイクロ流路を用いて DNA 溶液を電極間に導入し交流電圧を印加することで電極間に DNA を伸長固定した。そして、金属被覆処理を行った後に、1 本鎖と 2 本鎖の処理前後の交流インピーダンスを評価した。次に、予め還元剤と混合した DNA 溶液をマイカ基板上にスピコートすることで、メニスカス力を利用して DNA を基板上に伸長固定し、その後に銀イオンを含むトレンス試薬を滴下することで金

属被覆処理を行った。処理前後の1本鎖と2本鎖の外径をAFMにより計測した。

(3) 長さ2 μm の1本鎖DNAの中央部に相補的なプライマーをハイブリダイゼーションさせることで1本鎖と2本鎖が複合したDNAを形成し、スピコートを用いてマイカ基板上に伸長固定した。そして、両末端に還元基を有するナフタレンジイミド(図2(a))を2本鎖間に挿入し、還元基を2本鎖DNAの周囲のみに配列させた。次に、銀イオンを含むトレンス試薬を導入し、2本鎖DNA近傍の銀イオンを還元することで、銀を2本鎖DNAの表面のみに析出させ、DNAを部位特異的に金属被覆した(図2(b))。AFMによりこれを観察した。次に、ガラス基板上に間隔1 μm の1組の金電極を作製し、1本鎖/2本鎖DNA複合体を静電配向により電極間に伸長固定した。そして、DNAを部位特異的に金属被覆し、DNAのインピーダンス変化を評価した。

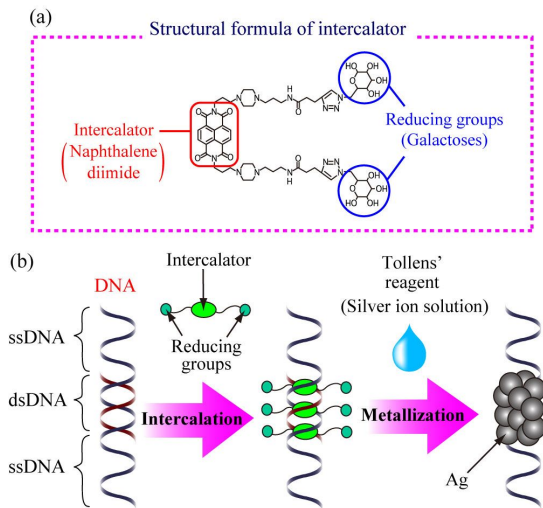


図2 インターカレータの構造式(a)とDNAに対する部位特異的な金属被覆(b)

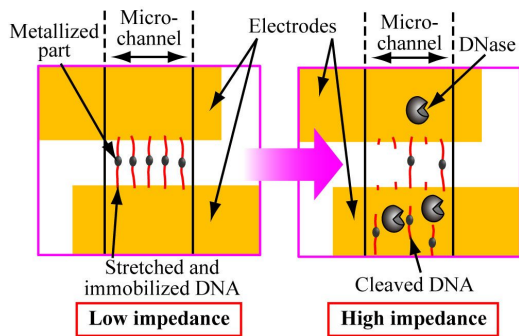


図3 DNaseの測定原理

(4) 金属被覆DNAを用いて、心筋梗塞などの診断マーカーであるDNA分解酵素(DNase)の測定を行った。マイクロ流路内の電極間に複数本のDNAを伸長固定した後にDNase溶液を導入し反応させると、1本鎖部が切断され電極から剥離し本数が減少する。これに伴う電極間のインピーダンスの増加率からDNase濃

度を定量化できる(図3)。この時、DNAを部分的に金属被覆することで、切断前のインピーダンスが小さくなり切断前後のインピーダンス変化が大きくなるため、高感度化を期待できる。マイクロ流路を通じて濃度 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{ U}/\mu\text{l}$ のDNase溶液を電極間に導入し、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ、再び測定を行うことで反応前後の電極間のインピーダンスを比較した。

(5) ポンプなどの外部動力源を使用せずに、マイクロ流路中の毛細管力を利用して、全血から血漿のみを抽出する技術を構築した。また、DNA鑄型ナノワイヤの金属表面における局在表面プラズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)を血中タンパク質検出に応用することを想定して、流路中に固定化した金ナノ粒子のLSPRを利用して血中タンパク質を計測する技術を構築した。開発したデバイスは、血漿抽出を行う主流路と側流路、及び金ナノ粒子が固定化されたガラス基板によって構成される(図4)。主流路は幅2mm、深さ100 μm であり、その側面上方に幅3 μm 、深さ2 μm の側流路がアレイ状に多数接続され、その下流には測定に用いる金ナノ粒子が配置されている。側流路内を効率よく血漿で満たしつつ、LSPRによる測定エリアを確保するため、側流路はテーパ状に拡大する形状となっている。血液が毛細管力によって主流路内に導入されると、上澄みの血漿のみが側流路へと侵入し、金ナノ粒子を固定化した測定エリアへと流れ込む。予め金ナノ粒子表面に生体分子と特異的に結合する抗体を固定しておき、その抗原抗体反応による金ナノ粒子表面の誘電率変化をLSPRによる散乱光スペクトルの変化として検出する(図5)。

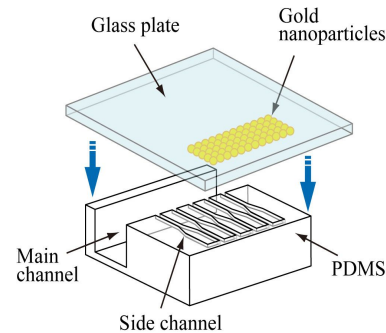


図4 血漿抽出デバイスの概要

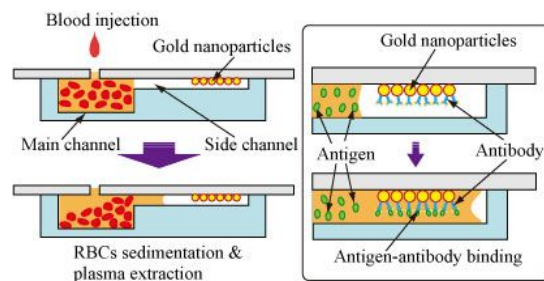


図5 血漿抽出及びLSPR測定の原理

4. 研究成果

(1) SEM 観察により、ナノチャンネル中に直径 20~40nm 程度の単一の銀ナノワイヤが形成されており、ナノワイヤがバルク銀を数珠つなぎにした構造を成していることが分かった(図 6)。そして、交流インピーダンス法により得られた複素インピーダンスプロットをもとに、ナノワイヤの等価回路を推定した。等価回路は、析出したバルク銀の抵抗約 17 Ω と、バルク間の接触抵抗と容量成分から成る RC 並列回路との直列接続で表現された。

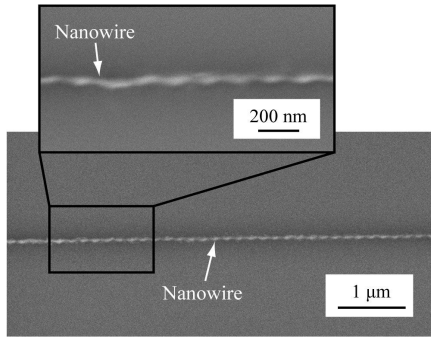


図 6 ナノチャンネル中に形成した金属被覆 DNA ナノワイヤ

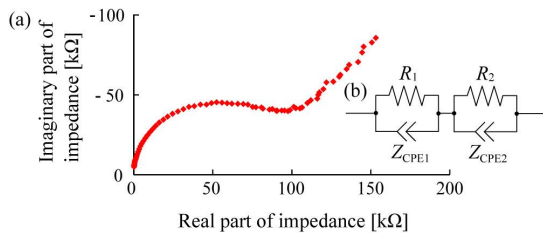


図 7 金属被覆前の 2 本鎖 DNA の複素インピーダンスプロット(a)とその等価回路(b)

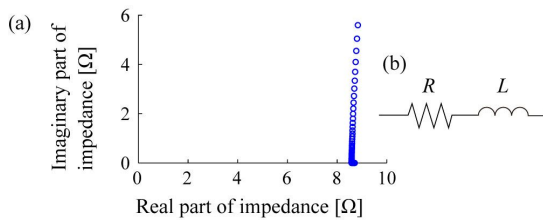


図 8 金属被覆後の 2 本鎖 DNA の複素インピーダンスプロット(a)とその等価回路(b)

(2) 間隔 1 μm の電極間に固定化した 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA に対して金属被覆処理を行った後に、処理前後の交流インピーダンスを評価した。その結果、いずれも処理前には大きな抵抗成分とコンデンサ成分が見られたが、処理後には 1 本鎖の特性に変化がなかったのに対して、2 本鎖の場合にはコンデンサ成分が消失し、抵抗値が 10000 分の 1 に減少した(図 7, 8)。また、マイカ基板の上にスピンコートして固定化した 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA に対して金属被覆処理を行った後に、処理前後の 1 本鎖と 2 本鎖の外径を AFM により計測したところ、2 本鎖では約 2nm から 20~40nm に増大し(図 9)、1 本鎖では変化が見

れなかった。以上のようにして、本手法が 2 本鎖 DNA のみを特異的に金属被覆することができることを実証した。

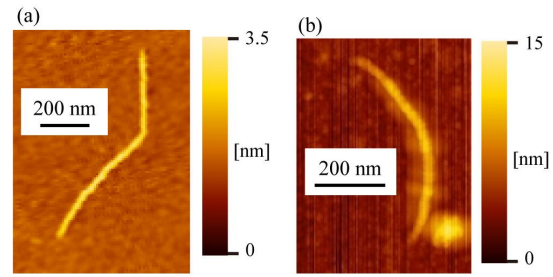


図 9 金属被覆操作前(a)及び操作後(b)の 2 本鎖 DNA の AFM 画像

(3) マイカ基板の上に伸長固定した 1 本鎖 / 2 本鎖 DNA 複合体の 2 本鎖部分のみを金属被覆し、これを AFM により観察したところ、1 本鎖部の外径は約 1.5nm であり金属被覆操作後に大きな変化が見られなかったのに対して、2 本鎖部は金属被覆操作後に約 5nm まで太くなっていることが分かった。次に、電極間に固定化した 1 本鎖 / 2 本鎖 DNA 複合体の 2 本鎖部分のみを金属被覆し、金属被覆前後の電極間のインピーダンスを周波数 100Hz ~ 10MHz の範囲で計測し複素平面上にプロットしたところ、金属被覆により DNA のインピーダンスが低下していることが分かった。電極間の等価回路を導出し、インピーダンス減少率を定量的に評価した(図 10)。

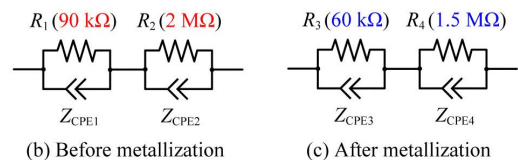
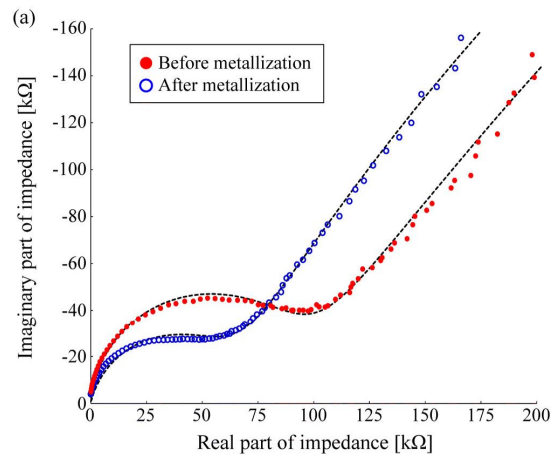


図 10 金属被覆前後の 1 本鎖 / 2 本鎖 DNA 複合体の複素インピーダンスプロット(a)とその等価回路(b, c)

(4) 電極間に固定化した部分的金属被覆 DNA に DNase を作用させ、DNA 切断前後のインピーダンス増加率を計測した。DNase 濃度と電

極間のインピーダンス増加率には正の相関があることが分かり(図 11)、本技術を用いることで DNase 測定が可能であることを実証した。

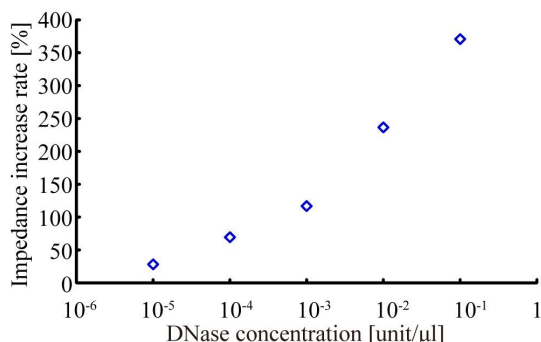


図 11 DNase 濃度とインピーダンス増加率の関係

(5) 血液 10 μL を主流路入口に滴下すると、血液は毛細管力によりデバイス内に導入され、血漿のみが側流路内に抽出された。この血漿抽出に要した時間は 5sec 以下であり、迅速かつ簡便な血漿抽出に成功した(図 12)。また、側流路中に固定化した金ナノ粒子の LSPR を利用して、tPA (組織プラスミノゲン活性化因子) の抗原抗体反応の検出を試みた。tPA 濃度を 10ng/ml から 100ng/ml へ段階的に増加させながらデバイスに導入し、ステップ毎の散乱光のスペクトルを分光器にて測定したところ、tPA 濃度の上昇とともに散乱光スペクトルのピークが上昇することが分かった(図 13)。

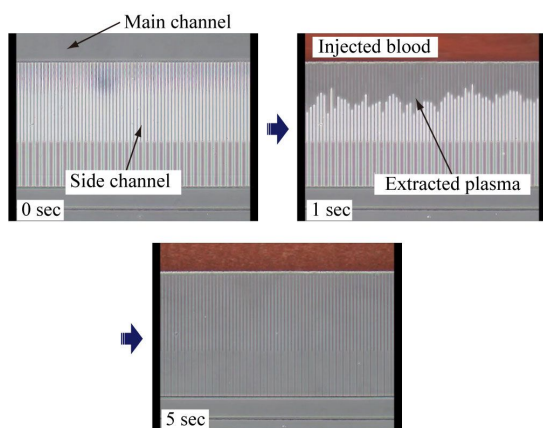


図 12 マイクロ流路内での血漿抽出の様子

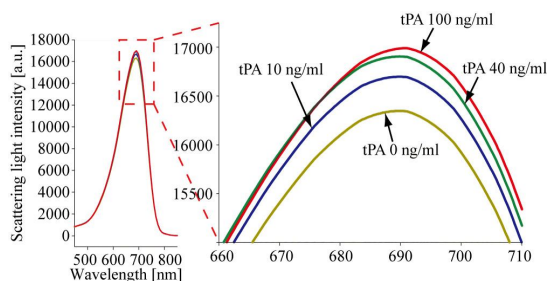


図 13 tPA の計測結果

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 2 件)

氷室貴大, 佐藤しのぶ, 竹中繁織, 安田隆, 還元基修飾インターカレータによる 1 本鎖 / 2 本鎖 DNA 複合体の部位特異的金属被覆, 第 31 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, くにびきメッセ(島根県松江市), 2014 年 10 月 22 日

氷室貴大, 荒木遼, 池堂英幸, 佐藤しのぶ, 竹中繁織, 安田隆, 金属被覆 DNA ナノワイヤのインピーダンス評価と AFM 観察, 平成 26 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会 バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学生産技術研究所(東京都目黒区), 2014 年 5 月 28 日

氷室貴大, 荒木遼, 池堂英幸, 佐藤しのぶ, 竹中繁織, 安田隆, 2 本鎖 DNA への特異的な金属被覆によるナノワイヤの形成とその電気的特性の評価, 第 30 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2013 年 11 月 5 日

Takahiro Himuro, Ryo Araki, Hideyuki Ikedo, Shinobu Sato, Shigeori Takenaka, and Takashi Yasuda, Nanowire Formation Using Specific Metallization of Double-Stranded DNA, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2013), フライブルク(ドイツ), 2013 年 10 月 30 日

Hiroki Kanamori, Fumiya Takada, Yuhei Sasaki, Makoto Yamanaka, and Takashi Yasuda, Development of a Blood Testing Device Based on Localized Surface Plasmon Resonance, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2013), フライブルク(ドイツ), 2013 年 10 月 28 日

Takahiro Himuro, Hideyuki Ikedo, Shinobu Sato, Shigeori Takenaka, and Takashi Yasuda, Formation of a Single Metallized DNA Nanowire in a Nanochannel, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2012), 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市), 2012 年 10 月 31 日

高田郁弥, 山中誠, 安田隆, 局在表面プラズモン共鳴を用いた血液検査デバイスの開発, 第 29 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 北九州国際

会議場（福岡県北九州市），2012 年 10 月
24 日

氷室貴大，池堂英幸，佐藤しのぶ，竹中繁
織，安田隆，金属被覆 DNA ナノワイヤの
形成とその電気的特性の評価，第 51 回日
本生体医工学会大会，福岡国際会議場（福
岡県福岡市），2012 年 5 月 10 日

Takahiro Himuro, Hideyuki Ikedo,
Keiichi Ohtsuka, Shigeori Takenaka,
and Takashi Yasuda, Nanowire
Formation Using Metallization of
Extended and Immobilized DNA, The
15th International Conference on
Miniaturized Systems for Chemistry and
Life Sciences (μ TAS 2011), シアトル（米
国），2011 年 10 月 3 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安田 隆 (YASUDA, Takashi)
九州工業大学・大学院生命体工学研究科・
教授
研究者番号：8 0 2 7 0 8 8 3