

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23810034

研究課題名（和文）

DNA上での修復タンパク質実時間計測を目指すハイスループット分子計測デバイス

研究課題名（英文） High throughput single molecule manipulation device for real-time observation of DNA binding proteins

研究代表者

新田 英之 (ARATA HIDEYUKI)

名古屋大学・理学研究科・特任講師

研究者番号：00582446

研究成果の概要（和文）：バイオ MEMS と一分子生物物理双方の技術の融合を目指したハイスループット分子操作・計測デバイスの開発を行った。加工したシリコン基板とガラス基板とをボンディングすることにより、マイクロチャンネルとナノチャンネルやナノスリットを組み合わせたデバイスを設計・製作し、実際にそのナノチャンネル内で DNA を分子レベルで観察、操作できることを確認した。

研究成果の概要（英文）：Future goal of this project was to develop high-throughput single molecule system utilizing technical aspects of both bioMEMS and single molecule manipulation. To achieve this goal, we have developed a silicon-based microdevice consists of two microchannels and multiple nanochannels. We also confirmed that a single DNA molecule can be inserted and manipulated in a nanochannel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：MEMS, DNA, 一分子計測, ハイスループット

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 相同組み換えは遺伝子暗号の維持（DNA 修復）と多様性の調整（突然変異）にとって必要不可欠な機構であり、その中心的役割を果たしているタンパク質が RecA や Rad51 である (Shinohara, A., *et al.*, *Cell*, 69, 457, 1992; Sung, P. and Klein, H., *Nat. Rev. Mol. Cel. Biol.* 7, 739, 2006)。相同組み換え機構の研究は主に一分子計測技術により進展してきた (Gore, J., *et al.*, *Nature*, 439, 100, 2006; Galletto, R., *et al.*, *Nature*, 443, 875, 2006)。相同組み換えの準備段階ともい

える重合過程と、最終段階である乖離過程においては、それぞれ従来の光ピンセット、流速による操作技術や磁気ピンセットなどの技術により、タンパク質一分子レベルでの挙動計測を実現することができた。しかし、相同組み換え機構の核心ともいべき修復過程（Homology search と Strand exchange）に関しては分子レベルでの直接的な測定が困難であり、従来の生化学的手法で間接的に予測するしかなかったため、タンパク質一分子レベルでの解析はほぼ手付かずの状態であった (Arata H., *et al.*, *PNAS*, 2009, 106,

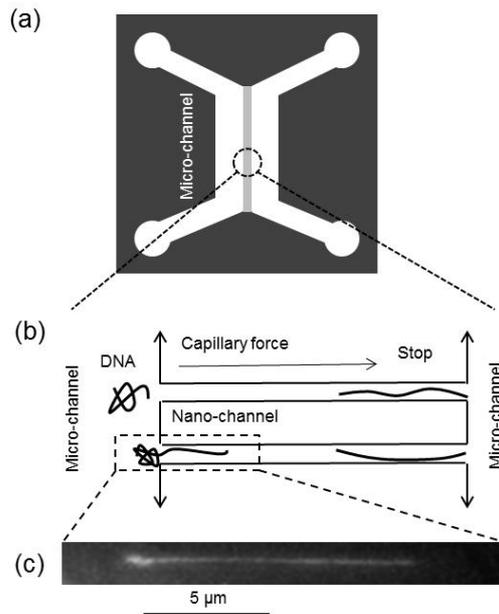


図 1 : (a) ナノチャンネルによる単分子 DNA の配列。親水性ナノチャンネルの一端から毛管現象によりバッファーと共に DNA が一分子ずつ侵入する。(b) ナノチャンネル内に自ら侵入する  $\lambda$ DNA (長さ 15  $\mu\text{m}$ ) の蛍光顕微鏡画像。

pp. 19239)。また一分子計測実験においては、統計処理に耐えるデータ数を集めることが極めて困難であったことが、研究遂行上の現実的課題であった。

これまでガラス表面の段差構造や生化学的表明処理技術で DNA をガラス基板上に固定した「DNA カーテン」などの手法が発案されている(Gorman J., *et al.*, *Nat Str Mol Bio*, 2010, 17, pp. 932.)。しかしこれら従来の手法では流速を用いて DNA を引き延ばすため、DNA の一分子単位での分離や、あらかじめ設計した位置、向きで操作・配列することは不可能であった。

一方で、様々な機能単位をチップ上に集積化した Lab on a chip 技術の殆どが、実際には十分な実験設備の整った研究室内などの環境でしか使用できない、“Chip in a lab”ともいえる状況である。この状況を打開するためには、マイクロ・ナノスケール特有の物理現象を利用した、機械的構造や表面の化学的条件などでプログラム可能な自動プロセス技術の進展が不可欠である。

## 2. 研究の目的

多数の DNA を並列操作するため、微細加工技術を駆使したナノチャンネルなどの構造を用いたハイスループット一分子操作・計測デバイスを開発・評価し、その後の様々な DNA 結合タンパク質の一分子計測への応用

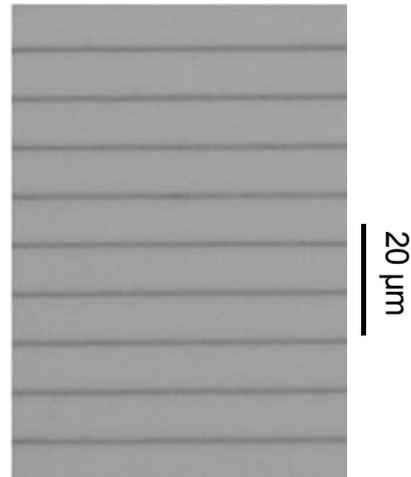


図 2 : 高さ、幅 100nm のシリコンナノチャンネルの光学顕微鏡写真。

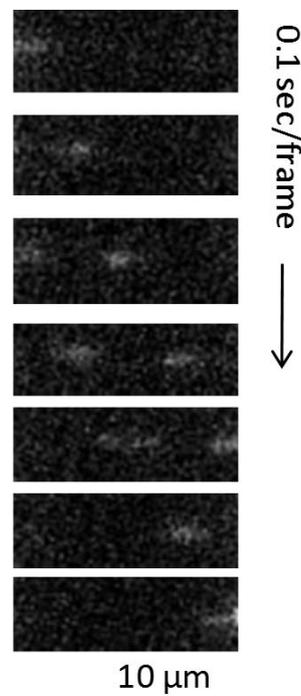


図 3 : 幅 100 nm、高さ 100 nm のナノチャンネル内で伸長され一本ずつ移動する DNA (蛍光修飾した DNA の蛍光観測写真)。

を可能とするための基板技術を確認することを目的とした。また、これらのデバイスや技術が生物学の分野でもその重要性が評価されるためには、このデバイスを用いて実際に DNA を操作・観察し、デバイスの有用性を示すことが大変重要である。そのため、ナノチャンネル内での DNA の挙動を 1 分子レベルで確認し、デバイスの有効性を示すことも目標とした。

### 3. 研究の方法

MEMS 技術を用い、多数の DNA を個別に並列操作するデバイスの開発を行った。はじめに、ナノチャンネル内で多数の DNA を任意の位置に任意の物理的条件で配置し、その化学的環境を自由に操作できるデバイスをめざして製作した。その際、空洞の親水性ナノチャンネル内へ毛管力（キャピラリーフォース）により DNA を一本ずつ無動力で進入させる手法を用いた（図 1）。但し、この手法では十分な性能が得られなかったため、研究期間後半では、外部動力を用いて流速や水圧で DNA を操作することを代替技術として適用した。DNA の伸長の度合いは de Gennes の法則(Brochard F., and de Gennes P. G, *J. Chem. Phys.*, 1977, 67, pp. 52)を用いて最適なナノチャンネルの幅と高さを設計することにより制御した。マイクロチャンネル内の溶液を交換し、ナノチャンネル内への溶液の拡散により DNA 周辺の生化学的条件を調節し、種々の生化学実験を行うことができる構造になっている。DNA は蛍光インターカレーターで修飾し、蛍光顕微鏡下で観察した。

### 4. 研究成果

加工したシリコン基板とガラス基板とをボンディングすることにより、マイクロチャンネルとナノチャンネルやナノスリットを組み合わせたデバイスを製作した。DNA が一本だけ挿入され、適度な伸長度合いを保つナノチャンネルの幅と高さ、または DNA が一本も挿入されないための最大企画等の予測値をもとに、デバイスの製作、改良を行った。ボンディング前のガラスの表面処理方や、DNA 実験に最適なチャンネルの幅、高さ、長さなど、最適な規格のナノチャンネルデバイスを作製した（図 2）。そのデバイスを用いた検証実験では、当初予定していた、マイクロチャンネル内へ  $\lambda$ DNA 分子（長さ 15  $\mu\text{m}$ ）を、空洞の親水性ナノチャンネル（幅 100 nm、高さ 100 nm）内へ 1 本ずつ、毛管力（キャピラリーフォース）により無動力で進入、伸長させることに成功した（図 3）。しかしこの方法では、多様な DNA 操作や溶液交換をなどの実験を行うことが難しかったため、HPLC ポンプを用い、ナノチャンネルへ圧力をかけ、DNA を挿入、操作、観察する方法をとった。結果として、DNA を分子レベルで、ナノチャンネル内で観察、操作することが可能であることを確認した。

この DNA 自動配列技術はシリンジポンプや電子機器との接続が不要であり、一般の生物系研究室でも使用可能な汎用性のあるバイオ実験チップへの応用が期待できる。DNA のナノチャンネル内での操作、観察手法の確立は、DNA 結合タンパク質と DNA との相互作用など、生物学や生物物理学の分野において重要な課題の中の一つである。そのため、こ

れらの生物学的実験技術は、腫瘍学などとの関連から医療の分野からも注目を集めてきている。このように当研究は他の学術分野に影響を与える純粋科学的価値のある研究成果を生み出すのみならず、人工 DNA 修復技術、癌治療、遺伝病治療などの新技術の創生のためにも大変重要な知的資産形成への試金石となる可能性を秘めている。

### 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 4 件）

1. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Kazuo Hosokawa, and Mizuo Maeda, "Sub-Attomole MicroRNA Detection with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification on Power-Free Microfluidic Chip", PLoS One, 査読有, 2012, Vol. 7, e48329. DOI: 10.1371/journal.pone.0048329
2. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Aishan Han, Kazuo Hosokawa, and Mizuo Maeda, "Rapid MicroRNA Detection Using Power-Free Microfluidic Chip: Coaxial Stacking Effect Enhances the Sandwich Hybridization", Analyst, 査読有, 2012, Vol. 137, 3234-3237.
3. 新田 英之：「相同組み換えタンパク質による DNA ねじり運動の実時間計測」（トピックス），生物物理, 査読有, 2011 年, 51, pp. 2-3.
4. 新田 英之、藤田博之：「マイクロ高速加熱デバイスを用いた生体分子挙動の顕微鏡下ミリ秒計測」（総合論文），分析化学, 査読有, 2011 年, Vol. 60, No. 4, pp. 325-332.

〔学会発表〕（計 10 件）

1. Mitsuhiro Horade, Yoko Mizuta, Noritada Kaji, Tetsuya Higashiyama, and Hideyuki Arata, "Plant-on-a-Chip Microfluidic-System for Quantitative Analysis of Pollen Tube Guidance by Signaling Molecule: Towards Cell-to-Cell Communication Study", microTAS 2012, Oct., Nov. Okinawa, Japan, pp. 1027-1029.
2. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Kazuo Hosokawa, and Mizuo Maeda, "Sub-Attomole Detection of MicroRNA in Twenty Minutes Using Power-Free Microfluidic Chip: Towards Point-of-Care Testing", microTAS 2012, Oct., Nov. Okinawa, Japan, pp.

- 776-778.
3. 洞出 光洋, 水多 陽子, 加地 範匡, 新田 英之, 東山 哲也:「PDMS マイクロチャネルを用いた花粉管細胞伸長の計測と制御」第 25 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、崇城大学(熊本県)、2012 年 5 月, 2P04.
  4. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Aishan Han, Kazuo Hosokawa and Mizuo Maeda, "Highly Sensitive MicroRNA Detection Using Gold-Nano-Particles on Power-Free Microfluidic Chip: Towards Point-of-Care Early-Stage Cancer Diagnosis", Proc. of microTAS 2011, Oct., Seattle, pp. 491.
  5. 新田 英之, 藤田 博之:「微細加工技術を用いて製作した極微小デバイスによるタンパク質分子の顕微鏡下ミリ秒計測」日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 16 日, 名古屋大学(愛知県), pp. 218, J 3011L.
  6. 小松 仁, 新田 英之, 韓 愛善, 細川 和生, 前田 瑞生:「自律駆動マイクロ流体チップと金ナノ粒子によるマイクロ RNA の検出」日本分析化学会第 60 年会, 2011 年 9 月 14 日, 名古屋大学(愛知県), pp. 32, B 1012Y.
  7. H. Komatsu, H. Arata, A. Han, K. Hosokawa, M. Maeda, "MicroRNA Detection in Thirty Minutes Using Gold Nanoparticles on Power-Free Microfluidic Chip", JAIMA Discussion on Analytical Science & Technology, JAIMA Conference, 2011 年 9 月 8 日, 幕張メッセ(千葉県).
  8. 小松 仁, 新田 英之, 細川 和生, 前田 瑞夫:「自律駆動マイクロ流体チップを用いたマイクロ RNA 高感度検出」第 23 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、千葉大学(千葉県)、2011 年 6 月, pp. 71.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
新田 英之 (ARATA HIDEYUKI)  
名古屋大学・理学研究科・特任講師  
研究者番号: 00582446
  - (2) 研究分担者なし
  - (3) 連携研究者なし