

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 18 日現在

機関番号：33934

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23860054

研究課題名（和文） ナノインプリント技術による次世代 DNA センサの開発

研究課題名（英文） Development of novel DNA sensor by nanoimprint technique

研究代表者

大竹 才人 (OHTAKE TOSHIHITO)

愛知工科大学・工学部・機械システム工学科・准教授

研究者番号：30437355

研究成果の概要（和文）：

DNA は機能性材料としてバイオナノデバイスへの展開が期待されており、それに必要な DNA ナノパターンニング技術の開発が求められている。また、オーダーメイド医療などの次世代診断に向けて簡便で高感度な DNA センサが求められている。そこで本研究では、ナノインプリント技術を利用して DNA センサ開発に向けた DNA のナノパターンニングを試みた。ナノインプリントのレジストとして、DNA と強い相互作用を有するポリマーとして知られているポリ-L-リジン (PLL) をガラス基板上に用いた。まず、ガラス基板上的 PLL 薄膜を Si モールドを用いて 120 °C、6 MPa、5 min の条件でナノインプリントした。その後、この基板の上に 1 mg/ml DNA 溶液を滴下して 2 分間紫外光照射して、熱湯で洗浄することで DNA ナノパターンを得た。これは、ナノインプリントによって PLL がナノパターン状に改質されて、そのナノパターン部位が DNA をより強固に固定化するためであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The DNA properties were considered recently to understand new functional bio-device. However, most reports about the DNA nano patterning are not intended to make them. Therefore, I carried out DNA nano patterning using a nanoimprint process. The substrate coated with poly-L-lysine was heated at 120 °C and the nanoimprint carried it forth for 120 °C, 6 MPa, 5 min, and it applied 1 mg/ml DNA solution fixed with poly-L-lysine in substrates. Finally the substrate was washed at twice of the water and once of the hot water intensely. DNA lines that consist of lines at about 700 nm as line width was obtained, and the very fine lines correspond to convex patterns of the mold surface. These results suggest that the imprint would make the poly-L-lysine reform by exposing it under high pressure and high temperature. Therefore since DNA is immobilized with the amino group in the poly-L-lysine, a lot of amino group would expose on the surface by the imprint from the balk, and would be patterned DNA.

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：材料加工・処理

キーワード：電気化学センサ、ナノインプリント

1. 研究開始当初の背景

次世代医療に向けた必須事項として DNA 診断がある。これは我々が持っている体質や、将来発症しやすい疾患などを予め診断して予防や治療に役立てる医療である。また、薬剤の服用前に副作用発症の有無が分かるため、安全で的確な治療ができる。これは、オーダーメイド医療ともよばれ、従来の画一的な治療法ではなくて、個人に応じた最適な治療ができることから、次世代の医療として盛んに研究が行われている。この実現には、1人の患者から数千種類の遺伝情報を一度に得る必要があり、簡便で高感度な DNA センサの普及が早急に求められている。

2. 研究の目的

現状は、蛍光標識式の DNA センサが利用されている。これは患者の血液などから採取された DNA を、蛍光プローブであらかじめ化学修飾して、そこに用意された疾患遺伝子（がん遺伝子など）と作用させる。疾患遺伝子を有しているときは、お互いに結合して二重らせん構造となり、疾患遺伝子を有していないときは、結合せずに一重構造のままとなる。この判定を蛍光顕微鏡で現在行っている。しかしこの問題点は、患者の DNA を蛍光プローブで化学修飾する煩雑な工程が含まれ、かつ得られる顕微鏡像による判定が、蛍光の強度に依存するために、あいまいな判定が避けられない点にある。そこで本研究では、

(1) 蛍光プローブによる化学修飾を必要としない無標識法

(2) 蛍光顕微鏡によらない判定方法として迅速で明瞭な判定が可能な電気化学法を特徴とした次世代 DNA センサの開発を目的としている。この無標識型電気化学センサは、煩雑な蛍光プローブを DNA に化学修飾するプロセスを必要としないために、非常に簡便で実用的な手法となる。またこのセンサはデバイス化することで、その場で電気信号の検出として迅速で明瞭な測定が可能である。この時のデバイスにはトランジスタ (IS-FET : Ion Sensitive - Field Emission Transistor) を利用する。この無標識型電気化学 DNA センサの普及が、期待される次世代医療に不可欠であると考えている。

また実際の DNA センサは、一度に、数千種類の遺伝子を判定する必要がある。そのために DNA センサの構造は、数千種類の遺伝子断片を、同一基板上に規則正しく配列させなければならない (DNA アレイセンサ)。この DNA アレイは縦×横に 数十×数十 または

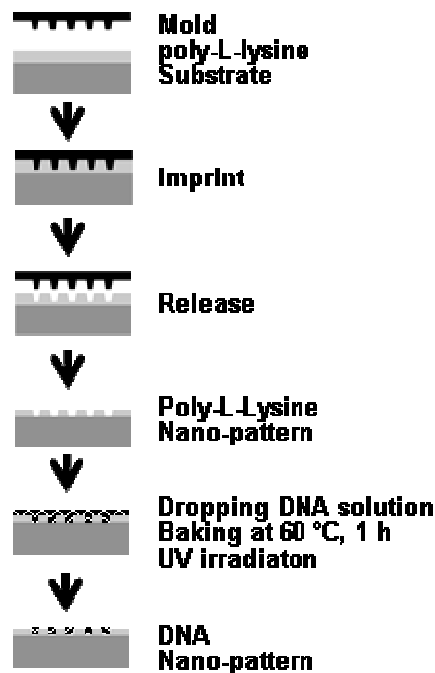


図1 DNA ナノインプリントプロセス図。
インプリント条件 120 °C、6 MPa、5 min。

数百×数百の DNA パターンを基板上に配列させている。従来の蛍光標識式では、数千種類の DNA を同一基板上に固定化させるために、DNA 溶液を針先からごく僅か吐出 (数 μ l) させて、アレイ状に一点一点の滴下を基板上に数千回繰り返して固定化させている。これをプロッター法といい、DNA アレイ作製に非常に多くの時間と操作を必要とする。これらをノーオーダーでかつ簡便なプロセスによって作製するためにナノインプリント技術の利用を試みた。特に本研究では DNA との親和性が非常に高い Poly-L-Lysine のナノパターンニングを、ナノインプリント技術を用いて行うことで、DNA ナノパターンニングプロセスとその DNA センサの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) poly-L-lysine (PLL) のナノインプリント

DNA を基板上へ固定化させるために、高分子ポリマーである poly-L-lysine (PLL) を用いた。ここでは DNA のナノパターンニングの前に、先に PLL のナノインプリントを行った。まず、ガラス基板を PLL 水溶液に浸漬させ、ディップ法にて PLL を成膜し、その後この基板をベーキング (150~200°C) する。この PLL

コートガラス基板へ、ナノインプリント (100 °C、6 MPa、5 min) を実施して PLL をナノパターンニングした。これは、EB リソグラフィによってナノパターンニングされた SiO₂/Si モールド (鋳型パターン) を用いて、インプリント後に約 55°C で基板とモールドを剥離した。このプロセスにより 100×100 nm ~ 700×700 nm などのナノパターンニングを行った。(図 1)

(2) DNA の固定化

上記で得られた PLL ナノパターンニング基板へ、1 mg/ml の DNA 水溶液を 100 μl 滴下して 60°C、1h で乾燥させる。この基板に 302 nm の紫外光を 2 min 照射することで PLL と DNA との間で UV クロスリンクを行わせ、DNA を基板上へ固定化した。その後、水と熱湯で余分な DNA を除去することで、PLL ナノパターン部だけに DNA が固定化されて DNA のナノパターンニングを得た。このナノパターンは蛍光色素 YO-PRO-1 で DNA を染色して、蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) SPR 評価

ナノインプリントによる PLL の DNA 固定化能の影響を調べるため、SPR (Surface Plasmon Resonance) による評価を行った。ガラス基板上の Au 薄膜を、1 % PLL 溶液に浸漬させて、ディップ法により PLL を製膜した。測定に際して、予め buffer 溶液 (2×SSC) をフローさせ、測定 0s 時に DNA 溶液を導入した。更に 480 s 後に DNA 溶液から buffer 溶液に切り替えた。

(4) IS-FET 評価

BAS Inc. の IS-FET を利用した。はじめにゲート電極上にプローブ DNA (一本鎖) を固定化させ、その後に相補的な塩基配列を持つターゲット DNA (一本鎖) を加えてハイブリダイゼーションさせた。この時のバッファー溶液は、20 mM tris-HCl + 500 mM MgCl₂ とした。

4. 研究成果

(1) ナノパターンニングプロセス

DNA を蛍光修飾することで、蛍光顕微鏡でナノパターンニングされた基板を観察した。図 2 にその一例を示す。DNA によるパターンが確認でき、線幅 700 nm の DNA によって 10×10 μm の格子状パターンが得られた。またその中には 2×7μm の長方形 DNA パターンが確認できた。これらは SiO₂/Si モールドのナノパターンと一致しており、本プロセスで DNA をナノパターンニングできることが確認できた。更により複雑なパターンを図 3 に示した。様々なサイズの長方形 DNA パターンを確認することができるが、約 600nm より小さい DNA

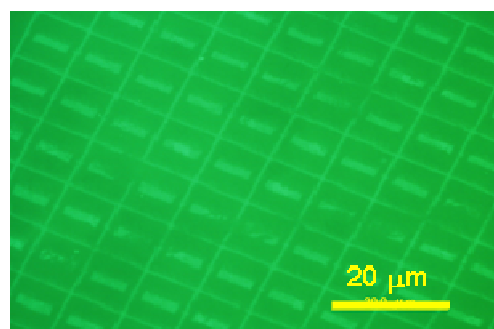


図 2 YO-PRO-1 によって染色された DNA の蛍光顕微鏡によるナノパターン

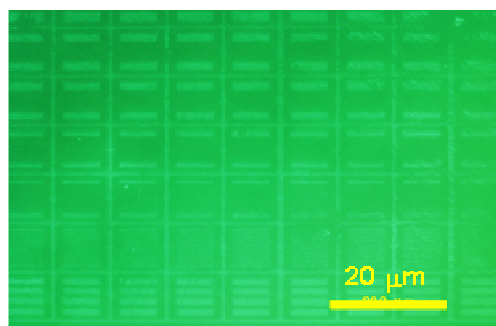


図 3 蛍光顕微鏡による更に複雑な DNA のナノパターン

パターンは蛍光顕微鏡による光学限界を超えるため、鮮明な像を得ることが難しかった。したがって、SiO₂/Si モールドには 100nm パターンが刻まれているが、そのサイズで DNA がパターンニングされているか確認することは難しかった。以上のように蛍光顕微鏡による結果から、その検出限界内において DNA ナノパターンニングが確認できた。

(2) ナノパターンニングのメカニズム

本プロセスによりナノオーダーでの DNA パターンニングを得た。この DNA ナノパターンは、PLL の凹型パターンに沿って得られていることが分かった (図 4)。これはナノインプリントの高温・高圧条件下において、PLL 膜がモールドのパターン部に従って改質されて、DNA の固定化能が高まることに起因すると思われる。そこで PLL の DNA 固定化能を、SPR を用いて評価した。図 5 にその結果を示した。ガラス基板上的 PLL 膜に DNA 溶液を導入して、その時の DNA 吸着量を SPR シグナルとして評価した。用いた PLL 膜は、
①全面にインプリントを 120 °C、6 MPa、5 min 条件で行った試料
②インプリントせずに 120 °C、5 min ベーキングした試料
③未処理
の 3 種類である。未処理の PLL 膜においても



図4 基板上に製膜されたPLLとナノインプリント部に固定化されたDNAの模式図

SPRシグナルは得られることから、一定量のDNA吸着能を有していることが分かる。更に吸着能はベーキングすることで高まり、インプリントによって大きく向上することが分かった。PLLが本来有しているDNAとの高い親和性は、アミノ基に起因していることが知られている。インプリント処理をPLLに行うことによって、アミノ基によるDNA固定化が高まることが示唆された。

(3) DNA センサ評価

DNAを電極上へ固定化処理後、DNAセンサとしてその評価を行った。IS-FETをセンサデバイスとして使用して、そのゲート電極上にプローブDNA（一本鎖）を固定化した。そこに相補的な塩基配列を持つターゲットDNA（一本鎖）を作用させてハイブリダイゼーションさせたときの $I_{\text{drain}}-V_{\text{gate}}$ 特性を評価した。21塩基のDNAを使用して、その配列は

プローブDNA;

5' -GCAGTAGCATGTGACGAGTCG-3'

ターゲットDNA;

3' -CGTCATCGTACACTGCTCAGC-5'

である。プローブDNAが固定化されたIS-FETにターゲットDNAを作用させると、図6のようにゲート電圧が約+10mVシフトする結果が得られた。ターゲットDNAに相補的な配列を持たない場合、このようなゲート電圧のシフトは見られないことから、相補的な塩基配列を持つ場合、ハイブリダイゼーションが進

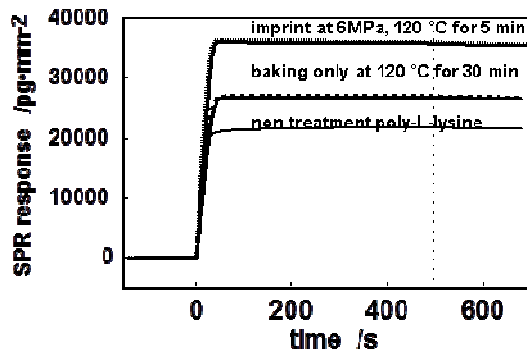


図5 SPRによるPLL膜のDNA固定化能評価。試料1；全面にインプリント（120 °C、6 MPa、5 min）、試料2；インプリントせず120 °C、5 minベーキングのみ、試料3；未処理のPLL試料。

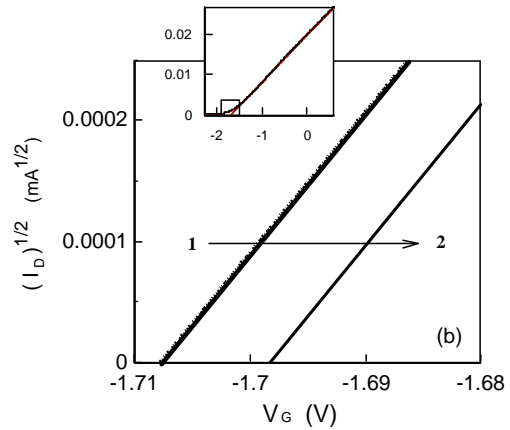


図6 DNAをゲート電極上に固定化したIS-FETの $I_{\text{drain}}-V_{\text{gate}}$ 特性。直線1；プローブDNAを固定化、直線2；さらにターゲットDNAを加えて42 °C、15 hハイブリダイゼーションを行った。

行してゲート電圧をモニターすることによりセンシングできることが確認された。これにより、無標識タイプの次世代型DNAセンサ開発に向けて大きな指針を得ることができた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

ナノインプリントによるDNAナノパターンニング法の開発

大竹才人, 日本ケミカルバイオロジー学会, 第7回年会, 2012年7月8日, 京都大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹才人 (OHTAKE TOSHIHITO)
愛知工科大学・工学部・准教授
研究者番号：30437355

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし