

自己組織化単分子膜を利用した DNA センサーの構築

「組織化と機能」領域 中村 史夫

要 旨

本研究では、固液界面において DNA の二重鎖形成能を効果的に活用することにより、複雑な有機化学合成法を用いずに、一本鎖 DNA を固体基板上に固定化する手法を確立した。また、本手法を用いて表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング法によるハイスループットな検出法の開発を推進した。プローブ DNA として一本鎖部分と二本鎖部分を持つオリゴ DNA を用い、プローブ DNA 水溶液に金基板を浸漬することにより、DNA 自己組織化単分子膜を基板上に作製した。この単分子膜は検体 DNA との二重鎖形成効率、その選択性、非特異吸着の抑制、その作製の簡便性さらには感度においても、現行の DNA 固定化膜よりも優れた特性を有している。また、更なる高感度化を目指し、一つのプローブ DNA に複数のプローブ部位を有するブランチ型 DNA 固定化法、金ナノ粒子を用いた検出シグナルの増幅に成功した。さらに、本手法により金基板上に DNA アレイを作製し、SPR イメージング法により一塩基ミスマッチの高精度検出に成功した。

I. 研究の狙い

DNA は、4 つの塩基 (アデニン-チミン、シトシン-グアニン) の組み合わせによって遺伝情報を保存・伝達する「分子情報材料」としてとらえることができる。近年、DNA チップに代表されるように、DNA の塩基配列にコードされている遺伝情報の固体基板上での簡便かつ迅速な読み取りが世界的に盛んに行なわれているが、20 塩基対程度のオリゴマーにおいてさえ 1 塩基多型の効率的な検出 (1 塩基ミスマッチ検出) は未だ容易ではない。本研究では、固液界面での DNA の二重鎖形成 (ハイブリダイゼーション) に関する独自の研究成果に基づいて、さらに選択性の高い表面反応場の創製を進めるとともに、ハイスループットな DNA の新規検出法の開発を進めることを目的とする。

II. 研究成果と考察

1. DNA 自己組織化単分子膜の作製と機能評価

末端チオール化した DNA 溶液中に 2 価のカチオンを添加することにより、金基板上で DNA が配列した、安定な単分子膜が形成される。しかし、DNA 単分子膜の形成メカニズムについては未だ不明な部分が多い。そこでその単分子膜の評価を原子間力顕微鏡 (AFM) により行った。DNA 単分子膜を直接観察した結果を図に示す。タッピングモードによる観察から、ほぼ均一な表面が観察された。一方、所々に直径 10-20nm、深さ 2nm のくぼみが確認された。さらに単分子膜と金基板との結合状態を X 線光電子分光法 (XPS) のより評価した結果、S-Au に帰属されるバンドが観察されたことから、この単分子膜は S-Au 結合により形成されていることが確認された。

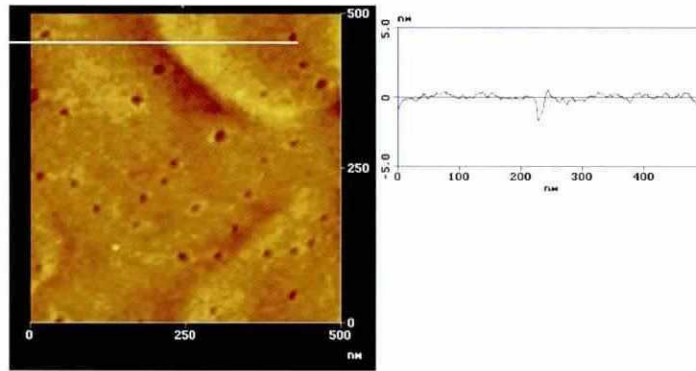


図1 DNA 単分子膜の原子間力顕微鏡 (AFM) 像 (左) およびラインプロファイル (右)

次に、この手法により作製したプローブ DNA 単分子膜を用い、プローブ部位とターゲット DNA とのハイブリダイゼーションを表面プラズモン共鳴法 (SPR) により、評価した。図2に DNA 単分子膜を用いたハイブリダイゼーションの模式図を示す。

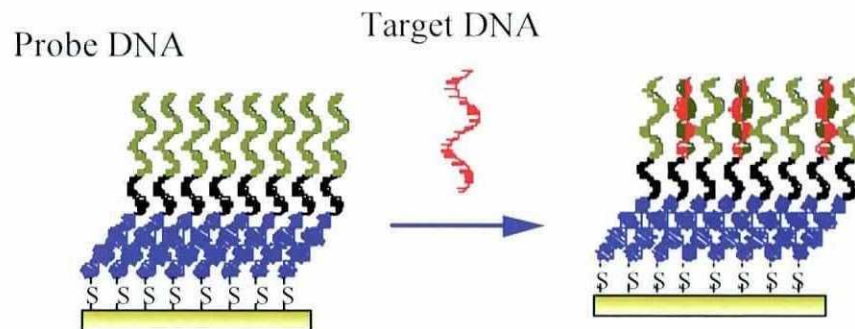


図2 DNA 単分子膜を用いたハイブリダイゼーション

様々な鎖長のターゲットを用い、DNA 単分子膜中のプローブ部位の表面被覆率変化させることによるハイブリダイゼーションの最適化を行った。本項目では 20、60、100 塩基の一本鎖 DNA (ハイブリ部分は 20 塩基) をターゲット DNA として用い、プローブ DNA 単分子膜とのハイブリダイゼーションを SPR により観察した。図3に3種のターゲット DNA を用いた際の、プローブ DNA の被覆率とハイブリダイゼーションの関係を示す。この結果から、100 塩基のターゲット DNA においても、高効率なハイブリダイゼーションの検出が可能であることが示された。さらに、SPR 吸着シグナルの時間変化を Langmuir 型吸着等温式でフィッティング解析を行った。

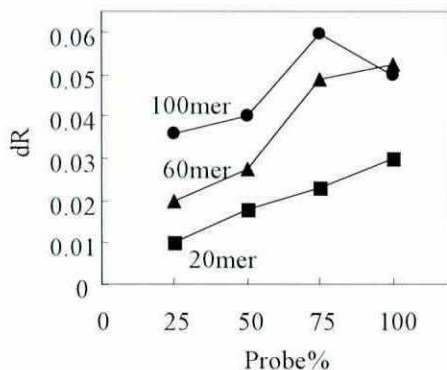


図3 プローブ被覆率と吸着量の関係

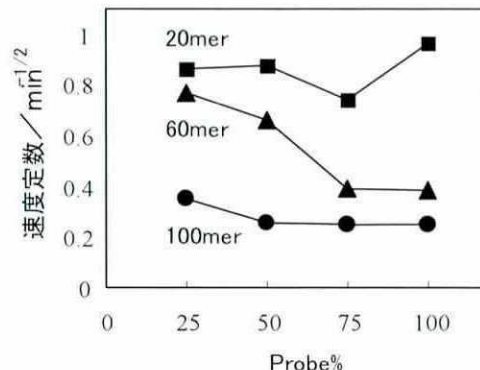


図4 プローブ被覆率と吸着速度定数の関係

図4にプローブ DNA の表面被覆率とフィッティングにより求めた速度定数の関係を示す。ここから 60 塩基、100 塩基 DNA ではプローブ DNA の表面被覆率が減少するにつれて、速度定数の増加が観察された。これはプローブ DNA が疎になることにより、プローブ DNA の運動性が増加し、その結果反応性が向上したことを示唆するものである。

2. ハイスループット化を目指したハイブリダイゼーションの多点同時観察

ハイブリダイゼーションのハイスループットな検出実現のため、DNA 単分子膜アレイを金基板上に作製し、このアレイ上でのハイブリダイゼーションを、SPR 顕微鏡による多点同時観察を行った。この SPR 顕微鏡は広いエリア (~80mm²) を観察することのできることを特徴とする。プローブ DNA として、ターゲット DNA と相補的な塩基配列を持つもの、1 塩基ミスマッチを持つもの 2 種類、2 塩基ミスマッチを持つもの計 4 種類を用いた。これらのプローブ DNA 単分子膜を金基板上に作製し、DNA チップとして用いた。図 5 にハイブリダイゼーション後の DNA 単分子膜アレイの SPR イメージを示す。

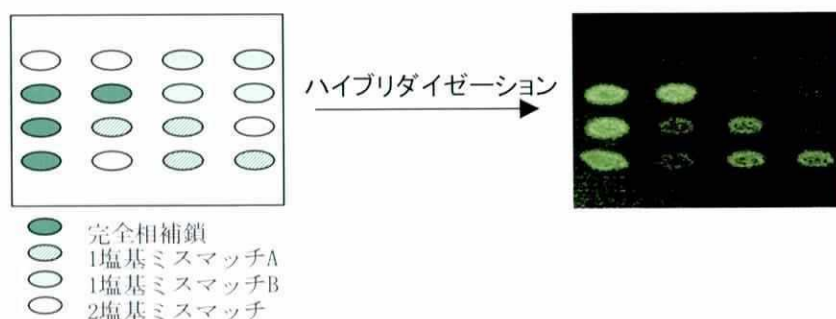


図5 SPR イメージによるハイブリダイゼーションの多点同時観察：明るい部分はハイブリダイゼーションが起こっていることを示す。ハイブリ部分は 20 塩基、ターゲット DNA は 100 塩基の一本鎖 DNA。1 塩基ミスマッチ A 及び B は異なる位置においてミスマッチを含んでいることを示す。

完全相補的な塩基配列を持つプローブ DNA が固定化されている領域ではハイブリダイゼーションによるシグナルの増加が観察された。一方、ミスマッチを含むターゲット DNA では、相補的なプローブ DNA が固定化されている領域と比べシグナル強度が 50%以下であった。このことから、本系を用いて 1 塩基ミスマッチの検出が可能であることが示された。

3. 高感度化への取り組み

現在、医療現場では非常に微量な検体を用いての遺伝子診断が望まれているが、既存の DNA チップでは感度・精度とも十分とは言い難い。そこで上述の手法をさらに発展させ、次に挙げる 2 つの手法を新規に考案して高感度化を図った。

(a) ブランチ型 DNA 単分子膜を用いた手法

3 つのプローブ部位を持つブランチ型プローブ DNA からなる DNA 自己組織化単分子膜を固体基板上に作製し、ターゲット DNA のハイブリダイゼーションを表面プラズモン共鳴法 (SPR) により観察した。(図 6 参照) すでに確立している方法に比べ、同じプローブ DNA の基板上的存在率で約 3 倍量のターゲット DNA の吸着が観察された。また、このブランチ型 DNA 単分子膜を用いることにより、一種類のプローブ DNA で複数種類のターゲット DNA を検出することが可能となる。

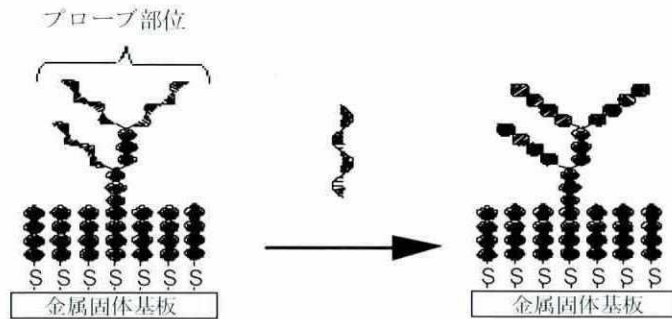


図6 ブランチ型 DNA 単分子膜を用いた DNA ハイブリダイゼーション

図7にブランチ型プローブDNAアレイを用いて、ハイブリダイゼーションを行った結果を示す。ブランチ型DNAはプローブDNA一分子に3つのプローブ部位を有している。また、一つのプローブ部位を持つプローブDNAをコントロールとして用いた。ここから、ブランチ型プローブDNAからなるアレイではハイブリダイゼーション効率が約2倍増大していることが確認された。この手法により更なる高感度検出が期待される。

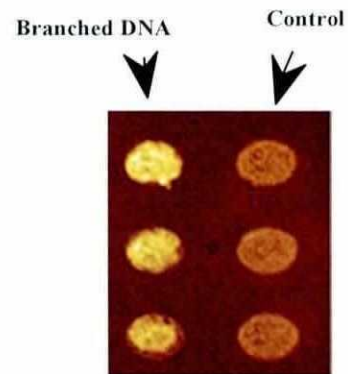


図7 ブランチ型 DNA 単分子膜を用いたハイブリダイゼーション観察

(b) DNA 修飾した金ナノ粒子を用いた手法

DNA 修飾した金ナノ粒子を作製し、この金ナノ粒子を用いてターゲット DNA の検出シグナルの増幅を試みた。(図8参照)

ターゲット DNA をメディエーターとして、DNA 単分子膜上への金粒子の吸着挙動を SPR 顕微鏡により観察した。図9に5つのDNAアレイ上のハイブリダイゼーションシグナル強度を示す。この測定から、ターゲットDNAのみと比較して、金ナノ粒子を用いることにより、ハイブリダイゼーション時のシグナルが6-7倍程度の増幅が確認された。

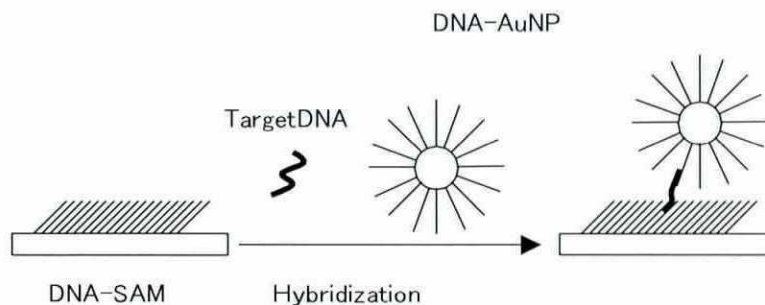


図8 金粒子を用いたハイブリダイゼーションの機構

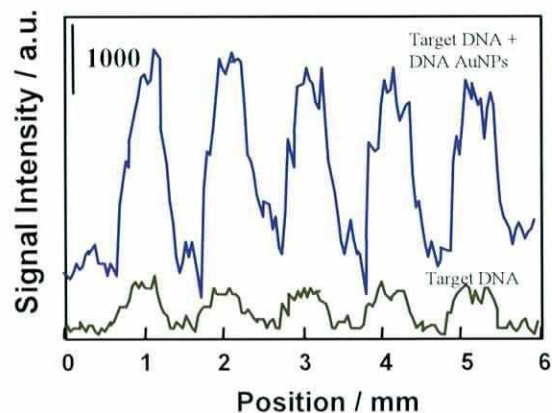


図9 DNAアレイ上のハイブリダイゼーションのシグナル。
下：ターゲットDNAのみ、上：ターゲットDNAと金ナノ粒子を添加した場合

III. 展 望

DNAチップに対する医療現場の主なニーズとして、(1)検体DNAへの修飾をすることなく検出できること、(2)PCRによる検体DNAの増幅無しで検出できる感度を有していること、の2点が挙げられる。検体DNAへの非標識検出（ニーズ(1)）が望まれている理由として、蛍光ラベリングの煩雑さコスト面、さらには蛍光色素の失活などが挙げられる。また、PCRにより増幅する際のコピーミスが防ぐことが困難なため、より正確な検出ができない可能性がある。さらにガン疾患などの遺伝子発現解析では極微量ガン細胞からの診断が望まれるため、極微量検体（数ミリグラム程度の細胞）での検出が必要不可欠となっている（ニーズ(2)）。一方、プローブDNAの固定化法に関しては、固定化の再現性が低いため、正常と異常の2つの検体DNAを用い、それらのプローブDNAとの結合比で反応量を評価している（二色蛍光法）。

本研究ではSPR顕微鏡を利用してハイブリダイゼーションのシグナルを検出するため、一度に多種類のプローブDNAのハイブリダイゼーションを観察でき、検体DNAへの標識を施すことなく、ハイスループットな検出が可能となる。DNA自己組織化単分子膜によるDNAセンサーの利点は高密度かつ再現性よくプローブDNAを固定化できる点である。もう一つの解決すべき点はニーズ(2)の高感度化である。本研究において2つの高感度化の取り組みを推進し、それぞれにおいて2～7倍程度の高感度化に成功している。現在のところ我が国では、DNAチップを用いた遺伝子診断は殆ど行われておらず、倫理面や法律を含めた周辺の整備がこれから必要となる。しかし近い将来、我が国でもDNAチップを用いた疾患の遺伝子レベルでの診断が行われるようになるであろう。その際には、本研究成果の強みが発揮できると期待できる。

発表論文

- (1) M. M. Matsushita, N. Ozaki, T. Sugawara, F. Nakamura and M. Hara, "Formation of Self-Assembled Monolayer of Phenylthiol Carrying Nitronyl Nitrooxide on Gold Surface", Chemistry Letters. 2002, 6, 596-597 (2002).
- (2) F. Nakamura, K. Mitsui, M. Hara, S. Kraemer, S. Mittler, and W. Knoll "Preparation of Self-Assembled Monolayer Containing Anthryl Groups toward Hybridization of Nucleotides", Langmuir, 19, 5823-5829 (2003).
- (3) Y. Sakao, F. Nakamura, N. Ueno, and M. Hara, "FORMATION OF DNA SELF-ASSEMBLED MONOLAYER ON A GOLD SUBSTRATE", Molecular Crystals and Liquid Crystals, 407, 141-146 (2003).
- (4) F. Nakamura, E. Ito, Y. Sakao, N. Ueno, I. N. Gatuna, F. S. Ohuchi, and M. Hara "Preparation of Branched DNA Self-Assembled Monolayer Toward Novel DNA Biosensors", Nano Letters 3, 1083-1086 (2003)
- (5) W. Knoll, M. -Y. Han, X. Li, J. -L. Hernandez-Lopez, A. Manna, K. Mullen, F. Nakamura, L. Niu, R. Robelek, E. L. Schmid, K. Tamada, and X. Zhong, , "Nanoscopic building blocks from polymers, metals, and semiconductors for hybrid architectures", Journal of Nonlinear Optical Physics and Materials, 13, 229-241 (2004)
- (6) Colloids and Surfaces B in press (2004), "HYBRIDIZATION OF OLIGONUCLEOTIDE BY USING DNA SELF-ASSEMBLED MONOLAYER" Y. Sakao, F. Nakamura, N. Ueno, and M. Hara

その他

招待・依頼講演

国内 3 件、海外 1 件

特許

国内

- (1) ハイブリダイゼーション用基板、この基板の製造法及び使用方法 特願 2002-095132
- (2) 核酸マイクロアレイ、その作製方法及び使用方法 特願 2002-376831
- (3) 相補性試験方法及びそれに用いる金粒子 特願 2003-128818
- (4) カルボラン誘導体化合物を用いる自己組織化単分子膜を用いるバイオチップ
特願 2004-092072

海外

- (1) ハイブリダイゼーション用基板、この基板の製造法及び使用方法 TCP/JP03/03815

受賞

第 83 春季年会 講演奨励賞 「DNA 単分子膜を用いた新規 DNA センサーの構築」
(平成 15 年 6 月)