



DNA塩基配列のトンネル電流計測による 超早期がん診断技術の開発

安井 隆雄

名古屋大学 大学院工学研究科 化学・生物工学専攻
〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

Early cancer diagnosis based on current detection of DNA sequences

Takao Yasui

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,
Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

概要

DNAの塩基配列情報は生物学の基盤であり、高速かつ低コストにDNAの生体情報を解析する技術は、生物学のみならず医学や食品分野など多くの分野への貢献が期待できる。DNAの生体情報を解析する手法として、ナノメートルサイズの細孔にDNA分子が通過する際に、伸長したDNA分子の塩基配列の電気信号を計測する解析法が開発が進められている。電気信号を用いたDNA分子の解析による早期がん診断技術開発の実現において、塩基配列上のがん特異的な配列の電気信号を計測する技術、並びにDNA分子を細孔へと導入する分子挙動制御技術は重要な課題である。そこで本研究では、そのナノワイヤ・ナノピラー構造体によるDNAの1分子の挙動制御技術にがん特異的な塩基配列を電気計測する技術を組み合わせ、DNA塩基配列の電気計測による早期がん診断技術の開発を試みた。DNA分子の塩基配列上のがん特異的な配列は、これまでの研究成果より、後天的なゲノム変化であるエピジェネティクス的一种であるDNAのメチル化とその部位が密接な関係を持っていることがわかっている。そこでDNAのメチル化部位に特異的に結合するナノ粒子を用いて、DNA塩基配列上のメチル化部位の詳細な解析を行った。

1. はじめに

DNA の塩基配列情報は生物学の基盤であり、高速かつ低コストに DNA の生体情報を解析する技術は、生物学のみならず医学や食品分野など多くの分野への貢献が期待できる。DNA の生体情報を解析する手法として、次々世代の DNA 塩基配列解読法である細孔による電気信号計測法の開発が進められている。その計測法はナノメートルサイズの細孔に DNA 分子が通過する際、伸長した DNA 分子のトンネル電流値の変化を電気信号として計測する解析法である。その計測法の読み取り速度は 1000 塩基/秒である。そのため、例えば 10 程度の計測系を同時に用いると、人の全ゲノム配列を解読するのに必要な時間は約 8 時間であると考えられている。この計測法を用いた DNA 分子の解析による早期がん診断技術開発の実現において、DNA 分子の塩基配列上のがん特異的な配列の電気信号を計測する技術、並びにその DNA 分子を細孔へと導入する分子挙動制御技術は重要な課題である。課題の 1 つである DNA 分子を細孔へと導入する分子挙動制御技術開発には、微細流路デバイス中で球形状(ランダムコイル)の DNA 分子を伸長する必要があり、その挙動を制御するためには球形状の DNA 分子と同程度サイズのナノ構造体(数 10-100 nm)の構築が要求される。しかしながら、既存の半導体微細加工技

術ではそのような構造体を作製するのは容易ではない。筆者らは、これまでに研究開発してきた自己組織化ナノワイヤ構造体¹やナノピラー構造体²を、石英ガラスやプラスチック、シリコン基板上のマイクロ流路中の狙った空間位置に配置する技術を確立し、DNA 分子の分子挙動を制御することに成功してきた。この研究における独創的な点は、微細流路内部の狙った空間位置にナノワイヤ・ナノピラー構造体を配置させることで長鎖 DNA 分子の挙動制御を行うところであった。微細流路内部の狙った空間位置にナノワイヤ構造体のような小さい構造体を作製した例はこれまでに報告されておらず、本研究が世界初の結果となった。また、微細流路内部に形成された自己組織化ナノワイヤ構造体を用いて DNA 分子を伸長させ、その挙動を制御している研究例も同様に他に報告されておらず、本研究の新規性および独創性は極めて高く、世界的にも高く評価されている。そこで本研究では、そのナノワイヤ・ナノピラー構造体による 1 分子 DNA の挙動制御技術に細孔によるがん特異的な配列を電気計測する技術を組み合わせ、DNA 塩基配列の電気計測による早期がん診断技術の開発を行った。

早期がん診断を行うための DNA 分子の塩基配列上のがん特異的な配列として、本研究では DNA メチル化等の配列変化を伴わない後天的なゲノム変化であるエ

エピジェネティクスの解析を目的とした。がんの発症機構解明と疾患診断は、1塩基多型(SNPs)など先天的ゲノム配列変化を中心に研究されてきた。しかし、近年、がん発症においてエピジェネティクスの重要性が指摘されており、がんの悪性度・転移診断の可能性も見出されており、社会的意義も非常に高い。エピジェネティクス解析は、アメリカ国立衛生研究所(NIH)ロードマップにおいても、生命の基礎研究のみならず、がん発症・転移診断やがん治療薬開発への展開が強く期待されている。さらに、高齢化が進行している我が国においても、エピジェネティクス解析によるがんの早期診断と予防医療構築が強く求められている。このエピジェネティクス解析の研究は国内外で進められ、領域特異的メチル化解析法や網羅的メチル化解析法が報告されている。しかし、これらは、細胞からのゲノム抽出、DNA断片化、亜硫酸水素塩(bisulfite)反応、PCR、シーケンシング等の煩雑な操作が必要な上に長時間の測定が必要であり、大量の細胞を必要としながら、ゲノム配列によってはメチル化部位が検出できず、測定条件設定が困難などの多数の問題がある。これらのことがエピジェネティクス解析のがん機構解明・疾患診断の臨床応用を妨げる原因となっている。

これらの問題点を解決するため、電気計測法を用いた「DNA断片化、bisulfite反

応、PCRが不要な」がんエピジェネティクス解析を着想した。DNAのメチル化部位に特異的に結合するナノ粒子を用いて、DNA塩基配列上のメチル化部位の電気信号を増強し、DNAの塩基配列上にあるメチル化部位の詳細解析に取り組んだ。メチル化部位に特異的に結合するナノ粒子は、メチル化部位認識能の高い分子とナノ粒子を結合させた新規ナノ材料を開発することで達成した。このナノ材料を結合させたDNA分子の挙動を制御する技術、ナノポアに導入する技術の開発を行った。

2. 自己組織化ナノワイヤによるDNAの挙動制御技術

自己組織化ナノワイヤ構造体は、石英ガラス基板上の微細流路に作製した。微細流路は、石英ガラス基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィーで流路パターンを形成後、反応性イオンエッチングにより作製した。微細流路を作製した後、スパッタリング装置を用いて金属触媒を微細流路内部にのみ固定化した。気液固反応法により、金属触媒が固定化された位置より酸化錫ナノワイヤ構造体を作製した。この金属触媒を用いた気液固反応法は原理的に空間の狙った位置に1次元単結晶ナノワイヤ構造を形作る唯一無二の手法である。微細流路中にナノワイヤ構造体を作製した後、金属触媒をスパッタリング法によって再度、

ナノワイヤ構造体の表面に固定化し、気液固反応法を用いて枝分かれしたナノワイヤ構造体を作製した³。その後、表面電荷制御のために酸化ケイ素をナノワイヤ表面上にヘテロ構造として導入した。酸化ケイ素が酸化錫ナノワイヤ表面上にヘテロ構造として導入されたかどうかは透過電子顕微鏡により確認を行った。酸化ケイ素を導入した後、石英ガラス製カバーガラスと貼り合わせを行い、デバイスを完成させた。

この作製したデバイスを用いて長鎖DNAを外部電場により導入を試みたところ、ナノワイヤ構造体の密度、成長回数、配置パターン、直径の違い等により、長鎖DNA分子の挙動と伸長度合いに違いが観察された。この結果より、ナノワイヤ構造体の密度、成長回数、配置パターン、直径の違い等のパラメータを最適化し、長鎖DNA分子を完全伸長させることが可能なクリスマスツリー型ナノワイヤ構造体の作製に成功した⁴。

3.ブリッジ回路型電流計測システム

細孔を用いた電流計測システムは、導電性溶液で満たされた微細孔(ポア)を物体が通過する際に発生する抵抗値変化をシグナル電流として感知することで、シグナル電流値に基づいたサンプルの大きさを識別することが可能である。しかしながら、従来の直列回路計測では、検出

範囲が狭く、ポアに対して $1/10^2$ 以上の体積を持つサンプルしか検出できないという問題があった。本研究では、微小流路を用いてブリッジ回路を作ることでシグナル電流のみを増幅し、 $1/10^4$ 以下の体積を持つサンプルに対応した検出を達成した⁵。また、顕微鏡を同一計測系内に組み込み、蛍光画像取得も可能となる同時計測系を構築し、ポアにDNAが導入される蛍光画像と電流計測値の相関も取得した⁶。

電流計測では、印加電圧を大きくするほどシグナル電流も大きくなるが、マイクロアンペアのバックグラウンド電流が流れる中でナノアンペアやピコアンペアのシグナル電流を読み取ることは困難である。本研究のブリッジ回路は、平衡状態を作りマイクロアンペアのバックグラウンド電流をゼロアンペアに抑えこむことで、シグナル電流のみを得ることができる。ブリッジ回路は、電圧印加装置を接続した泳動流路と、可変抵抗を含む電気回路を接続した計測流路が交差する構造となっている。電気回路の可変抵抗を操作して、電気回路と流路交差部の電位差を合わせることで、計測流路に電流が流れない平衡状態を作った。その後、サンプルを泳動流路に導入して流路交差部に到達すると、設定した電位差のバランスが崩れて計測流路にシグナル電流が流れた。その結果、従来

法と比べ、非常に大きな電圧の印加が可能であった。また、デバイスを光透過性の樹脂で作製することで、流路を通過するサンプルの電流計測を行いながら、細胞膜の蛍光染色能を顕微鏡観察から判別することにも成功した。微小流路の交差部に対して $1/10^4$ 以下の体積を持つ微小粒子の検出に成功した。DNA の直径は 2 nm で、メチル化部位に特異的に結合するナノ粒子の直径が 10 nm であることから、我々のシステムでは、数百 nm の微小流路を作製することで DNA とそこに特異的に結合したナノ粒子を計測可能であることを見出した。また、顕微鏡観察から得られる蛍光画像の検出結果を組み合わせることで、今回得られた信号がサンプル由来であることの識別に成功した。

4. メチル化部位認識能の高い分子とナノ粒子を結合させた新規ナノ材料の開発

DNA のメチル化部位を標識化用のナノ粒子には、高輝度・長寿命な蛍光特性を持つ量子ドットを用いた。量子ドットとメチル化結合タンパク質をビオチン-ストレプトアビジン結合により、複合体を作成した。メチル化された DNA に量子ドット-メチル化結合タンパク質の複合体を導入し、伸長した DNA より、メチル化部位に相当する位置にナノ粒子の蛍光観察を行うことに成功した⁷。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人高柳健次郎財団の助成を受けました。ここに感謝の意を表します。

6. 参考文献

- 1 Yasui, T. *et al.* DNA manipulation and separation in sublithographic-scale nanowire array. *ACS Nano* **7**, 3029-3035, (2013).
- 2 Yasui, T. *et al.* Electroosmotic flow in microchannels with nanostructures. *ACS Nano* **5**, 7775-7780, (2011).
- 3 Rahong, S. *et al.* Ultrafast and wide range analysis of DNA molecules using rigid network structure of solid nanowires. *Sci. Rep.* **4**, 5252-5259, (2014).
- 4 Rahong, S. *et al.* Three-dimensional Nanowire Structures for Ultra-Fast Separation of DNA, Protein and RNA Molecules. *Sci. Rep.* **5**, 10584-10592, (2015).
- 5 Yasaki, H. *et al.* Highly sensitive ionic current sensing system with optical observation for discriminating a wide diversity of sizes of bacteria with contaminants. *Micro Total*

- Analysis Systems 2015* **1**, 314-316, (2015).
- 6 Yasaki, H. *et al.* Micropore channel-based simultaneous electrical and optical sensing from single biomolecules, single exosomes to single cells. *Micro Total Analysis Systems 2014* **1**, 2161-2163, (2014).
- 7 Hattori, A., Yasui, T., Kaji, N. & Baba, Y. High-throughput methylation mapping by detecting fluorescently stained methylation sites at a single molecule level. *Micro Total Analysis Systems 2015* **1**, 861-863, (2015).