

研究終了報告書

「プラズモニクナノ流路を用いた DNA1分子高速解析」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：東直輝

1. 研究のねらい

生体内や環境中に存在する細菌やウイルスの DNA を分析するための基本工程の一つに DNA の長さ分析がある。例えば、細菌の遺伝子型の判別には、ゲノム DNA を制限酵素により特定の塩基対部で切断し、断片化した DNA の長さ分布を分析する。また、細菌の遺伝子の水平伝播の解析には、遺伝子や塩基配列の解析の前処理として細菌が有する複数のプラスミド DNA の長さ分布を分析する。これらは、薬剤耐性菌などの病原菌の感染経路や遺伝子伝播経路の特定に用いられ、高速で高精度な分析を必要とする。これまでは、ゲルの網目構造を分子ふるいとして利用するゲル電気泳動法が用いられてきた。しかし、この方法は分析に長い時間を要していた。特に、細菌のゲノム DNA やプラスミド DNA のような 10 kbp(base pairs:塩基対)以上の長鎖 DNA の長さ分析には、通常の泳動方法では長鎖 DNA 分子がゲルの網目構造に引っ掛かって泳動できないため、通常とは異なる泳動方法(パルスフィールド泳動)が必要であったが、これに数日を要していた。そこで本研究では、DNA 一分子毎に長さを分析できれば、高速な長さ分析が可能になると着想した。しかし、それには第一に、DNA 一分子はランダムコイル形状が安定であるため、DNA 一分子を操作して伸長させる必要がある。第二に、伸長させた DNA 一分子を観察して長さを高精度に測定する必要がある。そこで本研究では、DNA 一分子の伸長と蛍光観察による長さ測定の二つの要素技術を確立し、DNA 一分子の長さ分析法の基盤を構築することを目的とした。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、DNA の一分子伸長と一分子長さ測定の二つの要素技術を確立し、DNA 一分子長さ分析法の基盤を構築した。一つ目の DNA 一分子伸長法として、DNA 溶液の微小液滴を移動させた際に生じる気液界面移動を用いた方法を試みた。この結果、10 kbp 以下の DNA 分子について長さ分析を実現した。一方で、この方法では 10 kbp 以上の長鎖 DNA では伸長率が低く、長さ分析を実現できないことが示された。そこで、長鎖 DNA 一分子伸長における課題を明らかにするため、二つ目の伸長法として、マイクロ流路内で DNA 一分子の伸長過程をリアルタイムに観察することを試みた。微細加工技術によってマイクロ流路を形成したデバイスを開発して、長鎖 DNA 一分子の伸長を観察した結果、どちらの DNA も伸長したが、伸長後に断裂されたのが確認され、長鎖 DNA 一分子の断裂が長さ分析の課題であることが示された。そこで、三つ目の方法として、ナノ流路内の閉じ込めを用いた伸長を試みた。微細加工技術を用いて深さと幅が数百 nm のナノ流路を作製した。長鎖 DNA 一分子の伸長を観察した結果、ナノ流路内への導入によって一分子の断裂なく伸長された。また、ナノ流路内で DNA 一分子の長さを高精度に測定することに成功した。長鎖 DNA 分子の混合試料を用いて、長鎖 DNA 一分子の定量的な長さ分析を実現した。分析時間は数分であり、従来のゲル法と比較して高速な長さ分析を実現し、DNA 一分子の長さ分析法の基盤を構築することに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「液滴移動による DNA 一分子長さ分析」

DNA 溶液の微小液滴を移動させた際に生じる気液界面移動を用いた DNA 一分子伸長法を用いて一分子長さ分析の実現性を検証した。ガラス基板を角度調整可能な治具に固定した。基板上に DNA 溶液を 10 μ L 滴下した後に、DNA 液滴を移動させた。DNA 一分子の末端は表面に結合され、気液界面移動によって伸長される。蛍光観察のため、DNA 分子にはあらかじめ蛍光分子を結合させた。液滴移動後の蛍光像から、伸長された DNA 一分子が観察された。同様に、4, 6, 26, 48 kbp の DNA 分子を伸長させ、それぞれについて数十分子の伸長長さを測定した。DNA 一分子が完全に伸長された際の理論長(1 bp 間の長さ 0.34 nm \times bp 数)との比較によって、10 kbp 以下の DNA 分子では高い伸長率の分子が多く、1 kbp 精度で長さ分析を実現できることが示された。一方で、26 kbp と 48 kbp の DNA では低い伸長率の分子も多く、その平均値が同程度になった。したがって、この方法は 10 kbp 以上の長鎖 DNA 一分子の長さ分析に適用できないことが示された。そこで長鎖 DNA 一分子の伸長における課題を明らかにするため、マイクロ流路内で DNA 一分子の伸長をリアルタイムに観察した。

研究テーマ B 「マイクロ流路による DNA 一分子長さ分析」

B-1: マイクロ流路の作製

微細加工技術によって深さが数 μ m、幅が数百 μ m の直線状の凹を形成し、マイクロ流路を形成した。DNA 試料を流路内に導入して圧力を印加した。DNA 分子は流路内を泳動しながら、その末端がガラス表面に結合され、圧力流れによって生じるせん断力によって伸長された。デバイスを蛍光顕微鏡に設置して伸長過程を観察した。

B-2: 伸長観察の結果

48 kbp と 166 kbp の長鎖 DNA 一分子の伸長の蛍光像から、どちらの DNA もマイクロ流路内で伸長された。伸長長さはどちらともに理論長の約 90% の伸長率であった。48 kbp と 166 kbp を混合した試料を用いて、流路内で伸長させ長さを測定した結果、166 kbp の DNA の理論長の分子はほとんどなく、短い DNA 分子のみが測定され、長鎖 DNA 一分子の断裂が長さ分析の課題であることが示された。断裂の原因として、大きなせん断力によるものが考えられた。流路内のせん断力は圧力流れの流速に比例するため、高い伸長率を実現するには高速な流速を必要とする。しかし、高速泳動によって DNA 一分子が断裂された。特に、長鎖であるほど二重らせん構造の欠陥などの強度が弱い部分の存在確率も高いため、断裂されやすかった可能性がある。そこで、DNA 一分子の断裂の少なくして伸長し長さ分析を実現するため、ナノ流路内の閉じ込めを用いた伸長を試みた。

研究テーマ C 「ナノ流路内の DNA 一分子長さ分析」

C-1: ナノ流路の作製

ランダムコイル形状の DNA 一分子を、その直径よりも深さと幅の小さなナノ流路内に導入させることで伸長させることを試みた。ナノ流路内の閉じ込めを用いた方法であるため、低速泳動でも伸長でき、DNA 一分子の断裂を減少させることができると考えた。ナノ流路を形成したデバイスを微細加工技術によって作製した。シリコン基板表面に直線状のマイクロ深さの凹形状を形成した後に、その中心位置に集束イオンビーム加工によってナノ深さの凹形状を形成した。条件検討に

よって、様々な凹形状の形成に成功した。濡れ性の向上のために、表面に数十 nm 厚さの SiO₂ 薄膜を形成した後に、陽極接合を用いてガラス基板を接合させた。

C-3: DNA 一分子伸長と長さ分析結果

48 kbp と 166 kbp の長鎖 DNA 一分子の伸長の結果、どちらの DNA もナノ流路内への導入によって一分子の断裂なく伸長された。また、DNA 一分子の高精度な蛍光観察によって長さを測定することに成功した。48 kbp と 166 kbp を混合した試料を用いて、流路内で伸長させ長さを測定した結果、二つのピークが計測されたことから、二種類の長鎖 DNA 一分子の長さ分析の原理検証に成功したといえる。長さ分析精度は 10 kbp 精度であった。また、48 kbp と 166 kbp の分子数の比は試料の混合割合と概ね一致したため、定量的な分析を実現した。

本研究では、DNA 一分子長さ分析の結果から、液滴移動法を用いて 10 kbp 以下の DNA 分子について、1 kbp 精度で長さ分析を実現した。一方で、10 kbp 以上の DNA 分子について、ナノ流路によって 10 kbp 精度で長さ分析を実現した。分析時間は数分であり、ゲル法(10 kbp 以下: 1時間, 10 kbp 以上: 数日)と比較して高速な長さ分析を実現し、DNA 一分子の長さ分析の基盤を構築することに成功した。

【ACT-X 領域内外の研究者との連携】

下記に示す研究会や交流の場を企画または参加し、当 ACT-X 領域内外の多くの研究者と研究ディスカッションや連携を行った。

研究会・研究交流

- 研究会: 10件, 研究室訪問: 3件

研究交流を通して得られた具体的な成果

- 共同研究: 3件
- 合同シンポジウム発表: 1件

3. 今後の展開

本研究では、DNA 一分子の長さ分析法の基盤を構築した。分析時間は数分であり、従来のゲル法と比較して高速な長さ分析を実現できることを示した。細菌・ウイルスの DNA を用いた検証を実施し、本手法がゲル法では検出できない少量の DNA の長さ分析も実現できることも示した。今後は、異分野連携によって様々な細菌・ウイルスの DNA 分析に取り組むのに加えて、企業との連携によって本手法の高精度化と自動化を進めて、実用化につなげたいと考えている。

4. 自己評価

ACT-X 研究において、二つの目標で研究を進めてきた。一つ目の目標は DNA 一分子長さ分析法の基盤を構築することである。DNA 一分子の伸長やデバイス作製の過程で想定していなかった問題が生じたが、課題の本質を明らかにしながら研究を進めることで、提案する分析法の基盤を構築することに成功し、十分な成果が得られたと評価している。二つ目の目標は研究領域内外の研究者とのネットワークを構築することであった。私は機械分野を専門としており、領域内では異分野の立場であったため、“他研究者の研究を深く知ること”と“異分野融合による新しい研究テーマを創出すること”を目標として、多くの研究会の場を企画し、参加した。その結果、ACT-X 領域内外で研究者間のネットワークを形成でき、十分な成果が得られたと確信している。今後は、

本研究で得られた“バイオ分析のシーズ”と“異分野の研究者間ネットワーク”を活用して、新しい研究分野の開拓に貢献したいと考える。本研究で得られた知見は、微生物学・生物学・医学・疫学などの幅広い分野に展開でき、社会的なインパクトも大きいと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. N. Azuma, H. Ozeki, K. Miki, K. Fukuzawa, S. Itoh, H. Zhang, Quantitative Measurement of Squeeze Flow Distribution in Nanogaps by Particle Image Velocimetry Using Quantum Dots, Tribology Letters 71, 112 (2023).

この研究では、蛍光追跡を用いてナノすきま内の流体の流れ場を計測したものである。この研究は ACT-X 研究で提案する DNA 一分子長さ分析を進める上で得られた知見をもとにしており、成果の一部は ACT-X 研究で得られたものである。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際会議

1. K. Tanaka, N. Azuma, R. Suzuki, K. Fukuzawa, S. Itoh, and H. Zhang, Method for Identifying Positions of Proteins Bound to a Single DNA Molecule Stretched and Immobilized in a Microchannel, 36th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2023), 15C-3-3 (2023).
2. H. Ozeki, N. Azuma, K. Fukuzawa, S. Itoh, and H. Zhang, Estimating Velocity Profile and Interfacial Slippage of Squeeze Flow in Nanogap Using Nanoparticle Image Velocimetry, International Tribology Conference 2023 (ITC2023), 30-G-11 (2023).
3. R. Suzuki, N. Azuma, K. Fukuzawa, S. Itoh, and H. Zhang, Stretching DNA molecule using pressure flow in a microchannel and its super-resolution imaging, 2022 JSME-IIP/ASME-ISPS Joint Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE2022), C1-1-02 (2022).

国内学会

4. 鈴木 瞭太郎, 東 直輝, 福澤 健二, 伊藤 伸太郎, 張 賀東, 一分子伸長固定と超解像光学観察による DNA 一分子上の結合タンパク質の位置特定法, IIP2023 情報・知能・精密機器部門(IIP 部門)講演会, IIPA-6-6 (2023).
5. 東 直輝, 鈴木 瞭太郎, 福澤 健二, 伊藤 伸太郎, 張 賀東, DNA 一分子分析のための微小流路内の伸長・固定と超解像イメージング, 日本機械学会2022年度年次大会, J025-12 (2022).