

論 文

分子手術のための伸長固定 DNA のナノプリンティング

福家真史^{*,1}, 小穴英廣^{*}, 鷺津正夫^{*}

(2005年8月1日受付, 2005年9月18日受理)

Nano-Printing of Stretch-and-Positioned DNA for Molecular Surgery

Masafumi FUKU^{*,1}, Hidehiro OANA^{*} and Masao WASHIZU^{*}

(Received August 1, 2005; Accepted September 18, 2005)

Molecular surgery refers to the space-resolved operation on a molecule, where the target molecule is immobilized onto a solid surface and the operation is performed using position-controlled probes. In order to achieve a high resolution DNA surgery with enzyme-immobilized probes, the target DNA must be immobilized onto a solid surface with a stretched conformation, yet in such a way that the surface itself does not cause steric hindrance to the activity of the enzyme. In this paper, we propose and experimentally demonstrate a new method to realize such immobilization using nano-printing of DNA onto a microfabricated convex/concave structure. DNA is first stretched and anchored onto a micro electrode system using electrostatic stretch-and-positioning method. A substrate having a surface microstructure of periodical convex/concave texture is prepared separately, onto which the stretch-and-positioned DNA is made into contact to transfer DNA onto the texture. It is found that the binding strength between DNA and the surface must be carefully controlled for successful transfer, and is realized in this paper by a discharge plasma treatment of PDMS. DNA strands, being securely held at multiple locations along its length onto the convexes, while leaving other parts freely suspended above the concaves to allow interactions with enzymes, are obtained with the method.

1. はじめに

従来の生化学的手法において DNA は水溶液として集団で扱われるため、特定分子の特定位置を指定して操作を加えることは困難である。例えば、長い DNA の塩基配列を解析するためには、まず DNA を短い断片に切断して各々を解析し、それらをつなぎ合わせることで全体配列を再構築する。この過程において、それぞれの断片がもとの DNA のどの部分からきたものであるのかという位置情報が失われてしまうため、再構築のプロセスは膨大な手間のかかるものとなる。これに対し、DNA を固体表面に固定してしまえば、分子の任意位置にアクセスできるので、分子の特定位置への操作（分子手術）が可能となり、再構築のプロセスが軽減されるため DNA 解析の高速化へとつながることが期待される。

我々の研究室では、以前より、微細加工電極間に作り出される高周波電界を用い、DNA を伸長・配向し基板に固定

できることを示し^{1,2)}、さらにその応用として、固定された DNA を微小工具により切断し、特定部位の DNA 断片を取得する技術の開発を行ってきた³⁾。

一方、この微小工具として、酵素を固定化したプローブを用いれば、切断点の分子構造が明らかな切断を行うことが可能であり、さらには、DNA 上の特定部位をメチル化するなどの部位特異的分子修飾への応用も期待される。このような酵素反応を用いた分子手術においては、酵素の活性部位と DNA とがきちんと嵌合される必要があるため、例えば、DNA が固体表面に全面的に吸着していると、固体表面が立体障害となり反応が阻害される可能性がある。そのため、われわれは、以前に、図1のような微細電極系（フローティングポテ

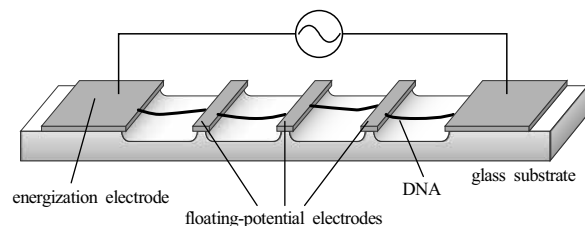


図1 フローティングポテンシャル電極
Fig.1 Floating-potential electrode system.

キーワード DNA, 分子手術, 誘電泳動, マイクロマニピュレーション, μ CP

* 東京大学工学系研究科機械工学専攻 (113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Department of Mechanical Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, JAPAN

¹ fuke@washizu.t.u-tokyo.ac.jp

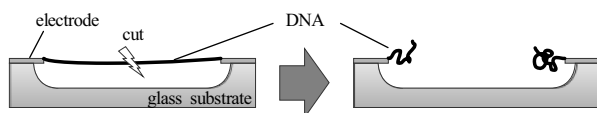


図2 両端固定 DNA の切断
Fig.2 Cutting DNA anchored at both ends.

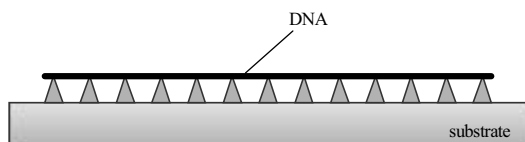


図3 DNA の多点固定法
Fig.3 Immobilization of DNA at multi point.

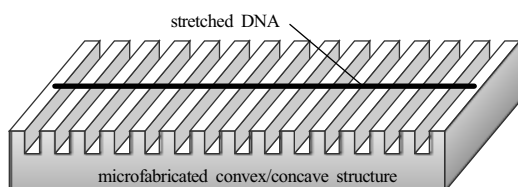


図4 微細凹凸構造上への伸長 DNA の固定
Fig.4 Immobilization of stretched DNA on microfabricated convex/concave structure.

ンシャル電極)を用いて、固体表面に吸着することなく DNA を保持する手法を開発した。この系では、固定されるべき DNA の長さよりわずかに短いギャップを持つ電極に高周波高電界を印加することにより、DNA を静電伸長して、その両端を電極間をまたがる形で固定するが、この時、電極のギャップ部分に相当する基板表面がエッチングにより掘り下げられているので、DNA は基板へ吸着することなく、酵素との相互作用が可能な状態で固定される。実際、この電極系を用いて固定された DNA の任意位置を、DNA 切断酵素を固定化したプローブを押しあてて切断する手法が実証されている⁴⁾。

しかしながら、このような状態で固定された DNA に対し、1箇所での切断を生じさせると、図2のように、DNA はエンロピー弾性により縮んでしまうため、伸長し固定された状態を維持することができない。例えば、酵素固定化プローブにより DNA を切断し、切断片を回収するためには、切断が生じても伸長し固定された状態を維持でき、かつ酵素との相互作用が可能である DNA 固定法が必要とされる。

この目的で、本論文では、図3のような DNA 多点固定法の開発を行った。この固定法によれば、酵素と相互作用でき

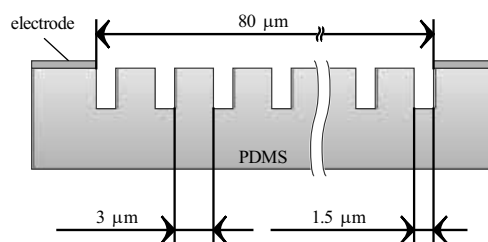


図5 DNA 多点固定のための基板
Fig.5 Device for multi point DNA immobilization.

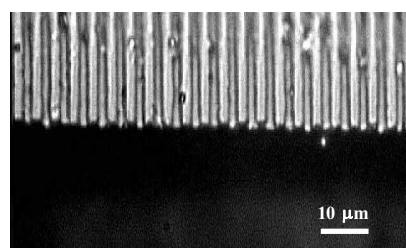


図6 PDMS 微細凹凸構造 (反射顕微鏡像)
Fig.6 Reflecting microscopic image of PDMS microfabricated convex/concave structure.

る状態で DNA を保持しつつ、1箇所での切断が生じても伸長された固定状態を維持することが可能となる。さらに、切断後、固定点をレーザーアブレーション等で剥離させることにより DNA 断片を回収することが期待される。

2. DNA 多点固定基板の作製

DNA の多点固定は、図4に示すように、微細な凹凸構造上に伸長 DNA を固定する方法で行う。これにより、DNA は複数の凸部で固定され、凹部上では空間中に浮いた状態で保持される。この際、酵素反応を用いて DNA を切断することができる部位は凹部上のみであるので、回収できる DNA 断片長は凸部幅に依存することとなる。今回の実験では凸部幅を $3 \mu\text{m}$ とし、図5に示すような断面形状の微細凹凸構造を作製した。

まず、ネガレジスト SU-8 (MicroChem. Corp.) を使用し、フォトリソグラフィによりスライドガラス上に凹凸の鋳型となる構造を得る。この上に PDMS (KE-106, 信越シリコン) を滴下し、スライドガラスをかぶせ、硬化させた後に鋳型から剥離することにより、スライドガラス上に図6のような PDMS 微細凹凸構造をもつ基板を作製した。

3. 微細凹凸構造上への DNA 静電伸長固定

このようにして得られた微細凹凸構造上に、静電伸長法²⁾を用いて DNA を伸長固定させるべく、この構造の上からメタルマスクを通してアルミニウムを蒸着することにより、図5に示すようなギャップ 80 μm の電極をつけた。この際、蒸着時にアルミニウムが PDMS 表面につきやすいように、あらかじめ酸素プラズマにより PDMS 表面の親水化処理を行った。

DNA の伸長固定には、静電伸長法により電極エッジに DNA の一端を固定(図 7-a)した後、電界を取り去り(図 7-b)、その後 molecular combing 法⁵⁾により、カバーガラスを基板表面と平行に動かして取り去る(図 7-c)と共に、メニスカスフォースにより DNA を微細凹凸構造上へと再伸長・固定する(図 7-d)という手法³⁾を用いた。

この molecular combing 法による DNA 再伸長時に、電極上と PDMS 上の表面エネルギーが異なると、メニスカスがうまく移動できないため、基板表面は酸素プラズマにより再度親水化処理をし、さらに、DNA の吸着を防止するために BSA (10 mg/ml) でコートした。DNA としては、 λ -DNA 溶液 (48 kb, 長さ 16.5 μm , 濃度 5 ng/ μl) を用い、蛍光色素 YO-PRO-1 (Molecular Probes Inc., 5 μM) で染色し可視化した。

以上の手順で微細凹凸構造上へ固定した DNA の蛍光顕微鏡像を図 8 に示す。電極エッジに片端部を固定された DNA が、図中横方向へ伸長固定され、縦方向にははしっている微細凹凸構造上へ固定されているが、凹部上(図中矢印部)で DNA が切断されてしまっているのが観察された。これは、molecular combing 法による DNA 再伸長時に溶液が凹部に残り、これが乾燥する際のメニスカスフォースにより DNA が凹部内に引き込まれて切断されてしまうためではないかと推測される。

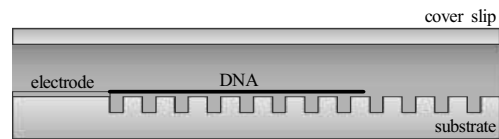
たとえば、塩基配列解析の目的で、単に DNA をある決まった長さに断片化するのが目的であれば、この手法により目的は達成される。しかしながら、制限酵素等を用いて切断点の分子構造が明確に定義された切断を行いたい場合には、このような切断が生じないようにする必要がある。

4. PDMS と電極を用いた伸長 DNA の転写

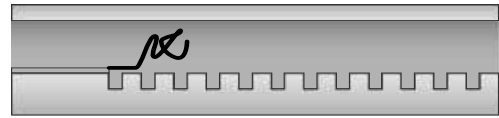
前節の実験より、単純な molecular combing 法では、メニスカスフォースにより DNA が凹凸形状の溝部分に引き込まれ切断されてしまうことが判明した。そこで、あらかじめ別の基板に DNA を伸長して仮固定しておき、その DNA を凹凸基板上へ転写する手法を開発した。

このような転写法に関しては、滴下した DNA 溶液が蒸発する時のメニスカスフォースにより DNA を PDMS 上へ配向

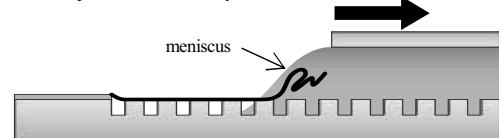
a) Apply voltage to stretch DNA and anchor one end.



b) Remove voltage. DNA is still anchored.



c) Move cover slip to stretch DNA by meniscus force.



d) Fully stretch and immobilize DNA.

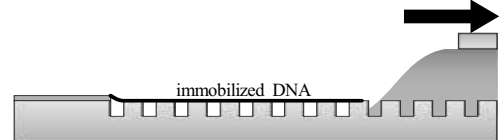


図7 DNA の伸長固定
Fig.7 Immobilization of stretched DNA.

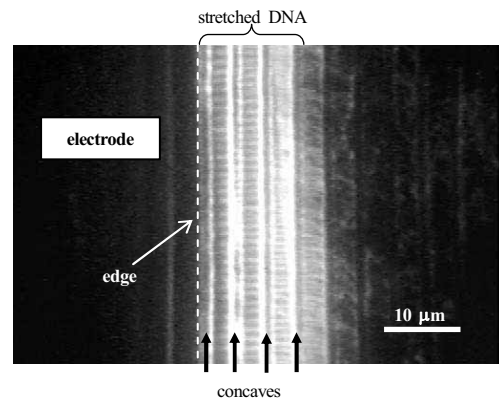
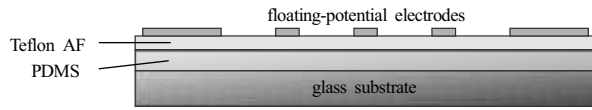


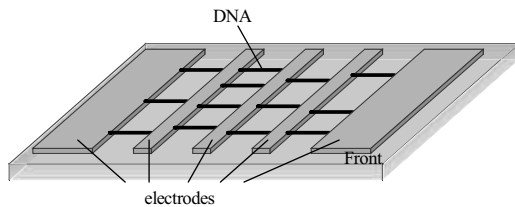
図8 微細凹凸構造上へ固定された DNA
Fig.8 Immobilized DNA on microfabricated convex/concave structure.

させ、これをガラス基板へ押し付けることにより転写した報告例がある⁶⁾。この報告では、PDMS 表面は疎水的であり、極性分子である DNA との親和性が低いため、DNA との親和性の高いガラス基板側へ転写される、とされている。ただしこの場合、単に蒸発時のメニスカスフォースを利用しているため、DNA の伸長は完全ではなく、固定される位置も予測不能で、得られる配向も、おおよそ放射状で、一方向に揃う

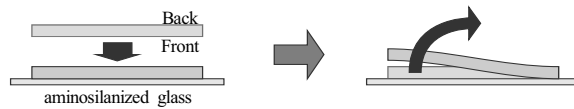
a) The device for transfer-printing of stretched DNA.



b) Apply voltage to stretch DNA and anchor both ends.



c) Press against aminosilanized glass and then remove.



d) Transfer DNA onto glass substrate.

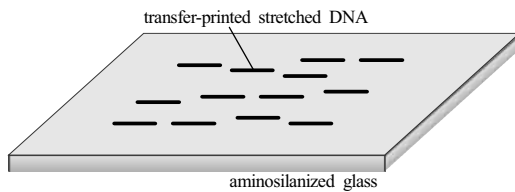


図9 伸長DNAの転写法

Fig.9 The process of transfer-printing for stretched DNA.

わけではない。一方、われわれが欲するのは、定められた位置に一方に配向された完全に伸長された状態のDNAである。

そこで、我々は、PDMS上にフローティングポテンシャル電極を作製することにより、PDMS表面に伸長DNAを仮固定し、これを転写する技術を開発した。手順を図9に示す。

まず、スライドガラス上に、PDMSを滴下しスピンコートにより厚さ10 μm とした後、硬化させた。次に、酸素プラズマによりPDMS表面の親水化処理を行い、スピンコートによって膜厚2 μm のテフロン層 (Teflon[®] AF 2400, DuPont) を作製した後、真空アルミ蒸着及びエッチングによるフローティングポテンシャル電極の作製を行った (図9-a)。電極ギャップ長は、DNAが固定されやすいよう、 λ -DNA長より若干短い13 μm とした。PDMS上に直接アルミ電極を作製した場合、エッチングプロセスに伴うPDMSの熱変形によって電極にクラックが入ってしまうが、上記手順でテフロン層を作製

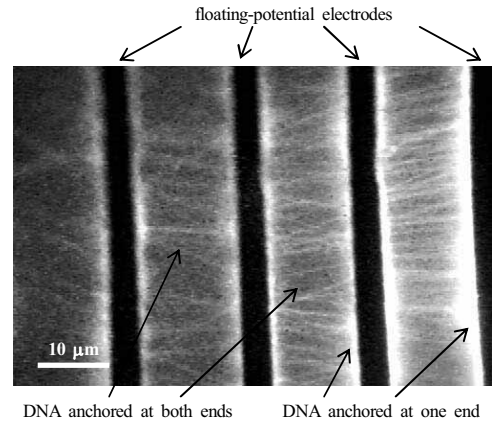


図10 両端固定されたDNA

Fig.10 Anchoring DNA at both ends.

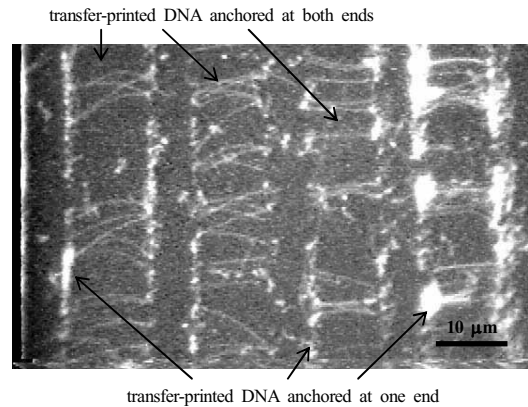


図11 転写された伸長DNA

Fig.11 Transfer-printed DNA on aminosilanized glass.

しているのは、これを防止するためである⁷⁾。テフロンは疎水性であるため、PDMSと同様の効果が得られ、また、PDMS層は転写の際の被転写側基板との密着性のために必要となる。

この電極上にDNA溶液 (5 ng/ μl λ -DNA, 5 μM YO-PRO-1) を滴下し、静電伸長固定法を用いて、DNAの両端部を隣りあう電極エッジへ固定する (図9-b)。これを、転写される側の基板へ押し付け (図9-c)、取り去ることにより伸長DNAが転写される (図9-d)。この際、乾燥させることによりDNAがテフロン上に固着してしまうため、一連の手順は基板表面を乾燥させることなく行った。また、転写される側の基板は、DNAの吸着を確実にするために、表面をアミノシラン (KBE-903, 信越シリコン) でコートした。

図10は作製した基板を用いて、フローティングポテンシャル電極にDNAを両端で固定したものである。電極ギャップ長がDNA長より短いため、斜めに固定されているDNAが

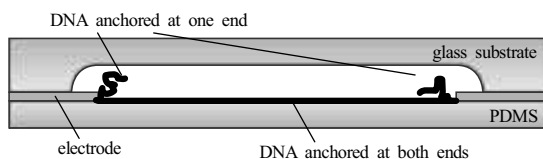


図 12 ギャップ間を掘り下げた電極を用いた DNA の転写

Fig.12 Transfer-printing DNA by floating-potential electrode with trench structure.

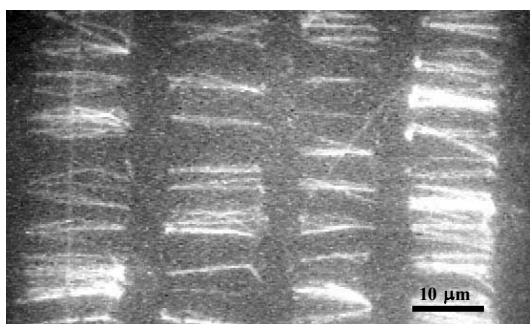


図 13 酸素プラズマ処理した PDMS への DNA の転写

Fig.13 Transfer-printed DNA on oxygen plasma-treated PDMS.

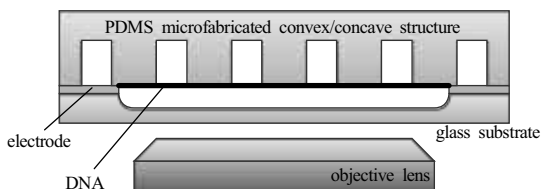


図 14 観察方法概略図

Fig.14 Schematic diagram of the device.

多数見られるが、電極ギャップ長と DNA 長をほぼ等しくとれば、DNA が同一方向に固定されるものと考えられる。

この基板を、表面にアミノシラン修飾を施したスライドガラスへ押し付け、転写の操作を行ったものを図 11 に示す。図 10 において電極エッジに片端で固定されていた DNA が、電極形状に沿って転写されており、電極ギャップ部が押しあたっていた部分に、両端固定されていた伸長 DNA が転写されている。

この手法においては、ガラス上へ DNA の転写を行う際に、基板同士の密着性のために転写用基板の PDMS 層が必要であったが、PDMS 微細凹凸構造のように転写される側の基板が弾性変形できる素材であれば、それにより密着性が確保できるため、転写用基板の PDMS 層は不要となる。テフロン層

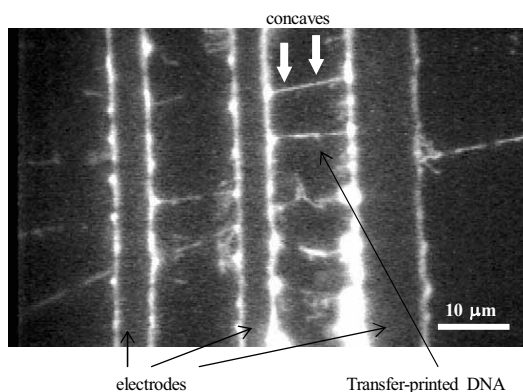


図 15 微細凹凸構造上への DNA の転写

Fig.15 Transfer-printed DNA on microfabricated convex/concave structure.

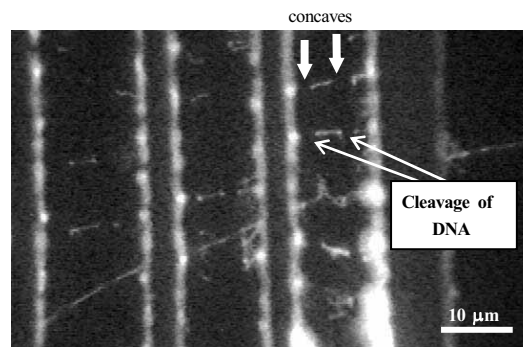


図 16 固定された DNA の凹部上の切断

Fig.16 Photocleavage of DNA immobilized above the concaves.

についても、PDMS 上に電極を作製するため、かつ DNA との親和性が低い、という点で用いているが、液中で特にガラス表面に DNA が吸着することはないため、これも不要となり、スライドガラス上に直接電極を作製したのみの基板を用いても、PDMS 表面へ転写を行うことができる。

ただし、PDMS 表面は疎水性であり DNA との親和性が低いため、DNA を転写することができない。DNA を転写するためには、PDMS 表面にアミノシランのような正電荷を持つ分子を修飾することが有効と考えられるが、我々は、PDMS 表面を酸素プラズマ処理するだけでも DNA を吸着できることを新たに見出した。酸素プラズマ処理をした PDMS 表面に DNA が吸着する原理については、現時点では明らかではない。

さらに、ガラスエッチングにより電極ギャップ間を掘り下げることにより、転写プロセス中、両基板を密着させた際に、図 12 のように片端で固定されていた DNA が押し付けられることなく基板間の空隙に逃れることができ、特に酸素プラズマ処理した PDMS を用いた場合には、DNA が積極的に引きつけられることがないので、図 13 に示すように両端固定されていた伸長 DNA のみを転写することにも成功した。

5. 微細凹凸構造上への伸長 DNA の転写

上記手法を用いて、PDMS 微細凹凸構造上への伸長 DNA の転写を試みた。図 14 に示すように、転写後に両基板を剥離せずに観察を行ったのが図 15 である。図中、縦方向に微細な凹凸がはしっており、電極間に横方向に伸長された DNA が固定されている。

この後、励起光を強く照射することにより、図 16 のように凹部上の DNA (図中矢印部) のみが消失するのが観察された。これは、励起光による非特異的切断が DNA に起き、凹部上では空間中に保持されているために切断により流されて DNA が失われてしまう一方、凸部上では基板上に吸着しているため、切断が生じて DNA が基板上に留まっていると説明できる。この結果より、DNA の多点固定状態が実現できていると確認された。

6. おわりに

酵素を用いた分子切断手術を実現するためには、DNA が酵素と相互作用な状態で固定でき、かつ切断を行っても伸長状態が維持できることが必要である。本研究では、この目的のため、微細凹凸構造を用いた DNA 多点固定法の開発を行った。得られた結果は、以下に要約される。

- 1) 凸部幅 3 μm 、深さ 3 μm 、ピッチ 4.5 μm の凹凸構造の両側に電極を持つ微細構造を作製し、静電伸長固定法を用いて、微細凹凸構造上への伸長 DNA の固定を実証した。しかしながら、伸長された DNA は、メニスカスフォー

スにより凹部に引き込まれて切断されてしまうことが判明した。

- 2) PDMS 層上に電極を配置し、ここに静電伸長固定した DNA を、別の基板の上に転写する手法を開発した。
- 3) 上記手法を用いて、伸長 DNA の微細凹凸構造上への転写を実証した。励起光による切断により凹部上の DNA のみが失われることから、凸部上で DNA が固定され、凹部上では空間中に保持されるという多点固定状態が確認された。

今後、多点固定した DNA に対して制限酵素を作用させ、酵素を用いた分子手術の実証を行うとともに、凸部上に残された DNA 断片の回収手法の開発を行う予定である。

謝辞

(株)アドバンスの黒澤修博士の御議論と御助力に謝意を表します。

この研究の一部は、生物系特定産業技術研究推進機構(生研機構)新事業創出研究開発事業「遺伝子工学における分子操作」、文部省科研費(A14205037)、NEDO 産業技術研究助成事業「Intact genomic DNA 単分子操作・解析システム開発」(04A01541)の助成を受けて行われました。

参考文献

- 1) M. Washizu and O. Kurosawa: IEEE Trans. Ind. Applicant., **26** (1990) 1165
- 2) M. Washizu, O. kurosawa, I. Arai, S. Suzuki and N. Shimamoto: IEEE Trans. Ind. Applicant., **31** (1995) 447
- 3) 黒澤修, 鷺津正夫: 電気学会論文誌 E, **123** (2003) 112
- 4) T. Yamamoto, O. Kurosawa, H. Kabata, N. Shimamoto and M. Washizu: IEEE Trans. Ind. Applicant., **36** (2000) 1010
- 5) A. Bensimon, A. Shimon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon: Science, **265** (1994) 2096
- 6) H. Nakao, M. Gad, S. Sugiyama, K. Otake and T. Ohtani: J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 7162
- 7) M. Ishizuka, H. Hojo, M. Abe, K. Akahori, N. Honda, M. Mori, T. Sekiguti, and S. Shoji: Micro Tot. Anal. Sys., **1** (2002) 413