

称号及び氏名	博士（工学） 床波 志保
学位授与の日付	2007年3月23日
論文名	「Application of Nano-Gapped Gold Nanoparticle Array to Electrical DNA Detection」 (ナノギャップを有する金ナノ粒子配列の電氣的 DNA 検出への応用)
論文審査委員	主査 教授 長岡 勉 副査 教授 八尾 俊男 副査 教授 河野 健司

論文要旨

DNA チップは遺伝子研究、ゲノム創薬やテーラーメイド医療の実現において不可欠な技術となっている。このチップによる DNA 検出は、固定化プローブ DNA とターゲット DNA との結合を蛍光シグナルとして読み取る方式で行われている。しかし、この方法は多段階洗浄や厳密な温度管理といった複雑な条件設定に加え、高精度光学機器や蛍光色素の使用に伴う経済性の低下など、多くの問題を抱えている。これらの問題を解決するため、最近では金ナノ粒子の分散凝集特性を利用する分光学的手法、酸化還元性標識試薬を用いた電気化学的手法など、新たな手法開発に関する研究が活発に行われている。

近年、単一分子の導電性に関する研究が精力的に行なわれているが、その中でも DNA は二重らせん内の塩基対スタッキング構造により対象分子として注目されている。これらの研究結果より DNA は分子内電荷移動を起こすことが示唆されている。したがって、その構造および導電性をデバイス作製に応用でき

れば微小電子機器への応用も可能となる。また、DNA の二重鎖形成に伴う導電性の変化が計測可能になれば、増感や標識化が不要で経済性にも優れた DNA センサの開発が実現できる。

このような背景の下、本研究では金ナノ粒子二次元配列膜を用いた DNA センサの開発を行った。この膜では、バインダとして用いたアルカンジチオールにより粒子間隔の制御が可能であり、ナノメートルサイズの間隔を有する電極として分子導電性を測定することが可能となる。本論文では、この膜を用いて DNA の二重鎖形成により生じる微小な電気抵抗変化を直接高感度に検出する方法を開発した。また、DNA 塩基配列中のミスマッチ部位の有無が電気抵抗変化に与える影響についても検討を行った。

本論文は、DNA の導電性および検出に関する緒言と 4 章から成る研究成果、および結言とから構成されている。

第 1 章は、本論文の緒言であり、研究の背景と目的および本論文の概要について述べた。

第 2 章は、金ナノ粒子配列膜の表面観察と電氣的評価を行なった結果について述べた。膜の作製は、微小白金くし型電極（電極間距離、5 μm ）をバインダである 1,10-デカンジチオール溶液と金ナノ粒子（直径 50 nm）分散液に交互浸漬し、この操作を繰り返すことにより行った。この操作によってナノ粒子膜が作製されると電極の端子間抵抗は大きく減少した。膜の SEM 観察を行なったところ、金ナノ粒子は白金電極上だけでなくガラス基板上にも均一に吸着している様子が確認された。さらに、膜が 200 Ω 程度の抵抗を有していること、ナノ粒子はバインダ分子を吸着しているなどの理由から、粒子間にはデカンジチオールの分子長（約 1.3 nm）に相当するギャップが存在していると結論した。

第 3 章では、金ナノ粒子膜を用いた電氣的 DNA 検出について検討した。金ナノ粒子膜へ 5'末端チオール化 12 塩基 DNA を滴下することによりプローブ修飾を行なった。プローブ DNA の修飾量は酸化還元活性なインターカレータであるビスベンズイミドを用いて決定した。金ナノ粒子膜に固定された DNA へのビス

ベンズイミドの挿入量より、プローブ DNA は金ナノ粒子膜に 27 pmol/cm^2 の表面密度で修飾されていることが分かった。

次に、プローブ DNA を修飾した金ナノ粒子膜に相補鎖 DNA を添加したときの電気抵抗の変化を直流二端子法（印加電流：1 mA）により測定した。ターゲットとなる相補鎖 DNA を添加すると、抵抗は直ちに減少し始め約 30 秒後に一定となった。さらに抵抗は $5 \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ の DNA 濃度に関して良い相関を示した。このときの最小検出量は 25 pmol に対応する。また、二重鎖形成前後の金ナノ粒子膜の交流インピーダンス測定において酸化還元応答が確認されなかったことから、相補鎖 DNA 添加による抵抗変化は DNA 二重鎖の導電性変化に起因すると結論した。

DNA の二重鎖形成により抵抗変化が生じたことをさらに確かめるため、二重鎖形成後の膜に DNA 分解酵素であるデオキシリボヌクレアーゼ I（DNase I）を添加した。DNase I の活性剤であるマグネシウムイオン存在下で DNase I を添加すると DNA 二重鎖の分解が起こり、抵抗はターゲット DNA 添加前の値にまで上昇した。マグネシウムイオン無添加時には DNase I による抵抗変化が起こらなかったことから、抵抗変化が DNA 二重鎖形成により生じたことが立証された。

第 4 章では、DNA 配列中のミスマッチ塩基がセンサ応答に及ぼす影響について検討した。ターゲットとして相補鎖、1 塩基、4 塩基、11 塩基ミスマッチ DNA を添加したところ、応答は相補鎖 DNA のとき最大となり ($0.19 \text{ }\Omega$)、1 塩基ミスマッチ ($0.11 \text{ }\Omega$)、4 塩基ミスマッチ ($0.06 \text{ }\Omega$)、11 塩基ミスマッチ ($0.05 \text{ }\Omega$) とミスマッチ塩基数の増加に伴い小さくなった。また、1 塩基ミスマッチと 4 塩基ミスマッチの間には $0.05 \text{ }\Omega$ 、相補鎖と 1 塩基ミスマッチ DNA の間には $0.08 \text{ }\Omega$ と顕著な差が見られたが、4 塩基と 11 塩基ミスマッチの間には違いはほとんど見られなかった ($0.01 \text{ }\Omega$)。この差は粒子間ギャップと DNA の長さにより説明できた。粒子間距離はバイнда分子（約 1.3 nm ）により一定に保たれているが、これは DNA 鎖の 4 塩基分（約 1.4 nm ）に相当する。したがって 4 塩基以

上のミスマッチは粒子間ギャップを越える長さに相当するため抵抗変化に差がなくなったと考えられる。以上のことから、DNAの一塩基多型検出においては1.3 nm程度のギャップが適していると結論した。また、ミスマッチ部位の異なる1塩基ミスマッチターゲットに対して応答を比較したところ、すべての場合において同程度の抵抗変化が観測された。このことから、本法ではミスマッチの部位の位置に依存しない一塩基多型検出が可能であることが分かった。

第5章では、より高感度なナノ粒子薄膜の設計に関する検討を行った。前章では、ナノギャップを持つ金ナノ粒子に5'末端チオール化プローブDNAを修飾した後、検出を行なった。この場合、プローブの他端はチオールで固定されていないため、導電経路形成が効率的でない可能性がある。したがって、DNA両端の固定化が生ずるようにナノ粒子薄膜を設計することにより、さらに高感度な検出が可能になると考えた。このような観点から、本章では二種類の異なる12塩基DNAを修飾した12 nm金ナノ粒子プローブを先に調製し、これらを広いギャップを有する50 nm金ナノ粒子に固定した膜を作製した。この膜にプローブ粒子の両方に結合する24塩基相補鎖ターゲットDNAを添加すると、2つの50 nm粒子の間を架橋する構造体が形成される。本章では、このようなハイブリッド構造の生成に伴う電気抵抗変化を測定し、その効果を検証した。

12 nm金ナノ粒子へのプローブ修飾量の見積もりを蛍光標識プローブである5'-ヘキサクロロフルオレセインフォスフォアミダイトを用いて行なった。その結果、金ナノ粒子には16 pmol/cm²の表面密度でDNA修飾が起こっていることが分かった。これは、50 nm金ナノ粒子膜へのプローブ修飾量(27 pmol/cm²)とほぼ同程度であった。

このようにして作製したセンサ膜にそれぞれのプローブに対して相補鎖配列となる24塩基相補鎖DNAを添加すると、抵抗は瞬時に減少し約60秒で安定した。応答はDNA濃度に依存し、広いDNAの濃度領域(10 nM~100 μM)において測定が可能であった。このときの最小検出量は50 fmolに対応し、前章の方法よりも500倍の高感度化を達成することができた。さらにターゲット濃度100

μM において選択性の検討を行ったところ、応答は相補鎖 DNA を添加したとき最大 (0.12Ω) となり、ミスマッチ塩基数の増加に伴い減少した。相補鎖と 1 塩基ミスマッチ DNA との間に顕著な差 (0.07Ω) が見られたことから、本法においても一塩基多型検出が可能であると結論した。

第 6 章では、本論文で得られた結論の総括を行った。

審査結果の要旨

DNA センサは遺伝子研究，ゲノム創薬やテーラーメイド医療の実現において不可欠な手法となりつつあるが，未解決な問題を多く抱えており現状では研究室レベルの実用化にとどまっている。本論文で開発された方法は金ナノ粒子の2次元配列膜を用いる DNA センサであり，電気的検出が可能であり，経済性，感度，選択性とも実用を視野に入れた内容となっている。

本論文では，以下に述べる具体的成果を得ている。

①金ナノ粒子配列膜に関する基礎的知見を得るため，白金楕形電極上に配列膜の作製を行った。この配列膜の表面観察を行い，粒径約 50nm の金ナノ粒子が電極表面に均一に吸着している様子を確認した。また，電気的評価を行ない，膜が 200 Ω ~ 1 k Ω 程度の抵抗を有しているなどの理由から，粒子間にはデカンジチオール分子長（約 1.3nm）に相当するギャップが存在していると結論した。

②次に，金ナノ粒子膜の電気的 DNA 検出について検討した。プローブ DNA を修飾した金ナノ粒子膜に相補鎖 DNA を添加すると電気抵抗は直ちに減少した。減少の程度は DNA 濃度に依存し，5~100 μ M の範囲で直線的に変化した。このときの検出下限は 25 pmol であった。

③さらに DNA 配列中のミスマッチ配列がセンサ応答に及ぼす影響について検討した。ターゲットとして相補鎖，1，4，11 塩基ミスマッチを有する DNA について応答を観測したところ，抵抗変化は相補鎖 DNA のとき最大となり，ミスマッチ塩基数の増加に伴い小さくなった。このことにより，本法が一塩基多型検出に応用できることを示した。

④また，更なる高感度化を達成するため2種類の異なる DNA を修飾したプローブ粒子を作製し，これを 50 nm 粒子上にハイブリッド形成させた配列膜を作製した。この膜では上述の方法に比べて約 500 倍の高感度化を達成することが可能であった。

以上の研究成果はナノ粒子配列膜を用いた新しい DNA 検出法として評価できる。また、電気抵抗検出という簡便な手法で DNA の選択的検出に成功しており、実用化も視野に入れた内容となっている。従って、この論文は学術的な新規性を有するとともに、工業的にも有益であると考えられる。また、申請者が自立して研究を行うに十分な能力と学識を有していることも証した。