

報告番号	甲 第 11880 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 **Nanofluidic System for
Single DNA Molecule
Manipulation and Analysis**
(ナノ流体システムによる
一分子 DNA 操作および分析)

氏 名 孫 曉寅

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、現在主流となっている光学顕微鏡を用いた一分子ナノバイオ計測技術の開発に注目し、精密にサイズを制御したナノ流体デバイスによる一分子 DNA の操作及び分析に関する研究である。一分子計測は、集合系の測定では手に入らない情報が得られるため、より詳細に生命現象を解明することができる。近年、マイクロ・ナノ流体デバイスは省サンプル・高効率・短時間で生体分子を分析できるといった利点があるため、一分子計測に強力なツールとして頻繁に使用されている。そこで、本研究では、ナノ流路中における一分子 DNA の自由操作方法及び分析方法の開発を目的とし、以下の三つの研究項目を報告する。

1. ナノ流路を用いた一分子 DNA の速度制御

本研究項目は、DNA の塩基配列を正確に解読するため、ナノ流路中一分子 DNA における通過速度の制御方法の開発である。ナノポア DNA シーケンサは従来の方法と比べ、迅速・低コスト・長鎖 DNA の解読が可能などの利点を持つため、DNA の塩基配列を識別するツールとして発展している。ナノポア DNA シーケンサの原理は、電圧を印可することにより、ナノサイズの穴に DNA を通し、4 種類の塩基は個々で体積が微量に異なるため、ナノポアを通る際に電流量の違いが生じる。この電流量の違いをモニタリングすることで、DNA の塩基配列を解読することができる。しかしながら、ナノポアに電場が集中することで、それを通る DNA の通過速度が速くなりすぎてしまう。よって、正確な電流量の計測が困難となり、解読エラーが生じる。このことから、より高い解読精度で DNA の塩基配列を分析す

るため、ナノポアを通る DNA の通過速度を制御する方法が必要とされる。従来の手法としては、溶液の粘度が増加することで、ナノポアを通る DNA の通過速度が制御できる。この手法だと、粘度が増加するにつれ DNA がナノポアに詰まる率にも増えるため、より新たな方法で DNA の通過速度を制御する必要がある。そこで本研究では、ナノポアを模擬したナノ流路を作製し、溶液の粘度以外のパラメーターを検討することで、ナノ流路中の一分子 DNA の通過速度を制御した。まず、電場の方向を変えることで、ナノ流路中に負の電荷を帯びる DNA を自由に操作することに成功した。次に、印加電圧、DNA の長さ、ナノ流路の長さおよび溶液の塩濃度を検討することで、ナノ流路中における一分子 DNA の通過速度を 1384 kbp/ms から 200 kbp/ms まで制御することに成功した。

2. ナノ構造体とナノ流路の融合デバイスを用いた一分子 DNA の速度制御

1 の研究項目に記述したように、ナノポアを通る DNA の通過速度が速い原因はナノポアに電場が集中するためである。ナノポアに集中する電場を減少させることで、さらに DNA の通過速度が制御できるという考えのもと、ナノポアを模擬したナノ流路を含む新たなデバイスを作製した。ナノ流路に集中する電場を減少させるために、異なるナノ構造体をナノ流路の手前に作製し、デバイス全体の電気抵抗を増加させた。このような異なるナノ構造体とナノ流路の融合デバイスを用いることで、ナノ流路にかかる電場が小さくなり、ナノ流路中における一分子 DNA の通過速度を減少させることに成功した。また、一分子 DNA は異なるナノ構造体によってあらかじめ引き伸ばされた後、ナノ流路に導入されるため、より効率的にナノ流路中の一分子 DNA を伸長することができた。

3. ナノ流路による一分子 DNA メチル化検出方法の開発

1 と 2 の研究項目から、ナノ流路中における一分子 DNA の自由操作方法を把握することができた。これを用いた一分子 DNA 解析を行い、がん診断等で重要性が高まっている DNA メチル化を一分子レベルで検出できる方法を開発した。

DNA のシトシンの 5-メチル化(DNA メチル化)は代表的なエピジェネティクス修飾である。この修飾は DNA の配列変化がなく、遺伝子の機能を喪失させ、ヒトの各種疾患の発症原因になることがわかっている。ゲノム研究で明らかにはできなかった疾患の原因を解明するため、DNA メチル化を深く研究することが望まれる。

また、近年、一分子 DNA のメチル化部位の数が異常に増加することが、乳がんおよび肺がんとの関連性があることが判明した。がんなどの疾患の早期発見を実現するため、より簡便・迅速な一分子 DNA メチル化検出方法を開発する必要がある。

近年、MBD というタンパク質を用いてメチル化部位と結合させ、光学および電学的な手法でメチル化部位を検出したとの報告がいくつかある。しかし、MBD タンパク質とメチル化 DNA サンプルの調製は非常に複雑である。また、MBD タンパク質は非メチル化部位にも結合するため、非メチル化部位はメチル化部位として検出されてしまう懸念がある。従

って、より精確な DNA メチル化部位を検出するため、MBD タンパク質が不要となる新たな検出方法を開発することが望まれている。

そこで本研究では、MBD タンパク質が不要で、ナノ流路における一分子 DNA の緩和過程を評価することで、メチル化と非メチル化 DNA を一分子レベルで識別することに成功した。メチル化 DNA は巨大なメチル基の挿入により立体障害が生じ、硬度が高くなることが報告されている。しかし、自由溶液中の DNA はランダムコイル状態で存在し、メチル基の挿入で起こった DNA 硬度の変化を識別することが非常に困難である。そこで、電場を印加することで、負の電荷を帯びる DNA をナノ流路中に導入し、DNA を伸長させることに成功した。また、電場を切り、強制的に伸長させた DNA は自分の平衡状態に回復するため、ナノ流路中の DNA が緩和する。ナノ流路中の DNA の緩和過程を評価したところ、柔らかい非メチル化 DNA より硬いメチル化 DNA の緩和長および緩和時間が長いことがわかった。また、一分子 DNA 上に 8% のシトシンがメチル化された場合に、がんなどの関連性があることがわかっており、本メチル化検出方法では、8% 以上のメチル化率を有する DNA を検出することができた。また、既存のメチル化検出方法は 96 時間かかるのに対し、本メチル化検出方法は 2 時間しかかからないため、およそ 94 時間を短縮することに成功し、今後のエピジェネティクス解析に大きく貢献できると考える。

また、近年、DNA メチル化により生物機能に及ぼす影響は多く研究されているが、物理機能に及ぼす変化に関することはほぼ未知である。以上の研究成果に基づいて、ナノ流路中の一分子 DNA メチル化に及ぼす速度の影響を解明した。ナノ流路中のメチル化 DNA の速度は非メチル化 DNA より速いことがわかった。通常のゲル電気泳動では、同じサイズ・電荷を有するメチル化および非メチル化 DNA が、ゲルに引かれながら移動するため、二つの DNA を分離することが不可能である。しかしながら、メチル化 DNA の分子量は大きく硬度が高いため、拡散係数が小さく緩和速度が遅いので、メチル化 DNA の速度に影響を与えることが想像できる。そこで、ナノ流路を用いて、メチル化および非メチル化 DNA の速度を計測したところ、微妙な速度変化を検出することに成功した。

これらの研究では、ナノ流体デバイスを用いた、一分子 DNA の自由操作方法および分析方法の開発を行った。マイクロ・ナノ流体デバイスの基盤となる、一分子計測システムの実用化に大きく貢献できると考えられる。