

研究課題別評価

1 研究課題名: 自己組織化単分子膜を用いた DNA センサーの構築

2 研究者氏名: 中村 史夫

3 研究の狙い:

DNA は、4 つの塩基 (アデニン-チミン、シトシン-グアニン) の組み合わせによって遺伝情報を保存・伝達する「分子情報材料」としてとらえることができる。近年、DNA チップに代表されるように、DNA の塩基配列にコードされている遺伝情報の固体基板上での簡便かつ迅速な読みとりが世界的に盛んに行なわれているが、20 塩基対程度のオリゴマーにおいてさえ 1 塩基多型の効率的な検出 (1 塩基ミスマッチ検出) は未だ容易ではない。本研究では、固液界面での DNA の二重鎖形成 (ハイブリダイゼーション) に関する独自の研究成果に基づいて、さらに選択性の高い表面反応場の創製を進めるとともに、ハイスループットな DNA の新規検出法の開発を進めることを研究の目的とする。

4 研究成果:

① ブランチ型プローブ DNA を用いた DNA 自己組織化単分子膜の構築

3 つのプローブ部位を持つブランチ型プローブ DNA からなる DNA 自己組織化単分子膜を固体基板上に作製し、ターゲット DNA のハイブリダイゼーションを表面プラズモン共鳴法 (SPR) により観察した。すでに確立している方法に比べ、同じプローブ DNA の基板上の存在率で約 3 倍量のターゲット DNA の吸着が観察された。また、このブランチ型 DNA 単分子膜を用いることにより、一種類のプローブ DNA で複数種類のターゲット DNA を検出することが可能となる。

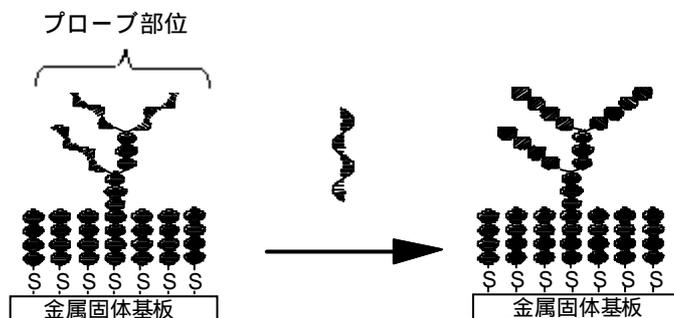


図1 ブランチ型 DNA 単分子膜を用いた DNA ハイブリダイゼーション

② 表面プラズモン顕微鏡 (SPR イメージャ) を用いたハイブリダイゼーションの多点同時観察と一塩基ミスマッチ検出

DNA 自己組織化単分子膜作製法により金基板上に様々な塩基配列を持つ DNA アレイを作製し、SPR イメージャによりハイブリダイゼーションの多点同時観察に成功した。また、この DNA アレイを用いて一塩基ミスマッチの検出に成功した。

③ ナノ粒子を用いた高感度バイオセンサーの構築

DNA 修飾した金ナノ粒子を作製し、この金ナノ粒子を用いてターゲット DNA の検出シグナルの増幅を試みた。(図2参照) ターゲット DNA をメディエーターとして、DNA 単分子膜上への金粒子の吸着挙動を SPR により観察した。この測定から、金ナノ粒子を用いることにより、ターゲット DNA のハイブリダイゼーション時のシグナル増幅が観察された。

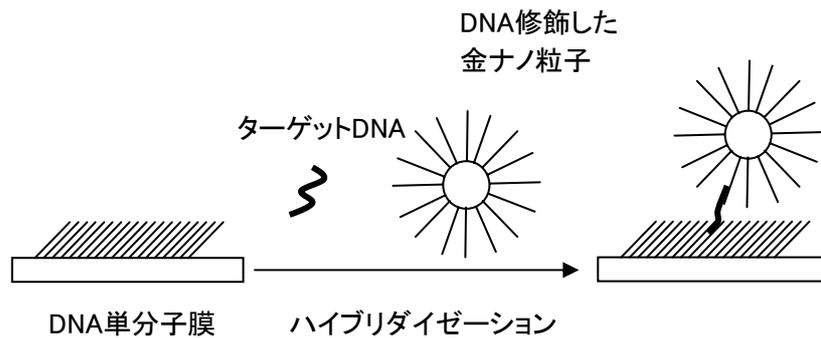


図2 金ナノ粒子を用いた DNA ハイブリダイゼーション

④プローブ DNA の表面被覆率を変化させることによるハイブリダイゼーションの最適化

これまでターゲットとして 20 塩基程度のオリゴ DNA を用いてきたが、さらに長鎖の DNA をターゲットとして用いるためには、プローブ DNA の表面被覆率を変化させることによるハイブリダイゼーションの最適化を図る必要がある。検討の結果、100 塩基のターゲット DNA においても、プローブ DNA の被覆率を制御することにより、高効率なハイブリダイゼーションの検出が可能であることが示された。

5 自己評価:

新規 DNA センサーの構築に際して重要な点として、1.新規 DNA 固定化法の確立、2.簡便な DNA アレイの作製法の確立、3.ハイブリダイゼーションの多点同時観察法の確立、4.検出シグナルの増幅の4点が挙げられる。本さがけプログラムの遂行により、これら4点を含むトータルシステムが構築できたことは有意義なことであり、このシステムを用いた DNA センサーへの展開が期待できる。また、DNA 自己組織化単分子膜と SPR イメージャと組み合わせることにより、当初の目的の一つである、DNA アレイを用いたハイスループットな塩基ミスマッチ検出に成功した。さらに、当初の予定にはない、新規ハイブリダイゼーション検出法を幾つか考案できたことは大きな収穫である。

6 研究総括の見解:

中村史夫研究員は、SRP 法による DNA ハイブリダイゼーションを観察し、DNA 修飾した金ナノ粒子を利用するなどして、高感度化を達成している。今後の実用化の促進を期待したい。

7 主な論文等:

論文

Langmuir, 19, 5823-5829 (2003), "Preparation of Self-Assembled Monolayer Containing Anthryl Groups toward Hybridization of Nucleotides", F. Nakamura, K. Mitsui, M. Hara, S. Kraemer, S. Mittler, and W. Knoll

Nano Letters, 3, 1083-1086 (2003) "Preparation of Branched DNA Self-Assembled Monolayer Toward Novel DNA Biosensors", F. Nakamura, E. Ito, Y. Sakao, N. Ueno, I. N. Gatuna, F. S. Ohuchi, and M. Hara

その他3報

特許

ハイブリダイゼーション用基板、この基板の製造方法及び使用方法 (理研・JSTさがけ) 中村史夫・原正彦・林純子、特願 2002-095132

その他国内3件、海外1件