

学 位 論 文 題 名

金ナノ微粒子を用いた高感度 DNA センサーに関する研究

学位論文内容の要旨

生活習慣病や癌などさまざまな疾患が遺伝子の多型や発現状態と関連づけられ、世界中の研究者によって膨大なデータベースの構築が進められている。現在では血友病や鎌形赤血球症のような DNA 一塩基の変異に基づく病気が数千の遺伝病が知られ、これらの疾患の遺伝素因が一塩基多型として同定されつつある。これらの情報を個人の疾患リスク診断や医療診断、薬事耐性の診断などに応用することで、患者に対してより適切な予防や治療を施すことが可能になる。このような、テーラーメイド医療と呼ばれる医療を可能とするためには、個人に対して網羅的な遺伝子の発現状態や一塩基多型、または発現タンパク質などの検査を安価に、正確に行う必要がある。現在、このような検査を可能とするために DNA チップやタンパク質チップなどの検査技術のチップ化が活発に研究されている。また、蛍光法による DNA チップはすでに多数の企業から販売され、基礎医学や基礎生物学の研究分野においては広く使われ始めている。

蛍光法による DNA チップでは、蛍光分子を化学修飾した検体 DNA をガラス基板上の複数のプローブ DNA とハイブリダイゼーションさせ、基板上での蛍光分子の蛍光を検出する。しかし、この手法では検体 DNA への蛍光分子の修飾の程度が検出精度におおきく影響し、再現性や定量性を落とす原因となる。また、蛍光分子の光退色などの蛍光法による DNA チップは原理的な問題を多くかかえている。研究開発においては複数回の実験から結果の良いデータを取得できれば、統計的な処理によって有益な情報を引き出すことができる。しかし、医療診断に用いる場合にはこのような誤診は許されない。さらに、研究室レベルではそれらの技術を熟知した研究者が検査を行う。一方、実際の医療診断に広く普及させるためには、DNA チップの取り扱いに不慣れな人でも間違いなく操作し分析を行えるようにする必要がある。

そこで本研究では、精度が高く診断誤差を本質的に抑制できる手法として、表面プラズモン共鳴（SPR）分光法に着目し、これを検出手法とする DNA チップの開発を行った。金属薄膜に臨界角付近で P 偏光に調節した光を入射したとき、反射率が急激に減少する角度、SPR 角度が存在する。SPR 角度は金属薄膜表面の屈折率変化に対して非常に鋭敏であり、金属薄膜表面にアルカンチオールなどの自己組織化単分子膜を形成することで、SPR 角度がシフトすることが知られている。この SPR 測定は DNA チップにおけるハイブリダ

イゼーション検出にも、利用可能であると考えられる。SPR 測定による DNA チップでは、金基板表面に固定した一本鎖 DNA をプローブ DNA として用い、検体 DNA とのハイブリダイゼーションを検出する。この手法では、検体 DNA への蛍光や放射性物質の標識なしに検出でき、DNA ハイブリダイゼーションの吸着過程の in-situ 測定も可能である。入射光の直径を広げ基板全体に光を照射し、その反射光を CCD カメラで検出すれば金薄膜表面における、それぞれの位置での屈折率変化を一括で検出することもできる。しかし、SPR 測定では DNA ハイブリダイゼーションによる SPR 角度シフト量が微少で検出感度が低いという問題がある。そこで、本研究では SPR 測定の利点を損ねることなく、DNA ハイブリダイゼーションの検出感度を上昇させるために、金微粒子修飾 DNA 単分子膜を用いた DNA チップの開発を行った。末端に修飾したチオール基をかいして、数十塩基の一本鎖 DNA を金薄膜表面に固定し、そのもう一方の末端に抗原抗体反応を用いて直径 10 nm の金微粒子を修飾し、これをプローブとして DNA ハイブリダイゼーション検出を行った。金微粒子修飾 DNA 単分子膜を用いることで、ハイブリダイゼーション前後での SPR 角度シフトは溶液中の測定で、金微粒を修飾しない場合の 0.06° に比べ、金微粒子修飾の場合で 0.18° と 3 倍増大させることに成功した。また、DNA ハイブリダイゼーションの in-situ 測定で、検体濃度 $10\ \mu\text{M}$ ~ $1\ \text{pM}$ という 7 桁にもおよぶ広いダイナミックレンジでの定量的な検出が可能であった。

本論文は 6 章から構成されている。以下に各章の概要を述べる。

1 章では、ポストゲノム研究とテーラーメイド医療と、DNA ハイブリダイゼーションの検出手法としてこれまでに報告されている、代表的な手法を紹介した。また、表面プラズモン共鳴の理解を助けるために近接場光学について解説した。その上で、本研究を行う意義、目的について述べた。

2 章では SPR 角度スキャンや、SPR イメージング測定、また in-situ SPR 測定システムについて説明した。また、SPR 角度スキャンの解析手法としてフレネルフィッティングについても述べた。

3 章では SPR 測定に用いる金薄膜基板の作成方法について検討した。基板となるガラス基板の洗浄法や、金薄膜の作成条件について述べた。また、金薄膜厚を原子間力顕微鏡を用いて測定し、SPR カーブのフレネルフィッティングより金薄膜の複素屈折率を算出した。

4 章では金薄膜表面に DNA 単分子膜を作製し、その SPR 測定を行った。金薄膜の熱処理による DNA 単分子の基板表面への修飾量の評価や、検体の非特異的な吸着を防ぐための表面修飾を検討した。また、金薄膜表面に修飾した DNA 単分子膜の修飾量の定量を SPR 測定により行った。

5 章では基板上に固定した一本鎖 DNA に金微粒子を修飾し、その金微粒子修飾 DNA 単分子膜の SPR 測定を行った。SPR カーブ測定により、ハイブリダイゼーションによる SPR 角度シフトを測定した。また、SPR イメージング測定と、DNA ハイブリダイゼーションの in-situ 測定を行った。

6章ではこれまでの研究成果をまとめて総括とし、今後改善すべき点をあげそれらに対する方策を提案した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 澤 弘 明

副 査 教 授 末 宗 幾 夫

副 査 教 授 笹 木 敬 司

副 査 助 教 授 Saulius Juodkakis

学 位 論 文 題 名

金ナノ微粒子を用いた高感度 DNA センサーに関する研究

従来用いられる、蛍光法による DNA チップでは、蛍光分子を化学修飾した検体 DNA をガラス基板上の複数のプローブ DNA とハイブリダイゼーションさせ、基板上での蛍光分子の蛍光を検出する。しかし、この手法では検体 DNA への蛍光分子の修飾の程度が検出精度におおきく影響し、再現性や定量性を落とす原因となる。また、蛍光分子の光退色などの蛍光法による DNA チップは原理的な問題を多くかかえている。

そこで本論文では、検体への蛍光分子などの化学修飾の必要がなく、診断誤差を本質的に抑制できるハイブリダイゼーションの検出手法として、表面プラズモン共鳴 (SPR) 分光法を検出原理とする DNA センサーの研究を行っている。一般的に、SPR 測定による DNA センサーでは、金基板表面に固定した一本鎖 DNA をプローブ DNA として用い、検体 DNA とのハイブリダイゼーションを検出する。この手法では、検体 DNA への蛍光や放射性物質の標識なしに検出でき、DNA ハイブリダイゼーションの吸着過程の in-situ 測定も可能である。さらに、入射光の直径を広げ基板全体に光を照射し、その反射光を CCD カメラで検出すれば金薄膜表面における、複数のプローブ DNA によるハイブリダイゼーションの一括検出で検出できるなどの利点がある。しかし、ハイブリダイゼーションによる SPR 応答が小さく検出感度が低い。そこで、本論文では SPR 測定の利点を損ねることなく、DNA ハイブリダイゼーションの検出感度を上昇させるために、金微粒子修飾プローブ DNA を用いた DNA センサーの開発を行っている。金薄膜基板上に固定した一本鎖 DNA の末端に金ナノ微粒子を抗原抗体反応により修飾し、これをプローブとして用いてハイブリダイゼーション検出を試みている。その結果、金微粒子修飾プローブ DNA を用いることで、DNA ハイブリダイゼーションの in-situ 測定で、検体 DNA 濃度 $10 \mu\text{M}$ - 1 pM という 7 桁にもおよぶ広いダイナミックレンジでの定量的な検出を可能としている。さらに、DNA 塩基の 1 塩基のミスマッチを判別することに成功している。

本論文は 6 章から構成されている。以下に各章の概要を述べる。

1 章では、ポストゲノム研究とテーラーメイド医療について解説し DNA チップの重要性について述べられている。そして、これまでに報告されている、代表的な DNA ハイブリダイゼーションの検出手法を紹介している。また、表面プラズモン共鳴の理解を助けるために近接場光学についても解説されている。その上で、本論文を行う意義、目的について述べられている。

2 章では SPR 角度スキャンや、SPR イメージング測定、また in-situ SPR 測定システムについて説明されている。また、SPR 角度スキャンの解析手法としてフレネルフィッティングについても述べられている。

3章では SPR 測定に用いる金薄膜基板の作成方法について検討を行っている。基板となるガラス基板の洗浄法や、金薄膜の作成条件についての検討が行われている。また、金薄膜厚を原子間力顕微鏡を用いて測定し、SPR カーブのフレネルフィッティングより金薄膜の複素屈折率を算出している。

4章では金薄膜表面に DNA 単分子膜を作製し、その評価を SPR 測定により行っている。金薄膜の熱処理による DNA 単分子の基板表面への修飾量の評価や、検体の非特異的な吸着を防ぐための表面修飾を検討している。

5章では、金微粒子修飾 DNA 単分子膜の作製と評価を行っている。金微粒子修飾プローブ DNA でのハイブリダイゼーションで金微粒を修飾することにより、修飾なしの場合と比べて、SPR 角度シフトが増大することを示している。また、ハイブリダイゼーションの in-situ SPR 測定を行い、その検出限界が検体 DNA 濃度 1pM であることを示し、さらに、検体 DNA 濃度 $10\mu\text{M}$ –1pM での非常に広い検定濃度での定量測定を成功させている。

6章ではこれまでの研究成果をまとめて総括とし、今後改善すべき点をあげそれらに対する方策を提案されている。

これを要するに、著者は、SPR 測定を検出原理とした DNA センサーについて検出感度増大手法の新知見を得たものであり、遺伝子解析技術に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。