

トンネル電流ランダムシーケンス法による マイクロ RNA/DNA 識別

Tunnel-Current based Random Resequencing for Micro RNA/ DNA Profiling

阪大産研 ○大城敬人, 筒井真楠, 古橋匡幸, 龍崎奏, 横田一道, 谷口正輝, 川合知二

Osaka University ISIR, Takahito Ohshiro, Makusu Tsutsui, Masayuki Furuhashi, Soh Ryuzaki,

Kazumichi Yokota, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai

E-mail: toshiro@sanken.osaka-u.ac.jp

1. 緒言

高速・高精度かつ低コストに個人の遺伝情報を読み取ることのできる次世代 DNA シーケンスの開発は, 近年世界中でしのぎを削っている. 本研究室では, 単分子 DNA 鎖を微小ギャップ電極によって電気計測する方法論を提案しており, これまでにトンネル電流を指標として核酸塩基種全種と主要な後天的修飾塩基種をコンダクタンスの値の違いから識別可能であることを示している. さらにこの核酸塩基認識能を用いて, DNA および RNA のオリゴマー鎖の分子シグナルを得ることで, 配列情報を読み取り, 生理的に重要なマイクロ RNA の識別能を検討している.

本研究では, マイクロ RNA の let7 ファミリーの電気シグナルの違いにより識別・定量法について計測法および解析方法について検討した.

2. デバイス作製および測定条件

計測に用いる nano-MCBBJ の作製はリン青銅基板表面にポリイミド膜をスパインコートし, その上に電子線描画法および RF スパッタ法を用いて, 金ナノ接合を形成する. その後, ポリイミドのエッチングを行い, free-standing な金ナノ接合を作製する. この金ナノ接合を自己破断後, ピエゾ素子をもちいて電極間距離をトンネル電流測定可能な距離 (0.75 nm) に固定し, 電気計測を行った. 試料となる核酸塩基モノマーおよびオリゴマー水溶液は, ナトリウム塩をリン酸緩衝溶液中に 1μM の濃度となったものを用い, 室温・大気圧下で計測を行った. 高速電気計測 (10k~1MHz) で単分子計測を行った. 試料核酸塩基鎖としては, マイクロ RNA let7 ファミリー(let7a,c,e,f)およびそれと同一配列を持つ DNA 鎖を用いた. 混合試料については,

let7a および let7c の濃度比を変え, 全体を 1μM にしたものを用いた.

3. 結果・考察

溶液中の核酸塩基鎖は, ナノギャップ電極間を通る時, 分子を介したトンネル電流が流れるため, 分子由来の電氣的なシグナルが計測される. この分子シグナルは, すでに報告した核酸塩基モノマーの固有コンダクタンスをもとに, 通過した核酸塩基分子種の識別を行った. 観察した DNA / RNA 鎖の核酸塩基 1 つあたりの計測時間を指標に, ナノギャップ電極間に流れる核酸塩基種を順次決定し, 核酸塩基鎖の配列の一部をよみ, 分子シグナルの各重複配列をつなぎ合わせて再構成して得られた配列が, 試料核酸塩基鎖の配列と一致することから, let7a, c, e, f のリシーケンシングできることが分かった. さらに, 複数のマイクロ RNA ファミリーの配列の試料を混合したものについて, 塩基変異部分を読み取ったロングリード部のシグナル解析をすることで, 混合濃度比に応じた量的な評価が可能であることが可能であることがわかった.

3. 結言

今回, 分子サイズの微小ギャップ電極を用いた DNA の核酸塩基分子を識別とその配列情報を読み取りにより, マイクロ RNA 識別および定量評価について検討を行い, 類似配列を持つ核酸塩基種について評価可能であることが示された. 今後こうしたトンネル電流に基づく電気計測デバイスに, 分子の流動・配向制御を目的としたナノポアおよび流路を追加し, 長い鎖長の遺伝子鎖をよむ行う予定である.