

トンネル電流計測に基づく後天的修飾核酸識別法の開発

Development of Tunnel-Current based detection

for Epigenetic modification of oligonucleotide

阪大産研 ○大城敬人, 横田一道, 龍崎奏, 谷口正輝, 川合知二

Osaka University ISIR, Takahito Ohshiro, Kazumichi Yokota, Soh Ryuzaki, 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 シーケンサの開発は, 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[1].

本研究では, 後天的修飾核酸塩基種のモノマーの各特性コンダクタンスを計測し, その値をもとに, 配列中の後天的修飾核酸をふくむ配列決定を試みる[2]. 従来よりも高精度・高選択性を要するため, 計測デバイスについては, 単分子識別能をもつ流路付与・非対称電極を用いることで, ロング・ライトリードの確率を促進する分子制御付きデバイスによる単分子計測法を確立し, これを用い主に DNA メチル化を対象とした測定を行い, 解析アルゴリズムを含めた配列決定・識別法開発を行った.

2. デバイス作製および測定条件

計測に用いる nano-MCMBJ の作製はシリコン基板表面にポリイミド膜をスピコートし, 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. その後 SiO₂ の CVD 膜を形成後, 流路を RIE エッチングにより作成した. 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. 試料となるメチル化シトシン, アデニン等の核酸塩基モノマーおよびメチル化シトシンを含む DNA 水溶液は, ナトリウム塩をリン酸緩衝溶液中に 1 μ M 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. 高速電気計測で単分子計測を行った.

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, 分子由来の電気的なシグナルが計測される. この時, 通過する核酸塩基の種類が転移するごとにコンダクタンス変化が起こる. たとえば, メチル化サイトの指標となるメチル化シトシン(mC)は, DNA のグアニンモノマー(dG)に対して, 1.21 となる. この核酸塩基モノマーとの相対的なコンダクタンス値をもとに, 通過した核酸塩基分子種の識別し, リード方向の時間変化やリード数の変化について統計的解析を行った. これにより開発した流路構造を付加し, 電極形状を非対称にしたデバイスでは, リーセンスに必要なロングリードの割合が上昇することが示された. 得られたシグナル解析では, 各核酸塩基種の確率密度関数をもとに, アサインを行うが, 後天的修飾核酸(ここではメチル化シトシン)では確率密度関数の相対確立について, 存在比を考慮した解析アルゴリズムに基づいて, シグナルのリード配列を決定した. このシグナルの各配列番号ごとのコンダクタンスをプロットして作製したコンダクタンスプロファイルは, 試料配列と同等となった.

3. 結言

今回, トンネル電流に基づく電気計測デバイスに, 計測デバイスおよび解析アルゴリズムの開発を行い, DNA 中のメチル化シトシンを識別に成功した.

関連論文 [1] *Sci.Rep.*, 2012;2, 501. [2] *J Am Chem Soc.* 2011 Jun 15;133(23):9124-8.