

ナノインプリント製フォトニック結晶を用いたメチル化シトシン検出

Detection of DNA methylation using nanoimprint lithography-based photonic crystal

阪公大工 中島 悠佑, 川崎 大輝, 末吉 健志, 久本 秀明, [○]遠藤 達郎

Osaka Metropolitan Univ., Yu Nakajima, Daiki Kawasaki, Kenji Sueyoshi, Hideaki Hisamoto,

[○]Tatsuro Endo

E-mail: t_endo@omu.ac.jp

[背景・目的]

DNA のメチル化は、細胞の分化や老化、癌化等に関与することが知られており[1]、その多くはシトシンとグアニンが存在する領域においてシトシンにメチル基が付加（メチル化シトシン）されたものである。メチル化シトシンを検出することは、生命現象の解明や、疾病の診断への応用が期待できる。しかしメチル化シトシン検出には、バイサルファイト法が広く用いられているが、大型・高額な装置、煩雑な操作が必要という課題があった。

一方で我々は、ポリマー表面へナノ構造を転写する技術であるナノインプリントリソグラフィを用いて、ナノメートルサイズの周期構造を有する光学素子「フォトニック結晶(Photonic crystal: PhC)」を簡便・安価に作製することに成功している。加えて作製した PhC は、周辺の屈折率変化に対して鋭敏に光学特性変化を示すことから、バイオセンサーへの応用にも成功している。

これまでの我々の実績から本研究では、前述した課題を解決するためナノインプリント製 PhC を用いたメチル化シトシン検出を行ったので報告する。

[実験方法]

本研究では、Cycloolefin polymer (COP)を基材としたピラーアレイ構造（三角配置、直径・ピッチ：230 nm、深さ：200 nm）を有するナノインプリント製 PhC を用いた。また高感度にメチル化シトシンを検出するために PhC 表面へ液相析出法を用いて TiO₂層を堆積させた。TiO₂層堆積後は、0.5 % (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilane および 2.5 % (v/v) Glutaraldehyde を用いて表面へアルデヒド基を導入し、アミノ基末端プローブ DNA を導入・固定化した。なお、未反応のアルデヒド基は、100 mM 2-Aminoethanol にて不活性化させた。

メチル化シトシンの検出には、プローブ DNA の配列に対して①相補的、②非相補的、③メチル化シトシンを導入した相補的、な配列を有するターゲット DNA 溶液をそれぞれ 1 μ M に調製し、プローブ DNA 固定化 PhC 表面へ滴下、ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後は、PhC の反射スペクトル観察を行った。

[実験結果]

作製した PhC は、相補的・非相補的な配列で顕著な光学特性変化の差を観察することができたが、メチル化シトシンの有無では差異を観察することはできなかった。そこで、ハイブリダイゼーション後にメチル化シトシンに対して特異的に結合する抗メチル化シトシン抗体を導入した結果、メチル化シトシンの有無によって差を観察することができた。これは、メチル化シトシンへ抗体が結合することにより、PhC 周囲の屈折率変化が誘起されたためと考えられる。以上の結果からナノインプリント製 PhC を用いてメチル化シトシン検出が可能であることが明らかとなった。

[参考文献]

[1] B. E. Bernstein *et al.*, *Cell*, **2007**, 128, 669-681.