マイクロ・ナノマシーニングを用いた生体単分子マニュピレーション法の開発

Dvelopment of micro electro mechanical system for single molecule manipulation

研究代表者 東京大学生産技術研究所 産学官連携研究員 久米村百子

[研究の目的]

近年、バイオ MEMS の分野においては、特定 の機能を持つ生体分子をデバイスに導入するこ とによって、機械・電気的デバイスとして利用 しよういう試みがなされている。機能性分子と マイクロ・ナノマシーニングの融合により、ナ ノテクノロジーの目指す高機能性微細構造が可 能になると期待されている。しかし、複数の機 能を持つそれぞれの分子を、デバイス内の任意 の場所に置くためには、物理的に分子を制御す ることが必要と考える。そこで本研究では、マ イクロ・ナノマシーニングによって作製したフ ルイディクスデバイス内で生体分子を単分子に 分離し、微小なピンセットにより捕獲・マニュ ピレーションする方法を確立することを目的と した。

[研究の内容、成果]

#### マイクロ・ナノフルイディクスデバイスの設計

本研究で提案するマイクロ・ナノフルイディク スデバイスは、幅の異なるチャネルを組み合わせ たデザインを有し、チャネルの構造によって分子 の分離(振り分け)を達成しようとするものであ る。つまり、分子一個が通れるような微小なチャ ネルを作り、これに順々に分子を通過させる。対 象とする分子は、生化学の基礎実験で頻繁に用い られており、購入しやすいλ-DNA(48k bps, Takara) を用いることとした。λ-DNA は直径 2nm、長さ 16µmの高分子であり、分子全体は電気的に負の状 態になっている。 チャネル層の材質には、Poly(dimelylsiloxane) (PDMS)を選択した。PDMS は、無色透明な粘性の 高いポリマーであり、加熱によって硬化するため、 モールディングによりマスターのパターンを転写 することができる。生体分子を扱うマイクロデバ イスの基板として頻繁に利用されている。また、 チャネル内での DNA の駆動方法には、電気泳動 を採用した。DNA は電気的に負に帯電しているた め、陰極から陽極へ泳動させることができる。そ のため、電気泳動のための電極を、ガラス上にパ ターニングすることとした。

### マイクロ・ナノフルイディクスデバイスの作製

チャネル層の作製方法を以下に示す。シリコン 基板にレジストを塗布し、ホトリソグラフィによ りチャネルのデザインをパターニングした。Deep Reactive Ion Etching (DRIE)によりチャネルの深さ に相当する距離をエッチングした。これをが鋳型 となる。鋳型のシリコン基板をアセトンで洗浄し た後、PDMS (Dow Corning Toray, Silpot 184)を流し 込み、100℃7分の条件で固化させた。完成した PDMS シートに、円筒形のパンチを使って、試料 をチャネルに導入するためのアクセスホールを開 けた。

電極層の作製方法を以下に示す。(1)ガラス基板 (Matsunami, NEO)をアセトン浴で超音波洗浄、 (2)ネガレジスト(Zeon, ZPN1150-90)を 5000rpm, 60sec. の条件でスピンコート、(3)アルミニウムを 蒸着(50nm)、(4)アセトンに浸し、超音波によりリ フトオフ。 以上の手順で作製したチャネル層と電極層を、 マスクアライナー(ユニオン光学)を用いて、アラ イメントしながら両ウエハの距離を徐々に近づけ、 張り合わせた。作製したマイクロ・ナノフルイデ ィクスデバイスを図1に示す。



図1 マイクロ・ナノフルイディクスデバイス

# DNA 分子振り分けの実験方法

全ての実験は、倒立顕微鏡(Olympus, IX-71)のス テージ上で行い、イメージインテンシファイア (Hamahatsu photonics, C9016-1)とカメラ(DAGE MTI, CCD-300-RCX)を接続して画像を取得した。 DNA の様子を観察するために、蛍光染料の YOYO-1(molecular probes)を加えた。YOYO-1の濃 度は、DNA 濃度に対して約 1000 倍とした。

マイクロピペットを使って、チャネル層のアク セスホールに超純水を入れ、チャネルが水で満た されるのを確認したのち、DNA 水溶液 2µL を片 方のアクセスホールに入れた。直流電圧を印加し、 DNA がチャネル内を電気泳動する様子を観察し た。

# チャネルサイズの最適化

λ-DNA 一分子ずつをマイクロチャネルに通過 させるため、チャネル幅 800nm から 2µm におい て数種類のマイクロチャネルを作製し、DNA 通過 の実験を行った。幅 800nm のチャネルを用いた場 合は、DNA はほとんど通過しなかった。この原因 は、電気浸透流の影響や、DNA の粘性抵抗などに よるものではないかと考える。幅 1µm×深さ 2µm のチャネルの場合、実験を始めて10分程度はDNA が通過する様子が観察されたが、実験時間が経過 するに従って、DNA がチャネル入り口で留まるよ うになった。これはチャネル表面の電気的状態が 変化し、DNA が阻害を受けているのではないかと 考える。幅 2µm×深さ 4µm のチャネル 10 本を並 列に並べたチャネル層(図 2)を用いた場合、電 気泳動によって DNA 分子を通過させることがで きた。このチャネル層を用いて DNA 振り分けの 効率を評価した。



図2 マイクロチャネル(中央) サイズ:幅2µm×深さ4µm×長さ50µm

### DNA 分子の振り分け効率の評価

マイクロ・ナノフルイディクスデバイスを用い た DNA 分子の振り分け効率を、チャネルを通過 する DNA 個数を計測することによって評価した。 この実験に用いたチャネルは、幅の広いチャネル (アクセスチャネル)と狭いチャネル (マイクロ チャネル)から構成されており(図2)、アクセス チャネルは、幅 300µm×深さ4µm、マイクロチャ ネルは、幅 2µm×深さ4µm である。電圧印加に より、DNA が電気泳動することを確認した後、0.5 ~4V の範囲で、アクセスチャネルとマイクロチャ ネルを通過する DNA 個数を数え、比較すること で、本デバイスの分子振り分け効果を評価した。 具体的には、それぞれのチャネルの断面を単位時 間あたりに通過する DNA の個数を計測した。図3 に結果を示す。

図3より、マイクロチャネルを通過する個数は アクセスチャネルを通過する個数より、約20分の 1 に減少していることがわかる。これは、DNA の 電気泳動の流れと、電気浸透流の流れの関係から 生じると考える。DNA は陽極から陰極へ流れるが、 電気浸透流は逆向きである。電気浸透流は、ガラ スなどの表面で起こる流れなので、チャネルの比 面積(面積/体積)が大きくなるほど、効果的にな る。本実験で用いたデバイスの場合、マイクロチ ャネルの比表面積は、((0.002×0.05×2+0.04×0.05 ×2)/(0.004×0.002×0.05mm3)) = 1.5×103mm<sup>-1</sup> と 算出される。アクセスチャネルの比表面積は、チ ャネル長さを 200µm とした場合(同様の計算によ り) 253.3mm<sup>-1</sup>になるため、マイクロチャネルはア クセスチャネルに対して、約 2.5 倍の比表面積を 持つことになる。



図3 単位時間の通過 DNA 個数 上:アクセスチャネル,下:マイクロチャネル

#### 平面電極による DNA 単分子の捕獲

鷲津らは、アルミニウムの平行な電極に高周波 の電圧を印加することによって DNA 分子を伸長 させ、捕獲する方法を報告している [1]。鷲津ら の提案した平面電極では、電圧が直接印加されな い部位があり [2]、電気的にフローティングとな っている。通常、2 本の電極に電圧を印加した場 合、電極からジュール熱が発生し、電極周辺に対 流が生じる。一方、フローティング電極の周辺に は対流は生じないために、水溶液中の DNA が、 対流に巻き込まれて電極から遠ざかることはない。 このデザインを参考に、マイクロ・ナノフルイデ ィクスデバイス内に作り込んだ平面電極間への捕 獲を試みた。

平面電極のギャップ間隔は 10μm とした。 DNA がマイクロチャネルを通過し、電極付近に 達したのを確認して、捕獲用の平面電極に 0.9MV/mm の交流電圧を印加した。図に DNA が電極間に捕獲される様子を示す。DNA 分子は、 伸長しながら片側の電極に付着したのち、電界 によって逆の末端が伸長し、最後に電極間に付 着した。



図4 電極間に固定される単分子 DNA

マイクロ・ナノフルイディクスデバイスと微小 ピンセットによる DNA 分子の捕獲実験

マイクロ・ナノマシーニングにより、微小ピン セットを作製した。ピンセットについても、一部 がフローティングになるように設計した。ピンセ ット作製で行う主なプロセスは、微細パターン形 成のためのホトリソグラフィー, SOI 基板のバル ク層を高いアスペクト比で加工するための DRIE、 ピンセット先端を鋭角にするための異方性エッチ ングである。詳細な微小ピンセットの作製方法に ついては省略する [3]。ピンセットをマイクロ・ ナノフルイディクスデバイスのホールに挿入し、 チャネルで振り分けた DNA 分子の捕獲を試みた。 マイクロチャネルから数十µm の距離にホールを 設け、微小ピンセットをマニュピレータを用いて アプローチした。ピンセットの先端は、顕微鏡に より観察することができる。DNA がチャネルを通 過するのを確認してピンセットに交流電圧を印加 すると、DNA はピンセット先端には集まらず、上 方(z 軸方向)に流れる様子が観察された。これ は、ピンセットの上方も水に浸されているため、 電界による水流の向きが複雑になっているためと 考える。マイクロ・ナノフルイディクスデバイス 内では、チャネル高さが 4µm と固定されているた めに、DNA の垂直方向の動きはほとんど制限され る。しかし、ホール内では DNA の動きは三次元 になるために観察することも困難であった。

[今後の研究の方向、課題]

本研究では、マイクロ・ナノフルイディクスデ バイス内で DNA 分子を単分子に効果的に振り分 けることに成功した。また、デバイス内で単分子 を捕獲することができた。しかし、立体的な微小 ピンセットによる単分子の捕獲には至らなかっ た。これを達成するためには、ピンセットを挿入 する部分を数µm までに小さくし、DNA の動きを できるだけ制限する必要があると考える。

# [文献]

 M. Washizu, "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Trans. Ind. Appl., 26, pp.1165-1172, (1990).

- [2] M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki, & N. Shimamoto, "Applications of electrostatic stretch-and-positioning of DNA", Ind. Appl. IEEE Trans., 31, pp.447-456, (1995).
- [3] G. Hashiguchi, T. Goda, M. Hosogi, K. Hirano, N. Kaji, Y. Baba K. Kakushima, and H. Fujita, "DNA manipulation and retrieval from an aqueous solution with micromachined nanotweezers" Anal. Chem., 75, pp.4347-4350, (2003).

# [成果の発表、論文等]

マイクロチップを用いた単分子λ-DNAの捕獲, 久米村百子, 榊直由, Christophe Yamahata, 橋 口原, Dominique Collard, 藤田博之, 第15回化 学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2007年5 月25,26日, 東北大学