

顕微赤外分光法によるポーラスシリコン 表面上における DNA 分子の検出[†]

山口僚太郎*・石橋健一*・白木宏一*・宮本浩一郎*

木村康男*, **, 石井久夫*, **, 庭野道夫*, **

*東北大学電気通信研究所 ナノ・スピン実験施設 ☎ 980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

**戦略的創造科学推進事業 (CREST) ☎ 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉山 04

(2005 年 4 月 25 日受付; 2005 年 7 月 14 日掲載決定)

Detection of DNA Molecules on Porous Si Surfaces by Infrared Spectromicroscopy

Ryotaro YAMAGUCHI*, Ken-ichi ISHIBASHI*, Hirokazu SHIRAKI*, Ko-ichiro MIYAMOTO*,

Yasuo KIMURA*, **, Hisao ISHII*, ** and Michio NIWANO*, **

*Laboratory for Nanoelectronics and Spintronics, Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University,
2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577

**CREST, Japan Science and Technology Corporation, 04 Aoba-yama, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579

(Received April 25, 2005 ; Accepted July 14, 2005)

A method is described for the detection of DNA hybridization on porous Si thin film, based upon the pairing of oligonucleotide chemistry and the silicon nano-technologies. A porous Si thin film with a pore diameter of approximately 25 nm was synthesized by anodizing a highly doped, n-type Si crystal in a dilute hydrofluoric acid (HF) solution. The surface of pores in the porous Si film was converted to the DNA-modified surface, on which single-stranded DNA molecules are covalently attached. Infrared spectromicroscopy was employed to monitor the hybridization of DNA immobilized on the pore surface with its complementary DNA. In our method, labeling of target DNA with fluorophore probes is not necessary. We demonstrate that DNA hybridization on porous Si thin film can be detected with high sensitivity by analyzing IRAS spectral profiles, suggesting potential utility of our method in DNA sensing chips.

1. はじめに

DNA チップ¹⁾は、遺伝子の発現解析や、癌や遺伝病などの予防・診断などのために開発された一種のバイオ・センサであり、テーラーメイド医療の実現のために、今後ますますその需要が増していくと考えられる。と同時に、その性能の更なる向上が要求されている。現在広く用いられている DNA チップは、ガラスやシリコン(Si)などの基板上に、塩基配列が既知の、さまざまな 1 本鎖の DNA (これをプローブ DNA と呼ぶ) を斑点 (スポット) 状に付着させたものである。それぞれのスポットには一定の塩基配列の DNA が多数固定化されている。

このチップに、ヒトの細胞などから抽出してきた DNA (これをターゲット DNA と呼ぶ) を作用させると、基板上のプローブ DNA と塩基配列が相補的なターゲット DNA のみがハイブリダイゼーション (相補対形成) 反応を起こして基板上に付着し、相補的でないものはチップ表面を洗浄することにより除去される。どのスポットに DNA が付着して残っているかを調べることで、そのヒトがどのような遺伝子発現を起こしているかがわかる。現在一般的に用いられている DNA チップでは、DNA 付着の判定に蛍光標識法を用いている。予め、ターゲット DNA に蛍光色素を標識しておけば、蛍光顕微鏡によって、どのスポットにターゲット DNA が残っているかを判定できる。この手法は、高価な蛍光色素が必要で、また標識する操作が必要であるため時間がかかることや、再現性に乏しいといった欠点がある²⁾。そのため、

[†] 第 24 回表面科学講演大会 (2004 年 11 月 8 日~11 月 10 日) にて発表

E-mail: niwano@riec.tohoku.ac.jp

蛍光色素標識を必要としない、新しいハイブリダイゼーション判定法の開発も精力的に行われている。

われわれは、蛍光色素修飾を用いない方策の1つとして、赤外分光法を用いる方法を提案している。赤外分光法を用いると、DNA ハイブリダイゼーション反応をDNA 塩基部の振動スペクトル解析から検知できるため、蛍光標識を必要としない。我々は最近、多重内部反射型赤外分光法(MIR-IRAS)を用いて、実際に溶液中のDNAのハイブリダイゼーション反応を「その場」観察することに成功し、赤外分光法のDNA 反応解析法としての有用性を示している³⁾。しかし、このMIR-IRASは高感度計測法であるが、赤外光をSi基板内部で多数回反射させる必要があるため、比較的長い光路長(数十ミリ程度)を必要とする。したがって、DNAチップで要求されるような、基板上的微小領域(数十ミクロン程度)のDNA分析には不相当である。そこで、われわれは、このような微小領域を解析するためには、十数ミクロン程度の領域を分析できる顕微赤外分光法が有効であると考え、さらに、スペクトルのS/N比を向上させるために、チップ基板としてポーラスシリコン(Por-Si)を用いることを提案する。本研究では、この手法の有効性を実験的に調べ、その結果、 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ という微小領域でDNAハイブリダイゼーション反応が高感度で検出できることを確かめた。この結果は、ポーラスシリコンをベースとした赤外分光DNAチップの実現可能性を示唆するものである。また、赤外分光の利点として、チップ上のプローブDNAの固定化状態をその場で前検査できる点もあげられる。DNAの固定化状態の検査は再現性のある解析結果を得るために必要不可欠である。そこで本稿では、ポーラスシリコン表面上のDNA固定化過程についても、顕微赤外分光法で調べた結果を示す。

2. 実 験

2.1 ポーラス Si 薄膜作製

Por-Si 薄膜の作製過程を Fig. 1 に示す。基板として比抵抗 $\leq 0.02 \Omega \cdot \text{cm}$ のCZ n⁺型Si(100)ウェーハを用いた。一般に、高ドーパ量Si基板を陽極化成(anodization)すると、直径50 nm以下の枝分かれない直線状の孔(pore)が生成される^{4, 5)}。まず、Si基板をRCA洗浄した後、フッ酸(HF)により水素終端処理を施し、その後、基板の裏面に金(Au)薄膜(電極)を堆積し熱処理を行った。このAu電極を通して背面より可視光を照射しながら、HF:エタノール=1:1の混合溶液中において、印加電流密度40 mA/cm²で10分間陽極化成を行い、膜厚がおおよそ20 μm のPor-Si薄膜を形成した。次に、電解溶液のHF濃度を下げ(HF:エタノール=1:6)、

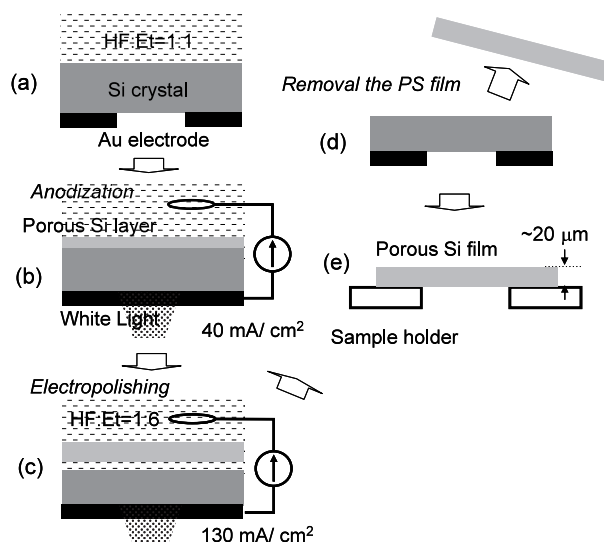
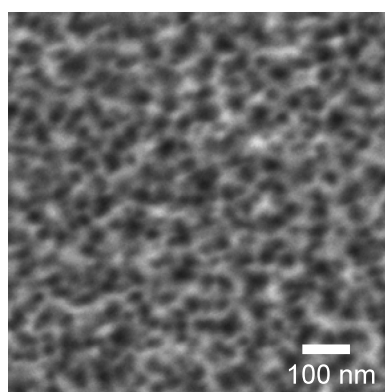


Fig. 1. Procedure for the formation of a porous Si film.

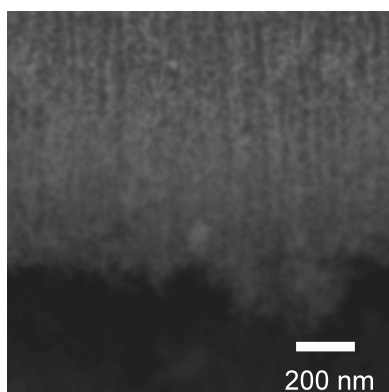
印加電流密度を130 mA/cm²に上げ、電解研磨を5分間行うことによりPor-Si薄膜を剥離した⁶⁾。その後、その剥離したPor-Si薄膜を支持板(アクリル基板)にエポキシ樹脂で糊着した。作製したPor-Si薄膜のSEM写真をFig. 2に示す。Fig. 2(a)より孔径は25~30 nmであることがわかる。これは、20塩基長程度のDNA(長さ約6.4 nm)の大きさよりも十分大きい孔径である。また、Fig. 2(b)より、孔には枝分かれはほとんどなく、直線状に成長していることがわかる。したがって、作製したPor-Si薄膜は、短塩基長のDNAであれば孔につきまり難いと判断した。

2.2 DNAの固定化法とハイブリダイゼーション

Por-Si薄膜の表面修飾法とDNA固定化法の一連の反応プロセスをFig. 3に図示する。作製した直後のPor-Si薄膜の孔表面は水素終端されているため^{4, 5)}、Fig. 3(a)に示すように、まず大気下で波長254 nmの紫外線(UV)を約7時間照射し、有機汚染物の除去と酸化膜の形成を行った。次に、Fig. 3(b)に示すように、窒素雰囲気下において、メタノールを溶媒とする3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン(MPTMS)の2 vol %溶液に12時間浸漬し、Fig. 3(c)に示すような、表面にSH基を持った自己組織化膜(self-assembled monolayer, SAM膜)を形成した⁷⁾。反応していないMPTMSを重水で洗い流した後、5'末端がチオール化された、アデニン20塩基の一本鎖DNA(dA₂₀)の重水溶液に、室温で約24時間浸漬した。この処理により、SAM膜のSH基とDNAのSH基が反応してS-S結合が形成され、Fig. 3(d)に示すように、一本鎖DNAが孔表面に固定する。固定化されていないDNAは、重水に一定時間浸漬することによ



(a)



(b)

Fig. 2. SEM images of a Por-Si film. (a) Top view and (b) cross section.

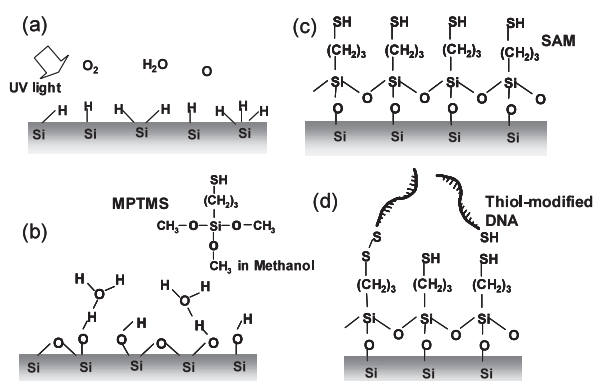


Fig. 3. Reaction scheme for immobilization of DNA on Por-Si surface.

り除去した。

固定化したDNAと相補的なチミン20塩基DNA (dT₂₀)を溶かした、濃度2Mの重水希釈NaCl溶液に、Por-Si薄膜を24時間浸漬し、ハイブリダイゼーションさせた。その後、余剰のdT₂₀をNaCl溶液で洗い落とし

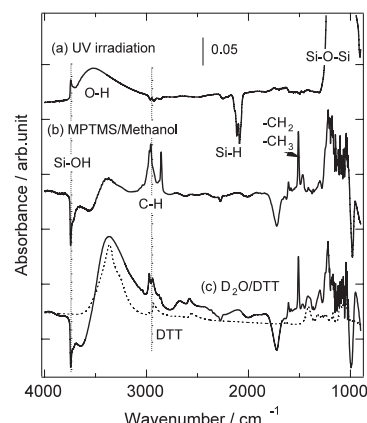


Fig. 4. IR spectral change caused by (a) UV illumination, (b) immersion of the oxidized pore surface into 2 % MPTMS in methyl-alcohol, and (c) a subsequent rinse of the MPTMS-adsorbed surface with a solution of DTT in D₂O.

た。

Por-Si 薄膜の孔表面の化学状態の変化を調べるために、それぞれの表面処置プロセスごとに、顕微赤外分光器 (Nicolet 670+Continuum) を用いて、 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ の領域の同一箇所における赤外吸収スペクトルを逐次測定した。赤外線検出器は MCT (HgCdTe) 検出器を用い、分解能は 4 cm^{-1} とした。本研究では、溶媒として水ではなく重水を用いた。その理由は、 H_2O の変角モードによる赤外吸収ピークが $1,650 \text{ cm}^{-1}$ 付近にあり、そのピークが DNA の塩基部による吸収ピーク (C=O, C-N, C=C の伸縮振動などに因る) と重なるためである。因みに、重水の対応するピークは $1,230 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れ、塩基部に起因したピークと全く重ならない。

3. 結果と考察

3.1 DNA の固定化

Fig. 4 (a) に、作製した Por-Si 薄膜に UV を照射したときの赤外吸収スペクトルの変化を示す。参照スペクトルは UV 照射前の薄膜の吸収スペクトルである。UV を照射すると、 $2,000 \text{ cm}^{-1}$ 付近の Si 水素化物 Si-H による吸収ピークが減少し、 $1,100 \text{ cm}^{-1}$ 付近の Si 酸化膜の Si-O-Si の格子振動による吸収スペクトルが増大している。また、 $3,740 \text{ cm}^{-1}$ 付近の幅の狭いピークは、表面上の Si-OH によるもので、このピークも UV 照射によりピーク強度が増大している。これらの結果から、UV 照射前の孔表面は水素化物 Si-H で覆われているが、UV 照射後では、**Fig. 3** (b) に示すように、孔表面は水酸基-OH と酸化膜で覆われていることが確かめられた。UV 照射前の孔表面は水素終端されているため、疎水性である。このような表面には、有機物が吸着し易いことが知られて

いる。2,800~3,000 cm^{-1} 付近の C-H 伸縮振動によるピークの減少は、孔表面に吸着していた大気中の有機物が UV 光照射により分解されたことを示している。

UV 照射後の Por-Si 薄膜を MPTMS 溶液処理したときの赤外吸収スペクトルの変化を Fig. 4 (b) に示す。参照スペクトルは UV 照射後の薄膜の吸収スペクトルである。2,800~3,000 cm^{-1} 付近の一群のピークは、メチル基 (-CH₃) とメチレン基 (-CH₂-) の C-H 伸縮振動によるものであり、1,510 cm^{-1} のピークは C-H 変角振動によるものである。一方、3,740 cm^{-1} 付近の Si-OH によるピークが大きく減少している。以上のスペクトル変化は、Fig. 3 (c) に示すように、MPTMS が孔表面上の Si-OH と反応して表面に吸着したことによると考えられる。MPTMS 溶液処理後に、ジチオトレイトール (C₄H₁₀O₂S₂, DTT) の重水溶液に 6 時間浸漬し、反応していない MPTMS を洗い流した。そのときの赤外吸収スペクトルの変化を Fig. 4 (c) に示す。参照スペクトルは Fig. 4 (b) と同じものを用いた。DTT 溶液洗浄した理由は、DTT は S-S 結合を切断する還元剤であることが知られており、浸漬中に SAM 膜表面の SH 基同士が反応して、S-S 結合を形成するのを防ぐ効果があるためである。比較のために、DTT 単体の吸収スペクトルを図中に点線で示した。3,400 cm^{-1} 付近に現れた幅の広いピークは、DTT の O-H の伸縮振動によるものである。DTT が表面付近に残存しているためと思われる。

一方、2,800~3,000 cm^{-1} 付近のスペクトル形状は大きく変化している。Fig. 5 にこの領域を拡大したスペクトルを示す。DTT 溶液処理により、-CH₃ の対称伸縮振動 (ν_{ss}) と非対称伸縮振動 (ν_{as}) によるピークの強度が小さくなっている。これは、表面-SH 基と反応しなかった MPTMS と、孔内に残留していたメタノール溶液が

洗い流されたためであると考えられる。メチレン基-CH₂ の対称伸縮振動 (ν_{ss}) と非対称伸縮振動 (ν_{as}) によるピークが強く現れていることは、アルキル鎖中のメチレン基が表面に残存していることを示すものであり、Fig. 3 (c) に示すような自己組織化膜 (SAM 膜) が形成されたことを示唆している。

表面処理の最終段階は、上述の SAM 膜上へのチオール化された 20 塩基長一本鎖 DNA (dA₂₀) の固定化である。Fig. 3 (d) に示すように、まず、Por-Si 薄膜を dA₂₀ の重水溶液に浸漬させ、S-S 結合により dA₂₀ を Por-Si 表面に固定化し、その後、重水で洗浄を行うことにより吸着していない (反応していない) DNA を洗い流した。まず、dA₂₀ の重水溶液に浸漬させたときの赤外吸収スペクトルの変化を Fig. 6 (a) に示す。1,645 cm^{-1} にアデニン塩基のプリン環変形モード由来のピークが観測される⁹⁾。Fig. 6 (b) に示すように、このピークは重水 (D₂O) に 12 時間浸漬したときに、半分程度にピーク強度が減少した。しかし、Fig. 6 (c) に示すように、24 時間浸漬しても 12 時間浸漬の場合とピーク強度が殆ど同じであった。また、MPTMS による処理を施さなかった Por-Si 薄膜は、チオール化された DNA (dA₂₀) と反応させても、わずか 2 時間重水に浸漬させただけでアデニン塩基によるピークは消滅した。これらのことから、DNA は SAM 膜を介して孔表面に固定化したことが確かめられた。通常の平坦な Si 基板を用いて、同様の DNA 固定化処理を施した場合には、1,645 cm^{-1} のアデニン塩基由来のピークは全く観測されなかった。このことは、多孔質化により実効的な表面積が桁違いに増大し、検出効率が大きく向上したことを示している。

3.2 DNA ハイブリダイゼーション

dA₂₀ を固定化した Por-Si 薄膜を、dT₂₀ の NaCl 重水溶

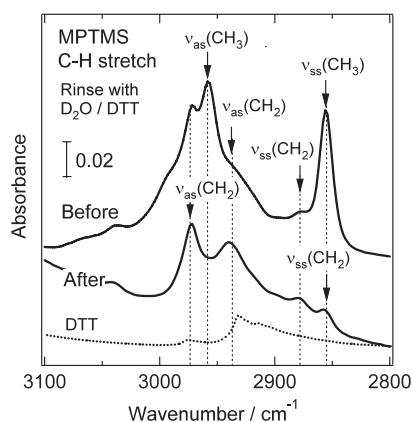


Fig. 5. C-H stretching vibration spectra of the MPTMS adsorbed Por-Si surface before and after a DTT/D₂O rinse.

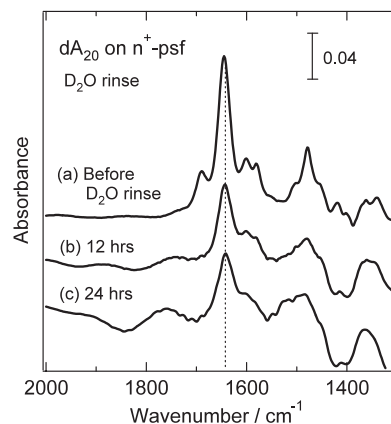


Fig. 6. IRAS spectra of the Por-Si film after (a) immersion in DNA solution and (b), (c) subsequent rinses in D₂O.

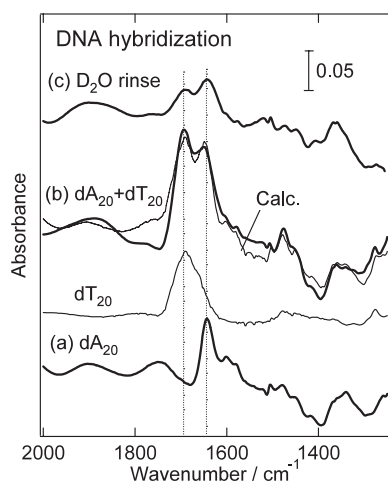


Fig. 7. IRAS spectra of the Por-Si surface (a) modified with DNA (b) immersed into NaCl solution containing dT₂₀ and subsequently rinsed in a solution of NaCl, and (c) after a D₂O rinse.

液に浸漬し、ハイブリダイゼーション反応させ、その後 NaCl 溶液、続いて重水で洗浄した。この一連の溶液処理によるスペクトル変化を Fig. 7 にまとめて示す。比較のために、表面処理していない Por-Si 薄膜に dT₂₀ の重水溶液を滴下して測定した、dT₂₀ の赤外吸収スペクトルを Fig. 7 に示す。Fig. 7 (a) は固定化した dA₂₀ のスペクトルで、Fig. 6 (b) と同じ状態のものである。Fig. 7 (b) は、dT₂₀ と反応させた後に NaCl 溶液で 12 時間洗浄し、dA₂₀ と結合していない dT₂₀ を洗い流した後の赤外吸収スペクトルである。ここで、NaCl 溶液を用いるのは、DNA はその骨格のリン酸基に負の電荷を持っており、陽イオンで電荷を中和することにより 2 本鎖構造を安定化させるためである。比較のために、固定化した dA₂₀ のスペクトルと、dT₂₀ のスペクトルを適当な比率で足し合わせて求めたスペクトルを Fig. 7 (b) のスペクトルに重ねて示した。計算スペクトルとの比較から、実測されたスペクトルは、dA₂₀ によるピーク (1,645 cm⁻¹) と、dT₂₀ によるピーク (1,700 cm⁻¹ 付近のチミン塩基の C=O による伸縮振動ピーク⁸⁾) の重ね合わせになっていることがわかる。このように、12 時間の NaCl 溶液洗浄後も dT₂₀ によるピークが残存していたことは、dT₂₀ が dA₂₀ と比較的強く結合していたこと、すなわちハイブリダイゼーションしたことを示している。

Fig. 7 (c) に示されているように、NaCl 溶液洗浄の後に重水で洗うと、dA₂₀ によるピークに比べ、dT₂₀ によるピークが大きく減少した。これは、浸漬する溶液中に陽イオンが存在しなくなったことから、DNA の二本

鎖構造が静電的な反発力により変性し、ハイブリダイゼーションしていた dT₂₀ が洗い流されたためであると解釈できる。このことは、Fig. 7 (b) に示したスペクトルはハイブリダイゼーションしている状態であることを裏付けている。図には示していないが、dT₂₀ の代わりに、dA₂₀ とは非相補的であるシトシン 20 塩基 (dC₂₀) を用いた場合には、NaCl 溶液によるわずか 3 時間程度の洗浄で、dC₂₀ 由来のピークは完全に消滅した。

4. ま と め

本研究では、Si 基板から剥離した Por-Si 薄膜を用いて、顕微赤外分光法により DNA の固定化とハイブリダイゼーション反応を観察した。その結果、50×50 μm² という微小領域で DNA ハイブリダイゼーション反応が高感度で検出できることが確かめられた。また、ポーラスシリコン表面上の DNA 固定化過程についても、顕微赤外分光法で詳細に調べ、プローブ DNA の固定化状態をその場で検定できることを示した。以上の結果は、ポーラスシリコンをベースとした赤外分光 DNA チップの実現可能性を示唆するものである。

現在、われわれは Si 基板上にポーラスシリコン層をスポット状に形成する技術を確立し、ポーラスシリコンを用いた新しい DNA チップ実現に向けた研究を続行中である。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金基盤研究 (課題番号 14205007) と戦略的基礎研究推進事業 (CREST) の援助で行われた。

文 献

- 1) G. Ramsay: Nature Biotechnol. **16**, 40 (1998).
- 2) 石森義男: 電気化学 **72**, 581 (2004).
- 3) K. Miyamoto, K. Ishibashi, K. Hiroi, Y. Kimura, H. Ishii and M. Niwano: Appl. Phys. Lett. **86**, 0503902 (2005).
- 4) R.L. Smith and S.D. Collins: J. Appl. Phys. **71**, R 1 (1992).
- 5) H. Föll, M. Christophersen, J. Carstensen and G. Hasse: Material Science and Engineering R: Report **39**, 93 (2002).
- 6) C.S. Solanki, R.R. Bilyalov, H. Bender and J. Poortmans: Phys. Stat. Sol. (a) **182**, 97 (2000).
- 7) M. Hu, S. Noda, T. Okubo, Y. Yamaguchi and H. Komiya: Appl. Surf. Sci. **181**, 307 (2001).
- 8) M. Tsuboi: Appl. Spectr. Rev. **3**, 45 (1969).