

伸張固定した DNA オリゴマーの STM 観察

(J S T¹, 阪大産研²) ○高見 知秀¹, 安立 京一¹, 田中 裕行^{1,2}, 川合 知二^{1,2}

【序】デオキシリボ核酸(DNA)は生物の遺伝情報を担う分子であり、その塩基配列には生命体に必要な情報が符号化されている。DNA シークエンシング[1]は遺伝情報を解析するための基本手段となっているが、サンガー法[2]など DNA 断片長を調べる方法が主流である。これに対して走査プローブ顕微鏡法で一分子 DNA の *in situ* 観察解析を行うことは、単に一分子シークエンシングが可能になるだけでなく、DNA 内の分子のマニピュレーションへの応用へと期待できる。

走査プローブ顕微鏡法において現在最も汎用な手法は原子間力顕微鏡法(AFM)であり、この AFM で DNA 螺旋を識別する分解能は達成されている[3]が、その先の塩基識別は困難である。これに対して走査トンネル顕微鏡法(STM)は、DNA 観察においても AFM よりも高い空間分解能を得ることが可能であり[4]、真空噴霧法で作製した DNA 試料を超高真空下で液体窒素温度において観察することにより、塩基が識別できる高い空間分解能が達成できる。[5] この高い分解能を、室温で大気中または固液界面など汎用性の高い環境で得るためには、DNA を伸張した状態で安定に基板表面に固定することが必要である。山本らはグラファイト表面に伸張した DNA を展開する方法を開発した。[6] しかしこの手法で作製した試料を STM 観察すると、螺旋までは確認できたが、DNA が基板に安定に固定されていないため、それ以上の分解能を得ることは困難であった。

そこで本研究では、居城と岡畑によって開発された手法[7]を応用して、DNA オリゴマーのリン酸部位にアルキルアミンを結合させる反応を、水と有機溶媒の界面で行って単分子膜を作製して、この単分子膜を基板に固定させる手法を開発した。この手法で作製した DNA-アルキルアミン複合体の単分子膜を 1 テラオーム以上の高インピーダンス STM で観察することにより、作製した単分子膜を破壊することなく塩基識別可能な空間分解能観察を達成したので報告する。

【実験】図 1 に本研究で開発した試料作製法を模式的に示す。劈開したグラファイト基板表面に六量体 DNA (AAATTT, A=アデニン, T=チミン) の水溶液を 0.1 μ l 滴下して 10 分間静置する。アルキルアミンのフェニルオクタン溶液をこの水溶液上に静かに滴下して、両液体界面での反応により DNA-アルキルアミン複合体の単分子膜を生成する。そして基板を 60°C に加熱しながら基板にフェニルオクタンを滴下してリンスすることにより、生成した単分子膜をグラファイト基板に固定する。

作製した基板の STM 観察は、RHK Technology 社の Besocke 型 STM ヘッド(ATM300)を専用コントローラ(SPM1000)で制御して行った。探針には汎用の PtIr 線の他に、電解研磨で作製した PtIr 探針や、タングステン探針を白金またはチタンで被覆した探針や、さらにこれらの探針表面をフッ素樹脂被覆した探針なども用いた。

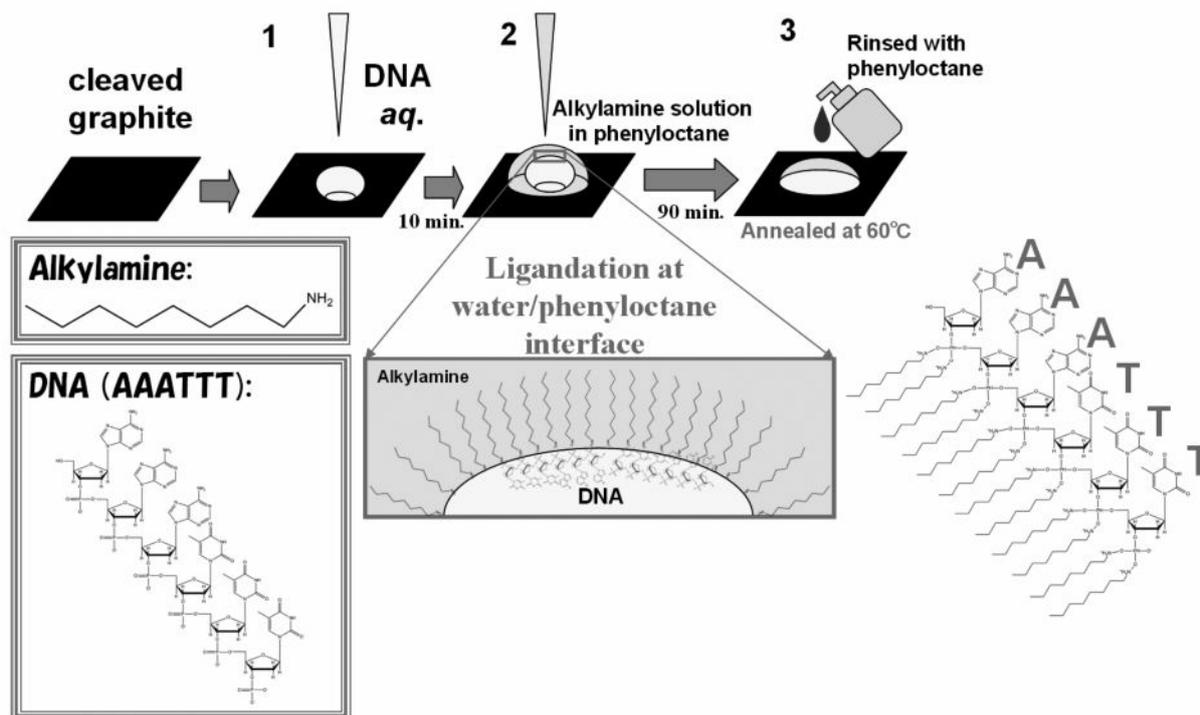


図 1 : DNA—アルキルアミン複合体の単分子膜を液体界面反応によって作製してグラファイト表面に固定する方法の模式図。詳細は本文参照。

【結果と考察】 作製した基板を STM で観察して得られた像を図 2 に示す。DNA—オクチルアミン複合体がグラファイト基板表面の $\langle 18 \ 1 \ 0 \rangle$ と $\langle 18 \ \bar{1} \ 0 \rangle$ の方位にエピタキシャル配向していることが、この像を解析して確認された。さらにこの像を詳細に解析した結果、DNA—オクチルアミン複合体はダイマーを形成した上でグラファイト表面において $7\sqrt{7} \times 7\sqrt{7}$ 周期構造をとっていることがわかった。この周期構造解析結果から、DNA はオクチルアミンと結合することで伸張した状態になってグラファイト表面に配列していると考えられる。

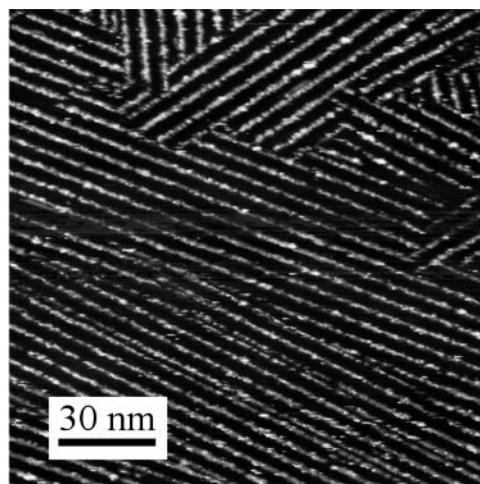


図 2 : DNA-アルキルアミン複合体の STM 像
バイアス電圧: 1 V, トンネル電流 0.2 pA

- [1] L. T. C. França, E. Carrilho, and T. B. L. Kist, *Quart. Rev. Biophys.* **35**, 169 (2002).
- [2] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 5463 (1977).
- [3] H. G. Hansma *et al.*, *Science* **256**, 1180 (1992); *Nucl. Acids Res.* **20**, 3585 (1992).
- [4] R. Gukenberger *et al.*, *Science* **266**, 1538 (1994).
- [5] H. Tanaka and T. Kawai, *Surf. Sci.* **539**, L531 (2003).
- [6] I. Yamamoto, T. Kanno, H. Tanaka and T. Kawai, *Jpn. J. Appl. Phys.* **42**, L559 (2003).
- [7] K. Ijiro and Y. Okahata, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1339 (1992).