

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32657

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13294

研究課題名(和文)超高速電圧制御によるナノポア内1分子操作を利用した生体高分子の分岐構造解析法開発

研究課題名(英文)Branch analysis of biopolymers based on voltage-controlled single molecule translocation across a solid-state nanopore

研究代表者

武政 誠 (TAKEMASA, Makoto)

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号：30318795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子を1個単位で通過させる数ナノメートルの穴、ナノポアを、薄膜に1つだけ開け、糖鎖などの分岐構造を有する分子を精密に分析する研究を実施した。分子がナノポアを通過させる原動力として、従来電気泳動が用いられてきたが、分子のナノポア通過速度が速すぎる、また通過速度が一定でない問題に対して、ナノポアに分子が入り始めた直後に、膜の両側に印加している電圧のレベルおよび符号を高速に制御し、分子の通過速度を低減させたり、通過方向を逆転させるための計測、および制御システムを構築し、1分子操作による計測精度向上を行なった。

研究成果の概要(英文)：Sequential analysis of single molecule was performed using a solid-state nanopore, a small hole fabricated on thin membrane. Driving force of the translocation across the membrane is mainly an electrophoretic force based on the voltage applied across the membrane. By changing this voltage level and/or sign just after the entrance of each molecule into the nanopore, we tried to control the speed and/or direction of the translocation of the molecule.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノポア 多糖類 分岐 FPGA

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノムや発現解析のために、次世代シーケンサー (Next generation sequencer, NGS) は、急速に進歩している。その進化速度は、半導体の発展を象徴するムーアの法則を上回り、近年最も発展を遂げた技術の一つにあげられる。個別医療で必須となるコスト低減のために新技術開発が世界的に推し進められた結果、「ナノポア」式 NGS に注目が集まっていた。

ナノポア、つまり数 nm の細孔を膜に一つだけ形成し、塩化カリウムなど電解質を溶解させた水溶液に膜を浸して、膜の両側に電位差を作ると、穴を経由して移動するイオンにより、時間に対して一定の電流が観測される。溶液中に DNA などの電解質高分子も共存していれば、電気泳動により高分子も穴をいずれ通過する。

高分子がナノポアを通過中は、前述のイオン電流がその際に前述のイオン電流が低下することが知られている。これは、ナノポアの断面積の一部が高分子で占有された状態となり、イオン電流が妨げられることによる、と考えられている。この現象は、より巨視的なスケールでも確認されている。例えば、マイクロメートルスケールの穴で赤血球数をカウントする方法、Coulter 原理 (Fig.1) は我々の健康診断における血液検査でも利用されている。ナノポアによるイオン電流評価は、ナノメートルスケールの Coulter カウンターと本質的に同等であるが、ポアサイズが、赤血球観測用から、1/1000 以下のサイズへと極小化された事により、単分子の断面積を高精度 (<1nm²) で見積もる事や、上で述べたように DNA では塩基の種類を検出して 1 分子 DNA シーケンサーとして利用する事が可能になりつつある。つまり、穴を通過する分子の数をカウントする用途だけでなく、各分子の、分子内の断面積や穴 (壁) との相互作用などの特性を、ナノポアを利用することで分析が可能である [ref2, 3, Fig2]。

この用途でナノポアを利用する場合、分子断面積の見積もり精度は前述のように非常に高いが、一方でその垂直方向、つまり分子の通過方向 (側鎖がない、もしくは短い高分子の場合では主鎖方向) については、断面積と比較すると数十分の一程度、と分解能が低い事が問題となっている。この問題は、分子のナノポア通過速度が一定ではない、または通過速度が速すぎて、電子計測系及び穴付近の応答速度を上回ってしまう事が原因である。既に市販化されている 1 分子 DNA シーケンサーは、DNA 分子の通過速度を低速化し、またほぼ一定とするために、触媒活性を失ったポリメラーゼの変異体を利用し、ラチェット機構による 1 塩基ずつ DNA をおくる工夫 [ref4] 等により実現している、と言われている。この方法では、ポリメラーゼのラチェット機構が核心であり、DNA/RNA 以外の高分子一般に対しては適用できない点が問題

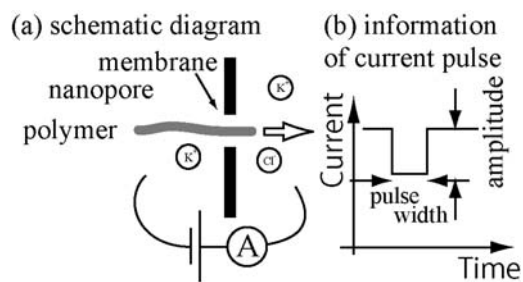


Fig.1 (a) ナノポアを利用したコールターカウンターの原理図。膜の両側に一定電圧を印加し、電極間に流れる電流を計測する。ナノポアを経由して流れるイオン (図では、K⁺, Cl⁻) は、ナノポアを通過する他の分子 (図では緑色の高分子) の存在により変調を受ける。(b) ナノポアを通過するイオン電流の時間依存性測定例。分子がナノポアを通過する際には、その分子の断面積に応じてイオン電流が低下し、分子がナノポアを通過した後は、電流値は元に戻る。棒状分子の通過により発生するパルス状の電流変化は、通過する分子の特性を反映している。

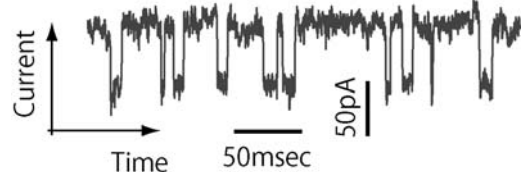


Fig. 2 ナノポアを通過する分子をポア通過電流でモニターした測定例。パルス状のシグナルが 10 個程度観測されている。上部の電流は、ナノポアに観測対象分子が通過していない、空の状態に対応すると考えられる。パルスの底に対応する電流値は、ナノポアに観測対象分子が通過中の電流に対応している。パルス振幅は、ポアを通過する 1 分子の分子断面積を反映している。この例では、断面積はパルス内で一定として観測されているが、これは直鎖状分子の断面積が主鎖に沿って観測すると一定であることが、実測できることを意味している。

であった。

2. 研究の目的

ナノポアを利用した単分子計測、特にナノポアを経由するイオン電流を用いて、競合してナノポアを通過する分子の断面積評価を試みる手法において、分子の通過速度を制御する方法を見つける事ができれば、既に類を見ない分解能を誇る、分子の断面積評価に加えて、そこから約 2 ケタ分解能が劣る、分子の通過方向における位置決め精度の向上が見込める。高分子一般への適用を可能にする、「分子のナノポア通過速度制御法」を開発できれば、分子の種類を問わず、高分解能 1 分子分析法へと、ナノポアをより広い範囲で活用する事が可能になり、DNA などと異なり、現状では分析が不可能と言える単分子分岐構造分析法などが実現できると期待され

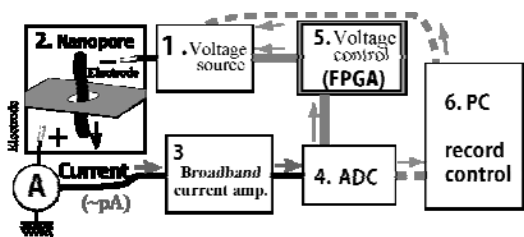


Fig.3 今回作成した装置の概略図。ナノポアを有する薄膜の両側に引加する電圧を、分子の通過状況に応じて制御することにより、ポア通過分子の移動に変調をかけることを目的とし、ポア通過電流を超高感度アンプにより増幅したのち、PC を経由せずに FPGA により高速処理（状況判断）を行い、引加電圧制御へとフィードバックするシステムとなっている。

る。この問題を、膜間印加電圧の超高速制御によって、分子の通過速度と方向を制御 (Fig.3)する手法に本研究で取り組んだ。

3. 研究の方法

ナノポアを形成する膜には、脂質 2 重膜と固体ナノポア、つまり人工膜の 2 種類がある。脂質 2 重膜中に膜たんぱく質を配置して DNA などの生体分子を解析する研究が広く行われているが、本研究が対象とする分岐構造を有する分子の場合、膜たんぱく質の細孔が小さすぎて、対象分子が通過できない。そのため、窒化シリコン薄膜（厚み 10~30nm 程度）を半導体リソグラフィに準じた手法により作成し、高輝度電子線集光により数 nm 程度の穴を 1 つ形成した。水溶液中で、前述のようなイオン電流を計測して、ナノポアを経由する各種分子を 1 個単位で識別、また分子内の構造を計測する手法の高度化として、膜の両端に引加する電圧を Fig.1 のように一定値でなく、分子の通過中に変化させる方法に取り組んだ。

今回構築した装置の概要を Fig3 に示す。ナノポアを有する薄膜の両側に (Fig3 の①)電圧を印加すると、②ナノポア経由してイオン電流が流れる。その電流を③の高感度電流計で検出し、その電流値を④でデジタル化して計測し、計測された電圧値を⑤（または⑥）で、その時間変化挙動から分子がナノポアに入った状態かどうかなど条件に基づいて「判断」し、電圧を変化させて、膜間電圧①へとフィードバックする。つまり、分子がナノポアに入った後、穴から完全に出までの短時間（通常数 ms 以下）のうちに、印加電圧を変化させることにより、分子の移動を制御する。例えば、電圧の向きを反転させることで、分子の移動方向を逆転させたり、また電圧レベルを低下させることで、通過速度を低速化させたり、分子のナノポア内移動をより詳細に制御する事が期待できる (Fig.4)。

4. 研究成果

ここで問題となるのが、分子の通過時間が

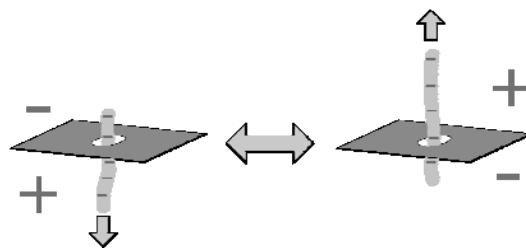


Fig.4 電圧制御によるナノポア通過 1 分子の制御。ナノポアを分子が通過する駆動力は、外部電圧による電気泳動力によるところが大きい。分子がナノポアに入り始めたことを検出した後に、電圧の向きを逆転させることで、分子の通過方向を逆転させることが可能となる。その際、分子がポアを通過し終わる前に、電流値からポア内に分子が存在するかどうかなどの状況を判断して、電圧の向きや方向を制御する必要があり、状況判断の高速化が必須である。同様に、分子がナノポア内には言った後に引加電圧を低下させることにより通過速度の低減も期待される。

短い（前述のように通常数 ms 程度）点である。分子がナノポアを抜ける前に、(a)電流データ取り込み、(b)電流値、時間依存性から状況判断、(c)分子の移動方向及び速度制御のための引加電圧の決定、(d)出力電圧値を変更、という一連の動作 (Fig3-3,4,5,1 に対応)を完了させる必要がある。一般に、(a)と(d)は専用回路において実現し、可能であれば(b)と(c)は状況判断アルゴリズムを実装可能であり、かつ複雑な条件でも判断可能とするために試行錯誤が欠かせないため、アルゴリズムを複数検討、および変更が迅速に実施可能な PC 上のソフトウェアとして実装する事が理想的である。一方で、処理速度の問題として(a)~(d)全てを 1ms 以下で終えることは容易ではない。この問題を解決するために、Field Programmable Gate Array (FPGA)を利用して高速化を試みた。

一般に、PC などの上で動作するソフトウェアは、仕様の変更が容易である一方で、処理速度が遅く、一方で ASIC などのハードウェア上に作りこんだ電子回路は、処理速度は光速であるものの、変更が非常に困難という特徴がある。FPGA は、両者の長所を兼ね備える性質を持ち、比較的容易に変更が可能であるために、どの条件（分子がナノポアへ差しかかったか否かの判断）で、電圧制御を開始するか、に関して様々な試行錯誤が可能であるが、一方で PC 上のソフトウェアと比較して数十~数百倍高速に状況判断、および電圧制御を開始することができるため、本研究の目的には適しているデバイスである。

上記の動作のうち、特に(b)と(c)を高速化するために効果的な方法を試行した。つまり状況判断などを PC 上のソフトウェア処理を行う代わりに、FPGA 上に構築された回路、つまりハードウェア処理により高速化を実現できた。

分子がナノポアに入り始めてから、出終わ

るまでの時間（以後滞在時間）は、分子の長さや印加電圧など複数の要素の依存するが、いずれの条件においても、平均滞在時間を10ms以上とする事は容易では無い。この原因は、平均通過速度が高速すぎるためである。引加電圧を下げると、ナノポアに分子が入り難くなる事が判明し、分子の通過速度や方向を制御するためには、やはりナノポアに分子が入り初めてから高速に電圧制御する必要がある事が、改めて確認された。

いずれの場合においても、電圧の急激な変化は、電流の過渡応答という形でイオン電流の精密な計測を阻害する事がわかった。ダイナミックレンジの広い A/D 変換機を駆使する事で、ベースライン電流の急激な変動下においても、分子の通過を電流パルスとして検出可能であることを確認した。ナノポア内を通過中の分子に対して、ナノポアを通過し終わる前に、印加電圧の方向を逆転することで、分子がナノポアから出ていく事のないように工夫するという操作は、鎖長が長い高分子に対しては可能であったが、連続して何度も電圧の方向を逆転させることは、容易ではない事がわかった。これは、固体ナノポアを用いたイオン電流計測においては、脂質二重膜を利用するケースよりも、過渡応答時の時定数が長くなるためであると考えられた。

この、引加電圧を変化させた際の問題点は、ナノポア付近の電気回路特性として容量性の時間応答に起因していると考えられる。膜の両側に加える電圧をステップ状に変化させた後、実際の電流応答はステップ状に変化しない過渡応答に起因している。これは、一般に RC 回路の特性として知られているが、特に固体ナノポアの膜では、デバイス政策上の制限や歩留まりの問題により、膜容量が大きくなりがちであり、過渡応答における時定数が長くなりがちである。膜タンパクで同種の操作を行う場合[ref5]と比較して高精度の電流計測の妨げになるため、引加電圧の波形を調整するなどの対策を行った。

膜厚を、これまでのナノポアデバイスのように均一ではなく、2段階の膜厚を持つデバイスを設計、作成することにより、膜容量を数十分の1程度に低減することが可能であった。膜容量 C は、膜の面積 S と厚み d により、 $C \propto S/d$ となるため、一般に S を低下させ、また d を増加すれば膜容量を低減させる事が可能となる。ナノポアのごく近傍においては、膜は薄い方がコールター原理の概念を実現させるため、また分子が穴を詰まらせるなどの問題低減のためにも望ましい。一方で、ポアから離れた部分の膜厚は、薄い必要はない。つまり、ポアから離れた部位の膜厚を厚くすることで、膜全体の容量は低減することが可能であった。工程の増加により歩留まりの問題は発生したが、本質的な障害とはならず、技術的には達成可能である。作成したナノポアデバイスの中でも、特に膜容量の小さいデバイスを選定すれば、容量性のノイズの低減

と過渡応答の時定数の低下、及び FPGA による電圧制御時の電流ベースラインの変動幅が減少する事が観測された。これにより、分子がナノポアを通過中（通過完了する前）に電圧制御を開始する事で、分子の速度や進行方向を変化させることができた。

単分散の試料を用いて、本研究で構築したシステムを測定した場合でも、パルス幅、つまり分子のナノポア内滞在時間には一定の分布が見られた。つまり、分子の通過時間は鎖長だけでなく、ポアへ入る際の分子の形状や、ミクロブラウン運動による変形、及びポア内壁との相互作用などの要素が、一定とならないために、外部引加電圧だけでは、主軸方向の分解能を高める事には限界があることが予想された。

以上のように、本研究で構築した Fig.3 のようなシステムを利用する事により、固体ナノポアを利用した単分子形状計測システムにおいても、引加電圧の超高速制御により、分子がナノポアを通過し終わる前の短時間 (<1ms) に、分子の移動を制御することは可能であり、主鎖に沿った方向における分解能の向上が可能であると考えられた。

引用文献

1. Takemasa M et al., Nanopores for Bioanalytical Applications, Proceedings of the International conference, 2012, 89-92.
2. Wallace H. Coulter, US 2656508, Means for counting particles suspended in a fluid, October 20, 1953.
3. Storm AJ et al., Phys. Rev. E 71, 2005, 051903.
4. Kate Lieberman et al., JACS, 2010, 132(50).
5. Olasagasti F, Nature Nanotech. 5, 798-806, 2010.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 7件）

- ① 信州コロイド&界面科学研究会 第3回研究討論会, 武政誠, 藤田雅弘, 前田瑞夫, 信州大学, 2017年11月
- ② 第66回高分子討論会, “固体ナノポアを通過する方向及び速度制御による高分子の1分子分析”, 武政誠, 藤田雅弘, 前田瑞夫, 愛媛大学, 2017年9月
- ③ 第65回高分子討論会, “Control of translocation speed toward more accurate single molecule polymer analysis using a nanopore”, Makoto Takemasa, Masahiro Fujita, Mizuo Maeda, 神奈川大学, 2016年9月
- ④ バイオ高分子研究会, “固体ナノポアによるバイオ高分子の1分子解析”, 武政誠, 藤田雅弘, 前田瑞夫, 東京工業大学, 2016年7月
- ⑤ PacifiChem2015, “Single molecule analysis

of polysaccharides using a solid state nanopore”, Makoto Takemasa, Masahiro Fujita, Mizuo Maeda, Honolulu, Hawaii, 2015 年 12 月

- ⑥ 第 64 回高分子討論会, “ナノポアによる高分子の単一分子分析”, 武政誠, 藤田雅弘, 前田瑞夫, 東北大学, 2015 年 9 月
- ⑦ KIFEE meeting, 8th, “Single molecular analysis of biomolecules using a solid state nanopore“, Makoto Takemasa, Masahiro Fujita, Mizuo Maeda, NTNU, Norway, 2015 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武政誠 (TAKEMASA, Makoto)

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号: 30318795