

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K13323

研究課題名(和文)電気泳動時間計測を基盤とする単一粒子質量測定法の創成

研究課題名(英文)Single-particle mass spectroscopy by electrophoresis analysis

研究代表者

筒井 真楠(Tsutsui, Makusu)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50546596

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)：本研究では、マイクロポア/マイクロ流路/ナノ電極を融合させた新規センサ構造を開発し、大きさや表面電荷密度が既知のナノ粒子を対象に、当該センサデバイスによる1粒子電気泳動時間計測を実施した。まず横電場の印加無しに流路を通るイオン電流計測を実施した結果、粒子通過を示唆する電流パルス信号を観測した。一方、横電場を加えた場合は、流路を通るイオン電流が埋め込み電極間の電圧に比例して減少し、粒子通過に伴う流路を通るイオン電流変化と同期した横方向の電流応答が観測された。これにより、埋め込み電極間電流計測を応用した粒子のダイナミクス解析及びその質量分析応用の可能性を実証することができた。

研究成果の概要(英文)：In this research an integrated nanostructure consisting of micropores, microfluidic channels, and nanoelectrodes were developed to investigate fast electrophoretic dynamics of individual particles in liquid via resistive pulse sensing. Particle translocation time was measured under cross-channel voltage for driving the electrophoretic motions while imposing transverse voltage to the embedded nanoelectrodes. Simultaneous measurements of the longitudinal ionic current and the transverse current showed concomitant change associated with blocking of ion transport via a particle passing through the fluidic channel, thereby demonstrating a possibility of using the novel fluidic channel sensor as a useful tool to study single-particle dynamics in liquid and its application for mass spectroscopy.

研究分野：ナノテクノロジー

キーワード：マイクロナノセンサー

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖は、生物の発生からその生命活動維持に渡って重要な役割を担うプロセスであり、増殖制御機能が欠如した細胞は、無秩序に増殖し、臓器や身体の大や腫瘍形成を招く。このいわゆる細胞の癌化について効果的な予防・治療法を開発するには、まず基本的な細胞の増殖制御メカニズムを明らかにすることが重要となる。一方、哺乳動物細胞の増殖制御パターンの解明には、細胞周期における 6%以下の細胞体積変化を検出することが要求される (A. Tzur et al., Science 325, 167 (2009))。しかし、コールターカウンター等の従来法では十分な検出分解能が得られておらず (J. M. Mitchison, Int. Rev. Cytol. 226, 165 (2003))、細胞周期において、細胞増殖のタイミングがどのように決定されているかは未解明となっているのが現状である。

そのような中で近年注目されているのが 1 細胞質量分析である (M. Godin et al., Nat. Methods 7, 387 (2010))。そこで、本研究では、イオンの飛行時間 (Time Of Flight (TOF)) を指標に用いる TOF 型イオン質量分析法に習って、細胞の電気泳動時間 (Time Of Electrophoresis (TOE)) から質量に関する情報を抽出する TOE 型質量分析法を新規に創成する。この手法では、単一細胞が微小流路を通過する際に、流路内にある複数のナノ電極対を用いた微小電流測定を実施することで、細胞の泳動速度変化を観測すると共に、その結果から細胞質量に関する情報を抽出する (図 1)。

TOE 測定による 1 粒子質量分析の実現には、ナノ電極を用いた高速微小電流計測と、1 粒子表面電荷密度測定を 1 個のデバイス上で実施する必要がある。一方、申請者はこれまで、ナノ電極を用いた高速微小電流計測による単一分子・粒子検出法を独自に開発し (Nature Nanotechnol. 5, 286 (2010); Nature Commun. 1, 138 (2010); Nature Nanotechnol. 9, 835 (2014))、同技術を応用発展させて、ナノ流路とナノ電極を融合させた 1 分子センサー (Sci. Rep. 2, 394 (2012)) を創製すると共に、1 分子ダイナミクス制御に向けた基礎科学を開拓してきた (ACS Nano 5, 5509 (2011); ACS Nano 6, 3499 (2012))。さらに最近では、低アスペクト比ナノポア (ACS Nano 5, 8391 (2011)) を応用した 1 粒子表面電荷密度評価法を創成することに成功した (Appl. Phys. Lett. 103, 013108 (2013))。以上の経緯を通して、表面電荷密度測定用低アスペクト比マイクロポアと TOE 計測用ナノ電極/流路を融合させたナノデバイスを創製し、上述の申請者独自の 1 粒子検出技術を集約することで、TOE 型質量分析法を創成できると確信し、その着想のもと、本研究計画を構想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、微小流路内における検体の電気泳動時間計測を基盤とする高感度質量分析法を創成する。そのためにまず、マイクロポア/マイクロ流路/ナノ電極を融合させた新規センサー構造を開発し、1 粒子検出のための微小電流測定系並びに電気泳動制御プログラムを立ち上げる。さらに、大きさや表面電荷密度が既知のナノ粒子を対象に、当該センサーデバイスによる 1 粒子電気泳動時間計測を実施し、最適なデバイスパラメータを抽出する。またそこで得られるデータをもとに、理論シミュレーションの観点からナノ粒子の加速泳動機構を明らかにすると共に、測定結果と照合することで、1 粒子質量を導出するプロトコルを構築する。そして以上の結果を集約し、電気泳動時間計測による 1 細胞質量分析を実証する。

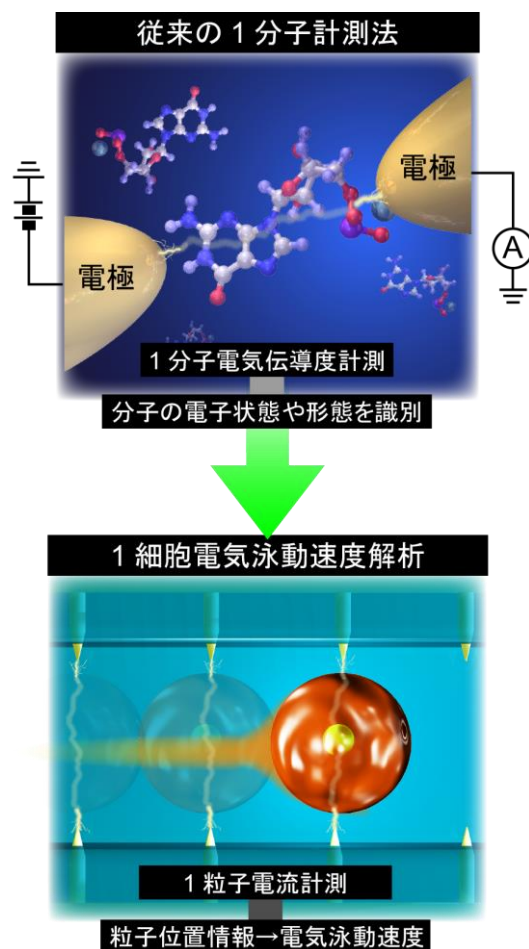


図 1. 従来の 1 分子電流計測法 (上) と、これを発展させた 1 粒子電流計測法を基盤とする 1 細胞電気泳動速度解析 (下)。

### 3. 研究の方法

複数電極組込み型マイクロ流路デバイスの作製プロセスを構築した。まず SiO<sub>2</sub> 膜付き Si ウエハ上にフォトリソグラフィ法および高周波マグネトロンスパッタプロセスを用いて引き出し電極パターンを形成させた。続いて電子線描画法とスパッタ法を用い

て、約 150nm の電極間距離を有する複数電極ギャップを作製した。そして Chemical Vapor Deposition 法を用いて SiO<sub>2</sub> 膜でウエハ全面をコートした。その後、フォトリソグラフィによりマイクロ流路を描画し、残ったフォトレジストをマスクとして用いて反応性イオンエッチングによる SiO<sub>2</sub> の掘削を行った。このとき、引き出し電極パターンの一部を外部マーカーとして用いた。さらに同様の方法で電子線描画を行い、幅約 200nm の流路を作製した。ここで外部マーカーを指標にして精緻に位置あわせすることで、電極先端部約 25nm の領域だけが流路内に露出した構造を作ることが出来た。測定では、29mm 角に切り出したウエハ小片上に、流路を片面に配したポリジメチルシロキサンプロックを吸着させることで、流路を封止した。そして当該ブロックに空けた貫通孔を通して検出対象とする粒子を含んだバッファ溶液を導入し、その後 1 対の Ag/AgCl 電極を用いて幅 200nm のマイクロ流路を通るイオン電流を測定した。このとき、複数電極間にも電圧を加え、流路の横方向のイオン電流も同時に測定した。

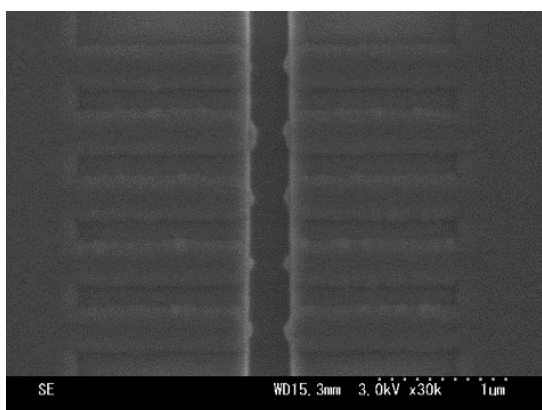
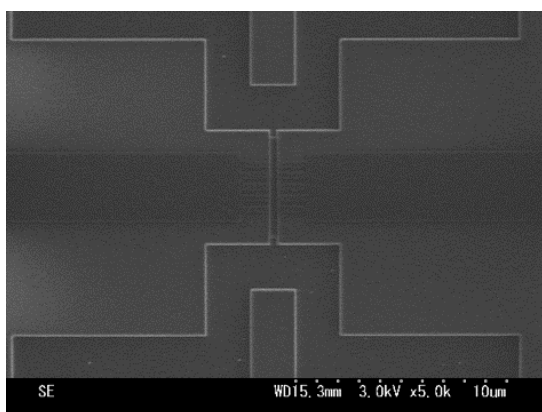


図 2. 複数電極組込み型マイクロ流路. 上: 全体図、下: ナノ電極が埋め込まれたマイクロ流路部。

#### 4. 研究成果

(1) 一様な深さの流路で構成されたセンサでは、導入流路部がセンサ部流路に比して顕著に長くなるため、電気泳動や水圧による粒子の泳動が困難であった。そこで、センサ部となるマイクロ流路より深い導入流路を有

する 2 段構造流路設計に変更した (図 2)。これを用いて、まず横電場の印加無しに流路を通るイオン電流計測を実施した結果、粒子通過を示唆する電流パルス信号を観測した。一方、横電場を加えた場合は、流路を通るイオン電流が埋め込み電極間の電圧に比例して減少し、粒子通過に伴う流路を通るイオン電流変化と同期した横方向の電流応答が観測された。これにより、埋め込み電極間電流計測を応用した粒子のダイナミクス解析及びその質量分析応用の可能性を実証することができた。

(2) 流路に埋め込んだ電極を用いることで、流路内に発生させることができる強力な電場を利用して、粒子のダイナミクス制御を試みた。埋め込み電極間に交流電場を発生させて、マイクロスケールの流路を通るイオン電流を計測したところ、粒子の 2 次元方向の動きを交流電場周波数や振幅によって制御可能であることが明らかになった。この手法の利点は、粒子のダイナミクス制御に交流電圧を利用する手法であることから、単純なローパスフィルタを用いることで、その影響を粒子検出に用いる直流イオン電流成分と切り分けることができる点にある。今後、当該手法が様々な流路センサデバイスに用いられることを期待する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Makusu Tsutsui, Yuhui He, Kazumichi Yokota, Akihide Arima, Sadato Hongo, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, and Tomoji Kawai, Particle Trajectory-Dependent Ionic Current Blockade in Low-Aspect-Ratio Pores. ACS Nano, 査読有, 10 巻, 2015, 803  
DOI: 10.1021/acsnano.5b05906
- ② Yuhui He, Makusu Tsutsui, Xiang Shui Miao, and Masateru Taniguchi, Impact of Water-Depletion Layer on Transport in Hydrophobic Nanochannels. Anal. Chem., 査読有, 87 巻, 2015, 12040  
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03061

[学会発表] (計 2 件)

- ① "Low-aspect-ratio micropore sensors: possibilities and limitations" Makusu Tsutsui, Akihide Arima, Kazumichi Yokota, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, Pacificchem 2015, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 15 日
- ② 「四重極マイクロポアによる微粒子通過位置制御」、筒井真楠, 横田一道, 谷口正輝, 川合知二, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、名古屋大学国際会議場、2015 年 9 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 真楠 (TSUTSUI, Makusu)  
大阪大学・産業科学研究所・准教授  
研究者番号：50546596

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし