

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13645

研究課題名(和文) ナノ粒子・生体分子のアクティブナノポア通過制御

研究課題名(英文) Active control of nanopore translocation of nanoparticles and biomolecules

研究代表者

齋木 敏治 (SAIKI, Toshiharu)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：70261196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナノポア技術への期待はシーケンサ応用にとどまらず、分子・粒子識別、タンパク分子解析や細胞観察・遺伝子導入などに広がりつつある。本研究では、固体ナノポアに対してアクティブな制御機能を具備させることを目的とした。ナノポアを相変化材料で被覆し、結晶相・アモルファス相間の大きな光学的コントラストを利用することによって、ナノポア近傍に生じる対流、熱泳動を制御し、DNAやナノ粒子のナノポア通過過程のスイッチング機能を実証した。

研究成果の概要(英文)：Applications of nanopore technology are not limited to the DNA sequencing but also are extending to the molecular recognition, protein analysis, cell imaging, and gene transfer. The objective of this study is to implement active functionalities into the solid-state nanopore by employing a phase-change material. A huge contrast of optical indices between the crystalline and amorphous phases of phase-change material enabled control of convection flow and thermophoresis in the vicinity of nanopore by means of light irradiation. Switching of nanopore translocation of DNA molecules and nanoparticles was demonstrated.

研究分野：ナノフォトニクス・光物性・バイオセンシング

キーワード：バイオセンシング ナノポア 相変化材料

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 1分子の構造解析を可能にするナノポアセンシング技術の進展が著しい。固体ナノポア作製・界面修飾技術や1分子操作技術の高度化を背景に DNA 配列解読の原理実証がなされ、医療現場での実用化やタンパク分子構造解析が次なるターゲットとして視野に入ってきた。また波及技術として細胞への遺伝子導入のためのエレクトロポレーションへの応用も有望視されている。これらの新たな展開に向け、固体ナノポアに対してアクティブな制御機能を具備させることが急速に求められている。

ナノポア技術への期待はシーケンサ応用にとどまらず、分子・粒子識別、タンパク分子解析や細胞観察・遺伝子導入などに広がりつつある。単調に塩基配列を解読するシーケンサであれば、ナノポアは DNA を真っ直ぐ一定速度で通過させるためのパッシブな機能で十分である。しかし新しい応用展開に向けてさまざまなアクティブ機能が必要となることは明白であるが、そのような試みはナノポアの分子修飾といった手法にとどまる。本研究ではアクティブ機能付与に向けて光ディスクや不揮発性メモリの記憶媒体として実績のあるカルコゲナイド相変化材料 (GeSbTe) に着目する。GeSbTe は結晶相とアモルファス相をレーザ照射のみで可逆的に変化させることが可能であり、両相の光学的コントラストがきわめて大きい。また、吸収係数が大きい一方、熱伝導率は低く、また表面エネルギーが小さいことから、流体現象と組み合わせた光熱効果の発現に適した材料である。

### 2. 研究の目的

DNA シーケンサのみならず、タンパク分子解析やエレクトロポレーション基盤技術としての応用が期待されている固体ナノポアに対して、任意のタイミングでのポアの開閉などのアクティブな制御機能を具備させることを目的とする。光パルス照射のみによって結晶相とアモルファス相を可逆的に往復可能なカルコゲナイド相変化材料に着目し、両相間の光学的・電氣的コントラストを最大限に活用する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ナノ粒子通過過程の観測とダイナミクスの解析

15nm 厚のシリコンメンブレンに対し、直径 200nm のナノポアを集束イオンビーム (Focused Ion Beam; FIB) によって形成する。メンブレンを挟む2つのチャンパー (図 1) の片側 (Cis チャンパー、-電極側) に直径 20nm のカルボキシル基修飾蛍光ポリスチレンビーズを含む電解質溶液を装填する。チャンパー間に電圧を印加することにより、負に帯電した蛍光ビーズはナノポアを通過して Trans チャンパー (+電極側) へ移動する。

ビーズ通過の駆動力となるナノポア近傍の電界分布を図 2 に示す。

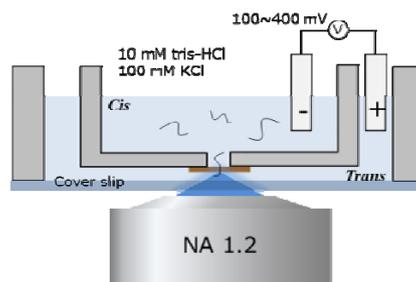


図 1 ナノポア光学検出用チャンパー

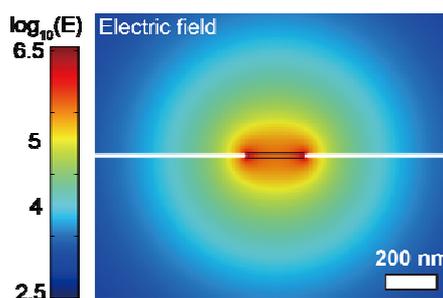


図 2 ナノポア近傍の電界分布

Trans チャンパー側に設置した光学窓から紫外レーザ光 (波長 375nm) を導入し、水浸対物レンズによってポア上に集光する。ナノポア近傍での光強度分布を図 3 に示す。レーザ光によって蛍光ビーズを励起し、蛍光信号を同一の対物レンズで集光した後、光電子増倍管にて検出する。図 3 においてレーザ光が局在している領域 (観察領域) 内にビーズが存在する時間帯のみ蛍光信号が検出される。本測定用に開発したフォトンカウンティングシステムにより、100us の時間分解能で、ナノポア通過過程を計測する。

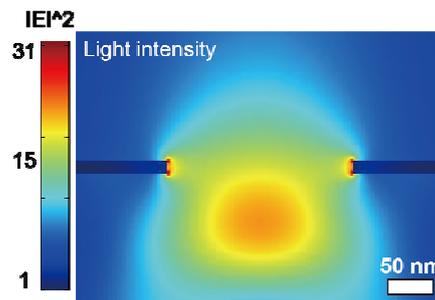


図 3 ナノポア近傍における光強度分布

#### (2) 相変化ナノポアの作製

膜厚 20nm の窒化シリコンメンブレンに対して、FIB を用いて直径 200nm のポアを形成する。ポア形成後、相変化材料として厚さ 100nm の Ge<sub>2</sub>Sb<sub>2</sub>Te<sub>5</sub> (GST) をスパッタ成膜する。このように作製した GST ナノポアを保護膜のないまま測定に使用すると、ポアを流れるイオン電流によって、GST がエッチングされる

ことが確認された。そこで GST 上に保護膜として  $\text{SiO}_2$  を原子層堆積法 (Atomic Layer Deposition; ALD) によって成膜し、エッチングの抑制を試みる。

また、ナノポア領域に波長 532nm のサブナノ秒パルス光を照射し、アズデポ (アモルファス相) GST の結晶化を確認する。ホットプレートを使用した結晶化も同様に確認する。

### (3) 相変化薄膜による光加熱対流発生 の検証

GST による光熱効果を確認するため、図 4 に示すような 2 次元チャンネル構造を作製し、レーザ照射にともなう対流発生を確認する。直径 2 $\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズをスペーサとし、直径 1 $\mu\text{m}$  のビーズを対流のモニター用粒子として使用する。

GeSbTe の光熱効果を相対的に評価するために、金を成膜したガラス基板、ならびにシリコン基板を用いて同様の測定を行い、発生する対流の違いを調査する。

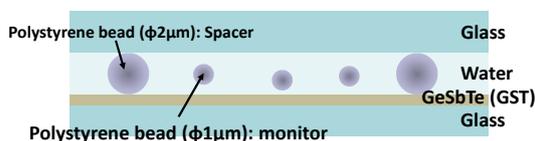


図 4 GeSbTe 光熱効果実証のためのチャンネル構造

### (4) 相変化ナノポアにおける DNA 通過率のスイッチング

GST の結晶相とアモルファス相間の相変化にともなう大きな屈折率・吸収率変化を利用し、ナノポア近傍の熱泳動の制御、ならびにナノポア通過率のスイッチングを試みる。

(3) で作製した GST ナノポアを使用し、GST がアズデポ (アモルファス相) と結晶相の場合で、蛍光励起光照射に起因する温度上昇にともなう熱泳動がどの程度異なるかを、DNA の通過過程を通して評価する。

測定用の DNA として YOYO-1 をインターカレートした長さ 9598 bp の二重鎖 DNA を用意する。蛍光励起用の光源としては、波長 488nm の連続光レーザを使用する。

## 4. 研究成果

### (1) ナノ粒子通過過程の観測とダイナミクスの解析

直径 20nm のポリスチレンビーズの蛍光信号波形を図 5 に示す。印加電圧 100~400mV に対して、典型的な信号を示している。シリコンメンブレンは紫外光に対して完全に不透明であるため、蛍光信号が現れるのは、ナノポア通過開始直後からである。信号の減衰時間は、ナノポア通過後に電界によるドリフトと拡散によって、図 3 の観察領域から退避するのに要する時間に対応する。印加電圧とともにドリフト速度が増加し、信号の減衰時間が短くなっていることがわかる。

各印加電圧における減衰時間の平均値を

図 6 に示す。ナノポアからの退避過程においてドリフト運動が支配的であれば、印加電圧と減衰時間は単純な反比例の関係になるが、図 6 の結果は、そのようになっておらず、ドリフト運動と拡散運動の両方が寄与していることを示唆する。両者を考慮し、図 6 の結果に対してフィッティングを行った。その結果得られた移動度、拡散係数ともに先行研究、理論計算と良く一致した。

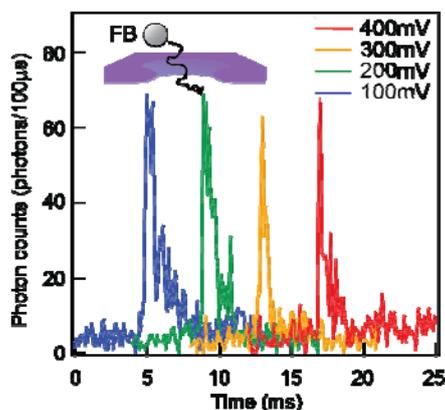


図 5 蛍光ポリスチレンビーズのナノポア通過波形

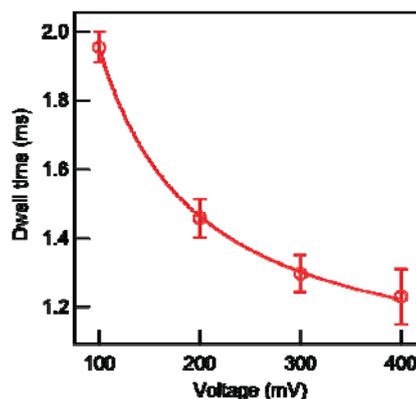


図 6 信号減衰時間の印加電圧依存性

### (2) 相変化ナノポアの作製

FIB によって窒化シリコンメンブレンに形成したナノポアの TEM 画像を図 7(a) に示す。また、GST 成膜後のナノポアの TEM 画像を図 7(b) に示す。GST を厚さ 100nm 成膜することにより、ナノポア直径が約 60nm 小さくなっていることがわかる。

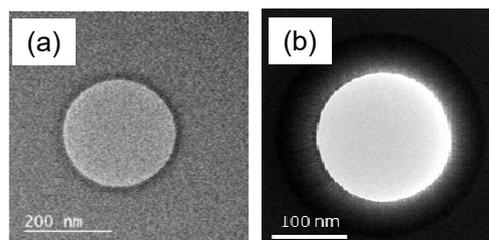


図 7 (a) GST 成膜前と (b) 成膜後のナノポアの TEM 画像

図 8 にナノ粒子通過測定後の GST ナノポアの TEM 画像を示す。ポア周辺の GST が広い領域にわたってエッチングされていることが

わかる。一方、SiO<sub>2</sub>をALD成膜したGSTナノポアについて、通過測定使用前と使用後のTEM画像を図9に示す。GSTのエッチングはほとんど見られず、SiO<sub>2</sub>層が保護膜として有効に機能していることが確認された。

アモルファス相GSTナノポアにサブナノ秒パルス光を照射することにより結晶相へ相変化可能であることも確認した。

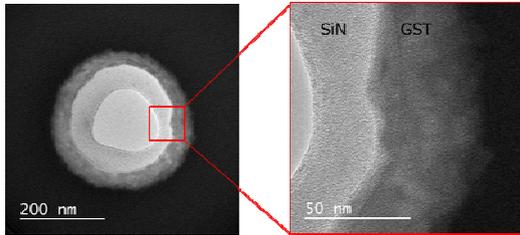


図8 保護膜なし GST ナノポアの計測後の TEM 画像

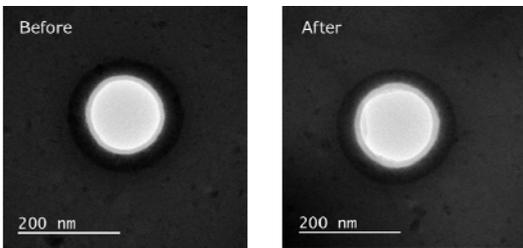


図9 SiO<sub>2</sub>保護 GST ナノポアの計測前後の TEM 画像

### (3)相変化薄膜による光加熱対流発生を検証

直径1μmのポリスチレンビーズをモニタ粒子として使用し、サブナノ秒パルス光照射によってGST基板上で発生する対流の可視化をおこなった。結果を図10に示す。左が光照射直前、右が光照射2秒後の光学顕微鏡写真である。ビーズが強い対流によって引き寄せられ、結晶構造を形成していることがわかる(白い輝線はビーズのレンズ効果によって結晶化した領域に対応)。

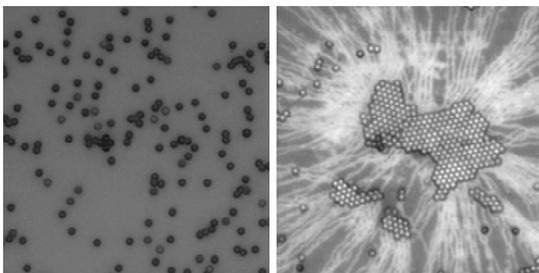


図10 GST膜上での対流発生を観察結果

金成膜ガラス基板、ならびにシリコン基板で同様の実験を行ったところ、上記のような速度でビーズが引き寄せられることはなく、結晶構造の形成も確認されなかった。GSTとの違いは、単に光吸収量(温度上昇量)では説明できず、表面エネルギーの違い(GSTの表面エネルギーは金、シリコンと比べて圧倒的に小さい)に起因するのではないかと推測している。

### (4)相変化ナノポアにおけるDNA通過率のスイッチング

図11にDNAのGSTナノポア通過にともなう蛍光バースト信号を示す。蛍光バーストの場合と同様に、DNAがナノポア通過時に、観察領域に滞在する間のみ、蛍光信号がパルス状に観察される。図11では、励起光強度とともに通過頻度がどのように変化するか、またアモルファス相(aGST)と結晶相(cGST)でどのように異なるかを比較している。励起光強度の増大とともに通過頻度は大きく減少し、かつアモルファス相の場合の方が、その傾向が顕著である。GST膜の厚さと励起光の波長を考慮した計算を行うと、アモルファス相の方が光吸収量が大きいがわかる。また、アモルファス相の方が熱伝導率が小さいことと合わせると、結晶相よりも温度上昇が大きいことが結論付けられ、励起光強度に対する依存性と整合する。上記の測定結果は、ナノポア近傍に温度勾配が形成され、ナノポアから遠ざかる方向に熱泳動が生じていると考えることによって説明される。

図12は、印加電圧が100mVと300mVの場合の通過頻度の励起光強度依存性である。同一の励起光強度でも、印加電圧を上昇させることにより、通過頻度が回復することを示している。

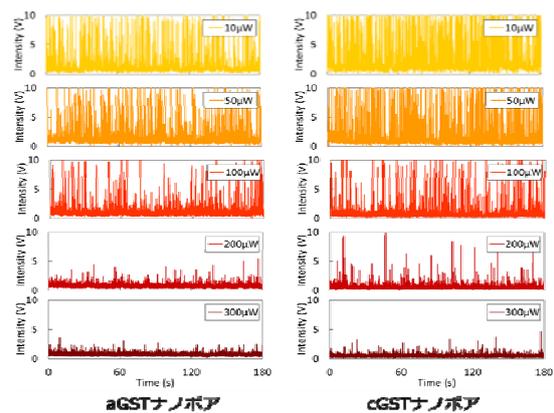


図11 DNA ナノポア通過時の蛍光バースト信号

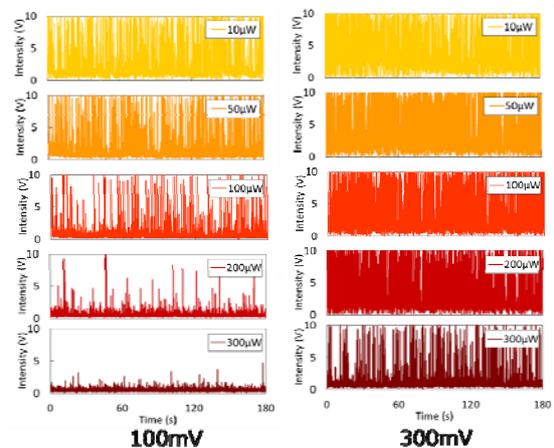


図12 DNA ナノポア通過頻度の印加電圧依存性

図 13 は通過時間ヒストグラムの励起光強度依存性をまとめた結果である。励起光強度の増大とともに通過速度が増していることがわかる。温度上昇にもなって水の粘性が変化し、DNA の移動度が増大した可能性がある。この通過時間もまた、相変化にもなって制御可能であることを確認している。

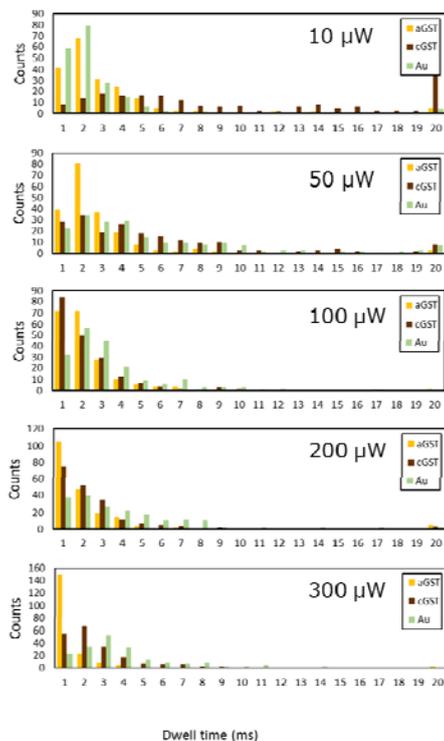


図 13 DNA ナノポア通過時間の励起光強度依存性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- ① K. Esashika and T. Saiki, “DNA hybridization assay using gold nanoparticles and electrophoresis separation provides 1 pM Sensitivity”, *Bioconjugate Chem.* **29**, 182–189 (2018). DOI:10.1021/acs.bioconjchem.7b00682 査読有
- ② T. Saiki, “Switching of localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles using phase-change materials and implementation of computing functionality (Review paper)”, *Appl. Phys. A* **123**, 577/1–12 (2017). DOI:10.1007/s00339-017-1185-x 査読有
- ③ T. Saiki, T. Shintani, M. Kuwahara, P. Regreny, and M. Gendry, “Nanospectroscopy of single quantum dots with local strain control using a phase-change mask (Review paper)”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**, 08LA02/1–9 (2017). <https://doi.org/10.7567/JJAP.56.08LA02> 査読有
- ④ H. Yamazaki, K. Esashika, and T. Saiki, “A

150nm ultraviolet excitation volume on a porous silicon membrane for direct optical observation of DNA coil relaxation during capture into nanopores”, *Nano Futures* **1**, 011001/1–5 (2017).

<https://doi.org/10.1088/2399-1984/aa655d> 査読有

- ⑤ K. Esashika and T. Saiki, “Optimized modification of gold nanoparticles with a self-assembled monolayer for suppression of nonspecific binding in DNA assays”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**, 107001/1–5 (2016). <http://doi.org/10.7567/JJAP.55.107001> 査読有
- ⑥ S. Ito, H. Yamazaki, M. Tsukahara, K. Esashika, and T. Saiki, “Salt dependence of DNA translocation dynamics through silicon nanopores detected by ultraviolet excitation”, *Appl. Phys. A* **122**, 342/1–5 (2016). DOI 10.1007/s00339-016-9762-y 査読有
- ⑦ H. Yamazaki, S. Ito, K. Esashika, Y. Taguchi, and T. Saiki, “Optical observation of DNA translocation through Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sputtered silicon nanopores in porous membrane”, *Appl. Phys. A* **122**, 216/1–6 (2016). DOI 10.1007/s00339-016-9764-9 査読有

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① 水口高翔, “GeSbTe ナノポアにおける DNA 通過の熱的制御”, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会 (2018 年 3 月).
- ② 山口慧, “相変化薄膜上でのレーザー照射によるコロイド粒子の自己組織化”, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会 (2018 年 3 月).
- ③ T. Mizuguchi, “Optical Control of Translocation Dynamics through Nanopore with Ge<sub>2</sub>Sb<sub>2</sub>Te<sub>5</sub> thin film”, The 29th Symposium on Phase Change Oriented Science (2017 年 11 月).
- ④ K. Yamaguchi, “Hydrodynamics of Active Colloids on GeSbTe Substrate Induced by Laser Heating”, The 29th Symposium on Phase Change Oriented Science (2017 年 11 月).
- ⑤ T. Saiki, “DNA Sensing Based on Gold Nanoparticles and Silicon Nanopores (Invited)”, 2017 CLEO Pacific Rim Conference (2017 年 8 月).
- ⑥ K. Esashika, “Sub-pM Sensitivity for Genetic Screening Using Gold Nanoparticles Purified by Agarose Gel Electrophoresis”, The 11th Asia-Pacific Conference on Near-Field Optics (2017).
- ⑦ R. Ishii, “Control of sub-nm spacing of gold nanoparticle dimers and wide-range tunability of localized surface plasmon resonance”, The 11th Asia-Pacific Conference on Near-Field Optics (2017 年 7 月).
- ⑧ T. Saiki, “DNA sensing based on gold

nanoparticles and silicon nanopores”,  
Core-to-Core NTU-Japan Workshop on  
Nanomaterials and Nanophotonics for  
Intelligence (2017 年 1 月).

- ⑨ H. Yamazaki, “Optical observation of single dsDNA translocation dynamics through silicon nanopores”, The 11th Asian Thermophysical Properties Conference (2016 年 10 月).
- ⑩ T. Saiki, “DNA Sensing Based on Gold Nanoparticles and Silicon Nanopores (Invited)”, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会 (2016 年 9 月).
- ⑪ 齋木敏治, “金ナノ粒子とシリコンナノポアを利用した DNA センシング (招待講演)”, 電子情報通信学会シリコンフォトニクス時限研究専門委員会第 24 回研究会 (2016 年 6 月).

[その他]

ホームページ <http://keio-saiki-lab.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋木 敏治 (SAIKI, Toshiharu)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号：7 0 2 6 1 1 9 6

### (2) 連携研究者

桑原 正史 (KUWAHARA, Masashi)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・上級主任研究員  
研究者番号：6 0 3 5 6 9 5 4