

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：34303
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19H02571
研究課題名(和文) マイクロナノ融合プロセスによる光電気複合型ナノポアセンサデバイスの基盤技術構築

研究課題名(英文) Micro/Nano Fusion Process based Nanopore Sensing Device for Optical and Electrical Combined Detection

研究代表者
田畑 修 (TABATA, OSAMU)
京都先端科学大学・工学部・教授

研究者番号：20288624
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルコールを原料とした常圧アルコールCVDは導入量と温度の制御により層数制御が可能となった。各種アルコールを用いた実験から原料の炭素と水酸基の割合が欠陥抑制に強い影響を及ぼすことがわかった。AuNP表面分子の除去プロセスの検討した結果、予め表面を被覆していた分子によるノイズの影響を受けないSERS測定が可能となった。また、基板上的直径200nmのAuNPダイマーによる一本鎖DNAのSERS測定を実施し、光学的な1分子・1塩基検出・同定の可能性を示した。また、AuNPダイマーにナノ配線を施したナノギャップ電極を作製し、トンネル電流特性とSERS特性からナノギャップの電氣的・光学的評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
液体ガリウム触媒を用いることで常圧CVDにより単層グラフェン自立膜の直接形成を実現した。また、ヘリウムイオン顕微鏡による最小直径1.5nmのナノポア加工と組み合わせることで単一原子厚さを持つセンシング部を構築した。また、DNAナノ構造を使った大粒径AuNPダイマーの形成に成功した。直径200 nmのAuNPダイマーを用いた電氣的・光学的なDNAオリゴマー1分子検出の可能性を示した。本研究で得られた成果は、光電気複合型センサデバイスによる新しいDNA計測技術の構築に資するものである。

研究成果の概要(英文)：A CVD method using gallium as a liquid metal catalyst was proposed as a direct formation process for freestanding film of monolayer graphene. Nanopore milling was performed on freestanding CVD graphene films using a helium ion microscope. The nanopore fabrication was reproducible with a minimum size of 3.5 nm to freestanding CVD graphene. As a result of the investigation of the removal process of AuNP surface molecules, it was possible to perform SERS measurements free from noise effects caused by molecules that had previously coated the surface. SERS measurements of single-stranded DNA with AuNP dimers of 200 nm on a substrate were performed. We investigated the possibility of optical single molecule/single base detection and identification of DNA oligomers. Nanogap electrodes were fabricated by nano-wiring on AuNP dimers. Electrical and optical evaluation of the nanogap was performed based on tunneling current and SERS characteristics, respectively.

研究分野：微細加工，ナノテクノロジー

キーワード：ナノプロセス DNA グラフェン ナノポアセンシング SERS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA、タンパク質、ポリペプチド、多糖などを直径数 nm の孔 (ナノポア) に通過させ、煩雑なラベル化プロトコルを必要としない (ラベルフリー) で 1 分子を検出・識別・解析するナノポアセンシングが注目されている。期待される応用分野は第 3 世代ゲノムシーケンサから 1 分子解析まで多様である。ナノポアセンシングはナノポア作製法と分子種の検出原理により分類される。ナノポア作製法はタンパク質を固定した脂質膜を利用するものと無機薄膜にナノポアを微細加工したものに分類され、検出原理はイオン電流を用いるものとトンネル電流を用いるものに分類される。2012 年には Oxford Nanopore Technologies 社がタンパクナノポアとイオン電流検出を利用したゲノムシーケンサを発表、同年日本の Quantum Biosystems 社は無機薄膜に形成したナノポアとトンネル電流検出を組み合わせた方法を発表した。

従来のイオン電流方式のナノポアゲノムシーケンサの出力には、高速でナノポアを通過する DNA の複数塩基からの信号が重畳されている。時系列信号処理によって塩基種を判別しており、DNA がナノポアで停止していると 1 塩基単位での識別が出来ない。単分子膜厚のナノポアメンブレンを用いれば 1 塩基単位で識別できることが計算で示されているが、塩基種の同定はできない。トンネル電流方式の場合、先端を単原子レベルとした電極対を用いることで 1 塩基の識別が可能であると期待される。しかし、トンネル電流方式でも原理的に塩基種の違いは検出できるが同定は出来ない。そこで我々の研究グループでは、金ナノ粒子 (AuNP) 二量体の数 nm のナノギャップにおける強電磁場による表面増強ラマン分光 (surface-enhanced Raman spectroscopy : SERS) を用いる光方式を従来の手法に組み合わせることを提案し、そのための原理検証を行ってきた (2016 年度 基盤研究 B : B16H03841)。本研究で提案する光電気複合型ナノポアセンシング方式は、イオン電流方式やトンネル電流方式に SERS による分子同定機能を付加することで超高空間分解分子認識能を実現できる点で優れており、学術的独自性が高いといえる。

2. 研究の目的

本研究では、新規に提案する光電気複合型ナノポアセンサデバイスを作製し、DNA 等に代表されるサブ nm サイズの分子識別を目指している。創製を目指すデバイスは図 1 に示すような構造であり、直径 5 nm 以下のナノポアを持つ単層グラフェン自立メンブレンと AuNP ダイマーおよびナノギャップ電極で構成する。この構造を実現するため、DNA ナノ構造を使って AuNP ダイマーを形成し、ナノポアデバイスにアセンブルすることを目指す。トンネル電流測定用ナノギャップ電極と SERS 測定用 AuNP 二量体ナノギャップをアライメントして、その直下に設けたナノポアに測定分子を通過させることで、ナノギャップへ測定分子を導く。この提案手法は、従来の微細加工限界を超えたナノメートルオーダの複雑構造を融合する手法として極めて創造性が高いといえる。本研究では、提案するナノポアデバイス実現のため、各要素技術を改めて見直し、それらの技術課題の克服を目指す。

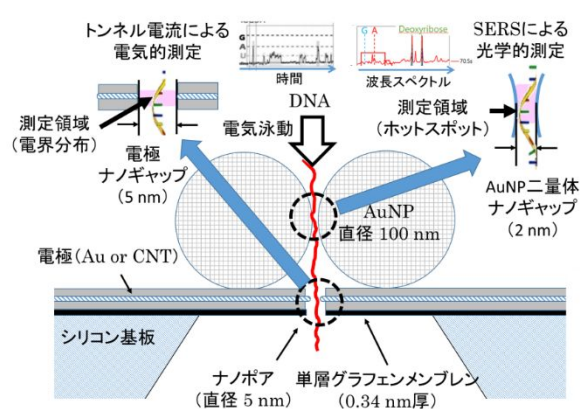


図 1 光電気複合型ナノポアセンサデバイスの断面構造模式図

3. 研究の方法

本研究で提案するデバイスの実現のため、以下に示す3つの要素技術を組み合わせる必要がある。それぞれの内容に関して得意とする研究グループが開発・評価を主導して行い、密に打合せをすることによってグループ全体で研究を推し進めた。

- (1) 直径 5nm 以下のナノポアを形成した単層グラフェン自立メンブレンの作製
- (2) AuNP 表面分子の除去プロセスの検討と二量体を使った SERS 性能評価
- (3) SERS およびトンネル電流測定による一本鎖 DNA の解析

4. 研究成果

提案する光電気複合型ナノポアセンサデバイス実現に向け、各要素技術の発展および課題解決のために取り組んだ内容と得られた成果について以下に示す。

- (1) 直径 5nm 以下のナノポアを形成した単層グラフェン自立メンブレンの作製

グラフェン自立膜の直接成膜手法として、ガリウムを液体金属触媒として利用した常圧での化学気相成長 (Chemical Vapor Deposition: CVD) 法を新規に提案し、アルコールを原料としたグラフェン自立膜形成を行った。加熱時間・アルコール導用量・アニール速度等について CVD 条件を検討し、ラマン分光法により単層かつ低欠陥なグラフェン自立膜形成を確認した。各種のアルコールを用いた実験から原料の炭素と水酸基の割合が欠陥抑制に強い影響を及ぼすことがわかり、1 : 1 のときに最も欠陥が抑制された (図 2)。

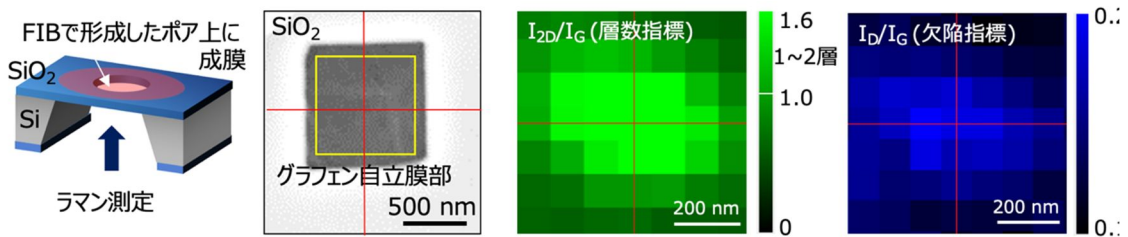


図 2 CVD グラフェン自立膜の SEM 像とラマンマッピング像(層数・欠陥)

貫通孔形成シリコン基板へ直接成膜されたグラフェン自立膜に対し、ヘリウムイオン顕微鏡でナノポア加工を行った。真空加熱前処理を行うことによって CVD プロセスで生じた基板上的残留汚染を除去し、イオンビームによる揮発有機汚染の再付着を抑制した。その結果、直接成膜を行った CVD グラフェン自立膜に対し再現性の高いナノポア加工が可能となった。直接成膜グラフェンにおいて直径 3.5nm を、間接転写グラフェン膜においては直径 1.5nm を実現した (図 3)。

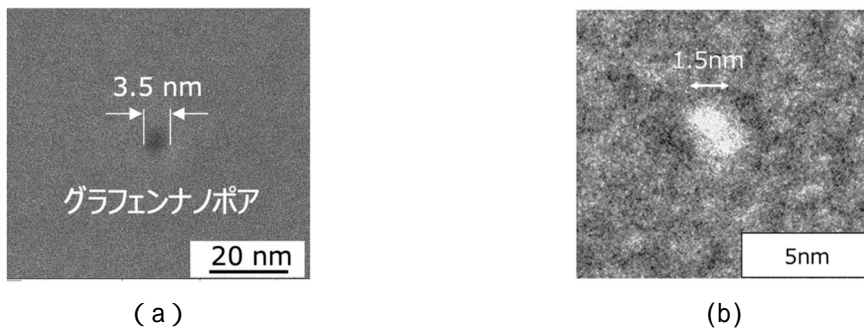


図 3 (a) 直接成膜グラフェン自立膜へのナノポア加工 (直径 3.5nm) の HIM 像
(b) 間接転写グラフェン自立膜へのナノポア加工 (直径 1.5nm) の TEM 像

常圧 CVD によるグラフェン自立膜の直接成膜法と、ヘリウムイオン顕微鏡によるナノポア加

工を組み合わせることで、再現性高く単一原子厚さを持つ DNA 塩基のセンシング部が形成できるようになり、AuNP ダイマーとグラフェンナノポアを組み合わせた光電気複合型センサデバイスによる新しい DNA 計測技術の構築が今後期待できる。

(2) AuNP 表面分子の除去プロセスの検討と二量体を使った SERS 性能評価

DNA ナノ構造を使って大粒径の AuNP ダイマーを作製するためには、緩衝液中での AuNP の凝集を防ぐことが前提となるため、一本鎖 DNA で AuNP 表面を高密度に被覆する必要がある。この実現方法を試行した結果、濃縮した AuNP と一本鎖 DNA の混合水溶液を冷凍した後に解凍する Freeze-thaw 法を導入することによって AuNP 表面に一本鎖 DNA が高密度に修飾され、AuNP が緩衝液中でも凝集せずに安定することを確認した。また、作製した DNA/AuNP 複合体をゲル電気泳動によって精製した後、シリコン基板に吸着させて SEM で観察した結果、収率 20% で直径 100nm の AuNP ダイマーが形成できることがわかった。

次に、DNA/AuNP 複合体から DNA のみを選択的に分解除去する方法を調査した。金ナノ粒子表面を覆う DNA をメルカプトヘキサノール (MCH) で置換した後にホウ素化水素ナトリウム (NaBH_4) 溶液に浸漬する方法は、ナノポアメンブレンの下部にダメージを与えずに金ナノ粒子二量体を用意するために有効である可能性が示された。図 4 は、各洗浄工程後の大気中 SERS 分析の結果を示しているが、MCH 後に NaBH_4 処理を施したものは、ラマンシグナル強度が弱く、表面を被覆していた DNA が除去されていることがわかる。

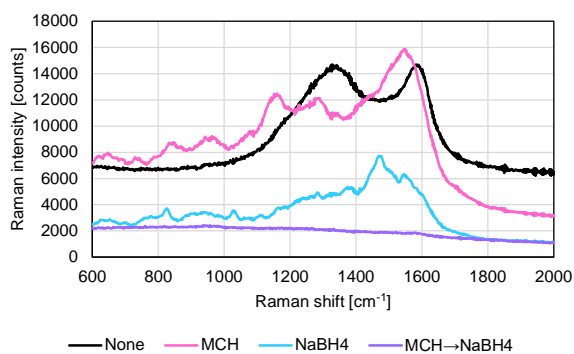


図 4 大気中 SERS 測定による AuNP 粒子表面の残差評価

最適化した手法によって形成した金ナノ粒子二量体を使って SERS による水溶液中の微量分子の検出

を行った。その結果、1nM の濃度の 4,4'-ピピリジン水溶液から DNA の残差由来の信号を含まない SERS シグナルの取得に成功した (図 5)。先行研究では、1 μM の濃度からの検出が限界であったことから、高感度化に成功したといえる。

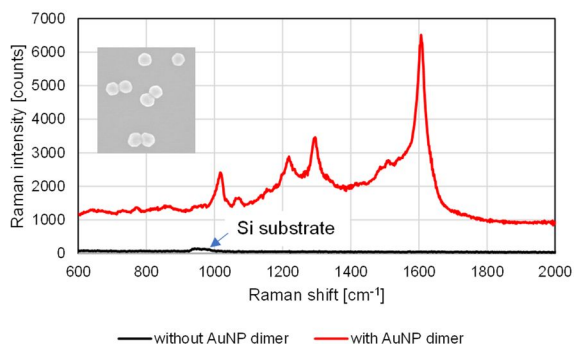


図 5 AuNP 二量体を使った SERS 測定による水溶液中の微量分子検出

(3) SERS およびトンネル電流測定による DNA 塩基の分析

基板上的 AuNP ダイマーを使って塩基配列が既知の一本鎖 DNA の SERS 測定を実施した。レーザスポット内に AuNP ダイマーが 1 つ存在する構造を作製し、アデニンまたはシトシンを含む 8 鎖長程度の DNA オリゴマーの検出を行った。粒子表面分子の除去プロセスと DNA オリゴマー溶液導入方法を最適化することで高い検出確率を実現した。さらに、AuNP ダイマー構造と SERS 強

度の相関を調べることにより、高い SERS 強度を得るための適したナノ構造の指針を得た。そして、光学的な 1 分子・1 塩基検出・同定の可能性を示した。

同様の構造を用いてトンネル電流による DNA オリゴマー検出可否を検証した。AuNP ダイマーを用いたナノギャップ電極作製プロセスの最適化を行うことで、光学的・電

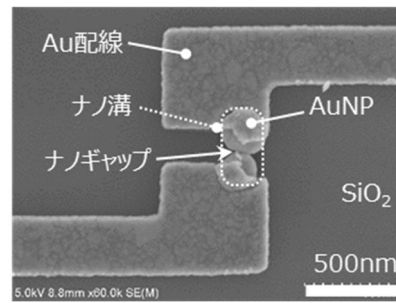


図 6 AuNP ダイマーを用いたナノギャップ電極

6) トンネル電流計測による電気的特性の評価(図 7)を行うとともに SERS 効果が得られることを明らかにした。また、配列基板の 4 点曲げを行う装置を構築することにより、ナノギャップのサイズ制御を行った。4 点曲げにより基板のたわみの増加により、SERS 強度やトンネル電流が増加することが明らかとなった。この結果により、今後光電気複合型センサデバイスによる新しい DNA 計測技術の構築が期待できる。

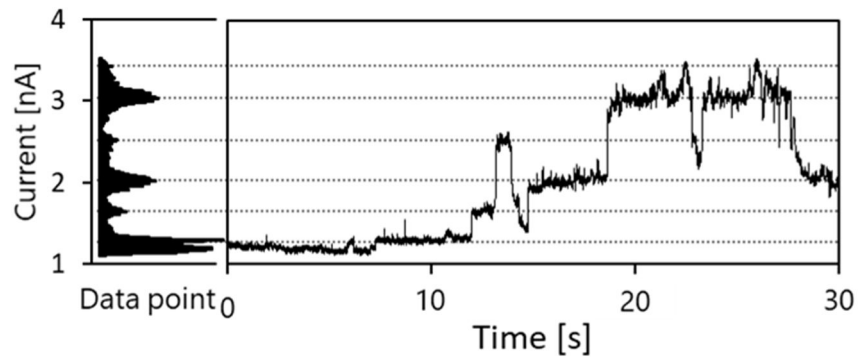


図 7 AuNP ダイマーを用いたナノギャップ電極における電流の時間変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Naoki, Park Seongsu, Kawai Kentaro, Hirai Yoshikazu, Tsuchiya Toshiyuki, Tabata Osamu	4. 巻 15
2. 論文標題 Surface enhanced Raman spectroscopy with gold nanoparticle dimers created by sacrificial DNA origami technique	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micro & Nano Letters	6. 最初と最後の頁 384 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1049/mnl.2019.0416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Naoyuki, Uesugi Akio, Sugano Koji, Isono Yoshitada	4. 巻 140
2. 論文標題 Polarization Dependence of Near-infrared Absorption Spectrum of Si-deposited Gold Nano-grating Structures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 72 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.140.72	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Akihiro, Sumitomo Takayuki, Uesugi Akio, Sugano Koji, Isono Yoshitada	4. 巻 2
2. 論文標題 Dynamic electrical measurement of biomolecule behavior via plasmonically-excited nanogap fabricated by electromigration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nano Express	6. 最初と最後の頁 010032 ~ 010032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/2632-959X/abe9c0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsubota Tatsuya, Arai Naoyuki, Harada Atsuya, Uesugi Akio, Sugano Koji, Isono Yoshitada	4. 巻 38
2. 論文標題 Silicon-coated gold nanodiffraction grating structures as plasmonic absorbers for short-wavelength infrared light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Optical Society of America B	6. 最初と最後の頁 2863 ~ 2863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/JOSAB.427768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugano Koji, Maruoka Katsunari, Ikegami Kohei, Uesugi Akio, Isono Yoshitada	4. 巻 47
2. 論文標題 Dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA oligomer with a single hotspot from a gold nanoparticle dimer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 373 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OL.441580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 16件)

1. 発表者名 Kentaro Kawai, Keita Hara, Kenta Arima, Kazuya Yamamura, Osamu Tabata
2. 発表標題 DNA origami assembly in gradient temperature microfluidic channel
3. 学会等名 The 14th International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentaro Kawai, Keita Hara, Kenta Arima, Kazuya Yamamura, Osamu Tabata
2. 発表標題 Rapid assembly of DNA origami in microfluidic temperature gradient
3. 学会等名 The 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Tsuji, Kenta Arima, Kazuya Yamamura, and Kentaro Kawai
2. 発表標題 Freestanding graphene CVD growth on insulating substrate using Ga catalyst
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Yamashita, Seongsu Park, Kentaro Kawai, Yoshikazu Hirai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata
2. 発表標題 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy with Gold Nanoparticle Dimers Created by Sacrificial DNA Origami Technique
3. 学会等名 The 14th International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下直輝, 朴晟洙, 馬志鵬, 川合健太郎, 平井義和, 土屋智由, 田畑修
2. 発表標題 犠牲DNAオリガミ技術によって形成した金ナノ粒子二量体を用いた表面増強ラマン分光法による分子検出
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Morita, Akio Uesugi, Koji Sugano, and Yoshitada Isono
2. 発表標題 Manipulation of Biomolecules Into Nanogap by Plasmonic Optical Excitation for Highly Sensitive Biosensing
3. 学会等名 The 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Sugano, Katsunari Maruoka, Akio Uesugi, and Yoshitada Isono
2. 発表標題 SERS Detection of a Single Nucleobase in a DNA Oligomer Using a Gold Nanoparticle Dimer
3. 学会等名 The 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji. Murotani, Katsunari Maruoka, Akio Uesugi, Koji Sugano, Yoshitada Isono
2. 発表標題 Effect of Gold Nanoparticle Diameter on Raman Intensity of DNA Oligomers toward Single Nucleobase Detection
3. 学会等名 32nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Sugano
2. 発表標題 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA with Single-Molecule Sensitivity Using Gold Nanoparticle Dimer
3. 学会等名 The 19th IEEE International Conference on Nanotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Sugano
2. 発表標題 Single-molecule Surface Enhanced Raman Spectroscopy Using Gold Nanoparticle Dimer
3. 学会等名 2019 International Conference on Optical MEMS and Nanophotonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金谷恭臣, 丸岡克成, 森田明宏, 上杉晃生, 菅野公二, 磯野吉正
2. 発表標題 金ナノ粒子二量体表面増強ラマン分光によるDNAオリゴマーの1塩基検出
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田明宏, 上杉晃生, 菅野公二, 磯野吉正
2. 発表標題 光励起ナノギャップ電極を用いたDNA オリゴマーの光トラップおよび1分子検出
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Tabata
2. 発表標題 DNA as an Engineering Material to Bridge between MEMS and Nanotechnology
3. 学会等名 The 19th IEEE International Conference on Nanotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下直輝
2. 発表標題 DNAオリガミを利用したSERS分析用金ナノ粒子二量体の形成とその固定化技術
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住友 孝行, 森田 明宏, 上杉 晃生, 菅野 公二, 磯野 吉正
2. 発表標題 金ナノ粒子二量体を用いたナノギャップ電極の作製とその電氣的・光学的評価
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Sumitomo, A. Morita, A. Uesugi, K. Sugano Y. Isono
2. 発表標題 Electrical and Optical Characterization of Nanogap Electrodes with an Assembled Gold Nanoparticle Chain
3. 学会等名 33rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Sugita, T. Tsuji, K. Arima, K. Yamamura, K. Kawai
2. 発表標題 Reproducible formation of graphene nanopore within 10 nm using helium ion microscope
3. 学会等名 18th International Conference on Precision Engineering (ICPE2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 N. Yamashita
2. 発表標題 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Gold Nanoparticle Dimers Formed by DNA Origami as a Sacrificial Nanostructure
3. 学会等名 The 14th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine & Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野⽥晃平, 辻友希, 杉⽥祥吾, ⼭村和也, 有⾺健太, 川合健太郎
2. 発表標題 DNAシーケンシングデバイスのためのマイクロ流路を⽤いたナノピラー/横型ナノポア集積化
3. 学会等名 2021年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田祥吾, 野田晃平, 有馬健太, 山村和也, 川合健太郎
2. 発表標題 ヘリウムイオン顕微鏡でのナノポア形成における加工前処理条件の検討
3. 学会等名 精密工学会2021年度関西地方定期学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kentaro Kawai
2. 発表標題 Fabrication and observation of nanopore in two-dimensional materials using Helium ion microscope
3. 学会等名 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuanzhi Chang, Takayuki Sumitomo, Akio Uesugi, Koji Sugano, Yoshitada Isono
2. 発表標題 Characterization of nanogap with gold nanoparticle dimer controlled by four-point bending for electrical and optical single molecule measurement
3. 学会等名 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Sugano
2. 発表標題 Manipulation and detection of a single DNA oligomer using a gold nanoparticle dimer
3. 学会等名 The 17th International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

菅野公二 https://researchmap.jp/read0144548 川合健太郎 https://researchmap.jp/kawai_k 山下直輝 https://researchmap.jp/naoki-yamashita 田畑 修 https://researchmap.jp/tabata.osamu
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅野 公二 (SUGANO KOJI) (20372568)	神戸大学・工学研究科・准教授 (14501)	
研究分担者	山下 直輝 (YAMASHITA NAOKI) (50847746)	東京理科大学・理工学部機械工学科・助教 (32660)	
研究分担者	川合 健太郎 (KAWAI KENTRO) (90514464)	大阪大学・工学研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------