

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22108

研究課題名（和文）積層集積ナノポアを用いた1細胞内物質解析法の創成

研究課題名（英文）Single-cell analysis using a 3D-integrated nanopore

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、電子線リソグラフィー等の微細加工技術を用いて、固体ナノポアとマルチポアを3次元的に集積させた積層集積ナノポアを作製した。そしてこれを用いて、1個の大腸菌の細胞膜を、マルチポア部に生じさせた強電場により破壊し、マルチポアよりも小さな細胞内物質だけを、ナノポア部に通すことに成功した。さらに、得られたイオン電流信号波形を解析したところ、大腸菌内のリボソームやDNAが検出されていたことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で創成した積層集積ナノポアによる1細胞内物質分析法は、細孔サイズ如何でDNAから細胞小器官まであらゆる細胞内粒子・分子の解析が可能な原理を有する。今後、当該技術が医療分野などで広く応用されることで、ハイスループット且つ超高感度な細胞診が実現でき、早期がん診断、ひいては遺伝子レベルの治療法の可能性を拓くことができると期待される。

研究成果の概要（英文）：A 3D-integrated nanopore was fabricated that consisted of a multipore membrane stacked vertically on a SiNx nanopore membrane via a thick polyimide layer. This novel nanosensor was used to measure intra-cellular molecules of *E. coli*. When the bacterial cell was trapped at the multipore, its membrane surface was ruptured by the strong electric field there that enabled extraction to resistive pulse sensing of the molecules inside including ribosomes and DNA.

研究分野：マイクロ・ナノ科学

キーワード：ナノポア 電気穿孔 1細胞解析 電気泳動 イオン電流

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、1分子・粒子計測のための高速微小電流計測技術を開発し、これを用いて高空間分解能ナノポアセンサによる1粒子識別法を創成してきた。さらに、高時間・空間分解能なポリイミド被覆ナノポアセンサと、機械学習による電流波形解析を融合させ、細菌・ウイルス等の実生体粒子の1粒子識別に成功した。その中で、ナノポア法による細胞内物質の1粒子レベル分析の実現可能性を見通すと共に、多細胞分析に留まっている従来法の原理的な課題を見出した。そして、マルチポアを、細胞穿孔の場合だけでなく高性能なフィルタとして機能させることで、この課題が解決できると考え、マルチポアとポリイミド被覆ナノポアを融合させた積層集積ナノポアによる細胞内物質分析法の創成に関する本計画を着想するに至った。

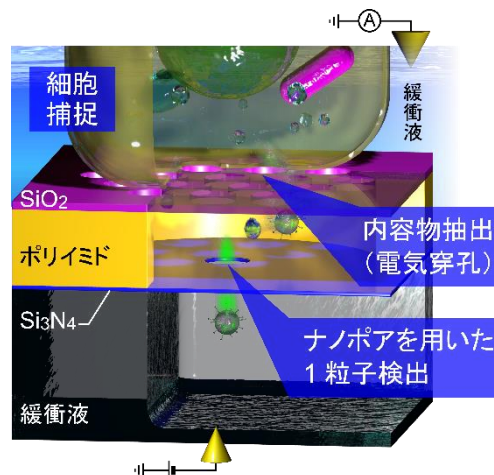


図1. 積層集積ナノポアによる1細胞内物質検出.

2. 研究の目的

本研究では、ナノポア法を基盤とする1細胞内物質の1粒子検出法を創成する(図1)。まず、マルチポアとポリイミド被覆ナノポアを3D集積させた積層集積ナノポアを創製する。そして、当該デバイスのマルチポア近傍に生じる強電場を利用した1細胞電気穿孔法を確立すると共に、マルチポア内のナノ制限空間における細胞膜の局所電場誘起細胞膜変形・破壊メカニズムを解明する。以上の実験を通して得られる知見を集約し、積層集積ナノポアを用いた1細胞内ミトコンドリア並びにリボソームの1粒子検出を実証する。

3. 研究の方法

はじめに、マルチポアの直下にナノポアを配置させた積層集積ナノポアを創製する。基本構造はポリイミド被覆ナノポアであり、本研究ではさらに当該ポリイミド層上面にCVD法を用いてSiO₂メンブレンを形成させ、電子線描画法等MEMS技術(既存設備)を駆使してマルチポアを開口させる(作製プロセス構築済み)。このようにして作製する積層集積ナノポアを用いて、ナノ粒子を内包させたリボソーム(球状人工細胞膜)を対象に、動作実証を実施する。この段階では、2種類のサイズのナノ粒子を測定対象として用い、得られるイオン電流信号の波高から、リボソーム内包ナノ粒子の検出可否を判断する。以上の実験を通して、積層集積ナノポアの動作原理を実証する。実細胞を対象にした1細胞電気穿孔法を創成する。まず、前述の動作実証において得られる知見を基に、マルチポア上に1細胞をトラップすると共に、細孔に生じる強力な電場を変調させることで、その細胞膜を変形・破壊する。その過程で観測されるイオン電流変化を詳細に調べ、さらにマルチフィジックスイオン電流計算の結果と照合することで、マルチポアにおける細胞膜変形・破壊機構を明らかにする。測定対象には動物細胞と植物細胞を用いる(大腸菌について、すでに膜破壊可能であることは確認済み)。なお、実験ではマルチポアの片側を低塩濃度の緩衝液で満たしておく。この工夫により、細胞膜に浸透圧が生じ、膜破壊が容易になるだけでなく、塩濃度勾配によって誘起される電場効果によって、穿孔後のマルチポアを介した細胞内物質の輸送が促進できる。以上の実験を通して、マルチポアを用いた1細胞電気穿孔法を確立する。創成する1細胞電気穿孔法を用いて、積層集積ナノポアによる1細胞内物質の1粒子検出を実施する。検出対象は、マイクロメートルサイズのミトコンドリアと数十ナノメートルサイズのリボソームとする。これらの検体に合わせて、粒子検出用ナノポアの直径は、3 μm並びに100 nmのものを用いる(申請者のナノ加工技術では、直径100 μm~20 nmのナノポア作製が可能)。そして、測定で得られるイオン電流信号の波形を機械学習に掛け、粒子同定を行う(学習データ=従来のナノポア法での計測結果)。以上の実験を通して、積層集積ナノポアによる1細胞内物質の1粒子検出を実証する。

4. 研究成果

ポリイミド被覆ナノポアとマルチポア構造を融合した、積層集積ナノポアの作製プロセスを開発した。まずCVD法により窒化膜を成膜したシリコンウエハの片面から、KOHによるウェットエッチングによりシリコン層を除去し、窒化シリコンメンブレンを作製した。次に、電子線リソグラフィと反応性イオンエッチングにより、メンブレン中に1個のナノポアを開口させた。続いてメンブレン上にポリイミド膜を成膜し、さらにCVD法により上部をSiO₂層で覆った。そして、電子線描画を行い、反応性イオンエッチングによりSiO₂層内にマルチポアを加工した。最

後に、この SiO₂ 層をマスクとして利用し、ポリイミド層をアッシングにより除去した。以上のプロセスにより、ナノポアおよびマルチポアの直径が 60 nm までの積層集積ナノポアを作製した。

実験では、まず積層集積ナノポアの動作実証として、大きさの異なるポリスチレンナノ粒子を対象に、イオン電流計測による 1 粒子検出を実施した。ナノポアとマルチポアの直径が共に 260 nm のものを用い、直径 900 nm と 100 nm のポリスチレン粒子を測定した。その結果、直径 900 nm の粒子はマルチポア部でフィルタリングされ、100 nm の粒子だけをナノポアに通過させることができた。さらに、得られたイオン電流波形を有限要素シミュレーションの結果と照合し、100 nm の粒子がナノポアを通過したことを確認した。以上の結果により、当初の想定通り、マルチポアがフィルタと機能することが確認でき、さらにフィルタを通過する微小粒子をイオン電流測定により検出可能であることを実証した。

次に、積層集積ナノポアを用いた細胞内物質検出を試した。測定対象は、大腸菌と枯草菌とした。積層集積ナノポアのポア径は、ナノポアとマルチポア共に直径 60 nm のものを用いた。リン酸緩衝液にこれらの細菌を加え、ナノポアを通るイオン電流を測定したところ、電圧が 0.5 V 以下の場合には、特に細菌の膜破壊や細胞内物質の検出を示唆する電流変化は観測されなかった。それに対し、電圧を 1 V まで上昇させたところ、大腸菌の膜破壊を示唆するイオン電流の急峻な増大傾向が観測された。さらにこれに続いて、まずパルス状の電流変化が観測された。これは、大腸菌の膜がマルチポア部に生じる強電場によって破壊され、細胞内のリボソームやプラスミドが溶出し、これらがナノポアを通過した結果である、と解釈された。さらに測定を続行すると、ステップ状のイオン電流変化が現れた。この特徴的なシグナルを積算し、ヒストグラムを作成したところ、ある電流値の整数倍のところにピークが確認できた。これは、大腸菌の DNA が様々な折り畳み構造を持ちながらナノポアを通過したことを示唆する結果である。一方、枯草菌ではこれらのイオン電流変化は観測されなかった。枯草菌は強固な芽胞を作るため、マルチポア部での強電場にも耐え膜が破壊されなかったことによる結果であると解釈された。

以上の通り、本研究では積層集積ナノポアを作製し、これを用いて 1 細胞の膜破壊並びに細胞内物質の検出に成功した。

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Deep learning-enhanced nanopore sensing of single-nanoparticle translocation dynamics
Makusu Tsutsui, Takayuki Takaai, Kazumichi Yokota, Tomoji Kawai, and Takashi Washio
Small Methods, doi.org/10.1002/smt.202100191 (2021)、査読あり
2. Dielectric Coatings for Resistive Pulse Sensing Using Solid-State Pores
Tomoki Hayashida, Makusu Tsutsui, Sanae Murayama, Tomoko Nakada, and Masateru Taniguchi
ACS Appl. Mat. Interf. 13, 10632–10638 (2021)、査読あり
3. Quasi-stable salt gradient and resistive switching in solid-state nanopores
Iat Wai Leong, Makusu Tsutsui, Sanae Murayama, Tomoki Hayashida, Yuhui He, and Masateru Taniguchi
ACS Appl. Mat. Interf. 12, 52175–52181 (2020)、査読あり
4. Machine learning-driven electronic identifications of single pathogenic bacteria
Shota Hattori, Rintaro Sekido, Iat Wai Leong, Makusu Tsutsui, Akihide Arima, Masayoshi Tanaka, Kazumichi Yokota, Takashi Washio, Tomoji Kawai, and Mina Okochi
Sci. Rep. 10, 15525 (2020)、査読あり
5. Dissecting time-evolved conductance behavior of single molecule junctions by nonparametric machine learning
Bo Liu, Sanae Murayama, Yuki Komoto, Makusu Tsutsui, and Masateru Taniguchi
J. Phys. Chem. Lett. 11, 6567–6572 (2020)、査読あり
6. Crucial role of out-of-pore resistance on temporal response of ionic current in nanopore sensors
Shohei Kishimoto, Sanae Murayama, Makusu Tsutsui, and Masateru Taniguchi
ACS Sens. 5, 1597–1603 (2020)、査読あり

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. 固体ナノポアにおける非対称イオン輸送
梁 逸偉, 筒井 真楠, 谷口 正輝
第 81 回応用物理学会秋季学術講演会、2020 年

2. Negative differential resistance in a nanopore under salt gradient: models of surface charge effect
梁 逸偉、筒井 真楠、谷口 正輝
日本化学会第 101 春季年会、2021 年
3. 四重極電極組込ポアを用いた非修飾粒子の検出
林田 明樹、筒井 真楠、谷口 正輝
日本化学会第 100 春季年会、2020 年
4. Asymmetric ionic transport through low-aspect-ratio nanopore under electrolyte concentration gradient
梁 逸偉、筒井 真楠、谷口 正輝
日本化学会第 100 春季年会、2020 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shohei Kishimoto, Sanae Murayama, Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Crucial Role of Out-of-Pore Resistance on Temporal Response of Ionic Current in Nanopore Sensors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b00113	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 Liu Bo, Murayama Sanae, Komoto Yuki, Tsutsui Makusu, Taniguchi Masateru	4. 巻 11
2. 論文標題 Dissecting Time-Evolved Conductance Behavior of Single Molecule Junctions by Nonparametric Machine Learning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 6567 ~ 6572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c01948	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 Hattori Shota, Sekido Rintaro, Leong Iat Wai, Tsutsui Makusu, Arima Akihide, Tanaka Masayoshi, Yokota Kazumichi, Washio Takashi, Kawai Tomoji, Okochi Mina	4. 巻 10
2. 論文標題 Machine learning-driven electronic identifications of single pathogenic bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72508-3	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 Leong Iat Wai, Tsutsui Makusu, Murayama Sanae, Hayashida Tomoki, He Yuhui, Taniguchi Masateru	4. 巻 12
2. 論文標題 Quasi-Stable Salt Gradient and Resistive Switching in Solid-State Nanopores	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 52175 ~ 52181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsam.0c15538	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 Hayashida Tomoki, Tsutsui Makusu, Murayama Sanae, Nakada Tomoko, Taniguchi Masateru	4. 巻 13
2. 論文標題 Dielectric Coatings for Resistive Pulse Sensing Using Solid-State Pores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 10632 ~ 10638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.0c22548	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 Tsutsui Makusu, Takaai Takayuki, Yokota Kazumichi, Kawai Tomoji, Washio Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Deep Learning Enhanced Nanopore Sensing of Single Nanoparticle Translocation Dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Small Methods	6. 最初と最後の頁 2100191 ~ 2100191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smt.202100191	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梁 逸偉、筒井 真楠、谷口 正輝
2. 発表標題 固体ナノポアにおける非対称イオン輸送
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梁 逸偉、筒井 真楠、谷口 正輝
2. 発表標題 Negative differential resistance in a nanopore under salt gradient: models of surface charge effect
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林田 明樹、筒井 真楠、谷口 正輝
2. 発表標題 四重極電極組込ポアを用いた非修飾粒子の検出
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梁 逸偉、筒井 真楠、谷口 正輝
2. 発表標題 Asymmetric ionic transport through low-aspect-ratio nanopore under electrolyte concentration gradient
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------