

平成 23 年 3 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200025

研究課題名（和文） ゲーティング固体ナノポアによるDNAシーケンシング

研究課題名（英文） Development of DNA Sequencing Technologies Using Gating Nanopores

研究代表者

谷口 正輝 (TANIGUCHI MASATERU)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：40362628

研究成果の概要（和文）：数十nm以下の直径を持つナノポアと、直径と同じ電極ギャップを持つナノ電極が融合したゲーティングナノポアを開発した。直径30nmの縦型ゲーティングナノポアを、微細加工技術を用いて作製し、ナノ電極間の電流変化により、直径28nmの金ナノ粒子の検出に成功した。また、マイクロ流路と機械的破断接合を組み合わせて横型ゲーティングナノポアを作製し、ナノ電極間のトンネル電流により、核酸塩基分子の単分子識別に成功した。

研究成果の概要（英文）：Gating nanopores are the key devices for third generation DNA sequencing technologies. These nanodevices will make sequencing kilobase length single-stranded genomic DNA or RNA or identifying individual small molecules using only electric currents and without fluorescent labels at low cost and unheard speeds. We have developed vertical and parallel gating nanopores with embedded nanogap-electrodes in a solid-state nanopore. The vertical type consists of a single nanogap electrode with the nanopore perpendicular to the surface of the silicon substrate. The parallel type consists of a single nanogap electrode with the nanopore parallel to the surface of the substrate. We synthesized vertical gating nanopores with a diameter of 30 nm using an 11-step nanofabrication process. Vertical gating nanopores can identify a single Au nanoparticle ($\phi = 28$ nm) passing through them by changes in the electric current flowing between the nano-electrodes. Single base molecules of DNA can be identified by changes in tunneling current between nano-electrodes using parallel gating nanopores, incorporating a microfluidic channel in to nano-fabricated mechanically controllable break-junction. We found that single-molecule electrical conductance order thymine < cytosine < adenine < guanine corresponds to the highest occupied molecular orbital (HOMO) energy order.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
総計	24,100,000	7,230,000	31,330,000

研究代表者の専門分野：単分子科学、分子デバイス

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス、複合化学・分析化学

キーワード：ナノポア、ゲーティングナノポア、DNAシーケンサー、微細加工、単一分子計測、トンネル電流、イオン電流

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの完全解読に成功したヒューマンゲノムプロジェクトの終わりは、ゲノム情報を利用した個別化医療の幕開けと期待されていた。ところが、DNAの塩基配列を決定するDNAシーケンサーのスピードとコストが、個別化医療を実現する大きな障壁となっていた。例えば、1世代DNAシーケンサーは、30億塩基から構成されるヒトゲノムの完全解読には、3ヶ月と\$10000000を要する。このような状況下、ヒューマンゲノムプロジェクトを主導した米国国立衛生研究所(NIH)は、いち早く、1日と\$1000でヒトゲノムを完全解読する次々世代DNAシーケンサーの開発プロジェクトを立ち上げ、巨額の資金を投入し、研究・開発を開始させた。そのターゲットデバイスとなっているのが、ゲーティングナノポア(ゲーティング固体ナノポア)である。

ゲーティングナノポアは、数nmの直径を持つナノポアと、直径と同じギャップを持つナノギャップ電極から構成されるナノデバイスである。1本のDNAがゲーティングナノポアを通過するとき、このデバイスは、塩基分子を介したナノ電極間のトンネル電流により、1塩基分子を識別する検出原理を持つ。1世代、2世代DNAシーケンサーが、光を検出プローブにしているのに対し、ゲーティングナノポアは、電気を検出プローブとしているため、蛍光色素等のDNAへの化学修飾を必要としない。また、ゲーティングナノポアは、1本のDNAを検出対象とするため、PCRによるDNA増幅過程も必要としない。従って、ゲーティングナノポアは、光から電気、バルクから1分子へのパラダイムシフトを持った革新的デバイスである。

しかし、本研究を提案した当時、理論計算は、この検出原理が正しいことを証明していたが、実験による実証は行われていなかった。これは、数nmのナノギャップ電極を高い精度で作製し、単分子の電気特性をナノギャップ電極により計測する手法が未確立であったためである。また、数nm程度の位置合わせ・加工精度が要求される複雑なナノ構造のため、ゲーティングナノポア構造が開発されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、微細加工技術を駆使して、ゲーティングナノポアの作製プロセスを確立し、ゲーティングナノポアを用いて、1個のナノ粒子・1塩基分子を電流により検出・識別することを目的とした。特に、3世代DNAシーケンサーの検出原理を、世界に先駆け、実験で実証することを最優先課題に設定して研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 縦型ゲーティングナノポアの開発

①ゲーティングナノポアには、ナノポアが基板平面に垂直に配置される縦型ゲーティングナノポア(図1)と、並行に配置される横型ゲーティングナノポア(図2)の2種類がある。縦型ゲーティングナノポアは、絶縁体である Si_3N_4 で両面被覆されたシリコン基板の上に、11の微細加工プロセスの組み合わせで作製された。ナノギャップ電極として、金を用い、電流ノイズの低減のため、ナノギャップ電極を SiO_2 で被覆した。

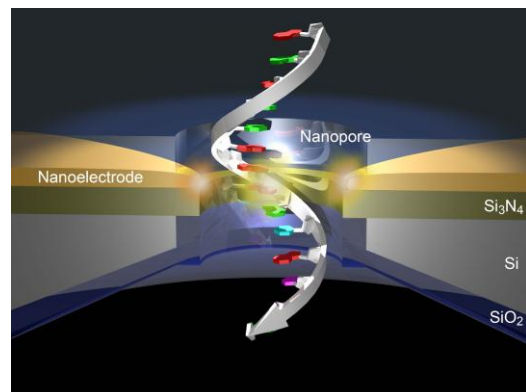


図1. 縦型ゲーティングナノポアの模式図。ナノ電極とナノポアから構成され、ナノポアは基板と垂直に配置される。

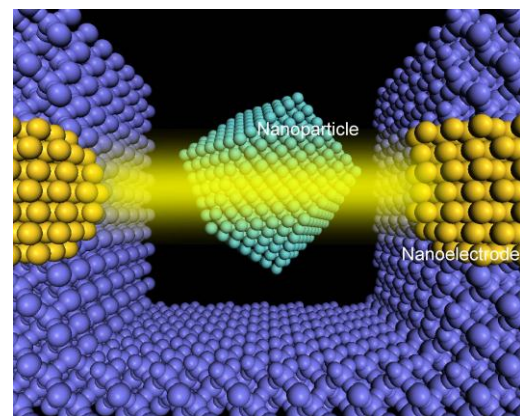


図2. 横型ゲーティングナノポアの模式図。ナノ電極とナノポアから構成され、ナノポアは基板と並行に配置される。

②開発した直径30nmのゲーティングナノポアを用いて、金ナノ粒子(直径28nm)の検出を行うため、シリコン基板の両面にポリジメチルシラン(PDMS)のマイクロ流路を形成した。ゲーティングナノポア内に金ナノ粒子を電気泳動で流動させるため、2つのマイクロ流路にそれぞれ1本の白金電極を配置した。マイクロ流路内には、シリンジポンプにより、金ナノ粒子の水溶液を流しこみ、ナノ電極間の電流—時間プロファイルを10kHzの

サンプリングスピードで計測した。

(2) 横型ゲーティングナノポアの開発

①横型ゲーティングナノポアは、微細加工機械的破断接合で作製するナノギャップ電極とマイクロ流路を組み合わせで作製された。

②マイクロ流路内に配置された1対の電極間の電気泳動により、平均直径2nmの金ナノ粒子の水溶液を、2nmの横型ゲーティングナノポアに流動させた。ナノ電極間の電流—時間プロファイルを2kHzのサンプリングスピードで計測した。

(3) トンネル電流による1核酸塩基分子識別
DNAを構成する4つの核酸塩基分子(アデニン、シトシン、グアニン、チミン)の水溶液を流動させ、1nmの横型ゲーティングナノポアを用いて、電流—時間プロファイルを2kHzのサンプリングスピードで計測した。

(4) 電流揺らぎによる単分子識別

新しい単分子識別技術を開発するため、ヘキサジチオール単分子接合の電流—電圧曲線を4.2Kで測定し、電流—電圧曲線から、電流の揺らぎ成分を抽出した。また、同じ単分子接合の4.2Kにおける非弾性トンネルスペクトルを計測した。

4. 研究成果

(1) 縦型ゲーティングナノポアによる金ナノ粒子の検出

金ナノ粒子の電流—時間プロファイルには、最大電流値 (I_p) と電流持続時間 (t_d) で特徴付けられるスパイク状のシグナルが観察された (図3)。 I_p と t_d の相関を調べたところ、 I_p と t_d が、比例関係にあることを見出した。定常流における流動解析の結果、 $I_p \propto t_d$ は、金ナノ粒子がゲーティングナノポア内に長く滞在すれば、電流値が大きくなる現象を表すことが分かった。また、 I_p の分散は、金ナノ粒子の直径分散と相関していることが示唆された。これらの結果は、電流の変化により、1個の金ナノ粒子が検出できることを示している。

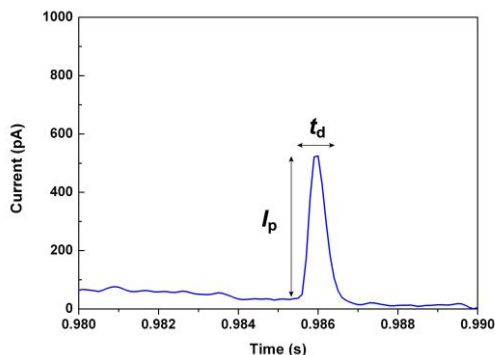


図3. 直径30nmの縦型ゲーティングナノポアを用いた金ナノ粒子(直径28nm)の検出における電流—時間プロファイル。 I_p と t_d は、それぞれ、最大電流値と電流持続時間を表す。

(2) 横型ゲーティングナノポアによる金ナノ粒子の検出

縦型ゲーティングナノポアと同様に、 I_p と t_d で特徴付けられるスパイク状の電流シグナルが観測され、 I_p は t_d と比例関係にあることが明らかとなった。従って、ナノ電極間の電流変化により、1個の金ナノ粒子(直径2nm)を検出できることが分かった。

(3) トンネル電流による核酸塩基分子識別

横型ゲーティングナノポアを用いて得られた電流—時間プロファイルは、金ナノ粒子の検出実験と同様に I_p と t_d で特徴付けられるスパイク状のシグナルを示した。グアニンの核酸塩基(GMP)水溶液を流動させたときの電流—時間プロファイルから得られる I_p のヒストグラムを形成したところ、ヒストグラムに1つのピークが観測された(図5)。このヒストグラムピークの電圧依存性を調べたところ、ピーク電流値と電圧が比例関係にあることを見出した。

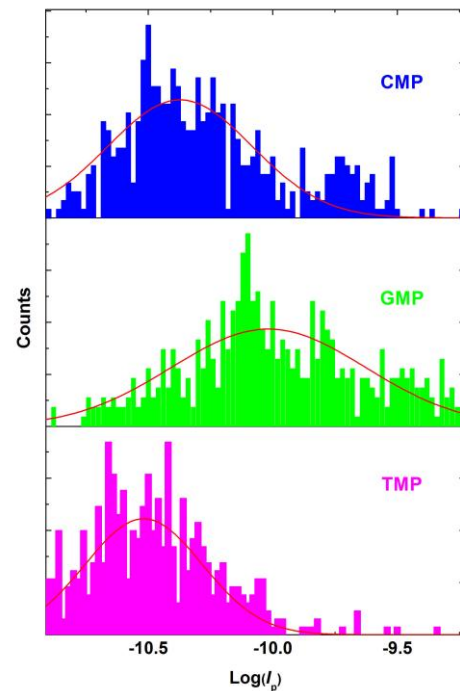


図4. 核酸塩基分子の電流ヒストグラム. 各電流値は、電流—時間プロファイルから得られた I_p を示す. 赤線は、ガウスフィットを示す. CMP、GMP、TMPは、それぞれ、シトシン、グアニン、チミンの核酸塩基.

他の3つの核酸塩基分子水溶液を流動させた時の電流—時間プロファイルから、それぞれ I_p ヒストグラムを作成したところ、アデニン以外の3つの核酸塩基分子のヒストグラムに、1つのピーク電流値が得られた(図5)。得られたピーク電流値のオーダーは、グアニン>シトシン>チミンであった。分子軌道計算から得られた各塩基分子の最高占有軌道(Highest Occupied Molecular Orbital:

HOMO) のエネルギー準位と金のフェルミ準位のギャップエネルギーのオーダーが、ピーク電流値のオーダーに一致していることから、得られた電流値の起源は、核酸塩基分子の HOMO を介したトンネル電流であると考えられる。

また、グアニンとチミンを 1 対 1 のモル比で混合した水溶液の電流—時間プロファイルを計測し、 I_p ヒストグラムを作成したところ、グアニンとチミンに対応する 2 つの電流ピークが観察され、ピーク電流値により、塩基分子の種類を識別できることを実証した。

このように、ゲーティングナノポアを用いて、3 世代 DNA シーケンサーの検出原理を実証した。

(4) 電流ノイズによる単分子識別

金を電極としたヘキサジチオール単分子接合の電流—電圧曲線を 50 回測定し、各電圧における電流の分散値を算出した。さらに、電流分散値から $1/f$ 揺らぎ成分を差し引き、電圧で微分したスペクトルを算出した。得られた電流ノイズスペクトルには、電圧に対して対称的なピークが観察された。

同じ単分子接合の非弾性トンネルスペクトルを計測し、非弾性トンネルスペクトルと理論計算を組み合わせることで、スペクトルピークを与える分子振動モードの帰属を行った。電流ノイズスペクトルと非弾性トンネルスペクトルを比較したところ、2 つのスペクトルピークの多くが一致することを見出した。これらの結果から、電流揺らぎは、非弾性トンネル過程において放出されるフォノンエネルギーによる局所加熱が原因と考えられる。

以上の結果、電流—電圧曲線における電流揺らぎ解析が、新しい単分子解析技術になることを見出した。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕 (計4件)

- ① Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, Single Molecule Identification via Electric Current Noise, Nature Communications, 1, 138-142, 2011、査読有
- ② Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi, Kazumichi Yokota, Tomoji Kawai, Identifying Single Nucleotides by Tunneling Current, Nature Nanotechnology, 5, 286-290, 2010、査読有
- ③ Masateru Taniguchi, Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Tomoji Kawai, Fabrication of the Gating Nanopore, Appl. Phys. Lett., 95, 123701-123703, 2009、査読有

- ④ Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, Atomistic Mechanics and Formation Mechanism of Metal-Molecule-Metal Junctions, Nano Lett., 9, 2433-2439, 2009、査読有

〔学会発表〕 (計7件)

- ① 谷口正輝、核酸塩基分子の単分子識別—次々世代DNAシーケンサーにむけて—、日本化学会第91春季年会、2011年3月28日、神奈川大学 (神奈川県)
- ② 谷口正輝、1 分子解析技術による次々世代DNAシーケンサーの開発、日本表面科学会第69回表面科学研究会、2011年3月9日、東京工業大学 (東京都)
- ③ Masateru Taniguchi, Development of Gating Nanopores for Single-Molecule Electrical Sequencing, International Symposium: Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules, 2011年1月24日、京都国際会館 (京都府)
- ④ Masateru Taniguchi, Development of 3 D Generation DNA Sequencer Using Gating Nanopore Devices, 2nd Japanese-Russian Young Scientists Conference on Nano-materials and Nano-technology, 2010年9月22日、東京工業大学 (東京都)
- ⑤ 谷口正輝、ゲーティングナノポアを用いた 1 分子検出、バイオ・マイクロシステム研究会、電気学会研究会、2010年1月29日、名古屋大学 (愛知県)
- ⑥ Masateru Taniguchi, Identification of Single Nucleotides Using Gating Nanopores, 13th SANKEN International Symposium 2010, 2010年1月19日、関西空港ANAホテル (大阪府)
- ⑦ 谷口正輝、ゲーティング固体ナノポアを用いた電気計測、第56回応用物理学関係連合講演会、2009年3月31日、筑波大学 (茨城県) (招待講演)

〔その他〕

ホームページ

<http://www-kawai.sanken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 正輝 (TANIGUCHI MASATERU)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：40362628

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者
該当なし