

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510114

研究課題名（和文） ナノ流体デバイスによる分子ソーターの開発

研究課題名（英文） Development of Molecular Sorter using Nanofluidic Device

研究代表者

山本 貴富喜 (Yamamoto Takatoki)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号 20322688

研究成果の概要（和文）：

本研究は、幅や高さが数 10nm サイズのナノ流路を利用して、生体分子を 1 分子ずつ検出する 1 分子センシングデバイスを実現するために必要な要素技術の開発を目的としてスタートした。その結果、ナノ流路内で fA オーダーの感度を持つ電流計測系の構築に成功し、ナノ流路内での超高感度電流測定から、ナノ流路を流れる DNA1 分子の検出に成功した。さらに、オンチップ型の fA 級電流測定回路の集積化にも成功し、集積化 1 分子計測ナノ流体システムの構築を一步進めることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

This work is to develop a single-molecule sensing device using nanofluidic system, which has a channel having tens to hundreds nanometer sized width and height. As results, we have successfully demonstrated the single DNA molecule detection in the nanochannel by ultra-sensitive (fA order) electric measurement. Furthermore, we have also successfully demonstrated an on-chip electric measurement circuit, which was integrated on the nanofluidic chip to realize portable system.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,180,000 | 4,680,000 |

研究分野：複合新領域

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

キーワード：1 分子イメージング・ナノ計測・

1. 研究開始当初の背景

バイオテクノロジーにおける様々な合成や分析の過程において、必要な分子を分離・選別する操作というものが基幹技術として広く用いられている。代表的なものとしては、クロマトグラフィーや、DNA・タンパク質の研究に必須となる電気泳動も分子の分離・選別を応用した分析手法の 1 つに挙げられる。

こうした技術が目指す究極的な目標の 1 つには、例えば細胞 1 個体に発現しているタンパク質や RNA 等の様々な分子を、丸ごと全て分離して解析することなどが考えられる。ただし、1 細胞から取り出せるサンプル量はわずか fL~pL オーダーという極微量であるため現在の技術では全く太刀打ちできず、細胞やバクテリアに発現しているタンパク質など

の個体差を1細胞レベルで調べるような技術は未開のままである。こうした極微量の液体を直接扱うには、極微量の容積を持つツールが必要となるのは想像に難くない。

申請者は、これまで極微量の液体を扱う様々なナノ・マイクロ流体デバイスの開発を進めており、nmスケールの幅や深さを持つナノ流路構造を作製し、さらにナノ流路内にDNA分子を1分子ずつ送液することにも成功している。こうした1分子を操作するナノ流体デバイスの開発過程で次のような着想を得た。すなわち、ナノ流路内に分子を1分子ずつ流しつつ個々の分子の1)サイズ、2)組成や構造、あるいは3)信号強化用に結合させたラベル剤、などに由来する誘電率や導電率の変化を電気インピーダンス分光(Electrical Impedance Spectroscopy:EIS)により検出し、さらにその下流で電気力学操作を利用して検出した分子の種類ごとに出口を振り分ければ分子ソーターが実現する。nmサイズの流路であれば、例えば何100種類分の出口流路を作ってもcmサイズに収まるし、電気測定や電気力学操作のためには電極があれば良く、製造方法も操作方法も簡便にでき、システム化へのマッチングも良い。送液に関しても、電気泳動や電気浸透流を利用すれば外部に大がかりなポンプシステムを必要としない。

こうした着想を実現すべく、既にナノ流路内に通過する分子を検出するための電極作製技術の開発にも成功している。さらに、多分子系での測定となるが、マイクロ流路内でのEIS測定でDNAのサイズや濃度の違いを誘電率の変化として捉えることにも成功している。

2. 研究の目的

本研究は、幅や高さが数10～数100nmサイズのナノ流路を利用して、生体分子を1分子ずつ検出しつつソートする分子ソーターを実現するために必要な要素技術として、分子1個体を流すようなナノ流路構造と、流路構造中への測定用ナノ電極の作成、および流路を流れる1分子の電気的検出の実証を目的とする。具体的には、

1) デバイスの製作手法の開発

申請者がこれまでに開発したナノ流路とナノ電極の作製手法を元に、適宜改良しながらデバイス全体を作製する手法を確立する。

2) ナノ流路内で分子を電気的に検出する手法の開発

申請者が現有の 10^{-16} Aオーダーの感度を持つ直流電流計による導電率変化の評価、あるいは最大1fA(10^{-15} A)の電流感度を有する周波数掃引型のインピーダンスアナライザ

(Frequency Response Analyzer: FRA)を利用した0～10MHz間の周波数応答による電気インピーダンス測定から検出能を探り、本手法の有効性や限界を明らかにする。

3) ナノ流路で分子を電気力学的に振り分ける手法の開発

1本から多分岐に分岐するナノ流路のそれぞれに電極を配置しておき、電気泳動力または誘電泳動力で流れてくる分子を狙った流路に導入する技術を実現する。

最終的なデバイスのデザインとしては、ナノ流路中の検出部の下流に振り分け機構を配置することになるが、まずは個別に検討して必要な要素技術の開発と問題点を洗い出し、その解決に向けたアプローチを検討しつつ、3年間の研究のまとめとして両者を組み合わせた**分子ソーターのプロトタイプを完成させる**。テストサンプルには比較的大きいため測定しやすいことと、蛍光染色すれば顕微鏡での直接観察が容易であることからDNAを使用する。

3. 研究の方法

デバイスの作成に関しては、これまでに開発したナノ流路とナノ電極の作製手法(を元に、適宜改良しながらデバイス全体を作製する手法を確立する。電気的計測法に関しては、申請者が現有の 10^{-16} Aオーダーの感度を持つ直流電流計による導電率変化の評価、あるいは最大1fA(10^{-15} A)の電流感度を有する周波数掃引型のインピーダンスアナライザ(Frequency Response Analyzer: FRA)を利用した0～10MHz間の周波数応答による導電率・誘電率測定から、ナノ流路内における1分子検出を実現する。

4. 研究成果

1) ナノ流路+ナノ電極デバイスの作成

フォトリソグラフィとプラズマエッチングとを組み合わせ、例えば、加工深さが浅いため比較的短時間の作業で作製出来るプラズマエッチング用のマスク構造部分をFIBで作っておき、そのように用意した多数の基板を1回のプラズマエッチングで処理することで、デバイス間の加工のばらつきを最小化する手法を検討した。その結果、ガラス基板上に接着層としてTi(厚さ2nm)とマスク材のPt(厚さ20nm)をそれぞれ真空蒸着し、一旦フォトリソグラフィによって μm サイズまでのパターンニング後、nmサイズの構造をFIBによって加工することに成功した。また、フォトリソグラフィとFIBによって形成したPt/Tiパターンをマスクとして、CF₄+O₂を使った反応性イオンエッチング(RIE)法によりガラスをエッチングし、Pt/Tiマスクの反転ナノパターンをガラスに転写することにも

成功した。

インターフェース部分に関してであるが、ナノ流路内を観察するためには作動距離(レンズ表面と試料までの距離)が約 100 μm の高 NA かつ油浸対物レンズを使わなくてはならない。電氣的測定のためのノイズ低減には測定部位を電磁シールドする構造が望まれるが、わずか 100 μm の距離内に従来のような構造の電磁シールドを構成することは困難である。そこで、本研究ではこうしたナノデバイス用の電磁シールド構造の基礎検討と検証実験から進めることにした。具体的には、顕微鏡で内部を観察するためにはシールド部分が透明でなくてはならず、かつ電磁シールド材には導電性が要求されるため、まずは透明導電体として Indium Tin Oxide (ITO) をスパッタにより着膜した厚さ約 100 μm のガラス基板でナノ流路をシールドすると共に、電磁シールド効果が得られるかどうか試みた。さらに、デバイス内部のナノ電極と外部とを接続するコンタクト部分の検討もすすめ、デバイスを簡単に交換可能で、かつコンタクト部位での接点抵抗や電気容量が極めて小さいコンタクトパッドの試作にも成功した。ところで、このような電氣的・光学的なインターフェースは、本研究テーマでは脇役的存在ではあるが、実は将来の産業化に向けてのシステム化には非常に重要となる部分であり、電氣的・光学的なインターフェースを必要とするナノ流体デバイス応用には必須の要素であるため、本研究から得られた知見はそうした未来のナノ流体デバイス研究・開発に重要な貢献となるであろうと期待している。

2) ナノ流体デバイスによる 1 分子の電氣的検出法の実証

ナノ電極を組み込んだナノ流路中に DNA1 分子ずつ流すことに成功し、図 1 に示すよう

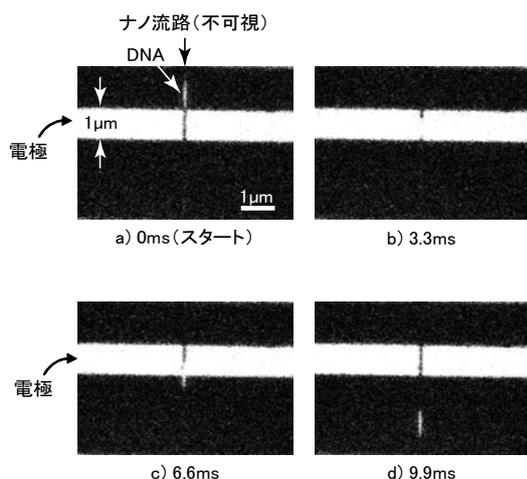


図 1 ナノ流路中のナノ電極を横切る DNA1 分子

に、DNA1 分子がナノ電極間を横切る際の電流変化(図 3)をその位置を蛍光顕微鏡で可視化しつつ検出することに成功した。

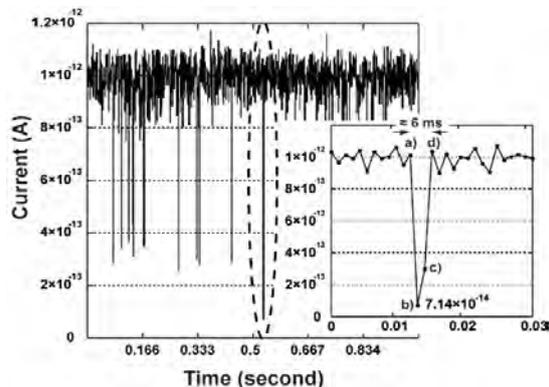


図 2 DNA がナノギャップ電極を横切る際の電流変化

3) 超微量電流測定回路のオンチップ化によるポータブル化と超高感度の実証

デバイスのポータブル化によるオンサイトでの超高感度測定の可能性を開拓しつつ、配線の最小化による低ノイズ化を同時に達成すべく、ナノ流路チップ上への電氣測定回路の集積化もおこなった。測定回路としては、オペアンプを用いた電流-電圧変換回路(トランスインピーダンス回路)をチップ上に直接構成した。市販の超低入力バイアス電流のオペアンプと、高精度高抵抗、およびチップ上のリーク電流や寄生容量を考慮した電氣配線パターンにより、1.25 インチ角上の石英チップに、ナノ流路と電流測定回路を同時に実現すると共に、超高感度の電流測定回路のオンチップ化に成功した。現在、ノイズレベルは数 10fA オーダーで、数 100fA 程度の電流測定能を達成している。

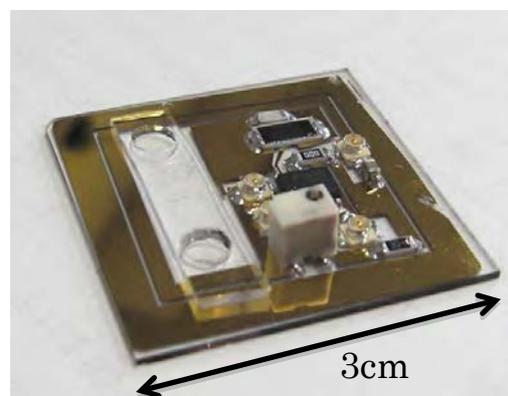


図 3 電氣測定回路集積化チップ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

[1] 山本貴富喜, ” マイクロ・ナノ流体デバイスのナノバイオ応用”, 機械の研究, Vol. 63, No. 2, pp. 117-124 (2011) 査読有

[2] Takatoki Yamamoto, Teruo Fujii, “Nanofluidic Single-molecule Sorting of DNA: A New Concept in Separation and Analysis of Biomolecule”, Nanotechnology, Vol. 21, No. 39, 395502 (2010) 査読有

[3] Takatoki Yamamoto, Sang-Wook Lee, Teruo Fujii, “ Nonlinear Electrical Impedance Measurement Controlling Conformation of DNA”, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.22, No. 5, pp. 601-607 (2010) 査読有

[4] 山本貴富喜, ” シリコーンゴム製マイクロ流体デバイスのライフサイエンス応用”, 材料の科学と工学, Vol. 47 No. 5 pp. 6-11(2010) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

[1] Takatoki Yamamoto, “ Multiphysics simulation to design micro/nanofluidic device for biotechnology applications”, COMSOL conference of Tokyo 2010, (2010, 12/3) Tokyo

[2] T. Yamamoto, T. Fujii, “NANOFLUIDIC SINGLE-MOLECULE SORTER CONCEPTUALLY PROVEN BY SORTING OF DNA”, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2010) pp.1874-1876 (2010), October 3 - 7, 2010 Groningen, The Netherland

[3] 山腰一平, 山本貴富喜, 「両親媒性マクロ構造体による自己組織化の研究」, 第2回マイクロナノ工学シンポジウム, 講演論文集 pp. 185-186, 島根 (2010年10月13-15)

[4] 淵上裕次郎, 山本貴富喜, 「電気的1分子検出のためのナノ流体デバイスの研究」, 第2回マイクロナノ工学シンポジウム, 講演論文集 pp. 15-16, 島根 (2010年10月13-15)

[5] Wataru Okada, Takatoki Yamamoto, ” Direct bonding of solid-state silicone by atmospheric-pressure surface excitation”, The 27th Sensor Symposium on

Sensors, Micromachines and Applied Systems, p 117, Shimane (October 14 - 15 2010)

[6] 山本貴富喜, ” マイクロ・ナノ流体デバイスのライフサイエンス応用”, 日本機械学会, 実験流体力学-マイクロ流れ実験の基礎と応用- (2010, 8/24) 東京

[7] Takatoki Yamamoto, Teruo Fujii, “Design using COMSOL for life science application of microfabrication technology”, COMSOL conference of Tokyo 2009, (2009, 12/4) Tokyo

[8] 山本貴富喜:” 機械学会 No.08-59 講習会-実験流体力学-マイクロ流れ実験の基礎と応用-“, 日本機械学会 (2008, 8, 26) 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 貴富喜 (Yamamoto Takatoki)

研究者番号: 20322688

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

(3) 連携研究者

野島 高彦 (Nojima Takahiko)

北里大学・一般教育部自然科学教育センター

研究者番号: 00291930

福場 達洋 (Fukuba Tatsuhiro)

東京大学・生産技術研究所・特任准教授

研究者番号: 80401272