

平成 22年 5月 26日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20710097

研究課題名 (和文) 生物分子を用いた1分子DNA解析デバイスの改良

研究課題名 (英文) Functionalization Toward single molecule DNA devices

研究代表者

三井敏之 (MITSUI TOSHIYUKI)

青山学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：40406814

研究成果の概要 (和文)：

ナノポアを金蒸着や有機分子付着による、DNA通過の影響を直接観測し、今後のナノポアによる1分子DNA解析デバイスにむけてのさらなる改良方法を発見した。具体的には、ナノポアによるDNA解析の一番の問題点だった、DNAのポアへの詰まりを、金蒸着と有機分子付着により減らした。しかしながら、完全に詰まりを回避できたわけではない。しかしながら、本研究では、交流 (AC) を直流電圧 (DC) に印加することにより、詰まったDNAを取り除くことにも成功した。

研究成果の概要 (英文)：

Chemically or Physically modified Nanopores have been fabricated by deposition organic molecules or evaporating Au on the SiN membrane. We have realized that both modified nanopores reduce the chance of DNA clogging into nanopores by using a fluorescence microscope to observe the DNA translocation directly. In addition, we have investigated the way to remove DNA's after DNA's get stuck in nanopores. AC voltage adding to DC offset voltage induces to remove the stuck DNA's.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：生物物理・ナノ材料・マイクロナノデバイス

## 1. 研究開始当初の背景

2005年に米国国立健康機関 (NIH) により「1000ドルゲノムプロジェクト」(DNAの塩基配列を10万円程度で確認する技術開発)としてDNAの塩基配列を新しい手法で読む技術開発への研究助成金が大量に大学や民間の研究所に出回ったことを機会に、ナノポアによるゲノム解析を試みている研究グループが増えた。現在、ナノポアをつかって、DNAの一分子検出が可能になった。

具体的には、まず、ナノポアを介して二つのイオン溶液が入ったチャンバーを作る。そして、ナノポアの両端に電位差を与える。ナノポアを介してイオン電流が数nA程度のイオン電流が検出できる。そしてそのチャンバーにDNAを入れると、ナノポアの内径が5nm以上であれば、DNAがナノポア内を通過する。その際に、DNAは物理的にイオン電流の流れをブロックするので、イオン電流の時間的変化を測定すれば、DNAがナノポアを通過するたびに、イオン電流が一時的に降下する。その降下するイオン電流の大きさはDNAの物理的大きさに比例し、降下している長さは、DNAの長さに比例することが確かめられた。

この発明により、ナノポアによる塩基配列の確認を行う可能性が見えてきた。しかしながら、この方法には問題がいくつかある。一番大きな問題は、DNAがナノポアに詰まりやすいことである。そして実際に詰まるとその時点でナノポアによるDNAの検出が難しくなる。現在、ほとんどの研究グループはこの問題を回避するために、短いDNA (< 10,000bp) を実験にもちいている。しかしながら、短いDNAを実験に用いることは実用化にむけて好ましくない。なぜならヒトなどのDNAは、億の単位のbpであるからだ。そこで本研究では①詰まったDNAをとる。②

詰まらせない。ための改良をおこなう。ことを目的としナノポアの改良を試みた。

## 2. 研究の目的

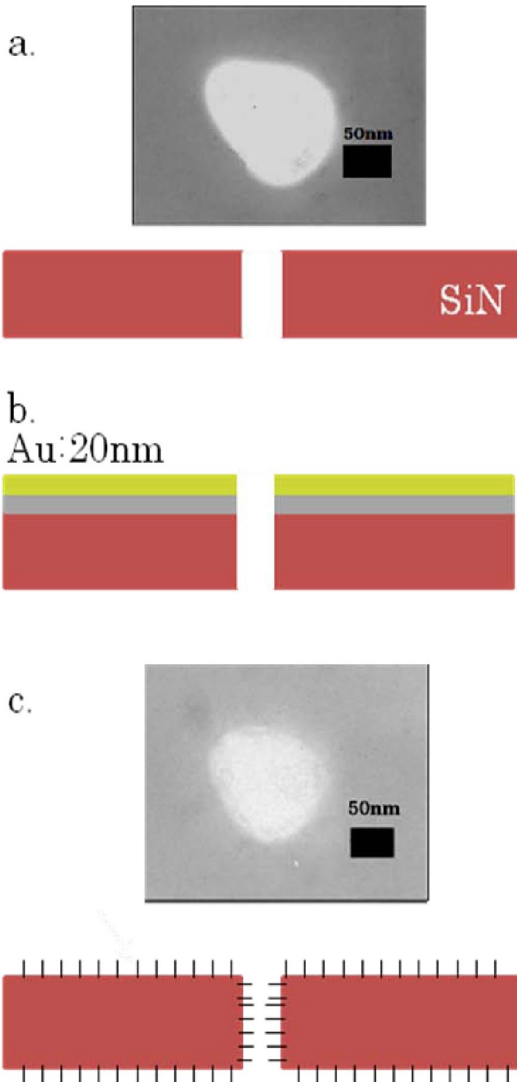
ナノポアによる塩基配列確認を達成し、実用化へ結び付けるために必要な技術について考慮すると、第一に長いDNAがナノポアを通過する際に詰まる問題を解決しなければいけない。そこで、①詰まったDNAをとる。②詰まらせない。ための改良を目的とした。この研究はナノポアを用いた実験を行っている研究グループの研究課題とは、少し異なるが遅かれ早かれ、必ず解決しなければいけない重要な問題である。

本研究ではナノポアの表面加工を物理的、化学的に変化させ、DNAが詰まる要因と予想されている、表面とDNAとの相互作用を減らす。そのために表面を“装飾”した

## 3. 研究の方法

DNAがナノポアに入るところを蛍光顕微鏡によって直接観測を行う。更にナノポアの“装飾”により、DNAの詰まる影響を調べる。本研究では、“装飾”として、金蒸着と有機分子の表面付着を試みた。図aはナノポアの透過型電子顕微鏡画像である。本研究では、一般的に持ちいられているDNA検出用のナノポアに比べると内径が大きく、50~100nm程度である。図bは50nmのAuと20nmのCrを蒸着後に蒸着した模試図である。図cは、有機分子を付着させた模試図と、その透過型電子顕微鏡画像である。画像ではナノポアの内側に有機分子が付着した様子が観測できる。そして、詰まったDNAをナノポアより取り除く方法としては、AC+DCの電位差をポアの両端に印加して、影響を調べた。

#### 4. 研究成果



金蒸着においては、ナノポアから染み出る電場が減り、DNA のナノポアに詰まる確率を減らすことに成功した。しかしながら、特にナノポアの内面を金で装飾した場合は、DNA の通過がほとんど観測されなかった。これはナノポアのまわりにどのように電場が形成されるかに依存するものと思われ、シミュレーションにより電場を評価したが、今のところ実験結果とは一致していない。

次にナノポアの生物分子・有機分子を装飾した場合は、DNA のナノポア通過が DNA の濃度に対して 50%減ったが、DNA が通過する際の詰まる確率が、またその 50%くらいになった。

現在、電場のプロファイルをシミュレーションし、実際の実験結果と比べている。少なくとも電場の大きさ（電位）はナノポアを中心に球対称とはなっていないことがわかった。

詰まった DNA をナノポアから取り除く方法を探求し発見した。印加電圧の DC 成分にパルス状の AC 成分を加えることによって可能となった。

これらの結果は世界中のナノポアを用いた DNA 解析を行っている研究の基礎技術として応用できる。

#### 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 1 件)

Mous Tatarkhanov, D. Frank Ogletree, Franck Rose, Toshiyuki Mitsui, Evgeny Fomin, Sabine Maier, Mark Rose, Jorge I. Cerd and Miquel Salmeron “*Metal- and Hydrogen-Bonding Competition during Water Adsorption on Pd(111) and Ru(0001)*” J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (51), pp 18425–18434 [査読あり]

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tomoharu Takita, Noriyuki Toyama, Kaya Kobayashi, Toshiyuki Mitsui, “*Direct observation of DNA dynamics toward solid state nanopore studied by fluorescence microscopy*” アメリカ物理学会 March 17, 2009, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
- ② Yoshitaka Hayashi, Genki Ando, Kaya Kobayashi, Toshiyuki Mitsui, “*DNA dynamics near modified solid state nanopore*” アメリカ物理学会 March 16, 2010 Portland, Oregon, USA

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.phys.aoyama.ac.jp/~w3-mitsui/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三井敏之 (MITSUI TOSHIYUKI)  
青山学院大学・理工学部・准教授  
研究者番号：40406814