

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22710117

研究課題名（和文） ナノポア DNA センサーの実用化に向けてナノポア付近の DNA 泳動制御
 研究課題名（英文）

Controlling the motion of DNA motion near nanopore for DNA sensing applications

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）：

ナノポア付近の DNA の泳動を観測することにより、ポア付近の物理的状況がわかった。また、導電膜の電位を制御することにより、DNA のポアへの侵入頻度、詰まる確率などを確認した。

研究成果の概要（英文）：

By observing the motion of DNA's near nanopore before their translocation through nanopore, we have estimated the electric field near the nanopore. The rate of the DNA translocations through nanopore depends on the gate voltage on the nanopore membrane relative to the cis voltage. We also estimated the clogging probability of DNA's into nanopore by various bias voltages between trans and cis chambers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：ナノ材料

科研費の分科・細目：ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノバイオ、生物物理、マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

ナノポアの研究は 2001 年にナノポアの製作法と DNA の一分子解析のデータが、ハーバード大学より発表されて以来、指数的のナノポアを用いる研究が発展した。特に 2005 年に米国国立健康機関 (NIH) が「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、ナノポアグループに支援を始めてから、一般的にも「ナノポア⇔DNA 解析」というアイデアが定着化しつつある。

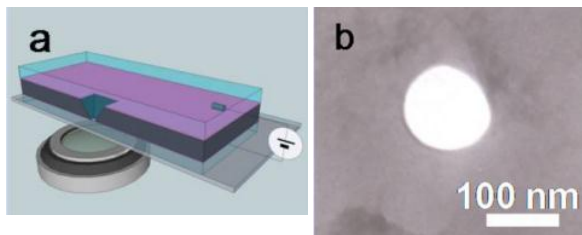
その後、ナノポアの研究は、1 DNA 分子の検出、DNA のポア通過の形態、DNA への付着たんぱく質の確認が主流となった。しかしながら、このナノポアを用いた検出方法には問題点があり、それが、 λ dna のように 16 μ m 程度の DNA でもポアに詰まることである。将来的にシーケンスをゴールとするならば、この問題は致命的である。実際に、現在のナノポアを用いる研究グループは、詰まらないと思われている長さ 2, 3 μ m 程度の DNA を用いている。

2. 研究の目的

最終的なゴールとして DNA シークエンスとするならば、現在のナノポアによる一分子検出の最大の問題である、DNA のナノポアへの詰まりについて研究する。そこで、本研究では、DNA の直接観測を研究のツールとして、その DNA の泳動ダイナミクスを観測し解析する。ナノポア付近の物理的状況を調べ、ナノポアに DNA が詰まる過程、詰まった場合の除去方法を調べる。また、詰まらないための、ナノポアの表面修飾やポア膜の導体化等を検討する。そして、DNA がナノポアに詰まった際の DNA の相互作用についても研究する。

3. 研究の方法

下図 a のように DNA の直接観測試料台を作製し、DNA がポアに侵入する過程を観測し、DNA の泳動からイオン電流による電場などの物理的状況を評価する。ナノポアは例えば、電気泳動の影響を大きくするために、一般的に用いられている直径 10 nm 程度のポアから、図 b のように大きな直径 100 nm 程度のポアを用いる。



(1). ナノポアの表面を Methoxyethylene glycol で修飾する。その DNA の泳動に与える影響を観測する。

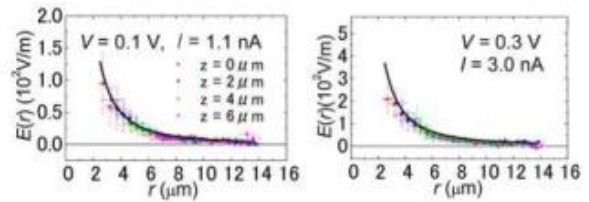
(2). FET ポア付近の DNA の泳動と、ゲート電位の泳動に与える影響を観測する。

2010 年度に、他のナノポアグループより、導体膜によるナノポア、導体を蒸着したナノポアを用いた DNA のナノポア通過の研究が発表された。導体の電位により DNA の泳動頻度の制御が可能になるとの推測があるからである。そこで、我々も、導体として、金蒸着を行い、その金に与える電位を制御 (FET ポアのゲート電位の制御) し、DNA の泳動の変化を観測する。特にこの課題に集中した。

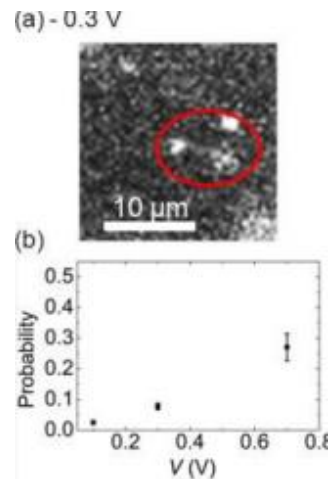
(3). 詰まった DNA を高濃度の DNA とし、DNA 同士の相互作用を直接観測する。

(4). ポアに銀粒子を付着し、ラマンの表面増強を観測する実験を計画した。これは当初の申請にはなかったが、1 分子検出を可能とすると言われている Ag ナノ粒子を用いれば、新たなナノポアを用いた DNA の検出ツールとしての可能性がある。特に AGTC の塩基により異なるシグナルが期待されているので、この実験のモチベーションは高い。

4. 研究成果

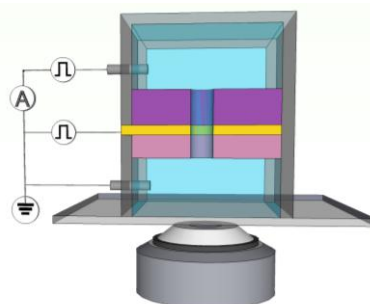


(1). 先ず、基礎的データとして、先行実験結果をとって学会で発表済みの SiN 膜のナノポアにおける DNA の泳動評価の論文をパブリッシュする際に、3D での電場のプロファイルが重要となった。そこで、その実験回数を増やし、誤差を 10% 以下にした。上図のような結果が出て、SiN 表面では、イオン電流を引き起こす電場のプロファイルが球対称であることが確認された。また、DNA のポアへの詰まりについて、初めて直接観測として、DNA が詰まる様子、確率、そのパラメータなどの結果を出した。興味深いことに、先ず、①詰まった DNA は、泳動の電場を逆にしても取れない。②通る際の速度の大きさを上げる、膜間の電位差を上げると、DNA がよりナノポアに詰まりやすい。そして、これらの結果を ACS NANO にパブリッシュした。特に②は、直感に反することで、いくつかのナノポアグループから、②については興味深いとコメントをもらった。



(2). 当初の目的としていたナノポアの表面を Methoxyethylene glycol で修飾の実験は、DNA がポア付近に近づかない結果が出たことと、ボストン大学のグループより、同等の実験条件による解析の結果が発表されたこと、FET ポアがナノポアの実験の主流になったことにより、途中で断念した。

(3). FET ポア付近の DNA 観測用のセル



先ず、左図のようなセルを構築した。赤紫が SiO 膜、黄色が金膜、ピン

クが SiN 膜で、金膜をゲートとして、電圧を印加した。ここでは、スキマティックとして描いているが、ポア膜の下面と対物レンズ上のカバーガラスとの間に液貯めつくるが、その高さを、高倍率の対物レンズを用いる都合上、 $100\mu\text{m}$ 以下にしなければいけない。そのため、このセルを構築するのに、様々な工夫を重ね、2011 年度夏に完成し、実験結果を得られるようになった。

(4). FET ポア付近の DNA の泳動と、ゲート電位の泳動に与える影響を観測について

上図の黄色い部分にあたる、金のゲート電位を制御することにより、DNA の電気泳動の変化を観測し、ポアのまわりに形成される電場の見積りを行った。①SiN+Au (金) 膜と、SiN+Au+SiO 膜とで、それぞれ、精度よく、3D の電場プロファイルを DNA の泳動から見積もれた。論文執筆中である。最後に、DNA の侵入レートが、ゲート電極に大きく依存し、これは DNA の泳動を制御できたことになる。

(5). ポアに銀粒子を付着し、ラマンの表面増強を観測する実験においては、ポアに詰まった DNA のラマン測定に成功し、銀粒子による増強度も確認されたが、しかし、増強度は、ポア付近のナノ粒子の配置により、文献では、ナノ粒子の間隔が nm 程度とされている。この間隔でナノ粒子を置く技術は開発できなかった。これが理由と思われるが、シングル DNA 分子のスペクトルを得るほどのラマンシグナルの増強を得ることはできなかった。

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 2 件)

- ① Directly Observing the Motion of DNA Molecules near Solid-State Nanopores. Ando G, Hyun C, Li J, Mitsui T, ACS Nano. 2012 Nov 27;6(11):10090-7(2012)
- ② Adsorbed water-molecule hexagons with unexpected rotations in islands on Ru(0001) and Pd(111), Sabine Maier, Ingeborg Stass, Toshiyuki Mitsui, Peter J. Feibelman, Konrad Thürmer, and Miquel Salmeron, Phys. Rev. B 85, 155434-9 (2012)

[学会発表] (計 21 件)

1. FET ナノポア近傍の DNA の挙動解析, 安藤元気, 杉本 学, 山田一輝, 三井敏之 春季 第 60 回 応用物理学会学術講演会 2013 年 3 月 29 日、神奈川工科大学

2. Cell migration under ultrasound irradiations in micrometer scale, Shinya Murakami , Yo Otsuka , Yusuke Oshima , Atsuhiko Hikita , Toshiyuki Mitsui, March 21, 2013 Baltimore
3. Controlled cell migration with ultrasound, Shinya Murakami, Yo Otsuka, Manabu Sugimoto, Toshiyuki Mitsui, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Nagoya, Japan, Sept. 22-24, 2012
4. Evaluation of Ultrasound Irradiation effects on Cells by using Raman Spectroscopy, Manabu Sugimoto, Yo Otsuka, Shinya Murakami, Toshiyuki Mitsui, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Nagoya, Japan, Sept. 22-24, 2012
5. Genki Ando, Kazuteru Yamada, Toshiyuki Mitsui, Interaction of DNA molecules with nanopore studied by fluorescence microscopy , The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Nagoya, Japan, Sept. 22-24, 2012
6. Genki Ando , Hiroki Moriya , Kenta Tsukahira , Satoshi Yano , Toshiyuki Mitsui, Direct observation of DNA translocation influenced by electrically gated nanopores, American Physical Society, March Meeting 2012, アメリカ、ボストン 2012 年 2 月 27 日
7. 高根沢聡太, 盛田伸一, 廣島通夫, 三井敏之, 尾崎幸洋, 佐甲靖志, ラマン分光法による細胞分化の識別, 春季 第 59 回 応用物理学会学術講演会、2012 年 3 月 16 日 早稲田大学
8. 杉本 学, 大塚 陽, 村上真也, 三井敏之, 表面増強ラマン散乱を用いた局所的な HeLa 細胞の分析, 春季 第 59 回 応用物理学会学術講演会、2012 年 3 月 16 日 早稲田大学
9. 守屋裕樹, 安藤元気, 塚平健太, 三井敏之, FET ナノポアによる DNA の通過解析とその制御 青学大理工, 春季 第 59 回 応用物理学会学術講演会、2012 年 3 月 16 日 早稲田大学
10. Shin-ichi Morita, Sota Takanezawa, Michio Hirohima, Toshiyuki Mitsui, Yasuhi Sako, A phase diagram of cell differentiation based on Raman spectroscopic measurements, 第 49 回 日本生物物理学会, 2011 年 9 月 16 日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス

11. 高根沢聡太、盛田伸一、廣島通夫、三井敏之、尾崎幸洋、佐甲靖志” Raman analysis of the cell differentiation using two-dimensional correlation spectroscopy”秋季 応用物理学会学術講演会 2011年8月29日-9月2日 山形大学
12. 高根沢聡太、盛田伸一、廣島通夫、三井敏之、尾崎幸洋、佐甲靖志、「細胞分化のラマン分光分析」日本分析化学会第60年会、名古屋大学東山キャンパス、9月14~16日 2011年
13. Genki Ando, Kenta Tsukahira, Yuki Moriya, Toshiyuki Mitsui, Fluorescence microscope study of DNA motion near silicon based nano scale pore、第49回日本生物物理学会 2011年9月16日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス
14. Yo Otsuka, Jyunki Kawagoe, Shinya Murakami, Satoshi Yano, Toshiyuki Mitsui, Analysis of bactericidal activity on Escherichia coli by Ag nanoparticle in medium and by its surface coating in sub millimeter chamber, 第49回日本生物物理学会 2011年9月16日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス
15. Sota Takanezawa, Shin-ichi Morita, Michio Hiroshima, Takurou N. Murakami, Norimichi Kawashima, Toshiyuki Mitsui, Yasushi Sako “ Raman Spectroscopy and Correlation Analysis on Live Cell Dynamics ” Sixth International Meeting on 2 - Dimensional Correlation Spectroscopy, Sonoma County, California, June 9-12 2011
16. 石田 猛, 柳 至, 大浦 剛, 板橋直志, 山本治朗, 赤堀玲奈, 小沢 理, 穴沢 隆, 高口雅成, 三井敏之, “TEM ビームによるナノポア形成機構の解析” 春季 第58回 応用物理学会学術講演会, 2011年3月15日神奈川県
17. 赤堀玲奈, 大浦 剛, 小沢 理, 穴沢 隆, 石田 猛, 柳 至, 板橋直志, 山本治朗, 高口雅成, 三井敏之 “ナノポアシーケンシングに向けたナノポアデバイスのイオン電流” 春季 第58回 応用物理学会学術講演会 2011年3月15日神奈川県
18. 盛田伸一, 高根沢聡太, 廣島通夫, 村上拓郎, 川島徳道, 三井敏之, 佐甲靖志“ラマン分光による生細胞の分化ダイナミクスの研究” 春季 第58回 応用物理学会学術講演会 2011年3月15日神奈川県
19. Yoshitaka Hayashi , Genki Ando , Ichiro Idutsu , Toshiyuki Mitsui, “Direct observation of DNA motions into solid state nanopore under applied electrical potentials on conductive surface”, American Physical Society, March Meeting 2011, アメリカ、ダラス 2011年3月23日
20. 盛田 伸一 高根沢 聡太 廣島 通夫 三井敏之 佐甲 靖志 Raman spectroscopy for non-invasive microscopic analysis of biological systems and single live cells, 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20日-22日, 東北大学川内キャンパス
21. Hayashi, Yoshitaka; Ando, Genki; Kobayashi, Kaya; Mitsui, Toshiyuki, “DNA dynamics near modified solid state nanopore”, American Physical Society, March Meeting 2010, アメリカ、オレゴン 2010年3月17日

〔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

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：