

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681031

研究課題名(和文) ゲーティングナノポアによる単分子流動制御技術の開発

研究課題名(英文) Development of methods for controlling fluid dynamics of single molecules using gating nanopore devices

研究代表者

谷口 正輝 (TANIGUCHI, Masateru)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：40362628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円、(間接経費) 6,210,000円

研究成果の概要(和文)：数ナノメートルの穴やチャンネル内に配置された1対の電極間(ゲーティングナノポア構造)を通過する1分子のDNAとRNAの塩基配列を、1対の電極間を流れる電流を用いて、高い精度と速度で決定するためには、一定の速度で1分子を流す必要がある。本研究では、このナノ構造中を流れる1分子の速度を、電氣的に制御するデバイス構造を開発し、1分子の速度制御の原理を構築するとともに、電圧で1分子の流れる速度を制御できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：The method, which is used to control the translocation speed of a single DNA and RNA molecule, is a key technology used for identifying base molecules with high accuracy and throughput. We developed surrounding gate nanopores, which consist of a gating nanopore and gate electrode. We demonstrated the calculated gate voltage dependence of the DNA translocation velocity, using theoretical simulations. In addition, in an effort to demonstrate the control method for the translocation speed using gate voltage, we fabricated a surrounding gate nanopore with a diameter of 20 nm. The translocation time was found to be 35 ms without a gate voltage. On applying a gate voltage of -0.5 V, we obtained slower translocation times of the order of approximately 350 ms, which is caused by the upward electro-osmotic flow. Thus, we demonstrated that surrounding gate nanopores can control the translocation speed of single DNA and RNA molecules using gate voltages.

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・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：ゲーティングナノポア ナノポア 単分子 流動制御 生体分子 1分子科学 1分子技術

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報を基盤とする予防医療やオーダーメイド医療を実現するためには、超高速・低コストでヒトゲノムの塩基配列を調べる次々世代 DNA シークエンサーの開発が必須であり、米国では、国立衛生研究所が進める \$1000 ゲノムプロジェクトとして研究が展開されている。次々世代 DNA シークエンサーを実現するコアデバイスは、ナノポアデバイスと想定されており、生体ナノポア、固体ナノポア、ゲーティングナノポアの3つの新デバイスがある。特に、ナノ電極間の電流変化で1塩基分子識別を行うゲーティングナノポアは、次々世代 DNA シークエンサーのターゲットデバイスになっている。これらのデバイスのうち、1塩基識別が実証されているのは、生体ナノポアとゲーティングナノポアであり、両デバイスにおいて、1塩基分子を塩基配列の順に、ナノポア内に流動させる単分子流動制御技術が、次々世代 DNA シークエンサーを実現するコア技術になると認識されている。しかし、ナノポアという規制ナノ空間における1分子の流動制御技術の学理は、流体力学、電磁学、イオン輸送が複雑に絡み合うと考えられ、未開のままであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゲーティングナノポアデバイスを用いて、電圧により1分子の流動速度を制御するゲート電極付ゲーティングナノポアデバイス(サラウンディングゲートナノポアデバイス)を開発し、1分子流動速度の電気泳動電圧依存性、ゲート電圧依存性、およびイオン濃度依存性を実験的・理論的に明らかにして、ナノポアを流れる1分子の流動ダイナミクスの基礎科学を構築する。本研究の達成により、1分子流動制御技術の学理となる流体力学、電磁気学、イオン輸送が融合した新研究分野を切り拓き、次々世代 DNA シークエンサーをはじめとする1分子解析デバイスへと発展する基盤技術を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) 1塩基分子を流動させる力(駆動流)は、流動制御電極間の電位で発生する電気泳動、あるいは電気浸透流である。バルクでは、溶液のイオン濃度が低い場合、壁面からの電気二重層の厚み(純水では、数 $\mu\text{m}$ )が大きく、電界とは逆向きの電気浸透流が流動を支配する。一方、高いイオン濃度は薄い電気二重層(緩衝溶液で、1~10nm)を形成し、電界と同じ向きの電気泳動が流動を支配する。しかし、本研究で用いるゲーティングナノポアデバイスでは、直径が20nm以下であるため、直径と電気二重層の厚みの大小関係に駆動流が大きく依存する。従って、イオン濃度に強く依存して、駆動流は、電気泳動、電気浸透流、あるいは2つの駆動流の混合流になると予測される。また、形成される電気二重層は、絶縁体として機能するため、ゲートナノ

電極間で得られるトンネル電流の値に影響する。そこで、1分子 DNA を対象にして、2つの電極電位・イオン濃度と流動速度の相関の解明を目指した。

一方、ゲーティングナノポアデバイスは、膜厚100nm~300nmの $\text{SiO}_2$ 上に形成されるため、流動制御電極間に印加される電界強度が $10^4\text{V}/\text{cm}$ 程度となり、2つの電極間電位とイオン濃度の制御だけでは、1塩基分子を1msの長時間でゲートナノ電極間を通過させることは難しい可能性がある。そこで、ナノポアの直径より数10nm程度大きい直径を持つゲートナノ電極を $\text{SiO}_2$ 内に埋め込み、電圧によりナノポア内の表面電荷を制御できるサラウンディングゲート技術を開発した(図1)。このデバイスでは、ナノポアの表面電荷を制御することで、負に帯電するDNAの速度を制御できると期待される。

さらに、1分子 DNA を対象とした計測データとマルチフィジックスシミュレーションを組み合わせ、規制ナノ空間における流動の学理構築を目指した。

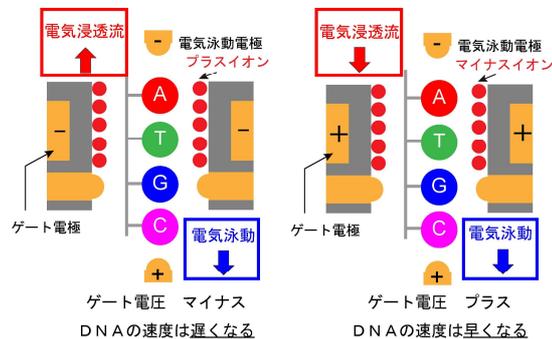


図1 サラウンディングゲートナノポアデバイスの構造と1分子流動速度制御の原理。

(2) シリコン基板に並行にゲーティングナノポアが配置された横型ナノデバイスとともに、シリコン基板に垂直にゲーティングナノポアが配置された縦型ナノデバイスを微細加工技術により開発した。特に、初年度の研究から、ナノポア内の1分子流動速度には、ゲート絶縁膜表面に存在する電荷種・電荷量が大きく影響することを見出したため、ゲート絶縁膜の材料、膜厚、および表面処理の最適化を行い、サラウンディングゲートナノポアの作製プロセスを確立した。さらに、横型・縦型ゲーティングナノポアデバイスを用いて、2本鎖 DNA の流動速度の電気泳動電圧依存性、ゲート電圧依存性、およびイオン濃度依存性を実験的・理論的に詳細に調べ、1分子流動ダイナミクスの基礎科学の構築を目指した。

(3) 開発したサラウンディングゲートナノポアデバイスを用いて、ナノ粒子とDNAのナノポア通過速度が、負のゲート電圧により遅くなることを実証したが、理論値よりも小さな速度変化であった。その原因は、ゲート電極上に作製する酸化シリコン膜の絶縁性と膜厚の不均一性にあり、ゲート電圧により

酸化シリコン表面への効果的なイオン集積が生じていないことであった。特に、金ゲート電極上の酸化シリコンの剥離が、リーク電流の原因であった。そこで、酸化シリコンと密着性の高い電極材料をゲート電極に用い、また、酸化シリコンの作製条件の最適化を行うことで、ゲート電圧により、効果的にイオン集積を行えるサラウンディングゲートナノポアデバイスを作製した。特に、イオン集積により生じる電気浸透流の流動領域は、ナノポアの直径と溶液のイオン濃度に大きく依存するため、直径 20nm 以下のサラウンディングゲートナノポアデバイスを作製し、通過速度のイオン濃度依存性を調べた。さらに、流体力学、電磁気学、およびイオン輸送を組み合わせたマルチフィジックスモデルを用いて、サラウンディングゲートナノポアデバイスで得られる現象を理論的に解明し、電気泳動電圧、ゲート電圧、およびイオン濃度が 1 分子流動速度に及ぼす効果を明らかにすることで、1 分子流動制御技術の学理の深化を目指した。

1 分子流動制御技術は、トンネル電流による 1 塩基読み出し精度と、ナノポア内に 1 分子 DNA が捕捉される頻度を制御する重要な技術である。読み出し精度を上げるためには、1 分子の通過速度を遅くする必要があるが、この時、1 分子 DNA がナノポアに入る方向とは反対方向に電気浸透流が発生するため、捕捉頻度は遅くなる。一方、高い捕捉頻度が得られるとき、1 分子 DNA がナノポアに入る方向に電気浸透流が生じるため、読み取り精度は低くなる。そこで、ゲート電圧の制御性を向上させ、高い捕捉率が得られる 1 分子流動制御技術を開発するため、サラウンディングゲートナノポアデバイス構造の前段に流速を絞る流路デバイスを融合させた集積デバイスを開発した。

#### 4. 研究成果

(1) ゲート電圧、電気泳動、電気浸透流、および水溶液のイオン濃度を取り込んだマルチフィジックスモデルを用いて、 $\text{SiO}_2$  をゲート絶縁膜とするゲーティングナノポア内の 1 本の DNA 分子の流動ダイナミクスシミュレーションを行った(図2)。正のゲート電圧を印加する場合、 $\text{SiO}_2$  表面に負電荷イオンが蓄積されるため、電気浸透流が電気泳動と同じ方向に流れ、1 分子流動速度が速くなることが分かった。一方、負のゲート電圧を印加すると、正電荷が蓄積されるため、電気浸透流が電気泳動とは逆向きに流れるため、1 分子流動速度が遅くなり、ゲート電圧の制御により、1 分子流動速度を制御できることを理論的に明らかにした。また、1 分子流動速度は、水溶液のイオン濃度に大きく依存し、高いイオン濃度ほどゲート電圧に対する速度変化が小さいことが明らかとなった。特に、ナノポア表面に本質的に存在する電荷量と電荷種が、ゲート電圧に対する流動速度

を決定するため、ゲート絶縁膜材料の選択と表面処理が、現実のデバイスでは重要なパラメータになることを見出した。

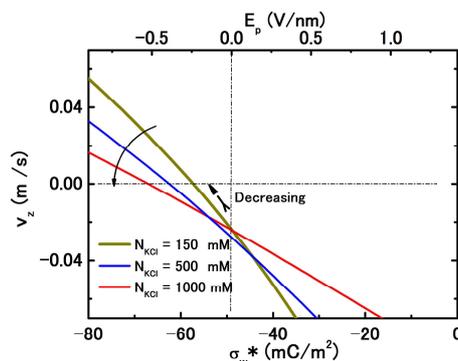


図2 異なるイオン濃度における 1 分子 DNA の流動速度 ( $v_z$ ) のゲート電圧 ( $E_p$ ) 依存性. ナノポア表面は、 $-50\text{mC}/\text{m}^2$  の表面電荷を持つ  $\text{SiO}_2$  から構成.

微細加工技術を用いて、シリコン基板に平行にゲーティングナノポアがある横型ゲーティングナノポアデバイスを開発し、ゲート電圧に対する 1 本の DNA 分子の流動時間依存性を調べた。ゲート電圧を印加しないときの 1 本の DNA 分子の流動時間は、約 500 $\mu\text{s}$  であった。一方、0.7V のゲート電圧印加時には、約 9ms と約 200ms の 2 つの流動時間が得られた。200ms の遅い流動時間は、DNA と電極の静電相互作用により実現され、9ms の流動時間は電気浸透流により実現されたと考えられる。目標時間であった 1 ms より遅い流動時間が、ゲート電圧の変調により実現されることを実証した。

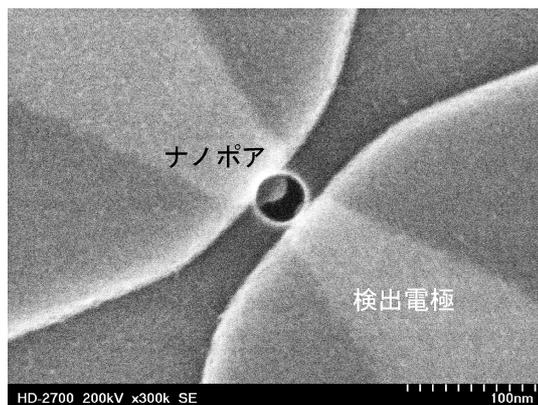


図3 サラウンディングゲートナノポアデバイスの走査電子顕微鏡像.

(2) 微細加工技術を用いてシリコン基板に  $\text{SiO}_2$  で被覆された金属細線を作製し、エレクトロマイグレーション法により金属細線を破断することで、約 2nm 程度のナノギャップ電極とナノ流路を持つ横型ナノデバイスの作製に成功した。一方、微細加工プロセスの最適化を行うことで、直径 20nm の縦型ナノデバイスの作製に成功し、ゲート電圧の印加により、1 分子の流動速度を制御するサラ

ウンディングゲートナノポアデバイスの開発に成功した(図3)。

直径 20nm のサラウンディングゲートナノポアデバイスを用いて、500 塩基からなる DNA のナノポア通過時間のゲート電圧( $V_g$ )依存性を調べたところ、 $V_g=0V$  では、通過時間は 35ms であったが、 $V_g=-0.5V$  では、通過時間は 350ms と遅くなった。負のゲート電圧を印加すると、ナノポア界面にはカチオンが集積されるため、負に帯電する DNA の電気泳動方向とは反対方向の電気浸透流がナノポア界面近傍で生じる。その結果、負のゲート電圧が、DNA の通過時間を遅くしたと考えられる。流体力学、電磁気学、およびイオン輸送を同時に取り入れるマルチフィジックスモデルを用いて、サラウンディングゲートナノポア内の DNA の流動ダイナミクスをシミュレーションしたところ、負のゲート電圧印加により、DNA の電気泳動方向とは反対方向の電気浸透流が発生することが支持された。一方、正のゲート電圧を印加すると、ナノポア界面にアニオンが集積される結果、DNA の流動方向と同じ方向に電気浸透流が発生するため、DNA の通過時間は短くなることが示唆された。

(3) ナノポアへの DNA の捕捉頻度を向上させるため、直径 20nm のサラウンディングゲートナノポア構造とマイクロ・ナノ流路構造を集積させたデバイス構造を作製し、DNA の流動速度とともに捕捉頻度の計測を行った。ナノポア構造の前段にマイクロ・ナノ流路を組み込み、DNA をナノポアに誘導することで、捕捉率が向上した。ゲート電圧を印加することで、DNA のポア通過速度は広い分布を持ち、最大でゲート電圧無印加時の 10% 程度まで減速することに成功した。流体力学、電磁気学、およびイオン輸送を組み合わせたマルチフィジックスモデルを用いて流動現象を解析した結果、電気泳動電圧が、ナノポアと流路に分圧され、DNA がナノポアに高い頻度で導入されると同時に、実効的な電気泳動電圧が小さくなり、遅い通過速度が実現されることが示唆された。この分圧効果により、100mV の電気泳動電圧印加時でも、DNA を捕捉することが可能となり、ポア通過時間のヒストグラム解析から、通過速度は 54 塩基/ms であり、1 塩基/ms まで減速された DNA も検出された。また、1 分子の流動速度のイオン濃度依存性をマルチフィジックスモデルにより解析した。サラウンディングゲートナノポアデバイスでは、シリコン基板を挟む上下の液体チャンバー内のイオン濃度は同じであると想定しているが、実験系では、有限なイオン濃度勾配が予測される。そこで、サラウンディングゲートナノポアデバイスにおいて、イオン濃度勾配がある場合のシミュレーションを行ったところ、イオン濃度勾配は、DNA 捕捉確率を向上させるが、濃度勾配で生じる電気浸透流の影響により、DNA の流動速度を急激に遅くすることが示唆された。これまでの研究から、ナノポア内の 1 分子流動速度は、ナ

ノポア壁面近傍を流れる電気浸透流に大きく支配され、電気浸透流の大きさは、ナノポアの直径、ナノポア側面の電荷量、イオン濃度、温度、およびゲート電圧をパラメータすることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)全て査読有

Y. He, M. Tsutsui, S. Ryuzaki, K. Yokota, M. Taniguchi, T. Kawai, "graphene/hexagonal boron nitride/graphene nanopore for electrical detection of single molecules", NPG Asia Materials, in press, 2014

A. Arima, M. Tsutsui, T. Morikawa, K. Yokota, M. Taniguchi, "Fabrications of insulator-protected nanometer-sized electrode gaps", J. Appl. Phys., 115, 2014, pp. 114310(1-5), DOI: 10.1063/1.4869135

K. Doi, M. Tsutsui, T. Ohshiro, C.-C. Chien, M. Zwolak, M. Taniguchi, T. Kawai, S. Kawano, M. Di Ventra, "Nonequilibrium ionic response of biased mechanically controllable break junction (MCBJ) electrodes", J. Phys. Chem. C, 118, 2014, pp. 3758-3765, DOI: 10.1021/jp409798t

Y. He, M. Tsutsui, R. H. Scheicher, C. Fan, M. Taniguchi, T. Kawai, "Mechanism of how salt-gradient-induced charges affect the translocation of DNA molecules through a nanopore", Biophys. J., 105, 2013, pp. 776-782, DOI: 10.1016/j.bpj.2013.05.065.

M. Tsutsui, Y. Maeda, Y. He, S. Hongo, S. Ryuzaki, S. Kawano, T. Kawai, M. Taniguchi, "Trapping and identifying single-nanoparticles using a low-aspect-ratio nanopore", Appl. Phys. Lett., 103, 2013, pp. 013108(1-5), DOI: 10.1063/1.4813084

N. Yukimoto, M. Tsutsui, Y. He, H. Shintaku, S. Tanaka, S. Kawano, T. Kawai, M. Taniguchi, "Tracking single-particle dynamics via combined optical and electrical sensing", Sci. Rep., 3, 2013, pp. 1855(1-7), DOI: 10.1038/srep01855

Y. He, M. Tsutsui, R. H. Scheicher, F. Bai, M. Taniguchi, T. Kawai, "Thermophoretic manipulation of DNA translocation through nanopores", ACS Nano, 7, 2013, pp. 538-546, DOI: 10.1021/nn304914j

Y. He, M. Tsutsui, M. Taniguchi, T. Kawai, "DNA capture in nanopores for

genome sequencing: challenges and opportunities”, J. Mater. Chem., 22, 2012, pp. 13423-13427, DOI: 10.1039/c2jm31495a

M. Tsutsui, Y. He, M. Furuhashi, S. Rahong, M. Taniguchi, T. Kawai, “ Transverse electric field dragging of DNA in a nanochannel ”, Sci. Rep., 2, 2012, pp. 394(1-7), DOI: 10.1038/srep00394

Y. He, M. Tsutsui, C. Fan, M. Taniguchi, T. Kawai, “ Controlling DNA translocation through gate modulation of nanopore wall surface charges ”, ACS Nano, 5, 2011, pp. 5509-5518, DOI: 10.1021/nn201883b

M. Tsutsui, S. Rahong, Y. Iizumi, T. Okazaki, M. Taniguchi, T. Kawai, “ Single-molecule sensing electrode embedded in-plane nanopore ”, Sci. Rep., 1, 2011, pp. 46(1-6), DOI: 10.1038/srep00046

Y. He, M. Tsutsui, C. Fan, M. Taniguchi, T. Kawai, “ Gate manipulation of DNA capture into nanopores ”, ACS Nano, 5, 2011, pp. 8391-8397, DOI: 10.1021/nn203186c

[学会発表](計22件)

M. Taniguchi, “ Single molecule sequencing ”, Pioneer Workshop 2014 on nanopore and nanofluidics - Physics and application as Biodevices, 2014.02.07, 大阪大学 産業科学研究所 (大阪府茨木市) [invited]

M. Taniguchi, “ Single molecule electrical sensing technologies ”, The 17th SANKEN International Symposium -Joined with The 2nd International Symposium of Nano-Micro Materials, Devices, and System Research Alliance Project, 2014.01.21, 大阪大学 銀杏会館 (大阪府吹田市) [invited]

谷口正輝, “ ゲーティングナノポアを用いた DNA シークエンサー ”, 2013 年真空・表面科学合同講演会 第 33 回表面科学学術講演会 第 54 回真空に関する連合講演会, 2013.11.26, つくば国際会議場 (茨城県つくば市) [invited]

谷口正輝, “ Single molecule electrical sequencing of DNA and microRNA ”, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013.10.28, 国立京都国際会館 (京都府京都市) [invited]

M. Taniguchi, “ Single molecule electrical sequencing of DNA and RNA ”, APS March Meeting 2013, 2013.03.21, Baltimore Convention Center (Maryland, USA) [invited]

谷口正輝, “ 1 分子科学を用いるバイオ

ナノデバイス ”, 東北大学通研 / 阪大産研 研究交流会, 2013.03.15, 大阪大学 産業科学研究所 (大阪府茨木市)

谷口正輝, “ 1 分子シークエンサーの開発 ”, (独)産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門 講演会, 2013.02.25, (独)産業技術総合研究所 (茨城県つくば市) [invited]

M. Taniguchi, “ Tunneling nanopore / nanochannel for next generation DNA ”, Pioneer Workshop on Nanopore, 2013.02.21- 23, Seoul National University (Seoul, SouthKorea) [invited]

谷口正輝, “ 1 分子科学と 1 分子デバイス ”, 第 6 回有機電子系シンポジウム, 2012.12.14, 道後温泉 茶波瑠 (愛媛県松山市) [invited]

谷口正輝, “ 1 分子を解析するナノポアデバイス ”, 学術振興会 174 委員会 第 40 回研究会, 2012.09.28, 京都テルサ (京都府京都市) [invited]

谷口正輝, “ 1 分子エピゲノム解析技術の開発 ”, 大阪大学 蛋白質研究所セミナー エピゲノム解析の新技术とエピジェネティクス制御機構の新展開, 2012.09.27, 大阪大学 蛋白質研究所 (大阪府吹田市) [invited]

谷口正輝, “ ゲーティングナノポアによる 1 分子 DNA シークエンシング ”, 日本分析化学会第 61 年会 シンポジウム, 2012.09.19-21, 金沢大学 角間キャンパス (石川県金沢市) [invited]

谷口正輝, “ ナノポアデバイスの 1 分子科学 ”, 文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」 第 3 回ソフトインターフェースの分子科学ワークショップ「ソフト界面と計測・センシング」, 2012.08.08, 東京医科歯科大学 湯島キャンパス (東京都千代田区) [invited]

M. Taniguchi, “ Next-next generation DNA sequencing system for single molecules ”, 阪大産研・imec 国際シンポジウム 2012 imec・Handai International Symposium 2012, 2012.06.05, 大阪大学 産業科学研究所 (大阪府茨木市)

M. Taniguchi, “ Single-molecule electrical sequencing using gating nanopores ”, 2nd Next Generation Sequencing, 2012.05.30, Hyatt Harborside (Boston, MA, USA) [invited]

谷口正輝, “ 1 分子ナノポアシークエンシング技術 ”, 第 6 回日本エピジェネティクス研究会, 2012.05.15, 国立情報学術研究所 学術総合センター (東京都千代田) [invited]

M. Taniguchi, “Single molecule electrical sequencing of DNA and RNA”, International Symposium on Nanobiotechnology meets Holonic Communication, 2012.03.23, Nagoya University (Aichi) [invited]

M. Taniguchi, “Single-molecule electrical sequencing technology”, The 15th SANKEN International Symposium 2012, The 10th SANKEN Nanotechnology Symposium, 2012.01.12, Osaka University (Osaka) [invited]

M. Taniguchi, “Third-generation DNA sequencing technology using single-molecule analysis”, China-japan Joint Symposium on Current and Future Molecular Electronics, 2011.10.25, Nanjing University (China) [invited]

M. Taniguchi, “Development of gating nanopores for next-next DNA sequencing using mechanically controllable break-junctions”, American Society of Mechanical Engineers, The Japan Society of Mechanical Engineers, and Korean Society of Mechanical Engineers, Joint Fluid Engineering Conference 2011, 2011.07.25, ACT City Congress Center (Hamamatsu) [invited]

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bionano.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・教授

研究者番号：40362628

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当無し