

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681032

研究課題名(和文)泳動速度制御機能を有する単一分子識別デバイスの創製

研究課題名(英文)Development of single-molecule sensors with electrophoresis control capability

研究代表者

筒井 真楠(Tsutsui, Makusu)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50546596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、透明基板(SiO₂)上にトラップ電極を組み込んだ面内型ゲーティングナノポア構造を構築し、静電場を用いたDNA泳動速度制御を利用した、トンネル電流計測による1分子DNAシーケンシングを実証することを目的とした。この目的に対して、単分子DNAダイナミクス評価に向けたナノデバイス及び電流・蛍光同時観察法を創成すると共に、トラップ電極による横方向静電場を利用したDNA泳動速度制御を実証することに成功した。また、トラップ電場と単分子トンネル電流計測用電場の干渉を抑えることが可能な絶縁被覆ナノ電極系の作製プロセスを構築し、これを用いて高精度なトンネル電流計測を実証した。

研究成果の概要(英文)：This research project aims to develop an in-plane nanopore device for single-molecule DNA sequencing that incorporates electrophoresis control of DNA motions through the pore. For this purpose, a new method was developed for evaluating single-molecule dynamics in a nanochannel that is based on simultaneous measurements of the cross-channel ionic current and fluorescence. Moreover, two nanoelectrodes were used to create an electric field inside a fluidic channel. It was demonstrated that this transverse electric field could slow-down the DNA electrophoretic speed by up to 1/500. On the other hand, it was found that the trapping field interferes with the electric field used for the tunneling current measurements. In order to suppress the interference effects, insulator-protected nanoelectrode systems were developed, which were proven to be useful in probing tunneling current with accuracy in a liquid environment.

研究分野：分子エレクトロニクス

キーワード：ナノポア 単分子 DNA シーケンシング トンネル電流 ナノ電極 MEMS

1. 研究開始当初の背景

PCR 増幅や蛍光検出をベースとする従来技術では実現し得ない、DNA 塩基配列解読の高速化・低コスト化に向けた新奇なシーケンシング技術の熾烈な開発競争が国内外で広く展開されている。本研究で開発するナノポアシーケンシング法は、カリフォルニア大の Di Ventra ら (Rev. Mod. Phys. 80 (2008) 141) が理論的に提唱して以来、第3世代シーケンサーの根幹技術のひとつとして、その原理実証やデバイス応用に向けた研究が急速に進められている (Nat. Biotechnol. 26 (2008) 1146)。そのような中において、申請者は、トンネル電流を指標とした DNA 塩基識別法の動作原理を世界に先駆けて実証することに成功した (**Nature Nanotechnol.** 5 (2010) 286)。一方、ゲーティングナノポア構造の作製に関しては、2011年にロンドン大の Albrecht ら (Nano Lett. 11 (2011) 279) が cross-plane 型の構造作製に成功しているが、単一分子検出への応用には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に確立してきた分子サイズ電極ギャップ形成技術 (**Nano Lett.** 8 (2008) 345; **Nano Lett.** 8 (2008) 3293; **Nano Lett.** 9 (2009) 1659; **Nano Lett.** 9 (2009) 2433) を応用し、面内型ゲーティングナノポア構造を透明基板 (SiO_2) 上に作製する。この新規ナノデバイスを用いて、1分子蛍光観察とイオン電流計測を融合した1分子ダイナミクス評価技術を構築すると共に、静電トラップ法を利用した DNA 泳動速度制御技術を開発する。さらに、この分子泳動速度制御技術と、申請者の単分子電気伝導度評価技術 (**Nature Nanotechnol.** 5 (2010) 286; **Nature Commun.** 1 (2010) 138; **Scientific Reports** 1 (2011) 46) を融合させることで、面内型ゲーティングナノポアを用いた1分子 DNA の塩基配列識別を実証する (図1)。本研究の達成により、ナノ空間における1分子ダイナミクスの基礎科学を構築し、超高速 DNA シーケンサーの基本原則・設計指針を示すことでテーラーメイド医療実現への道を切り拓く。

3. 研究の方法

本研究では、透明基板 (SiO_2) 上にトラップ電極を組み込んだ面内型ゲーティングナノポア構造を構築し、静電場を用いた DNA 泳動速度制御を利用した、トンネル電流計測による1分子 DNA シーケンシングを実証する。そのために、まずナノ加工プロセスフローの設計並びに蛍光観察・電流同時計測のための実験系を立ち上げる。そしてこれを用いて、1分子 DNA の泳動速度計測を行い、さらに理論シミュレーションの観点から、ナノポア内における1分子 DNA のダイナミクスを明らかにする。また、そこで得られる知

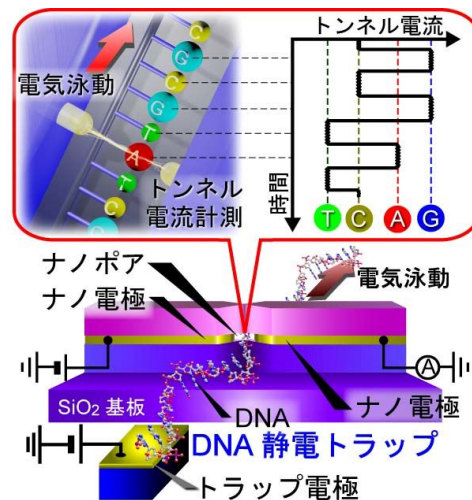


図1. 面内型ゲーティングナノポアを用いた DNA 塩基配列解読。ナノポアを通過する1分子 DNA の側鎖方向のトンネル電流計測をとおして、DNA を構成する4種類の塩基分子、チミン(T)、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)の配列を識別する。

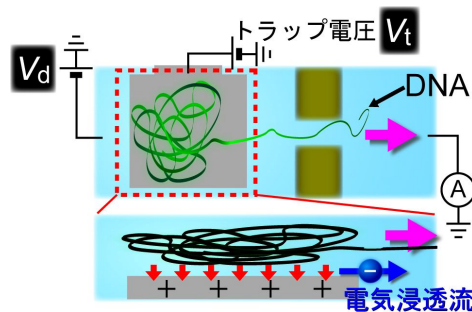


図2. 静電トラップ法を利用した DNA のナノポア通過速度制御。DNA の泳動速度を、トラップ電圧 V_t と電気泳動電圧 V_d で制御する。

見をもとに、静電トラップ法を応用した DNA 泳動速度制御技術を開発し(図2)、トンネル電流計測による1分子 DNA の塩基配列解読を実証すると共に、その塩基分子識別精度・確度と DNA 泳動速度との相関を明らかにし、ゲーティングナノポアシーケンサーの設計指針を示す。

4. 研究成果

(1) 新規1分子ダイナミクス観察法の創成

面内型ゲーティングナノポアセンサーによる1分子DNAの塩基配列解読の実証に向けた、1分子ダイナミクス制御のための新規1分子観察技術を開発した。開発したデバイスは、厚さ約0.1 mmの透明ガラス基板上に作製したマイクロピラーを有する検体導入用流路と、検体検出用マイクロ流路で構成されるものである。このデバイスを用いて、イオン電流計測法と蛍光顕微鏡を用いた1粒子観察を同時に実行することで、マイクロ流路を通過する単一蛍光粒子のダイナミクス解析を試みた。実験では、流路デバイスをPDMSブロックでシリリングし、シリンジポンプを用いて蛍光粒子の分散溶液を流路に導入した。2つの銀/

塩化銀電極を用いてマイクロ流路に電場を生じさせることで、電気泳動的に蛍光粒子が流路を通過するようにした。流路を通るイオン電流の測定を行なったところ、1個の粒子が通過されたことを示唆するスパイク状のイオン電流変化が観測された。また、同時に記録した蛍光観察像によって、個々のイオン電流シグナルに対応して、単一蛍光粒子がマイクロ流路を通過していることが確認された。この結果により、これまでの電氣的検出法では確認されてこなかった「本当に流路を粒子が通過しているのか？」という疑問を完全に解消することができた。以上のようにして、マイクロ秒スケールの高時間分解能とナノメートルスケールの高空間分解能を併せ持ちながら、液体中における1個の粒子あるいは分子のダイナミクスの実像観察を行うことができる新しい手法の創成に成功した。

(2) 横電場による単分子DNAのダイナミクス制御

面内型ゲーティングナノポアセンサーに適用可能な単分子DNAのダイナミクス制御法を創成した。電子線描画法や反応性イオンエッチング法などの微細加工技術を用いてSiウエハ上にマイクロ・ナノ流路構造を作製し、更にナノ流路中に電極間隔が約50ナノメートルのナノ電極対を作り込んだ。流路中にはシリジポンプを用いて⁻DNAを含んだバッファをフローさせ、また2個の銀/塩化銀電極を用いてナノ流路部に電気泳動電圧を加えた。流路中に組み込まれたナノ電極間には0.5Vの電圧を印加した状態でDNAがナノ流路を電気泳動する様子をイオン電流測定法により観察したところ、ナノ電極間に0.5Vの電圧を加えることで、DNAの移動速度が500分の1にまで低減することが分かった。これは、負に帯電したDNAのリン酸基部分が正極側の電極表面とクーロン相互作用を起こし、その結果電極に引き付けられた結果であると考えられる。以上のようにして、横電場による単分子DNAの電気泳動速度制御を実証した。また、このときにナノ電極間を通る電流を同時計測した結果、電気泳動電圧とナノ電極間の電圧は干渉し合い、このクロストークにより観測される電流値が予期せぬ影響を受けることが明らかとなった。

(3) クロストーク抑制用絶縁被覆電極の作製

前述のクロストークを抑制するために、電極先端部分を残した他の部分を全面絶縁被覆したナノ電極系の作製プロセスを構築した。ナノ加工機械的破断接合の金接合表面全体(裏面を含む)をCVD法を用いたSiO₂成膜により絶縁被覆した。そして、この接合を破断することで、数十ナノメートル四方の電極

先端部だけが露出した絶縁被覆ナノ電極対を作製することに成功した。さらに、当該SiO₂膜は絶縁膜としてだけでなく、電極の補強材としても働くことが分かり、これにより従来の機械的破断接合法に比べて飛躍的にその機械的安定性を向上させることにも成功した。これは想定以上の成果である。

(5) 分子サイズ電極ギャップを用いたトンネル電流計測により、ペプチドの単分子識別を実証した。ナノ加工機械的破断接合を用いてサブナノメートルサイズの電極ギャップを種類のペプチドのバッファ溶液中で作製し、これを用いてトンネル電流計測によるペプチドの単分子検出を行った。その結果はペプチドの種類によってそれぞれ異なるトンネル電流の分布が得られた。以上より、トンネル電流計測による水溶液中でのペプチド単分子識別を実証した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計13件)

1. Makusu Tsutsui, Yuhui He, Masayuki Furuhashi, Sakon Rahong, Masateru Taniguchi, and Tomoji Kawai, Transverse electric field dragging of DNA in a nanochannel. *Scientific Reports*, 2, 394 (2012).
2. He Yuhui, Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi, and Tomoji Kawai, DNA capture into nanopore for genome sequencing: challenges and opportunities. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 13423-13427 (2012).
3. 筒井真植, 谷口正輝, 川合知二, 1分子電流計測による非標識DNAのメチル化検出. *生物物理* 52, 152-153 (2012).
4. Makusu Tsutsui and Masateru Taniguchi, Single molecule electronics and devices. *Sensors*, 12, 7259-7298 (2012).
5. 筒井真植, 谷口正輝, 川合知二, 面内型ゲーティングナノポアを用いたDNAの単一塩基分子識別. *ナノ学会会報* 11, 3-9 (2012).
6. Naoya Yukimoto, Makusu Tsutsui, Yuhui He, Hirohumi Shintaku, Syoji Tanaka, Satoyuki Kawano, Tomoji Kawai, and Masateru Taniguchi, Tracking single-particle dynamics via combined optical and electrical sensing., *Scientific Reports*, 3, 1855 (2013).
7. Yuhui He, Makusu Tsutsui, Ralph H. Scheicher, Chun Fan, Masateru Taniguchi, and Tomoji Kawai, Mechanism of how salt-gradient-induced charge affect the translocation of DNA molecules through a nanopore., *Biophysical Journal*, 105, 776 (2013).
8. Kentaro Doi, Makusu Tsutsui, Takahito

- Ohshiro, Chin-Chun Chien, Michark Zwolak, Masateru Taniguchi, and Tomoji Kawai, Nonequilibrium ionic response of biased MCBJ electrodes., *Journal of Physical Chemistry C*, 118, 3326 (2014).
9. Akihide Arima, Makusu Tsutsui, Takanori Morikawa, Kazumichi Yokota, and Masateru Taniguchi, Fabrications of insulator-protected nanometer-sized electrode gap. *Journal of Applied Physics*, 115, 114310 (2014).
 10. Kazumichi Yokota, Makusu Tsutsui, and Masateru Taniguchi, Electrode-embedded nanopores for label-free single-molecule sequencing by electrical currents., *RSC Advances*, 4 15886 (2014).
 11. Akihide Arima, Makusu Tsutsui, and Masateru Taniguchi, Discrimination of equi-sized nanoparticles by surface charge state using low-aspect-ratio pore sensors., *Applied Physics Letters*, 104 163112 (2014).
 12. Akihide Arima, Makusu Tsutsui, Takanori Morikawa, Kazumichi Yokota, and Masateru Taniguchi, Fabrications of insulator-protected nanometer-sized electrode gap., *Journal of Applied Physics*, 115 114310 (2014).
 13. Takahito Ohshiro, Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Masayuki Furuhashi, Masateru Taniguchi, and Tomoji Kawai, Detection of post-translational modifications in single peptides using electron tunneling currents., *Nature Nanotechnology*, 9 835-840 (2014).

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 筒井真楠, ユファイバー, 古橋匡幸, サーコンラホン, 谷口正輝, 川合知二, 静電場による生体分子の泳動速度制御, 第 7 3 回応用物理学会学術講演会, 2012 年 9 月 12 日, 愛媛大学
2. 筒井真楠, 谷口正輝, 川合知二, 面内型ゲーティングナノポアを用いた DNA の単一塩基分子識別, ナノ学会第 1 0 回大会, 2012 年 6 月 14 日, 大阪大学
3. 有馬彰秀, 筒井真楠, 谷口正輝, 低アスペクト比マイクロポアデバイスを用いた単一粒子検出, 第 7 4 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 16 日, 同志社大学
4. 筒井真楠, 雪本直哉, 田中頌二, 川野聡恭, 川合知二, 谷口正輝, イオン電流と蛍光の同時計測による単一粒子検出, 第 7 4 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 16 日, 同志社大学
5. 田中頌二, 筒井真楠, 川野聡恭, 土井謙太郎, 川野聡恭, 谷口正輝, 川合知二, 液中ポータルトラップ効果によるナノ粒子のマイクロポア通過速度の制御, 第 7 4 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 17 日, 同志社大学
6. Shoji Tanka, Makusu Tsutsui, Kentaro Doi,

- Satoyuki Kawano, Tomoji Kawai, Masateru Taniguchi, Detections of fast single-particle translocation through a micro-fluidic channel via combined optical and electrical sensing., MRS 2013 Fall Meeting, 2013 年 12 月 2 日, Boston, USA
7. Akihide Arima, Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi, MRS 2013 Fall Meeting, 2013 年 12 月 3 日, Boston, USA
 8. 有馬彰秀, 筒井真楠, 谷口正輝, 被覆金属電極を利用した分子サイズ電極ギャップの検討, 日本化学会第 94 回春季年会, 2014 年 3 月 28 日, 名古屋大学
 9. 筒井真楠, 有馬彰秀, 谷口正輝, 蛍光観察とイオン電流計測による微小流路中の単一粒子検出, 日本化学会第 94 回春季年会, 2014 年 3 月 28 日, 名古屋大学
 10. 谷本幸枝, 森川高典, 有馬彰秀, 筒井真楠, 谷口正輝, Fishing 法による単一分子検出, 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 2014 年 9 月 19 日, 北海道大学
 11. 有馬彰秀, 筒井真楠, 谷口正輝, ナノポアトラップ法による名の粒子の粒径識別, 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 2014 年 9 月 19 日, 北海道大学
 12. 筒井真楠, 横田一道, 大城敬人, 谷口正輝, 川合知二, 低アスペクト比マイクロポアを用いた浮遊微粒子の検出, 第 62 回応用物理学会秋春季学術講演会, 2015 年 3 月 12 日, 東海大学
 13. 有馬彰秀, 筒井真楠, 谷口正輝, ナノポアトラップ法を用いた微粒子の蛍光 - 電流同時計測, 第 62 回応用物理学会秋春季学術講演会, 2015 年 3 月 13 日, 東海大学
 14. 横田一道, 筒井真楠, 大城敬人, 谷口正輝, 川合知二, 電極組込型ナノポアデバイスにおける電極間クロストーク, 第 62 回応用物理学会秋春季学術講演会, 2015 年 3 月 13 日, 東海大学

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 物質の識別方法
 発明者: 筒井真楠, 谷口正輝
 権利者: 大阪大学
 種類: 特許
 番号: 2013-28433
 出願年月日: 平成 25 年 2 月 15 日
 国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 真楠 (TSUTSUI, Makusu)
 大阪大学産業科学研究所・准教授
 研究者番号: 50546596

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし