

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25600061

研究課題名(和文) ナノポアトラップ法を用いた単一ウイルス粒子識別法の創成

研究課題名(英文) Development of a nanopore trapping method for identification of single-viruses

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低アスペクト比ナノポアセンサーを応用発展させ、電氣的に1個のナノ粒子や生体分子をナノ細孔中にトラップ/脱トラップさせる技術を新規に開発するとともに、ナノ細孔中に捕捉した単一ウイルス粒子のインピーダンス計測を行い、その電気容量や電気伝導率による1粒子識別の実証を目的した。

ナノポアトラップ法による単一粒子の表面電荷状態の識別を実証することに成功した。さらに、埋込み電極対を用いた横方向電流計測では、単一粒子のトラップに起因した電極表面の電気二重層の変化によるものと考えられる過渡的な電流応答を観測することができた。

研究成果の概要(英文)：This research aims to develop a nanopore trapping method for identification of analytes via transverse current measurements. It is demonstrated that single-particles can be trapped/detrapped repeatedly at a nanopore by electrophoretic voltage control. Upon trapping, ion current through a pore drops due to partial blockade of ion transport through the pore by the trapped particles, the electrical signals of which are found useful in discriminating the surface charge status. Transverse current measurements are also performed by using two electrodes embedded in a nanopore. Measuring the current through these electrodes, the current shows pulse-like changes synchronously to the particle trap at a pore. This is attributable to a change in the properties of electric double layers on electrodes' surface. Overall, it is shown that the transverse current approach can be a new method capable of identifying analytes not by their volume but other properties such as surface charge densities.

研究分野：総合理工

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノマイクロシステム

キーワード：ナノポア センサー 電気泳動 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

ナノポア構造を用いたバイオセンシングは、高速 DNA シークエンシングや高感度ウイルス検出の実現に向けた新しい1分子技術として、国内外でその研究開発が進められている。これまでのナノポアデバイスでは、ナノ細孔を通るイオン電流を計測し単一生体分子がナノ細孔を電気泳動的に通過する際に生じる分子の大きさを反映したイオン電流変化を計測することで、1分子識別が可能となる (Di Ventra et al., *Review of Modern Physics* 80, 141 (2008))。しかしこの従来のナノポア技術ではその動作原理上、生体分子のナノポア通過速度が非常に高速となることから (Venkatesan et al., *Nature Nanotechnology* 6, 615 (2011))、1分子識別を実施するためにはサブ nA レベルの微小電流を MHz 以上の速度で計測することが求められるといった技術的に極めて困難な問題点があった。

一方、当方ではこれまで、ナノポア中にナノ電極対を組み込んだゲーティングナノポアデバイスに関する研究を展開してきており (*Nano Letters* 9 (2009) 1659; *Scientific Reports* 1 (2011) 46; *Scientific Reports* 2 (2012) 394) その中でナノ電極間の電流計測によって DNA や花粉アレルゲンの単一分子・粒子検出が可能であることを実証してきた (*Nature Nanotechnology* 5 (2010) 286; *Nature Communications* 1 (2010) 138; *Journal of Physics: Condensed Matter* 24 (2012) 164202)。さらに最近では、ナノポアに印加する電圧を制御することで、可逆的にナノ粒子や分子を細孔中にトラップ・脱トラップさせることに成功している。以上の経緯を通して、このナノポアトラップ法により細孔中に検体を捕捉し、電気的に固定された状態でゲーティングナノポア中のナノ電極を用いて単一分子のインピーダンス計測を行うことで、分子の電気伝導率やキャパシタンスを指標とした1分子識別を可能にする新しいナノポアセンシング技術が創成できると確信し、本研究計画を構想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、検出対象分子や粒子よりも孔径が小さい細孔を有するゲーティングナノポア構造を用いて電解質溶液中に分散する検体粒子を電気泳動的に細孔上にトラップ・脱トラップさせる技術を構築し、ナノ電極間に捕捉したウイルス検体のインピーダンス計測による単一ウイルス粒子の識別を実証する。そのために、まずナノポアトラップ法を用いた単一粒子インピーダンス計測のための測定系並びに自動制御プログラムを立ち上げる。さらに、大きさや表面電荷密度が既知の合成ポリスチレンナノ粒子を対象に、ナノポアトラップの最適条件を抽出し、インピーダンス計測系の動作検証を行う。またそこで得られるデータをもとに、理論シミュレーションの観点から [ナノ粒子-電気二重層-単一粒子-電気二重層-ナノ電極] 接合系における電流輸送機構を明らかにする。そして以上の結果を集約し、ナノポアトラップ法を応用したインピーダンス計測による単一ウイルス粒子識別を実証する。

ユレーションの観点から [ナノ粒子-電気二重層-単一粒子-電気二重層-ナノ電極] 接合系における電流輸送機構を明らかにする。そして以上の結果を集約し、ナノポアトラップ法を応用したインピーダンス計測による単一ウイルス粒子識別を実証する。

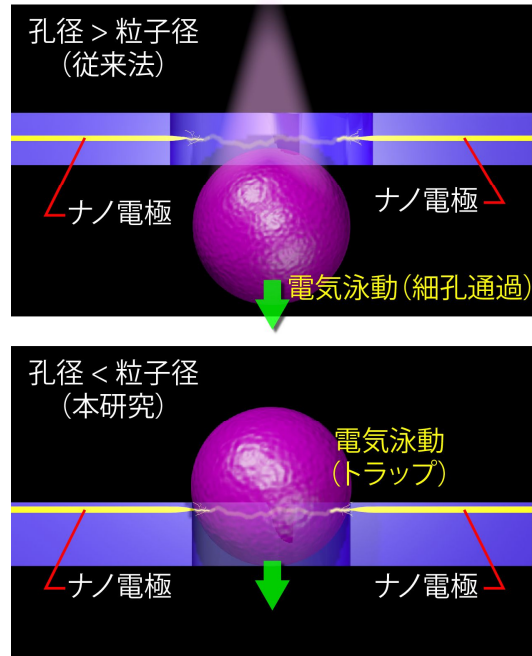


図 1. 従来のナノポア計測法 (上図) と本研究で創成するナノポアトラップ法を用いた単一分子検出法 (下図)。従来法では、検体が高速にナノポアを電気泳動するため、ナノ電極を用いた電流計測によって、検体由来の電流応答を精度高く検出することが困難となる。一方、ナノポアトラップ法では、検体がポアを通過せず、その開口部付近で固定されるため、埋込みナノ電極を用いて、より精密な電気計測を行うことが可能になると期待できる。

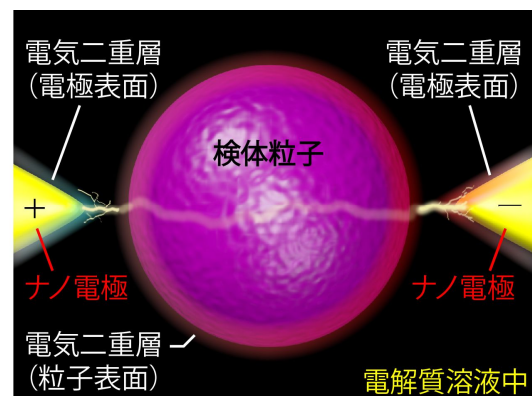


図 2. 電解質溶液中におけるナノ電極 - 単一粒子 - ナノ電極接合のモデル図。電解質溶液中では、溶液中のイオン濃度に応じた厚さの電気二重層が、粒子および電極表面に形成される。

3. 研究の方法

ナノポアを用いた単一粒子トラップを行い、その時に生じる埋込みナノ電極間の電流

応答を調べた。実験では、まず 50nm の厚さの SiN 層でコートされた Si ウェハの一部の Si を、KOH 水溶液を用いたウェットエッチングにより除去することで、SiN メンブレンを作製した。その後、フォトリソグラフィ法および高周波マグネトロンスパッタ法による、マイクロ電極を作製した。次に、マイクロ電極の一部を使い、メンブレン上にナノ電極対を作製した。そしてさらに、電子線描画法および反応性イオンエッチングプロセスにより、電極間隙間の位置に、直径数百 nm の細孔を作製した。測定では、ポアの上下をポリイミドブロックで封止し、2 個の銀/塩化銀電極を用いて、ポアを通るイオン電流を測定した。この時、 GPIB 制御のもと Keithley6487 ピコアンメータ・ソースユニットを用いて電圧を加え、出力電流を記録した。それに加えて、もう 1 台の Keithley6487 ピコアンメータ・ソースユニットを用いて、埋込みナノ電極間の電流計測も同時に実施した。

#### 4. 研究成果

(1) ナノポアトラップ法による単一粒子識別を試みた。実験では、ポアの片側にある浴槽を、直径 500nm のポリスチレンビーズを分散させた TE バッファー (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) で満たし、反対側の浴槽を、粒子を含まない TE バッファーで満たした上で、一定 DC 電圧の下、ポアを通るイオン電流をモニタリングした。ポリスチレン粒子は、その表面がカルボキシル基あるいはアミノ基を有する分子で修飾されたものを用いた。アミノ基修飾とカルボキシル基修飾された粒子共に、ポアに印加した電圧がしかるべき極性の時には、あるときイオン電流が急峻な低下をみせた。その後、電圧の極性を反転させると、イオン電流が元のレベルに戻った。更に、電圧極性を変えた場合には、また同様のステップ状の電流低下が観測された。以上の現象は、電圧極性制御による数百回以上の繰り返し試行の中で、再現性良く現れた。一方、ゼータ電位測定を行い、TE バッファー中に分散されたポリスチレン粒子の表面電荷状態を確認したところ、カルボキシル基修飾、アミノ基修飾共に、負に帯電していることが分かった。以上の結果から、観測されたステップ状のイオン電流変化は、負に帯電したポリスチレン粒子がポア近傍に生じる電界に引かれトラップされ、その結果、粒子の大きさ分だけ、イオンの移動経路が塞がれたことに起因するものであることが示唆された。また、電圧の極性を反転させたときに、イオン電流が元の大きさに戻ったことは、つまり、極性反転によりトラップされた粒子に、ポアから遠ざかる方向の電気泳動力が働くようになり、粒子がポアから脱離することで、ポア内におけるイオン伝導度が元の状態に戻ったのだ、と考えられる。

ここで、粒子がトラップされた際のイオン

電流減少度に着目したところ、アミノ基修飾のポリスチレン粒子に比べ、カルボキシル基修飾の粒子について、より大きな電流低下が生じていることが分かった。また、ゼータ電位計測から、粒子表面電荷密度は、アミノ基修飾の粒子より、カルボキシル基修飾された粒子のほうが高いことが示された。一方、より多くの電荷を持つ粒子ほど、より大きな電気泳動力を獲得することから、粒子はよりポアに近い位置にまで接近し、粒子の電気泳動方向とは逆方向に生じる電気浸透流による抗力と均衡するところでトラップされると予測される。これらのことから、測定で見られた表面修飾の違いによるイオン電流減少の差異は、アミノ基修飾粒子に比べて高い表面電荷密度を有するカルボキシル基修飾粒子では、粒子がポアにより接近するため、より顕著にポア内のイオン輸送を妨げたことによるものであると解釈できた。以上のように、ナノポアトラップ法を用いて、粒子の表面電荷密度の違いを指標とした単一粒子識別を実証することができた。この手法は、従来のコルターカウンターの原理とは異なり、検体の体積以外の性状を調べることができる、新しいナノポアセンシング法である。

(2) 電極組込み型ナノポア構造を用いて、ナノポアトラップ法により単一粒子検出を試みた。電子線描画法や高周波マグネトロンスパッタ法などの微細加工技術を用いて、メンブレン中に作られた直径 300nm の細孔内に、1 対のナノ電極が組み込まれたデバイス構造を作製した。実験では、2 つの銀/塩化銀電極を用いてポアを通るイオン電流を計測しながら、同時に埋め込みナノ電極間に生じる電流の経時変化をモニタリングした。なお、測定対象には、カルボキシル基修飾された直径 510nm のポリスチレン粒子を用いた。(1)での測定と同様に、ポアに印加する電圧の極性に応じて、ポアを通るイオン電流は、ステップ状に増減を繰り返した。これは、ナノポアトラップ法により、電場制御のもと、ポリスチレン粒子を繰り返しポア上にトラップ/脱トラップさせることができたことを示している。一方、同時に計測した、埋め込み電極間の電流は、粒子のトラップ(脱トラップ)に伴い、ポアを通るイオン電流に急峻な減少(上昇)が生じた時に、正(負)のパルス状の応答を見せた。この過渡的な横方向電流の応答は、粒子がトラップされ埋込み電極表面に接近した時に、電極表面に生じていた電気二重層が乱され、その結果生じるキャパシタンス変化に伴い、キャリアの充放電が結起されたことによるものであると考えられる。以上の結果より、埋込み電極を用いた横方向電流計測を通して、単一粒子のトラップ現象に起因したキャパシタンス変化による単一粒子検出に成功した。今後、この手法が、検体の表面電荷密度などの性状を測定するための新しい手法として応用発展されることが

期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Tsutsui, Y. Maeda, Y. He, S. Hongo, S. Ryuzaki, S. Kawano, T. Kawai, and M. Taniguchi, Trapping and identifying single-nanoparticles using a low-aspect-ratio nanopore. Appl. Phys. Lett., 査読有, 103 巻, 2013, 023112  
<http://dx.doi.org/10.1063/1.4813084>

〔学会発表〕(計 2 件)

” Controlling particle position using a nanopore trapping method ” Y. Maeda, M. Tsutsui, K. Doi, S. Kawano, T. Kawai, M. Taniguchi, MicroTAS 2013, Freiberg, Germany, 2013 年 10 月 30 日

「ナノポアトラップ法による単一粒子の識別」前田陽一、筒井真楠、土井謙太郎、川野聡恭、川合知二、谷口正輝、第 7 4 回応用物理学会秋季学術講演会、同志社大学、2013 年 9 月 16 日

## 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