

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26790025

研究課題名(和文) ナノ空間内物質輸送現象の解明と一分子インピーダンス計測

研究課題名(英文) Study of transport phenomena in nano-space and impedance measurements for single-molecule

研究代表者

横田 一道 (Yokota, Kazumichi)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：50633179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：制限ナノ空間における流体中の物質輸送現象を解明するために、ナノギャップ電極組込型ナノポアデバイスを作製するとともに、インピーダンス分光手法を開発した。ナノギャップ電極をガラス基板上に作製する事によって寄生容量をfF以下にまで低減し、G以上のハイインピーダンス計測が可能な測定系を構築した。以上の測定系を用いてナノギャップ ナノポアでの拡散現象の計測に成功した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate transport phenomena for fluid in a nano-space, nanogap-embedded nanopore devices were fabricated and a measurement system by impedance spectroscopy was developed. Parasitic capacitance of the nanogap electrodes was reduced lower than the order of fF by fabricating the device on a glass substrate, and the measurement system, which enables us to measure devices of G and higher impedance, was developed. By using these system, diffusion phenomena in nanogap-nanopore devices was observed.

研究分野：化学

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 一分子計測 マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、タンパク質や DNA といったマイクロ・ナノメートルの生体物質を一分子レベルで操作、分析、識別するツールとして、マイクロ・ナノデバイスを利用する事が注目され、盛んに研究が行われている。一分子を識別する手法として、ナノケールの制限空間(ナノポア・ナノ流路)を有するデバイスを用いたイオン電流測定がこれまで行われてきた(*Nat. Nanotechnol.* 6 615, (2011), *ACS Nano*, 6, 9087 (2012))。その原理は、分子がナノポアに入る事によって、ポアを通じた電解質イオン電流が阻害されるため、そのイオン電流減少量を測定するというものである。そこからポア中の電解質溶液が排除された量により分子の体積が評価される(*J. Colloid Interface Sci.* 61, 323 (1977))。しかし、この手法では、同程度の体積を持つ異種分子を識別することは原理的に不可能であった。

我々の研究グループでは、ナノギャップ電極を用いて分子を流れるトンネル電流の計測を行い、溶液中の DNA 塩基分子の一分子識別を初めて実証した(*Nat. Nanotechnol.* 5, 286 (2010))。このナノギャップ電極によって一分子を直接電氣的にプローブする手法は、メチル化 DNA や RNA の一塩基分子識別を可能にするなど(*J. Am. Chem. Soc.* 133, 9124 (2011), *Sci. Rep.* 2, 501 (2012))、大きく発展する一方、ナノギャップ間に分子が捕獲される詳細な物理化学的メカニズムは不明であった。また、トンネル電流を用いるという原理上、巨大な生体分子等には適応困難という課題もあった。

そこで申請者は、ナノギャップ電極をナノポアに組み込んだデバイスを作製し、トンネル電流計測によって一分子計測を行った。このデバイスにおいて、標的分子(デオキシグアノシンーリン酸、dGMP)の Inlet Outlet 間の輸送とナノギャップ電極での捕獲を目的として、更に電気泳動電極を組み込んだデバイスを作製し計測を行った。この結果、分子の輸送はバルク溶液中での分子の電気泳動移動度では説明できず、ナノポア-ナノギャップ電極の構造に大きく依存した。生体ナノチャンネルにおいては立体選択、静電相互作用、酵素反応といった、ポア内の物理化学的構造と標的分子との微視的な相互作用が物質輸送を担っている事はよく知られているが(*Science* 274 (1996) 1859)、上記の結果は、固体ナノポアデバイスにおいても、ポア内固液界面における分子レベルの拡散や吸脱着反応が、ナノポアを介した物質輸送の重要な要因であることを示唆している。

2. 研究の目的

(1) 申請者は以上の経緯から、制限ナノ空間における溶液や分子の一分子レベルでの動的挙動を、ナノポアに組み込まれたナノギ

ャップ電極を用いた交流インピーダンス計測によって解明する事を考えた。更に、イオン電流計測では識別できない同一体積を有する異種分子、トンネル電流では計測できない巨大生体分子なども、交流インピーダンス測定であれば静電容量から識別でき、様々な分子を包括的に一分子識別する事が可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、極めて小さな静電容量を評価するため、寄生容量を低減したデバイスを開発する必要がある。よってデバイス自身のもつ容量成分を低減するため、(2)四線式のナノギャップ電極組み込みナノポアデバイスをガラス基板上に作製する。このデバイスを用い、まず(3)ナノポア内での流体の挙動を交流インピーダンス計測によって評価し、次いで(4)電気泳動電極組み込みデバイスで、同一体積のナノ粒子を静電容量によって識別する。最終的には(5)一分子の体積と静電容量から一分子識別を行うとともに、ナノポア内分子輸送現象のダイナミクスを解明する。

(2) ガラス基板上デバイスの開発

一分子トンネル電流計測においては、測定対象の一分子の抵抗($\sim G$)にたいして、リードなどの接触抵抗はほぼ無視できた。しかし、容量測定においては、ナノ空間中の溶液や一分子は極めて小さい静電容量($\sim fF$)であると考えられ、リードやコンタクト等の寄生容量を極力減らす必要がある。そこで、電流プローブと、その間の電圧降下の計測による、四線式計測を実現するナノポア ナノギャップデバイスを開発する。このデバイスは基板の寄生容量も低減するためにガラス基板上に作製する。また、交流計測では、計測系全体のマクロなデバイスの情報も測定結果に影響するため、電極や基板を含めたシミュレーションを合わせて行った。

(3) ナノポア内流体にたいする交流インピーダンス計測

開発したデバイスにおいてギャップ間距離(数百 数 nm)と電解質(KCl、NaCl)濃度をパラメーターとして交流インピーダンス計測を行い、抵抗・容量成分とそれらの交流周波数依存(2Hz 2MHz)からナノポア内での溶液の挙動(固定層、拡散層、電気二重層の広がりと変化)を明らかにする。計測は LCR メータ(Agilent E4980A)に独自に開発した高速電流アンプを組み合わせて行う。既に開発した高速電流アンプは DC 10MHz までの広い帯域で高インピーダンス($\sim T$)計測が可能である。これによってインピーダンスの実部(ReZ)とインピーダンスの虚部(ImZ)から Cole-Cole プロットを作成し、溶液の挙動を評価する(*Sci. Rep.* 3 (2013) 2730)。溶液の挙動としては、バルクでは kHz MHz 領域

で分子の配向分極成分が観測される事が知られている。本研究で用いるナノポア・ナノギャップ電極デバイスでは溶液はナノポア内に束縛されており、固液界面特有の固定層に関する知見が kHz 以下の領域において観測される事が期待される。

(4) 電気泳動電極組み込みデバイスを用いたナノ粒子静電容量計測による一粒子識別

異なる材質からつくられたナノ粒子(ポリスチレン粒子、金粒子等)について、交流インピーダンス法による静電容量計測によって一粒子識別を行う。用いるデバイスは(2)で開発する四線式ナノギャップ電極組み込みナノポアデバイスに、電気泳動電極を組み込んだものとする。泳動電圧によって Inlet から Outlet へとナノ粒子を輸送するとともに、そのイオン電流変化から粒子の体積を測定する。粒径の等しいポリスチレン粒子と金粒子を用いた場合、体積からは識別できない。ここで、ナノギャップ電極でのインピーダンス計測によって、それらの一粒子の抵抗・容量(RC)成分を測定し、粒子材料による識別を行う。以上の実験により、同一の体積を有する異なる分子・粒子が、インピーダンス計測によって識別可能であることの原理実証を行う。

4. 研究成果

(1) まずガラス基板上でのナノギャップ電極作製とインピーダンス計測系の構築を行った。

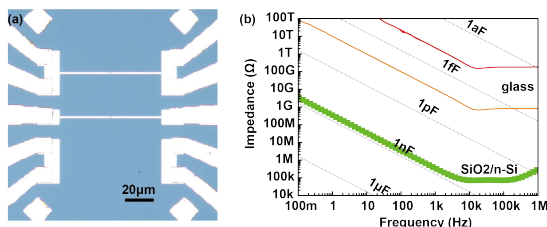


図 1 (a)ガラス基板上四端子・二端子ギャップデバイスと(b)インピーダンス計測結果

図 1 に作製した作製したガラス基板上ギャップデバイスの顕微鏡像と、100mHz から 1MHz までのインピーダンス計測結果を示す。ハイドロシリコン上の SiO₂ 膜に作製されたギャップ電極では、SiO₂ 膜の静電容量に由来する約 1nF の寄生容量が確認される。一方でガラス基板上に作製したギャップデバイスでは、寄生容量を pF から fF 以下にまで低減できた。一粒子・一分子の計測では極微小の電気容量計測が必須であり、基盤となるデバイスの作製の設計指針を確認できた。

また計測系の構築については、当初 LCR メーターの前段に自作の増幅器を組み込むことにより、G 以上の高インピーダンス領域の計測を計画していたが、自作の増幅器で低

周波数・高インピーダンス領域を測定し、LCR メーターで高周波数・低インピーダンス領域を測定することで、より広範囲のインピーダンスと周波数の帯域について評価することができた。

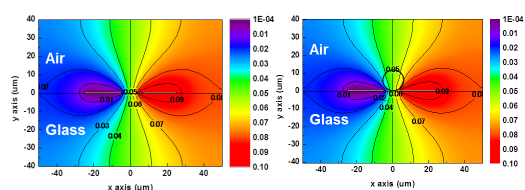


図 2 ギャップデバイスによる一粒子静電容量計測の有限要素法電界シミュレーション

更に開発デバイスの定量的な設計指針を与えるために、有限要素法シミュレーションを行った。図 2 はギャップ間距離が 10 μm のギャップ電極に直径 10 μm のポリスチレン(PS)粒子がトラップされた場合の電位分布を示したものである。計算結果に見られるように、粒子の有無によって電位分布はそれほど大きく変調されるわけではなく、予測される容量変化は aF レベルであった。電極間静電容量は電極間距離に反比例する事を考えれば、望ましいギャップ間隔は数 nm 領域であることが明らかとなった。

以上の知見をもとに、ナノギャップ組み込み型ナノポアの近傍に微小流路を形成し、溶液導入前後でのインピーダンス変化について計測を行った。ナノギャップは nm スケールのギャップ電極が作製可能な電氣的破断法を用いた。

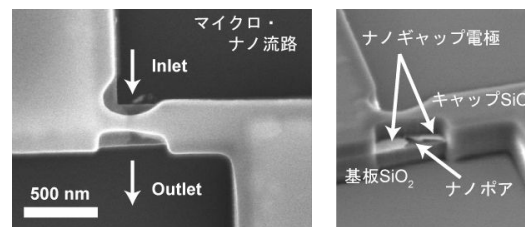


図 3 電氣的破断法によって作成したナノギャップ電極組み込みナノポアデバイスの電子顕微鏡(SEM)像

図 4 はデバイスへの溶液導入前後でのインピーダンス計測結果である。計測は 2mHz から 2GHz の範囲で行ったが、溶液導入前後の変化が顕著であった低周波領域について示す。特に、交流周波数 10Hz 以下では、液導入後にのみインピーダンス実部と虚部が 45° の傾きで変化している領域が観測されており、これは拡散に起因するワールブルグインピーダンスであると考えられる。更に本実験に用いたデバイスの電極がナノポア内に埋め込まれていることを考えると、このワールブルグインピーダンスはナノポア内、もしくはナノポアの極近傍での溶液拡散を反映するものと考えられる。

得られた Cole-Cole プロットについて、半

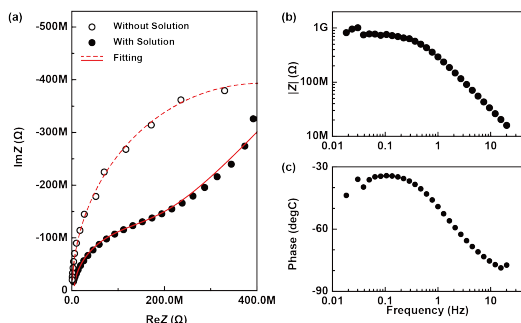


図4 電極組込ナノポアデバイスにおける溶液導入前後のインピーダンス変化。(a)Cole-Coleプロット(ナイキスト線図)および(b)(c)ボード線図。

無限拡散を仮定した等価回路モデル式、

$$Z = R_s + \frac{1}{i\omega C_d + \frac{1}{R_c + \frac{(1-i)\sigma}{\sqrt{\omega}}}}$$

によるフィッティングを行った。ここで、 R_s は溶液抵抗、 C_d は電気二重層容量、 R_c は電荷移動抵抗であり、 σ は拡散条件に関する定数で拡散係数 D の平方根に反比例する。電極面積の見積もりなどにもよるが、フィッティングより得られた値から導出した拡散係数は、バルクのそれに比べて数桁大きい値となった。これは、ギャップ間隔が nm サイズであり、溶液の拡散層をはるかに下回る大きさのナノ空間内特有の拡散現象に起因すると考えられる。

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)

Kazumichi Yokota, Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi, Electrode-Embedded Nanopores for Label-Free Single-Molecule Sequencing by Electric Currents, RSC Adv. 査読あり, 4 (2014) 15886-15899. DOI: 10.1039/c4ra00933a

[学会発表](計5件)

横田 一道、Lee Steven、筒井 真楠、谷口 正輝、川合 知二 近接複数ナノポアのイオン電流評価、第63回応用物理学会春季学術講演会、2016年3月19日、東京工業大学大岡山キャンパス

Kazumichi Yokota, Makusu Tsutsui, Takahito Ohshiro, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai "Electrical detection of single DNA molecules by electrode-embedded nanopore devices" The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

2015 (Pacifichem 2015) 12. 17, 2015, Hawaii Convention Center

横田一道、筒井真楠、大城敬人、谷口正輝、川合知二、電極組込ナノポアデバイスにおける電極間クロストーク、第62回応用物理学会春季学術講演会、2015年3月13日、東海大学湘南キャンパス

横田一道、筒井真楠、谷口正輝、電気泳動電極を組み込んだナノポアデバイスの開発、第2回アライアンス若手研究会、2014年11月27日、大阪大学産業科学研究所

横田一道、谷口正輝、川合知二、TEM観察下での電氣的破断法によるナノギャップ電極形成、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月17日、北海道大学札幌キャンパス

[図書](計0件)

[産業財産権](計0件)

[その他]

<http://www.bionano.sanken.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 一道 (YOKOTA, Kazumichi)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：50633179