

令和元年9月24日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05417

研究課題名(和文) ナノポアを用いた溶液中生体材料の形状分布解析法の開発

研究課題名(英文) Nanopore devices for structural analysis of nanobio materials

研究代表者

龍崎 奏 (Ryuzaki, sou)

九州大学・先端物質化学研究所・助教

研究者番号：60625333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低アスペクト(ポア厚/ポア径)ナノポア構造をSi₃N₄メンブレンに作製し、微粒子をナノポアに通過させ、その際のナノポアを流れるイオン電流の変化を数学的に解析することで、液中に浮遊している微粒子の1粒子形状解析に成功した。また、本解析技術によって生体微粒子(EV)の1粒子形状解析を行うことで、液中に浮遊しているEVの形状分布は分泌元のがん細胞の種類ごとに異なることを発見し、EVの形状は重要な生態情報であることが示唆された。さらに、グラフェンナノポアの作製や金属微粒子のパターニング技術開発にも成功し、今後、ナノポアによる形状解析の空間分解能を改良できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんを根治するためには腫瘍の早期発見が重要である。しかしながら、がんは種類(部位)ごとに検査方法が異なるため、全身のがんを毎年調べることは現実的に困難である。そのため、任意のがんを簡便に検出できる技術の開発が必要である。

本研究では血液中に含まれる細胞からの分泌物である「生体粒子(EV)」に着目し、その生体粒子の形状ががん細胞の種類ごとに異なることを初めて明らかにした。本成果により、血液検査から任意のがんを検出できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rapid structural analysis of nanoscale matter in a liquid environment represents innovative technologies that reveal the identities and functions of biologically important molecules. However, there is currently no method with high spatio-temporal resolution that can scan individual particles in solutions to gain structural information. Here we report the development of a nanopore platform realizing quantitative structural analysis for suspended nanomaterials in solutions. We used a low thickness-to-diameter aspect ratio pore architecture for achieving cross sectional areas of analyte (i.e. tomograms). Combining this with multiphysics simulation methods to translate ionic current data into tomograms, we demonstrated rapid structural analysis of many kind of single vesicles and EVs. The present results indicate this structural analysis is very powerful tool to identify nano-bioparticles and have a potential as novel nanobio sensors from the view point of particle shapes.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：ナノポアデバイス

1. 研究開始当初の背景

近年、エクソソームは新しいがんマーカーとして注目を集めている (Y. Yoshioka, et al., J. Extra. Vesic. 2, 20424 (2013))。エクソソームは直径が 20 ~ 500 nm 程の細胞分泌物であり、血液・唾液・尿といった体液中に存在している。最近の研究から、がん細胞から分泌されたエクソソームは、正常細胞から分泌された物に比べ、その「粒径分布」や「形状分布」が異なることがわかってきた。さらに、がんの種類や進行ステージによっても、粒径分布・形状分布・数が変化することが明らかになってきた (D. D. Taylor, et al., Gynecol. Oncol. 110, 13 (2008))。そのため、体液中に浮遊しているエクソソームの粒径分布・形状分布・数を定量的かつ高速に計測することができれば、エクソソームをがんマーカーとして使用することができ、簡便・高速・低コスト・非侵襲的な革新的がん検査デバイスの実現が期待される。

一方、ナノポアデバイスは超微量・超高速な分析を行う革新的な 1 分子解析技術として期待されており、世界中で激しい研究開発競争が展開されている。ナノポアデバイスの構造は、ナノポアの上下にイオン電流計測および電気泳動用の電極が設けられ、ナノポアと電極はともに KCl などの電解質溶液で満たされている。ナノポア内に分子が無ければ、ナノポアを介して電極間にイオン電流が流れ、電気泳動により分子がナノポア内に入ると、一部のイオン電流が分子によって遮断され、イオン電流が減少する。この減少量がナノポア内の検出物質の体積に比例するため、1 分子の体積がイオン電流の変化から算出され、1 分子検出・識別に用いられている。このナノポアデバイスを生体材料に応用することで、溶液中 (体液中) に浮遊している生体物質の形状分布解析を行える革新的な生体物質解析技術の創成が期待されるが、これまでに溶液中に浮遊している生体物質の 3 次元形状分布解析に成功した例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に開発してきた「ナノポアを用いた 1 分子構造解析法」を応用し、溶液中に浮遊している生体物質の「形状分布解析法」の技術開発と原理構築を行う。具体的には、エクソソーム (細胞分泌顆粒) をナノポアに通過させ、ナノポアを流れるイオン電流の変化からエクソソームの「形状分布」を高空間分解能で解析する技術を開発する。がん細胞由来のエクソソームは、正常細胞から分泌された物に比べ、「粒径分布」や「形状分布」が異なる。そのため、「形状分布解析法」を開発することで、エクソソームをがんマーカーとした新しいがん検査デバイスの実現を目指す。(図 1)

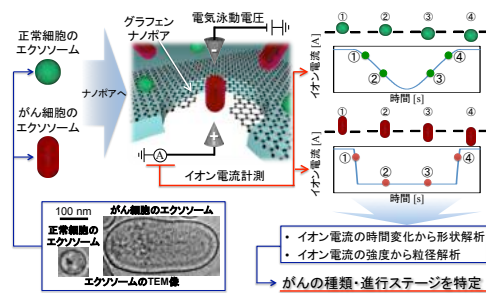


図 1. 本研究の概略図。

3. 研究の方法

厚さ 35 nm の窒化シリコン (Si_3N_4) メンブレンに、直径 200 nm のポアを電子線リソグラフィ法により作製する。また、より高分解能を得るために、直径 1 μm 以上の Si_3N_4 ポアの上にグラフェンシートを転写し、そこに収束イオンビームを用いて直径 100 ~ 500 nm のグラフェンナノポアの作製も行う。

続いて、粒径が既知のテスト粒子を用いて本デバイスの形状解析方法を定量的に評価する。そのデータを基にデバイスの最適化をし、その後、様々なエクソソームの形状分布を計測し、エクソソーム形状分布の評価を行う。ナノポア計測では、電気泳動電圧として 100 ~ 800 mV を印加する。

4. 研究成果

微細加工により作製した Si_3N_4 ナノポアデバイスによってエクソソームの 1 粒子形状解析を行うことで、液中に浮遊しているエクソソームの形状分布は分泌元のがん細胞の種類ごとに異なることを発見した。さらに、本 1 粒子形状解析技術を用いて健康者と乳がん患者の血液から取り出したエクソソームの形状を解析した結果、明らかに異なる形状分布を示したため、血液検査による任意がん検査法の実現が期待される。今後、様々なエクソソームを解析することで、がんの進行メカニズムに関する解析や、それらの解析データを基にした医療診断など、その将来展望は基礎から応用まで幅広いと言える。また、本技術は、エクソソームに限らず様々な微粒に対して応用が可能であるため、生理学、医学、薬学など、幅広い分野に大きく貢献するものである。

一方、ナノスケールのグラフェンナノポアの作製に成功した (図 2)。しかし、グラフェンは基本的に疎水であり、さらにポアを通過するエクソソームよりもグラフェンに吸着してしまうエクソソームの方が多くことが実際の実験を行うことで明らかとなった。

また、エクソソームのポア通過速度制御には光ピンセットが有力であることが示唆されたため、光増強電場を示す金属微粒子のパターンニング技術の開発を行った。既存の金属微粒子膜はフォト/電子線リソグラフィの

作製プロセスに耐えられないが、本研究では微粒子間をジチオール分子で架橋することで微粒子膜の耐久性を上げ、各リソグラフィによるパターンニングを可能にした(図3)。

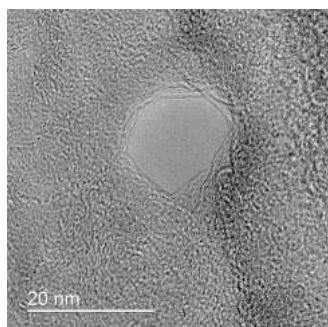


図2. 本研究で作製したグラフェンナノポア.

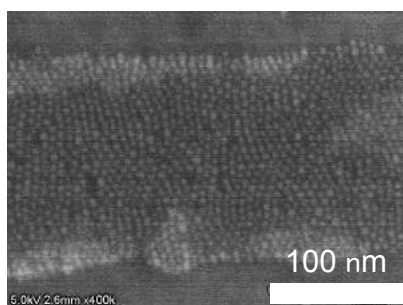


図3. 金属微粒子膜のパターンニング.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① N. Saito, S. Ryuzaki, P. Wang, S. Park, N. Sakai, T. Tatsuma, K. Okamoto, and K. Tamada, “Durability improvements of two-dimensional metal nanoparticle sheets by molecular cross-linked structures between nanoparticles”. 13. Jpn. J. Appl. Phys., 52, 06GD03 (2017). (査読有)
- ② N. Saito, P. Wang, K. Okamoto, S. Ryuzaki, and K. Tamada, “Large patternable metal nanoparticle sheets by photo/e-beam lithography”. 14 Nanotechnology 28, 435705 (2017). (査読有)
- ③ S. Ryuzaki, M. Tsutsui, Y. He, K. Yokota, A. Arima, T. Morikawa, M. Taniguchi, and T. Kawai, “Rapid structural analysis of nanomaterials in aqueous solutions”. 15. Nanotechnology 28, 155501 (2017). (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

招待講演

- ① 龍崎奏, “1 粒子解析技術を基盤としたナノバイオセンサー”, 第5回アライアンス若手研究交流会, 東京, 8/21-22 (2017).
- ② S. Ryuzaki, “Nanopore devices for structural analysis of suspended nanomaterials in aqueous solutions”, Japan-Taiwan Joint Symposium 2017, Fukuoka, Japan, 6/28 (2017).

- ③ 龍崎奏, “ナノ空間における光・電子・イオン”, 第38回光化学若手の会, 福岡, 6/16-18 (2017).
- ④ 龍崎奏, “ナノ空間を利用したナノバイオセンサー”, 青山学院大学コロキウム, 神奈川, 6/1 (2017).
- ⑤ 龍崎奏, “溶液中における浮遊生体物質の形状分布解析法に基づくナノバイオセンサーの開発”, 第77回秋季応用物理学会講演奨励賞受賞記念講演, 新潟, 9/13 (2016).
- ⑥ 龍崎奏, “金属微粒子ナノシートの大面積パターンニング”, 電子情報通信学会, 福岡, 3/16 (2016).
- ⑦ 龍崎奏, “液中における浮遊ナノ材料形状解析技術の開発”, ナノ学会応用部会合同シンポジウム, 福岡, 11/27 (2015).
- ⑧ 龍崎奏, “シリコン窒化膜によるイオンチャンネルを用いた一分子構造解析法の開発”, 神戸大学先端膜工学センター学術講演会, 神戸, 3/6 (2015).
- ⑨ S. Ryuzaki, “Rapid structural analysis of a single molecule in aqueous solutions”, 2015 IMCE International Symposium, Fukuoka, 1/28 (2015).

国際会議

- ⑩ S. Ryuzaki, M. Tsutsui, K. Yokota, and M. Taniguchi, “Rapid structural analysis of nanomaterials in aqueous solutions”, European Conference on Molecular Electronics (ECME), Dresden, Germany, 8/29-9/2 (2017). (Selected Oral Paper)
- ⑪ S. Ryuzaki, M. Tsutsui, K. Yokota, M. Taniguchi, “Rapid structural analysis of nanomaterials in aqueous solutions”, 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics, Kanazawa, Japan, 6/26-28 (2017). (Selected Paper)
- ⑫ S. Ryuzaki, M. Tsutsui, T. Yasui, K. Yokota, K. Tamada, Y. Baba, M. Taniguchi, “A nanobiosensor based on structural analysis of nanobiomaterials in solutions”, JSAP Autumn Meeting, Niigata, Japan, 9/12-15 (2016).
- ⑬ S. Ryuzaki, N. Saito, P. Wang, K. Okamoto, K. Tamada, “Charge transport properties of silver nanoparticle sheets”, The International Conference on Materials for Advanced Technologies 2015, Singapore, 6/28-7/4 (2015). (Selected Paper)

国内学会

- ⑭ 龍崎奏, 筒井真楠, 安井隆雄, 横田一道, 玉田薫, 馬場嘉信, 谷口正輝, “溶液中生体物質の形状解析を基盤としたがん検査デバイスの開発”, 第14回ナノ学会, 小倉, 6/13-15 (2016).
- ⑮ 龍崎奏, 筒井真楠, 安井隆雄, 横田一道, 玉田薫, 馬場嘉信, 谷口正輝, “溶液中における浮遊生体物質の形状分布解析法に基づくナノバイオセンサーの開発”, 春

季第 63 回応用物理学会, 東京, 3/18-22 (2016).

- ⑩ 龍崎奏, 斎藤昂, Wang Pangpang, 岡本晃一, 玉田薫, “粒子間分子架橋構造を有する銀微粒子二次元膜の作製と評価”, 第 13 回プラズモニクスシンポジウム, 松山, 1/22-23 (2016).
- ⑪ 龍崎奏, 斎藤昂, 岡本晃一, 玉田薫, “ジチオール置換銀微粒子単層膜の作製と評価”, 春季第 62 回応用物理学会, 平塚, 3/11-14 (2015).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

- ① 名称: エクソソームの形状分布の解析装置、がん検査装置、エクソソームの形状分布の解析方法、及びがん検査方法
発明者: 谷口正輝, 筒井真楠, 川合知二, 馬場嘉信, 安井隆雄, 落谷孝広, 龍崎奏
権利者: 大阪大学、名古屋大学、国立がん研究センター
種類: 特許
番号: 特願 2016-38204
出願年月日: 2016 年 2 月 29 日.

国内外の別: 国内

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

龍崎 奏 (RYUZAKI, Sou)
九州大学・先導物質化学研究所・助教
研究者番号: 60625333

(2) 研究協力者

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