

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01846

研究課題名(和文) 極薄ナノポアを用いた液中1分子形状解析法の創成

研究課題名(英文) Single-molecule analysis by nanoporescopy

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1粒子・分子の性状を高度に解析する新規ナノポアセンシング法を創成した。ベースとなるのは極薄メンブレンに加工するナノサイズの細孔であり、さらに、物質の細かな形状を測定可能にするために、サラウンドゲートをナノポア周囲に作りこんだ。この新規ナノポアデバイスを用いて、形状の異なるナノ粒子、細菌、ウイルス、タンパク質やDNAの検出を実施し、さらにイオン電流信号波形の解析に機械学習を応用することで、これらの物質の形状だけでなく、表面電荷や質量、表面タンパクの種類まで識別可能な新規1粒子・分子センシング法を創成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した液中1粒子・分子形状解析法は、物質の体積だけが測定可能な従来法とは異なり、物質の表面電荷や質量、表面タンパクの種類など、様々な性状の違いを見分けることができる手法であり、また、ウイルスやタンパク質、DNAなどあらゆる生体分子に応用可能な検出原理を備えたセンサ技術である。当該技術がタンパク質構造解析やDNA塩基配列解読に広く活用されることで、構造生物学、ひいては生命科学の発展に大きく寄与することができるかと期待される。

研究成果の概要(英文)：Low thickness-to-diameter aspect ratio nanopores were fabricated for structure analyses of individual particles and molecules in electrolyte solution. The nanosensor consisted of a nanoscale hole formed in an ultra-thin membrane. A gate electrode was also embedded around the pore that enabled to slow down the translocation motions of the objects via the gating-induced electroosmotic flow. Overall capability allowed to discriminate various substances from bacterial cells to proteins via the ionic current signal waveforms.

研究分野：マイクロ・ナノ科学

キーワード：ナノポア イオン電流 1分子泳動ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

ナノポアセンサの研究は世界中で広く展開されており、特に DNA 塩基配列解読に向けた技術競争は熾烈を極めている。その中で、イオン電流計測による 1 塩基分子識別を実現するべく、グラフェンなどの単原子シート中にナノポアを開口させた低アスペクト比ナノポアの開発が精力的に実施されてきている。しかし、これらの極薄ナノポアの開発は、従来の 1 粒子体積測定法の原理を基本コンセプトにおいたものであり、低アスペクト比ナノポアにおけるイオン電流機構に関する基礎学理は未だ確立されていないのが現状である。そしてこのことが、低アスペクト比ナノポアによる 1 分子識別を実現する上での根幹を成す課題であることが認識され始めている。一方、1 分子構造解析という観点からは、クライオ電子顕微鏡や非弾性トンネル分光法によって、数原子レベルの空間分解能での 1 分子観察技術がすでに確立されている。しかし、これらの技術は極低温・真空中で固定化された分子に対してのみ適用可能な観察技術であり、また大型な装置を必要とするため、生体分子が活性な環境下で個々の分子の構造多様性やダイナミクスを調べることができない。そこで本研究では、低アスペクト比ナノポア内での粒子-ポア壁面間のナノ制限空間におけるイオン輸送機構を実験・理論の両面から徹底的に解明することで、極薄ナノポアによる 1 分子形状解析を実証する。この 1 分子形状解析法は、小型なナノポアチップを用いて室温・液体中で *in vivo* 解析にも応用可能なデバイス原理を備えた手法であり、シンプルなイオン電流計測であるため個々の分子の構造多様性やダイナミクスまで評価可能な世界初の技術である。当該技術がタンパク質構造解析や DNA 塩基配列解読に広く活用されることで、構造生物学、ひいては生命科学の発展に大きく寄与することができる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に確立してきた電流計測を基盤とする 1 分子検出技術を応用・発展させ、極薄ナノポアを用いたイオン電流計測を基盤とする数ナノレベルの空間分解能を有した液中 1 粒子形状解析手法を創成する。そしてこの手法を駆使して、タンパク質の 1 分子形状解析を実証する (図 1)。本研究の達成により、ナノ制限空間におけるイオン輸送機構に関する基礎科学を構築すると共に、液体中での 1 生体分子構造解析に資する革新的なナノポア技術並びにデバイスを創出する。

3. 研究の方法

本研究では、ナノポアを通るイオン電流計測を基盤とする液中 1 分子形状解析法を創成する。そのために、まず低容量極薄ナノポアセンサ構造を作製し、これを用いて電気泳動電圧制御による繰り返し 1 粒子測定法を開発する。そして同手法を駆使し、異方性ナノ粒子の 1 粒子検出を実施する。さらにそこで得られるデータをもとに、マルチフィジックス理論シミュレーションの観点から、粒子-ポア壁面間のナノ制限空間におけるイオン輸送機構を明らかにすると共に、イオン電流波形から 1 粒子形状を導出するプロトコルを構築する。そして以上の知見を集約し、極薄ナノポアによるタンパク質の 1 分子形状解析を実証する。

4. 研究成果

まず、超高速イオン電流計測を可能にするポリイミド被覆ナノポアを作製した。ポリイミド層で部分的に表面をコートしたナノポアチップを作製し、ナノ粒子がナノポアを通過する際に生じるパルス状のイオン電流変化を測定した。その結果、ポリイミド層の面積に比例しイオン電流応答速度が高速化することを明らかにした。これは、低電気容量はポリイミド層を被覆することで、ナノポアチップ全体の電気容量が低下したことによるものであると考えられた。さらに、イオン電流応答性におけるナノポア外部の抵抗の寄与を実験的に調べ、ナノポア測定におけるイオン電流応答速度は、ナノポア内部の抵抗ではなく、外部の抵抗成分によって変化することを明らかにした。これらの知見をもとに、ナノポアチップの等価回路モデルを構築し、ナノポアチップの裏面にポリマー層を被覆する新規ナノポア構造を開発した。以上の実験を通して、タンパク質の 1 分子検出・識別のための高速なイオン電流応答を可能にする新規ナノポアデバイスが作製可能になった。

イオン電流応答高速化が達成できた一方、1MHz 以上の高速イオン電流計測において観測される顕著な電流ノイズが新たな課題として浮彫りになった。従来のナノポア測定では、ローパスフィルタやフーリエ解析・ウェーブレット変換などのデジタル処理によってノイズの低減が図られていた。しかしこれら手法では、ノイズが低減されると同時に、電流変化の鈍化が起きてしま

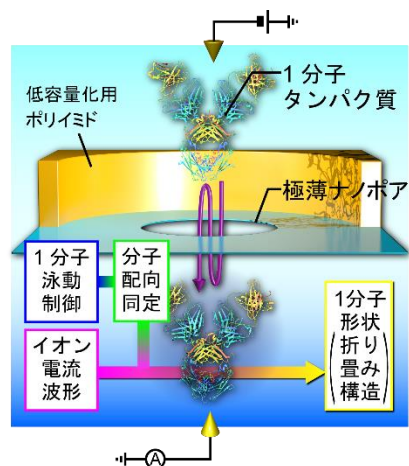


図 1. 極薄ナノポアを用いた 1 分子形状解析.

うため、極めて短時間でナノポアを通過するタンパク質などのナノ物質を検出しようとする際にはシグナル自体も大きく歪んでしまう。そこで、シグナルと区別してイオン電流ノイズだけを除去するための深層学習アルゴリズムを開発した。画像のノイズ処理法としてその有効性が認められた Noise2Noise を1次元時系列データに適用可能なものにし、これを用いてイオン電流データのデノイズを試した。アルゴリズムの動作検証のため、人工的にナノ起伏を作りこんだナノ流路を用い、ナノ粒子がこのナノ起伏ナノ流路を通過する際のイオン電流変化を測定した。得られた電流変化はナノ起伏の形状を部分的に反映した特徴的な波形を示したが、起伏の位置や数は、シミュレーションで予測されるものとは異なった。これは、ナノ起伏部をナノ粒子が通過する際に生じる微弱な電流変化が前述の高周波ノイズによって判別不能になるためであった。そこでまず従来のフーリエ解析やウェーブレット変換も試した。しかしこれらの方法では、ノイズが低減できたものの、波形は大きく歪んでしまった。一方、新たに開発した深層学習アルゴリズムを用いた場合には、微弱な信号波形を歪ませることなく、高周波電流ノイズを大幅に低減することができ、シミュレーションで予測されていた電流波形を確認することができた。

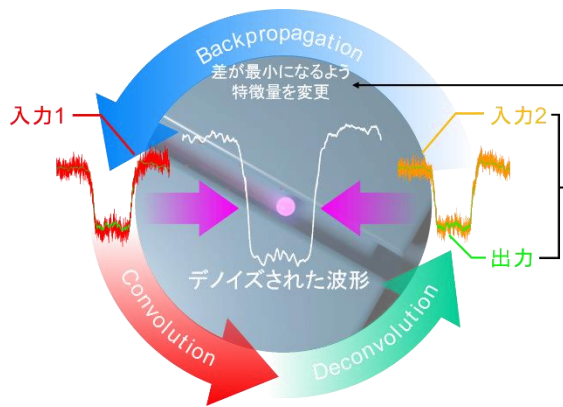


図2. 深層学習によるイオン電流デノイズ。

これらの研究によって、高速にナノポアを通過するタンパク質などの物質を検出するためのナノポア技術を創成することができた。そこで、最後にタンパク質のナノポア通過速度を制御するための1分子泳動制御法を創成した。物質のナノポア通過速度が低減できれば、より確実な1粒子・分子の検出・識別が可能になる。実験では、まず、電気浸透流によるタンパク質の泳動速度低減をねらい、ナノポア壁面を種々の絶縁膜 (SiO_2 , Si_3N_4 , Al_2O_3 , TiO_2 , HfO_2) で被覆し、その効果を系統的に評価した。その結果、被膜材料の等電点に応じてナノポア壁面のゼータ電位が変化することを確認した。そして物質が絶縁被覆ナノポアを通過する際には、ナノポア内に生じる壁面ゼータ電位に応じた向き・速度の電気浸透流によって、粒子の泳動速度が増減することを明らかにした。この結果を発展させて、ナノポア壁面のゼータ電位を物理的に変調する手法を考案した。開発したデバイスは、固体メンブレンに開けられたナノポアと、さらにその周囲が SiO_2 薄膜を介してゲート電極で囲まれたサラウンドゲートナノポアである。この新規デバイスの動作検証のため、イオン電流計測によるナノ粒子の1粒子検出を実施した。その結果、ゲート電極に加える電圧によってナノポア内に発生する電気浸透流の向きと速度を自在に制御できることを明らかにし、この効果によってナノポアを電気泳動するナノ物質の速度を、従来のナノポア技術に比して10000分の1にまで低減させることに成功した。そして、開発したナノポア技術を用いて、形状の異なるナノ粒子、細菌、ウイルス、タンパク質やDNAの1粒子・分子検出を実施し、さらに機械学習によるイオン電流波形解析を応用することで、これら物質の形状だけでなく、その表面電荷密度、質量、表面タンパクの種類まで識別できる1粒子・分子解析法を創出した。

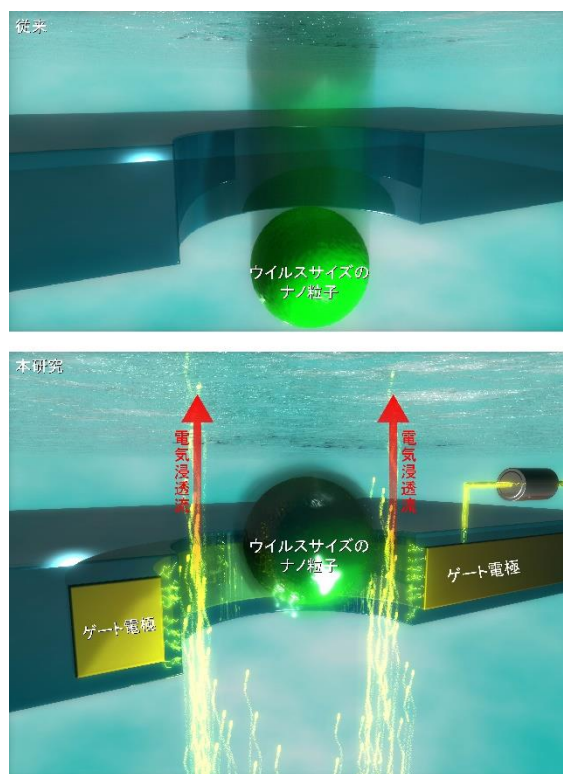


図3. 上図:従来の固体ナノポアでは粒子が高速にナノポアを通過する。下図:それに対し今回開発した集積固体ナノポアデバイスでは、ゲート電極に加える電圧により、ナノポア内の水流を制御することで、ウイルスサイズのナノ粒子の移動速度を1/10000倍にまで減速できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsutsui Makusu, Ryuzaki Sou, Yokota Kazumichi, He Yuhui, Washio Takashi, Tamada Kaoru, Kawai Tomoji	4. 巻 2
2. 論文標題 Field effect control of translocation dynamics in surround-gate nanopores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Materials	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43246-021-00132-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsui Makusu, Yokota Kazumichi, He Yuhui, Washio Takashi, Kawai Tomoji	4. 巻 5
2. 論文標題 Nano-corrugated Nanochannels for In Situ Tracking of Single-Nanoparticle Translocation Dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 2530 ~ 2536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.0c00845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Makusu Tsutsui, Sou Ryuzaki, Kazumichi Yokota, Yuhui He, Takashi Washio, Kaoru Tamada, and Tomoji Kawai	4. 巻 2
2. 論文標題 Field effect control of translocation dynamics in surround-gate nanopores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Materials	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43246-021-00132-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Leong Iat Wai, Tsutsui Makusu, Murayama Sanae, He Yuhui, Taniguchi Masateru	4. 巻 124
2. 論文標題 Electroosmosis-Driven Nanofluidic Diodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7086 ~ 7092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c04677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Akihide Arima, Yuhui He, Tomoji Kawai	4. 巻 4
2. 論文標題 Solid-State Nanopore Time-of-Flight Mass Spectrometer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 2974-2979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b01470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki Hayashida, Kazumichi Yokota, Sanae Murayama, Akihide Arima, Makusu Tsutsui, Masateru Taniguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Tailoring Dielectric Surface Charge via Atomic Layer Thickness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 5025-5030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.9b18444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iat Wai Leong, Makusu Tsutsui, Tomoko Nakada, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, Tomoji Kawai	4. 巻 4
2. 論文標題 Back-Side Polymer-Coated Solid-State Nanopore Sensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 12561-12566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b00946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makusu Tsutsui, Yu-Chang Chen	4. 巻 9
2. 論文標題 Heat dissipation in quasi-ballistic single-atom contacts at room temperature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55048-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makusu Tsutsui, Tomoko Yamazaki, Kenji Tatematsu, Kazumichi Yokota, Yuko Esaki, Yukari Kubo, Hiroko Deguchi, Akihide Arima, Shun'ichi Kuroda, Tomoji Kawai	4. 巻 11
2. 論文標題 High-throughput single nanoparticle detection using a feed-through channel-integrated nanopore	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 20475-20484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NR07039G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Tomoko Nakada, Akihide Arima, Wataru Tonomura, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, and Tomoji Kawai	4. 巻 11
2. 論文標題 Electric field interference and bimodal particle translocation in nano-integrated multipores	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 7547-7553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8NR08632J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Tomoko Nakada, Akihide Arima, Wataru Tonomura, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, and Tomoji Kawai	4. 巻 11
2. 論文標題 Silicon substrate effects on ionic current blockade in solid-state nanopores	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 4190-4197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8NR09042D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akihide Arima, Ilva Hanun Harlisa, Takeshi Yoshida, Makusu Tsutsui, Masayoshi Tanaka, Kazumichi Yokota, Wataru Tonomura, Jiro Yasuda, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, Mina Okochi, and Tomoji Kawai	4. 巻 140
2. 論文標題 Identifying single viruses using biorecognition solid-state nanopores	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 journal of American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 16834-16841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b10854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Tomoko Nakada, Akihide Arima, Wataru Tonomura, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, and Tomoji Kawai	4. 巻 3
2. 論文標題 Particle capture in solid-state multipores	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 2693-2671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.8b01214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Akihide Arima, Wataru Tonomura, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, and Tomoji Kawai	4. 巻 10
2. 論文標題 Temporal response of ionic current blockade in solid-state nanopores	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 34751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.8b11819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ziwei Ji, Zhuo Huang, Bowei Chen, Yuhui He, Makusu Tsutsui, Xiangshui Miao	4. 巻 29
2. 論文標題 Impact of ionization equilibrium on electrokinetic flow of weak electrolytes in nanochannels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 295402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6528/aac126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 筒井真楠、横田一道、中田知子、有馬彰秀、殿村渉、谷口正輝、鷲尾隆、川合知二
2. 発表標題 マルチナノポアを用いた高効率1粒子検出
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 筒井真楠, 横田一道, 有馬彰秀, ハ ユフイ, 川合知二
2. 発表標題 低アスペクト比ナノポアを用いた1粒子質量測定
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makusu Tsutsui, Akihide Arima, Ilva Hanun Harlisa, Takeshi Yoshida, Masayoshi Tanaka, Kazumichi Yokota, Wataru Tonomura, Jiro Yasuda, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, Mina Okochi, Tomoji Kawai
2. 発表標題 Single-bacteria and virus identification using a bio-recognition nanopore
3. 学会等名 Materials Research Society, 2019 Fall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makusu Tsutsui
2. 発表標題 Virus infection diagnosis by AI-driven nanopore sensing
3. 学会等名 Sixteenth International Conference on Flow Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林田 朋樹、筒井 真楠、谷口 正輝
2. 発表標題 Al ₂ O ₃ 成膜によるマイクロポア壁面の表面電荷の調整
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬 彰秀、筒井 真楠、谷口 正輝
2. 発表標題 ナノボアトラップ法による単一粒子の捕捉と識別
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本 匠平、筒井 真楠、谷口 正輝
2. 発表標題 ナノボアによるメソポーラス・ナノ粒子の計測
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 筒井 真楠、有馬 彰秀、ハルリサ イルファ、吉田 剛、田中 祐圭、横田 一道、殿村 渉、鷲尾 隆、大河内 美奈、川合 知二
2. 発表標題 機械学習と分子認識ナノボアを用いた1ウイルス識別
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬 彰秀、筒井 真楠、殿村 渉、横田 一道、立松 健司、山崎 智子、黒田 俊一、谷口 正輝、鷲尾 隆、川合 知二
2. 発表標題 ナノボア計測による多項目ウイルス識別
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iatwai Leong, Makusu TSUTSUI, Masateru TANIGUCHI
2. 発表標題 Characterization of single nanoparticle shape using solid state nanopore
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------