

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25286031

研究課題名(和文) グラフェンを用いた1分子シーケンシング

研究課題名(英文) Single molecule sequencing using graphene

研究代表者

田中 裕行 (Tanaka, Hiroyuki)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20314429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した世界で唯一の技術であるDNAの伸張固定方法(成立特許)及び走査トンネル顕微鏡(STM)による塩基識別手法(Nature姉妹紙)を、最新の理論計算予測やグラフェン基板を採用するなどの実験条件最適化により、全4種類の塩基の1分子シーケンシングを目指して研究を行った。その結果、グアニン塩基だけでなく、アデニン塩基のシーケンシングにも成功した。1本の二本鎖DNAのアデニン塩基とグアニン塩基のシーケンシングをするだけで、DNA塩基の相補性のため、全4種の塩基分子を知ることができるので重要な成果と言える。

研究成果の概要(英文)：The author have applied the latest method of theoretical calculations and graphene substrate to the base identification method (Nature sister paper) by DNA extension and fixation method (established patent, developed by the author) and scanning tunneling microscope (STM). By optimizing experimental conditions such as adoption, the author aimed at single molecule sequencing of all four kinds of bases. As a result, the author succeeded in sequencing not only guanine base but also adenine base. It is an important result as it is possible to know all four kinds of base molecules as complementarity of the DNA base only by sequencing adenine base and guanine base of one double stranded DNA.

研究分野：1分子可視化分光

キーワード：グラフェン DNA 1分子 可視化 顕微鏡 STM AFM

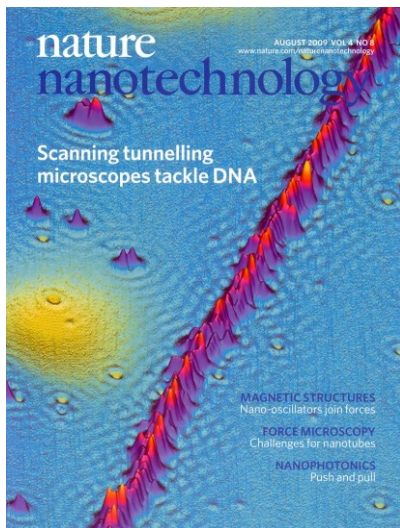
1. 研究開始当初の背景

申請者は、表面科学者の夢の技術であった走査トンネル顕微鏡(STM)による DNA の塩基識別(主にグアニン)を実現した。その成果の一部は Nature Nanotechnology 4 (2009) 518にて掲載された。さらに

<https://www.nature.com/articles/nnano.2009.155>

その画像の一部は、掲載号の表紙にも採択された(右図)。

<https://www.nature.com/nnano/volumes/4/issues/8>



News and Views の記事でも、Danny Porath 教授により紹介された。

“Scanning tunnelling microscopy: A DNA sequence scanned”(pp476)

<https://www.nature.com/articles/nnano.2009.212>

その記事の最後の文を参考に下に引用する；

“the direct imaging reported by Tanaka and Kawai is unprecedented for DNA — this in itself is a considerable scientific achievement.”

長い歴史的背景は省略するが、前述のように紹介された STM による DNA シークエンシングの実績を、本申請研究で、さらに発展(完成)させ、国益につなげることも目的とする背景があった。

2. 研究の目的

申請者が独自に開発した世界で唯一の技術である DNA の伸張固定方法(成立特許)及び走査トンネル顕微鏡(STM)による塩基識別手法(Nature 姉妹紙)を、最新の理論計算予測やグラフェン基板を採用するなどの実験条件最適化により、全4種類の塩基のシークエンシングを実現する。

本研究では、固体表面に伸張固定させた DNA を一塩基の分解能で STM 観察・分光測定するだけでなく、伸張固定化メカニズムや吸着系の電子状態の理論的解析を行い、さらに近年発展してきた STM/原子間力顕微鏡(AFM)同時測定も適応し、実験手法的にも実験・理論的にも多角的で、学理的にも確立し

た信頼性の高い次々世代単分子シークエンシングを、単分子に近い極微量で、世界に先駆けて実現する。

3. 研究の方法

申請者自身の先行研究を発展させること、つまり、条件最適化や原理的な解明、STM だけでなく理論計算の解釈。予測も行い、DNA の伸張過程や塩基分子指紋の由来、つまり、バイオ分子と固体表面との相互作用を解明し、学理的にも確立した信頼性及び高スループットシークエンシングの実現を目指す。具体的な項目は以下の通り。

(1). グラフェン基板作成及び DNA の伸張固定の最適化・測定の高感度化とその機構の解明

(2). 1の続き：分子指紋のデータベース化と DNA 塩基-基板間相互作用の解明

(3). STM/AFM 同時測定による新たな分子指紋(分子骨格や電荷・電位情報)の採取

(4). スループットを向上(探針先端制御の自動化及びトータルでの最適化)

さらに、実用性の見通しを明らかにする。

4. 研究成果

DNA の塩基分子で、最も大きなグアニン分子は、前述の背景の通り、既に分子指紋が特定され識別することに成功している。そこでまず、最も識別に困難な、小さな塩基分子のチミンとシトシンに集中して研究を行った。分子の蒸着方法及び固定法などは省略する。

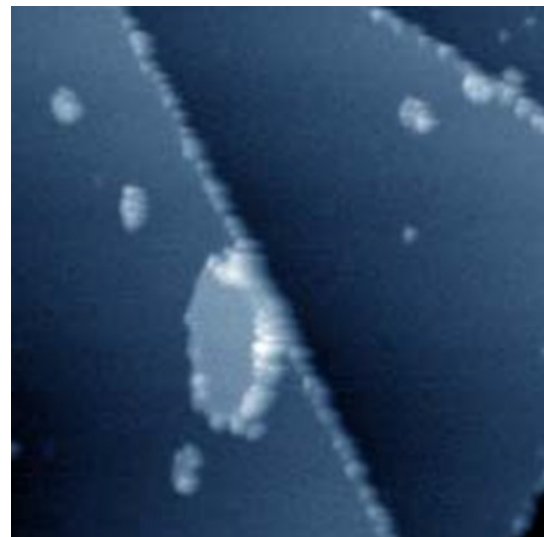


図 Cu(111)に吸着した STM 像(約 60nm 四方)において FI-CCCTT が複数個吸着している。

発色団である FI(Fluorescein isothiocyanate) をマーカーとし、FI 以外のシトシンとチミンの部分において確実に分光測定を行い、分子指紋の検出を行った。

その結果、シトシンとチミンは、-2V に分子指紋に対応したピークを持っている可能性が明らかになった。(データは次ページのグラフ参照。)赤はコントロール、黄・緑がシトシンとチミンであり、ピークは明瞭ではな

いが、コントロール（基板の部分）との差は認められた。

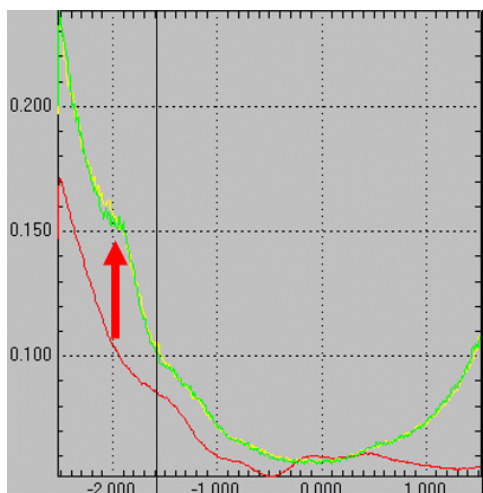
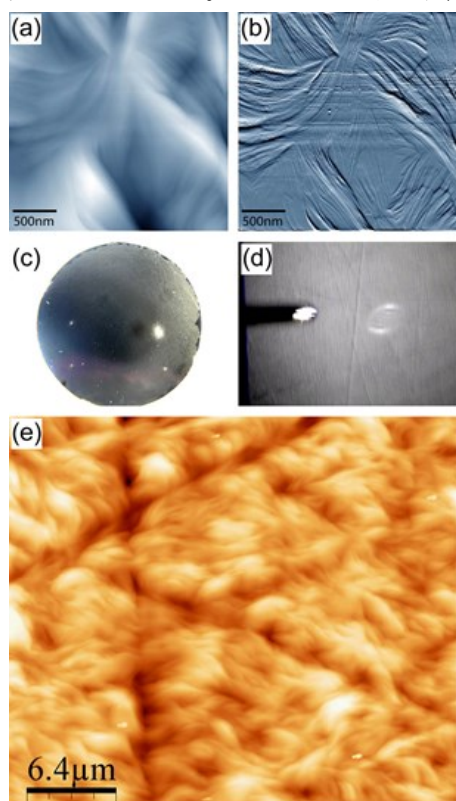


図 シトシンとチミンの分子指紋に対応したスペクトル（黄・緑）

グアニンのピークの強度が大きく、また、エネルギー的に近い（-1.6V）なので、シトシンとチミンの分子指紋をグアニンのそれと弁別することが困難であった。その後、表面にコンタミ層が生成することが判明したため、念のため、本成果の論文等の発表は行わなかったが、データの質自体には、影響がないとみなし、再実験などは行わず、計画を先に進めることとした。

グラフェン基板の作成に関して大きな成果を得ることができた。走査型トンネル顕微鏡

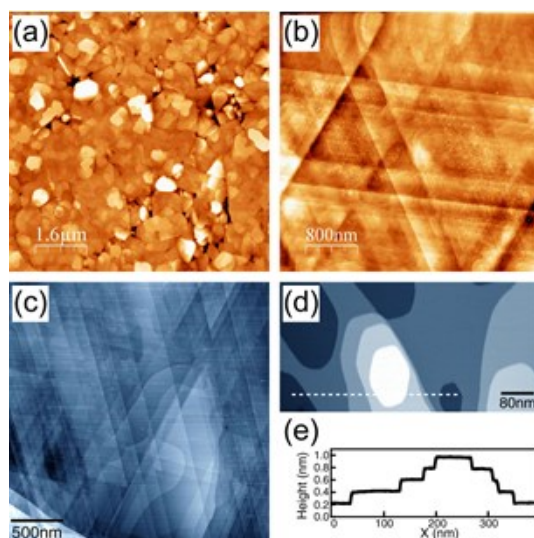


などに用いるグラフェンは、ニッケル単結晶表面に CVD により成膜する。ニッケル単結晶

は高価であるだけでなく、図のように、表面研磨や不純物の問題のため、清浄化困難なことが多く、研究の障壁となっていた。本研究だけでなく、同様の現象に関する経験談は、複数の研究者から得ている。”昔わからなかった謎が解けた”といったインパクト性も有する。（なお、図の詳細な説明は、雑誌論文の④を参照のこと。）

原子的に平坦な金属清浄表面を作成するための簡便で確立した手法は、マイカ基板への蒸着薄膜であり、金マイカとして市販されているほどに確立されている。ところが、”ニッケルマイカ”というものは存在しない。

近年、1000 °C 程度でも分解しない”合成マイカ”が市販されるようになり、van der Waals エピタクシー用の基板として用いられている。そこで、高温にも耐える合成マイカ上に Ni を蒸着することとした。基板温度を 700 °C と 800 °C にそれぞれ加熱した Ni 薄膜試料の大気 AFM 像を下図(a, b)に示す。同図(a)の温度条件(700 °C)では、天然マイカの場合は分解していたが、合成マイカの場合は分解しなかったため、AFM 観察を行うことができた。



700 °C でアニールした Ni 薄膜の AFM 像の表面粗さは、3.5 nm(rms)と目標の 1 nm 以下に比べ大きいため、さらに平坦化を目指し、800 °C に昇温した。その結果、面心立方構造の金属の(111)面らしい表面構造、つまり、hexagonal な表面構造を有する AFM 像を得た。この AFM 像の表面粗さは 0.6 nm(rms)と 1 nm を下回る値を示した。定量的な比較は難しいが、市販されている金マイカに比べても、表面の平坦さや結晶性は悪くないことが明らかになった。

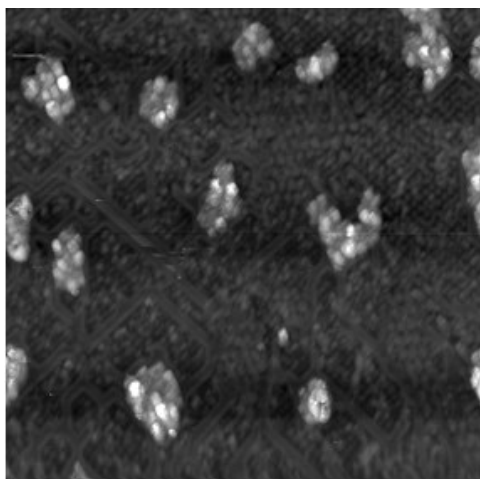
Ni の清浄表面は反応性が高く汚染されやすいため、超高真空 STM チャンバーにトランスファーする前に、スパッタとアニールを手短かに数回行った。同図(c-d)に、典型的な UHV-STM 像(2.5 ミクロン四方)を示す。大気下で観察された AFM 像と同様に fcc(111)

らしい表面構造が確認できる。より狭いエリア(幅 600 nm)の STM 像と、白い破線の部分の断面図を同図(e)に示す。原子レベルで平坦な表面と、高さ約 0.2nm の単原子ステップが明瞭に観察され、単原子ステップの高さからも Ni(111)であることが明らかになった。

本研究のこの成果は、バルク単結晶を清浄化するコストの削減などの十分な意義があると考えている。さらに、今回用いた Ni の蒸着法も特別な装置を用いるのではなく、金マイカ作成の場合と似た装置構成及び手順で行うことができるのもメリットであり、また、他の研究者によって容易に再現できるので、波及効果も高いことが期待される。つまり、今後の他の研究者によって様々な研究に発展することも期待される。

同様に、重要なグラフェン成膜用基板として研究されている白金基板も同様に作成することに成功しているが、紙面の都合で割愛する(雑誌論文参照)。また、白金の場合は、ニッケルよりも貴重な元素であるため、世界的に、また、特に資源に乏しい我が国においてのインパクトは大きく、また発展も期待される。

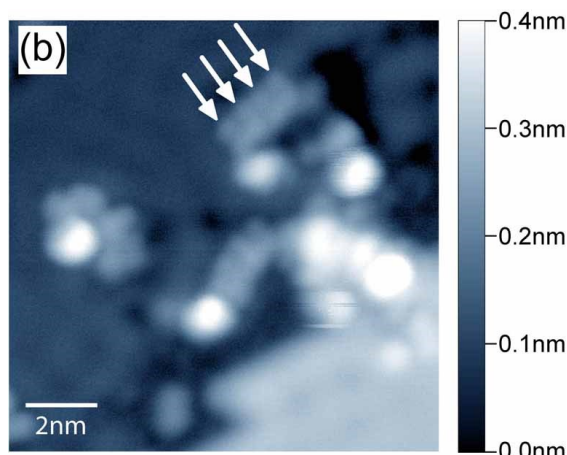
グラフェン基板に固定した DNA サンプルは、発色団(FI)が修飾され、グアニンが 3ヶ及びアデニンが 3塩基連なったオリゴマー FI-GGGAAA の DNA である。下図に示すように、孤立したオリゴマーは殆ど観察されず、様々な形状と大きさを有する吸着物が観察された。それらの水平方向の大きさは 5nm~20nm 程度と大きく、また嵩高く観察された。Cu(111)基板に比較し、グラフェンの表面が不活性で平坦なため、吸着した DNA オリゴマーが表面拡散・凝集しやすいことが明らかになった。



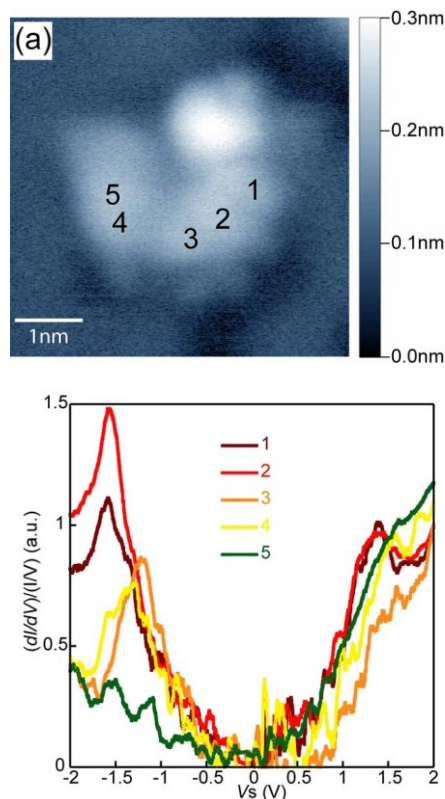
なお、塩基分子に特有と判断される分子指紋に関するスペクトルデータは得られなかった。

DNA のプリン塩基の一つであるグアニンだけでなくアデニンも識別できると、二重らせん DNA のそれぞれの 1 本鎖のプリン塩基すべて

を読み取ることで、DNA 塩基対の相補性より元の二重らせんの DNA 塩基配列決定を行うことが可能である。従って、アデニンを読み取るとはシーケンシングの観点より重要でありインパクトが大きい。アデニンのみで構成された合成 DNA オリゴマー(下図)およびウイルス DNA を対象として、アデニンの識別を行った。



上図より、発色団(マーカー)とアデニンに対応したヌクレオチドが明瞭に観察できていることがわかる。このようなオリゴマー分子のヌクレオチド部位において分光を行った結果を下グラフに示す。

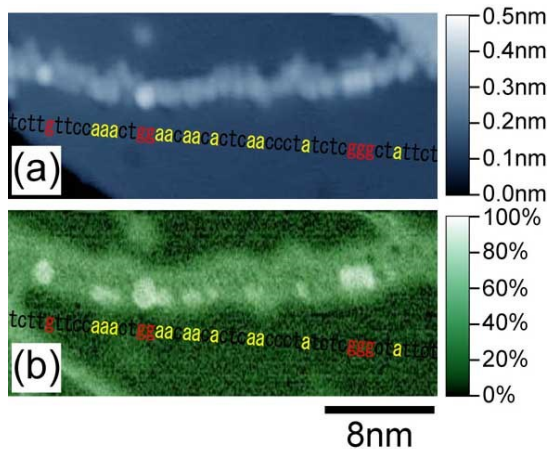


なお、図(a)中の数字 1-5 は、スペクトル番号に対応する。

分子指紋らしきピークが-1 から-1.5V にわたり認められる。チミンとシトシンのときに比べられると明瞭ではあるが、グアニンのそ

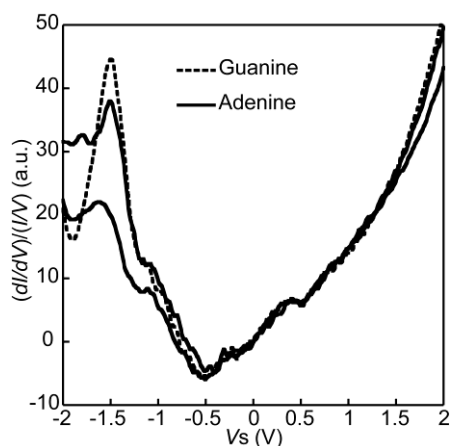
れと比べれば、強度が弱く、また、ばらつきも大きいと言える。

本成果をさらに深く且つ実践的に検証するために、ウイルス DNA を対象にして分子指紋の検出を行った。



上図において (a) はトポグラフィ像であり、(b) は $-1.6V$ での状態密度 (分子指紋の強度を反映する) である。トポグラフィ像では、グアニンが高さ (大きさ) の違いとして識別されていることがわかる。状態密度像では、グアニンだけでなく、アデニンも検出されていることがわかる。(図が小さいが、ガイドの塩基配列の文字列と一致している)

アデニンも識別できることが明らかになったが、スペクトル測定によって詳細に測定した (下図)。



上図からわかるように、分子指紋の領域 ($-1.6V$ 付近) の、グアニンのピークの強度が最も大きい。一方、アデニンでは、グアニンのそれよりも小さく、また、強度にばらつきがあることが明らかになった。

ランダムなコイルになりやすいオリゴマーと異なり、伸長された長鎖 DNA は、吸着状態 (コンフォメーション) がより均一的であり、その結果、分子指紋 (分子由来の状態密度) の出現するエネルギー領域の幅が小さく (ほぼ $-1.6V$) なることが明らかになった。

主要装置が、移転のため性能が損なわれたり、経年劣化するなどの思わぬトラブルに見

舞われ、期待したほどには進まなかったことは否めない。しかし、グアニンとアデニン塩基のシーケンシングに成功した。二重らせん DNA のそれぞれの 1 本鎖のプリン塩基を読み取るだけで、DNA 塩基対の相補性より、元の二重らせんの DNA 塩基配列決定を行うことが可能となったことは大きな成果といえる。

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 6 件)

① Hiroyuki Tanaka and Masateru Taniguchi, Atomically flat nickel film grown on synthetic mica, 2016 Jpn. J. Appl. Phys. 査読あり 55 078003.

<https://doi.org/10.7567/JJAP.55.078003>

② Hiroyuki Tanaka and Masateru Taniguchi, Single-crystalline epitaxial platinum film on yttrium-stabilized zirconia (111) prepared by sputtering deposition, 2016 Jpn. J. Appl. Phys. 査読あり 55 120304.

<https://doi.org/10.7567/JJAP.55.120304>

③ Hiroyuki Tanaka and Masateru Taniguchi, Single crystalline epitaxial platinum film on $Al_2O_3(0001)$ prepared by oxygen-doped sputtering deposition, 2017 Jpn. J. Appl. Phys. 査読あり. 56 058001.

<https://doi.org/10.7567/JJAP.56.058001>

④ 田中裕行, 谷口正輝, 合成マイカ上の原子レベルで平坦な Ni 膜基板の作成方法, 表面科学, 査読あり Vol. 38, No. 7 (2017) p. 336.

<https://doi.org/10.1380/jsssj.38.336>

⑤ Hiroyuki Tanaka and Masateru Taniguchi, Sequencing of adenine in DNA by scanning tunneling microscopy, 2017 Jpn. J. Appl. Phys. 査読あり. 56 08LB02.

<https://doi.org/10.7567/JJAP.56.08LB02>

⑥ Hiroyuki Tanaka and Masateru Taniguchi, Atomically flat platinum films grown on synthetic mica, 2018 Jpn. J. Appl. Phys. 査読あり 57 048001.

<https://doi.org/10.7567/JJAP.57.048001>

[学会発表] (計 17 件)

① 田中裕行, 走査型トンネル顕微鏡による 1 分子 DNA 解析 (キーノートスピーチ), 2013 年度精密工学会秋季大会, 2013 年 9 月 12~14 日, 関西大学千里山キャンパス (大阪)

② 田中裕行, グラフェンに吸着した DNA の STM/STS, 第 74 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 16 日 (月) から 20 日 (金),

間同志社大学京田辺キャンパス（京都）

③田中裕行、グラフェンに吸着した DNA の STM/STS、2013 年真空・表面学術合同講演会：第 33 回表面科学学術講演会・第 54 回真空に関する連合講演会、2013 年 11 月 26 日～11 月 28 日、つくば国際会議場（茨城県）

④田中 裕行、谷口正輝、STMに適した Ni(111) 及びグラフェン基板の作成、第 61 回応用物理学会春季学術講演会、2014 年 3 月 17 日(月)～20 日(木)、青山学院大学相模原キャンパス（神奈川県）

⑤ Hiroyuki TANAKA and M. Taniguchi、Preparation of Atomically Flat Pt(111) Surfaces、22nd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy(ICSPM22)、2014 年 12 月 11-13 日、静岡県賀茂郡東伊豆町奈良本 1240-14（静岡県）

⑥田中裕行、谷口正輝、Pt(111) 基板上的グラフェンの成膜、平成 26 年度日本表面科学会東北・北海道支部学術講演会プログラム、平成 27 年 3 月 9 日(月) - 10 日(火)、北海道大学百年記念会館（北海道）

⑦田中裕行、谷口正輝、STMに適した Pt(111) 基板の作成、第 62 回応用物理学会春季学術講演会、平成 27 年 3 月 11 日-14 日、東海大学 湘南キャンパス（神奈川県）

⑧ Hiroyuki TANAKA and M. Taniguchi、Preparation of Atomically Flat Pt(111) Surfaces、23rd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy(ICSPM23)、December 10-12, 2015, Hilton Niseko Village, Japan（北海道）

⑨ Hiroyuki TANAKA and M. Taniguchi、Preparation of metal supported graphene substrate for STM、2015 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2015)、平成 27 年(2015 年)12 月 15 日(火)～20 日(日)、ホノルル市、ハワイ州（米国）

⑩田中裕行、谷口正輝、STMに適した Ni(111) 基板の作成、第 63 回応用物理学会春季学術講演、2016 年 3 月 19 日(土)～22 日(火)、東工大大岡山キャンパス（東京）

⑪田中裕行、谷口正輝、マイカ基板にエピタキシャル成長した Ni(111)およびグラフェン、第 77 回応用物理学会秋季学術講演会、2016 年 9 月 13 日(火)～16 日(金)、朱鷺メッセ（新潟県）

⑫田中裕行、谷口正輝、マイカ基板にエピタキシャル成長した Ni(111)の構造解析、2016 年真空・表面学術合同講演会：第 36 回

表面科学学術講演会・第 57 回真空に関する連合講演会、2016 年 11 月 29 日(火)～12 月 1 日(木)、名古屋国際会議場（愛知県）

⑬Hiroyuki TANAKA and M. Taniguchi、Sequencing of Single-Stranded DNA by STM and Dispersion-Corrected Density Functional Theory、24th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM24)、December 14-16, 2016, Hawaii Convention Center, Honolulu（米国）

⑭田中裕行、谷口正輝、DNA 中のアデニンの STM によるシーケンシング、第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 3 月 14 日(火)～17 日(金)、パシフィコ横浜（神奈川県）

⑮Hiroyuki TANAKA and M. Taniguchi、Visualization of DNA on Graphene fabricated on atomically flat metal surfaces、11th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '17、December 3 (Sun) - 8 (Fri), 2017, Aqua Kauai Beach Resort, Kauai, Hawaii（米国）

⑯Hiroyuki TANAKA and M. Taniguchi、Scanning Probe Microscope Imaging of DNA Molecules on Graphene Surface、25th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy(ICSPM25)、2017 年 12 月 07-09 日、熱川ハイツ、伊豆熱川（静岡県）

⑰田中裕行、谷口正輝、グラフェンに吸着した DNA の SPM 観察、第 65 回応用物理学会春季学術講演会、2018 年 3 月 17 日(土)～20 日(火)、早稲田大学・西早稲田キャンパス（東京）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 裕行 (TANAKA, Hiroyuki)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20314429

(2) 研究分担者

なし