

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月15日現在

トンネル電流による1分子シーケンシング法

Single-Molecule Sequencing Methods
via Tunneling Current

課題番号：26220603

谷口 正輝 (TANIGUCHI MASATERU)

大阪大学・産業科学研究所・教授



研究の概要

本研究では、遺伝情報がDNA→RNA→たんぱく質の順で伝達されるセントラルドグマに関わる生体分子の1分子シーケンシング法と、その学理を確立する。特に、既存のDNAシーケンシング法では検出できないが、疾病マーカーや機能の発現制御に重要な修飾塩基分子と修飾アミノ酸を1分子レベルで識別する方法と学理を構築する。

研究分野：ナノ材料化学

キーワード：シーケンシング、ペプチド、1分子科学、トンネル電流

1. 研究開始当初の背景

ゲノムに基づく個別化医療を実現するためには、DNAの塩基配列解読はもちろんのこと、がん等の疾病マーカーとなるマイクロRNAの塩基配列解読と、ゲノムの設計図を基に作られるタンパク質のアミノ酸配列解読が必須となる。我々は、開発・発展させてきた1分子計測技術を用いて、1nmのナノギャップ電極を作製し、世界に先駆け、トンネル電流による1塩基分子識別を実現し、さらに、DNAと既存のDNAシーケンシング法では直接読取ることが出来ないマイクロRNAの塩基配列決定に成功した。この1分子シーケンシング法の開発により、ペプチドのアミノ酸配列決定と、これまで実現できなかったDNA修飾・RNA修飾・ペプチド修飾の1分子解像度マッピング法を開発する道が拓かれた。

2. 研究の目的

本研究では、ペプチドのアミノ酸配列を、トンネル電流により解読する1分子ペプチドシーケンシング法を開発するとともに、1分子シーケンシング法の学理を確立する。また、1分子シーケンシング法を、疾病マーカーや生体機能を制御するDNA修飾、RNA修飾、およびペプチド修飾における修飾塩基分子と修飾アミノ酸の1分子解像度マッピング法へと発展させる。本研究の達成により、遺伝情報がDNA→RNA→タンパク質の順で伝達されるセントラルドグマに関わる生体分子の1分子シーケンシング法を開発する。

3. 研究の方法

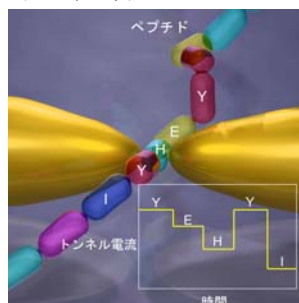
高い再現性と高い歩留まりでナノギャップ電極を作製する微細加工プロセスを確立し、低ノイズ・高速計測可能な計測システムの開発から研究を進めた。開発した計測システムを用いて、アミノ酸の1分子識別、ペプチドのアミノ酸配列決定、および修飾アミノ酸の検出を行い、RNAとDNAにおける修飾塩基分子の1分子解像度マッピングへと研究を展開している。1分子シーケンシング法の学理構築には、ナノ流路内を流れる1分子の流動ダイナミクスの学理構築とともに制御方法の開発がカギとなる。本研究では、流体力学、電磁気学、およびイオン輸送の連成方程式から構成されるマルチフィジックスシミュレーションと、量子化学に基づく1分子電流特性シミュレーションを援用しながら、外部電圧による電気泳動や電気浸透流を摂動に用いて1分子流動ダイナミクスを解明・制御する研究を進めている。成果の抜粋を以下に示す。

4. これまでの成果

・ペプチドのアミノ酸配列決定と修飾アミノ酸の1分子識別

トンネル電流により、20種類のアミノ酸のうち13種類の1分子識別に成功し、リン酸化チロシンの1分子識別にも成功した（文献5）。さらに、10個のアミノ酸構成されるペプチドとチロシンがリン酸化された修飾ペプチドの電流-時間波形をナノギャップ電極で計測した。得られた電流-時間波形を、ア

ミノ酸の1分子電気伝導度ヒストグラムを用いて解析したところ、アミノ酸の部分配列を決定することができ、修飾・非修飾ペプチドの識別に成功した。また、修飾・非修飾ペプチドの1:5混合溶液の電流-時間波形を計測し、チロシンとリン酸化チロシンのシグナル強度を比較することで、ペプチドの存在比1:4.3を得た。このように、1分子シーケンシング法が、アミノ酸配列とともにペプチドの混合比を決定できる定量解析可能な方法であることを発見できたのは、予想以上の進展であった。



・機械学習を用いた1分子シグナル解析法の開発

機械学習を用いた1塩基分子の電流-時間波形解析により、1分子シーケンシング法の最大の課題であった1分子電気伝導度ヒストグラムの重なりによる識別精度の低下を解決し、予想をはるかに超えた塩基分子の高い識別精度を達成した。

・1分子流動ダイナミクスの解明と制御法の開発

ナノ電極間を流れるトンネル電流をプローブとして1分子のスナップショットを連続的に取り、水溶液中の1分子の流動ダイナミクスを計測・評価するため、計測電流に含まれるイオン電流の最小化と電流計測の高速化を行った。ナノ電極をSiO₂で被覆し、電極対向面のみが溶液に接するナノ構造の開発により、従来のイオン電流値を10%以下に低減し、50 kHzの高速で7.6 pArmsの低ノイズを実現した(文献 2)。この低ノイズ・高速計測技術を用いて、ベンゼンジアミンの3つの異性体の1分子識別を水中で行ったところ、異なる3つの1分子電気伝導度得られ、化学の基本であるオルト、メタ、パラの異性体の1分子識別に成功した(文献 3)。この結果は、わずかな分子構造の違いを識別できることを示しており、1分子シーケンシング法はDNA・RNA・ペプチドのみならず、1分子識別法として広く用いられると期待される。また、実験で得られた1分子電気伝導度と電極間距離を量子化学計算で検討したところ、電極間電場と1分子の双極子モーメントの相互作用により、安定な電極-1分子-電極構造が形成され、その結果、各1分子でピーク電流が得られることが示唆された。

電気泳動と電気浸透流が存在する水溶液中では、ナノ流路の壁面電荷とイオン濃度が、流動ダイナミクスに支配的であるため、マルチフィジックスシミュレーションを用いて、流動ダイナミクスにおける壁面電荷とイオ

ン濃度の影響を詳細に調べた。壁面が負電荷である場合、カチオンが壁面に集積され、高イオン濃度では溶液の流速が極めて遅くなることが示唆された(文献 4)。さらに、ナノ流路の入口と出口を異なるイオン濃度の水溶液で満たすと、イオン濃度勾配が、1分子の流動速度を増加させ、ナノ電極間への1分子捕捉効率を増加させることが示唆された。

5. 今後の計画

低ノイズ・高速計測システムの早期開発と、機械学習による電流-時間波形解析法の予想をはるかに超えた進展により、当初計画したDNA・RNA上の修飾塩基分子の1分子解像度マッピングと、1分子流動ダイナミクスを核とする1分子シーケンシング法の学理構築は期間内に達成されると期待される。当初計画していなかったが、1分子流動ダイナミクスの実験的・理論的な研究結果を用いて、機械学習解析から得られる電流-時間波形の特徴量ベクトルの物理的・化学的解釈を行い、新たな現象・理解の発見に取り組む。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Decoding DNA, RNA and Peptides with Quantum Tunnelling, M. Di Ventra, M. Taniguchi, *Nat. Nanotechnol.*, 11, 117-126 (2016).
2. Fast and Low-Noise Tunnelling Current Measurements for Single-Molecule Detections in Electrolyte Solution Using Insulator-Protected Nanoelectrodes, T. Morikawa, K. Yokota, M. Tsutsui, M. Taniguchi, *Nanoscale*, in press, DOI: 10.1039/C6NR09278K.
3. Dipole Effects on the Formation of Molecular Junctions, S. Tanimoto, M. Tsutsui, K. Yokota, M. Taniguchi, *Nanoscale Horiz.* 1, 399-406 (2016).
4. Impact of Water-Depletion Layer on Transport in Hydrophobic Nanochannels, Y. He, M. Tsutsui, X. Shui, M. Taniguchi, *Anal. Chem.*, 87, 12040-12050 (2015).
5. Detection of Post-translational Modifications in Single Peptides Using Electron Tunnelling Currents, T. Ohshiro, M. Tsutsui, K. Yokota, M. Furuhashi, M. Taniguchi, T. Kawai, *Nat. Nanotechnol.*, 9, 835-840 (2014).

谷口正輝、日本化学会学術賞(2017)

谷口正輝、大学発ベンチャー表彰 2015 科学技術振興機構理事長賞(2015)

谷口正輝、文部科学省科学技術・学術政策研究所ナイスステップな研究者(2014)

ホームページ等

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