

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03841

研究課題名(和文) MEMSとDNA融合プロセスによる光電気複合型ナノポアセンサデバイスの基盤構築

研究課題名(英文) Establishment of fundamental technology for nanopore sensing device based on opto-electro detection principle by fusion process of MEMS and DNA

研究代表者

田畑 修 (TABATA, OSAMU)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：20288624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAナノ構造を利用し直径30nmの金ナノ粒子二量体を形成し、表面増強ラマン分光(SERS)による分子由来のシグナルの高感度検出に成功した。粒子径の最適化により、単一の二量体構造を用いて単一のDNAオリゴマーの検出と単一のアデニン塩基の検出・識別が可能であることを明らかにした。50%を超える収率で基板上の所望位置へのDNAナノ構造を固定化に成功した。Heイオンビームを用いてDNA塩基計測に最適な1.5-2nmのグラフェンナノポアを再現性良く形成し、作製したナノポアを用いてイオン電流によるDNAセンシングに成功した。以上より、光電気複合型ナノポアセンサデバイス実現に必要な基盤技術構築を完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAナノ構造による金ナノ粒子二量体間ギャップの精密制御および二量体の精密配置技術は、ナノポアセンシングデバイスに代表される機能的分子検出デバイス創成にDNAナノ構造が有用であることを示した。表面増強ラマン分光を用いてDNAオリゴマー内の単一塩基の検出・識別した例はなく、識別能力の高いラマン分光によるDNAセンシングの実現可能性を示すとともに、1分子計測による分析技術の発展に寄与する。

転写単層CVDグラフェン膜にHeイオンビームを用いて孔径が制御されたナノポアアレイの作製は、ナノポアセンシングだけでなく分子フィルタやイオン交換膜、電子フォノン相互作用の制御などの新たな応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Highly sensitive detection of single molecule was successfully demonstrated which is based on surface enhanced Raman scattering principle using gold nanoparticle (GNP) dimer. The dimer is fabricated by sacrificial DNA origami technology using 30 nm GNPs. The detection and identification of single DNA oligomer and single Adenine base was successfully achieved using single GNP dimer. Immobilization of a DNA origami nanostructure at a specific position of a substrate were successfully demonstrated. Using He ion beam technique, a Graphene nano pore with diameter of 1.5 to 2 nm, optimized size for DNA base detection, was fabricated with good reproducibility. It was demonstrated that the DNA sensing based on ion current measurement principle was succeeded using the fabricated Graphene nano pore. Through the project, fundamental technology for nano pore sensing device based on opto-electro detection principle was established.

研究分野：微細加工、DNAナノテクノロジー、マイクロナノシステム

キーワード：ナノポアセンシング MEMS DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA、タンパク質、ポリペプチド、多糖などを直径数 nm の孔 (ナノポア) に通過させ、1 分子レベルで検出・識別・解析するナノポアセンシングが注目されている (例: Nanopore analytics: sensing of single molecules, S. Howorka et. al., Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 2360-2384)。期待される応用分野の一つは第 4 世代のゲノムシーケンサである。ナノポアセンシングはナノポアの作製法と分子種の検出原理により分類することができる。ナノポアの作製はタンパク質を利用するものと微細加工した無機薄膜を利用するものに分類でき、検出原理はイオン電流を用いるものとトンネル電流を用いるものに分類できる。2012 年には Oxford Nanopore Technologies 社が 100 kb 長の DNA 分子の塩基配列を 20~400/秒/塩基の速度、誤差 1% (期待値) で読み取るタンパクナノポアを利用したゲノムシーケンサを発表した。同年、日本の Quantum Biosystems 社は無機薄膜に形成したナノポアとトンネル電流検出を組み合わせた方法 (図 1) で、塩基が識別可能であることを示している。

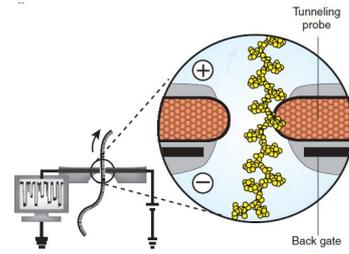


図1 トンネル電流を用いるナノポアセンシング

(D. Branton et. al., Nature

一方、ナノスケールで発現する量子効果や表面効果を積極的に利用するために、DNA を構造材料として用い、DNA のハイブリダイゼーションを利用した自己組織化 (ボトムアップ手法) によってナノスケールで構造制御したナノ構造を創製する DNA ナノテクノロジーは、多様なナノ機能材料のテーラーメイド創製法として期待されている。DNA で創製したナノ構造を足場として多様なナノ材料を nm 精度で 3 次元空間に配置した高次ナノ構造で、メタマテリアルなどの機能材料を創製する研究も加速している。この技術は、従来のトップダウン型微細加工技術の加工限界を、高価な最先端 EB に頼らずに超えることのできる手法として期待される。必然の流れとして、DNA ナノテクノロジーで作成したナノ機能コンポーネントをトップダウン手法で作製した MEMS、LSI に組込む (セルフアSEMBルする) ことで、機能を飛躍的に高めたナノマイクロシステムを実現するための基盤技術開発が期待されている。

2. 研究の目的

ナノ材料を nm 精度で空間配置できる高次 DNA ナノ構造を MEMS に集積化し、nm~ μ m スケール構造をシームレスに融合したナノマイクロシステム創製のための基盤技術構築を最終目的とし、本申請では提案基盤技術を応用して DNA シーケンシングを目的とした単一分子計測用ナノポアセンシングデバイスを作製し、提案技術の有用性を実証する。DNA 塩基認識法として、SERS を用いた光学的分子認識技術とトンネル電流による電気的分子認識技術を併用した新方式を提案する。SERS センシングおよびトンネル電流センシングの実現に必要なナノギャップの形成には、基盤技術の中核となる DNA ナノテクノロジーと MEMS 技術の融合プロセス技術を利用する。プロジェクト終了までに、提案方式によるナノポアシーケンシングを実現し、有用性を実証する。

3. 研究の方法

提案デバイス実現に向けて以下の要素技術を構築することを目指す。(1) DNA ナノ構造を利用した金ナノ粒子二量体形成方法、(2) DNA ナノ構造の基板固定技術、(3) 直径 5nm 程度のナノポアを形成した無機材料メンブレン作製技術、(4) 金ナノ粒子二量体を利用した DNA 塩基認識技術、(5) ナノポアへの DNA ナノ構造のセルフアSEMBル技術。

4. 研究成果

(1) 逆 T 型 DNA ナノ構造を設計・作製し、直径 30 nm の金ナノ粒子を結合させて金ナノ粒子-DNA ナノ構造複合体を形成した。基板上に吸着させた複合体に対し、真空紫外線照射および超純水リンスを施すことによって、DNA ナノ構造が完全除去可能であることを示した。基板上にランダムに配置した金ナノ粒子二量体を利用して、検体分子

(4,4'-bipyridine) を 10^{-3} mol/L または 10^{-6} mol/L の濃度で含む水溶液を用いて SERS による分子検出を実施した。その結果、濃度 10^{-6} mol/L の低濃度の場合にも検体分子に由来する主要なシグナルの検出に成功し、提案技術によって形成した金ナノ粒子二量体によるナノポアセンシング実現への可能性を示した(図2)

シリコン基板上に原子間力顕微鏡(AFM)を利用して形成した微小領域を一本鎖 DNA のコネクタで修飾し、それと相補的な塩基配列の一本鎖 DNA のコネクタを持つ DNA ナノ構造の特異的な固定化を試みた結果、56% の高い固定化率を達成し、パターン外への吸着量も 2.3 個/ μm^2 に抑えることに成功した。

(2) 金ナノ粒子二量体を利用した DNA 塩基認識技術

巨大な電磁場増強効果を発現する金ナノ粒子二量体を用いて、DNA オリゴマーの SERS 計測を行った。直径 100 nm の金ナノ粒子による二量体を、レーザースポット(直径約 $2\mu\text{m}$) の中に 1 つとなるようにシリコン基板上に配列した(図3)。基板上に形成したナノスケールの溝へ、界面張力により粒子をトラップする。計測対象として 8 鎖長 DNA オリゴマー (AGCTAGCT) を用いた。SERS 計測時間とインターバルを 1 秒とし 50 回計測を行った。取得したラマンスペクトルの時間変化を図 4 に示す。基板のシリコンピーク (Si) のほかにアデニン(A)およびグアニン(G)のラマンピークが得られた。単独の金ナノ粒子二量体を用いて DNA オリゴマーの検出および塩基識別が可能であることを示した。

次に電氣的な検出を行うために配列した金ナノ粒子二量体にナノスケールの金配線を作製し、ナノギャップを用いた DNA オリゴマー電気検出に成功した。

(3) ナノポア形成とイオン電流計測による DNA センシング

SERS 計測用金ナノ粒子を固定後に、二量体間のナノギャップにナノポアを形成する手法と

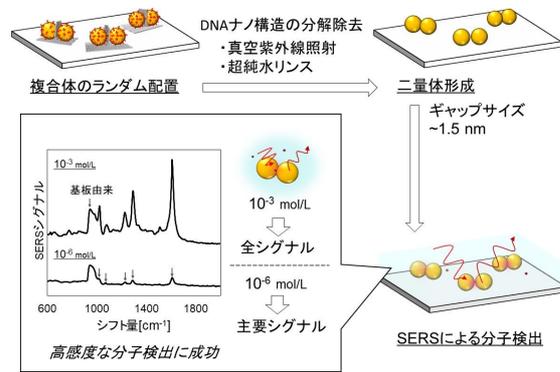


図2 DNA ナノ構造を利用して形成した金ナノ粒子二量体による SERS

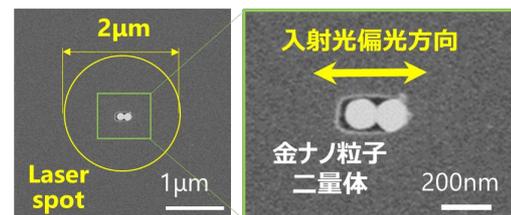


図3 作製した金ナノ粒子二量体の電子顕微鏡写真。粒子直径は約 100 nm。

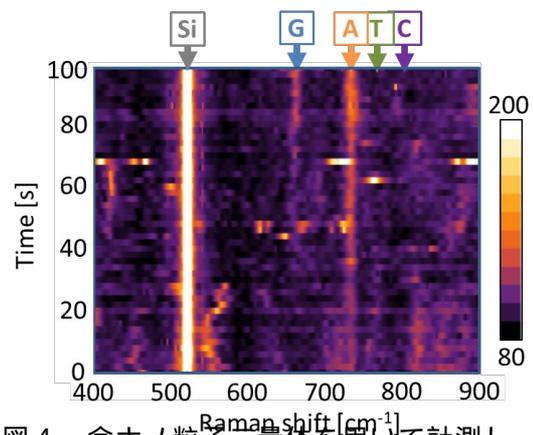


図4 金ナノ粒子二量体を用いて計測した 8 鎖長 DNA オリゴマー (AGCTAGCT) のラマンスペクトル時間変化

して、He イオン顕微鏡(HIM)を用いてナノポア加工を行った。設定位置に対し 10, 20, 40, 50, 100nm の異なるポアサイズを並列加工した HIM 観察結果を図 5 に示す。加工時間は 10nm ポアで 10 秒、100nm ポアで 1 分であった。ドーズ量やフォーカス量の最適化により 1.5~5nm のナノポア加工についても実証した。作製したナノポアが DNA センサとして使用できるかどうか調べるために、SiO₂ 膜に HIM で 13, 20nm のポアを作製したチップと、ポアが空いていないチップと合わせ 3 つのチップでそれぞれイオン電流の測定を行った。印加電圧を-150~150mV の範囲で変化させた際の電流値を計測したところ、各ポアサイズに対応した理論値と概ね一致した電流が計測された。DNA 溶液を用いてイオン電流を測定したところ、図 6 のように DNA の通過によると考えられる電流降下のピークを多数観測した。

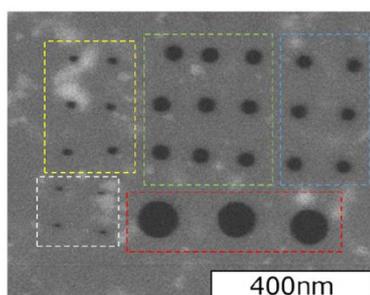


図 5 SiO₂ 膜上への並列ポア加工
(赤:φ100nm, 黄緑:φ50nm,
青:φ40nm, 黄:φ20nm, 白:φ10nm)

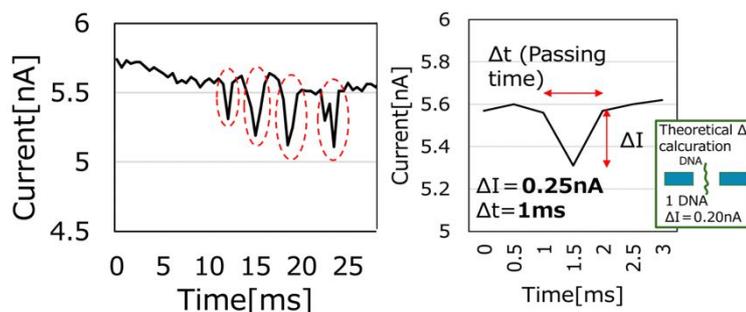


図 6 膜厚 20nm、ポア径 12nm の SiO₂ 基板を用いたイオン電流測定結果

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Koji Sugano, Kohei Ikegami, Yoshitada Isono, Characterization method of relative Raman enhancement for surface enhanced Raman spectroscopy using gold nanoparticle dimer array, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 56巻, 2017, 06GK03, DOI <https://doi.org/10.7567/JJAP.56.06GK03>

Koji Sugano, Kiyohito Aiba, Kohei Ikegami, Yoshitada Isono, Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of 4,4'-bipyridine on a prefabricated substrate with directionally arrayed gold nanoparticle dimers, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 56巻, 2017, 06GK01, DOI <https://doi.org/10.7567/JJAP.56.06GK01>

Toshimitsu Takeshita, Keisuke Suekuni, Kiyohito Aiba, Koji Sugano, Yoshitada Isono, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Analysis Device with Gold Nanoparticle Arranged Nanochannel, Electronics and Communications in Japan, 査読有, 100巻, 2017, pp.33-41, DOI doi.org/10.1002/ecj.11945

Zipeng Ma, Seongsu Park, Naoki Yamashita, Kentaro Kawai, Yoshikazu Hirai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, Constructing higher order DNA origami arrays using DNA junctions of antiparallel/parallel double crossovers, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 56巻, 2017, 06GL04, DOI [10.7567/JJAP.55.06GL04](https://doi.org/10.7567/JJAP.55.06GL04)

Zhipeng Ma, Seongsu Park, Naoki Yamashita, Yoshikazu Hirai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, Investigation of the self-assembly process for discrete and polymerized bivalve DNA origami structures, Transactions on Electrical and Electronic Engineering,

査読有、100巻、2017、pp.S164-170、DOI 10.1002/tee.22249

Zhipeng Ma, Kentaro Kawai, Yoshikazu Hirai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, Tuning porosity and radial mechanical properties of DNA origami nanotubes via crossover design、Japanese Journal of Applied Physics、査読有、56巻、2017、06GJ02、DOI <https://doi.org/10.7567/JJAP.56.06GJ02>

Yagyu Hiromasa, Lee Jae-Young, Kim Do-Nyun, Tabata Osamu, Coarse-Grained Molecular Dynamics Model of Double-Stranded DNA for DNA Nanostructure Design, The Journal of Physical Chemistry B、査読有、121巻、2017、pp.5033-5039、DOI 10.1021/acs.jpcc.7b03931
Naoki Yamashita, Zhipeng Ma, Seongsu Park, Kentaro Kawai, Yoshikazu Hirai, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, Formation of Gold Nanoparticle Dimers on Silicon by Sacrificial DNA Origami Technique, ACS Nano Letters, 査読有、12巻、2017、pp.854-859、DOI 10.1049/mnl.2017.0426

Zhipeng Ma, Yunfei Huang, Seongsu Park, Kentaro Kawai, Do-Nyun Kim, Yoshikazu Hirai, Toshiyuki Tsuchiya, Hirofumi Yamada, and Osamu Tabata, Rhombic-Shaped Nanostructures and Mechanical Properties of 2D DNA Origami Constructed with Different Crossover/Nick Designs, Small, 査読有、14巻、2018、1702028、DOI 10.1002/smll.201702028

Koji Sugano, Nanotemplate-guided self-assembly of gold nanoparticles and its application to plasmonic bio/chemical sensing, International Journal of Automation Technology, 査読有、12巻、2018、pp.79-86、DOI 10.20965/ijat.2018.p0079

Yuki Miyata, Yasunori Nakamukai, Cassia Tiemi Azevedo, Miho Morita, Junichi Uchikoshi, Kentaro Kawai, Kenta Arima, Mizuho Morita, Photoetching method that provides improved silicon-on-insulator layer thickness uniformity in a defined area, Microelectronic Engineering, 査読有、180巻、2017、pp.93-95、DOI 10.1016/j.mee.2017.06.008

稲垣達也, 朴晟洙, 山下直輝, 馬志鵬, 川合健太郎, 平井義和, 土屋智由, 田畑修、リンカーンによる三角形DNAオリガミ二量体形成における支配要因の解明、電気学会論文誌E(センサ・マイクロマシン部門誌)、査読有、138-E巻、2018、pp.171-177、DOI <https://doi.org/10.1541/ieejsmas.138.171>

T. Hayashi, K. Arima, N. Yamashita, S. Park, Z. Ma, O. Tabata, K. Kawai, Nanopore Fabrication of Two-Dimensional Materials on SiO₂ Membranes Using He Ion Microscopy, IEEE Transactions on Nanotechnology, 査読有、17巻、2018、pp.727-730、DOI 10.1109/TNANO.2018.2840721

山下直輝, 朴晟洙, 馬志鵬, 川合健太郎, 平井義和, 土屋智由, 田畑修、AFMリソグラフィで作製したナノ領域へのDNAオリガミの特異的固定、電気学会論文誌E、査読有、139-E巻、2019、pp.95-102、DOI <https://doi.org/10.1541/ieejsmas.139.95>

〔学会発表〕(計 40 件)

以下に代表発表 5 件を記載

山下直輝, 朴晟洙, 馬志鵬, 川合健太郎, 平井義和, 土屋智由, 田畑修、犠牲DNAオリガミ技術とナノギャップを有する金ナノ粒子二量体作製への応用、第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2017

丸岡克成, 菅野公二, 磯野吉正、単一金ナノ粒子二量体を用いた表面増強ラマン分光による

DNAオリゴマー1分子検出、第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、
2017

K. Hara, K. Arima, O. Tabata, K. Kawai, Rapid Folding of DNA Nanostructures in Takahiro
Tanaka, Syogo Kanetani, Kenta Arima, Kentaro Kawai, Nanopore Fabrication of
Two-Dimensional Materials on SiO₂ Membranes Using He Ion Microscopy, 12th Annual IEEE
International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2017

Katsunari Maruoka, Kohei Ikegami, Akio Uesugi, Koji Sugano, Yoshitada Isono,
Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA Bases Using Gold Nanoparticle Dimer Array,
31st International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2018), 2018

Kentaro Kawai, Takumi Hayashi, Kenta Arima, Kazuya Yamamura, Osamu Tabata, Nanopore
Fabrication and DNA sensing on Two-Dimensional Materials using Helium Ion Microscopy,
The 13th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular
Systems (IEEE-NEMS 2018), 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：菅野 公二

ローマ字氏名：SUGANO, koji

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院工学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20372568

研究分担者氏名：川合 健太郎

ローマ字氏名：KAWAI, kentarou

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院工学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：90514464

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。