

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14099

研究課題名(和文) ナノ分子メカニクスを用いたバイオハイブリッドグラフェンナノポアセンシング

研究課題名(英文) Hybrid nanopore sensing using molecular mechanics

研究代表者

川合 健太郎 (Kawai, Kentaro)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：90514464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ハイブリッドナノポアによるナノポアセンシングに向け、「ヘリウムイオン顕微鏡を用いたイオンビーム加工による再現性の高いナノポア加工」、「ハイブリッドナノポア形成のためのDNA自己組織化ナノ構造体作製」、「自己組織化DNAナノ構造体形成の高効率化」、「ナノポア形成基板へのグラフェン膜直接CVD技術」、「DNA伸長用ナノピラーアレイの集積化」、「グラフェンナノポアによるDNAセンシング」について計画に基づいて研究を進め、機能性付与のための3次元DNAナノ構造体を設計・作製し、グラフェン膜上に形成したナノポアを用いてイオン電流によるDNAセンシングを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノポアシーケンサは今後普及していくゲノム医療や個別化医療にとって、長鎖DNAを断片化することなく読み取れる、RNAを直接読み取れる、など優れたDNA読み取り技術である。実用化されているタンパクナノポアシーケンサでは複数のDNA塩基からの時系列信号を確率処理で推定する一方、原子1個分の厚さの二次元単結晶膜ナノポアを用いることにより数値計算上では高精度な塩基識別が可能であると示されている。これを実現する方法として提案する自己組織化ナノ構造形成とトップダウンであるヘリウムイオンビーム加工を融合したハイブリッドナノポアの作製は従来の微細加工を超えた集積ナノシステムの構築法として創造性が高い。

研究成果の概要(英文)：For nanopore sensing by a hybrid nanopore, research proceeded: "Highly reproducible nanopore processing using a helium ion microscope", "Fabrication of self-assembled DNA nanostructures for hybrid nanopore formation", "High efficiency of DNA self-assembled nanostructures", "Direct CVD Graphene formation on through-hole structure", "Integration of nanopillar arrays for DNA Extension", and "DNA sensing with graphene nanopores". 3-dimensional DNA nanostructures for functionalization were designed and fabricated, and DNA sensing by ion current was confirmed using nanopores formed on a graphene membrane.

研究分野：ナノ・マイクロシステム

キーワード：ナノポアセンシング グラフェン ナノ加工 自己組織化

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

### 1. 研究開始当初の背景

DNA を直径数ナノメートルの孔 (ナノポア) に通過させ、1 分子で塩基配列の読み取りを行うナノポアシークエンシングが注目されている。これは DNA が電気泳動でナノポアを通過する際のイオン電流変化を計測し、各塩基に対応するイオン電流から配列を決定するシークエンシング法である (図 2)。断片化後に PCR 等の DNA 増幅が必要な従来法とは異なり、DNA 1 分子を直接読み取るため、長鎖 DNA を正確にシークエンシングできる。

現在のナノポアシークエンサは「ナノポアの塩基分解能」と「DNA 塩基の検出速度」に課題がある。主流として用いられているタンパク質のナノポアでは分子認識部は 4 塩基分に相当する 2nm 程度の長さを持つため、現在は 256 種類 (4<sup>4</sup>) のイオン電流レベルを、隠れマルコフモデルと呼ばれる確率モデルで推定しているのが現状である。

二次元単結晶薄膜は 1 原子層厚さでも自立膜として安定なため 4 種類のイオン電流レベルで 1 塩基分解能が得られることが期待できる (タンパクナノポアでは最小で 2nm : 4~5 塩基分解能)。二次元単結晶膜としてよく知られるグラフェンによるナノポアは、相互作用により DNA 分子が膜に付着しやすいため通過速度のばらつきが大きいという欠点がある (Schneider, G.F. et al., Nano let. 10, 3163-3167, 2010)。これを防ぐためには膜厚が増える表面処理が必要である。DNA 分子の付着が生じない二硫化モリブデンは分子構造として単層グラフェン膜の 0.34nm より厚い 0.65nm を持つが、数値計算から 1~2 塩基分解能が可能と報告されている (Farimani, A. B. et al., PNAS, 201608271, 2016)。

イオン電流計測以外で提案された電気計測手法としては 2012 年に日本の Quantum Biosystems 社などは電極が埋め込まれた無機薄膜にナノポアを形成し高速検出が可能となるトンネル電流検出を行う方法を発表したが、実用化には至っていない。

### 2. 研究の目的

ハイブリッドナノポアによるナノポアセンシングに向けた基盤技術の構築と実証のため、「ヘリウムイオン顕微鏡を用いたイオンビーム加工による再現性の高いナノポア加工」、「ハイブリッドナノポア形成のための DNA 自己組織化ナノ構造体作製」、「ハイブリッドナノポア形成のための DNA 自己組織化ナノ構造体の高効率化」、「ナノポア形成基板へのグラフェン膜直接 CVD 技術」、「DNA 伸長用ナノピラーアレイの集積化」、「グラフェンナノポアによる DNA センシング」について研究を行う。

### 3. 研究の方法

二次元結晶膜ナノポア形成プロセスを図 1 に示す。二次元結晶膜を保持する支持基板として、両面に膜厚 200nm の酸化膜を形成した 200 $\mu$ m 厚の Si ウエハを用いた。片面の酸化膜をパターニングし、25%TMAH によるウェットエッチングによって SiO<sub>2</sub> 自立膜を作製した。SiO<sub>2</sub> 自立膜上に Ga イオンを用いた FIB (Focused ion beam) で数  $\mu$ m のポアを形成した。その後、別基板に CVD で作製されたグラフェンと BN は間接転写法により、MoS<sub>2</sub> は結晶からテープ剥離法により、支持基板へ転写を行い、FIB で形成した二次元結晶自立膜保持用の SiO<sub>2</sub> ポアを最小で 100nm のポアを形成した上に二次元結晶膜の転写し、自立膜を形成した。

HIM 加工におけるサイズ制御性や再現性を確かめるために、最初に SiO<sub>2</sub> 自立膜上でフォーカス依存性を調べた。ステージの高さを変化させ、焦点位置から 5 $\mu$ m 以内で再現性のある加工が可能であることが分かった。また、フォーカスとビーム照射量を変化させたときの再現性を調べた。焦点位置からのズレが 5 $\mu$ m 程度でもビーム照射量の増減により形状・サイズが変化することが確認できた。このことからヘリウムイオンビーム加工では精密なポア加工のためにフォーカス合わせが重要である。自立膜表面へ Au ナノ粒子を散布し、フォーカス合わせを行った。ビーム照射量が増加するにつれ、ポアのサイズも大きくなることが分かる。ナノポア形成が確認された最小ビーム照射量の 8 $\times 10^6$  [ions/nm<sup>2</sup>] において再度グラフェン自立膜のナノポア加工を行い、TEM 観察を行った (図 2)。最小 1.5nm のナノポアの形成を達成した。

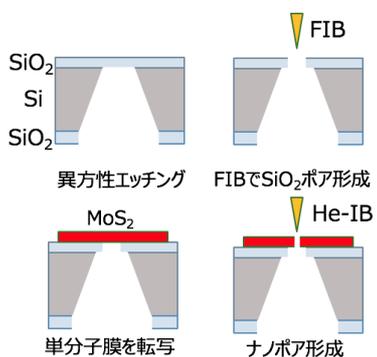


図 1 ナノポア形成プロセス

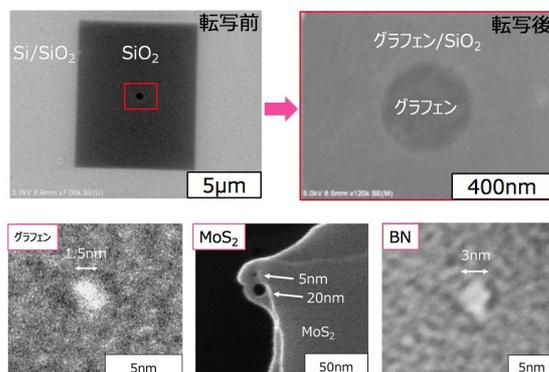


図 2 シリコン基板へのグラフェン膜転写と二次元結晶膜への高精度ナノポア加工

#### 4 . 研究成果

研究目的で記した について、ヘリウムイオンビームにおけるフォーカスとドーズ量による加工精度を調査し、DNA の塩基計測に最適な 1.5-2nm のグラフェンナノポアを再現性よく形成できることを見出した。 について、ナノパターン形成のための3次元構造のDNAナノ構造体を設計・作製し、TEM で確認を行った。 について、マイクロ流路を用いて作製時間の短縮と歩留まりの改善を行った。また、スピノン法によってナノポア形成基板の上にナノパターン形成のための3次元構造のDNAナノ構造体を吸着させ、金属膜パターンの形成を試みた。

について、通常は銅などの金属触媒基板上へCVD成膜したグラフェンを間接転写法によりシリコン基板等へ転写後にナノポアを形成していたプロセスを、シリコン酸化膜上でガリウムを液状触媒として直接グラフェンをCVD成膜する手法を開発した。これにより、間接転写法の際に問題となっていた転写時の支持材料によるグラフェン膜の汚染と膜厚増加を考慮する必要がなくなり、プロセス工程も短縮化できた。 について、DNA通過速度を制御するためのDNAナノ構造体としてDNA伸長用ナノピラーアレイを集積化し、基板垂直面に対しヘリウムイオンビームによってナノポア形成を行ったデバイスを作製した。 について、グラフェン膜上に形成したナノポアを用いてイオン電流によるDNAセンシングを確認した。

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計2件)

T. Hayashi, K. Arima, N. Yamashita, S. Park, Z. Ma, O. Tabata, K. Kawai  
Nanopore Fabrication of Two-Dimensional Materials on SiO<sub>2</sub> Membranes Using He Ion Microscopy  
IEEE Transactions on Nanotechnology, Vol. 17, No. 4, pp. 727-730 (2018). 査読有

Z. Ma, Y. Huang, S. Park, K. Kawai, D-N. Kim, Y. Hirai, T. Tsuchiya, H. Yamada, O. Tabata  
Rhombic-Shaped Nanostructures and Mechanical Properties of 2D DNA Origami Constructed with Different Crossover/Nick Designs  
Small, Vol.14, 1702028 (2018) (pp.1-7) 査読有

##### 〔学会発表〕(計11件)

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) 査読有

K. Hara, T. Inagaki, N. Yamashita, K. Arima, K. Yamamura, O. Tabata, K. Kawai  
Effect of Temperature Distribution in Microtube and Microfluidic Channel for DNA Origami Assembly  
The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018) 査読有

中村亮太、原 啓太、有馬 健太、山村 和也、田畑 修、川合健太郎  
三次元 DNA オリガミ構造作製におけるアニール条件及びDNA濃度比の影響  
第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム(10.30@札幌市民交流プラザ)  
(2018) 31pm2-PS-164

T. Tanaka, S. Kanetani, K. Arima, K. Kawai  
Nanopore sensing device integrating nanopillar array for dna translocation control  
The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), p. 362-363 査読有

K. Hara, K. Arima, O. Tabata, K. Kawai  
Rapid folding of dna nanostructures in microfluidic channel  
The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), p. 387-389 査読有

田中貴大, 金谷省吾, 有馬健太, 川合健太郎  
ナノピラー/横型ナノポア集積化DNAセンシングデバイスの開発  
2017年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集(9.20@大阪大学-豊中キャンパス)(2017)  
661-662

##### 〔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〕

<http://www-nms.prec.eng.osaka-u.ac.jp/>

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。