

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14091

研究課題名（和文）MCBJ法を用いた単分子接合の構造変化の定量評価法の構築

研究課題名（英文）Development of quantitative analysis for structure change of single-molecule junction

研究代表者

小本 祐貴 (Komoto, Yuki)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：90814210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：金属ナノギャップ間を通過する単分子のトンネル電流を計測する単分子計測は、極微量の生体分子の計測手法や分子デバイスの作製の発展への期待のもと、研究が盛んになされている。しかし、これまでの単分子計測では平均的な伝導度を解析するのみで、その変化が十分に解析されていなかった。そこで本研究では単分子計測における電流の時間変化に着目して、単分子計測を用いて単分子を識別する技術確立した。単分子計測を用いて取得した単分子パルス電流シグナルを機械学習を用いて、平均的な伝導度だけでなく、その変化まで解析することにより、神経伝達物質、DNA修飾塩基、DNA塩基長を識別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

これまで、神経伝達物質やDNA修飾塩基は、生物学的な側面から重要性が認識されていたものの簡便に計測する手法がなく、詳細な理解や医療応用などの幅広い応用ができなかった。本研究により、単分子レベルでこれらの分子を検出することが可能になり、様々な研究に発展していくことが期待される。また、単分子計測研究の観点からは、これまで解析できていなかった、電流変化という動的な情報を解析することにより、単分子が識別可能である、すなわち、分子固有の構造変化の情報があると示した。これにより、単分子計測を複数種の分子が含まれる溶液中での計測を可能にすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Single-molecule measurements, which measure the tunneling current of a single molecule passing through a metal nanogap, have been researched for the development of measurement methods for biomolecules and the fabrication of molecular devices. However, conventional single-molecule measurement method only analyzed the average conductance and not the change in conductance. In this study, we focused on the time variation of the current in single-molecule measurements and established a technique to identify single molecules using mechanically controllable break junction measurements. By using machine learning to analyze not only the average conductance but also the changes in the pulse current signals obtained by single-molecule measurement, we succeeded in identifying neurotransmitters, DNA modified bases, and DNA base lengths.

研究分野：単分子計測

キーワード：単分子計測 MCBJ法 機械学習

1. 研究開始当初の背景

単分子接合は 2 つの金属電極間に単一の分子が架橋した系である。単分子接合は単一分子を素子とする分子デバイスの実現のために盛んに研究がなされてきた。これまでにダイオードや、トランジスタ、スイッチといった機能を有した分子接合が報告されている。単分子接合の作製法には Break Junction (BJ) 法が最もよく用いられる。BJ 法では金属電極接触後に電極を引き離し接合を破断させ、形成したナノギャップ間に単一の分子が架橋した場合に単分子接合が形成する。近年では、分子素子の開発に留まらず、単分子接合は分子が二つの金属表面に接する特異な構造に起因する新規物性の発現や、単分子スケールでの化学反応の追跡といった基礎的側面や、高感度、極微量の新規検出技術の応用面からも注目を集めている。これまでに単分子接合の架橋構造など決定できるようになってきたが、単分子接合形成のダイナミクスと単分子接合の接合構造がどのように変化するかということは未だ十分な注目がなされていない。従来の研究は、単分子接合の伝導度トレースから伝導度ヒストグラムを作成し、伝導度を決定してきた。統計平均を用いる測定、解析方法により、単分子接合の破断過程における顕著な状態の単分子接合の幾何構造や電子状態を決定することは可能になってきた。しかし、ある構造から別の構造に移り変わる様子や頻度、統計平均に埋もれてしまう微細な構造の情報についてはヒストグラムを作成する際に情報を失う。したがって、BJ 法における単分子接合形成において分子の動的な情報がほとんどない。しかし、単分子接合における反応や DNA シーケンサーといった接合構造の変化を伴う研究が注目を集め、単分子接合の伝導度の時間変化から分子接合の構造変化を知る要求が高まっている。

2. 研究の目的

単分子計測では、単分子接合の形成・破断過程において、ある伝導度の接合状態でなく、接合構造の変化自体を定量的な評価、単分子接合のダイナミクスが重要視されてきた。これまでの解析手法では喪失してしまった伝導度の時間変化を解析し、電流の時間変化から接合構造の変化を定量的に評価する方法を構築し、接合構造の変化のダイナミクスを理解することが単分子接合における重要な課題である。本研究では、単分子伝導度の時間変化を計測及び解析し、単分子の動的な構造変化の情報を検出し、分子固有の動的な情報を比較することを目的にした。計測する分子は、検出技術が求められている生体分子を対象にし、その電流変化の情報を解析し、検出、識別する技術を開発した。

3. 研究の方法

本研究では、機械学習を用いて、単分子の伝導度だけでなく、単分子接合の構造変化に伴う単分子伝導度の時間変化を解析し、単分子の識別を行う手法を開発した。識別する分子の対象として、神経伝達物質、DNA 修飾塩基、DNA 塩基長、セカンドメッセンジャーを計測した。本手法では、図 1 に示すように導入した単分子電流計測システムを用いて BJ 法の一種である Mechanically Controllable Break Junction (MCBJ) 法を行って、単分子電流シグナルを取得した。MCBJ 法は弾性基板の上に微細加工技術により描画された金属細線を、弾性擬番を湾曲させることにより破断させ、分子スケールのナノギャップを形成する手法である。

得られた電流変化から、単分子由来のパルス電流シグナルを抽出し、各電流シグナルを特徴量へと変換する。ここで、今まで用いられてきた電流値の平均や、最大電流値のみでなく、シグナルを時間方向に分割し、その各領域の平均を特徴量として用いることにより、これまで平均化した際に埋もれてしまった電流変化に関する情報を解析した。(図 2) 分子種がわかっているシグナルの分子名とともに、特徴量に変換したパルスシグナルを、機械学習の分類器に学習させ、識別するパルスのテストデータを識別する手法を開発した。また、本研究では、Positive and unlabeled data classification (PUC) と呼ばれる機械学習手法を用いて、同様にシグナルを解析することにより、夾雑物中のノイズを取り除き、目的分子の識別を行った。

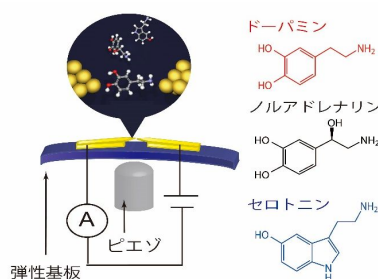


図 1 本実験の概念図

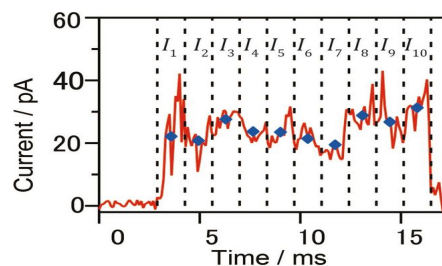


図 2 解析に用いた特徴量の例

4. 研究成果

神経伝達物質の識別では、主要な神経伝達物質である、ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンの識別を行った。これらの分子はいずれもモノアミン神経伝達物質であり、分子構造が似通っているため、単分子での識別が難しい。MCBJ法を用いて単分子シグナルを取得し、その後識別を行った。これらの分子は従来手法である伝導度ヒストグラムからは識別不能であった。(図3)

ヒストグラムから識別できない3種の神経伝達物質を、機械学習を用いて識別したところ図4に示すように、F値0.52で識別することに成功した。F値は識別精度の指標1に近いほどよい識別結果であることを示す。3種の識別でランダムであればF値は0.33となるので、識別に成功したことを表す。この識別精度は1分子当たりの識別精度であり、40シグナルで90%、110シグナルで99%の精度で識別することが可能である。識別に成功した原因を探るために、電流変化の特徴量を詳細に解析すると、共役面、分子の配座異性体が多いほど、電流変化が大きいことを見出した。これにより、分子構造が単分子伝導度変化に影響を与えていると示した。

さらに、この識別手法を用いて混合物の識別を行った。これまでは、識別精度が低かったために、単分子計測では混合物中の測定において、計測された単分子シグナルがどの分子に由来するか決定することはできなかった。開発した機械学習識別手法を用いると、3種の混在比の異なる混合物を識別することに成功した。(図5)これは、単分子計測を生体分子の定量や異種分子の発見へ応用するための重要な成果である。

さらに、夾雑物由来のシグナルを取得し、その伝導度変化を計測し、同様に解析し、PUCを用いてノイズ除去を行うことにより、本研究では、生体試料中の神経伝達物質を定量した。神経伝達物質由来のシグナルを学習させた機械学習分類器により、生体試料シグナル中から目的の神経伝達物質由来のシグナルを抽出し、先に述べた識別手法を適用することにより、生体試料中の神経伝達物質の濃度比を決定した。決定した濃度比は既存手法と定性的な一致を見せ、本手法が、生体試料中での神経伝達物質の時間発展を計測することが可能である基礎原理を示した。本手法は、単分子計測を世界で初めて生体試料に適用した例であり、今後の様々な生体試料中の分子の検出技術の基礎となる成果である。

同様の手法をDNA修飾塩基、DNA塩基長、二次伝達物質に対して用い、単分子レベルでの識別に成功した。DNA修飾塩基は、アルコール代謝物のアルデヒド負荷により生じるDNA損傷であり、癌マーカーとして期待されている、N2-エチル-2'-デオキシグアノシンとデオキシグアノシンの識別を識別精度0.77で行った。DNA塩基長は同一の塩基が連続したDNAの塩基長を見分け、細胞の代謝に関与する二次伝達物質はサイクリックAMPとAMPを識別することに成功した。

以上、本研究はこれまで解析されなかった単分子伝導度の構造変化に起因する電流変化を解析し、単分子レベルで識別を行う手法を開発した。

本研究は、単分子計測の生体分子の検出などの応用を推し進める重要な成果である。また、単分子計測の学術的な観点からも、これまで解析されていなかった伝導度変化の解析を可能にし、伝導度変化に分子固有の情報があると示した点で意義深い。

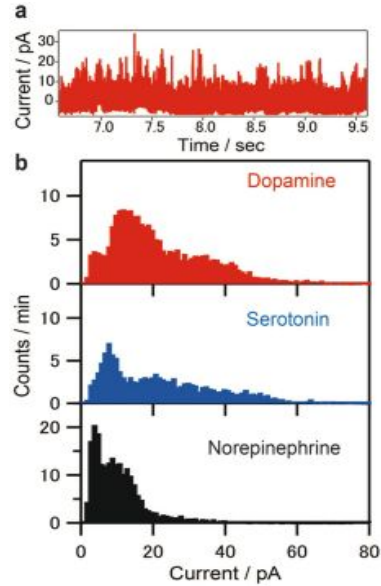


図3 a ドーパミンの単分子計測結果
b 伝導度ヒストグラム

	DA	NE	5-HT
DA	0.56 ±0.06	0.25 ±0.05	0.19 ±0.02
NE	0.27 ±0.03	0.55 ±0.05	0.18 ±0.03
5-HT	0.22 ±0.03	0.33 ±0.04	0.45 ±0.04
	DA	NE	5-HT

Predicted Class

図4 神経伝達物質の単分子シグナルの識別結果を示す混同行列

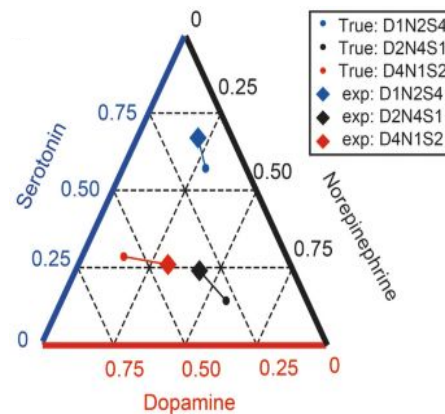


図5 神経伝達物質の混合物の識別結果

図は Komoto, Yuki, et al. "Time-resolved neurotransmitter detection in mouse brain tissue using an artificial intelligence-nanogap." Scientific reports 10.1 (2020): 1-7. Creative commons 4.0 - BY より引用した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Komoto Yuki, Ohshiro Takahito, Yoshida Takeshi, Tarusawa Etsuko, Yagi Takeshi, Washio Takashi, Taniguchi Masateru	4. 巻 10
2. 論文標題 Time-resolved neurotransmitter detection in mouse brain tissue using an artificial intelligence-nanogap	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68236-3	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 Furuhata Takafumi, Komoto Yuki, Ohshiro Takahito, Taniguchi Masateru, Ueki Ryosuke, Sando Shinsuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Key aurophilic motif for robust quantum-tunneling-based characterization of a nucleoside analogue marker	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 10135 ~ 10142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0SC03946B	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 Komoto Yuki, Ohshiro Takahito, Taniguchi Masateru	4. 巻 56
2. 論文標題 Detection of an alcohol-associated cancer marker by single-molecule quantum sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 14299 ~ 14302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CC05914E	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 Komoto Yuki, Ohshiro Takahito, Taniguchi Masateru	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of Single-Molecule Electrical Identification Method for Cyclic Adenosine Monophosphate Signaling Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 784 ~ 784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano11030784	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 Ohshiro Takahito, Komoto Yuki, Taniguchi Masateru	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-Molecule Counting of Nucleotide by Electrophoresis with Nanochannel-Integrated Nano-Gap Devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 982 ~ 982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11110982	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 Liu Bo, Murayama Sanae, Komoto Yuki, Tsutsui Makusu, Taniguchi Masateru	4. 巻 11
2. 論文標題 Dissecting Time-Evolved Conductance Behavior of Single Molecule Junctions by Nonparametric Machine Learning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 6567 ~ 6572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c01948	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 KOMOTO Yuki, OHSHIRO Takahito, TANIGUCHI Masateru	4. 巻 37
2. 論文標題 Length Discrimination of Homo-oligomeric Nucleic Acids with Single-molecule Measurement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 513 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCP13	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小本祐貴
2. 発表標題 機械学習を用いた解析による単分子神経伝達物質検出
3. 学会等名 第4回計測インフォマティクス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小本祐貴, 大城 敬人, 吉田 剛, 足澤 悦子, 八木 健, 鷲尾 隆, 谷口 正輝
2. 発表標題 単分子計測によるマウス脳内神経伝達物質検出
3. 学会等名 応用物理学会第67回春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小本祐貴, 大城 敬人, 谷口 正輝
2. 発表標題 単分子計測によるアルデヒド化修飾塩基の検出
3. 学会等名 応用物理学会第80回秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Komoto, Takahito Ohshiro, Takayuki Takaai, Takeshi Yoshida, Takashi Washio, Masateru Taniguchi
2. 発表標題 Single-molecule Discrimination of monoamine neurotransmitters with MCBJ method
3. 学会等名 10th International Conference on Molecular Electronics & BioElectronics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小本 祐貴
2. 発表標題 MCBJ法を用いた神経伝達物質の単分子識別
3. 学会等名 応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Komoto, Takahito Ohshiro, Takayuki Takaai, Takeshi Yoshida, Takashi Washio, Masateru Taniguchi
2. 発表標題 Single-molecule discrimination of neurotransmitters with machine learning
3. 学会等名 1st AIRC Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Komoto
2. 発表標題 Single biomolecule detection and discrimination with nanogap measurements
3. 学会等名 The 23rd SANKEN International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Komoto, Takahito Ohshiro, Takayuki Takaai, Takeshi Yoshida, Takashi Washio, Masateru Taniguchi
2. 発表標題 Single-molecule recognition of monoamine neurotransmitters with machine learning
3. 学会等名 日本化学会第99回春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小本祐貴, 大城敬人, 鷹台孝之, 吉田剛, 鷺尾隆, 谷口正輝
2. 発表標題 機械学習を用いた神経伝達物質の一分子識別
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小本祐貴, 大城敬人, 鷹合孝之, 吉田剛, 鷲尾隆, 谷口正輝
2. 発表標題 MCBJ法を用いた神経伝達物質の機械学習識別
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小本祐貴, 大城敬人, 谷口正輝
2. 発表標題 MCBJ法を用いたDNAシーケンシングによる連続塩基数識別法の開発
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