

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月15日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22750078
 研究課題名（和文）STM単分子可視化法を用いたDNA二重鎖を介した電荷移動度測定法の開発
 研究課題名（英文）Single-Molecules Tunnel-Current Imaging for DNA duplex by using STM.

研究代表者
 大城 敬人（OHSHIRO TAKAHITO）
 大阪大学・産業科学研究所・特任助教（常勤）
 研究者番号：10462665

研究成果の概要（和文）：確立したトンネル電流を指標としたDNA鎖の単分子可視化法により、パーフェクトマッチやSNPをもつ二重鎖の電気伝導度および、一本鎖中のDNA/RNAモノマーおよび後天的修飾核酸モノマーの電気伝導度を単分子レベルで決定し、これにより核酸塩基鎖の配列決定に成功した。これに加え、長く読むための分子制御技術検証や正確に読むための光による単分子認識技術検証、DNA分子デバイス作成のためのナノ構造体作製技術検証に成功した。

研究成果の概要（英文）：I developed methods on single-molecule tunnel-current identification with STM and nanogap-electrode. By using these methods, the electron-conductance values were determined for perfect-matched and miss-matched DNA duplexes, and single DNA/RNA nucleotides, and post-transcriptional modified-nucleotides. Based on these relative conductance values, the sequence of oligonucleotides was successfully determined. In addition, methodologies, for a molecule-control by using nanopore, molecule-recognition by using photonic waveguide, and a construction of DNA-based nanostructures, were also developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究代表者の専門分野：化学，分析化学，表面科学，ナノサイエンス

科研費の分科・細目：複合科学，分析化学

キーワード：表面分析，DNA，走査型トンネル顕微鏡，電気計測

1. 研究開始当初の背景

1990年代にBartonらによって、DNA二重鎖を介した電荷移動度は金属に匹敵するという報告がされ、DNA鎖の微細回路の配線等の電子材料としての興味が高まった。またDNA鎖内の電荷移動現象は、UVや酸素

ラジカル等によるDNA二重鎖の遺伝子損傷・修復等の生理学的現象と関連しており、この現象の理解は重要なテーマある。Bartonらの報告後、DNA鎖を介した電荷移動度について、様々な測定法により検証が行われてきた。しかし、これまでの計測法は、

測定系の再現性の低さや測定法ごとに結果が異なるため、定量データの比較検証は困難であった。試料単分子の電気伝導性を再現よく測定する方法として、STM や微小ギャップ電極 による単分子ごとに直接観察する方法がある。しかし、これまでに STM による DNA 鎖単分子レベルの直接測定で成功した例はない。それは、DNA 二重鎖を STM 測定した場合、DNA 鎖同士が凝集し、単分子観察ができなかったためである。

2. 研究の目的

(1) 申請者が開発した電気化学 STM によって金属基板上に固定化した DNA 二重鎖の単分子可視化法により、DNA 二重鎖を介した電子移動度の直接測定をし、単分子レベルで定量評価を行い、DNA 鎖を介した電荷移動機構の理解などの基礎的な知見を得る。

(2) トンネル電流による単分子可視化法によって得られる、DNA 配列中の塩基や塩基対の種類、塩基対ミスマッチの種類・数・位置依存的な電子移動度の違いを基に、DNA 自己組織化電子回路の作製や配列情報読み取りなどの様々な応用展開を目指す。

3. 研究の方法

(1) 走査型トンネル顕微鏡による単分子測定系構築

DNA 鎖を介した電子移動が定量評価するためには、単分子レベルの DNA 鎖のトンネル電流計測系の構築が必要不可欠である。観察溶液条件を最適化することで、DNA 二重鎖の凝集現象を制御し、DNA 二重鎖の単分子観察を実現した (図)。

この単分子可視化法を用いることで、ミス

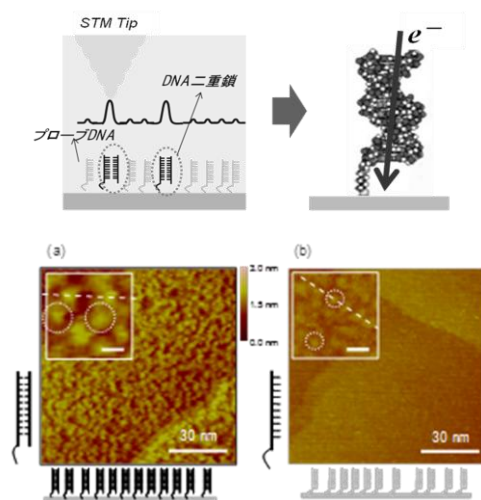


図1: STM による DNA 鎖単分子可視化法を用いた塩基鎖長の DNA 二重鎖の電子移動度測定法
ツチ塩基対を含む二重鎖を単分子レベルで

観察し、各々の分子の見かけ上の高さ情報から、各電気伝導性違いを計測した。

(2) 微小隙間電極による単分子計測系構築
微小隙間電極による単分子電気計測系の構築を行った。まず、銅基板表面に絶縁層とな

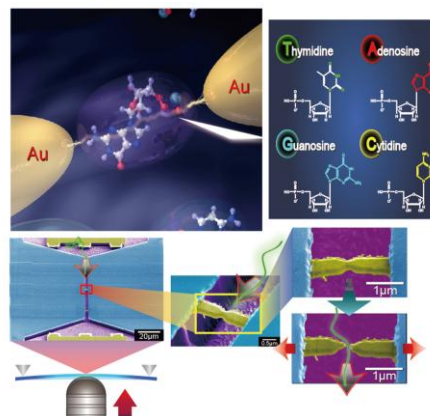


図2: 微小隙間電極による単分子計測系の構築とそれをもちいた核酸塩基分子の電気計測。

るポリイミド膜をスピコートし、その上に電子線描画法を用いて、金ナノ接合を形成する。その後、ポリイミドのエッチングを行い、free-standing な金ナノ接合を作製する。この金ナノ接合を自己破断後、ピエゾ素子をもちいて電極間距離をトンネル電流測定可能な距離 (サブナノメートルスケール) に固定し、電気計測を行った (図2)。

試料分子をリン酸緩衝溶液中溶解させ、室温・大気圧下で計測を行い、各核酸塩基分子の電気伝導度を計測する。溶液中の核酸塩基鎖や核酸塩基モノマーは、微小ギャップ電極間を通る時、分子を介したトンネル電流が流れるため、分子由来の電気シグナルが計測される。この分子シグナルをもとに、核酸塩基モノマーの固有コンダクタンスを決定し、通過した核酸塩基分子種の識別を行った。

(3) 微小電極付ポア構造体による単分子計測系の構築

近年、単一バイオ分子の新たな検出方法として生体ナノポアを用いた研究が注目されている。この生体ナノポアとは、膜貫通タンパク質が脂質二重層中で自己会合することで形成される直径数ナノメートルのポアのことである。ここに、生体ナノポアよりも堅牢で検出分子に対応した自由な設計が可能なソリッドステートナノポアにし、さらにポア部分に分子をセンシングするために両側に微小ギャップ電極を埋め込んだゲーティングナノポアデバイスを用いた計測系構築を目指す。このゲーティングナノポアを用いた電気計測を行うことで、ナノポアを通過する分子を

高速・高感度に検出・識別および電気泳動による分子制御が可能となることが期待される(図3)。

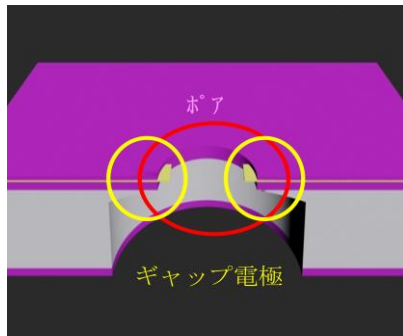


図3: ゲーティングナノポアによる DNA 鎖の分子制御および分子認識の模式図。

(4) DNA を用いたナノ構造体作製手法構築 DNA を用いた電子デバイス開発に先立ち, ナノ構造体作製技術の構築を行った. DNA を用いたナノ構造体の一例として, 物質の可視光領域で磁性を持つ光機能性材料(プラズモンック・メタマテリアル)を, DNA の自己組織化能を用いたボトムアップ的手法により作製することを目的とした. 金属リングに切れ目の入ったナノ構造は, 電磁気学に基づく計算

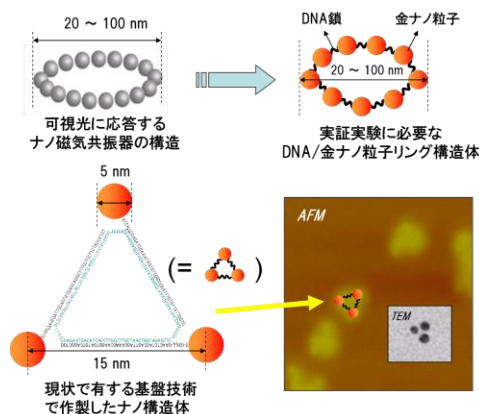


図4: S DNA と金属ナノ粒子から, DNA 同士のハイブリダイゼーションによりナノ磁気共振器となるナノ構造体を作製。

により“ナノ磁気共振器”として働き人工的な磁性を有すると予想される. この構造体は, 金属ナノ粒子を DNA によってリング状に連結することで作製した(図4). 作製する金属ナノ粒子のリング構造体は, 金属ナノ粒子の大きさ, DNA の長さを様々に精密設計することで, 今まで自然界に存在しなかった多様な屈折率を持つ光機能性材料を精密設計・創製し, かつバルク合成が期待される.

4. 研究成果

(1) 単分子レベルの DNA 二重鎖の電子移動度計測

原子・分子レベルの高分解能をもつ表面分析法である走査型トンネル顕微鏡 (STM) 観察により, DNA 二重鎖からなるソフト界面を, 単分子レベルで可視化検出することを試みた. 従来 STM による観察では, 界面に固定

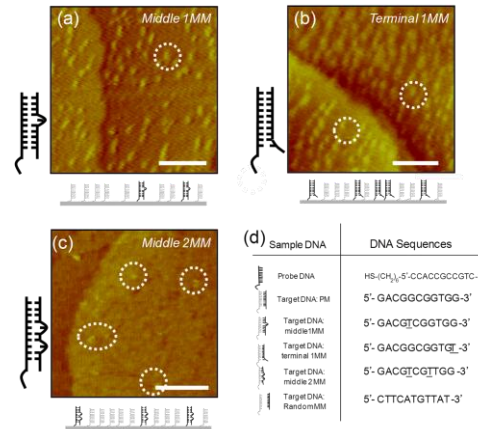


図5: STM による DNA 鎖単分子可視化法を用いた塩基鎖長の DNA 二重の電子移動度測定法

された DNA 二重鎖分子は, 水溶液中で測定すると凝集体としてしか観察されなかった. ここでは, DNA 二重鎖の作成条件を検討することにより, 単分子レベルで可視化することに初めて成功した. このことから, プロブ DNA 分子に対して, フルマッチ, 一塩基ミスマッチ, 二塩基ミスマッチの各々のターゲット DNA を用いて DNA 二重鎖を作製し, 単分子レベルで観察した(図5). その結果, 各 DNA 鎖のハイブリダイゼーション効率や温度依存的な変化が単分子レベルで分析可能となった. また, この方法は, DNA 二重鎖分子ごとの電子状態をも可視化できるものである. 各々の DNA 二重鎖介した電子移動現象を観察した結果, DNA 二重鎖中のミスマッチの数, 位置依存的に, 二重鎖を介した電子移動現象が変化することを見出した. (Chem.Comm., (2010), 46, 2581-2583).

(2) DNA 折り紙技術を用いた電子デバイス構造および新規光物性材料作成の研究

DNA の自己組織化能を用いてリング状に連結し作製し, ボトムアップ型微細加工により可視光域での磁気応答を, 負の屈折率を持つ光. 実現し, 応用・実用化が可能な大量合成の方法論の確立を目指した. 可視光で負の屈折率を持つ“ナノ磁気共振器”は, 理論計算より, 10-50nm 径の金ナノ粒子を 10-20nm の長さ DNA 鎖によって連結させた構造体と予測される. この 20nm 系の金ナノ粒子からなるリング構造体を, DNA と金ナノ粒子の 1:1 で接合体を作製し, さらにこの DNA/金ナノ粒子接合体同士をハイブリダイゼー

ションにより連結させたリング状構造体 (3~6 量体) の作製に成功した (図6) . これにより, 可視光領域で負の屈折率を持つことが期待される光機能性材料の実現に必要な微細加工技術を確立した(*Chem.Comm.*, (2010), 46, 6132-6134) .

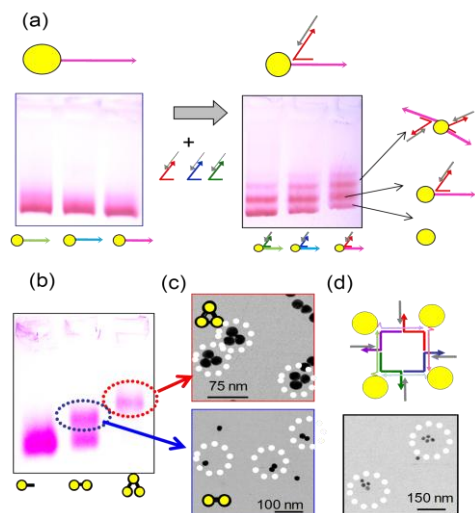


図6: DNA 鎖による金属ナノ粒子のナノ高構造体作製(a-b) ゲル電気泳動による確認, (c-d)TEM による確認

(3) トンネル電流を指標とした単分子識別の研究

微小隙間電極による DNA 鎖の測定系の構築を行い (*J.Appl.Phys.*, 108, 064312, (2010)), およびそれをもちいた核酸塩基モノマーおよびオリゴマー単分子に対する電気計測に成功した (第 72 回応用物理学会, 第 58 回応用物理学関係連合講演会, 日本化学会第 91 春季年会による口頭・ポスター発表). 電気計測によって得られるピーク電流値のヒストグラムを作製し, その最頻度の値を基に各電導度を決定した. (図7). さらに, メチルシトシンやオキソグアニンなどの修飾塩基についても電気伝導度測定を行った (*J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9124-9128, (2011)). これにより単分子計測によるエピジェネティック解析を広げることにつながると予想される

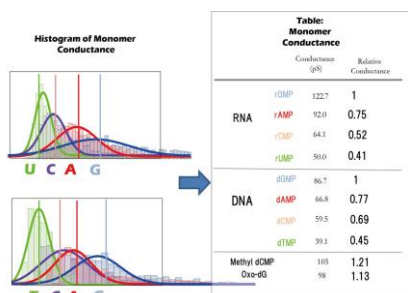


図7: 核酸塩基モノマーおよびオリゴマー単分子に対する電気計測

(4) トンネル電流を指標とした核酸塩基配列決定の研究

微小隙間電極による DNA 鎖の測定系を用いて, マイクロ RNA let7 family の共通配列の核酸塩基 DNA/RNA 鎖の電気計測し, その計測データを基に配列情報の再構成することに成功した (図8) (第 72 回応用物理学会, 日本分析化学会第 60 回年会, Global Technology Congress, 日本化学会第 92 春季年会, ISIN2012 による口頭・ポスター発表). この成果を他の RNA 小分子の計測に展開するため, 分子像計測を行った (*Bioconjugate Chem.*, (2011), 22, 2082-2092, *Chem. Comm.*, 47, 2125-2127, (2011)).

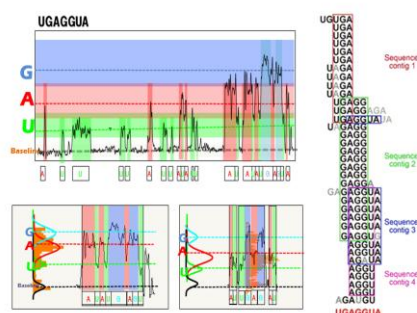


図8: STM による DNA 鎖単分子可視化法を用いた塩基鎖長の DNA 二重の電子移動度測定法

(5) 分子制御技術を導入した単分子計測系の構築

より長い DNA 鎖の電気計測を行うため DNA 鎖の三次構造を解消するなどの分子制御技術の開発の一環として, 微小ポアをもつデバイスを作製し, ギャップ電極とポア間電極の微小電流計測系の構築した (第 59 回応用物理学関係連合講演会の口頭発表). これにより, 分子制御と分子認識を同時に行う計測系へつながると期待される.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① N. Ito, H. Abe, T. Ohshiro, Y. Nakashima, M. Maeda, and Y. Ito, Synthesis and Characterization of Small Circular Double-Stranded RNAs, *Chemical Communication.*, (査読有), 47 巻, 2011, 2125-2127.
- ② M. Tsutsui, K. Matsubara, T. Ohshiro, M. Furuhashi, M. Taniguchi, T. Kawai, Electrical detection of single methylcytosines in a DNA oligomer., *J. Am. Chem. Soc.*, (査読有) 133 巻, 2011,

- 9124-9128.
- ③ N.Abe, H.Abe, C.Nagai, M.Harada, H.Hatakeyama, H.Harashima, T.Ohshiro, M.Nishihara, K. Furukawa, M.Maeda, S.Tsuneda, Y.Ito, Synthesis, Structure, and Biological Activity of Dumbbell-Shaped Nanocircular RNAs for RNA Interference, *Bioconjugate Chemistry* (査読有), 2011, 22 巻, 2082-2092.
 - ④ M.Furuhashi, M.Fujiwara, T.Ohshiro, M.Tsutsui, K.Matsubara, M.Taniguchi, T.Kawai, Development of microfabricated TiO₂ channel wave guides. *AIP Advances* (査読有), 2011, 1 巻, 032102.
 - ⑤ T.Ohshiro, M.Mizuo, Single-Molecule Imaging of DNA Duplex Immobilized on Surfaces with Scanning Tunneling Microscope, *Chemical Communication* (査読有), 46 巻, 2010, 2581-2583.
 - ⑥ T.Ohshiro, T. Zako, R. Watanabe-Tamaki, T. Tanaka, Mizuo, S, A Facile Method Towards Cyclic Assembly of Gold Nanoparticles Using DNA Template Alone, *Chemical Communication* (査読有), 46 巻, 2010, 6132-6134.
 - ⑦ M.Tsutsui, T. Ohshiro, Atomically controlled fabrications of subnanometer scale electrode gaps, *J. Appl.Phys.*, (査読有), 108 巻, 2010, 064312.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 大城敬人, 松原一喜, 筒井真楠, 古橋匡幸, 谷口正輝, 川合知二, トンネル電流を指標とした単分子DNA/RNA配列決定法の開発, 日本化学会第92春季年会, 2012年3月28日, 慶応大学 (神奈川)
- ② Takahito Ohshiro, Kazuki Matsubara, Makusu Tsutsui, Masayuki Furuhashi, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, Single-Molecule Identification of DNA/RNA Towards Tunnel-Current Based Genome Sequencing, International Symposium on Innovative Nano-Biodevices (ISIN2012), 2012年3月21日, Nagoya University (Nagoya)
- ③ 大城敬人, 佐々木優太, 筒井真楠, 川野, 谷口正輝, 川合知二, ゲーティングナノデバイスによる単一バイオ分子計測, 第59回応用物理学関係連合講演会, 2012年3月16日, 早稲田大学 (東京)
- ④ Takahito Ohshiro, Kazuki Matsubara, Makusu Tsutsui, Masayuki Furuhashi, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, Single-Molecule Identification of DNA/RNA Towards Tunnel-Current based Genome Sequencing, 7th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium, 2011年11月10日, Osaka University (Osaka, Japan)
- ⑤ 大城敬人, 松原一喜, 筒井真楠, 古橋匡幸, 谷口正輝, 川合知二, トンネル電流による単分子DNA/RNAの配列決定, 日本分析化学第60回年回, 2011年9月14日, 名古屋大学 (名古屋)
- ⑥ 大城敬人, 松原一喜, 筒井真楠, 古橋匡幸, 谷口正輝, 川合知二, トンネル電流を指標とした単分子DNA/RNA鎖の配列決定, 第72回応用物理学会, 2011年8月25日, 山形大学 (山形)
- ⑦ Takahito Ohshiro, Kazuki Matsubara, Makusu Tsutsui, Masayuki Furuhashi, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, Single-Molecule Tunnel-Current Detection Towards a Sequencing of Oligonucleotides, Global Technology Congress: 1st Next Generation Sequencer Congress, 2011年7月6日, Hyatt at Fisherman's Wharf (San Francisco, USA)
- ⑧ 大城敬人, 松原一喜, 筒井真楠, 古橋匡幸, 谷口正輝, 川合知二, トンネル電流を指標とした神経伝達分子の単分子計測, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月26日, 神奈川大学 (横浜)

- ⑨ 大城敬人, 松原一喜, 筒井真楠, 古橋匡幸, 谷口正輝, 川合知二, トンネル電流を指標とした単分子DNAコドンの配列決定, 第58回応用物理学関係連合講演会, 2011年3月24日, 神奈川工科大 (厚木)
- ⑩ Takahito Ohshiro, Kazuki Matsubara, Makusu Tsutsui, Masayuki Furuhashi, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, Single-Molecule Identification of DNA/RNA Towards Tunnel-Current Based Genome Sequencing, International Symposium: Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules (ISSMA2011), 2011年1月22日, Kyoto International Convention Center (Kyoto, Japan)
- ⑪ Takahito Ohshiro, Mizuo Maeda, Single-molecule Imaging of DNA Immobilized on Surfaces with Scanning Tunneling Microscope. Pacificchem 2011, 2010年12月18日, Hawaii Convention Center (Hawaii, USA)
- ⑫ 大城敬人, 松原一喜, 筒井真楠, 古橋匡幸, 谷口正輝, 川合知二, トンネル電流を指標とした生理活性核酸分子の単分子計測, 第71回応用物理学会, 2010年9月8日, 長崎大学 (長崎)
- ⑬ 大城敬人, 前田瑞夫, 走査型トンネル顕微鏡による基板上に固定したDNA二重鎖の単分子観察, 第59回高分子年会, 2010年5月26日, 国際フォーラム (横浜)

研究者番号 : 10462665

- (2) 研究分担者
該当なし
- (3) 連携研究者
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大城 敬人 (OHSHIRO TAKAHITO)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教 (常勤)