

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18947

研究課題名（和文）ナノヒータ組込みナノポアを用いた1分子計測法の創成

研究課題名（英文）Single molecule sensing using nano-heater embedded nanopores

研究代表者

筒井 真楠（Tsutsui, Makusu）

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50546596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：固体ナノポアは水中の微小物体を単一粒子・分子レベルの超高感度で検出することが可能なセンサとしての応用が期待されている。本研究では、微細加工技術を基軸に固体ナノポアとナノワイヤヒータを集積したナノ構造を創製し、これを用いて局所的に昇温したナノポア空間を形成した。そして当該ナノポアを応用し、二本鎖DNAの一本鎖化や生体粒子の破碎・内部分子検出を可能にする新規ナノポア計測法を創成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

本研究では、水の沸点以上にまで昇温されたナノポア空間を形成する新たな手法を創成できた。今後は、この特殊なナノポア空間において、水の密度やイオン濃度分布、粘性や電気浸透流などの流体減少、さらにはイオン輸送過程における平均自由行程等がどのように理解できるものなのかを調べる新たな研究展開が期待される。また、本研究により当該ナノポア空間が1生体粒子の内部物質検出に応用可能であることを明らかにできた。これにより、PCR増幅が原理的に不可能なタンパク質や代謝物質をオンチップで1分子検出する革新的1細胞解析技術の創出可能性を大きく拓くことができた。

研究成果の概要（英文）：Solid-state nanopores are anticipated to be applied as sensors capable of detecting microscopic objects in water with ultra-high sensitivity at the single particle or molecule level. In this study, we created a nanostructure that integrates solid-state nanopores and nanowire heaters using microfabrication technology, forming a locally heated nanopore space. By applying these nanopores, we successfully developed a novel nanopore measurement method that enables the denaturation of double-stranded DNA into single strands, as well as the lysis of biological particles and in-situ single-molecule detections of their DNA.

研究分野：バイオテクノロジー

キーワード：ナノポア 電気化学 イオン電流 局所加熱 NEMS DNA 熱泳動

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固体ナノポア法は、DNA の塩基配列を高速解読する手法として、国内外でその研究開発が急速に進められている(Xue et al., Nat. Rev. Mat. 5, 931 (2020))。この方法では、電解質液中の DNA が、ナノスケールの細孔(ナノポア)を通過する際に生じるイオン電流変化を測定する。得られる電流波形は、細孔を通過する物体の物理特性を反映することから、その波形の違いによって、DNA 塩基分子を 1 分子レベルで識別することができる(Feng et al., Nat. Nanotechnol. 10, 1070 (2015))。しかし、これまでの固体ナノポア法では、事前に多数の生体粒子を破碎・精製・分離し、さらに PCR 増幅することで、ナノポア近傍に DNA が高濃度に存在する状態を整える必要があった(Greninger et al., Genome Med. 7, 99 (2015))。加えて、当該原理は 1 本鎖 DNA にしか機能しないにも関わらず、如何にしてナノポアに入る前に 2 本鎖 DNA を 1 本鎖化するか、という問題もなおざりにされてきた。このため従来法は通常、1 分子感度を有しながらも、PCR 増幅した 2 本鎖 DNA の検出にしか適用できておらず、イオン電流計測による塩基配列解読の実現見通しも立てられていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、高速微小電流計測技術を基盤とする固体ナノポア法とナノヒータ技術を融合させ、上記 2 つの根幹的な課題を解決する新規ナノポア法を創成する。まず、ナノポアとナノヒータの集積構造を用いて局所加熱されたナノポア空間を形成する。そして、イオン電流計測による精製 DNA の 1 分子検出を実施し、当該ナノ空間を DNA が通過する際の、局所熱による 1 本鎖化ならびに 1 分子熱泳動機構を解明する。さらに本手法を発展させ、ナノヒータの局所熱を生体粒子の外膜破壊にも活用することで、1 生体粒子から DNA の抽出・1 本鎖化・1 分子検出を実行できる新規 1 分子検出法を創成する。

### 3. 研究の方法

はじめに、白金細線ナノヒータと固体ナノポア(DNA 検出を可能にするため、ナノポアの直径は 100 nm とする)の集積構造を作製する。そして、ヒータに電圧  $V_{ヒータ}$  を与え通電加熱した状態で、イオン電流計測による  $\lambda$  および T4 ファージ由来の精製 DNA の 1 分子検出を実施する(図 3)。この時 DNA には、メンブレンに印加する電圧  $V_b$  による静電気力に加え、局所温度勾配に伴う熱泳動力が作用する。そこで、様々な  $V_b$  と  $V_{ヒータ}$  条件で 1 分子検出を行い、各条件下で得られるイオン電流信号の波幅と、既知である  $\lambda$  および T4DNA の分子長から、DNA のナノポア通過速度を導出し、その  $V_{ヒータ}$  依存性を明らかにする。さらに、高  $V_{ヒータ}$  条件下において、局所熱による DNA 1 本鎖化(Qiu, PloS ONE 7, e39793 (2012))に伴い、電流信号波高が 1/2 になることを確認する。以上の結果をマルチフィジックスシミュレーションと照合することで、ナノポア空間における DNA の 1 本鎖化および 1 分子熱泳動ダイナミクスの機構を解明する。なお、DNA はランダムな角度でナノポアに入り、かつ折り畳み構造を有する場合もある(Steinbock et al., Nano Lett. 10, 2493 (2010))。そこで、各電圧条件下で 1000 個以上の電流信号を測定し、その波幅の分布から、DNA の泳動速度を統計的に評価する。

続いて、ナノヒータ組込みナノポアを用いて、 $\lambda$  および T4 ファージ内 DNA の 1 分子検出を実施する。まず、様々な  $V_{ヒータ}$  条件でイオン電流測定を行う。この時、低  $V_{ヒータ}$  下では、ナノポアにファージがトラップされイオン電流がステップ状に変化する。一方、 $V_{ヒータ}$  を増大させると、ナノポア近傍の局所温度がファージ外膜(カプシド)の融解温度(68 °C: Qiu, PloS ONE 7, e39793 (2012))に達し、内部の 2 本鎖 DNA がナノポアで検出されるようになる。そしてさらに  $V_{ヒータ}$  を上げた場合には、抽出される DNA がナノポアに侵入する直前で 1 本鎖化すると予測される。なおナノポアの大きさは、DNA が検出でき、かつ DNA 以外のタンパク質等でナノポアが詰まらないようにするために、直径 100 nm とする。ここで、得られ

るイオン電流信号は、DNA 以外のタンパク質等によるものも多数観測されると予測される。そこで、初年度に計測する精製 DNA( $\lambda$  及び T4)の結果を参照し、イオン電流信号波形を照合することで、ファージ内の DNA に由来する電流信号を同定する。以上の結果を通して、ナノヒータ組込みナノポアを用いた 1 生体粒子内 DNA の抽出・一本鎖化・1 分子検出を実証する。

#### 4. 研究成果

まず、ナノポア空間の局所温度制御に向けて、ナノヒータの構造設計を実施した。電子線リソグラフィーと高周波マグネトロンスパッタにより、コイル状の白金ナノワイヤ(幅約 100 nm)を厚さ 50 nm の窒化シリコン層が被覆されたシリコンウエハ上に形成した。デバイス構造は二種類試し、一つは厚さ約 0.5 mm のシリコン層がそのまま残されたものであり、もう一つは KOH 水溶液を用いたウェットエッチングによってシリコン層を部分的に除去し窒化シリコンメンブレンを形成したものである。またどちらのデバイスにおいても、白金ナノワイヤを通電加熱するためにフォトリソグラフィーとスパッタ蒸着によって金のマイクロ電極を形成した。そして白金ナノワイヤに電圧を加え、その際に生じた電気抵抗の変化からナノワイヤの温度変化を見積もった。具体的には、温度コントローラで温度が調節できるステージ上にデバイスを設置し、ステージ温度に対する白金ナノワイヤの抵抗変化を測定した。続いて、大気中および水中において、通電加熱させたナノワイヤの抵抗変化を測定し、両者の結果を照合することで、自己加熱によるナノワイヤの局所温度変化を調べた。その結果、シリコン層がそのまま残されたデバイスの場合、大気中において 2 V の電圧下でナノワイヤ温度は 60 °C 程度まで昇温されることが確認できた。それに対し、シリコン層を除去した窒化シリコンメンブレン上のナノワイヤの場合には、より顕著な自己加熱効果が観測され、2 V の電圧下で局所温度が 700 °C 以上にまで上昇する結果を得た。これは、熱の散逸に寄与していた分厚いシリコン層を除去した結果、ナノワイヤに生じるジュール熱がその自己加熱により効果的に現れるようになったためと解釈できる。同様に、水中で実施したジュール熱計測では、窒化シリコンメンブレン上でも 2 V の電圧下でも温度上昇は 100 °C 程度に留まった。これは、水を介した熱伝導によってジュール熱が散逸するようになったことを示唆する結果である。以上の結果を通して、ナノポア近傍の局所温度を水の沸点付近まで昇温させることに応用可能な白金ナノワイヤを創製することができた。

次に、マルチフィジックスシミュレーションによりナノポア近傍の空間的な温度分布がナノワイヤの通電加熱によってどのように変化するかを調べた。すると、白金ナノワイヤに 2 V 以上の電圧を加えた時に、水で満たされたナノポア付近の温度は沸点以上にまで昇温されている可能性が示された。そこでシミュレーションの結果の妥当性を検証するために、隣接した 2 個の白金ナノワイヤを窒化シリコンメンブレン上に形成し、一方を通電加熱した状態でもう一方のナノワイヤの抵抗変化を測定した。これにより、ジュー



図 1. 白金ナノワイヤヒータとナノポアの集積構造.ナノワイヤを通電加熱させてナノポア近傍の温度を昇温させる.

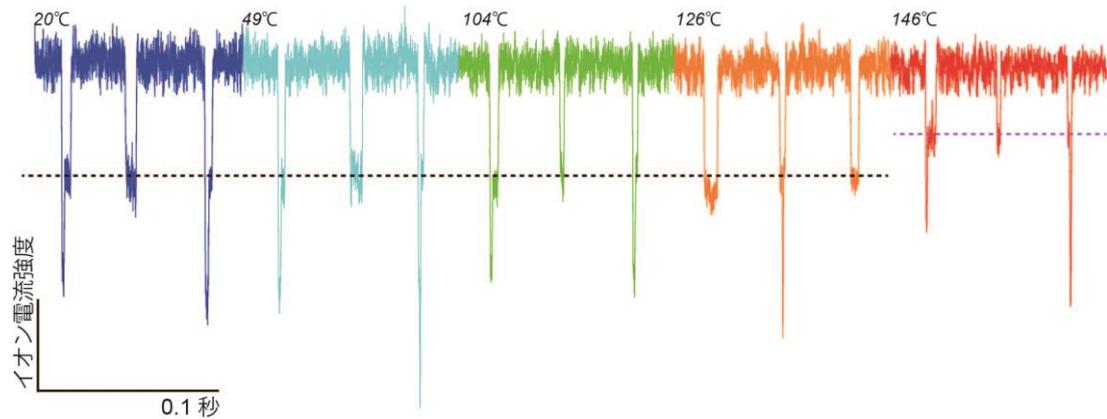


図 2. 白金ナノワイヤでナノポア局所温度を昇温させた状態で観測された  $\lambda$ DNA のイオン電流信号。点線は折り畳まれていない直鎖状の DNA がナノポアを通過した際のイオン電流変化値を表している。ナノポア温度を 146°C まで上昇させると当該イオン電流変化が約半分にまで低下していることが分かる。

ール熱散逸によってナノワイヤの少し遠方での温度がどのように変化しているかを評価したところ、得られた結果はシミュレーションの結果とわずかな誤差で一致した。これらのことから、ナノワイヤの通電加熱によって水の沸点以上にまで昇温可能なナノポア空間が創製可能なことが確認できた。

そこで、白金ナノワイヤを形成した窒化シリコンメンブレン中に、さらに電子線リソグラフィーと反応性イオンエッチングにより直径 100 nm~60 nm のナノポアを加工し、ナノワイヤを通電加熱した状態でイオン電流計測による DNA の 1 分子検出を実施した。まず、イオン電流はナノワイヤに加える電圧の 2 乗に比例して上昇する傾向が観測された。これは、ナノポア付近の局所温度上昇に伴い水の粘性が低下し、その結果イオンの移動度が上昇したためと解釈できる。一方、局所加熱されたナノポア空間に  $\lambda$  DNA を電気泳動により通過させると、1 分子 DNA が通過する度に局所温度によらずパルス状のイオン電流変化が観測された。その波形は階段形状のものであったことから、DNA が様々な折り畳み構造でナノポアを通過したことが示唆された。そうして得られた  $\lambda$  DNA のイオン電流信号を統計的に解析し、折り畳まれていない DNA が通過した際のイオン電流変化を見積もった。その結果、ナノワイヤに加える電圧がある値を超えた時に、イオン電流変化の大きさが約半分に減少することが分かった。これは、局所的に昇温されたナノポアに二本鎖 DNA である  $\lambda$  DNA が近づいてくると、熱エネルギーによって鎖間の水素結合が切断され二本の一本鎖 DNA に乖離したことを示唆している。加えて、 $\lambda$  DNA より分子長の短いプラスミド DNA (pBR322) でも同様の計測を実施したところ、プラスミドでも同様の信号形状変化が観測されたが、その際の閾値電圧は  $\lambda$  DNA よりも低電圧であった。一般に短い DNA ほど鎖間の水素結合の数は少ないため、それだけ低温で DNA の熱変性が起きやすいことが知られており、今回得られた結果も同様に解釈することができる。以上の結果により、ナノワイヤヒータを集積したナノポアデバイスを用いて、数万塩基対からなる二本鎖 DNA をオンチップで一本鎖化するだけでなく、その場検出まで実施可能な新規 1 分子計測法を創成することに成功した(論文投稿中)。

さらに、当該デバイスを用いてバクテリオファージの 1 粒子計測を実施した。まず、直径 200 nm~50 nm のナノポアで  $\lambda$  ファージを計測した。その結果、まず  $\lambda$  ファージは DNA とは異なり、電気泳動力ではなく電気浸透流による流体抗力でナノポアを通過することが分かった。この結果はつまり、同じ極性の印可電圧下でファージと DNA を選択的に検出可能なことを意味している。一方、ナノポア直径が 100 nm を下回ると、頻繁にナノポアがファージで詰まる傾向が観測された。 $\lambda$  ファージの全長は 100 nm 以上あるため、その配向次第でナノポア上面に引っかかったためと考えられる。また、ナノワイヤを通電加熱させていきながらファージ計測を実施したところ、低電圧下ではイオン電流信号が観測されなかったのに対し、高電圧下では  $\lambda$  DNA のナノポア通過を示唆する特徴的な電流波形の信号が低頻度ながら

観測された。以上の結果より、本研究で創製した集積ナノポアは、1 生体粒の破碎から内部分子の検出まで一貫して実施可能なデバイスであることを実証することに成功した(論文執筆中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsutsui Makusu, Yokota Kazumichi, Hsu Wei Lun, Garoli Denis, Daiguji Hirofumi, Kawai Tomoji	4. 巻 2
2. 論文標題 Peltier cooling for thermal management in nanofluidic devices	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Device	6. 最初と最後の頁 100188 ~ 100188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.device.2023.100188	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	ガロリ デニス  (Garoli Denis)		

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			
イタリア	Instituto Italiano di Tecnologia			