

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25790029

研究課題名(和文) ナノポアを用いた1分子構造解析法の開発

研究課題名(英文) Nanopore devices for a structural analysis of single molecules

研究代表者

龍崎 奏 (Ryuzaki, Sou)

九州大学・先端物質化学研究所・助教

研究者番号：60625333

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)：本研究課題では、ナノポアを通過する分子の速度を制御するサラウンドゲート電極と、ナノポアデバイスを融合することで、ナノポアを通過する分子の速度をゲート電圧で減速させることに成功し、さらにイオン電流変化からナノポア通過分子の構造解析に成功した。ゲート電圧によるナノポア通過分子の速度制御、およびナノポアを用いた構造解析はいずれも本研究が世界発である。具体的には、ナノ粒子を最大で240倍ほど減速させ、DNA 1分子の速度は10倍ほど減速させることに成功した。また、それらの粒子の3次元形状や、DNAのナノポア通過時の構造を定量的に解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Nanopore devices consisting of a surround gating electrode causing a decrease in speed of nanomaterials passing through the nanopore have been fabricated in order to analyze structures of the materials. The gating voltage via a gating electrode resulted in 240 times slower speed of nanoparticles passing through a nanopore than that without the gating voltage, and DNA also showed 10 times slower speed under the gating voltage. In addition, the shapes and structures of these materials passing through a nanopore were quantitatively revealed by analysing changes in ionic current due to the material translation.

研究分野：ナノバイオデバイス

キーワード：ナノポア

1. 研究開始当初の背景

1 分子解析技術は、超微量・超高速な分析を行う革新技術として期待されており、例えば、個別医療を担う次世代 DNA シークエンサーでは、1 分子識別技術が用いられ、世界中で激しい研究開発競争が展開されている (B. M. Venkatesan and R. Bashir, Nature Nanotechnol. 2011, 6, 615)。この 1 分子識別技術を実現するコアデバイスは、膜貫通タンパク質を用いたバイオナノポア、あるいはシリコン基板に数 nm の貫通孔を持つシリコンナノポアであり、イオン電流の変化、あるいはトンネル電流の変化を 1 分子検出プローブとして用いている。イオン電流をプローブとするナノポアデバイスの構造は、ナノポアの上下にイオン電流計測用の電極が設けられ、ナノポアと電極はともに KCl などの電解質溶液で満たされている。ナノポア内に検出物質が無ければ、ポアを介して電極間にイオン電流が流れ、検出物質がナノポア内に入ると一部のイオン電流が遮断され、イオン電流が減少する。この減少量が、ナノポア内の検出物質の体積、つまり、ナノポア内から排除されたイオン量 (排除体積) に比例するため、1 分子の体積がイオン電流の変化から算出され、1 分子検出・サイズ識別に用いられる。このイオン電流変化が排除体積に比例する原理を応用すると、溶液中の 1 分子の構造解析を行えることが期待されているが、溶液中の 1 分子構造解析に成功した例はなかった。

1 分子構造解析が実現していない理由は、構造解析に必要な空間分解能を得る 2 つのブレークスルーが実現されていなかったからである。排除体積 (V) は、物質の断面積 (S) とナノポアの厚み (L) の積で決定されるため、ナノポア内に流動する物質の時間当たりの高い空間分解能 ($dV/dt = L \times dS/dt$) は、L が小さく、時間当たりの面積変化が小さいとき、つまり、ポア内の物質の移動距離が小さい時に得られる。一方、イオン電流計測の時間分解能 (dt) は、250 kHz が上限であるため、ナノポアの厚みが薄く、物質の流動速度が遅い時に高い空間分解能が得られる。従って、「極限まで薄いナノポア膜を持つナノデバイス構造」と、「1 分子の流動速度を遅くする技術」の 2 つが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、ゲート制御電極を組み込んだ低アスペクト (ポア厚/ポア直径) のナノポアデバイスを開発し、ナノポアを流れるイオ

ン電流の変化から、ナノポアを通過する 1 分子やナノ材料の 3 次元構造解析を行う。研究の初期段階では、SiN メンブレンに低アスペクトナノポアを作製する。最終的には直径数 100 nm の貫通穴を持つ SiN メンブレン上に、直径数 100 nm の貫通孔をもつグラフェンを積層し、ナノポアを通過する分子の速度を制御するサラウンドゲート電極が融合したナノデバイスを開発する。このナノデバイスを用いて、ナノポアを通過する分子の速度をゲート電圧で減速させながら、1 分子の時間分解断層像をイオン電流変化から作成し、1 分子の 3 次元構造解析を行う原理構築と技術開発を行う (図 1)。

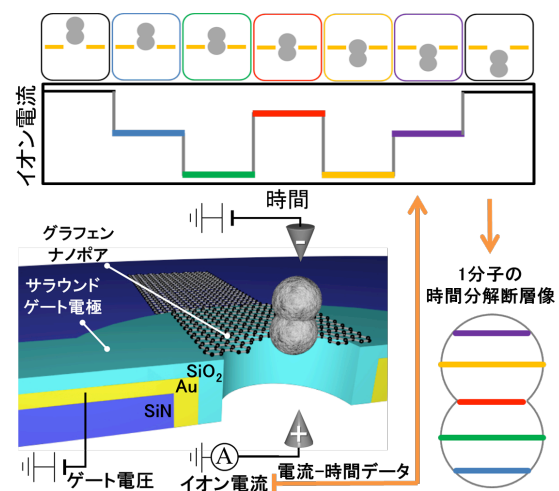


図 1. 溶液中の 1 分子構造解析の概略図。

3. 研究の方法

研究の初期段階では、SiN メンブレンによる低アスペクトナノポアを作製し、ポリスチレン (Pst) ナノ粒子をテスト試料として用いて本構造解析法の原理構築を行う。また、ゲーティングナノポアによるナノポア通過物質の速度制御を行うと同時にグラフェンナノポアの作製について検討する。最終的に、これらの技術を組み合わせ、実際の生体材料や 1 分子の構造解析を行い、本構造解析法の限界を明らかにする。

4. 研究成果

本研究課題では、ナノポアを通過する分子の速度を制御するゲート電極と、低アスペクト比 (ポア厚/ポア直径) ナノポアデバイスを融合することで、ナノポアを通過する分子の速度をゲート電圧で減速させることに成功し、さらにイオン電流変化からナノポア通過分子の構造解析に成功した。ゲート電圧に

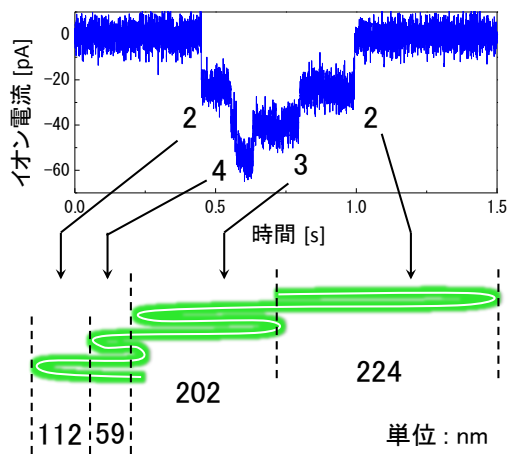


図 2. ナノポア通過時の DNA の折畳み構造.

よるナノポア通過分子の速度制御、およびナノポアを用いた構造解析はいずれも本研究が世界発である。

具体的には、直径 200 - 300 nm のナノ粒子を最大で 240 倍ほど減速させ、DNA 1 分子の速度は 10 倍ほど減速させることに成功した。また、それらの粒子の 3 次元形状や、DNA のナノポア通過時の構造を定量的に解析することに成功した (図 2)。さらに、エクソソームや大腸菌などの実際の生体物質等への応用も可能であることを明らかにした。

さらに、グラフェンナノポア作製のために、酸化還元グラフェン (RGO) の基礎特性に関する実験を行い、ヒドラジンのみを用いた還元法において、既存の RGO よりも高い導電性を示す RGO の作製に成功した (Appl. Phys. Lett. 105, 093109 (2014))。これは、酸化グラフェンを既存の手法よりも均一に還元することを目的に、圧力雰囲気下において酸化還元グラフェンの作製を行った。

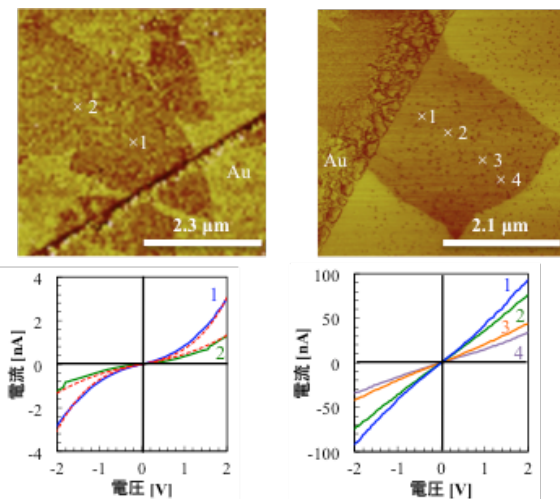


図 3. 既存の RGO (左) と本研究で作製された RGO (右) の AFM 像と I-V 特性.

その結果、還元反応中に圧力を加えることで、還元されたグラフェンの領域が広くなり、大気下での還元反応よりも均一に還元されていることが明らかとなった。そのため、I-V 特性は線形性を示し、導電率はこれまでの酸化還元グラフェンよりも高い値を示した (図 3)。また、積層グラフェン構造を用いた新しい 1 分子構造解析ナノポアデバイスを提案し、理論的実証に成功した (NPG Asia Materials 6, e104 (2014))。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① S. Ryuzaki, J. Meyer, S. Petersen, K. Nørgaard, T. Hassenkam, and B. W. Laursen, "Local charge transport properties of monolayer reduced graphene oxide sheets prepared under self-generated pressure", Appl. Phys. Lett. 105, 093109 (2014). (査読有)

DOI: 10.1063/1.4895072

② Y. He, M. Tsutsui, S. Ryuzaki, K. Yokota, M. Taniguchi, and T. Kawai, "Graphene/hexagonal boron nitride / graphene nanopore for electrical detection of single molecules", NPG Asia Materials 6, e104 (2014). (査読有)

DOI: 10.1038/am.2014.29

[学会発表] (計 7 件)

① 龍崎奏, "シリコン窒化膜によるイオンチャンネルを用いた一分子構造解析法の開発", 神戸大学先端膜工学センター学術講演会, 神戸大学, 3/6 (2015).

② S. Ryuzaki, "Rapid Structural Analysis of a Single Molecule in Aqueous Solutions", 2015 IMCE International Symposium, Kyushu University, 1/28 (2015).

③ 龍崎奏, "ナノポアを用いた一分子構造解析法の開発", 第二回アライアンス若手研究交流会, 大阪大学, 11/26 (2014).

④ S. Ryuzaki, "Rapid Structural Analysis of Nanomaterials in Aqueous Solutions", Department of Physics / Chemistry, National University of Singapore, 2/13 (2014).

⑤ S. Ryuzaki, K. Okamoto, K. Tamada, M. Taniguchi, "Nanopore devices for rapid structural analysis of nanomaterials", International Symposium on Small Particles and Inorganic Clusters (ISSPIC-17), Kyushu University, 9/9 (2014).

- ⑥ 龍崎奏, 筒井真楠, He Yuhui, 横田一道, 大城敬人, 古橋匡幸, 谷口正輝, 川合知二, “ナノポアを用いた溶液中ナノ材料立体構造解析”, 秋季第 74 回応用物理学会, 同志社大学, 9/16 - 9/20 (2013).
- ⑦ 龍崎奏, 筒井真楠, He Yuhui, 横田一道, 谷口正輝, 川合知二, “ナノポアデバイスを用いたナノ材料構造解析”, 第 11 回ナノ学会, 東京工業大学, 6/3 (2013).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：試料作製装置および試料作製方法

発明者：川合知二, 谷口正輝, 龍崎奏, 橘田和美, 高畠令王奈, 真野潤一, 中江裕樹, 布藤聡, 吉井淳治

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-073805

出願年月日：平成 26 年 3 月 31 日

国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

龍崎 奏 (RYUZAKI, Sou)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：60625333