

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26706010

研究課題名(和文) デジタル化ナノチャンネルに基づく単一細胞オミクス計測技術の確立

研究課題名(英文) Development of Digital Nanochannels for Single Cell Omics

研究代表者

許 岩 (Xu, Yan)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90593898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単一細胞内のすべての生体分子を1分子単位かつハイスループットで計測すること可能な技術としてデジタル化ナノチャンネル(DN)を提案し、DNのコンセプトを実現するための技術基盤を確立した。具体的には、まず、精密、高密度、安定的なDN構造を有するチップ作製の基盤技術を確立した。そして、DNによる1分子計測のための信号検出機構が確認できた。さらに、DN性能向上に関連するタンパク質非特異吸着の抑制やDNチップの再生などの基盤技術を確立した。以上から、DN技術は全く新しい細胞計測技術として更なる展開を大変期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established technology base for the proof-of-concept of a new technology called digital nanochannel (DN), which was proposed by us and holds great potential allowing single cell omics analysis at the single molecule level. First, the basic technology for fabricating nanofluidic chips with precise, high density, stable DN structures was developed. Second, the mechanism of signal detection for single molecule counting by DN was confirmed. Third, fundamental technologies to improve the performance of single molecule detection by DN, such as suppression of nonspecific protein adsorption in DN and regeneration of DN chips, were further established. These results promise that DN could be a powerful tool for single cell omics studies after further development in the future.

研究分野：ナノ化学システム、分析化学、バイオマテリアル

キーワード：デジタル化ナノチャンネル 単一細胞オミクス 細胞計測 ハイスループット計測 Nano-in-Nano集積化
ナノ流体デバイス 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

近年、単一細胞内の全ての生体分子を一網打尽に解析する単一細胞オミクス解析が注目されている。しかし、単一細胞容量に適合かつ効率的な生体分子計測技術が開発されない限りはその実現は難しい。従って、単一細胞オミクス解析のためには、非常に微量の単一細胞容量 ($pL = 10^{-12} L$) でも解析でき、ハイスループットの細胞計測のブレークスルー技術の開発が急務である。

2. 研究の目的

研究代表者がこれまで携わってきたナノチャンネル技術と1分子計測技術に基づいて、単一細胞内のすべての生体分子を1分子単位かつハイスループットで計測することが可能な技術としてデジタル化ナノチャンネル (DN) を提案するとともに、これに基づく全く新しい細胞計測技術の確立が本研究の目的である。

3. 研究の方法

ナノチャンネルは、単一細胞の体積より3桁小さいフェムトリットル ($fL = 10^{-15} L$) 容積を有するため、単一細胞の内容物を1分子レベルで計測するには最も適していると考えられる (XuY., et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402, 99-107)。

ここで DN の仕組みを説明する。DN は、配列させたナノチャンネル内に、さらに生体分子 (例えば、タンパク質) が捕捉できる機能性表面のアレイを高密度に配置した構造を有する。単一細胞の内容物を DN に導入すると、目標検体分子数より目標検体分子捕獲のアレイ表面数が極めて多い場合、確率論により、個々の捕捉表面は目標検体分子を1分子のみ結合しているか (1)、結合していないか (0) のどちらかになる。結合している検体の検出信号がナノチャンネル内局所化されるため、信号が容易に検出できる。検出信号がある場合 (信号1) またはない場合 (信号0) について信号を2値化し、単一細胞内における全ての目標検体を1分子単位でハイスループット計測できる。

本研究では、DN のコンセプトを実現するために、DN チップ作製の基盤技術の確立、DN による信号検出機構の確認、及び DN 性能向上に関連する基盤技術の確立を行った。

4. 研究成果

① DN チップ作製の基盤技術の確立

DN 構造を作製するには、電子ビーム (EB) リソグラフィや、プラズマドライエッチング、蒸着、リフトオフなどの多段階ナノ加工プロセスを利用した。研究代表者が開発した Nano-in-Nano 集積化技術を利用して、それぞれのプロセスのパラメータの検討実験によって、超高精度 (数 10 nm) の位置とサイズの制御ができる、高密度、安定的な DN 構造の作製条件を明らかにした。

DN 構造にアレイ化したナノスケールの金表面構造がある。従来のガラスチップ溶融接合は、1060 °C の接合温度が金の融点に近いので、DN チップの接合に利用できない。また、研究代表者が開発した室温接合 (XuY., et al., *Lab Chip*, 2013, 13, 1048-1052) は、フッ素ガスを使うため、金をエッチング・フッ素化する効果があり、DN チップの接合に適合した方法とは言えない。従って、DN 構造を有するチップのダメージレス接合は課題であった。この課題に対して、酸素プラズマ処理などの複合プロセスを開発し、DN チップのダメージレス接合は低温 600°C で実現した。これにより、DN チップ (図1) の作製法を確立した。

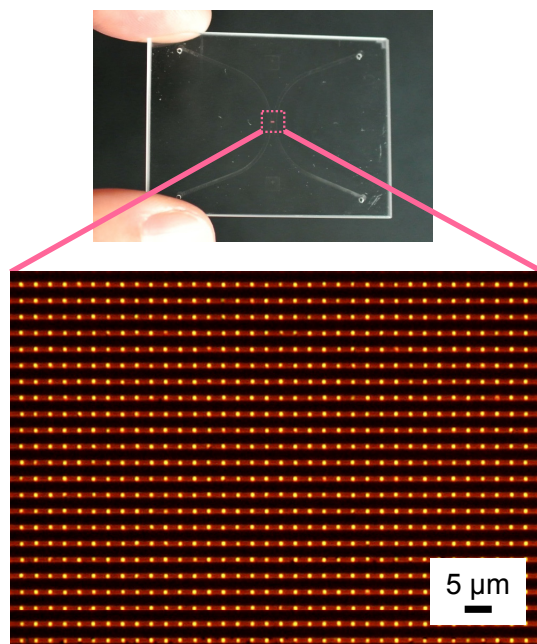


図1. 作製した DN チップの写真 (上) と DN 部分の明視野光学顕微鏡画像 (下)

② DN による信号検出機構の確認

提案した DN 検出法では、金表面上に形成する自己組織化単分子膜 (SAM) を利用して標的タンパク質捕獲用の抗体を固定する。作製した DN チップを用いて、チップ内に SAM を形成させることで、高密度かつ高分解能を有する SAM のナノアレイの作製に成功した。この成果は、化学マイクロ・ナノシステム分野で最高峰の学術誌である *Lab on a Chip* に発表され、さらに裏表紙 (Issue 9, 2015) を飾った。

さらに、DN のコンセプトを実現するため、抗体の高密度固定化と標識検出範囲の確認に取り組んだ。標的タンパク質を高効率に捕獲するために、DN 内抗体の高密度アレイ化の流体制御、試薬濃度、反応時間などの条件だし実験を行い、それぞれの条件に明らかにした。高感度で1分子の信号を容易に検

出するために、標識体を利用して DN によって標識体由来するドット状の蛍光が、極微弱蛍光を検出できる EM-CCD カメラを用いて検出された。使用している標識体は適合していることを証明したうえで、信号検出機構が確認できた。結果の詳細に関しては、論文を作成しているところであるため、ここで割愛する。

②DN 性能向上に関連する基盤技術の確立

DN のコンセプトの実現にあたり存在するいくつかの課題にさらに取り組んだ。

本研究の推進により、タンパク質非特異吸着が DN に基づく高感度 1 分子検出に大きな支障になったことが明らかとなった。この新たな重要課題を解決するため、以前に研究代表者が培ってきたマイクロスケールでの非特異吸着抑制の経験を活用し、ナノチャネルの極めて小さい空間に適合する、タンパク質非特異吸着の抑制が期待されるリン脂質モノマーの分子設計、合成、及び評価を行った。ガラス表面における定性評価と定量評価の両方から、合成したリン脂質モノマー MPC-Si は良好なタンパク質吸着抑制効果を有することがわかった。また、ナノチャネルにおい

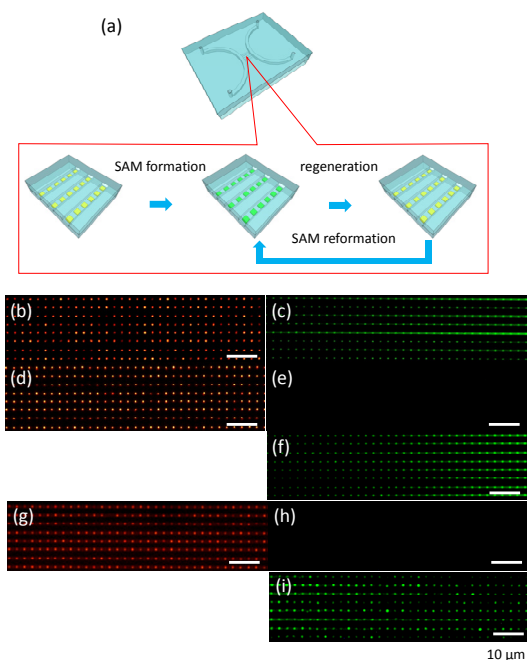


図 2. 6 段階熱化学的分解による再生工程を用いた DN チップの再生と評価。(a) 評価プロセスの模式図；蛍光 SAM (緑) を形成した DN の再生前の (b) 明視野画像と (c) 蛍光画像；1 回目再生後の (d) 明視野画像、(e) 蛍光画像、及び蛍光 SAM 再形成後の (f) 蛍光画像；3 回目再生後の (g) 明視野画像、(h) 蛍光画像、及び蛍光 SAM 再形成後の (i) 蛍光画像；

て、合成したリン脂質モノマー MPC-Si を用いたコーティング技術を確立した。さらに、MPC-Si を用いて DN におけるタンパク質非特異吸着の抑制効果について評価したところ、MPC-Si コーティングは DN 内で優れたタンパク質非特異吸着能力を有することが示された。

そして、実験の効率化と検出精度の向上を目的として、1 分子検出におけるダブルカウントや、その逆のカウント漏れを防ぐため、検出画面のサイズに基づいて DN の分子検出区域を区画し、さらに工夫した矢印を設計するなど、チップの構造的な改良を加え、観察しやすく、カウント精度を向上させた DN チップを作り出すことができた。

また、1 分子検出率をさらに向上させるため、DN 内の流体が静止できるような疎水性ゲーティングの構築を試した。一般的なナノチャネル内に作成した疎水性ゲーティングの性能を評価したところ、DN チップ内でも流体の制御ができると十分に期待される結果が得られた。

さらに、DN チップの作製工程が複雑であり、また加工に用いる素材や装置が高価であるため、作製した DN チップの使用回数を 1 回だけではなく、繰り返し使用できる再生法が求められている。その為、6 段階熱化学的分解による再生工程を設計、評価して確立した (図 2)。一度使われた DN チップが再利用できるようになり、本研究のみならず、ナノ流体に関する研究の効率面及び経済面を促進した。この成果は、学術誌 *Lab on a Chip* に発表され、さらに裏表紙 (Issue 19, 2015) を飾った。

上述した取り組みにより DN の 1 分子検出の能力が向上させた。以上を踏まえ、DN 技術は全く新しい細胞計測技術として更なる展開を大変期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Yan Xu, Misato Shinomiya, Atsushi Harada, Soft Matter-Regulated Active Nanovalves Locally Self-Assembled in Femtoliter Nanofluidic Channels, *Advanced Materials*, 査読有, 2016, 28, 2209-2216 (doi:10.1002/adma.201505132)
- ② 許岩, リン脂質ポリマーハイドロゲルを用いた On-Chip 細胞保存, *色材協会誌*, 査読有, 2016, 89(5), 154-158, (doi:10.4011/shikizai.89.154)
- ③ 許岩, 原田敦史, ナノ流路で開閉可能な超微小スマートバルブフェムトリットル単位の液体を自在に制御, *化学*, 査読

- 無, 2016, 71 (7), 36-39
<http://www.kagakudojin.co.jp/kagaku/web-kagaku02/c07107/c07107-xu/index.html>
- ④ 許岩, 1兆分の1 mLの水を自在に制御できる技術, *自動車技術*, 査読無, 2016, 70 (9), 122-123
http://www.jsae.or.jp/e07pub/yearbook_e/2016/index.html
- ⑤ Yan Xu, Nobuhiro Matsumoto, Qian Wu, Yuji Shimatani, Hiroaki Kawata, Site-Specific Nanopatterning of Functional Metallic and Molecular Arbitrary Features in Nanofluidic Channels, *Lab on a Chip*, 査読有, 2015, 15, 1989-1993. (Featured on back cover)
(doi: 10.1039/C5LC00190K)
- ⑥ Yan Xu, Nobuhiro Matsumoto, Flexible and In-Situ Fabrication of Nanochannels with High Aspect Ratios and Nanopillar Arrays in Fused Silica Substrates Utilizing Focused Ion Beam, *RSC Advances*, 査読有, 2015, 5, 50638-50643.
(doi: 10.1039/C5RA06306J)
- ⑦ Yan Xu, Qian Wu, Yuji Shimatani, Koji Yamaguchi, Regeneration of Glass Nanofluidic Chips through a Multiple-Step Sequential Thermochemical Decomposition Process at High Temperatures, *Lab on a Chip*, 査読有, 2015, 15, 3856-3861. (Featured on back cover)
(doi:10.1039/C5LC00604J)
- ⑧ Yan Xu, Baihui Xu, An Integrated Glass Nanofluidic Device Enabling in situ Electrokinetic Probing of Water Confined in a Single Nanochannel under Pressure-Driven Flow Conditions, *Small*, 査読有, 2015, 11, 6165-6171. (VIP; featured on cover)
(doi:10.1002/sml.201502125)
- ⑨ Yan Xu, Kazuma Mawatari, Tomohiro Konno, Takehiko Kitamori, Kazuhiko Ishihara, Spontaneous Packaging and Hypothermic Storage of Mammalian Cells with a Cell-Membrane-Mimetic Polymer Hydrogel in a Microchip, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 査読有, 2015, 7, 23089-23097.
(doi:10.1021/acsami.5b06796)
- ⑩ Yiyang Dong, Yan Xu, Wei Yong, Xiaogang Chu, Daning Wang, Aptamer and its potential applications for food safety, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 査読有, 2014, 54, 1548-1561.
(doi:10.1080/10408398.2011.642905)
- ⑪ Yiyang Dong, Yan Xu, Zaixin Liu, Yuanfang Fu, Toshinori Ohashi, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori Determination of Cattle Foot-and-Mouth Disease Virus by micro-ELISA Method, *Analytical Science*, 査読有, 2014, 30, 359-363. (Hot Article)
(doi:10.2116/analsci.30.359)
- [学会発表] (計 34 件)
- ① 許岩, 超微量流体を制御す Nano-in-Nano 集積化技術を駆使したナノ化学システム, *JST オープンイノベーションフェア WEST2017 ~関西発 大学技術シーズ見本市~*, 2017/2/22-2/23, プリーゼプラザ (大阪府大阪市北区)
- ② Yan Xu, Beyond the Bare Nanochannels: Exploring the Possibilities of Nanofluidics through Nano-in-Nano Integration, *State Key Laboratory of Analog and Mixed-Signal VLSI (AMSV) Distinguished Lecture*, 2016/12/28, Macau University (Macau, China)
- ③ Yan Xu, Nanofluidic Nanoarrays for Single-Cell Omics with Single-Molecule Sensitivity, *The 10th Shenzhen Symposium on Biomedical and Health Engineering*, 2016/12/23-12/24, 深セン先院 (Shenzhen, China)
- ④ Yan Xu, Bridging World-to-Nanofluidics Interfaces through Nano-in-Nano Integration Technology, *27th 2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (MHS2016)*, 2016/11/28-11/30, 名古屋大学野依記念学術交流館 (愛知県名古屋市)
- ⑤ 藤本学都, 呉倩, 許岩, シラン化 MPC モノマーの蛋白質吸着抑制効果の評価とナノ流体デバイスへの応用, *日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016*, 2016/11/21-11/22, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑥ Yan Xu, Qian Wu, Antifouling surface Modification of Nanochannels Using a Silanized Phospholipid Monomer, *The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016)*, 2016/10/9-10/13, Convention Center Dublin (Dublin, Ireland)
- ⑦ 許岩, Nano-in-Nano 集積化技術を駆使したナノ化学システムの開発, *化学工学会関西支部 第4回技術シーズフォーラム*, 2016/10/7, 同志社大学室町キャンパス (京

都府京都市)

- ⑧ 中嶋太一、許岩、Nano-in-Nano 集積化技術を利用したナノチャンネル in-situ 温度測定、*日本分析化学会第 65 年会*、2016/9/14-9/16 北海道大学工学部 (北海道札幌市)
- ⑨ Yan Xu、Femtoliter-Scale Nanofluidic Analysis Enabled by Nano-in-Nano Integration Technology、*3rd Asian Symposium for Analytical Sciences (3rd ASAS)*、2016/9/14、北海道大学工学部(北海道札幌市)
- ⑩ Taichi Nakajima, Yan Xu、In-situ Measurement of Temperature in Nanochannels Utilizing Nano-in-nano Integration Technology、*RSC Tokyo International Conference 2016*”、2016/9/8-9/9、幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ⑪ 中嶋太一、許岩、Nano-in-Nano 集積化によるエネルギー変換デバイス創製への挑戦、*化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回研究会*、2016/9/7-9/9、幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ⑫ Yan Xu、Active Regulation of Femtoliter-scale Fluids in Nanochannel by Nano-in-Nano Technology、*The 6th International Multidisciplinary Conference on Optofluidics*、2016/7/24-7/27、Park Plaza Beijing Science Park (Beijing, China)
- ⑬ Yan Xu、Single Molecule Detection Using A Nanofluidic Nanoarray For Single Cell Omics.、*8th International Symposium on microchemisry and microsystems (ISMM2016)*、2016/5/31-6/1、Universiy of Hong Kong (Hong Kong, China)
- ⑭ 許岩、「Nano-in-Nano」超高精度ナノ集積化技術を駆使したデジタル化ナノチャンネル分析、*第 76 回分析化学討論*、2016/5/27-5/28、岐阜薬科大学 (岐阜県岐阜市)
- ⑮ Yan Xu、Fabrication of smart biointerfaces in nanochannels with a thiolatedtemperature-responsivepolymer.、*10th World Biomaterials Congress(WBC2016)*、2016/5/17-5/22、Montreal Convention Center (Motreal ,Canada)
- ⑯ 中嶋太一、許岩、超高精度ナノ集積化技術(Nano-in-nano 技術)を利用したナノ流路 in-situ 温度測定、*化学とマイクロ・ナノシステム学会第 33 回研究会*、2016/4/25-4/26、東京大学(東京都目黒区)
- ⑰ 孫佳儀、許岩、末吉健志、久本秀明、遠藤達郎、バイオセンサー応用を指向したフォトニック結晶導波路の設計・試作、*化学とマイクロ・ナノシステム学会第 32 回研究会*、2015/11/26-11/27、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑱ 藤本学都、許岩、デジタル化ナノチャンネルによるリガンド-受容体反応の 1 分子検出、*「化学とマイクロ・ナノシステム学会第 32 回研究会」*、2015/11/26-11/27、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- ⑲ 中嶋太一、許柏卉、許岩、ナノ流路における水のその場動的プロービング、*化学とマイクロ・ナノシステム学会第 32 回研究会*、2015/11/26-11/27、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- ⑳ 島谷雄士、許岩、ナノ流路を用いたナノ粒子のアレイ化、*「化学とマイクロ・ナノシステム学会第 32 回研究会」*、2015/11/26-2015/11/27、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ㉑ 呉倩、許岩、ナノ空間内タンパク質の非特異的吸着を抑制するための MPCSi モノマーの合成と評価、*日本バイオマテリアル学会*、2015/11/9-11/10、京都テルサ(京都府京都市)
- ㉒ Yan Xu、Site-specific working inside nanofluidic channels: general methodology, critical techniques, and nanobio applications.、*The 2nd FZU-OPU Joint International Symposium on Photocatalysis, Phot-functional Materials and Nano-Science & Technology*、2015/11/6、福州大学 (Fuzhou,China)
- ㉓ Yan Xu、Nanobio interfaces innovation enabling nanofluidics: general methodology, critical techniques, and nanobio applications.、*Lecture Series for the 100th Anniversary of the Birth of Lu Jiaxi*、2015/11/5、Fujian Institute of Research on the Structure of Matter,Chibese Academy of Sciences, (Fuzhou,China)
- ㉔ Yuji Shimatani, Yan Xu、Formation of Submicron Particle Arrays by Utilizing Nanowells in Nanochannels、*The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015)*、2015/10/25-10/29、Hwabaek International Convention Center(HICO) (Gyeongju, KOREA)

- ②⑤ Yuji Shimatani, Qian Wu, Koji Yamaguchi, Yan Xu, A Simple Regeneration Method for Glass Nanofluidic Chips by Utilizing a Thermochemical Decomposition Process, *RSC Tokyo International Conference 2015*, 2015/9/3-9/4、幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ②⑥ Yuji Shimatani, Yan Xu, Arraying of Nanoparticles in Nanochannels with Nanowells, *7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2015)*, 2015/6/8-6/10、京都大学桂キャンパス (京都府京都市)
- ②⑦ 許岩、マイクロ化学チップのお話し--髪の毛ほどの太さの流路を使って化学をする--、「未来の博士」育成ラボ・H27 年度開講式、2015/4/18、大阪府立大学 (大阪府堺市)
- ②⑧ 許岩、マイクロ・ナノ化学チップ技術の最前線、第 12 回 *NanoSquare* カフェ、2015/3/7、大阪府立大学 I-site なんば (大阪府大阪市浪速区)
- ②⑨ Yan Xu, Functionalization of Nanofluidic Channels and its Application to NanoBio Sciences, “Summit of Biomedical and Health Engineering (2015)”、2015/1/5、Shenzhen,(China)
- ③⑩ Yan Xu, Konno Tomohiro., Ishihara Kazuhiko., Kitamori Takehiro、A Phospholipid Polymer Hydrogel for On-Chip Cell-Based Applications in Flexible Working Conditions、第 24 回日本 MRS 年次大会、2014/12/10-12/12、横浜市開港記念館 (神奈川県横浜市)
- ③⑪ Shinomiya Misato, Harada Atsushi., Yan Xu, Design, synthesis and characterization of a thiolated temperature-responsive polymer for smart nanofluidic control、*"The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014)"*、2014/10/26-10/30、San Antonio (Texas,USA)
- ③⑫ Yan Xu, Xu Baihui., Kawata Hiroaki. Fabrication of Nanofluidic Chips with Nanoelectrodes Embedded into Nanochannels for Electrokinetic Measurements of Nanospace、*"The 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2014)"*、2014/7/30-8/1、Singapore (Singapore)
- ③⑬ 島谷雄士、許岩、ナノ流路内 1 分子検出信号を局所化する為のナノウェルアレイ

の作制、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 29 回研究会、2014/5/22-5/23、日本女子大学目白キャンパス桜楓 2 号館(東京都文京区)

- ③⑭ 許岩、マイクロ・ナノ界面の創製によるマイクロ・ナノ化学バイオシステムの研究(平成 25 年度化学とマイクロ・ナノシステム学会若手優秀賞 受賞講演)、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 29 回研究会、2014/5/22-/23、日本女子大学目白キャンパス桜楓 2 号館 (東京都文京区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：流路構造体および流路構造体の製造方法

発明者：許岩

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-101461 号

出願年月日：2014 年 5 月 15 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

ホームページ等

大阪府立大学・許研究室 HP

<http://www.chemeng.osakafu-u.ac.jp/group8/index.html>

許研究室 HP には本研究の最新の研究結果に関して随時発信しています。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

許岩 (XU, Yan)

大阪府立大学工学研究科・准教授

研究者番号：90593898