

**DNA シリコンナノポア通過過程及び
通過後挙動の光学的観察**

2015 年度

山 崎 洋 人

学位論文 博士（工学）

**DNA シリコンナノポア通過過程及び
通過後挙動の光学的観察**

2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

山崎 洋人

目次

第1章 序論

| | | |
|-------|---------------------------|----|
| 1.1 | はじめに | 1 |
| 1.2 | ナノポア | 1 |
| 1.2.1 | タンパク・ナノポア | 2 |
| 1.2.2 | ソリッドステート・ナノポア | 4 |
| 1.3 | 塩基配列読み取り方法 | 6 |
| 1.3.1 | イオン電流測定 | 6 |
| 1.3.2 | トンネル電流測定 | 7 |
| 1.3.3 | 光学的測定 | 8 |
| 1.3.4 | 読み取り方法の比較 | 9 |
| 1.4 | ナノポアシーケンサ開発における課題 | 10 |
| 1.5 | ナノポア通過前・後の DNA 挙動観察 | 12 |
| 1.6 | おわりに | 13 |

第2章 ナノポアにおける電解質溶液の流動特性と

DNA ナノポア通過特性の物理

| | | |
|-------|---------------------------|----|
| 2.1 | はじめに | 18 |
| 2.2 | ナノポアの流動特性 | 18 |
| 2.2.1 | ナノポアにおけるイオン輸送 | 18 |
| 2.2.2 | 表面電荷のないナノポアのコンダクタンス | 20 |
| 2.2.3 | 表面電荷の影響 | 21 |
| 2.2.4 | 表面電荷のあるナノポアのコンダクタンス | 22 |
| 2.3 | ナノポア近傍における DNA 挙動 | 23 |
| 2.3.1 | ナノポアへの DNA 捕捉過程 | 24 |
| 2.3.2 | ナノポア通過過程における DNA 挙動 | 28 |
| 2.4 | おわりに | 30 |

| | |
|--|----|
| 第 3 章 実験試料と方法 | |
| 3.1 はじめに..... | 32 |
| 3.2 DNA 試料..... | 32 |
| 3.3 ポーラスシリコン薄膜..... | 35 |
| 3.4 光学的 DNA ナノポア通過挙動観察装置..... | 38 |
| 3.5 データ解析..... | 39 |
| 3.6 ナノポアのイオン電流値測定..... | 40 |
| 3.7 DNA ナノポア通過挙動観察の実験手順..... | 41 |
| 3.8 おわりに..... | 42 |
| 第 4 章 シリコンナノポア界面における集光スポットの発生 | |
| 4.1 はじめに..... | 44 |
| 4.2 FDTD シミュレーション..... | 44 |
| 4.2.1 計算モデル..... | 45 |
| 4.2.2 ナノポア近傍における集光スポット..... | 46 |
| 4.3 集光スポットの実験的検証..... | 48 |
| 4.3.1 実験条件..... | 48 |
| 4.3.2 積算時間 0.5 ms における DNA ナノポア通過挙動観察..... | 48 |
| 4.3.3 積算時間 2 ms における DNA ナノポア通過挙動観察..... | 50 |
| 4.3.4 積算時間 0.5 ms と 2 ms における観察結果の比較..... | 52 |
| 4.4 おわりに..... | 52 |
| 第 5 章 時間分解フォトンカウンティングシステムの構築 | |
| 5.1 はじめに..... | 54 |
| 5.2 時間分解フォトンカウンティングシステムの概要..... | 55 |
| 5.3 時間分解フォトンカウンティングシステムの動作確認..... | 56 |
| 5.3.1 蛍光ビーズ観察..... | 56 |
| 5.3.1.1 実験方法..... | 56 |
| 5.3.1.2 実験結果..... | 57 |

| | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----|
| 5.3.2 | DNA ナノポア通過挙動観察..... | 59 |
| 5.3.2.1 | 実験方法..... | 59 |
| 5.3.2.2 | 実験結果..... | 59 |
| 5.4 | 蛍光強度波形の考察..... | 63 |
| 5.5 | おわりに..... | 66 |
| 第6章 ナノポア通過中と通過直後の DNA 挙動観察 | | |
| 6.1 | はじめに..... | 68 |
| 6.2 | 長さ 10 kbp の二本鎖 DNA ナノポア通過挙動観察..... | 68 |
| 6.2.1 | 実験方法..... | 69 |
| 6.2.2 | 実験結果..... | 69 |
| 6.3 | λ DNA(48 kbp)ナノポア通過挙動観察..... | 72 |
| 6.3.1 | DNA ナノポア通過挙動観察..... | 72 |
| 6.3.1.1 | 実験方法..... | 72 |
| 6.3.1.2 | 実験結果..... | 72 |
| 6.3.2 | 電場計算..... | 75 |
| 6.3.2.1 | 電場計算モデル..... | 75 |
| 6.3.2.2 | 電場計算結果..... | 76 |
| 6.4 | アルミナスパッタ膜を用いた DNA ナノポア通過挙動観察..... | 77 |
| 6.4.1 | FDTD シミュレーション..... | 77 |
| 6.4.1.1 | FDTD シミュレーション計算モデル..... | 77 |
| 6.4.1.2 | FDTD シミュレーション計算結果..... | 78 |
| 6.4.2 | DNA ナノポア通過挙動観察..... | 79 |
| 6.4.2.1 | 実験方法..... | 79 |
| 6.4.2.2 | 実験結果..... | 79 |
| 6.4.3 | 電場計算..... | 81 |
| 6.4.3.1 | 電場計算モデル..... | 81 |
| 6.4.3.2 | 電場計算結果 (膜厚と空孔率の影響)..... | 82 |

| | |
|--|-----|
| 6.4.3.3 電場計算結果 (2 種類の薄膜の比較) | 85 |
| 6.5 おわりに..... | 87 |
| 第 7 章 結論 | |
| 7.1 はじめに..... | 89 |
| 7.2 ナノポアにおける電解質溶液の流動特性と DNA ナノポア通過特性の物理 (第 2 章) | 89 |
| 7.3 実験試料と方法 (第 3 章) | 89 |
| 7.4 シリコンナノポア界面における集光スポットの発生 (第 4 章) | 90 |
| 7.5 時間分解フォトンカウンティングシステムの構築 (第 5 章) | 90 |
| 7.6 ナノポア通過中と通過直後の DNA 挙動観察 (第 6 章) | 90 |
| 7.7 おわりに..... | 91 |
| 7.8 今後の展望..... | 91 |
| 付録..... | 95 |
| 論文目録 | 113 |
| 謝辞..... | 116 |

1. 序論

1.1 はじめに

DNA の塩基配列識別は、分子レベルでの有機物の遺伝的な差異を理解する上で、重要な手法である。近年では、2003 年の全ヒトゲノム解読 (The Human Genome Project: HGP) の完了に伴い、癌などの人の生命に関わるような疾患をこの塩基配列識別から治療を行うテーラーメイド治療に期待が寄せられている¹。しかしながら、現在の DNA シーケンサは、30 億塩基から構成される全ヒトゲノムを解析に要する解析時間とコストが医療現場において実用的な水準を満たしていないことが課題とされている^{2,3}。この社会的な需要と現在の DNA シーケンサの性能との格差を埋めるために、米国立ヒトゲノム研究所 (National Human Genome Research Institute :NHGRI) は、“Advanced Sequencing Technology Awards” という研究プログラムを設けた。この研究プログラムでは、全ヒトゲノムの解読にかかる費用を 1000 ドルまでコストダウンすることを目標に掲げ、数千万ドルもの研究助成金を投じた⁴。この研究助成金に採択された課題のうち、重点的に助成金を投じられたのがナノポアシーケンサ技術開発に関する課題である。ナノポアシーケンサは、一本の DNA 鎖から塩基配列の読み取りができることから、従来の DNA シーケンサでは必要不可欠であったポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) で生じるエラーを取り除くことができる点、PCR 酵素が不要になる点やキロベース長のロングリードの読み取りが可能である点が特徴である⁵。したがって、ナノポアシーケンサの実現は、DNA シーケンサ技術においてパラダイムシフトを引き起こす可能性を大いに秘めている。

1.2 ナノポア

ナノポアはナノ薄膜上に形成されたナノサイズの孔のことをいう。電気泳動力などの外力を受けると、DNA はこの数分子程度の大きさに相当する孔に一塩基ずつ配列順に通すことができる⁶。このナノポアの特徴を利用することで、DNA の塩基配列解析が 1 分子レベルで可能となる^{7,8}。これまでに、ナノポアを用いて DNA の塩基配列を読み取る技術として、イオン電流測定、トンネル電流測定、光学的測定が提案されている。これらの技術は、1.3 にて紹介する

このナノポアシーケンサの概念は、カリフォルニア大学サンタクルーズ校の Davis Deamer によって提唱された⁹。この概念の実現性は、7 年後の 1996 年に Kasiwanowicz らのイオン電流測定結果によって証明された¹⁰。彼らは、DNA がナノポア通過する際に生じるイオン電流の遮蔽時間が DNA の長さに依存するこ

とから、コイル状の DNA が膜タンパク質である α -ヘモリジンを直線かつ塩基配列順に通ることを明らかにした。この研究成果は、遮蔽電流から塩基配列が読み取れることを初めて示唆した報告であった。この報告に伴い、2000 年初頭までは、タンパク・ナノポアを用いた研究が多く行われてきたが、近年、実験環境に対する高い耐久性を有し、かつ、多機能化できることから、ソリッドステート・ナノポアが注目されている。これら 2 種類のナノポアについて、次項にて紹介する。

1.2.1 タンパク・ナノポア

タンパク・ナノポアは、脂質二重膜に担持されたバレルの構造を呈するタンパク質である。このタンパク・ナノポアは、単一分子 DNA の解析において、以下のような有利な特徴を有する。

- ① トップダウン型微細加工技術では困難であった、サブナノメートルスケールの微細構造をタンパク質合成から高い再現性をもって作製が可能である。
- ② X 線結晶構造解析法から、タンパク・ナノポアの立体構造を原子レベルで明らかにすることができる。
- ③ 部位特異的突然変異誘発法によって変異させることで、タンパク・ナノポアの物理・化学的性質を改良できる。
- ④ 分子レベルの空間分解能を有する構造物の作製において、タンパク・ナノポアの不均質な立体構造が有用である。

タンパク・ナノポアのうち、1 分子 DNA 解析技術に向けて主に利用されているものは、 α -ヘモリジンと MspA である。

α -ヘモリジン

α -ヘモリジン (α -Hemolysin: α -HL) は、最も一般的に 1 分子 DNA 解析技術に利用されているタンパク・ナノポアである (Figure 1.1 A)。 α -ヘモリジンは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来の孔形毒素のタンパク質であり、その分子量は 232.4 kDa である。このタンパク質は、マッシュルーム形状の 7 量体からなる膜透過チャネルを形成する。 α -ヘモリジンの外径および高さは、ともに 10 nm である。 α -ヘモリジン内の膜透過チャネルは、キャップ部分の内径が 3.6 nm、 β バレル部分の内径が 2.6 nm と 2 段構造を呈する¹²。キャップと β バレルの境界において、内径 1.4 nm の原子レベルでの隆起構造が形成されており、これが 1 本鎖 DNA の直径と同程度の大きさである。

MspA

Mycobacterium smegmatisporin A (MspA) は、スメグマ菌由来のタンパク質である (Figure 1.1 B)。MspA は、円錐台状の構造をした八量体からなる膜透過チャネルを形成する。MspA の大きさは外径 8.8 nm、高さ 9.6 nm であり、MspA 内の膜透過チャネルの内径が 4.8 nm である。膜透過チャネルの底部において、2 種類のアミノ酸 (D90, D91) の隆起構造が単一分子の大きさに相当する高さ 0.6 nm と内径 1.3 nm の立体構造を形成する。この高さ 0.6 nm の立体構造が α -ヘモリシン以上の空間分解能を実現する¹³。空間分解能に加えて、MspA は、その他のタンパク・ナノポアと比べて高い溶媒安定性を示し、pH 0~14 の溶媒、また、100°Cに 30 分間そのタンパク・ナノポアとしての性能を維持できる¹⁴。

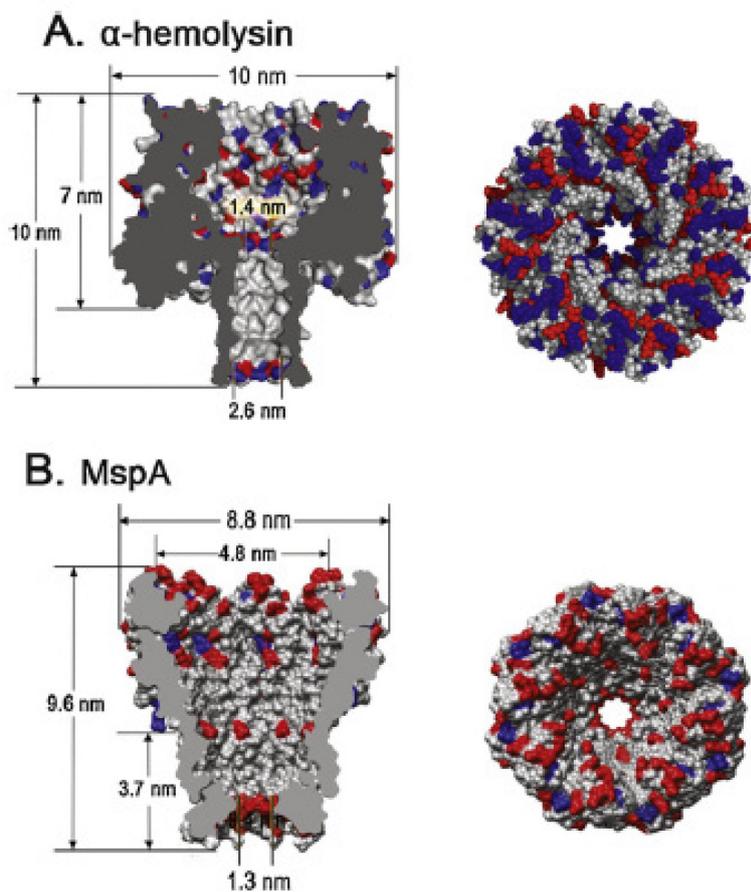


Figure 1.1 タンパク・ナノポア A. α -Hemolysin, B. MspA¹¹

Reprinted with permission from *Nano Today* 8, 56 (2013).

Copyright 2016, Elsevier.

先行研究では、タンパク・ナノポアを使うことで、DNA の塩基配列を高精度で識別することに成功しているが、単一 DNA 解析において、不利な特徴も存在する。まず、タンパク・ナノポアが担持されている脂質二重膜の力学的強度が低いことが挙げられる。2つめに、タンパク・ナノポアが自身の構造や物理・化学的性質を保つために、塩濃度や pH といった溶媒条件に制約があることが挙げられる。最後に、タンパク・ナノポアは、膜タンパク質の拡散運動を利用して脂質二重膜上に埋め込むことで作製されるため、高スループットの測定において必要不可欠なアレイ化が困難であることが挙げられる。

1.2.2 ソリッドステート・ナノポア

ソリッドステート・ナノポアは、安定的かつ耐久性の高い測定を実現するナノポアとして期待されている。このソリッドステート・ナノポアは、以下のような点でタンパク・ナノポアよりも優れて特徴をもつ。

- ①ナノポアの形や孔径をナノスケール大きさに制御が可能である¹⁵。
- ②トップダウン式の加工を行うことでアレイ化が可能である。
- ③高い力学的強度、化学的、熱的、電気的耐性を有し、再利用が可能である¹⁶。
- ④ナノ構造を機能化することで、光学的・電気的検出が可能である¹⁷。

ソリッドステート・ナノポアとして、一般的に使用されている材料は、窒化シリコン・ SiO_2 ・ SiC ・酸化アルミニウム・グラフェンである¹⁸⁻²²。これらの材料のうち、高い抵抗率 ($10^{16}\Omega \cdot \text{cm}$) と高い絶縁耐力 (10 MV/cm) を有する窒化シリコンが最も一般的に使用されている²⁵。イオン電流測定において、ギガオームスケールを有する窒化シリコンは、pA オーダーの微弱なイオン電流検出を可能にする。更に、窒化シリコンは、高い化学的安定性を示すことから、幅広い溶媒条件下での測定も可能にする。

初めて、ソリッドステート・ナノポアをナノ薄膜上に作製することに成功したのは、ハーバード大学の Golovchenko グループである²³。Golovchenko グループの手法では、反応性イオンエッチングよりボウル状の窪みを窒化シリコンナノ薄膜の片側に作製し、もう一方からアルゴンイオンを窒化シリコンナノ薄膜上に広範囲に照射する。このアルゴンイオン照射を窒化シリコンナノ薄膜の表面がボウル状の窪みに到達するまで行うことで、ナノポアが作製される。ボウル状の窪みからナノポアが開孔するに従い、ディテクターに検出されるアルゴンイオンの量が増加するため、これをモニタリングすることで、ナノポアの大きさを調整する。この手法を用いることで、Golovchenko グループは、直径 60 nm 以下のナノポアの作製に成功している。また、アルゴンイオンを照射する以外にも、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscopy: TEM) の電子線を集

束することで、ナノメートルの精度でナノポアを作製する手法が提案されており、現在では、これが一般的な手法として用いられている¹⁵。この手法は、まず約 50 nm のナノポアをナノ薄膜に作製し、 $10^5 \sim 10^7$ A/m² オーダーの集束電子線を広範囲に照射する。この集束電子線照射により、ナノポア周囲の材質が融解し、ナノポアが収縮する。収縮速度を 1 分間に数ナノメートルに調整することで、ナノポア孔径の制御を可能にする。デルフト工科大学の Dekker グループでは、この手法を用いて、直径 40 nm のナノポアを 2 nm まで収縮させることに成功している¹⁸。

イオン電流測定において、ナノポアの深さが空間分解能に大きく反映することから、DNA の塩基配列読み取りにおいて、薄膜の厚みを数ナノメートルにする必要がある。このような背景のもと、1 分子の厚さまでの薄膜化方法として、グラフェンナノポアが提案されている²¹。しかし、グラフェンにイオンが吸着するために、グラフェンナノポアは、高い電流ノイズを示すことが、この技術の開発の大きな障壁となっている。

Table 1.1 にこれまでに報告されているソリッドステート・ナノポアの構造と特徴を比較した表を示す。ナノポア作製では、主に TEM と集束イオンビーム (Focused Ion Beam: FIB) が利用されている。これらの方法に加え、窒化シリコンでは、高い電圧印加時に生じる絶縁破壊を利用して、ナノポアを作製できる。窒化シリコンとシリコンのナノポア深さは 1.4 nm まで作成できるが、塩基間隔である 0.34 nm までの薄膜化には成功していない。微細構造の作製において、窒化シリコン・シリコン・グラフェンにおいて、プラズモン構造が作製されている。加えて、窒化シリコンでは、ナノ電極やゼロモード導波路の作製にも成功している。

Table1.1 ソリッドステート・ナノポアの構造と特徴の比較

| | 材料 | ナノポア作製方法 | 孔径 | 深さ | 微細構造の作製 | 特徴 | 参考文献 |
|-----------|-----------|-------------------|------|----------|-----------------------------|--|------------------|
| シリコン系ナノポア | 窒化シリコン | FIB/ TEM/ 絶縁破壊 | ~数nm | ~1.4 nm | ナノ電極 ゼロモード導波路 プラズモン構造 | 最も機械・化学・熱・ 電氣的安定性を示す。 | 15, 17, 23-26 |
| | 酸化シリコン | FIB/ TEM | ~数nm | ~10 nm | 実例なし | 容易に入手できる。 安価である。 | 18, 27 |
| | シリコン | FIB/ TEM | ~数nm | ~1.4 nm | プラズモン構造 | | 28, 29 |
| アルミナ系ナノポア | アルミナ | TEM | ~数nm | ~20 nm | 実例なし | DNAナノポア通過 速度が低減する。 DNA捕捉頻度が 高くなる。 | 16, 20 |
| | アルミナ+シリコン | FIB/ TEM | ~数nm | ~30 nm | 実例なし | | 30, 31 |
| 単層ナノポア | グラフェン | TEM | ~数nm | ~0.34 nm | プラズモン構造 | 塩基間隔0.34 nm までの薄膜化が 可能である。 | 21, 32 |

1.3 塩基配列読み取り方法

1.3.1 イオン電流測定

DNA 塩基配列読み取り法として、最も一般的にイオン電流測定が利用されている。Figure 1.2 に示すように、イオン電流測定は、ナノ薄膜を介して分けられる 2 つの浴槽に電極を挿入した機構で構成されるコルターカウンターを用いる³³。この機構に対して、電圧を印加すると、イオン電流が生じ、この値はナノポアを流れるイオン数に相当する。このとき、DNA がナノポアを通過すると、DNA がイオンの流れを遮蔽するため、イオン電流値が減少する³⁴。イオン電流値の減少量と減少時間がナノポアを通過する DNA 構造の情報を含むため、この 2 つのパラメータを解析することで塩基配列を読み取ることができる³⁵。

これまでに、イオン電流測定を用いた塩基配列識別の原理は、 α -ヘモリシンと MspA のタンパク・ナノポアを用いて、実証されている^{36,37}。今日では、Oxford Nanopore Technologies 社が α -ヘモリシンを利用したナノポアシーケンサ (MinION) を開発し、MinION Access Program (MAP) という早期利用プログラムを開始して、幅広い分野の研究者が MinION の性能を評価している³⁸⁻⁴⁰。MAP を利用している研究者によると、MinION は平均リード長が 2~3 kbp、最大リード長が 98 kbp と長いリード長が読めるが、40 %程度の高いエラー率を示すことが課題として報告されている⁴⁰。さらに、Genia 社や Stratos Genomics 社もイオン電流を用いたナノポアシーケンサの開発を行っており、Oxford Nanopore Technologies 社以外のナノポアシーケンサのリリースが今後期待されている。

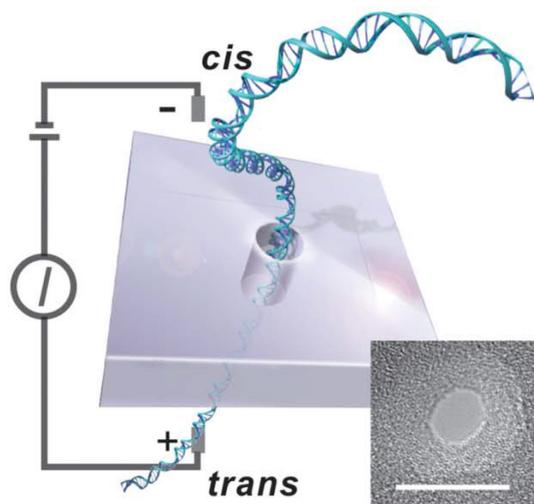


Figure 1.2 イオン電流測定概念図³⁴

Reprinted with permission from *Sci. Rep.* **3**, 1389 (2013).

Copyright 2016, Nature Publishing Group.

1.3.2 トンネル電流測定

トンネル電流測定は、量子力学的な現象であるトンネル電流を用いて、塩基配列の読み取りを行う。Figure 1.3 のように、数ナノメートルで隔たれた2つのナノギャップ電極がナノポア上に併設された構造に電圧を印加すると、電子が一方の電極から他方へ移動し、印加電圧と電極間距離に依存したトンネル電流が生じる。このトンネル電流値は、ナノギャップ電極間に存在する分子の大きさ・分子構造・配向に依存することから、ナノギャップ電極間を横断するDNAの塩基配列識別が可能となる^{41,42}。走査型トンネル顕微鏡の金属探針の作製技術（ブレイクジャンクション法）を用いることで、トンネル電流測定は、イオン電流測定では困難とされているサブナノメートルの空間分解能を実現する。

トンネル電流測定を用いたDNA塩基配列識別の理論実証は、大阪大学の川合グループにて報告されている⁴²。先行研究では、ヌクレオチドを超純水中に分散させ、0.75 V を印加した条件下において、4種類のヌクレオチドのうちシトシン・グアノシン・チミンの3種類の識別に成功している。更に、トンネル電流測定を用いると、DNAのナノギャップ電極間の通過速度が低減する作用やDNAの二次構造を解く作用があることも報告されている。トンネル電流測定を用いたDNAシーケンサの実用化には、ナノギャップ電極間に存在するDNAの熱揺らぎによって生じるトンネル電流の変動を低減させる必要がある。

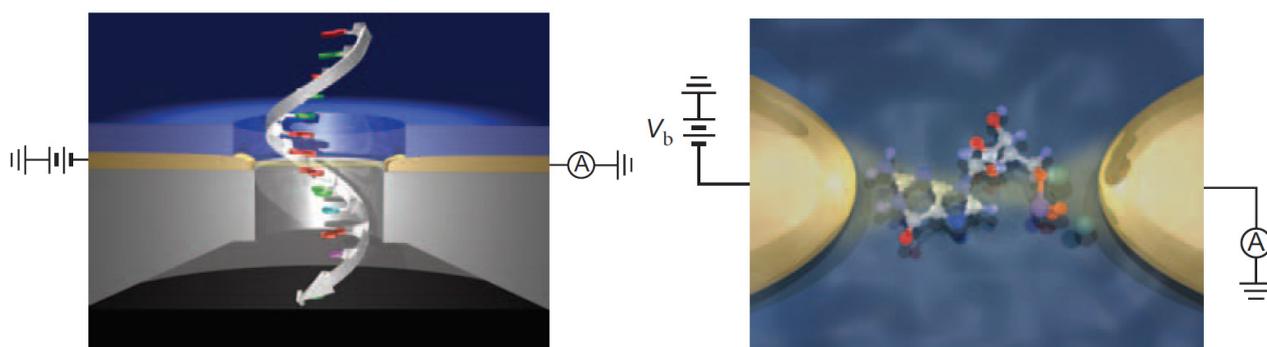


Figure 1.3 トンネル電流測定概念図⁴³

Reprinted with permission from *Nat. Nanotechnol.* **5**, 296 (2010).

Copyright 2016, Nature Publishing Group.

1.3.3 光学的測定

光学的測定は、サンガー法などの従来の DNA シーケンサと同様に蛍光プローブを用いて、塩基配列を読み取る方法である。この測定方法は、ボストン大学の Meller グループによって、考案されている⁴⁴。Meller グループの測定方法では、被験 DNA の 4 種類のヌクレオチドを 2 種類の蛍光分子で標識化した DNA を用いる。まず、それぞれのヌクレオチドは 2 種類の長さ 12-mer オリゴヌクレオチドに変換される。2 種類のオリゴヌクレオチドで構成される配列は、例えば、オリゴヌクレオチドを 0 と 1 で定義すると、アデニン・グアニン・チミン・シトシンはそれぞれ 11・10・01・00 と標識化することができる。この方式に従うと、AGATTCGATA の 10 塩基配列は、11-10-11-01-01-00-10-11-01-11 というバイナリコードの配列に変換される。被験 DNA を変換した後、蛍光分子と消光分子を有する分子標識とハイブリダイゼーションする。このハイブリダイゼーションの結果、分子標識は一行に配列されるため、変換された DNA は低バックグラウンドで蛍光発光する。光学的測定では、変換された DNA を 3 nm 以下のナノポアに引き込み、ハイブリダイゼーションした分子標識を 1 分子ずつ引きはがす。この引きはがす過程において、変換された DNA は、ナノポア近傍に留められるため、EM-CCD で観察可能な ms スケールの蛍光発光が生じる。更に、全反射照明蛍光顕微鏡を用いて、ナノポア近傍にエバネッセント光を発生させることで、観察対象以外の蛍光発光を抑え、高い SN 比で単一蛍光分子からの蛍光発光の観察を可能にする。

Meller グループが考案した光学的測定は、その他のナノポアシーケンサと比べて、下記のような長所を有する。まず、蛍光波長によって標識化された 4 種類の塩基は、高い SN 比のシグナルとして検出できる。次に、引きはがす過程において、DNA のナノポア通過速度の低減が望める。更に、それぞれ分子標識の時間間隔は、オリゴヌクレオチドの長さで制御できる。最後に、EM-CCD を用いた光学的な検出は、並列測定が可能のため、高いスループットに期待できる。しかしながら、光学的測定を用いたナノポアシーケンサの実用化には、いくつかの課題が予想される。第一に、DNA の変換過程において、余分な化学的操作が必要であるため、測定の長時間化やエラー率の低下に繋がる。第二に、直径 3 nm 以下のナノポアアレイ作製が困難である。この課題には、一度に無数のナノポアを薄膜一面に作製できるポーラスシリコン薄膜の利用が改善策として挙げられる。

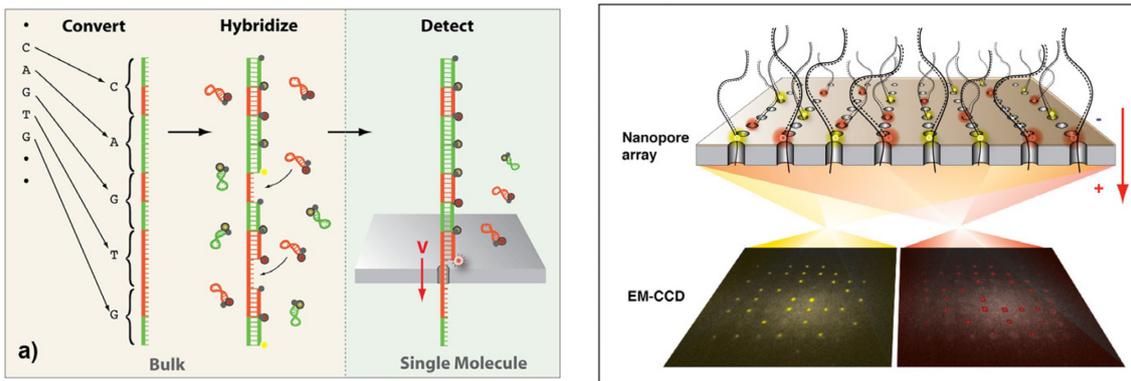


Figure 1.4 光学的測定の概念図⁴⁴

Reprinted with permission from *Nano Lett.* **10**, 2237 (2010).

Copyright 2016, American Chemical Society.

Table 1.2 ナノポア技術における測定方法の比較

| | 読取分解能 | 読取速度 | リード長 | 蛍光修飾 | 参考文献 |
|----------|-------------------------|-----------|----------|------|------------|
| イオン電流測定 | 4塩基 (MspA) | 1-100塩基/秒 | ~98000塩基 | 不要 | 40, 45, 46 |
| | ~5塩基 (α -ヘモリシン) | | | 不要 | 37, 47, 48 |
| トンネル電流測定 | 1塩基 | 200塩基/秒 | 7塩基 | 不要 | 43, 49 |
| 光学的測定 | 1塩基 | 25塩基/秒 | 7塩基 | 必要 | 44, 50 |

1.3.4 読み取り方法の比較

先行研究報告を基に、Table 1.2 に上述した塩基配列読み取りを実証した測定方法をまとめた。イオン電流測定において、タンパク・ナノポアである MspA と α -ヘモリシンを利用した時の読取分解能のは、熱ゆらぎが存在するために、それぞれ 4 塩基と 5 塩基と報告されている^{45,47}。そのため、読取分解能が 1 塩基に達していないが、先行研究では、イオン電流波形を解析するアルゴリズムを構築することで、塩基配列の読み取りを可能にしている⁴⁸。一方、トンネル電流測定と光学的測定では、サブナノメートルのナノギャップ電極作製や単一蛍光分子の蛍光発光検出を実現したことで、1 塩基の読み取りを可能としている^{43,49}。ヒトゲノムシーケンシングを行う場合、Table 1.2 に示した読取速度では、1 週間以上の時間を要するため、目標解析時間の 8 時間に到達するには、並列測定 (ナノポアのアレイ化) が必要とされる⁵¹。イオン電流測定では、リード長が 10 万塩基であるのに対して、トンネル電流測定と光学的測定では 7 塩基と非常に短い。このことから、これら 2 種類の測定方法は、装置開発として初期段階であることが見受けられる。

1.4 ナノポアシーケンサ開発における課題

ナノポアシーケンサの原理検証は上述のような手法で行われてきたが、この実用化には以下のような課題が存在する。

- ①測定装置の時間分解能を上回ることから、DNA ナノポア通過の低速度化と安定化が求められている⁵¹⁻⁵⁹。(装置の時間分解能：~10 μ s、ナノポア通過速度：20 nt/ μ s)
- ②1回の解析に求められるDNA ナノポア通過測定の回数を少なくするために、ナノポア通過速度分布を狭める必要がある^{53,60,61}。
- ③aM以下のDNA濃度において塩基配列の読み取りを行うために、DNA捕捉頻度を高めなければならない⁶²。
- ④長時間測定を実現するために、DNAのナノポアへの詰まりを抑えなければならない⁶³。

上述の課題を解決する最適な測定条件や測定機構を模索するために、DNA ナノポア通過メカニズムが研究されている。この研究課題の取り組みとして、大きく分けて理論的・実験的アプローチがある (Table 1.3)。理論的アプローチでは、分子動力学法、モンテカルロ法によるDNA ナノポア通過の分子シミュレーション結果を基に、DNAの長さ、粘性抵抗力、ナノポア通過時のDNAに加わる駆動力とナノポア通過時間の関係やDNAの長さやナノポア通過前後のDNAコイルの大きさの関係について研究されている⁶⁴⁻⁷⁰。また、理論モデル計算では、ナノポア通過前後のDNAの大きさやナノポア内外のDNAに掛かる駆動力について研究されている^{71,72}。一方、実験的アプローチでは、イオン電流測定や光学的測定を用いて、ナノポア通過速度・DNA捕捉頻度のDNA長さ依存性・印加電圧依存性やDNAのナノポアへの詰まり、ナノポア近傍におけるDNA電気泳動移動度について研究されている^{27,62,73-79}。

Table 1.3 DNA ナノポア通過メカニズムの研究

| | 解析方法・測定方法 | 比較対象 | 研究対象 | 参考文献 |
|----------|-----------|-------------------|-------------------------------------|------------------|
| 理論的アプローチ | 分子動力学法 | DNAの長さ | DNAコイルの大きさ | 64, 65 |
| | | DNAの長さ 駆動力 | ナノポア通過時間 | 66, 67 |
| | モンテカルロ法 | ナノポアの深さ 粘性抵抗力 | | 68-70 |
| | 理論モデル計算 | 通過前・後、 ナノポア内・外 | DNAコイルの大きさ 駆動力 | 71, 72 |
| 実験的アプローチ | イオン電流測定 | 印加電圧 DNAの長さ | DNA捕捉頻度 ナノポア通過時間 電気泳動移動度 | 27, 62, 73-75 |
| | 光学測定 | 印加電圧 | ナノポア近傍の電場強度分布 DNA捕捉頻度 電気泳動移動度 | 76-78 |
| | | - | DNAのナノポアへの詰まり | 79 |

上述の①の課題ために塩基配列自体が読み取れないことから、DNA ナノポア通過メカニズムの研究において、DNA ナノポア通過速度に関わる研究が重点的に行われている³⁶。例えば、理論モデル計算において、Leiらは、ナノポア内と cis, trans チャンバー内の DNA に分けて、実験値を基に理論式から、DNA に掛かる詳細な駆動力を見積もっている⁷²。一般的に、溶媒中をコイル状で漂う DNA は、自身のコイル構造を崩して、ナノポアを通過して、cis チャンバーから trans チャンバーへ移動する。ナノポア通過時において、ナノポアを通過した直後の DNA は再びコイル構造を形成するため、Figure 1.5 に示すようなダンベル状の形態をとる。Figure 1.5 の DNA 形態において、DNA に加わる駆動力は、電氣的駆動力、粘性抵抗カ、ナノポア近傍における DNA コイルの uncoiling/recoiling に由来するエントロピーカに分類される⁷²。 F_e^* 、 F_d^* は、ナノポア内の DNA に加わる電氣的駆動力、粘性抵抗カである。また、 F_{blob1}^* 、 F_{blob2}^* 、 F_u^* 、 F_r^* は、それぞれ cis、trans チャンバー内に滞在する DNA コイルの粘性抵抗カとエントロピーカである。印加電圧 120 mV において、16.5 kbp の二本鎖 DNA に加わる駆動力の計算結果を Table 1.4 にまとめた。ナノポア内の DNA に加わる電氣的駆動力 F_e^* は、100 pN 程度であるのに対して、cis、trans チャンバー内に滞在する DNA コイルに加わるエントロピーカと粘性抵抗カは 2 桁以上小さい。このことから、彼らは、同程度の力が働くナノポア内の DNA に加わる粘性抵抗カ F_d^* と電氣的駆動力 F_e^* が、ナノポア通過速度に寄与する駆動力と結論づけている。

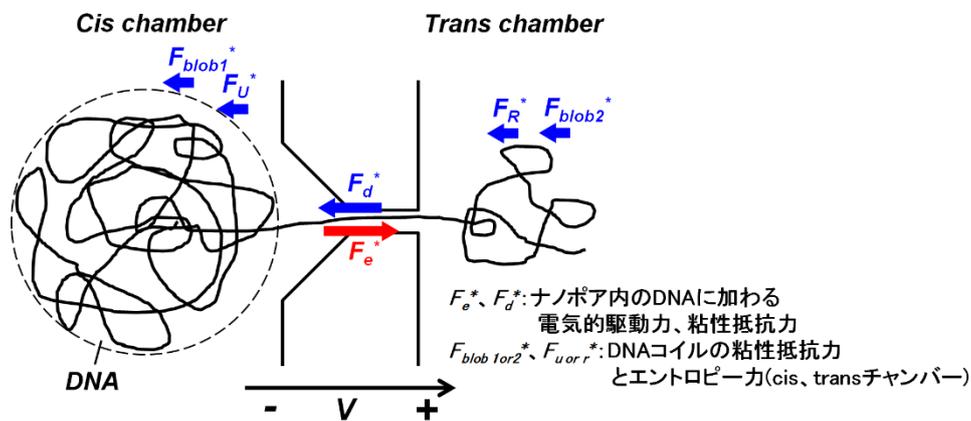


Figure 1.5 ナノポア通過過程における DNA に加わる駆動力

Table 1.4 DNA に加わる駆動力の理論計算値⁷²

| Force | Magnitude |
|--------------------|-----------|
| F_u^* [80] | ~0.01 pN |
| F_u^* [81] | 0.67 pN |
| F_u^* [82] | 1.9 pN |
| F_r^* [83] | 0.083 pN |
| F_{blob1}^* [27] | 7.86 pN |
| F_{blob2}^* | ~0.1 pN |
| F_e^* | 113 pN |
| F_d^* | 83.5 pN |

しかしながら、Table 1.4 に示す理論計算では、電場がナノポア内に集中することから、ナノポア周囲の電場強度を考慮していない。そのため、これまでに cis、trans チャンバー内に滞在する DNA コイルに加わる電氣的駆動力やこの駆動力に伴うエントロピー力や粘性抵抗力について議論されていない。Figure 1.5 の DNA モデルに対して、電氣的駆動力を計算すると、印加電圧 120 mV において、cis、trans チャンバー内の DNA コイルに加わる電氣的駆動力はそれぞれ 60 pN と 41 pN と概算される。一方、ナノポア内の長さ 30 bp の DNA に加わる電氣的駆動力は、80 pN と概算される。計算条件は、膜厚 20 nm の作製された孔径 10 nm のナノポアを長さ 5 kbp の二本鎖 DNA が一直線に通過するモデルを採用した。このモデルにおいて、ナノポア内の二本鎖 DNA は長さ 30 bp、また、trans、cis チャンバー側の DNA コイルはそれぞれ長さ 3 kbp、1 kbp である。ナノポア内の DNA と cis、trans チャンバー内の DNA に同程度の電気駆動力が加わると概算されることから、ナノポア近傍の DNA コイルに加わる電気駆動力がナノポア通過速度に影響することが考えられる。したがって、DNA ナノポア通過速度の低速化と安定化を実現する上で、ナノポア通過直前・直後の DNA コイル状態やそれに依存したドリフト運動と拡散との競合を明らかにする必要がある。

1.5 ナノポア通過前・後の DNA 挙動観察

ナノポア通過前・後の DNA 挙動観察を行った事例は、いくつか報告されている。研究報告を Table 1.5 にまとめる。イオン電流測定を用いた実験では、Langecker らは、2 つのナノポアを直列配置させた流路を作製し、2 つのナノポアを単一 DNA が連続的に通過する際に生じるイオン電流値変化を観察することで、ナノポア近傍における DNA 電気泳動移動度を明らかにした⁷⁴。一方、光学的測定を用いた実験では、Ando らは、DNA がナノポアへ引き寄せられる様子を蛍光顕微鏡で観察し、ナノポア周囲における DNA 電気泳動速度を見積もることで、ナノポアから離れるに従い電場が減衰する様子をとらえることに成功した⁷⁸。

ナノポア通過直前・直後の DNA コイルの観察には、長さ数から数十 kbp の DNA ナノポア通過時間が典型的に数百 μs から数 ms であること、また長さ 48 kbp DNA コイルの大きさは、バルク溶媒中において 1 μm 程度であることから、ms 以下の時間分解能かつ、 μm 以下の空間分解能が求められる。しかしながら、Table 1.5 に示す研究報告から分かるように、ナノポア通過直前・直後における DNA コイル観察に必要とされる時間領域・空間領域を観察する方法は実現されていない^{54,55}。

Table 1.5 ナノポア通過前・後の DNA 挙動に関する研究

| 測定方法 | 実験方法 | 観察領域 | 時間分解能 | 参考文献 |
|-------------------|-----------------------------|--|-----------------------|------|
| イオン電流測定 | 2つの直接に配置されたナノポア間の移動時間を測定 | 1.5 μm (ナノ流路間の距離) | $\sim 10 \mu\text{s}$ | 74 |
| | ナノポア通過後のDNAが再び捕捉されるまでの時間を測定 | 1.2 μm ($V=120 \text{ mV}$ における6kbpのDNA捕捉有効距離) | $\sim 10 \mu\text{s}$ | 75 |
| 光学的測定 +イオン電流測定 | ナノポア通過後のDNAドリフト運動を蛍光観察 | 15 μm | 2 ms | 76 |
| 光学的測定 | レーザースキャンでDNAナノポア通過軌跡を蛍光観察 | 30 μm | 25 ms | 77 |
| | DNAがナノポアに捕捉される様子を蛍光観察 | 10~20 μm | 40 ms | 78 |

1.6 おわりに

このような背景のもと本論文では、レーザーの集光スポットがナノポア近傍において $1 \mu\text{m}$ 以下に空間分布することに着目して、これの観察に有効な 100 nm 、 $100 \mu\text{s}$ の空間・時間分解能を有する光学的観察手法を構築し、DNA ナノポア通過挙動の観察を行う (Figure 1.6)。光学的観察手法の構築するために、次の2点に求められる。第一に、背景光を抑えつつ、空間分解能 100 nm の集光スポットをナノポア上に形成させる必要がある。第二に、 $100 \mu\text{s}$ の時間分解能で高感度な蛍光観察を行う必要がある。第一の要求を満たすために、本研究では、薄膜の材料としてシリコン、励起光として紫外光を選定し、シリコンの紫外光に対する高い遮光性を利用する。また、第二の要求を満たすために、本研究では、高時間分解能を有するフォトンカウンティングシステムを構築する。

本論文の構成は、次のようになっている。第2章では、本論文に関連する原理について述べる。第3章では、本論文で用いた蛍光標識DNA、ポーラスシリコン薄膜、実験装置と実験方法について述べる。第4章では、高空間分解能・高S/N観察を実現するための集光スポットの形成方法について述べる。第5章では、本研究で新たに構築した時間分解フォトンカウンティングシステムと検出波形の解釈について述べる。第6章では、ナノポア通過波形のDNA長、印加電圧、膜特性依存性を測定し、ナノポア近傍の電場に起因するDNA通過挙動を議論した結果について述べる。第7章では、本研究を総括し、今後の展望について述べる。

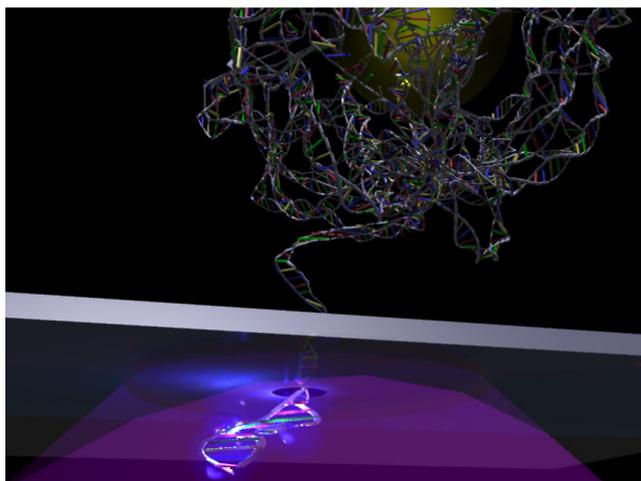


Figure 1.6 本研究法の概念図

参考文献

1. International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **431**, 931 (2004).
2. M. Garay, *Pers. Med.* **11**, 523 (2014).
3. K. V. Voelkerding, S. A. Dames, and J. D. Durtschi, *Clin. Chem.* **55**, 641 (2009).
4. E. C. Hayden, *Nature* **507**, 294 (2014).
5. L. J. Steinbock and A. Radenovic, *Nanotechol.* **26**, 074003 (2015).
6. D. W. Deamer and M. Arkeson, *Trends Biotechnol.* **18**, 147 (2000).
7. B. M. Venkatesan and R. Bashir, *Nat. Nanotechol.* **6**, 615 (2011).
8. C. Dekker, *Nat. Nanotechol.* **2**, 209 (2007).
9. E. Pennisi, *Science* **336**, 534 (2012).
10. J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13770 (1996).
11. F. Haque, J. Li, H. C. Wu, X. J. Liang, and P. Guo, *Nano Today* **8**, 56 (2013).
12. L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, *Science* **274** 1859 (1996).
13. M. Faller, M. Niederweis, and G. E. Schulz, *Science* **303**, 1189 (2004).
14. T. Z. Bulter, M. Pavlenok, I. M. Derrington, M. Niederweis, and J. H. Gundlach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20647 (2008).
15. M. J. Kim, B. McNally, K. Murata, and A. Meller, *Nanotechnol.* **18**, 205302 (2007).
16. B. M. Venkatesan, B. Dorvel, S. Yemenicioglu, N. Watkins, I. Petrov, and R. Bashir, *Adv. Mater.* **21**, 2771 (2009).
17. P. Xie, Q. Xiong, Y. Fang, Q. Qing, and C. M. Lieber, *Nat. Nanotechnol.* **7**, 119 (2012).
18. A. J. Storm, J. H. Chen, X. S. Ling, H. W. Zandbergen, and C. Dekker, *Nat. Mater.* **2**, 537 (2003).

19. J. Gierak, A. Madouri, A. Biance, E. Bourhis, G. Patriarche, C. Ulysse, D. Lucot, X. Lafosse, L. Auvray, L. Bruchhaus, and R. Jede, *Mircoelectron Eng.* **84**, 779 (2007).
20. B. M. Venkatesan, A. B. Shah, J. M. Zuo, and R. Bashir, *Adv. Funct. Mat.* **20**, 1266 (2010).
21. M. D. Fleischer and M. Drndic, *Appl. Phys. Lett.* **93**, 113107 (2008).
22. M. Gad-el-Hak, "The MEMS Handbook", (CRC Pres, Boca Raton, 2005).
23. J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Braton, M. J. Aziz, and J. Golovchenko, *Nature* **412**, 166 (2001).
24. I. Yanagi, R. Akahori, T. Hatano, and K. Takeda, *Sci. Rep.* **4**, 5000 (2014).
25. F. Sawafta, A. T. Carlsen, and A. R. Hall, *Sensors* **14**, 8150 (2014).
26. S. Pud, D. Verschueren, N. Vukovic, C. Plesa, M. P. Jonsson, and C. Dekker, *Nano Lett.* **15**, 7112 (2015).
27. A. J. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J. F. Joanny, and C. Dekker, *Nano Lett.* **5**, 1193 (2005).
28. J. A. Rodri'guez-Manzo, M. Puster, A. Nicolai, V. Meunier, and M. Drndic, *ACS Nano* **9**, 6555 (2015).
29. Y. Li, C. Chen, S. Kerman, P. Neutens, L. Lagae, G. Groeseneken, T. Stakenborg, and P. V. Dorpe, *Nano Lett.* **13**, 1724 (2013).
30. P. Chen, T. Mitsui, D. B. Farmer, J. Golovchenko, R. G. Gordon, and D. Branton, *Nano Lett.* **4**, 1333 (2004).
31. E. H. Trepagnier, A. Radenovic, D. Sivak, P. Geissler, and J. Liphardt, *Nano Lett.* **7**, 2824 (2007).
32. S. W. Nam, I. Choi, C. Fu, K. Kim, S. G. Hong, Y. Choi, A. Zettl, and L. P. Lee, *Nano Lett.* **14**, 5584 (2014).
33. W. H. Coulter, "Means for counting particles suspended in a fluid." US2656508 (1953).
34. J. Shim, G. Humphreys, B. M. Venkatesan, J. M. Munz, X. Zou, C. Sathe, K. Schulten, F. Kosari, A. Nardulli, G. Vasmatzis, and R. Bashir, *Sci. Rep.* **3**, 1389 (2013).
35. R. D. Maitra, J. Kim, and W. B. Dunbar, *Electrophoresis* **33**, 3418 (2012).
36. J. Clarke, H. C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, and H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.* **4**, 265 (2009).
37. A. H. Laszlo, I. M. Derrington, B. C. Ross, H. Brinkerhoff, A. Adey, I. C. Nova, J. M. Craig, K. W. Langford, J. M. Samson, R. Daza, K. Doering, J. Shendure, and J. H. Gundlach, *Nat. Biotechnol.* **32**, 829 (2014).
38. M. Jain, I. T. Fiddes, K. H. Miga, H. E. Olsen, B. Paten, and M. Akeson, *Nat. Method.* **12**, 351 (2015).

39. P. M. Ashton, S. Nair, T. Dallman, S. Rubino, W. Rabsch, S. Mwaigwisya, J. Wain, and J. O'Grady, *Nat. Biotechnol.* **33**, 296 (2015).
40. T. Laver, J. Harrison, P. A. O'Neill, K. Moore, A. Farbos, K. Paszkiewicz, and D. J. Studholme, *Biomol. Detec. Quantif.* **3**, 1 (2015).
41. M. Zwolak and M. D. Ventra, *Nano Lett.* **5**, 421 (2005).
42. J. Lagerqvist, M. Zwolak, and M. D. Ventra, *Nano Lett.* **6**, 779 (2006).
43. M. Tsutui, M. Taniguchi, K. Yokota, and T. Kawai, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 296 (2010).
44. B. McNally, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng, and A. Meller, *Nano Lett.* **10**, 2237 (2010).
45. D. Stoddart, A. J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia, and H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 7702 (2009).
46. G. M. Cherf, K. R. Lieberman, H. Rashid, C. E. Lam, K. Karplus, and M. Akeson, *Nat. Biotechnol.* **30**, 344 (2012).
47. E. A. Manrao, I. M. Derrington, A. H. Laszlo, K. W. Langford, M. K. Hopper, N. Gillgren, M. Pavlenok, M. Niederweis, and J. H. Gundlach, *Nat. Biotechnol.* **30**, 349 (2012)
48. I. M. Derrington, J. M. Craig, E. Stava, A. H. Laszlo, B. C. Ross, H. Brinkerhoff, I. C. Nova, K. Doering, B. I. Tickman, M. Ronaghi, J. G. Mandell, K. L. Gunderson, and J. H. Gundlach, *Nat. Biotechnol.* **33**, 1073 (2015).
49. T. Ohshiro, K. Matsubara, M. Tsutsui, M. Furuhashi, M. Taniguchi, and T. Kawai, *Sci. Rep.* **2**, 501 (2012).
50. O. N. Assad, N. D. Fiori, A. H. Squires, and A. Meller, *Nano Lett.* **15**, 745 (2015).
51. L. J. Steinbock and A. Radenovic, *Nanotechnol.* **26**, 074003 (2015).
52. S. Carson and M. Wanunu, *Nanotechnol.* **26**, 074004 (2015).
53. M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, and A. Meller, *Biophys. J.* **95**, 4716 (2008).
54. M. Wanunu and A. Meller, *Nano Lett.* **7**, 1580 (2007).
55. B. N. Anderson, M. Muthukumar, and A. Meller, *ACS Nano* **7**, 1408 (2013).
56. S. W. Kowalczyk, D.B. Wells, A. Aksimentiev, and C. Dekker, *Nano Lett.* **12**, 1038 (2012).
57. J. Li and D. S. Talaga, *J. Phys-Condens Mat.* **22**, 454129 (2010).
58. D. V. Verschuere, M. P. Jonsson, and C. Dekker, *Nanotechnol.* **26**, 234004 (2015).
59. J. Larkin, R. Henley, D. C. Bell, T. Cohen-Karni, J. K. Rosenstein, and M. Wanunu, *ACS Nano* **7**, 10121 (2013).
60. B. M. Venkatesan, B. Dorvel, S. Yemenicioglu, N. Watkins, I. Petrov, and R. Bashir, *Adv. Mater.* **21**, 2771 (2009).

61. B. Lu, F. Albertorio, D. P. Hoogerheide, and J. A. Golovchenko, *Biophys J.* **101**, 70 (2011).
62. M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabion, A. Y. Grosberg, and A. Meller, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 160 (2010).
63. E. C. Yusko, J. M. Johnson, S. Majd, P. Prangkio, R. C. Rollings, J. Li, J. Yang, and M. Mayer, *Nat. Nanotechnol.* **6**, 253 (2011).
64. M. Fyta, S. Melchionna, S. Succi, and E. Kaxiras, *Phys. Rev. E* **78**, 036704 (2008).
65. K. Luo, S. T. T. Ollila, I. Huopaniemi, T. A. Nissila, P. Pomorski, M. Karttunen, S. C. Ying, and A. Bhattacharya, *Phys. Rev. E* **78**, 050901 (2008).
66. A. Bhattacharya, W. H. Morrison, K. Luo, S. C. Ying, A. Milchev, and K. Binder, *Eur. Phys. J. E* **29**, 423 (2009).
67. K. Luo, T. A. Nissila, S. C. Ying, and R. Metzler, *EPL* **88**, 68006 (2009).
68. I. Huopaniemi, K. Luo, T. A. Nissila, and S. C. Ying, *J. Chem. Phys.* **125**, 124901 (2006).
69. J. K. Wolterink, G. T. Barkema, and D. Panja, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 208301 (2006).
70. K. Luo, I. Huopaniemi, T. A. Nissila, and S. C. Ying, *J. Chem. Phys.* **124**, 114704 (2006).
71. T. Saito and T. Sakaue, *Phys. Rev. E* **88**, 04606 (2013).
72. L. Chen and A. T. Conlisk, *Biomed. Microdevices* **13**, 403 (2011).
73. J. Li and D. S. Talaga, *J. Phys. Condens. Matter* **22**, 454129 (2010).
74. M. Langecker, D. Pedone, F. C. Simmel, and U. Rant, *Nano Lett.* **11**, 5002 (2011).
75. M. Gershow and J. A. Golovchenko, *Nat. Nanotechnol.* **2** 775 (2007).
76. V. V. Thacker, S. Ghosal, S. H. Ainsa, N. A. W. Bell, and U. F. Keyser, *Appl. Phys. Lett.* **101**, 223704 (2012).
77. V. Kurz, E. M. Nelson, J. Shim, and G. Timp, *ACS Nano* **7**, 4057 (2013).
78. G. Ando, C. Hyun, J. Li, and T. Mitsui, *ACS Nano* **6**, 10090 (2012).
79. T. Auger, J. Mathé, V. Viasnoff, G. Charron, J. M. D. Meglio, L. Auvray, and F. G. Montel, *Phys. Rev. Lett.* **113**, 028302 (2014).
80. M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.* **111**, 10371 (1999).
81. T. Odijk, *Macromolecules* **16**, 1340 (1983).
82. L. I. Klushin, A. M. Skvortsov, H. P. Hsu, and K. Binder, *Macromolecules* **18**, 5890 (2008).
83. P. Prinsen, L.T. Fang, A. M. Yoffe, C. M. Knobler, and W. M. Gelbart, *J. Phys. Chem. B* **113**, 3873 (2009).

2. ナノポアにおける電解質溶液の流動特性と

DNA ナノポア通過特性の物理

2.1 はじめに

本章では、初めに電解質溶媒に満たした時のナノポアにおける流動特性について述べる。次に、電圧印加場における DNA ナノポア通過特性について説明する。

2.2 ナノポアの流動特性

2.2.1 ナノポアにおけるイオン輸送

ネルンスト・プランク式は、ブラウン運動のランジュバン方程式から導出される。単一荷電粒子をある温度 T の溶媒に沈めると、これは、分子衝突を受けて、瞬間速度 $v=dx/dt$ で動き回る。粒子が受ける変動力は、次の2種類の独立した力が関係している。まず、ランダム力 $F_r(t)$ は、多くの衝突によって生じる力である。ランダム力 $F_r(t)$ の方向は、典型的に 10^{-13} 秒ごとに変わる。この素早いランダム力 $F_r(t)$ の方向変化により、ある時間におけるランダム力 $F_r(t)$ は、平均ゼロとなる。次に、抗力 $F_{drag}(t)$ は、移動速度に依存した力であり、これが遅い変動力として働く。印加電圧下において、さらにドリフト力 $F_e = zeE$ が加わる。 ze は粒子の荷電量、 E は電場である。ニュートンの運動方程式で表すと、次式となる。

$$m \frac{dv}{dt} = F_e + F_{drag} + F_r(t) \quad (2.1)$$

抗力 F_{drag} は、ドリフト速度 v_{drift} に作用する成分であり、 $-\alpha v_{drift}$ と表される。 α は、抗力に関する係数である。したがって、瞬間速度は、 $v = v_{drift} + v_r$ で表されるので、(2.1)式は、次式となる。

$$m \left(\frac{dv_{drift}}{dt} + \frac{dv_r}{dt} \right) = zeE - \alpha v_{drift} + F_r(t) \quad (2.2)$$

dv_r/dt と F_r は、ある一定の時間において平均ゼロである。定常状態において、 v_{drift} は、時間に依存しない成分となる。

$$v_{drift} = \frac{1}{\alpha} zeE = u_i E \quad (2.3)$$

u_i は電気泳動移動度である。一般的には、(2.3)式の計算結果から、拡散と電場の影響を考慮した値が得られる。静的な条件下では、イオン種 i の流れは、 v_{drift} とイオン密度 c_i で計算される。

$$j_i = c_i v_{drift} = c_i u_i E = -c_i u_i \frac{d\mu_{el}}{dx} \quad (2.4)$$

μ_{el} は電気化学ポテンシャルである。ある温度における電気化学ポテンシャル μ_{el} は、イオン活量 $a_i = \gamma_i \cdot c_i$ に依存する。 γ_i は、活量係数である。

$$\mu_{el} = \mu^0 + RT \cdot \ln c_i + RT \cdot \ln \gamma_i + z_i F \Phi + pV \quad (2.5)$$

μ^0 、 R 、 T 、 Φ 、 V 、 p 、 F は、それぞれ標準状態の化学ポテンシャル、気体定数、温度、電位、体積、圧力、ファラデー定数である。希釈溶液において、電気泳動移動度は、拡散定数と相関があり、アインシュタインの関係式から $u_i = D_i/RT$ で表される¹。(2.4)と(2.5)式から、イオン流れは、次式となる。

$$j_i = -D_i \left[\frac{dc_i}{dx} - c_i \frac{z_i F}{RT} E \right] \quad (2.6)$$

(2.6)式からイオンの流れは、第1項の拡散と第2項ドリフトにより形成されることがわかる。空間電荷効果がない条件下において、電流密度 J はそれぞれのイオンの総和となる。

$$J = e \sum_i z_i j_i \quad (2.7)$$

(2.6)と(2.7)式は、ナノポアのコンドクタンスを計算する上での、基本式として用いられる。しかしながら、クーロンモデルだけでは、簡易的なモデルのため、考慮できない現象もある。例えば、溶媒和殻によるイオン電荷の電場遮蔽効果や外部場により引き起こされるイオン流動効果などが挙げられる²。

2.2.2 表面電荷のないナノポアのコンダクタンス

ある濃度の電解質溶媒が均一の濃度で電気泳動槽内に満たされているとき、イオン i の流れと電流密度は次式で表される。

$$j_i = D_i c_i \frac{z_i F}{RT} E \quad (2.8)$$

$$J = \frac{z_i^2 \cdot F^2}{RT} [D_+ + D_-] c E = \sigma_s E \quad (2.9)$$

D_+ 、 D_- 、 σ_s は、それぞれカチオン・アニオンの拡散定数と電解質溶媒の伝導率である。ナノポアの直径 d が深さ h と比べて十分小さい場合、ナノポアの抵抗 R_{pore} が電気泳動槽の全抵抗の大部分を占める。電極・電解質溶媒間と電解質溶媒内での電位降下 ($\Delta\Phi_{elec}$, $\Delta\Phi_{sol}$) は小さい場合、ナノポア内の電位降下 $\Delta\Phi_{pore}$ は、印加電圧と同程度となる。電極・電解質溶媒間での電位降下は、Ag/AgCl 電極といった不分極電極を使用すると、小さくなる。また、電解質溶媒での電位降下は、高塩濃度の電解質溶媒が満たされていると、小さい。そのため、一般的には、ナノポアを用いた電流値測定において、塩濃度 0.01 M から 1 M の電解質溶媒（主に塩化カリウム）を使用する。ナノポアの深さが浅いと、ナノポアの抵抗 R_{pore} は小さくなり、また、アクセス抵抗が大きくなる。電気泳動槽内での電位を次式にまとめる。

$$\Delta V = \Delta\Phi_{pore} + \Delta\Phi_{sol} + \Delta\Phi_{electr} \cong \Delta\Phi_{pore} \quad (2.10)$$

ナノポアを通り抜ける電気力線はすべて平行であるので、ナノポア内に加わる電場 E は、一定である ($E \cong \Delta\Phi_{pore}/L \cong \Delta V/h$)。したがって、(2.9)式から、イオン電流量 I が求まる。

$$I = \frac{A}{h} \sigma_s \Delta V = \frac{\pi d^2}{4h} \sigma_s \Delta V \quad (2.11)$$

(2.9)と(2.11)式から、ナノポアのコンダクタンス G_{pore} が求まる。

$$G_{pore} = \frac{dI}{d \Delta V} = \frac{\pi d^2}{4h} \sigma_s = \frac{\pi d^2}{4h} z_i^2 F^2 [u_+ + u_-] c \quad (2.12)$$

u_+ と u_- は、それぞれカチオンとアニオンの電気泳動移動度である。(2.11)式から、ナノポアのコンダクタンスは、カチオンとアニオンの特性に依存することがわかる。どちらのイオンも電場を受けて、ナノポア内を移動する。移動方向は、反対である。

ナノポアの深さが小さいとき、ナノポアの抵抗以外にアクセス抵抗を考慮しなければならない。アクセス抵抗は、電場により電解質溶媒がナノポアに集中することで生じる。アクセス抵抗は、次式で表される³。

$$R_{access} = \frac{1}{\sigma_s \pi d} \quad (2.13)$$

ナノポアシーケンサなどのナノ薄膜を用いた測定において、アクセス抵抗を考慮する必要がある。したがって、全抵抗を次式で表される。

$$R_{total} = \frac{1}{\sigma_s \pi} \left(\frac{4h}{d^2} + \frac{1}{d} \right) \quad (2.14)$$

(2.14)式から、ナノポアの深さ L と直径 d が小さくなるにつれて、アクセス抵抗が全抵抗を占める割合が増えることがわかる。グラフェンなどの単層薄膜の場合、(2.14)式は次式で表される。

$$R_{graphene} = \frac{1}{\sigma_s d} \quad (2.15)$$

2.2.3 表面電荷の影響

物質表面を電解質溶媒に浸すと、溶媒中のイオンが安定化する方向へ働くために表面電荷は常に現れることが知られている。表面電荷の大きさは、物質の特性、溶媒の種類、溶媒条件（塩濃度、pH、温度など）に依存する。表面電荷は、金属や半導体の表面、コロイド粒子、ナノ粒子、DNAやタンパク質といった生体分子に現れるため、この影響を考えなければならない。溶媒中の可動性イオンは、表面電荷を相殺するために、静電的効果から帯電した表面に集められる。これの集められたイオンの層を電気二重層と呼ぶ。また、イオンは熱拡散により溶媒内で均一に分布する。これら2つの要因が界面のイオン分布に影響している。

Sternモデルは、界面現象を議論するときによく用いられている^{4,5}。Sternモ

デルでは、有限サイズのイオンを取り扱う。これは、イオンを点電荷として取り扱っていた Gouy-Chapman モデルでは、イオン自体の大きさや水和核を考慮できなかったために、界面の静電ポテンシャルが実験値と一致しなかったことに由来する。有限サイズのイオンは、界面に極限までに近づくことはできず、イオンサイズに匹敵する距離にとどまる。このイオンが吸着している層を Helmholtz 層と呼ぶ。また、イオン雰囲気形成される外側の層を拡散二重層という。Helmholtz 層と拡散二重層の境界面を Helmholtz 面という。拡散二重層内の界面からのイオン濃度分布は、次式で表される。

$$c_i = c_\infty \exp\left(\frac{-ze\Phi}{k_B T}\right) \quad (2.16)$$

c_∞ 、 z 、 Φ は、バルク中でのイオン濃度、イオンの価数、電位である。

Helmholtz 層と拡散二重層で構成される電気二重層の対イオンは、電圧が印加されると、静電気力によって、一方向へ流れる。この対イオンの流れを電気浸透流と呼ぶ。電気二重層の厚みは、次式のデバイ長で定義される。

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon RT}{F^2 \cdot \sum c_i \cdot z_i^2}} \quad (2.17)$$

塩化カリウム 1 M の電解質溶媒に窒化シリコンを沈めたとき、(2.17)式から、デバイ長は、1 nm と算出される⁶。DNA をナノポアに通過させる場合、直径 10 nm 程度のナノポアを用いることから、電気浸透流がナノポアの流動特性に影響することが考えられる。

2.2.4 表面電荷のあるナノポアのコンダクタンス

前節では、印加電圧条件下では、ナノポア表面に電気浸透流が生じることを述べた。そのため、電気浸透流を含めて流動特性を理解する必要がある。表面電荷密度 $\sigma_{surface}$ のナノポアが電解質溶媒に満たされると、対イオンの吸着により、中和される全表面電荷は $\sigma_{surface}\pi dh$ である。したがって、対イオンの塩濃度は、

$$c_i = \frac{-4}{z_{dl} F} \frac{\sigma_{surface}}{d} \quad (2.18)$$

z_{ai} は対イオンの価数である。(2.18)式を(2.8)式に代入すると、帯電したナノポアにおける対イオンの流れと電流密度は、次式で表される。

$$j_{ai} = -4D_{ai} \frac{\sigma_{\text{surface}}}{dRT} E \quad (2.19)$$

$$J = \frac{z_i^2 \cdot F^2}{RT} \cdot [D_+ + D_-] \cdot c \cdot E + \left(-4D_{ai} \frac{\sigma_{\text{surface}}}{dRT} E \right) \quad (2.20)$$

また、(2.10)式と(2.11)式より、負に帯電したナノポアにおけるイオン電流量とナノポアのコンダクタンスは、次式となる。

$$I = \frac{\pi d^2}{4h} (\mu_+ + \mu_-) c \cdot e \cdot V_{\text{bias}} + \pi \frac{d}{h} |\sigma_{\text{surface}}| \mu_+ \Delta V \quad (2.21)$$

$$G_{\text{pore}} = \frac{\pi d^2}{4h} (\mu_+ + \mu_-) c \cdot e + \pi \frac{d}{h} |\sigma_{\text{surface}}| \mu_+ \quad (2.22)$$

μ_+ 、 μ_- は、それぞれカチオン・アニオンの電気泳動移動度である。(2.22)式は、3.5にて、電解質溶媒が満たされているナノポアの数を見積もる時に用いる。

2.3 ナノポア近傍における DNA 挙動

DNA は、溶媒中においてコイル状の形態をとることが知られている。このコイル状の DNA が自身の大きさよりも十分小さなナノポアを通過する場合、これまでに報告されてきた研究成果をまとめると、次のような過程を経ている。外場力（印加電圧）が与えられた条件下において、バルク溶媒中を拡散しているコイル状の DNA は、ナノポアへ引き寄せられる（DNA 捕捉過程）⁷。ナノポア近傍に引き寄せられた DNA は、コイル状の形態を解き、ナノポアを通過する（DNA ナノポア通過過程）^{8,9}。このとき、ナノポアを通過した DNA は、再び丸まり始めるため、DNA 全体としては、ダンベル状の形態を呈する⁷。DNA がナノポアを通過し終わると、DNA は、再びコイル状の形態を呈し、ナノポアから離れる（ナノポア通過後過程）^{10,11}。本節では、理論・実験的に理解が深められている DNA 捕捉過程と DNA ナノポア通過過程について説明する。

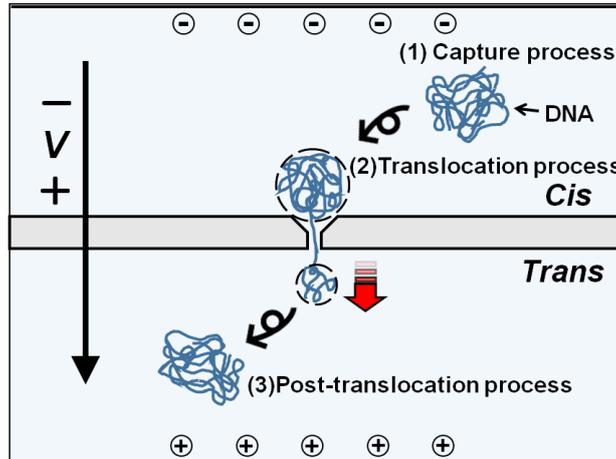


Figure 2.1 DNA ナノポア通過過程の概念図
 (1)捕捉過程 (2)ナノポア通過過程 (3)ナノポア通過後過程

2.3.1 ナノポアへの DNA 捕捉過程

先行研究において、DNA がナノポアへ捕捉される頻度の向上が測定の高スループット化に貢献することから、DNA 捕捉過程は数多く研究されている^{12,13,14,15}。低濃度において、溶媒内を拡散する DNA は、お互いに作用し合わないため、DNA 捕捉過程は、ポアソン過程として理解される。この過程において、到達時間間隔の確率は次式で表される。

$$P_{\delta t=t}(t) = e^{-R_c t} \quad (2.23)$$

δt 、 R_c は、それぞれ DNA ナノポア通過の時間間隔の測定値と平均捕捉確率である。上式のポアソン過程は、①平均到着時間 $1/R_c$ がナノポア通過時間と同程度であること、②DNA がお互いに作用し合うこと、③電解質溶媒が均一に混ざっていないことといった条件を除いて、適用できる。

また、DNA 捕捉確率は、電圧に依存することも知られている^{16,17,18}。DNA の捕捉確率は、ナノポア外の電圧分布が大きく関わっており、ナノポアから距離 r の地点における電圧は、次式で表される。

$$V(r) = \frac{d^2}{8hr} \Delta V \quad (2.24)$$

(2.24)式の電圧分布において、ナノポアからの距離 $r > r^*$ の領域では、DNA は溶媒内を自由に拡散運動する。一方、ナノポアからの距離 $r < r^*$ の領域では、DNA

のドリフト運動が拡散運動を上回るため、DNA は徐々にナノポアへ引き込まれるようになる。DNA の捕捉確率 R は、スモルコフスキー方程式から導出することができ、この有効距離 r^* を用いて、次式で表せる¹⁹。

$$R = 2\pi D r^* \quad (2.25)$$

(2.25)式において、 2π は、DNA が補足される領域が半球状の領域であることを表現している。

有効距離 r^* は、DNA の熱エネルギーとドリフトエネルギーが一致する距離として定義されなければならない。したがって、

$$k_B T = Q_{eff} V(r^*) \quad (2.26)$$

k_B 、 Q_{eff} は、それぞれボルツマン定数と DNA 全体の有効電荷である。しかしながら、DNA 全体の有効電荷 Q_{eff} は、対イオンが DNA に吸着するため、DNA 本来の電荷量でないことや(2.23)式の電圧分布による電気浸透流に由来する DNA 全体の電荷が明らかでないことから、(2.26)式から有効距離が算出できない。そこで、(2.24)式の電圧分布において、ある位置からその他の位置へ DNA が移動する確率が $\exp(-W_{DNA}/k_B T)$ と相関があるとする²⁰。 W_{DNA} は、DNA が2間点を移動するために必要な最低エネルギーである。これが最も低い条件は、DNA が最も遅い速度で移動する時であるので、DNA のドリフト力と粘性抵抗力が一致する場合に満たされる。したがって、この条件は、次式で表される。

$$W_{DNA}(r^*) - W_{DNA}(\infty) \approx k_B T \quad (2.27)$$

Long らが構築した理論式によると、DNA が溶媒中でコイル構造を保つためには、次式を満たす必要がある²¹。

$$F_{stall}(r) = \frac{\mu k_B T}{D} E(r) \quad (2.28)$$

(2.28)式から、 r_1 から r_2 までの距離に移動した時の粘性抵抗によるエネルギーは、

$$W_{stall}(r_1 \rightarrow r_2) = \int_{r_1}^{r_2} F_{stall}(r) dr \quad (2.29)$$

(2.28)式と(2.29)式から、DNA が 2 間点を移動するために必要な最低エネルギー W_{DNA} は、粘性抵抗力によるエネルギー W_{stall} を超える必要があることを考えると、 $W_{DNA} = W_{stall}$ となる。したがって、 W_{DNA} は、次式で表される。

$$W_{DNA}(r) = \frac{\mu k_B T}{D} V(r) \quad (2.30)$$

$W_{DNA}(\infty)$ は、ゼロであることから、(2.27)式と(2.30)式から、

$$V(r^*) = \frac{D}{\mu} \quad (2.31)$$

が導かれる。(2.30)式に(2.23)式を代入すると、有効距離 r^* は、次式で表される。

$$r^* = \frac{d^2 \mu}{8hD} \Delta V \quad (2.32)$$

(2.24)式と(2.31)式から、DNA の捕捉頻度を次式として書き直される。

$$R = \frac{\pi d^2 \mu}{4hD} \Delta V \quad (2.33)$$

(2.32)にDNAの拡散定数や泳動移動度が含まれていることから、有効距離 r^* は、DNAの長さやDNAの全電荷量に依存することがわかる。また、有効距離 r^* は、上式から印加電圧に対して線形的に増加することが予想されるが、Figure 2.2のように、捕捉確率は、指数関数的に増加する。これは、ナノポアに接近したDNAのうち、ナノポアを通過できないDNAも存在することを示唆している。現在、この現象は、DNA捕捉のためのエントロピー障壁が関与していると考えられている。DNAは、ひも状構造を呈するため、様々な構造で溶媒中を動き回る。このDNAをナノポアに通過させることは、DNAの自由度を減らすため、不利な状態である。印加電圧を上げると、コイル状のDNAを解すためのエントロピー障壁を低下させるため、結果として、DNA捕捉率は指数関数的に増加する。また、エントロピー障壁が無視できる閾値電圧以上では、DNA捕捉過程は、拡散限界現象として観察され、捕捉確率は、線形な電圧依存性を示す⁷。

ナノポア自体の形状もDNAの捕捉確率に影響する。Figure 2.3に、DNAが α -ヘモリシンのcis側とtrans側に捕捉させる頻度を示す。1.2.1で説明したように、

α -ヘモリシンは、バレル状の構造を有する膜タンパク質であり、cis 側の孔径の方が trans 側の孔径と比べて大きい。Cis 側と trans 側の DNA 捕捉確率は、どちらも印加電圧に対して、指数関数的に増加することがわかる。しかし、DNA 捕獲確率は、trans 側と比べて cis 側の方が高く、孔径の大きな α -ヘモリシンの cis 側の方が、エントロピー障壁は低いことが示唆されている¹⁵。

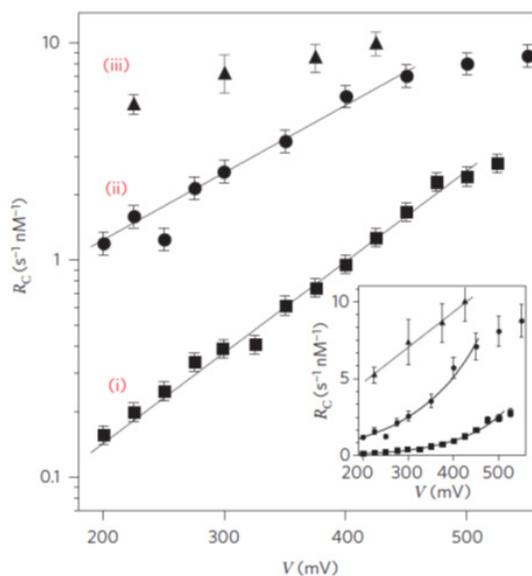


Figure 2.2 ナノポアへの DNA 捕捉率の電圧依存性
(■ 400bp, ● 3500 bp, ▲ 48.5 kbp)⁷

Reprinted with permission from *Nat. Nanotechnol.* **5**, 160-165 (2010).

Copyright 2016, Nature Publishing Group.

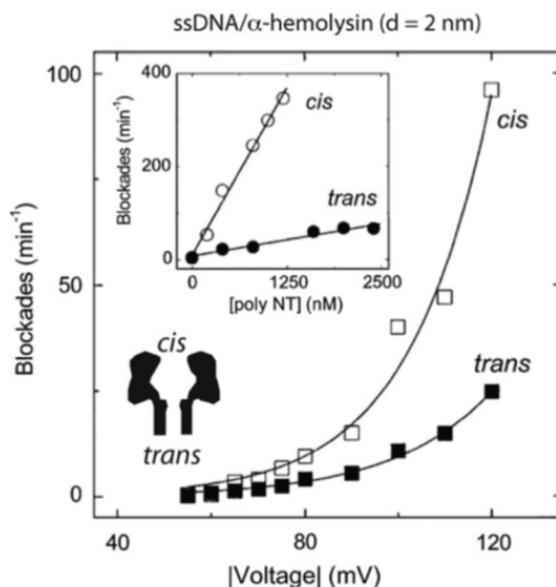


Figure 2.3 ナノポアへの DNA 捕捉率の形状依存性¹⁵

Reprinted with permission from *Phys Life Rev.* **9**, 125–158(2012).

Copyright 2016, Elsevier

2.3.2 ナノポア通過過程における DNA 挙動

ナノポアを用いた DNA 塩基配列の解析には、どのような軌跡やどれくらいの速度で DNA がナノポアを通過するかを理解する必要がある。そのため、これまでにイオン電流を用いて、詳細な DNA のナノポア通過過程の研究結果が報告されている。

先行研究では、ナノポア界面と DNA との相互作用について報告されている。Meller らによると、 α -ヘモリシンに DNA を通すと、ナノポア通過時間はガウシアン分布と一致せず、なだらかに長い通過時間へ分布する。彼らは、この分布がタンパク・ナノポアと DNA との相互作用の影響に由来すると結論づけている⁷。同様な傾向性は、Storm らによって、長い二本鎖 DNA を直径 10 nm の酸化シリコンナノポアを通過させた条件下でも、観察されている²²。さらに、二本鎖 DNA の直径と同程度の直径 4 nm 窒化シリコンナノポアに DNA を通すとこの傾向性が顕著にみられ、タンパク・ナノポアとソリッドステート・ナノポアのどちらでも、ナノポア界面の影響でナノポア通過速度が低下することがわかっている (Figure 2.4)²³。

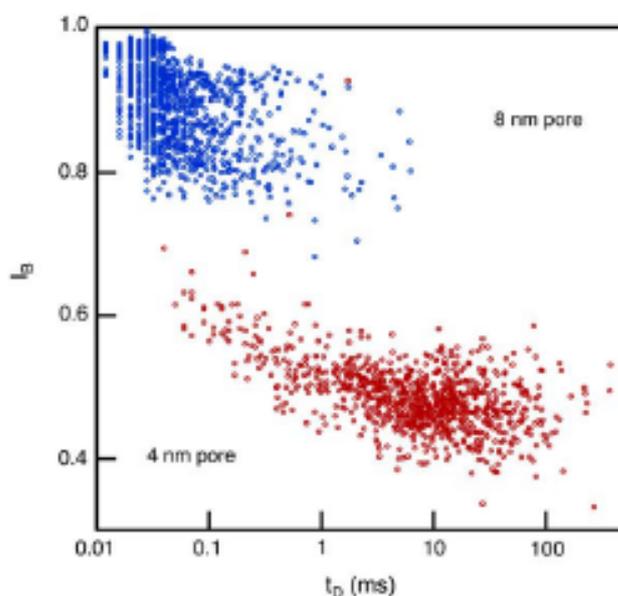


Figure 2.4 界面との相互作用による DNA ナノポア通過時間²³

Reprinted with permission from *Biophys. J.* **95**, 4716 (2008).

Copyright 2016, Elsevier

DNA の長さ と DNA ナノポア通過速度の関係も重要な項目として、研究されている。タンパク・ナノポアを用いた実験では、DNA ナノポア通過時間と DNA の長さに線形関係 ($t_d \propto L$) があるのに対して、ソリッドステート・ナノポアを用いた実験では、非線形関係 ($t_d \propto L^{1.27}$) が報告されている (Figure 2.5)²⁴。この非線形関係は、ナノポア界面と DNA の相互作用以外に、ナノポア近傍に滞在するコイル状の DNA の収縮過程が影響していると考えられており、Strom らは、ナノポア通過時間と DNA コイルの大きさとの関係性 ($t_d \propto R_g^2$) を示唆している (Figure 2.6)。(t_d 、 L 、 R_g は、それぞれナノポア通過時間、DNA の長さ、DNA の gyration 半径である。)

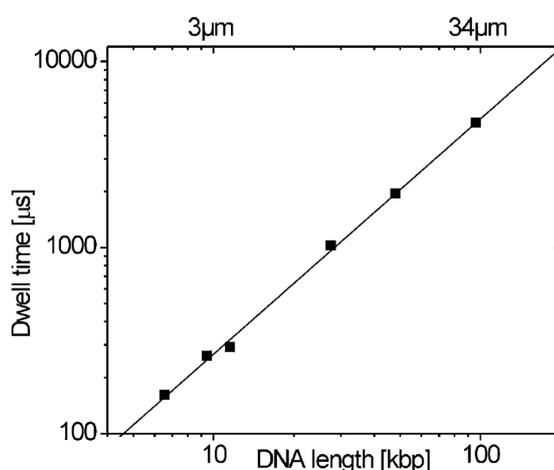


Figure 2.5 DNA ナノポア通過時間の DNA 長依存性²⁴
 Reprinted with permission from *Nano Lett.* **5**, 1193 (2005).
 Copyright 2016, American Chemical Society

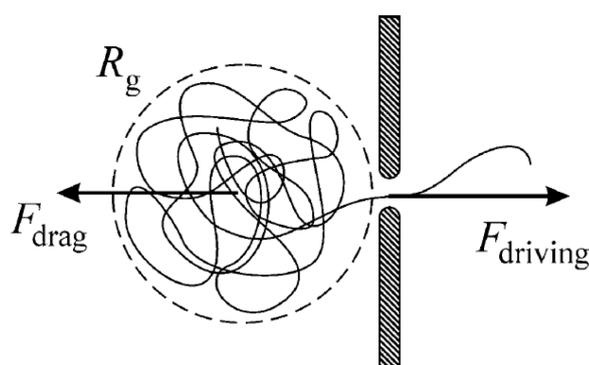


Figure 2.6 ナノポア通過時の DNA コイル概念図²⁴
 Reprinted with permission from *Nano Lett.* **5**, 1193 (2005).
 Copyright 2016, American Chemical Society

2.4 おわりに

本章では、ナノポアにおける電解質溶媒の流動特性と DNA ナノポア通過特性の物理に関して述べた。2.2 では、ナノポアにおけるイオン輸送に関する理論式から、表面電荷があるナノポアにおける流動コンダクタンスを導出した。2.3 では、捕捉過程とナノポア通過過程における DNA 電気泳動特性について述べた。

参考文献

1. B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **51**, 199 (1968).
2. P. Turq, J. Barthel, and M. Chemla, Transport, “Relaxation, and Kinetic Processes in Electrolyte Solutions”, (Springer Verlag, Berlin, 1992).
3. D. A. Chapman, *Philos. Mag.* **25**, 475 (1913).
4. G. G. Sur La, *Compt. Rend* **149**, 654 (1909).
5. G. Schmid and H. Schwarz, *J. Memb. Sci.* **150**, 159 (1988).
6. B. Lu, D. P. Hoogerheide, Q. Zhao, and D. Yu, *Phys. Rev. E* **86**, 011921 (2012).
7. M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabion, A. Y. Grosberg, and A. Meller, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 160 (2010).
8. L. Chen and A. T. Conlisk, *Biomed. Microdevices* **13**, 403 (2011).
9. T. Saito and T. Sakaue, *Phys. Rev. E* **88**, 042606 (2013).
10. M. Gershow and J. A. Golovchenko, *Nat. Nanotechnol.* **2**, 775 (2007).
11. C. Plesa, L. Cornelissen, M. W. Tuijtel and C. Dekker, *Nanotechnol.* **24**, 47510 (2013).
12. A. Y. Grosberg and Y. Rabin, *J. Chem. Phys.* **133**, 165102 (2010).
13. Y. He, M. Tsutsui, R. H. Scheicher, F. Bai, M. Taniguchi, and T. Kawai, *ACS Nano* **7**, 538 (2013).
14. C. T. Wong and M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.* **126**, 164903 (2007).
15. M. Wanunu, *Phys. Life Rev.* **9**, 125 (2012).
16. S. E. Henrichson, M. Misakian, B. Robertson, and J. J. Kasianowicz, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 3057 (2000).
17. P. Chen, J. Gu, E. Brandin, Y. R. Kim, Q. Wang, and D. Branton, *Nano Lett.* **4**, 2293 (2000).
18. J. J. Kasianowicz, E. Brandin, J. Golovchenko, and D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1079 (2000).

19. M. Von Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.* **92**, 129 (1917).
20. L. D. Landau and E. M. Lifshiz, “Statistical Physics, Part 1, Course of Theoretical Physics Vol. 5“, (Butterworth-Heinemann, Oxford, 1980).
21. D. Long, J. L. Viovy, and A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.* **76**, 3858 (1996).
22. A. J. Storm, J. H. Chen, H. W. Zandbergen, and C. Dekker, *Phys. Rev. E* **71**, 051903 (2005).
23. M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, and A. Meller, *Biophys. J.* **95**, 4716 (2008).
24. A. J. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J. F. Joanny, and C. Dekker, *Nano Lett.* **5**, 1193 (2005).

3. 実験試料と方法

3.1 はじめに

本章では、初めに本研究で使用する蛍光標識 DNA 試料について述べる。3.3 では、2 種類のポーラスシリコン薄膜について概説する。3.4 では、実験装置の概要を説明する。3.5 では、本研究で構築した時間分解フォトンカウンティングシステムより検出された蛍光強度波形の解析方法について述べる。また、3.6 では、ナノポア内に電解質溶媒が満たされていることの確認のために行う電流測定について述べる。3.7 では、実験手順の概要を説明する。

3.2 DNA 試料

本研究では、2 本鎖 DNA に対して、蛍光分子修飾を行った DNA 試料を用いて、DNA ナノポア通過挙動の観察を行った。実験に用いた DNA 試料は、次の 3 種類の二本鎖 DNA である (①DNA 断片、②長さ 10 kbp の二本鎖 DNA、③ λ DNA)。

長さ 48 kbp の λ DNA(タカラバイオ株式会社)の溶媒に制限酵素 PuvI (タカラバイオ株式会社) を混ぜて、これを 37°C で 1 時間、65°C で 10 分間インキュベートし、長さ 11933 bp・14321 bp・9533 bp・12715 bp の λ DNA 断片を作製した。作製した DNA の長さは、アガロースゲル電気泳動で確認した。 λ DNA 断片と DNA ラダーをアガロースゲルに流し込み、電気泳動を行った。Figure 3.1a にこれをエチジウムブロマイドで染色した蛍光像を示す。蛍光像は、蛍光イメージアナライザー (Proteinsimple 社) より取得した。アガロースゲルは、Agarose S (ニッポン・ジーン株式会社) を使用した。また、アガロースゲルの濃度は、0.8%とした。印加電圧と電圧印加時間は、それぞれ 175 V と 15 分とした。 λ DNA 断片のバンドが λ DNA (長さ 48 kbp) と長さ 9316 bp の二本鎖 DNA のバンドの間に現れていることから、 λ DNA 断片には、長さ 48 kbp から 9316 bp の二本鎖 DNA が含まれることが分かる。蛍光強度比から λ DNA 断片には、長さ 10 kbp 程度の二本鎖 DNA が多く含まれるといえる。

長さ 9598 bp の二本鎖 DNA (長さ 10 kbp の二本鎖 DNA) の作製は、ポリメラーゼ連鎖反応酵素 (PlatinumTaq DNA Polymerase High Fidelity : タカラバイオ株式会社) と PCR キットを用いた。まず、 λ DNA とヌクレオシド三リン酸 (dNTP) と PCR バッファを混ぜた溶媒を 94 °C で 2 分間インキュベートした後、94 °C で 30 秒と 55 °C で 30 秒を交互に 35 サイクル、インキュベートした。PCR 反応には、ライフタッチサーマルサイクラー (日本ジェネティクス株式会社) を使用した。インキュベート後に、スピンカラム (QIAquick PCR Purification kit; キアゲン社) を用いて、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA を精製した。

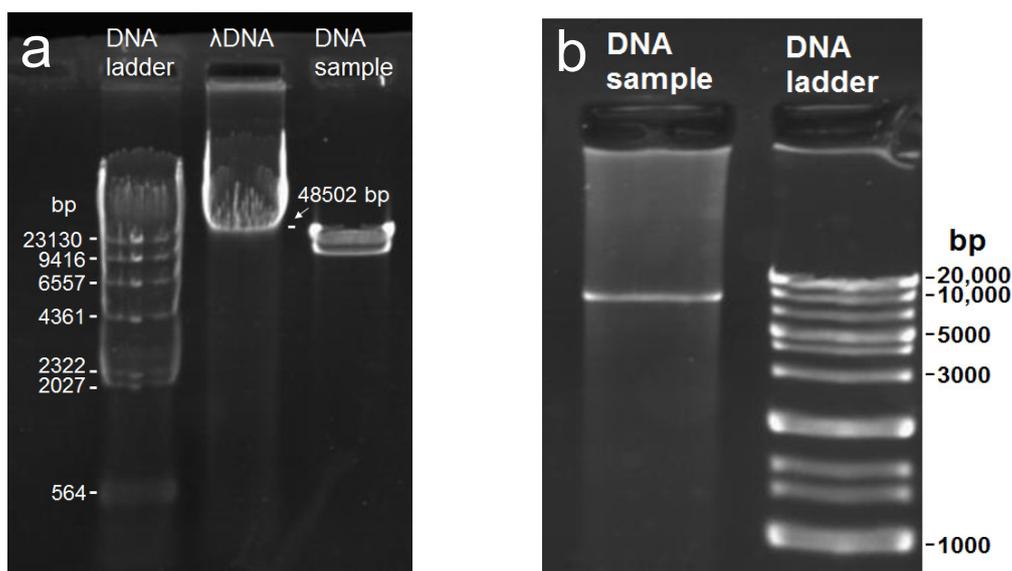


Figure 3.1 ゲル泳動写真(a) λ DNA 断片(b)10kbp dsDNA

Figure 3.1b に、アガロースゲル泳動結果を示す。電気泳動結果より、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA 試料のバンドは、長さ 9316 bp の二本鎖 DNA のバンドと並ぶことから、設計通りの長さ 9598 bp の二本鎖 DNA が作製されていることが確認されている。

λ DNA 試料は、タカラバイオ株式会社製の λ DNA を使用した。

すべての精製された DNA 試料は、室温において、蛍光色素 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI: 同仁化学研究所) で染色した。DAPI は、二本鎖 DNA のアデニンとチミンが豊富な領域に結合 (インターカレート) する蛍光色素である。この蛍光色素が二本鎖 DNA に結合すると、蛍光強度が約 20 倍に増加する。DAPI のようなインターカレートする蛍光色素は、DNA 全体から蛍光発光を得ることができるため、溶媒内での DNA の振る舞いを光学的に観察する際に使用されている。例えば、マサチューセツ工科大学の Doyle らのグループでは、蛍光色素で染色した DNA を蛍光観察することで、溶媒や印加電圧などの条件と DNA の振る舞いの関係について研究している^{1,2}。本研究でも、DNA の振る舞いを観察する目的から蛍光色素として DAPI を選定した。DAPI の吸収領域、発光領域はそれぞれ、 $\lambda=300 \sim 400$ nm と $\lambda=400 \sim 600$ nm である。DNA 試料の染色後、これを、スピнкаラム (Centri-Sep spin columns: プリンストンセパレーション社) によって、精製した。

DNA 試料に染色された DAPI の分子数は、吸光度スペクトルから算出した。染色された DNA 試料の吸光度スペクトルを Figure 3.2 に示す。吸光度スペクトルは、分光分析器 (BioSpectrometer: エッペンロルフ社) より取得した。検出波長域は、250 nm から 800 nm とした。いずれの吸光度スペクトルにも、波長 260

nm と 360 nm に吸収ピークがみられ、これらは、二本鎖 DNA と DAPI のピーク吸収波長にそれぞれ一致する³。DAPI は、260 nm の光も吸収するため、次式を用いて、二本鎖 DNA のみの 260 nm における吸収量を計算し、二本鎖 DNA に修飾している DAPI の分子数を見積もった⁴。

$$A_{DNA} = A_{260} - (A_{DAPI} \times CF_{260}) \quad (3.1)$$

$$DNA/DAPI = \frac{(A_{DNA} \times \epsilon_{DAPI})}{(A_{DAPI} \times \epsilon_{DNA})} \quad (3.2)$$

A_{DNA} 、 A_{260} 、 A_{DAPI} 、 CF_{260} は、それぞれ波長 260 nm における DNA 吸収量、波長 260 nm における吸光度、波長 355 nm における DAPI の吸光度、波長 260 nm における DAPI の補正率である。また、 ϵ_{DAPI} と ϵ_{DNA} は、DAPI の消衰係数と DNA の消衰係数である。上式に、Figure 3.2 の吸光度を代入し、DNA 試料に修飾している DAPI の分子数を計算すると、1M KCl、10 mM Tris-HCl 溶媒における条件下での 10 kbp の二本鎖 DNA 試料と λ DNA 試料に修飾されている DAPI の分子数は平均 730 個と 803 個であった。

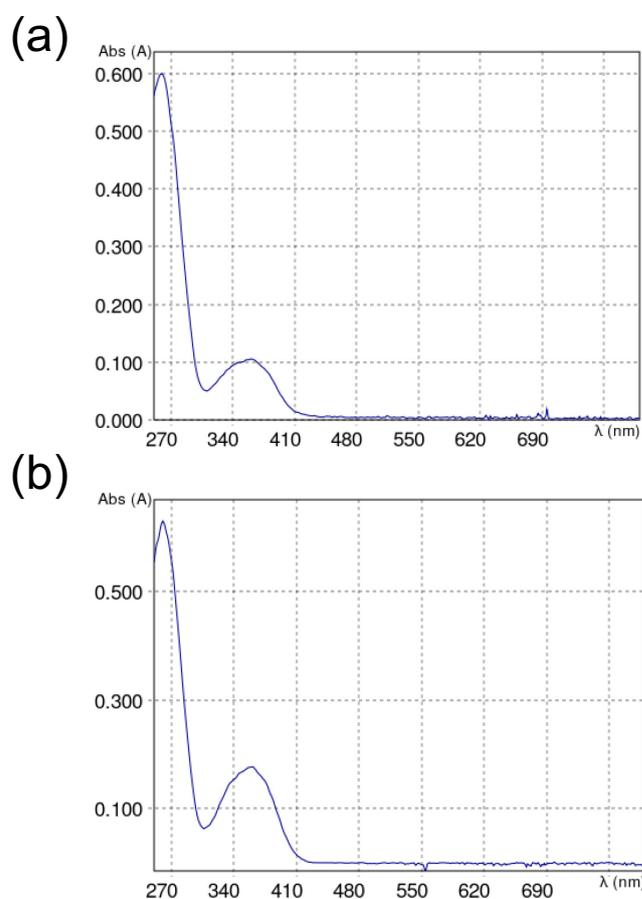


Figure 3.2 吸光度測定結果(a)10kbp dsDNA(b) λ DNA

3.3 ポーラスシリコン薄膜

本研究では、ポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ薄膜の 2 種類の薄膜を使用する。アルミナスパッタ薄膜は、ポーラスシリコン薄膜にアルミナをスパッタして作製された薄膜のことである。ポーラスシリコン薄膜は、SiMPore社から購入した微細孔シリコンメンブレン TEM グリッドを使用した。Figure 3.3 に微細孔シリコンメンブレン TEM グリッドの外観と断面図を示す。微細孔シリコンメンブレン TEM グリッドは、結晶シリコンのフレーム中央にポーラスシリコン自立薄膜が製膜された構造をとる。このポーラスシリコン薄膜は、アモルファスシリコン薄膜をシリコンフレームに製膜した後、これに急速加熱処理を行い、部分的にナノサイズの結晶シリコンを作製する。結晶シリコンは、アモルファスシリコンと比べて体積が小さいので、この相変化に伴い、アモルファスシリコン薄膜内にナノポアが作製される^{5,6}。シリコンフレームの厚みは 100 μm である。本研究で使用しているポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ薄膜の規格を Table 3.1 にまとめた。

Figure 3.4 に膜厚 10 nm のポーラスシリコン薄膜の透過型電子顕微鏡像 (TEM 像) を示す。TEM 像の黒いドットは、シリコンナノ薄膜上に作製されたナノポアを表す。TEM 像から、ナノポアの孔径は、8 から 16 nm の分布を有しており (Figure 3.5)、平均孔径は、10 nm である。このポーラスシリコン薄膜の空孔率は、 $0.2 \sim 0.3 \text{ nanopores}/(100 \text{ nm})^2$ である。

Figure 3.6 に、アルミナスパッタ膜の TEM 像を示す。このアルミナスパッタ薄膜は、膜厚 15 nm のポーラスシリコン薄膜に 12.5 nm のアルミナをスパッタし平均孔径 10 nm に調整した。ナノポアの孔径分布は、4 から 14 nm であった (Figure 3.7)。空孔率は、 $5.4 \sim 6.2 \text{ nanopores}/(100 \text{ nm})^2$ である。

ポーラス薄膜の孔径分布が DNA ナノポア通過挙動に与える影響は、次のように説明できる。孔径 4 nm 以下のナノポアを通過する場合、二本鎖 DNA は強い界面相互作用を受けるため、ナノポア通過時間が長くなることが報告されている^{7,8}。エントロピー障壁の低い孔径の大きなナノポアを DNA が通ることを考慮すると、ポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ薄膜の孔径分布において、界面相互作用を受けてナノポアを通過する DNA の割合は低いといえる⁹。また、ポーラス薄膜の場合、ナノポア近傍の電圧分布は、単一のナノポアではなく複数のナノポアから発生する電圧分布の総和であるため、空孔率に依存する。したがって、孔径分布がナノポア通過後過程に与える影響はほとんどないといえる。

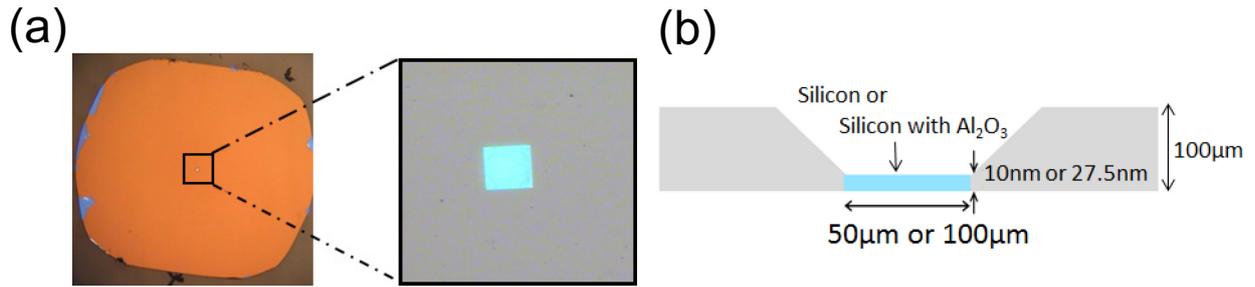


Figure 3.3 ポーラスシリコン薄膜の概観 (a)上面写真, (b)断面図

Table 3.1 ポーラスシリコン薄膜の規格

| | Membrane Thickness | Frame Thickness | The number of windows | Window Size |
|---|--------------------|-----------------|-----------------------|--------------------------------|
| Porous Silicon membrane | 10 nm | 100 nm | 1 | 30 nm×30 nm |
| Porous Silicon membrane with Al ₂ O ₃ | 27.5 nm | 100 nm | 9 | 100 nm×100 nm 100 nm×250 nm |

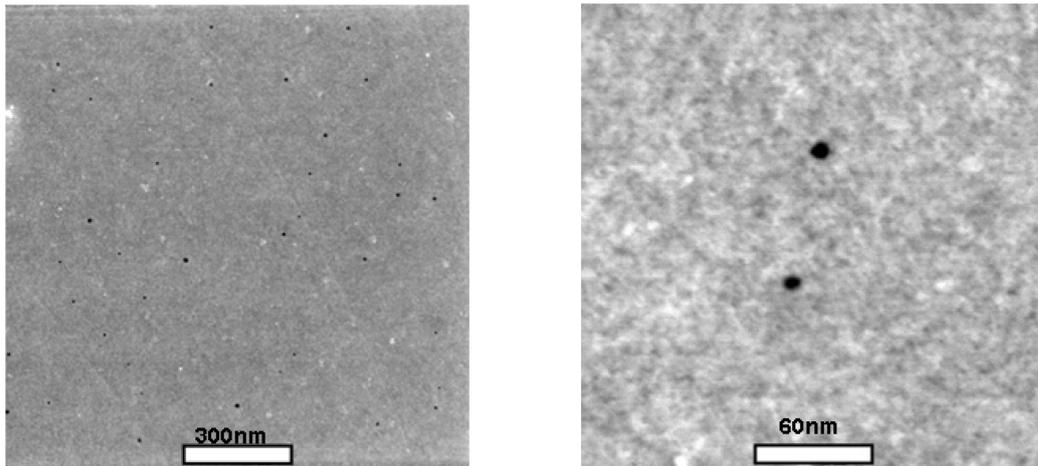


Figure 3.4 ポーラスシリコン薄膜の電子顕微鏡像

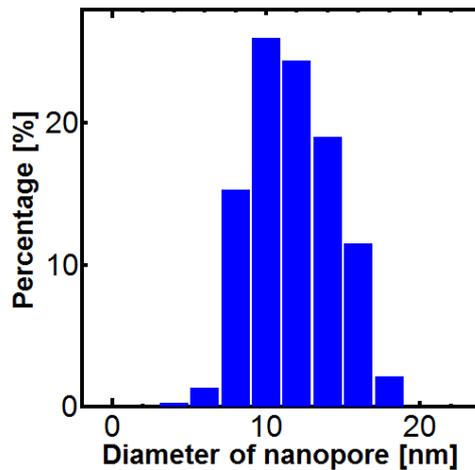


Figure 3.5 ポーラスシリコン薄膜のナノポアの直径分布

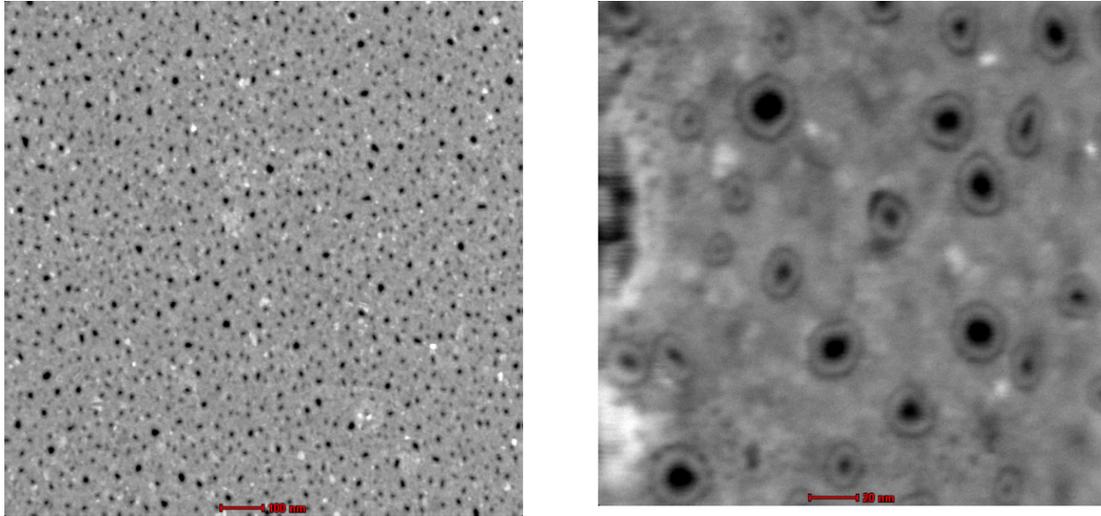


Figure 3.6 アルミナスパッタ薄膜の透過型電子顕微鏡像

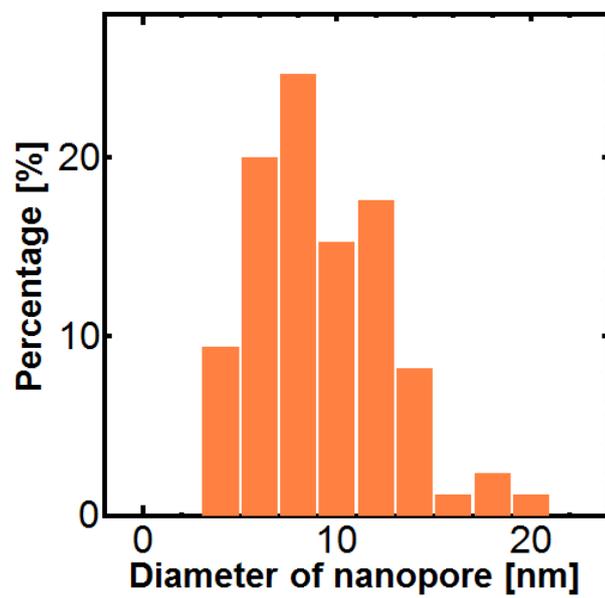


Figure 3.7 アルミナスパッタ薄膜のナノポアの直径分布

3.4 光学的 DNA ナノポア通過挙動観察装置

本研究では、単一 DNA のナノポア通過挙動を観察するために、励起光源として紫外光、また、薄膜の材料としてシリコンを使用した。また、DNA の素早い動きを観察するために、時間分解能 ms 以下の時間分解フォトンカウンティングシステムを構築した。構築したフォトンカウンティングシステムに関しては、第 5 章で述べる。Figure 3.8 に、構築した実験系の概要を示す。電気泳動槽は、テフロン製の 2 種類のチャンバー (cis チャンバーと trans チャンバー) で構成される。Cis チャンバーは、外径 10 mm の円すい形の容器に中央に 2 mm 程度の孔が空いた構造をとる。また、trans チャンバーは、中央とその両端に孔が開けられた構造をとる。中央の孔径は、cis チャンバーの外径と同じであり、この孔は cis チャンバーを嵌めるために作製されている。この trans チャンバー底部には、電気泳動槽の下方から励起光を集光するため、カバーガラスが設置されている。ポーラスシリコン薄膜を cis チャンバー中央の孔に接着させる。そして、cis チャンバーを trans チャンバーに挿入することで、ポーラスシリコン薄膜を隔てて 2 つのチャンバーで構成される電気泳動槽となる。ポーラスシリコン薄膜の接着は、シリコーンゴム (Dragon skin, Smooth-on 社) を用いた。溶媒と電極は電解質溶媒 (KCl, Tris-HCl(pH 7.9) : 和光純試薬工業株式会社) と Ag/AgCl 電極 (A-M systems 社) を使用した。電圧源は、菊水電子工業株式会社のコンパクト電源 (PMC18-2) を使用した。

波長 375 nm の紫外レーザー (Oxxius 社) は、紫外光用シングルモードファイバー (PM-S350-HP: ソーラボ社) に通して、ガウシアンビームにビーム整形した。コリメートレンズとして、対物レンズ (PlanFluor, NA 0.13: 株式会社ニコン) を使用した。水浸対物レンズ (UPlanSApo, NA 1.2 : オリンパス社) で、ポーラスシリコン薄膜上に集光した。DNA 試料からの蛍光発光の検出は、フォトンカウンティングシステムを用いた。フォトンカウンティングシステムでは、蛍光発光を光電子増倍管 (浜松フォトニクス社) よりフォトンパルス電流に変換して、これをフォトンカウンター (SR400:スタンフォードリサーチシステム社) でフォトン数を電圧値に変換する。フォトンカウンターから出力された電圧値は、オシロスコープ (UDS-1 : 日本データシステム株式会社) を用いて、保存した。背景光を抑えて、DAPI の蛍光発光を検出するために、ダイクロイックミラー (FF409-Di03-25×36: Semrock 社)、バンドパスフィルター (fluorescence edge filter 409 nm : エドモンドオプティクス社)、ショートパスフィルター (short pass filter 475 nm : エドモンドオプティクス社) を使用した。

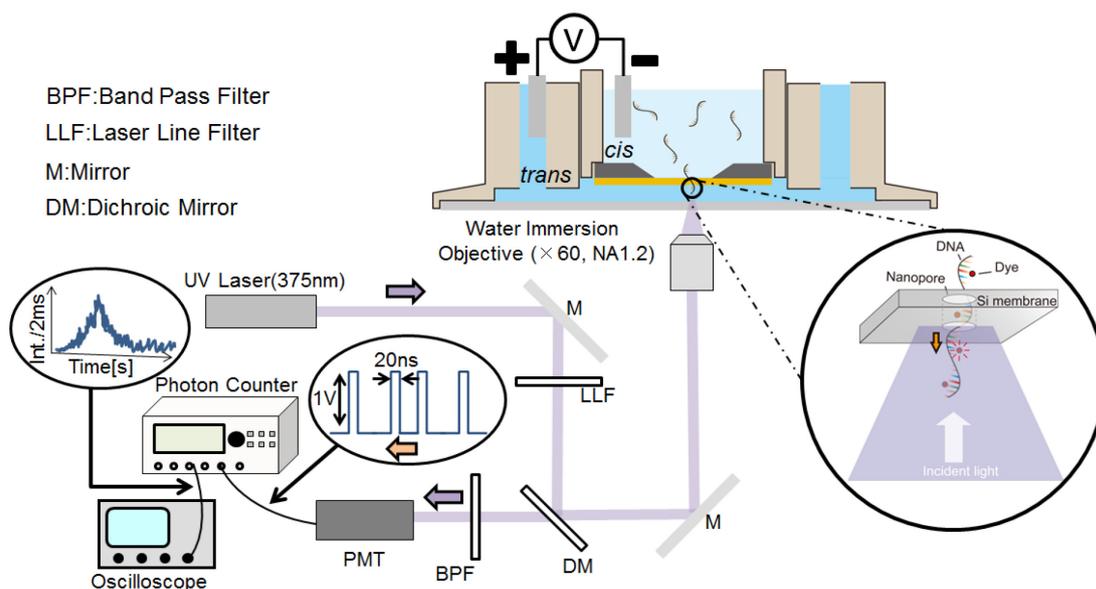


Figure 3.8 DNA ナノポア通過挙動観察実験装置

3.5 データ解析

第 5 章で述べる時間分解フォトンカウンティングシステムより取得された蛍光強度波形を Figure 3.9 に示す。データ解析に用いた波形は、積算時間 $100 \mu\text{s}$ の蛍光強度波形とした。DNA ナノポア通過挙動は、背景光から鋭く立ち上がる波形として得られていることがわかる。DNA がナノポアを通過してナノポア近傍に発生した集光スポットを横断する時間を滞在時間と定義し、本論文では、DNA ナノポア通過挙動を議論する。滞在時間は、Labview プログラムを用いて、背景信号から蛍光強度がピークに達し、バックグラウンドまで減衰するまでの時間を測定した。バックグラウンドは、初めの 10 プロット (1 ms) の平均蛍光強度を背景信号値と定義した (Figure 3.9)。背景信号値が高い蛍光強度波形は、Figure 3.9 に示す波形とは異なり、減衰波形が揺らぎ、減衰する時間も長くなる傾向がみられている。これは、詰まりや DNA のナノポア界面吸着による影響と考えられる。また、蛍光強度波形には、集光スポットの裾野を横断する DNA も含まれていることが考えられる。そのため、データ解析において、バックグラウンドが $10 \text{ photons}/100 \mu\text{s}$ を超える波形と背景信号値がピークフォトン数の $\frac{1}{4}$ の値を超える波形は、解析から除外した。

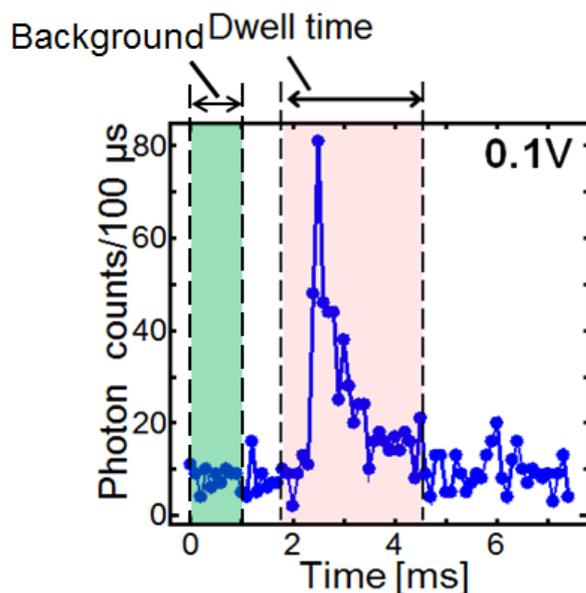


Figure 3.9 滞在時間の測定方法

3.6 ナノポアのイオン電流値測定

DNA ナノポア通過挙動の観察を行う前に、本研究では、イオン電流値を測定することで、電解質溶媒 (KCl 溶媒) がナノポアに満たされていることを確認した。イオン電流測定は、低電圧ソースメータ (ケースレーインストルメンツ社) を用いた。Figure 3.10 に膜厚 10 nm のポーラスシリコン薄膜 (Figure 3.4) を用いた時の典型的なイオン電流値測定結果を示す。電解質溶媒は、1.0 M KCl、10 mM Tris-HCl である。イオン電流測定結果は、印加電圧に対して、線形に増加する傾向が確認された¹⁰。

本研究では、(2.22)式を用いてイオン電流測定結果から、電解質溶媒が満たされているナノポアの数を見積もった¹¹。計算に使用したパラメータは、表 3.2 に示す。(2.22)式から、直径 10 nm の単一ナノポアのコンダクタンスは 35.9 nS と算出される。Figure 3.4 のポーラスシリコン膜の空孔率 (23.3×10^{12} nanopores/m²) から、大きさ $30 \times 30 \mu\text{m}$ のポーラスシリコン膜のナノポア総数は、20970 個と見積もられる。理論式から、印加電圧 500 mV において、20970 個の直径 10 nm のナノポアを流れるイオン電流値は、376.4 μA と算出される。この値について、印加電圧 500 mV における実験値 (25 μA) は、7%に相当することから、ポーラスシリコン薄膜を用いた実験において、電解質溶媒に満たされているナノポアは、約 1394 個と概算される。

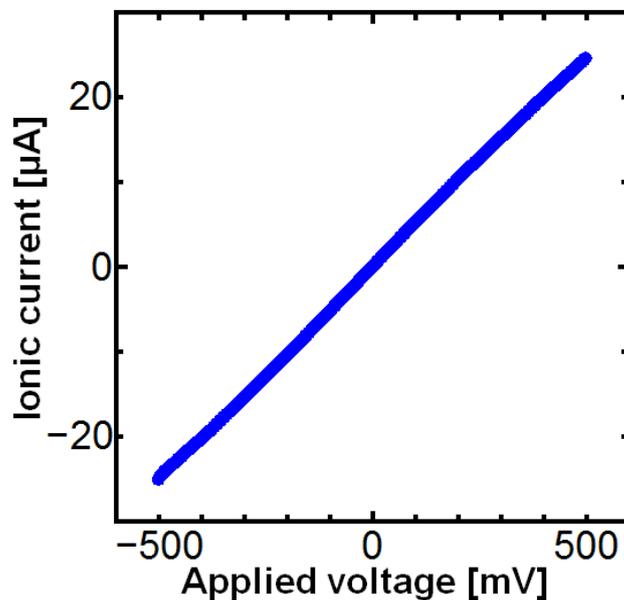


Figure 3.10 ポーラスシリコン薄膜の I-V 測定結果

Table 3.2 理論解析に用いた理論値

| Parameter | Value | Reference |
|-----------|--|-----------|
| d | $10 \times 10^{-9} \text{ m}$ | — |
| h | $10 \times 10^{-9} \text{ m}$ | — |
| μ_+ | $7.616 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$ | 12 |
| μ_- | $7.909 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$ | 12 |
| c | 6.0×10^{23} | — |
| σ | 60 mC/m^2 | 13 |

3.7 DNA ナノポア通過挙動観察の実験手順

DNA ナノポア通過挙動観察の実験手順を以下に記す。

- ①微細孔シリコンメンブレン TEM グリッドをシリコンゴムで cis チャンバーに接着させる。
- ②微細孔シリコンメンブレン TEM グリッドが接着された cis チャンバーをメタノールと DDW につけて、シリコン薄膜の洗浄を行う。
- ③cis チャンバーを trans チャンバーに取り付けて、これに電解質溶媒を満たす。
- ④電気泳動槽に Ag/AgCl 電極を挿入し、イオン電流測定を行い、ナノポア内に

電解質溶媒が満たされていることを確認する。

- ⑤電気泳動槽を光学系に取り付けて、光電子増倍管やレーザーのコリメート等のアライメントを行う。
- ⑥cis チャンバーに DNA 試料を滴下し、cis チャンバー内の溶媒に対してピペティングを行い、DNA 試料を分散させる。
- ⑦電圧を印加し、蛍光強度波形の検出を行う。

3.8 おわりに

本章では、初めに本研究で使用する 3 種類の DNA 試料について説明した。また、吸光度測定結果から DNA 試料に修飾されている蛍光色素の分子数について述べた。次に、2 種類のポーラスシリコン薄膜について概説し、TEM 像からポーラスシリコン薄膜のナノポア孔径分布について述べた。3.4 と 3.5 では、実験装置の概要と検出された蛍光強度波形の解析方法について説明した。3.6 では、ナノポアに電解質溶媒が満たされていることを確認するために行うイオン電流測定について説明した。また、イオン測定結果から典型的に実験ではポーラスシリコン薄膜内の約 7% のナノポアが満たさせていることを述べた。最後に、実験手順を概説した。

参考文献

1. G. C. Randall and P. S. Doyle, *Macromolecule* **38**, 2410 (2005).
2. J. Tang, N. Du, and P. S. Doyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 16153 (2011).
3. S. K. Kim, S. Eriksson, M. Kubista, and B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3441 (1993).
4. “Alexa Fluor Reactive Dye Decapacks for Microarray Applications”, (Life Technologies Corporation, New York, 2009).
5. C. C. Striemer, T. R. Gaborski, J. L. McGrath, and P. M. Fauchet, *Nature* **445**, 749 (2007).
6. T. R. Gaborski, J. L. Snyder, C. C. Striemer, D. Z. Fang, M. Hoffman, P. M. Fauchet, and J. L. McGrath, *ACS Nano* **4**, 11, 6973 (2010).
7. M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, and A. Meller, *Biophys. J.* **95**, 4716 (2008).
8. R. Akahori, T. Haga, T. Hatano, I. Yanagi, T. Ohura, H. Hamamura, T. Iwasaki, T. Yokoi, and T. Anazawa, *Nanotechnol.* **25**, 275501 (2014).
9. P. Rowghanian and A. Y. Grosberg, *Phys. Rev. E* **87**, 042722 (2013).

10. S. Liu, T. D. Yuzvinsky, and H. Schmidt, *ACS Nano*. **7**, 5621 (2013).
11. R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, D. Krapf, M. Y. Wu, N. H. Dekker, and C. Dekker, *Nano Lett.* **6**, 89 (2006).
12. D. R. Lide, “CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th ed.”, (CRC Press, Boca Raton, 2005).
13. D. Stein, M. Kruithof, and C. Dekker, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 035901 (2004).

4. シリコンナノポア界面における集光スポットの発生

4.1 はじめに

単一分子蛍光計測は、生体分子の構造や機能を理解する上で重要な技術である。初めて液中で直接的に生物分子の単一分子蛍光計測を行ったのは、大阪大学の柳田らのグループである。彼らのグループでは、全反射顕微鏡を用いて、ミオシンによる蛍光 ATP 加水分解反応を観察することに成功した¹。しかし、彼らのグループのように、溶媒中を漂う単一生体分子を観察するには、溶媒・コンタミ・基板からの反射光や蛍光発光による背景光を低減させる必要がある。これまでに、低バックグラウンドでの溶液中における単一生体分子の観察するために、様々な方法が提案されている。例えば、金属ナノ開口を有するゼロモード導波路を用いて、開口内に光を局在させることで、開口部に固定化された単一分子からの蛍光を検出する方法が提案されている^{2,3}。同様に、ナノポアを用いた単一分子蛍光検出においても背景光を抑えることが求められる。ボストン大学の Meller らのグループでは、全反射顕微鏡を用いることで、単一 DNA からの蛍光発光の検出に成功している⁴。彼らの手法では、窒化シリコン薄膜を隔てて、cis チャンバーと trans チャンバーに分離される浴槽に異なる屈折率を有する溶媒で満たすことで、窒化シリコン薄膜に作製されたナノポア上にエバネッセント光を発生させた。エバネッセント光の発生により、cis チャンバー内を拡散する DNA 試料からの蛍光発光を抑え、単一 DNA のナノポア通過を蛍光観察することに成功している。また、ノースイースタン大学の Wanunu らのグループでは、ゼロモード導波路を用いて、DNA がナノポアに引き寄せられ、ナノポアを通過するまでの一連の様子を蛍光観察することに成功している⁵。このように、DNA ナノポア通過挙動の光学的観察において、cis チャンバー内の蛍光発光を低減させる必要があることから、本論文では、シリコンの紫外光に対する遮光性を利用して、背景光を抑えた単一 DNA 観察を行う。本章では、シリコンの遮光性による集光スポットの発生を理解するために、電磁場計算と実験検証を行う。

4.2 FDTD シミュレーション

本節では、FDTD 法 (Finite-Difference Time-Domain Simulation) を用いて、実験条件下での、電磁場計算を行った。FDTD 法は、空間を格子状のセルに離散化し、この格子状のセルに対して、マクスウェル方程式を適用して、時間発展を計算する。電磁場計算に用いられるマクスウェル方程式は、次の 2 式である。

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\mu_0 \mu \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} \quad (4.1)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \epsilon_0 \epsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (4.2)$$

E 、 H 、 ϵ_0 、 μ_0 、 ϵ 、 μ は、それぞれ電場強度、磁場強度、真空の誘電率、真空の透磁率、物質の比誘電率、物質の比透磁率である。4.2.1 では、計算モデル・条件について述べる。4.2.2 では、ナノポア近傍での電場分布について述べる。

4.2.1 計算モデル

Figure 4.1 に xz 平面の計算モデルを示す。計算ソフトは、Lumerical Solutions 社の FDTD Solutions を使用した。計算モデルは、膜厚 10 nm のシリコン薄膜を全計算領域に配置し、中央 3 箇所直径 10 nm のナノポアを配置された系を取り扱った。ナノポアの間隔は 100 nm である。この系に対して、波長 375 nm のガウシアンビームを開口数 (NA) 1.2 の対物レンズでシリコン上に集光した時の電場強度分布を求める。光源は、 x 偏光の直線偏光とした。光源は、シリコン薄膜の上面から 400 nm の位置に配置した。計算領域は、 x [-15000 nm:15000 nm]、 y [-15000 nm:15000 nm]、 z [420 nm:-100 nm]とした。シリコンの屈折率と消衰係数は、それぞれ 6.7 と 1.4 である。屈折率 1.49 の塩化カリウム溶媒をナノポア内とシリコン薄膜の周囲に満たした。メッシュサイズは、ナノポアに対して $2 \times 2 \times 2 \text{ nm}^3$ 、シリコン薄膜に対して $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$ 、シリコン薄膜周囲の塩化カリウム溶媒に対して $50 \times 50 \times 50 \text{ nm}^3$ とした。境界条件は、完全吸収境界 (PML) とした。実験系を想定して、trans チャンバーから cis チャンバーへ励起光を集光したモデルとする。

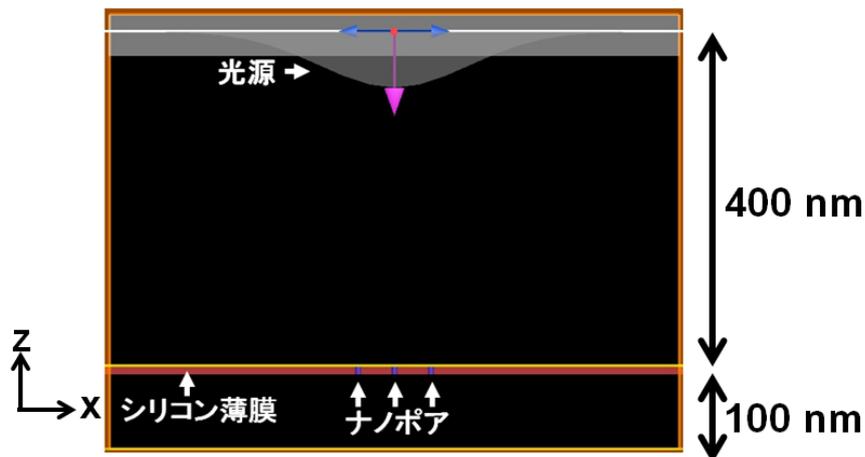


Figure 4.1 計算モデル

4.2.2 ナノポア近傍における集光スポット

まず、 $x[-200\text{nm}:200\text{nm}]$ 、 $z[-50\text{nm}:150\text{nm}]$ の領域における電場強度分布について述べる。Figure 4.2(a)に計算結果を示す。シリコンは紫外光領域において高い屈折率と消衰係数を有することから、透過光量を大幅に低減され、ポーラスシリコン薄膜上に直径 280 nm・深さ 140 nm の逆 U 字型の集光スポットが形成されることがわかる。先行研究では、直径数百 nm のナノポア内を光が伝搬することが示されているが、本論文で用いる直径 10 nm のナノポアは、光の伝搬を抑制するのに十分小さな大きさであることがわかる⁶。以上のことから、紫外光をポーラスシリコン薄膜上に集光した条件下において、cis チャンバー内の DNA 試料からの蛍光発光を抑えた条件（低い背景信号）での測定が可能といえる。また、集光スポットが trans チャンバー側に励起されていることから、DNA 試料の励起は、ナノポア通過後に生じることがわかる。

次に、集光スポットの偏光依存性について述べる。本論文では、高 NA の対物レンズを使用することから、集光スポットには、x 偏光成分以外に y と z 偏光成分の 2 偏光成分が含まれる。これは、入射レーザーを集光すると、光路が傾くため、集光前の電場ベクトル配置が、x 方向のベクトル配置から傾くことで生じる。Figure 4.2 (b)と(c)に示すように、境界条件から、x 偏光成分の集光スポットは、シリコン薄膜界面から 100 nm 離れた領域に形成される。一方、z 偏光成分の集光スポットは、2 つの半円状の分布でナノポア近傍に形成される⁷。z 偏光成分に対する x 偏光成分の集光スポット振幅の比 ($|E_x|/|E_z|$) は、2.7 である。この値は、先行研究で報告されている NA 1.4 の対物レンズでシリカ基板上に集光した時に励起する集光スポット振幅の比 ($|E_x|/|E_z| = 2.5$) と同程度である⁸。z 偏光成分の集光スポットに着目すると、電場強度は、ナノポア界面から僅か 4 nm の距離でピーク電場強度の 80 %まで急激に増加することがわかる (Figure 4.2 (d))。したがって、z 偏光成分の集光スポットは、ナノポアを通過した直後の DNA の観察に有効な励起光源である。z 偏光素子を利用すると、z 偏光成分の集光スポットのみを形成させることができるが、本論文における実験では、Figure 4.2 (a)の集光スポットを用いるため、z 偏光成分の集光スポットは積極的に利用されていないと考えられる。

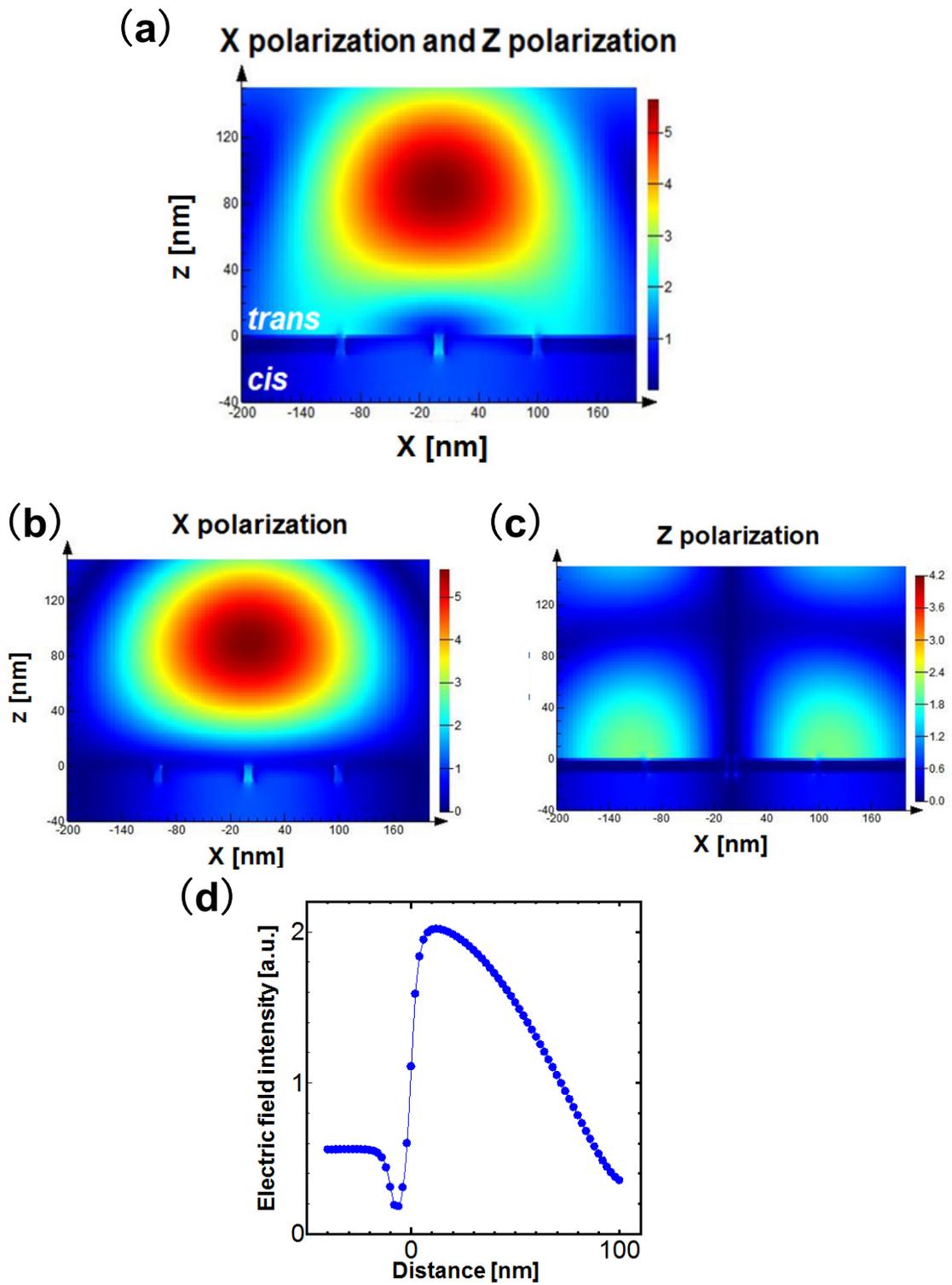


Figure 4.2 シリコン薄膜条件下における FDTD シミュレーション計算結果
 (a) - (c) $x[-200\text{nm}:200\text{nm}]$, $z[-50\text{nm}:150\text{nm}]$ の領域における電場分布
 (a) 全偏光成分, (b) x 偏光成分, (c) z 偏光成分,
 (d) z 軸方向成分の電場強度分布

4.3 集光スポットの実験的検証

本節では、シリコンの遮光性が単一 DNA のナノポア通過観察に有用であることを実験的に検証する。4.3.2 では、先行研究で報告されている DNA ナノポア通過時間が数百マイクロ秒であることに着目し、フォトンカウンターの積算時間を 0.5 ms における観察結果について述べる⁹。4.3.3 では、3.3 にて紹介した実験装置が連続的にフォトンカウンティングできる最短積算時間 2 ms における観察結果について述べる。

4.3.1 実験条件

実験は、3.4 にて紹介した実験装置を用いた。レーザー強度は 100 μW とした。試料は、 λDNA 断片（長さ 11933 bp、14321 bp、9533 bp、12715 bp）を蛍光色素 DAPI で染色した DNA 試料を使用した。実験において、電圧印加前の cis チャンバー内の DNA 試料の濃度は、10 pM とした。ポーラスシリコン薄膜は、膜厚 10 nm・孔径 10 nm の薄膜を使用した。フォトンカウンターの積算時間は、4.3.2 では 0.5 ms、4.3.3 では 2 ms とした。電解質溶媒は、1.0 M KCl/10 mM Tris-HCl (pH 7.8)を使用した。電極は、Ag/AgCl 電極を使用した。

4.3.2 積算時間 0.5 ms における DNA ナノポア通過挙動観察

まず、フォトンカウンターの積算時間 0.5 ms の設定下で、DNA ナノポア通過挙動を観察した。Trans チャンバーから cis チャンバーへ電圧を印加すると、バックグラウンド 80 photons/0.5ms に対して、ピークフォトン数 ~ 200 photons/0.5ms のバースト波形を検出した (Figure 4.3 (a), (b))。本研究法では、紫外レーザーをポーラスシリコン薄膜上に集光していることから、溶媒の温度上昇が DNA ナノポア通過挙動に影響することが予想される。先行研究において、波長 800 nm の集光レーザーによる溶媒温度の上昇率は、0.005 K/mW と報告されている¹⁰。したがって、本実験に用いる強度 100 μW の集光レーザーによる温度上昇が、DNA ナノポア通過挙動にあたる影響はないといえる¹¹。電気泳動により、DNA は、ナノポアを通過し集光スポットを横断することから、このバースト波形は、DNA 由来の蛍光発光といえる。Figure 4.3 (c)に、3 分間のバースト波形のピークフォトン数をまとめたヒストグラムを示す。フォトン数は、ピークフォトン数から背景信号値を差し引いた値である。印加電圧 200 mV におけるピークフォトン数 50 \sim 70 photons/0.5 ms の検出頻度が、印加電圧 100 mV と比べて、高い傾向がみられた。先行研究では、DNA をナノポアへ引きつける力が、印加電圧に依存することが報

告されている¹²。ナノポア近傍において、電場はナノポアに向かって集中した分布を形成し、これによって、DNA はナノポアへ引きつけられ、ナノポアから吐き出される。この引きつける力の有効距離 r^* を電気泳動速度が拡散速度を超える領域とすると、次式で定義される。

$$r^* = \frac{d^2 \mu}{8hD} \Delta V \quad (4.3)$$

d 、 μ 、 l 、 D 、 ΔV は、それぞれナノポアの直径、DNA 電気泳動移動度、ナノポアの深さ、DNA の拡散定数、印加電圧である。上式から、印加電圧 100 mV における有効距離 ($r^* = 2.3 \mu\text{m}$) は、集光スポットがこの領域内に十分含まれる長さであった。有効距離 r^* と電気泳動力は、印加電圧 ΔV に従って、線形的に増加する。したがって、印加電圧の増加に伴い、DNA がナノポアに引き寄せられる有効距離が長くなるために、DNA の捕捉率は増加する。また、DNA 泳動速度が増加したために、ピークフォトン数は低くなる。これら 2 つ要因が関係して、印加電圧 100 mV と 200 mV におけるピークフォトン数 50 ~ 70 photons/0.5 ms の検出頻度の違いに表れたといえる。

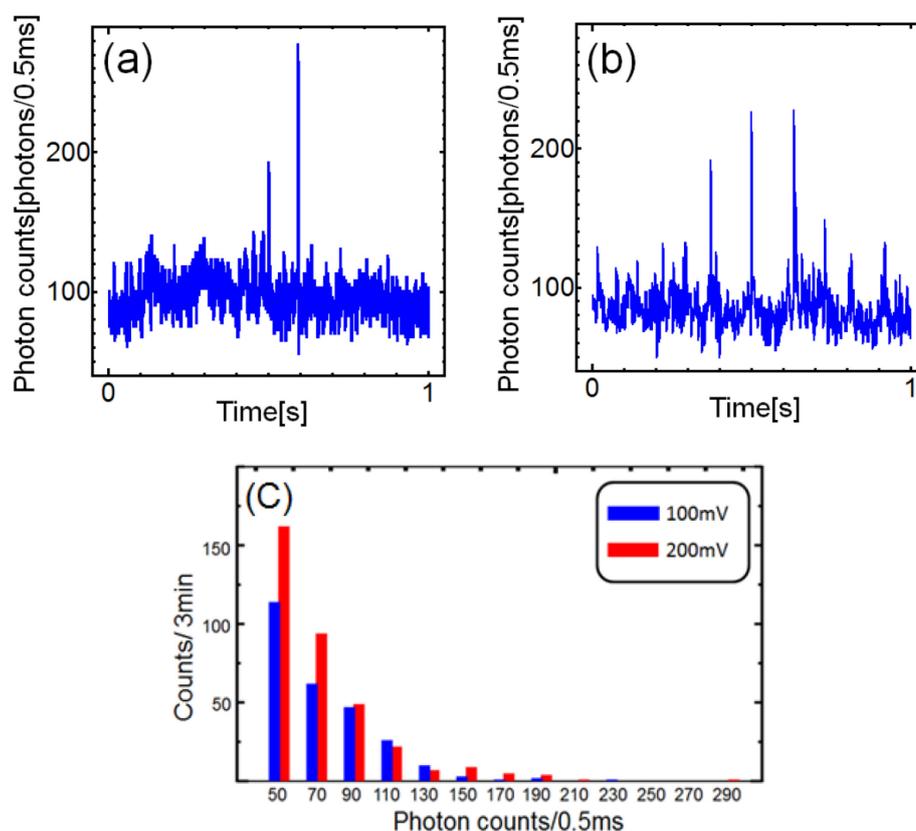


Figure 4.3 積算時間 0.5ms 設定下における DNA ナノポア通過挙動観察結果 (a), (b) 蛍光強度波形 (a) 100 mV, (b) 200 mV, (c) バースト波形のフォトン数ヒストグラム

4.3.3 積算時間 2 ms における DNA ナノポア通過挙動観察

次に、フォトンカウンターの積算時間 2 ms の設定下で、DNA のナノポア通過挙動を観察した。まず、電圧 300 mV を trans チャンバーから cis チャンバーへ印加すると、4.3.2 と同様に DNA 試料由来と考えられるバースト波形が検出された (Figure 4.4 (a))。これは、バックグラウンド 200 photons/2.0 ms に対して、ピークフォトン数 ~600 photons/2.0 ms ・ 時間幅 数 ms のバースト波形であった。DNA の捕捉率は、次式で表される¹²。

$$R = \frac{\pi d^2 \mu}{4h} \Delta V \quad (4.4)$$

先行研究において、印加電圧 300 mV、ナノポアの大きさ 3.5 nm の条件下における 10 kbp の二本鎖 DNA の捕捉確率は、8 回/(s・nM) と報告されている。上式から、本実験条件における DNA 捕獲率を算出すると、1.8 回/(s・10pM) である。本実験におけるバースト波形の検出頻度 3.1 回/s は、先行研究と同程度の値であることから、バースト波形は単一 DNA ナノポア通過によるものといえる。

続いて、印加電圧を変えて、DNA ナノポア通過挙動を観察した。印加電圧 600 mV と 800 mV においても、バースト波形が観察された (Figure 4.4 (b), (c))。Figure 4.4 (d) に、印加電圧 300、600、800 mV の条件下で、2 分間のバースト波形のピークフォトン数をまとめたヒストグラムを示す。フォトン数は、4.3.2 と同様に、ピークフォトン数から背景信号値を差し引いた値である。いずれの印加電圧条件下においても、ヒストグラムは 100 ~ 200 photons/2.0 ms の分布をもっている。ヒストグラム分布自体は、ナノポア通過時と通過直後の DNA 試料が様々な立体構造や経路で集光スポットを通過することが理由として考えられる^{13,14}。また、印加電圧に伴い、ヒストグラム分布は低いフォトン数へシフトすることがわかる。この傾向は、4.3.2 で述べたように、DNA 泳動速度は、電圧に依存して増加するために、検出されるフォトン数が低下することが理由として考えられる¹³。印加電圧 600 mV と 800 mV における検出頻度は、2.4 回/s と 1.7 回/s であった。DNA 捕捉率の電圧依存性が観察されなかった理由として、高い印加電圧条件下では、DNA 電気泳動速度の増加にすするため、識別に十分なフォトン数のバースト波形が得られていないことが考えられる。

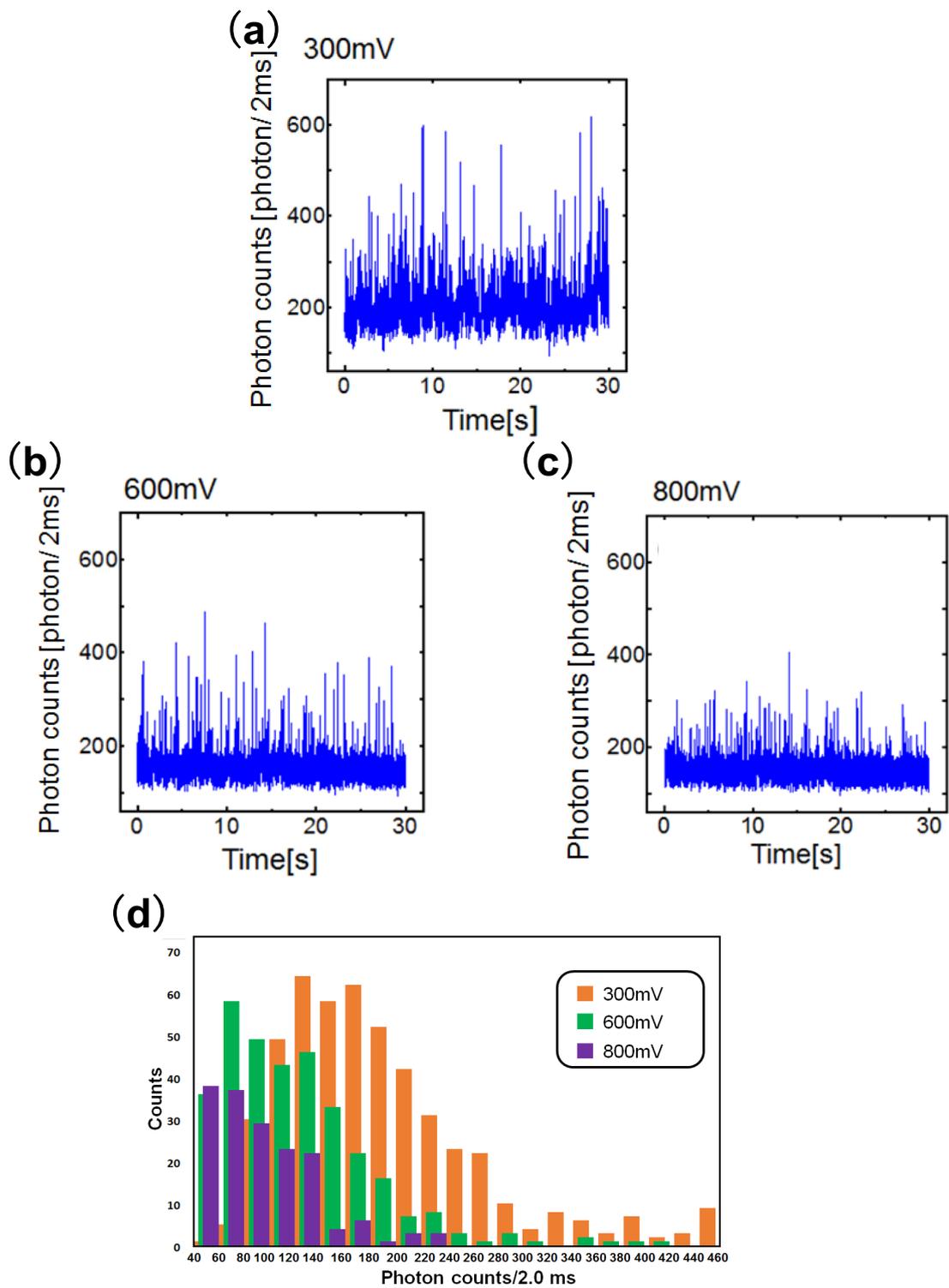


Figure 4.4 積算時間 2 ms 条件下における DNA ナノポア通過挙動観察結果

(a) - (c) 蛍光強度波形 (a) 100 mV, (b) 200 mV, (c) 300 mV,

(d) バースト波形のフォトン数ヒストグラム

4.3.4 積算時間 0.5 ms と 2 ms における観察結果の比較

積算時間 0.5 ms と 2 ms の条件において、DNA ナノポア通過挙動を観察することができた。ピークフォトン数を比較すると、印加電圧 100 mV、積算時間 0.5 ms の条件におけるピークフォトン数が 0 ~ 200 photons/0.5 ms であったのに対して、印加電圧 300 mV、積算時間 2 ms の条件におけるピークフォトン数は 50 ~ 400 photons/2 ms であった。印加電圧が高いにもかかわらず、積算時間 2 ms の条件の方がピークフォトン数の方が高い値となった理由として、ナノポア通過後の遅い DNA の空間移動が挙げられる。4.2 の電磁場計算から DNA 試料からの蛍光発光は、DNA がナノポアを通過してから集光スポットを横断し終えるまでの時間に生じることが考えられる。また、ナノポア近傍の電場強度は、(2.23)式から、距離に依存して減衰することがわかる。そのため、ナノポア通過後の DNA は、距離で減衰する電場強度を受けて、DNA ナノポア通過速度より遅い速度で空間移動することが考えられる¹⁵。したがって、ナノポア通過後の DNA が遅い速度で集光スポットを移動する過程が蛍光強度波形に含まれていたために、高い電圧を印加したにもかかわらず、典型的な DNA ナノポア通過時間よりも長い積算時間 2 ms の条件の方が高いピークフォトン数になったといえる。

4.4 おわりに

本章では、シリコン薄膜界面に発生する集光スポットについて、検討した。まず、4.2 では、FDTD 法を用いて、集光スポットの発生について電磁場計算による理論的な解析を行った。4.3 では、DNA のナノポア通過挙動を観察し、実験的に集光スポットの発生を検証した。以上の理論計算と実験検証から、シリコン薄膜と紫外光の組み合わせは、単一 DNA ナノポア通過観察に有用な方法であることがわかった。

参考文献

- 1 T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida, *Nature* **374**, 555 (1995).
2. S. Uemura, M. Dorywalska, T. H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu, *Nature* **446**, 454 (2007).
3. M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, and W. W. Webb, *Science* **299**, 682 (2003).
4. G. V. Soni, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, B. McNally, and A. Meller, *Sci. Instrum.* **81**, 014301 (2010).
5. J. Larkin, M. Foquet, S. W. Turner, J. Korlach, and M. Wanunu, *Nano Lett.* **14**, 6023 (2014).
6. J. Hong, Y. Lee, G. Chansin, J. Edel, and A. deMello, *Nanotechnol.* **19**, 65205 (2008).
7. B. Sick, B. Hecht, P. U. Wild, and L. Novotny, *J. Microsc.* **202**, 365 (2001).
8. L. H. Herman, C. J. Kim, Z. Wang, M. H. Jo, and J. Park, *Appl. Phys. Lett.* **101**, 123102 (2012).
9. M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, and A. Meller *Biophys. J.* **95**, 4716 (2008).
10. E. J. G. Peterman, F. Gittes, and C. F. Schmidt, *Biophys. J.* **84**, 1308 (2003).
11. N. D. Fiori, A. Squires, D. Bar, T. Gilboa, T. D. Moustakas, and A. Meller, *Nat. Nanotechnol.* **8**, 946 (2013).
12. M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, and A. Meller, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 160 (2010).
13. Q. Liu, H. Wu, L. Wu, X. Xie, J. Kong, X. Ye, and L. Liu, *PLoS ONE* **7** e46014 (2012).
14. B. Lu, F. Albertorio, D. P. Hoogerheide, and J. A. Golovchenko, *Biophys. J.* **101**, 70 (2011).
15. J. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J. A. Golovchenko, *Nat. Mater.* **2**, 611 (2003).

5. 時間分解フォトンカウンティングシステムの構築

5.1 はじめに

DNA ナノポアシーケンサ開発において、最適な測定条件や測定機構を模索するために、光学的な方法を用いて DNA ナノポア通過挙動を明らかにする試みが行われている。青山学院大学の三井らのグループでは、蛍光顕微鏡を用いて、DNA がナノポアに引き寄せられる様子を広視野に観察することで、ナノポアに向かって集中する電場が放射的に発生していることを明らかにしている¹。また、ケンブリッジ大学の Keyser らのグループでは、DNA がナノキャピラリーを通過し、ナノキャピラリー内を移動する様子を蛍光顕微鏡で観察することで、ナノキャピラリー内特有の DNA 電気泳動移動度を見積もることに成功している²。しかしながら、いずれの先行研究においても、検出系の時間分解能の制約から、数百 nm 近傍における素早い DNA コイルの形成や空間移動を観察した事例は未だ報告されていない。

第 4 章では、従来のフォトンカウンティングシステムを用いて、単一 DNA がナノポア通過し、シリコン薄膜上に発生した 140 nm 程度の集光スポットを横断する様子を時間幅数 ms のバースト波形として観察した。Jail Li によると、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA が直径 10 nm のナノポアを通り抜ける平均時間は、印加電圧 120 mV において 400 ~ 500 μ s と報告されており、ナノポア近傍での DNA コイルの形成と空間移動の観察には、最低でも 100 μ s の時間分解能が求められる³。しかしながら、従来のフォトンカウンティングシステムでは、ms 以下のフォトンカウンティングができないため、フォトンカウンティングシステムの時間分解能を向上させる必要がある。このような背景の基、本章では、100 μ s 時間分解能を有するフォトンカウンティングシステム（時間分解フォトンカウンティングシステム）の構築を行う。5.2 では、本論文で構築したフォトンカウンティングシステムの概要を紹介する。5.3、5.4 では、このフォトンカウンティングシステムの動作確認のため、蛍光ビーズのブラウン運動と DNA のナノポア通過挙動を観察した。5.5 では、検出された蛍光強度波形の考察を行った。

5.2 時間分解フォトンカウンティングシステムの概要

本節では、時間分解フォトンカウンティングシステムの概要を紹介する。従来のフォトンカウンティングシステムでは、光電子増倍管で検出されたフォトンを実効電圧 20 ns・パルス振幅 1 V のパルス電流に変換し、これをフォトンカウンター（積算器）で設定積算時間におけるパルス数を電圧値に変換して、時間あたりのフォトン数を測定していた。しかし、フォトンカウンターのカウント周期が 2 ms であるため、時系列で ms 以下のフォトン計測が行えない。そこで、本論文では、Figure 5.1 に示すように、光電子増倍管から出力されるパルス電流を大量メモリ搭載・高速 A/D 変換ボード（CompuScope; Gage Applied Technologies 社）を用いて、直接データとして保存し、パルス数を Labview プログラムで数える方法を考案した。Labview プログラムでは、パルス波形に対して立ち上がり判定を行い、保存した電流波形データからパルス数を数える。光電子増倍管から出力される電流に含まれる時間幅 20 ns のパルスを数えるために、本論文において、十分な時間分解能をもち、低容量のデータを保存できるサンプリングレート 200 MS/s を設定値とした。数 ms 以上の蛍光強度波形を得るために、サンプル数 10^6 オーダーのデータを一度に保存する。本論文では、トリガー用の波形として、パルス密度変調した波形を利用した。パルス密度変調とは、パルス電流密度をアナログ量の電流に変換する方式である。本論文では、光電子増倍管から出力されたパルス電流に対して、ローパスフィルターをかけ、パルス密度変調を行い、時間当たりのパルス数に対応した波形に変換した。この波形に対して、トリガーをかけてパルス波形の保存を行った。Figure 5.2 にデータ取得時の電流波形を示す。Ch01、Ch02 の波形は、それぞれ保存したパルス電流波形とパルス密度変調した電流波形を表す。Ch02 の波形がある閾値を越えたときのパルス電流波形を保存した。ローパスフィルターの周波数は、変換波形の積算時間に対応することから、10 kHz とした。

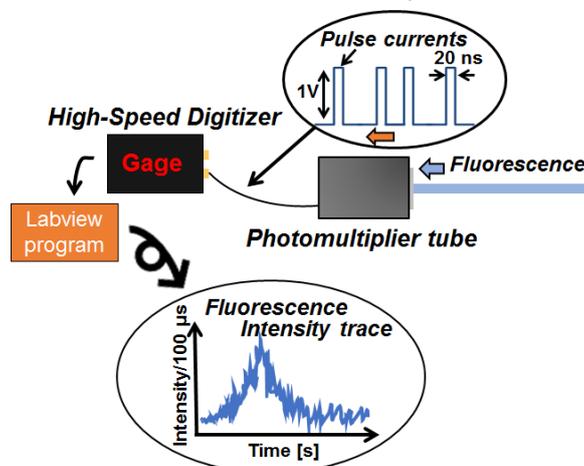


Figure 5.1 時間分解フォトンカウンティングシステムの概要

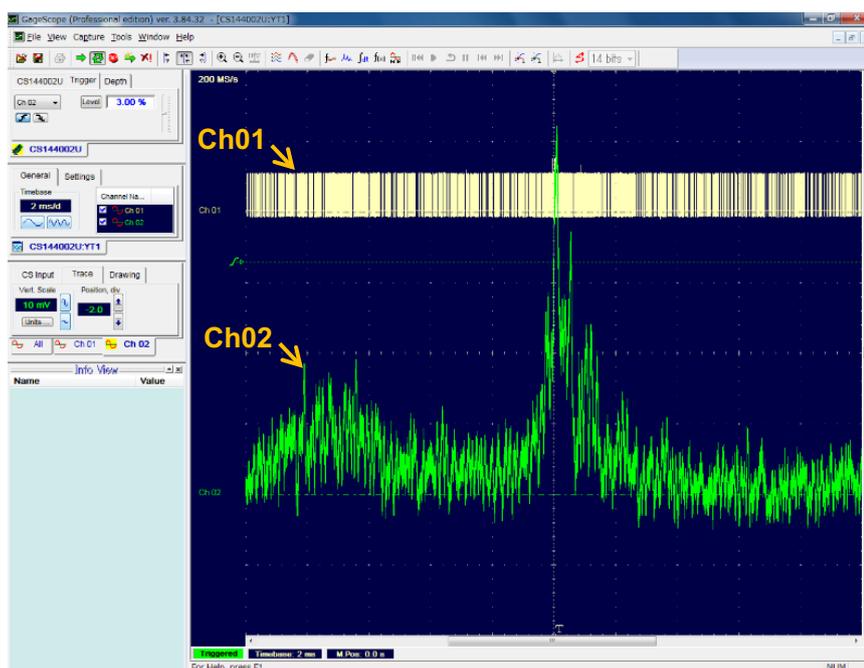


Figure 5.2 データ取得時の電流波形
Ch01:パルス電流, Ch02:パルス変調した電流波形

5.3 時間分解フォトンカウンティングシステムの動作確認

本節では、時間分解フォトンカウンティングシステムの動作確認を行う。従来のフォトンカウンティングシステムと時間分解フォトンカウンティングシステムを用いて、同時に検出した波形の比較を行う。5.3.1 では、まず蛍光ビーズのブラウン運動の観察から、検出波形の比較を行う。5.3.2 では、DNA ナノポア通過挙動の観察から、検出波形の比較を行う。

5.3.1 蛍光ビーズ観察

5.3.1.1 実験方法

実験は、3.4 にて紹介した実験装置を使用した。レーザー強度は $100 \mu\text{W}$ とした。試料は、Invitrogen 社の直径 20 nm の蛍光ビーズ (FluoSpheres ($365 \text{ nm}/415 \text{ nm}$)) を使用した。実験では、この蛍光ビーズの原液に DDW を加えて、 100000 倍に希釈した溶媒を使用した。蛍光ビーズの濃度は、 1 nM である。この試料をカバーガラス上に滴下し、レーザーを溶液中に集光して蛍光ビーズのブラウン運動観察を行った。レーザーの集光位置は、カバーガラス上面から $10 \mu\text{m}$ とした。フォトンカウンターの積算時間は、 2 ms とした。

5.3.1.2 実験結果

Figure 5.3(a)に従来のフォトンカウンティングシステムにより検出された蛍光強度波形を示す。バックグラウンド 200 photons/2.0 ms に対して、最大 2000 photons/2.0 ms のバースト波形が観察されていることがわかる。Figure 5.3 (b)に、パルス波形のピークフォトン数をまとめたヒストグラムを示す。平均 614 photons/2.0 ms であり、1000 photons/2.0 ms の分布をもつことがわかる。集光スポットの滞在時間を表す指標である相関時間は、次式で表される⁴。

$$\tau_D = \frac{w_{xy}^2}{4D} \quad (5.1)$$

w_{xy} 、 D は、それぞれ xy 平面の集光スポットの半径と拡散定数である。直径 20 nm の蛍光ビーズに対して、相関時間 400 μ s である。蛍光ビーズの濃度から、集光スポットあたりの蛍光ビーズの個数を算出すると、 1.6×10^4 個である。相関時間 (400 μ s) のイベントが集光スポットあたりの個数 (1.6×10^4 個) につき 1 回起こると考えると、検出頻度は 0.4 回/s と概算される。観察時間 200 s において、この検出頻度は、1.7 回/s と良好な一致を示すことから、バースト波形が単一蛍光ビーズの蛍光発光によるものといえる。

Figure 5.4 (a)に、時間分解フォトンカウンティングシステムより検出された蛍光強度波形を示す。積算時間 100 μ s において、背景信号に対して、ピークフォトン数 40 ~ 100 photons/100 μ s ・ 時間幅 1 ms 以下の蛍光強度波形が観察された。Figure 5.4 (b)に、Figure 5.4 (a)に示す波形の時間 6.1 ~ 8.0ms のプロットの積算値をまとめたヒストグラムを示す。平均 504 photons/2.0 ms であり、1000 photons/2.0 ms の分布をもち、これらの値は Figure 5.3 と概ね一致する。Figure 5.4 (c)に、Figure 5.4 (a)に示す波形の時間幅をまとめたヒストグラムを示す。先行研究に習って、時間幅は半値幅とした⁵。平均時間幅は、495 μ s であり、これは、相関時間 400 μ s と概ね一致する。以上の比較から、構築した時間分解フォトンカウンティングシステムにより検出された蛍光強度波形は、従来のフォトンカウンティングシステムにより検出されるバースト波形に対応することがわかった。蛍光ビーズのブラウン運動を高時間分解で蛍光観察できたことから、構築したシステムの有用性が確認された。

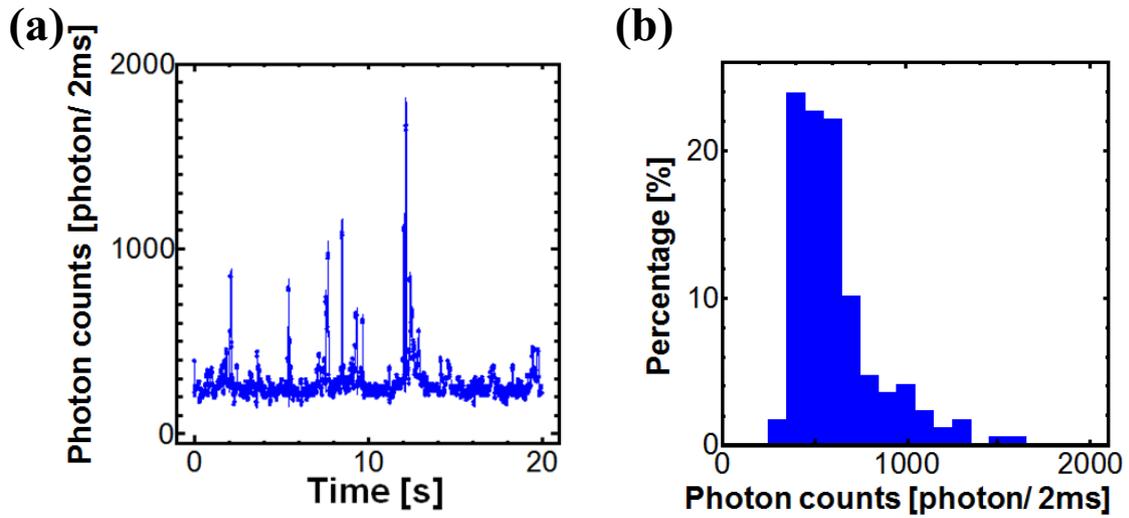


Figure 5.3 蛍光ビーズのブラウン運動観察（従来のフォトンカウンティングシステム）
 (a) 蛍光強度波形, (b)ピークフォトン数ヒストグラム

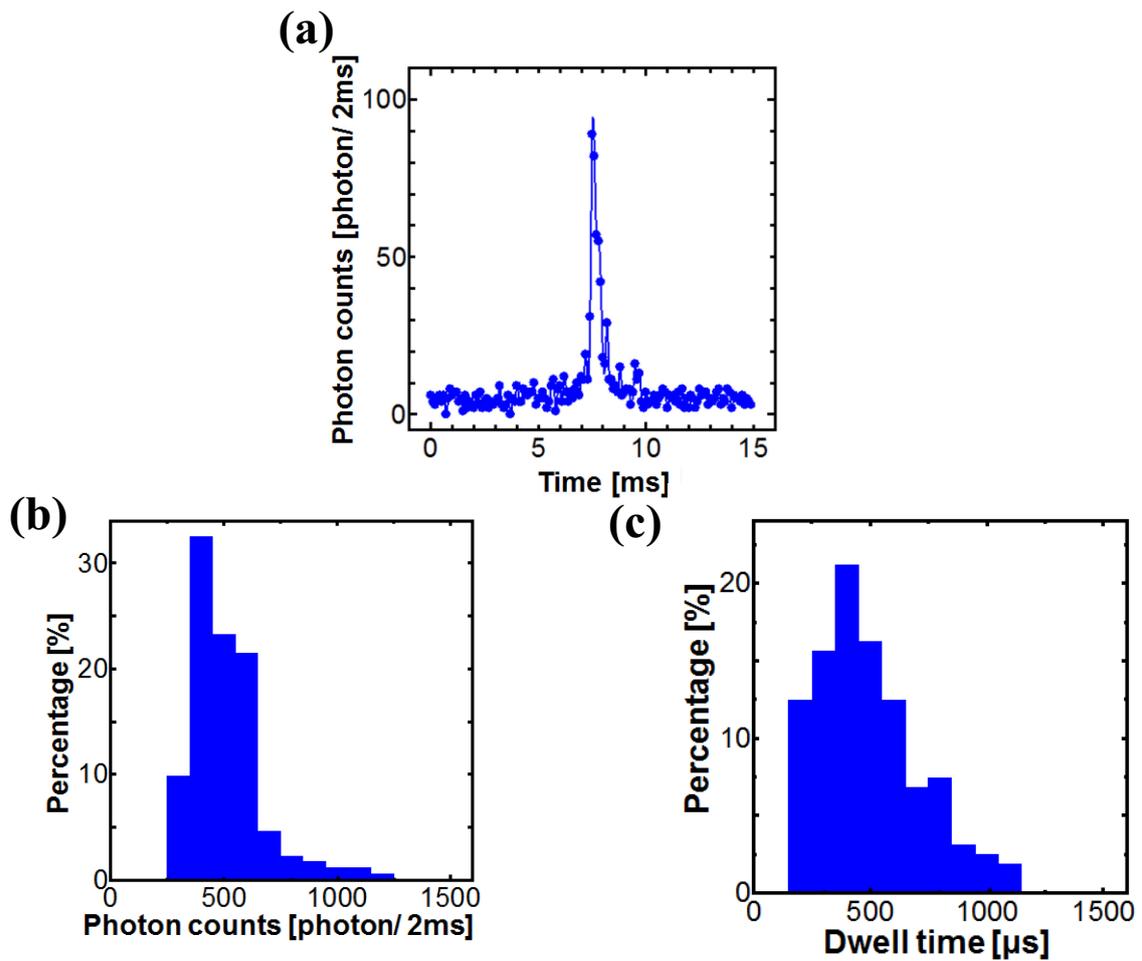


Figure 5.4 蛍光ビーズのブラウン運動観察（時間分解フォトンカウンティングシステム）
 (a) 蛍光強度波形, (b)ピークフォトン数ヒストグラム, (c)滞在時間のヒストグラム

5.3.2 DNA ナノポア通過挙動観察

5.3.2.1 実験方法

実験は、3.4 にて紹介した実験装置を用いた。レーザー強度は $100 \mu\text{W}$ とした。試料は、 λDNA 断片（長さ 11933 bp ・ 14321 bp ・ 9533 bp ・ 12715 bp ）を蛍光色素 DAPI で染色した DNA 試料を使用した。実験において、電圧印加前の cis チャンバー内の DNA 試料の濃度は、 70 pM とした。ポーラスシリコン薄膜は、膜厚 10 nm ・孔径 10 nm の薄膜を使用した。電解質溶媒は、 $1.0 \text{ M KCl}/10 \text{ mM Tris-HCl}$ (pH 7.8)を使用した。電極は、Ag/AgCl 電極を使用した。印加電圧は、 100 mV と 400 mV とした。蛍光強度波形は、従来のフォトンカウンティングシステムと時間分解能フォトンカウンティングシステムを用いて、同時検出を行った。フォトンカウンターの積算時間は、 2 ms とした。ポーラスシリコン薄膜の洗浄時間は、メタノール 2 時間・DDW 2 時間とした。時間分解フォトンカウンティングシステムの積算時間は、 $100 \mu\text{s}$ とした。

5.3.2.2 実験結果

Figure 5.5 (a)と(b)に印加電圧 100 mV ・ 400 mV 時に従来のフォトンカウンティングシステムで得られた蛍光強度波形を示す。電圧 100 mV ・ 400 mV において、4.3 と同様に、背景信号に対して、時間幅数 ms のバースト波形が観察され、これが DNA のナノポア通過による蛍光発光であることがわかる。また、印加電圧が高くなるにつれて、ピークフォトン数が下がる様子もみられ、DNA 電気泳動速度の電圧依存性が観察できている。印加電圧 100 mV における検出頻度 6.1 回/s であった。(4.2)式から、ナノポア通過頻度の理論値を概算すると、 $4.2 \text{ 回}/(\text{s} \cdot 70 \text{ pM})$ と実験値と概ね近い値を示した。しかし、印加電圧 400 mV において検出頻度は、4.2 と同様に、1 秒間に 4.3 回と減少する傾向がみられた。Figure 5.5 (c)と(d)にパルス波形のピークフォトン数をまとめたヒストグラムを示す。印加電圧 100 mV において、ヒストグラムは、平均ピークフォトン数 $456 \text{ photons}/2 \text{ ms}$ であり、 $600 \text{ photons}/2 \text{ ms}$ の分布をもつ。また、印加電圧 400 mV において、ヒストグラムは、平均ピークフォトン数 $240 \text{ photons}/2 \text{ ms}$ であり、 $500 \text{ photons}/2 \text{ ms}$ の分布をもつ。印加電圧が高くなると、ヒストグラムの分布が低いピークフォトン数へシフトし、4.3 の成果と同様の傾向がみられた。

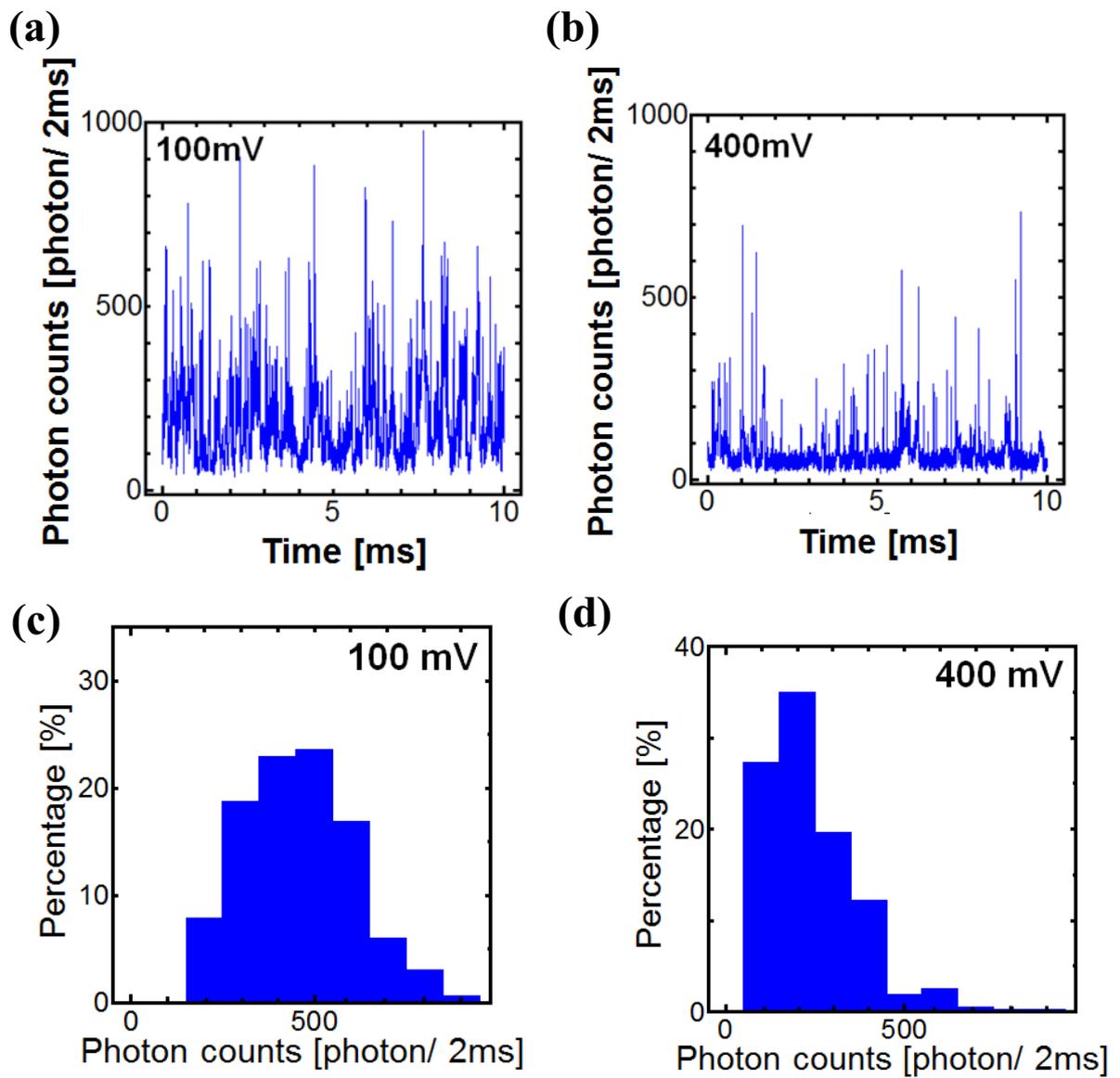


Figure 5.5 DNA ナノポア通過挙動観察 (従来のフォトンカウンティングシステム)
 (a), (b) 蛍光強度波形, (c), (d) ピークフォトン数ヒストグラム,
 印加電圧(a), (c) 100 mV, (b), (d) 400 mV

続いて、時間分解フotonカウンティングシステムより検出された蛍光強度波形を Figure 5.6 (a)と(b)に示す。検出した蛍光強度波形は、1 ms 以内に急峻に立ち上がり、数 ms の時間をかけて減衰する波形であった。印加電圧 100 mV と 400 mV の蛍光強度波形を比較すると、印加電圧 400 mV における蛍光強度波形のピークフoton数が減少することがわかる。Figure 5.6 (c)と(d)に Figure 5.6 (a)と(b)の蛍光強度波形の立ち上がりから減衰するまでの時間 (dwell time) をまとめたヒストグラムを示す。100 mV における dwell time は、平均時間 3.9 ms であり、7 ms の分布をもつ。これに対して、400 mV における dwell time は、平均時間 3.1 ms であり、7 ms の分布をもつ。どちらのヒストグラムも、80 %以上の蛍光強度波形が 5 ms 以下の dwell time と、バースト波形の時間幅数 ms と近い値を示した。また、Figure 5.6 (e)と(f)に Figure 5.6 (a)と(b)の時間 9.4 ~ 11.4 ms のプロットの積算値をまとめたヒストグラムを示す。印加電圧 100 mV において、平均フoton数 432 photons/2 ms であり、400 photons/2 ms の分布をもつ。また印加電圧 400 mV において、平均フoton数 222 photons/2 ms であり、300 photons /2 ms の分布をもつ。印加電圧 100 mV と 400 mV における平均フoton数は、Figure 5.5 (c)と(d)に示した平均フoton数と概ね一致したことから、Figure 5.6 の蛍光強度波形は、Figure 5.5 のバースト波形に対応することがわかった。したがって、DNA ナノポア通過挙動においても構築したシステムの有用性が確認された。

Figure 5.5 (c)と(d)と比べて、Figure 5.6 (e)と(f)の分布が狭かった。この違いが生じた理由として、トリガーの閾値とデータ転送時間が考えられる。ローパスフィルターを 10 kHz としていたため、Figure 5.2 のような変換された波形は、積算時間 100 μ s の波形に対応することがいえる。したがって、積算時間 2 ms では、識別に十分なピークフoton数であったが積算時間 100 μ s では、トリガーの閾値を超えない波形が存在したことが理由として考えられる。特に、フoton数が低いバースト波形に対しては、この可能性が大きい。また、取得波形データは、compuscope に一時的に保存した後、パソコンに転送され、保存される。そのため、データの一時保存時と転送時には、波形は取得できない。頻度の少ないフoton数の高いバースト波形は、データの一時保存と転送のため、ほとんど検出されなかったことが理由として考えられる。

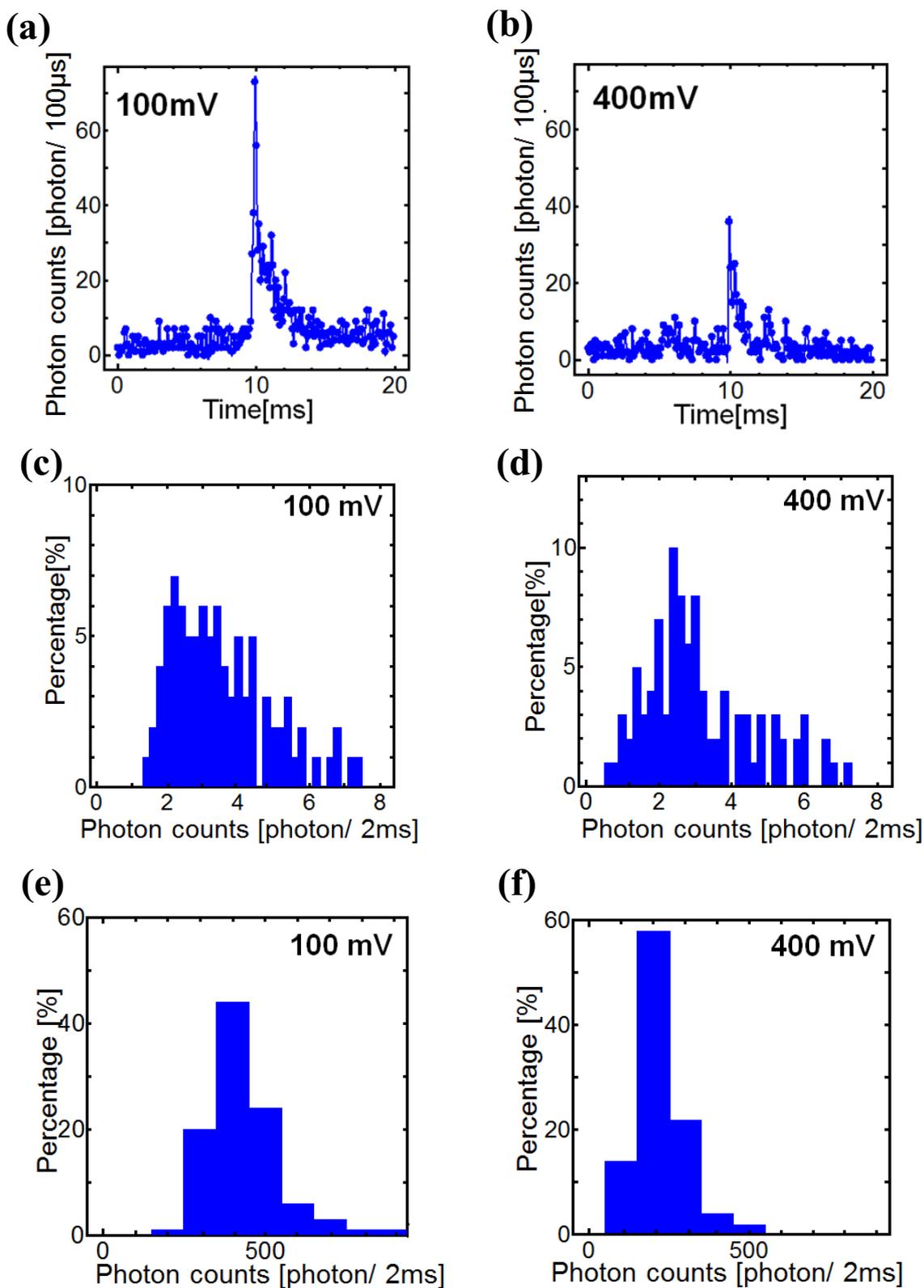


Figure 5.6 DNA ナノポア通過挙動観察 (時間分解フォトンカウンティングシステム)
 (a), (b) 蛍光強度波形, (c), (d) ピークフォトン数のヒストグラム,
 (e), (f) 滞在時間のヒストグラム, (a), (c), (e) 印加電圧 100 mV, (b), (d), (f) 印加電圧 400 mV

5.4 蛍光強度波形の考察

前節では、構築したフォトンカウンティングシステムにおいて、DNA がナノポアを通過する様子が 1 ms 以下で立ち上がり、数 ms でなだらかに減衰する波形として検出された。これまでに、DNA ナノポア通過挙動を 100 μ s の時間分解能で光学観察した事例はないことから、本節では、先行研究の報告事例や理論解析から、蛍光強度波形と DNA ナノポア通過挙動との対応を検討する。

まず、集光スポットの大きさと DNA コイルの大きさについて検討する。コイル状の DNA は、ナノポアに引き寄せられ、これを解きナノポアを通過する⁵。ナノポアを通過した DNA は、再びコイル状の形態をとり、ナノポアから離れていく^{6,7}。本章の実験では、長さ 10 ~ 15 kbp の二本鎖 DNA を使用した。バルク中における DNA のコイルの大きさ (radius of gyration: R_g) は、次式で表される⁸。

$$R_{g,linear} = a \left[\frac{L}{3a} - 1 + \frac{2a}{L} - 2 \left(\frac{a}{L} \right)^2 \left(1 - \exp \left(\frac{-L}{a} \right) \right) \right]^{1/2} \quad (5.2)$$

a 、 L はそれぞれ DNA の持続長 (persistence length) と DNA 全長である。また、高塩濃度溶媒において、2 本鎖 DNA の持続長は 44 nm である⁹。長さ 10 ~ 15 kbp の二本鎖 DNA は、全長 3.4 ~ 5.1 μ m である。(5.2)式より、バルク中における長さ 10 ~ 15 kbp の二本鎖 DNA のコイルの大きさは、直径 440 ~ 540 nm と算出される。先行研究において、ナノポアを通過した後の DNA は、DNA 鎖に掛かる張力の影響で、DNA のコイルの大きさが最大で半分程度まで小さくなることが示唆されている^{10,11,12}。この収縮効果により、10 ~ 15 kbp の二本鎖 DNA のコイルの大きさが 220 ~ 270 nm 程度になる可能性がある。収縮の影響を考慮しても、trans チャンバー側における DNA コイルの大きさは、集光スポット 140 nm と比べて、大きいことがわかる。

続いて、ナノポア通過過程の DNA 挙動と蛍光強度波形との対応について検討する。ナノポア通過時間に関しては、先行研究において、次式に示す 1 次元ラジュバン方程式から、DNA のナノポア通過前の立体的形態とナノポア通過速度との関係を見積もっている¹³。

$$m \frac{dv}{dt} + \gamma v - F = A(t) \quad (5.3)$$

m 、 v 、 γ 、 F 、 $A(t)$ は、それぞれ DNA の質量、ナノポア内での DNA 移動速度、動粘性率、DNA に加わる駆動力、分子衝突により生じる力 (thermal force) である。

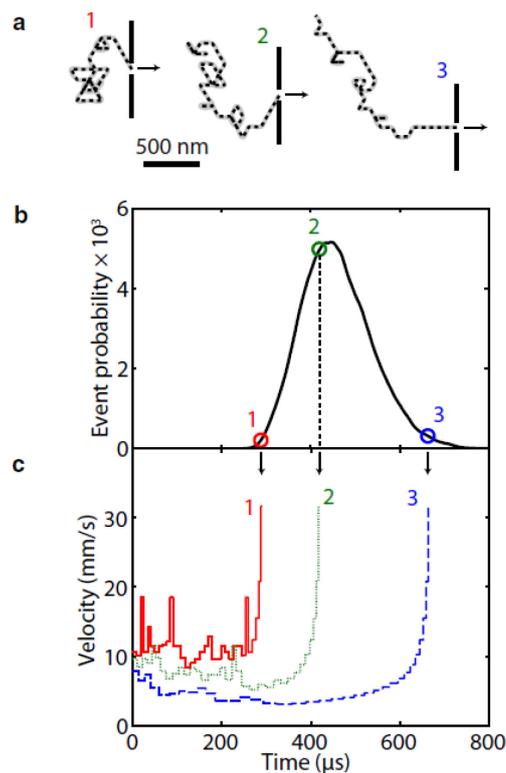


Figure 5.7 ナノポア通過時間と DNA 立体構造の関係性¹³

Reprinted with permission from *Biophys J.* **101**, 70 (2011).

Copyright 2016, Elsevier

Figure 5.7 に印加電圧 120 mV、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA の条件下における(5.3) 式の計算結果を示す。

Figure 5.7 より、ナノポア通過前の DNA の立体的構造によってナノポア通過時間に違いがあらわれることがわかる。具体的には、ナノポア近傍において、DNA が丸まった構造(Figure 5.7 a 1)を呈すると、ナノポア通過時間が短く、引き伸ばされた構造を呈するとナノポア通過時間が長くなることが示唆されている(Figure 5.7 b)。Figure 5.7 c は、ナノポア通過速度が通過時間に応じて変化することを示している。ナノポア通過時間の後半では、速度が急激に上昇することがわかる。Figure 5.7 a の場合、通過時間 250 μs までは、ナノポア通過速度 10 mm/s を維持しており、通過時間後半の 50 μs の間でナノポア通過速度 30 mm/s まで上昇する。

Figure 5.7 c の 1 から概算すると、ナノポア通過時間 200 μs の時点は、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA 全長 (3.4 μm)のうち 2 μm 分がナノポアを通過した瞬間と対応する。2 μm を DNA の分子数に換算すると、6 kbp である。この長さは、(5.2) 式から、バルク中の DNA コイルの大きさは、330 nm に相当する。DNA コイルの収縮の影響を考慮しても、DNA コイルの大きさは、局在光の大きさ 140 nm と

比べて大きい。このことから、本研究で用いる実験装置において、10 ~ 15 kbp の二本鎖 DNA は、ナノポア通過時に既に集光スポット全体に分布することが想定されるため、蛍光強度波形は、ナノポア通過過程から立ち上がることが考えられる。

最後に、ナノポア通過後の DNA 挙動と蛍光強度波形の対応について検討する。ナノポアを通過した後の DNA は、次式で表されるナノポアから放射状に分布する電場 $E(r)$ を受けて、局在光を通して、ナノポアから離れていく。

$$E(r) = \frac{d^2}{8hr^2} \Delta V \quad (5.4)$$

d 、 h 、 ΔV は、それぞれナノポアの直径、ナノポアの高さ、印加電圧である。この電場を受けて、ナノポアからある距離まで移動する時間の計算は、次式に示すドリフト拡散方程式 (drift diffusion equation) から見積もることができる⁷。

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} r^2 \left(\mp \frac{|uI|}{2\pi\sigma r^2} c(r, t) + D \frac{\partial c(r, t)}{\partial r} \right) \quad (5.5)$$

μ 、 I 、 σ 、 D は、それぞれ電気泳動移動度、ナノポア内を流れるイオン電流値、溶媒の導電率、DNA の拡散定数である。先行研究では、(5.5)式を用いて、DNA が(5.4)式の電場を受けてナノポアから移動する距離の時間発展分布を計算している。Figure 5.8 に、長さ 4 kbp の二本鎖 DNA の空間分布の時間発展を示す。距離 0 nm がナノポア表面に対応する。時間が経過するにつれて、ドリフトと拡散によって、分布の中心位置がナノポアから離れ、分布も広がる様子がみられる。長さ 600 bp 以上の 2 本鎖 DNA の場合、電気泳動移動度が一定である^{14,15}。これを考慮すると、4 kbp の 2 本鎖 DNA が数 ms の時間をかけて、ナノポアから数百 nm 移動する様子は、本章で使用した長さ 10 ~ 15 kbp の二本鎖 DNA においても、同様な中心位置・広い分布を有した時間発展分布が得られる。Figure 5.8 からナノポアを通過した後の DNA は、バルク溶媒の DNA コイルの大きさと分布すると仮定すると、中心位置 220 ~ 270 nm に位置する DNA コイルが集光スポットの大きさ 140 nm 移動する時間がナノポア通過後の DNA が集光スポットに滞在する時間と考えられる。Figure 5.8 からこの時間は、5 ms 程度と概算される。この値は、Figure 5.6 (a) の蛍光強度波形の減衰時間 2 ~ 5 ms と概ね一致する。このことから、蛍光強度波形の減衰は、ナノポア通過後過程の DNA 挙動を表していることが考えられる。

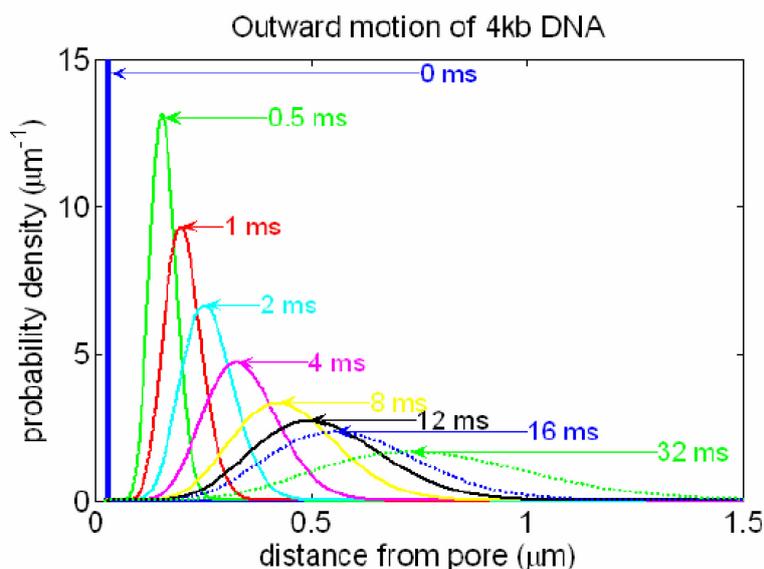


Figure 5.8 ドリフト拡散方程式より算出された 4 kbp DNA 時間発展分布⁷

Reprinted with permission from *Nat. Nanotechnol.* 2, 775 (2007).

Copyright 2016, Nature Publishing Group

以上の考察から、蛍光強度波形の立ち上がりと減衰は、それぞれナノポア通過過程と通過後過程の DNA 挙動の情報が含まれるといえる。

5.5 おわりに

本章では、ナノポア近傍での DNA コイルの形成と空間移動を観察するために、時間分解フォトンカウンティングシステムを構築した。5.2 では、時間分解フォトンカウンティングシステムの概要を紹介した。5.3、5.4 では、蛍光ビーズのブラウン運動と DNA ナノポア通過挙動を観察し、構築した時間分解フォトンカウンティングシステムの動作確認を行った。5.5 では、5.4 の DNA ナノポア通過挙動観察の波形を考察した。先行研究から得られる知見を基に、DNA ナノポア通過観察の波形には、ナノポア通過中とナノポア通過直後の DNA 挙動の情報が含まれると結論づけた。

本章では、 λ DNA 断片に蛍光色素 DAPI を修飾した DNA 試料を使用した。 λ DNA 断片の長さは、①14321 bp から 9533 bp のばらつきがあったこと、②制限酵素が働かないため切断パターン以上の長さの DNA が含まれていた可能性があったことから、詳細な解析が行えないことが問題点として挙げられる。本論文の手法を用いて、DNA ナノポア通過挙動を観察するためには、長さを揃えた DNA 試料を使用した実験を行う必要がある。

参考文献

1. G. Ando, C. Hyun, J. Li, and T. Mitsui, *ACS Nano* **6**, 10090 (2012).
2. V. V. Thacker, S. Ghosal, S. Hernandez-Ainsa, N. A. W. Bell, and U. F. Keyser, *Appl. Phys. Lett.* **101**, 223704 (2012).
3. J. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J. A. Golovchenko, *Nat. Mater.* **2**, 611 (2003).
4. M. A. Digman, and E. Gratton, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **62**, 645 (2011).
5. A. J. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J. F. Joanny, and C. Dekker, *Nano Lett.* **5**, 7 (2005).
6. C. Plesa, L. Cornelissen, M. W. Tuijtel, and C. Dekker, *Nanotechnol.* **24**, 475101 (2013).
7. M. Gershow and J. A. Golovchenko, *Nat. Nanotechnol.* **2**, 775 (2007).
8. D. R. Latulippe and A. L. Zydney, *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 1 (2010).
9. J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield, *Biophys. J.* **82**, 6 (2002).
10. A. Bhattacharya and K. Binder, *Phys. Rev. E* **81**, 041804 (2010).
11. T. Saito and T. Sakaue, *Phys. Rev. E* **88**, 042606 (2013).
12. M. Fyta, S. Melchionna, S. Succi, and E. Kaxiras, *Phys. Rev. E* **78**, 036704 (2008).
13. B. Lu, F. Albertorio, D. P. Hoogerheide, and J. A. Golovchenko, *Biophys. J.* **101**, 70 (2011).
14. M. Langecker, D. Pedone, F. C. Simmel, and U. Rant, *Nano Lett.* **11**, 5002 (2011).
15. D. A. Hoagland, E. Arvanitidou, and C. Welch, *Macromolecules* **32**, 6180 (1999).

6. ナノポア通過中と通過直後の DNA 挙動観察

6.1 はじめに

ナノポアを用いた単一分子計測において、DNA ナノポア通過に関わる一連の現象解明が重要な研究課題とされている。イオン電流測定において、DNA がナノポアを通過すると電流遮断が生じ、この電流遮断値と電流遮断時間が DNA の分子構造の情報をもつ。この特徴を利用して、先行研究では DNA コイルを解き、ナノポアを通過する過程といったナノポア近傍における DNA 挙動を研究されている。ノースイスタン大学の Wanunu らのグループでは、ドリフト拡散方程式から導き出した計算結果と DNA ナノポア通過時間を比較することで、直径 3.4 ~ 6.0 nm のナノポアを通過する DNA は、外部電場により DNA コイル自体がナノポア通過を妨害することを示した¹。また、ハーバード大学の Golvechenko らのグループでは、DNA ナノポア通過時間の分布と一次元のランジュバンモデルから算出した DNA のナノポア通過時間が一致することから、ナノポア近傍における DNA の立体構造とナノポア通過時間分布に相関があることを示唆している²。これらの先行研究では、理論計算を用いることで、DNA コイルがナノポア通過過程と関係があることを示唆したが、実験的にナノポア近傍で空間分布する DNA コイルの形成や空間移動を直接観察し、関係性を示した事例はない。本章では、5 章で構築したフォトンカウンティングシステムを用いて、ナノポア通過中と通過直後の DNA 挙動を観察する。6.2 と 6.3 では、ポーラスシリコン薄膜を用いて、DNA ナノポア通過挙動の観察を行う。6.2 では、まず長さ 10 kbp の二本鎖 DNA を用いて、DNA ナノポア通過挙動の電圧依存性を観察する。6.3 では、 λ DNA ナノポア通過観察をする。また、6.2 で得られた結果との比較を行い、DNA ナノポア通過と通過後過程における長さ依存性について検討する。6.4 では、作製が容易なアルミナスパッタ膜を用いて、10 kbp の二本鎖 DNA ナノポア通過挙動を観察する。また、6.2 で得られた結果と比較し、ナノポア通過と通過後過程におけるポーラス薄膜の空孔率や材質の影響について検討する。

6.2 長さ 10 kbp の二本鎖 DNA ナノポア通過挙動観察

光学的測定は、複数のナノポアを通過する DNA を並列観察できることが利点とされている^{3,4}。先行研究では、透過型電子顕微鏡の集束電子ビームを利用して、トップダウン方式でナノポアを作製する方法が主流とされているが、近年では、量産性の高いポーラスシリコン薄膜の利用が期待されている⁵。本節では、ポーラスシリコン薄膜を用いて、DNA ナノポア通過挙動を観察する。

6.2.1 実験方法

実験は、3.4にて紹介した実験装置を用いた。レーザー強度は $100\ \mu\text{W}$ とした。DNA 試料は、蛍光色素 DAPI で染色した長さ $10\ \text{kbp}$ の二本鎖 DNA を使用した。実験において、電圧印加前の cis チャンバー内の DNA 試料の濃度は、 $10\ \text{pM}$ とした。ポーラスシリコン薄膜は、膜厚 $10\ \text{nm}$ ・孔径 $10\ \text{nm}$ の薄膜を使用した。電解質溶媒は、 $1.0\ \text{M}\ \text{KCl}/10\ \text{mM}\ \text{Tris-HCl}$ (pH 7.8) を使用した。電極は、Ag/AgCl 電極を使用した。印加電圧は、 $100\sim 400\ \text{mV}$ とした。蛍光強度波形は、時間分解能光子カウンティングシステムを用いて検出した。ポーラスシリコン薄膜の洗浄時間は、メタノール 2 時間、DDW 2 時間とした。時間分解光子カウンティングシステムの積算時間は、 $100\ \mu\text{s}$ とした。

6.2.2 実験結果

Figure 6.1(a)に印加電圧 $100\ \text{mV}$ における長さ $10\ \text{kbp}$ 二本鎖 DNA の蛍光強度波形を示す。典型的な蛍光強度波形は、 $1\ \text{ms}$ 以内でピーク光子数に到達し、数 ms で減衰する波形であった。検出された波形は、いずれも減衰時間は、立ち上がり時間の数倍程度であった。この傾向は、5.3.2 のナノポア通過観察で検出された波形と同じである。

次に、蛍光強度波形の電圧依存性について検討した。Figure 6.1 (b)~(d)に印加電圧 $200\sim 400\ \text{mV}$ における蛍光強度波形を示す。印加電圧を $100\ \text{mV}$ から $400\ \text{mV}$ まで上げるにつれて、滞在時間は短くなるのがわかる。また、ピーク光子数も下がるのがわかる。Figure 6.2 に印加電圧 $100\sim 400\ \text{mV}$ における滞在時間とピーク光子数をまとめたヒストグラムを示す。印加電圧 $100\ \text{mV}$ の滞在時間のヒストグラムは、 $500\ \mu\text{s}$ から $5\ \text{ms}$ の範囲に分布することがわかる。この分布が、印加電圧が高くなるにつれて、分布範囲が狭まり、ヒストグラム全体が短い時間へシフトすることがわかる。また、ピーク光子数のヒストグラムも、印加電圧 $100\ \text{mV}$ において、 $25\sim 100\ \text{photons}/100\ \mu\text{s}$ の範囲に分布し、これは印加電圧が高くなるにつれて、分布範囲が狭まり、ヒストグラム全体が短い時間へシフトすることがわかる。平均滞在時間は、印加電圧 $100\sim 400\ \text{mV}$ において、それぞれ 2.14 、 1.98 、 1.75 、 $1.43\ \text{ms}$ である。また、平均ピーク光子数は、印加電圧 $100\sim 400\ \text{mV}$ において、それぞれ 50 、 42 、 39 、 $33\ \text{photon}/100\ \mu\text{s}$ である。立ち上がり時間は、印加電圧 $100\sim 400\ \text{mV}$ において、 455 、 435 、 407 、 $357\ \mu\text{s}$ と大きな変化がみられず、ナノポア内にかかる高い電場によって、DNA が素早く通過する様子を表していることが考えられる。Figure 6.2 (b)と(d)から、平均滞在時間と平均ピーク光子数は、印加電圧に依存することがわかる。これ

らの結果は、ナノポアを通過した直後の DNA の電気泳動速度の電圧依存性から説明される。(4.1)式を用いて、印加電圧 100 mV の条件下で、10 kbp の二本鎖 DNA の有効距離 r^* は、2.3 μm である。領域 $r < r^*$ において、DNA は電気泳動運動が支配的となり、領域 $r > r^*$ において、拡散運動が支配的となる。本論文で用いる集光スポットは、ナノポアから 140 nm の距離まで分布する。この集光スポット内を通過する DNA は、電気泳動運動が支配的な領域に位置するため、Figure 6.2 で示した蛍光強度波形の電圧依存性は、電気泳動速度の増加に由来する。

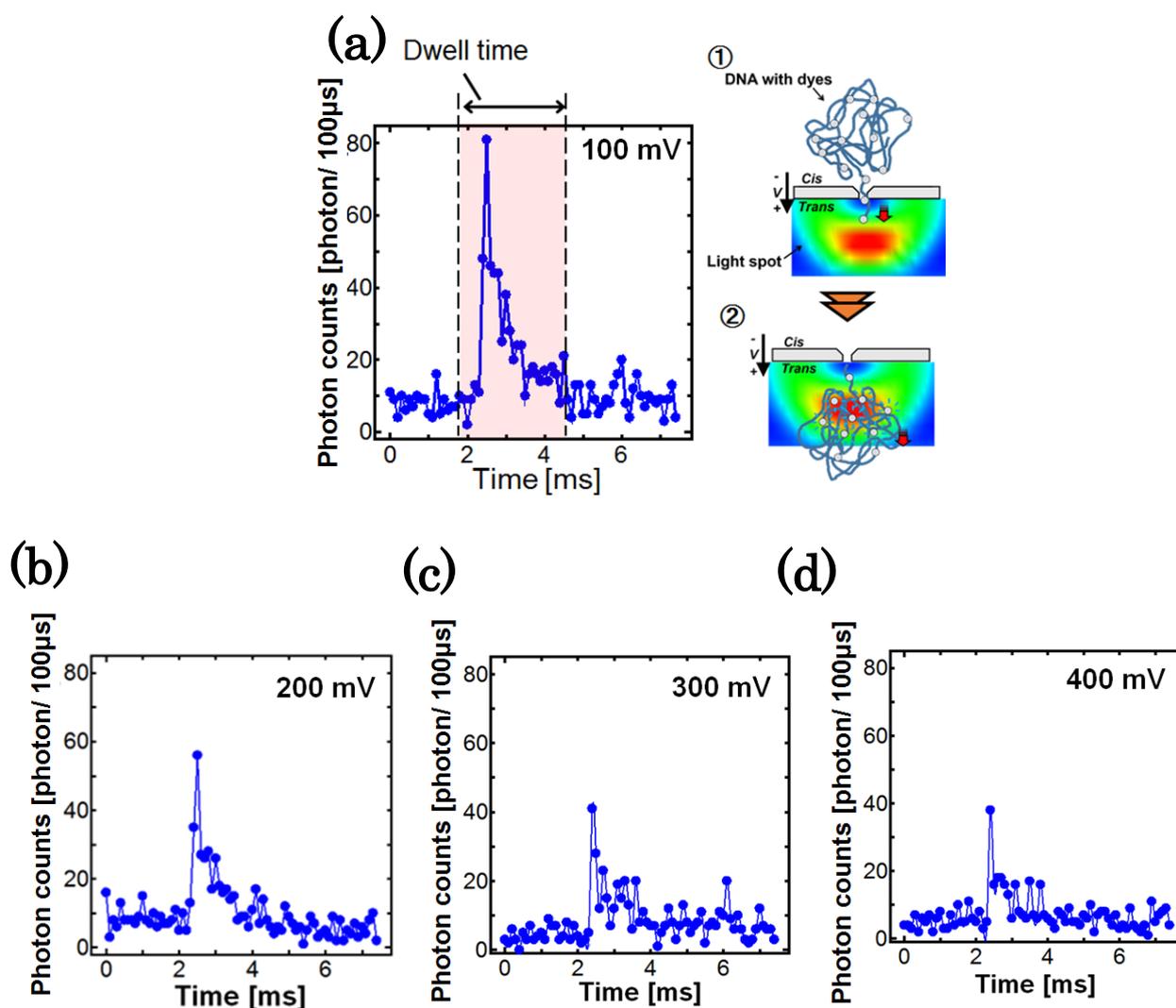


Figure 6.1 10 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過挙動の観察結果
(a) - (d) 100 - 400 mV

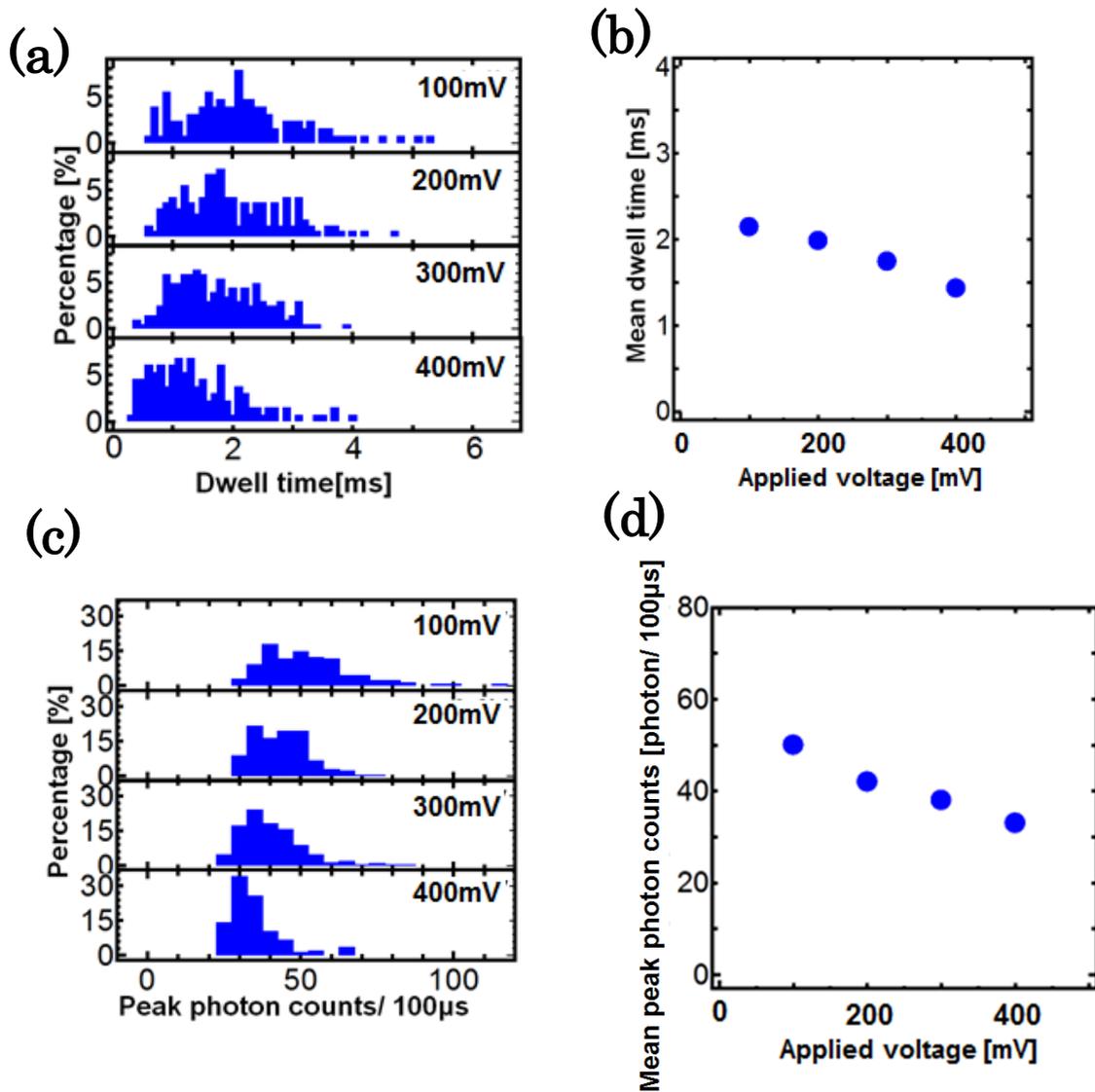


Figure 6.2 10 kbp の二本鎖 DNA ナノポア通過挙動の観察結果

(a)滞在時間のヒストグラム, (b)平均滞在時間の電圧依存性,

(c)ピークフォトン数のヒストグラム, (d)平均ピークフォトン数の電圧依存性

6.3 λ DNA(48 kbp)ナノポア通過挙動観察

本節では、 λ DNA ナノポア通過挙動の観察を行った。6.2 の長さ 10 kbp 二本鎖 DNA 通過挙動観察結果と比較を行い、DNA ナノポア通過挙動の長さ依存性について理解を深める。

6.3.1 DNA ナノポア通過挙動観察

6.3.1.1 実験方法

実験は、3.4 にて紹介した実験装置を用いた。レーザー強度は 100 μ W とした。DNA 試料は、蛍光色素 DAPI で染色した λ DNA を使用した。実験において、電圧印加前の cis チャンバー内の DNA 試料の濃度は、10 pM とした。ポーラスシリコン薄膜は、膜厚 10 nm、孔径 10 nm の薄膜を使用した。電解質溶媒は、1.0 M KCl/10 mM Tris-HCl (pH 7.8)を使用した。電極は、Ag/AgCl 電極を使用した。印加電圧は、300 mV と 500 mV とした。蛍光強度波形は、時間分解能フォトンカウンティングシステムを用いた。ポーラスシリコン薄膜の洗浄時間は、メタノール 2 時間、DDW 2 時間とした。時間分解フォトンカウンティングシステムの積算時間は、100 μ s とした。

6.3.1.2 実験結果

Figure 6.3(a)~(b)に、印加電圧 300 mV と 500 mV における、 λ DNA の蛍光強度波形を示す。Figure 6.1 の蛍光強度波形でみられたように、 λ DNA のナノポア通過挙動は、立ち上がり時間に比べて、減衰する時間が数倍長い蛍光強度波形として検出された。Figure 6.3(a)と(b)を比較すると、印加電圧が高くなるにつれて滞在時間が短く、ピークフォトン数が下がる傾向がみられた。Figure 6.3 (c)と(d)に印加電圧 300 mV と 500 mV における滞在時間とピークフォトン数をまとめたヒストグラムを示す。印加電圧 500 mV における滞在時間のヒストグラムは、300 mV における滞在時間のヒストグラムと比べて、全体的に短い滞在時間分布である。平均滞在時間と平均ピークフォトン数は、印加電圧 300 mV と 500 mV に対して、それぞれ 4.38 と 3.01 ms、44 と 31 photons/100 μ s である。これらは、6.2 の長さ 10 kbp の二本鎖 DNA 電気泳動速度の電圧依存性でみられた傾向と一致する。

次に、印加電圧 300 mV の条件下における、長さ 10 kbp と 48 kbp (λ DNA) の二本鎖 DNA のナノポア通過挙動観察結果の比較を行う。Figure 6.2 (a)と Figure

6.3 (c)から電気泳動移動度が同じであるにもかかわらず、 λ DNA の平均滞在時間 (4.38 ms) は、10 kbp 二本鎖 DNA の平均滞在時間 (1.73 ms) と比べて2倍程度長いことがわかる。 λ DNA と長さ 10 kbp の二本鎖 DNA の蛍光強度波形に違いが表れた理由として、2つの要因が考えられる。第一に、ナノポア通過時間は DNA の長さに依存することから、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過時間と比べて、 λ DNA のナノポア通過時間が長いことが挙げられる。先行研究において、印加電圧 300 mV における λ DNA のナノポア通過時間は、数 ms と報告されており、蛍光強度波形の時間分解能 100 μ s でも十分観察できるくらい長いといえる⁸。これは、 λ DNA の平均立ち上り時間が 650 μ s と、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA の平均立ち上がり時間 400 μ s と比べて長いことから理解できる。

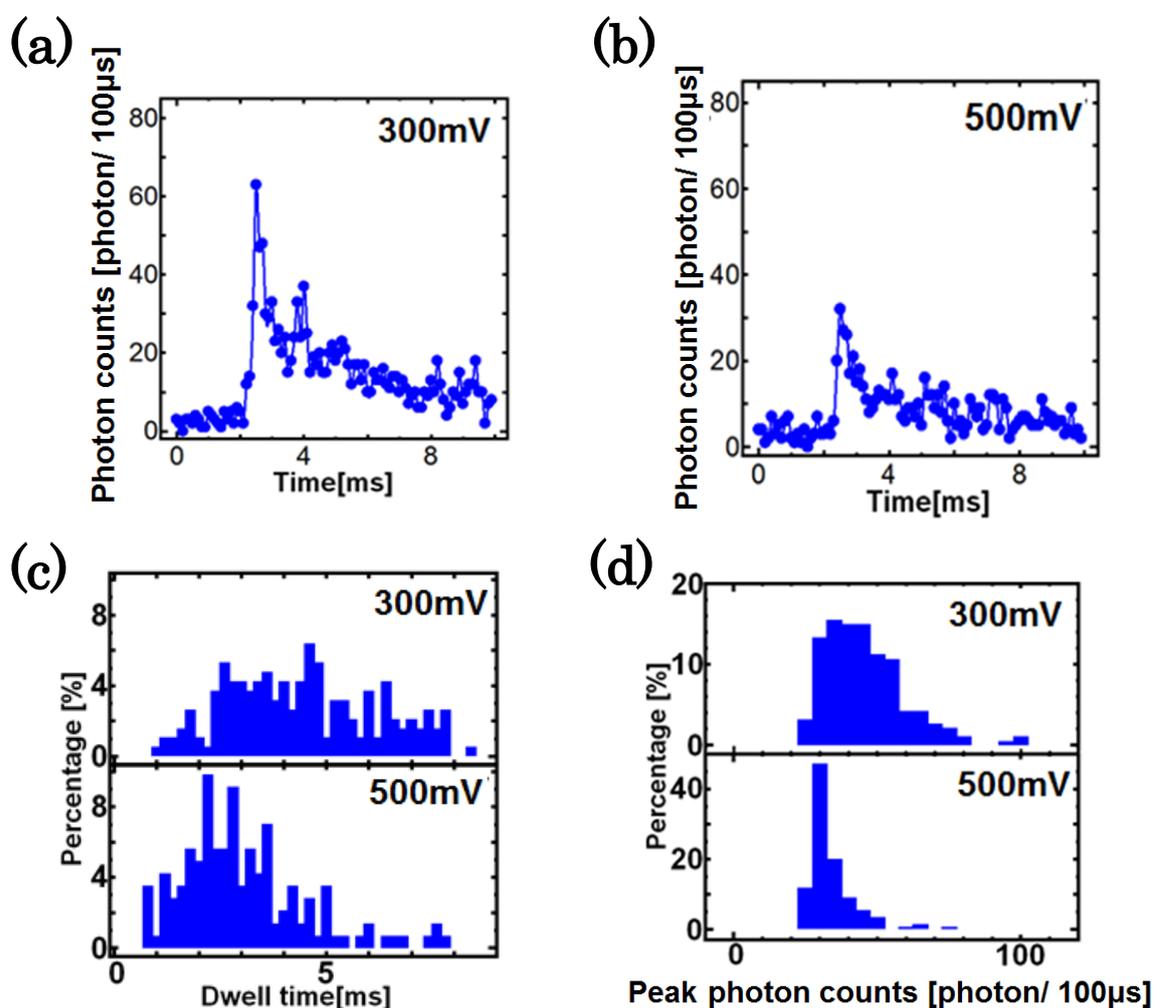


Figure 6.3 λ DNA ナノポア通過挙動の観察結果 (a), (b) 蛍光強度波形, (c) 滞在時間のヒストグラム, (d) ピークフォトン数のヒストグラム

第二に、ナノポア通過後過程における λ DNAは、長さ10 kbp二本鎖DNAと比べて、ドリフト速度が遅い可能性が考えられる。バルク溶媒中のDNAの大きさを示すgyrationは(5.2)式で示される⁹。(5.2)式より、高塩濃度溶媒における二本鎖DNAの持続長は44 nmであることから、バルク溶媒において、長さ10 kbpの二本鎖DNAと λ DNAの大きさは、440 nmと940 nmと概算される⁷。概算結果から、ナノポア通過後過程の初期段階では、 λ DNAは長さ10 kbp二本鎖DNAと比べて、広範囲に分布していることが考えられる。(5.4)式で示したように、電場強度はナノポアから距離に依存して減衰する。この電場分布において、広範囲に空間分布している λ DNA全体に加わる電気泳動力は、長さ10 kbpの二本鎖DNAに加わる電気泳動力と比べて小さいため、ナノポア通過後過程において、 λ DNAはゆっくりドリフトすることが考えられる。この仮説を明らかにするために、次節で理論解析を行う。

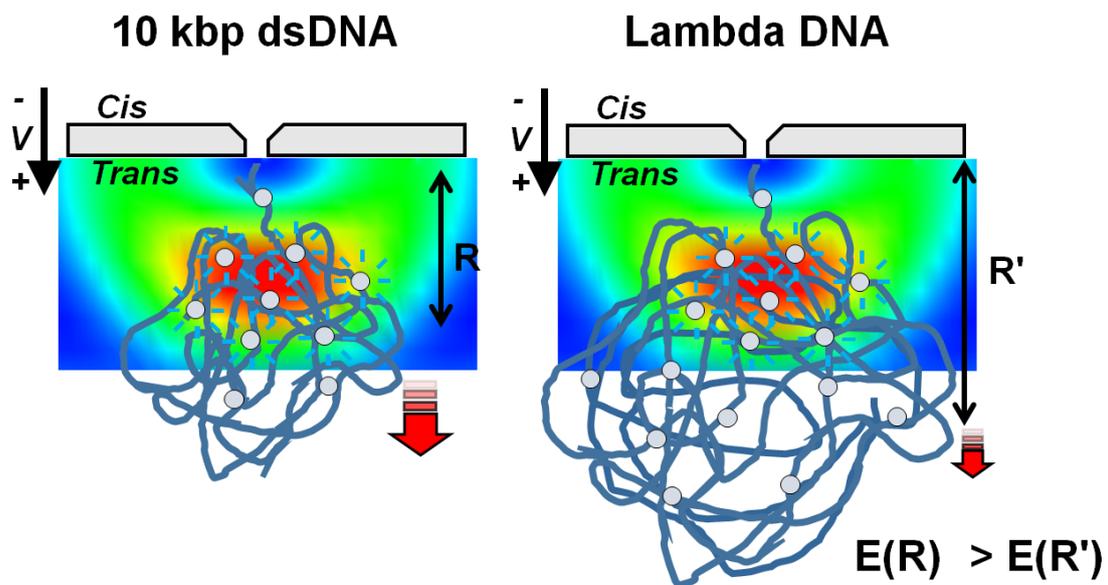


Figure 6.4 λ DNA と 10 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過後過程の概念図

6.3.2 電場計算

本節では、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA と λ DNA に掛かる電場強度を見積もるために、ポーラスシリコン薄膜近傍の電場分布を計算した。計算ソフトは、COMSOL Multiphysics を使用した。電場計算では、空間を格子状のセルに離散化し、この格子状のセルに対して、方程式を適用して、時間発展を計算する。電場計算では、以下の 3 式を用いた。

$$\nabla \cdot \mathbf{J} = -\frac{\partial Q_j}{\partial t} \quad (6.1)$$

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} + \mathbf{J}_e \quad (6.2)$$

$$\mathbf{E} = -\nabla V \quad (6.3)$$

\mathbf{J} 、 Q_j 、 σ 、 \mathbf{E} 、 \mathbf{J}_e 、 V はそれぞれ電流、電荷量、導電率、電場強度、外部電流である。

6.3.2.1 電場計算モデル

ポーラスシリコン薄膜近傍の電場分布の計算に用いた計算モデルを Figure 6.5 に示す。計算領域は、 $x[-500 \text{ nm}:500 \text{ nm}]$ 、 $y[-500 \text{ nm}:500 \text{ nm}]$ 、 $z[-1000 \text{ nm}:1000 \text{ nm}]$ とした。シリコン薄膜を全計算領域に配置した。シリコンの膜厚は 10 nm とした。空孔率を 0.04 nanopores/(100 nm)² と設計するために、単一のナノポアを中央に配置した。シリコンの導電率と比誘電率は、それぞれ $1.0 \times 10^{-12} \text{ S/m}$ と 11.7 である。また、塩化カリウムの導電率と比誘電率は、それぞれ 11.43 S/m と 60 である。塩化カリウム溶媒をナノポア内とシリコン薄膜の周囲に満たした。計算モデルの底面をアース ($V = 0 \text{ V}$) とし、上面から印加電圧を与える配置に設計した。印加電圧は、300 mV である。

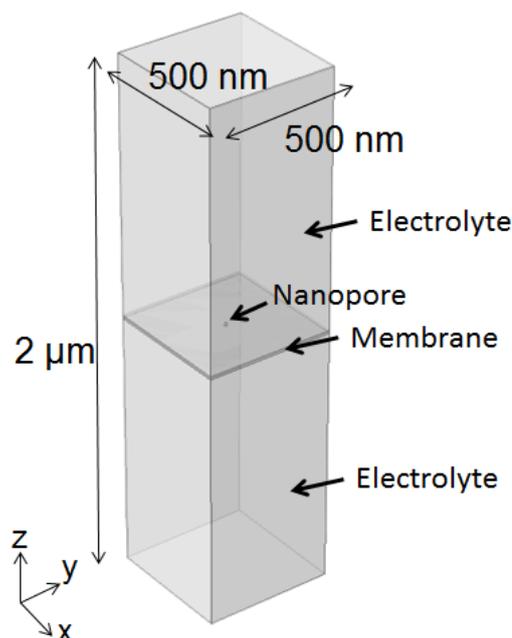


Figure 6.5 ポーラスシリコン膜の計算モデル

6.3.2.2 電場計算結果

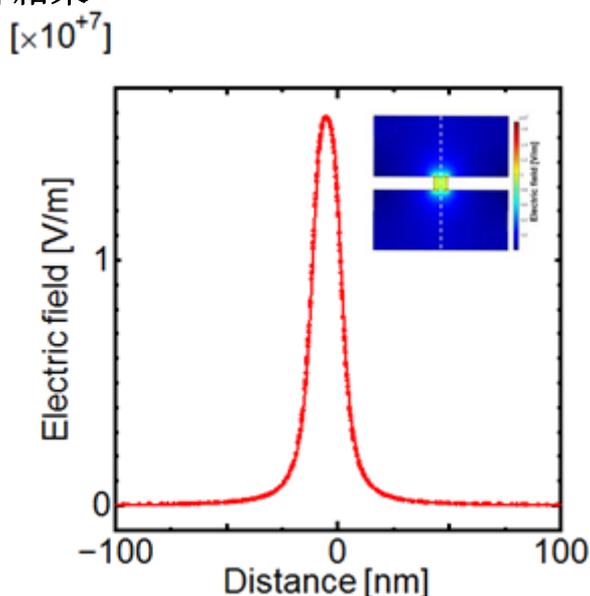


Figure 6.6 ポーラスシリコン膜の電場強度分布

Figure 6.6 に $z[-100\text{nm}:100\text{nm}]$ におけるナノポア中央から z 軸方向の電場強度分布を示す。 $Z=0\text{ nm}$ は、ナノポア上面に対応する。 $Z=0\sim-10\text{ nm}$ の領域において、高い電場強度がナノポア内に掛かっており、シリコン薄膜間において電圧降下が起こることを表している。また、 $z=0\sim100\text{ nm}$ の領域において、電場強度の急峻な減衰がみられであり、ナノポア上面からの電場強度分布を表す(5.4)式と一致する。

ナノポアを通過した後の 10 kbp の二本鎖 DNA と λDNA コイルの大きさは、(5.2)式からナノポアからそれぞれ 440 nm と 940 nm まで分布している。次式を用いて、ナノポアから 440 nm と 940 nm までの平均電場強度を算出する。

$$\bar{E} = \frac{1}{L} \int E(l) dl \quad (6.4)$$

\bar{E} 、 L 、 $E(l)$ はそれぞれ平均電場強度、コイルの大きさ、電場強度分布である。(6.4)式より、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA と λDNA に掛かる平均電場強度は、それぞれ $2.2 \times 10^5\text{ V/m}$ と $1.0 \times 10^5\text{ V/m}$ であった。平均電場強度から、電気泳動速度移動度 (μ : $1.8 \times 10^{-8}\text{ m}^2/(\text{V s})$) を掛けて、電気泳動速度を算出すると、 $4.0 \times 10^{-3}\text{ m/s}$ と $1.8 \times 10^{-3}\text{ m/s}$ であった⁸。 λDNA の電気泳動速度が 10 kbp の二本鎖 DNA の電気泳動速度の半分程度遅いことから、ナノポア通過後の電気泳動速度の違いによって、 λDNA の滞在時間が 2 倍程度長くなったと理解できる。

6.4 アルミナスパッタ膜を用いた DNA ナノポア通過挙動観察

ナノポア DNA シーケンサにおいて、孔径 10 nm 程度のナノポアを使用する必要がある。しかしながら、孔径 10 nm 程度のナノポアを集束電子ビームなどで薄膜上に作製することは容易でないことから、一度作製した孔径数十 nm のナノポアにスパッタリング成膜を行い、ナノポアの大きさを調整する方法が提案されている⁸。本節では、高い実用性を有するアルミナスパッタ薄膜における DNA ナノポア通過挙動を理解するために、この膜を用いて DNA ナノポア通過挙動の観察を行った。また、6.2 の DNA 通過観察結果と比較を行い、DNA ナノポア通過挙動の膜特性依存性について検討した。

6.4.1 FDTD シミュレーション

6.4.1.1 FDTD シミュレーションモデル

まず、FDTD シミュレーションより、電場強度分布の解析を行った。 Al_2O_3 (アルミナ) をスパッタしたポーラスシリコン薄膜に紫外光を集光したモデルの電磁場計算を行った。Figure 6.7 に計算モデルを示す。計算ソフトは、Lumerical Solutions 社の FDTD Solutions を使用した。膜厚 15 nm のシリコン薄膜を全計算領域に配置し、この上面に 12.5 nm のアルミナを配置したモデルを計算に使用した。アルミナ薄膜上面を $z=0$ とした。中央 13 箇所直径 10 nm のナノポアを配置された系を取り扱った。ナノポアの間隔は 20 nm である。この系に対して、波長 375 nm のガウシアンビームを開口数(NA)1.2 の対物レンズでアルミナ薄膜上に集光した。光源は、アルミナ薄膜の上面から 400 nm の位置に配置した。計算領域は、 $x[-8000 \text{ nm}: 8000 \text{ nm}]$ 、 $y[-8000 \text{ nm}: 8000 \text{ nm}]$ 、 $z[-100 \text{ nm}: 420 \text{ nm}]$ とした。シリコンの屈折率と消衰係数は、それぞれ 6.7 と 1.4 である。アルミナの屈折率は、1.79 である。屈折率 1.49 の塩化カリウム溶媒をナノポア内と薄膜の周囲に満たした。メッシュサイズは、ナノポアに対して $2 \times 2 \times 2 \text{ nm}^3$ 、シリコン薄膜に対して $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$ 、シリコン薄膜周囲の塩化カリウム溶媒に対して $50 \times 50 \times 50 \text{ nm}^3$ とした。境界条件は、完全吸収境界 (PML) とした。アルミナスパッタ薄膜の FDTD シミュレーションモデルは、4.2 のモデルと比べると、シリコンの膜厚が 5 nm 大きい。また、アルミナ 12.5 nm がシリコン上面に配置されている点と空孔率が高い点が異なる。

6.4.1.2 FDTD シミュレーション計算結果

電磁場計算結果を Figure 6.8 (a)に示す。4章で紹介したポーラスシリコン薄膜上に集光した条件と同様にして、集光スポットが薄膜上に形成されることがわかる。集光スポットの大きさは、直径 280 nm、深さ 130 nm であり、ポーラスシリコン薄膜と比べて、10 nm 程度小さいことがわかる。これは、集光スポットがアルミナ膜の遮光性ではなく、シリコン膜の遮光性により励起されることが理由として考えられる。 $X=100\text{ nm}$ における z 軸方向の集光スポット (z 偏光成分) の電場強度分布を確認すると、アルミナ薄膜内では電場強度が 40 % 低減されるのに対して、シリコン薄膜内では、電場強度が 90 % 以上低減されていることから理解できる (Figure 6.8 (b))。電磁場計算結果から、アルミナスパッタ薄膜においても、DNA ナノポア通過挙動観察に有効な集光スポットが形成されることが確認された。

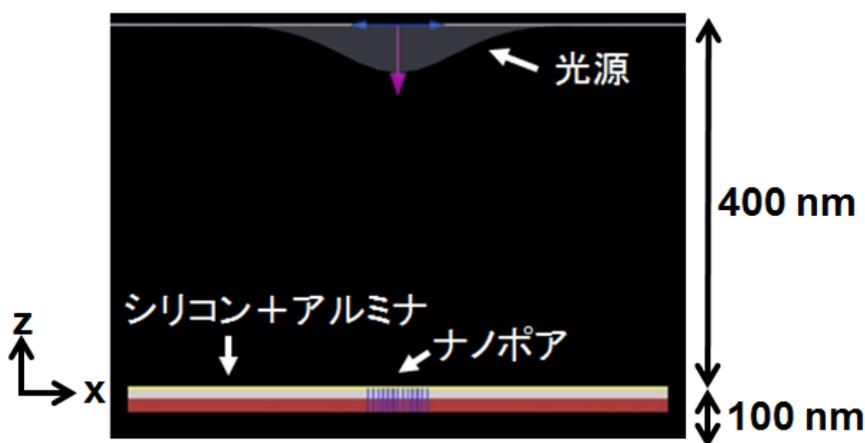


Figure 6.7 アルミナスパッタ膜の FDTD 計算モデル

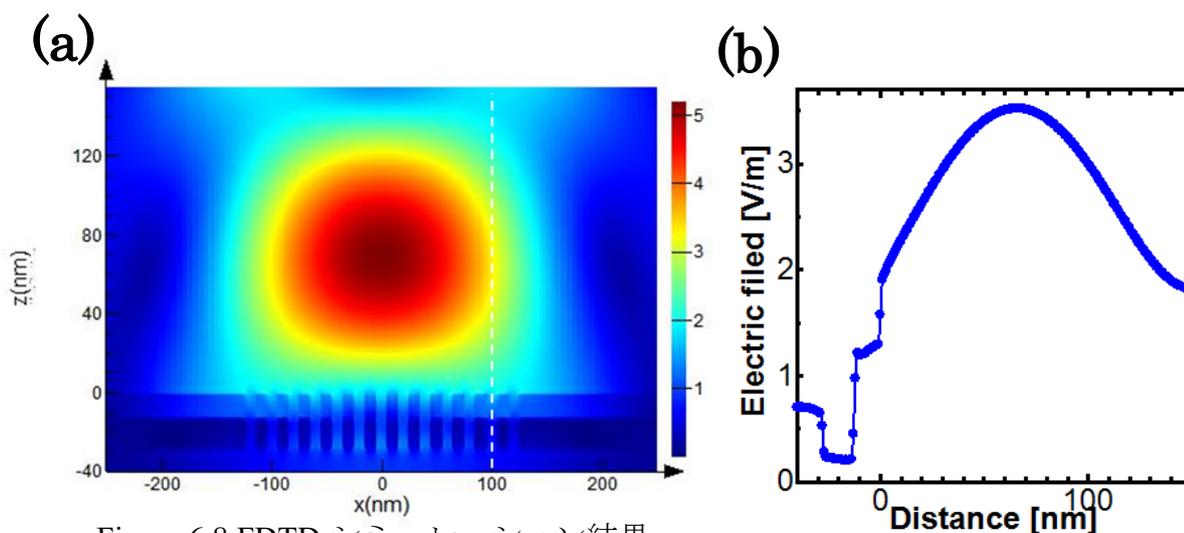


Figure 6.8 FDTD シミュレーション結果

(a)アルミナスパッタ膜上の電場強度分布, (b) z 軸方向の電場強度分布

6.4.2 DNA ナノポア通過挙動観察

6.4.2.1 実験方法

実験は、3.4にて述べた実験装置を用いた。レーザー強度は $100 \mu\text{W}$ とした。DNA 試料は、蛍光色素 DAPI で染色した長さ 10 kbp の二本鎖 DNA を使用した。実験において、電圧印加前の cis チャンバー内の DNA 試料の濃度は、 10 pM とした。アルミナスパッタ薄膜は、膜厚 15 nm のシリコン薄膜にアルミナを 12.5 nm スパッタしたものを使用した。空孔率と平均孔径は、それぞれ $5.4 \sim 6.2 \text{ nanopores}/(100 \text{ nm})^2$ と 10 nm である。電解質溶媒は、 $1.0 \text{ M KCl}/10 \text{ mM Tris-HCl}$ ($\text{pH } 7.8$) を使用した。電極は、 Ag/AgCl 電極を使用した。印加電圧は、 300 mV とした。蛍光強度波形は、時間分解能フотンカウンティングシステムを用いた。洗浄時間は、メタノール 2 時間、DDW 1 時間とした。時間分解フотンカウンティングシステムの積算時間は、 $100 \mu\text{s}$ とした。

6.4.2.2 実験結果

Figure 6.9 (a)に、印加電圧 300 mV における蛍光強度波形を示す。ポーラスシリコン薄膜を用いた場合と同様に、DNA のナノポア通過は、減衰する時間が立ち上がり時間の数倍程度長い蛍光強度波形として検出された。Figure 6.9 (b)と(c)に滞在時間とピークフoton数をまとめたヒストグラムを示す。平均滞在時間と平均ピークフoton数は、それぞれ 2.20 ms と $36 \text{ photons}/100 \mu\text{s}$ である。

6.2 のポーラスシリコン薄膜を使用した場合、印加電圧 300 mV において、平均滞在時間と平均ピークフoton数は、それぞれ 1.75 ms と $39 \text{ photons}/100 \mu\text{s}$ であった。本実験結果と比較すると、アルミナスパッタ薄膜を使用した場合、平均滞在時間が長くなる傾向があることがわかる。平均滞在時間が長くなる理由としてナノポア界面と DNA の相互作用が考えられる。先行研究において、 $\text{pH } 8.0$ の溶媒条件下において、アルミナがスパッタした表面は、正に帯電していることが報告されている⁶。アルミナスパッタ膜は正に帯電しているために DNA 通過する方向に浸透流が流れるが、イオン濃度 1.0 M において、アルミナ表面のデバイ長は 0.3 nm と短く、DNA のナノポア通過過程に電気浸透流が寄与しないことが報告されている⁶。電気浸透流の影響がないことを考えると、負に帯電した DNA が正に帯電するアルミナに吸着するために、平均滞在時間が長いことの一理由の一つとして挙げられる。また、アルミナスパッタ膜とポーラスシリコン薄膜の空孔率と膜厚が異なることから、ナノポア近傍における電場強度分布の影響が考えられる。

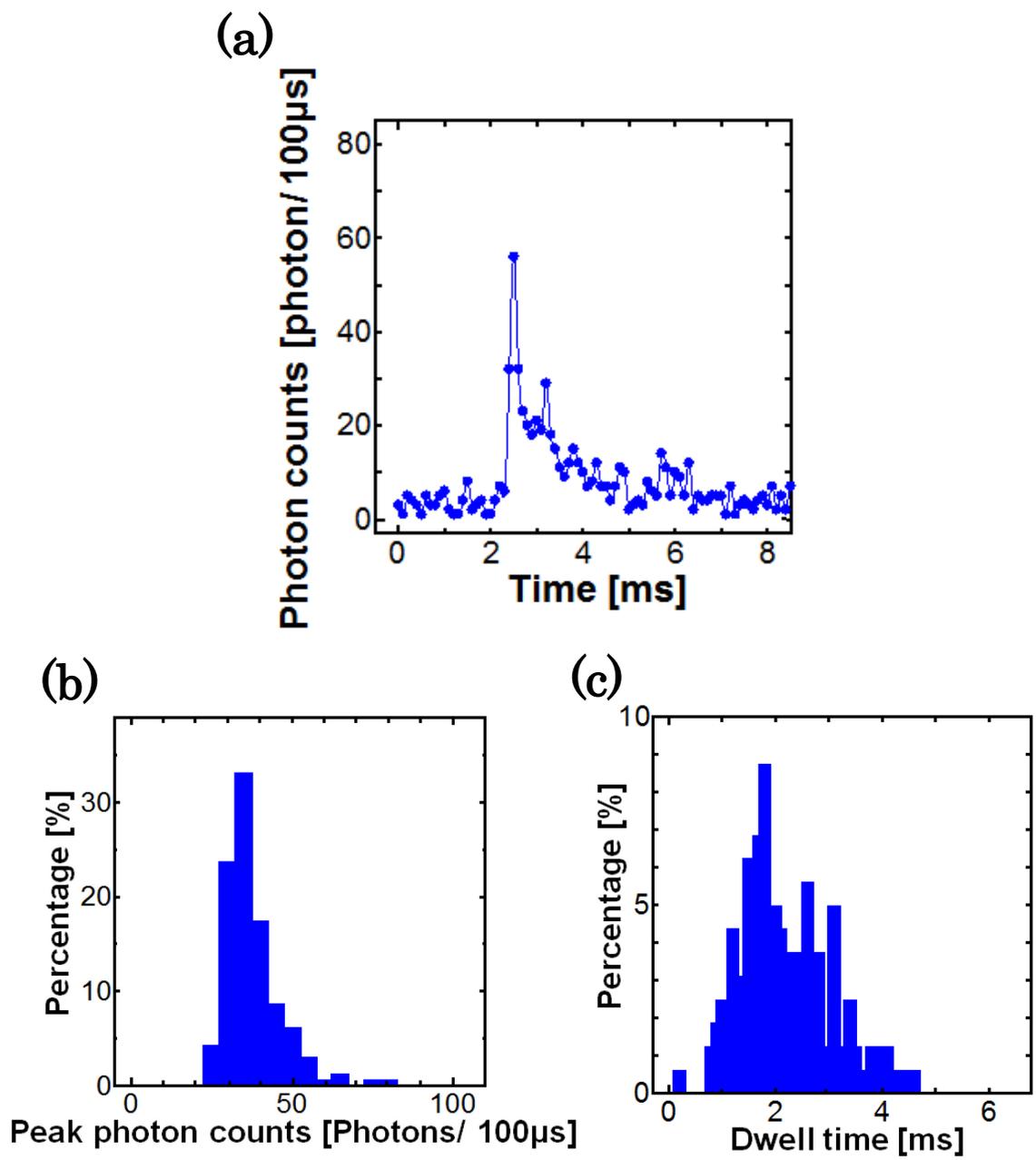


Figure 6.9 アルミナスパッタ膜を用いた

10 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過観察結果

- (a) 蛍光強度波形, (b) ピークフォトン数のヒストグラム,
- (c) 滞在時間のヒストグラム

6.4.3 電場計算

6.4.3.1 電場計算モデル

続いて、電場強度分布の影響を理解するために、電場強度分布の膜厚依存性と空孔率の関係について検討した。Figure 6.10 に一例としてアルミナスパッタ薄膜の計算モデルを示す。計算ソフトは、COMSOL Multiphysics を使用した。計算領域は、 $x[-500 \text{ nm}: 500 \text{ nm}]$ 、 $y[-500 \text{ nm}: 500 \text{ nm}]$ 、 $z[-1000 \text{ nm}: 1000 \text{ nm}]$ とした。シリコン薄膜を全計算領域に配置し、直径 10 nm のナノポアを配置したモデルを用いた。膜厚依存性の計算では、シリコンの膜厚を 10、20、30、40、50 nm とした。空孔率依存性の計算では、空孔率を 0.04、1、4、10.4、16、25 nanopores/(100 nm)² と設計するために、薄膜全体に 20、25、33、50、100、200 nm 間隔でナノポアを配置した。また、ポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ薄膜の電場強度分布を計算し、ナノポア通過波形の違いについて検討した。2 種類のポーラス薄膜の比較では、ナノポアのつまりを考慮して、空孔率は、公称値の 10 % とした。ポーラスシリコン薄膜の計算条件は、膜厚 10 nm ・空孔率 0.04 nanopores/(100 nm)² とした。アルミナスパッタ薄膜の計算では、膜厚 15 nm のシリコン上面に膜厚 12.5 nm のアルミナを配置したモデルを用いた。アルミナスパッタ薄膜の計算条件は、膜厚 27.5 nm (シリコン 15 nm+アルミナ 12.5 nm) ・空孔率 0.5 nanopores/(100 nm)² とした。シリコンの導電率と比誘電率は、それぞれ $1.0 \times 10^{-12} \text{ S/m}$ と 11.7 である。塩化カリウムの導電率と比誘電率は、それぞれ 11.43 S/m と 60 である。塩化カリウム溶媒をナノポア内とシリコン薄膜の周囲に満たした。計算モデルの底面をアース ($V = 0 \text{ V}$) とし、上面から印加電圧を与える配置に設計した。印加電圧は、300 mV とした。

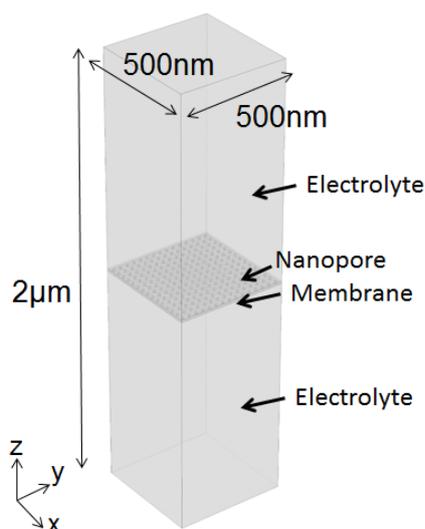


Figure 6.10 アルミナスパッタ膜の計算モデル

6.4.3.2 電場計算結果（膜厚と空孔率の影響）

まず、電場強度分布の膜厚依存性について検討する。Figure 6.11 (a)にシリコン薄膜に単一ナノポア（孔径 10 nm）に配置した条件での、電場強度分布を示す。膜厚は 10、20、30、40、50 nm である。Z = 0 nm がナノポア上面に対応する。Figure 6.11 (a)から、ナノポア内に一様の電場強度で分布しており、薄膜間で電圧降下が生じることを表している。また、ナノポア内の電場強度も 1.6×10^7 、 1.1×10^7 、 8.0×10^6 、 6.2×10^6 、 5.2×10^6 V/m と膜厚に依存していることがわかる (Figure 6.11 (b))。これは、ナノポア内の電場強度が膜に掛かる電圧 V を膜厚 h で割った値に相当することを表している ($E_{pore} \propto V/h$)。

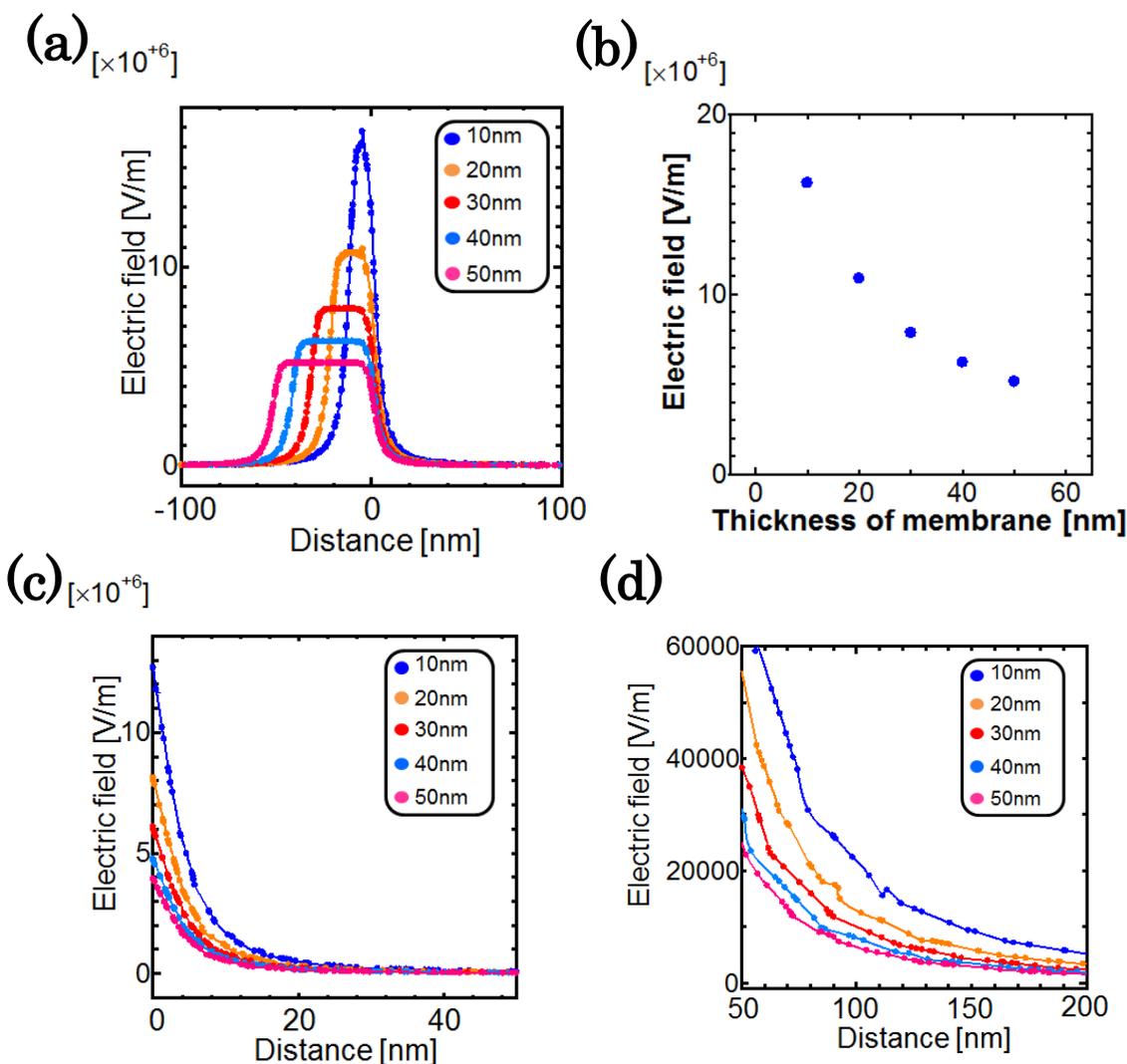


Figure 6.11 電場強度分布の膜厚依存性

(a) z [100 nm:-100 nm], (c) z [50 nm:0 nm], (d) z [200 nm:50 nm],

(b) ナノポア内の電場強度の膜厚依存性

Figure 6.11 (c)、(d)にナノポア上面 ($z = 0 \text{ nm}$) から 200 nm までの電場強度分布を示す。電場強度はナノポア上面から距離に依存して減衰することがわかる。また、電場強度は、膜厚にも依存することがわかる。(5.4)式から、Figure 6.11 (c)、(d)の電場強度の減衰は、ナノポア上面から $1/r^2$ で減衰する様子を表しているといえる。また、電場強度が膜厚に依存する様子は、(5.4)式の $1/h$ の成分を表しているといえる。

続いて、電場強度の空孔率依存性について検討する。Figure 6.12 (a)に膜厚 10 nm のシリコン膜にナノポアを変えた条件での電場強度分布を示す。空孔率は、 0.04 、 1 、 4 、 10.4 、 16 、 $25 \text{ nanopores}/(100 \text{ nm})^2$ である。 $Z = 0 \text{ nm}$ がナノポア上面に対応する。ナノポア内の電場強度は、 0.04 、 1 、 4 、 10.4 、 16 、 $25 \text{ nanopores}/(100 \text{ nm})^2$ のシリコン薄膜に対して、 1.6×10^7 、 1.4×10^7 、 1.1×10^7 、 7.7×10^6 、 5.3×10^6 、 $3.7 \times 10^6 \text{ V/m}$ と空孔率に依存していることがわかる (Figure 6.12 (b))。これは、空孔率が大きくなるにつれて、ナノポア内に通過する電気力線密度が小さくなることを表している。

Figure 6.12 (c)、(d)にナノポア上面から 200 nm までの電場強度分布を示す。ナノポア上面からおおよそ 30 nm までの領域では、空孔率が小さいほど、高い電場強度を示すことがわかる。これは、単一のナノポアから発生する電場に由来するものと考えられる。単一ナノポアに集中する電気力線密度は、空孔率に依存することから、空孔率が小さいほど、単一ナノポアから発生する電場強度は高くなる。ナノポア上面からおおよそ 30 nm までの領域において、単一ナノポアから発生する電場の空孔率依存性がみられる。一方、 30 nm 以上の領域では、空孔率が大きくなるにつれて、電場強度が高くなることがわかる。これは、空孔率が大きくなるに従い、シリコン薄膜内のナノポア全体の抵抗が小さくなったため、電解質溶媒内に掛かる電圧値が大きくなったことが理由として考えられる。ナノポアの抵抗値は、次式で表される。

$$R_{nanopore} = \frac{1}{\sigma_s \pi} \left(\frac{4h}{d^2} + \frac{1}{d} \right) \quad (6.5)$$

$R_{nanopore}$ 、 σ_s 、 d 、 h は、それぞれナノポアの抵抗値、溶媒の伝導率、ナノポアの直径、ナノポアの深さである。(6.2)式から、ナノポア直径の二乗に反比例することからも、空孔率に依存して、ナノポア全体の抵抗値が小さくなり、電解質溶媒内の電圧値が大きくなったと理解できる。

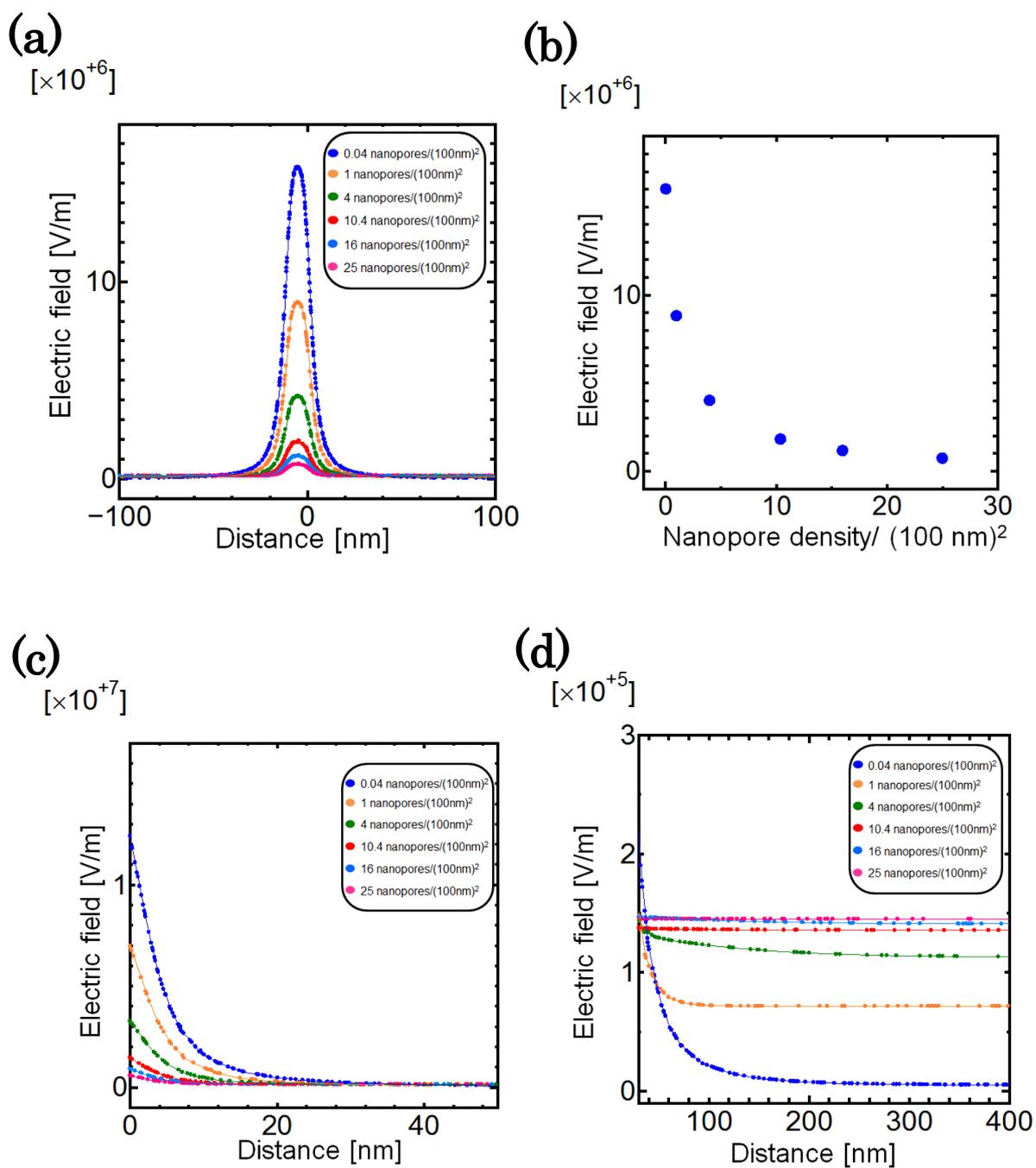


Figure 6.12 電場強度分布の空孔率依存性
 (a) $z[-100 \text{ nm}:100 \text{ nm}]$, (c) $z[0 \text{ nm}:50 \text{ nm}]$, (d) $z[50 \text{ nm}:200 \text{ nm}]$,
 (b) ナノポア内の電場強度の空孔率依存性

6.4.3.3 電場計算結果 (2種類の薄膜の比較)

続いて、ポーラスシリコン膜とアルミナスパッタ膜の電場計算結果の比較を行い、蛍光強度波形の違いについて検討する。Figure 6.13 (a)と(b)に、ポーラスシリコン膜とアルミナスパッタ膜における電場強度分布を示す。 $Z=0$ nm の位置がナノポア上面に対応する。膜厚・空孔率が大きいアルミナスパッタ薄膜のピーク電場強度が小さくなる傾向は、6.4.3.2 で示した膜厚依存性と空孔率依存性と一致する (Figure 6.12 (a))。また、空孔率が大きいアルミナスパッタ薄膜は、ポーラスシリコン薄膜と比べて、ナノポア上面から 40 nm の領域において電場強度が小さく、40 nm 以上の領域において電場強度が大きくなるのがわかる (Figure 6.12 (b))。これは、6.4.3.2 で示した空孔率依存性と一致する。

ナノポア通過挙動観察において、アルミナスパッタ膜の方が、ポーラスシリコン薄膜と比べて、滞在時間が長かった。蛍光強度波形には、ナノポア通過過程と通過後過程が含まれることから、これら2つに分けて、考察する。DNA ナノポア通過時間は、ナノポア内に存在する DNA に加わる駆動力に依存することが報告されている ($\tau \propto 1/F$)⁹。ナノポア内の DNA に加わる駆動力は、 $F = qE_{pore}$ で表される。Figure 6.13 (a)のナノポア内の電場強度を 1 nm ずつにナノポア内の DNA の有効電荷 0.5 e/basepair を掛けて、ポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ薄膜における電氣的駆動力を計算すると、それぞれ 22.4 pN と 9.0 pN である¹⁰。電氣的駆動力の概算から、ナノポア通過時間は、アルミナスパッタ膜の方が 2 倍程度長いことがわかる。ナノポア内の電場強度は、膜に掛かる電圧を膜厚で割った値に相当し ($E_{pore} \propto V/h$)、また、ナノポア内に存在する DNA の長さは、膜厚に対応する ($l_{DNA_{pore}} \propto h$)。このことから、ナノポア内の DNA に加わる駆動力は、膜厚に対して常に一定であり、膜厚の違いがナノポア通過時間に寄与しないことが知られている¹¹。したがって、アルミナスパッタ薄膜の長いナノポア通過時間は、空孔率が高いことにより、ナノポア内に掛かる電場強度が低くなったことが理由として挙げられる。また、空孔率が高い場合、ナノポア近傍の電場分布も DNA のナノポア通過挙動に影響することが考えられる。ナノポアを通過する前の DNA は、DNA コイルがナノポアより大きいために、DNA 自身の構造を解して、ナノポアを通過する必要がある。DNA 自身の構造を解す過程において、粘性抵抗や浸透流などのイオン衝突が DNA ナノポア通過時間に影響することが報告されている¹²。本研究で使用した空孔率が高いのポーラスシリコンの場合、DNA ナノポア通過時において、Figure 6.14 の概念図に示すように、DNA は、周囲のナノポアから発生する電場やイオン衝突を受ける。この複雑な流動場と電場駆動力によって、DNA 自身の立体構造を解し、ナノポアに通過することが妨害されることも、ナノポア通過時間が長くなる要因として考え

られる。蛍光強度波形の平均立ち上がり時間に着目すると、アルミナスパッタ膜における平均立ち上がり時間は $616 \mu\text{s}$ に対して、ポーラスシリコン薄膜における平均立ち上がり時間は $407 \mu\text{s}$ と 1.5 倍長くなることから、DNA ナノポア通過時間が長くなることが理解できる。

一方、ナノポアを通過した後の DNA は、ナノポア近傍に発生する電場を受けて、移動する。(5.2)式からナノポアを通過した後の DNA の大きさは、バルク溶媒中の大きさ 440 nm と考えられる。(6.4)式より、アルミナスパッタ膜とポーラスシリコン薄膜それぞれに対して、DNA に掛かる平均電場強度は、 $2.6 \times 10^5 \text{ V/m}$ と $2.2 \times 10^5 \text{ V/m}$ である。この平均電場強度から、電気泳動速度は、 $4.7 \times 10^{-3} \text{ m/s}$ と $4.0 \times 10^{-3} \text{ m/s}$ と算出される。したがって、ナノポア通過後の DNA に同程度の電気泳動速度で移動することから、ナノポア通過後の DNA は、同程度の時間を経て、集光スポットから離れていくことが考えられる。アルミナスパッタ膜の方がナノポアから 40 nm 以降の領域で高い電場強度を示すにも関わらず、アルミナスパッタ膜とポーラスシリコン薄膜における蛍光強度波形の平均減衰時間がそれぞれ $1570 \mu\text{s}$ と $1350 \mu\text{s}$ と近い値を示すことから概算が妥当であると理解できる。

上述の内容をまとめると、アルミナスパッタ膜で滞在時間が長くなった理由として、DNA のアルミナ界面吸着以外に、高い空孔率のためにナノポア通過時間が長くなったことが挙げられる。

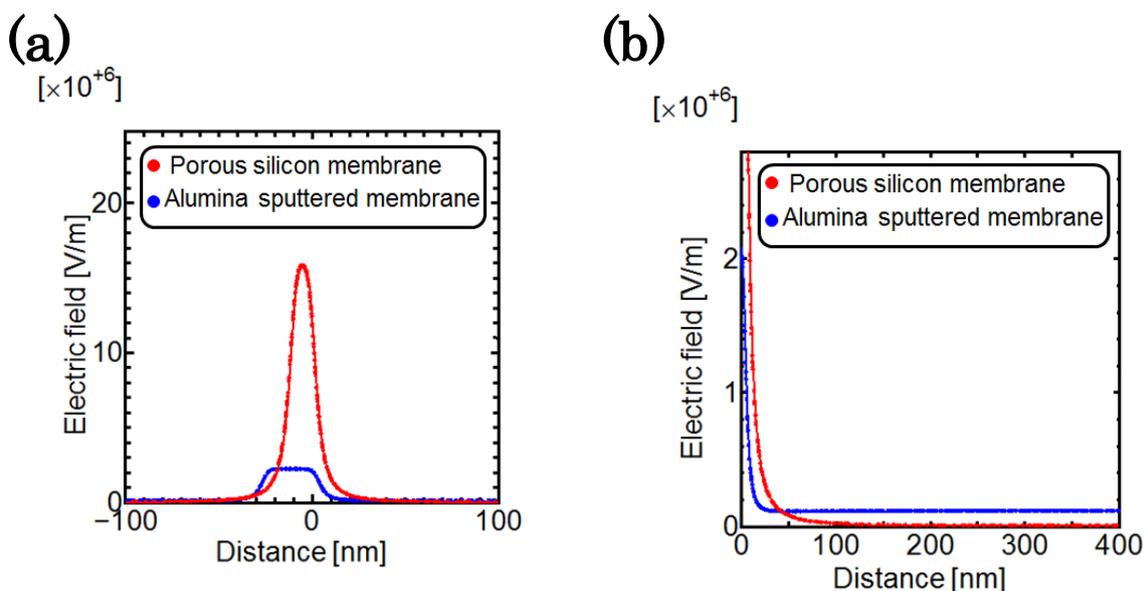


Figure 6.13 ポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ膜の電場強度分布
(a) $z[100 \text{ nm}:-100 \text{ nm}]$, (b) $z[0 \text{ nm}:400 \text{ nm}]$

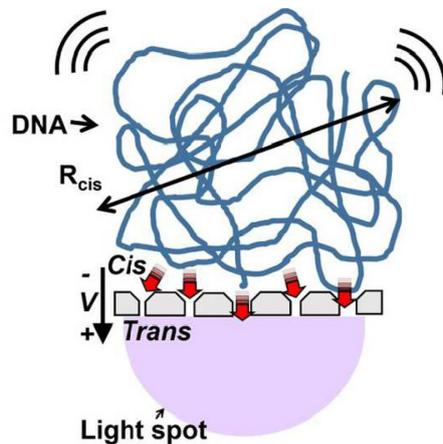


Figure 6.14 複数のナノポアが DNA に与える影響

6.4 おわりに

本章では、ナノポア通過と通過後の DNA 挙動を観察し、ナノポア近傍の電場に起因する DNA 通過挙動を議論した。6.1 と 6.2 では、ポーラスシリコン薄膜を用いて、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA と λ DNA のナノポア通過挙動を観察し、これの DNA 長依存性について議論した。その結果、ナノポアを通過した後の DNA は長い DNA ほど平均電気駆動力が小さいために、電気泳動速度が遅いことが示された。6.3 では、簡易に作製可能なアルミナスパッタ膜を用いて、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過挙動観察を行い、6.1 の観察結果と比較した。比較結果から、DNA のアルミナ界面吸着とポーラス薄膜の高い空孔率の影響によって、DNA ナノポア通過時間に長くなることを示した。空孔率がナノポア通過時間に与える影響として、ナノポア内に加わる電場強度が低下することに加えて、周囲のナノポアから受ける電場強度やこれらによって生じる複雑な流体力学的相互作用によって、DNA コイルを解す過程が妨害されていることが示した。

本研究法より、新たに得られた知見から、次の方法が DNA ナノポア通過の低速化に利用できる。まず、平均電場強度はナノポア通過後の DNA コイルの大きさに依存することから、DNA コイルの大きさが大きくなる測定条件を選定することが望ましい。例えば、溶媒温度を低くして、DNA コイルを大きくすることで、これに加わる電氣的駆動力を下げるができる。詳細なメカニズムは明らかとなっていないが、低温の溶媒条件においてナノポア通過の低速化が報告されており、DNA コイルの大きさにより電氣的駆動力の低下がナノポア通過の低速化に寄与することが十分考えられる¹¹。また、ナノポアアレイを利用するこ

とが望ましい。また、ポーラス薄膜と単一ナノポアを用いたイオン電流測定結果を比較すると、ポーラス薄膜のナノポア通過時間が長いイオン電流波形が得られており、ナノポアアレイの利用によりナノポア通過の低速化が望める^{12,13}。

参考文献

1. S. Carson, J. Wilson, A. Aksimentiev, and M. Wanunu, *Biophys. J.* **107**, 2381 (2014).
2. B. Lu, F. Albertorio, D. P. Hoogerheide, and J. A. Golovchenko, *Biophys. J.* **101**, 70 (2011).
3. A. Ivankin, R. Y. Henley, J. Larkin, S. Carson, M. L. Toscano, and M. Wanunu, *ACS Nano* **8**, 10774 (2014).
4. S. Huang, M. R. Ruiz, O. K. Castell, H. Bayley, and M. I. Wallace, *Nat. Nanotech.* **10**, 986 (2015).
5. J. P. S. DesOrmeaux, J. D. Winans, S. E. Wayson, T. R. Gaborski, T. S. Kire, C. C. Striemer, and J. L. McGrath, *Nanoscale* **6**, 10798 (2014).
6. P. Chen, T. Mitsui, D. B. Farmer, J. Golovchenko, R. G. Gordon, and D. Branton, *Nano Lett.* **4**, 1333 (2004).
7. D. R. Latulippe and A. L. Zydney, *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 1 (2010).
8. J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield, *Biophys. J.* **82**, 6 (2002).
9. C. M. Edmonds, P. J. Hesketh, and S. Nair, *Chem. Phys.* **425**, 1 (2013).
10. U. F. Keyser, B. N. Koeleman, S. V. Dorp, D. Krapf, R. M. M. Smeets, S. G. Lemay, N. Dekker, and C. Dekker, *Nat. Phys.* **2**, 473 (2006).
11. D. V. Verschueren, M. P. Jonsson, and C. Dekker, *Nanotechnol.* **26**, 234004 (2015).
12. A. J. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J. F. Joanny, and C. Dekker, *Nano Lett.* **5**, 1193 (2005).
13. L. Liu, L. Zhu, Z. Ni, and Y. Chen, *Nano. Res. Lett.* **8**, 498 (2013).

7. 結論

7.1 はじめに

2003 年のヒトゲノム計画の完了に伴い、米国立ヒトゲノム研究所は、全ヒトゲノムを 1000 ドル以下のコストで解析すること目標に 1000 ドルゲノムアワードという研究補助金を設立し、多額の費用をシーケンサ開発に関連する研究に投じた。その結果、現在では、様々な原理に基づく次世代シーケンサが開発されている。その中でも特に注目されている次世代型シーケンサは、ナノポアシーケンサである。ナノポアシーケンサは、1 分子レベルでの検出感度を有することから、DNA 試料の増幅が不要である。そのため、ナノポアシーケンサは、前処理が不要となり、低コストかつ短時間解析可能な技術として期待されている。しかし、ナノポアシーケンサの実現には、課題点が多く、これらの課題を解決するために DNA ナノポア通過の詳細な理解が求められる。本研究では、先行研究で提案されている技術では不可能であったナノポア通過中と通過直後の DNA を観察するために、光学的観察手法を構築した。これを用いて DNA ナノポア通過挙動について検討した。以下に、本研究で得られた成果を各章ごとにまとめ、今後の展望について述べる。

7.2 ナノポアにおける電解質溶液の流動特性と

DNA ナノポア通過特性の物理 (第 2 章)

本章では、本研究に関連する物理現象に関して述べた。2.2 では、ナノポアの流動特性について述べた。2.3 では、ナノポア近傍における DNA の挙動について述べた。先行研究では、ナノポア通過後過程について、研究報告は数少ないため、ナノポア捕捉過程とナノポア通過過程に関して説明した。

7.3 実験試料と方法 (第 3 章)

本章では、実験試料と方法について述べた。3.2 では、DNA 試料について説明した。実験で使用した λ DNA 切片、長さ 10 kbp 二本鎖 DNA のゲル泳動写真から、設計通りの DNA が試料として使用されていることを示した。また、吸光度スペクトルから、それぞれの DNA に修飾されている蛍光分子数の概算結果について説明した。3.3 では、実験に使用したポーラスシリコン薄膜について説明した。ポーラスシリコン薄膜の構造について概説し、TEM 像写真から、実験に使用したポーラスシリコン薄膜のナノポアの孔径分布について述べた。3.4 では、

DNA ナノポア通過挙動観察に用いた実験装置について説明した。3.5 では、蛍光強度波形の解析方法について説明した。3.6 では、実験前にナノポア内に溶媒が満たされていることを確認するために行ったイオン電流測定について説明した。また、測定において、典型的な I-V 測定結果を示し、理論式から溶媒が満たされるナノポアの数を見積もった。3.7 では、実験手順について説明した。

7.4 シリコンナノポア界面における集光スポットの発生 (第 4 章)

本章では、DNA ナノポア通過観察に用いる集光スポットの発生について述べた。4.2 では、FDTD 法を用いて算出された電磁場解析結果から、紫外光 ($\lambda = 375$ nm) をポーラスシリコン薄膜上に集光すると、シリコンの遮光性により、ナノ薄膜界面上に集光スポットが励起されることを示した。4.3 では、ナノ薄膜上に励起される集光スポットは、DNA ナノポア通過挙動観察に有効であることを実験的に示した。

7.5 時間分解フォトンカウンティングシステムの構築 (第 5 章)

本章では、時間分解フォトンカウンティングシステムの構築し、システムの動作確認を行った。5.2 では、時間分解フォトンカウンティングシステムについて概説した。5.3 では、構築した時間分解フォトンカウンティングシステムを用いて、蛍光ビーズのブラウン運動と DNA ナノポア通過を観察した。観察結果を従来のフォトンカウンティングシステムより検出された波形と比較を行い、システムの妥当性を示した。5.4 では、5.3 で検出された蛍光強度波形を先行研究で報告されている知見から、蛍光強度波形の立ち上がりと減衰には、それぞれナノポア通過過程とナノポア通過後過程の DNA 挙動が含まれると結論付けた。

7.6 ナノポア通過中と通過直後の DNA 挙動観察 (第 6 章)

本章では、5 章で構築した時間分解フォトンカウンティングシステムを用いて、ナノポア通過中と通過後の DNA 挙動観察結果について述べた。6.2 では、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA ナノポア通過挙動観察結果について述べた。6.3 では、 λ DNA ナノポア通過挙動観察結果について述べた。6.2 の観察結果の比較から、ナノポアを通過した後の DNA の電気泳動速度は、非一様な電場強度分布より、長い DNA ほど遅いことを示した。6.3 では、アルミナスパッタ薄膜を用いて、10 kbp の二本鎖 DNA のナノポア挙動通過を観察した結果について述べた。6.2 の観察結果の比較から、表面電荷と高い空孔率の影響によって DNA ナノポア通過速度

が遅くなることを示した。

7.7 おわりに

本論文では、集光スポットが DNA コイル観察に有効な $1\ \mu\text{m}$ 以下の空間分布を有することから、DNA コイル形成と空間移動の観察に求められる空間分解能 $100\ \text{nm}$ と時間分解能 $100\ \mu\text{s}$ を有する光学的観察法を構築した。そして、構築した観察法を用いて、ナノポア通過中と通過直後の DNA 挙動を観察した。

本研究法を用いて、DNA の長さや膜特性に依存した蛍光強度波形が得られた。理論計算を基に蛍光強度波形から解析すると、先行研究では報告されていない DNA ナノポア通過挙動を示すことができた。まず、DNA 長が長いほど、ナノポア通過後の DNA 電気泳動速度が遅いことが示された。また、周囲のナノポアから DNA が受ける複雑な電氣的駆動力や流体力学的相互作用によって、DNA ナノポア通過速度が遅くなることが示された。また、これらの知見を基に、DNA ナノポア通過を低速化する方法を提案することができた。

新たなナノポア通過過程と通過直後の DNA 挙動が示せたことから、本研究手法は、DNA ナノポア通過現象の詳細なメカニズム解明に大いに貢献できるといえる。しかしながら、5 章では、先行研究から報告されている知見を基に、蛍光強度波形の立ち上がり・減衰は、それぞれ DNA ナノポア通過過程とナノポア通過後過程に対応すると結論づけた。しかし、詳細な DNA ナノポア通過現象を理解するには、蛍光強度波形から DNA ナノポア通過過程と通過後過程を分けて解析することには、情報として不十分である。今後の展望でも述べるが本論文で述べた光学的手法にイオン電流測定などの DNA ナノポア通過過程を観察する装置を導入することで、詳細な DNA ナノポア通過現象が明らかになるだろう。

7.8 今後の展望

ナノポアシーケンサの目覚ましい研究進展は、Oxford nanopore 社の MinION のプレリリースや Quantum biosystems 社などのベンチャー企業の設立からも伺うことができる。しかし、ナノポアシーケンサの商品化には、更なる測定精度の向上が求められるため、DNA ナノポア通過現象の詳細なメカニズムの解明が必然的に重要な研究対象となる。本研究法は、ナノポア通過過程と通過直後の DNA 挙動を観察できることから、このメカニズム解明に大いに貢献できる。以下に、今後の展望として、行うべき研究課題をいくつか述べる。

まず、詳細な DNA ナノポア通過挙動観察に向けて、微細加工技術により作製した単一のナノポアを用いて観察を行う必要がある。ナノポア通過直後の DNA

コイル形成を観察するには、大きさ数十 nm 程度のナノポアを使用することが望ましいが、光学顕微鏡像では、これを探すことが出来ない。この解決策として、光学顕微鏡で探せるような十分に大きなナノポアに対して、二酸化ケイ素 (SiO₂) をスパッタリングして作製したナノポアを用いるのが有効である。例えば、付録 D で紹介している FIB で加工した孔径 280 nm のシリコンナノポアに SiO₂ をスパッタリングして孔径を数十 nm まで小さくすれば、ナノポアを光学顕微鏡から探すこともできるため、ナノポア通過直後の DNA のコイル状態を観察できる。

イオン電流測定を組み合わせることで、本研究法の応用性を更に広げることができる。本研究では、蛍光強度波形にナノポア通過過程とナノポア通過後過程が含まれることを述べたが、素早い DNA ナノポア通過過程を蛍光強度波形からの解析では不十分である。そのため、現状では、ナノポア通過過程と通過後過程に分けて、詳細な解析ができない。この解析を実行するためには、イオン電流測定を組み合わせ、蛍光観察との同時測定を行うことが望ましい。例えば、孔径 10 nm 程度のナノポアを通過する場合、直径 2 nm の DNA はまっすぐ一塩基順番に通過するだけでなく、折りたたまれた状態で通過する。本研究法とイオン電流測定の組み合わせを用いれば、ナノポア通過時における DNA の立体的構造 (unfolded DNA translocation, folded DNA translocation) がナノポア界面における DNA 立体的構造に与える影響について検討できる (Figure 7.1)。

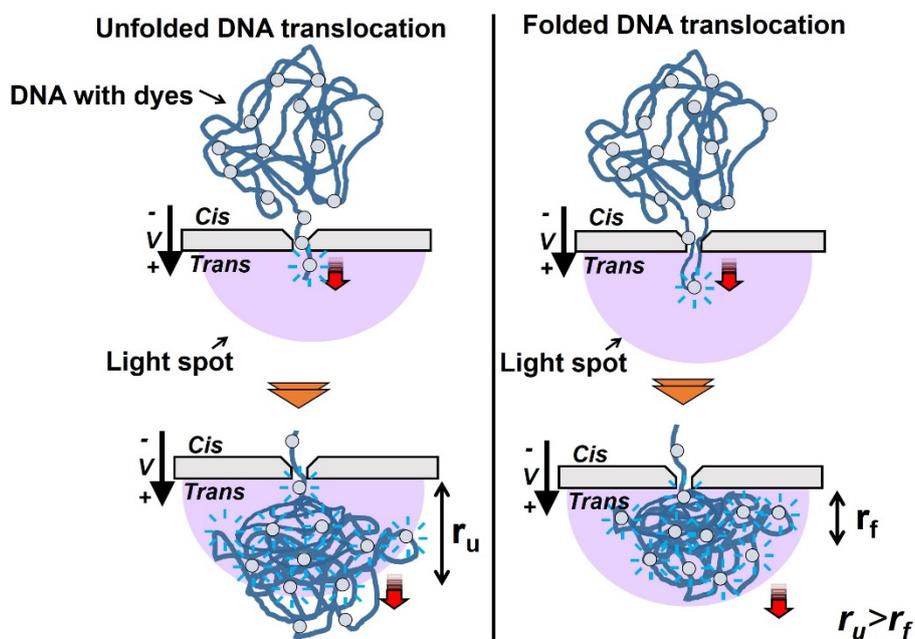


Figure 7.1 unfolded translocation と foled translocation 直後の DNA 挙動

本研究法の空間分解能を上げるために、集光スポットの空間分布制御法を構築する必要がある。Figure 7.2 の FDTD シミュレーション結果に示すように、z 偏光成分と x 偏光成分の集光スポットは、ナノポア界面上とナノポアから 100 nm の異なる領域に分布する。この偏光特性によって、集光スポットが異なる空間領域に形成される性質を利用して観察領域を 100 nm 移動させることができる。具体的には、z 偏光成分の集光スポットを生成する光学素子(z 偏光素子)を測定装置に組み込むことで、通常形成される x 偏光成分と、これとは異なる領域に分布する z 偏光成分を使い分けて、ナノポア近傍において急激に変化する DNA コイル状態を観察することが可能となる。

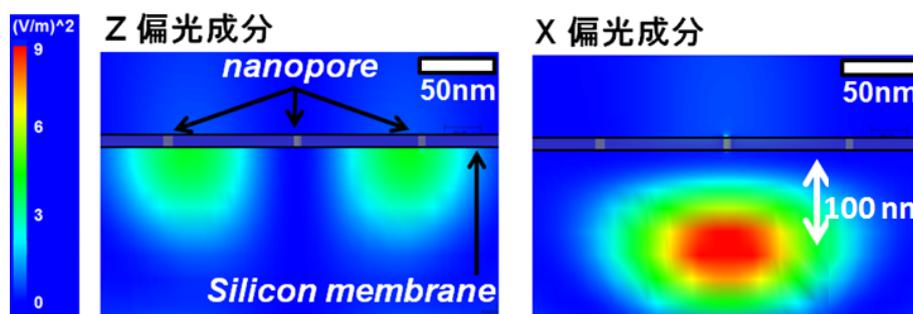


Figure 7.2 x と z 偏光成分の電場強度分布の空間分布

DNA のナノポア近傍における動的立体構造を解明するために、溶媒条件（イオン濃度、pH、温度など）パラメータとして実験を行い、比較・検討を行う必要がある。DNA の物理的性質は、溶媒条件に応じて変化するため、DNA の収縮過程に顕著な違いが現れると考えている。特に、DNA の stiffness（硬さ）が大きく収縮距離に寄与していると予想され、例えば、溶媒の温度を下げても DNA の stiffness を高めることで、DNA の収縮距離の伸長が期待できる。この収縮距離を励起光源の外側まで伸ばすことができれば、本研究法を用いて、塩基配列の読み取りが可能となる (Figure 7.3)。

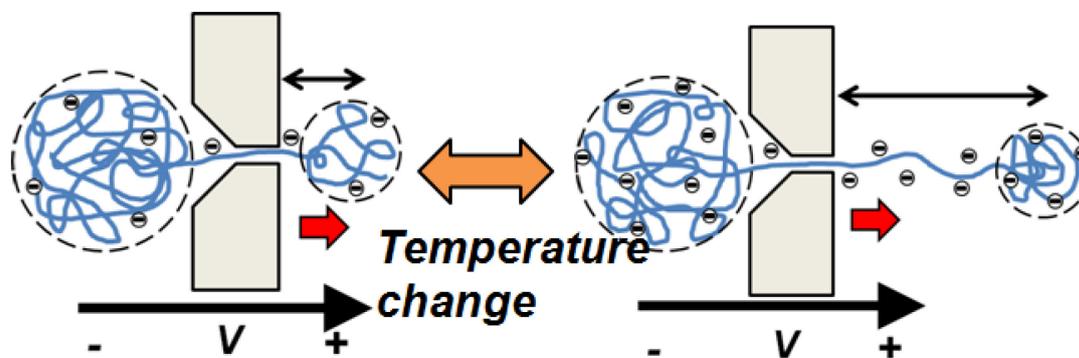


Figure 7.3 ナノポア通過後 DNA 立体構造の溶媒条件依存性

最後に、付録 F に記載してあるように、本研究法を用いて、捕捉過程の DNA 挙動を観察することができる。イオン電流を用いた先行研究では、捕捉過程の DNA が検出頻度 (capture rate) や DNA ナノポア通過時間と関係があることが示唆されている。本研究法を用いれば、DNA がコイル構造を解して、ナノポアを通過する様子を観察することができるため、捕捉過程の DNA 挙動と capture rate やナノポア通過時間との相関関係について調べることができる。

付録

A. はじめに

本章では、本論文の骨子として掲載しない実験結果を紹介する。今後の研究に活用していただきたい。

B. DNA に加わる静電的駆動力の概算

DNA に加わる静電的駆動力を計算するために、有限要素法を用いて、ナノポア内とその周辺に発生する電場強度分布を計算した。計算ソフトは、COMSOL Multiphysics を使用した。

B.1 電場計算モデル

計算領域は、 $x[-500 \text{ nm}:500 \text{ nm}]$ 、 $y[-500 \text{ nm}:500 \text{ nm}]$ 、 $z[1000 \text{ nm}:-1000 \text{ nm}]$ とした。シリコン薄膜を全計算領域に配置し、直径 10 nm のナノポアを中央に配置したモデルを計算に用いた。シリコンの膜厚は 20 nm とした。シリコンの導電率と比誘電率は、それぞれ $1.0 \times 10^{-12} \text{ S/m}$ と 11.7 である。また、塩化カリウムの導電率と比誘電率は、それぞれ 11.43 S/m と 60 である。塩化カリウム溶媒をナノポア内とシリコン薄膜の周囲に満たした。計算モデルの底面をアース ($V=0 \text{ V}$) とし、上面から印加電圧を与える配置に設計した。印加電圧は、 120 mV とした。

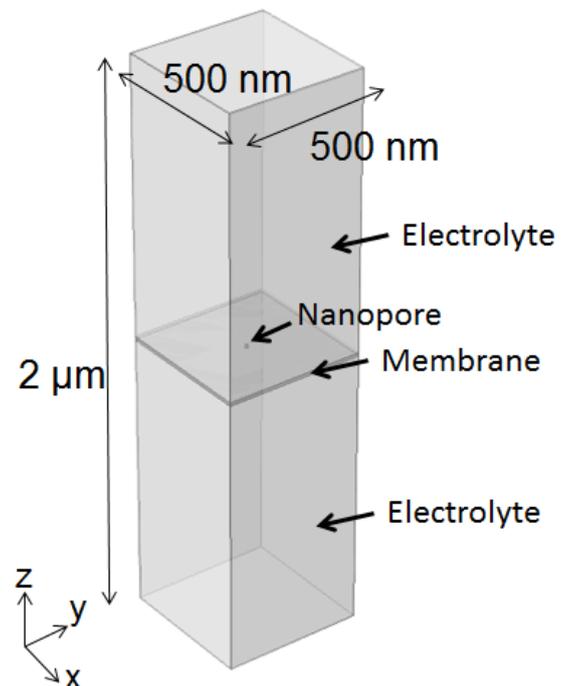


Figure B.1 計算モデル

B.2 電場計算結果

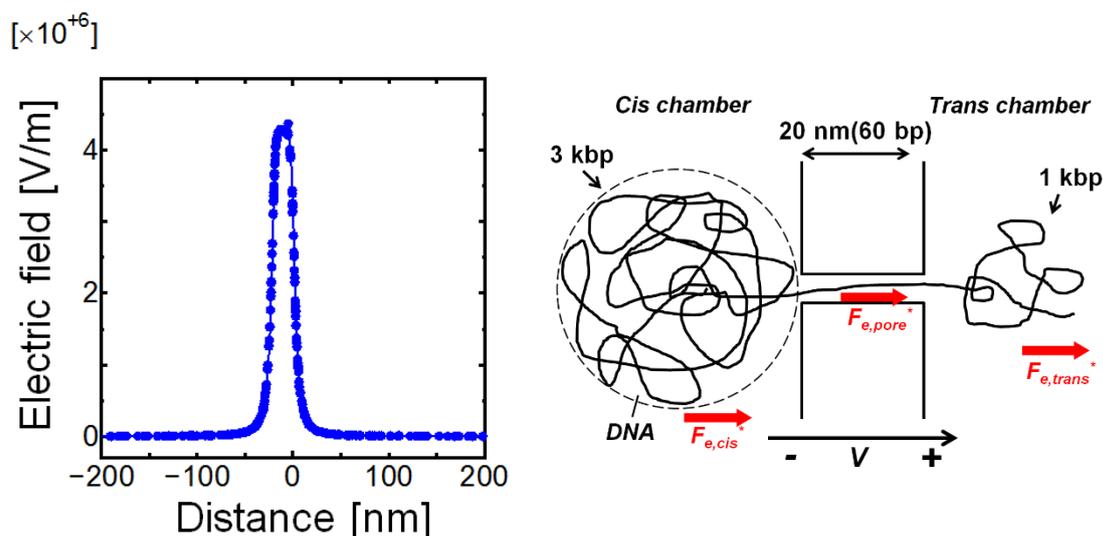


Figure B.2 (a)膜厚 20 nm・孔径 10nm のシリコンナノポアの電場強度分布,
(b)長さ 4 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過モデル

Figure B.2 (a)に電場計算結果を示す。ナノポア上面を $z=0$ nm とした。 $Z=0 \sim -20$ nm において、一様な電場強度で分布しており、シリコン薄膜で電圧降下が起こることを表している。また、 $z=0$ nm 以降の領域において、電場強度は、指数的に減衰していることがわかる。これらの特徴は、6章で行った電場強度計算結果と一致する。Figure B.2 (b)に長さ 4 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過モデルを示す。膜厚 20 nm のシリコン薄膜に作製されたナノポアを一直線に通過すると、長さ 60 bp の長さ DNA がナノポア内に存在する。Cis チャンバー内に 3 kbp、また trans チャンバー内に 1 kbp の DNA が存在する条件における、ナノポア内と cis、trans チャンバー内の DNA に掛かる静電的駆動力を計算する。Cis、trans チャンバー内の DNA コイルの大きさがバルク溶媒中の DNA コイルの大きさと同程度であると仮定すると、それぞれは、次式から算出される¹。

$$R_{g,linear} = a \left[\frac{L}{3a} - 1 + \frac{2a}{L} - 2 \left(\frac{a}{L} \right)^2 \left(1 - \exp \left(\frac{-L}{a} \right) \right) \right]^{1/2} \quad (\text{B.1})$$

L 、 a は、それぞれ DNA の長さと DNA の持続長である。(B.1)式に、高塩濃度条件下における DNA の持続長 44 nm を代入して、長さ 3 kbp と 1 kbp の DNA コイルの大きさは、270 nm と 130 nm である。

続いて、DNA の表面電荷を算出する。Chen らの文献から、ある長さ L の DNA の表面電荷は次式で表される²。

$$q = 2\pi a^* \sigma^* L \quad (\text{B.2})$$

a^* 、 σ^* は、それぞれ DNA の半径 (1 nm) と DNA の表面電荷密度である。 a^* 、 σ^* は、1 nm と 0.15 C/m² である。長さ 3 kbp と 1 kbp の DNA コイルの表面電荷は、 9.3×10^{-16} C と 3.1×10^{-16} C と算出される。DNA コイルを上式から算出した表面電荷で帯電する球体と仮定して、Figure B.1 の電場分布から 3 kbp と 1 kbp の DNA コイルに掛かる平均電場強度を算出すると、 6.4×10^4 V/m と 1.3×10^5 V/m である。したがって、長さ 3 kbp と 1 kbp の DNA コイルに加わる静電氣的駆動力は、60 pN と 41 pN と算出される。また、ナノポア内の長さ 60 bp の二本鎖 DNA の表面電荷は、(B.2)式から 1.8×10^{-17} C と算出される。これに、ナノポア内の一様な電場強度 4.3×10^6 V/m を掛けると、ナノポア内の DNA に加わる静電氣的駆動力は、80 pN と算出される。

C. 集光スポットの励起における屈折率と消衰係数の影響

本章では、薄膜の屈折率・消衰係数を変えて、FDTD シミュレーションによる電磁場解析を行い、これらのパラメータと集光スポットの励起の関係について検討する。

計算条件は、4.2 で示したように波長 375 nm の光源を N. A. 1.2 の対物レンズで膜厚 10 nm の薄膜上面に集光したモデルを用いた。また、薄膜中央には直径 10 nm ・深さ 10 nm のナノポアを 3 つ配置した。初めに、屈折率をシリコンの屈折率 $n=6.7$ に固定し、消衰係数を $k = 0.5 \sim 5$ に変えて電磁場解析を行った。Figure C.1 (a) に屈折率 $n = 6.7$ ・消衰係数 $k = 0.5$ における電磁場解析結果を示す。Figure C.1 (a) の集光スポットは、低い消衰係数にも関わらず、Figure 4.2 (a) と同じ電場強度を示した。その他の消衰係数の条件においても、電場強度は Figure 4.2 (a) と同じ値を示した。次に、消衰係数 $k = 1.5$ に固定し、屈折率を変えて計算を行った。Figure C.1 (b) に屈折率 $n = 2$ における電磁場解析結果を示す。4.1.2 の電磁場解析と同様に、集光スポットは薄膜上面から 100 nm の位置に励起していることがわかる。また、屈折率 $n = 2$ の条件では、励起光が薄膜を透過し、薄膜下面に集光スポットの半分程度が分布しており、ピーク電場強度が屈折率 $n = 6.74$ と比べて低いことがわかる。Figure C.1 (c) に薄膜の屈折率 $n = 2 \sim 6.7$ における集光スポットのピーク電場強度と KCl ($n = 1.2$) 溶媒中に集光した時の集光スポットのピーク電場強度をまとめたグラフを示す。屈折率が高くなるにつれて、ピーク励起強度が大きくなり、屈折率 $n = 6.7$ の条件下では、溶媒に集光した時のピーク励起強度と比べて、2 倍程度高くなることがわかる。屈折率と消衰係数を変えた計算から、励起波長に対して高い屈折率を有するナノ薄膜を用いることで、4.2 で示した集光スポットが励起できるといえる。

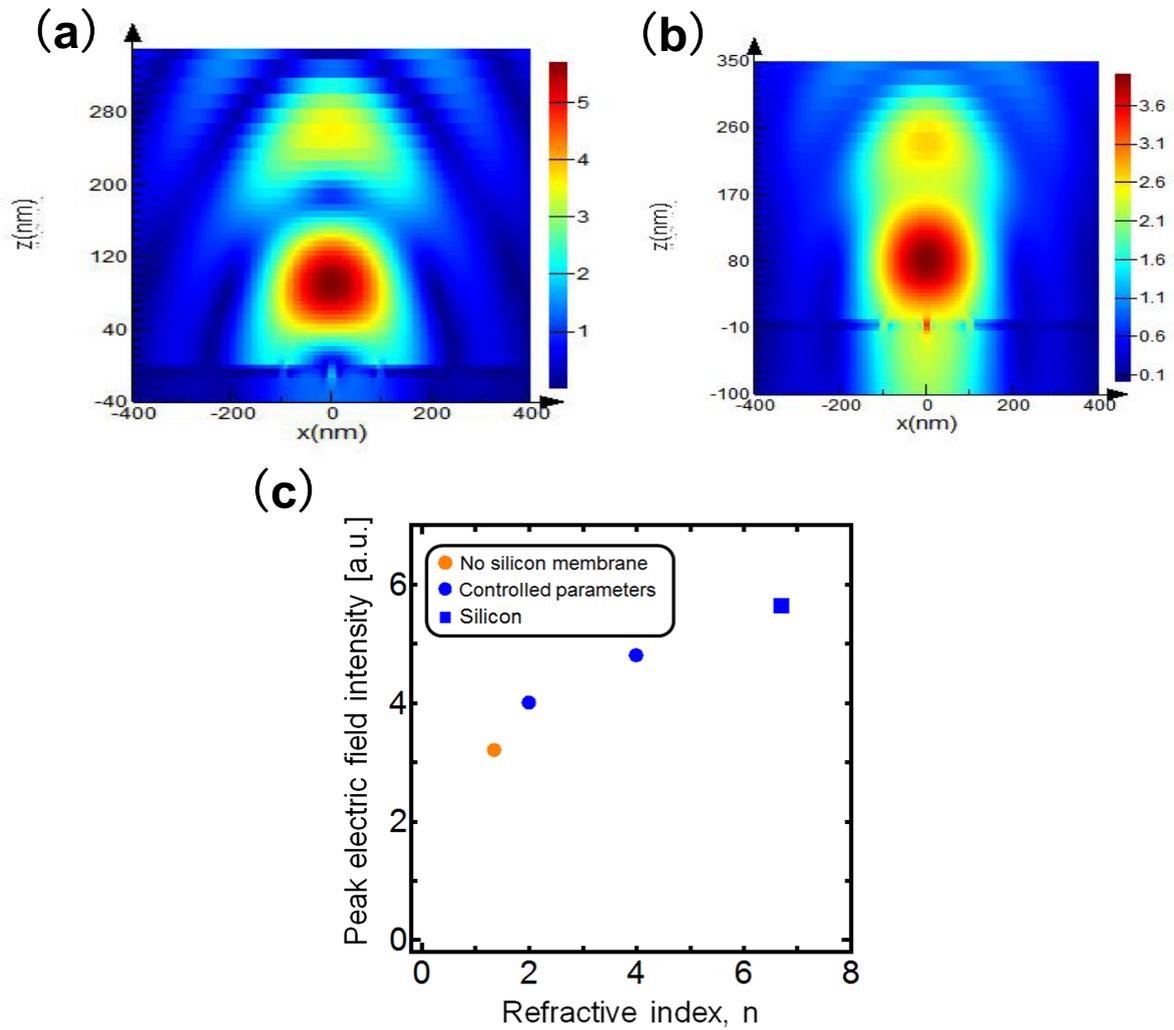


Figure C.1 薄膜の屈折率・消衰係数を変えた条件での

FDTD シミュレーション計算結果

(a)屈折率 $n = 6.7$ ・消衰係数 $k = 0.5$ における電磁場解析結果

(b)屈折率 $n = 2$ ・消衰係数 $k = 1.5$ における電磁場解析結果

(c)屈折率 $n = 2 \sim 6.7$ における局在光のピーク電場強度

D. DNA の単一ナノポア通過観察

本章では、FIB で加工した単一ナノポアを用いて DNA ナノポア通過観察を行った。

D.1 FIB 加工によるシリコンナノポア

単一ナノポアを用いた DNA のナノポア通過観察を行うために、集束イオンビーム装置を用いてシリコン薄膜上にナノポアを作製した。使用したシリコン薄膜は、膜厚 15 nm のアモルファスシリコンメンブレン TEM グリッドである。シリコンメンブレン TEM グリッドは、Figure D.1 に示したように結晶シリコンのフレーム中央にアモルファスシリコン自立薄膜が作成された構造をとる。ナノポア作製に使用した集束イオンビーム装置は、日本電子株式会社製の JIB-4600F である。作製条件は、ビームサイズ 10、ドーズ量 $0.1 \text{ nC}/\mu\text{m}^2$ とした。ナノポアは、 $5 \mu\text{m}$ 間隔に、 4×4 の合計 16 個をシリコン薄膜上に作製した (Figure 3.8)。作製したナノポアの大きさは、280 nm である。

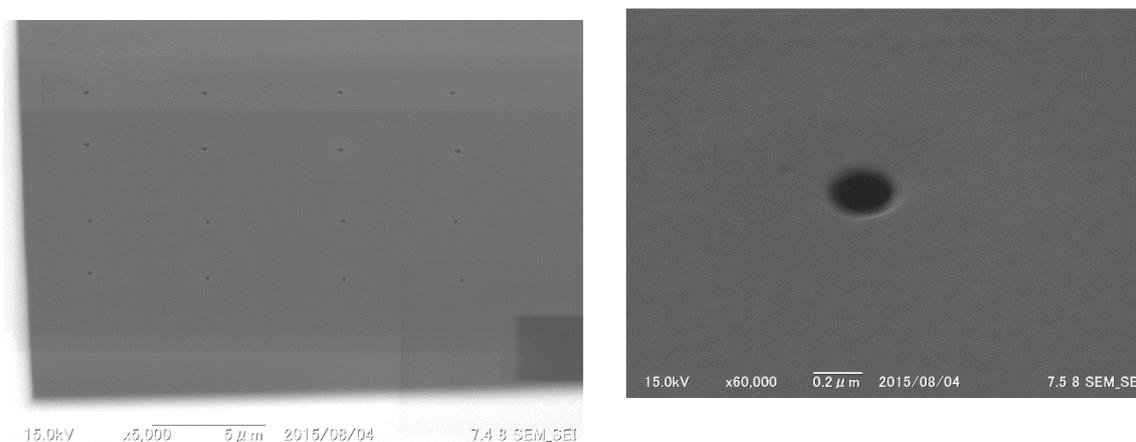


Figure D.1 FIB 加工によるシリコンナノポアの走査型電子顕微鏡像

D.2 FDTD シミュレーション

D.2.1 FDTD シミュレーションモデル

まず、シリコン薄膜上に作製した単一ナノポアに紫外光を集光したモデルの電磁場計算を行った。Figure D.2 に計算モデルを示す。計算ソフトは、Lumerical Solutions 社の FDTD Solutions を使用した。膜厚 15 nm のシリコン薄膜を全計算領域に配置したモデルを計算に使用した。シリコン薄膜上面を $z=0$ nm とした。中央 1 箇所直径 280 nm のナノポアを配置された系を取り扱った。この系に対して、波長 375 nm のガウシアンビームを開口数 (NA) 1.2 の対物レンズでナノポア中央に集光した。光源は、シリコン薄膜の上面から 400 nm の位置に配置した。計算領域は、 $x[-8000$ nm: 8000 nm]、 $y[-8000$ nm: 8000 nm]、 $z[420$ nm: -300 nm]とした。シリコンの屈折率と消衰係数は、それぞれ 1.4 と 6.74 である。屈折率 1.49 の塩化カリウム溶媒をナノポア内とシリコン薄膜の周囲に満たした。メッシュサイズは、ナノポアに対して $5 \times 5 \times 5$ nm³、シリコン薄膜に対して $5 \times 5 \times 5$ nm³、シリコン薄膜周囲の塩化カリウム溶媒に対して $50 \times 50 \times 50$ nm³ とした。それぞれのメッシュサイズ差を埋めるように、メッシュタイプは、Custom non-uniform とした。境界条件は、完全吸収境界 (PML) とした。



Figure D.2 FIB 加工ナノポアの FDTD 計算モデル

D.2.2 FDTD シミュレーション結果

Figure D.3 に $x[-200 \text{ nm}: 200 \text{ nm}]$ 、 $z[-400 \text{ nm}: 400 \text{ nm}]$ の領域における電場分布を示す。孔径 280 nm の条件において、ナノポア内に直径 280 nm・深さ 700 nm の集光スポットが励起されていることがわかる。シリコン薄膜からの反射光との干渉により、 $Z=280 \text{ nm}$ の領域に、2 つ目の集光スポットが現れていることがわかる。また、孔径数十 nm のナノポアに集光した場合とは異なり、孔径 280 nm のナノポアの条件では、電場が trans 側に 400 nm 程度染み出ていることが確認できる。したがって、DNA ナノポア通過観察実験において、DNA の励起は trans 側から起こることがわかる。

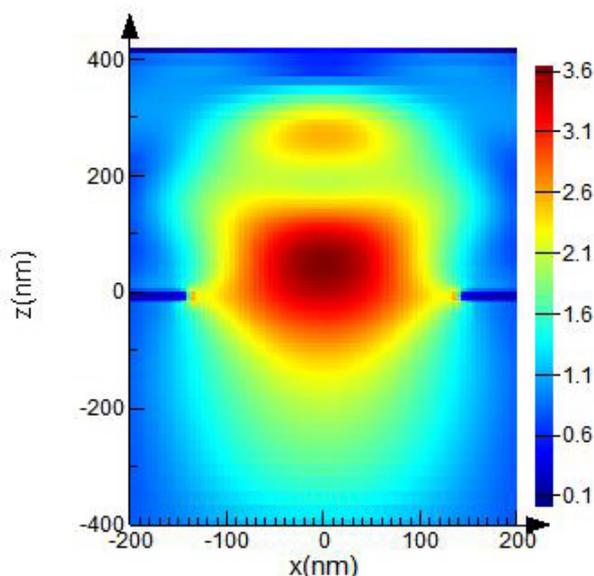


Figure D.3 FDTD シミュレーション結果
(FIB 加工ナノポア)

D.3 ナノポア通過観察

D.3.1 実験方法

実験は、3.3 にて紹介した実験装置を用いた。レーザー強度は $100 \mu\text{W}$ とした。試料は、長さ 10 kbp の二本鎖 DNA を蛍光色素 DAPI で染色した DNA 試料を使用した。実験において、電圧印加前の cis チャンバー内の試料の濃度は、 10 pM とした。シリコン薄膜は、膜厚 15 nm のシリコン薄膜に FIB 加工により孔径 280 nm のナノポアを作成したものをを使用した。電解質溶媒は、 $0.01 \text{ M KCl}/10 \text{ mM Tris-HCl}$ (pH 7.8) を使用した。電極は、Ag/AgCl 電極を使用した。印加電圧は、100、200、300、400 mV とした。蛍光強度波形は、時間分解能光子カウンティングシステムを用いた。洗浄時間は、メタノール 30 分・DDW 30 分とした。時間分解能光子カウンティングシステムの積算時間は、 $100 \mu\text{s}$ とした。レーザーを単一ナノポア上に集光して、実験を行った。レーザー集光位置は、光学像から、ナノポアの中央にレーザーが集光されていることを確認した。実験では、5 分につきレーザー集光位置のアライメントを行い、おいて常にレーザーがナノポア上に集光していることを確認して、実験を行った。解析には、ピーク光子数が $40 \text{ photons}/100 \mu\text{s}$ 以上の蛍光強度波形を用いた。

D.3.2 実験結果

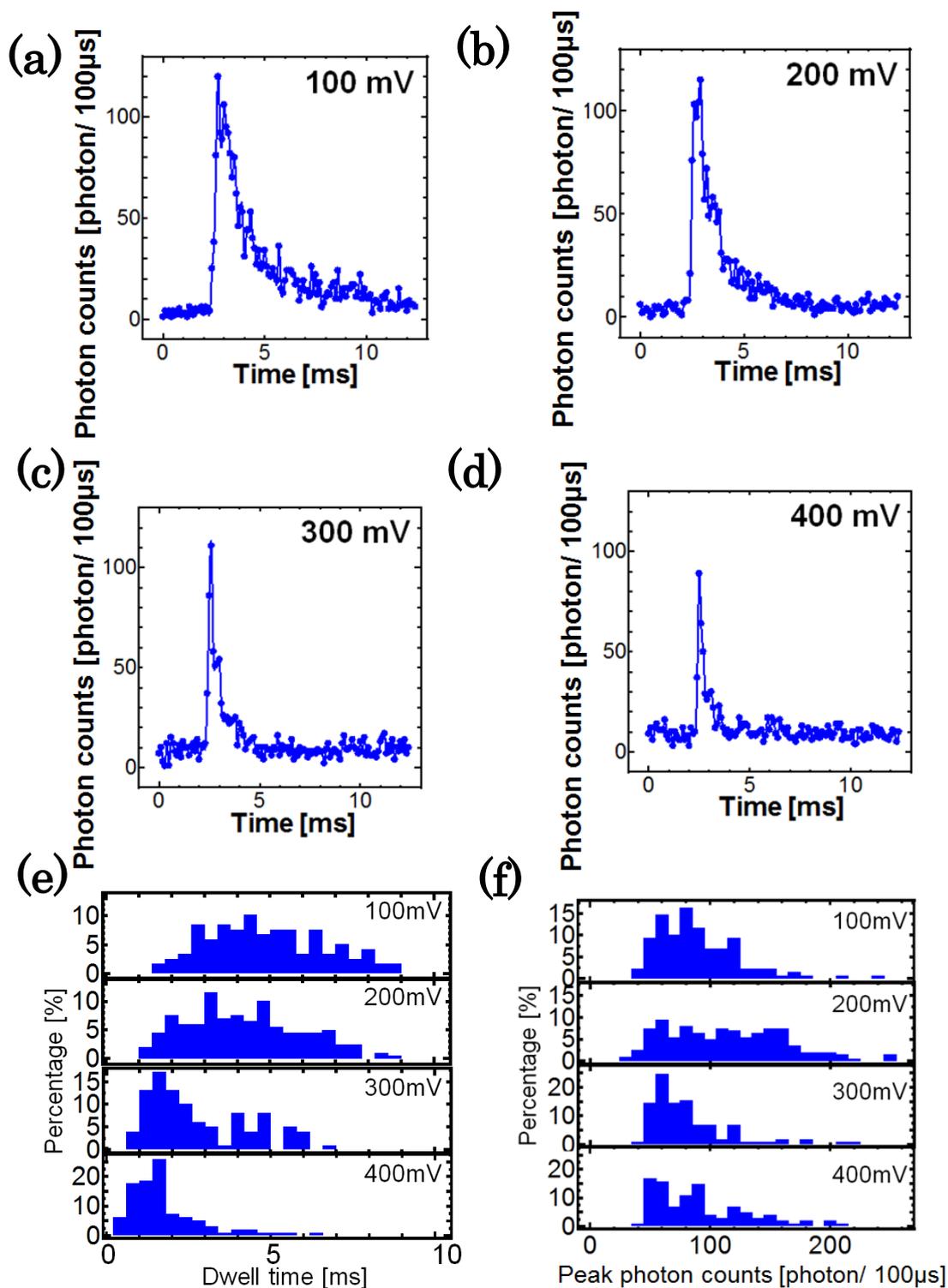


Figure D.4 10 kbp の二本鎖 DNA の FIB 加工ナノポア通過観察

(a) - (d)印加電圧 100 ~ 400 mV における蛍光強度波形,

(e)滞在時間のヒストグラム, (f)ピークフォトン数のヒストグラム

Figure D.4 (a)に印加電圧 100 mV における蛍光強度波形を示す。検出された波形は、減衰時間が立ち上がり時間の数倍程度の蛍光強度波形であった。6.2 のポーラスシリコンを用いた場合と比べて、数倍長い滞在時間であることがわかる。Figure D.4 の FDTD シミュレーション結果から、これは、DNA を励起している領域が 700 nm と数倍広いことが理由として考えられる。

Figure D.4 (b) ~ (d)に印加電圧 200 ~ 400 mV における蛍光強度波形を示す。印加電圧が高くなるに従い、滞在時間が短くなる傾向がみられ、これは、ポーラスシリコン薄膜の条件での電圧依存性の実験結果と一致する。Figure D.4 (e) - (f) に滞在時間のヒストグラムとピークフォトン数のヒストグラムを示す。印加電圧 100 ~ 400 mV において、滞在時間はそれぞれ 4.8、4.1、2.7、1.8 ms であった。また、印加電圧 100 ~ 400 mV において、ピークフォトン数は、84、113、73、96 photons/100 μ s であった。滞在時間に関しては、ポーラスシリコン膜を用いた場合と同様に DNA 電気泳動速度の電圧依存性がみられた。しかし、ピークフォトン数では、電圧依存性がみられなかった。

D.4 電場計算

D.4.1 電場計算モデル

続いて、単一ナノポア近傍の電場分布の計算を行った。Figure D.5 に計算モデルを示す。計算ソフトは、COMSOL Multiphysics を使用した。計算領域は、 x [-500 nm:500 nm]、 y [-500 nm:500 nm]、 z [1000 nm:-1000 nm]とした。シリコン薄膜を全計算領域に配置し、直径 280 nm のナノポアを中央に配置したモデルを計算に用いた。シリコンの膜厚は 15 nm とした。シリコンの導電率と比誘電率は、それぞれ 1.0×10^{-12} S/m と 11.7 である。また、塩化カリウムの導電率と比誘電率は、それぞれ 11.43 S/m と 60 である。塩化カリウム溶媒をナノポア内とシリコン薄膜の周囲に満たした。計算モデルの底面をアース ($V = 0$ V) とし、上面から印加電圧を与える配置に設計した。印加電圧は、100、200、300、400 mV とした。

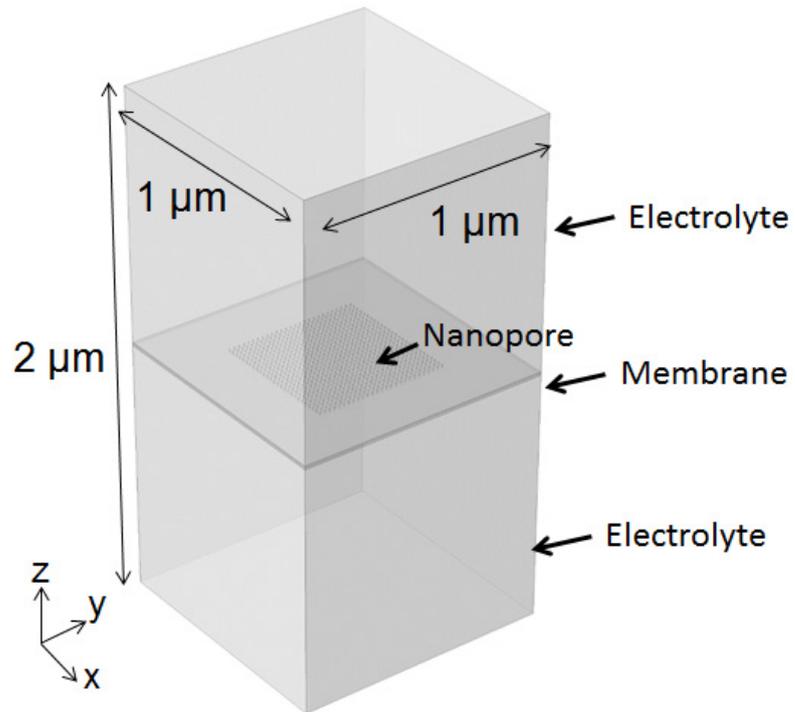


Figure D.5 FIB ナノポアの COMSOL 計算モデル

D.4.2 電場計算結果

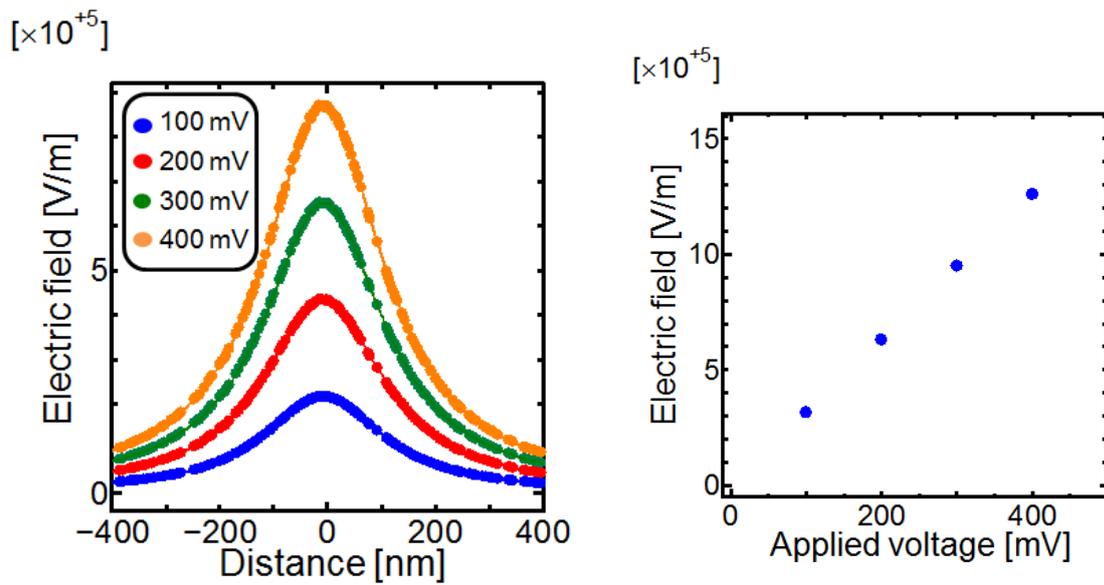


Figure D.6 FIB ナノポア近傍における電場強度分布の電圧依存性
(a)電場強度分布, (b)ピーク電場強度

Figure D.5 (a)にナノポア中央から z 軸方向に -400 nm から 400 nm までの電場分布を示す。 $Z=0 \text{ nm}$ がナノポア上面と対応する。電場強度は、等方的に分布することがわかる。Figure D.5 (b)にピーク電場強度を示す。印加電圧に線形的に依存しており、ナノポア内の電場強度の電圧依存性 ($E_{pore} \propto V/h$) と一致する。また、ナノポア近傍においても ($z=0 \sim 400 \text{ nm}, -15 \sim -400 \text{ nm}$)、電場強度は、印加電圧に依存しており、これは、(6.3)式と一致する。

DNA の電気泳動速度は、電場強度に電気泳動移動度を掛けることで算出される ($v = \mu E$)。ある電気泳動速度の物体がある距離を移動する時間は、次式で示される³。

$$\tau = \frac{1}{\mu} \int_{z_2}^{z_1} \frac{1}{E(z)} dz \quad (D.1)$$

局在光が分布する $z = -400 \sim 280 \text{ nm}$ までの領域を大きさ 520 nm の DNA が通過する。上式に Figure D.5 (a)に示す電場強度を代入して、 $z = -920 \sim 800 \text{ nm}$ のに要する時間を算出すると、印加電圧 $100, 200, 300, 400 \text{ mV}$ において $5.1, 2.6, 1.7, 1.3 \text{ ms}$ であった。この理論値は、Figure D.5 (e)の滞在時間 (実験値) と概ね近い値を示す。実験値に理論値より長い滞在時間が含まれる理由として、DNA のシリコン吸着や電気浸透流の影響が挙げられる。バルク中における 10 kbp の二本鎖 DNA の大きさは、直径 520 nm と実験に用いたナノポアより大きい。そのため、DNA は、シリコン界面と接触しながら、ナノポアを通過するため、DNA の界面吸着によって、電気泳動速度が低下したことが考えられる。また、シリコンは、 $\text{pH } 7.9$ の溶媒条件下において、負に帯電しているため、DNA がナノポアを通る方向に逆らって電気浸透流が流れる⁴。この電気浸透流が DNA のナノポア通過を遅めたことも理由として考えられる。

E. 長さ 10 kbp の環状 DNA ナノポア通過挙動観察

長さ 10 kbp 環状 DNA ナノポア通過挙動を観察した結果について述べる。

E.1 実験方法

実験は、3.3 にて紹介した実験装置を用いた。レーザー強度は 100 μW とした。試料は、長さ 10 kbp 環状 DNA を蛍光色素 DAPI で染色した DNA 試料を使用した。実験において、電圧印加前の cis チャンバー内の試料の濃度は、10 pM とした。ポーラスシリコン薄膜は、膜厚 10 nm・孔径 10 nm の薄膜を使用した。電解質溶媒は、1.0 M KCl/10 mM Tris-HCl (pH 7.8)を使用した。電極は、Ag/AgCl 電極を使用した。印加電圧は、200 mV とした。蛍光強度波形は、時間分解能フォトンカウンティングシステムを用いて検出した。ポーラスシリコン薄膜の洗浄時間は、メタノール 2 時間・DDW 2 時間とした。時間分解フォトンカウンティングシステムの積算時間は、100 μs とした。

E.2 実験結果

Figure E (a)に、印加電圧 200 mV における長さ 10 kbp 環状 DNA の蛍光強度波形を示す。長さ 10 kbp 環状 DNA においても、立ち上がり時間と比べて、減衰時間が長い蛍光強度波形として、検出された。Figure E (b)と(c)に、印加電圧 200 mV における蛍光強度波形の滞在時間とピークフォトン数をまとめたヒストグラムを示す。印加電圧 200 mV における平均滞在時間は、2.1 ms であった。また、平均ピークフォトン数は、それぞれ 31 photons/100 μs であった。環状 DNA は、折れ曲がってナノポアを通過する DNA のナノポア通過時間と一致することが知られている¹。立ち上がり時間に着目すると、印加電圧 200 mV における平均立ち上がり時間は、典型的には 392 μs と、長さ 10 kbp 二本鎖 DNA の蛍光強度波形 (Figure E (b)) の立ち上がり時間と違いがみられなかった。このことから、本研究条件下では DNA がナノポアを真っすぐ通過する場合と折れ曲がって通過する場合を蛍光強度波形から区別できないといえる。

長さ 10 kbp の二本鎖 DNA のピークフォトン数と滞在時間を比較すると、長さ 10 kbp の環状 DNA は、滞在時間に違いがみられず、低いピークフォトン数であった。この結果は、ナノポア通過後の過程が影響していることが考えられる。これらのバルク溶媒中における大きさは、次式で算出することができる¹。

$R_{g,open-circular}$

$$= \left[\left(2a + \frac{22a^2}{3L} \right) \left(\frac{L}{12} - \frac{2\alpha^2 a^2}{L} + \frac{8\alpha^3 a^3}{3L^2} \right) + \frac{4\alpha a^3}{L} + \frac{4\alpha a^3}{L} \left(\frac{1}{3} - \frac{\alpha}{6} + \frac{k_2 \alpha^2}{5} + \frac{k_3 \alpha^3}{6} \right) \right]^{1/2} \quad (\text{E.1})$$

a は、である。 L_s と r_s は、である。また、高塩濃度溶媒における 2 本鎖 DNA の持続長を 44 nm を代入すると、環状 DNA の大きさは、それぞれ 160 nm と算出された³。6.3.2.2 で行ったように、電場強度分布から環状 DNA の電気泳動速度を見積もると、 $4.9 \times 10^{-3} \text{ m/s}$ と 20% 程度大きい値と算出された。20% 程度と電気泳動速度の差が小さかったため、本実験機構では、滞在時間に違いがみられなかったと考えられる。一方、この環状 DNA がナノポアを通過し終えた直後に早い速度で移動する様子は、少ないピークフォトン数に表れていることが考えられる。

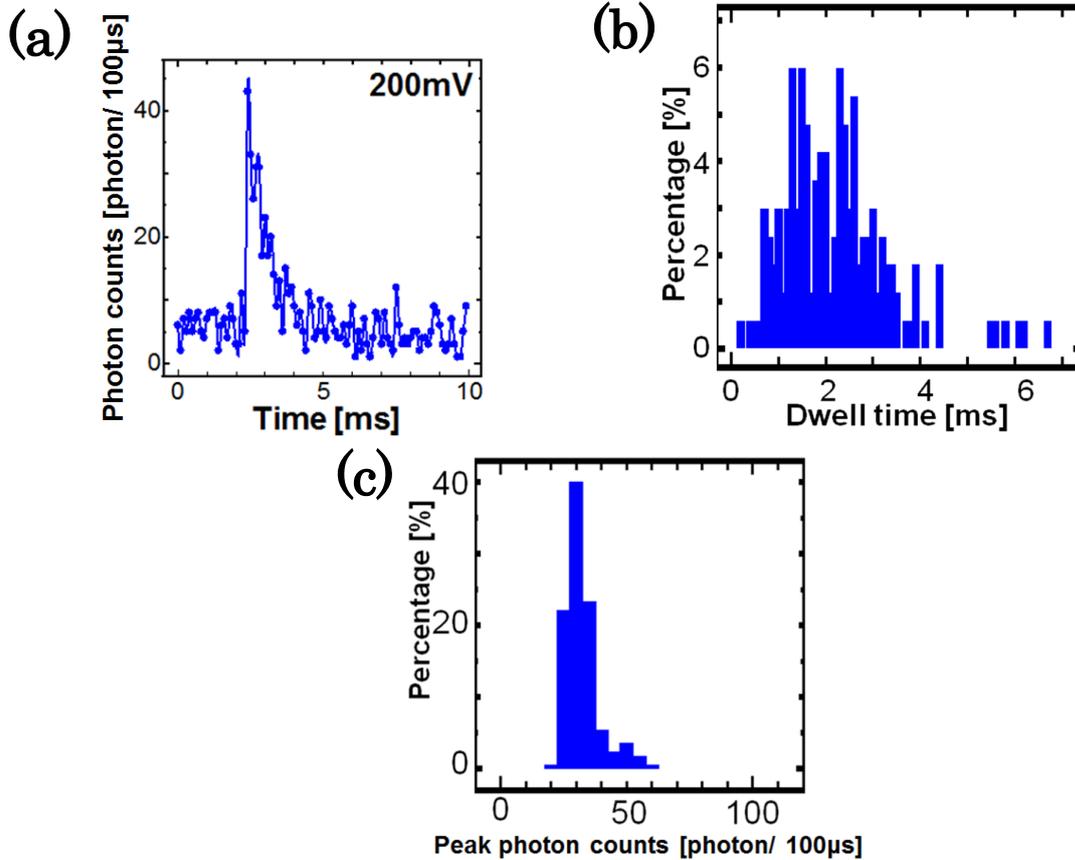


Figure E 10 kbp の環状 DNA ナノポア通過観察結果
 (a) 蛍光強度波形, (b) 滞在時間のヒストグラム,
 (c) ピークフォトン数のヒストグラム

F. DNA 捕捉過程の観察

DNA の捕捉過程は、イオン電流測定を用いた実験において、capture rate と関係があることから重点的に研究されている⁵。本節では、DNA の捕捉過程を観察した結果について紹介する。

F.1 実験方法

実験は、3.3 にて紹介した実験装置を用いた。レーザー強度は $100 \mu\text{W}$ とした。試料は、長さ 10 kbp 二本鎖 DNA を蛍光色素 DAPI で染色した DNA 試料を使用した。実験において、電圧印加前の trans チャンバー内の試料の濃度は、 20 pM とした。薄膜は、膜厚 10 nm ・孔径 10 nm のポーラスシリコン薄膜と膜厚 27.5 nm ・孔径 10 nm のアルミナスパッタ薄膜を使用した。電解質溶媒は、 $1.0 \text{ M KCl}/10 \text{ mM Tris-HCl}$ (pH 7.8)を使用した。電極は、Ag/AgCl 電極を使用した。印加電圧は、 -300 と -500 mV とした。蛍光強度波形は、時間分解能フォトンカウンティングシステムを用いて検出した。ポーラスシリコン薄膜の洗浄時間は、メタノール 2 時間・DDW 2 時間とした。アルミナスパッタ薄膜の洗浄時間は、メタノール 2 時間・DDW 1 時間とした。時間分解フォトンカウンティングシステムの積算時間は、 $100 \mu\text{s}$ とした。

F.2 実験結果

Figure F.1 (a)と(b)に、ポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ膜を使用した条件における、DNA の捕捉過程の蛍光強度波形を示す。印加電圧は、それぞれ -300 mV と -500 mV である。どちらの条件においても、ナノポア通過観察時にみられた蛍光強度波形を反転させた蛍光強度波形であることがわかる。なだらかに立ち上り、急峻に減衰する波形の時間変化は、集光スポットに DNA が引き寄せられて、ナノポアを通過する様子を表していると考えられる。立ち上りから減衰するまでの時間を滞在時間と定義して、ピークフォトン数と滞在時間の分布をまとめた散布図を Figure F.1(c)に示す。ポーラスシリコン薄膜を使用した条件では、平均滞在時間と平均ピークフォトン数は $780 \mu\text{s}$ と $32 \text{ photons}/100 \mu\text{s}$ であった。これに対して、アルミナスパッタ薄膜を使用した条件では、 1.8 ms と $50 \text{ photons}/100 \mu\text{s}$ であった。

Figure 6.13 のポーラスシリコン薄膜とアルミナスパッタ膜の電場強度分布から考察する。ナノポアから 40 nm までの領域では、ポーラスシリコン薄膜の方が高い電場強度分布を示し、 40 nm 以降の領域では、これが反転することがわか

る。定性的に考えると、40 nm 以降の領域において、低い電場強度を示すポーラスシリコン薄膜の方が、DNA に加わる駆動力が弱いことから、長い滞在時間と高いピークフォトン数を示すことが考えられる。しかし、実験結果では、ポーラスシリコン薄膜の方が、短い滞在時間と低いピークフォトン数となった。このような結果から、ナノポアから 40 nm までの領域の電場強度分布が DNA ナノポア通過に大きく寄与することが考えられる。

電場勾配条件下において、先頭の DNA の方が強い電場を受けるため、DNA は引き伸ばされた形態でナノポアへ引き寄せられていることが考えられる (Figure F.2①)。先頭の DNA がナノポアに到達すると、コイルの大きさがナノポアより大きいため、DNA はナノポア上にとどまり動き回る (Figure F.2②)。この動き回る DNA の先端がナノポア直上の電場を受けて、コイルを解すのに十分な力を得るとナノポアを通過する (Figure F.2③, ④)。実験において、ポーラスシリコン薄膜において、DNA は、ナノポア直上に到達すると、強い電場強度を受けてを動きまわる間も無く、直ぐにナノポアを通過したために、短い滞在時間と低いピークフォトン数を示したといえる。

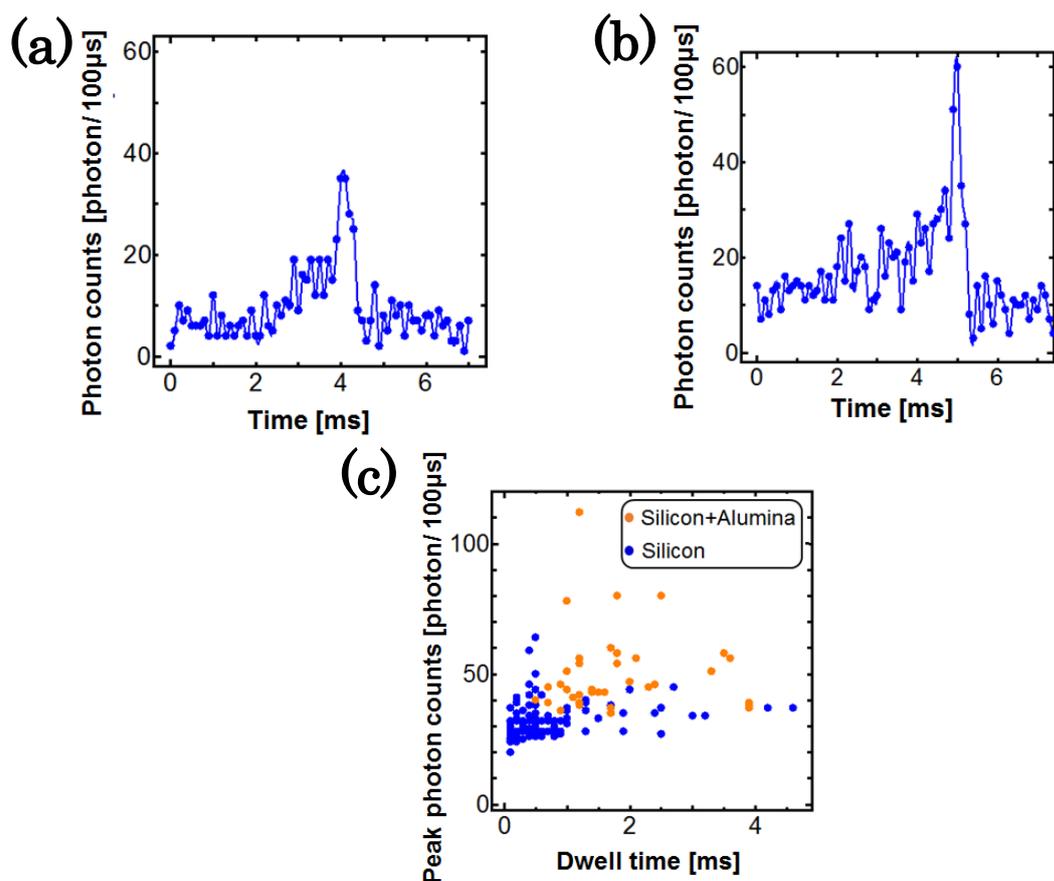


Figure F.1 10 kbp の二本鎖 DNA 捕捉観察結果

(a), (b) 蛍光強度波 (a)ポーラスシリコン薄膜, (b)アルミナスパッタ膜

(c) ピークフォトン数 vs 滞在時間の散布図

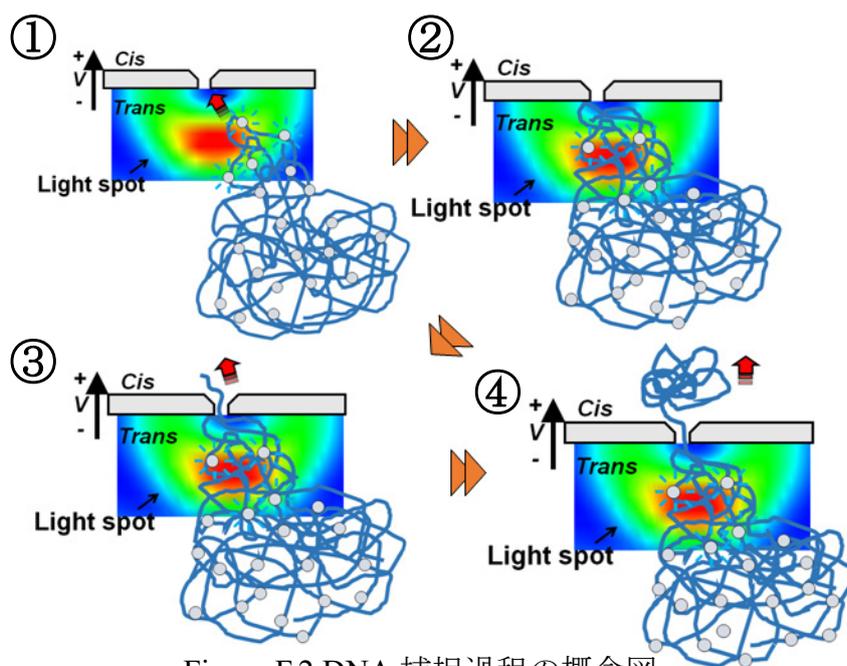


Figure F.2 DNA 捕捉過程の概念図

参考文献

1. D. R. Latulippe and A. L. Zydney, *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 1 (2010).
2. L. Chen and A. T. Conlisk, *Biomed. Microdevices* **13**, 403 (2011).
3. M. Langecker, D. Pedone, F. C. Simmel, and U. Rant, *Nano Lett.* **11**, 5002 (2011).
4. S. Ghosal, *Phys. Rev. Lett.* **98**, 238104 (2007).
5. M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, and A. Meller, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 160 (2009).

論文目録

1 原著論文

1.1 本研究に関連する論文

1. H. Yamazaki, S. Kimura, M. Tsukahara, K. Esashika, and T. Saiki, “Optical detection of DNA translocation through silicon nanopore by ultraviolet light”, *Applied Physics A* **115**, 53 (2014).
2. H. Yamazaki, S. Ito, K. Esashika, and T. Saiki, “Optical observation of DNA motion during and immediately after nanopore translocation”, *Applied Physics Express* **9**, 017001 (2016).
3. H. Yamazaki, S. Ito, K. Esashika, Y. Taguchi, and T. Saiki, “Optical observation of DNA translocation through Al₂O₃ sputtered silicon nanopores in porous membrane”, *Applied Physics A*, *accepted for publication*.

1.2 国際会議論文 (査読付きのfull-length paper)

1. H. Yamazaki, S. Kimura, M. Tsukahara, S. Itoh, K. Esashika, and T. Saiki, “Highly-sensitive measurement of single DNA translocation through an ultraviolet light spot on silicon nanopore”, *Proc. SPIE* 8954, Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications XI, **8954** (2014).

2. 定期刊行誌掲載論文 (その他の論文)

1. S. Itoh, H. Yamazaki, K. Esashika, and T. Saiki, “Salt Dependence of DNA Translocation Dynamics through Silicon Nanopores Detected by Ultraviolet Excitation”, *Applied Physics A*, *accepted for publication*.

3. その他の国際会議発表

1. H. Yamzaki*, S. Kimura, M. Tsukahara, S. Ito, K. Esashika, and T. Saiki, “Highly-sensitive measurement of single DNA translocation through an ultraviolet light spot on silicon nanopore”, Photonic west, U.S.A., February 2013.
2. H. Yamzaki*, S. Ito, M. Tsukahara, K. Esashika, and T Saiki, “Observation of the DNA dynamics near silicon nanopores by ultraviolet light”, International workshop of Nanoscale electron-photon interactions via energy dissipation and fluctuation, Japan, November 2014.
3. H. Yamzaki*, M. Tsukahara, S. Ito, K. Esashika, and T. Saiki, “The DNA Dynamics near Nanopores at Sub-millisecond and Sub-micrometer Levels by the Ultraviolet Light Spot”, Biophysical Society 59th Annual Meeting, U.S.A., February 2015.
4. H. Yamzaki*, S. Ito, K. Esashika, and T. Saiki, “Observation of DNA dynamics near silicon nanopores by controlling the ultraviolet light spot”, American physical society March Meeting, U.S.A., March 2015.
5. H. Yamazaki*, S. Ito, H. Amalvy, K. Esashika, and T. Saiki, “Optical observation of DNA dynamics near nanopores at sub-millisecond and sub-micrometer levels”, The 10th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics, Japan, July 2015.

4. 国内会議発表

1. 山崎洋人*, 木村真二, 塚原睦, 伊藤晋太郎, 江刺家恵子, 斎木敏治, 「紫外光励起によるシリコン界面局在光を用いた高感度DNAナノポア通過観察」, 日本光学会年次学術講演会(OPJ2013), 奈良, 2013年11月.
2. 山崎洋人*, 木村真二, 塚原睦, 伊藤晋太郎, 江刺家恵子, 斎木敏治, 「紫外光源を用いた時間分解DNAナノポア通過観察」, 第61回応用物理学会春季学術講演会, 神奈川, 2014年3月.

3. 山崎洋人*, 「紫外光源を用いたシリコンナノポア近傍におけるDNAダイナミクスの解明と制御」, 第4回先端フォトンクスシンポジウム, 東京, 2014年8月.
4. 山崎洋人*, 塚原睦, 伊藤晋太郎, 江刺家恵子, 斎木敏治, 「光学的高時間分解能観察によるDNAナノポア通過ダイナミクスの解析」, 第75回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道, 2014年9月.
5. 山崎洋人*, 伊藤晋太郎, アマルビー・ユーゴ, 江刺家恵子, 斎木敏治, 「正に帯電したナノポアを用いた光学的DNAナノポア通過観察」, 第62回応用物理学会春季学術講演会, 神奈川, 2015年3月.
6. 山崎洋人*, 伊藤晋太郎, アマルビー・ユーゴ, 江刺家恵子, 斎木敏治, 「シリコンナノポアへのDNA捕捉過程の光学的観察」, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋, 2015年9月.

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学部齋木敏治教授の御指導のもとに行ったものである。本研究を行うにあたり多大なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました齋木敏治教授に心より感謝の意を表します。本研究のような未開拓な研究テーマを挑戦する経験を与えて頂きました。誠に有難うございます。

また、本論文を完成するのに多くの御指導、御助言を賜った慶應義塾大学理工学部栗野裕二教授、同津田裕之教授、同泰岡顕治教授には心から深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたって、国内外の著名な研究者から御指導を頂きました。Boston 大学・イスラエル工科大学の Amit Meller 教授には、ナノポア研究に用いる装置に際して、ご指導を賜りました。California 大学 Santa Cruz 校の Mark Arkson 教授には、光とナノポアの応用に際して、ご指導を賜りました。Northeastern 大学の MeniWanunu 准教授には、データの解釈に際して、ご指導を賜りました。青山学院大学の三井敏行教授には、ナノポア研究に必要な知識に際して、ご指導を賜りました。また、日立製作所の柳至氏と赤羽玲奈氏には、応用物理学会において、研究内容に対して、貴重な御指摘と御助言をいただきました。上述の研究者らに心より感謝の意を表します。

同じ研究グループとして、研究内容に関する活発な議論を行い、多くの場面で支えてくださった木村真二氏、塚原睦氏、伊藤新太郎氏、Hugo Amalvy 氏、近重貴仁氏に感謝の意を表します。本研究は、ナノポアに DNA を通せるか分からない状態から始めました。来る日も来る日も、ただ揺れない波形を見続ける日々は、今ではいい思い出です。グループメンバーの多大な協力があったからこそ、今日までの研究進展がありました。誠に有難うございます。

これまで、齋木研究室での研究生生活を共に過ごした先輩方、同期、後輩に感謝の意を表します。特に、公私にわたって暖かいご配慮をいただいた北村成章氏、高橋基紀氏、伊藤淳氏、田島和幸氏、岩井秀僚氏、高島瑛介氏には、心より感謝の意を表します。また、江刺家恵子研究員には、バイオ試料作製や取り扱いなどの指導や本研究に関して助言を賜りました。江刺家研究員がいらしたからこそ、本研究を今日まで推し進めることができました。誠に有難うございます。

武村宙氏、小野武正氏、林俊之氏、加藤宏之氏には、苦しいときに激励の言葉をかけて応援していただきました。誠に有難うございます。

本研究は、日本学生支援機構の若手特別研究員 DC2 の資金的援助のもと遂行された。このような環境を与えてくださった日本学術振興会に感謝の意を表し

ます。

最後に、大学院博士課程への進学に理解し、常に暖かく激励してくれた父秀勝、母敦子、兄拓人に心より感謝の意を表します。