

Title	シリコンナノポアを用いた光学検出による一分子DNAの塩基配列情報解読
Sub Title	Optical detection of single DNA molecules using a silicon nanopore for readout of sequence information
Author	斎木, 敏治(Saiki, Toshiharu) 岩崎, 渉(Iwasaki, Wataru)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>ナノポアシーケンサにおいて高精度な塩基識別実現に向けた課題は、通過速度の低速化と安定化である。そのためには、ナノポア通過直前・直後のDNAの形態やそれに依存したドリフト運動と拡散運動の競合等を明らかにする必要がある。本研究では、ナノポア通過中、ならびに通過後のDNAコイル形成と空間的移動の観測に必要な100nm, 0.1msの空間・時間分解能を有する光学的観察手法の開発、動作実証をおこない、さらにナノポア近傍の電場に起因する特徴的なDNA通過挙動を見出した。また塩基情報解読に向けてSTED利用の有効性を確認し、プラズモニック・ナノポアの作製に成功した。</p> <p>The challenge in highly accurate identification of each nucleotide is slowing and stabilizing DNA translocation velocity. For this purpose, DNA conformation and drift-diffusion motion immediately before and after translocation should be investigated. In this study, an optical microscopic method with 100-nm and 0.1-ms resolution is developed to observe DNA coiling immediately after translocation and its motion. Characteristic DNA translocation dynamics caused by the electric field in the vicinity of nanopore exit is obtained and the mechanism is discussed in detail. To achieve higher spatial resolution aiming to single-molecule sequencing, the possibility of combination with STED and plasmonic nanopore is also demonstrated.</p>
Notes	研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2014～2015 課題番号：26600055 研究分野：ナノ光学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26600055seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600055

研究課題名(和文)シリコンナノポアを用いた光学検出による一分子DNAの塩基配列情報解読

研究課題名(英文)Optical detection of single DNA molecules using a silicon nanopore for readout of sequence information

研究代表者

齋木 敏治 (Saiki, Toshiharu)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：70261196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナノポアシーケンサにおいて高精度な塩基識別実現に向けた課題は、通過速度の低速化と安定化である。そのためには、ナノポア通過直前・直後のDNAの形態やそれに依存したドリフト運動と拡散運動の競合等を明らかにする必要がある。本研究では、ナノポア通過中、ならびに通過後のDNAコイル形成と空間的移動の観測に必要な100nm、0.1msの空間・時間分解能を有する光学的観察手法の開発、動作実証をおこない、さらにナノポア近傍の電場に起因する特徴的なDNA通過挙動を見出した。また塩基情報解読に向けてSTED利用の有効性を確認し、プラズモニック・ナノポアの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：The challenge in highly accurate identification of each nucleotide is slowing and stabilizing DNA translocation velocity. For this purpose, DNA conformation and drift-diffusion motion immediately before and after translocation should be investigated. In this study, an optical microscopic method with 100-nm and 0.1-ms resolution is developed to observe DNA coiling immediately after translocation and its motion. Characteristic DNA translocation dynamics caused by the electric field in the vicinity of nanopore exit is obtained and the mechanism is discussed in detail. To achieve higher spatial resolution aiming to single-molecule sequencing, the possibility of combination with STED and plasmonic nanopore is also demonstrated.

研究分野：ナノ光学

キーワード：ナノポアセンシング DNA 蛍光計測 プラズモン

1. 研究開始当初の背景

現在の DNA 配列解読装置の主流は第 2 世代シーケンサであり、数 10~数 100 塩基程度の短い断片を超並列的に解読し、それらをつなぎ合わせるにより配列情報を再構築する。つなぎ合わせにあたっては、コンピュータ解析への依存度が高く、解読精度、時間、コストの点でまだ改善の余地を多く残している。この問題を根本から解決するには、1 万から 10 万塩基を断片化することなく解読する技術（長いリード長）が必要であり、ナノポアシーケンサはその最有力候補である。ナノポアシーケンサの大半は、ポアを通過するイオン電流、あるいはトンネル電流を信号とし、塩基ごとの電流変化の違いを検出することを基本原理とする。グラフェンに形成されたナノポアや α -Hemolysin などのタンパクナノポアにおいて優れた分解能が確認されているが、再現性良くルーチ的に活用できる段階には至っていない。

電流検出型の共通の課題は、(i)電流の変化（減少分）を検出するため、ポア径に対して非常に厳しい精度、条件が課される、(ii)十分な S/N 確保のためには、DNA のポア通過速度を大幅に減速する必要がある、などにあり、これらは実用化に向けて未知数の要素を残している。

2. 研究の目的

現行のシーケンシングにおける最大の課題である長いリード長（1~10 万塩基）実現のために、光学的検出法を用いたナノポアシーケンサを開発する。まず、ごく短期的視野に立ち、シリコンナノポア近傍に発生するナノ光スポットサイズ（50nm 程度）の分解能で、DNA のポア通過速度を減速することなく、 λ -DNA の通過過程を測定する。並行して短中期的視野に立ち、ナノポア近傍での急峻な電場勾配（立ち上がり約 2nm）を活かした高分解能化の可能性を模索する。金ナノ粒子をナノポアに充填することによって得られるプラズモニックナノポアの作製も実施する。

3. 研究の方法

(1)ナノポア DNA 検出法の概略

測定方法の概略を図 1 に示す。電解質溶液をシリコンメンブレンで仕切り、一方のチャンパーに観測対象の DNA を導入する。以降、DNA を導入する側を cis チャンパー、DNA がナノポアを通過して移動する側を trans チャンパーと呼ぶ。チャンパー間に電圧を印加するとイオン電流が流れ、その流れに沿った電界が発生する。通常負に帯電している DNA はその電界によって泳動力を得て、ナノポアを通過する。DNA 通過過程観測のための蛍光励起光を trans チャンパー側からナノポアに照射し、同じ側で蛍光信号を集光する。

本研究でシリコンメンブレンと紫外光を組み合わせた理由は、シリコンがとりわけ紫

外領域で大きな屈折率と消衰係数もち、以下の 2 つの効果をもたらすからである。

厚さがわずか 10nm のメンブレンでも十分な遮光性を有し、cis チャンパーに存在する DNA からの背景信号を抑制できる。

大きな屈折率に起因して、ナノポア出口にて急峻、かつ高コントラストな電場勾配が形成され、高分解能計測を可能にする。

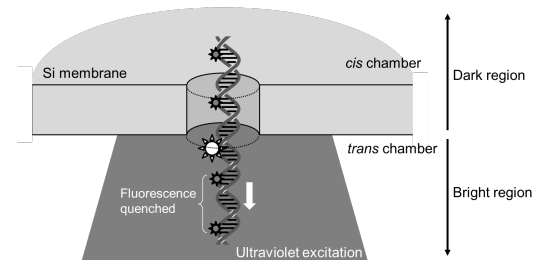


図 1 ナノポア DNA 検出法の概略

の効果を実験的に評価するために電磁界解析を行った結果を図 2 に示す。直径 10nm のナノポアを有する厚さ 10nm のシリコンメンブレンに対して集光した照射光（波長 375nm, x 偏光）の電界強度分布を x 偏光成分と z 偏光成分に分けて図示している。ナノポア界面では境界条件により、z 偏光成分（界面に垂直方向の電場成分）が支配的である。図 2(b)に定義した z 軸に沿ってナノポア内外の電界強度変化をプロットすると図 2(c)のようになり、ナノポア出口近傍約 2nm で急激に電界が立ち上がっており、そのコントラストも非常に大きいことがわかる。

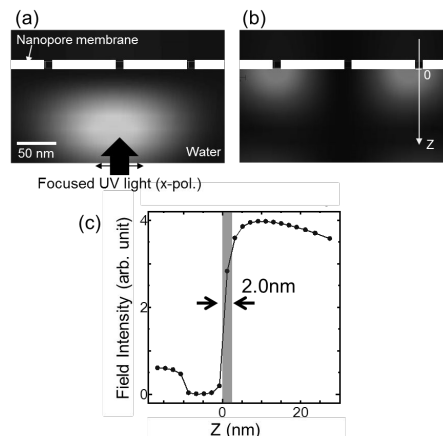


図 2 光紫外光のナノポア近傍での電場強度分布。(a)と(b)はそれぞれ x 偏光成分と z 偏光成分。(c)図(b)に定義した座標軸に沿った電場強度分布。

この照明法の特徴と、何らかの蛍光消光過程を組み合わせたことにより、原理的には 1~2nm の分解能で配列解読が可能となる。消光過程としては、光異性化や STED (STimulated Emission Depletion) 光同時照射による強制的消光などが考えられる。FDTD 法によって計算した電界分布をもとに、

STED との組み合わせによって得られる分解能をシミュレートした結果を図3に示す。

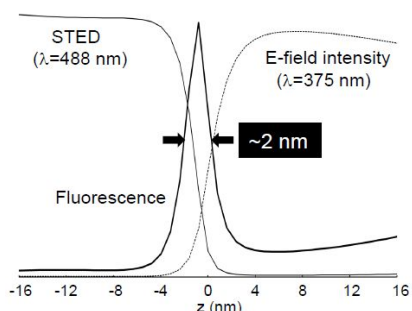


図3 STED との組み合わせによって得られる2nmの空間分解能。

(2) ナノポア DNA 通過過程の観測方法

図4に測定系の全体図を示す。電気泳動槽をシリコン・ナノポア膜で仕切り、2つのチャンバーを形成する。典型的なナノポア膜としてはポア径10nm、厚さ10nm、観測領域に2~3個のポアを含むものを最も頻りに使用した。それぞれのチャンバーに電解質溶液(主にKClを使用)を満し、Ag/AgCl電極を挿入する。transチャンバー側を正極としてチャンバー間に電圧を印加すると、ナノポアを介してイオン電流が流れる。電圧降下は高抵抗となるナノポア部で起こり、ナノポア内部とそのごく近傍に強い電界が発生する。cisチャンバーに導入されたDNAは拡散運動しながらナノポアに接近し、電界によってファネル効果的にナノポアへ引き込まれ、ポアを通過する。

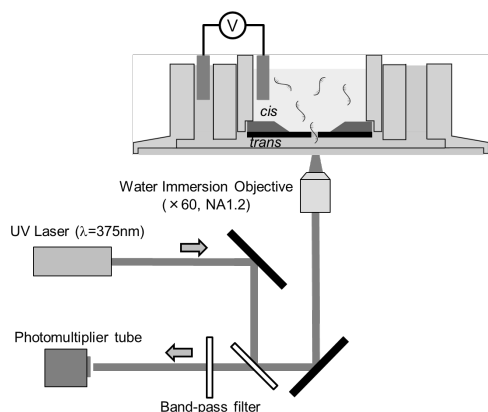


図4 測定系の概略図。

本測定では電気泳動槽を倒立顕微鏡上に設置し、ナノポア通過からtransチャンバーへの移動、観察領域からの退避過程を高い時間分解能により観察する。励起光として波長375nmの紫外光を水浸対物レンズ(x60, NA1.2)にて膜上に集光し、DNAにインターカレート(塩基対間に挿入)させたDAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)を励起する。DAPIからの蛍光を再び対物レンズで集光し、光電子増倍管によって光子数計測を行う。

DNAのナノポア通過過程は非常に速く、一塩基あたりサブ μs である。すなわち数kbpの長いDNAのダイナミクス観測においても、サブmsの時間分解能を必要とする。本測定では高時間分解能化のために、200MHzのレートで 10^6 サンプリングによる波形保存が可能なオシロスコープを使用した。光電子増倍管からのパルス出力波形を直接取得した後、信号強度と必要な時間分解能を勘案しながら、適切な積分時間のもとで蛍光強度波形を得る。

4. 研究成果

(1) ナノポア DNA 通過過程の観測

図5(a)に10kbp DNAが直径10nmのナノポア(膜厚10nm)を通過する際の蛍光強度波形の一例を示す。電解質溶液は1MのKCl、チャンバー間の印加電圧は100mVに設定している。DNAがナノポアを通過する様子が、立ち上がり時間600 μs 、立ち下がり時間4msの蛍光強度変化として観察されている。

ここで得られる波形はポア径、ポア密度、膜厚、電解質溶液の媒質・濃度や印加電圧によって変化する。それらの依存性はパラメータに対してほぼ系統的に変化し、それらの結果を総合すると、図5(a)の波形は概ね以下のように解釈できる(図6)。ナノポアを通過したDNAは通過直後にコイル状に収縮するが、長さ10kbp程度の場合、コイルの大きさはナノポア近傍のx偏光スポットの広がりと同程度である。このことから、図5(a)に示す蛍光強度波形のピーク時刻は、DNAがナノポアを通過し終えた瞬間にほぼ対応すると考えられる。すなわち立ち上がり時間はDNAがナノポアを通過するのに要する時間(以下、単に通過時間translocation time)に相当する。この解釈は、印加電圧を-300mV(逆方向電圧)としDNAがtransチャンバーからcisチャンバーへ戻るようすを観察した際の波形(図5(b))とも整合している。図5(b)において立ち上がりはDNAが観察領域に引き込まれポアを通過し始めるまでの過程、立ち下がりにはポアを通過する過程に対応する。この波形から見積もられるポア通過時間(立ち下がり時間)が図5(a)の結果とほぼ一致している。

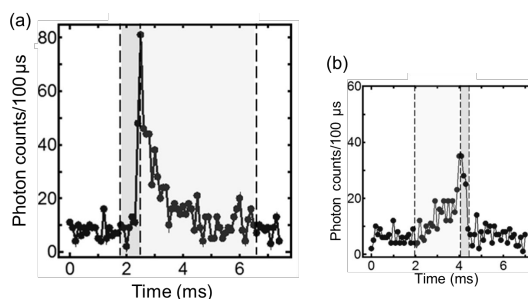


図5 (a)10kbp DNAがナノポア通過した際の蛍光信号波形。(b)逆方向電圧を印加した際の逆行するDNAの蛍光信号波形。

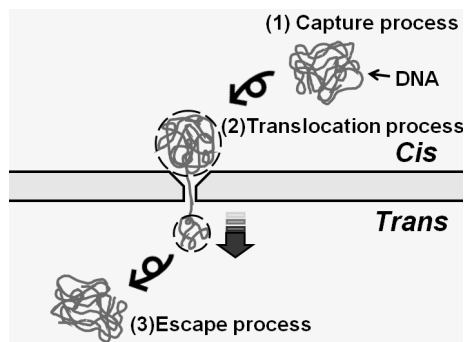


図 6 ナノポア通過過程の模式図。

一方、図 5(a)の立ち下がり時間は、DNA がナノポアを通過後、観察領域に滞在する時間、すなわち観察領域から退避するのに要する時間と理解できる（以下、単に滞在時間 dwell time）。退避過程においてはナノポア近傍の電界によるドリフト運動と拡散運動が競合しており、どちらが支配的であるかは、ポア径や印加電圧などによって決まる。電流検出型の場合、情報として得られるのは電流の遮蔽時間、すなわち DNA の通過時間だけである。それに対し光検出型の場合、より詳細な通過過程（通過速度の変化）や通過直後のコイル化過程、通過後のドリフト・拡散過程を観察することができる。また、図 5(b)のように戻りのようすを観察することにより、ナノポアへの捕捉過程の情報も得ることができる。例えば、通過直後のコイル化が始まる位置や初期コイルサイズなどは未解明であり、今後本手法で明らかにできると考えている。

上記の基本的な結果以外に、以下のようなナノポア近傍の電場に起因する特徴的な DNA 通過挙動を見出している。長さ 10 kbp と 48 kbp の二本鎖 DNA のナノポア通過波形の比較から、ナノポア近傍における非一様な電場強度分布に起因して長い DNA ほどナノポア通過後の電気泳動速度が遅いことを示している。また、アルミナをスパッタリング成膜した薄膜を用いた実験では、表面電荷と高い空孔率の影響によるナノポア通過速度の低速化を確認している。

(2) プラズモニック・ナノポアの作製

ナノポアに金ナノ粒子を充填し、電場局在・増強にともなう高分解能化、高コントラスト化を目指したプラズモニック・ナノポアの作製を行った。ナノポアメンブレン材料として、シリコン、ならびに窒化シリコンを選定した。ポアとしては、ポーラス状のメンブレンをそのまま使用方法と集束イオンビームによってナノポアを形成する方法を検討した。電気泳動ゲルにメンブレンを挿入することにより、効率良く金ナノ粒子をポアに充填できることを確認した。直径 40nm の金ナノ粒子とポーラスシリコンメンブレンを使用して作成したプラズモニック・ナノポアの一例を図 7 に示す。

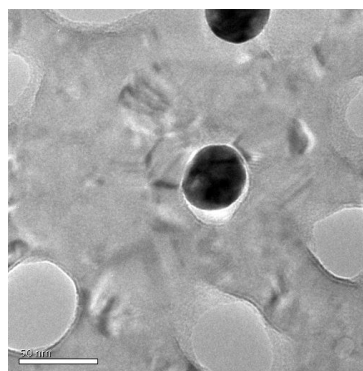


図 7 ポーラスシリコンメンブレンと金ナノ粒子を使用して作成したプラズモニック・ナノポアの電子顕微鏡写真。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 4 件)

S. Ito, H. Yamazaki, M. Tsukahara, K. Esashika, and T. Saiki, "Salt dependence of DNA translocation dynamics through silicon nanopores detected by ultraviolet excitation", *Applied Physics A*, vol. 122, no. 4, pp. 342/1-5 (2016). DOI:

10.1007/s00339-016-9762-y 査読有

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*, vol. 122, no. 3, pp. 216/1-6 (2016). DOI: 10.1007/s00339-016-9764-9 査読有

H. Yamazaki, S. Ito, K. Esashika, and T. Saiki, "Optical observation of DNA motion during and immediately after nanopore translocation", *Applied Physics Express*, vol. 9, no. 1, pp. 017001/1-4 (2016). DOI: <http://doi.org/10.7567/APEX.9.017001> 査読有

J. Kobayashi, Y. Takeshita, N. Mizuno, K. Esashika, and T. Saiki, "Robust discrimination between single gold nanoparticles and their dimers in aqueous solution for ultrasensitive homogeneous bioassays", *Advances in Optical Technologies*, vol. 2015, pp. 581381/1-5 (2015).

DOI:10.1155/2015/581381 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

H. Yamazaki, S. Ito, K. Esashika, and T. Saiki, "Optical Observation of DNA Translocation Dynamics through Solid-State Nanopores", *The 11th Conference on Lasers and Electro-Optics*

Pacific Rim, August 27, 2015, Busan, Korea.

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, July 7-10, 2015, 函館市国際水産・海洋総合研究センター(北海道, 函館市).

S. Ito, H. Yamazaki, M. Tsukahara, K. Esashika, and T. Saiki, "Salt Dependence of DNA Translocation Dynamics through Silicon Nanopores Detected by Ultraviolet Excitation", The 10th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics, July 7-10, 2015, 函館市国際水産・海洋総合研究センター(北海道, 函館市).

H. Yamazaki, M. Tsukahara, S. Ito, K. Esashika, and T. Saiki, "DNA dynamics near nanopores at submillisecond and sub-micrometer levels by ultraviolet light spot", Biophysical Society 59th Annual Meeting, February 7-11, 2015, Baltimore, USA.

S. Ito, H. Yamazaki, M. Tsukahara, K. Esashika, and T. Saiki, "Measurement of salt dependence of single DNA translocation through Si nanopores with ultraviolet excitation", Biophysical Society 59th Annual Meeting, February 7-11, 2015, Baltimore, USA.

M. Tsukahara, S. Itoh, H. Yamazaki, K. Esashika, T. Narsushima, H. Okamoto, and T. Saiki, "Fabrication and evaluation of plasmonic nanopore towards single molecule DNA sequencing", The 13th international conference of Near-field Optics and Nanophotonics, August 31-September 4, 2015, Salt Lake City, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋木 敏治 (SAIKI Toshiharu)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：70261196

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岩崎 渉 (IWASAKI Wataru)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：50545019