

**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

主 論 文 要 旨

報告番号	甲	第	号	氏 名	山崎 洋人
主論文題目：					
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					
(内容の要旨)					
<p>遺伝子解析情報に基づく個別化医療への期待とともに、それを支える基盤技術としてナノポア DNA シーケンサが注目されている。ナノポアシーケンサとは、外部印加電場を駆動力として DNA を直径数 nm の孔に通過させながらイオン電流計測により塩基配列を順次読み出す技術である。大量の DNA サンプルを必要とする現行のシーケンサと比べ、DNA 一分子を対象として高速、安価、簡便な遺伝子情報取得が可能となり、大きな市場も見込まれている。</p> <p>ナノポアシーケンサにおいて、高精度な塩基識別を実現するためには、通過速度の低速化と安定化が求められている。DNA をナノポアに引き込む駆動力としてナノポア内部の電場のみならず、ナノポア近傍の電場が同程度に寄与することが予想されるが、その機構を定量的に理解し速度制御に活用する試みはこれまでに報告されていない。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。既存のイオン電流測定や光学的測定によってナノポア通過前後を含む DNA 通過挙動を観察する試みはあるが、必要とされる空間・時間分解能を満たした観測の事例はない。このような背景のもと本論文では、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 100 nm、100 μs の空間・時間分解能を有する光学的観察手法を開発し、その動作実証をおこなっている。さらにナノポア近傍の電場に起因する特徴的な DNA 通過挙動を見出している。</p> <p>第 1 章は序論であり、ナノポアシーケンサの技術的背景、特にナノポアの種類と塩基配列読み取り手法について説明している。ナノポアシーケンサ実現に向けた課題を明確にし、本研究の目的を述べている。</p> <p>第 2 章では、ナノポア内部とその近傍における電解質溶液の流動特性と DNA ダイナミクスについて概説している。</p> <p>第 3 章では、本研究で使用する蛍光標識 DNA 試料とポーラスシリコン薄膜、ならびに実験装置と実験手順の概要を説明している。</p> <p>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ている。紫外光を蛍光励起光として使用することにより、シリコンが有する高い屈折率・消衰係数を活かした 100 nm スポットの形成と背景信号の低減が可能であることを、電磁場解析と DNA ナノポア通過にともなうバースト信号検出により示している。</p> <p>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それによる検出波形の解釈について述べている。既知の蛍光ビーズのブラウン運動を本システムで観察することにより動作確認をおこなっている。また先行研究から得られる知見をもとに、DNA ナノポア通過観察時の検出波形には、ナノポア通過中だけでなく、ナノポア通過直後の DNA 挙動の情報が含まれると結論付けている。</p> <p>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。</p> <p>第 7 章は結論であり、本研究を総括し、集光スポットを用いた DNA 通過挙動観察に関する今後の展望について述べている。</p>					

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

<p style="text-align: center;">School</p> <p style="text-align: center;">Integrated Design Engineering</p>	<p style="text-align: center;">Student Identification Number</p>	<p style="text-align: center;">SURNAME, Given name</p> <p style="text-align: center;">YAMAZAKI, Hirohito</p>
<p>Title</p> <p style="text-align: center;">Optical observation of DNA motion during and immediately after translocation through silicon nanopores</p>		
<p>Abstract</p> <p>Nanopore DNA sequencing has been attracting significant attentions as a fundamental technology for developing personalized medicine. In nanopore sequencing, DNA passes through a nanopore by experiencing electric force and the sequence is read out by the ionic current measurement. The nanopore sequencing provides a fast and inexpensive genome sequencer for single DNA molecule, which is in contrast to conventional sequencers requiring the amplification of target DNA.</p> <p>The challenge in highly accurate identification of each nucleotide is slowing and stabilizing DNA translocation velocity. Although DNA translocation dynamics could be influenced by the electric force outside of the nanopore as well as inside, the impact of the electric field outside of the nanopore on the translocation speed and stability has never been discussed. For this purpose, DNA conformation and drift-diffusion motion immediately before and after translocation should be investigated. There are a few attempts to observe whole translocation process by means of optical and ionic current measurements, but their spatial and temporal resolution is insufficient for the purpose mentioned above. In this thesis, an optical microscopic method with 100-nm and 100-μs 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.</p> <p>Chapter 1 summarizes the technical background of nanopore DNA sequencing, especially types of nanopores and sequencing methodologies. Major challenges in nanopore sequencing and the objectives of the thesis are described.</p> <p>Chapter 2 describes the fluidic and ionic transport inside and outside of nanopores and DNA dynamics in the vicinity of nanopores.</p> <p>Chapter 3 describes fluorescent dye-modified DNA samples and porous silicon membranes. An experimental setup and measurement procedures are also detailed.</p> <p>Chapter 4 describes the generation of focused light spot to achieve high spatial resolution and signal-to-noise ratio. A 100 nm sized light spot and low background measurement by ultraviolet light due to high refractive index and extinction coefficient of silicon are demonstrated by both the electromagnetic field simulation and the experimental observation of DNA translocation detected as photon bursts.</p> <p>Chapter 5 describes the development of time resolved photon counting system and interpretation of detected signals. For demonstration of the system, observation of fluorescent beads in Brownian motion is conducted. It is concluded that, based on the discussion of previous studies, the signal for DNA translocation through the nanopore includes information about both DNA translocation and DNA motion immediately after translocation.</p> <p>Chapter 6 describes the impact of the DNA length, applied voltage, and membrane property on the signal to discuss the DNA translocation dynamics influenced by the electric field in the vicinity of nanopores. Comparison of the translocation signals for 10-kbp and 48-kbp double-strand DNA indicates that the electrophoretic velocity of DNA during and post-translocation depends on its length due to non-uniform electric field. It is also found that the translocation speed for alumina sputtered nanopores is slower due to higher porosity and surface charge, compared to that for unmodified silicon nanopores.</p> <p>Chapter 7 provides the conclusion of the thesis and describes a perspective of the optical observation of DNA translocation dynamics.</p>		