

課題番号 : F-13-OS-0018, S-13-OS-0014  
利用形態 : 機器利用  
利用課題名 (日本語) : 一分子解析技術を用いた革新的ナノバイオデバイスの開発  
Program Title (English) : Development of Innovative Nanobiodevice by Single-Molecule Analysis Technology.  
利用者名 (日本語) : 川合知二, 大城敬人, 古橋匡幸, 龍崎奏, 横田一道, サーコン・ラホング, 川瀬朋代, 小和田弘枝, 近田和美, 保手浜千絵, 村山さなえ, 山田里絵, 宇根直美, ユフイ ハー  
Username (English) : Tomoji Kawai, Takahito Ohshiro, Masayuki Furuhashi, , Soh Ryuzaki, Kazumichi Yokota, Sakon Rahong, Tomoya Kawase, Hiroe Kowada, Kazumi Konda, Chie Hotehama, Sanae Murayama, Satoe Yamada, Naomi Une, He Yuhui  
所属名 (日本語) : 大阪大学 産業科学研究所 所長特任研究室  
Affiliation (English) : ISIR, Osaka University

### 1. 概要 (Summary)

当研究室では、内閣府最先端研究開発支援プログラム (FIRST) に採択されたプロジェクト: 「1分子解析技術を基盤とした革新ナノバイオデバイスの開発研究—超高速単分子DNAシーケンシング、超低濃度ウイルス検知、極限生体分子モニタリングの実現—」 (略称: 川合プロジェクト) として2010年4月より研究をスタートさせ、生体を構成する要素の中で機能をもつ最小単位であるタンパク質やDNAなどの分子、およびウイルスやアレルギーのもととなる物質を一つ一つ分離、検出、解析できる革新的な技術やデバイスの開発を目指している。

### 2. 実験 (Experimental)

ナノバイオデバイスの作製のため、RIE, EB リソグラフィ, フォトリソグラフィ, スパッタリングをもちいて、シリコンおよび絶縁したリン青銅基板上にナノ構造体を作製した。作製したデバイスは、微小電流計測のための装置に設置する。デバイスの試料溶液ホルダーへ、DNA およびペプチド鎖等の生体高分子の溶液を滴下し、高速電流計測を行い、測定した分子シグナルを統計的解析を行うことで、試料分子の識別を行う。

### 3. 結果と考察 (Results and Discussion)

**・ギャップ電極デバイスを用いたトンネル電流単分子計測法の開発:** トンネル電流による単分子計測法を確立した。この単分子識別能を用いて、アミノ酸およびオリゴペプチド鎖の識別が原理的に可能であるかについて検証した。具体的には、距離制御可能なギャップ電極デバイスにより、通過する単アミノ酸およびオ

リゴペプチド鎖を介したトンネル電流の高速計測を行った。その結果、12種類のアミノ酸(W,Y,F,H,P,E,D,I)とリン酸化チロシン(pY)。さらにこれに基づき、キナーゼ基質ペプチドのチロシンリン酸化について識別可能であることが示された。また、エピジェネティック核酸塩基種の識別について行った。メチル化シトシン (mC), メチル化アデニン (mA), オキソグアニン (oxoG) の各核酸塩基種の特異コンダクタンスを決定。メチル化シトシンを含む合成核酸塩基鎖を対象として単分子計測を行い、その分子シグナルの統計的解析により、モデル配列 (CCGmCTGCTT) 中のメチル化シトシン部位の配列識別、kininogen プロモータ遺伝子 (GGTGmCACT), HGMT プロモータ遺伝子 (CTTTCCCGGAATTAmCGCCCAGATGAG) 一部配列の計測を行いメチル化識別が可能であることを実証した。

#### ・ナノギャップ・ナノポア集積デバイスの開発:

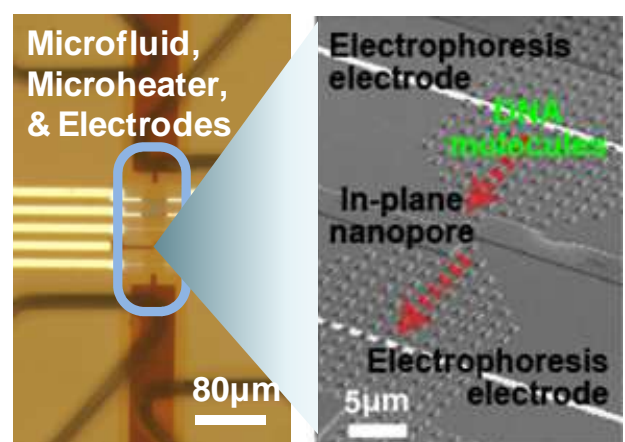


Fig. 1 Microscope images for the on-chip integrated in-plane nanopore devices used on this study.

DNA塩基分子を分離し、それを一塩基分子レベルで電気的に検出及び識別するトータル計測システムを、チップデバイス上で実現する。そこでDNA塩基分子の動きを制御する電気泳動電極と、一分子検出を行うナノギャ

ップーナノポア構造(面内型ナノポア)をオンチップ集積化したデバイスを作製し (Fig. 1), 集積化デバイスの実証実験を行った。その結果, 得られた分子シグナルの検出頻度は、泳動電圧を印加しない場合は10/sであったのに対し、泳動電圧印加時には23/sと2倍以上に増加し、この結果から、電気泳動電極のオンチップ集積化が、ナノポアデバイスの検出効率向上に有効であることが明らかとなった。

#### 4. その他・特記事項 (Others)

本プロジェクトの研究は内閣府の最先端プロジェクトの支援を受けて行われたものです。

#### 5. 論文・学会発表 (Publication/Presentation)

(1) Naoya Yukimoto, Makusu Tsutsui, Yuhui He, Hirofumi Shintaku, Shoji Tanaka, Satoyuki Kawano, Tomoji Kawai, \*Masateru Taniguchi, Scientific Reports Vol.3, (2013), pp 1855(1-7).

(2) \*Takao Yasui, Sakon Rahong, Koki Motoyama, \*Takeshi Yanagida, Qiong Wu, Noritada Kaji, Masaki Kanai, Kentaro Doi, Kazuki Nagashima, Manabu Tokeshi, Masateru Taniguchi, Satoyuki Kawano, \*Tomoji Kawai, \*Yoshinobu Baba, ACS NANO Vol.7, (2013), pp 3029-3035.

(3) Non-equilibrium Ionic Response of Biased MCBJ Electrodes, Doi, K. Tsutsui, M, Ohshiro T, Chien Chin-Chun, Zwolak M, Taniguchi M., Kawai T. Kawano S, Di Ventra, M. J.Phys.Chem.C Vol.118, (2014), pp 3758-3765

(4)大城敬人, 日本分析化学第73回討論会 平成25年5月21日

(5) 龍崎奏, 第11回ナノ学会, 平成25年6月3日

(6) 川合知二, "The 1st WPI Workshop on Materials Science - the 10th France-Japan Workshop on Nanomaterials, 平成25年6月7日

(7) 川合知二, iNovel Approaches to DNA Sequencing, 平成25年6月11日

(8) ユフイ ハー, Novel Approaches to DNA Sequencing 平成25年6月11日

(9)大城敬人, 日本分析化学第62回年会, 平成25年9月10日

(10)大城敬人, 第62回高分子討論会, 平成25年9月12日

(11)大城敬人, 第74回応用物理秋季学術講演会, 平成25年9月16日

(12)横田一道, 第74回応用物理秋季学術講演会, 平成25年9月16日

(13) 龍崎奏, 第74回応用物理秋季学術講演会, 平成25年9月16日

(14)ユフイ ハー, 第74回応用物理秋季学術講演会, 平成25年9月16日

(15)古橋匡幸, 第74回応用物理秋季学術講演会, 平成25年9月16日

(16) S. Rahong, MicroTAS 2013, 平成25年10月27日

(17) 川合知二, The 18th Biophysics Conference Institute of Biomedical Sciences 平成25年6月29日

(18) 川合知二, NANO KOREA 2013 Symposium Coex 平成25年7月10日

(19) 川合知二, 4th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC4) 平成25年11月16日

(20) 川合知二, Convergence of NT with IT and Bio for Green and Life Innovation, 平成25年11月18日

(21) 川合知二, International Symposium on Single Biomolecule Analysis 2013, 平成25年11月21日

(22) 大城敬人, EMN Fall Meeting 2013, 平成25年12月8日

(23) 龍崎奏, 2013年度日米若手研究者シンポジウム, 平成25年12月12日

(24)大城敬人, The 17th SANKEN International Symposium, 平成26年1月21日

(25) 大城敬人, Trends in Nanotechnology (TNT) Japan 2014, 平成26年1月31日

(26) 大城敬人, 1st. Kansai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium 平成26年2月3日

(27) 大城敬人, 第61回応用物理春季学術講演会, 平成26年3月19日

(28)大城敬人, 日本化学会第94春季年会, 平成26年3月29日

#### 6. 関連特許 (Patent)

なし