

# ナノポアを用いた1分子レベルの診断技術



研究室紹介

谷口正輝\*

Single-molecule diagnostic technologies using nanopores

Key Words : single-molecule science, nanopores, DNA, RNA, peptides, viruses, bacteria

## 1. はじめに

インフルエンザやO157などの季節になると流行するウイルスや細菌に加え、ジカ熱などの突発的に流行するウイルスを、微量で、早く、安く、正確に診断する技術が、世界中で求められています。現在のように、多くの人々が世界中を頻繁に移動する時代にあっては、ウイルスや細菌の拡散を防止する早期診断は、安心・安全な社会を維持していくための基盤技術です。ウイルスや細菌の流行は、世界中のどこでも起こり得るため、世界共通のインフラとなったスマートフォンで動作する診断技術が理想的で、インターネットで診断情報を集約・分析する新たな産業の創出が期待されています。

一方、2人に1人ががんになる時代になっており、がんを早期に発見し、自分にあった薬を選ぶことを可能にする、遺伝子に基づく個別化医療の発展が強く求められています。必要とされる技術は、遺伝子を、微量で、早く、安く、正確に解読する技術です。この技術は、医科学や創薬の研究を革新するだけでなく、遺伝子のビッグデータを扱うデータマネジメントの分野で巨大市場の開拓が期待されています。ナノポアは、ウイルス、細菌、遺伝子を、微量で、早く、安く、正確に診断する技術の最有力候補として期待され、世界中で研究開発が展開されています。

## 2. イオン電流で1細菌・1ウイルスを検出

ナノポアには、大きく分けて、イオン電流を用いるものと、トンネル電流を用いるものの2種類があります[1]。イオン電流を用いるものは、直径数 $\mu\text{m}$ から数十nmの直径を持つ貫通孔(マイクロ・ナノポア)が、微細加工技術を用いて、絶縁体上に作製されます。多くの場合は、シリコン基板上の窒化シリコン薄膜にマイクロ・ナノポアが作製され、基板の上下にイオンを含む溶液を溜めるリザーバーが作られます。各リザーバーには、1つの電極が設置され、この電極間に流れるイオン電流を計測します。

イオン電流型ナノポアの原理は、非常に簡単です(図1(a))。電極間に電圧をかけると、電極間に大きなイオン電流が流れます。負に帯電しているウイルスや細菌は、電気泳動で上から下に流れます。ナノポアの中に、ウイルスや細菌が入ってくると、イオンの流れが妨げられるため、イオン電流の減少が観察されます(図1(b))。このため、ウイルスや細菌の体積が大きいほどイオン電流の変化は大きくなり、イオン電流の最大変化量から体積を求めることができます。

イオン電流変化量が体積情報を持つことを考えると、窒化シリコン膜の厚みを検体より薄くする時、CTスキャンのように検体の断層情報が得られることが期待されます。ナノポアを通過する検体のダイナミクスを反映するイオン電流は、流体力学、電磁気学、およびイオン輸送の連成方程式で記述されるマルチフィジックスモデルを用いて説明されます[2]。このモデルを用いてイオン電流を解析すると、イオン電流一時間波形には、検体の体積、構造、および表面電荷の情報が入っていることが分かりました。そこで、ウイルスや細菌のイオン電流一時間波形を解析して、1個のウイルスや細菌の識別法の開発を行っています。まず、既知のウイルスや細菌のイオ



\* Masateru TANIGUCHI

1972年7月生  
京都大学大学院工学研究科分子工学専攻  
博士後期課程修了  
現在、大阪大学 産業科学研究所 産業  
科学ナノテクノロジーセンター  
バイオナノテクノロジー研究分野 教授  
博士(工学) 1分子科学、1分子技術  
TEL : 06-6879-8445  
FAX : 06-6875-2440  
E-mail : taniguti@sanken.osaka-u.ac.jp

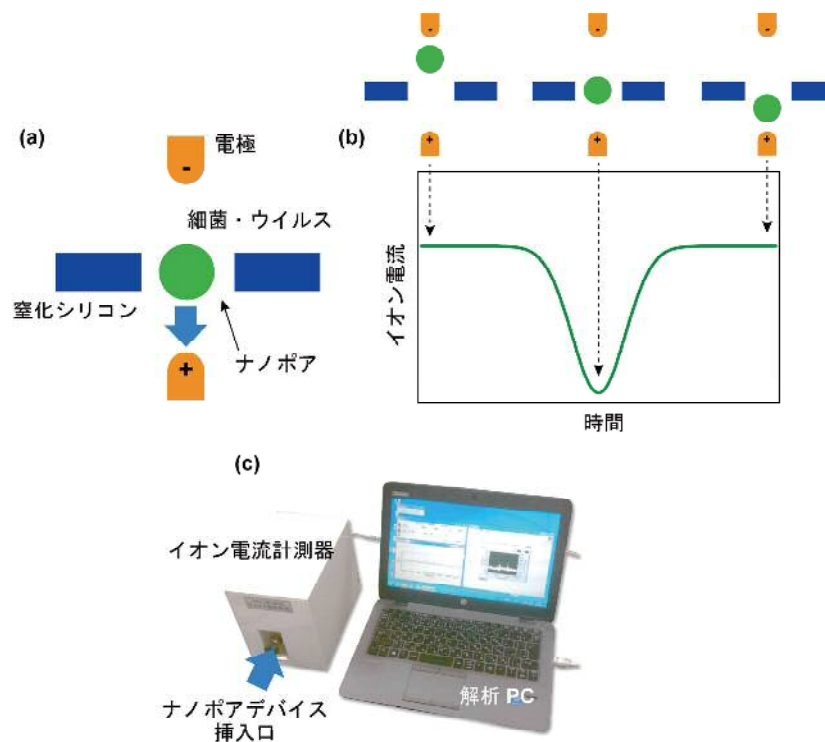


図1. (a) マイクロ・ナノポアデバイスの原理図。絶縁膜に直径数 $\mu\text{m}$ ～数十 $\text{nm}$ の直径の貫通孔をマイクロポア、ナノポアという。細菌・ウイルスの多くは負に帯電しているため、電気泳動で上から下に動く。1対の電極間のイオン電流をモニターして、1個の細菌やウイルスを検出する。(b) イオン電流-時間波形。(c) 細菌・ウイルス検出装置の試作機。

ン電流-時間波形を大量に取得し、機械学習を用いて、個々のウイルスや細菌を特定する学習データを構築します。次に、1つのイオン電流-時間波形が、どのウイルス・細菌によるものかを学習データをもとに機械学習により識別します。イオン電流-時間波形と機械学習の融合により、同じような体積を持つウイルスや細菌の識別に成功しています。この識別方法を実用化するため、細菌・ウイルス検出装置のプロトタイプ (図1(c)) を開発して、実際のサンプルとなる唾液や鼻腔液などに含まれたウイルスや細菌の検出に取り組んでいます。

### 3. トンネル電流で遺伝情報を読み出す

イオン電流型ナノポアは、1個のウイルスや細菌等、100 $\text{nm}$ 以上の直径を持つ検体を識別しますが、トンネル電流型ナノポアは、数 $\text{nm}$ 以下の検体を識別します [3]。トンネル電流型ナノポアは、絶縁膜の上に作製された電極間距離が数 $\text{nm}$ 以下の電極 (ナノギャップ電極) を持ちます。電極間を1 $\text{nm}$ 程度の分子が通過するとき、分子を介して電極間にトンネル電流と呼ばれる量子的な電流が流れます (図2(a))。

トンネル電流は、1分子のわずかな電子状態を読み出すことができ、走査型プローブ顕微鏡に使われています。DNAを構成するアデニン、シトシン、グアニン、チミンの4つの塩基分子や、RNAを構成するアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルの4つの塩基分子は、1 $\text{nm}$ 程度の大きさを持ちます。また、ペプチドを構成する20種類のアミノ酸も1 $\text{nm}$ 程度の大きさを持ちます。個々の塩基分子とアミノ酸は異なる電子状態を持つので、異なるトンネル電流が得られます [3,4]。その結果、連続した塩基配列を持つDNAを計測すると、図2(b)のようなトンネル電流-時間波形が観察されます [5]。同様に、RNAやペプチドを計測すると、構成要素である塩基分子とアミノ酸に対応するトンネル電流-時間波形が観察されます [5,6]。この識別法は、高速・低コストな遺伝子診断技術として期待されています。

トンネル電流型ナノポアでは、数 $\text{nm}$ 以下のナノギャップ電極を作る方法がキーになります。現在の最先端微細加工技術を用いても数 $\text{nm}$ のナノギャップ電極を作ることができません。私達は、3点曲げの要領で金属細線を破断させる機械的破断接合を開

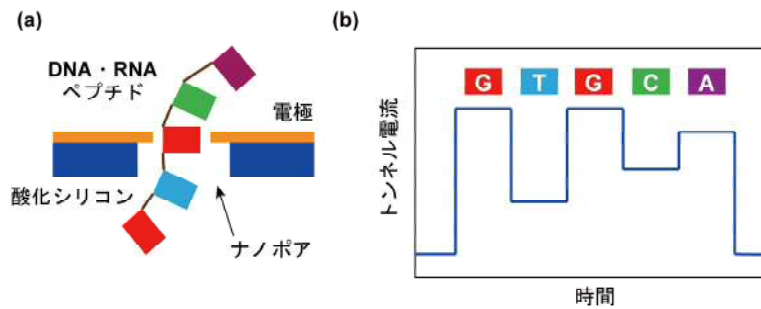


図2. (a) トンネル電流を用いて、DNA・RNAの塩基配列や、ペプチドのアミノ酸配列を調べる原理図。(b) アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、およびチミン(T)から構成されるDNAを計測したときに得られるトンネル電流—時間波形。

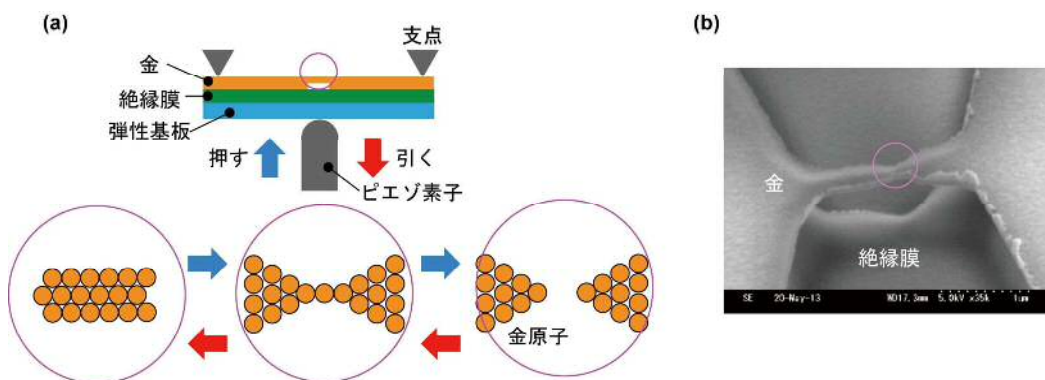


図3. (a) 1nm以下の電極間距離を持つナノギャップ電極を作る機械的破断接合の模式図。(b) 金属細線の走査電子顕微鏡像。丸印の部分が、ナノギャップ電極になる。

発して、数 nm 以下のナノギャップ電極を作製しています (図3)。この方法は、 piezoelectric 素子の上下運動により、金属細線の破断・接合を行い、目的とするナノギャップ電極を作製できます。微細加工技術を用いて作製した金属細線の破断・接合を精密に制御することで、1 nm 以下のナノギャップ電極が高い再現性と高い安定性で作製されます。

#### 4. おわりに

1 分子レベルの診断技術を開発するためには、新たなセンシングデバイスの開発とともに、1 分子を対象とした基礎科学の研究が欠かせません。紹介しました研究の他に、1 分子の電気特性・熱特性と、液体中の 1 分子の流動ダイナミクスの研究を進めており、基礎から応用まで一貫した 1 分子科学の研究を行っています。現在、私達の研究室は、スタッフ 14 名 (教授：谷口、特任教授：川合、准教授：筒井、特任准教授：大城、助教：田中・横田、特任助教：殿村・有馬、技術スタッフ：5 名、秘書)、理学研究科学生 3 名 (博士 1 名、修士 2 名)、研究員 3 名 (企

業・海外研究員) の総勢 20 名で活動しています。ご興味のある方は、研究室ホームページ (<http://www.bionano.sanken.osaka-u.ac.jp/>) をご覧ください。

#### 参考文献

1. M. Taniguchi, *Anal. Chem.*, **87** (2015) 188-199.
2. Y. He, M. Tsutsui, C. Fan, M. Taniguchi, and T. Kawai, *ACS Nano* **5** (2011) 8391-8397.
3. M. Di Ventra and M. Taniguchi, *Nat. Nanotechnol.*, **11** (2016) 117-126.
4. M. Tsutsui, M. Taniguchi, K. Yokota, and T. Kawai, *Nat. Nanotechnol.*, **5** (2010) 286-290.
5. T. Ohshiro, K. Matsubara, M. Tsutsui, M. Furuhashi, M. Taniguchi, and T. Kawai, *Sci. Rep.*, **2** (2012) 00501.
6. T. Ohshiro, M. Tsutsui, K. Yokota, M. Furuhashi, M. Taniguchi, and T. Kawai, *Nat. Nanotechnol.*, **9** (2014) 835-840.