

Title	Study on Electrical Analysis of Single-Particles and -Molecules Using Extended-Nanospace in Aqueous Conditions
Author(s)	有馬, 彰秀
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56070
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (有馬 彰 秀)

論文題名

Study on Electrical Analysis of Single-Particles and -Molecules Using Extended-Nanospace in Aqueous Conditions
(液中における拡張ナノ空間を利用した1粒子及び1分子の電気的分析に関する研究)

論文内容の要旨

[研究背景]

生体分子の多くは1分子レベルでその機能を発現しており、生体内に類似した環境で1生体分子の測定を実施するためには、高空間分解能な、非修飾、非固定での液中分析法が必要となっている。これを達成するポテンシャルを有する測定系として、ナノスケールの細孔(ナノポア)およびナノ電極があり、多くの研究が展開されている。さらに、これら2つの要素を組み合わせることで、1)ナノポア構造を用いた検体の捕捉及び2)ナノ電極による検体の検出による、イオン電流とトンネル電流を用いたナノ空間での1粒子及び1分子の電気的分析が期待される。本研究では、この検体分析法の創成に向けて、ナノポアによる単一検体捕捉法の実証と機構解明、および電解質溶液中においても高感度測定可能なナノ電極系の開発を行った。

[ナノポアを用いた1粒子分析]

近年ナノポアにおける研究では、ポアの厚さをその直径よりも極めて小さくした低アスペクト比ナノポアが、高感度分析の観点から期待されている。イオン電流を用いた測定では、この低アスペクト比ナノポアを用いて、検体粒子の表面電荷識別を行なった。従来の検体のポアの通過による分析法と、ポア直径を検体より小さく設計することで検体を捕捉するナノポアトラップ法を用いた。

ナノポア分析では、検体の挙動はイオン電流変化のみにより判断されているため、本当に1検体がナノポアを通過あるいは捕捉されているのかという基本的なことが確認付けられておらず、1検体の挙動の電流シグナルへの帰属が課題となっている。そこで、ナノポアとマイクロ流路で構成される新規デバイス構造を設計し、蛍光観察とイオン電流の同時計測を行った。その結果、検体の電場の制御によるトラップ/脱トラップとイオン電流変化のみで判断されていた粒子の挙動を蛍光との同時計測により電流シグナルに帰属することができた。また、印加電圧により、検体のxy方向の拡散を抑制しながら、z方向の位置が制御できる位置制御可能な1粒子捕捉機構法の可能性が示唆された。

[ナノギャップ電極を用いた1分子分析]

本研究では電解質溶液中での高感度生体分子測定に向けたナノ電極系を構築するとともに、タンパク質を試料として検体検出を行なった。代表的なナノギャップ電極作製法の一つに、機械的破断接合(Mechanically controllable break junction: MCBJ)法が挙げられる。MCBJ法では、弾性基板上の金属細線の機械的破断を行うことでナノギャップ電極として機能させており、DNAの核酸塩基の識別など、トンネル電流を利用した1分子レベルでの電気伝導度測定に広く応用されている。本研究では、MCBJ法を用いて、電極の表面全体をSiO₂で被覆することで分子サイズの絶縁被覆ナノ電極を作製し、分子検出時におけるバックグラウンドイオン電流を1/10に抑制した。さらに、シトクロムc(cyt c)およびウシ血清アルブミン(BSA)について絶縁被覆MCBJを用いた電流計測による1分子検出を実施した。電極間距離を一定に保ったときの両者のコンダクタンスヒストグラムには明確な違いが確認された。1分子が検出されたと考えられたが、同時に複数のピークが観察されたことから、複数の分子と異なる電極-分子の接合状態の寄与が考えられた。cyt cでは、特定のピークでは整数倍の関係が確認され、複数の検体による寄与が考えられるが、具体的な接合状態までの評価は本測定系ではまだ課題があると考えられ、検体を捕捉した状態での分析の必要性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (有 馬 彰 秀)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	谷 口 正 輝
	副 査	教 授	中 澤 康 浩
	副 査	教 授	松 本 卓 也

論文審査の結果の要旨

DNA、RNA、ペプチド、糖などの生体分子は、1分子レベルでその機能を発現するため、これらの分子を1分子で検出・識別し、その挙動を調べることは、生体機能の理解に重要と考えられている。近年では、サブマイクロメートルまで観察可能な蛍光顕微鏡の発明により、蛍光分子で修飾された生体分子のミクロな観察が溶液中で実現され、透過電子顕微鏡やプローブ顕微鏡により、蛍光分子を用いない1分子の観察が可能となった。さらに、生体に近い環境下における1生体分子を調べるため、非蛍光修飾、溶液中、非固定、かつナノスケールの空間分解能を特徴に持つ理想的な1分子分析法の創出が強く望まれている。

本論文は、理想的な1分子分析法の構築を目指して、その構成要素となる1粒子・1分子をナノ空間で捕捉する手法の開発と捕捉機構の解明、電解質溶液中におけるトンネル電流による1生体分子識別法の開発を行った。シリコン基板に作製した検体より小さい直径の貫通孔（ナノポア）を用いて、ナノポアへの1粒子の捕捉・脱捕捉を電圧で行い、ナノポアを流れるイオン電流変化により、リアルタイムで捕捉・脱捕捉を検出した。蛍光粒子を用いたイオン電流計測と蛍光観察の同時計測を行うことで、イオン電流変化と1粒子ダイナミクスの相関を明らかにするとともに、ブラウン運動が抑制された状態で1粒子がナノポアに捕捉されることを明らかにした。さらに、ナノポア垂直方向における捕捉位置の電圧依存性を解析し、1粒子に印加される電気泳動力と電気浸透力のつり合いにより、ナノポア表面から浮遊した状態で捕捉されることが示唆された。

生体環境は電解質溶液であるため、ナノスケールの電極間距離を持つナノギャップ電極を用いたトンネル電流による1分子検出・識別では、如何にイオン電流を抑制するかが高感度計測の要となる。本論文では、ナノギャップ電極を絶縁体であるSiO₂で被覆したナノ構造を作製し、非被覆ナノギャップ電極を流れるイオン電流の約10%以下に抑制することに成功した。被覆ナノギャップ電極を用いて、シトクロムcとウシ血清アルブミンの計測を行い、それぞれの生体分子に特徴的な電気伝導度を得ることに成功した。

本論文は、生体に近い環境で計測可能な1分子分析法の2つの構成要素と考えられる、1粒子・1分子捕捉法とトンネル電流による1分子検出法の開発、および捕捉原理の解明を行い、得られた計測データは、定式化が未だ困難なナノ空間における1粒子・1分子の流動ダイナミクスの学理を構築する重要な実験データになると期待される。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。