

平成 31 年 4 月 7 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 57

氏 名 山崎 洋人

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ノースイースタン大学 (国名: アメリカ合衆)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

ナノポア近傍における DNA 動的立体構造解析法の確立とエピジェネティクスへの応用

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 10 日 ~ 平成 31 年 4 月 9 日

4. 受入機関名及び部局名

ノースイースタン大学・物理学部・Meni Wanunu 准教授

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究では、DNA ナノポア通過時における動的立体構造を明らかにするために、イオン電流計測と光計測技術を組み合わせた計測方法の開発を行う。そして、エピジェネティックといった遺伝子解析への応用を目的とする。ナノポアとはナノサイズの孔を指す。これを電解質溶媒の満たされた流路セルに設置し、電圧を印加すると、イオンがナノポア内を流れる。イオンの流量は、電流値として読み取ることができる。このとき、電圧印加に伴う駆動力(電気泳動力・電気浸透流など)を受け、ナノポア内に生体分子が通過すると、通過に伴うイオン流の減少は遮蔽電流として計測される。遮蔽電流の解析結果から、分子自体の大きさ・構造及び界面相互作用を明らかにできる。

先年度の研究で、可視光レーザーを窒化シリコン薄膜に照射した場合、フォトサーマル効果により薄膜が加熱され、このときのナノポア温度をイオン電流値の変化から計測できることを明らかにした。そして、このナノポア系を温度プローブとして適用することで、単一生体分子(tRNA と DNA 折り紙)の熱的融解過程を観察し、バルク溶媒中における融点温度の計測に成功した。しかしながら、レーザー加熱の副作用として、レーザーエッチング効果がみられ、ナノポアがレーザー照射時間に応じて大きくなり、測定を通して統一的な生体分子のナノポア通過過程を観察することが困難であった。そこで、本年度はまず、窒化シリコン薄膜のレーザーエッチング効果について理解を深めることで、最終的に、あらゆる測定環境条件に適応できる光学・イオン電流検出可能なゼロモード導波路-ナノポアの構築を目指す。まず、初めに昨年度と同様に可視光により励起されたとき、どのような反応をするかを環境条件を変えて調べた。空気中において 75 nm の窒化シリコン薄膜に 10, 20, 30, 40, 50 mW の 532 nm レーザーを対物レンズ(x60, N.A.0.9)で集光すると、レーザー強度 50 mW において、瞬時にマイクロサイズの孔(マイクロポア)が形成された。このマイクロポアを透過型電子顕微鏡(Transmission electron microscope: TEM)で観察するとマイクロポア周囲にひびがあることが分かった。窒化シリコン薄膜が高温にレーザー加熱され、サーマルアブレーションが生じ、マイクロポア形成後の急冷に伴いひびが形成されたといえる。さらに、窒化シリコン薄膜をメタノール溶媒に浸し、15 mW のレーザーを照射すると、マイクロサイズの泡(マイクロバブル)の発生が観察された。有限要素法ベースのシミュレーションである COMSOL Multiphysics を用いて、窒化シリコン薄膜温度を理論計算すると、空気中においてレーザー強度 50 mW とメタノール溶媒中においてレーザー強度 15 mW の条件下、薄膜温度はそれぞれ 1500℃と 200℃に達す

ることがわかった。これらの温度はそれぞれ先行研究による窒化シリコンの分解温度とメタノール溶媒中におけるバブル発生温度と一致する。さらに、レーザー照射に伴う窒化シリコンの蛍光の量子収率を計測すると、励起光強度に応じて減少することがわかり、先行研究で明らかとなった量子収率の温度依存性が計測された。以上の実験結果は、窒化シリコン薄膜が高いフォトサーマル効果を有することを明らかに示す。

次に、高いレーザーエネルギー密度（レーザー強度:50mW において、 $1/e^2$ のビーム半径 710nm としたとき、 $\sim 3 \times 10^7 \text{ W/cm}^2$ ）が窒化シリコンに与える影響を理解するために、本研究では、TEM 加工された孔径 6.4 nm のポアに対して、30 mW レーザーを照射し、時系列変化を観察した。レーザー加熱に伴い、照射時にイオン電流の増加がみられた。昨年本研究で解析的に得られたイオン電流増加率 v.s. ナノポア温度のプロファイルから、このときのナノポア温度は 60℃ である。イオン電流増加が定常状態に達した後に、イオン電流値が徐々に上昇する現象がみられた。10 分のレーザー照射において、ナノポアコンダクタンスは 2 倍まで大きくなった。Gilboa らの報告から、このコンダクタンス変化は窒化シリコンのエッチング及びポアの拡大に起因する。更に、7.6 nm の窒化シリコンポアに 1 nm の酸化ハフニウムをコーティングしたポア（酸化ハフニウムコーティングポア）を作製し、レーザー加熱時の形状変化を観察した。窒化シリコンポアと同様にナノポア温度を 60℃ まで加熱すると、10 分後のイオン電流値はレーザー照射前と比べ、ほとんど違いがみられなかった。窒化シリコンポアと酸化ハフニウムコーティングポアのイオン電流変化率は、それぞれの 5.0 pA/s と 0.6 pA/s であった。したがって、ナノポア形状変化は、窒化シリコンの光反応特有の現象であることがわかった。

どのような要因が窒化シリコンの光反応に関連しているかを理解するために、溶媒条件 0.4 M 塩化カリウム(KCl)溶媒、0.4 M 酢酸ナトリウム溶媒、超純水における、レーザーエッチング効果について研究した。まず、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、上述の溶媒において 47 mW のレーザーを 10 分間、同一の膜厚 75 nm 窒化シリコンに照射した後のエッチング領域の深さを計測した。AFM で表面凹凸像を観察すると、薄膜観察領域に応じて異なった表面凹凸像が得られた。これは、基板からの応力に耐えるために窒化シリコン薄膜自体が曲面を有するため、同一平面としての凹凸像が得られないことが理由である。そのため、本研究では、TEM 像が同じ材質であった場合に膜厚に応じた像のコントラストが得られる特徴を利用して、それぞれの溶媒条件でのエッチング領域の深さを比較した。すると、0.4 M 酢酸ナトリウム溶媒と超純水と比べて、0.4 M KCl 溶媒のエッチング領域が明らかに高い透過電子量がみられ、つまり、KCl 溶媒がエッチングを促す要因の一つであることがわかった。また、レーザー加熱の影響がほとんどないレーザー強度 1.5 mW を 4 M KCl 溶媒に浸した膜厚 75 nm の窒化シリコン薄膜に 8 時間照射すると、ほとんどエッチングがみられなかった。加えて、0.4 M KCl 溶媒中において、47 mW のレーザーを 3 分照射したエッチング領域を AFM でスキャンすると、深さ 25 nm、幅 533 nm とレーザーのビーム半径と概ね一致する結果であった。この結果から、エッチング過程は温度に大きく影響すること、光化学反応によることがいえる。続いて、レーザー強度 47, 25, 12.5 mW において、照射時間それぞれ 8, 6, 4, 2 分の条件で膜厚 75 nm の窒化シリコン薄膜をエッチングし、各条件におけるエッチングアレイを作製した。それぞれのエッチング深さを AFM で計測し、これらをまとめると、時間条件に関係なく、エッチング深さはレーザー強度すなわち薄膜温度に対して非線形的に大きくなる傾向がみられた。この実験結果は、アレニウスの式 ($k = A \exp(\frac{E_a}{RT})$) で表されるように、エッチング現象が化学反応に由来することを示す。 k, A, E_a, R, T はそれぞれ反応速度定数、温度に無関係な定数、活性エネルギー、気体定数、絶対温度である。以上の実験結果から、次のような化学反応が推測できる。シリコンリッチな窒化シリコン (SiN_x の x が 1 程度) が可視光を吸収すると励起子生成に伴いシリコン原子は活性化され、シリコン結合 (Si-Si) が不安定化する。このとき、溶媒中の塩素イオン (Cl^-) が不安定化したシリコン結合を安定化する役割として一時的に塩素とシリコンの結合 (Si-Cl) を生み出すことが想定できる。類似的な現象として、古くから塩素プラズマが窒化シリコンを削るプロセスがある。反応式は $\text{Cl} + \text{Si}_3\text{N}_4 \rightarrow \text{SiCl}_4 + \text{NCl}_3, \text{N}_2$ である。この反応過程は高温で活性化され、特に温度 300-500℃ において高い反応性を示す。 Si-Cl は水分子の存在下では不安定であり、瞬時に水分子に置き換えられ、酸化する。この反応過程は、蛍光強度の減少として観察された。そして、酸化により生成されたアモルファス SiO_2 は局所加熱による熱勾配によって、熱拡散する。塩素イオン由来の窒化シリコンのエッチング過程がある証明として、高い KCl 濃度条件の方がエッチングスピードが早いことが挙げられる。膜厚 75 nm の窒化シリコンを 47 mW のレーザーを照射し、ポロブ電圧 10 mV を印加して、75 nm のエッチングによるポア形成時間を測定した。同一の薄膜を用いて、0.4 M KCl と 4 M KCl におけるポア形成時間はそれぞれ 170 s と 42 s であった。さらに、0.04 M KCl 溶媒条件では、0.4 M KCl 溶媒条件と比べて三倍エッチングスピードが遅いことがわかった。溶媒に含まれる tris が pH の温度依存性を有するため溶媒の pH が減少する影響もあるが、0.1 M の水酸化カリウム溶媒において、エッチング過程が促進されることがわかった。したがって、本研究で観察された光励起による窒化シリコン薄膜のエッチング現象は、塩素イオンと水酸化イ

オンに由来することが明らかとなった。

本研究により理解されたエッチング効果を活用してナノポア作製法の開発を行った。一般的には、TEMの強力な電子ビームを集束させることで膜厚100 nm以下の薄膜に75 nm~1 nmまでのポアを作製し、ナノポア計測を行い、生体分子を解析している。しかしながら、使用できる施設が限られているため、TEM加工は実用的でないといわれている。近年、dielectric breakdownという高電圧印加時に生じる半導体における破断現象を用いて数nmのポア作製が可能となった。一方で、この方法は、複数のポアが作製されたり、薄膜化すると容易に破損したりといった課題がある。そこで、エッチングで極限まで薄膜化し、dielectric breakdownで数nmの単一ナノポア作製を試みた。膜厚75 nmの窒化シリコン薄膜に47 mWのレーザーを照射し、電圧1 Vを印加すると、180 後に急峻に立ち上がる電流波形が得られた。これは、エッチング効果とdielectric breakdownによるナノポア形成を示す。電流値が閾値0.5 nAに達すると、フィードバック制御により電圧50 mVとレーザー0 mWに変える。そして、弱い電圧50~100 mVをしばらく印加し、安定的なナノポア形状の形成・汚れの洗い流しを行う。先行研究から、このナノポア作製過程はレーザーエッチング、加熱に伴う欠陥生成の促進・励起光照射による電場形成が関わりと考えられる¹。続いて、レーザー強度がナノポア形成過程に与える影響を研究した。レーザー強度47, 35, 24 mWを比較すると、破断時間はそれぞれ 165 ± 67 s, 536 ± 288 s, 814 ± 440 sであった。また、二本鎖DNAおよび一本鎖DNAを作製したナノポアに通し、通過波形からポアサイズと厚みを計測した。このポア寸法は、二本鎖DNAと一本鎖DNAの太さがそれぞれ2.2 nmと1.2 nmと既知のサンプルを使用することで、計測可能となる。この方法により、レーザー強度47, 35, 24 mWにおけるポアの厚みはそれぞれ 1.8 ± 1.1 nm, 3.9 ± 1.1 nm, 4.6 ± 2.3 nmであった。レーザー強度が小さい方が厚み・分散値ともに大きくなる傾向がみられた。この結果は、今後レーザー強度・印加電圧条件を最適化することで、使用用途に合ったナノポア作製ができることを示唆する。

続いて、trans-からcis-チャンパー(trans→cis)とcis-からtrans-チャンパー(cis→trans)に向けてDNAがナノポアを通過するときのダイナミクスを観察した。すると、trans→cisではDNA通過波形は鋭かった(100 μs程度)のに対して、cis→transでは二段階の長い遮蔽電流(100 μsから数十ms程度)であった。この波形は、cisチャンパー側にキャビティと呼ばれる大きなお椀構造があり、cis→transの場合DNAがナノポアを通過する前にこのキャビティにはまり込み、DNA先端がナノポアを探し出すまでに時間を要している様子を示している。同様なDNAナノポア通過ダイナミクスはコニカル型といる非対称なナノポア(ナノポアピペット)を使用した場合にも観察されることが先行研究から報告されている²。cis→transとtrans→cisでは捕捉頻度が 3.19 ± 0.08 s⁻¹ nM⁻¹と 1.05 ± 0.03 s⁻¹ nM⁻¹と孔径の大きいcisチャンパー側の方が捕捉頻度が大きいことから、本研究法により作製されたナノポアは非対称なナノポア形状を有することがわかる。

この非対称なナノポアを用いて、いくつかのアプリケーションの提案を試みた。まず、初めにDNA長さの識別に取り組んだ。長さ250 bpと2.5 kbpの二本鎖DNAがそれぞれ30 nMと3 nMの濃度で調整されたサンプル溶媒を用いて、大きさ2.7 nm・厚み1.7 nmのポアの通過波形を観察した。すると、長さに応じた2つ明らかな通過時間分布を得ることができた。印加電圧200, 250, 300 mVにおいて、長さ250 bpと2.5 kbp DNAの平均通過時間(logスケール)は、それぞれ $3.80 \pm 0.01/4.79 \pm 0.01$, $3.36 \pm 0.03/4.47 \pm 0.02$, $3.19 \pm 0.05/4.29 \pm 0.02$ μsであった。この結果からわずか1 nmの膜厚のポアであってもポアの大きさが小さければ長さの違いは見れることがわかった。

そして、最後に本研究によるナノポアは究極的に薄くかつ小さくできることから、DNA配列情報の取得を試みた。ナノポア計測において、DNAが電気泳動でナノポアを通過するスピードが早すぎるため、既存の電子機器および測定機構では塩基を読み取るだけの低ノイズかつ高いサンプリングレートで計測できない。そのため、これまでに様々なDNA通過速度低減の方法が提案されてきた。本研究では、complimentary DNAを自身で作成し、これを2本鎖DNAが通れない大きさ2 nm以下のポアに通し、unzipping現象を利用したDNA通過速度の低速化を行った。このunzippingを用いると、二本鎖DNAが引っかかり、その間、特定のDNA配列がナノポア内に長時間滞在するため、設計した配列情報が電流波形として得られる。大きさ1.7 nm・厚み1.8 nmのポアにcomplimentary DNAを通すと、90%以上の深い遮蔽電流に小さな3段階のpolyC・polyA・polyCに応じた電流値分布がみられた。電流値分布を統計的にガウシアンフィッティングを用いて解析すると、polyAとpolyCに対応する電流値差は16.9 pAとなった。この値は、先行研究で膜タンパクナノポアを使用した場合に得られる電流値差と概ね一致する³。この研究成果は、研究代表者が知る限りでは、半導体ナノポアを用いて、初めて、一本のDNAから配列情報を得た事例である。

本研究成果は、レーザーエッチングを活用することでZMW基板にナノポアを加工でき、そして、薄膜化による窒化シリコン由来の蛍光を低減できること意味する。また、窒化シリコン薄膜のシリコン原子と窒素原子の割合を調整することでナノポア拡大化の影響を抑えることが期待できる。窒化シリコン薄膜の組成と発光の関係性を今後究明できれば、これまでのゼロモード導波路ナノポアと比べ、機械的強度の高いデバイスが実現でき、単一蛍光分子の発光を容易に計測できるといえる。

本海外特別研究員中に、研究者代表者は、研究成果をこれまでに筆頭著者として2報の国際論文誌 (Hirohito Yamazaki *et. al.* ACS Nano **12**, 12472-12481 (2018). Hirohito Yamazaki *et. al.* Nano Letters, **17**, 7067-7074 (2017))、さらに共著として2報の国際論文誌 (Pradeep Waduge *et. al.* ACS Nano, **11**, 5706-5716 (2017). Rui Hu *et. al.* ACS Nano **12**, 4494-4502 (2018).) に投稿している。また、本研究において開発したナノポアサーモスコピーを学会・研究会で発表することで、ノースイースタン大学のPaul Champion教授やマサチューセッツ大学アムハースト校のMin Chen専任講師と共同研究を結んだ。更に、生物物理に関連する学会のみならず、様々な研究会にも積極的に参加しており、幅広い分野の研究者と交流・ディスカッションを行った。例えば、Harvard Medical Schoolで開催される“いざよいのタベ勉強会”は、医療・生物研究に携わる研究者の集会であり、申請者は唯一の生物物理学研究者として参加し、自身の研究発展・応用を医療・生物学研究者からの意見を取り入れる試みを行ってきた。この研究会で本研究成果を医学・生物学系の研究者らの前で発表した。そして、Biophysical Society 63th Annual Meetingでは、所属研究室が主に発表するMicro・nanotechnologyセッションではなく、Bioengineeringセッションで招待講演を行った。これは、申請者が国際的に該当分野では申請者の研究が受け入れられていることを示す。更に、慶応義塾大学・斎木教授の協力のもと、日本国内のナノポア研究者とNortheastern大のナノポア研究が交流するためのナノポアセミナーの設置に申請者は携わった。2月に慶応義塾大学を訪問し、学生らに向けて海外での研究状況と留学に向けての準備方法及びノースイースタン大学での研究成果を発表した。

1. Gilboa, T.; Zreben, A.; Girsault, A.; Meller, A., Optically-Monitored Nanopore Fabrication Using a Focused Laser Beam. *Scientific reports* **2018**, *8* (1), 9765.
2. Bell, N. A. W.; Chen, K.; Ghosal, S.; Ricci, M.; Keyser, U. F., Asymmetric dynamics of DNA entering and exiting a strongly confining nanopore. *Nature communications* **2017**, *8* (1), 380.
3. Akeson, M.; Branton, D.; Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Deamer, D. W., Microsecond Time-Scale Discrimination among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments within Single Rna Molecules. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3227.