

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－シンガポール研究交流）

1. 研究課題名：「フェリチンとナノインプリントにより実現する DNA シーケンサー」
2. 研究期間：平成24年7月～平成27年3月
3. 支援額： 総額 18,920,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	山下一郎	奈良先端科学技術大学院大学	教授
研究者	岩堀健治	奈良先端科学技術大学院大学	研究員
研究者	信澤和行	奈良先端科学技術大学院大学	特任助教
研究者	熊谷慎也	奈良先端科学技術大学院大学	准教授
研究者	岡本尚文	奈良先端科学技術大学院大学	技術員
研究者	吉田智明	奈良先端科学技術大学院大学	修士学生
		研究期間中の全参加研究者数	名

相手側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	Dr. Karen Chong Siew Ling	Institute of Material Research and Engineering Agency for Science, Technology and Research	Senior Research Engineer
研究者	Dr. MSM Saifullah	Institute of Material Research and Engineering Agency for Science, Technology and Research	Scientist
研究者	Mr. Kevin Khaw	Institute of Material Research and Engineering Agency for Science, Technology and Research	Specialist
研究者	Mr. Lee Yeong Yuh	Institute of Material Research and Engineering Agency for Science, Technology and Research	Specialist
研究者	Dr. Teo Yin Nah	Molecular Engineering Laboratories, Agency for Science, Technology and Research	Scientist
研究者	Dr. Shawn Hoon	Molecular Engineering Laboratories, Agency for Science,	Scientist

		Technology and Research	
研究期間中の全参加研究者数		6	名

5. 研究・交流の目的

本研究はシーケンサー装置の重要プロセスである DNA 相補結合検出を、電気的手法で読み取る probe-DNA 密度制御・固定位置制御電極を作製することを目的とする。具体的には日本側は、球殻状タンパク質変異体を開発して均一金化合物ナノ粒子の合成を行い、タンパク除去と金化合物改変により金ナノ粒子の位置制御個別一個配置を担当し、シンガポール側はナノインプリントによるナノ粒子内包球殻タンパク質を固定するパターンの大規模作製と電子供与体担持 probe-DNA の合成を担当する。両者の組み合わせにより、金ナノ粒子に probe-DNA を固定して電氣的検出 probe-DNA の位置制御高密度電極を実現する。本研究で日本とシンガポールが研究交流を通じて相互補完的に取り組むことで、これまでにないナノスケール制御精度の probe-DNA 電極が実現され、画期的な高精度、低エラーと小型化が実現でき、将来必須となる制御された DNA アレイ技術の基礎となることが期待される。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

ミュータントフェリチンの作製、金化合物ナノ粒子の合成、基板上タンパク質除去技術とナノ粒子還元技術の完成、金ナノ粒子と DNA の結合等で成果を得ることができた。特に直径 $\sim 4\text{nm}$ の均一金ナノ粒子を作製できるようになったことは大変重要な成果であった。まず同一サイズのかご状タンパク質フェリチンの内部空間で硫化金の合成を行い、次にタンパク質除去の為オゾン処理を行ったところ、硫黄原子の除去、硫化金の還元が行われ、均一の $\sim 4\text{nm}$ の金ナノ粒子が作製できた。この手法は他の硫化物ナノ粒子にも応用可能と考えられ、この手法を用いれば各種金属の量子効果素子の実現につながる。

次にこの金ナノ粒子と末端に硫黄原子を持つ probe-DNA 溶液を混合することで、probe-DNA を金ナノ粒子に固定できることが示された。金ナノ粒子の位置制御固定とあわせることで、狙った位置に probe-DNA を固定できることが示された。

シンガポール側の研究は、Token シーケンサーという全く新しい概念のシーケンサーの一部で、そのシーケンサー用電極に電子供与体担持 probe-DNA を密度制御して固定するものであった。電子供与体担持 probe-DNA の合成では、ハイブリダイゼーションによる 2 本鎖 DNA の形成により電荷を輸送する能力を確認した。またナノインプリントによるナノ精度での正電荷ナノディスクパターン作製の原理的な確認が行われ、正電荷ナノディスクへの負に帯電した硫化金内包フェリチンの配置についても原理的な確認は行われた。

この手法は Role-to-Role で作られたナノパターンに硫化金ナノ粒子内包フェリチンの溶液を載せて洗うだけでナノ粒子固定がされ、タンパク質と硫黄原子を除去後はナノ粒子に DNA を固定することができるもので、量産性が飛躍的に改善され、シーケンサー電極への応用では精度が高くなると予想される。

6-2 人的交流の成果

シーケンサーの電極表面改質は重要な研究要点であり、奈良先端科学技術大学院大学側

は助教を選任し、シンガポールと密な連携を取る体制をとった。毎年 3 月には研究成果のとりまとめを行うために研究討論会議をシンガポールにて行い、2014 年 3 月には相互の理解の為シンガポール側からも奈良先端科学技術大学院大学を訪問し実際の実験手法の確認を行った。また可能な限り TV 会議も実施した。その結果 DNA シーケンサー電極に求められる要点とその実現のための問題点が、シンガポール側と日本側で共有されその理解が深まった。また日本側はナノインプリンティングの手法を DNA 位置密度制御配置に応用をしたと考えて、今後も交流と継続したく人的交流も続けている。

7. 本研究交流による主な論文発表・主要学会での発表・特許出願

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年、DOI ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、出願番号、出願人、発明者等	特記事項
論文	H. Tanaka, P. Fiorini, S. Peeters, B. Majeed, T. Sterken, M. Op de Beeck, M. Hayashi, H. Yaku, and I. Yamashita, "Sub-micro-liter Electrochemical Single-Nucleotide-Polymorphism Detector for Lab-on-a-Chip System", Jpn. J. Appl. Phys. 51,(2012) 04DL02	DNA 検出
国際会議発表	Ichiro Yamashita "Protein based direct fabrication on Si wafer in aqueous solution Bio Nano Process", International conference of Photopolymer Science and Technology 2012	ナノ粒子配置
国際会議発表	K. Nobusawa ¹ , N. Okamoto, K. Iwahori and I. Yamashita, "Synthesis of Gold Sulfide Nanoparticle inside Recombinant Ferritin for Quantitative DNA Sensor", JSAP-MRS Joint Symposia, Kyoto , 2013	硫化金合成
論文	I. Yamashita, K. Iwahori, B. Zheng, S. Kumagai, "Nanoparticle Synthesis: Biological Path Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology", CRC Press: New York, pp.3144–3151, 2014	ナノ粒子合成
論文	H. Tanaka, P. Fiorini, B. Jones, S. Peters, R. S. Wiederkehr, B. Majeed, H. Yaku, M. Hiraoka, T. Matsuno, I. Yamashita, "Electrochemical sensor with dry reagents implemented in lab-on-chip for single nucleotide polymorphism detection", Japanese Journal of Applied Physics 53, 05FS03, 2014	DNA 検出