ナノテクノロジー

グラフェンの細孔を利用したDNAシーケンサー

Holes with an edge

Hagan Bayley 2010年9月9日号 Vol. 467 (164–165)

2010年のノーベル物理学賞は、グラフェン（原子レベルの薄さの炭素シート）の研究者に贈られた。
グラフェンの1枚1枚に電子ビームでナノ細孔を開けると、単一DNA分子の超高速シーケンサーが作れるかもしれない。

小さな孔（ナノ細孔）にDNA鎖を通し、塩基の違いによる電気的な変化を検出することによって、DNAの塩基配列を読み取ることができるかもしれない。この考えは、14年前に提案された[1]。その後、米国立衛生研究所の1000ドルゲノムプロジェクト[3]に刺激され、この目標[2]に向かって大きな前進がみられた。最近の塩基識別の進展をみると、タンパク質ナノ細孔が優勢なようである。しかし、今回の3報の論文[4–6]によると、塩基識別には、グラフェン（原子1個または2、3個分の厚さしかない炭素シート）に開けられたナノ細孔が極めて有効かもしれない。

グラフェン[7]は、縮合炭素6員環からなる大きく広がった二次元の芳香族分子であり、特異な電気的・機械的特性をもつ物質である。Garajら[4]は、電子ビームを使って、1層または2層のグラフェンに直径5～23nmの孔を開けた（*Nature* 2010年9月9日号190ページ）。次に、孔の開いたグラフェンをチャンバー内に設置し、グラフェン膜のそれぞれの面が塩水溶液に触れるようにした。そして、膜の両側に置いた（塩水溶液に浸した）電極の間に電圧をかけ、塩イオンによって運ばれる電流を測定した。ナノ細孔のコンダクタンス（抵抗の逆数）は直径とともに変化しているが、これは、直径よりも厚みがはるかに小さい細孔の場合、予想どおりのことである[8]。コンダクタンスの値をもとに、Garajらは、グラフェンの実効絶縁厚みがわずか0.6nm程度であることを計算で求めた。この値は、DNA解析に用いられたほかの材料よりもはるかに小さい。例えば、一般的な窒化シリコン細孔では30nmであり[9]、α溶血素タンパク質細孔では10nmである[10]。

Garajら[4]は、続いて、グラフェンナノ細孔に二本鎖DNAを通しながら、直径5nmのナノ細孔を流れる電流を測定した。電流にスパイクが観測されたが、これは電流ブロッケード（遮断）を意味しており、DNAが折りたたまれているかどうかにかかわらずDNAの通過に対応している。過去に、窒化シリコン細孔を用いた類似の実験において、同様のブロッケードが観測された[11]。高イオン強度の塩基性溶液を用いた場合、ごく一部であるがDNA分子がグラフェン表面に付着してしまい、DNAの移動が妨げられた。電流ブロッケードの平均振幅を用いることによって、Garajらはもう一度グラフェン膜の実効厚みを計算し、それが約0.6nmであることを確認した。

Garajら[4]が用いたグラフェンは、化学気相成長法（CVD）で作製したものである。Schneiderら[5]は、グラフェンナノ細孔を通る二本鎖DNAの移動について同様のデータを*Nano Letters*に報告している。しかし、剥離（はくり）法（バルクのグラファイトからグラフェンシートをはがし取る方法）で得た膜を使っており、剥離法によるグラフェン膜はCVD法によるグラフェン膜よりも欠陥が少ないと述べている。

Garajらの研究結果とは異なり、Schneiderらのデータは、細孔のコンダクタンスは細孔直径の2乗とともに変化することを示唆している。このことは、Schneiderらの膜が予想より厚いことを示している。おそらく、DNAがグラフェン表面に付着することを防ぐために、グラフェンを16-メルカプトヘキサデカン酸でコーティングしたからであろう。

グラフェンナノ細孔を通るDNAの移動に関する3番目の研究（同じく*Nano Letters*に発表された）が、Merchantら[6]によって報告されている。この研究に使用されたのは、CVD法で作製した厚さ3～15原子層のグラファイト（Garaj[4]らのグラファイトの厚さはわずか1、2原子層）であり、直径5～10nmの細孔をもつ。このケースでは、高いリーク電流（おそらくグラフェンのピンホール欠陥に起因する）がみられたものの、折りたたみDNA、非折りたたみDNAのいずれについても、DNA移動に伴う電流ブロッケードが観測されており、他の研究[4,5]と一致した結果が得られている。

では、DNAシーケンシング用グラフェンナノ細孔デバイスの開発は、どこまで進んでいるのだろうか。ナノ細孔シーケンシングでは、個々の塩基が細孔の認識ポイントを通るときのイオン電流の塩基特異的な変化を観測することによって、

©2010 NPG Nature Asia-Pacific. All rights reserved

1 本鎖 DNA の塩基配列が決定される[1,2]。またグラフェン単層の利点は、ナノ細孔の厚さが塩基の大きさと同等であることと認識されている。したがって、細孔中に DNA との接点が複数存在するのではなく、認識ポイントは 1 点だけとなる（図 1）。ここで取り上げた研究[4–6]では、二本鎖 DNA が塩基当たり約 10 ナノ秒の速度で移動している。これでは速すぎて、個々の塩基に起因する電流ブロッケードを分解できない。このため、Garaj ら[4]は、移動速度を遅くして 2.4nm の細孔で実現しうる空間分解能を計算によって見積もり、0.35nm という良好な値（これは単一塩基の識別に適合する）になることを確認した。

しかし、たとえ細孔を通る一本鎖 DNA の移動速度を、イオン電流記録によって個々の塩基の電流ブロッケードが測定可能となる[2]塩基当たりミリ秒まで遅くできても、グラフェンナノ細孔シーケンシングは、いくつかの問題にぶつかるであろう。例えば、グラフェンナノ細孔は、電流雑音のレベルが高い[4–6]。これは、デバイスを厚くした場合にのみ改善可能である[6]。さらに、グラフェンナノ細孔が異なる塩基を識別できるという実験的証拠がないため、移動する塩基を遅くし、一時停止させ、方向を正すために、細孔の縁を化学的に修飾する必要があるかもしれない。

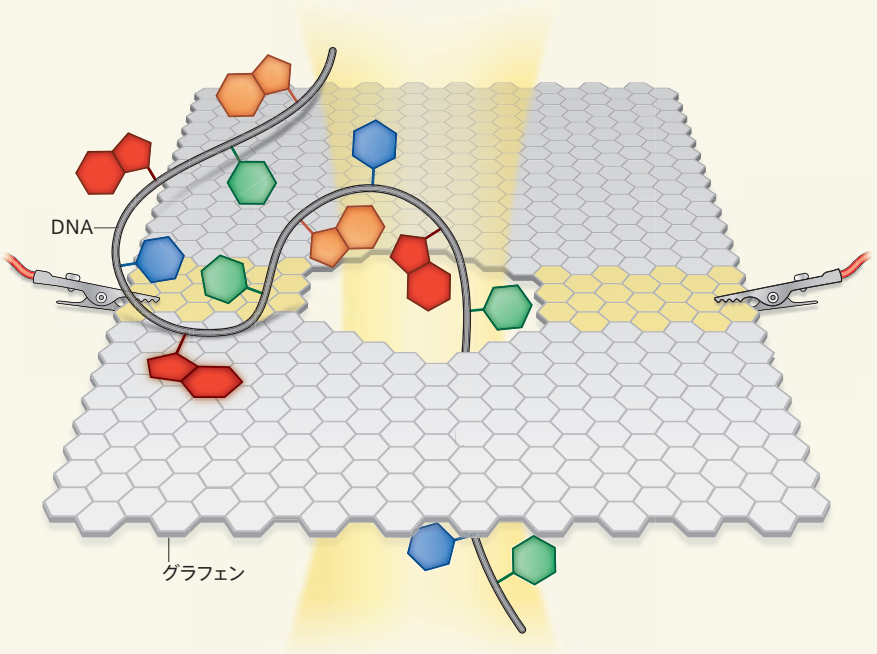

図 1. 提案されている DNA シーケンシング方法。グラフェン単層に開けられたナノ細孔に一本鎖 DNA を通すことによって、単一分子 DNA の塩基配列を決定する魅力的な方法である。ここでは、グラフェン中の炭素原子環を六角形で表している。ナノ細孔の直径は約 1.5nm であり、六角形約 35 個分に相当する。電位が与えられ、鎖は上から下へと移動する。4 つの DNA 塩基は異なる色で示されている。DNA 塩基はイオンの流れを遮断するので、細孔を通るイオンの流れ（垂直方向の黄色い影）を観測し、それぞれの DNA 塩基に特徴的なイオン電流変動を記録することによって、DNA の塩基配列を決定できる可能性がある。代わりの方法として、グラフェンを流れ、DNA が細孔を通ると変化する横方向（交差方向）のトンネル電流（水平方向の黄色い影）の変動を測定できる可能性がある。ワニ口クリップは電気的接続を表している。起こりうる問題として、図に示すように、一本鎖 DNA がグラフェンに付着することが挙げられる。3 報の論文[4–6]が、DNA がグラフェンナノ細孔を通過する際、イオン電流の変動が測定できることを報告している。ただし、現時点の測定分解能は不十分なものであり、1 個 1 個の DNA 塩基を検出して識別することはできない。

別の塩基特定手段では、DNA を通る電子トンネリングという量子力学的現象を利用しており[12]、グラフェンを交差方向の電極（trans-electrode）として用いている（図 1）。トンネル電流などの電気的特性の測定によって、塩基当たりマイクロ秒のスピードという並外れて速い塩基識別が可能になるかもしれない[2,12,13]。重要なのは、イオン電流法とトンネル電流法のいずれの DNA シーケンシングも、直径 1.5nm 未満（これまで報告されたものよりはるかに小さい）の細孔が必要となりそうなことである（図 1）。

また、グラフェンナノ細孔を用いた DNA シーケンシングには、新しい化学と物理学を適用する必要がある。グラフェン表面の性質、特にグラフェンナノ細孔周辺の性質は、十分には理解されていない。グラフェン表面は、しなやかに波打つ傾向にあり[14]、また今回の研究[4,6]でリーク電流の原因となっている欠点も含めて、さまざまな欠点が存在している。グラフェンナノ細孔が空気や水にさらされたとき、ナノ細孔周辺にはどのような化学基が存在するのであろうか。おそらく、酸化グラフェン[15]と同じく、カルボン酸基、水酸基、エポキシ基、アルケン基、ジエン基などのいろいろな基が存在するであろう。あるいは、細孔を開ける電子ビームによって、周辺の基に構造の再組織化が起こり、5 員環などの新しい構造ができるかもしれない[16]。これらの周辺構造は、さらに再配列や加水分解が起こりやすく、ナノ細孔の再現性がなくなったり、不安定化したりするのだろうか。また、ナノ細孔を共有結合的に修飾して、塩基認識を容易にできるのであろうか。

重要なのは、グラフェンの表面を安定化処理して化学的に不活性化する必要があるかもしれないこと、そして表面状態にかかわらず細孔を化学的に修飾する必要があるかもしれないことである。これらはやっかいな課題となる。物理学的観点からは、超高速 DNA シーケンシング

©2010 NPG Nature Asia-Pacific. All rights reserved

には、電気的にアドレス可能な大型のナノ細孔アレイが必要であろう。これには、グラフェンシートの細孔[13]よりも、グラフェンリボンのナノスケールギャップ[17]を利用するほうが、対処しやすいかもしれない。

ナノ細孔アレイを用いた単一分子DNAシーケンシングによって、短時間でゲノム配列を決定できる可能性がある。それは、革新的といってもよい技術であり、例えば個人個人に合ったがん治療など数多くのゲノム配列を知る必要があるとき、他の追随を許さないものとなるであろう。今回のグラフェンナノ細孔を用いた初の実験[4–6]は、ナノ細孔DNAシーケンシングの実現を阻む障害[2]をクリアする強力な方法を提示するものである。■

（翻訳：藤野正美）

Hagan Bayley、オックスフォード大学化学科。

1. Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. & Deamer, D. W. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 13770–13773 (1996).
2. Branton, D. *et al. Nature Biotechnol.* **26**, 1146–1153 (2008).
3. Schloss, J. A. *Nature Biotechnol.* **26**, 1113–1115 (2008).
4. Garaj, S. *et al. Nature* **467**, 190–193 (2010).
5. Schneider, G. F. *et al. Nano Lett.* **10**, 3163–3167 (2010).
6. Merchant, C. A. *et al. Nano Lett.* **10**, 2915–2921 (2010).
7. Geim, A. K. *Science* **324**, 1530–1534 (2009).
8. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes* 3rd edn (Sinauer, 2001).
9. Kim, M. J., Mcnally, B., Murata, K. & Meller, A. *Nanotechnology* **18**, 205302 (2007).
10. Song, L. *et al. Science* **274**, 1859–1865 (1996).
11. Dekker, C. *Nature Nanotechnol.* **2**, 209–215 (2007).
12. Thundat, T. *Nature Nanotechnol.* **5**, 246–247 (2010).
13. Postma, H. W. C. *Nano Lett.* **10**, 420–425 (2010).
14. Meyer, J. C. *et al. Nature* **446**, 60–63 (2007).
15. Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W. & Ruoff, R. S. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 228–240 (2010).
16. Chuvilin, A., Kaiser, U., Bichoutskaia, E., Besley, N. A. & Khlobystov, A. N. *Nature Chem.* **2**, 450–453 (2010).
17. Wang, X. & Dai, H. *Nature Chem.* **2**, 661–665 (2010).

©2010 NPG Nature Asia-Pacific. All rights reserved