主論文の要約

論文題目 **Study on fabrication and analysis of solid-state nanopores for direct DNA sequencing**
(DNA 直接解読に向けたソリッドステートナノポアの作製と解析の研究)

氏名 柳 至

論文内容の要約

ナノポアを用いた生体分子の非標識検出技術は近年非常に注目を集めている。その原理は、対象となる生体分子がナノポアを通過する際に変動する電流変化をもって、対象物の大きさや構造を決定するというものである。ナノポアを用いた検出法の最も有名なアプリケーションとしては、単分子の DNA シーケンシングが挙げられる。2014 年、オックスフォードナノポアテクノロジーズ社は、自身らが開発した開発したバイオ材料を用いたナノポア DNA シーケンサ(MinION)を一部研究機関に配布し、 β テストを開始した。現在では、多数の研究者から MinION を用いた DNA シーケンシングに関する報告がなされており、MinION を用いて M13 genomic DNA の配列決定を 85%もの精度で行えたといった報告もある。このようなバイオ材料を用いたナノポアの他に、固体無機材料で形成されたナノポア(以下、ソリッドステートナノポア)も注目を集めている。ソリッドステートナノポアは主に半導体関連の無機材料で形成され、バイオ材料を用いたナノポアにくらべロバストであるという利点がある。しかしながら、現在のところ、ソリッドステートナノポアで DNA シーケンシングを達成したという報告はない。本論文はこの達成に向けて、ソリッドステートナノポアの形成と解析に関するいくつかの研究を行ったものである。

第 1 に、迅速かつ正確なナノポアの形成方法に関する研究を行った。従来、ナノポアの形成は、TEM 装置を用いてメンブレンへ電子線照射をすることで行っていた。この方法は、直径数 nm の DNA シーケンシングに適したナノポアを形成することが可能である一方、ナノポア形成のスループットとナノポアサイズのばらつきが量産に向けての大きな課題であった。そこで今回、メンブレンの絶縁破壊を利用した迅速かつ高精度なナノポアの形成方法を提案し、その実証を行った。提案手法は、メンブレンにナノポアを形成するための高

電圧パルス印加する工程と、パルス印加後に低電圧でメンブレンを通過する電流をモニタしナノポアの形成を判断する工程を繰り返すという方法である。さらに、ナノポアが形成された後は、中間電圧パルスを加えることで、ナノポアの径を所望の大きさにチューニングする。上述した方法を用いて、厚み 10 nm の SiN メンブレンに直径 1-3 nm のナノポアをサブ nm 精度で形成できることを実証した。

第 2 に、DNA シーケンシングの際の塩基識別能(空間分解能)向上に向けて、薄膜 SiN メンブレン形成に関する研究を行った。従来我々が使用していた SiN メンブレンは、その製造工程の最後で、メンブレンの上部に位置する酸化膜犠牲層をフッ酸水溶液を用いて除去することで形成していた。この製造方法では、膜厚 7 nm 以下の SiN メンブレンを割れ欠けなく形成することが困難であった。これは、フッ酸による SiN メンブレンへのダメージや、酸化膜犠牲層とその上部の SiN カバー層の強い応力が原因であると推測されていた。そこで、酸化膜犠牲層を poly-Si 犠牲層に代えて応力を緩和し、また poly-Si 犠牲層の除去を KOH で行うことにより、SiN メンブレンへのダメージを抑制することを考えた。本プロセスを適用してメンブレンを試作した結果、膜厚 3 nm の SiN メンブレンまで安定して形成できることが分かった。

第 3 に、KCl 水溶液中における、極薄 SiN メンブレンの絶縁破壊挙動の膜厚依存性に関して研究を行った。具体的には、絶縁破壊によって形成されるナノポアの大きさの膜厚依存性と、絶縁破壊電界の膜厚依存性を調べた。その結果、膜厚が厚くなるにつれて、形成されるナノポアの大きさが大きくなることが分かった。これは、膜厚が厚くなるにつれてナノポアを形成する際に生じるジュール熱も増大するためと考えている。また、メンブレンの膜厚が 5 nm を下回ると絶縁破壊電界が急激に低下することが分かった。この傾向は、よく知られる MOS トランジスタの絶縁破壊現象と同じであった。MOS トランジスタの絶縁破壊の場合、膜厚 4-5 nm 以下で直接トンネル電流が増大するため、絶縁破壊電界が低下する。今回の我々の結果は、それと同様のことが起きている可能性を示唆していると考えている。さらに、メンブレンの膜厚が薄くなるにつれて、絶縁破壊時のリーク電流の上昇が不明確になっていくという現象（ハードブレイクダウンからソフトブレイクダウンへの移行）も確認された。これも MOS トランジスタの絶縁破壊現象と類似していた。

第 4 に、ナノポアアレイの電流計測に関する検討を行った。アレイ化はナノポアセンシングのスループット向上の為の有力な手段である。今回、隣接する SiN メンブレンに形成されたナノポア間の電流クロストークを詳細に調べた。その結果、ナノポアチップの表面で隣接ナノポア間の水溶液を分離した場合は、隣接ナノポア間の電流クロストークは確認されなかった。一方、ナノポアチップの裏面で隣接ナノポア間の水溶液を分離した場合、隣接ナノポア間で電流クロストークが確認された。原因を調べたところ、Si 基板を介した隣接チャンバ間の容量カップリングならびに、Si 基板を通じてのリーク電流が原因であることが分かった。そしてこの対策として Si 基板表面を酸化したところ、ナノポアチップの裏面で隣接ナノポア間の水溶液を分離した場合でも、電流クロストークが抑制されること

が分かった。さらに Si 基板表面を酸化する際に SiN メンブレンの一部も酸化され、これが封鎖電流値(ナノポアを DNA が通過する際の電流減小値)に大きく影響することも分かった。

第 5 にセンサ電極埋め込み型ナノポアセンサに関する研究を行った。特に、ナノポアの脇に Si チャネルを配置したナノポア FET センサを提案し、その試作と評価を行った。本センサは、Si チャネルが極薄(2 nm)であり、極めて高い空間分解能が期待される。また DNA がナノポア通過時に変動させる電場の範囲が狭いため、センサを高集積化できることも利点である。試作したセンサを評価した結果、p 型 n 型の両方のナノポア FET センサで、チャネル膜厚 2 nm のトランジスタ動作を確認することが出来た。また p 型のナノポア FET センサを用い、DNA がナノポア通過時に引き起こす電位変動を検出することができた。

以上 5 つの研究は、ソリッドステートナノポアの形成と解析に関して、非常に有益な情報をもたらしたと考えている。ソリッドステートナノポアを用いた DNA シーケンシングの実現に向けては、今回触れた課題以外にも幾つか課題がある。中でも大きいのが、ナノポア中での DNA の運動制御法の確立である。現状、ナノポア中での DNA の揺らぎが大きく、これがソリッドステートナノポアでの DNA シーケンシングを難しくしている。この課題に対しては我々を含む世界中の研究者が現在取り組んでおり、徐々に答えに近づいていると考えている。従って、近い将来に DNA 運動制御方法も確立され、ソリッドナノポアによる DNA シーケンシングが実現すると私は考えている。