

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年12月22日(22.12.2022)



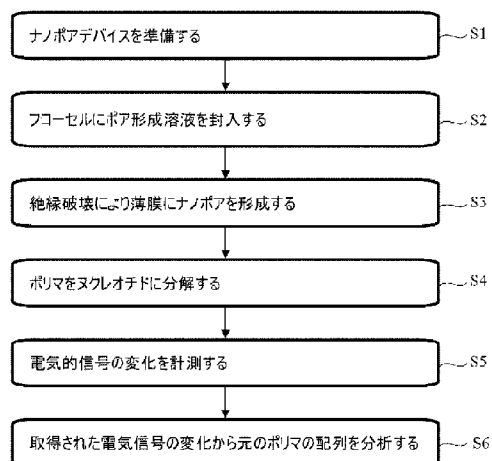
(10) 国際公開番号  
**WO 2022/264243 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*CI2Q 1/6869* (2018.01) *G01N 27/02* (2006.01)  
*CI2M 1/42* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/022614
- (22) 国際出願日: 2021年6月15日(15.06.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社日立ハイテク  
(**HITACHI HIGH-TECH CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1056409 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 赤堀 玲奈(**AKAHORI Rena**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 中川 樹生(**NAKAGAWA Tatsuo**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). グエンファム ハイフイ(**NGUYENPHAM Hai Huy**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所  
(**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー32階 Tokyo (JP).

(54) **Title:** BIOMOLECULE ANALYSIS METHOD, BIOMOLECULE ANALYZING REAGENT, AND BIOMOLECULE ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称: 生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイス

図1



- S1 Prepare nanopore device  
S2 Encapsulate pore-forming solution in flow cell  
S3 Form nanopores in thin film by dielectric breakdown  
S4 Degrade polymer into nucleotides  
S5 Measure change in electrical signal  
S6 Analyze original polymer array from change in acquired electrical signal

(57) **Abstract:** This biomolecule analysis method is characterized by including: preparing a biomolecule analysis device provided with a thin film having nanopores with diameters in the range of  $\pm 20\%$  of the diameters of biomolecules, a first liquid tank and a second liquid tank separated by the thin film, a first electrode disposed in the first liquid tank, a second electrode disposed in the second liquid tank, and a biopolymer degradation mechanism that degrades a biopolymer into the biomolecules; degrading the biopolymer into the biomolecules in the biopolymer degradation mechanism; and applying a voltage between the first electrode and the second electrode, under conditions where a measurement solution is enclosed in the first liquid tank and the second liquid tank, to measure a current flowing between the first electrode and the second electrode. The biomolecule analysis method is also characterized in that said measurement liquid comprises



WO 2022/264243 A1

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

ammonium ions and sulfate ions.

(57) 要約 : 本開示の生体分子分析方法は、生体分子の直径の±20%の範囲の直径を有するナノポアを有する薄膜と、前記薄膜により隔てられる第1の液槽及び第2の液槽と、前記第1の液槽に配置される第1の電極と、前記第2の液槽に配置される第2の電極と、生体ポリマを前記生体分子に分解する生体ポリマ分解機構と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、前記生体ポリマ分解機構において生体ポリマを前記生体分子に分解することと、前記第1の液槽及び前記第2の液槽に計測溶液が封入された状態で、前記第1の電極及び前記第2の電極間に電圧を印加して、前記第1の電極及び前記第2の電極間に流れる電流を計測することと、を含み、前記計測溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする。

## 明 細 書

発明の名称：

生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイス

技術分野

[0001] 本開示は、生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイスに関する。

背景技術

[0002] 次世代DNAシーケンサの分野では、伸長反応や蛍光ラベルを行うことなく、DNAの塩基配列を電氣的に直接計測する方法が注目されている。具体的には、ナノポアDNAシーケング方式の研究開発が活発に進められている。この方式は、試薬を用いることなくDNA鎖を直接計測し、塩基配列を決定する方式である。

[0003] ナノポアDNAシーケンシング方式では、薄膜に形成された細孔（以下「ナノポア」という。）をDNA鎖が通過することで生じる封鎖電流を計測することにより、塩基配列を計測する。DNA鎖に含まれる個々の塩基種の違いにより封鎖電流が変化するので、封鎖電流量を計測することで塩基種を順次同定することができる。この方式では、蛍光標識した基質を酵素の伸長活性により取り込み解析する方式とは異なり、直接DNA鎖の情報を取得することになるため、その読み取り塩基長さは酵素の伸長活性に限定されず原理的に長鎖のDNA解読が可能であり、DNA鎖への修飾も直接解読することができる。

[0004] ナノポアDNAシーケンシング方式においてDNAを分析する際に使用する生体分子分析デバイスは、一般的に、電解質溶液が満たされている第1及び第2の液槽と、その第1及び第2の液槽を仕切る薄膜と、第1の液槽に設けられる第1の電極及び第2の液槽に設けられる第2の電極とを備える。生体分子分析デバイスは、アレイデバイスとして構成することもできる。アレイデバイスは、薄膜によって仕切られる液室の組を複数個備えるデバイスを

いう。例えば第1の液槽を共通槽とし、第2の液槽を複数個の個別槽とする。この場合、共通槽と個別槽の各々に電極を配置する。

[0005] この構成において、第1の液槽と第2の液槽の間に電圧が印加されると、ナノポアにはナノポア径に応じたイオン電流（ベースライン電流）が流れる。また、ナノポアには、印加した電圧に応じた電位勾配が形成される。DNAなどの生体分子を第1の液槽に導入すると、拡散及び電位勾配に応じて、生体分子がナノポアを介して第2の液槽へ搬送される。このとき、ナノポアを封鎖する、各核酸の封鎖率に応じて生体分子内の分析が実施される。なお、生体分子分析装置は、生体分子分析デバイスに設けられた第1及び第2の電極の間に流れるイオン電流（封鎖信号）を測定する測定部を有し、測定部は、測定されたイオン電流（封鎖信号）の値に基づいて生体分子の配列情報を取得する。

[0006] ナノポアをDNAが閉塞することによって発生する封鎖信号は、ナノポア内部の封鎖、並びにナノポア入口及び出口に滞留する物質に依存して発生する。したがって、DNA鎖の分解能は、このナノポア内部の抵抗、並びにナノポアの入口及び出口の抵抗成分によって決定される。ここで、ナノポアDNAシーケンシングにおいてはDNAを鎖のまま解析することが前提とされている。しかしながら、DNAのナノポア通過速度を制御するためにナノポア入口に酵素を配置する場合があります、この酵素も封鎖抵抗成分の一つとなりうる。また、DNAがナノポアの入口及び出口でコイル状をとることによってもナノポアの入口及び出口の抵抗成分が変化する。これらの抵抗成分に起因する封鎖信号量の変化は、塩基の種類に応じた電流信号の変化量を検出する際の妨げになる。

[0007] 抵抗成分に起因する封鎖信号量の変化を避けるために、鎖状のDNAを解析するのではなく、ヌクレオチドに分解して各ヌクレオチドの封鎖量に基づいて一塩基ずつ塩基種を決定する手法が考えられる。

[0008] 非特許文献1には、バイオナノポアを用いてKC1溶液にてヌクレオチドの分離度を計測することが記載されている。一方、非特許文献2には、ヌク

レオチドをナノポアに通過させて信号の分離度を確かめることが記載されている。

## 先行技術文献

## 非特許文献

[0009] 非特許文献1: Clark, J. et al., Nature Nanotechnology, DOI: 10.1038/NNANO.2009.12

非特許文献2: Yang, H. et al., J. Phys. Chem. B 2018, 122, 7929–7935

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0010] ところで、固体ナノポアはLSIとの親和性が高いことから、高集積化が期待されている。また、固体ナノポアはデバイス保管期間を長期化できることから、低コスト化実現への期待が高い。非特許文献1においては、バイオナノポアを用いた計測について記載されており、固体ナノポアについては検討がなされていない。

[0011] 非特許文献2においては、固体ナノポアでヌクレオチドを計測した結果の封鎖信号の分離度が低いため、一塩基がナノポアを通過した際の封鎖信号をヌクレオチド種に変換することが困難であることが予想される。

[0012] そこで、本開示は、固体ナノポアにおける生体分子の識別能を向上する技術を提供する。

### 課題を解決するための手段

[0013] 本開示の生体分子分析方法は、生体分子の直径の±20%の範囲の直径を有するナノポアを有する薄膜と、前記薄膜により隔てられる第1の液槽及び第2の液槽と、前記第1の液槽に配置される第1の電極と、前記第2の液槽に配置される第2の電極と、生体ポリマを前記生体分子に分解する生体ポリマ分解機構と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、前記生体ポリマ分解機構において生体ポリマを前記生体分子に分解することと、前記第1の液槽及び前記第2の液槽に計測溶液が封入された状態で、前記第1の

電極及び前記第2の電極間に電圧を印加して、前記第1の電極及び前記第2の電極間に流れる電流を計測することと、を含み、前記計測溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする。

[0014] 本開示に関連する更なる特徴は、本明細書の記述、添付図面から明らかになるものである。また、本開示の態様は、要素及び多様な要素の組み合わせ及び以降の詳細な記述と添付される請求の範囲の様態により達成され実現される。本明細書の記述は典型的な例示に過ぎず、本開示の請求の範囲又は適用例を如何なる意味に於いても限定するものではない。

### 発明の効果

[0015] 本開示の技術によれば、固体ナノポアにおける生体分子の識別能を向上することができる。上記以外の課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

### 図面の簡単な説明

- [0016] [図1]生体分子分析方法を示すフローチャートである。  
[図2A]生体分子分析装置の構成を示す概略断面図である。  
[図2B]前処理フローを示す模式図である。  
[図3]生体分子分析装置の他の構成を示す概略断面図である。  
[図4A]実験例1の結果を示すグラフである。  
[図4B]実験例1の結果を示すグラフである。  
[図5A]実験例2の結果を示すグラフである。  
[図5B]実験例2の結果を示すグラフである。  
[図5C]実験例2の結果を示すグラフである。  
[図5D]実験例2の結果を示すグラフである。  
[図6A]実験例3の結果を示すグラフである。  
[図6B]実験例3の結果を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0017] 以下、図面に基づいて、本開示の実施形態を説明する。なお、添付の図面は、本開示の原理に則った具体的な実施形態を示しているが、それらは本開

示の技術の理解のためのものであり、決して本開示の技術を限定的に解釈するためのものではない。

[0018] 本開示において「生体分子」とは、例えば、核酸（DNA、RNA、PNAなど）を構成するヌクレオチド及びそのアナログ、並びに、タンパク質を構成するアミノ酸及びその改変体を指し、天然物か人工物かを問わない。

[0019] また、本開示において、生体分子の「分析」とは、生体分子の特性解析を指す。生体分子の特性解析には、例えば、核酸のモノマの配列順序の分析（配列決定）、核酸の長さの決定、一塩基多型の検出、生体分子中の構造多型（コピー数多型、挿入、欠失など）の検出などがある。

[0020] [生体分子分析方法]

図1は、第1の実施形態に係る生体分子分析方法を示すフローチャートである。以下、生体ポリマの一例として核酸を用い、生体分子の一例としてヌクレオチドを計測する場合について説明する場合がある。

[0021] (ステップS1：生体分子分析装置の準備)

ステップS1において、作業者は、ソリッドステート式のナノポアデバイス（生体分子分析デバイス）を備える生体分子分析装置を準備する。具体的には、例えば、ナノポアデバイスは、ナノポアが形成されるべき薄膜を備え、フローセルに薄膜を設置することにより作製することができる。これにより、薄膜の両側にそれぞれ液槽が形成される。一方の液槽（第1の液槽）に第1の電極を配置し、他方の液槽（第2の液槽）に第2の電極を配置する。このようなナノポアデバイスの第1の電極及び第2の電極の間に電圧を印加する電源を接続する。また、作業者は、第1の電極及び第2の電極間の電流を計測する電流計を設置する。これにより、生体分子分析装置が準備される。

[0022] 本実施形態の生体分子分析装置には、ナノポアが形成される薄膜より上流側に配置される生体ポリマ分解部が設けられる。生体ポリマ分解部は、生体ポリマが流れる流路を有し、流路中で生体ポリマをモノマ（生体分子）に分解する。流路には、例えば生体ポリマの分解酵素（エキソヌクレアーゼ及び

その類似物など）、高濃度の酸（ピロリン酸若しくは塩酸など）など、生体ポリマを分解可能な物質が配置されている。代替的に、生体ポリマ分解部は、流路に生体ポリマを分解可能なレーザ光が照射されるように構成されていてもよい。

[0023] (ステップS 2 : ナノポア形成溶液の封入)

ステップS 2において、作業者は、フローセルの供給口から、第1の液槽及び第2の液槽にナノポア開孔用のナノポア形成溶液（電解質溶液）を封入する。

[0024] (ステップS 3 : ナノポアの開孔)

ステップS 3において、作業者は、電源を駆動して第1の電極及び第2の電極間にナノポア開孔用の電圧を印加し、絶縁破壊により、所定の直径のナノポアを薄膜に形成する。

[0025] (ステップS 4 : 生体ポリマの分解)

ステップS 4において、作業者は、電源を駆動して第1の電極及び第2の電極間に分析用の電圧を印加し、サンプル注入口から計測対象である生体ポリマ（核酸）が含まれる計測溶液を封入する。その後、生体ポリマは流路内を泳動し、生体ポリマ分解部を通過する際に生体分子（ヌクレオチド）に分解され、各生体分子（ヌクレオチド）は、第1の液槽に導入される。

[0026] (ステップS 5 : 計測)

ステップS 5において、作業者は、電流計により、第1の電極及び第2の電極からの電気的信号（電流値）の変化を計測する。

[0027] (ステップS 6 : 生体分子の分析)

ステップS 6において、例えばコンピュータ装置により、電気的信号の変化に基づいて、生体分子を分析する。生体分子がナノポアを通過する際にモノマ種別（塩基種別）によって電気的信号が変化するため、その電気的信号のパターンによって配列決定を行うことが可能である。このような方法の詳細は文献 (A.H. Laszlo, et al., Nature Biotechnology 32, 829, 2015) に開示されている。



[0028] (ナノポア径及び電解質溶液について)

本発明者は、ヌクレオチドの分析に用いられる電解質溶液について鋭意検討を行った結果、予想外にも、電解質のカチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含む計測溶液を用いた場合に、ナノポア径が1.4 nm以上ではヌクレオチド由来の信号が確認できないのに対し、ナノポア径を1 nmよりも小さくすると、ヌクレオチド由来の信号が明瞭に確認され始め、かつ生体ポリマを構成する4種ヌクレオチド由来の封鎖量が明瞭に異なることを見出した。すなわち、生体分子の直径の±20%以下の直径を有する(具体的には、例えば直径1 nm以下の)ナノポアを用い、計測溶液としてアンモニウムイオン及び硫酸イオンを含む電解質溶液を用いることにより、生体分子の識別能を向上できることを見出された。

[0029] したがって、本実施形態の生体分子分析方法において、計測溶液(以下、単に「電解質溶液」という場合がある)は、電解質のカチオンとしてアンモニウムイオン( $\text{NH}_4^+$ )を含み、かつ、アニオンとして硫酸イオン( $\text{SO}_4^{2-}$ )を含む。すなわち、電解質溶液の電解質は、カチオンとしてアンモニウムイオンを生成し、アニオンとして硫酸イオンを生成するものである。ナノポア形成溶液及び計測溶液の両方が、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むこともできる。

[0030] アンモニウムイオン及び硫酸イオンを生成する電解質(塩)としては、例えば硫酸アンモニウムを用いることができる。また、電解質として、溶媒中で電離する硫酸塩及びアンモニウム塩を用いることもできる。硫酸塩としては、例えば硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸銅、硫酸鉄などが挙げられる。アンモニウム塩としては、例えば塩化アンモニウム、炭酸アンモニウムなどが挙げられる。

[0031] 電気伝導度を確保するために、電解質溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオン以外のイオンを含んでいてもよい。カチオンは、例えば任意の金属イオンから選択することができる。ただし、例えばカリウムイオン等の一価の金属イオン類は、SiN表面の未結合手の結合乖離を促進する虞がある。

また、二価の金属イオンは、ベースライン電流に重畳されるノイズの低減に一定の効果はあるが、高濃度に存在すると他イオンと反応して沈殿を生成させる原因となる。したがって、電解質溶液にアンモニウムイオン以外のカチオンを含める場合は、その種類及び濃度を適切に調整する必要がある。アニオンは、電極材質との相性によって選定することができる。例えば電極材質としてハロゲン化銀を用いた場合、電解質溶液に含まれるアニオンは、ハロゲン化物イオン（塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン）とすることができる。あるいは、アニオンは、グルタミン酸イオン等に代表される有機アニオン類であってもよい。

[0032] すなわち、電解質溶液には、硫酸アンモニウム、若しくは、硫酸塩及びアンモニウム塩以外の電解質（塩）を共存させることができる。このような電解質には、例えばKCl、NaCl、LiCl、CsClなどが挙げられる。電極にプラチナやAuを用いる際にはフェリシアン、フェロシアンを共存させてもよい。また、生体分子の任意の搬送制御を行う場合の一つの手段として分子モータを用いる場合には、第1の液槽の電解質溶液には、基質と、分子モータの駆動に適したバッファとを共存させる。生体分子の安定化のため、緩衝剤を混在させることも可能である。一般には緩衝剤としてMgSO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>、Tween（登録商標）、HEPES、Tris-HCl、EDTA、グリセロールなどを混在させることができる。

[0033] 電解質溶液の溶媒としては、生体分子を安定に分散可能であり、かつ電極が溶媒に溶解せず、電極との電子授受を阻害しない溶媒を用いることができる。電解質溶液の溶媒として、例えば、水、アルコール類（メタノール、エタノール、イソプロパノールなど）、酢酸、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどが挙げられる。生体分子として核酸を測定対象とする場合、典型的には水が用いられる。

[0034] 電解質濃度の下限を設けることで、信号対ノイズ比（SNR）を向上することができる。具体的には、例えば電解質濃度の下限を0.01Mとすることができる。一方、電解質濃度の上限を妨げる要件はなく、飽和濃度まで許

容することができる。すなわち、電解質溶液が電解質（塩）として硫酸アンモニウムのみを含む場合、硫酸アンモニウム濃度は、0.01 M以上飽和濃度以下とすることができ、場合に応じて、0.01 M以上4 M以下、又は0.01 M以上2 M以下とすることができる。

[0035] 電解質溶液が電解質（塩）として硫酸アンモニウム及び他の塩を含む場合、塩濃度の合計に対する硫酸アンモニウム濃度の割合は、5%以上100%未満とすることができる。場合に応じて、塩濃度の合計に対する硫酸アンモニウム濃度の割合は、25%以上100%未満、又は50%以上100%未満とすることができる。

[0036] 電解質溶液が電解質として硫酸塩、アンモニウム塩及び他の塩を含む場合、アニオン濃度の合計に対する硫酸イオン濃度の割合は、5%以上100%未満とすることができる。場合に応じて、アニオン濃度の合計に対する硫酸イオン濃度の割合は、25%以上100%未満、又は50%以上100%未満とすることができる。また、カチオンの濃度の合計に対するアンモニウムイオン濃度の割合は、5%以上100%未満とすることができる。場合に応じて、カチオン濃度の合計に対するアンモニウムイオン濃度の割合は、25%以上100%未満、又は50%以上100%未満とすることができる。

[0037] ナノポアは、絶縁破壊に限らず、予め微細加工やTEM装置を用いた加工などにより形成することもできる。この場合、上述のステップS1において、作業者は、予めナノポアが形成された薄膜を用いてナノポアデバイスを組み立て、ステップS2及びS3は実施しない。

[0038] また、ステップS2及びS3で用いたナノポア形成溶液を計測溶液に置換することなく、ナノポア形成溶液を用いて計測することも可能である。この場合、ナノポア形成溶液は、上述の計測溶液と同様に、電解質のカチオンとしてアンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) を含み、かつ、アニオンとして硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) を含む。また一方で、上述のステップS4のように生体分子にとってより好適な計測溶液に置換することで、より正確に生体分子の解析を実現できる。

## [0039] (まとめ)

以上のように、本実施形態に係る生体分子分析方法は、生体分子の直径の±20%以下の直径を有するナノポアを有するナノポアデバイスを用い、計測溶液が、カチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含む。それ以外は、従来法と同じ装置、工程及び条件を使用して実施することができる。このような計測溶液を使用することによって、ナノポアを通過する生体分子（ヌクレオチド）由来の封鎖信号量のばらつきを低減することができ、通過している生体分子（ヌクレオチド）の種類を高い信号対ノイズ比で判定することができる。また、生体分子の直径の±10%以下の直径のナノポアを用いることにより、生体分子由来の封鎖信号量のばらつきをより低減することができる。特に、直径が1nm以下のナノポアによりヌクレオチドを計測することで、ヌクレオチド由来の封鎖信号を検出することができる。このとき、各種ヌクレオチド由来の封鎖信号量の分散が低減されるため、各ヌクレオチド種の判定が容易となる。

## [0040] [生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイス]

本開示の生体分子分析試薬は計測用消耗品として提供することができ、上述した電解質溶液の電解質を構成要素として含む。すなわち、生体分子分析キットの内、生体分子分析試薬は溶液とした場合、カチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含む。生体分子分析試薬は、計測試薬（場合に応じて、ナノポア形成用試薬及び計測試薬）として使用される。また、生体分子分析デバイス（ナノポアデバイス）は計測用消耗品として提供され、上述した寸法のナノポアを構成要素として含む。生体分子分析デバイスは、あらかじめ1nm以下のナノポアが形成された状態で提供することができる。あるいは、生体分子分析デバイスは、薄膜のみの状態で提供することができ、計測直前に生体分子分析装置にセットされた後に、1nm以下のナノポアが形成される。

[0041] 本開示の生体分子分析キットは、使用手順及び使用量などを記載した説明書と共に提供され得る。生体分子分析試薬は、即時使用可能な状態（上述の

ナノポア形成溶液及び計測溶液)で提供されてもよいし、使用時に適当な溶媒で希釈するための濃縮液として提供されてもよいし、あるいは使用時に適当な溶媒で再構成するための固形状態(例えば粉末など)であってもよい。そのような生体分子分析試薬の形態及び調製は、当業者であれば理解することができる。生体分子分析デバイスは、生体分子分析試薬に接した状態で提供されてもよいし、計測直前に生体分子分析装置にセットされてから試薬に接してもよい。

[0042] ナノポア形成用試薬は、薄膜の両側に形成された2つの液槽間に電圧を印加して絶縁破壊によりナノポアを形成する際に使用される。計測試薬は、ナノポアに生体分子を通過させ、ナノポアを流れる電流(封鎖電流)を測定する際に使用される。ナノポア形成用試薬の電解質の濃度と、計測試薬の電解質の濃度とは、同じであってもよいし異なってもよい。また、ナノポア形成用試薬は従来の組成の試薬であってもよい。これらの試薬及びデバイスは、ナノポア形成用試薬及び計測試薬及びデバイスのセットとして使用者に提供されてもよいし、それぞれ別個に提供されてもよい。

[0043] (まとめ)

以上のように、本実施形態に係る生体分子分析キットには生体分子分析試薬が含まれており、計測溶液とした場合に、カチオンとしてアンモニウムイオンを生成し、かつアニオンとして硫酸イオンを生成する。生体分子分析デバイスの薄膜には、ナノポア形成溶液により1nmのナノポアを作製することができる。このような生体分子分析用キットを使用することによって、ナノポアを通過する生体分子(ヌクレオチド)由来の封鎖信号量のばらつきを低減することができ、通過している生体分子(ヌクレオチド)の種類を高い信号対ノイズ比で判定することができる。

[0044] [生体分子分析装置]

図2Aは、第1の実施形態に係る生体分子分析装置1の構成を示す概略断面図である。生体分子分析装置1は、前処理機構(生体ポリマ分解機構)において生体ポリマを分解し、封鎖電流方式にてイオン電流を測定することで

、分解してできた生体分子の特性を計測する装置である。

[0045] 図2Aに示すように、生体分子分析装置1は、ナノポアデバイス100、電流計106、電源107、コンピュータ108及び生体ポリマ分解機構110を備える。ナノポアデバイス100は、ナノポア101が形成された薄膜102、第1の液槽104A及び第2の液槽104B、第1の電極105A及び第2の電極105Bを備える。第1の液槽104A及び第2の液槽104Bは、薄膜102を挟んで薄膜102と接するように配置され、その内部に電解質溶液103が満たされている。第1の電極105Aは第1の液槽104Aに設けられ、第2の電極105Bは第2の液槽104Bに設けられる。

[0046] 図2Aのナノポアデバイス100は、薄膜102にナノポア101が形成され、生体ポリマ分解機構110により分解されてできた産物である生体分子109が順次ナノポア101に導入される状態が示されている。

[0047] 生体分子109は、ナノポア通過時に電気的特性、特に抵抗値を変化させる測定対象物であれば良く、典型的には一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）を構成するヌクレオチド、タンパク質を構成するアミノ酸、又はこれらの改変体（例えば、ヌクレオチドアナログ）などである。ナノポアデバイス100において、生体ポリマを構成するヌクレオチド配列を解析する際には、生体分子109はその配列に応じてナノポアを通過する必要がある。生体分子109にナノポア101を通過させる手段としては、電気泳動による搬送を採用することができるが、圧力ポテンシャル差などで発生させた溶媒流であってもよい。

[0048] 電解質溶液103は、前述のナノポア形成溶液又は計測溶液である。電解質溶液103の容量は、例えばマイクロリットルオーダー又はミリリットルオーダーである。

[0049] 電源107は、第1の電極105A及び第2の電極105B間に所定の電圧を印加する。第1の電極105A及び第2の電極105B間に電圧が印加されると、ナノポア101が形成された薄膜102の両面の間に電位差が生

じ、上側の第1の液槽104A (cis槽) に溶解している生体分子109が、下側に位置する第2の液槽104B (trans槽) の方向に泳動される。

[0050] 電流計106は、第1の電極105A及び第2の電極105B間に流れるイオン電流(封鎖信号)を計測し、計測値をコンピュータ108に出力する。電流計106は、電圧の印加によって電極間に流れる電流を増幅するアンプと、ADC (Analog to Digital Converter) とを有している(図示せず)。ADCの出力である検出値がコンピュータ108に出力される。

[0051] コンピュータ108は、電源107による第1の電極105A及び第2の電極105Bへの印加電圧を制御する。また、コンピュータ108は、電流計106からの電流の検出値に基づいて、生体分子109を分析する。より具体的には、コンピュータ108は、イオン電流(封鎖信号)の値に基づいて生体分子109の配列情報を取得する。

[0052] 本開示の技術が効果を発揮する最も有力なナノポア計測方式は、上記のように封鎖電流を計測する方式であるが、情報を補填するために、以下の方法を追加することも可能である。一つは、第1の電極105A及び第2の電極105B以外にもう一对の電極をナノポア近傍に設け、該一对の電極の間に電圧を印加し、生体分子が通過した際に発生するトンネル電流の変化を計測する方法である。その他に、FETデバイスをナノポアメンブレンに設け、デバイスで取得されるトランジスタの信号変化を計測する方法がある。また、ナノポア近傍に金又は銀で作製されたボウタイを形成したり、金又は銀の微粒子二量体を配置したりした上で、光を照射して近接場を発生することでラマン散乱光を計測する方法がある。そのほかにも、ナノポア近傍に照射された光の吸収、反射、蛍光特性などの光学的信号を計測することも可能である。

[0053] コンピュータ108は、典型的には、イオン電流計測装置、アナログデジタル出力変換装置、データ処理装置、データ表示出力装置及び入出力補助装置を備える。イオン電流計測装置には電流電圧変換型の高速増幅回路が搭載

される。データ処理装置には演算装置、一時記憶装置、不揮発性記憶装置が搭載される。ナノポアデバイス100をファラデーケージで覆うことで、外部ノイズを低減することができる。

[0054] なお、図2Aに示すように、電流計106、電源107及びコンピュータ108をナノポアデバイス100に対して別部材とするのではなく、ナノポアデバイス100と一体構成としても良い。

[0055] 以下では、前述した生体分子分析装置1の作製方法について説明する。いわゆる封鎖電流方式で生体分子の分析に用いられる生体分子分析装置の基本的な構成自体は当技術分野で既知であり、その構成要素も当業者であれば容易に理解することができる。例えば、米国特許第5795782号、“Scientific Reports 4, 5000, 2014, Akahori, et al.”、“Nanotechnology 25(27):275501, 2014, Yanagi, et al.”、“Scientific Reports, 5, 14656, 2015, Goto, et al.”、“Scientific Reports 5, 16640, 2015”に具体的なデバイスが開示されている。

[0056] ナノポア101が形成される薄膜102は、半導体微細加工技術で形成できる材質からなる薄膜（ソリッドポア）である。半導体微細加工技術で形成できる材質としては、例えば窒化ケイ素（SiN）、酸化ケイ素（SiO<sub>2</sub>）、酸窒化ケイ素（SiON）、酸化ハフニウム（HfO<sub>2</sub>）、二硫化モリブデン（MoS<sub>2</sub>）、グラフェンなどがある。薄膜102の厚さは、1Å（オングストローム）～200nmとすることができ、場合に依じて1Å～100nm、又は1Å～50nmとすることができ、具体的には例えば約5nmとすることができる。

[0057] 薄膜102の面積は、電圧の印加によるナノポア101の形成の際に2個以上のナノポア101が形成され難い面積であり、かつ、強度上許容される面積とすることができる。一例として、当該面積は、例えば100～500nm<sup>2</sup>程度とすることができる。また、薄膜102の膜厚は、一塩基相当の実効膜厚を有するナノポア101を形成可能な膜厚とすることによって、DNAの一塩基分解能を達成することができる。一例として、膜厚は7nm程度



かそれ以下とすることができる。なお、薄膜102は、貫通孔を有する他の薄膜によって両面が挟まれた構造であってもよく、この場合は、両面側の貫通孔によって露出する薄膜102の面積を、上記のように設定すればよい。

[0058] ナノポア101の寸法(径)は、分析対象である生体分子109の種類に応じて適切な寸法を選択することができる。ナノポア101の直径は、計測対象物である生体分子109の直径の±20%に設計される。一例として、DNAを構成するヌクレオチドを計測する場合、ナノポア101の寸法は、例えば0.7nm~1.0nmとすることができる。

[0059] ナノポア101の深さは、薄膜102の厚さを調整することにより調整することができる。ナノポア101の深さは、生体分子109(モノマ単位)の2倍以上とすることができ、場合に応じて3倍以上、又は5倍以上の大きさとするすることができる。例えば生体分子109がヌクレオチドから構成されている場合には、ナノポア101の深さは、塩基3個以上の大きさ、例えば約1nm以上とすることができる。ナノポア101の形状は、基本的には円形であるが、楕円形や多角形とすることも可能である。

[0060] ナノポア101を有する薄膜102を複数枚備えるアレイ型の装置構成の場合には、ナノポア101を有する薄膜102を規則的に配列することができる。複数の薄膜102を配置する間隔は、使用する電極、電気測定系の能力に応じて、0.1μm~1mm、又は1μm~700μmとすることができる。

[0061] なお、薄膜102中にナノポア101を形成する方法に特に限定はなく、例えば透過型電子顕微鏡(TEM)などによる電子ビーム照射や、電圧(パルス電圧など)印加による絶縁破壊などを用いることができる。ナノポア101を形成する方法は、例えば“Itaru Yanagi et al., Sci. Rep. 4, 5000 (2014)”又は“A. J. Storm et al., Nat. Mat. 2 (2003)”に記載されている方法を使用することができる。

[0062] 上下2つの液槽に設けられた電極に電源から電圧が印加されると、ナノポアの近傍に電場が生じ、液中で負に帯電した生体分子は、ナノポア内を通過

する。その際、前述した封鎖電流  $I_b$  が流れる。

[0063] 薄膜 102 に接触する計測溶液を収納できる第 1 の液槽 104 A 及び第 2 の液槽 104 B は、封鎖電流の測定に影響を及ぼさない材質、形状及び大きさで、適宜設けることができる。これらの第 1 の液槽 104 A 及び第 2 の液槽 104 B を仕切る薄膜 102 に接液するように計測溶液が注入される。

[0064] 第 1 の電極 105 A 及び第 2 の電極 105 B は、計測溶液中の電解質と電子授受反応（ファラデー反応）を行うことが可能な材質で作製することができる。典型的には、ハロゲン化銀又はハロゲン化アルカリ銀で作製される。電位安定性及び信頼性の観点からは、銀又は銀塩化銀を使用することができる。

[0065] 第 1 の電極 105 A 及び第 2 の電極 105 B は、分極電極となる材質で作製されてもよく、例えば金や白金などで作製されてもよい。その場合、安定的なイオン電流を確保するために計測溶液に電子授受反応を補助することができる物質、例えばフェリシアン化カリウム又はフェロシアン化カリウムなどを添加することができる。あるいは、電子授受反応を行うことが可能な物質、例えばフェロセン類をその分極電極表面に固定化することもできる。

[0066] 第 1 の電極 105 A 及び第 2 の電極 105 B の構造は、全てが前記材質で構成されていてもよく、あるいは前記材質が下地材（銅、アルミニウムなど）の表面に被覆されていてもよい。第 1 の電極 105 A 及び第 2 の電極 105 B の形状は特に限定されるものではないが、計測溶液と接液する表面積が大きくなる形状を採用することができる。第 1 の電極 105 A 及び第 2 の電極 105 B は配線と接合されて、測定回路（電流計 106）へと電気的信号が送られる。

[0067] 生体分子分析装置 1 は、上記の構成を要素として含む。上述のナノポア方式の生体分子分析装置 1 は、使用手順や使用量などを記載した説明書と共に提供され得る。そのような形態及び調製は、当業者であれば理解することができる。ナノポアデバイス 100 に関しても同様に、即時使用可能な状態でナノポアが形成されている状態で提供されてもよいし、提供先で形成される

状態で提供されてもよい。

[0068] (まとめ)

以上のように、本実施形態に係る生体分子分析装置は、生体ポリマ分解機構を備え、生体ポリマ（核酸）の分解産物である生体分子（ヌクレオチド）が薄膜の上部の液槽に搬送される。また、薄膜の両側に封入される電解質溶液が、カチオンとしてアンモニウムイオンを含み、かつアニオンとして硫酸イオンを含む。さらに、計測対象である生体分子（ヌクレオチド）が通過するナノポアの直径は生体分子（ヌクレオチド）の直径の±20%に調整されている。これにより、ナノポアを通過する生体分子由来の封鎖信号量のばらつきを低減することができ、通過している生体分子の種類を高い信号対ノイズ比で判定することができる。

[0069] [前処理から計測までのフロー]

生体ポリマを生体ポリマ分解機構110に導入する前に、生体ポリマの前処理を実施することができる。以下では、生体ポリマがDNAである場合を例として、前処理工程を説明する。前処理としては、例えばDNAの直鎖化及び一本鎖化が実施される。

[0070] 図2Bは、DNAポリマを前処理及び分解した後にナノポアにて計測可能となるまでのフローを示す模式図である。図2Bの左側上段には、前処理チップ10におけるDNAの直鎖化のフローが示されている。前処理チップ10は、サンプル回収部11、マイクロ流路12及びナノ流路13を有し、これらが連続して1本の流路を形成する。サンプル回収部11には、例えば細胞から抽出されたDNAが回収されている。抽出されたDNAは、立体構造をとりコイルリングしている状態（ガウシアンコイル）である。DNAは、マイクロ流路12を通過することで、夾雑物を取り除くと同時に、ある程度引き延ばされた状態となる。その後、DNAは、ナノ流路13（例えばサブミクロンオーダー）を通過することで、一本に引き延ばされた状態に変化する。図2Bの左側下段に示すように、前処理チップ10には、流路が複数（図2Bでは3つ）並列して設けられている。

[0071] 図2Bの中央上段には、DNAの一本鎖化のフローが示されている。DNAの一本鎖化は、例えば、図2Bの中央中段に示すように、ナノ流路13に配置された片鎖分解酵素15を用いた反応により実施することができる。一本鎖化したDNAは、数ナノメートルの流路14を通過して、生体ポリマ分解機構110に導入される。あるいは、図2Bの中央下段に示すように、酵素を用いずに、二本鎖の直径以下一本鎖の直径以上のナノ流路14を通過させることによって、DNAを一本鎖化することもできる。

[0072] その後、図2Bの右側に示すように、ナノ流路14を通過した一本鎖DNAは生体ポリマ分解機構110を通過することで、末端からヌクレオチド化し、切断された順番に、拡散及び電気泳動によってナノポア101を通過する。上述のように、生体ポリマ分解機構110には、再度一本鎖結合及びヌクレオチド分解可能な酵素が配置されている。あるいは、高濃度の塩酸が保持されている。あるいは、生体ポリマ分解機構110は、DNAにレーザー光を照射可能に構成されている。

[0073] [アレイデバイス]

図2Aに例示した生体分子分析装置1のナノポアデバイス100は、1つの薄膜102が1つのナノポア101のみを有している。しかしながら、これはあくまでも一例であり、薄膜102に複数個のナノポア101を形成し、複数個のナノポア101の各々の領域を隔壁で分離して構成されるアレイデバイスとすることも可能である。そこで、以下においては、アレイデバイスの構成例について説明する。

[0074] 図3は、生体分子分析装置2の構成を示す概略断面図である。図3において、図2Aに示した生体分子分析装置1と同一の構成要素については同一の符号を付しているため、重複する説明は省略する。図3に示すように、生体分子分析装置2は、アレイデバイスであるナノポアデバイス200を備える点で、図2Aの生体分子分析装置1と異なっている。

[0075] ナノポアデバイス200においては、薄膜102Aが複数のナノポア101を有しており、薄膜102Aの下の第2の液槽104Bが隔壁（具体的に

は薄膜102Cの側壁)により複数の空間に分割されている。薄膜102Aを固定する薄膜102B及び102Cにおいて、ナノポア101に対応する位置に貫通穴が設けられ、薄膜102Cの貫通穴の側壁により、複数の空間(個別槽)が形成されている。複数の空間の各々には、第2の電極105Bが設けられている。第1の液槽104Aも、各生体ポリマが混在しないように隔壁111によって個別の空間に分割され、絶縁されている。このため、各ナノポア101を流れる電流を独立に計測することができる。各第1の液槽104Aには個別の生体ポリマ分解機構110が設けられている。

[0076] ナノポア形成溶液又は計測溶液(電解質溶液103)は上述のものを用いればよい。これにより、ナノポアを通過するヌクレオチドの種類を高い判定精度で決定することができる。生体分子分析装置2では並列して計測を行うことができるため、高い解析精度を保持したまま、非常に高いスループットで生体分子のモノマ配列解析を行うことが可能となる。

[0077] 本開示に係る生体分子分析方法、生体分子分析試薬及び生体分子分析デバイスは、例えば核酸から構成される生体分子の分析、並びにその分析を利用する試験、診断、治療、創薬、基礎研究などの分野に有用である。

## 実施例

[0078] 以下、実施例を用いて本開示の技術をより詳細に説明するが、本開示の技術はこれら実施例に限定されるものではない。

[0079] [生体分子分析装置の準備]

各実施例において、図2Aに示した構成の単一ポアの生体分子分析装置を使用することとする。まず、以下のようにしてナノポアデバイスを作製した。

[0080] 以下の手順で、半導体微細加工技術により薄膜を作製した。まず、厚さ725mmの8インチSiウエハの表面に、 $\text{Si}_3\text{N}_4$ /polySi/ $\text{Si}_3\text{N}_4$ をそれぞれ膜厚5nm/150nm/100nmの順に成膜した。また、Siウエハの裏面に、 $\text{Si}_3\text{N}_4$ を105nm成膜した。なお、中間層のpolySiはSiOであってもよい。

- [0081] 次に、Siウエハ表面最上部の $\text{Si}_3\text{N}_4$ を500nm四方で反応性イオンエッチングにより除去した。同様に、Siウエハ裏面の $\text{Si}_3\text{N}_4$ を1038 $\mu\text{m}$ 四方で反応性イオンエッチングにより除去した。裏面については更に、エッチングにより露出したSi基板をTMAH (Tetramethylammonium hydroxide) により更にエッチングした。Siエッチングの間は、表面側のpoly Siのエッチングを防ぐため、ウエハ表面を保護膜 (ProTEK (登録商標) B3 primer及びProTEK (登録商標) B3、Brewer Science社製) で覆った。
- [0082] 次に、当該保護膜を取り除いた後、500nm四方で露出しているpoly Si層を $\text{NH}_4\text{OH}$ 溶液で取り除いた。これにより、膜厚5nmの $\text{Si}_3\text{N}_4$ 薄膜が露出した仕切り体を得られた。SiOが犠牲層に選択された場合は、BHF溶液 ( $\text{HF}:\text{NH}_4\text{F}=1:60$ ) によるエッチングにより薄膜が露出される。この段階では、薄膜にナノポアは設けられていない。
- [0083] 以下の手順でナノポアを形成した。上記の仕切り体を生体分子分析デバイス等にセットする前に、ピラニア溶液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=3:1$ ) に3分間浸漬することで $\text{Si}_3\text{N}_4$ 薄膜を親水化した。浸漬後は5分以上純水にて流水洗浄を行った。親水化はAr/ $\text{O}_2$  plasma (サムコ社製) により、10W、20sccm、20Pa、45secの条件でも実施可能である。次に、生体分子分析デバイスに仕切り体をセットした。その後、薄膜を挟む上下の液槽を、ナノポア形成溶液で満たし、各液槽のそれぞれに電極を導入した。電極としては銀塩化銀電極を用いた。ナノポア形成溶液の溶媒としては水を用いた。
- [0084] 電圧の印加は、ナノポアの形成時だけでなく、ナノポアが形成された後にナノポアを介して流れるイオン電流の計測時にも行われる。ここでは、下側に位置する液槽をcis槽と呼び、上側に位置する液槽をtrans槽と呼ぶ。また、cis槽側の電極に印加する電圧 $V_{\text{cis}}$ を0Vに設定し、trans槽側の電極に電圧 $V_{\text{trans}}$ を印加する。電圧 $V_{\text{trans}}$ は、パルス発生器 (例えば41501B SMU AND Pulse Generator Expander、アジレント

テクノロジーズ社製)により発生する。

[0085] パルス印加後の電流値は、電流計（例えば4156B PRECISION SEMICONDUCTOR ANALYZER、アジレントテクノロジーズ社製）で読み取ることができる。パルス電圧の印加前に形成されたナノポアの直径に応じて電流値条件（閾値電流）を選択し、順次、ナノポアの直径を大きくしつつ、目的とする直径を得ることができる。

[0086] ナノポアの直径は、イオン電流値から見積もることができる。条件選択の基準は表1の通りである。

[0087] [表1]

表1. 電圧印加条件

パルス電圧印加前の ナノポア径	非開口～Φ1.0 nm	～Φ1.4 nm	～Φ1.5 nm
印加電圧 ( $V_{Gis}$ ) [V]	5	3	2.5
初期印加時間 [s]	0.01	0.01	0.001
閾値電流	0.2 nA / 0.4 V	0.5 nA / 0.1 V	0.6 nA / 0.1 V

[0088] ここで、 $n$ 番目のパルス電圧印加時間  $t_n$ （ただし、 $n > 2$ の整数。）は、次式で決定される。

[0089] [数1]

$$t_n = 10^{-3+(1/6)(n-1)} - 10^{-3+(1/6)(n-2)} \quad \text{For } n > 2$$

[0090] [実験例1：ナノポアの直径の変更]

(実施例1)

実施例1において、ナノポア形成溶液として、0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 0.5 M KCl + 10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.5) を用いて、ナノポアを形成した。このナノポア形成溶液で取得されたポア導電率は1.94 nSであり、実効膜厚3.5 nmとして換算されたナノポアの直径は0.94 nmであった。ここで、実効膜厚は、dsDNAを計測した際の封鎖量のベース電流値依存性に基づき、dsDNAの実効直径を2.5 nmであるとして求めた。その後、ナノポア形成溶液を排出し、計測溶液とし

て、cis槽を0.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+1×酵素buffer (pH7.5)+Tween (登録商標) 20の溶液 (Mg無) に置換し、trans槽を0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.5M MgSO<sub>4</sub>+10mM Tris-HCl (pH7.5) 溶液に置換した。上記計測溶液に置換後、ベースライン電流の時間変化を計測した。その後、100μM dNTPを添加してイオン電流 (封鎖信号量) の時間変化を計測した。結果を図4Aに示す。

[0091] (比較例1)

比較例1においては、実施例1とは異なる大きさのナノポアを形成した際のdNTP由来の信号の封鎖信号量を比較した。具体的には、上記ナノポア形成溶液にてナノポア形成後に取得される導電率が5.74nSのナノポアを形成し、実効膜厚3.5nmとして計算されるナノポアの直径は1.72nmであった。ナノポアの直径を変更した以外は実施例1と同様にして、ベースライン電流の時間変化と、100μMのdNTP添加後のイオン電流の時間変化とを計測した。結果を図4Bに示す。

[0092] (結果)

図4Aは、実施例1における100μMのdNTP添加後のベースライン電流を示すグラフである。図4Aに示すように、実施例1では、取得されたdNTP由来の封鎖信号量の分布が1b~90pA (LPF 2kHz) であり、dNTP由来と考えられる明瞭な信号が取得された。

[0093] 図4Bは、比較例1における100μMのdNTP添加後のイオン電流を示すグラフである。図4Bに示すように、比較例1では、取得されたdNTP由来の封鎖信号量の分布が1b~60pA (LPF 2kHz) までと、ベース電流のノイズ由来と考えられる信号のみが取得された。このことから、実施例1のように計測溶液として硫酸アンモニウム溶液を用い、かつナノポアの直径が1nm以下 (0.94nm) であることにより、比較例1のように1nmより大きい場合と比較して、dNTP由来の封鎖信号量が安定し、ノイズに埋もれずに明確な信号を検出できることが分かった。

[0094] [実験例2：計測溶液の変更]



## (実施例 2)

実施例 2 において、ナノポア形成溶液として、 $0.5\text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.5\text{ M KCl} + 10\text{ mM Tris-HCl}$  溶液 ( $\text{pH} 7.5$ ) を用いて、直径約  $0.9\text{ nm}$  のナノポアを形成した。ここで、別の溶液に置換せずに、 $100\text{ }\mu\text{M}$  の dCTP 添加後の電流値の時間変化を計測した。その後、ベースライン電流の時間変化を計測した。結果を図 5 B に示す。

## [0095] (比較例 2)

比較例 2 においては、実施例 2 と同様に直径約  $0.9\text{ nm}$  のナノポアを形成後、ナノポア形成溶液を排出し、計測溶液としての  $1\text{ M KCl}$  溶液に置換した。計測溶液に置換後、 $100\text{ }\mu\text{M}$  の dCTP 添加後の電流値の時間変化を計測した。結果を図 5 A に示す。

## [0096] (結果)

図 5 A は、比較例 2 における  $1\text{ M KCl}$  中の  $100\text{ }\mu\text{M}$  の dCTP 添加後の電流値の時間変化を示している。図 5 A に示すように、電流値が約  $0.05 \sim 0.55\text{ nA}$  の範囲にあることが分かる。

[0097] 図 5 B は、実施例 2 における  $0.5\text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.5\text{ M KCl} + 10\text{ mM Tris-HCl}$  溶液 ( $\text{pH} 7.5$ ) 中における  $100\text{ }\mu\text{M}$  の dCTP 添加後の電流値の時間変化を示す。図 5 B に示すように、電流値が約  $0.04 \sim 0.3\text{ nA}$  の範囲にあることが分かる。図 5 A 及び 5 B から、比較例 2 と比較して、実施例 2 は電流値の範囲が狭く、ばらつきが小さいことが分かる。

[0098] 図 5 C は、実施例 2 及び比較例 2 において取得された dCTP 由来の封鎖信号の封鎖量及び封鎖時間の散布図である。図 5 C に示すように、実施例 2 の封鎖量は比較例 2 の封鎖量よりも明瞭にばらつきが小さいことが確認された。

[0099] 図 5 D は、実施例 2 及び比較例 2 における封鎖量のヒストグラムである。図 5 D から分かるように、実施例 2 で用いた  $0.5\text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.5\text{ M KCl} + 10\text{ mM Tris-HCl}$  溶液 ( $\text{pH} 7.5$ ) 中では、比較

例2の1MdCTPの封鎖量の分散が小さくなることが分かる。また、封鎖量の分散は差分約6倍小さくなることがわかる。

[0100] 以上の実験例1及び2の結果から、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含む溶液中であっても、ナノポア径を1nm以下にすることでdNTP由来の信号を取得することが可能となることが確認できた。特に、イオン電流計測時において $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む計測溶液を用いることで、dNTP由来の封鎖信号の分散を抑制できることが確認できた。

[0101] [実験例3：4種ヌクレオチドの封鎖量比較]

DNAの塩基配列をイオン電流により解析する際、DNAを構成する4種のヌクレオチドの各々がナノポアを通過した際の封鎖量に基づいて塩基を判別する必要がある。しかしながら、従来よく使用されていた1M KCl溶液中では、各種ヌクレオチド由来の封鎖信号分布のオーバーラップが大きく、一分子が通過した際の封鎖信号のみで塩基を判別することは難しいと推定される。

[0102] そこで、本実験例においては、4種のヌクレオチドを計測溶液中で各々測定し封鎖信号量の分布を比較することとした。

[0103] (実施例3)

実施例1と同じ条件で作製したナノポアデバイスにおいて、ナノポア形成後、計測溶液として0.5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +0.5M KCl溶液を用いて、100 $\mu\text{M}$ のdCTP、dATP、dTTP又はdGTPを添加した溶液を順次置換することで封鎖信号量を比較した。結果を図6Bに示す。

[0104] (比較例3)

非特許文献2に記載の条件にて、dGTP、dATP、dTTP、dCTPをそれぞれ含む計測溶液を用い、封鎖信号量を比較した。具体的には、比較例3の条件は、TEM装置を用いてナノポアを形成し、計測溶液として1M KClを用いたこと以外は実施例3と同様である。結果を図6Aに示す。

[0105] (結果)

図6Aは、比較例3における各ヌクレオチド由来の封鎖信号量の散布図及びヒストグラムである。図6Aに示すように、それぞれのヌクレオチド由来の封鎖量のヒストグラムは相互に値が重畳しており、明瞭に分離が見られないことが分かる。

[0106] 図6Bは、実施例3において0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.5M KCl中でヌクレオチドを計測した際の封鎖量のヒストグラムを示している。図6Bに示すように、図6Aと比較して、各ヌクレオチドのヒストグラムの分布のピーク位置が明瞭に異なっており、分布のオーバーラップも少ない。実施例3では、計測溶液として0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.5M KClを用いたが、当該濃度以上の塩濃度での計測も可能であり、より明確な分離を期待することができる。

[0107] [変形例]

本開示は、上述した実施形態に限定されるものでなく、様々な変形例を含んでいる。例えば、上述した実施形態は、本開示を分かりやすく説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備える必要はない。また、ある実施形態の一部を他の実施形態の構成に置き換えることができる。また、ある実施形態の構成に他の実施形態の構成を加えることもできる。また、各実施形態の構成の一部について、他の実施形態の構成の一部を追加、削除又は置換することもできる。

[0108] 本明細書中で引用した全ての刊行物及び特許文献の内容は、そのまま参照により本明細書中に組み込まれるものとする。

## 符号の説明

- [0109] 1、2…生体分子分析装置  
100、200…ナノポアデバイス  
101…ナノポア  
102…薄膜  
103…電解質溶液  
104A…第1の液槽

- 104 B…第2の液槽
- 105 A…第1の電極
- 105 B…第2の電極
- 106…電流計
- 107…電源
- 108…コンピュータ
- 109…生体分子
- 110…生体ポリマ分解機構

## 請求の範囲

- [請求項1] 生体分子の直径の±20%の範囲の直径を有するナノポアを有する薄膜と、前記薄膜により隔てられる第1の液槽及び第2の液槽と、前記第1の液槽に配置される第1の電極と、前記第2の液槽に配置される第2の電極と、生体ポリマを前記生体分子に分解する生体ポリマ分解機構と、を備える生体分子分析デバイスを準備することと、  
前記生体ポリマ分解機構において生体ポリマを前記生体分子に分解することと、  
前記第1の液槽及び前記第2の液槽に計測溶液が封入された状態で、前記第1の電極及び前記第2の電極間に電圧を印加して、前記第1の電極及び前記第2の電極間に流れる電流を計測することと、を含み、  
前記計測溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする生体分子分析方法。
- [請求項2] 前記生体分子分析デバイスを準備する前に、前記第1の液槽及び前記第2の液槽にナノポア形成溶液が封入された状態で、前記第1の電極及び前記第2の電極間に電圧を印加して、前記薄膜に前記ナノポアを形成することをさらに含み、  
前記ナノポア形成溶液は、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする請求項1記載の生体分子分析方法。
- [請求項3] 前記生体ポリマが核酸であり、前記生体分子がヌクレオチドであり、前記ナノポアの前記直径が1nm以下であることを特徴とする請求項1記載の生体分子分析方法。
- [請求項4] 前記ナノポアの直径が前記生体分子の直径の±10%の範囲であることを特徴とする請求項1記載の生体分子分析方法。
- [請求項5] 前記計測溶液が硫酸アンモニウム溶液であり、  
前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01M以上飽和濃度以下であることを特徴とする請求項1記載の生体分子分析方法。

- [請求項6] 前記硫酸アンモニウムの濃度が0.1 M以上飽和濃度以下であることを特徴とする請求項5記載の生体分子分析方法。
- [請求項7] 前記硫酸アンモニウムの濃度が1 M以上飽和濃度以下であることを特徴とする請求項6記載の生体分子分析方法。
- [請求項8] 前記計測溶液は、塩として硫酸アンモニウム及び他の塩を含み、前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、5%以上100%未満であることを特徴とする請求項1記載の生体分子分析方法。
- [請求項9] 前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、25%以上100%未満であることを特徴とする請求項8記載の生体分子分析方法。
- [請求項10] 前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、50%以上100%未満であることを特徴とする請求項9記載の生体分子分析方法。
- [請求項11] 前記薄膜は、SiN、SiO<sub>2</sub>及びSiのうち少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項1記載の生体分子分析方法。
- [請求項12] 生体分子の直径の±20%の範囲の直径を有するナノポアに前記生体分子を通過させて前記生体分子を分析する用途に使用される生体分子分析試薬であって、  
アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする生体分子分析試薬。
- [請求項13] 前記生体分子分析試薬は、さらに前記生体ポリマを前記生体分子に分解する用途に使用されることを特徴とする請求項12記載の生体分子分析試薬。
- [請求項14] 前記生体分子分析試薬は、硫酸アンモニウム溶液であり、前記硫酸アンモニウムの濃度が0.01 M以上飽和濃度以下であることを特徴とする請求項12記載の生体分子分析試薬。
- [請求項15] 前記硫酸アンモニウムの濃度が0.1 M以上飽和濃度以下であるこ

とを特徴とする請求項 1 4 記載の生体分子分析試薬。

[請求項16] 前記硫酸アンモニウムの濃度が 1 M以上飽和濃度以下であることを特徴とする請求項 1 5 記載の生体分子分析試薬。

[請求項17] 前記生体分子分析試薬は、塩として硫酸アンモニウム及び他の塩を含み、

前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、5 %以上 1 0 0 %未満であることを特徴とする請求項 1 2 記載の生体分子分析試薬。

[請求項18] 前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、2 5 %以上 1 0 0 %未満であることを特徴とする請求項 1 7 記載の生体分子分析試薬。

[請求項19] 前記塩の濃度の合計に対する前記硫酸アンモニウムの濃度の割合が、5 0 %以上 1 0 0 %未満であることを特徴とする請求項 1 8 記載の生体分子分析試薬。

[請求項20] 生体ポリマを生体分子に分解する生体ポリマ分解機構と、  
前記生体分子の直径の± 2 0 %の範囲の直径を有するナノポアが形成される薄膜と、

前記薄膜により隔てられ、電解質溶液を収容する第 1 の液槽及び第 2 の液槽と、

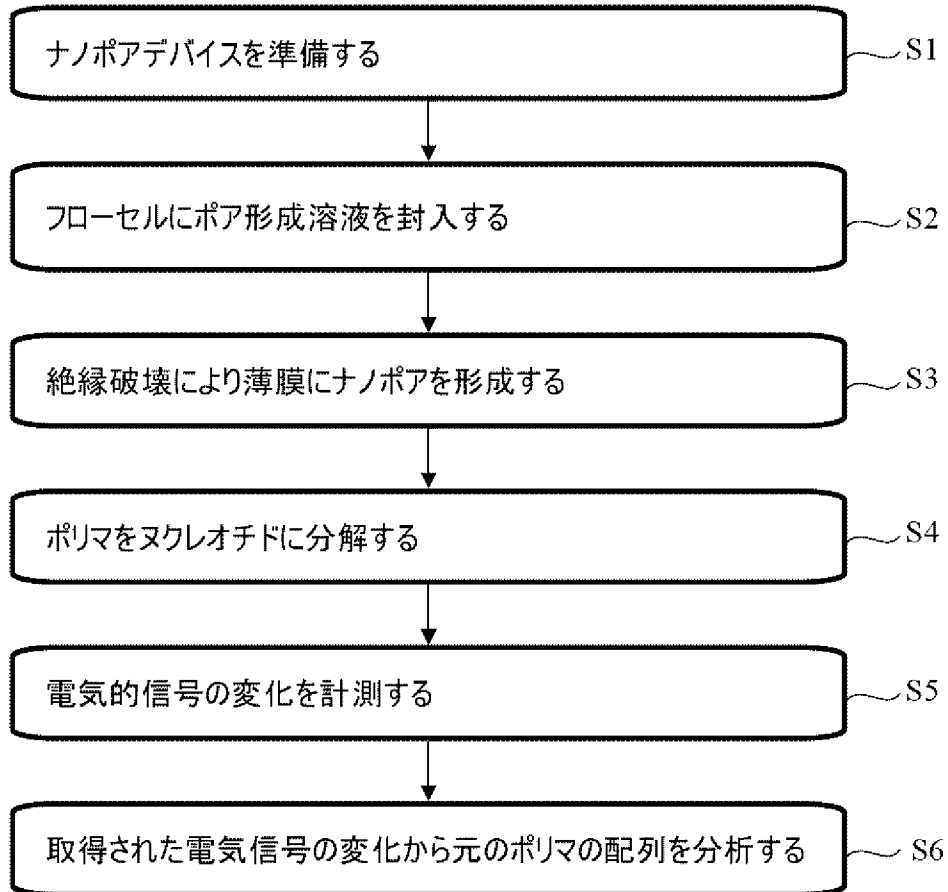
前記第 1 の液槽に配置される第 1 の電極と、

前記第 2 の液槽に配置される第 2 の電極と、を備え、

前記電解質溶液が、アンモニウムイオン及び硫酸イオンを含むことを特徴とする生体分子分析デバイス。

[図1]

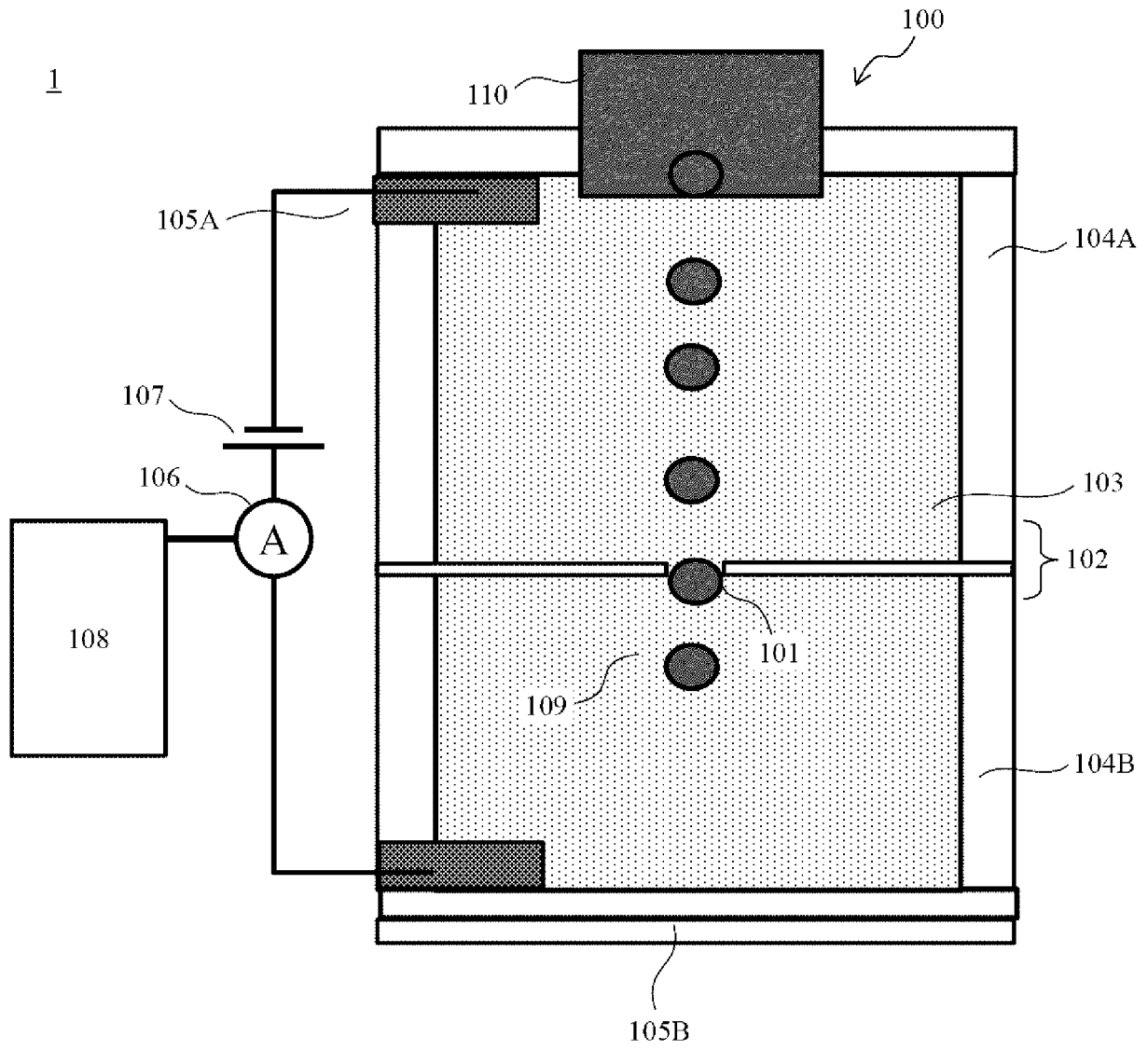
図 1





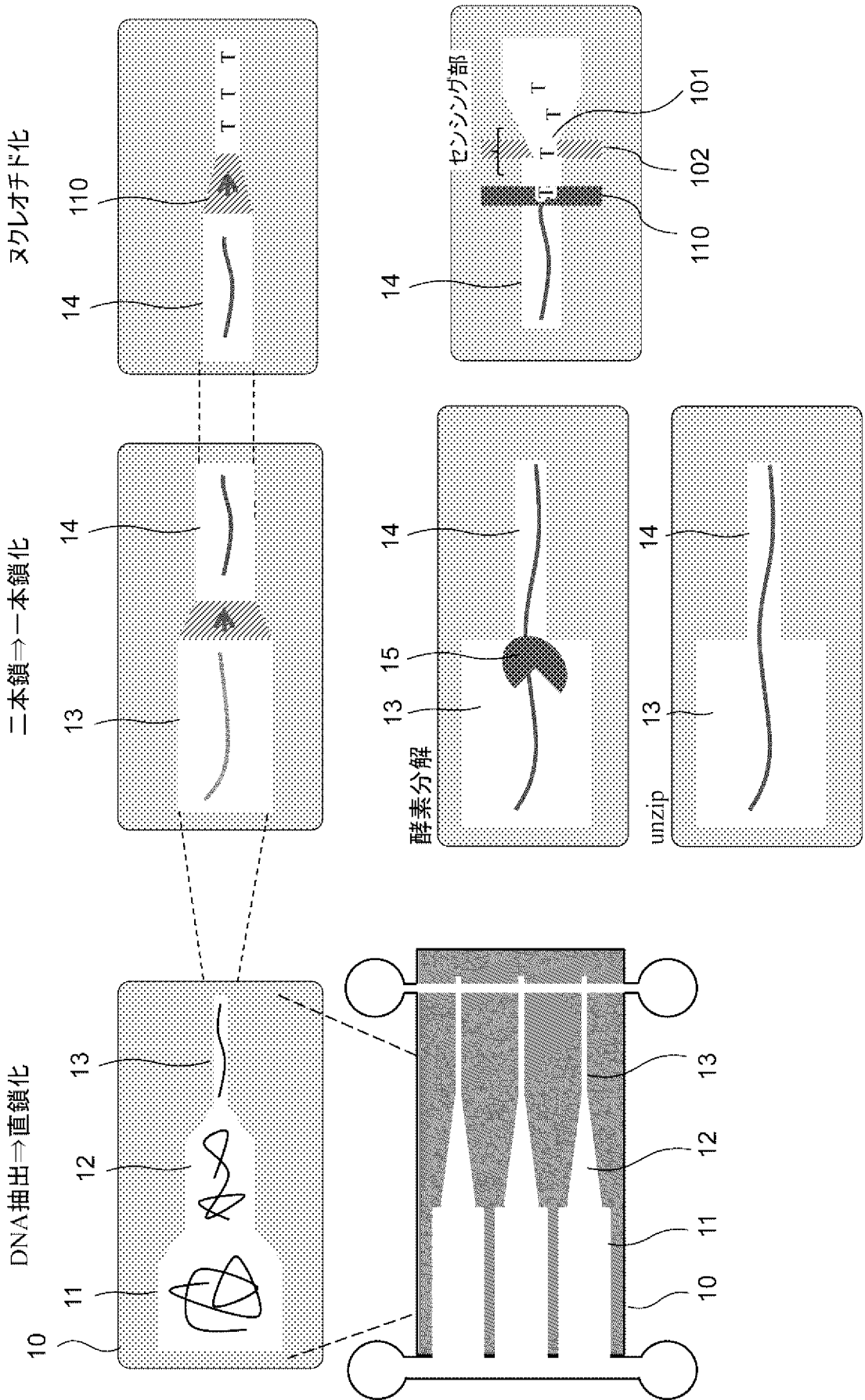
[図2A]

図 2 A



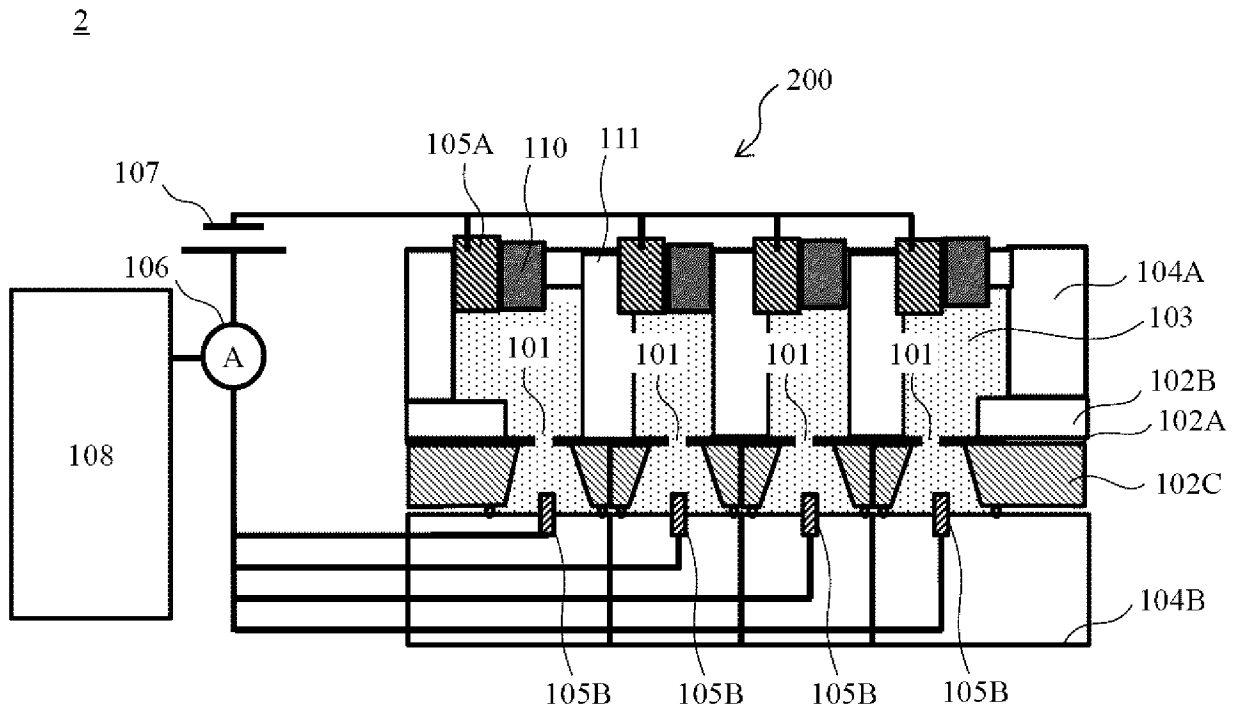
[図2B]

図2B



[図3]

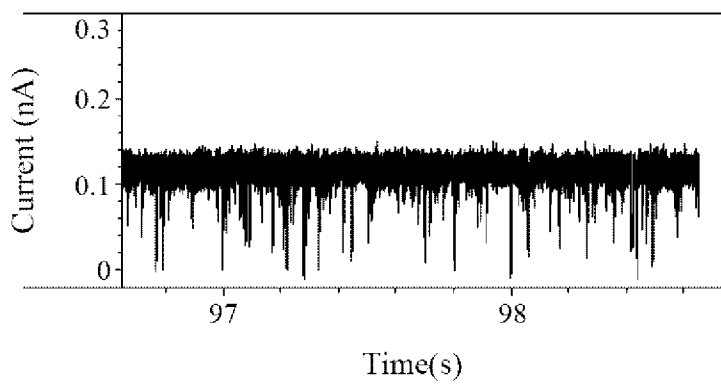
図 3



[図4A]

図 4 A

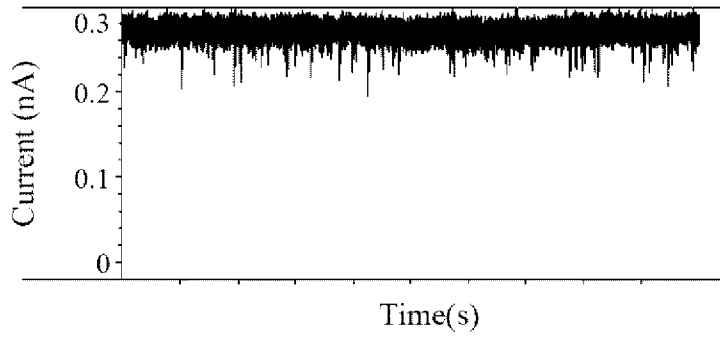
実施例1



[図4B]

図 4 B

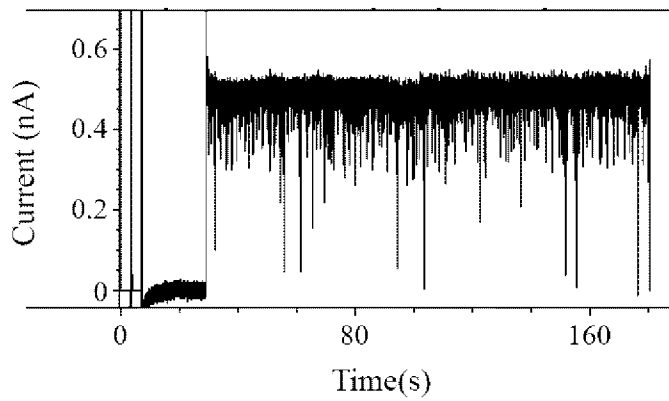
比較例1



[図5A]

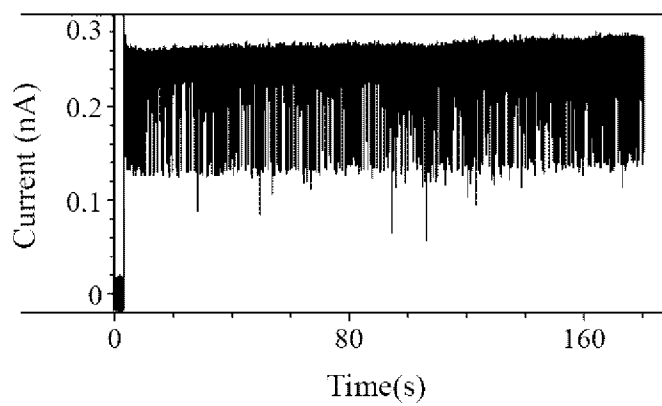
図 5 A

比較例2: 1M KCl



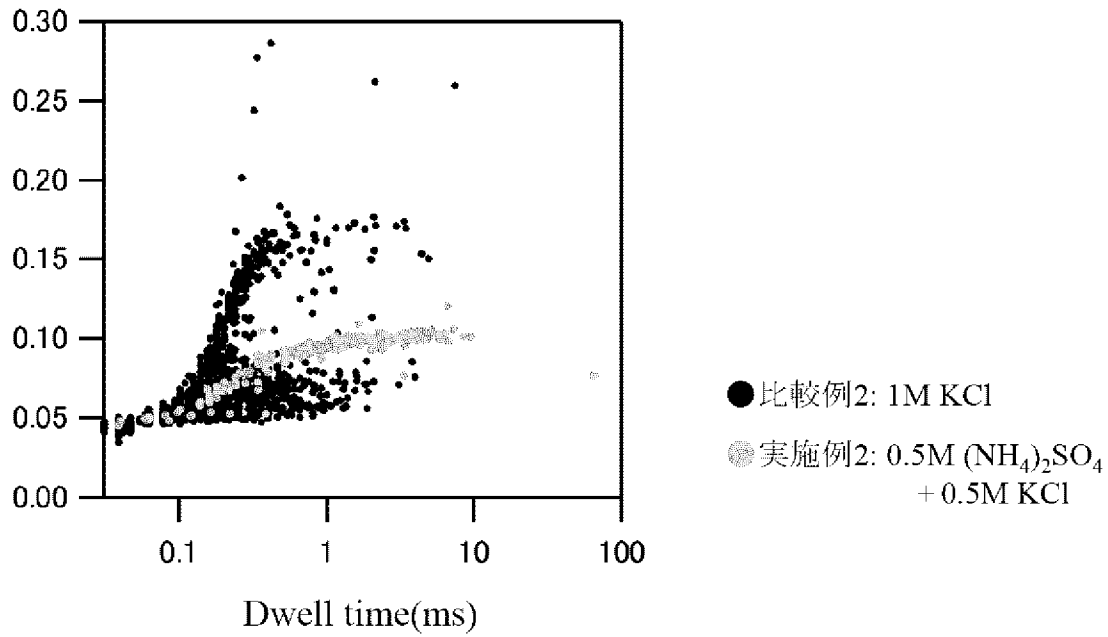
[図5B]

図 5 B

実施例2: 0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.5M KCl

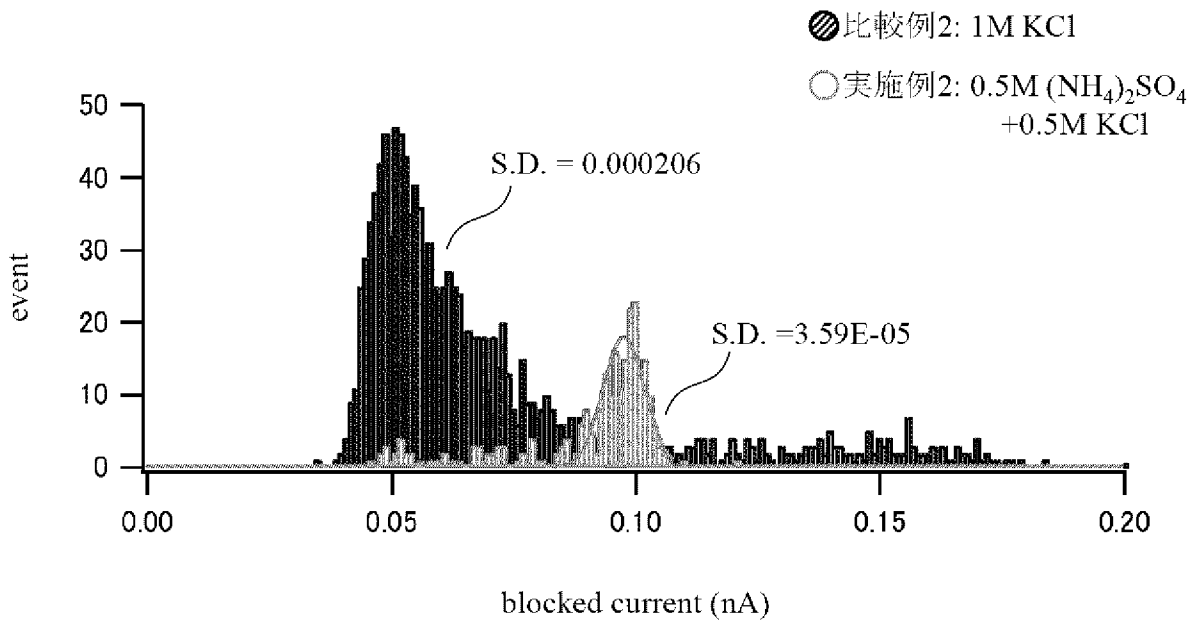
[図5C]

図 5 C



[図5D]

図 5 D



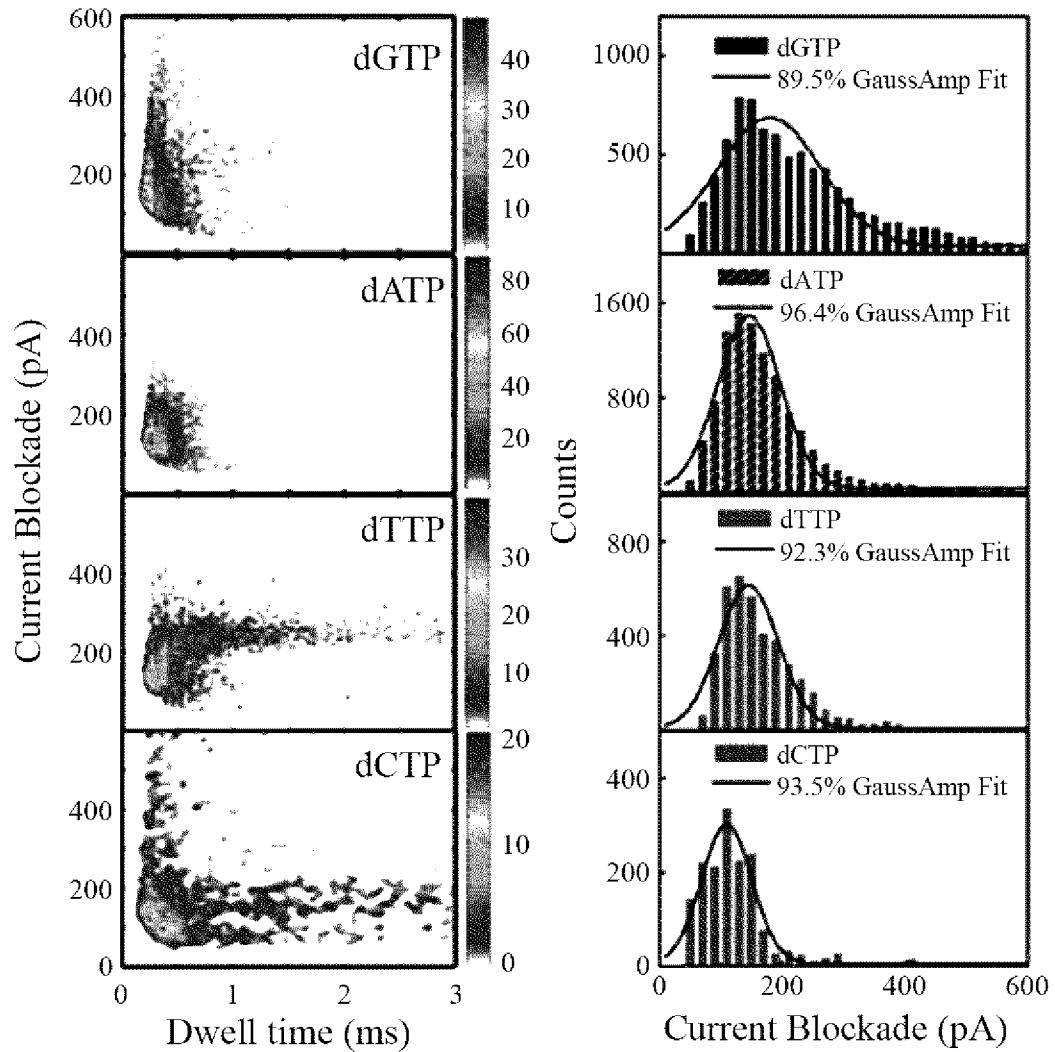
[図6A]

## 図 6 A

比較例3

導電率: 105 mS

1M KCl

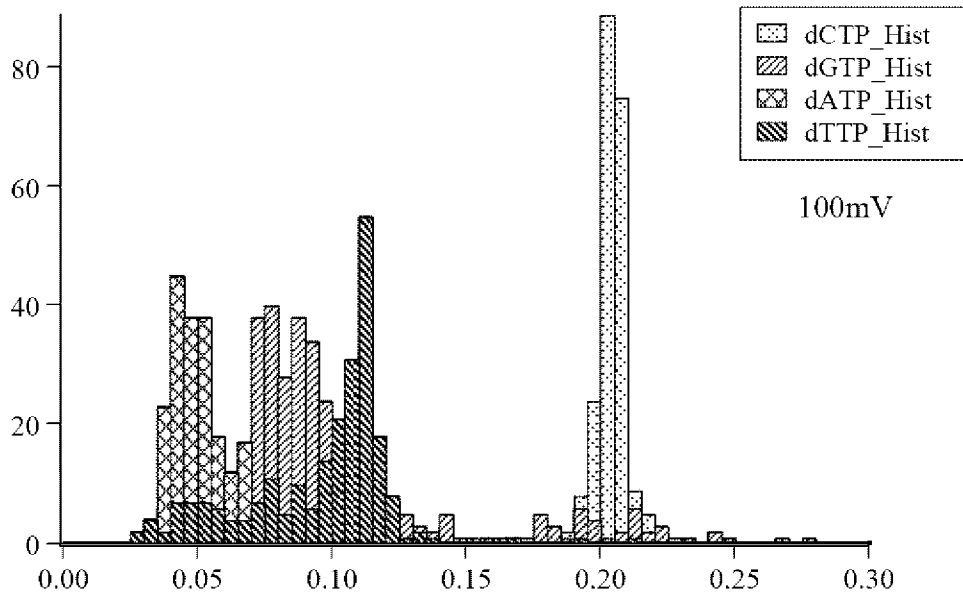


[図6B]

## 図 6 B

実施例3

導電率: 125.0 mS  
(0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.5M KCl)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2021/022614

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12Q 1/6869(2018.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; G01N 27/02(2006.01)i  
FI: C12Q1/6869 Z; G01N27/02 D; C12M1/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q1/6869; C12M1/42; G01N27/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOTO, Y. et al. Silicon nitride nanopore created by dielectric breakdown with a divalent cation: deceleration of translocation speed and identification of single nucleotides. Nanoscale., 2019, vol. 11, pp. 14426-14433 abstract, page 14427, left column, line 9 from the bottom to page 14428, left column, line 25, page 14431, right column, line 11 from the bottom to page 14432, right column, line 49, fig. 1, 5	1-20
Y	GOTO, Y. et al. Solid-state nanopores towards single-molecule DNA sequencing. Journal of Human Genetics., 2020, vol. 65, pp. 69-77 page 73, right column, from the bottom, page 74, left column, line 6, fig. 5(a)	1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 August 2021 (27.08.2021)

Date of mailing of the international search report  
07 September 2021 (07.09.2021)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2021/022614

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CLARKE, J. et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. Nature nanotechnology., 2009, vol. 4, pp. 265-270 page 268, right column, section "Nucleotide detection from ssDNA.", fig. 6	1-20
Y	AYUB, M. et al. Nanopore-Based Identification of Individual Nucleotides for Direct RNA Sequencing. Nano Letters., 2013, vol. 13, pp. 6144-6150 abstract, fig. 1	1-20
Y	WO 2020/084705 A1 (HITACHI HIGH TECH CORP) 30 April 2020 (2020-04-30) paragraphs [0017], [0018], [0063], [0064], fig. 1	1-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/022614

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2020/084705 A1	30 Apr. 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/6869(2018.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; G01N 27/02(2006.01)i FI: C12Q1/6869 Z; G01N27/02 D; C12M1/42		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/6869; C12M1/42; G01N27/02 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	GOTO Y. et al., Silicon nitride nanopore created by dielectric breakdown with a divalent cation: deceleration of translocation speed and identification of single nucleotides, Nanoscale, 2019, Vol.11, p.14426-14433 Abstract, 第14427頁左欄下段から第9行-第14428頁左欄第25行、第14431頁右欄下段から第11行-第14432頁右欄の第49行, Fig.1, 5	1-20
Y	GOTO Y. et al., Solid-state nanopores towards single-molecule DNA sequencing, Journal of Human Genetics, 2020, Vol.65, p.69-77 第73頁右欄下段から第74頁左欄第6行、Fig.5(a)	1-20
Y	CLARKE J. et al., Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing, Nature nanotechnology, 2009, Vol.4, p.265-270 第268頁右欄 “Nucleotide detection from ssDNA.” の項、Figure 6	1-20
Y	AYUB M. et al., Nanopore-Based Identification of Individual Nucleotides for Direct RNA Sequencing, Nano Letters, 2013, Vol.13, p.6144-6150 ABSTRACT, Figure 1	1-20
Y	WO 2020/084705 A1 (株式会社日立ハイテク) 30.04.2020 (2020 - 04 - 30) 段落0017, 0018, 0063, 0064, 図1	1-20
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	27.08.2021	国際調査報告の発送日 07.09.2021
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  北村 悠美子 4N 4501  電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/022614

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/084705 A1	30.04.2020	(ファミリーなし)	