

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

川合 知二

(大阪大学産業科学研究所 教授)

「プログラム自己組織化による人工生体情報材料創製」

1. 研究実施の概要

生体は、DNAのプログラムによって驚くべき精巧かつ高度な“情報材料・システム”を創り上げている。本研究はこのプログラム自己組織化のメカニズムを取り入れた高機能物質・デバイス・システムの創製を目指すものである。このような観点から、これまでに、基板上へのDNAの伸張・固定、STM画像におけるバイアス電圧による分子の見かけの高さの変化、生体親和性に優れたハイドロキシアパタイトを従来より優れた結晶性の薄膜として作製する方法、を明らかにしてきた。そこで重要研究課題として以下のものを設定した。

- ・生体分子系の選択的結合力を利用した、プログラムされた自己組織化構造の構築。特に、DNA/金微粒子複合体の形成。
- ・トップダウン技術（電子ビームリソグラフ技術）とボトムアップ技術（ナノインプリンティング技術）の融合による、プログラム自己組織化機能を生かした3次元制御、ナノ構造構築技術の確立。さらに当該技術を利用した、ノンラベリング方式による新規バイオチップの作製。
- ・デバイス構造の電気・電子特性をナノスケールで評価できる新規プローブ顕微鏡の手法開拓。さらに高分解能観察による分子種の識別。
- ・生体関連分子に高い親和力を有する、ハイドロキシアパタイト（HAp）を用いた、バイオチップ・バイオセンサーの開発。Al₂O₃基板上への特異な配向を持たせたHApのエピタクシヤル薄膜作製。

長期展望として、このような着想の展開により、人工生体情報材料の創製を目標とする。

2. 研究実施内容

本研究は、ボトムアップナノテクノロジーの最重要課題である“プログラム自己組織化”の原理の解明・確立と、その原理にのっとり人工的な“生体情報材料”の創製を目指し展開してきた。以下に、平成15年度の成果を項目別に報告する。

1) バイオ分子デバイス

本年度は、バイオ分子デバイスのテンプレートとなるDNAを用いた自己組織化構造の構築

を試みた。ネットワーク型の自己組織化構造を基板上に形成するには、分子同士の会合反応と分子と基板に対する付着性の二つの要素が大きな支配因子となる。

まず、相補的塩基配列を有する3種類の一本鎖DNA #A (62塩基)、B# (62塩基)、#C (15塩基) を用いて、重合反応を試みた。CのDNAにはシステインが導入してあるので、うまく多量体を形成出来れば、金ナノパーティクルの結合サイトを規則的に導入できたことになる。種々の反応条件を試み、電気泳動とAFM観察を行った。しかし多量体の形成には至らなかった。塩基配列は、良く知られた動物由来のDNAをもとにしたものである。相補的会合そのものは確実に起こっているが、DNAの剛直性など、個々の塩基配列よりも大きなスケールの形状を制御していないため、DNA鎖の畳み込みなどが多量体の形成を阻害していると考えられる。もっと複雑なDNAの組み合わせを用いて、大きなスケールの規則構造の形成に成功した例が既に報告されているので、今後、塩基配列にさらなる検討を加えた実験を続ける予定である。

一方、ネットワーク型自己組織化構造を基板上で効果的に安定化するために、Au(111)基板表面と分子の間の付着性について検討した。塩基数が同じで、末端にチオール基を有する単鎖DNAとPNAでは、PNAの方がはるかに高い付着性をもつことがわかった。DNAでは、リン酸基の負電荷がDNA同士の接近を抑制するのに対して、PNAは電荷をもたないので、容易に高密度の付着が起こると考えられる。この結果は、DNA多量体の一部にPNAを導入することで、多量体の決まったサイトを基板に接続できる可能性を示唆している。

また、DNAの分子認識能を利用した、二重螺旋中への他分子の包摂も試みた。DNA塩基のチミンと、相補的な水素結合サイトを持つ分子から、分子レベルでの相互分子認識を確認した。またチミジル酸のオリゴマーを用いての包摂能を検討したところ、分光により分子の二重螺旋中への取り込みが示唆される結果を得た。

2) 生体適合性バイオチップ

1 IS-FETを利用したDNAセンサの開発

従来のDNAセンサは、予め検体となるDNAに蛍光分子を修飾する必要があった。本研究では、予めDNAに蛍光修飾する必要のないノンラベリング型DNAセンサの開発をIS-FETを利用して試みた。IS-FET型DNAセンサの概念図を下図に示す。シリコンデバイスであるIS-FETのゲート上に正常な塩基配列を持つ一本鎖probeDNAの固定化を行う。続いて検体となる相補的なtargetDNAを導入して、ハイブリダイゼーションを行い二本鎖DNAを形成させる。このとき、DNA鎖が持つ負電荷がハイブリダイゼーションにより倍増することからgate電極に更に負のポテンシャルが印加され、ソースドレイン間の電流値が変化する。これによりDNAのハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果、図2より一本鎖DNAとハイブリダイゼーションによる二本鎖DNAとの差は約10mVであった。これにより、IS-FET型DNAセンサを利用したハイブリダイゼーション検出が可能であることが明らかとなった。

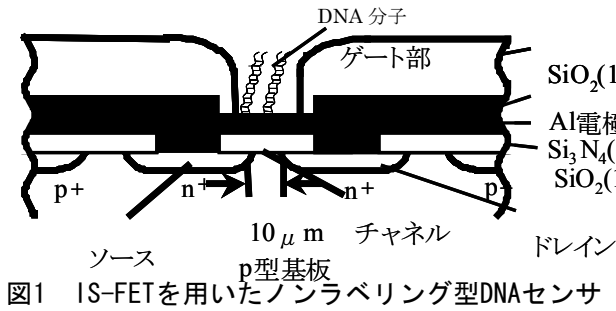


図1 IS-FETを用いたノンラベリング型DNAセンサ

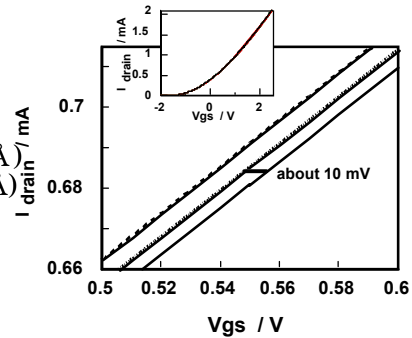


図2 IS-FET型DNAセンサの I_d - V_{gs} 測定結果

2 ナノインプリント技術を利用したDNAのナノパターンニング

最近DNAの様々な物性研究が盛んに行われ、バイオナノデバイスへのDNAの利用が考えられるようになった。この実現のためにはDNAを用いてナノパターンニングを行う必要があるが、そのための技術がないのが現状である。本研究では、ナノインプリント技術を利用することによって自己組織化によるDNAナノパターンニングプロセスの開発を行った。図3に得られたDNAナノパターンの蛍光顕微鏡写真を示す。ナノインプリント技術を利用することにより、DNAのナノパターンニングを観察することができた。このDNAナノパターンは、モールドの凹型パターンに沿って忠実に得られていることが分かる。本プロセスを利用することで、モールドパターンに従った様々なDNAナノパターンを自己組織化により得ることができた。

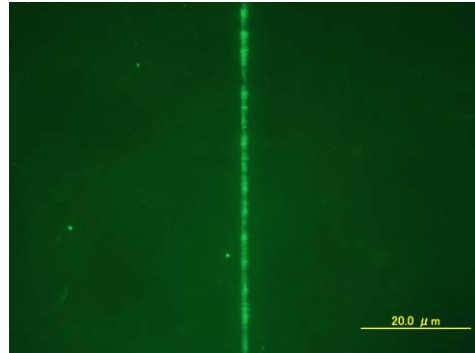


図3 パターンニングされたDNAの蛍光顕微鏡写真

3) プローブ顕微鏡による分子識別、計測技術

本研究計画では、DNAをテンプレートとして金属微粒子を配し、その間に色素分子を導入した分子デバイスの構築を目指している。このような分子構造体は、光電子機能を有すると期待できるが、デバイスとしての動作を解析するには、光励起により生成した電荷とその移動、消滅過程を分子スケールで追跡することが重要である。しかし、このような計測が可能な方法は、現在の技術水準では存在しない。

そこで、分子レベルの空間分解能とマイクロ秒レベルの時間分解能が両立した新しい計測手法の開発を目指している。平成15年度は、その第一段階として、光励起による電荷の生成と消滅により生じる基板-探針間の静電気力を時間分解して検出することを試みた。その結果、励起レーザー光と同期した力の検出に成功した。現在は、均一な薄膜試料を用いて、プローブを走査することなく力の時間変化のみを検出している。今後、空間的に分布のある試料を用いて、画像の取得を目指す予定である。

4) 多次元自己組織化ナノデバイス

我々は以前より、タンパク質やアミノ酸、核酸等の各種生体関連分子に対し、ハイドロキシアパタイト (HAp) が優れた吸着能を持つことを利用し、タンパク質あるいは核酸の分離精製シート、タンパク質や細胞のスキヤホールド、バイオリアクター等の各種バイオチップを実現するための基礎研究を行ってきた。本研究においてはこれまでの結果を基に、レーザアブレーション法で作製した高品質なHAp薄膜をマイクロ/ナノレベルで加工し、人工的HApパターンに沿った各種生体関連分子の配列を実現することで、これまでになく新しいタイプのバイオチップ開発を念頭に研究を進めている。また、HApへの分子吸着に伴うHApの電気特性変化をバイオチップのセンシング部に使用する「バイオエレクトロニクスインタフェースとしてのHAp薄膜」を考え、絶縁体であるHApのCa²⁺サイトをNa⁺をはじめとする各種陽イオンで置換し、電気伝導度を持たせたHApを作製することを試みている。以下に、平成15年度の研究実施報告を記す。

まずHApのCa²⁺サイトを10 mol%Na⁺で置換したNaドーパHAp (Na-HAp) 薄膜の作製と、その水分子吸着に伴う電気伝導性変化を用いた湿度センサ試作について述べる。Na-HAp薄膜は、Na₂CO₃とCa₃(PO₄)₂を1 mol: 6molの比で混合した原料を、乾式法によって固相反応させて得られたNaCa₉(PO₄)₆(OH)₂の組成を持ったターゲットを用い、レーザアブレーションによって作製した。得られたNa-HAp薄膜を結晶化させる目的で、純水中を通過させることでH₂Oを含んだO₂雰囲気中にてポストアニールした。得られた薄膜の構造を粉末X線回折法によって調べたところ、報告されているHApとほぼ同様のパターンが観察されたことから、アパタイト構造の薄膜が得られていることがわかった。組成の分布によってNaが結晶内に均一に固溶していることを、平成16年度導入予定の微細領域元素分析装置によって調べることが課題として残っている。得られた試料に真空蒸着法でくし型金電極を設置し、その湿度変化に伴う電気伝導性を調べたところ、湿度40 %→80 %で二桁近い巨大な抵抗変化が得られた(図4)。この結果はNa-HApが分子吸着センサとして利用できることを示唆しており、今後タンパク質を用いた吸着実験によってタンパク質センサとしての動作確認を行う予定である。

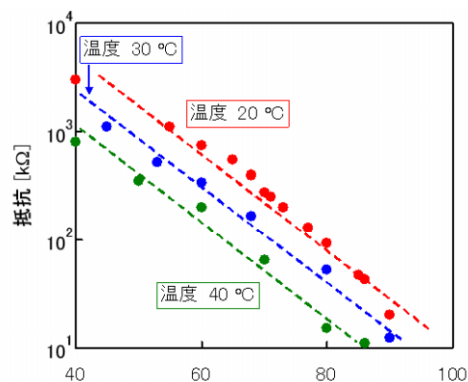


図4 Na-HApの湿度センサ特性

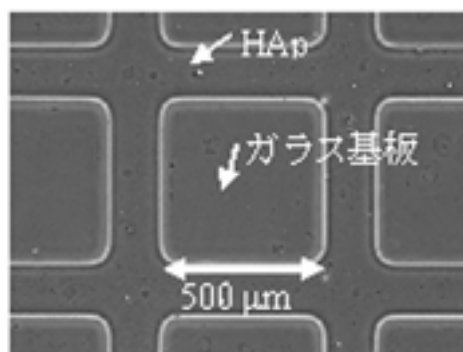


図5 エッチング加工したHAp薄膜/ガラス基板

次に人工的HApパターンにおけるタンパク質吸着について述べる。上記のNa-HApと同様の手順でガラス基板上に得られた正規組成のHAp薄膜を、フォトリソグラフィと塩酸によるウェットエッチングで加工し、図5に示す格子パターンを得た。ミオグロビンを混合した純水にこの試料を浸漬し、取り出した後に純水で洗浄して蛍光顕微鏡で観察した結果を図6に示す。ガラス部に対し、HAp部に優先的にミオグロビンが観察され、HApを用いたタンパク質配列制御が期待できる結果を得た。今後パターンの微細化、他のタンパク質に対する吸着能確認、配列制御下での細胞培養等の実験を行っていく予定である。

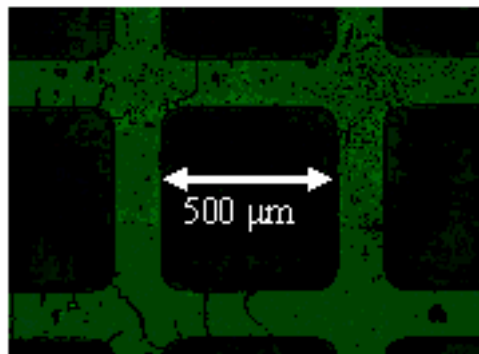


図6 ミオグロビン吸着後、
蛍光顕微鏡で観察した
人工的HApパターン

3. 研究実施体制

大阪大学グループ

研究分担グループ長：川合 知二（大阪大学産業科学研究所 教授）

研究実施項目：（1）バイオ分子デバイス

（2）生体適合性バイオチップ

（3）プローブ顕微鏡による分子識別、計測技術

近畿大学グループ

研究分担グループ長：本津 茂樹（近畿大学生物理工学部 教授）

研究実施項目：多次元自己組織化ナノデバイス

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

【投稿論文】

〈国際誌〉

- Katsunori Tagami, Takuya Matsumoto, Tomoji Kawai, Masaru Tsukada
“Theoretical Prescriptions for Improving Conductances of Short DNA Segments Sandwiched by Metal Electrodes” Jpn. J. Appl. Phys. vol. 42, Part 1 No. 9A, September, 5887-5891 (2003)

〈国内誌〉

- 安立京一 “DNA中の電荷移動とその塩基配列依存性” 化学と工業 「トピックス」 (2003年11月)

- 大塚洋一、内藤泰久、寺脇歩、松本卓也、川合知二 “点接触電流イメージング原子間力顕微鏡の開発” 表面科学 24巻 第9号 p.573

【口頭発表】

〈国際発表〉

- F. Yamada, H. Tanaka, T. Matsumoto, T. Kawai, “Structure and electronic properties of DNA-metal nanoparticle complex” 「12th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques」 Holland, Eindhoven. Eindhoven University of Technology, 2003, 7, 24.
- Takuya Matsumoto and Tomoji Kawai, “Photo-coincident Time-resolved Force Detection by Noncontact Atomic Force Microscopy” Sixth International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy, Dingle, Ire, 2003, 9, 2.
- Y. Otsuka, Y. Naitoh, T. Matsumoto, W. Mizutani, H. Tabata and T. Kawai “Fabrication of nano-gap electrode without lithography technique and electrical characteristics of nano structured molecules” International symposium on scientific and industrial nanotechnology Osaka University, 2003, 12, 8.
- Keiichi Adachi, Masateru Taniguchi, and Tomoji Kawai “Complex Incorporation in DNA Duplexes” International symposium on scientific and industrial nanotechnology Osaka University, 2003, 12, 8.
- Toshihito OHTAKE, Chiho HAMAI, Takeshi UNO, Hitoshi TABATA and Tomoji KAWAI “Immobilization of probe DNA on Ta₂O₅ thin film and detection of hybridized helix DNA by using IS-FET” International symposium on scientific and industrial nanotechnology Osaka University, 2003, 12, 8.
- F. Yamada, Y. Otsuka, T. Matsumoto, H. Tanaka, T. Kawai “DNA-templated assembly of gold nanoparticles” The 11th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2003, 12, 11.
- K. Ojima, K. Adachi, F. Yamada, T. Matsumoto and T. Kawai “Alignment of Au nano-particle on HOPG surface” The 11th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2003, 12, 11.
- Y. Otsuka, Y. Naitoh, T. Matsumoto, W. Mizutani, H. Tabata and T. Kawai “Measuring Electrical Conductivity of Molecules with Nano-gap electrodes” The 11th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2003, 12, 11.
- Takeshi Uno, Toshihito Ohtake, Hitoshi Tabata and Tomoji Kawai

“Direct Detection of DNA using ISFET based on PNA” 7th SANKEN International Symposium on Hybridization of Chemistry, Biology and Material Science, 2004, 1, 13.

- Toshihito OHTAKE, Shinji MATSUI, Hitoshi TABATA and Tomoji KAWAI “DNA Nano-patterning by Nanoimprint and Self-organization” 7th SANKEN International Symposium on Hybridization of Chemistry, Biology and Material Science, 2004, 1, 13.
- H. Tabata, T. Ohtake, T. Uno, Y. Ohtsuka and T. Kawai “Interdisciplinary Nano-Technology of Bottom-Up and Top-Down for DNA and Bio-Electronics” International Workshop on Plasma Nano-Technology and Its Future Vision, 2004, 2, 5.
- 産業科学研究所 産業科学ナノテクノロジーセンター “Bio/DNA chip based on IS-FET Primary process of quantum beam-induced nanofabrication Environmentally conscious electronics packaging” nano tech 2004国際ナノテクノロジー総合展・技術会議, 2004, 3, 17-19
- Y. Otsuka, Y. Naitoh, T. Matsumoto, W. Mizutani, H. Tabata and T. Kawai “Fabrication of Nano-gap Electrodes Without Lithography Technique and Electrical Characteristics of Nano Structured Molecules” Annual APS March Meeting 2004 Montreal (Canada) 2004, 3, 22.

〈国内発表〉

- 安立京一 “DNAの選択的結合能を利用したナノ構造体の構築” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」
- 小嶋 薫 “DNAをテンプレートとした分子配列の構築” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」 (2003年4月)
- 大竹才人 “生体適合性バイオチップ” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」 (2003年4月)
- 宇野 毅 “ペプチド核酸分子 (PNA) およびDNAの固定化に関する定量的評価とPNAチップの開発” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」 (2003年4月)
- 田畑 仁 “ゆらぎと共存の物理ースピン・電荷・双極子～酸化物&バイオエレクトロニクスに向けて～” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」 (2003年4月)
- 金井真樹 “バイオチップ基板応用を目的とした光応答性無機・有機複合デバイスの作製” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」 (2003年4月)
- 八尾亜紗子 “DNA chipの作製過程とhybridizationの液中観察” 「ナノサイエンス

ス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」(2003年4月)

- 屋嘉比友子 “蛍光分子インターカレーションDNAの光誘起電気伝導” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」(2003年4月)
- 菅野誉士 “生体分子のAFM観察” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」(2003年4月)
- 大塚洋一 “DNAの構造と電気伝導性に関する研究” 「ナノサイエンス・ナノテクノロジー研究ワークショップ」(2003年4月)
- 安立京一・谷口正輝・川合知二 “DNA塩基と相補的な相互作用をする錯体の合成とその認識能” 第53回錯体化学討論会(2003年9月)
- 小林俊之・谷口正輝・川合知二 “半導体および絶縁膜ともに高分子を用いた有機FETの作製と特性評価” 第64回応用物理学会学術講演会(2003年9月)
- 田中慎一・谷口正輝・田畑 仁・藤原伸介・内山 進・福井希一・川合知二 “酵素反応を用いた長鎖Poly(dG)・Poly(dC)の合成” 高分子学会(2003年9月)
- 小嶋 薫、安立京一、大竹才人、宇野 毅、金井真樹、谷口正輝、松本卓也、田畑仁、川合知二 ” プログラム自己組織化を用いた新規なバイオデバイスの創製” 「ナノ格子新技術開発研究センター第2回シンポジウム」(2004年1月)
- 楠正暢、川島将実、西川博昭、本津茂樹、森本康一、川合知二 “ハイドロキシアパタイトパターン上への蛋白質吸着” 「第51回応用物理学会関係連合講演会」(2004年3月)
- 宇野 毅、大竹 才人、田畑 仁、川合 知二 “PNA-ISFET用いたDNAの検出” 「第51回応用物理学会関係連合講演会」(2004年3月)
- 谷口正輝、藤本辰彦、小嶋薫、H. L. Anderson, 川合知二 “プログラムされた分子ワイヤの合成と物性” 「第51回応用物理学会関係連合講演会」(2004年3月)
- 大竹才人、中松健一郎、松井真二、田畑 仁、川合知二 “ナノインプリントを利用した自己組織化によるDNAナノパターンニング” 「第51回応用物理学会関係連合講演会」(2004年3月)
- 小嶋 薫、宇野 毅、松本卓也、川合知二 “Au(111)表面でのペプチド核酸単分子膜の形成” 「第51回応用物理学会関係連合講演会」(2004年3月)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件