

「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、結晶性・生体親和性に優れたハイドロキシアパタイト薄膜の作製、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ィ技術）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。Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>基板上への特異な配向を持たせたHApの薄膜作製。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16年度の成果を項目別に報告する。

#### 1) バイオ分子デバイス

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、まず、DNAの塩基識別能を利用して1次元テンプレートを形成させる必要がある。まず、9本の異なる配列のDNAを用

いてビルディングブロックを形成させ、そのブロック同士をさらに連結することで一次元構造の構築に成功した。各ビルディングブロックからは1本鎖DNAが出ており、これがアンカー部位となり他分子を特異的に捕らえる働きをする。ブロックの1本鎖DNAに相補的な配列を持つPNAで被覆した金ナノ粒子を作製してテンプレート溶液と混合したところ、金ナノ粒子の一次元構造の作製に成功した。最終的には金ナノ粒子を他分子で架橋する必要があり、その検証を行った。PNAに加えアミノエタノールを金ナノ粒子の被覆分子として用いた結果、複数の成分で被覆できることを確認した。この金ナノ粒子はビスアルデヒドで架橋できることも分光・AFMにより確認した。これらの結果から分子配列作製に向けての基本ユニットとなるDNAテンプレートおよび金ナノ粒子の設計・作製に成功したと言える。

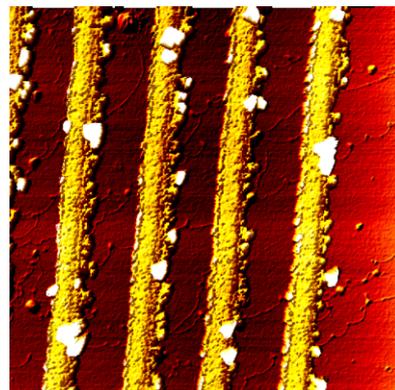


図1 ナノトランスファーにより作製した金電極

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・融点測定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。また欠陥を有するDNAを用い、上で用いた分子の分子認識能を検討したところ、使用した分子が欠陥を補填するような挙動が見られた。

さらに、デバイス作製に向けて、位置決めの問題を解決すべく、トップコンタクト方式電極の有用性を検討した。既存のボトムコンタクト型電極では、コンタクトが確実に取れない、分子が歪む等の問題があった。今回取り入れたこの新手法では、非加熱・非表面修飾により金電極作製に成功した(図1)。この電極は、バルクの金属特性を有する、且つ、有機導体を通して電流を流せる、特性を持つことを確認した。これらの結果より、ナノトランスファープリンティングにより作製した電極は、分子デバイス作製に利用できると考えられる。

## 2) 生体情報ナノデバイス

塩基の正確な対合によってDNAが2本鎖を形成するハイブリダイゼーションプロセスは、バイオテクノロジーの分野における重要な反応である。この反応を効率的に利用した生体情報デバイスは、ポストゲノムシーケンス時代のキーテクノロジーとして注目されている。我々は、ペプチド核酸分子(PNA)と電界効果トランジスタ(ISFET)を組

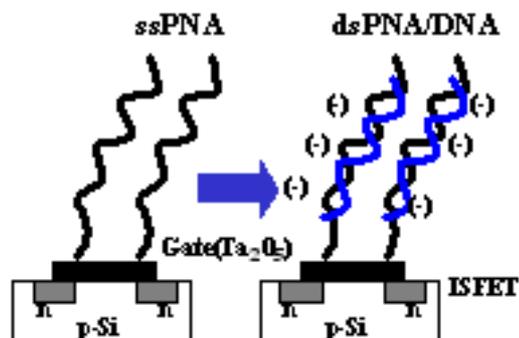


図2 ISFETによるDNA検出の原理図

み合わせた新規生体情報デバイスを作製し、遺伝子検出の可能性について評価した。PNAは2-アミノエチルグリシンを骨格とする無電荷の人工核酸分子で熱安定性、塩基配列選択性、塩濃度非依存性などハイブリダイゼーション反応に優れ、またISFETを用いる事によりDNAハイブリダイゼーションをダイレクトに検出する事が可能となる。

ゲート面にプロトン感受性膜 $Ta_2O_5$ を有するBAS社製ISFET電極を実験に用いた。ISFET電極ゲート面にアミノシラン誘導体を導入後グルタルアルデヒドによる架橋を組み合わせPNAを固定化した。その後逆反応と平衡関係にあるシッフ塩基の安定化の為 $NaCNBH_3$ により還元処理を行なった。処理後相補鎖DNAとのハイブリダイゼーション反応を行い、ハイブリ前後のI-V特性を測定した。結果ハイブリダイゼーション反応によって、静特性飽和電流値の減少また伝達特性閾値電圧の正シフトが観察された。これはポリアニオン性DNAのハイブリダイゼーションにより正のゲート電圧が相殺された事に起因する現象と考えられる。

### 3) 多次元自己組織化五感センサ・メモリ

多様な外場応答機能を持つ、無機材料、有機材料、バイオ材料を、ナノパターニングを施した固体表面上へ自己組織化により形成・配置し、磁場、赤外線、分子、電界などに応答する各種センサを形成する。さらに可視および赤外光に優れた光応答機能を有する無機酸化物/有機半導体、分子応答性を持つ有機/バイオ材料、バイオ分子をプログラム自己組織化に基づき原子・分子スケールで組み合わせて、多様な情報に高感度に応答する新規センサ群(五感)センサを形成する。

目標として赤外線センサと味覚用センサの形成を掲げ、その各種センサ材料として下記の材料を選定し、ナノ薄膜形成を行った。

- 赤外線センサ材料 -  $(La, Ba)MnO_3$ セラミックス (無機材料)
- 味覚用センサ材料 -- 脂質二分子膜 (リポソーム) (バイオ分子材料)

また、自己組織化用テンプレートを作製の為、AFMによる機能性酸化物薄膜のナノ加工を行った。

赤外線センサ関連 ---- 遷移金属酸化物薄膜 ( $(La, Ba)MnO_3$ 薄膜) を用いて赤外線センサを開発するにあたり、基板( $SrTiO_3$ )との格子歪みを利用して結晶構造を制御することにより、室温で4~6%/Kの高い抵抗温度係数および、 $10^{-31}$ 乗位の低いノイズ指数を得ることに成功した。こ即ち、 $(La, Ba)MnO_3/SrTiO_3$ 薄膜の低周波ノイズは既知の材料よりはるかに低く、センサ検出能の大幅な向上が期待できる

バイオセンサ関連 ---- 生体分子である脂質二分子膜 (リポソーム) を用いて電極に基板上に固定化を試みた。特に、電気化学的な反応を用いて味覚の物質を検出するためリポソーム膜の機能化を行うとともに金電極上に高密度で固定化する方法を検討した。味覚用センサにおいては、機能性リポソーム膜を用いて4つの基本的な味覚物質 (苦味、甘味、塩味、酸味) に対して主成分分析により応答性を検討した結果、市販のコーヒーにおいて4種の成分パターンが異なり識別できることを示した。

機能性酸化物薄膜のナノ加工 ---- 探針に印加する電界、走査速度、荷重などを調整する事により、30nm級のナノ加工を達成した。これは機能性酸化物のナノ加工における世界最

高値である。

#### 4) 多次元自己組織化バイオナノデバイス

本研究では、平成15年度に引き続いて、ハイドロキシアパタイト (HAp) がタンパク質やデオキシリボ核酸 (DNA) などの機能性生体関連分子を強く吸着する能力に優れていることを活かし、HApの高結晶性薄膜を作製してバイオセンサや細胞培養のスキヤホールド、バイオリアクタなどへ応用することを目的に基礎研究を行っている。平成16年度は①水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) の振動子センサ表面へのHApコーティングに伴う分子検出の高感度化、②Naドーピングすることで導電性を向上させたNa-HApを用いたタンパク質センサの試作、③ $Al_2O_3$  (0001) 基板を用いた軸配向HAp薄膜の作製、を中心に研究を行った。これらの結果を以下に述べる。

図3に、HApコートQCMセンサの実験概略図を示す。市販の水晶振動子表面にHAp薄膜をコートすることで、センサへの分子吸着能を向上させ、高感度化することを考えた。実験はリン酸緩衝生理食塩水中で、ウシ血清アルブミン (BSA) を滴下した。結果を図4に示す。これより、通常的水晶振動子センサに比べて感度が50倍以上になっており、HApの持つ優れたタンパク質吸着能を活用することに成功したといえる。

次に、Na-HApを用いたタンパク質センサについて述べる。NaをCaサイトに10%ドーピングしたNa-HAp薄膜をポーラスアルミナ基板上へ作製し、真空蒸着法によって金のくし型電極を取り付けた。ポーラスアルミナを基板として用いたのは、分子吸着のための表面積を大きくするためであり、吸着に伴う表面電子状態の変化をくし型電極間の交流抵抗で測定することを試みた。純水中へ薄膜試料を設置し、120 kHzの交流抵抗を測定しながらBSAを滴下したところ、図5に示すように滴下に伴って (矢印の時間) 交流抵抗が減少し、Na-HApの電気抵抗がBSAの吸着によって減少することがわかった。この結果より、Na-HApのタンパク質センサとしての可能性を明らかにした。

最後に軸配向HAp薄膜の作製結果について述べる。現在HAp結晶の人工的な作製法は水溶液からの析出法が主流を占めているが、その結晶性は極めて低い。これに対して、本研究ではレーザーアブレーション法という物理的気相成長によって結晶を作製しており、結晶性に優れた試料を作製できる。この場合、基板選択によってエピタキシャル成長することが期待できる。HApと格子整合性のよい基板を考えた結果、不整合1%以下である $Al_2O_3$  (0001) を用いることを試みた。この

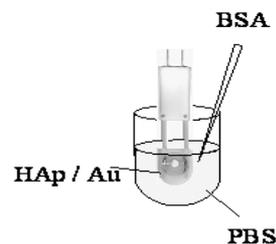


図3 HApコートQCMセンサの実験概略図

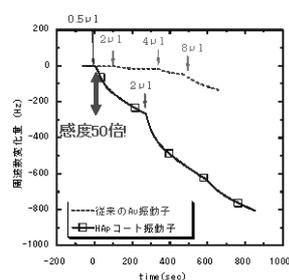


図4 HApコートQCM

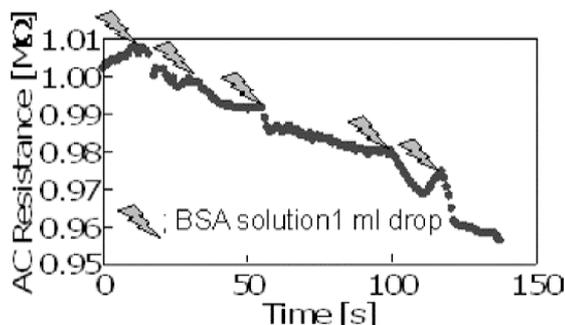


図5 Na-HApへBSAを吸着させた際の電気抵抗変化

場合、HApはc軸配向、すなわちc面のみが表面に露出した試料となるが、HApのc面が塩基性タンパク質を優先的に吸着することから酸性タンパク質と塩基性タンパク質を分離することが可能となる。実験の結果、基板温度750℃、ガス圧( $O_2+H_2O$ )100 mTorr、成膜速度4Å/分という条件で、図6に示すX線回折パターンのような、極めて高品質な試料を得ることに成功した。

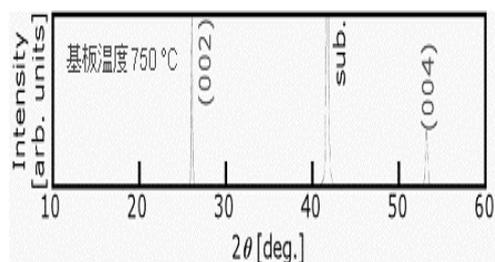


図6  $Al_2O_3(0001)$ 基板上へ作製したc軸配向HAp薄膜のX線回折結果

平成17年度以降は、上記の結果を基に、パターンニングしたHApと軸配向制御を組み合わせ、分子吸着能に優れた機能性生体分子の自己組織化のためのテンプレートを作製し、チーム内での他のグループとの連携を密にしていく予定である。

#### 5) プローブ顕微鏡による分子識別、計測技術

絶縁体上に形成された自己組織化構造各部の電氣的ポテンシャル測定を行った。一般的にナノ表面のポテンシャル測定は、ケルビンフォース顕微鏡を用いて行われる。しかし、その原理は導体基板と導体探針との間の接触電位を測定するものであるために、絶縁体上の局所電荷状況を把握する方法はないと考えられてきた。しかし絶縁体表面でも十分に電場の変調をかけることができ、ナノサイズの表面ポテンシャル画像が実際に得られることが、実験と有限要素法を用いた計算の両面から明らかになった。

### 3. 研究実施体制

#### 大阪大学グループ

- ①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）
- ②研究実施項目：（1）バイオ分子デバイス
- （2）生体情報ナノデバイス
- （3）多次元自己組織化五感センサ・メモリ
- （4）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

- ①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）
- ②研究実施項目：多次元自己組織化バイオナノデバイス

### 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

- Toshihito OHTAKE, Chiho HAMAI, Takeshi UNO, Hitoshi TABATA and Tomoji KAWAI, “Immobilization of Probe DNA on  $Ta_2O_5$  Thin Film and Detection of Hybridized Helix DNA by Using IS-FET” Japanese Journal of Applied Physics Vol. 43, pp L1137 (2004)
- M. Kanai, H. Tanaka, and T. Kawai, “Origin of metal-insulator transition

temperature enhancement in  $\text{La}_{0.8}\text{Ba}_{0.2}\text{MnO}_3$  thin films as determined by structural analysis “ Physical Review B , Vol. 70, pp 125109 (2004)

- Yoichi Otsuka, Yasuhisa Naitoh, Takuya Matsumoto, Wataru Mizutani, Hitoshi Tabata and Tomoji Kawai, “A Simple Fabrication Method of Nanogap Electrodes for Top-contacted Geometry: Application to Porphyrin Nanorod and DNA Network “ Nanotechnology 15 (2004) 1639-1644.
- HeaYeon Lee, JongWan Park, HoSub Jung, JongMin Kim, and Tomoji Kawai “Electrochemical assay of nonlabeled DNA chip and SNOM imaging by using streptavidin-biotin interaction” Journal of Nanoscience and Nanotechnology., 4 (2004) 882-885
- Takeshi UNO, Toshihito OHTAKE, Hitoshi TABATA and Tomoji KAWAI ” Direct Deoxyribonucleic Acid Detection Using Ion-Sensitive Field-Effect Transistors Based on Peptide Nucleic Acid” Jpn. J. Appl. Phys., Vol.43, No.12B, 2004, pp.L1584-1587
- Fumihiko Yamada, Yutaka Sacho, Takuya Matsumoto, Hidekazu Tanaka, and Tomoji Kawai ” DNA-Templated Assembly of Au Nanoparticles via Step-by-Step Binding Reaction” e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, Vol. 2 (2004) 222-225
- Toshihito Ohtake, Kenichiro Nakamatsu, Shinji Matsui, Hitoshi Tabata, and Tomoji Kawai “DNA Nano-Patterning with Self-organization by using Nanoimprint” J. Vac. Sci. Technol. B, Nov/Dec 22 (6), 3275-3278 (2004)
- J. M. Kim, H. S. Jung, J. W. Park, H. Y. Lee, T. Kawai, “AFM Phase Lag Mapping for Protein-DNA Oligonucleotide Complexes” Ana. Chem. Acta, 525 (2004) 151-157.
- H.Y. Lee, J. W. Park and T. Kawai, “SNPs feasibility of nonlabeled oligonucleotides by using electrochemical sensing” Electroanalysis., 16 (2004) 1999-2002.
- Masanobu Kusunoki, Masami Kawasima, Hiroaki Nishikawa, Koichi Morimoto, Takashi Hayami, Shigeki Hontsu, and Tomoji Kawai “Protein Adsorption on Patterned Hydroxyapatite Thin Film Fabricated by Pulsed Laser Deposition” Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 44 (2005) No. 10, pp. L326-L327
- 田畑 仁 “DNA分子の特徴活かした自己組織化パターン形成 ナノインプリント活用によるナノパターン作製にもチャレンジ” Nano Tech Weekly (週刊ナノテク) 1178 (2004) 10-11.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：6件 (CREST研究期間累積件数：7件)