

「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、その原理にのっとった人工的な“生体情報材料”の創製を目指し展開してきた。以下に、平成 17 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。昨年度までに、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次元構造の構築に成功している。今年度、各ビルディングブロックから末端をチオール化したDNAを出すことにより、特異的に金粒子を吸着させ、配列させることを試みた。その結果、一定間隔を有する金微粒子配列を再現性よく作製する方法を見出した。よって、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パーティクルの設計・作製に成功したと言える。

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。昨年度までにDNA-包摂分子複合体が存在することを確認している。そこで今年度は、その構造体と金電極を架橋すべく、DNA-電極間連結分子の設計、合成を行った。既存のDNAチップ等の研究では、DNA-電極間の連結サイトには主にアルカンチオール構造が用いられており、特にその部分での電荷移動は非常に疑わしかった。そこで架橋分子に π 電子系の広がった電子構造を持たせることで、DNA或いは構造体内部の電荷移動の情報を、直截に電極まで引き出すことが可能になると考えた。架橋分子の作製にあたり、分子（塩基）認識部位、架橋部位、電極接合部位に分けて設計を行った。

さらに、これまで絶縁体上電荷測定法を開発し、さらに構造体と電極との接合についてプローブ顕微鏡を用いて評価する技術を確立した。

2) 生体情報ナノデバイス

これまでイオン感応性電界効果トランジスタ (IS-FET) のDNAチップとしての可能性を評価してきた。今年度、X線光電子分光法 (XPS)、表面プラズモン共鳴測定 (SPR) 及び電気浸透流を利用した固体表面ゼータ電位測定を実施、表面科学的手法により多角的にIS-FETの遺伝子センサとしての可能性を評価した。またインクジェットを用いピコからナノリットルオーダーで射出量の制御されたプローブ分子PNAの固定化法を確立した。

また、これまで基板上への生体分子の固定については、生体分子の失活や非特異的吸着等の問題があった。それらを解決すべく、ナノウェル構造の構築や、生体親和性の高いハイドロキシアパタイトの利用を考えた。

ナノウェル構造構築に関しては、金電極上にナノサイズの井戸型構造を格子状に配置することで、電気化学的に検出可能な生体情報ナノデバイスの開発を目指した。その為に先ず、マイクロサイズでリポソームの固定化を検討した。金電極への生体分子の金電極への非特異的な吸着を制御するためPEGコポリマーをレジストとして用いて、キャピラリーリソグラフィーによるPEGコポリマーの100nmのマイクロウェル構造体の作製に成功した。さらに、PEGコポリマーマイクロウェル構造体中にボトムアップ技術を用いて自己組織的にリポソームを固定化することに成功した (図1)。今後上記の手法を応用し、ナノウェル構造体の作製及び電気化学的な検出法を検討する。

ハイドロキシアパタイト (HAp) の利用に関しては、HAp の高結晶性薄膜を作製してバイオセンサや細胞培養足場などへ応用することを目的に

基礎研究を行っている。以下に概略を説明する。

血糖値測定が簡易に行えるグルコースセンサの開発を念頭に、Na をドーピングして導電性を増加させた HAp 薄膜の表面に交流電圧を印加し、その表面インピーダンス変化を測定した。50 ml の純水中に試料を設置し、そこへグルコース酸化酵素であるグルコースオキシダーゼを滴下、さらにグルコースを滴下した場合には、約 6 % と大きなインピーダンス変化を示した (図 2)。

HAp 表面に細胞非親和性を示す可能性のある撥水性高分子をコーティングし、これをリソグラフィとエッチング技術によってマイクロレベルで加工することを試みた。これにより、目的の場所に目的の細胞、組織を共培養することが期待できる。実験の結果 HAp/ジメチルポリシロキサン各領域で、明確に神経細胞の吸着/非吸着を確認することができた (図 3)。これにより、神経細胞を自由な形状に誘導しパターン化することが可能であることが示され、ドラッグスクリーニング用の試験チップなどへの応用が期待できる。

マイクロレベルでパターンを持つポリスチレンフィルム表面に、レーザアブレーション法で均一な HAp 薄膜を作製することに成功した (図 4)。この結果は細胞親和性に優れた HAp 表面にマイクロレベルの凹凸を作製したこととなり、各種の組織形成に

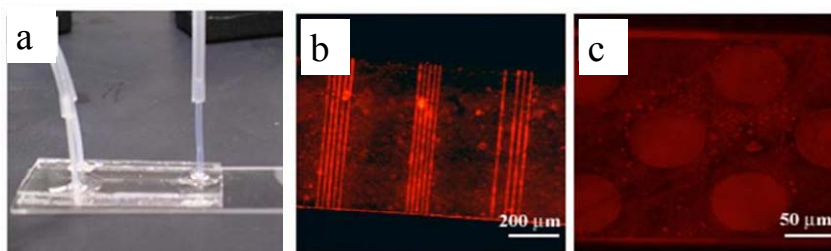


図 1. マイクロウェル構造体中でのリポソームを固定化

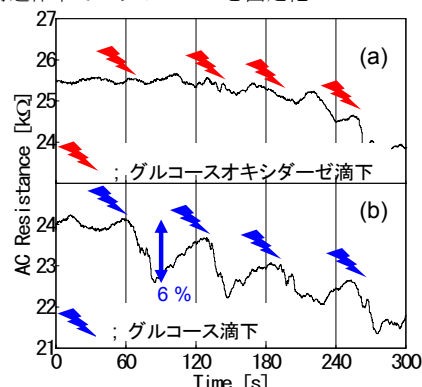


図 2 グルコースセンサ予備実験の結果。(a) はグルコースオキシダーゼのみを滴下した結果。(b) はその後グルコースを追加する形で滴下した結果。

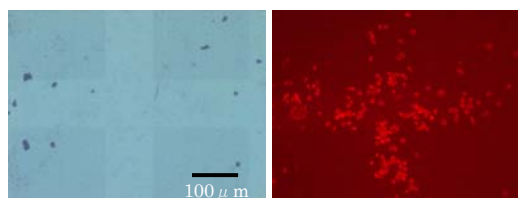


図 3 HAp/ジメチルポリシロキサンのパターン化(a)を行い、その神経細胞の吸着/非吸着を確認することができた(b)。

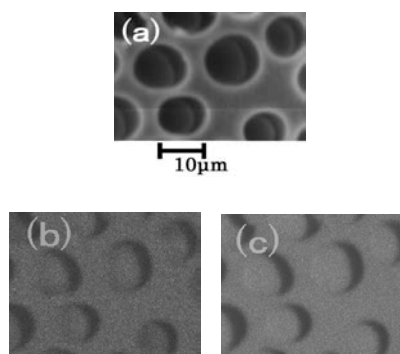


図 4 マイクロレベルで凹凸を持つポリスチレン表面への HAp 薄膜作製結果(a)。EDX 分析結果より、HAp 構成元素である Ca(b)、P(c)が均一に、しかも表面形状を壊さずに存在することがわかる。

大きな影響を与えるとされているオーダーでの表面形状と、HAp の細胞親和性を組み合わせた新たな細胞培養足場作製が期待できる。

3) 多次元自己組織化五感センサ・メモリ

昨年度までに、 $\text{La}_{0.8}\text{Ba}_{0.2}\text{MnO}_3$ (LBM0) 薄膜を作製し、この薄膜が温度変化に対する優れた応答と低ノイズ性を持つことを見いだした。今年度はこの薄膜を赤外線センサ媒体として利用することを試みて実験を行ってきた。具体的には素子の微細化及び集積化を目指して以下の研究を行った。この上記素子の実用化に向け、センシングアルゴリズム、具体的には動画像中の輝度・色相情報の変化を捉えるアルゴリズムの検討を行った。また、赤外線センサの開発と平行して、ストレスセンサの開発も行った。

1. SrTiO_3 (STO) 単結晶基板のパターニング

現在計画中の手法においては、赤外線センサ媒体の微細化および集積化を、自己組織化現象を利用して行うために、STO 基板の加工が必要である。そこで本研究では、AFM リソグラフィを用いて加工を試みた。STO(100) 基板は絶縁体なので、そのままでは AFM による加工はできない。そこで、まず基板上に PLD を用いて STO を約 30nm ホモエピタキシャル成長させる。この STO 薄膜は酸素欠陥を多く含んでいるので導電性が現れ、AFM リソグラフィによる加工が可能になった。また加工したサンプルを $\text{HF-NH}_4\text{F}$ 緩衝水溶液 (pH=5.0) で 1 分間エッチングすることによって、パターン部分が除去され、くぼみができることがわかった。このパターンされた STO 薄膜は、空气中 1400℃ でアニールすることにより、パターンを残したまま酸素欠陥が回復し絶縁体に戻った。これにより、STO 薄膜は STO 単結晶基板と一体化したと考えられる。

2. モリブデン・リフトオフ法による、LBM0 結晶の離散的配置

赤外線カメラとして LBM0 薄膜を動作させるためには、LBM0 結晶が離散的に配置されることが必要である。我々は加工した STO 基板上に自己組織化現象を利用して配置させることを考えているが、それと平行して、別の手法も試みた。まず、STO 基板上にモリブデンを約 12nm スパッタし、AFM リソグラフィで加工して穴を開け、このモリブデン層をマスクとして、LBM0 を 700℃ で蒸着する。モリブデン層は 1M 水酸化ナトリウム水溶液で 1 時間エッチングすることにより除去された。これに伴いモリブデン層の上に乗った余分な LBM0 もリフトオフされ、LBM0 結晶素子の離散的な配置に成功した。

3. センシングアルゴリズムの検討

上記赤外線検知モジュールと組み合わせるオムロンのセンシングアルゴリズム、具体的には動画像中の輝度・色相情報の変化を捉えるアルゴリズムの検討を行った。実工業環境における実証例として、モータの異常発熱を赤外線動画像から早期検知でき、ひいては回転部品の故障予知にも応用できる可能性を示した。

また、信号処理技術の実環境における実証実験として、軽量走行ロボットが自動収集していく視覚動画情報を、センサネットワークを活用してロボット上と基地局上で効果的

に計算資源を分割し信号処理する実験システムを構築した。このシステム上で、特徴的な視覚動画情報として顔属性を例に、既存のエンジンにより顔属性を検知し、この顔属性検知結果に応じ最適なロボット動作モードへ変化していくことを検証する実証実験を行った。

4. DNA-タンパク質分子間相互作用を利用したストレスセンサの開発

グルココルチコイドレセプター(GCR)がグルココルチコイド(GC)の存在によりダイマーを形成して特定の塩基配列をもつ DNA に結合する性質を利用し、表面プラズモン共鳴法 (SPR)を用いて DNA の塩基配列の違い、および生体試料中の GC 濃度をパラメータとして明確な検出シグナルレベルの差を確認した。DNA の塩基配列による DNA-タンパク質分子間相互作用の特異性、検出シグナルの測定対象分子 (GC) 濃度依存性を確認できたことによって、特定塩基配列を持った DNA をプローブとして、センサ基板上に固定化したストレスセンサへの適用可能性を検証した。

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、教授）

②研究項目：

- ・バイオ分子デバイス
- ・生体情報ナノデバイス
- ・多次元自己組織化五感センサ・メモリ

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、教授）

②研究項目：生体情報ナノデバイス

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- “Fabrication of DNA nanofibers on a planar surface by electrospinning”, T. Takahashi, M. Taniguchi, and T. Kawai, Jpn. J. Appl. Phys. 44 (2005) L860–L862.
- “DNA patterning by nano-imprinting technique and its application for bio-chips”, H.Tabata, T.Uno, T.Ohtake and T.Kawai, Journal of Photopolymer Science and Technology, 18 (2005) 519–522.
- “Suppressing low-frequency noise in $\text{La}_{0.8}\text{Ba}_{0.2}\text{MnO}_3$ films by a simple method of controlling film thickness”, H. Touyama, H. Tanaka, T. Kawai and M. Kanai, Appl. Phys. Lett. 87, 102504 (2005)
- “Protein Adsorption on Patterned Hydroxyapatite Thin Films Fabricated Pulsed Laser Deposition”, Masanobu Kusunoki, Masami Kawasima, Hiroaki Nishikawa, Koichi Morimoto,

- Takashi Hayami, Shigeki Hontsu and Tomoji Kawai, Japanese Journal of Applied Physics, 44 (2005) L326–L327.
- “Printing electrode for top-contact molecular junction”, K. Ojima, Y. Otsuka, T. Matsumoto, T. Kawai, K. Nakamatsu and S. Matsui, Applied Physics Letters 87, 234110 (2005).
 - “Electrical Recognition of Label-Free Oligonucleotides upon Streptavidin Modified Electrode Surfaces”, J.W.Park, H.S.Jung, H.Y.Lee and T. Kawai, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 10, 505–509 (2005)
 - “Co-crystallization between a thymine and a metal complex connected by triple hydrogen bonds”, K. Adachi, M. Taniguchi, S. Kawata, and T. Kawai, Inorg. Chim. Acta, 358, 4563 (2005)
 - “Soft lithographic patterning of supported lipid bilayers onto a surface and inside microfluidic channels”, P. N. Kim, S. E. Lee, H. S. Jung, H. Y. Lee, T. Kawai, and K. Y. Suh, Lab on a chip, 6, 54–59 (2006).
 - “Dependence of Ionic Strength for Immobilization of Probing Oligonucleotides onto Streptavidine modified Surface”, R. Yamasaki, J. M. Kim, H. S. Jung, H. Y. Lee and T. Kawai, Biochemical Engineering Journal (BEJ), 29, 125–128 (2006).
 - “Electronic structure of strained $(\text{La}_{0.85}\text{Ba}_{0.15})\text{MnO}_3$ thin films with room-temperature ferromagnetism investigated by hard x-ray photoemission spectroscopy”, Hidekazu Tanaka, Yasutaka Tanaka, Koji Horiba, Munetaka Taguchi, Ashish Chainani, Shik Shin, Daigo Miwa, Kenji Tamasaku, Yoshinori Nishino, Tetsuya Ishikawa, Eiji Ikenaga, Mitsuhiro Awaji, Akihisa Takeuchi, Tomoji Kawai, and Keisuke Kobayashi, Physical Review B, 094403, (2006).
 - “Optical rotation inversion of porphyrin-DNA complexes”, Chikako Takatoh, Takuya Matsumoto, Tomoji Kawai, Takayuki Shitoh and Kazuyoshi Takeda, Tetrahedron Lett. 47, 519–522 (2006).
 - “Single molecular morphology of porphyrin / DNA complex”, ChikakoTakatoh, Takuya Matsumoto, Tomoji Kawai, Takayuki Saitoh and Kazuyoshi Takeda, Chem. Lett. 35, 88–89 (2006).
 - “A Robot with Networked Facial Image Sensing”, Eiji Takemoto and Hideyuki Kishiba, Proceeding of INSS2005 (Second International Workshop On Networked Sensing Systems) pp.124–127, 2005 ISBN 0-9743611-2-7
 - “Hall Effect in Strained $\text{La}_{0.85}\text{Ba}_{0.15}\text{MnO}_3$ Thin Films”, Teruo Kanki, Takeshi Yanagita, Bertrant Vilquin, Hidekazu Tanaka, and Tomoji Kawai: Physical Review B, 71, (2005) 012403.
 - “Nanopatterning of Perovskite Manganite Thin Films by Atomic Force Microscope

- Lithography” Run-Wei Li, Teruo Kanki, Hideaki Tohyama, Motoyuki Hirooka, Hidekazu Tanaka, and Tomoji Kawai: *Nanotechnology*, 16 (2005) 28-31.
- “Amperometric Immunosensor for Direct Detection Based upon Functional Lipid Vesicles Immobilized on Nanowell Array Electrode” H. S. Jung, J. W. Park, L. M. Kim, H. Y. Lee, and T. Kawai: *Langmuir*, 21(13), (2005) 6025-6029.
 - “Conductance Measurement of a DNA Network in Nano-Scale by Point Contact Imaging Atomic Force Microscopy”, A. Terawaki, Y. Otsuka, H. Y. Lee, T. Matsumoto, H. Tanaka, and T. Kawai: *Appl. Phys. Lett.*, 86 (2005) 113901.
 - “Spontaneous Immobilization of Liposomes on Electron-Beam Exposed Resist Surfaces”, J. M. Kim, H. S. Jung, H. Oka, T. Yukimasa, H. Y. Lee, and T. Kawai: *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 2358-2362.
 - “Approach to Electrical Conductance Spectroscopy of Chemical Reactions on Nano-Space”, K. Yokota, M. Taniguchi, and T. Kawai: *Chem. Phys. Lett.*, 44 (2005) L860-L862.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 5 件 (CREST 研究期間累積件数 : 6 件)