

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 18 年度採択研究代表者

中山 喜萬

(大阪大学大学院工学研究科 教授)

「カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測」

1. 研究実施の概要

生体反応は、分子の構造変化や相互作用、エネルギー移動を伴って進行する。これを分子レベルで解明するために、本研究は、カーボンナノチューブ (CNT) の優れた電気機械的性質を利用して変位と熱流の検知デバイスを開発し、数ミリ秒の時間分解能でzeptogram精度の質量と pN精度の2次元力、 10^{-19}J 精度の熱量を計測する技術を構築することを目的としている。

本年度はCNT先端への部位特異的タンパク質結合技術の確立、CNTの物性制御、質量・力計測デバイス開発、質量計測技術の開発、熱量計測デバイス開発の基礎的な技術構築とデータ収集に主眼をおいた。

2. 研究実施内容

1. ナノチューブ先端への部位特異的タンパク質結合技術の確立(中山 G、吉村 G)

1-1 CNT アーム先端の活性化(中山 G、吉村 G)

TEM 内でマニピュレータを操作して孤立した CNT を Si カンチレバー先端に担持し、通電によるCNT先端の開端加工プロセスを検討した。過剰通電によって多層CNTが電極間中央部の最外層から順に昇華し、最終的に切断することを確認した。ただし、切断したCNTは先端が高い確率で閉じていることも見いだした。先端の開端法として、切断して一旦閉じたCNTの先端同士を対向させ、直流電圧を印加して負極から電子放出させることにより、正極のCNT先端を開端できることを見いだした。

開端したCNT先端へのタンパク質トラップは、カートリッジ上に配列したCNTについて調べた。TEM観察を容易にするためQドットをマーカーとして取り付けられたタンパク質(ストレプトアビジン)を用いた。CNT表面に欠陥がある場合は側壁にも付着することを確認した。そういった場合でもCNTに電界を印加しながらプロセスすることにより、先端のみへの選択的トラップが行えるという知見を得た。

1-2 CNTシートの開発(中山 G)

CNTシート素材として、Si基板上に垂直配向した $100\mu\text{m}$ 長のブラシ状単層CNTを合成した。これにディッピング法によりエポキシ樹脂を含浸し、CNT-樹脂複合シートを作製した。この表面を粒

径 $1.0 \mu\text{m}$ の研磨剤を用いて研磨し、SEM 観察により表面形状を調べた結果、CNT 突起が無数に存在することを確認した。CNT の密度や突出長さ、先端の開端状態などの加工プロセス探索が、次年度以降の課題である。

1-3 タンパク質の部位特異的ラベルおよび検証(吉村 G)

タンパク質内の任意の部位を介してそのタンパク質を CNT に結合する技術を確立するために、非天然アミノ酸を用いた試験管内翻訳系を立ち上げた。非天然アミノ酸をタンパク質内の任意の部位に導入するには、アンバーコドンを用いた部位特異的アミノ酸導入法を用いた。importin a と呼ばれるタンパク質内の特定のフェニルアラニン残基をコードするコドンアンバーコドンに変換した DNA を作製し、これを用いて試験管内で転写翻訳反応を行わせた。この反応系に、ビオチン化フェニルアラニンをもつアンバー-tRNA (化学合成したもの)を加えた場合のみ、合成された importin a がビオチン化されていることを確認した。

2. CNT の物性制御(中山 G)

TEM 装置内で扱う CNT のカイラリティを同定するために分析装置の開発を行った。しかし、まだ十分な性能を得るに至っていない。

3. 質量・力計測デバイス開発(秋田 G)

3-1 CNTFET の製作とプロセス開発

CNT アームの変位検出デバイス(CNT アームを変位ゲートとする電界効果型トランジスタ(FET)あるいは圧電ゲート CNTFET)のプロトタイプとして平面型変位計測デバイスの基本設計を行なった。これに基づきプロセスを検討し、必要な機材および薬剤の整備を行った。さらに、CNTFET の液中における動作の安定性試験を行いプロセス上の問題点を解決した。

3-2 CNT センサに適した CNT の探索

どのような CNT が力センサとして適しているかの基礎データを収集するために、機械的振動におけるエネルギー損失を調べた。また、同様の観点から分子動力学計算を行なった。

ラマン分光法から求めた G/D 比が 1~10 にある 7 つのグループの CVD 多層 CNT を片持ち梁とし、走査型電子顕微鏡(SEM)内で一次共振周波数および共振の幅からヤング率 Y および Q 値を見積った。

小振幅条件下では、 Y は直径にはあまり依存せず 0.2 TPa とほぼ一定であるが、G/D 比が大きい試料では Y は大きくなった。また、 $1/Q$ は Y に顕著に依存しないが直径に強く依存し、直径とともに損失が増加した。つまり、機械的な強度は欠陥の総量でなく欠陥密度に依存し、エネルギー損失は欠陥密度よりも直径に依存する事が明らかになった。分子動力学計算の結果と併せて考える

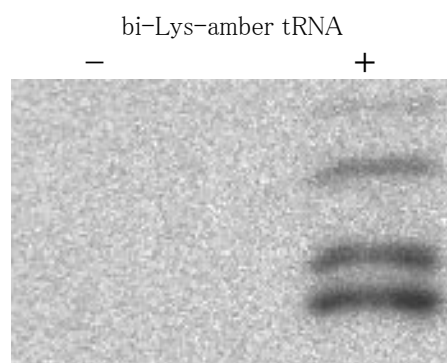


図 1 : 無細胞試験管内翻訳系に bi-Lys-amber tRNA を加えたもの(右)、加えなかったもの(左)。ビオチン化タンパク質を HRP-conjugated StAv で検出した。

と、直径に依存した損失は層間のファンデアワールス相互作用がその原因の一つとなることが明らかになった。

4. 質量計測技術の開発(荒川 G)

4-1 質量変化の計測

この項目については、本年度はまだ開始しない予定であったが、CNT センサを使った実験の予備実験として、原子間力顕微鏡のカンチレバーの振動を使った質量センサの実験系を検討した。その結果、磁気力励振と光テコによるカンチレバー変位の検出のシステムで、感度は低いが予定されている CNT センサと同原理の質量センサが構築可能であることがわかった。

4-2 酵素反応の実時間計測

酵素反応の検証研究の端緒として、プローブ先端の分子と基板表面の分子をよく制御された状態で接触・

操作し、これを近接場光学による高感度検出系と複合化したシステムの構築を開始した。まず全反射型蛍光顕微鏡のセットアップを行い、原子間力顕微鏡との複合化を行った。今後、より高性能化をはかる。

また、水平ナノ力学測定法の開発を行った。モデル分子としてのポリエチレングリコール(PEG)を対象とし、基板表面上で基板と平行方向へ分子延伸のナノ力学測定(水平ナノ力学測定)に成功した。本研究計画での CNT センサでの力測定の基礎固めとして重要なものである。

5. 熱量計測デバイス開発(石島 G)

カーボンナノチューブ(CNT)を局所的に固定し、蛍光発光を背景として観察した。CNT の操作・観察には従来 AFM や SEM が使用されてきたが、そのためには真空状態に曝さねばならず、使用条件が限られてくる。光学顕微鏡下では水中で試料を扱えるが、径が数ナノ~数十ナノの CNT を観察するには分解能が低く特殊な処理が必要となってくる。蛍光物質で CNT を修飾する方法が報告されているが、蛍光物質は時間経過と共に退色し、長時間の観察には向かない。しかも物理的に CNT に吸着しているので、一度退色してしまうと同一サンプルを観察することは不可能である。そこで我々は蛍光物質を背景に、CNT を観察する方法を開発した。蛍光物質溶液中に CNT を分散させると、CNT の存在する部分が黒く浮きでて見える。この方法ならば退色後に新たな蛍光物質を加えることもでき、長時間で何度でも観察が可能となる。本年度は局所的に CNT を捕捉するために ITO マイクロ電極を微細加工により作製し、誘電泳導力を用いて水溶液中にて CNT を電極間に捕捉した。蛍光観察を長時間安定に行うためのシステムを開発し、ローダミン B 溶液を背景として CNT を観察した。また 4 端子法により、捕捉された CNT の抵抗値を測定することに成功した。

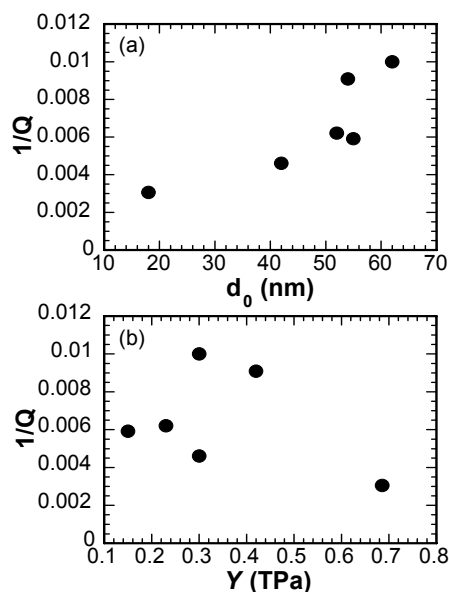


図2 : (a) Q値の逆数 (1/Q) 平均値の外層直径依存性。1/Qはエネルギー損失に相当する。(b) 1/Qの平均ヤング率依存性。

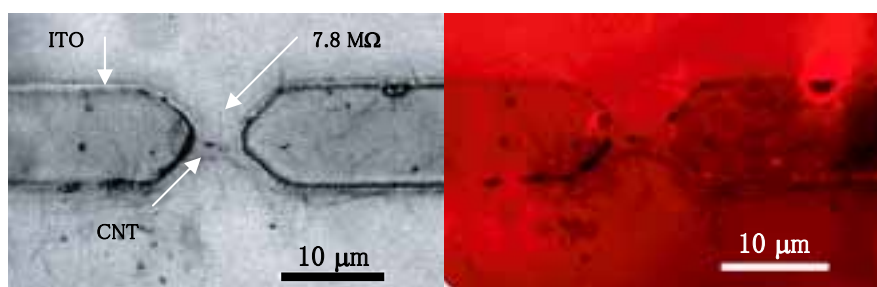


図 3: ITO 電極上に捕捉された CNT (左)明視野像 (右)蛍光観察像。

生体材料発生する微量の熱を検出するための極微小センサを設計・試作した。将来、アト(10^{-18})ジュール以下の熱量分解能を持つことを目標とし、振動型の熱量計測方式を採用した。本方式では、サブミクロンのサイズの微小梁(共振子)を振動させ、その温度変化を共振周波数の変化として検出する。共振子の先端には、熱を効率よく試料からセンサに伝達するための、熱導波路としてカーボンナノチューブ(CNT)を利用する。

熱のセンサへの流入により、センサの温度が変化し、共振周波数変化として検出される。原理的に小型で熱容量が小さいほど温度変化が大きく、小さな熱量を検出できる。本年度は、理論的な設計指針を明らかにし、分解能や感度とスケーリングの関係について明らかにした。また、マクロスケールのセンサを作製し、試料を走査型プローブ顕微鏡で観察しながら、プローブ顕微鏡の先端に集積化したセンサにて試料の熱量が高感度に測定できることを示した。

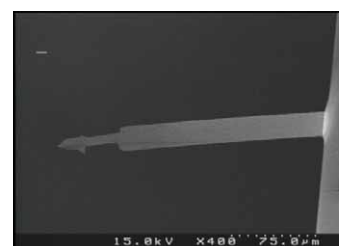


図 4: 試作したバイメタル型温度センサ付きAFMプローブ。

6. CNT 探針の供給(秋田 G、中山 G)

吉村 G、荒川 G の研究支援のため、CNT を取り付けられた AFM 探針を製作し供給した。ナノチューブの取り付けには、走査型電子顕微鏡(SEM) マニピュレータを用いた。

3. 研究実施体制

(1)「中山」グループ

①研究分担グループ長：中山 喜萬(大阪大学大学院工学研究科 教授)

②研究項目

- ・CNT 先端活性化・物性制御によるタンパク質選択的トラップ
- ・CNT・樹脂複合シート作製

(2)「秋田」グループ

①研究分担グループ長：秋田 成司(大阪府立大学大学院工学研究科 助教授)

②研究項目

- ・質量・力計測デバイス開発
- ・CNT 探針の供給

(3)「荒川」グループ

①研究分担グループ長：荒川 秀雄((独)物質・材料研究機構ナノ有機センター グループリーダー)

②研究項目

- ・一分子質量計測
- ・酵素反応実時間計測

(4)「吉村」グループ

①研究分担グループ長：吉村 成弘(京都大学大学院生命科学研究科 助教授)

②研究項目

- ・タンパク質のナノチューブへの部位特異的結合と力計測

(5)「石島」グループ

①研究分担グループ長：石島 秋彦(東北大学多元物質科学研究所 教授)

②研究項目

- ・暗視野、蛍光を用いたCNTの水溶液中での観察
- ・CNTの化学修飾法の確立
- ・ナノプローブの作製・評価とナノ計測システムの構築
- ・局所温度計の水溶液中での評価

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- Fukuoka, H., Sowa, Y., Kojima, S., Ishijima, A. & Homma, M. “Visualization of functional rotor proteins of the bacterial flagellar motor in the cell membrane.” *J Mol Biol* **367**, 692-701, (2006).
- Yamamoto, K., Shimada, K., Ito, K., Hamada, S., Ishijima, A., Tsuchiya, T. & Tazawa, M., “Chara myosin and the energy of cytoplasmic streaming”. *Plant Cell Physiol* **47**, 1427-31, (2006).
- R.L. Ohniwa, K. Morikawa, J. Kim, T. Kobori, K. Hizume, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, T. Ohta, C. Wada, S.H. Yoshimura and K. Takeyasu, “Atomic force microscopy dissects the hierarchy of genome architecture in eukaryote, prokaryote

and chloroplast”, *Microsc. Microanal.* **13**(1) 3-12 (2007).

○S. Akita, S. Sawaya, Y. Nakayama, “Energy loss of Carbon Nanotube Cantilevers for Mechanical Vibration.” *Jpn. J. Appl. Phys.*, *in press*.