

「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

前年度までに、DNA構造体を利用して金微粒子を一定間隔で配列することに成功した。

この成果をもとに、18年度は金微粒子の間に色素分子、電気伝導性分子を架橋して、電気伝導性分子／金微粒子／DNA構造体によるデバイス構造の構築に進んだ。

金微粒子間に分子架橋を形成するためには、①金微粒子表面の反応活性を保ち、かつ②架橋分子の反応に際して金微粒子の構造が壊れない、という二つの条件を満たすことが必要である。トリフェニルホスフィンをサーファクタントとする金微粒子を用いることで、DNA構造体による金微粒子の規則的配列と、この配列構造を維持しながら金チオール反応による架橋形成を行うことが出来た。すなわち、本プロジェクトの柱のひとつである、「シーケンシャル自己組織化」に成功した。比較実験として、DNA、金微粒子、導電性分子を一挙に混合するワンポット反応を試みたが、3次元的な凝集物が形成されたことから、シーケンシャル自己組織化の有効性が明らかとなった。

さらに、前年度までに完成したナノトランスファープリンティング技術を用いて、形成した電気伝導性分子／金粒子／DNA構造体ネットワークを破壊することなく、トップコンタクト電極を形成することができた。

一方、DNA及びDNA構造体を金電極に架橋すべく、DNA—電極間連結分子の設計、合成を行った。既存のアルカンチオール構造では、その部分での電荷移動は非常に疑問がある。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。またセレンノール分子の有用性が明らかとなり、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（セレン含有）に分けて設計及び合成を行った。ヨードベンゼンセレンノールと3-(3,5-ジアミノ2,4,6-トリアジン)フェニルホウ酸を縮合し、セレン含有のDNA—電極間接合分子とした。

2) 生体情報ナノデバイス

生体情報ナノデバイスの構築の為に、電気信号を受ける電極の近傍に生体分子を配する必要がある。しかし既存の電極近傍への生体分子の固定法では、生体分子の失活や非特異的吸着等の為に、精度に問題があり定量性は求められない。そこで、ナノウェル構造の利用を考えた。

昨年度までに、金電極への生体分子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、100nmのナノウェル構造体の作製に成功した。さらに、PEGコポリマーナノウェル中に自己組織的にリポソームを固定化することに成功した。

しかしPEGコポリマーを用いたナノウェルは、基板との接着性や構造的な安定性に問題があり、今年度は以下の複数の手法により改良を試みた。①PEGコポリマーの代わりに基板との接着

性を考慮した構造を有するPVAコポリマーを用いることで、プロセスを簡便化した。②PVA

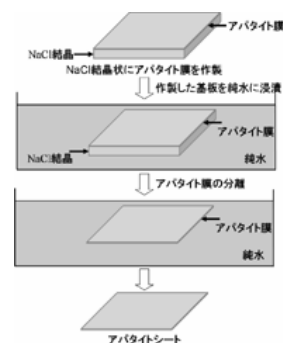


図1 HApシートの作製方法

コポリマー中に感光性有機分子を導入する事で、光により PVA コポリマー同士が hydrogel 化され、構造的な安定性および基盤との接着性を増加させた。③ナノウェル構築後に加熱処理を行う事で、昨年度までのナノウェルで見られた、ポリマーが抱水する事で見られた膨張を抑制した。これらの手法を用いる事で、数百 nm のナノウェル構造体の作成およびナノウェルの中にリポソームを自己組織的に固定化することに成功した。

一方、ハイドロキシアパタイト (HAp) の利用に関しては、昨年度までに種々のタンパク質の HAp への吸着現象や、酵素反応の特異性を電氣的に検出する事に成功している。生体親和性に優れる HAp は、それ自身が細胞や組織のパターニングを行なう際のテンプレートとして有用であり、生体組織の自己組織化のための足場材料として応用が期待できる。本年度の研究においては、HAp の薄膜を基板から単離した HAp シートを、多様な形状の組織培養足場として応用するための基礎研究を行なった。

HAp シートを基板から単離する方法として、水溶性の基板を用いた。レーザアブレーション法を用いて、NaCl 基板上に HAp 薄膜を作製し、その後試料を浸水することで基板を溶解させ、HAp シートを単離する(図 1)。得られたシート(膜厚 12 μm)は、可撓性をもち、曲面にフィットさせた状態での細胞培養が期待できるものであった。また、得られた HAp シートは透明であるため、細胞の接着や増殖・分化を生きたまま観察するための足場として用いることが期待できる。シャーレ上に HAp シートを置き、スライドガラスで固定したうえで、 2×10^5 cells/ml に調整したヒト由来骨芽細胞を 2 ml 播種した。これを 5%炭酸ガス雰囲気中 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。得られた細胞シートは、図 2 に示すようにピンセットなどで容易に取り扱うことができ、しかも柔軟性を保持している。つまり、実際に組織培養足場として十分期待でき、そのまま生体に移植が可能な足場としての利用へと展開できる。



図 2 HAp シートを用いた細胞シート

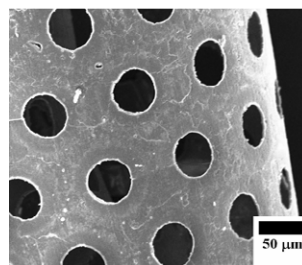


図 3 貫通孔を持つ HAp シート

この結果にさらに機能性を付加することを目的に、貫通孔を有する HAp シートの作製に成功した。これは、水溶性の基板にマイクロメートルオーダーの凹凸を作製しておき、その表面に HAp 薄膜を作製したのち、浸水して基板を溶解させることで、マイクロメートルオーダーの凹凸をシートに転写するもので、基板の凹凸の高さが HAp シートの膜厚より大きければ貫通孔を作製できる。実際の実験では、ガラス基板上にアモルファス MgO を成膜した後、直径 50 μm の孔が 100 μm 間隔で配列したメタルマスクを通してさらにアモルファス MgO を成膜する。その上に HAp を成膜して浸水することで、貫通孔を有する HAp シートを作製することに成功した(図 3)。これはシートの両面で相互にタンパク質や血液の交換を可能とし、三次元的培養の足場として期待できる。

また、細胞が特異的に吸着しにくい材料と HAp を組み合わせた表面パターンを人工的に作製し、神経細胞の選択的パターンニングを試みた。用いた非吸着材料はジメチルポリシロキサンで、レジストとリフトオフのプロセスによってバルクの HAp 試料表面にジメチルポリシロキサンの島を作製した。この表面に神経細胞（ニューロブラストーマ雑種細胞）を均一に播種し、凍結乾燥した試料表面を走査型電子顕微鏡によって観察した。一見して分かるように、HAp が露出した表面に優先的に細胞が接着しており、選択的な培養が期待できる組み合わせといえる。また、HAp とジメチルポリシロキサンのそれぞれに接着した細胞の接着形態が大きく異なることも分かる(図5)。今後は、接着形態の違いが細胞機能の違いに及ぼす影響などに注目して、選択的培養の足場材料として発展させたい。

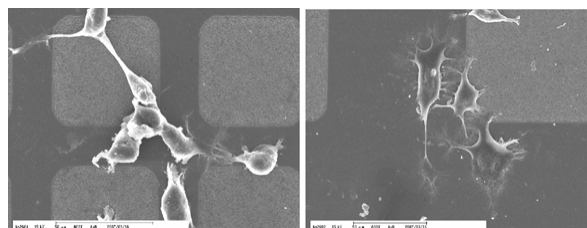


図4 ジメチルポリシロキサン表面(a)と HAp 表面(b)では神経細胞の接着形態が大きく異なる。

また、近年生体の情報を司る分子として、新たに糖鎖が注目されている。糖鎖を電気化学的に検出すべく、金電極上に糖のオリゴマーを配列する事を試みた。還元糖の末端を有する糖鎖に対し、高収率で末端をチオール化する方法を編み出した。またその電極を利用する事で、糖鎖に選択的に相互作用する毒素を、電気化学的に検出する事に成功した。

3) 多次元自己組織化五感センサ・メモリ

赤外線センサ媒体の微細化および集積化を行うためには、遷移酸化物薄膜を微細加工する手法の開発が必要である。本研究においては、ナノインプリント・リソグラフィ(NIL)によって加工した Mo ナノマスクをリフトオフ用のレジストとして用いることによって、酸化物薄膜の微細構造を大面積にわたって形成することに成功した。酸化物薄膜の形成は通常数百度の高温で行われるため、高分子樹脂をレジストとして用いた従来のリフトオフ法では、レジストが変形することが問題となる。しかし、高融点金属であるモリブデンを用いるならば、そのような問題は生じないと考えられる。

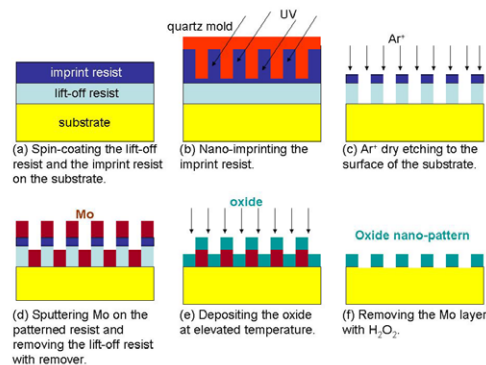


図5 モリブデン・リフトオフ法による、FMO ナノパターンの作製方法。

図5に、モリブデン・リフトオフ法による、 $\text{Fe}_{2.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ (FMO) の加工の様子を示す。初めに、 $\text{Al}_2\text{O}_3(0001)$ (ALO) 基板の上に、リフトオフ用レジストとナノインプリント用レジストをスピコートし、NIL を用いてナノインプリントレジストをパターンニングする。 Ar^+ イオンを用いてリフトオフレジストにパターンを転写した後、この上から、モリブデン

をスパッタし、リフトオフ用レジストを有機溶媒で除去することにより、モリブデンパターンを得る。このレジスト上にFMOをレーザー蒸着で形成した。蒸着は基板温度を350度にして行った。Mo層を10vol%過酸化水素水で除去することにより、FMOのパターンが形成する。

図6に、この手法を用いて作成したFMOパターンのSEM像を示す。約120nmのナノドットアレイがきれいに形成していることが分かる。このナノアレイに対しX線回折測定を行い、FMOナノドットが基板からエピタキシャルに成長していることが分かった。

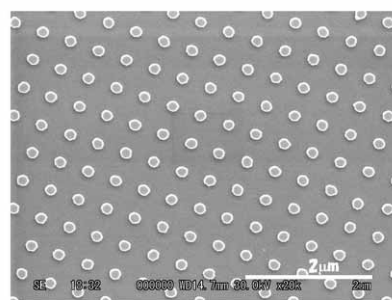


図6 モリブデン・リフトオフ法により作成したFMOナノドットアレイ。

3. 研究実施体制

(1) 大阪大学グループ

①研究者名

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

(2) 近畿大学グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- “Well-Oriented NanoWell Arrays Metrics for an Integrated Digital Nanobiosensor”, H. Y. Lee, J. W. Park, J. M. Kim, H. S. Jung, and T. Kawai, Appl. Phys. Lett., 89, 113901-113903 (2006).
- “Atomic Force Microscopy Observation of Highly Arrayed Phospholipid, Bilayer Vesicle on a Gold Surface”, H. S. Jung, J. M. Kim, J. W. Park, S. E. Lee, H. Y. Lee, R. Kuboi, and T. Kawai, J. Biosci. Bioeng., 102(2006) 28-33.
- “Self-organized Interconnect Method for Molecular Devices”, Masateru Taniguchi, Yoshihiro Nojima, Kazumichi Yokota, Jun Terao, Kimihiko Sato, Nobuaki Kambe, Tomoji Kawai, J. Am.

Chem. Soc. 128 (2006) 15062-15063 (Communication).

- “Fabrication of sub-50 nm (La,Ba)MnO₃ ferromagnetic nanochannels by atomic force microscopy lithography and their electrical properties”, M. Hirooka, Y. Yanagisawa, T. Kanki, H. Tanaka, and T. Kawai, Appl. Phys. Lett., 89 (2006) 163113.
- “(Fe,Mn)₃O₄ Nanochannels Fabricated by AFM Local-Oxidation Nanolithography using Mo/Poly(methyl methacrylate) Nanomasks”, L. Pellegrino, Y. Yanagisawa, M. Ishikawa, T. Matsumoto, H. Tanaka, T. Kawai, Adv. Materials, 18 (2006) 3099-3104.
- “Digitalized magnetoresistance observed in (La,Pr,Ca)MnO₃ nanochannel structures”, Yoshihiko Yanagisawa, Hidekazu Tanaka, Tomoji Kawai, Appl. Phys. Lett. 89 (2006) 253121.
- “Nanoscale patterning of (La,Pr,Ca)MnO₃ thin film using atomic force microscopy lithography and their electrical properties”, Yoshihiko Yanagisawa, Motoyuki Hirooka, Hidekazu Tanaka and Tomoji Kawai, J. Appl. Phys. 100 (2006) 124316.
- “Anchoring gold nanoparticles onto a mica surface by oxygen plasma ashing for sequential nanocomponent assembly”, Akihiko Takagi, Kaoru Ojima, Eriko Mikamo, Takuya Matsumoto, and Tomoji Kawai, Appl. Phys. Lett., 90, 043122 (2007).
- “Functional Lipid Vesicles Based on Artificial Electric-Taster Sensor”, H.S.Jung, Hide.Tanaka, H.Y.Lee, and T.Kawai, Mol. Cryst. Liq. Cryst., 463, 271[553]-279[561] (2007).

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願：3 件（CREST 研究期間累積件数：9 件）