平成 19 年度
実績報告

「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機械工学専攻・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ゼプトグラム精度の質量と 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。

H18 年度に引き続き、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を行った。

2. 研究実施内容

（文中にある参照番号は 4. (1)に対応する）

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）

従来の Si チップへの CNT アーム接着では強度が弱いことが判明し、透過電子顕微鏡(TEM)マニピュレータを用いた C60 分子の電子線照射処理による強固な固定法を開発した(図 1(a))。タンパク質一分子の担持に適した先端径をもち剛性の強い CNT アームを実現するため、根元が数 nm、先端が 1nm 程度の円錐に整形(図 1(b))する通電プロセスを開発した。これを開端しタンパク質担持実験を進めている。

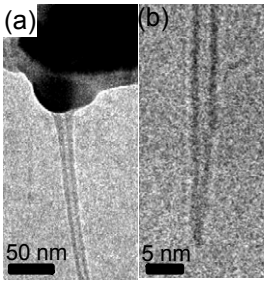

図 1 (a) Si 探針に固定した CNT (b) 先鋭化した CNT。

1−2 CNT シートの開発（中山 G）

Si 基板に成長した垂直配向 CNT に樹脂を含浸させ、基板から剥離して CNT 根元側の面を取り出す手法を検討し、原子間力顕微鏡（AFM）評価で、表面粗さ 3 nm 程度の極めて平坦で、約 5 nm 程度の CNT の突出長さを得ることに成功した。走査型電子顕微鏡（SEM）、TEM 観察からも、開端した CNT のシート表面突出を確認した（図 2）。

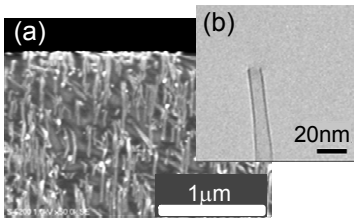

図 2　CNT-樹脂複合シート薄片の(a)FE-SEM 像および(b)TEM 像。

1−3 タンパク質の部位特異的ラベルおよび検証（吉村 G）

タンパク質を CNT 先端に結合させる際に、タンパク質内の任意の部位を介して結合させる技術を確立することを目的とした。インポーティンαは分子内の IBB とよばれる領域を介してインポーティンβと相互作用する。まずこの IBB 内のアミノ酸（Phe58）をコードするコドンをアンバーコドンに変換した。一方で、ビオチン化フェニルアラニンを化学合成し、これを化学合成したアミノアシルアンバーtRNA に RNA リガーゼを用いて結合させ、アミノアシル tRNA を合成した。試験管内タンパク質合成系に、アンバー変異を持つ鋳型 DNA および人工アミノアシル tRNA を添加し、ビオチン化アミノ酸を Phe58 の位置に取り込ませた IBB を合成した。インポーティンβとの相互作用がストレプトアビジン存在下でのみ阻害されたことから、部位特異的にビオチン化アミノ酸が取り込まれていることが示された。また、大腸菌の DNA 結合タンパク質である H-NS 中の DNA 結合部位にもアンバー変異を導入し（Tyr20）、同じ系を用いてビオチン化アミノ酸を取り込ませることに成功した。一方で、これらのタンパク質を用いて 1 分子相互作用計測を行うための基盤技術を AFM や光ピンセットを用いて確立した。（原著論文 10-14）

2. ナノチューブアームの研究開発−CNT の物性制御−（中山 G）

TEM 内における孤立 CNT のカイラリティ同定法として電子回折による手法を検討した。タンパク質捕捉に資する十分細い径（直径 0.8nm 以上）の CNT についてカイラル指数の同定ができることを実証した。また、化学気相合成法（CVD）による CNT に含まれる欠陥量と機械振動特性、電気的特性との関係を調べ、結晶性の高いアーク放電 CNT の特性との比較から、CNT 欠陥の通電による修復制御の指針を得た。

3．質量・力計測デバイス開発（秋田 G）

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完了し，フォトリソグラフィー用マスクをデザイン／準備した。試作したデバイスの SEM 像を図 3 に示す。ソース－ドレイン電極は高さが 30nm であるのに対しＣＮＴの取り付

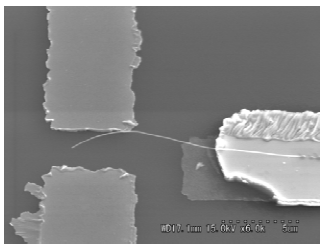
図 3　製作したデバイス

けられたゲート電極の高さは 100nm である。

また、比較的太い CNT の振動を真空中だけでなく（原著論文 7）大気中で計測することに成功し（図 4）、直径が 50nm 程度のＣＮＴでは Q 値が 50~150 程度と気体との粘性損失から期待される値となった。理論との対比から直径が 10nm 程度になると粘性損失が低下し、より分子流損失に近づき、大気中においても数倍高い Q 値が期待できることが分かった。

図４　非共振 CNT と共振中の CNT

製作した CNTFET が振動するゲートに対して十分な応答を示すか確認するために走査型ゲート顕微鏡法（SGM）を利用し特性を解析した（追加予算で購入の電流同時 DFM 用フランジを使用）。CNTFET が振動するゲート電極に対して応答することが実験的にも証明された。

以上のように、本年度はデバイス製作が可能になり、さらに片持ち梁ＣＮＴの大気中での共振振動の確認と CNTFET の振動ゲートに対する応答特性を明らかにした。

4. 分子反応検出プローブ顕微鏡の開発（中山 G,秋田 G）

クローズドループによりステージ位置を正確に操作できる AFM を導入し、大気中および液中での動作確認を行った。その際 CNT 探針を用いて大気中でのイメージングにも成功した。また、導入したバーチャルリアリティのシステムにより、実際にイメージングしたものを操作できることを確認した。センサデバイス搭載についてはプロトタイプが未完成であり作製を進めている。

5. 質量計測技術の開発（荒川 G）

昨年度から取り組んできたAFMと全反射型蛍光顕微鏡の複合化技術を本年度も引き続き発展させ、CNT探針先端に結合させたタンパク質の全反射型蛍光顕微鏡による検出を行った。具体的には、大阪府立大学秋田 G・大阪大学中山 G から開端CNTが取り付けられた AFM 探針の提供を受け、昨年度に開発したCNT先端へのタンパク質結合技術を用いて、蛍光タンパク質をCNT探針の先端に結合させる技術の開発に取り組んだ。CNT 探針先端に取り付けられた蛍光タンパク質を、全反射型蛍光顕微鏡を用いて観察するための光学系を構築した。

6. 熱量計測デバイス開発（石島G）

市販の CNT は本研究目的に適していない（長さが短い、結晶性が悪い、不純物が多い、など）ため、まずは CNT 自身を自作し、その製法、生成方法の確立を目指した. 従来の大量生産可能な、CVD 法では、CNT の結晶状態が悪いため、アーク放電法を用いてその製作条件を模索した。その結果、未だ長さは目標値には達していないものの、今後の進展に期待を持たせる CNT の作成に成功した。さらに、純度を高めるために、熱処理を行い、アモルファス状態の炭素をのぞくことを試みた. その結果、処理温度、時間の最適化を図ることに成功した。

CNTを局所的に固定し、蛍光発光を背景として観察した。光学顕微鏡下では水中で試料を扱えるが、径が数～数十 nm 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。昨年度に引き続き、蛍光物質を背景に、CNT を観察する方法を改良した（図5）。（原著論文18） 前回までの報告ではITO 電極間にCNTを捕捉したが、複数本まとまって捕捉されてしまう事が多々確認した。そこで今回は特に電極の微細加工に重点をおき、電場解析を用いることで、CNT が単数本捕捉されやすい形状を設計し、CNT が捕捉される場所の予測が可能になった。また、温度制御システムを新たに構築しサンプルを冷却するための流路形状の最適化を行った。また、SEM を利用し、外部操作可能な 2 自由度のサンプルステージと3自由度のナノマニピュレータを設置したナノマニピュレーションロボットを作製し、SEM内に導入した。CNT をリアルタイムで観察をしながら、ナノロボットによる遠隔操作が可能となった。これにより、CNT デバイスの製作が可能となる。

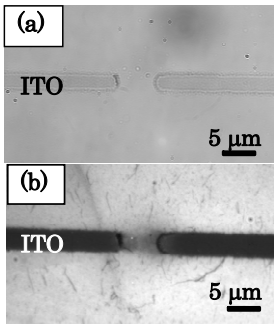

図 5 ITO 微小電極上に捕捉された CNT （a)明視野像 (b)暗視野像（CNT が線として明瞭に観察できた。）

生体試料が発生する熱量を測定するためのプローブを、半導体マイクロファブリケーション技術を用いて試作し、その基本特性を評価した。（原著論文 16, 17）図 6 は原理を確認するために試作したプロトタイプである。片持ち梁の先端に Au を堆積したシリコン窒化膜の振動子が形成されており、その共振周波数変化から高感度に熱量を測定する。根元の片持ち梁を力センサとして用いて、AFM の原理により表面形状が測定できる。2つの振動を利用して熱量と表面形状の両方が同時に検出できる。振動型熱量センサは非常に高感度であり、小型化によりさらに高感度にできることを示した。また、サブミクロンの最小加工寸法で高感度なセンサ構造を作製する方法を開発した。今後、作製したセンサを評価し、高感度化を図る。

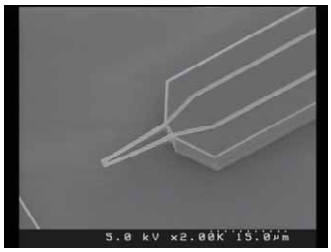

図 6 熱量プローブのプロトタイプ。

7. CNT 探針の供給（秋田 G、中山 G）

18 年度に引き続き CNT 探針の供給を行った。秋田 G が SEM 内で Si チップ先端に CNT を取り付け、中山 G が TEM マニピュレータを用いてこの CNT 先端を開管させ、活性化させた。この CNT 探針を荒川 G に供給した。

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、教授）

②研究項目

・CNT アーム先端の活性化

・CNT シートの開発

・ＣＮＴアームの研究開発

・分子反応検出プローブ顕微鏡の開発

・ＣＮＴ探針の供給

(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、准教授）

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（物質・材料研究機構、グループリーダ）

②研究項目

・質量計測技術の開発

(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、准教授）

②研究項目

・タンパク質の部位特異的ラベルおよび検証

(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、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)

1) Y. Yoshikawa, S. Akita, Y. Nakayama, “Barrier modification at contacts between carbon nanotube and Pt electrode using well-controlled Joule heating”, Jpn. J. Appl. Phys. **46** (15), 359 -361 (2007).

2) M. Yasuda, Y. Kimoto, K. Tada, H. Mori, S. Akita, Y. Nakayama, Y. Hirai, ”Molecular dynamics study of electron-irradiation effects in single-walled carbon nanotubes”, Phys. Rev. B **75**, 205406-1-205406-5 (2007).

3) Y. Nakayama, Plasticity of Carbon Nanotubes, “Aiming at Their Use in Nanosized Devices”, Jpn. J. Appl. Phys. **46** (8A), 5005–5014 (2007).

4) H. Mori, S. Ogata, J. Li, S. Akita, Y. Nakayama, “Plastic bending and shape-memory effect of double-wall carbon nanotubes”, Phys. Rev. B **76**, 165405-1 - 165405-7 (2007).

5) H. Maruyama, S. H. Yoshimura, S. Akita, A. Nagataki, Y. Nakayama, “Covalent attachment of protein to the tip of a multiwalled carbon nanotube without sidewall decoration”, J. Appl. Phys. **102**, 094701-1 - 094701-5 (2007).

6) H. Somada, Y. Yoshikawa, A. Nagataki, K. Hirahara, S. Akita, Y. Nakayama, “Energy barrier for disappearance of buckling to form a plastic bend in carbon nanotubes”, Jpn. J. Appl. Phys. **46** (44), 1055–1057 (2007).

7) S. Akita, S. Sawaya, Y. Nakayama, “Energy loss of Carbon Nanotube Cantilevers for Mechanical Vibration”, Jpn. J. Appl. Phys., 46, 6295-6298 (2007).

8) J. Jin, Y. Sugiyama, K. Mitsui, H. Arakawa, I. Ichinose “Nanomechanical Properties of Reversed Surfactant Bilayers Formed in Micrometer-Sized Holes” Chem. Commun. **8**, 954-956 (2008).

9) D. S. Bulgarevich, K. Mitsui, H. Arakawa “Lateral force-distance curve technique” Journal of Physics: Conference Series **61,** 170-174 (2007).

10) H. Sanchez, P. P. Cardenas, S. H. Yoshimura, K. Takeyasu and J. C. Alonso, “Dynamic structures of Bacillus subtilis RecN–DNA complexes”, Nuc. Acids Res. **36** (1), 110-120 (2008).

11) J. Wen, L. Lancaster, C. Hodges, A. Zeri, S.H. Yoshimura, H. F. Noller, C. Bustamante, I. Tinoco, Jr., “Following translation by single ribosomes one codon at a time”, Nature **452** (7187), 598-603 (2008).

12) D. Liu, L. Ge, F. Wang, H. Takahashi, D. Wang, Z. Guo, S.H. Yoshimura, T. Ward, X. Ding, K. Takeyasu, X. Yao, “Single-molecule detection of phosphorylation-induced plasticity changes during ezrin activation”, FEBS Lett. **581** (18), 3563-3571 (2007).

13) N. Crampton, M. Yokokawa, D. T. Dryden, J. M. Edwardson, D. N. Rao, K. Takeyasu, S. H. Yoshimura, R. M. Henderson, “Fast-scan atomic force microscopy reveals that the type III restriction enzyme EcoP15I is capable of DNA translocation and looping”, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **104** (31), 12755- 12760 (2007).

14) M. Yokokawa, K. Takeyasu, S.H. Yoshimura, “Scanning probe microscope revealed mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope in living cells”, J. Microscopy *in press*.

15) Y. Inoue, C. J. Lo, H. Fukuoka, H. Takahashi, Y. Sowa, T. Pilizota, G. H. Wadhams, M. Homma, R. M. Berry, A. Ishijima, “Torque-speed relationships of Na^+-driven chimeric flagellar motors in Escherichia coli”, J. Mol. Biol. **376**, 1251-9 (2008).

16) Sang-Jin Kim, Takahito Ono, Masayoshi Esashi, “Mass detection using capacitive resonant silicon resonator employing LC resonant circuit technique”, Review of Scientific Instruments **78**, 085103-1~085103-6 (2007).

17) Sang-Jin Kim, Takahito Ono, Masayoshi Esashi, “Study on the noise of silicon capacitive resonant mass sensors in ambient atmosphere”, Journal of Applied Physics, **102**, 104304-1~104304-6 (2007).

18) 猪股直生, 山西陽子, 大川原竜人, 林　育菁, 新井史人, ポーラス構造 PDMS 担体を用いた蛍光試薬供給によるカーボンナノチューブの液中観察, 日本機械学会論文集（C編）, *accepted*.

19) T. Umeda, T. Inaba, A. Ishijima, K. Takiguchi, H. Hotani, “Formation and Maintenance of Tubular Membrane Projections: Experiments and Numerical Calculations”, BioSystems, *in press*.

（2） 特許出願

平成 19 年度　国内特許出願件数:1 件（CREST 研究期間累積件数:1 件）