「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 平成 20 年度 実績報告

## 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ゼプトグ ラム精度の質量と pN 精度の2次元力、10<sup>-19</sup>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。

H19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 シートおよびタンパク質操作プラットホームの開発(中山 G)

二層 CNT を用いて樹脂化 CNT シートを作製し、このシートによるタンパク質の捕捉を試みた。 前年度 CNT ボトム側を利用する方法により、CNT 先端 5 nm 程度を均一に樹脂表面から突出 させることに成功し、また CNT 先端は開端していることを確認した。今年度はこのシートを用いて Qdot ストレプトアビジンのトラッピングを試み、CNT 先端への 2-3 分子のタンパク質の結合を確 認した。また、より直径の細い CNT を用いたシート作製を目的とし、アルコール CVD により垂直 配向単層 CNT が合成できる実験系を整備した。その結果、垂直配向単層 CNT を安定に再現 性よく合成することができた。合成した垂直配向単層 CNT を用いて二層 CNT と同様の方法でシ ートを作製し、樹脂表面から 3 nm 程度 CNT が突出していること、その CNT 先端は開端してい ることを確認した。この単層 CNT シートへのタンパク質(フェリチン)の捕捉を試みた結果、CNT 先端に一分子のフェリチンが結合している様子が TEM で確認された。現在タンパク質を効率よく CNT 先端に結合させるための条件改善を行っている。また、樹脂への非特異的なタンパク質の 吸着が見られるため、それを抑制する方法を検討している。 プラットホームの開発に関しては、その基本仕様を決定するためのプロトタイプをデザインした。 プロトタイプの作製に取り組んでおり、シリコン基板を深くエッチングする条件の検討を行っている。

## 1-2.タンパク質の部位特異的ラベルおよび検証(吉村G)

非天然アミノ酸を用いたラベル法を用いてナノチューブの先端にタンパク質を部位特異的に結 合させる方法を開発することを目的とした。

終止コドンにはターミネータと呼ばれるタンパク質が結合してタンパク質合成を停止させるが、 CUA をアンチコドンに持つ tRNA を人工的に合成し、反応系に添加しておけば、一定の割合で この終止コドンをスルーして合成を継続することができる。この技術を利用して、非天然アミノ酸を 任意の場所に取り込ませることができる。アジド基は、Huisgen 反応でエチニル基と反応し、また、 Staudinger 反応でトリアリルフォスフィン誘導体と特異的に反応することができる(図1)。この性 質を用いて、カルボキシル化したナノチューブ先端とタンパク質に導入したアジド基(アジドチロシ ン)との間を共有結合で結ぶ手法をデザインした(図2)。成果は次の通りである。

①アンバー変異を用いたアミノ酸残基特異的アジドチロシンの取り込み

Importin αはその中の IBB とよばれる部位を介して importin βに結合することが知られてい る。この IBB内 (F58Amb) もしくは外 (F130Amb) にアンバー変異を導入した cDNA を作成し、 カルボキシル末端にはヘキサヒスチジンタグ (Hisx6) を導入した。アジドチロシンを結合させたア ンバーtRNA を添加した試験管内タンパク質合成系を用いてこれらのタンパク質を合成し、 SDS-PAGE および CBB 染色で解析すると、目的の位置にバンドを検出した(図3)。また、 Staudinger 反応によりアジド基の取り込みも確認した。

②アジド化タンパク質とカルボキシル化ナノチューブとの結合反応

①で合成に成功したアジド化 importin α(WT、F58Amb、F130Amb) を Staudinger 反応 を用いてアミノ化量子ドットに結合させた。アジド基特異的な結合を検証するために、ガラス基板 上に importin βを結合させ、これに上記の量子ドットを結合させたところ、IBB 内にアジド基を導 入したタンパク質 (F58Amb)は IBB 外にアジド基を導入したもの (F130Amb) に比べ、著しく結 合頻度が低かった (図4)。これは、量子ドットの立体的障害により結合が阻害されたためと考えら れる。



図1 アジド基の反応性



図3試験管内翻訳系によ図4アミノ化量子ドットへのアジドタンパク質の結合法および検証るアジド化蛋白質の合成法(左)と実際の結果(右)。F130Amb で結合の著しい低下が見られる。

20.1kDa

14.4kDa

CBB染色

0.5

# 1-3.非天然アミノ酸を導入したタンパク質を CNT 先端に取り付ける技術の確立(吉村 G、中山 G)

以下の2つの実験により、先端酸化した CNT にアジド化 importin  $\alpha$  を結合させる技術の確立 を目指す。i) シリコン基板上で先端酸化した CNT に対して、エチレンジアミンをと EDC を反応さ せ、先端をアミノ化した。これに Staudinger 反応を用いてアジド化 importin  $\alpha$  を結合させ、これ を AFM 観察した。この結果、アジド基を導入してある importin  $\alpha$ のみで、CNT 先端へのタンパ ク質の結合が高頻度(76%)で見られた。 ii) 基板上で酸化した CNT を、1、 1-carbonyldiimidazole で処理した tween20 を用いて可溶化し、これにアミノ基を有する蛍光色 素(Texas red)を結合させた。これにより、蛍光顕微鏡下で個々の CNT を観察することが可能に なった。現在、この CNT にアジド基を有する importin  $\alpha$  (量子ドットでラベル)を Staudinger 反 応で結合させ、蛍光顕微鏡その先端への特異的結合を蛍光顕微鏡を用いて検証中である。

## 2.ナノチューブアームの研究開発-CNT の物性制御-(中山 G)

#### 2-1.CNTの物性制御

CNT アーム先端には、タンパク質分子を一個だけ捕捉することが要求されるため、現在直径 2nm 程度の CNT を用いている。ただし、そのような CNT は Q 値の向上が課題となる。本年度は CNT アームの振動特性向上を目的として CNT にフラーレン分子を内包し、機械特性評価を行っ た。単一 CNT の操作・加工に用いている透過型電子顕微鏡(TEM)マニピュレータを使って、 TEM 内での CNT 共振が観察できる系を構築した。TEM 内に印可した電場を高周波変調させな がら個々の CNT 振動の様子を像観察することにより、CNT 共振振動数および Q 値の計測に成 功した。その結果、Q 値の CNT 形状依存性と共に、孤立した単層~2 層 CNT ではフラーレン分 子内包により Q 値が向上することを実証した。

#### 2-2.CNTの形状制御

H19 年度に見いだした通電加熱による CNT 先鋭化 プロセスについて、熱伝導方程式の数値計算を基にメ カニズムを考察した。通電加熱時の架橋 CNT 内の温度 分布を、両端電極部が室温一定で、架橋部中央が最高 温度となる放物線とした。CNT の局所領域の炭素昇華 量を温度に依存するとして計算した。この結果から、 電流量、即ち通電時の加熱温度により CNT 切断後の先 端形状を制御できることが明らかになった。具体的に は、低温(最大温度 2000 K)で加熱した場合、結合エネ ルギーの比較的小さい 5-7 欠陥からの昇華が優先的に 起こり、注射器形状の先鋭化が起こる。一方、高温(最 大温度 2600 K)で加熱した場合、5-7 欠陥からの昇華だ けでなく、比較的安定な 6-6 欠陥からの昇華量も無視 できなくなり、温度分布を反映した炭素昇華が起こり、 円錐状に先鋭化される。



図5 CNT-FETの形状像とSGM像.

#### 3.質量・力計測デバイス開発(秋田G)

CNT による単一分子レベルの質量・力計測を行うためにプロトタイプのデバイス開発を 行ってきた。先ず、変位検出のための CNT・電界効果型トランジスタ(FET)の製作プロ セスを単層 CNT の成長プロセスを含め確立した。また、この CNT・FET が振動するゲー トに反応することを確認し、提案しているデバイスの原理を実証した。ここで、走査型ゲ ート顕微鏡(SGM)技術を改良した新しい SGM 法を提案しその測定方法を確立した。図 5に示すように多くの CNT が形状像では確認できるが振動ゲートに応答している CNT チ ャネルのみが SGM 像では確認できた。この方法 は振動ゲートの評価だけでなく CNT-FET の動作 状態の確認にも応用可能な方法であることが分か った。[図 5]

しかし、開発した CNT-FET は液中動作で電極 が劣化する課題があり、それを防ぐ方法を検討し ている。また、FET を具備した CNT アームの組 み立てに走査型電子顕微鏡 (SEM) マニピュレー タを採用しているが、問題となっていた電子線照 射による CNT の劣化は 10nm 程度の Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 薄膜 で CNT 部分を覆うことで回避出来ることを見出 した。

上記に加えて液中での CNT 片持ち梁の振動挙 動を明らかにするために分子動力学(MD)計算を 進め、液中でも Q 値が 2 ~ 3 程度で CNT が振動 する事を確認した(図 6)。また、このようなサイズ においても連続体理論で解析可能である事が分か った。





さらに、完成したデバイスの電気信号が、液中における CNT の振動によるものである ことを確認する手法として、CNT 振動を光学的に検出する方法を開発してきた。現状では、 大気中で 20nm 以上の太い CNT 片持ばりの共振を光学的に計測することに成功した。こ の時の Q 値は 100 程度である。また、光学式手法において振幅検出による周波自動追尾用 プログラムの作成を行った。この場合、秒のオーダーの追従は可能であるが、さらに高速 でかつ高精度な検出は困難である。これを解決するため光学系の配置を改良し S/N 比を一 桁程度向上させた。また、位相検出系構築に向け PLL による位相検出システムの準備を完 了した。現状では、ディテクターの時定数が遅く位相検出に至っていないが、今後開発を 行う光学式、電気式検出の両手法に対応できる。

## 4. 分子反応検出プローブ顕微鏡の開発(中山 G、秋田 G)

市販の Si チップ先端に CNT を取り付けた CNT 探針を用い、タンパク質の一分子イメージン グおよび項目 1・1 で作製した CNT シートのイメージングを行った。現在タンパク質を捕捉させた CNT シートの観察に取り組んでおり、CNT シートの機能確認を行っている。また、中山GにSE Mマニピュレータを導入し、CNTアームをより効率良く作製する環境を整備した。CNT アーム先 端へ部位特異的タンパク質捕捉の確証実験に適用して性能向上に向けた基礎データを収集して いる。

#### 5.質量計測技術の開発(荒川G)

これまでに確立した全反射型蛍光顕微鏡による一分子蛍光観察技術に、中山G、吉村G で開発した CNT 先端にタンパク質を結合させる技術を組み合わせ、CNT プローブ先端に タンパク質を補足する技術を確立することを目的に研究を遂行した。予備実験として Si プローブ先端に蛍光タンパク質を付着させ、AFM により基板表面にアプローチした。こ れを同時に全反射型蛍光顕微鏡で観察すると、プローブ先端が表面に近づいた時にのみ蛍 光シグナルが観察された。現在、CNT プローブを用いて同様の実験に取り組んでいる。

## 6.熱量計測デバイス開発(石島G)

6- 1.カーボンナノチューブの溶液中での熱伝導性の 評価(石島)

CNT は高い熱伝導性を有することが知られているが、 すべて空気中、真空中での結果であり、水溶液中での特 性は未だ明らかではない。我々は水溶液中での CNT の熱 伝導性を明らかにするために、CNT に可視光レーザーを 照射し、そのエネルギーが吸収され、水溶液中に熱とし て散逸されていく過程を計測した。温度変化は蛍光色素 を標識したタンパク質

を用い、その蛍光強度の変化から見積もった。その結 果、照射したレーザー強度に応じて温度変化が見られた。 この結果は CNT が水溶液中においても高い熱伝導性を 有することを初めて証明したものである。今後、CNT の 結晶性との相関などを明らかにしていく予定である。

## 6-2.CNT ナノ温度プローブの作製とマルチスケール 環境計測システムの実現(新井)

SEM 内ナノマニピュレーションシステムの拡張、CNT 及 び CNT・基板間接着の熱伝導評価デバイスの作製、及び温 度プローブの導入のための World-to-Chip インタフェースを 有するマイクロ流体チップの作製を行った。ナノマニピュレー ションシステムはカンチレバー先端への CNT の固定に用い る。SEM のステージを活用する設計とし、マニピュレータを 単腕から双腕へ拡張したことで 12 自由度のナノマニピュレ ーションシステムを作製した(図 7 参照)。このマニピュレーシ ョンシステムの拡張により、CNT 操作の自由度が向上し、カ ンチレバー上への CNT の設置の時間短縮を実現した。熱 伝導評価デバイスは、CNT 末端を局所的に加熱した際の



図7カーボンナノチューブのSEM像



図8 アクチンの蛍光像



図 9 アクチンの蛍光強度変化の時間

CNTの温度特性を、四端子計測によるCNTの電気抵抗変化からの評価に用いる。CNTへの局 所加熱では基板上の断熱が重要であり、FEM 解析結果を基に評価デバイスの作製を行った。ナ ノマニピュレーションシステムを用いて基板上の電極パターンへの配置に成功した。また CNT と カンチレバー間を熱伝導性よく固定するために EBID で堆積する物質の選定及び局所堆積によ る CNT 固定を行っていく。温度プローブによる温度計測を安定した環境で行うため、 World-to-chip インタフェースを有するマイクロ流体チップ を製作した(ロ頭講演の 20、21)。熱電対や蛍光法によ り環境全体の情報を取得し、サンプルを光ピンセット 等の非接触操作手法によりプローブ先端に搬送しプロ ーブを用いてサンプルの高精度な計測を行えるシステ ムを構築した。プローブ挿入口を有するマイクロ流体チッ プを、二段露光によるフォトリソグラフィにより製作した。チ ップへカンチレバーを挿入しチップ中の流れの状態を観 察し、プローブの挿入及びチップ内での動作時にもチップ 中の流体の安定性が保たれることを確認した(図8参照)。 小野らが研究している振動型熱量センサをチップ内で 利用できる見通しがたった。

## 6-3.振動型熱量センサの液中での特性(小野)

サブミクロンの最小加工寸法をもつバイメタル振動 型の熱量センサを作製する方法を開発し、プロトタイ プを試作した。真空中や大気中でその共振周波数の温 度依存性を評価した。また、光励起により振動型セン サを水中で自励発振させ、光プローブでその振動を検 出することに成功した。また、電気的なチューニング により、液中においてQ値を増幅することができるこ とを示した。真空中では振動子の共振周波数は、材料 の熱物性によってきまるが、溶液中では溶液の密度や 粘性の温度変化が大きく影響することを見出した。こ のことについて理論的な解析を行い、センサのサイズ がナノメートルスケールになると粘性の影響を大きく 受け、マイクロスケールでは密度の影響を受けること がわかった。溶液中でセンサ近傍においた熱源へのパ ワーを変調させ、その際のセンサの共振周波数変化を



図 10 上昇温度のレーザー強度依存性



図 11 12 自由度ナノマニピュレーシ ョンシステム



図 12 Worl-to-chip インタフェースを 有するバイオチップ内でのカ ンチレバー操作

調べる実験をおこなった。その結果、熱容量が小さく熱伝導がおおきなセンサは、熱源からの熱を効率よく捕えて周波数応答することがわかった。また、振動型の温度センサ以外に、静的なそりから熱を測定するバイメタル型熱量センサの試作を行った。

## 7.CNT 探針の供給(秋田 G、中山 G)

今年度は秋田 G、中山G それぞれが SEM 内での CNT を取り付け、TEM マニピュレー タを用いた CNT 先端活性化について、荒川 G に技術提供をすることにより、研究効率活 性化を図った。

## 3. 研究実施体制

(1)「中山」グループ

1.研究担当グループ長:中山 喜萬 (大阪大学大学院、教授) ②研究項目

- ・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、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)「物材研」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、グループリーダー) 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

- ・CNTの蛍光修飾、熱伝導性の評価
- ・ナノプローブの作製・評価とナノ計測システムの構築

## 4. 研究成果の発表等

- (1) 論文発表(原著論文)
  - 1. H. Maruyama, Y. Nakayama, "Trapping Protein Molecules at a Carbon Nanotube Tip using Dielectrophoresis", *Appl. Phys. Express* 1, 124001 (2008).

- K. Hata, Y. Nakayama and S. Akita, "Response of Carbon Nanotube Field Effect Transistors to Vibrating Gate using Scanning Gate Microscopy", Jpn. J. Appl. Phys. Vol.40, 040202(4), 2009
- M. Yokokawa, K. Takeyasu and S. H. Yoshimura, "Scanning probe microscope revealed mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope in living cells", J. *Microscopy* 232 (Pt I), 82-90 (2008).
- S. Otsuka, S. Iwasaka, Y. Yoneda, K. Takeyasu and S. H. Yoshimura, "Individual binding pockets of importin b for FG-nucleoporins are differently regulated by RanGTP". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105 (42), 16101-16106 (2008).
- T. Umeda, T. Inaba, A. Ishijima, K. Takiguchi, H. Hotani, "Formation and maintenance of tubular membrane projections: experiments and numerical calculations." *Biosystems* 93, 115-9. (2008).
- 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<sup>+</sup>-driven chimeric flagellar motors in Escherichia coli." *J. Mol. Biol.* 376, 1251-9. (2008).
- F. Arai, N. Inomata, Yoko Yamanishi, "Manipulation and Observation of Carbon Nanotubes in Water Under an Optical Microscope Using a Microfluidic Chip," *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 電子版公開(2009)
- 小野崇人、「シリコンマイクロ振動子を用いた高感度熱機械変換素子」、豊田研究報告、 No. 61、143-148.(2008 年 5 月).
- 9. Kim, S.-J., Ono, T., and Esashi, M., "Thermal imaging with tapping mode using a bimetal oscillator formed at the end of a cantilever." *Review of Scientific Instruments* 80, 033703-1-6. (2008).

## (2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数:0件(CREST 研究期間累積件数:1件)