

「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。

H20年度に引き続き、質量および力計測については、1)タンパク質をCNT先端に部位特異的に捕捉するために、タンパク質のアジド基化と CNT 先端の先鋭化と活性化技術、2)それらの結合とその評価技術、3)CNTアームの振動および変位を光学的、電気的に検出する技術、4)CNTシーートの製作、タンパク質操作プラットフォームの製作技術とオペレーション技術の開発を行った。

また、熱量計測については、5)熱量計測に適したCNTの調整とCNTの熱伝導性を含む物性評価、6)被測定位置にCNT先端をアプローチさせるために、水溶液中でCNTを可視化する技術、7)バイメタルカンチレバーによる水溶液中での熱量計測評価技術と褐色脂肪細胞反応の熱量計測、8)CNT・バイメタルカンチレバー系による時間・空間分解能の高い熱量計測システムの構築に取り組んできた。

§ 2. 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 先端への部位特異的タンパク質結合技術の確立
 - ・ 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
- ・ 一分子力計測
- ・ 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
 - ・ 分子反応検出プローブ顕微鏡の開発
 - ・ CNT探針の供給

(3)「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
 - ・ 部位特異的タンパク質付加技術の確立
 - ・ 質量変化の計測
 - ・ 1分子力計測

(4)「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
 - ・ 熱量計測デバイス開発
 - －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
 - －細胞の熱発生計測

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. CNT 先端への部位特異的タンパク質付加技術の確立(中山 G、吉村 G)

1-1. CNT シートの作製(中山 G)

昨年度までに確立した多層 CNT シートの作製技術を垂直配向単層 CNT に適用し、樹脂化単層 CNT シートを作製した。得られたシート表面は、CNT が 3 nm 程度突出しており、なおかつ CNT 先端が開端していることから、タンパク質 1 個レベルの捕捉に適した形態といえる。実際に作製した単層 CNT シートを用いて、CNT 先端へフェリチン分子のトラッピングに成功し(図 1)、シート上の CNT に一分子ずつタンパク質を付加する条件を確立できた。また、ビオチン化牛血清アルブミン

(BSA)のCNTシートへの結合を、Qdot ストレプトアビジンを用いたアビジン-ビオチン反応により検出した。その結果、走査型電子顕微鏡(SEM)観察によるタンパク質結合の可視化に成功し、CNTの存在領域のみビオチン化 BSA の特異的な結合を確認した(図 2)。

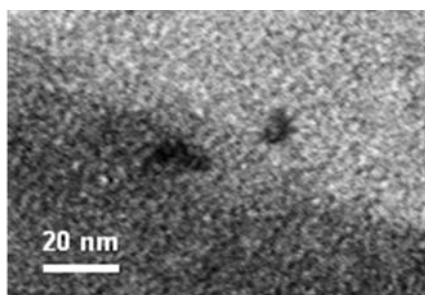


図1 シートから突出した単層CNT先端へのフェリチン分子の結合を示す透過電子顕微鏡像

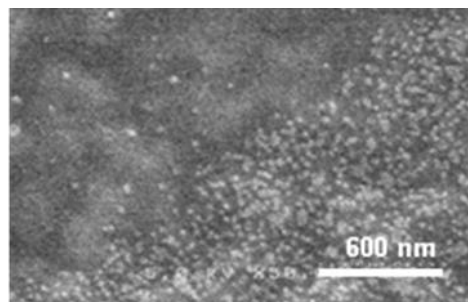


図2 ビオチン化 BSA および Qdot-ストレプトアビジンを固定した後の CNT シートの SEM 像

1-2. タンパク質操作用プラットフォームの開発(中山 G)

活性を保持したままタンパク質が固定できる CNT シートを液中に固定し、CNT アームを大気中へ出すことなくタンパク質を操作するために、マイクロ流路を利用するプラットフォームの作製に着手した。マイクロ流路内で二層流を形成し、層流間を CNT アームが水平移動させられる設計にした。これにより、タンパク質間相互作用の計測に必要な全ての反応を行うことができる。これまでにポリジメチルシロキサンを用いたプロトタイプを作製を行い、マイクロ流路内での二層流の形成を確認した(図 3)。

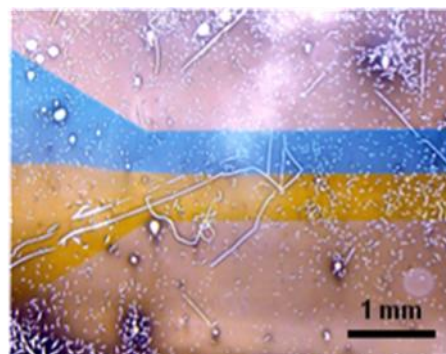


図 3 プラットホームのマイクロ流路内での二層流の形成

1-3. CNT アーム先端へのタンパク質の部位特異的付加と原子間力顕微鏡による力計測(吉村 G、中山 G)

1-3-1. 部位特異的タンパク質の付加技術の確立(吉村 G)

①研究の目的

CNT デバイスによる正確な質量測定およびキネティクス測定には、いかにタンパク質を CNT 先端に結合させるかが大きな課題となる。本項目では非天然アミノ酸を用いたタンパク質ラベル法を応用し、CNT 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。

②研究実施方法

昨年度までに、以下の技術を確立している。

- アンバー変異と非天然アミノアシル tRNA を用いてタンパク質の任意の部位にアジドチロシンを取り込ませる技術
- staudinger 反応を用いて、タンパク質のアジド基を支持体(量子ドット)上のアミノ基と結合させる技術

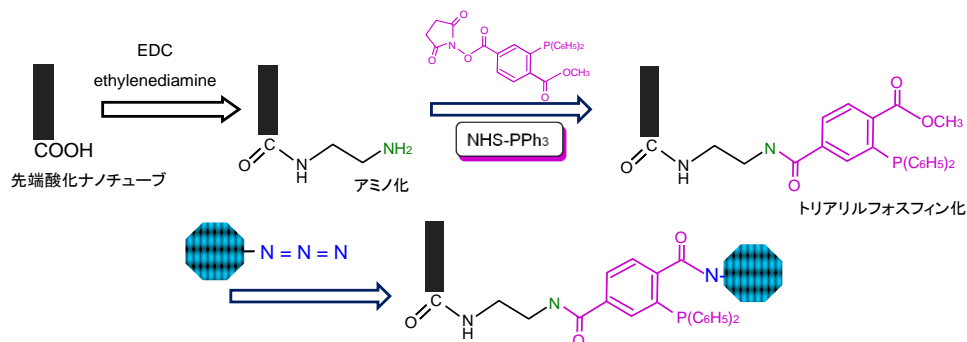


図 4 アジド基入りタンパク質を CNT 先端に捕捉するプロセス

今年度は、これらの技術を利用して、CNT 先端にアジド基入りタンパク質を捕捉し、それを蛍光顕微鏡で確認することを行った。アジド基入りタンパク質を CNT 先端に結合させる実験の具体的な流れを図4に示す。まず先端を酸化した CNT にエチレンジアミンとカルボジイミド(EDC)を反応させカルボキシル基をアミノ基で修飾する。このアミノ基に N ヒドロキシスクシニイミジル基を持つトリアリルフォスフィン誘導体を反応させて活性化した後、アジド基を含むタンパク質を反応させる。

③結果および結論

今年度は、カルモジュリンというタンパク質を用いて、その機能を阻害することなく CNT 先端に結合させる試みをおこなった。まず、カルモジュリンの 85 番目の位置(チロシン)にアンバー変異を用いてアジドチロシンを導入し、図 4 に示される反応を用いて CNT 先端に結合させた。カルモジュリンの結晶構造に基づく、85 番目のチロシンはリガンド及びカルシウム結合部位とは離れているため、CNT の結合によってカルモジュリンの機能が阻害されることはないと予測される。CNT 先端に結合しカルモジュリンを検出するために、青色蛍光タンパク質 (ECFP) と融合させたカルモジュリンの基質ペプチドをカルシウム存在下で加え、蛍光顕微鏡で観察した。CNT の蛍光ラベルには、界面活性剤 (tween 20) を用いて標識する技術を別に確立し(業績原著論文 7)、これを用いた。図 5 にその結果を示す。Texas Red で赤色にラベルされた CNT 先端にカルモジュリン基質の青色のシグナルが見られた。これはカルシウム非存在化ではほとんど見られなかったことから、カルモジュリンがその性質を維持したまま CNT 先端に結合していることがわかる。(業績原著論文 8)

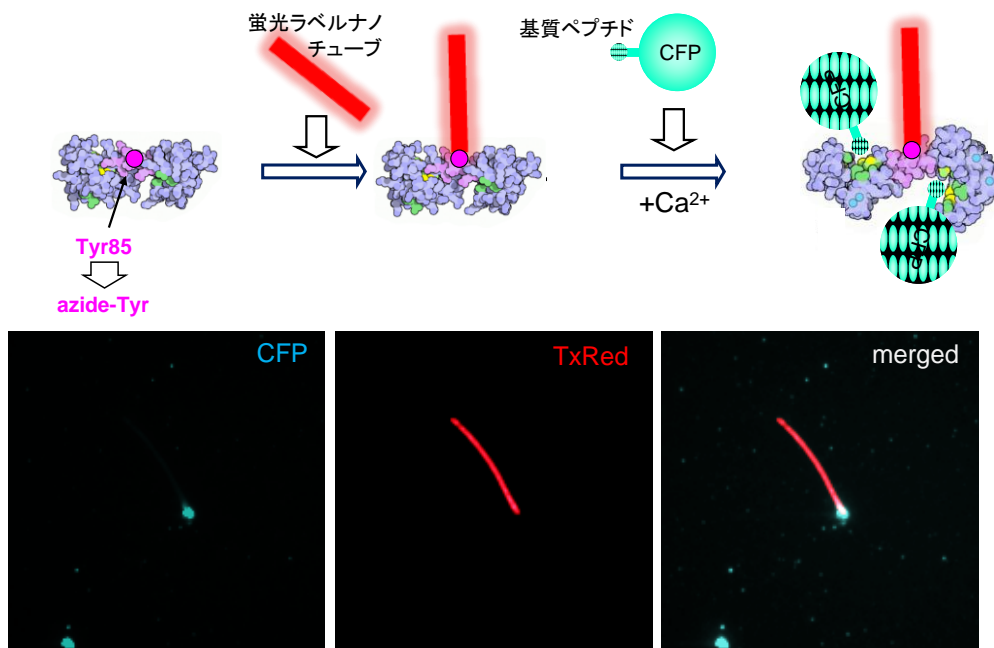


図 5 タンパク質(カルモジュリン)の機能を阻害することなく部位特異的に CNT 先端に捕捉したことを蛍光ラベルを使って可視化した実験手順と結果。

1-3-2. 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(中山 G)

モデルタンパク質として、非天然アミノ酸アジドチロシンを導入した importin α を用いて CNT 先端への取り付けを行った。開管した CNT 先端に存在するカルボキシル基にエチレンジアミンを結合させ、CNT 先端をアミノ基化した。さらにトリアリルフォスフィン誘導体を用いて Staudinger 反応を行い、importin α を結合させた。一連の反応後の CNT を AFM 観察した結果、アジド基化 importin α を用いた場合、約 72%の CNT 先端に図 6 に示すような粒子が観察された。原子間力顕微鏡 (AFM) 像から計測される粒子サイズから、CNT 先端には importin α が 1 分子レベルで結合したことが示唆された。また、比較対照として天然 importin α を用いて同様な反応を行った場合、CNT 先端への粒子結合率が 28%に減少することから、アジド基化した importin α が Staudinger 反応により CNT 先端へ一分子単位で部位特異的に捕捉されていることを確認した。

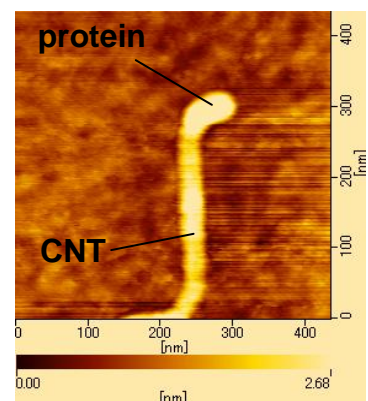


図 6 先端でタンパク質を捕捉した CNT の AFM 像

1-3-3. 原子間力顕微鏡によるタンパク質間相互作用力の 1 分子レベル計測 (中山 G)

上記の手法を用いて importin α 一分子をあらかじめ先端に捕捉した CNT アームを AFM の探針として、基板上に展開した個々のタンパク質分子(importin β)との分子間相互作用力をフースカーブ測定により計測し、捕捉分子の活性保持および捕捉配向制御について評価した。Importin β との特異的相互作用部位を外に向けて CNT 先端で捕捉した importin α (124amb)と、反対向きに捕捉した importin α (56amb)の二種類を用いて計測を行った結果、後者の場合、15 pN にのみピークがある分布が得られた(図 7(b))。一方、前者では 23 pN と 37 pN の 2 つのピークを持つヒストグラムが得られた(図 7(a))。両者の比較から、この importin α (124amb)を用いた場合にのみ計測された 37 pN 付近の力が importin α - importin β 間の特異的相互作用に相当すると考えられる。この結果は、CNT 先端では分子の生体活性を保持しながらタンパク質分子の部位特異的捕捉が実現できていることを示している。

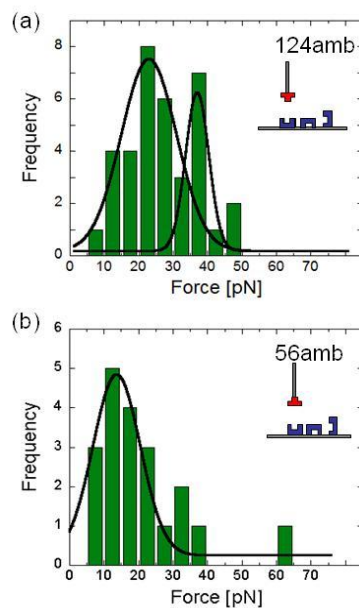


図 7 タンパク質間相互作用力計測値の分布

2. CNT アームの開発 (中山 G)

2-1. 光学式 CNT アームおよび電気式 CNT アームの開発

CNT 振動検出を行うための最適形状を持つ CNT アーム加工方法を見いだした。直径 10nm 程度の 2 本の多層 CNT 先端同士をつき合わせて通電することにより、一方の多層 CNT 先端に直径 1nm 程度の単層 CNT を新たに形成することに成功した。この先端形成法は再現良く行えるようになりつつあり、目的とする光学式 CNT アーム作製が可能となった。また、細い多層 CNT を用いた電気式 CNT アームの作製にも目処を得た。

2-2. CNT アームの性能向上 (CNT 形状・物性制御)

CNT アームを TEM 内で通電加熱により加工したその前後の共振周波数を計測し、Q 値の変化を見積もった。印加電圧の高周波変調により共振周波数をあらかじめ計測した 1 本の多層 CNT を引っ張りながら通電加熱し、延伸塑性変形させた。変形加工後の CNT の共振を計測した結果、共振振動数、Q 値共に上昇した。通電加熱により CNT 内の欠陥が修復されて剛性が向上することや、延伸により直径制御が行えるなど、CNT アームの性能向上への指針を得た。また、2-1 で作製した、先端にタンパク質捕捉用の細い CNT を取り付けられたアームについても共振計測を行い、加工によるアーム質量変化(約 710zg)を評価した。一連の TEM 内共振測定から、CNT アームを用いる本実験系では質量変化が約 7zg の精度で計測できるとの見通しを得た。

3. 質量力検出デバイスの開発 (秋田 G)

3-1. 片持ちばりデバイス開発・基本動作の確認

CNT-FET は液中動作で電極が劣化する課題があり、それを防ぐパッシベーション膜形成や有機薄膜被服等の方法を検討している。本年度は無機薄膜の Si_3N_4 だけでなく有機系薄膜としてエポキシ系薄膜である SU-8 (MicroChem 社製) を用いたデバイス作成工程を開発した。これら新しく開発したプロセス技術を組み合わせ片持ちはり力検出デバイスの作成を行った。

この、片持ちはり振動の検出を電氣的に行うために機械的周波数ミキサ方式を採用した。このようにすることで検出系の応答速度が比較的遅いものでも共振周波数シフトの計測が可能になると同時に CNT-FET の高周波信号検出で問題となる高出力インピーダンスの問題も回避可能となった。図 8 に大気中で動作させた時の出力信号の励振周波数依存性を示す。900kHz 付近に片持ちはり CNT の機械的共振による信号が見える。また、ゲート電圧の DC 成分を大きくすると共振周波数が低下している。これは、片持ちはりへの引力が静電気力により付加された、実効的にバネ定数が低下したことに相当する。以上のように、本プロジェクトで提案したデバイスの作成に成功し、大気中での動作を確認した。

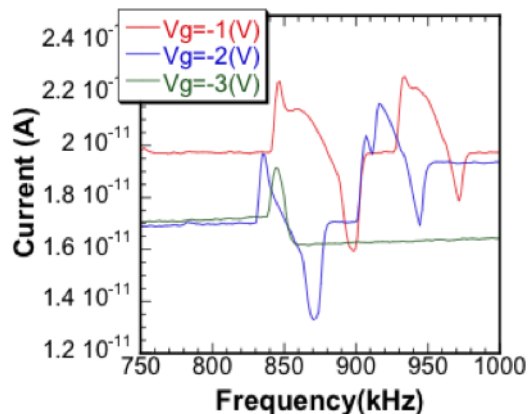


図 8 片持ち梁 CNT デバイスの大気中における周波数特性

3-2. 周波数自動追尾機構の開発

電氣的機械的周波数ミキサの方法を用いた場合、振動周波数よりも遙かに低い周波数で位相検出が可能であることがわかった。本手法を用いることで、CNT の機械的共振周波数は数 MHz 以上と高いにも関わらず検出器の周波数応答が遅い安価なシステムの構築を行った。現在、電氣的手法は S/N 比が低いため時定数が 100 ms となっている。また、研究項目 3-4 で述べる光学式手法において振幅検出による周波自動追尾用のプログラムを作成した。また、ヘテロダイン方式を組み合わせた位相検出系構築に向け PLL による数百 KHz 程度の振動に対する位相検出システムの準備を完了した。

3-3. 両持ちはりデバイスによる液中質量計測 (H21 年度追加項目)

外部損失の影響が大きい環境中における振動では、単層 CNT の方が多層 CNT に比べ損失が小さくなると期待出来る。また、液中において CNT トランジスタの変位が、高周波領域で液中イオンなどで遮蔽されず検出できるか確認するために単層 CNT の両持ちはりデバイスを作成し、液中での動作を確認する。「はり」となる CNT にタンパク質を付着させ共振周波数変化の検出と質量計測の実証を目的とする。

両持ちはり構造は Si/SiO_2 基板上的 Ti/Pt 電極間 (約 3 mm 間隔) に配置した直径約 1~1.5 nm の単層 CNT 直下をエッチングし作成した。大気中で両持ちはり単層 CNT の共振を電氣的に検出

することができた。また V_g の絶対値を大きくすると、静的な張力により CNT の共振周波数がより高周波側へ移動した。このように、CNT の大気中における気体分子との衝突による損失が少ないことがわかった。

3-4. 液中光学的 CNT 振動検出システム構築

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、液中で 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。このとき液中における Q 値は 2~3 程度である。また、レーザーヘテロダイン光変調により光学的なナノカンチレバーの振動状態の詳細な解析の可能性を見出した。

4. 分子反応検出プローブ顕微鏡の開発(中山 G, 秋田 G)

研究項目 1-1 で得られた CNT シートを分子反応検出プローブ顕微鏡に組み込み、タンパク質間の相互作用力を計測した。Si 探針にストレプトアビジンを、CNT シートにビオチン化 BSA を固定させてフォースカーブ測定により力計測を行った。その結果、ビオチン化 BSA をマイカに固定した際には数分子間の相互作用も検出されたのに対し、CNT シートに固定した場合には検出された力は 2 分子間の相互作用のみであり、一分子レベル計測における CNT シートの有効性が確認された。

5. 質量変化の計測(吉村 G)

先端にタンパク質を捕捉した CNT アームの共振周波数により、タンパク質の質量や化学反応における質量変化を計測する。今年度は、当初予定していた電気式質量計測デバイスではなく、現時点で最も実用性の高い、光学検出を利用した CNT 振動計測法(秋田 G で開発)を用いた。目標とする質量は、最終目標であるzeptogram (10^{-21} g) に向けた前段階として、 10^{-17} グラムとする。当初予定していた研究項目 5-1 (質量変化の計測) と 5-2 (酵素反応の実時間計測) とを統合した形で進めてゆく。具体的には、CNT 先端に部位特異的にカルモジュリンを結合させ、これとカルモジュリン結合ペプチドを融合した蛍光タンパク質(CFP)との結合を計測する。本年度は、CNT の振動を検出するための光学デバイスを構築し、カートリッジ状の CNT を蛍光ラベルし、その振動を計測する系を立ち上げることに成功した。

6. 一分子力計測(吉村 G, 中山 G)

CNT を用いた変位検出デバイスを用いて、分子間に働く力を計測する。そのために、片持ちばり型の電気式変位検出デバイスを用いる。CNT 先端に DNA やタンパク質を捕捉し、基板にはそれと相互作用するタンパク質を吸着させる。CNT アームを操作し、その撓みを検出する。電気式の片持ちばり変位検出デバイスが作動し始めたら、これらの技術を統合し、分子間力を計測する実験を開始する予定である。

7. 熱量計測デバイス開発(石島 G)

7-1. バイメタル型温度計

より高感度な熱量センサを開発するため、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、そのプロトタイプを試作した(図 9)。高感度化のために振動体を極めて小さく作り、熱容量を小さくする必要がある。このため、電子ビーム描画装置を用いて、幅が 200nm~1 μ m の微小な振動型センサを作製した。これにより、ほぼ当初の予定通り作製技術の開発のめどがたった。これまでに作製した振動子を真空中、大気中や液体中に入れ、Q値や熱量に対する応答をレーザードップラー振動計により評価した(図 10)。また、感度向上のため電氣的なQ値制御により、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。溶液中でナノメートルの振動子を約 5nm の振動振幅で振動させることができ、熱量センサとして約 4.5fJ の熱分解能が期待できることを示した。

バイメタル型温度計を用いた温度計測を安定した環境で実施するため、昨年度作製したWorld-to-chip インタフェースを有するマイクロ流体チップ内(図 11)で、自己検知型のカンチレバーによる温度検出を行った。チップ内への溶液の流入量とドレインからの排出量を制御することでインタフェースからの溶液の漏出を防止した状態で計測を行う。流路内にマイクロヒータを加工し、ヒータを 20 $^{\circ}$ C及び 40 $^{\circ}$ Cに加熱した際の温度変化をカンチレバーで検出することに成功し、バイメタル型センサによるチップ内計測の実施の見通しが立った。

また、変位型のバイメタル構造で熱膨張率の大きく異なる金と窒化シリコンからなる厚さ 400nm 以下、長さ 500 μ m から 1mm までのプローブを設計・作製した。このカンチレバークロップを用いて、真空中・大気中にて、レーザーによる局所発熱に対する変位の応答を評価すると、真空中と比べて大気中では感度が2桁程度低下することが確認された(図 12)。大気中への放熱が予想以上に大きいことを示しており、大気

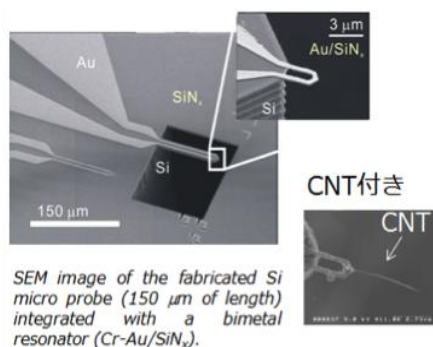


図 9 作製した振動型熱量センサ

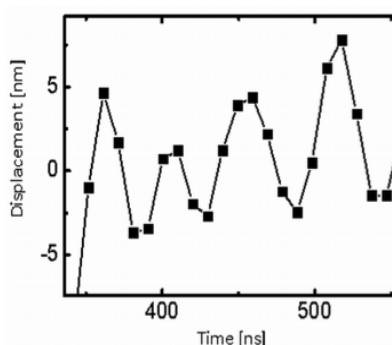


図 10 溶液中で検出した熱量センサの振動信号

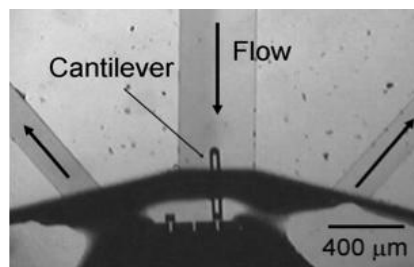


図 11 World-to-chip インタフェースを有するバイオチップ内でのカンチレバー操作

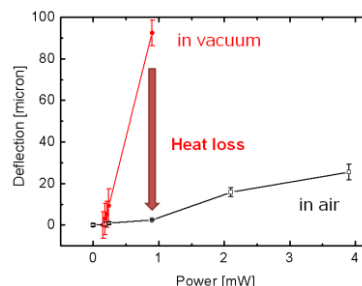


図 12 大気中への熱伝達による変位量の真空中との比較

への熱伝達を考慮した新たなモデルを構築した。現在、この新モデルを基にした構造の最適化を行い、環境への熱の逃げを考慮した高感度センサの作製に取り組んでいる。

7-2. CNT・バイメタル構築と評価

昨年度開発したマニピュレーションシステム(図 13)を用いて、熱伝達材料としての CNT を熱量センサ上に配置し、熱量センサとしての性能評価を行った。CNT を実際に作製したセンサに取り付け、センサとしての特性評価を行う。電子顕微鏡下での CNT のマニピュレーションにより、熱量センサへのコンタミネーションの堆積などの影響、センサの性能劣化などの影響を調べた。実際に作製したセンサを図 14 に示す。CNT をバイメタルセンサの先端に配置できた。さらに、本センサを振動させて、その信号が検出できることを示した。カセンサ、熱量センサとしての動作に関しては、今後行う予定である。

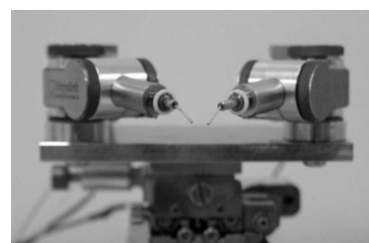


図 13 12 自由度ナノマニピュレーションシステム

7-3. CNTの可視化

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蛍光色素での修飾等の特殊な処理が必要となってくる。蛍光観察に関しては、CNT表面には蛍光色素と結合に有効な反応基がないため、ピレンを介して蛍光色素の結合を試みた。また、CNTへの蛍光修飾を必要としない方法として、CNTを局所的に固定した状態で、クエンチング現象を用いて蛍光発光を背景として観察した。

ピレンを介したCNTへの蛍光色素の結合は可能であったが、その効率は高くなく、目的とする蛍光観察のレベルには達していなかった。そこで、京都大学吉村Gからの示唆を元に、ピレンを表面活性剤 Tween20 に置き換えてみたところ、蛍光標識効率が上昇した。最適条件を検討したところ、収率が約20%までに向上した。また、CNTの直径、及び長さ依存して蛍光強度の均一性が異なることが示唆された。そのため、CNTの結晶性だけでなく、直径と長さについても検討し、高輝度かつ均一な蛍光標識を実現するために最適化条件を検討中である。

クエンチング現象を用いて蛍光物質を背景に CNT を観察する方法を実現し、これを用いて誘電泳動により透明電極(ITO)間に CNT を捕捉したが、複数本まとまって捕捉される事を確認した。そこで電極の加工形状に重点をおき、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。

7-4. CNTプローブと生体分子との相互作用

再来年度に取り組む研究課題である。

7-5. 局所熱発生器

CNT の熱伝導性を評価する局所的に熱刺激を与えるデバイスとして、熱発生機となる電極マイクロヒータと熱伝導性評価用の 4 端子電極を集積化した局所熱発生機を作製し CNT を設置して熱評価デバイスを作製した。電極はフォトリソグラフィにより作製し、CNT の作製した電極基板上への設置には SEM 内ナノマニピュレーションシステムを構築して行った。SEM のステージと双腕マニピュレータとを併用することで 12 自由度ナノマニピュレーションシステムを構築する。CNT をヒータと計測電極を加工した基板に固定した熱伝導評価デバイスの作製を行った。

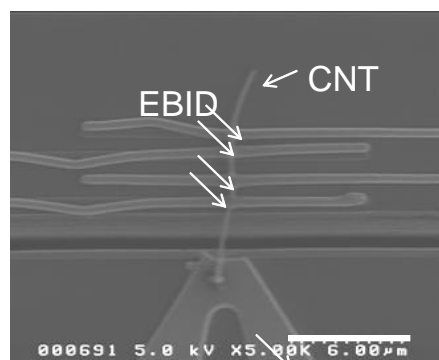


図 14 熱伝導性評価デバイス

構築した 12 自由度ナノマニピュレーションシステム(図 13 参照)により、CNT の電極上への設置の時間短縮を実現した。CNT は電子線誘起堆積(EBID)法による堆積物により電極に固定した。この作製した熱伝導性評価デバイスは、CNT 末端をマイクロヒータで局所的に加熱して CNT の電気特性変化から熱伝導性を評価することができる(図 14)。この評価デバイスを用いて研究項目 7-8 での CNT の熱伝導性の評価に用いた。

7-6. CNT の自作、熱量計測用の CNT の作製

新たにアーク放電法による CNT の調製を自ら行った。大阪府大秋田G、東北大田路研究室に装置を借りて、CNT の作製を行い、さらに精製、評価を行った。結晶性、純度は満足のいくものを作製できたが、長さに関してはまだ不十分であった。さらに条件を検討している状況である。

一方、溶液中における CNT の熱伝導測定のため、新たにシート状 CNT の作製を行った。CNT 成長時に触媒となる鉄をシリコン基板上に予めパターニングし、化学気相蒸着法によって CNT を合成した。これまでに 10 μ m 以上の線幅に触媒をパターニングした場合、垂直に配向した CNT の成長が確認できている。さらに垂直に配向した CNT をアルコールに含浸し、ゆっくりと引き上げることで基板に水平に配向したシート状 CNT の作製に成功した。今後は光透過性の高い基板である石英等を用いてシート状 CNT の作製を行い、溶液中における CNT の熱伝導性評価に光学顕微鏡下で行う予定である。

7-7. CNT、CNTT の溶液中での物性計測

今までの CNT の物性評価はそのほとんどが真空中、空気中であった。その物性を水溶液中に関してもそのまま適用してもよいかどうかを検証した。まず水溶液中での物性評価の一つとして、拡散現象に着目し、CNT と長さ、太さが均一な CNTT(Carbon Nano Test Tube)を材料に選び、溶液中での拡散現象を、軸に対して垂直、水平、回転方向に分離してそれらの拡散定数を見積もり、理論値との整合性を検討した。水溶液中で観察したところ、拡散運動を観察することができた。この運動を、軸に対して、水平、垂直、回転成分に分離し、それぞれの拡散定数を求めた。その結果、垂直、回転に関しては理論とよく一致する結果となった。しかし、擬似的な生体(細胞)内環境

と捉えることができる粘性液体中においては、垂直、水平成分に関して理論値からの逸脱が顕著に表れた。また制限された空間における拡散は水平方向のみ理論値よりも大きな値を示すことが明らかになった。この結果を説明するために、CNTT 表面の電荷、疎水性を検討した。溶液に有機溶媒、電荷の添加などの効果を検討中である。

また 7-6 で示したシート状 CNT を用いて、溶液中における CNT の熱伝導の計測を行った。実験はシート状 CNT にレーザーを照射し、予めシート状 CNT 上に塗布した蛍光色素の蛍光強度変化から温度上昇を見積もった。その結果、シート状 CNT の配向方向に依存して上昇温度が異なることが示唆された。このことは、CNT の熱伝導は長軸方向が支配的であることを間接的に示している。今後定量的な解析を進めるために、シート状 CNT の平滑さや蛍光色素導入法の再検討を行っている。

7-8. CNT 自体の熱伝導性の評価

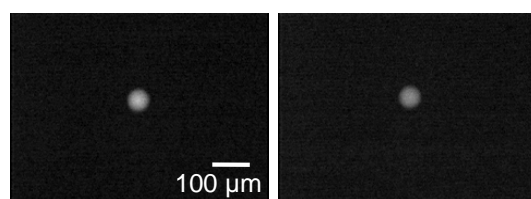
CNT の熱伝導性を評価するための局所的な熱刺激を与えるデバイスとして、熱発生機となる電極マイクロヒータと熱伝導性評価用の 4 端子電極を集積化した 4 端子法による CNT 熱評価デバイスを作製した(図 14 参照)。電極はフォトリソグラフィで作製した。CNT の電極基板上への設置は、SEM 内ナノマニピュレーションシステムにより行った。CNT は EBID による堆積物により電極に固定した。熱伝導性評価デバイスを用いて、CNT 末端をマイクロヒータで局所的に加熱して、空气中及び水中での CNT の電気特性変化から CNT の熱伝導性評価システムを構築した。現在 CNT と電極は EBID により固定しているため、CNT と電極間の熱伝導性の向上のためタンゲステン等の電気抵抗の少ない物質による CNT 固定を検討中である。

7-9. 細胞における熱計測

カンチレバーによる水溶液中での熱計測システムの評価のために、細胞の発熱量を直接カンチレバーで計測するシステムの構築を新たに加えた。まずは、褐色脂肪細胞調製の最適化条件を検討し、 10^5 オーダの細胞が入った試験管内の溶液温度変化を熱電対を用いて測定することで、細胞 1 個が生産する熱量を見積もることに成功した。しかし、温度変化は微量なため(約 10 nW/個)、断熱システムなどまだ検討することは多い。

また、酸素消費を少数細胞で計測可能なデバイスを作製した。大きさ数 μm の酸素透過性を有する高分子ビーズに、蛍光強度に強い酸素依存性を有するルテニウム錯体を導入した酸素計測ビーズを作製した(図 15 参照)。

細胞近傍に酸素計測ビーズを設置することで熱発生時の細胞の酸素消費を計測した。現在約 5000 個の細胞での酸素消費のモニタリングに成功した(図 16 参照)。



[O₂]: 0.25 mg/l [O₂]: 7.1 mg/l

図 15 酸素計測ビーズの蛍光画像

また、nJ レベルの細胞熱を計測できる変位型熱計測プローブを作製した。熱量変化にともなう温度変化により、バイメタルプローブが変位することを利用している。熱膨張率の大きく異なる金と窒化シリコンからなる厚さ400nm以下、長さ500 μ mから1mmまでのプローブを設計、製作した(図17)。光でこの検出法を用い、このレーザー光を反射する金のミラーを先端に形成した。熱絶縁構造により、レーザーによる熱がプローブに伝わりにくいよう工夫してある。培養液中で、褐色脂肪細胞にノルエピネフリンを加えたところ、少なくとも3個付いた細胞からの発熱と思われる変位が計測され、約15分程度の数個の細胞による発熱現象と思われる信号が見られた(図18、図19)。

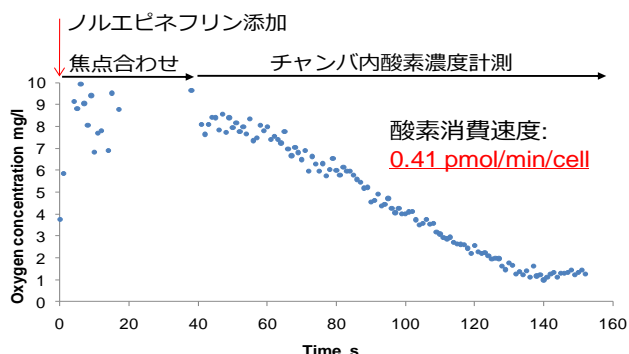


図16 褐色脂肪細胞の酸素消費計測結果

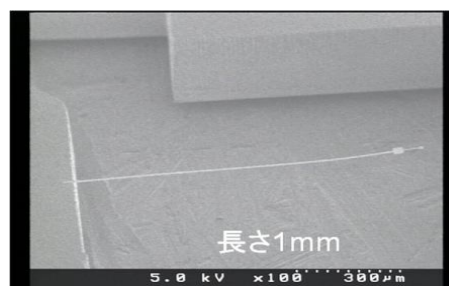


図17. 変位型熱量センサ

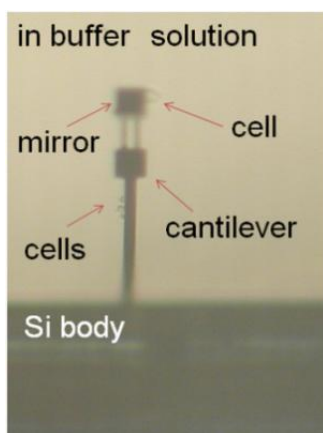


図18. 熱量センサへの細胞吸着

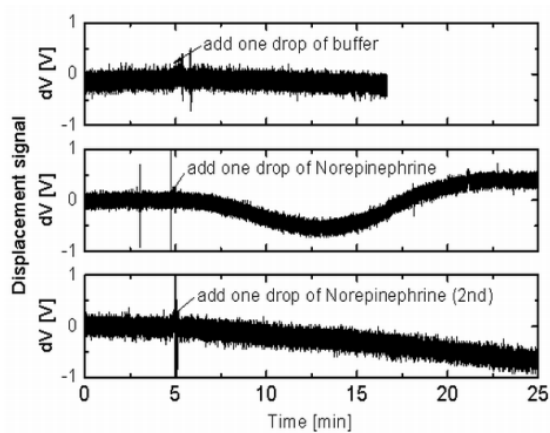


図19.褐色細胞の熱量計測結果

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

中山G

- 1) H. Maruyama, T. Ishibashi, K. Hirahara, Y. Nakayama, "Carbon Nanotube Sharpening Using an Induced Electrical Current", Appl. Phys. Express, 3, No.2, p.025101 (2010).

- 2) R. Senga, K. Hirahara, Y. Nakayama, “Carbon Nanotube Sharpening Using an Induced Electrical Current”, *Appl. Phys. Express.* 3, No.2, p.025001 (2010). DOI:10.1143/APEX.3.025001

秋田 G

- 3) K. Hata, Y. Nakayama, and S. Akita, “Response of Carbon Nanotube Field Effect Transistors to Vibrating Gate Determined by Scanning Gate Microscopy”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 48, pp.04C202-1 - 04C202-4 (2009).
- 4) S. Akita and T. Arie, “Carbon Nanotube Mechanical Resonators for Mass Sensing”, *Sensors and Materials*, 21, pp.339-349 (2009).
- 5) S. Fukami, T. Arie, and S. Akita, “Effect of Gaseous Dissipation of Oscillating Cantilevered Carbon Nanotubes”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 48, pp.06FG04-1 – 06FG04-3 (2009) DOI:10.1143/JJAP.48.06FG04
- 6) S. Fukami, T. Arie, and S. Akita, “Temperature Dependence of Cantilevered Carbon Nanotube Oscillation”, *Jpn. J. Appl. Phys.* (in press)

吉村 G

- 7) S.H. Yoshimura, S. Khan, H. Maruyama, Y. Nakayama and K. Takeyasu “Solubilization and Fluorescent Labeling of Carbon Nanotube for Biological Applications” (in preparation)
- 8) S. Kahan, S. Ohno, K. Nishikawa, H. Maruyama, Y. Nakayama, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura “Amino-acid-specific attachment of a protein to the termini of carbon nanotube without affecting its enzymatic function” (in preparation)

石島 G

- 9) Fumihito Arai, Naoki Inomata, Yoko Yamanishi, “Manipulation and Observation of Carbon Nanotubes in Water Under an Optical Microscope Using a Microfluidic Chip,” *IEEE Transactions on Nanotechnology*, Volume 8, Issue 4, July 2009, pp. 463 - 468.
- 10) Sang-Jin Kim, Takahito Ono, and Masayoshi Esashi, “Thermal imaging with tapping mode using a bimetal oscillator formed at the end of a cantilever”, *Review of Scientific Instruments*, 80 , 033703-1~033703-6(2009).
- 11) Yonggang Jiang, Takahito Ono, and Masayoshi Esashi, “Temperature-dependent mechanical and electrical properties of boron-doped, piezoresistive nanocantilevers”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19, 065030 (2009). DOI:10.1088/0960-1317/19/6/065030 Impact Factor(ISI):2.233

- 12) 入佐 正幸, 「Scaled Particle Theory からみた溶媒和の van der Waals 描像」,物性研究, 91-6, 704-706 (2009).
- 13) Masaya Toda, Takahito Ono, Fei Liu, I. Voiculescu, “Evaluation of bimaterial cantilever beam for heat sensing at atmospheric pressure “, Review of Scientific Instruments, (2010 in press).

(4-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1件)