

「界面の構造と制御」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成23年度終了研究課題－

研究総括 川合 眞紀

1. 研究領域の概要

本研究領域は、異種材料・異種物質状態間の接合界面に着目し、新たなナノ界面機能および制御技術の創出およびその応用を目指す研究を対象としている。

具体的には、異なる物質系の界面における構造および機能を制御し、さらに高付加価値を有する機能を創出するには、最新の分子工学、界面工学、薄膜工学、精密材料創製化学、ナノメカニクス、精密分子操作、表面反応ダイナミクス、精密加工などの分野における、ナノスケールレベルの界面の観測や分析手法の開発およびそれによる知識の蓄積、界面のナノ構造制御技術などが不可欠であり、これら広い観点を背景とした着想をもつ研究を対象とする。

一方、細胞や組織などの生体関連物質をデバイスの一部として扱う研究において、界面は重要な機能を担うが、現時点では開拓的な研究分野であり、個人レベルの新しい独創的着想を活かした要素研究なども対象にしている。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「界面の構造と制御」領域に設けた選考委員 10 名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、基本的には募集要項に公表した選考基準に沿って行ったが、特に以下の点に留意した。

テーマ選択に関しては、

- ①提案者自身のオリジナリティおよび、物質科学の新たなブレークスルーに繋がり得るか
 - ②多少本領域の範囲をはみ出しても提案内容本位の選考を行い、分野間のバランスも特に考慮しない
- また、研究者個人に関しては、

- ①独立して、自分の考えで研究を進められること、
 - ②自ら手を下し、研究に専念できること、
- をそれぞれ重視した。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	122 件	27 件	10 件

備考：

- 1)平成 20 年度採択課題のうち、以下 2 名は今回の評価対象外としている。

・好田 誠 研究者

東日本大震災の被災に伴う研究期間の延長措置により、今年度中に研究を終了しないため。

・松崎 典弥 研究者

内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム」への採択に伴い、同プログラムの規定により平成 23 年 3 月末をもって研究を終了したため。

5. 研究実施期間

平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

6. 領域の活動状況

- 1) 領域会議: 7 回
- 2) 研究報告会(公開): 1 回
- 3) 研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 47 回

7. 評価の手続き

研究者の研究報告書及び研究報告会を基に、領域アドバイザーの意見を参考に研究総括が評価を行った。

(評価の流れ)

平成 23 年 12 月 14 日	研究報告書提出
平成 24 年 1 月 5 日	研究報告会開催
平成 24 年 1 月 8 日	研究総括による評価
平成 23 年 3 月 31 日	研究期間終了

8. 評価項目

- (1) 研究開始時点の研究構想を基準とした研究の達成度;
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表等)、特許など研究成果の発信状況;
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事等外部からの評価状況;
- (4) 得られた研究成果の科学技術への貢献(基礎、応用を含む。外部からの評価に至らなくとも独創性の高い着手は評価)。

9. 研究結果

第 3 期研究者のうち今年度末で研究終了となる 8 名の研究結果とそれに対する評価を個別に記述する。

○安宅 憲一 研究者

「時間分解表面増強赤外吸収分光法による光受容タンパク質単分子膜の動的挙動の解析」

微小シグナルを定量的に扱うことに積極的に挑戦し、たんぱく分子機能を振動分光から解明しようとする大変挑戦的な課題であった。表面増強赤外分光法(SEIRAS)および変調時間分解赤外分光法を計測手法に用いて、光受容たんぱく単分子膜の計測を可能にしたことは大いに評価できる。研究環境を整備するための助走期間があったため計測したい対象について、必ずしも完成度の高い成果は得られなかったようであるが、これまでの成果を基礎にこれからの発展が大いに期待される。動的な挙動を追跡しようとする野心的な研究を継続いただきたい。

○生嶋 健司 研究者

「テラヘルツ波の単一光子検出と近接場センシング」

テラヘルツ領域の単一光子検出および近接場計測というかなり野心的で困難な問題に取り組み、当初計画の全てではないが2、3の重要な成果を上げることができた。特に量子ホールデバイスからのテラヘルツフォトン計測は興味深い成果と言える。また、これから着想されたオンチップ THz 光子検出制御法の開発は、研究期間の途上で着想されたものであるが、今後大きく発展する可能性があり、評価できる。

○川村 稔 研究者

「抵抗検出型核磁気共鳴による電子スピン偏極測定法の開発」

抵抗検出型核磁気共鳴法という新しい核スピン偏極分布の計測法を駆使して、量子ホール相崩壊による核スピン偏極過程を観察したことは、重要な成果である。また、その核磁気共鳴スペクトルから電子スピン偏極の空間分布についても手掛かりが得られた。量子ポイントコンタクトを用いた核スピン偏極効果とその検出法も見出して、新たな発展への道筋も開かれた。有効な成果を得ている。

○田中 裕行 研究者

「単一分子 DNA のナノポアシーケンシング」

比較的短期間の研究で、分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発し実証した点は評価出来る。今後、この基盤を当初目標である DNA のナノポアシーケンシング実現に向けて如何に効率良く研究をフォーカス出来るかがポイントであろう。本人は研究の方向としてマルチモーダル化を指向しているようであるが、目標が発散して、「二兎を追う者一兎をも得ず。」とならないように着実な研究計画を持って進めることが望まれる。

○塚崎 敦 研究者

「酸化物界面への電氣的・磁氣的機能性の付加と制御」

分子線エピタキシー法を用いて MgZnO と ZnO の急峻な酸化物界面を形成し、 $100,000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ を超える大きな移動度を実現し、分数量子ホール効果などの高移動度系に特有な量子現象を観測した。さらに Co を添加した薄膜との界面で興味深い磁気抵抗現象を見出しており、急峻で高移動度を実現する酸化物 界面相形成法を確立した研究で、高く評価できる。

○野村 慎一郎 研究者

「高次構造制御による膜タンパク質機能発現リポソームの構築」

細胞内小器官を含め、細胞内の構成要素をリポソーム中に再構築し、人工細胞の創製を目指すという点で生命進化の道筋を探る方法論を提供しうる興味深い研究成果である。一方において、研究者本人も指摘しているとおり、細胞自身の解析的研究が近年、飛躍的に進みつつあり、生物物理的研究の目指す方向性について、生命のモデル化も含め、新しい切り口を提案する努力を続けて行って欲しい。

○森 俊明 研究者

「細胞膜表層上のナノ糖鎖の精密集積構造の構築」

糖鎖関連酵素の 1 分子反応解析をフォースカーブ測定から明らかとする方法論の確立は、酵素反応の素過程を 1 分子レベルで解明する新しい方法論を提供している点で評価出来る。一方、当初の目標である細胞膜表層での相互作用解析実現には、今後、さらなる工夫が必要であろう。細胞膜における相互作用においては、糖鎖結合というシグナルが脂質分子の相分離や集合状態変化と密接に関連しており、このプロセスの分子レベルでの解明が今後、重要な課題となっていくものと考えられる。この様な局面にまで解析の方法論を拡げて行って欲しい。

○山本 貴富喜 研究者

「ナノ界面空間での電気二重層制御を利用した一分子電気インピーダンス計測法の創成」

ナノ流路とナノ電極から構成されるデバイスを作製し、1 分子検出に成功するなど独創的なアイディアで行った研究を高く評価したい。1 分子レベルで分子の分離・分画を実現する 1 分子ソーターの作製などの応用面もさることながら、このようなデバイスにおける分子と界面との相互作用に関する基礎的な観点からの研究を展開できれば学術的にもたいへん面白いのではないかと。波及効果の大きな優れた研究と言える。

10. 評価者

研究総括 川合 眞紀 理化学研究所 理事／東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

領域アドバイザー氏名(五十音順)

荒川 泰彦	東京大学生産技術研究所 教授
猪飼 篤	東京工業大学イノベーション研究推進体 特任教授
小野 崇人	東北大学大学院工学研究科 教授
片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科 教授
新海 征治(*)	崇城大学工学部 教授
高柳 英明	東京理科大学理学部 教授
多田 博一	大阪大学大学院基礎工学研究科 教授
塚田 捷	東北大学原子分子材料科学高等研究機構 教授
野地 博行	東京大学大学院工学系研究科 教授
福谷 克之	東京大学生産技術研究所 教授
松本 吉泰	京都大学大学院理学研究科 教授

(*) 関連領域 CREST「ナノ界面技術の基盤構築」研究総括、面接選考時のオブザーバー

(参考)

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	6	58	64
口 頭	139	99	238
その他	11	7	18
合 計	156	164	320

※平成 24 年 1 月現在

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
24	7	31

(3) 受賞等

○好田 誠

- ・第 20 回トーキン科学技術振興財団 研究奨励賞 “半導体における電氣的スピン注入・スピン制御に関する研究”(2010 年 3 月)
- ・第 50 回本多記念会 原田研究奨励賞 “半導体における電氣的スピン注入・スピン制御に関する研究”(H2010 年 7 月)

○松崎 典弥

- ・日刊工業新聞社主催 第 4 回モノづくり連携大賞特別賞 “ナノ微粒子等を定量定点配置できる装置を応用した、産官学連携による多様なアプリケーション開発”(2009 年 11 月)
- ・第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム奨励賞 “ナノ薄膜を用いた細胞界面の制御による三次元積層組織の構築”(2010 年 1 月)
- ・日本化学会第 60 回進歩賞 “ナノ構造高分子材料による細胞操作と生体組織モデルの構築”(2011 年 3 月)

(4) 招待講演

国際 24 件

国内 17 件

「界面の構造と制御」領域 終了評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成24年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
安宅 憲一 (専任)	時間分解表面増強赤外吸収分光法による光受容タンパク質単分子膜の動的挙動の解析 (ベルリン自由大学 物理学科)	JST さきがけ研究者 (ビーレフェルト大学 シニアサイエンティスト)	43
生嶋 健司 (兼任)	テラヘルツ波の単一光子検出と近接場センシング (東京農工大学 工学部)	東京農工大学工学部 准教授 (同上)	53
川村 稔 (兼任)	抵抗検出型核磁気共鳴による電子スピン偏極測定法の開発 (理化学研究所基幹研究所)	理化学研究所基幹研究所 専任研究員 (東京大学生産技術研究所 特任助教)	40
田中 裕行 (兼任)	単一分子 DNA のナノポアシーケンシング (大阪大学産業科学研究所)	大阪大学産業科学研究所 助教 (同上)	40
塚崎 敦 (兼任)	酸化物界面への電氣的・磁氣的機能性の付加と制御 (東京大学大学院工学系研究科付属量子相エレクトロニクス研究センター)	東京大学大学院工学系研究科付属量子相エレクトロニクス研究センター 特任講師 (東北大学金属材料研究所 助教)	47
野村 慎一郎 (兼任)	高次構造制御による膜タンパク質機能発現リボソームの構築 (東北大学大学院工学研究科)	東北大学大学院工学研究科 准教授 (京都大学物質・細胞統合システム拠点 特定研究員)	43
森 俊明 (兼任)	細胞膜表層上のナノ糖鎖の精密集積構造の構築 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)	東京工業大学大学院生命理工学研究科 准教授 (同上)	47
山本 貴富喜 (兼任)	ナノ界面空間での電気二重層制御を利用した一分子電気インピーダンス計測法の創成 (東京工業大学大学院理工学研究科)	東京工業大学大学院理工学研究科 准教授 (東京大学生産技術研究所 助教)	70

研究報告書

「時間分解表面増強赤外吸収分光法による光受容タンパク質単分子膜の動的挙動の解析」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：安宅憲一

1. 研究のねらい

細胞膜上に存在する様々な膜受容タンパク質は、光、電位等の外部信号を受けてその構造を変化させながら細胞内へ情報を伝達すると同時に、この信号を複合的に判断し環境に応じてその反応を自ら制御できる。このようなタンパク質反応機構の解明は、生物の多様な機能の本質的理解に迫ると同時に、この機能を模したインテリジェント分子のデザインにも寄与すると期待される。本研究は電極表面上にタンパク質を固定化した“バイオ修飾電極”を構築し、その反応を電位によって制御しタンパク質の持つ複雑で多様な機能を分子レベルで解明することを目標とする。具体的には、種々の古細菌ロドプシン類の光反応を主な研究対象とする。

2. 研究成果

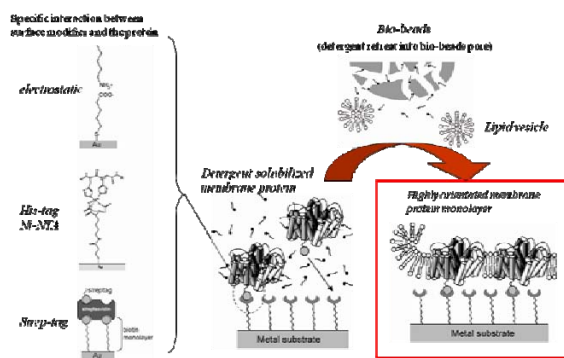


図1. 膜タンパク質単分子膜の作成プロセス

この研究で要となるのは、単分子膜の状態を高感度に観測できる表面増強赤外分光法 (Surface Enhanced InfraRed Absorption Spectroscopy: SEIRAS) という計測法を用いる事である。SEIRASは電極に吸着した分子の赤外吸収スペクトルを数十～百倍に増強させる。古細菌ロドプシン類の光反応時のシグナルはタンパク質全体の吸収強度の約5%程度と非常に小さい上に、単分子膜という極微量 ($<10^{-9}$ mol/cm²) からシグナルを捕ら

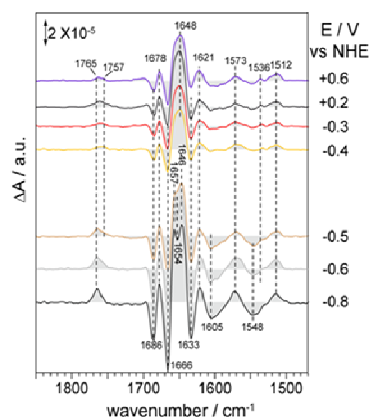


図2. 様々な電位におけるセンサーロドプシンII (SRII) 単分子膜の光反応時のSEIRASスペクトル

えるには、SEIRASの増強効果は不可欠となる。二つ目の要は、電極表面上に規則的に配向しかつ脂質二分子膜内に再構成された膜タンパク質の単分子膜を構築する事である。これにはアフィニティークロマトグラフィーの原理を応用した(図1)。Ni-nitorilotriacetic acid(Ni-NTA)基を末端に持つ自己集合単分子膜を電極上に形成し、これにタンパク質上に標識したヒスチジン・タグを特異的に相互作用させて吸着させる。このタンパク質単分子膜をバイオビーズ等を用いて脂質二分子膜内に再構築する。

2.1 センサーロドプシン単分子膜の光サイクル反応における膜間電位差の影響

図2に様々な電位におけるセンサーロドプシンII (SRII)

単分子膜の光反応時における構造変化の SEIRA スペクトルを示す。 -0.4 V を境にスペクトルが大きく変化している。SRII は光反応時に幾つかの反応中間体を経るが、この実験条件下では最も反応速度が遅い中間体がスペクトルとして捕らえられる。ここで $>-0.4\text{ V}$ で見られるスペクトルは O-中間体、 $<-0.4\text{ V}$ の領域の物は M-中間体に対応する。この変化は -0.4 V を境に光反応律速が O-から M-中間体に移行したことを示している。また電位の変化によって生じる電極表面の局所的な pH 変化を特定のアミノ酸残基 (Asp193) が感知しプロトン化される事が明らかとなった。これがシグナル伝達経路の水素結合ネットワークの再配列を誘引し、光センサー分子のレチナール周りの構造を変化させて反応中間体の律速状態をコントロールしている事が示唆された。

2. 2 自己集合タンパク質単分子膜のデザインと評価

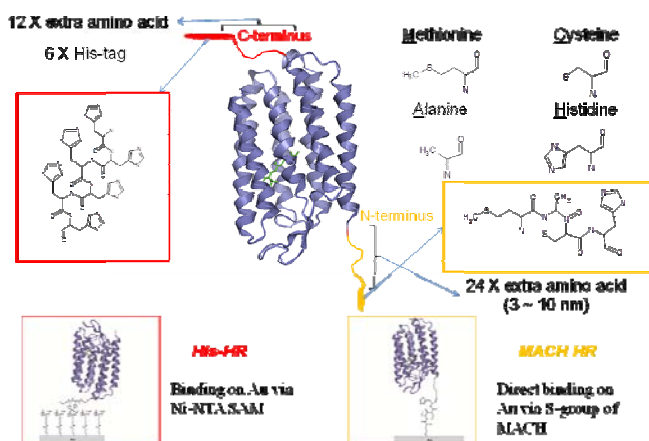


図 3. MACHハロロドプシンの分子構造

さらに、直接高配向な単分子膜を作成できるようなタンパク質を作成した。このタンパク質はN末端にメチオニン(Methionine: M)・アラニン(Alanine: A)・シスチン(Cysteine: C)・ヒスチジン(Histidine: H)の配列を持つためMACHと呼んでいる(図3)。MACHタンパク質を金属電極表面に露出するとヒスチジンのチオール基(-SH)を介して直接共有結合的に吸着させる事が出来る。図4に金属表面に各々ヒスタグとMACHを用いて作成したハロロドプシン(HR)単分子膜のスペクトルの比較を示す。ヒスタグを介してHRを吸着させると 1400 cm^{-1} 以下の波数領域にNi-NTAによるバンドが強く現れている(図4a)。これはHRの吸着反応によってNi-NTA基の構造が変化した事に由来するが、

Ni-NTA自己集合単分子膜をリンカー分子としてタンパク質の単分子膜を作成する方法は、タンパク質を精製する為に標識したヒスチジン・タグを応用するため汎用性があるが、反面、条件によってはタンパク質を励起した際にNi-NTA SAMも同時に反応して赤外吸収のバンドが重なり、スペクトルの解析が煩雑になるという欠点が生じる事がある。この欠点を補う方法として、リンカー分子を介

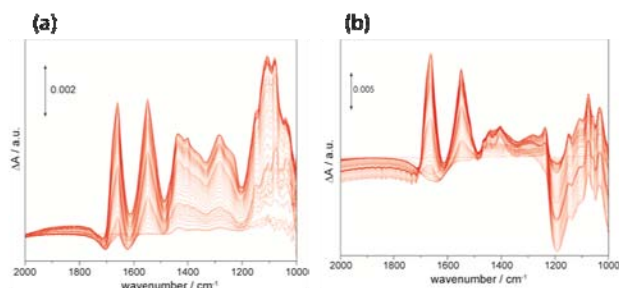


図 4. (a)His-tag/Ni-NTA相互作用、(b)MACH基を通じて金電極表面への吸着したハロロドプシンのSEIRAスペクトル

HRよりNi-NTA基がより電極表面に近い状態のためSEIRASの性質で強く現れる。この状態でタンパク質の機能計測を行うと 1400 cm^{-1} 以下の波数領域はこの吸収によって肝心のタンパク質のバンドが覆い隠されてしまう。一方MACHを用いて吸着させると、Ni-NTAのバンドは観測されずより広い波数領域でタンパク質のスペクトルの計測が可能となる(図4b)。

2.2 電位変調赤外分光法によるビオロゲンチオール単分子膜の電気化学的酸化還元反応

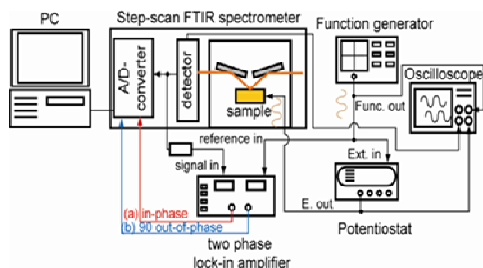


図5. 電位変調赤外分光法の実験セットアップ

料の反応速度論的な知見を得る事が出来る。この手法をビオロゲンチオール(メルカプトベンジルピリジン:MBBP)単分子膜の酸化還元反応のダイナミクス計測に応用した。検出する位相を変化させるに従いスペクトルの強度が変化し、分子の応答が変調(周波数=17Hz)に対して約200°の位相角で遅れている(図6a)。これは約35msとなり、他の方法で求めたビオロゲンチオールの反応の遅れ時間と一致した。

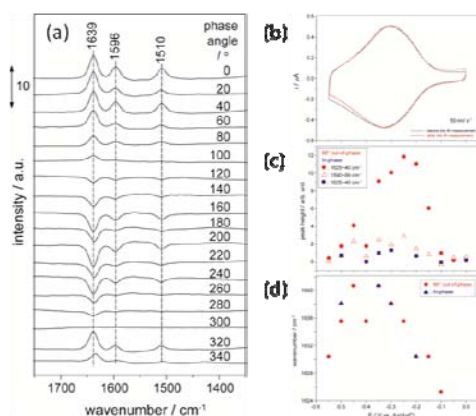


図6. (a) 様々な位相におけるMBBPの電位変調IRスペクトル、(b) MBBPのサイクリックボルタンメトリー、(c) 様々な中心電位におけるMBBPバンドの強度と(d) バンドピーク位置

また、変調の中心電位を変化させて様々な電位でスペクトルを測定した結果、1639 cm^{-1} と1596, 1510 cm^{-1} のバンドでは極大となる電位が異なっていた(図6b-d)。前者はMBBPラジカルカチオンのモノマーに、後者はラジカルカチオンダイマーに帰属される。電位変調したときの、極大電位は夫々の反応種の酸化還元電位に相当する。各々の極大電位の違いは、モノマーとダイマーで酸化還元電位が異なっていることを示唆している。この様に、電位変調赤外分光法を用いることにより、電極表面上に混在する夫々の反応種の酸化還元電位を個別に求める事が可能となる事が示された。

3. 今後の展開

SEIRAS を用いて、電極上に固定した古細菌ロドプシン単分子膜の光反応のスペクトルを計測することに成功した。また、モデル分子(MBBP)を用いて、変調赤外分光法による単分子膜の反応ダイナミクスを計測することも可能となった。残る課題はこの二つを組み合わせる「古細菌ロドプシン単分子膜の光反応ダイナミクスを計測する」ことであるが、これが未だに成功していない。主な問題は(1)時間分解計測の際に原因不明のノイズによって生じるアーティファクトバンドが期待されるシグナルよりも大きい(2)変調赤外分光法をタンパク質に応用したとたんに再現性が悪くなることである。(1)に関してはハードウェアの問題でありノイズの原因(電源、ポンプ、振動など)を一つ一つ検証して除去してゆく。また(2)に関しては、再現性の問題はおもにタンパクの失活によるためであると考えられるので、失活しない実験条件(pH、イオン強度、レーザー照射の強度など)を検証してゆく。

4. 自己評価

研究課題名が示すとおり、タンパク質単分子膜の時間分解赤外スペクトルを測定する事が

この研究の第一の課題であった。しかし、現在までの所この目的を果たすまでには至っていない。研究初期の段階で、種々の実験条件におけるタンパク質単分子膜の定常状態の計測から、膜タンパク質反応に対する膜間電位の影響を観測できた事は大きな成果であった。この成果と、過去の時間分解赤外スペクトル計測の経験から、本研究はスムーズに進行できるものと多少楽観視していたが、ふたを開けてみると未解決の実験条件が多数残ってしまった。研究実施場所の移動で、新しい海外研究機関との契約の調整や研究室の立ち上げに時間がかかってしまった事から、実質的な研究期間が1年半程度であった事も最終課題に至る事が出来なかった一因として悔やまれる。これらの研究課題は現在も進行中であり、今後、この研究を継続・発展させてゆくに十分な実験機材を揃える事が出来たことは大きな前進であったと考えている。

5, 研究総括の見解

微小シグナルを定量的に扱うことに積極的に挑戦し、たんぱく分子機能を振動分光から解明しようとする大変挑戦的な課題であった。表面増強赤外分光法(SEIRAS)および変調時間分解赤外分光法を計測手法に用いて、光受容たんぱく単分子膜の計測を可能にしたことは大いに評価できる。研究環境を整備するための助走期間があったため計測したい対象について、必ずしも完成度の高い成果は得られなかったようであるが、これまでの成果を基礎にこれからの発展が大いに期待される。動的な挙動を追跡しようとする野心的な研究を継続いただきたい。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1.) Xiue Jiang, Martin Engelhard, Kenichi Ataka*, and Joachim Heberle, "Molecular Impact of the Membrane Potential on the Regulatory Mechanism of Proton Transfer in Sensory Rhodopsin II." *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (31), pp 10808–10815, (2010)
2. Seigo Shima and Kenichi Ataka, "Isocyanides inhibit [Fe]-hydrogenase with very high affinity", *FEBS Lett.*, 585, 353-356. (2011)
3. Henning Krassen, Sven T. Stripp, Nadine Böhm, Albrecht Berkessel, Thomas Happe, Kenichi Ataka, Joachim Heberle, "Tailor-Made Modification of a Gold Surface for the Chemical Binding of a High-Activity [FeFe] Hydrogenase", *Eur. J. Inorg. Chem.*, 7, 1138-1146 (2011)
4. Kenichi Ataka, Ionela Radu, Melanie Nack, Henning Krassen, and Joachim Heberle, "Surface-Enhanced InfraRed Absorption Spectroscopy (SEIRAS) of membrane protein monolayer", *Eur. Biophys. Journal with Biophys. Lett.* vol. 40 suppl. 1, 227-227 (2011)
5. Kenichi Ataka, Tilman Kottke, and Joachim Heberle, "Thinner, Smaller, Faster: IR Techniques to Probe the Functionality of Biological and Biomimetic Systems." *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 2-11 (2010)
6. Ballout, F., Krassen, H., Kopf, I., Ataka, K., Bruendermann, E., Heberle, J., and

Havenith, M., “Scanning Near-field IR microscopy of proteins in lipid bilayers” ,
Phys. Chem. Chem. Phys., DOI:10.1039/C1CP21512D

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

‘Effect of membrane potential on the photo-cycle of Sensory Rhodopsin studied by surface enhanced Infrared spectroscopy’ Trilateral Symposium on NanoBio Integration, 2010, Berlin, Germany.

‘Function of Membrane Protein Monolayer Formed on the Electrode Surface Studied by in-situ Vibrational Spectroscopy’ International Society of electrochemistry, 6 2nd annual meeting, 2011, Niigata Japan

研究報告書

「テラヘルツ波の単一光子検出と近接場センシング」

研究期間：平成20年10月～平成23年3月

研究者：生嶋 健司

1. 研究のねらい

本研究では、半導体量子構造によるテラヘルツ(THz)波の単一光子検出機構を応用して、局所的なテラヘルツ電磁場を検出・イメージングする近接場センシングを開発する。特に、①対象物の自発的放射を検出するパッシブ・テラヘルツ顕微鏡の開発、②固体デバイス上を伝搬するテラヘルツ波を検出するオンチップ・テラヘルツ光子制御、の実現を目指す。これらテラヘルツ検出技術は、半導体ナノ構造の発光過程探索や少数分子系における化学反応分析、生きている細胞・生体高分子の活性状態の可視化など広範囲な応用へ発展することが期待される。

2. 研究成果

本研究では、半導体量子構造による単一 THz 光子検出技術を発展させて、テラヘルツ科学へ貢献する新たな計測ツールを開発してきた。次の二つの展開を行った。

(1)パッシブ THz 顕微イメージング。

(2)オンチップ・THz 光子検出および制御。

以下、それぞれについて研究成果を報告する。

(1)パッシブ THz 顕微イメージング

サーモグラフィに代表されるパッシブ顕微鏡では、空間分解能を一桁向上させるには、検出感度を二桁改善する必要がある(輻射は面積に比例)。また、0.1mmに及び長波長光であるか

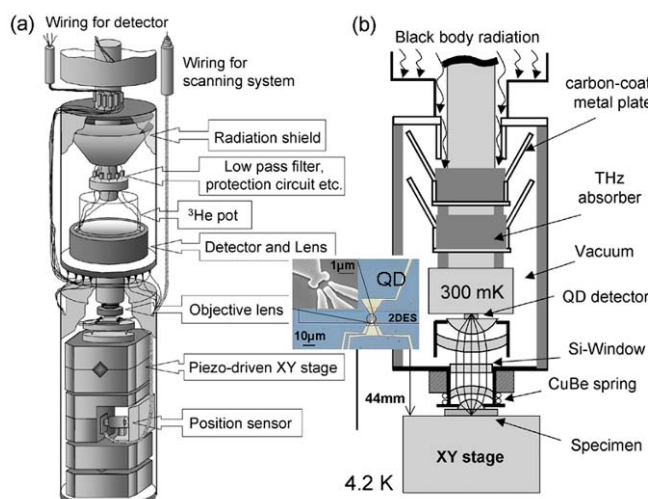


Fig. 1 Photon-counting THz microscope

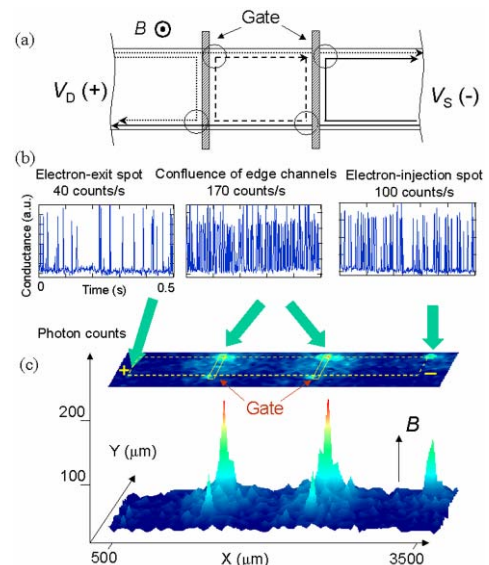


Fig2. Photon-counting imaging of THz emission from a quantum-Hall device.

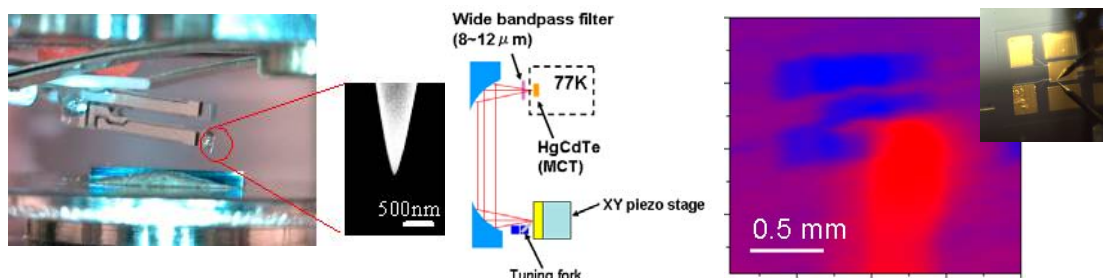


Fig.3 Passive s-SNOM (left). Far-field passive imaging of the metal tip (right).

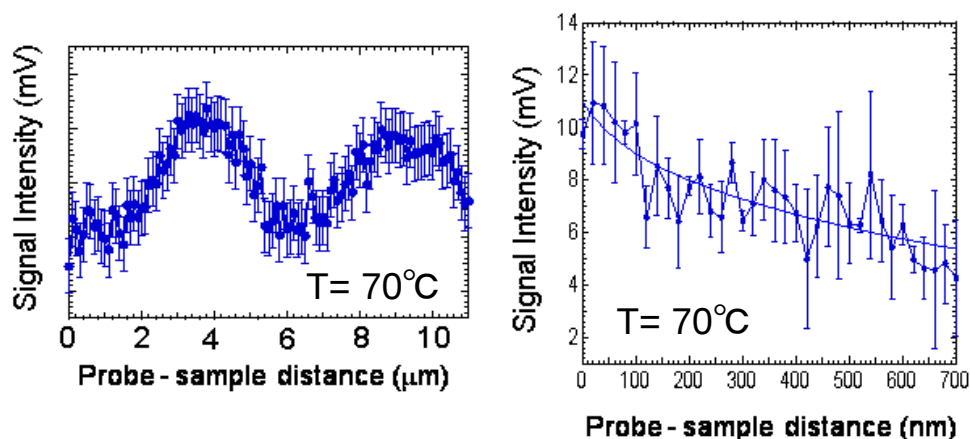


Fig. 4 Interference term (left). Near-field response (right).

ら、高い空間分解能を達成するためには、回折限界を超える光学システムが必要である。また、常温の熱エネルギーと同程度、もしくは小さな光子エネルギーをもつテラヘルツ波を相手にするので、常温の背景輻射から目的微小信号を取り出すことも重要な技術的要素である。まとめると、パッシブ顕微鏡の困難点は、(i) 高い検出感度、(ii) 回折限界を超える空間分解能、(iii) 背景輻射に埋もれた微小信号の検出、の 3 点が挙げられる。これらの困難点を同時に克服することは難しいことから、我々はひとつずつ解決する戦略を取っている。まず、最初に試みたことは、(i)に対する問題解決、つまり極限の感度追求である。半導体量子ドットを単電子トランジスタとして動作させた単一THz光子検出器を用いて、我々はTHz帯域におけるフォトンカウンティングイメージングを可能にしてきた(Fig.1 とFig.2)。この顕微鏡を用いて極低温の半導体素子(量子ホール効果素子)からの新しいTHz発生機構を見出した(Fig.2)。この新しい単色点光源の発見が後述するオンチップ・THz光子検出、さらにはオンチップ・光子制御の着想の起点になっている。これらの成果から、低温環境下において0.1 アトワットの放射レベルの顕微観察が可能であることがわかる。

次に、常温環境下の観察対象物に対して波長スケールを超える高い空間分解能の追求に取り組んだ。ここでは使い勝手のよい汎用中赤外光検出器(HgCdTe:MCT)を使用する。感度不足のため、試料を 70°C程度まで加熱して熱輻射強度を上げて測定する。空間分解能の改善のため、次の二つのシステムを立ち上げた。まずひとつは散乱型のパッシブ近接場顕微鏡システムである(Fig.3)。音叉型振動子にタングステンナノプローブを取り付けたAFMを利用している。Fig.3 の右図は共焦点光学系において試料を走査して得られたナノプローブ近辺のFar-field像である。空間分解能は 30μm程度である(波長 10.3μm)。Far-field像からナノプローブ先端部に光学系の焦点を固定し、試料表面ーナノプローブ間距離の信号強度依存性を

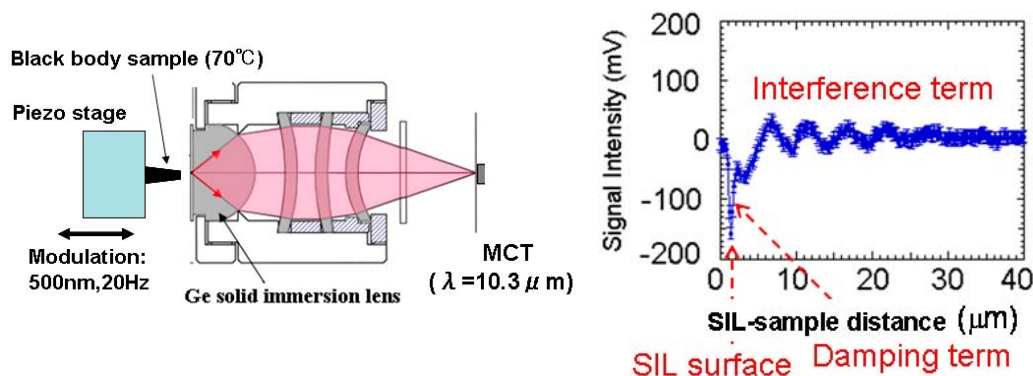


Fig. 5 SIL-Thermomicroscope (left). Signal intensity vs SIL-sample distance (right).

測定した結果、Fig.4 に示すように干渉項および 100nmスケールで減衰する近接場と思われる応答が観測されている。まだパッシブ近接場応答の物理的描像が確立していないものの、約 100nmの空間分解能を示す画像が得られている。さらにもうひとつ立ち上げたシステムは、Geという誘電率の高い材料をソリッドイマージョンレンズ(SIL)として使用したサーモマイクロスコプである(空間分解能 2 μm 程度。Fig.5)。たとえば、細胞サーモグラフィの場合、マイクロメートルスケールの空間分解能で十分活用できると考えられる。SILサーモマイクロスコプでは、試料そのものをSIL表面で微小振動させて変調することで背景輻射との区別が可能となった。Fig.5 に試料とSIL表面との距離依存性を示す。減衰項とSILと試料との干渉項が観測された。減衰項は低周波変調でかつ試料を加熱したときにだけ現れることから、試料とSILの熱拡散によるものと考えられる。これらの結果から、熱拡散や干渉の効果を念頭に置いて画像化していくことが必要であることが明らかになった。これらの開発を通して背景輻射の抑制方法や信号変調技術に対して多くの知見が得られ、量子ドット検出器を用いたフォトンカウンティングシステムとの融合への道筋がついたと考えている。また、現状の汎用検出器を用いたシステムでも常温よりやや試料を加熱することにより計測可能であることから、熱励起による金属や誘電体における固体表面の電子・格子ダイナミクスを調べることができると考えられる。

(2) オンチップ・THz 光子検出および制御

本研究は、フォトンカウンティングイメージングにより見出された量子ホール効果素子からの THz 発光により着想された。強磁場中の 2 次元電子系において、我々は波長よりもずっと小さな単色点光源とフォトンカウンターを作製することができる。したがって、これらの THz コンポーネントを組み合わせることで、固体チップ上の電磁場を光子レベルで制御する回路ができるのではないかと考えた。現代科学では 1 個ずつの電子制御は当たり前となったが、質量も電荷もない相対論的素粒子の光子を制御することはまだ人類未踏の挑戦である。我々はまず、エッジ電流注入による点光源と量子ドット検出器を伝送路で結合させたデバイスを作製した。フォトンカウンティング実験により、固体上の配線を伝わる高周波の電気信号を光子として捕えられることを示した。さらに、詳細なエミッター特性の研究から、量子ホール電子系の閉じ込めポテンシャル近傍で従来考えられているスピン分裂よりも 20 倍以上増強していることが見出された。これは、ランダウ準位間における交換相互作用によるものと考えられ、量子ホール電子系の分野において新しい知見を与えると共に、発光過程においてスピン自由度が強く関与していることが見出された。

3. 今後の展開

本研究で、テラヘルツ帯域のパッシブ顕微鏡技術として、背景輻射の少ない極低温環境下でフォトンカウンティングレベルで画像が取れるということ、常温環境下において波長スケールよりも高い空間分解能(サブミクロン)で画像が取れるということ、を立証した。今後は、これらの技術を融合して、常温試料観察が可能で、フォトンカウンティングレベルの感度で波長スケールを超える高い空間分解能をもつパッシブな近接場テラヘルツ顕微鏡へと発展させたい。特に、常温試料観察の場合、300Kプランク輻射のピークに相当する波長 15 μ m程度が望ましいだろう。二重量子井戸を利用した電荷敏感型の中赤外検出器では、量子ドットサイズにするとフォトンカウンティングレベルの感度になることが予想されており、そのフォトンカウンターの開発に取り組むつもりである。また、パッシブ分光ができるようにすることも重要な課題である。高感度で広帯域なテラヘルツ検出器の開発は今後の重要な課題である。ひとつの候補は、層数により大きく性質の異なるグラフェンのランダウ分裂の利用である。特許の可能性があるので詳細は控えるが、現在、グラフェン結晶成長の専門家との共同研究が始まっている。一方、生きている細胞のサーモグラフィーを実現するためにこれまで準備をしてきたが、細胞を長時間生かすための環境セルの開発と細胞周辺の水溶液への熱拡散を回避するための工夫が必要であることを認識した。今後、バイオ系の専門家との共同研究を通して解決することを計画している。

オンチップ・光子制御を目指すテーマについてはまだプロシーディングにおいてしか発表していないにもかかわらず、既に複数の国際会議からの招待講演と UK の著名な雑誌からのレビュー執筆依頼まで来ている。期待以上に評価を頂いており、今後の励みにしたい。光子を制御することは無謀なまでの挑戦だが、発光効率、伝送効率、検出効率の改善をひとつずつ克服し、単一光子を取り扱う“光子回路”の実現を目指したい。

4. 自己評価

当初の計画どおり、フォトンカウンティングイメージングの追及と汎用検出器を用いた常温試料観察用の近接場センシング実現まではほぼ達成した。パッシブな近接場センシングの実演はまだ論文発表に至っていないが、さきがけ期間中にぎりぎり間に合うことができてほっとしている。さらに、フォトンカウンティングイメージングで得られた結果から、オンチップ・THz 光子検出および制御への新しい構想が生まれ、周辺分野にインパクトを与えた。当初の最終目標である、“フォトンカウンティング近接場 THz 顕微鏡”にまでは至っていないが、上記開発過程において多くの知見が得られ、その道筋は見えつつある。さきがけ期間中に細胞サーモグラフィーだけは実現したいと考えたが、研究室の立ち上げにおいてバイオ系の新しいセットアップや測定にまで手が回らなかったことが心残りである。多くのバイオ系研究者およびバイオベンチャー企業の方々が興味を抱いてくれており、近い将来に生命の息吹を画像化できるように精進したい。

5. 研究総括の見解

テラヘルツ領域の単一光子検出および近接場計測というかなり野心的で困難な問題に取り組み、当初計画の全てではないが2、3の重要な成果を上げることができた。特に量子ホールデバイスからのテラヘルツフォトン計測は興味深い成果と言える。また、これから着想されたオンチップ THz 光子検出制御法の開発は、研究期間の途上で着想されたものであるが、今後

大きく発展する可能性があり、評価できる。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. <u>K. Ikushima</u> and S. Komiyama, Photon generation by injection of electrons via quantum Hall edge channels, Phys. Rev. B 84, 155313 (1–5) (2011). |
| 2. <u>K. Ikushima</u> , D. Asaoka, S. Komiyama, T. Ueda, K. Hirakawa, Manipulating terahertz photons on a quantum Hall effect device, Physica E 42, 1034–1036 (2010). |
| 3. 【Invited Review】 <u>K. Ikushima</u> , S. Komiyama, Imaging by terahertz photon counting, C. R. Physique 11 444 – 456 (2010). |

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

・国際会議

- 1.【Invited】 K. Ikushima, K. Kunitani, D. Asaoka, S. Komiyama, T. Ueda, and K. Hirakawa, On-chip terahertz photon manipulation, The 35th International Conference on Infrared, Millimeter and THz Waves (IRMMW-THz2010), Sep. 2010.
2. 【Oral】 K. Ikushima and S. Komiyama, Generation of terahertz photons via edge-channel transport, International Symposium on Advanced Nanodevices and Nanotechnology (ISANN), Hawaii, USA, Dec. 2009.
3. K. Ikushima and K. Kunitani, Landau level emission in the imbalance between adjacent spin-resolved edge channels, EP2DS-19, USA, July 2011.

・解説

生嶋健司、テラヘルツ放射の単一光子計測とパッシブ顕微観察、J. Vac. Soc. Jpn. 53, 309 (2010).

・著書

Kenji Ikushima, Single-Photon Counting and Passive Microscopy of Terahertz Radiation, Frontiers in Optical Methods--Nanocharacterization and Coherent Control (Springer), in press.

研究報告書

「抵抗検出型核磁気共鳴による電子スピン偏極測定法の開発」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：川村 稔

1. 研究のねらい

近年目覚ましい発展を遂げているスピントロニクス分野では、電子のスピン自由度を利用し、従来の半導体エレクトロニクスでは実現できなかった機能や性能を持つデバイスが実現されている。これらのスピンドバイスの性能を高めていくためには、半導体界面の伝導チャネルにおける電子スピンダイナミクス・電子スピン空間分布を理解することが重要となる。ところが、半導体界面では電子スピン数が少ないため、バルク物質のスピン物性測定に用いられる実験手法をそのまま適用することができず、半導体界面のスピン物性にはまだ解明されていない部分が多く残されている。走査型プローブ顕微鏡を応用した最新の実験手法でも界面の電子スピンだけを選択的に検出することは難しく、界面スピン物性探索にはあまり応用されていない。本研究のねらいは、半導体界面の電子スピン偏極状態を調べる新しい測定手法を確立することである。抵抗検出型核磁気共鳴を利用して、界面の電子スピン状態を選択的に検出し、電子スピンのダイナミクス・空間分布を調べる測定手法を確立する。

2. 研究成果

(1) 核スピン偏極度の空間分布測定

抵抗検出型核磁気共鳴をおこなうために、半導体界面の核スピンを動的に偏極する必要がある。量子ホール効果を電流印加によって崩壊させることで、GaAs/AlGaAs 半導体界面に存在する核スピンを動的に偏極させる。量子ホール効果崩壊はランダウ準位間の電子-電子衝突励起によって引き起こされる。我々はこれまで、この衝突励起が核スピン偏極の直接的原因であると主張してきたが実験証拠は得られていなかった。量子ホール効果崩壊では衝突励起が電子の流れに沿って雪崩的に生じるため、核スピン偏極の原因が衝突励起であれば、量子ホール効果崩壊によって生じた核スピン偏極も電子流に沿った空間分布を有することが予想される。これを実証するためにホール電圧測定をおこない、核スピン偏極にともなうホール電圧変化の検出を試みた。

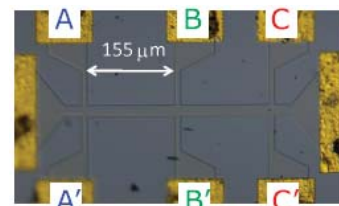


図1：測定した多端子ホールバー素子

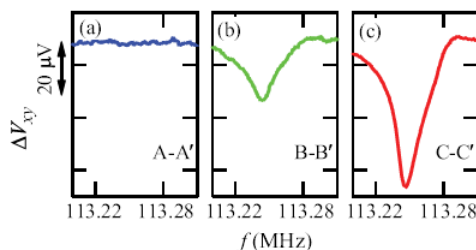


図2：ホール電圧測定によって得られた核磁気共鳴スペクトル。

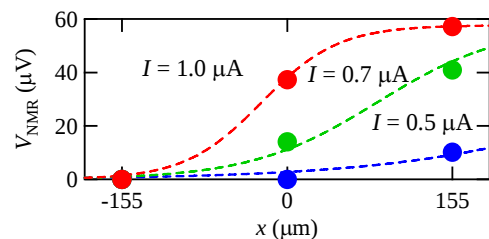


図3：核磁気共鳴スペクトル強度の空間依存性。

ホール電圧測定では、ホール電圧プローブと電流路の交差点の情報が得られる。したがって、図1のような多端子ホールバー素子を用いれば、A, B, C の3交差点からの核磁気共鳴信号を比較することができる。長さ300ミクロンのホールバー素子を1.5ケルビンに冷却して実験をおこない、核磁気共鳴スペクトル強度がホール電圧プローブの位置に依存することを見出した(図2)。得られたスペクトル強度の空間分布は、測定する電流極性反転によって反転し、空間分布の特徴的長さは電流および磁場の大きさによっても変化する。これらの実験結果は、核スピン偏極が電子流に沿った空間分布を有することを示しており、核スピン偏極がランダウ準位間衝突励起によって雪崩的に引き起こされること強く示唆する。またこの実験結果からホール電圧測定がホールバー素子内部での核磁気共鳴信号の空間分布を調べる有効な手段であることが分かった。

(2)電子スピン偏極率の空間分布

核磁気共鳴周波数は電子スピンの作る有効磁場によって変化する。したがって、核磁気共鳴スペクトル形状の解析から、電子スピン偏極率 P_e を得ることができる。ランダウ準位充填率 $\nu=1$ の量子ホール系では電子スピンは完全偏極しているが、量子ホール効果が崩壊すると電子スピン偏極率は大きく減少することが期待される。電子系に流す電流量を変化させ、核磁気共鳴スペクトルの変化を調べた(図4)。量子ホール効果崩壊が生じる臨界電流値の2倍以上の電流を印加すると、核磁気共鳴スペクトルのピーク周波数が高周波数側へシフトし始めることが分かった。ピーク周波数のシフトから電流印加時の電子スピン偏極率を定量的に決定した(図5)。この実験では、量子ホール効果崩壊にともなう急峻な電子スピン偏極率変化を捉えることを目指したが、周波数シフトが始まる電流値が量子ホール効果崩壊の臨界電流値よりもかなり大きな値であり、量子ホール効果崩壊にともなう電子スピン偏極率の変化は捉えられていない。これは量子ホール効果崩壊に関与する電子スピン数がスペクトル形状の変化をもたらすほど多くなかったためと考えられる。量子ホール効果崩壊にともなう電子スピン偏極率の変化を捉えるには、より線幅の狭い共鳴線を用いて周波数分解能を高めた実験を行う必要がある。電気四重極分裂を用いて実効的なスペクトル線幅を狭くする方法が有効であると考えている。またこの実験では、大電流領域でのスペクトル形状が空間的に一様な電子スピン偏極を仮定したモデルと合致しないことが明らかになった(図4, $I = 3.0 \mu\text{A}$)。ホール電圧測定によって得られた核磁気共鳴スペクトルでもホール電圧プローブの位置によってスペクトル形状が変化するという結果を得ている。これらの結果は、大電流領域において電子スピン偏極が空間分布していることを示唆しており、スピン反転をともなった電子励起が空間的に非一様に起きていると解釈できる。

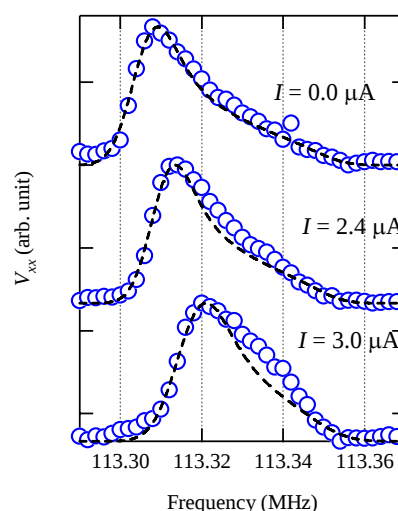


図4: 電流印加による核磁気共鳴スペクトルの変化。

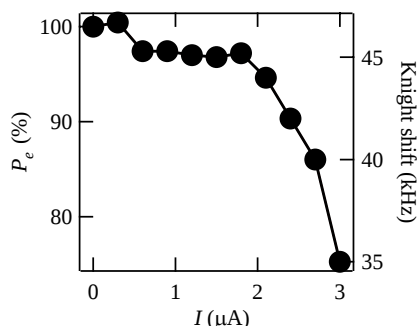


図5: 電子スピン偏極率の電流依存性

(3)新しい核磁気共鳴検出手法の開発

量子ホール効果崩壊を用いた動的核スピン偏極・検出手法では、電子のサイクロトロン運動の量子化を利用しているため、この手法を適用できる材料系が限定される。サイクロトロン運動を利用せずに核スピンを制御できれば、抵抗検出型核磁気共鳴の応用範囲も広がると考え、サイクロトロン運動を利用せずに核スピンを電氣的に偏極・検出する実験手法を新たに開発した。実験には GaAs/AlGaAs 半導体界面の2次元電子系を静電ポテンシャルによって狭窄した量子ポイントコンタクト素子を用いた。磁場中において、静電ポテンシャルを変化させポイントコンタクトの伝導チャネルを狭めていくと、閉塞する直前で核スピンが動的に偏極することを見出した。核スピン偏極による有効磁場の微小変化を量子ポイントコンタクト素子の電気伝導度測定によって検出し、核磁気共鳴スペクトルを得ることに成功した。この実験手法では、量子ポイントコンタクトという数10ナノメートル程度の微小領域における核スピンを偏極・検出しており、従来の方法に比べて高感度かつ局所的な核スピンの電氣的制御が可能になった。

3. 今後の展開

本研究では、抵抗検出型核磁気共鳴法が半導体界面の電子スピン偏極分布を計測する有効な実験手法であることを示すことができた。一方で、核スピンを偏極するために量子ホール効果崩壊という特殊な条件を必要とすることがこの実験手法の限界を与えていることも明らかになった。今後は量子ポイントコンタクト素子を用いた核スピン偏極手法や強磁性体／半導体接合の電子スピン注入による核スピン偏極手法と組み合わせることによって、スピントロニクスデバイス中での電子スピン偏極空間分布測定へと展開したい。そして、今回達成できなかった走査型プローブを用いた核磁気共鳴顕微鏡の開発についても今後検討を重ね、実現につなげたい。

4. 自己評価

デバイス構造や測定方法を工夫することにより、半導体デバイス界面の電子スピンおよび核スピンの非一様な偏極状態を示したことで、目標の第一段階は達成できたと考えている。しかし、走査型プローブを用いた核磁気共鳴顕微鏡の開発が計画通り進まず、研究期間内に当初の研究目的を達成するには至らなかった。一方で、量子ポイントコンタクト素子を用いた新しい核スピン偏極手法が見つかったのは予想外の成果であり、微小領域における核磁気共鳴の局所測定に向けて発展させていきたいと考えている。

5. 研究総括の見解

抵抗検出型核磁気共鳴法という新しい核スピン偏極分布の計測法を駆使して、量子ホール相崩壊による核スピン偏極過程を観察したことは、重要な成果である。また、その核磁気共鳴スペクトルから電子スピン偏極の空間分布についても手掛かりが得られた。量子ポイントコンタクトを用いた核スピン偏極効果とその検出法も見出して、新たな発展への道筋も開かれた。有効な成果を得ている。

6, 主な研究成果リスト

論文(原著論文)発表

1. M. Kawamura, K. Kono, Y. Hashimoto, S. Katsumoto, and T. Machida, "Spatial gradient of dynamic nuclear spin polarization induced by breakdown of quantum Hall effect", *Phys. Rev. B* **83**, 041305 (2011).
2. M. Kawamura, T. Yamashita, H. Takahashi, S. Masubuchi, Y. Hashimoto, S. Katsumoto, and T. Machida, "Strain-induced enhancement of electric quadrupole splitting in resistively detected nuclear magnetic resonance spectrum in quantum Hall systems", *Appl. Phys. Lett.* **96**, 032102 (2010).
3. M. Kawamura, M. Ono, Y. Hashimoto, S. Katsumoto, K. Hamaya, and T. Machida, "Dynamic nuclear polarization induced by breakdown of fractional quantum Hall effect", *Phys. Rev. B* **79**, 193304 (2009).

研究報告書

「単一分子 DNA のナノポアシーケンシング」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：田中 裕行

1. 研究のねらい

走査型プローブ顕微鏡 (SPM) は、1960 年代後半から Young 等 (米国国立標準局) が開発した topographiner に始まり、現在では、走査型トンネル顕微鏡 (STM) や原子間力顕微鏡 (AFM) として普及することとなった。SPM は単一分子解析・操作手法としても有用であるが、そもそも化学種帰属や元素識別を行うには、特別な工夫が必要となる (参照：第二期生西野・齋藤)。さらに、電子顕微鏡の場合と同様に、観察対象とする系によっては、特別な試料調整法の開発が必須となることも多い。実験技術的なノウハウを要求するパッチクランプのような電気生理学的手法が必要となる系に SPM は殆ど適応されていない。我々は、超高真空低温という特殊で静的な実験条件において DNA のシーケンシングを STM の電流変化の検出で行ってきた。本研究では、そこから大きく飛躍させ、生体ナノポアのイオン電流をパッチクランプで計測しつつ同時に、分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発し、イオンチャネルタンパク分子の機構解析や DNA のシーケンシングに発展させることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 脂質二分子膜基板の開発：テフロンサポート

本研究では、SPM とパッチクランプによる電流計測の同時測定を実現させられるか否かで研究の成否が決定的に決まってしまう。研究開始当初より手段を選ばない試行錯誤を続け (図 1a-b)、その結果、電気生理学でよく使われる“削り取り法”を独自に改良し、さらに、低融点テフロンを用いると脂質二分子膜のサポート基板に適した真円に近い微細孔が容易に得られることを見いだした (図 1c)。さらに改良し (図 2a)、どこまで微細な孔を作成できるかを試みたところ、図 2 に示すように、直径数マイクロメートル程度のきれいな円形に近い微細孔を、高価で大がかりな微細加工装置も使わずローテクだけで作成することに成功した。

(2) 脂質二分子膜基板の開発：電流計測

前述の手法で作成したテフロンの微細穴に脂質二分子膜を作成し、単一チャネル電流測定 (パッチクランプ測定) を行ってみた。エアバブル法によって、脂質二分子膜を微細穴に形成し、コンダクタンスの比較的小さく、安定なチャネルとして有名なグラミシジンチャネルを測

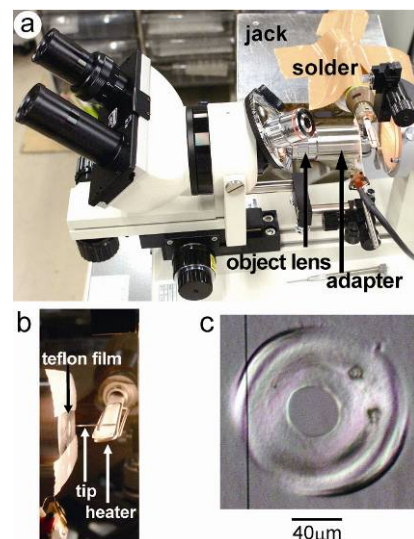


図 1 初期のテフロン基板作成装置
加熱した針で穴をあける

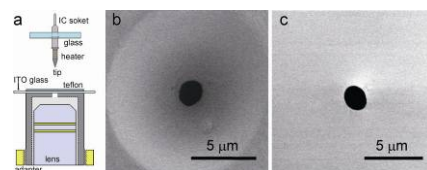


図 2 第二世代のテフロン基板作成装置
の模式図及び微細孔の写真 (両側)

定した。全般にノージーだが、量子化された飛び飛びの値をとる電流を測定することができた(図 3)。ちなみに、チャネル導入前の電流値(リーク電流)は、0.5pA 以下で、絶縁抵抗は $T\Omega$ 近い。さらに、印可する電位差を装置の最大電圧である 1V にまで上げてもすぐには壊れることがなく、安定な膜を得ることに成功した。

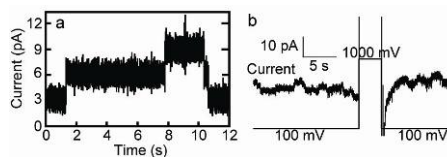


図 3 単一チャネル電流測定(パッチクランプ測定)の一例と安定性の確認

(3)パッチクランプとAFMとの融合:モデル基板でのイオン電流とAFMの同時測定

AFMと組み合わせる場合、AFMの構造にもよるが、一般的にAFMのワークディスタンスは小さいため、パッチクランプ用のセルの厚みは薄い方がよい。そこで、セルの下側のコンパートメントをアガロースゲルによりゲル化し、Oリングなどの嵩高い部分を省略できるようにした。このような支持膜は、無支持膜に比べて安定で長寿命というメリットもある。

そのようなセルで、フォースカーブと膜電流測定の同時計測を行ってみた(図4)。プローブの負荷が徐々に増加するが、膜電流は特に変化がない。しかし、やがて突然、膜電流が飽和し、プローブの負荷が小さくなってしまった。これは、非可逆的に脂質二分子膜が破壊され下地の軟らかいアガロースゲルにプローブが突き刺さってしまったと理解でき、このようにパッチクランプ可能な水和ゲル支持型の脂質二分子膜のシステムをAFMと融合させることに成功した。

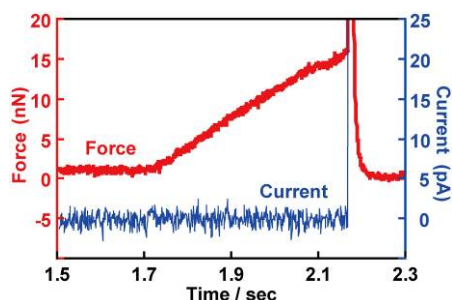


図 4 水和ゲルサポートされた人工脂質二分子膜 電流-力同時計測例

(4)パッチクランプとAFMとの融合:イオンチャネルゲートのAFMによる操作

個々の原子分子を可視化・分光できるだけでなく操作できることが、SPMの他の分析手法と大きく異なる特徴の一つである。そこで、チャネルのゲートをAFMによって操作し、その応答をパッチクランプで検出することを試みた。

チャネルの開確率を制御する構造はゲートとよばれ、電位、リガンドや機械などの刺激によってチャネルはゲーティングされる。KcsAの開確率は、pHが中性の時は低く、酸性のときは高い。また、KcsAがゲーティングされるとき、つまり、刺激を感じそれがゲート(イオンフィルタ)に伝わるとき、タンパクの構造が変化すると予想されている。そこで、この構造変化をAFMプローブによる機械刺激として直接入力することによりゲーティングさせることを実験のポイントとした。

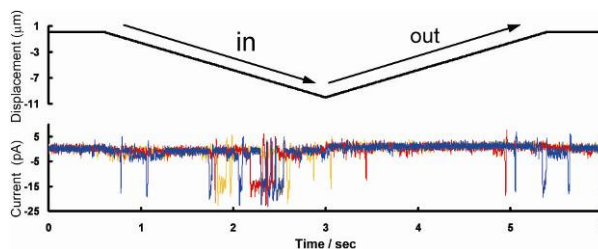


図 5 AFMのプローブ操作とイオン電流との相関の同時計測

C末端にヒスチジンタグをつけられたKcsAチャネルをAFMプローブに修飾し、前述のセルに、膜が破れない程度の条件でプローブを繰り返し押し込み引き戻させながら膜電流計測を行った。酸性条件(pH4.0)の場合では、AFMプローブが押し込む途中で電流に変化が現れ、プローブが無負荷の状態でも、KcsAのコンダクタンスに対応する電流が測定された。とこ

ろが、中性条件(pH7.2)では、プローブを連続的に何度も押し込み(in)ー引き戻した(out)が、KcsA のコンダクタンスに対応する電流が際だって多く測定されたところは、押しつけている条件(in)のところであった(図 5)。これらの結果は、AFM プローブに修飾された KcsA が、独自の手法で作成した人工脂質二分子膜のセル内に再構成され、しかも、AFM プローブが押し込まれるときの機械刺激によって、ゲーティングがバイアスされたことを表している。このように、分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発し実証した。

3. 今後の展開

本研究での成果をふまえ、イオン電流とプローブ操作の相関の同時測定手法をさらに発展させ、DNA を修飾したプローブを用いてナノポアシーケンシングを行う。また、イオンチャネル蛋白分子を1分子の分解能で可視化させる顕微鏡動作も行う。また、そのために必要となるマルチプローブ機構の開発を行う。さらに、多角的に理解を行うために、蛍光顕微鏡やラマン顕微鏡などとの融合、いわゆるマルチモーダル化にも発展させたいと考えている。

4. 自己評価

上述のように、当初の目標に掲げた、「生体ナノポアのイオン電流をパッチクランプで計測し、同時に分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発」については、ローテクを生かした独自のアイデア(特許技術等)により達成できた。さらに共同研究者により提供された KcsA というイオンチャネルタンパク分子を修飾されたプローブ探針をプローブ操作により、そのイオンチャネルの開閉を制御(バイアス)し、その機能をパッチクランプのイオン電流として同時計測し、イオンチャネルタンパク分子の機構解析に適應することに成功した。一方、「DNA のシーケンシング」に関しては、マルチプローブの開発に研究資源が期間内に都合できず、平成24年度中の達成を目指している。

本研究成果でふれたように、絶縁体のフィルムに直径数マイクロメートルオーダーのきれいな円形に近い微細孔を、高価で大がかりな微細加工装置も使わず、いわゆるローテクだけで作成することに成功したのだが、この成果の評価のために参考となるエピソードを挙げておきたい。共同研究をしていた阪大・生命機能の電気生理学グループにこの成果を説明したとき、「どうやってそんな小さな穴をあけるんですか？」と驚かれてしまった。経緯の詳細はよく知らないが、過去にそのような穴を形成できないために、やりたい研究ができなかったということであった。

課題を提案したとき、単一チャネルのレベルのパッチクランプと SPM をちゃんと融合した研究例はなかった。それを独自のアイデアで安価で簡便でロバストに融合でき、論文と特許を早々とさせたことは幸先がよかった評価している。また、研究を遂行するにあたって、予算の使い方が適切だったことも成功の一因となっており、適切なアドバイスをいただけた JST の事業とスタッフのサポートも評価されるべきと感じている。

なお、総括から、研究開始前の訪問面談にて、申請者自身だけでなく、「学生が興味を持って研究ができるように指導せよ」とのアドバイスをいただいていた。関係した二人の学生が共に面白いと感じ推進してくれたので、これは達成されたと認識している。一方、所属研究室の教授退官を見越した「転出」に関する対応は未達成で、手のひらの孫悟空であったと実感して

いる。

5, 研究総括の見解

比較的短期間の研究で、分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発し実証した点は評価出来る。今後、この基盤を当初目標である DNA のナノポアシーケンシング実現に向けて如何に効率良く研究をフォーカス出来るかがポイントであろう。本人は研究の方向としてマルチモーダル化を指向しているようであるが、目標が発散して、「二兎を追う者一兎をも得ず。」とならないように着実な研究計画を持って進めることが望まれる。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. M.Kitta, H.Tanaka and T. Kawai, Rapid Fabrication of Teflon Micropores for Artificial Lipid Bilayer Formation, Biosensors and Bioelectronics 25 (2009) 931-934.
2. M. Kitta, T. Ide, M. Hirano, H. Tanaka, T. Yanagida and T. Kawai. Direct Manipulation of a Single Potassium Channel Gate with an Atomic Force Microscope Probe. Small, 7(16), (2011) 2379-2383.
3. 田中裕行. 簡便な安定化脂質二分子膜プラットフォームの開発とその応用. 表面科学Vol. 32, No. 7, (2011) 445-450.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 田中裕行、橘田晃宜、川合知二

発明の名称: 平面脂質二重膜の形成方法

出 願 人: JST

出 願 日: 2010/2/17

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

- ・「膜タンパク質の電氣的・力学的同時計測による一分子測定」 表面科学会、大阪大学 2010 年 11 月。(本講演により、表面科学会会誌への寄稿の招待を受けた。)

研究報告書

「酸化物界面への電氣的・磁氣的機能性の付加と制御」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：塚崎 敦

1.研究のねらい

本研究では、酸化物を対象に原子レベルで急峻な界面を作製して、電氣的・磁氣的機能性を制御することを目的としている。酸化物は多様な構造と物性を有する物質群であり、近年では界面での高移動度 2 次元電子ガスや界面磁性などの研究が注目されている。特に、ウルツ鉱構造を持つ物質には結晶中に自発分極が形成され、それらの物質で構成される界面にはバルクにない電気伝導性が発現する。本研究では、薄膜技術を活用したウルツ鉱型結晶界面の形成と電氣的・磁氣的機能性の探索を行った。

2.研究成果

1, 電気伝導性制御 —MgZnO/ZnO 界面における分数量子ホール効果の観測—

酸化亜鉛(ZnO)は、ウルツ鉱型の結晶構造で直接遷移型のバンド構造を持ち、励起子に関する光学的研究と電流注入型の発光ダイオードを目的とする研究が古くから行われてきた物質である。本研究では、マグネシウムを添加したMgZnOとZnOとの界面を形成して、自発分極差を利用した高移動度電子系の制御を実現した。具体的には、分子線エピタキシー法を駆使して作製された急峻な界面に、さらにゲート絶縁体を組み合わせた電界効果素子(図1)を作製した。界面品質の指標となる電子移動度は、現在までに 0.3K で $100,000\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ を超える値に到達し、この値は SiO_2/Si 界面を凌駕して、酸化物界面中最高値である。本試料を用いて電気伝導の電界制御を行ったところ、調整した電子濃度で図2に示す分数量子ホール効果が観測された。温度依存性などの詳細な評価を行い、各分数量準位の活性化エネルギーを見積もった。 $\nu=8/3$ や $7/3$ といった高次の分数量準位が、従来から精力的に研究されてきたGaAs/AlGaAs系の最高品質試料(移動度 1000 万 $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)と、同じ程度の大きさの活性化エネルギーを持っていることがわかった。

研究期間中、界面品質の向上を目指して成長条件の最適化に継続して取り組んだ。作製した試料を上記の電界効果トランジスタ構造に加工し、低温における電子移動度を評価したところ、不純物散乱が支配的な散乱要因であると結論づけた。成長速度が重要なパラメータであることを見出し、実際に 600nm/h にて最高値の移動度 $180000\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ を得

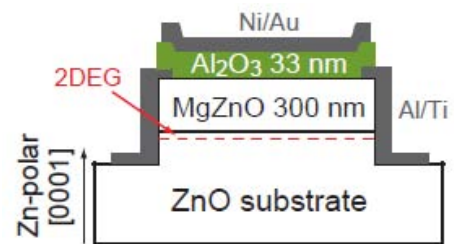


図1 電界効果素子の断面図

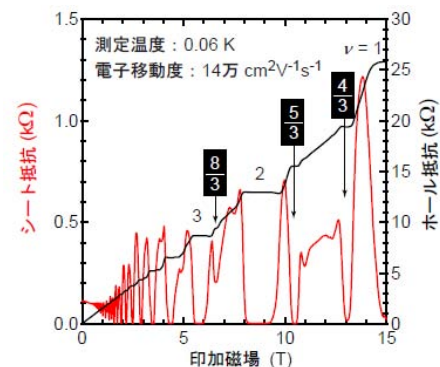


図2 磁場中での伝導特性

た。したがって、成長速度を速めることで結晶中の不純物濃度を低減でき、移動度の向上によって高純度化を確認できた。界面品質を散乱時間の観点でGaAs/AlGaAs系と比較すると、現状の試料は、GaAs系の試料水準で約 $100 \text{ 万 cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ に匹敵する。

2. 磁氣的性質の付加

ヘテロ構造に磁氣的性質を付加することを目的に、3d 遷移金属を含む薄膜へと研究対象を広げた。特に、Co, Mg と酸素のみの供給で薄膜作製を試みたところ、基板に含まれる Zn との相互拡散が生じていたが、上部界面においては、欠陥のない急峻なウルツ鉱型結晶界面が形成されることを見出した(図3参照)。東京大学柴田先生との共同研究を行い、薄膜ヘテロ界面を高分解能 STEM で観察したところ、転移のないコヒーレント界面であることがわかった。さらに、界面の組成分析で Co 濃度を評価した結果、既報の固溶限界濃度を越えて添加されていたため、界面での電氣的不安定性が拡散を助長した可能性がある。

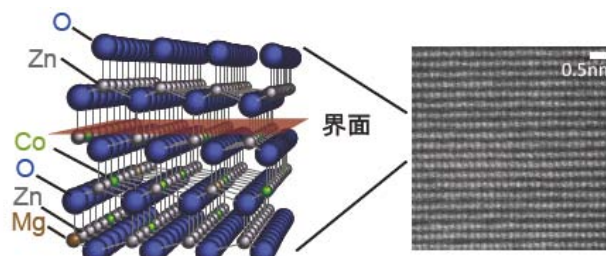


図3 界面結晶構造と高分解能電子顕微鏡像
(測定は東京大学柴田先生)

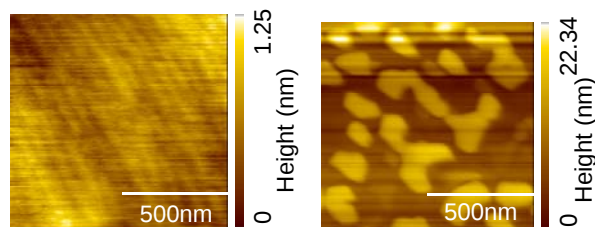


図4 Co 添加薄膜の AFM 像 臨界膜厚以下(左)と臨界膜厚以上(右)

Co 添加層の作製においては、岩塩

構造の CoO 層が析出する可能性がある。そこで、成長中に反射高速電子線回折を測定して、表面構造の変化に注目した。実際に、臨界膜厚(約 50nm)を過ぎると、電子線回折パターンが 3 次元表面構造となることを確認した。この臨界膜厚を超えた界面では、多数の転移が観測されるとともに、グレイン形状が見られた。図 4 に示す原子間力顕微鏡(AFM)像においても、試料表面が島状の形状となっている。界面の伝導特性評価では、コヒーレント界面の試料において形成された電子系が高移動度を保持している上、さらに異常ホール効果を示した。この結果は、高移動度電子系に p - d 交換相互作用による磁氣的性質が付加されたことを示唆している。

3. 今後の展開

本研究課題では、分子線エピタキシー法を駆使することで、急峻な酸化物ヘテロ界面の作製を行った。酸化物界面においても純度や作製条件を調整することで、従来の半導体素子に十分比肩する水準の界面形成が可能であることを示した。特に、3d 遷移金属酸化物を用いた界面においても、原子レベルで平坦な界面形成が可能であることは、技術水準の拡張を示す成果と言える。物性制御においては、酸化物界面における 2 次元電子系の電界制御を可能にし、金属絶縁体転移現象や電子相関の影響を観測した。さらに、磁氣的性質の関連する輸送特性の評価と電界制御に注力している。

これらの成果は、今後、多様な性質を持つ強相関物質群の界面形成が飛躍的に改善されることを示唆している。界面制御技術の向上を継続して行い、次世代エレクトロニクスに活用できる機能性界面を探索する。

4. 自己評価

電氣的性質と磁氣的性質に関する2つの当初目標に対して、電気伝導性制御は大きく進展した。実際に、酸化物界面における分数量子ホール効果の観測と電子移動度の向上を実現した。また、磁氣的性質の付加を目指した3d遷移金属との界面形成においては、Coに集中して研究を展開した。界面構造の評価において、Coを多量に含む場合にも、ウルツ鉱構造を保ってコヒーレントな界面が形成できたことは大きな進捗と考えている。また、ホール効果測定において、従来までの非磁性界面にはない異常ホール効果の観測に成功したことは、本提案の当初目標を一定の水準で到達できたと考えている。しかしながら、上記2つの界面(MgZnO/ZnOとCoZnO/ZnO)を高品質に形成するための条件探索と輸送特性評価に集中し過ぎたことで、超格子化や他の3d遷移金属元素への展開など、計画に行き届かなかった内容もある。今後、物質系を拡張して、磁氣的性質に関する研究を一層精力的に展開していく必要がある。

5. 研究総括の見解

分子線エピタキシー法を用いてMgZnOとZnOの急峻な酸化物界面を形成し、 $100,000\text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ を超える大きな移動度を実現し、分数量子ホール効果などの高移動度系に特有な量子現象を観測した。さらにCoを添加した薄膜との界面で興味深い磁気抵抗現象を見出しており、急峻で高移動度を実現する酸化物界面相形成法を確立した研究で、高く評価できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1) Observation of the fractional quantum Hall effect in an oxide

A. Tsukazaki, S. Akasaka, K. Nakahara, Y. Ohno, H. Ohno, D. Maryenko, A. Ohtomo, M. Kawasaki

Nature Materials **9**, 889 (2010).

2) Improvement of electron mobility above $100,000\text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ in $\text{Mg}_x\text{Zn}_{1-x}\text{O}/\text{ZnO}$ heterostructures

S. Akasaka, A. Tsukazaki, K. Nakahara, A. Ohtomo, M. Kawasaki

Japanese Journal of Applied Physics **50**, 080215 (2011).

その他 15 件

(2) 特許出願

特許出願 1 件 (出願中)

1, 「結晶および積層体」

発明者：塚崎敦

出願人：科学技術振興機構

出願番号：特願 2011-222161 (2011.10.6)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

国際会議招待講演 6 件

1) Quantum Hall effect in MgZnO/ZnO heterostructures

- 4th International Workshop on Emergent Phenomena in Quantum Hall Systems (EPQHS), Beijing, China, June 23-26, 2011.
- 2) Fractional quantum Hall effect at the MgZnO/ZnO heterointerfaces
38th International symposium on Compound Semiconductors (ISCS), Berlin, Germany, May 22-26, 2011.
- 3) Emergence of fractional quantum Hall states in well-regulated MgZnO/ZnO heterostructures
Materials Research Society (MRS) spring meeting, 2011 San Francisco, USA, April 27, 2011.
- 4) Fractional Quantum Hall effect in MgZnO/ZnO heterostructures
The 2010 WPI-AIMR Annual Workshop, Sendai, March 25-27, 2010.
- 5) Observation of fractional quantum Hall effect in MgZnO/ZnO based heterostructures
APS March meeting, Portland, USA, March 15, 2010.
- 6) 2D electron transport in $\text{Mg}_x\text{Zn}_{1-x}\text{O}$ based heterostructures
JSPS Core program meeting, Korea, Oct. 24, 2009.

国内会議招待講演 4 件

- 1) ZnO 系酸化物界面における移動度向上と量子ホール効果
第 58 回春季応用物理学会 神奈川工科大, 厚木, 3 月 25 日, 2011.
- 2) 酸化物界面への電氣的・磁氣的機能性の付加と制御
さきがけ領域「革新的次世代デバイスを目指す材料とプロセス」会議, 大阪, 1 月 12 日, 2011.
- 3) MgZnO/ZnO 界面における量子輸送特性の進展
第 118 回東北大学金属材料研究所講演会, 仙台, 11 月 27 日, 2009.
- 4) 透明酸化物伝導体 酸化亜鉛界面の量子伝導とデバイス展開
第 1 回機能性酸化物エレクトロニクス研究会, 大阪, 10 月 23 日, 2008.

解説記事 2 件

- 1) 酸化物界面に閉じ込めた二次元電子の超伝導と量子ホール効果
川崎雅司、**塚崎敦**、上野和紀
物理学会誌 3 月号 (2011).
- 2) 酸化亜鉛系分極不整合界面の 2 次元伝導と導電性高分子を用いた伝導性制御
塚崎敦、中野匡規、大友明、上野和紀、赤坂俊輔、湯地洋行、中原健、福村知昭、川崎雅司
まてりあ 7 月号 312-313 (2010).

研究報告書

「高次構造制御による膜タンパク質機能発現リポソームの構築」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：野村 慎一郎

1. 研究のねらい

膜タンパク質は、脂質膜に組み込まれた状態で機能を発現する分子であり、膜によって自他を分けるすべての生物に本質的に重要である。創薬のターゲットとして、また高機能性バイオ界面のデバイス材料として有用性が期待できる。本研究では、遺伝情報に基づき合成された膜タンパク質が機能を発現するための「場」としての人工細胞膜モデルの構築を目的とする(図 1.)。脂質膜の高次構造の制御に基づく膜タンパク質の局在・機能化についての知見を得、機能化細胞モデルの構築手法を確立する。

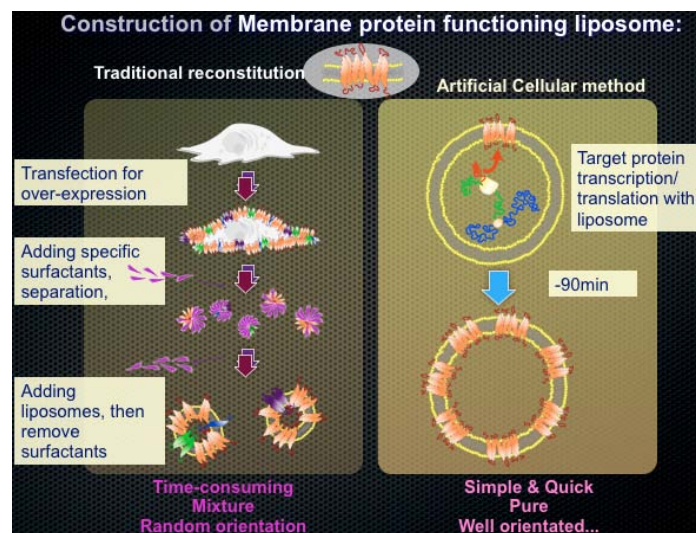


図 1. 一般的な膜タンパク質導入リポソーム調製法(左図)と対比させた本研究の概念図(右)

2. 研究成果

i) 新規な膜タンパク質合成リポソームの調製と機能評価

・コネキシン(Cx)は、細胞同士が細胞質間の小分子を交換するチャネルを形成する膜タンパク質である。我々は、細胞サイズリポソーム環境での Cx 無細胞合成により、リポソームと培養細胞との間に上記チャネルが形成され、小分子の薬剤(遺伝子発現抑制)を直接、細胞内に届ける事が可能となった[1] (図 2)。さらに、直径 100–300nm の小型リポソームに対して外部から Connexin を無細胞合成した場合に、膜に

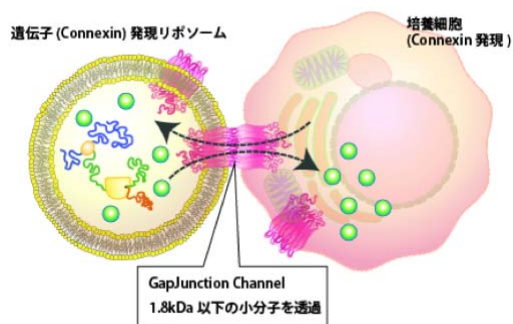


図 2. 膜タンパク質コネキシンの無細胞合成 & 直接挿入によるリポソーム膜上への導入とそれを用いた細胞との直接物質送達系の概念図。

挿入されたタンパク質の配向が均一に配向することを、消化法を用いて証明し、報告した[2].

・光応答性プロトンポンプである膜タンパク質・バクテリオロドプシン(bR)を無細胞合成し、その場でリポソーム膜に組み込むことに成功した。その際、遺伝暗号を拡張する4塩基コドン法を用いて、膜タンパク質の特定アミノ酸部位に蛍光ラベルを付与し、蛍光顕微鏡およびFCSを用いることで、リポソームへのbRの組み込みを確認した[3]。本手法は、特定の膜タンパク質内の局所部位をターゲットとした改変による機能化の手法として有効であることが示された。

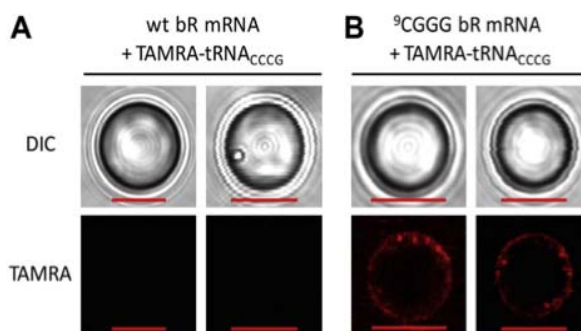


図 3. 膜タンパク質バクテリオロドプシンの無細胞合成 & 直接挿入によるリポソーム膜上への導入。A: 無改変, B: 4 塩基コドン改変。

スケールバーは 5μm.

・天然に存在する多種多様な生物種から有用なタンパク質を求める手法として、細胞への毒性の有無にかかわらず合成・抽出を可能とする無細胞合成への期待は大きい。そこで、膜タンパク質の直接機能化手法である本研究のアイデアを、様々な種に対応させるタンパク質機能化モデルの構築は重要かつ必須な技術的課題である。その一例として、生育温度の高い高度好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* の無細胞抽出液より調製したタンパク質合成溶液を調製し、リポソーム環境での無細胞タンパク質合成と機能化の試験を行った。25℃では進行しないタンパク質合成反応が 45℃で進行するという新奇な人工細胞モデルの構築に成功し、報告した [4].

ii) 細胞サイズリポソーム構築手法と評価系の検討

・タンパク質の無細胞合成反応をリポソーム環境で行う細胞モデルは、しかし実際の細胞や菌体と異なり非常に壊れ(割れ)やすく、細胞用に市販されている各種のツールを流用することが殆どできない。また、リポソームおよびタンパク質の定量に頻繁に用いられる蛍光ラベルを用いた計測法は、小サイズのリポソームや蛍光分子のノイズの効果が大きいため除去する必要がある。そのため、リポソーム分離・精製用のマイクロ流体デバイスの開発を行った。分離・精製効率を評価し、直径 3μm 以上の巨大リ

Analyzing device: microfluidics

Selection and collection device for giant liposomes

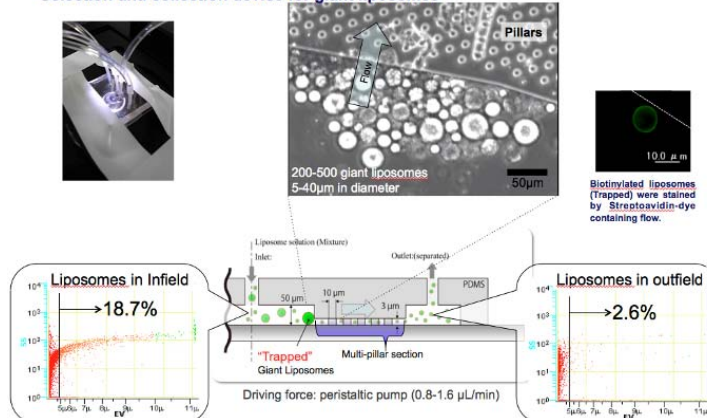
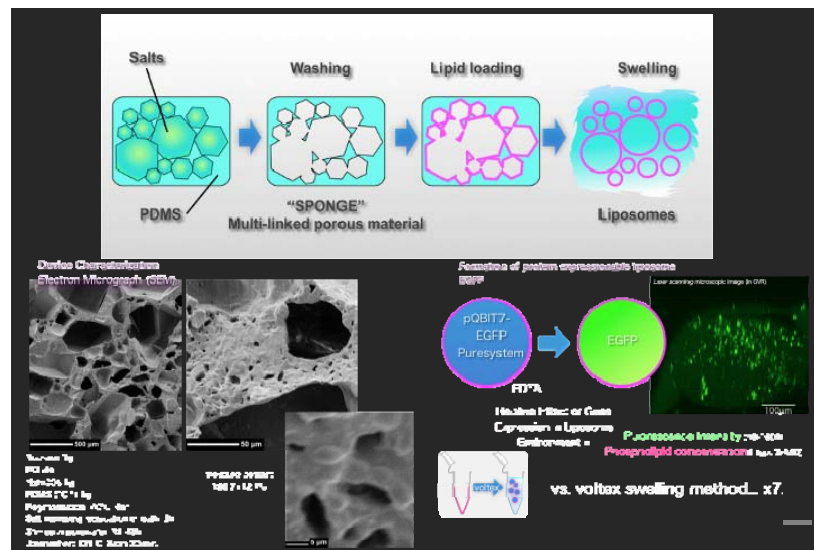


図 3. 細胞サイズリポソーム分離精製用マイクロ流体デバイス

図 3. 細胞サイズリポソーム分離精製用マイクロ流体デバイスの開発を行った。分離・精製効率を評価し、直径 3μm 以上の巨大リ

ポソームを流路内に捕捉し、非破壊的な還流による染色操作が可能である事を示した[5].

・無細胞タンパク質合成には高濃度の塩・高分子電解質溶液が必須であり、リポソーム形成に不利な条件が揃っている。この溶液を高効率にリポソーム内に導入することを可能とする手法(スポンジ法)を新規に開発した。従来平面上で行われてきたリポソーム調製を3次元の連結性多孔質表面で行



う手法(右図)で、GFP 発現リポソームを従来法に比べ7 倍の効率で得ることに成功した。前出の膜タンパク質 Cx の発現・提示においても1.3 倍の効率上昇が得られた。その際、脂質組成により合成量と局在効率が異なる事、また脂質のアルキル鎖長と膜挿入効率との間に特徴的な相関があることを示した(論文作成中)。本法は特許申請[P1]を行っている。

以上のように、本研究により得られた細胞モデルの構築手法は、種々の細胞内要素を加算的に構築し要素間の相互作用を研究可能にし、薬剤スクリーニングに利用可能な受容体アレイや新規 DDS の構築を通じ生物学・医工学の分野へ貢献すると期待される。

3. 今後の展開

細胞は溶液内で生きる都合、分子の拡散による輸送を利用する。その輸送は正確だが遅い。例えば神経細胞は複数の膜電位依存性チャネルを用いた興奮波を併用し、素早い通信を実現し、モータータンパク質は既設のレールを用いて、パケット的な通信を行う。いずれにせよ、細胞同士がコミュニケーションを行うためには、近隣の空間に居る必要がある。その距離を拡張することは将来的には可能であろう。こうしたいわば「分子通信」の概念は、生体間をつなぐ次世代の通信プロトコルとして提唱され研究が進んでいる。その核心技術である生体との非侵襲通信デバイスとして、膜タンパク質の利用は本質的に重要である。

近年、無細胞合成系を用いて膜タンパク質の機能化の研究が加速しつつある[6]。かつて筆者の所属したグループにおいても、接着性タンパク質の提示・機能化、また感覚を司る受容体の無細胞合成と組み込みが大きく進歩している。欲しい配列のタンパク質のみが合成されるという点から、複雑な相互作用を理解するためのモデルとして人工細胞系が利用されると期待できる。特に、Puresystem に代表される再構成無細胞タンパク質合成系を用いることで、未知の要素がなく、目的のタンパク質を得られるため、開拓的な研究に向いている。目的分子が非修飾状態で得られるため、修飾機構を知る目的でも利用されることと期待される。

一方で、超えるべきハードルもまた明らかになった。たとえば直接接触による情報変換として有名な Notch-delta 系等は、糖鎖が重大に関与するため、糖鎖の簡便かつ自在な合成が出来るようになるまでしばらくは困難だろう。無細胞系で利用可能性を検討した後は、細胞に強発現させ抽出したタンパク質を用いることで、リポソーム膜に組み込むことが大量生産できて有効であろう。細胞から生化学的手法で抽出した受容体をそのままリポソームに移植する、という伝統的な再構成実験は王道である。既知材料から「本当に動く」システムをつくる手がかりに、また無細胞系の Positive Control としても有効である。

担体であるリポソームを高効率に得る手法は、本研究を含め、この 10 年で急速に進歩した。w/o エマルジョンを用いる手法やその MEMS での応用など、ユニラメラの巨大リポソーム作成手法は様々提案されている。膜タンパク質のユニラメラ GV への移植には、膜融合ペプチドを用いる系が現時点では、もっとも効率が高いようである。Kahya らは WAE と呼ばれる配列を用い、三重大学の吉村・湊元らはバキュロウィルスのエンベロープをリポソームに融合させる系を構築している。コネキシンも最近、この手法を用いて再構成され、機能化が報告されている。さらに GPCR の関連3種の膜タンパク質を同一リポソーム膜に導入し、協調動作させる試みも行われている。膜タンパク質の連携動作は、今後の極めて重要なテーマとなりうる。神経細胞軸索のような、イオンチャネルを用いた同一膜内での側方伝搬コミュニケーションは、無細胞合成では配向性の制御が不明な上、たとえば Na チャネルは極めて大きく (Nav1.6, 分子量 225kDa, 24 回膜貫通)、合成量が期待できない問題と、不応期から膜電位を戻すためのイオンポンプをカップリングさせる必要、などの点で困難が大きい。MEMS 技術等を用いて、内外にアクセス可能なチューブ状リポソームを構築し、膜融合手法をチューブ内外から独立に行うことができれば、困難はかなり解決されるものと考えられる。

ES/iPS 細胞の研究の進展により、直接、生細胞の代理として人工細胞モデル・リポソームを用いるという時代は終わったが、理学・薬学・応用医工学などの各現場で用いられる基礎ツールとして、人工細胞モデルが果たす役割はより重要になってきており、野村はより汎用性の高いモデルと、特定機能に特化したモデルの構築を行ってゆく。

4. 自己評価

当初、脂質膜の高次構造変化に着目する予定であったが、リポソーム同士がチューブ構造で連結されたマルチリンク構造が無細胞タンパク質発現系環境ではきわめて不安定であったことで、次元制御による定量化に見切りをつけた。その見切りが遅くなった点は反省材料である。その後、無細胞発現を行う場としての球状のリポソームを得る手法の開発および定量化に当面の軸足をおいたために、多様な膜タンパク質への挑戦を縮小せざるを得なかったことは残念である。プロジェクトのポストドクを務めつつさがけの研究を進めるという立場で奇妙な経験も数多くあったが、さがけの年 2 回の領域会議における原理的で率直なディスカッションと、手厚い人的・金銭的支援を生かすことで、膜タンパク質発現・機能化リポソーム調製と評価に関する新規な手法を生み出し、今後の人工細胞モデルの新たな局面を迎える地ならしができたと自負している。

5. 研究総括の見解

細胞内小器官を含め、細胞内の構成要素をリポソーム中に再構築し、人工細胞の創製を

目指すという点で生命進化の道筋を探る方法論を提供しうる興味深い研究成果である。一方において、研究者本人も指摘しているとおり、細胞自身の解析的研究が近年、飛躍的に進みつつあり、生物物理的研究の目指す方向性について、生命のモデル化も含め、新しい切り口を提案する努力を続けて行って欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. M. Kaneda et al., “Direct formation of proteo-liposomes by <i>in vitro</i> synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes”, <i>Biomaterials</i> , 30, (2009), 3971–3977.
2. Y. Moritani et al., “Direct integration of cell-free synthesized connexin-43 into liposomes utilizing chaperone-like function of liposomes”, <i>FEBS Journal</i> , 277, (2010), 3343–3352.
3. T. Ohtsuka et al., “Synthesis and in situ insertion of a site-specific fluorescently labeled membrane protein into cell-sized liposomes”, <i>Analytical Biochemistry</i> , 418, (2011), 97–101.
4. K. Yamaji et al., “Protein Synthesis in Giant Liposomes Using the In Vitro Translation System of <i>Thermococcus kodakaraensis</i> ”, <i>IEEE trans. Nanobiosci.</i> , 8, (2009), 325–331.
5. S.-i. M. NOMURA et al., “Giant liposome sorting/collection device: for individual analysis of artificial cell-models”, <i>Int. Symp. Micro-Nanomechatronics & Human Science</i> , (2009), 620–622.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 野村 慎一郎

発明の名称: リポソームの製造方法

出 願 人: 科学技術振興機構, 京都大学

出 願 日: 2010/5/10

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

1. “Making a cell model: membrane protein expression/functioning on giant liposome”, S.-i. M. Nomura, *Synthetic biology: from the present into the future*, 京都, Mar., 2010.

2. “膜タンパク質の直接無細胞合成による細胞モデルの多機能化”, 野村 M. 慎一郎「細胞を創る」研究会 2.0, 東京, Oct. 2009.

著作物

1. “人工細胞モデルとコミュニケーション能” 野村 M. 慎一郎, 細胞を創る・生命システムを創る, 実験医学増刊 Vol.29 No.7, 2011, 竹内昌治, 上田泰己・編, 41–47.

2. “Construction of an In Vitro Model of a Living Cellular System” K. Yoshikawa, S.M. Nomura, K.

Tsumoto, K. Takiguchi, The Minimal Cell, Edited by P.L. Luisi, 2011, Part 3, 173–193.

3. “細胞計算による Drug Delivery System” 自己組織化ハンドブック 第3編 システム・デバイス編第4節システム, 野村 M. 慎一郎 (分担執筆)(2009), 854–855, NTS, 総ページ数 940p.

研究報告書

「細胞膜表層上のナノ糖鎖の精密集積構造の構築」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：森 俊明

1. 研究のねらい

生体内での分子認識や情報伝達には糖鎖の関わる分子間相互作用が大きく関連していることが最近の糖鎖生物学の進歩から明らかにされている。特に細胞表層に提示されている糖脂質糖鎖や糖タンパク質糖鎖は細胞膜という界面を介して、わずか数ナノメートルの毒素などのタンパク質分子からウイルス・細菌、そして数十マイクロメートルの細胞まで広範囲の大きさにわたる相互作用に関わっている。役割としては、細胞表層のレセプターとリガンドとの相互作用を通してウイルスなどの感染やレセプターからのシグナル伝達などが分かってきた。本研究では、糖鎖ナノ集積構造を精密に構築し、その界面での分子間相互作用メカニズムを解明することを目指し、細胞膜における糖鎖の受容体との相互作用および細胞膜において発現している糖鎖の生成反応について検討した。

2. 研究成果

1) ペロ毒素とGb₃ 糖鎖間相互作用の 1 分子解析

糖鎖と糖結合性タンパク質の相互作用は生体内の情報伝達において重要な役割を担っており、その結合親和性は糖鎖密度により多価的に相互作用することで劇的に変化すると考えられる。しかし基板に糖鎖を並べて相互作用の解析を行う場合、糖鎖密度を精度良くコントロールすることはこれまで困難であった。

腸管出血性大腸菌が産出するペロ

毒素とGb₃糖鎖との結合について糖鎖密度を精密にコントロールし、ペロ毒素との相互作用を水晶発振子マイクロバランスにて解析し、ペロ毒素の認識性に及ぼす糖鎖密度の効果、糖鎖クラスター化度の効果を明らかにした。図 1 に示したように原子間力顕微鏡を用いて探針に固定した試料と基板に固定した試料を接触させた後に引き離したときに生じる破断力を測定し、分子間相互作用についてさらに詳細に解析したところ、ペロ毒素を固定したマイカ基板に対し、4 分岐Gb₃糖鎖を固定した探針を用いてフォースカーブ測定を行うと、1 分子レベルの相互作用に基づく破断力のみが観察された。次いでLoading rateを変え同様に測定を行うと破断力の変化が観察された。これらをDFS解析することで、それぞれの結合におけるエネルギー障壁を求めた。1Gb₃糖鎖の場合には2つの直線上にあったが、4Gb₃糖鎖の場合には曲線的に変化していることより、ペロ毒素と糖鎖との相互作用はジッパーモデルもしくは並列モデルにあることが示唆される。また、有効結合長を見積もったところ、ペロ毒素と 1Gb₃糖鎖または 4Gb₃糖鎖との相互作用では両者と

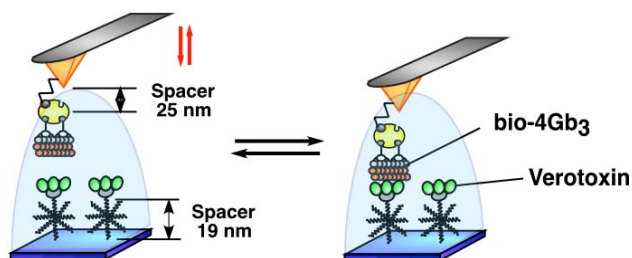


図 1 分岐型Gb₃糖鎖修飾チップを用いたペロ毒素固定化基板のフォースカーブ測定

もほぼ一致し、結合メカニズムは同じだが結合力のみ大きくなっているということが明らかになった。また、結合寿命は 4Gb_3 糖鎖の方が 1Gb_3 糖鎖よりもはるかに長いことも分かった。以上より多点で Gb_3 糖鎖に結合する特徴を持つペロ毒素のより詳細な相互作用メカニズムについての知見を得ることができた。

2) 糖鎖関連酵素の 1 分子計測による反応解析

細胞表層に発現する糖鎖伸長酵素の反応ではアクセプター糖鎖の酵素への結合とそれに続く糖ヌクレオチドなどの活性化モノマーによる連続した糖転移により伸長することが多い。そこで、プライマー糖鎖依存型糖鎖伸長酵素のモデル化としてデキストランスクラーゼによる伸長反応 (図 2a) を 1 分子レベルで追跡することを検討した。図 2b で示したように基板上にデキストラン伸長酵素 (DSase) を共有結合的にまばらに固定化し、カンチレバーの先にデキストランプライマーを共有結合で修飾した系で、所定速度でフォースカーブ測定を行うことにより反応を追跡した。まずモノマーであるショ糖非存在下でのフォースカーブは、図 3a のようにデキストランプライマーの非還元末端糖と DSase との結合に基づく破断力が観察され、その大きさは 1 分子レベルの結合に匹敵することが確認された。(図 2b 左端) その後、所定速度でカンチレバーの上げ下げをしながらショ糖を添加して糖鎖と酵素が接触した時点を反応開始として連続してフォースカーブ測定を続けたところ図 3b のように反応時間とともに破断力は長距離方向へシフトする挙動が観察された。結合の破断される距離を反応時間に対してプロットして伸長速度を求めると (図 3c)、1 秒あたり 2.7 糖の伸長しており、この値はこの酵素の k_{cat} (3.1 s^{-1}) にきわめて近いことから、フォースカーブの破断力のシフトは 1 分子レベルの糖鎖伸長反応の進行を追跡できたことになる。この手法を細胞膜上の酵素に用いるとおおのの酵素特性を評価できることになる。

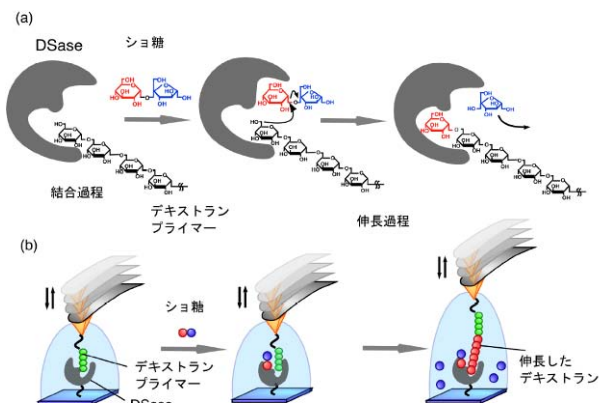


図2デキストラン伸長酵素反応の 1 分子力学計測

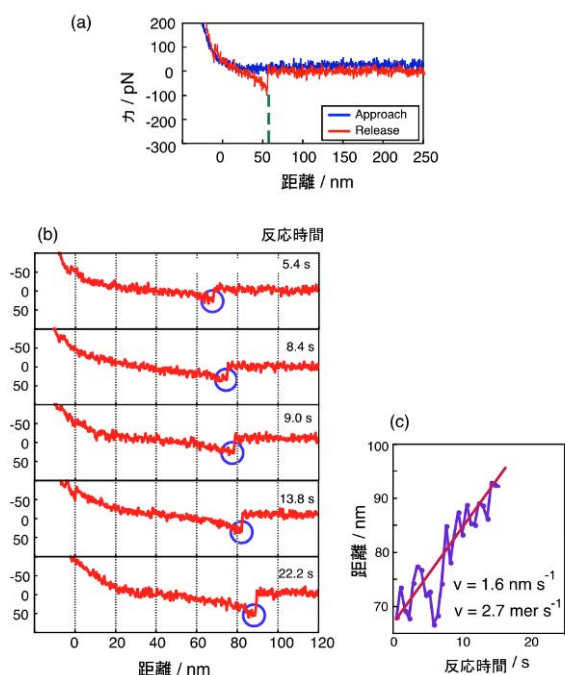


図3デキストランプライマー修飾カンチレバーによる DSase 固定化基板のフォースカーブ

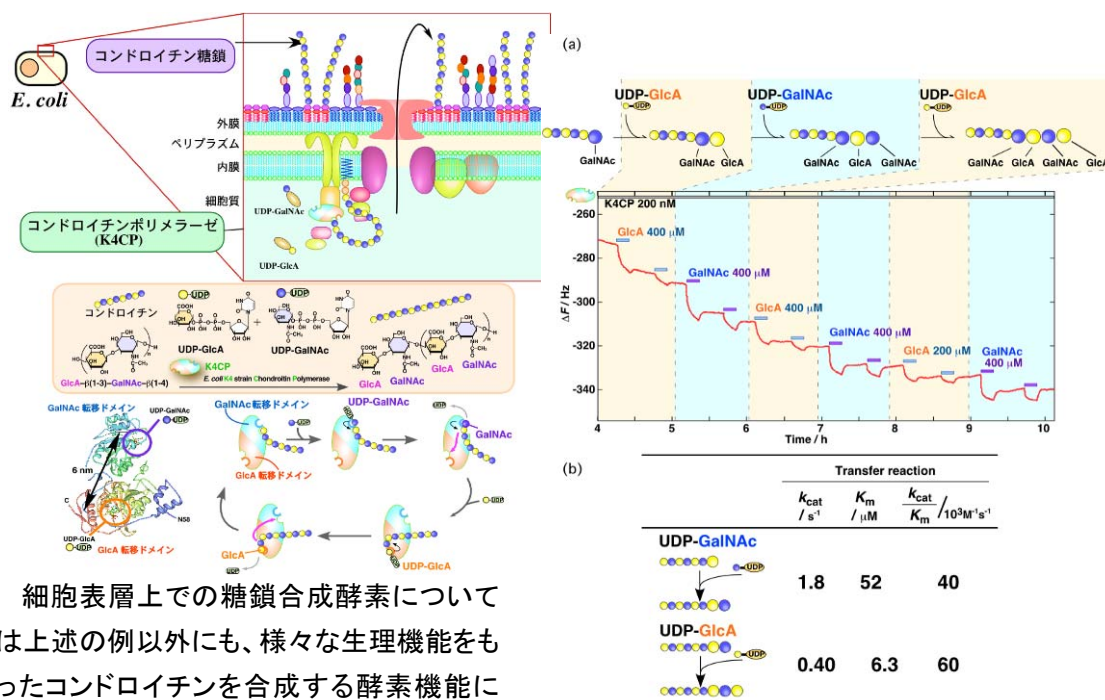


図4 コンドロイチンポリメラーゼによる一糖交互糖転移反応のモニタリング

細胞表層上での糖鎖合成酵素については上述の例以外にも、様々な生理機能をもったコンドロイチンを合成する酵素機能に関する研究が行われており、最近、*Escherichia coli* K4株由来のコンドロイチンポリメラーゼ (K4CP) がクローニングされ、

可溶性タンパク質として大量に発現、精製された。この酵素は、コンドロイチン糖鎖の非還元末端に対してUDP-GalNAc糖モノマーおよびUDP-GlcA糖モノマーが交互に糖転移反応することによりコンドロイチン糖鎖を伸長し、細菌から哺乳動物に至るまで広く保存されている糖転移酵素のUDP化糖結合ドメインが存在することなどが明らかにされた。(図4)また、結晶構造解析からK4CPは一つの酵素で二つの反応を触媒するバイファンクショナルな酵素であることが分かった。さらに各々の一方の糖転移活性部位を不活性化させた酵素変異体を用いると、単糖のみしか転移しないことも分かった。これらの反応解析にあたっては主にRI-ラベル化されたUDP化糖モノマーを用いることにより反応生成物を定量されてきた。そのため反応の経時変化を追跡することは煩雑であり、反応の詳細なメカニズムを解明することは困難であった。そこで高感度フロー型QCMによる反応解析について検討し、図4に一糖交互糖転移反応のモニタリング結果を示す。非還元末端にGalNAcをもつコンドロイチンオリゴマーを固定した基板にモノマー基質であるUDP-GlcAを添加すると振動数が減少(重量が増加)し、その値は単糖が転移した値に相当することより、反応を追跡できていると考えられる。飽和値に達したところで、次いでUDP-GalNAcを添加すると再び振動数が減少しその値は単糖分に相当した。一糖ずつ交互に転移する挙動を観察することは少なくとも3回ずつは認められた。反応初速度を求めMichaelis-Mentenプロットよりもとめた反応パラメーターを求めるとおのおの k_{cat} 値と K_m 値は異なったが、触媒効率を示す k_{cat} / K_m の値はほぼ一致し、この酵素はおおのこの糖転移についてほぼ同等に進行させることが分

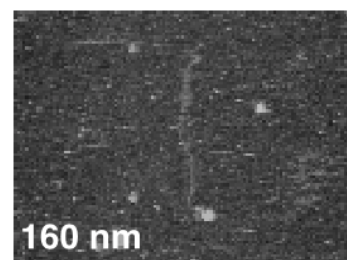


図5糖転移酵素から伸長する糖鎖の高速 AFM 観察

かり、そのことが交互共重合体であるコンドロイチン多糖をスムーズに生成させる要因になっているものと考えられる。また、固定化膜上で酵素から糖鎖が伸長する様子を高速AFMにより1分子レベルで観察することにも成功した。(図5) 細胞表層上での糖鎖が様々な生理活性を示すことは上述したとおりであるが、その分子メカニズムや糖鎖の生成メカニズムにはまだまだ不明な点が多い。細胞膜という界面で起こる現象を理解する際に、どの位置でどのようなときに起こっているかを時空間レベルで探るためには一分子計測は有効な手段であると考えられる。

3, 今後の展開

細胞表層上での糖鎖が様々な生理活性を示すことは上述したとおりであるが、その分子メカニズムや糖鎖の生成メカニズムにはまだまだ不明な点が多い。細胞膜という界面で起こる現象を理解する際に、どの位置でどのようなときに起こっているかを時空間レベルで探るためには一分子計測は有効な手段であると考えられる。特に細胞膜に埋め込まれた糖転移酵素の反応メカニズムを明らかにするために有効である。

4, 自己評価

細胞膜中での糖鎖の関わる分子認識及び酵素反応に焦点を当てて、モデル系にて解析してメカニズムを明らかにすることができた。特に AFM による 1 分子計測を実施することにより、細胞膜中での挙動を空間分解能は nm オーダー、時間分解能もサブ秒オーダーで詳細に明らかにすることができたことは成果である。最終目標である細胞膜そのものの相互作用・反応については定量評価するに至っていないが、そのための目処は十分実現可能なところまで来ていると考えている。

なお、上記以外の成果・展開に関しては、特許も含めて早くまとめていきたい。

5, 研究総括の見解

糖鎖関連酵素の 1 分子反応解析をフォースカーブ測定から明らかとする方法論の確立は、酵素反応の素過程を 1 分子レベルで解明する新しい方法論を提供している点で評価出来る。一方、当初の目標である細胞膜表層での相互作用解析実現には、今後、さらなる工夫が必要であろう。細胞膜における相互作用においては、糖鎖結合というシグナルが脂質分子の相分離や集合状態変化と密接に関連しており、このプロセスの分子レベルでの解明が今後、重要な課題となっていくものと考えられる。このような局面にまで解析の方法論を上げて行って欲しい。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表 (*: Corresponding Author)

1. Toshiaki Mori,* Megumi Asakura, and Yoshio Okahata*, "Single-Molecule Force Spectroscopy for Studying Kinetics of Enzymatic Dextran Elongations", *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 5701-5703 (2011).
2. Takanori Nihira, Toshiaki Mori,* Megumi Asakura, and Yoshio Okahata*, "Kinetic Studies of Dextranucrase Enzyme Reactions on a Substrate or Enzyme-Immobilized 27 MHz Quartz

Crystal Microbalance”, <i>Langmuir</i> , 27 , 2107-2111(2011).
3. <u>Toshiaki Mori</u> ,* TatsuroOhtsuka, and Yoshio Okahata*, “Kinetic Analyses of Bindings of Shiga-like Toxin to Clustered and Dispersed Gb3 Glyco-Arrays on a Quartz-Crystal Microbalance”, <i>Langmuir</i> , 26 , 14118-14125 (2010)
4. <u>Toshiaki Mori</u> , Momoko Toyoda, TatsuroOhtsuka, Yoshio Okahata “Kinetic analyses for bindings of concanavalin A to dispersed and condensed mannose surfaces on a quartz crystal microbalance” <i>Anal. Biochem.</i> , 395 , 211-216 (2009)
5. <u>Toshiaki Mori</u> ,* Masayoshi Shibata, TakanoriNihira, BunzoMikami, and Yoshio Okahata*, “Kinetic Monitoring of Site-Directed Mutational β -Amylase Catalysis on a 27-MHz QCM” <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , in press.

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

その他の論文・総説

1. <u>Toshiaki Mori</u> ,* “Single-molecule Force Spectroscopy for Studying Kinetics of Enzymatic Elongations of Glycoconjugate”, <i>Glycoconj. J.</i> , 28 , 292 (2011).
2. <u>Toshiaki Mori</u> , Kanehira Imai, Mirei Hasegawa, Yoshio Okahata “Nanometer-scale Surface Modification by Polymerization of Tetrafluoroethylene on Polymer Substrates in Supercritical Fluoroform” <i>J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.</i> , 46 , 1577-1585 (2008).
3. 森 俊明, “細胞表層上のナノ糖鎖の構造・機能および精密集積化”, <i>高分子</i> , 60 , 739-741 (2011).
4. 森 俊明 “糖鎖伸長酵素反応の高感度測定-細胞表層上のコンドロイチン多糖伸長酵素の反応解析” <i>化学と工業</i> , 62 , 990-991, (2009)
5. 森 俊明 “非水溶媒中で酵素を利用する”バイオ研究のフロンティア「酵素・タンパク質をはかる・とらえる・利用する」工学図書、137-147(2009)
6. 森 俊明, “細胞表層上の糖鎖集合構造への相互作用解析”表面, <i>in press</i> .

招待講演

1. 超高速(動画)AFMシンポジウム、 <u>森 俊明</u> 、“糖鎖関連酵素の1分子計測による反応解析”ビジョンセンター日本橋、2011年6月10日
2. Bio-nanotechnology Seminar 2011 in Shanghai Science and Technology Park, <u>Toshiaki MORI</u> , “Surface modification of biomolecules on the polymer substrates by supercritical fluids”, 立邦塗料(中国)有限公司 Shanghai, 2011年9月2日,
3. 2011 ナノ材料よこはま研究会、 <u>森 俊明</u> 、“細胞表層上のナノ糖鎖の構造および機能解析”、2011年10月10日
4. ソフト界面のダイナミクス(科研費新学術領域「ソフト界面」ワークショップ)、 <u>森 俊明</u> 、“界面で起こる糖鎖認識・糖鎖合成反応の1分子解析”、富山大学、2011年11月

- 4 日.
5. 化学工学会（第 41 回秋季大会）「超臨界流体と生体関連化学」 広島大学 2009. 9. 16
6. 日本接着学会東北支部講演会 2009 「細胞表層上のナノ糖鎖の精密集積化と生体分子間相互作用」東北大学 2009. 11. 13
- 7.China-Japan Bio-forum Regenerative Medicine and Related Technology 2009 “Direct Monitoring of Carbohydrate Elongation by an Atomic Force Microscopy”Shanghai, China 200 名 2009.3.18
- 8.1st International Symposium on Biotechnology, Bioengineering and Biomedical Science“Analysis of glycosylations catalyzed by dextran sucrose using an AFM” Tsinghua University, Beijing, China) 200 名 2009.3.21
- 9.Symposium for Eco-environmental and Biological Technology (EcoBioTech)“Direct Monitoring of Carbohydrate Elongations by a Quartz-crystal Microbalance”Beijing, China 2009.8.5
10. 東京工業大学プロダクティブリーダー養成機構第一回フュージョンプロジェクト 「超臨界流体のナノバイオテクノロジーへの利用」東京工業大学 2008. 12. 25

研究報告書

「ナノ空間での電気二重層制御を利用した一分子電気インピーダンス測定法の創成」

研究期間：平成 20 年 11 月～平成 24 年 3 月

研究者：山本 貴富喜

1. 研究のねらい

断面のサイズがナノメートルのオーダーとなる流路構造(ナノ流路)では、内部空間のほとんどが固液界面となるため、内部のイオン分布や物質輸送が界面に支配される、いわばナノ界面空間とみなすことが出来る。特に、流路幅がナノオーダーとなると、界面の電気二重層がオーバーラップするため、実質的に電気二重層が消失するような場が形成されると考えられる。そこで本研究では、電気二重層の消失効果を電気インピーダンス分光により明らかとしつつ、その効果を合目的に利用して超高感度の液中電気測定系を実現し、生体高分子を 1 分子レベルで検出するような電氣的 1 分子測定法の実現を目的としている。1 分子測定のキラーアプリケーションとして、1 分子レベルで分子の分離・分画を実現する 1 分子ソーターを提案し、その実証も目指す。

2. 研究成果

図 1 に示すように、流路幅がナノメートルのオーダーとなるナノ流路では、流路幅が狭くなるに伴い流路壁面と内部の液体との界面に形成される電気二重層がオーバーラップするようになる。その結果、流路内部では電気二重層が実質的に消失するため、電気二重層に由来する巨大なキャパシタンス(電気回路的にはコンデンサー)を取り除くことが可能となり、従来のマクロな測定系では実現不可能であった超高感度の電流測定が可能となる。

本研究ではこのようなコンセプトの実証のため、まずナノ流路とナノ電極から構成されるナノ流体でバイスの作製方法に取り組んだ。その結果、①Focused Ion Beam(FIB)を利用する方法、および、②FIB 加工では実現が難しい複雑形状のナノ流路+ナノ電極ネットワークを実現するための電子ビーム描画とドライエッチングを組み合わせた作製法、2 種類のナノ流体デバイスの作製方法を開発した。さらに流路ネットワークの 3 次元化と、より高精度の電流測定を目指し、ダマスクプロセス(電極を埋め込むことにより表面をフラット化しつつ電極パターンを形成する手法)を適用し、図 2 に示すような埋め込み型ナノ電極によるナノ流体デバイスの形成に成功した。

一方、閉じたナノ流路を形成するためには、上記で作製したナノ流路の凹

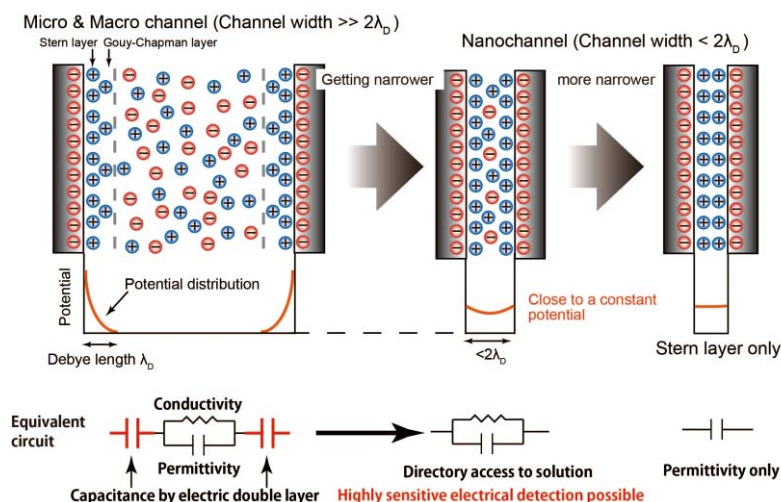


図 1 ナノ流路内における電気二重層

構造に蓋をする必要がある。ただし、接着剤や熱融着を利用する従来法ではナノ流路の溝が埋まってしまうため不適である。そこで、熱も接着剤も利用しない新しい接着法として、波長 172nm の真空紫外光照射により、表面励起したシリコン樹脂と SiO_2 間に形成されるシロキサン結合($-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-$)を利用した固体間直接接着法を開発し、わずか数 10nm のナノ構造を表面に持つ基板間で、ナノ構造を破壊することなく接合する手法を実現した(国際特許を含む複数特許出願済)。

さらに真空紫外光の過剰照射により、ジメチルシリコンが SiO_2 化(ガラス化)するメカニズムを解明すると共に、ガラス化に伴う

親水性向上によってナノ流路内に毛管現象で送液する手法の開発にも成功した。本手法は、ナノ流体デバイスの基板材料である石英を通して内部のナノ流路表面をクリーニングすると共に再親水化が可能であることも、作製困難なナノ流体デバイスの再利用の観点から重要な手法となることも明らかとなった。

以上のナノ流体デバイス作製法により、1 分子の電気的検出を試みた。まず、流路断面が生体分子 1 分子サイズとなるナノ流路には、分子は 1 度に 1 分子ずつしか流れ入ることが出来ないことを実証し、さらにナノ流路を挟み込むように配置したナノギャップ電極間を流れる電流測定から図 3 に示すように 1 分子の電気的な検出にも成功した。次に、誘電泳動や電気泳動を組み合わせた電気的 1 分子操作と 1 分子測定を組み合わせ、単一の分子を 1 分子ずつ個別に分離・回収するような 1 分子ソーターの実現を目指し、図 4 に示すようなナノ流路とナノ電極から構成される入口が 1 つで出口が 3 つのナノ流体デバイスを作製した。本デバイスは、センシング電極からのフィードバックで操作電極を制御することにより、1 本の流路から 3 つの出口を選択出来る構成となっている。分子量が異なる 3 種類の DNA の混合溶液をサンプル溶液として用い、分子量毎に 3 つの出口に回収するソーティング操作を行ったところ、98%以上の確度で 1 分子ずつソーティングすることに成功し、世界初の 1 分子ソーターの実証に成功した(国内特許出願済み、国際特許出願)。

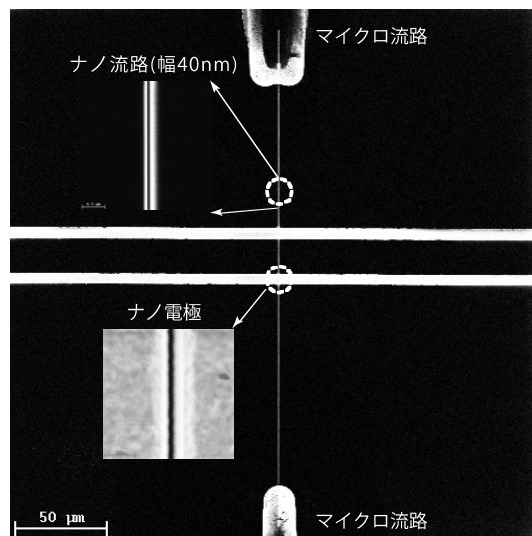


図 2 ナノ流体デバイス

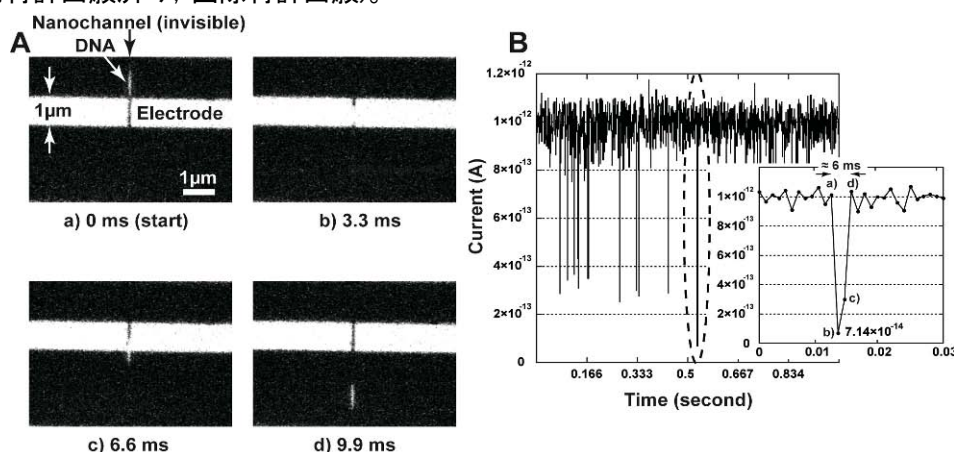


図 3 ナノ流路を流れる 1 分子の電流測定

ところで、以上の1分子センシングでは直流測定を利用しているため、分子量がほぼ同程のサンプルを見分けることが困難であることは研究開始当初から予想されていた。そこで、例えば分子量が同じであっても、その構造に由来する誘電率から分子を同定するような、電気インピーダンス分光による分子検出の検討も行った。電気インピーダンス分光は交流測定であり、誘電率の測定が可能である反面、周波数帯域の拡大に伴いノイズが増大するため直流測定より感度が悪くなる欠点を有する。そこで、1次構造はひも状高分子である生体分子のソフトマテリアルとしての特徴を利用して、通常の電気測定ではタブーとなる高電界印加に伴う誘電泳動力で分子を変形させながら測定する非線形電気インピーダンス分光による高感度化の実証に成功した。

このような非線形測定では電界強度が数 MV/m 以上もの高電界が必要となる。このような高電界をマクロな測定系で実現しようとすると、例えば 1mm のギャップを持つ電極の場合、数 kV 以上もの高電圧印加が必要となり、このような高電圧を高周波で印加することは事実上不可能に近い。ところが電極ギャップが例えば 100nm の電極であれば、印加電圧はわずか 0.1V で良いため、高周波領域まで容易に測定が可能となる。すなわち、ここで提案する非線形電気インピーダンス分光は、ナノ流路系で初めて実用化可能な手法であることも、ナノ流路を合目的に利用する1因である。

デバイスのポータブル化によるオンサイトでの超高感度測定やセンサーとして利用するような応用を開拓しつつ、配線の最小化による低ノイズ化を同時に達成すべく、ナノ流体デバイスチップ上への電気測定回路の集積化も試みた。測定回路としては、オペアンプを用いた電流-電圧変換回路(トランスインピーダンス回路)をチップ上に直接構成した。市販の超低入力バイアス電流のオペアンプと、高精度高抵抗、およびチップ上のリーク電流や寄生容量を考慮した電気配線設計により、1.25インチ角上の石英チップに、ナノ流路と電流測定回路を同時に実現することに成功した。このような無駄な配線を極小化したデザインにより、現在、シールドボックスを使用しないオープンな環境でもバックグラウンドのノイズレベルが数 10fA オーダーで数 100fA 程度の電流測定能を達成している。今後、ガード電極を組み込むことで更なる低ノイズ化の見通しである。本オンチップ電流測定回路は、その他一般的な電気化学センシングやフォトダイオードような光センシングの超高感度化にもそのまま利用可能なものである。このような低価格回路、超小型化、PC 駆動可能な低電力動作、超高感度などの様々な利点を通して、光・電気測定全般の超高感度オンチップ測定への道の開拓も行った。

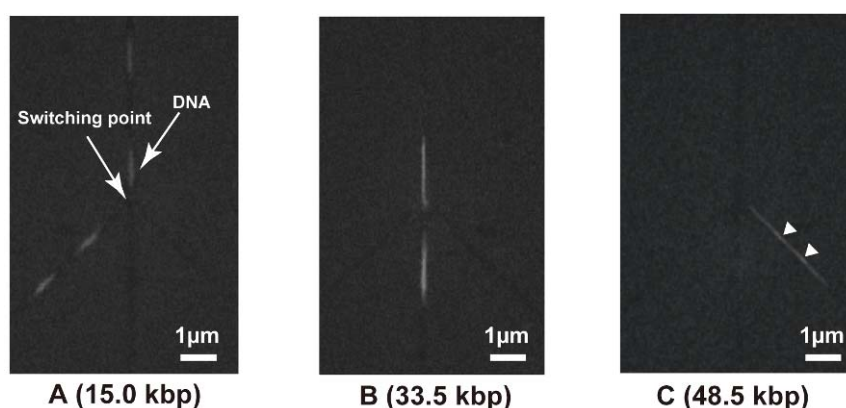


図4 1分子ソーティングの様子

3, 今後の展開

現在、ナノ流路内におけるキャリアイオンの静的・動的分布のデータが出そろい始めている。今後、まずイオン分布の詳細を電気インピーダンス分光で明らかとし、既に報告されている理論値との比較を行いながらナノ界面空間の構造を明らかとする。まだ非公開の成果として、熱運動によるゆらぎでイオンが電極間を往復する現象が電氣的に測定出来つつある。このような熱運動を積極的に利用出来るナノ界面空間の特徴を生かした電気測定の高感度化と共に、熱運動のエネルギーを電気エネルギーに変換するようなエネルギーデバイスへの展開も検討する。さらに、表面電位を制御することによるナノ流路内での選択的イオン輸送と、ポンプやバルブ機能といったナノ流路における流体制御への応用可能性を検討する。また、本手法のアプリケーションサイドの研究として、タンパク質の1分子検出やウイルスの1分子検出を進め、特にエアコンや空気清浄機、あるいはモバイル機器に内蔵出来るようなウイルスセンサーへの展開を進める。

4, 自己評価

研究開始1年目で大学を移転することになり、予定していた装置群が使用出来なくなる可能性があること、また立ち上げに時間がかかるためしばらく実験が停滞することが予想されたため、装置が利用出来る間に本研究のゴールに設定していた1分子検出と、さらに将来的なゴールに設定していた1分子ソーターの実証に着手するという、当初の研究計画とは全く反対のスタートとなったが、幸いにもDNAを用いた1分子検出と1分子ソーターの実証に成功し、複数件の特許出願繋がったことは良い判断だったと思っている。その後、デバイス作製に手間取りなかなか測定データが得られなかったことは、予想通りとはいえ、ファウンダリーなどに外注すればデバイス作製がもっとスムーズに進んだ可能性を考えると手間取り過ぎと反省している。震災の影響で壊れた装置でさらにデバイス作製が遅れたことを考えると、結果論ではあるが重ねて積極的に外注しておくべきだったかと思う。その反面、デバイス作製が出来なかった時間を利用して進めた真空紫外光による表面・界面の改質技術を、接着や印刷など今後世の中で求められるであろう加工技術のニーズに上手くマッチさせ、短期間で特許や共同研究に展開するまでに至ったことは、本来の研究テーマからは外れてしまったとはいえ、良い成果に至ったと考えている。

全体的に基礎現象を深く掘り下げる予定の研究が、各々良い成果には繋がったとはいえ横に広がってしまったことは、研究マネジメント上の反省点すべき点である。

5, 研究総括の見解

ナノ流路とナノ電極から構成されるデバイスを作製し、1分子検出に成功するなど独創的なアイデアで行った研究を高く評価したい。1分子レベルで分子の分離・分画を実現する1分子ソーターの作製などの応用面もさることながら、このようなデバイスにおける分子と界面との相互作用に関する基礎的な観点からの研究を展開できれば学術的にもたいへん面白いのではないかと考える。波及効果の大きな優れた研究と言える。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Takatoki Yamamoto, “Single molecular level analysis and processing in nanochannels, <i>Frontiers in Bioscience</i> , accepted (2011)
2.Wataru Okada, Takatoki Yamamoto, “Direct Bonding between Silicone and Glass by Atmospheric-Pressure Surface Modification”, <i>IEEJ</i> ,Vol131, No.4, pp159–164 (2011)
3.Takatoki Yamamoto, TeruoFujii, “Nanofluidic Single-molecule Sorting of DNA: A New Concept in Separation and Analysis of Biomolecule”, <i>Nanotechnology</i> , Vol. 21, No. 39, 395502 (2010)
4.Takatoki Yamamoto, “Study on 172-nm Vacuum Ultraviolet Light Surface Modifications of Polydimethylsiloxane for Micro/Nanofluidic applications”, <i>Surface and Interface Analysis</i> , Volume 43, Issue 9, pp.1271–1276 (2010)
5.Takatoki Yamamoto, Sang-Wook Lee, TeruoFujii, “ Nonlinear Electrical Impedance Measurement Controlling Conformation of DNA”, <i>Journal of Robotics and Mechatronics</i> , Vol.22, No. 5, pp.601–607 (2010)

(2)特許出願

研究期間累積件数:6 件

国際出願番号:PCT/JP2011/000245

発明者:山本貴富喜

発明の名称:硬質シリコン樹脂の接着方法, 微細構造を有する基板の接合方法および当該接合方法を利用したマイクロ流体デバイスの製造方法

出願人:国立大学法人東京工業大学

出願日:1 月 19 日, 2011 年

国際出願番号:PCT/JP20110/062497

発明者:山本貴富喜

発明の名称:流路デバイス及びそれを含むサンプル処理装置

出願人:科学技術振興機構

出願日:10 月 3 日, 2011 年

出願番号:特願 2011-207042

発明者:山本貴富喜, 他

発明の名称:シリコン系樹脂と非シリコン系樹脂の接着方法

出願人:国立大学法人東京工業大学

出願日:9 月 22 日, 2011 年

出願番号:2010-008956

発明者:山本貴富喜, 他

発明の名称:微細構造を有する基板の接合方法および当該接合方法を利用したマイクロ流体デバイスの製造方法

出願人:国立大学法人東京工業大学

出願日:1 月 19 日, 2010 年

出願番号:2009-293960
発明者:山本貴富喜, 他
発明の名称:サンプル溶液処理装置
出願人:科学技術振興機構
出願日:12 月 25 日, 2009 年

出願番号:2009-274921
発明者:山本貴富喜, 他
発明の名称:サンプル溶液処理装置
出願人:科学技術振興機構
出願日:12 月 2 日, 2009 年

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

- [1] TakatokiYamamoto, “微細加工技術のバイオデバイスへの応用”, 日本機械学会マイクロ・ナノ加工分科会 第7回技術セミナー (2011, 7/28) 東京
- [2] TakatokiYamamoto, “ナノフルイディクスが目指す究極のバイオセンシング”, 平成 23 年度北東北ナノメディカルクラスター研究会サマーキャンプ (2011, 8/5～6), 岩手
- [3] TakatokiYamamoto, “Multiphysics simulation to design micro/nanofluidic device for biotechnology applications”, COMSOL conference of Tokyo 2010, (2010, 12/3) Tokyo
- [4] 山本貴富喜, “マイクロ・ナノ流体デバイスのライフサイエンス応用”, 日本機械学会, 実験流体力学—マイクロ流れ実験の基礎と応用— (2010, 8/24) 東京
- [5] TakatokiYamamoto, TeruoFujii, “Design using COMSOL for life science application of microfabrication technology”, COMSOL conference of Tokyo 2009, (2009, 12/4) Tokyo

著書

山本貴富喜, “マイクロ・ナノ流体力学”, 森北出版, 2012 年発刊予定