「情報、バイオ、環境とナノテクノロジーの融合による革新的技術の創製」研究領域
領域活動・評価報告書
－平成 17 年度終了研究課題－

研究総括　潮田　資勝

1．研究領域の概要

この研究領域は平成 14 年度に発足したナノテクノロジー分野別バーチャルラボに属する 10 領域の中で唯一の個人型（さきがけタイプ）研究領域であり、情報通信、バイオ、環境に係わるナノテクノロジー分野において、個人の独創的な発想に基づくこれまでにない新技術、新物質、新システム等の創製を目指した新しいルートを切り拓く挑戦的な研究を行うことをめざす。具体的には、ナノスケールにおける物理現象に係わる研究、化学や生物系新材料の機構・機能等に係わる研究、センシング、操作、制御等の技術の基盤となる研究、既存技術の限界に挑戦する新しい情報通信、バイオ、環境の技術の創出に向けた研究、現在まだ原理の解明等の段階にとどまっている現象を次世代のデバイスやシステムのコンセプトに結びつける研究等が含まれる。

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「情報、バイオ、環境とナノテクノロジーの融合による革新的技術の創製」領域に設けた選考委員（領域アドバイザー）9 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）　研究内容が優れていることはもちろんであるが、分野間のバランス、所属機関の種類間のバランス、地域的分布、年齢層なども考慮して選考する。

4．選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー2 名が専門家としての立場から書類審査し、書類選考会議において異なる専門分野からの視点も十分に検討して面接選考の対象者を選考した。面接選考では具体的にどのような成果がナノテクノロジーにつながるのか、成功の可能性はどのくらいか等について説明を受けて提案内容を評価した。さらに、面接審査の結果を研究総括と 9 人のアドバイザーが総合的に議論・検討して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	265 名	29 名	19 名

5．研究実施期間

平成 14 年 11 月～平成 18 年 3 月

6．領域の活動状況

領域会議：7 回

研究総括（または技術参事）の研究実施場所訪問：研究総括は平成 14-15 年度にほとんどの研究者を訪問し、研究実施場所の状況を把握するとともに、研究計画について議論し助言を行った（技術参事同行）。以後は研究実施場所の移動、大型設備の導入などに際し適宜、状況の確認を行った。

7．評価の手続き

研究者が課題別評価用報告書に自己評価を記載して提出。これに加えて研究総括の定めた様式に則って、応募時の達成目標のうちで達成された内容、達成されなかった内容および未達成の理由、応募時の目標以外で得られた重要な成果を簡潔にまとめた資料を提出。これらの提出資料と最終領域会議での口頭報告・質疑を基に、領域アドバイザーが自身の専門分野の研究課題についてコメントを総括に提出。総括はアドバイザーのコメントを加味して各研究課題の評価を行った。

（評価の流れ）
平成 17 年 10 月～　　研究期間終了
平成 18 年 3 月
平成 18 年 1 月　　研究課題別評価用報告書（自己評価）提出
平成 18 年 1 月　　研究総括、アドバイザーへの報告（最終領域会議において）
平成 18 年 2 月　　アドバイザーによる評価、研究総括による評価

8．評価項目
（1）　応募時の目標の達成に向けて妥当な方向で研究がなされてきたか、その結果として目標が達成されたか。
（2）　得られた研究成果の先進性、科学技術への貢献。
（3）　今後の発展性

9．研究結果
本領域では、比較的若く挑戦的で創造性豊かな研究者 19 名を物理、化学、生物学、工学などの広い専門分野から結集して"バーチュアル・ラボラトリー"を構成した。「さきがけ」プログラムの精神は研究者本人が自分自身で直接研究を企画、実行する点が特長だと考えるので、この特長を常に意識して領域を運営した。
"バーチュアル・ラボラトリー"として有効に機能するためには、研究者間に情報だけでなく人間的にも相互交流を奨励することが重要だと考えて、領域会議などの機会を捉えてこれを強調した。例えば、領域会議における発表時間と討論時間を各 20 分ずつに設定し、十分な討論による研究者間及び研究者とアドバイザー間の相互作用を促進するように工夫した。その結果、20 分発表 20 分討論の領域会議では、熱心な領域アドバイザーによる質問と議論が活発に行われた。また研究者間でも真摯な議論による切磋琢磨が実現したことも、若い人材の育成という面で貴重な成果であったと考える。
この領域には広く分布した専門分野が含まれているので、自身の専門分野だけでなく異分野の研究者にも理解される発表内容や方法を工夫することが非常に重要であり、各研究者がそのような意識を持って相互交流したことによって、異分野交流・融合の実質的成果があったと考えられる。またこの領域に参加することによって異分野の研究者が知り合い、お互いの助け合いと協力によって効率的な研究が進められた例がいくつかあり、このように若手研究者達の将来に繋がる協力関係とネットワーキングを誘導したことも評価できる。
個々の研究課題の評価に反映されているように、所期の期待を大きく上回る成果を挙げた課題から所期の目標を達成できなかった課題まで、専門分野の広い分布と同様に成果のレベルも広く分布する結果となった。例えば発表論文の数においても、相当な開きができた。これは分野の性格による差もあるが、実際の成果の質と量による差もあることが明らかである。いくつかの課題で、当初の提案は魅力的かつ挑戦的であるが、研究の実施に当たってはやりやすいところからやろうという態度、まっすぐに所期のテーマに集中しようとしない状況などが見られたのは残念であり、領域総括としての指導が不足していたと考えて反省している。また物理学の人間から見ると、全体的に研究展開の論理性、必然性、解析的アプローチの不足などが見受けられ、よりシステマティックに研究を進める態度を求めるべきだったと思っている。
領域総括としての反省点を挙げると、1）"バーチュアル・ラボラトリー"としての実を挙げる目的で、当初はニュースレターをインターネット上で発行して研究者間の相互作用を密にすることを考えたが、実行に至らなかったこと、2）実地視察など個々の研究者との直接コンタクトによって研究の進展に協力する予定であったが、これをすべての研究者に対しては実行できなかったこと、などである。
本研究領域を運営するに当たって、領域アドバイザーの方々が熱心に参画して下さったことがいくつかの課題の成果に反映されている。この点を特記して感謝申し上げる。さらに技術参事と事務参事の強力なサポートを得られたことは非常に幸いであり、総括としては大変ありがたかった。ここに感謝の意を表する。また研究費に関しては、総括が必要と認めたものに対して機構本部から迅速に適切な予算措置をとって頂いたことに深く感謝する次第である。

10．　評価者
研究総括　潮田　資勝　　北陸先端科学技術大学院大学　学長

領域アドバイザー氏名（五十音順）
油谷　浩幸　　東京大学国際・産学協同研究センター　教授
江刺　正善　　東北大学未来科学技術共同研究センター　教授

関　一彦　　　名古屋大学物質化学国際研究センター・高等研究院　教授
高柳　邦夫　　東京工業大学大学院理工学研究科　教授
名取　俊二　　(独)農業生物資源研究所　理事、東京大学　名誉教授
八田　一郎　　金井学園福井工業大学　教授
馬場　寿夫　　NEC 基礎・環境研究所　研究部長
原　正彦　　東京工業大学大学院総合理工学研究科　教授
和佐　清孝　　横浜市立大学理学部　客員教授

(参考)
(1)外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	3	168	171
口　頭	499	272	771
その他	40	6	46
合　計	542	446	988

※平成 18 年 3 月現在

(2)特許出願件数

国　内	国　際	計
26	11	37

(3)受賞等
・大古　善久
電気化学会　進歩賞・佐野賞(H16.3)
・加藤　大
日本分析化学会中部支部　奨励賞(H15.8)
・新井　豊子
日本学術振興会ナノプローブテクノロジー第 167 委員会　ナノプローブテクノロジー賞(H17.3)
・一木　隆徳
第 26 回本多記念研究奨励賞(H17.5)
・井出　徹
日本生理学会　入沢記念優秀論文賞(H15.3)

(4)招待講演
国際　55 件
国内　26 件

別紙

「情報、バイオ、環境とナノテクノロジーの融合による革新的技術の創製」領域　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 （応募時所属）	研究費 （百万円）
青柳　隆夫 （兼任）	体外からの刺激情報伝達によるナノデバイス機能制御 （鹿児島大学大学院理工学研究科）	鹿児島大学大学院理工学研究科ナノ構造先端材料工学専攻　教授 （　同上　）	36
安部　隆 （兼任）	マイクロ・ナノマシニングを用いた水晶振動子型分子認識チップの創製 （東北大学大学院工学研究科）	東北大学大学院工学研究科バイオロボテックス専攻　助教授 （東北大学大学院工学研究科機械電子工学専攻　助手）	33
石内　俊一 （専任→兼任）	超臨界流体ジェット法の開発による分子認識メカニズムの解明 （分子科学研究所電子状態動力学部門→東京工業大学資源科学研究所）	東京工業大学資源化学研究所分光化学部門　助手 （慶應義塾大学理工学部　助手）	33
大古　善久 （専任→兼任）	酸化チタン上に析出した銀ナノ粒子の多色フォトクロミズム （東京大学生産技術研究所→（独）産業技術総合研究所）	（独）産業技術総合研究所環境管理技術研究部門　研究員 （東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻　助手）	45
尾上　慎弥 （出向）	集積−融合増幅型ナノ粒子センシングシステムの開発 （理化学研究所）	協立化学産業（株）研究所　研究員 （　同上　）	33
加藤　大 （兼任）	生体システムを集積化した素子・システムの創製と実用化 （静岡県立大学薬学部）	静岡県立大学薬学部　講師 （　同上　）	30
冨田　知志 （専任）	強磁性金属ナノコンポジット膜を用いた Left-Handed Materials の実現と応用 （理化学研究所ナノ物質工学研究室）	さきがけ専任研究者 （理化学研究所ナノ物質工学研究室　協力研究員）	40
森脇　和幸 （兼任）	Si ナノ結晶を増感材とした光導波路増幅器の創製 （神戸大学大学院自然科学研究科）	神戸大学大学院自然科学研究科助教授 （　同上　）	36

浅沼　浩之 （兼任）	生体反応の光制御を目指した人工核酸デバイスの創製 （東京大学先端科学技術研究センター　→名古屋大学大学院工学研究科）	名古屋大学大学院工学研究科　教授 （東京大学先端科学技術研究センター　助教授）	99
新井　豊子 （兼任）	走査型相互作用分光顕微鏡の開発とナノ構造創製への応用 （北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科→筑波大学大学院数理物質科学研究科）	筑波大学大学院数理物質科学研究科　助教授 （北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科　助手）	106
板倉　明子 （兼任）	自己集合膜を利用したストレスの制御とパターニング （（独）物質・材料研究機構材料研究所）	（独）物質・材料研究機構材料研究所　主幹研究員 （　同所　主任研究員　）	83
一木　隆範 （兼任）	微細加工によるナノバイオ情報解析デバイス創製 （東洋大学工学部電気電子工学科→東京大学大学院工学系研究科総合研究機構）	東京大学大学院工学系研究科総合研究機構　助教授 （東洋大学工学部電気電子工学科助教授）	82
井出　徹 （専任→兼任）	バイオナノポアを用いた1分子センサーの開発 （大阪大学大学院生命機能研究科）	大阪大学大学院生命機能研究科特任助教授 （JST 国際共同研究プロジェクト・一分子過程プロジェクト　研究員）	83
井上　将彦 （兼任）	精密分子認識に基づく人工 DNA の創成とナノ材料への応用 （富山医科薬科大学薬学部）	富山大学大学院医学薬学研究部教授 （富山医科薬科大学薬学部　教授）	105
大久保　達也 （兼任）	ナノ空間ネットワークの構築による超集積場の創製 （東京大学大学院工学系研究科）	東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻　助教授 （　同上　）	79
竹内　俊文 （兼任）	テーラーメイド分子集積による機能性三次元空間創製 （神戸大学大学院自然科学研究科）	神戸大学大学院自然科学研究科教授 （　同上　）	126

長谷川　幸雄 （兼任）	ナノサイズ一次元構造の電子物性評価 （東京大学物性研究所）	東京大学物性研究所　助教授 （　同上　）	82
深津　晋 （兼任）	シリコンをベースとする新光機能素子の創製 （東京大学大学院総合文化研究科）	東京大学大学院総合文化研究科 助教授 （　同上　）	86
藤本　健造 （兼任）	光応答型インテリジェント核酸を用いた遺伝子操作法の開発 （北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科）	北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科　助教授 （　同上　）	107

研究課題別評価

1　研究課題名：体外からの刺激情報伝達によるナノデバイスの機能制御

2　研究者氏名：青柳　隆夫

3　研究のねらい：

死亡原因としての悪性腫瘍（ガン）の割合は、最近の医学の進歩にもかかわらず年々増加しており、治療後の社会復帰などを考慮した低侵襲治療の重要性が高まってきている。放射線療法や温熱療法などが知られており、化学療法と組み合わせることによりその効果を増強させることが報告されている。本研究では、ヒステリシス損失によって発熱することが知られている磁性ナノ微粒子および敏感に応答する温度応答性材料を組み合わせることによって、温熱療法と化学療法を同時に実現する温度応答性ナノデバイスを構築した。現在臨床的に応用されているハイパーサーミアのように体外から加温させるのではなく、外部からのリモートコントロールが可能な交流電流による誘導磁場を利用した。さらに、この誘導磁場による発熱によって局所的な温熱効果を発揮させ、その発熱を刺激(情報)として薬物の制御放出を行わせるシステムである。

4　研究成果：

1．ナノ磁性微粒子表面の改質とキャラクタリゼーション

市販のマグネタイト磁性微粒子を入手し、TEMおよびXRDにより評価した結果、約 130nm 程度の比較的球形に近いマグネタイト磁性微粒子であることを確認した。3-aminopropyltrimethoxysilane を用いたシランカップリング反応によりこのナノ磁性微粒子の表面に化学反応が可能なアミノ基を導入した。反応前と比較して、反応後に新たに Fe-O-Si 結合が XPS 測定により確認されたことから官能基の導入を確認した。

2．温度応答性高分子材料の調製と評価

本研究では、温度応答性高分子として水和ー脱水和を可逆的に生起するイソプロピルアクリルアミド(IPAAm)を基本とする共重合体（図１参照）と、結晶ー融解現象を利用できるポリ(ε-カプロラクトン)(CL)について追究した。IPAAm ベースの共重合体については、磁性微粒子表面のアミノ基との反応を行うために、カルボキシシル基を導入したイソプロピルアクリルアミド共重合体を2-カルボキシイソプロピルアクリルアミドを用いて調製した。この共重合体は重合性基の化学構造が同一であるために反応性比が等しく、カルボキシル基が均一に分布した理想共重合体となることが期待された。Kelen-Tudas 法によって実際にその反応性比を評価した結果、ほぼ等しい反応性を確認することが出来た。

一般に固体表面への固定は温度応答性高分子の転移温度を変化させることが知られており、駆動温度の調製を行う必要が出ることが考えられた。そこで、非イオン性の類似ポリマーとして

2−ヒドロキシイソプロピルアクリルアミド(HIPAAm)とIPAAm との共重合体の調製を行った(図1参照)。この共重合体においてはHIPAAm モノマーの導入率にしたがってほぼ比例的に転移温度が上昇することが確認された。すなわち、ナノ磁性微粒子表面への固定化するポリマーの駆動温度をこのモノマーの導入率で制御出来ると考えられた。このモノマーは非イオン性であり、イオン的な相互作用での薬物固定化を想定しているのでそれらには影響しないものと考えられた。

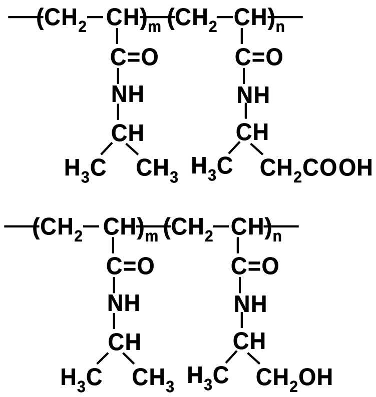


図１ポリイソプロピルアクリルアミド誘導体の化学構造

PCL については、ポリマーの性質としてその転移温度が 60℃付近と生体系での利用を考慮すると高過ぎるために、生体付近で駆動させるための研究を遂行した。鎖長と分岐数を制御して架橋構造を導入することにより、結晶性を制御し、その結果として駆動温度を体温付近に近づけることが出来た。

3．温度応答性高分子固定化と得られたナノ磁性微粒子のキャラクタリゼーション

ナノ磁性微粒子表面のアミノ基とカルボキシル基を有するIPAAm共重合体とを縮合剤を用いて化学結合させた。反応の進行は、XPSにより追跡しアミド基に起因するN_{1s}のピークの増大が観察された。さらに、TEMによる形態観察を行ったところ、磁性微粒子表面に10～20nm程度の高分子層が確認された。この層はナノ磁性微粒子にほぼ同程度の厚さであり、entanglementを起こしてゲル薄膜様の構造になっていると考えられた。

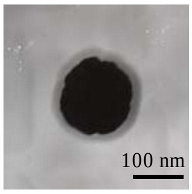


図２　温度応答性高分子固定化ナノ磁性微粒子のTEM写真

4．温度応答性高分子固定化ナノ磁性微粒子の刺激応答性評価

安定な IPAAm ベースの温度応答性高分子層の固定化を確認するために、この高分子の良溶媒あるいは貧溶媒中での微粒子の分散安定性を評価した。その結果、ポリマーの貧溶媒である n−ヘキサン中では微粒子の早い沈殿形成が確認された。固定化に関与しなかったカルボキシル基はナトリウム塩となっているために、水中での長時間にわたる分散安定性が確認された。さらに、この微粒子の温度応答性を評価した(図３参照)。固

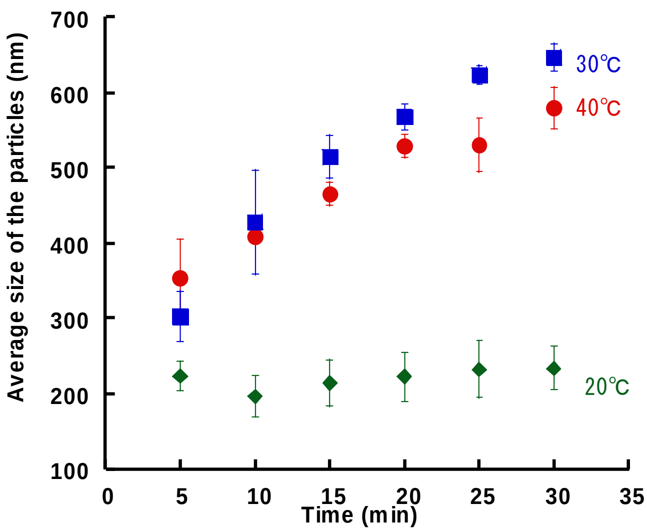


図３　温度応答性高分子を固定化したナノ磁性微粒子各温度の粒径変化

定化に用いた温度応答性高分子は、100mM の NaCl が含む水溶液中で 27℃付近に相転移温度を有することが確認されていることから、20℃、30℃および 40℃でのナノ磁性微粒子の見かけの粒径変化を動的光散乱測定装置により評価した。その結果、温度応答性高分子の相転移温度以下の 20℃では粒径変化は観察されなかった。一方、相転移温度以上の 30℃および 40℃においては、事件経過と共に徐々に粒径が増大する傾向を示した。これは、相転移温度以上で温度応答性高分子が脱水和して疎水化したために疎水性相互作用によって磁性微粒子同士が凝集したためであると考えられた。すなわち、化学固定しても温度応答性高分子が機能したことを示している。

さらに、誘導磁場内での温度応答性何磁性微粒子の挙動を追究した（図4参照）。すなわち、疎水性のオクタデシル基を表面に修飾したシリカ粒子を、カラムに充填し、交流磁場が発生するコイル内に固定した。これに温度応答性磁性ナノ微粒子分散液を流した。交流磁場を発生させない場合は、ナノ磁性微粒子がそのまま流出してきたが、交流磁場を発生させると、ナノ磁性微粒子がカラム内に滞留することが判った。これは、ナノ磁性微粒子が交流磁場に応答して表面が疎水化し、疎水性表面と相互作用したためである。これは、ナノ磁性微粒子が誘導磁場によって発熱し、その熱が微粒子表面に伝わりその結果、脱水和を引き起こし疎水化したことを示している。

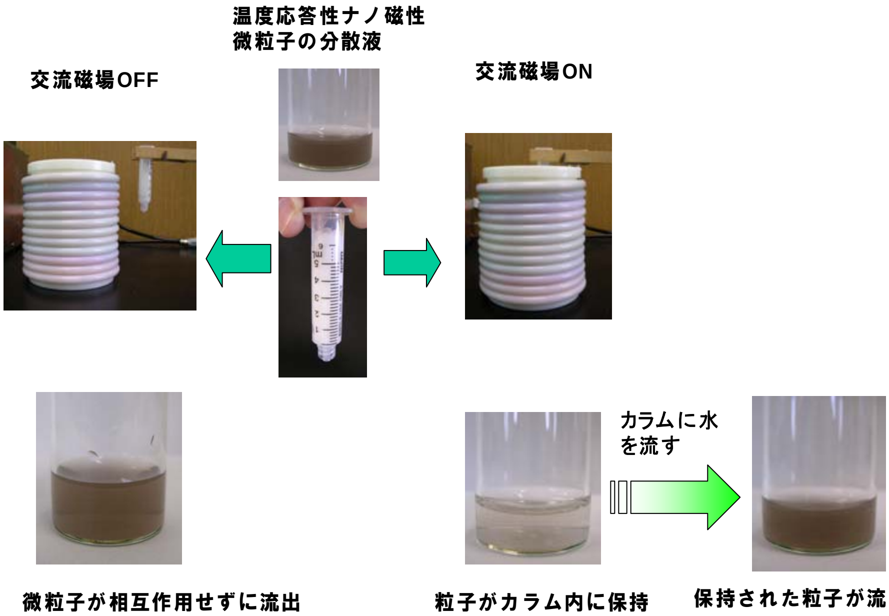


図４　交流磁場に応答した温度応答性ナノ磁性微粒子の流出挙動

5．抗ガン剤の固定化と薬物放出制御

温度応答性高分子の固定化反応に関与しなかったカルボキシル基を利用してアミノ基を有するドキソルビシン静電的な相互作用で固定化を試みた。高分子の固定化の際に、縮合剤のモル比を変化させて未反応のカルボキシル基を残存させ、その官能基を利用した。固定化後の薬物濃度を測定した結果、カルボキシル基の残存率が高いほど薬物の固定化量が多くなることを見いだした。さらに、抗ガン剤を固定化した温度応答性ナノ磁性微粒子を温度応答性高分子の

相転移温度前後の水中に分散させたところ、相転移温度以上で薬物の放出が確認された。すなわちイオン的な相互作用をしていたカルボキシル基が高分子の脱水和によってその解離度が低下してしまったために薬物を放出させたものと考えられた。

5 自己評価:

研究当初、磁性微粒子表面への温度応答性高分子の固定化はそれほど困難であると予想しなかったが、マグネタイト表面へのシランカップリング試薬の反応性が想定していた以上に悪く、さらにその確認に大幅に手間取ってしまったために多くの研究時間が割かれてしまった。しかし、その後、固定化反応に成功し、これまで得ていていた温度応答性高分子の知見に基づいた予想通りに、ナノ磁性微粒子への固定化後も敏感な温度応答挙動を発現することを見いだすことが出来た。交流磁場に応答した温度応答挙動、抗ガン剤の固定化さらには温度変化に応答した放出挙動も確認することが出来た。最終年度は培養細胞での効果の確認まで行う予定であったが時間が不足してしまったのは反省点である。

磁性微粒子と敏感な温度応答性を示す概念は、JSTサテライト宮崎が募集した「実用化のための可能性試験(FS)」に採択され、研究をスタートさせることが出来た。また、別の用途として遺伝子デリバリー用の担体としての可能性も見いだすことが出来た。

また、当初検討した温度応答性高分子として結晶融解型のポリカプロラクトン系材料を用いて、体温付近で駆動することが出来る材料設計に成功した。今後、磁性微粒子との混み合わせによって、新しい磁場応答性の新しい材料展開が可能である。

6 研究総括の見解:

磁性微粒子に交流磁場をかけて加熱し，薬品を放出してがん治療を行なうことは面白いアイディアであり、磁性微粒子に吸着して相転移を起こす高分子を見つけたことは評価できる。しかし、これからはナノ磁性微粒子の腫瘍細胞へのアクティブターゲティングを現実化することが必要である。薬物の放出を確認する成果がえられているが、磁性ナノ微粒子を加熱する誘導磁場を発生するのに大きな電力を必要としている。材料や周波数などの最適化と動物実験などで実用化に向けた研究をさらに進めることが期待される。

7 主な論文等:

論文:

1. T. Kanda, K. Yamamoto, T. Aoyagi, ″N-Isopropylacrylamide-based Temperature-Responsive Polymer with Carboxyl Groups for Controlled Drug Release″, Journal of Photopolymer Science and Technology, 18(4), 515-518(2005)

2. K. Uto, K. Yamamoto, S. Hirase, T. Aoyagi, ″Temperature-responsive cross-linked

poly(ε-caprolactone) membrane that functions near body temperature",
Journal of Controlled Release, 110, 408-413(2006)

3. H. Wakamatsu, K. Yamamoto, T. Aoyagi, "Preparation and Characterization of Temperature-Responsive Magnetite Nanoparticle Conjugated with N-Isopropylacrylamide-based Functional Copolymer",
Journal of Magnetism and Magnetic Materials, in press

4. T. Maeda, T. Kanda, Y. Yonekura, K. Yamamoto, T. Aoyagi, "Hydroxylated Poly(N-isopropylacrylamide) as Functional Thermo-responsive Materials",
Biomacromolecules, in press

（総件数 4 件）

特許：

1） 複合微粒子およびその製造法（出願番号２００４－２４５８４４）

2） 同ＰＣＴ出願（ＰＣＴ／ＪＰ２００５／１１５４５１）

（総件数 2 件）

招待講演：

1. T. Aoyagi, "Stimuli-responsive materials for Nano- and Microtechnology", The Forth International Symposium on Advanced Fluid Information and The First International Symposium on Transdisciplinary Fluid Integration, Nov. 11, 2004, Sendai Japan

2. 青柳　隆夫, "刺激応答性高分子の分子設計とその応用", 第3回高分子医療研究会, 物質・材料研究機構, 2005 年 1 月 31 日, つくば市

（総件数 2 件）

研究課題別評価

1　研究課題名：

　　マイクロ・ナノマシニングを用いた水晶振動子型分子認識チップの創製

2　研究者氏名：安部　隆

3　研究のねらい：

　水晶は，結晶内部の摩擦によるエネルギー損失が低く、優れた機械振動特性を持つことが知られている。 特に、空気、液体とのダンピングによる振動損失が低い厚みすべり振動モードを持つ AT-カット水晶は原理的には原子の吸着も検出することができるほど高感度である。本プロジェクトでは、この水晶にマイクロ・ナノマシニング技術で微細加工を加え、水晶の持つ優れた機械振動特性を限界まで引き出した高性能な振動子を製作評価することを目的とした。さらに、この振動子を配列させたセンサアレイを試作し、温度補償、非特異的吸着評価、ケモメトリック分析等の新たな機能を持つ水晶振動子ベースの計測システムを実現することを目指した。

4　研究成果：

本プロジェクトでは、工学から理学にわたる研究、つまり、センサの加工から、発振回路、ソフトウエアそして計測へと一貫した研究を実施した。特に世界的にQCM研究者がほとんど手をつけていないセンサ加工部に重点をおいた。振動子加工の研究の大勢は通信用振動子の開発にあり、金額的に圧倒的なマイノリティである QCM へはその技術がそのまま転用されている状況である。そのため、研究者の大部分はセンサに修飾する膜の研究を重用視しほとんど手がけられていなかった。これは大きな賭けであったが、実際の計測においても従来の通信用振動子の流用品では測れない現象を測定できるなど幸いにも大きな成果につながった。

（1）振動子加工技術に関した技術進歩

　従来の水晶微細加工技術は主に機械研磨と湿式加工技術で行なわれてきた。本研究では、乾式加工（深掘反応性イオンエッチング）技術をベースにして水晶のダメージを減らしてかつ高速加工が可能な技術の開発を進めた。すでにその研究当初からその加工技術を有していたが、添加ガスとその組成を工夫し未加工と同等の Q 値（エネルギーの損失の程度を示す因子）を得ることに成功した。具体的には、アルゴン、キセノンといった希ガスを添加することにより加工面をより鏡面にすることができ、さらに Q 値の改善にも成功した。分子レベルの吸着挙動を観察する場合には不可欠な加工技術である。

（2）高性能振動子のミニチュア化

　本プロジェクトの開始時に4つの振動子のアイデアとその製造工程を提案したが、（a）振動子を

レンズ形状にする方法と(b)逆メサ形状に加工する方法についてのみ構造の最適化に成功した。
(a)のレンズ形状の振動子のねらいは振動子の中央部に質量が分布する振動子形状による安定性の向上にある。つまり、1Hz 以下の周波数で測れるようにすることにある。この振動子の形状は、ホトレジストをレンズ形状にしてドライエッチングで転写するという方法で実現した。この考え方は、将来、水晶振動子製造のスタンダードになるものと期待される。半導体マイクロマシニングを用いるために量産性に優れており、加工時間も数十分と短時間で完了する。従来技術では数日から数週間必要である。振動子の厚さ分布のばらつきも小さく隣接振動子との共振周波数差は50ppm 以下である。また、振動特性も優れており、Q 値は未加工の場合の2倍程度になる。振動子の裁断面をレンズ外縁にまで小型化した場合においては一桁も改善した。
(b)の逆メサ形状の振動子のねらいは高周波化による感度向上にある。これは、1Hz あたりの質量感度が厚さの自乗に逆比例する理論を根拠としている。100μm 加工しても表面粗さが nm のオーダーの加工技術を開発しこれを用いて高周波振動子のアレイを試作した。支持損失が低減できる最適なサイズを振動子の直径が200μm から1mm の範囲において見いだした。逆メサ構造は液体等の負荷により不安定になりやすいためガスセンサなどのような振動子への質量負荷が低い目的に適している。
以上のように、半導体マイクロマシニングを用いた水晶振動子製作の方法論と実際に製作する技術を確立し、得られた振動子の性能が優れていることを実証した。

（3）計測システムのプロトタイプの試作

振動子アレイを用いてセンシングする場合には、アレイ間の周波数応答の違いを評価する特別な装置が必要である。高周波スイッチとネットワークアナライザーを用いて多チャンネル振動子を評価する二次元センサ評価装置と2チャンネルで環境ドリフト補償を目的とする装置を開発した。

多チャンネルタイプでは、256ch の振動子の共振周波数変化を記録できる。この装置による信号集録の時間分解能は4分程度であり、最終的に検知対象が吸着したかどうかの親和力の差を判断する目的には適するが実時間で計測するその場測定の目的には適さない。環境補償ができることは実証したが、センサの歩留まりや性能分布の一括評価などにしか使用できなかった。多チャンネル振動子は表面修飾技術の自動化など課題が多く、また、ついたかつかないかだけの評価であれば蛍光標識を用いる他の研究手法に対して競争力がないことが見えてきた。

2チャンネルタイプは、環境ドリフトが完全に補償できるようになれば次世代QCMとして有望になるであろうという判断から研究を進めてきた。2つの振動子を同一ウエハ上で製作すると、共振周波数、周波数の温度係数が揃ったものが製作できる長所がある。別に製作したものを使用するとその確認が不可欠になるとともに、振動子間の距離が離れてしまうのが難点である。発振回路間は基本的に電磁シールドがされていれば干渉しない。同一ウエハ上で製作しているためにセンサチップ上での機械的振動結合が問題であるが、振動カップリングが全く観察されないレベルの振動子アレイを製作できたので干渉は見られなかった。実際、片方の振動子への質量負荷に対して、1000Hz 変化しても全く周波数変化を示さなかった。また、試料用振動子から参照用振動子の共振周波数を引いて環境ドリフトをリアルタイムで除去し表示するソフトウエアを開発した。測定時間は

連続で一週間近く記録できるようにし研究室で使用できるレベルの測定システムの試作には成功した。

（4） 外乱下における界面現象のその場測定の実現へ

試作した測定システムを用いて、紫外線を照射する、マイクロポンプより高温に熱したガスを導入するなどの環境操作を加えて、環境ドリフトを除去できるかどうか調べた。紫外線照射に関しては 0 から 30mW/cm^2の照射強度の範囲で検討し、環境ドリフト除去を 0.6Hz以下にまでおさえることに成功した。高温に熱したガス導入についても 100 度程度の温度差ではほぼ完全な環境ドリフトの除去ができた。従来のQCMではほぼ不可能な温度や光などのアクティブな環境操作下で計測に利用できそうである。また、振動子の安定も優れており、環境制御なしで4日間に2Hz以下の周波数変動しかみられず、長期にわたるサブ原子層レベルの質量変化を記録できることが実証された。これはQCMを利用した経験がある研究者には驚きの性能である。

以上の性能を試すために実際の物性測定への応用を試みた。行なった実験は、試料用振動子の表面にアルキルチオール自己組織化単分子膜を修飾し紫外光を照射して光酸化反応をその場測定することである。チオールは 254nm の光で酸化しチオレートになることが知られている。これらの知見は、XPS や SIMS を用いた測定から既に得られているがその場測定ではないことに注意したい。我々の方法では、紫外線照射下（熱変化も伴う）で、一週間にわたるようなゆっくりとした反応をサブ原子層レベルの感度で追うことができる。測定の結果、予想される光酸化に伴う質量増加による周波数低下を観察したが、その変化が多段であることを見いだした。つまり、酸化反応はまず一つ目の酸素がすべてのチオール基に反応するまでは次の酸素が反応しないことを示している。これは、一見、当たり前のような結果であるが外乱下で長期間に渡る反応をサブ原子層レベルでその場測定できる手段がなかったためにこれまで測定した例はない。

以上のように、徐々にではあるが、基礎研究における先端計測機器としての潜在力が見えてきた。今後、基礎研究応用においてさらなる展開が期待される。

5 自己評価：

分子認識チップの創製が本プロジェクトのゴールである。外乱下で原子層レベルの感度を維持したまま感応膜間の親和力の差を測定するチップ開発に成功した。つまり、チップの創製という意味ではゴールしたと思う。また、研究室で利用するには十分なレベルの測定システムのプロトタイプも完成し、今後の研究展開が楽しみである。しかし、計測機器開発の醍醐味は他の方法で測れないような測定例を示し未知の現象を解明することにある。その点から判断すると、一例は示せたものの論文執筆開始の段階にたどり着くのがようやくであり少し不満が残るものとなった。この研究成果の持つ真のポテンシャルをこの成果報告書の段階で公知にできなかったのは残念である。いずれにしても、研究を継続し発展させるためにどう世の中に説明し理解してもらうかが今後の課題であり、今回の自己評価は中間評価と捉えるぐらいの気持ちで奮起したい。

6 研究総括の見解：

新しい原理に基づいたものではないが、マイクロ加工を応用することによって古典的な振動子の

極限的特性を得るという、工学的に面白く、最も実用化に近い研究の一つであった。明確な方針の下に着実な研究を重ね、種々の試みを行って、超小型、2チャンネル型による実用化の狙える技術を作り上げたことは評価でき、現段階でも商品化されれば多くの需要があると思われる。ある程度見えていた目標設定ではあったが、計画通りに目標を達成したことは大いに評価できる。また、領域内の他の研究者に対する積極的な研究協力も評価できる。開発した技術をもとに、さらに各種の応用へ展開・実用化することが期待される。

7 主な論文等:

論文(4 件)

[1] Li Li、Masayoshi Esashi、Takashi Abe, A miniaturized bi-convex quartz-crystal microbalance with large-radius spherical thickness distribution, *Appl. Phys. Lett.*, 85, 2652-2654 (2004)

[2] Li Li, Takashi Abe, Masayoshi Esashi, Fabrication of miniaturized bi-convex quartz crystal microbalance using reactive ion etching and melting photoresist, *Sens. and Actuators A*, 114, 496-500 (2004)

[3] Li Li, Takashi Abe, Masayoshi Esashi, Smooth surface glass etching by deep reactive ion etching with SF6 and Xe gases, *J. of Vac. Sci & Tech B* 21, 2545-2549 (2003)

[4] Xinghua Li, Takashi Abe, Masayoshi Esashi, Highly selective reactive-ion etching using CO/NH3/Xe gases for microstructuring of Au, Pt, Cu, and 20% Fe-Ni, *J. of Vac. Sci & Tech B* 21 2159-2162 (2003)

投稿準備中(2件)

Takashi Abe, Xinghua Li, In-situ measurement of photooxidation of alkylthiol self-assembled monolayer by dual-channel quartz crystal microbalance, ,manuscript in preparation.

Takashi Abe, Eiji Sakata, Xinghua Li, Dual-channel quartz crystal microbalance for sensing under active environmental disturbances, manuscript in preparation

特許(2件)

[1] 安部隆、李麗、江刺正喜「圧電材料の加工方法」特願2003-142894(PCT出願)

[2] 安部隆、李麗「圧電素子の製造方法」特願2004-25780(PCT出願)

受賞(1件)

坂田英治(メンバー)、江刺正喜、西澤松彦、安部隆 平成17年度電気学会全国大会優秀論文発表賞(内定)

招待講演(1件)

Takashi Abe, Miniaturization of AT-cut quart-crystal resonators by using deep RIE technology
345th WE-Heraeus-Seminar on Acoustic-Wave-Based Sensors, 2005 年 4 月, Germany

国際会議(9 件)、国内会議(12 件)

研究課題別評価

1　研究課題名：超臨界流体ジェット法の開発による分子認識メカニズムの解明

2　研究者氏名：石内　俊一

3　研究のねらい

分子レベルの機能を活用することにより、飛躍的な高度集積化・高機能化を達成するということが、ナノテクノロジーの1つの目標である。生体分子は正にその 1 つの究極的な解答であり、生体分子を模倣することにより、或いは改造することにより新たな人工分子（「ナノテク分子」）が合成されている。ところが、このような研究において、そして、生体分子そのものの研究において、それらが分子レベルでどのような構造をとり、また機能発現においてどのような構造変化或いは化学反応を起こしているかという詳細な情報を得るための分析手段が欠如している。この問題に答えるために、超音速ジェット・レーザー分光法を用いることを着想した。

超音速ジェット法とは、気体試料を希ガスとともに直径数百 μm 程度の小孔より真空中に噴射し、断熱膨張効果により極低温まで冷却された非平衡分子流（超音速ジェット）を得る方法である。超音速ジェット中の気体試料分子は、並進速度が揃うため分子間衝突のない状態であるだけでなく、分子の回転・振動状態及び電子状態などの内部エネルギー状態が最低エネルギー状態となる。ジェット中で分光スペクトル測定を行うと、極めて先鋭化したスペクトルが得られるため、レーザー分光法と組み合わせることにより、分子の構造やダイナミクスに関する極めて詳細な情報が得られる。

従来の超音速ジェット・レーザー分光法の問題点は、気体分子或いは容易に気化できる分子にしか適用できないことである。この問題を克服しない限り、上記分子に対してこの方法を適用することはできない。そこで本研究では、不揮発性物質の超音速ジェットを得る新たな方法として、超臨界流体ジェット法を提案する。この方法は、不揮発性試料を超臨界流体に溶解し、その溶液をそのまま真空中にジェット噴射することによって、不揮発性試料の超音速ジェットを非加熱で得るという方法である。

本研究は、超臨界流体ジェット法を実現するための装置を開発し、ナノテク分子或いは生体分子の新たな分光学的研究手段を開拓することを目的としている。またその応用として分子認識メカニズム解明の一環として特に神経伝達物質の気相レーザー分光研究を試みることを目的とした。

4　研究成果：

図1に本研究で開発した超臨界流体ジェット法を実現するための装置の概略図を示す。装置は超臨界抽出部、超臨界ジェット発生部及び質量分析部よりなる。超臨界抽出部では、超臨界流体発生装置で生成した超臨界流体を試料ホルダーに導き温度・圧力をコントロールしながら試料を超臨界流体中に抽出する。得られた超臨界溶液を超臨界流体発生部に導入する。超臨界溶液は

100 気圧以上の高圧流体であり、これをジェット噴射しながら且つ高真空雰囲気に保つ必要がある。そのために開閉時間が非常に短い電磁パルスバルブを用いた。パルスバルブは高速に開かないと減圧作用を示すためジェット冷却効果が得られない。特に高圧下では開閉弁に大気圧下よりも数百倍の圧力が掛かっているため、高速に開くことが困難になる。本装置においてはソレノイドに数百アンペアの大電流パルスを印加することにより、瞬間的に巨大な磁力を発生させ、100 気圧程度の高圧化での高速バルブ開閉を可能とした。ジェット噴射部はジェット噴射時に 10^{-5}–10^{-4} Torr程度の真空度となるため、より高真空度（10^{-7} Torr程度）を必要とする質量分析部と接続するために、超臨界流体ジェットをイオン化室に導入する前に差動排気室を設け、差動排気室及びイオン化室をそれぞれターボ分子ポンプで排気し、質量分析装置内の高真空度を維持できるようにした。質量分析部には、Wiley-McLaren型飛行時間質量分析器を自作し、イオン検出器には一般的に用いられるMCPに比べて高感度なDaly検出器（ダイノード・コンバータ）を自作した（一般的な高感度検出では、ゲインを飽和させたMCPのスパイク信号をカウンティングするが、本研究ではレーザー分光測定を行う都合上通常のイオン電流強度計測方式を採用した）。Daly検出器からの信号をデジタルオシロスコープ／パーソナルコンピューターを用いて捕捉し、質量スペクトル・レーザー分光スペクトルを測定するためのソフトウエアを自作した。

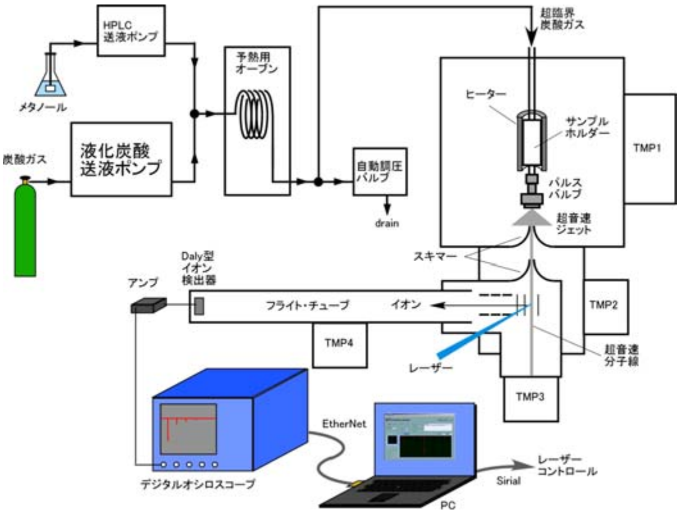


図１ 超臨界流体ジェット質量分析装置の模式図

以上の装置を用いて超臨界流体ジェット法の検証実験を行った。試料として 1-ナフトール（図 2 参照）を用いた。1-ナフトールを 50℃, 100 気圧で超臨界CO_2に溶解し、超臨界パルスジェットを発生させた。

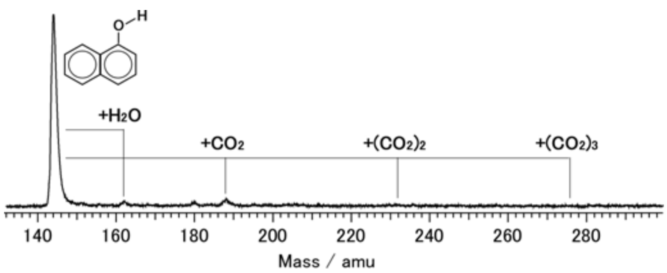


図2 1-ナフトールの超臨界流体ジェット・レーザーイオン化質量スペクトル

これを紫外レーザーでイオン化し質量分析・検出した。得られた質量スペクトルを図 2 に示す。当初、1-ナフトールに多量のCO_2が付着したクラスターの生成を懸念したが、質量スペクトルから明らかなようにそのようなクラスターは生成しておらず、1-ナフトール/CO_2 1：1クラスター及び 1-ナフトール/水 1：1クラスターが僅かに観測されるのみあった。次に、1-ナフトールのピークをモニターしながらイオン化用の紫外レーザーを波長掃引し、イオン化効率の紫外レーザー波長依存性（REMPIスペクトル）を測定した（図 3a）。この場合、紫外レーザーの波長が 1-ナフトールの電子遷移エネルギーに共鳴したときのみ急激にイオン量が増大するため、スペクトルのピークは 1-ナフトールの電子遷移に対応する。図 3 に示された最も低波数側のピークは 1-ナフトールの電子基底

状態零振動準位から第 1 電子励起　ャ
ープなピークが観測され、十分なジ

　純粋なCO_2だと抽出力が小さく、より高濃度の超臨界抽出を行うために超臨界CO_2に微量のメタノール（エントレーナー）を添加した。その結果、REMPIスペクトルのS/Nは大きく改善し（図3b）、またエントレーナーがジェット冷却効果に影響を及ぼさないことも確認した。

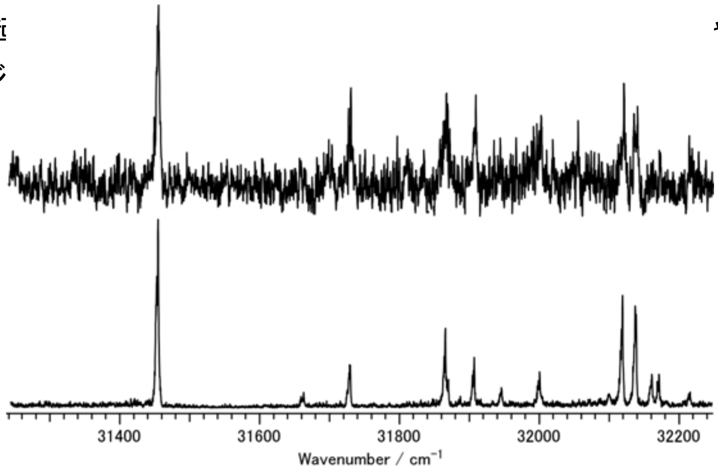


図 3　1−ナフトールの超臨界流体ジェット・共鳴 2 光子イオン化励起スペクトル
a）超臨界CO_2　b）エントレーナー（メタノール）を添加

　パルスジェット法はパルスバルブの使用限度圧力があるため、より高圧での超臨界抽出を行うために、そのような制限のないピンホールノズルによる連続ジェット法を試みた。この方法は文字通り、連続的に高圧ガスを高真空中に導入するため、高い排気速度と微細なピンホールノズルが必要である。本研究では口径５μm のピンホールノズルを製作した。この方法でも、十分なジェット冷却効果が得られることが分かったが、真空槽中の高真空を維持するのが難しく、装置的には更に排気速度を上げる必要がある。

　最後に、連続ジェット法を用いて神経伝達物質の1つであるカプサイシンのスペクトル測定を行った。カプサイシンは、「痛み」に関連した物質であり、カプサイシンが受容体に結合することにより代謝が促進されるため肥満解消への利用や、またカプサイシン様物質による新しい鎮痛剤への応用などで注目されている。また、最近のテロ問題に関連して催涙ガスなどに含まれるカプサイシンのリアルタイム微量分析技術の確立が課題となっている。図4にカプサイシンの連続超臨界ジェット・レーザーイオン化質量スペクトルを示す（マス校正のためにヒドロキノンを添加した）。電子衝撃イオン化ではフラグメンテーションが激しく親マスはほとんど観測されないが、本方法では親マスのピークが明瞭に観測された。分光研究のみならず、質量分析の新たな方法としても注目に値するものであると思われる。今後、カプサイシンと水、アミノ酸等の錯合体の分光研究を行う予定である。

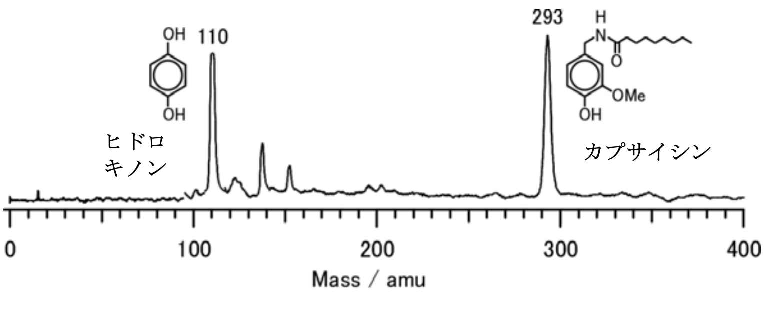


図4　カプサイシンの超臨界流体ジェット・レーザーイオン化質量スペクトル

5　自己評価

　本研究の目標は、1）超臨界流体ジェット法の確立、及び2）これを用いた生体分子、特に神経伝達物質に関する分子分光学研究である。1）に関しては、超臨界発生装置以外は全て装置を自作

し、超臨界流体ジェット法の原理検証、及び最適化を行った。特許出願も行い、目標は十分に達成された。また、超臨界流体ジェット法におけるジェット冷却過程がこれまでの超音速ジェット法とは異なった様相を呈していることが分かり、超臨界流体そのものの研究においても興味深い側面をもつことが明らかとなった。一方2)に関しては、超臨界流体ジェット法の最適化にほとんどの時間を費やしてしまったために、研究期間の終盤でようやく入り口までたどり着いたところである。今後、こちらの研究に関しては継続して進めていきたい。本研究を通じて、超臨界流体ジェット法の新しい分析方法として重要性を示すことができ、新しい分析技術の確立を目的とした別のプロジェクトに発展しており、環境分析への貢献への第一歩となった。

6 研究総括の見解

最初の装置開発と、それを用いた通常分子の高分解能測定までは迅速だった。その後高圧高速ノズルの技術的問題に遭遇しながらも、問題を明確にして、未踏技術だった超臨界流体を用いた超音速ジェット法を立ち上げた。魅力的なターゲットの設定とそこに至るまでの課題およびマイルストーンを非常に明確にした研究開発を行い、ほぼ目標を達成したことが高く評価される。是非神経伝達物質の分光や分子認識メカニズムの研究に発展させ、また広く使われる装置となるように発展させることを期待する。さらに成果を論文として発表することが必要である。

7 主な論文等

特許出願

「超臨界流体ジェット法及び超臨界流体ジェット質量分析装置」

機構整理番号：N081P16

出願番号：特願 2004-053391

発明者：石内俊一

招待講演等

1)防衛医科大学校　医用電子工学講座オープンセミナー (2004/11/9)
「超臨界流体ジェット分光法の開発による生体関連分子へのアプローチ」

2)学振マイクロビームアナリシス第141委員会　第118回研究会 (2004/12/8)
「超臨界流体ジェット法の開発による生体関連分子の気相分光研究へのアプローチ」

3)横浜市立大学大学院総合理学研究科セミナー (2005/1/31)
「生体関連分子の気相分光のための超臨界流体ジェット法の開発」

4)先端的レーザー分光の若手シンポジウム(理化学研究所) (2005/11/11)
「超臨界流体ジェット・レーザー分光法の開発」

新聞報道

日経産業新聞 2004 年 4 月 8 日(木曜日)7 面

「生体分子の結合計測―科学技術振興機構、機器を開発」

研究課題別評価

1　**研究課題名**：

酸化チタン上に析出した銀ナノ粒子の多色フォトクロミズム～新現象の機構解明と応用展開

2　**研究者氏名**：大古　善久

3　**研究のねらい**：

提案者は、酸化チタンに紫外線を照射して光触媒反応で析出させた銀微粒子（褐色）に対し、室温・空気下で特定の波長の光を照射することにより、その波長に対する光透過性を高め、照射した光の色と同じ色に試料が着色できることを見出した。白色光を照射すれば、ほぼ透明にすることができる。また、再度紫外線を照射すると再び褐色に着色する。従来のフォトクロミズムでは異なる複数の色の材料を組み合わせないとマルチカラー化は難しかったが、この非常に容易に作製できる見かけ上一様な材料でマルチカラー化が達成された。暗所で一日以上色を保持し、室内灯下でも少なくとも数時間色を保持できる。レーザーを使えば、短時間で複数の波長で吸光度が減少し、ホールバーニング的な挙動を示す。本研究では、この新現象の機構解明と、可逆に書き込み・消去のできる電子ペーパーなどのマルチカラー表示材料や多重記録材料としての応用展開を進めることを目的とした。

4　**研究成果**：

⑴ 色固定技術の開発

提唱機構の一つに、大きさや形などが異なる銀ナノ粒子がランダムに存在することから、個々の銀ナノ粒子が持つプラズモン共鳴特性が異なるであろう、そして単色光照射によって選択的に光酸化を受けるものの、紫外光照射によって元の銀ナノ粒子に戻るであろう、というモデルが考えられた。これが正しいならば、例えば青色光照射により生じたAg^{+}を水に溶出させれば、その後、もし紫外光を照射しても、青色の光を吸収する銀ナノ粒子は形成されず、青色の保持や再現が可能になるものと考えられた。そこで、例えば、銀ナノ粒子を析出させた試料を純水中に入れ、試料の中央部分をスポット状に青色単色光（460　nm）で照射してみると、青く着色した部分が仮に白色光下で白色となっても、紫外光を照射すれば、褐色に戻らず、青色が再現できた。これとは別に、紫外線照射による光触媒反応で銀ナノ粒子を調製する際、青い光を同時に照射することで、異方性を持つ粒子の生成が抑えられ、単色光照射に対して吸収のホールが一つだけできるようになることを確認した。（J. Am. Chem. Soc. 126, 3664-3368 (2004)）

⑵ 退色速度の制御

発色･退色の化学的機構について、可視光照射により励起された銀の電子が空気中の酸素に捕捉され、Ag^{+}が生成するものと考えている。その場合、銀への酸素の供給を抑えることで、退色を抑制できると考えられた。そこでオクタデカンチオール等を銀ナノ粒子へ吸着させることで、退色の減速を試みた。その結果、3　日以上色を保持させることが可能になった。この試料に紫外光を

照射すれば、チオール修飾剤は光触媒反応の酸化力で完全に分解されるため、また元のフォトクロミック特性が回復することを示した。(Chem. Commun., 10, 1288-1290 (2005).

⑶ 電気化学的に析出させた銀の多色フォトクロミズム

光触媒法ではなく、電解析出法によって銀ナノ粒子を様々な材質の多孔質膜に担持して、その多色フォトクロミック特性について調べた。その結果、酸化チタン膜でも酸化亜鉛膜でも電析した銀に多色フォトクロミック特性があることが確認できた。つまり光触媒反応は多色フォトクロミズムには必要な条件ではないということがわかった。一方、酸化ケイ素膜やITO膜ではほとんど変化しなかった。酸化チタンと酸化亜鉛は光触媒活性を持つ半導体で、銀のプラズモン電子の電荷分離に有利な条件を与えているものと考えられ、実際に電気化学的手法により銀から酸化チタン膜へ一部電子移動していることが確認できた。酸素への電子移動を補助する別の金属ナノ粒子を担持すれば色変化速度が速まるものと期待されたが、元々の酸化チタンに高い光触媒能(すなわち高い酸素還元能)があるため、小幅な改善に留まった。(Phys. Chem. Chem. Phys., in press.)

⑷ プラズモン選択的な銀の光酸化反応の実証

これまで、酸化チタン微粒子膜の細孔内に銀ナノ粒子が生成することが必要条件の一つと考えてきた。しかし、原理的には、銀のプラズモン共鳴を光励起することで始まる反応であり、酸化チタン膜の内部でも外部でも赤い光に対してプラズモン共鳴を示す銀は赤い光に応答して化学反応を起こすものと考えられた。酸化チタン表面だけに銀が存在する条件で多色性が確認できれば、銀の形態変化や状態変化を結論付けられる。そこで、酸化チタン単結晶などを用いて検討を行ったが、現在は酸化チタン微粒子膜に銀ナノ粒子を物理的に乗せるという操作で、光学顕微鏡観察と分光分析からプラズモン選択的に銀ナノ粒子が光酸化を受け、共鳴強度が大きく減少したり共鳴波長がブルーシフトする現象を確認できた。(in preparation.)

5 自己評価:

本研究は、光照射によって物質の色が様々に変わる、しかも照射した光と同じ色に着色する、そして元の褐色に光で戻るという、新しいフォトクロミズムを見出した時にスタートした。反応機構の解明に重心をおく一方で、色強度や着色速度の制御という応用を意識した検討も行った。幸いにも、第一報がNature Materials誌に掲載された。また、朝日新聞などの一般紙にも掲載されたことで認知度が高まった。現在の職場(産業技術総合研究所)に移ってからも、私を探し出し、つくばにお越しいただく方も多く、研究を進める上で大変励みになっている。

研究開始当初、多くの課題が想定された。他の金属ではどうか、他の半導体ではどうか、他の調製法ではどうか、銀はどう変化しているのか、酸化チタン側へ電子が流れているのかなど、挙げれば切りがない。観測法や測定法にしても、電子顕微鏡や光学顕微鏡を始め、様々の手法が考えられた。既に反応雰囲気を変えた検討から銀の酸化反応による色変化であることがわかっていたので、電気化学的手法を一つの柱としたが、独自の技術を開発するため、あえて困難な銀を見る(銀ナノ粒子の変化を可視化して示す)ことに研究をフォーカスさせた。本材料は簡単に作製できることを特徴とする一方で、酸化チタンに対して銀ナノ粒子の量が極微量であることと、吸収のホールの形成能が材料によってはっきりしない場合が多く、また反応速度が遅いことが、研

究の進捗を遅くした最大の原因である。しかし、自分しかこの仕事を手がけられないという責任感と期待を胸に、できる限りの努力をしてきた。

本研究のポイントは、銀ナノ粒子固有のプラズモン共鳴を選択的に光励起することによって、自己酸化反応を引き起こすことである。これはまだ考察の域を出ていなかったが、研究期間の最後になって、ようやく実験的な証明となる結果を得ることができ始めた。研究期間内での 2 度の人事異動のロスを乗り越え、落ち着いた研究環境でこそ得られた大きな成果といえよう。特に最後の 1 年は、本研究領域の尾上氏と田丸氏に大変お世話になった。今後銀ナノ粒子の挙動を詳細に調べることで、銀ナノ粒子の光変化に関する理解が深まり、新しい材料開発の起点となることを期待している。現在の職場の総合力を大いに活用し、銀ナノ粒子の光制御は基より光メモリーやセンサーなど新しい展開を目指して検討を進めているところである。

本研究を行う機会を得たのは藤嶋　昭　神奈川科学技術アカデミー理事長（東京大学名誉教授）、窪田吉信　横浜市立大学医学部教授の共同研究に参画させていただいたことによる。酸化チタン光触媒を利用した抗菌性の材料開発という応用研究の中で、偶然起こったサンプルの色の違いを調べることから始まった。多くの学生諸子、立間徹　東京大学生産技術研究所助教授のご協力に感謝している。

6　研究総括の見解：

光で書き込み・消去できるという興味ある表示材料Ag/TiO_2に関する研究である。本人が発見した照射光と同じ色に発色する現象について、種々の切り口から迫って、Agナノ粒子のプラズモンが関与する現象を実際に確認し、その基本的着色機構を明らかにしたことは評価できる。粒子サイズとプラズモン波長の関係、微粒子のライプニング機構など物理研究者との対話による理論的展開があれば、さらに発展していたと考えられる。一方で期待される応用面への展開が今少しあってもよかった。最後にこれまでの結果をきちんとした論文にまとめることが必要である。

7　主な論文等：

原著論文

(1) “Multicolor Photochromism of TiO_2 Films Loaded with Silver Nanoparticles”, Y. Ohko, T. Tatsuma, T. Fujii, K. Naoi, C. Niwa, Y. Kubota, and A. Fujishima, *Nature Mater.*, 2, 29-31 (2003).

(2) “TiO_2 Films Loaded with Silver Nanoparticles: Control of Multicolor Photochromic Behavior”, K. Naoi, Y. Ohko, and T. Tatsuma, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3664-3368 (2004).

(3)“Switchable Rewritability of Ag-TiO_2 Nanocomposite Films with Multicolor Photochromism”, K. Naoi, Y. Ohko, and T. Tatsuma, *Chem. Commun.*, 10, 1288-1290 (2005).

(4) “Electron Transport in Silver-Semiconductor Nanocomposite Films Exhibiting Multicolor Photochromism”, K. Kawahara, K. Suzuki, Y. Ohko, and T. Tatsuma, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, in press.

総説・解説

(1) "Ag担持TiO_2膜の多色フォトクロミズム", 大古善久, 立間　徹, 会報光触媒, 11. 52-55 (2003).
(2) "Ag 担持酸化チタンの多色フォトクロミズム", 大古善久, 立間　徹, セラミックス, 39, 545-546 (2004).
(3) "Ag担持TiO_2膜の多色フォトクロミック特性の制御", 大古善久, 直井憲次, 立間　徹, 会報光触媒, 14. 16-19 (2004).

著書

"光触媒-基礎・材料開発・応用-, 第 2 編　光エネルギー変換に向けた光触媒材料の開発　-水分解による水素製造から光機能材料の開発まで-　第 4 章　光機能材料への展開　4.4　銀/酸化チタン複合系光触媒の多色フォトクロミズム", 大古　善久, 立間　徹, エヌ・ティー・エス, 東京, 479-481 (2005).

受賞

(社)電気化学会　進歩賞・佐野賞

招待講演

(1) "Multicolour photochromism of TiO_2 films loaded with silver nanoparticles", Y. Ohko, T. Fujii, K. Naoi, T. Tatsuma, and A. Fujishima, Third International Symposium on Biomimetic Materials (BMMP-3) (Nagoya, Japan) (平成 14 年 1 月).
(2) "Ag担持TiO_2膜の多色フォトクロミズム", 大古善久, 立間　徹, 第 3 回光触媒研究討論会 (東京) (平成 15 年 7 月).
(3) "Multi-color photochromism of TiO_2 films loaded with silver nanoparticles", Y. Ohko and T. Tatsuma, The 10th International Display Workshops (Fukuoka, Japan) (平成 15 年 12 月).
(4) "Multicolor Photochromism of TiO_2 Films Loaded with Ag Nanoparticles", Y. Ohko and T. Tatsuma, 205th Meeting of The Electrochemical Society (San Antonio, USA) (平成 16 年 5 月).
(5) "Ag担持TiO_2膜の多色フォトクロミズムの制御", 大古善久, 直井憲次, 立間　徹, 第 4 回光触媒研究討論会(東京) (平成 16 年 7 月).
(6) "Plasmon Resonance-Induced Changes of Silver Nanoparticles on Titanium Dioxide", Y. Ohko and S. Matsuzawa, The European-Japanese Initiative on Photocatalytic Applications and Commercialization (Tokyo, Japan) (平成 17 年 7 月).
(7) "無機系マルチカラーフォトクロミズム", 大古善久, 光化学技術講習会「光化学の応用技術と測定法２００５」ー フォトクロミック材料の最新技術と計測法　ー(東京) (平成 17 年 12 月).

学会発表

国内学会　計 20 件

国際学会　計 6 件

研究課題別評価

1　研究課題名：

　　集積−融合増幅型ナノ粒子センシングシステムの開発

2　研究者氏名：

　尾上　慎弥

3　研究のねらい：

　原子や分子、複雑系分子集合体に至る物質群の高感度センシング材料として、無機ナノ粒子が注目されている。 本研究では、ナノ粒子を利用した実用化に向けた超高感度ナノ粒子センシングシステムの開発を目指す。ナノ粒子表面に空間的、機能的に配置した有機被覆剤の特異部位において、ターゲット(生体関連物質、低分子、イオン、媒質などの環境変化)を認識して、被覆剤の脱離などによりナノ粒子を不安定化させ、その結果引き起こされる粒子の集積さらには粒子間の融合によって分光学的な増幅効果を狙う。有機化学的アプローチおよびナノ粒子のハンドリング技術・作成技術に基づき、ナノ粒子のセンシング材料としての幅広い可能性を探る。

4　研究成果：

(1)有機被覆剤の合成とナノ粒子の調製およびナノ粒子の安定性－不安定性の探索

　金属に親和性のある低分子アミン、オリゴアミン、脂肪族および芳香族硫黄化合物の系統的合成を行った。その際、モジュール化を念頭に置き、金属吸着部位　－　リンカー　－　機能性（認識）部位と分けて被覆剤構成成分を合成した。特に標的物質を金属イオン、P，Sb，As（V族）化合物やオリゴペプチド（酵素反応に使用）とし、　例えば、V族化合物を補足可能な糖鎖プールを形成させるためのオリゴ鎖などを合成した。これらの化合物を用いて、被覆剤の系統的合成を行い、これらの被覆分子を用いて金属ナノ粒子の調製を行った。調製時にナノ粒子の形成が可能なもの、そうでないものに分類し、さらに有機物が安定に被覆して粒子が形成したものについては、沈殿が生じるかどうかを紫外可視分光光度計や透過型電子顕微鏡などから検討した。調製されたナノ粒子は、ナノ粒子がうまく形成されないか、極めて安定で標的物質の添加物によっても脱着やナノ粒子の沈殿を誘起する事はできなかった。　残念ながら、融合をスムースに誘発し得る準安定あるいは不安定性を内在するナノ粒子を調製（ナノ粒子の安定と不安定を有機的に制御すること）するにはいたらなかった。しかしながら、数多くの被覆剤と多様な調製条件下でのナノ粒子の調製例から、多彩な官能基を表面に持つ“安定な”金属ナノ粒子が調製できた。引き続き本研究に準じるセンシング素材として用いたい。

(2)有機化学的アプローチによるナノ粒子の液体媒体中への分散性の向上と加熱による分散・集積の制御

　従来からその等方的性質から各種媒体に対する混和性・分散性が低いとされたナノ粒子の分

散性を向上させるための方法論として、被覆剤がより効果的に溶媒和される必要があると考え（アルキル鎖周りのフリースペースを作る）、リポ酸を用いて二つの吸着部位に一つの炭化水素鎖を持つ被覆分子を合成し、これを被覆剤として用い、数 nm の金ナノ粒子を調製した。従来型のモノアルキルチオール被覆金ナノ粒子も用いて各種液体への分散性を比較した。様々な極性をもつ汎用性溶媒で検討した結果、新しく開発した金ナノ粒子は、従来型のモノアルキルチオール被覆金ナノ粒子より高極性の溶媒に対して分散性を示し、多くの溶媒に対して高い分散性を示した。特に加熱状態においては、これまでに炭化水素鎖系の化合物によって被覆された金ナノ粒子にとって貧溶媒であったエタノール中においても分散することが分かった。 さらに高温、高粘度の媒体としての特徴を持つ液晶中（棒状液晶、ディスコティック液晶、コレステリック液晶）への分散性も検討し、アイソトロピック相と液晶相にても良好な分散性を示した。この場合も汎用溶媒と同様に新しく開発した金ナノ粒子の方が高い分散性を示すことがわかった。液晶相に与える影響は、含有量にもよるが、分散性が高いほど少ないことも分かった。またディスコティック液晶中においては、カラムナー相に沿って粒子が一次元配列を形成し集積することが明らかとなった。溶媒自身が粒子の配列を規定する初めての例となった。さらにこれを拡張し、（エポキシやアクリル系など）重合性モノマーを液体媒体として用い、分散性を検討したところ、汎用性溶媒とほぼ同様の結果が得られ、新しく開発したナノ粒子の高い分散性が示された。またこの際、従来型のモノアルキルチオール被覆金ナノ粒子も、適切な極性を持つ溶媒を選択することで、室温で凝集し、加熱して分散するということを見出した。特に重合性溶媒中では硬化することが可能であるため、集積状態を瞬時に固め、固体材料として扱う方法論を確立した。また基本的にアルキル鎖に被覆されたナノ粒子の分散は加熱によって行われることがなかったが、安定性の高い粒子の場合、加熱によって集積分散の繰り返し制御が可能であることを明らかにした。（図 1）

本研究結果は、これまでコロイド科学的アプローチではなく、むしろこのサイズ領域では、分子と同様に扱うこと（有機化学的処方）でナノ粒子の集積やその機能を制御できることを意味しており、新しい見地が見出されたと考えている。

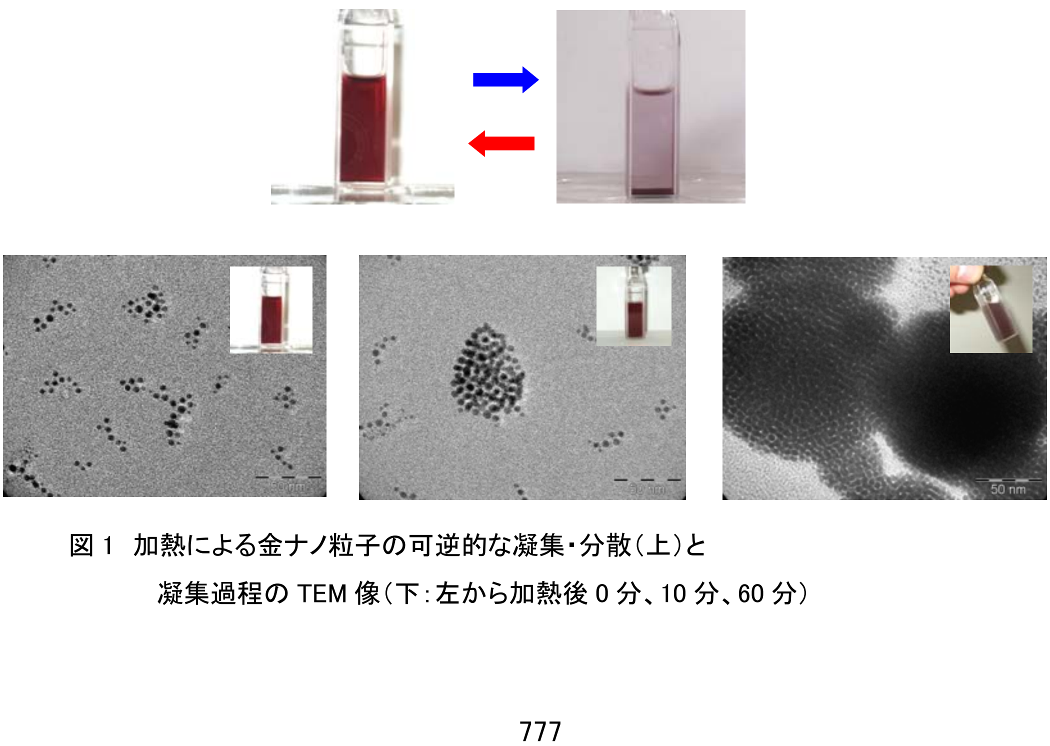


図 1　加熱による金ナノ粒子の可逆的な凝集・分散（上）と

凝集過程の TEM 像（下：左から加熱後 0 分、10 分、60 分）

(3)ナノ粒子の一次元集積

分散系においてナノ粒子が集積しかつ沈殿を生じないことは、センシングを行う上できわめて重要であり、コロイド科学的に分散と凝集を制御する上での重要な要素技術である。特に溶液中において金属ナノ粒子の一次元的な自己集積を精密制御する技術は、ナノ粒子の特異的な分光特性や(吸収特性、屈折率など)、異方性ナノ粒子の創生を計る上で必要不可欠である。

君塚らの技術を更に発展させ、水素結合性脂質を直接被覆分子とすることにより，自己組織性金属ナノ粒子を開発することに成功した。本手法は、金以外にも、これまで安定にナノ粒子を作成できなかった広範な金属ナノ粒子を一次元組織化することが可能なことが分かった。銀、白金、パラジウム、ロジウムなども直接的に水素結合性脂質を被覆分子として用いて、水素化ホウ素ナトリウムの還元によるナノ粒子の調製が可能であった(トルエン/水還流条件下)（図 2)。 また調製後に得られた分散液(トルエン相)は、室温に戻すと、同様にいずれの金属種においてもゲル化した。これらのゲルは一旦乾燥させた後にも、種々の溶媒に対して、再加熱分散させることができた。また熱可逆的にゾル状態とゲル状態を何度も繰り返し再現できることが分かった。その際、紫外可視吸収スペクトル測定より、加熱−冷却の繰り返し後のスペクトル変化が見られないことから、金属核部分の変質が起きていないものと推察される。

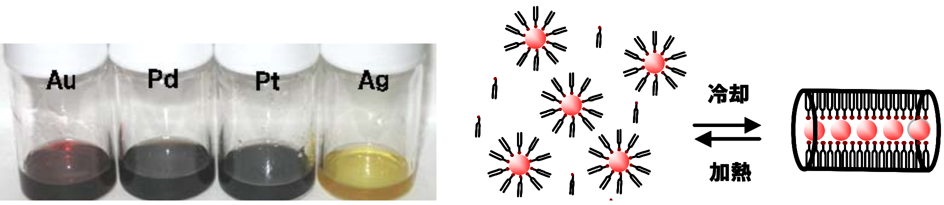


図 2　溶液中において一次元集積した金属ナノ粒子の写真（ゲル状態　左）と模式図（右）

さらにこのゲル状態を透過型電子顕微鏡によって構造観察したところ、発達したファイバー状の構造体が確認された。裸状態の金属核が脂質にくるまれながら一次元的に組織化し、隣接する粒子と融合することなく安定に存在していた。またこれを加熱した際の TEM 観察を行ったところ、特定の配列構造は見られなかった。加熱時には、一次元集積構造は完全に崩れ、金属核部分が周囲を脂質に被覆されながらも独立して分散しているものと思われる（図 3）。

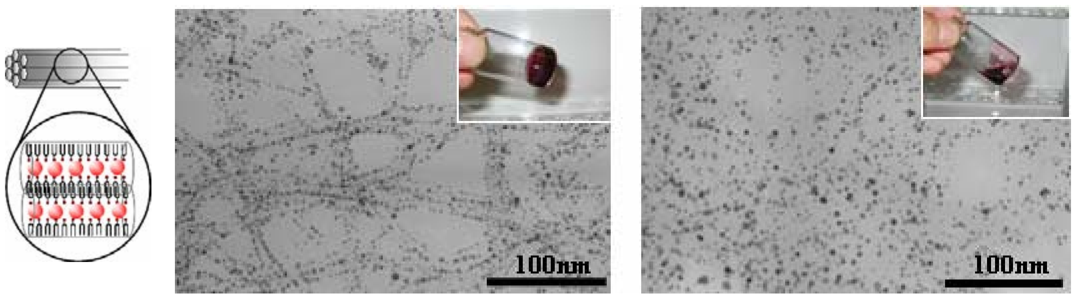


図 3　溶液中において一次元集積した金属ナノ粒子の模式図と TEM 像（集積状態：左、独立分散状態：右）

センシングの材料とは一線を画した結果が得られたが、新規な集積技法として、興味深い知見が得られた。さらに今後は集合体に包まれたナノ粒子の協同性等を利用したセンシングメカニズムの開発にも取り組みたい。

（4） 金属ナノ粒子の融合体の構造と機能

金属核間の融合現象（サブ項目）も、増幅度の向上のための重要なキーワードである。融合後の光学特性ならびに電気特性などを調べることは、センサー材としてのアウトプット部分として極めて重要である。そのため恣意的に強い外部刺激を与え、ナノ粒子を積極的に融合させる方法を探った。密にかつ規則的に配列された金ナノ粒子に酸素プラズマ処理（180mTorr、10W、～90min）を施すことで、有機物を分解するのみならず、隣接する粒子と粒状の形が完全に消失するまで融合が進んだ。ナノ粒子の二次元的な配列により金ナノシートが、また DNA を利用した一次元集積から金ナノワイヤーが作成された。この際、紫外可視吸収スペクトル測定から融合体のサイズが大きくなるにつれて、プラズモン吸収が大きく長波長側へシフトすることが観察された。これはプラズマ照射により原子の相互拡散が促進された結果だと考えられる。加熱による融合のほかに極低温で融合させる手法として興味深い知見が得られた。セルロース鋳型（繊維から成るシート）内に閉じ込めた銀イオンを還元し、ナノ粒子を作成した後に熱によって融合することを検討した。特にセルロースのような低密度の繊維内にナノ粒子を作成した場合、焼成後の構造は、極めてよくその鋳型であるセルロース繊維のマクロ（シート）およびミクロ（繊維）な形状を保持できることが明らかとなった。こうして作られる構造体は、繊維の立体構造を保ちながら（空間率 95％以上）も極めてよく融合しているので、高い電気伝導性を有することが分かった。

これらの融合挙動は、別の観点からするとナノ粒子の集積形状や鋳型の形状に応じた金属成型ができるとも捉えることができ、多種多様な機能に展開できると考えられる。鋳型構造とナノ粒子配置とうまく組み合わせることでラインや球、三次元構造物などナノファブリケーションにも応用可能である。

さらにこれらの融合構造は、ラマン分光（SERS）を用いたセンシングにも有効であることが示されつつある。

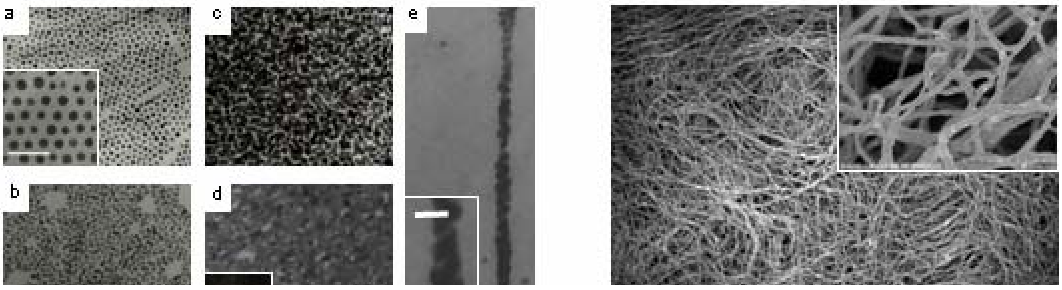


図 4 酸素プラズマ処理を施した 6.2nm 金ナノ粒子に次元単粒子膜の TEM 像（酸素プラズマ処理の時間は、それぞれ a) 処理前, b) 2.5 min, c) 15 min, d) 45min, e) λ-DNA に沿って一次元的配列された 4.6 nm 金ナノ粒子の融合細線構造の TEM 像（酸素プラズマ処理： 180 mTorr, 10

5　自己評価：

　コロイド（ナノ粒子）分散系で、観察される予測の難しい不可逆的な粒子の凝集、すなわち粒子の不安定な分散性は、ナノ粒子の取り扱いにおいて兼ねてから克服すべき課題であった。ここに立ち向かうべく、3 年間のさきがけ研究として、ナノ粒子のセンシングシステム材料としての可能性をひたすら探ってきた。結果として、目標とした“不安定性”がプログラムされた安定ナノ粒子の作成には至らなかった。しかしながら、2000 例を超えるナノ粒子の調製を終えて、限りなく膨大な量のナノ粒子の調製法と分散に関する知見が得られた。この後の研究に続く大きな礎となると考えている。またシステムとしての構築を目指した上で基礎土台となるべく行った実験から、多くの現象が見出された。

　特にナノ粒子の分散性に関して、炭化水素鎖の揺らぎを確保（溶媒和）することで高分散性が得られるようになり、種々の液状媒体にナノ粒子を混和することが出来た。また液晶中に分散させることで、自発的な 3 次元組織化を可能にした。その他、実用材料化に近い、金属ナノ粒子の集積方法および融合方法などを見出せたと考えている。

6　研究総括の見解：

　ナノ粒子のセンシング材料としての可能性を探る研究であり、表面に有機被覆剤を吸着させた金属ナノ粒子を液体中に拡散させ、そこに微量なターゲット物質を加えたときに起きるナノ粒子の集積・融合を光学的に測定することにより、ターゲット物質を検出した。多数の有機薄膜を合成して、ターゲット物質を認識する部位を持った有機被覆膜を見つけるなど、多くの実験からいくつかの有用なセンシング材料を見つけたことが評価できる。しかし当初目標とした不安定性を内在するナノ粒子の作製には成功していない。今後、新しく作った安定なナノ粒子の利用法を開発することが期待される。

7　主な論文等：

論文：

①「Fabrication of Gold Nanosheet and Nanowire by Oxygen Plasma Induced Fusion of Densely-arrayed Nanoparticles」 Shin-ya Onoue, Junhui He, and Toyoki Kunitake, *Chem. Lett.* **2006**, *2*, in press.

②「Formation of mesoscopic metal architectures via fusion of precisely-assembled metal nanoparticles」 Shin-ya Onoue, Denki Kagaku (*Electrochemistry*), **2006**, *74*, 4, in press.

研究課題別評価

1　研究課題名：生体システムを集積化した素子・システムの創製と実用化

2　研究者氏名：加藤　大

3　研究のねらい：

生体という高度に維持された組織体は複雑系における精密な認識と協調の上に達成されている。これらの調節機構に関与している生体分子による認識、捕捉、反応等は、正確であり、かつ高効率であることが知られている。また近年半導体集積化技術の発達により、各種ユニットを一体化した機能集積型マイクロチップの作製が可能になっている。機能を集積化することで、省スペース、必要な試料・試薬量の軽減、高感度化等が達成される。しかしながらマイクロチップ上での機能発現に、生体分子を利用した例は少ない。申請者は、高含水ゲルを用いることでタンパク質をその機能を保持したまま微小空間内に固定化する手法を開発し、固定化したタンパク質の機能を利用したバイオ素子・システムの開発に成功した。そこで本提案では、以下の３点の研究項目を検討することで、優れた分析素子やシステムの創製を目標とする。1）個体レベルに近づけたバイオ素子・システムの創製、2）タンパク質固定化システムの実用化、3）生体物質の固定化に適した高含水ゲルの開発。

4　研究成果：

（1）個体レベルに近づけたバイオ素子・システムの創製

-a)1つの生体内反応に関与する複数の生体物質の固定化

多くの生体内反応は、1つの酵素のみではなく複数の生体物質が関与している。そこで本研究では、ミクロソームを利用して1つの生体内反応に関与する生体物質群を固定化したアレイチップを開発した。生体内反応には薬物代謝の第1相反応を選択し、チトクロムやリダクターゼ等の固定化を行った。これらの生体物質群の固定化には、珪酸ナトリウムとコロイダルシリカより生成したゲルを利用し、反応の過程でメタノールが生じるのを防いだ。3種類のチトクロム（CYP1A1、3A4、2C19)を固定化したチップを作製し、蛍光基質を添加した結果、代謝物質に由来する蛍光が検出された。さらに蛍光基質と拮抗薬の混合液を添加することで、生成する蛍光強度が減少し、その減少量は添加した拮抗薬の濃度の増加に伴って大きくなった。作製したチップは、洗浄することで繰り返し利用でき、さらに長期間薬物代謝活性を維持したことから、優れた実用性を有する薬物代謝活性評価用チップであると考えられる(Anal. Chem. 2005, 77, 7080-7083)。

-b)細胞を利用した解析用素子の開発

細胞は生命体の最小単位であり、これらが組織化することで組織、器官、個体が形成される。そこでまず細胞を利用した評価系の構築を行った。細胞にはヒト肝癌由来の HepG2 細胞

を用い、多孔質体やガラス板上で、細胞を培養し、測定時に細胞をマイクロチップ上に移動させることにした。まず始めに細胞の培養に適した多孔質体の調製を試みた。そこで異なった条件で多孔質体を調製し（J. Chromatogr. A 2002, 961, 45-51）、細胞の3次元的な培養に利用している。反応に用いるシリカモノマーの種類、反応温度、添加するポロジェンの量等を検討した結果、細胞の大きさより大きい空隙（約 10μm）を有する多孔質体の調製に成功した。

この実験と並行してマイクロチップ上で、細胞を利用した生体内反応の反応液をマイクロチップで分析した。その結果、肝細胞の代謝反応の解析に成功した。

（2）タンパク質固定化システムの実用化

-a)プロテオーム解析システムの開発

ヒトゲノムが解読された現在、ゲノムによって調節されているタンパク質の機能や動態に人々の興味が集まっている。その解析（プロテオーム解析）には、高速に多種類のタンパク質を同定し、定量する解析法が必要不可欠である。タンパク質の動態を解析するには、2次元ゲル電気泳動、ゲル内消化、質量分析を組み合わせた方法などが現在用いられている。しかしながらこれらの方法では、自動化が困難である、解析に時間がかかる、非常に高価な高分解能質量分析装置が必要である等の問題点があった。そこで私は、自動化が容易でありタンパク質を高速に解析可能な測定システムの開発を行った。タンパク質の解析を簡便にかつ自動化して行うために、解析に必要な操作の全てを連結したシステムの開発を試みた（図1）。生体試料中のタンパク質の解析には、分離、酵素消化、質量分析が必要であり、これらを直列に連結することにした。また質量分析装置に不揮発性の塩を用いると、試料のイオン化効率が減少し、感度の低下や装置の汚染等の問題があることから、揮発性のギ酸溶液を分離、酵素消化、質量分析に用い、酸性条件でも安定であり活性を有するペプシンを消化酵素に用いることにした。キャピラリー内にペプシンを固定化し、タンパク質試料をキャピラリー内で分離・酵素消化し、精製したペプチド断片を直接、質量分析装置に導入し、タンパク質の同定を行った。その結果、タンパク質であるリゾチームのアミノ酸配列の 73%を検出、同定することに成功し、本手法がプロテオーム解析の効率化に役立つことを明らかにした(Anal. Chem. 2004, 76, 1896-1902)。

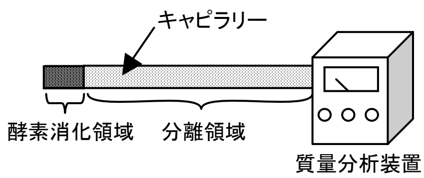


図1　開発したプロテオーム解析システムの模式図

-b)薬物代謝評価システムの開発

キャピラリーを利用して肝臓ミクロソーム画分を固定化した薬物代謝評価システムを開発した。開発したシステムでは、少量の薬物候補物質を注入すると、代謝物が生成し、さらに候補物質と代謝物質が分離検出された。代謝物が泳動された時間により化合物が同定され、またピーク強度と反応時間から、反応効率を測定することができた(Anal. Biochem. 2002, 308, 278-284)。本システムでは、候補物質と同時に、代謝拮抗薬を注入することで代謝阻害の評

価も可能であった(J. Chromatogr. A 2004, 1051, 261-266)。

-c)臨床分析用マイクロチップの開発

マイクロチップを臨床応用するために、生理活性物質の分析に利用した。プラスチック製マイクロチップは、安価で壊れ難いため病床などの試料採取場所でのオンサイト分析に適している。しかしプラスチックは、その表面の疎水性により試料が吸着し良好な分離や反応が行えないという問題があった。そこでプラスチック表面による非特異的な吸着を抑制する添加剤の探索を行った。その結果、カチオン化した澱粉誘導体を用いることで、アミノ酸、タンパク質等の生理活性物質をマイクロチップで1分以内に分離検出することに成功した(図2、Anal. Chem. 2004, 76, 6792-6796, Electrophoresis 2005, 26, 3682-3688)。

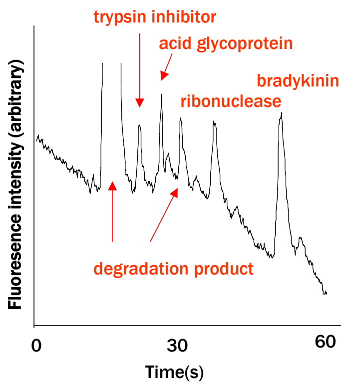


図2　マイクロチップによるタンパク質の分離

-d)リン脂質を有するポリマー利用したタンパク質固定化マイクロチップの開発

生体物質をより生体内と類似した環境下に固定化するために、細胞膜の成分であるリン脂質を利用した固定化を試みた。細胞膜と類似した構造をマイクロチップ上に構築するために、まず始めにリン脂質を有する高分子でマイクロチップ表面を被覆した。その後、トリプシンを化学結合によりリン脂質膜表面に固定化することで、消化反応、分離、検出を集積化したマイクロチップを作製した。本チップを用いることで、アミノ酸誘導体が2分以内に加水分解、分離、検出された(Lab Chip 2004, 4, 4-6)。

-e)高感度検出装置の最適化

細胞の状態、応答等を計測するには、細胞から放出される信号を様々な手法で高感度に検出する必要がある。これまでのマイクロチップの実験で用いた蛍光検出法は、汎用性がないため限られた蛍光物質しか検出されなかった。そこで細胞等の生体システムから出力される様々な情報を高感度に検出するために質量分析装置の最適化を行った。まず始めにキャピラリー電気泳動装置と質量分析装置とを組み合わせて、細胞に含まれる内容物の網羅的解析を試みた。その結果、低分子のアニオン化合物に対しては、数 f(フェムト)mol～数 100a(アト)mol の検出が可能であった。またアニオン性、カチオン性、中性物質の一斉分離検出法の開発も行った。この結果、数十種類の生体物質の同時分離検出に成功した(論文投稿中)。

(3)新しい高含水ゲルの開発

-a)高含水ゲルの構造解析

高含水ゲルの構造解析には、高分解能を有する走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡

を用いた。高分解能の電子顕微鏡を用いて、薄膜状に作製した生体物質（トリプシン）包含ゲルを観察した結果、固定化された生体物質と思われる形が観察された(Anal. Chem. 2005, 77, 1813-1818)。また透過型電子顕微鏡を用いることで、高含水ゲルに含まれるミクロソームやシリカのネットワークを観察することに成功した（図３）。観察された構造は、推測していた模式図(J. Pharm. Biomed. Anal. 2003, 31, 299-309)と類似していた。従来は、酵素活性や元素分析によって固定化された生体物質の量を推定していたが、電子顕微鏡によって実際に固定化された生体物質を直視することができるようになった。

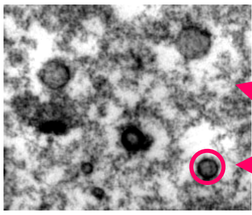


図3　ミクロソームを包含した高含水ゲルのTEM像

-b)生体物質の固定化に優れた高含水ゲルの開発

　生体物質の固定化に利用している高含水ゲルをシリカのみならず、ゼラチンやキトサン等の天然由来の有機高分子で調製した。しかし有機高分子のみでは、包含させた生体物質が流出してしまい、固定化素子として利用することができなかった。そこで従来のシリカと有機高分子とのハイブリットなゲルを調製し、より生体物質がその機能を発現するのに適したゲルの開発を試みた。アルブミン固定化素子の場合は、高含水ゲル調製時に少量のキトサンを添加することで、固定化されたアルブミンとの相互作用がより強固となり、また安定性も増加し、固定化素子の機能が改善した(J. Chromatogr. A 2004, 1044, 267-270)。

-c)多孔質支持体を利用した固定化法の開発

　高含水ゲルに固定化された生体分子を利用した分析法では、固定化に利用している網目構造より大きい物質が良好に分析できなかった。そこで多孔質支持体の表面に生体分子を含んだ高含水ゲルを被覆する新しい固定化法を開発した。まず固定化タンパク質としてトリプシンを選択し、支持体に用いる多孔質体の構造の最適化を行った。その結果、貫通孔が大きい多孔質体に固定化されたトリプシンが最も強い活性を示した。 作製したトリプシン固定化多孔質体を用いることで、網目構造より大きいタンパク質試料が効率的に加水分解された。また固定化多孔質体は、繰り返し利用でき、さらに冷蔵庫での長期間保管が可能であった(Anal. Chem. 2005, 77, 1813-1818)。

-d)アルコールの生成しない固定化法の開発

　透過型電子顕微鏡の実験より、固定化されているミクロソームの密度が期待していた固定化密度より低いことが明らかとなった。これは固定化の過程で一部のミクロソームの破壊や流出が起こっていると考えられた。また固定化されたチトクロムの活性も予想以上に弱かった。これら原因の一つにアルコキシシランの加水分解、もしくは重合過程で生成するアルコールが、ミクロソームの破壊やチトクロムを失活させていると考えた。そこでアルコキシシランの加水分解や重合反応の過程で生成するアルコール量を減少させた高含水ゲルの調製を試み

た。その結果、珪酸ナトリウムとコロイダルシリカの反応で生じるゲルは、反応の過程でアルコールを生じず、また生成したゲルは長期間包含した生体物質（チトクロム）の機能を保持することが明らかとなった(Anal. Chem. 2005, 77, 7080-7083)。

5　自己評価：

研究代表者は、採択時に上記の研究成果の欄に記載した3つの研究項目を掲げていた。１番目の研究項目である生体システムを利用した優れた評価系の構築は、複数の生体物質による生体内反応を利用した評価系を構築し、さらにマイクロチップ上で細胞を利用した評価系もほぼ構築したものの、組織・器官などより複雑な細胞システムを利用した系の構築までは至らなかったことから、目標を達成したとは言えない。しかし2番目と3番目の研究項目はほぼ予定通り研究が進行し、実用的な評価系の構築や新しい固定化ゲルの開発に成功したことから、目標を達成したと考えられる。

これらの研究成果とともに、私にとって意義深かった点として、このさきがけに採択されなければ知り合うことがなかったような異分野の研究者やアドバイザーの先生方との人的な交流ができたことが挙げられる。この交流によって今後の研究の進め方について多く学ぶことができた点は、これからの研究人生において大変有意義であり、今後の展開につながると考えている。

6　研究総括の見解：

当初の主要な目標は、高含水ゲルを利用して生体分子、細胞等を3次元的に固定化し生体内を模倣したバイオ素子・システムを創製することであったが、細胞の固定化に適した高含水ゲルの開発に成功しなかったこともあり、達成できなかったのが残念である。しかし最近、細胞を利用したマイクロチップ上での評価系の構築やアルコールの発生しないゲルの調製法の開発に成功したことから、近い将来に目標が達成される可能性は認められる。バイオ素子を利用した優れた分析法の開発や新しいハイブリッド高含水ゲルの開発などに成功した点は評価できる。

7　主な論文等：

<u>論文</u>

1. M. Kato, K. Inuzuka, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, "Monolithic bioreactor immobilizing trypsin for high-throughput analysis" Anal. Chem. 2005, 77, 1813-1818.

2. K. Sakai-Kato, M. Kato, H. Homma, T. Toyo'ok, N. Utsunomiya-Tate, "Creation of P-450 chip for high-throughput analysis"Anal. Chem. 2005, 77, 7080-7083.

3. K. Sakai-Kato, M. Kato, K. Ishihara, T. Toyo'oka, "An Enzyme-immobilization Method for Integration of Biofunctions on a Microchip using a Water-soluble Amphiphilic Phospholipid Polymer Having a Reacting Group" Lab Chip 2004, 4, 4-6.

4. M. Kato, K. Sakai-Kato, H.-M. Jin, K. Kubota, H. Miyano, T. Toyo'oka, M. T. Dulay, R. N. Zare, "Integration of On-line Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification using Pepsin-Coated Photopolymerized Sol-Gel Columns and Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry" Anal. Chem. 2004, 76, 1896-1902.

5. M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, T. Nakajima, T. Toyo' oka, "Cationic starch derivatives as dynamic coating additives for analysis of amino acids and peptides using poly(methyl methacrylate) microfluidic devices"Anal. Chem. 2004, 76, 6792-6796.

（他　計１３報）

総説・解説記事

1. M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo' oka, "Minitualization using immobilized biomolecules toward high throughput screening" Anal. Bioanal. Chem. 2006, 384, 50-52.

2. M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo' oka, "Silica sol-gel monolithic materials and their use in a variety of applications" J. Sep. Sci. 2005, 28, 1893-1908.

3. 加藤　大, "ゾルーゲル反応を利用した high-throughput screening に適したアッセイ系の構築" ファルマシア 2005, 41, 1159-1163.

4. 加藤　大, "ゾルーゲル反応の分析化学への応用" ぶんせき 2004, , 101-102.

5. 加藤　大, "生体システムを集積化した素子・システムの開発" 化学工業 2003, 54, 339-345.
（他　計6報）

特許

1.「機能性物質含有薄膜で被覆された固定化素子、及びその製造法」平成 15 年 9 月 27 日
出願番号：PCT/JP2004/014055

2.「分析方法、及び該分析方法に用いる装置」平成 17 年 8 月 3 日
出願番号：特願 2005-224935

受賞

1. 分析化学会中部支部奨励賞（日本分析化学会中部支部） 2003 年
「生体物質を利用した高性能ハイスループット解析法の開発」

招待及び依頼講演

1. 日本薬学会第 126 年会シンポジウム（仙台） 2006 年 3 月 28 日（予定）

2. 第 36 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（静岡） 2005 年 9 月 23 日

3. The Fifth Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis（ソウル） 2004 年 12 月 6 日

4. 第 35 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（名古屋） 2004 年 9 月 18 日

5. 東海バイオファクトリー研究会＆SMS研究会合同シーズ発表会(名古屋) 2003 年 10 月 2 日
（他　計7回）

研究課題別評価

1　研究課題名：
　強磁性金属ナノコンポジット膜を用いた Left-Handed Materials の実現と応用

2　研究者氏名：冨田　知志

3　研究のねらい：
　物質の電磁気応答を決定する誘電率と透磁率が共に負となる物質は、Left-Handed Materials（LHMs）と呼ばれる。本研究では強磁性金属ナノコンポジット膜を用いて、これまで実現不可能と言われてきた LHMs をマイクロ波領域で創製することを目的とする。本研究の成果は、物質の電磁気応答における従来の既成概念を打ち破るブレイクスルーとなり、将来的な光ディスクの超高密度化等に繋がる基盤技術へと発展すると期待される。

4　研究成果：
　強磁性金属ナノ粒子が埋め込まれた非磁性絶縁体膜（強磁性金属ナノコンポジット膜）を用いて、マイクロ波領域での LHMs の実現と応用を目指した研究を行った。研究の各段階での具体的な目標は、①強磁性金属ナノ粒子のサイズ及び体積充填率が制御されたナノコンポジット膜の作製、②ナノコンポジット膜の構造及び物性の解明、③マイクロ波領域での LHMs としての機能発現の確認、④光の領域への展開も含めた応用展開であった。以下、順に研究成果を示す。
　①ナノコンポジット膜の作製を行った。まず、同時スパッタリング法により、直径数nmのFeナノ粒子が埋め込まれたSiO_2薄膜を作製した[論文 5]。しかし、同時スパッタリング法のような物理的手法では、作製可能な試料の量に限界があり、またコンポジット膜の微細構造、特に粒子サイズと充填率の独立かつ精密な制御は困難であった。よって次に、化学的手法を試みた。表面改質法を応用し、強磁性金属であるNiのナノ粒子を有機高分子膜（ポリイミド、PI）に埋め込んだ。作製手順は、KOH処理によるPIの表面改質、イオン交換反応を用いた改質層へのNiイオンの埋め込み、水素ガス中での熱処理によるイオン還元に伴うNiナノ粒子形成、である。図 1 に、7 分間KOH処理し、300℃で 30 分間熱処理したNi-PI膜の、膜断面の透過型電子顕微鏡（TEM）像を示す。一様に分散した平均粒径 8nm程度のNiナノ粒子が確認できる。詳細なTEM観察の結果、熱処理後に形成されるNiナノ粒子の直径は、KOH処理時間に依存することが明らかになった[論文 4]。KOH処理時間を 1 分から 15 分まで変化させると、Niナノ粒子の直径は約 5nmから10nmまで変化した。一方、熱処理によるPIマトリックスの熱分解と収縮を用いることで、コンポジット層中のNi粒子の相対的な体積充填率を増加させることができた。図2にKOH処理時間 7 分の試料での、Ni粒子の直径と体積充填率の熱処理時間依存性を示す。粒子直径は、時間に依らず約 8nmで一定であることがわかる。一方、長時間の熱処理により、体積充填率は 3.2%から18%まで増加している。以上より、KOH処理時間及び熱処理時間などの作製条件を制御するこ

とで、Ni-PI膜中のNiナノ粒子のサイズと体積充填率を独立かつ精密に制御することに成功した[特許出願済み]。なお本手法による粒子サイズと充填率の独立制御は、非磁性金属ナノ粒子の場合でも有効であり、汎用性を有すると考えられる[論文 3]。

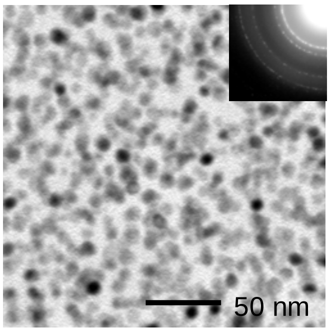


図1 Ni-PI 膜断面 TEM 像(KOH-7 分間処理、300℃30 分間熱処理)

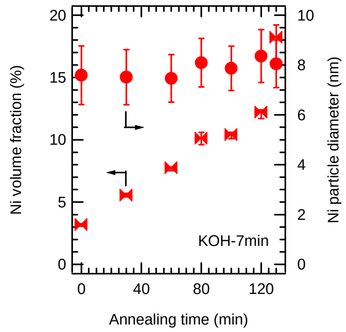


図 2 粒子サイズと充填率の熱処理温度依存性(KOH-7 分処理試料)

次にNi-PI膜に対して、②ナノコンポジット膜の構造と物性の解明を行った。超伝導量子干渉素子(SQUID)磁力計を用いた磁化測定から、室温での Ni-PI 膜中の Ni ナノ粒子は熱擾乱により粒子の磁気モーメントが乱された、いわゆる超常磁性状態にあることが確認された[論文作成中]。汎用の電子スピン共鳴測定装置を用いて、Ni-PI 膜の *X* バンド(9GHz 帯)での電子磁気共鳴(EMR)を調べた。EMR は、強磁性金属ナノコンポジット膜を用いてマイクロ波領域で負の透磁率(μ)を得るために利用する物理現象である。よって EMR 条件が膜の微細構造とどのような相関関係にあるか、を明らかにしておくことは重要であった。室温での EMR 信号を図 3 に示す。図の横軸は外部磁場である。膜中の Ni 粒子の直径は約 8nm であった。体積充填率が 3.2%の試料が示す共鳴磁場は、磁気的に孤立しているバルク Ni 球の共鳴磁場とほぼ一致している(g=2.21)。よって充填率 3.2%の試料では、粒子間の磁気双極子相互作用はほぼ無視できると言える。ところが体積充填率の増加に伴い共鳴磁場が、外部磁場を膜面に対して平行に加えた場合(θ=0°)は低磁場側(見かけ上の g値が大きくなる方向)に、垂直に加えた場合(θ =90°)は高磁場側(見かけ上の g 値が小さくなる方向)にシフトしていることが判る。この磁場シフト量は、Ni 粒子間の磁気双極子相互作用の計算から得られた、一粒子が感じる双極子磁場の増加量とほぼ一致した。よって体積充填率の増加により、Ni 粒子間の磁気双極子

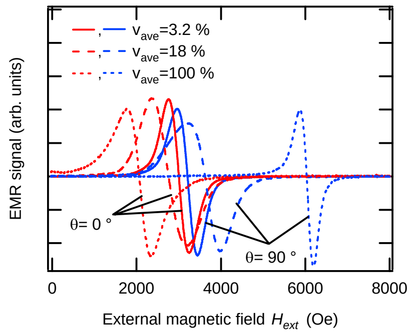


図 3 Ni-PI 膜の *X* バンドでの EMR 信号(KOH-7 分処理試料)

相互作用が強くなり、双極子磁場が増加しEMRの共鳴磁場がシフトすることが半定量的に説明できた。即ち、強磁性金属ナノコンポジット膜の EMR では、粒子間の磁気双極子相互作用が重要な役割を果たすことが明らかになった[論文 2]。

双極子相互作用を持つNiナノ粒子系でのEMRを更に詳細に調べるために、計算機実験を行った。計算モデルは双極子相互作用を考慮に入れた9×9×5の3次元配置Niナノ粒子系であった。Ni粒子直径は、実験と同じ、8nmとした。面内(9×9)方向には周期的境界条件を設定し、0 Kでのランダウ・リフシッツ・ギルバート(LLG)方程式を解き、粒子の磁気モーメントのダイナミクスを調べた。粒子内のギルバートダンピング定数(α)は 0.01 で一定とした。外部振動磁場の周波数は、*X*バンドと同じ 9GHzとした。まず双極子相互作用がない孤立粒子に対する計算を行った。バルクNiの*g*値(2.21)から予想される 3213Oe付近に共鳴が現れ、計算に問題がないことを確認した。次に、双極子相互作用を入れ、粒子間距離を変化させて計算を行った。その結果、粒子間距離の減少に伴い、測定結果と同様にEMR信号の共鳴磁場がシフトした。そのシフト量は測定結果を定量的に良く再現した。また粒子間距離の減少に伴い、共鳴信号の強度減少が見られた。EMR信号強度は、ピーク強度×(半値幅)^{2}で表される。しかし今回は信号の半地幅は一定であった。この信号強度減少は、双極子磁場の面内成分の増加の影響と考えられる[論文作成中]。また同じモデルで、乱数的に粒子サイズをばらつかせ、粒子サイズ分布を持ったNiナノ粒子系での計算機実験も行った。こちらの方が実験で使用しているNi-PIにより近い。サイズ分布の増大に伴い、αが一定にもかかわらずEMR信号の半値幅が増大した。これは双極子磁場の面内成分及び面直成分のばらつきの増大に起因すると考えられる。このことは 0 Kであっても、高充填率でサイズ分布を持ったランダムな粒子系では、信号の著しいブロードニングによりEMR信号が見かけ上消失することを予言していると考えられる[論文作成中]。このような相互作用を持った粒子系での磁気ダイナミクスには、まだ不明な点が多く、実験・理論の両面から更に研究を進める必要がある。

更に、目標③マイクロ波領域での LHMs としての機能発現の確認を目指した。磁場下での強磁性金属ナノコンポジット膜に対して、10-100GHz帯マイクロ波の透過・反射特性が周波数掃引で測定可能なシステムが必要であった。よって、貫通型ボア中に6T まで励磁可能な無冷媒超電導マグネットを導入し、ベクトルネットワークアナライザと組み合わせ、測定システムを新たに構築した。測定システムをチェックするための標準試料として、イットリウム鉄ガーネット(YIG)粉末ペレットのマイクロ波透過特性を調べた。90GHz 帯(波長約 3mm)での周波数掃引測定の結果、YIG の磁気共鳴によるディップが観測された。その後もシステムの改良を重ね、更なる高安定化・高感度化を図った。そして、強磁性金属ナノコンポジット膜試料の測定を行った。膜厚約100μm の Ni-PI 膜を 57 枚重ねたものを試料として使用した。膜面に垂直に 1.6-2.8T の磁場を印加すると、周波数掃引のマイクロ波透過スペクトルにディップが現れた(図 4)。ディップの *g* 値は、2.15 とバルク Ni の *g* 値よりも小さかった。*X* バンドでの実験結果を考慮すると、これは Ni ナノ粒子からの EMR 信号であると考えられる。即ち、我々は周波数掃印測定では初めて、Ni ナノ粒子系からの EMR 信号の観測に成功した。しかし、ここで大半のマイクロ波は Ni-PI 膜試料を透過していた。これは、Ni-PI 膜だけでは誘電率(ε)が正であることを示している。それゆえ、マ

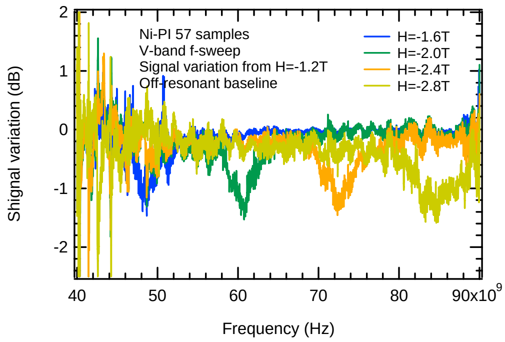


図 4　磁場下の Ni-PI 膜試料のマイクロ波透過スペクトルに現れた Ni ナノ粒子の EMR 信号

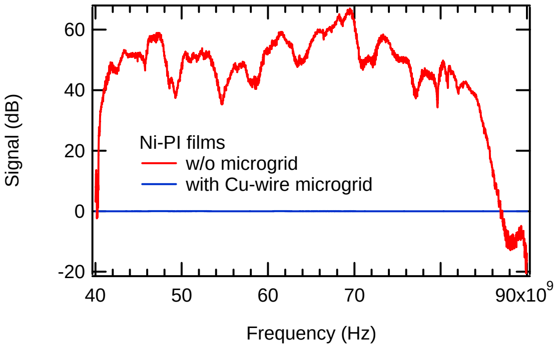


図 5　Ni-PI 膜上に直接蒸着した Cu-MWG の無磁場下でのマイクロ波透過特性

イクロメートルサイズの Cu マイクロワイヤグリッド（Cu-MWG）を試料に組み込み、それに負のεを担わせることを試みた。即ち、負のμと負のεを、それぞれ Ni-PI 膜と Cu-MWG で分担し、それらをマイクロ波の波長（数 mm）より十分小さい周期で繰り返すことで、実効的にεとμが同時に負となる LHMs を実現することを目指した。マスクを用いた真空蒸着法により、ワイヤ径 100μm で間隔 600μm の Cu-MWG を Ni-PI 膜上に直接作製した。計算から求められた、この構造の Cu-MWG の擬プラズマ周波数は約 150GHzである。よってこの Cu-MWG を用いて、実効的に負のεが 90GHz帯で実現できると考えられる。実際に無磁場下でマイクロ波透過率を測定すると、マイクロ波はほとんど透過しなかった（図 5）。現在、最適化した Cu-MWG と Ni-PI 膜を組み合わせた試料を作製し、実証実験を継続中である。

最後に、目標④光の領域への展開も含めた応用展開、に関連した成果を記す。物理的、工学的両観点から、更なる高周波、即ち赤外、近赤外、可視光など光の領域での LHMs および負屈折率媒質（NIMs）の実現が求められる。しかし、強磁性金属ナノ粒子での EMR を利用する限り、光の領域に到達する可能性は極めて低い。EMR を利用した LHMs の稼動周波数の上限は、外部磁場によって決まる。例えば、g =2.21 の孤立 Ni ナノ粒子の場合、現在使用しているマグネットで最大磁場 6T を印加しても、200GHz 程度が上限である。仮に 100T 程度の強力な磁場をかければ 3THz まで周波数は上がるが、それでもせいぜい赤外領域であり、またそのような実験は現状では現実的ではない。更に双極子相互作用をもつ現実のナノ粒子系の場合、膜に垂直に磁場をかけた場合、見かけ上の g 値は小さくなり、より低周波でしか共鳴しない。以上より、強磁性金属ナノ粒子を埋め込んだ強磁性金属ナノコンポジット膜を用いて、光の領域での LHMs 及び NIMs が得られる可能性は低い。そこでこの目標の下での研究は方針転換し、貴金属ナノ粒子が分散した磁性絶縁体膜の実現に取り組んだ。具体的には、Au ナノ粒子が分散した YIG 薄膜（Au-YIG 薄膜）の作製を試みた。このような膜では、磁場下での YIG の磁気光学（MO）効果と Au ナノ粒子の局在表面プラズモン（LSP）共鳴がカップルすることで、ある偏光方向を持つ可視光領域での円偏光に対して負の屈折率を示す可能性があると考えられる。同時スパッタリング法により、石英基板上に Au と YIG の混合薄膜を作製した。Au の体積充填率は、1.7−10.9%

であった。X 線回折測定から、900℃のポストアニーリングを行うと、Au と YIG が共に結晶化することが明らかになった。膜断面の TEM 観察では、直径約 10nm 程度の Au 粒子が確認された（図 6）。またアニーリング後の膜を SQUID 磁力計で測定した結果、ヒステリシス曲線は自発磁化を示した。これは結晶化した YIG のフェリ磁性を反映していると考えられる。以上より、同時スパッタリング法とポストアニーリングにより、Au-YIG 薄膜が作製できることが明らかになった。膜の紫外・可視光透過吸収スペクトルを測定した結果、約 600nm に Au ナノ粒子の LSP 共鳴による吸収が見られた（図 7）。また、分光エリプソメトリーで膜の屈折率の波長分散を調べた結果、600nm 近傍に LSP に起因する明確な分散が見て取れた[論文作成中]。以上より、Au-YIG 薄膜は、600nm 付近に LSP 共鳴を持つことが示された。この波長領域での MO 効果として、極磁気 Kerr 効果を調べた。その結果、図 7 に見られるように、Au ナノ粒子が埋め込まれることで、600nm 付近での膜の Kerr 回転角の正負が逆転した[論文 1]。この回転角反転は、YIG の MO 効果と Au ナノ粒子の LSP とのカップリングの可能性を示唆していると考えられる。回転角反転のメカニズムの解明、及び光領域での NIMs の実現へ向けて、現在、実験と理論の両面からの更なる研究を進めている。

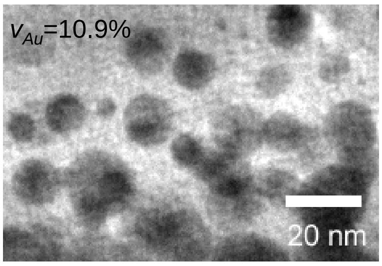


図 6　Au-YIG 薄膜の膜断面 TEM 像

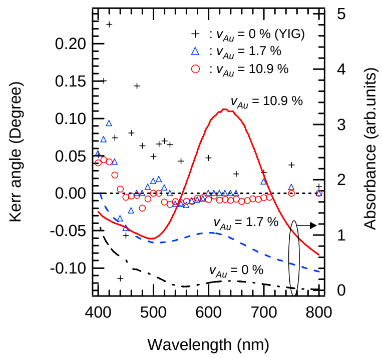


図 7　Au-YIG 薄膜の光吸収スペクトルと極磁気 Kerr スペクトル

5　自己評価：

本研究課題では、研究の各段階で 4 つの具体的な当初目標を設定し、研究を遂行した。よって、得られた成果を元にそれぞれの目標の達成率を％で示し、自己評価としたい。まず①強磁性金属ナノ粒子のサイズ及び体積充填率が制御されたナノコンポジット膜の作製に関しては、Ni-PI 膜という新しいナノコンポジット膜を用いて 100％達成できたと考える。次に、②ナノコンポジット膜の構造及び物性解明に関しては、Ni-PI 膜の構造と、磁気特性及び、EMR 特性との相関を実験的に明らかにすることが出来た。また計算機実験により、測定結果を説明し、そこに潜む物理的メカニズムの詳細を明らかにすることができた。更に実験からだけでは明らかにならなかった、新たな現象の予測もできた。よって、この目標も 100％達成できたと考える。③マイク

ロ波領域での LHMs としての機能発現の確認に関しては、無冷媒超電導マグネットを用いた新しいマイクロ波測定システムを立ち上げた。そして、そのシステムを用いた周波数掃引測定で、Ni ナノ粒子からの EMR 信号を観測できた。また Cu-MWG を作製し、そのマイクロ波透過特性を調べた。しかし、LHMs 実現には更なる試料の改良が必要であり、現在継続して研究中である。よって、現時点での達成率は 50%といわざるを得ない。④光の領域への展開も含めた応用展開に関しては、光の領域での NIMs の実現を目指して、貴金属ナノ粒子が埋め込まれた強磁性絶縁体薄膜（Au-YIG 薄膜）を作製した。その構造及び、光学特性を調べた。また、極磁気 Kerr 効果を調べ、MO 効果とLSP 共鳴とのカップリングの存在を示唆するデータが実験的に得られるところまでは達成できた。しかし、NIMs の実現には更なる試料の改良及び光学測定が必要であるため、現状での達成率は 40%といわざるを得ないと考える。この分野には更に興味深い物理が潜んでいる可能性があり、今後も継続して研究していきたいと考えている。

６ 研究総括の見解：

目標であった光領域における left-handed material (LHM)の実証まで至らなかったのは残念であるが、まだポピュラーになっていない LHM の研究の中で、光の領域まで拡張しようとした時のいろいろな課題や知見を得たことは評価できる。LHM の実現は未達としても、着実に研究を進め、成果も着実に蓄積している点、若い研究者として高く評価できる。より解析的な研究が必要であり、物理（電磁光学）と物性（磁化率と誘電率）のアプローチが必要だったが、理論面での深まりを欠いた点が惜しまれる。

７ 主な論文等：

論文 5 件

1. ″Magneto-Optical Kerr Effects of Yttrium Iron Garnet Thin Films Incorporating Gold Nanoparticles″,
   Satoshi Tomita, Takeshi Kato, Shigeru Tsunashima, Satoshi Iwata, Minoru Fujii, Shinji Hayashi, Physical Review Letters 印刷中.
2. ″Tuning magnetic interactions in ferromagnetic-metal nanoparticle systems″,
   Satoshi Tomita, Kensuke Akamatsu, Hiroyuki Shinkai, Shingo Ikeda, Hidemi Nawafune, Chiharu Mitsumata, Takanari Kashiwagi, Masayuki Hagiwara,
   Physical Review B, Vol. **71**, 180414 (Rapid Communication), May 2005.
3. ″Controlling Interparticle Spacing among Metal Nanoparticles through Metal-Catalyzed Decomposition of Surrounding Polymer Matrix″,
   Kensuke Akamatsu, Hiroyuki Shinkai, Shingo Ikeda, Satoshi Adachi, Hidemi Nawafune, Satoshi Tomita,
   Journal of American Chemical Society, Vol. **127**, No. 22, pp.7980 (Communication), June 2005.
4. ″A Novel Fabrication Technique for Interacting Ferromagnetic-metal Nanoparticle

Systems: Fine-tuning of Particle Diameter and Interparticle Spacing",
Satoshi Tomita, Kensuke Akamatsu, Hiroyuki Shinkai, Shingo Ikeda, Hidemi Nawafune, Chiharu Mitsumata, Takanari Kashiwagi, Masayuki Hagiwara,
Material Research Society Symposium Proceeding, vol. **853E**, pp. I5.10.1-6, January 2005.

5. "Ferromagnetic resonance study of diluted Fe nanogranular films",
Satoshi Tomita, Masayuki Hagiwara, Takanari Kashiwagi, Chusei Tsuruta, Yoshio Matsui, Minoru Fujii, Shinji Hayashi,
Journal of Applied Physics, Vol. **95**, No. 12, pp. 8194, June 2004.

特許　1 件

特開 2005-139438「金属ナノ粒子コンポジット膜の製造方法」
PCT/JP2004/015458 "Production method of metal-nanoparticle composite films"
出願人：科学技術振興機構，発明者：冨田知志、縄舟秀美、赤松謙祐
出願日：2004.10.13

招待講演　4 件

1. "Ferromagnetic-metal nanocomposite films as a candidate for left-handed materials", （予定）
Satoshi Tomita,
International Advanced Materials Forum for Young Scientists (IAMF), February 27-March 1, 2006, Mishima, Shizuoka, Japan

2. "強磁性金属ナノコンポジット膜を用いた左手系メタ物質",
冨田知志,
量子エレクトロニクス研究会 「フォトンマニピュレーションとその応用」，2006 年 1 月 12-14 日（木），上智大軽井沢セミナーハウス

3. "Ferromagnetic-metal nanocomposite films as a candidate for left-handed materials",
Satoshi Tomita,
International Workshop on Meta-materials and Negative Refraction (IWM05) Hangzhou, China, August 27-29, 2005

4. "Ferromagnetic-metal nanocomposite films: A possible candidate for left-handed materials",
Satoshi Tomita,
Nanoarchitectonics Workshop 2005 "Nano@Micro: Innovations for Nanoarchitectonics" (NAMINA 2005), March 3-4, 2005, AIST, Tsukuba

研究課題別評価

1　研究課題名：　Si ナノ結晶を増感材とした光導波路増幅器の創製

2　研究者氏名：　森脇　和幸

3　研究のねらい：

SiO_2膜中にSiナノ結晶とErイオンをドープした膜を光増幅器コア膜として用い，従来のSiナノ結晶が含まれていない膜ではできなかった，大きな実用的ゲインを持つ光通信用の平面型光増幅器を実現する事を目的とする．SiO_2中にErイオンをドープした材料を用いて光ファイバーアンプは既に実用化されているが，この平面導波路型増幅器が作製できれば，増幅やレーザ等の能動機能を組み込んだ石英系光集積回路を，実用的なレベルで初めて実現でき，非常に大きな分野に発展すると期待される．

4　研究成果：

4－1　当初計画

当初の計画は，作製しやすい小面積（1cm　角程度）の試料で，まず最適な作製条件を得た後，実際の素子形状にできるだけ近い形状（プロトタイプ素子）で，アンプ特性が得られるように更に最適化を行うこととした．そのプロトタイプ素子作製のための要素技術をできるだけ平行して行うという計画であった．ただし，当初計画にあった埋め込み方式のプロトタイプ素子作製については，最終的には望ましい形態と思われるが，作製の容易なリッジ型・ハイメサ型に変更して検討した．他の点は概ね計画通りに進めた．以下，具体的に計画項目毎に得られた結果を述べる．

4－2　小面積（1cm角程度）で薄い膜作製と，発光強度評価

ここでは，1cm角程度の小面積で，1μm厚程度の導波路用としては薄い膜で，加工していないSiO_2/Si/Er膜を用い，導波構造でなく膜の厚み方向から出射する光で，基礎的な発光や光増幅特性の予備的な評価を行った．

まず，スパッタ成膜時のターゲット数を変えて Si と Er 濃度を変えた試料を多数作製し，PL（フォトルミネッセンス）強度の強い条件を調べた．この結果，一時期再現性不良もあったが，そのような際にも短期に修正できるような，以後の導波路形状での評価の基礎データとした．

また，励起光を照射した増幅効果の予備実験において，本来 1.55μm 信号光波長では Si の吸収はないが，励起光照射によって Si ナノ結晶中に形成されるエキシトンが，1.5μm 帯の信号光を吸収することが確認された．これは増幅器を構成したとき，本来増感剤として導入されていた Si ナノ結晶が損失を生じる原因となることを意味する．また Si ナノ結晶のサイズによりエキシトンの寿命が変わることから，損失も大きく変化することもわかった．膜厚方向の観測なので短い距離であり，増幅かどうかは目安ではあるが，Si ナノ結晶の平均粒径が大きいと損失となるが，平均粒径が 3nm より小さい時増幅が示唆された．このことより，PL の強い試料のアニール条件としては，以前から Si ナノ結晶作製に適した条件である 1100℃を用いているが，アンプ素子としてはこれより

低い温度が最適となることが予想された.

また, 励起光を照射しない状態でのSiナノ結晶の光導波損失への影響も調べた. スラブ導波路で, Siナノ結晶の濃度により光導波損失が増加する結果を得た. それに比べErの添加による光導波損失増はあまり大きくなかった. エキシトンのない励起光非照射時でも, SiO_2中のSiナノ結晶による屈折率揺らぎがあり, 散乱損失等が増えるためと考えられる. またその損失増加分がSi濃度の大きい試料では 5dB/cm程度になることもわかり, これを上回る増幅が必要とわかった.

ここまでの結果をまとめると, PL を調べた結果は最初の目安としては意味があるが, その最適値が必ずしも光導波路アンプの最適値ではないということで, 導波路としての評価により修正が必要である. また, これらのスラブ導波路(加工前の膜状態の導波路)での光導波損失は, 8dB/cm 程度で, Si や Er の添加されていない導波路に比べ, 2 桁程度高い. これらの結果を踏まえて, 以下の 4-3, 4-4 の検討を行った.

４－３ 導波路アンプ素子のプロトタイプ実現へ向けた要素検討

４－３－１ 4 インチ基板上の大面積・厚膜により, 長尺導波路作製

また実際のデバイス作製時に近い長尺且つ厚膜の導波路で問題点が検討できるよう, 4 インチ基板上で, 4μm厚以上のSiO_2/Si/Er膜を作製できるようにした. 作製した膜について膜厚分布や発光スペクトル特性を測定した. その結果, 少なくとも4インチの基板上の半分程度で, 均一(発光強度分布 10%以内)な導波路膜を作製することができた. この面積内で 30cm長程度の導波路を作製可能であり, 当面十分と考えている. ただし, 4-2 の検討結果により, 現状の光導波損失が大きいため, 当面のデバイス実験には 2cm程度の長さで, 試料数を多くして評価を行った.

４－３－２ 導波路加工技術の構築

SiO_2/Si/Er膜の加工について検討を行った. 加工プロセスとして, フォトレジストをマスクとしたRIE(Reactive Ion Etching)を用いた. 単純なSiO_2膜については, 6μm程度の深さを加工できていたが, SiO_2/Si/Er膜の場合エッチングレートも低下し, 表面や側面の荒れも大きかった. その後RIE条件を検討し, 酸素プラズマ処理が原因でSiの過剰酸化による屈折率低下等のトラブルもあったが, 最終的に4m深さのSiO_2/Si/Er膜アンプコアパターンを作製することができた. 当面デバイス評価に必要な加工技術は確立し, 以下の 4-4 の素子形状での評価を行った.

４－３－３ 励起方式の検討

励起光の光源選択や波長選択, 励起方式(上面から全面照射や, 導波路へのカップリング)といった検討が考えられたが, ここでは当面 PL で用いていた Ar レーザの 488nm 波長の励起光を導波路上面から照射した.

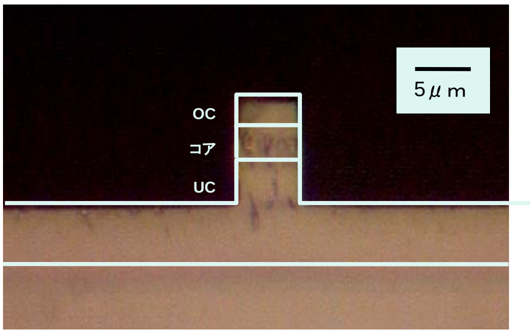
４－４ プロトタイプ素子作製により, 実用性を評価(光導波損失とゲインの評価)

ここではできるだけ最終素子形態に近いデバイス形状で特性評価をし, その結果を作製条件へフェードバックするサイクルを確立し, アンプ素子としての正確な評価と特性向上を行うことを目指した. まず, リッジ型またはハイメサ型の導波路により評価を行った.

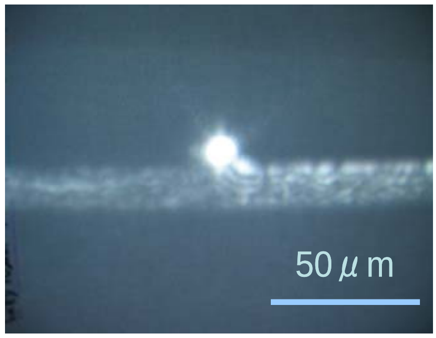
加工後の導波路を切断して長さを変え, その都度出射光の強度を測定するカットバック法により, ハイメサ型導波路の導波損失が 6.7dB/cm と測定できた. その際の光導波路両端の結合損失の合計は 27dB と高いが, これは構造の最適化がまだなされていないことによる. 4-2 でスラブ膜

での予備的な損失測定結果が8dB/cmであったが，それに比べて正確に損失が評価できて，少し低い損失値が得られた．実際の導波路断面の顕微鏡写真と，光導波させて出射端面から赤外カメラで光の閉じ込めを観測した結果を図1に示す．

ここまでの結果を踏まえ，アンプ素子特性と膜作製条件との対応を詳細に調べた．アンプコア



(a)導波路断面の光学顕微鏡写真



(b)導波路出射部断面の赤外カメラ像

図1　ハイメサ型導波路の断面顕微鏡写真と1.55μm信号光の出射光写真．

膜材料であるSiO_2/Si/Er膜を作製する条件は，主にSi添加量，Er添加量と，成膜後のアニール温度である．ここで，これら作製条件を網羅的に変えて，励起光非照射時と照射時の光導波損失を測定した．主にスラブ導波路で測定したが，加工後のリッジやハイメサ型導波路でも測定して，同様な結果を得ている．SiとErの濃度については，4-2 の結果を踏まえ，比較的発光強度の強い濃度範囲の中で，損失を抑えるためSi濃度の低い条件を重点化した．

まずアニール温度を固定して光導波損失を測定したが，図2と3は，それぞれ励起光を照射しない場合と，照射した場合の光導波路の損失（導波路入射光強度と出射光強度比を dB 表示）を示している．どちらの図も，Si と Er 濃度（スパッタ成膜時のターゲット個数）を横軸にとっている．アニール温度については，エキシトンの吸収を考慮して，PL 強度の最適な 1100℃より低めで，900℃で行った．また，縦軸の損失については，図2は導波路の挿入損失を示し，図3は励起光照射時の損失から励起光非照射時の損失を引いた損失差となっている．図2より，励起光効果のない時の，過剰 Si や Er による導波損失の増加が評価でき，Si，Er 共に濃度が増えると導波損失が増える傾向がわかる．従って，励起光照射時に，この損失を上回るゲインを得られないとアンプ特性は得られない．図3では励起光としては波長 488nm，パワー200mW の Ar レーザを照射し，図2と同じ試料を用いて導波損失・ゲインを調べた結果を示す．図3の縦軸は損失時に正で，もしゲインが得られれば負になるが，残念ながら全て損失となった．図2と比べると， Si と Er の量がある一定以上で励起光の効果が見られる．すなわち，励起時のゲインにより，損失を少し補って損失が減っていることが推察される．しかし，損失を上回るゲインまでは至らず，総合的には励起光を照射すると損失が全て増える結果となっている．

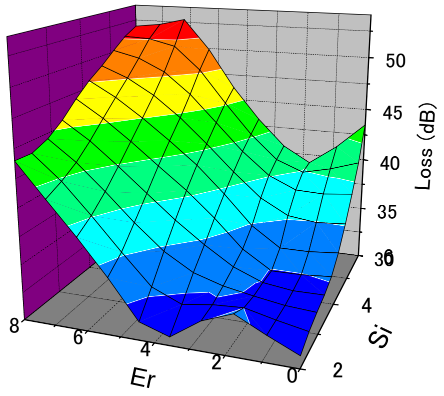


図２　励起光非照射時の光導波路損失．Si と Er 濃度を，作製時のスパッタターゲット数で示している．スラブ膜で，それぞれの損失を測定した．

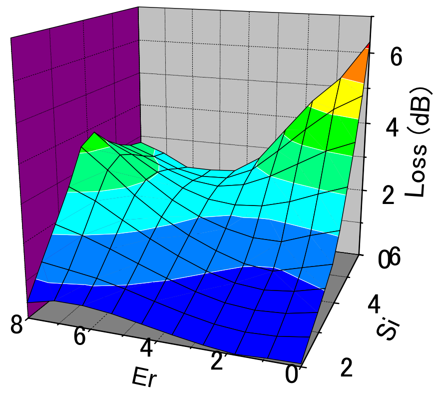


図3　励起光照射時の光導波路損失．試料は図1と同じものを用い，スラブ膜で損失を測定した．縦軸損失は，励起光非照射時の損失を引いた差を示す．

図2，3の試料のアニール温度 900℃は，通常用いていた 1100℃より少し下げ，導波路損失を下げる事を意識した設定であった．しかしそれでも増幅に至っていないので，更に低い温度も含めてアニール温度の効果を調べてみた．その結果が図4である．各組成で，アニール温度を変えて損失を測定したが，損失が最小になる温度はあって，最適値を示唆してはいるが，総合的にゲインを得ることには至っていない．この最適と思われるアニール温度でも，増幅には至っていないので，成膜の条件のかなり（場合により実用的でないくらい）狭い範囲でないと増幅に至らない可能性がある．

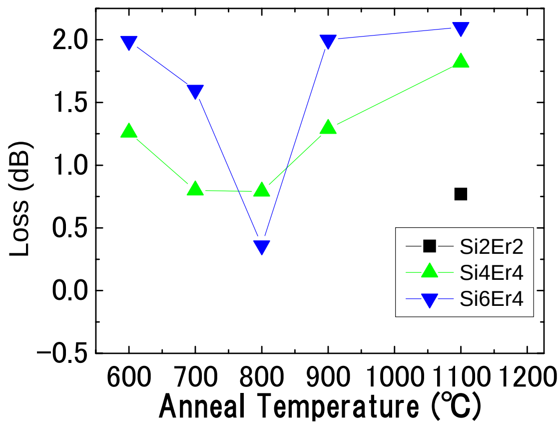


図4　Si，Er 濃度を変えた試料について，アニール温度を変えたときの光導波損失測定結果．縦軸の損失は励起光非照射時の損失との差．

5　自己評価：

研究成果の位置づけとして，残念ながら当初目指した増幅を得ることができていない．得られた結果は，物性的に優れた特徴を示していたこの材料を，光導波路アンプとして十分機能させるためには，新たな特別な工夫をしない限り困難と示唆しているように思える．基礎特性を得て，基盤技術も最低限は構築したと思うが，目指した目標に届かなかった点は反省材料となる．仮に実用的な素子応用は無理であったとしても，もう一歩の特性向上は可能だったかもしれない．

6　研究総括の見解：

当初の目標であったリッジ，スラブ構造導波路での光増幅が確認できなかったことは残念である。膜の作製や評価を行った結果として得られた成果を将来活かせるように整理するとともに、網羅的な実験に加えて理論的な裏づけを行うことを期待する。シミュレーションなどを行って、目標を達成できなかった要因を定量的に明らかにし、その改善策を提示してほしい。粒子と母胎材料との屈折率差を無くすなどの構造的な工夫ができるはずである。基礎的な研究なのか応用開発なのか、目標があいまいであり、論理的に研究・開発が進められなかったと判断される。

7　主な論文等：

論文 （1 件準備中）

学会・研究会報告（2 件）

研究課題別評価

1. 研究課題名：生体反応の光制御を目指した人工核酸デバイスの創製

2. 研究者氏名：浅沼浩之

研究員：趙　静（研究期間　H.15.4　～　H.17.10）

研究補助者：樫田　啓（研究期間　H.17.10　～　H.18.3）

3. 研究のねらい：

一つのタンパク質をコードしている遺伝子は数万から数百万という塩基数から構成されているが、その発現を実際に制御しているのは、RNA ポリメラーゼのプロモーターの様に高々数十から数百塩基よりなるナノサイズのデバイス的な機能を持った核酸である。もしこのような天然のバイオデバイスに化学的な“改造”を施せば、人類にとってより合目的的に遺伝子発現等の制御可能なシステムを作り上げることが期待できる。そこで本提案研究では、核酸に光応答性分子を組み込んだ光スイッチングデバイス（＝人工核酸デバイス）を構築し、遺伝子発現をはじめとする核酸の関与する生体反応の光制御を目指す。具体的には、アゾベンゼンを導入した光応答性 DNA を合成しこれを用いて 1) DNA 二重鎖の形成と解離の光制御、2) 転写反応の光スイッチング、を実現する。

4. 研究成果：

（1） アゾベンゼン導入 DNA による二重鎖形成と解離の光制御

DNA の大きな特徴の一つは相補鎖とのハイブリダイゼーションであり、酵素反応を含め多くの反応・機能が二重鎖形成と深く関わっている。従って、ハイブリダイゼーションが特定波長の光照射のみで制御できれば、DNA が関与する多くの反応を光制御することが可能になる。そこで特定波長の光照射で可逆的に構造異性化するアゾベンゼンを DNA 中に化学的に組み込んで、DNA 二重鎖の形成と解離の光制御を目指した（Scheme 1 参照）。その結果リンカーとして D-threoninol を用いてアゾベンゼンを導入したところ、*trans*-体では二重鎖を安定化し *cis*-体では不安定化することを見出し、UV 光および可視光照射によって二重鎖形成と解離が光制御できることを明らかにした。更に NMR による構造解析から、*trans*-体 *cis*-体いずれの場合でも DNA 二重鎖内にインターカレートしていることも明らかにした。

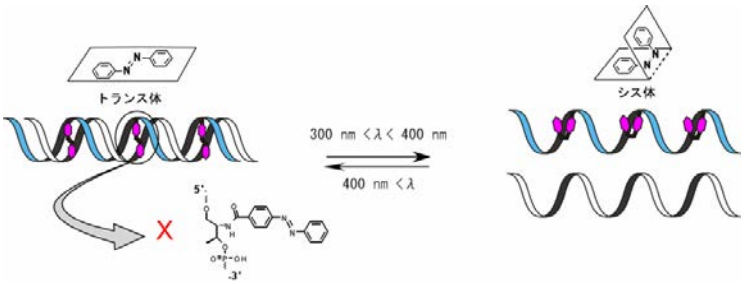


図1.　アゾベンゼン導入 DNA による二重鎖形成と解離の光制御

光制御効率はアゾベンゼンの導入数を増やすことで飛躍的に向上し、20mer の DNA にアゾベンゼンを 10 残基導入したところ、*trans-cis* 異性化

によって最大 85%の光制御を実現した。非常に興味深いことに、これだけ多数のアゾベンゼンをDNA に組み込んでも *trans* 体の場合には、アゾベンゼンを含まない天然の DNA 二重鎖よりも不安定化せず、むしろ若干安定化することも見出した。またこの場合、配列特異性を失うことも無かった。

(2) アゾベンゼン導入 DNA を用いた RNase H 反応の光制御

ハイブリダイゼーションを光照射のみで制御できれば、アンチセンス法を適用することで遺伝子発現の光制御が可能となる。一般にアンチセンス効果は、ターゲットとなる m-RNA とアンチセンス DNA がハイブリダイズした RNA/DNA 二重鎖を、RNase H が切断することに基づくと考えられている。従ってアンチセンス法を適用した遺伝子発現の光制御では、RNaseH による RNA 切断を光制御することが重要である。そこで(1)の成果を活用して、光応答性 DNA をセンス鎖に用いてアンチセンス鎖の放出を光照射でコントロールすることで RNase H による RNA 切断の光制御を目指した。その結果、設計どおり *trans*-体（可視光照射）では RNase H 活性を抑制し、*cis*-体（UV 光照射）で活性を向上させることに成功した。

（3） 光応答性 DNA エンザイムによる RNA 切断の光制御

天然の RNase H と同様の機能を持った人工酵素が、RNA 切断機能を持つ DNA エンザイムである。DNA エンザイムに光応答性が付与できれば、（2）と同様にアンチセンス法を利用した遺伝子発現の光制御が可能となる。そこで DNA エンザイムにアゾベンゼンを導入した光応答性 DNA エンザイムの開発を目指した。アゾベンゼンの DNA エンザイム内での導入位置を検討したところ、Loop と Binding arm の境界にアゾベンゼンを導入することで高効率な光制御を実現した。更に興味深いことに、この DNA エンザイムは *trans* 体で Native より触媒活性が向上することも明らかとなった。

（4） アゾベンゼン導入プロモーターによる転写・翻訳反応の光制御

上記のアゾベンゼン導入DNAは、融解温度（T_m）付近では光異性化で二重鎖の形成と解離を起こすが、T_mより十分低い温度領域では異性化によるアゾベンゼン近傍の局所的構造変化を起こす。この現象を利用すれば、DNA結合性タンパクや酵素のDNAへの結合を直接制御することが期待できる。T7-RNAポリメラーゼはプロモーターと呼ばれる 17 塩基より構成される特別な配列に結合することで転写反応を開始することが知られている。もしプロモーターへのポリメラーゼの結合が光照射により制御できれば、転写反応の光制御が実現する。そこでプロモーターの特定の位置にアゾベンゼンを導入したところ、T7-RNAポリメラーゼによる転写反応がUV光あるいは可視照射のみで非常に効率よく光制御できることを見出した。更にバイオセンサーによる分析と動力学的パラメータから、図２に示したようなアゾベンゼンの*trans-cis*異性化に伴うRNAポリメラーゼのプロモーターへの結合の差に基づいていることが明らかとなった。

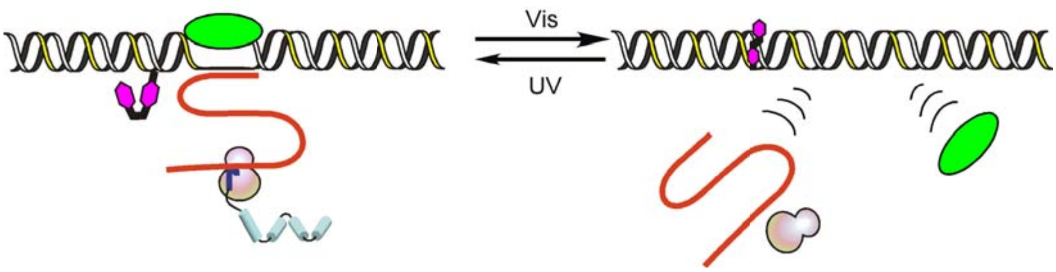


図 2　光応答性プロモーターを用いた T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応の光制御

（5） *in vitro* での GFP 発現の光制御

上記のように T7-プロモーター中にアゾベンゼンを導入することで転写反応の光制御が可能なことが明らかとなった。そこで、Green Fluorescent Protein(GFP)をコードしている遺伝子を実際に光応答性プロモーターの下流に導入し、*in vitro* での GFP 生産（＝翻訳）の光制御を検討した。

アゾベンゼンを導入した 1000 mer 程度の DNA の化学合成は実質不可能であり、またアゾベンゼン導入 DNA をプライマーに用いて PCR で増幅するとアゾベンゼンの手前で伸長反応が停止する恐れがある。そこで非天然分子を導入した DNA でもプライマーとして使用することが可能な非対称 PCR 法を用いて non-template 鎖と template 鎖を別々に作り分け、両者をハイブリダイズすることで光応答性プロモーターの下流に GFP をコードしている遺伝子を持つ cDNA を合成した。次に PURESYSTEM で GFP を発現させ、UV 光照射あるいは可視光照射による発現量の差を GFP の発する 505nm の蛍光（470 nm 励起）から定量化した。GFP の発現量はアゾベンゼンを導入していない native の cDNA より減少するものの、UV 光照射により可視光照射と比較して発現量の明確な増大が認められ、光異性化に伴う m-RNA の生成量の変化が GFP の発現量に直接反映されていることが示唆された。以上のように、*in vitro* で遺伝子発現の光制御を達成することが出来た。

5. 自己評価

ほぼ当初の計画通り、光応答性 DNA によるハイブリダイゼーションの光制御と、それを応用した酵素反応の光制御を達成した。更に、このプロジェクトの最終目標として掲げた *in vitro* での遺伝子発現の光制御(＝転写・翻訳の光制御)を幸いにも実現することができた。また本プロジェクトを通じて化学修飾 DNA に関する新たな興味深い性質を多数見出し、別の方向に発展させる見通しも得た。今後は本プロジェクトの基礎成果を活かし、バイオテクノロジーのための新たなツールとして *in vivo* での応用を目指した研究を推進したい。

6. 研究総括の見解

アゾベンゼンを DNA に結合させて核酸構造の光制御を行うという意欲的な研究であり、二重鎖形成、T7 RNA ポリメラーゼによる転写・翻訳反応の in vitro での光制御などの所期の目標を達成したことが高く評価できる。多数のアゾベンゼン分子を DNA に組み込んでも配列特異性や DNA

としての超分子性を失わないという発見も重要である。なお、in vivo における制御への応用には一層の技術開発が必要であるものの、さらなる展開が期待される。

7. 主な論文等

原著論文および総説・出版物

(1) Liu, M.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Azobenzene-tethered T7 promoter for Efficient Photoregulation of Transcription", *J. Am. Chem. Soc. in press.*

(2) Kashida, H.; Tanaka, M.; Baba, S.; Sakamoto, T.; Kawai, G.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Covalent Incorporation of Methyl Red Dyes into Double-Stranded DNA for Their Ordered Clustering", *Chem. Eur. J.,* **2006***, 12,* 777-784*.*

(3) Matsunaga, D.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Photo-regulation of RNA Digestion by RNase H with Azobenzene-Tethered DNA", *J. Am. Chem. Soc*., **2004***, 126(37),* 11452-11453*.*

(4) Kashida, H.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Alternating hetero H-aggregation of different dyes by interstrand stacking from two DNA-dye conjugates", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **2004**, *43(47)*, 6522-6525.

(5) Liang, X.; Asanuma, H.; Kashida, H.; Takasu, A.; Sakamoto, T.; Kawai, G.; Komiyama, M. "NMR study on the Photo-responsive DNA Tethering an Azobenzene. Assignment of the Absolute Configuration of Two Diastereomers and Structure Determination of their Duplexes in the *trans*-Form.", *J. Am. Chem. Soc*., **2003**, *125*, 16408-16415.

他、25 編

特許

「光応答性 DNA エンザイム」 特願 2004-55086 浅沼浩之、倉持壮、松永大次郎、小宮山真

招待講演

(1) 「色素と DNA とのコンジュゲーションによる DNA の光機能化」、表面技術学会第 113 回講演大会、平成 18 年 3 月 15 日

(2) 「生体機能の光制御を目指したアゾベンゼン導入 DNA の設計」、MRS シンポジウム、平成 17 年 12 月 10 日

(3) 「機能分子との交互コンジュゲーションが広げる DNA の可能性」、SORST ジョイントシンポジウム(4)、平成 17 年 11 月 28 日

(4) "Photo-regulation of DNA functions by azobenzene-tethered DNA", Annual Spring Meeting of the Polymer Society of Korea, 2004/4/9

(5) "核酸機能の光制御"、第 51 回応用物理学関連連合講演会、平成 17 年 3 月 30 日

他、2 件

研究課題別評価

1　研究課題名：

走査型相互作用分光顕微鏡の開発とナノ構造創製への応用

2　研究者氏名：新井　豊子

研究員：片野　元　（研究期間　H.15.4～H.15.10）

研究員：平出　雅人　（研究期間　H.17.4～H.18.3）

3　研究のねらい：

非接触原子間力顕微鏡（nc-AFM）は、試料が導電体でも絶縁体であっても、表面形状を原子スケールで描きだせる走査型プローブ顕微鏡である。本研究代表者はさきがけ研究以前に、原子スケールの分解能をもった超高真空nc-AFMを独自に開発し、探針-試料間に特定の電圧を印加して表面を走査すると、探針が試料表面の特定な原子上に来たときに強い引力がはたらくことを見いだした。この発見にヒントを得て、探針先端原子と試料表面原子の化学結合を印加電圧で評価、あるいは制御できるのではないかと着想した（この手法を「表面局在相互作用分光法」と名付け、特許申請した。）。さきがけ研究では、まず、化学結合に関わる準位を表面局在相互作用分光法により解析できることを実証する。これは、本手法により試料表面原子の同定が可能になり、さらに、印加電圧を制御して1原子―1原子の化学結合を制御し、原子・分子の操作・組み立てへと発展できることを意味する。そこで、本研究ではnc-AFMを基に、表面局在相互作用分光法の機能を併せ持つ走査型相互作用分光顕微鏡を開発し、個々の原子・分子を識別、化学結合を制御して、ナノ構造を創製する新しいボトムアップ型ナノテクノロジー基盤技術の創成を目指す。

4　研究成果：

本研究期間に、室温動作超高真空走査型相互作用分光顕微鏡が完成し、それを用いて表面局在相互作用分光スペクトル（電圧印加非接触原子間力分光スペクトル）注の取得に成功した。さらなる高精度な解析、および、原子・分子の操作・組み立てを目指して、極低温超高真空環境で動作する走査型相互作用分光顕微鏡の開発を進めている。

注：本研究で開発する探針-試料間相互作用力による分光手法を「表面局在相互作用分光法」と研究開始時に命名した。しかし、多くの研究者と研究成果を討議した結果、本手法は非接触原子間力顕微鏡(nc-AFM)によるナノ力学的分光手法であることから「（電圧印加）非接触原子間力分光法（nc-AFS）」が適していると判断し、論文等では nc-AFS と表記している。よって、以下の成果でも nc-AFS と記す。

【電圧印加非接触原子間力分光法】

試料は n 型 Si(111)ウェハー片、探針にはピエゾ抵抗カンチレバー端の[001]方位 Si 探針を用いた。走査型相互作用分光顕微鏡で観察された Si(111)7x7 再構成表面の nc-AFM 像を図1に

示す。輝点の1つ1つがダングリングボンドをもつ Si 吸着原子に対応し、12 個の吸着原子からなる菱形の領域が 7x7 単位胞である。明るく描き出された6個の原子からなる正三角形状の半単位胞は下層に積層欠陥がある領域で、積層欠陥がない半単位胞に比べて電子がやや過多な状態であることが知られている。この像に描きだされたコントラスの差異から、積層欠陥半単位胞内の Si 吸着原子が非積層欠陥層の半単位胞内の Si 吸着原子より化学活性が高いことが類推される。

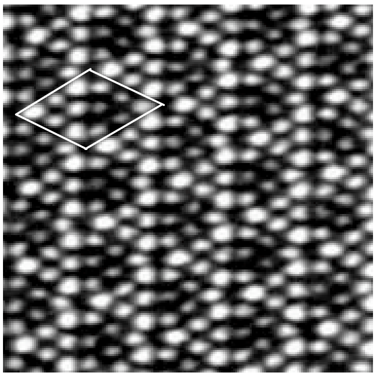


図1．Si(111)7x7 再構成表面の nc-AFM 像．走査範囲：12 nm x 12 nm. Δf = － 40Hz (f_0=192 kHz). 試料印加電圧 Vs = － 0.6 V. 菱形に囲った領域が 7x7 単位胞.

次に、この表面上で探針と試料間距離を 1.5, 0.43, 0.33, 0.3nm と近づけつつトポグラフィー像を観察しながら間欠的にZフィードバックをホールドし、探針−試料間印加電圧を掃引し、多数点で電圧印加 nc-AFS スペクトルを取得した（図2）。探針が試料面から 1.5nm 以上離れているときは、相互作用引力は接触電位差に相当する印加電圧で極小値を取り、印加電圧の増大とともに2次関数的に強くなった。この変化は古典的静電気学で説明できる現象である。一方、探針―試料間距離を 0.43nm に接近させると、すべての測定点で 0V 近傍にやや幅広のピークが出現した。

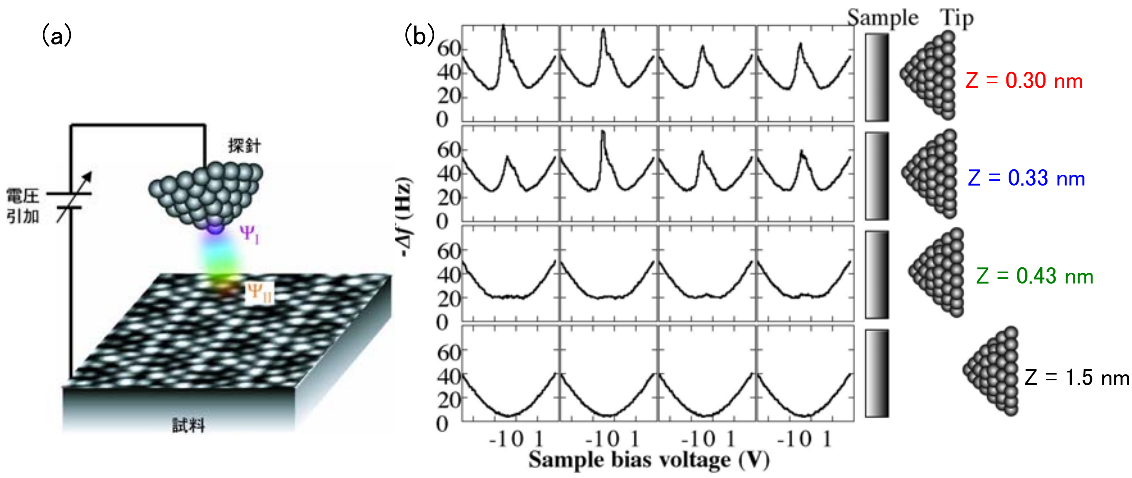


図2. (a) 電圧印加非接触原子間力分光法の概念図. (b) Si(111)7x7 の電圧印加非接触原子間力分光スペクトル. 探針と試料間を 1.5, 0.43, 0.33, 0.3nm と近づけながら、試料表面上を走査しつつ 256 点でスペクトルを取得した. 縦軸は相互作用力によるカンチレバーの周波数シフト量であり、大きいほど引力が強いことを示す. それぞれの距離で走査開始後に取得した4点でのスペクトルのみを表示した.

さらに 0.33, 0.30nm と近づけると、特定の測定点で 0V 近傍のピークが非対称に鋭くなることを見いだした。図3に、Si(111)7x7 表面の Si 吸着原子上で得られたスペクトルの探針─試料間距離の依存性の一例を示す。これらのスペクトルを詳細に解析すると、鋭い非対称なピークは、一つの幅広のピーク(半値半幅:約 0.35eV)といくつかの鋭いピーク(半値半幅:約 0.1eV)に分解できること、また、鋭いピークは試料表面上の原子位置によって出現電位が変化することがわかった。例えば、Si 吸着原子上ではフェルミ準位より−0.4eV のエネルギー準位に、積層欠陥層を持つ半単位胞内の Si レスト原子上では−1.0eV のエネルギー準位にもピークが現れる。これらの値は、光電子分光・トンネル分光法で測定された値や、密度汎関数法によって求められた Si(111)7x7 表面のそれぞれの Si 原子の電子状態が持つエネルギー準位によく一致する。

検出された鋭いスペクトル・ピークは、特定の印加電圧下で表面 Si 原子と探針 Si 原子との間で発生した量子力学的共鳴結合状態を捉えたと考えられる。即ち、図4に示したように、印加電圧の変化によって静電エネルギーが変化し、探針と試料の双方のダングリングボンドの電子エネルギー準位がチューニングされるように一致したときに、両者の電子の量子力学的共鳴が極めて強くなり、化学結合が強く誘起されたと考えられる。すなわち、力学的手法による全く新しい分光手法「非接触原子間力分光法(nc-AFS)」を提案し、実証したことは本研究の最大の成果である。nc-AFS は力学的電子分光法であるため、従来、トンネル分光では、印加電圧 0V 近傍で電流がわずかにしか流れないため分析できないが、本手法ではそのような結合に重要な役割を果たしているフェルミ準位近傍の電子状態を分光できる。さらに、nc-AFS と同時に探針−試料間に流れる電流も検出でき、化学結合の形成とコンダクタンスの関係についても考察を進めている。

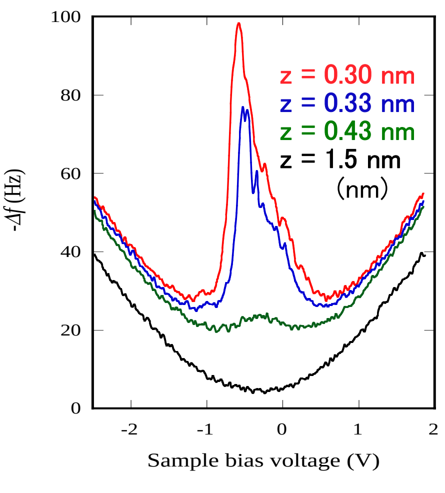


図3. Si(111)7x7 表面 Si 吸着原子上の電圧印加非接触原子間力分光スペクトル. zは探針−試料間距離. 0V 近傍のピークに、量子力学的共鳴による相互作用の電圧依存性が現れている.

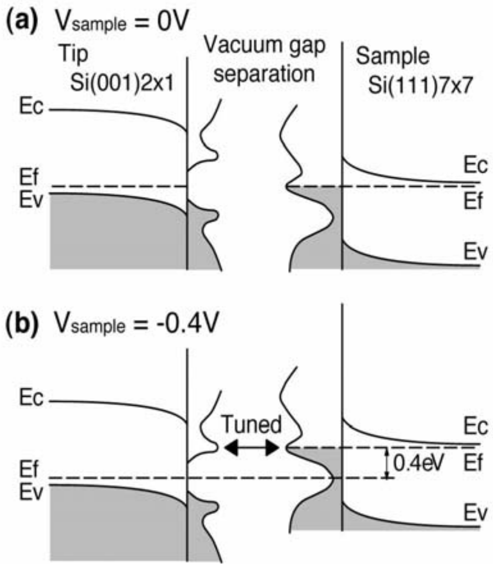


図4. 変化する印加電圧下で[001]方位の Si 探針とSi(111)7x7 表面が近接したときのエネルギー・ダイアグラム. Si 探針先端は Si(001)2x1 再構成構造と同じ表面電子状態であると仮定した.

【固体表面原子間の化学結合論への発展】

量子力学的な電子の共鳴現象と化学結合の関連は、Pauling らが確立した「化学結合論」で説明される。本研究により、2つの固体表面の原子に局在する表面準位をバイアス電圧を印加してチューニングし、化学結合を誘起できることが示された。さらに Si 以外の系でも印加電圧による表面準位のチューニングにより化学結合が誘起されるかを調べ、Pauling の「化学結合論」を拡張した「凝縮系の表面化学結合論」を構築できる可能性が生まれた。

5 自己評価:

研究申請当初「探針−試料間印加電圧を変化させて、探針先端原子の表面準位と試料表面準位を合わせれば、量子力学的にそれらの準位が共鳴して強い化学結合力が生じる」ことを予言し、この現象を利用した分光手法を提案した。本研究により、その予言を実験的に確認し、新しいナノ力学的分光手法の道を開くことに成功した。当初、本手法により化学結合を解析、制御、さらに発展させて原子・分子の操作・組み立て手法の開拓までを目標としていたが、極低温環境で駆動する装置の開発が遅れ、原子・分子の操作・組み立てには至らなかった。申請当初の提案が正しかったことから、テスト段階まできている極低温装置を用いて近い将来、当初目標が達成されるよう研究を推進する。

6 研究総括の見解:

ユニークな表面局在相互作用分光法を提案し、新しい分光法を目指して開拓的研究を進め、個々の原子間に特徴的な相互作用の観測に成功したことは高く評価できる。この実験により外部操作によって化学結合力を実際にコントロールする手法を実証した。この分光法がどれだけ発展性があるかは、今後種々の表面へ適用し、結果を蓄積することと、信頼できる理論による基礎付けで行われると考えられ、期待が持たれる。今後はこの新しい分光顕微鏡の有用性を示すとともに、他の分野の人達との議論などを通して、ナノ構造創製への筋道を明確にして行くことが期待される。

7 主な論文等:

原著論文:7件、特許:1件、受賞:1件、招待講演:6件

論文

1. T. Arai and M. Tomitori, "Electric conductance through chemical bonding states being formed between a Si tip and a Si(111)7x7 surface by bias-voltage noncontact atomic force spectroscopy", Phys. Rev. B, in print.
2. M. Hirade, T. Arai and M. Tomitori, "Energy spectra of electrons backscattered from sample surfaces with hetero structures using field emission scanning tunneling microscopy", Jpn. J.Appl. Phys. in print.
3. T. Arai and M. Tomitori, "A Si nano-pillar grown on a Si tip by AFM in UHV for a

high-quality scanning probe", Appl. Phys. Lett. **86**, 073110 (2005).

4. T. Arai and M. Tomitori, " Observation of Electronic States on Si(111)-7x7 through Short-Range Attractive Force with Noncontact Atomic Force Spectroscopy ", Phys. Rev. Lett., **93**, 256101 (2004).
5. T. Arai, S. Gritschneder, L. Tröger and M. Reichling, "Carbon tips as sensitive detectors for nanoscale surface and sub-surface charge", Nanotechnology, **15**, 1302-1306 (2004).

特許

1. 「走査型プローブ顕微鏡用探針の製造方法」新井豊子、富取正彦、出願人：科学技術振興事業団、公開番号：特許公開２００４－２７９３４９、特許番号：第 3753701 号 (2005.12.22)

受賞

平成16年度 ナノプローブテクノロジー賞

授与機関：日本学術振興会ナノプローブテクノロジー第167委員会

業績名：電圧印加非接触原子間力(顕微鏡)分光法の開発

招待講演

1. T. Arai, International Conference on Nanoscience and Technology（ICN+T 2006）, 2006.7.30-8.4. （開催地：Basel, Switzerland）（招待受託、講演タイトル未定）
2. T. Arai and M. Tomitori, "Bias-Voltage Dependence of Chemical Bonding Force Detected by Noncontact Atomic Force Microscopy/Spectroscopy", The 13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy and Related Techniques (STM'05), 2005.7.3-8. （開催地：札幌）
3. T. Arai and M. Tomitori, "In-situ preparation of noncontact AFM tips for surface force spectroscopy", the 8th Asia-Pacific Conference On Electron Microscopy, 2004.06.07-11. （開催地：金沢）

研究課題別評価

1　**研究課題名**：

自己集合膜を利用したストレスの制御とパターニング

2　**研究者氏名**：

研究員：板倉　明子　（研究期間　H.14.11～H.18.3）

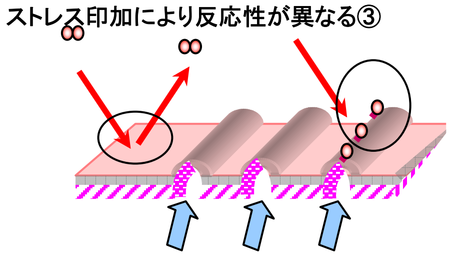
ポスドク研究員：五十嵐　慎一　（研究期間　H.15.4～H.18.3）

3　**研究のねらい**：

ストレスは物質の歪みや破壊に繋がるものとして悪印象があるが、ストレスが存在する場所だけで反応性が上がったり、ポテンシャルが変化したりして、利用の可能性も秘めている。本研究は自己集合膜が作るストレスがイオンや紫外線照射で大きく変わることを利用し、ストレスを制御、配置した表面を作り、反応制御のパターニングを行うことをねらいとした。

4　**研究成果**：

図 1.　パターニング概念図



研究の狙いを分割して列記すると①ストレスを定量的に供給でき、かつ配置ができるような材料を探索する、②その材料を使って、反応基板表面にストレスを配置する、③基板表面にストレス起因の反応パターンを作る（モニターとなるような反応を模索することも含む）、という 3 段階になる（たとえば図 1 参照）。狙いの 3 段階に従う形で成果を記述する。

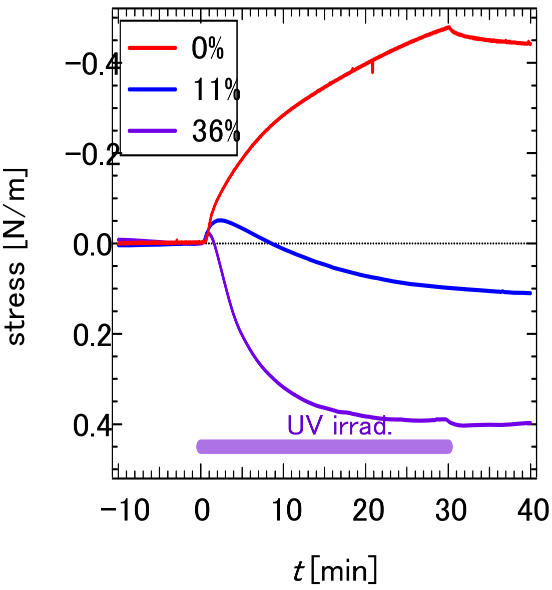
まず、**①のストレスを定量的に供給でき、かつ配置ができるような、材料を探索する**事に関して、金上のアルカンチオール膜、金上のプラズマ重合アリルアミン(PPAA)膜、電子応答のレジスト膜、ポリエレクトロライト膜について、研究を行った。このうち、金上およびシリコン上のプラズマ重合アリルアミン膜がもっとも有効であったので、これを成果として報告する。

有機分子のポリマー膜には、紫外線照射により架橋反応を示すものが多く、ポリマー内の分子間結合が変化して膜の密度・体積を変化させる。この特徴を利用して、ストレス供給源とすることをもくろみ、カンチレバーセンサーを用いて、PPAA 膜に紫外線を照射した時のポリマー膜⇔基板界面でのストレスを測定した(図2参照)。雰囲気の湿度が 0 パーセントの状態で紫外線を照射すると、PPAA 膜(膜厚 20nm)の体積が膨張し、圧縮ストレスが観察された（図中紫色で示した紫外線照射中に、ストレスが縦軸上方向に変化している）。一方、湿度を上げることにより、紫外線照射により発生するストレスが圧縮性から引っ張り性(縦軸下方向への変動)へと変わる。これは水蒸気がある状態では紫外線により解離した水分子が膜と反応し、架橋構造のでき方が変わるためである。紫外線照射をせずに環境の湿度のみを変えても PPAA はストレスを

発生するが、それは湿度変化に対して可逆的であった。一方紫外線照射によるストレスは照射終了後にも変化しない（Sensors and Actuators B-Chemical (2006), APL（2006））。

なお、紫外線、湿度変化による膜厚方向の体積膨張については報告があるが、横方向の膨張を測ったのはこの研究がはじめてである。その過程で、膜の厚み方向と横方向の体積変化から、膜のヤング率を直接測定することが可能となった。成膜時(プラズマ重合時)のプラズマ出力を変えると膨張率の縦横比率が変わってくるという結果も得られ、これまで膜厚方向のみの体積変化の計測で架橋度の低いポリマーのほうが湿度応答性がよいと思われていたものを覆す結果となった。また、カンチレバー上の PPAA の湿度応答は可逆的で再現性もいいことから、湿度センサーとしての利用が可能である（特願 2005-104023）。

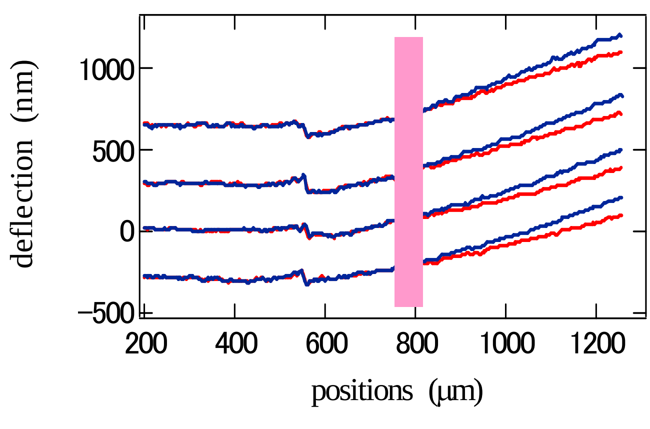
図２　紫外線照射によるPPAAのストレス変動



②の反応基板表面にストレスを配置する事に関しては、シリコン薄板の裏面に上記の①で試みた膜を成膜し、その膜に紫外線やイオンを部分照射して、そのストレスにより薄板をゆがませる。生じたストレスの二次元分布を、光てこシステム、顕微ラマン分光、インターフェロメータなどで測定した。インターフェロメータでPPAA膜への紫外線（λ = 254 nm）部分照射で生じた応力を測定し、よい結果を得たので報告する。

インターフェロメータは、基板各点からの反射光を参照光との干渉をその場測定することで、平面上の局所的なたわみを測定し、それに対応する応力を見積もる手法である。PPAA を（20nm）成膜したシリコン基板(2μm)に、スリットを持つステンシルマスクを固定し、紫外線を照射した。図 3 には、湿度 0 パーセントの窒素ガス雰囲気で、4 本のシリコンカンチレバー試料の一部に幅 50μm の線状に紫外線を照射したときのシリコン表面の応力変化を示す。縦軸はカンチレバーの各点の変位、横軸はカンチレバー各点の位置で、200 から 450μm までの部分はカンチレバーを支えるベース、その先に長さ 750μm のカンチレバーが取り付けられている。四本のカンチレバーのいずれに対しても、横軸で

図３　PPAA膜の局所ストレス分布



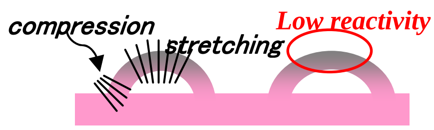
750～800μm のエリアに紫外線を照射している(紫の紗の部分)。赤のラインが照射前、青のラインが 2 時間照射後の変位である。紫外線照射範囲から折れ曲がり、基板の照射部分にのみ 0.7N/m（この基板厚だと 1MPa 程度に相当）の応力をかけることに成功したことがわかる。

また、ステンシルマスクを基板から浮かして固定し、紫外線を角度を変えた 2 方向から照射し、一つのマスクを用いて、カンチレバーに高湿度下での引っ張り性ストレスと、乾燥環境下での圧縮性ストレスの双方を作ることにも成功している(未発表データ)。

研究のこの段階(ストレスを配置する)に関連し、ストレスセンサーの研究で問題になっている“定量性”の問題に直面した。いくつかの研究機関が、金上のアルカンチオールが自己集合膜を作るときの圧縮応力について報告している。カンチレバーの曲率や先端の変位から、ストーニーの式(脚注)を用いてストレスを計算するという同じ手法で、各研究機関とも定性的には同じ結果が得られている。にもかかわらず、ストレスの値が一桁くらいの範囲でばらついてしまい、理由が議論されていた。この研究で、同一の膜質、膜厚の PPAA に照射領域の形や幅を変えて紫外線を照射したときに、（本来数式に入ってこないはずの）カンチレバーの横幅や、照射領域の形状、広さなどが、（本来の分子構造からは同じ値に現れるはずの）ストレス値に影響を及ぼしていることがわかった。現在のところ、実験的に傾向を捕らえただけなので、結論を出すためには更なる実験が必要であるが、カンチレバーをセンサーとして研究する場合には必ず議論しなければならない効果のひとつを見つけたと考えている。なお、傾向としては、照射領域を狭くしたほうが大きなストレスが得られるので、微細加工の観点からは歓迎する方向である。

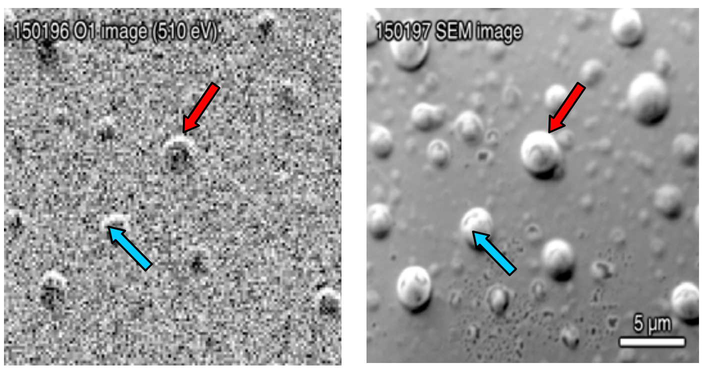
注)ストーニーの式：膜を吸着させたときに変形する基板材料を等方弾性体と仮定して、片側を固定した薄い基板(厚さ h)の先端の歪みの値(δ)から中にかかっているストレス(σ)を求めるもので、固定端から先端までの長さ(L)、材料のヤング率(E)、ポアソン比(ν)から、$\int = \delta t \cdot (L^2/h^2) \cdot (1-\nu)/3E$ という関係式で計算される。

③基板表面にストレス起因の反応パターンを作ることに関して、



局所ストレスを作る手法の一つとして、シリコン基板へイオン照射を行い、ブリスター(表面にできた気泡)の形状を利用したストレスパターニングを行った。H イオンでシリコン上に作製したブリスターに関しては、最表面が結晶性を保っていることが報告されているので、(ブリスター付近には)ストレスがかかっていると考えられる(図参照)。また、その形状から、周縁部と頭頂部のストレスの値も計算することが可能である。表面を大気曝露し、オージェ電子分光法

図４． シリコンブリスターの酸化実験
酸素原子分布（左）と、同位置の電顕写真（右）



により表面組成を調べると、図4のような酸素分布を示した。明点が酸素ピークに対応している。

SEM像と比較するとブリスター周縁部はリング状に酸化が促進されていること(赤矢印)、ブリスター頭頂部は酸化が抑制されていること(青矢印)が分かる。この図でのストレスは、頭頂部が6GPaの引っ張りストレス、周辺部が6GPaの圧縮ストレスと見積もった。この結果では、酸化のリングの幅はサブミクロン程度だが、シリコンブリスターのサイズは照射イオンのエネルギーや種類で制御できるので、より小さい酸素パターンの作成も可能である。(表面科学(2004), JJAP投稿中, 特開2005-051081)

5 自己評価:

目標の中心である、ストレスを利用してパターンを作る、という意味においては、PPAA 膜の利用によってストレスの大きさおよび方向を制御して配置することができるようになった。

自己集合膜を利用することはできなかったが、反応の二次元パターン(サブミクロン幅のリングパターン)も手に入れた。しかし、酸化膜厚の厚い部分と薄い部分のパターンを作っただけで、「酸化する場所としない場所のパターニング」という工業的に利用できるレベルには及ばない。

自己集合膜が作った(究極的には分子サイズまで小さくできる)ストレスを利用して反応パターンを作ることについては、現在まだ研究を進行中である。この研究では、パターンの大きさや形を自由に変えられることによって、これまで(この分野で)解決に至っていないカンチレバーセンサーの感度やセンサーの弱点と正面から向き合うことになり、実験の再現性を保証できない多くのデータに埋もれる状況になってしまった。反応パターンができても、過去の研究者の解釈のように「これはストレス起因と思われる」というのでは納得がいかないので、やはり、定量化したストレスを与えてパターンを設計したい。歪みを利用して応力を測定する分野の研究者が、センサーの信頼性や特徴について積極的に議論し始めたところであり(2006 年 5 月にカンチレバーセンサー関連の WS が開かれる)、昨年あたりから応力の効果を発表する研究者も急激に増えた。これから議論も活発になると期待できるし、この研究は他所より先行しているので、2 年程度の後には「(自己集合膜が作ったストレスを利用した)反応パターニング」を完成させたいと思う。

個人的には研究期間中に第2子の出産があり、体調不良や産休などで一時的に研究を中断したほか、思うように時間を取れない時期があった。しかし、ポスドク研究員の大きな協力があって、実質的な停滞は長くなかったと思う。出産をネガティブな要因としないためにも、今後、あまり遅れのないように当初の目的を達成したいと思う。

6 研究総括の見解:

シリコン結晶表面のパターニングした薄膜に紫外線を照射することによってストレスパターンを作り、ストレスに依存する表面反応性を調べるという研究である。ストレスを積極的に利用しようという発想はよく、紫外線照射により応力の方向を制御できるなど興味深い知見も得られている。この目的に適した薄膜材料をいくつか発見し、実際にストレスの測定を行った点は評価できる。ストレスと結晶成長との関係は、基礎的にも応用面からも重要で、論理的に着実に研究

を進めている。学会活動･特許など研究成果もあり、今後の研究成果が期待される。

7　主な論文等:

＜論文＞　合計8件

●A.N. Itakura, M. Shimoda and M. Kitajima, “Surface Stress Relaxation in SiO_2 films by Plasma Nitridation and Nitrogen distribution in the film”, Appl. Surf. Sci. 216(2003) 41-45

●五十嵐慎一、板倉明子、北島正弘、中野伸祐、武藤俊介、田辺哲朗、北條喜一、「ブリスタリングによる応力変調を利用した局所シリコン酸化の観察」, 日本表面科学会学会誌, 25 巻 9 号、pp. 562-567(2004)

●S. Igarashi, A.N. Itakura, M. Toda, M. Kitajima, L. Chu, A.N. Chifen, R. Förch, and R. Berger, “Swelling signals of polymer films measured by a combination of micromechanical cantilever sensor and surface plasmon resonance spectroscopy”, Sensors and Actuators B-Chemical,(2006)　*in printing*

●S. Igarashi, A.N. Itakura, M. Kitajima, A.N. Chifen, R. Förch and R. Berger, “Surface stress control using ultraviolet light irradiation of plasma-polymerized thin films”, Applied Physics Letters, *submitted*

●M. Toda, A. Nakamura Itakura, K. Büscher, and R. Berger, Surface stress of polyelectrolyte adsorption measured by micromechanical cantilever sensors, eJSSNT (proceedings of ISSS4) *submitted*

＜特許＞　合計 2 件　　*＊中村明子は、板倉の戸籍名です*

●「二次元パターニング方法ならびにそれを用いた電子デバイスおよび磁気デバイスの作製方法」特開 2005-051081、平成 17 年 2 月 24 日、五十嵐　慎一、中村　明子、北島　正弘
同、国際出願番号 PCT/JP2004/011025　2004 年 7 月 27 日

●「高分子膜の体積膨張に伴うストレス変化を利用した湿度センサー」、特願 2005-104023、平成 17 年 3 月 31 日、五十嵐慎一、中村明子、北島正弘

＜受賞＞なし

＜招待講演等＞　招待講演3件、一般講演は合計 27 件

●“Stress control and stress patterning by self-assembled monmolayer” A.N.Itakura, Max Planck Institute for Polymerforschung Science Seminer, Mainz, June. 25. 2004

●“Surface stess indused by swelling of plasma-polymerized allylamine films” S.Igarashi, Max Planck Institute for Polymerforschung Science Seminer, Mainz, June. 25. 2004

研究課題別評価

1　研究課題名：

　微細加工によるナノバイオ情報解析デバイス創製

2　研究者氏名：一木　隆範

　研究員：大益　史弘　（研究期間　H.15.4～H.16.7）

　技術員：加瀬　聖悟　（研究期間　H.15.4～H.17.3）

3　研究のねらい：

　本提案研究は、半導体産業で培われた 10nm から 100μｍ に亘る高精度微細加工技術を応用して作製されるバイオチップ（マイクロエレクトロニクス、マイクロマグネティクス等とマイクロ流体デバイス、マイクロアレイチップの複合集積デバイス）を中核とし、更に光学顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡等を利用した顕微画像計測技術を組み合わせて個々の細胞の直接的な操作・分析を可能にする従来に無い新しい細胞分析システムならびに分析手法の開発を目指した。即ち、近年進捗が著しいバイオイメージング技術の利点を最大限に活かしつつ、さらにイメージングのみでは達成できないバイオ研究の手段をバイオチップ技術により提供することで、将来のバイオ基礎研究、医療、創薬産業において有要な単一細胞レベルでの生命活動を精密に計測するための新規なプラットフォームの構築に繋げることが目的である。

4　研究成果：

（1）マイクロ流体デバイスのための微細加工技術の開発

　細胞を扱うデバイスには 10μｍ～100μｍレベルの微細加工が要求される。また、基板材料も半導体デバイスのようなシリコンウエファに留まらず、透明なガラスやプラスチックがしばしば用いられる。そのため、シリコン半導体デバイスの微細加工技術を基盤としつつも、異種材料への展開や加工速度の劇的な高速化を図った。ガラス加工技術、プラスチック製流体デバイス製造に関するプラズマ応用技術、高気圧微小プラズマによる超高速シリコンエッチング技術を研究し、ここで構築した独自のデバイス加工技術を応用して種々のデバイスの試作開発を行った。

（2）微細加工チップを用いた細胞の機能評価、分取システムの開発

　多数の細胞試料の中から必要な細胞だけをマイルドに分取するセルソート技術はこれからの細胞研究において必要不可欠な技術である。本研究では光学顕微鏡上による細胞の画像情報に基づき、ソーティングを行うためのセルソーターの開発を行った。シリカガラス製のマイクロ流体デバイスに微小電極を集積化し、交流電界を利用した誘電泳動方式ならびに直流電界を利用した電気泳動方式により複数の流路への細胞の振り分けを可能にするセルソータチップの試作開発と赤血球細胞を用いたデバイス動作の確認・評価を行い、それぞれの方式の動作特性をスケーリングの観点から考察した。交流電界による誘電泳動方式は電気的に中性な粒子にも適用可能と

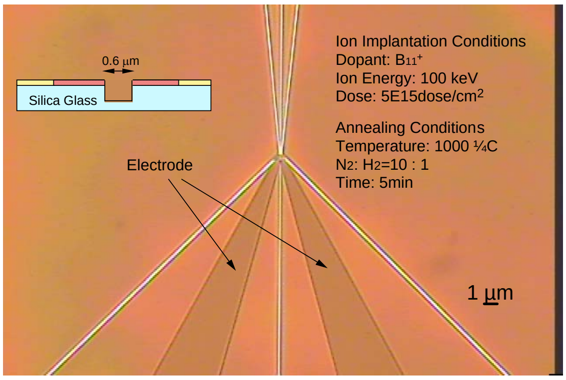


Fig. 1 ナノフルイディクスに電極を自己整合プロセスで付与したナノソーターデバイス.

いう利点を持つが、細胞のサイズの2乗に反比例する電圧の印加が必要で、一方の直流電界による電気泳動方式では細胞のサイズではなく、細胞のζ電位により動作条件が決まる。誘電泳動方式で動作電圧の高電圧化を避けるためにはソーティング対象のサイズに合わせてデバイス全体を縮小するという方針も可能である。そこで、更に、流路寸法をサブμm領域に縮小したナノ流体デバイス技術への拡張による分離対象物の更なる微小化についても検討した。高抵抗 Si 薄膜をガラス基板で挟む構造の流体デバイスを提案し、イオン注入による自己整合電極形成技術と陽極接合によるデバイス封止技術の併用により、電極をナノフルイディクスに精度良く集積できるようになった(Fig. 1)。当該技術を用いた細胞小器官分取デバイス作製プロセスを提案した。

上述のセルソーターシステムは、顕微画像から細胞選択の基準となる情報を抽出することを前提に開発したが、個々の細胞の状態の判定に利用できる物性値は画像情報に限られるものではない。細胞の表面電位(ゼータ電位)を計測する細胞電気泳動法は、ゼータ電位が細胞膜表面のタンパクや糖タンパク等の状態を反映する特性値であることや、非侵襲的に測定できることから、細胞の種類や状態の判別に有用であると考えられる。そこで、我々はマイクロキャピラリー電気泳動(μCE)チップと高速度カメラを搭載した顕微光学系、実時間粒子画像処理ソフトウェアから構成される高効率細胞表面電荷評価システムを開発した。この技術は上述のセルソータチップの細胞評価判定基準として組み込むことも可能である。μCE チップ流路内壁への細胞の非特異吸着の問題、ならびに、壁と細胞間の相互作用が泳動挙動に及ぼす影響を検討するためにチップ流路内壁に複数の異なる材料で被覆を施し、異なる環境 pH における細胞電気泳動度の値を比較、評価した。内壁被覆材料の違いは流露内壁のゼータ電位の変化をもたらすために、電気浸透流(EOF)の挙動、ひいては細胞の泳動挙動に著しい変化をもたらすが、最終的に得られる正味の電気泳動度の値には何らの影響も及ぼさないことが判明し(Fig. 2)、チップを用いた細胞電気泳動度測定の広範な pH条件域における高い信頼性が示された。さらに、当該システムを用いて HL60 の細胞周期同調剤への応答を評価し、細胞周期に伴う細胞の状態変化を追跡可能なことを示した(Fig. 3)。

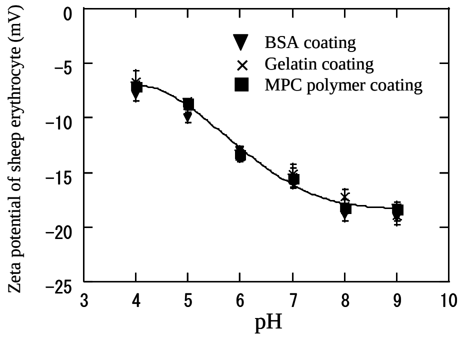


Fig. 2　赤血球のζ電位のpHによる変化.
流路内壁の被覆法を変更に依らず電気泳動チップにより算出される細胞ζ電位は広いpH領域においてよく一致する.

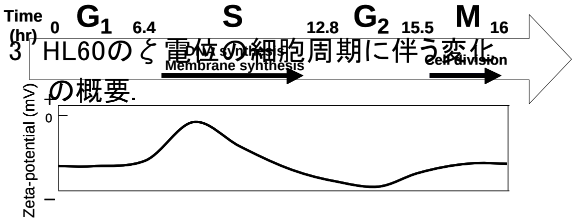


Fig. 3　HL60のζ電位の細胞周期に伴う変化の概要.

（3）磁気ビーズ操作機能を有するマイクロ流体デバイス、マイクロリアクターアレイチップの開発

微細パターン化磁性材料を集積化したマイクロ流体デバイスとそのアフィニティアッセイへの応用

細胞や蛋白質、核酸の分離、精製を高効率化するために、超常磁性微粒子を高分子ポリマーで被覆した磁気ビーズの表面を抗体等で修飾し、目的の細胞や生体分子を固定化し、磁石で操作する磁気ビーズ法が用いられている。この磁気ビーズは担体として利用すると、通常は物理的操作が困難な生体分子の操作も可能になる。そこで、微細パターン化したパーマロイ薄膜をマイクロ流体デバイス上に集積化した磁気ビーズ操作デバイスを開発・試作し、ビオチンで表面修飾した磁気ビーズをモデル系として用いて、生体分子の特異的アフィニティを利用した生体物質の検出、収集デバイスの実証動作を行った（Fig. 4、Fig. 5）。電磁石によりデバイス外部から導入した磁力線がパターン化した磁性薄膜により局所的に集中し、磁場の不均一性によりマイクロ流体デバイス上で磁気ビーズの固定、開放の制御を可能にした。このデバイスの試作開発のためにはパーマロイ薄膜の水素と一酸化炭素のプラズマケミストリーを用いた微細加工技術を独自に開発して用いた。また、パーマロイで試作したデバイスでは僅かな残留磁化がビーズの操作にわずかに影響したため、発展的に、ナノ磁性微粒子を分散したポリマー薄膜をパターニングして集積化するデバイス要素技術も提案した。また、派生の成果として、マイクロリアクターに磁性薄膜を付与する技術により、膨大量の磁気ビーズをセルフアセンブルで配置するマイクロリアクターアレイチップ技術も開発した。

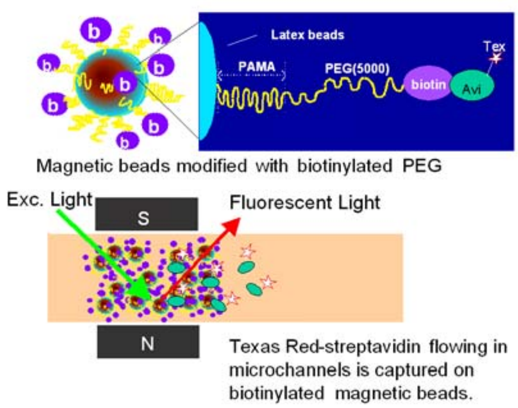


Fig. 4 モデル系としてビオチン修飾磁気ビーズを用いたストレプトアビディンのアフィニティアッセイ.

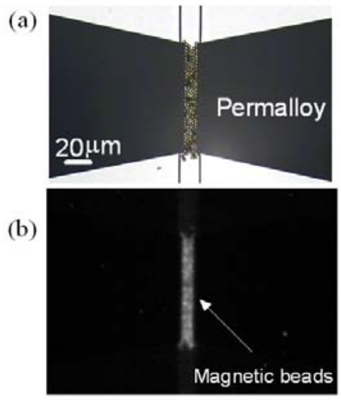


Fig. 5 パーマロイ微細パターン間で固定された磁気ビーズ（上）、ビーズ上に結合したストレプトアビディンの蛍光検出(下).

（4）マイクロ流体デバイス上へのマイクロピペット集積化技術

マイクロファブリケーション技術で形成される微細構造体による細胞の直接的計測、操作（細胞内外への物質抽出、注入、細胞内あるいは細胞膜の電位計測など）の概念を実装化するために、自己支持型シリカ製マイクロニードルのマイクロ流体デバイスへの集積化(Fig. 6)、ならびに、シリカ製プレーナー型マイクロピペットデバイス(Fig. 7)について研究した。前者を作製するために開発された製造プロセスは、ピペットを自立構造にするための犠牲層となるアモルファスシリコン層を利用してほう珪酸ガラス基板に陽極接合する点に特徴がある。流路、マイクロニードルはいずれも可視光域で透明で、顕微鏡下での細胞観察、レーザーピンセットとの併用に適している。マイクロ流路により細胞を自動的にマイクロピペット先端位置に輸送できること、約 1～2μm 径のシリカガラス製マイクロニードルが細胞膜を容易に貫通することが確認された。後者については、厚さ 150μm の溶融石英ガラスに両面からそれぞれ径が 100μm、2μm の孔をアライメントして ICP エッチング加工し、電流を流す貫通孔を形成し、ポリマー製マイクロ流体デバイスに組み込んで用いた。プレーナー型マイクロピペットデバイスの電気的な特性評価の結果、試作チップは現在、通常用いられているガラス管を引き伸ばして作製するマイクロ電極と同程度の良好な性能であることを確認した。我々の試作したこれらのデバイスは、必要に応じて更なる微細化や電極数、形状等のデザインが可能であり、今後、電気生理研究における細胞局所性向上や多点計測等への進歩が期待できる。

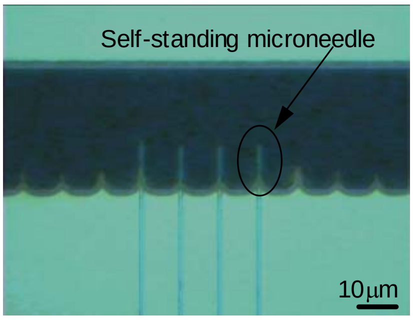
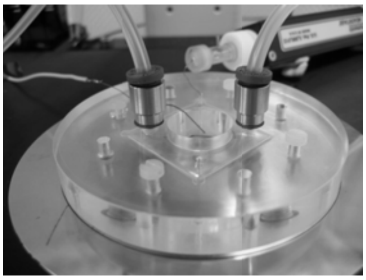


Fig. 6 μ流路に集積化したμニードルアレイ.



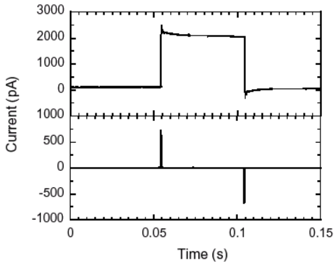


Fig. 7 プレーナーマイクロピペット集積化流体デバイス(左)とその電流応答特性(bath mode と on-cell mode)(下).

(5)チップ上で培養・凍結した細胞の原子間力顕微鏡による計測技術の開発

チップ上で培養した細胞を瞬時に凍結させることにより、細胞膜の流動性および内部の生体分子の分布を固定させ、細胞の発現状態を保持したままで原子間力顕微鏡を用いて微視的計測を実現することが目的である。本目的を達成するためには、計測システムの開発に加え、チップ上での低ダメージな細胞凍結、解凍プロトコル、チップ上での細胞の制御培養技術が必要であり、これらの要素技術について並行して研究した。

まず、凍結細胞計測のためのクライオ原子間力顕微鏡の開発について述べる。Fig. 8 のように倒立型位相差顕微鏡ステージ上に雰囲気制御可能な AFM 観察チャンバーが搭載された計測システムを試作した。チャンバー内には液体窒素をフローして冷却可能なサンプルステージを設置され、これはピエゾ素子にて X-Y 方向への移動が可能である。カンチレバーは PZT 薄膜による自己検出型であり、狭隘な光学顕微鏡への組み込みを可能にし、外部検出器や複雑な光学的アライメントも不要である。本装置を用いて氷表面を観察し、像取得動作を確認した。

AFM 計測の信頼性や再現性を得るためには、観察の対象となる細胞試料の位置や形状を人為的に制御することが重要であると考え、チップ上での制御培養技術を検討した。モールドに充填した磁気ビーズを PDMS フィルム上に転写して作製したビーズパターン配列培養プレートを用いると、細胞外マトリクスの物理的形状と化学的性質の相乗的な効果のデザインが可能になる(Fig. 9)。この技術を HeLa 細胞の培養に適用し、位置・サイズ、形状制御、さらにはこれらに起因する増殖速度の制御に応用可能であることを示した。

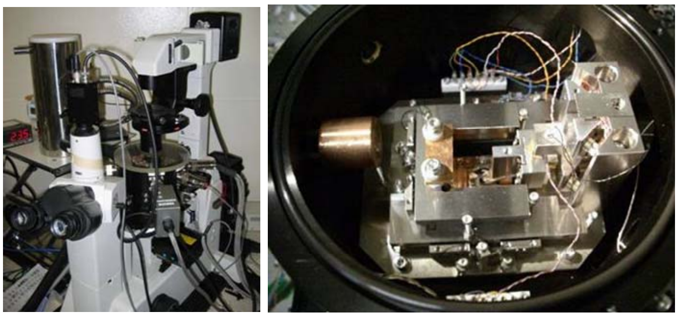


Fig. 8 凍結細胞観察用顕微鏡システム

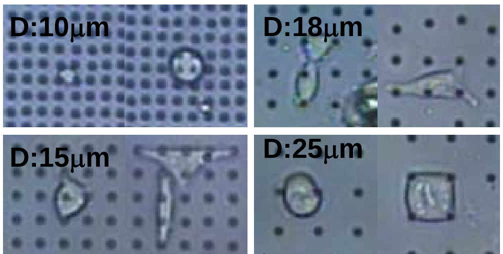


Fig. 9 細胞形状のビーズ間距離Dによる変化.

5 自己評価:

当該研究では、半導体産業で培われたナノマイクロファブリケーション技術をバイオ計測に展開し、特に細胞の操作、計測に有用な新しい手段を提供する手段をデバイス、更にはデバイスを中核とした計測システムとして実装することを提唱した。具体的には、（A）光学計測とデバイス技術により細胞を選別的により分ける技術（10μmテクノロジー）、（B）微細加工構造を利用して1細胞を局所的に計測する技術（μｍーサブμmテクノロジー）、（C）走査プローブ顕微鏡との組み合わせによる分子レベル計測（サブμｍーnm テクノロジー）の大別して３つのスケール領域において、成果を示すことを初期目標として掲げた。研究は、（A）から（B）、更に（C）へと順に、次のステージへの基盤となる技術を構築しながらスケールダウンしていく形で進めた。また、これらのデバイス開発研究に伴う必要性に応じて適宜、独自のプロセス技術の開発を行った。（A）については微細加工チップを用いた細胞の機能評価、分取システム研究の成果として開発されたシステムが生物学的研究のツールとして利用できる状況に至っており、当初の計画が十分に達成されたと考える。（B）についてはデバイス技術として実装化され、今後、バイオ計測への応用研究へと展開が可能な状況であり、ほぼ達成されたと考える。（C）については独自に凍結細胞計測のための原子間力顕微鏡を開発し、観察用試料作製技術の検討まで進んだが、細胞の凍結観察までは至っていない。本研究の期間内では最終目標まで達していないが、この研究テーマを進める基盤技術は整ってきており、今後も着実に進めていきたい。

６　研究総括の見解：

新しい微細加工技術も工夫しながら、役に立ちそうな具体的なシステムを実現しており、細胞のソーティングやゼータ電位の評価など数々の有用なツールを創出してきたことが高く評価できる。ただしゼータ電位のモニタリングは実際に何を反映した電位を測定しているのかの検討が必要であり、薬剤処理をしない条件、HL60　以外の細胞系でも再現可能かどうかについても検証が必要である。半導体の加工技術をバイオに応用しようという試みは多くあるが、まだビジネスに結びつくものは無いので、新たなビジネス領域を拓けるように創出してきた技術を１つでも実用化することを期待する。

７　主な論文等：

【論文】 9 報

F. Omasu, Y. Nakano and T. Ichiki, "Measurement of the electrophoretic mobility of sheep erythrocytes using microcapillary chips", Electrophoresis 26, (2005).

K. Takahashi, A. Hattori, I. Suzuki, T. Ichiki and K. Yasuda, "Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time microscopic image processing", J. Nanobiotechnology, 2, 5-12 (2004).

T. Ichiki, R. Taura, and Y. Horiike, “Localized and ultrahigh-rate etching of silicon wafers using

atmospheric-pressure microplasma jets", J. Appl. Phys. 95, pp. 35-39 (2004).

T. Ichiki, Y.Sugiyama, T. Ujiie and Y. Horiike, "Deep dry etching of borosilicate glass using fluorine-based high-density plasmas for MEMS fabrication", J. Vac. Sci. Technol. B 21, pp. 2188-2192 (2003).

T. Ichiki, Y. Sugiyama, R. Taura, T. Koidesawa, and Y. Horiike, "Plasma applications for biochip technology", Thin Solid Films 435 (1-2), pp. 62-68 (2003).

【特許】
発明者: 一木隆範
出願人: 科学技術振興機構
名称: マイクロプラズマジェット発生装置
特許番号: 第 3616088 号(2004).
国際出願: PCT/JP2004/10388

【受賞】
第 26 回本多記念研究奨励賞(2005)

【学会、研究会発表】
招待講演(国際学会)9 件
T.Ichiki, "Microdevice technologies for biomolecular and cellular manipulation", The 1st International Symposium on Molecule-Based Information Transmission and Reception (MB-ITR2005), (Okazaki, Japan, March. 3-7, 2005).

T. Ichiki, T. Ideno, H.M.L.Tan, R.Taura, "Microplasma processes for MEMS Applications"Proc. 25th Int. Symp. on Dry Process, (Tokyo, Japan, Nov. 30-Dec. 1, 2004) .

T. Ichiki, "Atmospheric-pressure plasma micro-jet and its applications to plasma processing and micro analytical systems", Gordon Research Conference, August 17, Plymouth, USA, 2004).

T. Ichiki, "Plasma technologies for microfluidics for novel bioanalytical systems", 51st Int. Symp. American Vacuum Society, (Anaheim, USA, Nov. 16, 2004).

T. Ichiki, "Development of Nano/Microfluidic Devices for the Analysis of Biomolecules", Fourth Int. Symp. on Biomimetic Materials Processing (BMMP-4), (Nagoya, Jan. 28-30, 2004).

国際学会発表 23 件

Y. Hosoi, K. Takahashi, M. Biyani, N. Nemoto, T. Akagi, and T. Ichiki, "High-throughput screening of mutant AKR enzymes using mRNA display and novel microreactor array chips”, Proc. Ninth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2005) (Boston, USA, Oct. 9-15, 2005).

N. Minamino, T. Akagi and T. Ichiki, “Fabrication of micropipette chips for simultaneous electrophysiological and optical measrurement”, Proc. Ninth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2005) (Boston, USA, Oct. 9-15, 2005).

T. Akagi, K. Takahashi and T. Ichiki, “Evaluation of cell cycle stage by electrophoretic mobility using a microcapillary electrophoresis chip”, Proc. Ninth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2005) (Boston, USA, Oct. 9-15, 2005).

N. Ichikawa, Y. Katsuyama, Y. Nagasaki and T. Ichiki, “Microfluidic devices integrated with permalloy micropatterns for bead-based assay”, Eighth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2004) (Malmoe, Sweden, Sept. 26-30, 2004).

T. Ichiki, Y. Sugiyama, S. Kase, and Y. Horiike, "Surface micromachined hollow microneedle array integrated on a microfluidic chip", Seventh International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2003), (Squaw Valley, USA, Oct. 5-9, 2003).

招待講演（国内学会、研究会）13 件

国内学会、研究会発表　44 件

研究課題別評価

１　研究課題名：　バイオナノポアを用いた1分子センサーの開発

２　研究者氏名：　井出　徹

研究員：青木　高明　（研究期間　H.15.1～H.18.3）

技術員：竹内　裕子　（研究期間　H.15.1～H.18.3）

３　研究のねらい：

ナノテクノロジーは、21世紀の最も重要な技術の一つと期待され、世界中で精力的に研究、技術開発が進められている。生物科学の分野でも、微細加工、操作、計測等の技術が様々な形で応用されている。特に、天然のナノ構造体であるタンパク質や核酸分子を1分子ずつ操作、観測する技術の開発は、我々を含む、日本の研究者によるところが大きく、現在、この分野では、明らかに我が国が世界をリードしているといえる。しかし、残念ながら、ナノテクノロジーのバイオ分野への応用において我が国の取り組みは明らかに遅れており、我々が開発した1分子計測技術も欧米の研究者、企業を利している場合が多い。本研究計画は、我々が基礎研究を目的に開発した技術を基に、実用的な新技術を世界に先駆けて発展させることを目指した。

医薬品開発、遺伝子診断など多くの分野において、高感度で、コンパクトなセンサーの開発が強く望まれている。本研究では、我々が開発したチャネルタンパク分子1分子のイメージング・操作技術を応用して、極めて感度の高い、微小なセンサーを作成することを目指した。本研究のセンサーは、チャネルタンパク1分子の構造揺らぎを電気・光学的に捉え、揺らぎの変化を解析することによりセンシングを行うもので、多分子からの情報を加算、平均化して用いる従来型のセンサーとは全く異なる新しい原理に基づく。研究の主眼は、電気・光学測定装置の改良（小型化、高効率化）、及びセンサー素子となるチャネルタンパクの遺伝子操作等による「作成」に置いた。また、生体膜上で起こる信号伝達を人工膜上に再構成し、このセンサーを用いて1分子レベルで観測することも試みた。

４　研究成果：

【チャネルタンパク1分子計測装置の小型化、高効率化】

我々は既に、チャネルタンパク1分子を電気的、光学的に同時計測する装置を開発していたが、従来型の装置は大型であること、計測に熟練を要することなど、幾つかの問題があった。そこで、装置の小型化、高効率化を目指して装置の改良を行った。測定効率を下げる原因となっていた、人工膜形成に要する時間を大幅に短縮するために、人工膜に加圧し薄化する方法を開発した。これにより、測定（準備）に要する時間を従来の数十分の一から数百分の一程度に短縮することに成功した。また、これにより必要とする測定溶液も、従来型の千分の一程度まで減少させることが出来るようになった。小型化された装置を用いて、センサーアレイ（現在のとこ

ろ4チャンネル）を試作することにも成功している。

【新しい光学的・電気的同時計測のための実験装置の開発】

我々が開発した人工膜による計測法は、膜容量が大きく、急速な電位変化に対するチャネルの応答を見る必要がある場合など、ある種のチャネルに対しては適用が難しい場合がある。そこで、従来型の計測装置の改良に加えて、新しい手法の開発も試みた。

全反射型蛍光顕微鏡法と Tip-Dip 法を融合させた新しい同時計測用顕微鏡を開発した。気液界面に展開した単層膜を Tip-Dip 法を用いてすくい取ることにより脂質二重膜を形成し、グラミシジン分子の単一チャネル電流を計測することにより正常な構造を保っていることを確認した。また、蛍光標識した脂質分子の運動をエバネッセント照明により観察することが出来た。これらにより、ガラスピペットを用いた新しい光学的・電気的同時計測のための実験装置の開発に成功したと言える。

【アセチルコリン受容体チャネル（nAChR）の電気・光学的1分子同時計測】

アミノ基反応性の Cy5 を用いて標識した nAChR を再構成したベシクルを気液界面に展開し、ピペット先端の二重膜に取り込んだ上でエバネッセント観察することにより、nAChR1分子の輝点を観察することが出来た。標識した nAChR の単一電流を計測したところ、確率は低いながらも単一チャネル電流を計測することが出来た。よって nAChR の電気・光学的同時計測実験の基礎的な手順は開発できたと言える。また、蛍光性アセチルコリン誘導体を合成する手順を考案した。有機化学合成は、さきがけ研究同領域の北陸先端大・藤本研究室との共同研究として行われ、現在までにアルキル鎖長 n=5 の Cy3 標識分子種の合成が終了した。ベシクル上の nAChR との相互作用を観察したところ、結合解離に伴う離散的な蛍光強度変化を観察することに成功している。よって1分子レベルでのアゴニスト相互作用を実時間計測できる蛍光誘導体の作製に成功したと言える。

【AmB-ステロール連結体の単一電流計測】

AmB のコレステロールまたはエルゴステロール連結体（阪大化学・村田研作成）の単一チャネル電流 Tip-Dip 法を用いて計測したところ、エルゴステロール連結体において高い開確率となり、コレステロール連結体においては非常に低いチャネル活性を観測した。これにより AmB は動物などの細胞膜中に多いコレステロールではなく真菌細胞膜中に多いエルゴステロールと相互作用してチャネル構造を形成することにより選択的毒性を発現するという仮説を単分子レベルで直接検証することに成功した。また、人工膜の脂質置換法を開発し、これによってチャネルに対する脂質分子の作用も継時的に観測可能となった。

【ヘモリシンチャネルの1分子センサー系への応用】

Tip-Dip 法を用いて α-ヘモリシンの単一チャネル電流を計測することに成功した。また、ビオチン化した poly-dA(100)をアビジンに結合させた分子複合体を添加することにより、定常的なチ

ャネル電流が激しくゆらぐ現象を観察できた。これは強く負に帯電したpoly-dAが電位勾配に従って移動する際にチャネルポアを塞ぐような形になることにより起こると考えられる。すなわち、この系をチャネルとアゴニストとの相互作用を直接検出するための手段として用いることが可能なことを示しており、検体を高感度に検出するための1分子センサー開発への応用が期待される。また、蛍光標識したα-ヘモリシン分子を合成し、電気・光学的1分子計測を行った。通常の分子と同様のチャネル活性を確認したが、アミノ基反応性の蛍光色素によりチャネルを直接修飾した影響と思われる電流のふらつきが見られた。これらの結果により、ヘモリシンチャネルを用いた電気・光学的1分子センサー（特にDNAセンサー）の開発が可能となったと言える。

【Ca依存性Kチャネルの電気・光学的1分子計測】

開発したセンサーを応用し、細胞内で起こる信号伝達を1分子レベルで観測することを試みた。気管平滑筋BKチャネル（Ca依存性Kチャネル）を蛍光標識し、人工膜に再構成することによって、機能しているチャネル分子の1分子光学計測に世界で初めて成功した。次に、チャネルと薬剤との相互作用を1分子レベルで可視化するために、チャネルの特異的阻害剤であるIbTXの蛍光誘導体を合成した。また、チャネル分子-阻害剤相互作用の1分子可視化のためには、チャネルの拡散を抑えることが不可欠であったため、チャネルタンパクの膜内固定（拡散阻害）法を開発した（ポリエチレングリコールによってチャネルをガラス表面に固定する方法、及び膜結合蛋白アネキシン5により脂質の流動を止める方法）。現時点では、相互作用の1分子検出には至っていないが、測定準備は完全に整ったと言える。

【リアノジン受容体とリアノジンの結合解離の1分子計測】

チャネルタンパク1分子の光学的検出のために、リアノジン受容体に蛍光色素（eGFP）を組み込んだり、タグをつけた組み換え体を作成した。筋肉型リアノジン受容体(RyR1)のN末、C末、DR2領域それぞれにeGFP遺伝子を組み込んだcDNAを、哺乳動物培養細胞HEKに発現させることに成功した。発現効率は、N末> DR2 >C末の順であり、confocal顕微鏡観察により、組み換えRyRは、HEK細胞の核膜周辺や細胞内小胞構造に発現していることを確かめた。また、これらの発現細胞から得られたER分画は、RyR1及びeGFPを含むことを、それぞれの抗体を用いたwestern blotting法で確認した。またRyR1を発現した細胞は、カフェイン刺激によってカルシウム上昇が見られることを、カルシウム感受性蛍光色素を用いて確かめた。これらを用いて、リアノジン受容体とリアノジン分子との結合解離を調べた。その結果、1分子レベルで高親和性と低親和性の結合が存在していることを示すことが出来た。ガラス表面に接着したベシクル中の心筋型RyRとリアノジンの結合を、1分子で可視化した。RyRを含まないリポソーム膜を用いると、リアノジンは1秒以下の短い結合時間で非特異的に結合していた。またチャネルが開かないPCa3の条件下ではRyRとリアノジンの間に、長い結合は見られなかった。一方、チャネル活性があるPCa5ではRyRに結合するリアノジンは数秒間結合しているものも多く見られ、中には数十秒以上という長い結合もあることがわかった。これは高親和性と低親和性結合の違いを一分子レベルで示しているものと考えられる。 チャネルが機能している状態で少なくとも2つ

以上の結合状態があることがわかった。Open lock 状態になると思われるリアノジン濃度（1 nM から 100 nM）では、結合時間は大きく変化することはなかった。

さらに、リアノジンの結合解離を電気・光学的に1分子同時計測するために、前述のアネキシンによるチャネルタンパクの拡散阻害法を開発した。酸性リン脂質である phosphatidylserine (PS)を含む人工脂質平面膜中でBODIPY－DHPEとCy5-RyR2の一分子の拡散を直接観察し、様々なアネキシン 5 の濃度での拡散を測定した。その結果、1μM のアネキシン 5 存在下では PE、RyR ともにアネキシン 5 が存在しないときに比べて拡散係数を 1/200 以下に減少させることがわかった。また、RyR2 の機能へのアネキシン 5 の効果を測定し、アネキシン 5 が少なくとも RyR2 の機能に大きな影響を与えないことを明らかにした。

５ 自己評価：

大別して2つの目標を設定し、研究を遂行した。

一つは、実用的なセンサー作製に向けたチャネルタンパクの1分子計測系の改良であり、これについては、当初の目標を完全に遂行しえたと考えている。人工膜を用いた単一チャネル測定系の解決すべき問題点は、装置が大きいこと、測定に要する人手（熟練者が必須）や時間がかかることなどであったが、本研究で開発した方法により、何れの問題も解決されたと考えられる。つまり、数千分の一のサイズダウン、数百分の一の迅速化に成功し、測定の自動化への道も開かれた。但し、研究員に微細加工の専門家がいなかったので、当初予定していた装置のマイクロメートルサイズへの小型化までには至らなかった。これについては、現在、他研究室との共同研究という形で実現しつつある。

次に、二つ目の目標として、開発したセンサーを用いた信号伝達（チャネル-他分子相互作用）の1分子観測を挙げた。チャネルタンパク1分子の機能計測法（単一チャネル記録法）が開発されてから 30 年になるが、他の分子（例えば、阻害剤や賦活剤）との相互作用については、多分子系の実験に依らざるを得なかった。重要性は認識されながら 30 年来手つかずであった問題であり、非常にチャレンジングで困難極まりない技術開発であったと感じている。しかしながら、最終年度に入って、最も大きな問題の一つであったチャネル分子の拡散制御法の開発に成功し、これによってチャネルタンパクと薬剤との相互作用検出に世界で初めて成功した（未発表）。現在、さらに精度を上げるべく手法の改良中であるが、生理学上の新しい手法を開発したものと自負している。

６ 研究総括の見解：

チャンネル分子の一分子計測を可能とする人工膜を用いた再構成系による測定デバイスの開発に成功したことが高く評価できる。実用化を可能にするような頑健かつ安定なシステムの開発も求められる一方で、この一分子認識系を用いて何を測定できるかの展開が今後の鍵になる。例えば、一分子の測定系において観察された現象がどれだけ生理的な現象を反映しているのか明らかにできるとよい。領域内の他の研究者との良好な協力関係を築いたことも評価

できる。

7 主な論文等:

【論文】

[1] T. Ide, Y. Takeuchi, T. Aoki, and T. Yanagida (2002)
Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel.
Jpn J. Physiol. 52(5): 429-34

[2] Nobuaki Matsumori, Noritsugu Eiraku, Shigeru Matsuoka, Tohru Oishi, Michio Murata, Takaaki Aoki, and Toru Ide (2004)
Amphotericin B-Ergosterol Covalent Conjugate Bearing Powerful Membrane Permeabilizing Activity
Chemistry and Biology 11, 673-679

[3] T. Ide, T. Ichikawa (2005)
A Novel Method For Lipid-Bilayer Formation: An Approach to the Development of Optical and Electrical Single Ion-Channel Biosensors.
Biosens. Bioele. 21: 672-677

[4] T. Aoki, Y. Sowa, T. Yanagida, T. Ide (2005)
Non-contact surface force microscopy for molecular interaction study
J. Surf. Sci. Nanotech. 3: 46-50

[5] T. Ichikawa, Y. Takeuchi, T. Aoki, T. Ide (2005)
Annexin 5 decreases the diffusion of lipid and channel molecules in an artificial lipid bilayer.
J. Surf. Sci. Nanotech. 3: 213-217

他8報(含投稿中)

【特許】

[1]人工脂質二重膜における脂質置換方法、その脂質置換方法を用いて得られる人工脂質二重膜、その人工脂質二重膜を製造する装置、および、イオン透過測定装置. 井出 徹、平成 15 年 9 月 4 日、特願 2003-313203

[2]人工脂質二重膜の形成装置および人工脂質二重膜の形成方法、並びにその利用、井出 徹、平成 15 年 9 月 19 日、特願 2003-328651

[3]人工脂質二重膜を有する電流測定装置、井出 徹、平成 15 年 9 月 19 日、特願 2003-328696

【受賞】

2002 年度 日本生理学会入沢記念優秀論文賞

【招待講演】

[1] T. Ide, T. Aoki, Y. Takeuchi, T. Yanagida (2002)

Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel.

International Symposium on Dynamics and Function of Nano-Biomachines

[2] T. Ide (2003)

Single molecule physiology of ion channels.

80th Annual meeting of Jpn Physiol. Soc.

[3]T. Ide (2003)

Simultaneous optical and electrical recording of single ion-channel proteins

NanoSpec2003

[4] T. Ide, T. Aoki, Y. Takeuchi (2003)

Simultaneous optical and electrical recording of a single ion channel.

International symposium on single-molecule bioanalysis and nano-biodevice

[5]T. Ide, T. Ichikawa, Y.Takeuchi, T. Aoki (2005)

Simultaneous optical and electrical recording of single ion-channels.

Molecule-based information transmission and reception

他3件

【口頭発表】

国際会議 11件、 国内会議 26件

研究課題別評価

1　研究課題名：精密分子認識に基づく人工 DNA の創成とナノ材料への応用

2　研究者氏名：井上　将彦（研究期間　H.14.11〜H18.3）
　 研究員氏名：千葉　順哉（研究期間　H.15.11〜H18.3）

3　研究のねらい：

　オングストローム解像度の合成化学と分子認識化学を基盤として、ナノメートルレベルの人工 DNA を組み立て、バイオサイエンスとバイオテクノロジーの発展に資する物質群を創成する。

　第一点目のサイエンスとして、全ての核酸塩基を人工の水素結合能を有する分子に置き換え、人工的な"分子部品"で DNA 様の構造を構築することを目標とする。さらに人工 DNA の、天然の DNA ポリメラーゼ、もしくはそのミュータントへの適合性を調べ、自己複製が可能な人工分子システム（疑似遺伝子）へと展開する。

　第二点目のテクノロジーとして、電気化学的あるいは光化学的応答を有する人工分子部品を天然の DNA に組み込むことにより、センシング機能を有する人工 DNA を構築する。これらの人工 DNA を用いて、バイオテクノロジーの分野において有用な分子材料、例えば DNA プローブや分子センサーを開発する。

4　研究成果：

（1）人工ヌクレオシド（人工 DNA ユニット）の多様性のある合成法の確立

完全人工 DNA の創成を念頭に、人工的な“分子部品”で DNA 様の構造を構築することを目標とした。具体的には、全ての核酸塩基を人工の水素結合能を有する分子に置き換え、またその水素結合分子と糖鎖との連結も非天然様式とする戦略をとった。

図1a には、完成させた4種類の水素結合分子の構造を示してある。これらの4種類の分子は、その水素結合のパターンが ADA、DAD、DAA、ADD（D = Donor、A = Acceptor）であり、ADA は DAD と、DAA は ADD（この二つは互変異性体の関係）とのみ、強固な水素結合が可能である。また、水素結合分子とデオキシリボースとを、非天然の *β-C*-グリコシド結合でアセチレンを介して連結する合成法も新規に開発した（図1b）。本法は一般性があり、水素結合分子のみならず様々な芳香族化合物を連結できる力量のある合成法である。この人工ヌクレオシドを用いた完全人工 DNA の合成、さらにはその高次構造の解析を現在検討中である。また、ここで開発した水素結合分子や連結法は、以下の研究において重要な役割を果たした。

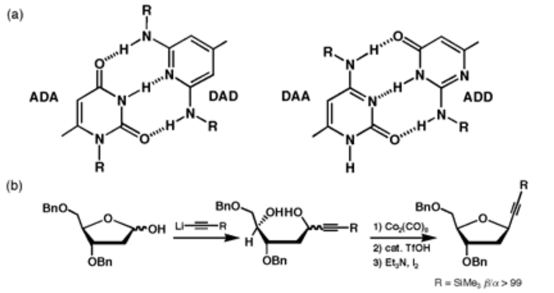


図1　(a)　4種類の水素結合分子の構造　(b)　非天然 *β-C*-グリコシドの合成法

（2）蛍光分子の発光スイッチングを利用する DNA 分子センサー

代表的な疎水性蛍光分子であるピレンは、低濃度下では青紫色のモノマー発光を示し、高濃度下では黄緑色のエキシマー発光を示す。このピレンの光化学的な特徴を利用して、ステム＆ループ構造を有するオリゴヌクレオチド鎖の両末端の双方にピレンを導入し、エキシマー・モノマー発光のスイッチングを利用した DNA プローブ 1 を開発した（図2a）。本プローブの最も重要な特徴としては、エキシマー・モノマー発光の“ratio 測定”が可能なことである。発光波長の“比”を測定することにより、他の光化学活性な生体分子からの影響や、プローブの不均一分散に絡む不確実性を大幅に低減できる。

1 のループ領域に対する完全相補鎖を加えていったところ、等量に達した段階でエキシマー発光は消失し、モノマー発光に切り替わった（図2b）。相補鎖不在時におけるモノマー発光強度（$I_{382\ \mathrm{nm}}$）とエキシマー発光強度（$I_{498\ \mathrm{nm}}$）比が $I_{382\ \mathrm{nm}}$ / $I_{498\ \mathrm{nm}}$ = 0.2 であるのに対し、相補鎖検出時にはそれが 20 と

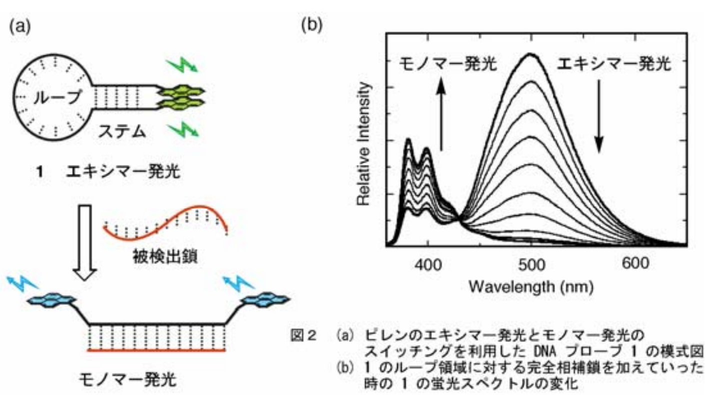


図2　(a)　ピレンのエキシマー発光とモノマー発光のスイッチングを利用した DNA プローブ 1 の模式図
(b)　1 のループ領域に対する完全相補鎖を加えていった時の 1 の蛍光スペクトルの変化

なり、約 100 倍の変化が観測された。このスイッチングは完全相補鎖の場合のみ起こり、一塩基多型（SNPs）由来のミスマッチ鎖の場合にはほとんど蛍光の変化は見られなかった。完全相補鎖とミスマッチ鎖とを“ratio測定”で判別できるので、“Real Time”での PCR モニターなど幅広い応用が期待できる。

（3）デジタル的な“on-off”応答性を有する電気化学 DNA プローブ

電気化学活性なフェロセンを、π 共役可能なアセチレンで水素結合性分子と連結した新規人工ヌクレオシドを開発した。この人工ヌクレオシドとオリゴヌクレオチドの 5’ 末端を，ホスホロアミダイト法によって連結し、3’ 末端にはスペーサーを介してチオール基（SH 基）をつけ電気化学活性 DNA プローブ **2** とした（図3の中央）。このプローブと検出鎖とで二重らせんを形成させた後に金電極に固定化して、電気化学的に相補鎖を検出する戦略をたてた。

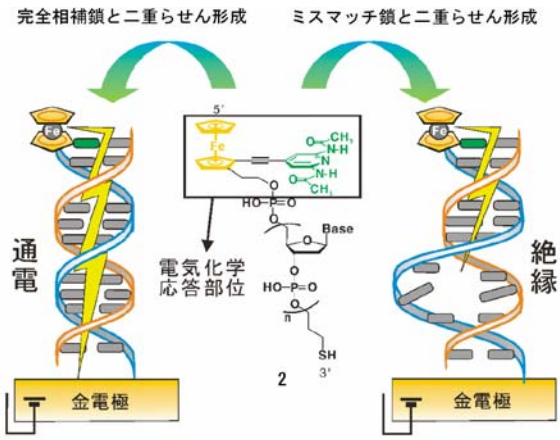


図３　電気化学 DNA プローブ 2 の構造式とミスマッチ鎖検出の概念図

完全相補鎖ならびにミスマッチ鎖をハイブリダイゼーションさせた DNA プローブ電極の SWV（Square Wave Voltammetry）測定を行った。結果、完全相補鎖では明らかにフェロセン由来の電流（0.31 V vs Ag/AgCl）が観測されたのに対し、ミスマッチ鎖ではほとんど電流は観測されなかった。種々の部位に種々のミスマッチを有する場合にも、ほとんどデジタル的な on/off 応答で完全相補鎖から識別することに成功した。電気化学触媒反応を組み合わせることなく、1回の SWV 測定で高感度にミスマッチ鎖を識別できた前例はなく、学問的にも SNPs 検出における実用を考える上でも非常に注目すべき結果である。

（4）DNA 二重らせん構造を“足場”とする多様性のある分子認識センサー

合成化学の手法を用いて分子認識センサーを構築する場合、最も困難なことはそれを水中で働かせることである。また水中では、その認識力を十分に発揮させることが難しいことも問題点として上げられる。水中で小分子を効率的に認識し、かつセンサーとして働く分子システムとして、人工 DNA を用いる二重らせん型分子認識センサーを開発した。本センサーにおいては、二本のピレン修飾 DNA 鎖を「定常部」とし、小分子を認識する部位を「可変部」として、種々のターゲットに対する多様性を確保できる。

まずは「可変部」として、15-クラウン-5 エーテルを用いる分子認識センサーを合成した。2本の DNA 鎖は、それらのみでは室温で“ぎりぎり”二重らせんを組まない相補的な配列として、一方の DNA 鎖の 5’ と 3’ 末端にはピレンとクラウンエーテルを、もう一方の DNA 鎖にはそれを逆にして連結した。クラウンエーテルがサンドイッチ型で認識する K^+ の存在下、DNA 鎖中のピレンの発光がモノマーからエキシマーへと明瞭に変化した（図4）。本センシングシステムにおいては、タ

ーゲットに応じて分子認識部位を替えればよく、また認識力は DNA 鎖の長さと塩基配列で容易に調整が可能である。

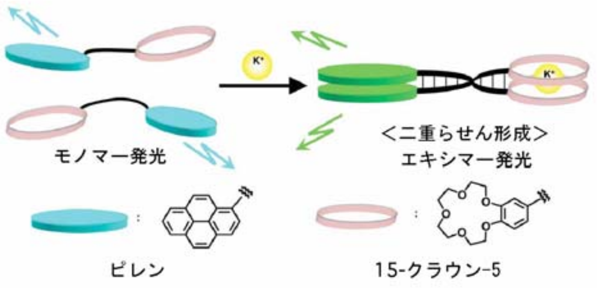


図４　DNA 二重らせんの形成に基づく分子認識センサー

(5)アルキニルピレンを骨格とする高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブの開発

ピレンはその構造の単純さと疎水性、エキシマー発光を示すという特有の光化学的性質より、蛍光プローブ分子としての応用が数多くなされている。蛍光プローブ分子として魅力的なピレンだが、励起波長が短波長、蛍光量子収率が低い、溶媒中の溶存酸素による消光を受けやすいといった問題が存在する。(2)の研究の際に、様々な置換基を有するピレンを合成し、その光物性を詳細に検討した。その結果、アリール基を有するアルキニルピレンが、励起波長（$\lambda_{ex} \geq 400$ nm）・蛍光量子収率（$\Phi_f > 0.8$）ともに良好な結果を与えることがわかった。

ペプチド・タンパクに対する蛍光プローブとして、アルキニルピレン **4** を合成した(図5a)。**4** はマレイミド部位で、システイン残基に対して蛍光標識を行うことができる。また **4** 自身は非蛍光性であり、反応したもののみが蛍光性を示す。ウシ血清アルブミン(BSA)を、**4** および市販の **3** と反応させたときのゲル電気泳動の結果を図5b,c に示す。UV-イルミネーション下、**4** で標識された BSA は、**3** の場合と比較してはるかに明瞭なバンドで確認することができた。この結果より、BSA 中の **4** は非常に高い蛍光量子収率であることが予想され、**4** は高感度なタンパクの蛍光プローブとして機能することが判明した。

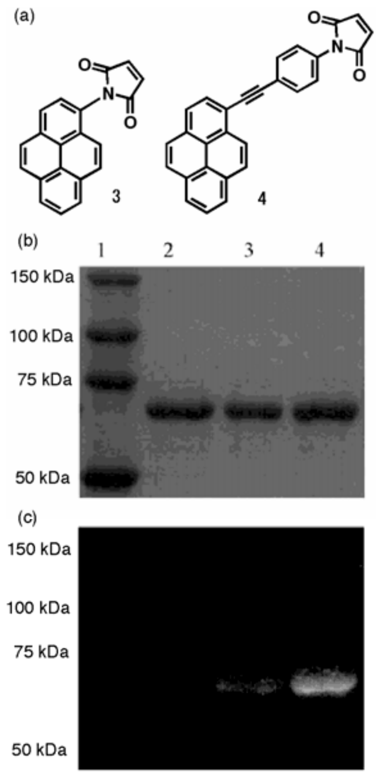


図５　(a) 市販のプローブ **3** と
高蛍光量子収率プローブ **4**
(b) BSA を標識後の SDS-PAGE を Coomassie Blue で染色した場合
(c) BSA を標識後の SDS-PAGE を 312 nm の光で照射した場合
(b, c) lane 1: 分子量マーカー
lane 2: BSA のみ
lane 3: **3** で標識
lane 4: **4** で標識

5 自己評価:

研究は、ナノサイエンスとしての人工 DNA の創成と、ナノテクノロジーとしての人工 DNA の利用を同時並行的に、かつそれぞれの結果を互いにフィードバックさせつつ遂行した。結論からいえば、初期の設定目標に対してナノサイエンスは 50 点、ナノテクノロジーは 85 点の自己評価である。

ナノサイエンスの研究は、著者の得意とする合成化学を存分に活用し、4種類の核酸塩基と相補的に相互作用する人工ヌクレオシド(人工 DNA ユニット)の構築までは完成した。しかしながらそれらを用いる「完全人工 DNA」の創成は、3年経った現在において、やっとその汎用的ルートを確立したという一里塚である。DNA 合成機にかけるための、"新規な保護基"・"新規な合成条件"・"新規な脱保護条件"の最適化に相当な時間を費やした。この後には、完全人工 DNA の高次構造の確認、さらには自己複製が可能な人工分子システム(疑似遺伝子)への展開という、より高い壁が待ち受けている。それでも本さきがけ研究では若干の進捗がみられた。"フラスコの中の自己複製分子"の創成は、本研究者のライフワークである。地道にでも必ず続けていきたい研究テーマである。

ナノテクノロジーとしての人工 DNA の利用に関しては、当初の予定+αの成果を得ることができた。人工 DNA ユニットを部分的に天然のDNAに組み込むことは、ナノサイエンスの成果をフィードバックすることで容易に達成された。また、その結果得られた人工 DNA に関しても、多種多様なセンシング機能の付加など広範囲な研究へと展開することができた。蛍光分子の発光スイッチングを利用する DNA 分子センサー、デジタル的な"on-off"応答性を有する電気化学 DNA プローブ、DNA 二重らせん構造を"足場"とする多様性のある分子認識センサー、などがその成果である。これらの研究過程で、偶然にも非常に高い蛍光量子収率をもつピレン誘導体を発見した。本さきがけ課題と直接的には関係しないが、タンパクや細胞膜に対する優れた疎水性蛍光プローブ分子へと研究を展開した。-15 点分は、電気化学 DNA プローブの研究の際、基盤への固定化とその再現性に手間取ったこと、またその界面科学を十分には追求できなかったことである。しかし本さきがけ研究期間中に、専門の研究者の方々から多大なるサジェスチョンをいただいた。それを基に、もう少し深く界面科学の視点からも研究を展開することが今後の課題である。

本さきがけ研究はポスドク参加型である。研究期間の3年半のうち約2年半を、1名のポスドク(千葉順哉氏)とともに研究を遂行した。実際にポスドクの参加によって、研究は飛躍的に進捗・発展した。これは、異なるバックグラウンドをもつポスドクが、異なる視点から研究を展開してくれたことに負うところが大きい。

6　研究総括の見解：

人工 DNA の創成により DNA 多型を識別可能な電気化学 DNA プローブを開発した成果が高く評価できる。簡明な合成戦略のもとに種々の物質を創成して、DNA 関連のセンサー開発に成果を挙げており、新しい方向を見出している研究である。伝導性の分子機構などについては今後の解明が期待される。DNA 二重螺旋構造を利用した分子認識センサーは、微量物質の検出への応用も期待されるが、DNA を使用することによるデバイスとしての安定性、温度変化に伴う測定データの再現性が今後の課題であろう。

7　主な論文等：

＜論文＞

1. Alkynylpyrenes as Improved Pyrene-Based Biomolecular Probes with the Advantages of High Fluorescence Quantum Yields and Long Absorption/Emission Wavelengths
Maeda, H.; Maeda, T.; Mizuno, K.; Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M.
Chem. Eur. J. **2006**, *12*, 824-831.

2. A General and Versatile Molecular Design for Host Molecules Working in Water: A Duplex-Based Potassium Sensor Consisting of Three Functional Regions
Fujimoto, K.; Muto, Y.; Inouye, M.
Chem. Commun. **2005**, 4780-4782.

3. Single-Nucleotide Polymorphism Detection with "Wire-Like" DNA Probes that Display Quasi "On-Off" Digital Action
Inouye, M.; Ikeda, R.; Takase, M.; Tsuri, T.; Chiba, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2005**, *102*, 11606-11610.

4. Tautomeric Self-Dimerization and Molecular Recognition Properties of 2-Amino-pyrimidinone Derivatives as Triple Hydrogen-Bonding Modules in Molecular Assemblies
Abe, H.; Takase, M.; Doi, Y.; Matsumoto, S.; Furusyo, M.; Inouye, M.
Eur. J. Org. Chem. **2005**, 2931-2940.

5. Unambiguous Detection of Target DNAs by Excimer-Monomer Switching Molecular Beacons
Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M.
J. Org. Chem. **2004**, *69*, 3271-3275.

＜特許＞

1 発明の名称：高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ、それを用いる生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法
発明者：井上将彦; 藤本和久; 清水久夫
出願者：国立大学法人 富山医科薬科大学
出願番号：特願2005-118313.

2 発明の名称：π共役型電気化学活性非天然ヌクレオシドを用いる相補鎖核酸分子配列検出方法及び SNP 検出方法
発明者：井上将彦; 千葉順哉; 池田怜男奈; 高瀬雅祥
出願者：独立行政法人 科学技術振興機構
出願番号：特願2005-218129.

3 発明の名称：蛍光性分子のモノマー発光とエキシマー発光のスイッチングを利用した分子ビーコンを用いる DNA 検出法
発明者：井上将彦; 藤本和久; 清水久夫
出願者：科学技術振興事業団
出願番号：特願 2003-320311; 特開 2005-80637.

＜招待講演＞

1 Ferrocene-Conjugated DNAs as an Electrochemical Probe for Single-Base Mismatch Detection
16th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers
Lanzhou, China, 7/24-27, 2006.

2 精密分子認識に基づく電気化学活性 DNA プローブの開発
第8回生命化学研究会シンポジウム
富山, 1/13, 2006.

3 Electrochemical SNPs Detection with Ferrocene-Modified "Wire-Like" DNA Probes
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2005
Honolulu, USA, 12/12-20, 2005.

4 Alkynylpyrenes as Improved Pyrene-Based Biomolecular Probes
The 12th China-Japan Bilateral Symposium on Intelligent Electrophotonic Materials and

Molecular Electronics
Suzhou, China, 12/8-11, 2005.

5 電気化学活性人工 DNA をプローブとする高効率な SNPs 検出法の開発
第3回環境調和型有機反応プロセス研究会
和歌山, 11/18. 2005.

研究課題別評価

１　研究課題名：ナノ空間ネットワークの構築による超集積場の創製

２　研究者氏名：大久保達也
　　研究員：Sajo P. Naik（研究期間　H.15.4～H.18.3）
　　研究員：Feifei Gao　（研究期間　H.16.3～H.18.3）

３　研究のねらい：
人類の持続的な発展を支えていくためには､従来の機能を遙かに超えた機能性材料群の創出が不可欠である｡従来の材料設計においては単一の階層の物質系が主たる対象とされてきたが、更なる高機能性を実現するためには、原子‒ 分子‒ イオン‒ クラスターといった異なる階層の物質系を「形」を整えて「秩序よく配置・配列」すること、すなわち「超集積」することが必要である｡本研究においては、異次元ナノ空間のヘテロ接合手法を確立することにより、ナノ空間ネットワークを構築すること、ならびに、このようなネットワーク中に階層の異なるゲストを超集積することで、これまでにない高機能性材料･デバイスを創出することを目的とする。本研究の成果は、階層を超えた様々な物質系に対して、包括的な「超集積場」を提供するもの、ナノテクノロジーにおける発見をシステム化・デバイス化するものであり､その成果の及ぼす波及効果は新規産業分野創出のポテンシャルを有するものと考える

４　研究成果：
本研究においては､ナノ空間材料の中で､高度な周期性を有するゼオライト及びメソポーラスシリカを素材に検討を進めた。

（１）ナノ空間の相を決定する因子の解明
ナノ空間材料は準安定相として生成するものがほとんどであるため､最終的に生成する相は速度論により支配される｡生成相の制御のためには､組成や温度を押さえるだけでは不十分であり、プロセスの制御が不可欠となる。そのため、制御すべき因子が多く、多形制御が容易ではない。そこで、全体像をつかむため、ゼオライトに関しては非晶質前駆体の構造解析手法の開発を、メソポーラスシリカに関しては全体像の把握を行った。ゼオライトに関してはヘテロ原子の添加がシリケートのリング分布を変化させ､それらのリングがアルカリ金属あるいは有機構造規定剤(SDA)により組織させることがわかった。メソポーラスシリカに関しては､縮合と乾燥が相転移を逆方向に推進すること、しかしながら縮合が進行するとシリカが剛直となり、相転移が速度論的に凍結されることがわかった。俯瞰図を図１に示す。

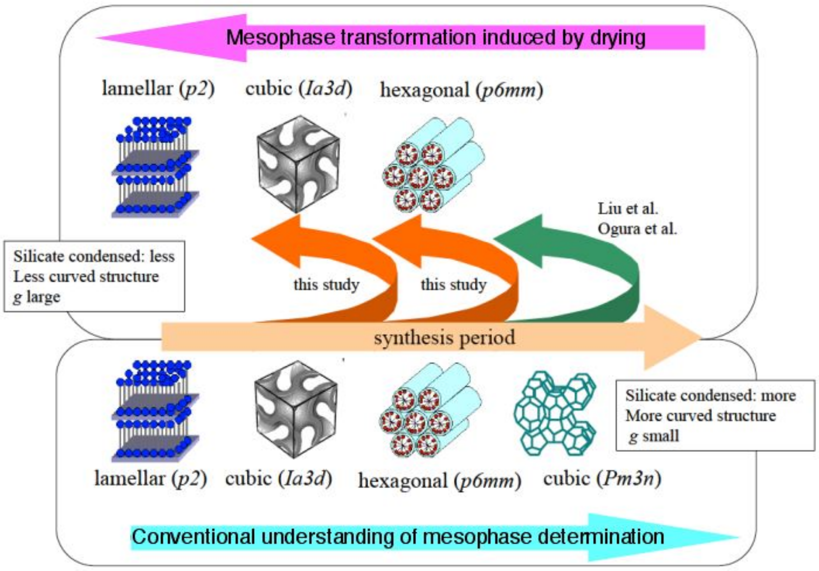


図１　メソポーラスシリカ相転移の俯瞰図

（２）ナノ空間の相及び配向制御手法の開発

上記のメカニズムを前提に相及び配向を精度良く制御する手法の開発を検討した。ゼオライトに関しては、液相エピタキシャル成長によりソーダライト（０次元）ーカンクリナイト（１次元）ーチャバザイト（３次元）の３つの構造をヘテロに成長させ、部分的にではあるが、ナノ空間の接合が形成できることを示した。

メソポーラスシリカに関しては図１の俯瞰図を踏まえて、相と配向を制御する手法の開発を検討した。製膜とこれらの制御を同時に達成することは困難であると考え、製膜後のポストトリートメント時に相転移を進行させる戦略をたて、シリカの縮合を抑えた条件で検討を進めた。これらの検討の中から、乾燥誘起相転移に加え、焼成時の SDA の部分分解により誘起される相転移を見いだした。この方法を用いると、直接製膜では形成が困難である３次元 *Ia3d* 構造を有する薄膜を容易に製膜可能である（図２）。

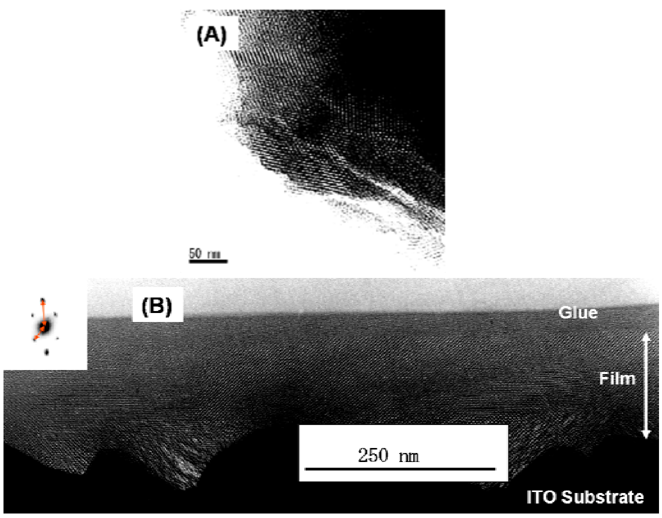


図２　相転移を用いた作製した *Ia3d* 薄膜の TEM 像

また相転移に伴い粒界が減少し、配向をそろえながら、ドメインが拡大することを見いだした。相転移を部分的に進行させれば、ヘテロ接合構造が形成できることがわかった。

図１における乾燥に伴う水の除去はミセルとシリカの界面構造を変化させ、相転移を誘起する。これに対して図２の場合は、ミセルのコアの部分の分解に伴う構造変化が、相転移を誘起する。そこで、ミセルのコア構造を制御することで、相及び配向を制御する可能性に着目し、疎水性分子を添加した後、ポストトリートメントで除去することによる構造の変化を検討した。一連の疎水性分子の検討の中から、分子サイズの大きいトリイソプロピルベンゼン（TPIB）を添加した場合に、SDA 単独あるいは SDAーシリカ系では発現しない３次元構造を容易に形成できることを見いだした（図３）。薄膜の詳細な構造解析の結果、これまでは特殊な SDA を用いないと合成が困難であった *Im3m* が形成され、乾燥に伴い膜厚方向に収縮することがわかった。構造解析の結果、空隙が非常に大きく、薄膜面内から高いアクセス性を有していることがわかった。

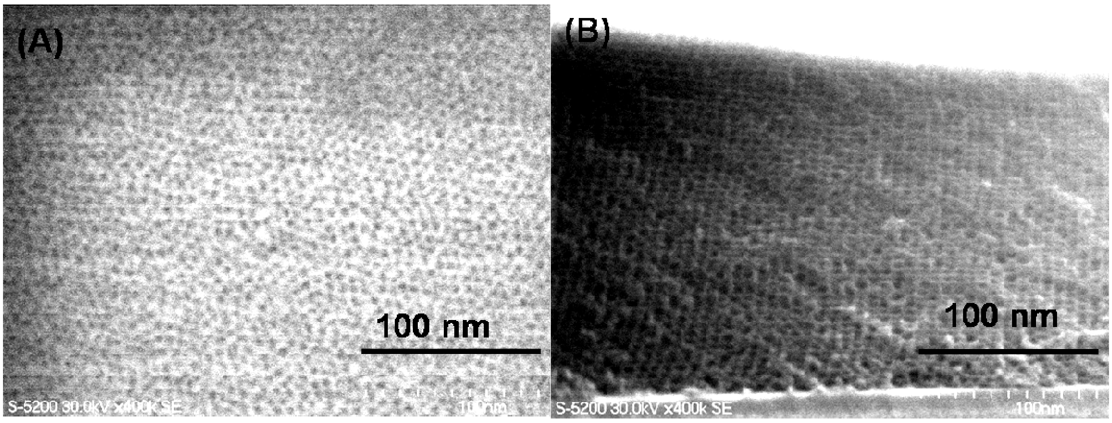


図３　疎水性分子添加により作製した薄膜の FE-SEM 像

（３）ナノ空間表面修飾法の開発

シリカ表面の化学的特性はシロキサン結合 ≡Si-O-Si≡ の O と表面シラノール基 ≡Si-O-H の O-H により支配されている。これまでの表面修飾法はこのいずれかを利用するものであった。ナノ空間を集積場として利用するために、より多様な表面の化学的特性が必要となる。そこで、アンモニアと熱化学反応させることで、酸素の一部を窒素で置換し、メソポーラスオキシナイトライドを形成することを考えた（図４）。まず、粒子系で反応のスキームとそれに伴う細孔構造変化を検討した。その結果、反応温度を制御することで、様々な部分窒化表面を創出できることがわかった。シラノール基は弱酸であるが、窒化表面は塩基性を示す。そのため、有機ハロゲンとの反応による有機官能基の導入が可能であることが明らかとなった。さらに表面窒素を利用して、遷移金属イオンを配位・固定化できることを見いだした。遷移金属イオンをナノ空間表面に固定し、更に金属イオンに有機配位子を錯形成させることで、通常のシリカ上では実現することができなかった金属イオンと有機分子の集積が可能であることが示された。

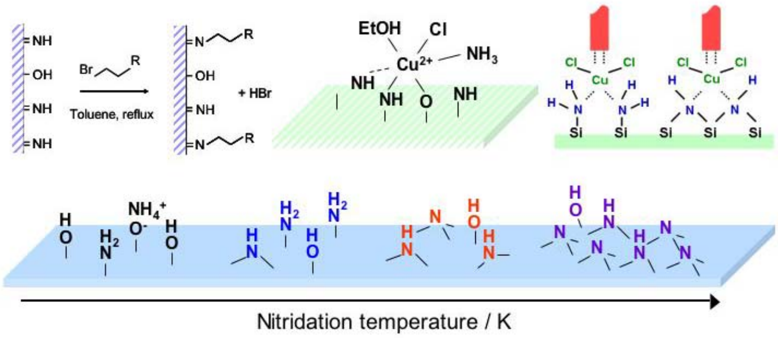


図４　熱窒化を経由した表面修飾

（４）ナノ空間の超集積場としての利用

以上の方法で作製した様々なナノ空間を利用して、ナノ構造体の超集積を検討した。

電極基板表面にメソポーラスシリカ薄膜を製膜後、Co ナノ粒子触媒を薄膜／基板界面に析出させ、これを成長端として、アルコールを原料とする CVD 法を用いて単層カーボンナノチューブ SWNT を合成した（図５）。非常に純度の高い SWNT の合成が可能で、SWNT はナノ空間をガイドとして、膜厚方向に配向成長した。*I*-*V* 特性を評価したところ、電子は電界放出によるものであることが確認できた。

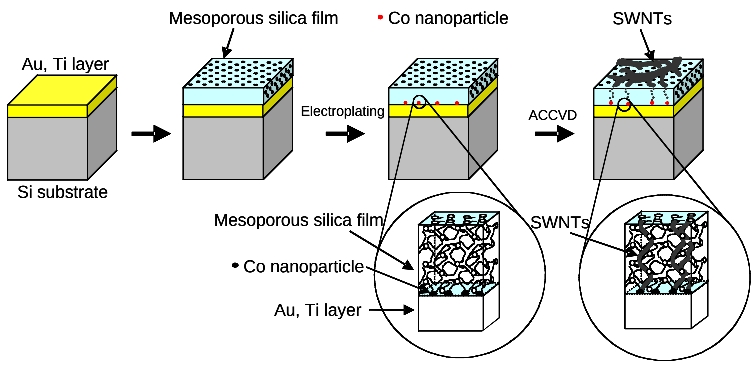


図５　メソポーラスシリカ中での SWNT 合成

電気メッキ法によりメソポーラスシリカ薄膜のナノ空間中に酸化亜鉛の半導体ナノ粒子の合成を行った。酸化亜鉛表面はシリカと界面を形成し、気相の酸素分子がアクセスできないため（図６）、予想よりも大きな電流が検出できた。そのため UV を照射すると、電流の増大が容易に検出可能であった。引き続き金を析出させることで、ショットキー型の接合の形成が確認できた。

アンモニアを用いて熱窒化により作製したメソポーラスオキシナイトライド粒子のナノ空間内表面に銅イオンを配位固定した後、有機配位子としてカルミン酸を導入した。これらを水溶液中に分散させて、pH を変化させたところ、pH に応答して色の変化が確認できた（図７）。さらにこれらを薄膜系で組み上げたところ、吸光度の変化から精度良く pH を検出できることができた。

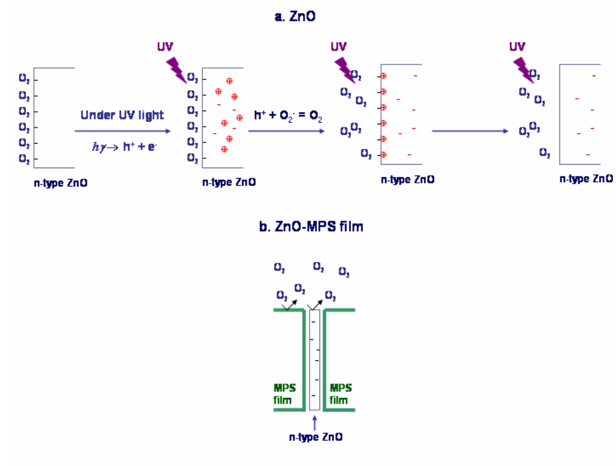


図6 ナノ空間中の ZnO の状態

図７　NMPS-Cu-CA の色変化

５　自己評価：

　当初はゼオライトとメソポーラスシリカの２本立てて検討を進める予定であったが、ゼオライトに関しては、比較的早い段階で、配向の制御に成功し、部分的ではあるが、ヘテロ接合ならびにネットワーク構築を達成した。しかしながら、マイクロ空間は〜2nm とサイズ的な制限があり、導入するゲストの制約が大きかった。そこで、メソポーラスシリカ薄膜に研究の中心を置くこととした。１次元ナノ空間を有する *p6mm* が基板に平行に配向し、膜表面に開口部を持たない薄膜が、当時は主として検討されていたが、ゲストの集積が目的であるため、３次元構造と１次元 *p6mm* の基板垂直配向に着目し研究を開始した。当初は試行錯誤的に検討を進めたが、再現性、制御性に問題があり、生成メカニズムに立ち返り検討することが必要となった。そこで相を決定する因子を明確にするための検討を行い、全体像を把握し、俯瞰図を作成し、以後はこれに基づいて相及び配向の制御を検討した。その過程で乾燥誘起相転移に加え、SDA の部分分解に伴う相転移を見いだした。この方法を用いることで、大きなドメインを有する３次元配向膜の製膜に成功した。また俯瞰図に基づいて、添加物の添加によるミセル構造の制御を考え、疎水性分子の添加の検討を行った。その結果、前述のものとは異なる、空隙の大きな３次元構造を有する粒子及び薄膜の作製に成功した。並行して従来の酸化膜表面では実現できない機能導入を考え、窒化反応の検討を進めた。その結果、通常のシリカでは実現できない窒素による金属イオンの配位固定と金属イオンへの有機配位子の導入による機能創出に成功した。これらのナノ空間中に、階層の異なるゲストを集積することで、電界放出デバイス、光センサー、pH センサーの構築が可能であることを示すことができた。

　メソポーラスシリカ報告後１０余年、多くの研究者が挑戦しながら誰もなしえなかった *p6mm* の基板垂直配向を、相転移を利用することで検討したが、これを実現することはできなかった。そのためメソ空間のネットワーク形成には至らなかった。

６　研究総括の見解：

シリカのネットワークを制御して自由自在にナノ空間ネットワークを制御するところまでは至らなかったが、メソポーラスシリカの相転移に関して各種の知見を得たことは評価できる。今後は、重要な応用に集中して制御すべきパラメーターを絞り込むことで、この手法の有効性を実証することが望まれる。当初は研究構想が曖昧であったが、着実に研究を進めることによっていくつか評価できる成果を挙げた。夢のある研究として今後の進展が期待される。

７　主な論文等：

論文　19 報

1) Toru Wakihara, Shigehiro Yamakita, Kumiko Iezumi and Tatsuya Okubo, Heteroepitaxial Growth of a Zeolite Film with a Patterned Surface-Texture, Journal of the American Chemical Society, 125, 12388-12389 (2003).
2) Masaru Ogura, Hayato Miyoshi, Sajo P. Naik and Tatsuya Okubo, Investigation on Phase Transformation of Mesoporous Silica during Drying for the Comprehensive Understanding of Mesophase Determination, Journal of the American Chemical Society, 126, 10937-10944 (2004).
3) Naotaka Chino, Tatsuya Okubo, Nitridation Mechanism of Mesoporous Silica: SBA-15, Microporous and Mesoporous Materials, 87, 15-22 (2005).
4) Sajo P. Naik, Masaru Ogura, Hideshi Sasakura, Yukio Yamaguchi, Yukichi Sasaki and Tatsuya Okubo, Phase and Orientation Control of Mesoporous Silica Thin Film via Phase Transformation, Thin Solid Films, 495, 11-17 (2006).
5) Feifei Gao, Sajo P. Naik, Yukichi Sasaki and Tatsuya Okubo, Preparation and Optical Property of Nanosized ZnO Electrochemically Deposited in Mesoporous Silica Films, Thin Solid Films, 495, 68-72 (2006).

特許　１報準備中

招待講演等　12 回

1) 大久保達也、ナノ空間ネットワークの構築による超集積場の構築に向けて、触媒学会第 92 回触媒討論会（徳島）、2003 年 9 月 20 日
2) Tatsuya Okubo, Sajo P. Naik and Masaru Ogura, Mesophase control of mesoporous silica films via phase transformation, Fifth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-5), Nagoya, January 26-28 (2005).
3) Tatsuya Okubo, SAXS/WAXS and HEXRD studies on nucleation and crystal growth of zeolites, American Chemical Society, 229th National Meeting, San Diego, March 13-17 (2005).

4) Tatsuya Okubo, Sajo P. Naik and Masaru Ogura, Phase and orientation control of mesoporous silica thin film via phase transformation, E-MRS 2005 Spring Meeting, Strasbourg, May 31-June 3 (2005).
5) Tatsuya Okubo, Phase and orientation control of mesoporous silica film by post-treatment, Gordon Research Conference on Zeolitic & Layered Materials, South Hadley (Mount Holyoke College) July 3-8, (2005).

研究課題別評価

1　研究課題名：

　テーラーメイド分子集積による機能性三次元空間創製

2　研究者氏名：竹内　俊文

　研究員：Fernando Navarro Villoslada　（研究期間　H.15.2～H.15.10）

　研究員：高瀬　雅祥　（研究期間　H.15.4～H.16.10）

　研究員：Woo-Sang Lee（研究期間　H.16.11～H.17.3）

　研究員：菱谷　隆行　（研究期間　H.17.4～H.18.3）

3　研究のねらい：

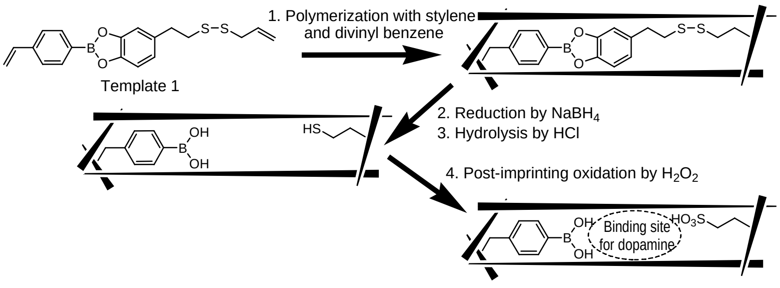
生体高分子が機能を発揮するためには、生体高分子が折れ曲がり，標的分子が結合するのに都合のよい三次元空間を創り出すことが必要である。生体高分子と同じように三次元空間をテーラーメイド的に設計・合成することが出来れば、原理的には生体高分子がもっているすべての機能を人工的に再現できる。この生体機能の人工的再現を現実のものとし、ナノテクノロジーの基盤技術にしようというのが本研究のねらいである。

本研究では，分子インプリンティングの技術を駆使して望みの三次元空間を創出する。ここで用いる鋳型分子は、1）作りたい三次元空間に匹敵するような大きさをもたせ、2）触媒活性やセカンドメッセンジャー発信機能をもつモノマーを意図どおりの順番や位置に結合させ、3）重合して構造体が出来た後に、抽出や分解により構造体内から消失させるように設計し、各種機能性モノマーと自己集合・組織化させることで、バイオ，環境から分子デバイスなどの情報関連分野にいたる様々な分野で応用可能なインプリント機能性構造体を創製する。

4　研究成果：

1）分子インプリンティングとポストインプリント化学修飾を組み合わせた新しい分子認識高分子の合成法の開発

本研究では、ドーパミンを標的分子にした人工レセプターをポストインプリント化学修飾を併用した分子インプリンティングの手法で開発した。ドーパミンはカテコール骨格とアミンをもち、そのシスジオールがホウ酸と環状ジエステルを作ることが知られている。また、アミノ基はスルホン酸などの強酸基と静電的相互作用をすると期待される。そこで、ポリマー内の結合部位中に、ドーパミンが結合するのに都合のいい位置にホウ酸基とスルホン酸基を配置したインプリントポリマーを合成するために、ドーパミンに構造が類似した新規ジスルフィド鋳



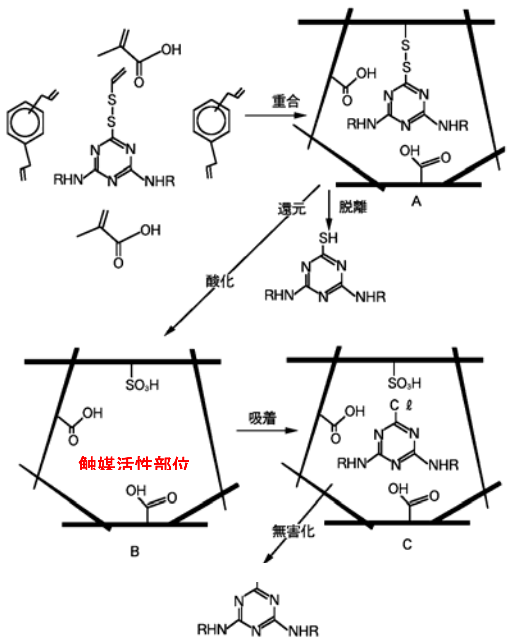
型分子を設計した。この鋳型分子に、架橋剤加え重合しポリマーを得た。引き続き、鋳型分子を切り出すため、ジスルフィドを還元し、ホウ酸エステルを加水分解した。この時点で、ドーパミンを認識するための空間と、カテコール骨格を結合するためのホウ酸基が、適切な位置に配置される。さらに、ジスルフィドを還元した時に結合部以内に残ったチオール基を、ポストインプリント処理として酸化し、安定でアミノ基と静電的相互作用の期待されるスルホン酸基に変化させた。

得られたインプリントポリマーは、ドーパミンを選択的に結合した。アミノ基の代わりにカルボキシル基をもつ 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸やホモバニリン酸はほとんど吸着しないことから、ポリマー中のスルホン酸基がドーパミンのアミノ基と強く相互作用していると考えられる。また、ドーパミンから水酸基を一つ除いた構造のチラミンはドーパミンに比べ弱い吸着を示したので,ホウ酸残基とカテコールのシスジオールによる環状エステルの生成も同時に起こり、結合部位として機能していると思われる。架橋剤のみの対象ポリマーはこの条件ではほとんど吸着せず、鋳型分子による結合部位の構築が確認された。

ジスルフィド結合を持つテンプレートモノマーを利用してインプリントポリマーを合成、還元反応を利用したテンプレートの除去、さらにポストインプリント処理によって官能基を変更するという、一連のチオールの酸化還元システムの利用は、これまでの分子インプリンティング法の中でも新しい手法であり、これからの応用が期待される。

2)アトラジン分解能をもつインプリントポリマーの設計と合成

1)の手法を展開し、内分泌かく乱性のあるアトラジンを選択的に吸着し、分解反応を触媒するポリマーの設計と合成を行った。今回は、ジスルフィド結合(S–S 結合)によりアトラジンの 6 位の位置にアリルジスルフィド基が連結した新規な鋳型分子を設計･合成した。



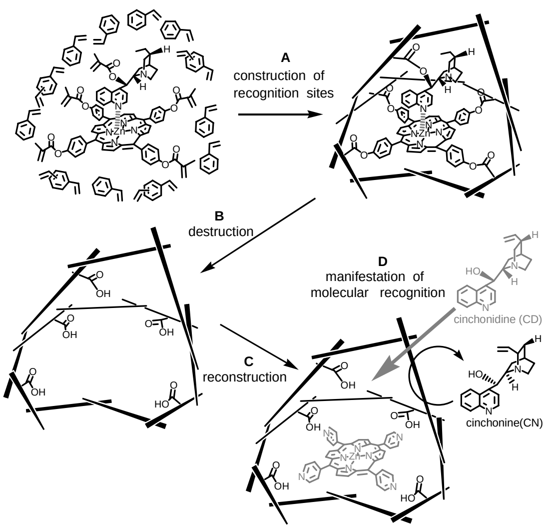
この鋳型分子と水素結合により結合部位を形成するメタクリル酸を用いてポリマーを重合し、S–S結合を$NaBH_4$でSH基に還元してアトラジン骨格をポリマーから除去した。その後、鋳型分子除去後の官能基変換であるポストインプリント処理として、H_2O_2で酸化を行いSH基からSO_3H基に変換した。以上の方法により、アトラジンがポリマー内の結合部位に結合した際、触媒に必要な酸性のSO_3H基がその近傍のみに配置された新規アトラジン分解ポリマーを合成した。

得られたポリマーをメタノールを含むアトラジン溶液に加えて撹拌すると、基質であるアトラジンの Cl 基が OMe 基に置換した毒性の低いアトラトンの生成が確認された。種々の類似化合物に対して触媒活性を評価したところ、トリアジン系除草剤に対し特異性があった。重合時は、鋳型とな

る部分と触媒活性部位となる部分はジスルフィド結合でつながれているため、確実に結合部位中にひとつだけ触媒活性部位を導入することが可能となり、アトラジンを選択的に結合して分解する部位のポリマー中における均一性は高くなり、基質特異性や触媒活性が発現したと思われる。

3）認識場の再構築が可能なインプリントポリマーの開発

複数の分子の存在により機能発現（ターゲット分子の特異的な認識）が可能な人工レセプターの創製について検討した。本研究では、ターゲット分子に対する認識場を構築後、一旦、その認識場を破壊し、再度構築することで、結合部位が再生するか検討した。分子認識場の合成法として、テーラーメイド的に認識場を構築できる分子インプリント法を用い、シンコニジン(CD) をモデルターゲット分子、金属ポルフィリンを認識場構成分子として、認識場の再構築が可能なインプリントポリマーの合成を行った。



ターゲット分子（二重結合を還元し、メタクリロイル化した CD）、認識場構成分子（側鎖をメタクリロイル化したポルフィリン亜鉛錯体（Ⅱ））、架橋剤を加え重合を行った(A)。その後、加水分解と洗浄により、ポルフィリンと CD の切り出しを行った(B)。得られたポリマーをピリジルポリフィリンとともに撹拌し、認識場の再構築を行った (C)。 CD とそのジアステレオマーであるシンコニン(CN) を用いて吸着量の違いを比較し、再構築された認識場の精密性を確認した (D)。

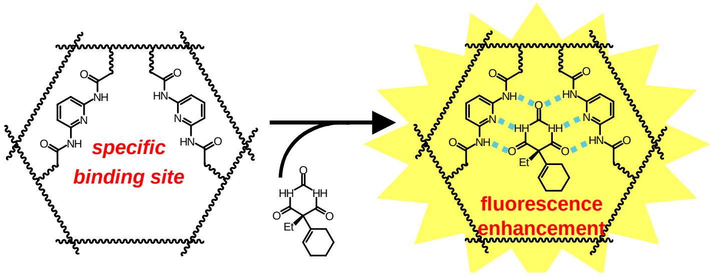
ポルフィリンと CD を切り出した後のインプリントポリマーは、再度ポリフィリンを吸着したことから、ピリジルポルフィリンが、加水分解によってできた 4 つのカルボキシル基と水素結合し、CD 認識場を再構築していることが示唆された。さらにこのポリマーは CN よりターゲットである CD を多く吸着し、ジアステレオ選択性が再現されていた。ランダムにピリジルポルフィリンを吸着させた場合はジアステレオ選択性が見られないことから、再結合したポルフィリンとポリマーに結合しているメタクリル酸の位置関係が CD の認識に都合よく配置され、ポルフィリンへの軸配位とメタクリル酸残基との水素結合により、CD をジアステレオ選択的に認識したと考えられる。可逆的な人工分子認識場の再構築の初めての例である。

4）情報発信型インプリントポリマーによる薬物の蛍光検出

本研究では、我々のところで開発したモノマー、2,6−ビス(アクリルアミド)ピリジンが、催眠薬シクロバルビタールと多点水素結合を形成することにより、その蛍光強度を増加させる効果を持つ蛍光機能性モノマーであることを見出し、分子インプリントポリマーによるシクロバルビタールの蛍光検出を行った。

得られたシクロバルビタールインプリントポリマーを液体クロマトグラフィーやバッチ結合法によ

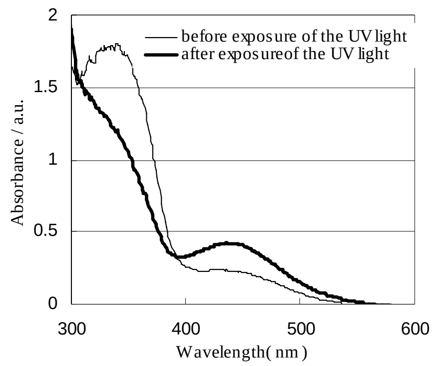
り評価したところ、シクロバルビタールに対して選択的な結合を示すことが確認された。また、ポリマー粒子を分散させた試料溶液の直接蛍光測定によって得られた蛍光スペクトルから、シクロバルビタールの結合に伴って蛍光機能性モノマー由来の蛍光強度が増加することを見出し、蛍光によるシクロバルビタールの検出が可能であることが示された。すなわち、ポリマー自体がセンサーとなる情報発信型ポリマーを実証した。



5)アゾベンゼン骨格をもつインプリントポリマーの光機能制御

本研究では、光応答性を持つポリマーとして、アゾベンゼン骨格をもつポリマーを構築し、その吸着機能を光制御することを目的とした。ポリマーの合成には、ターゲット分子に特異的な結合部位をポリマー中に容易に形成させることができる分子インプリンティング法を用いた。ターゲット分子には、4－ニトロフェニル－α－D－マンノピラノシドを用いた。

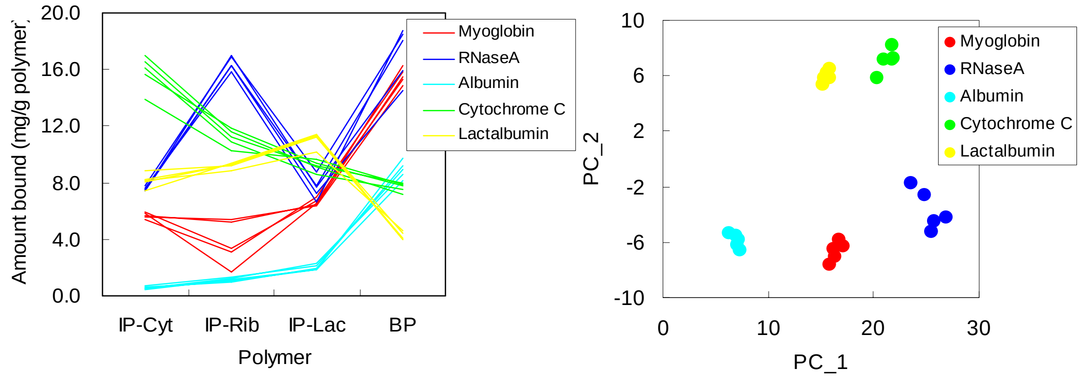
今回合成したポリマーは、紫外光照射によって、アゾベンゼン骨格が光異性化挙動を示すことが確認され、吸着特性が変化することが示された。すなわち、光応答性分子認識場の構築に成功した。



6)プロテインチップのためのタンパク質インプリント材料の合成

本研究では、分子インプリンティング法を用いてタンパク質を認識するインプリントポリマーを合成することを目的とした。機能性モノマーとしてアクリル酸を用いて、シトクロームC、リボヌクレアーゼ A 、ラクトアルブミンを鋳型に用いたインプリントポリマーおよびタンパク質を加えないブランクポリマーの計 4 種類のポリマーを合成し、それぞれのポリマーについて、シトクローム C、ミオグロビン、リボヌクレアーゼ A 、ラクトアルブミン、アルブミン 5 種類のタンパク質の吸着量をみた。それぞれのポリマーは、鋳型タンパク質に対し最も吸着量が多く、インプリント効果が認められた。

このデータを多変量解析のひとつである主成分分析により解析し、結果をプロットした。その結果，それぞれのタンパク質が、3D グラフ上できれいに分割できることが分かった。このことから、これらのインプリントポリマーをアレイ化して、同様のデータ処理をすることで、人工材料を用いた新しいコンセプトのプロテインチップが出来ると思われる。



IP-Cyt: Cytochrome C インプリントポリマー；IP-Rib: Ribonuclease A インプリントポリマー；

IP-Lac: α-Lactalubumin インプリントポリマー

5　自己評価：

本研究では，分子インプリンティングの技術を駆使して、望みの三次元空間を創出することを目的とした。当初、1)ポストインプリント処理インプリントポリマーによる環境負荷物質の吸着と分解、2)情報発信型インプリントポリマーを用いるセンシングシステム、3)ペプチドを用いる光感応性分子インプリントドラッグデリバリーシステム、4)光感応性インプリントポリマーによる光応答性固相抽出、5)フラーレンインプリントポリマーによる新しい分子デバイス、6)シミュレーションによる構造-機能相関の推定、の6サブテーマを計画した。

3 年の研究期間で1)、2)、4)は当初の目的を達したが、3)はペプチドの固相合成に問題があり、現在までに十分な成果があがっていない。また、5)のフラーレンインプリンティングは、新たなクレフト型分子を、6)のシミュレーションで発見したところで時間切れになったので残念である。しかしながら、当初予定していなかったタンパク質の分子インプリンティングに着手し、多変量解析を組み合わせることで、新しい概念のプロテインチップの可能性が示唆されたことは収穫であった。

これまで、系統的な研究がほとんどなく、方法論としては未熟であった分子インプリンティングが、本研究の結果、よく考えられてデザインされた鋳型分子を用いることで、テーラーメイドにナノスケールの分子の鋳型を人工高分子内に構築できる手法であることが示された。さらに、情報発信機能、光応答機能、認識場の再構築機能、触媒活性機能など新たな機能を思いのままに付与できることを例示し、分子レベルでデザインされた新しいテーラーメイド機能性人工高分子のコンセプトを実証できた点が、本研究の大きな成果であるといえる。また、慎重に選考したポスドク研究員の研究参加が、本研究の成果に拡がりを与えたことは、特筆すべきことである。

6　研究総括の見解：

インプリントポリマーによる鋳型形成、機能性を持った3次元空間の創製、それを使った特定物質の検出あるいは合成といった期待は完全には実現しなかったが、鋳型形成後の修飾などで、「鋳型形成の有用性」を示したことが評価できる。特にポストインプリント処理によって所望の官能基を鋳型内に固定する手法は有用だと考えられる。当初の目標に沿って着実に研究を進め目標の内のいくつかを達成したが、研究のさらなる進展が期待される。

7　主な論文等：

【論文】（14 件＋4 件投稿中）

1. Takeuchi, T., Murase, N., Maki, H., Mukawa, T., Shinmori, H. Dopamine Selective Molecularly Imprinted Polymers via Post-imprinting Modification, Org. Biomol. Chem. 2006, in press （表紙に採用）.
2. Takeuchi, T., Minato, Y., Takase, M., Shinmori, H. Molecularly Imprinted Polymers with Halogen Bonding-based Molecular Recognition Sites, Tetrahedron Lett. 2005, 46, 9025-9027.
3. Kubo, H., Yoshioka, N., Takeuchi, T. Fluorescent Imprinted Polymers Prepared with 2-Acrylamidoquinoline as a Signaling Monomer, Org. Lett. 2005, 7, 359 - 362.
4. Takeuchi, T., Ugata, S., Masuda, S., Matsui, J., Yane, T., Takase, M. Atrazine Tranformation Using Synthetic Enzymes Prepared by Molecular Imprinting, Org. Biomol. Chem. 2004, 2, 2563-2566.
5. Kubo, H., Nariai, H. Takeuchi, T Multiple Hydrogen Bonding-based Fluorescent Imprinted Polymers for Cyclobarbital Prepared with 2,6-Bis(acrylamido)pyridine, Chem. Commun.. 2003, 2792-2793.

【特許】（3 件）

1. 竹内俊文、菱谷隆行、特願 2005-246863「インプリントポリマーおよびその利用」
2. 竹内俊文、特願 2004-139046「標的分子の認識場が再構築可能な分子認識ポリマー及びその製造方法」
3. 竹内俊文、特願 2004-139040「分子認識ポリマーおよびその製造方法」

【招待講演】（9 件）

1. 竹内俊文「インプリントポリマーによる分子認識」第 53 回高分子学会年次大会招待講演（平成 17 年 5 月、パシフィコ横浜）
2. 竹内俊文，「分子の鋳型を取る －モレキュラーインプリント機能性ナノ空間創製－」第 2 回ナノテクノロジー総合シンポジウム（平成 16 年 3 月，東京ビッグサイト）
3. Takeuchi, T., "Molecularly Imprinted Polymers with Post-imprinting Conversion of the Binding Sites" Material Research Society (MRS) Fall Meeting (Boston, MA, December, 2003).
4. Takeuchi, T., "Molecularly Imprinted Polymers for Biorecognition", 2nd Asian European Symposium on Biomolecular Recognition in Downstream Processing (Vienna, Austria, October, 2003).

研究課題別評価

1　研究課題名：

　　ナノサイズ一次元構造の電子物性評価

2　研究者氏名：　長谷川　幸雄

　ポスドク研究員：安　東秀　（研究期間　H.15.4～H.18.3）

　技術補佐員：秋山　琴音　（研究期間　H.16.4～H.18.3）

3　研究のねらい：

　微細デバイスへの究極としてのナノサイズ一次元構造の電子輸送現象の本質を解明すべく、走査プローブ顕微鏡（SPM）を駆使した2つの研究戦略を提案した。ひとつは、走査トンネル顕微鏡（STM）により、表面二次元電子系に形成された一次元パターンの電子状態を実空間で観察するもので、例えば、一次元リング構造におけるアハラノフ・ボーム効果に絡む波動関数の実空間観察を目標とする。もう一つは、原子間力顕微鏡（AFM）による絶縁体表面上でのナノサイズ一次元構造作成とその電気抵抗・磁気抵抗の測定であり、STMなど他の手法では得られないダイレクトな電気伝導特性評価を目指す。ナノスケール構造の物性評価には原子スケールでの構造評価が不可欠との信念から、SPMの高分解能化にも主眼を置いて研究を進めている。

4　研究成果：

　（1）　AB効果実空間観察の試み

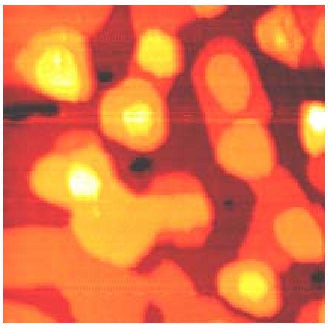


図1　Si(111)-√3Ag 構造のSTM像（室温）。サイズ

　表面には、その表面電子状態が金属的な振る舞いを示し、二次元的な電子系を持つものが知られている。こうした表面準位をステップなどを障壁としてリング形状に閉じ込め、磁場を印加することにより現れるアハラノフ・ボーム効果（AB効果）をSTMによる電子状態分布測定を通じて、実空間観察することを試みた。

　計画当初は二次元電子系を持つCu（111）表面を用いて測定することを予定しており実際に測定を試みたが、表面電子状態とバルクの電子状態とのカップリングが高く、ステップによる閉じ込め準位のエネルギー幅が広くなり、磁場による微細な電子状態の変化の検出が困難であることが判明した。そこで、基板のバンドギャップ内に表面準位があり、そのため閉じ込め準位のエネルギー幅の小さいことが期待されるSi（111）-√3×√3Ag構造（以下、√3Ag構造）を用いて研究を進めることとした。

　図1のSTM像は、Si基板上にSiとAgを適当な条件で蒸着することによって作成された√3Ag表面によるアイランド構造を示す。2層目の部分に表面電子状態がリング状に閉じ込められた構造が作成されている。図2は同表面での低温でのSTMおよび走査トンネル分光（STS）観察例で、アイランド構造（リング構造は作成されていない）で閉じ込められた電子定在波が観察さ

れており、また準位のエネルギー幅も十分に狭いことが確認されている。

このように√3Ag構造はAB効果観察に要する条件を満たしていることを示すことができた。現在、低温でのリング構造作成を進め、磁場中での電子定在波観察を行うことにより、AB効果観察を試みている。

（2） STSによる表面での静電ポテンシャル分布測定

上記のAB効果観察を試みる際に、ある点でのトンネル分光測定やある特定電圧での微分トンネル電流像などこれまでの部分的なSTS測定では詳細な解析が困難であると判断し、全ての領域において一度にトンネル分光測定が行えるようSTSシステムの高精度化を進めた。その結果、√3Ag構造上における微小な（＜10meV）静電ポテンシャルの変化を表面準位のエネルギー値の変化として捕らえることができることを見出した（図3、PRL. 96, 016801, '06）。

エネルギー値のシフト量から求められたポテンシャル分布は、この表面に存在する二次元電子系（図2参照）により遮蔽されたポテンシャルとして説明され（図4）、さらに遮蔽効果によるポテンシャルの振動構造、いわゆるフリーデル振動を初めて実空間観察することにも成功している（図5）。これまで、図2に観察される電子定在波が誤ってフリーデル振動と呼ばれることがしばしばあったが、今回、両者を直接比較することにより、その形状・位相などの差異を指摘することができた。

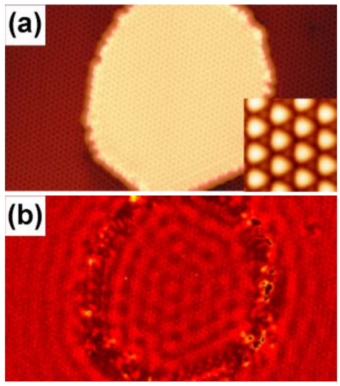
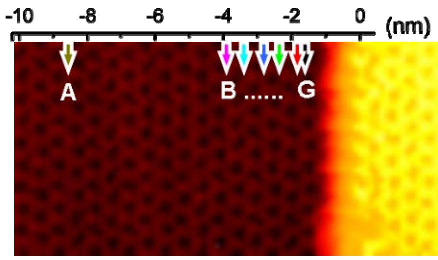


図2 √3Ag 構造のSTM像(a)とその電子定在波（b）。観察領域は 23nm x 40nm。低温（5K）での観察



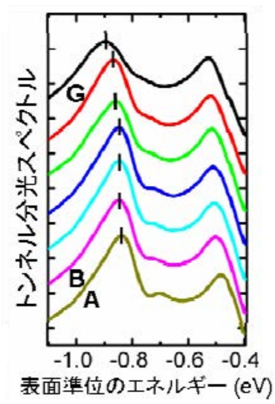


図3 √3Ag表面のステップ近傍で測定されたトンネル分光スペクトル。ステップに近づくにつれて、ピーク値がシフトしている様子が見てとれる。

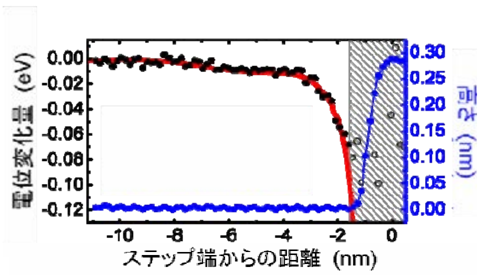
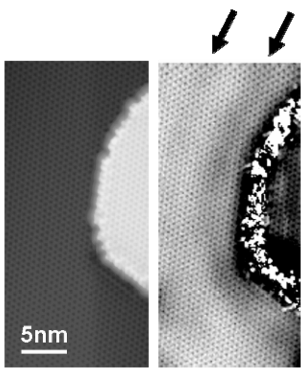


図4 √3Ag構造のステップ近傍での静電ポテンシャル分布。黒点が実測値で、赤線は理論から求められた遮蔽されたポテンシャル分布。青線はトポグラフを表し、ステップ形状を示している。



(a) STM像 (b) 電位分布像

図5 √3Ag 構造のステップ近傍での STM 像とポテンシャル分布像。（b）のポテンシャル分布像にフリーデル振動が観察される（矢印）

（3） 低温AFMの立ち上げ

絶縁体表面上での一次元導体の電気伝導測定を目指して、超高真空低温磁場中で稼動する AFM 装置の開発を行った。低温磁場下でのスペースが限られていることから、通常の光によるカンチレバー変位検出の方法を採らず、自己検出型の長辺型水晶振動子を用いて試料表面からの力を検出して像を得ることとした。

図6はその水晶振動子の写真である。中央部のロッドが縦に 1MHz の共振周波数で伸び縮みし、それに対応する電気信号がロッド表面の電極から検出される。ロッドの先に取り付けたタングステン探針を表面に近づけて力を感ずると共振周波数が変化するので、それを一定に保ちながら走査することによって像が得られる。ちなみに図6（d）の像で共振周波数の変化を−0.37Hz に設定して撮っている（APL, 87, 133114, '05）。

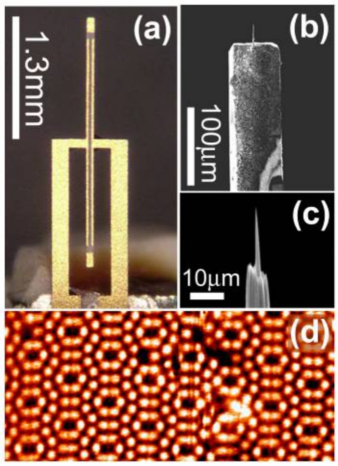


図６　長辺型水晶振動子 (b)（c）は先端に取り付けた探針、（d）は観察された Si(111)表面での室温での AFM 像（19nm x 9nm）

このセンサーの特長は、光学系の調整が不要なことに加え、共振周波数が高いことから変調法によるポテンシャル測定などが行いやすく、またその直線形状から探針先端形状の電界イオン顕微鏡（FIM）像観察が可能で先端形状の評価や酸化膜除去に活用できる点などがある（図7）。探針先端形状を原子スケールで評価可能な FIM を装備したAFMは、本研究により初めて実現することができたものである。

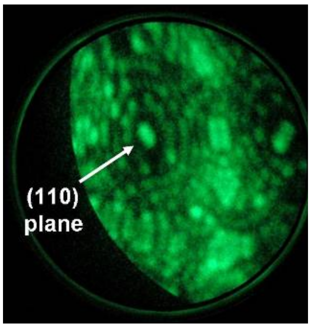


図7：水晶長辺振動型振動子に取り付けられた探針先端のFIM像

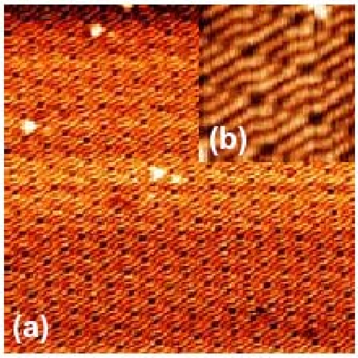


図8　水晶長辺振動型振動子による Si(111)表面の低温での AFM 像。温度は 3.6K, (a)42nmx42nm、(b)1nmx1nm

同センサーを低温装置に組み込むことにより、図8に示すような Si 表面の原子像を撮ることができた。室温での観測に比べドリフトなどが極めて少なく、フォースカーブや散逸などの測定が安定に行えることが確認できており、今後の計測に十分活用する計画である。

（4） 金属探針カンチレバーの作成

AFM の高空間分解能化や AFM リソグラフィーによる絶縁体表面での電極作成、さらにはケルビンプローブ法における高精度化などを目的として、金属探針を持つシリコンカンチレバーを作成することに成功した（図9、RSI 76, 033705 '05）。

直径 5μm のタングステンワイヤをカンチレバー先端に銀ペーストで取り付けた後、集束イオンビーム（FIB）を用いて先端を尖らせており、既存のシリコン探針に比べ明らかに鋭い先端を持つ。

この探針の特長は、シリコンカンチレバーの特性（Q 値など）を保ったまま探針部のみを金属にできる点にあり、電圧印加時にも電界侵入が起こらないため、ケルビン法による静電ポテンシャル分布測定などには有利である。

また、この方法は探針に用いる材料を選ばないことから、Au や Pt などの探針作成も可能である。Au 探針を用いると、適当な電圧を印加することにより電界蒸発によって表面上に Au 原子を移すことができる。この方法により絶縁体表面上での電極作成などが可能であり、一次元構造評価に活用できると考えている。

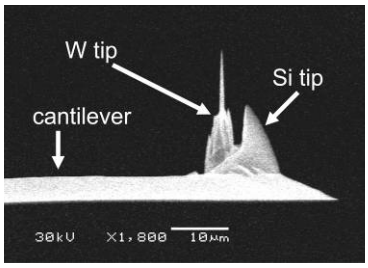


図9　金属探針シリコンカンチレ

（5） 高精度AFM観察およびケルビン法による原子分解静電ポテンシャル測定

非接触型 AFM の高精度化を行い、その評価として Ge/Si(105)表面での AFM 像観察およびケルビンプローブ法によるポテンシャル分布評価を行った。同表面での STM 像では、表面の電子状態を反映して探針バイアス電圧の極性に依存した像が得られるのに対し、AFM ではダングリングボンドを持つ全ての表面原子を高分解能でイメージングすることを示すことができた（図 10、PRL, 93, 266102 '04）。また、同表面上でのダングリングボンド間での電荷移動による静電ポテンシャルを検出することによって（ケルビンプローブ法）、電荷移動を直接的に検証することができた（図 11）。

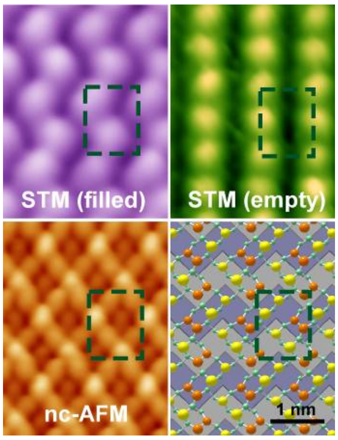


図 10　Ge/Si(105)表面での STM 像・AFM 像とその構造

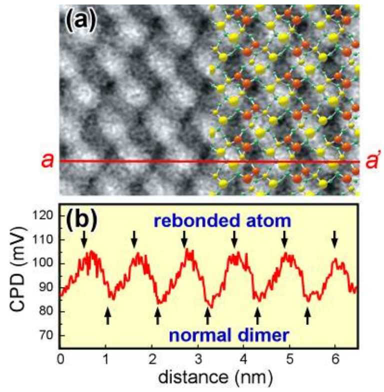


図 11　Ge/Si(105)表面でのケルビンプローブ法による静電ポテンシャル分布像とそのプロファイル

5　自己評価：

装置の開発・高精度化の過程において得られた成果（上記（2）（5））は、いずれも装置の高い性能を生かした前例の無いレベルの研究成果であり、その内容には十分に満足している。特に（2）の結果は全く予想しなかったものであり、STS の高精度化を行わなければ気付くことの無かった内容である。「ユニークな装置を開発しデータを得ればユニークな結果が得られる」ということをまさに実感させる研究であった。

また（4）の研究は、これまで研究者が進めてきた研究スタイルとは異なるものであり、今回のような機会が無ければ行わなかったであろう研究対象である。ポスドク研究員あるいは技術員といった人的支援を得て余裕ができたことから多少の遊び心を持って取り組んだところ、ことのほか上手く行き一定の成果を得ることができた。また開発した方法は、他の研究、例えば（3）の水晶振動子先端の探針取り付け・加工にも応用することができ、メインのプロジェク

ト推進にも大いに役立つ結果となっている。

一方で、プロジェクト本来のテーマである一次元構造に関しては、STM・AFM いずれにおいても十分な成果を得ることができず、課題が残った。STM による AB 効果に関しては試料選定の問題、AFM に関しては装置立ち上げの見通しの甘さ、さらには全体的にテーマが散漫になったなどがその原因として挙げられるであろう。今後のプロジェクト策定における反省点としたい。

6 研究総括の見解：

一次元構造の電気抵抗・磁気抵抗の測定と表面におけるアハロノフ・ボーム効果の観測という2つの興味あるテーマを掲げて研究を進めたが、両テーマとも目標を達成しなかった。当初の目標達成に集中するよう領域総括としてアドバイスしたが、他の実験にエネルギーを取られて、本来の目標が十分達成できなかったのは残念である。低温動作の STM と AFM の活用という2つのかなり難しい技術を追ったのには無理があった。しかし表面二次元電子系におけるフリーデル振動を実空間観察するなど、物理的に興味ある結果を得たことは評価できる。

7 主な論文等：

論文： 16 件（内、国内 3 件）、招待講演: 17 件（内、国際学会 8 件）

主な論文：

1. Toyoaki Eguchi and Y. Hasegawa
″High resolution atomic force microscopic imaging of the Si(111)-7x7 surface: Contribution of short range force to the images″, Phys. Rev. Lett., 89, 266105 (2002).
2. T. Eguchi, Y. Fujikawa, K. Akiyama, T. An, M. Ono, T. Hashimoto, Y. Morikawa, K. Terakura, T. Sakurai, M.G. Lagally, and Y. Hasegawa,
″Imaging of all dangling bonds and their potential on the Ge/Si(105) surface by noncontact atomic force microscopy″, Phys. Rev. Lett., 93, 266102 (2004)
3. Kotone Akiyama, T. Eguchi, T. An, Y. Fujikawa, Y. Yamada-Takamura, T. Sakurai, and Y. Hasegawa, ″Development of a metal tip cantilever for non-contact atomic force microscopy″, Rev. Sci. Instrum. 76, 033705 (2005).
4. Toshu An, Toyoaki Eguchi, Kotone Akiyama and Yukio Hasegawa
″Atomically-resolved imaging by frequency-modulation atomic force microscopy using a quartz length-extension resonator″, Appl. Phys. Lett., 87, 133114 (2005)
5. Masanori Ono, Y. Nishigata, T. Nishio, T. Eguchi, and Y. Hasegawa
″Electrostatic potential screened by a two-dimensional electron system:: A real-space observation by scanning tunneling spectroscopy″, Phys. Rev. Lett. 96, 016801 (2006)

主な招待講演:

1. Yukio Hasegawa and Toyoaki Eguchi
   ″High Resolution Atomic Force Microscopy by Probing a Single Chemical Bonding″,
   8th IUMRS International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM2003), Yokohama, Japan, October, 2003
2. Yukio Hasegawa, T. Eguchi, K. Akiyama, M. Ono, and T. Sakurai
   ″Highly resolved surface imaging by atomic force microscope″
   FSISE2004, the 2004 joint conference of the 7th international conference on Advanced Surface Engineering (ASE 2004) and the 2nd international conference on Surface and Interface Science and Engineering (SISE 2004), May 2004, Guangzhou, China
3. Y. Hasegawa, T. Eguchi, K. Akiyama, Y. Fujikawa and T. Sakurai,
   ″STM and AFM; Which is Better for Surface Structural Analysis? Non-contact AFM Studies on Ge/Si(105) Surface″
   13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy /Spectroscopy and Related Techniques (STM'05), July, 2005, Sapporo, Japan
4. 長谷川幸雄「非接触 AFM による表面原子・電荷移動の観察」(シンポジウム講演)
   日本物理学会 2005 年秋季大会、2005 年 9 月、京田辺、京都
5. Yukio Hasegawa and Toyoaki Eguchi,
   ″Sensing Charge Transfer Among Surface Atoms by Kelvin Probe Force Microscopy″,
   43rd IUVSTA Workshop on ″Chemical Sensitivity in Scanning Probe Microscopy″ Zakopane, Poland, Nov.-Dec. 2005

研究課題別評価

1. 研究課題名： シリコンをベースとする新光機能素子の創製

2. 研究者氏名： 深 津 晋

研究員：菅原 由隆（研究期間 H.17.4 ～ H.18.3）

3. 研究の狙い： 本研究の目的は、シリコン・ベースのヘテロ構造における電子・正孔系と PHz 電磁場との相互作用をデザインし、シリコンに残された最後の課題である「光発生・増幅」機能を実現することで、真の”シリコン” フォトニクスの早期形成に資することである。

4. 研究成果：

1） <u>界面局在電子・正孔系を利用した新しい光学遷移制御法の確立</u>

Si が光発生に不向きな原因は、生来の間接遷移バンド構造にある。本研究では、この歴史的難題を解決するための新原理を提案し、その検証を行った。Si よりエネルギーギャップの小さい直接遷移物質を Si 中に導入しても、直接遷移特性は生かせない。これは、電子に対して斥力のバンド不連続が生じ、電子が常に Si 中に存在するためである。過去の研究はこのジレンマが解決できず頓挫した。我々は、コペルニクス的転換により、反電子ポテンシャルを逆手にとる戦略に出た。V 族／Si 界面に発生する双極子は、強い短距離電子トラップとして働くが、III−V 族物質内へエバネセント電子波が浸出する結果、直接バンド端成分が電子に継承される。この効果を通じて「Si の電子」であるにも拘わらず、電子・正孔系に直接遷移特性が発現し、Si を間接遷移の呪縛から解放することにはじめて成功した。

2） <u>GaSb/Si量子ドットの形態とポテンシャル制御</u>

分子線エピタキシ(MBE)法により、GaSb/Si 量子ドットの形態がほぼ系統的に制御できること、および量子ドットのバンドプロファイルが、歪の符号に無関係にキャリアを遠方から引き寄せる効果を新たに見いだし、励起法に依存しない構造設計が可能であることを示した。

3） <u>GaSb/Si量子ドットの高輝度蛍光</u>

GaS/Si 量子ドットは、Si サブギャップ(1.1−1.7μm)に強いブロードバンド蛍光を呈するが、赤外カメラによるイメージングが可能なほどの高い外部効率（>0.3%,@10K）を持つことがわかった。外部効率は低下するものの、単一層の量子ドットでも、室温蛍光が観測され、量子ドットの内部量子効率は 1%にも及ぶことがわかった。室温で 500MHz 以上の変調帯域を確保し、イントラチップ用途であれば実用化が視野に入り得ることを示した。

4） <u>GaSb/Si量子ドットの光増幅機能</u>

シリコン系では初めてとなる近バンド間遷移の光利得を検証した。ポンプ・プローブ配置で、スラブ導波路のシングルパス on−off 利得を評価し、低温(10K)で、光励起。電流励起ともに 10dB/cm 以上の値を得た。また、プローブ光強度依存性、利得スペクトルから界面3準位電子系の反転分布を検証した。さらに、SOI 導波路搭載の量子ドットにおいて増幅自然放出光(ASE)の観測に成功

し、共振器化を待ってレーザ発振検証を行う準備が整った。一方、高温動作には閉じ込めポテンシャルの改良か、材料系変更が必要なことがわかった。

5) SiGe/Si量子井戸を利用した単一チップ電場制御型多波長可変LED

SiGe/Si の反電子型バンド接続を通じて電子が電場敏感となる性質に注目し、光学利得のない光源でも適用可能な、新しい波長制御法を案出した。電子のみの分布を縦電場で制御すると、電子の欠乏した井戸が消光する効果を利用する。インパクトイオン化を利用したの双方向性 LED 構造において、3波長までの波長スイッチング動作を検証した。

6) Si一次元導波路を利用した波長変換・光発生デバイスの開発

シリコン・ベースの一次元導波路を利用した、$\chi^{(3)}$起源の波長可変コヒーレント光源・波長コンバータを目指した。内因性の導波路損失で最も顕著な、自由キャリア吸収 (FCA)の抑制法として、低次元構造の導入を提唱した。SiGe/Si量子井戸による光・キャリアの空間分離を通じて、従来の電場掃引法によらずともFCAを 1%程度に抑制できることを理論的に示した。一方、二次元層の採用により、FCA素過程である電子、正孔のバンド内間接遷移終状態を 10%オーダまで抑制できる可能性ほか、広帯域利得発生への指針を示した。実験では、シリコンSOI一次元矩形導波路において自然放出ストークスラマン光を観測できたが、伝播結合損失が大きく、誘導光発生の検証には至っていない。高精度に制御された導波路の確保が課題である。

7) その他シリコン・ベース材料の新光機能

バンド端近傍の反射光強度変調は、KK 変換により吸収係数に支配されるため、シリコン・ベース物質では、0.01%以下の変調度しか得られないことが予想される。しかし、SiGe の表面にはギャップ近傍に欠陥起因の強い吸収帯が発生し、1%強の光強度変調度が得られた。

5. 自己評価:

研究紹介文に謳った、究極目標のひとつであるレーザ発振に関しては、SOI 導波路搭載の GaSb/Si 量子ドット試料単一チップ上での ASE 発生まで検証が進み、共振器化技術の完成を待って、ようやく手の届く段階にまで迫ることができた。

一方、諸般の事情により、研究開始直前のタイトル調整段階において、若干、最終目標を下方修正する必要があったため、「シリコン・ベースの新光機能素子」もターゲットに入ることとあいなった。これらに関しては、未だに原理の検証の域を出ないものもあるが、少なからず期待以上の成果を上げることができたと自負している。中でも、SiGe/Si 量子井戸を利用した電場制御型波長可変 LED は、タイプ II 量子構造に普遍的かつ極めて単純な動作原理に基づき、単一チップフォーマットのインコヒーレント光源を、縦電場のみの制御を通じて、波長可変な光源へと変貌させ得る技術であり、稀に見る高機能集約の例であると言えよう。

一方、中途より開始した、導波路の非線形性にもとづく波長変換・光発生デバイスに関しては、予想外の技術的制約のせいで失速に苦しんだ。しかし、導波路能動デバイスの設計指針に関する、有意義な提言を行うことができた。導波路では、二光子吸収起因の FCA が顕著となるが、低次元構造によってこれが抑制可能となるなばかりでなく、広帯域での利得発生など、高機能化を推進する駆動力として、低次元構造の利用が有効に機能する可能性を指摘した。

研究の中核をなす光学遷移制御法に関しては、バンド物理に立脚した物性制御の停滞状況を打破する、大きな前進であることに間違いはなく、シリコン・フォトニクス完成への唯一のネックとなっていた、シリコン・光エミッタの実現を一気に推しすすめるための牽引力になってくれるものと信じている。

尚、シリコン・ベース材料による光発生の方法論には、別の可能性も残されているはずであり、今回、我々が提案、検証した方法が唯一絶対の方法だとは考えていない。今後は、単一光子、相関光子対発生などのマイルストーン達成も視野に入れながら、従来の一電子近似の範疇を越えて、光と物質の相互作用を追求したい。例えば、光電場と強く結合した電子系や、凝縮状態の利用など、従来の双極子遷移の制約を払拭できる、もしくは双極子遷移を利用しながらも、全く異質な効果が期待できる、新たな可能性についても、積極的に検討してゆきたいと考えている。

6. 研究総括の見解：

ナノ構造を応用した Si ベースの新機能素子の創製を目的に、GaSb ドットを用いた LED や SiGe/Si の多波長 LED などユニークなデバイスを提案して実証し、また理論的解析も示して学術的にも貢献した点が評価できる。今後は、実用化に向けた課題を明確にして、Si フォトニクスとして実用に結びつけていくことが期待される。

7. 論文等：10件

1） M. Jo, K.Ishida, N.Yasuhara, Y.Sugawara, K.Kawamoto, and S.Fukatsu
Appl. Phys. Lett. **86**, 103509 (2005).

2） M. Jo, N. Yasuhara, Y. Sugawara, K. Kawamoto, and S.Fukatsu
J. Cryst. Growth **278**, 142-145 (2005).

3） N. Yasuhara and S.Fukatsu, J. Cryst. Growth **278**, 512-515 (2005).

4） Y. Sugawara, Y. Kishimoto, Y. Akai, and S.Fukatsu, Appl.Phys.Lett. **86**, 011907 (2005).

他6件

招待講演： 国際学会 1件、国内学会 3件

1. 研究課題名：光応答型インテリジェント核酸を用いた遺伝子操作法の開発

2. 研究者氏名：藤本健造

研究員：吉村嘉永 （研究期間 H. 15. 4～ H. 18. 3）

研究員：野口悠紀 （研究期間 H. 17. 4～ H. 18. 3）

3. 研究のねらい：遺伝子操作の「脱酵素化」に取り組み、光応答型遺伝子操作という新しい方法論の開発を行う。現代の遺伝子工学は酵素を用いた遺伝子操作に基づくものであり、生体内細胞中での操作、マイクロマシン上での操作には限界があるとされてきた。光応答型遺伝子操作法を開発することで、これらの問題を解決し、細胞内での遺伝子治療、マイクロチップ上での遺伝子診断、バイオコンピューティング等へ展開することを目的とした。

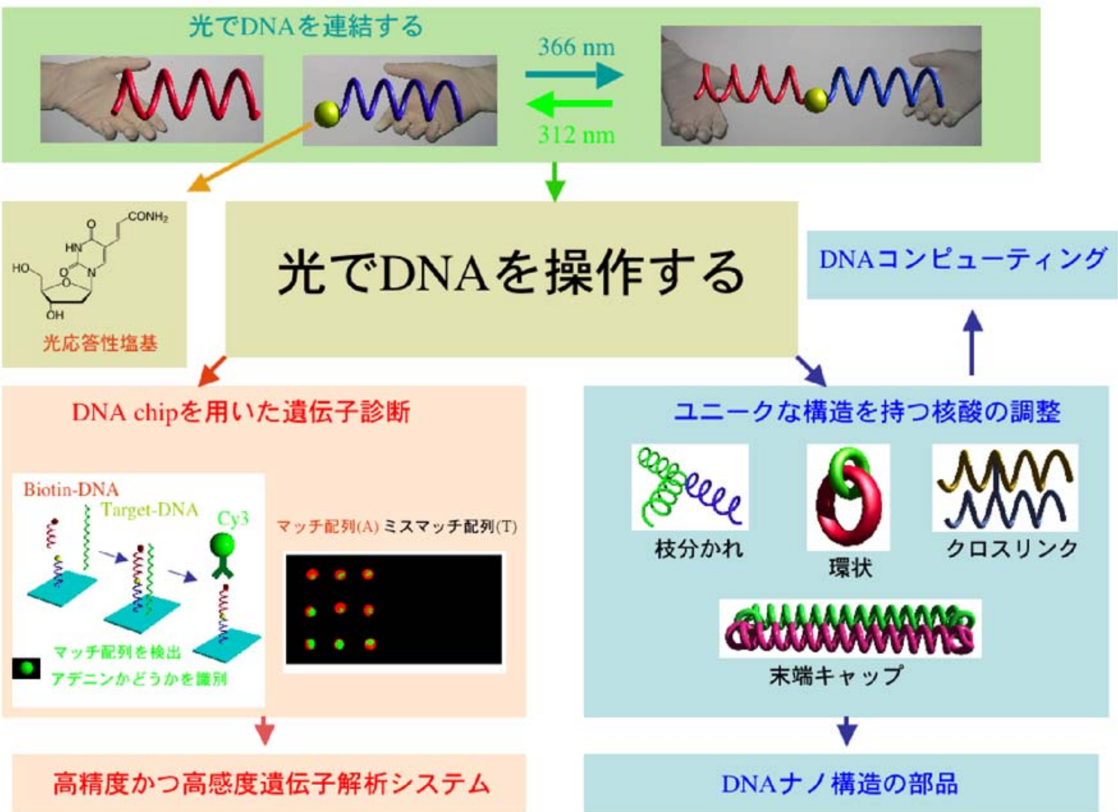
4. 研究成果：図にまとめると下図の通りである。以下の通り成果を分類し、順に報告する。

1）「脱酵素化」を可能にする光応答性人工核酸を設計し人工核酸ライブラリーを作製

2）それらを用いて今まで作ることの出来なかったユニークなナノ構造の構築に成功

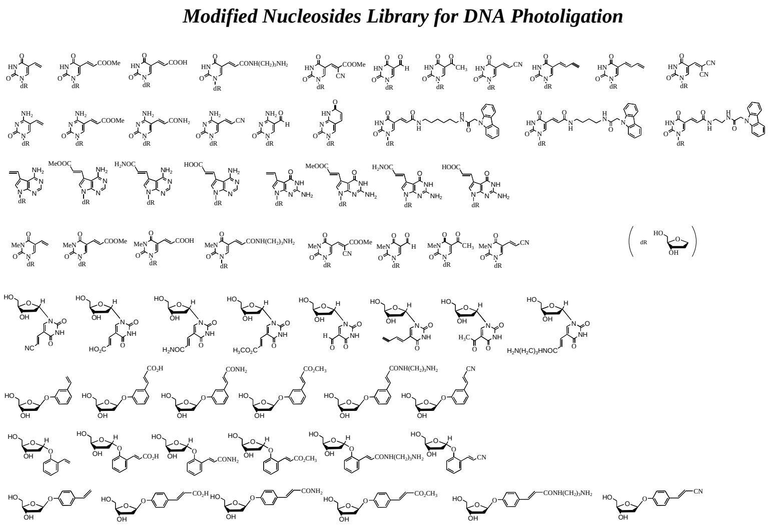
3）DNA チップ上での光遺伝子診断への応用に成功（今までにない高い S/N 比）

4）DNA コンピューティングへの応用に成功



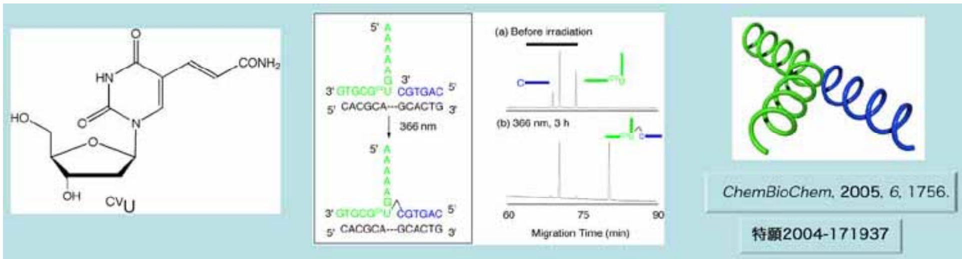
1)「脱酵素化」を可能にする光応答性人工核酸ライブラリーを作製

述べ100種類の人工核酸塩基及びヌクレオチドを合成した(下図参照)。

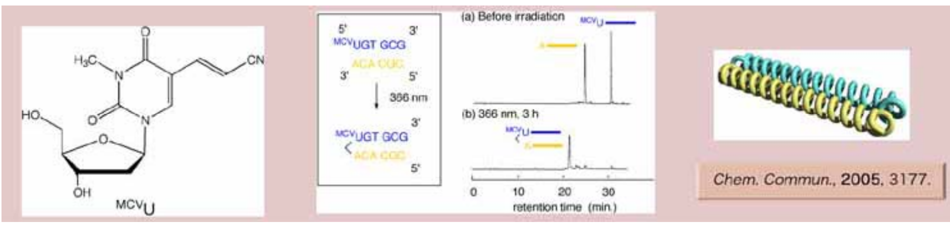


2)ユニークなナノ構造の構築に成功

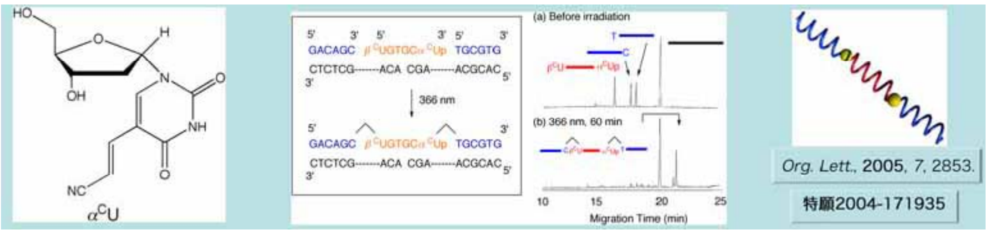
・2−1 枝分かれ核酸の合成 ―― ^{CV}Uを用いることで任意の位置で枝分かれ構造を導入することが可能となった。*ChemBioChem*, 2005, 6, 1756. 特願 2004−171937



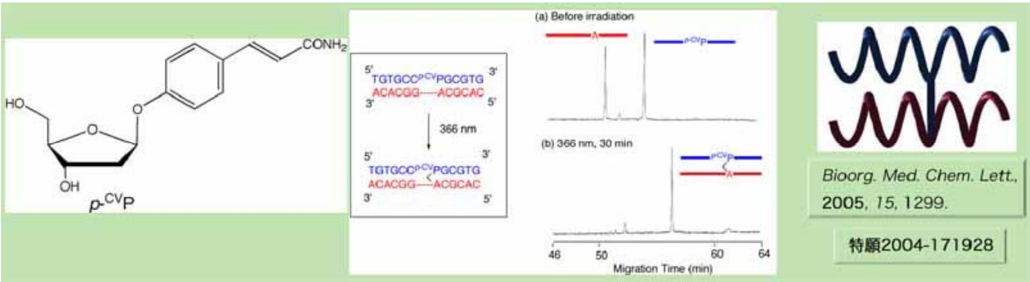
・2−2 キャップされた核酸の合成 ―― ^{MCV}Uを用いることによりDNA末端部位でキャッピング構造を導入することが可能となった。またキャッピングされることで酵素耐性を獲得することを見出した。*Chem. Commun.*, 2005, 3177.



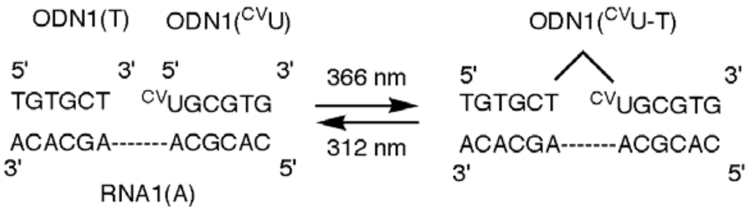
・2−3 キャップされた核酸の合成 ――α^{C}Uを用いることによりDNA3’末端側で連結することが可能となった。また両末端での連結が可能となり天然のDNA断片同士を連結することに成功した。*Org. Lett.*, 2005, 7. 2853. 特願 2004−171935



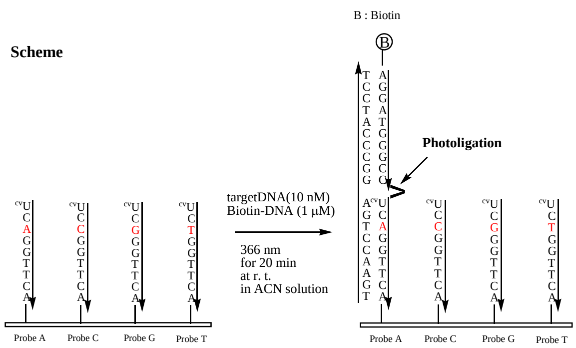
・2−4　相補鎖DNAへのクロスリンク核酸の合成　──p-^{CV}Pを用いることで相補鎖DNAへの光クロスリンク核酸が合成できることを見出した。*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15. 1299. 特願 2004-171928



・2−5　RNA を鋳型とした DNA 光連結　──具体的なナノ構造構築とまで進んでいないが、鋳型が RNA であってもこれら上記の反応が進行することを見出した。RNA を鋳型にして DNA 同士を連結することはリガーゼでは難しいので非常に有意な反応開発に成功したと考えている。　*ChemBioChem*, 2006, *in press*



3）DNAチップ上での光遺伝子診断への応用に成功。（今までにない高いS/N比）

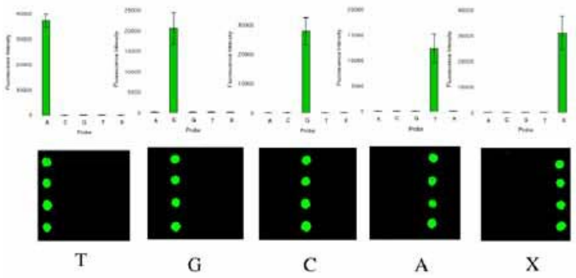


Biotin ODN : 5'-Biotin-AGGATGGGCC-3'

Target ODN
Wild-type : 5'-TGAACCTGAGGCCCATCCT-3'
Mutant (G) : 5'-TGAACCGGAGGCCCATCCT-3
Mutant (C) : 5'-TGAACCCGAGGCCCATCCT-3'
Mutant (A) : 5'-TGAACCAGAGGCCCATCCT-3'
Mutant (X) : 5'-TGAACC--GAGGCCCATCCT-3'

X: deleted

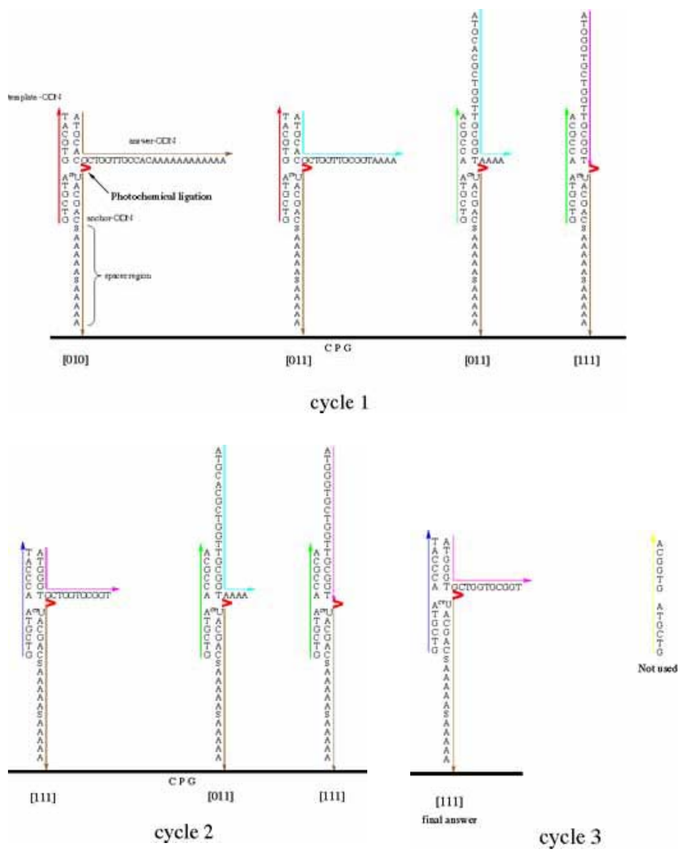
酵素が苦手とする基盤上での遺伝子操作への展開を狙い、DNAチップ上での可逆的光連結を行った。表面がアルデヒド処理されたマイクロアレイスライドに対し5‘末端に^{cv}Uを 3’ 末端にアミン基を有する光応答性核酸を固定化させた。溶液中で行ってきた鋳型DNA上での光連結をDNAチップ上で行った。連結対象DNAにはあらかじめBiotin基を導入しており、未反応DNAを洗浄後、Cy3がつながったStreptavidineと後処理するこ

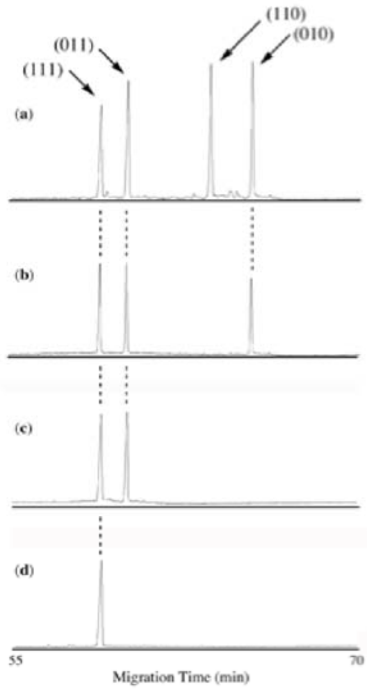


とでDNAチップ上の核酸と光連結された場合にのみ、スポット上に蛍光が現れるシステムを評価系として採用した(Scheme)。その結果、溶液中と同様に配列選択的な光連結がDNAチップ上でも可能であることや、増感剤と組み合わせることで光可逆的操作も可能であることを見いだした。このDNAチップ上での光連結反応をSNPs解析へと応用できないかp53 遺伝子を対象遺伝子として遺伝子解析を行った結果、目的の遺伝子のスポット上に強い蛍光を有することを見いだした（左図）。4種類全ての塩基に対して特異的に選別可能であるだけでなく1塩基欠損したものについても正確に選別できることを見出した。特願 2005-332424

4）DNAコンピューティングへの応用に成功

$$(\bar{x} \vee z) \wedge (x \vee z) \wedge (x \vee \bar{z}) = 1$$





cvUを含むODN、鋳型ODN及び連結対象ODNの混合溶液への 366 nmの光照射によりcvUのビニル基と連結対象ODNのピリミジン環の二重結合が光[2+2]環化反応し連結する。そして、その連結体ODNに 312 nmの光を照射すると結合部位が開裂を起こす。この特性を応用し酵素を使わずにDNAを連結、切断することでコンピューティングを行った。DNAコンピューティングは任意の情報を塩基配列で表し演算を行う。その過程でODNはソフトウェア、入力、出力を担い、光源はハードウェアの役割を果たす。本研究では情報をランダムな数個の塩基配列に置き換えるのではなく、将来への応用を見据えコドンを模範し 3 塩基で 1 つの情報を表し、その組み合わせをもって解ODNとした。このようにして設計したODN群を用い 2SAT問題（式1）を解いた。3 回の演算後、解となる一本のODNを導くことに成功した（上図）。*Chem. Lett.* 2005. 34 (3) 378.

5. 自己評価：当初の最大の目的である遺伝子操作の「脱酵素化」に取り組み光応答型遺伝子操作という独自の手法論の発展的開発に成功したと考えている。酵素では今まで作ることが出来なかったナノ構造を容易に調整することが出来る様になった。特にマイクロチップ上での遺伝子診断は計画以上に進んだ。既に報告されているどの手法よりも高い S/N 比を有しており実用化が期待できる反応開発に成功したと考えられる。また、DNA コンピューティングへの展開も予想以上に良好な成果が得られた。ただ、目標の一つであった生体内細胞中の操作に関しては、生体に適合したより長波長での光応答分子の開発が難しかった為、開発途中の段階で終了時期を迎えた。

6. 研究統括の見解

遺伝子操作の脱酵素化というオリジナルな目標を掲げて、チミンダイマー修復用のカルバゾールを含有するインテリジェント核酸を創出し、光応答性を利用した様々な遺伝子操作技術の開発を行った。チミンダイマーの修復や SNP 検出など実用化テーマにも取り組み、マイクロチップ上での遺伝子診断実験に成功したことなどが高く評価できる。

7. 主な論文等：

論文　１８件（総説4件含む）

1) Shinzi Ogasawara and <u>Kenzo Fujimoto</u>
“A Novel Method to Synthesize Versatile Multiple-Branched DNA (MB-DNA) by Reversible Photochemical Ligation”
ChemBioChem **2005** 10(6), 1756-1760

2) Masayuki Ogino, Yoshinaga Yoshimura, Akio Nakazawa, Isao Saito and <u>Kenzo Fujimoto</u>

"Template-directed DNA photoligation via a –5-cyanovinyldeoxyuridine"

Org. Lett. **2005** 14. .2853-2856

3) Kenzo Fujimoto, Yoshinaga Yoshimura, Tadayoshi Ikemoto, Akio Nakazawa, Masayuki Hayashi and Isao Saito

"Photoinduced DNA end capping via N3-methyl-5-cyanovinyl-2-deoxyuridine"

Chemical Communication **2005** 25, 3177-3190

4) Yoshinaga Yoshimura, Yoshiaki Ito and Kenzo Fujimoto

"Interstrand Photocrosslinking of DNA via p-Carbamoylvinyl Phenol Nucleoside"

Bioorg.Med.Chem.Lett. **2005**, 15(5), 1299-1232

5) Yoshinaga Yoshimura, Yuuki Noguchi, Hideaki Sato and Kenzo Fujimoto

"Template-directed DNA photoligation in rapid and selective detection of RNA point mutations"

ChemBioChem **2006** *in press*

特許　4件

1)「フェノール骨格を有する光応答性ヌクレオシド」

藤本健造、吉村嘉永、伊藤義朗、特願2004-171928

2)「3' 末端側で可逆的に光連結できる光応答性ヌクレオシド」

藤本健造、吉村嘉永、荻野雅之、特願2004-171935

3)「特定位置より光化学的に枝分かれ核酸構造を作る方法」

藤本健造、吉村嘉永、小笠原慎治、特願2004-171937

4)「特定の塩基配列の標的核酸類を検出する方法、及び検出のための核酸類セット」

藤本健造、吉村嘉永、小笠原慎治、特願2005-332424

招待講演　6件

1)「酵素ではなく光を用いて DNA を連結する」

学振 151 委員会ナノバイオフュージョン分科会「先端バイオチップとポリマーテクノロジー」

2004年7月28日

2)「光を用いて可逆的に遺伝子を連結する」

平成16年生物工学会若手会

2004年7月30日

3)「酵素を使わず光で DNA を操作する。-DNA ナノアーキテクチャー創製-」

第2回ナノ総合シンポジウム「JST ナノテクノロジー分野別バーチャルラボセッション」

2004年3月17日

4）「光応答性核酸による遺伝子操作法の開発及びナノ構造構築への応用」

第54回高分子討論会（山形）

2005年9月20日

5）「Photochemical ODN manipulation based on reversible DNA photoligation mediated by modified photoresponsive base」

The 22nd Conference of Photopolymer Science and Technology, The International Symposium 2005 Materials & Processes for Advanced Microlithography and Nanotechnology

2005年6月23日

6）「光応答性核酸を用いた新規遺伝子操作法の開発」

第8回生命化学研究会シンポジウム

2006年1月13日