

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630095

研究課題名(和文) マイクロ・ナノエレクトロニクスを繋ぐ巨大DNA分子配線技術

研究課題名(英文) Development of molecular wiring using giant DNA for the integration of micro and nano electronics

研究代表者

寺尾 京平 (Terao, Kyohei)

香川大学・工学部・准教授

研究者番号：80467448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、DNA分子をマイクロ電極間を配線する素材として用いると同時に、DNAナノデバイスを配置するための足場として利用することを考案した。これにより、DNAナノデバイスと、集積回路やMEMSなどのミクロンサイズのデバイスがひとつのチップ上で繋がるのが可能となると期待される。

研究期間内に、1) DNA配線実証実験のためのマイクロピラー電極の作製プロセスの確立と評価を行った。また、2) DNAを操作するための光駆動微小構造体を作製し、そのプロセスの改善と操作特性の評価を行い、3) これらの技術を用いて酵母染色体DNAの伸張操作までを実証した。

研究成果の概要(英文)：This project aims at the development of the technique to connect DNA nanodevices to micron-size devices, including MEMS or IC, on a single chip using giant DNA molecules as molecular wires, which have the size of 2 nm in width and over 100 micrometers in length.

For the demonstration of the DNA molecular wiring, we fabricated the micropillar electrodes covered with gold on a glass substrate, on which a DNA wire is immobilized and connected electrically. The side walls of the pillars were successfully covered with gold, which are also used for chemical modification to improve the adhesion between DNA and the pillars. For the manipulation of each single DNA molecules, we developed optically-driven microstructures and evaluated their characteristics. We demonstrated the extension of single yeast chromosomal DNA molecules of Mbp size by catching them between 2 optically-driven microstructures and translocating them in aqueous situation.

研究分野：マイクロナノ工学

キーワード：分子操作 DNA 光ピンセット ナノマイクロ加工

1. 研究開始当初の背景

DNA は太さが 2 nm、長さは巨大なものであれば数 mm の長さをもつ柔軟な分子ワイヤである。近年、DNA 分子を利用した 3 次元ナノ構造や、DNA ナノロボット、ナノ回路といった革新的な技術が提案されている。しかし、DNA が物理的に脆いために、現在のマニピュレーション技術では最長で 10 ミクロン程度の長さしか扱えず、そのため、数ミクロンの DNA 素子として機能するものに限られている。また、素子の形成は DNA の自己組織化を利用しているが、溶液中での攪拌によって作製されるため、液中に散在しており、配置を制御した状態で素子を機能させることができない。

上記の素子サイズ・配置に関する制限が DNA デバイスの開発の障害となっていると考えられる。そこで、研究代表者は独自技術である mm 長・Mbp サイズの巨大な DNA 分子の非侵襲操作技術を用い(文献)、DNA 分子を配線素材として用いると同時に、DNA ナノデバイスを配置するための足場として利用することを考案した。これにより、これまで接続することができなかった、DNA 回路・DNA ロボットといったボトムアップ加工で作製したナノデバイスと、集積回路や MEMS などのトップダウン加工で作製されたミクロンサイズのデバイスがひとつのチップ上で繋がることが可能となると期待される(図 1)。

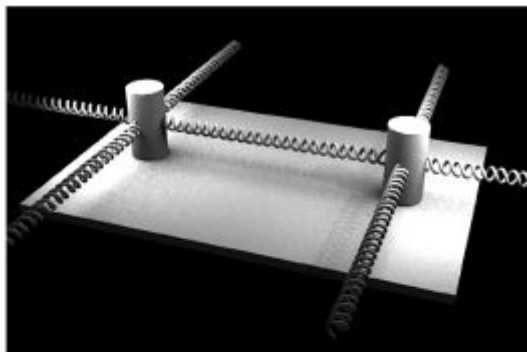


図 1 . 巨大 DNA 分子配線技術の概念及び位置付け

2. 研究の目的

本研究は、複数の電極間を mm サイズの DNA 分子を線材として液中配線する技術を実現することを目的とする。具体的には、操作実績のある約 1 mm 長の分裂酵母 DNA 分

子进行操作し、3 次元的なマイクロピラー電極アレイに接合することにより、水溶液中でピラー電極間に懸架された分子ワイヤを得る。この巨大 DNA 分子配線技術により、これまで散在していた個々の DNA 素子同士が DNA 配線を足場として塩基の相補性によって配置され、さらに DNA 配線を通してミクロンサイズの電極と接続される。

ワイヤボンディングによって集積回路や MEMS がパッケージの電極パッドと接続することで駆動可能になるのと同様に、DNA 配線により、集積回路・MEMS と DNA ナノデバイスが接続することで、真に利用可能なナノエレクトロニクスが実現される可能性がある。具体的には、DNA ロボットの電気的外部制御や、DNA 回路による機能の集積化を通して、新原理に基づく物理量センサ、生体分子分析システム、分子ロボットの機能評価システムが実現できる可能性が生まれる。

3. 研究の方法

(1) 概要: 研究目的の「巨大 DNA 分子を用いたマイクロピラー電極間配線」の原理を実証するため、まず、配線を行う電極基板として、表面が金で被覆されたマイクロピラー電極基板を作製する。その後、染色体 DNA 分子を光ピンセットで操作するため、微小構造体を作製する。そして、それらの基材を用いて、分裂酵母染色体 DNA を操作対象として、顕微鏡下で観察しながら、伸張およびピラー電極表面への接合を行う(図 2)。各段階における具体的な方法を以下に示す。

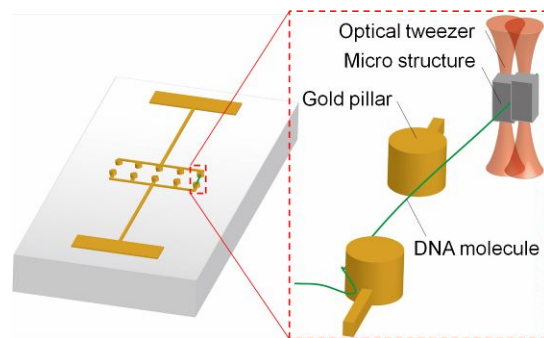


図 2 . 金マイクロピラー電極間を繋ぐ DNA 配線操作

(2) ピラー電極基板の作製: ガラス基板上に紫外線リソグラフィによりマイクロピラーをパターニングし、その表面上に金を成膜し、パターニングを行うことで金マイクロピラー電極を作製する。ピラーの作製には、高アスペクト比が得られる感光性樹脂 SU-8 を用いた。ピラーを電極として機能させるため、また、ピラーと基板との電極パッドを繋ぐ金配線をパターニングするため、スパッタリングによりピラー表面とガラス基板を金で被覆する。その際、垂直壁面部分が完全に被覆されず、導通がとれない可能性があるため、スパッタ条件の検討を行い、ピラー側面部に

も金が成膜された条件を得る。その後、厚膜ポジレジストを用いたリソグラフィと金エッチングによりパターンニングを行う。

金を電極に使用する理由は、化学的に安定なだけでなく、金-チオール結合を利用した化学修飾を行うベースとして確立したプロトコルを利用できる点にある。電極と接触しただけでは DNA 分子を接合できないと考えられる。したがって、正電荷を持つアミノ基をピラー電極に化学修飾することで、負電荷を持つ DNA を静電的に固定することを計画した。具体的には、金-チオール結合により形成した自己組織化膜に、カップリング反応によりアミノ基を大量にもつポリリジン分子を固定する。DNA は基本的に同一焦点面内で操作するため、ピラー電極の側面に DNA 分子をアプローチし、接触・吸着させる操作が必要となる。したがって、ピラー側面への金の被覆が重要な課題である。この点について検討を行った。

(3) 光駆動微小構造体の作製: これまでの DNA 操作の実績に基づき、DNA を安定に捕捉し操作できる微小構造体のデザインを決定し、電子線リソグラフィと紫外線リソグラフィを組み合わせた作製法により 100 万個程度一括形成し、水溶液中に回収した (論文投稿中)。

DNA を伸張しながら操作するため、DNA 分子を二つの光駆動微小構造体の間に挟み込み移動する方法を採用した。まず単純な形状として、直方体を選択し、複数種類のサイズを作製し、操作性の評価を行った。

(4) 光学系の構築と DNA 分子操作: 配線操作に必要な 2 軸光ピンセット光学系を構築した。既に 1 本の赤外レーザーを蛍光顕微鏡に導入し、1 軸の光ピンセットを構築している。そこで、赤外レーザーを追加し、2 軸の光トラップを構築した。一方のレーザーはガルバノミラーにより走査する。2 つの光トラップ位置を作業者が顕微鏡観察画面を見ながら、リアルタイムで操作できる環境を構築した。

2 軸の光ピンセット光学系のレーザー強度・スポットサイズの基本的な特性の取得後、配線操作に用いる適正な操作速度値を得るため、トラップした微小構造体を液中移動し、粘性抵抗力による微小構造体トラップ姿勢の変化とトラップからの脱離現象の観察を行う。その結果から最大トラップ力、安定したトラップ姿勢が得られる限界速度を決定し、その発生力・速度以下の領域で配線操作を行うこととした。また、複数種類のサイズの微小構造体を操作し、比較を行った。

提案手法の原理実証のため、ガラス基板上で分裂酵母 DNA の分子操作を行った。ゲルブロックに包埋された染色体 DNA 分子を熱を与え回収し、蛍光色素で可視化し、蛍光顕微鏡観察下で 2 つの微小構造体を利用して

DNA 分子を挟み込み、伸張操作を行った。

4. 研究成果

(1) 概要: 本研究は、ナノデバイスと MEMS や集積回路といったマイクロデバイスの間を DNA 分子を配線素材として繋ぐ技術の開発に取り組みものである。本助成期間では提案原理である、マイクロ電極間の DNA 分子の配線を実証することを目指し取り組んだ。その成果について以下に示す。

(2) ピラー電極基板の作製: ガラス基板表面に金マイクロピラー電極および金配線をパターンニングした結果を図 3 に示す。金ピラー電極については高さ $10\ \mu\text{m}$ 、幅 $10\ \mu\text{m} - 500\ \mu\text{m}$ の大きさ、形状は正方形、ひし形、円形を作製し、それぞれ良好に形状が作製されていることを確認した。電極ギャップは $90\ \mu\text{m}$ で設計し、作製結果は $94.9 \pm 2.2\ \mu\text{m}$ であった。

数種類のレジストを用いてピラー作製後、金のパターンニングを行った。その結果、粘度の低い S1805, S1818 レジストではピラー側面にレジストが堆積せず、金がエッチングされたが、厚膜用の TCIR-ZR8800PB レジストを用いることで、金側面を保護することができ、金マイクロピラー電極基板が設計通り作製された。

マイクロピラー側面が金で被覆されていることを確認するため、EDS により元素分析を行った (図 4)。その結果、ピラー側面で金が検出され、また SEM による画像から均一に被覆されていると判断した。

現時点では、金ピラー電極表面の化学修飾には至っていないが、金表面に微細加工を施した基板に対して、マイクロ流路によって安定に化学修飾を行う実験系を確立し、表面プラズモン共鳴測定により、金表面へのタンパク質分子の固定化を確認した。今後、これらの技術を持ちいて、3 次元的な形状をもつマイクロピラー電極上に化学修飾を行う計画である。

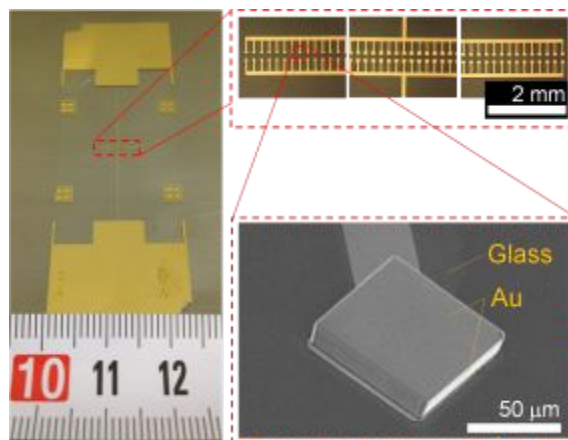


図 3 . 金マイクロピラー電極基板

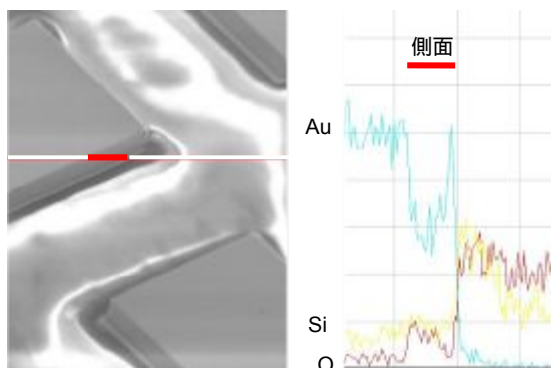


図4 . EDSによるピラー側面元素分析

(3) 光駆動微小構造体の作製: 微小構造体の作製効率を向上すること、およびさらに微細な構造の作製を実現するため、これまで行っていた基板からの破壊的な回収方法ではなく Polyvinyl alcohol (PVA)を用いたリフトオフ法による回収方法を確立し、6 倍程度に収率を向上した。また、40 nm 程度のパターン精度で微小構造体を製作することに成功した(図5)。

研究開始当初微小構造体の作製効率は10%程度に留まっていたが、本リフトオフ法を用いることで60%まで向上することができた。これにより単位体積当たりでより多くの微小構造体が得られるため大量一括作製に繋がると期待される。

1.25 $\mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$, 2.5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$, 5 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ (幅 \times 高さ \times 厚み)の3種類の構造体を作製した。その中で、基板との接地面積が小さいことから、1.25 $\mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ の構造体については、作製時に剥離が生じ、回収が困難であった。したがって、以降のDNAの操作には2.5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$, 5 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ の二種類の構造を使用することとした。

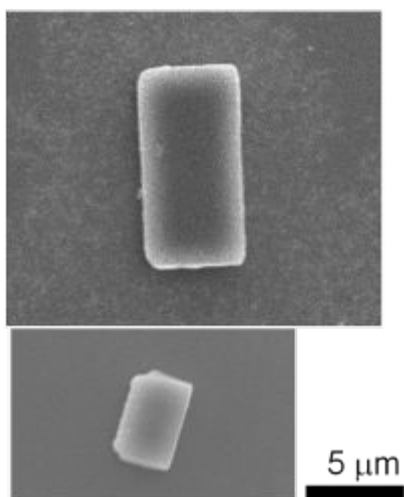


図5 . DNA操作用微小構造体
(上: 5 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ 直方体
下: 2.5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ 直方体)

(4) 光学系の構築と DNA 分子操作: 開発当初想定していなかった実験設備の移設のため、新たに光学系を構築し直す必要が生じ、光学部品の選定と購入から進め、助成期間中に2軸レーザー光学系への拡張を行った。

大きさの異なる微小構造体に対して、複数のレーザー出力条件でトラップを行い、構造体のサイズとトラップ力の関係に関して調査を行った。その結果、小さいものではトラップ力が低下するものの、作製したパターンではDNA操作に必要な10 pN以上の力が発生できることを確認した(図6)。

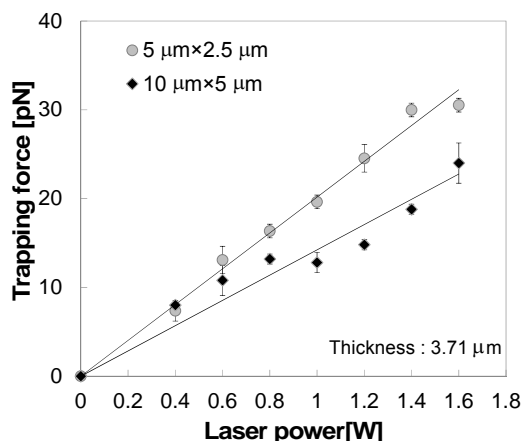


図6 . レーザー出射強度とトラップ力の関係

本研究では、ボトムアップ加工法の中で有望な材料であるDNAに着目し、自己組織化によって作製されるDNAナノ構造体をマイクロデバイス内に配置することを目的として、100 μm を越える長さの巨大DNA分子の液中配線技術を実現する。

巨大DNA分子配線の原理実証実験として、金電極マイクロピラー間にDNA分子を橋渡しすることを試みる。DNAは熱運動の為、直接光ピンセットで捕捉できない。そこで、微小構造体を作製し、光ピンセットで捕捉し操作を行う。分子鎖と垂直方向にDNAを操作することは微小構造体をDNA分子に押し当てるだけでよく、微小構造体1個を使った比較的簡単な操作である。一方で、電極間を橋渡しするためにはDNA分子を伸張する必要があり、それには分子鎖に沿った方向に操作せねばならない。そこで、(3)で作製した微小構造体を2個を2軸光ピンセットを用いてトラップし、2つの構造体の間にDNA分子を挟み込み、DNA分子を伸張させながら操作を行う方法を採用した。それにより、金電極マイクロピラー表面に接触・固定できれば、撓みなく配線することが可能になると考えられる。

構造体を用いて、DNA分子の伸長操作実験を行った。DNAは分裂酵母染色体DNAがゲルに包埋されたものを用いた。実験の結果、DNA分子を2.5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ の光駆動微小構造体で挟み込んだ状態で顕微鏡のステージを移動し、DNA分子の伸長操作を行え

ることを確認した(図7)。これらの結果より、巨大 DNA 分子配線技術の技術実証が行える可能性を示した。

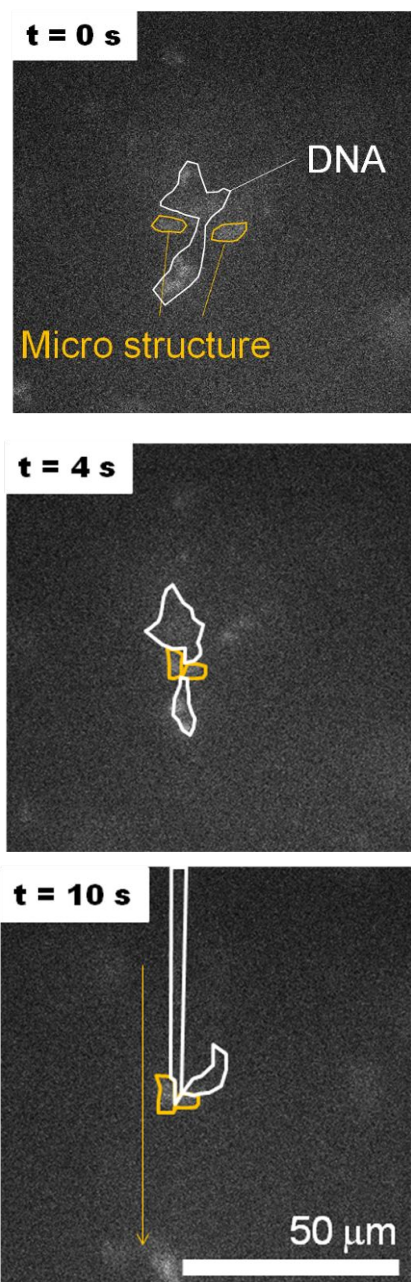


図7 . 光駆動構造体によるDNA分子の挟み込みと伸張移動操作

<引用文献>

K. Terao, M. Washizu, H. Oana: "On-Site Manipulation of Single Chromosomal DNA Molecules by using Optically Driven Microstructures", Lab on a Chip, 8(8), 1280-4 (2008).
 K. Terao, H. Kabata, M. Washizu: "Extending chromosomal DNA in microstructures using electro-osmotic flow", Journal of Physics: Condensed Matter, 18(18), S653-63 (2006).

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 2件)

K. Terao, S. Hiramatsu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, F. Oohira: "Fast protein detection from raw blood by size-exclusion SPR sensing", Analytical Methods, 査読有, in press.

K. Terao, M. Gel, A. Okonogi, A. Fuke, T. Okitsu, T. Tada, T. Suzuki, S. Nagamatsu, M. Washizu, H. Kotera: "Subcellular Glucose Exposure Biases the Spatial Distribution of Insulin Granules in Single Pancreatic Beta Cells", Scientific Reports, 査読有, 4, 4123 1-6 (2014).

(学会発表)(計 7件)

Y. Takemura, T. Suzuki, F. Shimokawa, H. Takao, K. Terao: "Single Cell Dissection Using Nano-Blade Array for the Analysis of Intracellular Spatial Heterogeneity", Proceedings of the 1st African International Biotechnology and Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single Cell Analysis, 99, 2014/9/10-12, Nairobi, Kenya.

K. Terao: "Induction and Measurement of Intracellular Heterogeneity Using Micro/Nano Structures", Proceedings of the 1st African International Biotechnology and Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single Cell Analysis, 40, 2014/9/10-12, Nairobi, Kenya.

寺尾京平, 平松 真一, 清水 一範, 宮西伸光, 鈴木 孝明, 高尾 英邦, 下川 房男, 大平 文和: "マイクロスリット構造を有したSPRセンサチップによる生体試料分離・検出", 日本機械学会第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, 21am2-E7, 2014/10/20-22, くにびきメッセ, 松江.

竹村祐人, 鈴木孝明, 高尾英邦, 下川房男, 寺尾京平: "細胞内物質局在解析を目指した微細ナノ構造による単一細胞空間分画", 化学とマイクロナノシステム学会第30回研究会 (Cheminas30), 58, 2014/10/2,3, 北海道大学, 札幌.

織田拓也, 鈴木孝明, 高尾英邦, 下川房男, 寺尾京平: "単一細胞内物質の多段階抽出マイクロデバイスの設計", 化学とマイクロナノシステム学会第30回研究会 (Cheminas30), 59, 2014/10/2,3, 北海道大学, 札幌.

今井啓輔, 鈴木孝明, 高尾英邦, 下川房

男、松岡達、小寺秀俊、寺尾京平: “ マイクロ流体デバイスを用いた隣細胞クラスター内における細胞間相互作用の計測 ”, 第36回日本分子生物学会年会, 0480, 2013/12/3-6, 神戸ポートアイランド, 神戸.

今井啓輔、鈴木孝明、高尾英邦、下川房男、松岡達、小寺秀俊、寺尾京平: “ 細胞クラスター内における細胞間相互作用の解明に向けた単一細胞薬剤刺激デバイス ”, 電気学会 センサ・マイクロマシン部門総合研究会 バイオ・マイクロシステム研究会, pp.15-19 (BMS-13-038)2013/10/8, 東京大学生産技術研究所, 東京.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bntech.org/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺尾 京平 (TERAO, Kyohei)

香川大学・工学部・准教授

研究者番号: 80467448