

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310081

研究課題名（和文）プログラマブル・セルフ・アセンブルを用いたMEMSとナノ構造の融合プロセス

研究課題名（英文）Fusion Process of MEMS and Nanostructure using Programmable Self Assemble

研究代表者

田畑 修 (TABATA OSAMU)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20288624

研究成果の概要（和文）：DNA オリガミ技術で作製した DNA ナノ構造体を MEMS 上にセルフ・アセンブルし、非周期構造を有する複雑な高次ナノ構造とMEMS を一体化したナノ・マイクロ融合システムを構築する基盤技術を構築した。

研究成果の概要（英文）：Fundamental technology was developed to construct a system which has high order non-periodic nanoscale structure fused with MEMS. The nanoscale structure was fabricated by self-assembly of a DNA nanostructure constructed by DNA origami technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロファブ리케이션、ナノ構造作製、自己組織化、DNA、MEMS、NEMS、セルフ・アセンブル、原子間力顕微鏡、1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

MEMSは微小空間において、さまざまな物理化学量を相互作用させることで新規な機能を発現させるデバイスとして応用が拡大してきた。LSIの高機能化の方向としても、高周波MEMS、光MEMS、バイオMEMSとの融合による更なる機能向上を目指す動きが活発化している。一方、ナノスケールで発現する量子効果や表面効果を積極的に利用するために、原子、分子、微粒子の相互作用を用いた自己組織化（ボトムアップ手法）を用いてナノスケールで形状や配列を制御した機能材

料を創製する試みは、多様な材料のナノコンポーネントのテーラーメイド創製法として期待されている。これらを規則的に配列したナノポーラス材料やメタマテリアル、さらにはDNAオリガミなどのナノ構造を有するナノコンポーネントの研究も加速している。必然の流れとして、これらのナノスケールで形状や配列を制御したナノ機能コンポーネントをトップダウン手法で作製したMEMS、LSIに組み込む（アセンブルする）ことで、飛躍的に高機能化したナノ・マイクロ融合システムが実現できると期待され、この技術により、

今後 nanoelectronics, nanophotonics, plasmonics, nanocatalysis などの研究開発が飛躍的に進展すると期待される。

2. 研究の目的

MEMS デバイス上に、ナノ粒子・カーボンナノチューブ・タンパク質等を配置した 100nm 角のビルディング・ブロックを設計図に基づいて時空間的にセルフ・アセンブルして、ナノ～ミリスケールをシームレスに融合したナノ・マイクロ融合システムを実現するための、プログラマブル・オリエンテッド・セルフ・アセンブル・オン MEMS (P-OSAM: Programmable Oriented Self-Assemble on MEMS) の基盤技術構築を目指している。

図 1 に最終的に確立を目指す P-OSAM 技術の概念図を示す。ビルディング・ブロックには DNA オリガミ技術で作製した DNA ナノ構造体を用い、DNA ナノ構造体の塩基配列をアドレス情報として用いて DNA ナノ構造体上にナノ材料を配置して数種類のビルディング・ブロックを作製する。DNA ナノ構造体の 4 辺には異なる塩基配列の一本鎖 DNA (ssDNA) を配置し、設計図に従って生成した DNA ナノ構造体相互のセルフ・アセンブル・シーケンス情報に基づいて、1 ステップ毎にビルディング・ブロックの特定の辺同士をリンカ DNA によって結合させることで、非周期構造を有する複雑なナノ構造を MEMS 上にセルフ・アセンブルし、ナノ・マイクロ融合システムを構築する。

本研究では、最終目標達成のためのステップとして、P-OSAM 技術を構成する要素技術の原理検証、基本プロセスパラメータの解析、およびビルディング・ブロックの高機能化に関する研究を行うことを目的とする。

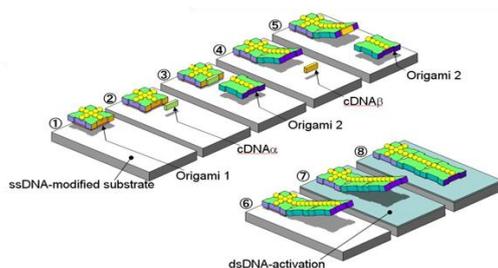


図 1 Programmable Oriented Self-Assemble on MEMS (P-OSAM) 技術の概念

3. 研究の方法

DNA ナノ構造体は DNA オリガミ法を用い、ターゲットとなるアセンブル構造に合わせて設計構築した。長鎖の環状一本鎖 DNA M13mp18(7,249 nt) に対して設計した短い相補鎖 DNA (ステーブル DNA) を加えて、90°C に加熱した後、冷却(アニーリング)すること

で構造体を得た。実験に用いた種々の DNA ナノ構造体については後述する。作製した構造体は高速原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察した。作成した DNA ナノ構造体のさらなるプログラム・アセンブルは、60°C 程度の低温からのアニーリングによって行った。DNA ナノ構造体の機能化は、ssDNA で修飾した金ナノ粒子を DNA ナノ構造体に固定可する方法、DNA 鎖に化学修飾を導入し同様にアセンブルする方法を用いた。シリコン基板のナノパターンニングには紫外線リソグラフィ法および走査型プローブリソグラフィ法を用いた。

4. 研究成果

(1) ssDNA で修飾されたナノパターンのシリコン基板への形成

P-OSAM 技術は、設計図に従って MEMS 基板上に DNA ナノ構造体を時系列的にオリエンテッド・セルフ・アセンブルする。MEMS に形成された電極や光導波路とインターフェースを形成し、これらと DNA ナノ構造体上のナノ材料間でエネルギー交換を達成できなければならない。そのためには、MEMS 上に最初に固定する DNA ナノ構造体の位置と向きを数十 nm 精度で制御する必要がある。しかし、従来発表されている親水性・疎水性パターンを用いた DNA ナノ構造体の基板へのアセンブル制御では、位置制御は可能であるが、向きの制御や DNA ナノ構造体の表裏の制御ができない、という制約があり、P-OSAM 手法には適していない。そこで我々は、シリコン基板上に ssDNA で修飾した数十 nm オーダのパターンを形成し、その表面に相補的 ssDNA を有する DNA ナノ構造体をハイブリダイゼーションでアセンブルする技術を構築した。

まず ssDNA による表面修飾手法を説明する。酸化処理したシリコン基板表面を APTES, NHS-PEG-maleimide で処理し、最後に末端をチオール修飾した ssDNA を固定することで、サブ nm の基板表面平滑性を保持したまま基板表面を ssDNA で修飾した。

パターンニングには Trimethylsilyl (TMS) の SAM 層をマスクとする選択修飾法を用いた。シリコン基板表面に分子レベルで緻密な TMS を形成すると、上記の処理をしても ssDNA は固定されない。TMS 層を UV リソグラフィとエッチングで選択的に除去することで、ssDNA で修飾されたパターンを形成可能である。しかし、緻密な TMS 膜上にはレジストが塗布できないため、この手法を EB リソグラフィに適用することはできない。そこで、原子間力顕微鏡による走査型プローブリソグラフィ (SPL) 技術を用いた。図 2 に SPL を用いた ssDNA のナノパターン形成プロセスフローを示す。図 3 に幅 20nm、ピッチ 400nm のライン

& スペースパターンを形成し、20nm×400nmの短冊状 DNA ナノ構造体をライン間を選択固定した結果を示す。

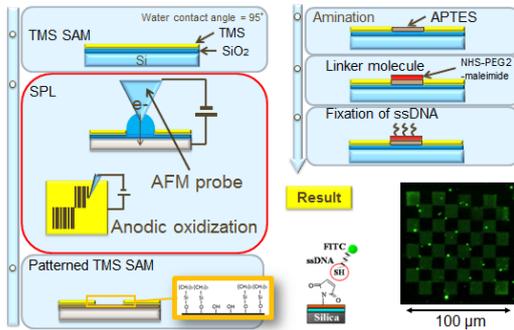


図 2 SPL を用いた ssDNA のナノパターン形成プロセスフロー

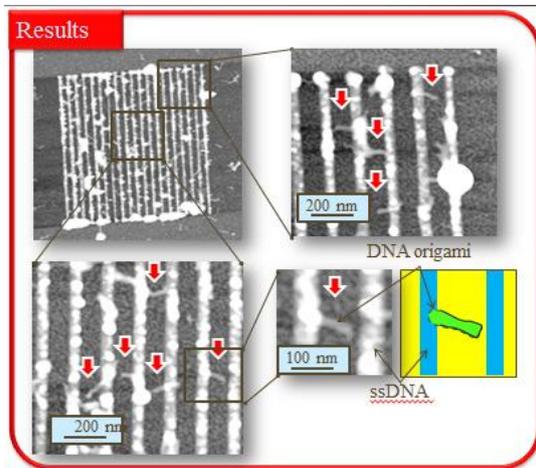


図 3 SPL で描画したナノパターンを ssDNA で修飾し、相補的な ssDNA を付与した短冊状 DNA ナノ構造体をライン間を選択固定した結果。

(2) DNA 塩基配列のプログラムによる DNA ナノ構造体の精密な配列と機能化

DNA ナノ構造を DNA 塩基配列のプログラムで 1 次元方向に配列する系の構築を検討した。DNA ナノ構造体に DNA 塩基配列、形によるフィット、 π 相互作用を組み合わせ、1 次元に配列できるように設計した (図 4A)。

5 種類の異なる DNA 構造体ユニットを設計し、文字を導入しユニットを自己集合させた。その結果、塩基配列のプログラムどおりに異なるユニットが 1 次元方向に配列された単語として表示できた。この方法により、機能化した分子のプログラムに従った 1 次元方向への自由な配列が可能である。

また、DNA ナノ構造体の熱に対する安定性を改善するために、光架橋分子による分子内

架橋を行った。DNA に光架橋するソラレンを用いて DNA ナノ構造体の熱に対する安定性の向上を検討した (図 4B)。DNA オリガミは自己集合によって形成されるため 60°C 以上ではその構造を保つことができないが、光架橋することで 85°C まで構造を保てることが明らかとなった。また、この構造体を 1 次元に集合させることができ、高温でも集合体を作成することが可能となった。この方法で、温度に対する安定性は大幅に改善され、この光架橋した複数の DNA 構造体をプログラム通り配列化できることに成功した。

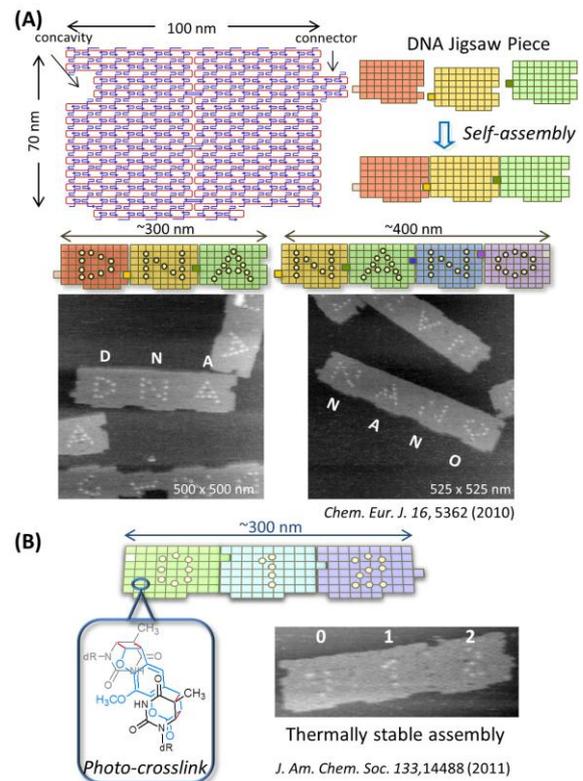


図 4 2 次元 DNA 構造体の設計とプログラムに従った自己集合による 1 次元方向への配列の形成。(A) DNA 構造体 Jigsaw Piece 構造と異なるユニットからの自己集合。文字を導入した DNA 構造体の配列:DNA, NANO。(B) 光架橋分子による集合体の安定化。

(3) 溶液中での DNA ナノ構造体のセルフ・アセンブルプロセスにおける反応速度定数および逆反応速度定数の温度依存性

図 4A に示すセルフ・アセンブルプロセスにおいて、DNA ナノ構造体間に作用する結合力は、構造間を跨って 2 重差鎖を形成する ssDNA (リンカ DNA) のハイブリダイゼーションによる結合と π 相互作用による結合 (π スタッキング力) が主である。この 2 つの結合力に支配される反応速度の温度依存性を明らかにすることで、セルフ・アセンブル

ロセスを最適化し、収率を高めることが可能となる。そこで、同一形状の3種類 (E, F, G) のDNA ナノ構造体を用いて、これら2つの結合力に関する反応速度定数の温度依存性を明らかにした。これらはE, F, Gの順にアセンブルされるようにリンカDNAが設計されている。ハイブリダイゼーションが結合を支配するEとF、および π スタッキング力が結合を支配するEとGをそれぞれ混合したチューブを複数本用意し、10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°Cで一定温度に保ち、15分, 30分, 60分, 150分, 300分経過後にチューブを取り出し、0°Cまで急速冷却し、アセンブルを停止させた。その後、冷却したマイカを用いてAFM観察用サンプルを作製し、得られたAFM画像からモノマー数、ダイマー数、トリマー数、その他を計数した。ハイブリダイゼーションと π スタッキングによる結合をそれぞれ二つの反応定数、例えばモノマーからダイマーを形成する反応の正反応定数 K_{md} 、ダイマーが解放してモノマーになる反応の逆反応定数 K_{dm} で表し、状態間の遷移の反応速度は、濃度に比例し、300分で定常状態に達していると仮定すると、計測した各状態の時間推移から、各温度における反応速度定数を求めることができる。

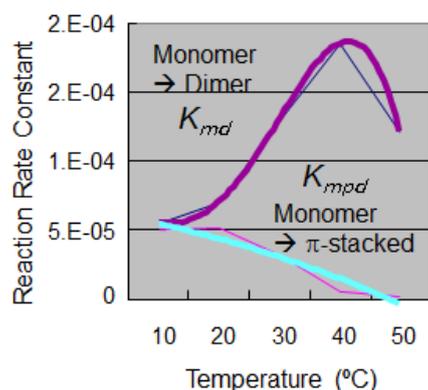


図5 ハイブリダイゼーション結合の反応速度定数 (K_{md}) および π -スタッキング結合の反応速度定数 (K_{mpd}) の温度依存性

図5にハイブリダイゼーション結合の正反応速度定数 (K_{md}) および π -スタッキング結合の正反応速度定数 (K_{mpd}) の温度依存性測定結果を示す。 K_{md} は温度と共に増加し、40°Cで最大値を示した後、減少した。40°C以上で減少する理由は、DNA ナノ構造体の構造不安定性に起因するものと考えている。一方 K_{mpd} は温度と共に減少した。この結果を基に、3種類 (E, F, G) のDNA ナノ構造体をセルフ・アセンブルする際のアニールプロセスの影響をシミュレーションにより検討したところ、従来の50°Cから一定速度で冷却するより、35°Cで一定温度に保ってから急速に冷却することによってアセンブル収率を改善できるこ

とが示され、これまで試行錯誤で行ってきたアニールプロセスをシミュレーションにより最適化することが可能となった。

(4) プログラムされた2次元DNAオリガミ集合体の構築

DNA オリガミ構造体を使ってプログラム可能な2次元集合系の設計と構築を検討した。DNA オリガミは塩基配列の相補性、形状の相補性、 π 相互作用を組み合わせ、1次元方向 (2重らせん軸方向) と2次元方向 (2重らせん軸に直交方向) に配列できるように設計した (図6A)。9種類の異なる2次元構造体ユニットを設計し、自己集合させた。その結果、塩基配列のプログラムどおりに異なるユニットが1次元方向と2次元方向に配列され、目的とする3x3集合体を構築することに成功した。また、4方向に2重らせん軸を向けたDNA構造体を用いることで、自己集合によって十字型と中空な四角形 (口の字型) 構造を構築することに成功した (図6B)。

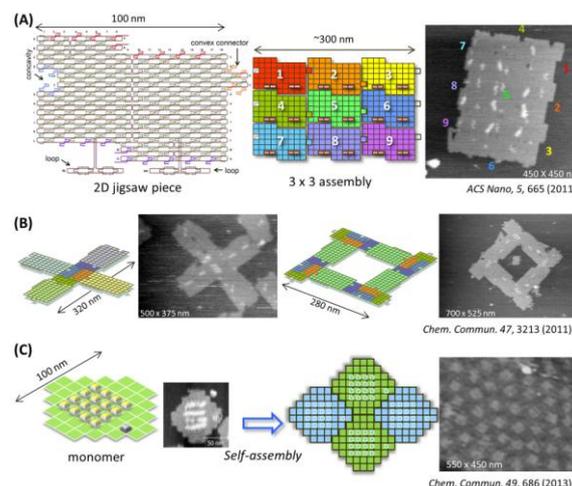


図6 DNA 構造体の設計とプログラムに従った自己集合による2次元方向への配列化。(A) DNA 構造体 2D Jigsaw Piece 構造と9種類のユニットからの3x3集合体とそのAFM像。(B) 4方向に結合可能なDNAユニットを用いた十字型構造と中空な四角形構造。(C) 4方向に結合可能なDNAユニットによる大規模な集合体形成。

一方で、大規模な集合体形成を行うには、新たな設計が必要である。構造上のストレスをかけることで平面にした4方向に結合可能なDNAユニットを用いて、自己集合を行った。この結果、数十 μ mに及ぶ自己集合体を得ることに成功した (図6C)。

これらの方法は、機能化した分子の塩基配列プログラムに従った2次元上での自由な配

置と、機能配置したナノ構造体の MEMS 基板上への集積化を可能にする基盤技術である。

(5) DNA ナノ構造体とナノ材料の複合構造体の形成

6 本の二重鎖を束ねたバンドル構造を有する 400nm 長の DNA ナノ構造体を作成し、軸上に 14nm ピッチで 28 個の金ナノ粒子 (5nm ~ 15nm) を固定化することに成功した (図 7)。この構造をビルディング・ブロックとして 1 次元にセルフ・アSEMBルすることで、マイクロメートルオーダーのプラズモン光導波路を実現できる目処があった。

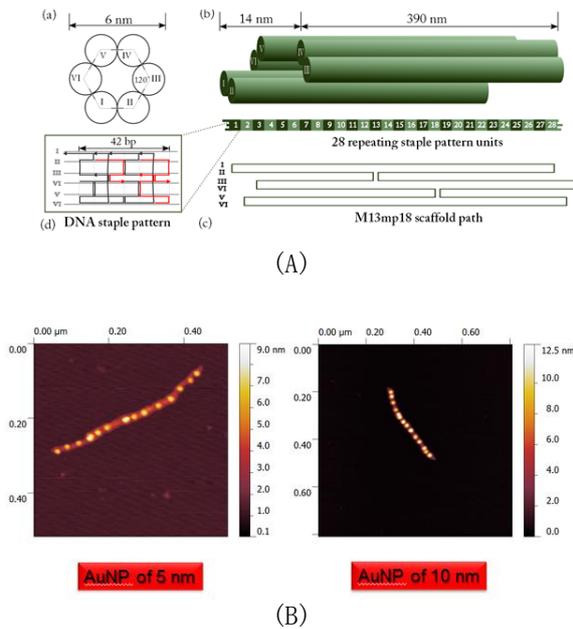


図 7 6 本の二重鎖を束ねたバンドル構造を有する 400nm 長の DNA ナノ構造体 (A) と金微粒子を軸上にアSEMBルして複合化したビルディング・ブロック

DNA ナノ構造体を使ってプログラム可能なタンパク及び金微粒子の選択的な結合と配列化を検討した(図 8)。そのため、5 個の空間を持つ DNA ナノ構造体を設計し、その空間内に異なる配列の 2 本鎖 DNA を導入し、配列特異的なピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの配列特異性の 1 分子解析を行った(図 8A)。DNA ナノ構造体上に導入した 2 本鎖 DNA へのアルキル化反応によって、その配列特異性を観察した。合成した PI ポリアミドにはビオチンを結合してあり、反応後ストレプトアビジンでラベルが可能である。この結果、特異的な塩基配列に対してアルキル化がおり、ストレプトアビジンでラベル化できた。また、DNA オリガミ上での金粒子の配列化を検討した。DNA オリガミ構造体にスリット状に長方形の空間を複数導入し、チオールを

結合した DNA オリガマーを介して、5 nm の金ナノ粒子を固定化した。この方法では 2 次元の DNA ナノ構造体に対して、縦、横、対角方向に自在に金粒子を配列することが可能となった。これらの金粒子の 2 次元ナノ構造体上での配列化とプログラムした DNA 構造体の配列化を組み合わせることで、金粒子の比較的大きな 2 次元平面上での自由な配置が可能である。

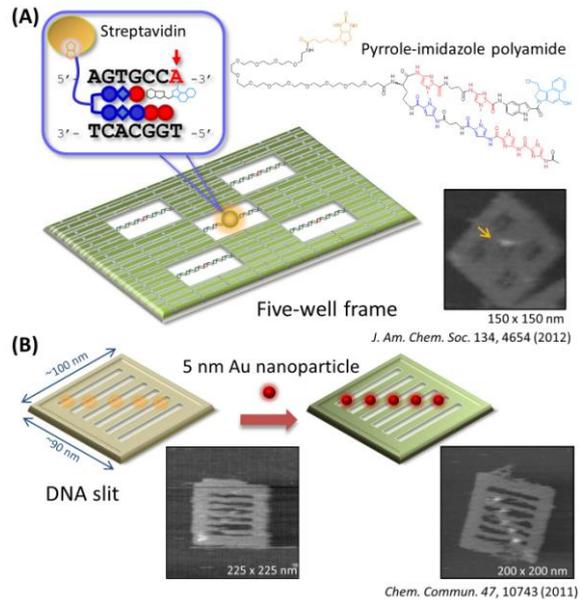


図 8 小分子、タンパク、金粒子の DNA ナノ構造上への特異的な配置。(A) ポリアミドによる DNA 構造体上での配列特異的なアルキル化反応とストレプトアビジンによるラベル化。特異的配列は中央の空間に導入してあり、選択的に反応した。(B) DNA 構造体上での金粒子の配列化。指定した位置に金粒子を配列できる。

(6) 光操作可能な DNA オリガミ集合体の構築

オリガミ構造体の集合と解離を外部操作によって制御することは、基板上での集合体の外部操作が可能となり有用である。2 本鎖 DNA の形成と解離を光照射によって操作できるアゾベンゼンを導入した光応答性 DNA を六角形の形状の DNA ナノ構造体に導入し、これによって制御された自己集合を検討した。

光の波長に応答して 2 本鎖の形成と解離を制御でき、紫外光(UV)の照射を行うと形成されていた 2 次元集合体は解離し、続けて可視光照射を行うと、再び集合体を形成した。また、UV-可視-UV と連続的に光照射しても集合体の解離と形成を可逆的に行えた。集合体は、光応答性 DNA 鎖の導入する位置によって、直

線状、カーブ状、環状に集合させることができ、光照射の波長に応じた新たなプログラム可能な自己集合の方法を確立した。

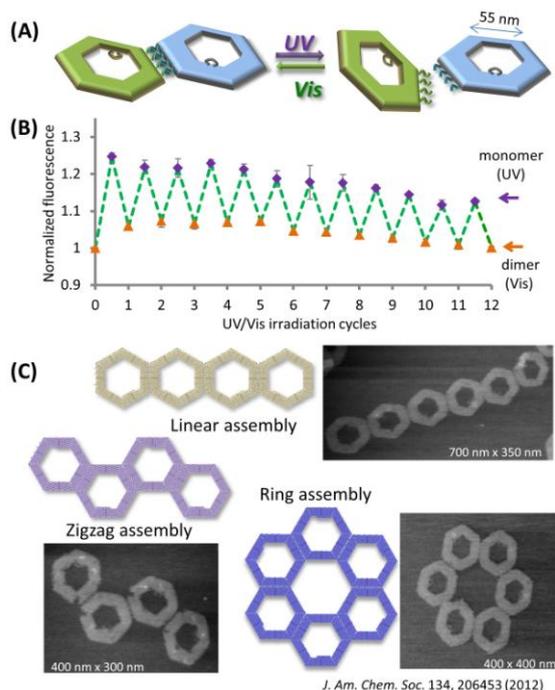


図9 DNA オリガミ構造体の光照射による集合と解離の操作. (A) 1辺55 nmの六角形構造体に光応答性のDNA鎖を導入し、UV光照射で解離し、可視光照射でアセンブルする. (B)連続的なUV/可視光照射によるオリガミ構造体の集合と解離. (C)オリガミ構造体による様々な集合体構造.

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29件)

- (1) Y. Yang, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, Photo-controllable DNA Origami Nanostructures Assembling into Predesigned Multiorientational Patterns, *Guanine quartets: Structure and application*, 査読有, pp.73-85, 2013, DOI:10.1039/9781849736954-00073
- (2) A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, DNA Origami, Synthesis and Self-Assembly, *Current Protocols in Nucleic Acids Chem.*, 査読有, Vol. 48, 12.9.1-12.9.18, DOI:10.1002/0471142700.nc1209s48
- (3) O. Tabata, A Closer Look at DNA Nanotechnology - A bridge between nanomaterials and a nanosystem-, *IEEE Nanotechnology Magazine*, 査読有, Vol.4, pp.13-17, 2010. DOI: 10.1109/MNANO.2010.938652

[学会発表] (計27件)

- (1) T. Akishiba, N. Tamura, T. Ichii, Y. Hirai, K. Sugano, T. Tsuchiya, H. Sugimura, O. Tabata, DNA origami assembly on patterned silicon by AFM based lithography, The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Taipei, Taiwan, 20-24 Jan 2013.
- (2) S. Z. Kiss, D. S. Hautzinger, O. Tabata, and J. G. Korvink, AuNPs conjugate DNA origami nanotubes for nanophotonic application, The 7th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, Kyoto, Japan, 6-8 Mar. 2012.
- (3) C. Huang, T. Saeki, M. Endo, H. Sugiyama, C.-H. Weng, G.-B. Lee, K. Sugano, T. Tsuchiya, and O. Tabata, Configurable Assembly of DNA origami on MEMS by Microfluidic Device, The 6th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, Kaohsiung, Taiwan, 19-22 Feb 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nms.me.kyoto-u.ac.jp/>

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/ppl/grp/sugiyama.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 修 (TABATA OSAMU)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 20288624

(2) 研究分担者

遠藤 政幸 (ENDO MASAYUKI)

京都大学・学内共同利用施設等・助教授

研究者番号: 70335389

(3) 連携研究者 なし