

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18760215

研究課題名（和文）

気相に保持した微小液滴中における生体高分子の反応技術の開発

研究課題名（英文）

Chemical reaction in a small water droplet suspended in air

研究代表者

高島 和則（KAZUNORI TAKASHIMA）

豊橋技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号：60303707

研究成果の概要：

電界蒸発を生じさせるために必要な極めて高い電界強度を得るための電極の作成のため、電解研磨による加工を検討し、先端の曲率半径が 100nm 程度の針状電極を作成する方法を開発した。また、このようにして作成した電極を用いて電界蒸発により気相中に生体高分子を供給するために電極表面に Au とチオール基 (-SH) の間に形成される特異的結合を利用した DNA 固定法の検討を行った。さらに、効率がより高い DNA 固定法を開発を行い、針電極先端を除く部分を絶縁物で被覆することによって、通常は特異的な結合を形成しないタングステン製の針電極と未修飾 DNA との組み合わせにおいても誘電泳導による固定化が可能であることがわかった。このことは機械的強度に優れるタングステン製の針状電極を基板として DNA を固定することが可能であり、金電極を用いた DNA 固定法で必要となるチオール基による DNA 末端の修飾等の複雑なプロセスを必要としない簡易な方法を提供するものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：静電気応用工学

科研費の分科・細目：

キーワード：帯電液滴、電解研磨、電界蒸発、電界イオン顕微鏡、DNA

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム科学の発達には様々な種のゲノム解析を可能にし、それらの結果がプロテオーム解析、遺伝情報に基づいた医療や創薬などの分野へ応用されるようになってきており、生体高分子の合成や解析の高速化が今

後ますます重要性を増している。化学反応の速度は反応速度定数だけでなく、基質濃度およびそれらの混合状態によって支配されている。前者は物性値であるが、後者の場合は基質濃度を上げ、拡散あるいは混合を改善することで反応を高速化することが可能であ

る。micro total analytical system (μ TAS) 等の研究は拡散律速の反応の速度を向上させようとする試みであり、一定の成果を上げてきている。しかしながら、流路中を試料が流れるという構造上の制約から処理速度が制限される。また、試料を流すための微細加工された流路は反応ごとに設計する必要があり、汎用的な装置を構成することは困難である。また、液体の試料を駆動するためのポンプ等の補機も必要であるため、主要部分はコンパクトであるが装置全体としては大きなものにならざるを得ないという問題を有している。

本研究では帯電した微細な液滴を静電気力によって非接触で気相中に保持し、それを反応場として生体高分子の化学反応を行わせることを発想した。本手法は、サンプルの反応器との接触を排除することができるので、反応器壁面への吸着や壁による汚染等を防ぐことが可能であり、コンタミネーションや試料の損失が深刻な問題となる極微量試料のハンドリングに適している。また、エレクトロスプレーや放電プラズマと組み合わせることによって微細な液滴に任意の電荷を与えることが可能であることから、液滴を逆極性に帯電させることによって融合や混合を極めて高速に行うことや、マスキングで特定の比電荷を持った液滴のみを選別して取り出すことにより反応が終わった液滴のみを分離することも可能である。また、反応装置内の雰囲気や温度変化、気体の溶解等の基本的な操作を行うことも可能である。

本手法は生体高分子の解析や合成を高速化できる可能性があるだけでなく、生体膜の作成や結晶成長などの荷電粒子が重要な役割を果たしていると考えられる高度に非平衡な系へ適用することで従来の方法では不可能であった反応を誘起することができる可能性も有している。

2. 研究の目的

本研究では、通常バルクの液相で行われている生化学反応を極小化した液相で行うことの可能性を検討することを目的とする。タンパク質や核酸などの生体高分子は、その周囲数層の水分子との相互作用で、構造および機能を維持している。一方、化学反応は反応すべき分子が相互作用を及ぼす距離まで接近したときに進行する。このことは見方を変えれば、化学反応を起こすべき分子の間に存在する機能維持には不必要な水分子によって、反応に関わる分子の衝突が妨げられているということもできる。

そこで、本研究ではこれらの分子の間に存在する大部分の水や溶液の分子を取り除く

ことで、極めて高速な化学反応が達成されるのではないかと考えた。そのために、液体の試料を噴霧する等して微小な液滴を作成する方法やさらに極小化された反応系として、生体高分子に数個から数十個の水分子が結合した生体高分子と水分子の複合体を用いた化学反応の誘起が可能であるかを調べることを目的とする。

これらの検討事項を実現するためにエレクトロスプレーによって帯電させた微小液滴を静電気力によって気相に保持する方法や電界イオン顕微鏡において見られる電界蒸発現象を利用した生体高分子の供給法等の実験的検討を行うことも本研究の目的とする。もしプラズマを媒体として核酸やタンパク質などの生体高分子の活性を維持したまま気相に保持することが出来れば、分子間は低密度のガスあるいは真空となり、前述のような水分子の影響を排除して、分子の衝突頻度を極めて高くすることが可能ではないかと考えた。

3. 研究の方法

電界蒸発現象を利用して DNA をヌクレオチド単位で切断しながら真空中に供給するための DNA 固定用基盤および電極を作成するために、電界研磨によって金属線の先端を加工する方法を検討した。また、このように作成した電極先端に DNA を固定する方法の検討も行った。

4. 研究成果

図 1 に電界研磨を用いた FIM 観察用針電極の作成装置の概略図を示す。電極材料には機械的強度に優れるタングステン(W)と DNA 末端に導入可能なチオール基(-SH)と特異的結合を形成することができる金(Au)線を用いた。対向電極には白金線を用い、タングステンおよび金に対しては NaOH および HCl を電解液として用いた。印加電圧は

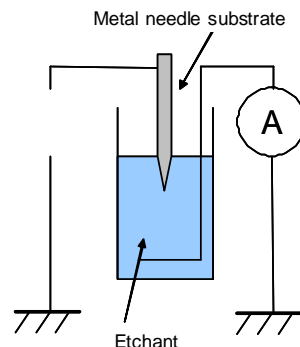


図 1: 電界研磨装置の概略図

0-10V、周波数 60Hz の交流電圧とし、固定した電圧に対して電流の時間変化を観察することによって電界研磨の最適条件を見つけることを試みた。また、電界研磨した。

電圧値を変化させた場合の電流値の時間変化の測定結果から、規格化された電流値が電界研磨の進行具合を表すパラメータとして利用できることがわかった。電界研磨開始直後の電流値に対してどの程度電流値が低下したときに研磨を停止させるかによってどのような形状の電極が得られるかを観察した結果を図 2 に示す。ここでは電圧値は 5V とした。先端形状を SEM で観察した結果、初期値の 30%以下の電流まで研磨した試料では先端の曲率半径が 100nm を下回ることがわかった。

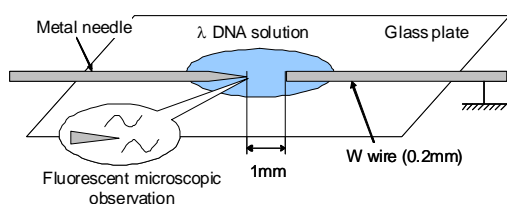


図 2: 誘電泳動装置の概略図

図 3 に誘電泳動を利用した DNA 固定法の概略図を示す。ガラス基板上にタングステン線を対向電極として 1mm の間隔で張り電極を配置した。少量の DNA 溶液を電極間にスポットし、電圧値 11V、周波数 1MHz の交流高周波電圧を印加した。電圧を印加することによって不平等電界が生じ、針電極先端の強電界部に DNA が引き寄せられることで透過的な DNA 濃度を極めて高くすることが可能である。さらに、針電極先端で生じる電気化学反応による固定も期待できる。

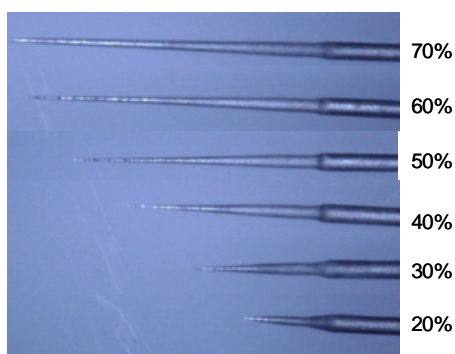
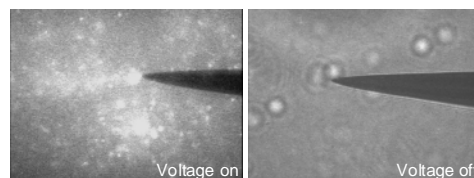


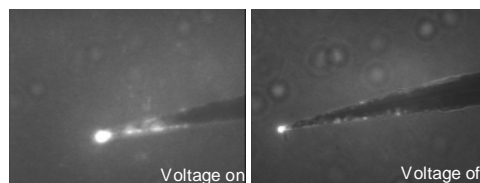
図 3: 研磨終了時の電流値と電極形状

誘電泳動による DNA の固定を可視化するために、DNA を蛍光色素で染色し、蛍光顕

微鏡下において観察を行った。上記のように作成した先端曲率半径 100nm 以下のタングステン針電極を用いて誘電泳動により DNA を電極上へ固定化することを試みた。誘電泳動中および純粋による洗浄後の針電極先端部の DNA の蛍光像の写真を図 4 に示す。電圧印加中には誘電泳動力によって電極先端に DNA が泳動されていることが確認できた。しかしながら、純粋で洗浄した後は DNA は観測されなかったため、十分な強度を持った固定化ができなかったと考えられる。



(a) 誘電泳動中 (b) 洗浄後
図 4: W 針上への DNA 固定



(a) 誘電泳動中 (b) 洗浄後
図 5: 絶縁コーティングされた W 針上への DNA 固定

先端部以外の部分に絶縁性コーティングを施したタングステン針電極を用いた場合の結果を図 5 に示す。誘電泳動中および洗浄後も DNA の蛍光像が観察され、十分な強度を持った DNA の固定が行われたと考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Kei Kakuta, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Electro-chemical preparation of fine needles for field ion microscopy to observe

biomolecules”, Proceedings of IEEE IAS2008
Industry Applications Society Annual Meeting

〔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〕

6 . 研究組織
(1)研究代表者
高島和則

(2)研究分担者

(3)連携研究者