

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K13730

研究課題名(和文)感光性複合材料を用いた微小管運動の制御と分子輸送システムへの応用

研究課題名(英文)Control of gliding microtubules using photosensitive composite and its application to molecular transportation system

研究代表者

中原 佐(Nakahara, Tasuku)

山口大学・大学院創成科学研究科・助教

研究者番号：00756968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キネシン-微小管の運動系を制御システムとして発展させることを目的とし、微小管運動の方向および速度制御が可能なオンチップ型システムを開発した。デバイス製作には、感光性材料に銅粒子を混ぜ合わせた複合材料を使用し、フォトリソグラフィを用いて微細なパターン構造を製作した。複合材料に含まれる銅粒子は、微小管運動の蛍光観察に用いる励起光によって光熱効果が生じるため、デバイス上では観察と同時に温度上昇を得ることが可能となる。本研究では複合材料の微細なパターン構造によって微小管の運動方向を物理的に制御するとともに、光熱効果によって生じた温度上昇により微小管の移動速度を制御する方法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに微小管運動の移動方向と速度の制御機構をチップ上に集積化させる方法は提案されておらず、分子輸送システムとしての有用性は明らかにされていない。本研究で提案したシステムは、微小管の移動方向と速度制御技術の一つのチップ上に集積化させたものであり、微小管運動の制御システムとしての発展に資するものであると考えられる。今後、本研究で提案したシステムを用いて分子スケールの迅速な物質輸送が実証できれば、極少量の試料から目的の物質を検出する技術として、様々な分野での応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：For developing motility assay of microtubules as a molecular transportation system, we fabricated a system, which enables to control the direction and velocity of gliding microtubules on a chip. We used a photosensitive composite made of mixing photoresist and copper particles, and made a micro patterned structure using the photolithography process. Since copper particles of composite generate the photothermal effect by using excitation light used for fluorescent observation of microtubules, this effect enables us to perform the observation of microtubules and control of temperature on the device simultaneously. In this study, we controlled the direction of gliding microtubules physically using the fabricated micro patterned structure, and controlled the moving velocity using the rise of temperature generated by photothermal effect.

研究分野：BioMEMS

キーワード：キネシン 微小管 MicroTAS MEMS BioMEMS 感光性複合材料

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2016年に「分子マシンの設計と合成」がノーベル化学賞を受賞し、ナノスケールの機械的に制御された分子が注目を集めるようになった。光や熱によって変形する分子を組み合わせることで、世界最小のナノ四駆を実現するなど、今後の発展が期待される分野である。分子マシンは生物の体の中にも存在し、それらは生体分子モーターと呼ばれるタンパク質によって、筋肉の収縮や精子の鞭毛運動、細胞分裂の動きなどを担っている。近年では、生体分子モーターによる運動系を体の外で再構築し、ナノスケールの駆動機構として応用する研究が行われている。

生体分子モーターによる運動系には、キネシンと呼ばれる生体分子モーターと、細胞の骨格となる微小管を組み合わせた運動系があり、微小管は、エネルギー(ATP:アデノシン三リン酸)の供給によって基板上に固定されたキネシン上を移動する。キネシン-微小管の運動系(微小管運動)をナノスケールの制御システムとして応用するために、これまでに多くの方法が提案されてきたが、運動系の環境が変化しない場合、微小管の移動方向は不規則であり、その速度も一定となる。そのため、迅速に目的の領域へ微小管を移動させるためには、外部からの制御が必要となる。移動方向の制御については、微小管が負に帯電していることを利用し、電界によって制御する方法等が提案されており、移動速度の制御については、キネシンの活性に影響を与えるATP濃度や温度変化を用いた方法が提案されている。これらの方法は、蛍光標識させた微小管を顕微鏡で観察することによって、移動方向や速度制御の程度を定量的に評価しているが、制御には電圧源やヒーターといった外部装置を必要とするため、制御システム全体の小型化が難しくなる問題がある。利便性や携帯性の向上を目的として、制御システムの小型化を実現するためには、微小管の移動方向と速度の制御機構をチップ上に集積化させる必要がある。しかし、デバイスの作製工程や制御機構の統合が難化するため、これまでに提案された例はなく、その有用性は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、微小管運動の方向および速度制御が行えるオンチップ型の分子輸送システムを開発することである。

3. 研究の方法

微小管運動の制御機構のオンチップ化を実現するために、本研究では複合材料を用いてマイクロデバイスを作製した。複合材料は直径3-5 μm または直径1 μm の銅粒子と感光性ポリマー(MicroChem製、SU-8 3010)を混ぜ合わせたものである。この複合材料は紫外光によって硬化し、構造物となる加工性を有している。また、蛍光観察に用いる緑色の励起光に対して優れた吸光特性があり、光熱効果によって周囲の温度を上昇させる機能性を有している。したがって、複合材料を用いたマイクロデバイスは、図1に示すように、構造によって微小管の運動方向を物理的に制御するとともに、温度変化によって微小管の移動速度を制御することが可能となる。本研究では微小管運動の移動方向と速度の制御機構を、パターン原版を通した複合材料への紫外光照射によって一括で作製し、制御系のチップ上への集積化を簡易的に解決する方法を提案した。

デバイス作製に用いる複合材料の加工性については、紫外光の照射量に対する複合材料の膜厚、パターンニング精度および加工できる最小パターン幅を評価した。複合材料の機能性については、微小な温度センサを用いて、照射する励起光の強度に対する温度変化を計測した。微小管運動の構築時には、複合材料の構造物を有するガラス基板上に簡易流路を作製し、濃度調整したキネシン、微小管、ATP溶液を流路内に順次導入した。微小管の観察には倒立型顕微鏡を使用し、緑色の励起光による蛍光観察によって微小管が移動する様子を連続写真として保存した。微小管運動の方向および速度制御については、観察した連続写真をもとに、画像処理ソフトウェアを用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 複合材料の加工性評価

複合材料は、現像工程において紫外光が照射された部分(露光部)が構造物として残り、照射されなかった部分(未露光部)は除去される。また、銅粒子を混ぜ合わせたことで、銅粒子を含まない感光性材料に比べて露光される深さ方向の膜厚が大きく減少する。この特性を明らかにするために、本研究では厚さ0.17mmのガラス基板上に複合材料を塗布後、基板の裏面からパターン原版を通して紫外光を照射し、現像工程後に残った膜厚を計測した。その結果、図2に示すように、銅粒子の重量比の増加に伴い、露光膜厚は減少する傾向が確認できた。また、粒径3-5 μm の複合材料では、露光量1.2J/cm²以上を照射した場合、露光膜厚が一定値で飽和する傾向を示した。これらの結果より、複合材料の塗布膜厚よりも露光膜厚が小さい場合、基板の上面向

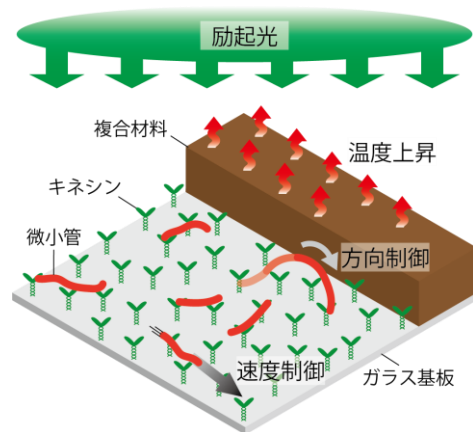


図1 提案するデバイスの概念図

ら紫外光を照射する方法では現像工程において構造物が剥離すると考えられる。そのため、本研究では構造物を作製する際、パターン原版を通してガラス基板の裏面から紫外光を照射した。

複合材料のパターニング精度を評価するために、基板の裏面から一定のライン幅を有するパターン原版を通して紫外光を複合材料に照射し、作製した構造物の寸法値と設計値を比較した。製作したパターン構造の観察写真を図 3 に示す。ラインとスペースが交互に並んだパターン構造を作製することができており、紫外光による加工が可能であることを確認した。複合材料の調製条件を変更し、それぞれのパターニング精度を評価した結果を図 4 に示す。複合材料に含まれる銅粒子の重量比が増加するにしたがって、加工できる最小パターン幅は大きくなっており、パターニングが出来ていない箇所では複合材料の剥離を観察した。この原因は、銅粒子の重量比の増大に伴い、紫外光によって硬化する感光性材料の割合が減少し、露光される膜厚も小さくなるため、現像工程において構造が壊れやすい状態になっていたことが考えられる。また、本研究でおこなったパターニング精度の評価では、いずれの条件においても最大 5 μm 程度の誤差が生じた。パターニング精度を改善するためには、露光量の最適化が必要となるが、複合材料を用いた場合では露光量が露光膜厚やパターニングできる最小パターン幅に影響するため、マイクロデバイスの作製時には設計値および許容できる寸法誤差に基づき最適な加工条件を選択する必要がある。

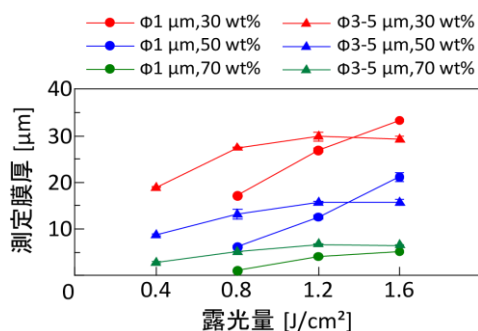


図 2 露光量に対する露光膜厚

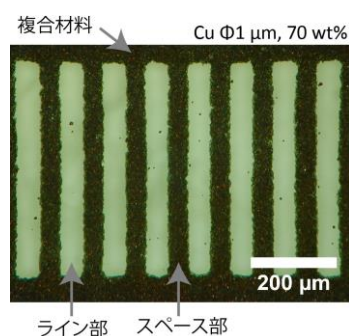


図 3 パターンの観察写真

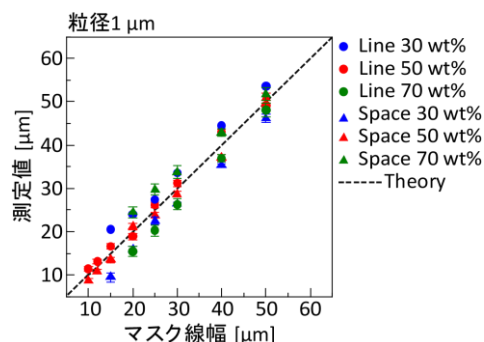


図 4 パターニング精度

(2) 複合材料の機能性評価

複合材料の機能性である温度上昇量を計測するために、微小な温度センサをガラス基板上に作製し、その温度センサ周りに複合材料（銅粒子 70 wt%）をパターニングした。作製したデバイスの観察写真を図 5 に示す。本研究では温度センサに 4 線式測温抵抗体を採用し、ガラス基板上に白金をパターニングすることで作製した。作製した温度センサについては、恒温水槽を用いて温度校正をおこない、温度計測器として使用できることを確認した。温度校正後、デバイスを倒立型顕微鏡の試料台に設置し、蛍光観察に用いる緑色の励起光を照射したときの温度上昇量を計測した。図 6 の計測結果に示すように、温度上昇量は複合材料がない場合に比べて、ある場合の方が大きな値を示した。また、顕微鏡の対物レンズの倍率によって温度上昇量は異なる値を示した。異なる値を示した要因は、対物レンズから照射される励起光の照度の違い、または照射範囲に含まれる複合材料の面積割合の違いが考えられる。本研究で実施した条件においては、銅粒子の重量比 70 wt%、対物レンズ 60 倍のとき、最大約 21°C の温度上昇が得られることを明らかにした。また、微小管運動の観察に用いる 100 倍の対物レンズを用いた場合においても、温度上昇量は約 13°C を示しており、微小管運動の速度変化を生じさせる温度として十分な変化量であることを確認した。

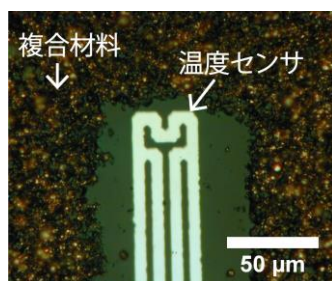


図 5 温度計測デバイス

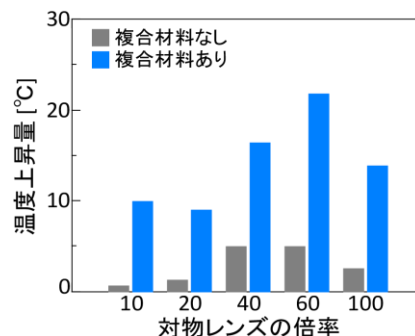


図 6 温度上昇量の比較

(3) 作製したデバイスにおける微小管運動の観察

本研究では、微小管運動に対する複合材料の有用性を検証するために、簡易的な矩形構造を複合材料で作製し、その矩形構造とガラス基板の境界付近における微小管運動を観察および評価した。複合材料の矩形構造は、ガラス基板上に複合材料を塗布後、パターン原版を通して基板の裏面から紫外光を照射することで作製した。作製したデバイスの全体写真と、複合材料およびガ

ラス基板との境界付近の拡大写真を図7に示す。観察写真より、矩形パターンはガラス基板上に形成されており、複合材料とガラス基板の境界面も形成されていることを確認した。矩形構造を作製後、デバイス上に図8に示す簡易流路（フローセル）を作製し、流路内に濃度を調整したキネシン、微小管、ATP 溶液を順次導入することでフローセル内に微小管運動を構築した。本研究では、速度評価において複合材料の有無による違いを明らかにするために、複合材料ありのフローセル A と複合材料なしのフローセル B の微小管運動をそれぞれ観察した。図9はフローセル A のパターン境界面における微小管運動の連続観察写真である。複合材料の構造に接触する微小管は、その形状に沿って移動方向を変化させる様子を示した。この結果より、複合材料は微小管の移動方向制御に有用であると考えられるが、本実験において移動方向の変化を観察できた微小管の本数は少数であった。パターンの境界付近で剥離するものや複合材料の方へ進入し、消失する微小管も観察されたことから、より再現性の良い方向制御を行うためには、デバイス設計および作製方法の改善が必要であると考えられる。

図10はフローセル A の複合材料近傍の微小管と複合材料なしのフローセル B の微小管について、30秒間の移動距離を比較した連続観察写真である。図10に示すように、フローセル A の微小管は、フローセル B に比べて移動速度が大きく、30秒間で約 $3.0\mu\text{m}$ の移動距離の差が生じた。図11はフローセル A およびフローセル B において、励起光の照度が小さいときと大きいときの微小管速度をそれぞれ計測し、移動速度の変化率を求めた結果のグラフである。励起光の照度が 4 W/cm^2 から 76 W/cm^2 に変化したとき、フローセル A の微小管の平均移動速度は $0.124\mu\text{m/s}$ から $0.231\mu\text{m/s}$ に増加し、約 1.85 倍速くなる結果を示した。一方、フローセル B の微小管速度は $0.160\mu\text{m/s}$ から $0.185\mu\text{m/s}$ の増加であり、約 1.23 倍の変化率であった。得られた結果より、励起光の照度が 76 W/cm^2 のとき、フローセル A の微小管速度はフローセル B に比べて約 1.5 倍大きくなることを確認した。複合材料近傍においては、複合材料で生じた熱が周囲の溶液温度を上昇させたことによってキネシンの活性が変化し、微小管の移動速度が大きくなったと考えられる。

上記の結果より、微小管運動の方向および速度制御が行えるオンチップ型の分子輸送システムの開発において、本研究では複合材料の制御機構としての有用性を示すことができたと考えられる。本研究期間内においては、方向と速度の同時制御による効率的な輸送システムの実証には至らなかったが、現在それぞれの制御機構を組み合わせた新たな分子輸送システムの開発をおこなっている。今後は、デバイス内での微小管運動の制御性の改善を図るとともに、微小管への分子結合系を融合した新たな分子輸送技術の確立に取り組み、オンチップ型分子輸送システムの有用性を実証する計画である。

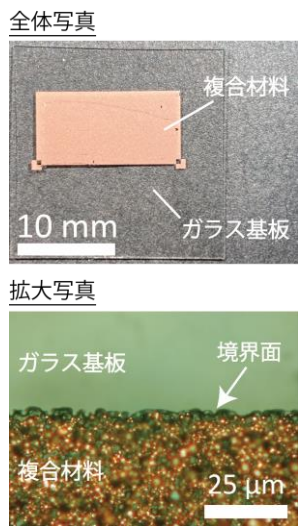


図7 矩形構造の観察写真

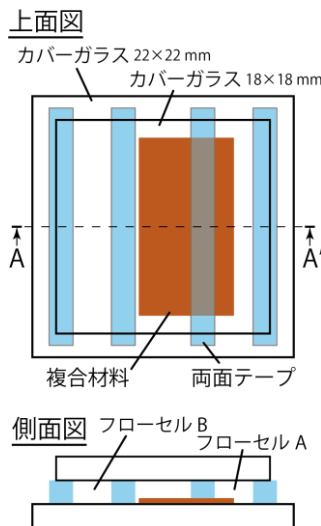


図8 フローセル

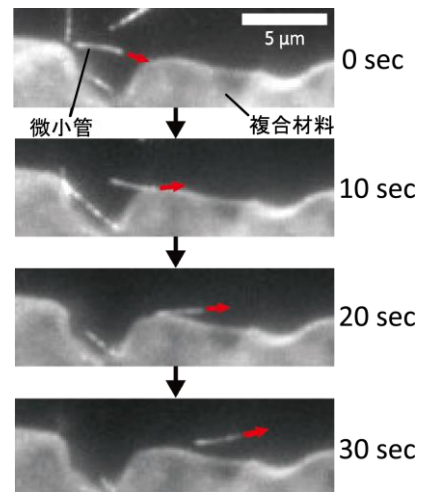


図9 微小管の移動方向の変化

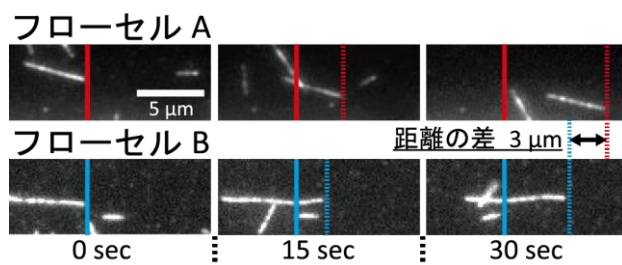


図10 移動する微小管の連続観察写真

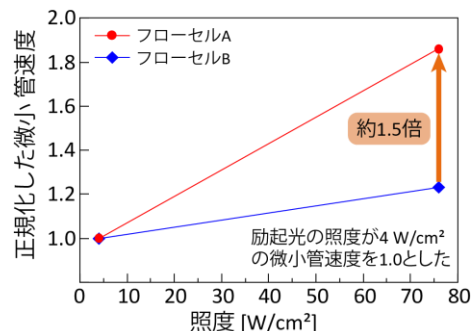


図11 照度に対する移動速度の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tasuku Nakahara, Yusaku Ueda, Hayato Miyagawa, Hidetoshi Kotera, and Takaaki Suzuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Self-aligned fabrication process for active membrane in magnetically driven micropump using photosensitive composite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 25006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6439/ab6302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田崎淳一、中原佐、南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料を用いたマイクロヒータの開発
3. 学会等名 日本機械学会 2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎淳一、中原佐、南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料の光熱効果を利用した温度制御デバイスの開発
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第57期総会・講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中原佐、伊勢一貴、南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料と励起光照射による微小管運動の速度制御技術
3. 学会等名 日本機械学会 2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢一貴、中原佐、南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料を用いた微小管運動の速度および方向制御
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中原佐、宮崎勇、南和幸
2. 発表標題 表面粗さ構造パターンにおける微小管運動の挙動評価
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西政人、中原佐、南和幸
2. 発表標題 キネシンのパターン境界部における微小管運動の挙動評価
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第58期総会・講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----