

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750001

研究課題名 (和文) ナノ空間集積化流路による分子分別システムの構築

研究課題名 (英文) Molecular filter consisted of nano-space array on micro-channel

研究代表者

並河 英紀 (NABIKI HIDEKI)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：30372262

研究成果の概要 (和文)：本研究により、幅数十ナノメートル程度の微小空間への脂質二重膜の連続的な流入を発現させることで、膜内に含まれた異種分子をフィルタすることが可能であると示された。また、用いる空間のサイズや形状、膜の組成などにより、フィルタの効率や分子選択性が制御可能であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The present project has established novel molecular filter by using of self-spreading lipid bilayer and nano-spaces. By spreading the bilayer through the nano-space, it was found that the molecule doped in the bilayer was selectively filtered by the nano-space, which can be controlled by the size of nano-space and bilayer composition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：表面・界面

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで脂質二分子膜の自発展開現象に関する研究を行ってきた。本現象は、系の自由エネルギー差に駆動される自発過程であり、外部バイアス（電場や圧力など）を要しない新規物質輸送システムである。その中で、共同研究者が研究対象としていた金属構造体の規則配列基板に着目し、この基板上での自発展開実験に着手した。その結果、脂質二分子膜は金属構造体間隙（ナノゲ-

ト）へ連続的に流入し、その連続的な過程において膜内添加色素分子がフィルタされる現象を見出した。本現象は、ナノゲートにおいて脂質二分子膜の集合体構造が局所的に歪み、これに伴うナノゲート内化学ポテンシャル変調が膜内添加分子のゲート透過能を抑制したものと考えている。本成果は他に類を見ない全く新奇な現象論に基づいた分子分別機構であるとして報告してき。フィルタ効果に対する分子構造依存性も既に確認さ

れており、複数分子混合系からの分離分別システムの構築も可能となると考えられる。化学ポテンシャル変調が分子認識フィルタ機構の根幹原理であるならば、本現象論は全ての分子間相互作用を認識因子とする革新的ナノ空間分子分別システムとして提案できると考えられる。以上の経緯及び考察を経て、本提案研究を申請するに至る。

## 2. 研究の目的

まず、ナノゲート構造依存性ならびに展開膜組成依存性の明確化を目指す。たとえば、ゲートについてはゲート幅、ゲート周期、ゲート表面修飾を、脂質膜については組成、ナノドメイン形成、電荷密度設計に関して、それぞれの分子フィルタリング特性への寄与を明確化する。また、ナノゲートでの自発展開膜構造歪の直接的検証するため、膜構造応答性色素を膜内に添加し、ナノゲート通過時の発光スペクトルを採取することでゲート内の特異環境の構造解析を行う。次いで、より拡張性の高い二次元分別システムの構築すべく、化学ポテンシャル障壁とブラウニアンラチェットを組み合わせ、一次元的フィルタリングシステムを拡張子二次元分子分別用分岐流路などを構築する。

## 3. 研究の方法

モデル系として各種色素修飾脂質分子を添加した脂質二分子膜を用い、ナノゲート・脂質膜構造の各項目についてフィルタリング特性への依存性を検討し、ターゲット分子のサイズ・電荷・立体配置などに対する構造効果相関データベースを構築する。効果の評価は①流路内での分子分布評価と②単一分析システムによる分子拡散ダイナミクス変調の定量的評価に基づき、巨視的・微視的の両者からの評価を行なう。また、脂質膜依存性に関しては、膜の剛性・相を制御する膜組成に関して、生体由来脂質から合成脂質までその構造依存性を検討し、また、相転移誘起分子の添加効果も併せて検討する。

一方、これまでの予備検討により、個々のナノゲートにおいては数~数十 kJ/mol 程度の相転移状態が形成しているものと予想されている。この値は自発展開ダイナミクスのナノゲートによる変調を基に算出したものである。ゲートサイズの定義が不明瞭であるため一桁近い大幅な誤差圏を許しており、漠然とした膜構造歪モデルの提唱に止まっている。本モデルの定量的厳密化を目的とし、ナノゲートにおける脂質二分子膜構造の直接的評価に基づいた検討を行う。特に脂質二分子膜内の構造変化に関しては、BODIPY 色素の様に膜密度・相に依存して発光特性を変調させる環境応答性色素が有用であり、これを利用してナノゲートにおける膜密度

増大に関する定量的評価を行ない、モデルの確立を目指す。

また、二次元システムの構築では、分子輸送媒体として生体細胞膜由来の脂質二分子膜を用いているため、ペプチド・膜タンパク質・DNA・環境ホルモン・細胞毒素など多彩な生体高分子への適用が期待できる。特に分子量の大きな生体高分子はブラウニアンラチェット機構発現の可能性が高く、化学ポテンシャルゲートによる分子透過能の制御と組み合わせた微小場二次元分別システム創成のモデル系として期待できる。微小ゲートのゲート角度・依存性を中心とした実験を機軸に、適応可能分子系の模索などデバイスとしてのポテンシャルを議論する。

## 4. 研究成果

まず、本効果をより系統的に評価するため、電子線リソグラフィ(EBL)法を用いて構造体を構築し、同様の実験を行った(図1)。NSL基板と同様に、金属構造体存在下ではフィルタ効果が発現したが、構造体の間隔幅( $d$ )の低下と伴に(1)フィルタ効率が向上する、(2)自発展開速度が遅くなる、という傾向が確認された。これらの定量的な解析の結果、本フィルタ効果は、構造体間隔での二重膜構造変調による化学ポテンシャル変調、つまり、分子の溶解度の変調に基づいた膜内添加分子の間隙部透過能制御によるものであることが示唆された。自発展開現象に駆動される本システムは、完全なる非バイアス下で作動するナノ・マイクロ空間分子選択的フィルタ機構として、今後の応用展開が期待される。

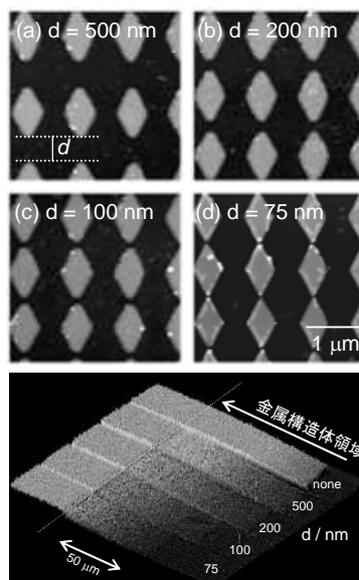


図1. (上) EBL基板のAFM像。(下) EBL構造体流路を自発展開する脂質二重膜の蛍光顕微鏡像。

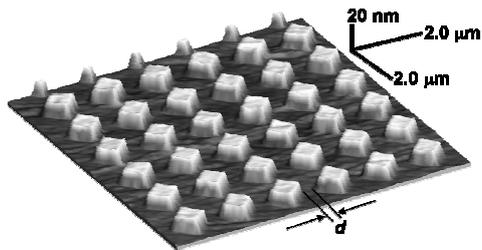


図 2. 対角線長 1000 nm の正方形構造体が頂点間距離  $d = 500$  nm 隔てて規則的に配列した構造体基板の AFM 像。

また、より詳細な機構解明を行うため、単一分子追跡実験による評価を行った。対角線長 1000 nm の正方形 Au 構造体をゲート幅  $d = 75 \sim 200$  nm にて規則配列させたガラス基板を作製し(図 2)、本基板上的のナノゲート存在部位の近傍に  $10^{-6}$  mol% TR-DHPE 含有 DLPC のクロロホルム溶液を滴下し、室温大気下にてクロロホルムを蒸発させ脂質供給源を構築した。その後、100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  水溶液に浸漬することで自発展開を発現させた。膜内の TR-DHPE の観察には 532 nm レーザー励起による全反射顕微鏡 (TIRFM) を用い、拡散挙動をビデオレートにて観察した。観察された各軌跡に対し、平均変位量解析を行い、分子の膜内での輸送速度に関する定量的評価を行った。

ガラス基板上では TR-DHPE は 600 nm/s の速度で自発展開方位に輸送されていることが明らかとなった(図 3)。この値は二重膜の自発展開速度 (ca. 250 nm/s) よりも大きく、TR-DHPE の輸送には自発展開以外の寄与も加わっていることが示唆された。本結果は、単分子観察のために極度な低 TR-DHPE 濃度状態にした自発展開膜に対し、脂質供給源から TR-DHPE が連続的に供給され、これが有意な輸送速度として観測されたものと推測される。一方、ナノゲート存在下での輸送速度はゲート幅の低下と共に減少し、 $d =$

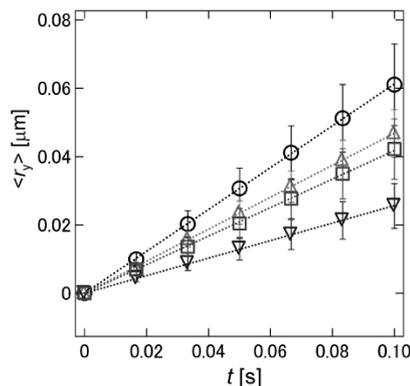


図 3. 自発展開中の二重膜内を拡散する分子の自発展開方位への平均変位量プロット.  $\circ$ : ガラス基板上、 $\square$ :  $d = 200$  nm、 $\triangle$ :  $d = 100$  nm、 $\nabla$ :  $d = 75$  nm.

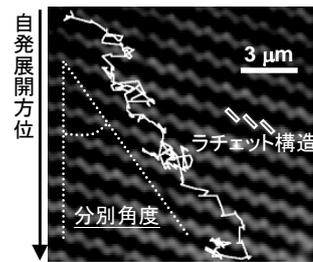


図 4. ラチェット基板上にて観察された TR-DHPE 由来の輝点軌跡. 展開方位に対して傾斜した構造体が設置されている (しるす長方形を参照)。

75 nm では 200 nm/s にまで抑制されることが明らかとなった。この輸送速度の減少は TR-DHPE に対するフィルタ効果発現を直接的に示すものである。また、得られた値に対して Einstein の関係式を用いてナノゲート近傍にて印加されている力を見積もった所、1 fN/molecule の力が作用していることが明らかとなった。この値は電気泳動力と同等であり、外部エネルギーを利用しない自発展開系においても分子拡散性を制御可能な有意な力を発現させ得ることが示された。本系を利用することで、微小場特有の分子拡散性変調を利用した単分子レベルでの分子操作や分別が可能な微小場分子操作法の創成が期待できる。

さらに、二次元的な分子分別を達成するため、図 4 に示したような傾斜構造体基板を構築し、同様の実験を行った。軌跡に対する数値解析より、自発展開方位に対する平均変位量から各分子の輸送速度  $v$  を算出し、垂直方位の平均変位量解析と併せて展開方位

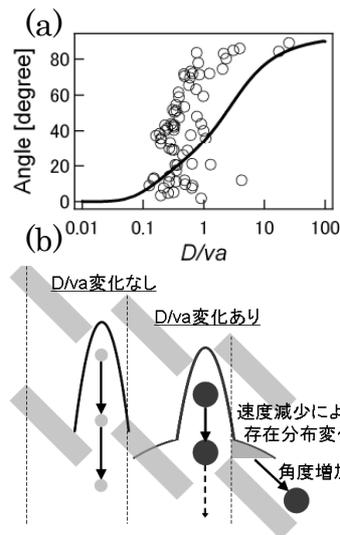


図 5. (a)  $D/va$  に対する分別角度プロット. 黒実線が計算曲線. (b) 分子サイズの考慮により提案される角度増加の機構.

に対する輸送角度を算出した。個々の分子のラチェット分別効率決定パラメータ  $D/va$  に対してプロットしたところ、TR-DHPE 系は計算予測を超える分別効率を示すことがわかった(図 5a)。本結果は、構造体間隙部における分子と構造体壁面との摩擦抵抗や輸送媒体である脂質膜自体の膜密度変化など、構造体の近傍において誘起される特異的な  $v$  の減少により発現したと考えられる。これにより  $D/va$  から決定される存在分布のブロード化が引き起こされ、その結果、付加的な分別角度増加が発現したと考えられる(図 5b)。以上、自発展開ラチェット系の定量的検討により、既存の予測分別効率を超える新奇な分子分別機構が提案された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. H. Nabika, T. Sumida, K. Murakoshi, "Fluorescence Resonant Energy Transfer Observation of Molecules at Nano-gate Molecular Filter", Trans. Mater. Res. Soc. Jpn., (in press). 査読あり
  2. H. Nabika, T. Yamamoto, K. Murakoshi, "Effect of Bending Energy on the Self-spreading Lipid Bilayer", ECS Trans. 19(32), 79-85 (2009). 査読あり
  3. B. Takimoto, H. Nabika, K. Murakoshi, "Enhanced Emission from Photo-Activated Silver Clusters Coupled with Localized Surface Plasmon Resonance", J. Phys. Chem. C 113(27), 11751-11755 (2009). 査読あり
  4. H. Nabika, N. Iijima, B. Takimoto, K. Ueno, H. Misawa, K. Murakoshi, "Segregation of Molecules in Lipid Bilayer Spreading through Metal Nano-gates", Anal. Chem. 81(2), 699-704 (2009). 査読あり
  5. B. Takimoto, H. Nabika, K. Murakoshi, "Single Molecular Observation of Hop Diffusion in a Lipid Bilayer at Metallic Nanogates", J. Phys. Chem. C 113(8), 3127-3132 (2009). 査読あり
  6. H. Nabika, T. Motegi, K. Murakoshi, "Single Molecule Tracking of Cholera-toxin Subunit B on GM1-ganglioside Containing Lipid Bilayer", e-J. Surf. Sci. Nanotechnol. 7, 74-77 (2009). 査読あり
- [学会発表] (計 22 件)
1. 並河英紀, 瀧本麦, 村越敬, ナノ空間における分子拡散挙動の単分子解析、日本化学会第 90 春季年会. 2010/3/26, 東大阪.
  2. 茂木俊憲, 並河英紀, 村越敬, 脂質二分子膜内分子拡散方位制御による二次元分子分別、日本化学会第 90 春季年会. 2010/3/26, 東大阪.
  3. 深川一哉, 住田智希, 茂木俊憲, 並河英紀, 村越敬, 金属微小構造体による自発展開脂質二重膜内分子フィルタ効果の制御、日本化学会第 90 春季年会. 2010/3/26, 東大阪.
  4. 小川高史, 住田智希, 茂木俊憲, 並河英紀, 村越敬, 脂質二分子膜の自発展開特性に対する周期的曲率基板の効果と分子フィルター現象の発現、日本化学会第 90 春季年会. 2010/3/26, 東大阪.
  5. 並河英紀, 村越敬, 曲率基板上での脂質二重膜内分子拡散性の制御、電気化学会第 77 回大会. 2010/3/29, 富山.
  6. 並河英紀, 住田智希, 村越敬, ナノゲート分子フィルタ効果の発現に伴う脂質二重膜の構造特異性評価、2010 年春季第 57 回応用物理学関係連合講演会. 2010/3/18, 平塚.
  7. 小川高史, 住田智希, 茂木俊憲, 並河英紀, 村越敬, 脂質二重膜の自発展開特性に対する基板曲率の効果と分子分別現象の発現、化学系学協会北海道支部 2010 年冬季研究発表会. 2010/1/27, 札幌.
  8. 深川一哉, 住田智希, 茂木俊憲, 並河英紀, 村越敬, 金属微小チャンネルによる脂質二重膜内分子フィルタリング効果の制御、化学系学協会北海道支部 2010 年冬季研究発表会. 2010/1/27, 札幌.
  9. 茂木俊憲, 並河英紀, 村越敬, 脂質二分子膜内分子に対するラチェット分別機構の定量的効率評価、2010 年春季第 57 回応用物理学関係連合講演会. 2010/3/18, 平塚.
  10. B. Takimoto, H. Nabika, K. Murakoshi, Suppression of Molecular Passage Through Well-Defined Metal Nano-gates, 2nd International Symposium on Nanomedicine (ISNM2009). 2009/2/6, Okazaki.
  11. H. Nabika, B. Takimoto, N. Iijima, K. Murakoshi, Molecular Segregation on Self-spreading Lipid Bilayer, 2nd International Symposium on Nanomedicine (ISNM2009). 2009/2/6, Okazaki.
  12. T. Motegi, H. Nabika, K. Murakoshi, Brownian Ratchet Effect on Molecular Motion in Self-spreading Lipid Bilayer Investigated by Single Molecular Tracking Technique, 2nd International Symposium on Nanomedicine

- (ISNM2009). 2009/2/6, Okazaki.
13. 茂木俊憲、並河英紀、村越敬、非対称微小構造体を用いた二次元分子分別システムの構築、北海道大学グローバル GCOE 若手成果発表会。2010/2/24, 札幌。
  14. 並河英紀、茂木俊憲、村越敬、脂質二重膜を用いたナノ物質の分離分別法の開発、JST 新技術説明会。2009/11/13, 東京。
  15. 並河英紀、瀧本麦、村越敬、固液界面に構築したナノ空間での分子拡散性操作、第 29 回表面科学学術講演会。2009/10/28, 東京。
  16. 並河英紀、瀧本麦、村越敬、単一分子追跡法によるナノゲートでの分子拡散性評価、ナノ学会第 7 回大会。2009/5/10, 東京。
  17. 並河英紀、瀧本麦、村越敬、電解質水溶液／固体界面に形成した脂質二重膜内での分子操作、2009 年電気化学秋季大会。2009/9/10, 東京。
  18. 並河英紀、村越敬、自発展開脂質二重膜に対する曲率印加の効果、第 47 回日本生物物理学会年会。2009/10/31, 徳島。
  19. H. Nabika, M. Oowada, B. Takimoto, T. Nomura, Y. Chuman, K. Sakaguchi, K. Murakoshi, Dynamic Adsorption and Insertion Behavior of MSI-78 on a Self-spreading Lipid Bilayer, The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA 2008). 2008/8/27, Sapporo.
  20. H. Nabika, N. Iijima, B. Takimoto, K. Murakoshi, Selective Molecular Filtration at Nano-Gate Using Self-Spreading Lipid Bilayers as Transport Medium, XXIIInd IUPAC Symposium on Photochemistry. 2008/7/28, Sweden.
  21. H. Nabika, Molecular Filtering Effect of the Self-spreading Lipid Bilayer at Metal Nano-gate, The 4th Hokkaido University - Nanjing University Joint Symposium. 2008/11/17, Sapporo.
  22. H. Nabika, Segregation of Molecules in Lipid Bilayer Spreading through Metal Nano-Gate, Japan-Korea-China Mini-symposium on Nanotechnology, Biotechnology and Catalysis. 2008/11/7, Sapporo.

[図書] (計 2 件)

1. Hideki Nabika, Kei Murakoshi, "Molecular segregation at periodic metal nano-architectures on solid surface", in Molecular Nano Dynamics, edited by H. Fukumura, M. Irie, Y. Iwasawa, H. Masuhara, K. Uosaki,

John Wiley and Sons Ltd, Weinheim (2009).

2. 並河英紀、村越敬、“ナノ構造とナノ空間”，金属ナノ・マイクロ粒子の形状・構造制御技術，シーエムシー出版 (2009)。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：分子の分別方法およびそれに用いられる分別チップ

発明者：村越敬、並河英紀、茂木俊憲

権利者：国立大学法人北海道大学

種類：特許

番号：願 2008-214315

出願年月日：平成 20 年 8 月 22 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

並河 英紀 (NABIKA HIDEKI)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：30372262