

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度 ～ 2014 年度

課題番号：23650253

研究課題名（和文） 軟骨構成分子の分子捕捉および解析用のナノテンプレートチップの開発

研究課題名（英文） Development of nano-template chip for immobilization and analysis of cartilaginous bio-polymer molecules

研究代表者

峯田 貴 (MINETA TAKASHI)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：50374814

研究成果の概要（和文）：

関節軟骨の重要な構成物質であるヒアルロン酸(HA)およびプロテオグリカン(PG)の集合体の捕捉手法の指針を得ることを目的として、特定の場所に分子を分散させて捕捉・固定するチップ基板の開発に取り組んだ。ソフトスタンプ法による転写およびナノリソグラフィによるパターンニングを用いて、PG 単分子サイズに相当するナノドットパターン状に配列して基板表面を修飾処理して PG 分子を固定化する手法の開発を行った。また、基板表面の薄膜ナノ電極対に捕捉した HA 分子バンドルについて、液中での分子像観察により再溶解挙動を解析した。

研究成果の概要（英文）：

Proteoglycan (PG) and hyaluronic acid (HA) aggregate is an important bio-material for cartilaginous tissues. In order to obtain perspective for HA-PG aggregate immobilization, this research focused on the development of a nano-dot-patterned surface modification with mono-molecular size for immobilize PG molecules. Surface modifications with nano-stamp translation technique and nano-lithographed patterning technique were attempt for the nano-dot patterned template chip. Moreover, trapping and resolving of HA molecular bundle between thin film nano-electrode couple was characterized in liquid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：プロテオグリカン，分子捕捉，基板表面処理，ナノテンプレート，ヒアルロン酸，ナノドット，ソフトスタンプ

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会到来に伴って関節軟骨および関節液の構成物質への関心が高まっている。プロテオグリカン(PG: proteoglycan)分子は、直線状の糖鎖であるヒアルロン酸分子へ枝状に多数結合して超分子の集合体を形成し、大量の結合水を取り込むことによって軟骨に粘弾性をもたらす重要な生体物質である。

天然素材から抽出する糖鎖工学的な技術開発が進んでいるが、生成したヒアルロン酸および PG の分子構造を簡易な計測法で精密に解析する手法は確立されていない。平坦な基板表面へ水溶液中から析出させて AFM により分子像を直接観察する手法が注目されるが、再現性良く HA および PG 分子を分散して固定するのは容易ではない。我々は基板

表面のアミノシラン化修飾により PG 分子を固定化する条件を探索してきた。また、HA 分子については、基板表面のナノ薄膜電極対に交流を印加する手法を用い、分子を水溶液中から捕捉できることを見出してきたが、捕捉後の液中での挙動が未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた分子像の直接観察手法へ適用して簡易かつ精密な分子構造の解析手法の確立に結び付けるために、HA および PG を所定の場所に分散させて捕捉・固定するナノテンプレートチップ基板を開発し、集合体の捕捉手法を確立する指針を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

水溶液中で負に帯電する PG 分子を凝集を防いでチップ基板表面の狙った場所へ固定化するために、親和性の高いアミノ基(-NH₃⁺)によって基板表面へ PG 単分子サイズのナノドットパターン状に表面修飾する検討を行った。そのために、シリコン樹脂(PDMS)ナノスタンプ法および電子ビーム(EB)リソグラフィ法によるナノドットパターン状のアミノシラン化処理手法の開発を検討し、PG 分子捕捉の検証を行った。また、原料および抽出法の異なる PG 分子と集合体について、基板表面へ固定化して AFM 観察により分子像を評価する本手法の有効性を評価した。集合体のコアになる HA 分子については、静電伸長して薄膜ナノ電極の捕捉および液中での再溶解挙動の基礎的な研究を行い、ナノテンプレートチップの有効性を検討した。

4. 研究成果

(1) PG 分子は、図 1 に示すように HA 分子へ多数結合して集合体を形成し、関節軟骨を構成する材料となっている。PG 分子は、直鎖のコアタンパクへコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカン (GAG : glycosaminoglycan) が多数枝状に結合した構造であり、長さが 300nm 前後で幅が約 100nm の分子である。

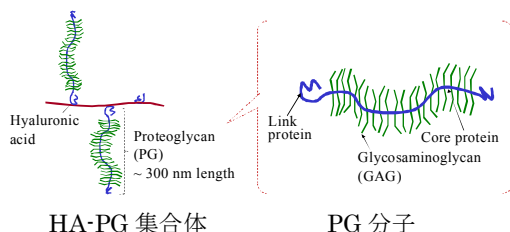


図 1 HA-PG 集合体および PG 分子の構造

水溶液中で電離して負に帯電する枝状の GAG を分散して固定化するため、観察用のマイカ等の基板表面をアミノシラン化処理

してアミノ基(-NH₃⁺)に修飾する。

基板表面をナノドット状にアミノシラン化するために、シリコン樹脂(PDMS)製のソフトスタンプ形成手法を検討した。

(100)面方位の単結晶シリコン基板を結晶異方性エッチングし、(111)面で構成された逆ピラミッド形状のホールアレイを形成し、これをモールドとして用い、液状の PDMS (主剤:硬化剤 = 5 : 1) を流し込んで硬化後に剥離し、高さ約 3.5 μm、底面 5 μm×5 μm のピラミッド状の PDMS 突起が 9×10⁴ 個配列したソフトスタンプを形成した。プラズマ CVD による Si モールド上へのフロロカーボン膜堆積による剥離性向上および剥離後のソフトスタンプ先端の異物除去プロセスを検討し、図 2 に示すように良好な PDMS ソフトスタンプアレイを形成可能にした。

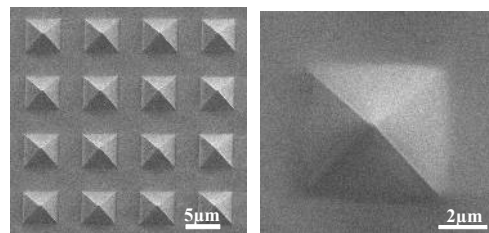


図 2 PDMS ソフトスタンプ (Si ウエットエッチング型)

形成した PDMS ソフトスタンプ上へ、アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)水溶液(0.01%)をインクとして滴下し、乾燥後にマイカ基板上へ機械的にスタンプすることで APTES の転写によるアミノシラン化を図った。図 3 は、スタンプ後の基板表面へ PG 溶液(1g/L)を滴下して溶液中から固定化された PG 分子の AFM 像である。スタンプ先端の接触が不均一であり、単分子サイズの転写は明確に確認できなかったが、PDMS スタンプ先端が広く形成されてマイクロオーダーの領域で転写された箇所では、良好に PG 分子を分散固定化することができ、ソフトスタンプを用いた本手法によるアミノシラン化処理の有効性が確認された。

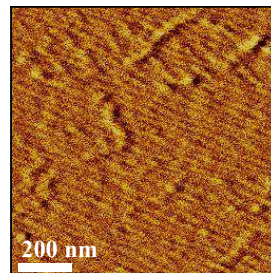


図 3 PDMS ソフトスタンプによる転写箇所への PG 分子固定化

また、反応性イオンエッチング(RIE)によるソフトスタンプ用のシリコンモールド形成を行い、シリコン基板表面に PG 単分子サイズの約 $2\mu\text{m}$ 深さのホールアレイを形成するプロセスを確立した。図 4 に形成したホールアレイを示す。ウェットエッチング型と異なり、垂直に近い加工ができるため、間隔を近接した極細柱状のスタンプを形成可能であるが、液状 PDMS の埋め込みに課題があり、ポイド発生等を抑制して直立した柱状スタンプを形成するために、PDMS 充填および硬化条件等の適正化を図る必要があることがわかった。

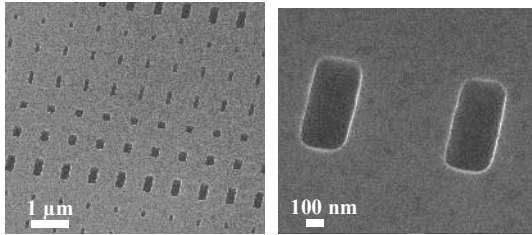


図 4 ソフトスタンプ用ナノホールアレイ (Si ドライエッチング型)

さらに、基板表面へ電子線描画レジストパターン開口部をナノドット状に形成し、開口部内の基板表面を APTES 蒸気によりアミノシラン化する手法も検討した。単結晶シリコン基板の熱酸化により形成した 700 nm 厚の SiO_2 膜上に、EB 描画により $100\text{ nm}\times 200\text{ nm}\sim 200\text{ nm}\times 400\text{ nm}$ の開口部を 600 nm 間隔で配列したナノドット状のレジストパターンを形成した。APTES 溶液とともに密閉容器中に封入し、気化する APTES 分子の蒸気により EB レジスト開口部の基板表面をアミノシラン化処理した。EB レジスト溶解および洗浄後に、基板表面へ PG 溶液 (1g/L) を滴下して 20 min 放置して基板表面への固定化を図った。

図 5 はアミノシラン化処理後の基板表面である。EB レジストの開口パターン通りに APTES 分子を付着させることができた。各ドットの中央部は APTES 単分子層に近い厚さであったが、エッジ部分は蒸気処理の際に凝集しやすく数 nm の厚さになりやすいことがわかった。図 6 は PG 分子を固定化した後の基板表面の AFM 像である。ナノドットパターンのエッジ部を起点として、PG 分子は粒子状に付着していくことがわかった。基板全面を APTES 蒸気処理した実験でも、APTES 分子が凝集した箇所には PG 分子が粒子状に成長していくことが確認できた。粒子化を抑制して PG を単分子に分散させ、GAG を枝状に分散して基板表面へ固定化するためには、APTES の凝集を抑制して付着させることが重要であることがわかった。

(2) PG 分子が会合して集合体となる際のコアとなる紐状のヒアルロン酸(HA)分子について、薄膜ナノ電極対による静電伸長捕捉のメカニズム解明を進め、捕捉した HA 分子バンドルが数分程度で再溶解していく様子を AFM 液中観察により捉えた。

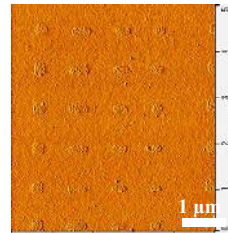


図 5 EB リソグラフィ法によるナノドット表面処理パターン(アミノシラン化)

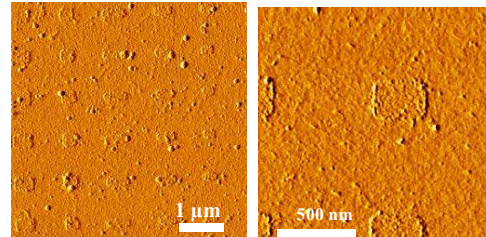
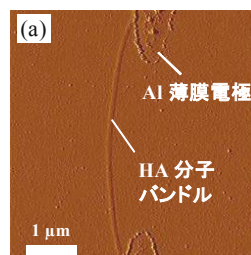
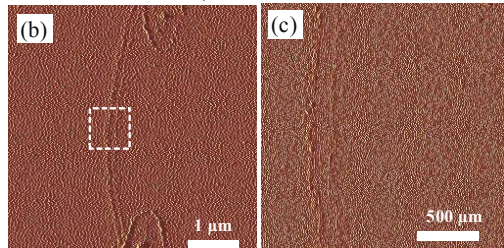


図 6 EB リソグラフィで形成したナノドットパターンへの PG 分子固定化

単結晶シリコン基板の熱酸化膜上に薄膜 Al 電極対を形成し、液中で高周波印加後に急速乾燥により伸長した HA 分子バンドル(数 10 nm 幅、数 nm 厚)を電極先端間にブリッジ状に捕捉した。図 7 は、HA 分子を捕捉した後に純水中を滴下したまま AFM プロブを浸漬させて、液中にて AFM ダイナミックモードによりその場観察した様子である。電極間に捕捉されていた HA 分子バンドルは、浸漬前よりもバンドル幅が広がりつつ、丸い粒状の分子が断続的に連なっている状態になっていき、純水への浸漬によりランダムコイ



捕捉した HA 分子(大気中 AFM 観察)



純水再浸漬中の液中観察

図 7 捕捉した HA 分子バンドルの再溶解挙動

ル状に戻り、丸い粒状になっていく様子を捉えることができた。PG と会合した HA-PG 集合体の捕捉へ、薄膜ナノ電極を用いた本手法を適用していくためには、HA 分子の再溶解時間と PG 分子固定化までの時間のタイミングが重要になることがわかった。

電極間に HA 分子捕捉を行った後に、そのまま HA 溶液中での AFM その場観察の研究にも取り組み、高粘度の HA 水溶液中では AFM カンチレバーが共振せず、ダイナミックモードでの観察は困難であり、また、コンタクトモードでは観察中に HA 分子が表面から除去されてしまうことを見出した。

(3) ウシおよびサケの軟骨を原料に用いて種々抽出法による PG モノマ試料を調製した。APTES 溶液を用いて全面を均一にアミノシラン化したマイカ基板処理を用いて PG 分子を固定化し、AFM 観察により、枝状の GAG 分子像まで鮮明に観察できることを検証し、原料および抽出法の違いによる PG コアタンパクの長さや枝状の GAG 分子の様相の差異を評価できる可能性を見出した。また、HA・PG 集合体を調製し、全面をアミノシラン化処理した基板表面へ固定化して AFM により分子像を評価し、生化学的な分析により得られた HA 量の違いを反映して HA・PG 集合体の分子像の差異が得られ、分子固定化手法および AFM による分子像の直接観察の有用性を示した。

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)

- ① I. Kakizaki, S. Suto, Y. Tatara, T. Nakamura, M. Endo, Hyaluronan -chondroitin hybrid oligosaccharides as new life science research tools, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 423, pp. 344-349 (2012) 査読有
- ② I. Kakizaki, Y. Tatara, M. Majima, Y. Kato, M. Endo, Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage, *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 506 (1), pp. 58-65 (2011) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 峯田 貴, 佐々木愛, 牧野英司, 基板表面へのプロテオグリカン分子転写のためのソフトスタンプ形成, 表面技術協会第 127 回講演大会要旨集, 2013 年 03 月 18 日, 日本工業大学(埼玉県宮代町)
- ② 峯田貴, 洪振瑞, 柿崎育子, プロテオグリカン分子選択固定化のための基板表面パターン処理の検討, 表面技術協会第

127 回講演大会要旨集, 2013 年 03 月 18 日, 日本工業大学(埼玉県宮代町)

- ③ 峯田貴, 竹内博子, 牧野英司, AI 薄膜ナノ電極対へのヒアルロン酸分子の捕捉と再溶解挙動の評価, 第 23 回バイオフロンティア講演会論文集, 2012 年 10 月 05 日, 弘前市文化センター(弘前市)
- ④ 柿崎育子, プロテオグリカンの糖鎖プロファイリングへのアプローチ, 第 5 回 GFRG 研究会公開シンポジウム, 2011 年 10 月 5 日, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター (弘前市)
- ⑤ 柿崎育子, 峯田貴, 佐々木愛, 多田羅洋太, 牧野英司, 遠藤正彦, サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの糖鎖分析, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 国立京都国際会議場 (京都市)

[図書] (計 1 件)

- ① 加藤陽治, 柿崎育子, シーエムシー出版, 『マリンバイオテクノロジーの新潮流』 分担執筆 (2012) 12

[その他]

ホームページ等

http://mineta_lab.yz.yamagata-u.ac.jp/Research-HA-AFM.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯田 貴 (MINETA TAKASHI)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号 : 50374814

(2) 研究分担者

柿崎 育子 (KAKIZAKI IKUKO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・

准教授

研究者番号 : 80302024

(3) 連携研究者

なし