「ナノシステムと機能創発」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成24年度終了研究課題－

研究総括 長田 義仁

1. 研究領域の概要

本研究領域は、ナノテクノロジーにおけるトップダウン手法の革新的高度化、精密で斬新なボトムアップ手法の駆使、あるいはそれらの手法の融合によって、要素の単なる総和や重ね合わせでは得られない、自律的、非線形的機能を生み出す（”創発する”）研究を推進し、次世代ナノシステムの構築を目指します。

具体的には、生命科学、物質科学、精密工学、電子工学、医用工学、知能情報工学などの様々な分野における知識と知見を包括的に駆使し、自律的機能創発のしくみの解析・解明、あるいは機能を創発するシステムのナノレベルでの設計・創製等、独創的・挑戦的な研究を対象とします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 16 件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1）選考は、「ナノシステムと機能創発」領域に設けた選考委員15名の協力を得て、研究総括が行う。

2）選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3）選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準（URL：http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryou4.html）の他、以下の点を重視した。即ち、自律的機能創発のしくみの解析・解明ならびに機能創発の実現を目指したシステムのナノレベルでの設計・創製等を研究し、既存の学問領域や手法を統合・融合し独自の発想にもとづいた挑戦的な提案を求める。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザーと外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選定した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会（書類選考会議）へ2課題を推薦した。

<table>
<tr><td rowspan="2">選　考</td><td rowspan="2">書類選考</td><td rowspan="2">面接選考</td><td colspan="4">採択数</td></tr>
<tr><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">対象数</td><td rowspan="2">177件</td><td rowspan="2">44件</td><td rowspan="2">15件</td><td rowspan="2">内訳</td><td>3年型</td><td>13件（1件）</td></tr>
<tr><td>5年型</td><td>2件（0件）</td></tr>
</table>

（ ）内は大挑戦型としての採択数。

備考：

1）平成 21 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・白幡直人研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2年間延長することが決まったため。

2）平成 20 年度採択課題のうち、以下を今年度の事後評価対象とする。

・梅津光央研究者、及び、藪浩研究者

東日本大震災の影響から研究期間を延長し、終了年度がずれたため。

・田川美穂研究者、および、松村幸子研究者

ライフイベントによって研究を一時中断したため。

5. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議：7回

平成 22 年 3 月の第 3 回領域会議から、平成 25 年 3 月の第 9 回領域会議まで、合計 7 回の領域会議を開催した。口頭とポスターによる研究者の発表が中心であるが、各回とも各研究者と総括・アドバイザーとの熱心な討論と率直で有益な数々の助言が行われ、深い研究交流が実現された。同時に、領域アドバイザーによる特別講演も毎回実施した。

なお、領域会議の直前（直後）に、さきがけ研究者の研究室・施設を見学して討論と研究交流を行うという本領域独自の「研究室見学会」を 6 回実施し、多くの研究者とアドバイザーが参加した。

研究総括の研究実施場所訪問

・サイトビジット

研究総括と技術参事が、さきがけ研究者 2 期生 15 名の全研究室を訪問した。（英国ヨーク大学・廣畑貴文研究室を含む）

各々の上司の先生にさきがけ研究へのご理解をお願いするとともに、研究施設等を見学し、さきがけ研究者から研究内容や抱負・希望等を聞き話し合った。研究者と研究総括との直接的ディスカッションは相互のコミュニケーションを良くしたが、その後の研究展開にも極めて有益であった。

・研究者訪問（技術参事）

技術参事が単独で 2 期生 10 名を訪問した。（残りは余裕がなく未実施） 1 人 1 人にさきがけに対する要望、研究推進上の様々な問題点などを聞いてその後のさきがけ研究支援に活かした。

第 2 期生研究成果報告会（公開）

・平成 24 年 12 月 17 日～18 日、サイエンスプラザ（東京都）で開催

・本年度終了 2 期生（3 年型）13 名のさきがけ研究終了報告と、5 年型研究者 2 名の中間報告が実施された。外部の方々からの質問も多く出て研究交流としても有効であった。

CREST２研究領域との合同会議

平成 20 年度「プロセスインテグレーションによる次世代ナノシステムの創製」という戦略目標のもとに設置された CREST２領域とさきがけ当領域のメンバーが参加する会議（非公開）を実施した。3 領域の研究者の交流促進に有効であった。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会（研究報告会、領域会議等）での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

（事後評価の流れ）

平成 21 年 10 月（研究開始）～平成 25 年 3 月（研究期間終了）
平成 22 年 3 月～25 年 3 月　領域会議を 7 回開催
平成 24 年 12 月　2期生研究成果報告会実施
平成 25 年 2 月　研究報告書提出（研究者より）
平成 25 年 3 月　研究総括による事後評価
平成 25 年 3 月　被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

（1） 外部発表（論文、口頭発表等）、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

（2） 得られた研究成果の科学技術への貢献（インパクト）
（3） 研究展開の独創性、適切性と妥当性
（4） さきがけ研究としての意義と今後の発展性
（5） 大挑戦型についてはさらに、大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展についても評価項目とした。

9．事後評価

総論
本研究領域では、ナノテクノロジーにおけるトップダウン手法とボトムアップ手法の駆使、あるいはそれらの融合によって新しい機能を創発する研究を対象とし、次世代ナノシステム構築を目指す幅広い研究課題が採択されている。この間の領域会議を始め様々な機会を通じて、多様な専門分野の研究者同士、ならびに、総括・アドバイザーとの活発な議論がなされ協同した研究も進み各課題で多くの斬新な成果が得られている。
以下に、第 1 期生（3 年型）研究者 4 名と、第2期生（3 年型）研究者12名が行った研究の狙い、結果及び評価を個別に記述する。

1．梅津 光央 研究者 「ナノ界面特異的バイオ接合分子を用いた多元ナノ結晶集合」
（東日本大震災の影響で研究期間を 6 カ月延長）
評価結果
無機材料結晶面を識別し結合する新奇なペプチド・抗体分子断片を独自の方法（ラクダ抗体の抗原結合部位に移植して進化工学を用いる方法など）で作成することに成功した。さらに、多機能セラミックスである酸化亜鉛に対する抗体の作成、および、金ナノ粒子間を自在に接合できるプロセス技術を開発することにも成功した。これらの研究は世界的に報告がほとんどなく、無機材料表面に選択的結合する抗体を迅速に作製する手法を世界に先駆けて確立した点で高く評価できる。

2．田川 美穂 研究者 「DNAセルフアセンブリによるナノシステムの創製」
（ライフイベントのため研究期間を 1 年延長）
評価結果
本研究は、DNA を用いたナノ材料の超構造の制御を研究し、ボトムアップナノテクノロジーの新手法を確立することを目指した。その結果、1）DNA 正四面体の介在で DNA 被覆金ナノ粒子を結晶化するとダイヤモンド構造が形成されること、2）二次元 DNA タイルアレイの構造安定化と耐熱化を行い、テンプレートとしての利用とともに DNA 二重螺旋の直接的画像化にも成功したこと、3）光クロスリンク反応した DNA タイルアレイが高温や外力に耐えること、等の興味深い成果をおさめた。どのようにナノ粒子を組み立てて超構造を制御するかは重要課題であるが、本研究はそのための一手法を示した。本研究で得られた知見は、今後様々な機能材料を作成するための指針を与える基礎技術になると考えられる。

3．松村 幸子 研究者 「適応進化的に機能創発するナノキャリアの開発」
（ライフイベントのため研究期間を 10 カ月延長）
評価結果
分子の集合状態を制御して新機能を生み出すナノキャリアの開発を2つの方向で行った。1）「腫瘍部位でナノ粒子を集合して大きくするキャリアの開発」（滞留性向上と薬物の高濃度化・長期放出を目指す）では、腫瘍部位でフェリチン分子が集合する系を作り MRI でその状態を評価できた。2）「小さなペプチドの自己集合を利用した磁気共鳴画像（MRI）の造影剤キャリアの開発」では、金属結合部位を導入したβシートペプチドに Mn あるいは Gd を結合すると造影能力が向上することを見出し、マウス体内での撮影とがん細胞のターゲティングが可能であった。これらの成果は、キャリアの動態や抗腫瘍効果を評価する in vivo システムとして有望で、治験をふくめた今後の発展が期待できる。

4．藪 浩 研究者 「メタマテリアルの自己組織的作製とナノリソグラフィーへの応用」
（東日本大震災の影響で研究期間を 9 カ月延長）
評価結果
相分離構造を持つブロック共重合体ナノ微粒子を金属化してメタマテリアルを作製し、回折限界を超えるナ

ノリソグラフィー技術の確立を目指している。研究成果として、マイクロ波を用いたミクロ相分離構造の迅速形成法の開発、有機−無機ハイブリッド微粒子を作成してその集積体の光学特性評価を行い、金属−誘電体周期構造の屈折率を制御する可能性を示した。メタマテリアルという物理・工学分野の理論的物質を合成化学的手法で実現しようとする先駆的な研究である。メタマテリアルとしての負の屈折率の実現はまだだが、化学的に制御する可能性を示したことは高く評価できる。今後ナノリソグラフィーへの展開や新規光学素子への応用が期待される。

5. 一木　正聡　研究者 「ナノ格子制御による薄膜キャパシタ構造の作製と剥離・転写・接合によるナノ電子部品用実装技術の確立」
評価結果
　金属電極と薄膜キャパシタの結晶成長を実現し、ナノ表面機構の解明により、次世代電子回路基板のナノ実装技術の確立を目指した。研究成果として、1）構造体作製時に引張応力状態が必要である、2）密着性の要因が鉛の原子拡散にあり、拡散により密着力を制御できる、3）プロセスパラメータを定量的に評価して熱処理温度が主要なパラメータである、などを明らかにした。高性能薄膜キャパシタを電子回路基板上に展開できれば、電子機器の小型・薄型・軽量化が期待できる。本研究は個別・要素的性格が強いが、実装という具体的課題の解決を目指す成果をおさめたと判断される。

6. 木戸秋　悟　研究者 「細胞運動・機能を操作するナノ・マイクロメカニカルシステムの構築」
評価結果
　外力場環境による細胞運動の制御を目指し、細胞接着性ゲルの表面弾性率分布のマイクロパターニング手法によって細胞運動を制御する機能性材料の開発を行った。本研究により、1）細胞の運動を操作できる弾性基材開発の可能性を示しそのダイナミクスを解析したこと、2）間葉系幹細胞の分化フラストレーション現象の創発を確認したこと等は興味深い新知見である。これらは、細胞運動の力学的側面と細胞内の生化学過程・シグナル伝達との関係を理解するうえで前進であり、また、幹細胞内トランスクリプトーム・プロテオームの非線形振動システムダイナミクスへの展開の可能性を示唆し、細胞運動の制御を可能にする重要な基礎知見が得られたと高く評価される。

7. 木村　建次郎　研究者 「ナノシステムの大規模集積化に向けた高速電子線露光法の開発」
評価結果
　本研究は、全く新しい高速電子線露光法開発を目指して、独自アイデアに基づく、1）任意のパターンを持つ電子線束を発生させる方法と、2）電子線の収差低減の方法、の有効性を実証したものである。1）では、マイクロチャネルプレートを電子線束発生に使う世界で初めての電子線露光装置を試作しパターンの縮小投影に成功した。この成果は回路情報を持つ大面積の電子線束を均一に縮小投影させるための要素技術として重要である。2）では、独自に考案した「近軸光線レンズ」の原理実証に成功した。これらの成果はともに、「さきがけ」の予算と期間でモデル機を試作して世界最先端の原理を実証したものとして特筆に値する。本研究は、世界最高性能の小型電子顕微鏡や電子波散乱トモグラフィなどの実現が可能となる極めて重要な研究成果である。

8. 齊藤　健二　研究者 「ナノ細線状半導体光触媒システムの開発」
評価結果
　独自のナノ細線状半導体作成技術をもとに、世界最高の光触媒活性を持つナノ細線状半導体群の創製を目指した。課題として、1）高い光触媒能を有するナノ細線状半導体合成法の確立、2）水を完全分解する光触媒の開発、3）バルクの光触媒活性を凌駕する可視光応答性光触媒の開発とその機構解明、などの研究を実施した。その結果、初めて半導体ナノワイヤーによる水分解を確認したこと、可視光応答性ナノワイヤーがバルクの特性を超えた世界初の結果を得るなどの成果をあげた。今後は、ナノ細線固有の活性発現機構を解明するとともに、世界トップレベルの活性触媒物質の探索を期待したい。

9. 高見澤　淳　研究者 「ナノ構造を利用した高感度質量分析総合システムの開発」
評価結果
　これまで困難だった低極性・非極性分子を非極性溶媒中でイオン化して質量分析を可能にする研究を進めた。研究者が開発したテトラキス[3,5−ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ホウ素リチウムをカチオン化剤として用い、質量分析でイオン化が困難な炭化水素類のイオン化に成功し（これは溶液中でのアルカンのイオン化

例として世界初)、この方法で C16 まで測定できることを明らかにした。その他イオン化困難ないくつかの分子のイオン化にも成功した。本研究は質量分析の測定感度を向上させる新たな方法を開拓するものであるが、将来は環境汚染物質や原油の分析を始め広く役立つ方法に発展することを期待したい。

10．田中　秀明　研究者 「生体粒子 vault の立体構造情報を基盤とした新規 DDS の戦略的開発」
評価結果
新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)開発を目指して、pH5 で解離し pH7 で再会合するように生体内巨大粒子ボルト(vault)を遺伝子工学で改変しようとした。野生型ボルトでは会合が弱く粒子内に薬剤を保持出来ないため、N 末端にロイシンジッパーモチーフを付加し数残基のグリシンリンカーも挿入し、安定で且つ自由度の高いボルト粒子作成を試みた結果、目的の組換えボルト粒子が従来の 10 倍の収率で得られた。しかし、ボルトが pH 依存で可逆的に開閉制御できるかどうかの検討は十分なされていない。はたしてボルトが pH 応答性 DDS 素材として適した物質であるかどうかという点の再検討も必要だと考えられる。

11．内藤　昌信　研究者 「Nano から Micro への精密自己組織化で拓く円偏光レーザーの創成」
評価結果
シクロデキストリンとピレン誘導体の包接錯体を発光分子素子とする強円偏光発光素子を創り、μm の垂直配向膜を媒質とする面発光型の円偏光有機レーザーシステム開発を目指した。本研究で、分子長を所望の長さに制御し円偏光発光性超分子を垂直に配向させる技術を確立したのは画期的成果として高く評価できる。また、リソグラフィのマスクパターン中で超分子クリック重合を行いパターンの高さで重合が停止することを利用して円偏光発光性有機薄膜の膜厚を制御するという興味深い知見も得た。ボトムアップとトップダウンの手法を活用して円偏光発光材料の分子設計―構造・機能相関を明らかにしたことは新しい合成化学手法として価値が高い。今後は所望の波長を選択的に増幅する有機円偏光レーザーデバイスの実証を望みたい。

12．永野　修作　研究者 「高分子ナノマテリアルの光アクティブ制御と機能探索」
評価結果
リアルタイムに動く"光アクティブ"高分子ナノマテリアル創出を目指し、ミクロ相分離構造を持つ光応答性液晶性高分子と、室温付近にガラス転移温度を持つ高分子からなるブロック共重合体を合成した。そして、1)この高分子が直線可視偏光でミクロ相分離構造の配向変化を繰り返す光アクティブ高分子であること、2)この配向変化が、分子→液晶相→ミクロ相分離構造へと階層的かつダイナミックに伝搬するメカニズムであること、3)液晶配向制御、ミクロ相分離構造の相変化など様々なナノ構造の"動き(モード)"が可能であること、等興味深い成果を挙げた。今後は、"光アクティブ"高分子の基本物性の理解を通じてナノ材料の新しい時空間制御手法として活用されることが期待される。

13．平野　愛弓　研究者 「ナノ形状設計に基づく人工神経細胞膜センサーの創製と機能発現」
評価結果
従来問題であった機械的脆弱性を克服してイオンチャネルアレイを作製し、創薬に応用できる効率よい薬物スクリーニングへ展開可能な人工神経細胞膜センサーの創製を目指した。主な成果として、1)トップダウン手法でSi_3N_4/Si基板中に微細孔を作り、この中で膜形成するとイオンチャネルを挿入した状態で機械的に強い二分子膜を構築できること、2)チップを多数個並列に並べたイオンチャネルアレイでチャネル電流を複数チップから同時に測定することに成功したこと、等があげられる。本研究の脂質ナノ構造と人工神経細胞膜を融合したセンサデバイスは、神経細胞と集積回路を融合した見事な成果である。この手法をモデルとして、今後、薬物スクリーニングのみならず、重要な次世代ナノバイオデバイスへ発展されるものと期待できる。

14．山西　陽子　研究者 「ナノ電気メスによる高精度細胞センシング・加工システム」
評価結果
高精度な細胞加工を実現するナノ電気メス―電界誘起型微細気泡・インジェクションメス(気泡メス)―の開発に成功した。この気泡メスを用いると熱侵襲ダメージなしに細胞を微細加工することが可能である。また、気泡界面に試薬・遺伝子・蛍光ビーズ等を入れると、一つの操作で加工とインジェクションを同時に行うことができるという優れた機能がある。マイクロ～ナノスケールで細胞の加工を電気メスで行う例はこれまでなく、極めてインパクトの強い成果である。本技術を応用すると、植物細胞等硬い細胞への遺伝子導入や腫瘍マーキングなど新たな界面技術の創製が可能となり、将来の実用化が期待される。本研究は、本領域の「ナノシステム」の大きな成果の一つとして高く評価できる。

15．横山　英明　研究者 「ブロックコポリマーテンプレートによる3次元ナノパーツの創成」
評価結果
　超臨界二酸化炭素流体中でブロックコポリマーを膨潤させ、様々な形態を示すナノ相分離構造（3次元ナノパーツ）を形成して、将来のナノロボットやナノマシンの部品とする基盤技術の構築を目指した。研究の結果、1）超臨界流体系で作られるブロックコポリマーの構造と動的変化の観測、2）球状・シリンダー・ラメラ・共連続構造などの相構造を鋳型としたナノパーツの作製、等の成果を得た。このような方法がナノロボットなどの基盤技術になるかという疑問はあるが、ブロックコポリマーの膨潤構造を鋳型とする方法によって、様々な表面と 3 次元形態を有するナノ材料が合成できることを示したことは高く評価される。しかし、その形成メカニズムは未解明であり、今後研究を発展させてユニークで有用な本反応系を一般的な系として位置付けてほしい。

16．和田　章　研究者 「創発的機能制御性ペプチドアプタマーの創成　ー生物機能性材料の創製と創薬基盤技術の開発へー」
評価結果
　ハイブリッド型リボソームディスプレイ法の検討により、「ペプチドーリボソームーmRNA 複合体」を安定化し、部位特異的にアミノ酸を導入した多数のペプチドライブラリーを構築して、目的のペプチドアプタマーを作成する技術を確立した。従来困難であった高親和性の抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー、金属酵素様活性ペプチドアプタマー、材料表面吸着性ペプチドアプタマー、標的応答型蛍光性ペプチドアプタマーなどの創成や、薬剤・標的タンパク質を迅速に探索・同定するシステムの開発など数々の目覚ましい成果を挙げた。これら新規ペプチド群とその創出システムは、独自性の高いすぐれた成果である。将来は、医療用マテリアルやセンシング・創薬支援システムへの応用につながる可能性があり、「さきがけ」にふさわしい先進的先導的研究と言える。

10．　評価者
　研究総括　長田 義仁　　独立行政法人理化学研究所　客員主管研究員

　領域アドバイザー（五十音順。所属、役職は平成 25 年 3 月末現在）

新井 史人	名古屋大学大学院工学研究科　教授
生田 幸士	東京大学大学院情報理工学系研究科　教授
居城 邦治＊1	北海道大学電子科学研究所 教授
今堀 博	京都大学物質-細胞統合システム拠点 教授
宇佐美 光雄	株式会社Ｒ＆Ｖ 代表取締役社長
江刺 正喜	東北大学原子分子材料科学高等研究機構 教授
須賀 唯知	東京大学大学院工学系研究科　教授
染谷 隆夫	東京大学大学院工学系研究科　教授
田口 善弘	中央大学理工学部 教授
中西 八郎	東北大学本部事務機構　監事（名誉教授）
原 正彦	東京工業大学大学院総合理工学研究科 教授
原田 慶恵	京都大学物質-細胞統合システム拠点 教授
三谷 忠興＊1	北陸先端科学技術大学院大学グリーンデバイス研究センター アドバイザー（名誉教授）
山下 一郎	奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 客員教授
渡辺 順次＊1	東京工業大学大学院理工学研究科 教授

＊1 平成 22 年3月～参画

（参考）
　件数はいずれも、平成25年3月末現在。

　（1）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	8	88	96
口　頭	313	143	456
その他	25	4	29
合　計	346	235	581

（2）特許出願件数

国　内	国　際	計
15	7	22

（3）受賞等

・田川　美穂

Oleg Gang, Fang Lu, Miho Tagawa

Brookhaven National Laboratory Patent Incentive Award　（Aug. 28th, 2012）

・藪　浩

日本化学会第60回進歩賞（H23.）

高分子学会平成22年度高分子研究奨励賞（H23.）

トーキン科学技術振興財団　奨励賞

IDW'11　Outstanding Poster Paper Award

・田中　秀明

平成 22 年度文部科学大臣表彰　若手科学者賞　受賞（H22.4）

大阪大学　飛翔 30 研究フェロー（若手研究トップ 30）受賞（H22.10）

大阪科学技術センター　第 1 回ネイチャー・インダストリーアワード特別賞　受賞（H24.11）

・内藤　昌信

NAIST 学術奨励賞（H23）

・山西　陽子

SII2010 Best Paper Award（H22.12）

日本機械学会　　JRM 表彰（H23.5）

SI2011 優秀講演賞（H23.12）

日本機械学会　Robomec 表彰（H24.5）

・横山　英明

高分子学会 Wiley 賞（H23）

（4）招待講演

国際　40 件

国内　62 件

別紙

「ナノシステムと機能創発」領域　事後評価実施　研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 （参加形態）	研　究　課　題　名 （研究実施場所）	現　職（平成 25 年 3 月末現在） （応募時所属）	研究費 （百万円）
梅津　光央 （兼任）	ナノ界面特異的バイオ接合分子を用いた多元ナノ結晶集合 （東北大学　大学院工学研究科）	東北大学大学院工学研究科：准教授 （同上）	40
田川　美穂 （専任→兼任）	DNAセルフアセンブリによるナノシステムの創製 （米国 BNL、及び、名古屋大学大学院工学研究科）	名古屋大学大学院工学研究科：准教授 （東京大学大学院総合文化研究科：特任研究員）	38
松村　幸子 （専任→兼任）	適応進化的に機能創発するナノキャリアの開発 （がん研究会　がん研究所）	がん研究会がん研究所：特任研究員 （癌研究会癌研究所：研究員）	43
藪　浩 （兼任）	メタマテリアルの自己組織的作製とナノリソグラフィーへの応用 （東北大学　多元物質科学研究所）	東北大学多元物質科学研究所：准教授 （同上：助教）	66
一木　正聡 （兼任）	ナノ格子制御による薄膜キャパシタ構造の作製と剥離・転写・接合によるナノ電子部品用実装技術の確立 （産業技術総合研究所 集積マイクロシステム研究センタ）	産業技術総合研究所　集積マイクロシステム研究センタ：研究チーム長 （東京大学大学院工学系研究科：准教授）	38
木戸秋　悟 （兼任）	細胞運動・機能を操作するナノ・マイクロメカニカルシステムの構築 （九州大学先導物質化学研究所）	九州大学先導物質化学研究所：教授 （同上）	41
木村　建次郎 （兼任）	ナノシステムの大規模集積化に向けた高速電子線露光法の開発 （神戸大学　大学院理学研究科）	神戸大学大学院理学研究科：准教授 （同上：講師）	46
齊藤　健二 （兼任）	ナノ細線状半導体光触媒システムの開発 （東京理科大学理学部、及び、新潟大学工学部）	新潟大学若手研究者育成推進室：テニュアトラック助教 （東京理科大学理学部：助教）	39
高見澤　淳 （専任）	ナノ構造を利用した高感度質量分析総合システムの開発 （首都大学東京　大学院 理工学研究科）	さきがけ専任研究員 （首都大学東京　大学院 理工学研究科：特任助教）	39
田中　秀明 （兼任）	生体粒子 vault の立体構造情報を基盤とした新規 DDS の戦略的開発 （大阪大学　蛋白質研究所）	大阪大学　蛋白質研究所：助教 （同上）	39
内藤　昌信 （兼任）	Nano から Micro への精密自己組織化で拓く円偏光レーザーの創成 （物質・材料研究機構 環境・エネルギー材料部門）	物質・材料研究機構　環境・エネルギー材料部門：主幹研究員 （奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科：助教）	53
永野　修作 （兼任）	高分子ナノマテリアルの光アクティブ制御と機能探索 （名古屋大学　大学院工学研究科）	名古屋大学大学院工学研究科：准教授 （同上：助教）	39
平野　愛弓 （兼任）	ナノ形状設計に基づく人工神経細胞膜センサーの創製と機能発現 （東北大学　大学院医工学研究科）	東北大学大学院医工学研究科：准教授 （同上）	48

山西　陽子 （専任→兼任）	ナノ電気メスによる高精度細胞センシング・加工システム （名古屋大学　大学院工学研究科）	名古屋大学大学院工学研究科：准教授 （東北大学大学院工学研究科：助教）	40
横山　英明 （兼任）	ブロックコポリマーテンプレートによる3次元ナノパーツの創成 （東京大学大学院　新領域創成科学研究科）	東京大学大学院 新領域創成科学研究科：准教授 （同上）	39
和田　章 （兼任）	創発的機能制御性ペプチドアプタマーの創成　ー生物機能性材料の創製と創薬基盤技術の開発へー （理化学研究所　基幹研究所）	理化学研究所基幹研究所：専任研究員 （同上：研究員）	39

研 究 報 告 書

「ナノ界面特異的バイオ接合分子を用いた多元ナノ結晶集合」

研究タイプ:通常型
研究期間: 平成 20 年 10 月～平成 24 年 9 月
研 究 者: 梅津 光央

1. 研究のねらい

本研究は、研究者が独自に生み出した無機材料結晶面を自発的に識別し結合できるペプチド・抗体分子断片を構成要素として、積み木細工様式で自在なバイオナノ接合分子をペプチド・蛋白質工学的に設計する。そして、単純な混合操作のみで、ナノレベルで無機ナノ粒子間を自在に接合できる技術を開発する。

2. 研究成果

(1)概要

様々な無機・有機材料でナノ化が進んでいる材料工学分野では、ただ単にサイズ微細化だけでなく界面設計されたナノ結晶の合成が可能になりつつあり、その形状に基づいてナノ結晶粒子を自己組織化させることによって機能創発させる提案がある。研究者は、10 残基程度のアミノ酸からなるペプチド分子が、特定の無機材料表面に選択的に結合できる報告に着目し、ペプチド分子よりも分子認識機能と結合力に優れている抗体蛋白質を用いて無機材料表面に親和性を示す分子を創出できれば、ナノ領域でナノ結晶粒子間を自発的に接合させる接合分子を設計できると考えた。そこで、本研究では、特定無機材料表面へ結合する抗体の作製に対する CAnIGET 法の汎用性を検討すると共に、ドメイン組換え蛋白質工学を用いて二重特異性分子を設計することによって、目的の無機材料表面同士を自発的に接合させるバイオ接合分子としての抗体分子の新規な機能創発を目指した。

そのために、まず、金表面結合性ペプチドおよび酸化亜鉛表面結合性ペプチドを各々ラクダ抗体 cAbBCII-10 の重鎖可変領域断片(VHH)の CDR の 1 箇所に移植し、その後、両ペプチド移植 VHH 中の移植に用いなかった他の CDR をファージ提示法により最適化することによって、酸化亜鉛および金に高親和に結合する VHH 断片の取得に成功した。これらの抗体断片は金, 酸化亜鉛ナノ粒子の表面に強く結合し、それらナノ粒子を水溶液中で安定的に分散させた。そして、両 VHH 断片をペプチドリンカーで架橋した二重特異性抗体を金と酸化亜鉛ナノ粒子の分散液に加えることによって両粒子間を自発的に架橋できることを証明し、材料表面に高親和な抗体を用いて接合分子を設計すれば、異種なナノ材料間も容易に架橋できることを示した。

（2）詳細

研究テーマ A「ペプチド移植と進化工学操作を組み合わせた無機ナノ結晶結合性抗体断片取得法の確立」

研究者は、多機能セラミックスである酸化亜鉛を対象に、材料結合性ペプチドをラクダ抗体 cAbBCII-10 の抗原結合部位(CDR)の一部に移植し、その後、進化工学を用いることによって、ペプチドの数十倍の強さで酸化亜鉛に結合する抗体の作製に成功している(CAnIGET 法)。そこで、この手法の汎用性を示すために、酸化亜鉛と金に結合性を示す抗体の作製を行った。

酸化亜鉛については、研究者がすでに取得している酸化亜鉛結合性ペプチドをラクダ抗体 cAbBCII-10 の重鎖可変領域断片(VHH)のCDRの 1 箇所に移植し、金については、すでに報告のある金表面結合性ペプチドを移植した。その後、両ペプチド移植VHHは、移植に用いなかった他のCDRをファージ提示法により最適化した。その結果、両VHH共に材質特異性を示し(図 1,2)、平衡解離定数K_d値が 9nM (酸化亜鉛), 150 nM(金)を示す抗体断片ZnO 4F2 VHH 及びAu E32 VHHを取得することに成功した。

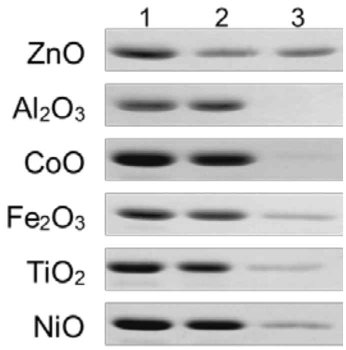


図 1. SDS-PAGE を用いた ZnO 4F2 VHH の材質特異性試験. 4F2 VHH を含む溶液(1)を各無機粒子と混合後遠心分離を行い(2:上清画分)、沈殿画分の粒子に結合している VHH を変性剤溶液にて溶出(3).

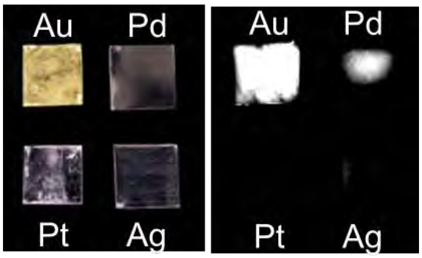


図 2. Au E32 VHH の材質特異性試験. E32 VHH を含む溶液へ各金属基板を浸した後洗浄し、基板に残存したVHH をペルオキシダーゼを用いた酵素抗体法により検出.

研究テーマ B「無機材料結合性抗体断片による無機ナノ粒子の凝集抑制効果」

無機ナノ粒子は、単位重量当たりの表面積が非常に大きいため、粒子間の相互作用が大きく、溶液中での凝集性が問題になることが多い。そこで本研究では、無機材料に高親和な抗体断片を利用して、ナノ粒子の凝集抑制効果を検討した。

金ナノ粒子は低塩濃度水溶液環境下では凝集せずに分散し 520～550 nm 付近にプラズモン吸収を持つ。その水溶液は赤色透明であるが、金ナノ粒子はわずかなイオン強度の増加で凝集し、その凝集はプラズモン吸収帯を長波長シフトさせ、水溶液が紫色へ変化していく。そこで、この金ナノ粒子水溶液に金表面に高親和な抗体断片 E32 VHH を添加することによって、高塩濃度での金ナノ粒子の分散安定化を評価した(図 3)。その結果、10 mMリン酸緩衝水溶液(pH7.5) 中の 0.1 nM 金ナノ粒子(粒径 20 nm)に NaCl を加えたところ、

40 nM E32 VHH が存在している場合、1 M の NaCl 濃度存在下でも、金ナノ粒子はある程度高い分散性を示した。これは、金表面に高い親和性を示す AuE32 VHH が金ナノ粒子表面をコーティングしたため高いイオン強度環境下でも蛋白質層が解離せず金ナノ粒子表面の

電気二重層が維持されたことを示す。

次に、抗体が無機ナノ粒子を粉末から高分散させ得るかを評価するため、すでに取得済みの酸化亜鉛結合性抗体(4F2 VHH)を含む水溶液中に酸化亜鉛ナノ粒子粉末を添加し、動的光散乱を用いて水溶液中で分散した酸化亜鉛ナノ粒子の粒子径を評価した。その結果、水溶液中の粒子径は、ナノ粒子単体の粒子径とほぼ同じであり、無機材料表面に高親和な抗体断片は、粒子凝集体から粒子を分散させ得ることも分かった。

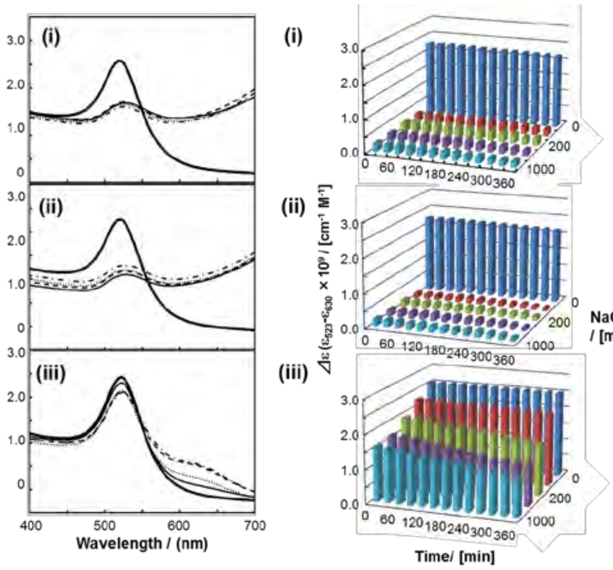


図 3. 様々な塩濃度下での金ナノ粒子のプラズモン吸収スペクトル(a)と経時変化(b)
(i) 蛋白質無, (ii) 40 nM BSA, (iii) 40 nM E32 VHH

研究テーマ C「二重特異性抗体を利用した異種ナノ材料間接合」

無機材料結合性抗体を用いて異種材料間を架橋する接合分子として応用するため、まず初めに、金結合性抗体 E32 VHH の C 末端のみにビオチン分子を結合させた後にストレプトアビジンと混合することにより、ストレプトアビジンを核とした VHH の 4 量体を形成させた。そして、その VHH 4 量体を用いて金ナノ粒子間の架橋を試みるため、金ナノ粒子分散水溶液に滴下していったところ、VHH 4 量体濃度が 40 nM 以上の濃度で金ナノ粒子が凝集し、金表面に高親和な抗体分子を用いて接合分子を設計することによって、混合操作のみでナノ粒子間を架橋できることが分かった(図 4)。

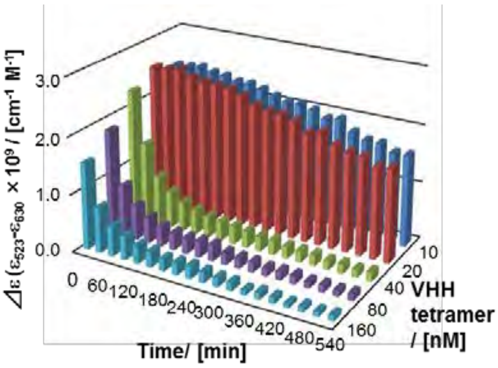


図 4. 様々な E32 VHH 4 量体濃度での金ナノ粒子のプラズモン吸収の経時変化

次に、異種ナノ材料間での架橋を試みるために、酸化亜鉛結合性抗体 4F2 VHH と金結合性抗体 E32 VHH をリンカーで繋いだ二重特異性抗体 4F2-E32 VHH dimer について粒子間架橋を評価した。超音波処理した粒子径 100 nm の球状酸化亜鉛粒子に金ナノ粒子を添加したところ、金ナノ粒子は凝集せずに溶液中を分散していたが、二重特異性抗体 4F2-E32 VHH dimer を同時に添

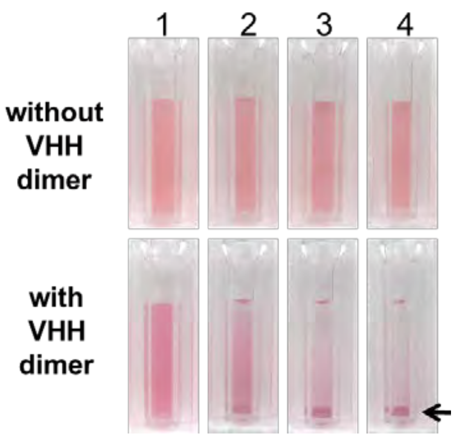


図 5. 酸化亜鉛と金ナノ粒子混合液に 4F2-E32 VHH dimer を添加した時の経時変化
1. 0 min, 2. 60 min, 3. 120 min, 4. 180 min

加した時は、金ナノ粒子は、添加直後から凝集し始め沈殿し、材料表面に高親和な抗体を用いて接合分子を設計すれば、異種なナノ材料間も容易に架橋できることが示された(図 5)。

3.　今後の展開

2000 年に無機材料表面に結合性を示すペプチドが発見されて以来、この分子は異種材料間を接合させる架橋ツールとして注目されてきた。しかし、ナノ領域での接合ツールとしては材料表面への結合力が不十分なことが多く、かつ、分子構造として剛直性に欠けるため、結合方向性を持たせる点にも課題があった。本研究では、ペプチドよりも分子認識機能が優れており、かつ、結合方向性に剛直性がある抗体分子に着目し、ラクダ抗体 cAbBCII-10 の重鎖可変領域断片へ無機材料結合性ペプチドを移植し、その後、進化工学操作を適応することによって、無機材料表面へ高親和な抗体を迅速に作製する手法(CAnIGET 法)を確立した。その結果、無機材料表面へ高親和な分子を用いることで、異種材料間の接合分子としての操作性を格段と向上させることができ、ナノ領域での接合分子を設計することが可能であることが分かった。この成功により、抗体分子は分子標的薬としてだけでなく、材料工学において、ナノ世界での接合ツールとなる機能分子であることを実証できた。本研究で開発したナノ粒子間接合プロセスは、材質に依存しないため、様々なナノ粒子に適応でき、今後、ナノ粒子配列体と機能発現との相関を明らかにするアセンブリ技術ツールとして期待できる。

4.　自己評価

当初の目的通りに、単純な混合操作のみで、自在に無機ナノ粒子間を自在に接合できるプロセス技術を開発することに成功した。本達成は、世界的に報告例がほとんどない無機材料表面に選択的結合できる抗体を迅速に作製できる手法を確立できたことが大きい。反省点として、本さきがけ領域が掲げる「ナノシステムと機能創発」の「機能創発」について曖昧な成果になってしまったことがある。今後の課題として、本プロセスを利用して作製したナノ粒子アセンブリ体の機能発現に取り組んでいきたい。

5.　研究総括の見解

研究者が独自に生み出した無機材料結晶面を自発的に識別し結合できるペプチド・抗体分子断片を構成要素として、自在なバイオ-無機ナノ接合分子をペプチド・蛋白質工学的に設計し、接合できる技術を開発することを目標とした。

まず、多機能セラミックスである酸化亜鉛を対象に、結合性ペプチドをラクダ抗体 cAbBCII-10 の抗原結合部位(CDR)の一部に移植し、その後、進化工学を用いることによって酸化亜鉛に結合する抗体の作製に成功した。また、金結合性抗体 E32 VHH の C 末端のみにビオチン分子を結合させた後にストレプトアビジンと混合することにより、自在に金ナノ粒子間を接合できるプロセス技術を開発することにも成功した。

以上の研究は、世界的に報告例がほとんどない独創的な構想と成果であり、無機材料表面に選択的結合できる抗体を迅速に作製する手法を確立したことは、「さきがけ」研究らしい先導的創造的研究であると高く評価できる。

６． 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. T. Hattori, M. Umetsu, T. Nakanishi, S. Sawai, S. Kikuchi, R. Asano, and I. Kumagai, A High-Affinity Gold-Binding Camel Antibody: Antibody Engineering for One-Pot Functionalization of Gold Nanoparticles as Biointerface Molecules, Bioconjugate Chemistry, 2012, 23, 1934-1944.
2. T. Togashi, N. Yokoo, M. Umetsu, S. Ohara, T. Naka, S. Takami, H. Abe, I. Kumagai, and T. Adschiri, Material-binding peptide application -ZnO crystal structure control by means of a ZnO-binding peptide-, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111, 140-145.
3. T. Hattori, M. Umetsu, T. Nakanishi, T. Togashi, N. Yokoo, H. Abe, S. Ohara, T. Adschiri, and I. Kumagai, High Affinity Anti-inorganic Material Antibody Generation by Integrating Graft and Evolution Technologies. POTENTIAL OF ANTIBODIES AS BIOINTERFACE MOLECULES, The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285, 7784-7793.
4. N. Yokoo, T. Togashi, M. Umetsu, K. Tsumoto, T. Hattori, T. Nakanishi, S. Ohara, S. Takami, T. Naka, H. Abe, I. Kumagai, and T. Adschiri, Direct and Selective Immobilization of Proteins by Means of an Inorganic Material-Binding Peptide: Discussion on Functionalization in the Elongation to Material-Binding Peptide, The Journal of Physical Chemistry B, 2010, 114, 480-486.
5. M. Umetsu, T. Nakanishi, R. Asano, T. Hattori, and I. Kumagai, Protein-protein interactions and selection: generation of molecule-binding proteins on the basis of tertiary structural information, FEBS Journal, 2010, 277, 2006-2014.

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

1. 梅津 光央，熊谷 泉，ボトムアップな粒子アセンブリツールとしてのバイオ分子，セラミックス 47, 616-619, (2012)
2. 梅津 光央，渡邊 秀樹，熊谷 泉，材料ナノ表面を抗原とする抗体ーナノ世界の糊としてー，バイオサイエンスとインダストリー, 68, 39-43 (2010)
3. 熊谷 泉，梅津 光央，ナノ材料も抗原？ ポリマー・金属表面構造を識別できる抗体分子，月刊「化学」, 65, 66-67 (2010)

研 究 報 告 書

「DNA セルフアセンブリによるナノシステムの創製」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成20年10月～平成25年3月
研 究 者： 田川 美穂

1． 研究のねらい

ナノテクノロジーにおける重要課題の一つとして、ナノ部品をボトムアップ的にアセンブリするためのプログラマブルな技術の開発がある。ナノ粒子等、ナノメートルサイズの物質では、バルク材料と異なる特異的な性質を示すものがある。それらの特異的な性質を利用するためには、それらナノ材料をナノ～メゾスコピックスケール、あるいはコロイド次元と呼ばれるスケール/次元でどう組み立てるかが鍵となる。これは、ナノ材料の特異的な性質が、これらのスケール/次元における構造と深く関係しているからである。本研究では、DNA 分子あるいは DNA ナノ構造体（数本の DNA 分子から成るナノ構造体）を用いたナノ材料の構造制御の可能性を追求し、ボトムアップナノテクノロジーの一手法を確立することを目指す。

「DNA ナノ構造体ガイドのDNA被覆ナノ粒子結晶化の研究（研究テーマA、B）」では、ナノ粒子を DNA 分子及びDNAナノ構造体を利用して二次元、三次元の秩序的な構造へとプログラマブルにアセンブルする方法の開発を目指す。ナノ粒子等のナノサイズのユニットは、それ自身が特異な物性を示すだけでなく、それらをどのように組み立てるかによって更に面白い物性が生まれる。本研究では、ナノ粒子間の相互作用と結合を DNA 分子及び DNA 構造体で正確に制御し、他の方法では成し得ない構造と機能を創製することが目的である。

「DNA タイルのセルフアセンブリの研究（研究テーマ C-E）」では、DNA タイル（数本の DNA 分子で作られた方形状のナノ構造体）をセルフアセンブリして構築した DNA タイルアレイを足場として、ナノ部品をプログラマブルにアセンブリし、トップダウン的な微細化技術の限界を超える技術の開発を目指す。これまでの先行研究における DNA 構造体は、熱で簡単に壊れ、また外力によって簡単に変形してしまうことから、ボトムアップナノテクノロジーの手法として用いるには問題があった。本研究では、ナノ部品をアセンブリするための足場として十分に頑丈な、熱や外力に強い DNA 構造体を構築する。また、従来の DNA セルフアセンブリ技術では実現困難であった「非周期パターン（非周期アドレス）の大規模化：トップダウン技術と融合できるだけの大きさをもつ非周期パターンの足場の構築」にも挑戦する。非周期パターンは非周期構造体で作るという従来の考え方に囚われずに、生体が行っている複雑な構造をシンプルに作成する方法（タンパク合成方法）に習い、非周期パターンを周期構造体で作るという発想の転換を行う。

2． 研究成果

（1）概要

ナノ粒子表面に DNA を結合させてコード化すると、DNAの相補性により粒子間の相互作用が制御され、超構造を形成する。DNAの長さや配列、ナノ粒子の大きさを変えることで、ナノ粒子超構造の結晶構造を変えることができる。しかしこの方法ではDNAの結合手の数を制御できないため、作成できる結晶構造に限りがある。そこで本研究では、ナノ粒子間の空間配置を

より精密に制御し、超構造制御の自由度を広げようと、「高融点のDNAナノ構造体を介在させたDNA被覆ナノ粒子（DNA-NP）の結晶化」という新しい方法を考え出した。DNAナノ構造体の設計自由度及びプログラマビリティを利用して結合の手の数や方向、距離、結合力等を制御することにより、従来の方法よりもさらに精密な構造制御を行った。高融点の DNA 正四面体を介在させて DNA 被覆金ナノ粒子（DNA-AuNP）を結晶化すると、ダイヤモンド構造が形成されることを示した。

DNA-AuNP の二次元結晶化の研究では、三次元で成功している DNA-AuNP の結晶化を二次元結晶化へ拡張するために、基板との静電相互作用を用いた。電荷をもつ基板上に DNA-AuNP を吸着させた状態で拡散し、DNAの相補性を利用することにより、ナノ粒子の二次元超構造の制御を精密に行うことに成功した。

また、従来のDNA構造体は熱や外力に弱く、壊れやすかったため、例えばマイクロサイズまで成長するDNAタイルアレイを形成しても、それをさらにナノ材料をアセンブリするためのテンプレートとして利用するのは難しかった。本研究では、二次元DNAタイルアレイの構造安定化及び耐熱化にも取り組み、ナノ材料をアセンブリするためのテンプレートとして利用できる程丈夫な構造体を作成することに成功した。二次元DNAタイルアレイの構造安定化に成功したことで、周波数変調検出型原子間力顕微鏡（FM-AFM）による溶液中高分解能測定に成功し、DNA二重螺旋を直接的に画像化することができた。

タンパク合成の方法に習った DNA タイルによる二次元非周期アドレスのアセンブリの研究では、DNA タイルアレイの大きさを決めるルーラーDNA を用いることにより$6 \times N$の固定サイズの DNA タイルアレイを形成し、更にそのタイルアレイ上に二次元アドレス空間を配置した。

（2）詳細

研究テーマ A「高融点のDNAナノ正四面体を介在させたDNA被覆金ナノ粒子（DNA-AuNP）の三次元結晶化」

四本の対称的な結合手を持つ高融点の DNA 正四面体を介在させて DNA-AuNP を結晶化することにより、DNA-AuNP のダイヤモンド構造を作ることに成功した。ダイヤモンド構造は、DNA-AuNP のみの結晶化では作成できなかった構造である。

研究テーマ B「DNA被覆金ナノ粒子（DNA-AuNP）の二次元結晶化」

基板との相互作用を利用して、DNA-AuNP の二次元結晶化を行った。脂質二重膜、マイカ、ポリマーコートのシリコン基板上で DNA-AuNP を表面拡散し、温度、イオン濃度等の条件を最適化することにより、二次元方向にのみ成長する結晶化条件を見出すことに成功した。

研究テーマ C「光クロスリンクによる二次元 DNA タイルアレイの構造安定化」

ナノ材料をアセンブリするためのテンプレートとして利用できる二次元DNA構造体を作成した。数本のDNA一本鎖から成るDNAタイルを結晶化することにより、マイクロサイズの二次元タイルアレイが形成される。予めＤＮＡタイルの結合部に光感受性分子の 3-cyanovinylcarbazole nucleosides (CNVKs)を導入しておき、結晶化後にUV光を照射することによってタイル同士を結合した。従来のDNA構造体は軟らかく、外力や熱で簡単に壊れてしま

っていたが、本研究の光クロスリンク反応により安定化されたDNAタイルアレイは70度まで熱をかけても壊れず、また外力に対しても丈夫であることがわかった(図1)[1]。

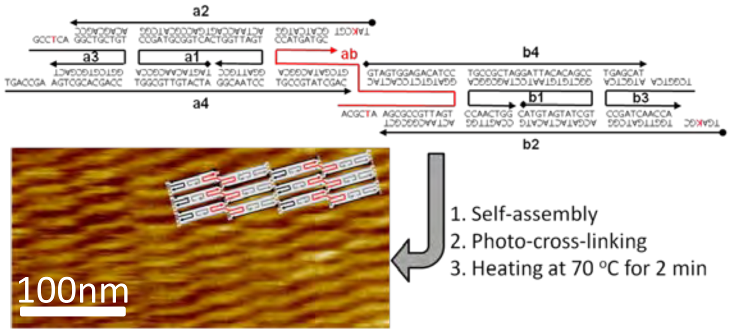


図1. 70度まで加熱しても壊れないDNAタイルアレイ

研究テーマ D「周波数変調検出型原子間力顕微鏡(FM-AFM)による構造安定化後の DNA タイルアレイの溶液中高分解能測定」

FMーAFMは、振幅変調型原子間力顕微鏡(AMーAFM)に比べ高分解能の像が得られることが無機材料等の固い材料表面測定で知られていたが、バイオ分子等の軟らかい材料への応用は難しかった。DNA構造体の測定においては、測定中にカンチレバーのタッピングダメージで構造体が壊れてしまう現象が起き、高分解能の測定は難しかった。本研究で光クロスリンク反応によりDNAタイルアレイを安定化させたことにより、FMーAFMの測定に耐えうる強度を持たせることに成功し、これまでにない高分解能測定が可能となった。図2に示す溶液中FMーAFM像は、DNA二重螺旋の主溝 (major groove) と副溝 (minor groove) までも画像化することに成功している(論文投稿中)。

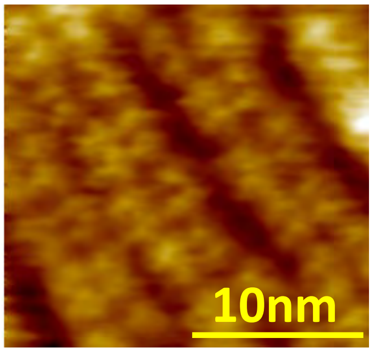


図2.DNAタイルアレイのAFM像

研究テーマ E「タンパク合成方法に習った DNA タイルの二次元プログラマブルアセンブリ」

タンパク合成では、mRNAにコードされた情報に従ってアミノ酸の配列が決まる。そしてアミノ酸の一次元配列が決まると自然と二次元の構造(フォールディングによる二次構造)も決まる。本研究では、一次元の配列を決めるだけで二次元の構造が決まるこのタンパク合成の方法に習い、DNAタイルのプログラマブルセルフアセンブリを行った。タンパク合成ではアセンブリのスケールを決めるルーラー分子はmRNAであるが、本研究ではmDNAをルーラー分子として、DNAタイルが一次元方向へどの順序で幾つつくかを制御した。図3aに本研究の概念図を示す。一次元目のmDNA1 で 6 種類のアドレスタグ配列を並べた幅 92 nmのDNAタイルのストリングを二次元目のmDNA2 を用いて並べる実験を行い、一次元方向に 92 nmの幅をもつ固定サイズの周期的DNAタイルアレイ基板上に二次元の非周期アドレスタグをアセンブリした(図3b)[2]。非周期アドレスタグはそれぞれ固有の塩基配列(正規直行配列)の一本鎖DNAであり、この正規直行配列と相補的な配列を結合させたナノ材料を、このアレイ上でプログラマブルに配置することを考えている。

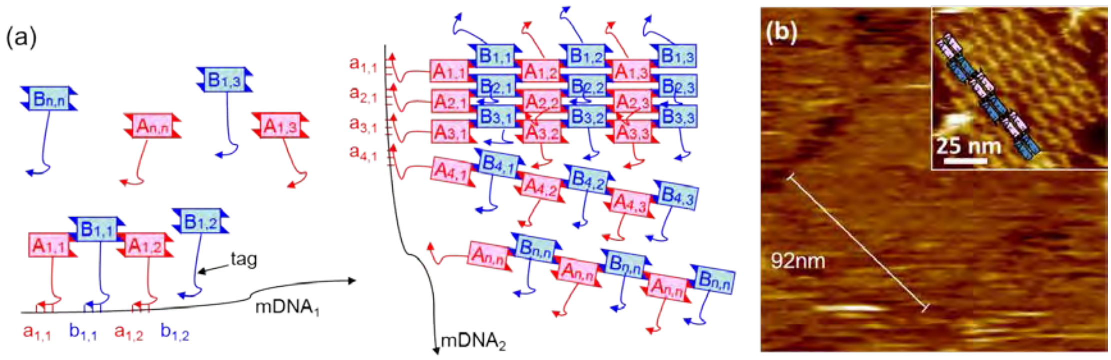
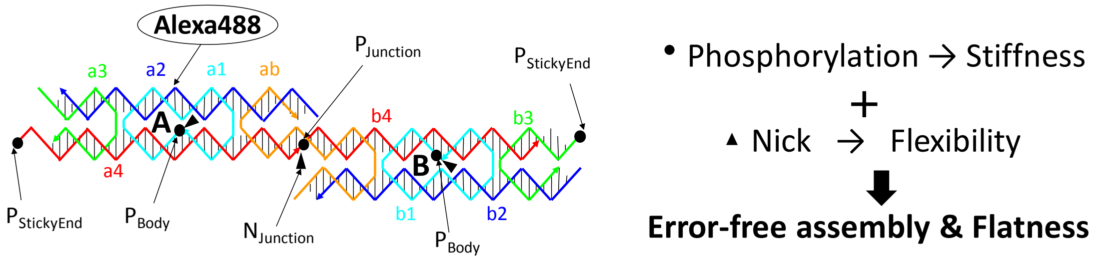


図3.（a）mDNAを用いたDNAタイルアセンブリの概念図。（b）非周期アドレスを持つ固定サイズのDNAタイルアレイのAFM像

研究テーマ F「DNA 末端リン酸化が DNA タイルアレイのアセンブリに及ぼす効果」

DNA末端リン酸化が、DNAタイルアレイのアセンブリエラーを低減し、ナノスケールの規則的な構造を維持するために重要であることを発見した。またDNAタイルのどの部位をリン酸化するかにより、その効果が異なることも発見した[2]。蛍光顕微鏡及び原子間力顕微鏡により、マイクロ・ナノ両スケールで構造を観測し、リン酸化部位とアセンブリ効率の関係を明らかにした（図4、論文投稿準備中）。



$P_{junction}$	+	+	−	−	−	+	+	−	−
P_{body}	+	−	+	−	−	+	−	+	−
$P_{StickyEnd}$	+	−	−	+	−	−	+	+	−
$N_{junction}$	+	+	+	+	+	+	+	+	−
1 μm × 1 μm									
High resolution									
Fluorescence microscopy (Scale bar= 20μm)									

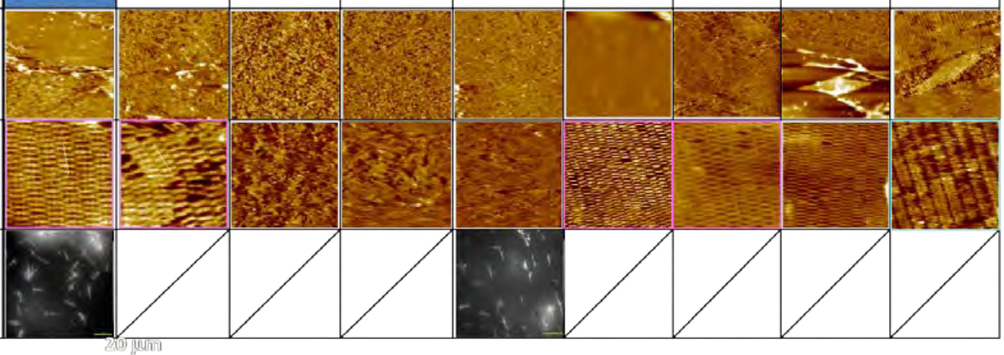


図4. DNAタイルアセンブリにおけるDNA末端リン酸化の効果

3.　今後の展開

光学的、触媒的、電気的、電磁的に特異な性質をもつナノ粒子の応用は学術的にも工業的にも期待が大きいため、それらをどう組み立てるか、またその超構造をどう制御するかは重要課題である。本研究ではその課題を解決するための一手法としてDNA分子及びDNAナノ構造体を利用する方法が有効であることを示した。三次元結晶化は、例えばコロイドフォトニック結晶、メタマテリアル、超高効率量子ドット太陽電池、分子準結晶の実現手段として有効である。また、二次元結晶化は、バイオセンサ、例えばナノロッドやナノチューブ、または精密な微結晶配向制御が必要な圧電素子セラミクス結晶成長のための種結晶テンプレートとしての利用が期待できる。また、二次元結晶化方法を応用して三次元方向へ異種粒子をプログラマブルに積層する技術が開発されれば、分子ナノエレクトロニクスへの応用も考えられる。

本研究の三次元結晶化方法は、DNA 構造体を介在させることにより、他の方法に比べナノ粒子超構造制御の精度と自由度が飛躍的に高いことが特色であるだけでなく、結晶化後に更に他の粒子や分子を結合させられるという利点もある。二次元結晶化においても、今後DNAナノ構造体を介在させた構造制御の研究を行う予定である。

本研究のもう一つの特色は、ナノ粒子以外のナノ材料への応用可能性である。本手法では金ナノ粒子をはじめ様々な金属粒子や半導体粒子等、種類を問わず同じ法則で結晶化できるが、その他にも、球形以外のナノ粒子、フラーレン、更にはタンパク分子等の生体分子も本研究の法則を応用して結晶化できる可能性がある。将来的には、ボトムアップナノファブリケーション技術としても期待できる。また、結晶化困難なタンパク分子の結晶化手法へ応用して X 線構造解析に役立てたり、生体反応に関与する分子を本手法で結晶化し、方向の揃った状態でリアルタイム X 線解析する等、バイオ分野への応用も期待できる。

4.　自己評価

「DNA ガイドのナノ粒子結晶化」及び「DNA タイルのセルフアセンブリ」という二つの方向から、DNA セルフアセンブリがボトムアップナノファブリケーションの一手法として有効であることを示せた。どの研究テーマも、ほかに類似研究の無い独創的で挑戦的な課題であったが、すぐに研究成果が出るかどうかわからない新しい分野開拓に挑戦できたのも、さきがけのバックアップがあったからこそである。特に高融点のDNAナノ構造体を介在させた DNA 被覆ナノ粒子の結晶化の研究は、立ち上げにかなり苦労したが、自分の研究分野にナノ粒子実験や小角散乱等、未経験の分野を取り込むことにより、これまでのナノ材料アセンブリやDNAナノテクノロジーの手法では不可能であったナノ材料の超構造制御を飛躍的に発展させることに繋がった。このように、私にとってさきがけ期間は研究者としての土台を固める期間であり、すぐに成果の出る課題ではなく、敢えて成果に繋がるかどうかわからないテーマに挑戦してきたため、さきがけ期間に成果として間に合わなかった部分が多々ある（投稿中論文１本、投稿準備中３本）。ただ、テーマの独創性や研究手法の多様さ等、普通以上にしっかりした大きな土台を作ることができたため、今後のアウトプットに是非注目して頂きたい。具体的には、さきがけ期間中に間に合わなかった論文掲載や研究途中のテーマの完成、そしてさきがけ期間中に立ち上げた独自の分野の今後の発展である。

研究の本筋とは関係ないが、未知の研究分野を開拓するために渡米し、所属機関にブルックヘブン国立研究所を選んだことが本研究の「DNA 被覆ナノ粒子のダイヤモンド構造構築」の成果

に繋がった。三年間滞在したブルックヘブン国立研究所では、さきがけ研究に対する契約がなかなか成立せず、長期間にわたって関係各所に交渉したり、使用できないさきがけ予算の代わりに別の財源を確保するため、研究テーマを変更せざるを得なかったりと、大変な苦労を経験したが、この苦労なくして本成果は生まれなかった。

5. 研究総括の見解

ナノ材料の特異的な性質は、スケール/次元における構造と深く関係しており、それゆえにバルク材料と異なる特異的な性質を示すものがある。本研究は、DNA 分子あるいは DNA ナノ構造体(数本の DNA 分子から成るナノ構造体)を用いたナノ材料の構造制御の一手法を確立することを目指している。そのため、①「DNAナノ正四面体を介在させたDNA被覆金ナノ粒子(DNA-AuNP)の三次元結晶化」 ②「DNA被覆金ナノ粒子(DNA-AuNP)の二次元結晶化」 ③「光クロスリンクによる二次元 DNA タイルアレイの構造安定化」 ④「FM-AFM による DNA タイルアレイの溶液中測定」 ⑤「DNA タイルの二次元プログラマブルアセンブリ」 ⑥「DNA 末端リン酸化がアセンブリに及ぼす効果」という 6 課題に取り組んだ。その結果、DNA 被覆金ナノ粒子(DNA-AuNP)を結晶化するとダイヤモンド構造が形成されること、二次元DNAタイルアレイの構造安定化及び耐熱化、DNA 二重螺旋を直接的に画像化、等々興味深い成果をおさめた。

ナノ粒子をどう組み立てどう制御するかは重要であり、本研究はそのための一手法としてDNA分子及びDNAナノ構造体を利用する方法が有効であることを示した。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Miho Tagawa, Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto, Akira Suyama. "Stabilization of DNA nanostructures by photo-cross-linking". Soft Matter vol.7, 22, pp10931-10934, 2011.
2. Miho Tagawa, Tadashi Ohtani, Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto, Akira Suyama. New photoligation method and strand phosphorylation to construct improved fully-addressed DNA scaffolds. Proceedings of 6th Annual Conference on Foundations of Nanoscience: Self-Assembled Architectures and Devices (FNANO09) 2009, pp41-42, Utah, USA.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

1.
発 明 者: Oleg Gang, Fang Lu, Miho Tagawa
発明の名称: Rational Assembly of Nanoparticle Superlattices with Designed Lattice Symmetries
出 願 人: Brookhaven National Laboratory
出 願 日: 2012/1/18
出 願 番 号: 61/587,786

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表：

.1．（ポスター）Miho Tagawa, Tadashi Ohtani, Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto, Akira Suyama. New photoligation method and strand phosphorylation to construct improved fully-addressed DNA scaffolds. Proceeding of The 6th Annual Conference on Foundations of Nanoscience. April 20th, 2009, Utah.

2．（依頼講演） 田川美穂, 陶山明, Oleg Gang. DNAセルフアセンブリによるナノシステムの創製. 第 58 回高分子討論会. 2009 年 9 月 16 日, 熊本.

3．（招待講演） Miho Tagawa. DNA-covered nanoparticle assembly mediated by DNA nanostructures. Japan-Netherlands Symposium on Crystal Growth -Theory and in situ Measurements-. July 24th, 2012, Sendai, Japan.

4．（口頭発表）Miho Tagawa, Kevin Yanger, Oleg Gang. Gold Nanoparticle Assembly mediated by DNA Nanostructures. The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2012). Nov. 17th, 2012, Nagoya, Japan.

5．（受賞）Aug. 28th, 2012. Brookhaven National Laboratory Patent Incentive Award

Oleg Gang, Fang Lu, Miho Tagawa. “Rational Assembly of Nanoparticle Superlattices with Designed Lattice Symmetries”. Serial No. 61/587,786. Filed January 18, 2012.

研　究　報　告　書

「適応進化的に機能創発するナノキャリアの開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成２０年１０月～平成２５年１月
研　究　者：　松村　幸子

１．　研究のねらい

ナノキャリアはナノテクノロジーの応用の出口として期待されている分野の一つであり、特に、がんの予防、診断、治療への応用が期待されている。本研究では、がんを標的として、腫瘍環境を利用して分子や粒子の集合状態をコントロールし、機能を生み出すナノキャリアの開発を目指した。ナノキャリアは薬物やイメージング剤を体内で効果的に運搬し機能させるためのものであるが、そのサイズは、性能を決める重要な因子の一つである。ナノサイズの物質は、毛細血管を通ることができ体内を循環できるが、サイズの違いによって、臓器や組織、がんへの浸透性や集積性、排出されやすさなどが異なる。その上で、キャリアの表面電荷や修飾分子などによって体内挙動が変化する。したがって、キャリアが特定のサイズや形態に固定されず、体内で変化することができれば、効率の良いデリバリーや新しい機能を生み出すことが可能になる。本研究ではキャリアのサイズを制御することに焦点をあて、二つのアプローチから研究を進めた。

一つ目は抗がん剤キャリアを目指した、ナノ粒子を集合化させて腫瘍部位で大きくなるキャリアの開発である。小さい粒子はがん組織への浸透性に優れている反面、排出もされやすい。そこで、小さい粒子を腫瘍環境に応答して大きくすることで滞留性を向上させ、薬物の高濃度化や長期放出を可能にするキャリアの開発を目指した。

二つ目のアプローチは、もっと小さいペプチド分子の自己集合を利用した、磁気共鳴画像（MRI）の造影剤キャリアの開発である。小分子ペプチドは、分子設計によってナノサイズの集合体を非共有結合で形成させることができ、環境応答性や機能性分子も組み込むことが可能である。非共有結合による集合体は、環境に応答して大きく変化するキャリアとなる可能性があることから、ペプチド集合体を利用して造影剤の能力を制御することを目指した。現在の臨床で造影剤として多用されているガドリニウム（Gd）錯体は、非常にまれではあるが重篤な副作用を引き起こす。そこで、より毒性が低いと期待されているマンガン（Mn）錯体を用いて、高性能かつ安全性の高い造影剤の開発を目指した。

２．　研究成果

（１）概要

本研究では、「ナノ粒子の集合化」と、「ペプチド分子の自己集合」という、二つのアプローチから研究を進めた。ナノ粒子をもとにしたキャリアでは、腫瘍部位で集合化することで長く滞留することが可能なキャリアの開発を目指し、腫瘍環境に応答して集合化するナノ粒子を作製した。集合化をイメージングによって評価できるように、鉄貯蔵タンパク質のフェリチンをキャリア素材として用いた。フェリチンは中空粒子で、内部の酸化鉄は　MRI　の造影剤として利用でき

る。フェリチン表面にペプチドやポリマーを化学修飾することで、腫瘍環境で高発現している酵素に反応してフェリチンを集合化させることに成功した。フェリチンの集合化は、MRI において、緩和時間を短縮する効果を増強した。すなわち、溶液中での集合化をMRIで検出できることを示した。抗がん剤キャリアの開発に向けて、in vivo MRI でキャリアの体内動態や集合化を評価するためのもととなるシステムをつくることができた。

二つ目のペプチド集合体を利用したキャリアでは、MRI 造影剤の金属錯体をペプチド集合体中に集積化することで、造影能力を向上させることに成功した。適切にアミノ酸配列を設計したペプチドは、非共有結合によってナノサイズの集合体を形成し、金属錯体を集積化した。Gd 錯体に加え、より毒性が低い Mn 錯体を用いてペプチド集合体を作製し、錯体単体より緩和能が向上することを明らかにした。またマウスでのイメージングが可能で、体内滞留時間が延長させた。リガンドを導入したペプチド集合体は受容体特異的にがん細胞に結合したことから、細胞レベルでの腫瘍ターゲティングに成功した。ペプチド集合体を利用することで錯体の造影能を制御できる可能性が示され、がんの診断のための MRI 造影剤キャリアとして、ペプチド集合体が有望であることを示すことができた。

（2）詳細

研究テーマ①「集合化するナノ粒子キャリアの開発」

腫瘍環境に応答して集合化することでサイズが大きくなるナノ粒子キャリアの作製を行った。当初、もともと水中で凝集しやすい性質をもつ、カーボンナノ粒子の一つであるカーボンナノホーンを用いて研究を開始した。表面を化学修飾して安定に水中に分散するものを作製し、これをもとに環境応答的に集合化するシステムを作ろうとした。しかし、カーボンナノホーン表面に、目的の機能をもつように分子を化学修飾したが、十分に安定に水溶液中に分散させることができなかった。そこで、発想を逆にし、もともと水中で分散しているタンパク質ナノ粒子を用い、この表面に集合化因子を化学修飾することで集合化させることにした。この際、集合化をイメージングで評価できるようにするために、全身のイメージングも可能なMRIを利用することを考え、タンパク質ナノ粒子のフェリチンを用いることにした。鉄貯蔵タンパク質のフェリチンは直径約 12 nmの中空粒子で、内部の酸化鉄粒子は水分子の緩和時間（T_2）を短縮させる効果があり、MRIの造影剤として利用できる。またフェリチンは、内部空間に鉄以外の物質、例えば抗がん剤も担持できるため、抗がん剤治療へも展開しやすいと考えた。

フェリチンをもとに、腫瘍環境因子に応答して集合化する仕組みを作った（図1）。腫瘍環境因子として、多くの腫瘍で発現が亢進していることが知られているマトリックスメタロプロテアーゼ-2（MMP-2）を利用し、フェリチン表面に親水性のポリエチレングリコール（PEG）、MMP-2 の基質ペプチド、疎水性分子を化学修飾した。はじめ、フェリチンの最表面は親水性のPEGが覆っているが、MMP-2が基質ペプチドを切断すると疎水性分子が露出し、疎水的な効果でフェリチンが集合化する仕組みである。作製

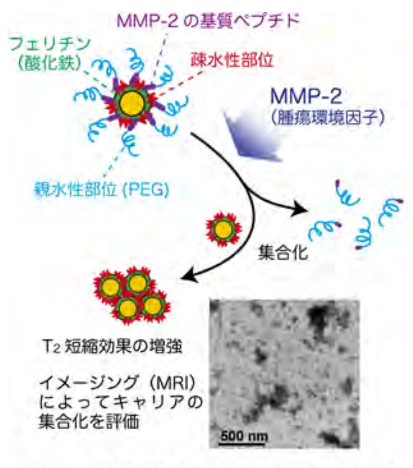
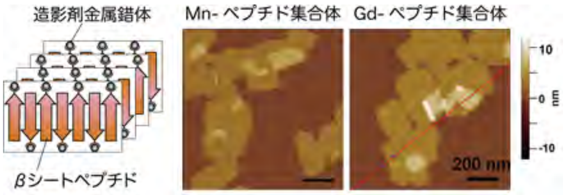


図1 . 腫瘍環境因子によって集合化するナノ粒子キャリア（フェリチン）。

した修飾フェリチンは、そのままでは水溶液中で分散状態を保っているが、MMP-2 を添加すると、基質ペプチドが切断されて集合化することが、動的光散乱測定や電子顕微鏡観察などにより確認された。MRIで緩和時間(T_2)を測定すると、未修飾フェリチンではMMP-2 を添加してもT_2に変化はなかったが、修飾フェリチンではT_2が 11%短縮し、期待どおりに造影能が増強された。以上の結果から、キャリアであるフェリチンを腫瘍環境因子に応答して集合化させ、これをMRIで評価できることがわかった。抗がん剤キャリアの開発に向けて、in vivoでのキャリアの動態評価、抗腫瘍効果を評価するための基礎となるシステムをつくることができた。

研究テーマ②「自己集合ペプチドを利用したキャリアの開発」

非共有結合でナノサイズの集合体を作製し、MRI造影剤の金属錯体を集積化するために、短いペプチドで集合体形成が可能なβシートペプチドを用いることにした。以前に報告しているアミノ酸配列をもとに、ゲルを形成しにくく、制御された集合体を形成するように、新たに 12 残基からなるβシートペプチドを設計し、その末端に金属結合部位を導入した複数種類のペプチドを合成した。その中で、金属結合部位としてDOTAを導入したペプチドは、MnあるいはGdイオンと安定にキレート錯体を形成することが確認された。このMnあるいはGdを結合したペプチドはβシート構造を形成し、均一な高さのシート状のペプチド集合体を形成した(図2)。ペプチド集合体の緩和能について、7Tおよび 1Tの磁場のMRIで緩和時間(T_1)を測定し、緩和能(r_1)を算出した。Mn、Gdのいずれの場合も、ペプチド集合体はDOTAとの錯体単体よりr_1が大きくなり、錯体の造影能力を向上させることに成功した(図3)。またランダムコイルペプチドに錯体を導入したものよりも大きな値であり、得られた向上効果はβシート構造に基づくペプチド集合体に依存するものと推察された。1Tと 7Tで得られた値を比較すると、1Tにおけるr_1向上効果が 7Tのときに比べて高いことから、造影剤金属錯体がペプチド集合体に結合していることで分子運動が遅くなり、T_1が短縮されたことが大きな要因と推測された。



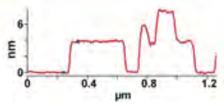


図2．造影剤金属イオンを導入したペプチド集合体の模式図と AFM 像。

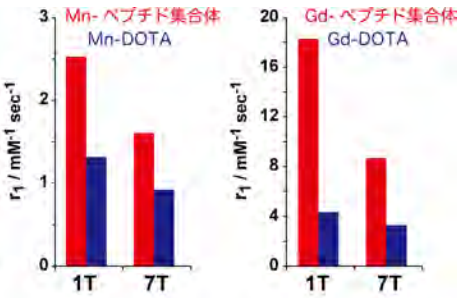


図3. 1T および 7T の磁場におけるペプチド集合体と錯体単体の緩和能 (r_1)。

Mn を導入したペプチド集合体をマウスの尾静脈から投与し、in vivo MRI を行ったところ、急性毒性を示すことなく投与でき、体内でも造影可能であることがわかった。肝臓、脾臓、腎臓においてシグナルの上昇がみられ、錯体単体を投与したときより体内滞留時間が大幅に延長した。徐々に尿として排出され、24 時間後にほぼシグナルが消失していたことから、体外に排出されたと推察された。

さらにがんへのターゲティング能力を付与するために、リガンドとして NGR 配列を導入したペプチド集合体を作製した。NGR は、がん細胞や腫瘍血管内皮細胞に発現している CD13 に結合することが知られている。NGR-ペプチド、蛍光色素(FAM)を導入したペプチド、Gd 錯体を

導入したペプチドの3成分を混合してペプチド集合体を作製し、培養培地に添加した。このペプチド集合体は、CD13 を発現している HT1080 細胞に結合し、発現していない HT29 細胞にはほとんど結合しなかった(図4)。また NGR を導入していないペプチド集合体は、いずれの細胞にも結合しなかった。HT1080 細胞において、ペプチド集合体は細胞内に取り込まれ、一部はライソソームに存在していた。これらの結果から、in vitro において、CD13 を標的としたがん細胞へのターゲティングが可能であることが示された。

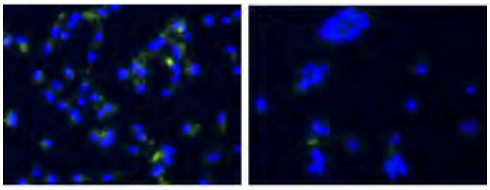


図4．リガンド導入ペプチド集合体のがん細胞への結合。（左）標的受容体を発現しているがん細胞、（右）発現していないがん細胞。緑：ペプチド集合体、青：細胞核。

3.　今後の展開

研究テーマ①のサイズが大きくなるキャリアでは、キャリアとするフェリチンナノ粒子の集合化を MRI で評価可能なことを示すことができた。次は、マウスに投与して in vivo MRI を行い、体内でのキャリアの挙動、集合化を調べていく予定であり、リガンドの導入による腫瘍へのターゲティングや、体内の凝集因子を利用することで、腫瘍環境に応答した集合化の促進を目指す。腫瘍部位で集合化することは、薬物の高濃度化や長期放出として抗がん剤治療にメリットがあると考えられるので、フェリチン内部には抗がん剤を入れることで抗腫瘍効果が期待できる。MRI によるキャリアの動態評価と同時に進めることで、より効率的にキャリア開発を進めることができると考えている。

研究テーマ②では、ペプチド集合体を用いることで、金属錯体単体より造影能力を向上させることに成功した。現時点で、Mn 導入ペプチド集合体の緩和能は、既存造影剤の Gd 錯体の約半分にまで高めることができており、マウスにおいても造影可能であることを示した。細胞レベルでのターゲティングにも成功しており、in vivo でのターゲティングが期待できる。小分子ペプチドは生体適合性に優れ、分解、排出されやすい素材であるのに加え、化学合成により様々な分子とのコンジュゲートが可能で、多様な機能設計が可能である。造影能をさらに強化することや、腫瘍環境因子を利用して集合体の形成／崩壊を制御することも可能であると考えている。腫瘍環境に応じて造影能を変化させるダイナミックな MRI も可能な、高性能かつ安全性の高い造影剤の開発へと展開できる。

4.　自己評価

ナノ粒子を集合化させる抗がん剤キャリアは、腫瘍環境因子でキャリアを集合化させ、イメージングで評価できることを示すことができた。体内でのイメージング、さらに抗がん剤治療にまで研究を進めることができなかったが、すぐれた抗腫瘍効果を生み出すために腫瘍部位でキャリアを集合化させるという本研究のコンセプトの効用を明確にするためには、キャリアの体内挙動を把握することが必要である。そのための基礎となるシステムをつくることができたと考えている。

ペプチド集合体を血中投与型のキャリアとして利用しようとする試みは、世界的にもまだ報告が少なく挑戦的な課題である。本研究では、現在の主流である Gd 造影剤より安全性が高く、かつ高性能の MRI 造影剤の開発を目指し、Mn 錯体をペプチド集合体に導入した。現行の Gd

造影剤の半分程度にまで Mn 錯体の造影能を向上させ、体内滞留時間が延長することを示すことができた。ペプチド集合体を用いることで、錯体単体とは異なる造影能を発揮できることがわかり、ペプチド集合体の分子設計によって造影能を制御することが期待できる。研究期間内に腫瘍環境応答性を加えるところまで研究を進めることができなかったが、腫瘍環境に応答して造影能を変化させるダイナミックな造影剤の開発に向けた基盤ができたと考えている。

5. 研究総括の見解

分子や粒子の集合状態をコントロールして機能するがん標的ナノキャリアの開発を目指して二つのアプローチで研究を進めた。研究テーマ①「集合化するナノ粒子キャリアの開発」 では、粒子を腫瘍環境に応答して大きくすることで滞留性を向上させ、薬物の高濃度化や長期放出を可能にするキャリアの開発を目指した。化学修飾したフェリチンを合成し、マトリックスメタロプロテアーゼ-2MMP-2 が基質ペプチドを切断するとフェリチンが腫瘍環境因子に応答して集合化できることを見出した。 研究テーマ②「自己集合ペプチドを利用したキャリアの開発」 では非共有結合によるペプチド集合体形成を利用して造影剤の能力を制御することを目指し、Mn や Gd を導入した 12 残基からなるβシートペプチドは造影能力を向上させること、急性毒性を示すことなく体内撮影が可能であることを見出した。また、臓器内においてシグナルの上昇、体内滞留時間の大幅延長が見出され、in vitro において、CD13 を標的としたがん細胞へのターゲティングも可能であることが示された。

以上の成果は抗がん剤キャリアの開発に向けて、in vivo でのキャリアの動態評価、抗腫瘍効果を評価するための具体的システムを作れたものと評価され、治験をふくめた今後の発展に期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. S. Matsumura, I. Aoki, T. Saga, K. Shiba, A tumor-environment-responsive nanocarrier that evolves its surface properties upon sensing matrix metalloproteinase-2 and initiates agglomeration to enhance T_2 relaxivity for magnetic resonance imaging. *Mol. Pharmaceutics*, **2011**, *8*, 1970-1974.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

1.
発　明　者: 松村　幸子、青木　伊知男、芝　清隆
発明の名称: 新規ペプチド複合体及び造影剤
出　願　人: がん研究会、放射線医学総合研究所、JST
出　願　日: 2012 年 3 月
出 願 番 号: 出願手続き中

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. S. Matsumura, I. Aoki, K. Shiba, Design and construction of the ferritin-based MRI contrast agent that can self-assemble into oligomers upon sensing a tumor specific protease, 9th Australian Peptide Conference, 2011.10.16-20
2. 松村幸子、芝　清隆、腫瘍特異的酵素によってサイズ変化するMRI 造影剤の作製、第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.3
3. 松村幸子、宮脇仁、弓削亮太、佐藤重男、冨田章弘、湯田坂雅子、飯島澄男、芝清隆、カーボンナノ粒子の体内分布評価と表面修飾、第 58 回高分子討論会、 2009.9.16
4. S. Matsumura et al.,Bioapplication of the Surface Modified Carbon Nanohorns for Drug Delivery Systems, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009.7.26-30
5. 松村幸子、宮脇仁、弓削亮太、佐藤重男、冨田章弘、鶴尾隆、湯田坂雅子、飯島澄男、芝清隆、ナノ粒子の体内分布評価に向けたカーボンナノ粒子の作製、第 25 回日本 DDS 学会学術集会、 2009.7.3

研　究　報　告　書

「メタマテリアルの自己組織的作製とナノリソグラフィーへの応用」

研究タイプ：通常型
研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 12 月
研　究　者：藪　浩

1.　研究のねらい

波長よりも小さい金属−誘電体の周期構造は、負の屈折率を持ち、回折限界以下の光を投影できるメタマテリアルとなることが報告されています。本研究では、自己組織化により内部にナノサイズの相分離構造を持つブロック共重合体微粒子を作製し、ナノメッキ技術により金属化することで、紫外・可視光領域におけるメタマテリアルを作製する事を目的とする。さらにこれをレンズに用いることで、回折限界を超えるナノリソグラフィー技術の確立を目指す。

2.　研究成果

（1）概要

本研究では、（1）マイクロ波を用いたブロック共重合体中におけるミクロ相分離構造の迅速形成手法を確立し、（2）有機−無機ハイブリッド微粒子の作製手法および（3）有機−無機ハイブリッド微粒子の集積手法の開発し、（4）有機−無機ハイブリッド微粒子集積体の光学特性評価を行った。その結果、可視光波長よりも小さい金属−誘電体周期構造を作製する方法論を確立し、作製した金属−誘電体周期構造の屈折率を制御する可能性を明らかとした。

本研究は物理や工学分野での研究が中心であったメタマテリアルの研究分野において、化学の知見を応用する事により、新規の材料作製手法を提案することができた。

（2）詳細

（1）ブロック共重合体微粒子中におけるミクロ相分離構造の迅速形成

ブロック共重合体を良溶媒に溶解させ、貧溶媒を加えた後に良溶媒を蒸発除去することにより微粒子を得る自己組織化析出（Self-ORganized Precipitation, SORP）法を見いだしている。本手法を用いる事により、内部に相分離構造を持つ微粒子を得る事が出来る。一方、ブロック共重合体のミクロ相分離構造を熱安定構造へ成長させるためには、ガラス転移点以上での熱アニーリングや、溶媒によるアニーリングが必要であった。しかしながらこれらのアニーリング手法は数時間から数日という非常に長い時間を必要とするため、ブロック共重合体の産業的な応用への大きな制約となっていた。実際にブロック共重合体微粒子中のミクロ相分離構造を熱安定構造へ転移させるためには、温水中で数週間アニーリングする事が必要であった。

このような問題を解決するために、ブロック共重合体微粒子の水分散液を耐熱容器に封入し、マイクロ波により迅速に加熱を行う事により、ブロック共重合体微粒子中に熱安定なミクロ相分離構造を数分程度で形成させる手法を開発した（特許出願「ポリマー材料の製造方法」）。本手法を用いることにより、従来は数週間必要であったアニーリング時間を大幅に短縮することが可能となった（図1）。

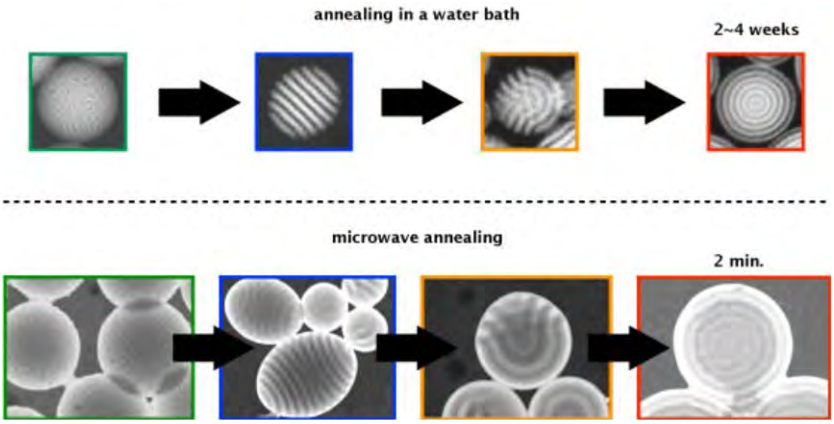


図1. ブロック共重合体を水中でアニーリングした場合の走査型透過電子顕微鏡像（上図）と、マイクロ波照射によりアニーリングした場合の走査型透過電子顕微鏡像（下図）

（2）有機−無機ハイブリッド微粒子の作製

メタマテリアルを実現するためには、透磁率および誘電率を負にすることが必要である。そのためには、可視光と相互作用し、波長よりも十分小さい金属共振器を作製する事で、誘電率・透磁率を同時に負にする必要がある。可視光よりも十分小さい金属共振器の作製には、従来電子線リソグラフィーなどのトップダウン技術が使われてきたが、多段階で限られた面積にしか作製を行う事が出来ないなどの制約があった。

本研究では、ブロック共重合体微粒子の内部に金属を導入する事により、金属ナノ共振器をボトムアップ的に作製する事を試みた。その手法として、①金属と錯体を形成する官能基を持つブロック共重合体からSORP法を用いて微粒子を作製し、金属イオンの錯化・還元により共振構造を形成する方法および②ポリマー被覆した金属ナノ粒子とブロック共重合体微粒子のハイブリッド微粒子をSORP法により作製する方法の2つの手法を提案した。

①の手法を用いることにより、金、銀、白金などの金属イオンをブロック共重合体微粒子中に導入する事が可能である事を見いだした。さらに②の手法を用いる事により、ブロック共重合体微粒子中に形成されたミクロ相分離構造に沿って金ナノ粒子を配列させることに成功した（図2、論文2、5、特許出願「無機−有機ハイブリッド微粒子およびその製造方法。」）。ミクロ相分離構造の内部に配列させるためには、ミクロ相分離構造の周期長とナノ粒子のサイズ比が重要であり、ナノ粒子のサイズがミクロ相分離構造の周期長以上のサイズであると、相分離構造内にナノ粒子が取り込まれず、微粒子の表面に偏析する事、逆の場合はナノ粒子表面を被覆したポリマーと親和性の高い相に自発的に導入されることを見いだした。以上の結果から、ブロック共重合体微粒子中への金属ナノ構造形成手法を確立した。

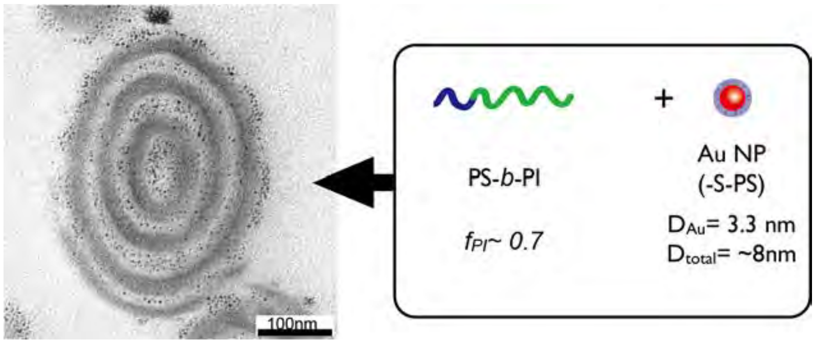


図2. ポリスチレンで被覆された金ナノ粒子と poly(styrene-block-isoprene)ブロック共重合体のハイブリッド微粒子の断面透過型電子顕微鏡像

（3）有機−無機ハイブリッド微粒子集積体の作製

（2）に示した有機-無機ハイブリッド微粒子をメタマテリアルとして実測できる形態にするためには、有機-無機ハイブリッド微粒子を高密度に集積した有機-無機ハイブリッド微粒子集積体の形成が必要不可欠である。

サブミクロン～ミクロンサイズの微小球分散液を乾燥させると、これらのコロイド粒子が集積したコロイド結晶が形成される。このコロイド結晶を鋳型として、樹脂などの材料を空隙に導入し、固化後鋳型粒子を取り除くことによって、コロイド粒子を鋳型とした多孔体、逆オパールが形成される。この逆オパール構造を用いる事により、ブロック共重合体微粒子の集積体を一括形成する手法を考案した。300 nm～500 nm のポリスチレン（PS）微小球水分散液を2枚のガラス板で挟み、一方をスライドさせることでコロイド結晶を作製した。作製したコロイド結晶にポリビニルアルコール（PVA）水溶液をキャストコートし、乾燥後 PS 微小球を溶出する事により、PVA 逆オパールを形成した。PVA 逆オパール中にブロック共重合体とポリマー被覆した金ナノ粒子の溶液をキャストコートする事により、逆オパールの空孔内に金ナノ粒子が配列したミクロ相分離構造の形成に成功した(図3)。

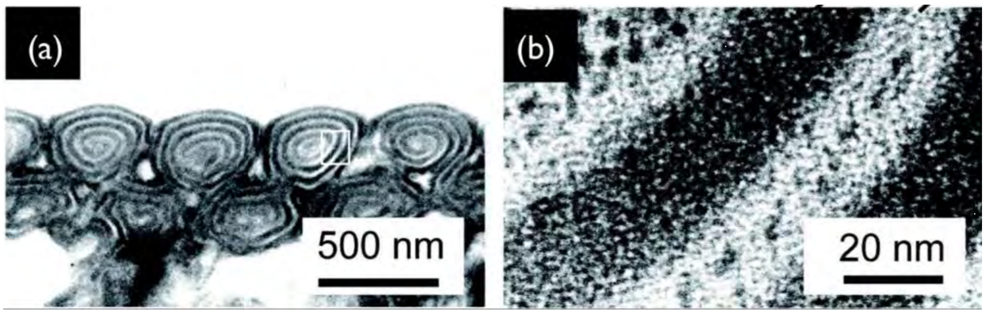


図3. 逆オパール構造を鋳型としたブロック共重合体微粒子・金ナノ粒子複合フィルムの断面透過電子顕微鏡像（a）とその拡大図(b)

（4）有機−無機ハイブリッド微粒子集積体の光学特性測定

（3）で作製した集積体の光学特性を、紫外−可視吸光光度計や分光エリプソメトリを用い

て測定を行ったところ、金ナノ粒子単体が示すプラズモン吸収帯とは異なる光吸収を持つこと、屈折率実部がポリマーフィルムよりも低下していることを見いだした。このような単純なナノ粒子やポリマーフィルムに対する光学特性の差は、金ナノ粒子の配列形成に由来する物であると考えられる。

3.　今後の展開

本研究により、自己組織化により微粒子内部に金属ナノ構造を導入する手法、ナノ構造を持った有機−無機複合フィルムの作製手法が確立された。このようなボトムアップ手法を用いる事で、機能性のハイブリッド微粒子作製や光学的機能を持ったフィルムを大面積に作製する技術へと展開できる。

また、作製した有機−無機ハイブリッドフィルムは屈折率を自在に制御出来る可能性があり、今後ナノリソグラフィーへの展開や新規の光学素子への応用が期待される。

4.　自己評価

本研究ではボトムアップ手法により、有機−無機ハイブリッドナノ構造を作製し、それをメタマテリアルに応用することを目的としてきた。有機−無機ハイブリッドナノ構造の形成に関する目標はほぼ達成出来た。一方で光学特性の解明についてはまだ未解明な部分も多く、今後の研究課題として引き続き検討が必要であると考えられる。

本研究は物理や工学分野での研究が中心であったメタマテリアルの研究分野において、化学の知見を応用する事により、新規の材料作製手法を提案するものであり、当該分野に一石を投じるものであると考えている。

5.　研究総括の見解

自己組織化によりナノサイズの相分離構造を持つブロック共重合体微粒子を作製し、ナノメッキ技術により金属化することで、紫外・可視光領域におけるメタマテリアルを作製する事を目的とする。あわせて、回折限界を超えるナノリソグラフィー技術の確立を目指している。

本研究の成果は、（1）マイクロ波を用いたブロック共重合体中ミクロ相分離構造の迅速形成手法の確立　（2）有機−無機ハイブリッド微粒子の作製手法の提案　（3）有機−無機ハイブリッド微粒子の集積手法の開発　（4）有機−無機ハイブリッド微粒子集積体の光学特性評価、に集約出来る。その結果、可視光波長よりも小さい金属−誘電体周期構造体の作製法を確立し、それによって金属−誘電体周期構造の屈折率を制御できる可能性を示した。

本研究によって、メタマテリアルという物理・工学分野を中心とする概念的、理論的物質を、巧みな、しかも比較的容易な合成化学手法によって具体的に合成したのは重要な成果であり、化学の可能性と重要性を広く知らしめた先駆的研究ということができる。作製した有機−無機ハイブリッドフィルムは、メタマテリアルとしての負の屈折率を実現できなかったのは残念であったが、それを化学的に制御出来る可能性を示したことは高く評価できる。今後、当初提案したナノリソグラフィーへの展開や新規の光学素子へ発展する研究を期待したい。

６．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. K. Motoyoshi, A. Tajima, T. Higuchi, H. Yabu, M. Shimomura, "Static and Dynamic Control of Phase Separation Structures in Nanoparticles of Polymer Blends", Soft Matter, 6(5), 1253-1257 (2010)
2. H. Yabu, K. Koike, K. Motoyoshi, T. Higuchi, M. Shimomura, " A Novel Route for Fabricating Metal-Polymer Composite Particles with Phase Separation Structures", Macromolecular Rapid Communications, 31(14), 1267-1271 (2010)
3. T. Higuchi, K. Motoyoshi, H. Sugimori, H. Jinnai, H. Yabu, M. Shimomura, "Phase Transition and Phase Transformation in Block Copolymer Nanoparticles" Macromolecular Rapid Communications, 31(20), 1773-1778 (2010)
4. H. Yabu, T. Jinno, K. Koike, T. Higuchi, M. Shimomura, "Three-dimensional Assembly of Gold Nanoparticles in Spherically Confined Microphase-Separation Structures of Block-copolymers", Macromolecules, 44(15), 5868-5873 (2011)
5.H. Yabu, K. Koike, T. Higuchi, M. Shimomura, "Nanoparticle Arrangements in Block-copolymer Particles Having Microphase Separated Structures", Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 49(24), 1717-1722 (2011)

（2）特許出願

研究期間累積件数：3件

1.
発　明　者：藪浩、樋口剛志、本吉究、小池和孝
発明の名称：無機—有機ハイブリッド粒子、およびその製造方法。
出　願　人：科学技術振興機構
出　願　日：2009/2/13
出 願 番 号：特許出願 2009—30628

2.
発　明　者：藪浩、樋口剛志
発明の名称：ポリマー材料の製造方法（国内特許成立）
出　願　人：科学技術振興機構
出　願　日：2009/8/18
出 願 番 号：特許出願 2009-188892

3.
発　明　者：藪浩、齊藤祐太
発明の名称：ナノインプリント用樹脂、該樹脂を含む積層体、該樹脂を含むプリント基板、及びナノインプリント基板の製造方法
出　願　人：科学技術振興機構
出　願　日：2012/12/5
出 願 番 号：特許出願 2012-266628

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

【受賞】

日本化学会第 60 回進歩賞

高分子学会平成 22 年度高分子研究奨励賞

トーキン科学技術振興財団奨励賞

Outstanding Poster Paper Award, IDW' 11

研 究 報 告 書

「ナノ格子制御による薄膜キャパシタ構造の作製と剥離・転写・接合によるナノ電子部品用実装技術の確立」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成21年10月～平成25年3月
研 究 者： 一木 正聡

1. 研究のねらい

本研究では、次世代エレクトロニクスにおける主要構成要素の一つである基本構造をナノ構造制御として確立すると共に、ナノ実装技術としてシステム化することを目標とする。提案者らは他のグループに先駆けて従来比20倍程度の高容量密度キャパシタをプリント基板上に形成する剥離・転写の基本プロセス技術を確立してきた。しかし、剥離性の基板上に高容量密度の薄膜キャパシタを作製するための、制御要因や機構などは明らかになっておらず、本技術の実用化のために技術基盤としては科学的知見及び主要技術が十分に蓄積されているとは言い難い状況である。そこで、本研究では、ナノ格子の結晶整合/不整合性を活用して、金属電極と薄膜キャパシタによる基本構造の結晶成長を実現すること、またナノ表面機構を明らかにすることで、ナノ実装プロセス技術としてのシステム化を図り、従来は不可能であった高性能ナノ電子部品の内蔵実装を実現するための、次世代の電子回路基板のための製造基盤技術として確立することを目標として研究を行う。

本技術の実用化や技術の普及に当たっては、実装技術を含めたファシリティの利活用方策が重要であるとの認識を持った。また、近年センサネットワークに関係する研究開発に従事したことで、キャパシタに関する技術課題が多く、国際技術競争力のある本分野の技術基盤の強化はユビキタスネットワーク社会において重要であるとの認識を持つに至った。電子回路基板には主に樹脂材料が使用されており、シリコン等の耐熱性基板とは異なり、高温プロセス技術への適用は困難である。そのため、従来は表面実装や低誘電率の薄膜キャパシタのみが使用されてきた。しかしながら、高密度実装への要求は非常に大きく、現状の方式には限界が見え始めている。

そこで本研究では、ナノ格子の制御による高性能薄膜キャパシタの基本素材を金属電極と薄膜キャパシタによる構造で実現することで、部品性能の向上を行う。また、実装技術としては、速やかな実用化の技術基盤の強化に貢献したい。高性能な薄膜キャパシタを現行の電子回路基板上に展開することができれば、表面の約50%を占める電子部品の内蔵化が可能となり、これまで表面実装に頼ってきた実装方式に大きなブレークスルーが期待される。これにより、電子機器の小型・薄型・軽量化に加えて、性能・信頼性の向上に寄与するシステム化技術の新機軸としての普及が期待できる。

2. 研究成果

（1）概要

本研究における成果としては、剥離性基板上における薄膜キャパシタ構造体の作製、剥離プロセスに於いて見いだされた以下の３点が挙げられる。１）構造体に作製時においては引張応力状態が必要であること、２）密着性の要因が鉛の原子拡散にあることと拡散により密着力

が制御できること、3)プロセスパラメータを実験計画法によって定量的に評価し熱処理温度が主要なパラメータであることを明らかにしたことである。1)においては、サンプルを安定的に作製するために必要なプロセス条件であり、この知見を得てから研究が加速度的に進展できるようになった。2)密着性の要因が明らかになると共に、拡散の制御により密着性が調整できることが明らかになった。また、拡散は積層構造体の厚みなどの構造設計により異なることも明らかとなり、実用化に於いて重要な知見を得ることができた。3)は化学溶液法における課題の一つであった多くのプロセスパラメータをシステム化した条件最適化手法を確立できたこととなる。以上の知見から、従来明らかになっていなかった現象機構が明らかになると共に、システム設計に対して有用な技術的基盤を明らかにすることができた。

(2)詳細

研究テーマA「積層構造体の作製」

薄膜キャパシタとしてはチタン酸ジルコ酸鉛(PZT)膜を用いて、その作製時の安定性を調べるため、下部電極である Pt 膜を成膜条件(成膜温度)を変えて基板を準備し、PZT 膜を作製した。Pt 膜厚 1um、高温(200℃)の条件で成膜した基板は PZT を安定して 10 層積層できたのに対し、Pt 膜厚 1um、室温で成膜の基板では、PZT を 2 層積層したところで破壊され、安定して PZT の成膜が行えなかった。

図2に PZT 成膜前に計測した Pt 膜の応力分布を示す。成膜条件が高温の Pt 膜と室温の Pt 膜では引張と圧縮で応力が反転することが分かった。

このことから、Pt 膜応力が成膜条件によって反転したため、PZT 薄膜を安定して成膜できたといえる。PZT 薄膜は一般的に引張であるので、Pt の成膜条件が高温の場合、同じ引張応力であるために応力が緩和し、PZT 成膜時の不安定性が解消されたと考えられる[3]。

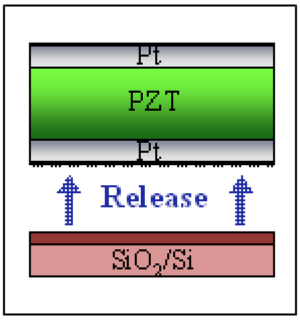


図1 積層構造体の断面図

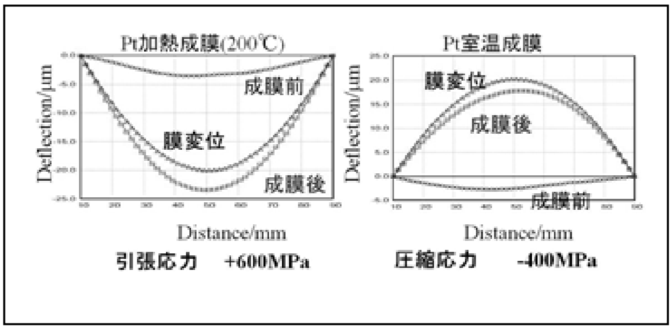


図2 PZT 成膜前の Pt 膜応力

また、XRD の結果により、作製された PZT 薄膜はペロブスカイト構造で(110)に配向していることが確認されている。剥離前の誘電率を測定した結果、すべてのキャパシタにおいて二桁後半の比誘電率であり、Pt 膜の成膜条件との依存はみられなかった。また、ヒステリシスカーブについてもキャパシタによる大きな違いは見られなかった。このことから電気的特性は Pt 膜の成膜条件に依存せず、PZT 膜の成膜条件や結晶性に依存することが予想される。

研究テーマB 「密着性の要因に関する機構」

ナノトランスファー法にはPZT薄膜とSi基板の剥離過程がある。この界面の密着力は、下部電極層である Pt 層と強誘電体層である PZT 層の厚さに依存して変化することがテープ剥離試験によって判明しているが(4)(図 2 参照)、特性要因の機構は解明されていない。そこで本研究では、凝着力変化の要因を解明するために、要因の一つと考えられる成分元素拡散の調査と、凝着力の定量的測定を行い、成分元素拡散の有無と凝着力への影響を明らかにすることを目的とした。

図3はPt膜厚が150nmのサンプルの断面写真である。PtとSiO$_2$の間にSiO$_2$方向に物質浸透に基づくと想定される厚さ約 10nmの層があることが認められる。この層をEDS(エネルギー分散型X線分析装置、Energy Dispersive X-ray Spectrometer)によって分析したところ、主にSi、Oが検出され、Pbも微量に検出された。この層は、PZT成分元素がPtを通じて拡散し、SiO$_2$と固溶体を形成してできた層だと考えられる。この拡散と固溶体形成は、PZT成膜時の 700℃という高温プロセスに起因していると思われる。

図4に凝着力測定の結果を示す。これらの結果より、Pt・Si 基板界面の凝着力は PZT 薄膜作製後に上昇することが判明した。この現象は、PZT 薄膜作製時に、PZT 成分元素が拡散し、Pt・Si 基板界面において固着層を形成するためであると考えられる。今回の結果により、Si 基板方向への Pb、Ti といった、Zr を除くPZT 成分元素の拡散が発生しており、Si 基板表面に拡散層が形成されていることが判明した。この拡散は、Pt 膜厚増加に伴い減少し、拡散層の厚さも減少した。また、この拡散層は Pt・Si 基板界面の凝着力を強化していることが判明した。特に Pt150nm のサンプルにおいては凝着力が約 2.4 倍と大きく上昇した。これらのことから、PZT 成分元素の拡散現象が凝着力変化の主要な要因であることが確認された[5]。

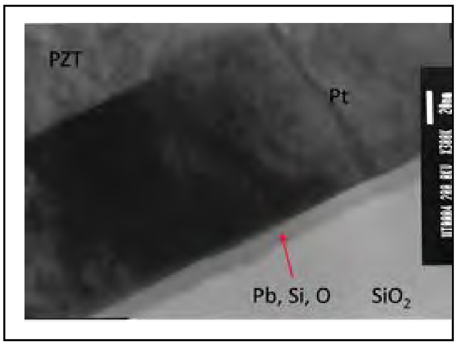


図3 PZT/Pt/SiO2/Si 断面 TEM

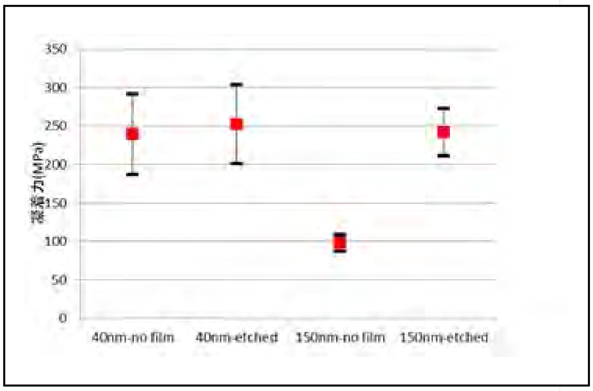
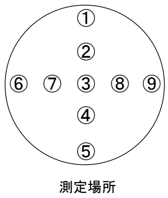


図4 密着力の評価試験の結果

研究テーマC 「薄膜特性の最適化」

本研究では、薄膜製造方法として MOD 法を用いており、PZT 薄膜の特性向上や均質化のために, プロセスパラメータの最適化が課題となる。MOD 法には数多くのパラメータが存在するが、統計的手法である実験計画法を用いて検討を行った。実験計画法とは, 各パラメータの水準を組み合わせることで, 実験回数の低減を行うことが可能である。これと分散分析を組み合わせることで, 最適化を行うだけでなく重要なパラメータの特定も行った。

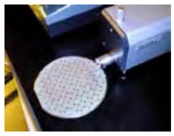
実験においては 20mm角のPt/Ti/SiO_2/Si基板を用意した．SiO_2，Ti，Ptの膜厚はそれぞれ300nm，5nm，150nm程度である．この基板上にPZT溶液を塗布し，加熱によって結晶化させるというプロセスを繰り返し，PZT薄膜を作製した．このプロセスにおいて成膜温度，昇温速度，溶液濃度等をパラメータとするとともに，各パラメータ水準の組み合わせを検討した。
本研究では，化学溶液塗布法を用いた誘電体薄膜の作製において，温度に関連するパラメータを中心に重要因子の特定と最適化を行った。その結果，温度に関連するパラメータの中でも，特に前駆体形成温度と結晶化温度が重要であることが判明した。また，前駆体形成温度は結晶性，電気特性両方に対して特性温度がやや異なるという結果が得られた。この結果を用いて4インチウェハに均質膜を形成することを試みた。その結果を図5に示す。膜厚及び誘電率については7%程度となった。強誘電特性については3．5倍程度あり、まだ改善の余地があると思われる。この点で、薄膜の均質性はやや低かったため，今後より均質性を高める工夫が必要である[4]。

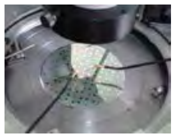


測定場所

測定結果

位置	膜厚 (μm)	比誘電率	残留分極 (μC/cm²)	抗電界 (kV/cm)
1	2.4	1213	16.5	56.0
2	2.4	1248	15.8	52.5
3	2.4	1241	18.0	48.3
4	2.4	1353	25.8	50.6
5	2.4	1252	24.2	47.7
6	2.4	1041	17.8	53.3
7	2.4	1270	21.3	51.3
8	2.4	1370	18.4	56.0
9	2.4	1205	20.9	54.1
ばらつき	―	1290±90 (±7%)	20.8±5.0 (±24%)	51.8±4.2 (±8%)


膜厚測定の様子


電気特性測定の様子

2012/10/24 1

図5 均質化膜の作製の検討結果

3． 今後の展開

本研究を通じて、剥離性の基板上における薄膜キャパシタの科学的及び技術的な知見が明らかになってきた。安定した薄膜キャパシタの作製に必要な要因が内部応力にあることを明らかにするとともに、膜特性や密着性の特性要因の機構を元素拡散の観点から調べた。また、多数のパラメータの最適化の定量的な評価のために統計的な手法が有効であることを示した。
本研究の実用化を今後進めるに当たっては、大面積化とシステム化が課題になるとおもわれる。大面積化には均質膜の大面積化を実現することが必要となるが、その方法論をおおよそ確立することができていると思われる。一方、システム化については元素拡散による密着性の制御が可能であるという機構を用いて具体的な手法の提案を今後進めていきたい。

4． 自己評価

本研究においては、実用化を推進するために技術的基板となり得る科学的な知見の集積を目指した。薄膜構造体の作製、剥離性基板上での密着性の機構、特性パラメータの最適化のための方法論について一定の結果を得ることができ、これらの新しい知見を元にした科学的あるいは技術的な展開を行うことができると考えている。とくに、剥離性基板状へのキャパシタの作製には、膜応力を引っ張り状態にすること、凝着力は鉛原子の拡散に由来していること、温度パラメータの定量的な評価法を確立できたことは大きな前進と考えている。一方、当初の

研究スコープに入っていたうちシステム設計に関しては、明確な開発結果を現時点では示せていない。今後できるだけ速やかな対応をするように尽力したい。また、上記の科学的な知見は自分としてはそれらよりも価値的には有用性が高く今後の展開を図る上での貴重な知見であることを付記したい。

本研究の開始時点においても、本技術手法のおおよその利活用可能範囲を簡易的なテープ試験などにより明らかにしていたが、それらの根拠を明確化することは実現できていなかった。上記の科学的な知見と実験結果により、剥離性基板を用いた薄膜キャパシタに適した膜厚領域についても一定の知見が集積できた。このことは、高容量密度の薄膜キャパシタを用いた機能の「創発」を行うために非常に重要な知見となり得るものと考えている。

5.　研究総括の見解

金属電極と薄膜キャパシタの結晶成長を実現し、同時にナノ表面機構を明らかにすることにより、次世代の電子回路基板のためのナノ実装プロセス技術を確立することを目標としている。

成果として、1)構造体作製時においては引張応力状態が必要であること、2)密着性の要因が鉛の原子拡散にあること、また拡散により密着力が制御できること、3)プロセスパラメータとして、熱処理温度が主要であること、等を明らかにした。

本研究成果は個別的・要素的データとしての性格が強く、全体として、提案内容にどの程度アプローチできたのか捕えがたいが、特許内容にみられるように実装という極めて具体的課題の解決を目指した研究であり、電子機器の小型・薄型・軽量化につながる成果をおさめたと判断される。

6.　主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. K.Iimura, T.Hosono, M.Ichiki, T.Itoh and T.Sugah, “A release property of High-permittivity thin film manufactured with nano-transfer method” Trans.Jpn.Inst. Electronics and Packaging　2011, 4, 37-40.
2. T.Hosono, K.Iimura, M.Ichiki, T.Itho and T.Suga, “An Electrode Structure for Ferroelectric Thin Films and Its Application to the Nanotransfer Method”, Trans.Jpn.Inst. Electronics and Packaging　2011, 4, 41-45.
3. E.Komine, M.Ozaki, T.Suga, M.Ichiki and T.Itoh, “Fabrication and Characterization of Ferroelectric PZT and BaTiO3 Thin Films on Releasable Electrode Structures”, Trans.Jpn.Inst. Electronics and Packaging (in press).
4. K.Sueshige,K.Iimura, T.Suga, M.Ichiki and T.Itoh, “ Homogenizing and Applying Dielectric Film to Wafer Level Film Preparation”, Trans.Jpn.Inst. Electronics and Packaging (in press).
5. F.Honda, K.Sueshige, T.Hosono, T.Suga, M.Ichiki and T.Itoh, 電気学会誌(投稿中)

(2)特許出願

研究期間累積件数:3件

1
発明者:　一木正聡、須賀唯知、飯村慶太、細野智史、伊藤寿浩、前田龍太郎
発明の名称:　誘電体構造体、及びその製造法
出願人:　独立行政法人科学技術振興機構、独立行政法人産業技術総合研究所
出願日:　2010/5/8
出願番号:　:特開2011－238766

2
発明者:　一木正聡、黒木啓介、須賀唯知、鈴木章夫、伊藤寿浩、前田龍太郎
発明の名称:　非接触信号伝送システム及び方法
出願人:　独立行政法人科学技術振興機構、独立行政法人産業技術総合研究所
出願日:　2010/8/8
出願番号:　特願 2010-200735

発明者:　一木正聡、黒木啓介、須賀唯知、鈴木章夫、伊藤寿浩、前田龍太郎
発明の名称:　非接触信号伝送システム及び方法(優先権出願)
出願人:　独立行政法人科学技術振興機構、独立行政法人産業技術総合研究所
出願日:　2011/8/8(非公開希望)
出願番号:　特願 2011-195674

3.
発　明　者:　一木正聡、鈴木堅吉、伊藤寿浩、前田龍太郎
発明の名称:　有機 EL 表示装置及びそれに用いるテープ構造体
出　願　人:　独立行政法人産業技術総合研究所
出　願　日:　2013/1/28(非公開希望)
出 願 番 号:　特願 2013-013597

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・受賞　ICEP ヤングアワード　(受賞者:小峰えりか)　対象発表:2012年4月 ICEP2012

研　究　報　告　書

「細胞運動・機能を操作するナノ・マイクロメカニカルシステムの構築」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成２１年１０月～平成２５年３月
研 究 者：　木戸秋　悟

１．　研究のねらい

生体内における細胞の形態・運動性・機能は、その細胞の属する組織が感受する種々の静的ないし動的な力学環境（生体力学場）により重要な調節を受ける。細胞外力学環境の設計・制御は、細胞行動と機能の制御とともに適切な組織形成誘導の基礎として、再生医工学用人工基材（骨格基材や人工細胞外マトリックス等）の開発における主要課題の一つとなっている。この課題においては、人工基材における細胞外力学環境の微視的レベルでの設計と、その結果誘導される細胞行動・機能調節および組織の力学応答との間の関係を系統的に把握することが必要である。一方、その把握のための、細胞自体、人工基材、および細胞−人工基材間相互作用各々の力学的特性のナノレベルでの定量的理解は不充分であり、細胞外力学環境の微細設計・分子設計の定量的指針に関しては、ごく限られた知見しか得られていないのが現状である。

本研究課題では、細胞、人工基材、および細胞−人工基材間相互作用のメカノバイオロジーの定量的理解の拡充と、細胞外力学環境の微細設計（ナノ・マイクロメカニカルデザイン）とそれによる細胞行動の制御を目的とした。具体的には、細胞のメカノタクス挙動に着目した。メカノタクシス（mechanotaxis）は細胞が周囲組織のより硬い領域を指向して移動する性質（機械的走性）であり、基材表面に固定された走化性因子指向性のハプトタクシス（haptotaxis）とともに、細胞運動制御の方法の一つとして近年注目されつつある。メカノタキクスの方向や移動速度等を定量的に制御し得る二次元あるいは三次元の人工基材の力学環境条件を明らかにし、その微細設計・分子設計の指針に応用した。また細胞運動を定量的に制御し得る材料は、細胞運動の分子メカニズムの系統的研究のための画期的プラットフォームとなり得る。そのようなナノバイオメカニズム解明のための新しいナノ・マイクロメカニカルシステムを開発し、細胞運動研究の力学的側面と細胞内の生化学過程・シグナル伝達との関係を解析し、材料の精密設計に基づくメカノバイオロジー研究の展開を目指した。

２．　研究成果

（１）概要

細胞はそれらが生着する組織環境の生物学的、化学的、機械的条件に依存した接着伸展形態の動的応答性、すなわち運動性を示す。細胞運動は生体組織における様々な生理学的・病理学的過程に重要な役割を有しており、そのメカニズムの理解と制御技術の確立は、細胞分子生物学における学術的基礎からバイオテクノロジー・生体材料設計等の医用工学分野への応用展開も含む重要課題の一つである。従来、細胞運動の制御には、液性因子濃度勾配により誘導されるケモタクシスや、表面固定化接着因子等の密度勾配への応答性であるハプトタクシスなど指向性運動特性が活用されてきている。これに対し、私は独自に細胞接着性ゲルの表面弾性率分布のマイクロパターニング技術を開発し、細胞の硬領域指向性

運動として知られるメカノタクシスの制御条件を世界に先駆けて確立した[1-2]。本課題ではその技術をさらに展開し、細胞運動を自在に制御する微視的材料力学場（ナノ・マイクロメカニカルシステム）の系統的設計およびメカニズム研究とともに、これを利用した新規の細胞機能操作材料の開発を行った。具体的には、1）細胞運動を整流化する微視的培養力学場の構築、2）よく定義された培養力学場における細胞の接着牽引力ダイナミクスの系統的解析、3）間葉系幹細胞の分化フラストレーションの発見、の 3 点の成果をあげている。特に成果 3 は、幹細胞の未分化保持材料としての応用可能性が強く期待され、新しい幹細胞操作材料の開発に貢献するものである。

（2）詳細

1）ファイマンラチェット型非対称弾性勾配ゲルによる細胞運動の整流化

メカノタクシスの誘導条件の本質は、細胞一体の接着面内で弾性率が急峻かつ不連続的に増加する弾性境界の導入にある[1-2]。このことはメカノタクシスが弾性境界においてのみ局所的に誘導される走行性であることを意味し、材料表面上での長距離にわたる細胞運動制御への応用の際には多数の弾性境界の機能的配置設計が必要となる。この課題に対して本項目では、鋸型の非対称弾性勾配を連続的に有するマイクロパターニングゲルを設計し、細胞運動の整流化の誘導について検討を行った（図 1）。光硬化性スチレン化ゼラチンゲル表面の弾性率分布を光リソグラフィー的にパターニングし、細胞運動の長距離整流化を可能とする非対称弾性勾配場の条件探索を行ったところ、約 10 kaの低弾性率領域と約 60 kPaの高弾性率領域間を約 30 μm幅で急峻に上昇し、約 60 μm幅で緩慢に減衰する非対称な弾性率分布が 90 μmおきに繰り返された非対称弾性勾配ゲルに、約 5 kPaの交差軟領域PSLを導入した系が最もよく整流化を誘導することがわかった（図 2）。細胞培養基材表面に非対称弾性勾配分布を設計することにより、細胞運動の長距離整流化が可能となることが示唆された（投稿中）。

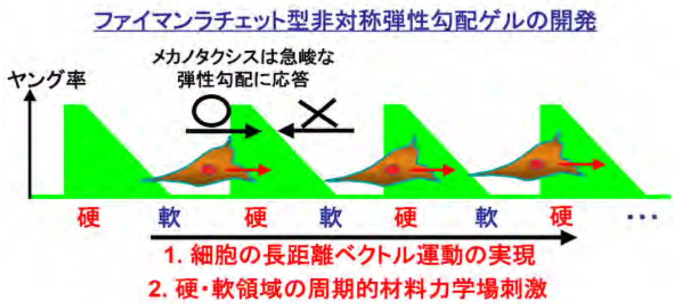


図 1. 非対称弾性勾配ゲルを用いた細胞の長距離ベクトル運動制御

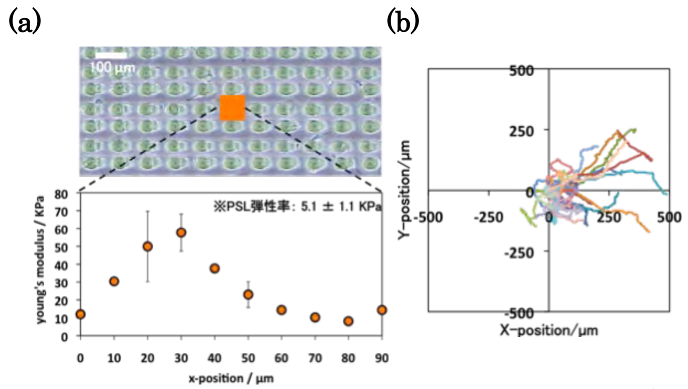


図 2. a) PSL を導入した鋸型非対称弾性勾配パターニングゲルの位相差顕微鏡像および単位パターンの弾性率分布. b) 3T3 線維芽細胞の 24 時間培養時における移動軌跡

2）弾性勾配ゲル界面における細胞接着牽引力分布の局所ダイナミクス解析

メカノタクシスを誘導する弾性境界条件を確立した上で、メカノタクシスのメカニズムの検討を行った。接着系細胞のアメーバ様運動における運動方向の決定は一般に，一体の細胞内に前進方向と後退方向の極性が形成されることに始まる。弾性境界近傍で運動する細胞の前進・後退領域の極性決定に関与するメカニカルな要因として，細胞接着班のサイズと分布，および収縮性細胞骨格から接着班に伝達され基材へと負荷される接着牽引力の分布のダイナミクスに着目した。メカノタクシスが起こる際の接着牽引力の挙動を牽引力顕微解析法により調べたところ，運動極性の決定に基材弾性率に依存した牽引力の経時的変化が強く関与している様子が可視化された（図 3）。すなわち，軟領域に侵入した細胞の一部領域においては牽引力の顕著な低下（図 3−⑤⑥）が，硬領域に侵入した細胞領域ではその顕著な増大（図 3−⑦⑧）がそれぞれ引き起こされ，特に牽引力の減少した領域の接着は不安定となり，硬領域での接着よりも速く仮足の退縮が誘起される。その結果，硬領域への細胞体全体のシフトが起こることにより，メカノタクシス挙動が発現するという機構が示唆された。

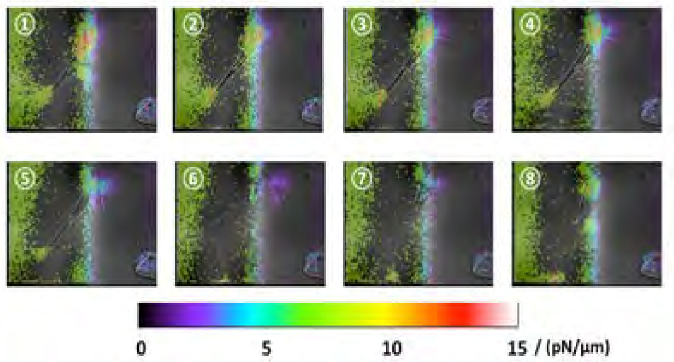


図 3. 弾性境界近傍で運動する3T3 線維芽細胞の接着牽引力ダイナミクス

3）微視的培養力学場設計に基づく幹細胞分化フラストレーションの誘導

幹細胞フラストレーション仮説とは、硬・軟領域を微細パターン化したゲル上で間葉系幹細胞 MSC に硬軟領域間の非定住培養を行った場合、特定の系統への分化誘導が抑制されてその未分化状態が維持される可能性について、私が独自に提唱している理論である。MSC は培養床の弾性率に依存して異なる細胞種へ分化することが知られており、もし硬・軟領域のいずれかに一定時間以上定住すると特定の系統への分化方向の決定が起こるが、硬・軟領域をランダムあるいは周期的に経験させると MSC の系統決定がブロックされるものと予想

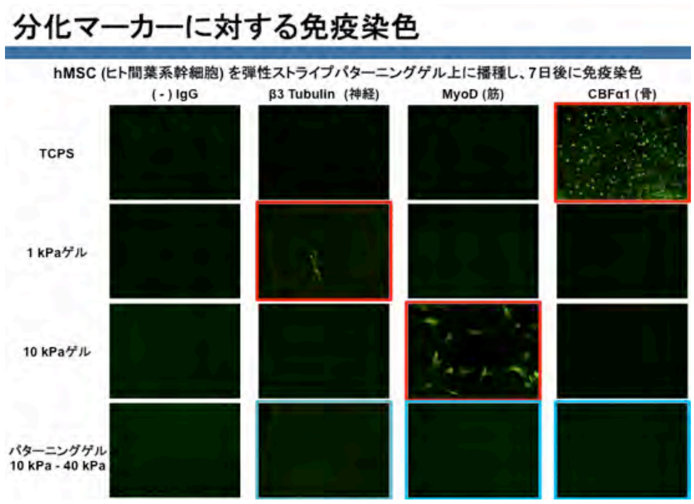


図4.10kPaおよび40kPaの弾性率を有する50 幅の交互パターン上で7日間培養後のMSCに対する各種分化マーカー発現の評価．神経、筋、骨原系統へのいずれの分化も抑制されている（最下段）

される。この仮説を検証するため、50 幅の硬軟ストライプパターン（硬領域：50kPa, 軟領域:5kPa）を作製し、この上での MSC の運動を一週間にわたり調べたところ、およそ 2～3 時間程の周期の硬軟領域間の非定住運動が誘導されることを確認できた。その後、MSC の幹細胞性を評価したところ、各種幹細胞マーカーの正常な発現および神経・筋・骨分化マーカーの明確な発現抑制が見られ、通常のプラスチックシャーレ上での培養に比べ、より良質の未分化状態を維持していることが明らかとなった（図 4）。

4）考察

以上のように本研究では、微視的培養力学場の系統的設計に基づく細胞運動と機能を操作する弾性基材の多用な可能性を開拓した。これらの成果の中で特に、異なる力学場間を強制的に移動させることで力学場シグナルの振動入力を駆動することによる間葉系幹細胞の分化フラストレーション現象の創発が確認されたことは、全く新規の発見である。そのメカニズムに関しては、ES 細胞においてその幹細胞性の維持が転写因子 Hes1 の発現レベルの短周期振動特性と深く関わっている現象が示唆を与えるものと考える。すなわち、遺伝子発現調節の上流に関わる Hes1 の振動が ES 細胞内でのその下流のタンパク質群の振動を誘起することが幹細胞性保持の要因となっているように、間葉系幹細胞においてもメカノシグナル入力という最上流刺激がその下流に続くメカノトランスダクション関連タンパク質群の振動を誘起することによって ES 細胞と同様の幹細胞性保持環境が細胞内に実現され得るものと考えることができる。このような力学場刺激による幹細胞の分化制御のメカニズムは研究が始まったばかりで十分な知見は未だ確立されていないが、そのメカノシグナル伝達様式としては、『力学場依存的メカノセンサータンパク活性のメカノアロステリック制御』→『接着斑構造リモデリング』→『細胞骨格構造制御による細胞内部応力の調節』→『細胞核の変形』→『核膜被層ラミナマトリックスに連結したクロマチンの高次構造制御』→『遺伝子発現調節』という流れが考えられている。これら各段階に関与する分子メカニズムが、幹細胞のメカノバイオロジーの領域で研究されているが、いずれの段階のシグナルタンパク質群の振動システムが幹細胞性保持に関わるか、今後の詳細な調査が必要である。

3. 今後の展開

本研究では、独自の弾性マイクロパターニング材料と技術を応用して、細胞運動の系統的操作材料の確立とともに、細胞運動と連動する力学場シグナルの振動入力システムの構築に成功した。最も重要な成果として、『幹細胞の分化フラストレーション』創発の実証に成功しつつある。この現象は幹細胞の未分化維持技術としての再生医療分野への応用可能性が期待されるが、一方そのような幹細胞操作ための基礎知見にとどまるものではないと考えている。すなわち、幹細胞性の本質は細胞内プロテオミクスの時空間振動ダイナミクスにあり、それが細胞のリプログラミングのメカニズムに深く関わる可能性を予想している。この視点から、次の展開として、iPS 細胞のメカノバイオロジー挙動を調べる予備実験にも既に着手している。将来的には幹細胞性の起源～幹細胞内トランスクリプトーム・プロテオミクスの非線形振動システムダイナミクスの特質を明らかにする研究へと発展させていきたいと考えている。

4. 自己評価

本研究では、ナノバイオメカニズム解明のための新しいナノ・マイクロメカニカルシステムを開発し、細胞運動研究の力学的側面と細胞内の生化学過程・シグナル伝達との関係の解析、および材料の精密設計に基づくメカノバイオロジー研究の展開をねらいとした。このねらいに対し、本研究では、細胞運動の自在な操作を可能とする培養力学場設計技術を構築でき、細胞運動のメカノバイオロジー研究を系統的に進める上で役立つ弾性パターニング材料の利用を提唱するとともに、革新的な成果として幹細胞の未分化保持材料の構築に着手することができた。当初に意図して研究のねらいはこれらの 3 方向で総合的に実現できたものと評価している。また、そのような成果ばかりでなく、本研究から一つの極めて重要な仮説が検証されつつある。『幹細胞の分化フラストレーション』であるが、この現象は単に幹細胞の未分化維持技術のための基礎にとどまるものではないと考えている。すなわち、幹細胞性の本質は細胞内プロテオミクスの時空間振動ダイナミクスにあり、それが細胞のリプログラミングのメカニズムに深く関わる可能性を予想している。将来的には幹細胞性の起源を明らかにする研究への発展性も生み出すことができたものと考えている。

5. 研究総括の見解

細胞行動の制御を目的として独自に開発した細胞接着性ゲルの表面弾性率分布のマイクロパターニング手法により、細胞運動を制御する細胞機能操作材料の開発を行った。

主な成果として、1)細胞運動を整流化する培養力学場の構築、2)培養力学場における細胞の接着牽引力ダイナミクスの解析、3)間葉系幹細胞の分化フラストレーションの発見、の 3 点があげられる。

本研究で細胞運動を操作する弾性基材開拓のための有力な指針を示したこと、ならびに間葉系幹細胞の分化フラストレーション現象の創発が確認されたことは興味深い新発見である。前者は細胞運動の力学的側面と細胞内の生化学過程・シグナル伝達との関係を理解するための基本となる指針が本研究によって得られることを意味し、また、後者は幹細胞内トランスクリプトーム・プロテオームの非線形振動システムダイナミクスへの展開が可能であることを示しており、どちらも将来、細胞運動制御を可能にする重要な知見が得られたものと高く評価される。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. S. Kidoaki*, Mechanics in cell adhesion and motility on the elastic substrates, *J. Biomech. Sci. Eng*.(2010), **5,** 218-228.
2. T. Kawano and S. Kidoaki*, Elasticity boundary conditions required for cell mechanotaxis on microelastically-patterned gels, *Biomaterials,* (2011) **32,** 2725-2733.
3. T. Kuboki, F. Kantawong, R. Burchmore, M.J. Dalby, S. Kidoaki*, 2D-DIGE proteomic analysis of mesenchymal stem cell cultured on the elasticity-tunable hydrogels, *Cell Structure and Function*, (2012) **37,**127-139.
4. M. Horning, S. Kidoaki, T. Kawano, K. Yoshikawa, Rigidity-matching between cells and the extracellular matrix leads to the stabilization of cardiac conduction, *Biophys. J.* (2012) **102,** 379-387.

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. S.Kidoaki, “Mechanobio-materials”: design of micropatterned elastic gels to control cell mechanotaxis and motility-related functions, 第48回生物物理学会年会, 2010 (招待講演)
2. 木戸秋 悟, 細胞運動・機能を操作する微視的培養力学場設計 表面科学 (2010) 31, 307-312.
3. 木戸秋 悟, メカノバイオマテリアル:細胞のメカノバイオロジーを操作する材料力学場設計 高分子 (2011) 60, 302-305.
4. 木戸秋 悟 “細胞の挙動を操作する微視的培養力学場の設計” 石原一彦、塙隆夫、前田瑞夫編集『バイオマテリアルの基礎』(第4章3)、日本医学館, 2010(分担執筆).
5. 木戸秋 悟, メカノバイオマテリアル:細胞運動・機能を操作する微視的培養力学場設計, 第60回高分子討論会, 2011 (招待講演)

研　究　報　告　書

「ナノシステムの大規模集積化に向けた高速電子線露光法の開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月
研 究 者：　木村　建次郎

1.　研究のねらい

CPU の高速化には、半導体素子の微細化が不可欠である。半導体素子の作製において、その微細化の鍵となるのが半導体露光装置であり、その光源をいかに短波長化するかが、量産向けの露光装置開発の中心的技術課題である。一方、研究用途では電子顕微鏡の応用技術である電子線露光装置が用いられ、10 nm 以下の半導体素子が試験的に開発され、その高速動作が実証されてきた。しかしながら、X 線より遥かに短い波長の波動を得ることが可能な電子線は、光において行われているように、LSI の回路情報に相当する任意のパターンを持つ電子線の束を発生する方法が未だ確立されていないこと、特定の回路情報を持つ電子線束の発生が実現されたとしても、大面積の電子線を均一に集束投影するための無収差投影技術が確立されていないことなどが、技術的課題として挙げられ、最先端半導体素子の量産用途において、用いられていないのが現状である。

そこで、本研究では、量産用の電子線露光装置の実用化に向けて、「任意のパターンを持つ電子線束を発生させる方法」と「電子線の光学系における収差の低減方法」について、独自に提案した要素技術の原理実証を行う。特に後者は、すべての荷電粒子顕微鏡の性能向上に関係する基礎的な研究として位置付けている。

2.　研究成果

（1）概要

本研究の成果は、回路情報を持つ大面積の電子線束を均一に縮小投影させるための要素技術「任意のパターンを持つ電子線束を発生させる方法」と「電子線の光学系における収差の低減方法」の原理実証の成功である。前者においては、半導体製造装置の分野とはかけ離れた暗視装置の分野で主に用いられるマイクロチャネルプレート（Micro-Channel Plate: MCP）を電子線束の発生に使用する点に大きな工学的発見がある。実際に、MCP を用いた電子線露光装置は、本研究期間中に米国で基本特許が成立した。MCP は光電子倍増管を束にしたデバイスで、片側に光電変換膜を備え、光電変換膜に入射した光子は電子に変換され、管内にて数万倍に増幅された後、反対側から電子線束として出射される。暗視装置としては広く実用化され、月明かり程度で数千メートル先を視ることができる。すなわち、MCP は、光のパターンを増幅された電子線束のパターンに変換するデバイスと表現することができる。露光を高速に行うためには、電子線の投影面において、各点あたり最大 nA 程度の電流を必要とする。一括露光装置の電子光学系においては、収差低減を目的として、電子線束をエネルギーフィルタ、球面収差補正機を通過させ、総電流値が抑制されるため、レンズ入射時の電流値を十分に確保するために、光電変換時の増幅が不可欠となる。 加えて、MCP を用いる利点として、MCP に照射する光にパターンを加えることで、パターニングされた電子線束

を得ることができるため、電子線のマスクが不要となる。従来の一括電子線露光装置におけるマスク貼り合わせによる位置精度の悪化の問題が回避されるため、均一なパターンの露光が実現されることも期待できる。MCP の光電変換膜に照射する光のパターンの生成は、プロジェクタにおいて実用化にされている DMD（Digital Micro-mirror array Device）を用いる。本研究にて提案した露光法を纏めると、パターン光を MCP に集束、照射し、電子線束に変換後、電子光学系にて半導体基板に集束、投影する方式となる。

（2）詳細

研究テーマ

「任意のパターンを持つ電子線束を発生させる方法 － MCP 電子線露光装置の開発 －」

図 1 に示す MCP 電子線露光装置の試作機を開発し、原理実証に成功した[1, 2]。本装置の開発要素を列挙すると、「① 光パターンの生成と MCP への照射」「② 光電変換」「③ MCP 出射電子のコリメートと集束」「④ 光軸調整」となる。4 つの開発要素の中で、最も装置開発コストの増大と直結するのが、②の光電変換である。MCP 端面の光電変換膜はアルカリ金属を主成分とし、大気解放することができない。そのため、常に高い真空度を維持した真空チャンバーを電子光学系とは別に設置しなければならない。そこで、本研究では、耐酸化性を有し、紫外光によって光電変換可能なヨウ化セシウムを光電変換膜の材料として選定し、真空に係る装置コストを削減した。そのため、励起光源としては、真空紫外光(波長 172nm)を採用し、加えて、MCP 出射電流値を向上させるため、内部に鏡面を備え、指向性を高めたヘッドオン型の紫外光源ランプモジュールを採用した。また、MCP 全面に均一に真空紫外光が照射されるように、ランプモジュールを XYZ ステージ上に設置し、光強度の分布を調整可能な仕様にした。真空紫外光が絶縁碍子に照射されると耐圧が低下するため、ランプモジュールと MCP 光電変換面に金属製のカイドチューブを設置し、絶縁破壊による MCP の損傷を防いだ。MCP からの出射電子は、ウェーネルト電極により逆バイアスを印加することで発散を防ぎ、集束レンズに入射させた。電子光学系としては、装置製作コストが安価で、入射電子線のエネルギーと

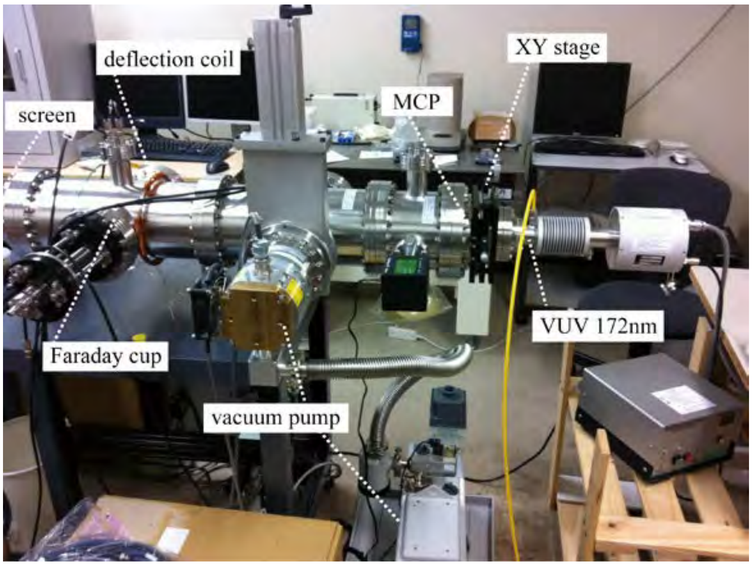


図 1: 任意のパターンを持つ電子線束を発生させる MCP 電子線露光装置

出射電子線のエネルギーが等しく、制御性の良いアインツェルレンズ 2 段構成を採用した。光路での電子線束を評価するために、ファラデーカップを挿入、2次元走査する機構を 2 箇所設け、さらに電子線束の投影位置には蛍光板を設置し、パターンの集束性を評価した。また、光軸の調整のため、2段目のアインツェルレンズを位置調整可能にし、またMCP背後にマスクを設置する機構を設け、光軸を Z 軸とした場合、マスク中心位置の XY 座標を調整可能とした。また、投影位置の XY 座標調整のため、光軸に磁束が直交するように、ヘルムホルツコイルを設置した。

以上のシステムを荷電粒子線装置メーカであるオメガトロン社とともに、設計、試作し、世界で初めて、MCP 電子線露光装置でパターンの縮小投影の原理実証に実験に成功した。最大 10 分 1 の倍率で縮小が達成でき、ピクセル解像度としては、2 ミクロン径の MCP ポアを使用した場合、200 nm の解像度が実現できる。また、1000 時間の電流安定性を確認したと同時に, マスク交換のための大気開放後にも MCP の劣化は見られなかった。

3. 今後の展開

今後は、本研究にて原理実証した収差補正機を搭載した電子顕微鏡を実現し、卓上の電子顕微鏡にて 1nm の空間分解能を目指す。また、スーパーコンピュータ京と連携した収差補正機を実現し、世界最高性能の電子顕微鏡の実現、電子波散乱トモグラフィの実現をめざし、物質解析技術の進展に貢献する。さらに、それらの高精度電子光学技術を MCP 電子線露光装置に応用し、10 nm 以下の最先端半導体素子の量産に寄与する計画である。

4. 自己評価

本研究にて原理実証した MCP 電子線露光法、収差補正機ともに、世界的にも前例のない方法である。半導体露光装置は、製造費として 10 億円程度必要とする。今回は、その 20 分の 1 のファンドにおいて、原理実証に成功したことは、必要な精度を出すための無数にある開発事項の篩い分け、工夫の集積に成功しており、工学上、大変意味のある結果であると理解している。すなわち、原理実証が成功した現時点で、装置の高精度化を行うための投資、開発リスクを大幅に低減することができた。後半の収差補正機の開発は、荷電粒子線装置史上、現状では前例が見つかっていない。現時点で、電子光学レンズを同じ性能で 20 分の 1 に小型化可能であることが計算機実験により実証されている。これは超小型高分解能電子顕微鏡が実現されることを意味し、また一括電子線露光装置の高精度化、超高分解能電子顕微鏡の実現など顕微鏡分野において重要な進展であると理解している。

5. 研究総括の見解

本研究は、量産用電子線露光装置の実用化に向けて、①「任意のパターンを持つ電子線束を発生させる方法」 ②「電子線の光学系における収差の低減方法」について提案し、要素技術の原理実証を行うことを目的としている。電子線は、任意のパターンを持つ電子線束を発生する方法が確立されていないこと、大面積の電子線を均一に集束投影するための無収差投影技術が確立されていないことが背景にある。

課題①については、マイクロチャネルプレート（Micro-Channel Plate: MCP）を電子線束の発生に使用するという独自の方法を提案し、世界で初めて、MCP 電子線露光装置でパターンの縮小投影の原理実証に成功した。（米国基本特許が成立）。本研究の成果は、回路情報を持つ大面積の電子線束を均一に縮小投影させるための要素技術となる重要な成果といえる。

課題②は、荷電粒子線輸送、照射装置の性能向上にとって重要な基礎課題であり、早期実用化が要請されている重要な研究課題である。独自に「近軸光線レンズ」を発案しその原理実証に成功した。本研究にて原理実証した MCP 電子線露光法、収差補正法ともに、世界に前例のない方法であり、「さきがけ」という限られた予算と期間内にこのような世界最先端の原理が実証され、試作されたことは、特筆に値する。

今後は、本研究にて原理実証した収差補正機を搭載した世界最高性能の電子顕微鏡の実現や電子波散乱トモグラフィの実現をめざしてほしい。そのためにも本研究者（木村建次郎）に長期的研究継続が可能な措置をひきつづき考慮することが望まれる。

6.　主な研究成果リスト

（1）特許出願

研究期間累積件数：2件

1.

発　明　者： K.Kimura, K.Kobayashi, H.Yamada, K.Matsushige

発明の名称： ELECTRON BEAM IRRADIATION DEVICE

出　願　人： 京都大学

特許成立日時： 2010/11/9

特許番号： US 7,829,863 B2

2

発　明　者： 木村　建次郎, 芳賀沼　哲夫

発明の名称： 電子線照射装置,

出　願　人： 神戸大学

出　願　日： 2011/8/5

出 願 番 号： 2011-171729

（2）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

3, Kenjiro Kimura, Ryu Haganuma, Shunsuke Haganuma, Testuo Haganuma
“Maskless Electron Beam Stepper”, 国際ナノテクノロジー総合展, 2010 年 2 月.17~19 日.

4, 木村　建次郎
“次世代半導体デバイス検査技術、製造技術に関する研究”, 村田製作所, 2010 年 10 月.26 日.

5, Kenjiro Kimura, Ryu Haganuma, Shunsuke Haganuma, Testuo Haganuma
“Maskless Electron Beam Stepper”, 国際ナノテクノロジー総合展, 2011 年 2 月 16 日~18 日.

6, Kenjiro Kimura, Ryu Haganuma, Shunsuke Haganuma, Testuo Haganuma
“Maskless Electron Beam Stepper”, セミコン・ジャパン 2011, 2011 年 12 月 7 日~9 日.

7, Kenjiro Kimura, Notarisation by notary public in Kobe, register No. 47 2012/3/1.

研　究　報　告　書

「ナノ細線状半導体光触媒システムの開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月
研 究 者：　齊藤　健二

1.　研究のねらい

半導体光触媒を用いたソーラー水分解による水素製造（$H_2O \rightarrow H_2 + O_2$）は、近年の急速な化石燃料の消費と、それに伴い深刻化する環境問題を改善するための方法の一つとして、活発に研究が行われている。光触媒は、固相法、水熱法、錯体重合法等で合成されており、一般的には数ミクロン程度の大きさを有する。これまでに、GaN-ZnO固溶体や$Ru/SrTiO_3$-$BiVO_4$等の高性能な可視光応答性光触媒が報告されている。しかし、本技術を実用化するには効率を飛躍的に向上させる必要がある。ここで、光触媒が示す活性というものは、光触媒自体の大きさ、結晶性、表面状態（結晶面）等を変えると大きく変化することが知られている。つまり、これらの活性支配因子を熟慮することで、高性能な光触媒を開発することが可能になる。ナノサイズおよび大きな比表面積（単位体積あたりの表面積）を有するナノ細線状半導体は、固相法等に代表される通常の方法で得られるバルクとは異なる特異な性質を有することから、CVD等のドライプロセス技術を利用して合成し、それらの物性研究が盛んに行われている。光触媒分野では、ナノ細線状半導体を構成要素とする光電極触媒としての報告は数多くある。一方、電極触媒のような、外部電場を利用したバンドベンディングによる強制的な電荷分離の促進ができない不均一系（水溶液中に光触媒を懸濁させるのみ）では、報告数が極めて少ない。ナノ細線という特異な構造体を生み出し、かつ不均一系光触媒反応を検討するためのグラムスケール合成を可能にする方法は、本さきがけスタート時には水熱法しかなかった。水熱法は、装置さえあれば簡便に合成できるという利点があるが、目的とする光触媒の種類や結晶構造に大きく依存すると共に、使用できる出発原料の種類の制約により、ナノワイヤーの半径（サイズ）制御などは極めて困難である。これに対し、常圧下、金属錯体を出発原料として三級アミン中で加熱を行うと、自己組織的にナノ細線構造が生成することを見いだし、得られたナノ細線状半導体が高い光触媒性能を有することを明らかにした。そこで本研究では、金属錯体を基盤とした独自の方法を用い、種々の構成元素からなるナノ細線状半導体光触媒群を創製することを目的とした。本合成法の汎用性を明らかにするだけでなく、ナノワイヤーの高次組織化過程を理解することで、光触媒反応に有利な機能の創発を実現することも検討した。

2.　研究成果

（1）概要

本さきがけのスタート時に掲げた目標は、「世界に先駆けてナノ細線状半導体光触媒群を開発する」というものであった。本目標を達成するため、合成・光触媒特性に関する検討項目として、（1）金属錯体を用いた独自の合成法が目的物の結晶構造に依らない一般化された方法になりうるかを検証する、（2）水を完全分解（$H_2O \rightarrow H_2 + O_2$）できる光触媒を開発する、（3）バルクの光触媒活性を凌駕する可視光応答性光触媒を開発する、（4）ナノ細線構造が

バルクよりも光触媒活性が向上する理由を解明することを設定した。以下に詳細を記載する。

(2)詳細

研究テーマ 1「金属錯体をベースとした方法が汎用性のあるナノ細線構造の合成技術になりうるかの検証」

本法では、シュウ酸を支持配位子とする金属錯体とトリオクチルアミン($[CH_3(CH_2)_7]_3N$)が必須である(図1)。これは、以下の機構によってナノワイヤーが形成されるためである:(1)初期の加熱過程(< 463 K)でアミンがシュウ酸配位子と一部配位子置換し、金属に配位したアミンのメチレン鎖同士の疎水性相互作用により一次元成長した構造体(ナノワイヤー)が形成される、(2)加熱温度がシュウ酸の分解温度に達すると(< 573 K)、シュウ酸の脱離によって金属種が凝集して非晶質のナノワイヤーとなる。非晶質ナノワイヤーは焼成によって結晶化される。

Nbを中心金属にすると、バルクよりも高活性な光触媒特性を有するNb_2O_5ナノワイヤーを合成できることがわかっていた。そこで、Nbやそれ以外のd^0電子配置の金属イオン(M_1)を用い、反応系内に他の金属イオン(M_2およびM_3)を添加することで、様々な半導体群の合成を行った。その結果、TiO_2, ZrO_2, $ANbO_3$ (A = Li, Na, Ag), Ta_2O_5, MoO_3等、結晶構造に依らず紫外光応答性のナノ細線状半導体群を合成できることがわかった(図1上)。

酸化物半導体の価電子帯は一般的にO2p軌道で形成されており、エネルギー的に深い位置(約+3 eV)に存在する。よって、酸化物は紫外光しか吸収できないものが多い。これを可視光吸収させる手段の一つとして、遷移金属ドーピングが挙げられる。遷移金属ドーピングでは、バンド間の禁制帯内に不純物準位が形成されることで可視光吸収できる。そこで、ドーピング系ナノワイヤーの合成も検討したところ、Nb_2O_5ナノワイヤーにRhをドープできることがわかった(図1下)。

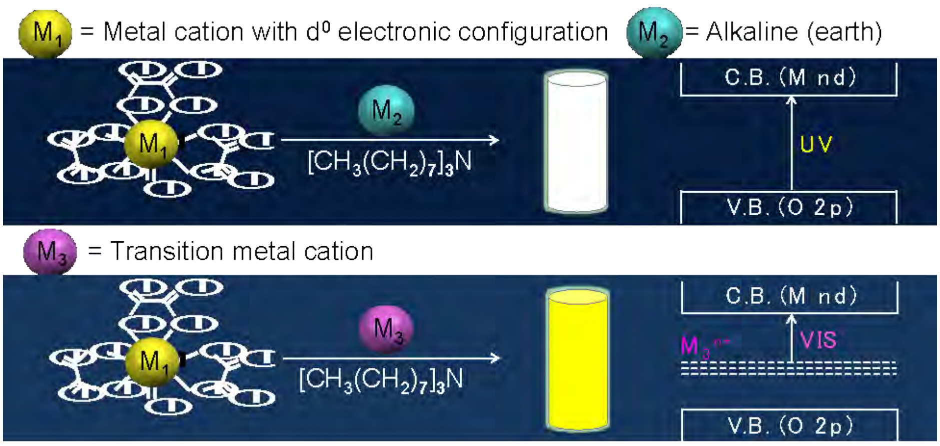


図1　金属錯体を用いたナノ細線状半導体の合成戦略

研究テーマ 2「水を完全分解($H_2O \rightarrow H_2 + O_2$)できる光触媒を開発する」

研究テーマ１で得た紫外光応答性の$NaNbO_3$ナノワイヤー上にRuO_2を助触媒として担持し、水分解を紫外光照射下で検討した。その結果、固相法で合成した$NaNbO_3$バルクは活性を示さなかったのに対し、本ナノワイヤーを用いると、化学量論量のH_2とO_2の発生を確認した（図 2）。これは、半導体ナノワイヤーを用いて水分解が進行した世界初の報告例である。$NaNbO_3$以外にも、$LiNbO_3$ナノワイヤーも水分解活性を示した[1,2]。

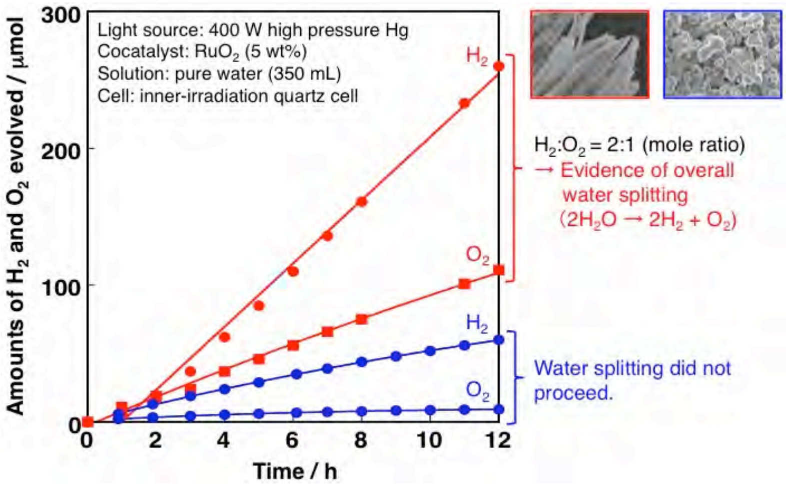


図 2　$NaNbO_3$ナノワイヤーおよびバルクを用いた紫外光照射下における水分解反応

研究テーマ 3「バルクの光触媒活性を凌駕する可視光応答性光触媒を開発する」

研究テーマ 1 で得た可視光吸収できるRhドープNb_2O_5ナノワイヤー（TT-Nb_2O_5:Rh-NW）を用い、光触媒反応を検討した。同じ焼成温度で固相法により合成したバルクと物性を比較したところ、結晶性は低く、表面積は同じであった。一般的には、光触媒活性が向上するとは考えにくいものであった。しかし、硝酸銀を酸化剤とする酸素生成反応を検討したところ、バルクよりも遥かに高い光触媒活性を示した（30 倍の向上、図 3）。このように、可視光応答性ナノワイヤーがバルクの特性を超えたのはこれが世界初の例である。

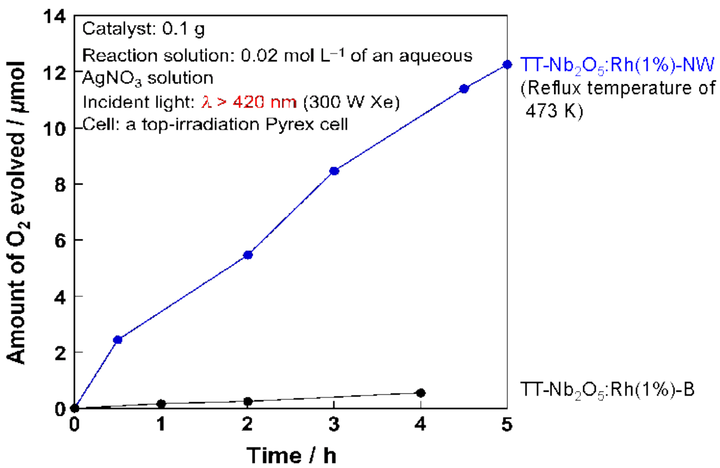


図 3　RhドープNb_2O_5ナノワイヤーおよびバルクを用いた可視光照射下での酸素生成反応

研究テーマ 4「ナノ細線構造がバルクよりも光触媒活性が向上する理由の解明」

一次元に単結晶成長したナノワイヤーは、バルクに比べて粒界が生成しにくく、光触媒として利用するには有利である。また、ナノワイヤーを電極に対して垂直配向させると、キャリア（電子または正孔）がナノワイヤーの成長方向に沿って移動する（電荷分離が促進される）ことが「提案」されている。それに対し、独自に合成したNb_2O_5ナノワイヤー光触媒上で励起電子が異方的に移動し、バルクよりも光触媒特性が大きく向上することを明らかにした[3)]。

しかし、上述のような現象はあくまで一例であり、全ての系で起こるわけではない。$NaNbO_3$ナノワイヤーの系では、バルクと比較して結晶性は大きく劣っていたのに対し、水分解活性が発現（研究テーマ 2）した。RhドープNb_2O_5ナノワイヤー（研究テーマ 3）では、結晶性が劣り、表面積は同じであったのに劇的な活性向上が見られた。両テーマでは、上述のような現象は観測されていない。原因究明の困難性の要因として、ナノワイヤーと全く同様の物性を示すバルクを用意するのが不可能に近いことと、材料を変えることで物性が、合成法を変えることで表面状態等が変化してしまうことが挙げられる。

新たに開拓した研究テーマ「溶融塩を利用した可視光応答性層の導入および Oriented Aggregation 機構を利用した可視光応答性ナノ細線状半導体の創製」

溶融$AgNO_3$や$SnCl_2$を用いたイオン交換反応を利用することで、研究テーマ 1 で合成した$NaNbO_3$ナノワイヤーの表面を$AgNO_3$や$SnNb_2O_6$で被覆したコアーシェルナノワイヤーを創製した[4,5)]。$SnNb_2O_6$では、可視光照射下（□> 420 nm）におけるメタノールを還元剤とする水素生成反応では、バルクと同程度の活性を示した（図 4 左図）。

市販のMoO_3を$AgNO_3$中に懸濁させて還流するだけで、層状構造を有する単斜晶系の$Ag_2Mo_2O_7$ナノワイヤーを世界で初めて合成した。本ナノワイヤーは、液相合成で一般的なOstwald Ripening機構ではなく、Oriented Aggregation機構で成長していることも確かめた。さらに、可視光照射下で硝酸銀水溶液からの酸素生成反応に活性を示すことを初めて見いだした（投稿中、図 4 右図）。

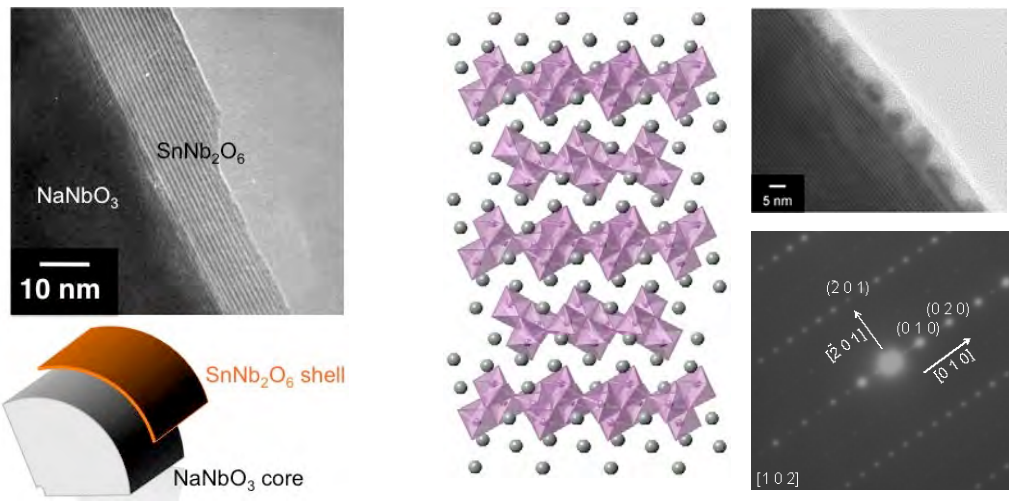


図 4　$SnNb_2O_6$-$NaNbO_3$（左図）および$Ag_2Mo_2O_7$ナノワイヤー（右図）

3．　今後の展開

本研究で開拓したナノ細線状半導体の合成ルートを利用し、さらなる材料探索を行い、ソーラー水分解を達成するとともに、様々な物質群を用い、活性発現や劇的な活性向上の要因を解明する。さらに、開発した方法はナノ細線状半導体の大量合成が可能であるため、光触媒にとどまらず、他の研究分野に積極的に応用することも視野に入れている。

4．　自己評価

ナノ細線という特徴的な構造体に注目し、オリジナル合成法の探求、その単結晶成長機構の解明、そして半導体光触媒としての性能評価を行った。合成面では、これまでの金属錯体ベースの方法だけでなく、溶融塩処理による表面構造の変換や、市販のMoO_3粉末を利用した、Oriented Aggregationという通常では稀な機構を創出する方法を開拓した。光触媒の性能面では、水分解や可視光照射下でバルクを遥かに上回る活性を世界に先駆けて達成した。しかし、様々な検討にも関わらず、材料依存の観点から「なぜナノ細線にすると性能が良くなるのか」という質問の回答としては、スペキュレーションの域を脱することができなかった。ソーラー水分解という極めて高難度な化学反応を促進する光触媒システムを構築するには、多角的な視点からアプローチを行うことが肝要である。ナノ細線状半導体を光触媒として利用できている例は未だ少ないが、さきがけの研究成果が本研究分野のさらなる発展に貢献することを期待する。

本研究は、さきがけの支援なしで展開することは不可能であったと考えられる。さきがけ最終年度には二度の異動があり、集大成の時期に研究が思うように推進できない期間もあったが、長田総括および佐々木技術参事に二度目のサイトビジットをして頂き、叱咤激励も頂くことで研究の進め方について再考する機会ができ、集中力も維持することができた。アドバイザーの先生方からは技術的なコメントだけでなく、自身の研究を客観視できるきっかけを頂いた。大學事務参事にも領域会議だけでなく、予算関係や異動の際に大変お世話になった。本部担当の横田さんにも領域会議の際に様々なコメントを頂いた。飯塚さんにも種々の書類関係で大変お世話になった。本さきがけ研究は上述の方々の援助によって推進できた。最後になりましたが、さきがけの関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

5．　研究総括の見解

様々な構成元素からなる世界最高レベルの光触媒活性を持つナノ細線状半導体群を創製することを目的としている。

この目的実現のため、（1）ナノ細線状半導体合成法を普遍化された方法にする、（2）水を完全分解（$H_2O \rightarrow H_2 + O_2$）できる光触媒を開発する、（3）バルクの光触媒活性を凌駕する可視光応答性光触媒を開発し、（4）その理由を解明する、という 4 つの課題を設定した。（1）では、TiO_2, ZrO_2, $ANbO_3$ (A = Li, Na, Ag), Ta_2O_5, MoO_3等のナノ細線状半導体群が結晶構造に依らず一般的に合成できること。（2）では$NaNbO_3$ナノワイヤーで水分解すると、化学量論量のH_2とO_2が発生すること（これは、半導体ナノワイヤーを用いて水分解が進行した世界初の報告例）。（3）ではRhドープしたNb_2O_5ナノワイヤー（TT-Nb_2O_5:Rh-NW）は、固相法で合成したサンプルに比較して 30 倍高い光触媒活性を示すこと。（4）では、4Nb_2O_5ナノワイヤー上で励起電子が異方的に

移動することがその理由であることを明らかにした。

本研究で、様々な金属錯体系に関し、ナノ細線状半導体の一般的合成ルートを開拓し、それらが高い光触媒能を有していることを示したのは大きな成果といえる。しかし、ナノ細線にするとなぜ触媒能が良くなるのかという基本的疑問は相変わらず未解決のままであるのが残念である。

今後は、さらなる材料探索を行いナノ細線固有の活性発現機構を解明して世界トップレベルの活性触媒物質の探索を期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Saito, K.*; Kudo, A.* Niobium-complex-based syntheses of sodium niobate nanowires possessing superior photocatalytic properties. *Inorg. Chem. (Communication).* 2010, *49*, 2017-2019.
2. Saito, K.*; Koga, K.; Kudo, A.* Lithium niobate nanowires for photocatalytic water splitting. *Dalton Trans. (Article).* 2011, *40*, 3909-3913. (***Selected as an outside back cover***) (***invited***).
3. Saito, K.*; Kudo, A. Diameter-Dependent Photocatalytic Performance of Niobium Pentoxide Nanowire. *Dalton Trans. (Article).* In press (Article DOI: 10.1039/C3DT32924K).
4. Saito, K.*; Koga, K.; Kudo, A.* Molten salt treatment of sodium niobate nanowires affording valence band-controlled ($AgNbO_3$)-($NaNbO_3$) nanowires. *Nanosci. Nanotech. Lett. (Communication).* 2011, *3*, 686-689. (***invited***).
5. Saito, K.*; Kudo, A. Fabrication of highly crystalline $SnNb_2O_6$ shell with a visible light response on $NaNbO_3$ nanowire core. *Inorg. Chem. (Communication).* In revision.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1　The 19th International Conference on Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy (Caltech, USA, August 2, 2012, Oral Presentation)
「Composite semiconductor nanowire as a visible light responsive photocatalyst」

2　40th International Conference on Coordination Chemistry (Valencia Conference Center, Spain, September 11th, 2012, Oral Presentation)
「Visible light responsive semiconductor nanowire given by metal complex-based strategy」

3　太陽光エネルギーによる物質変換に関するシンポジウム(2012 年 9 月 24 日、新潟大学、日本)
「ナノ細線状半導体の光触媒特性」(招待講演)

4　錯体化学若手会関東支部(2011 年 11 月、東京大学、日本)
「優れた光触媒特性を有するナノ細線状半導体」(招待講演)

著作物

1　工藤 昭彦、齊藤 健二 電気化学会編、「電気化学便覧 第6版」、第8章、3節、項目3
「エネルギー獲得型光触媒」、印刷中、丸善出版株式会社.

2　齊藤 健二 単著、「光触媒の表面を加工する ― セシウム処理によるイオン交換サイトの導入―」、
化学、66巻、3号、pp.64-65、化学同人.

3　齊藤 健二 単著、「M13ウィルスを利用した可視光応答性酸素生成光触媒」、
触媒、53巻、6号、触媒学会、pp.377.

研　究　報　告　書

「ナノ構造を利用した高感度質量分析総合システムの開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月
研 究 者：　高見澤　淳

1.　研究のねらい

多種多様な化学物質が製造・利用、そして排出されている今日、化学物質を分析する技術の発展も目覚ましい。現在までに開発された化学物質は 1000 万種以上、使用された化学物質は 10 万種、日常的に使われている化学物質は 1 万種以上にものぼるといわれている。これらを分析する手法もレーザー分光・核磁気共鳴(NMR)・X 線構造解析・質量分析法等多岐にわたっているが、既存の分析装置では観測できない物質も多い。このような『測定できるものしか測定していない。試料の 90%は不明のまま』という現状を乗り越えるためには、現在の分析手法ではままならないのは確かである。

質量分析法において試料を検出するためには試料をイオン化する必要があり、この部分の開発が感度向上に重要な影響を与える。現在主に利用されている方法では電子衝撃法(EI)(1)、化学イオン化法(CI)、 原子衝撃法(FAB)、 エレクトロスプレーイオン化法(ESI)、マトリックス支援レーザー/脱離イオン化法(MALDI)など様々なイオン化法がある。その中でも分子をなるべく壊さずにイオンにする方法を「ソフトイオン化法」と呼び、上記に上げた中では ESI や MALDI が該当し、さらに大気圧化学イオン化(APCI)等のイオン化法もある。固体試料をソフトに高感度で測定できる MALDI 法ではタンパク質などの巨大分子の測定も可能である。もう一方の方法である ESI は溶液中で行う最もソフトなイオン化法であり熱不安定化合物などの測定も可能である。これらに述べた方法はいずれも一長一短ある方法であり、測定する試料分子によってイオン化法を使い分けているのが現状である。しかしながら現状のイオン化法で対処できない物質も多々存在するのも確かであり、特に低極性分子をソフトにイオン化できる方法はほとんど存在しない。提案者は新たに図 1 に示すようなテトラキス[3,5−ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ホウ素リチウム(LiTFPB)をカチオン化剤として利用し低極性分子を非極性溶媒中でイオン化することに成功した。本提案ではこの新たに合成したカチオン化剤を用いることで理想的にはすべての低極性・非極性分子を非極性溶媒中でイオン化する可能性を模索して研究を行っている。高感度化にはミセルやバブルなどのナノ構造を利用してイオン－分子反応の効率を高め、現代のライフサイエンスの要求に耐え得る汎用性の高いイオン化法を目指す。

2.　研究成果

（1）概要
(a)測定困難な種々の分子のイオン化 炭化水素類は質量分析において最もイオン化が困難な試料の一つである。本提案で新たに合成したイオン化剤を用いて溶液中での炭化水素類のイオン化にはじめて成功した。また、その他にも液晶分子をはじめとして種々のイオン化が困難な分子のイオン化にも成功してい

る。

(b)非極性溶媒中での解離定数の算出法の開発

非極性溶媒中で解離定数を算出するのは非常に困難である。本研究で非極性溶媒中での解離定数の算出法を開発した

(c)非極性溶媒中での電場の活用法の確立

質量分析分野において困難とされる低極性溶媒中での電場の利用法を確立した。

(d) ナノ構造を利用したイオン化方法の萌芽的成果

(2)詳細

(a) 測定困難な種々の分子のイオン化

炭化水素類は質量分析において最もイオン化が困難な試料の一つである。本提案で新たに合成した AgTFPB を用いて炭化水素類のイオン化を行った。測定した試料のスペクトルを図1(エイコセン)、図 2(テトラコサン)に示す。エイコセンは一つ不飽和結合をもつ炭化水素であり、テトラコサンは不飽和結合をもたず極性が全くない分子である。これらの試料のうち LiTFPB では不飽和結合をもつエイコセンのみイオン化が可能であったが、AgTFPB を用いるとテトラコサンにおいても非常にはっきりとカチオン化された測定試料が観測された。Ag カチオンは Li に比べるとアルキル鎖への親和性が高いためだと考えられる。この測定例は溶液中でのアルカンのイオン化例としては世界初である。測定限界はこの条件下だと C16 までである。

分析化学において混合物の分析ほど困難なものはなく特にアルコール系が持つヒドロキシル基などは振動分光においても測定ピークが幅広くなりがちなため分離・同定するのは非常に困難である。本提案では生体分子の酸素吸着機能を利用しようと考えヘムと同様の化合物である 8,13-Bis(ethyl)-3,7,12,17-tetramethyl-21H,23H-prphine-2,18-dipropionic acid iron(III) chloride Mesohemin (Fe(III) Mesoporphyrin IX chloride)をカチオン化し、この化合物を$TFPB^-$を対アニオンにもつカチオン化剤として用いたところ、メントール(図 3)のような従来非常に検出されにくい物質の検出に成功した。メントールは今まで我々が研究してきたLi^+でも検出可能ではあるが非常に検出感度が低くまた多量体がメインピークとなる欠点がある。また図 4 に示すように、同じ酸素原子でもカルボキシル基やケトン基にはつかずヒドロキシル基に優先的に結合することが明らかになってきている。

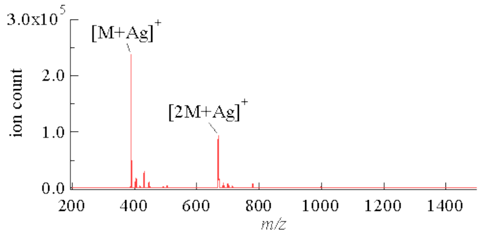


図 1

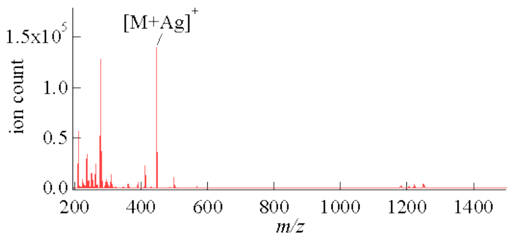
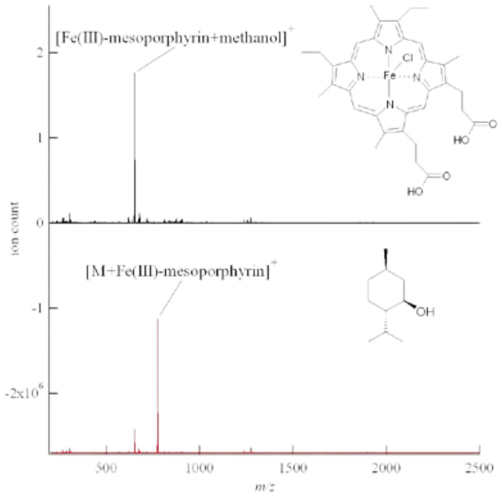


図 2



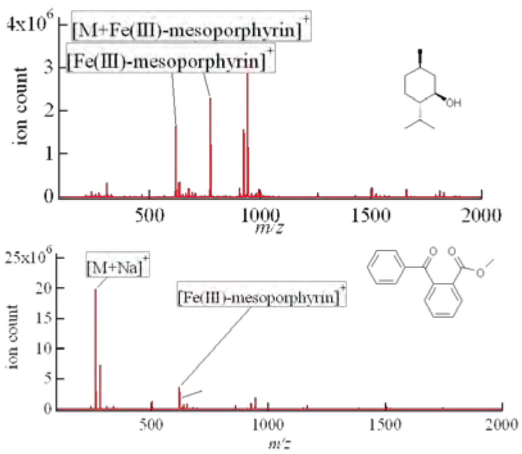


図 4　　　　　　　　　　　　図 5

(b) 非極性溶媒中での解離定数の算出法の開発

我々が開発してきた溶液イオン化においてメカニズムを知っておくことは重要であり今後の開発にもつながる。メカニズム解明のために反応効率を疑似的に 100%にした、すなわち最初からカチオンをかさ高い有機カチオンとした試薬(R−TFPB；R＝テトラブチルアンモニウム(TBA)、テトラヘキシルアンモニウム(THA)、テトラオクチルアンモニウム(TOA))を合成し非極性溶媒中に溶解してこれをイオンペアとし濃度依存性を測定する実験を前年度に引き続き行っている。溶液中での解離平衡の理論といくつかの仮定を利用することで溶液中でのイオンペアの解離の程度を定量的に求めることに成功した。現在論文執筆の準備に取り掛かっているが非極性溶媒中での電解質の一般的な解離度を求める方法にもなりうるので特許を出願した。

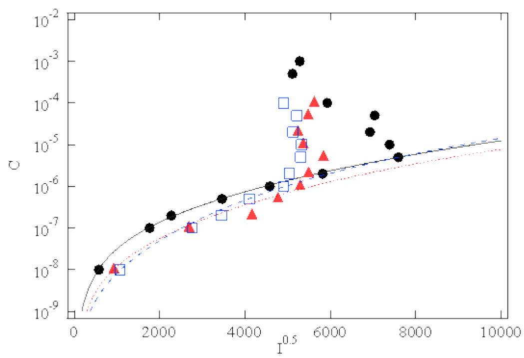


図 6 有機カチオンに変更したイオン化試薬信号強度の濃度依存性とフィッティングカーブ(黒：TBA－TFPB、赤：THA－TFPB、青：TOA−TFPB)

(c)　非極性溶媒中での電場の活用法の確立

従来のエレクトロスプレー法では試料分子をイオン化するのに電場を利用するため溶媒に

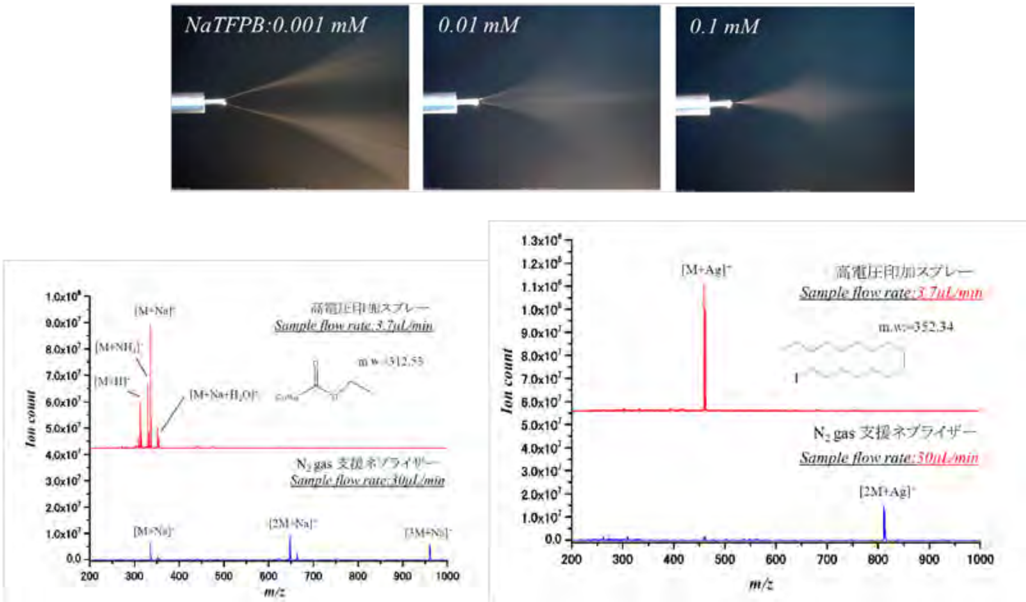


図 6　従来型と電圧印加型の比較

水やアセトニトリル、メタノールなど極性溶媒が利用されている。本提案では非極性溶媒を使用しているが、電離を促す電場の利用は測定感度向上が期待できるだけでなくカチオンの濃縮による反応効率の上昇も期待できる。TFPB 塩の濃度工夫により通常困難である非極性溶媒中における電場の利用が可能となり測定感度の向上が見られた。通常非極性溶媒において電場を利用するのは非常に困難である。本研究において TFPB カチオン化剤は非極性溶媒中においても、ある程度電離することが明らかになりつつある。今回新たにカチオン化剤の濃度制御によりスプレーが可能であることを見出した(図 6)。この現象を利用してコレステロールを測定したところ従来型に比べて 10 倍程度の測定感度向上を達成し、さらに多量体生成を抑制することに成功した。測定試料の流量も従来の 10 分の 1 程度で済むために微小な試料量でも測定は可能であると考えられる。

3.　今後の展開

　本提案は基本的に質量分析の測定感度を向上させるための工夫としてナノ構造を利用する研究であるが特に将来的に本提案が役に立つ分野と今後の発展の展望として以下の 2 分野を想定している。

⑴環境分析

　環境ホルモンや環境汚染物質(ダイオキシン・多環芳香族等)は質量分析法で測定するには困難な物質も多い。また最近は難燃剤であるポリブロモジフェニルエーテル(PBDE)等の規制も厳しくなってきており定量的に測定できる方法が模索され始めている。本研究で得られた成果を生かして環境ホルモン等の非破壊測定を目指す。

⑵原油分析

現在化石燃料の枯渇に関して深刻な議論がなされているが、本研究で得たアルカンの検出能力を生かして原油を分析しわからないまま分解・利用されている重成分の有効利用ができないかと考えている。

上述のように主に分析分野における主力技術としての一般化と実用化を目指して取り組んでいく。この方法は非常にソフトな方法であり、電場を用いない方法ではESIやMALDIよりも非破壊で検出できる。学術的な意義はこの点であり、質量分析分野の歴史を紐解いてみると前述の ESIや MALDI(ソフトなイオン化である)のノーベル賞受賞をはじめ非破壊なイオン化の重要性は強調してもしすぎることはない。また本研究の成果で得られたナノ構造の利用法を深く追求して、非極性溶媒中・ナノ界面におけるイオン－分子反応の研究やイオンの効率輸送、新たな機能の創発などを見出していきたい。

4. 自己評価

全体的に検出に関しては飛躍的に測定可能種が増えたこと、電場の利用法を確立したことで測定感度が10倍程度上昇した、以上の2点を踏まえて研究の狙いに関しては成功したと言える。しかしながら手法に関してナノ構造を利用する研究がまだ萌芽的段階でありナノ構造を利用した新規性・階層性を見いだせてない点に不満が残りこれを今後の研究の課題としたい。

5. 研究総括の見解

研究者が開発したテトラキス[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ホウ素リチウム(LiTFPB)をカチオン化剤として用い、従来困難とされていた低極性・非極性分子を非極性溶媒中でイオン化して質量分析を可能とするための研究を行った。

炭化水素類は質量分析において最もイオン化が困難な試料の一つであるが、上記イオン化剤を用いて炭化水素類のイオン化に成功した。これは溶液中でのアルカンのイオン化例として世界初であり、この条件下でC16まで測定可能であることを明らかにした。その他いくつかのイオン化困難な分子のイオン化にも成功している。さらにイオン化のメカニズムを考察するため、非極性溶媒中での解離定数の算出法を開発した。

本提案は基本的に質量分析の測定感度を向上させるため新規カチオン化剤を利用してその汎用性を調べ新たな質量分析法を開拓しようとする研究であるが、将来、環境分析はじめ、本提案がさらに役に立つよう発展することを期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Atsushi Takamizawa*, Kayoko Mishina, and Kenzo Hiraoka, *Journal of Mass Spectrom*. **47**, 22 (2012)
2. Atsushi Takamizawa, Takashi Korenaga, *BUNSEKI KAGAKU* **61**, 555 (2012)

（2）特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発　明　者:高見澤　淳

発明の名称: 電離定数の測定方法

出　願　人: 首都大学東京

出　願　日:2010/6/14

出 願 番 号: 特願 2010-135190

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等

(出版物)

1. 高見澤　淳　ケミカルエンジニヤリング, 57, 77-81(2012)

2. 高見澤　淳　伊永隆史編著(研究代表者は13章担当)

生命科学のための分析化学, 化学同人

(国際学会)

3. Atsushi Takamizawa, Naoto Niizuma, Takashi Korenaga,

ASMS in Vancouver, Canada (2012)

研　究　報　告　書

「生体粒子 vault の立体構造情報を基盤とした新規 DDS の戦略的開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月
研 究 者：　田中　秀明

1．　研究のねらい

幅広い真核生物が持つ分子量約 1000 万の巨大粒子ボルトは、3 種類のタンパク質（major vault protein （MVP）、vault poly(ADP-ribose)polymerase （VPARP）、telomerase-associated protein 1 （TEP1））と 1 種類の非翻訳RNA（vRNA）によって構成されている。主成分であるMVPが 78 個集まることで卵型中空の特徴的な基本骨格を形成し、他の成分は粒子内部に存在する。半分のボルト（half vault）は 39 個のMVPが集合することでお椀のような形を形成し、2 つのhalf vaultがお椀の縁と縁を合わせるようにして（向かい合ったMVPのN末端同士で）会合することで卵型の粒子を形成している。

本研究では、ボルトの立体構造情報に基づき、遺伝子工学的手法を用いて MVP の N 末端に変異や修飾を加えることで様々な改変粒子を作成する。そして、それぞれの改変粒子の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定し、立体構造情報をフィードバックしながらドラッグデリバリーシステム（DDS）への利用に最適な構造を持つ改変粒子を戦略的に開発する。具体的には、pH5 で半分のボルトに解離して、pH7 で再会合するような粒子の開発を目指し、薬剤の取り込みや放出の制御を容易にする。これまでに、pH 依存で可逆的に割ったり閉じたりできるナノカプセルは報告されておらず、この様な粒子を立体構造情報に基づいて開発することで、DDS 開発の新たなモデルケースを確立する。

2．　研究成果

（1）概要

私は 2009 年にラット肝臓由来ボルトの全体構造決定に成功した（*Science* **323**, 384-388(2009)）。得られた立体構造情報から、ボルトは主成分である MVP(Major Vault Protein)が 39 個集まってお椀型の半分のボルトを形成し、それら 2 つがお椀の縁と縁を合わせるように会合して、合計 78 個の MVP で卵型粒子を形成することが明らかになった。2 つの半分のボルトは、お椀の縁に集まった MVP の N 末端を突き合わせて会合することによって卵型のボルト粒子を形成するが、その会合はイオン結合と短い分子間βシートだけで非常に弱いことが分かっていた。したがって、本粒子そのまま（野生型ボルト：W-ボルト）では、粒子内に薬剤等を保持することが出来ず、ナノカプセルとしては利用でないので、N 末端にロイシンジッパー（LZ）と呼ばれるファスナーのようなモチーフを付加した MVP で構成される安定なボルト粒子（LZ-ボルト）の作成を目指した。LZ は、約 30 残基のアミノ酸で構成されるα-ヘリックス 2 本が、互いのロイシン残基で疎水結合することにより形成されるファスナーの様なモチーフである。本研究では、すでに立体構造が報告されていた酵母の転写活性化因子 GCN4 由来の LZ を遺伝子工学的手法で MVP の N 末端に導入した。LZ は互いのロイシン残基で疎水

結合を形成することにより、非常に強固なホモダイマーを作るので、これによりボルト粒子の形成が阻害されることが考えられた。よって、MVP と LZ の間にグリシン 3～6 残基からなるリンカーを挿入して自由度を高めることで、安定で均一な粒子を得る事に成功した。LZ-ボルトの収量は、昆虫細胞 1L 培養あたり 70-80mg で、従来比(W-ボルトと比較して)の 10 倍以上得る事が可能となった。前述したように、W-ボルトのウェスト部位は非常にフレキシブルで、常に開閉していると考えられているため、薬剤等をボルト粒子内部に留めておくためには、VPARP の INT ドメイン(ボルト粒子内部で MVP と会合する)を粒子内部への輸送タグとして用いることが必須であった。しかし、本研究で LZ-ボルトの作成方法が確立できたことにより、INT タグ無しでも薬剤等を取り込み可能なナノカプセル開発に向けた基盤を確立することができた。

(2)詳細

「昆虫細胞による MVP のみで構成されるボルト粒子の大量発現系の構築」

まず、野生型 MVP(W-MVP)のみで形成されるボルト粒子(W-ボルト)の昆虫細胞(Sf9: *Spodoptera frugiperda*(ヨウトガ)卵巣細胞由来の細胞)による発現系構築を行った。発現系の構築には、すぐに成功したが、収量が昆虫細胞 1L 培養あたり 1mg と非常に少なかったため、培養条件の最適化を行った。具体的には、培養の際に一般的に使用されるスピナーフラスコではなく、振とう培養機を用いて培養することによるエアレーションの効率化や昆虫細胞に感染させるウィルス液の濃度と感染時間の最適化を行い、従来の約 5 倍(1L 培養あたり 5mg)のボルト粒子を得る事が可能になった。これにより、N 末端に変異や修飾を加えた改変ボルト粒子の大量発現系構築に向けた基盤を確立することができた。

「MVP の N 末端にヒスチジンタグを導入したボルト粒子の大量発現系の構築」

MVP の N 末端にヒスチジンタグ(His タグ)を導入し、コバルトを介して half vault を会合させることを考えた。His タグは、タンパク質のアフィニティー精製によく用いられるタグで、通常は 3-6 個程度の連続した His 残基を遺伝子工学的手法によってタンパク質の N 末端か C 末端に付加し、Ni や Co などの金属をアガロースなどの担体に固定化したクロマトグラフィーにより、金属に対する親和性(His と金属イオンの配位結合の違い)によってタンパク質を精製する。ここでは、中性付近では、His タグが Co に配位することで、会合していた half vault が、pH が 6 以下になると His のイミダゾール環の N がプロトン化され(His の pKa=6 であるため)、コバルトに配位できなくなって half vault に解離するというメカニズムで開閉する粒子の開発を目指した。遺伝子工学的手法により、MVP の N 末端に 3 個の連続した His 残基を導入し、昆虫細胞(Sf9)による発現系構築を行った。しかし、発現量が非常に少なく、目的とする粒子は得る事ができなかった。

「MVP の N 末端にロイシンジッパーを導入したボルト粒子の大量発現系の構築」

これまでの研究から、ボルトの構成成分の 1 つである VPARP の C 末端 160 残基(ボルト粒子内で MVP と会合するドメインで、INT と呼ばれる)とボルト粒子を溶液中で混ぜると、INT が粒子内部に取り込まれることが分かっていた。これは、ボルトのウェスト部位(MVP の N 末端

同士）の会合が非常に弱く、フレキシブルで、ここから INT が取り込まれるためであると考えられている。したがって、ボルト粒子内に薬剤等を留めておくためには、N 末端同士をしっかり固定できる様に設計する必要がある。したがって、私は、MVP の N 末端にロイシンジッパー（LZ）と呼ばれるモチーフを付加することを考えた（図 1）。LZ は、アミノ酸 7 残基おきに疎水性アミノ酸であるロイシンを持ち、これらが分子間疎水結合を形成することにより安定なコイルドコイルを形成する。酵母の転写活性化因子 GCN4 のロイシンジッパーは、33 残基から成る α-helix で、ホモダイマーを形成することが知られている。これを、MVP の N 末端に付加するが、LZ の疎水結合は非常に強固なので、直接付加するとボルト粒子の形成を阻害することが考えられた。したがって、MVP の N 末端にある程度の自由度を持たせるため、MVPとLZの間にグリシン残基から成るリンカーを挿入することにした。その結果、グリシンを 3 残基または 6 残基挿入(LZ-MVP_Gly3、LZ-MVP_Gly6)すると、均一な粒子が高い収量で得られることが分った(図 2)。LZ-ボルトの発現は、細胞数が 1x10^6 cell/mlの培養液 1Lに 1%量（10ml）のウィルス液（P4 もしくはP3）を加えて中 3 日間培養することで、昆虫細胞 1L培養あたり 70-80mg（ゲルろ過クロマトグラフィー後の高純度精製品）の粒子を得る事が可能になった。これは、W-ボルトと比較して約 16 倍以上の収量であり、将来、ボルトを利用したナノカプセルとして利用したDDSを開発する際に大幅なコストダウンにつながる（特願 2012-253031）。

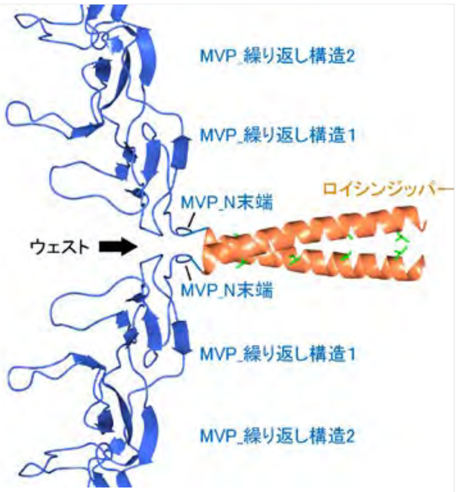


図 1. LZ-ボルトの概略図

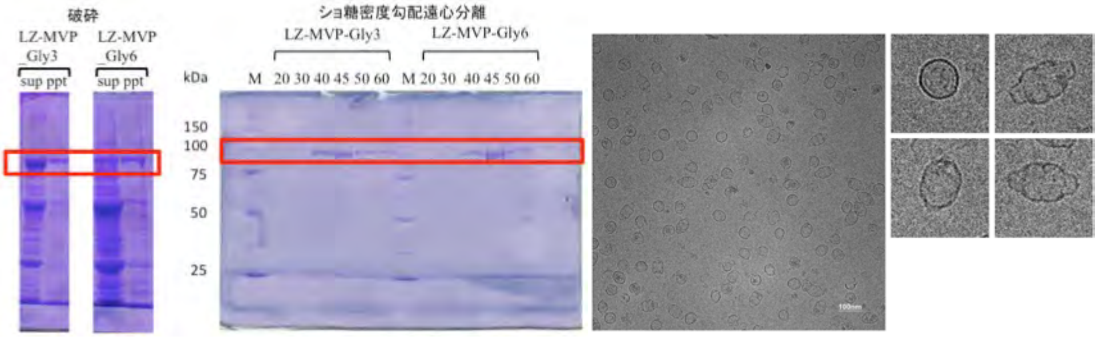


図 2. LZ-ボルトの SDS-PAGE とクライオ電顕による観察

3．　今後の展開

本研究により、昆虫細胞 1L 培養あたり従来比（W-ボルトと比較して）の約 16 倍のボルト粒子を得る事が可能となった。ボルトは、DDS などに利用可能なナノカプセルとして期待されているので、本発明により収量が一桁上がったことで、大幅なコストダウンにつながる。また、本粒子を基盤として、pH 依存で可逆的に開閉制御可能な粒子の開発が進むことが期待できる。

4. 自己評価

ボルトをナノカプセルとして利用したドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発は、米国 UCLA の L. H. Rome 教授の研究室を中心に行われている。彼らは、薬剤の粒子内部への取り込みのために、ボルトの構成成分で粒子内部に存在するVPARP の C 末端 160 残基（INTドメイン：粒子内部で MVP との結合する）をタグとして利用している。これは、粒子内部に薬剤を保持させておくためでもある。しかし、この方法では、ボルトの大きな内部空間を活かし切れていない。私が開発を目指す、「卵を割ったり、閉じたりするように pH 依存で可逆的に開閉制御可能なナノカプセル」では、この様なタグがなくとも pH を変化させるだけで、どんなものでも粒子内部に取り込む事が可能となる。現時点では、目的とするナノカプセルの開発には至っていないが、MVP の N 末端にロイシンジッパーを付加した LZ-ボルトの開発に成功したので、今後は LZ-ボルトを基盤としてさらなる粒子の改変を進める事で、pH 依存で可逆的に開閉制御可能なナノカプセルの開発を目指す。また、LZ-ボルトはボルトウェスト部位の相互作用を強固にしただけでなく、従来比の約 16 倍の収量でボルト粒子を得る事を可能にした。ボルトは、DDS などに利用可能なナノカプセルとして期待されているので、本発明により、収量が一桁上がったことで、大幅なコストダウンにもつながる。

5. 研究総括の見解

分子量約 1000 万の巨大粒子ボルト(vault)に対し、改変粒子を作成し、ドラッグデリバリーシステム（DDS）への利用に最適な改変粒子を開発することを研究のねらいとしている。具体的には、pH5 で解離して、pH7 で再会合するような粒子を開発して、薬剤の取り込みや放出を制御することをめざしている。 ボルト粒子の会合力は非常に弱く、そのままでは、ナノカプセルとして利用できないので、ロイシン・ジッパーの付加とグリシン 3～6 残基からなるリンカーを挿入して安定化と自由度向上をはかった。その結果、従来比の 10 倍以上の収率で安定な粒子を得る事に成功した。

本研究で、効率的に LZ-ボルトの作成方法を確立したことは評価できるが、当初の狙いである pH 依存で可逆的に開閉制御可能な粒子の開発が全く手づかずであったことは残念である。ボルトが研究者が考えるように「卵を割ったり、閉じたりするように pH 依存で可逆的に開閉制御可能なナノカプセル」なのかどうかが現時点で不明であることを考えると、果たしてボルトがpH応答性DDS素材として適した物質であるかどうかという原理的視点から再検討する必要もあると考えられる。

6. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Tanaka H and Tsukihara T, Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **88**, 416-433 (2012).
2. Casanas A, Querol-Audí J, Guerra P, Pous J, Tanaka H, Tsukihara T, Verdaguer N, Fita I, New features of vault architecture and dynamics revealed by novel refinement using the deformable elastic network approach. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* (in press)

（2）特許出願
研究期間累積件数:1 件

発　明　者: 田中　秀明
発明の名称: 人工生体粒子およびその製造方法
出　願　人: 独立行政法人科学技術振興機構
出　願　日: 2012/11/19
出 願 番 号: 特願 2012-253031

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）
主要な学会発表

1. 田中秀明、生体粒子ボルトを利用したナノカプセルの開発、第 1 回ネイチャーインダストリーアワード～若手研究者からの発信～（大阪科学技術センター主催、日刊工業新聞社共催）、大阪府大阪市、2012 年 11 月 20 日

2. Tanaka H, Structure determination of rat vault, a large nucleoprotein complex at 3.5Å resolution. 日本生物物理学会第 49 回年会、兵庫県姫路市、2011 年 9 月 16 日～18 日（招待講演）

3. Tanaka H, The mechanisms of self-assembly of the vault, the largest cytoplasmic ribonucleo-protein complex. XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2011), Madrid, Spain 23 -24 August, 2011.

4. 田中秀明、 謎の巨大分子ボルトの全立体構造情報の利用 ～機能解明とDDS への応用を目指して～ SENRI（Seminar for Enchaining of Research & Industry）の会、大阪府吹田市、2010 年 12 月 24 日（招待講演）

5 Tanaka H, X-ray crystal structure of rat vault, a large nucleoprotein complex at 3.5Å resolution. International Symposium at Chungbuk National University, Chungbuk, Korea, November 17-18 2010. (invited talk)

受賞

1. 平成 22 年度文部科学大臣表彰　若手科学者賞　受賞（2010 年　4 月 13 日）

2. 大阪大学　飛翔 30 研究フェロー（若手研究トップ 30）受賞（2010 年 10 月 6 日）

3. 大阪科学技術センター 第1回ネイチャー・インダストリーアワード特別賞 受賞（2012年11月20日）

著作物

1. 田中秀明、加藤公児、住澤知之、山下栄樹 ミニレビュー「全立体構造決定から切り開く謎の巨大粒子ボルトの機能解明」 *生化学* **83**, 392-395.（2011 年 5 月）

プレスリリース等

ネイチャー・インダストリーアワード～若手研究者からの発信～ 日刊工業新聞 12-13 面（2012 年 12 月 21 日）

研 究 報 告 書

「Nano から Micro への精密自己組織化で拓く円偏光レーザーの創成」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 20 年 10 月～平成 25 年 3 月
研 究 者： 内藤 昌信

1. 研究のねらい

本研究では、非常に大きな円偏光発光効率を示すシクロデキストリンとピレン誘導体の包接錯体(Py-CD)を発光分子素子とした強円偏光発光素子を創製し、μmオーダーの垂直配向膜を創成する。さらに、この膜厚を精密に制御した強円偏光発光薄膜を利得媒質とする面発光型の円偏光有機レーザーシステムを開発する。

本提案を実現するためのコア技術として、強円偏光発光性の Py-CD をキャビティーに対して垂直配向させる技術と、その薄膜の膜厚を媒質中の Py-CD の最大発光波長とナノレベルで正確に一致させる有機薄膜の作成技術を確立する。この 2 つの課題を達成することで、完全円偏光化と所望の波長での誘導放出を同時に実現する。

この技術課題を突破するアイデアとして、nano サイズの分子素子を micron サイズまで精密・正確に自己組織化するための新手法『超分子クリック重合』を創出する。さらに、発光性共役高分子や有機結晶を用いた有機半導体レーザーや、無機半導体レーザーの既存技術を組み合わせることで、ボトムアップとトップダウンの融合による円偏光有機レーザーを創出する。

2. 研究成果

(1)概要

円偏光レーザーは、量子暗号通信に必要な円偏光光源、3次元ディスプレイなど、次々世代の光情報プロセッシングの主力として注目されている。特に、スピントロニクスの分野で盛んに研究されている円偏光レーザー(スピンレーザー)は、右巻きまたは左巻きの円偏光だけを選択的に励起することができるため、理論的には消費電力を半減できる省エネレーザーを実現できる。一方、有機レーザーは、材料多様性による発振波長帯の選択、低しきい値誘導放出、レーザーの小型・軽量化・大面積化などで優位性が発揮できる。本研究で目指す『円偏光』の『有機レーザー』が実現すれば、ポータブル量子暗号通信端末やウェアラブル 3 次元ディスプレイなど、光情報通信技術のロードマップを塗り替える革命的な発明となる。

現在までに有機材料を用いた円偏光レーザーは、コレステリック液晶のらせんピッチに対応する選択反射をキャビティーとして用いた方法が広く知られている。しかし、この手法では、レーザー色素の発光成分の内、左右のいずれかの円偏光のみを増幅するため、発光成分のうち半分の光しか利用することができず、エネルギーロスが避けられない。そのため、本研究では、発光素子自身が強い円偏光発光性を示す材料を用いることで、より効率的に円偏光発光を増幅できると考えた。

上記の課題を克服するため、本研究では大きな円偏光発光効率を示すシクロデキストリンとピレン誘導体の包接錯体(Py-CD)を用いた。さらに、この Py-CD 錯体をレーザーキャビティー

に対して垂直配向、かつ、μm の膜厚を持つ強円偏光発光性の有機薄膜をボトムアップ的な手法で創製し、さらに、これをトップダウン的手法で作成した垂直配向キャビティー内に精密配向させることで、面発光型の円偏光有機レーザナノシステムを開発することを目的とした。

本研究を実現するためのコア技術は、強円偏光発光性の Py-CD をキャビティーに対して垂直配向させること、膜厚を媒質中の Py-CD の最大発光波長とナノレベルで正確に一致させることである。これにより、完全円偏光化と誘導放出を同時に達成することを目指した。

具体的には、nano レベルの円偏光分子素子を micron サイズまで精密・正確に自己組織化するための新手法『超分子クリック重合』を創出することに取り組んだ。さらに、トップダウンによるリソグラフィ技術により精密に作成した垂直キャビティーを用い、トップダウンとボトムアップの融合による円偏光発光デバイス作製に取り組んだ（図１）。

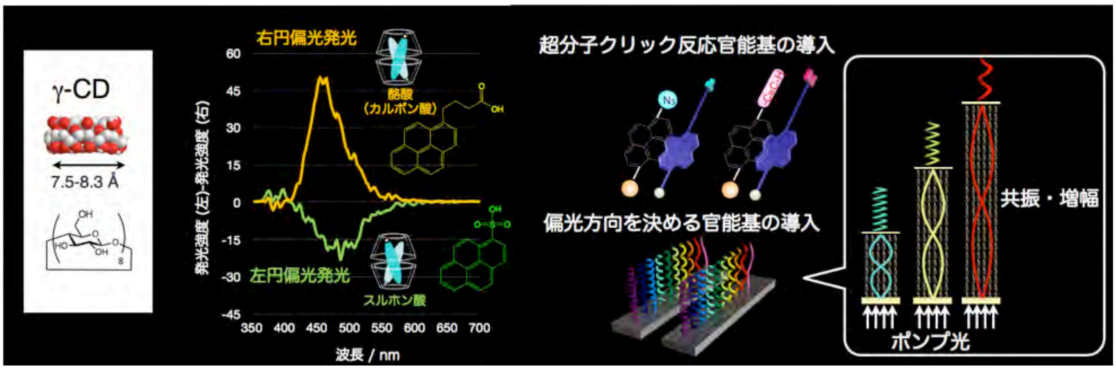


図１　本研究の概要

（2）詳細

【研究テーマ1】超分子クリック法を可能にするピレン誘導体の構造最適化:

本提案の予備的知見として、水酸基やカルボキシル基を導入したピレンを□CDx に包接させることで、有機発光体としては最大級の円偏光度が得られるのみならず、左右の円偏光の掌性制御も可能であることを見出していた。そのため、本提案の開始時には、円偏光の掌性を制御する官能基と超分子クリック反応を行う官能基の双方を持つ2置換ピレンが超分子クリック法には必要と考えた。しかし、種々検討した結果、クリック反応基の1官能基のみを最適化するだけで、円偏光の掌性の制御ができることを見出した。これにより、円偏光発光素子の合成を大幅に簡略化することができた（図 2a）。

さらに、超分子クリック重合反応の効率を目指し、クリック反応性ピレン誘導体の構造最適化を行った。具体的には、水溶性 CDx とロタキサン構造を形成するエチレングリコールを Py 発光体とクリック反応性基とのスペーサに導入した（図 2b）。

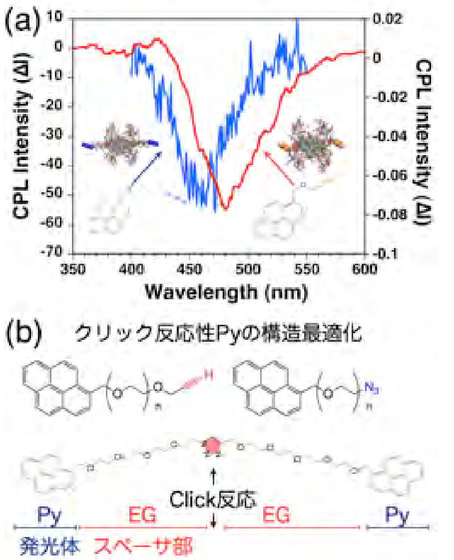


図 2 (a)クリック重合官能基を導入した Pyrene 誘導体とγ-CD の包接錯体からの CPL シグナルと(b)超分子クリック重合の分子設計戦略

【研究テーマ2】超分子クリック重合法の確立：

研究テーマ1で最適化した Py-CDx 包接超分子を用い、円偏光発光性超分子ポリマーのクリック重合に成功したところ、超分子クリック重合によって得られる強円偏光発光性超分子ポリマーは約 50 量体にメインピークと 100 量体にサブピークを持つ二峰性の分子量分布を示すことを明らかにした。さらに、重合度の制御には、ピレンとクリック反応基（アジド基およびアルキン基）間のスペーサであるエチレングリコール基の長さが重要な構成要素であることを明らかにした（図 3）。

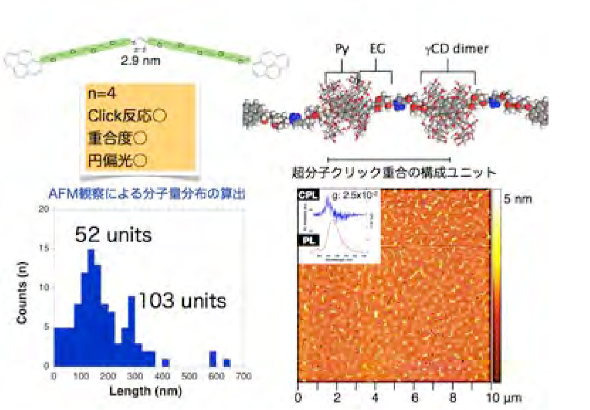


図 3　超分子クリック重合で得られた CPL 発光性超分子高分子の AFM 像および分子長ヒストグラム

【研究テーマ3】円偏光発光性超分子高分子の分子長・剛直性の制御：

次に、得られた強円偏光発光性超分子高分子の垂直配向化に向け、分子長および剛直性の制御を検討した。その結果、Py 誘導体-□CDx 包接錯体のみでは、高分子鎖全体として立体障害の歪みが大きくなり、垂直配向が困難であることが明らかになった。そこで、立体障害の影響を緩和するため、フレキシブルなユニットとして、クリック反応性基を導入したエチレングリコール誘導体を新たに合成した(図 4)。その際、ピレン誘導体-□CDx との混合を避けるため、□CDx に比べて直径の小さな α-CDx を用いた。α-CDx とエチレングリコール誘導体のクリック反応で得られた超分子高分子は、フレキシビリティーに由来するグロビュール構造の高分子量体を得た(図 5a)。

最終的には、ピレン誘導体-□CDx と α-CD とエチレングリコール誘導体を1対1で混合し、超分子クリック反応を行ったところ、剛直性が高く、かつ数 μm の分子長を持つ円偏光発光性超分子高分子を得ることに成功した。さらに、この高分子は、基板にキャストするだけで自発的に一軸配向するという液晶性剛直棒状高分子に特有の特徴を持つことを明らかにした(図 5b)。

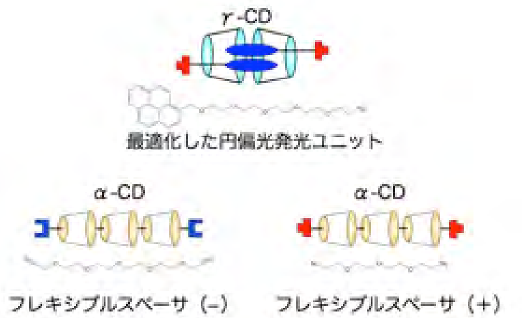


図 4　CPL 発光性超分子高分子の構造最適化に向けた分子設計

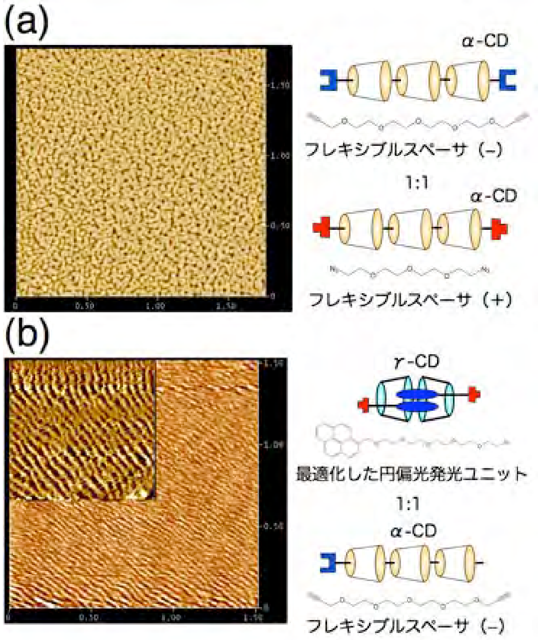


図 5　CPL 超分子高分子の剛直・配向制御

【研究テーマ4】超分子クリック重合を用いたグラフト重合：

ボトムアップにより創成した強円偏光発光性超分子高分子をトップダウンで作製したキャビティー内に集積化することで、円偏光レーザデバイスを作製するという最終目標に向け、シリコン基板表面からのボトムアップ集積化を行った。具体的には、クリック重合基を持つ自己組織化単分子膜（SAM）をトップダウン手法で作成したアクリル樹脂の微細加工パターンの凹部に作成し、SAM 表面のクリック反応基を起点として超分子クリック重合のグラフト反応を行った。その結果、超分子クリック反応が予め調整した微細加工パターンの高さで停止し、所望の膜厚に制御できることを見出した（図 6)。

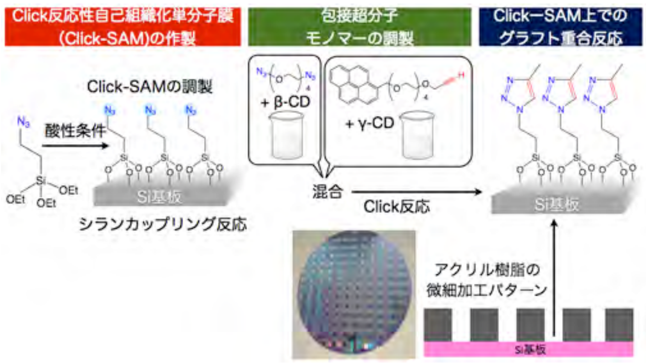


図 6　CPL 超分子高分子の graft-from 重合による基板固定化

本研究を通じて、クリック反応を用いた強円偏光発光性超分子高分子の分子長―剛直性―配向制御を確立したことから、円偏光レーザー作製するだけでなく、円偏光発光有機 EL などの発光デバイスへの応用も広がったと考えられる。また、円偏光発光の掌性を一置換ピレンの構造のみで制御できることから、同じ発光色でも右円偏光と左円偏光の2つの情報を持たせることができる。この特徴を生かし、新規なセキュリティペイントへの応用も考えられる。

3.　今後の展開

高強度円偏光発光性高分子の配向制御による精密自己組織化を目指し、分子設計・合成および円偏光発光分光測定装置開発・分光測定を行った。本研究を通じて、超分子クリック重合法を確立し、ボトムアップ的な手法で円偏光発光材料の分子設計―構造・機能相関を明らかにすることができた。本提案で目指した強円偏光発光性超分子高分子の垂直配向化に向けて、トップダウン技術によって得られた垂直配向ガイドの中で超分子クリック重合反応を行い、その結果、重合体の分子長をキャビティーの膜厚と同じにできることを見出した。今後は、分子長と発光波長の選択により、所望の波長を選択的に増幅した有機円偏光レーザーのデバイス作製を実証していく。

また、本研究を遂行する中で、新たな有機発光材料を数多く見出すことができた。今後は、円偏光有機レーザの実現に向けた研究を達成するのみならず、本研究課題を遂行する中で得られた新規有機発光材料の特性を生かし、様々な発光デバイス・情報デバイス・化学センサー等への分野へも広く展開を予定している。

一例を挙げると、Py-CDx を含む水溶性ポリマー（PVA）の自己支持膜の円偏光発光の温度特性を詳細に検討した結果、CPL 発光の円偏光度と温度との線形関係を見出

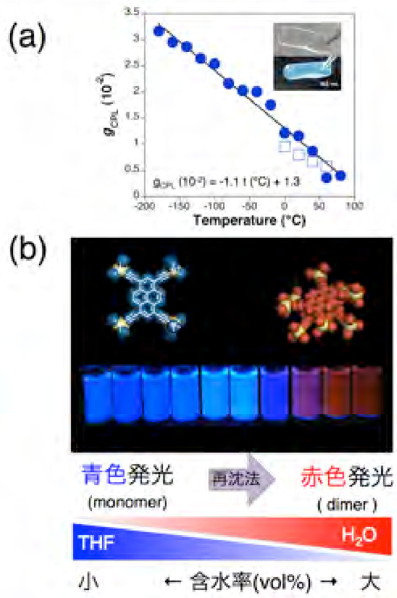


図 7（a）CPL 発光性 pyrene/CD 錯体の温度依存性と（b）青−赤発光波長制御

した(図 7a)。この結果は、Py-CDx の CPL が蛍光強度の規格化が必要ないユニバーサル蛍光温度計として利用でき、直接測定できない細胞内温度の蛍光計測などへ応用できる。また、4置換 Py 誘導体をナノ粒子化することで、青色から赤色までの発光波長制御を行うことができた(図 7b)。これは、本提案で目指す多色円偏光発光を実現する上で非常に有用な知見である。

4. 自己評価

本研究を通じて、ピレン誘導体とγ-CDx の包接錯体からなる強円偏光発光性超分子高分子薄膜を、トップダウン手法で作製したキャビティー内に垂直配向させながら重合することに成功した。当初計画していた本技術の達成により、分子長を所望の長さに制御しながら円偏光発光性超分子高分子を垂直に配向させる技術を確立した。

また、当初の計画では考えられなかった問題点も明らかになった。例えば、クリック反応性ピレン誘導体とγ-CDx との包接錯体の単独重合体のみで超分子クリック重合が進行すると考えていたが、立体障害に起因する低分子量化などの問題に直面した。その問題を克服するため、クリック反応性エチレングリコールを新たに導入した。このフレキシブル鎖を適度な割合で導入することで、数 μm 以上の剛直棒状の超分子高分子がキャストのみで一軸配向するという当初予想していなかった効果を見出すことができた。ここでは、γ-CDx に比べて空孔サイズの小さいα-CDx を用いたことが2成分の混合を抑制する鍵となった。

また、ボトムアップとトップダウンの融合による機能創発を目指して、リソグラフィのマスクパターン中で超分子クリック重合を行った。その結果、重合がマスクパターンの高さに併せて自発的に停止することで、円偏光発光性有機薄膜の膜厚を制御できるという新たな知見も得られた。

残された今後の課題としては、当初の計画にあった波長選択的な円偏光増幅によるレーザー発振という肝心な機能測定の部分が未達成である。しかし、デバイス作製の改善点と対処法が明らかになった今、最終的に目指すべき機能創発に向け今後の研究を加速していく。3年半のさきがけ研究の中で、最初に掲げた目標の達成に向けて真摯に向き合った。遅々とした歩みではあるが直面した問題を一つ一つクリアしながら研究を進めることができたことは非常に貴重な経験であり、今後の研究生活の大きな糧となった。

一方、今回の研究を通じて予期していなかった興味深い現象を見出すことができた。これらのデータをその都度吟味し、他の方面に研究を展開することも視野にいれる余地も十分にあったのではと考えている。具体的には、水平方向に一軸配向した円偏光発光超薄膜の特徴を活かして、円偏光有機 EL などの発光デバイスへの応用などが想定される。これまでに得られた研究シーズを今後さらに展開して行きたい。

また、ナノシステムと機能創発のメンバーや、“構造制御と機能”領域との合同領域会議を通じて、異分野の研究者と円偏光発光材料に関する共同研究を行う機会に恵まれた。その結果、円偏光発光する化合物半導体ナノ粒子や円偏光スイッチング材料に出会えたことは、当初想定しなかった“さきがけ”らしい研究成果であると考えている。

5．　研究総括の見解

シクロデキストリンとピレン誘導体の包接錯体（Py-CD）を発光分子素子とした強円偏光発光素子を創製し、μm オーダーの垂直配向膜を媒質とする面発光型の円偏光有機レーザーシステムを開発することがねらいである。そのため 4 つの課題に取り組んだ。【1】超分子クリック法を可能にするピレン誘導体の構造最適化、【2】超分子クリック重合法の確立、【3】円偏光発光性超分子高分子の分子長・剛直性の制御、【4】超分子クリック重合を用いたグラフト重合である。

計画にあった波長選択的な円偏光増幅によるレーザー発振という目標までは達成できなかったものの、ピレン誘導体とγ-CDx の包接錯体からなる強円偏光発光性超分子高分子薄膜が、トップダウンで作製したキャビティー内に垂直配向させながら重合できること、換言すると、分子長を制御しながら円偏光発光性超分子高分子を垂直に配向させる技術を合成化学的に確立したのは画期的な成果であり高く評価される。立体障害に起因する低分子量化などの問題に直面しても、フレキシブル鎖を導入することで克服し、数 μm 以上の剛直棒状超分子高分子が一軸配向するという成果も研究者の高い能力を示すものである。ボトムアップ手法とトップダウン手法を組み合わせて円偏光発光材料の分子設計－構造・機能相関を明らかにすることができたのは今後の化学合成に先鞭をつけたものであり、その価値は高い。今後は、本研究の当初計画にあるように、所望の波長を選択的に増幅した有機円偏光レーザーのデバイス作製を実証することを望みたい。

6．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1.	W. Chung, K. Nobusawa, H. Kamikubo, M. Kataoka, M. Fujiki and M. Naito,Time-Resolved Observation of Chiral-Index-Selective Wrapping on Single-Walled Carbon Nanotube with Non-Aromatic Polysilane, J. Am. Chem. Soc., 2013,135, 2374-2383
2.	Y. Haketa, Y. Bando, K. Takaishi, M. Uchiyama, A. Muranaka, M. Naito, H. Shibaguchi, T. Kawai, H. Maeda, Asymmetric Induction in the Preparation of Helical Receptor-Anion Complexes: Ion-Pair Formation with Chiral Cations, Angew. Chem. Int., Ed., 2012, 51, 7967-7971.
3.	H. Maeda, Y. Bando, K. Shimomura, I. Yamada, M. Naito, K. Nobusawa, H. Tsumatori, T. Kawai, Chemical-Stimuli-Controllable Circularly Polarized Luminescence from Anion-Responsive π-Conjugated Molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 9266-9269
4.	X. Jiang, A. Ishizumi, N. Suzuki, M. Naito and Y. Yamauchi, Vertically-oriented conjugated polymer arrays in mesoporous alumina *via* simple drop-casting and appearance of anisotropic photoluminescence, *Chem. Commun.*, 2012, 48, 549-551
5.	M. Naito, K. Iwahori, A. Miura, M. Yamane, I. Yamashita, Circularly Polarized Luminescent CdS Quantum Dots Prepared in a Protein Nanocage, Angew, Chem, Int. Ed., 2010, 49, 7006-7009.

（2）特許出願

研究期間累積件数：3 件

1. 発　明　者：　内藤昌信，中村祐亮，緒方寿幸，高山寿一，細野隆之
   発明の名称：　棒状分子を表面に備える基板及びその製造方法
   出　願　人：　奈良先端科学技術大学院大学
   出　願　日：　2012/3/8
   出 願 番 号：　特願 2012-052177
2. 発　明　者：　Masanobu Naito, Kenji Iwahori
   発明の名称：　CIRCULARLY POLARIZED LIGHT-EMITTING NANOPARTICLE
   出　願　人：　奈良先端科学技術大学院大学／科学技術振興機構
   出　願　日：　2010/9/28
   出 願 番 号：　**US12,935,066**
3. 発　明　者：　Masanobu Naito, Kenji Iwahori
   発明の名称：　CIRCULARLY POLARIZED LIGHT-EMITTING NANOPARTICLE
   出　願　人：　奈良先端科学技術大学院大学／科学技術振興機構
   出　願　日：　2010/10/27
   出 願 番 号：　**EP patent 09 727057.3**

6. その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

主な学会発表：

1. M. Naito, "Circularly polarized luminescent supramolecular chemistry", NAIST Colloquium for Future-Pioneering 2010, NAIST, 2010 年 12 月（依頼講演）
2. 内藤昌信，シクロデキストリン―ピレン包接錯体からの円偏光発光とそのスイッチング制御，第 61 回高分子討論会,高分子学会,2012 年 9 月（依頼講演）
3. Masanobu Naito, Circularly Polarized Luminescence from Cyclodextrin-Pyrene Inclusion Complex and its Optical Switching Control, Circularly Polarized Luminescence from Cyclodextrin-Pyrene Inclusion Complex and its Optical Switching Control, 2012 年 11 月（招待講演）
4. 内藤昌信，生体材料のキラリティを利用した円偏光発光性超分子の創発,内藤昌信,次世代の物質科学・ナノシステムを探る, 2012 年 1 月（依頼講演）
5. 内藤昌信，竹取の翁が見た光は・・・? ~生体高分子の中で作る次世代ディスプレイ光源~，日本化学会中国四国支部化学講演会／日本液晶学会分子配向エレクトロニクスフォーラム講演会,日本液晶学会,2012 年 5 月（招待講演）

受賞：

1. NAIST 学術奨励賞（2011）

著作物：

1. K. Ariga, Q. Ji, T. Mori, M. Naito, Y. Yamauchi, H. Abe, J. P. Hill, Enzyme nanoarchitectonics: organization and device application, Chem. Soc. Rev. 2013, in press.
2. T. Nakanishi, M. Naito, Y. Takeoka, K. Matsuura, Versatile self-assembled hybrid systems

with exotic structures and unique functions, Curr. Opin. Colloid&Interface Sci., 2011, 16, 482-490.
3. 内藤昌信, “円偏光発光性を示す超分子・高分子材料”, 光化学協会誌, 2011, 42, 114
4. 内藤昌信,“球殻状タンパク質を鋳型にした円偏光発光量子ドットの創成”, 化学工業, 62, 54 (2011).
5. 内藤昌信, 岩堀健治, 山下一郎, “蛋白質の中で作る円偏光発光性量子ドット”, 光アライアンス, 6, 45 (2011).

プレスリリース:
1. 円偏光ナノ粒子をタンパク質内部で合成, 内藤昌信、岩堀健治, 2010 年 8 月 30 日 /日本経済産業新聞 他
2. ポリマーがカーボンナノチューブを可溶化する過程のリアルタイム観測に初めて成功ーカーボンナノチューブ実用化の鍵となる技術の進展に大きな貢献ー, 内藤昌信, 2013 年 2 月 7 日/ 日刊工業新聞 他

研　究　報　告　書

「高分子ナノマテリアルの光アクティブ制御と機能探索」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月
研　究　者：　永野　修作

1.　研究のねらい

従来のナノテクノロジー研究は、リソグラフィー技術の発展としての概念にとどまった、"静的"なナノ構造の構築や他物質のナノテンプレートとしての"パッシブ"な利用を目指すものである。ボトムアップ型ナノテクノロジーの担い手である高分子や液晶などのソフトマテリアルは、自発的に様々なナノオーダーの秩序構造（自己集合構造および自己組織構造）を動的に形成する。しかし、これらの応用の際には、ナノ構造を固定化して用いることがほとんどであり、ソフトマテリアルの大きな特徴である動的な特性を生かした研究例はほとんどなされていない。そこで、本研究では、リアルタイムスケールにて、ナノスケールの構造の配向が変化する、これまでにない"動的"で"アクティブ"に制御可能なナノ構造を創出し、時空間制御可能な新規ナノマテリアルおよびデバイス機能へ展開することを狙いとした。

本研究では、ブロック共重合体の自己集合構造であるミクロ相分離構造を高分子ナノ構造のターゲットとし、①液晶性化合物の自己集合的な分子配向性、②光によって自己組織制御可能な光応答性、さらに、③高分子液体の高流動性、これらすべての性質を組み合わせたブロック共重合体を設計することにより、従来にはない動的で協同的な機能をミクロ相分離構造に付与し、リアルタイムに動く"光アクティブ"高分子ナノマテリアルの創出を目指した。

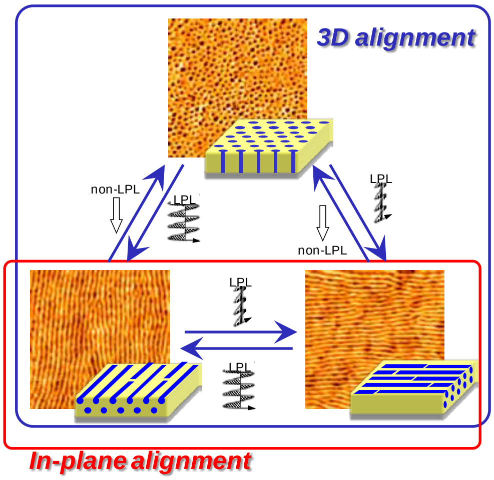


図 1. ミクロ相分離構造の光アクティブ制御の模式図：偏光・非偏光により面内および面外配向がアクティブに動く、スイッチする。

2.　研究成果

（1）概要

ミクロ相分離シリンダー構造を持つ光応答性液晶性ポリ（アゾベンゼンメタクリレート）ブロックと室温付近のガラス転移温度を持つ柔軟なポリ（ブチルメタクリレート）ブロックを持つブロック共重合体(PBMA-*b*-P5Az10MA)を合成した。PBMA-*b*-P5Az10MA 薄膜に、液晶温度下にて波長 436 nm の直線可視偏光（LPL）を照射したところ、P5Az10MA ブロックの液晶相およびさらにスケールの大きいシリンダー構造が数分のうちに光一軸配向、再配向を繰り返すことが明らかとなった。これらの結果により、一定温度下にて偏光光照射のみによりミクロ相分離構造が配向変化を繰り返すアクティブに動く、高分子ナノ材料の光アクティブ制御を達成し、新たな動的な高分子ナノマテリアルを提案した。

シンクロトロン放射光を用いた斜入射 X 線散乱測定によってこの光応答性液晶ブロック共重合体によるミクロ相分離構造のアクティブな配向変化をリアルタイム観察し、分子→液晶相→ミ

クロ相分離構造へと階層的かつダイナミックに伝搬する配向変化のメカニズムを明らかにした。液晶相およびシリンダー構造の配向変化は、数分にて起こり、高分子鎖の緩和過程としては速い速度にて光再配向が遂行されること、さらに、分子量、応答温度および光再配向ドメインサイズの検討から、液晶相とミクロ相分離構造の配向変化は全く同期し、その過程において液晶構造および相分離構造を維持した数百ナノメートル径のドメインを伴って配向変化していることが判明した。つまり、ミクロ相分離構造の再配向は、規則性の低い等方相やディスオーダー相を経るのではなく、液晶構造や相分離構造を保ったまま、規則的なナノ構造を持つドメインの回転を伴って遂行されることを見いだした。この液晶性ブロックの配向変化における規則構造を保ったドメインの回転機構は、ミクロ相分離構造内にナノ粒子材料を包埋する、または、表面に吸着させるなどして、ナノ粒子材料の配向制御する応用を示し、動く高分子ナノ材料としての新たな分野に展開するものと期待できる。

（２）詳細

「光応答性液晶ブロック共重合体の設計とミクロ相分離構造の光アクティブ配向制御」

室温付近のガラス転移温度をもち、表面張力のきわめて低いポリ（ブチルメタクリレート）(PBMA)ブロックとスメクチック液晶性ポリ（アゾベンゼンメタクリレート）(P5Az10MA)ブロックを持つブロック共重合体(PBMA-*b*-P5Az10MA:図 2)を分子設計し、ミクロ相分離シリンダー構造を示す組成のものを原子移動ラジカル重合法により合成した。合成したPBMA-*b*-P5Az10MA は、ホモポリマーとは異なった液晶配向性を示し、高感度な偏光応答性を示すことを明らかにした。P5Az10MA ホモポリマーは、アゾベンゼンメソゲンが基板に対して垂直配向するため、偏光配向応答性をほとんど示さない。一方、新たに分子設計したPBMA-*b*-P5Az10MA は、低い表面張力のPBMA ブロックが薄膜の最表面に偏析するため、ミクロ相分離界面が表面と平行に形成される。その結果、表面からP5Az10MA ブロックのプレーナー配向が誘起され、ホモポリマーとは異なった高感度な偏光応答性を示す液晶配向性を示すことがわかった。

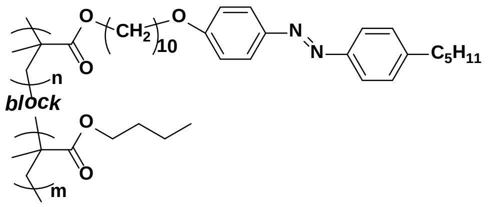


図 2. P5Az10MA-*b*-PBMA

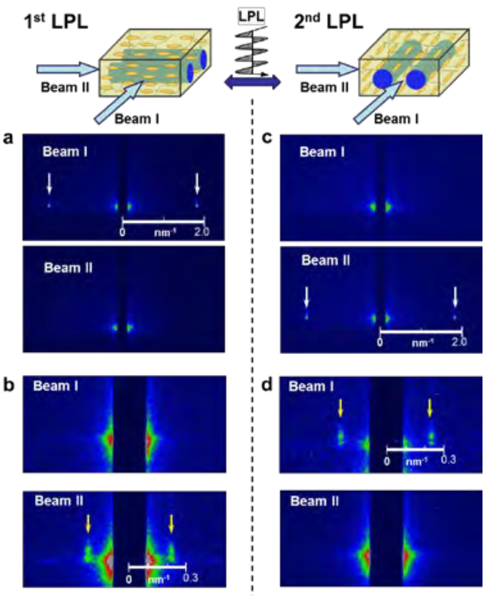


図 3. 偏光照射後の PBMA-*b*-P5Az10MA 薄膜の液晶スメクチック相とミクロ相分離構造の GI-SAXS 測定結果（CCD 像）：広角の液晶相および小角のシリンダー構造に明らかな異方性が観察された(a, b)。偏光の向きを変えるだけで、液晶相とミクロ相分離構造の配向が何度でもスイッチする(c, d)

PBMA-*b*-P5Az10MA スピンコート膜を調製し、波長 436 nm の直線偏光照射による液晶性アゾベンゼンブロックおよびミクロ相分離構造の光配向変化を、偏光吸収スペクトルおよび斜入射 X 線散乱測定（GI-SAXS）によって評価した。その結果、90 ℃の一定液晶温度下にて、P5Az10MA 液晶相およびミクロ相分離シリンダー構造は、照射偏光の向きに呼応して、良好に光一軸配向、再配向を繰

り返すことが明らかとなり(図 3)、よって、PBMA-*b*-P5Az10MA により、ミクロ相分離シリンダー構造のアクティブ配向制御を達成した。

「ミクロ相分離構造の光アクティブ配向制御の機構解明」

PBMA-*b*-P5Az10MA 薄膜のシリンダー構造は、液晶性ブロックの偏光応答により配向・再配向を何度でも繰り返す。このアクティブ配向制御において、アゾベンゼン分子の光再配向が、液晶相、ミクロ相分離構造の配向変化に階層的に伝搬するメカニズムは、本研究にて提案する“動的”なミクロ相分離構造の学術的のみならず応用的な観点からも重要な知見となる。そこで、PBMA-*b*-P5Az10MA 薄膜の光再配向過程を、偏光照射下、リアルタイム GI-SAXS 測定をシンクロトロン放射光を用いて遂行し、P5Az10MA スメクチック液晶相およびミクロ相分離シリンダー構造の配向変化の“動き”を詳細に追跡した。

P5Az10MAスメクチック相とシリンダー構造由来の散乱ピークは、照射偏光を 90° 向きを変えることで、消失および出現を繰り返すことをつかみ、光再配向過程のリアルタイム観察を達成した(図 4)。その結果、液晶相およびシリンダー構造の消失・出現過程は、数分(光強度 1 mw/cm^2, 照射時間 300 秒, 光量 300 mJ/cm^2)にて起こり、液晶光配向膜技術に鑑みても実用レベルの感度にて光再配向が起こることがわかった。さらに興味深いことに、高分子鎖の緩和過程としてはかなり速い速度にて光再配向が遂行されることが判明した。また、液晶相およびシリンダー構造のピーク強度の時間変化を詳細に解析すると、消失および出現過程ともに全く同期していることが明らかとなった。さらに、この光再配向過程のピーク強度推移の同期は、応

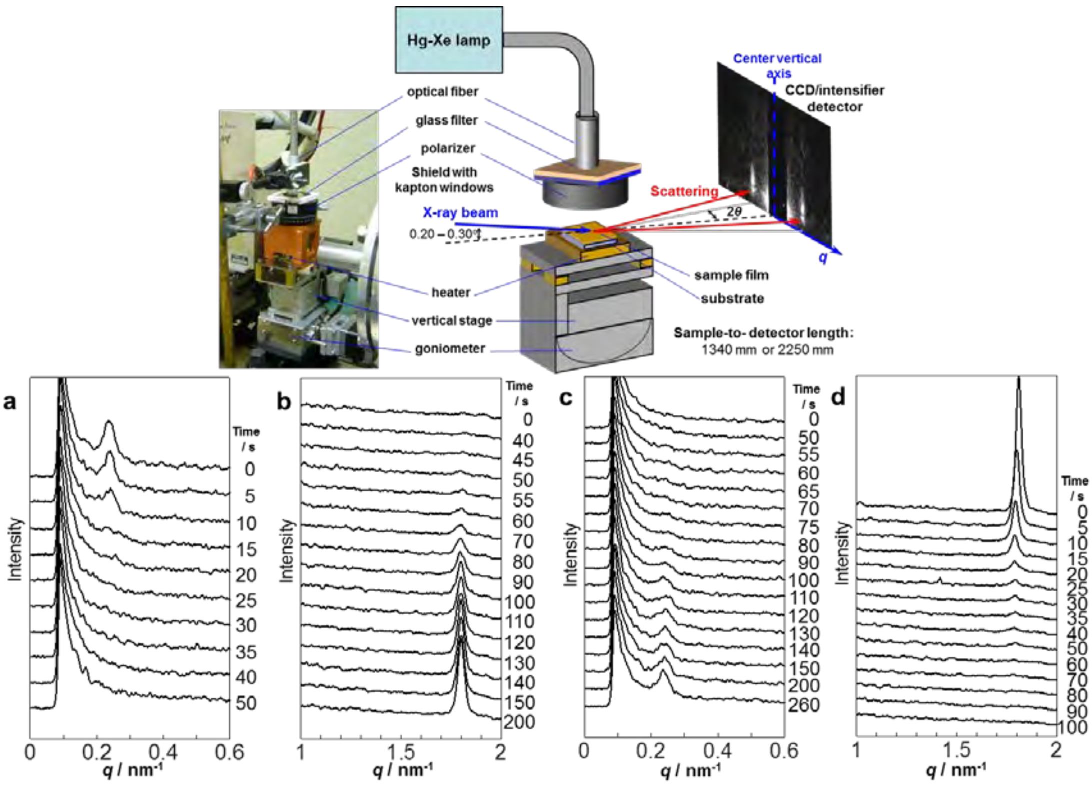


図4. 偏光照射下リアルタイム GI-SAXS 時分割測定のセットアップ(上図)および得られたミクロ相分離構造(a, c)、液晶相(b, d)の散乱ピークの消失および出現プロファイル:偏光の照射により液晶構造およびミクロ相分離構造のナノ構造が実際に動いている様を捉えた。

答温度や分子量によってもほとんど変化がないことも掴んでいる。得られた結果は、液晶相とミクロ相分離構造の配向変化が同時に起こっていることを強く示し、配向変化過程でナノ構造を維持していることを示唆する。つまり、これらの再配向変化は、規則性の低い等方相やディスオーダー相を経るのではなく、液晶構造や相分離構造を保ったまま、規則的なナノ構造を持つドメインが回転することより、遂行されることを意味する。

この階層的な光再配向過程のさらなる理解のため、再配向中間過程の捕捉および配向ドメインの大きさを解明する試みを行った。初期一軸配向、中間過程および一軸再配向の三つの光配向状態と加熱処理後の無配向状態のPBMA-*b*-P5Az10MA 薄膜を調製し、GI-SAXS 測定における散乱ピークの半値幅および偏光顕微鏡観察による光配向過程の液晶ドメインの観察およびそのサイズを解析した。その結果、興味深いことに、光再配向中間過程では、無配向状態の液晶ドメインサイズよりも大きな直径約 100～300 nm のドメインが観察された。さらに、これらの光配向中間過程の TEM 観察により、液晶ドメイン内にてミクロ相分離シリンダー構造が保たれていることも明らかにした（図 5）。よって、これらの結果は、リアルタイム観察の結果を支持し、ミクロ相分離の配向変化は規則構造を保ったドメインが回転する機構であることを突きとめた。

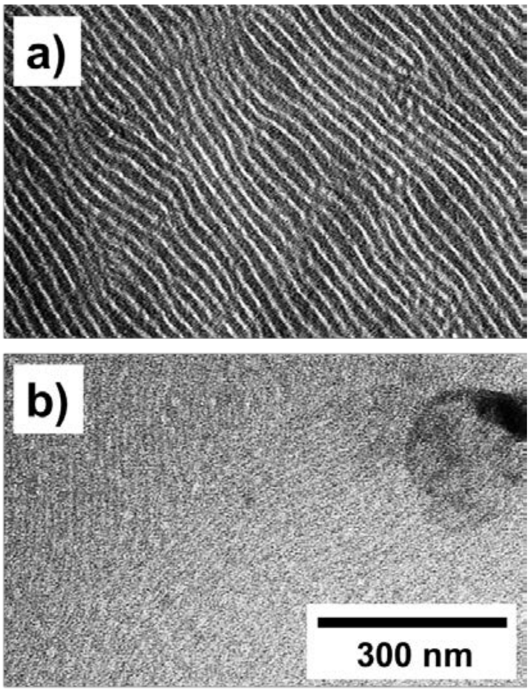


図 5. 一軸配向膜(a)と光再配向中間状態(b)の TEM 像: 偏光の入射方向から観察した像。一軸配向膜は、一様に配向したシリンダー構造が観察される。一方、再配向中間状態においてもシリンダー構造を確認でき、規則構造を保ったまま配向変化が起こることを示す。

以上の結果から、PBMA-*b*-P5Az10MA 薄膜の配向変化は、分子レベルの偏光配向が、よりスケールの大きい液晶ナノ構造、メゾスコピックなミクロ相分離構造へ階層的に伝搬し、協同的に動く機構によって達成されることを明らかにした。また、その配向変化は、数 100 nm 以上の大きな液晶ドメインが回転することにより行われることも解明した。これらの結果は、液晶性と光応答性を利用することにより、高分子鎖の重心移動が数分のうちに長い距離を移動できることを示し、有用な時間スケールにて動くアクティブ材料として高分子ナノ材料の応用を広げるものである。また、配向過程の大きな配向ドメインサイズは、ミクロ相分離構造内にナノ粒子材料を包埋する、または、表面に吸着させるなどして、ナノ粒子材料の配向制御するデバイス応用としての可能性を示す。本研究の光応答性液晶ブロック共重合体により、液晶およびミクロ相分離構造の自己集合性と光応答の自己組織性を有機的に結びつけ、ナノ構造のアクティブ制御手法のプラットフォームが提案できたものと考えている。

3. 今後の展開

本研究は、ナノオーダー構造が可逆的にリアルタイムに動く“アクティブ”なナノ材料を初めて達成し、その階層的な配向機構を明らかにした。リソグラフィー技術の延長である従来研究に対

し、本成果は、ナノ材料分野に動的な機能を提案する新たな学術分野を切り開くものと考えている。また、秩序構造を保ちながら配向を変えるメカニズムをとらえることができ、工学的な発展性をもったナノ材料であることも示唆できた。リソグラフィー技術を用いないため、配向ナノ構造を簡便かつ大面積に得ることができる技術としての応用が可能である。光配向速度や応答性は、液晶光配向膜技術に比較しても実用レベルであり、波長や光量などを考慮すると応用に際し、むしろ有利な点も多い。現在、機能探索としては、ナノ粒子材料をミクロ相分離構造内部に包埋し、その光配向制御行う新たな応用展開を行っている。

本研究にて提案した光応答性液晶ブロック共重合体のアクティブ配向制御は、液晶分子設計による液晶配向制御、ミクロ相分離構造の相変化、非偏光や偏光の組み合わせにより、様々な高分子ナノ構造の“動き（モード）”が可能である。本研究の面内一軸配向以外にも、様々な液晶配向モードを利用したシリンダー構造の面内-面外配向モードや回転モードも視野に入れ研究を遂行し、今後、ナノ材料の時空間制御手法として展開する。

4.　自己評価

ねらいに掲げた研究としてのテーマはおおむね遂行でき、ミクロ相分離構造の光配向変化は、動く高分子ナノマテリアルとして新たな分野を構築しつつあると考えている。液晶構造およびミクロ相分離構造の秩序構造を保った配向変化は、高分子科学および液晶科学分野に学術的なインパクトある成果であり、階層的な光配向機構を明らかにできたことは幸いであった。また、工学的にもソフトマテリアルの可能性を広げるもので、応用に展開する際にも有用な知見となる。今後、本成果を踏まえ、アクティブ配向制御がデバイスへ応用展開できるよう努力していく所存である。

5.　研究総括の見解

①自己集合的な分子配向性、②制御可能な光応答性、③高い流動性、を有する液晶性ブロック共重合体を合成し、リアルタイムに動く“光アクティブ”高分子ナノマテリアルの創出を目指した。そのため、ミクロ相分離構造を持つ光応答性液晶性ポリ（アゾベンゼンメタクリレート）ブロックと室温付近にガラス転移温度を持つポリ（ブチルメタクリレート）ブロックからなるブロック共重合体(PBMA-b-P5Az10MA)を合成し、これが直線可視偏光でミクロ相分離構造の配向変化を繰り返す光アクティブ高分子であることを見出した。X 線散乱測定によってこの配向変化が、分子→液晶相→ミクロ相分離構造へと階層的かつダイナミックに伝搬することを明らかにした。この光応答性液晶ブロック共重合体の配向変化は、非偏光や偏光の組み合わせにより、液晶配向制御、ミクロ相分離構造の相変化など様々なナノ構造の“動き（モード）”が可能であることなど興味深い成果を挙げた。

本研究で得られた面内一軸配向以外に様々な液晶配向モードを利用したシリンダー構造の面内-面外配向モードや回転モード等ソフトマターの運動と緩和といった“光アクティブ”高分子の基本物性の理解を通じ、あらたなナノ材料の時空間制御手法として活用されることが期待される。

6.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. S. Nagano, Y. Koizuka, T. Murase, M. Sano, Y. Shinohara, Y. Amemiya, T. Seki, "Synergy Effect on Morphology Switching: Real-Time Observation of Photo-Orientation of Microphase Separation in a Block Copolymer", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 5884-5888 (2012).
2. 永野 修作, 関 隆広, "ミクロ相分離構造の光配向制御", *液晶*, 15, 288-297 (2011).
3. K. Fukuhara, Y. Fujii, Y. Nagashima, M. Hara, S. Nagano,T. Seki, "Liquid-Crystalline Polymer and Block Copolymer Domain Alignment Controlled by Free-Surface Segregation", *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press (DOI: 10.1002/anie.201300560).

（2）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

【招待講演】12 件

1. 永野修作, "光を用いたナノ構造の構築と配向制御ーミクロ相分離構造を使ったアプローチー", 平成 24 年度フォトポリマー講演会「先端インテリジェントフォトポリマー」
2. S. Nagano, "Active Photoswitching of Microphase Separation Cylinders in a Liquid Crystalline Azobenzene Block Copolymer thin film", International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN) 2012
3. 永野修作, "ミクロ相分離構造を並べる、動かす", 2011 年度東海高分子学生講演会
4. S. Nagano, "Active Photocontrol of Microphace Separation Cylinders in Azobenzene Block Copolymer", Nagoya University Global COE in Chemistry 4th Annual Symposium 2011
5. 永野修作, "アゾベンゼン液晶相を利用した高分子ナノ構造体の光配向", 日本液晶学会 「液晶物理・物性」「液晶化学・材料」「ソフトマター」研究フォーラム 合同講演会 2009,「アゾベンゼン光異性化を用いた液晶科学への誘い」

【学会発表】138 件

1. 永野修作, 佐野誠実, 永島悠樹, 篠原佑也, 雨宮慶幸, 関 隆広, "液晶性アゾベンゼンブロック共重合体薄膜におけるシリンダー構造の光再配向挙動", 2012 年日本液晶学会討論会
2. 永野修作, "ミクロ相分離構造の光配向の階層的挙動", 第 61 回高分子討論会
3. M. Sano, S. Nagano, Y. Shinohara, Y. Amemiya, T. Seki, "Dynamic photorealignment behavior of liquid crystaline azobenzene block copolymer with different molecular weight", 14th International Conference on Organized Molecular Films 2012 (LB14)
4. 佐野誠実, 永野修作, 篠原佑也, 雨宮慶幸, 関隆広, "液晶性アゾベンゼンジブロックコポリマーの動的光配向過程の考察", 2011 年日本液晶学会討論会
5. S. Nagano, Y. Koizuka, T. Murase, Y. Shinohara, Y. Amemiya, T. Seki, "Active photoalignment control of microphase separation cylinders in azobenzene block copolymer", Pacifichem 2010

【著書】2 件

1. 永野修作, 関隆広, “第 3 編 第 2 章 高分子超薄膜とナノ構造の光配向制御”, シーエムシー出版「光配向テクノロジーの開発動向」市村國宏 監修

研 究 報 告 書

「ナノ形状設計に基づく人工神経細胞膜センサーの創製と機能発現」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月
研 究 者： 平野 愛弓

1．　研究のねらい

　細胞膜は厚さ 4-5 nm の自然界のナノ薄膜であり、また、化学的、電気的、機械的刺激に対して非常に高感度なバイオセンサーでもある。その構造は、脂質分子が二層向かい合って並んだ脂質二分子膜と、イオンチャネルをはじめとする種々の膜タンパク質から成り立っている。細胞膜の高感度な刺激感受性は、膜タンパク質によって発現されており、例えば神経細胞の軸索部分では、電位依存性のイオンチャネルの開閉によって活動電位が伝搬されていく。一方、基本構造となる脂質二分子膜は超薄膜の絶縁体であり、イオンチャネルを透過するイオン流のような微小信号に基づく細胞膜情報伝達の基礎となっている。
　本研究では、このような神経細胞膜の優れた機能を、半導体微細加工によるトップダウンプロセスとボトムアップ的な脂質分子の自己集合プロセスとを融合して人工的に再構築することにより、人工神経細胞膜センサーを開発することを目的とした。従来の人工細胞膜はその機械的強度に問題があり、センサー開発の障害となっていたが、本研究では、nm スケールで形状を制御した微細孔を作製し、その中で脂質二分子膜を形成することにより、人工脂質二分子膜系の大きな問題であった機械的脆弱性の問題を解決する。さらに、その膜中に電位依存性チャネルやレセプターチャネルを埋め込むことにより、細胞膜構造を人工的に再構築した人工神経細胞膜センサーを開発することを目指す。また、アレイ化が容易という半導体加工技術の特徴を活かしてイオンチャネルアレイを作製し、創薬のためのハイスループットな薬物スクリーニングへと展開する。特に、薬物候補化合物の副作用評価が必須となった電位依存性のカリウムチャネルや、脳疾患の創薬ターゲットとして重要なセプターチャネルを対象としたイオンチャネルアレイを構築することにより、新しい薬物スクリーニング法の開発を目指した。
　一方で、ナノ構造と人工神経細胞膜とを融合した本センサデバイスは、実際の神経細胞との人工的シナプス形成が可能となれば神経細胞と集積回路の接合部ともなりうるため、薬物スクリーニングのみならず、様々な分野での発展が期待される次世代ナノバイオデバイスとなると期待される。

2. 研究成果

（1）概要

細胞膜構造を模した人工脂質二分子膜にイオンチャネルを埋め込んだ人工細胞膜は薬物スクリーニングや高感度センサーの観点から期待されてきたが、イオンチャネルの機能発現にとって必須の環境である脂質二分子膜は機械的強度が低く、その発展の障壁となってきた。本研究では、テーパーの付いた滑らかなエッジを持つように作製した微細孔の中で膜形成を行えば、膜保持体と脂質二分子膜の接合部の歪みが減少して膜安定性が向上するのではないかとの考えから、滑らかなエッジを持つ微細孔をSi_3N_4/Si基板中に作製し、このチップ中での膜形成と膜安定性の評価を試みた。その結果、膜寿命、耐電圧特性ともに従来の 10 倍程度の向上が観測され、これまで不可能であったイオンチャネルを含んだ状態での溶液交換を可能にする、機械的強度の高い二分子膜を構築することに成功した。さらに、多数のチップの同時作製が容易という半導体微細加工の特徴を活かし、上述のチップを多数個並列に並べたイオンチャネルアレイの構築を行った。プロトタイプとして9つの膜の同時形成を行った結果、各チップに対して 60%以上の確率で脂質二分子膜を形成することができた。この脂質二分子膜アレイにモデルチャネルのグラミシジンを包埋した結果、グラミシジンチャネル電流を複数チップから同時に測定することに成功した。一方で、これらの脂質二分子膜には、膜安定性は高いものの、二分子膜とチップの総電気容量が大きく、ノイズ電流や過渡応答が大きくなってしまう問題もあることが判明した。そこで、作製したSiチップをSiO_2熱酸化膜とテフロン層で被覆することにより総電気容量を下げ、ノイズ電流値を 1-2 pA（ピーク電流幅）、過渡応答を 1 ms以下にまで抑制した。さらに、このようにして構築した二分子膜系に、副作用評価の対象タンパク質であるhuman *ether-a-go-go*-related gene（hERG）チャネルを抽出して包埋した結果、 hERGチャネルの単一チャネル電流を記録することに成功した。観測されたhERGチャネル電流は特異的阻害剤や、hERGへの副作用のために使用停止となった薬物によっても阻害され、生体膜中と同様の薬物反応性をSiチップ中で示した。今後は、上述のアレイにhERGチャネルを包埋し、新薬候補化合物のためのhigh throughput副作用評価チップへと展開したい。

（2）詳細

研究テーマ A「ナノ形状設計に基づく脂質二分子膜の安定化」

人工脂質二分子膜にイオンチャネルを埋め込んだ再構成系は薬物スクリーニングや高感度センサーとしての可能性を秘めているが、イオンチャネルの機能発現にとって必須の環境である脂質二分子膜は機械的強度が低く、その発展の障壁となってきた。近年、微細加工と脂質二分子膜を融合し、二分子膜の形成場となる小孔を微小化することにより膜の安定化を目指す試みについて多くの報告がなされたものの、膜強度の向上には至っていなかった。また、その多くは、チャネルに影響を与える有機溶媒を大量に用いており、適用可能なチャネルタンパク質の範囲には限界があった。一方、本研究では、小孔のサイズよりも微細孔のエッジと二分子膜との接合部の形状に着目した。すなわち、テーパーの付いた滑らかなエッジを持つように微細孔を作製すれば、膜保持体と脂質二分子膜の接合部の歪みが減少し、膜安定性を向上できるのではないかと考え、図1のような滑らかなエッジを持つ微細孔をSi_3N_4/Si基板中に作製し（孔径 20-40 □m、厚さ 200-240 nm）、このチップ中での膜形成と膜安定性の評価を試みた。その結果、膜寿命、耐電圧特性ともに従来の10 倍程度の向上が観測され、従来の膜系では困難であったイオンチャネルを含んだ状態での溶液交換を可能にする、機械的強度の高い二分子膜を構築することに成功した（図2）。薬物スクリーニング系への応用を考える際には、ターゲットチャネルの同定に必要な薬物と、候補薬物の2つの薬物を投与する必要があるため、溶液交換が必須となるが、チャネルを膜中に含む状態での溶液交換は極めて困難であった。本研究の二分子膜系では、イオンチャネルを含む二分子膜の溶液交換耐性は 90%を超えており（95%、膜の数n=20）、微細孔のエッジ形状をナノレベルで形状設計することにより、薬物スクリーニング応用も可能な二分子膜強度を獲得することに成功した。

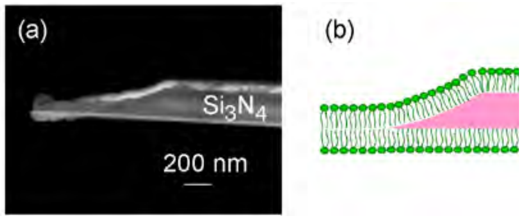


図1. 脂質二分子膜安定化へのアプローチ
(a) 微細孔縁部分の SEM 像, (b) 二分子膜ー保持体接合部の模式図

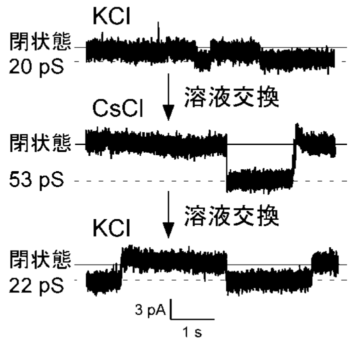


図2. グラミシジンチャネル電流と溶液交換耐性

研究テーマ B「イオンチャネルアレイへの展開」

イオンチャネルを対象とする薬物スクリーニング法や副作用評価法においては、対象となる候補化合物の数が膨大になることから、1 度の実験で多

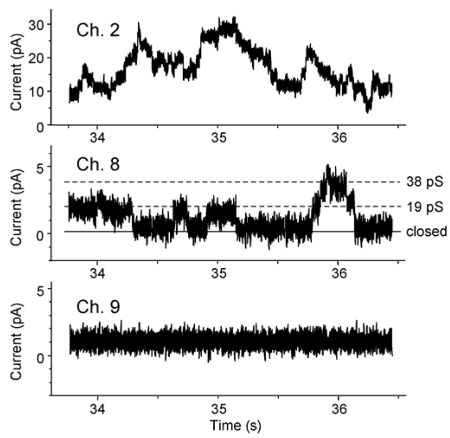


図3. 複数の膜からのチャネル電流測定の例

サンプルを評価できるハイスループットな解析系が必要とされる。私は、多数のチップの同時作製が容易という半導体微細加工の特徴を活かし、A のチップを多数個並列に並べたイオンチャネルアレイの構築を行った。プロトタイプとして9つの膜の同時形成を行った結果、各チップに対して 60%以上の確率で脂質二分子膜を形成することができた。この脂質二分子膜アレイにモデルチャネルのグラミシジンを包埋した結果、グラミシジンチャネル電流を複数チップから同時に測定することに成功した（図3）。

研究テーマ C「生体イオンチャネルセンサへの展開」

A、Bで構築した脂質二分子膜は、膜安定性は高いが、二分子膜とチップの総電気容量が大きく、ノイズ電流および過渡応答が大きくなってしまう問題もあることが判明した。そこで、作製したSiチップをSiO_2熱酸化膜とテフロン層で被覆することにより総電気容量を下げた結果、ノイズ電流値を 1-2 pA（ピーク電流幅）（図4）、過渡応答を 1 ms以下にまで抑制できた。次に、副作用評価の対象タンパク質である電位依存性のカリウムチャネル、human *ether-a-go-go*-related gene（hERG）チャネルを、その発現細胞から抽出し、この絶縁層被覆基板中の二分子膜に包埋した結果、図5のようにhERGチャネルの単一チャネル電流を記録することに成功した。観測された単一チャネルコンダクタンスや内向き整流性は、パッチクランプ法で報告された値や整流性とよく一致していた。またhERGチャネル電流は特異的阻害剤や、hERGへの副作用のために使用停止となった薬剤によっても阻害され、生体膜中と同様の薬物反応性をSiチップ中で再現することに成功した。このようなhERGチャネルに対するブロッカーアッセイは、溶液交換の可能な膜系において初めて実現可能であり、強度の高い人工脂質二分子膜系の構築により達成することができた。今後は、Bの脂質二分子膜アレイにhERGチャネルを包埋し、新薬候補化合物のためのハイスループットな副作用評価チップへと展開したい。

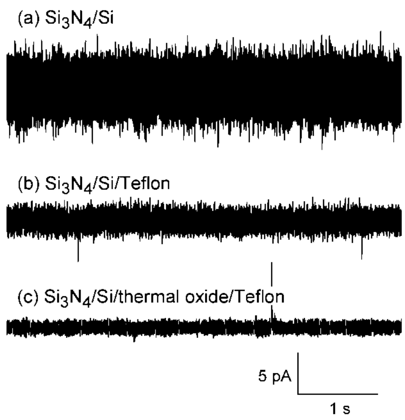


図4. 絶縁層被服によるノイズ電流の抑制

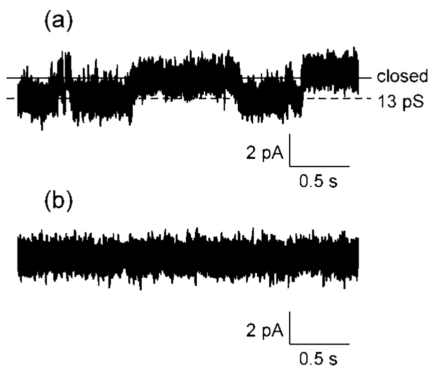


図5. hERG チャネルの単一チャネル電流
(a)コントロール, (b) 阻害剤の添加後

3. 今後の展開

現在の創薬におけるチャネル電流の評価においては、生体膜中のチャネル電流を記録するパッチクランプ法を high-throughput 化したオートパッチクランプが主流であるが、観測される電流が細胞の状態に依存することや、チップと細胞との間の高シール形成の歩留まりが低いことが課題となっている。本研究のイオンチャネル包埋脂質二分子膜チップが構築されれば、ready to use な評価チップの出現であり、これにより副作用評価および薬物作用のスクリーニング効率が飛躍的に向上すると期待される。現状では、膜中へのチャネル包埋確率は高くないが、包埋効率の向上については現在検討中であり、チャネル包埋二分子膜チップが高効率に作製できるようになれば、創薬の現場に大きなブレークスルーをもたらす方法論となると期待される。

4. 自己評価

本さきがけ研究では、人工脂質二分子膜の安定化とその膜中への hERG チャネルの包埋に成功し、hERG チャネルに基づく神経細胞膜センサーの構築に成功した。また、その展開としてのハイスループット薬物スクリーニングのためのイオンチャネルアレイの構築については、アレイ実験系を構築するところまで進捗した。最終的な到達目標である生体イオンチャネルアレイ(例えば hERG チャネルアレイ)の構築には至らなかったが、その構築に必要となる要素技術の開発は達成できたと考えている。一方で、安定化脂質二分子膜へのチャネルの包埋という新たな課題も見出しており、この課題については今後も引き続き取り組み、薬物スクリーニングのためのイオンチャネルアレイの実現を目指したい。

5. 研究総括の見解

半導体微細加工(トップダウンプロセス)と脂質分子の自己集合(ボトムアッププロセス)を融合して、人工神経細胞膜センサーを開発することが目的である。機械的脆弱性の問題を解決し、電位依存性チャネルやレセプターチャネルを埋め込んだイオンチャネルアレイを作製し、薬物スクリーニングへと展開することを狙っている。そのため、①「ナノ形状設計に基づく脂質二分子膜の安定化」 ②「イオンチャネルアレイへの展開」 ③「生体イオンチャネルセンサへの展開」という 3 つの課題を設定した。微細孔をSi_3N_4/Si中に作製し、このチップ中で膜形成すると、従来困難であったイオンチャネルを含んだ状態で機械的強度の高い二分子膜を構築できた。さらに、チップを多数個並列に並べたイオンチャネルアレイを構築し、この脂質二分子膜アレイにモデルチャネルのグラミシジンを包埋した結果、チャネル電流を複数チップから同時に測定することに成功した。ナノ構造と人工神経細胞膜を融合したこのセンサデバイスは、神経細胞と集積回路の融合した立派な成果と評価でき、この手法をモデルとして今後、薬物スクリーニングのみならず、重要な次世代ナノバイオデバイスへ発展できるものと期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ayumi Hirano-Iwata, Kouji Aoto, Azusa Oshima, Tasuku Taira, Ryo-taro Yamaguchi, Yasuo Kimura, and Michio Niwano. Free-Standing Lipid Bilayers in Silicon Chips ー

	Membrane Stabilization Based on Microfabricated Apertures with a Nanometer-Scale Smoothness. *Langmuir*, **2010**, 26, No.3, 1949-1952.
2.	Ayumi Hirano-Iwata, Tasuku Taira, Azusa Oshima, Yasuo Kimura, and Michio Niwano. Improved stability of free-standing lipid bilayers based on nanoporous alumina films. *Appl. Phys. Lett.*, **2010**, 96, Issue 21, 213706-1~3.
3.	Keiichiro Nozawa, Azusa Oshima, Tomohiro Nasu, Atsushi Shoji, Ayumi Hirano-Iwata, Michio Niwano and Masao Sugawara. *In situ* modification of lipid-loaded MCM-41 channels with bovine serum albumin at a planar lipid bilayer for biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2011**, 160, Issue 1, 139-144.
4.	Azusa Oshima, Ayumi Hirano-Iwata, Tomohiro Nasu, Yasuo Kimura, and Michio Niwano. Mechanically Stable Lipid Bilayers in Teflon-Coated Silicon Chips for Single-Channel Recordings. *Micro and Nanosystems*, **2012**, 4, No.1, 2-7.
5.	Azusa Oshima, Ayumi Hirano-Iwata, Hideki Mozumi, Yutaka Ishinari, Yasuo Kimura, and Michio Niwano. Reconstitution of Human *Ether-a-go-go*-Related Gene Channels in Microfabricated Silicon Chips. Anal. Chem., 85, Issue 9, 4363-4369 (2013).

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

・招待講演

1. ナノ構造を用いた自立型脂質二分子膜
   平野愛弓，大嶋　梓，青戸孝至，平良　祐，木村康男，庭野道夫
   第 31 回日本バイオマテリアル学会大会，京都，2009年11月16日

2. ナノ構造設計に基づく安定化脂質二分子膜センサーの開発
   平野愛弓
   真空・表面科学合同講演会　第30回表面科学学術講演会　第51回真空に関する連合講演会，大阪，2010年11月4日

3. 半導体微細加工に基づく安定化脂質イオンチャネルチップの開発
   平野愛弓
   平成23年度化学系学協会東北大会，仙台，2011年9月17日

4. 半導体微細加工に基づくイオンチャネルチップの開発
   平野愛弓
   第32回表面科学学術講演会，仙台，2012年11月20日

5. A Chip-Based Stable Lipid Bilayer for Recording Ion-Channel Activities

Ayumi Hirano-Iwata

Sendai Symposium on Analytical Sciences 2012, Sendai, November 9, 2012.

・総説・解説記事・著書

1. 微細加工に基づく人工細胞膜センサー —イオンチャネルチップへの展開ー
   平野愛弓
   化学と工業(支部発　話題欄), 63-3, 234-235 (2010).

2. Stable Lipid Bilayers Based on Micro- and Nano-Fabrication.
   Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Tomohiro Nasu, Tasuku Taira, Yasuo Kimura, and Michio Niwano
   Supramolecular Chemistry, 22, Nos. 7-8, 405-411 (2010).

3. ナノ・マイクロ加工に基づく人工細胞膜センサの研究
   平野愛弓, 大嶋　梓, 木村康男, 庭野道夫
   応用物理, 81 (2), 143-146 (2012).

4. Stable Lipid Bilayers Based on Micro- and Nano-Fabrication as a Platform for Recording Ion-Channel Activities.
   Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Hideki Mozumi, Yasuo Kimura and Michio Niwano
   Analytical Sciences, 28, No. 11, 1049-1057 (2012) .

5. Stable and Reproducible Bilayer Lipid Membranes Based on Silicon Microfabrication Techniques.
   Ayumi Hirano-Iwata, Azusa Oshima, Yasuo Kimura, Michio Niwano
   Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, Vol.11, Eds. H. T. Tien and A. Ottova, Elsevier, pp. 71-86 (2010).

研 究 報 告 書

「ナノ電気メスによる高精度細胞センシング・加工システム」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成21年10月～平成25年3月
研 究 者： 山西 陽子

1． 研究のねらい

医療あるいはバイオ産業など生物分野では、ウェットな環境下で狙った位置の加工や遺伝子導入及び局所的な悪性細胞死滅等の技術の発展が喫緊の課題となっている。本研究では従来医療分野で使用されている電気メスの技術を応用し、これまでにないまったく新しいアプローチによる高周波電気メスを製作し、ナノスケールオーダーの細胞加工技術を構築し、従来にはなかった液中加工技術を確立することにある。これまで電気メスによる生体組織加工における切開面には高電圧による熱侵襲が避けられず、単一細胞等小さい加工対象におけるダメージが大きいため、できるだけ放電時間を短くかつ、高精度加工のための絶縁領域の確保が必要であった。電気メスによる細胞等のマイクロナノスケール加工技術については他に例がなく、唯一スタンフォード大学のパランカー教授のグループが生体組織の加工研究を行い絶縁層で挟み込むことにより熱侵襲領域を数μm 程度に収めている。しかしながら熱侵襲の存在は単一細胞加工への応用において大きな弊害となる。一方、フェムト秒レーザを利用した加工技術においては大阪大学の増原教授のグループが 2005 年にタンパク質結晶の加工に成功している。一方、レーザを利用した細胞加工は ZILOS 等対物レンズに装着できる製品化されている技術もあるが、最近 UCLA の Chiou 准教授のグループがプローブにレーザを照射することで発生する気泡により細胞加工を行う技術を発表している。レーザ加工技術は高精度位置決めができるが、加工対象へのアクセシビリティ、無秩序な気泡の発生やコスト面において不利な面がある。

本研究では培養液中でも加工方向を制御しながらマイクロからナノオーダーにわたる幅広いダイナミックレンジで低侵襲細胞加工を行い、従来のガラスキャピラリやレーザ等による細胞加工技術を凌駕し、顕微作業で行われきたクローニング作業での卵子の核移植作業を低侵襲・低コスト・高効率に行うことを目標とし、細胞内の遺伝子操作など遺伝子工学や発生工学等の分野の発展に大きな影響を与えることがねらいである。また大気圧液中下の微小領域における加工技術と試薬等の導入技術を確立し、光学顕微鏡のマニピュレータや内視鏡の先端に組み込むことで安価で汎用性のある革新的加工技術を確立することについてもねらいとしている。

2． 研究成果

（1）概要

我々は大気圧液中下の微小領域における加工技術と試薬等の導入技術を確立し、光学顕微鏡のマニピュレータや内視鏡の先端に組み込むことで安価で汎用性のある革新的加工技術を確立することを目標に研究を行った。

研究当初は銀ナノワイヤ表面を自己組織化単分子絶縁膜により導電性を制御し、磁気駆動マイクロツールにそのワイヤを固定し、電磁コイルによる外部磁場を集中させることでナノメートルオーダーの位置決め精度を有し、回転電場を与えることで加工対象を回転させることよ

り 3 次元加工を可能にするという内容で研究を進めていた。しかしながら、液中放電による無秩序な気泡の発生や、ナノワイヤ電極自体の高電圧による電極摩耗や加工対象細胞からの蛋白質等の電極への付着など高精度加工について困難な課題が多く存在することがわかった。

そのような困難な課題を解決する過程においてガラス絶縁層内の導電性ワイヤの先端にバブルリザーバという空隙を設けることにより、指向性のあるサイズの揃った微細気泡列が高速で発生する特異な現象を発見し、その気泡の圧壊を用いることで細胞加工を行うというアイデアに至った。この気泡メスを用いることで、従来の電気メス加工における加工対象への熱侵襲ダメージを回避することができ、指向性があることにより加工方向を制御することができる。またプローブ先端径を変化させることにより、ナノからマイクロメートルオーダーにわたる幅広いダイナミックレンジで低侵襲加工を実現できる。例えばウシ卵子の除核操作をこの電界誘起型微細気泡・インジェクションメス(気泡メス)を用いて行ないガラスキャピラリによる顕微操作と同等の発生率を得ることに成功している。また細胞壁が堅固な植物細胞への有効性も確認している。一方、気泡メスは気泡の気液界面に試薬・遺伝子等を入れることにより加工と同時にインジェクションも行うことができるという優れた機能も持っている。このような気泡メスにおける低侵襲・高解像度な3次元加工・導入技術は高速な現象であり試薬の周囲への拡散速度よりも高速に気泡が移動することや、気泡の気液界面の吸着力により試薬をより遠くへ輸送できるといった特徴がある。これまで遺伝子導入の困難であった植物細胞等の硬い細胞への遺伝子導入や、腫瘍マーキング技術など新たな界面技術の機能創発をねらいとして研究を行なっている。

（2）詳細

さきがけ研究当初は全期間を通して下記の6つの研究項目に沿って研究を進めた。しかしながら上記の概要にも記載している通り、プロジェクト中途で当初の計画を変更し、気泡メスとして目標達成を行った。ここでは、最初に当初の6つのテーマの概要を記載し、その後気泡メスとしての研究テーマとその結果について詳述する。

研究テーマ①ナノワイヤによる電気メスの製作⇒当初計画のナノワイヤでの液中細胞加工実験では電極摩耗・無秩序な気泡の発生・電極へのタンパク質付着によりナノワイヤを使用した細胞加工の計画を変更し、2011 年下半期に発見した気泡メスのアプローチにより新しい低侵襲電気メスの構造を考案・製作・実証した。

研究テーマ②最適電気回路・高周波電源の設計、及び 研究テーマ⑥フィードバック制御による細胞加工システムの最適化⇒従来の電気メスの電気回路を細胞レベル加工の出力に調整するため、数十から数百kΩの無誘導抵抗を高周波電流発生回路に組み込み、1 秒間に 45 万回の出力データのサンプリングと 3500 回のフィードバックを行うことで加工対象のインピーダンスの変化に対応した出力調整を行い、またコンピュータ制御で出力時間や信号のDuty比を自由に設定させることを可能にした。（2011 年上半期完了）

研究テーマ③ナノ磁場集中機構設計及び位置決め制御試験、及び 研究テーマ④加工対象位置制御及び加工評価⇒気泡メスを使用するアプローチによりナノワイヤを固定した磁気駆動マイクロツールの高精度位置決め方法を使用することなく高精度除核作業に成功したため、この磁場集中や位置決め制御について行う必要がなくなった。現在気泡メスを用いること

で数μmの加工精度を達成しているが、気泡圧壊時に生じるマイクロジェットを利用することでnmオーダまで加工精度が向上する可能性がある。(2012 年上半期完了)

研究テーマ⑤センシング機能⇒当初はナノワイヤの接触センサによる細胞固さやインピーダンス計測を予定していたが、気泡メスとして電極と非接触に細胞を加工する手法に変更したため、センシング機能については次の研究フェーズへ持ち越しとなった。気泡メスのもう一つの機能としてインジェクション機能を付加することに最終年度に成功し、その気液界面に蛍光試薬や微小センサを吸着させて細胞内部へ打ち込むことにより、温度やpH等を計測するなどを引き続き行なって行きたい。

研究テーマ:電界誘起気泡メスによる細胞加工及びインジェクション

従来、液中の生体材料加工においては電極摩耗や気泡の発生、切開ブレードであるアクティブ電極表面に付着するタンパク質やデブリスなどの問題があり、無誘導抵抗を用いたシステムの最適化やガラスプラーを用いた堅固な絶縁膜の製作により加工精度を劣化させる気泡などの抑制に成功していた。しかし、電極先端のスケールを小さくすればするほど、そこに印加される高周波電圧に耐え切れず絶縁膜ごと吹き飛んでしまう現象が多々見受けられた。一方で、その現象時に電極内部から対向電極へ向かって発生する気泡はこれまで抑制しようとしていた気泡とは性質が異なり、指向性のある小さいスケールの気泡列が発生していることがハイスピードカメラによって確認された。そこで、アクティブ電極の先端構造を工夫し、電極先端にバブルリザーバとしての空隙を設け、電極に最小限に抑えた放電を発生させることで電極先端から対向電極まで一列に伸びる指向性を持ったマイクロナノスケールの気泡列を発生させることに成功した(図 1)。この気泡列は細胞膜表面に触れると気泡の圧壊現象により、低侵襲に加工することが可能であり、従来の電気メスのような焼結面を発生させずにタンパク質のダメージなく加工することができる(図 2)。(特願 2012-047053)

図 1. 指向性を持ったマイクロナノ気泡列の発生現象

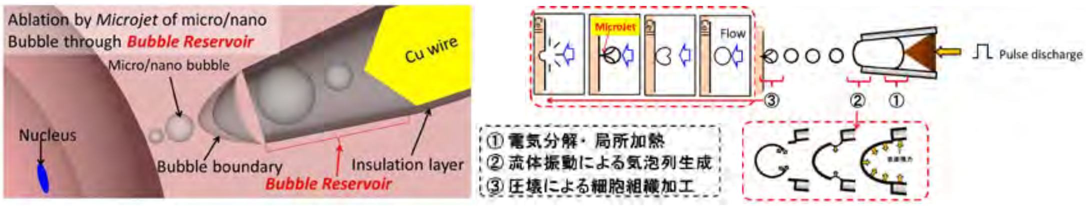


図 2. バブルリザーバを持った電気メス機構及び気泡圧壊による細胞組織加工メカニズム

気泡メスの加工精度を評価するために、実際にウシ卵子を加工し、その加工幅とメスから加工対象までの距離について共焦点顕微鏡画像を用いて評価を行ったところ、加工対象とメスの距離が離れるほど加工幅は小さくなり、例えばメスの先端である 10μm の距離分加工対象物から離れたところでは先端よりも小さい加工幅であることが確認できた。その後、2012 年 5

月より畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域の赤木研究者とともに電界誘起気泡メスによるウシ卵子の除核操作、核移植、気泡メスを用いた体細胞クローニング技術の発生評価を行ない、結果として図 4 図 5 に示すように胚盤胞に達することに成功し、発生率評価について従来のガラスキャピラリ技術と比較を行ったところ、発生率に大きな違いはなく、実用化へ向けた大きな一歩となっている。

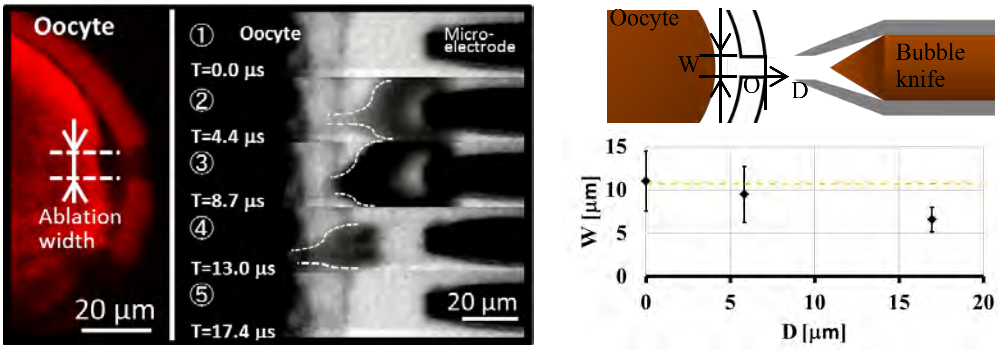


図 3. 気泡メスによるウシ卵子の加工及び細胞加工幅と距離の関係

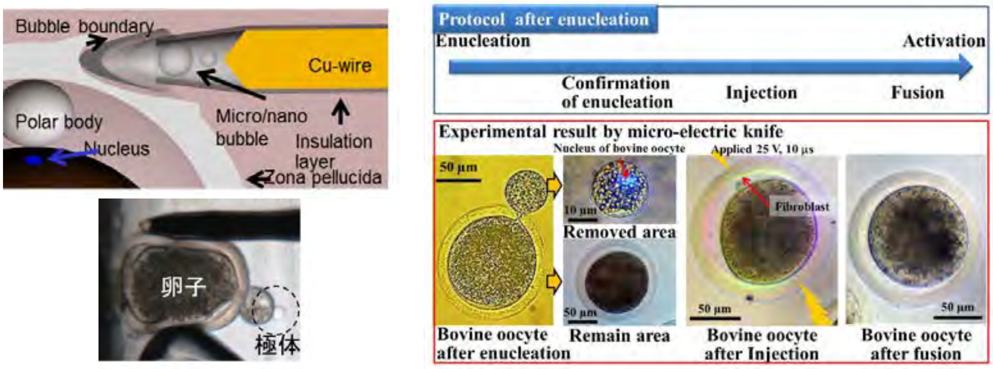


図 4. 電界誘起気泡メスによる除核・融合実験

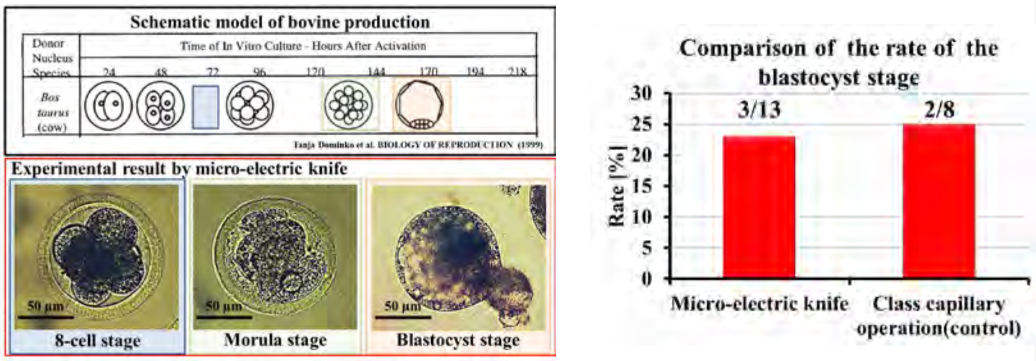


図 5. 電界誘起気泡メスによる発生率評価

その後、気泡メスのもう一つの機能として、気泡の気液界面し試薬を入れた気泡を撃つことで、「加工しながらインジェクション」を行う新しい機能を生み出すことに成功した。図6のようにガラス管を 2 重にすることで新しい気泡メスを作成し、試薬としてメチレンブルーを入れたところ図7のように直径数 μ m の試薬封入された気泡を発生させることに成功した。この気液界面

のメチレンブルーは約 100μｍ 程度の飛距離において青色を失うことなく飛んでいくことが確認され、実際に卵子に向かって加工しながら撃ったところ穴を穿ちながら試薬を導入できることについても確認することができた。また名古屋大学理学部東山教授より提供されたタバコ細胞(BY-2)を用いて植物細胞への蛍光ビーズのインジェクション実験を行ない、細胞壁を穿つと同時に2つの蛍光ビーズを細胞内に導入することに成功した(図8)。今後は遺伝子等を導入するなど幅広い分野において試薬を加工と同時に局所的にインジェクションすることに応用していきたい。

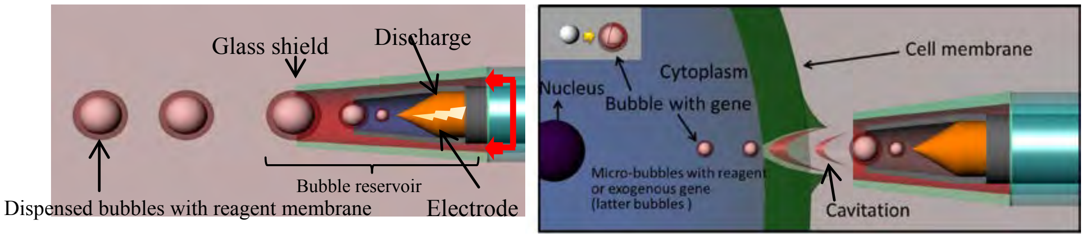


図6. 電界誘起気泡メスによる発生率評価

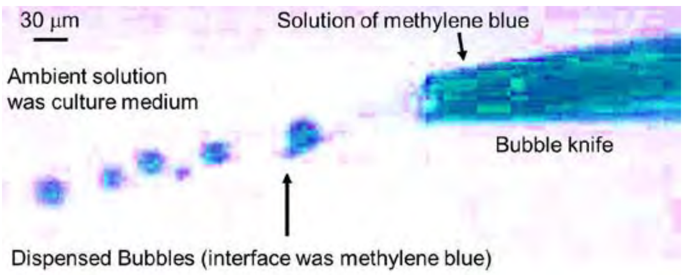


図7. メチレンブルー試薬を気液界面に吸着したまま液中を異動する気泡

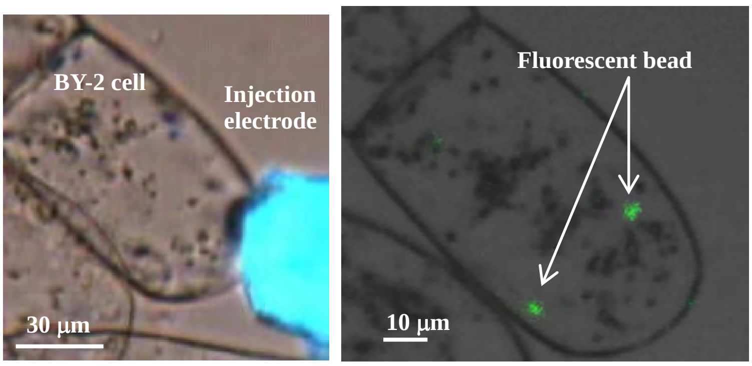


図8. タバコ細胞(BY-2)への蛍光ビーズインジェクション実験

3. 今後の展開

本研究で開発した電界誘起型微細気泡・インジェクションメス（気泡メス）は生体等の柔軟物を加工するだけでなく、加工対象を限定せずに狙った箇所のみ加工・導入できるところに強みがあり、従来の高周波メスや電気穿孔法、超音波穿孔法やレーザ加工技術にはない技術として、高速・高精度・低コストに行うことができる新しい液中加工・インジェクション技術としての発展が見

込まれる。

この技術の応用として、これまで遺伝子等の導入効率が低かった硬い細胞壁を持つ植物細胞などへの導入効率の向上や、気泡列の軌跡を制御した新しいパターニング・加工技術への応用が見込まれている。

また、治療が困難であった箇所への3次元アクセスによる悪性細胞の死滅やメカニズムの解明が期待でき、低コストで簡単に汎用顕微鏡マニピュレータや内視鏡などの汎用医用機器に取り付けることが可能であることより、高速・高精度治療や医薬品導入が期待できる。例えば高精度な腫瘍マーキング技術などに応用可能である。

一方、指向性気泡列の気液界面には固相・液相・気相と幅広い対象を封じ込めることができ、局所界面反応や気泡圧潰時の結晶化技術等、界面の要素技術分野での新しい応用が考えられている。また、気泡内のガスを反応性のガスなどに替え、気液界面に反応性の低い物質を吸着させることにより効率的に反応させ、気液界面の表面積の大きさを利用した液中反応場を作成することも考えられている。従来技術における気泡メスの位置づけについては下記図9に記載する。

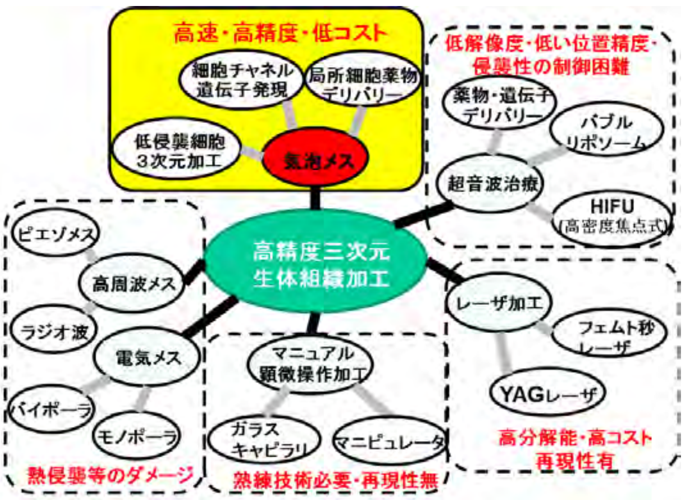


図9. 気泡メスの従来技術の対する位置付け

4. 自己評価

研究のねらいとして液中下で高精度に細胞加工を行うために、新しいアプローチによる高周波電気メスを製作しダイナミックレンジの大きい細胞加工技術を構築し、従来にはなかった液中加工技術を確立することにある。さきがけ研究当初は計画していた銀ナノワイヤを用いた電気メスによる細胞加工において多くの問題があり、それを解決している中で新たな気泡メスを用いる加工方法を発見し、それによって目標達成を目指した。結果として気泡メスを用いたウシ卵子の除核作業に成功し、その後の発生率評価においてもガラスキャピラリと同等の結果を出すなど、新しいアプローチによる高周波電気メスを開発に成功したと言える。当初の目標であるナノスケール加工にはまだ加工精度が及ばないが、気泡圧壊時のマイクロジェットの nm オーダーの加工性能を用いることや、プローブ先端をさらに小さくし、発生する気泡サイズを小さくして圧壊すること

で十分達成可能であると考えられ、気泡の大きさを制御することにより幅広いダイナミックでの細胞加工が実現可能と考えられる。

今回は研究の中途で新たな機能創発を行うことができたことは、大変幸運であり、長田総括はじめアドバイザーの先生方やさきがけ研究者の方々からの多くのアドバイスによって導きだされたものであり深く感謝申し上げる次第である。今後新しい気液界面技術をベースとして幅広い分野における機能創発を行なっていきたい。

5. 研究総括の見解

本研究の狙いは新規の高周波電気メスを製作し、ナノスケールオーダーの非熱侵襲細胞加工技術を構築するとともに、従来になかった液中加工技術を確立することにある。

研究者はガラス絶縁層内の導電性ワイヤの先端にバブルリザーバという空隙を設けるとサイズの揃った指向性のある微細気泡列が高速で発生する現象を発見した。その気泡列は細胞壁表面に触れると気泡の圧壊現象により熱侵襲ダメージなしに細胞加工が可能であることも見出した。しかも、先端径を変化させることにより、ナノからマイクロメートルにわたって三次元低侵襲加工ができることもわかった。さらに気泡の気液界面に試薬・遺伝子、蛍光ビーズ等を入れることにより加工とインジェクションを同時に行うことができるという優れた機能も持っていることも実証した。

電気メスによる細胞等のマイクロナノスケール加工技術についてはこれまで例がなく。極めてインパクトの強い重要な発見であるといえる。この技術を応用すると、これまで困難であった植物細胞等硬い細胞への遺伝子導入や、腫瘍マーキングなど新たな界面技術の創製が可能となろう。また、治療が困難であった箇所への3次元アクセスによる悪性細胞の死滅やメカニズムの解明の可能性も期待でき、近い将来の実用化が期待できる。本領域で得られたナノ「システム」の大きな成果の一つとして高く評価できる。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Yoko Yamanishi, Hiroki Kuriki, Shinya Sakuma, Kazuhisa Onda and Fumihito Arai. Local ablation by micro-electric knife. IEEE Nanotechnology Magazine. 2012, Vol.6, No.2, pp.20-24.

(2)特許出願

研究期間累積件数:3件

1.
発　明　者: 山西　陽子, 佐久間　臣耶, 栗木　宏樹, 新井　史人
発明の名称: 切削及び局所アブレーション方法
出　願　人: 名古屋大学
出　願　日: 2012 年 3 月 2 日
出 願 番 号: 特願 2012-047053

2.
発　明　者：山西　陽子，栗木　宏樹，佐久間　臣耶，新井　史人
発明の名称：局所アブレーション装置及びインジェクション方式
出　願　人：名古屋大学
出　願　日：2013 年 1 月 11 日
出 願 番 号：特願 2013-003748

3.
発　明　者：山西　陽子，佐久間　臣耶，栗木　宏樹，新井　史人
発明の名称：気泡噴出部材及びその製造方法、気液噴出部材及びその製造方法、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、インジェクション装置及びインジェクション方法、プラズマ気泡噴出部材、並びに治癒装置及び治癒方法
出　願　人：JST 及び名古屋大学
出　願　日：2013 年 3 月 1 日
出 願 番 号：PCT/JP2013/055703

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

（主要な学会発表）

1. Yoko Yamanishi *et al.*, "Transportation of mono-dispersed micro-plasma bubble in microfluidic chip under atmospheric pressure", Transducers (June 2013)(Accepted).

2. Yoko Yamanishi *et al.*, "Dispensing of mono-dispersed micro-bubbles for cell ablation", Proc. of IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2013), Karlsruhe, Germany, (May 2013), Accepted.

3. Yoko Yamanishi *et al.*, "Transportation of micro-plasma bubble in microfluidic chip under atmospheric pressure", IC-PLANTS2013,(O-03), (2013).

4. Yoko Yamanishi *et al.*, "Simultaneous Ablation and Injection by Electrically-induced Mono-dispersed Bubble Knife for Biomedical Applications", Proc. of The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2013), p.209-212, (2013).

5. Yoko Yamanishi *et al.*, "Single cell surgery with monodispersed microbubbles generated by a pulsed discharge of microelectric knife", Proc. of the 16th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (□TAS), pp.183-185, (2012).

6. Yoko Yamanishi *et al.*, "Electrically-induced Bubble Knife", 2012 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2012), pp.46-49 (2012).

7. Yoko Yamanishi *et al.*, "Local ablation by micro-electric knife", 7th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS), Kyoto, Japan, pp. 177-180, (2012).

8. Yoko Yamanishi *et al.*, "Cell Ablation by Electrically-induced Mono-dispersed Bubble Knife", RSC Tokyo International Conference, JASIS Conference, Tokyo, Japan, (2012).

9.山西他，"マイクロ・ナノバブルによる細胞の局所アブレーション"， ROBOMECH 2012 in Hamamatsu, (社)日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門, (1A2-V05),浜松, (2012).

10. 山西他, “拘束バブル流れ生成のためのバブルリザーバを有するマイクロ電極”, 第 25 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (25th Cheminas), (2012), 熊本, 講演要旨集, 3P22.
11. 山西他, “マイクロ電極を利用した局所アブレーション”, 第 24 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会(24th Cheminas), (2011), 大阪、講演要旨集 p.83.

（受賞）

1. Robomec 表彰

Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma , Masaya Hagiwara, Tomohiro Kawahara, Fumihito Arai, 「マイクロプラズマによる局所アブレーション–マイクロ電極を利用したプラズマブレードによる細胞加工–」, 2012 年 5 月 28 日, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門.

2. JRM 表彰

Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma, Tomohiro Iyanagi, Fumihito Arai, Tatsuo Arai, Akiyuki Hasegawa, Tamio Tanikawa, Akihiko Ichikawa, Osamu Satoh, Akihiro Nakayama, Hiroshi Aso, Mitsuhiro Goto, Seiya Takahashi, and Kazutsugu Matsukawa, 「Design and Fabrication of All–in–One Unified Microfluidic Chip for Automation of Embryonic Cell Manipulation」, 2011 年 5 月 27 日, (JRM, Vol.22, No.3, p.371–379).

（展示会）

・中部地区　医療・バイオ系シーズ発表会,
「マイクロナノバブル電気メスによる低侵襲細胞加工」, 2012 年 12 月 4 日

・Nanotech2013, 「電界誘起型微細気泡・インジェクションメス」, 2013 年 1 月 30 日～2 月 1 日

研　究　報　告　書

「ブロックコポリマーテンプレートによる3次元ナノパーツの創成」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成21年10月～平成25年3月
研　究　者：　横山　英明

1.　研究のねらい

ナノロボットやナノマシンを創り出すには様々なナノサイズの部品（ナノパーツ）が必要である。金属を始めとしたハードマターのナノパーツはもちろんのこと、動きが必要とされるロボットやマシンには、柔軟性や減衰特性を持ったソフトマターのナノパーツも同様に不可欠であることも明らかである。金属や半導体の加工にはリソグラフィに代表される微細加工技術を利用することができるが、ポリマーのようなソフトなナノパーツを創り出すには必ずしも適していない。リソグラフィのようないわゆるトップダウンの手法に代わり、自己組織化により形成される分子集合体を用いることは、ボトムアップの手法と呼ばれ、一度に大量の構造体を形成できることに繋がり、次世代の加工技術として注目されている。本研究では、ブロックコポリマーのミクロ（ナノ）相分離構造を利用してこれらのナノパーツを創成する手法についての研究を行う。ミクロ相分離そのものは、物質中の組成分布であり、立体的な形状、すなわちナノパーツの形成には直接的に繋がらない。ナノパーツとして形体を形作るには、組成分布ではなく、物質の空間的な配置（言い換えれば空間の導入）の制御を達成しなければならない。このような試みは物体のサイズが縮小しナノスケールになることにより加速度的に難易度が増加する。本研究においては、ブロックコポリマーをテンプレートとして超臨界流体中で膨潤させることで、ブロックコポリマーの本来の相分離構造だけではなく、膨潤により Order-Order 転移を誘起させ、様々なモルフォロジーのナノ相分離構造を形成させ、その後超臨界流体を除去することにより形成している相分離構造を形体として取り出すことにより、様々な形態の3次元ナノパーツ（粒子・棒・ディスク・シート・3次元ネット等）を創成することを目標とする。そのためには、形成する3次元ナノパーツの形状の元となる超臨界流体中での膨潤構造・構造転移について理解は不可欠であり、高圧下での構造の解析・相転移についての基礎的な研究もあわせて行う。この研究の結果として、数ナノメートルから数十ナノメートルの大きさで、球・シリンダー・シート・ネット等のソフトナノパーツが創成され、近い将来実現するナノロボットやナノマシンの重要な部品として利用されるための基盤となることが期待される。

2.　研究成果

（1）概要

ブロックコポリマーの自己組織化は古くから知られ、二元のブロックコポリマーの場合、ラメラ・ジャイロイド・シリンダー・球のドメインが規則的な周期構造を持った相分離構造を持つことが理論・実験により確認されている。本提案者らは超臨界二酸化炭素によってブロックコポリマーを膨潤させ、二酸化炭素の減圧除去により多孔体を創成できることを世界に先駆けて報告している。特に、球状の空孔の導入により超低屈折率を実現しほぼゼロ反射の反射防止膜として機能させた。本研究においては、これまでの研究を拡張し、ブロックコポリマー／超臨界

流体系において形成する構造を取り出すことにより固定化した、ナノパーツの創製について研究した結果、以下のことが明らかとなった。

1. ブロックコポリマー／超臨界流体系における構造形成について、その場解析を目的とした解析手法を開発し、高圧下である超臨界流体中での構造とその動的な変化を観測することに成功した。
2. 球状、シリンダー、ラメラ、共連続構造など典型的な相構造を鋳型としたナノパーツが超臨界流体の除去により得られた。
3. 1. の解析手法の確立により、狙った構造を鋳型としたナノパーツの創製が可能となった。
4. 上記の典型的な構造に加えて、波打つナノシートなど、非典型的なナノパーツの創製も可能であることが示された。

以下に詳細を記す。

（2）詳細

（1）超臨界二酸化炭素中におけるブロックコポリマーの秩序ー秩序転移

予言されていた、超臨界二酸化炭素中のポリマーの濃度変化に誘起される OOT を直接観測することを目的として装置の開発及び実験を行った。相挙動に違いの有無を明らかにする為に、組成・分子量の異なる PS-PFMA を用意し、本研究にて開発したダイアモンド窓付き高圧セル中で二酸化炭素加圧、加熱することで超臨界状態を実現した。放射光または中性子を用いて小角散乱(SAXS、SANS)を行い、モルフォロジーを解析した。また、反射率膜厚計により厚さの変化をとらえることで、膨潤率の測定を行い、二酸化炭素の加圧による膨潤率の変化を計算した。

加圧によって誘起されたOOTはすべて可逆で、履歴もほとんど見られなかった。逆相（CO_2とPFMAがマトリックスとなる相）に至っても、ここでの温度・圧力範囲ではPS-PFMAが溶出せず、CO_2を脱離させると初期の構造を再現した。発見されたHex+Lam相はブロック共重合体と有機溶媒の混合系において、メルトであればGyroidが形成される組成で代わりに出現することが報告されている。その場合は 2 元 2 相としてGibbsの相律を満たす。ところが、超臨界流体を用いたこの系ではHex相、Lam相の二相に加えて、圧力の維持・調節のためのCO_2のリザーバーが第三の相として二酸化炭素の化学ポテンシャルが釣り合っているため、2 元 3 相となってGibbsの相律が破錠している。転移が完了していない可能性も考えられるが、この系ではいずれもOOTが 10 分程度で完了するにもかかわらず、数時間に及んで共相が観測された。したがって共相を可能している要因は何らかの熱力学的パラメタの揺らぎである可能性が高い。出現している温度・圧力範囲が広範なため温度と圧力の揺らぎより、むしろ温度・圧力一定下での超臨界流体の密度の揺らぎが支配的である可能性が考えられる。

初期構造として球状ドメインを形成する系においては、10MPaから 30MPaまでの圧力範囲では明確なOOTを示さず、球状のドメインを維持していることが決定される。これは、広い範囲で球状の空孔が得られていることと良く一致している。OOTを起こさないことは、球ドメインがCO_2によって膨張していない可能性も否定できないため、膨潤度測定の結果を図 3 に示す。膨潤度からPolymer濃度が決まり、散乱実験でドメイン間距離が決まっている。その結果、初

期構造に関係なく膨潤は引き起こされるが、球状構造ではドメイン間距離が大きく変化し、逆にラメラの場合には膨潤によってドメイン間距離が増大していない。ドメインの膨張がPSとPFMAの界面に対して垂直方向には起こらず、専ら水平方向が主であることが考えられる。各ドメインの次元性を考えると、この膨潤の効果は一次元構造のラメラにおいて、その周期を維持したまま全体としては膨潤するという結果をもたらす。一方で、シリンダーと球では水平方向の膨潤とバルク全体の膨潤は分離することができないために、ドメイン間距離の増加は必然である。

（2）超臨界二酸化炭素処理によるナノパーツの形成

（1）の結果で得た相図を用いて、より戦略的な新規多孔構造の作成が可能となった。球状ドメインから球状空孔が得られた。球状空孔のみが得られ、相図を裏付けた。シリンダードメインからは、シリンダー状の空孔のみならず、秩序－秩序転移を反映して様々なナノパーツが得られた。一方で、膨潤によるフラストレーションが強くなる逆相領域における新規構造については特異な現象が見られた。特に、薄膜特有の拘束が加わった場合では、新奇な構造が得られることも期待できるため、薄膜中におけるナノパーツの生成を狙った実験を行った。PS-PFMAをシリコン基板上スピンコートして 100-200nm程度の薄膜のサンプルとし、超臨界二酸化炭素中で薄膜を選択膨潤させたまま、構造を凍結し、減圧・CO_2脱離をおこなうことで、PS-PFMAのナノスケールの相分離をテンプレートとした多孔構造を得た。多孔構造の解析のために射入射小角X線散乱と射入射超小角X線散乱（GISAXS&GIUSAXS）、SEM、AFMを用いた結果、Lam由来のシート状の多孔構造が基板に平行に積層していることが明らかとなった。一方で、30MPaの高圧で処理した場合には、中空の構造が表面に形成されていることが認められる。GIUSAXSにおいては基板平行方向に 300nm周期の構造由来のパターンがあらわれ、中空状のベシクルが基板上に配列しているものであると考えられる。

一方で、フッ素化ドメインの分率の高い PFMA 分率が 48wt%の試料では、60℃10MPa で処理した薄膜には基板に平行に積層した Lam 状の多孔構造が形成されたが、15MPa で処理した薄膜の GISAXS は 60℃、120℃ともに 10MPa で Lam のスポットが現れていた所に、基板平行方向にスプリットしたパターンがあらわれた。このパターンはラメラが不安定化して波打った undulated Lam に相当し、60℃では逆位相の egg carton と呼ばれるモード、120℃では同位相のモードで揺らいでいることが示された。以上のように同様の Lam の不安定化でも分子構造の違いにより異なったナノパーツが得られた。

（3）ブロックコポリマー/ホモポリマーブレンドによる構造転移制御

PS-PFMA単体のCO_2中 60 ˚Cにおける膨潤構造では、as cast状態のサンプルからは 1:$\sqrt{3}$:2とシリンダー由来のブラッグピークが観察され、10 MPaでラメラへと変化し、OOTが誘起された。しかしながら、20 MPa以上ではブラッグピークが弱まると同時に新たな構造に由来する形状因子が観察され、ラメラがさらに転移し、長距離秩序性が低い構造へと変化した。この構造は実空間観察により、PS-PFMAが二層膜を形成してできた 100 nmオーダーの閉じた“泡状構造”であることが明らかになった。ブロックコポリマーに特徴的で、構造として興味深いジャイロイドに代表される共連続空孔、あるいはネットワークは得られていなかった。そこで、PS-PFMAに短いhomoPS (Mn = 4,700 g mol-1)をブレンドし、PFMA重量分率 20%とした場合について検討した。高圧においてはブラッグピークが消滅しシート状構造に由来する形状因子

が出現し、シリンダー構造からの転移が示唆された。しかし転移後の構造は、共連続的なスポンジ構造となった。加えられたホモポリマーは単純に体積分率を変化させるのみではなく、偏在し、形成される構造そのものを大きく変化させることが明らかになった。）

3. 今後の展開

通常の有機溶媒の代わりに超臨界二酸化炭素を用いた、ポリマーの濃度変化誘起の OOT とモルフォロジーの観測及び解析の手法を確立した。共相はその密度の揺らぎから、界面水平への膨潤及び可逆的な濃度変化はその分子の移動度の高さからなど、超臨界流体特有の現象が確認された。以上で得た知見に基づき、ベシクルと Undulated Lamellae など新規ナノ多孔体の作製にも多数成功した。今後は超臨界流体にのみ出現する濃度変化誘起転移ダイナミクスの詳細な解析が期待される。この手法を確立したことにより、これまでに存在しなかった対称性とスケールをもつ構造のため、多様な機能性薄膜の形成が可能となることが期待される。

4. 自己評価

本研究で狙った、ブロックコポリマーの膨潤構造を鋳型としたナノパーツの創製が、可能であることを示すことができた。目的とした、典型的な構造を得ることに成功しただけではなく、研究開始時には予想しなかった非典型的な構造の形成が確認され、予想外の成果も得た。しかしながら、そのメカニズムについては、完全に明らかにしたとは言えず、今後の課題として残った。

5. 研究総括の見解

超臨界二酸化炭素流体中でブロックコポリマーの相分離ならびに Order-Order 転移を誘起させ、3次元ナノパーツ（粒子・棒・ディスク・シート・3次元ネット等）を創製することを目標とする。この研究により、数ナノメートルから数十ナノメートルのソフトナノパーツを作り、近い将来実現するかもしれないナノロボットやナノマシンの部品として利用されるための基盤を作ることが研究者のねらいである。

その結果、1）超臨界流体系におけるブロックコポリマーの構造とその動的変化を観測し、 2）球状、シリンダー、ラメラ、共連続構造など典型的な相構造を鋳型としたナノパーツを作製した。本研究の狙いが、果たしてブロックコポリマーの膨潤構造を鋳型としたナノロボットやナノマシンのナノパーツの創製という位置づけが適切なのか疑問が残るものの、本法によって様々な2次元、3次元形態を有する材料合成が可能であることを示したことは高く評価される成果である。その形成メカニズムは学術的に興味あるところであり、今後の成果に期待したい。ユニークで有用な反応系であるがゆえに、基礎研究を発展させて、より一般的な系として発展してほしい。

6. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. T. Shinkai, M. Ito, K. Sugiyama, K. Ito, and H. Yokoyama "Ordered and foam structures of semifluorinated block copolymers in supercritical carbon dioxide" Soft Matter 8, 5811-5817 (2012).

2. C. Dutriez, K. Satoh, M. Kamigaito and H. Yokoyama "Nanocellular foaming of fluorine containing block copolymers in carbon dioxide: the role of glass transition in carbon dioxide" RSC Adv. 2 (7), 2821-2827 (2012).
3. R. Zhang, C. Dutriez, K. Sugiyama, T. Ishizone and H. Yokoyama, "Thermally robust nanocellular thin films of high-Tg semifluorinated block copolymers foamed with supercritical carbon dioxide", Soft Matter, 7, 4032-4038 (2011)
4. R. Zhang, H. Yokoyama, "Fabrication of Nanoporous Structures in Block Copolymer Using Selective Solvent Assisted with Compressed Carbon Dioxide" Macromolecules 42, 3559-3564 (2009).
5. H. Yokoyama, "Small angle X-ray scattering studies of nanocellular and nanoporous structures" Polymer Journal 45, 3-9 (2013)

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（2）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

招待講演　FAPS Polymer Congress 2009 H. Yokoyama "Nanocellular and nanoporous structures templated from Block copolymer self-assembly"

招待講演　Japan-Taiwan bilateral symposium of neutron and X-ray scattering 2010 H. Yokoyama "Block copolymer self-assmebly in supercritical carbon dioxide"

招待講演　Pacific Polymer Conference, Korea 2011 H. Yokoyama "Order-order Transition of Block Copolymers in Carbon Dioxide and Formation of Nanopores"

受賞　2011 年 Wiley 賞受賞講演、高分子討論会　横山英明 "ブロックコポリマー/超臨界流体系における相転移とナノ多孔体創製"

など

研 究 報 告 書

「創発的機能制御性ペプチドアプタマーの創成」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月
研 究 者： 和田 章

1． 研究のねらい

近年、抗体に匹敵する標的結合性を獲得したペプチドを人工的に作製する手法として「ファージディスプレイ法」が開発され、ペプチドライブラリーから標的分子に対して特異的に結合する"ペプチドアプタマー"を自在に創出する道が開かれたように見えた。しかし、この手法では、標的分子とファージ本体との立体障害が大きいだけでなく、ホストの大腸菌の生活環に影響するペプチドは自動的に排除されてしまうため、実際に利用しているペプチドライブラリーの多様性は小さい($10^{7\sim8}$種類)など、改善すべき問題は数多く残されている。そこで、生細胞を使用することなく、ペプチドアプタマーを試験管内で選択する「ポリソームディスプレイ法」および「mRNAディスプレイ法」の原理が新たに提案され、表現型と遺伝子型の対応付けの方法やペプチドライブラリーの拡大($10^{10\sim12}$種類)などの検討が可能となってきた。しかしながら、目的のペプチドアプタマーを試験管内で自在に創出できる研究者は、世界的に見ても数が少ない。特に、小規模化・高速化に最も適していると考えられるリボソームディスプレイ法の報告例が極端に少ないのは、「ペプチド―リボソーム―mRNA複合体」の合成および選択操作・条件設定などの難しさにある。

そこで、本研究では、その複合体の超安定化を実現すると共に、天然アミノ酸だけでなく、化学的に機能化した非天然アミノ酸を部位特異的に導入したペプチドライブラリーを構築し、その中から目的・用途に最適なペプチドアプタマーを選択・同定する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法」の開発に取り組んだ。そして、本手法を駆使することで、タンパク質や細胞の特定機能を模倣・発現・賦与・検出・探索する「創発的機能制御性ペプチドアプタマー」を創成し、独自の"ペプチド・バイオテクノロジー"の確立と本領域から世界へと発信することがねらいである。

2． 研究成果

（1）概要

本研究では、試験管内タンパク質合成システムにより、天然アミノ酸だけでなく、機能化アミノ酸で構成した人工ペプチドの集団(人工ペプチドライブラリー)を構築すると共に、その中から標的分子に特異的に結合する"次世代のペプチドアプタマー"を選択・同定する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法(図 1)」を独自に開発した。そして、本手法を駆使することで、抗体に匹敵する標的結合性を獲得した「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー」を創成したことを足掛かりに、金属酵素の機能と構造を規範として、特定の生体反応を触媒する「金属酵素様活性ペプチドアプタマー」の創成、細胞機能を誘導する生理活性タンパク質を自己集積させる「材料表面吸着性ペプチドアプタマー」の創成、標的タンパク質の構造情報を光シグナルへと

変換する「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー」の創成が可能となった。さらに、ペプチドライブラリーをタンパク質ライブラリーへと拡張したリボソームディスプレイ法により、生物活性化合物や創薬候補の標的タンパク質を正確かつ迅速に同定する創薬技術の基礎を確立するまでに至っている。

つまり、本研究とは、ハイブリッド型リボソームディスプレイ法の開発と利用により、様々な異種分子(金属イオン・生体材料・生理活性因子・蛍光分子・生物活性化合物など)と融合して働く「創発的機能制御性ペプチドアプタマー」を創成すると共に、標的タンパク質および標的細胞の特定機能を“ペプチド”により再現する／制御する「ペプチド・バイオテクノロジー」の独自開拓を目指した取り組みと定義できる。

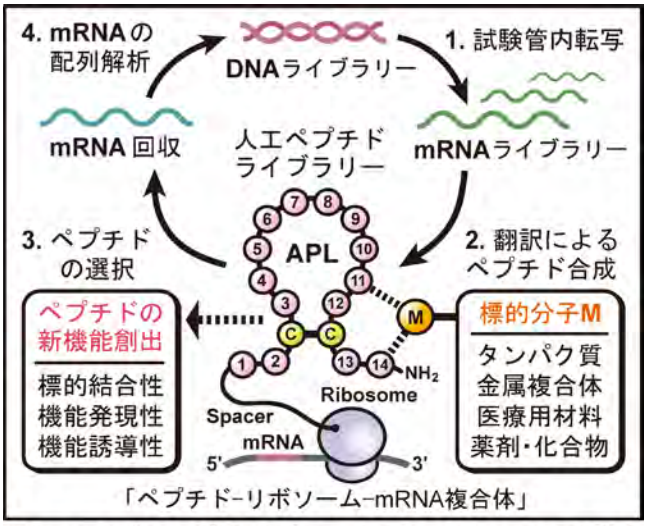


図1. ハイブリッド型リボソームディスプレイ法の開発

(2)詳細

2－1:「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー」の創成

抗体は、相補性決定領域CDR (Complementarity Determining Region)のアミノ酸配列をランダムに変化させることで、様々な抗原と結合することを可能にしている。そこで、抗体の抗原認識のように、任意の標的分子と特異的に結合できるペプチド(ペプチドアプタマー)を創成するため、抗体のCDRの長さとループ構造を模倣するだけでなく、実際の抗原認識に利用されるアミノ酸の出現確率を考慮した“抗体CDR様ペプチドライブラリー”を構築した。そして、そのペプチドライブラリーを提示させた安定型リボソームディスプレイ法を利用することで、標的タンパク質(Avidin)に対して結合する新規ペプチドアプタマーの選択と同定を行った。その結果、これまでに報告例のない新たなアミノ酸配列を有するペプチドを見出すことができた。さらに、その標的タンパク質に対する結合性を速度論的に解析したところ、抗体に匹敵するnMオーダーの解離定数K_Dを有する高親和性ペプチドアプタマーであることが明らかとなった。つまり、これらの結果は、本研究におけるペプチドアプタマーの模倣的設計と安定型リボソームディスプレイ法の有用性を示している。

2－2:「金属酵素様活性ペプチドアプタマー」の創成

生体内に存在する金属酵素が反応活性を発現するためには、金属イオンへの配位によって活性化した反応活性種と標的となる基質が適切に配向する“空間反応場の構築”が必要不可欠である。つまり、「金属イオンー反応活性種ー標的基質」で構成される空間反応場を再現・構築できるペプチドは、金属酵素様活性を発現することが期待できる。そこで、RNA のリン酸エステル部位を加水分解する亜鉛含有酵素の機能と構造に着目し、「亜鉛イオンーヒドロキシ活性種ーリン酸エステル基質」の反応場アナログとしての金属錯体に結合するペプチドアプタ

マーの創成に取り組んだ(つまり、ペプチドの反応場アナログへの結合活性(反応場を構築する活性)を反応活性へと変換できることを、実際に金属酵素様活性ペプチドアプタマーを創成することで証明する)。その結果、今回見出したペプチド P1 のアミノ酸配列は、金属酵素の活性中心構造に必須のアミノ酸群(His, Arg 等)を豊富に有しているだけでなく、標的分子である金属錯体に対して高い親和性を示すことが判明した。さらに、亜鉛(Zn)イオンと複合体を形成することで、一本鎖 RNA 基質のリン酸エステル部位を加水分解する「リボヌクレアーゼ(RNase)活性」を発現することも明らかとなった(図 2)。特に、このリボヌクレアーゼ活性は、ペプチドのアミノ酸配列・環状構造・金属イオンの種類・pH に依存しており、天然の金属酵素と類似した特徴を有していたことから、本研究が提案する金属酵素様活性ペプチドアプタマー創成戦略の正当性を実証するものとなった。

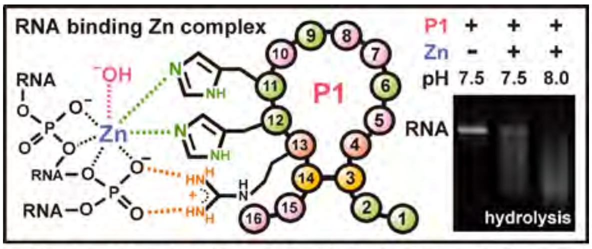


図2. Zn-P1複合体のRNase活性の電気泳動評価

２－３:「材料表面吸着性ペプチドアプタマー」の創成

近年、免疫原性が低く、物理的強度と可塑性に優れた金属である“チタン”は、医療用機器部品・インプラント材料として汎用されている。一方、次世代医療に求められるバイオマテリアルの創製においては、それら材料表面に接する細胞・組織の微小環境・クロストークを時空間的に制御する“革新的表面修飾技術”の開発が期待されている。そこで今回、ハイブリッド型リボソームディスプレイ法を利用することで、望みの細胞機能を誘導する生理活性因子を金属材料表面に自己集積させるペプチドアプタマーを創成し、目的に対応した細胞機能誘導性金属材料の創製に取り組んだ。まず、本手法を駆使することで、標的分子としてのチタン製ナノ粒子に結合するペプチドアプタマーの選択と同定を試みたところ、天然には存在しない特有のアミノ酸配列を有すると共に、チタン表面に対して高親和性を示す「チタン表面吸着性ペプチドアプタマー(TOP1)」であることが判明した。さらに、このペプチドアプタマーとヒト上皮細胞成長因子 EGF を融合した人工タンパク質(TOP1-EGF)は、チタン表面に対して自発的に吸着するだけでなく、様々な哺乳類細胞(繊維芽細胞など)の接着を促進すると同時に、細胞の増殖・伸展を能動的に誘導する機能を発現することが明らかとなった(図 3)。つまり、これらの結果は、ペプチドアプタマーを介して金属表面に自己集積した活性型 EGF により、細胞増殖機能が持続的に誘導されたことを示しており、将来の細胞機能誘導性材料のテイラーメイド創製に貢献できるものと期待している。

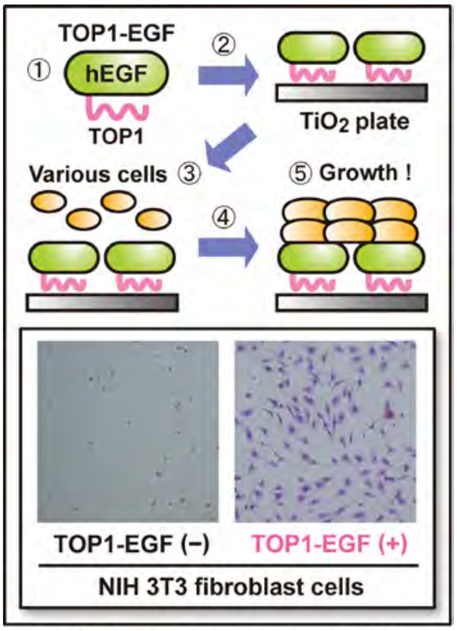


図3. TOP1-EGFのチタン表面における自己集積化と細胞増殖誘導性の発現

２－４:「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー」の創成

生命分子が複雑に絡み合って生じる生命現象を定量的に理解するためには、標的となる分

子の構造変化や相互作用を直接的に検出・追跡できる革新的バイオセンサーの開発が必要不可欠である。そこで、生命分子の構造情報を光シグナルへと変換するバイオセンサーとしてのペプチドアプタマーを創成するため、様々な蛍光分子を化学的に修飾した蛍光性アミノ酸-tRNA を合成し、それら蛍光性アミノ酸を部位特異的に組み込むための試験管内タンパク質合成システムを構築した。そして、そのシステムにより駆動するハイブリッド型リボソームディスプレイ法を利用して、標的タンパク質の構造変化を蛍光シグナルとして検出する「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー」の創成に取り組んだ。ここでは、カルシウム濃度に依存して構造を変化させることで、細胞内シグナル伝達系の重要な役割を果たすカルモジュリン(CaM)に着目し、カルシウムイオンに結合したカルモジュリンの立体構造だけを特異的に認識するペプチドアプタマーの選択と同定を試みた。その結果、今回見出された新規ペプチド(CaMP)は、標的であるカルシウム結合型カルモジュリンの立体構造に対して特異的に結合するだけでなく、その分子認識の情報を蛍光分子 TMR 由来の蛍光シグナルとして検出するバイオセンサー機能を発揮することが明らかとなった(図4)。今後は、望みの標的分子に結合するペプチドアプタマーをオンリーワン・バイオセンサーとして創出できる汎用的なシステムにまで発展させることを検討している。

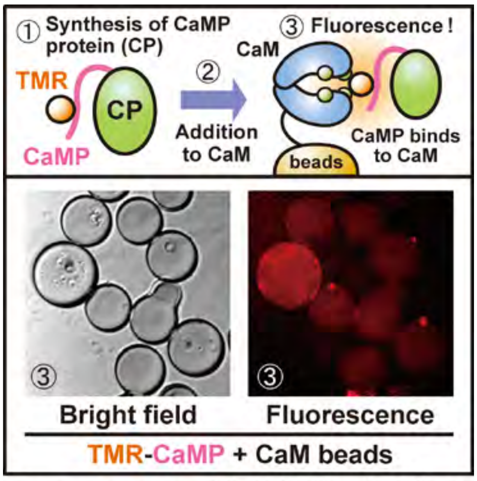


図4. CaMPによる標的構造の蛍光検出

2－5:「化合物結合性タンパク質探索システム」の構築

現在、ケミカルバイオロジーを基盤とする創薬研究では、副作用が小さく、薬理効果の高い分子標的薬を発掘するため、大規模な化合物ライブラリーのスクリーニングが細胞レベル／動物レベルで展開されている。そして、特定の細胞機能を制御する生物活性化合物を創薬シーズとして見出し、医薬品へと開発するためには、その化合物が結合する標的タンパク質を正確かつ網羅的に同定し、それらの生体内における作用機序と副作用を解明することが必須となっている。そこで、上記の喫緊のニーズに応える創薬基盤技術を独自に開発するため、ペプチドライブラリーからタンパク質ライブラリーへと拡張したハイブリッド型リボソームディスプレイ法を設計し、薬剤・生物活性化合物と結合する標的タンパク質を迅速に同定する「化合物結合性タンパク質探索システム」を新規に構築した。そして今回、小規模ではあるが完全長ヒトタンパク質ライブラリーモデルを合成すると共に、免疫抑制剤として利用されている FK506 を光架橋反応により固定化した化合物ビーズを利用して、その薬剤に結合する標的タンパク質の探索と同定を試みた。その結果、FK506 の標的タンパク質である FKBP12 を正確かつ短時間で同定することに成功した。今後は、完全長ヒトタンパク質ライブラリーを更に拡充すると共に、新たに発掘される生物活性化合物や薬剤候補の標的タンパク質を探索・同定することで、革新的創薬基盤技術としての本システムの有用性を実証していく計画である。

3.　今後の展開

本研究では、試験管内タンパク質合成システムで駆動する「ハイブリッド型リボソームディス

プレイ法」を新規に開発することで、天然アミノ酸で構成されるペプチドアプタマーだけでなく、化学的に機能化した非天然アミノ酸を部位特異的に導入したペプチドアプタマーを創成することが可能となった。そして、実際に本手法を利用することで、「抗体様分子認識機能、金属酵素様触媒、細胞機能誘導性材料、光バイオセンシング素子の開発を可能にするペプチドアプタマーの創成とそれらの機能解析」に成功した。

今後の展望としては、上記の研究成果を基盤として、ペプチドアプタマーの更なる可能性を発掘し、ペプチド・バイオテクノロジーの有用性を発信し続けるため、実際の細胞内・生体内において働くことができる次世代のペプチドアプタマーを創成し、ペプチドの創薬シーズ・人工酵素・医療用インプラント材料・疾患診断用プローブ・創薬基盤技術などの応用開発へと展開していく。そして、生命科学・分子生物学などの学術研究から環境・創薬・医療産業に至る幅広い領域において貢献する「ペプチドアプタマーの科学と技術」を開拓していきたい。

4. 自己評価

本研究では、任意の標的分子に対して特異的に結合するアプタマー機能と共に、異種分子との融合により初めて発現する機能を獲得した"次世代のペプチドアプタマー"を創成するため、試験管内タンパク質合成システムで駆動する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法」の考案と開発に取り組んだ。これにより、従来のファージディスプレイ法では獲得することが困難であった高親和性ペプチドアプタマーとしての「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー(2-1)」の創成を皮切りに、「金属酵素様活性ペプチドアプタマー(2-2)」の創成では、金属酵素の機能と構造を再現することで、特定の生体反応を触媒するペプチドアプタマーを創り出す戦略を新たに提案・実証することができた。

さらに、「材料表面吸着性ペプチドアプタマー(2-3)」の創成では、そのペプチドアプタマーと細胞機能を誘導する生理活性タンパク質を融合するだけで、希望の細胞機能制御性材料を簡便に創製できることを証明した。また、「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー(2-4)」の創成では、機能化アミノ酸をペプチドライブラリーに導入する試験管内タンパク質合成システムの構築とそれにより駆動するハイブリッド型リボソームディスプレイ法を開発して、標的タンパク質の構造変化を蛍光シグナルへと変換するバイオセンサーとしてのペプチドアプタマーを創出するスキームを確立することができた。

一方、これまでの低分子量ペプチドを高分子量タンパク質にまで拡張したライブラリーを新たに合成する共に、そのタンパク質ライブラリーを組み込んだハイブリッド型リボソームディスプレイ法(2-5)を開発することで、薬剤や生物活性化応物の標的タンパク質を正確かつ迅速に探索・同定できるシステムとして確立するに至っている。

以上、本研究において独自に開発したバイオテクノロジーとそれにより創出した新規ペプチド群は、国内外における研究発表だけでなく特許としても出願しており、将来のペプチドアプタマーを利用した"分子標的薬・生体触媒・医療用マテリアル・センシングデバイス・創薬支援システム"などの開発を実現する学術的応用研究の創出と共に、産業界との連携も視野に入れて取り組むことができた。そして最後に、近い将来、本研究成果を新たな出発点とし、ペプチドアプタマーの基礎研究から応用研究そして実用化へと導くことができれば、本研究の真の目標は達成されるものと信じている。

5.　研究総括の見解

本研究は、従来困難であった「ペプチド-リボソーム-mRNA 複合体」の安定化を実現することによってペプチドライブラリーを構築し、その中から目的・用途に応じたペプチドアプタマーを選択・同定する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法」の開発を目標としている。本手法を用いることによって、タンパク質や細胞の特定機能を模倣・発現・賦与・検出・探索する「創発的機能制御性ペプチドアプタマー」を創成し、“ペプチド・バイオテクノロジー”なる学問の確立をめざしている。

研究の結果、①従来困難であった高親和性ペプチドアプタマーとしての「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー」の創成、②「金属酵素様活性ペプチドアプタマー」の創成、③希望とする細胞機能制御性材料を創製できる「材料表面吸着性ペプチドアプタマー」の創成、④標的タンパク質の構造変化を蛍光シグナルへ変換する「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー」の創成、⑤薬剤や標的タンパク質を正確かつ迅速に探索・同定できるシステムーハイブリッド型リボソームディスプレイ法の開発、といった数々の目覚ましい成果を挙げた。

これら新規ペプチド群とその創出システムは、独自性の高い優れた成果であると評価できる。将来、これらのペプチドアプタマーを利用した“医療用マテリアル・センシングデバイス・創薬支援システム”といった一連のバイオテクノロジーの開発につながる可能性があり、「さきがけ」にふさわしい先進的、先導的研究ということができる。

6.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. A. Wada, “Development of Next-generation Peptide Binders using *In Vitro* Display Technologies and Their Potential Applications”, *Front. Immunol. (Research Topic)*, **2013**, in press.

（2）特許出願

研究期間累積件数：4 件

1.
発　明　者： Akira Wada, Hiroyuki Osada
発明の名称： Nucleic acid construction, nucleic acid-protein complex and use thereof
出　願　人： 独立行政法人 理化学研究所
出　願　日： 2012/5/23
出 願 番 号： PCT/JP2012/63221

2.
発　明　者： Akira Wada, Yoshihiro Ito, Takashi Kitajima
発明の名称：Method of selecting polypeptide sequence, and metal oxide or silicon containing compound binding peptide and use thereof
出　願　人： 独立行政法人 理化学研究所
出　願　日： 2012/9/11
出 願 番 号： US: 13/608052,　EP: 11753490.9,　JP: 2012-504544

3.
発　明　者： 和田 章、長田 裕之
発明の名称： 核酸構築物、核酸－蛋白質複合体、及びその利用
出　願　人： 独立行政法人 理化学研究所
出　願　日： 2011/5/23
出 願 番 号： 特願 2011-115166

4.
発　明　者： 和田 章、伊藤 嘉浩、北嶋 隆
発明の名称： ポリペプチド配列の選択方法、並びに金属酸化物または
含珪素化合物結合ペプチドおよびその利用
出　願　人： 独立行政法人 理化学研究所
出　願　日： 2010/3/11
出 願 番 号： 特願 2010-054927

（３）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

1.
和田 章
「ペプチド・バイオテクノロジーの開発から生体機能性金属材料の創製へ」
第 43 回 中部化学関係学協会支部連合 秋季大会
「特別討論会：21 世紀をリードする無機化学」、
名古屋工業大学 （愛知）、2012 年 11 月 （依頼講演）

2.
和田 章
「新規バイオディスプレイ法の開発によるアプタマー・バイオエンジニアリングの展開」
CREST シンポ：トップダウンとボトムアップの融合によるナノ構造の作製と新機能発現
東京大学 （東京）、2011 年 10 月 （招待講演）

3.
Akira Wada
“ Development of Next-Generation Ribosome Display Technologies ”
3rd Annual International Congress of Antibodies 2011,
China National Convention Center (Beijing, China), Mar. 2011 (Invited talk)

4.
和田 章
「模倣的設計と進化的選択による人工生命分子の創成」
理研シンポジウム：統合バイオナノシステム研究がもたらすイノベーション基盤の新展開、
理化学研究所 （埼玉）、2010 年 8 月 （招待講演）

5.
和田 章
「ペプチド・バイオテクノロジーを切り拓く研究者」
理研ニュース 2011 年 2 月号「FACE」
(http://www.riken.jp/r-world/info/release/news/2011/feb/fac_01.html)