

水溶液中静電相互作用の解明による
タンパク質超分子の基板上配置制御

博士学位論文

2008年3月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科
メゾスコピック物質科学講座

吉井 重雄

目次

第 1 章 序論	1
1-1 研究背景	1
1-2 かご状タンパク質超分子.....	2
1-3 本研究の目的とその位置づけ.....	4
参考文献	6
第 2 章 高密度フェリチン単層膜のシリコン基板上作製	7
2-1 はじめに.....	7
2-2 コア入りかご状タンパク質の準備	9
2-2-1 リコンビナントフェリチン	9
2-2-2 アポフェリチンへの酸化鉄導入と精製	9
2-3 フェリチンおよび基板表面の電位制御による高密度選択吸着	11
2-3-1 シリコン基板表面へのアミノ修飾膜形成	11
2-3-2 シリコン基板 SiO ₂ 表面上へのフェリチン吸着	12
2-4 外殻タンパク質と表面修飾膜の選択除去	15
2-5 まとめ	22
参考文献	23
第 3 章 フェリチン分子のナノパターンニング	24
3-1 はじめに.....	24
3-2 局所電荷修飾パターンの形成と評価.....	25
3-2-1 局所パターンニング可能な高電荷密度アミノ修飾膜形成.....	25
3-2-2 基板とタンパク質の表面電位（ゼータ電位）測定	28
3-3 修飾パターン上への選択吸着配置によるナノパターンニング	30
3-4 まとめ	35
参考文献	36

第 4 章	表面修飾パターン上へのタンパク質超分子吸着の モデル化と解析	37
4-1	はじめに	37
4-2	溶液中相互作用の理論解析	39
4-3	フェリチンと同程度の直径を有するアミノシランディスク上での 単一分子配置の可能性検討	42
4-4	大面積アミノシランディスク上単一分子配置の可能性検討	48
4-5	まとめ	58
	参考文献	59
第 5 章	単一フェリチン分子の基板上配置制御	60
5-1	はじめに	60
5-2	小径電荷修飾ディスクのサイズ評価手法	61
5-3	配置状態のポテンシャル形状依存性と、単一配置の実現	63
5-4	電荷増強フェリチンを用いた 32-45nm 修飾ディスク上単一配置	66
5-6	まとめ	70
	参考文献	71
第 6 章	結論	72
6-1	本論文の主要結果	72
6-2	今後の課題と指針	74
	研究業績	76
	謝辞	86

第 1 章 序論

1-1 研究背景

情報化社会を支えるシリコンテクノロジーは、これまで半導体プロセス技術の継続的な微細化によって発展してきた。集積回路上のトランジスタ数が 18-24 ヶ月で 2 倍になるとするムーアの法則は、半導体産業における時間軸を予測する指針となり、近年にいたるまでほぼ成立してきた[1]。2008 年現在、液浸露光技術、位相シフトマスク等の技術を駆使することで最新量産設備の最小加工寸法は 45nm にまで達しているが、世代ごとの素子特性向上は鈍化しており、新たな加工装置の開発にかかる費用は増大している。このため集積度の伸びは鈍化しており、2006 年の ITRS では、従来 2 年間隔であった世代更新が今後 3 年かかると予想されている[2]。加工寸法が 22nm 以下の世代では EUV 露光や電子線露光等が必要となるが、これらの露光装置は未だ開発中であり、実用化にはさらに大規模な投資が必要になると予測される。

一方、近年のバイオテクノロジー分野はめざましい発展をみせている。この分野では基本となるサイズ単位はナノメートルあるいは、分子単位であり、このようなナノメートルサイズの方法(ナノブロック)が自己組織的に組み上がることで微細構造を構築している。例えば、生物はナノメートルサイズの部品、タンパク質やリン脂質膜などの生体超分子が精緻に組み上がってできており、その生体超分子の相互作用により生物の高度な能力、機能が実現されている。またバイオテクノロジー研究の進展に伴って、現在では各種タンパク質の立体構造が解明されており、無機材料表面と相互作用する機能性ペプチドも次々に発見されている。さらに天然のタンパク質を遺伝子的に改変して新たな機能を付与したり、新たなナノ構造を有する人工タンパク質を合成することも可能となっている[3,4]。

そこで、同じ設計図(DNA)から作られる全く同じ構造をもつタンパク質を規格品として捉え、このタンパク質に無機材料を担持させて「ナノブロック」として利用し、ナノ構造を作製してタンパク質部分などの有機物を除去すれば、非常に精密な無機材料のナノ構造が作製できる可能性がある。この手法を用いたナノ構造構築技術として「バイオナノプロセス(BNP)」があり、これは従来の半導体プロセス技術とバイオテクノロジーを融合した新たなデバイス作製プロセスである[5]。著者らは電子デバイスの更なる微細化や性能向上にむけて、バイオナノプロセスを用いたナノ構造作製と電子デバイス作製に取り組んでいる[6,7]。

1-2 かご状タンパク質超分子

本節では、本研究を含むバイオナノプロセスにおいて、重要な要素となるかご状タンパク質超分子について説明する。

本研究で用いるかご状タンパク質超分子は主にフェリチンである。フェリチンは生体内に存在するかご状タンパク質である。図 1-1 の模式図で示すように、通常、生体内のフェリチンは直径 12nm の球状の外殻タンパク質をもっており、内側に直径 7nm の酸化鉄コア ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、フェリハイドライト) を保持している[8,9]。外殻のタンパク質部分は 1 本のポリペプチド鎖から形成される 2 種類のサブユニット(L-サブユニットと H-サブユニット、ただし L は Light、H は Heavy を意味する)が合計で 24 個集合することで形成されており、その割合はさまざまである[10]。通常のタンパク質に比べ高い熱安定性と pH 安定性を示す。また特にコアを持たないフェリチンはアポフェリチンと呼ばれている。本来フェリチンは生体内での鉄イオン量を調整する働きをする。つまり周囲の環境に応じて鉄イオンの供給と吸収が可能となる。生体中の余剰 2 価鉄イオンは H-サブユニットが持つ酸化活性部位によって酸化され、フェリハイドライトのコアとして貯蔵される。一方、L-サブユニットにはカドミウム結合部位といわれる箇所が存在し、24 量体となったときに、フェリチン - フェリチン間でカドミウムを塩橋とした結合を形成する部位である。したがってカドミウム結合部位を利用することでフェリチンタンパク質結晶を作製することも可能である[11]。

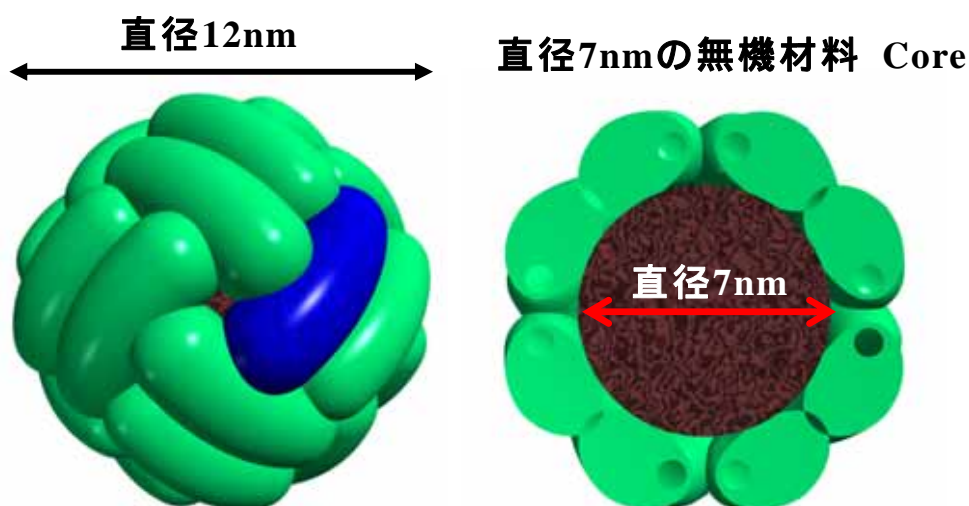


図1-1 24 個のサブユニットが集合して一つのフェリチンタンパク質を形成する (左図)。内部に直径7nm の無機材料コアを保持する能力を持つ (右図)。

本研究で用いたフェリチンタンパク質は DNA という設計図によって精密に構造が規定されている。この DNA を用いることで同一のタンパク質を無数に生成できる。現在では、DNA の解読・操作(置換)技術の発展により自然界には存在しない人工のタンパク質構造を生成することが可能である。この DNA の置換、いわゆる遺伝子操作技術によって特定の構造に再構成されたフェリチンをリコンビナントフェリチンとよぶ[12]。

また、自然界のフェリチンコアは酸化鉄で構成されることを既に述べたが、このコアは人為的に抽出・内包することも可能である。現在ではニッケル、インジウム、コバルト、亜鉛などの酸化物やカドミウムセレンなどの化合物の内包が可能になっており、また金や白金などの貴金属の内包も研究されている[13,14]。しかし、本研究において主には酸化鉄をフェリチンコアとして用いた。これは本プロセスにおいて、フェリチンを使用する場合に、現段階で最もコア形成率、および収率が高く、またその手法も簡便であるからである。

同一の構造を有するフェリチン分子を鋳型として用いることにより、サイズの均一なナノ粒子を低コストで大量に作製できる。本研究では主に酸化鉄コアを有するかご状タンパク質であるフェリチンを用いて、基板上配置制御技術を確立することを目指した。

1-3 本研究の目的とその位置づけ

フェリチンを用いることで、各種材料から成る均一なナノ粒子を作製できるが、これを実際に電子デバイスや光デバイス等として利用するためには、基板上に所望の構造で配置する必要がある。

例えばレイヤー状に配置されたナノドット群への電荷注入を行うフローティングナノドットメモリ素子では、単層でかつ高密度のナノドットがチャネル領域上に均一に敷き詰められている状態が望ましい[15]。一方で、単一電子素子や、量子効果素子等、個々のナノドットの機能を利用する素子では、ナノ粒子を1個ずつ、目的の位置に正確に配置することが要求される。また、フェリチンのナノ粒子コアをマスクとしてナノピラーを形成することで、縦型トランジスタや量子ナノディスク素子が形成でき、またナノ粒子を触媒として利用することで、Si結晶を成長させる低温多結晶ポリシリコン薄膜や、CNT成長を行うことができる[16-19]。これらの用途においても、ナノ粒子の位置を制御することで、ナノピラーやナノディスク、Si結晶、CNT等の位置決めを行うことができ、外部からのアクセスや高次の集積化を行うことが可能となる。

しかし、ミクロンサイズの粒子を基板上で配置する技術は従来から研究されているが、ナノ粒子を高精度で大面積基板上に均一に敷き詰めたり、ナノメートル領域でパターンニングもしくは単独で配置する技術については小数の報告例しかなかった[20]。そこで、本研究では、フェリチンをナノ粒子合成のための鋳型としてだけでなく、ナノ粒子配置のためのビークルとして利用することで、各種のナノ粒子配置を目指した。

大面積基板上への均質な配置を実現するため、配置工程としては、基板表面の修飾、フェリチン溶液中での高密度・あるいは選択的な基板表面への吸着固定、洗浄・固定およびタンパク質除去を基本とした(図1-2)。

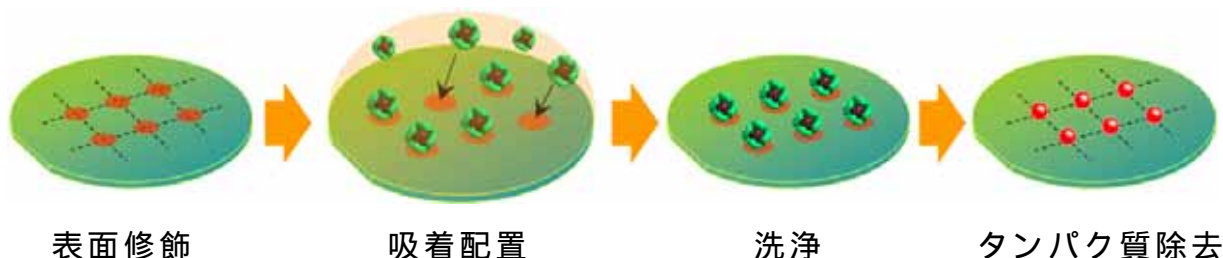


図1-2 フェリチンを利用したナノ粒子配置のプロセスフロー図

基板上での配置状態を決めるフェリチン吸着過程には、静電相互作用、親水・疎水相互作用、水素結合ファンデルワールス力、アダマーによる特定表面認識等、各種の相互作用がかかっている。この中でも静電相互作用は、他の相互作用に比較して長距離領域で支配的となることから、これまでナノ領域までの配置制御には向かないとの見方もあった。しかし、一方で静電相互作用は、以下に示す特徴を有している。

- ・ 相互作用の基礎となる各表面の電荷密度を定量的に評価できる。
- ・ 広範囲の基板表面・タンパク質材料に適用でき、広く応用できる配置技術として一般化できる可能性がある。
- ・ 相互作用の働く距離空間を決める遮蔽長（Debye 長）をイオン強度により広範囲で連続的に制御できる操作自由度がある。
- ・ 複雑な 3 次元空間における相互作用を数値的に解析できる可能性がある。
- ・ タンパク質を遺伝子的に改変することで、フェリチン表面の表面電荷をも変調できる可能性がある。

本研究では、上記の利点に着目し、静電相互作用を基本的な支配相互作用として活用することで、フェリチンの吸着過程を操作し、所望のナノ粒子配置が実現できる技術の構築を目的とした。

参考文献

- 1) R.H.Dennard: IEEE J. Solid-State Circuits, SC-9, **5** (1974) 256.
- 2) International Technology Roadmap for Semiconductors 2006 update.
- 3) K. Sano and K. Shiba: J. Am. Chem. Soc. **25** (2003) 14234.
- 4) K. Sugimoto, S. Kanamaru, K. Iwasaki, F. Arisaka, and I. Yamashita: Angew. Chem. Int. Ed. **45** (2006) 2725.
- 5) I. Yamashita: Thin Solid Films **393** (2001) 12.
- 6) T.Hikono, Y.Uraoka, T.Fuyuki, and I.Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **42** (2003) L398.
- 7) A. Miura, T. Hikono, T. Matsumura, H. Yano, T. Hatayama, Y. Uraoka, T. Fuyuki, S. Yoshii and I. Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **45** (2006) L1.
- 8) W. H. Massover: Micron **24** (1993) 389.
- 9) S. Mann: Nature **365** (1993) 499.
- 10) E. Theil: Ann. Rev. Biochem. **56** (1987) 289.
- 11) T. Furuno, H. Sasabe and K. M. Ulmer: Thin Solid Films **180** (1989) 23.
- 12) S. Takeda: Biochem. Biophys. Acta. **1174** (1993) 218.
- 13) I. Yamashita, J. Hayashi, and M. Hara: Chem. Lett. **33** (2004) 1158.
- 14) M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita and H. Yoshimura: Biotechnol. Bioeng. **84** (2003) 187.
- 15) S. Tiwari, F. Rana, H. Hanafi, A. Hartstein, E. F. Crabbé and K. Chan: Appl. Phys. Lett. **68** (1996) 1377.
- 16) T. Kubota, T. Baba, S. Samukawa, H. Kawashima, Y. Uraoka, T. Fuyuki, and I. Yamashita: Appl. Phys. Lett. **84** (2004) 1555
- 17) T. Kubota, T. Baba, S. Saito, S. Yamasaki, S. Kumagai, T. Matsui, Y. Uraoka, T. Fuyuki, I. Yamashita and S. Samukawa: J. Vac. Sci. Technol. **B 25**, (2007) 760.
- 18) S. Kumagai et al.: personal communication.
- 19) H. Kirimura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, M. Okuda, and I. Yamashita: Appl. Phys. Lett. **86** (2005) 262106.
- 20) I. Yamashita, H. Kirimura, M. Okuda, K. Nishio, K-I. Sano, K. Shiba, T. Hayashi, M. Hara and Y. Mishima: Small **2** (2006) 1148.

第2章 高密度フェリチン単層膜のシリコン基板上作製

2-1 はじめに

フローティングナノドットゲートメモリ(FNGM)のメモリノードとして利用できるナノドット群を作製するには、アルカリ金属イオンの混入が無い状態で、高密度でかつ単層のナノドット配列を基板上に均一に作製する必要がある。本章では、上記の条件を満す高密度二次元ナノドット配列の形成技術を開発することを目的とする。

従来のかご状タンパク質の基板への吸着は、LB膜などを用いて気液界面で二次元配列させたものを基板上に転写する手法が主であった。ポリペプチドを用いたフェリチン粒子の気液界面二次元結晶から転写する基板上コア形成方法を図2-1に示す[1]。

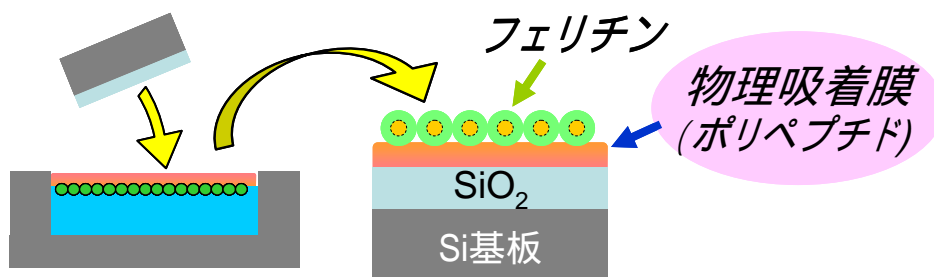


図 2-1 気液界面を利用したフェリチン二次元結晶化方法

この方法では、気液界面にフェリチンの二次元結晶膜を作製し、それをシリコン基板上に転写して物理吸着させることにより、基板上へのフェリチン粒子展開を行っていた。使用するタンパク質溶液は、タンパク質の安定性などを優先し、アルカリ金属塩等を含む溶液を用いていた。しかし、シリコン半導体系のプロセスにおいて、アルカリ金属塩の混入は素子の信頼性に深刻な影響を与える。また気液界面からの転写は、将来の大面積ウエハへの適用が困難になると予測される。

本研究では、上記半導体プロセスにおける要請を考慮し、表面修飾によるかご状タンパク質の配置制御(図2-2)の検討を行った。本プロセスは、表面修飾膜(化学吸着膜)を利用することで、アルカリ金属汚染を排除しつつ、基板上の目的領域にかご状タンパク質を選択的に単層吸着させ配置することを目指している。ここでは気液界面からの転写の必要が無いので、大面

積基板に容易に適用可能である。

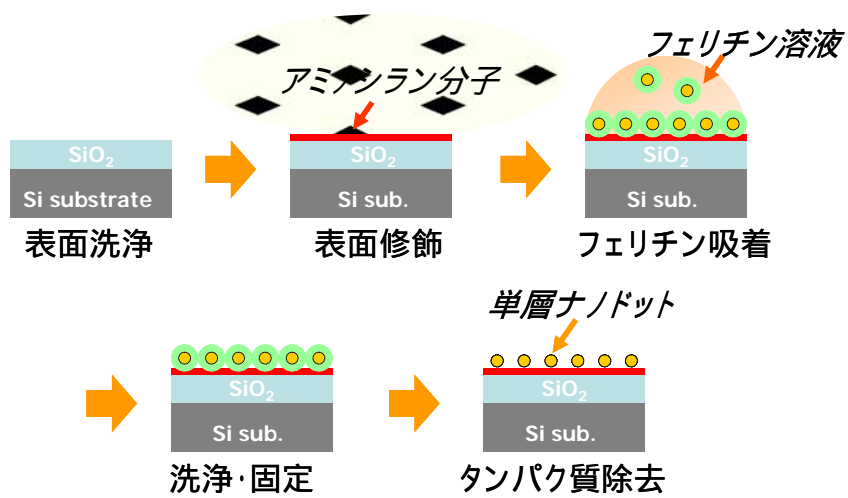


図 2-2 表面修飾によるナノドット配置プロセス

2-2 コア入りかご状タンパク質の準備

2-2-1 リコンビナントフェリチン

2-2 節は本研究で使用する酸化鉄コア入りかご状たんぱく質の調製について記述する。

本研究ではフェリチンの対称性を分子レベルで向上させるため、遺伝子工学的手法を用いて作製された、L-サブユニットのみからなるフェリチン（リコンビナントフェリチン）である Fer8 を主として用いた[2]。これまでは馬脾臓由来のフェリチンを用いるなど、実際の生体内から抽出した野生種フェリチンを用いて実験されてきた。野生種フェリチンのサブユニットには H-サブユニットと L-サブユニットが存在し、対称性が低い。今後のフェリチン二次元結晶配置への発展やバイオミネラル化によって自然界に存在する酸化鉄コア以外のコア種形成を考え、本検討ではリコンビナントフェリチンを使用した。

2-2-2 アポフェリチンへの酸化鉄導入と精製

アポフェリチンへの酸化鉄コア導入と精製は、下記のプロセスによって行った。

- (1) 超純水と 100mM の 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, pH7.0) をビーカーに入れる。
- (2) 0.5mg / ml アポフェリチンを入れる。(アポフェリチン：内部空洞にコアを持たないフェリチン)
- (3) 5 mM 硫酸アンモニウム鉄() 溶液を入れる。
- (4) 室温で 12 時間放置した後、2000rpm で 15 分遠心。
- (5) 上澄みを回収しセントリプレップで濃縮。

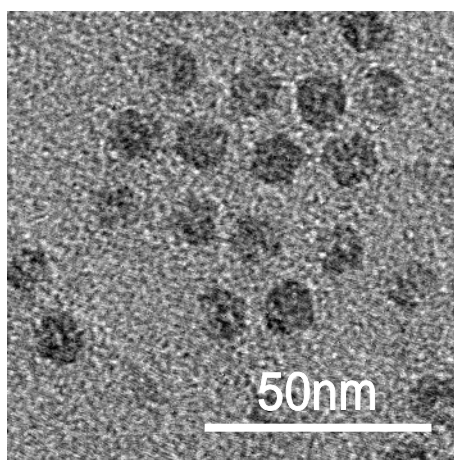


図 2-3 フェリチンコアの高分解 TEM 像
(コアは黒く見える部分)

上記により得られたフェリチン溶液を透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope : TEM) 観察用のグリッドに滴下し、自然乾燥させた後、高分解能 TEM (JEM-3100FEF) にて観察し、コアの形成を確認した。観察用グリッドは銅メッシュ基板にカーボン支持膜を 30 ~ 50nm 堆積したものをを用いた。得られた TEM 像を図 2-3 に示す。黒く見える部分がコアである。

金属導入直後のフェリチン溶液には単量体フェリチン、多量体フェリチンおよびフェリチンが崩壊してできたタンパク質が混在しており、このうちの多量体フェリチンや崩壊したタンパク質はナノ粒子高密度配置の妨げになる。そこで、ゲルろ過 (カラムクロマトグラフィー) を用いて、フェリチン単量体の採取を行なった。ゲルろ過は分子のサイズの違いによる溶出時間の差を利用して、必要な分子量のタンパク質を採取する方法である。ゲル粒子は網目のサイズによって多くの種類があり、目的とするタンパク質の分子量に応じて選択する。今回、ゲルろ過用の溶媒として 50 mM Tris (pH 8.0) の緩衝液を脱気したものをを用いた。カラムは Sepacryl S-300 HR (GE Healthcare) を用い、吸光度測定用の光源には重水素ランプを用いた。また精製したフェリチン溶液のタンパク質濃度は Lowry 法を用いて評価した。

2-3 フェリチンおよび基板表面の電位制御による高密度選択吸着

2-3-1 シリコン基板表面へのアミノ修飾膜形成

シリコン基板上の特定領域のみに、高い選択性で高密度かご状タンパク質を選択吸着させるには、タンパク質の吸着挙動を大きく変化させるような表面修飾が必要となる。前節の結果等から、フェリチン吸着を促進させるには、静電相互作用を利用することが効果的と考えられ、通常マイナスに帯電したシリコン基板表面にプラス電荷を導入できる、アミノ基修飾が有望な候補となる。本研究では SiO₂ 表面へのアミノ基修飾膜の形成を試みた[3,4]。

図 2-4 に液相 AEAPTMS 処理によるシリコン基板表面のアミノ修飾の概念図を示す。アミノシラン分子として、3-(2-aminoethyl amino)propyl trimethoxy silane) (AEAPTMS)を用いた。

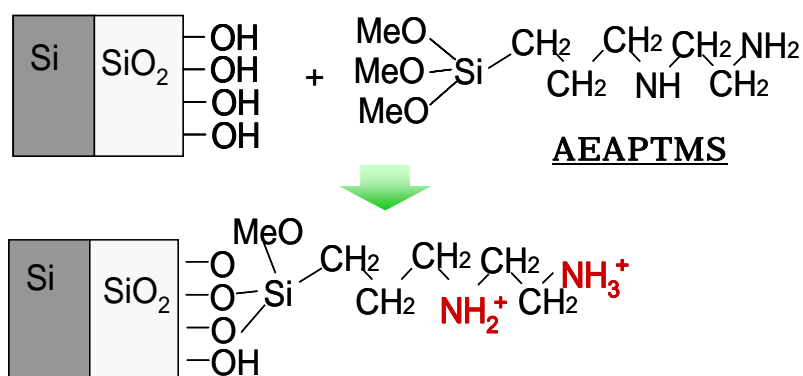


図 2-4 液相 AEAPTMS 表面修飾理

基板としては、急熱酸化法(RTO)により形成した 3nm の熱酸化シリコン薄膜を有する p 型シリコン基板(100)を用いた。まず前処理として、基板を純水洗浄した後、110 °C にて 10 分間の UV/オゾン処理を行い、基板表面に吸着した有機汚染物を除去・清浄化した。次に、AEAPTMS による基板表面修飾を行うため、清浄化した基板を 2.2mM の AEAPTMS 水溶液に浸漬し、室温で 5 分間保持して SiO₂ 表面と AEAPTMS 分子を反応させた。反応後の基板は、純水によって洗浄し、最後に 110 °C、3 分間のベークを行って AEAPTMS と SiO₂ 表面の Si-O 結合を促進して反応を完了させ、表面修飾膜を固定した[5,6]。

2-3-2 シリコン基板 SiO₂ 表面上へのフェリチン吸着

酸化シリコン膜を形成したシリコン基板にフェリチン粒子を分散した溶液を滴下し、基板表面へのフェリチン粒子の直接単層吸着を利用した固定法について検討を行った。基板には p 型シリコン(100)基板を用い、酸化シリコン膜としては、急速熱酸化法(RTO)により形成した、膜厚 3nm の熱酸化膜を用いた。フェリチン溶液は、酸化鉄コア内包リコンビナントフェリチン(Fer4)の 0.5mg/mL 溶液を純水置換によりアルカリ金属塩を除去したものをを用いた。溶液を滴下した基板は、30 分間静置してフェリチン粒子を吸着させた後、純水流水中で 5 分間洗浄して余剰吸着物や不純物の除去を行った。吸着処理した基板は、110 °C、3 分のベークを行ってフェリチン粒子を固定した後、SEM により表面状態の観察を行った[3]。

熱酸化シリコンの表面は、未処理の酸化膜表面の他に、アミノシラン系分子を反応させて表面処理膜を形成し、アミノ基を導入した表面を用いた。今回のアミノシラン化処理では、前節に記載した APTMS を用いた。

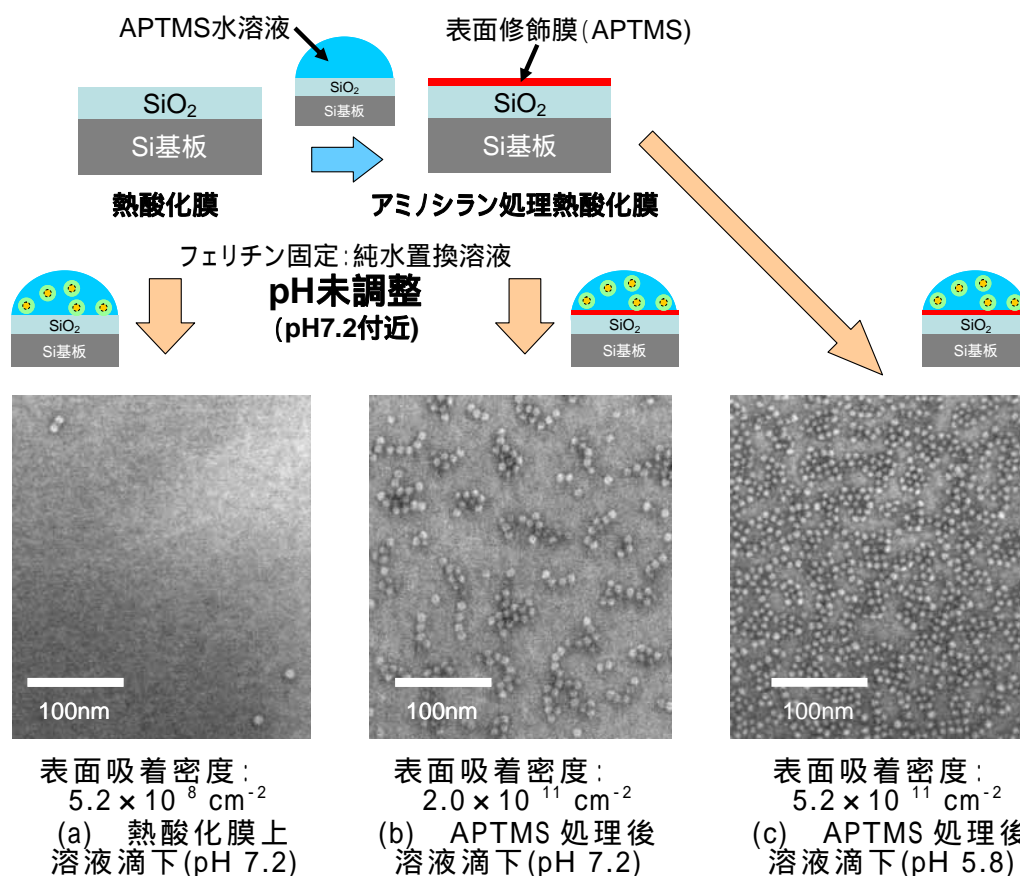


図 2-5 フェリチン粒子固定プロセスの流れおよび、固定後の基板表面の SEM 観察像

また表面修飾処理を行った基板に対しては、さらに pH を調整したフェリチン溶液による検討を行った。溶液 pH の調整には、アルカリ金属イオンを排除した 20mM MES-6mM Tris の緩衝液を用い、混合後のフェリチン溶液が弱酸性の pH 5.8 となるように調整した。なお、純水置換後、pH 未調整のフェリチン溶液はほぼ中性(pH7.2)であった。

今回検討したフェリチン粒子固定プロセスの流れおよび、固定後の基板表面の SEM 観察結果を図 2-5 に示す。図 2-5(a)は未処理の熱酸化膜上に pH 未調整のフェリチン溶液を滴下、図 2-5 (b)は、アミノシラン修飾した表面に pH 未調整のフェリチン溶液を滴下、さらに図 2-5 (c)は、アミノシラン修飾した表面に pH 5.8 に調整したフェリチン溶液を滴下して、それぞれフェリチンを吸着させた結果を示す。図 2-5 (a)と図 2-5 (b)を比較すると、アミノシラン化処理により、フェリチンの表面吸着密度が 400 倍近く増大していることがわかる。すなわち、溶液の pH が中性に近い領域では APTMS による表面修飾はフェリチン吸着に明確な効果がある。これは、表面処理により導入されたアミノ基の正電荷(-NH₃⁺)が、酸化シリコン表面の負電荷(Si-OH⁻)を相殺し、中性領域で負に帯電しているフェリチン粒子と基板表面の間の静電的反発力を緩和したためと考えられる。

また一方で、図 2-5 (b)と図 2-5 (c)を比較すると、溶液の pH を弱酸性(5.8)に調整することでもフェリチン粒子の表面吸着密度が向上していることがわかる。溶液の pH が外殻タンパク質の等電位点に近づくことで各粒子が保持する負電荷量が減少し、結果として粒子-粒子間の静電的反発力が緩和して高密度の基板上吸着が可能となったと考えられる。表面処理および溶液 pH 調整を行った際の表面吸着密度は $5.2 \times 10^{11} \text{cm}^{-2}$ であり、フェリチン粒子の直径を 12nm と仮定したときの理想的な最密充填密度に対する充填比率は 65% 程度である。酸化膜厚の異なる複数の基板に対しても、上記手法による吸着状態は良好な再現性を示した。また気液界面からの転写は実質的に 10mm 角程度までの小片ウエハに制限されていたのに対して、上記手法では 50mm(2 インチ)基板全面に対して容易に適用できた。ここで 50mm 基板の中央部と外周部を比較してもほぼ均一な吸着状態が観測された(図 2-6)。

以上のように、熱酸化シリコン膜を形成したシリコン基板の表面をアミノシラン(APTMS)により修飾し、弱酸性(pH5.8)に調整したフェリチン溶液を滴下することで、面内密度： $5.2 \times 10^{11} \text{cm}^{-2}$ のフェリチン粒子を基板上に固定することが可能となった。

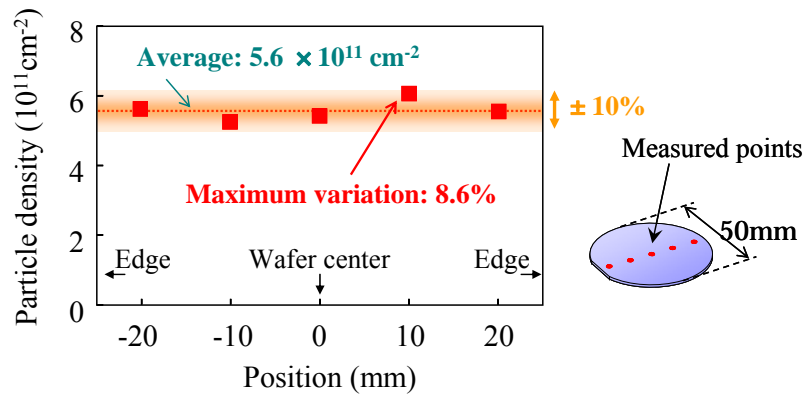


図 2-6 50mm 基板上における面内フェリチン配置密度分布

2-4 外殻タンパク質と表面修飾膜の選択除去

本節では基板上に固定したナノ粒子内包かご状タンパク質の雰囲気中熱処理によるタンパク質部分除去の検討について記載する。従来の熱処理による基板上コア形成では、気液界面より転写したフェリチン二次元結晶膜を、雰囲気炉を用いて窒素雰囲気中 450 で 1 時間の熱処理を行うことにより、物理吸着膜と外殻タンパク質を除去してコアの形成を行っていた。前節で述べたように、本業務においては半導体プロセスにおけるアルカリ金属塩の除去、大面積化、およびパターンングへ要請を考慮し、表面修飾によるかご状タンパクの配置制御を利用したプロセスを目指している。

この手法では表面修飾膜(化学吸着膜)を利用することで、基板上の目的領域のみへの選択的なフェリチン吸着が期待できる。しかし一方、表面修飾膜と基板との結合が従来の物理吸着膜に比較して強いため、従来の窒素雰囲気熱処理では有機物を除去することが困難になると考えられる。従来方法で単に処理温度を上げると、コアの形状を維持することが困難となることが知られている。表面修飾を利用したデバイス作製には、コアの分散・配置を保持した上で、外殻タンパク質とシリコン基板に強固に結合している表面修飾膜を同時に除去できるような、コア形成プロセスの確立が必須となる。

本研究では表面修飾膜と外殻タンパク質を除去するために、前章で作製したフェリチン粒子固定シリコン基板を利用して、雰囲気を変化させた熱処理条件の検討を行った。熱処理の手段として赤外線ランプ加熱炉を用いた[3]。

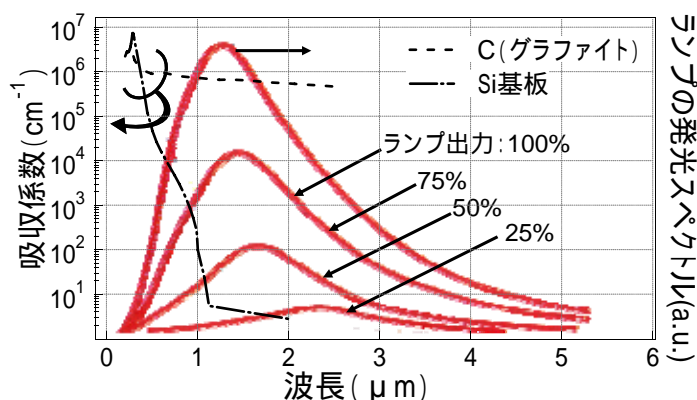


図 2-7 赤外線ランプのスペクトルおよびグラファイトとシリコンの吸収係数

図 2-7 に赤外線ランプ加熱炉の赤外線ランプのスペクトル(実線)およびグラファイトカーボンとシリコンの吸収係数(破線および一点鎖線)を示す。図より加熱した有機物から生成するグラファイトの光吸収が、ほとんどの加熱領域でシリコン基板の吸収を大きく上回ることがわかる。すなわち本装置を用いることにより、従来除去が困難とされてきたグラファイトについても直接加熱が可能となり、これは有機物を除去する上で、雰囲気炉等に比較して有利に働くと期待される。

熱処理条件を決めるため、まず、フェリチン粒子単体の熱重量 - 示差熱分析(TG-DTA)を行った。その結果、図 2-8 に示すように、窒素雰囲気中では TG は緩やかな重量変化を示すのに対し、空気中では 400 付近で急峻な重量減少を起こすことが判明した。対応する DTA が発熱反応を示していることから、これは空气中酸素による外殻タンパク質の酸化反応と考えられる。したがって、基板上コア形成においても処理雰囲気に酸素を導入することで、比較的低い温度でも有機物除去を促進できることが予想できる。

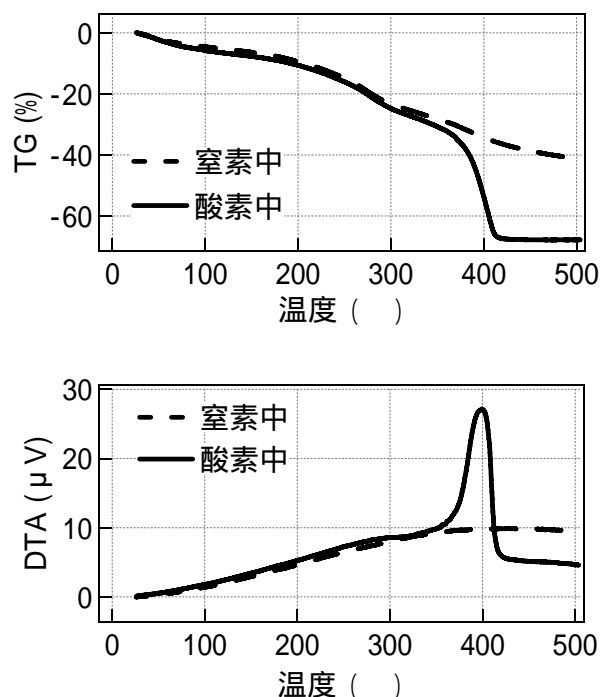


図 2-8 フェリチン粒子の熱重量 - 示差熱分析結果

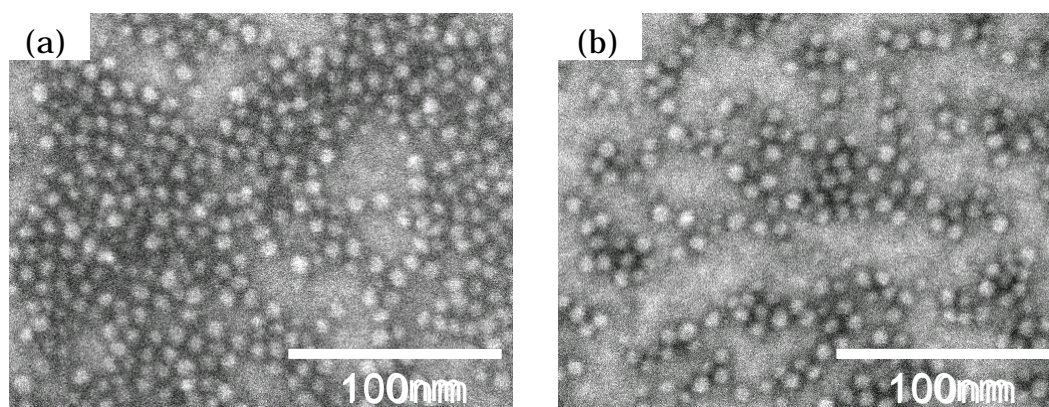
この結果より、表 2-1 に示す窒素雰囲気中の 400 および 500、さらに酸素雰囲気中での 400 および 500 の 4 種類の熱処理条件を設定し、有機物の除去を検討した。

表 2-1 熱処理条件

雰囲気	処理温度
窒素	400
	500
酸素	400
	500

昇温速度：20 /sec、 処理時間：10分

まず窒素雰囲気中で熱処理をした後、XPS 及び SEM を用いて、表面修飾膜と外殻タンパク質除去の評価を行った。図 2-9 に熱処理後の SEM 像を示す。400、500 の熱処理後も、ともにコアの分散状態が良好に保持されていることを示している。



(a) 400 熱処理後

(b) 500 熱処理後

図 2-9 窒素雰囲気中熱処理により形成した基板上コアの SEM 観察像

ここで基板表面の組成状態を分析するため X 線光電子分光法(X-ray Photoelectron Spectroscopy :XPS)による評価を行った。窒素(N1s)と炭素(C1s)の XPS スペクトルを、それぞれ図 2-10(a)および(b)に示す。実線が未処理基板(熱酸化シリコン膜を形成したシリコン基板)表面のスペクトルである。この基板に、前章に述べた手法により APTMS 表面修飾を行い、リコンビナントフェリチン粒子(Fer4)を固定した試料(APTMS+Fer4)のスペクトルを2点鎖線で示す。またフェリチン固定後、窒素中 400 および 500 の熱処理を行った試料のスペクトルをそれぞれ1点鎖線および点線で示す。

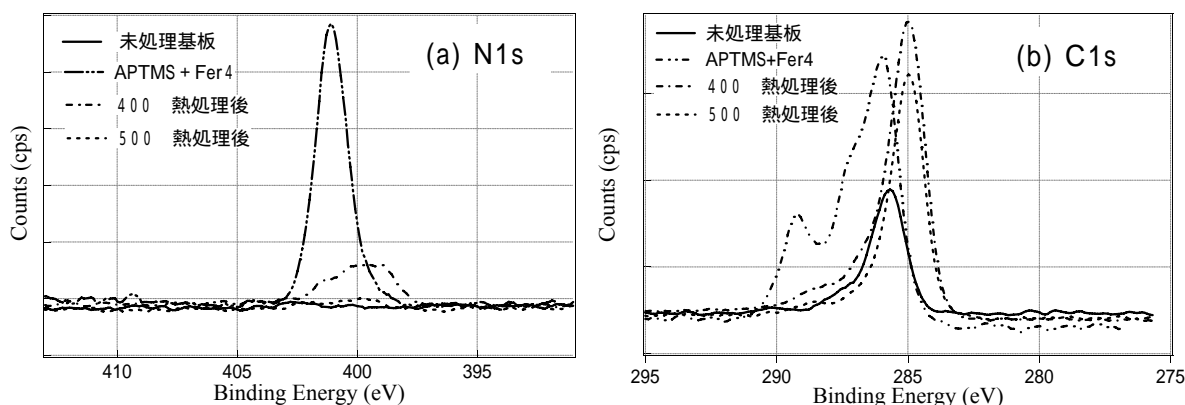


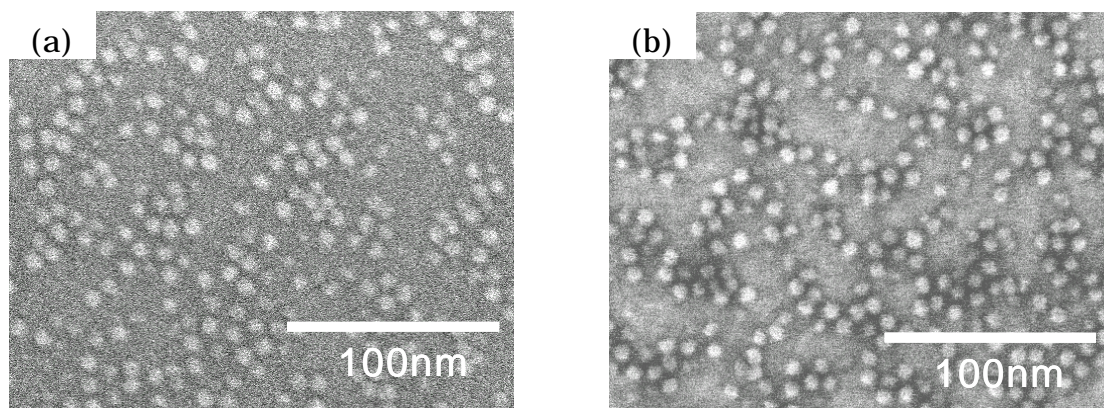
図 2-10 未処理基板、APTMS 表面処理後フェリチンを固定した試料、およびフェリチン固定後窒素雰囲気中熱処理を行った試料の XPS スペクトル

炭素のスペクトルでは未処理基板でもピークが観測されるが、これは XPS 分析で通常検出される、表面汚染に起因する炭素ピークである。APTMS 表面修飾およびフェリチン固定をした試料では、窒素と炭素の両方のスペクトルで有機物に由来すると考えられる明瞭なピークが現れている。窒素のスペクトルにおいて熱処理の効果を比較すると、400 処理では明らかに窒素の残留が認められるが、500 処理では窒素検出限界付近となり、処理温度の上昇により有機物の除去が促進できることが確認される。しかし炭素のスペクトルにおいては、400 および 500 処理の試料は、ともにピーク位置がシフトし化学結合状態の変化を示しているものの、そのピーク強度はいずれも未処理基板と比較して大きい。これは、熱処理後も変性した有機物からなる炭素系残渣が残存することを示している。以上の結果から、窒素雰囲気中 10 分の熱処理では、400 および 500 のいずれの温度でも有機物の除去は不十分であると考えられる。

次に、酸素雰囲気中で熱処理を行った後、上記と同様に SEM および XPS を用いて、基板表面の評価分析を行った。図 2-11 に熱処理後の SEM 観察像を示す。酸素雰囲気中でも、400 処理後および 500 処理後のいずれも、コアの分散状態が良好に保持されることが示されている。

酸素熱処理前後の XPS 分析による窒素(N1s)と炭素(C1s)のスペクトルを、それぞれ図 2-12(a)および(b)に示す。図 2-10 同様、実線が未処理基板のスペクトル、2 点鎖線が APTMS 表面修飾およびフェリチン固定をした試料のスペクトルである。フェリチン固定後、酸素雰囲気中 400 および 500 の熱処理を行った試料のスペクトルをそれぞれ 1 点鎖線および点線

で示す。



(a) 400 熱処理後

(b) 500 熱処理後

図 2-11 酸素雰囲気中熱処理により形成した基板上コアの SEM 観察像

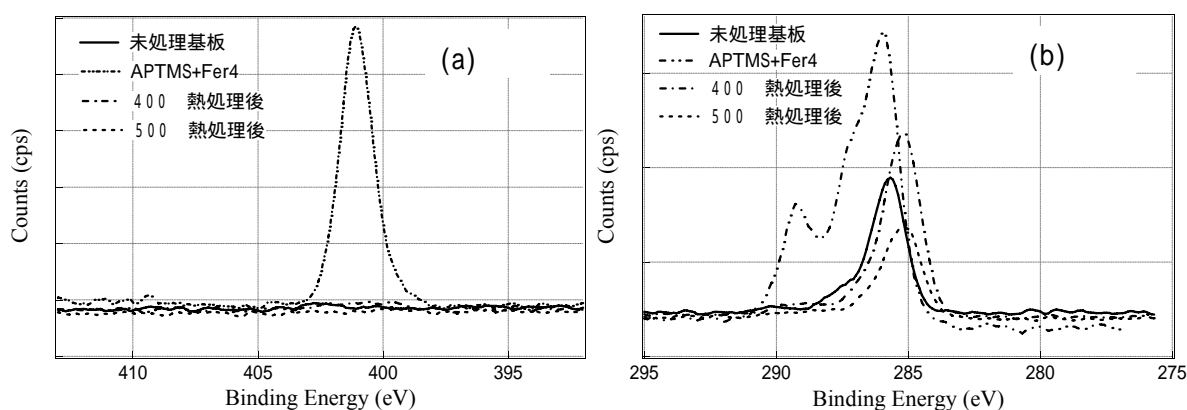


図 2-12 未処理基板、APTMS 表面処理後フェリチンを固定した試料、およびフェリチン固定後酸素雰囲気中熱処理を行った試料の XPS スペクトル

窒素のスペクトルにおいては、400、500 熱処理のいずれのピーク強度も検出限界以下となった。炭素のスペクトルにおいても、両者のピーク強度は熱処理前のものに比較して減少している。しかし、400 熱処理のピーク強度は、未処理基板よりも若干大きく、有機物に起因する少量の炭素が残留していると考えられる。これに対して、500 熱処理の炭素のピーク強度は、表面汚染に由来する未処理基板のピーク強度と比較してもさらに小さくなっている。以上の結果より、酸素雰囲気中、500 で 10 分の熱処理を行うことにより、未処理の熱酸化シリコン表面と同等レベルまで、有機物を除去できたと考えられる。

上述の XPS 分析結果から、各元素に対する光電子放射係数を考慮して、表面原子濃度の算出を行った。この結果を、表 2-2 に示す。

表 2-2 表面原子濃度

	濃度 [atom %]				
	C1s	N1s	O1s	Si2p	Fe2p3
APTMS+Fer4	46	11	33	7	3
N ₂ 400	35	3	42	16	3
N ₂ 500	25	1	50	20	5
O ₂ 400	18	< 1	54	23	5
O ₂ 500	10	< 1	59	25	7
未処理基板	11	< 1	58	31	-

また表 2-2 から各試料における炭素(C)と窒素(N)の表面原子濃度を、図 2-13 に比較して図示する。炭素の表面原子濃度に着目すると、熱処理前の APTMS 表面処理/フェリチン固定試料、窒素雰囲気中 400 熱処理、窒素雰囲気中 500 熱処理、酸素雰囲気中 400 熱処理、酸素雰囲気中 500 熱処理の順で減少し、酸素雰囲気中 500 熱処理では、未処理基板の表面汚染に起因する濃度以下となった。窒素の表面原子濃度も炭素の濃度も窒素と同じ順序で減少し、酸素雰囲気中 400 熱処理および酸素雰囲気中 500 で検出限界以下となった。

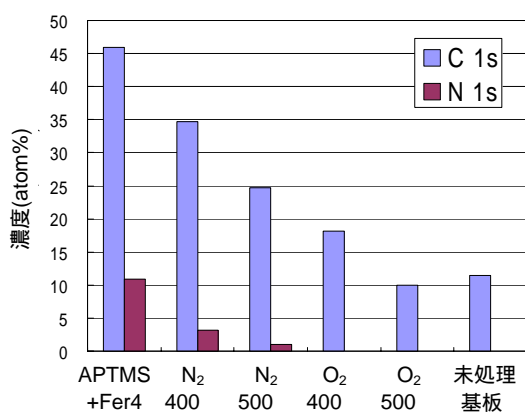


図 2-13 炭素(C)および窒素(N)の表面原子濃度

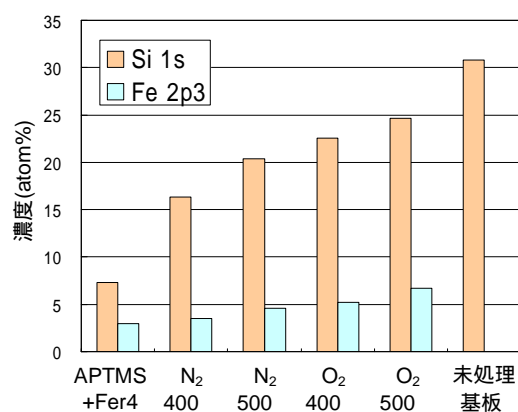


図 2-14 シリコン(Si)および鉄(Fe)の表面原子濃度

同様に、表 2-2 から各試料における熱酸化シリコン膜(SiO₂)に由来するシリコン(Si)と酸化鉄コアに由来する鉄(Fe)の表面原子濃度を、図 2-14 に比較して示す。炭素、窒素の表面原子濃度減少と同一の試料の順序に対して、シリコンおよび鉄の表面原子濃度は逆に増大している。これは熱処理により、基板表面を覆う表面修飾膜と、コアを覆う外殻タンパク質が除去

されることで、同時にシリコン酸化膜表面と酸化鉄コアが露出することを示している。ここでも酸素雰囲気中 500 °C 熱処理においてシリコンおよび鉄の原子濃度が最も高く、表面原子濃度から見ても、酸素雰囲気中 500 °C の熱処理で、最も良好に表面修飾膜と外殻タンパク質が除去できていることがわかる。

以上のように、修飾処理表面上フェリチン吸着により作製したフェリチン固定基板を、還元処理炉を用いて酸素雰囲気中 500 °C で 10 分間の熱処理を行うことで、コアの分散状態を良好に保持しつつ、表面修飾膜と外殻タンパク質を同時に除去することに成功した。XPS 分析により、熱処理後の残留物は、未処理の熱酸化シリコン表面レベル以下まで除去されていることを確認した。

2-5 まとめ

電子デバイスへの応用に必要とされる、大面積化への適用可能性とアルカリイオン排除の条件を満たし、均質かつ高密度なフェリチン単層膜をシリコン基板上に形成する技術を開発した。シリコン酸化膜表面のアミノシラン (AEAPTMS 分子) 修飾と、pH 調整による基板 - タンパク質間の電荷バランス制御により平衡状態での吸着量を制御した。また酸素中熱処理によりコアの分散状態を維持しつつ外殻タンパク質だけを選択的に除去できることを示した。

本章での研究により、シリコン基板上へ 10^{11} cm^{-2} 台の高密度な単層ナノドット配列のシリコン基板上への形成が達成されフローティングナノドットゲート素子に適用可能な単層ナノドット配列の基板上への形成が可能となった。

参考文献

- 1) T. Furuno, H. Sasabe and K. M. Ulmer: *Thin Solid Films* **180** (1989) 23.
- 2) S. Takeda: *Biochem. Biophys. Acta.* **1174** (1993) 218.
- 3) S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa and I. Yamashita: *Jpn. J. Appl. Phys.* **44** (2005) 1518.
- 4) K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, I. Fujiwara, K. Nishio, M. Okuda, N. Matsukawa and I. Yamashita: *Jpn. J. Appl. Phys.* **45** (2006) 4259.
- 5) H. Sugimura, A. Hozumi, T. Kameyama and O. Takai: *Surf. Interface Anal.* **34** (2002) 550.
- 6) T. Sato, D. G. Hasko and H. Ahmed: *J. Vac. Sci. Technol.* **B 15** (1997) 45.

第3章 フェリチン分子のナノパターンニング

3-1 はじめに

電子デバイスとして駆動できるナノ構造を得るには、基板上の目的位置にナノ構造を配置することが重要となる。前章で得られた知見を利用すれば、基板表面に局所的な電荷修飾を行い、タンパク質-基板間の静電相互作用を利用することで、ナノスケールでフェリチンを選択的に配置して単層膜パターンを形成する可能性が拓ける。

すなわち、負に帯電した SiO_2 表面に、局所的に正に帯電したアミノシラン修飾パターンを形成できれば、負電荷を有するフェリチン分子との静電相互作用により修飾面上のみへの選択的な吸着が期待できる(図 3-1)。

ただし、前章で用いた液相での AEAPTMS 修飾では、ナノメートル領域での電荷修飾パターンの形成は期待できない。また修飾面の周囲の SiO_2 表面は、清浄度が低下すると表面状態が著しく変化することが知られている。

そこで、本研究では新たに気体状態でのアミノシラン表面修飾を行い、これを電子ビーム露光によるレジストパターン形成と組み合わせることで、 SiO_2 表面の清浄度を低下させることなく、数十ナノメートル領域の高電荷密度を有する修飾パターンの形成を行った。またアミノシラン修飾表面と、フェリチンタンパク質の表面電位状態をゼータ電位測定により評価した。

さらに上記のナノメートル領域の修飾パターンを利用し、フェリチン水溶液中の静電相互作用状態をイオン強度を変化させて制御することで、実際に数十 nm スケールの修飾領域で、選択的にフェリチン分子を吸着させた単層膜パターンを得ることを目指した。

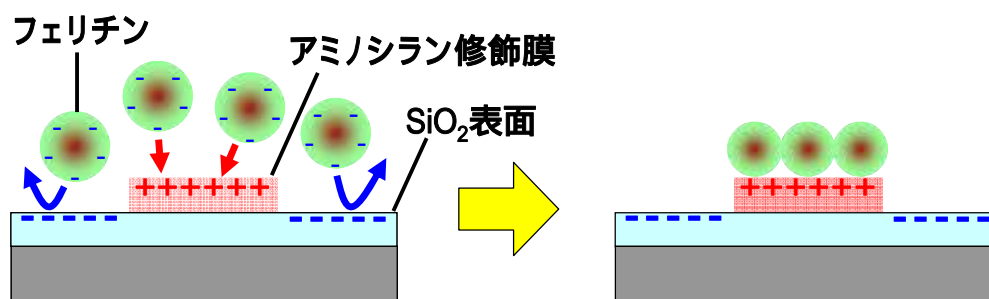


図 3-1 局所表面修飾膜によるフェリチン単層膜パターンニング

3-2 局所電荷修飾パターンの形成と評価

3-2-1 局所パターンニング可能な高電荷密度アミノ修飾膜形成

前章で用いた AEAPTMS 修飾は、水溶液中での反応を利用しているため、ナノメートル領域での修飾膜をパターンニングすることは困難である[1]。また修飾面の周囲の SiO₂ 表面は、清浄度が低下すると表面状態が著しく変化することが知られている。著者らは、予備的な実験において、ポジ型電子ビームレジスト：ZEP520A（日本ゼオン）が親水性状態の高清浄度 SiO₂ 表面でも良好な薄膜を形成し、さらにレジスト除去後も下地の SiO₂ 表面が清浄な親水性状態を保持しうることを確認した[2]。

そこで、本研究では電子ビーム露光によるレジストパターン形成と組み合わせた修飾膜パターンニングを想定し、3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)を用いた表面修飾を試みた（図 3-2）。基板としては、前章同様、急熱酸化法(RTO)により形成した 3nm の熱酸化シリコン薄膜を有する p 型シリコン基板(100)を用いた。

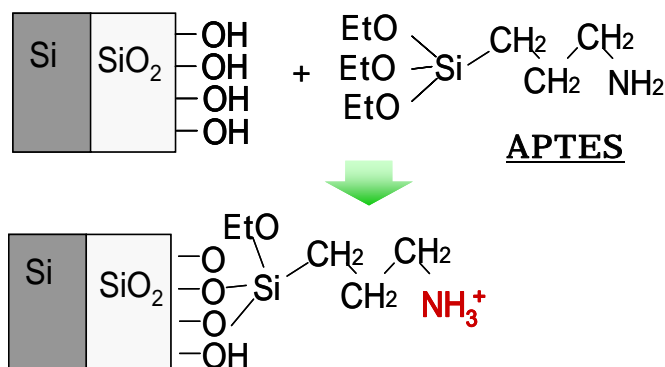


図 3-2 蒸気法 APTES 表面修飾理

図 3-3 に APTES による表面修飾の処理工程を示す。まず前処理として、基板を純水洗浄した後、110 °C にて 10 分間の UV/オゾン処理を行い、基板表面に吸着した有機汚染物を除去・清浄化した。次に、APTES による基板表面修飾を行うため、清浄化した基板を少量の APTES と共に密閉容器中に入れて APTES 蒸気に暴露し、室温で 20 時間保持して SiO₂ 表面と APTES 分子を反応させた。反応後の基板は、洗浄工程 A と B の両方、又は B のみによって洗浄し、最後に 110 °C、3 分間のベークを行って APTES と SiO₂ 表面の Si-O 結合を促進して反応を完了させ、表面修飾膜を固定した。

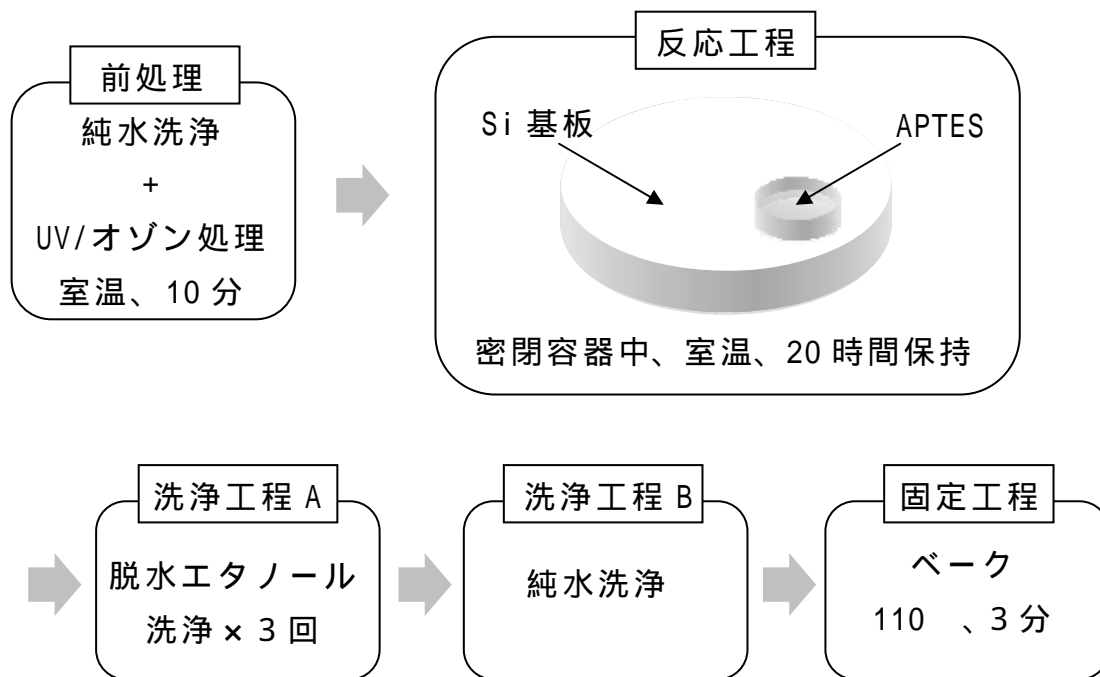


図 3-3 蒸気法 APTES 処理の処理工程図

SiO₂表面をもつシリコン基板上に形成する表面修飾膜の膜厚の均一性をエリプソメータにより評価する。あらかじめエリプソメータにより SiO₂膜厚を計測した 10mm 角のシリコン基板を用い、蒸気法 APTES 処理を施した後に基板上の 4×4 ポイントにおいて、再度エリプソメータによる膜厚の測定を行った。APTES 修飾膜の膜厚は、その屈折率を 1.46 として面内分布を評価した[3]。まず蒸気法 APTES 修飾の検討として、洗浄工程 B のみを採用した試料について APTES 膜厚を測定した。その膜厚分布を図 3-4(a) に示す。この試料では面内で 1.5nm 以上の膜厚ばらつきがあり、面内均一性は良くない。反応工程終了時の基板表面に未反応の APTES 分子が吸着しており、これが後の工程で不規則な表面重合膜を形成したものと考えられる。そこで反応工程の終了時にまず脱水エタノール中で基板を 3 回洗浄して未反応分子を除去する洗浄工程 A を加えて試料を作製し、APTES 膜厚測定を行った。その膜厚分布を図 3-4 (b)に示す。10mm 角の基板全体での膜厚ばらつきは最大でも 0.25nm 未満に抑制され、均一な面内分布が得られた。また、その平均膜厚は約 0.9nm であり、APTES 分子の分子鎖サイズ(0.8 ~ 1.0nm 程度)とほぼ対応している。また後述する修飾膜パターンニング後の原子間力顕微鏡 (AFM) 観察においても厚 1.0nm 程度の均質な修飾膜を形成していることが観測されている[2]。

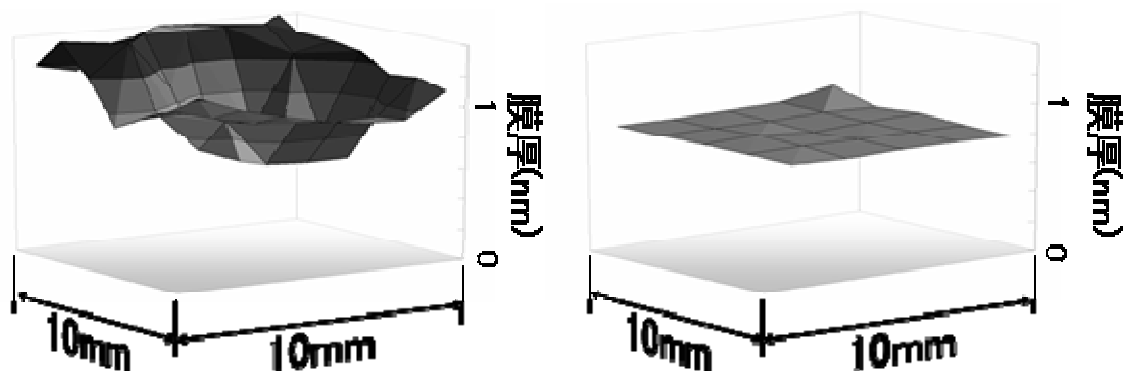


図 3-4 蒸気法 APTES 処理による APTES 膜の基板上膜厚分布
 (a)脱水エタノール洗浄無、(b)脱水エタノール洗浄有

APTES との反応工程における、密閉容器中での保持時間と修飾膜厚の関係を評価したところ、3～5 時間以内にほぼ膜厚が飽和し、その後は処理毎のばらつきはあるものの、いずれも 0.9～1.4nm の範囲内で収束した。APTES 分子が基板表面でどのような配置をしているかは明確ではないが、上記工程で 5 時間以上の反応を行うことで、1～2 分子長程度に対応する膜厚範囲で均質な修飾膜を再現性良く作製することが可能となった。

3-2-2 基板とタンパク質の表面電位（ゼータ電位）測定

ナノメートル領域でのフェリチンパターンニングの吸着条件を検討するため、溶液中各表面の表面電位をゼータ電位測定により評価した。測定には表面状態の異なる2種類の基板（未修飾 SiO₂: SiO₂、および蒸気法 APTES 処理: APTES）とフェリチンを用いた。

ゼータ電位は溶液中の物質の界面付近にある“すべり面”における液中電位であり、ほぼ溶液中の表面電位を反映している。基板表面の測定には、大塚電子製のゼータ電位測定装置（ELS-800）を用いた。片側に基板を配置した電気泳動セル内各点での標準粒子（hydroxypropylcellulose で表面コートした polystyrene ラテックス粒子、イオン強度 1 mM）の泳動速度(u)をレーザードップラー法により評価し、セル内の溶液速度分布と下記 Smoluchowski の式から、基板表面のゼータ電位()を算出できる。

$$\psi_{\zeta} = \frac{\eta}{\varepsilon} u \quad \dots(2.2)$$

ここで、 η は溶液粘度、 ε は溶液の誘電率である。フェリチンタンパク質の測定には、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments 社製)を用いた。Zetasizer Nano ZS の測定原理もレーザードップラー法であるが、ELS-800 に比べて測定用セルサイズが小さく、1/10 のタンパク質量で測定できる。この2種類の基板およびフェリチンのゼータ電位の測定結果を図 3-5 に示す。

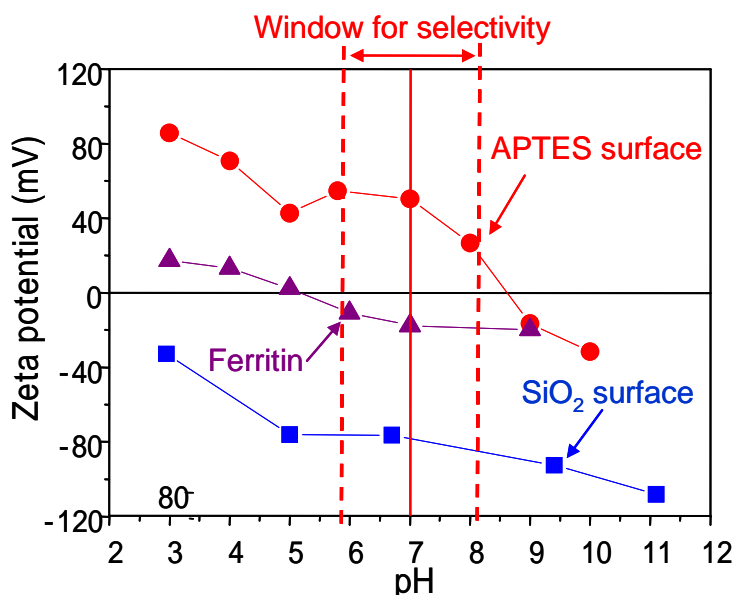


図 3-5 アミノシラン修飾表面および未修飾 SiO₂ 表面におけるゼータ電位の pH 依存性

未処理 SiO₂ 表面は、pH3 ~ 11 の全域にわたって -50 ~ -100mV 程度の負の

電位を保持している。これに対して、蒸気法 APTES 処理を施した表面電位は大きく正にシフトしており、酸性側から中性領域を含む pH8 以下の領域で、正のゼータ電位を持つことが分かる。図示していないが AEAPTMS による修飾表面の電位はこれより低く、蒸気法 APTES 修飾面にはより高密度な活性アミノ基が存在し、高密度の表面正電荷が導入できることが判明した。

以上のように、蒸気法 APTES 法による基板表面処理を用いることにより、均質で、かつ広い pH 領域で修飾面と未修飾面の電位をそれぞれ正負電位に反転可能なアミノ基修飾が実現できた。これにより、例えば pH6-8 等の中性領域の溶液条件を選択することで、負の電荷を持つフェリチン粒子との修飾/未修飾基板表面の間にそれぞれ静電的な引力/斥力場を形成し、選択吸着配置が可能になると期待できる。

3-3 修飾パターン上への選択吸着配置によるナノパターンニング

前節のアミノシラン修飾を利用して、フェリチンの微細単層パターン形成を試みた[2]。プロセスとしては、まず基板上の微小領域にアミノ基修飾を行い、負に帯電したフェリチンを正に帯電したアミノ基部分に選択的に静電吸着させることで、微小領域上にフェリチン粒子配置させる。本プロセスの概要を図 3-6 に示す。

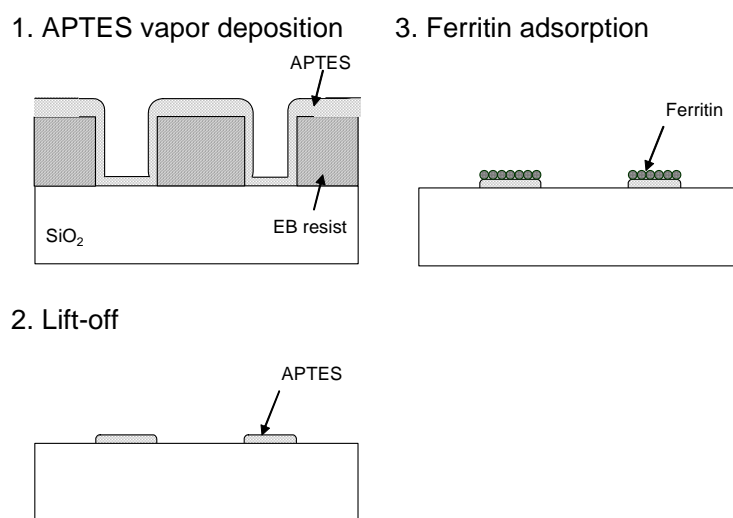


図 3-6 微小領域表面修飾および選択吸着による修飾パターンの作製工程

まず SiO₂ 表面を有するシリコン基板を UV オゾン処理により清浄化した。清浄化した基板上に電子ビーム(EB)レジストを塗布してプリベークした後、電子ビーム直接描画により露光・現像し、微細孔を有するレジスト膜を作製した。EB レジストとして日本ゼオン社製のポジ型レジスト、ZEP-520A7 を用いた。購入したレジスト溶液は、アニソール溶媒を用いて初期濃度の 25% に希釈した後、3nm の熱酸化膜を形成したシリコン基板の上にスピンコートした。これを 110 °C、3 分間、プリベークすることで、100nm のレジスト薄膜が形成された。電子ビーム描画は、エリオニクス社製の電子ビーム露光装置 ; ELS-7500 を用いて行い、さらに n - アミルアセテート溶媒を用い、室温にて 5 分間の現像を行うことで、数十 ~ 数百 nm 領域の微細孔を有するレジストパターンを得た。

次に、前節に示した APTES 修飾により基板表面にアミノ基を導入した。この方法により微細なレジストパターン内部にもアミノシラン分子が容易に侵入することができ、ナノスケールの微細孔内部においても、再現性良く基板表面をアミノ基修飾することが可能となった。

上記により作製した表面修飾基板を 40 °C の DMAC (dimethylacet

amide)溶媒中に浸漬して5分間保持し、さらに同じ溶媒中で5分間の超音波洗浄を行うことで、基板表面のEBレジストを除去した。レジスト除去後の基板表面のAFM観察像を図3-7(a)に示す。パターンの端部は、APTES分子の長さ(8~10程度)に比較して異常に大きな膜厚のリング状の壁を形成している。これはAPTES分子と反応したレジスト側壁が硬化して、DMAC溶媒に溶解できない状態に変化したためと考えられる。AFM像の中央部分は、3nmの熱酸化SiO₂を有するシリコン基板が1nm弱の凹凸があり、APTES膜の厚みが1nm程度のため、判断に注意を要するが、直径100nmのパターン領域が周辺領域に比較して盛り上がっていると思われた。すなわちこのAFM像から、微細領域にAPTMS修飾膜が形成され、周辺部でAPTESの異常な塊状体が形成されていることを示している。

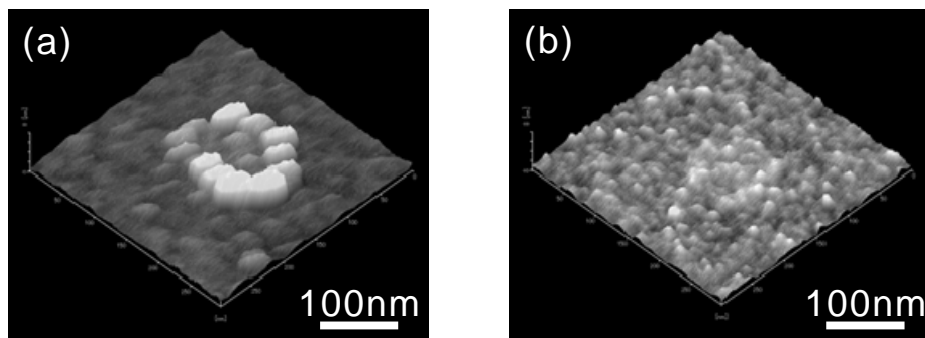


図 3-7 蒸気法 APTES 処理による基板上微細修飾パターンの AFM 観察像(a)110、3分のベーク処理有、(b)ベーク処理無

そこで、蒸気法 APTES 処理の最後のベーク処理を抜き、気相反応および脱水エタノールと純水洗浄を行った基板をそのまま DMAC 溶媒に浸漬してレジスト除去を行うことを試みた。作製した基板表面の AFM 観察像を図 3-7(b)に示す。想定したようにベーク処理を行った AFM 像と異なり端部の膜厚増大がなくなっている。また、もともとの基板に 1nm 弱の凹凸があるため、明瞭ではないが、平坦な修飾膜パターンを識別することができる。そのプロファイルから、膜厚は約 1nm であり、APTES 分子の長さ(8~10程度)とほぼ対応し、APTES の単層膜ができていると判断できる。この結果から、ベーク処理を抜くことでレジストと APTES の反応による塊状体の形成を抑制でき、また SiO₂ 表面と APTES 分子の結合は、ベークなしでも DMAC 溶媒によるレジスト剥離過程にも十分耐性を持つことが判る。

さらに、作製した微細修飾領域パターンに吸着させるため、フェリチン溶液を調整した。未修飾の基板表面(SiO₂面)が水溶液中でマイナスに帯電しているのに対し、アミノ基修飾した基板表面には正電荷が導入されている。前節に記載したように、蒸気法 APTES 処理によれば、中性付近で修飾表面電荷をプラスとすることができるので、中性領域のマイナスに帯電したフェリチン粒子を有する溶液を利用すれば、微細修飾領域にのみ選択的にフェリチンを吸着させることができると考えられる。

そこで、まず予備検討として鉄酸化物コアを内包させたリコンビナントフェリチン (Fer4) 溶液を純水置換し、蒸気法 APTES 処理による表面修飾基板、および未修飾の SiO₂ 表面を持つ基板の 2 種の基板表面に対する各吸着状態を評価した。溶液濃度は 0.4mg/mL とし、吸着は、4.1 節同様、室温で 30 分間の表面張力による基板上溶液保持と洗浄工程により行った。この結果、図 3-8 に示すように、アミノ修飾を行った基板上では高密度の単層フェリチン吸着が観察されたのに対し、未修飾の SiO₂ 表面を持つ基板上では、いくらかの吸着が見られたものの、その密度は修飾基板に比較して非常に低い。

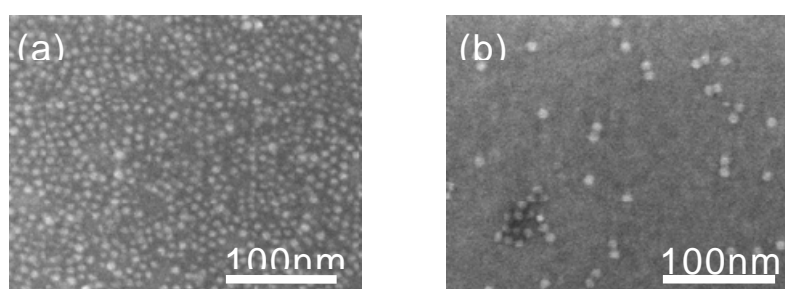


図 3-8 (a)蒸気法 APTES 処理による表面修飾基板、および(b)未修飾 SiO₂ 表面を持つ基板にフェリチンを吸着させた SEM 観察像

上記の予備検討では基板全面への吸着であるが、さらに微細修飾パターンへの選択吸着をさせる上では、溶液中のイオン強度および Debye 長の与える影響が重要となると考えられる。溶液中の静電遮蔽距離を規定する Debye 長 ($1/\kappa$) は、下記の式によりイオン強度(I)に依存して決まる。

$$1/\kappa = \sqrt{\epsilon\epsilon_0 kT / 2e^2 I}$$

ここで、k はボルツマン定数、T は温度、e は素電荷、 ϵ は溶液の比誘電率、 ϵ_0 は真空の誘電率である。上式によると、イオン強度が数十 mM から 0.01mM に変化すると水溶液中の遮蔽長はナノメートル以下からマイクロ

メートルまで大きく変化する。これによりフェリチンと基板間の静電相互作用状態が大きく変化するので、ナノメートルスケールの表面修飾パターン上への配置制御にはイオン強度を適切に制御することが重要と予測される。そこで、本検討では Fer4 濃度を 0.4mg/mL とし、MES および TRIS を用いて pH を 7.0 付近に保持しつつ、表 3-1 のように Debye 長およびイオン強度を調整した溶液を作製した。

表 3-1 溶液の Debye 長およびイオン強度調整表
Debye length (nm) Ionic strength (mM) MES

Debye length (nm)	Ionic strength (mM)	MES (mM)	Tris (mM)
1	100	110	110
10	1	1.1	1.1
100	0.01	0.01	0.01
1000	10^{-4}	0	0

作製した溶液を、上記の微細表面修飾基板上に滴下し、室温で 30 分間の表面張力による基板上溶液保持と洗浄工程によりフェリチン吸着を行い、SEM 観察により吸着状態を観察した。この結果を図 3-9 に示す。Debye 長が 1nm と短いものは未修飾表面に対してもフェリチンが多数吸着する、非選択的吸着が観察され、フェリチン吸着パターンを得ることはできなかった。これに対して、Debye 長が 10nm 以上のものは、いずれもアミノ修飾領域のみへの選択的な吸着が観測されている。フェリチンと修飾表面、および非修飾表面の電荷バランスが適切で、静電的相互作用による 50nm 級微小領域へのフェリチン粒子配置が実現している。Debye 長が 10nm 以上の条件でも、非修飾領域へ非選択的に吸着したフェリチン粒子が観察されるが、その量は Debye 長 1nm のものに比較して著しく抑制されており、Debye 長が大きくなるにつれ、減少している。ただし本検討の範囲内では、Debye 長が最大のもので、非修飾領域への吸着が残っていることが観察される。なお選択吸着が得られる Debye 長限界(10nm)は、フェリチンの粒子径にほぼ対応している。

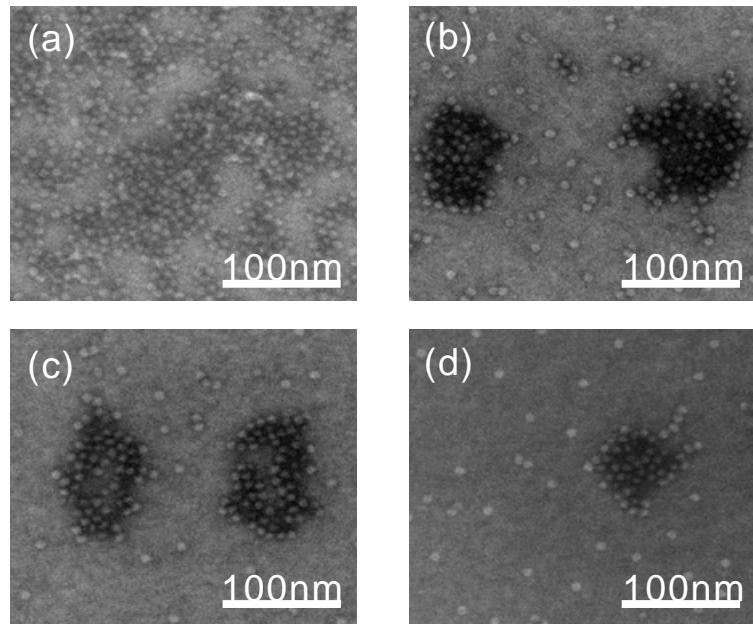


図 3-9 Debye 長が(a)1nm、(b)10nm、(c)100nm、(d)1000nm の各溶液を用いたフェリチン吸着結果の SEM 観察像

また本手法による微細パターン形成は、パターン端部での膜厚異常もなく、パターン領域の全体でほぼ単層吸着が実現している。レジストパターンが残る状態でフェリチン吸着を行いリフトオフ加工した場合はパターン形状が劣化したが、本手法ではフェリチンとレジストが接触せず、タンパク質変性が起こらないため、高い形状精度が得られたと考えられる。

以上のように、シリコン基板上に電子ビームリソグラフィーと蒸気法 APTES 処理を施して微小領域にアミノ基修飾を行い、静電相互作用を利用したフェリチンの選択吸着により、50nm 級微小領域へのフェリチン粒子配置に成功した。

3-4 まとめ

基板表面に局所的な電荷修飾を行い、タンパク質-基板間の静電相互作用を利用することで、ナノスケールでフェリチンを選択的に配置して単層膜パターンを形成することに成功した。

新たに APTES 分子を用いた気体状態でのアミノシラン表面修飾を行い、これを電子ビーム露光によるレジストパターン形成と組み合わせることで、数十ナノメートル領域の高電荷密度を有する均一な修飾パターンの形成が可能となった。上記のナノメートル領域の修飾パターンを利用し、フェリチン水溶液中の静電相互作用状態を制御することで、実際に 50nm スケールの修飾領域にのみ選択的にフェリチン分子を吸着させた、単層膜パターンを得ることができた。

参考文献

- 1) S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa and I. Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005) 1518.
- 2) S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, I. Fujiwara, N. Matsukawa and I. Yamashita: J. Photopolym. Sci. Technol. **18** (2005) 495.
- 3) M. Rodahl, F. Hook, A. Krozer, P. Brzezinski and B. Kasemo: Rev. Sci. Instrum. **66** (1995) 3924.

第4章 表面修飾パターン上へのタンパク質超分子吸着のモデル化と解析

4-1 はじめに

単一電子デバイスや、量子デバイス等のより高度なデバイス応用においては、ナノドットを基板上の目的の場所に位置決めして1個ずつ配置することが要求される。また単一フェリチン分子の配置ができれば、それを基本として、ナノドットの任意パターン配置が実現できる。例えばラスターキャンのように、単一フェリチン分子配置を繰り返すことで、任意のパターン配置が可能になると考えられる。

本研究では、前章までの知見をベースに、静電相互作用によるフェリチン分子の吸着過程を解明し、より高精度に制御することで分子1個ずつを位置制御することを目指し、相互作用場のモデル化解析を試みた[1,2]。

前章でも触れたように、シリコン酸化膜は pH7 付近で、表面 OH 基の解離反応の結果、負に帯電する。フェリチンタンパク質分子は pH7 付近で正負両方の電荷を持つが、分子全体としては負に帯電している。ここで基板を表面修飾することで正の電荷を導入すると、フェリチン - 表面修飾部間に引力が働き、フェリチン - 基板間は斥力が働くため、フェリチンを選択的に表面修飾部分に配置させることが可能になると考えられる[3]。シリコン酸化膜表面をアミノシラン化合物(APTES)を用いて修飾すると、APTES 分子はシリコン酸化膜表面と結合してアミノ基を表面に提示するため、pH7 付近で修飾面が正に帯電する。そこで、電子ビーム描画技術等を利用してフェリチンと同等の大きさの APTES 修飾表面をシリコン基板上に作製すると、単一フェリチン分子吸着が実現されると考えられる。しかし、この表面修飾を利用した静電吸着方法をナノスケールでの単一フェリチン分子選択配置に適用するためには、上記のことに加えて溶液中における静電遮蔽距離である Debye 長 λ をも考慮しなければならない[1]。

$$\lambda = \sqrt{\epsilon_0 \epsilon_r kT / 2e^2 I} \quad (4-1)$$

ここでは、 ϵ_0 :真空中の誘電率、 ϵ_r :比誘電率、 k :ボルツマン定数、 T :温度、 e :素電荷、 I :イオン強度を表す。タンパク質を取り扱う通常の溶液条件では Debye 長が 1nm ~ 100nm のオーダーになっているからである。静電相互作用を利用した選択吸着の原理を図 4-1 に示す。Debye 長が短い場合、基板およびフェリチン表面に形成される電気二重層が薄くなり、フェリチンは容易に基板表面修飾部に到達することができる[図 4-1(a)]。しかしな

がら斥力ポテンシャル領域も小さくなるため、フェリチンはシリコン酸化膜表面近傍にも容易に到達できるようになり、最終的に近接相互作用(van der Waals 相互作用、疎水 / 親水性相互作用等)により基板に吸着される。Debye 長が長い場合、基板およびフェリチン表面に形成される電気二重層が厚くなる。その結果、表面修飾部からの引力ポテンシャルは周囲のシリコン酸化膜表面からの斥力ポテンシャルによって完全に遮蔽される[図 4-1 (c)]。この場合、フェリチンは斥力ポテンシャルによって阻まれるため基板に到達することができない。この二つの場合の中間に最適な Debye 長条件があると考えられる[図 4-1 (b)]。この状況においては、表面修飾部近傍においてのみ斥力ポテンシャルが弱められ、表面修飾部にフェリチンは吸着されるが、それ以外のシリコン酸化膜表面には斥力ポテンシャルに阻まれ吸着されない。この選択吸着を実現するポテンシャル障壁の高さは、Debye 長、表面修飾パターンサイズ、正負電荷の定量的なバランスによって変化する。したがって、単一フェリチン分子吸着を実現するためには、フェリチンと同等の大きさの APTES 表面修飾部分とそれ以外のシリコン表面の正負電荷分布によるポテンシャル障壁を Debye 長により制御し、図 4-1 (b)の最適化された状態を実現しなければならない。

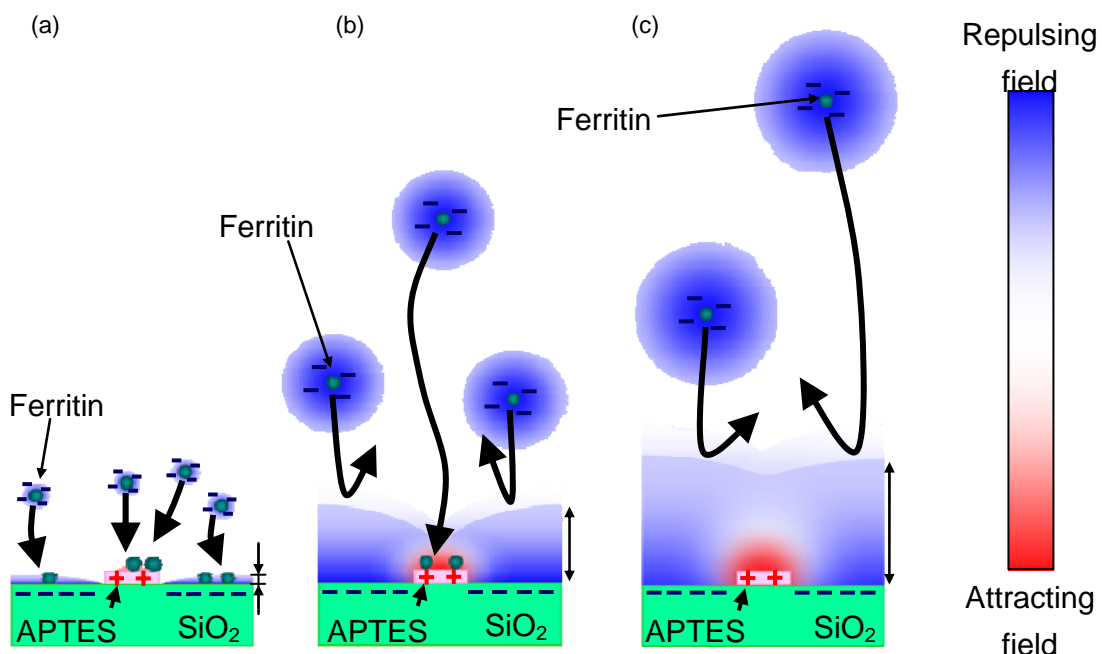


図 4-1 静電相互作用を利用した吸着の原理 (a)Debye 長が短い場合 (b) Debye 長が最適化された場合 (c) Debye 長が長い場合。

4-2 溶液中相互作用の理論解析

基板上への単一フェリチン分子吸着を実現するポテンシャル分布を明らかにするため、溶液中相互作用を定量的に解明するモデル化および解析手段の構築を行った[1,2]。溶液モデルの計算空間として用いたユニットセルを図4-2に示す。セルのXY面($Z=0$)が基板表面であり、その中央にはアミノシランディスクが設置されている。セルは基板面内方向(X,Y方向)で周期的境界条件により無限に配置され、Z方向の長さはDebye長の10倍以上とした。

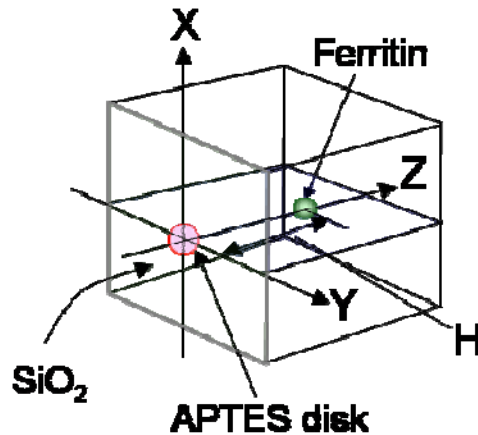


図 4-2: 計算空間のユニットセル

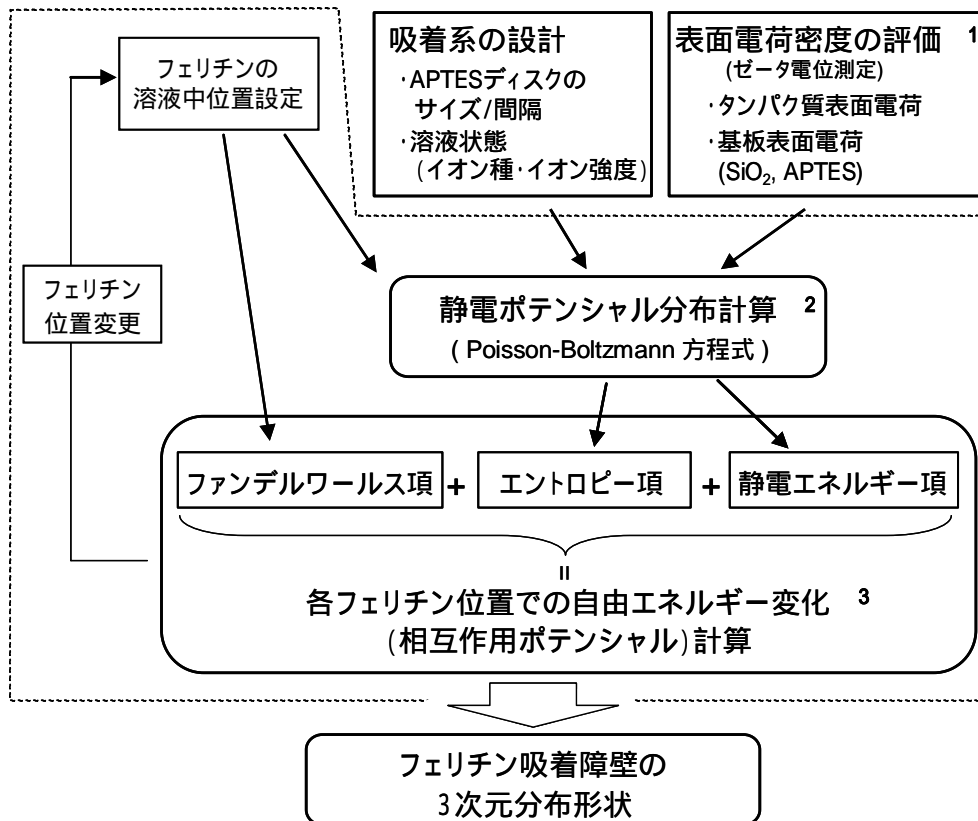


図 4-3 フェリチン吸着相互作用解析の計算フロー

次に、フェリチン吸着相互作用解析の手順を記述する。解析計算フローの全体像を図 4-3 に示す。まず、静電相互作用解析の基礎データとして必要となる、フェリチン、シリコン酸化膜、APTES の各表面電荷密度を取得する(図 4-3 1)。ここでは各表面は均一に帯電していると仮定して、ゼータ電位の実験値をもとに、フェリチン表面に対しては式(4-1)から、SiO₂, APTES 各表面に対しては式(4-2)から、それぞれ電荷密度 σ を算出する [4,5]。

$$\sigma = \frac{2\varepsilon_0\varepsilon_r kT}{e \cdot \lambda} \sinh\left(\frac{e\psi_0}{2kT}\right) \sqrt{1 + \frac{2}{\frac{a}{\lambda} \cosh^2\left(\frac{e\psi_0}{4kT}\right)} + \frac{8 \ln\left[\cosh^2\left(\frac{e\psi_0}{4kT}\right)\right]}{\left(\frac{a}{\lambda}\right)^2 \sinh^2\left(\frac{e\psi_0}{2kT}\right)}} \quad (4-1)$$

$$\sigma = \sqrt{8\varepsilon_0\varepsilon_r I kT} \sinh\left(\frac{e\psi_0}{2kT}\right) \quad (4-2)$$

ここで ψ_0 は基板あるいはタンパク質の表面電位、 a はフェリチン半径を表わす。次に、得られた電荷密度と、APTES の形状やフェリチン位置等の幾何的パラメータ、溶液中のイオン強度の情報を用いて、Poisson-Boltzmann 方程式を数値的に解き、溶液中の静電ポテンシャル ψ の分布およびイオン密度分布を求める(図 4-3 2) [6]。

$$\Delta\psi = -\frac{1}{\varepsilon_0\varepsilon_r} \sum_i e z_i n_{i0} \exp\left(-\frac{e z_i}{kT} \psi_0\right) \quad (4-3)$$

ここで z_i は i 種イオンの価数を表す。また n は溶液中イオン密度を表し、 n の添字 $i, 0$ は、 i 種の化学種、あるいは静電ポテンシャル 0 の状態に対するイオン密度であることをそれぞれ示している。静電ポテンシャルの数値計算には逐次過緩和アルゴリズムを用いた [7]。計算の収束を加速させるため、解析条件ごとに過緩和パラメータの最適化を行うが、大半の計算では約 1.8 に設定できる。静電ポテンシャルの計算を計算領域の境界から開始し、更新後の静電ポテンシャル値を用いて溶液中のイオンを Boltzmann 分布に従って再分布させる。以上の計算を静電ポテンシャル値が収束するまで繰り返し行う。

数値計算により得られた静電ポテンシャルの 3 次元分布を用いると、相互作用ポテンシャルを、フェリチン、基板、溶液を含む系の全自由エネルギー (F) の変化として次式により計算できる(図 4-3 3) [8,9]。

$$F = \frac{1}{2} \int \varepsilon_0 \varepsilon_r (\nabla \psi)^2 dV + kT \sum_i \int \left(n_i \ln \left(\frac{n_i}{n_{i0}} \right) - n_i + n_{i0} \right) dV$$

$$- \frac{A}{6} \left(\frac{a}{H} + \frac{a}{2a+H} + 2 \ln \frac{H}{2a+H} \right) \quad (4-4)$$

ここで V は溶液中体積、 a はフェリチン半径、 H はフェリチン表面 - 基板表面の間隔距離であり、 A は Hamaker 定数である。右辺第一項は静電エネルギー項、第二項は混合エントロピー項、第三項は van der Waals 項に相当する。本検討では SiO_2 上および APTES ディスク上での van der Waals 場は同じとし、 $A=5kT$ として計算を行った。ここで相互作用ポテンシャル（全自由エネルギー変化）は、フェリチン - 基板間距離が無限大の時に 0 となるように定義している。

フェリチンの位置を変えて上記計算を繰り返すことにより、吸着過程の各段階でフェリチンが経験する 3 次元的な相互作用ポテンシャル分布、すなわち吸着障壁ポテンシャルの形状を明らかにすることができる。

4-3 フェリチンと同程度の直径を有するアミノシランディスク上での 単一分子配置の可能性検討

単一フェリチン分子配置を実現するため、APTES ディスクパターンをフェリチンと同程度の直径 15nm に設定し、前節の計算を実施した。計算に用いた、各表面のゼータ電位、表面電荷密度を表 4-1 に示す。

表 4-1 : フェリチン(Fer8S)、SiO₂、APTES 各表面のゼータ電位および表面電荷密度

	フェリチン (Fer8S)	SiO ₂	APTES
ゼータ電位 (mV)	-23.0	-76.5	50.4
表面電荷密 (C/nm ²)	-4.28×10^{-21}	-6.8×10^{-21}	4.2×10^{-21}

APTES パターンの間隔は 100nm (したがって計算セルの X,Y サイズも各 100nm) フェリチン分子は Fer8S を用いた。Debye 長 14nm 溶液での静電ポテンシャルの計算結果の一例を図 4-4 に示す。

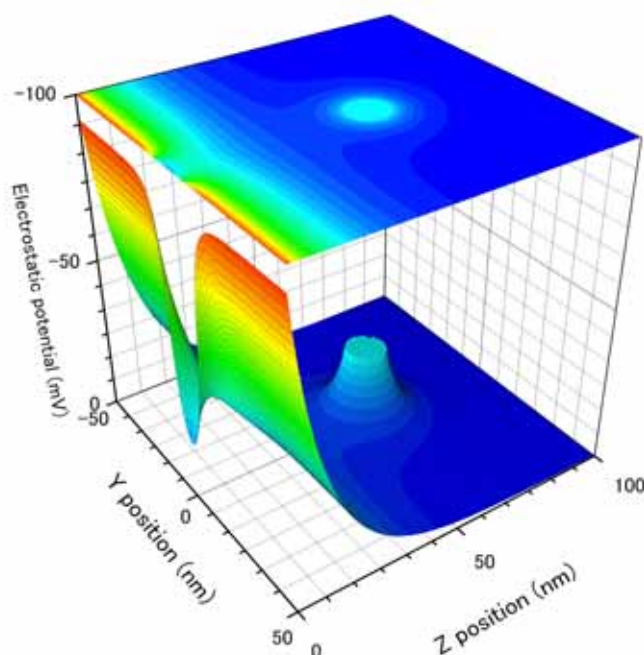


図 4-4: 静電ポテンシャル分布 (λ=14nm)

基板上の APTES 領域において斥力静電ポテンシャルが弱められているが、APTES パターンの上には依然として静電ポテンシャルの障壁が形成されていることが分かる。セル中央部にあるポテンシャル面の凸部は、フェリチンの負電荷により引き起こされたポテンシャル変化である。

静電ポテンシャル分布の計算結果から、式(4-4)を用いて全自由エネルギーを構成する静電エネルギー項と混合エントロピー項を計算でき、van der Waals 項とあわせて全自由エネルギーが算出できる。フェリチン位置を計算ユニット内の各位置に配置して各項を計算することで、各位置での各相互作用の寄与が明らかになる。一例として Debye 長が 14nm のときの、van der Waals 項、静電エネルギー項、混合エントロピー項の各分布形状を図 4-5 (a),(b),(c)に、またこれらを重ね合せた図を図 4-5 (d)に示す。なお、図 4-5 において Ferritin-substrate separation distance の軸は、フェリチン表面と基板表面の間隔距離を示し、式(4-4)における H に対応している。これは、後に記載する図 4-6、図 4-8、図 4-9 においても同様である。

本検討では、 SiO_2 上と APTES ディスク上での van der Waals 場は同じと仮定している。van der Waals 項はフェリチン - 基板間距離の関数として計算され、図 4-5(a)に示されるように、基板表面近傍でエネルギー値が急激に減少する分布形状となっている。このように van der Waals 項は基板近傍において優勢となるため、この減少領域に到達したフェリチンは van der Waals 力によって捕らえられ基板に吸着すると考えられる。

静電エネルギー項は、図 4-5 (b)に示されるように、APTES ディスクパターン向かって単調に減少する形状を示している。その一方で SiO_2 上へ接近する場合、静電エネルギーは一度減少して極小となり、その後再び増加する形状となっている。基板近傍でのエネルギー減少はバッファイオンの集積効果のためと考えられる。 SiO_2 表面にフェリチンが接近すると、電界の重なりによりフェリチン - 基板間に正に帯電したバッファイオンが集積する。その結果電場勾配が緩和され、静電エネルギーが減少する。この状況から、フェリチンが SiO_2 表面にさらに接近すると、フェリチン - 基板間の空間が減少するにつれ、電場勾配を緩和する正に帯電したバッファイオンが減少し、フェリチン表面と SiO_2 表面の負電荷同士が直接的に静電的反発するため、静電エネルギー項が増加すると考えられる。一方、APTES ディスクパターン上では上記のような直接的な静電反発が無いため、接近によるエネルギー上昇は無い。

混合エントロピー項は、図 4-5 (c)に示されるように、基板への接近に関して単調に増加する形状となっており、大きな斥力ポテンシャル場を形成

している。SiO₂ 表面にフェリチンが接近すると、前述のようにフェリチン - 基板間の電位上昇領域に高濃度の正イオンが集積し、混合エントロピーが増大する。フェリチン分子は、基板側にある高濃度イオン領域から浸透圧による斥力を受けるが、この斥力に打ち勝ってフェリチンを基板に近づける際の仕事が、エントロピー項に対応している。上記の正イオン集積が起きるのは、正イオンが表面負電荷からの静電的引力を受けているからなので、混合エントロピー項も形を変えた静電相互作用の一形態とみなすことができる。

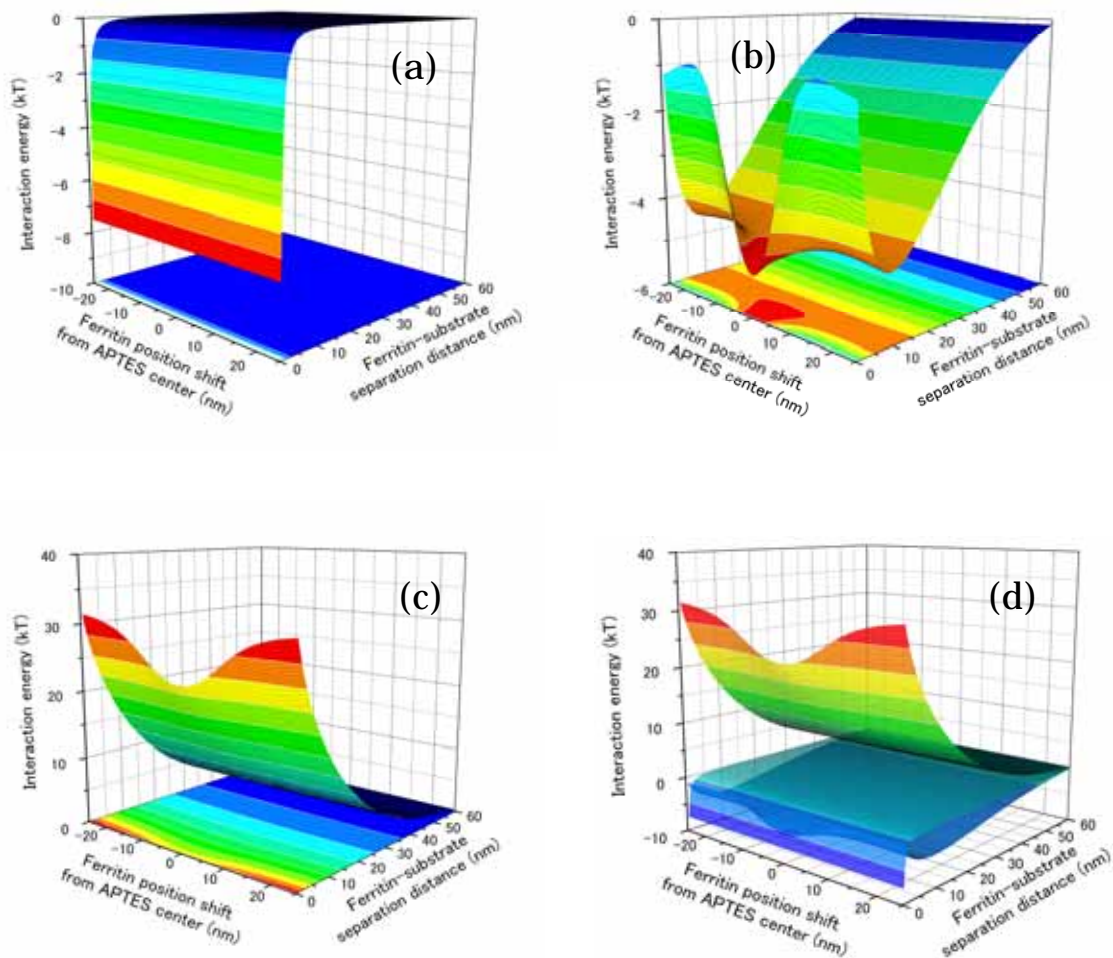


図 4-5 $\lambda=14\text{nm}$ での各相互作用エネルギーの分布形状

(a) van der Waals 項 (b) 静電エネルギー項 (c) 混合エントロピー項
(d) van der Waals 項、静電エネルギー項、混合エントロピー項の重ね合せ図

基板表面近傍で比較すると、APTES ディスクパターン付近のエネルギー値は SiO₂ 表面付近に比較して抑制されている。正に帯電している APTES ディスクパターン上に負に帯電したフェリチンが接近した場合、

異符号の電荷に起因する電界が重なるため、バッファイオンの集積は緩和される。その結果、混合エントロピー項のエネルギー値が抑制されると考えられる。

以上をまとめると、以下のように解釈できる。

- ・ 混合エントロピー項の、強い斥力場が吸着ポテンシャルの大勢を決めている。
- ・ 静電エネルギー項の基板近傍における変化が、吸着選択性を向上し、吸着経路をより集束する。
- ・ van der Waals 項による基板近傍の引力場が、ポテンシャル障壁を越えてきたフェリチンを捕獲する。

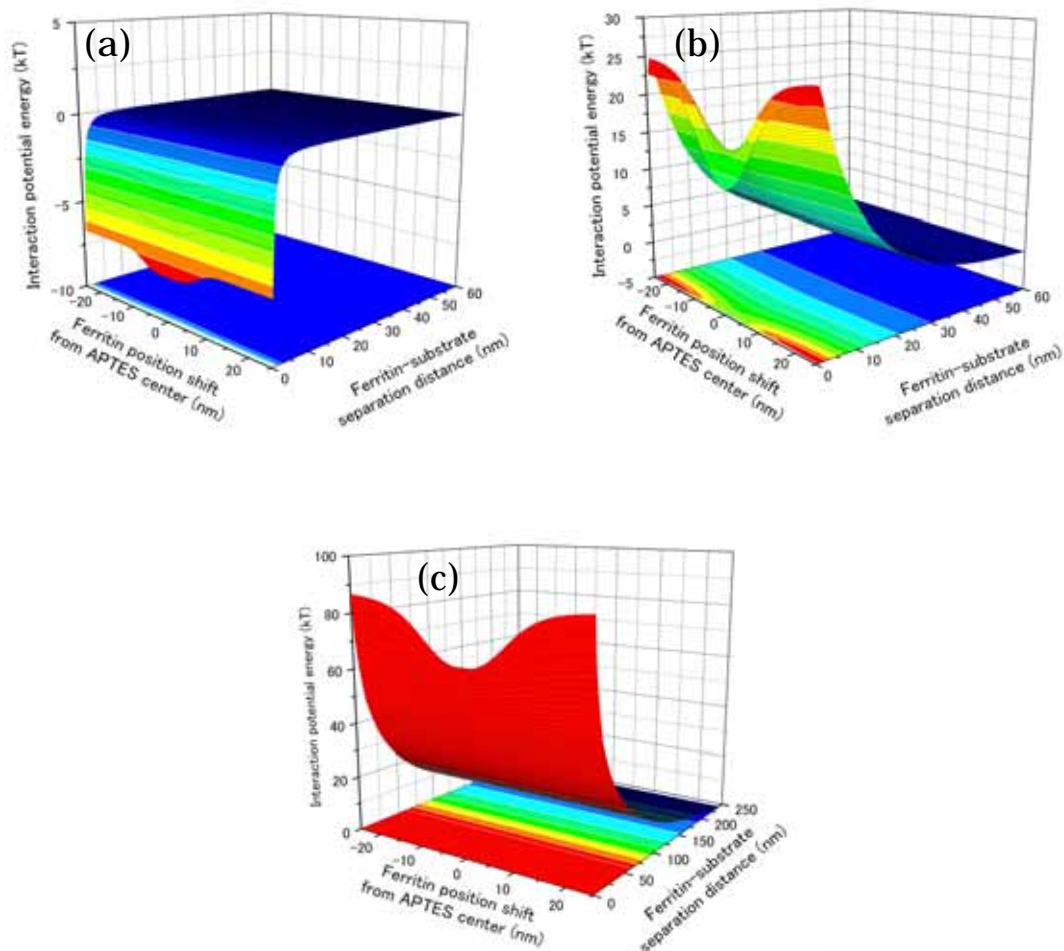


図 4-6: 相互作用ポテンシャル分布 (a) $\lambda=1\text{ nm}$, (b) $\lambda=14\text{ nm}$, (c) $\lambda=100\text{ nm}$

フェリチンの吸着障壁ポテンシャルは、上述の静電エネルギー項、混合エントロピー項、van der Waals 項の総和である全自由エネルギー変化として得られる。Debye 長を 1nm, 14nm, 100nm としたときの 3 次元障壁ポテンシャル形状を図 4-6 に示す。

幾何的配置を考慮すると、APTES パターンの中心を通る垂線に沿ってフェリチンを APTES パターンに接近させる時に、最小のポテンシャル障壁を通過することになる。フェリチンは基板に接近するときこのポテンシャル障壁の最高部（ポテンシャル面の鞍点）を乗り越えることができれば、基板に吸着されることになる。

コロイド理論によると、粒子間の凝集を避けるために 16kT 以上のポテンシャル障壁高さが提案されている。そこでこのエネルギー値 16kT を吸着の可否を判定する条件として適用した。Debye 長 1nm の条件では基板に向かって相互作用ポテンシャルが単調に減少する引力特性が示されている [図 4-6(a)]。そのため、この Debye 長条件では基板全面にフェリチンが吸着することが予測される。

一方、Debye 長が 100nm になると、基板上でのポテンシャル値は SiO_2 、APTES ディスク上ともに 16kT 以上になっており、フェリチンは基板に到達することができないと予測される [図 4-6 (c)]。

両者の間で Debye 長が 14nm の場合、 SiO_2 表面近傍のポテンシャル障壁は 25kT になっているが、APTES ディスクパターン近傍において、ポテンシャル値が 16kT 以下になるフェリチンの大きさ程度の領域（吸着経路）が形成されることが分かる [図 4-6 (b)]。このポテンシャル分布形状は、基板上へのフェリチン接近はポテンシャル障壁を越えた後 APTES ディスク中心に向かって収束することを示しており、本 Debye 長条件において単一フェリチン分子配置が実現されると予測される。

なお、上記の計算では SiO_2 上と APTES パターン上で同じ Hamaker 定数を用いているが、各表面特性を反映した値を設定すれば、さらに van der Waals 場の計算精度を高めることができる。ただし、ポテンシャル面の鞍点位置は、基板から数 nm ~ 10nm と離れているため、Hamaker 定数の変化による障壁高さの変化は小さい。この傾向は、後述する低イオン強度の溶液条件において特に顕著である。静電相互作用が支配的な場では、van der Waals 場をはじめとする近距離相互作用が吸着の可否に与える影響は限定されており、これら近距離相互作用は、フェリチンが鞍点を越えてから基板に衝突・固定する間際までの挙動を決めると考えられる。

また、上記検討ではいずれも APTES ディスクパターン間隔を 100nm と

しているが、パターン間隔を極端に接近させると、 SiO_2 表面上の障壁高さ
と吸着経路での障壁高さの差が減少し、配置の選択性確保が困難になると
予想される。タンパク質同士を接触させるような近接配置には2章の高密
度単層配置や2次元結晶配置[10]が適しているが、パターン間隔を変化さ
せた数値解析では、30nm 間隔程度までは溶液条件調整により上記と同様
のポテンシャル形状が得られ、単一分子配置が可能であろうとの予測が得
られた。

4-4 大面積アミノシランディスク上単一分子配置の可能性検討

前節までの溶液中静電相互作用解析によって、単一フェリチン配置の可能性と、その際の溶液状態を示すことができた。ただし、前節の議論では直径がフェリチンサイズ（15nm）のアミノシランディスクを用いることを前提としている。アミノシランディスクとフェリチンの直径が同程度であれば、同一ディスク上への複数のフェリチン吸着を立体障害により抑止する効果が期待できるので、吸着の単一性を確保し易いであろうと予想できる。しかし、15nmのパターンを形成するには、電子ビーム露光装置等の高コストで低スループットのリソグラフィー装置を使用する必要がある。このため、上記プロセスの適用範囲は研究レベルの小規模工程に限定される。

一方で、現在半導体製造工場で用いられている最新の露光装置のパターニング限界（最小加工寸法）は45nm程度とされており、2010年頃には32nm世代の露光装置が量産化されると予想されている。したがって仮に、32nmあるいは45nm程度よりも大面積のアミノシランディスクを用いても単一フェリチン配置ができるなら、実用上大きな利点をもたらすことになる。例えば通常の半導体プロセスを利用して数十nmのアミノシランディスクを形成し、そこにフェリチンを単一配置することで、数nmスケールのナノドットを、大面積基板上の任意の場所に1個ずつ位置決めして配置できる可能性がある。また静電相互作用による配置制御の可能性を明らかにするという観点から見ても、立体障害に依存することなく、溶液中の相互作用場だけでフェリチン分子の吸着数を制限したり、配置の単一性を確保したりできるかという点は興味深い。

そこで本研究では前節までの解析手段を利用し、32-45nmの大面積アミノシランディスク上への単一フェリチン配置の可能性を検討した[11]。予備的な検討により、大面積ディスク上の配置に15nmの吸着配置と同じイオン強度（0.5mM）を用いると、吸着経路のポテンシャルが低くなり過ぎ、多数のフェリチンが吸着することが明らかとなった。そこで、低イオン強度において高精度の解析を行うため、0.1mM条件におけるフェリチン表面およびAPTES表面のゼータ電位を測定してその電荷密度を評価し、これを計算に用いた(表4-2)。

表 4-2 : フェリチン(Fer-8)、APTES 各表面の表面電荷密度

	フェリチン (Fer8)	APTES
表面電荷密 (C/nm ²)	-1.9 × 10 ⁻²¹	4.2 × 10 ⁻²¹

SiO₂ 表面に関しては、中性付近でも表面電位が pH 依存性を持つため、APTES の影響により表面電位が変化して表面近傍のプロトン濃度が変化すると、電荷密度にも分布ができると考えられる。すなわち、APTES ディスクに近接した領域では、孤立した（あるいは APTES ディスクから遠く離れた）SiO₂ 表面に比較して表面電位が高く（負電位の大きさが小さく）なるので、プロトン濃度が低下し、より高密度の負電荷が分布すると予想される。この電荷分布を反映した、より正確な計算を行うため、表面電荷の電位依存性を実験的に評価した。

以下に表面電荷がシラノール基（≡Si-OH）の解離反応により発生するとする表面解離モデルを考える。中性付近における解離反応式は下記である。



ここで K_a は酸解離定数である。表面負電荷密度はプロトン活量 $a_s(\text{H}^+)$ に依存し、また $a_s(\text{H}^+)$ は溶液中電位に依存してボルツマン分布するので、以下の式が成り立つ。

$$[\equiv \text{Si-O}^-] = K_a \frac{[\equiv \text{Si-OH}]}{a_s(\text{H}^+)} = K_a \frac{[\equiv \text{Si-OH}]}{a_b(\text{H}^+) \cdot \exp(-e\psi_0/kT)} \quad (4-6)$$

ここで、 ψ_0 は基板表面電位、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度である。中性領域では SiO₂ 表面の正電荷は無視できるので、表面電荷密度 σ は $-[\text{Si-O}^-]$ に一致する。また基板上の解離可能な -OH 基の密度を N_S とすると、

$$[\equiv \text{Si-OH}] = N_S - [\equiv \text{Si-O}^-] = N_S + \sigma \quad (4-7)$$

となるので、式(4-6),(4-7)より σ は以下となる。

$$\sigma = -\frac{N_s}{1 + \frac{a_b(\text{H}^+)}{K_a} \cdot \exp(-e\psi_0/kT)} \quad (4-8)$$

ここで、SiO₂ 解離の pK_a は 7.1 付近 ($K_a = 10^{-7.1}$) であることを考慮すると [12,13]、pH7 ($a_b(\text{H}^+) = 10^{-7}$) のとき表面電位 ψ_0 が負で -50meV 以下の領域では、式(4-8)は下記に近似できる。

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \exp\left(\frac{e\psi_0}{kT}\right) \quad (4-9)$$

$$\text{ただし } \sigma_0 = -\frac{K_a}{a_b(\text{H}^+)} N_s$$

ここで σ_0 は、表面電位 ψ_0 を 0 に外挿した際の仮想的な表面電荷密度に対応する (ただし $\psi_0 = 0$ では式(4-9)の近似は成立しない)。式(4-9)より、上記領域で表面電荷密度は表面電位に指数関数的に依存することがわかる。

ところで、均一な SiO₂ 表面の表面電荷密度 σ と表面電位 ψ_0 およびイオン強度 I の関係は式(4-2)により示され [4]、hyperbolic sine 関数を展開すると下記となる。

$$\sigma = \sqrt{2\varepsilon_0\varepsilon_r kT I} \cdot \left\{ \exp\left(\frac{e\psi_0}{2kT}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi_0}{2kT}\right) \right\} \quad (4-10)$$

式(4-9)と式(4-10)より下式が導かれる。

$$2\varepsilon_0\varepsilon_r kT I = \sigma_0^2 \frac{\exp\left(\frac{3e\psi_0}{kT}\right)}{\left\{ \exp\left(\frac{e\psi_0}{kT}\right) - 1 \right\}^2} \quad (4-11)$$

$\psi_0 = -77\text{mV}$ の場合、上式は

$$2\varepsilon_0\varepsilon_r kT I = \sigma_0^2 \exp\left(\frac{3e\psi_0}{kT}\right) \quad (4-12)$$

と近似でき、表面電位 ψ_0 はイオン強度 I の対数に対してほぼ線形依存することが判る。

式(4-9)、(4-10)は σ_0 と I および ψ_0 の関係を示し、 I と ψ_0 は実験的に測定可能であることから、実効的な σ_0 を、実験値として求めることができる。 σ_0 が判れば、式(4-9)により表面電荷と電位の関係をポテンシャル計算において扱うことができる。一方、 σ が基板電位に依存しない場合、すな

わち表面電荷一定条件では、 I と ψ_0 の関係は式(4-10)だけで決まり、 ψ_0 が -60mV 以下の領域では下式に近似できる。

$$2\varepsilon_0\varepsilon_r kT I = \sigma^2 \exp\left(\frac{e\psi_0}{kT}\right) \quad (4-13)$$

そこで実際に、イオン強度を変化させた MES-Tris 系 pH7 緩衝溶液を製作し、SiO₂ 表面のゼータ電位を測定した。SiO₂ 表面としては、急熱酸化法による膜厚 3nm の熱酸化膜を水洗し、UV/オゾン処理により表面親水化した状態を用いた。図 4-7 に測定値のプロットを示す。

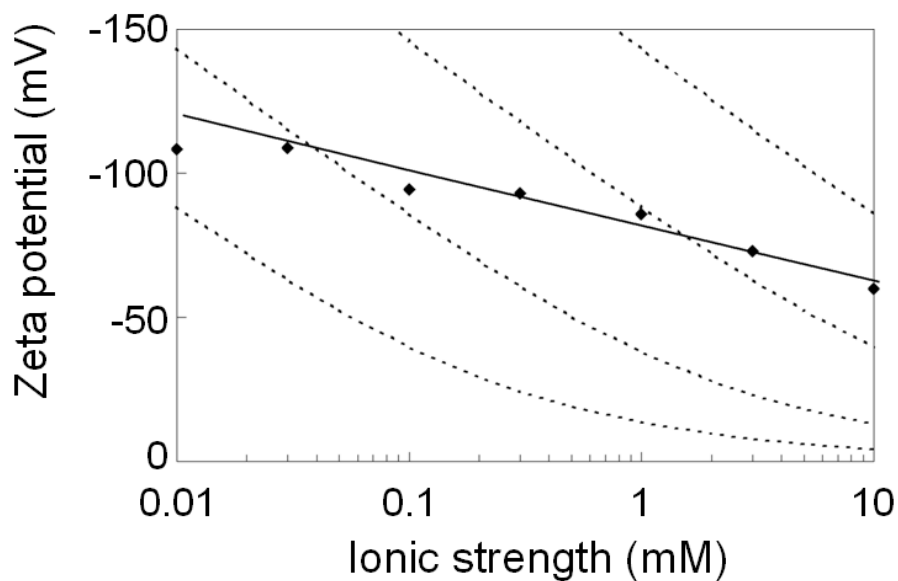


図 4-7: SiO₂ 表面ゼータ電位のイオン強度依存性(MES-Tris buffer pH7)。点線と実線は、各々電荷一定条件と表面解離モデル(式(4-11))による計算値。

表面電位がイオン強度に依存して変化することから、SiO₂ 表面が電位一定条件ではないことが判る。また、図 4-7 には式(4-10)を用いて複数の表面電荷量に対して電荷一定条件で計算したライン(点線)を示すが、測定値のプロットは、どの点線にも載らない。すなわち SiO₂ 表面は電荷一定でもない。これに対して、 σ_0 をパラメータとして式(4-11)をフィッティングしたところ、実線で示される計算値が得られ、測定結果を良好に再現することができた。このとき、 σ_0 の値は $-2.1 \times 10^{-5} \text{C/cm}^2$ であった。この結果から、上記の表面解離モデルは SiO₂ の表面電位の記述に有効であり、 σ_0 の実験値と式(4-9)により表面電荷密度と表面電位の関係を定式化できるこ

とが判る。以下の溶液中ポテンシャル計算では、Poisson-Boltzmann 方程式と式(4-9)を組み合わせて self-consistent な解を求めることにより、表面解離による電荷分布の影響を考慮した計算を行った。

まず Fer8 の 32nm APTES ディスク上への吸着における相互作用ポテンシャル計算を行った。図 4-8 の左側に、吸着経路における障壁高さ(鞍点におけるポテンシャル高さ)が約 16kT となるイオン強度条件: 0.01mM のポテンシャル曲面を示す。

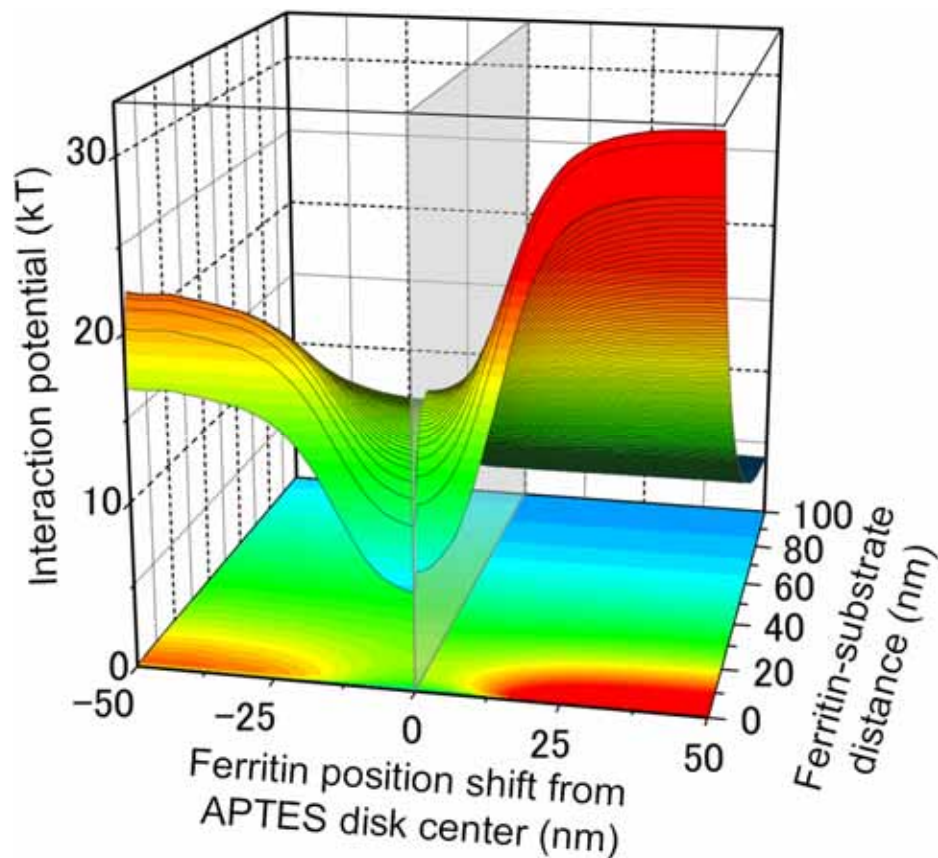


図 4-8: 32nm APTES 上への吸着相互作用ポテンシャル分布。左側は Fer8(イオン強度 0.01mM)、右側は Fer8 の 2 倍電荷を有するフェリチン(イオン強度 0.1mM)に対して計算されたポテンシャル分布を示す。

図 4-8(左側)に示されるように、吸着経路となるポテンシャル谷は広い。ただし、単一フェリチン配置の可否を議論するには、2 個目のフェリチンの吸着過程について考慮する必要がある。

そこで、次にディスク上に1個目のフェリチンが吸着した状態を想定し、2個目のフェリチンの吸着における相互作用ポテンシャルの計算を行った。この際、計算を単純化するため、1個目のフェリチンの表面電荷は、APTESディスク上に均一に分散していると仮定した。図4-9(a)に、1-3回目の吸着時のAPTESディスク中央部における相互作用ポテンシャルのプロファイルを示す。1個目のフェリチン配置に対する2個目のフェリチン吸着の確率は、1個目のフェリチン吸着の吸着障壁：鞍点（サドルポイント）のエネルギー（ E_1 ）と、2個目のフェリチン吸着の吸着障壁（ E_2 ）の差（ E_{21} ）により把握できる。Fer8における E_{21} の計算結果は $0.9kT$ 程度しかなく、ボルツマン分布から2個目の吸着確率は1個目の吸着確率の40%以上となり、各ディスク上で吸着数がバラついた配置状態が予測される。

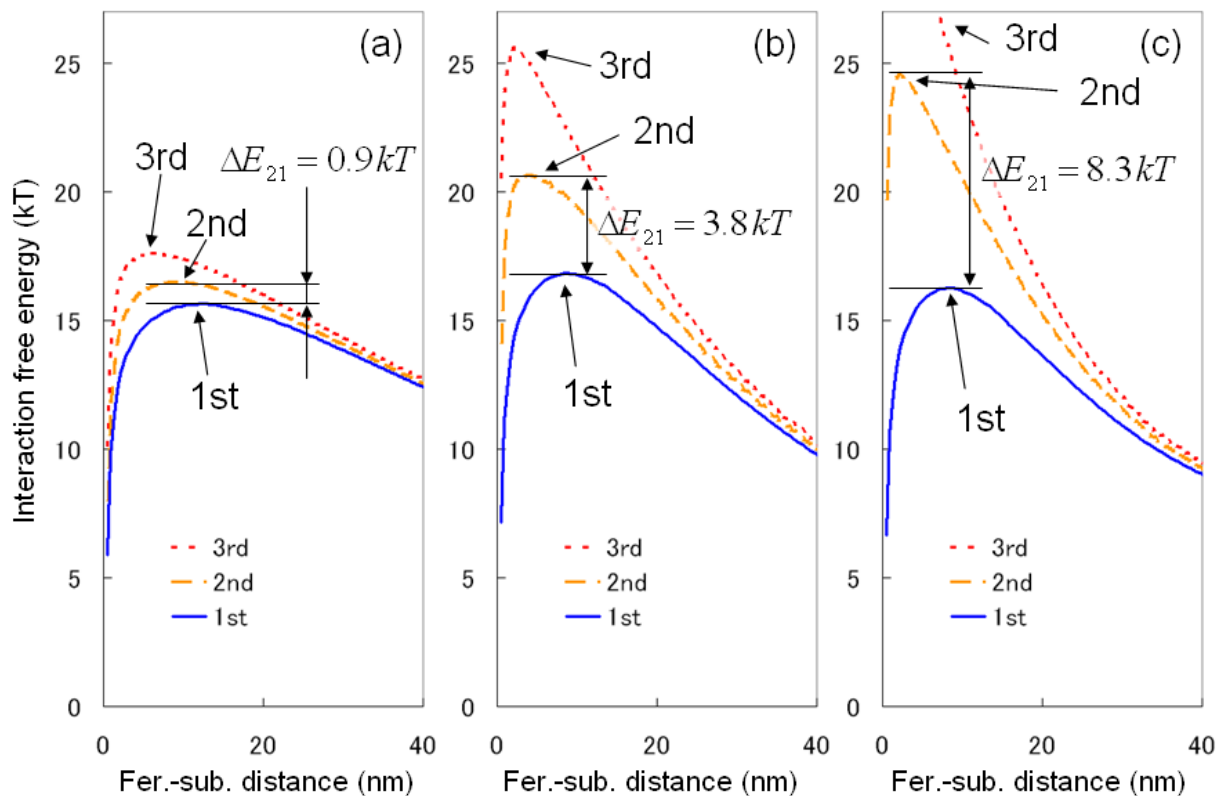


図4-9 複数回のフェリチン吸着における相互作用ポテンシャルプロファイルの変化: (a) Fer8, (b) 2倍電荷フェリチン, (c) 3倍電荷フェリチン

E_{21} により吸着の概要が予想できるが、実際の吸着過程では1個目のフェリチン吸着と、2個目、3個目のフェリチン吸着が同時並行的に進行

し、単一配置率（APTES ディスクの全数に対する、フェリチンが 1 個だけ配置されたディスクの数）は時間発展的に変化する。そこで、この変化をより正確に把握するため、 i 個のフェリチンが配置されたディスク数の全ディスク数に対する割合 n_i の時間経過を以下に考察する。

$i-1$ 個のフェリチンが既に載っている APTES ディスク上に、単位時間当たり p_i の確率で i 個目のフェリチンが吸着するとする。溶液中のフェリチンがディスク上の吸着障壁に衝突する回数が、単位時間当たり f 回であるとする、 p_i は f と、ボルツマン分布により吸着障壁（ E_i ）を乗り越える確率の積、

$$p_i = f \cdot \exp\left(\frac{\Delta E_i}{kT}\right) \quad (4-14)$$

となる。このとき、 n_i の時間変化は下記の連立微分方程式により支配される。

$$\begin{aligned} \frac{dn_0}{dt} &= -p_1 \cdot n_0 \\ \frac{dn_1}{dt} &= p_1 \cdot n_0 - p_2 \cdot n_1 \\ &\vdots \\ \frac{dn_i}{dt} &= p_i \cdot n_{i-1} - p_{i+1} \cdot n_i \end{aligned} \quad (4-15)$$

上式の一般解を求めるのは困難であるが、 i が小さい場合は比較的容易に解析解が得られ、 $i=0,1,2$ の解は以下となる。

$$\begin{aligned} n_0 &= \exp(-p_1 \cdot t) \\ n_1 &= \frac{p_1}{p_1 - p_2} \exp(-p_2 \cdot t) \cdot \{1 - \exp((-p_1 + p_2)t)\} \\ n_2 &= \frac{p_1 \cdot p_2}{(p_1 - p_2)(p_1 - p_3)(p_2 - p_3)} \exp(-p_3 \cdot t) \\ &\quad \times \left\{ \begin{aligned} &p_1 - p_2 - p_1 \cdot \exp((-p_2 + p_3)t) \\ &+ (p_2 - p_3) \cdot \exp((-p_1 + p_3)t) \\ &+ p_3 \cdot \exp((-p_2 + p_3)t) \end{aligned} \right\} \end{aligned} \quad (4-16)$$

図 4-9(a)のプロファイルから得られた E_i を用いて、式(4-14), (4-16)から計算した、Fer8 吸着時の n_i の時間変化を、横軸を衝突回数として図 4-10(a)に示す。単一配置率 n_1 は吸着初期過程で増加するが、すぐに 2 個目吸着に

よる n_2 の増加が始まり、その増大と共に n_1 は減少する。 n_1 の最大値は 60% 以下であり、吸着時間を最適化しても単一配置は期待できず、複数の配置状態が混在することが予想される。

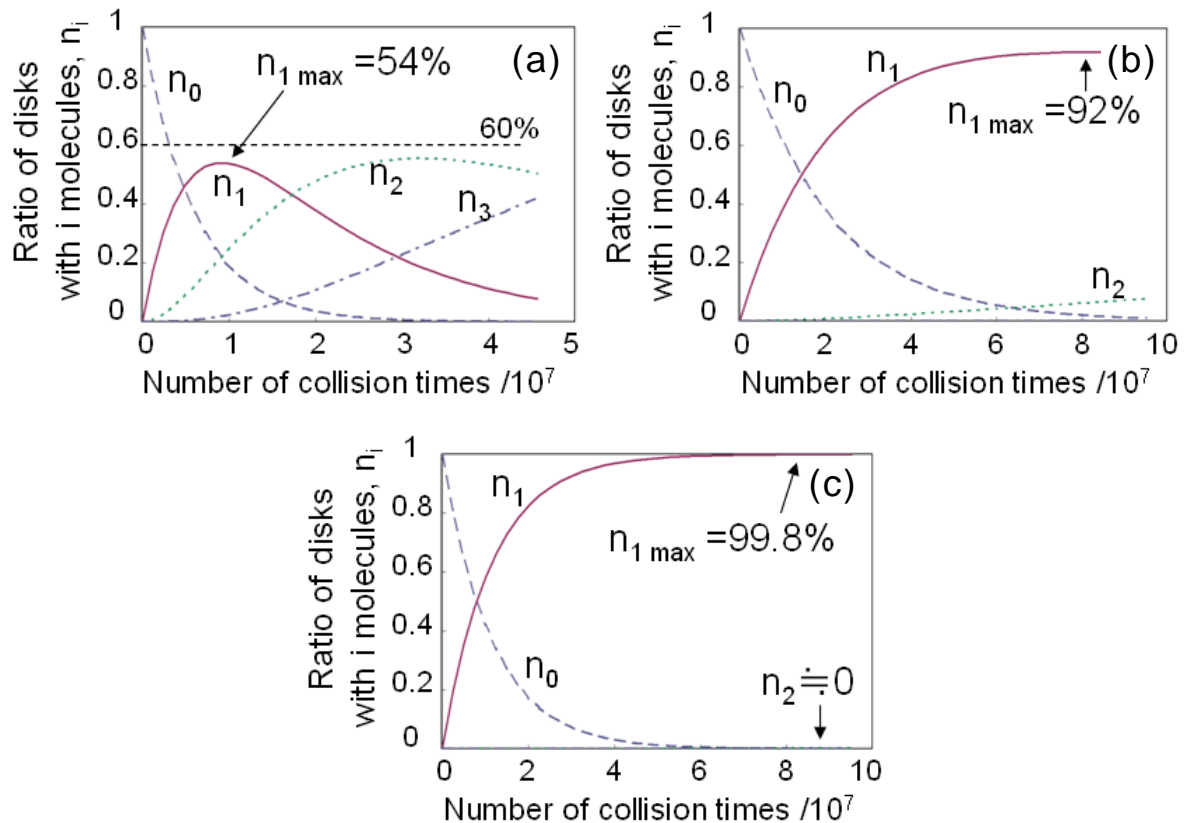


図 4-10 (a) Fer8、(b) 2 倍電荷フェリチン、(c) 3 倍電荷フェリチンに対して計算した n_i の時間変化

なお、さらに低いイオン強度条件で相互作用ポテンシャル計算を行っても、上記の結果は変化しなかった。以上の検討の結果、32nm APTES ディスク上では、溶液条件や吸着時間を最適化するだけでは単一配置は期待できないことが判明した。

上記の課題を克服するため、本研究ではタンパク質の表面が遺伝的に改変できることに注目し、フェリチンの電荷密度を変更することで単一配置ができないかを検討した。

まず仮に、表面電荷を 2 倍に増大させたフェリチンタンパク質を想定し、溶液中の相互作用ポテンシャル分布を計算した。計算結果を図 4-8 の右側に示す。また図 4-11 に、32nm APTES 上への吸着相互作用ポテンシ

ル曲面を基板側から見た射影図を示す。

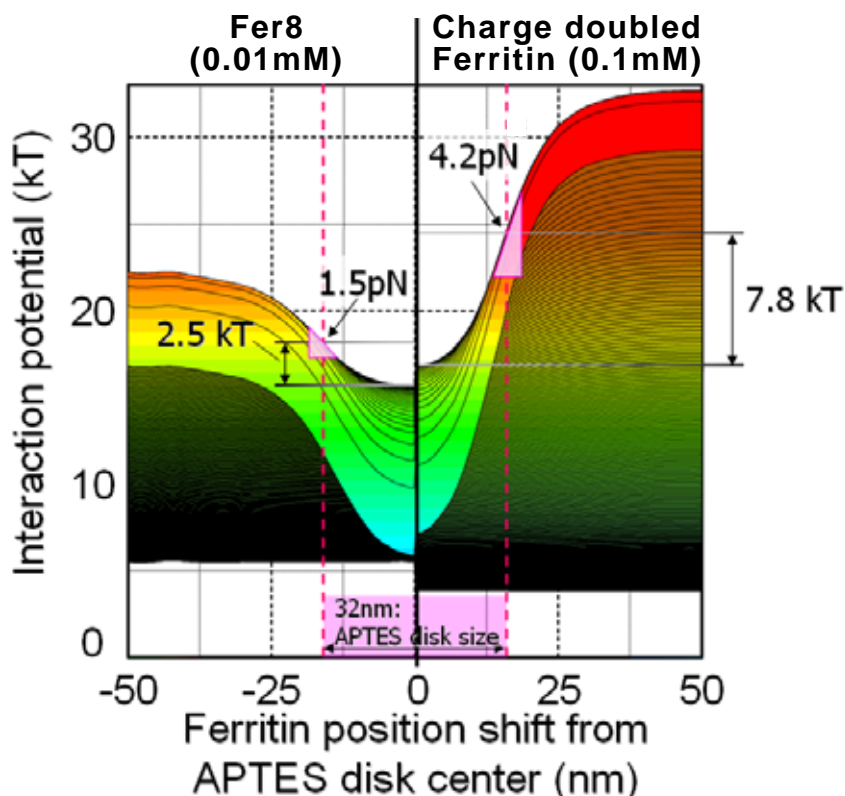


図 4-11 32nm APTES 上への吸着相互作用ポテンシャル曲面を基板側から見た射影図。左側は Fer8(イオン強度 0.01mM)、右側は 2 倍電荷フェリチン(イオン強度 0.1mM)に対して計算された結果を示す。

図 4-11 において、APTES ディスク端直上における吸着障壁とディスク中央部での吸着障壁の高さの差は、Fer8 では 2.5kT であったのが、2 倍電荷フェリチンでは 7.8kT へと約 3 倍に増加する。この効果により、2 倍電荷フェリチンが APTES 端部でポテンシャル障壁を越える確率は強く抑制され、その吸着経路は Fer8 の場合に比較してディスク中央部に狭窄される。さらにディスク端直上のポテンシャル障壁上部におけるフェリチンに加わる力の横方向成分(フェリチンを中心方向に誘導する力)も、Fer8 では 1.5pN であったのが、2 倍電荷フェリチンでは 4.2pN へと約 3 倍に増加する。この効果により、仮に 2 倍電荷フェリチンが APTES 端部でポテンシャル障壁を越える場合にも、ディスク中央に向かう強い力を受けることになる。すなわち、APTES ディスク上には 2 倍電荷フェリチンをディスク中央に誘導する漏斗型のポテンシャル形状が形成されており、吸着位置を

パターン中心部分に収束できると期待できる [14] 。

上記の 2 倍電荷フェリチンと、さらに電荷量を Fer8 の 3 倍に設定した 3 倍電荷フェリチンについて、Fer8 と同様に 1-3 回目吸着における相互作用ポテンシャルプロファイルを計算した。計算結果を図 4-9(b)、(c)に示す。計算によると、2 倍電荷フェリチンの E_{21} は 3.8kT 以上に増大し、この結果、2 個目の吸着確率は 1 個目の吸着確率の 2% 程度に抑制できる。吸着状態の時間変化の計算結果は図 4-10(b),(c)となり、2 倍電荷フェリチンの単一配置率の最大値は 90% 以上、3 倍電荷フェリチンではさら 99% 以上となることが予想でき、32nm ディスク上でも単一配置が実現できると推察される。

以上の解析結果から、タンパク質表面の改変による負電荷増強は、大面積修飾パターン上の単一配置を実現する上で、大きな効果を有するであろうことが予測できた。

4-5 まとめ

本章では、単一フェリチン分子配置の実現に向け、静電相互作用によるフェリチン分子の吸着過程をモデル化し、解析した。ゼータ電位測定により各表面電荷密度を測定し、Poisson-Boltzmann 方程式を数値的に解いて、溶液中の静電ポテンシャル分布を求めた。さらに、各フェリチン位置における溶液中の全相互作用自由エネルギーを計算することにより、フェリチンの各位置における 3 次元的な相互作用ポテンシャル分布、すなわちフェリチンが吸着時に経験する障壁ポテンシャルを明らかにした。

計算結果より、イオン強度を 0.5mM とした溶液条件 (Debye 長 14nm) を用いることで 15nmAPTES ディスクパターンの上部にのみフェリチン分子サイズ程度の低ポテンシャル領域、即ち単独のフェリチンが通過できる吸着経路が形成され、単一分子の位置決め配置が実現できるであろうと予測できた。

またさらに、表面電荷を 2-3 倍に増強したフェリチンでは、分子サイズより大きな 32nm の APTES パターン上でも単一吸着できる可能性が示され、タンパク質表面の改変による負電荷増強が、大面積修飾パターン所上の単一配置を実現する上で、大きな効果を有するであろうことが予測された。

参考文献

- 1) S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, I. Fujiwara, N. Matsukawa, K. Iwahori, and I. Yamashita: Appl. Phys. Lett. **88** (2006) 153103.
- 2) S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa, K. Iwahori, and I. Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **45** (2006) 8311.
- 3) S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa, and I. Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005) 1518 .
- 4) J. N. Israelachvili: *Intermolecular and Surface Forces*, (Academic Press, New York, 1992) 2nd ed.
- 5) H. Oshima, T. W. Healy and L. R. White: J. Colloid Interface Sci. **90** (1982) 17.
- 6) Z. Adamczyk: Adv. Colloid Interface Sci. **100-102** (2003) 267.
- 7) W. H. Press, S. A. Teuklosky, B. P. Flannery and W. T. Vetterling: *Numerical recipes in C* (Cambridge University Press, Cambridge, 1988).
- 8) M. Manciu and E. Rukenstein: Langmuir **19** (2003) 1114.
- 9) S. Bhattacharjee and M. Elimelech: J. Colloid Interface Sci. **193** (1997) 273.
- 10) T. Matsui, N. Matsukawa, K. Iwahori, K-I. Sano, K. Shiba and I. Yamasnita: Langmuir **23** (2007) 1615.
- 11) S. Yoshii et al.: "Specific placement of single nanodots by electrostatic self-alignment of ferritin" submitted.
- 12) P. Schindler, H. R. Kamber: Helv. Chim. Acta, **51** (1968)1781.
- 13) M.L. Hair, W. Hertl: J. Phys. Chem. **74** (1970) 91.
- 14) L-C. Ma, R. Subramanian, H-W. Huang, V. Ray, C-U. Kim and S. J. Koh: Nano Lett. **7** (2007) 439.

第5章 単一フェリチン分子の基板上配置制御

5-1 はじめに

本研究では、4章の理論解析からの予測に基づき、3章の実験系をリファインして表面修飾の精度を確保することにより、実験的に単独分子を基板上に配置することを試みた。

ここで、理論設計に基づく配置実験を行うには、15nm や 32nm といった微細なアミノシランディスクパターンを設計どおりの形状で基板上に形成する必要がある。しかし、従来は数十 nm 領域の分子膜パターンのサイズを精度良く評価する手法が無く、作製したアミノシランパターンが、設計どおりのものであるかどうかを検証する手段が無かった。そこでまず、10～数十ナノメートル台の微細なアミノシラン膜ディスクパターンの直径を測定する手法の開発を試みた。

次に、上記により作製・評価した 15nm の微小ディスクを用いて、4-3節の理論計算により設計した各溶液条件下でフェリチン分子の吸着配置実験を行った。これによりフェリチン分子の単一配置の実現を試みると共に、配置結果と理論予測とを比較し、その一致について検証を行った[1,2]。

またさらに、4-4節の理論予測に基づき、大修飾ディスクパターン上の単一配置を目指し、フェリチン分子の遺伝子改変によるタンパク質外側表面の電荷増強と、32nm アミノシランディスク上への単独配置を試みた[3]。

5-2 小径電荷修飾ディスクのサイズ評価手法

3章で記載したように、本研究において利用するアミノシラン分子膜パターンの膜厚は約1 nmと薄い。このため、通常のSEM観察では分子膜の有無によるコントラストを得ることは困難で、SEMの装置状態によっては微かにその存在を把握できる場合もあるが、その形状や大きさを定量的に評価することはできなかつた。しかし、理論設計に基づく単一配置を実現するには、配置したディスクサイズを定量的に測定することが不可欠である。

著者は、タンパク質のTEM観察において、重金属イオンを利用した染色が用いられること、また少数ではあるが、基板上的SEM観察においても重金属イオンによる染色でタンパク質の吸着状態を評価した報告例[4]があることに着目し、タンパク質表面と同様に多数のアミノ基が提示されたアミノシラン分子膜表面でも重金属による染色が可能ではないかと考えた。

そこで、3章に記載の電子ビーム露光を用いたプロセスにより、基板上にディスク状のAPTES分子膜パターンを作製し、重金属イオンを含む染色液を滴下して、パターン染色を試みた。正電荷を有するパターンを染色するため、染色液としては、負電荷を持ち、かつ2次電子散乱能が高い重金属イオンの安定な溶液を検討し、リンタンゲステン酸カリウム5%溶液(PTA)、塩化金酸カリウム5%溶液(KAuCl₄)の2種類を候補として選択した。

APTES分子膜パターン基板上に、
、
のいずれかを滴下して1分間保持し、その後(a)超遠心装置による染色液除去と乾燥、(b)純水中での洗浄および乾燥、
のいずれかの方法で染色液除去を行ってSEMにより分子膜パターンの観察像を評価した。この結果PTA、KAuCl₄のいずれを用いても、(a)による染色液除去では、多数の染色液に起因する液滴マークや微結晶が発生してパターン観察が困難になったのに対し、(b)の純水洗浄を用いると、無染色の状態に比較して、APTESパターンのコントラストを改善することができた。また追加的に、
(b)
(b)の2回の工程による染色を行ったところ、各液で1回のみ染色に比較してさらにパターンのコントラストが改善し、SEM観察が容易となった。図5-1(a)-(c)にその結果を示す。

さらに、上記染色によるAPTESパターンと、対応するEBレジストのパターン(同一レジスト膜上に同じ露光条件で作製したリフトオフ前のパターン)のSEM観察像から、その輝度分布のパターン中心に対する動径

分布プロファイル(図 5-1(d),(c))は良好に対応した。

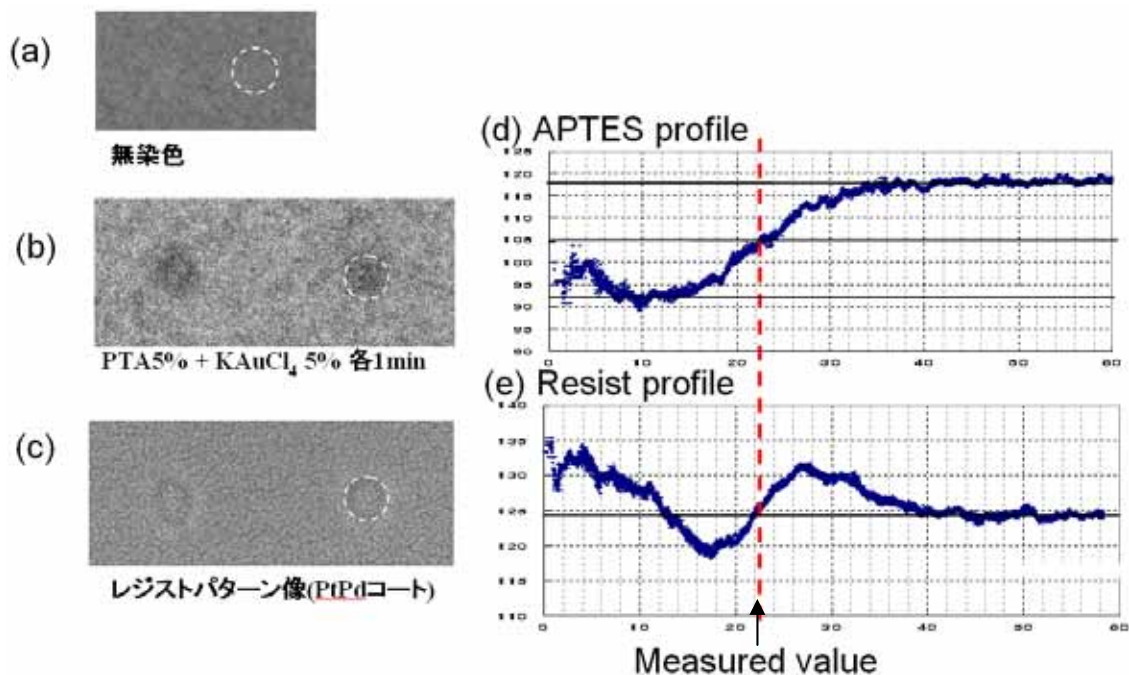


図 5-1 (a)無染色状態、(b) P T A および KAuCl₄ による染色後の APTES ディスクおよび(c)リフトオフ前のレジスト孔の SEM 観察像。(d),(e)は、各々(b),(c)の画像輝度のパターン中心からの動径分布プロファイルを示す。

APTES 染色像の輝度は、吸着した重金属イオンの密度を反映し、その分布は APTES 修飾膜上の正電荷密度分布を反映していると考えられる。したがって、染色像の輝度が、パターン中央とパターン外の輝度の中央値となる半径を APTES の実効的なパターンサイズとみなすことができ、これにより APTES 分子膜ディスクの直径を見積もることができるようになった。

5-3 配置状態のポテンシャル形状依存性と、単一配置の実現

前節の方法により APTES 分子膜パターンの形状を評価できるようになったので、15nm の APTES ディスクを作製し、4 章で設計した条件による単一フェリチン分子配置を試みた[1,2]。プロセスの主要な流れは 3 章に記載したものと同様である。図 5-2 にその概要を示す。本検討においては EB レジスト(ZEP520A7)の希釈率を 3 章の 25%(4 倍希釈)からさらに 10%(10 倍希釈)に下げることにより、レジスト膜厚を 10nm にまで薄膜化し、電子ビーム描画による微細パターンニングの再現性を向上した。このような薄膜レジストは、通常のエッチング加工や金属蒸着膜のリフトオフには利用できない。しかし、本配置で用いるアミノシラン修飾膜の膜厚は、ほぼ分子長さに対応している(約 1nm)ため、上記の薄膜レジストでもリフトオフ不良は発生せず、再現性の良い APTES 膜のパターンニングができた。上記により、100nm 間隔で直径 15nm の APTES ディスクパターンを形成した基板に、フェリチン溶液を滴下して吸着を行った。フェリチン吸着配置プロセスにおいてはシミュレーションの状況を再現するため、フェリチン(Fer8S)濃度を 0.4mg/mL とし、MES/Tris バッファを用いてイオン強度を 100mM, 0.5mM, 0.01mM に調整した。それぞれが Debye 長 1nm, 14nm, 100nm に対応している。吸着後は基板を純水中で洗浄し、スピン乾燥を行った。

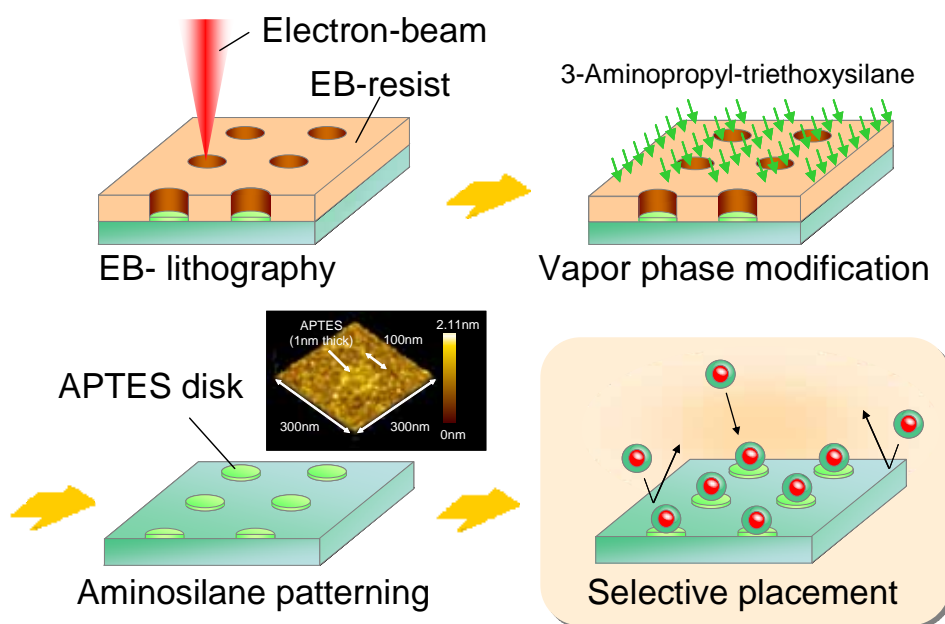


図 5-2 シリコン基板上へのフェリチン単一分子配置プロセス

なお、上記フェリチン濃度では、計算セル内部でのフェリチンが1個程度となるので、フェリチン - フェリチン間相互作用に起因する計算解析と実験条件の相違を考慮する必要が無い。また、動的光散乱解析(DLS)の結果から、溶液中フェリチン分子は広い濃度範囲で互いに斥力状態にあり、凝集体等を形成せずに分散していることを確認している。

フェリチン吸着後の基板表面の SEM 写真を、4-3 節の解析によるポテンシャル分布と合わせて図 5-3 に示す。図 5-3(d)は Debye 長 1nm のときの配置結果である。図 5-3 (a)の相互作用ポテンシャル分布から予測される通り、基板全面にフェリチンが吸着していることがわかる。Debye 長 14nm のときの配置結果を図 5-3 (e)に示す。APTES ディスクパターン上にそれぞれ単一のフェリチン分子が吸着されていることがわかる。この結果は図 5-3 (b)から予測される結果と一致している。Debye 長 100nm の条件においても、実験結果は図 5-3 (c)からの予測と一致し、基板上へのフェリチン吸着は観測されなかった。配置結果の SEM 像を図 5-3 (f)に示す。図中コントラストが黒く現れている部分が APTES ディスクパターンに相当する箇所であるが、フェリチンは吸着していない。

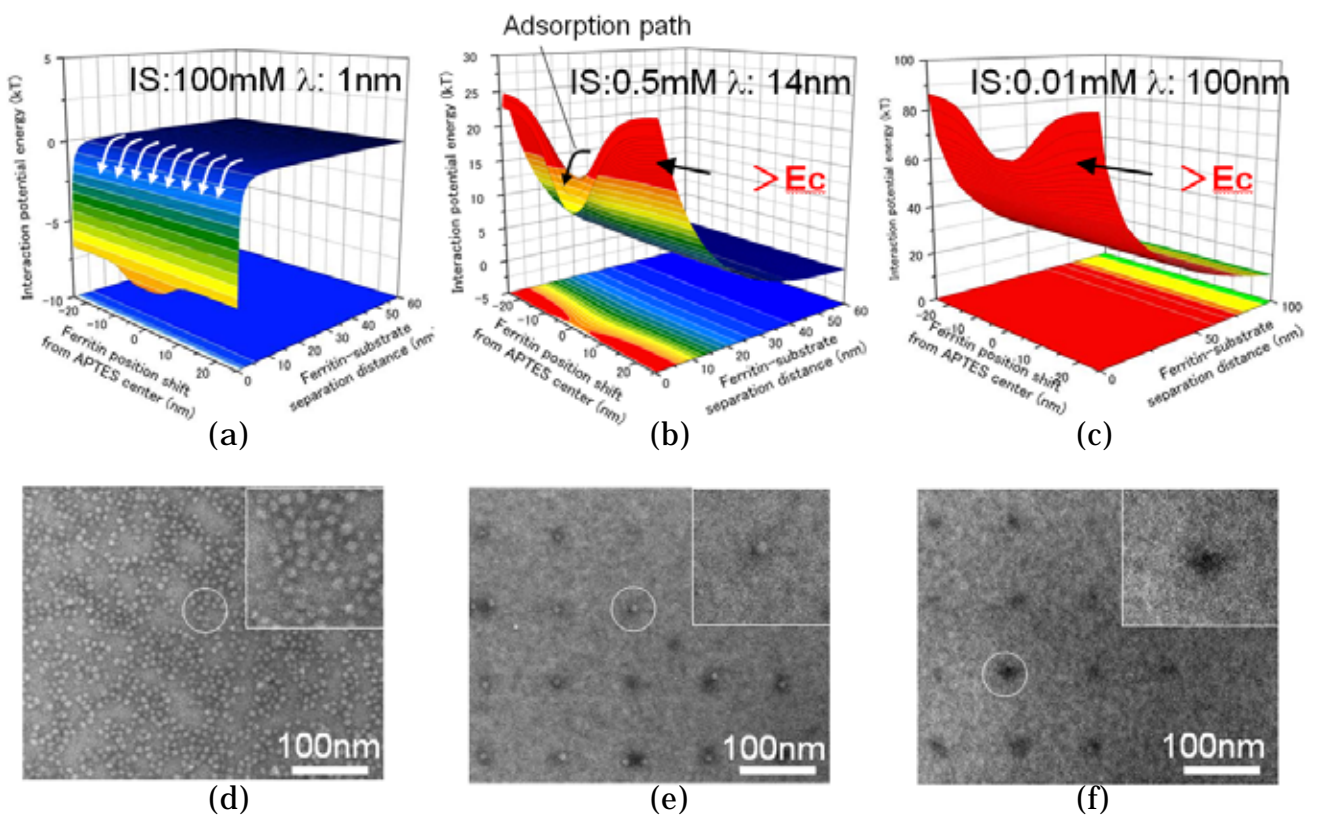


図 5-3: 相互作用ポテンシャル分布: $\lambda =$ (a) 1nm, (b) 14nm, (c) 100nm
およびフェリチン吸着状態: $\lambda =$ (d) 1nm, (e) 14nm, (f) 100nm

以上のように、相互作用ポテンシャル計算による吸着挙動の予測結果と、フェリチン吸着実験の結果は良く対応しており、さらに計算結果に基づいて設計した Debye 長 14nm の溶液条件において、実際に単一フェリチン分子を基板上で配置することに成功した。この結果により、基板-タンパク質間の相互作用を制御することで、タンパク質分子および内包されたナノ粒子を一個ずつ、設計された任意の基板上位置に配置できることが初めて実証できた。

また、上記検討ではいずれも APTES ディスクパターン間隔を 100nm としているが、より狭いパターン間隔でも検討を行った。パターン間隔が接近するにつれ、電子ビーム描画時の近接効果が顕著となり、均一なパターン形状の形成が困難になるが、50nm 間隔および 30nm 間隔で配置した APTES ディスクパターン上においても、上記と同様に単一のフェリチン分子が配置された結果を得られている。

5-4 電荷増強フェリチンを用いた 32-45nm 修飾ディスク上単一配置

本節では、4-4 節の理論解析に基づいて行った、フェリチン分子の遺伝子改変によるタンパク質外側表面の電荷増強と、32nm アミノシランディスク上への単独配置について記述する[3]。

まず、4-4 節の解析により示された指針に基づき、遺伝子操作によるフェリチンタンパク質の外側負電荷の増大を試みた。改変位置は、現在使用している Fer8 のアミノ酸配列[5]および、X 線構造解析による立体構造データ[6]に基づいて、24 量体構造の外側表面に提示されるアミノ酸残基を候補とした。この中から、内部空洞へのコア導入に重要な役割を果たすとされている 3 回対称軸付近を除く領域に位置し、またその性質が静電的に正に荷電しているか、あるいは中性であるアミノ酸残基として、98 番目のリシン、105 番目のリシン、157 番目のグリシン、159 番目のグルタミンを選択した。

まず、Fer8 の DNA 配列に 98 番目のリシンを、負電荷を有するグルタミン酸に改変するポイントミューテーションを導入した DNA 配列を有するプラスミド(pMK2)を作製した。このプラスミドを大腸菌: E. coli strain Nova Blue (Novagen)に導入し、培養・精製を行うことで、改変体 Fer8-K98E を作製した。

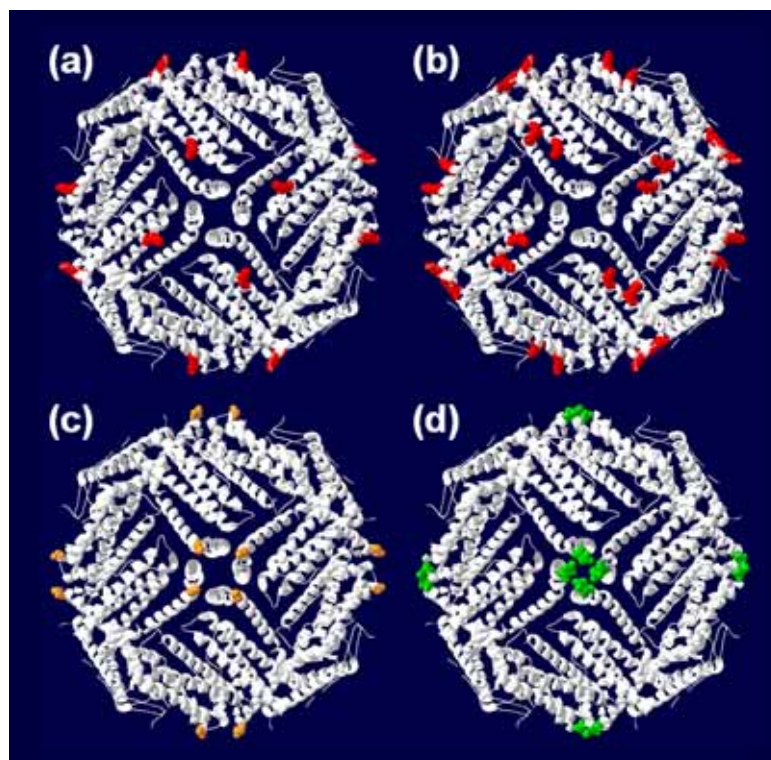


図 5-4 (a)Fer8-K98E, (b)Fer8-K98E-K105E, (c)Fer8-G157E, (d)Fer8-Q159E の各変異体の改変位置

同様に、157番目のグリシン、159番目のグルタミンをそれぞれグルタミン酸に改変した Fer8-G157E、Fer8-Q159E、を作製した。また、98番目のリシンと105番目のリシンの両方をグルタミン酸に改変した Fer8-K98E-K105E も作製した。図 5-4 に各改変体の改変位置を示す。

ここで、98番目と105番目の改変位置は、いずれも、24量体の3回対称軸と4回対称軸の間の中間的な領域に位置しており、157番目と159番目の改変位置は、4回対称軸の周囲に位置している。

作製した改変体は、TEM観察により、いずれも改変前の Fer8 と同じ内径と外径を持つカゴ状構造を保持していることを確認した。これらの改変体に、通常の方法で鉄コアの導入を行った[7]。Fer8-K98E、Fer8-G157E、Fer8-K98E-K105E の3種の改変体では、鉄コア導入後も水溶性を保持し、TEM観察により内部に鉄コアを有することが確認できた。しかし Fer8-Q159E については、鉄コア導入時にタンパク質が沈殿してしまい、水溶性状態で採取することができなかった。Fer8-Q159E における改変位置が4回対称軸に集中しているため(図 5-4(d))、局在化した負電荷が24量体の外側でのミネラルイゼーションを引き起こした可能性がある。

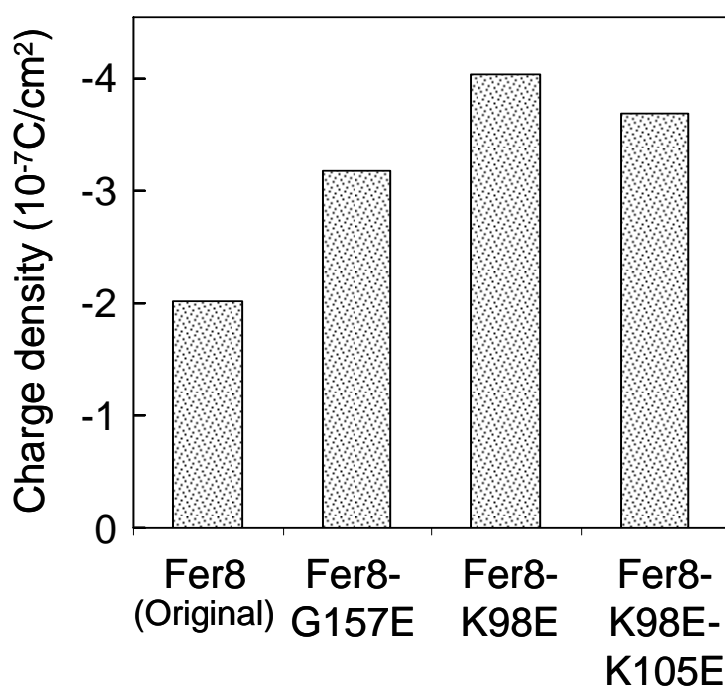


図 5-5 改変前の Fer8, Fer8-G157E, Fer8-K98E, Fer8-K98E-K105E および SiO₂ の表面電荷密度(イオン強度 0.1mM)

作製した鉄コア入り Fer8-K98E、Fer8-G157E、Fer8-K98E-K105E の負電荷導入の効果を評価するため、水溶液中でのゼータ電位を測定し、表

面電荷密度を計算した。結果を図 5-5 に示す。いずれの改変体も、改変前の Fer8 に比較して負電荷密度が増大しており、特に Fer8-K98E の電荷密度は改変前の 2 倍に達している。ここで、中性残基を改変した Fer8-G157E に対して正電荷を有する残基を改変した Fer8-K98E の負電荷量が多いのは予想通りである。一方、2 箇所のリシンを改変した Fer8-K98E-K105E の電荷が 1 箇所しか改変していない Fer8-K98E に比較して低下している原因は明確ではない。接近した位置に導入された追加負電荷が、24 量体の外側表面で Fe イオンを吸着している可能性も考えられる。

上記により、負電荷量を 2 倍に増強した負電荷増強フェリチン(Fer8-K98E)が得られたので、4-4 節の設計に基づき、100nm 間隔で配置した 32nm の APTES ディスク上で吸着配置実験を行った。イオン強度 0.1mM の MES-Tris pH7 溶液を基板の上に滴下して室温で 1 分間保持し、純水にてリンスした後、スピン乾燥した。

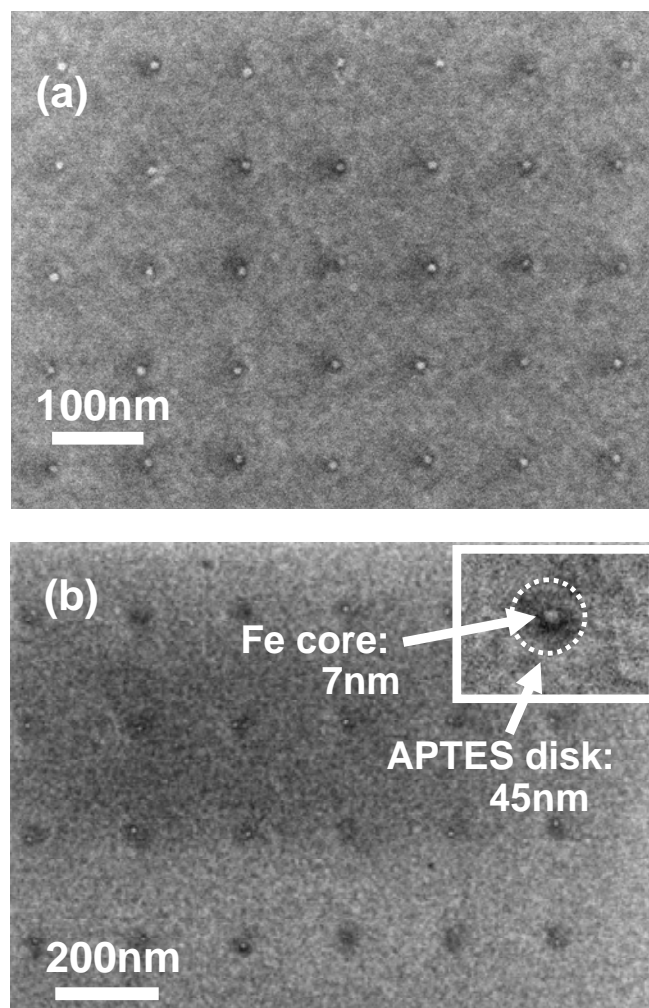


図 5-6 Fer8-K98E を用いた大面積 APTES disk 上基板上単一配置
(a) 32nm disk, イオン強度 0.1mM, (b) 45nm disk, イオン強度 0.01mM

図 5-6(a)にその SEM 観察像を示す。フェリチンサイズよりはるかに大きな 32nm の APTES ディスクパターン上に、単独のフェリチンが吸着していることがわかる。このときの、単一配置率（基板上 APTES ディスク数に対する単独のフェリチンが配置されたディスク数の比）は、90%以上であった。また、さらに大面積の 45nm APTES ディスクパターンでも、検討を行った。45nm ディスクでは、電子ビーム露光時の近接効果によるパターン形状の劣化を防ぎ、また隣接するディスクによる吸着への影響を抑えるため、パターン間隔を 200nm とした。理論解析に基づいてイオン強度 0.01mM の溶液条件を用いることで、上記 45nm の大面積 APTES ディスク上でも単独フェリチンの配置に成功した[図 5-6(b)]。

以上のように、遺伝子改変により表面負電荷を増強したフェリチンを製作することで、タンパク質サイズに比較して大きな 32-45nm のアミノシランディスク上に 7nm ナノドットを 1 個ずつ制御して配置することに成功した。本結果は、静電相互作用を適切に用いることで、立体障害に依存することなく、各サイトへの吸着数を制御できることを示している。

5-6 まとめ

4章の理論解析からの予測に基づき、3章の実験系をリファインして表面修飾の精度を確保することにより、実験的に単独分子を基板上に配置できることを示した。

重金属イオンを用いたアミノシラン修飾部位の染色によりSEM観察によって10~数十ナノメートル台の微細なアミノシラン膜ディスクパターンの直径を定量的に測定する手法を開発した。

次に、上記により作製・評価した15nmの微小ディスクを用いて、4-3節の理論計算により設計した各溶液条件下でフェリチン分子の吸着配置実験を行った。実験結果は理論予測とよく一致し、Debye長14nmの溶液条件にて、単一分子の基板上位置決め配置に初めて成功した[1,2]。

またさらに、4-4節の理論予測に基づき、フェリチン分子の遺伝子改変によるタンパク質外側表面の電荷増強を行った。作製した改変体Fer8-K98Eの電荷密度は、改変前の2倍に達した。この負電荷増強フェリチンを用いて、タンパク質サイズに比較して大きな32-45nmのアミノシランディスク上に7nmナノドットを1個ずつ制御して配置することに成功した[3]。この結果は、静電相互作用を適切に用いることで、立体障害の有無に依存することなく、吸着配置の位置と吸着数の両方を制御できることを示している。

本技術を次世代のフォトリソグラフィ装置と組み合わせることにより、近い将来、電子ビーム露光等を使わずに大面積基板上の任意の位置でナノドットを個別配置できるようになると予想される。

参考文献

- 1) S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, I. Fujiwara, N. Matsukawa, K. Iwahori, and I. Yamashita: *Appl. Phys. Lett.* **88** (2006) 153103.
- 2) S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa, K. Iwahori, and I. Yamashita: *Jpn. J. Appl. Phys.* **45** (2006) 8311.
- 3) S. Yoshii et al., "Specific placement of single nanodots by electrostatic self-alignment of ferritin" submitted.
- 4) T. Furuno, K. M. Ulmer and H. Sasabe: *Microsc. Res. Tech.* **21** (1992) 32.
- 5) S. Takeda: *Biochem. Biophys. Acta.* **1174** (1993) 218.
- 6) Protein Data Bank (PDB) ID code:1DAT.
- 7) S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa, and I. Yamashita: *Jpn. J. Appl. Phys.* **44** (2005) 1518.

第 6 章 結論

本研究では、生体分子を利用した無機ナノ構造の構築プロセス（バイオナノプロセス）における、水溶液中の静電相互作用を利用したタンパク質超分子の基板上への配置制御技術を構築した。

まず、大面積化への適用可能性とアルカリイオン排除の条件を満たし、均質かつ高密度なフェリチン単層膜をシリコン基板上に形成する技術を開発した。また、基板表面を部分的に修飾し、タンパク質-基板間の静電相互作用を利用することで、ナノスケールでフェリチンを選択的に配置して単層膜パターンが形成できることを示した。

さらに、単一ナノドットの配置制御に向け、静電相互作用に基づく水溶液中の相互作用場のモデル化解析手法を構築した。解析に基づく溶液条件を用いて各ディスク上に単一のフェリチン分子を配置できることを示した。さらに理論解析から得られた指針に基づき、遺伝子改変による負電荷増強フェリチンを作製することで、立体障害のない 32-45nm ディスク上でも単一のフェリチン分子を配置できることを示すことができた。

6-1 本論文の主要結果

(1) 高密度フェリチン単層膜のシリコン基板上作製

電子デバイス応用の前提となる、大面積化への適用可能性とアルカリイオン排除の条件を満たし、均質かつ高密度なフェリチン単層膜をシリコン基板上に形成する技術を開発した。シリコン酸化膜表面のアミノシラン（AEAPTMS 分子）修飾と、pH 調整による基板 - タンパク質間の電荷バランス制御により平衡状態での吸着量が制御できた。また酸素中熱処理によりコアの分散状態を維持しつつ外殻タンパク質だけを選択的に除去できることを示した。

(2) フェリチン分子のナノパターンニング

基板表面を部分的に修飾し、タンパク質-基板間の静電相互作用を利用することで、ナノスケールでフェリチンを選択的に配置して単層膜パターンが形成できることを示した。APTES による高密度の電荷配置とイオン強度の制御により 50nm スケールの修飾領域にのみ、選択的にフェリチン分子を吸着させた単層膜パターンを得ることができた。

(3) 表面修飾パターン上へのタンパク質超分子吸着のモデル化と解析

単一ナノドットの配置制御に向け、静電相互作用に基づく水溶液中の相互作用場のモデル化解析を行った。まず溶液中の静電ポテンシャルを数値解析し、さらにその分布から静電エネルギー、エントロピー項、ファンデルワールス力の和として系の自由エネルギー変化を算出し、ナノ領域での吸着障壁ポテンシャルの3次元形状を初めて定量的に解明した。数値解析の結果から静電相互作用に基づく単一分子配置ができる可能性およびその際の溶液条件を示した。さらに、フェリチン外径より大きな直径を有するパターン上でも単一の分子配置ができる可能性と、その実現に向けた指針としてフェリチン電荷の増強が必要であることを示した。

(4) 単一フェリチン分子の基板上配置制御

まずリンタングステン酸と塩化金酸を用いた染色により、これまで困難であった微小アミノシラン分子パターンのSEM観察と形状評価を可能にした。これによりSiO₂表面に15nmのAPTESディスクパターンを作製し、解析に基づく溶液条件を用いて各ディスク上に単一のフェリチン分子を配置できることを示した。

さらに理論解析から得られた指針に基づき、遺伝子操作によりフェリチン外表面に追加負電荷を導入した負電荷増強フェリチンを作製することで、フェリチン分子より大きな32-45nmディスク上でも単一分子を配置できることを示した。

6-2 今後の展開への課題と指針

本研究では、水溶液中の静電相互作用を利用したタンパク質超分子の基板上への配置制御技術と吸着配置の解析手段を示したが、そこから得られた今後の展開に向けた課題と指針を以下に述べる。

本研究では、支配的な溶液中相互作用として静電相互作用に着目し、一部ファンデルワールス力も考慮して配置制御と解析を行った。しかし、水溶液中の相互作用としては、他にも親水・疎水相互作用、水素結合等の近距離相互作用がある。また、本研究の解析では、タンパク質表面電荷が分子表面に均一に分布するものと仮定して取り扱っている。このため、極端に疎水性の高いパターンや、特殊なアダプターを備えた表面認識タンパク等に対して本研究の手法を直接適用することはできない。

ここで、分子の立体構造に基づく表面の電荷分布の偏りをモデルに導入すれば、タンパク質と基板間の双極子-双極子相互作用に起因する近距離相互作用や、タンパク質による特定基板表面認識機能等を解析できる可能性がある。さらに他の近距離相互作用の影響も考慮したモデルを構築することで、包括的に溶液中の生体分子や各種ナノ粒子の挙動を解明できるようになると期待される。

また、本研究では、球状（カゴ状）超分子を取り扱ったが、この手法を発展させることで、棒状やテトラポッド状等、さらに高次の構造についても基板上配置の挙動を解明できると期待される。このためには、計算量の増大に対応できる計算手段の工夫や、検証に必要な実験系の構築が必要となり、今後の更なる検討が必要である。

なお、本研究ではタンパク質超分子であるフェリチンの配置を取り扱ったが、本手法は、化学的な手法で作製した各種コロイド粒子やミセル/逆ミセル構造、 dendrimer 等の巨大分子等の配置に対しても同様に適用できる。化学的な手法により、より高密度の電荷を有する粒子体や、より自由な粒径制御が可能と考えられる。一方で、フェリチンをはじめとするタンパク質は、その形状・機能を遺伝子情報により一意的に決められるという利点を持つ。同一の形状・電荷を有する均質なナノ粒子を容易に得られるので、再現性の高い単一ナノドット配置等には好適である。将来的には、このようなタンパク質の均質性・設計性と化学的手法の高い自由度を組み合わせることで、より高機能のナノ粒子を生み出せる可能性がある。例えば遺伝子改変により外部表面の特定位置に SH 基を有するシステインを導入し、そこに高電荷を有する dendrimer 等を固定すれば、非常に高密度の電荷を有する複合体ナノ粒子ができる可能性がある。ナノ粒子

の電荷密度を高め、強い粒子間斥力状態を保ちつつ基板表面層に高密度で閉じ込めることができれば、事前にパターンニング等を行うことなく自己組織的に2次元コロイド結晶を形成できる可能性もある。

また、本研究では配置の基礎となる電荷パターンの形成手段として、次世代のフォトリソグラフィーを主に想定したが、この他にも AFM チップを用いたディップペン・リソグラフィーや、ナノインプリント技術等を用いることもできる。これらのより自由度の高いパターン形成技術と、タンパク質の自己組織的配置と組み合わせることで、ナノドット列や2次元ナノドット配列等を所望の位置に形成できる可能性もある。

本研究の溶液内相互作用の解析・設計手法を基礎として、より一般的でかつ高次の機能構造を自在に構築できるウエット系ナノ構造構築技術が発展することを願い、本論文の結びとする。

研究業績

本研究の主な原著論文

- 1 . “Making Monolayer of Inorganic Nanoparticles on Silicon Substrate”
Shigeo Yoshii, Kiyohito Yamada, Nozomu Matsukawa and Ichiro Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005) 1518.

- 2 . “Nano-patterning of vapor-deposited aminosilane film by using EB lithography for ferritin protein adsorption”
Shinya Kumagai, Shigeo Yoshii, Kiyohito Yamada, Isamu Fujiwara, Nozomu Matsukawa and Ichiro Yamashita: J. Photopolym. Sci. Technol. **18** (2005) 495.

- 3 . “Electrostatic placement of nanodots onto silicon substrate using ferritin protein supramolecules with control of electrostatic interaction in solution”
Shinya Kumagai*, Shigeo Yoshii*, Kiyohito Yamada, Nozomu Matsukawa, Kenji Iwahori and Ichiro Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **45** (2006) 8311.
* equal contributors

- 4 . “Electrostatic placement of single ferritin molecules”
Shinya Kumagai, Shigeo Yoshii, Kiyohito Yamada, Nozomu Matsukawa, Isamu Fujiwara, Kenji Iwahori and Ichiro Yamashita: Appl. Phys. Lett. **88** (2006) 153103.

- 5 . “Specific placement of single nanodots by electrostatic self-alignment of ferritin”
Shigeo Yoshii, Shinya Kumagai, Ayako Kadotani, Kazuaki Nishio and Ichiro Yamashita: submitted.

本研究に関する参考論文

1 . “High-Density and Highly Surface Selective Adsorption of Protein Nanoparticle Complexes by Controlling Electrostatic Interaction”

Kiyohito Yamada, Shigeo Yoshii, Shinya Kumagai, Isamu Fujiwara, Kazuaki Nishio, Mitsuhiro Okuda, Nozomu Matsukawa and Ichiro Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **45** (2006) 4259.

2 . “Floating Gate Metal-Oxide-Semiconductor Capacitor Employing Array of High-Density Nanodots Produced by Protein Supramolecule”

Kiyohito Yamada, Shigeo Yoshii, Shinya Kumagai, Atsushi Miura, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki and Ichiro Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **45** (2006) 8946.

3 . “Influence of Dot Density and Size on Charge Injection Characteristics in Nanodots Array Produced by Protein Supramolecules”

Kiyohito Yamada, Shigeo Yoshii, Shinya Kumagai, Atsushi Miura, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki and Ichiro Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **46** (2007) 7549.

4 . “Reduction of Core in Cage Protein for Application to Electron Device”,
Takio Hikono, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki, Shigeo Yoshii, Ichiro Yamashita and Masaki Takeguchi: Surf. Sci. **600** (2006) 2817.

5 . “Electron confinement in a metal nanodot monolayer embedded in silicon dioxide produced using ferritin protein”,

Takio Hikono, Takashi Matsumura, Atsushi Miura, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki, Masaki Takeguchi, Shigeo Yoshii and Ichiro Yamashita: Appl. Phys. Lett. **88** (2006) 023108.

6 . “Floating Nanodot Gate Memory Devices Based on Biomineralized Inorganic Nanodot Array as a Storage Node”,

Atsushi Miura, Takio Hikono, Takashi Matsumura, Hiroshi Yano, Tomoaki Hatayama, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki, Shigeo Yoshii and Ichiro Yamashita: Jpn. J. Appl. Phys. **45** (2006) L1.

7 . “Bionanodot monolayer array fabrication for nonvolatile memory application”,

Atsushi Miura, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki, Shinya Kumagai, Shigeo Yoshii, Nozomu Matsukawa and Ichiro Yamashita: Surf. Sci. **601** (2007) L81.

8 . “In Aqua Structuralization of a Three-Dimensional Configuration Using Biomolecules”

Ken-Ichi Sano, Shigeo Yoshii and Ichiro Yamashita: Nano Lett. **7** (2007) 3200.

9 . “Using the Ring-Shaped Protein TRAP to Capture and Confine Gold Nanodots on a Surface.”

Jonathan G. Heddle, Isamu Fujiwara, Hirokazu Yamadaki, Shigeo Yoshii, Kazuaki Nishio, Christine Addy, Ichiro Yamashita and Jeremy R. H. Tame: Small **3** (2007) 1950.

10 . “Floating nanodot gate memory fabrication with biomineralized nanodot as charge storage node”,

Atsushi Miura, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki, Shigeo Yoshii and Ichiro Yamashita: J. Appl. Phys., in press.

本研究に関する国際学会発表

1. S. Yoshii, I. Yamashita, "Biological Pathway to the Nanoelectronics Devices" Fourth International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration (AFI/TFI) Sendai (2004).
2. S. Yoshii , I. Yamashita, "Fabrication of inorganic nanoparticle array on a solid wafer from cage-shaped proteins" 229th ACS National Meeting San Diego (2005).
3. K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, I. Fujiwara, K. Nishio, N. Matsukawa, I. Yamashita, "Fabrication of high density nanoparticles on Si substrate using cage-shaped proteins", The 24th Electronic materials symposium Matsuyama (2005).
4. K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, I. Fujiwara, K. Nishio, I. Yamashita, "High density and surface-selective adsorption of ferritins for nano-electronics devices" Pachifichem2005 Honolulu (2005).
5. S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, I. Fujiwara, N. Matsukawa, I. Yamashita, "Single ferritin molecule placement on silicon substrate using electrostatic interaction in solution" International Symposium on Surface Science and Nanotechnology, Saitama (2005).
6. S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, I. Fujiwara, N. Matsukawa, I. Yamashita, "Nano-patterning of Vapor-deposited Aminosilane Film by using EB Lithography for Ferritin Protein Adsorption" The 22nd Conference of Photopolymer Science and Technology, The International Symposium 2005 Materials & Processes for Advanced Microlithography and Nanotechnology, Chiba (2005).
7. S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa, K. Iwahori, I. Yamashita "Nanodot placement on silicon substrate by using ferritin protein with control of Debye length in solution" 6th International Conference on Recent Plasmas and 23rd Symposium on Plasma Processing, Sendai(2006) JAN.23-27.

8. P. Panchaipetch, T. Hikono, Y. Uraoka, T. Fuyuki, S. Yoshii, I. Yamashita, "Floating gate memory devices based on biomineralized nanodots embedded in high-k gate dielectrics" 2006 IEEE Silicon Nanoelectronics Workshop (SNW 2006), Honolulu (2006) JUN. 11-12.
9. S. Yoshii, I. Yamashita, "Protein-based nanostructure fabrication: Bio Nano Process" 2006 ASME/JSME Joint Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE 2006) Santa Clara (2006) JUN.21-23, Invited talk.
10. K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, I. Yamashita, "MOS capacitor memory with embedded inorganic cores being synthesized and arrayed by protein supramolecule" The 25th Electronic materials symposium(EMS25), Shizuoka (2006) JUL.5-6.
11. K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, A. Miura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, I. Yamashita, "High-Density Floating Nanodots Memory Produced by Cage-Shaped Protein " Solid State Devices and Materials (SSDM 2006), Yokohama (2006) SEP.12-15.
12. S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, K. Nishio, N. Matsukawa, K. Iwahori, I. Yamashita, "Synthesis and nano-placement of nano-particle using cage-shaped protein" 2007 American Physics Society March Meeting, Colorado convention center, Denver (2007) MAR. 5-9.
13. S. Kumagai, S. Yoshii, N. Matsukawa, R. Tsukamoto, K. Nishio, I. Yamashita, "Novel process for single electron transistor using cage-shaped protein ferritin" 26th Electronic Materials Symposium EMS-26 (2007) Jul.4-6.
14. S. Kumagai, S. Yoshii, N. Matsukawa, R. Tsukamoto, K. Nishio, I. Yamashita, "Fabrication of single electron transistor using cage-shaped protein Supramolecule" the 2007 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2007), Tsukuba, (2007) Sep.18-21.

15. K. Yamada, S. Yoshii, S. Kumagai, A. Miura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, I. Yamashita, "Floating Gate MOS Capacitor with High-Density Nanodots Array Produced by Protein Supramolecule" the 2007 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2007), Tsukuba, (2007) Sep.18-21, The highly Notable Papers of SSDM2007.
16. T. Matsumura, A. Miura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, S. Yoshii, I. Yamashita, "Reduction of a Ferritin Core Embedded in Silicon Oxide Film for An Application to Floating Gate Memory" the 2007 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2007), Tsukuba, (2007) Sep.18-21.
17. S. Kumagai, T. Ono, R. Tsukamoto, S. Yoshii, I. Yamashita, "Aligned Growth of Carbon Nanotube using Protein Supramolecule" AVS 54th International Symposium & Exhibition, Seattle (2007) Oct.14-19.
18. S. Yoshii, A. Kadotani, S. Kumagai, K. Nishio, I. Yamashita, "Electrostatic Nano-placement of a Single Nanoparticle by Charge-enhanced Protein Cage" MRS Fall Meeting 2007, Boston (2007) Nov. 26-30.
19. M. Kobayashi, R. Tsukamoto, K. Ishikawa, H. Nakagawa, S. Yoshii, H. Tabata, Y. Watanabe, I. Yamashita, "Fabrication of Nano-scaled Structures Using Genetically Engineered Tobacco Mosaic Virus." MRS Fall Meeting 2007, Boston (2007) Nov. 26-30.
20. J. G. Heddle, S. Yoshii, K. Nishio, C. Addy, I. Yamashita, J. R. H. Tame, "Using a Ring Protein to TRAP and Insert Gold Nanodots in a MOS" MRS Fall Meeting 2007, Boston (2007) Nov. 26-30.

本研究に関する国内学会発表

1. 山田聖人、吉井重雄、上田路人、松川望、山下一郎、「Si 基板上のアミノシラン系表面処理膜及び吸着タンパク質除去の検討」第 51 回応用物理学関係連合講演会 東京 3/28-31 (2004)
2. 山田聖人、吉井重雄、熊谷慎也、藤原勇、松川望、西尾和晃、山下一郎、「リステリアフェリチンを用いたナノ粒子の Si 基板上 $10^{12}/\text{cm}^2$ 高密度配置」第 52 回応用物理学関係連合講演会 埼玉 3/29-4/1 (2005)
3. 熊谷慎也、山田聖人、吉井重雄、藤原勇、松川望、山下一郎、「蒸気法アミノ基修飾による高密度フェリチンタンパク質選択配置」第 52 回応用物理学関係連合講演会 埼玉 3/29-4/1 (2005)
4. 松村貴志、彦野太樹夫、三浦篤志、浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山下一郎、「フェリチンタンパク質酸化物コアの非結晶 Si 薄膜中熱処理による還元」第 52 回応用物理学関係連合講演会 埼玉 3/29-4/1 (2005)
5. 藤原勇、吉井重雄、山田聖人、熊谷慎也、西尾和晃、岩堀健治、山下一郎、「ZnSe-フェリチンの基板上固定と ZnO ナノ粒子作製の検討」第 66 回応用物理学会学術講演会 徳島 9/7-11 (2005)
6. 藤原勇、吉井重雄、西尾和晃、Heddle Jonathan、山下一郎、「システインを導入した TRAP による基板上 Au ナノ粒子の固定」第 43 回日本生物物理学会年会 北海道 11/23-25 (2005)
7. 山田聖人、吉井重雄、熊谷慎也、藤原勇、西尾和晃、山下一郎、「アミノシラン表面修飾を用いたリステリアフェリチンの高密度ナノパターンニング」第 66 回応用物理学会学術講演会 徳島 9/7-11 (2005)
8. 熊谷慎也、吉井重雄、山田聖人、藤原勇、松川望、山下一郎、「蒸気法アミノ基修飾による単一フェリチンタンパク質粒子選択配置」第 66 回応用物理学会学術講演会 徳島 9/7-11 (2005)
9. 松村貴志、三浦篤志、彦野太樹夫、浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山下一郎、「フェリチンタンパク質酸化物コアの非結晶 Si 薄膜中熱処理による還元 - 」第 66 回応用物理学会学術講演会 徳島 9/7-11 (2005)

10. 熊谷慎也、吉井重雄、山田聖人、山下一郎、「静電相互作用による基板
上への単一フェリチンタンパク質分子位置制御」第 53 回応用物理学関
係連合講演会 東京 3/22-26 (2006)
11. 松村貴志、三浦篤志、彦野太樹夫、浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山
下一郎、「フェリチンタンパクコアをフローティングゲートとした MOS
デバイスの電気特性」第 53 回応用物理学関係連合講演会 東京 3/22-26
(2006)
12. 三浦篤志、松村貴志、浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山下一郎、「コバ
ルトコア内包フェリチンタンパクを用いた MOS デバイスの電気特性」
第 53 回応用物理学関係連合講演会 東京 3/22-26 (2006)
13. 松村貴志、三浦篤志、浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山下一郎、「フェ
リチンタンパク質コアの非晶質 Si 薄膜中熱処理による還元」応用物理
学会 シリコンテクノロジー分科会 第 82 回研究集会 広島 6/21(2006)
14. 熊谷慎也、吉井重雄、山田聖人、山下一郎、「静電相互作用による単
一フェリチンタンパク質分子配置」第 67 回応用物理学会学術講演会滋
賀 8/29-9/1 (2006)
15. 齋藤卓、久保田智広、熊谷慎也、吉井重雄、山下一郎、寒川誠二「単
一フェリチン選択配置を用いたナノ構造の作製」第 67 回応用物理学会
学術講演会 滋賀 8/29-9/1 (2006)
16. パンチャイペッチプラカイペッチ、矢野裕司、畑山智亮、浦岡行治、
冬木 隆、吉井重雄、山下一郎、「High-K 絶縁膜に埋め込まれた バイ
オナノドットフローティングゲートメモリー」第 67 回応用物理学会学
術講演会 滋賀 8/29-9/1 (2006)
17. 三浦篤志、浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山下一郎、「バイオナノコア
を用いた MOS デバイスの作製・評価と単一コアの電気特性」第 67 回
応用物理学会学術講演会 滋賀 8/29-9/1 (2006)
18. パンチャイペッチプラカイペッチ、三浦篤志、浦岡行治、冬木隆、吉
井重雄、山下一郎「フェリチンタンパクを利用したフローティングゲー
トメモリー~High-K ゲート絶縁膜による高性能化~」応物薄膜・表面物理
/シリコンテクノロジー分科会共催第 12 回特別研究会 静岡 2/2-3 (2007)

19. 吉井重雄、熊谷慎也、山田聖人、山下一郎、「単一リステリアフェリチン分子の基板上配置制御」第 54 回応用物理学関係連合講演会 神奈川 3/27-30 (2007)
20. 山田聖人、吉井重雄、熊谷慎也、三浦篤志、浦岡行治、冬木隆、山下一郎、「リステリアフェリチンによる高密度ナノドット配列埋め込み MOS キャパシタ」第 54 回応用物理学関係連合講演会 神奈川 3/27-30 (2007)
21. 山抱弘和、藤原勇、吉井重雄、西尾和晃、山田聖人、Jonathan Heddle、Jeremy Tam、三浦篤志、浦岡行、冬木隆、山下一郎、「表面認識 TRAP タンパク質による金属ナノドット埋め込み MOS キャパシタの作製」第 54 回応用物理学関係連合講演会 神奈川 3/27-30 (2007)
22. 吉井重雄、門谷文子、西尾和晃、熊谷慎也、山下一郎、「電荷増強フェリチンによる大面積パターン上単一分子配置」第 68 回応用物理学学会学術講演会 北海道 9/4-8 (2007)
23. 熊谷慎也、吉井重雄、松川望、塚本里加子、西尾和晃、山下一郎、「フェリチンタンパク質を利用した単電子トランジスタ構造の作製」第 68 回応用物理学学会学術講演会 北海道 9/4-8 (2007)
24. 山田聖人、吉井重雄、熊谷慎也、三浦篤志、浦岡行治、冬木隆、山下一郎、「密度制御バイオナノドット埋め込み MOS キャパシタの作製と電気特性評価」第 68 回応用物理学学会学術講演会 北海道 9/4-8 (2007)
25. 浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山下一郎、「バイオ系新材料を用いて作製した低温多結晶シリコン薄膜トランジスタ」第 68 回応用物理学学会学術講演会 北海道 9/4-8 (2007)
26. 吉井重雄、熊谷伸也、松川望、西尾和晃、山下一郎、「ナノ粒子のパターニングと配置」第 55 回応用物理学関係連合講演会 千葉 3/27-30 (2008)
27. 浦岡行治、冬木隆、吉井重雄、山下一郎、「バイオ技術で作る次世代ディスプレイ「システムオンパネル」」第 55 回応用物理学関係連合講演会 千葉 3/27-30 (2008)

28. 熊谷慎也、吉井重雄、西尾和晃、山下一郎、「異種ナノ粒子の静電パターン配置」第 55 回応用物理学関係連合講演会 千葉 3/27-30 (2008)
29. 熊谷慎也、小野崇人、吉井重雄、山下一郎、「フェリチンナノ粒子パターン配置を利用したカーボンナノチューブ位置決め成長」第 55 回応用物理学関係連合講演会 千葉 3/27-30 (2008)
30. 山田聖人、吉井重雄、熊谷慎也、三浦篤志、浦岡行治、冬木隆、山下一郎、「サイズ・密度制御バイオナノドット単層配列の作製と電荷注入評価」第 55 回応用物理学関係連合講演会 千葉 3/27-30 (2008)

謝辞

本研究は著者が、奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 メゾスコピック物質科学講座において、山下一郎教授の御指導を賜ることでここに博士論文としてまとめることができたものです。山下一郎教授には本研究を進める過程において、多大なる御支援と激励をいただきました。また、日々の研究に関する議論は非常に有益で、多くのことを学ばせていただきました。ここに深く感謝いたします。

本学 バイオミメティック科学講座 菊池純一教授には本研究の理論構成や課題への取組みについて多くの御助言と有意義な御指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本学 微細素子科学講座 冬木隆教授には本研究の実施に多くの御支援をいただき、また本論文をまとめるにあたって有意義な議論と御指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本学 量子物性科学講座 柳久雄教授には本研究の節目において多くの有意義な御指導をいただき、応用面に関しても有益な御提言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本学 微細素子科学講座研究室 浦岡行治准教授には、本研究を進める上で数々の有意義な議論をいただき、応用面について有益な御提言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本学 微細素子科学講座研究室 矢野裕司助教、畑山智亮助教、三浦篤志博士、岡本尚文氏には多く有益な議論、御提言と御協力をいただきました。ここに厚くお礼申し上げます。

松下電器産業(株)先端技術研究所の上野山雄所長、江田和生前所長、飯島賢二所長、瀬恒謙太郎博士、辻村歩氏、田中英行博士、上田路人博士、松川望氏、西尾和晃博士、熊谷慎也博士、松井拓郎博士、奥田充宏博士、山田聖人博士、田中秀典氏、鈴木容子女史、小原麻実女史には日頃より有益な御指導と多くの御支援を賜りました。ここに深く感謝いたします。熊谷慎也博士には本研究の理論面と実験系構築において日々有意義な議論と多大な御協力をいただきました。松川望氏、西尾和晃博士、山田聖人博士、田中秀典氏には数多くの御助言と御協力をいただきました。厚くお礼申し上げます。

(独)科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業チーム(CREST)の岩堀健治博士、三島由美子博士、杉本健二博士、村岡雅弘博士、小林未明博士、中川博道博士、塚本里加子女史、慶澤景子女史、岸本直子女史、門谷文子

女史、山根みどり女史には有意義な議論と御協力を賜りました。ここに深く感謝いたします。門谷文子女史には、フェリチンタンパク質の改変に関して多くの知見と御協力をいただきました。岩堀健治博士、塚本里加子女史には変異体フェリチンと各種コア合成フェリチンに関して御指導と御協力をいただきました。厚くお礼申し上げます。

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 メゾスコピック物質科学講座の白坂雅子女史、松下電器産業(株)先端技術研究所の巽紀子女史には様々な事務面でのサポートをしていただき、円滑に研究を進めることができました。ここに深く感謝いたします。

最後に、精神的にいつも支えてくれた妻 美和子、両親、姉、親戚一同に心から感謝いたします。

2008年3月
吉井 重雄