

DNA のレーザー分子線堆積に基づくニューパラダイム：

新奇ハイブリッド薄膜材料の創製

松木 伸行^{*1}, 有賀 克彦², 小野 晶³, 亀山 敦⁴, 佐藤知正⁵, 山口 栄雄⁶, 横澤 勉³

A New Paradigm Based on Laser Molecular Beam Deposition of DNA:

Creation of Novel Hybrid Thin Film Materials

Nobuyuki MATSUKI^{*1}, Katsuhiko ARIGA², Akira ONO³, Atsushi KAMEYAMA⁴,Tomomasa SATO⁵, Shigeo YAMAGUCHI⁶ and Tsutomu YOKOZAWA³

1. 緒言

現在、創薬や医療技術の進展は著しく、それらを支援するための生体分子材料による様々な機能素子の開発も進められている。表 1 に、そのような機能素子と想定される応用例を示す。

表 1 生体分子材料による種々の想定されるデバイス例[1]

機能別分類		デバイス例
センサ	分子認識センサ	有害物質検知器、ウイルス・細菌検知器、人探知器、嗅覚・味覚センサ、血糖・乳酸・疾病マーカー測定器、DNA シーケンサー
	物理センサ	視覚・聴覚・触覚センサ、温度・発汗センサ
リアクタ	物質生産	ペプチド合成(酵素生産含む)、核酸合成(食品添加物含む)、水浄化膜、VOC 処理用生物膜、メタン変換気相リアクタ
	エネルギー生産	酵素発電機、微生物発電機、生物電気器官発電機
アクチュエータ	ウェットロボティクス	人工臓器(ハイブリッド型)、心筋細胞ポンプ、昆虫・動物細胞ロボット、ハイブリッド昆虫・魚
	分子ロボティクス	アメーバ型・スライム型分子ロボット、分子機械
プロセッサ	バイオコンピュータ	DNA コンピュータ、粘菌コンピュータ
その他	バイオチップ	DNA チップ、ペプチドチップ、細胞チップ、臓器チップ
	機能性材料	DNA ストレージ、DNA オリガミ(2D・3D ナノ構造体)

上記のデバイスを具現化する際、電気信号処理回路と組み合わせることが想定されるため、従来のデバイスと親和性の高い形態として構成されていることが望ましい。生体分子材料による分子認識や分子反応の機能を用いて、それを電気信号に変換するデバイスを作製する場合、その基本構造としては図 1 に示すように、反応部(Reaction part)・伝達部(Transduction part)、基板部(Substrate part) から成る基本構造が想定される。

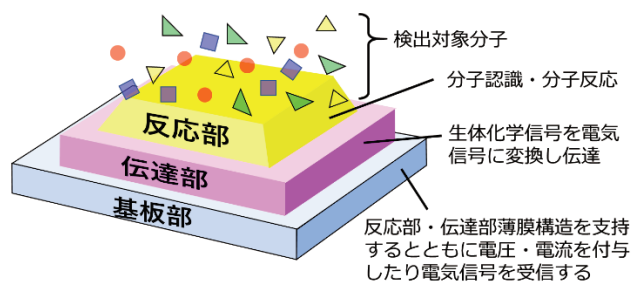


図 1 生体分子材料に基いたデバイスの基本構造例

表 1 のデバイス例一覧を見ると、DNA (Deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸) に関わる材料やデバイスが広範な分野の応用例に含まれており、これらが今後の新型機能素子材料として注目されていることがわかる。DNA は 2'-デオキシリボース(五炭糖)、リン酸、およびプリン塩基であるアデニン(A)とグアニン(G)、そしてピリミジン塩基であるシトシン(C)とチミン(T)から構成され、生物の遺伝情報機能を担う高分子生体物質の一つである。2'-デオキシリボースの 5'位部分にリン酸がエステル結合し、1'位部分に A, G, C, T のうちいずれかの塩基が結合した基本構成単位が「デオキシリボヌクレオチド」であり、この基本構成単位がさらにリン酸基部分を介して連続結合し 1 本の螺旋状分子鎖となったものが DNA 構造の方半分である 1 本鎖 DNA に相当する。A と T は 2 つの水素結合、C と G は 3 つの水素結合でそれぞれ対結合する「相補的塩基対」の性質を有している。1 本鎖 DNA と A, G, C, T を含むヌクレオチド(デオキシアデノシン-リン酸:dAMP, デオキシグアノシン-リン酸:dGMP, デオキシシチジン-リン酸:dCMP, チミジン-リン酸:dTMP) とポリメラーゼ酵素が一定条件の下で同時に存在するとポリメラーゼ酵素の働きによってそれぞれの相補塩基

^{*1} 准教授 電気電子情報工学科
Associate Professor, Dept. of Electrical, Electronics and Information Engineering

² 教授 東京大学大学院新領域創成科学研究科/ グループリーダー 国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点超分子グループ
Professor, Dept. of Adv. Materials Science, The Univ. of Tokyo; Group Leader, Nano-Materials Field, Supermolecules Group, International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

³ 教授 物質生命化学科
Professor, Dept. of Material and Life Chemistry

⁴ 教授 化学教室
Professor, Dept. of Chemistry

⁵ 助手 電気電子情報工学科
Research Assistant, Dept. of Electrical, Electronics and Information Engineering

⁶ 教授 電気電子情報工学科
Professor, Dept. of Electrical, Electronics and Information Engineering

が次々に対結合し、最終的に DNA は 2 本鎖の二重螺旋構造として構築される。この二重螺旋構造を比喩的に表せば、長い梯子（はしご）の上下両端を掴んでねじったような構造であり、足を掛ける「踏棧（とうざん）」の部分がヌクレオチド同士の水素結合部分、支柱部分がリン酸結合にそれぞれ相当する。

分子生物学および遺伝子工学の進展に伴って DNA を任意の構造に切断・結合・複製できる技術が開発されると、DNA の構造や機能が着目され、電子デバイスを構成する「機能性材料」として利用できないだろうかという考えが提唱されるようになった[2, 3]。DNA により発現させる主な機能として以下のようなものが期待されている。

- | | |
|--------------------|------------------|
| 1. 電気伝導性とその変化[4-6] | 5. 分子触媒[12] |
| 2. ナノ構造[7] | 6. ナノデバイス[13] |
| 3. 演算[8] | 7. ナノマシン[14, 15] |
| 4. 分子認識[9-11] | 8. DNA 認証 [16] |

これらの機能を有するデバイスを作製するためには、DNA を分子層レベルで平坦に再現性良く制御堆積する技術が求められる。従来、基板上に DNA を製膜する方法としては DNA 溶液をスピコート法やインクジェット法によって塗布した後、乾燥固化させる手法が一般的であったが、この方法では均一な膜厚や表面平坦性を得ることが困難であった。そこで本研究では、高融点無機材料や低分子材料の薄膜化に威力を発揮してきた物理蒸着法であるレーザー分子線堆積法（Laser Molecular Beam Deposition: LMBD）[17]に着目した。超高真空において、材料分子の分解エネルギーよりも低いエネルギー領域の赤外レーザーを有機原料へ局所的・短時間照射することによって材料分子の変性を抑制しつつ基板上へ分子層レベルで膜厚を制御しながら堆積することが可能である[18, 19]。しかしながら、DNA に対するレーザーを用いた堆積手法の実施例が極めて限られており[20, 21]、筆者の調べた範囲では実験条件や製膜された DNA 固体薄膜の物性に関する報告が殆どなされていない。

本研究は、LMBD によって、DNA がベースとなった新奇な機能性固体薄膜の創製を目指し、DNA 薄膜の作製プロセス条件を探索すること、および作製された DNA 薄膜の諸物性について知見を得ることを目的として開始した。

2. 実験方法

図 2, 3 に本研究で用いた LMBD 装置の構造模式図および外観写真をそれぞれ示す。ターボ分子ポンプ排気によって基本真空度を 4×10^{-5} Pa に維持可能なチャンパー内部には、上部に基板を取り付けたホルダーを固定する箇所があり、下部には 4 種類のターゲット材料を自転・公転できるターゲットカールセルが設置されている（本実験では 1 種類のターゲットのみ使用）。チャンパー側面に 45° の角度で取り付けられた合成石英ガラス窓を通じて、半導体発振赤外レーザー（波長：808 nm）をターゲット上にレンズで集光しターゲット材料を昇華・蒸散させる。製膜速度はチャンパー内に取り付けられた水晶振動子膜厚モニターにより 0.1 \AA/s の精度で計測可能となっている。基板直下にはステッピングモーター駆動の可

動マスクが設置してあり、基板上への分子線照射を遮蔽するシャッターの役割を担うとともに、製膜中にこの可動マスクを一定速度で動かすことによって、図 4 に示すように基板上へ膜厚が直線的に傾斜した製膜を行うことが可能である（マスクを特定箇所で停止させることにより階段状の膜厚変化を有する試料作製も可能）。本実験では以下の条件によって試料を作製した。

[基板] Si(100) n-type 42 mm × 19 mm × 0.5 mm をアセトン、エタノール、超純水により洗浄後エアブローにて乾燥させた後に基板ホルダーへ取付けてロードロック室を介し製膜チャンパー内に導入（自然酸化膜除去なし）。

[基板温度] 室温（23 °C）

[ターゲット材料] サケ精子由来乾燥 DNA 粉末 (MP Bio Japan)

[レーザー] 半導体連続発振赤外レーザー（波長：808 nm, Directphotonics, DIRECTBOND 800), 出力 1.8~2.5 W

[製膜速度] 平均製膜速度 0.48 \AA/s

[製膜プロセス] 製膜前に可動マスクを基板端までフルオープンし、製膜速度を調整した後に 77 \mu m/s の速度で可動マスクを閉じる（基板を覆う）方向へ動かして膜厚傾斜堆積を行った。

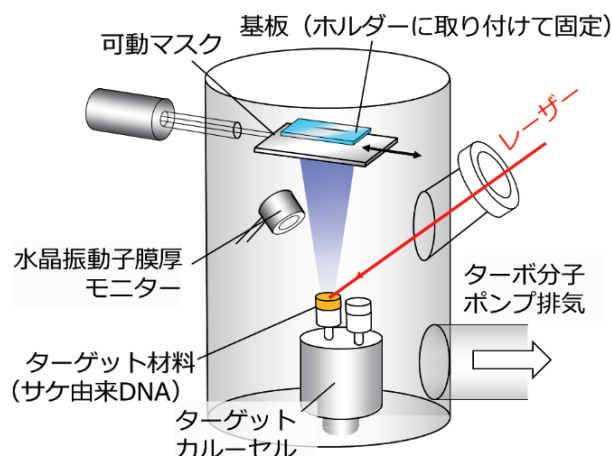


図 2 LMBD 装置の構造模式図

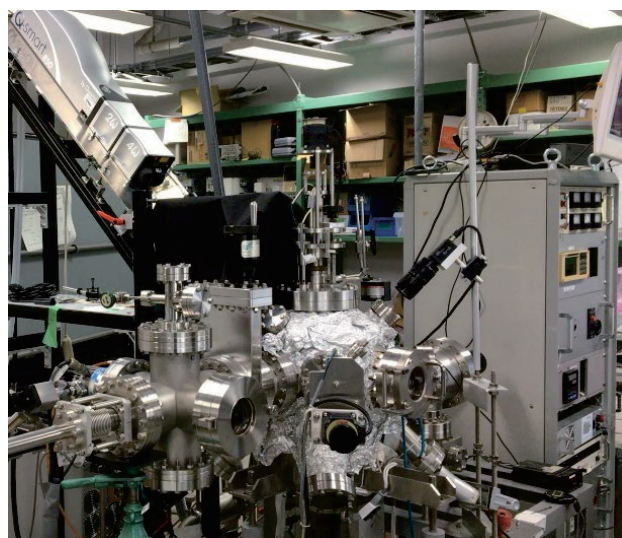


図 3 LMBD 装置の外観写真



図4 製膜中の可動マスク等速駆動による膜厚傾斜製膜の模式図

また、比較のためにキャスト法によっても製膜を行った。図5に示すように、超純水中にサケ精子由来乾燥DNA粉末を溶解させて作製した溶液を上述と同様のSi(100)基板上へ滴下した後、シリカゲルで満たした密閉容器中に基板を常温で96時間保持して乾燥させた。

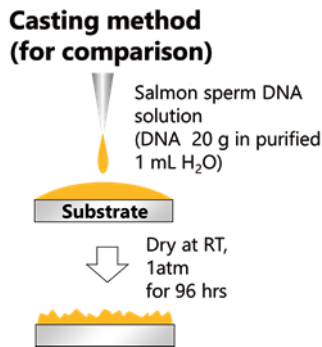


図5 キャスト法による製膜プロセス

製膜後は以下に示すそれぞれの方法で堆積薄膜の物性評価を行った。

[表面形状] 走査型白色干渉計

[表面粗さ] 原子間力顕微鏡 (AFM)

[膜厚] 触針式段差計

[結合構造] フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)

[DNA分子鎖長評価] アガロースゲル電気泳動法

- (1) 基板上薄膜をTE buffer 溶液 (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA* (pH 8.0)) によって溶解し分析に用いた。
 - (2) 電気泳動用アガロースゲル (1.4%) : アガロース 0.7 g を 500 mL TAE 溶液 (40 mmol/l Tris-acetate, 1 mmol/l EDTA*) に溶解して作製した。
 - (3) 電気泳動用バッファー溶液 : 上記 TAE 溶液
 - (4) DNA サイズマーカー : Gene Ladder 100 (Nippon Gene) 5 μ l
 - (5) 電気泳動条件 : 100 V, 30 min
 - (6) 染色蛍光試薬 : SYBR Safe DNA Gel Stain
- ※EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

3. 実験結果および考察

以下においては、LMBD およびキャスト法により作製された資料をそれぞれ LMBD 薄膜、キャスト薄膜と呼称する。

図6に触針段差計により計測したLMBD薄膜の膜厚分布を示す。試料の全体に渡って、ほぼ直線的な膜厚傾斜となっており、水晶振動子膜厚モニターと可動マスクによって高い膜厚制御性で製膜可能であることがわかる。この高い膜厚制御性はDNA薄膜をデバイス化する際に必要不可欠な要素である。

図7は、走査型白色干渉計により計測したLMBD薄膜とキャスト薄膜の断面形状プロファイルを示している。100 nm オーダーの凹凸があるのに対し、LMBD薄膜ではほぼ測定ノイズ範囲内程度の凹凸となっており、非常に平坦な表面が得られていることを表している。

MBD薄膜について、定量的に表面のRMS (最小二乗) ラフネスを評価するとともに、膜厚に依存したRMSラフネスの変化を調べるため、図8のように膜厚とRMSラフネスとの関係をプロットし

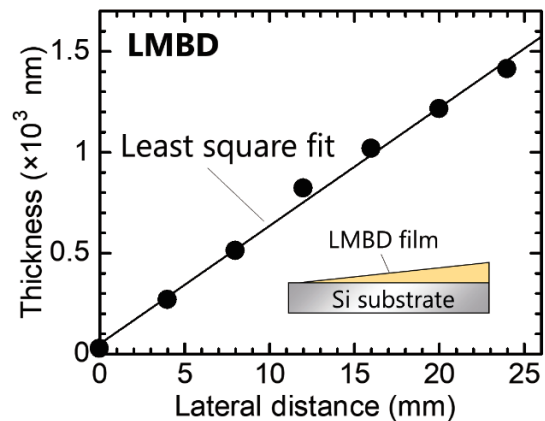


図6 触針段差計による膜厚分布測定結果。

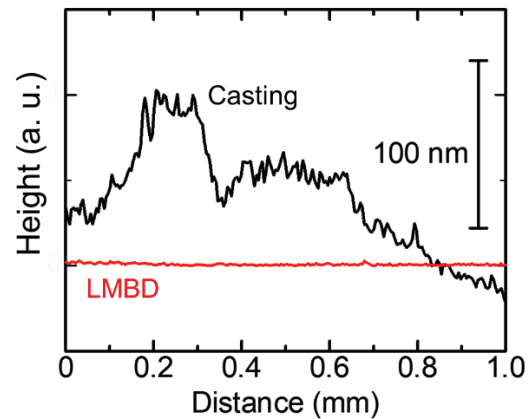


図7 走査型白色干渉計により計測した断面形状プロファイル。

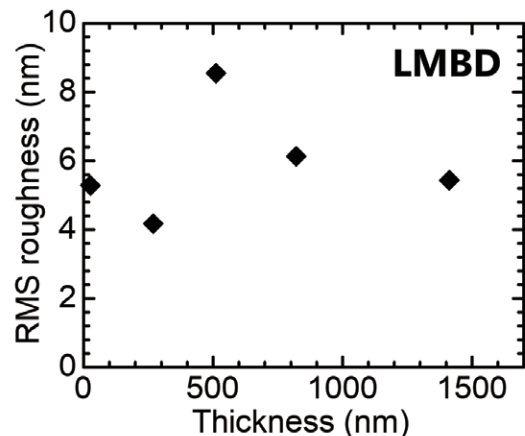


図8 AFMにより計測したLMBD薄膜のRMSラフネス。

た。同プロットからわかるように、膜厚の増大に伴う RMS ラフネスの明確な増大傾向はなく、4~9 nm の範囲に収まっている。このように nm レベルの平坦性が得られていることから、別の機能性薄膜を上部に積層し急峻な界面を得ることも可能であると考えられる。

以上の結果から、LMBD 薄膜は膜厚制御や表面平坦性に優れるという結果が得られた。これに加えて、形成された薄膜が DNA の分子構造を維持しているかどうかという点が DNA の機能を活用させるために最も重要な事項である。図 9 に、LMBD 薄膜とキャスト薄膜の FT-IR 吸収スペクトルを示す。LMBD 薄膜のスペクトルは、膜厚の小さい部分から大きい部分にかけて 7 領域を測定した結果を重ねて示してあり、膜厚の増加に応じてスペクトルの概形が相似を保ちながら吸収が増加している。特徴的な吸収ピークについて番号を付記し、対応する結合構造[22]を表 2 にまとめた。

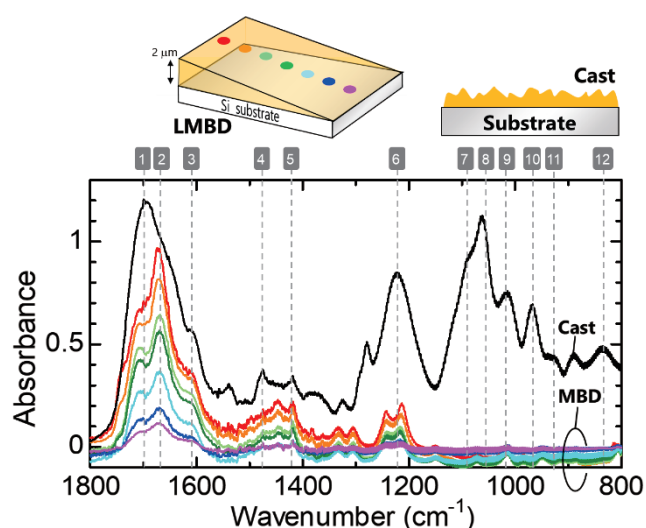


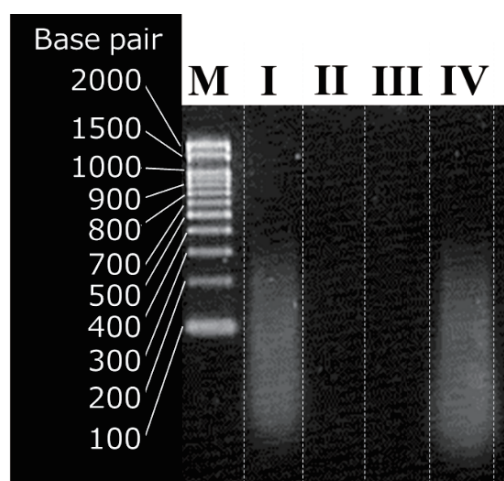
図 9 MBD 薄膜およびキャスト薄膜の FT-IR 吸収スペクトル。

表 2 赤外吸収ピーク位置と結合構造との対応[22].

ピーク No.	ピーク位置 (cm ⁻¹)	結合構造 (および振動モード)
1	1700	Guanine (C=O stretching)
2	1653	Thymine (C=O stretching)
3	1603	Adenine (C=N stretching)
4	1488	Cytosine (in-plane vibration)
5	1420	Cytosine and Guanine
6	1221	Phosphate antisymmetric stretching
7	1083	Phosphate symmetric stretching
8	1050	C-O deoxyribose stretching
9	1014	P-O or C-O stretching
10	963	C-C and C-O of deoxyribose skeletal motion
11	938	Adenine-Thymine base pairs
12	835	Deoxyribose phosphate

図 9 から、キャスト薄膜の吸収スペクトルにおいて現れていた No.6~12 のピークが LMBD 薄膜の吸収スペクトルにおいて著しく減少していることがわかる。結合構造との対応から推察されるこ

とは、リン酸結合が切断されている、すなわち DNA を梯子構造に例えた場合の支柱部分が断片化しているということである。No. 1~5 のピークについては LMBD 薄膜とキャスト薄膜で概形の相似がほぼ保持されていることから、A, G, C, T 塩基構造は維持されていると思われる。DNA 構造におけるリン酸結合が断片化していると推察されたことから、どの程度の塩基対数 (Base pair) まで断片化しているかを確認するため行ったアガロースゲル電気泳動実験の蛍光画像を図 10 に示す。



M: Marker (Gene Ladder 100)
I: Source DNA
II: Target DNA after IR laser irradiation
III: Laser-deposited film
IV: Casting method

図 10 アガロース電気泳動後の蛍光画像。

図 10 のレーン I にはサケ精子由来 DNA によるスミアな蛍光バンドが現れており、700 塩基対以下の種々の長さの DNA 鎖が原料に含まれていることがわかる。レーン IV はキャスト法による試料の結果であり、原料とほぼ同様のレーン範囲にスミアな蛍光バンドが出現している。これは原料水溶液を乾燥させたキャスト試料に対して想定された結果である。レーン II は、IR レーザーを照射した後のターゲットから採取した DNA 粉による結果であり、レーン III は LMBD 薄膜の結果である。これらのいずれのレーンにも蛍光バンドは現れていないことから、ターゲットとして IR 照射を受けた DNA 原料、およびそこから蒸散して基板上に堆積された薄膜では、DNA は 100 塩基対よりもはるかに小さな塩基対まで断片化したか、あるいは水素結合も乖離して色素がインターカレーションを起こさないような構造にまで分解したことが考えられる。

以上の結果から、LMBD を用いた DNA 薄膜堆積実験において、ナノメートルレベルで平坦な表面の固体薄膜が形成されるもののリン酸結合構造は維持されず、A, G, C, T 塩基構造は残存することがわかった。この原因は、IR レーザーによるターゲット加熱が変性を生じさせていることに帰せられる可能性が高い。A, G, C, T 塩基構造のみを利用した機能性薄膜を形成する目的であれば実験条件も活用可能であるが、原料 DNA の塩基対鎖を保持した DNA による固体薄膜形成を目指す上では不適である。そのため、新たな

アプローチの導入を進めることが必要である。

4. 新たなアプローチの検討

LMBD によって原料 DNA の塩基対鎖を保持した DNA 固体薄膜を形成するために、IR レーザーによる熱的な昇華ではなく、原料 DNA に与えるダメージがより少ない新たなアプローチを検討している。その有力な候補として挙げられるのが、Matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE)法である[20]。堆積物質よりもレーザー光吸収係数が高く、より蒸散しやすい材料を Matrix (母材)として堆積物質とともに混合ターゲットを作製する。このターゲットに真空中でレーザーを照射すると、まず Matrix にレーザーのエネルギーが吸収されて爆発的蒸発を生じ、堆積物質はその爆発的蒸発に押し出されるようにして基板方向に射出する。このプロセスにより、堆積物質はレーザーエネルギーによる分解を免れて基板上に堆積される。

最近、筆者らはこの Matrix 法を用いた LMBD による DNA 製膜実験を開始した。堆積膜の FT-IR スペクトルにおいて図 9 中の No. 6~12 に相当する吸収ピークが明瞭に現れる有望な結果が得られ始めており、目下のところ堆積条件の最適化と結果の解析を行いながら研究を進めている。

5. 結言

本研究では、DNA を機能材料とした新奇なデバイスの開発を目指し、LMBD を用いて DNA 固体薄膜を創製する研究を行った。サケ精子由来 DNA を原料として、赤外レーザーを用いた LMBD によりナノメートルレベルで平坦な表面を有する固体薄膜が得られた。しかしながら、FT-IR スペクトルの分析から原料 DNA の構造が維持されていないことが推察された。現在、新たなアプローチとして MAPLE 法の適用を進めており、有望な初期的結果が得られ始めている。今後は、堆積条件の最適化と詳細な評価を行いつつ LMBD による DNA 固体薄膜の製膜プロセス確立に向けて研究を進展させる。

6. 謝辞

本研究は工学研究所共同研究 A の助成により実施された。電気泳動実験でご協力とご指導をいただいた生物教室 朝倉史明教授に心より感謝申し上げます。DNA の精製方法についてご指導下さった公益財団法人 国際科学振興財団 シーラカンス研究所 飯岡恵里香氏に深く感謝の意を表す。本研究について貴重なご助言を下された岡田典弘 北里大学特任教授/東京工業大学名誉教授、鯉沼秀臣 東京工業大学名誉教授に心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] (国)新エネルギー・産業技術総合開発機構技術戦略研究センター (TSC) 編, 生物機能を利用したデバイス分野の技術戦略策定に向けて, TSC Foresight, Vol. 23 (2017).
- [2] R. Hoffmann, DNA as clay, *Am. Sci.* **82**, 308–311 (1994).
- [3] N. C. Seeman, DNA in a material world, *Nature* **421**, 427–431(2003).
- [4] S. Kelley and J. Barton, Electron transfer between bases in double helical DNA, *Science* **283**, 375–381 (2021).
- [5] 田畑 仁, 谷口 正輝, 田中 裕行, 大塚 洋一, 田中 慎一, 川合 知二, DNA エレクトロニクス, 表面科学 **24**, 677–683 (2003).
- [6] R. Yamada, I. Nomura, Y. Yamaguchi, Y. Matsuda, Y. Hattori, H. Tada, A. Ono, Y. Tanaka, Electrical conductance measurement of HgII-mediated DNA duplex in buffered aqueous solution, *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids*, **39**, 1083–1087 (2020).
- [7] A. Chandrasekaran, Nuclease resistance of DNA nanostructures, *Nature Reviews Chemistry*, published online in 10 Feb. 2021, (2021).
- [8] F. Wang, H. Lv, H. Lv, Q. Li, J. Li, X. Zhang, J. Shi, L. Wang, C. Fan, Implementing digital computing with DNA-based switching circuits, *Nat. Commun.* **11**, 121(2020).
- [9] S. Woo. and P. Rothmund, Programmable molecular recognition based on the geometry of DNA nanostructures. *Nat. Chem* **3**,620–627 (2011).
- [10] T. Dairaku, K. Furuita, H. Sato, J. Šebera, D. Yamanaka, H. Otaki, S. Kikkawa, Y. Kondo, R. Katahira, F. M. Bickelhaupt, C. F. Guerra, A. Ono, V. Sychrovský, C. Kojima and Y. Tanaka, Direct detection of the mercury–nitrogen bond in the thymine–Hg^{II}–thymine base-pair with ¹⁹⁹Hg NMR spectroscopy, *Chem. Comm.* **51**, 8488–8491 (2015).
- [11] Torigoe, H., Ono, A. & Kozasa, T. Detection of single nucleotide polymorphisms by the specific interaction between transition metal ions and mismatched base pairs in duplex DNA, *Transition Met. Chem.* **36**, 131–144 (2011).
- [12] N. Duchemin, I. Heath-Apostolopoulos, M. Smietana and S. Arseniyadis, A decade of DNA-hybrid catalysis: from innovation to comprehension, *Org. Biomol. Chem.* **15**, 7072–7087 (2017).
- [13] T. Liedl, T. Sobey, F. Simmel, DNA-based nanodevices, *Nano Today* **2**, 36–41 (2007).
- [14] J. Bath, A. Turberfield, DNA nanomachines, *Nat. Nanotech* **2**, 275–284 (2007)
- [15] P. Ma, C-P Liang, H.-H. Zhang, Bin-Cheng Yin, Bang-Ce Ye, A highly integrated DNA nanomachine operating in living cells powered by an endogenous stimulus, *Chem. Sci.* **9**, 3299–3304(2018).
- [16] M. Hashiyada, DNA Biometrics, Sec. 7 in “Biometrics”, InTech, J. Yang (Ed.), ISBN: 978-953-307-618-8 (2011), available from: <http://www.intechopen.com/books/biometrics/dna-biometrics>.
- [17] 松木伸行, 大久保勇男, レーザ堆積法 (レーザーアブレーション法), 2020 年版 薄膜作製応用ハンドブック, 第 2 編 2 章 5 節 pp. 372–380, 株式会社エヌ・ティイー・エス, (2020).
- [18] M. Haemori, J. Yamaguchi, S. Yaginuma, K. Itaka and H. Koinuma, Fabrication of highly oriented rubrene thin films by the use of atomically finished substrate and pentacene buffer layer, *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, 3740–3742 (2005).
- [19] K. Kawashima, Y. Okamoto, O. Annayev, N. Toyokura, R. Takahashi, M. Lippmaa, K. Itaka, Y. Suzuki, N. Matsuki and H. Koinuma, Combinatorial screening of halide perovskite thin films and solar cells by mask-defined IR laser molecular beam epitaxy, *Sci. Tech. Adv. Mater.* **18**, 307–315 (2017).
- [20] D. B. Chrisey, A. Piqué, R. McGill, J. Horwitz, B. Ringeisen, D. M. Bubb and P. K. Wu, Laser Deposition of Polymer and Biomaterial Films, *Chem. Rev.* **103**, 553–576 (2003).
- [21] S. Ito, S. Yaginuma, K. Itaka, K. Kawashima and H. Koinuma, Infrared laser MBE growth of bio-material films inclusive of DNA, 第 59 回高分子学会年次大会, 発表 No. 2L23, 予稿集 p. 683 (2010).
- [22] B. Gnapareddy, S. Dugasani, T. Ha, B. Paulson, T. Hwang, T. Kim J. H. Kim, K. Oh and S. H. Park, Chemical and Physical Characteristics of Doxorubicin Hydrochloride Drug-Doped Salmon DNA Thin Films, *Sci. Rep.* **5**, 12722 (2015).