顕微鏡観察下における局所的溫度制御のためのマイクロデバイス

学生員 新田 英之* 正 員 竹内 昌治*
 非会員 野地 博行* 正 員 藤田 博之*

Micro Device for Local Temperature Control under Microscope

Hideyuki Arata*, Student Member, Shoji Takeuchi*, Member, Hiroyuki Noji*, Non-member,
 Hiroyuki Fujita*, Member

The device for controlling the temperature locally under a microscope in a short response time, within 3 seconds, is developed. This device is equipped with a temperature controlling micro heater and a micro thermo sensor patterned on a glass plate which can be used for general biochemical assay. Since this device controls the temperature so locally, the total amount of the heat which is needed for temperature controlling is small enough to avoid the negative effects such as defocusing during observation under a microscope. We established the sensor model to calculate the temperature from the measured resistance value and the initial resistance at the room temperature. Thus, we can avoid the calibration in each sensor. The rotation velocity change of a single F1 molecule, the rotary biomolecular motor, within short response time is successfully observed by controlling the temperature. This is the result that could not be achieved without MEMS technology. This result also shows the applicability of the device to other temperature controlling biochemical assay.

キーワード：MEMS，温度センサ，生体分子一分子観測

Keywords：MEMS, thermosensor, single biomolecular observation

1. はじめに

これまで分子生物学の分野において、蛋白質の活性などの測定は集団としてのふるまいの観測や、統計力学的な平均値の測定が行われてきた。しかし近年、蛋白質の一分子レベルにおける観測が可能となり、蛋白質の挙動や性質を一分子単位で観測し、理解しようとする研究が注目を集めてきている⁽¹⁾。蛋白質を一分子で観測したり、活性などの測定をする研究は蛋白質に対する新たな見地をもたらし、分子生物学において大きなインパクトを与えることが期待される。そのため、生体分子一分子を対象に取り扱うツールへの期待が大変大きく、それらの技術開発が急務となっている。その中でMEMS・NEMS技術（マイクロ・ナノマシン技術）は重要な役割を果たすことが期待される。

蛋白質の大きさは10ナノメートルから100ナノメートル程度である。一方MEMS技術を用いて製作できる微細な構

造も同程度に微小化されている。そこで、MEMS技術を蛋白質一分子観測に応用することにより、新たな実験装置や系を実現し、これまでに不可能であった実験を可能とすることで、全く新規な知見を得ることが期待される。

顕微鏡を用いる観測系の多くは、顕微鏡の対物レンズとスライドガラスの間に油を介する観測法が一般的である(図1参照)。従来の市販の温度制御プレートなどを用いて顕微鏡下で温度を制御する場合、スライドガラス全体の温度を変化させるため応答速度が遅い。また、急激に温度を変化させようとする、プレートの温度が上下するためプレートの熱膨張により顕微鏡観察下で焦点がずれるという問題がある。さらに、サンプルと対物レンズ間の空気や油を介して熱が伝達し、熱膨張などの対物レンズへの悪影響が懸念される。そこで我々はMEMS技術を用い、マイクロヒータ・マイクロセンサをガラスプレート上に集積したデバイスを作製した⁽²⁾。局所的に加熱することで、顕微鏡下で観察しながら短時間で温度を変化できると同時に、系にあたえる熱量を最小限におさえて、焦点のずれや顕微鏡への悪影響を最小限におさえることができる。また、実験に使用するガラスプレートは使い捨てであるため、温度制御デバイスは大量生産が容易であることが求められる。このため一

* 東京大学 生産技術研究所 マイクロメカトロニクス国際研究センター

〒153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1

Center for International Research on Micromechatronics (CIRMM), Institute of Industrial Science (IIS), The University of Tokyo

4-6-1, Komaba Meguro-ku, Tokyo 153-8505

図1 従来の温度制御系における熱の伝達

Fig. 1. Heat transmission to object lenses in a conventional temperature controller.

括大量生産が可能という MEMS 技術の特徴が生かされる。

最後に温度制御デバイスの有用性を示すため、実際に温度を制御することによる酵素活性の制御実験を行った。顕微鏡下における急峻な温度変化において、F1-ATPase とよばれる回転型生体分子モータの温度変化にともなう回転速度の過渡応答を観測した。これはこのデバイスを製作することにより初めて観測された現象である⁽³⁾。

2. デバイスの概要

我々はヒータとセンサ両方に適用できる金属として、温度一抵抗係数が大きく加工が容易なニッケル(Ni)を選択し、ガラスプレート上にパターニングした。ヒータはNiの通電加熱(ジュール熱)により熱を供給する。センサはNiの温度一抵抗特性を利用し、その抵抗値から温度一抵抗特性の校正曲線により温度を求める。生化学の分野における蛋白質の観測で求められる温度精度は $\pm 5^{\circ}\text{C}$ である。これは蛋白質の温度感度が 5°C 程度であるということに起因する。校正をする際は、赤外放射温度計(Keyence 社 IT2-02)で温度を測定する。今回製作したデバイスを温度が既知の状態(ホットプレートなどで温めて)にして温度校正をし、本デバイスの放射率を求めた。その結果より放射率 0.93 に設定し、以降温度測定を行った。

プロセスは、ガラスプレートを KOH で洗浄した後、ニッケルを真空蒸着し、次にフォトリソグラフィとエッチングにより Ni をパターニングする。温度制御デバイスは一括大量生産が求められるため、プロセスの簡略化も考慮して設計した。ここではヒータとセンサを同じ材料から作ることにより、プロセスを簡略化できる(図2参照)。ヒータは、その内部の温度がなるべく一樣になるよう円形にした。その内側にセンサを配置した(図3参照)。

〈2・1〉 マイクロヒータ ヒータの円の直径は $400\ \mu\text{m}$ であり、ヒータの幅は $20\ \mu\text{m}$ である。約 $120\sim 140^{\circ}\text{C}$ まで加熱すると、Ni とガラスの熱膨張比の違いによりヒータが断線する。まず、ヒータで加熱した場合の温度分布をサーモグラフィにより測定した(図4参照)。円形のヒータ内部における温度分布による誤差は 1°C 未満であった。円の外部においては温度勾配はより急峻となる。ヒータの外側 $100\ \mu\text{m}$ 以内においては温度誤差がヒータ内部に比べ 3°C 以内

図2 デバイスのプロセス図

Fig. 2. Process chart of the device.

図3 スライドガラス上に集積されたマイクロヒータとマイクロ温度センサ

Fig. 3. Temperature control device on a slide glass.

図4 マクロヒータによる温度分布

Fig. 4. Temperature distribution by the micro heater.

であるので、温度制御範囲はヒータの内部と、外部 $100\ \mu\text{m}$ 以内と定義した。次に、実験系において最も重要な特性となる系の応答速度を評価するため、室温と 70°C 間におけるステップ応答を測定した(図5参照)。希望の温度範囲、つまり最終到達温度の $\pm 5^{\circ}\text{C}$ の範囲内に達するまでの時間は 3.0 秒である。このデバイスを、低温のステージにのせれば、ステージの温度から観測対象となる蛋白質が死活してしまう温度(80°C 程度)までの温度範囲における温度制御が可

図5 デバイスのステップ応答
Fig. 5. Step response of the device.

図6 センサにおけるヒステリシス
Fig. 6. Hysteresis of the sensor.

図7 各センサにおける温度—抵抗特性曲線
Fig. 7. Temperature-resistance curves in several sensors.

図8 センサのモデル
Fig. 8. The model of the sensor.

能である。

〈2・2〉 マイクロ温度センサ 温度はセンサで測定するため、正確な温度を実現するためにはヒータよりもセンサの精度の方が問題となる。まず、センサの抵抗—温度特性が1対1対応であるか（ヒステリシスがないか）を調べた。その結果、センサのヒステリシスによる温度差は、最大約2°Cであった（図6参照）。校正や測定時は温度変化を一方方向、上昇のみに限定した。センサの温度—抵抗特性は同じ設計のセンサにおいてもNi蒸着の厚みの差や、エッチングのむらなどにより各々異なる（図7参照）。同じ設計のセンサにおいて最もバラつきのあるパラメータはNi層の厚みであり、温度—抵抗校正曲線の違いも主にNi層の厚みのバラつきに起因すると予測される。バラつきがあるままでは、各センサごとに温度と抵抗の校正をしないとイケなく、大変な手間がかかる。そこで我々は校正曲線のバラつきがNiの厚みのバラつきにのみ起因すると仮定したモデルを立て、計算により温度を算出する手法を用いた。

センサを温度により3つの領域に分割した（図8参照）。Area 1では温度は顕微鏡ステージの温度 T_s で一様であると仮定する。Area 3では温度はマイクロヒータにより制御される温度 T_h において一様であると仮定する。Area 2では温度は T_s から T_h にかけて線形な温度勾配となると仮

定する。Area 1においては、温度制御範囲における温度分布による誤差は3°C以内であることから、この範囲を温度一様と仮定できる。Area 2においては温度はArea 1の温度からArea 3の温度まで変化する。その温度勾配は直線ではなく、対数関数など他の関数を持って近似することも可能であるが、ここでは計算を簡略化するため温度勾配を直線状に近似した。

各々の領域における抵抗値 r_1, r_2, r_3 は、単位体積あたりの抵抗値を示す以下の公式から算出できる。

$$r = \rho(t) \frac{L}{h \cdot w} \dots\dots\dots (1)$$

ここで $\rho(t)$ は体積抵抗率、 L は長さ、 h は高さ、そして w は幅である。各領域における抵抗値は以下のような式となる。

$$r_1 = R_{correct} \cdot (a_1 \cdot T_s + b_1) / h \dots\dots\dots (2)$$

$$r_2 = R_{correct} \cdot (a_2 \cdot T_s + b_2 \cdot T_h + c_2) / h \dots\dots\dots (3)$$

$$r_3 = R_{correct} \cdot (a_3 \cdot T_h + b_3) / h \dots\dots\dots (4)$$

ここで各 a, b と c はセンサの設計パターンから算出できる定数であり、 h はこの場合Ni層の厚みとなる。 $R_{correct}$ は、Niの膜厚が薄いために生じる測定時の高電界などに起因するずれを補正するパラメータであり、各々のセンサにおいて異なる。

図9 センサにおける計算値と実測値の比較

Fig. 9. Calculated curve and measured value in the sensor.

センサの合計抵抗値は以下のような式となる。

$$R_{total} = r_1 + r_2 + r_3$$

$$= R_{correct} \cdot (a \cdot T_s + b \cdot T_h + c) / h \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$\leftrightarrow T_h = \left(\frac{1}{b} \right) \left(\frac{h}{R_{correct}} \cdot R_{total} - a \cdot T_s - c \right) \quad \dots\dots\dots (6)$$

ここで a , b と c はセンサの設計パターンによる定数で、全てのセンサに共通する。まず設計寸法より式(2), (3), (4)における a_1 , a_2 , a_3 , b_1 , b_2 , b_3 , c_2 を求め、式(5)において $a = a_1 + a_2$, $b = a_3 + b_2$, $c = b_1 + c_2$ より a , b , c の値を求める。今回の設計においては $a=0.9357$, $b=6.831$, $c=1174$ となった。設計値による a , b , c の値と、実際に製作したデバイスにおけるそれらの値との誤差が最終的な算出温度に与える誤差は 0.9°C 以下と、今回の許容範囲であった。 h と $R_{correct}$ は各々のセンサ特有の値をとる。まず始めに室温における R_{total} と $T_s = T_h$ から $R_{correct}/h$ を求める。一度 $R_{correct}/h$ の値を決定すれば、 T_s がいかなる温度である場合においても、温度一抵抗校正曲線をあらかじめとっておく必要なしに R_{total} から T_h を求めることができる。この手法を用いた計算値と温度一抵抗校正による実測値を比較してみた (図9参照)。温度誤差は平均 1.3°C 、最大で 2.1°C であった。この誤差は今回の許容精度の範囲内であり、Area 1, Area 2 における温度分布近似の妥当性を示している。このモデリングにより、センサ毎の校正を省略でき、実験にかかる時間を大幅に短縮することができる。

3. 蛋白質一分子観測への応用

生体内におけるエネルギー源として重要な ATP (adenosine triphosphate) を生体内で合成しているのは、ミトコンドリア内膜やバクテリアの細胞膜、植物の葉緑体チラコイド膜に存在する ATP 合成酵素である。ATP 合成酵素の中の一つの機能単位で、ATP 合成・加水分解の触媒活性をもつ部分を F1 とよぶ⁴⁾。ATP 合成酵素から分離された F1 単体のみにおいては ATP 加水分解の活性を示す⁶⁾。F1 は加

図10 F1 モータの 23°C から 70°C への温度変化における積算回転数—時間のグラフ

Fig. 10. Time-revolution curve: temperature from 23°C to 70°C .

水分解の際に自身がトルクを発生して回転するという特徴をもつため、回転を顕微鏡下で観測することにより活性を測定できる。一回転あたり ATP 分子 3 個を加水分解することがわかったため、回転速度が ATP 加水分解活性と一対一に対応する。

このデバイスを用いて温度を 23°C から 70°C へ変化させた際の F1 の回転速度の変化を観測することができた (図10参照)。また、この時顕微鏡においてピントのずれは生じなかった。グラフの傾きが回転速度を表し、回転速度が 2.0 rps から 6.0 rps に変化した様子がわかる。系の応答速度が 3.0 秒と高速であるため、F1 の回転速度の変化が顕微鏡下で明瞭に観測された。この回転速度変化は、このデバイスを製作することにより始めて観測された生化学的現象である。この回転速度の変化は温度上昇に伴う水溶液の粘性抵抗の減少、すなわち F1 の回転を光学顕微鏡で観察可能にするため回転軸に人工のビーズ (直径 $0.49 \mu\text{m}$) を付加してあるが、その回転時に加わる水の抵抗が減少することによりモータの速度が上昇したと予測できる。回転速度が ATP 加水分解活性と一対一に対応するため、回転速度上昇と共に ATP の加水分解活性も比例して上がっていることになる。つまり、このデバイスを製作することにより、蛋白質の活性を温度により瞬時に外部から制御することに初めて成功した。

4. 結 論

MEMS 技術を用い、微小なヒータと温度センサをガラスプレート上に集積することにより、顕微鏡下において従来の温度制御器に比べ高い応答速度 (3 秒) での温度制御を実現した。実験に用いるガラスプレートは使い捨てであるため、MEMS 技術のもつ一括大量生産という利点が生かされている。各温度センサにおける毎回の温度校正を回避する

ため、モデルを用いた室温における抵抗と温度の値のみから制御温度を算出する手法を確立した。この算出法により、実験の際にセンサの抵抗-温度特性曲線の測定にかかる時間を大幅に短縮することができた。この手法を用いたセンサの温度精度は約 2°C であり、今回の実験に必要な精度(5°C 以内)を満足している。

実際にそのデバイス上でF1と呼ばれる回転型生体分子モータの回転実験を行い、顕微鏡観測下で温度を変化(23°C ~ 70°C)させた所、回転速度の変化(2.0 回/sから 6.0 回/s)が観測された。これは、このデバイスを製作することにより始めて観測された結果である。また、顕微鏡観測下において急激に温度を変化させても、対物レンズの焦点のずれなどの従来のシステムにみられる問題はおこらなかった。このデバイスを製作することにより、顕微鏡観察下においてタイムリーに温度を制御した中での蛋白質の活性の制御とその測定という、これまで観測不可能であった生化学的現象が観測された。

(平成15年11月19日受付, 平成16年3月12日再受付)

文 献

- (1) H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr.: "Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase", *Nature*, Vol. 386, pp. 299-302 (1997)
- (2) 新田英之・竹内昌治・野地博行・藤田博之:「温度センサとマイクロヒータを集積した顕微鏡用温度制御システム」, 平15電気学会全大, 第3分冊, p.147 (2003)
- (3) H. Arata, S. Takeuchi, G. Tresset, K. Tabata, Y. Rondelez, H. Noji, and H. Fujita: "Temperature control chip for Biomolecule activity measurement", *Proc. of Spring Meeting of the Society of Chemical and Micro-nano System*, Sapporo, Hokkaido, April 12, p.29 (2003) (inJapanese)
新田英之・竹内昌治・Guillaume Tresset・田端和仁・Yannick Rondelez・野地博行・藤田博之:「生体分子活性測定用局所温度制御チップ」, 第7回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 公演要旨集 北海道大学 p. 29 (2003)
- (4) 石渡信一:「生体分子モータの仕組み」, シリーズ・ニューバイオフィジックス, Vol.4, 共立出版 (2000)
- (5) 平田 肇・茂木立志:「ポンプとトランスポーター」, シリーズ・ニューバイオフィジックス, II-3, 共立出版 (2002)
- (6) G. Zeng, A. Shakouri, C. La Bounty, G. Robinson, E. Croke, P. Abraham, X. Fan, H. Reese, and J. E. Bowers: SiGe micro-cooler, *Electronics Letters* 25th, Vol. 35-24 (Nov. 1999)
- (7) J. Puigroble, A. Vila, I. Gracia, C. Cane, and J. R. Morante: Dielectric micro-hotplate for integrated sensors: an electro-thermo-mechanical analysis, *Transducers Eurosensors15*, (2001)

新 田 英 之

(学生員) 1980年生。2002年3月東京大学工学部卒業。同大学院工学系研究科博士前期課程修了, 現在, 博士後期課程在籍中。ナノ・バイオ融合領域, MEMS デバイスを用いた生体分子計測の研究に従事。趣味: バスケットボール, クラシック音楽。1994年鹿児島県南部地区バスケットボール大会(三好杯)優勝, 1995年全西日本バスケットボール選抜大会出場。

1995年鹿児島県高等学校音楽コンクールピアノ部門銀賞受賞。

2004年第1回東京大学学生発明コンテスト奨励賞受賞。

竹 内 昌 治

(正員) 1972年9月17日生。2000年3月東京大学大学院工学系研究科機会情報工学専攻博士課程修了。2001年東京大学生産技術研究所講師。2003年より同助教授。博士(工学)。神経インタフェース, 生体分子を用いたMEMSデバイスに関する研究に従事。日本ME学会, IEEEなどの会員。

野 地 博 行

(非会員) 1969年生。1989年3月東京工業大学理学部卒業。1993年同生命理工学研究科修了。1995年同総合理工学研究科修了。理学博士。1994年4月~1996年9月JR東京総合病院高等看護学校非常勤講師。1998年1月~2000年9月科学技術振興事業団CREST「生命活動のプログラム」チーム13研究員。2000年10月~2001年8月科学技術振興事業団 さきがけ研究「組織化と機能」研究員。2001年9月~現在東京大学生産技術研究所助教授。専門分野: 生化学, 生物物理学, 1分子生理学。現在東京大学生産技術研究所にて生体分子メカニクスに関する研究に従事。1998 Grand Prize, Amasham Pharmacia Biotech & Science Prize for Young Scientist 受賞。1999 手島賞(博士), 手島基金。趣味: 山岳スキー, フリークライミング, テニス, インラインスケート。

藤 田 博 之

(正員) 東京大学生産技術研究所マイクロメカトロニクス国際研究センター教授, 1980年3月東京大学大学院電気工学専門課程修了(工学博士)。同年4月より東京大学生産技術研究所講師, 81年5月同助教授, 93年8月同教授, 2000年4月同付属マイクロメカトロニクス国際研究センター長となり, 現在に至る。この間83年から85年までMIT 客員研究員。主としてマイクロマシン, マイクロアクチュエータ, 自律分散システムの研究に従事。97年市村学術賞功績賞, 2000年服部報公賞受賞, 2001年フランス共和国政府教育・学術功労勲章シュバリエ受賞。