

研究報告書

「ゲスト分子－空間空隙相互作用の原子スケール3次元AFM計測技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研究者: 浅川 雅

1. 研究のねらい

空間空隙材料にはゼオライトや多孔性金属錯体(PCP/MOF)から超分子ホスト構造や生体分子まで多様な構造体が存在する。それらの空間空隙材料の自在な設計・制御が実現できれば、エネルギー問題から医療まで多様な社会問題・課題の解決に貢献することが期待される。空間空隙材料の設計・制御手法を確立するためには、それを支える基盤技術として計測技術の進歩も強く望まれる。特に原子・分子スケールで精密設計・制御された空間空隙材料を詳細に構造解析、機能評価が可能な計測手法の確立が期待される。これまで主に X 線回折や電子顕微鏡による構造解析が行われてきたが、既存の計測技術の多くが、真空中や大気中で使用することを想定して開発されており、水溶液・イオン液体・有機溶媒など液中において動作する計測手法は少ない。一方、空間空隙材料は電池、水処理膜、ドラッグデリバリーシステムなど多方面への応用が期待されており、溶液環境下で原子スケール解析が可能な計測手法の確立が必要である。

そこで本研究では、液中で原子分解能を有する原子間力顕微鏡(AFM)を空間空隙材料の構造解析技術として発展させる。平均化された構造情報だけでは議論することが困難であった空間空隙材料の原子・分子スケールの構造や機能について理解を深めることを目指す。さらに、従来の AFM 技術を新しいコンセプトで発展させた3次元 AFM をもとに、ナノ空間空隙とそこに包接されるゲスト分子の間に働く相互作用力を液中で実空間計測する新しい3次元 AFM 計測技術を開発する。この3次元相互作用力計測法により、ゲスト分子が空間空隙に接近する際のエネルギー障壁や、吸着サイト・吸着確率分布などのゲスト分子の吸脱着に関する原子スケールメカニズムの理解が大幅に進展することが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、液中で原子分解能を有する原子間力顕微鏡(AFM)による空間空隙材料の構造・機能の直接計測とともにナノ空間空隙とそこに包接されるゲスト分子間の相互作用力分布を実空間計測する新規手法を開発することを目指した。

光合成関連膜タンパク質 LH2 を人工膜への再構成をおこなわなくても液中でサブユニットを含めて可視化できることを初めて報告した(原著論文 2、超空間2期生 佐賀佳央研究者・近畿大学との共同研究成果)。さらに高い分子認識能を有する新しい環状ホスト構造である Pillar[n]arene の液中 AFM 計測に取り組み、ゲスト分子の包接・脱離現象を1分子レベルで実空間計測できることを実証した(論文執筆中、超空間1期生 生越友樹研究者・金沢大学との共同研究成果)。これまで前例がなかったホスト-ゲスト複合体形成の1分子スケール可視化を

実現した。

ナノ空間空隙とゲスト分子間に働く相互作用力分布を実空間で計測する新規手法を確立するために、要素技術として(1)高力感度センサの実用化(原著論文1)、(2)探針先端の自己組織化膜による化学修飾条件(原著論文3)、(3)ゲスト分子を固定化する反応基点(テトラエチルフェニルメタン)の自己組織化、(4)探針先端でのヒュスゲン環化などを検討した。それらの要素技術の検討から、テトラフェニルメタン骨格分子がグラファイト表面で自己組織化構造を形成することや、スパッタリング法で形成した金薄膜表面におけるアルカンチオール自己組織化膜の分子スケールでの描像など様々な研究成果が得られた。

これらの研究成果をもとに、ナノ空間空隙とホスト分子の相互作用力分布の計測に取り組んだ。その結果、探針先端に固定化した環状ホスト Pillar[5]arene と基板上に整列させたゲスト分子(シアノブタン構造)の相互作用力分布を 3 次元実空間で可視化することに成功した。この計測技術がゲスト分子-空間空隙相互作用の 3 次元計測法として期待できることを実証することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「液中原子分解能 AFM による空間空隙材料の原子・分子スケール計測」 ・光合成関連タンパク質 LH2 の液中 AFM 計測(原著論文 2)

光合成関連タンパク質 LH2 について、液中 AFM で観察した。界面活性剤で単離された LH2 タンパク質をマイカ基板に吸着させるだけで、比較的容易に LH2 分子内のユニット構造を可視化することができた(図1)。LH2 タンパク質は、B800 色素を脱離後も Native と良く似たリング状構造を維持していることを初めて観察できた。

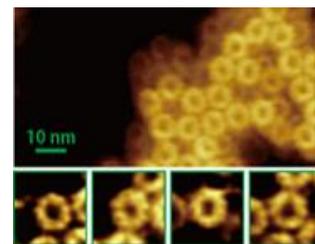


図1 LH2 の液中 AFM 像

・環状ホスト構造 Pillar[5]arene の液中 AFM 計測

空間空隙材料として環状ホスト構造である Pillar[n]arene (n=5, 6) の分子スケール計測に取り組んだ。特に五角形の Pillar[5]arene (P[5]A) がヘキサゴナル様構造を形成すること明らかにした(図 2)。基板として用いたマイカ構造の影響も考慮する必要があるが、五角形の P[5]A 分子が六回対照の周期構造を形成するという点が大変興味深い。

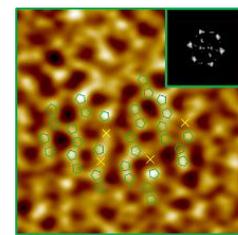


図2 マイカ上に自己集積した P[5]A の液中 AFM 像

ゲスト分子である オクタンスルホン酸 ゲスト分子の濃度を 0、1、10、50、100 mM と変化させて

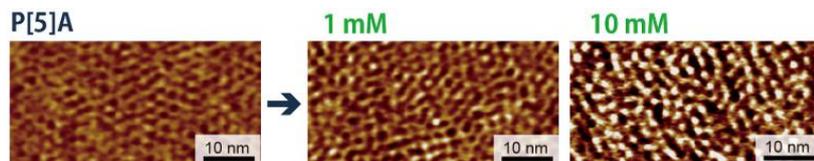


図3 環状ホスト P[5]A-ゲスト錯形成の1分子スケール AFM 計測

AFM 像の変化を観察してみると、10 mM から包接による粒子状コントラストが比較的秩序性を持った周期構造として現れることが分かった(図 3)。さらにオクタンスルホン酸を十分に包接させた後、ゲスト分子を超純水によるリンスで取り除き、脱離過程を連続 AFM 計測で可視化し

た。その結果、徐々に粒子状構造が消失し、約 40 分程度で P[5]A だけの AFM 像によく似た構造に変化することが分かった。このゲスト分子の離脱過程は、P[5]A の蛍光測定でも評価しており、離脱が進行する時間スケールは AFM 計測の結果と良く一致した。

研究テーマ B 「高力感度を有する高周波カンチレバーの実用化」

高い力感度を有する高周波カンチレバー ($F_{\min} = 1$ pN) を安定に駆動する光熱励振法の高効率化に向けて、カーボン薄膜による励振効率向上に成功した(原著論文1)。カーボン薄膜の被覆率などコーティング条件を最適化することで、これまで困難であった高周波カンチレバーの大振幅励振を可能とし、水中でも長時間の液中原子分解能イメージングに影響を与えないことを実証した。

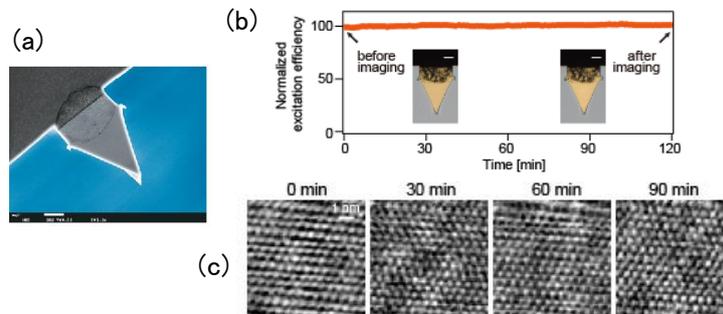


図 4 (a)カーボン薄膜を局所被覆した高周波カンチレバーの SEM 像、(b)光熱励振の長時間安定性、(c)長時間の液中原子分解能 AFM イメージングを実現

図 4 (a)カーボン薄膜を局所被覆した高周波カンチレバーの SEM 像、(b)光熱励振の長時間安定性、(c)長時間の液中原子分解能 AFM イメージングを実現

研究テーマ C 「ゲスト分子-空間空隙相互作用を 3 次元計測する新規計測手法の開発」

ゲスト分子とナノ空間空隙との間に働く相互作用力を 3 次元の実空間で AFM 計測するためには、探針および基板にゲスト分子と空間空隙材料を配向や密度が制御された状態で固定化する必要がある。これを実現するために、探針の先端にゲスト分子を固定化する「ゲスト分子探針」、空間空隙材料であるホスト構造を固定化する「ホスト探針」を調製することを目指した。

(1) ゲスト分子探針の調製法の検討

・機能性アルカンチオール自己組織化膜

ヒュスゲン環化付加反応などにより反応基点となる骨格分子を探針先端に固定化するためには、探針先端が反応性官能基で高密度に覆われた表面を形成する必要がある。ヘキサエチレングリコールを導入したアジドヘキサエチレングリコール自己組織化膜 (N_3 -EG₆-SAM) を調製し、数週間程度清浄表面を維持し、反応基点を導入できることが分かった(図 5)。

・テトラフェニルメタン骨格分子の自己組織化層

テトラキス(4-エチルフェニル)メタン(TEPM)を中心骨格として探針先端に固定化する手順を検討した。まず TEPM を高配向熱分解グラファイト(HOPG)基板に分散して固定化する方法について、初期濃度や分散方法(滴下、スピコート)などの条件を検討した結果、有機溶媒に溶解した 0.1~1 mM の溶液を用い、スピコート法(7000 rpm)で薄膜化することで、TEPM 分子が密に充填した単分子層を形成できることを AFM で観察することに成功した(図 6)。

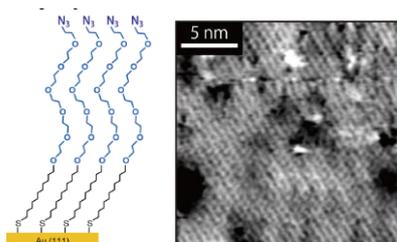


図 5 N₃-EG₆-SAM の液中 AFM 像

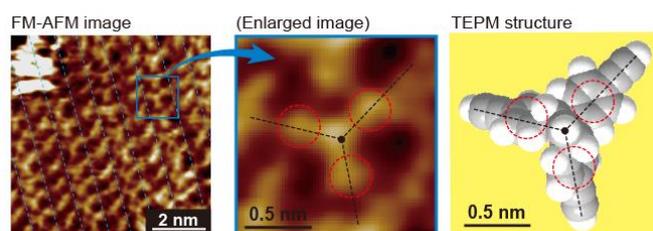


図 6 TEPM の液中 AFM 像: 分子内構造まで可視化

(2) ホスト探針を用いた分子間相互作用力の3次元実空間計測

負電荷を有する表面へ自己組織的に集積することの分かったカチオン性 Pillar[5]arene を Si 探針先端に固定化したホスト探針を用いて、ホスト-ゲスト相互作用力を3次元 AFM 計測することを目指した。ゲスト分子としてシアノブタン構造をテトラフェニルメタン骨格分子の自己組織化層を用いて HOPG 基板の上に配列させた。探針先端に固定化した Pillar[5]arene の xyz 位置を変化させながら、相互作用力の3次元実空間分布を計測した(図7)。

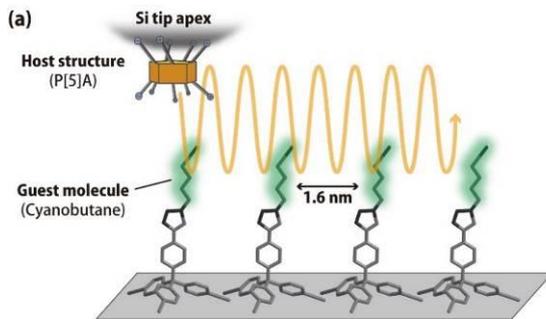


図7 液中 3D-AFM 法によるホスト探針と基板に固定化したゲスト分子間の相互作用計測

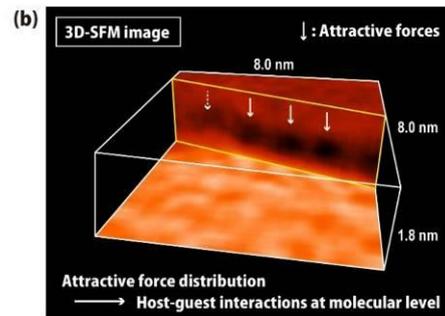


図8 液中 3D-AFM 像(矢印:ホスト-ゲスト相互作用力による引力分布)

その結果、150 pN 程度の引力極小をもつ 3 次元力分布像が得られた(図8および図9a)。その引力分布はシアノブタン構造の配列周期と一致しており、遊離ジシアノブタンの添加によって消失したことから、Pillar[5]arene とゲスト分子(シアノブタン)に働く相互作用力を可視化できたことを強く示唆している。引力分布の中心で z 方向に 2 分子が移動したとすると、相互作用ポテンシャルエネルギーが -6.13×10^{-20} J/単分子であった(図9c)。これから算出されるポテンシャルエネルギーは -36.9 kJ/mol と、これまで等温熱量計測装置などで報告されてきた Pillar[5]arene-ゲスト分子の錯形成における自由エネルギー変化(例えば、 -33.1 kJ/mol、Chem. Eur. J. 20 (2014) 12123.)と良い一致を示した。

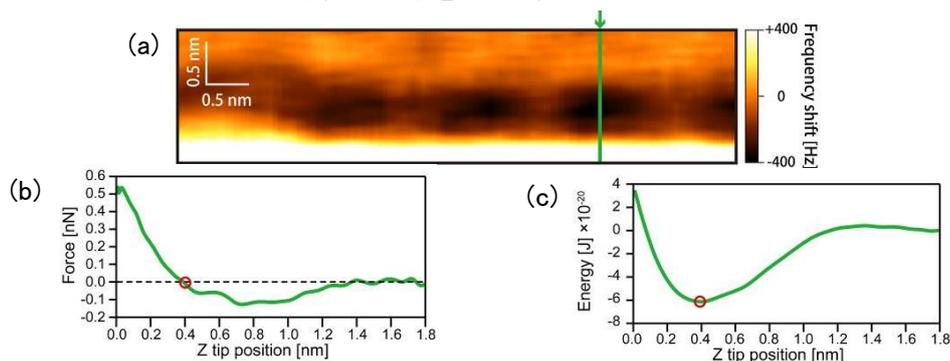


図9 (a) 3D-AFM 像の垂直断面、(b)相互作用力-z位置カーブ、(c)(b)をエネルギー変換

以上の結果より、ホスト-ゲスト相互作用のような pN オーダーの弱い相互作用力であってもその3次元分布を可視化できる計測手法を確立できる足がかりとなる結果を得ることができた。

3. 今後の展開

3次元 AFM 技術を発展させることでゲスト分子と空間空隙の相互作用力を実空間計測できることを実証することができた。しかし、あらゆる試料系に応用できる汎用性を主張できるほどの技術を確立できていないのが現状である。今後、ホスト探針・ゲスト分子探針の調製方法などを更に洗練することで、より広範なナノ空間空隙の計測技術へ発展させることが目標である。本さがけ研究の成果を足がかりに、空間空隙材料の機能に関わる原子・分子スケールの諸現象の解明に貢献する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

3次元実空間において2分子間の相互作用力を分子スケールで直接計測することは、これまでに報告はなく、新規手法の確立を目指して研究を進めてきた。空間空隙材料だけではなくあらゆる分子や材料で AFM 装置の構築に加えて、さがけ研究開始前に、自分自身の専門領域を超えた提案であったため、研究開始当初はスムーズにスタートできなかったが、領域会議を通じて化学分野や幅広い空間空隙材料の専門家と連携を開始することができ、3次元相互作用力計測を実証することができた。

所属の異動により3年目から研究環境が大きく変化したため、従来利用してきた大型装置が使用できないなどの問題が生じた。特に、高力感度を有する高周波カンチレバーを使用するためにはマイクロマニピュレータを用いた微小液滴の操作が必要であったが、追加支援によって必要な装置等を導入することができ、高感度 AFM 計測を実現できるようになった。

さがけ研究で目標としていたナノ空間空隙とゲスト分子の3次元相互作用力の直接計測は達成したが、多様な空間空隙材料に利用できる汎用な手法を確立するという最終的な目標に向けては、多くの課題も残っている。さがけ研究で実際に実験を行い着想した新しい方法論もあるので、今後の課題として取り組み、汎用的な計測法の確立を実現したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

AFM 計測技術開発において、探針先端にホスト/ゲスト分子を結合し、ホスト/ゲスト間の分子レベルでの相互作用、吸着・脱着現象の解析、3次元ポテンシャルマップを得たことは大きな成果です。実際の空間材料への適用に関しては未だ課題を残していますが、今後は、再現性、精度を高め、これまで不可能だった相互作用の解明への展開を期待しています。

研究の進め方においては、領域内研究者らと多くの共同研究を実施し、それぞれの研究の遂行に有効な相乗効果がありました。計測技術に関する研究では、対象物の選定が重要であり、さがけバーチャルラボをうまく活用できたと思います。本手法の優位性について共同研究を通じてさらに確固たるものにしてください。

また、本計測技術は共通基盤技術として価値が高く、波及効果の大きい研究課題であると思います。ポテンシャルマッピングが材料やデバイスの開発加速に繋がるような事例を示すことができ

ば、技術の注目度が上がることが期待されます。加えて、探針表面への化学種の固定化に関して一般的な手法が確立できると、さらに研究の価値が増大すると思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. N. Inada, H. Asakawa, T. Kobayashi, T. Fukuma. Efficiency improvement in the cantilever photothermal excitation method using a photothermal conversion layer. Beilstein Journal of Nanotechnology. 2016, 7, 409–417. |
| 2. Y. Saga, K. Hirota, H. Asakawa, K. Takao, T. Fukuma. Reversible Changes in the Structural Features of Photosynthetic Light-Harvesting Complex 2 by Removal and Reconstitution of B800 Bacteriochlorophyll a Pigments. Biochemistry. 2017, 56, 3484–3491. |
| 3. H. Asakawa, N. Inada, K. Hirata, S. Matsui, T. Igarashi, N. Oku, N. Yoshikawa, T. Fukuma. Self-assembled monolayers of sulfonate-terminated alkanethiols investigated by frequency modulation atomic force microscopy in liquid. Nanotechnology. 2017, 28, 455603. |
| 4. E. Holmström, S. Ghan, H. Asakawa, Y. Fujita, T. Fukuma, S. Kamimura, T. Ohno, A. Foster, T. Fukuma, Hydration Structure of Brookite TiO ₂ (210). The Journal of Physical Chemistry C. 2017, 121, 20790–20801. |
| 5. Y. Takano, T. Asakawa, M. Inai, A. Ohta, H. Asakawa, Aggregation Behavior of Disulfide Linked Gemini Surfactants Compared to that of Double Tailed Surfactants. Journal of Oleo Science. 66, 1321–1328. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(招待講演)

- 3次元走査型原子間力顕微鏡を用いたソフトマター/水界面のナノ空間計測 JAIST 第3回 異分野融合セミナー(2015/2/18)
- 液中原子分解能を有する原子間力顕微鏡による固液界面計測、電子情報通信学会有機エレクトロニクス研究会(2016/7/15).
- Direct observation of host-guest complex formations by frequency-modulation atomic force microscopy in water, The 6th Symposium on Challenges for Carbon-based Nanoporous Materials (2017/7/20)

(著作物)

- 分析化学実技シリーズ 機器分析編 15 走査型プローブ顕微鏡、共立出版(2017/12 出版)