

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17467

研究課題名(和文) イオン液体中における機能性膜タンパク上の溶媒和構造と生体機能との相関の解明

研究課題名(英文) Relationship between solvation structures and functionalities of proteins in ionic liquids

研究代表者

梅田 健一 (Umeda, Kenichi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特別研究員

研究者番号：60746915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：イオン液体は難揮発性・難燃性といった特性をもつため、電気化学・生体機能デバイスへの応用が期待されている。本研究では、周波数変調型原子間力顕微鏡(FM-AFM)を用いたイオン液体の3次元溶媒和構造可視化技術の開発を行い、プロトン性イオン液体であるEthylammonium nitrate (EAN)および非プロトン性イオン液体である1-Ethyl-3-methylimidazolium dicyanamide (emim-DCA)の水溶液中において原子分解能3次元溶媒和構造の可視化に成功した。更に、分子動力学計算を用いて、溶媒和構造のシミュレーションも行った。

研究成果の概要(英文)：Ionic liquids are expected to be applied to novel electrochemical and biofunctional devices due to their unique properties such as nonvolatile, nonflammable and high electric capacity. In this study, we visualized three dimensional solvation structures in aqueous solutions of a protic ionic liquid, Ethylammonium nitrate (EAN), and an aprotic ionic liquid, 1-Ethyl-3-methylimidazolium dicyanamide (emim-DCA) and revealed the relationship between the surface/solution properties and the solvation structures by ultra-low noise frequency-modulation atomic force microscopy (FM-AFM) with 3D-force mapping technique. In addition, we simulated the solvation structures by molecular dynamics technique and gained deep insight into the molecular structures.

研究分野：電子工学

キーワード：3次元周波数変調型原子間力顕微鏡 イオン液体 溶媒和構造 分子動力学計算 密度汎関数法

1. 研究開始当初の背景

溶媒和構造は、溶液中において物質表面上において表面原子構造/電荷密度分布を反映するように形成するため、生体機能発現や電気化学反応と密接な関係にある。この構造の形成メカニズムを微視的観点から明らかにすることで、高機能な生体機能/電気化学デバイスの開発に繋がる。

これまで固液界面系における水和/溶媒和構造に関する研究は X 線/中性子線反射測定や表面力測定装置を用いて行われてきたが、ラテラル方向の分布を可視化できないという問題点があった。申請者らは、これまで走査プローブ顕微鏡 (SPM) の一種である周波数変調型原子間力顕微鏡 (Frequency Modulation Atomic Force Microscopy: FM-AFM) の低雑音化および光熱励振法・高速 3 次元フォースマップ装置の開発により、固液界面において原子分解能で 3 次元水和構造および表面電荷密度分布を可視化できる測定手法の開発に成功した。図 1(a) に示す実験結果から、水和による水玉構造が可視化されていることが分かる。更に、図 1(b) に示すように分子動力学(MD)計算を用いた水和構造のシミュレーションも行い、実験結果と同様の水玉構造が形成されることを明らかにした。

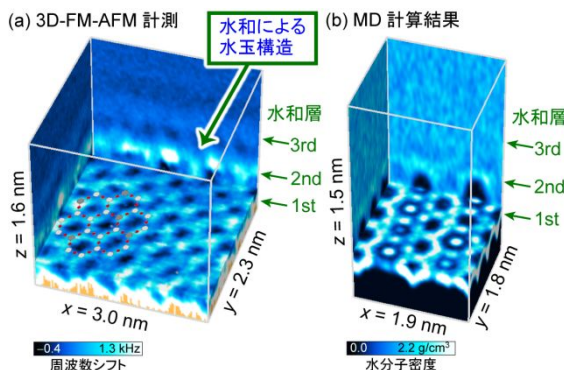


図 1: マイカ表面上において(a) 3D-FM-AFM を用いて可視化を行った 3 次元水和構造、(b) MD 計算結果。

これまで主に KCl 水溶液中において、ケイ酸塩鉱物やアルカリハライド結晶、生体試料表面上において水和構造計測を行い、様々な知見を得てきた。しかしながら、周囲の温度の影響により媒質が容易に状態変化を起こしてしまうことである。実用的な生体機能/電気化学デバイスの実現のためには、温度安定性の高い媒質中での制御・動作が必要不可欠となる。そのため、難揮発性・難燃性で且つ高電気二重層容量をもつイオン液体中における原子分解能 3 次元溶媒和構造計測および理論シミュレーションが強く求められる。イオン液体中で電気化学反応や生体機能を動作させることで、周囲の温度など使用環境を選ばない生体機能/電気化学デバイスの実現が可能となる。

2. 研究の目的

生体機能/電気化学デバイス開発に向けた、イオン液体の 3 次元溶媒和構造の可視化および溶媒和構造と生体機能発現/電気化学反応機構の相関の解明を目標とした装置・手法開発ならびに現象解明を行うこととした。

3. 研究の方法

- 1) 機能性生体分子上における 3 次元溶媒和構造計測を目標として、イオン液体中における 3 次元計測手法の確立を行う。そのために、装置系の熱ドリフトを低減するための改良を行うとともに、膨大な 3 次元データを解析するためのプログラムの開発を Visual Studio (Microsoft) を用いて行う。
- 2) 開発を行った測定手法を用いて、プロトン性イオン液体である Ethylammonium nitrate (EAN) (図 2(a)) および非プロトン性イオン液体である 1-Ethyl-3-methylimidazolium dicyanamide (emim-DCA) (図 2(b)) の水溶液中において原子分解能 3 次元溶媒和構造計測を行い、プロトン性と溶媒和構造の相関を明らかにする。
- 3) 更に、MD 計算を用いて溶媒和構造のシミュレーションを行い、実験結果の理論的解析を行う。

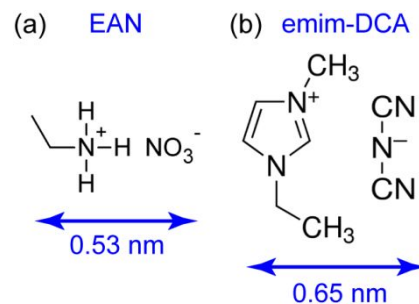


図 2: (a) EAN および(b) emim-DCA の分子構造。図中の寸法はイオンペアリングの平均直径を表す。

4. 研究成果

3D データのガウシアンスムージング、Sader 法によるフォースへの変換、Lanczos-3 関数によるデータ補間、MicroAVS および PNG 画像出力などを自動で行う解析プログラムの開発を行い、イオン液体中における 3D フォースマップ測定の最適化を行った。図 3(a,b) に示すように EAN および emim-DCA の 40mol% 水溶液中において原子分解能での 3 次元溶媒和構造計測を行った。このように EAN においてはラテラル方向に平均化されたような溶媒和構造が観察された。一方で、

emim-DCA の場合には、イオン液体の分子直径とおおよそ一致するボール状の溶媒和構造が観察された。図 3(c,d)に示す表面全体で平均を行ったフォースカーブからも、EAN の場合には、第 1 溶媒和層が単一のピークなのに対し、emim-DCA の場合には、二つにスプリットすることが分かった。

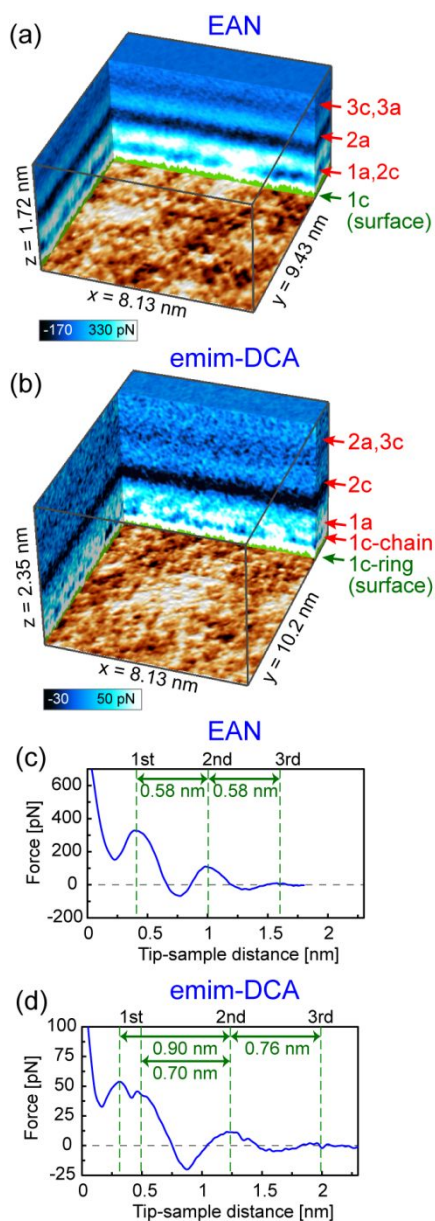


図 3: (a) EAN および (b) emim-DCA 水溶液中において観察された 3 次元溶媒和構造。図に示す溶媒和層のピークの帰属は MD 計算との比較により得られたものである。(c) EAN および (d) emim-DCA データからラテラル平均することで得られたフォースカーブ。

この実験結果を解析するために、MD 計算を用いてシミュレーションを行い、50 ns に渡って時間平均を行った分子の重量密度分布を図 4 に示す。図 4(a,b)に示すイオン密度像から、マイカ表面が負帯電であるため、正電荷をもったカチオン分子が最表面に選択的に

に吸着していることが分かる。その上に、アニオン層、更にその上にカチオン層、というようにしてカチオンとアニオンの層状構造を形成することが分かった。

更に図 4(c,d)に示す水分子密度像から、プロトン性を有する EAN の場合には、水分子はカチオンとともに表面上に吸着するが、非プロトン性の emim-DCA の場合には、水分子のみが最表面に吸着し、その上にカチオン層を形成することが分かった。更に、図 4(e,f)に示す全原子密度から、EAN の場合には、第 1 アニオンと第 2 カチオン層が水分子とネットワーク構造を形成するため、一つの層構造を形成することが分かった。これが実験的に観察された第 1 溶媒和層であると考えられる。

一方で、emim-DCA の場合には、水分子とイオン液体が分離するようにして溶媒和構造を形成することが分かった。カチオンの五員環 (ring) が最表面に吸着し、アルキル鎖 (chain) が立ち上がった吸着構造をとるため、これら二つが異なった層構造として観察されることが分かった。この第一溶媒和のカチオンのアルキル鎖とアニオンが実験でボール構造として観察された第 1 溶媒和層であることがわかった。

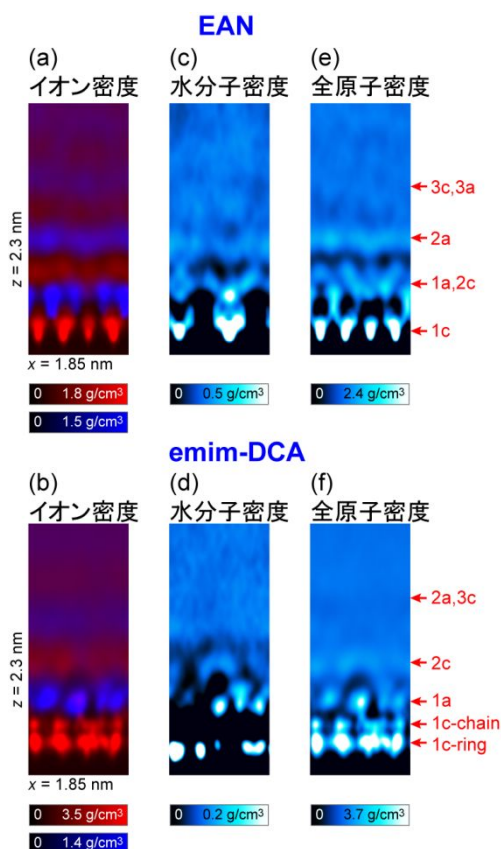


図 4: (a,b) イオン密度、(c,d) 水分子密度、(e,f) 全原子密度の時間平均。イオン密度において、赤色がカチオン濃度、青色がアニオン濃度を示す。(a,c,e) EAN、(b,d,f) emim-DCA。

これらの結果をまとめたものを図 5 に示す。プロトン性をもつ EAN の場合にはアニオン

や水分子と水素結合ネットワークを形成するために、ラテラル方向に分子数個分のクラスター構造を形成する。一方で、プロトン性をもたない emim-DCA の場合には、カチオンやアニオンが水素結合ネットワークを形成するために、分離して観察される。このように、水分子ネットワークの形成の有無が、表面近傍におけるイオン液体溶媒和構造クラスターの形成に大きな影響を与えることを明らかにした。

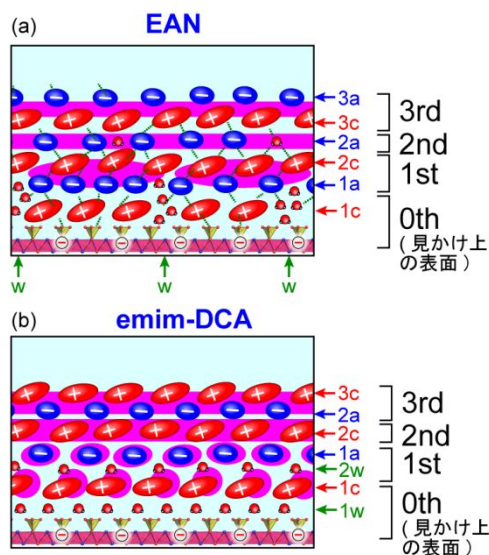


図5: (a) EAN および(b) emim-DCA 水溶液の溶媒和構造の模式図。

本研究において、機能性膜タンパク上における 3D-FM-AFM による溶媒和構造可視化の前段階として、MD 計算との比較により、イオン液体の溶媒和構造と溶液物性に関して様々な知見を得ることができた。今後は、実際に機能性生体試料表面上において溶媒和構造計測を行うとともに、MD 計算で用いられるフォースフィールドの最適化を行い、更に詳細に溶媒和構造に関して知見を深める必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Fumiaki Ito, Kei Kobayashi, Peter Spijker, Lidija Zivanovic, Kenichi Umeda, Tarmo Nurmi, Nico Holmberg, Kari Laasonen, Adam S. Foster, and Hirofumi Yamada, “Molecular resolution of the water interface at alkali halide terraces and steps”, *Journal of Physical Chemistry C*, **120**, 19714 - 19722 (2016).
- 2) Kenichi Umeda, Kei Kobayashi, Noriaki Oyabu, Kazumi Matsushige and Hirofumi Yamada: “Molecular-scale quantitative charge density measurement of biological

molecule by frequency modulation atomic force microscopy in aqueous solutions”, *Nanotechnology*, **26**, 285103-1 - 9 (2015).

〔学会発表〕(計 10 件)

国際会議 (口頭発表)

- 1) ○K. Umeda, K. Kobayashi, L. Zivanovic, P. Spijker, A.S. Foster, and H. Yamada, “Local hydration structures around boundary between heterogeneously charged surfaces by FM-AFM and MD simulation”, 24th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM24), (講演番号 S8-5), Hawaii (USA), Dec. 16th, 2016.
- 2) ○K. Umeda, K. Kobayashi, L. Zivanovic, P. Spijker, A.S. Foster, and H. Yamada, “Molecular-scale local hydration structures on heterogeneously charged surfaces by FM-AFM and MD calculation”, 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop, 9:50 - 10:10 (講演番号 45), KKR ホテル (石川県・金沢市), Oct. 6th, 2016.
- 3) ○K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, “Relationship between local hydration and atomic structures studied by liquid-3D-FM-AFM”, Kyoto Workshop on Molecular-scale Visualization of Solid-liquid Interfaces by Novel Scanning Probe Techniques, 17:05 - 17:25 (講演番号無し), 京都大学 (京都府・京都市), Mar. 10th, 2016.
- 4) ○K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, “Molecular-scale analysis of hydration structures on heterogeneous surfaces by three-dimensional force mapping”, 18th International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2015), 9:20 - 9:40, (講演番号無し), Cassis (France), Sep. 8th, 2015.
- 5) ○K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, “Relationship between surface structures/charges and local hydration structures studied by 3D-liquid-FM-AFM”, International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM2015), OP 11, Rio de Janeiro (Brazil), June 22th, 2015.

国際会議 (ポスター発表)

- 6) ○K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, “Three-dimensional local hydration structures on silicate minerals with various tetrahedral arrangements studied by liquid-3D-FM-AFM”, 19th International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2016), 18:00 - 20:00, (講演番号無し), Nottingham (UK), Jul. 26th, 2016.

国内会議 (口頭発表)

- 7) ○梅田健一、小林 圭、L. Zivanovic、P.

- Spijker, A.S. Foster, 山田啓文, 「液中動作 3D-FM-AFM および MD 計算を用いた異種帯電表面上のドメイン境界における局所水和構造の解明」, 第 64 回春期応用物理学会学術講演会(2017), 15a-303-9, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2017 年 3 月 15 日
- 8) ○梅田健一、小林 圭、L. Zivanovic、P. Spijker, A.S. Foster, 山田啓文, 「液中動作 3D-FM-AFM を用いた異種帯電表面上における局所水和構造計測」, 第 36 回表面科学学術講演会(2016), 3Dp06Y, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2016 年 12 月 1 日
- 9) ○梅田健一、小林 圭、山田啓文, 「3D-FM-AFM を用いたイオン液体 3 次元溶媒和構造と分子種の相関に関する研究」, 第 76 回秋期応用物理学会学術講演会(2016), 15a-A32-3, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市), 2016 年 9 月 15 日
- 10) ○梅田健一、小林 圭、山田啓文, 「3D-FM-AFM を用いた固液界面における局所水和構造と表面原子構造との相関に関する研究」, 第 63 回春期応用物理学会学術講演会(2016), 21p-H113-6, 東京工業大学(東京都・目黒区), 2016 年 3 月 21 日

〔産業財産権〕

- 取得状況(計 1 件)
名称: 原子間力顕微鏡におけるカンチレバー
励振方法及び原子間力顕微鏡
発明者: 粉川良平、大田昌弘、梅田健一、小林圭、山田啓文、松重和美
権利者: 株式会社 島津製作所
種類: 特許
番号: 特許第 5765146 号
取得年月日: 平成 27 年 6 月 26 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 健一 (UMEDA, Kenichi)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
特別研究員
研究者番号: 60746915

(2) 研究協力者

- 1) 山田 啓文 (YAMADA, Hirofumi)
京都大学・大学院工学研究科・教授
- 2) 小林 圭 (KOBAYASHI, Kei)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
- 3) 湊 丈俊 (MINATO, Taketoshi)
京都大学・産官学連携本部・特定准教授