

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20360020

研究課題名（和文）パルス変調引力顕微鏡の開発と水溶液中における分子認識反応の解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular recognition in liquid by pulse-modulated attractive force microscopy

研究代表者

松本 卓也 (MATSUMOTO TAKUYA)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：50229556

研究成果の概要（和文）：

絶縁体基板裏側電極からの電位変調について表面電界分布計算を行ったところ、表面吸着試料に対して十分に意味のある大きさを持つことが計算から明らかになった。DNA と翻訳タンパク質の系において、分子分極の違いを反映した特徴的なコントラストの反転を観測した。これらの結果は、絶縁体表面において、個々の分子の静電的特性を画像化できることを意味しており、パルス変調引力顕微鏡実現の基礎となるものである。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that the surface electric-field modulation from the backward electrode of insulating substrate was effective for surface molecular adsorbates. We demonstrated that electrostatic force microscopy gives characteristic contrast inversion between DNA and transcription complex images reflecting the difference of electric polarizability of these molecules. These findings indicate that the electrostatic properties of individual biological molecules can be imaged on an insulator substrate suggesting the basis of pulsed-modulated attractive force microscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：走査プローブ顕微鏡

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 薄膜・表面界面物性

キーワード：走査プローブ、分子認識、分子電極、パルス変調、水溶液

## 1. 研究開始当初の背景

分子認識は、生体反応の基本であるだけでなく、バイオチップ、バイオセンサーなど、医療や環境科学にかかわる技術の基礎となる現象である。これまで、走査プローブ顕微鏡を用いたフォースカーブ測定により、分子認識反応の反応定数やエンタルピーなど、速度論や熱力学のデータに関する詳細な解析が試みられてきた。しかし、フォースカーブ

測定では、通常、分子画像は得られないので、測定が目的分子に対して行われていることの直接的な証明は難しく、統計解析から結論が導かれることが多い。

そこで、分子認識の推進力となる分子分極や分子認識を妨げる分子の変形と分子間相互作用との間の対応関係を個々の分子について明らかにすることができる顕微鏡手法の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

分子分極と分子間相互作用は水溶液中で引力を与える。そこで、これら引力だけに変調をかけ引力のみを検出するパルス変調引力顕微鏡の開発を最終目標として、そのために必要となる絶縁体基板上での生体分子に関する分子分極画像の取得手法を確立する。

## 3. 研究の方法

絶縁体基板の裏側に電極を密着させた（金属製の試料ホルダーを用いて）電位をかけた。図1はこのときの探針先端付近の電界分布を模式的に描いたものである。対向電極が存在しないとき（図1(a)）、絶縁体基板の厚み（通常1 mm以下）は、接地された装置の構造壁までの距離に比べて充分小さいので、絶縁体基板表面の電位は裏側の電極電位とほぼ等しい。面積の広い対向電極が存在して、基板表面からナノメートルレベルの近い距離にあるとき（図1(b)）、平行平板モデルとなり、表面電位は非常に小さくなる。この極端な二つの状態の間にあるのが、接地された導電性探針の先端が試料表面から数ナノメートル以下（場合によっては、擬接触状態）にあるとき（図1(c))である。探針先端は表面の極めて近い位置にあるので、基板表面の電位は、探針直下に向かって急激に減少していく。しかし探針先端の曲率半径は極めて小さく、かつ、試料が絶縁体であるため、周辺の電界が探針直下の試料表面に大きく張り出すので、ある程度の大きさの電位が残る。この電位を計算し、さらに、表面吸着ナノ物質への電場変調を行うことで、分子分極の計測を行った。

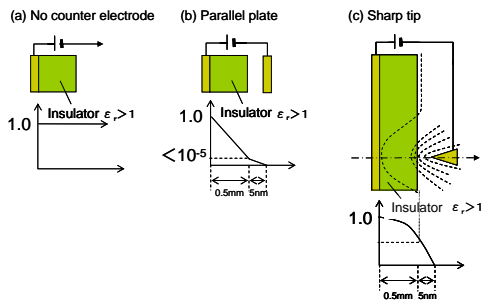


図1. 絶縁体基板表面の電位モデル

## 3. 研究成果

図2(a)は、有限要素法を用いて計算した探針直下の電位分布、(b)は、探針直下の電位の深さ依存性である。絶縁体として比誘電率 $\epsilon_0 = 6.0$ 、厚さ $t = 0.5$  mmのマイカ基板を仮定し、探針の曲率半径を $r = 20$  nm、試料-探針間距離 $z = 5$  nm、基板表面から接地壁までの距離60 mmの条件で計算を行った。絶

縁体基板裏側密着させた背面電極の電位を $V_0 = 1$  Vとしたとき、基板表面の電位 $V_s$ は約0.1Vであることがわかった。この計算から、表面と探針先端との間に位置する吸着ナノ構造に対して、充分な電場変調がかかると結論できる。

表面電位 $V_s$ は背面電位 $V_0$ に比例するが、 $V_0 = kV_s$ における比例定数 $k$ は探針先端の曲率半径、探針-表面間距離、絶縁体基板の誘電率など、探針先端周辺の構造と物性に依存する。実験的に $V_s$ を決めるのは困難であるが、図3のような数値計算を様々な条件で行ったところ、ほぼ $k \sim 0.1$ であり、通常の実験条件の範囲内であれば桁までが変わることはほとんど無い。言い換えれば、絶縁体の表面電位 $V_s$ を用いた測定は、オーダー程度の定量性を持つと言える。

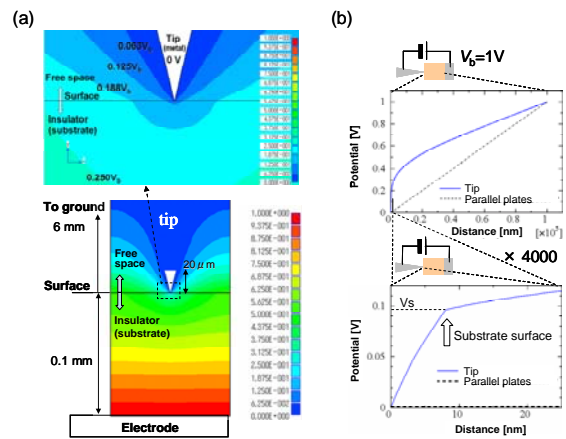


図2. 探針周辺の電位分布の計算結果

表面電位は常に変動しているが、表面電位を基準とした表面吸着物による局所的な電位変化は、吸着物上の電荷や分極を反映するので十分に意味がある。絶縁体表面と探針の間の全エネルギーは絶縁体表面と探針の電位差の二乗に比例するので、

$$U = -\frac{1}{2} C_{gap} \left( V_s - \frac{q_{gap}}{C_{gap}} - \frac{e\mu}{\epsilon_0 S} \right)^2 \quad (1)$$

となる。ここで $C_{gap}$ は表面-探針間の静電容量、 $q$ は単位面積あたりの表面電荷量とすれば $q/C_{gap}$ は表面電荷により発生した電位である。さらに $e$ は電子の素電荷、 $\epsilon_0$ は自由空間の誘電率、 $S$ と $\mu$ は表面吸着ナノ構造の表面への射影面積と双極子モーメントの表面垂直成分とすれば、 $(e/\epsilon_0 S)\mu$ は吸着物質の分極により生じた電位である<sup>18,19</sup>。さらに全双極子 $\mu$ は永久双極子 $\mu_p$ と分極率 $\alpha$ による誘起分極成分の和として、 $\mu = \mu_p + \alpha(V_s - q/C_{gap})/d$ であるので、これを(1)式に入れ

て整理すると、

$$U = -\frac{1}{2}h^2C_{gap}\left(V_s - \frac{q_{gap}}{C_{gap}} - \frac{1}{h}\frac{e\mu_p}{\epsilon_0 S}\right)^2 \quad (2)$$

ここで、 
$$h = 1 - \frac{e\alpha}{\epsilon_0 S d}$$

となる。式 (2) から全エネルギー  $U$  は  $V_s = (1/h)(q/C_{gap} + (e\mu_p / \epsilon_0 S))$  で極小値をとる。この電位  $V_s$  は表面上の電荷と永久分極により生じた電位を反映するが、試料表面と探針間の電位差をゼロにする電位であるので、誘電分極は反映しない。実験的には、 $V_s$  と比例関係にある  $V_b$  に交流変調  $V_{AC}$  を重畳し、カンチレバーに働く力の変調成分  $(dU/dz)_{AC}$  に対応する周波数シフトの変調成分  $\Delta f_{AC}$  をロックインアンプに入力し、出力がゼロとなるように  $V_b$  値にフィードバックをかければ、 $U$  が極小となる  $V_{b0}$  値を得ることができる。表面を走査しながら、そのときの  $V_{b0}$  値を記録すれば、表面電位に比例した濃淡像を得ることができる。

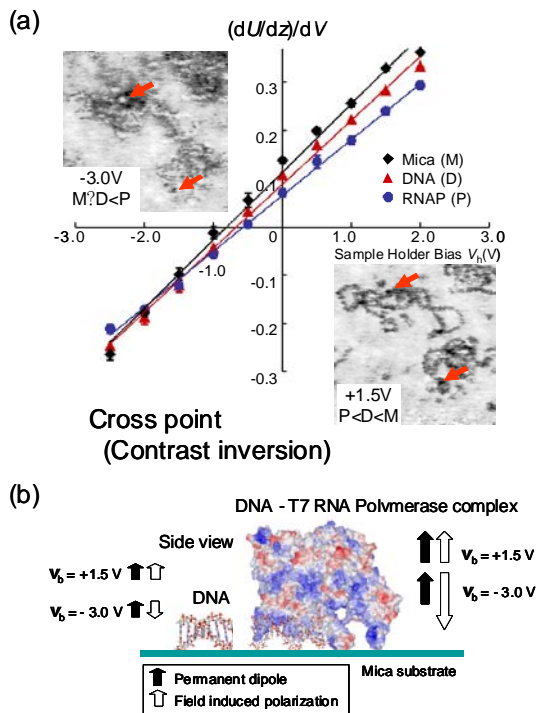


図3. (a)プラスミド DNA と翻訳タンパク質の静電引力像とコントラストの電位依存性プロット。(b)DNA と翻訳タンパク質の構造と分極のモデル。

図3 (a)は、プラスミド DNA に翻訳タンパク質 T7-RNA ポリメラーゼが結合した複合体をマイカ上に展開した試料について、マイカ

基板、DNA 上、タンパク質の上で  $(dU/dz)/dV$  値の  $V_b$  依存性をプロットしたものである。ほぼ直線状の依存性を示しているが、 $x$  軸切片はマイカ基板に比べて DNA やタンパク質の上では、プラス側にシフトしている。このシフト値から、DNA とタンパク質のマイカ表面上における双極子は、ともに基板表面側が正であることがわかった。

以上の実験結果を考察するために、図8 (b)にDNA-翻訳タンパク質複合体の構造モデルと、永久双極子、誘電分極の向きと大小関係を示した。DNA はもともと同心軸状の構造をとっているが、表面に吸着することにより、大きく変形する。DNA が基板と接している部分の構造を推測するのは非常に難しいが、少なくとも、自由空間側では、電気陰性度が大きいリン酸が DNA の外側に向かって伸びていると考えられるので、相対的に基板側が正の分極を持つと理解できる。また、翻訳タンパク質は、リン酸基を持つ DNA と結合するため、結合部位は静電的に正の電荷を有する。翻訳複合体を基板に分散吸着させた状態では DNA が基板に強く吸着するため、タンパク質の結合部位は基板側に向くことになる。すなわち、タンパク質全体の分極は、基板側が正になることになり、実験結果と良く一致する。DNA とタンパク質の双極子モーメントはそれぞれ  $0.04 \text{ D/nm}^2, 0.004 \text{ D/molecule}$  であった。DNA は長い連続体であるので、双極子モーメントの算出は、単位面積当たりの双極子密度の形で求めた。

タンパク質は、DNA よりはるかに大きく、誘電分極を示す部位も多く含んでいる。実際、 $(dU/dV)/dV$  直線の傾きは、DNA に比べてタンパク質では小さくなっていて、誘電分極が起こりやすいことを示している。このように直線の傾きに違いがあると、微分静電気力像では、バイアス電圧によるコントラストの反転現象が起きる。図8 (a)において、 $V_b = +1.5 \text{ V}$  では、DNA とタンパク質は両方ともマイカ基板よりも暗く画像化されるが、 $V_b = -3.0 \text{ V}$  では DNA が暗く画像化されている中でタンパク質は明るく観測される。この結果は、絶縁体基板の圧倒的に大きな静電容量があるにもかかわらず、表面吸着物の誘電分極の特徴を良く反映した計測、画像取得が可能であることを示している。バイオ関連物質では、異なる物質であっても、トポグラフでは、似たような大きさの粒子状にしか観察されないものが多くあり、それらの識別に役立つ可能性がある。

## 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 14 件) 全て査読有

① Y. Maeda, T. Akita, M. Daté, A. Takagi, T. Matsumoto, T. Fujitani, M. Kohyama, Nanoparticle Arrangement by DNA-programmed Self-assembly for Catalyst Applications, *J. Appl. Phys.*, 108[9], 094326 (4pp), 2010, 査読有

② A. Takagi, F. Yamada, T. Matsumoto, T. Kawai, Electrostatic Force Spectroscopy on Insulating Surfaces: the Effect of Capacitive Interaction, *Nanotechnology*, 20[36], 365501(7pp), 2009, 査読有

③ E. Mikamo-Satoh, F. Yamada, A. Takagi, T. Matsumoto, T. Kawai, Electrostatic Force Microscopy: Imaging DNA and Protein Polarizations One by One, *Nanotechnology*, 20[14], 145102(6pp), 2009, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① Yasushi. Maeda, Takuya Matsumoto, Tomogi Kawai, Imaging of Transverse Electron Transfer through DNA Molecule by Simultaneous Scanning Tunneling and Frequency-Modulation Microscopy, 19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM19), December 20 2011、Toyako Manseikaku, (Hokkaido, Japan)

② 松本卓也, バイオ分子の分極画像、第8回バイオテクニクス研究会・理研シンポジウム「蛍光相関分光と情報伝達 (8)」合同シンポジウム、2011年12月17日、北里大学相模原キャンパス(相模原市)

③ Takuya. Matsumoto, Electrostatic Force Microscopy /Spectroscopy on Insulating Substrates: Effect of Capacitive Interactions in Vacuum and Water、17<sup>th</sup> International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM17) (招待講演)、December 11, 2009、Atagawa Heights (Sizuoka, Japan)

[図書] (計 2 件)

① 松本卓也 (重川秀実、吉村雅満、河津 璋 共編)、共立出版、「有機分子試料測定のために」実験物理科学シリーズ6 「走査プローブ顕微鏡」実践編 第2章 試料の作り方・扱い方、第3節、2009、425 (170-178)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 4 件)

①名称: Probe apparatus for measuring an electron state on a sample surface  
発明者: Takkuya Matsumoto, Tomoji Kawai  
権利者: Japan Science and Technology Agency  
種類: 特許  
番号: US 7, 486, 667 B2  
出願年月日: 2008年12月30日  
取得年月日: 2011年1月25日  
国内外の別: 米国

②名称: Probe device and method of controlling the same  
発明者: Takkuya Matsumoto, Yoichi Otsuka, Yasuhisa Oaitoh, Tomoji Kawai  
権利者: Osaka University  
種類: 特許  
番号: CA 2, 503, 957  
出願年月日: 2005年2月25日  
取得年月日: 2010年2月5日  
国内外の別: カナダ

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/matsumoto/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 卓也 (MATSUMOTO TAKUYA)  
大阪大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 5 0 2 2 9 5 5 6

(4) 研究協力者

高木 昭彦 (TAKAGI AKIHIKO)  
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・企画室・特任准教授(常勤)

前田 泰 (MAEDA YASUSHI)  
産業技術総合研究所 関西センター・ユビキタスエネルギー研究部門 ナノ材料科学研究グループ  
研究員