

機関番号：12061

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21750136

研究課題名 (和文) 化学修飾グラフェンシートを支持材とした単分子構造・動態解析法の開発

研究課題名 (英文) Structure and dynamic behavior analysis of single molecules supported on chemically-modified graphene sheets

研究代表者

原野 幸治 (HARANO KOJI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70451515

研究成果の概要 (和文)：

本研究では単層グラフェンおよびカーボンナノチューブやカーボンナノホーンの透過型電子顕微鏡観察条件下における透明性を利用し、グラフェンシートへの化学修飾を基盤とした有機分子のナノレベルにおける挙動を追跡した。単分子毎のアルキル鎖とパーフルオロアルキル鎖のコンホメーション比較、結晶成長におけるエンブリオ構造といった、従来の分析法では解明不可能であった分子レベル構造を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)： Utilizing “transparency” of graphitic sheets consisting of single-walled carbon nanotube, single-walled carbon nanohorn and graphene in TEM analysis, we observed nanoscopic behavior of single organic molecules on chemically modified graphene sheets. This methodology provided us unprecedented information on structure and dynamic behavior of substances at molecular level, such as semistatistic conformational analysis of single alkyl and perfluoroalkyl chains, and structural elucidation of embryos in crystal growth process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学 (有機化学・超分子化学・ナノ科学)

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：ナノ材料・電子顕微鏡・分析科学

## 1. 研究開始当初の背景

透過型電子顕微鏡(TEM)技術の進歩により、炭素-炭素結合より短い空間分解能( $< 1 \text{ \AA}$ )が実現され、「単一有機分子の構造を電子顕微鏡で観て決める」という究極の構造決定法も夢物語ではなくなった。有機化合物試料の観察は「電子線で分子が壊れてしまうため不可能」という“常識”がかつて存在したが、分子を適切な支持材 (導電体かつ比較的軽い

元素から成る物質であることが望ましい) 上に固定化し、周囲の有機分子と相互作用しない状態にすることで、単一分子像を安定に観測することが可能であることが近年明らかになった。このような条件を満たす支持材の一つがカーボンナノチューブである。カーボンナノチューブは、内部空間に小分子を内包すること、外面の化学修飾により分子を導入することで有機分子の孤立化が可能であり、導電性をもつことや炭素が軽原子であるこ

とから観察対象分子のコントラストを妨げないという利点がある。中村らはこの特徴を利用し、カーボンナノチューブに内包した有機分子がチューブ内で並進、回転運動する様子や、ナノチューブ上の小孔を通過する様子など、単一分子の動的な振る舞いを TEM 観察によりとらえる事に成功している。また、最近申請者らはナノチューブの外面に導入したアミノ基を介して観察対象である鎖状アミド分子を結合することで、アミド分子が真空中でコンホメーション変化する様子を捕らえ、コントラスト解析によりコンホメーションの決定が可能であることを示した。この方法では分子サイズの制限が無く、分子の自由なコンホメーション変化、すなわち「動き」を追跡できるという点で、TEM による単分子観察の重要な方法論を提示できたと考える。

対象とする分子サイズに制限のなくなった今、次なる目標として、タンパク質を始めとする生体分子の構造解析を目指す。タンパク質試料の電子顕微鏡観察は薄膜状の氷に包埋した試料を用いた低温下での TEM 測定により行われているが、固体状態において分子の動きが大きく制限されているため、分子の動態解析は不可能である。近年の構造生物学の分野においては、これまでの「静的な」構造を元にした機能解析のみならず、タンパク質や DNA といった生体高分子同士、もしくはこれらと小分子基質の相互作用における高次構造変化を始めとする「動き」と機能の関連性について追求することの重要性が叫ばれており、このような分子の動きを視覚的に捕らえる分析手法の開発は分子科学が次のステージに進むための重要課題である。

しかし、現状のナノチューブを用いた固定化法をタンパク質の観察に適用するためには問題が残る。カーボンナノチューブはその疎水的表面ゆえに、タンパク質が安定に存在できる水中ではタンパク質結合の際に非特異的凝集が起こり、タンパク質の結合部分を明確に観測することができない。また、タンパク質の固定化はナノチューブ上に導入したカルボン酸への導入が一般的であるが、酸化に伴うチューブの残骸の発生が電子顕微鏡による単分子観察の妨げになる。一方でアミノ化ナノチューブを用いた方法ではタンパク質のカルボン酸の活性化を行う必要があるが、タンパク質の変性の可能性が免れない。このような状況から、単分子観察により適した支持材を選び、その化学修飾法を確立する必要がある。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、TEM による単一タンパク質分子の構造解析と動的挙動観測に向けて、グラフェンシートの化学修飾によるタンパ

ク質の固定化法の開発を行い、実際にタンパク質単分子像をとらえる事を目標とする。

グラフェンはグラファイトから切り出される単層のシートであり、炭素原子一層からなる世界最薄の物質として知られているだけでなく、伝導性や物理的強度に関して様々な興味深い挙動が見いだされており、Geim らによる電界効果トランジスタ作製の報告後わずか数年でナノ科学の中心物質となった。デバイス性能評価に用いる場合の単層グラフェンシートは繰り返し劈開法によって得ることが可能だが、最近では酸化グラファイトを化学的に処理し、官能基導入することによって溶媒中で自発的に分散し、単層もしくは2、3層のグラフェンからなるシートが得られることも明らかになっている。酸化グラファイトは末端にカルボキシ基を多数有しており、アミド化を介した有機分子の導入が可能である。そこで、タンパク質をこのカルボキシ末端に結合し、電子顕微鏡観察を行った場合、薄いグラフェンシート由来のコントラストがタンパク質のコントラストを妨害することなく、また電子線にも安定なグラフェンシート末端ゆえに安定に画像を得ることが出来、かつ分子のチャージアップの問題もグラフェンシートの伝導性で解消できる。すなわち、1残基レベルでのタンパク質の構造解析が実現できる。2年間の本研究期間内では、観察対象分子として構造既知のタンパク質を用い、電子顕微鏡によって結晶構造などと比較することにより、十分にそのタンパク質であるという確証が示せる像を得ること、およびその動きを観測することを目指す。具体的には、タンパク質をグラフェンへの固定化したのち TEM 観察を行い、分子モデリングとシミュレーションを組み合わせ、観察している像が真に目的とするタンパク質であることを証明する。他の顕微鏡測定がそうであるように、本研究でも試料調製の段階が最も重要な過程であるため、タンパク質と化学修飾グラフェンの効率的結合生成の検討を中心に、有機化学的アプローチに基づいて進めていく予定である。

## 3. 研究の方法

タンパク質観察に先だってまずは化学修飾グラフェンシートの清浄な末端が確実に観測できることが重要である。修飾の基板となるカルボン酸化グラフェンは Dai らにより既に報告されている調製法を用いる。この方法で作られたグラフェンはアミド化によるポリエチレングリコール鎖の導入が可能であり、同様の方法でタンパク質上の N 末端およびリジン残基上のアミンを介した、共有結合による固定化が可能であると考えられる。但し、このグラフェンシートは AFM による観察は行われているものの、TEM の条件下におい

て末端が確実に観測されるかどうかは現時点で不明である。そのため末端が高解像度においても安定に観測できるような試料の調製条件の探索，例えば酸化にかける反応時間や後処理，精製の方法を検討する。

このグラフェンシート末端の観察が確実にできるようになって初めて，タンパク質の結合と構造評価に移行する。初期の観測目標とするタンパク質として，(i)化学的に安定であり，(ii)単一サブユニットからなるタンパク質であり，(iii)小～中程度のサイズを持ち，(iv)電子顕微鏡像で見分けやすいような特徴的な構造や部位を有するものが適当と考える。世界で最初に結晶構造が解かれたタンパク質として知られるミオグロビン（アミノ酸残基数 157，分子量 17 kDa）はこの条件に見合ったタンパク質といえる。特に，ミオグロビンに補因子として組み込まれているヘムはその平面構造のため，高分解能 TEM においてある角度から観た際に特徴的な強い棒状のコントラストを与えるため，構造決定における重要な指標となり得る。この点については分子モデリングと TEM のコントラストシミュレーションにより既に確認済みである。数多くの像の中からこのようなコントラストを見つけ出し，アミド結合や置換基に由来する周辺のスポットの位置が，既知の結晶構造から導きだしたコントラストシミュレーションと一致することまで確認できれば，その像が目的とするミオグロビンであると断定できる。電子顕微鏡観察条件下においては，特にタンパク質の外表面付近の構造は結晶状態とは異なる構造になる可能性は高い。しかしヘム付近の構造は水素結合や配位結合により強固に支えられていることが予想される。

具体的な調製方法としては，水溶性にした酸化グラフェンとタンパク質分子を結合するため，カルボジイミドをカルボン酸の活性化剤としたアミド形成反応を利用する。TEM での評価を複雑にしないために余計な試薬類は極力用いずもっともシンプルな方法でグラフェンに固定化を行う。グラフェンシートとタンパク質が試料調製時に凝集体を形成してしまうという問題が起こる場合は，市販のカーボン被膜 TEM グリッドをアミン処理し，酸化グラフェンをグリッド上にあらかじめ結合させたのちにタンパクの結合を行うことで解決できると考えている。

ミオグロビン観察が順調に進み，高頻度でその構造決定や動的挙動の観察ができる試料調製条件，および観測条件が最適化できた場合は，観察対象をさらに拡張する。ここではウシ血清アルブミン(BSA)の構造決定を目標に据える。BSA は容易に入手できるタンパク質として広汎に用いられているにもかかわらずその X 線結晶構造は未だ明らかになっ

ていない。類似構造のヒト血清アルブミンなどからその電子顕微鏡像は予想がつくことから，これを元に類似像を見つけ，構造詳細に関する違いを電子顕微鏡像で予測することが可能であろうと考える。

#### 4. 研究成果

当初計画ではグラフェンシートを用いたタンパク質の単分子構造解析を目標としていたが，カーボンナノチューブやカーボンナノホーンを担体として用いた有機単分子観察を並行して検討していく中で，当初予想していなかった興味深い成果が複数得られた。以下に本研究期間内で得られた結果の概要を示す。

##### (1) グラフェンシートへのタンパク質の固定化と単分子観察

単原子の厚みを持った二次元物質であるグラフェンシートの化学修飾によりタンパク質を結合し，透過型電子顕微鏡測定により明瞭な像として観察することに成功した。酸化処理を施したグラフェンシートに対して鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンを縮合試薬存在下反応させることにより，フェリチンが結合したグラフェンシートを得た。これを高分解能 TEM により観察したところ，グラフェンシートの周縁部にフェリチンの鉄粒子を明確な像として捉えることができた。当初の予想通り，グラフェンシート自体のコントラストはフェリチンの像を妨げることはなく，酸化グラフェンシートが電子顕微鏡観察のための優れた分子固定化材として利用可能であることが示された。

##### (2) アルキル鎖とパーフルオロアルキル鎖の準統計的コンホメーション解析

単層カーボンナノチューブにアルキルフラレン，およびパーフルオロアルキルフラレンを内包させることにより，これらの分子のアルキル側鎖を高分解能 TEM により安定に観察することに成功した。それぞれの分子について，数十分子の構造解析を行った結果，パーフルオロアルキル鎖は伸びた all-anti のコンホメーションが優勢であり，一方でアルキル鎖については gauche を含む分子がほとんどであった。これらは過去の理論計算および実験結果と一致しており，透過型電子顕微鏡による有機分子の構造に対する準統計的解析が可能であることを初めて示した。

##### (3) 有機結晶成長におけるエンブリオ構造の解明

アミノ化したカーボンナノホーン上に 1,3,5-トリフェニルベンゼン誘導体を結合し，これをトリフェニルベンゼンの過飽和溶液に加

えて再結晶することで、ナノホーン上に導入した分子を種とした結晶化が進行した。得られた結晶のサイズを光学顕微鏡および TEM により求めたところ、サブミリメートルサイズのマイクロ結晶と、種分子を含む数分子—数十分子からなるナノサイズ集合体のみが観測され、中間のサイズの結晶は観察されなかった。この結果は Gibbs の提唱した結晶成長の理論と一致しており、観察された小数分子の会合体は結晶成長の核形成以前の過程にて生じるエンブリオ構造であるといえる。さらに詳細な構造を得る為に高分解能 TEM 観察とシミュレーションを行い、エンブリオがマイクロ結晶とは全く異なる等方的な構造をとることも明らかにした。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 原野幸治, 武永真也, 新見佳子, 吉戒直彦, 磯部寛之, 末永和知, 片浦弘道, 越野雅至, 中村栄一

“電子顕微鏡を用いたパーフルオロアルキルフラレン分子の配座および配向解析”

日本化学会第 91 春季年会

2011.3.28

神奈川大学, 横浜

(2) Koji Harano, Shinya Takenaga, Yoshiko Niimi, Naohiko Yoshikai, Hiroyuki Isobe, Kazutomo Suenaga, Hiromichi Kataura, Masanori Koshino, Eiichi Nakamura

“Conformation and Orientation Analysis of Single Perfluoroalkyl Fullerene Molecules by Electron Microscopic Imaging”

The 10th Tateshina Conference on Organic Chemistry

2010.11.13

Tateshina Forum, Chino

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/commmon/NakamuraLab.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

原野 幸治 (HARANO KOJI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：7 0 4 5 1 5 1 5