

## 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 4月 20日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750006

研究課題名（和文） STM-IETS法の巨大分子系への応用

研究課題名（英文） Application of STM-IETS measurement to a giant molecule system.

## 研究代表者

道祖尾 恭之（SAINOO YASUYUKI）

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：10375165

## 研究成果の概要（和文）：

走査トンネル顕微鏡を用いた振動分光（STM-IETS）法を巨大分子系に応用するためのシステム開発を行った。開発した装置を用いて DNA や変成蛋白質の実空間観察を行った。癌抑制蛋白として知られる p53 に関しては、濃度に依存した重合状態やその特徴的な形状を観察することにも成功した。今後、得られた知見をもとに STM-IETS 法を応用した巨大分子に対する構造解析法の確立が期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

I developed STM system for application of STM-IETS measurement to a giant molecule system. The system was applied for real space imaging of DNA and denaturation of protein. Real space imaging for protein 53, known as anti-oncogene, shows polymerized state and its various features depend on its concentration. The application of STM-IETS based on the knowledge of this research will establish a new structural analysis method for a giant molecule.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：1分子計測(SMD)、分子認識、ナノ材料、表面・界面物性

## 1. 研究開始当初の背景

走査トンネル顕微鏡（STM）でプローブとして用いられるトンネル電流を利用した吸着分子への摂動は、探針-試料間に印加する電圧に応じて吸着分子の振動や電子状態を励起することに繋がる。これらを巧みに利用す

ることで、様々な原子・分子操作を試みた報告がなされており、21世紀に入り“単一分子の化学”への挑戦が始まっている（J. Chem. Phys. 117 11033 (2002)）。特に、STMを用いた非弾性トンネル分光法（STM-IETS）では、STMのもつ優れた空間分解能はそのま

まに、表面に吸着した分子を一分子毎に振動分光可能で、空間極限での分子認識と化学種分析を同時に達成できるツールとしての注目度が高まっている。非弾性トンネルによる振動励起は、新たなトンネル経路を生成しトンネルコンダクタンスを変化させるが、その変化は高々数%のであり、STM-IETSではその僅かなトンネルコンダクタンスの変化を非常に精度よく計測する必要がある。熱によるフェルミ準位の揺らぎを抑えるために、測定は液体窒素温度以下で行われている。

実際にこれまでの研究で、STM像だけでは判別の困難な分子種もSTM-IETS法により、その同位体も含めた化学種を識別できることが報告されており、さらには、振動励起による化学反応の誘起と分子種の同定の報告もある。最近では分子の集団を対象として自己組織化膜を用い、より詳細な振動分光を試みている例もある。

ほかにも、振動励起を介した分子操作をすることで分子そのものを破壊することなくその吸着位置の詳細を明らかにした例もある。

しかしながら、測定対象となる分子は高々炭素十数個程度の“小さな”分子での報告例が大半であった。また、観測されるSTM-IETSスペクトルには本来その分子が持っている振動モード全ての情報が観測されているわけではなく、振動励起機構が完全に理解されているわけでもなかった。一方で、静的な分光法であるSTM-IETSと、動的分光法として実際に振動励起が起きていることを分子の応答反応から検出するアクションスペクトルを比較することで、実際の分子のダイナミクスからSTM-IETSスペクトルに現れない振動励起、つまり、単一分子の電子-振動結合に関連した知見を得ることができるが可能となった。

以上のような背景を踏まえ、STM像と振動スペクトルの実空間観察の結果から、“STM-IETS法の巨大分子系への応用”をした場合、分子内の“官能基検出”は可能であり、そこで得られる情報を基にした実空間での構造解析が可能ではないかという着想に至った。さらに、アクションスペクトル法の考え方から、電子注入による局所摂動に対する応答反応の詳細を観測・解析することで“官能基操作”も可能性ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、主に次に示す項目を目標としていた。

(1) 巨大分子に対する振動モードマッピングによる官能基検出法に基づく構造解析法の提案

研究背景でも触れたように、分子から観測される振動スペクトル中に現れる振動モー

ドはその分子のもつ構造に依存すると考えられる。さらに振動スペクトルが観測される空間分布は分子内で局在化している。このことから測定対象がDNA、蛋白といった巨大な分子になった場合、官能基位置や種類によって振動スペクトルの特徴が決定されることは十分に考えられる。そこで、振動スペクトルの計測位置を分子内で精密に制御して官能基毎のSTM-IETSスペクトルを取得する。さらに、得られたスペクトル群から特徴的かつ容易に識別できる振動ピークを抽出し、本研究で改良するSTM・振動像同時観察法を用い、その空間分布を明らかにする。つまり、蛍光分析における蛍光色素のように特徴的な振動モードをマーカーとして、官能基の空間分布を画像化し分子構造の特徴づけを行う。そして、この振動モードの空間分布の特徴を分子の構造解析に活用する。

(2) 局所摂動を用いた官能基操作への挑戦

表面吸着分子への局所的な摂動は、複雑な分子内エネルギー散逸過程を経て分子の拡散（移動）やや脱離、さらには原子間結合の切断による化学反応といった結果をもたらす。STMでは摂動を加える位置を精密に制御可能であることは容易に想像がつくが、実は、探針-試料間に印加する電圧に応じて吸着分子の振動や電子状態を励起することも選択できる。そこで、分子内の局所部位を選択的に電子注入により励起（刺激）し応答反応を観測・解析することで官能基部位の切断、置換といった“官能基操作”の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

(1) 測定・制御系の改良

検出信号の劣化を防ぐためのデジタル制御の探針位置制御回路を装置に組み込む。

(2) 試料準備・搬入室の構築

試料の準備は溶液浸漬法によって固定を行い、測定は超高真空中で行う。そのため、予備排気系を持つ試料準備搬送室を装置に組み込む。この方法は、真空蒸着が困難な巨大分子を基板に固定する簡便な方法である。

(3) 最適化された条件で試料を基板表面に固定化し、AFM/STMによる実空間観察・分光実験を行う。

## 4. 研究成果

本研究では、まず研究方法(1)、(2)に挙げた手法を確立するために装置を構築した。測定系では、信号検出の精度を高めるため探針位置制御を従来のアナログ方式からデジタル方式の制御回路に変更した。電流信号の増幅にはFEMTO社製のDLPCA200を用い利得・帯域ともにデジタルI/Oにより制御できるようにした。これにより対象分子に摂動を与えるために行うトンネル電子注入の動作で扱える電流量の範囲が拡大し、より

積極的に対象分子へアプローチすることが可能となった。また、電気伝導度が低い試料の観察時でも探針の試料への衝突による像の劣化が劇的に解消された。次に、溶液浸漬法によって固定を行うための、試料準備搬送室を構築した。これは、溶液から取り出した試料は不純物汚染を避けるために速やかに真空槽内へ導入しなければならず、一方で、像観察室の真空ポンプへのダメージを軽減する必要があったためである。予備排気系を持つ試料準備室にはガス導入系を追加し、不活性ガスを満たすことで試料表面への不純物の吸着を防止した。これにより、測定用の真空槽の真空度が安定に維持できるようになった。金を蒸着したマイカ基板を使用した場合、たとえ試料基板を取り出して溶液の浸漬を大気中で行った場合でも、試料表面に付着する不純物は最小限に抑えられ再構成表面を保持できることも確認できた。

最初に測定対象としたのは、末端をチオール化した poly(dG)poly(dC)DNA 鎖で金基板に対して、乾燥窒素ガス吹き付け法により伸張固定化した。観察の結果は複数の DNA 鎖がバンドルして伸張固定化されており、1本の DNA 鎖を分離して固定化するまでには至らなかった。これは、DNA 鎖間の相互作用が当初の予想以上に強かったが起因すると考えられる。

次に溶液の pH を調整することで変性・分散させることができるチトクロム c を対象に実験を行った。単純に酸性溶液の試料を滴下して乾燥させると表面張力で基板の平坦性が著しく失われた。溶液滴下後の湿度もコントロールした後、酸性溶媒で洗浄することでこの問題は解決できたが、残留する不純物との識別が非常に困難になることがわかった。そこで、最終的に試料の真空槽導入の前に超純水で残留溶媒の洗浄を行う必要があった。この方法では、浸漬時間や溶媒に係らず吸着の分布は表面全体にわたって均一とはならなかった。天然状態の吸着分子は室温での実空間観察では像の取得中に容易に分子が動く様子がしばしば見られ、一分子の状態を鮮明に識別できるほど安定な吸着像が得られず吸着サイトの特定までには至らなかった。変成状態の分子を吸着させた場合でも、高さや形状が天然のものと明らかに異なるということは無く、走査中に分解能が変化する現象が高かった。チトクロム c の組成から C14 に位置するシステインが分子内で唯一金基板に対して強固な結合を作ることが期待されるが天然状態では分子構造に起因した安定吸着に係る金-硫黄結合に対する立体障害が高いと予想される。また、変成状態の蛋白分子の折りたたみは ms オーダーで進行することから超純水で追加洗浄した際に変成状態が解ける可能性と、チトクロム c の

吸着状態は物理吸着に近い状態であることが変成・天然状態の識別すら困難にした原因と推察される。このことは、最近報告された銅と金表面に ESP 法で吸着させた分子観察の結果と一致する。後述の結果とも併せ、低温環境下でのより詳細な観察が必要である。

基板と分子間の結合がより強い状況が必要と判断し対象分子を癌抑制因子であり、同時に天然変性タンパク質である p53 に変更した。p53 分子は、一定の構造をとる規則領域と結合する分子によって構造が決定される不規則領域がある天然変性タンパク質であり複数のドメインに基板との結合可能な部位が存在する。この蛋白分子は天然変成状態にあるため、濃度を調整ながら一分子単位の実空間観察を目指した。試料は  $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$  ML の範囲で濃度調整した p53 溶液を金薄膜上に滴下して作成し、STM/AFM による観察を行った。AFM 観察では溶液濃度に依存した特長のある像が得られた。探針の曲率を仮定して観察された粒子の断面積、周囲長、円形度、体積、最大の高さを解析した。その結果、 $\sim 10^{-6}$  ML で観察された分子形状を単量体としたとき、濃度を上げていくにしたがって観察される分子形状の変化が重合状態を捉えていると説明できた。さらに、四量体の状態でも多様な構造をとり得る様子も観察された。これは溶液中で期待される濃度に依存した重合状態と一致しており、溶液中の構造が表面上でも保持されていることが明らかとなった。一方、STM 観察では、これらの粒子は非常に不安定で、特に単分子状態では、 $\sim 5$  pA 程の電流値をプローブすることが必要で安定した像を得るのが困難であった。試料を冷却して液体窒素温度 (77K) 以下で観察を行うと、不安定さは解消されつつあり、コアドメインと思われる形状のはっきりした部分と不鮮明な部分が対となったような分子が観察された。これらの分子は数百 meV の摂動を与えると簡単に表面上を移動した。これらのことから、この分子も基板との結合はさほど強くは無いと示唆される。また STM・AFM 観察からの結果は、分子の電気伝導度は部位によって非常に低いことも示している。

昨年度末に発生した災害では、高電圧アンプの電源短絡による破損、粗動機構の積層 PZT の破損等があった。その後の研究設備の点検・復旧作業により、残念ながら大きな遅延が生じてしまった。現在も IETS 測定以前に STM による実空間観察も度重なる余震の影響を受けている。今後は本研究で得られた知見を基にして、より安定した吸着状態をデザインし、STM-IETS 法の適応範囲を拡げていくことに繋げたい。

以上、“分子振動”をキーワードとした新たな構造解析法を確立するための研究を行

った。機能性分子素子に係わる有機分子の化学的状态を原子スケールで分析する手法が必要とされていることは明らかである。“分子振動”は、分子の吸着過程や拡散過程のメカニズムと密接に関係しており、学術的にも非常に重要な研究課題である。本研究で扱った STM-IETS は、単一分子に対する振動分光法であり直接的な化学種分析法のひとつであり“局所振動”による分子の直接操作は吸着過程や拡散過程の関わる様々な応用分野、とくにボトムアップ的な手法を用いるナノテクノロジー分野においても今後ますます重要となってくる。一方で、昨今の神経性疾患やがん治療の医療研究分野はいうに及ばず、生物物理の研究分野においても変性蛋白質の構造解析やDNAなどで求められており、官能基検出は重要で、その“局所振動”による直接操作にはプローブ顕微鏡ならではの特色がある。例えば、構造変化を起し機能発現に至る蛋白質のダイナミクス、いわゆる「蛋白質の折りたたみ問題」では、変性蛋白質の構造解明そのものが最重要課題であり、STM-IETS による官能基検出に基づく構造解析法のコンセプトは変性蛋白などの複雑な巨大分子の構造解析に応用されることが期待される。

#### 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1件)

1. Shahed. SMF, Sainoo. Y, Komeda. T  
“Scanning Tunneling Microscope Study of Surface Morphology Variation of CeO<sub>2</sub>(111) with Changing Annealing Condition” J. Appl. Phys. 50 (2011) 08LB05. DOI: 10.1143/JJAP.50.08LB05、査読あり

[学会発表] (計1件)

1. Y. Sainoo, S. M. F. Shahed and T. Komeda.  
“STM Study of the Redox Behavior on CeO<sub>2</sub>(111) Surface with Hydrogen”、18<sup>th</sup> international Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM18), Atagawa, Japan, Des. 2010.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

道祖尾 恭之 (Sainoo Yasuyuki)  
東北大学・多元物質科学研究所・助教  
研究者番号：10375165

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：