

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510157

研究課題名(和文) 小分子系に対応した走査型アトムプローブ測定手法の開発とその生体分子への応用

研究課題名(英文) Development of scanning atom probe technique for small molecular systems and its application for biomolecules

研究代表者

谷口 昌宏 (TANIGUCHI, Masahiro)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：30250418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：走査型アトムプローブはアトムプローブをもとに代表者らが開発した装置である。走査型アトムプローブによって分子性試料の分析を行うための手法の開発を行なった。試料分子の担持体にカーボンナノチューブを用いることで、基本的な生体分子としてアミノ酸16種類について、マスペクトルを得るための条件を見出すことができた。分子性の試料の電界蒸発にあたっては、分子の拡散と試料先端部への移動が重要であり、低温への冷却はむしろ分析を困難にすることが明らかとなった。最適な電界蒸発のトリガー手法の選択のために、電圧/レーザーのトリガーを交互に印加してマスペクトルを同時取り込みし比較できるようなシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：Scanning atom probe was applied for molecular systems which consist not of covalent bonded materials but of free molecules. Using single walled carbon nanotube as solid supporter which produced a strong field on their protruding apexes, mass spectra of 16 of 20 common amino acids were obtained. The results suggested that the migration of molecules to the apex region of the support is required for stable analysis. The cooling down the temperature was not favored for the analysis of molecules examined here. A new dual trigger system was developed to apply voltage pulse and laser pulse alternately to an identical sample. The dual trigger analysis showed that the mass spectrum obtained by voltage pulse and laser pulse were different and the selective evaporation would be possible by controlling the sequence of triggers

研究分野：表面化学、表面分析

キーワード：走査型アトムプローブ 質量分析 生体分子 アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 質量分析とその背景

質量分析は高感度元素分析ができるキャラクタリゼーション手法として広く認知されている。質量分析の分析対象は種々の無機・有機分子を始めとして蛋白質等の巨大分子に至るまで拡大を続けている。

化学あるいは生物分野での有機物、生体関連分子の化学分析においては、元素分析とは別に分子種の特定ができることが望まれるので、分子イオンの検出を主眼においたソフトイオン化手法の確立が望まれている。

### (2) 質量分析における課題

有機分子やアミノ酸、オリゴマー等の比較的小分子量の生体分子については、加熱により生成したガス分子を電子衝撃法でイオン化する従来主流の方法によるデータの蓄積はあるものの、ソフトなイオン化とは程遠いため、スペクトルの解釈が複雑であるという問題がある。また、巨大分子のソフトイオン化手法はマトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization, MALDI) の確立により著しく進展したものの、一方、MALDI 法での試料調製に用いられるマトリックス物質に由来するシグナルが分析対象分子のイオンピークと重なるために、MALDI 法は小分子系の有効な分析方法とは云えない。

従来方式の質量分析法は検出感度が十分であっても、試料のガス化、イオン化のプロセスが位置特異的でないために、微細領域での分析位置情報を得るには不向きであった。二次イオン質量分析法(Secondary Ion Mass Spectrometry; SIMS)、あるいは MALDI 法はイオンビーム、レーザービームの照射位置の走査により位置情報と質量スペクトルの情報を同時に取得できる手法である。ただし、SIMS においては、イオン化の手法がハードであること、MALDI においてはマトリックスから生成するイオンがスペクトルの解析を困難にするなどの欠点がある。

### (3) 本研究での取り組み

本研究で用いられる走査型アトムプローブ(Scanning Atom Probe, SAP)はアトムプローブ(Atom Probe, AP)を元にして、AP における試料への制約を取り払った装置である。AP は個々の原子を電界蒸発と呼ばれる現象により陽イオンとして取り出し、直接的に逐一検出する装置である。電界蒸発によるイオン生成においては、固体状態の試料の最外表面から個々の分子あるいは原子が強電界によって直接にイオン化して蒸発することが特徴である。このため、ガス化のために試料を加熱する必要がないことは、主流となっている質量分析法を補完し、特異的な知見を与えると期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究での手法の特長 従来からの質量分析手法あるいは近年開発され適用範囲が拡大している MALDI、SIMS などの方法に対し、AP は「1. 背景」にも述べたように、次のような特性を持つ。1 あらかじめ先鋭に整形された試料の最先端近傍に生じる強電界によって、表面原子のイオンがほぼ 100% の確率で生成する、2 イオン生成のためには電圧を試料に印加するのみで良く、熱的な励起は基本的に不要である。これら AP の特長は適用対象が金属試料の場合はそのまま利点とみなせる。

一方、本研究課題のように化学における一般的な試料、すなわち分子の集合体に対して AP を適用しようとする、これらの特性が次のような制約となる：1 試料を先端半径 100nm 以下の先鋭な針状に加工する必要がある、かつ、その状態で試料が力学的な強度も備えている必要がある、2 試料は針の先端にほぼ静止している必要がある、低温であることがむしろ望ましい。試料位置が明確でない形態、例えば蒸気(ガス)などの状態では供給できない、ということになる。AP が金属分野の研究で成果を挙げている一方で、それ以外の分野への適用が遅れたのは上記の厳しい制約により、試料作製方法が全く未解決であったことによる。

(2) 本研究での目的 本研究課題においては、既に我々が開発していた走査型 AP (SAP) によって試料の形状、寸法への制約が大幅に緩和できたこと、ならびに、試料の担持体としてカーボンナノチューブ(CNT) を利用することで分子性試料をそのまま AP 分析することを目指した。具体的な目標は、アミノ酸などの低分子量の分子(小分子)で、かつ従来法では熱的なガス化が必要であった試料を加熱なしに質量分析するための手法の確立することである。さらに、SAP によってアミノ酸の分析データを収集し、それらを従来法での質量スペクトルと比較対照することで SAP の小分子系への応用の可能性を探ることが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 実験装置 本研究課題においては、研究代表者らが開発したりフレクトロン型走査型アトムプローブと二次元位置敏感型イオン検出器による三次元 SAP (3D-SAP) を測定に用いる。これらはいずれも、微小引出電極を試料正面に備えることで、試料破壊の抑制、形状条件の緩和などに成功している。また、金属などの固体試料を AP 分析する場合は試料を He 冷凍機などで低温( $T < 100\text{K}$ ) に冷却することが一般的である。本研究では原子、分子の表面拡散を積極的に利用する立場から、He 冷凍機ではなく、室温近傍での冷却を想定して新たな冷却機構を設置した。

(2) 試料の作製方法 AP 分析を行おうとす

るとき、試料の先端に強い電界を生じさせる必要があるため、鋭い針状で先端の外径が半径 100nm 未満にする必要がある。分子結晶の場合、分子間力だけではそのような形態を維持できないので、そのような形状の条件を満たす担持体に分子を付着(物理吸着あるいは可逆な化学吸着)させることが必要である。

金属の針状試料は表面の反応性(触媒活性)が分子試料の分解を促進することが懸念されるために、ここでは用いないこととした。代わって、新たな高機能材料として注目されている様々なカーボンナノチューブ(Carbon Nanotube; CNT) の AP 分析を研究代表者らが SAP で行った結果、一酸化炭素の高圧下での触媒還元によって製造された単層 CNT (HiPCO - Single Walled CNT; SWCNT) の純度が他の CNT と比較して格段と高く、検出イオン種も  $C^{2+}$  と  $C_2^{2+}/C^+$  の 2 種のイオンが主であり、水素、酸素等は勿論のこと、CNT 生成の際に用いられる触媒も検出されない事が分かった。そこで、HiPCO-SWCNT を担持体として用いて分析を行なった。

通常の AP では試料が CNT であっても厳密に単一であることが要求されるが、SAP においては複数のチューブが絡み合ったバンドル状の試料でも AP 分析可能である。

試料の作製はまず電解研磨によって先端を細くしたタングステン W の針に銀ペーストで SWCNT の小塊を固定する。これを加熱乾燥させた後、目的試料であるアミノ酸の水溶液を付着させ、空気中で乾燥させた後、分析装置にマウントし、SAP で分析を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) アミノ酸、ペプチドの AP 分析結果蓄積生体に共通の 20 種類のアミノ酸につき順次分析を進めた。アミノ酸は側鎖の構造をもとに、炭化水素系(5 種)、芳香族系(3 種)、アミン系(3 種)、アミド基系(2 種)、カルボキシ基系(2 種)、ヒドロキシ基系(2 種)、チオール系(2 種)、その他(1 種)に区分される。これらのうち、グリシン、アラニン、アスパラギン、システインを除く、16 種類のアミノ酸については、マススペクトルが得られ、マスピークの帰属と試料の分子構造との対応が確認できた。20 種の基本的なアミノ酸以外では、2 個のアミノ酸がペプチド結合したジペプチド、シトルリンなどについても分析ができた。

有意のマススペクトルが得られなかった 4 種類のアミノ酸については、分子量が比較的小さいこと、アスパラギンを除けば側鎖の極性が小さいことが共通している。電界蒸発が起きて AP でスペクトルを得るには、対象分子が強電界にさらされていることが必要であり、分子が鋭い試料の最先端の位置に保持されていなくてはならない。試料の分子量が小さい場合、試料分子を担持した CNT を真空装置中で排気している間に昇華して失われる可能性がある。しかし、光学顕微鏡で

CNT への付着が確認できるような条件でも分子固有のマスピークが出現しないことから、小分子がマクロに CNT に付着していても、電界の強い末端部に分布していない、あるいは、緩慢に電界蒸発が進行し、パルス的な制御ができていない可能性がある。

(2) AP 分析ができた試料についてのまとめ 16 種類の基本アミノ酸、およびジペプチドなどの分析結果をまとめると次のようになる。

分子イオン、あるいは大きな質量のクラスターイオンが検出されるアミノ酸は芳香族アミノ酸、ヒスチジン、プロリンなどに限定される。

直鎖の側鎖を持つアミノ酸の場合、水素以外の原子数が 1,2,3 個程度までの小さいクラスターのマスピークが主体のマススペクトルが得られる。

カルボキシ基、アミド基のあるアミノ酸などでは、個々のアミノ酸を直接識別できる特異的なマスピークが現れる。しかし、それ以外のアミノ酸は指紋ピークになるピークが見出されなかった。

ロイシンとイソロイシンは側鎖の枝分れによる構造異性体であるが、この二者については、側鎖に由来するクラスターピークの有無の違いが現れた。しかし、カウントの小さいピークなので、全体のマススペクトルの上ではごく僅かな違いとみるべきであろう。

特徴的なマスピークから個別の試料を識別する代わりに、個々のマススペクトルのイオン計数値と試料分子の元素組成の対応を求めたところ、他のイオン化手法による質量分析の結果に比べ、AP 分析から求めた元素組成は良い一致を示した。

固体試料の AP 分析の際、試料原子の電界蒸発と連動して印加電圧を徐々に増やしていく。これは先端半径の増大に合わせて印加電圧を増やして電界を一定に保つためである。CNT に担持したアミノ酸の場合、必要な電界に到達した後は、ほぼ一定の印加電圧でイオンが継続的に検出された。その状態ではイオンの検出レートは分子の担持体表面上での拡散によって律速されているようであった(トリガーレートに依らない)。そのため、通常の AP 分析で良しとされる低温( $T < 200K$ )への冷却はイオンの計数値が激減するため、逆効果であることが分かった。

(3) 新しい測定手法の開発

新しい担持体の探索

HiPCO 法による SWCNT は優れた担持体であるが、継続的な入手性に問題がある。そこでこれ代わる担持体としてカーボンファイバー(CF)の AP 分析を試みたところ、実験室レベルで可能な前処理

のみでCFのAP分析が可能であることが確かめられた。今後、バンドル状態のCNTと比較した際の表面積の小ささなどが解決されれば、CFが担持体として利用できることが分った。

電圧パルス・レーザーパルスの交互印加によるAP分析システムの開発

AP分析においてはパルス電界蒸発のトリガーが必要であるとともに、それによる電界蒸発機構の違いも議論の対象となっている。CNTを用いたアミノ酸のAP分析ではトリガーに主に電圧パルスを用いた。近年活発に研究されている固体試料の3次元AP分析では短パルスレーザーをトリガーに用いることが一般的である。両トリガー手法の比較を厳密に同一試料で行うことを目的として、二つのトリガーを一発ずつ交互に印加し、検出されるイオンをトリガーを区別して計数できるシステムを製作した。

これにより、金属試料では脱離するイオンの価数に違いが現われた。一方、CNTに担持したアミノ酸の試料からは、電圧パルスとレーザーパルスで、そもそも違う元素のイオンが脱離することが確かめられた。後者の場合、マスペクトルを確認しながら、トリガーを任意に選択できるようにシステムを改良することで、より有用な分析結果が得られるものと期待される。

#### 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6件)

M. Taniguchi and O. Nishikawa,  
Scanning Atom Probe Analysis Alternately Triggered by Voltage and Laser Pulse,  
e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, 査読有,  
vol. 14, 69-72 (2016).

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ejssnt/14/0/14\\_69/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ejssnt/14/0/14_69/_article)

M. Taniguchi and O. Nishikawa,  
Atomic level analysis of dipeptide biomolecules by a scanning atom probe,  
Journal of Vacuum Science and Technology B, 査読有,  
vol. 34, 03H109-1,-3 (2016)

<http://dx.doi.org/10.1116/1.4941426>

K. Tamura, J. Yoshida, T. Kitazawa, M. Taniguchi, A. Yamagishi and H. Sato,  
Effects of Auxiliary Ligands of Pd(II) Dimers on Induction of Chiral Nematic Phases: Chirality Inversion and Photo-responsive Structural Change,  
Dalton Transactions, 査読有, vol. 44,

3209-3215 (2015)

DOI: 10.1039/C4DT02812K

O. Nishikawa and M. Taniguchi,

Atomic level analysis of carbon fibers by the scanning atom probe,  
Surface and Interface Analysis, 査読有,  
vol. 46, 1231-1235 (2014).

DOI 10.1002/sia.5695

Hisako Sato, Fumi Sato, M. Taniguchi and A. Yamagishi,

Chirality effects on core-periphery connection in a star-burst type tetranuclear Ru(III) complex:  
application of vibrational circular dichroism spectroscopy,

Dalton Transaction, 査読有,  
vol. 41, 1709-1712 (2012). (Hot Article),  
DOI: 10.1039/C1DT11510C

M. Taniguchi, O. Nishikawa and A. Ikai,

Atomic Level Analysis of Biomolecules by a Scanning Atom Probe,  
Surface and Interface Analysis, vol. 44,  
721-723 (2012).

DOI: 10.1002/sia.3873

[学会発表](計13件)

西川治, 谷口昌宏

走査型アトムプローブによるアミノ酸の原子レベルでの解析:グルタミンとグルタミン酸

応用物理学会春季学術講演会

2016年03月22日

東工大大岡山キャンパス

M. Taniguchi and O. Nishikawa

Scanning Atom Probe Study of Molecular System

10th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '15 (ALC'15) (国際学会)

2015年10月27日

くにびきメッセ(鳥根県松江市)

西川治, 谷口昌宏

走査型アトムプローブによるアミノ酸の原子レベルでの解析:バリンとプロリン

応用物理学会秋季学術講演会、

2015年9月15日、

名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

M. Taniguchi,

Analysis of amino acids by the scanning atom probe,

The Scientific International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions (国際学会)

2015年6月26日

成蹊大学(東京都武蔵野市)

谷口昌宏, 西川治,

アトムプローブにおける電界蒸発トリガ

ー方法、日本化学会 第 95 春季年会、  
2015 年 3 月 26 日、日大理工学部 船橋キ  
ャンパス(千葉県船橋市)  
西川治、谷口昌宏、  
走査型アトムプローブによるペプチドの  
原子レベルでの定性・定量解析、  
第 62 回応用物理学会春季学術講演会、  
2015 年 03 月 11 日、東海大学湘南キャン  
パス(神奈川県・平塚市)  
谷口昌宏、  
アトムプローブにおける電界蒸発トリガ  
ー方法の比較  
第 34 回 表面科学討論会、2014 年 11 月 6  
日(島根県立産業交流会館)  
西川治、谷口昌宏  
走査型アトムプローブによる炭素繊維の  
原子レベルでの解析(3)定量的組成分析、  
第 75 回応用物理学会秋季学術講演会  
2014 年 09 月 17 日  
北海道大学(北海道・札幌市)  
M.Taniugchi  
Atomic Level Analysis of Etched  
Carbon Fibers by the Scanning Atom  
Probe,  
SISS-16(二次イオン質量分析法および  
イオン-固体相互作用にもとづく関連手  
法の国際シンポジウム、学振 141 マイク  
ロビームアナリシス委員会)  
2014 年 6 月 19 日(北海道大学)  
谷口昌宏、西川治、  
3 次元アトムプローブによる炭素繊維の  
原子レベルでの解析  
第 61 回応用物理学会学術講演会  
2014 年 03 月 17 日  
青山学院大学(神奈川県相模原市)  
谷口昌宏、西川治  
走査型アトムプローブによる有機高分子  
膜(ウルシ膜)の分析 2  
第 33 回表面科学学術講演会  
2013 年 11 月 27 日  
つくば国際会議場(茨城県つくば市)  
O. Nishikawa and M. Taniguchi,  
Atomic Level Analysis of Carbon  
Fibers by the Scanning Atom Probe,  
9th International symposium on  
Atomic Level Characterizations for  
New Materials and Devices '13  
(ALC'13)  
2013 年 12 月 05 日  
アメリカ合衆国ハワイ州ハワイ島  
M.Taniugchi  
Atom probe analysis of  
electroconductive polymers  
SISS - 15 in 2013 (The International  
symposium on SIMS and Related  
Techniques Based on Ion - Solid  
Interactions at Seikei university)  
2013 年 4 月 26 日  
成蹊大学(東京都武蔵野市)

〔図書〕(計 1 件)  
「マイクロビームアナリシス・ハンドブ  
ック」日本学術振興会 マイクロビームアナ  
リシス第 141 委員会編 (オーム社、2014 年、  
全 708 ページ)  
「2・5・9 アトムプローブ電界イオン顕微鏡」  
pp. 271~281.を担当

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称: 軸性キラリティを有する Pd(II)<sub>2</sub> 核錯  
体からなる液晶物質キラルドーパント  
発明者: 田村堅志、山岸皓彦、佐藤久子、北澤  
孝史、谷口昌宏  
権利者: 田村堅志、山岸皓彦、佐藤久子、北澤  
孝史、金沢工業大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-079713  
出願年月日: 2014 年 04 月 08 日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 昌宏 (TANIGUCHI, Masahiro)  
金沢工業大学・バイオ・化学部・教授  
研究者番号: 30250418

### (2) 研究分担者

山岸 皓彦 (YAMAGISHI, Akihiko)  
東邦大学・理学部・訪問教授  
研究者番号: 70001865

### (3) 連携研究者

西川治 (NISHIKAWA, Osamu)  
金沢工業大学・産学連携室・教授  
研究者番号: 10108235