

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03870

研究課題名（和文）原子間力顕微鏡を用いた固液界面における構造ゆらぎと水和構造との相関に関する研究

研究課題名（英文）Investigation of relationship between local hydration structures and surface structures using atomic force microscopy

研究代表者

小林 圭 (Kobayashi, Kei)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40335211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：液中AFMにおける2次元・3次元フォースマップ法の高速化、試料調整および探針洗浄方法の最適化により、フォースマップにあらわれるドリフトおよび探針変化の影響を軽減し、測定結果の信頼性および再現性を高めた。また、アルカリハライドのステップ端、鉱物試料、さらには分子性表面やタンパク質分子を対象にフォースマッピング測定を行い、さらに分子動力学（MD）計算によって理論的な水分子密度分布を得て、実験結果と理論計算結果を比較し、表面の原子レベル構造やその構造ゆらぎと水和構造との相関を議論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固液界面は、結晶成長や触媒反応などの物理・化学現象や、生体分子がその機能を発現する活性場として極めて重要な役割を担っている。本研究で解明された表面の原子レベル構造やその構造ゆらぎと水和構造との相関に関する知見により、また本研究において開発された2次元・3次元フォースマップ法を用いて界面反応解析や生体分子機能解析を行うことにより、固液界面における物理・化学現象を利用したデバイスの開発や、生体分子の機能解明が進展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We recently developed frequency-modulation atomic force microscopy (FM-AFM) in liquids and made it possible to explore solid-liquid interface properties such as the hydration structures and surface charges with a nanometer-scale resolution by two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) force mapping techniques. In this project, we optimized the force mapping procedures to make the hydration measurements more reliable and reproducible. We employed FM-AFM to study the relationship between the local hydration structures and fine surface structures on alkali halide crystals, clay minerals, and molecular surfaces such as self-assembled monolayers and two-dimensional protein crystals. The measured local surface structures were compared with the water density distributions predicted by molecular dynamics (MD) simulations.

研究分野：工学

キーワード：走査プローブ顕微鏡 原子間力顕微鏡 固液界面

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原子間力顕微鏡 (AFM) は、生体試料を液中においてナノスケール分解能で観察できる唯一のツールである。われわれは、原子間力顕微鏡 (AFM) の変位検出系における変位換算ノイズをショットノイズ限界付近にまで低減する技術を開発し、また低 Q 値環境下でもカンチレバーを安定に自励発振させられる位相同期ループ (PLL) 回路の開発に成功し、周波数検出型 AFM (FM-AFM) を液中動作させ、マイカ原子像や DNA の二重らせん構造や抗体分子の 2 次元結晶を世界最高レベルの空間分解能で観察することに成功した。また、試料表面 / 溶液界面において、試料表面上での XY 平面内の各点においてカンチレバー周波数シフト-距離 (Z) カーブを取得し、これを繰り返すことで相互作用力分布を 2 次元 (ZX) または 3 次元 (XYZ) で可視化できる 2 次元・3 次元フォースマップ法を開発し、鉱物結晶や生体分子上での水和構造に起因する周波数シフトマップまたはフォースマップの観察に成功した。

しかしながら、水和構造のコントラストは探針先端の状態に非常に敏感であり、一連の測定の途中で水和構造のコントラストが変わることが多く、測定の信頼度の問題が指摘されていた。また、生体分子は水中において、その形状が保たれているのは分子表面に形成された水和構造ネットワークによるところが大きいにもかかわらず、生体試料表面近傍において、水和構造が観察されないことが多いことが分かってきた。

### 2. 研究の目的

液中 AFM における 2 次元・3 次元フォースマップ法の高速度化、また試料調整および探針洗浄によって得られるフォースマップにあらわれるドリフトおよび探針変化の影響を軽減し、測定の信頼性を高める。また、アルカリハライド等の無機材料単結晶表面のステップ端およびタンパク質分子をモデル試料とし、表面の原子レベル構造やその構造ゆらぎと水和構造との相関を議論する。これにより、3 次元フォースマップ法を界面反応解析手法または生体分子機能解析手法として確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

2 次元・3 次元フォースマップ法において、一般的には探針を試料表面に近接 / 離反させた際の周波数シフトを記録する方法が採用されているが、離反させる過程の周波数シフトの記録を廃することで、およそ測定時間を 1/2 に短縮する。また、濃度の調整により結晶成長の成長・溶解を抑制し、さらに探針の洗浄により測定信頼性・再現性を向上する。

アルカリハライド単結晶のへき開面におけるステップ端、表面が一様でない鉱物のへき開面や分子性表面、さらにはタンパク質表面において 2 次元・3 次元フォースマッピングによる水和構造測定を行う。また、分子動力学 (MD) 計算によって理論的な水分子密度分布を得て、実験結果と比較し、表面の原子レベル構造やその構造ゆらぎと水和構造との相関を議論する。

### 4. 研究成果

NaCl 結晶(001)面のステップ近傍における 2 次元周波数シフトマップ測定を行った。NaCl 結晶は大気中でへき開し、観察溶液には超純水に NaCl を飽和濃度近傍まで溶かした水溶液を用い、結晶の成長・溶解を抑えた。

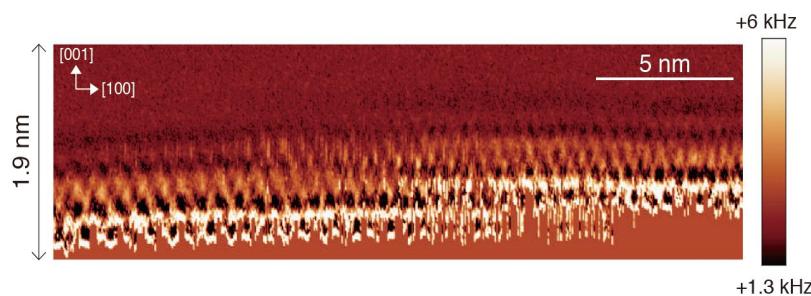


図 1: NaCl ステップ近傍の 2 次元周波数シフトマップ

図 1 は、ステップ近

傍における垂直な面内で取得した 2 次元周波数シフトマップである (25 nm × 1.9 nm)。1 秒あたりの周波数シフトカーブの測定時間は 0.1 秒とした。各周波数シフトカーブにおいて、水和構造に由来する振動的な周波数シフトを確認することができ、また 2 次元周波数シフトマップから水和構造が [100] 方向に結晶の格子定数と一致する周期性を有していることが分かった。

ステップ揺らぎの影響がない上下のテラス上で取得した 2 本の周波数シフトカーブとステップ揺らぎの領域で取得した周波数シフトカーブを比較したところ、3 本のカーブを比較すると、上下のテラス上で測定した周波数シフトマップから判断される水和層の位置に対し、ステップ揺らぎの領域で測定した周波数シフトマップから判断される水和層は、それらの間に位置することが分かった。これは、ステップ揺らぎの影響で探針直下のテラスの位置が上下したためと推察された。

次に、層状ケイ酸塩のクリノクロア ( $(\text{Mg,Fe})_5\text{Al}(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ ) のへき開面の水和構造計測を行った。クリノクロアは図 2 に示すように、テープでへき開するだけで正帯電の brucite-like ( $(\text{Mg,Fe})_2\text{Al}(\text{OH})_6$ 、以下 B) 領域および負帯電の talc-like ( $(\text{Mg,Fe})_3(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ 、以下 T) 領域をもった表面を得ることができる。B および T 領域はそれぞれ層間のイオンを排除したマイカおよびハイドロタルサイトと等価である。100 mM KCl 水溶液中で 3 次元周波数

シフトマップ測定を行った。各周波数シフトスカープをフォースカープに変換して得られた 2 次元周波数シフトマップを図 3 に示す。左側の T 領域上では斥力が強い領域がドット状に分布していることが分かり、分子動力学 (MD) 計算によって得られた水分子密度分布とよい一致を示した。実験・理論をさらに詳細に比較検討したところ、T 層上の見かけ上の表面は第 1 水和層であり、ドット状の構造は第 2 水和層に相当することが分かった。また、右側の B 領域は正帯電領域であるため、負に帯電した探針との間に遠方から引力がはたらいていたため、全体的に暗いコントラストが得られていることが分かる。

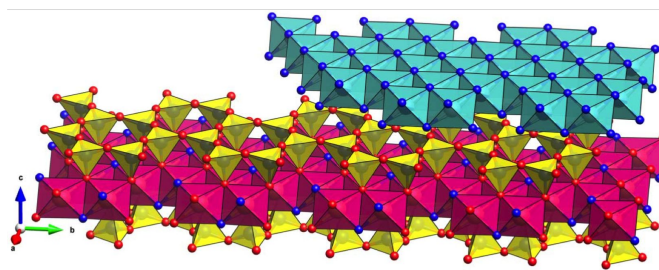


図 2: クリノクリアの構造図

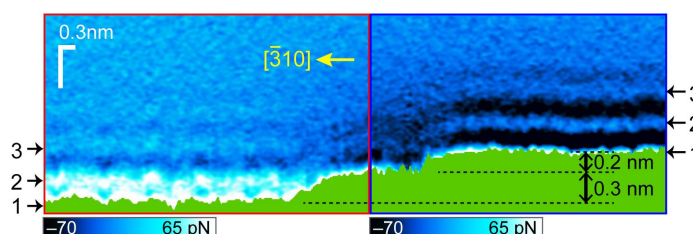


図 3: クリノクリア上で取得した 2 次元フォースマップ

一方、表面の官能基が異なるアルカンチオール自己組織化単分子膜 (SAM) を対象として水和構造評価を行い、その表面構造と水和構造との相関を議論した。図 4 は、マイカ基板上 Au(111) 表面に形成した 11-mercapto-1-undecanol (以下 C11OH) の SAM における 2 次元周波数シフトマップである。左側は  $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$  構造、左側は  $c(4 \times 2)$  超格子構造の C11OH の SAM において測定されたものである。赤色、青色の矢印は表面における凸部、凹部の位置をそれぞれ表している。両構造では表面の凹凸の周期が異なるが、水和構造の周期もそれに呼応して異なり、それぞれ表面構造を反映した水和構造が観察され、表面分子構造のわずかな違い (図 4 下) が水和構造に違いをもたらすことが明らかとなった。

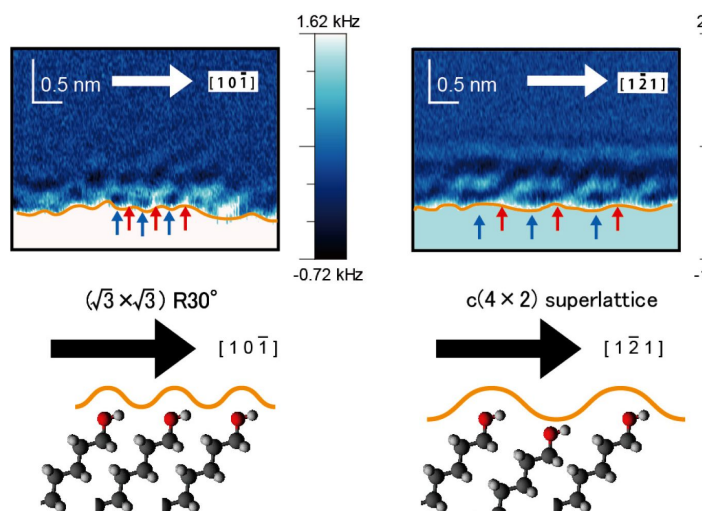


図 4: アルカンチオール SAM の 2 次元周波数シフトマップ

また、これまで末端官能基の異なる SAM を作製し、水和構造計測が行われることはあったが、測定ごとに探針の状態が異なるため、定量的な水和構造の比較を行うことは難しかった。そこで、メチル基終端およびカルボキシ基終端の分子を用いて相分離 SAM を作製し、水和構造計測を行ったところ、メチル基終端領域では表面に平行な帯状のコントラストが見られ、面内依存性のないような水和層が形成されており、カルボキシ基終端の領域では約 0.3 nm 間隔で振動する水和力が計測された。

タンパク質試料に関しては、マイカ基板および脂質二重膜上へストレプトアビジン (SA) を局所的に注入し、SA の 2 次元結晶の成長過程のその場観察に成功した。また、溶液中のカチオンによって成長様式が異なることを見出した。さらに、SA へ特異的に結合する biotin 分子を注入し、biotin 結合によって誘起される構造変化計測を行ったところ、基板によって SA の吸着姿勢が異なることに対応し、構造変化の様子も基板によって異なることが分かった。

さらに、脂質二重膜上の SA の 2 次元結晶上へ両末端を biotin で修飾した DNA 分子を注入したところ、DNA の両末端が SA に結合し、二重らせん構造が基板に弱吸着して構造がゆらいでいる状況を作製することに成功した。

最後に、本研究期間において、FM-AFM において周波数検出回路として一般的に用いられる PLL に代えて瞬時周波数法を用いたフォースマッピングの開発に着手した。瞬時周波数法では、カンチレバーの振動波形を高速デジタルにより記録する実験系、つまり振動波形をデジタルフィルタ処理した後、ヒルベルト変換により解析信号を得て、解析信号の瞬時周波数を計算する。瞬時周波数法では、周波数シフトや散逸に加え、波形の歪みなど、水和構造だけでなく、探針-試料間相互作用に関わる情報をより多く得られることが期待できる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

K. Umeda, K. Kobayashi, T. Minato, and H. Yamada, Atomic-Level Viscosity Distribution in the Hydration Layer, *Physical Review Letters*, 査読有, Vol. 122, No. 11, 2019, pp.116001(1-6)

A. Fujita, K. Kobayashi, and H. Yamada, Investigation of Local Hydration Structures of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers with Different Molecular Structures by FMAFM, *Langmuir*, 査読有, Vol. 34, No. 50, 2018, pp.15189-15194

H. Kominami, K. Kobayashi, S. Ido, H. Kimiya, and H. Yamada, Immunoactivity of self-assembled antibodies investigated by atomic force microscopy, *RSC Advances*, 査読有, Vol. 8, No. 51, 2018, pp.29378-29384

K. Umeda, K. Kobayashi, T. Minato, and H. Yamada, Atomic-Scale 3D Local Hydration Structures Influenced by Water-Restricting Dimensions, *Langmuir*, 査読有, Vol. 34, No. 31, 2018, pp.9114-9121

K. Umeda, L. Zivanovic, K. Kobayashi, J. Ritala, H. Kominami, P. Spijker, A. S. Foster, and H. Yamada, Atomic-resolution three-dimensional hydration structures on a heterogeneously charged surface, *Nature Communications*, 査読有, Vol. 8, 2017, pp.2111(1-9), DOI: 10.1038/s41467-017-01896-4

K. Hizume, H. Kominami, K. Kobayashi, H. Yamada, and H. Araki, Flexible DNA Path in the MCM Double Hexamer Loaded on DNA, *Biochemistry*, 査読有, Vol. 56, 2017, pp. 2435-2445, DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00922

F. Ito, K. Kobayashi, P. Spijker, L. Zivanovic, K. Umeda, T. Nurmi, N. Holmberg, K. Laasonen, A. S. Foster, and H. Yamada, Molecular Resolution of the Water Interface at an Alkali Halide with Terraces and Steps, *The Journal of Physical Chemistry C*, 査読有, Vol. 120, No. 35, 2016, pp. 19714-19722, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05651

小林 圭, 山田 啓文, 周波数変調原子間力顕微鏡による抗体分子の高分解能観察、*生物物理*, 査読有, Vol. 56, No. 4, 2016, pp.234-237, DOI: 10.2142/biophys.56.234

[学会発表](計37件)

木南 裕陽, 小林 圭, 平田 芳樹, 山田 啓文, Annexin A5 2次元結晶をテンプレートとした streptavidin ナノアレイの作製とタンパク質の特異的検出、第66回応用物理学学会春季学術講演会、2019

H. Kominami, Y. Hirata, K. Kobayashi, and H. Yamada, Streptavidin Nanoarrays using Two-dimensional Annexin V Crystals, 26th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ACSIN-14 & ICSPM26), 2018

S. Maeda, H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Visualization of biotinylated DNA on streptavidin crystal using FM-AFM, 26th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ACSIN-14 & ICSPM26), 2018

N. Fukazawa, H. Kominami, Y. Hirata, K. Kobayashi, and H. Yamada, Development of time-resolved frequency-modulation atomic force microscopy for liquid environments, 26th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ACSIN-14 & ICSPM26), 2018

前田 祥吾, 木南 裕陽, 小林 圭, 山田 啓文, FM-AFMによる streptavidin 結晶上 biotin 修飾 DNA の可視化、第79回応用物理学関係連合講演会、2018

院南 皓一, 小林 圭, 山田 啓文, バイアス変調を用いない時間分解ケルビンプローブ力顕微鏡による有機薄膜トランジスタにおけるキャリア挙動可視化(2)、第79回応用物理学関係連合講演会、2018

深澤 直人, 木南 裕陽, 小林 圭, 平田 芳樹, 山田 啓文, 液中環境下における時間分解 FM-AFM の開発、第79回応用物理学関係連合講演会、2018

杉本 千奈、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、修飾探針 FM-AFM による特異的相互作用力測定におけるリンカー長の影響、第 79 回応用物理学関係連合講演会、2018

H. Kominami, Y. Hirata, K. Kobayashi, and H. Yamada, Investigation of two-dimensional crystal of annexin A5 for making a protein nano-array, The 21st International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2018)、2018

Y. Yamamoto, H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale investigations of proteins bound to three-dimensional DNA origami using FM-AFM in liquid, The 21st International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2018)、2018

A. Fujita, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-Scale Investigations of Local Hydration Structures of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers with Different Molecular Structures, The 21st International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2018)、2018

濱田 貴裕、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、streptavidin 2 次元結晶の成長過程と特異結合による構造変化過程の観察、第 65 回応用物理学関係連合講演会、2018

藤田 朗人、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM による長鎖アルカンチオール自己組織化単分子膜の分子スケール水和構造計測、第 65 回応用物理学関係連合講演会、2018

H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Surface charge density measurements of Z-form DNA by FM-AFM force mapping, The 8th International Symposium on Surface Science (ISSS-8)、2017

T. Hamada, H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, FM-AFM Imaging of Two-dimensional crystal growth of streptavidin injected from a glass pipette, The 8th International Symposium on Surface Science (ISSS-8)、2017

H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Functional visualization of biomolecules by frequency modulation AFM and 3-dimensional force mapping, 11th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '17 (ALC '17)、2017

Z. Cui, K. Kobayashi, Y. Hirata, and H. Yamada, Effect of pH on two-dimensional crystal formation of streptavidin, 11th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '17 (ALC '17)、2017

木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、液中 FM-AFM による Z 型 DNA のナノスケール構造観察および表面電荷密度計測、第 78 回応用物理学関係連合講演会、2017

藤田 朗人、小林 圭、山田 啓文、末端官能基の異なるアルカンチオールの相分離自己組織化単分子膜の作製と FM-AFM 水和構造計測、第 78 回応用物理学関係連合講演会、2017

崔 子鵬、小林 圭、平田 芳樹、山田 啓文、低 pH 環境におけるマイカ基板上 streptavidin 2 次元結晶、第 78 回応用物理学関係連合講演会、2017

⑲ 濱田 貴裕、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、脂質二重膜およびマイカ表面混在条件下における streptavidin 2 次元結晶の成長過程のその場観察、第 78 回応用物理学関係連合講演会、2017

⑳ A. Fujita, K. Kobayashi, and H. Yamada, Investigation of Hydration Structures of Phase-Separated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers by FM-AFM, The 20th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2017)、2017

㉑ Z. Cui, K. Kobayashi, Y. Hirata, and H. Yamada, Effect of pH on Two-dimensional Streptavidin Crystals on Mica, The 20th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2017)、2017

- ②4 T. Hamada, H. Kominami, M. Miyamoto, K. Kobayashi, and H. Yamada, Imaging of Two-dimensional Crystal Growth of Streptavidin Injected from a Glass Pipette by FM-AFM, International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM2017)、2017
- ②5 A. Fujita, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale Investigations of Hydration Structures of Alkanethiol Self-assembled Monolayers of Different Functional Groups by FM-AFM, International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM2017)、2017
- ②6 H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, High-resolution Imaging and Surface Charge Measurement of Right-handed and Left-handed DNA by FM-AFM in Aqueous Solution, International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM2017)、2017
- ②7 Z. Cui, K. Kobayashi, Y. Hirata, and H. Yamada, Effect of pH on Two-dimensional Crystal Formation of Streptavidin on Mica, International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM2017)、2017
- ②8 宮本 眞之、木南 裕陽、山本 悠樹、小林 圭、山田 啓文、biotin 修飾 AFM 探針による分子分解能特異的相互作用力マップ、第 64 回応用物理学関係連合講演会、2017
- ②9 藤田 朗人、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM によるアルカンチオール自己組織化単分子膜の分子スケール水和構造計測(2)、第 64 回応用物理学関係連合講演会、2017
- ③0 宮本 眞之、木南 裕陽、小林 圭、山田啓文、FM-AFM による streptavidin 2 次元結晶の分子スケール構造観察、日本顕微鏡学会走査型プローブ顕微鏡分科会、2016
- ③1 藤田 朗人、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM によるアルカンチオール自己組織化単分子膜の分子スケール水和構造計測、第 77 回応用物理学関係連合講演会、2016
- ③2 小林 圭、山田 啓文、時分解静電気力顕微鏡による有機薄膜トランジスタのキャリアダイナミクス可視化、第 77 回応用物理学関係連合講演会、2016
- ③3 宮本 眞之、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、biotin 修飾探針を用いた AFM による streptavidin-biotin 相互作用力評価、第 77 回応用物理学関係連合講演会、2016
- ③4 A. Fujita, K. Kobayashi and H. Yamada, Molecular Scale Investigations of Hydration Structures of Hydrophilic Alkanethiol Self- Assembled Monolayers by FM- AFM, 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC)、2016
- ③5 M. Miyamoto, H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-Scale Imaging of Two-Dimensional Streptavidin Crystals in Aqueous Solutions by Frequency-Modulation Atomic Force microscopy、29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC)、2016
- ③6 A. Fujita, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale investigations of hydration structures on self-assembled monolayers in aqueous solutions、KJF International Conference on Organic Materials for Electronics and Photonics (KJF-ICOMEF) 2016、2016
- ③7 M. Miyamoto, H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale imaging of two-dimensional streptavidin crystals in solution by FM-AFM, The 19th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM)、2016