

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6月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350001

研究課題名 二次元分子膜の局所変調による少数分子制御

研究課題名 Control of a small amount of molecules in two-dimensional monolayer by local modification

研究代表者

村越 敬 (MURAKOSHI KEI)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：40241301

研究成果の概要（和文）：脂質二分子膜を幅 100nm 程度の微小間隙へ流入させると、膜内特定分子に対する分子選択的フィルタ現象が発現することを明らかにした。幅 100nm の間隙をもつ金属構造体を電子線リソグラフィーによりカバーガラス基板上に作製し、微小空間形状変化に対する分子拡散性変化を単一分子追跡法により評価することで、膜構造特異性と分子拡散性変調との相関性を定量的に議論した。

研究成果の概要（英文）：We revealed that molecules with distinct sizes and strictures in self-spreading lipid bilayer are selectively filtered when the bilayer spread through the metallic nanogates. In order to make clear the origin of this molecular filtering phenomenon, we have observed molecular diffusion in nano space by single molecular tracking. In this research, metal nanogates with sizes of 100 nm was fabricated on cover slips with using electron beam lithography. The quantitative evaluation by single molecular tracking can reveal that the structural change of lipid bilayer correlates molecular diffusion change in nano space.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：脂質二分子膜、蛍光標識脂質分子、全反射顕微鏡、分子フィルター、ゲート構造

1. 研究開始当初の背景

表面において、その二次元空間において実際に機能が発現する際には、単一の分子プロセスのみならず、隣接分子間相互作用、あるいは特定のサイズ領域における複数の分子集合体が複雑に相互作用することによって遠方の分子間に生ずる相関などが重要であることが認識されつつある。特に、表面にお

ける触媒反応過程、生体細胞膜における生理活性発現、などにおいては、系を構成する表面での原子・分子数個から数千個程度の集合体がマイクロなドメイン構造形成が、反応活性・機能発現の鍵因子になっていることがわかってきた。しかしながら、これら特徴を外部制御により積極的にアウトプットする基礎的研究例は少ないのが現状であった。

2. 研究の目的

微小空間を利用して分子運動ダイナミクスを制御し、分子選択的な操作・分離・機能性の付与などに関する基礎的知見を得ることを試みる。

①脂質二分子膜を表面物性が制御されたナノ構造基板上に自発展開させ、幅数十 nm 程度の微小ギャップ空間にて構造変調を誘起し、構成脂質分子とターゲット分子の局所空間における集団的な相互作用を制御することで特定分子の排斥を実現させる。

②自発展開方位に対し非対称な形状を有する金属構造を基板上に構築し、分子拡散性に依存して異方的分子拡散性を誘起するブラウニアン・ラチェット機構の発現による二次元的な分子分布制御を試みる。

③基板上に作製したナノ構造体の微小間隙形状を変化させ、その空間内での膜構造変調を、単一分子追跡から得た単分子レベルの拡散挙動変化から評価することを試みる。

3. 研究の方法

①電子線リソグラフィおよびスパッターによりカバーガラス基板上に 75 - 500 nm の微小間隙を有する金属構造ゲートパターンを作製した。得られた構造体を電解質溶液に浸漬し、脂質堆積物より脂質二分子膜を自発的に成長・展開させた。この膜内に添加された蛍光標識脂質分子の分布および拡散挙動について、蛍光顕微鏡観察および全反射顕微鏡 (TIRFM) を用いた単一分子追跡により評価を行った。

②電子線リソグラフィおよびスパッターによりカバーガラス基板上にラチェット構造を作製した。自発展開膜上での蛍光標識 CTB-GM1 会合体について、TIRFM により単一分子追跡法による直接観察を試みた。

③電子線リソグラフィおよびスパッターによりカバーガラス基板上にゲート間隔が

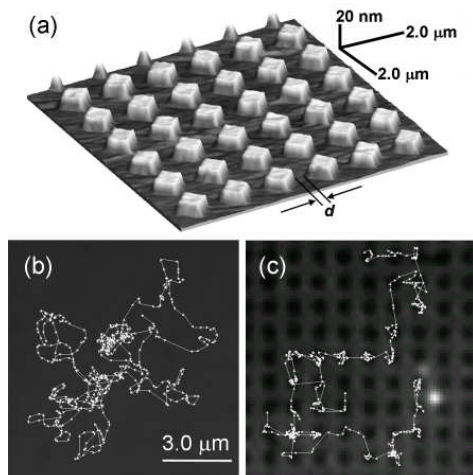


図 1.(a)ガラス基板上で構築したナノゲートの AFM 像 (ゲート間隔 500nm). TIRFM から得られた (b)ゲート構造無しおよび (c)ゲート構造有りにおける蛍光標識脂質分子の単一分子軌跡.

100nmで形状の異なる構造体パターンを作製した。この膜内に添加された蛍光標識脂質分子の分布および拡散挙動について、蛍光顕微鏡観察および全反射顕微鏡 (TIRFM) を用いた単一分子追跡により評価を行った。

4. 研究成果

① AFM 観察の結果、規則配列したナノゲート構造の形成が確認された (図 1 (a))。この基板上を自発展開する脂質二分子膜について蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、ゲート間隔が $d > 100$ nm に比べて $d = 75$ nm のゲートにおいては、膜先端部の蛍光強度がゲート通過に伴い特異的に大きく減少した。本結果より、 $d = 75$ nm のゲートにおいて TR DHPE 分子に対するフィルター効果の発現が示唆された。一方、TIRFM 像において単一 TR DHPE 分子の軌跡を追跡した結果、TR DHPE はナノゲートの無い基板上においてはランダムに拡散するのに対し、ナノゲートを有する基板上においてはゲートを通過するホップ拡散に従うことが明瞭に示された (図 2(b), (c))。このように得られた軌跡に対する数値解析を行うことで、ゲートにおける本フィルター効果の駆動力の定量化が可能であることを示した。また、微小間隙を有する金属構造体が担持された基板上での脂質二重膜の自発展開実験を行った結果、幅 100 nm 未満のナノゲートへ二重膜を通過させることで、膜内に添加された蛍光標識脂質分子の濃度が減少する分子フィルター効果が発現することを見出した。

②図2に示す非対称構造を有する基板上においてCTB-GM1会合体を含んだ自発展開膜を作製し、二次元的な分子分布変調を評価した

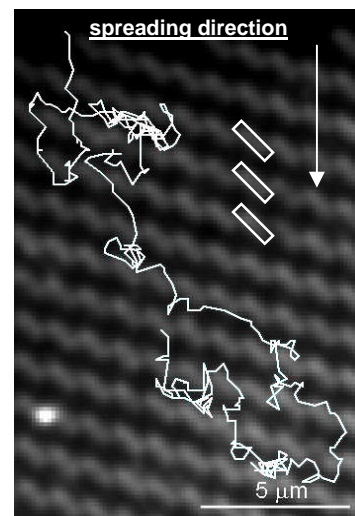


図 2.ラチェット構造内を拡散する単一 CTB-GM1 会合体の軌跡.

結果、展開方位に対して垂直方位に偏りを示す二次元分別が達成できたことが蛍光顕微鏡観察より示された。偏りを示した成分を詳細に検討するため、単一分子観察から検討を行った。観察した全輝点の拡散性を数値解析した結果、CTB-GM1会合体は異なる三成分の混在状態をとして存在することが明らかとなった(図3)。膜内分子の拡散性は会合体サイズに依存するため、本結果は異なる会合数のCTB-GM1会合体を区別したことを意味する。さらに、軌跡の平均変位量解析を行った結果、自發展開方位に対し平行および垂直いずれの方位においても変位量が拡散性に依存して異なることが示された。これにより本系においては二次元的な分布変調が発現したものと考えられる。また、拡散係数が既存の電気泳動系よりも1桁高い $10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ 程度におも効率的に二次元分別が発現していることが示された。この領域の分別は、既存の系では熱揺動のノイズにより困難であったのに対し、本研究では展開速度や構造サイズ・周期性の厳密な設計により可能となったと考えられる。

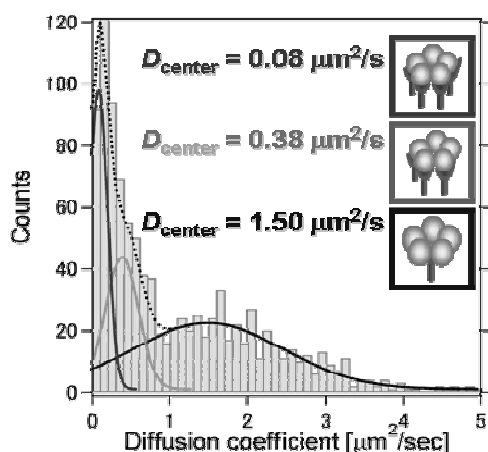


図 3. CTB-GM1 会合体の拡散効率ヒストグラム。

③図4(a)(b)に単一分子追跡の結果得られた軌跡例を示す。構造体のない Control 領域で得られた軌跡は、自發展開方位に伸びた形状をとっており、ターゲット分子である蛍光標識脂質分子が自發展開に沿って拡散していることが判る。また構造体の存在する領域で得た軌跡から、蛍光標識脂質分子が構造体によって拡散を妨げられながら、間隙を通過していることが判る。各構造体形状領域で得られた軌跡に対して、平均変位量 (MD) 解析を行った(図 4(c))。本プロットの傾きから、各構造体領域における分子の移動速度 v を算出することが可能であり、Control, Angle150, Angle90, Angle30 領域において各々、1.10,

0.60, 0.44, 0.29 $\mu\text{m}/\text{s}$ が得られた。各領域で得られた分子移動速度に差異が見られたのは、構造体形状を変化させることで、間隙部付近に形成される拡散を阻害する膜構造変調ドメイン領域が変化したことを示唆している。また、この移動速度 v ($\mu\text{m}/\text{s}$)や平均変位量解析 (MSD) から得た拡散係数 D (Control, Angle150, Angle90, Angle30 領域において各々、4.5, 2.9, 2.2, 1.9 $\mu\text{m}^2/\text{s}$)と式 $D = vk_B T / F$ を使用することにより、各領域にて分子に加わる力 F が算出可能である。 k_B はボルツマン定数であり、 T は絶対温度を表す。 T は 300 K として計算した。これより Control, Angle150, Angle90, Angle30 領域において、 $F = 1.01, 0.93, 0.85, 0.83$ fN の力が 1 分子に加わっており、gate が存在することによる。更に、Control で得られた F からそれぞれの Gap 領域で得られた F を引いたものを F_{gate} として定義し、Angle150, Angle90, Angle30 領域において、それぞれ $F_{\text{gate}} = 0.15, 0.18, 0.26$ fN/molecule が、間隙部での構造特異性発現に伴う分子分別に関わる力であると判断した。

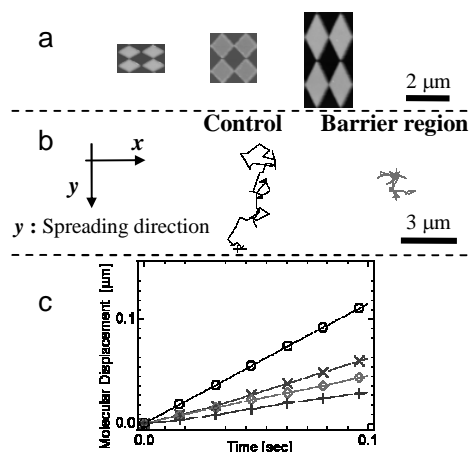


図 4. 各構造体による単一分子追跡の結果と拡散係数。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 41 件)

- ① T. Motegi, H. Nabika, K. Murakoshi “Enhanced Brownian Ratchet Molecular Separation Using a Self-Spreading Lipid Bilayer”, *Langmuir*, 28, 6656-6661 (2012). 査読あり
- ② F. Nagasawa, M. Takase, H. Nabika and K. Murakoshi “Polarization Characteristics of Surface-enhanced Raman Scattering from a Small Number of Molecules at the Gap of a Metal Nano-dimer”, *Chem. Commun.*, 47, 4514-4516 (2011). 査読あり
- ③ H. Nabika, M. Takase, F. Nagasawa and K. Murakoshi “Toward Plasmon-Induced Photoexcitation of Molecules”, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (16), 2470-2487 (2010). 査読あり

④B. Takimoto, H. Nabika and K. Murakoshi "Enhanced Emission from Photo-Activated Silver Clusters Coupled with Localized Surface Plasmon Resonance", J. Phys. Chem. C 113(27), 11751-11755 (2009). 査読あり

⑤Y. Sawai, B. Takimoto, H. Nabika, K. Ajito and K. Murakoshi "Observation of a Small Number of Molecules at a Metal Nanogap Arrayed on a Solid Surface Using Surface-Enhanced Raman Scattering", J. Am. Chem. Soc. 129, 1658-1662 (2007). 査読あり

〔学会発表〕(計 182 件)

①K. Murakoshi, F. Nagasawa, M. Takase, H. Nabika "Depolarization Behavior of Raman Scattering Photons from a Gap of Metal Nanodimer", XXV International Conference on Photochemistry ICP2011, 2011.8.7-12, Beijing, China, invited.

②K. Murakoshi "Monitoring Plasmon-Assisted Photochemical Reaction at Metal Nanogap by Surface-Enhanced Raman Scattering" Seminaire SOLEIL, 2011/6/20 France, invited.

③ K. Murakoshi "Plasmon-Assisted Nano-Processing of an Individual Single-Walled Carbon Nanotube", 219th Electrochemical Society Meeting (ECS), 2011.5.2, Montreal, Canada, invited.

④ K. Murakoshi "Catalytic Activity of An Individual Single-Walled Carbon Nanotube using Surface-Enhanced Raman Scattering", Novel Nanostructures and Catalysis -Seeking for Breakthrough- 2010/7/24 Lake Toya, invited.

⑤村越敬, "固液界面における少数原子・分子系の構造制御と機能化" 日本化学会第 90 春季年会 日本化学会第 27 回日学術賞受賞講演 2010/03/28 近畿大学

〔図書〕(計 2 件)

①H. Nabika and K. Murakoshi John Wiley and Sons Ltd: Molecular Nano Dynamics "Molecular segregation at periodic metal nano-architectures on solid surface" p1200 (2009).

②並河 英紀、村越 敬 "金属ナノ・マイクロ粒子の形状・構造制御技術" 第 8 章 米澤徹、シーエムシー出版 P236-248(2009)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

①名称: カーボンナノチューブの製造方法
発明者: 村越 敬、保田 諭、アハマド シャウキイ

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 出願 PCT/JP2011/055689

出願年月日: 2011 年 3 月 10 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/pc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村越 敬 (MURAKOSHI KEI)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号: 40241301

(2) 研究分担者

並河 英紀 (NABIKI HIDEKI)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 30372262

保田 諭 (YASUDA SATOSHI)

北海道大学・大学院理学研究院・講師

研究者番号: 90400639