

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02750

研究課題名(和文) ナノバイオ界面の単一分子機能・構造解明と機能創発

研究課題名(英文) Single molecule analysis of biomolecules at nanobio interfaces

研究代表者

原 正彦 (Hara, Masahiko)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：50181003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナノバイオ界面における単一分子レベルの機能や構造を明らかにし、特性を設計するために、走査型プローブ顕微鏡法の一つである先端増強ラマン散乱顕微鏡(TERS)とナノ構造を導入し議論した。TERSは単一分子の感度とオングストロームスケールの空間分解能を併せ持つ強力な表面分析方法であり、分子へのアクセスを可能とする技術である。本研究では、表面・物質ナノ科学における新しい方向性と、様々なナノ材料の特性評価・機能化への応用を展開した。また、圧力、電圧、光などの様々な外部刺激とTERSを組み合わせることによって、分子の性質や機能を局所的に制御したり、化学反応現象を明らかにしたりすることが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療検査をはじめとする様々な分野で、高感度の分子検出のセンシング技術が求められている。特に極微量の対象分子を、分光的に認識する手法の開発が急務である。また分子構造の変化や、それに伴う集合状態やマクロに発現する物性の変化に対して、個々の分子レベルに至る根源的な議論はまだ発展途上にある。本研究は、センサーという応用についても、新しい可能性を示したことのみならず、機能物性の発現機構、さらには設計制御に対して新しい知見をもたらしたという意味で、新しい方法論と方向性を示した研究であり、今後、他の分析手法との複合化により、より多くのセンシングと材料設計に用いられると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal single molecular functions, structures and design the properties at nano-bio interfaces, tip-enhanced Raman scattering microscopy (TERS), a family of scanning probe microscopy techniques and the related nano structures, have been introduced as powerful surface analytical and molecular access techniques having both single-molecule sensitivity and angstrom-scale spatial resolution. This project developed the new directions of the TERS related microscopy, spectroscopy, and surface structures in surface and material nanosciences, and applications for the nanoscale characterization and functionalization of a variety of nanomaterials. One of the most recent issues is combining TERS with various external stimuli such as pressure, voltage, and light, which enables the local control of the molecular properties and functions and also reveals chemical reaction phenomena.

研究分野：ナノテクノロジー

キーワード：ナノバイオ ナノフォトニクス 単一分子計測 プラズモニクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子の構造や機能は、その分子がおかれた環境の熱揺らぎのエネルギーによって絶えず変化し、その変化によって、分子認識反応や物性が発現すると言われている。本研究開発当初は、従来の「鍵と鍵穴」式のモデルではなく「揺らぎ」による柔軟なモデルが生体分子間相互作用機構として提唱され、揺らぎと生体分子認識機能の相関解明に関する研究が盛んに行われていた。また、単一分子に着目した蛍光共鳴エネルギー移動を用いた生体分子認識反応ダイナミクスの計測と解析が国内外で精力的に行われていた。さらに、原子間力顕微鏡(AFM: Atomic Force Microscope)などを用いた動的力分光法によって、生体分子認識相互作用のポテンシャルや結合寿命を測定することも報告されていた。申請者はこれまでに、動的力分光法を用いて生体分子認識能の相互作用時間依存性を測定し、相互作用時間が長いほど認識確率が上昇することを見出し、生体分子の揺らぎと分子認識機構に密接な関係があることを示してきた。一方、上記の一連のアプローチは、生体分子揺らぎの受動的観測に基づく定性的議論に留まり、分子認識における構造変化や分子機能の変化、ならびにそれらの分子認識反応において、単一分子レベルに至る、ダイナミクスを直接的かつ定量的に議論するには不十分であった。また、国内外でも分子に外部から摂動を与え、その変化の様子を単一分子レベルで詳細に議論している例はなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体分子認識反応ダイナミクスを単一生体分子スケールで分光分析する手法を確立し、分子認識のメカニズム、例えば、反応時の相互作用サイト、コンフォメーション、分子配向などの理解の深化を図ることである。さらに、電気化学的ないしは力学的な摂動を局所的に印加することによって、生体分子認識能(認識確率、相互作用力など)や、それに伴う分子の構造変化、機能創発などのアクティブ制御を実現する。任意の場所とタイミングで生体機能を局所的に誘発・制御する手法の実現によって、ナノスケールの生体機能デバイス開発に資する基礎研究開発を推進する。

3. 研究の方法

3-1) 2分子間距離に依存した光学測定：AFMプローブ探針先端に修飾したリガンド分子と基板上のレセプター分子間の距離をサブオングストロームオーダーの位置分解能で変化させながらラマンスペクトルを測定する機構を開発し、ラマン顕微鏡に導入する。

3-2) 1分子検出感度を有する金属ナノ探針の開発と生体分子修飾技術の確立：電磁場計算解析を駆使し、また10倍以上の光電場増強度を有する金属ナノ探針を設計し、集光イオンビーム等のナノ加工技術を用いて作製する。作製した金属ナノ探針のプラズモン共鳴スペクトルおよびラマン散乱増強能を実験的に評価する。

3-3) 分子認識反応ダイナミクスのラマン分光測定：分子間距離制御機構を用いて、分子認識反応ダイナミクスのナノ分光測定を行う。生体分子(リガンド)を修飾した原子間力顕微鏡探針を基板上に固着した生体分子(レセプター)に近づけながらラマン分光スペクトルを測定し、生体分子認識反応時のスペクトル変化(振動数変化)を測定する。

3-4) 分子認識反応時に観測されるラマンスペクトル変化の解析手法の確立：実験により得られたラマンスペクトルから分子認識反応機構・ダイナミクスを明らかにするため、密度汎関数法によるラマンスペクトル解析を行う。周囲の環境変化に鋭敏な振動モードにも着目し、生体分子間相互作用の種類解析も試みる。

3-5) 分子間相互作用(分子認識反応)の電気化学的ないしは力学的局所制御：ラマン分光測定に加え電気化学的ないしは力学的な摂動を局所的に印加することによって、分子間相互作用(分子認識反応)の局所制御を行う。

4. 研究成果

4-1) 貴金属ナノ構造の設計・作製・評価を行い、その有効性を確認した。600nm付近にプラズモン共鳴波長を有する金のナノアンテナ構造を、ナノ粒子ナノリソグラフィーおよび電子線ナノリソグラフィーを用いて作製した。これらのナノアンテナ構造表面に4-アミノチオフェノール分子を修飾し、励起波長594nmのレーザー光を用いてナノアンテナ構造のラマン散乱増強能を検証した。4-アミノチオフェノール分子の金ナノアンテナ表面におけるラマン散乱増強度は金ナノ粒子のそれよりも2桁以上大きいことがわかり、高感度な生体分子分光計測に有用であることを示した。探針型の金ナノアンテナ構造も開発し、探針先端でラマン散乱が10000倍以上増強されることを確認した。また、ラマン散乱だけでなくレーリー散乱にも着目し、レーリー散乱が探針直下の試料表面の屈折率によって変化することを見出した。試料表面上で探針を2次元走査させながら探針増強レーリー散乱光を検出することによって、回折限界を超えた数10nmの空間分解能で試料表面の屈折率分布を測定できることも示した。

4-2) ラマン散乱増強能が高い金属ナノギャップアンテナ構造の設計・作製とそれらを用いた生体分子分光分析を行った。探針型の金属ナノギャップアンテナ構造に関しては、金属探針と金属基板に用いる金属種と金属膜厚を制御することによって、ナノギャップ間に介在する試料分子のラマン散乱増強度を増大させることに成功した。特に、銀探針と金基板を使用した時に、ラマン散乱励起波長である633nm付近でギャップモードプラズモンが誘起され、それに伴ってナノギャップ間に介在する試料分子のラマン散乱が1000万倍程度に増強されることがわかった。

さらに、アミノ酸 10 分子程度から構成されるペプチド分子を金基板表面に吸着させて時間分解ラマンスペクトル測定を行った結果、単一分子検出に起因するスペクトル変化(ラマンバンドの明滅、振動数シフト)が観測され、金属ナノギャップ構造を用いた単一生体分子検出を実現した。探針型の金ナノアンテナ構造を用いたラマン分光装置の改良も行い、レーザー集光スポット中心に探針位置を 1nm 以下の精度で長時間(1 時間以上)保持する機構を新たに開発し、測定時間が長時間に及び 2 次元ラマンイメージングを安定的に行うことが可能となった。

4-3)分子間相互作用(分子認識反応)の電気化学的・局所力学的制御ラマン分光測定に加え電気化学的な摂動や力学的な摂動を局所的に印加することによって、分子間相互作用(分子認識反応)の局所制御を行った。金属探針と金属基板を独立した作用電極として使用し、それぞれの電極表面に修飾した生体分子の表面電荷を独立に制御し、生体分子が近接する際のラマンスペクトル変化を観測し、解析を行った。さらに探針下で単一分子に至る局所力学的摂動を加え、そのラマンスペクトル変化の観測に成功した。例えば光異性化を起こす分子では、力学的な摂動を印加することでも、単一分子レベルで異性化が起きることが、ラマンスペクトル変化から確認された。

主な発表論文等

〔査読付論文〕

- 1) K. Hara, T. Yano, J. Hata, K. Hikima, K. Suzuki, M. Hirayama, R. Kanno, and M. Hara
“Nanoscale optical imaging of lithium-ion distribution on a LiCoO₂ cathode surface”
Appl. Phys. Express, **10**, 052503 1-4 (2017).
- 2) K. Hara, T. Yano, K. Suzuki, M. Hirayama, T. Hayashi, R. Kanno, and M. Hara
“Raman imaging analysis of local crystal structures in LiCoO₂ thin films calcined at different temperature”
Anal. Sci., **33**, 853-858 (2017).
- 3) M. Mochizuki, G. Lkhamsuren, K. Suthiwanich, E. A. Mondarte, T. Yano, M. Hara and T. Hayashi
“Damage-Free Tip-Enhanced Raman Spectroscopy for Heat-Sensitive Materials”
Nanoscale, **9**, 10715-10720 (2017).
- 4) T. Yano and M. Hara
“Tip-enhanced Raman scattering microscopy: A step toward nanoscale control of intrinsic molecular properties”
J. Phys. Soc. Jpn., **87**, 610121-6101212 (2018).
- 5) G. Barcaro, L. Sementa, V. Carravetta, T. Yano, M. Hara and S. Monti
“Experimental and theoretical elucidation of catalytic pathways in TiO₂-initiated prebiotic polymerization”
Phys. Chem. Chem. Phys., **21**, 5435-5447 (2019).

〔学会発表〕

- 1) 森崎 冴香, 矢野隆章, 原 正彦
“金ナノ構造を用いた単一生体分子のナノプラズモニック分光分析”
真空・表面科学合同講演会, 2018
- 2) 森崎 冴香, 矢野隆章, 原 正彦
“金ナノギャップ構造を用いた単一生体分子のプラズモニック分光分析”
第 66 回応用物理学会学術講演会, 2019
- 3) 丸一優理子, 矢野隆章, 原正彦
“金属ナノギャップアンテナ構造を用いた単一生体分子のラマン分光分析”
日本表面真空学会学術講演会, 2019
- 4) 川瀬道啓, 矢野隆章, 原正彦
“探針増強ラマン分光法を用いたナノスケール異性化反応制御とその場分光分析”
日本表面真空学会学術講演会, 2019
- 5) 金旻宣, 矢野隆章, 原正彦
“酸化チタン表面におけるアミノ酸のヘテロペプチド形成メカニズム”
日本表面真空学会学術講演会, 2019
- 6) 川瀬道啓, 矢野隆章, 原正彦
“探針増強ラマン分光法を用いたナノスケール異性化反応制御とその場分光分析”
日本分光学会年次講演会, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T. Yano and M. Hara	4. 巻 87
2. 論文標題 Tip-enhanced Raman scattering microscopy: A step toward nanoscale control of intrinsic molecular properties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 610121-6101212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.7566/JPSJ.87.061012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Hara, T. Yano, J. Hata, K. Hikima, K. Suzuki, M. Hirayama, R. Kanno, and M. Hara	4. 巻 10
2. 論文標題 Nanoscale optical imaging of lithium-ion distribution on a LiCoO ₂ cathode surface	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Appl. Phys. Express	6. 最初と最後の頁 052503 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7567/APEX.10.052503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Hara, T. Yano, K. Suzuki, M. Hirayama, T. Hayashi, R. Kanno, and M. Hara,	4. 巻 33
2. 論文標題 Raman imaging analysis of local crystal structures in LiCoO ₂ thin films calcined at different temperature	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 853-858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.33.853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Mochizuki, G. Lkhamsuren, K. Suthiwanich, E. A. Mondarte, T. Yano, M. Hara and T. Hayashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Damage-Free Tip-Enhanced Raman Spectroscopy for Heat-Sensitive Materials	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 10715 - 10720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C7NR02398G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 G. Barcaro, L. Sementa, V. Carravetta, T. Yano, M. Hara and S. Monti	4. 巻 21
2. 論文標題 Experimental and theoretical elucidation of catalytic pathways in TiO ₂ -initiated prebiotic polymerization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phys. Chem. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 5435-5447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CP00167K	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森崎 冴香, 矢野隆章, 原 正彦
2. 発表標題 金ナノギャップ構造を用いた単一生体分子のプラズモニック分光分析
3. 学会等名 第66回応用物理学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森崎 冴香, 矢野隆章, 原 正彦
2. 発表標題 金ナノ構造を用いた単一生体分子のナノプラズモニック分光分析
3. 学会等名 2018年真空・表面科学合同講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸一優理子, 矢野隆章, 原正彦
2. 発表標題 金属ナノギャップアンテナ構造を用いた単一生体分子のラマン分光分析
3. 学会等名 2019年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川瀬道啓, 矢野隆章, 原正彦
2. 発表標題 探針増強ラマン分光法を用いたナノスケール異性化反応制御とその場分光分析
3. 学会等名 2019年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金旻宣, 矢野隆章, 原正彦
2. 発表標題 酸化チタン表面におけるアミノ酸のヘテロペプチド形成メカニズム
3. 学会等名 2019年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川瀬道啓, 矢野隆章, 原正彦
2. 発表標題 探針増強ラマン分光法を用いたナノスケール異性化反応制御とその場分光分析
3. 学会等名 2019年日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	青野 真士 (Aono Masashi) (00391839)	慶應義塾大学・環境情報学部(藤沢)・准教授 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	矢野 隆章 (Yano Takaaki) (90600651)	徳島大学・ポストLEDフォトンクス研究所・准教授 (16101)	2019年7月東京工業大学から徳島大学へ異動