

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20760022

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溶媒和構造解析

研究課題名 (英文) Investigation of local solvation structure at solid/liquid interface by frequency modulation atomic force microscopy

研究代表者

木村 建次郎 (KIMURA KENJIRO)

神戸大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：10437246

研究成果の概要 (和文)：本研究では、周波数変調方式の原子間力顕微鏡を応用した、固液界面に形成される溶媒和の計測方法を開発し、計測結果の定量化に取り組んだ。さらに、生体試料と液体の界面における水和構造の測定を行い、特にバクテリオロドプシンでは無機単結晶である雲母に比べて、液体分子が密に固体表面近傍に束縛されていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we developed a measurement technique for visualizing solvation structure at solid/liquid interface with frequency modulation atomic force microscopy, and had a quantitative analysis at the experimental data. Furthermore, we measured hydration structures at biomolecules-liquid interface (bR/buffer solution interface), and found surface hydration layers that are more packed than those at the muscovite mica/water interface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 薄膜・表面界面物性

キーワード：走査プローブ顕微鏡、界面

## 1. 研究開始当初の背景

生体高分子の高次立体構造の安定性やその機能発現メカニズムを解明するためには、周辺を取り巻く溶媒和構造の解析が不可欠である。例えば、生体高分子の複雑な高次構造は、疎水性の部分を内側に、親水性の部位が外側に向き織り込まれている。この場合、

水分子が外側に向いた親水性の部分に配列し、イオン濃度の変化など外乱に対する影響を低減することで複雑な高次構造が安定化されていると考えられている。溶媒和の3次元構造は、これまで主にX線回折法や中性子回折法によって解析されてきたが、これらの手法では試料を結晶化するプロセスが必要であるため、結晶化が困難な巨大生体高分子

には適用できない。NMR に関しても測定可能な分子量に制限がある。溶媒分子を取り入れた構造生物学の発展のためには、生体環境下であらゆる生体高分子の溶媒和構造を原子・分子スケールで解析可能な手法が求められている。2005 年、福岡らは周波数変調方式の原子間力顕微鏡(Frequency Modulation ? Atomic Force Microscopy: FM-AFM )を用いて溶液中で原子分解能を達成し[1]、2007 年我々は、FM-AFM を用いて局所溶媒和構造を計測できる可能性があることを指摘し[2]、2008 年世界で初めて実証に成功している[3]。ところが、AFM によって測定される力と溶媒分子の密度分布の対応関係が明確でなく、定量的な溶媒分子密度評価が曖昧であった。

#### Reference

- [1] T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige, and H. Yamada, Appl. Phys. Lett. 86, 193108 (2005).  
 [2] K. Kimura, et al, Ext. Abstr. 10th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, 2007, p. 82.  
 [3] K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, T. Imai, and H. Yamada, Ext. Abstr. 11th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, 2008, p. 62.

## 2. 研究の目的

本研究では、溶媒分子密度と AFM にて測定される力の対応関係を明確にし、標準試料(雲母)において AFM による溶媒和の計測原理を検証する。さらに、固体と液体の界面で 3 次元の力分布を精密に測定する技術開発を行い、さまざまな固体と液体の界面で安定に溶媒和の構造解析が実現可能な測定方法と装置を開発する。また、標準的な試料において、溶質、溶媒の変化が溶媒和構造、固体表面の構造に与える影響を検証する。最終的には、生体試料において溶媒和構造の可視化を行い、生体高分子周辺の溶媒分子の役割について議論する。

## 3. 研究の方法

### ○ AFM による溶媒和構造の計測原理 (図 1)

AFM の探針を固体表面(XY 面)から、高さ方向(Z 方向)に上下に移動させ、その際、探針に加わる相互作用力(周波数シフト  $df$ )の Z 座標依存性を計測する。この操作を異なる X, Y 座標で繰り返すことにより(図 1)、固液界面において 3 次元の相互作用力(周波数シフト分布)を得ることができる[1]。探針に加わる相互作用力と液体分子密度の関係を以下

に示す。探針を溶媒和構造に影響を与えない無限小物体と仮定する。探針と液体分子の 2 体ポテンシャルを  $u(Z-r)$  ( $Z$ : 探針の座標,  $r$ : 溶媒分子の座標)とすると、探針と周辺全溶媒分子との全ポテンシャルエネルギーは  $U(Z) =$  となる( $\rho$ : バルクの液体分子密度)。探針と溶媒分子が接近したときのみ急激な相互作用(デルタ関数型ポテンシャル)が働くと仮定すると、全ポテンシャルエネルギーは溶媒分子の密度に比例する。つまり、探針に加わる力は、溶媒分子密度分布関数の勾配に比例すると考えることができる。実際には、探針は溶媒和の構造そのものに影響を与えるという点、ポテンシャルがデルタ関数型であることが妥当か否かという点を詳細に計測原理そのものを評価することが今後必要となる。

#### Reference

- [1] K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai, H. Yamada, J. Chem. Phys. 132, 194705 (2010).

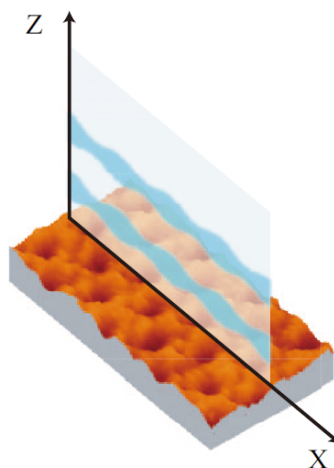


図 1: 溶媒和構造計測の原理図

### ○ 低ドリフト測定系

固体と液体の界面において、探針に加わる相互作用分布を 3 次元的に測定する際、装置周りの熱膨張に由来する探針と試料の位置関係の経時変化が非常に大きな問題となる。これを熱ドリフトと呼ぶ。熱ドリフトが発生すると、測定データが歪むだけでなく、ドリフト速度が非常に高速の場合、撮像そのものが困難になる。溶液中の観察は、対流の影響や、探針先端の溶媒和構造の変化など、コントロールが難しいパラメータが複数ある。熱ドリフト低減させることは、撮像速度に無関係に高品質の像を取得するためには非常に重要である。その問題に関して、申請

者の共同研究者である大藪らは、溶液セルの溶媒の蒸発を防ぐことが熱ドリフト低減に重要であることを見出し、雲母と水の界面における3次元溶媒和構造の測定に成功している[1]。本研究においても大藪らの方法を取り入れ、安定した3次元相互作用力測定が実現している。実際の装置構成では、観察に利用する溶媒を、混ざらない別の溶媒でシーリングして蒸発を防ぐ。

Reference

[1] N. Oyabu, K. Kimura, S. Ido, K. Suzuki, K. Kobayashi, T. Imai, and H. Yamada, Ext. Abstr. 12th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, 2009. P47.

4. 研究成果

○ 測定原理の検証 - 相互作用力と溶媒分子密度に関して(図2)

原子分解能を有するFM-AFMの標準試料である雲母と1M KCl溶液の界面において、液体の積分方程式理論であるRISM(Reference Interaction Site Model)理論を用いて雲母と水の界面において水分子の分布を計算し、その結果とFM-AFMから得られた実験結果を比較した。上述した計測原理に基づけば、水分子密度の勾配とAFMで測定する力が比例関係になる。図2の比較結果を示す。力分布と水分子密度勾配分布の極値(または変曲点)がZ座標において非常に良い一致を示すことが明らかとなった[1]。より正確には、探針の閉じ込め効果の影響を取り入れた形で力を水分子密度に変換する必要があるが、簡素な方法で容易に密度の値を得ることができる。この方法が有効な場合は、液体分子間の相互作用が弱く、界面において3次元な立体構造を形成せず、例えば3層目の液体分子層が探針に排除された場合でも、2層目の液体分子層の構造が強い影響を受けないような場合である。言いかえると層内部の分子間の相互作用に比べて、層間の分子間の相互作用が弱い場合に有効であるとも言える。

Reference

[1] K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai, H. Yamada, J. Chem. Phys. 132, 194705 (2010).

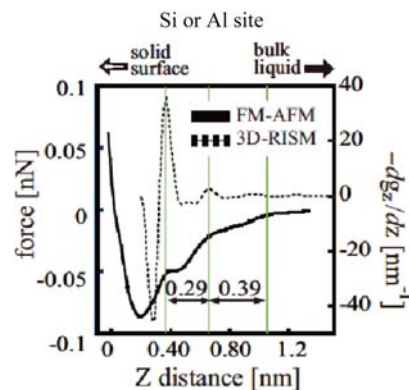


図2: AFMによる測定データ(力)とRISM理論による密度勾配の比較

○ 溶質イオンの種類に依存した溶媒和構造の変化(図3)

溶質イオンが溶媒和構造に与える影響については、特に電気化学分野において重要である。本研究では、溶質をKCl, MgCl2それぞれ濃度が1Mになるように純水に加えた溶液が、雲母表面にどのように異なった水和構造を形成するか検証する実験を行った。図3にその結果を示す。KCl 1Mの場合に比べてMgCl2 1Mの方が、層間の間隔が広い様子が撮像されている。これは、界面に存在する水和Mgイオンが層状構造を形成した結果と予想されるが、FM-AFMでは元素の識別が困難であるので、結論には至れない。今後、界面電気二重層の内部構造を定量的に取り扱うことができる手法開発が課題となる。

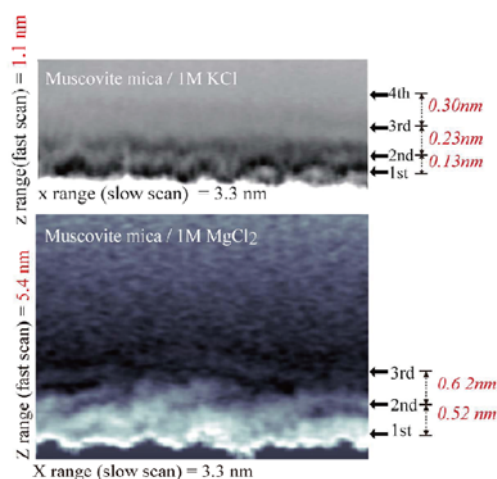


図3: 雲母上における溶媒和構造のイオン種類依存性。上: KCl 1M水溶液, 下: MgCl2 1M水溶液

○ 溶媒分子の種類と溶媒和構造、固体表面構造の関係 (図 4)

溶媒分子の種類によってどのように溶媒和構造が変化するか確認するため、Au(111) 面上にドデカンチオール自己組織化単分子膜を形成し、各種溶媒における相互作用力-Z 曲線の振動間隔を比較した。図 4 にはヘキサデカン、フェニルオクタン、ドデカンの場合における数十本平均化された相互作用力(周波数シフト)-Z 曲線を示す。溶媒分子径に応じて振動間隔が変化している様子が分かる。溶液中における特異な格子間隔の変化は見られなかった。微粒子など原子数の少ない径では、周辺環境の変化(溶媒分子の種類)に影響されやすいことが予想されるため、今後、特に少数原子系において溶媒和と結晶格子間隔の関係について研究を進めていく。

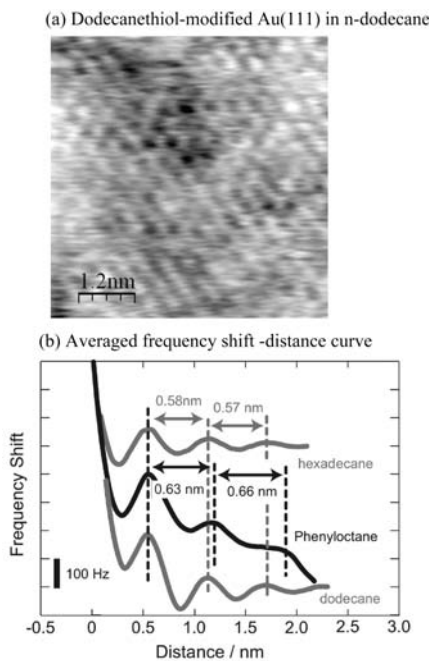


図 4: (a) n ドデカン中 ドデカンチオール分子像 (b) 相互作用力-Z 曲線における溶媒分子種依存性

○ 生体高分子への応用 (bR, DNA) (図 5)

生体高分子の立体構造、機能と溶媒和の関わりは、構造生物学として強い関心がある。本研究では、bR の細胞質側において、溶媒和構造の観察を行った[1]。図 5 にその結果を示す。雲母に比べて層間隔が密であることが分かり、これらの溶媒分子層が内部構造の安定化に寄与していると予想することができ

る。一方、DNA やコラーゲンなど生体内で結晶状態で存在しない(以下、孤立系と呼ぶ)試料においても実験を試みた。FM-AFM による高分解能観察は可能であったが、試料作製上の問題(バンドル化、基板への弱い吸着による脱離)から、3次元溶媒和構造の観測は現時点では成功していない。今後、試料作製最適条件を見つけ、孤立系の高次構造、構造転移と周辺溶媒和構造の関係を探求していく。

Reference

[1] K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai, H. Yamada, J. Chem. Phys. 132, 194705 (2010).

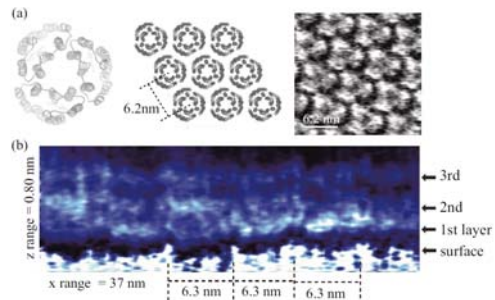


図 5:bR 上の 2 次元水和構造

○ 生体反応と溶媒和構造の関係の解明に向けた基礎実験 (図 6)

将来的には、本手法は生体反応を *in vivo* で測定することを目指し、生体高分子とそれを取り巻く環境を壊さない状態で試料作製した試料を観察することを検討した。アフリカツメガエルの卵の表面から脂質、膜タンパク質の複合体を取り出し、ベシクルフュージョン法にて基板に展開し、試料として用いた。基板に上記の複合体を吸着させた状態で、抗体分子の膜への接着を確認でき、生体反応を AFM 観察基板上で再現することに成功した (図 6)。今後は、生体反応における溶媒和構造の関わりについて、基礎的な研究を進めていく。

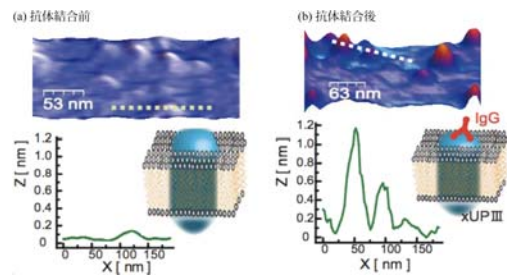


図 6: 抗体の吸着による表面構造の変化

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 2 件)

① K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai, H. Yamada  
Visualizing water molecule distribution by atomic force microscopy. Journal of Chemical Physics, 査読有, 132 巻、2010, 194705 (5pages)

② T. Hiasa, K. Kimura, H. Onishi, M. Ohta, K. Watanabe, R. Kokawa, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada  
A Solution-TiO<sub>2</sub> Interface Probed by Frequency-Modulation Atomic Force Microscopy. Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 48 巻、2009, 08JB19 (3pages)

[学会発表] (計 13 件)

① 木村建次郎、AFMで探る金属酸化物界面の溶液構造 (依頼講演)、日本化学会第 90 春期年会特別企画、2010 年 3 月 26 日、近畿大学

② 木村建次郎、液中ダイナミックモード原子間力顕微鏡による局所溶媒和の構造解析、分子科学討論会 2009, 2009 年 9 月 21 日、名古屋大学

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

①名称：カンチレバー型センサ、バイオセンサおよびプローブ顕微鏡  
発明者：木村建次郎  
権利者：国立大学法人神戸大学  
種類：特許  
番号：2009-297601  
出願年月日：2009 年 12 月 28 日  
国内外の別：国内

②名称：荷電粒子線照射装置、描画装置、分析顕微鏡、荷電粒子線出射装置および荷電粒子線用のレンズ装置  
発明者：木村建次郎  
権利者：国立大学法人神戸大学  
種類：特許  
番号：2009-164676  
出願年月日：  
国内外の別：国内

他 2 件

[その他]

ホームページ等

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/sci-onishi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 建次郎 (KIMURA KENJIRO)

神戸大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：10437246