

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05251

研究課題名（和文）自己組織化単分子膜による固液界面への機能性分子固定化方法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for immobilizing functional molecules on solid-liquid interfaces using self-assembled monolayers

研究代表者

中野 美紀（Nakano, Miki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員

研究者番号：20415722

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：界面利用デバイス最大の課題は、吸着分子の固定割合と機能維持を確認できない点である。界面制御にはどの自己組織化単分子（SAM）膜を表面修飾に用いるか絞ることが非常に重要である。本研究ではスラブ光導波路（SOWG）分光法を用いるその場観察結果を吸着分子の固定割合と機能維持の評価方法として確立した。疎水性シラン化合物と親水性ホスホン酸化合物のSAM膜を形成させた薄板ガラスを用いた場合にチトクロームc（Cytc）の固定割合は著しく増加するとともに酸化還元機能も維持した。固定割合評価に先立つCytcの吸着時間を増加させると固定割合が増加したため、吸着に伴うCytcの構造変化が生じていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最先端技術でも固液界面におけるその場観察は対象物質が極微量のため吸着量の変化や分子の機能維持判定は非常に困難である。そこで本研究では吸着の絶対量変化ではなく、吸着量の減少割合を可視領域の吸収スペクトル減少から計測した点で独創的な研究内容であり学術的意義が大きい。これらの成果が今後のデバイス開発に積極的に用いられることを想定すると、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：The largest technical issue to the development of devices utilizing interfaces is that it is impossible to confirm the immobilized ratio from the adsorbed molecules and if these immobilized molecules maintain their function or not. To control the interfacial phenomena, it is of much importance to narrow down which reagent for making self-assembled monolayer (SAM) should be used. In this study, in-situ observations with slab optical waveguide spectroscopy were established as a method to evaluate the fixation ratio of adsorbed molecules and their functional maintenance. Cytochrome c (Cytc) fixation ratio was significantly increased, and redox function was maintained when thin glass sheets with SAM of hydrophobic silane and hydrophilic phosphonic acid compounds were used. Furthermore, when the adsorption time of Cytc increased prior to the evaluation of the fixation ratio, the immobilized ratio increased, suggesting that the conformational change of Cytc induced because of the adsorption.

研究分野：表面科学

キーワード：固液界面 機能性分子 吸着 自己組織化膜 脱離 吸収スペクトル

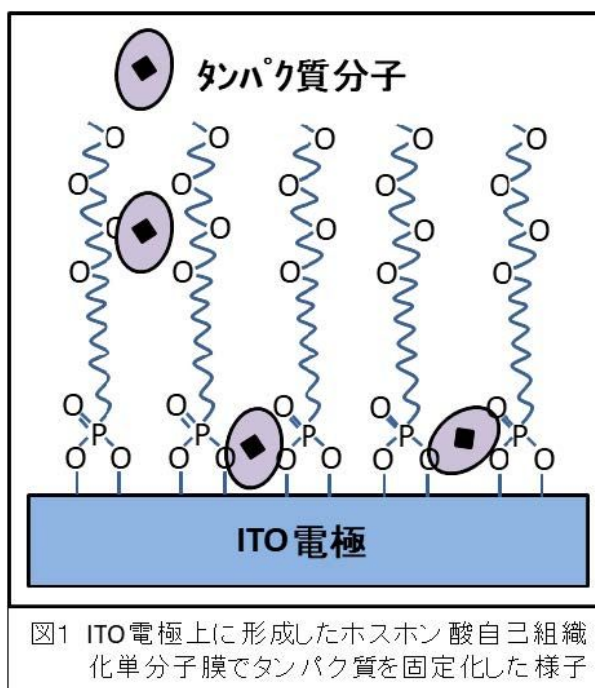
1. 研究開始当初の背景

電気化学センサー等の界面を利用するデバイスで最大の課題は、「吸着した分子は機能を維持しているか？どれぐらいの割合で固定されているのか？」を簡単には確認できない点である。代表的な表面修飾方法である自己組織化単分子 (self-assembled monolayer : SAM) 膜の材料は多種類の分子が存在しており、分子量や末端官能基によってもその特性は異なる。また従来から「界面に固定された分子の機能」に関して多くの報告がなされているが、情報が限定されているため分子固定と機能維持に効果的な表面修飾を議論することが困難である。それ以前に大きな課題として有効なその場観察ツールが存在しない。界面を制御し積極的に利用するためには「どの分子を表面修飾に用いるべきか？」をサイエンスとして網羅的に研究することが非常に重要である。

2. 研究の目的

固液界面において機能を保ったまま分子を固定可能な表面修飾方法の探索が目的であり、あわせてスラブ光導波路 (slab optical waveguide) SOWG 分光法を用いるその場観察とデータ解析を評価方法として確立する。以下により具体的な目的を示す。

- (1) ガラス基板上に形成した SAM 膜を分析し、SAM 膜形成条件の最適化を図る。
- (2) SAM 膜を形成した固液界面上に吸着した機能性分子の中で、洗浄によって脱離せずに、固定されたまま存在する分子の割合を増加させる SAM 膜の種類、及び形成条件を探索する。
- (3) 固定された機能性分子が機能を維持するか確認する。失う場合は原因を検討する。



3. 研究の方法

(1) SAM 膜作成

ガラス製の SOWG (厚さ 50 μm) 上にシラン化合物等の SAM 膜を形成させ、被覆率と形成状況を X 線光電子分光法 (XPS)、原子間力顕微鏡 (AFM)、水滴接触角等で分析し、SAM 膜の形成条件 (溶媒の種類、試料濃度、時間など) と比較検討する。均一でより高い被覆率の SAM 膜形成を目指し実験条件の最適化を図る。

シラン化合物として従来からオクタデシル (直鎖アルキルは 18 個の炭素原子が単結合で直線的に並んでおり C18 と略す) シリル化剤 (ODS) を用いガラス表面を疎水処理し分子固定に用いてきた。ODS は分子間の立体障害があるため表面被覆率は小さい可能性が指摘されている。分析化学で用いるカラム用シリカゲル表面修飾のエンドキャッピングを模倣し、ODS の SAM 膜を形成した後鎖長の短いメチル (C1)、ブチル (C4)、あるいはオクチル (C8) シリル化剤を反応させ ODS の SAM 膜を形成した基板表面に残存する -OH 基を減少させる。

末端官能基に $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 等を導入した SAM 膜を形成させ親水性にしたガラス表面を調

製し同様に検討する。

(2) 固液界面への機能性分子固定割合の確認

SOWG 分光法による吸収スペクトルのその場観察結果から固定される分子の割合を測定し、固定割合を増加させる条件や表面修飾分子を探索する。異なる表面修飾化合物を用い成膜条件を変化させ、機能を保ったまま固定される分子の割合増加を図ることが目的である。SOWG 分光法をもちいる脱離反応のその場観察結果は以下の関数でフィッティングし 5 個のパラメータが得られる。

$$A = A_0 + A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) \cdots \cdots (1)$$

ここで、 A_0 : 固定割合、定数 : A_1 、 A_2 、 τ_1 、 τ_2 である。今までは A_0 に焦点を当てて観察結果を評価したが、これらの情報から有用な結論が導けるか検討する。

SOWG 分光法をもちいる吸着反応のその場観察から、吸着反応速度 : v_1 、脱離反応速度 : v_2 、吸着脱離反応の平衡定数 : K 、ギブスの自由エネルギー変化 : ΔG_{ad} が求められる。吸着反応と脱離反応の解析から得られる結果を対比させ相関関係の有無を検討する。

SOWG 分光法による吸収スペクトルのその場観察結果から固定化された機能性分子が長時間にわたって機能を保つか確認し、機能維持に適した SAM 膜を探索する。

4 . 研究成果

均一かつ被覆率のより大きな SAM 膜形成を目指し、ガラス基板上で SAM 膜を形成させ、XPS 等で評価を行った。疎水化処理に用いられる ODS の SAM 膜形成の表面低被覆率問題の解決方法として、ODS の SAM 膜形成後にガラス表面に残留する OH 基を終端するため、鎖長の短いトリクロロメチルシラン(TCMS)を導入するエンドキャッピングを行った。エンドキャッピング後の薄板ガラスを用い、機能性タンパク質であるチトクローム c (Cyt c)の吸着過程の SOWG 分光法によるその場観察を行った結果、吸着した Cyt c の中の約 99.0%が表面に固定された。ODS の SAM のみの場合の固定割合は 85.5%程度であるため、エンドキャッピングが Cyt c 固定に効果的であることが分かった。

次に SAM 膜をシラン化合物からホスホン酸化合物に変え分子固定割合を観察するため、薄板ガラス上に、(11-{2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy}undecylphosphonic acid ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{PO}(\text{OH})_2$); 以下、M-EG3-UPA と略す)、及び 10-Carboxydecylphosphonic acid ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{10}\text{PO}(\text{OH})_2$); 以下、10-CDPA と略す)を用い SAM 膜を形成させ、水滴接触角と XPS で確認を行った。ホスホン酸化合物の SAM 膜形成後に、水溶液と接する固液界面での Cyt c の吸着、その後の自動洗浄による脱離を SOWG 分光法でその場観察を行ったところ、吸着した Cyt c の中の固定割合は、86.8 及び 92.6%であった。未修飾ガラス表面では 55.2%程度であり、親水性のホスホン酸 SAM 膜形成によって固定割合が大きく増加した。ODS の SAM 膜での固定割合 85.5%に比較し増加しており、親水性と疎水性とも SAM 膜形成により Cyt c の固定割合が大きく向上した事は非常に興味深い結果である。

また「脱離前に Cyt c を固液界面に吸着させている時間の固定割合に対する依存性」を検討した。通常は 14 分間放置するところを、30 秒と 30 分間でも行ったところ、吸着時間が長くなるに伴い脱離割合が減少し固定割合が増加した。従来から固液界面に吸着したタンパク質は三次元構造を変化させる、いわゆるコンフォメーション(立体構造)変化を示すことが示唆されている。今回、我々の実験でその場観察された吸着時間の増加に伴う固定割合増加は、このコンフォメーション変化に伴いタンパク質が分子レベルで吸着力を増すことで固定されている可能性が考えられる。さらに、固定された Cyt c に還元剤(ハイドロサルファイトナトリウム)水溶液を接触させたところ、吸着時間が増加しても Cyt c は迅速に還元され、その機能に大きな変化

は認められなかった。

また、「脱離前に Cytc を固液界面に吸着させている時間の固定割合に対する依存性」をより長い吸着時間に対して検討するため、より安定した SOWG への新規な光導入方法の開発を行った。従来は、SOWG 上に垂らしたグリセリン滴内に光ファイバを直接挿入しコア層内に白色光を導いているが、グリセリン滴の微小な変化でドリフトが生じてしまうため、1 時間程度の測定が限界であった。そこでグリセリン滴の代わりに透明なゲルを用いて SOWG コア層内への白色光導入を行ったところ、最長で 8 時間以上の測定が可能であることが分かった。そこで、ここまでは最長で 30 分間程度の放置時間を、1 時間以上、最長で 8 時間まで延長して Cytc の固定のその場観察を行った。すると、吸着時間の段愛的な延長 (1, 2, 4, 8 時間) に伴い脱離割合が減少し固定される割合が増加する現象は、放置時間 8 時間の範囲では成立することが示された。従来から多くの論文等で固液界面における吸着タンパク質の三次元構造変化は示唆されてきた。我々の実験でその場観察された吸着したまま放置する時間の増加に伴う固定割合増加は、コンフォメーション変化に伴いタンパク質が分子レベルで吸着力を増すことが原因である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsuda Naoki, Okabe Hirotaka, Nagamura Toshihiko, Nakano Koji	4. 巻 94
2. 論文標題 Direct Electron Transfer Reaction of Cytochrome c Immobilized on a Bare ITO Electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 433 ~ 439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20200192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoki Matsuda and Hirotaka Okabe
2. 発表標題 In situ observation of desorption reaction and immobilization of cytochrome c on solid/liquid interfaces by slab optical waveguide spectroscopy
3. 学会等名 ISOME2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Nakano, Hirotaka Okabe, Naoki Matsuda
2. 発表標題 In situ observation of immobilized fraction of cytochrome c adsorbed on solid/liquid interfaces by slab optical waveguide spectroscopy
3. 学会等名 MRM2023/IUMRS-ICA2023（国際学会）
4. 発表年 2023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	松田 直樹 (Matsuda Naoki) (10344219)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・上級主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------