

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286016

研究課題名(和文) 固液界面ポテンシャルで制御される生体分子配列の機能のダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of the functions of biomolecular arrangements controlled by the potential at solid-liquid interfaces

研究代表者

田中 正俊 (Tanaka, Masatoshi)

横浜国立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90130400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：含硫アミノ酸或は含硫複素環式化合物をAu電極表面に吸着させ、固液界面に加えるポテンシャルによって、分子が吸着・脱離、酸化・還元或は配向を変化させる様子を表面反射分光によりin-situリアルタイムで観測した。電子状態計算の結果との比較から、これらの反応前後の界面の電子状態を推定することができた。この方法によれば、固液界面研究の常とう手段であるサイクリックボルタンメトリーでは検出できない電子状態の変化や機能の変化について知見が得られることが示された。本研究は、液体環境にある固体表面に固定された生体分子の機能を、電子状態の観点から理解するための研究の先駆けとなるものである。

研究成果の概要(英文)：Sulphur-containing amino acids such as cysteine and cysteine, or sulphur-containing heterocyclic compounds such as 4-aminothiophenol and 4-mercaptobenzoic acid were adsorbed on Au electrodes in electrolyte. Potential-dependent behaviors of the molecules, including adsorption-desorption, oxidation-reduction, and inclination of the molecules, were observed by means of in-situ and real-time surface reflectance spectroscopy. With the aid of first-principles calculations, electronic states of the solid-liquid interface at each stage of the chemical reactions are presumed. Thus, the method used in this study is shown to provide useful information about variations of electronic states and resulting functions, which are not detected by cyclic voltammetry, a conventional method for analyzing solid-liquid systems. This is a pioneering research for understanding the functions of biomolecules on solid surfaces in electrolyte from the viewpoint of electronic states.

研究分野：総合理工

キーワード：ナノ材料 表面・界面 ナノバイオ 光物性

1. 研究開始当初の背景

バイオセンサー, 生体適合材料, 医療デバイス等の開発には, 固体表面と相互作用したときの電子状態によって決まる生体分子の機能についての知見が必要である. 従来の生体分子の研究では分子構造を X 線回折などで決定できれば, それで機能が理解できたとする研究が多かったが, 構造決定は機能研究の始まりに過ぎず, 電子状態が決定されない限り機能を解明したとはいえない. さらに, 生体分子が本来の機能を発揮するのは液体環境の中なので, 固液界面での研究が不可欠である. このように, 固液界面でまさに生きた状態での機能とそれが界面のポテンシャルによって変化する様子を捕らえることが今後必要になってくると考えられる. さらにデバイス応用の観点からも, 外部から加えるポテンシャルによって界面から 1nm 程度の領域にできる電気二重層の巨大電場を利用して分子-基板間の電荷移動や分子配向を変化させ, 分子の機能を制御できることのメリットは大きい.

固液界面上の生体分子の電気化学的測定や走査プローブ顕微鏡による配列構造の観察は数多く報告されているが, 分子の電子状態やそのダイナミクスを捉えるような研究は国内外ともほとんど皆無である. その理由は, 表面科学の常套手段である電子分光が固液界面の電子状態を分析するときには使用できないことにある. 雰囲気寄らず時間分解能の高い「光」をプローブとする方法が固液界面の in-situ リアルタイム測定に適した唯一の方法である. 本研究はまさにこのような研究を目指しており, 生きた状態での生体分子配列の電子状態を捕らえて, ポテンシャルによる機能の変化のメカニズムを明らかにすることを目的としている.

2. 研究の目的

本研究の最終目標は, 固液界面上に生体分子を固定し, 界面のポテンシャルによって分子の荷電状態を調節することで所望の機能を発現させ, 新規なバイオデバイスの開発に繋げることである. 本基盤研究(B)では, 電極表面上に生体分子ならびに関連する有機分子を配列させ, 電極に加えるポテンシャルの変化によって生じる分子配列の電子状態や配向の変化を表面反射分光法により in-situ リアルタイムで観測する. そして, 第一原理による電子状態計算の結果と比較して, 観測されたスペクトルの起源を界面上の分子配列の分子内遷移, 分子-電極基板間の電荷移動遷移, 界面状態が関与した遷移などに特定し, 分子と電極基板を含む系の電子状態のポテンシャル依存性を明らかにする. このようにして, ポテンシャルによる分子配列の機能の変化とそのダイナミクスを解明し, 界面ポテンシャルを用いた機能制御に関する知見を提供することによって, バイオデバイスの開

発に貢献することを目指している.

3. 研究の方法

液体と接触しても固体表面の原子スケールの構造が変化しないためには表面が化学的に不活性である必要があり, 固液界面の研究には通常, 電極としてAuまたはPt表面が用いられる. 本研究では, タンパク分子の表面に存在する硫黄原子と特異的に相互作用をするAuを電極として用いた. そして, これに吸着する生体分子として含硫アミノ酸であるcysteineとcystineを, さらにアミノ酸のアミノ基, カルボキシル基へのポテンシャルの影響を表面反射分光により明確に捉えるための有機分子として, 紫外領域に吸収帯をもつ含硫複素環式化合物 4-aminothiophenol (4-ATP), 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA)を用いた. 分子の吸着状況は光学顕微鏡, 及び原子間力顕微鏡で観察した.

固液界面上の有機分子の挙動をin-situリアルタイムで観測するため, 表面差分反射分光(SDRS)と反射率差分分光(RDS)が測定できる固液界面複合表面反射分光測定装置のうち, 可視・近紫外領域用を横浜国大に, 紫外領域用を産総研ナノエレクトロニクス研究部門に構築した. SDRSは主に表面に垂直な光学遷移を通して, RDSは表面に平行な光学遷移の異方性を通して, 電子状態や分子の配向の変化を検出する方法である. 構築した装置は日本学術振興会二国間交流事業(2011-2年度)で英国Liverpool Univ.のWeightman研究室から得た情報をもとに独自に開発したものであり, 三電極法によるサイクリックボルタンメトリー(CV)を同時に測定でき, 電荷移動の様子を確認しながら表面反射分光の測定ができるように設計されている.

電子状態計算に関しては, Vienna Ab Initio Simulation Package (VASP) による第一原理計算により有機分子/Au表面の最適構造を決定し, 時間依存密度汎関数法(TD-DFT)によりこの構造に対応する電子遷移の振動子強度を計算した. 電子状態計算の妥当性を判断するために行った光電子分光実験のうち, X線光電子分光(XPS)は九州シンクロトロン光研究センターの佐賀大学ビームラインBL-13で, 紫外光電子分光(UPS)は東京大学物性研究所吉信研で行った. また, 吸収端近傍X線吸収微細構造(NEXAFS)の測定は高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設BL-27Aで行った.

4. 研究成果

(1) Au 表面上の有機分子の配向と電子状態ならびにそれらのポテンシャル依存性: 表面反射分光, CV

アミノ酸ならびに関連する有機分子を作用電極である Au 表面に配列させ、ポテンシャルを制御しながら分子配列の挙動を表面反射分光によって観測した。Au(110)表面、Au(111)表面については完全に規定された表面が得られなかったため、機械研磨及び電解研磨した多結晶表面や真空蒸着した薄膜表面を用いた。CV によって Au 電極表面で反応の起こる電位を確認した後、表面反射分光スペクトルを測定し、ポテンシャルによって誘起される電子状態の変化や配向の変化を in-situ リアルタイム観測した。電荷移動を伴う分子の吸着、脱離、酸化などの反応と、電荷移動を伴わない、電気二重層内の高電場によって生じる分子の配向変化、について研究を行った。

ポテンシャルによる含硫アミノ酸分子の吸着、酸化還元、酸化脱離、及び脱離反応(学会発表)

0-100 μM cysteine/ H_2SO_4 溶液中における Au 電極の CV 測定の結果を図 1 に示す。0 μM の +1.1 V 以上での正の大きな電流応答は Au の酸化、+1.0 V の負のピークは Au の還元によるものである。cysteine の濃度を高くすると、100 μM から +0.7 V に、1 μM から +1.0 V に新たなピークが顕著に現れる。これらはそれぞれ Au 表面に吸着した cysteine の酸化と酸化脱離に由来すると考えられる。

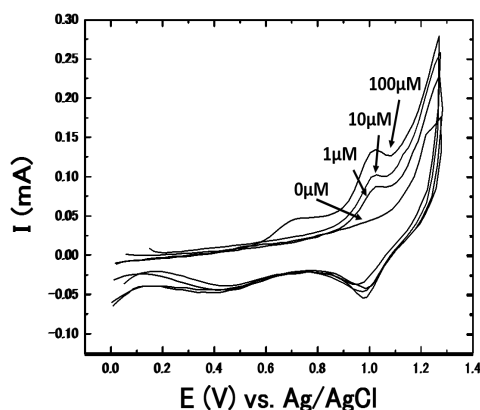


図 1 cysteine/Au のサイクリックボルタモグラム

まず、0 V での各濃度での反射スペクトルを 0 V、0 μM での反射スペクトルと比較した SDR スペクトルを図 2 に示す。1 μM で 2.2 eV と 4.8 eV 付近に負のピークが現れ、10、100 μM では少し成長する。これらのピークは cysteine の吸着により誘起された cysteine/ Au 界面の電子状態間の光学遷移に対応すると考えられる。(2)の TD-DFT 計算からもこの同定が支持される。

次に cysteine が酸化する +0.7 V で CV に僅かなピークが観測された 10 μM において、ポテンシャルを変化させたときの反射スペクトルを 0 V での反射スペクトルと比較した SDR スペクトルを図 3 に示す。+0.5 V 印加すると 2.5 eV と 4.6 eV 付近に負のピークが現

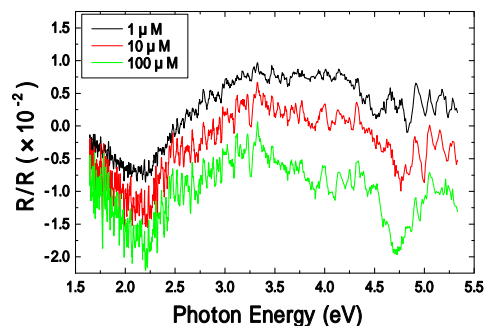


図 2 cysteine 吸着による Au 表面の反射スペクトルの変化

れ、+0.8 V ではさらに成長することが確認できる。これらのピークは、cysteine が酸化されて形成された cystine と Au 表面が作る電子状態間の光学遷移に対応すると考えられる。(2)の TD-DFT 計算からもこの同定が支持される。ポテンシャルを 0 V に戻すとこれらのピークも消滅するので、cystine は還元されて cysteine に戻ることがわかる。

CV の +0.7 V の cysteine 酸化由来のピークは 10 μM に比べ 100 μM のときに顕著に現れるが、SDR スペクトルの cysteine 酸化由来のピークは 10 μM と 100 μM でほとんど差がない。これは、SDRS では Au 表面と分子の界面のみを検出しているのに対し、CV 測定では Au 表面上の多層 cysteine での反応を検出しているためと考えられる。つまり、10 μM 付近で cysteine の吸着は飽和し、その以上では多層吸着をすると予想される。

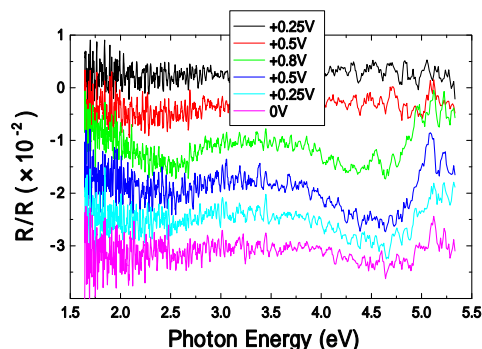


図 3 cysteine/Au 界面の酸化・還元による反射スペクトルの変化

さらに、1mM 溶液で吸着させた cysteine/ Au 表面に対して cysteine を含まない H_2SO_4 溶液中で 0 V から +1.3 V までのサイクルで電位走査を行うと、サイクリックボルタモグラムの +0.7 V と +1.0 V 付近のピークがサイクル毎に減少する。つまり、電位サイクルによって cysteine が酸化脱離することが観測される。各サイクル終了後の反射スペクトルと最初のスペクトルを比較した SDR スペクトルを図 4 に示す。全てのサイクル後に 2.2 eV

付近に正のピークが確認できる。このピークは図2の cysteine 吸着によるピークと逆符号であることから、同じ起源によるもの、つまり、cysteine の吸着により誘起された cysteine/ Au 界面の電子状態間の光学遷移に対応すると考えられる。また、SDR スペクトルの強度がサイクルと共にあまり変化しないのは、1 サイクル目でほとんどの cysteine が脱離するためと考えられる。

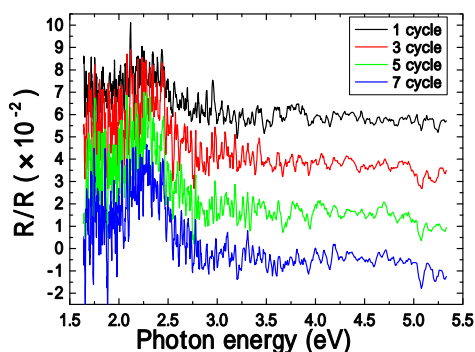


図4 cysteine/Au 界面の酸化脱離による反射スペクトルの変化

また、電位走査によって cysteine が Au 表面に吸着脱離する様子を観測することも可能である。50 μ M cysteine/ NaClO₄ 溶液中で -1.1 V から +0.1 V までのサイクルで電位走査を行うと、CV から推定される cysteine の吸着脱離に対応して、図4と同様な SDR スペクトルが得られる。これは、cysteine の吸着と共に cysteine/ Au 界面の電子状態間の 2.2 eV 付近の光学遷移が増加して反射率が減少、cysteine の脱離と共にこの光学遷移が減少して反射率が上昇するためである。

ポテンシャルによる含硫複素環式化合物分子の配向変化 (学会発表)

固液界面の電気二重層の厚さは1 nm程度なので、電極に印加するポテンシャルによって、真空中であれば電界電子放出や電界イオン放出が起こるような巨大電場が発生する。この電場によってアミノ酸のアミノ基とカルボキシル基は反対方向の力を受けるが、cysteine や cystine は分子の向きだけでなく分子構造が柔軟に変化するうえ、分子自体は紫外領域に強い光学遷移も持たないので、反射分光法で巨大電場の影響を検出するのは難しい。このため、紫外領域に強い光学遷移を持ち、かつアミノ基又はカルボキシル基をもつ含硫複素環式化合物4-MBAと4-ATPについてポテンシャルの反射スペクトルへの影響を測定した。

1 mM 溶液で吸着させた4-MBA/Au界面について、NaClO₄ 溶液中で -0.4 V から +0.4 V のCV 測定を行うことによって、この範囲で分子の酸化・還元反応は起きないことを確認した。図5にポテンシャルを変化させたときの

反射スペクトルを0 Vでの反射スペクトルと比較したSDRスペクトルを示す。正電位で3.5 eV 付近に正のピークが観測される。このピークはベンゼン環を含む電子状態間の光学遷移に対応していると考えられ、正の向きは4-MBAのCOO⁻イオンが電気二重層の電場によって表面に引き寄せられ、遷移モーメントの表面に垂直な成分が増大したことを示している。同様に負電位では3.5 eV に負のピークが観測され、COO⁻イオンが表面から反発される向きに分子配向が変化することを示している。

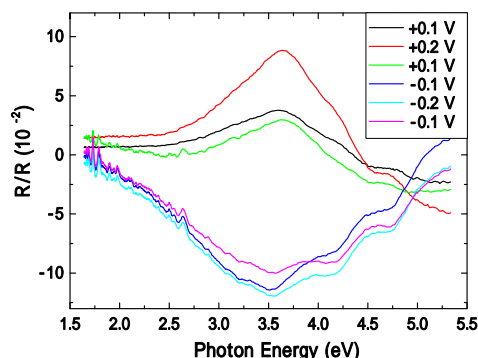


図5 4-MBA/Au 界面の分子配向変化に伴う反射スペクトルの変化

1 mM 溶液で吸着させた4-ATP/Au界面についての同様なSDR スペクトルを図6に示す。図5とは逆に、正電位で3.8 eV 付近に負のピーク、負電位で4.1 eV 付近に正のピークが観測される。このピークもまたベンゼン環を含む電子状態間の光学遷移に対応すると考えられ、SDRの負(正)の向きは4-ATPのNH₃⁺イオンが電気二重層の電場によって表面から反発され(に引き寄せられ)、遷移モーメントの表面に垂直な成分が減少(増加)したことを示している。

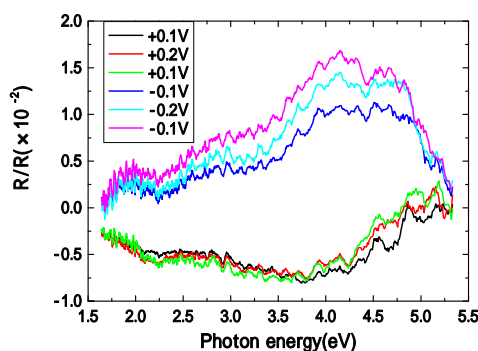


図6 4-ATP/Au 界面の分子配向変化に伴う反射スペクトルの変化

以上のように、分子/Au界面の電気二重層の電場により分子の配向が変化することが初めて捉えられた。

(2) 表面上の有機分子の電子状態： 電子状態計算（学会発表），光電子分光（論文，）

有機分子が吸着した Au 表面について，様々な荷電状態・構造に対応する電子状態の第一原理計算を行った．まず，VASP によって最適構造を決定し，TD-DFT によりこの構造に対応する電子遷移の振動子強度を計算して，表面反射分光スペクトルで観測される構造の帰属を行った．初めに，これらの電子状態計算の妥当性を判断するため，含硫有機分子 *γ*-sexithiophene を吸着させた系について，UPS により価電子帯の状態密度，XPS により化学結合状態，NEXAFS により分子配向について情報を得た．これらの実験結果と電子状態計算による分子配向，電子状態密度，電荷分布がほぼ一致したことから今回用いた電子状態計算の方法が妥当であることが示された．

VASP によって決定された cysteine/Au(110)と cystine/Au(110)の最適構造を図 7 に示す．cysteine/Au(110)について，TD-DFT 計算から 2.4eV 付近に表面に垂直な方向に大きな振動子強度をもつ光学遷移が存在することが示された．この遷移が図 2 の吸着過程と図 4 の酸化脱離過程における SDR スペクトルで観測された 2.2eV 付近のピークに対応していると考えられる．この遷移は，cysteine と Au 表面に広がる電子状態から主に Au 表面の電子状態への遷移，つまり cysteine から Au 表面へ電子が移動する遷移であると同定された．

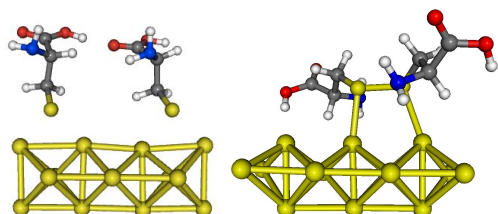


図 7 VASP の結果に基づいた cysteine/Au(110) (左図) と cystine/Au(110) (右図) のクラスターモデル

cysteine/Au(110)については，TD-DFT 計算の結果から吸収スペクトルの変化も計算した．表面に垂直な偏光に対する cystine/Au(110)と Au(110)の吸収スペクトルの差 Δ を図 8(a)に示す．この図の 2.7eV と 4.1, 4.7eV のピークが，図 3 の酸化・還元過程の SDR スペクトルで観測された 2.5 eV と 4.6 eV 付近のピークに対応していると考えられる．2.7eV の遷移は，主に Au 表面の電子状態から主に Au-S 結合の電子状態への遷移，つまり Au 表面から cystine へ電子が移動する遷移であると同定される．

図 8(b) は表面に平行な二つの主軸方向の偏光に対する Δ の差のスペクトルであ

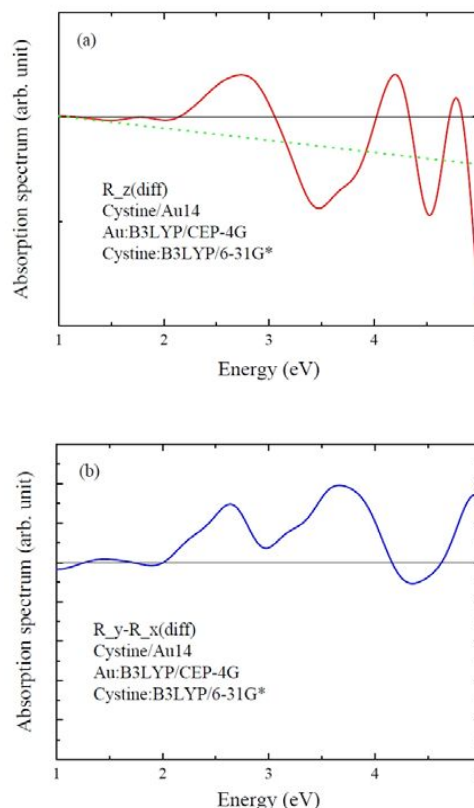


図 8 TD-DFT により計算された，(a)表面に垂直な偏光に対する cystine/Au(110) と Au(110)の吸収スペクトルの差 Δ ，(b)表面に平行な二つの主軸方向の偏光に対する Δ の差のスペクトル

る．先行研究 (LeParc et al., Langmuir 22, 3413 (2006)) 及び本研究では，cysteine/Au(110)の酸化によって RDS スペクトルに 2.6eV のピークが成長することが観測されている．図 8(b)の 2.6eV のピークは RDS スペクトルのピークをよく再現している．

以上のように，表面反射分光と電子状態計算を組み合わせることにより，cysteine/Au 界面について，ポテンシャルによって酸化・還元・酸化脱離などの反応を起こす各々の段階における電子状態が明らかになった．

(3) まとめと今後の展望

表面反射分光スペクトルの変化と電子状態計算の結果から，電子状態の変化又は分子配向の変化を推定した．そして，ポテンシャルに依存して，分子が吸着，脱離する，吸着した分子が酸化する，さらに酸化が進んで脱離する，或いは電荷移動がなくても電気二重層における電場によって分子配向が変化するなどの様子がそれぞれ捉えられた．CV では検出できない電子状態の変化，機能の変化について，表面反射分光と電子状態計算を併用することにより推定できることが示された．

現段階では、単純なアミノ酸である cysteine でさえも Au 多結晶表面や Au 蒸着面では結果が得られていない。不完全な Au(111)や Au(110)では、CV や STM では検知できない不安定な吸着構造があると推察される。電子状態計算との整合性を高めるために、今後 Au(111)や Au(110)などの規定された表面での測定が望まれる。cysteine/Au 界面でポテンシャルに依存した機能の解釈が確立されれば、他の生体分子についてもポテンシャルによる分子配列の機能の変化について理解が深めることができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

S. Ohno, H. Tanaka, K. Tanaka, K. Takahashi, M. Tanaka: "Sexithiophene ultrathin films on passivated Si(001) surfaces: growth and electronic structure", *Org. Electron.* 25, 170-177 (2015). (査読有)

K. Hiraga, H. Toyoshima, K. Inoue, S. Ohno, K. Mukai, J. Yoshinobu, M. Tanaka: "Electronic structure of α -sexithiophene ultrathin films grown on passivated Si(001) surfaces", *Appl. Surf. Sci.* 307, 520-524 (2014). (査読有)

〔学会発表〕(計 17 件)

S. Ohno, I. Sakurada, Y. Fujimori, N. Ninomiya, Y. Noda, K. Ohno, T. Sekiya, M. Tanaka: "Potential-dependent adsorption and reaction of cysteine molecules on gold surfaces in electrolyte solution by surface reflectance spectroscopy", 10th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices (Kunibiki Messe, Matsue, Japan, Oct. 2015)

I. Sakurada, S. Ohno, M. Tanaka: "Potential-dependent adsorption states of aromatic thiol molecules at liquid-Au interface studied by surface reflectance spectroscopy", 31th European Conference on Surface Science, (International Convention Center of Barcelona, Barcelona, Spain, Aug. 2015)

M. Tanaka, Y. Fujimori, N. Ninomiya, S. Ohno, Y. Noda, K. Ohno, T. Sekiya, "Potential-dependent adsorption of cysteine molecules on Au(110) surface in electrolyte solution studied by surface reflectance spectroscopy", 30th European Conference on Surface Science (Kervansaray Lara Convention Center, Antalya, Turkey, Sep. 2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 正俊 (TANAKA MASATOSHI)
横浜国立大学・工学研究院・教授
研究者番号：90130400

(2)研究分担者

大野 真也 (OHNO SHIN-YA)
横浜国立大学・工学研究院・准教授
研究者番号：00377095

大野 かおる (OHNO KAORU)
横浜国立大学・工学研究院・教授
研究者番号：40185343

関谷 隆夫 (SEKIYA TAKAO)
横浜国立大学・工学研究院・教授
研究者番号：60211322

宮内 良広 (MIYAUCHI YOSHIHIRO)
防衛大学校・応用物理学科・講師
研究者番号：70467124

(3)研究協力者

野田 祐輔 (NODA YUSUKE)
日本学術振興会・特別研究員

藤森 佑人 (FUJIMORI YUTO)
横浜国立大学・工学府・博士課程前期学生

二之宮成樹 (NINOMIYA NARUKI)
横浜国立大学・工学府・博士課程前期学生

川崎 朋晃 (KAWASAKI TOMOAKI)
横浜国立大学・工学部・学生

櫻田 一平 (SAKURADA IPPEI)
横浜国立大学・工学府・博士課程前期学生

佐野 花枝 (SANO HANAE)
横浜国立大学・理工学部・学生