

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600005

研究課題名(和文)液滴表面の自己組織化分子層のAFMその場観察の実現

研究課題名(英文)Self-organization of hydrophobin membranes formation at flattened-top domical water drops: a structural and mechanistic study using Atomic Force Microscope

研究代表者

春山 哲也 (Haruyama, Tetsuya)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：30251656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HFBI分子は、液滴上で精密な構造を有する単分子膜として自己組織化し、その過程で、液滴頂部を平坦にする特異な現象も発現する。本研究ではHFBIの液滴上(気液界面)における自己組織化挙動に着目し、その自己組織化プロセスの速度論的な解明と、構造のおよび力学的な分析を原子環力顕微鏡(AFM)、ラングミュアプロジェクト(LB)・表面圧測定(Wilhelmy-plate法)、懸滴法による分析と、構造的・力学的な解析を通して、自己組織化の機序と液滴頂部が平坦になる機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：HFBI is a species of hydrophobin protein that forms precise and structured self-organized membranes at air/water interfaces. When HFBI is dissolved in water droplets on a solid substrate, the top face of the water droplet becomes flattened through development of a self-organized HFBI membrane, as shown in the images below. This is a unique interface phenomenon. Self-organized HFBI membranes appear to be very strong. To determine the buckling strength of HFBI self-organized membrane, we analyzed them using AFM. The buckling strength of HFBI membranes is about twice as strong as the surface tension of HFBI containing water. This mechanistic study explains why water droplets containing HFBI have flattened tops.

研究分野：界面機能工学

キーワード：HFBI 自己組織化膜 AFM 電気化学 界面機能

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、機能タンパク質と構造タンパク質の2つに大別される。構造タンパク質の中でも膜タンパク質は、自己組織化により界面を形成する界面特性を持つものが存在する。一部の生体分子による自己組織化は極めて精密な規則構造を有する。そのため固液界面を反応場とする高機能な電気化学反応電極の構築への応用が期待されている。本研究室では HFBI という糸状菌由来のタンパク質を用いた研究を行っている。HFBI タンパク質も精密な自己組織化膜を形成することが知られている。さらに気液界面において自己組織化すると液滴の上面が平らになるという極めて特異な現象が生じることを明らかにしてきた。この現象は、液滴表面で形成される自己組織化膜の構造・物性に依ると考え、本研究を企図した。

2. 研究の目的

本研究では HFBI の液滴上(気液界面)における自己組織化挙動に着目し、その自己組織化プロセスの速度論的な解明と、構造的および力学的な分析を原子環力顕微鏡(AFM)、ラングミュアプロジェクト(LB)・表面圧測定(Wilhelmy-plate法)懸滴法による分析と、構造的・力学的な解析を通して、自己組織化の機序と液滴頂部が平坦になる機構を明らかにした。

3. 研究の方法

前述したとおり、HFBI を含む溶液を疎水性の基板上で液滴を作成すると、HFBI が気液界面で自己組織化することによって液滴の上面が平らになるという非常にユニークな特性を有している。液滴の表面張力測定、原子間力顕微鏡(AFM)を用いた自己組織化膜構造解析、フォースカーブ測定による自己組織化膜強度の測定等を行った。その結果、HHBI が液滴表面で形成する単分子自己組織化膜が、精密な八ニカム様構造を有し、その構造的特性から平坦平面膜を形成すること。そして、その膜の座屈強度が水表面張力よりも遙かに強く、液相側の膜面の親水性も大きいために、液滴頂部が完全に平

坦になる。ということを示した。

HFBI が精密な自己組織化構造を有することを明らかにすることが出来たので、この自己組織化膜を分子キャリアとして、活用するための基礎研究として、HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の電気化学特性解析を行なった。HFBI 自己組織化膜で被覆した導電性基板を電極として用い、サイクリックボルタンメトリー(CV)電気化学インピーダンス測定(EIS)を行うことでその電極特性を解析し、自己組織化膜が八ニカム様構造を有するために、被覆後の電極でも、その電気化学特性は一定以上保持できることを明らかにした。

さらに、遺伝子組換え(ポイントミューテーション)によって、タンパク質分子表面の電荷を「+電荷」「-電荷」「中性電荷」と変化させた HFBI 分子を調製し、WILD type を含めて4種類の HFBI 分子自己組織化膜で被覆した電極を作成し、同様にサイクリックボルタンメトリー(CV)電気化学インピーダンス測定(EIS)による電極特性解析を行なったところ、HFBI 表面電荷に応じた特性が得られることが明らかとなった。このことは、HFBI 分子によって形成できる精密八ニカム様単分子膜による整流効果が得られることを示唆する結果である。

4. 研究成果

HFBI が気液界面で自己組織化することによって液滴の上面が平らになるという非常にユニークな特性は、HHBI が液滴表面で形成する単分子自己組織化膜の物性に基づくという仮説から、膜の座屈強度による同現象発現仮説を立て、その実証を行なう、ナノ膜座屈強度の分析法を確立し、精密な定量に成功した。そして、膜座屈強度が水の表面張力よりも大きいために液滴頂部が平らになることを明らかにすることが出来た(発表雑誌論文2)。

しかし、これだけでは液滴頂部だけが平坦になる機構が説明出来ない。そこで自己組織化の進行と、その膜の浮力の関係を考察したところ、HFBI 分子が1-2個であれば、水との間で浮力差は生じない(つまりバルク水中に分散する)が、自己組織化が進み、

単分子膜を構成する HFBI 分子数が増える程に浮力が大きくなり、その結果として、液滴頂部に膜が形成されることを明らかにした（発表雑誌論文 1）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Ryota Yamasaki and Tetsuya Haruyama, Formation Mechanism of Flattened Top HFBI Domical Droplets, *Journal of Physical Chemistry*, ACCEPTED 2016.4.1
2. Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Takatsuji, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, and Tetsuya Haruyama, Flattened-top domical water drops formed through self-organization of hydrophobic membranes: a structural and mechanistic study using AFM, *ACS nano*, 10 (1), 81–87 (2016)
3. Ryota Yamasaki, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, and Tetsuya Haruyama, Structural and electrochemical properties of self-organized HFBI membranes on different types of substrates, *Electrochemistry*, 83(11), 969-973 (2015)
4. Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Takatsuji, Michael Lienemann, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, Markus Linder, and Tetsuya Haruyama, Electrochemical Properties of Honeycomb-like Structured HFBI Self-Organized Membranes on HOPG Electrodes., *Colloids and Surfaces B*, **123**, 803-808 (2014)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Ryota Yamasaki, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, and Tetsuya Haruyama Coating of electrodes with self-organized HFBI membrane; structure and electrochemical properties PACIFICHEM 2015, 2015 .12.15-20(Honolulu, Hawaii)

2. 山崎亮太、春山哲也、気液界面での HFBI 自己組織化分子膜形成による液滴の動的変化、第 5 2 回化学関連支部合同九州大会、2015. 6. 27(北九州国際会議場)
3. 山崎亮太、Michael Lienemann、Markus Linder、浅川雅、福間剛土、春山哲也、HFBI 自己組織化による液滴形状変化の解析と膜構造評価、第 24 回インテリジェント材料システムシンポジウム、 2015.1.19 (東京女子医科大学先端生命医科学研究所 TWIns)
4. Ryota Yamasaki, Megumi Mori, Michael Lienemann, Markus Linder, and Tetsuya Haruyama, Understand the consequences of self-organized HFBI membrane at the air/water interface and water/solid interface., 2nd International Symposium on Applied Engineering and Sciences, (SAES2014) 、 2014.12.20-21 、 (Kyushu Institute of Technology)
5. 山崎亮太、森愛美、浅川雅、福間剛土、春山哲也、HFBI タンパク質の自己組織化が液滴に及ぼす影響とその挙動解析、 4th CSJ Chemical Festa 、 2014.10.14-16 (タワーホール船堀、東京)
6. 山崎亮太、Michael Lienemann、Markus Linder、春山哲也、HFBI タンパク質による規則構造を形成した電極の電気化学特性、電気化学会第 81 回秋季大会、 2014.9.27-28 (北海道大学高等教育推進機構)
7. 山崎亮太、浅川雅、福間剛土、春山哲也、HFBI 自己組織化による液滴表面張力への影響、第 51 回化学関連支部合同九州大会 2014、2014.6.28、(北九州国際会議場、小倉)

〔その他〕

研究代表者（春山哲也）研究室ホームページ
<http://www.life.kyutech.ac.jp/~haruyam/>

研究分担者（福間剛士）研究室ホームページ
<http://fukuma.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

春山 哲也（HARUYAMA, Tetsuya）
九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号： 3 0 2 5 1 6 5 6

(2)研究分担者

福間 剛士（FUKUMA, Takeshi）
金沢大学・電子情報学系・教授

研究者番号： 9 0 4 5 2 0 9 4