

1. 研究目標及び研究成果の概要

課題名：分子認識能を有する構造規制界面の構築と分子レベル機能評価

研究機関名：産業技術総合研究所

任期付研究員氏名：澤口 隆博

【研究目標】

生体分子がもつ高度な機能を利用するには、生体分子と円滑に化学・生化学情報を交換しうるインターフェース(界面)の構築が必要不可欠である。本研究では、生体分子機能を引き出すため、比較的低分子量の化合物(機能性有機分子)を意図的な界面設計に従って固体表面に規則配列させ固定化することで生体分子を認識しうる電極界面(構造規制界面)を構築し、分子認識能の発現に関わる諸条件を分子レベルで解析することを目的としている。このため、走査型トンネル顕微鏡(STM)を用いて構造規制界面を溶液中で直接その場観察し、機能性有機分子の吸着構造と機能、反応性を原子・分子レベルで解析する。これにより、生体分子を認識するうえでの構造規制界面の優位性を明らかにし、機能性有機分子と生体分子の間に生じる分子認識プロセスを解明する。さらに、分子認識能を効率良く発現する諸条件の最適化を行うとともに、活性を維持した状態の生体分子を本来の環境に近い条件下で評価する基本技術の確立を図る。

【研究成果】

本研究は、生体分子がもつ優れた機能の高度利用を目指して、生体分子機能を引き出す機能性有機分子を意図的な界面設計に従って固体表面に規則配列させ固定化することで、生体分子を認識しうる電極界面(構造規制界面)の構築を行った。構築した構造規制界面を用いて、走査型トンネル顕微鏡(STM)により溶液中で直接その場観察を行い、機能性有機分子の吸着構造と機能、反応性、分子間相互作用について原子・分子レベルで評価した。併せて、電気化学的手法に基づく精密計測により生体分子に対する分子認識能を解析し、そのプロセスの解明と分子レベル制御を検討した。具体的には、生体のエネルギー生産系の電子伝達タンパク質の一つであるチトクロムcに着目し、機能性有機分子として、金(111)単結晶電極上に形成した(1)ピリジンチオール系化合物による単分子層、(2)3-メルカプトプロピオン酸(MPA)単分子層について、機能性有機分子の分子配列・配向構造を決定し、この界面構造がチトクロムcに対する分子認識能を発現させる決定的因素であることを明らかにした。また、(3)2成分混合チオール単分子層について、形成したマイクロドメイン構造の表面組成及びその分布を分子レベルで明らかにし、分子間に働く疎水性・親水性相互作用がドメイン形成プロセスを支配していることを明らかにした。

本研究におけるこれらの研究成果は国際学術誌数誌に掲載された。また、国際学会発表や、国内外の招待講演セミナー(テキサスA&M大、東北大、早稲田大など)を通してその成果が高く評価されている。

2. 研究実施計画

課題名：分子認識能を有する構造規制界面の構築と分子レベル機能評価

研究機関名：産業技術総合研究所

任期付研究員氏名：澤口 隆博

①研究の意義・目的・必要性

(1) 目的

本研究では、溶液中で動作可能な走査型トンネル顕微鏡(電気化学STM)を用いて、機能性有機分子が電気化学系で形成する構造規制界面の吸着構造及び分子配向を原子・分子レベルで直接解析することにより、分子認識能の発現機構を構造と関連づけて、精密かつ多角的に解明するための基礎的手法を確立することを目的としている。タンパク質や酵素などの生体分子を特異的に認識する界面の構築とその機能評価は、生体分子工学、生物物理化学等の生命科学の基礎的分野と密接に関連しているだけでなく、生体分子工学や生物電気化学の原理を利用した新規なバイオ素子等への応用にも大きく貢献する可能性がある。

(2) 意義

近年、走査型トンネル顕微鏡(STM)及び走査型原子間力顕微鏡(AFM)に代表される走査型プローブ顕微鏡(SPM)は、電子技術の進歩と周辺装置の改良により精度の向上が計られ、極微小領域を原子・分子レベルで直接観察可能な表面分析装置として幅広く認識されつつある。とりわけ、溶液中の電極界面を電気化学的な物理化学量を厳密に制御しながら、局所領域の形状や付随する機能の変化を原子・分子レベルで視覚的に観察し、評価することが可能になってきた。生体分子が関わる電極界面を直接観察し、微視的状態や物理化学的・生化学的特性を多角的に評価することにより、分子認識能や分子間相互作用に関する重要な知見が得られるものと考えられるが、このような生体分子を対象とした直接評価技術の実現のためには、活性を保持した状態の測定対象を本来の環境に近い条件下で取り扱う基本技術の確立が必要不可欠である。また、プローブ顕微鏡による各種タンパク質やDNA、細胞等の視覚化は最近の注目される動向の1つであるが、生体分子の直接観察にとどまらず、生体機能の発現・消失機構など、生体分子を総合的に評価する観点からも重要であり、産業技術総合研究所(当時、生命工学工業技術研究所)が取り組むべき課題であると考えられる。

(3) 必要性

STMやAFMなどSPM関連技術を用いた直接観察や原子・分子レベル表面構造解析が日々進展する中、電極界面(固液界面)系での構造解析は世界的に見てもやや出遅れているのが現状である。生命工学工業技術研究所(当時)においても唯一欠落した研究分野であった。本研究はその欠落部分を補い、SPM技術と電気化学手法に精通した研究者を配置し原子・分子レベルでの構造解析を戦略的に推進するものである。酵素やタンパク質等の生体分子と電気化学STMのコンビネーションは生体分子機能に関する新しい知見をもたらすだけでなく、新しい局所領域分析技術として材料関連などの評価・検査を必要とする広範な分野に即時適用可能であり、産業界へ貢献が期待される。

②研究計画・内容(方法も含む)

分子認識能を有する多くの機能性有機分子の中から、酵素やタンパク質などの生体分子を分子レベル

で認識可能な有機分子を探索し、電極上に分子レベルで固定化、構造規制界面を創製する。同時に、機能性有機分子の吸着構造及び分子配向を電気化学STMを用いて直接観察し、電気化学制御因子(電極電位や電流)による吸着過程のダイナミクス、分子間相互作用の変化、化学反応過程とそのメカニズムの解明を行う。これにより機能性有機分子による分子レベルでデザインされた構造規制界面を電気化学的手法を用いて積極的に精密制御することができ、その機能評価が可能となる。生体分子の構造規制界面上への吸着挙動、分子間相互作用の強弱、化学反応過程の有無など分子認識機能に関する情報を電気化学STM及び電気化学応答の測定から解析する。また、得られた知見をもとに、生体分子の構造及び機能と構造規制界面の関わり合いを評価し、分子レベルでの機能制御を試みる。研究は、(1) 構造規制界面の創製、(2) 吸着構造解析及び機能評価、(3) 生体分子認識能の測定、(4) 分子認識能の分子レベル制御の4つのステップから構成される。

③研究の目標

本研究は、各研究ステップごとに次のような具体的な研究目標を設定し、研究を進める。

(1) 構造規制界面の創製

酵素、タンパク質などの生体分子を特異的に分子レベルで認識可能な機能性有機分子を探索し、電極上に分子レベルで固定化、構造規制界面を構築する。分子が高度に配列・配向し分子レベルで規制された界面を実現しうる諸条件を決定する。

(2) 吸着構造解析及び機能評価

構造規制界面を構成する有機分子の吸着構造及び分子の配列・配向を電気化学STMにより分子レベルで明らかにする。溶液中、電気化学制御下での直接観察から、吸着構造あるいは分子配向の変化、吸着分子間の静電気的・化学的相互作用、化学反応誘起因子とその反応機構を解明し、構造規制界面の機能を評価する。

(3) 生体分子認識能の測定

まず、構造規制界面の生体分子に対する分子認識能あるいは相互作用を的確に評価しうる測定法を確立する。具体的には電気化学的手法による電流応答特性、二重層容量の測定を行い、生体分子の分子レベル認識・センシングについて評価する。

(4) 分子認識能の分子レベル制御

構造規制界面が有する生体分子認識能を分子レベルで制御する。電気化学測定及び電気化学STMで得られた知見から、構造規制界面上での生体分子の吸着過程、静電気的・化学的相互作用、水素結合など化学結合形成・開裂過程など、分子間同士の関わり合いを分子レベルで評価し、分子認識能の安定性・再現性及びその活性維持等の電気化学制御を行う。

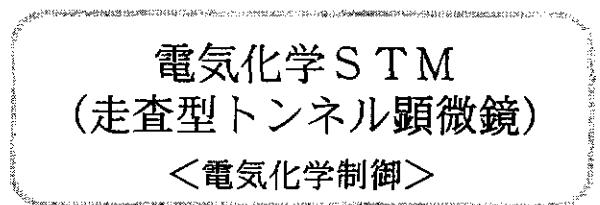
④ポンチ絵(研究概要)

分子認識能を有する構造規制界面の 構築と分子レベル機能評価

固体(電極)／液体界面では、固相および液相の同時かつ精密制御が重要

このため電気化学的手法を用いて界面制御を実現し、生体分子やその関連物質が
関与する電極界面の状態や形態、その機能を分子レベルで解析・評価する

——— <新規なその場観察・直接的解析手法>



○構造規制界面の創製

- ・機能性有機分子の
分子レベル固定化
- ・規則配列、高配向

○吸着構造解析及び機能評価

- ・吸着構造解析
- ・構造／配向変化
- ・静電気的相互作用
- ・水素結合
- ・化学反応過程

○生体分子認識能の測定

- ・電流応答特性
- ・二重層容量測定

○分子認識能の分子レベル制御

- ・安定性／再現性
- ・分子認識能の維持

目標・目的：

生化学活性を保持した状態の測定対象（酵素やタンパク質などの生体分子）を本来の環境に
近い条件下で取り扱う基本技術を確立し、構造規制機能界面が有する構造と機能の関係、
生体分子との分子間相互作用を分子レベルで評価・解析し、分子レベルで分子認識能の理解
を深める

3. 所要経費の推移

課題名：分子認識能を有する構造規制界面の構築と分子レベル機能評価

研究機関名：産業技術総合研究所

任期付研究員氏名：澤口 隆博

(単位:百万円)

11年度	12年度	13年度	合計
16	15	14	46

(四捨五入の関係で、合計額が合わないことがある。)

4. 研究成果

課題名：分子認識能を有する構造規制界面の構築と分子レベル機能評価

研究機関名：産業技術総合研究所

任期付研究員氏名：澤口 隆博

①研究成果

バイオ素子やセンシング素子など、生体分子がもつ高度な機能を利用した分子デバイスの構築には、生体分子と円滑に化学情報を交換しうるインターフェース(界面)の構築が必要不可欠である。そこで本研究では、生体分子機能を最大限に引き出すため、比較的低分子量の化合物(機能性有機分子)を意図的な界面設計に従って固体表面に規則配列させ固定化することで生体分子を認識しうる電極界面(構造規制界面)を構築し、分子認識能の発現に関わる諸条件について分子レベルで検討した。特に、生体のエネルギー生産系は一連の電子伝達タンパク質群により形成され、タンパク質間で順次電子を受け渡しすることでエネルギー生産を行っていることから、その電子伝達タンパク質の一つであるチトクロムcに着目し、チトクロムcを分子認識し、かつ、制御しうる構造規制界面の構築と分子レベル構造解析及び機能評価を目的とした。機能性有機分子により構築した構造規制界面は、走査型トンネル顕微鏡(STM)を用いることで溶液中で直接その場観察し、原子・分子レベルでの吸着構造解析を行った。これにより、生体分子を認識するうえでの構造規制界面の優位性を明らかにした。さらに機能性有機分子による単分子層の吸着構造解析及び分子認識プロセスの解明及び分子認識能を効率良く発現する諸条件を明らかにし、活性を保持した状態の生体分子を本来の環境に近い条件下で評価する基本技術の確立を図った。

(1) ピリジンチオール系化合物による単分子層

電子伝達タンパク質の一つであるチトクロムcの機能を引き出す機能性有機分子として、ピリジンチオール系化合物が知られており、プロモータ分子と呼ばれている。その代表的なプロモータ分子である4-ピリジンチオール(4-PySH)が金(111)電極上に形成した単分子層は、 $\rho(5 \times \sqrt{3}R-30^\circ)$ 構造で記述される規則的な配列構造(ハシゴ状構造)を有していることが電気化学STMを用いたその場解析から明らかになった。この4-PySH単分子層では、2個の4-PyS吸着分子がイオウ(S)原子部位で相互作用した二量体(ジスルフィド)状で対称に配置し、これが繰り返し単位となってハシゴ状構造を形成していることが判明した。さらに、吸着4-PyS分子のピリジン環は2次元的にスタックリー金(111)面に対して垂直に近い状態であるものの、ピリジン環の窒素(N)原子部位は溶液側に面した分子配向をしていることも明らかにした。一方、構造異性体である2-ピリジンチオール(2-PySH)による単分子層はチトクロムcに対するプロモータ機能をいっさい発現せず、まったく異なる吸着構造がSTMにより観察された。すなわち2-PySH単分子層では、 $\rho(4 \times \sqrt{7}R-40.9^\circ)$ 構造で記述される吸着構造を形成しており、プロモータ機能を発現する4-PySH単分子層と顕著に異なる点は吸着2-PyS分子の配向であった。つまり4-PySH単分子層で見られた二量体(ジスルフィド)状の吸着は観測されず、吸着2-PyS分子は単独でS部位とN部位の2点で金(111)表面上に吸着しピリジン環が垂直に配向していることが判明した。このことは、4-PySH単分子層のピリジン環がN原子を溶液側に向けているのに対し、2-PySH単分子層ではピリジン環のN原子が金(111)電極側を向いていることを意味しており、この分子配向の違いがチトクロムcとの相互作用サイトの形成とプロモータ機能の発現に決定的な影響を及ぼしていることが判明した。これらの研究成果は国際学術誌数誌に掲載された。(T. Sawaguchi, et. al., *Electrochim. Acta*, 45, 2861-2868 (2000); *Anal. Sci.*, 17, Suppl., i383-i386 (2001). 他)

(2) 3-メルカプトプロピオン酸(MPA)単分子層

ピリジンチオール系化合物と分子構造の異なる化合物でもプロモータ機能を発現することが分かっている。3-メルカプトプロピオン酸(MPA)による単分子層はその一例であり、電気化学STMによるその場解析から、金(111)電極上の MPA 単分子層は (3×3) 構造で記述される規則構造を形成していることが明らかとなった。分子配列・配向構造についてさらに詳細な原子・分子レベル吸着構造解析を行ったところ、MPA 単分子層では3個の MPA 分子が三角形に配置し末端のカルボン酸部位間で互いに水素結合した3量体構造を形成し、これが規則配列して (3×3) 構造を形成していることを世界ではじめて明らかにした。この MPA 分子による3量体構造の中央部分には強く吸着した水分子の存在も示唆され、また、チトクロムc も MPA 単分子層表面に吸着することから、MPA 単分子層最表面でのカルボン酸基同士の水素結合が規則構造の形成及び分子認識能の発現に重要な役割を果たしていることが判明した。これらの研究成果は国際学術誌数誌に掲載された。(T. Sawaguchi, et. al., *J. Electroanal. Chem.*, 507, 256–262 (2001); *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3, 3399–3404 (2001). 他)

(3) 2成分混合チオール単分子層

プロモータ機能をもたないデカンチオール(DT)とプロモータ機能のある 3-メルカプトプロピオン酸(MPA)を混合すると、DT のドメインと MPA のドメインが混在した界面(マイクロドメイン構造)を形成することができ、2成分の表面比率は2成分混合単分子層を作製する溶液の濃度で制御できることを明らかにした。例えば、金(111)電極上で表面比率が DT:MPA=50:50 の2成分混合単分子層は、DT:MPA=7:93 の濃度比の2成分混合溶液に浸漬することにより作製することができ、ドメインのサイズや形状も浸漬時間及び溶液温度によりある程度制御可能である。DT ドメイン内、MPA ドメイン内ではそれぞれ、 $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ 構造及び (3×3) 構造がSTMにより観測され、単成分単分子層での吸着構造と同じであった。このようなマイクロドメイン構造は、構造規制界面の中に電子伝達系タンパク質に対して活性な部分と不活性な部分を構築することができることを示しており、生体分子の優れた分子認識能を利用したバイオ素子やバイオチップにおけるマイクロパターニング・マイクロファブリケーション技術への応用の観点から興味が持たれるものである。これらの研究成果は国際学術誌数誌に掲載された。(T. Sawaguchi, et. al., *Electrochemistry*, 67, 1178–1180 (1999); *J. Electroanal. Chem.*, 496, 50–60 (2001). 他)

②波及効果、発展方向、改善点等

本研究による新規な局所領域分析法は、直ちに局所領域の形態と物理化学特性を同時測定できるシステム開発につながり、生体内分子のその場観察及び機能評価にとどまらず、新しい分析技術として界面電気化学や材料物性化学など多くの分野への波及効果があった。本研究の成果は、国際学術誌数誌に掲載されるとともに、国際学会発表や、テキサスA&M大、東北大、早稲田大等での国内外の招待講演セミナーを通して高く評価されているところである。加えて、北海道大、大阪大、フロリダ州立大等、内外研究機関から多くの研究者の訪問を受け、関連研究分野の第一線で活躍の研究者によるセミナー講演会の開催(計7回)と研究者間及び研究グループ間での発展協力的な研究交流・技術交流を実現できたことは、学会発表や論文発表を通じて本研究の成果を内外に広く周知できた結果と考えられる。また、関連学会の学術委員や評価委員等の役職を務めることで学会活動にも貢献することができ、本研究のもう一つの成果と考えている。

当該研究機関においては、これまで原子・分子レベルでの構造機能解析研究は主としてX線構造解析研究及びNMR構造解析研究が中心であり、本研究によりタンパク質分子や核酸分子の機能解析や操作技術の研究開発の核心に迫る新しい直接評価解析法としてインパクトを与えた。産業的には、製品開発に従事する技術者の技術相談を受ける等、医療診断、環境測定、食品検査等に需要が高いバイオセンサーやバイオチップの高感度化・高機能化を図るために要素技術として貢献大であったと考えられる。

走査型トンネル顕微鏡(STM)に代表されるプローブ顕微鏡は、新しい原理に基づく顕微鏡であるため、表面分析法として認知されつつあるが、その歴史は浅い。特に、電極界面への適用、すなわちSTMの溶液中の操作技術には高度の電気化学的知識が不可欠であるため、難度の高い測定が要求される。電気化学系が生体内分子を活性を発現している状態で観察し評価するのに適しているにも関わらず、その重要性に反して分子レベルでの解明の成功例が少ないのはこのためであったが、本研究により、高度なSTM操作技術と電気化学制御法の技術を融合し、生体分子を対象とした直接評価技術の確立に資することができた。その一方で、生体内で正常に機能している酵素やタンパク質の活性を維持した状態で電気化学系に導入するにはいくつかの問題点も浮き彫りになった。特に、生体分子の固定化技術と機能の精密測定技術にはさらなる工夫と改善が必要であることが分かった。これらの問題点は、今後、当該任期付研究員が所属するバイオセンシング技術研究グループが推進する生物電気化学研究と密接な連携を取りつつ発展させることにより克服できると考えている。溶液内原子・分子レベル直接解析技術と生物電気化学のコンビネーションは、生体分子を対象とした直接機能評価技術の確立をさらに加速させ、生体分子工学ひいては生物機能工学の分野においても分子レベルの視点に立った斬新な切り口を持つ独創的な研究を開拓できると考えられる。

5. 研究成果公表等の状況

課題名：分子認識能を有する構造規制界面の構築と分子レベル機能評価

研究機関名：産業技術総合研究所

任期付研究員氏名：澤口 隆博

1. 研究発表等

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	3	5	24	32
国外	8	2	6	16
合計	11	7	30	48

注) 件数は既発表分及び投稿中のものを合計した数を記入

(2) 原著論文による発表の内訳

1) 国内[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年等)]

(計 3件)

1. "Interfacial Structures of Self-Assembled Monolayers of 2-Pyridinethiol on Au(111) Studied by In Situ Scanning Tunneling Microscopy", Takahiro Sawaguchi, Fumio Mizutani, Isao Taniguchi, *Anal. Sci.*, 17, Suppl., i383-i386 (2001).
2. "In-Situ STM Imaging of Two-Component Self-Assembled Monolayers of 1-Decanethiol and 3-Mercaptopropionic Acid on Au(111)", Takahiro Sawaguchi, Yukari Sato, Fumio Mizutani, *Electrochemistry*, 67, 1178-1180 (1999).

2) 国外[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年等)]

(計 8件)

1. "Ordered Structures of Self-Assembled Monolayers of 3-Mercaptopropionic Acid on Au(111) : In Situ Scanning Tunneling Microscopy", Takahiro Sawaguchi, Yukari Sato, Fumio Mizutani, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3, 3399-3404 (2001).
2. "In Situ STM Imaging of Individual Molecules in Two-Component Self-Assembled Monolayers of 3-Mercaptopropionic Acid and 1-Decanethiol on Au(111)", Takahiro Sawaguchi, Yukari Sato, Fumio Mizutani, *J. Electroanal. Chem.*, 496, 50-60 (2001).
3. "Voltammetric and In Situ Studies on Self-Assembled Monolayers of 4-Mercaptopyridine, 2-Mercaptopyridine and Thiophenol on Au(111) Electrodes", Takahiro Sawaguchi, Fumio Mizutani, Soichiro Yoshimoto, Isao Taniguchi, *Electrochim. Acta*, 45, 2861-2868 (2000).

(3) 原著論文以外による発表の内訳

1) 国内[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 5件)

1. "電気化学STMによる電極表面構造解析 (In Situ Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy)", 澤口隆博, *Electrochemistry*, 69, 716-725 (2001).
2. "トンネル顕微鏡による電極界面の局所表面反応イメージング (In Situ STM Imaging of Interfacial Structures and Reactions on Electrodes)", 澤口隆博、水谷文雄、*表面技術*, 51, 27-33 (2000).

2) 国外[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 2件)

1. "In Situ STM and Electrochemical Studies of Self-Assembled Monolayers of Aromatic Thiols at Single Crystal Gold Surfaces", Takahiro Sawaguchi, Fumio Mizutani, *Proceedings of The First Cross-Straight Symposium on Microsystem Technology (Tainan/Taiwan)*, p. 74-79 (2000).
2. "Interfacial Structure of Sel-Assembled Monolayers of 3-Mercaptopropionic Acid on Au(111) Studied by In Situ Scanning Tunneling Microscopy", Takahiro Sawaguchi, Yukari Sato, Fumio Mizutani, *Proceedings of The Asia-Pacific Surface & Interface Analysis Conference (APSIAC'2000, Beijing/China)*, p.43-44 (2000).

2. 特許出願等[件名、出願者氏名、出願年月日、特許番号 等]

(計 0件)

なし

3. 受賞等[件名、受賞者氏名、受賞年月日 等]

(計 1件)

1. (社)表面技術協会 第三回優秀講演賞、澤口隆博、2002年3月14日