

# 水中静電力による官能基の識別

Identification of Charged Functional Groups in Aqueous Solutions

石野 隆  
T. Ishino

稗田 泰之  
H. Hieda

源間 信弘  
N. Gemma

微小なプローブを走査することによって、表面の構造・物性を原子レベルで評価する技術が開発された。これにより原子スケールのメモリやデバイスへの応用を旨として、さまざまな方向から研究が進展している。一方、これらの技術は生体分子など溶液中において本来の機能をもつ試料に対して、その場観察を行い、局所的な物性・分子レベルの機能評価を行う手段としても有効である。われわれは、溶液中において、生体分子の表面電位分布を官能基1個のレベルで評価する技術の確立を旨とし、プローブと表面間に働く静電相互作用について解析を進めている。

そこで、溶液中で微小な力を測定し、官能基の荷電状態を反映した力を検出することで、試料表面に存在する官能基の識別を試みた。その結果、プローブの先端径数 10nm に対応した分解能で官能基の識別が可能であることを確認した。

Recently, atomic-scale surface structures and properties have been investigated by means of scanning microfabricated probes. This technique is also useful for evaluating local features and functions of biomolecules, which are active only in an aqueous environment. We have analyzed electrostatic interactions between the probe and sample surface in aqueous solutions with the aim of observing potential distributions on the surfaces of biomolecules.

This time, we attempted to identify charged functional groups on monolayers by measuring microscopic forces with an atomic force microscope (AFM). As a result, functional groups within an area of a few tens of square nanometers were identified from the force-distance curves obtained.

## 1 まえがき

タンパク質などに代表される生体内の分子は、酵素反応や分子認識など、さまざまな機能を担っているが、これら分子の構成単位は、DNA(デオキシリボ核酸)から転写されるアミノ酸配列である。アミノ酸分子は、種類によって-COOH(カルボキシル)基、-NH<sub>2</sub>(アミノ)基、-OH(ヒドロキシル)基、-CONH<sub>2</sub>(アミド)基、-CH<sub>3</sub>(メチル)基などの官能基をもっており、それぞれ極・非極性、酸・アルカリなど性質が異なる。

分子内では、これらのアミノ酸配列が三次元的に複雑に入り組んでおり、分子表面に露出した官能基が解離することによって、溶液中で分子固有の複雑な表面電位分布を形成している。この電位分布が、各分子の構造や機能と密接に結びついていると考えられている<sup>(1)</sup>。ごく少数の構造が知られている分子については、溶液中での官能基の解離度を考慮に入れたシミュレーションにより表面電位分布が求められているものの、実験的にこれを分子レベルで直接評価する手段は現在のところ存在しない。

したがって、生体分子の表面を官能基1個のレベルで見ることが可能となれば、生体内で行われるさまざまな酵素反応や、抗原・抗体反応など、分子のもつ機能の解明に

よって、さまざまな医用技術への応用が考えられる。また、微小なプローブを用いたマニピュレーション技術と組み合わせることによって、任意の機能をもつ分子を自由に設計することが、可能となるかもしれない。

原子間力顕微鏡(AFM)<sup>(2)</sup>は、微小なこの変位を半導体レーザーと光検出器からなる光学系を用いて検出することによって、プローブ(探針)と試料表面の間に働く力を測定す

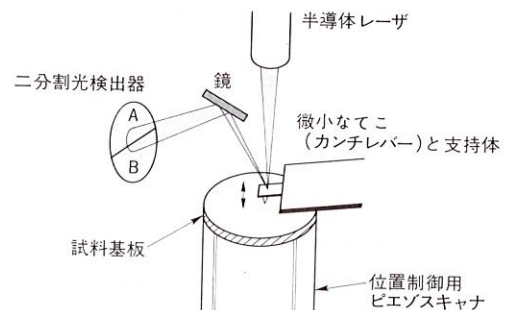


図1. AFMによる力の検出原理 カンチレバーと一体化して成形された探針が試料表面から力を受けることによって上下にたわみを生ずる。このたわみの変化量を二分割光検出器のセンシング部分におけるレーザー光の反射スポット位置のずれとして検出する。

Principle of detecting forces by AFM



る装置であり、大気中、真空中および溶液中などの環境下で、試料表面の物理的・化学的性質をナノメートルオーダーで評価できる技術が開発されている<sup>3)</sup>。また、さまざまな分野への応用の広がりとともに、分子1個のレベルの物性評価、機能制御を可能とする関連技術も急速に進展しつつある。

われわれは、AFMを用いてこれまで溶液中での微小な領域における静電相互作用の評価を行っており、今回溶液中での静電力測定によって官能基の識別を試みた。

以下にその結果を示す。

## 2 AFMを用いた溶液中の力測定

AFMを用いて力の測定を行う場合、試料が固定されたピエゾ素子に電圧を加えてプローブとの距離を制御する。この際に、カンチレバーの変位量を光学的に検出することによって、フォースカーブと呼ばれる力と距離の関係を示す曲線を得る<sup>4)</sup>。図1にAFMを用いた力の検出原理を示す。フォースカーブのデータからカンチレバーの変位を見積もることによって、プローブと試料表面の間に働く引力あるいは斥力を $1 \times 10^{-10}$ ニュートンのレベルで検出することができる。

溶液中では、水分子や電解質のイオンの関与により、プローブと表面との相互作用は、より複雑なものとなっている。この場合、帯電した表面間に働く力は電気二重層間の相互作用として記述されるが、官能基の荷電状態を識別するためには、試料表面の電荷密度によって検出される力のパターンが異なる条件を見出さなければならない。これまでpHやイオン濃度などを変化させてSiO<sub>2</sub>などバルクの試料に対してAFMによる力の測定が行われているが、水中静電力を能動的に制御するためには不十分である。

今回の測定では、プローブおよび試料表面の電位を能動的に制御しながら水中静電力を検出するために、双方の電位を電気化学的に制御することを試みた。このため、金属をコーティングしたプローブを作製し、これを作用電極とする3電極系を構成し、まずプローブ/試料の双方の電位を同時に制御しながら、プローブ/試料間に働く水中静電力を詳しく解析した。

次に、水中静電力の検出によって官能基の荷電状態を識別するために、試料表面に同一の官能基が一様に分布した単分子膜試料をLangmuir-Blodgett (LB)法によって作製し、上述した方法と同様にプローブの電位を電気化学的に制御しながらフォースカーブの測定を行った。図2に今回測定に用いた電気化学セルの構造を示す。

単分子膜試料は、製膜後、水中に保持した状態で測定を行わなければならないので、ここでは市販のAFMとは異なる特殊なセルを用いている。このような試料では、官能

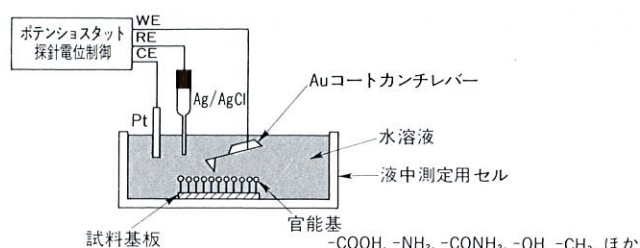


図2. 溶液中での力測定に用いられる電気化学セルの構造  
3電極系で構成する。ここではAuコートしたカンチレバーおよび探針を作用電極(WE)、リング状Ptワイヤを対向電極(CE)とし、探針に加えられる電圧の基準となる参照電極としては、キャピラリー型の銀/塩化銀(Ag/AgCl)電極(RE)を用いている。

Scheme of electrochemical cell for measurement of electrostatic forces in aqueous solutions

基の解離によって表面電荷を生ずるために試料表面はほぼ一定の電荷密度になっていると考えられる。したがって、AFMを用いて溶液中でのフォースカーブ測定を行うことによって、官能基の荷電状態を反映した水中静電力を検出し、結果として官能基の識別を行うことができる。

## 3 電位制御下での静電力測定<sup>5)</sup>

まず、探針と試料表面間の静電相互作用を制御する目的で、探針と試料とを独立に電位制御して、それぞれの電位が一定に保たれた条件下での力の測定を行った。

探針としては、半径 $5 \mu\text{m}$ のシリカ微小球をSiNカンチレバーに接着後、CrおよびAuを順次蒸着したものを用いた。試料は表面に酸化膜を5nm形成したSiO<sub>2</sub>/Si基板を用いた。水溶液としては、 $10^{-5} \text{mol/l}$ のKClO<sub>4</sub>溶液を用いた。探針と試料の電位は、バイポテンシオスタットにより独立に制御した。

図3には、試料電位を固定し探針電位 $V_{\text{tip}}$ を変えたときのフォースカーブの変化を示す。探針電位を一から十への方向へ変化させるにつれ、斥力だけが観測されるカーブから、遠距離で見られる斥力が近距離で引力に変わるカーブ、さらには遠距離から引力が観測されるカーブへと連続的に移り変わるようすが明瞭(りょう)に検出されている。

ここに示した力の特性変化は、試料の表面電位が $\gamma^-$ という条件で、探針の表面電位が $\gamma^-$ から $\gamma^+$ へと変化したことによると解釈される。また、斥力から引力へと変化するカーブが観測されていることは、試料側の電位変化によって、フォースカーブのパターンが異なり、官能基の荷電状態を識別する方法への応用が可能であることを示している。

図4は、逆に探針電位を固定して、試料電位を変化させたときの力の特性を示す図である。試料電位が1V以下の領域では、力は試料電位に強く依存するが、1V以上の領域では探針電位の値によらず力の試料電位依存性はほとんど



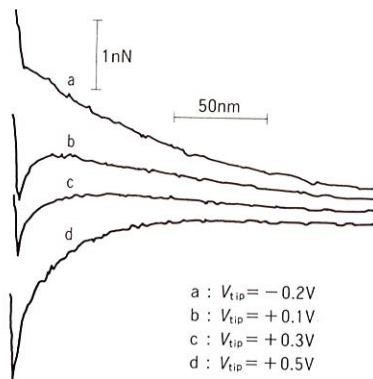


図3. 探針電位の制御によるフォースカーブの変化 SiO<sub>2</sub>微小球をCr/Auでコーティングした探針、膜厚5nmのSiO<sub>2</sub>/Si基板、試料電位は+0.3Vに固定。力のスケールは1nN(ナノニュートン)。

Force vs. distance curves obtained at various tip voltage for 5 nm SiO<sub>2</sub>/Si sample substrate

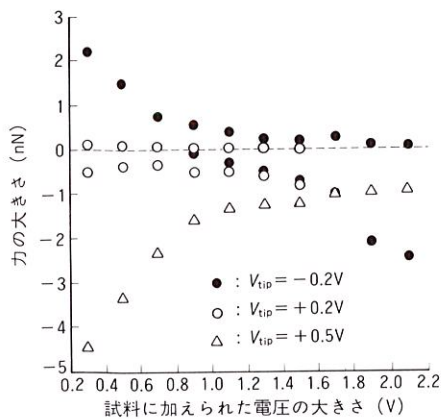


図4. 試料電位に対する力の変化 図3と同じ条件で試料電位を変化させた場合の力の変化。探針電位は、-0.2, +0.2, +0.5Vで固定した。

Force variations as function of sample voltage

ど見られない。

これらの結果を見ると、Au探針の表面電荷の符号が、探針電位0.2~0.3V付近で-から+へと変化しているのに対し、SiO<sub>2</sub>/Si試料の表面電位は、試料電位を+2.0V近くまで増加しても、-のままで+には変化していない。図3、図4に示したのは、SiO<sub>2</sub>の厚みが5nmの試料であるが、SiO<sub>2</sub>の厚みを20nmに増加させた場合には、力の試料電位依存性は、より緩やかであった。SiO<sub>2</sub>/Siの表面電位が変化しにくい原因としては、SiO<sub>2</sub>層での電位降下およびSiO<sub>2</sub>表面に存在する-OH基の解離性が高いことが、表面電位に対して支配的に働いていることが考えられる。

#### 4 水中静電力測定による官能基の識別<sup>(7),(8)</sup>

前に述べた結果から、試料側の電位の符号・大きさに

よってフォースカーブの形が変化し、これによって試料表面の荷電状態が識別できる可能性を示した。

図5にステアリン酸(CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>COOH)を用いて単分子膜を作製し、純水中でフォースカーブ測定を行った結果を示す。この場合、-COOH基が解離して-に帯電するために、試料表面は-の電荷がほぼ一様に分布していると考えられる。

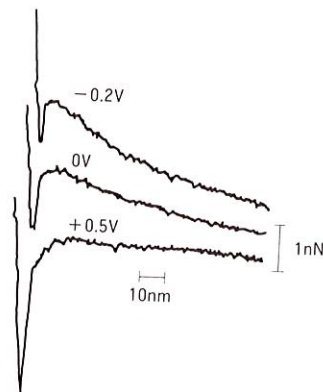


図5. ステアリン酸単分子膜に対するフォースカーブ測定の結果

金コートした探針およびカンチレバーを作用電極とする3電極系を構成し、探針側の電位を制御しながら、力の測定を行った結果。試料(ステアリン酸単分子膜)表面は-COOH基の解離によって-に帯電している。

Force curves obtained on stearic acid monolayer

図からわかるように、探針側の電位を-0.2Vで固定して力の測定を行った場合、水中静電力による斥力が働く。しかし、探針側の電位を+側に变化させた場合、斥力だけが生ずるパターンから、近距離では引力が働くパターン、さらには、斥力はほとんど消失し、長距離から引力が生ずるパターンへの変化が見られる。

次に、同様の方法で作製した単分子膜を用いて、-NH<sub>2</sub>基、-CONH<sub>2</sub>基について探針電位の値による力の変化を調べた。ただし、-NH<sub>2</sub>基では、試料の作製条件の制限から、pH=10のKOH溶液中で測定を行っている。これらの結果から、それぞれの官能基について探針電位の値による力の変化をプロットした結果を図6に示す。

-COOH基では、前述したように探針側の電位を-から+へ変化させた場合、斥力から引力への変化が見られる。また-CONH<sub>2</sub>基の場合、ほとんど解離せず、電的に中性であることから、探針側の電位変化による力の変化はごく小さい。

一方-NH<sub>2</sub>基では、-COOH基とは逆に解離して+に帯電することから、探針電位の増加につれて斥力が増大する傾向が見られる。ただし、この場合弱アルカリ溶液中での測定のため、純水中と比較して電位の基準値が+側にシフ

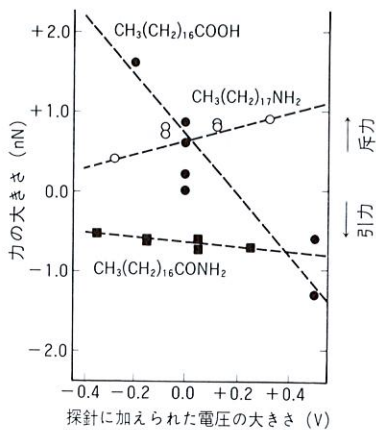


図6. 探針電位の制御による官能基の識別 探針電位を+側に变化させた場合の力の変化を調べることで試料表面に存在する官能基の識別を行った。それぞれの官能基の荷電状態に対応して、 $-\text{COOH}$ 基(-に帯電)では引力側へ、 $-\text{NH}_2$ 基(+に帯電)では斥力側への変化がみられる。これに対して $-\text{CONH}_2$ 基(ほぼ中性)では力の変化はごく小さい( $-\text{NH}_2$ 基の場合については弱アルカリ性の溶液(pH=10)の条件下で測定した)。

Identification of functional groups by measuring forces while controlling tip voltage

トしている。また、溶液中のイオン濃度が大きいため、探針と対向電極の間に流れる電流が大きくなり、電位制御が不安定となっている。このため、 $-\text{COOH}$ 基の場合のような引力から斥力への変化は見られず、力の変化も小さくなっている。

以上の結果から、AFMを用いた測定により、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}_2$ 基が識別できることを確認した。このほか、 $-\text{OH}$ 基については $-\text{CONH}_2$ 基と同様の特性を示すことが確認された。また、 $-\text{CH}_3$ 基については、上述した電気的に極性をもつ親水的な官能基と異なり、非極性の疎水的な官能基であることから、疎水-疎水相互作用を検出することによって識別可能であることを確認した。これら官能基について検出されている力の大きさから換算して、現在のところ約数十個の官能基からの寄与を観測しているものと考えられる。また、探針の先端径数10nmに相当した分解能で官能基の空間的な分布を識別することが原理的には可能である。

現在、力の大きさの分布を画像化するシステムを開発し、複数の官能基が混在する試料について、官能基の識別によるパターンの検出を行っている。現状では、試料の作製条件による制限、探針の電位制御の方法など課題も多いが、今後は探針先端の尖鋭化や力の検出感度向上により、

より局所的な力を検出し、最初に述べたような、タンパク表面の官能基分布に対応したナノメートルスケールで変化する電位分布の評価を実現させていきたいと考えている。

## 5 あとがき

今回、AFMを用いた溶液中での力測定によって、官能基の荷電状態の識別が可能であり、試料側の局所的な表面電位を反映した水中静電位が検出できることを確認した。今後は試料表面における電位分布を検出するシステムを高度化させ、生体分子1個の機能や構造を直接評価していく。

溶液系は、化学反応や分子間相互作用の場としても重要であり、今回の解析結果や、プローブの電位制御技術を用いれば、分子1個の機能や局所的な反応を制御し、今までにないまったく新しい機能をもった分子を創製する技術への応用も期待される。さらに、ナノメートルオーダーで表面物性を評価できる技術は、さまざまな種類の官能基や分子によるナノ構造形成や、センサ技術などへの応用が考えられる。将来的には、分子レベルで自由に材料やデバイスを創製できる技術への展開を旨とする。

## 文献

- (1) H. Nakamura and S. Nishida : J. Phys. Soc. Jpn., **56**, pp. 1609-1622 (1987)
- (2) G. Binnig, et al : Phys. Rev. Lett., **56**, pp. 930-933 (1986).
- (3) B. Drake, et al : Science, **243**, pp. 1586-1589 (1989)
- (4) A. L. Weisenhorn, et al : Appl. Phys. Lett., **54**, pp. 2651-2653 (1989)
- (5) W. A. Ducker, et al : Nature, **353**, pp. 239-241 (1991)
- (6) H. Hieda, et al : Jpn. J. Appl. Phys., **34**, pp. 595-599 (1995)
- (7) T. Ishino, et al : Jpn. J. Appl. Phys., **33**, pp. 4718-4722 (1994)
- (8) T. Ishino, et al : Jpn. J. Appl. Phys., **33**, pp. L1552-L1554 (1994)



石野 隆 Takashi Ishino

研究開発センター基礎研究所。  
溶液中 AFM の研究に従事。応用物理学会、物理学会、電気化学会会員。  
Advanced Research Lab.



稗田 泰之 Hiroyuki Hieda

研究開発センター基礎研究所。  
AFMを用いた分子マニピュレーションの研究に従事。生物物理学会、応用物理学会会員。  
Advanced Research Lab.



源間 信弘 Nobuhiro Gemma, ph.D.

研究開発センター基礎研究所主任研究員。理博。  
分子デバイスの研究に従事。物理学会、応用物理学会会員。  
Advanced Research Lab.