

ナノメートルスケールで構造が制御された有機単分子膜を基礎とした 金属単結晶表面における機能性分子の3次元固定化

京都大学大学院 工学研究科 助手 保原 大介

1. はじめに

高感度センシング素子や次世代エレクトロニクスデバイスの開発において、分子レベルで構造や機能が制御された表面の創製は重要である。チオール分子を用いた自己組織化単分子膜は、安定かつ高度に配向した単分子膜が容易に得られ、チオール分子自身に様々な官能基を導入することで表面特性をコントロールできるという利点を持ち、金属表面の性質の制御に有効である。本研究では、金属単結晶表面上に形成されたチオール自己組織化単分子膜のナノメートルスケールの構造が、機能性分子の固定化や、その機能発現に与える影響を調べる。そのために、高度に構造が制御された二成分系チオール自己組織化単分子膜の構築法および膜表面での化学反応や膜表面-機能性分子間の相互作用を利用した機能性分子の固定化を調べることを目的とする。

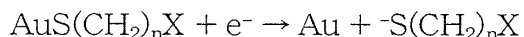
2. 実験

電極には、マイカ上に580℃で真空蒸着して作成した主に(111)単結晶面を有する金薄膜を用いた。チオール自己組織化単分子膜は、使用前に電気炉で530℃で7時間アニール処理した金薄膜を二種類のチオールを含む溶液に24 ± 5時間浸漬して形成させた。酵素として、西洋ワサビペルオキシダーゼ(isozyme C, TOYOBO Grade I-C)を用いた。チオール誘導体として、3-mercaptopropanol (MPOH), 1-tetradecanethiol (TDT), dithiobis-N-succinimidyl propionate (DTSP)を用いた。チオール自己組織化単分子膜の還元的脱離のサイクリックボルタンメトリーは、0.5 M KOH水溶液中で、参照電極にAg/AgCl(KCl sat.)、対極に白金を用いて行った。X線光電子分光(XPS)測定には線源としてMgKa線を用い、真空度 1×10^{-9} Torr以下で行った。走査トンネル顕微鏡(STM)、原子間力顕微鏡(AFM)は、NanoScope IIIa (Digital Instruments)を用いて測定した。STM測定にはPt-Ir製チップを、AFM測定にはSi₃N₄製のカンチレバーを使用した。

3. 研究成果

3. 1 MPOHとTDTの二成分系チオール自己組織化単分子膜のドメイン構造

二種類のアルカンチオール分子の共吸着により金表面に形成させた二成分系チオール自己組織化単分子膜では、二成分のメチレン鎖長差や末端官能基の性質が大きく異なる場合に相分離し、ナノメートルスケールのドメインを形成する。膜を形成させるときのチオールの濃度がドメインの構造に与える影響を調べるために、チオール濃度の異なる溶液から単分子膜を形成させ、ボルタンメトリー測定と走査トンネル顕微鏡(STM)測定を行った。Fig. 1は、Au(111)面上に、全チオール濃度が1 μM、100 μM、10 mMの溶液からMPOHとTDTの二成分系チオール自己組織化単分子膜を形成させ、測定したサイクリックボルタモグラムである。金表面に吸着したチオール分子は、



のように還元的に脱離することが知られている。Fig. 1aに示した1 μMの場合、-680 mVと-1100 mVに2本の大きなピークが観察された。これらはそれぞれ、相分離によって生じたMPOHのドメインとTDTのドメインの還元的脱離に起因する。チオールの濃度を高くすると、MPOHの還元脱離に由来するピークはネガティブ側へ、TDTに由来するピークはポジティブ側へシフトした(Fig. 1b, 1c)。このようなピークのシフトは、MPOHドメインへのTDTの溶解、およびTDTドメインへの

MPOHの溶解の程度が増加したためであると考えられ、チオール濃度が低いほど相互溶解性が低く、より相分離の程度が高い単分子膜が形成されていることを示唆する。また、2本のピークの間電位にブロードなピークが観察され (Fig. 1aでは、-860 mV、Fig. 1bでは、-900 mV、Fig. 1cでは、-950 mV)、その強度は、チオールの濃度と共に増加した。このようなピークは、二成分が相分離できずにほぼ均一に混合した領域の還元的脱離に起因すると考えられ、チオール濃度が低いほどより完全に相分離した膜が形成されていることを示している。

Fig. 2は、Fig. 1と同じ条件で作成したMPOHとTDTの二成分チオール自己組織化単分子膜のSTM像である。明るい領域と暗い領域はそれぞれ主にTDTからなるドメインと主にMPOHからなるドメインを示している。Fig. 2から、膜形成時におけるチオール濃度が小さいほどドメインサイズが大きくなることが明らかとなった。また、1 μ Mのチオール溶液から形成させた膜では、ドメインがAu(111)面の<101>方向に伸長している様子が観察された。このような膜構造は、チオール自己組織化単分子膜の形成によく用いられる1 mM程度の濃度のチオール溶液からの共吸着では、報告例がなく、膜形成時におけるチオールの濃度が二成分系チオール自己組織化単分子膜のドメインサイズや形状の制御に重要であることが明らかとなった。

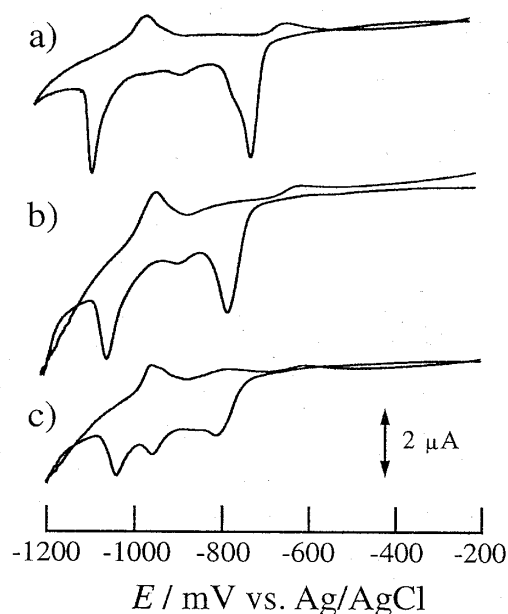


Fig. 1 Cyclic voltammograms for the reductive desorption of binary SAMs composed of MPOH and TDT. The SAMs were formed from solutions whose total thiol concentrations were a) 1×10^{-6} mol dm^{-3} , b) 1×10^{-4} mol dm^{-3} , and c) 1×10^{-2} mol dm^{-3} . The ratios of MPOH and TDT in the solutions were a) 1:1, b) 3:1, and c) 7:1, respectively.

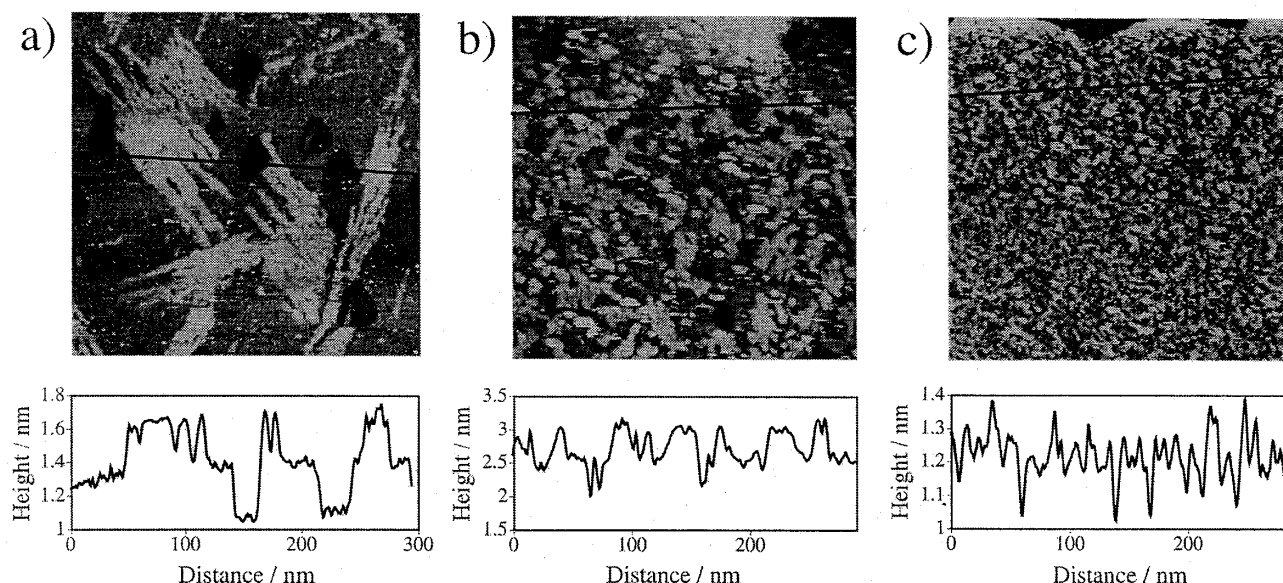


Fig. 2 STM images of binary SAMs of MPOH and TDT formed from a) 1×10^{-6} mol dm^{-3} , b) 1×10^{-4} mol dm^{-3} , and c) 1×10^{-2} mol dm^{-3} solutions containing MPOH and TDT. The ratio of MPOH to TDT at the surface was about 1 to 1 for all SAMs. The ratios of MPOH and TDT in the solutions were the same as in Fig. 1. A brighter part in the images corresponds to a higher point. Scan area: 300 nm $\times$ 300 nm.

3. 2 二成分系チオール自己組織化単分子膜のナノメートルスケールのドメイン上へのペルオキシダーゼの固定化
グルコース、乳酸エステル、アルコール、コリンなどのセンシングの手段として、ペルオキシダーゼと他のオキシダーゼを固定化した電極が研究されている。分子レベルでデザインされた高感度センシング素子の開発のためには、

酵素1分子の大きさに近いレベルで電極表面の構造を制御する必要がある。そこで、相分離した二成分系チオール自己組織化単分子膜を利用して西洋ワサビペルオキシダーゼ分子のナノメートルスケールドメインへの固定化を試みた。ペルオキシダーゼ固定化の手順をScheme 1に示した。ナノメートルスケールで相分離した膜としてMPOHとTDTの二成分系チオール自己組織化単分子膜を用い、電位制御による選択的置換によってDTSP分子を導入後、ペルオキシダーゼと反応させた。物理吸着したペルオキシダーゼ分子は、1 MのKCl溶液でリンスすることによって取り除いた。Fig. 3は、Scheme 1に示した各過程におけるN(1s)領域のXPSスペクトルである。MPOHとTDTの二成分系チオール自己組織化単分子膜のXPSスペクトルでは、窒素に由来するシグナルは、検出されなかったが (Fig. 3a)、MPOHをDTSPに選択的置換した後は、400.5 eV付近にDTSPのサクシニミド基に由来するピークが現れた (Fig. 3b)。ピーク強度は、基板をペルオキシダーゼの溶液に浸漬後、大幅に増大した。これは、ペルオキシダーゼのペプチド鎖の窒素に由来すると考えられる。また、Fig. 3dでは、Fig. 3cに比べピーク強度が減少した。1 MのKCl溶液でTDTに

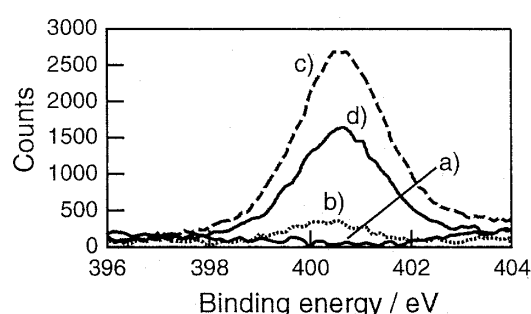
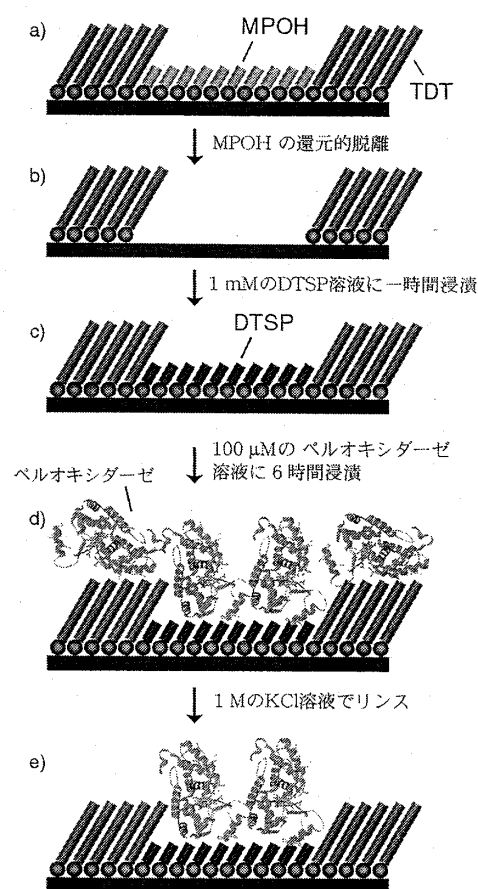


Fig. 3 XPS spectra of N(1s) and O(1s) regions of a) binary SAM of MPOH and TDT, b) binary SAM of DTSP and TDT, c) DTSP-TDT binary SAM after immersing into a peroxidase solution, and d) peroxidase-immobilized DTSP-TDT binary SAM after rinsing with 1 M KCl for 1 min. The MPOH-TDT binary SAM was formed by coadsorption from a mixed solution of MPOH and TDT (1:1). The ratio of MPOH in the MPOH-TDT binary SAM was ~50%.



Scheme 1 a) Phase-separated binary self-assembled monolayer (SAM) of MPOH and TDT, b) Sub-monolayer of TDT after the reductive desorption of MPOH, c) Phase-separated binary SAM of DTSP and TDT, d) DTSP-TDT binary SAM after immersing the substrate shown in c) into an HRP solution, e) HRP-immobilized DTSP-TDT binary SAM after rinsing with a 1 M KCl aqueous solution.

吸着したペルオキシダーゼ分子はほぼ完全に脱着することが確認されているため、Fig. 3dに示したピークは、Scheme 1 eに示したように、DTSP上に共有結合で固定化されたペルオキシダーゼに由来すると考えられる。

Fig. 4は、Scheme 1の各過程における試料表面を500 nm×500 nmの領域でAFM観察した結果である。MPOHとTDTの二成分系チオール自己組織化単分子膜のAFM像 (Fig. 4a) では、Fig. 2aに示したSTM像同様、明るく観察されるTDTのドメインが、Au(111)面の<101>方向に伸長した様子が得られた。MPOHをDTSPに選択的置換した後 (Fig. 4b) でも、ドメインが同様の方向に伸長した様子が観察された。観察されたDTSPドメインとTDTドメインの高さの差

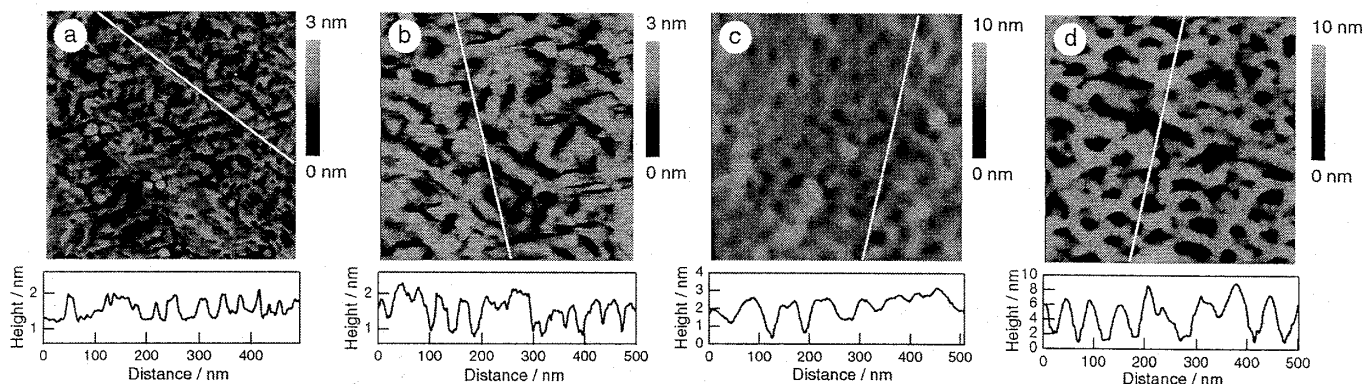


Fig. 4 AFM images of a) binary SAM of MPOH and TDT, b) binary SAM of DTSP and TDT, c) DTSP-TDT binary SAM after immersing into an HRP solution, and d) Peroxidase-immobilized DTSP-TDT binary SAM after rinsing. The ratio of MPOH in the MPOH-TDT binary SAM was ~ 0.5 . A brighter part in the images corresponds to a higher point. Scan area: 500 nm $\times$ 500 nm.

は約1 nmであった。DTSPとTDTの二成分系チオール自己組織化単分子膜が形成された試料をペルオキシダーゼ溶液に浸漬させると、細長く伸ばしたドメインは観察されなくなった。これは、Scheme 1dに示すようにペルオキシダーゼが膜表面をほぼ覆ってしまったためであると考えられる。1 MのKCl溶液によるリンス後は、像のコントラストが大幅に増加した。これは、TDTドメイン上に吸着したペルオキシダーゼが除去されたためであると考えられる。明るい領域（共有結合により固定化されたペルオキシダーゼのドメインと考えられる）と暗い領域（TDTドメインと考えられる）の高さの差は約5 nmであった。これから、ペルオキシダーゼの見かけの高さが、約6 nmと見積もられた。この値は、X線結晶構造解析により明らかとなった西洋ワサビペルオキシダーゼの分子サイズに近い。

Scheme 1にしたがって固定化されたペルオキシダーゼの酵素活性をカテコールをメディエーターとしてサイクリックボルタンメトリーを用いて調べた (Fig. 5)。溶液中に存在する過酸化水素の量に応じて還元電流の増加が観察された。過酸化水素濃度が0.1 mMから0.8 mMの範囲で溶液中の過酸化水素濃度と電流値は直線関係となり、固定化されたペルオキシダーゼの酵素活性が保たれていることが確認できた。

4. まとめ

膜形成時におけるチオールの濃度を制御することによって二成分系チオール自己組織化単分子膜のドメインサイズや形状をナノメートルスケールでコントロールできる可能性を示した。ナノメートルスケールのサイズのDTSPドメイン上に活性を保った状態でペルオキシダーゼ分子を固定化する方法を示した。酵素が固定化されていないドメインに、基質を酸化し過酸化水素を発生させるような他のオキシダーゼ類を固定化することによって、ナノメートルスケールで制御された二種類の酵素の相対的な位置関係とセンシング特性を調べることができると期待される。二成分系チオール自己組織化単分子膜は、機能性分子の固定化のための

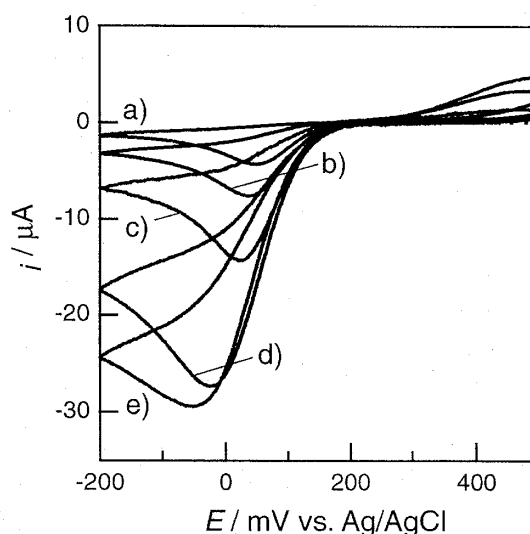


Fig. 5 Cyclic voltammograms of the peroxidase-immobilized Au(111) prepared according to Scheme 1 in a 30 mM phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.05 mM catechol. The ratio of MPOH in the MPOH-TDT binary SAM was ~ 0.5 . a) In the absence of hydrogen peroxide, in the presence of b) 0.13 mM, c) 0.26 mM, d) 0.52 mM, and e) 0.78 mM of hydrogen peroxide. Scan rate was 10 mV s⁻¹.

基礎構造として有効であると考えられる。

謝辞

本研究は、（財）新世代研究所研究助成費の援助を受けて行われました。深く感謝いたします。本研究を進めるにあたって、研究室の垣内 隆教授のご助力をいただきました。またペルオキシダーゼを用いた実験は、学生の鶴野雄介氏によって行われました。ここに感謝いたします。

発表論文

- 1) Daisuke Hobara, Takashi Kakiuchi, "Domain structure of binary self-assembled monolayers composed of 3-mercapto-1-propanol and 1-tetradecanethiol on Au(111) prepared by coadsorption", *Electrochem. Commun.*, **3**, 154-157 (2001).
- 2) Daisuke Hobara, Masahiro Yamamoto, Takashi Kakiuchi, "Reconstruction of Au(111) following the reductive desorption of self-assembled monolayers of 2-mercaptoethanesulfonic acid studied by in-situ scanning tunneling microscopy", *Chem. Lett.* 374-375 (2001).
- 3) Daisuke Hobara, Yusuke Uno, Takashi Kakiuchi, "Immobilization of horseradish peroxidase on nanometer-scale domains of binary self-assembled monolayers formed from dithiobis-N-succinimidyl propionate and 1-tetradecanethiol on Au(111)", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, in press.