

博士学位論文

自己組織化による界面現象の解析と
高機能界面構築に関する研究

平成 28 年 3 月

九州工業大学大学院 生命体工学研究科

山 崎 亮 太

目次

第 1 章	序論	4
1-1	はじめに	5
1-2	界面	5
1-3	バイオエレクトロニクス	6
1-4	生物を構成する「タンパク質」	8
1-4-2	構造タンパク質	8
1-4-3	機能タンパク質	9
1-5	Hydrophobin	9
1-5-1	Hydrophobin の特性と分類	9
1-5-2	HFBI タンパク質	11
1-6	本論文の流れ	13
	Reference	16
第 2 章	HFBI 自己組織化膜の構造解析及びその膜が及ぼす液滴界面現象の解明	22
2-1	目的	23
2-2	表面張力	23
2-3	基板上に滴下した HFBI 液滴の経時変化での観察	24
2-3-1	溶液調製	24
2-3-2	実験と結果	25
2-4	HFBI 液滴の表面張力測定と自己組織化率測定	26
2-4-1	溶液調製と実験操作	26
2-4-2	結果	28
2-5	HFBI 自己組織化膜の構造解析	29
2-5-1	原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた構造解析	29
2-5-2	HFBI 自己組織化膜の AFM 観察結果	30
2-6	HFBI 自己組織化膜の座屈強度測定	31
2-6-1	座屈強度測定の実験方法	31
2-6-2	結果	33
2-7	結論	36
	Reference	38

第 3 章 HFBI 液滴についての研究	42
3-1 目的	43
3-2 HFBI 液滴の上面が平らになる理由	43
3-2-1 液中で HFBI に作用する力	43
3-2-2 液の蒸発による体積減少と表面積変化の関係	44
3-2-3 温度と湿度を変化させたときの HFBI 液滴挙動	48
3-2-4 傾けた基板上に液滴を置いたとき	49
3-2-5 上面が平らになった液滴の上面と側面の AFM	51
3-3 蒸発しない環境下 (液/液界面) での HFBI 液滴の挙動	53
3-3-1 実験方法	53
3-3-2 結果と考察	53
3-4 結論	55
Reference	56
第 4 章 HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の電気化学特性	57
4-1 目的	58
4-2 HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の電気化学特性	58
4-2-1 実験	58
4-2-2 結果	59
4-2-3 HFBI 自己組織化膜の被覆率計算	61
4-3 電解質の pH 変化による HFBI 電極の電気化学特性	61
4-3-1 緩衝域の異なる緩衝液を用いた CV 測定	61
4-3-2 広域 pH 緩衝液を用いた HFBI 電極の電気化学特性	62
4-4 遺伝子改変による HFBI 電極の特性向上	64
4-4-1 ポイントミューテーションによる HFBI の電荷改変	64
4-4-2 それぞれの HFBI 自己組織化膜の構造解析	65
4-4-3 電気化学測定	66
4-5 GOx-HFBI を用いた酵素電極反応の測定	68
4-5-1 GOx-HFBI の培養と精製	68

4-5-2	GOx-HFBI の電気化学測定	70
4-5-3	フェロセンをメディエータとした電気化学測定	71
4-6	結論	74
	Reference	75
第5章	HFBI 自己組織化膜をテンプレートとした微小金属結晶の構築	77
5-1	背景	78
5-2	目的	78
5-3	実験手順の概要と溶液調製	79
5-4	基板の選択と作製	79
5-5	電極表面の AFM 観察	83
5-6	HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の AFM 観察	84
5-7	電極上に被覆した HFBI の除去法の検討	85
5-8	HFBI 自己組織化膜をテンプレートとした Cu の電解析出	88
5-8-1	実験方法と結果	88
5-8-2	位相差によるイメージング	88
5-8-3	走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察	90
5-9	単結晶 Au(111)電極を用いた電気化学実験	90
5-9-1	実験目的と実験操作	90
5-9-2	実験結果と考察	91
5-10	遺伝子改変した HFBI 自己組織化膜で被覆した単結晶 Au(111)電極 の電気化学特性	92
5-10-1	実験操作	92
5-10-2	実験結果と考察	92
5-11	結論	93
	Reference	95
第6章	結論	98
	研究業績一覧	102
	謝辞	105

第 1 章

序論

1 章. 序論

1-1 はじめに

タンパク質、DNA、細胞などの生体材料は非常に有能である。また人工模倣するのは困難とされている。生体材料は、高い生産性・構造形成能力・触媒機能や認識機能を有する自律的な機能材料であると考えられる。この機能を固定化触媒・センサほか各種電子材料・医療機器など有効に利用するには、界面での分子機能発現が求められ、分子機能が高度に発現される分子界面形成が求められる。本研究では生体材料の中でもタンパク質に着目し、タンパク質が持つ機能を高効率に発揮しうる界面の設計を目的としている。機能を持つタンパク質を電子デバイスとして用いる際に、直接電極と接触することによる失活や配向性の問題がある。それを解決するために自己組織化特性を持つ **HFBI** というタンパク質を分子キャリアとして用いることでこれらの問題の解決を目論んだ。

HFBI タンパク質を用いて実験をしている際に、**HFBI** を含む溶液で基板上に液滴を作り、しばらくすると液滴の上面部が平らになるという現象が生じることに気づく。通常、水などの液体は自身の持つ表面張力により球体になろうとする（詳しくは第2章で記述する）。しかし、液中に **HFBI** が存在することでその常識とされてきた表面張力の概念に反する現象が生じたのである。ゆえにまずはこの現象の解明に着手し、液滴の表面張力測定や **HFBI** 自己組織化膜の構造・強度などの測定を行った。**HFBI** が持つ特殊な界面現象を解明することで、**HFBI** 自己組織化膜の詳細な特徴をつかみ、冒頭でも述べた、分子機能電極としての応用に着手した。

このように生体分子が作用した界面の分析とその特性を利用した精密な界面設計を本論文のコンセプトとして研究を行った。

以降は、この研究の背景等を詳しく説明し、研究の意義を述べ、実験方法や結果・考察についてはこれ以降の章に記述する。

1-2 界面

本研究は界面分析と界面設計をコンセプトとして研究を行うことを述べた。この節では本論文において重要なキーワードである「界面」についてその説明と特性について述べる。

ある成分と他の成分が存在する際に、それらが理想気体のように分子間相互作用せず凝縮しないとき、エントロピーは増大する方向へ自発的に変化し、均一系となる。しか

し、実在分子は分子間相互作用があり、他種の分子間相互作用よりも同種の分子間相互作用のほうが強い影響をもたらす場合、同種の成分同士が相互作用して安定状態をとる。このとき、相分離した二つの層の境界を「界面」という。固体、液体、気体、それぞれによる3種の相が存在し（プラズマという第4の状態も存在するが、ここではそれには触れずに進める）、これらが接触することによってできる界面が5種類存在する（気-液、気-固、固-液、液-液、固-固）。界面付近では同一分子によって囲まれていない分子が存在し、この分子は内部の分子と比べて過剰な自由エネルギーを持つ。これを界面自由エネルギーといい、このエネルギーをできるだけ少なくしようと働く力を界面張力という。界面張力において気体との界面の場合を表面張力という。曲率を持つ表面であるとき、その表面自由エネルギーの効果はヤング・ラプラス式やケルビン方程式によって表される^{1,4}。界面では異種の分子が存在し、分子間力の分布が不連続的に変化するために、均一系とは異なる特殊な化学的、または物理的現象が生じる。このような特殊な環境を利用した技術の一つである、不均一触媒反応は、化学反応が起こしやすい界面を利用したものである。また、バイオセンサやバイオ燃料電池などのバイオデバイスも電極などの固相に生体分子を吸着させ、液相や気相との界面で起こる反応を利用した技術である⁵⁻¹⁰。

1-3 バイオエレクトロニクス

生体分子が持つ特性を電子素子と組み合わせた界面反応設計で、高機能な電子デバイスを構築する研究が進められている。このようなエレクトロニクスの世界において生物学やバイオテクノロジーとうまく結び付けていくことを強調して「バイオエレクトロニクス」という単語が用いられる¹¹。生体分子の一つである酵素は自然界に25000種類以上あり、また人間の体で働く酵素だけでも5000種類くらいあると言われており、それぞれに特有の優れた機能を有している。これらの生体分子の持つ優れた機能をエレクトロニクスの分野と結びつけることで、双方向がもつ有用性の複合デバイスを作成することができる。すなわち、一つの方向は、生体分子により元の電極界面が持つ性質を変えることや、生体分子自身の持つ特性をシグナルとして電極に伝える「生体反応による入力」、もう一つの方向は、生体分子をより高機能に活性化させるために電気的なエネルギーを与え、その機能を最大限に発揮し得る場を提供する「電気エネルギー的入力」、これら二つの方向を併せることが、バイオエレクトロニクスの基盤概念となる¹。酵素は基質と反応することで電子を発生する。この電子を電極が受け取ることで、反応に寄

与した物質（基質）の定量を行うことができる。つまり酵素の持つ生体触媒作用や分子認識機能を電子という情報として電子素子側に伝える、この原理を利用しているのがバイオセンサである。¹²⁻¹⁴。バイオセンサの歴史は長く、1962年にクラークが、酸素電極とグルコースオキシダーゼという酵素を使ったグルコースセンサを発表したのが最初である¹⁵。酵素は反応によりその構造や性質を変えないという特性を利用し、その触媒作用によって電極表面の酸素消費を電流減少として測定する原理を開発した。その原理でクラーク式酸素電極にグルコースオキシダーゼを含む溶液を透析膜で覆ってグルコース濃度を繰り返し測定できることを示した。その後、1967年にアップダイクとヒックが固定化酵素を用いたグルコースセンサを *Nature* 誌に報告し、糖尿病患者やその予備軍の血糖値を測定、モニタリングするセンサとして大きく発展してきた¹⁶。また、有機燃料基質を電気エネルギーに変換するバイオ燃料電池の構築として酵素の生体触媒的電子伝達機能を応用する研究も行われている¹⁷⁻¹⁸。これらの研究が行われる中で重要なことは、生体分子と電子素子との電子移動による直接的、または間接的な情報交換を目的とした精密な界面の構築が必要ということである。しかし、単に電極上に酵素を貼り付けただけなどの単純な設計では、酵素は失活したり反応部位の配向性が不制御となってしまう、電極との直接的な電子移動伝達性を欠いてしまう。生体材料と電子素子との間の電気伝達の欠如はバイオエレクトロニクスシステムの根本的な難題の一つとなっている。この問題を解決するべく近年行われている研究で、電子ユニットと連結した生体分子の集合体との電気接触の巧妙な方法が開発された¹⁹。生体分子が電子素子と電子伝達するいくつかの手段として、電子リレーによるタンパク質の構造的な改変²⁰、導電性ポリマーまたは酸化還元活性ポリマーへの酸化還元酵素の固定化¹³、電極と結合した電子リレー上のタンパク質の立体的配向²¹、あるいはDNAへの酸化還元活性挿入剤（インターカレータ）の挿入²²が挙げられる¹¹。本研究ではタンパク質を用いた研究を行っている。そのため本論文ではタンパク質に注目した視線で話を進めていく。

1-4 生物を構成する「タンパク質」

本研究ではタンパク質を用いた分子機能電極の構築を企画している。まず、タンパク質の特長について説明を行う。人体やあらゆる生物を組み上げている、さまざまな“カタチ”をしたタンパク質。筋肉や髪の毛、皮膚、さらには目のレンズ(水晶体)などもタンパク質でできている。人体を構成する部品であるタンパク質の種類は、2万数千種類以上とされている。タンパク質の大きさは、タンパク質によって様々あるが、数ナノメートルから十数ナノメートル程度である。例えば Fig. 1-1 に示す、筋肉中で酸素貯蔵を担うタンパク質である「ミオグロビン」だと、4ナノメートル程である。大きさが様々なのは、結合したアミノ酸の順序や数(一次構造)、このアミノ酸の鎖による立体的な折りたたみ(二、三次構造)に違いがあるためである²³。人体で使われるアミノ酸の種類は炭素・水素・窒素・酸素・硫黄の5種類の元素からなる20種類である。また、タンパク質はそれぞれに固有の立体構造を作り上げるため、固有の特性や機能を持つ。その特徴は大きく分けて2つあり、生体の構造を構築する「構造タンパク質」と酵素や物質(情報)の輸送などさまざまな化学反応に関わる「機能タンパク質」である。酵素や抗体といった機能タンパク質は人工では模倣し得ない、優れた特性を有していることから精密な分子電子材料としてデバイスへの応用が研究されている。

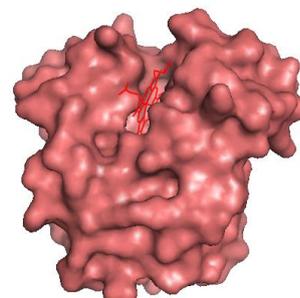


Fig. 1-1 ミオグロビンの分子モデル
(PDB data: 1MBN)

1-4-2 構造タンパク質

構造タンパク質とは生物の構造を構築するタンパク質のことで、軟骨や腱などを構成する繊維状のタンパク質であるコラーゲンや、髪の毛や爪などを構成するタンパク質ケラチンなどがある。構造タンパク質にはその一部に膜タンパク質というものが存在する。膜タンパク質とは細胞や細胞小器官などの生体膜に付着しているタンパク質のことである。膜タンパク質にはさらに内在性膜タンパク質と表在性膜タンパク質の2つに分類される。内在性膜タンパク質は常に膜に付着または貫通したタンパク質で、引き離すにはラウリル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤または非極性溶媒が必要となる。また表在性膜タンパク質は疎水性相互作用や静電相互作用によって脂質二重層

と結合しているタンパク質で、引き離すには高塩濃度の極性溶媒を必要とする²⁴⁻²⁷。

1-4-3 機能タンパク質

機能タンパク質とは酵素や物質の輸送など様々な化学反応に関わるタンパク質のこと、分子認識機能や触媒作用を持つ酵素や、物質の運搬や保持作用を持つ血中にあるヘモグロビン、神経伝達物質などの調節作用を持つホルモンなどがある。機能タンパク質はそれぞれに特有の機能を有しており、その機能を分子機能電極として応用する研究が盛んに進められている。

機能タンパク質の中の酵素は特定の分子（基質）とのみ反応する分子認識機能（基質特異性）を持つ。そして基質は特定の物質にのみ変化される（反応特異性）。その反応過程では電子が放出される。この電子を電極で受け取り、その電子の数を測定することで基質の量を定量するバイオセンサや、受け取った電子を電気エネルギーとして利用する酵素電池²⁸⁻²⁹などが存在する。酵素は電極上に固定しても直接電子移動が起こることはない³⁰。そのため現在行われているバイオセンサなどの研究には電子移動を間接的に行うために、電子メディエータが用いられている。電子メディエータとは酵素反応で出た電子を受け取り、電極や他の物質へその電子を受け渡す仲介役を担う物質のことである。電子メディエータには、フェリシアニド³¹、ビピリジニウム塩³²⁻³³、キノン³⁴⁻³⁵、遷移金属錯体³⁶などが利用されてきている。こうした方法を利用して応用していくにはまだ課題が多く、直接電極と酵素が接することによって、酵素の水和が崩れ、失活してしまう問題や、反応部位が隠れてしまい、基質と反応することができなくなるといった問題が残されている。

1-5 Hydrophobin

1-5-1 Hydrophobin の特性と分類

機能タンパク質などの生物活性を有する構造を保持しながら生体分子を固相に固定化するためには、固相と液相または固相と気相の界面における電子的な情報のやり取りを最適化できるような分子の相を精密に設計する必要がある。

前節での問題点を踏まえ、本研究室では固相上に精密な分子相形成を担う物質として、Hydrophobin というタンパク質に注目している。Hydrophobin とは糸状菌由来のタンパク質である。糸状菌は成長する際に、Hydrophobin を媒質中に分泌する。Hydrophobin は気相との界面に吸着し、その界面張力を下げる。そうすることで糸

状菌は気液界面を貫き、Hydrophobin に自身の周りを覆われながら気相側へと出て行き、別の新たな場所で増殖を続ける (Fig. 1-2) ³⁷。

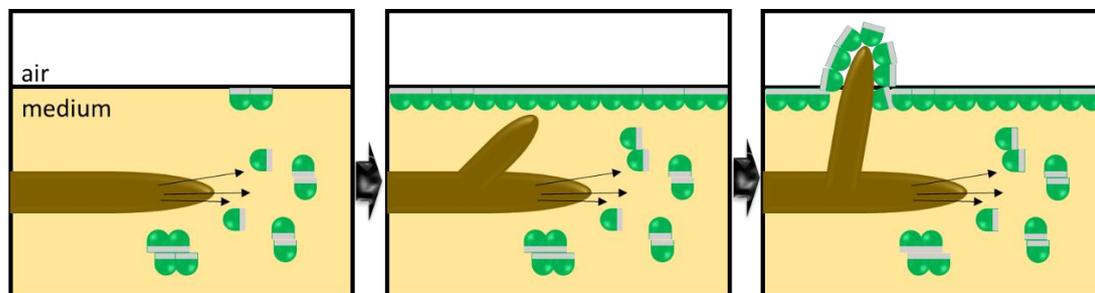


Fig. 1-2 糸状菌が気液界面を通過して成長する際の Hydrophobin の役割

Hydrophobin に分類されるタンパク質はそのほとんどが分子内に8個のシステイン残基を有している³⁸。その隣り合う二つのシステイン残基により、計4個のジスルフィド結合を持つため、疎水性ドメインを形成し外部に露出した状態で非常に強固な構造をとっている。露出した疎水性ドメインは平面構造をとっている。その露出した疎水性部位と親水性部位を併せ持つ両親媒性タンパク質であることから、気液界面において疎水性部位を気相側に、親水性部位を液相側に配向する界面活性をもち、自己組織化膜を形成することが明らかとなっている³⁹⁻⁴²。基板が疎水性の基板であれば、固相側に疎水性部位を配向させて固液界面にも自己組織化膜を形成する。Hydrophobin は大きく分けて二つに分類される⁴³。その分類はヒドロパシーパターン（親水性-疎水性パターン）と解離度特性によるもので class I に属するものと class II に属するものがある⁴⁴。class I の領域にある分子は高い不溶解性を持っており、この分子膜は容易に分解させることはできず、蟻酸やトリフルオロ酢酸 (TFA) によって単体に分解することができる。一方、class II に分類される分子は60%エタノールや2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) に溶解するなど、容易に解離させることができる。これら二つの違いはシステイン残基のそれぞれ特有の間隔が区別の基準にもなっている。class I はシステイン残基間のアミノ酸の数の変動が大きく、class II は class I に比べてアミノ酸の数の変動は小さい。さらに言えば、三番目と四番目のシステイン残基間の長さは class II よりも class I のほうが長い。このシステイン残基間の長さの違いが溶解性、解離度に影響している。しかしそれぞれに似ているところもあり、二番目と三番目、六番目と七番目のシステイン残基間と同じ構造をとっていることが分かる⁴⁵⁻⁴⁷。

Class I: X₂₅₋₁₅₈-C-X₅₋₉-C-C-X₄₋₄₄-C-X₇₋₂₃-C-X₅₋₇-C-C-X₆₋₁₈-C-X₂₋₁₃

Class II: X₁₇₋₁₆₅-C-X₇₋₁₀-C-C-X₁₁-C-X_{15/16}-C-X₆₋₉-C-C-X_{10/11}-C-X₃₋₈

1-5-2 HFBI タンパク質

本研究では Class II に属している HFBI というタンパク質に着手した研究を行っている。HFBI は *Trichoderma reesei* という糸状菌由来のタンパク質である。*Trichoderma reesei* ゲノムには少なくとも 6 種類のヒドロフォビン遺伝子が存在する⁴⁸。*Trichoderma reesei* 由来のタンパク質で初めに精製されたのが HFBI であり、菌の細胞壁で検出された⁴⁹。これも両親媒性のタンパク質であり、Fig. 1-3 に示すようにグレーの部分が疎水性で、グリーンの部分の部分が親水性を示し、気液界面において疎水性部位を気相側に、親水性部位を液相側に向けて自己組織化膜を形成する。また、赤で示すアミノ酸は正電荷のアミノ酸で、青は負電荷のアミノ酸を示している。分子サイズは 2.30nm×2.30nm×2.67nm 程度で、分子量は約 7.5 kDa と比較的小さいタンパク質である。また HFBI 分子の親水性部位の占める割合は約 80%で、疎水性部位の占める割合は約 12%であり、残りを中性アミノ酸が占めている⁵⁰。構造決定は X 線結晶解析により行われた⁵¹。表面に出ている疎水性部位の面積は約 4 nm² 程度である。HFBI を精製する際に必要なタグ (His タグなど) を導入することがあるが、タグを導入することによって本来の HFBI が持つ特性に影響することがないということがすでに知られている⁵²⁻⁵³。

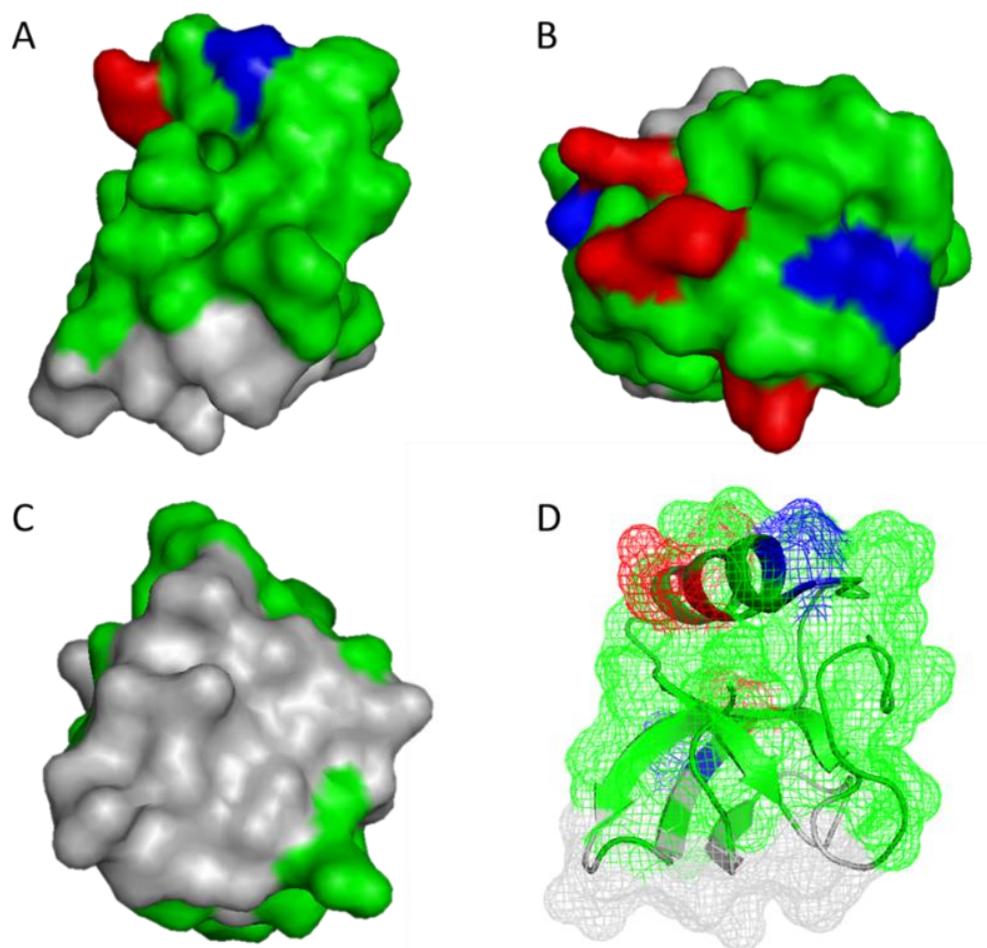


Fig. 1-3 (A) HFBI の分子モデル (B) 親水性側から見た HFBI (C) 疎水性側から見た HFBI (D) HFBI の立体構造 赤：正電荷のアミノ酸、青：負電荷のアミノ酸、緑：親水性アミノ酸、グレー：疎水性アミノ酸 (PDB data: 2FZ6)

気液界面に形成した HFBI の自己組織化膜は疎水性の固相基板を接着させることにより転写することができる。これを利用して、前節で述べた生体分子と電子素子を組み合わせたバイオエレクトロニクスへの応用、すなわち HFBI 自己組織化膜を分子キャリアとした精密な界面の設計・構築が期待できる。

HFBI を用いた応用研究に両親媒性の特性を活かしたドラッグデリバリーシステム (DDS) がある⁵⁴。気管支拡張剤として用いられるベクロメタゾンジプロピオネートを HFBI タンパク質で包括することで、薬剤の形状を球状にし、粒径をさらに小さくすることができる。さらにマーカーを修飾した HFBI 分子を混合することで患部に集中させることができるという研究である。また、HFBI を用いてグラフェンを単層

から数層で剥離させる技術の報告がある⁵⁵⁻⁵⁶。HFBIを含む溶液に高配向性熱分解黒鉛(HOPG)を浸すことで、表面にHFBIが吸着する。そこに超音波をあてることによってHOPGの層を単層から数層で剥離することができる技術である。さらにHFBIにセルロースバインディングドメイン(CBD)を修飾することでCBD側にはセルロースナノファイバーを、HFBIにグラフェンを吸着させることにより、セルロースナノファイバーに新たな機能を付加する研究報告もある⁵⁷。先行研究として、HFBIに機能タンパク質であるグルコースオキシダーゼ(GOx)を遺伝子工学的に修飾した分子を作製することで、酵素活性を飛躍的に向上させることに成功した論文を発表した。これはHFBI自己組織化膜を分子キャリアとして用いることで酵素を失活させることなく密度と配向性を精密に制御できたためである⁵⁸。

このようにHFBIの特性を活かした応用研究を行おうと目論んできたが、HFBIにはもう一つ、非常に特異な特徴がある。基板上にHFBIを含む溶液で液滴を作成した際に、HFBIタンパク質は気液界面に自己組織化する。この気液界面に形成した自己組織化膜によって、本来ドーム状の形を持つ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持つ⁵⁹⁻⁶⁰(Fig. 1-4)。一般的に、液滴は自身の持つ表面張力により表面積を最小限にするために球状になろうとする。しかし、HFBIを液滴内に含むことによって非常に珍しい現象が生じる。この特殊な液滴界面現象は、その球状になろうとする液滴の表面張力に逆らいうるほどの緻密な自己組織化構造を有していることを示唆している。

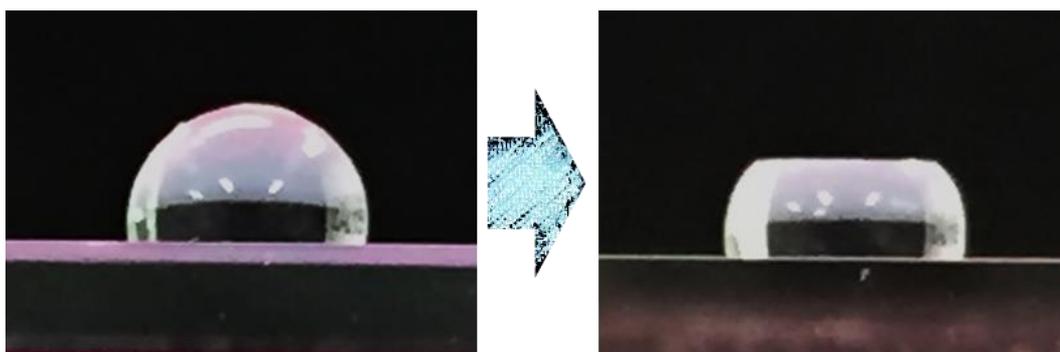


Fig. 1-4 HFBIを含む液滴の動的挙動変化

1-6 本論文の流れ

本研究では、液滴の形状を変化させるHFBIの自己組織化プロセスと動的挙動の解

析、また、固液界面上での HFBI 自己組織化膜の構造解析、さらには固相上に被覆した際の HFBI 自己組織化膜分子相と電極との間で起こる電子移動の高効率化、すなわち分子相と固相における界面の設計、制御を目的とする。また、HFBI 液滴の形状変化メカニズムにも着目し、この現象の解明を行うことでより詳細な HFBI 自己組織化膜の特性について研究する。

本論文は、本章を含め 6 章構成である。

第 2 章では、HFBI を含む溶液で液滴を作成した際の液滴形状変化のメカニズム解析と、固相基板上での HFBI 自己組織化膜の表面構造解析について報告する。HFBI 液滴を経時変化で観察し、形状の変化と表面張力の変化を解析した。また、気液界面に形成した自己組織化膜を固相上に転写し、その表面構造を原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて解析し、HFBI 自己組織化構造が気液界面に及ぼす影響を考察した。さらに、HFBI 自己組織化膜の座屈強度をフォースカーブ測定により求め、液滴の表面張力と比較し、HFBI が気液界面に自己組織化することで液滴上面が平らになる現象の解明を行う。

第 3 章では、HFBI 液滴の界面現象について、より詳しく研究していく。第 2 章で考察した構造力学の観点に加え、液滴の蒸発の影響などについてさらに実験を行い、考察を深める。行った実験結果や、液滴の体積・表面積の関係、または浮力の影響について解析し、液滴の頂点部から平らになる理由について考察する。

第 4 章では、HFBI 自己組織化膜で被覆した基板を電極として用いて、その電極特性を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 (EIS) を用いて測定した。また、電極特性をさらに向上させる目的で、HFBI が持つ表面荷電アミノ酸に着目した。遺伝子工学的に HFBI の荷電アミノ酸を改変することによる、分子相と固相での電子移動効率への影響を解析した。さらにグルコースオキシダーゼと遺伝子工学的に融合した HFBI (GOx-HFBI) を用いて酵素電極反応の実験を行った。GOx-HFBI が高い活性を保持していることは先行研究で報告しており、この活性を電気化学的に測定することで、分子機能電極としての応用に着手した。

第 5 章では、精密に形成する HFBI 自己組織化膜をテンプレートとして用いることで、微小ナノ金属結晶の作製に挑む。HFBI 自己組織化膜は精密なハニカム様の構造を形成する。そのため規則的に約 2 nm の孔部が存在し、ここに金属を析出させることにより、約 2 nm の超微小金属結晶を高密度に形成させることが可能である。この研究を行う際にまず、基板の検討を行うところから始め、次に HFBI 自己組織化膜の除去法、そして電解還元条件検討、AFM による表面解析を行った。

第 6 章では、現在までの研究成果をまとめて結論とし、今後の展開についても述べる。

Reference

1. Lichao Gao, Thomas J. McCarthy, How Wenzel and Cassie were Wrong. *Langmuir* **23**, 3762–3765 (2007)
2. Lichao Gao, Thomas J. McCarthy, Wetting 101°. *Langmuir* **25**, 14105–14115 (2009)
3. William Thomson, On the equilibrium of vapour at a curved surface of liquid, *Philosophical Magazine* **42** (282) 448-452 (1871)
4. Butt, Hans-Jürgen, Karlheinz Graf, Michael Kappl., The Kelvin Equation, *Physics and Chemistry of Interfaces* 16-19 (2006)
5. Updike, S. J.; Hicks, G. P. The enzyme electrode, a miniture chemical transducer using immobilized enzyme activity. *Nature* **214**, 986-988 (1967)
6. Seiichiro Iijima, Dai Kato, Soichi Yabuki, Osamu Niwa, Fumio Mizutani, Enzymatically amplified electrochemical detection for lipopolysaccharide using ferrocene-attached polymyxin B and its analogue, *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 2080–2084 (2011)
7. Takeo Miyake, Syuhei Yoshino, Takeo Yamada, Kenji Hata, and Matsuhiko Nishizawa, Self-Regulating Enzyme-Nanotube Ensemble Films and Their Application as Flexible Electrodes for Biofuel Cells, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 5129–5134 (2011)
8. R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman, F. C. Walsh, Biofuel cells and their development, *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 2015-2045 (2006)
9. Shelley D Minter, Bor Yann Liaw, Michael J Cooney, Enzyme-based biofuel cells, *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 1–7 (2007)
10. Kim J., Jia H., Wang P., Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells, *Biotechnol Adv.* **24**(3), 296-308 (2006)
11. 高木建次、“バイオエレクトロニクス～理論から応用まで～”、株式会社エヌ・ティー・エヌ、3-6 (2008)
12. Habermuller, L.; Mosbach, M.; Schuhmann, W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *J. Anal. Chem.* **366**, 560-568 (2000)
13. Heller, A. Electrical wiring of redox enzymes. *Acc. Chem. Res.* **23**, 128-134 (1990)

14. Armstrong, F. A.; Wilson, G. S. Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochim. Acta.* **45**, 2623-2645 (2000)
15. Clark, L.C., Jr; Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29-45 (1962)
16. Updike, S. J.; Hicks, G. P. The Enzyme Electrode. *Nature* **214**, 986–988 (1967)
17. Heller, A., Miniature biofuel cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 209-216 (2004)
18. Katz, E.; Shipway, A. N.; Willner, I. in *Handbook of Fuel Cells – Fundamentals, Technology, Applications*, Vol. 1, Part 4, Wiley, Chichester, Chapter 21, pp. 355-381 (2003)
19. Itamar, W.; Eugenio K. Integration of Layered Redox Proteins and Conductive Supports for Bioelectronic Applications. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **39**, 1180-1218 (2000)
20. A. Riklin, E. K., I. Willner, A. S., A. F. Bückmann, Improving enzyme–electrode contacts by redox modification of cofactors. *Nature* **376**, 672-675 (1995)
21. I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A.F. Bückmann, A. Heller Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto Au-electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10321-10322 (1996)
22. F. Patolsky, E. Katz, I. Willner Amplified DNA detection by electrogenerated biochemiluminescence and by the catalyzed precipitation of an insoluble product on electrodes in the presence of the doxorubicin intercalator. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 3398-3402 (2002)
23. Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci.* **37**(4) 205-11 (1951)
24. Bowie J. U. Solving the membrane protein folding problem. *Nature* **438**: 581-589 (2005)
25. Cho, W. and Stahelin, R. V. Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**: 119–151 (2005)
26. Goni F. M. Non-permanent proteins in membranes: when proteins come as

- visitors. *Mol. Membr. Biol.* **19**: 237-245 (2002)
27. Johnson J. E. and Cornell R. B. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions. *Mol. Membr. Biol.* **16**, 217-235 (1999)
28. S. C. Barton, J Gallaway, and P. Atanassov, Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices, *Chem. Rev.*, **104**, 4867-4886 (2005).
29. J. A. Cracknell, K. A. Vincent, and F. A. Armstrong, Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis, *Chem. Rev.*, **108**, 2439-2461 (2008).
30. R.A. Marcus, Norman Sutin, Electron transfers in chemistry and biology, *biochim. biophys. acta* **811** 265-322 (1985)
31. P N. Bartlett, P. Tebbutt, R G. Whitaker, Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry, *Prog. React. Kinetics* **16**, 55-155 (1991)
32. M.R. Tarasevich, Ways of using enzymes for acceleration of electrochemical reactions, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **6**, 587-597 (1979)
33. H. A. O. Hill, I. J. Higgins, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **302**, 267-273 (1981)
34. D. L. Williams, A. P. Doig, Jr., A. Korosi, Electrochemical-enzymatic analysis of blood glucose and lactate, *Anal. Chem.* **42**, 118-121 (1970)
35. P. Janada, J. Weber, Quinone-mediated glucose oxidase electrode with the enzyme immobilized in polypyrrole, *J. Electroanal. Chem.* **300**, 119-127 (1991)
36. T. Matsue, N. Kasai, M. Narumi, M. Nishizawa, H. Yamada, I. Uchida, Electron-transfer from NADH dehydrogenase to polypyrrole and its applicability to electrochemical oxidation of NADH, *J. Electroanal. Chem.* **300**, 111-118 (1991)
37. Han A. B. Wösten, Marie-Anne van Wetter, Luis G. Lugones, Henny C. van der Mei, Henk J. Busscher and Joseph G.H. Wessels, How a fungus escapes the water to grow into the air, *Current Biology*, **9**, 85-88 (1999)
38. J Wessels, O De Vries, SA Asgeirsdottir, and F Schuren, Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*, *Plant Cell.* **3**(8) 793-799 (1991)
39. Wessels J. G., Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal

- surface, *Advances in Microbial Physiology* **38**, 1-45 (1997)
40. Han A. B. Wösten, Joseph G. H. Wessels, Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development, *Mycoscience*, **38**, 3, 363-374 (1997)
 41. Wösten H. A., Hydrophobins: multipurpose proteins, *Annu Rev Microbiol.* **55**, 6, 25-46 (2001)
 42. H. A. B. Wosten, O. M. H. De Vries and J. G. H. Wessels, Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer, *The Plant Cell* **5**, 11, 1567-1574 (1993)
 43. Wessels, J. G. H., Developmental regulation of fungal cell wall formation, *Annu. Rev. Phytopathol* **35**, 413-437 (1994)
 44. Kyte, J. Doolittle, R. F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132 (1982)
 45. J. R. Whiteford, and P. D. Spanu, Hydrophobins and the interactions between fungi and plants, *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, **3**(5), 391-400 (2002)
 46. M. Linder, G. R. Szilvay, T. Nakari-Setälä, H. Soderlund, and M. Penttilä, Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi, *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 877-896 (2005)
 47. M. Sunde, A. H. Y. Kwan, M. D. Templeton, R. E. Beever and J. P. Mackay, Structural analysis of hydrophobins, *Micron*, **39**, 773-784 (2008)
 48. Neuhof T, Dieckmann R, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nakari-Setälä T, Penttilä M, von Döhren H, Direct identification of hydrophobins and their processing in *Trichoderma* using intact-cell MALDI-TOF MS, *FEBS J.* **274**(3), 841-852 (2007)
 49. Nakari-Setälä T, Aro N, Kalkkinen N, Alatalo E, Penttilä M., Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI, *Eur J Biochem.* **235**(1-2):248-255 (1996)
 50. Z. Wang, M. Lienemann, M. Qiau, and M. B. Linder, Mechanisms of Protein Adhesion on Surface Films of Hydrophobin, *Langmuir*, **26**(11), 8491-8496 (2010)
 51. J. Hakanpää, G. R. Szilvay, H. Kaljunen, M. Maksimainen, M. B. Linder,

- J.Rouvinen, Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI-
The structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction,
Protein science, **15**, 2129–2140 (2006)
52. S. Ikeno, G. R. Szilvay, M. Linder, H. Aritomi, M. Ajimi, and T. Haruyama,
Protein Dot stamp using hydrophobin as immobilization carrier, *Sensors and
Materials*, **16**(8), 413–420 (2004)
53. A. Iwanaga, H. Asakawa, T. Fukuma, M. Nakamichi, S. Shigematsua, M. B.
Linder, T. Haruyama, Ordered nano structure of a stamped self-organized
protein layer on a HOPG surface using a HFB carrier, *Colloids and Surfaces
B*, **84**, 2, 395–396 (2011)
54. Hanna K. Valo, Paivi H. Laaksonen, Leena J. Peltonen, Markus B. Linder,
Jouni T. Hirvonen, Timo J. Laaksonen, Multifunctional Hydrophobin: Toward
Functional Coatings for Drug Nanoparticles, *ACS NANO* **4**(3), 1750-1758
(2010)
55. Paivi Laaksonen, Markku Kainlauri, Timo Laaksonen, Andrey Shchepetov,
Hua Jiang, Jouni Ahopelto, Markus B. Linder, Interfacial Engineering by
Proteins: Exfoliation and Functionalization of Graphene by Hydrophobins,
Angew. Chem. **122**, 5066 –5069 (2010)
56. Paivi Laaksonen, Markku Kainlauri, Timo Laaksonen, Andrey Shchepetov,
Hua Jiang, Jouni Ahopelto, Markus B. Linder, Interfacial Engineering by
Proteins: Exfoliation and Functionalization of Graphene by Hydrophobins,
Angew. Chem. **49**, 4946 –4949 (2010)
57. Paivi Laaksonen, Andrey walther, Jani-Markus Malho, Markku Kainlauri,
Olli Ikkala, Markus B. Linder, Genetic Engineering of Biomimetic
Nanocomposites: Diblock Proteins, Graphene, and Nanofibrillated, *Angew.
Chem. Int. Ed.* **50**, 8688 –8691 (2011)
58. Yoshiyuki Takatsuji, Ryota Yamasaki, Atsushi Iwanaga, Michael Lienemann,
Markus B. Linder, Tetsuya Haruyama, Solid-support immobilization of a
“swing” fusion protein forenhanced glucose oxidase catalytic activity, *Colloids
and Surfaces B-Biointerfaces* **112**, 186-191 (2013)
59. G. R. Szilvay, A. Paananen, K. Laurikainen, E. Vuorimaa, H. Lemmetyinen, J.

- Peltonen, and M. B. Linder, Self-assembled hydrophobin protein films at the air-water interface: structural analysis and molecular engineering, *Biochemistry*, **46**, 2345–2354 (2007)
60. Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Takatsuji, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, and Tetsuya Haruyama, Flattened-Top Domical Water Drops Formed through Self-Organization of Hydrophobin Membranes: A Structural and Mechanistic Study Using Atomic Force Microscopy, *ACS NANO*, **10**, 81–87 (2016)

第 2 章

HFBI 自己組織化膜の構造解析及び その膜が及ぼす液滴界面現象の解明

2章. HFBI 自己組織化膜の構造解析及びその膜が及ぼす液滴界面現象の解明

2-1 目的

HFBI を含む溶液で基板の上に液滴を作成すると、液滴の上面が平らになる。前章でも述べたが、液滴は自身の持つ表面張力により、表面積を最小にしようとして球の形状をとる。それにもかかわらず HFBI は気液界面に自己組織化することによって液滴の形状を変化させる。この現象を解明するために、HFBI 液滴の表面張力測定、自己組織化率測定、接触角測定、HFBI 自己組織化膜の構造解析、HFBI 自己組織化膜の座屈強度測定を行った。

2-2 表面張力

結論から言うと、表面張力とは単位面積当たり存在するギブズの自由エネルギーということに落ち着く。水滴が球状になるのは表面張力が働くためである。水滴内部の水分子はその周りに存在する他の水分子と相互作用（水素結合）することで安定している。しかし、気液界面の最表面に存在する水分子は、水相側は他の水分子と相互作用しているが、気相側には相互作用する分子が存在しないため、結合できずにいる余分なエネルギーが存在することになる。この余分なエネルギーのことを表面自由エネルギーと言い、この余分な自由エネルギーを少なくしようと働く力を表面張力という。よって水滴は余分な自由エネルギーが最小になる、すなわち表面に存在する分子の数を最小限にするために同体積では最小の表面積となる球の形をとろうとする。

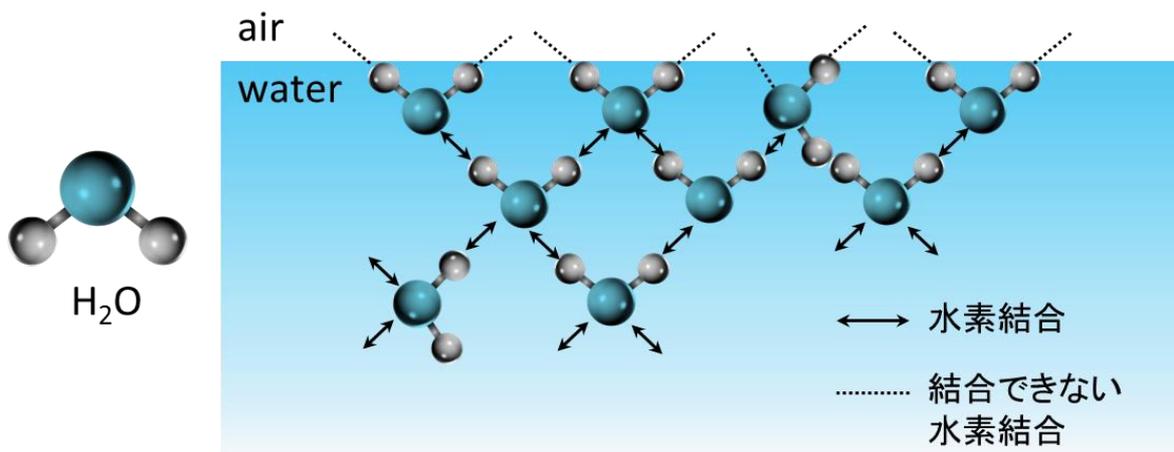


Fig. 2-1 水滴を分子レベルの視点で観察したときの気液界面の模式図

表面張力は単位面積あたりに存在するギブズの自由エネルギーであると述べたが、その理由を詳しく説明していく。 σ の表面を持つ水を考える。水の内部エネルギーは U_{initial} として、表面を増加させる仕事 w をしたとする。温度は常に一定であるとしたとき、内部エネルギーは U_{final} になる。このときの変化量 ΔU は、

$$\Delta U \equiv U_{\text{final}} - U_{\text{initial}}$$

した仕事とそれによって生じた内部エネルギーの変化との差をその仮定で吸収された熱と定義する。⁶¹

$$q \equiv \Delta U - w \rightarrow dU = dq + dw$$

一定圧の下で dV だけ容積が増えるなら、 PdV だけエネルギーが使われる。これは内部にとどまらず、外部に向かって行われる。そのとき $dw = -PdV$ なので、その分内部エネルギーは損失する。

例えば、水の表面積を $d\sigma$ 増やすとして、それに必要な仕事量は $\gamma \cdot d\sigma$ 、このエネルギーは内部にとどまるので $dw = +\gamma \cdot d\sigma$

$$\therefore dw = -PdV + \gamma d\sigma$$

表面エネルギーの中には、仕事のみならず熱として入ってくるエネルギーも含まれている。表面を作る際には熱が吸収されるためにいくらか温度が下がる。そのために dq をまわりから系が取り入れることになる。それは系の全エネルギーを増加させる。

$$dU = dq + dw = dq + (-PdV + \gamma d\sigma)$$

dq は絶対温度 T で割ることで、その熱エネルギーによる系自身だけについてのエントロピー変化となる。

$$dS = dq/T \Leftrightarrow dq = T \cdot dS$$

$$dU = T \cdot dS + (-PdV + \gamma d\sigma)$$

ギブズの関数式 $G = H - TS$ の微分式は

$$dG = dH - T \cdot dS - S \cdot dT \quad (dH > 0)$$

今、系の全エネルギーは dU 増加した。しかし、 $-PdV$ の仕事をした。その仕事量は dU を減少させるものだが、その量は外から来たエネルギーの一部なので、

$$dH = dU + PdV = (dq - PdV + \gamma d\sigma) + PdV = dq + \gamma d\sigma = T \cdot dS + \gamma d\sigma$$

$$dG = T \cdot dS + \gamma d\sigma - T \cdot dS - S \cdot dT = \gamma d\sigma - S \cdot dT$$

温度は一定なので、 $dT = 0$

$$\therefore dG = \gamma d\sigma \rightarrow \gamma = \frac{dG}{d\sigma}$$

ゆえに、表面張力とは単位面積あたりに存在するギブズの自由エネルギーということが

わかる⁶²。

2-3 基板の上に滴下した HFBI 液滴の経時変化での観察

2-3-1 溶液調製

HFBI を 15 μM の濃度で 1 mM Acetate buffer (pH 5.0) に溶かして 1 mL 調製した。

$$7532\text{Da} \times 15 \mu\text{M} \times 1 \text{ mL} = 0.113 \text{ mg}$$

HFBI を超精密天秤を用いて 0.113 mg 秤量し、1 mM Acetate buffer (pH 5.0)、1 mL に溶解した。溶解した溶液を 28 kHz で 1 min 超音波かけた。

次に、HFBI 液滴の自己組織化の様子を蛍光顕微鏡で観察するために、HFBI に蛍光分子である Fluorescein isothiocyanate (FITC) を修飾した分子を調製した。

$$\text{HFBI } 30 \mu\text{M} : 7532\text{Da} \times 30 \mu\text{M} \times 1 \text{ mL} = 0.226 \text{ mg}$$

$$\text{FITC } 30 \mu\text{M} : 398.38 \text{ g/mol} \times 30 \mu\text{M} \times 1 \text{ mL} = 0.58 \text{ mg}$$

FITC は水溶液に溶解しにくいので、初めに Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 μL に溶かした後、milliQ でメスアップした。共に 30 μM に調製した 2 液を等量で混合して 15 μM FITC-HFBI 溶液を調製した。

2-3-2 実験と結果

調製した HFBI 溶液を疎水性の基板であるフッ素ドーパ酸化スズ (FTO) 基板の上に 10 μL 滴下した。形成した液滴の形状観察を CAM200 (KSV Instruments Ltd., Finland)、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いて行った。実験環境は室温で加湿した条件で行った。

結果を Fig. 2-2 に示す。CAM200 による画像は HFBI 液滴を横から観察したもので、光学顕微鏡・蛍光顕微鏡像は HFBI 液滴を上から観察したものである。時間が経過するにつれて液滴の頂点部から徐々に平らになっていく様子が確認できる。液滴は本来自身の持つ表面張力により球状になるはずであるが、HFBI 液滴はその物理現象とは異なる挙動を示した。気液界面に HFBI が吸着し、自己組織化するために液滴の形状を変化させたものと考えられる。

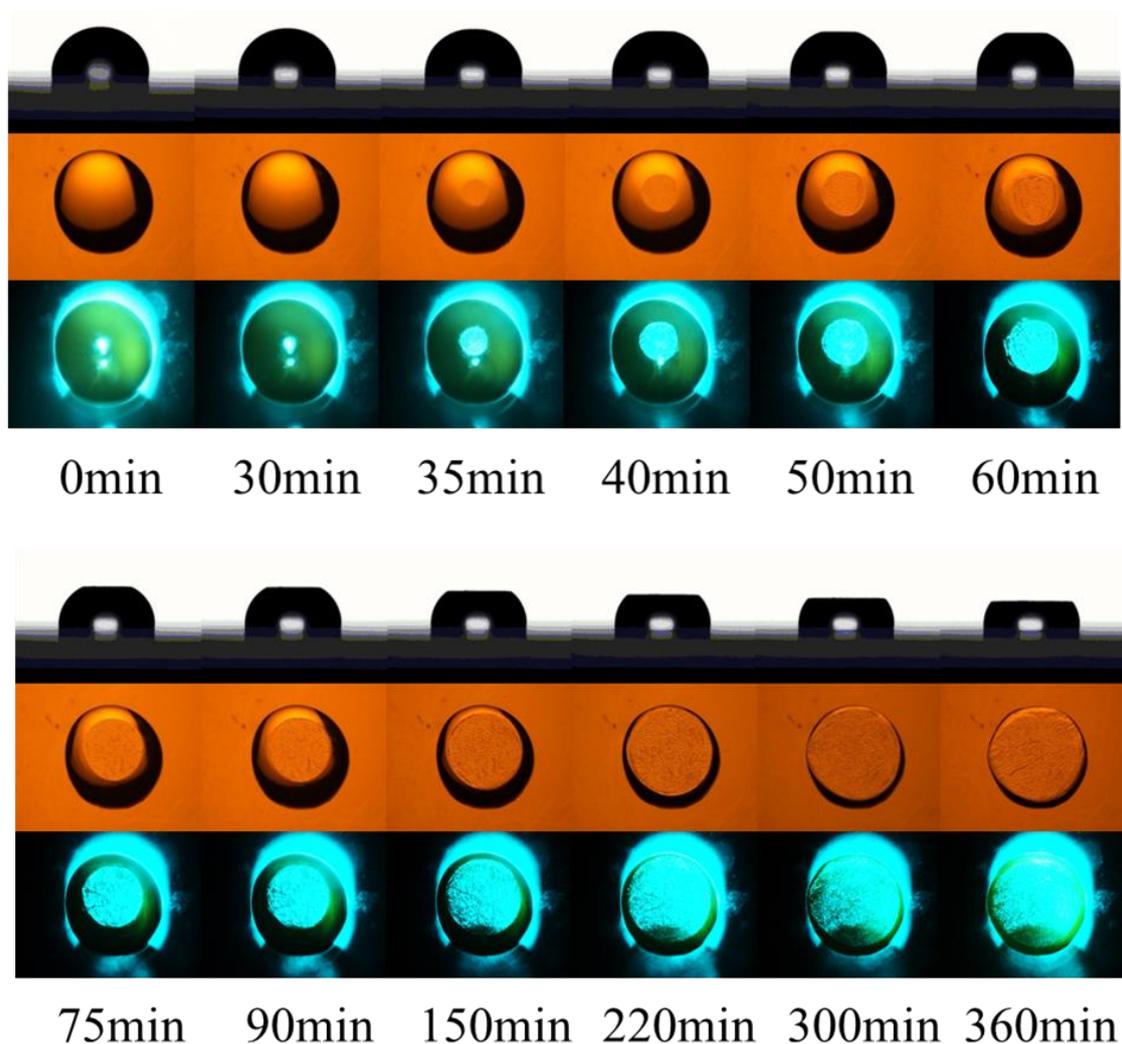


Fig. 2-2 FTO 基板の上に静置した HFBI 液滴の経時変化観察 (上) CAM200 による画像 (中) 光学顕微鏡による明視野像 (下) 蛍光顕微鏡による蛍光像

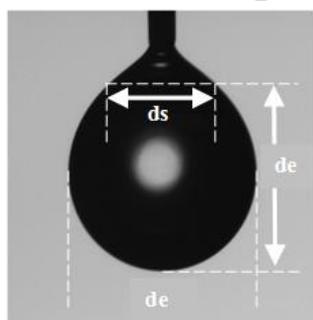
2-4 HFBI 液滴の表面張力測定と自己組織化率測定

2-4-1 実験操作

HFBI の特性を調べるために、HFBI 液滴の表面張力測定と自己組織化率測定を行った。滴がとる形状は、それを球状にしようとする表面張力と、それを歪めようとする重力 (あるいは別の力場) が折り合いをつけて決まっている。したがって与えられた状況下の滴の形を解析すれば、表面張力が調べられる。この原理に基づいた表面張力 (あるいは界面張力) の測定に現在使われている方法にはいくつかある。最も良く使われるのは、セシルドロップ (sessile drop) 法あるいは懸滴 (pendant drop) 法

である⁶²⁻⁶⁶。HFBI 溶液をシリンジで 15 μL 取り、スタンドに固定してから溶液を 10 μL 出して液滴を作製した。このとき周りの環境を加湿状態に保つ。これは液滴の蒸発を極力避けるためである。温度は室温である。形成した液滴を CAM200 を用いて経時変化で測定した。懸滴法での表面張力測定は Fig. 2-2 に示すように液滴の形状から算出することができる^{67,68}。

• Pendant drop



Surface tension:

$$\gamma = g \cdot \rho \cdot (de)^2 \cdot (1/\beta)$$

g : gravitational constant

ρ : liquid drop density

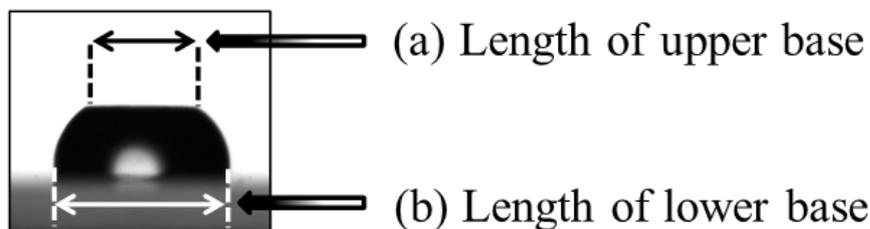
de : radius of curvature

$1/\beta$: shape factor

Fig. 2-3 懸滴法による表面張力の算出式

次に、自己組織化率の測定を行った。HFBI の溶液で基板の上に液滴を作ると、液滴の上面が平らになる特性を利用して、Fig. 2-4 に示すように液滴と基板が接する幅（液滴の接触部の直径）と自己組織化した際の上部の幅（自己組織化面の直径）の比を自己組織化率として定義した。

• Domical drop



$$\text{Self-organization ratio} = \frac{(a)}{(b)}$$

Fig. 2-4 自己組織化率の定義

2-4-2 結果

HFBI 液滴の表面張力測定と自己組織化率測定の結果を Fig. 2-5 に示す。

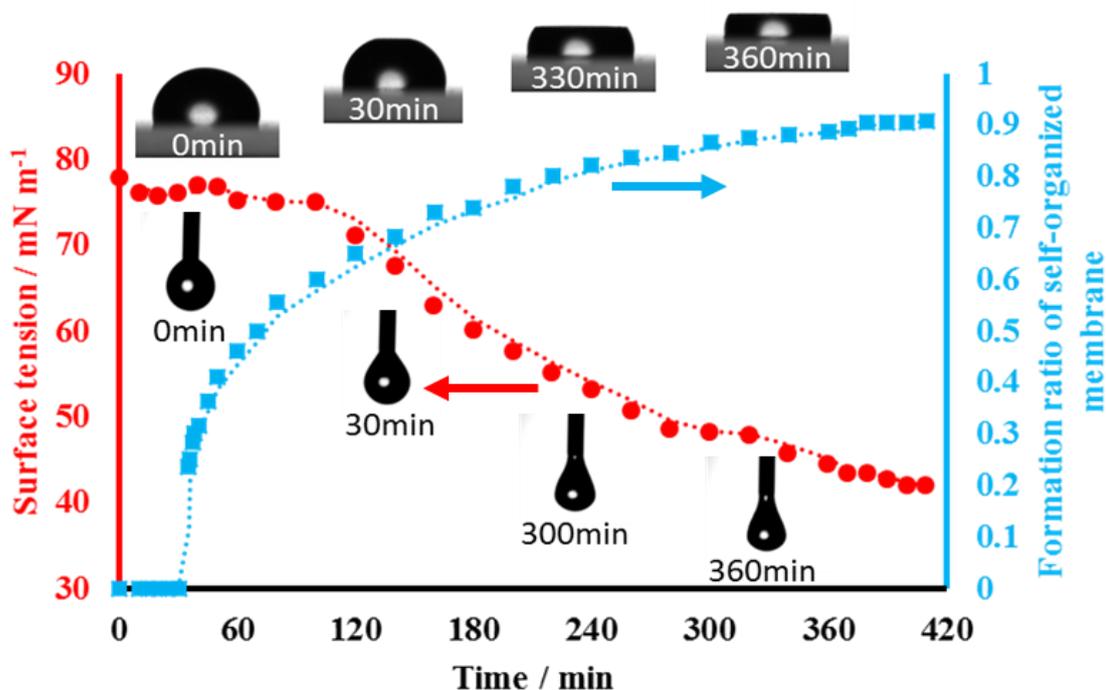


Fig. 2-5 HFBI 液滴の表面張力測定（赤）と自己組織化率測定（青）

第1軸（左軸）に対応する赤丸のプロットが表面張力を示し、第2軸（右軸）に対応する青い四角のプロットが自己組織化率を示している。時間の経過と共に自己組織化率は上昇していき、1に近づいているのが分かる。それに伴い表面張力は低下している。表面張力の低下は表面積を小さくしようとする、すなわち球状になろうとするための表面自由エネルギーの減少を意味する。これは気液界面に形成した HFBI 自己組織化膜が平らになるための一つの要因として考えられる。

HFBI が気液界面に自己組織化することで液滴の表面張力が低下するということは、HFBI は界面活性剤に似たような性質を持つと言える。界面活性剤は固相表面を活性化するため、疎水性の基板に滴下すると液滴は瞬時に広がっていく。実際にモノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 20) という非イオン性の界面活性剤を疎水性のフッ素ドーパ酸化スズ (FTO) 基板に滴下すると液滴が広がっている様子が確認できた (Fig. 2-6)。

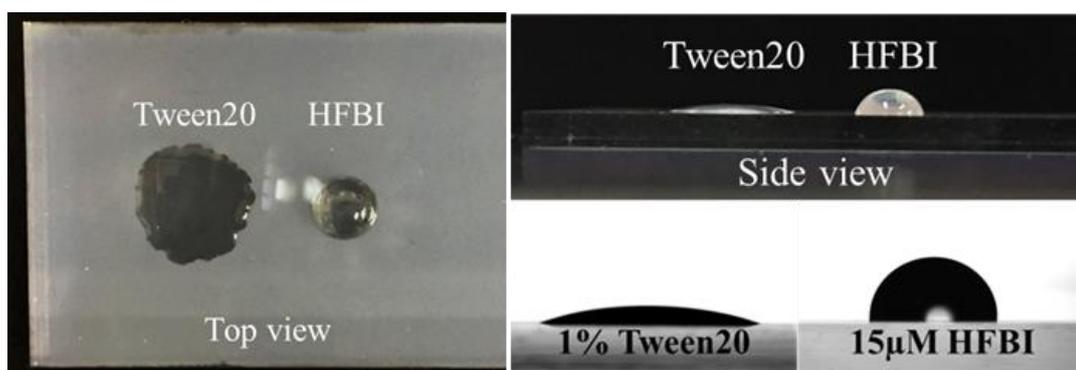


Fig. 2-6 疎水性基板 FTO 上に滴下した界面活性剤 (Tween20) (左) と HFBI 溶液 (右)

しかし、HFBI 液滴は同じ基板の上に滴下しても液滴は広がらなかった。これは HFBI は表面、すなわち気液界面を活性化させて表面張力を低下させることはできるが、今回基板に用いた FTO と溶液の界面を活性化し、界面張力を低下させるものではないといえる。

2-5 HFBI 自己組織化膜の構造解析

2-5-1 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた構造解析

液滴の気液界面に形成した HFBI 自己組織化膜がどのような構造を有しているのかの解析を原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて解析を行った。AFM とは、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の一つで、探針と試料間にはたらく相互作用力を検出し、それを一定に保つように探針-試料間距離を制御しながら、探針を水平方向に走査することでその際の探針の軌跡から表面の凹凸を画像としてイメージングするものである⁶⁹。今回、HFBI 自己組織化膜の構造解析には、相互作用力を、それによって生じるカンチレバーの共振周波数を変化として検出する FM (Frequency modulation)-AFM を用いた。FM 法はカンチレバーを自励発振系の共振器として用いることにより、カンチレバーを常に共振周波数で振動させる。そのため探針-試料間にはたらく力 F の z 方向の勾配が変化することによりこの振動系の共振特性が変化すると、カンチレバーの振動周波数もそれに伴い変化する。このときの周波数シフトを検出し一定に保つことで探針-試料間の距離を制御するものである⁷⁰。これまでに FM 検出法を用いることで超高真空下での原子・分子分解能観察が報告されている⁷¹⁻⁹⁰。またこの方法によ

り、絶縁性の基板でも導電性の基板でも有機材料や生体材料を液中で観察できるようになった⁹¹⁻⁹³。

観察試料の調製は、まず HFBI 溶液に超音波をかける (28 kHz、1 min)。その溶液で液滴を作製すると、HFBI は気液界面において気相側に疎水性面を向けて配向し、自己組織化する。そのため疎水性の基板を液滴に接着させることによって HFBI 自己組織化膜を単層、基板に転写することができる。今回用いた基板は、高配向性熱分解黒鉛 (HOPG : Highly Oriented Pyrolytic Graphite) で、表面をスコッチテープで劈開し、新しい面を露出した基板を用いた。HOPG 上に HFBI 自己組織化膜を転写した基板を、AFM 観察する際に使用する溶液である 100 mM Phosphate buffer (pH 7.0) で洗浄することで余分な分子を取り除き、AFM の試料台にセットして観察を行った。AFM 観察に用いたカンチレバーは PPP-NCHAuD (Spring constant = 42 N/m) である。

2-5-2 HFBI 自己組織化膜の AFM 観察結果

上記の方法で HFBI 自己組織化膜の液中 AFM 観察を行い、その構造解析結果を Fig. 2-7 に示す。結果に示されるように、非常に精密なハニカム様構造を形成していることが明らかとなった。HFBI のサイズは約 2 nm のほぼ球状のタンパク質であることから、一つ一つの丸い点が HFBI であると言える。その分子が 6 つ集まり六角形として 1 ユニットを形成し、それが集合した構造で自己組織化膜を形成している。ここで、気液界面に形成した HFBI 自己組織化膜のことを考える。AFM 観察結果から HFBI 自己組織化膜は六角形が集まったハニカム様の構造をしている。一般的に六角形が集めた構造は、平面構造や円筒構造をとることはできるが、球構造をとることはできない。六角形の内角は 120° であるため、3 つ合わさると 360° になり平面となるため

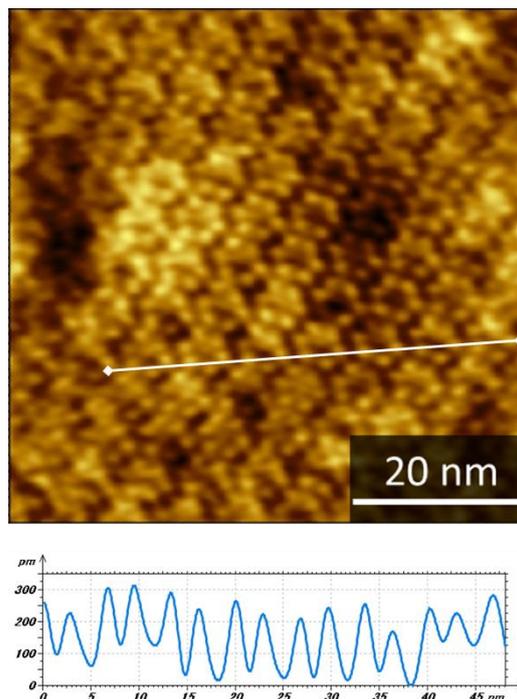


Fig. 2-7 HFBI 自己組織化膜の AFM イメージ

である。Fig. 2-8 の例に示すようにフラーレンなどのサッカーボール構造は六角形だけでなく五角形も含むため球状になることができる。

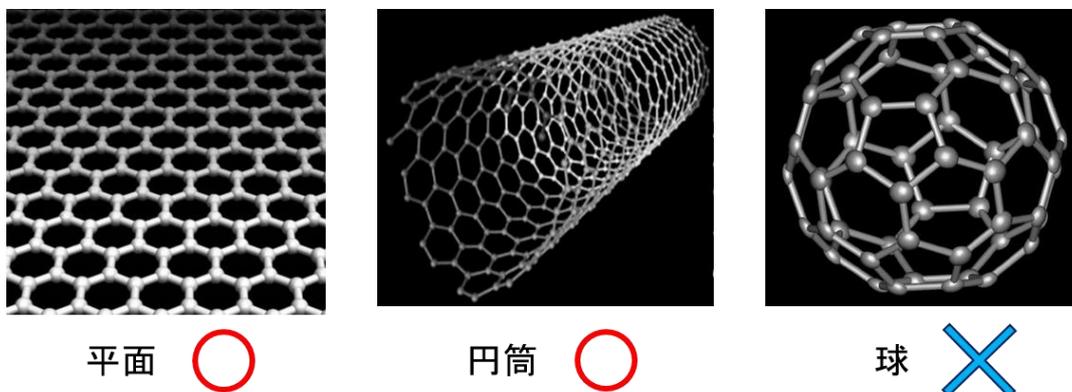


Fig. 2-8 分子集合により 6 分子六角形を 1 ユニットとするハニカム構造により構成し得る構造体

基板上に形成した液滴は半球状であり、気液界面に形成した HFBI 自己組織化膜はその構造から球状になるのを嫌い、平らになったのではないかと考える。しかし、液滴は自身の持つ表面張力によって球状になっている。ゆえに液滴の形状を変化させるためには、液滴の表面張力を上回るほどの構造強度が HFBI 自己組織化膜にあることが必要である。

2-6 HFBI 自己組織化膜の座屈強度測定

2-6-1 座屈強度測定の実験方法

HFBI 自己組織化膜の座屈強度を求め、HFBI 液滴の表面張力と比較を行った。HFBI を $15 \mu\text{M}$ の濃度で溶解させた溶液の表面張力は 42 mN/m である⁹⁴。HFBI 自己組織化膜の座屈強度がこの値を上回る値かどうかを実験より求めた。座屈強度の測定方法は AFM を用いたフォースカーブ測定を行うことで求めた。フォースカーブ測定とはカンチレバーを測定試料に接触させて押し込んだり、引き離したりして、そのときにカンチレバーが受けた力をカンチレバーの移動距離に対してプロットするものである。この方法を用いて HFBI 自己組織化膜をカンチレバーで押し込み、貫通した際のカンチレバーが受けた力から膜の座屈強度を計算した⁹⁵。AFM で HFBI 自己組織化膜の構造解析を行ったときのように基板に転写した膜をカンチレバーで押ししても、基板の影響が大きく出てきてしまう (Fig. 2-9 左)。そのため Fig. 2-9 右に示すように穴の開いた基板を HFBI 自己組織化膜で覆い、その覆われた穴の部分のカ

ンチレバーで押し破ればより正確に膜の座屈強度を算出することができる。

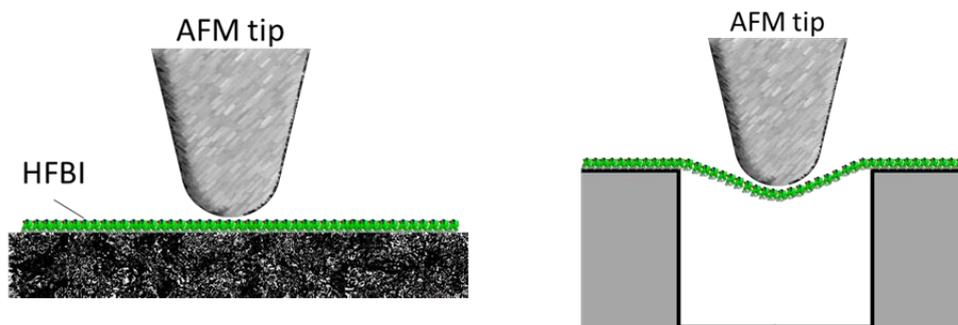


Fig. 2-9 HFBI 自己組織化膜の構造強度を分析（測定）するための AFM によるフォースカーブ測定の様式図

そこで今回、下地としてニュークリポア膜と呼ばれる細胞生物学やバイオアッセイ等で用いられる膜を用いた。この膜はポリカーボネート素材で孔径約 200 nm の穴が無数に開いた膜である。実際にこの膜の表面を AFM 観察したところ、Fig. 2-10 に示すように約 200 nm の穴が均一に開いていることが分かった。

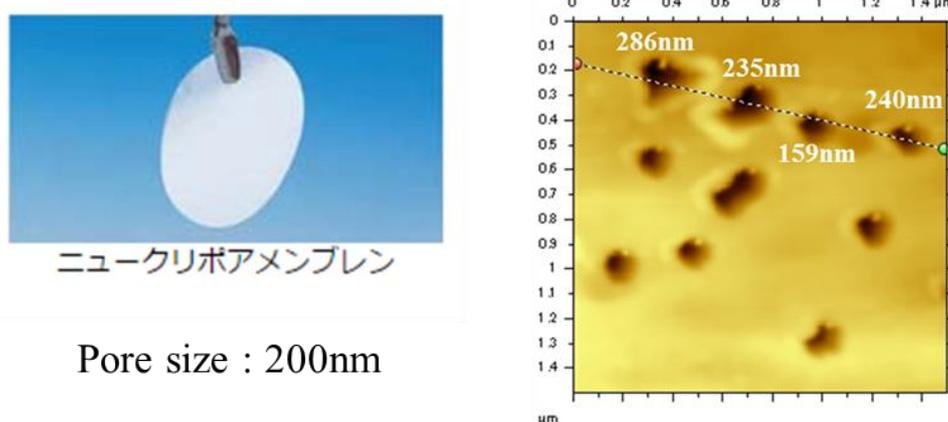


Fig. 2-10 ニュークリポア膜とその表面の AFM イメージ

この膜上を HFBI 自己組織化膜で覆い、覆われた穴の部分を AFM のカンチレバーで押し破ることで、そのときに受けた力から膜の座屈強度を求めた。

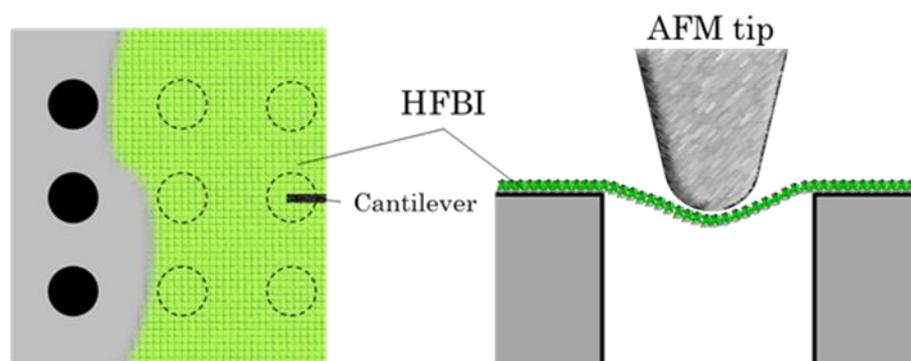
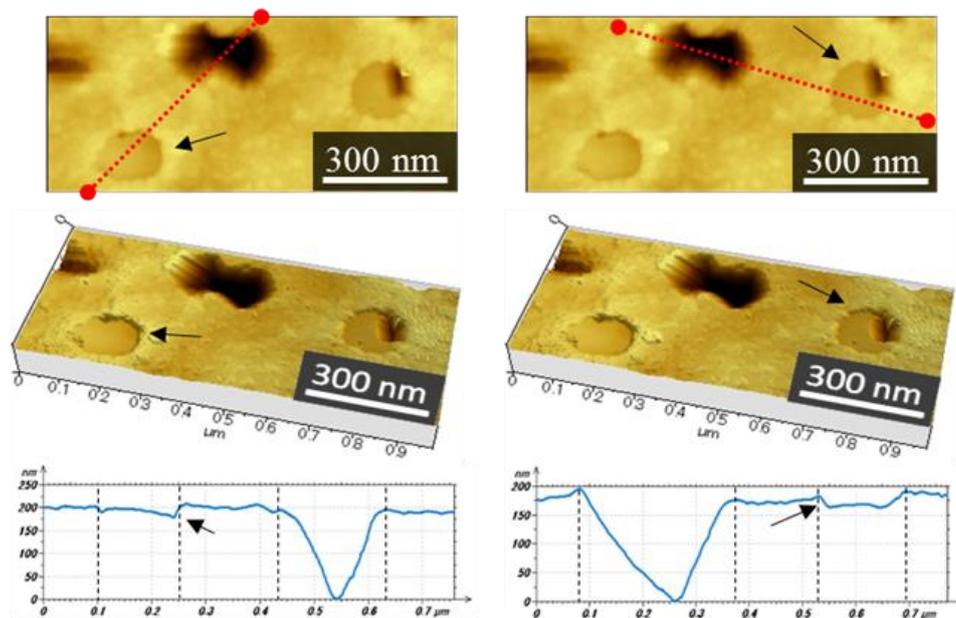


Fig. 2-11 フォースカーブ測定状態の模式図

2-6-2 結果

Fig. 2-12 にニュークリポアメンブレン上に被覆した HFBI 自己組織化膜の AFM 測定結果を示す。上の画像はフォースカーブ測定前で、3 つある穴のうち 2 つが HFBI 膜で覆われていることが確認できる。下の画像はフォースカーブ測定後の画像である。1 回目の測定で左側の穴を、2 回目の測定で右側の穴を押し破ることができていることが分かる。

Before force curve measurement



After force curve measurement

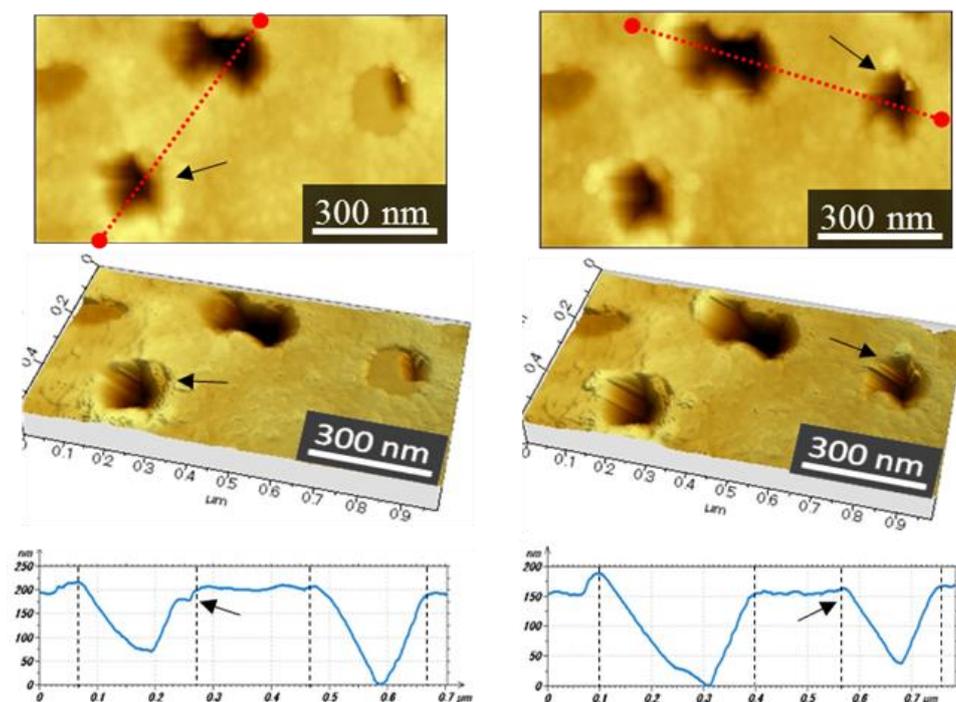


Fig. 2-12 ニュークリポアメンブレン上を HFBI 自己組織化膜で被覆した表面の AFM イメージ (上) フォースカーブ測定前 (左下) 1 回目のフォースカーブ測定後 (右下) 2 回目のフォースカーブ測定後

HFBI 自己組織化膜で覆われた穴の部分のカンチレバーで押し破った際のカンチレバーが受けた力をフォースカーブ測定によりプロットした (Fig. 2-13)。

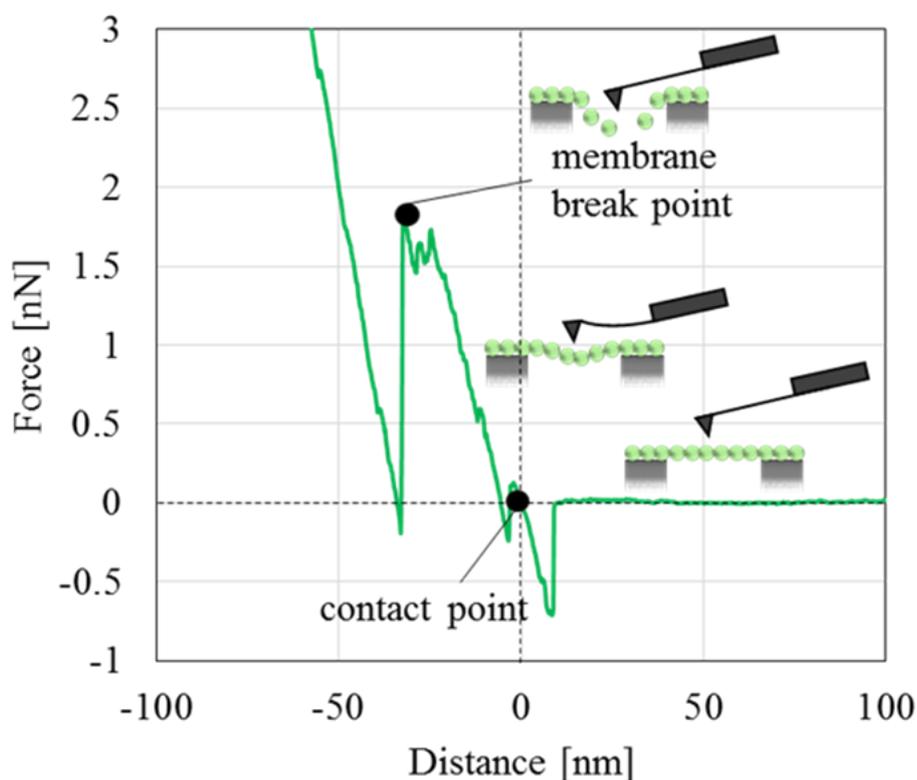


Fig. 2-13 HFBI 自己組織化膜の座屈強度を測定するためのフォースカーブ測定

横軸はカンチレバーの移動距離を、縦軸はカンチレバーが受けた力を示している。縦軸は、以下の式、

$$\text{スキャン中の力 [nN]} = \Delta V \times \text{Sensitivity [nm/V]} \times \text{カンチレバーの Spring Constant [N/m]}$$

を用いて力[nN]に換算して表示している。

グラフの右側からカンチレバーが近づいていき、原点で HFBI 膜表面とカンチレバーが接触する。そこからカンチレバーに力が加わっていき、ある点でガクッと力が減少している。この点が HFBI 膜の崩壊点であると考えられる。このときの力を計算し 6 点で行った結果を平均すると 1.34 nN であった (Fig. 2-14)。この測定で用いたカンチレバーは qpBioAC (S.C. = 0.1 [N/m]、先端曲率半径 < 10 nm) で、このカンチレ

バーの接触領域直径 (仮に 20 nm とする)

でカンチレバーが受けた力を割ると、

$$1.34 \text{ [nN]} / 20 \text{ [nm]} = 66.9 \text{ [mN/m]}$$

となる。曲率半径はこの値よりも小さいため、HFBI 自己組織化膜を貫くためには少なくとも 66.9 mN/m 以上の力が必要であるということがわかる。2-5-1 の冒頭でも記載したように、HFBI を含む液滴の表面張力は 42 mN/m である。この結果から HFBI 自己組織化膜の座屈強度は液滴の表面張力を上回っていることが確認された。よって気液界面を HFBI 自己組織化膜で覆った液滴は表面張力により球状になるよりも、その力を上回る HFBI 自己組織化膜の座屈強度により液滴上面を平らにするほうが安定であると考えられる。今回は HFBI 自己組織化膜で覆った穴をカンチレバーで押し破り、そのときにカンチレバーが受けた力から HFBI 自己組織化膜の座屈強度を算出した。この値はすべての要素を考慮した値とは言えない。ゆえにカンチレバー先端の形状、カンチレバーとサンプルとの相互作用力、接触領域における接触力学の検討などを行い、より詳細に表面張力と HFBI 自己組織化膜の座屈強度を比較していく必要がある。

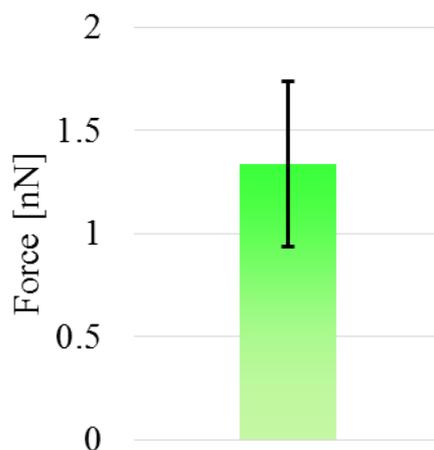


Fig. 2-14 フォースカーブ測定で得られた HFBI 膜を押し破るのに必要な力の平均値 (n =6)

2-7 結論

HFBI を含む溶液を用いて基板上に液滴を作成すると、液滴の頂点部分が平らになるという現象が生じる。この章ではこのユニークな液滴界面現象を解明するために、液滴の表面張力測定、自己組織化膜の AFM 測定、座屈強度を求めるためのフォースカーブ測定を行った。

表面張力測定の結果、時間経過と共に液滴の表面張力は低下した。液滴の表面張力を低下させるということは界面活性剤に似た性質を持つと言える。しかし、基板に滴下しても液滴は広がらない。これは固相表面を活性化できていないということである。

気液界面に形成した HFBI 自己組織化膜の構造解析を AFM を用いて行った。直接気液界面を観察することは困難であるため、極めて平坦な疎水性基板である HOPG 基板

に膜を転写してその表面構造解析を行った。その結果、極めて精密なハニカム様の構造を有することが明らかとなった。六角形が集まった構造では球状の構造は取り得ないことから気液界面に形成した自己組織化膜は液滴形状を変化させたものとする。

液滴の上面を平らにする要因は AFM による構造解析から推測することができたが、実際に液滴形状を変化させるためには、HFBI 自己組織化膜の座屈強度が液滴の表面張力を上回る必要がある。そこで HFBI 自己組織化膜の座屈強度を測定するために AFM を用いたフォースカーブ測定を行った。より正確にその値を求めるためにニュークリポアメンブレン上に HFBI 自己組織化膜を被覆し、膜で覆われた穴の部分をカンチレバーで押し破り、そのとき受けた力より膜の座屈強度を算出した。フォースカーブ測定により HFBI 自己組織化膜の座屈強度は 66.9 mN/m であることを求めた。HFBI を含む液滴の表面張力は 42 mN/m であることがすでに報告されており、この値を上回る値であることから、本章では HFBI が気液界面に自己組織化膜を形成することで液滴上面を平らにしたと結論付ける。

Reference

61. 千原 秀明、中村 亘男、アトキンス・物理化学、東京化学同人、62 (1984)
62. 井本 稔、表面張力の理解のために、高分子刊行会、8-12 (1993)
63. E. I. Frances, O. A. Basaran, and C. H. Chang, Techniques to measure dynamic surface tension *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 1, 296–303 (1996)
64. O. I. del Rio and A.W. Neumann, Axisymmetric Drop Shape Analysis: Computational Methods for the Measurement of Interfacial Properties from the Shape and Dimensions of Pendant and Sessile Drops, *J. Colloid Interface Sci.* **196**, 136–147 (1997)
65. J. P. Garandet, B. Vinet, and P. Gros, Considerations on the Pendant Drop Method: A New Look at Tate's Law and Harkins' Correction Factor, *J. Colloid Interface Sci.* **165**, 351–354 (1994)
66. K. J. Mysels, The maximum bubble pressure method of measuring surface tension, revisited, *Colloids and Surfaces*, **43**, 241–262 (1990)
67. Lichao, G.; Thomas, J. M. How Wenzel and Cassie were Wrong. *Langmuir* **23**, 3762–3765 (2007)
68. Lichao, G.; Thomas, J. M. Wetting 101°. *Langmuir* **25**, 14105–14115 (2009)
69. G. Binnig, C. F. Quate, & Ch. Gerber, "Atomic Force Microscope", *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986)
70. Albrecht, T. R.; Grutter, P.; Horne, D.; Rugar, D. Frequency-Modulation Detection Using High-Q Cantilevers for Enhanced Force Microscope Sensitivity. *J. Appl. Phys.* **69**, 668–673 (1991)
71. S. Kitamura and M. Iwatsuki. Observation of 7×7 Reconstructed Structure on the Silicon (111) Surface using Ultrahigh Vacuum Noncontact Atomic Force Microscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.* **34**, 145–148 (1995)
72. S. Kitamura and M. Iwatsuki. Observation of Silicon Surfaces Using Ultrahigh-Vacuum Noncontact Atomic Force Microscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.* **35**, 668–671 (1996)
73. H. Ueyama, M. Ohta, Y. Sugawara, and S. Morita, Atomically Resolved InP(110) Surface Observed with Noncontact Ultrahigh Vacuum Atomic Force Microscope,

- J. J. Appl. Phys.* **34**, 1086–1088 (1995)
74. Y. Sugawara, M. Ohta, H. Ueyama, and S. Morita, Defect Motion on an InP(110) Surface Observed with Noncontact Atomic Force Microscopy, *Science*, **270**, 1646–1648 (1995)
75. R. Erlandsson, L. Olsson, and P. Martensson, Inequivalent atoms and imaging mechanisms in ac-mode atomic-force microscopy of Si(111)7×7, *Phys. Rev. B*, **54**, 8309–8312 (1996)
76. P. Guthner, Simultaneous imaging of Si(111) 7×7 with atomic resolution in scanning tunneling microscopy, atomic force microscopy, and atomic force microscopy noncontact mode, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **14**, 2428, (1996)
77. R. Luthi, E. Meyer, M. Bammerlin, A. Baratoff, T. Lehmann, L. Howald, Ch. Gerber, and H. Guntherodt, Atomic resolution in dynamic force microscopy across steps on Si(1 1 1)7×7, *Z. Phys. B*, **100**, 165–167, (1996)
78. N. Nakagiri, M. Suzuki, K. Okiguchi, and H. Sugimura, Site discrimination of adatoms in Si(111)-7 × 7 by noncontact atomic force microscopy, *Surf. Sci.* **373**, 329–332, (1997)
79. M. Bammerlin, R. Luthi, E. Meyer, A. Baratoff, J. Lu, M. Guggisberg, C. Gerber, L. Howald, and H. Guntherodt, True atomic resolution on the surface of an insulator via ultrahigh vacuum dynamic force microscopy, *Probe Microscopy*, **1**, 3, (1997)
80. K. Fukui, H. Onishi, and Y. Iwasawa, Atom-Resolved Image of the TiO₂(110) Surface by Noncontact Atomic Force Microscopy, *Phys. Rev. Lett.*, **79**, 4202–4205 (1997)
81. K. Fukui, H. Onishi, and Y. Iwasawa, Imaging of individual formate ions adsorbed on TiO₂(110) surface by non-contact atomic force microscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **280**, 296–301 (1997)
82. B. Gotsmann, C. Schmidt, C. Seidel, and H. Fuchs, Molecular resolution of an organic monolayer by dynamic AFM, *Eur. Phys. J. B*, **4**, 267–268 (1997)
83. M. Bammerlin, R. Luthi, E. Meyer, A. Baratoff, J. Lu, M. Guggisberg, C. Gerber, L. Howald, and H. Guntherodt, Dynamic SFM with true atomic resolution on alkali halide surfaces, *Appl. Phys. A*, **66**, 293–294, (1998)

84. S. Orisaka, T. Minobe, T. Uchihashi, Y. Sugawara, and S. Morita, The atomic resolution imaging of metallic Ag(111) surface by noncontact atomic force microscope *Appl. Surf. Sci.*, **140**, 243–246 (1999)
85. Ch. Loppacher, M. Bammerlin, M. Guggisberg, F. Battiston, R. Bennewitz, S. Rast, A. Baratoff, E. Meyer, and H. Guntherodt, Phase variation experiments in non-contact dynamic force microscopy using phase locked loop techniques, *Appl. Surf. Sci.*, **140**, 287–292 (1999)
86. K. Fukui, H. Onishi, and Y. Iwasawa, Imaging of atomic-scale structure of oxide surfaces and adsorbed molecules by noncontact atomic force microscopy, *Appl. Surf. Sci.*, **140**, 259–264 (1999)
87. S. Kitamura, K. Suzuki, and M. Iwatsuki, High resolution imaging of contact potential difference using a novel ultrahigh vacuum non-contact atomic force microscope technique, *Appl. Surf. Sci.*, **140**, 265–270 (1999)
88. T. Uchihashi, T. Okada, Y. Sugawara, K. Yokoyama, and S. Morita, Self-assembled monolayer of adenine base on graphite studied by noncontact atomic force microscopy, *Phys. Rev. B*, **60**, 8309–8313 (1999)
89. K. Kobayashi, H. Yamada, T. Horiuchi, and K. Matsushige, Investigations of C60 molecules deposited on Si(111) by noncontact atomic force microscopy, *Appl. Surf. Sci.*, **140**, 281–286 (1999)
90. K. Kobayashi, H. Yamada, T. Horiuchi, and K. Matsushige, Imaging of fullerene molecules on Si(111)-7×7 surface with NC-AFM, *Appl. Surf. Sci.*, **157**, 228–232 (2000)
91. Hoogenboom, B. W.; Hug, H. J.; Pellmont, Y.; Martin, S.; Frederix, P. L. T. M.; Fotiadis, D.; Engel, A. Quantitative Dynamic-Mode Scanning Force Microscopy in Liquid. *Appl. Phys. Lett.* **88**, 193109 (2006)
92. Fukuma, T.; Mostaert, S. A.; Serpell, C. L.; Jarvis, P. S. Revealing Molecular-Level Surface Structure of Amyloid Fibrils in Liquid by means of Frequency Modulation Atomic Force Microscopy. *Nanotechnology* **19**, 384010 (2008)
93. Ido, S.; Kimura, K.; Oyabu, N.; Kobayashi, K.; Tsukada, M.; Matsushige, K.; Yamada, H. Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization of Native DNA in Aqueous Solution. *ACS Nano* **7**, 1817–1822 (2013)

94. Sanna, A.; Han, A. B. W. et, al. Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*, *Biomacromolecules* **7**, 1295–1301 (2006)
95. Ari M. Siitonen, Koji Sumitomo, Chandra S. Ramanujan, Youichi Shinozaki, Nahoko Kasai, Kazuaki Furukawa, John F. Ryan, Keiichi Torimitsu, Elastic modulus of suspended purple membrane measured by atomic force microscopy, *Applied Surface Science* **254**, 7877–7880 (2008)

第3章

HFBI 液滴界面現象についての研究

3章. HFBI 液滴界面現象についての研究

3-1 目的

前章で HFBI は気液界面に精密な自己組織化膜を形成し、その膜の座屈強度の高さから液滴の上面を平らにすることを明らかにした。

本章では、HFBI を含む液滴についてより詳細な研究を行い、HFBI が界面に及ぼす作用を解明していく。初めに何故 HFBI 液滴は液滴の頂点部から平らになっていくのかを明らかにする。様々な条件下での HFBI 液滴の挙動を観察し、それぞれの挙動を解析し考察していく。

3-2 HFBI 液滴の上面が平らになる理由

3-2-1 液中で HFBI に作用する力

初めに HFBI 液滴は頂点部分に HFBI が集まり徐々に自己組織化していくと仮定する。HFBI は液滴中ではモノマー・ダイマー・テトラマー、あるいはそれ以上の多量体で存在している⁹⁶。モノマーで存在する HFBI は疎水性面を露出しているため、他の HFBI とダイマー化するか、気液界面に吸着する。HFBI はダイマー化するよりも優先的に気液界面に吸着する⁹⁶。すなわち、初めは液滴内に存在する HFBI は疎水性相互作用により気液界面に吸着する。気液界面に吸着した HFBI は、液滴の頂点に向かう何かしらの力が働くために液滴頂点部に集まり、平らになる。その上に向かう力が何か。溶液中の物質が上方へ移行するための力として浮力が挙げられる。まず、浮力について考える。初めに HFBI の密度を計算する。

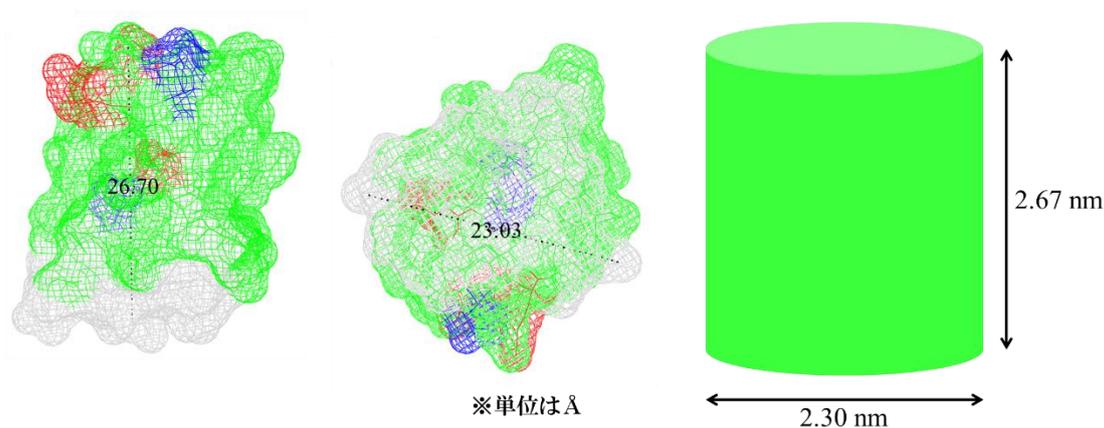


Fig. 3-1 X 線結晶回折に基づいた HFBI タンパク質の高さ (左) と幅 (中)

PDB data : 2FZ6

Fig. 3-1 に示すように、HFBI を円筒形とみなして幅 2.30 nm、高さ 2.67 nm で体

積を計算すると、

$$(2.30/2)^2 \times \pi \times 2.67 = 11.09 \text{ nm}^3$$

であり、この値から HFBI の密度を計算すると、

$$\frac{7532 \text{ [Da]}}{6.022 \times 10^{23} \text{ [/mol]} \times 11.09 \text{ [nm}^3\text{]}} = 1.13 \text{ g/cm}^3$$

となる。水の密度は 1 g/cm^3 なので、ほぼ一致している。ゆえに単体の HFBI に浮力は作用しないと考える。

3-2-2 液の蒸発による体積減少と表面積変化の関係

液滴上面が平らになった理由は前章で HFBI 自己組織化膜の座屈強度が液滴の表面張力を上回ったことと、構造上平面をとることが望ましいことから明らかにしたが、液滴の蒸発による体積減少も液滴形状変化の要因の一つであると考えられる。

固相基板上に液体が吸着すると、固相表面はぬれる。この「ぬれ」は固気界面が固液界面に置き換わったということを意味する。よって固相表面がぬれるとき、熱力学的には自由エネルギーが変化したということになる。つまり、界面の自由エネルギー変化 ΔG を単位面積で考えれば、自由エネルギーの変わりに界面張力 γ を使って、ぬれを考えることができる。固相基板上に接触角 θ を持つ液滴が形成したとき、その液滴と固相基板の三相界面では Fig. 3-2 で表されるような力のつり合いが生じている。

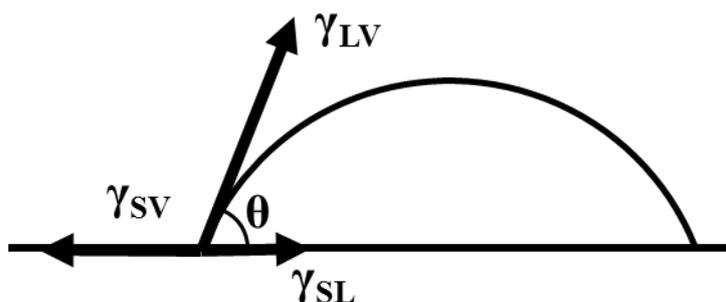


Fig. 3-2 接触角 θ を持つ液滴三相界面での力のつり合い

この力のつり合いを表す式が、

$$\gamma_{SV} = \gamma_{LV} \cos\theta + \gamma_{SL} \text{ (Young formula)}$$

である⁹⁷。 γ_{SV} は固相と気相の界面張力、 γ_{LV} は液相と気相の界面張力、 γ_{SL} は固相と液相の界面張力を表す。表面張力は γ_S や γ_L と表すが、表面に気体が接すると考えれば

γ_{sv} 、 γ_{lv} という界面張力となる。しかし実際には常温付近では $\gamma_{sv} \approx \gamma_{sv}$ 、 $\gamma_{lv} \approx \gamma_{lv}$ と考えてよいとされている^{98,99}。表面張力を扱う際に原式とされているのは、Young の式⁹⁷、Dupre の式¹⁰⁰、Girifalco・Good の式¹⁰¹ の3つである。

液滴が蒸発するとその体積変化に伴い、Fig.3-2 のように形状は保ったまま小さくなるのが一般的である。



Fig. 3-3 蒸発による液滴の一般的な変化の模式図

しかし、HFBI 液滴の場合は、アーチ橋のように気液界面を HFBI タンパク質が覆っているため、液滴の体積が減少するとその分だけ気液界面から HFBI を排除しなければならなくなり、形状を維持したまま小さくなるのが困難となる。そのため本来なら表面自由エネルギーを最小限にしようと球状になるところが、体積変化に伴い排除すべき HFBI を最小限にしようと、すなわち表面積の変化が少なくなるように下図に示すように体積変化が生じた。



Fig. 3-4 蒸発による HFBI 液滴の形状変化の模式図

疎水性基板上に水で液滴を作製すると、接触角の高い液滴が形成される。親水性基板の場合は液滴は広がり接触角は低くなる。この液滴が蒸発により液滴体積が減少した場合、疎水性基板のときは表面が濡れるのを嫌うため液滴形状はほぼ変わらないまま体積減少する (Fig. 3-5a)。親水性基板の場合、濡れていたほうが安定であるため、液滴の幅はほとんど変わることなく体積減少する (Fig. 3-5b)。HFBI 液滴の場合、疎水性基板上に置くと、水のとおり接触角の高い液滴が形成される。時間が経つにつれて溶液と基板の界面上、すなわち固液界面上は HFBI が吸着するため親水的になる。親水性表面は濡れていたほうが好ましいため、先ほどの水のとおり液滴の幅はほとんど変わることなく上のほうから体積減少することになる (Fig. 3-5c)。

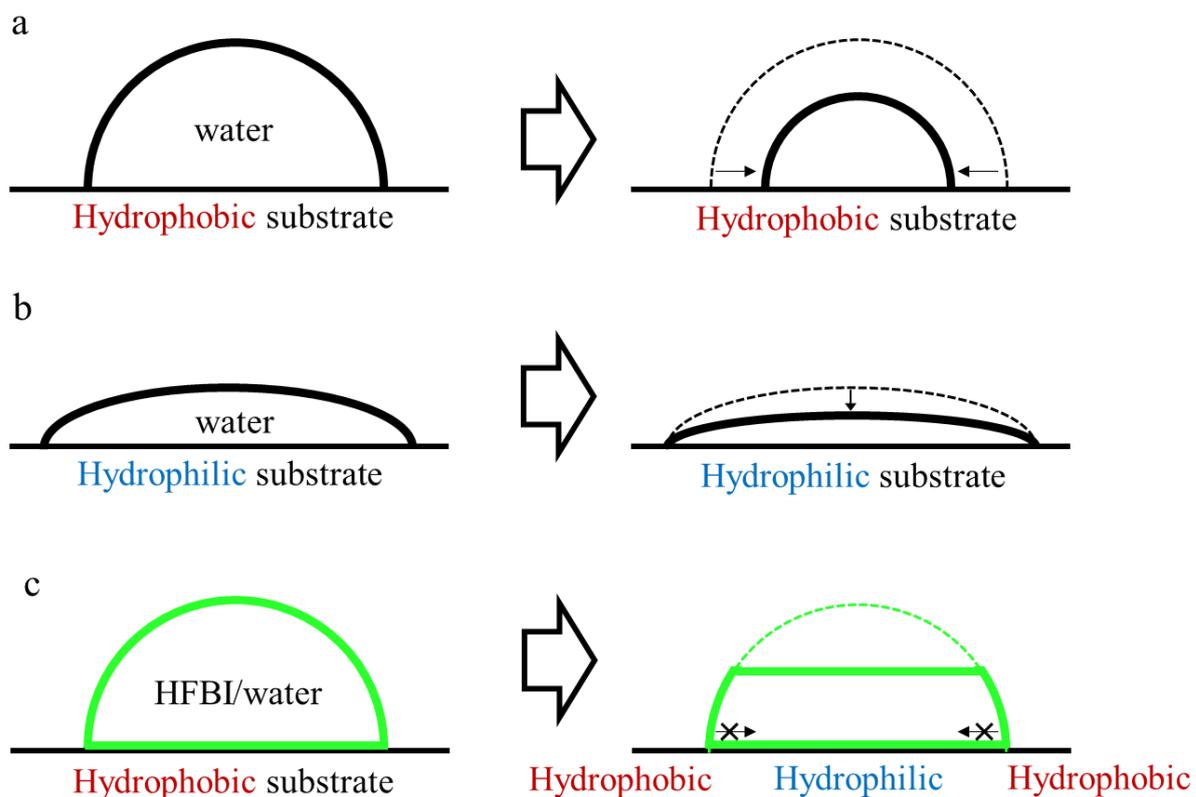
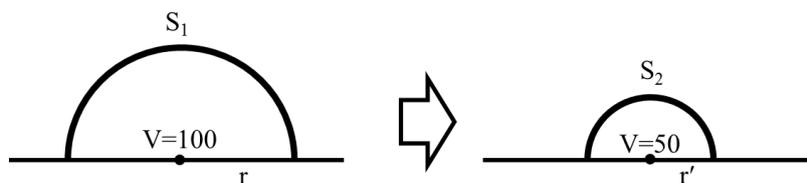


Fig. 3-5 疎水性基板と親水性基板上における水と HFBI 液滴の蒸発による体積減少挙動の模式図

Fig. 3-3 と Fig. 3-4 のそれぞれの場合、同体積での気液界面に露出した表面積の違いを計算する。体積が 100 の液滴で真半球と仮定して求める。



の場合、体積 $V=100$ での半径 r は、

$$\frac{4}{3}\frac{\pi r^3}{2} = 100$$

$$\frac{4}{3}\pi r^3 = 200$$

$$r^3 = 150/\pi$$

$$r = 3.62$$

表面積 S_1 は、

$$S_1 = \frac{4\pi r^2}{2}$$

$$S_1 = 82.34$$

体積が 50 になったと仮定すると、

$$\frac{4}{3}\frac{\pi r'^3}{2} = 50$$

$$\frac{4}{3}\pi r'^3 = 100$$

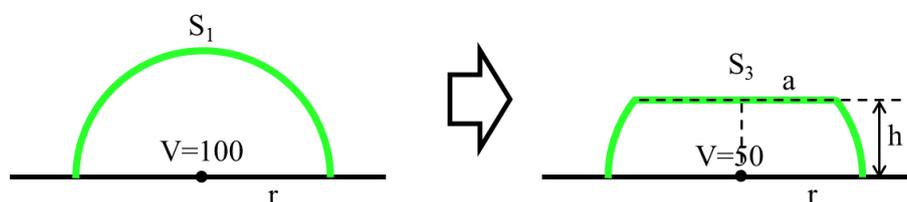
$$r'^3 = 75/\pi$$

$$r' = 2.88$$

表面積 S_2 は、

$$S_2 = \frac{4\pi r'^2}{2}$$

$$S_2 = 52.12$$



の場合、体積 $V=100$ のときは同じなので半径 $r = 3.62$ 、 $S_1 = 82.34$ である。

$V=50$ のときの表面積を計算すると、

$$V = 50 = \frac{1}{6}\pi h(3r^2 + 3a^2 + h^2)$$

$$= \frac{1}{6}\pi h(3r^2 + 3(r^2 - h^2) + h^2)$$

$$= \frac{1}{6}\pi h(6r^2 - 2h^2)$$

$$= \frac{1}{3}\pi h(3r^2 - h^2)$$

$r = 3.62$ は変わらないので、

$$50 = (3.62)^2\pi h - \frac{1}{3}\pi h^2$$

$$h = 1.27 \quad (\because 0 < h < r)$$

よって表面積 S_3 は、

$$\begin{aligned} S_3 &= 2\pi rh + \pi a^2 \\ &= 28.89 + 36.10 \\ &= 64.99 \end{aligned}$$

このように体積変化での表面積は Fig. 3-3 の場合と比べて Fig. 3-4 の場合の方が大きいことは明らかである。表面積の変化が少ない、すなわち排除される気液界面に存在する HFBI が少なくすむように Fig. 3-4 のような形状変化をもたらしたと考える。

3-2-3 温度と湿度を変化させたときの HFBI 液滴挙動

前節で液の蒸発も HFBI 液滴の上面が平らになる要因の一つであると述べた。では、蒸発しやすい環境下と蒸発しにくい環境下では、液滴の挙動に違いが生じてくるはずである。HFBI 溶液の濃度 (15 μM)、液量 (10 μL) は常に一定で、周りの環境について温度と湿度をさまざま変えて HFBI 液滴の観察を行った。結果を Fig. 3-6 に示す。グラフ内のバブルの大きさが大きいほど自己組織化に時間がかかったことを示している。自己組織化の時間は第 2 章で定義したように、液滴の底部と上部の長さの比から算出しており、その値が 0.3 のときの時間でプロットしている。湿度が高いと蒸発する速度も遅くなるため、自己組織化にも時間がかかっている。温度が高いと蒸発の速度も早まり、早く自己組織化した。40°C を超えると 1 分未満で液滴の形状は変化した。室温かつ加湿条件のときは、自己組織化して液滴の形状が変化するまでの時間は約 30 分であり、第 2 章で行った実験についてはすべてこの条件で行っている。

この結果から、温度や湿度を変化させると自己組織化による液滴形状の変化時間は変わってくるため、HFBI 液滴の上面が平らになる要因に液の蒸発は影響していると考えられる。

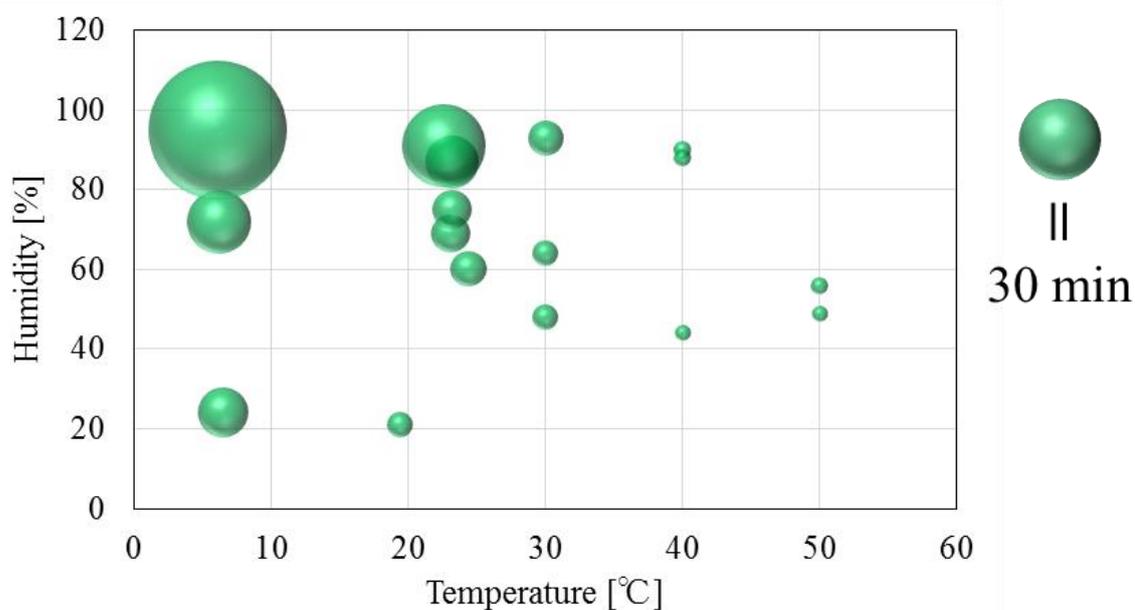


Fig. 3-6 温度・湿度をさまざま変化させたときの自己組織化時間 縦軸は湿度、横軸は温度、バブルの大きさが液滴の上面が平らになり始めの時間を表している

3-2-4 傾けた基板の上に液滴を置いたとき

HFBI 液滴を 30° 傾けた基板の上に作製した。前節で示したように蒸発による体積減少で、表面積の変化を少なくするのであれば、Fig. 3-7 に示すような液滴形状変化が起こってもおかしくない。



Fig. 3-7 液滴をのせた基板を 30° 傾けたときのイメージ図

しかし、実際に HFBI 液滴を傾けた基板にのせると、Fig. 3-8 のように液滴の最も高い点、頂点から平らになっていることがわかる。



Fig. 3-8 HFBI 液滴をのせた FTO 基板を 30°傾けた実験

ではなぜ、液滴の頂点部から平らになっていくのか。初めから 30° 傾けた基板に液滴をのせるのではなく、初めは傾いていない基板に液滴を作製し、液滴の上面が平らになってから基板を傾けるとどのような変化が起こるのかを実験した。傾ける角度は 0°~25°で傾けるのに要した時間は 1 分程度である。3-2-2 で説明したように、初めから気液界面を HFBI で覆っているのであれば、基板を傾けた後の変化は Fig. 3-7 のようになるはずである。結果は、Fig. 3-9 に示すように、基板を徐々に傾けても地面に対して水平を保ったままであった。この結果から側面の曲率の部分は HFBI 膜に覆われておらず、いかだのように液面に自己組織化膜が浮かんでいるような状態であるということがわかる。

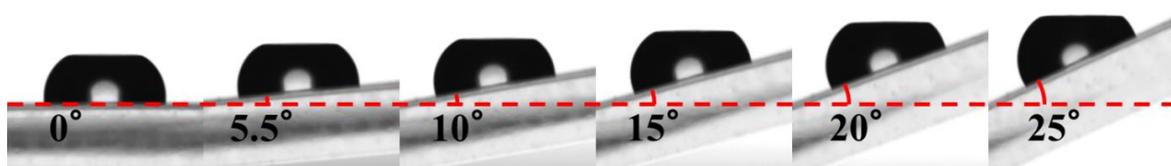


Fig. 3-9 HFBI 液滴をのせた FTO 基板を徐々に 30°傾けた実験

これらの実験結果、考察をまとめると、HFBI は液中で徐々に気液界面に吸着し、HFBI 同士の相互作用によってある程度まとまりができる。そのまとまりには浮力が働き、液滴の頂点に向かって移動する。頂点に集まった HFBI はより緻密に自己組織化し、前章で示した HFBI 自己組織化膜の座屈強度の高さから、液滴の上面を平らにしたと考える。

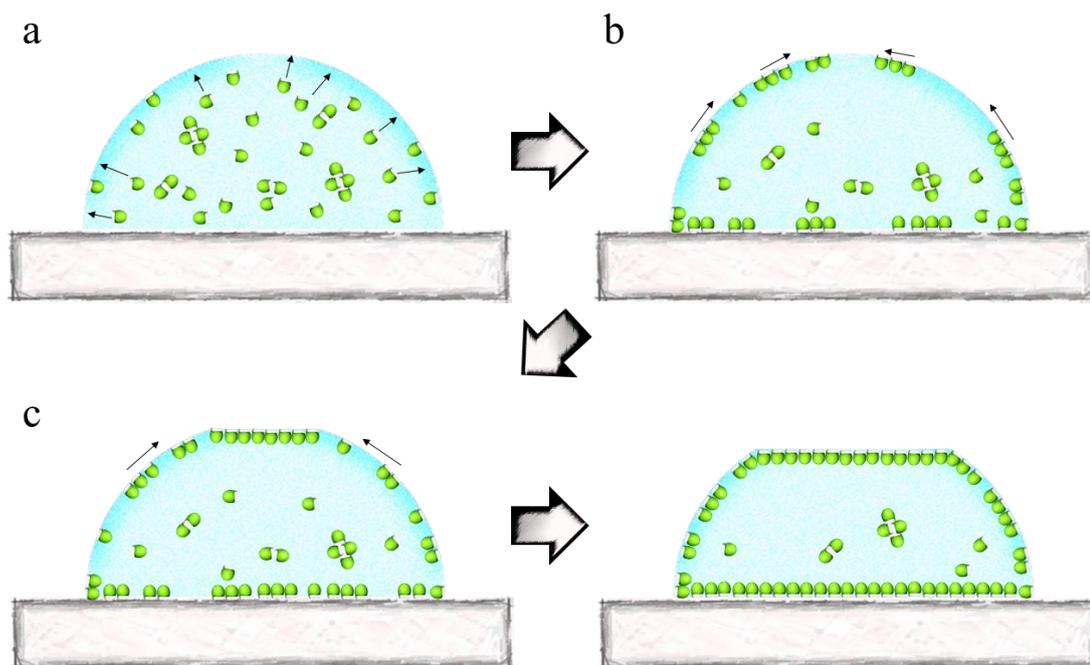


Fig. 3-10 HFBI 液滴内部での HFBI の挙動の模式図

3-2-5 上面が平らになった液滴の上面と側面の AFM

上面が平らになった液滴は Fig. 3-9 の結果から側面部には自己組織化はしていないと思われる。その確認を行うために、上面部と側面部をそれぞれ基板に転写し、基板表面の AFM 観察を行った。Fig. 3-11a は液滴の上面部を転写した基板の AFM イメージである。規則的な自己組織化構造であることが確認できる。Fig. 3-11b は側面部を転写した基板の AFM イメージである。タンパク質がまばらに存在しており、自己組織化はしていないことが明らかである。Fig. 3-11c は上面部と側面部をそれぞれ転写した基板の電気化学インピーダンス測定によるナイキストプロットである。側面部を転写した基板は上面部を転写した基板よりも電荷移動抵抗値が小さいことから、液滴の側面に存在する HFBI は上面よりも少ないことがわかった。

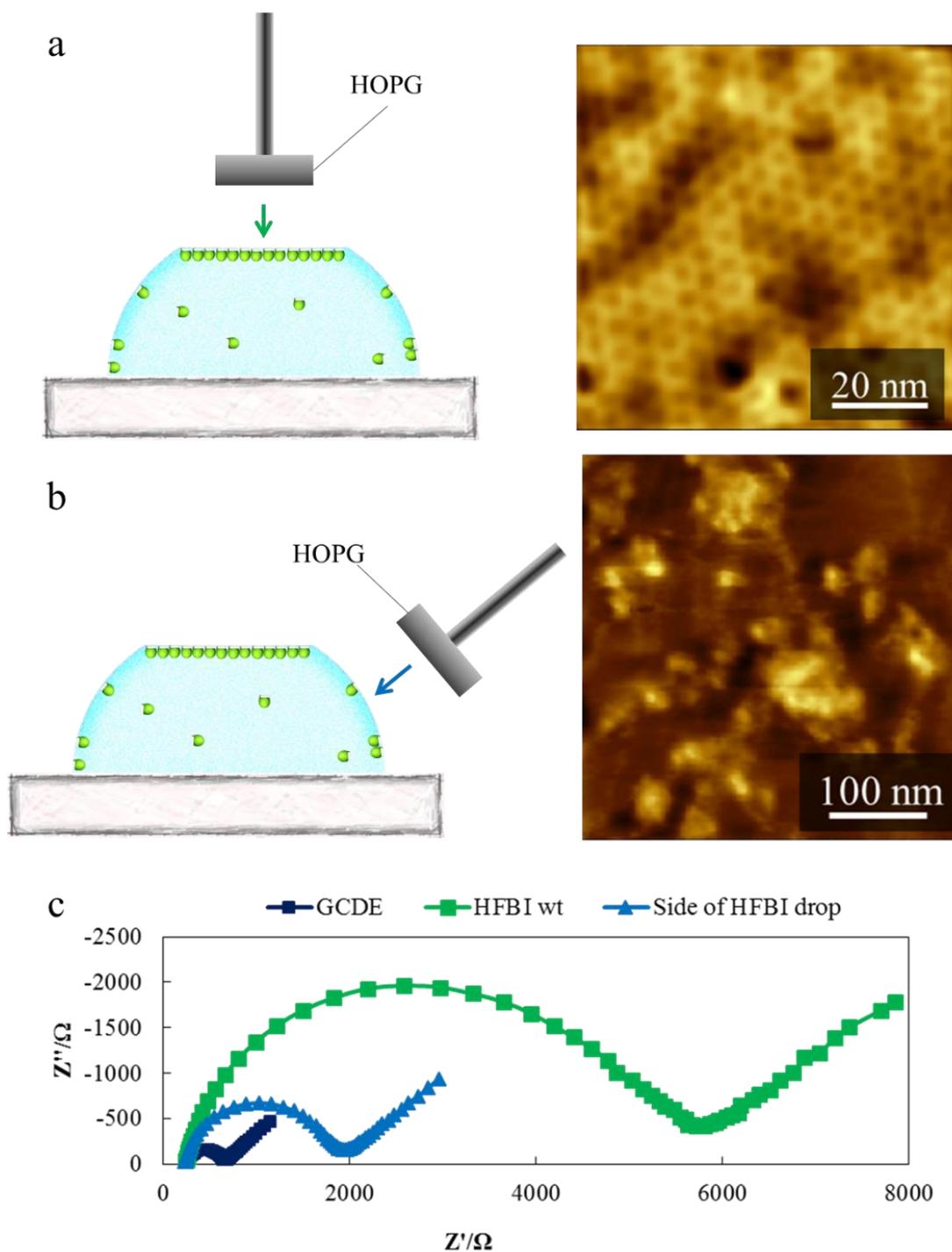


Fig. 3-11 a) 液滴の上面部を転写した基板の AFM イメージ b) 液滴の側面部を転写した AFM イメージ c) 上面部と側面部をそれぞれ転写した基板の電気化学インピーダンス測定によるナイキストプロット

3-3 蒸発しない環境下（液／液界面）での HFBI 液滴の挙動

3-3-1 実験方法

HFBI 液滴の形状変化に液の蒸発が要因の一つであるならば、液が蒸発しない条件下に置き、観察を行ったらどのような挙動を示すか実験を行った。HFBI 液滴の濃度・液量は変えずに液滴を作成した後、その周りをヘキサンで満たすことで液の蒸発を防いだ。透明なディスポセルに HFBI 液滴を 15 μL 容量で作成し、その周りを液滴を壊さないように慎重にヘキサンで満たした。この液滴を CAM 200 (KSV Instruments Ltd., Finland)を用いて経時変化で観察を行った。

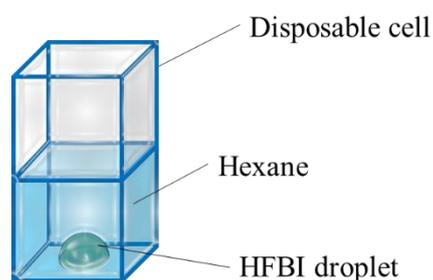


Fig. 3-12 ヘキサン中における HFBI 液滴観察の模式図

3-3-2 結果と考察

HFBI 液滴をヘキサン中に何時間置いても、液滴の形状に変化は見られなかった (Fig. 3-13)。

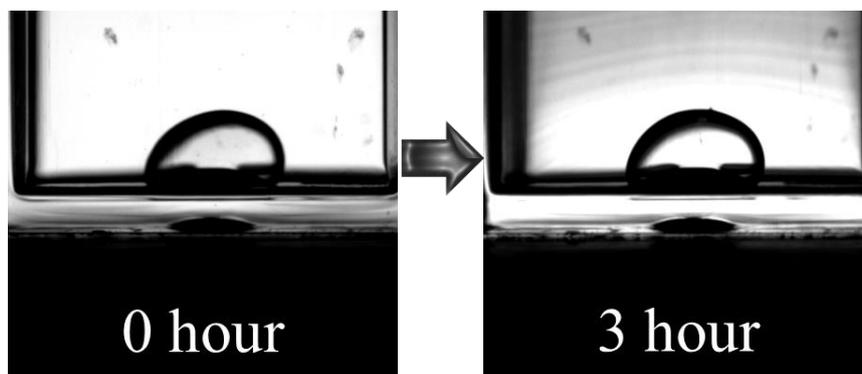


Fig. 3-13 ヘキサン中における HFBI 液滴観察

ヘキサン界面に HFBI が吸着しにくいために、界面で自己組織化していない可能性がある。ヘキサン中の HFBI 液滴を細い棒でつつくと、つついた箇所がへこんだ (Fig. 3-14)。その後、時間をおいても HFBI 液滴はへこんだ歪な形状を維持したまま変化はなかった。つまり、ヘキサン相と水相の界面に HFBI は吸着し、自己組織化膜を形成していることは明らかである。また、Elodie らの報告でも HFBI 液滴を有機溶媒中

で作製し、その界面に自己組織化膜が形成していることを示している¹⁰²。しかし、自発的に液滴形状を変えることはなかった。ゆえに、液の蒸発により体積が変わることが自発的な液滴形状変化には必要な要因であることを示唆した。ヘキサン中では液滴形状が変化しなかった理由としてもう一つ挙げるとすると、気液界面の場合だと界面に存在する HFBI 分子は気相側から受ける相互作用はないが、ヘキサンとの界面の場合、ヘキサン分子が HFBI 分子とお互いに引き合う力が働くため、液滴が平らにならなかったのではないかと考察する。

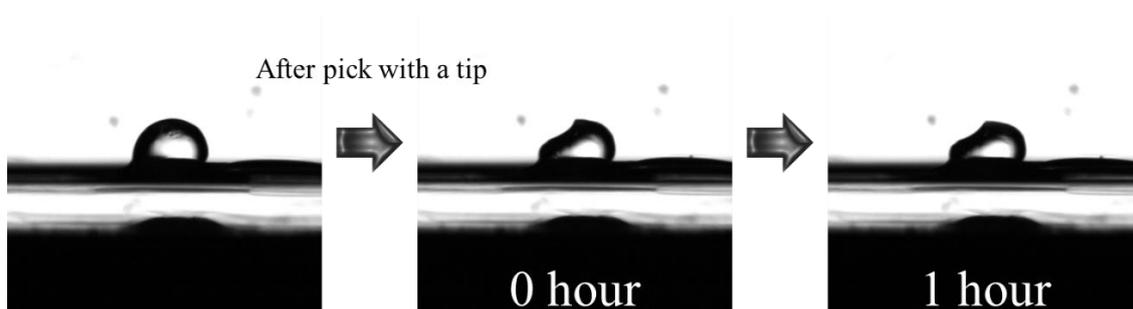


Fig. 3-14 ヘキサン中における HFBI 液滴観察

また、ヘキサン中における HFBI 液滴は外部刺激により液滴形状を変え、その形状を維持し続けることが出来る。液間の界面張力により、液滴の形状が戻ったりすることはなく、HFBI 自己組織化膜の意のままに形状を保っている。ヘキサン中に純水で液滴を作製し、その液滴をつついても球状の形状は変わらなかった (Fig. 3-15)。液滴の横にある黒い物質は容器に元々ある出っ張りである。

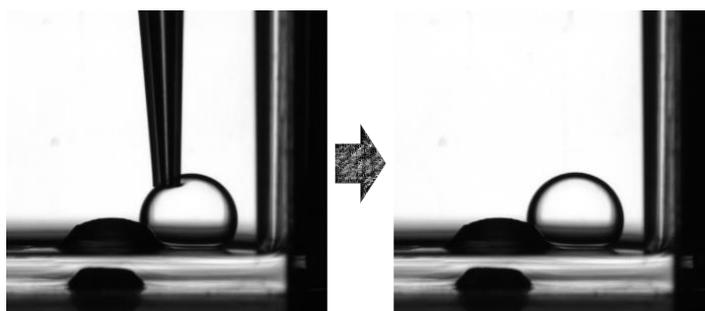
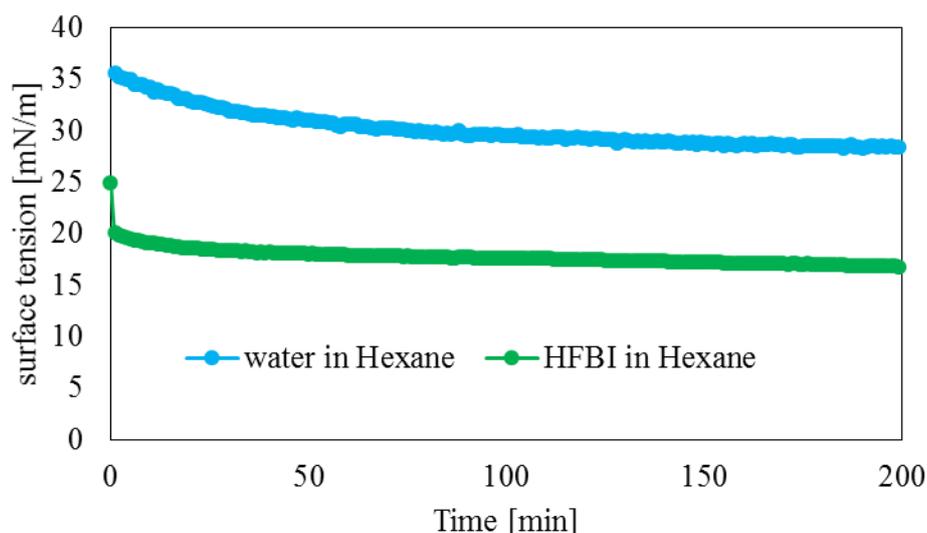


Fig. 3-15 ヘキサン中における純水の液滴観察

ヘキサンと HFBI 液滴の界面張力を懸滴法で測定した (Fig. 3-16)。



ヘキサンと HFBI 溶液の界面張力は 17 mN/m であったことから、界面にはその値を上回る HFBI 自己組織化膜が形成していることを示唆している。

Fig. 3-16 界面張力測定 (青) 水とヘキサンの界面張力、(緑) HFBI 溶液とヘキサンの界面張力

3-4 結論

この章では HFBI 液滴をさまざまな環境で観察することで液滴挙動のより詳細なメカニズム解析を行った。液体内の HFBI は初めに最も近くの気液界面に吸着し、その後液滴内の対流によって液滴頂点方向に集まると考えられる。HFBI の自己組織化により上面が平らになった液滴を徐々に傾けていくと、平らな面は地面と水平を保ったままであったことから、側面部に自己組織化膜は形成していないことがわかる。さらに液滴の蒸発による体積減少が、第2章で明らかにした構造強度の高さと兼ね合い、表面積を最小にする方向ではなく、気液界面に存在する HFBI が排除されるのを少なくする方向、すなわち表面積をできるだけ減少させない方向に働いたため、液滴の頂点部から平らになったものと考えられる。液滴の蒸発について、温度や湿度を変化させると液滴の上部が平らになる速度も変わることや、蒸発を防ぐために液滴の周りをヘキサンで満たして観察を行った結果、液滴の形状変化は起こらなかったことから、やはり蒸発による体積減少がひとつの鍵となっていると考えられる。

Reference

96. Geza R. S., Kaisa K., Ritva S., Markus B. L., The relation between solution association and surface activity of the hydrophobin HFBI from *Trichoderma reesei*, *FEBS Letters* **581**, 2721-2726 (2007)
97. T. Young, *Trans. Roy. Soc., London*, **95**, 84 (1805)
98. H. F. Mark, *Encyclopedia of Polymer Sci. and Technol.*, **1**, (1984)
99. John F McBride, John W Cary, C. Steve Simmons, Direct measurement of the spreading pressure of organic liquids on water *J. Colloid Interface Sci.*, **132**, 363-372 (1989)
100. A. Dupre, *Theorie Mechanique de la Chaleur*, Paris (1869)
101. J. Girifalco, R. J. Good, *J. Phys. Chem.*, **61**, 900 (1957)
102. Elodie, A., Sebastian, K., Pietro. C., Dominic, V., Wrinkling in the deflation of elastic bubbles, *Eur. Phys. J. E.* **36**, 22-26 (2013)

第 4 章

HFBI 自己組織化膜で被覆した電極 の電気化学特性

4章. HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の電気化学特性

4-1 目的

前章までに HFBI の自己組織化について研究し、その特性について解明を行った。本章からはこの HFBI 自己組織化膜を用いて応用を目指した研究を行った。第1章でも述べたが、HFBI を用いた応用研究は幅広く行われている。本研究室で行なった先行研究では、グルコースオキシダーゼを遺伝子工学的に HFBI に修飾することで、酵素活性を飛躍的に向上させることに成功している。このように HFBI を分子キャリアとして用いることの有用性を見出している。そこで本研究では HFBI を用いて高機能な分子機能電極の構築を目指した界面における電気化学特性に着目した。

4-2 HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の電気化学特性

4-2-1 実験

HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の電気化学特性を調べた。用いた電極は、表面が平坦で導電性を持つ基板が必要条件であるため、その条件を満たす、HOPG (10×10×1 mm, Grade SPI-1) を用いた。HOPG は sp² 炭素-炭素共有結合で六員環ユニットが連なることで形成されたグラフェンを層状に重ねた構造になったもので、極めて平滑な表面を持っている。また π 電子共役表面を持つため、高い導電性を有することから、走査型トンネル電子顕微鏡の標準表面としても使われるなど、幅広い用途で用いられている。HFBI 溶液は 15 μM で調製したものを 28 kHz で 1 min 超音波かけ、マイクロピペットで 10 μL サイズの液滴を作成した。気液界面に形成した HFBI 自己組織化膜をスコッチテープで表面を劈開した HOPG 上に転写し、電極としての特性をサイクリックボルタンメトリー (CV) と電気化学インピーダンス (EIS) で調べた。実験は3電極系で行い、対極 (CE) は白金線 (Pt)、参照極 (RE) は Ag/AgCl、作用極に HFBI で被覆した HOPG 電極を用いた。電解質溶液には 100mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にレドックス分子として 25mM フェリシアン化カリウム/フェロシアン化カリウム ([Fe(CN)₆]^{3/4-}) を混合したものをを用いた。測定装置にはポテンシostat (Hokuto Denko Co., Japan) を用いた。電気化学インピーダンスは一定の周波数で交流電流を流し、得られた交流抵抗を横軸をインピーダンスの実部 (Z')、縦軸をインピーダンスの虚部 (Z'') にとり、プロットしたものである。周波数は 10 kHz - 10 mHz、振幅は 10 mV 実験環境はすべて室温 (25°C) で行った。

4-2-2 結果

Fig. 4-1 に CV の結果を示す。HOPG 電極は導電性基板であるため高いレドックス応答を示した。HFBI 自己組織化膜で被覆した電極はタンパク質という電気を通しにくい物質を被覆しているにもかかわらず、レドックス応答を示した。これは HFBI 自己組織化膜が規則的なハニカム様の構造を有していることから、その孔部を利用してレドックス分子がレドックス反応しているためであると考えられる。この結果から HFBI が分子機能電極として利用可能であることを示した。

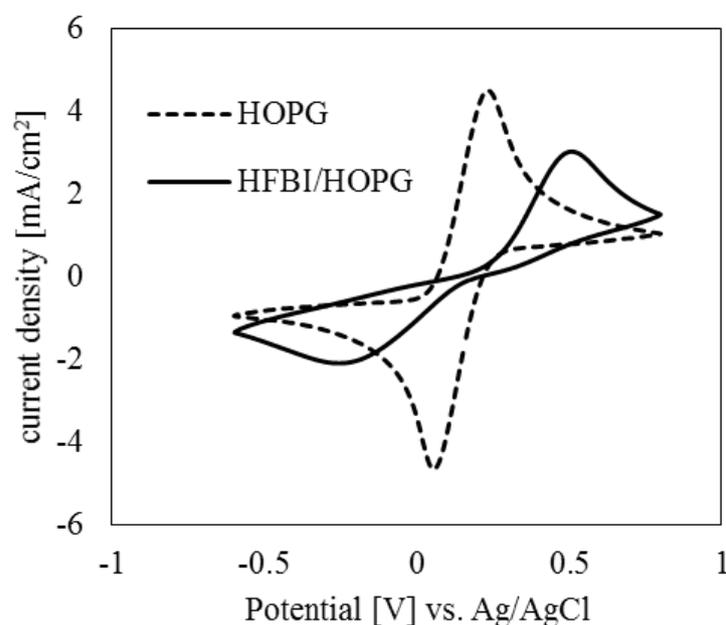


Fig.4-1 HOPG と HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極のサイクリックボルタモグラム

しかし、同じ電極を用いた EIS 測定では、bare の HOPG と比べて HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG は非常に高い電荷移動抵抗値を示した (Fig. 4-2)。半円の直径は電荷移動抵抗値 (R_{ct}) を表す。ゆえに半円が大きいほど抵抗値が高いことを示す。

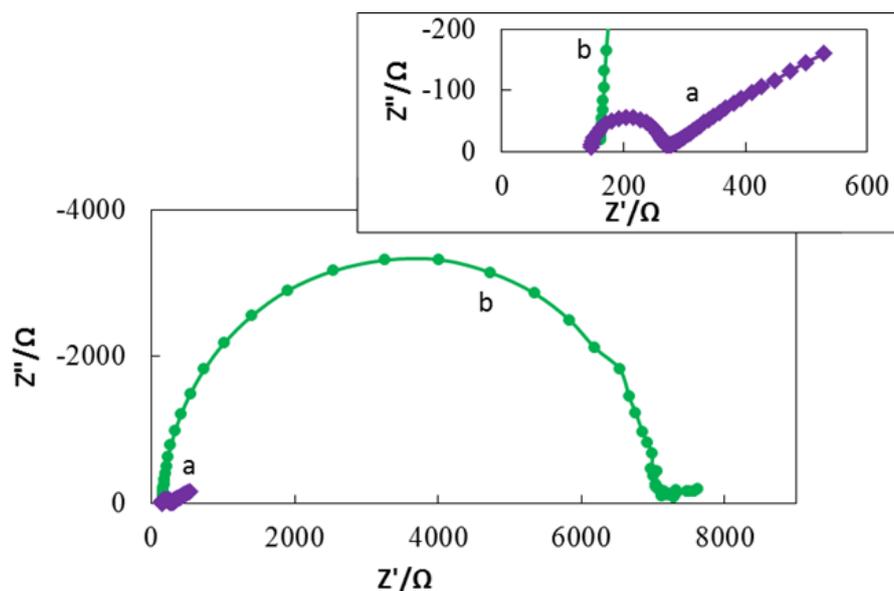


Fig.4-2 HOPG (a)と HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極 (b)のナイキストプロット

さらに、Fig. 4-2 で得られたプロットをもとに、等価回路を示した (Fig. 4-3)。 R_{sol} は溶液抵抗、 R_p は HFBI 自己組織化膜の孔部における溶液抵抗、 C_m は HFBI 自己組織化膜の電気容量、孔部における溶液と電極界面での電荷移動抵抗を R_{ct} 、電気二重層容量を C_{dl} とし、ワールブルグインピーダンス (拡散のインピーダンス) を Z_w で表した。

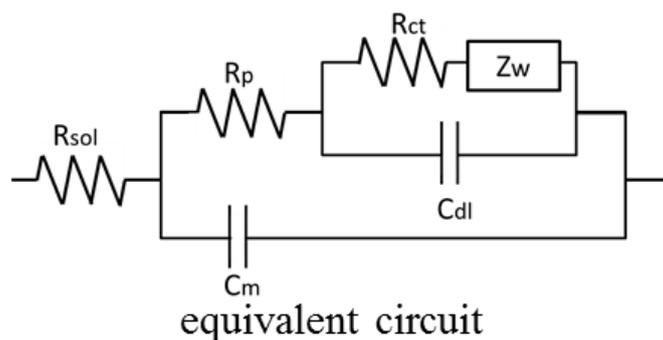


Fig.4-3 HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極を用いた系の等価回路

4-2-3 HFBI 自己組織化膜の被覆率計算

HFBI で被覆した HOPG 電極は、HFBI が電極上をどのくらいの割合で被覆しているのかを CV により算出した。走査速度を 5、10、20、50、100 mV/sec それぞれで測定を行い、そのピーク電流値 (I peak current: I_{pc}) を用いて、Randles-Sevcik 式 (formula 4-1) から被覆率を算出した¹⁰³⁻¹⁰⁶。

$$I_{pc} = 2.69 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times D^{1/2} \times C \times v^{1/2} \quad (\text{formula 4-1})$$

CV の結果を Fig. 4-2 に示す。

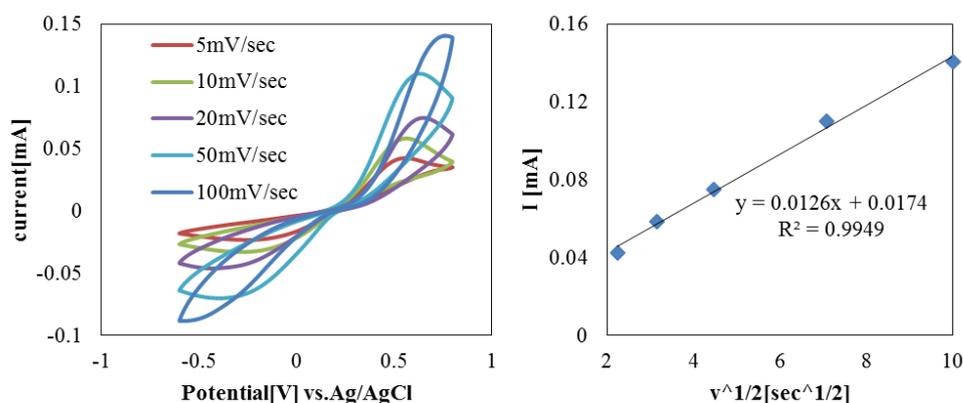


Fig.4-4 HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極の走査速度を変化させたときのサイクリックボルタモグラム (左) と走査速度とピーク電流の関係 (右)

Fig. 4-4 の結果をもとに formula4-1 から HFBI の被覆率を計算すると、42.0% となった。電極上を HFBI 自己組織化膜がハニカム状に完全に覆ったときの理論値を 100% とすると、被覆率は 86.86% と、高い被覆率であることがわかった。電気化学的に被覆率を算出していることや、電極を真っ平らなものとして計算しているため、この値は正確とはいえないが、概算値として得ることができた。

4-3 電解質の pH 変化による HFBI 電極の電気化学特性

4-3-1 緩衝域の異なる緩衝液を用いた CV 測定

前節で電極表面を HFBI 自己組織化膜で被覆してもその特性を大きくは損なわないことを示した。しかし、電荷移動抵抗値は非常に高いことがわかったため、分子機能電極として更なる高機能を目指すために、電解質の pH に着目した。レドックス分子は前節と同じように 25 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ を用いて溶解させる緩衝液を異なる緩衝域を持つものにそれぞれ溶解させて同様の条件で CV 測定を行った。緩衝液は 1 mM Glycine buffer (pH 3.0)、0.1 M Acetate buffer (pH 4.9)、0.1 M MES buffer (pH 6.0)、

0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4)、0.1 M Carbonate buffer (pH 9.3)を用いた。

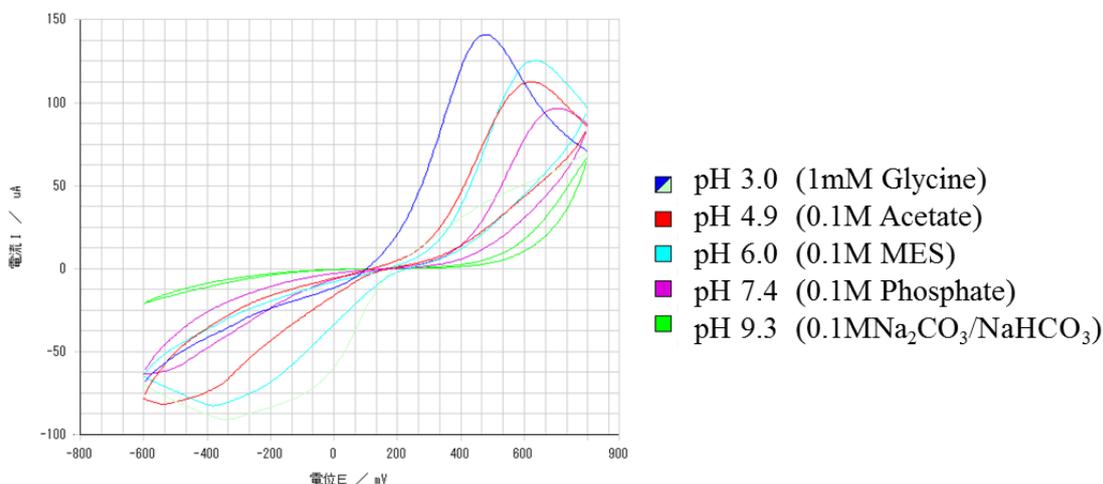


Fig.4-5 HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極の電解質の pH を変化させたときのサイクリックボルタモグラム

電解質が酸性なほど高い電流応答を示し、塩基性ではほぼ電流応答を示さないことがわかった。溶液が酸性になると電極表面の HFBI 自己組織化膜の電荷が正電荷に偏り、負の電荷を持つ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ が静電的に電極に引き寄せられ電子授受が行われやすくなったのではないかと考える。

4-3-2 広域 pH 緩衝液を用いた HFBI 電極の電気化学特性

pH を酸性にすると電流応答が大きくなることがわかった。しかし、前節の結果は異なる緩衝液を用いたためにそれぞれの特性が出た可能性が示唆される。ゆえに同一の緩衝液を用いて pH を振ることを考える。一般に緩衝液の緩衝域は 2 前後であるため同一の溶液で広い緩衝域を持つものはないと言える。しかし、複数の緩衝液を組み合わせることで広い緩衝域を持つ緩衝液を調製することができる。ゆえに今回は Carmody らが考案した広域緩衝液を用いた¹⁰⁷。溶液の組成は、0.2 M ホウ酸、0.05 M クエン酸を含む溶液に 0.1 M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液を pH を調整しながら加えていき調製する。

0.2 M ホウ酸、Mw: 61.83 g/mol

$$0.2 \text{ mol/L} \times 61.83 \text{ g/mol} \times 0.2 \text{ L} = 2.47 \text{ g}$$

0.05 M クエン酸、Mw: 210.14 g/mol

$$0.05 \text{ mol/L} \times 210.14 \text{ g/mol} \times 0.2 \text{ L} = 2.10 \text{ g}$$

0.1 M Na₃PO₄·12H₂O, Mw: 380.12 g/mol

$$0.1\text{mol/L} \times 380.12\text{ g/mol} \times 0.2\text{ L} = 7.60\text{ g}$$

①0.2 M ホウ酸+0.05 M クエン酸を milliQ 200mL に溶かした。

②0.1 M Na₃PO₄·12H₂O を milliQ 200mL に溶かした。

①に pH を調整しながら②を入れ、pH 3, 5, 7, 9, 11 の溶液をそれぞれ調製した。この緩衝液は低精度であるため、高精度な広域緩衝液を調製するときには Britton-Robinson buffer^{108,109} をおすすめする。今回はこの緩衝液を作成するのに必要なジエチルバルビツール酸を入手することができなかつたため、前者の緩衝液を用いた。

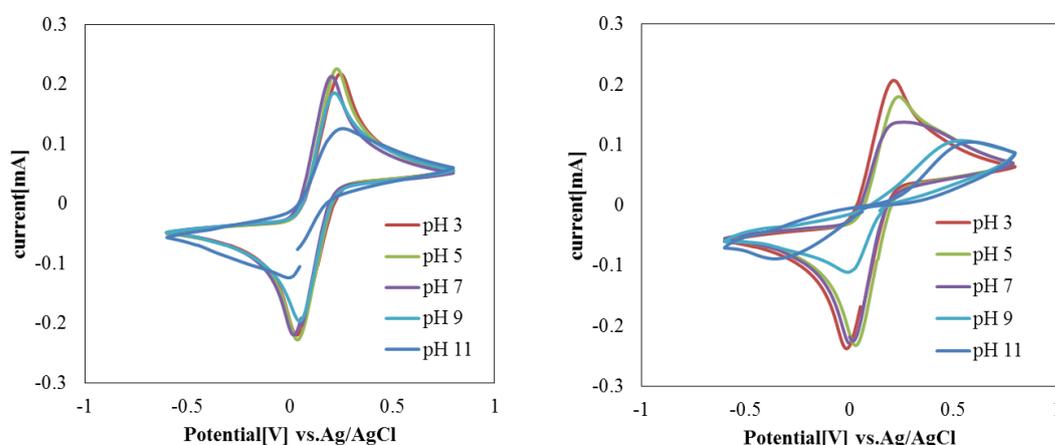


Fig.4-6 広域 pH 緩衝液を用いて電解質の pH を変化させたときのサイクリックボルタモグラム (左) HOPG (右) HFBI で被覆した HOPG

それぞれの pH の緩衝液に 25 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-}を加えて CV 測定した結果、HOPG 電極のときはほとんど変化はなく、pH 11 のときだけ電流応答の減少が見られた (Fig. 4-6 左)。これは [Fe(CN)₆]^{3-/4-}が構造を保てなくなったため酸化還元しにくくなったのではないかと考える。HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極は酸性側では高い酸化還元応答を示したが、塩基性になるにつれて電流応答が減少していることが確認できる (Fig. 4-6 右)。4-3-1 のときと同様に pH によって電極上の HFBI の電荷が変化したため、酸化還元応答に変化を齎したと考える。Fig. 4-6 のデータをそれぞれの pH ごとに分けたものを Fig. 4-7 に示す。

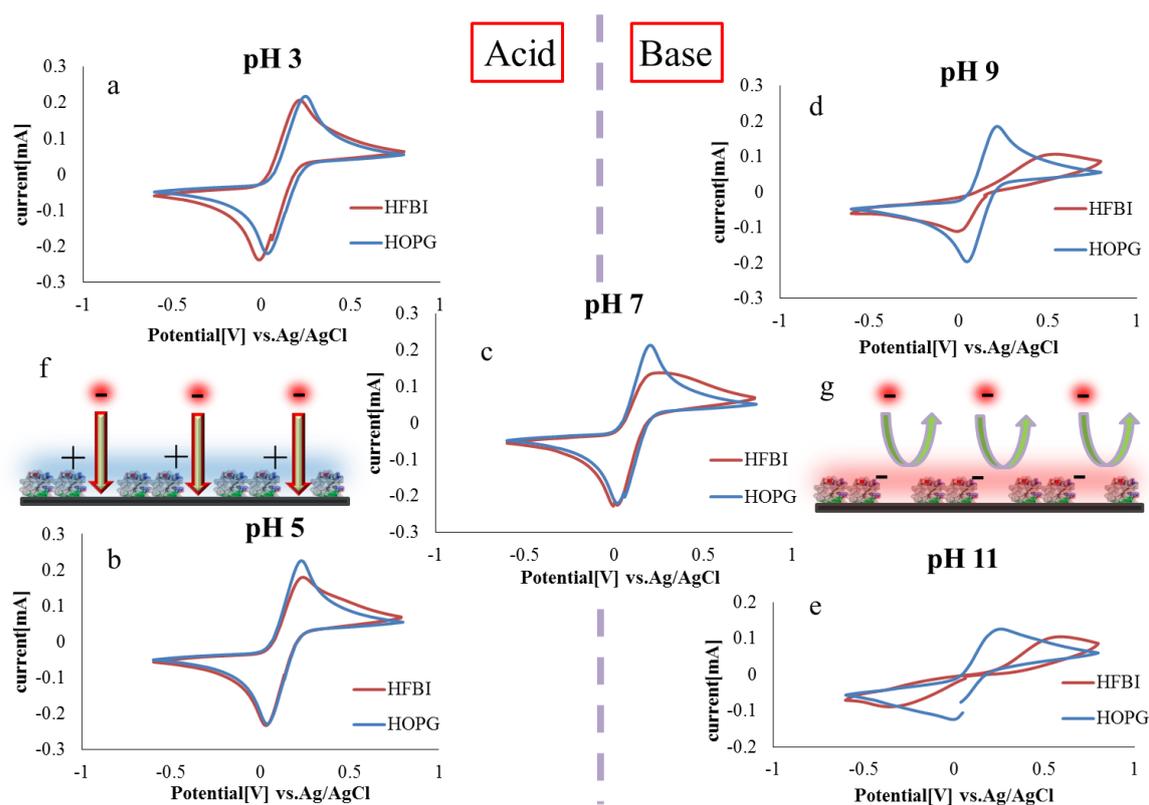


Fig.4-7 広域 pH 緩衝液を用いて電解質の pH を変化させたときのサイクリックボルタモグラム (a) pH 3 (b) pH 5 (c) pH 7 (d) pH9 (e) pH11 (f, g) 酸性、塩基性それぞれのときの電極界面で起こる反応の模式図

4-4 遺伝子改変による HFBI 電極の特性向上

4-4-1 ポイントミューテーションによる HFBI の電荷改変

前節で電解質の pH を変化させることで電極上の HFBI の電荷が変わり、電流応答が変化することを示唆した。この影響に着目して、分子機能電極として更なる高機能を目指すために、HFBI が持つ表面の荷電アミノ酸に着目した。HFBI は荷電アミノ酸として正電荷のアミノ酸と負電荷のアミノ酸を 3 つずつ持っている^{41, 110-112}。また、疎水性面を下としたときに上面に 2 つずつ正電荷と負電荷のアミノ酸が存在する。残り 1 つずつは側面に来る (Fig. 1-3)。電極上に HFBI 自己組織化膜を被覆した際に、レドックス分子と静電的な相互作用を起こし得るのは、HFBI の上面部分であると考え、そこに存在する 4 つの荷電アミノ酸に着目した。これらのアミノ酸をポイントミューテーションを用いて中性のアミノ酸に変えた、新たな 2 種類の改変型 HFBI を

作製した (Fig. 4-8)。1 つは正電荷のアミノ酸 (R:アルギニンと K:リジン) を中性のアミノ酸 (Q:グルタミン) に変えた負電荷の HFBI、もう 1 つは負電荷のアミノ酸 (D:アスパラギン酸) を中性のアミノ酸 (Q:グルタミンと N:アスパラギン) に変えた正電荷の HFBI である。

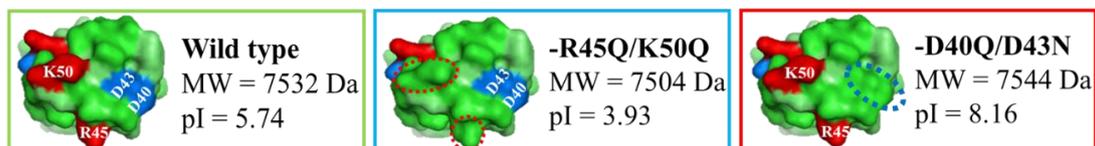


Fig. 4-8 野生型 HFBI と遺伝子改変した HFBI (左) 野生型 HFBI (中) 正電荷のアミノ酸を中性のアミノ酸に変えた HFBI (右) 負電荷のアミノ酸を中性のアミノ酸に変えた HFBI

電極上に修飾させる分子の電荷を制御することでその電極の特性を向上させる研究は過去に数多く報告されている¹¹³⁻¹¹⁵。本研究でもこれらの改変型 HFBI を用いることで電極上の電荷を制御し、レドックス分子との静電的相互作用の影響を調べ、電極としての特性向上を目指した。

4-4-2 それぞれの HFBI 自己組織化膜の構造解析

まず、遺伝子改変したことで HFBI の自己組織化構造に影響がないかを調べた。2-4-1で行ったときと同条件でそれぞれの HFBI 自己組織化膜の AFM 解析を行った。

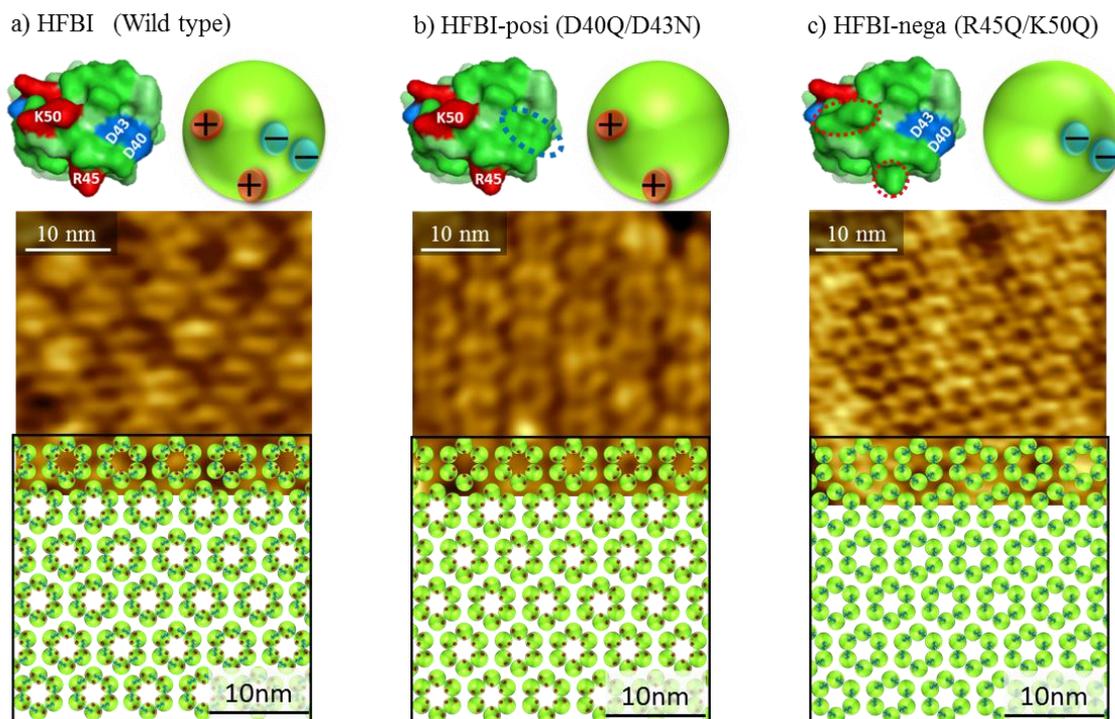


Fig. 4-9 野生型 HFBI と改変型 HFBI それぞれの自己組織化膜の AFM による構造解析

結果、Fig. 4-9 に示すように遺伝子改変した HFBI も野生型の HFBI と同様の自己組織化構造を有していることが明らかとなった。ゆえに今後の電気化学測定には構造の影響はないものとして進めていく。

4-4-3 電気化学測定

ポイントミュレーションで改変した HFBI と野生型 HFBI それぞれで HOPG 電極を被覆し、その電極特性を電気化学インピーダンス測定で調べた。レドックス分子には、負電荷を有するレドックス分子としてフェリシアン化カリウム ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$)、正電荷を有するレドックス分子としてヘキサアンミンルテニウム ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$) を用いた。それぞれ 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 25 mM の濃度で調製して使用した。装置は 4-2 と同様にポテンショスタットを用い、3 電極系での測定を行った。電気化学インピーダンスの測定条件は、フェリシアン化カリウムのはきは 100 kHz-10 mHz、ヘキサアンミンルテニウムのはきは 100 kHz-100 mHz で行い、振幅はどちらも 10 mV で行った。

Fig. 4-10 に電気化学インピーダンスの結果を示す。

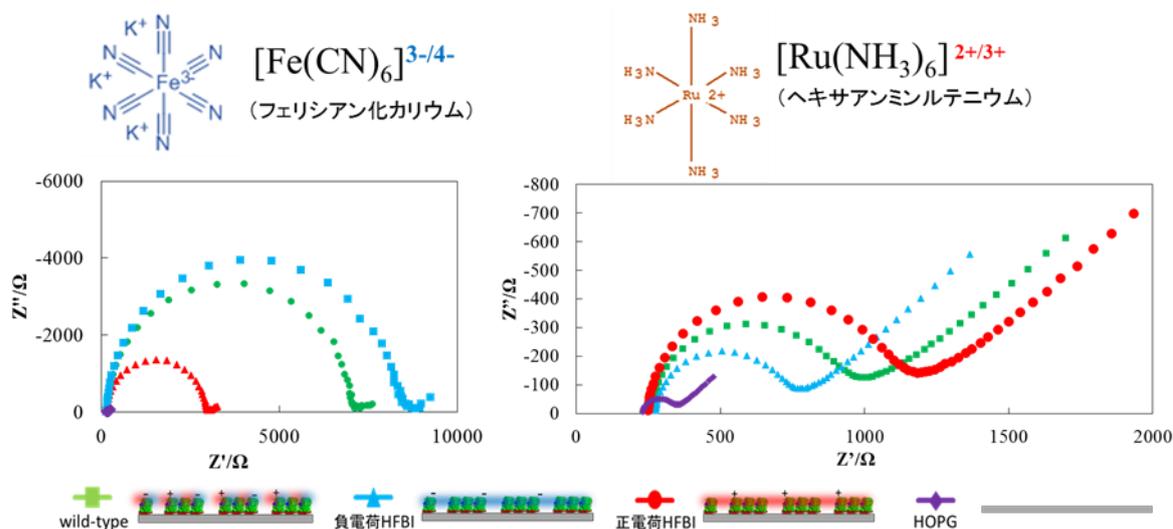


Fig. 4-10 電気化学インピーダンス測定による、遺伝子改変した HFBI の自己組織化膜で被覆した電極と酸化還元分子との相互作用 (紫) 高配向性熱分解黒鉛(HOPG)電極 (赤) 正電荷の HFBI で被覆した電極 (緑) 野生型 HFBI で被覆した電極 (青) 負電荷の HFBI で被覆した電極 (左のグラフ) 負電荷の酸化還元分子を用いた結果 (右のグラフ) 正電荷の酸化還元分子を用いた結果

電気化学インピーダンス測定で得られたデータを横軸にインピーダンスの実部を、縦軸にインピーダンスの虚部を取りプロットした。描かれた半円は電荷移動抵抗 R_{ct} と電気二重層容量 C_{dl} の積による時定数 RC の容量性半円である。低周波数極限では容量を流れる電流はゼロになるため、半円の直径が電荷移動抵抗値に相当する。すなわち、半円の大きさが大きいほど抵抗が高いことを示している¹¹⁶。負電荷のレドックス分子であるフェリシアン化カリウムを用いたときは、負電荷の HFBI 自己組織化膜 (青い三角のプロット) で被覆した電極が最も電荷移動抵抗値が高く、正電荷の HFBI 自己組織化膜 (赤い丸のプロット) で被覆した電極が最も電荷移動抵抗値が低いことを示した。正電荷のレドックス分子であるヘキサアンミンルテニウムを用いたときは、先ほどとは反対に正電荷の HFBI で被覆した電極が最も電荷移動抵抗値が高く、負電荷の HFBI で被覆した電極が最も電荷移動抵抗値低くなることを示した。すなわち、用いるレドックス分子の電荷に応じて電極表面の電荷を選択することで電極特性を向上させ得ることを示唆した。

4-5 GOx-HFBI を用いた酵素電極反応の測定

グルコースオキシダーゼ (GOx) と HFBI を融合した分子 (GOx-HFBI) を用いた電気化学実験を行う。

4-5-1 GOx-HFBI の培養と精製

疎水的なタンパク質は大腸菌発現系では凝集するために発現・精製が難しいことが知られている。そのため GOx-HFBI を発現させるためには、より高度な発現機能を持つ宿主を選択する必要がある。近年、疎水性の高い Elastin-like peptide (ELP) と Zeta protein (プロリンが多いタンパク質) を融合したタンパク質を植物の葉で発現させることで、著しく発現効率を向上させることに成功したという報告がある^{117,118}。これらの融合タンパク質は、分類学上は異なる小胞体において、タンパク質の形成を誘導する¹¹⁹⁻¹²¹。この性質によってタンパク質が細胞内に遺伝子組み換えタンパク質を安定して貯蔵することができる。2010年に Jussi らが HFBI に蛍光タンパク質である Green fluorescent protein (GFP) を融合したタンパク質をタバコの葉で発現することに成功している¹²²。ゆえに GOx-HFBI もタバコの葉を用いた発現を行った。

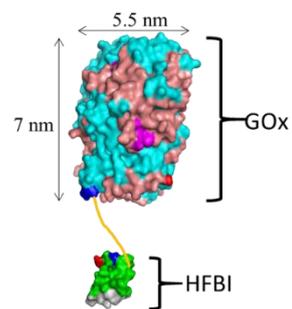


Fig. 4-11 GOx-HFBI の分子モデル

GOx-HFBI を発現させる情報を持つプラスミド pMiL001 を Agrobacterium EHA105 に導入した。導入法は Electroporation で行った。

○Preparation

Rifampicin 2mg/mL と Kanamycin 20mg/mL を混合して LB(-)プレート×2枚に 100μL ずつまいた。SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression)培地の組成を以下に示す。

SOC 培地	
NaCl	0.1g
Trypton	4g
East extract	1g
1M KCl	0.5mL (終濃度 2.5mM)
1M MgCl ₂	2mL (終濃度 10mM)
1M MgSO ₄	2mL (終濃度 10mM)
1M Glucose	4mL (終濃度 20mM)
5N NaOH	
milliQ	200mL

○Electroporation

0.2cm キュベット、Agrobacterium のコンピテントセル、pMiL001 を水中に準備する。Gene パルス装置の設定を 25 μ F、200 Ω 、2.5kV に合わせた。

Agrobacterium のコンピテントセルと pMiL001 をキュベット内に混合して電気穿孔を行った。すぐに SOC 培地を加え、28 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。

○Incubation

用意した (Rif⁺、Km⁺) プレートにエレクトロポレーションした Agrobacterium を 50 μ L、もう 1 枚のプレートに p19 (二本鎖 RNA の分解抑制：トンプウイルス由来) を播種し、28 $^{\circ}$ C、2days 培養した。

得られたコロニーを LB(Rif⁺,Km⁺)培地で 28 $^{\circ}$ C、1day 培養した後、4,000rpm、4 $^{\circ}$ C、15min 遠視分離した。

○Infiltration

得られた菌体は Resuspension buffer (10mM MES buffer、10mM MgSO₄、pH5.6) で溶解し、それぞれ OD₆₀₀ = 0.7 となるように調製した。調製した菌液を 1:1 で混合し、5-6 週間育成したタバコの葉 (N. benthamiana plants) にインフィルトレーションした。その後、約 1 週間生育を続けることで目的のタンパク質を発現させた。

発現したタンパク質は二層分離精製法により精製を行った¹²³。タンパク質を発現した葉を液体窒素で凍結させたものと葉の重さの 6 倍量の 1 \times PBS(-) (pH 7.4) をミキサーに入れ、粉碎した。粉碎後の余分な葉を濾した後、18,000g、20min 遠心した。上清を分液ロートに入れ、全量の 4% 量の Agrimul NRE 1205 (Cognis) 界面活性剤を加えて静かに混ぜた。その後、22 $^{\circ}$ C で静置し、Over night。上相の Agrimul のみを抽出し、加えた Agrimul の 10 倍量の Isobutanol と 0.35 倍量の PBS を加えて 22 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。22 $^{\circ}$ C、4,000rpm、5min 遠心して、下相のみを抽出した。得られた溶液を Econo Pac カラムで精製し、目的のタンパク質 GOx-HFBI を得た。得られたサンプルは SDS-PAGE により確認を行った (Fig. 4-12)。GOx-HFBI の分子量である 92 kDa 付近に単一バンドが確認されたことから、これまでに報告されている HFB 融合タンパク質の精製効率と同等の精製ができていることを示している¹²⁴。

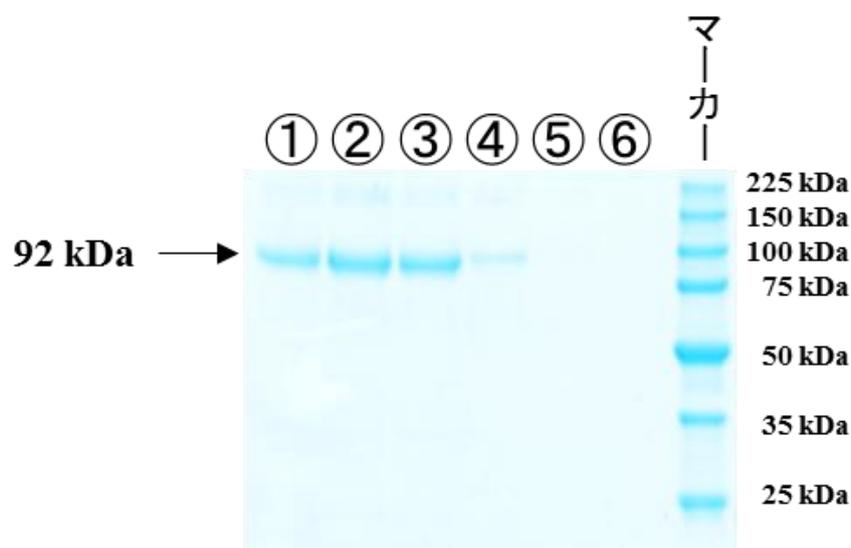


Fig. 4-12 GOx-HFBI (92 kDa) 精製の SDS-PAGE による確認 ①～⑥：溶出画
分サンプル

4-5-2 GOx-HFBI の電気化学測定

二層分離精製法で得られた GOx-HFBI は先行研究にて高い活性を有することを明らかにしている⁵⁸。この酵素活性を電気化学的なデータで得ることができれば、バイオセンサやバイオバッテリーなどへの応用が期待できる。

GOx は HFBI と比べてサイズが大きいため、GOx-HFBI のみを電極上に被覆しても精密な自己組織化はできない。GOx のサイズは HFBI⁹ 十分と同等であるため、GOx-HFBI と HFBI を 1:9 の割合で混合し、自己組織化したものを HOPG 電極上に被覆した。この電極を作用極とし、三電極系で電解液に 25mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ を含む 100mM Phosphate buffer (pH 7.0) を用いて CV 測定を行った。溶液は Ar 置換を行った。さらに基質として Glucose を 1%、2%、3% 濃度でそれぞれ加えて酵素反応測定を行った。

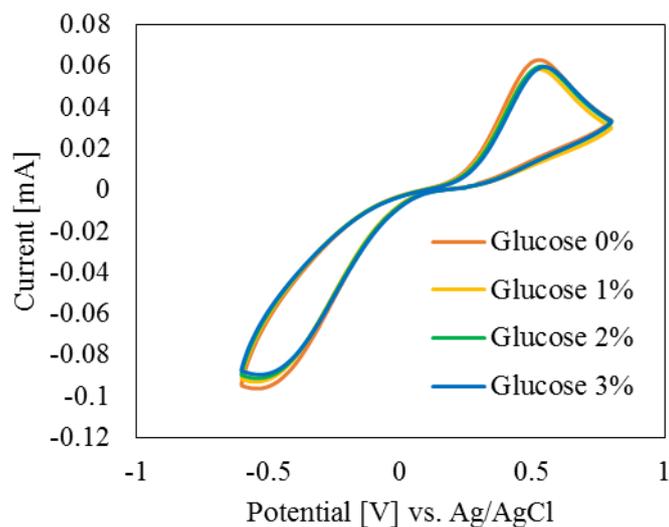


Fig. 4-13 GOx-HFBI と HFBI を 1:9 の割合で自己組織化させた HOPG 電極の酵素電極反応

結果、基質に対しての酵素反応のシグナルを電極で受け取ることができなかった。 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ をメディエータとして用い、酵素反応の電子を電極に伝える系であったが、その電子伝達がうまく機能していなかったものとする。

4-5-3 フェロセンをメディエータとした電気化学測定

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ は遊離したメディエータであるため、酵素反応で生じた電子を電極に運ぶ効率が悪いと考えられる。ゆえにタンパク質にメディエータを固定した系で実験を行う。フェロセンカルボン酸-N-スクシンイミジルをメディエータとして用いた。実験系のイメージ図は Fig. 4-14 に示すように、酵素反応で生じた電子がタンパク質に固定されたフェロセンを伝って電極に移動するものである。

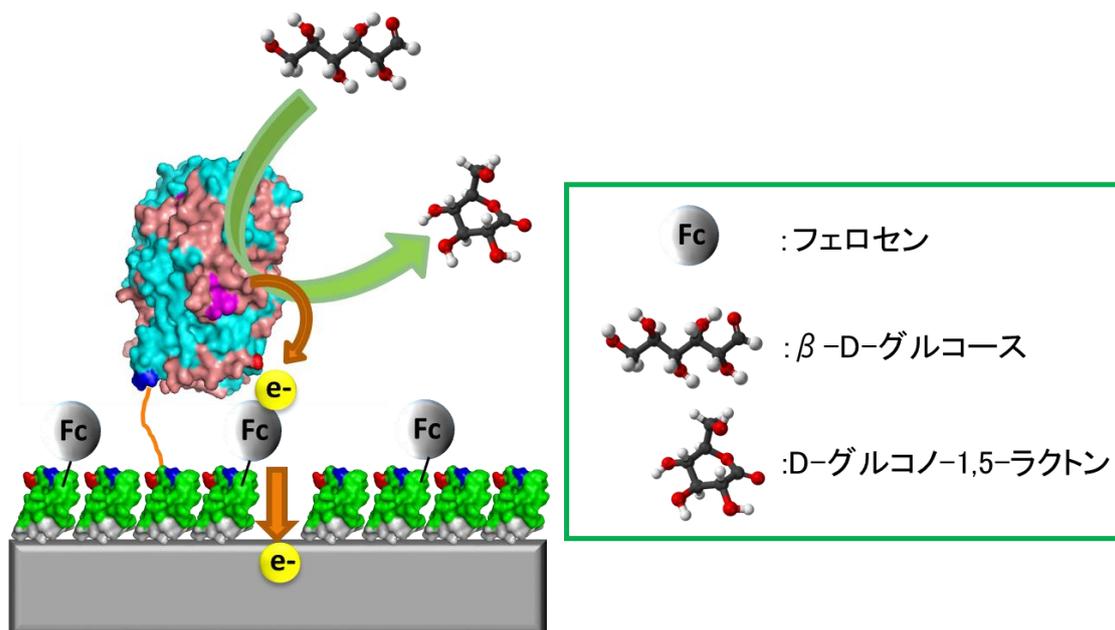


Fig. 4-14 固定型メディエータフェロセンを修飾した GOx-HFBI 酵素反応の電極上における電子伝達イメージ図

フェロセンカルボン酸-N-スクシンイミジル 8.0 mg を DMSO 1 mL に溶かし、それを 0.1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.3) で 50 倍希釈した。HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 基板をこの溶液中に浸し 24 時間反応させた。反応はタンパク質のアミノ基に反応し、スクシンイミド基と置換反応するものである。反応後、十分に wash し、その電極で CV 測定を行った。電解質は 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0) を用いた。

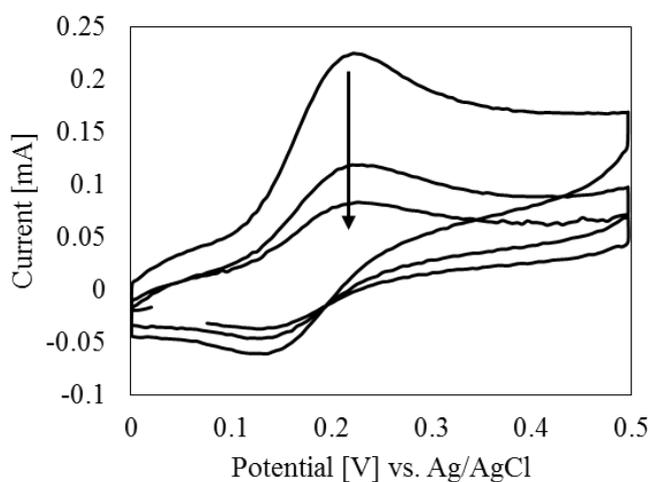


Fig. 4-15 フェロセンで修飾した HFBI 電極のサイクリックボルタモグラム 1 ~ 3 サイクル 50 mV/sec

メディエータとしてフェロセンを修飾した HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極は、初めは高い酸化還元応答を示したが、サイクル数を重ねるにつれて著しく減少した。この原因は初めのサイクルは修飾したフェロセンが持つ電子を基板に渡すことで電流応答を示したが、その後再びフェロセンへ電子が渡される量が少なく、2 サイクル目以降は電流応答が減少したものとする。その他、CV 測定や何らかの影響によりフェロセンが分解していることも考えられるが、フェロセンは極めて安定な錯体構造を有しているため、今回の系で分解することは考えにくい。

次に電極を Pt にして同様の実験を行った。HOPG はグラフェンが層上に重なったものであるが、グラフェンの電気化学特性は非常に特殊でグラフェン中の電気伝導に直接関わる π 軌道は、励起子効果やアンダーソン直交性崩壊など多体効果を受けやすく、炭素原子を結びつける骨格である σ 軌道は多体効果を受けにくいなどの特徴を持つ¹²⁵。このようか効果が電極特性の阻害になっている可能性があるため、シンプルに金属電極で Pt 電極を用いた。Pt ディスク電極上に GOx-HFBI と HFBI を 1:9 の割合で自己組織化させ、そこにフェロセンを修飾した。1 mM Acetate buffer (pH 5.0) に Glucose を 0.1 %、0.2 %、2.2 % の濃度でそれぞれ調製し、CV 測定を行った。

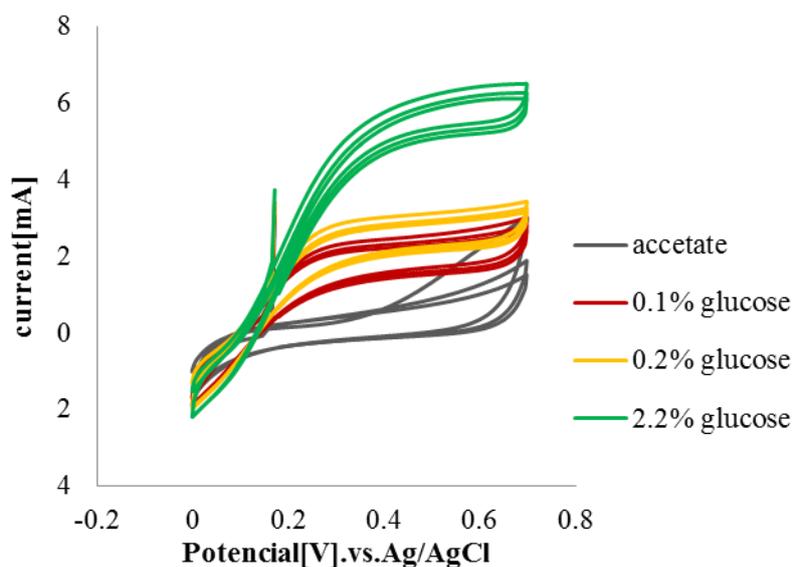


Fig. 4-16 Pt 上にフェロセンで修飾した GOx-HFBI&HFBI の自己組織化膜で被覆した電極のサイクリックボルタモグラム それぞれ 1 ~ 3 サイクルを示す 50 mV/sec (グレー) 0 % glucose、(レッド) 0.1 % glucose、(イエロー) 0.2 % glucose、(グリーン) 2.2 % glucose をそれぞれ 1 mM Acetate buffer (pH 5.0) に溶解した液

Glucose の濃度が上昇するにつれて酸化電流が上昇していることが確認できる。つまり酵素反応による電子を基板で受け取ることに成功したと考えられる。

4-6 結論

HFBI 自己組織化膜を分子機能電極として応用することを目的として、HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の電気化学特性を調べた。HFBI タンパク質で電極上に被覆しているにもかかわらず、電流応答を示した。これは HFBI 自己組織化膜が精密な構造を有しているために、規則的に存在する孔部を利用して電気化学反応が起きているためであると考察した。また、電極としての特性をさらに向上させるために、HFBI の表面にある荷電アミノ酸に着目した。HFBI が持つ荷電アミノ酸を遺伝子改変し、正電荷もしくは負電荷に偏った HFBI 分子を作製した。これらのタンパク質でそれぞれ被覆した電極を用い、レドックス分子も異なる電荷を持つ 2 種類を用いて電気化学インピーダンス測定を行った。その結果、静電相互作用と示唆される結果が得られたため、状況に応じて電極表面の HFBI 自己組織化膜を選択することによって分子機能電極としての特性を向上し得ることを明らかにした。

次にグルコースオキシダーゼを修飾した HFBI を用いて酵素電極反応の測定を行った。HFBI と GOx-HFBI を混合し、自己組織化したものを HOPG 電極上に被覆し、Glucose を含む溶液を入れて CV 測定を行ったが、酵素反応を電気化学的に捉えることはできなかった。遊離したメディエータでは生成した電子を基板に受け渡すことができないのではないかと考え、フェロセンをタンパク質に修飾した固定型のメディエータで CV 測定を行った。初めのサイクルでは電流応答を示したが、サイクルを重ねるにつれて電流値が著しく減少した。HOPG の電気化学的に特殊な性質が阻害の原因の一つであると考え、電極を Pt に変えて行った。すると Glucose の添加量に伴って酸化電流が上昇したことから酵素反応を電気化学的に測定することに成功したと考える。

以上の結果から、HFBI 自己組織化膜を分子キャリアとして用いることで酵素などの機能分子の機能を高効率に発揮させることができ、分子機能電極として有用であることを示した。

Reference

103. R.S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964)
104. P. Zanello, "Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application" The Royal Society of Chemistry (2003)
105. Crouch, Stanley R and Skoog, Douglas A: "Principles of instrumental analysis" Cengage Learning (2006)
106. Joseph Wang, *Analytical Electrochemistry*, VCH Publishers (1994)
107. Carmody, *J. Chem. Ed.* **38**, 559 (1961)
108. Britton and Robinson, *J. Chem. Soc.* **458** (1931)
109. Britton and Robinson, *J. Chem. Soc.* **1456** (1931)
110. Zefang W., Michael L., Mingqiang Q., Markus B. L., Mechanisms of Protein Adhesion on Surface Films of Hydrophobin, *Langmuir* **26**(11), 8491-8496 (2010)
111. Johanna H., Arja P., Sanna A., Tiina N. S., Tarja P., Merja P., Markus B. L., Juha R., Atomic Resolution Structure of the HFBI Hydrophobin, a Self-assembling Amphiphile, *The Journal of biological chemistry*, **279**(1), 534-539 (2004)
112. Michael L., Mathias S. G., Arja P., Matti S., Markus B. L., Charge-Based Engineering of Hydrophobin HFBI: Effect on Interfacial Assembly and Interactions, *Biomacromolecules* **16**(4), 1283–1292 (2015)
113. V. Pardo-Yissar, E. Katz, O. Lioubashevski, I. Willner, Layered polyelectrolyte films on Au electrodes: Characterization of electron-transfer features at the charged polymer interface and application for selective redox reactions, *Langmuir* **17**, 1110–1118 (2001)
114. N. Wei, J. Chen, J. Zhang, K. Wang, X. Xu, J. Lin, G. Li, X. Lin, Y. Chen, An electrochemical biosensor for detection of PML/RARA fusion gene using capture probe covalently immobilized onto poly-calcon carboxylic acid modified glassy carbon electrode, *Talanta*, **78**, 1227–1234 (2009)
115. W. Marmisolle, D. Capdevila, E. de la Llave, F. Williams, D. Murgida, Self-assembled monolayers of NH₂-terminated thiolates: Order, pK(a), and specific adsorption, *Langmuir* **29**, 5351–5359 (2013)
116. Itagaki Masayuki、電気化学インピーダンス法—原理・測定・解析—、丸善出版株式会社、3–6 (2011)

117. Patel J, *et al.*, Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res* **16**, 239–249 (2007)
118. Conley AJ, *et al.*, Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions. *BMC Biology* **7**, 8(2009)
119. Floss DM, *et al.*, Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnol Journal* **6**, 379–391 (2008)
120. Conley AJ, *et al.*, Plant recombinant erythropoietin attenuates tissue injury in a kidney cell model. *Plant Biotechnol Journal* **7** 183–199 (2009)
121. Torrent M, *et al.*, Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC Biology* **7** 5(2009)
122. Jussi J. Joensuu, *et al.*, Hydrophobin Fusions for High-Level Transient Protein Expression and Purification in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Physiology*. **152**, 622-633 (2010)
123. Linder, M.; Selber, K.; Nakari-Setälä, T.; Qiao, M.; Kula, M.; Penttilä, M. The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules* **2**, 511-517 (2001)
124. Josefine Persson, Lena Nyström, Hans Ageland, Folke Tjerneld, Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: recycling of thermoseparating polymer and surfactant with temperature-induced phase separation. *Biotechnol Bioeng* **65**, 371–381
125. Fukidome, H., Kotsugi, M., Nagashio, K. Sato, R., Ohkochi, T., Itoh, T., Toriumi, A., Suemitsu, M., Kinoshita, T., Orbital-specific Tunability of Many-Body Effects in Bilayer Graphene by Gate Bias and Metal Contact, *Scientific Reports* **4**, (2014) doi:10.1038/srep03713

第 5 章

HFBI 自己組織化膜をテンプレート とした微小金属結晶の構築

5 章. HFBI 自己組織化膜をテンプレートとした微小金属結晶の構築

5-1 背景

ナノサイズの金属粒子や半導体はマクロのものとは異なる特殊な電子的^{126,127}、光学的¹²⁸⁻¹³¹、触媒的^{132,133}特性を有する。ナノサイズの結晶は量子ドットと言い、マクロな金属結晶では自由に移動することができる電子も、量子ドットでは電子が閉じこもっている状態になる。この状態の電子は粒子と波の2つの性質を持つため、量子ドットの電子を変えられるようにゲート電極をつけて制御することで電子はトンネル効果により壁を透過して移動することができる。単電子デバイス（電子1個の動きを操ることのできるデバイス）はこのような原理を用いており、量子ドットの中の電子の数を1個単位で制御することができる。1987年にFultonらが初めて単電子トランジスタを作製し¹³⁴、それ以降単電子トンネリングの研究が盛んに行われてきた。現在のシリコン大規模集積回路で使用されている金属酸化膜半導体電界効果トランジスタ（MOSFET）のチャネルには数万個の電子が誘起されているのに対し、単電子デバイスでは1個の電子しか誘起されないため消費電力を大幅に削減することができる。単電子トランジスタは小さく作るほど量子サイズ効果を発揮しやすく、安定に動作する。

しかし、現在行われているフォトリソグラフィ法を用いた半導体作製プロセスでは作製される配線の線幅は30 nmが限界であり、これ以下のサイズで作製するのは用いる光の波長の限界により極めて困難とされている。この限界を超えるために、最近では生体材料を利用した研究が行われている。生体材料を用いたトランジスタの開発^{135,136}、酸化還元酵素の生体電気触媒的機能を一分子レベルで分析する技術¹³⁷などがある。これらの研究はまだ発展段階であるが、こうした生体材料の優れた特性をエレクトロニクスとして利用する技術は今後有用であり、新規な特性と機能を示す新しい世代のデバイス¹³⁸⁻¹⁴²と材料¹⁴³⁻¹⁴⁵が期待できる。

5-2 目的

HFBI 自己組織化膜をテンプレートとして用いる。第2章で明らかにしたように、HFBIは非常に精密な自己組織化構造を有する。HFBIはその分子サイズが約2 nmであることから、規則的に約2 nmサイズの孔が存在する。この孔部に金属を析出させた後、HFBIタンパク質のみ除去することで、約2 nmの微小ナノ金属結晶を精密かつ高密度に形成することが可能である。析出させる金属には多くの金属種が選択可能と考えられるが、今回の研究では最も析出させやすい金属、また汎用性の富んだ金属というこ

とで Cu を選択した。Cu の高密度なナノ金属結晶析出が可能であれば、上述したような単電子デバイスだけではなく、CO₂還元触媒としても応用が期待できる。

5-3 実験手順の概要と溶液調製

HFBI 自己組織化膜で電極表面を被覆し、その電極を電解還元して金属結晶を形成する。その後、HFBI のみ除去した電極表面を AFM 等で観察することで確認する。このような手順で実験を行った。

HFBI 溶液はこれまでと同様に 15 μ M の濃度で 1 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解したものを用いた。Cu 溶液は CuSO₄ を 50 mM KNO₃ 溶液に 50 mM の濃度で溶解したものを用いた。

5-4 基板の選択と作製

この研究で使用する基板の条件として、ナノサイズのタンパク質、金属を扱うことから、1. 原子レベルでフラットな基板表面をもつこと。電解析出で基板表面に金属を析出させるため、2. 導電性を持つ基板であること。を満たす必要がある。これら 2 つの条件を満たす基板として、HOPG 電極と単結晶 Au(111)電極を選択した。

HOPG は前章でも用いた基板であるが、グラフェンが何層も重なったような構造であるため、スコッチテープで劈開することで上の層を剥離し、原子レベルでフラットなグラフェン層が露出する。

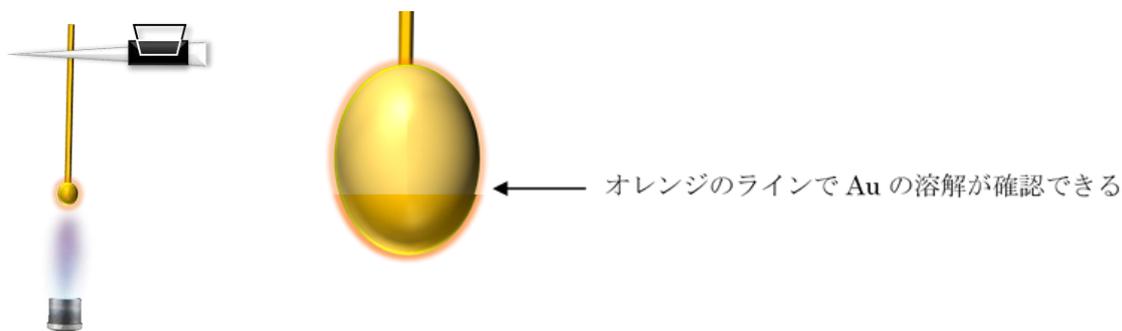
単結晶 Au(111)電極の作製法を以下、詳細に記す。

Au 玉作成

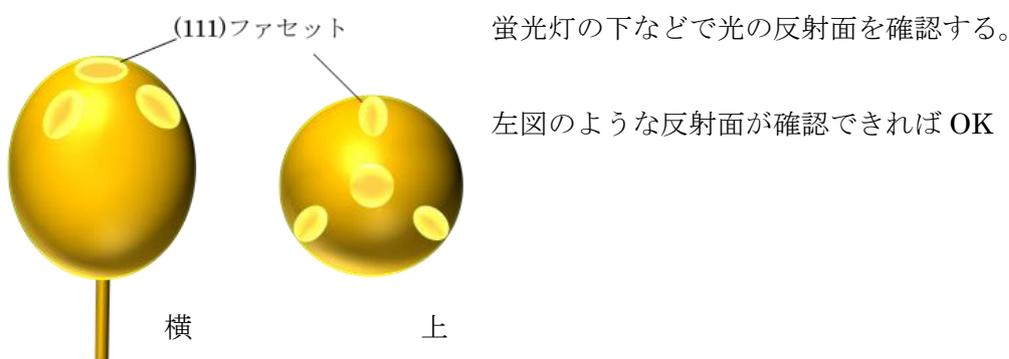
- ϕ 0.8mm Au 線を 6cm の長さに切る。
- ビーカーに入れて Au 線全体が浸るまでアセトンを入れて、超音波洗浄。(28kHz、30min)
- 王水を 200mL のビンに 150mL 程度調製しておき、湯浴で温める。
- 洗浄した Au 線を湯浴した王水に 30sec 浸す。(Au 線の 2/3 くらい)
- 王水に浸した Au 線をアセトンで洗い流す。
- 王水に浸したところに触れないようにバーナー用のピンセットに付け替える。



- 水素&酸素バーナーで下から燃やし、Auの玉を作っていく。



- ある程度の大きさまで出来たら (ca. $\phi 3\text{ mm}$) (111)ファセットが出来ているかの確認。

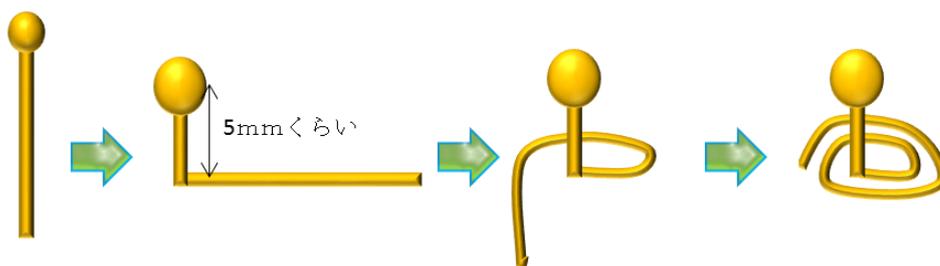


気泡抜き

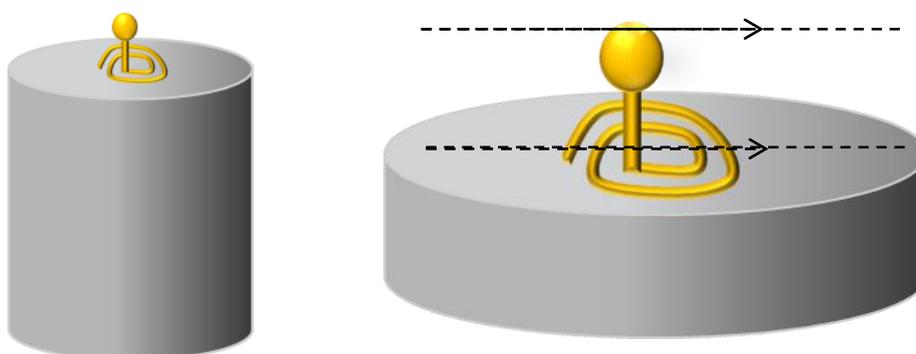
- もう一度火に戻す。
- 下からオレンジのラインが上昇していき、下から $2/3$ のところまで来たら少し火から遠ざける。オレンジのラインが下がっていき、下まで行ききる前にまた火に近づける。(このときにAu線の根元までオレンジのラインが来てしまうと、せっかく形成した結晶面が変わってしまうので注意すること。)
- これを20分くり返し行う。
- 20分後、オレンジのラインが下から $2/3$ のところで維持する。(5分)
- 5分後、さらに5分かけてゆっくりと火から遠ざける。
- 下までオレンジのラインが来たところで止めて、2分ほど底をあぶる。
- ファセットが崩れていないかを再度確認する。

樹脂で固める

- 作成したAu線を下図のように折り曲げていく。(Au線は触れないようにピンセットで!)

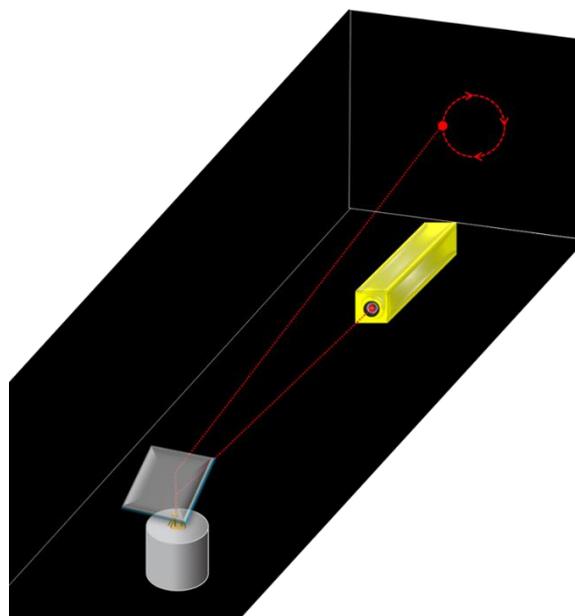


- サンプル台にセットし、上面のファセットと台が水平になるように調節する。
- 接着剤をつけて、中央に配置する。



- レーザーで正確にファセットを水平に合わせる。

サンプル台を回転させて、He-Ne レーザーの反射光が一点をさし続けることが理想。



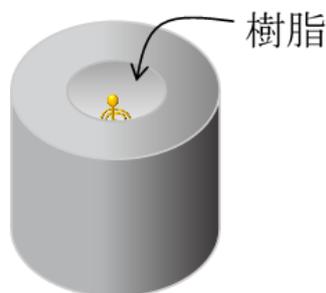
- サンプル台の穴の内側にグリースを塗る。
- 再度、内側の棒を差し込み、少し引っ込ませたところで固定する。

- 内側のくぼんだところに樹脂を流し込む。

メタクリル酸樹脂

液：7.5 ml

粉：大さじ 1.5 杯



- 一晩放置して、完全に固まらせる。

研磨

- 固まったら研磨する。
- 研磨紙のサイズを 100→400→1000→2000 の順で小さくし、削っていく。
100 で Au 玉の 40% くらいまで削る。400 で 45% くらいまで削る。1000 で荒い傷を目立たなくし、2000 で出来るだけ平滑になるよう磨く。
- アルミナ研磨を行う。
- アルミナ粒子サイズを 3.0→1.0→0.1 μm の順に小さくしていく。
3.0 で鏡面になるまで。1.0 で 5 分くらい。0.1 で 2 分くらい磨く。
- 水で洗い流し、最後に水研磨を行う。(1 min)

アニーリング

- 樹脂をサンプル台から取り外し、アセトンに浸して樹脂を溶かしていく。(Over Night)
- ファセット部以外はソニケーションかけるなどして、樹脂を完全に取り除く。
- Au 線をるつぼに入れて、電気炉で 950 °C、12 hour アニールする。

以上の工程で単結晶 Au(111)電極が完成する¹⁴⁶⁻¹⁴⁸。作製した電極が(111)の結晶面を露出しているのかを、サイクリックボルタンメトリーで確認した。0.05 mM H₂SO₄ 溶液を Ar 置換し、3 電極系 (CE: Pt、RE: RHE、WE: Au(111))、走査範囲を -0.1 V ~ +1.25 V (vs. RHE)、-0.1 V ~ +1.8 V (vs. RHE)、走査速度：50m V/sec で測定を行った。測定するときは、気相側を常に Ar を通気した状態を保ち、Fig. 5-1 に示すように Au 電極を液面につけて、少し引き上げ、メニスカスを作ることで(111)のみが測定対象になるようにセットした。

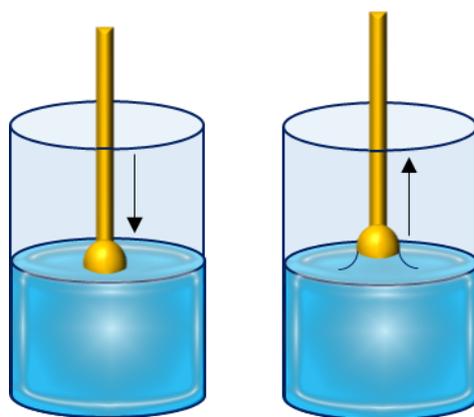


Fig. 5-1 Au(111)電極の電気化学測定時の模式図

結果を Fig. 5-2 に示す。赤のプロットで示した非ファラデー電流領域の 1 V 付近に酸化と還元のスパイク波が確認できる。このスパイク波は Au(111)に特有のシグナルであるため¹⁴⁸、作製した電極は(111)を露出した電極であることが確認できた。

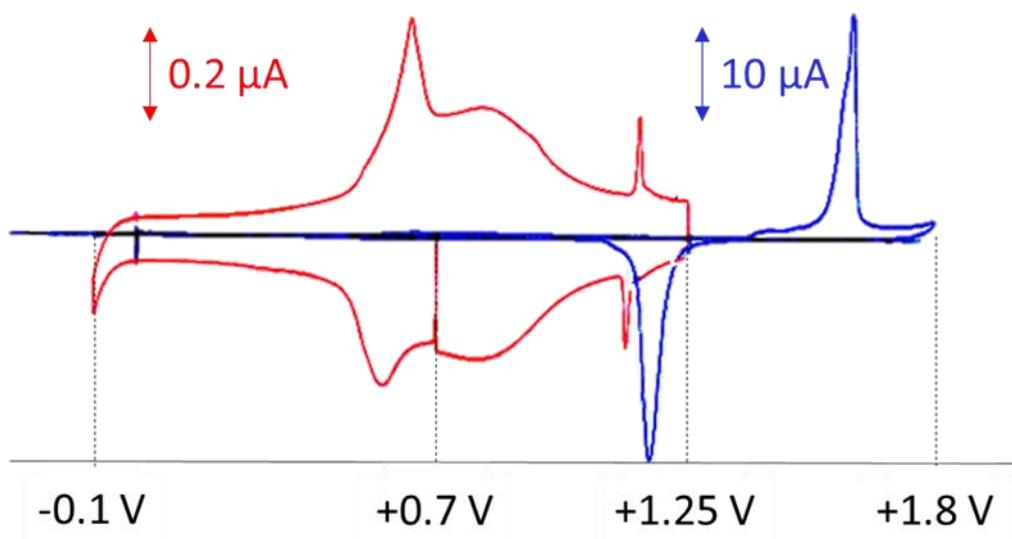


Fig. 5-2 Au(111)電極のサイクリックボルタモグラム

5-5 電極表面の AFM 観察

HOPG 電極と単結晶 Au(111)電極の表面が原子レベルでフラットであることを示すために、AFM 測定を行った。

Fig. 5-3 に示すようにイメージ中に見られる段差は 1 原子レベルの段差しかないことから、どちらの電極も極めて平坦であることが明らかとなった。ゆえに、初めに条件と

して挙げた平坦性かつ導電性を共にクリアしたことから、これらの電極を用いて実験を行った。

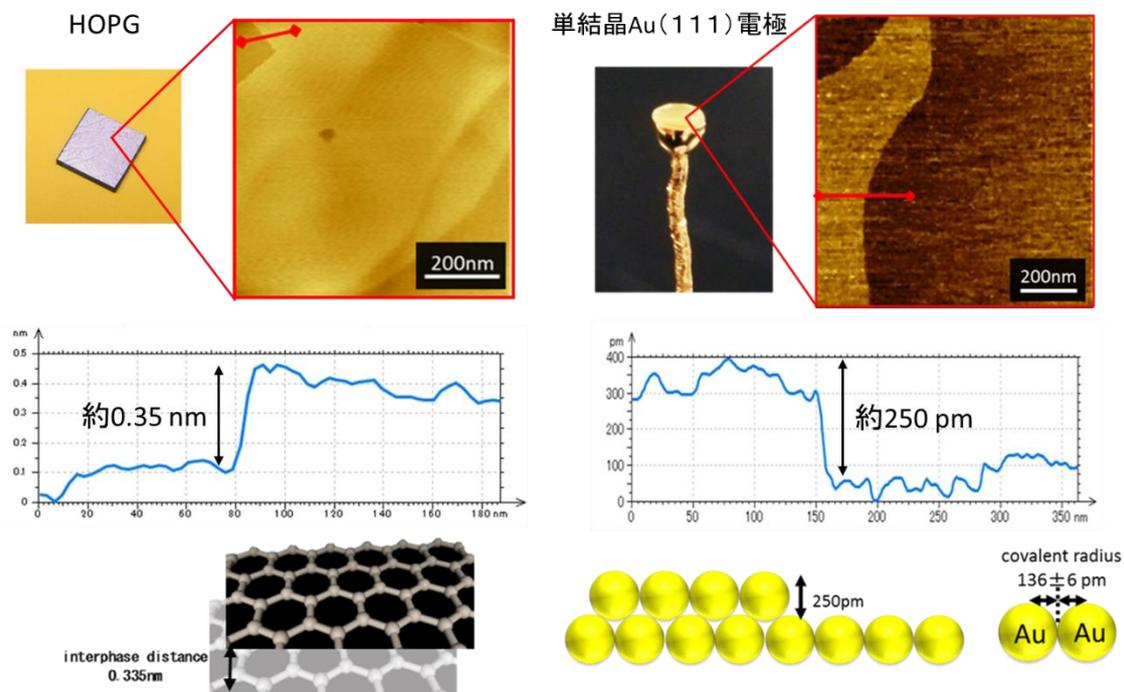


Fig. 5-3 HOPG 電極と Au(111)電極の AFM 観察

5-6 HFBI 自己組織化膜で被覆した電極の AFM 観察

本研究に適した 2 つの電極にそれぞれ HFBI 自己組織化膜を被覆し、AFM 観察を行った。観察条件は第 2 章で測定したときと同条件で行った。

HOPG 上に被覆した HFBI 自己組織化膜は第 2 章で明らかにしたように非常に精密なハニカム様の構造であった。単結晶 Au(111)電極上に被覆した HFBI 自己組織化膜はライン状に並んだ構造であることが明らかとなった (Fig. 5-4)。HFBI 自己組織化膜は気液界面上ではおそらくハニカム様の構造であると考えられる。HOPG は疎水性であるため、気液界面に形成した自己組織化膜は転写する際に疎水性相互作用でしっかりと吸着し、そのままの構造を維持している。単結晶 Au(111)は HOPG と比べて親水的であるため、HFBI 自己組織化膜との相互作用力が小さく、単結晶 Au(111)表面に合った構造に再配置されたものと考えられる。Au(111)表面は、最密面が積み重なったバルク結晶上に、縮んだ最密面が載るが、表面層とバルク結晶層間の歪みエネルギーを緩和するために、ミスフィット転位が配列した構造をとる。室温～約 700°C の温度範囲では、刃状ミスフィット転位が周期配列し、表面層は転位線に垂直な一次元方向に縮んだ構造となる。周

期は約 6.3 nm であり、 p 倍構造（あるいは $\sqrt{3} \times p$ 構造）と呼ばれる^{149,150}。AFM の結果を見るとストライプ状に並んだ HFBI の分子間距離は約 6.7 nm であることからミスフィット転移による周期間隔とほぼ一致している。この結果から目的として挙げた HFBI 自己組織化膜をテンプレートとして用いる技術に単結晶 Au(111)電極は不向きであることが分かった。ゆえに今後は HOPG 電極を用いて実験を行った。

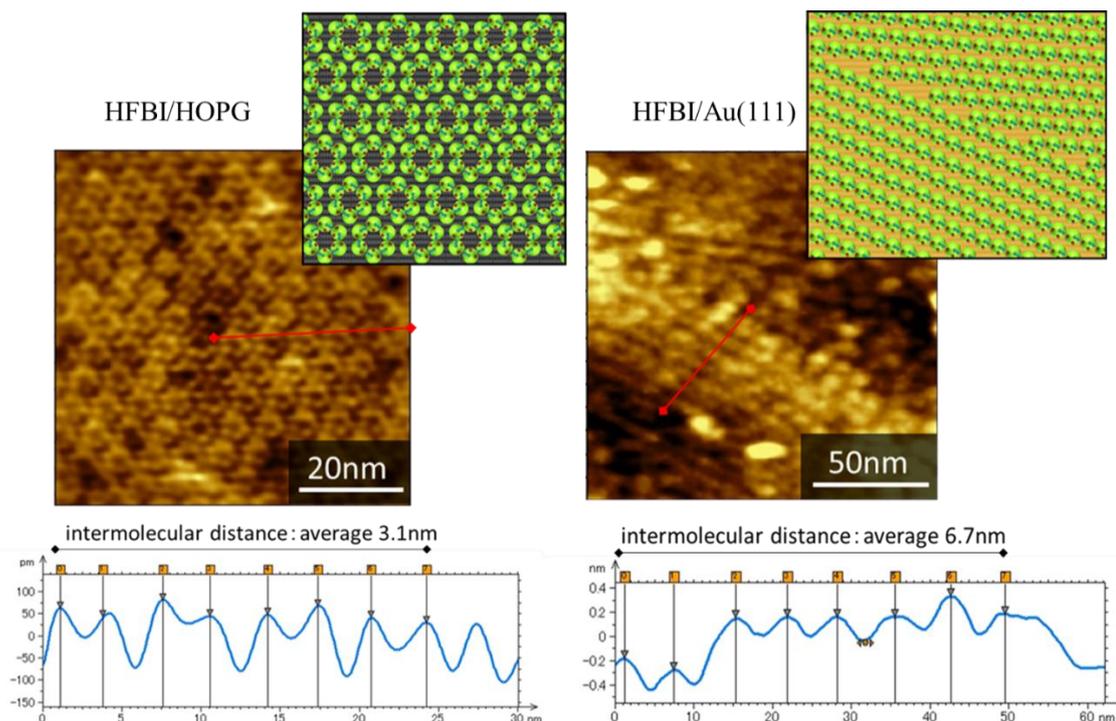


Fig. 5-4 HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極（左）と Au(111)電極（右）の AFM 観察

5-7 電極上に被覆した HFBI の除去法の検討

HFBI 自己組織化膜をテンプレートとして金属を析出した後、HFBI のみ除去することで金属ナノ結晶を形成することが目的である。ゆえにまずは HOPG 上に被覆した HFBI の除去法を検討した。HFBI と HOPG は疎水性相互作用で吸着していると考えられる。HFBI はタンパク質であるため、変性させて取り除くことを検討した。

まずエタノール中に 5 min 浸した。少し取れた程度で完全に除去することはできなかった (Fig. 5-5a)。次に 160 °C で 30 min 熱した後にエタノール中に 5 min 浸した。HFBI は除去できたようだが、熱の影響によるものか、基板表面を荒らしている結果となった (Fig. 5-5b)。タンパク質を変性させることができればよいので、グアニジン塩

酸塩を用いた。グアニジン塩酸塩はタンパク質の変性剤として用いられる。8 M の濃度で 5 min 浸した。その後 milliQ で洗浄し、表面を観察した。変性はしたが、それらが凝集し、基板に残ってしまったものと思われる (Fig. 5-5c)。酸 (5 M 塩酸)・塩基 (2 M 水酸化ナトリウム) 中に浸しても完全に除去することはできなかった (Fig. 5-5d, e)。酸を用いると、析出させた金属が溶解してしまう恐れがあるため、2 M 水酸化ナトリウム溶液で浸した後、エタノール処理を行った。2 M NaOH 2 min → milliQ 洗浄 → エタノール浸漬 5 min → milliQ 洗浄した結果、ほとんどきれいに除去することができた (Fig. 5-5f)。これらの他にも界面活性剤 (Tween20、SDS) を試したが、完全に除去できていない、もしくはそれによる汚染が確認された (Fig. 5-5g-i)。ゆえに、塩基で処理した後にエタノール処理を行うのが最も良いと判断した。

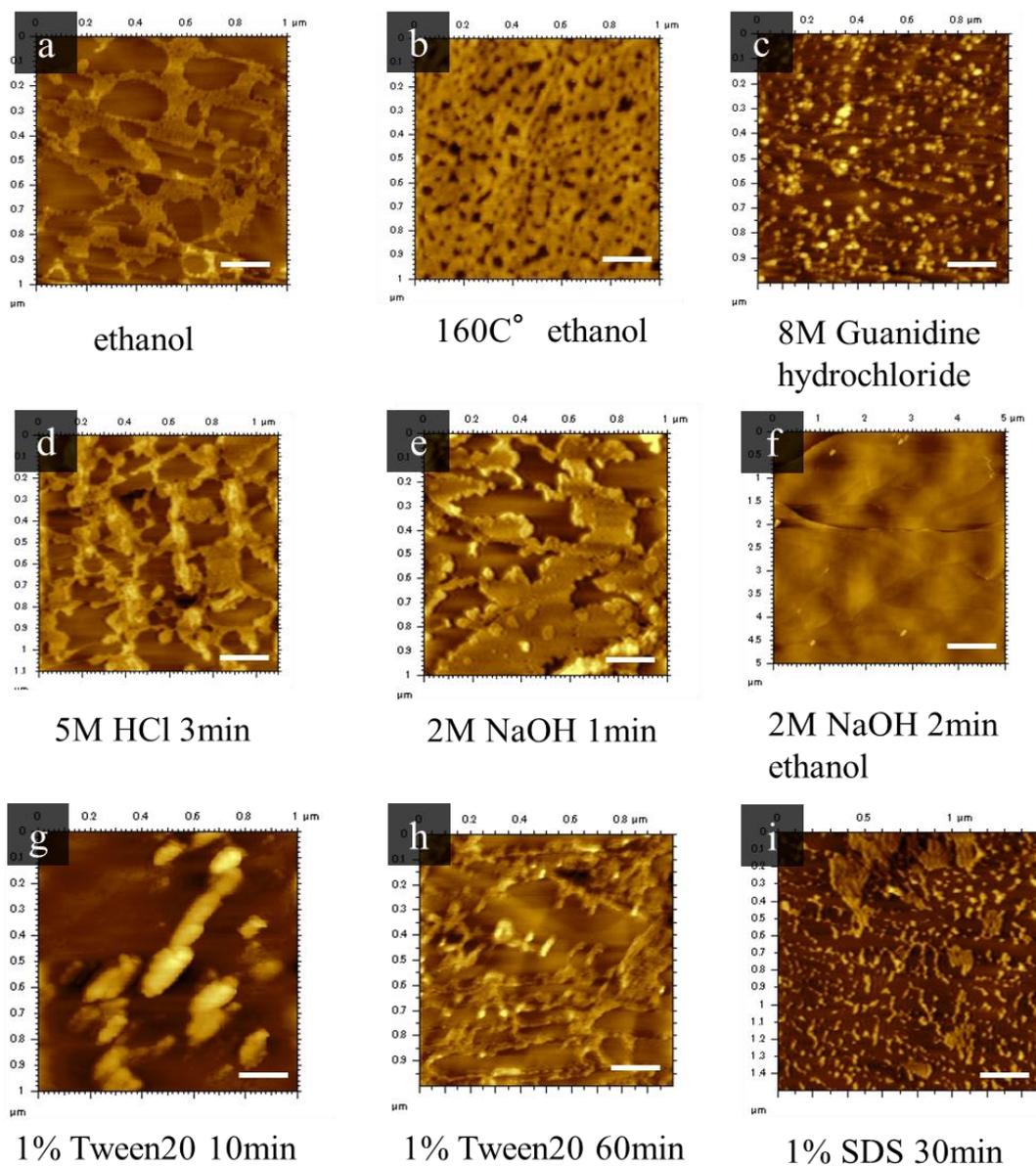


Fig. 5-5 (a)エタノール浸漬 5 min、(b)160°Cに熱した後、エタノール浸漬 5 min、(c)8 M グアニジン塩酸塩処理 5 min、(d)5 M HCl 浸漬 3 min、(e)2 M NaOH 浸漬 1 min、(f)2 M NaOH 浸漬 2 min 後、エタノール浸漬 5 min、(g)1 % Tween20 浸漬 10 min、(h)1 % Tween20 浸漬 60 min、(i)1% SDS 浸漬 30 min
スケールバー(a~e,g,h): 0.2 μm 、(f)1 μm 、(i)0.3 μm

5-8 HFBI 自己組織化膜をテンプレートとした Cu の電解析出

5-8-1 実験方法と結果

HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極上に Cu の電解析出を行った。3 電極系 (CE: Pt、RE: Ag/AgCl、WE: HFBI/HOPG) で溶液は 50 mM CuSO₄/KNO₃、印加電位を -500 mV (v.s Ag/AgCl)、印加時間 5 min で電解還元を行った。電解還元後の基板を AFM 観察した (Fig. 5-6)。結果、大量に Cu が析出してしまっている。印加時間が長すぎたのが原因と考える。もっと印加電位、印加時間、さらには溶液条件の検討を行っていく必要がある。

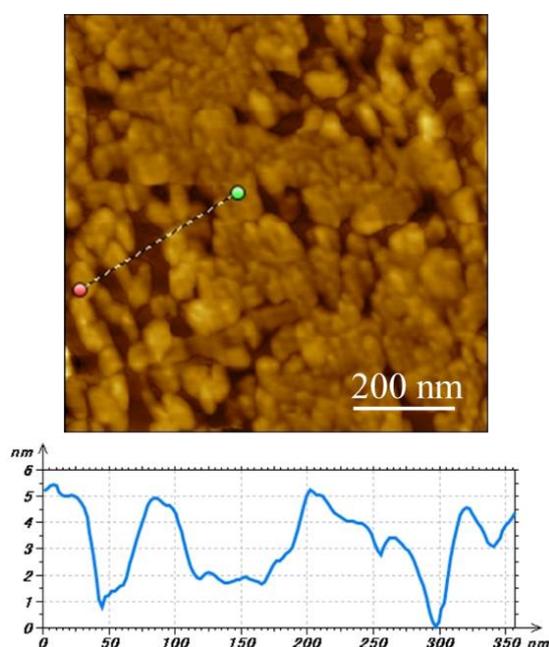


Fig. 5-6 HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極に Cu を電解析出させた基板の AFM による表面解析

5-8-2 位相差によるイメージング

Fig. 5-6 の結果を Cu の析出物であると判断した理由は、位相差像をとることにより判断した。位相差とは AFM を動作させる際にカンチレバーに振動させるための励振信号が送られる。その信号により一定の振幅、周期でカンチレバーが振動する。しかし、カンチレバーとサンプル間に異なる相互作用力が検出されると、その異なった相互作用力が位相の遅れとしてディテクタで検出される。この位相のずれをシグナルとして受け取り、コントラストを変えてイメージングする。

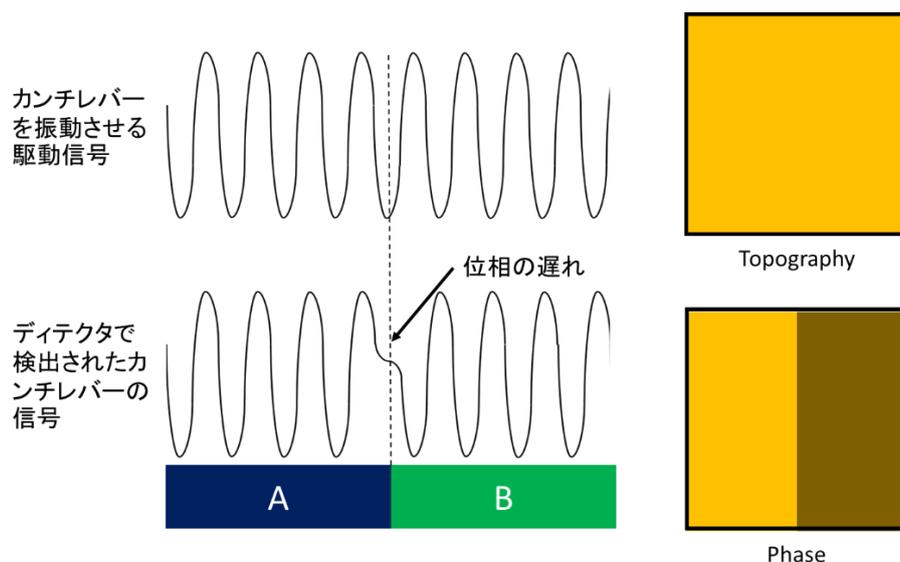


Fig. 5-7 AFM の位相差イメージングの原理図

この位相差を利用してイメージングを行った結果を Fig. 5-8 に示す。左の図が Cu 電解析出後で、右の図が電解析出前である。横にあるコントラストバーを見ると明らかのように HFBI 表面と Cu 表面では位相差が大きく異なっていることが分かる。一般的に材質の粘性もしくは表面の吸着力が高いものほどコントラストが暗くなると言われており、Fig. 5-8 の結果も Cu が明るく、HFBI は暗いことから、Cu が析出されていると判断した。

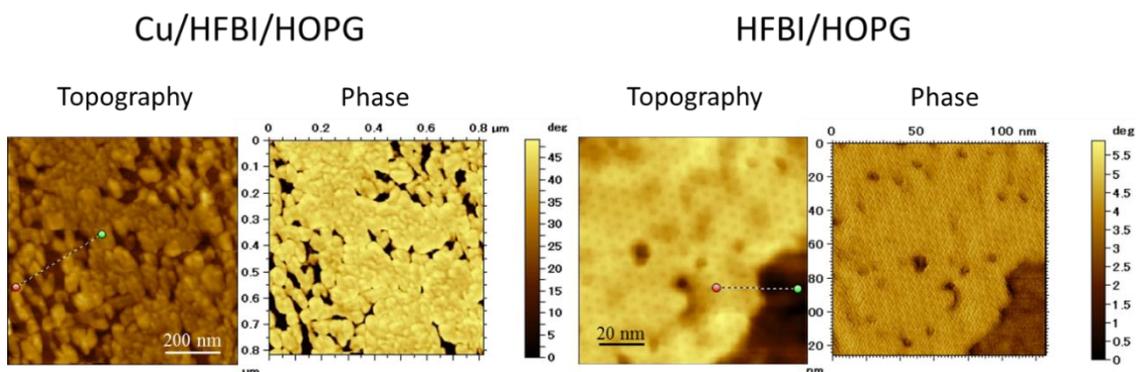


Fig. 5-8 Cu 電解析出を行った HFBI/HOPG 電極 (左) と電解析出前の HFBI/HOPG 電極 (右) の位相差イメージ

5-8-3 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

5-8-1 の実験では大量に Cu が析出してしまったため、条件を変えて、Cu の濃度を 1 mM にして、電解析出時間を 30 min にして行った。

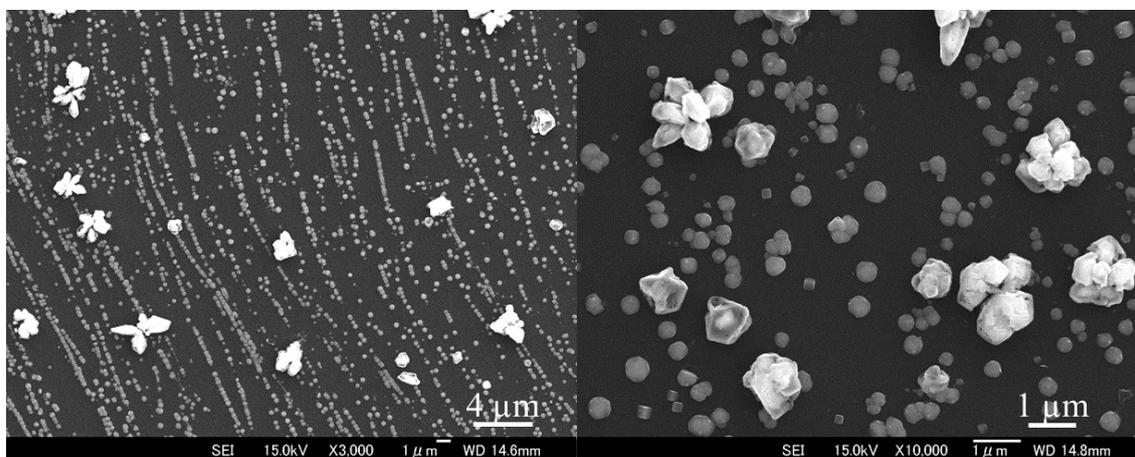


Fig. 5-9 HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極に Cu を電解析出させた基板の SEM による表面解析

規則的に Cu が析出していることが確認できる。しかし粒子サイズは 100 nm 程度と なってしまい、この条件でもまだ過剰析出してしまうことがわかった。この濃度で、析 出時間を減らすと良いと考えられる。

5-9 単結晶 Au(111)電極を用いた電気化学実験

5-9-1 実験目的と実験操作

5-4 で作製した単結晶 Au(111)電極は本章の目的である HFBI 自己組織化膜をテ ンプレートとした実験には適さないことがわかった (5-6 参照)。しかし、せつか く作製した電極であり、表面も極めて平坦かつ HFBI 自己組織化膜も表面構造は変 化するが吸着することがわかったため、分子機能電極として利用できないかと考えた。 そこで、HFBI 自己組織化膜で被覆した単結晶 Au(111)電極の CV 測定を行った。CV の条件は 3 電極系 (CE: Pt、RE: Ag/AgCl、WE: HFBI/単結晶 Au(111)) で、レドッ クス分子にフェリシアン化カリウムを用い、25mM になるよう 100 mM リン酸緩衝 液 (pH 7.0) に溶解したものを電解質に用いた。走査範囲は-0.2 V~0.6 V、走査速度 は 50 mV/sec で行った。

5-9-2 実験結果と考察

Fig. 5-10A は第 4 章で示したものと同一である。単結晶 Au(111)電極の場合でも HOPG のときと同様に HFBI というタンパク質で被覆しているにもかかわらず、電球応答を示したという結果である。しかし、HFBI/HOPG のときは電流減少に伴い、ピークシフトが観測されたが、単結晶 Au(111)電極ではピークのずれは観測されなかった。これは、Au 電極の場合、電極は金属であるため電子は自由に電極内を移動することができる。ゆえに電荷移動律速は生じない。HOPG 電極は前記したように、グラフェンが層になったような構造である。グラフェンはその平面構造の表面に π 電子雲が広がっている。ゆえに π 電子雲で非局在化する電子は表面に沿って水平方向へ電子移動が起こる。しかし、表面には HFBI が存在するために、その規則的に存在する孔部で酸化還元反応は起こるが、その電子の行く方向が遮られているために電子がたまったと考える。グラフェンの層間電子移動も起こるが、HFBI 自己組織化膜が表面に吸着した際に HOPG の表面 1 層がその下の層と間に距離が生じ、層間での電子移動が起こりにくくなったために電荷移動律速の影響によるピークシフトが観測されたものと考えられる。また、別の要因として HOPG 上では HFBI 自己組織化膜はハニカム状である。規則的に存在する六角形 (HFBI 6 分子で 1 ユニットとした) の中心部で電子授受が行われていると考えたときにこの六角形の中心部では電子授受が起こりにくい雰囲気になっていると考える。六角形状に並ぶ HFBI は同じ側面を六角形の中心に向けていると考えている。その側面にあるアミノ酸が電子授受を起こしにくい要因となっているのではないかという考えである。どちらも考察でしかなく、実証を行っているわけではないので、確証があるわけではないが、今回の結果からは単結晶 Au(111)電極のほうが HOPG 電極と比べて分子機能電極としての性能が高いことが明らかになった。

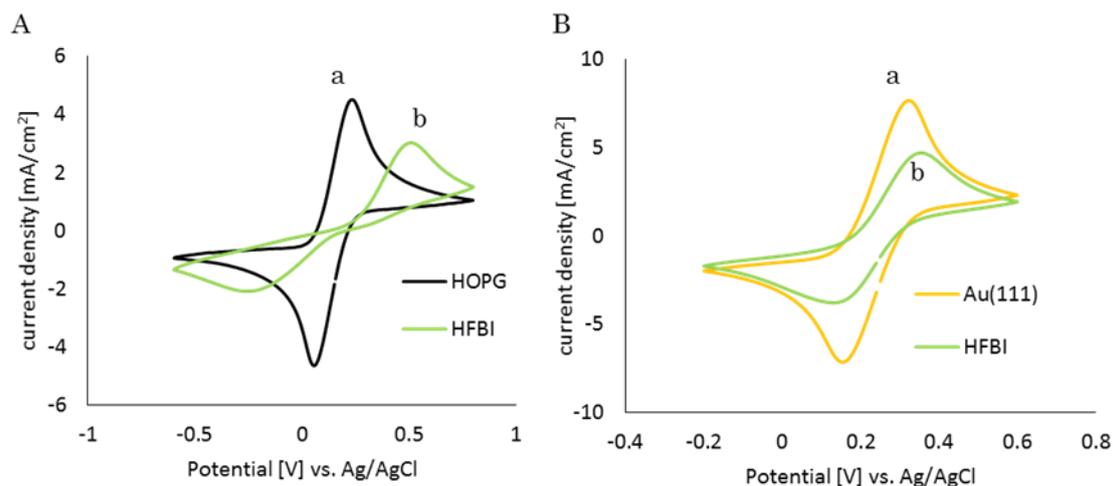


Fig. 5-10 HFBI 自己組織化膜で被覆した HOPG 電極 (A) と単結晶 Au (111)電極 (B) のサイクリックボルタモグラム、(a)HFBI 被覆前、(b)HFBI 被覆後

5-10 遺伝子改変した HFBI 自己組織化膜で被覆した単結晶 Au(111)電極の電気化学特性

5-10-1 実験操作

5-9 で得られた結果をさらに考察するために、第 4 章で用いた表面の荷電アミノ酸を改変した HFBI を用いて CV 測定を行った。野生型の HFBI、正電荷に偏った HFBI、負電荷に偏った HFBI をそれぞれ HOPG と単結晶 Au(111)電極上に被覆し、前章と同様の溶液条件、装置、操作で実験を行った。

5-10-2 実験結果と考察

結果を Fig. 11 に示す。用いたレドックス分子は負電荷を持つフェリシアン化カリウムであるため、電極表面の電荷が正電荷のときは負電荷のときと比べて電流値が大きいことがわかる。Fig. 5-11B を見ると、単結晶 Au(111)電極のときは、改変型の HFBI 自己組織化膜で被覆しても電流応答の減少はあるものの、ピーク位置のシフトは見られなかった。しかし、HOPG のときは少し特殊な挙動が観測された。野生型の HFBI と負電荷の HFBI のときはほとんど変わらない曲線を描いたにもかかわらず、正電荷の HFBI で被覆したときは、電流減少もピークのシフトもわずかしか観測されなかった。還元電流においては bare の HOPG のときとほぼ変わらない値を示した。これらの結果を考察すると、まず遺伝子改変によって改変した HFBI はいずれも

野生型の HFBI とほぼ同様の自己組織化膜構造を形成することがわかっている (第 4 章 Fig. 4-7)。Fig. 5-4 で示したように、HOPG と単結晶 Au (111) では HFBI 自己組織化膜構造は異なる。露出している電極の間隔は、HOPG が 3.1 nm に対し、単結晶 Au(111)は 6.7 nm と多少隙間が大きいことがわかる。単結晶 Au(111)のときの構造ではレドックス反応に対し、電極面積の減少というファクターのみが影響するため、単純な電流値の減少が観測された。しかし、HOPG のときは前節でも考察したようにハニカム構造の孔部で HFBI が持つアミノ酸の影響が出ているため、拡散阻害が起こっていると考えられる。Fig. 5-11A を見ると、負電荷の HFBI (正電荷のアミノ酸を中性のアミノ酸に改変した HFBI) は野生型の HFBI のときとほぼ変わらないが、正電荷の HFBI (負電荷のアミノ酸を中性のアミノ酸に改変した HFBI) は著しく電流応答が向上している。ゆえに HFBI が持つ負電荷のアミノ酸がレドックス分子の拡散を阻害しているため、電荷移動律速の原因となっていると考えられる。

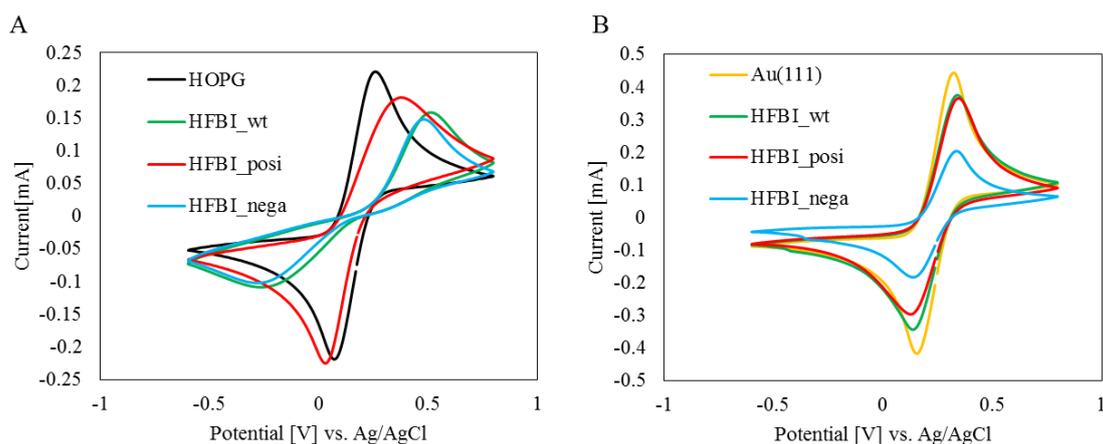


Fig. 5-11 改変型と野生型の HFBI 自己組織化膜それぞれで被覆した HOPG 電極 (A) と単結晶 Au(111)電極 (B) のサイクリックボルタモグラム、(緑)野生型 HFBI、(赤)正電荷の HFBI、(青) 負電荷の HFBI

5-1-1 結論

本章では HFBI 自己組織化膜をテンプレートとして用いた微小ナノ金属結晶の析出を目的として実験を行った。用いる基板の条件として、平坦性と導電性が必要であり、それらを満たす基板として HOPG と単結晶 Au(111)を選択した。AFM 観察結果より、どちらも原子レベルで平坦な表面であることを明らかにした。それぞれの基板上を

HFBI 自己組織化膜で被覆し、その構造解析を行った結果、HOPG 上ではハニカム様の構造だったのに対し、単結晶 Au(111)電極上ではストライプ状の構造に変化していることが明らかとなった。ゆえに目的として挙げたテンプレート技術には HOPG が適していると考え、この電極を用いて Cu の電解析出を行った。AFM で観察した結果、大量の Cu が析出してしまったため、条件を変えて行ったが、SEM の結果から規則的に析出しているように見受けられるが、粒子サイズは約 100 nm とこれでも過剰析出した。ゆえにまだ条件検討が不十分であるため、Cu の濃度、電解析出電位、電解析出時間等の条件を詳細に検討していく必要がある。最後に単結晶 Au(111)電極の用途を考え、CV 測定を行った。第 4 章のときと同様に野生型の HFBI と改変して表面の電荷を変えた HFBI をそれぞれ電極上で自己組織化させたものを用い、レドックス分子に負電荷を持つフェリシアン化カリウムを用いた。その結果、HOPG 電極と比べて優れた電極特性を示したため、分子機能電極としての応用が期待できることを示した。この理由は現段階では考察のみで、実験による確証がないため今後検討していく必要がある。

Reference

126. Khairutdinov R.F., Physical chemistry of nanocrystalline semiconductors, *Colloid J.* **59**, 535-548 (1997)
127. H. Gzabetz, M. H. Devozet, *Single charge tunneling and coulomb blockade phenomena in nanostructure*, **294**, Plenum Press, (1996)
128. Paul Mulvaney, Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles *Langmuir*, **12**, 788-800 (1996)
129. Marcos M. Alvarez, Joseph T. Khoury, T. Gregory Schaaff, Marat N. Shafigullin, Igor Vezmar, and Robert L. Whetten, Optical Absorption Spectra of Nanocrystal Gold Molecules, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3706-3712 (1997)
130. A. P. Alivisatos, Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals, *J. Phys. Chem. B*, **100**, 13226-13329 (1996)
131. L. Brus, Quantum crystallites and nonlinear optics, *Appl. Phys. A*, **53**, 465-474 (1991)
132. L. N. Lewis, Chemical catalysis by colloids and clusters, *Chem. Rev.*, **93**, 2693-2730 (1993)
133. Venkitasamy Kesavan, Pennadam S. Sivanand, Srinivasan Chandrasekaran, Yuri Koltypin, Aharon Gedanken, Catalytic Aerobic Oxidation of Cycloalkanes with Nanostructured Amorphous Metals and Alloys, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **38**, 3521-3523 (1999)
134. T. A. Fulton and G. J. Dolan, Observation of single-electron charging effects in small tunnel junctions, *Phys. Rev. Lett.* **59**(109), 1-6 (1987)
135. Koen Besteman , Jeong-O Lee , Frank G. M. Wiertz , Hendrik A. Heering , Cees Dekker, Enzyme-Coated Carbon Nanotubes as Single-Molecule Biosensors, *NANO letters* **3**, 727-730 (2003)
136. Ichiro Yamashita, Fabrication of a two-dimensional array of nano-particles using ferritin molecule, *Thin Solid Films*, **393**, 12-18 (2001)
137. Giuseppe Maruccio, Roberto Cingolani, Ross Rinaldi, Projecting the nanoworld: Concepts, results and perspectives of molecular electronics, *J. Mater. Chem.* **14**, 542-554 (2004)
138. David L. Klein, Richard Roth, Andrew K. L. Lim, A. Paul Alivisatos and Paul

- L. McEuen, A single-electron transistor made from a cadmium selenide nanocrystal, *Nature*, **389**, 699-701 (1997)
139. T. Sato, H. Ahmed, D. Brown, and B. F. G. Johnson, Single electron transistor using a molecularly linked gold colloidal particle chain, *J. Appl. Phys.*, **82**, 696-701 (1997)
140. I. L. Karle, Animesh Pramanik, Arindam Banerjee, Surajit Bhattacharjya, and P. Balaram, ω -Amino Acids in Peptide Design. Crystal Structures and Solution Conformations of Peptide Helices Containing a β -Alanyl- γ -Aminobutyryl Segment, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9279-9280 (1997)
141. T. Sato, H. Ahmed. Observation of a Coulomb staircase in electron transport through a molecularly linked chain of gold colloidal particles, *Appl. Phys. Lett.*, **70**, 2759-2761 (1997)
142. H. Weller, Transistors and light emitters from single nanoclusters, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 1658-1659 (1998)
143. Janos H. Fendler, Self-Assembled Nanostructured Materials, *Chem. Mater.*, **8**, 1616-1624 (1996)
144. Andrew K. Boal, Faysal Ilhan, Jason E. DeRouchey, Thomas Thurn-Albrecht, Thomas P. Russell and Vincent M. Rotello, Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates, *Nature*, **404**, 746-748 (2000)
145. V.I. Chegel, O.A. Raitman, O. Lioubashevski, Yu. Shirshov, E. Katz, I. Willner, Redox-Switching of Electrorefractive, Electrochromic, and Conductivity Functions of Cu^{2+} /Polyacrylic Acid Films Associated with Electrodes, *Adv. Mater.*, **14**, 1549-1553 (2002)
146. K. Sato, S. Yoshimoto, J. Inukai, K. Itaya, Effect of sulfuric acid concentration on the structure of sulfate adlayer on Au(1 1 1) electrode, *Electrochem. Commun.*, **8**, 725-730 (2006).
147. T. Kondo, J. Morita, K. Hanaoka, S. Takakusagi, K. Tamura, M. Takahasi, J. Mizuki, K. Uosaki, Structure of Au(111) and Au(100) Single-Crystal Electrode Surfaces at Various Potentials in Sulfuric Acid Solution Determined by In Situ Surface X-ray Scattering, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 13197-13204 (2007).
148. Noriko U., Shoko S., Nana A., Gernot F., Toshihiro K., Step-by-step Investigation of Atomically Flattening Processes of Au(111) Single Crystal

Surfaces, *Electrochemistry*, **82**(5), 346–350 (2014)

149. Y. Tanishiro, H. Kanamori, K. Takayanagi, K. Yagi, G. Honjo, *Surf. Sci.*, **111**, 395 (1981).
150. K. Takayanagi, Y. Tanishiro, K. Yagi, K. Kobayashi, G. Honjo, *Surf. Sci.*, **205**, 637 (1988).

第 6 章

結論

6章. 結論

生体分子が界面にもたらす作用を調べた界面分析と生体分子が持つ優れた特性を用いた精密な界面機能設計をコンセプトとして HFBI を用いた研究を行った。

第1章では、初めに、生体分子による界面分析と界面機能設計をコンセプトとした研究を行うための研究背景を述べた。そして界面の高機能化を担う生体分子として HFBI タンパク質に着目し、その分子の由来と特性について説明した。

第2章では、HFBI がもたらすユニークな液滴界面現象の解明に言及した。HFBI の液滴は気液界面に自己組織化膜を形成することで、液滴の上面が平らになる現象が生じる。この物理現象を解明するために、力学的な実験を行った。初めに AFM 測定により HFBI 自己組織化膜の構造が精密なハニカム様の構造であることを明らかにした。ハニカム構造は六角形の内角が 120° であることから平面構造や円筒構造は形成できるが、球状になることはできない。ゆえに半球状の液滴界面に形成した HFBI 自己組織化膜は球状になることを嫌い、平らになったのではないかと考える。液滴は表面張力を持ち、その力により球状になっている。すなわちこの力を超えるほどの座屈強度が HFBI 自己組織化膜にないことには液滴形状を変化させることはできない。HFBI 自己組織化膜の座屈強度を測定するために AFM を用いたフォースカーブ測定を行った。その結果、HFBI 自己組織化膜の座屈強度が液滴の表面張力を上回るほど高いことを明らかにした。このように構造上の観点から平面に成らざるを得ないこと、力学的に構造強度に優れていることなどから、液滴上面が平らになることを説明し、このユニークな界面現象を解明した。

第3章では、HFBI による液滴界面現象をより詳細に明らかにするための実験を行った。この章では主に、自己組織化した HFBI 液滴の側面部はどのようになっているのかや蒸発の寄与について言及した。液体内の HFBI は初めに最も近くの気液界面に吸着し、その後液滴内の対流によって液滴頂点方向に集まると考えられる。HFBI の自己組織化により上面が平らになった液滴を徐々に傾けていくと、平らな面は地面と水平を保ったままであったことから、側面部に自己組織化膜は形成していないことがわかる。HFBI 液滴の上面が平らになる要因は、液が蒸発して体積が減少する際にそれに伴う形状変化が、第2章で解明した高い構造強度により、一般的な液滴と違うところにある。普通は表面張力のために表面積を最小にしようとした形状変化が起こるが、HFBI 液滴の場合は、気液界面に存在する HFBI を排除する数を少なくしようとする形状変化が起こる。そのため液滴の体積減少による表面積変化の少ない構造をとるため、第2章の結

論と相まって液滴の頂点部から平らになったと考えられる。

第4章では、HFBI 自己組織化膜を分子機能電極として応用するための界面機能設計に着手した。HFBI 自己組織化膜で被覆した電極は、その機能を大きくは損なわない、つまり分子機能電極としての有用性を明らかにした。更なる機能向上のために HFBI の荷電アミノ酸を遺伝子操作で改変した分子を作製した。これらの HFBI を用いることで電極表面の電荷を設計することができ、それによってもたらされる静電相互作用の影響で、電極機能を向上させることに成功した。さらに分子機能電極としてグルコースオキシダーゼを融合した HFBI 分子を用いて、酵素電極反応の測定を行った。GOx-HFBI と HFBI を混合してできた自己組織化膜を電極上に被覆し、グルコースを添加した際に生じる電子を電気化学的に測定した。しかし、その反応を電気化学的に測定することはできなかった。これはグルコースオキシダーゼから電極までの距離が問題となったことと、電極に用いた HOPG が電気化学的に特殊な性質を持つためであると考えた。ゆえにメディエータとしてフェロセンをタンパク質に固定し、さらに基板を Pt 電極に変えて行った。すると、添加したグルコースの濃度に応じて電流応答の増大が確認された。この結果から、バイオセンサやバイオバッテリーとしての有用性を見出せたといえる。

第5章では、HFBI 自己組織化膜の別の応用として、精密な自己組織化構造であることを利用した、テンプレートとしての応用に着手した。第2章で明らかにしたように HFBI 自己組織化膜は非常に精密な構造を有している。したがってこれをテンプレートとして用いることで、微小ナノ金属結晶を高密度に形成することが可能であると考えた。この研究を行うための条件として挙げた、平坦性と導電性を持つ基板として、HOPG と単結晶 Au(111)を使用した。しかし、HOPG 上ではハニカム様だった HFBI 自己組織化膜は、Au(111)上ではライン状の構造に変化したため、テンプレートとして不向きであった。よって HOPG を用いて実験を行った。HFBI/HOPG 電極に Cu を電解析出させたが、多量の Cu が析出してしまいう結果となり、今後、より詳細な条件検討が必要であることがわかった。単結晶 Au(111)電極については別の用途を考え、CV 測定を行った。結果、HOPG の時よりも優れた電極特性を示したことから、より高機能な分子機能電極としての応用が期待できることを示唆した。

本論文は第2章、第3章で論じた、HFBI 自己組織化膜による界面分析と、第4章、第5章で論じた、分子機能電極としての応用、微小金属結晶形成のためのテンプレートとしての応用など界面機能設計に関する研究をまとめたものである。界面という大元の概念に基づき企画した本研究において、特殊な界面現象を生じさせる HFBI は非常に

面白い研究材料であったと言える。HFBIによる液滴界面現象を明らかにし、また幅広い応用への繋がりを示した。ゆえにこの研究成果は、バイオエレクトロニクスの分野の更なる発展に寄与する大変有用な結果であると考ええる。

研究業績一覧

(1) 学術雑誌等

査読付き論文

1. Ryota Yamasaki, Tetsuya Haruyama, The formation mechanism of flattened top HFBI domical droplets, *The Journal of Physical Chemistry B*, submitted
2. Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Takatsuji, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, and Tetsuya Haruyama, Flattened-top domical water drops formed through self-organization of hydrophobin membranes: a structural and mechanistic study using Atomic Force Microscope, *ACS NANO*, **10**, 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, Tetsuya Haruyama, Electrochemical properties of honeycomb-like structured HFBI self-organized membranes on HOPG electrodes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **123**, 803–808 (2014)
5. Yoshiyuki Takatsuji, Ryota Yamasaki, Atsushi Iwanaga, Michael Lienemann, Markus B. Linder, Tetsuya Haruyama, Solid-support immobilization of a “swing” fusion protein forenhanced glucose oxidase catalytic activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **112**, 186–191 (2013)
6. Ryota Furuno, Ryota Yamasaki, Kimihiko Kubo, Tetsuya Haruyama, Nano-structure Control of Leadframe Surface to Achieve Robust Juncture with Epoxy Resin, *IEEEJ Transactions on Sensors and Micromachines* **135**, 129–134 (2014)

(2) 国際会議における発表

○ R. Yamasaki, Y. Takatsuji, A. Iwanaga, M. Lienemann, M. Linder, and T. Haruyama, Nano-structured protein layer on an electrode surface taking advantage of self-organized HFBI and its electrochemical property, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science, Honolulu, HI, 7-12 October, 2012

○ Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Takatsuji, Atsushi Iwanaga, Michael Lienemann, Markus Linder, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, Tetsuya Haruyama, Effect of the charged interrelation to structure and electrochemical property of self-organized protein, The Fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, Kitakyushu, Japan, 26, October, 2012

○ Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Takatsuji, Tetsuya Haruyama, Accurate structured self-organized protein membrane on a solid surface and its electrochemical characterization, The 4th Asian Biomaterials Congress, Hong Kong, 26-29, June, 2013

○ R. Yamasaki, Y. Takatsuji, M. Lienemann, M. Linder, and T. Haruyama, Electrochemical property of HFBI self-organized membrane as used molecular carrier, UPM-Kyutech Symposium of Applied Engineering and Sciences, Universiti Putra Malaysia. 30, Sept – 1st, Oct, 2013

○ R. Yamasaki, Y. Takatsuji, M. Lienemann, M. Linder, and T. Haruyama, Electrochemical property of the unique HFBI protein on an electrode, 7th International Symposium on Nanomedicine, Kitakyushu, Japan, 7-9, November, 2013

○ 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, Kyushu Institute of Technology, International Symposium on Applied Engineering and Sciences, Kitakyushu, Japan, 20-21 December, 2014

○ Ryota Yamasaki, Hitoshi Asakawa, Takeshi Fukuma, and Tetsuya Haruyama, Coating of electrodes with self-organized HFBI membrane; structure and

electrochemical properties, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 15-20, December, 2015

(3) 国内学会・シンポジウム等での発表（口頭発表）

○山崎亮太, Michael Lienemann, Markus Linder, 浅川雅, 福間剛士, 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、東京女子医科大学・東京、2015.1.19

他、4 件

(4) 国内学会・シンポジウム等での発表（ポスター発表）

○山崎亮太、森愛美、浅川雅、福間剛士、春山哲也

HFBI タンパク質の自己組織化膜が液滴形状に及ぼす効果とその挙動解析

4t CSJ Chemical Festa、タワーホール船堀・東京、2014.10.13～2014.10.17

他、6 件

(5) 受賞暦

1. The Fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, BEST POSTER AWARD 2012.10.26
2. 最優秀修士論文賞、九州工業大学大学院生命体工学研究科、平成 25 年 3 月 25 日

謝辞

本論文は九州工業大学大学院生命体工学研究科 春山哲也教授の丁寧なご指導のもと作成したものです。ご多忙にもかかわらず、多大なご指導・ご指南を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授 篠崎信也先生、准教授 加藤珠樹先生、ならびに金沢大学 教授 福間剛士先生には多くのご指導、そして適切なお意見・ご助言を賜りました。ここで厚く御礼申し上げます。

本論文における研究にご協力いただきました、金沢大学の福間剛士教授ならびに浅川雅助教には FM-AFM を用いた測定とその解析のご指導・ご助言を賜りましたことを深く感謝致します。

測定試料の提供及び研究遂行におきまして、VTT Technical Research Centre in Finland の Markus B. Linder 博士ならびに Michael Lienemann 博士にご助力を頂きましたことを深く感謝致します。

単結晶 Au(111)電極の作成方法・技術をご指南していただきました、熊本大学の西山勝彦准教授ならびに吉本惣一郎准教授には深く感謝致します。

フィンランドでの研究生生活を共にした高辻義行研究員には、その惜しめない協力を賜りましたことに深く感謝致します。

春山研究室の皆様には、研究においてだけでなく普段の研究室生活においてもたいへんお世話になりました。協力していただいた皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げ、謝辞とさせていただきます。

山崎亮太