

電子材料界面の分光解析に基づく、高感度イオンセンシング分子機構の設計

Developing ion-sensitive biomolecular surfaces based on exploration of electronic sensing materials' surface with a surface-specific vibrational spectroscopy

(分子科学会推薦)

代表研究者 東京科学大学 関 貴一

Institute of Science Tokyo

Takakazu Seki

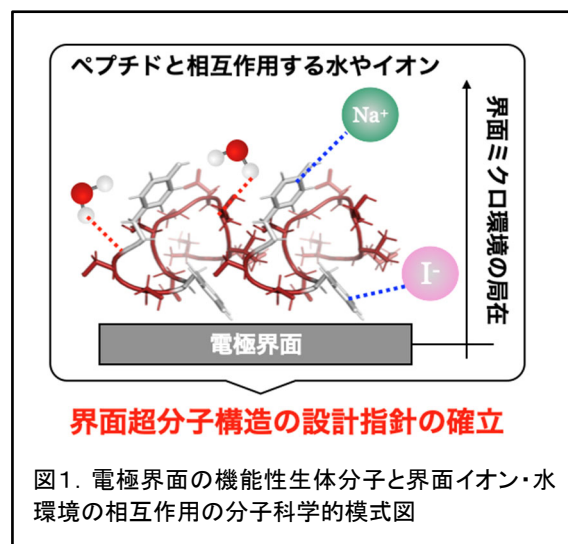
Detecting and separating specific ions in a mixture of electrolytes is of importance for various processes such as establishing accurate environmental sensing, medical diagnosis, and desalination. Aiming to develop such molecular functionalities, employing high affinity of biomolecules, e.g., DNA and protein, to metals and ions has attracted much attention recently. In particular, supramolecular scaffold of functional biomolecules on highly sensitive electronic materials is a promising candidate to develop ion-sensitive devices as molecular functionalities are expected to be aligned well. To realize this function, one needs to understand the multibody interactions between water, ions, and bio-supramolecules at the device surfaces systematically. In this research, we focused on (1) designing and evaluating ion-sensitive biomolecular supramolecular nanostructures and (2) developing visualization tools for interfacial molecular environment. In the first part, we have investigated several types of small peptides designed based on a naturally occurring ion-responsive protein structures and have discussed the peptides' nature for forming the nanostructures on graphitic and MoS₂ surfaces. In the second part, we have developed a microscopic surface-specific vibrational spectroscopic system with reflective optics and have discussed the current capability of the system and future problems.

研究目的

特定のイオンを検出・分離することは、精度の高い環境測定や医療診断、そして海水の脱塩機構構築のための基盤技術となる。そのためには、電極界面でのイオン環境を理解し、高感度に検出する機構の構築が不可欠である。

このイオン検出機構の1つとして、核酸やタンパク質などの生体分子のイオンや金属・ミネラルへの親和性を利用する方法があげられる¹。生体分子は、イオン認識能が高く、これまでに電子材料表面の修飾法としても有用であることが示されてきた。例えば、ファファージディスプレイ法により選定された、12アミノ酸配列の自己組織化ペプチドを用いて、高感度な二次元電子材料であるグラフェン電界効果トランジスタ (Field-effect transistor, FET) を修飾することで、グラフェン FET の電流特性を変調できることや²、グラフェンとは異なる二次元半導体ナノ材料で

ある二硫化モリブデンを用いた FET 上にターゲットタンパク質を認識するプローブを集積させることで、fM レベルで分子認識を介した信号測定が可能であ



ることが示されている³。これらの先行研究から、ペプチド超分子構造と環境変化に高感度なナノ電子材料を用いることで、高精度なイオン応答デバイスを作製できる可能性が示唆されている。

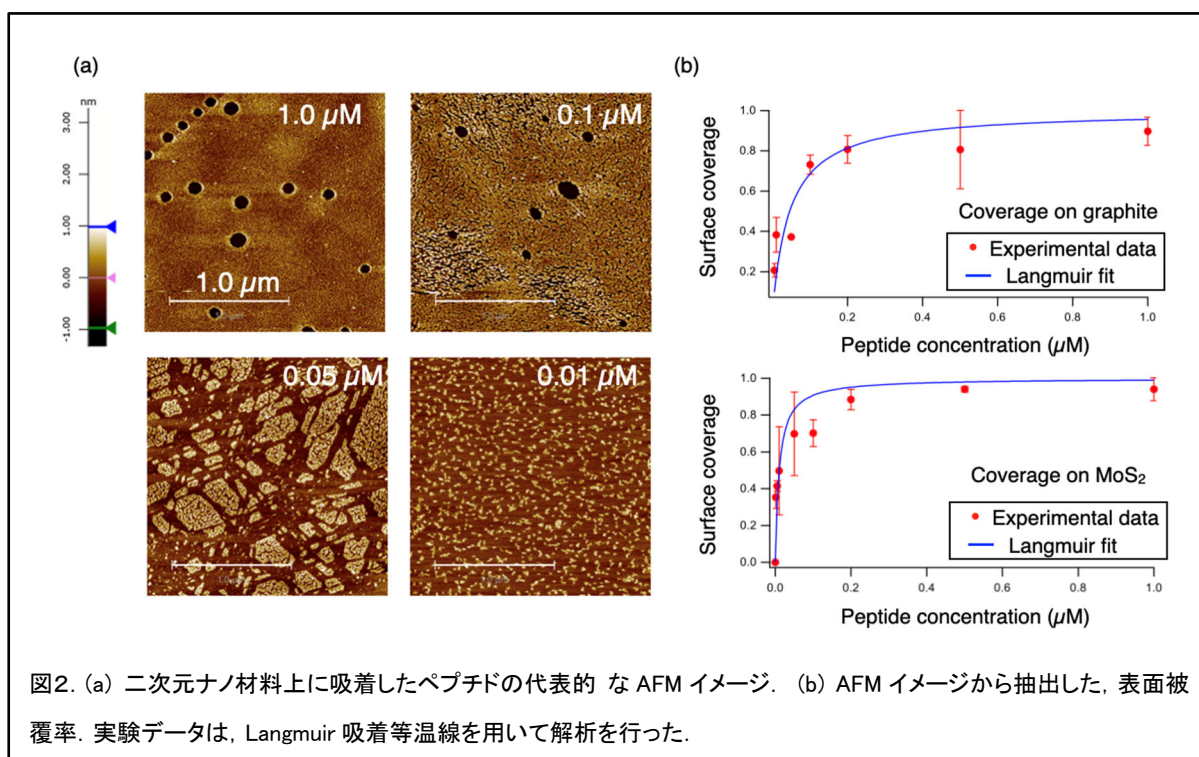
その一方で、これまでの生体材料によるナノ電子材料の機能化は、電子材料界面における分子描像の欠如から、デバイスの光電子特性値や分子情報の欠如したプローブ顕微鏡像などによって得られる観測量に基づく経験則に大きく依存した設計方針に留まっていた。本研究では、界面における「水分子・イオン、そして生体超分子の三体問題」(図1)を系統的に理解し、高感度なバイオイオンセンサーを構築する初期検討として、(1)イオン応答性自己組織化ペプチドの設計とナノ構造形成の評価、(2)界面分子環境の可視化のための新規分光システムの構築を目標と設定した。

研究経過

本研究期間では、亜鉛イオン親和性の高い自己組織化ペプチドの設計をターゲットとして研究に着手した。亜鉛イオンは、生体内で鉄イオンの次に豊富なイオンであり、遺伝子発現機構に関わる Zinc finger タンパクの活性調整を行う電解質として生体機能の維持に必須のイオンとされている。Zinc finger タンパクのアミノ酸配列に着想を受け⁴、 $-C-X-X-C-$

$-H-X-H(X:は任意のアミノ酸)$ を基本モチーフとした3種類のペプチドを合成した： $CH:CGAMHLPWCMGTLH$, $YCS:YCSCGPGGHSHY$, and $YCG:YCGCGPGGHGHY$ 。これらの内、ペプチド(1)については、Ishigamiらによって報告されている、グラファイトに特異的に吸着するアミノ酸配列(GAMHLPWHMGTL)を参考にした⁵。

まず電子デバイス基板として利用されるグラファイトや二硫化モリブデン上への自己組織化構造形成能を評価するため、種々の濃度のペプチド水溶液を基板上に滴下し1時間静置した。その後、乾燥空気ブローにより液滴を除去し、真空デシケーターで1晩乾燥させ、自己組織化構造の評価を行った。グラファイト上に吸着したペプチド(2)のAFMイメージを図2(a)に示す。0.1 μM 以上のペプチド高濃度域では高い被覆率が確認できた。0.1 μM より低い濃度領域では徐々に被覆率が減少していくことがわかった。この傾向は図2(b)の被覆率 vs ペプチド濃度のプロットから見て取れる。ここではグラファイトと二硫化モリブデン (MoS_2) を基板とした場合の被覆率変化を示している。この被覆率変化を、Langmuir 吸着等温線を用いて吸着定数を求めると、グラファイト基板の場合 $21.8 \mu M^{-1}$, MoS_2 の場合 $97.5 \mu M^{-1}$ という値が得られた。例えば、グラファイト基板に対するこの吸着定数は、これまで知られているグラフ



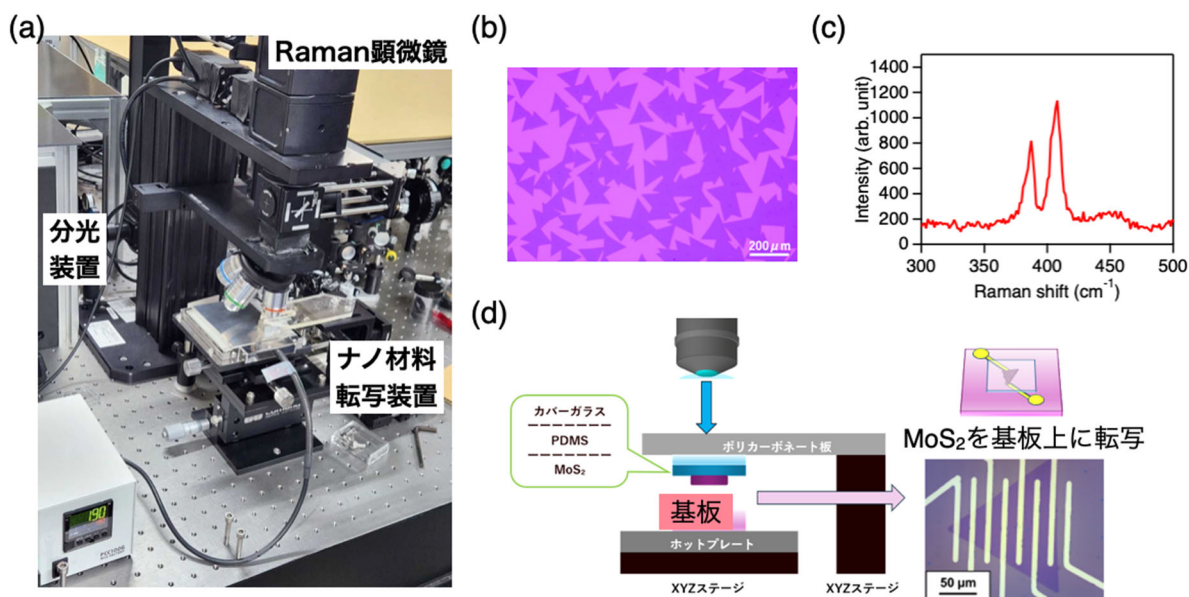


図 3. (a) 顕微ラマン分光装置(顕微システムとナノ材料転写設備)の概要と(b) 化学気相合成で得られた二次元ナノ材料の光学反射像と(c)そのラマンスペクトル(励起波長 532 nm). (d) 転写装置の概念図.

ァイト吸着ペプチド(IMVTESSDYSSY)の吸着定数 $2.23 \mu\text{M}^{-1}$ と比べると 10 倍高い結合能を示すことがわかった⁶. 今回合成したいずれのペプチドに関しても、グラファイト、MoS₂ 基板ともに高い吸着定数を示すことがわかった一方で、基板の格子を認識し、エピタキシャル様な構造形成は確認できなかった. 現在は吸着安定性やイオン種によるナノ構造変調について、さらなる検討を進めている段階にある.

さらに本研究期間では、電極界面の自己組織化ペプチドの分子構造、そして界面吸着イオン・水分子の構造情報の取得のために、顕微ラマン分光システムと顕微和周波発生振動分光システムの構築を進めた. 顕微ラマン分光システムについては、ラマン分光システムの励起光源として、狭帯域 CW レーザーを導入することで構築を完了した(図 3 a). プリミナル結果として、二次元ナノ材料上でのペプチド自己組織化膜の大気中でのラマン分光測定は、励起光の集光点において自己組織化ペプチドが脱離してしまうことがわかっている. これは励起光による熱効果によるものであると考えられる. そこで水溶液中で自己組織化させた直後のペプチド自己組織化膜の分光測定を行うため、フッ化カルシウムなどの光学的透明基板に二次元ナノ材料を固定する方法の確立を目指した. 化学気相合成法により、一辺 50 μm 以上の単結晶ナノシートの MoS₂ を作製した(図 3 b). そしてラマンスペクトルの MoS₂ の A_{1g}(~405

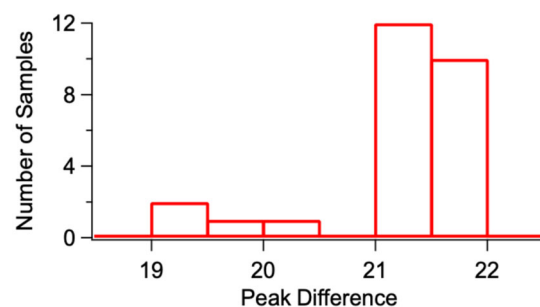


図4. A_{1g}とE_{2g}ピーク位置の差分のヒストグラム

cm⁻¹)モードと E_{2g}(~385 cm⁻¹)モードのピーク位置から、単層の MoS₂ ナノシートが生成していることを確認した(図 3 c). MoS₂ の CVD 合成方法についてはほぼ条件を確立しているが、ラマン分光法に基づく層数評価を行うと単層のもの(19-20 cm⁻¹)よりも二層以上の多層(21 cm⁻¹以上)に成長してしまっているものが多数見られた(図 4). ガス流量の時間制御に取り組み、歩留まりを向上させていきたいと考えている.

得られた二次元ナノシートを透明基板上に固定させるため、顕微ラマンシステムにホットプレートと位置マニピュレータを拡張し、様々な基板に合成した二次元ナノ材料を転写するシステムを構築した(図 3 d). 転写条件については、文献⁷ですでに報告をしているポリマー転写法を用いることができる. ペプチド自己組織化膜のためのラマン分光測定環境

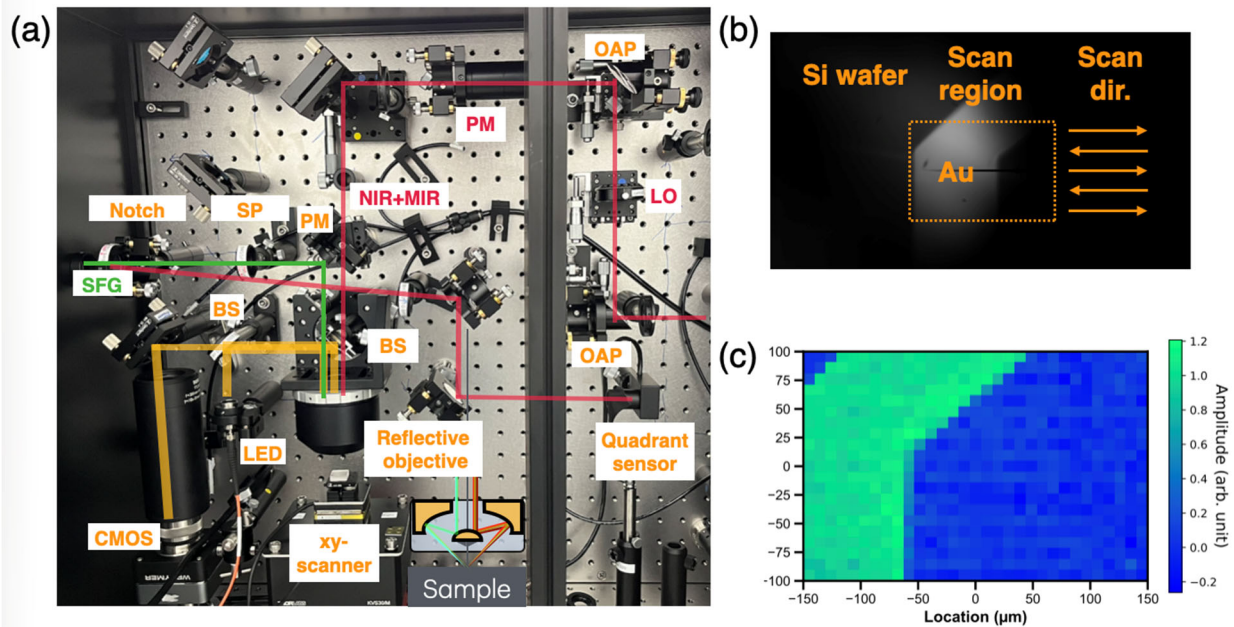


図5. (a) HD-SFG 顕微システムの外観. この実験システムは、2025 年 11 月の研究室移転後に東京科学大学に再構築したものである. (b)スキャン対象パターン金電極. (c)非共鳴信号の積算値のマッピング.

の整備は完了したと考えている.

本研究において界面吸着イオン・水分子の構造情報の取得のためのキモとなる、ヘテロダイン検出顕微 SFG 分光システムを構築するため、2024 年 7 月に自身の研究室に導入した新規高繰り返しフェムト秒パルス光源を用いて、まず広視野のヘテロダイン検出顕微 SFG 分光システムの構築に取り組んだ. SFG 分光法では、界面の振動子を振動励起するための中赤外光パルス(3 μm –7 μm 程度の領域)と、その振動子を仮想励起状態へアップコンバージョンするための近赤外光パルス(今回用いた光源においては、1030 nm)を用いる必要がある. さらに、それらのビームをサンプル位置で、時間的空間的にオーバーラップさせる必要がある. それぞれの光路を、ビーム径(1030 nm: 4–5mm, 3 μm : 3–4mm)などを調整しつつ構築した.

SFG 分光法で波長分解能を決める、近赤外光パルスの狭帯域化は、透過型回折格子(Light Smith, Coherent)を用いて Folded 4f パルスシェーパーを構築し行った. アップコンバージョンのビーム幅は $\sim 12\text{ cm}^{-1}$ 程度であり、サンプル位置で 1 μJ 程度の強度となった. 中赤外光に関しても 1 μJ 程度となった. このシステムを用いて、10 μm 厚の y カット水晶から発生させた参照 SFG 信号と、z カット水晶からの SFG 信号を干渉させ、ヘテロダイン SFG 信号を検出することができた. この巨視的

SFG 分光システムを用いて、気水界面や帯電脂質膜界面の水の OH 伸縮振動モード領域のスペクトルを測定したところ、先行研究を十分に再現しており、本システムを構築するための光学素子類の選定に基本的に問題は生じていないことが分かった.

そして、この土台となる SFG 分光システムにブラunchを作製する形で、顕微 SFG 分光システムの構築に取り掛かった(図 5). 顕微 SFG 分光システムにおいては、波長領域の大きく異なる光をサンプル上で集光する必要がある. そのため、通常のガラスを用いる対物レンズなどの屈折光学素子を用いることはできず、反射型の対物システムを用いる必要がある. 本研究では、まず操作の容易さを鑑みて、Beck Optronics 社の銀コート低倍率反射型対物(x15)を用いることとした.

反射型対物は、内部に凸面ミラーと凹面ミラーを有しており、凸面ミラーの半径は 6mm ほどである. そこへ SFG 分光で用いる近赤外光・中赤外光、そして参照信号を入射させる必要があり、巨視的 SFG 分光システムで用いるようなすべてのビームが異なる光路を進行する non-collinear 配置を用いることは難しく、用いるビームがすべて同光路を進行する collinear の配置で顕微 SFG 測定の検証を行うこととした. シリコン基板上にパターン化された金電極の SFG 信号を測定したところ、金電極上はシリコン表

面と比べて、大きな非共鳴信号が確認でき、現状は 1 ステップ 10 μm で各点 1 秒程度の露光時間で測定が可能となっている。

考察

本研究期間内では、いくつかのイオンに応答しうる吸着性能の高いペプチドを合成し、界面ナノ構造の評価を行った。そして単層 MoS_2 の作製法・ラマン分光システムによる評価法を確立し、さらに転写装置の構築したことによって、パターン電極上の狙った位置に単層 MoS_2 を担持できるようになり、 MoS_2FET の作製が可能となった。現状では、未修飾 MoS_2FET と比べ、ペプチド修飾 MoS_2FET は、より低い電圧で Drain-Source 間で電流が流れるようになった（閾値電圧のシフトが見られた）ことを確認した段階にある。今後はこの MoS_2FET デバイスを用いて、イオン添加による電動特性の変調を観測しつつ合理的なイオン応答性ペプチドの設計指針の構築に取り組んでいく。

また界面分子環境測定のための測定システムとしては、顕微 SFG 分光システムの構築に取り掛かり、パターン化金電極のイメージングに成功した段階にある。今後は、バイオセンサー表面を模したペプチド自己組織化膜内の分子配向解析だけでなく、その近傍の水和構造とイオン環境の可視化の検証を進めていく。想定しうる課題としては、金表面などの非共鳴信号と異なり表面分子由来の共鳴信号強度は著しく弱いことが考えられ（1/10-1/100 程度）、測定の長時間化が問題となる。これを克服するための、ソ

フトウェアベースのノイズ処理・効率的かつ高精度のデータ抽出法の検討が喫緊の課題となると想定される。

参考文献

1. Chen, C.-L. & Rosi, N. L. Peptide-based methods for the preparation of nanostructured inorganic materials. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49**, 1924–1942 (2010).
2. Hayamizu, Y. *et al.* Bioelectronic interfaces by spontaneously organized peptides on 2D atomic single layer materials. *Sci. Rep.* **6**, 33778 (2016).
3. Noguchi, H. *et al.* Self-assembled GA-repeated peptides as a biomolecular scaffold for biosensing with MoS_2 electrochemical transistors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **15**, 14058–14066 (2023).
4. Cassandri, M. *et al.* Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* **3**, 17071 (2017).
5. Katoch, J. *et al.* Structure of a peptide adsorbed on graphene and graphite. *Nano Lett.* **12**, 2342–2346 (2012).
6. So, C. R. *et al.* Controlling Self-Assembly of Engineered Peptides on Graphite by Rational Mutation. *ACS Nano* **6**, 1648–1656 (2012).
7. Seki, T., Ihara, T., Kanemitsu, Y. & Hayamizu, Y. Photoluminescence of CVD-grown MoS_2 modified by pH under aqueous solutions toward potential biological sensing. *2D Materials* **7**, 034001 (2020).