

◆ 有機バイオ SPM 研究会・2003 (M&BE, Vol. 14, No. 3 (2003))
 (原稿受理日: 2003 年 7 月 31 日)

単一分子マニピュレーションと極限計測

筑波大物理工学系・21 世紀 COE ○重川秀実、保田諭、武内修
 〒 305-8573 つくば市天王台 1-1-1
 (hidemi@ims.tsukuba.ac.jp, <http://dora.ims.tsukuba.ac.jp/>)

§ 1. はじめに

ナノスケールの世界で構造を制御し、目的とする機能(物性)を実現したり、全く新しい機能を創製する試みが進められている。しかし、対象が微細化・精密化にするにつれ、構成要素(例えば単一分子)の僅かな個性の差異により、実現される機能の全てが決定されるといった状況が引き起こされる。従って、今後の展開のためには、構成要素の物性を、複数の要素の平均的な情報から得られる特性と区別することに加え、個々の要素の中で、原子スケールの局所構造と発現する機能の関係を正しく理解、評価する技術の確立が必要不可欠となる。通常的手法は、複数の試料からの情報や単一構造内での情報を平均化した結果を与えるものであり、走査プローブ顕微鏡(SPM)は、こうした技術として最も有望な手法の一つと言える。¹⁾

高分子の高次構造や超分子の形成過程を解析したり、^{2,3)} 分子緩和や電荷密度波を直接観察する他、^{4,5)} 探針や非弾性トンネル過程を利用した運動モードや化学反応の制御・解析、⁶⁻⁸⁾ 光を組み合わせた手法等、⁹⁻¹¹⁾ 多くの試みが進められている。本講演では、こうした中から、主に、単一分子レベルでの構造変化と電子特性の観察・解析、また、溶液中で分子間相互作用を計測する手法について、新しく開発された方法を交えて紹介する。

§ 2. 分子操作と構造解析—分子スイッチへの展開をにらんで

(1) 構造変化と電子特性の解析

例えば、正負バイアスに対する非対称な電子状態(整流性)や、負性抵抗等、単一分子内の電子輸送の解析と理解は基礎的に重要であるだけでなく分子素子の開発においても重要な課題である。¹²⁻¹⁴⁾ 多くの研究が進められているが、良く知られているように、接合その他、単一分子の伝導特性を測定・解析するためには、今もなお、多くの解決すべき問題が存在する。

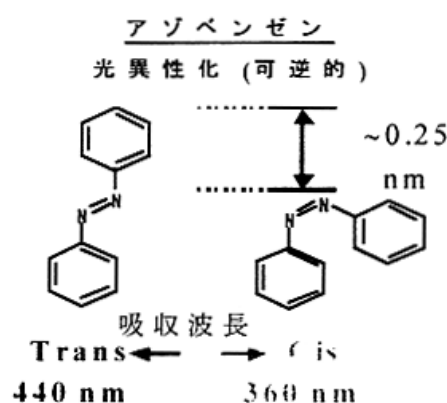
本講演では、光学異性体として知られているアゾベンゼン分子を対象とし、シス・トランス転移と、それに伴う電子特性の測定を例として、試料作製、測定・解析法、等について紹介する。アルカンチオール分子(C₁₂)膜中に埋め込んだアゾベンゼン分子は、走査トンネル顕微鏡(S TM)測定に伴う電圧・電流により、分子構造が変化し、それによって伝導特性が整流性を示す。段階的にバイアス電圧を変化させる I-V 曲線の測定により、選択

された特定の電圧における、シス-トランス間のフリップフロップ運動を解析することが可能である。バイアス電圧の大きさによる寿命の変化は、分子双極子と電場の相互作用による障壁の変化の見積もりとよく対応することが示される。また、実験からは、通常、準安定状態であるシス構造が最安定な構造となることを示唆する結果も得られている。非対称な構造を持つように設計された分子の特性が作動条件下で緩和されて整流性等の機能が劣化するといった結果も得られているが、外部励起と機能の関係については詳細な検討が必要であることを示すものである。アゾベンゼン分子の場合、光異性体であることから、次に述べるように、観察された構造変化の光制御も可能で、こうした両機構を利用することにより、ナノスケールのスイッチを実現する可能性も開けるものと期待される。

(2) 単一分子レベルでの光誘起構造の解析・制御

光学的な手法と STM を組み合わせると、局所領域での光物性計測の他、光誘起による構造制御を個々の分子に対して解析することが可能になる。ここでは、先に述べた、アゾベンゼン分子を例として詳細を紹介する。

アルカンチオール分子(C₁₂)単分子膜中に埋め込まれたアゾベンゼン分子の STM 像では、アゾベンゼン分子は明るい粒として観察される。アゾベンゼン分子は図に示してあるように、440 nm、320 nm の光励起により、トランス、シス構造をとることが知られており、溶液での測定の外、マクロではあるが単分子薄膜を対象とした測定や、原子間力顕微鏡を用いた分子鎖の平均的な長さの変化を測定することでも確認されている。そこで、He-Cd レーザーの二つの波長 (440 nm、320 nm) を交互に照射することにより、C₁₂ 薄膜中に埋め込まれ孤立したアゾベンゼン分子の構造制御と直接観察を試みた。C₁₂ のドメインバウンダリーや欠陥の近傍に存在する分子において、可視光 (440 nm) 照射では明るく見えるアゾベンゼン分子が、紫外光 (320 nm) を照射することにより暗くなり、可逆的にシス-トランス構造の分子長の差に対応する変化が現れることが確認された。光励起による単一分子レベルでの構造変化を STM でとらえた初めての例である。観察された変化は、先に述べた STM による外場変調による構造変化とよく対応しており、先にも述べたように、整流性などの電子特性を光制御と絡めることで今後の展開が期待される。



§ 3. 分子間相互作用の解析

生体材料等を対象とした分子機能の解析が盛んであるが、SPM の開発によって、抗原-抗体の分子間相互作用等を単一分子レベルで調べることも可能になった。こうした解析では、個々の分子の認識能や反応特性、溶媒効果などを直接評価することができるため、生体機能だけでなく、分子機能素子の設計・開発においても今後ますます重要な役割を担うもの

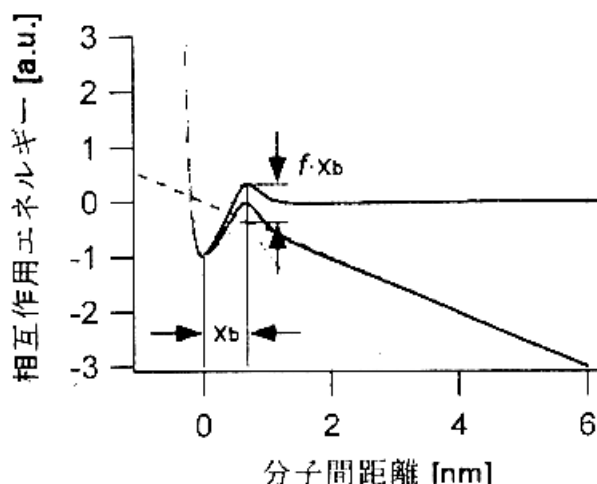
と期待される。^{1,15)}

(1) 動力学的な力の測定法

原子間力顕微鏡 (AFM) は、SiN などを材料に微細加工で作った非常に柔らかい板バネ (カンチレバー) をフォースプローブとして用い、プローブ先端に形成された針 (探針) と試料表面との間に働く微小な力 (一pN) を測定する装置であるが、探針や試料の表面を特定の分子で化学修飾することにより、これら分子の間に働く相互作用を単一分子レベルで測定することが可能になる。

分子結合は、結合を破断させるのに必要な破断エネルギー障壁 E_b によって規定され、ポテンシャルの最小点が定常状態における分子結合距離を与える。分子対に外力 f が加わるとポテンシャルは変形し、熱エネルギーを無視した議論では、 f を徐々に大きくしていくと、 f が dE/dx の最大値を越えたところでエネルギーバリアが消失し、結合が破断する。この場合、破断力 $f_{rupture}$ は $(dE/dx)_{max}$ で与えられ、引張り速度には依存しない。

しかし、一般に、生命活動で重要な役割を担う分子結合は、室温あるいは体温の環境で、容易に結合・破断することができ、その絶妙なバランスが分子の機能そのものとなる。これは、分子結合の破



断障壁 E_b が熱エネルギー $k_B T \sim 4pN \cdot nm$ (300K) と同程度であることを意味し、この時、分子結合は外力が無くても熱による攪乱の下で有限の自然寿命 t_{off} を持つ。外力 f が加わると障壁高さは $f x_b$ だけ減少し $E_b - f x_b$ となる (x_b は自然結合位置から測った障壁位置)。したがって、外力 f の下での結合寿命は (f による t_0 の変化が無視できるとき)、

$$t_{off}(f) = t_{off}(0) \exp[-f x_b / k_B T]$$

と表すことができる。図は外力によってポテンシャルが変化する様子を示したものである。そこで、外力を徐々に増加させると、それに伴い結合寿命は短くなり、 $f x_b < E_b$ のいずれかの時点で破断する。実際の破断点 (測定値) は理想的な条件下においても決定的ではなく、結合寿命の減少と外力の加重速度とのバランスで定まる確率分布に従って原理的なばらつきを示すことになる。

(2) 加重速度と破断力

加重速度を一定値 v_f とすると、力の変化は $f(t) = v_f t$ となる。結合状態にあった分子対が時刻 t で結合状態を維持している確率を $S(t)$ と書くと、一旦切れた分子対が再結合する確率が無視できる時、 $dS/dt = -S/t_{off}(f)$ が成り立つ (結合寿命 t_{off} の逆数が破断速度を与え

る)。従って、 $S(0)=1$ を用いて、この微分方程式を積分することにより、

$$S(t) = \exp\left[-\int_0^t 1/t_{\text{off}}(f) dt\right]$$

が得られる。破断力分布 $p(f)$ は $-dS/df$ で与えられ、

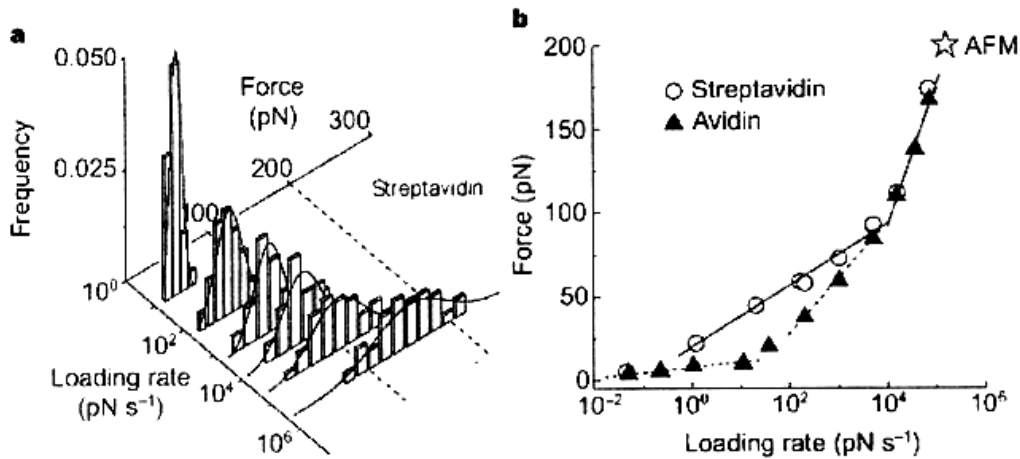
$$p(f) = \exp\left[-\int_0^t 1/t_{\text{off}}(f) dt\right] / [v_f \cdot t_{\text{off}}(f)]$$

であるから、分布の頂点を与える最頻破断力 f^* は $dp/df=0$ を解いて、

$$f^* = k_B T / x_b \left[\ln(v_f) + \ln(t_{\text{off}}(0)) - \ln(k_B T / x_b) \right]$$

と求まる。即ち、実験で複数の加重速度 v_f について破断力分布 $p(f)$ を測定すると、最頻破断力 f^* は加重速度の対数 $\ln(v_f)$ に比例し、比例係数から x_b が、 x 切片から結合の自然寿命 $t_{\text{off}}(0)$ が得られることになる。図は加重速度を変化させたときの判断力分布の変化の様子

(左図) と、破断力と対数 $\ln(v_f)$ の関係 (右図) である。傾きが幾つか現れるのは、ポテンシャルの構造に内部障壁が幾つか存在するためである。



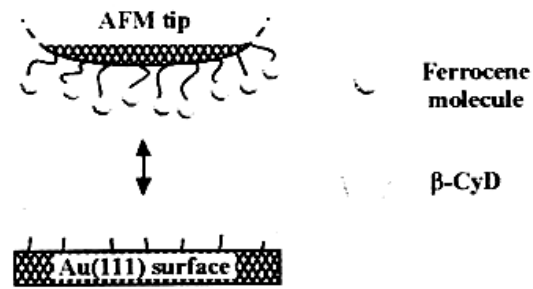
(3) より精密な測定にむけて

単一分子結合の破断力は非常に小さく (10–100 pN)、これを正確に測定するためには実験上のさまざまな困難を解決する必要がある。特に、1. 分子間結合以外のマクロスコピックな凝着力を除くための適切な試料の製作、2. 測定精度の原理的な限界を与える熱雑音の低減、3. 分子対に加える外力の適切な制御の3点が測定結果の信頼性を大きく左右する。以下に、それぞれの項目について簡単に紹介する。

3-1 試料の作製

DFS の試料は、図に示すように探針と基板とにそれぞれ測定対象となる分子を固定して作成する。通常これらの分子には長い分子鎖 (PEG 分子など、数–数十 nm 程度) が取り付けられ、その反対側が表面に固定される。これは、分子破断の瞬間に探針と対向基板との距離を十分に確保して、バルク同士の長距離引力が及ぼす影響を軽減するためである。また、分子の運動スケールに対して非常にゆっくりとしか移動できないマクロスケールのバネ先端に直接分子を取り付けると、分子の自由な運動を阻害してしまい、一旦破断した分子対が再結合する確率を無視できない程度に上げてしまうので、分子鎖にはこれを抑える利点もある。さらに、後述のとおり長い分子鎖がナノスケールのゴムとして働くことで、測定

精度を向上させる期待できる。分子密度が低い場合、探針や試料の表面には測定対象の分子に覆われていない表面部分が生じる。DFS測定のためにこの領域を他の不活性な分子で覆っておくことでバネ先端と対向基板との間のマクロスコピックな凝着力を軽減することが有効である。試料は、例えば、金表面と分子端に化学修飾したS原子の結合等を利用するが、膜の評価についてはSTM観察の他、電気化学的な測定等も有効である。^{16,17)}



3-2 探針のブラウン運動

非常にやわらかいバネは、溶媒中でブラウン運動による振動を示す。バネ（フォースプローブ）の熱振動振幅 Δx は、熱エネルギーの等分配則 $k(\Delta x)^2/2 = k_B T/2$ により、 $\Delta x = (k_B T/k_{fp})^{1/2}$ として与えられる。ここで k_{fp} は用いるバネのバネ定数である。対応してフォース曲線上での熱ゆらぎ Δf は $k_{fp} \Delta x$ により与えられ、 $\Delta f = (k_B T \cdot k_{fp})^{1/2}$ となる。これは、揺らぎを減らすにはやわらかいバネが適することを示している。このため、これまでDFSには、最もやわらかいAFMカンチレバーよりもさらに1~2桁やわらかいバネ定数を実現可能なBFP(Biomembrane Force Probe)やLOT(Laser Optical Tweezers)といった手法が用いられることも多かった。

しかし、実際の測定系はバネ、測定対象の分子対、分子対を基板とバネとに結びつける分子鎖、の3つから構成されており、系全体を考慮した議論が必要となる。まず、探針にはバネと分子鎖との両者により力が加えられるため、運動における実効的なバネ定数は、 k_{rub} を分子鎖のスティッフネスとして $k_{fp} + k_{rub}$ となる。従って、バネの熱振幅は、 $\Delta x = \{k_B T / (k_{fp} + k_{rub})\}^{1/2}$ 、フォース曲線上での振幅は、 $\Delta f_{apparent} = \{k_B T \cdot k_{fp}^2 / (k_{fp} + k_{rub})\}^{1/2}$ となり、ここでも小さな k_{fp} が小さな $\Delta f_{apparent}$ を与える。しかし、実際に分子対に力を及ぼすのが分子ゴムであることを考えると、分子結合にかかる力の揺らぎは $k_{fp} \Delta x$ で評価すべきである。 $\Delta f_{effective} = \{k_B T \cdot k_{rub}^2 / (k_{fp} + k_{rub})\}^{1/2}$ から、やわらかいバネと硬い分子鎖を用いることが有効とされてきたこれまでの指針とは180度異なり、硬いバネと、やわらかい、すなわち長い分子鎖を用いるほど分子対にかかる力の揺らぎを小さくできることが理解される。ただし、硬いバネを用いると装置の安定性や熱振動以外のノイズ成分の影響が顕著になるため、実験に際しては装置の特性を考慮した上でプローブのバネ定数を慎重に決定することが必要になる。

3-3 探針の位置制御

DFSは張力の加重速度 v_f を一定にした上で破断力分布を測定する。ところが、これまで行われたDFS測定はすべて、より簡便な方法として試料に対するプローブ根元部分の移動速度 v_x を一定にして行われてきた。分子対を表面に固定する分子鎖部分の伸びがプローブ

のたわみの変化に対して無視できる場合には $v_f = k_{fp}v_x$ の関係から、 v_x 一定は v_f 一定と同義であるが、分子鎖の伸びを考慮した場合には一般に v_f が $k_{fp}v_x$ よりも小さな値となり、分子鎖が伸びるにしたがって $k_{fp}v_x$ に近づくことになる。特に、プローブよりも分子鎖のスティッフネスが小さい条件ではこの影響が顕著になる。従って、分子のスティッフネスが問題となる状況でも、プローブのたわみを検出してプローブ移動速度へとフィードバックすることで加重速度を一定に保つことが必要である。分子ゴムのスティッフネスが探針・試料間距離に依存して変化するが、これに対応する形でプローブ移動速度を調節することにより、時間に対する加重速度変化を非常に小さく抑えられることが確認されている。

§ 4. まとめ

以上、分子マニピュレーションと極限計測について述べてきた。I-V 曲線を評価することから、相変化の寿命を解析したり、光励起STMを用いることで、単一分子レベルで分子の光学的特性と電子的特性と絡めて解析できる他、動的な力学測定法を用いることにより、例えば、ホスト-ゲスト錯体形成における微小な疎溶媒力の効果等の評価も可能となる。メゾスコピック系の物理が注目され、ナノスケールでの量子伝導の解析など理論的にも進展が著しい。理論との比較からも、対象とする微細構造を自由に加工・計測できることの意義は大きく、今後も、SPMを核とする技術が発展することにより、材料開発、物性研究をはじめとし、分野の垣根を越えて更なる可能性が展開することを願ってやまない。

参考文献

1. 朝倉物性シリーズ4「極限実験技術」三浦登、毛利信男、重川秀実
2. K. Shinohara, S. Yasuda, G. Kato, M. Fujita and H. Shigekawa, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001)3619.
3. K. Miyake, S. Yasuda, A. Harada, M. Komiyama, H. Shigekawa, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003)5080.
4. M. Ishida, O. Takeuchi, T. Mori, H. Shigekawa, *Phys. Rev. B* 18 (2001) 153405.
5. M. Ishida, T. Mori, H. Shigekawa, *Phys. Rev. Lett.* 83 (1999) 596.
6. H. Shigekawa, K. Miyake, J. Sumaoka, A. Harada, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 5411.
7. Y. Saino, Y. Kim, T. Komeda, M. Kawai, H. Shigekawa, *Surf. Sci.* 536 (2003) L403.
8. T. Komeda, Y. Kim, M. Kawai, B. Persson, H. Ueda, *Science* 295 (2002) 2055.
9. W. Ho et al, *Nature* 299 (2003) 542.
10. O. Takeuchi, R. Morita, M. Yamashita, H. Shigekawa, *Jpn. J. Appl. Phys.* 41, 7B (2002) 4976.
11. K. Nakajima et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* 42, 7B (2003) in press.
12. J. Chen, M. Reed, A. Rawlett, J. Tour, *Science* 286 (1999) 1550.
13. T. Ishida, W. Mizutani, N. Choi, U. Akiba, M. Fujihira, H. Tokumoto, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 11680.
14. J. Gaudioso, L. Lauhon, Ho, *Phys. Rev. Lett.* 85 (2000) 1918.
15. 武内修、保田論、三宅晃司、重川秀実 トライボロジスト 印刷中
16. S. Yasuda, I. Suzuki, T. Nakamura, M. Matsumoto, M. Komiyama, H. Shigekawa, *Appl. Phys. Lett.* 76 (2000) 643.
17. S. Yasuda, I. Suzuki, J. Sumaoka, M. Komiyama, H. Shigekawa, *Transactions of MRS of Japan* 25 (2000) 853.