

整理番号	2023-J-001	報告者氏名	関 貴一
------	------------	-------	------

研究課題名

生体超分子構造を利用した，二次元イオントロニックデバイスの構築

<代表研究者> 機関名：弘前大学 大学院理工学研究科 職名：助教 氏名：関 貴一

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：  
 機関名： 職名： 氏名：  
 機関名： 職名： 氏名：  
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

特定のイオンを検出するイオンセンシングやイオンを特異的に分離する技術は，精度の高い環境測定や医療診断，そして海水の脱塩機構の実現のために重要である．その技術を確立するためには，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ことがあげられる．これまでに高感度な電子材料上に自己組織化するペプチドを利用することで，二次元ナノ材料の電子特性や発光特性の制御が報告されており，適切に界面分子修飾を施し，光電子デバイスの応答性をチューニングすることで，高度なイオン応答性デバイスの作製が可能であることが示唆されている．

本研究では，この目標達成のための礎として，界面電気・分光測定を組み合わせ，(1) イオン種に対し特異的な親和性を示す生体ナノ構造のペプチド配列の選定，(2) イオン局在性と水分子の界面構造と生体ナノ構造のイオン応答性の相関を解明，の2つの研究ステップに着手した．

イオン種認識自己組織化ペプチドの初期検討として，生体に普遍的に存在する亜鉛イオンに焦点を当て，アミノ酸配列を設計した．原子間力顕微鏡を用いた界面吸着量の検証から，今回設計したペプチド群は，いずれの場合でもグラファイトや二硫化モリブデンなどの二次元ナノ材料上に高い吸着特性を示した．用いるペプチド水溶液濃度と表面被覆率の関係から求めた吸着定数は，既報のグラファイト吸着ペプチドの10倍ほどの値を示し，安定なデバイス表面修飾が望めることが明らかとなった．その一方で，界面におけるナノ構造形成の観点からは，マクロな周期構造は確認できず，界面ナノ構造法のさらなる検討が望まれる．

界面ペプチドの分子構造の解析においては，顕微ラマン分光システムの構築を完了し，水溶液中での *in situ* ペプチド分子構造を行うための二次元ナノ材料転写装置についても構築を終えた．透過配置にて分光測定を行うため，光学的に透過率の高い単層の二硫化モリブデンの合成法についても確立した．また界面イオン・水和環境を測定するための和周波発生振動分光システムについては，予備動作確認を完了し，顕微測定システムの構築に取り掛かっている．今後は，これらの分光システムを元に，電子材料界面における分子・イオン・水和構造の相関の解明に向けて，検証を重ねていく．下記にて，詳細を報告する．

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>  
記載事項なし.

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

#### 研究目的：

特定のイオンを検出するイオンセンシングやイオンを特異的に分離する技術は、精度の高い環境測定や医療診断、そして海水の脱塩機構の実現のために重要である。その技術を確立するためには、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ことがあげられる<sup>1</sup>。

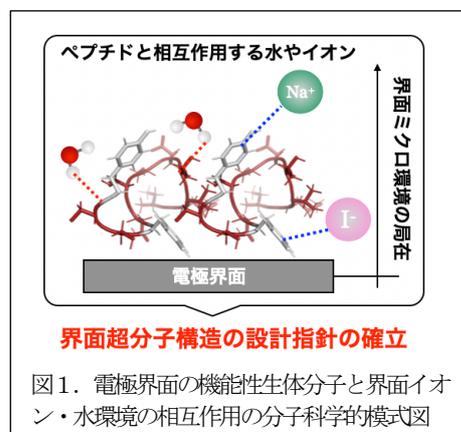
これまでに私は、生体分子のイオン認識能を利用すべく、二次元電子材料上に自発的に規則的な分子配向・ナノ構造を形成する自己組織化ペプチドの研究に着目してきた。これまでに、例えばフェージディスプレイ法を用いバイオコンビナトリアル的に選定された、グラファイト表面に特異的に吸着する12アミノ酸配列の自己組織化ペプチドを用いて、高感度な二次元電子材料であるグラフェン電界効果トランジスタ（Field-effect transistor, FET）を修飾することで、グラフェン電子材料の電流特性を変調できることが報告されてきた<sup>2</sup>。私は、この自己組織化ペプチドに着目し、グラフェンとは異なる二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を示してきた<sup>3</sup>。これらの先行研究から、ペプチド超分子ナノ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あることが示されてきている。さらに私は、これらの先行研究をもとに、二硫化モリブデンナノシートの発光特性に関しても、表面修飾をするペプチド種により、発光特性が異なることが分かり、さらには発光デバイスに電圧を印加し、発光特性の時間変化を評価したところ、ペプチド修飾をすることでカチオンの種類に応じて、発光強度の時間応答性の変化が見られた。このように適切に界面分子修飾を施し、光電子デバイスの応答性をチューニングすることで、高度なイオン応答性デバイスの作製が可能であることが示唆されている。

しかし、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。電子材料上の生体分子ナノ構造と界面イオン・水環境との相互作用を理解する、界面のナノバイオイオニクスともいべき、この学理を確立することで初めて、高感度かつ高精度のイオンセンサーや脱塩素子などの機能材料が実現できると考えられる（図1）。

本研究課題は、この目標達成のための礎として、界面電気・分光測定を組み合わせ、（1）イオン種に対し特異的な親和性を示す生体ナノ構造のペプチド配列の選定、（2）イオン局在性と水分子の界面構造と生体ナノ構造のイオン応答性の相関を解明、を試みるものであり、本研究の究極の到達地点としては、得られた知見を基に、イオンセンシングを行う高感度な光電子デバイスの開発を行い、イオン流によって高度な信号伝達を行う細胞の活動などを時空間的に検出するツールの構築を目指している。

#### 研究経過：

計画時に掲げた具体的な課題は、（1）界面でのペプチド超分子ナノ構造のイオン応答性評価、（2）ペプチド超分子ナノ構造のイオン応答性の起源の解明、である。本研究報告では、（1）の新規イオン応答性ペプチドの設計検討とナノ構造評価、そして上記目標（2）の前段階である、疎水性界面のイオン種の局在の評価と、顕微ラマン分光装置と和周波発生振動分光装置の構築状況について報告する。



## 研究結果と考察について：

## 1. 新規イオン応答性ペプチドの設計検討とナノ構造評価について

本研究期間では、新規イオン応答性自己組織化ペプチドとして、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、 $-C-X-X-C-/H-X-H-(X)$  (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。(1) CGAMHLPWCMGTLH, (2) YCSCGPGGHSY, (3) 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<sup>5</sup>。

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晩乾燥させた。研究申請時には、このペプチドナノ構造の評価のための原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy, AFM) が正常に動作することを期待していたが、ピエゾスキャナーとコントローラーの老朽化のため、動作に異常が発見され測定ができなかった。さらには、大学共通機器のAFMもコンピュータとの通信不良のためAFM測定を行うことができず、2024年9月に導入されたAFMを用いて、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。表面に吸着した気泡に由来すると考えられるペプチド非吸着部位は見られるものの、 $0.1 \mu\text{M}$  以上のペプチド高濃度域では高い被覆率が確認できた。 $0.1 \mu\text{M}$  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 ( $\text{MoS}_2$ ) 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解析することにより吸着定数を求めると、グラファイト基板の場合  $21.8 \mu\text{M}^{-1}$ ,  $\text{MoS}_2$  の場合  $97.5 \mu\text{M}^{-1}$  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る<sup>6</sup>。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、 $\text{MoS}_2$  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、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。

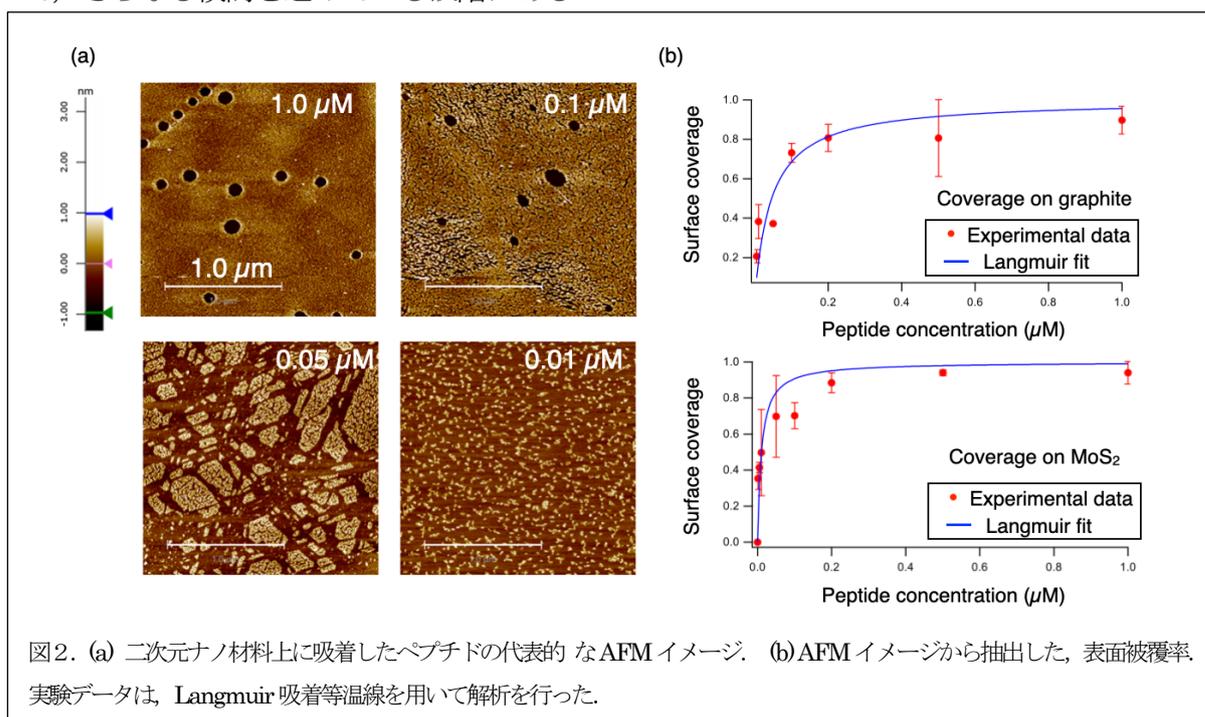
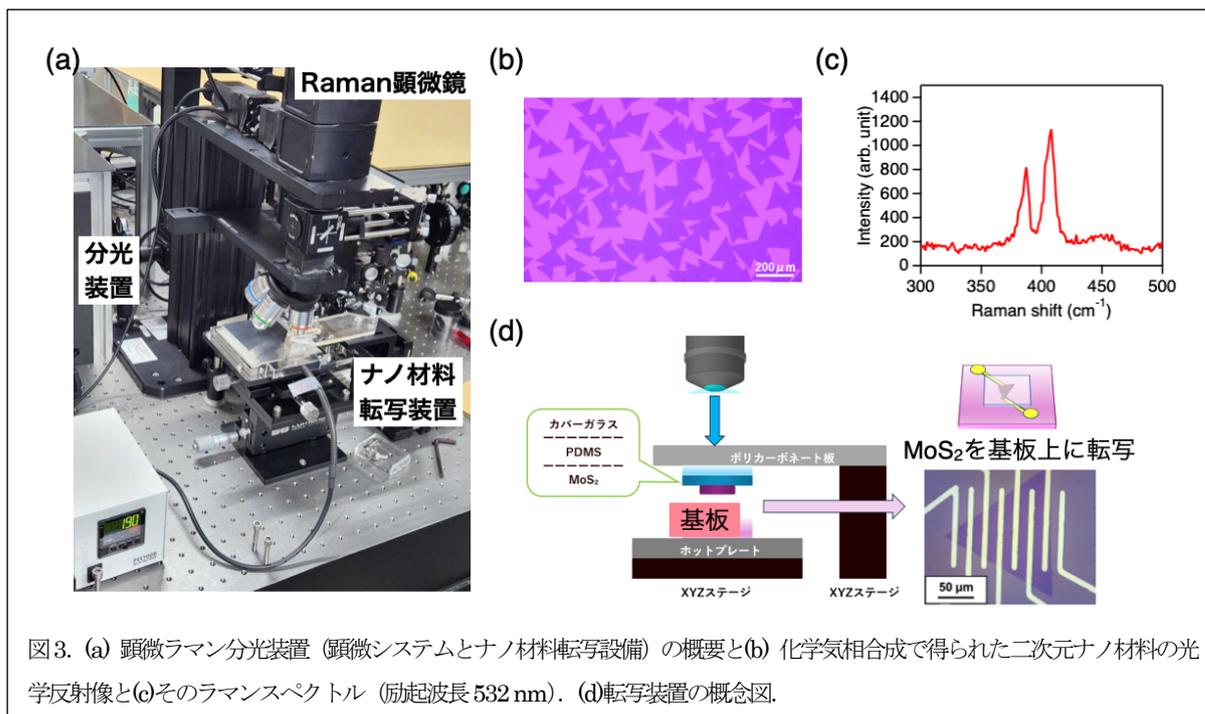


図2. (a) 二次元ナノ材料上に吸着したペプチドの代表的なAFMイメージ。(b)AFMイメージから抽出した、表面被覆率。実験データは、Langmuir 吸着等温線を用いて解析を行った。

## 2. 顕微ラマン分光システムとヘテロダイン検出 SFG 分光システムの構築の経過について

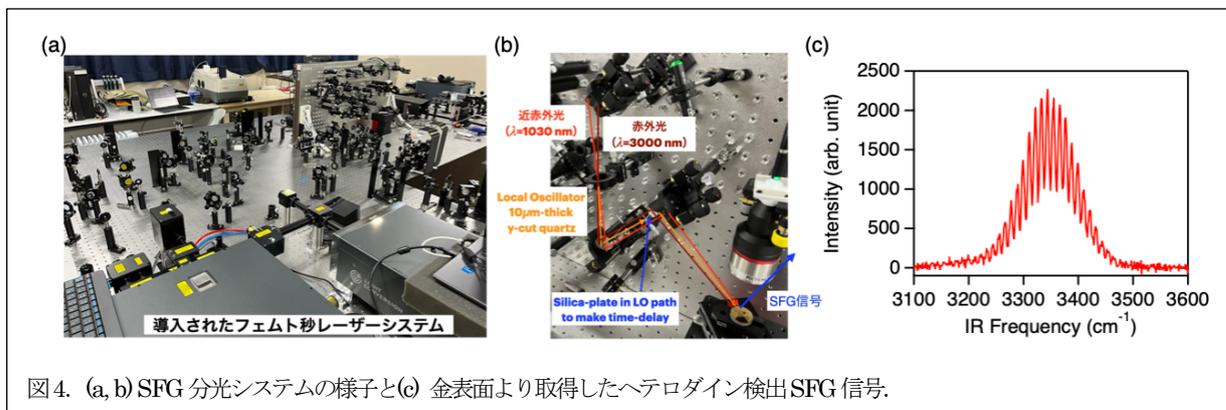
本研究期間では、上記項目（1：新規イオン応答性ペプチドの設計検討とナノ構造評価）に加えて、電極界面の自己組織化ペプチドの分子構造、そして界面吸着イオン・水分子の構造情報の取得のために、顕微ラマン分光システムと顕微和周波発生振動分光システムの構築を進め、顕微ラマン分光システムについては、申請時には構築中ではあったが、ラマン分光システムの励起光源として、狭帯域 CW レーザーを導入することで 2024 年 5 月頃構築を完了した（図 3a）。

プリ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、シリカやフッ化カルシウムなどの光学的透明基板に二次元材料を固定する方法の確立を目指した。光学的透過性を担保するため、二次元ナノ材料はバルク鱗片ではなく、薄膜化する必要がある。我々は化学気相合成法により単層の  $\text{MoS}_2$  を作製した。サイズとしては、一辺 50 ミクロン以上の単結晶ナノシートの合成条件を確立した（図 3b）。さらに、その層数に関しては、ラマンスペクトルの二硫化モリブデンの  $A_{1g}$  ( $\sim 405 \text{ cm}^{-1}$ ) モードと  $E_{2g}$  ( $\sim 385 \text{ cm}^{-1}$ ) モードのピーク位置から、単層の二硫化モリブデンナノシートが生成していることを確認した（図 3c）。これを透明基板上に固定させるため、2024 年 8 月には、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することで、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 3d）。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の整備は完了したと考えている。



また界面イオン・水環境を理解するための、SFG 分光装置に関しては、当初の予定では 2024 年 4 月頃までにフェムト秒レーザーを導入予定であったが、レーザーシステム選定や政府調達の手続きなどの滞りのため、最終的に 2024 年 7 月末に導入となった。本研究で構築する SFG 分光システムは、従来のチタンサファイアフェムト秒レーザーと異なる高繰り返しの高輝度光源を用いる。そのシステムの最適化のため、従来の SFG 分光システムで利用してきた光学素子類の再選定を行った。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をサンプル位置まで誘導し、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、ビーム径などを調整しつつ構築した。また SFG 分光測定波長の波長分解能を決めるアップコンバージョン光を狭帯域化する必要がある。自作の 4 f パルスシェ

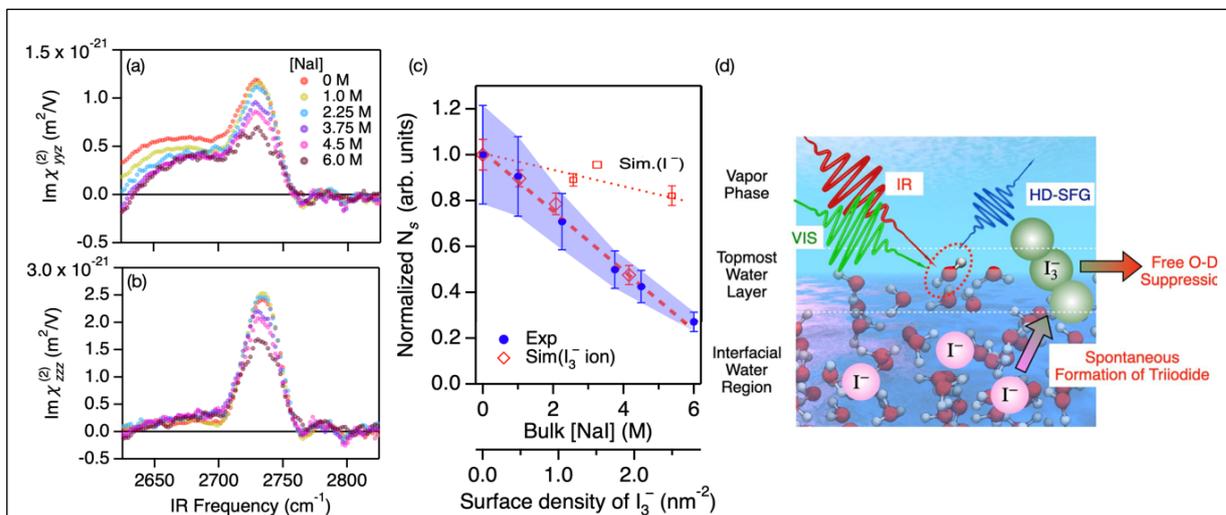
ーパーを構築した。このパルスシェーパーを構築する際に、初期の検討で反射型回折格子を検討したが、ビームポインティングが安定せず断念した。そこで熱膨張や素子のダメージを軽減させるため、透過型回折格子を用いてパルスシェーパーを構築し、狭帯域化を達成した。アップコンバージョンのビーム幅は $\sim 14 \text{ cm}^{-1}$ 程度であり、サンプル位置で $2 \mu\text{J}$ 程度の強度となった。中赤外光に関しても $2 \mu\text{J}$ 程度となった。それを用いて、yカット水晶から参照SFG信号を発生させ、金表面よりヘテロダインSFG信号を検出することができた。このようにSFG分光システムに関して、光学素子の選定を大方終了した(図4)。この知見を元に、顕微SFG分光システムの構築を進めている。



### 3. 電極界面のイオン局在性の評価法の開拓について

さらにスピノフではあるが、2023年度から2024年にかけて、電極界面におけるイオンや水分子の局在構造や水素結合様式の解明するための界面構造解析法の開拓を目指し、上述のヘテロダイン検出SFG法を用いて、モデル電極界面として、気液界面におけるイオンの局在性の評価法の構築に取り組んだ。具体的には、重水-空気界面に存在する気相にOD基を突き出した重水分子のHD-SFG信号強度(Free-OD基SFG信号)に着目し、ヨウ化物イオンが空間的にどのように界面に局在しているのか評価した。

イオン種の界面活性を定量的に評価するため、偏光依存SFG(PD-HD-SFG)測定を行い、異なる偏光状態の組み合わせで $\text{Im}\chi_{yyz}^{(2)}$ と $\text{Im}\chi_{zzz}^{(2)}$ スペクトルを取得した(図5a,b)。バルクのヨウ化ナトリウム濃度 $[\text{NaI}]$ を2 M以上に増加させると、 $2730 \text{ cm}^{-1}$ 付近のFree-OD基SFG信号は著しく減少し、6 M付近では純重水溶液のFree-OD基SFG信号の半分程度の強度となった。この $\text{Im}\chi_{yyz}^{(2)}$ と $\text{Im}\chi_{zzz}^{(2)}$ スペクトルの信号強度比から、界面のFree-OD基の数密度( $N_s$ )を見積もったところ、図5cに示すように、ヨウ化物イオン濃度の上昇に伴い、数密度が著しく減少していることが分かった。シミュレーションとの比較の結果、界面はヨウ化物イオンではなく、三ヨウ化物イオンによって支配されて



いることがわかった (図 5 d). これは水の界面構造の定量的評価が, 界面のイオン環境を高精細に解き明かせることを示すだけでなく, 界面におけるヨウ化物イオンから三ヨウ化物イオンの自然発生過程が, エアロゾル形成の鍵となるヨウ素の大気中への放出経路になるのではないか? という新たな環境化学的知見を与える結果となった<sup>8</sup>.

#### 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> modified by pH under aqueous solutions toward potential biological sensing. *2D Materials* **7**, 034001 (2020).
8. Seki, T. *et al.* Spontaneous appearance of triiodide covering the topmost layer of the iodide solution interface without photo-oxidation. *Environ. Sci. Technol.* **58**, 3830–3837 (2024).