

AFM によるリゾチーム単一分子の電気伝導計測[†]

角田 早・大山 浩・松本卓也

大阪大学大学院理学研究科 ☎ 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

(2016 年 3 月 11 日受付；2016 年 4 月 8 日掲載決定)

I-V Measurement of Lysozyme Single Molecule by Conductive-AFM

Saki SUMIDA, Hiroshi OHYAMA and Takuya MATSUMOTO

Osaka University, 1-1 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043

(Received March 11, 2016 ; Accepted April 8, 2016)

Although the protein attracts as a candidate molecular electronic material, its conduction mechanism in dry condition is not clear in detail. Electrical conductance through a single molecule of lysozyme, which is composed of only peptide chain without metal, was observed by conductive atomic force microscopy using a gold substrate and gold-coated tip modified with a self-assembled monolayer of 2-pyridine sulfide. A significant current ($\sim 10^{-9}$ A) is observed to flow under a bias voltage, and the current-voltage (*I-V*) characteristics show non-linear *I-V* characteristics with clear thresholds about 2.5 V. Observed *I-V* characteristics can be well reproduced by the single barrier tunneling model based on the narrower barrier width with the bias voltage. These results suggest that the electrical conduction of lysozyme is governed by the tunneling mechanism *via* the peptide chain of protein.

KEYWORDS : protein, lysozyme, atomic force microscopy, single-molecule, tunneling

1. はじめに

タンパク質はその構造に応じて、生体内で触媒作用、電子輸送、栄養貯蔵など様々な機能を有している。特に、生体内で金属の酸化還元に基づき電子輸送を行う金属内包タンパク質は、有機機能性材料として分子エレクトロニクス分野で注目されている。金属内包タンパク質は、酸化還元中心となる金属が分子内に存在することで非線形な電気伝導を示すと考えられているが、詳細は明らかになっていない。本研究では、ペプチド鎖のみから構成される金属非内包タンパク質に注目し、非線形な電気伝導を得ること、金属内包タンパク質との電気伝導の違いを検討することを目標として研究を行った。本研究では金属非内包タンパク質としてリゾチームに注目し、電気伝導測定を行った。本研究で用いたリゾチームは卵白由来のものである。リゾチーム分子はペプチド鎖のみから構成されており、X線構造解析の結果から分子

サイズは $3.0 \times 3.0 \times 4.5$ nm と報告されている¹⁾。

タンパク質単分子の電気伝導測定を行うためには、タンパク質単分子を電極間に配置する必要がある。ナノサイズの測定系において、分子—電極間の安定な接合を得ることが必要である。そこで、本研究では単分子の電気伝導測定を行うために、導電性原子間力顕微鏡 (conductive atomic force microscopy, C-AFM) による点接触法を用いた。この測定方法は、時間や温度に関する安定性では、ナノギャップ電極を用いた測定に劣るが、分子—電極間接合に働く力を計測・制御できること、測定対象分子の画像観測により単分子測定であることの確証や分子変形の程度がわかるなど、分子そのものに関する多くの情報を得ることができる。また、ブレイクジャンクション法のように、電極間距離を離す過程で行う測定ではないので、分子と電極間に化学結合を形成する必要がなく、物理的接触で測定が行えることもこの方法の利点である²⁾。

これまでに乾燥状態のタンパク質単分子について、走査トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscopy, STM) や C-AFM を用いた電気伝導測定の結果が報告されてい

[†] 第 35 回表面科学学術講演会 (2015 年 12 月 1 日～3 日) にて発表

E-mail : matsumoto-t@chem.sci.osaka-u.ac.jp

る³⁻⁵⁾。これら STM や C-AFM を用いた測定では、導電性基板上にタンパク質を直接固定化し、導電性探針を用いて電気伝導測定が行われていることが多い。しかし、金属上にタンパク質を固定化すると、タンパク質が金属吸着によって構造破壊してしまうことが問題である。正しくタンパク質の電気伝導特性を知るためには、測定の際に電極間でタンパク質が構造を保持していることが重要である。

そこで本研究では、タンパク質の構造を保持した状態で電気伝導測定を行うために、電極となる金基板、金コート探針に緩衝層となる自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer, SAM) 修飾を行った。SAM 修飾金基板上ではタンパク質が構造を保持するという報告がある⁶⁻⁸⁾。SAM として、ピリジンチオール (PyS) を用いた。ピリジンチオール分子は金表面に容易に SAM を形成することが知られている⁹⁾。ただし、ここでの構造保持とは、タンパク質のフォールディングがおよそ保持されているという意味であり、タンパク質に結合している水分子がすべて保たれているわけではない。当然、乾燥状態にあるタンパク質の電子状態は水中にあるときとは大きく異なっていると考えられる。このような相違も、固体デバイスとしてのタンパク質の応用を視野に入れた本研究の目的と強く関連している。

2. 実験方法

2.1 試料作製

Au(111) 清浄表面の作製は真空蒸着法を用いて行った^{10,11)}。蒸着には自作の高真空蒸着チャンバーを用いた。劈開したマイカ基板を真空チャンバー内に導入し、600°C で一晚加熱して脱ガスを行った後、そのまま温度を維持して金蒸着を行うことで、Au(111) 清浄表面を得た。マイカ基板の脱ガス、蒸着時の温度はパイロメーター (輻射率 0.5 に設定) で測定した。金薄膜の形成は、 5.0×10^{-5} Pa よりも高い真空度を維持しながら、約 100 Å/s の蒸着速度で行い、膜厚は約 400 nm であった。作製した Au/マイカ基板を真空チャンバーから取り出した後、素早く 2,2'-dipyridyl disulfide (東京化成工業) のエタノール溶液に室温で 12 時間浸漬することで、Au(111) 表面に 2-PyS の SAM を形成した⁹⁾。このようにして得た 2-PyS/Au(111)/マイカ基板の上に 1 μM リゾチーム水溶液を 40 μL 滴下した後、真空デシケータ中で乾燥して、基板上へのリゾチーム分子を固定した。

2.2 AFM 測定

AFM による表面形状の観察および電気伝導特性の測定は JEOL JSPM-4200 に手を加えた装置で行った。表面構造観察のみを行うときには、バネ定数 50 N/m、共振

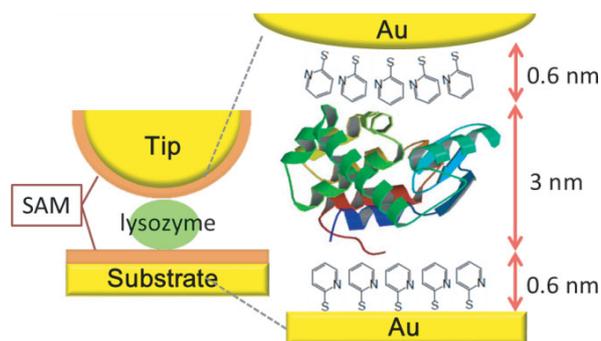


Fig. 1. (color online). Schematic diagram of *I-V* measurement for lysozyme single molecule by 2-PyS SAM modified Au electrodes using C-AFM.

周波数 350 kHz のシリコン探針 (NCH-10T, Nano world) を用いて、タッピングモードにより、大気中、室温で測定した。

電気伝導測定には、バネ定数 14 N/m、共振周波数 315 kHz の金コート探針 (NSC 12/Cr-Au/15, Mikro-Masch) を用いた。金コート探針は、O₃-UV 照射による前処理を 30 分間行った後、基板表面と同様の方法で SAM 修飾を行った。探針先端に SAM 膜があることは、タンパク質を固定化していない試料について、コントロール実験を行うことで確認した。すなわち、タンパク質のない試料で電気伝導特性を測定すれば、試料側と探針側を合わせて二層の SAM 膜を通したオーミックなトンネル電流が得られる。二層の SAM 膜を通したトンネル電流は、一層のときに比べて著しく小さいので、タンパク質を通した電流測定の実験中も、随時、容易に探針先端の SAM 修飾の有無を確認できる。

SAM 修飾金探針-タンパク質-SAM 修飾金基板間で行った電気伝導測定の概略を Fig. 1 に示した。測定は室温真空条件下で contact mode により行った。探針を試料に近づける際に、光でこのフォトダイオード出力をモニタしてカンチレバーの撓み、すなわち負荷力を一定に保ちながら、バイアス電圧の走査を行い、電流-電圧特性を得た。測定後に使用したカンチレバーのフォースカーブを測定し、バネ定数から負荷力を算出したところ、測定時の負荷力は 20 nN であった。

3. 結果および考察

Au(111) 基板表面を AFM 観察したところ、約 0.2 nm の Au 原子ステップと 3 回対称のエッジを持つテラスが広範囲で観察された。したがって、基板は Au(111) 表面であるといえる。さらに、これら Au(111) 表面の特徴は、ピリジンチオールで修飾した 2-PyS SAM/Au(111)

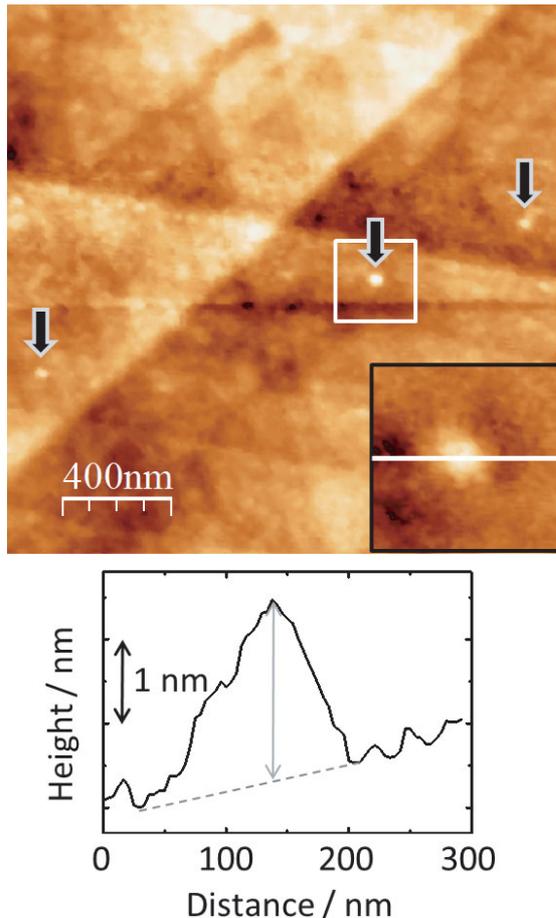


Fig. 2. (color online). AFM image of lysozyme molecules adsorbed on 2-PyS SAM modified Au substrate. The inset shows an enlarged image of white framed area. The section profile of white line in inset indicates a lysozyme single molecular height of about 2.5 nm.

表面でも変わることなく維持されていた。したがって、Au(111)表面でピリジンチオールSAMが一様に形成されていることがわかった。

Fig. 2は2-PyS SAM/Au基板上にリゾチームを固定した試料のAFM画像と、画像中の白線部の高さプロファイルである。画像中に矢印で示したように輝点が観測された。このような輝点は分子滴下前の基板では観測されなかったため、この輝点一つ一つがリゾチーム分子であると考えられる。画像中の白線の枠で囲んだ部分を拡大した画像が右下の画像であり、この輝点の高さは2.5 nm程度であった。他の輝点についてもおよそ2.5 nm程度に観測された。これは、X線構造解析によってわかっている分子の大きさである $3.0 \times 3.0 \times 4.5 \text{ nm}^3$ の短辺部分と大きく変わらない値となった¹⁾。金属表面に直接吸着した分子は半分以下程度の高さで観測されることや、タンパク質は高さの1/3~半分程度になるとフォルデ

イングが壊れるといったことが報告されている。このことから本研究ではSAM修飾基板を用いることでリゾチーム分子のフォルディングを壊すことなく基板上に固定化することに成功した。このようにリゾチーム分子のフォルディングが保たれ、1層以下で固定化された試料を用いて電気伝導測定を行った。

Fig. 3は20 nNのloading forceで2-PyS SAM修飾電極を用いてリゾチームの電気伝導測定を複数箇所で行った結果の電流-電圧(I - V)曲線と、規格化した I - V 曲線である。得られた電流値は $10^{-10} \sim 10^{-9}$ Aオーダーであった。電流値は数倍の範囲内で揺らぐが、規格化することで線形はほとんど一致した。これらの I - V 曲線はすべて2.5 V以下では検出限界以下の電流しか観測されず、2.5 Vから電流の立ち上がりが見られる閾値を有する非線形な電気伝導特性が得られた。SAMのみでの I - V 曲線はゼロバイアスコンダクタンスを有しており、今回得られた線形とは明らかに異なる。そのことから、得られた特性はリゾチーム分子由来の特性と考えられる。また、 I - V 曲線の電流値のばらつきの原因は、基板上でのリゾチームの固定状態のばらつき、測定における探針の揺らぎや分子と単針との接触面積の測定ごとの違いなどに起因すると考えられる。このような閾値を有する非線形な I - V 曲線を示す電気伝導の機構について、線形フィッティングを行うことで考察する。

リゾチームはペプチド鎖のみで構成されているため、電極間にペプチド鎖に由来する障壁が存在し、電極間を電子がトンネリングすることで伝導が起こっているというモデルでフィッティングを行った^{12,13)}。**Fig. 4**はモデルの概念図である。低バイアス領域では、トンネル距離が長いために検出限界以下の電流しか観測できないが、電圧を印加することにより、高バイアス領域でトンネル障壁の厚みが小さくなることにより電流が観測されるというモデルである。トンネリングモデルのフィッティングに用いた式は以下のとおりである。

$$I = \frac{Ae^3}{4\pi h \Phi} \left(\frac{V}{\beta d} \right)^2 \exp \left(- \frac{8\pi \beta d \Phi m^{\frac{1}{2}}}{3eh} \frac{1}{V} \right) \quad (1)$$

式(1)において、 A は探針-試料間の有効接触面積、 e は電気素量、 h はプランク定数、 d はトンネル障壁の厚み、 β はトンネルにおける減衰定数、 m は自由電子質量、 Φ は電極のフェルミ準位とトンネル障壁の高さの差である。 d はペプチド鎖由来のトンネル障壁の厚みであり、今回はAFMによって観測された基板上的リゾチーム分子の高さである2.5 nmを用いた。この式は、よく知られたFowler-Nordheimの式と基本的に同じ考え方であるが、分子系の電子トンネリングで良く用いられる減衰定数 β が顕わになる形で書き下した。線形フィッテ

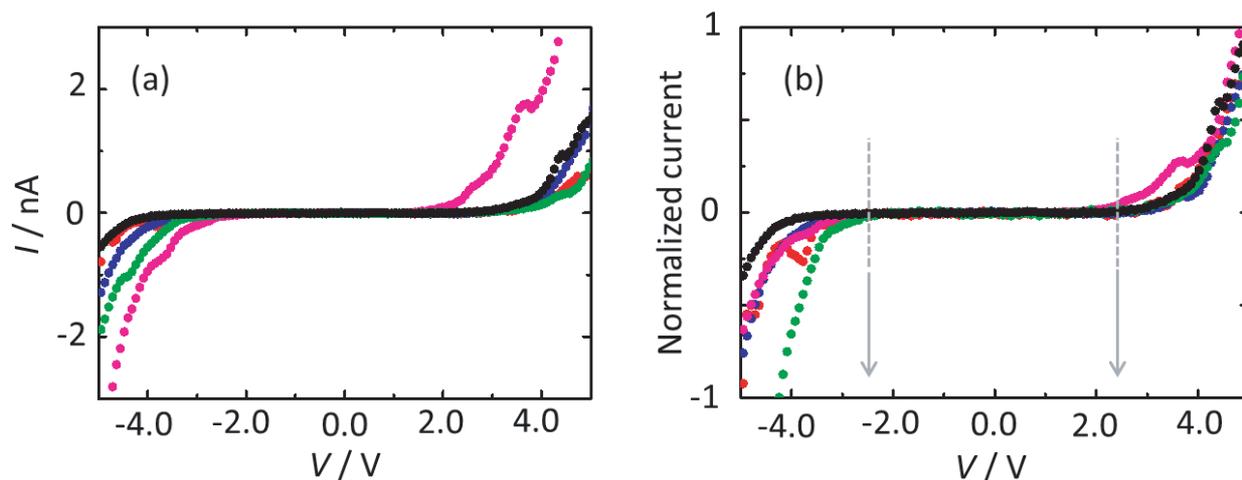


Fig. 3. (color online). (a) I - V curves obtained for lysozyme single molecule by 2-PyS SAM modified electrodes at different positions under a loading force of 20 nN. (b) Normalized I - V curves for several measurements. Non-linear I - V curves are obtained with threshold at 2.5 V.

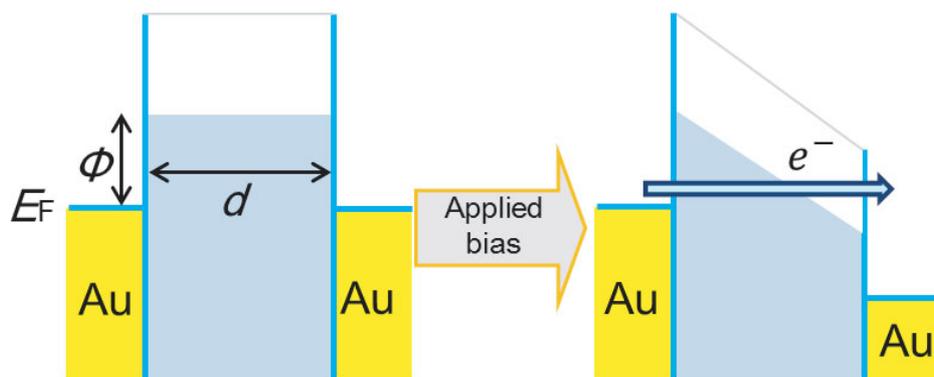


Fig. 4. (color online). Schematic diagram of tunneling conduction model through lysozyme single molecule. Left panel : without bias voltage ; right panel : with bias voltage.

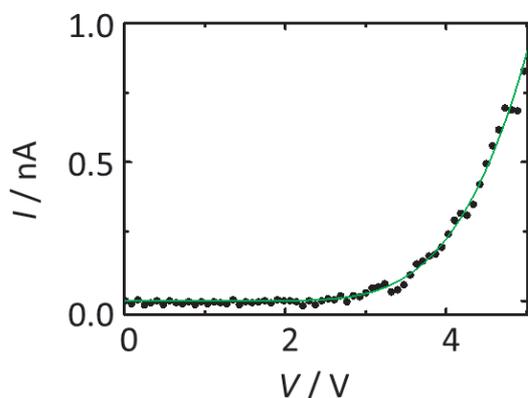


Fig. 5. (color online). Representative I - V curve obtained for lysozyme single molecule by 2-PyS SAM modified electrodes (black dot) and fitting result by tunneling conduction model expressed in equation (1) (solid line).

ィングの際には、 β 値として、これまでに報告されているペプチド鎖の減衰定数として一般的であると考えられる 1.0\AA^{-1} に固定した¹⁴⁾。他のパラメータはすべて、すでに値のわかっているものばかりであるので、フィッティングの結果から ϕ を求めることができる。

リゾチームの I - V 特性のフィッティング結果を **Fig. 5** に示す。トンネル障壁の高さ $\phi = 1.1 \pm 0.3$ V のとき、式 (1) は実験結果と良い一致を示した。これより、乾燥状態での電気伝導は、リゾチーム分子を通した 1 段階のトンネリングであること、電流-電圧特性の立ち上がりは、バイアス電圧により実効的なトンネル障壁が薄くなる効果によるものであることが示唆された。

4. ま と め

SAM 修飾基板を用いることで、乾燥条件下でリゾチ

ーム分子のフォールディングを保った状態での単分子電気伝導測定に成功した。分子に由来する電気伝導特性として、2.5 V の閾値を有する非線形な電気伝導特性を得た。リゾチーム分子を通した電流—電圧特性はトンネリングで理解できること、特にバイアス印加時の実効バリアの低下が重要な役割を果たし、閾値特性を示すことが明らかとなった。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金、新学術領域研究、分子アーキテクニクス「電子移動反応に基づくネットワーク型分子電子機能の創出」(25110014) および、基盤研究 B 「自己組織化レドックスネットワークによる脳型デバイスの創成」(24360011) の助成を得て行われた。

文 献

- 1) C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips and V.R. Sarma : *Nature* **206**, 757 (1965).
- 2) J. Zhao, J.J. Davis, M.S.P. Sansom and A. Hung : *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5601 (2004).
- 3) D. Xu, G.D. Watt, J.N. Harb and R.C. Davis : *Nano lett.* **5**, 571 (2005).
- 4) I. Delfino, B. Bonanni, L. Andolfi, C. Baldacchini, A.R. Bizzarri and S. Cannistraro : *J. Phys. : Condens. Matter* **19**, 225009 (2007).
- 5) C. Baldacchini, V. Kumur, A.R. Bizzarri and S. Cannistraro : *Appl. Phys. Lett.* **106**, 183701 (2015).
- 6) A. Krolikowska : *Electrochim. Acta* **111**, 952 (2013).
- 7) I. Ron, L. Sepunaru, S. Itzhakov, T. Belenkova, N. Friedman, I. Pecht, M. Sheves and D. Cahen : *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4131 (2010).
- 8) L. Li, S. Chen and S. Jiang : *Langmuir* **19**, 2974 (2003).
- 9) A. Ulman : *Chem. Rev.* **96**, 1533 (1966).
- 10) J.A. DeRose, T. Thundat, L.A. Nagahara and S.M. Lindsay : *Surf. Sci.* **256**, 102 (1991).
- 11) M. Hegner, P. Wagner and G. Semenza : *Surf. Sci.* **291**, 39 (1993).
- 12) A. Vilan : *J. Phys. Chem. C* **111**, 4431 (2007).
- 13) J.G. Simmons : *J. Appl. Phys.* **34**, 1793 (1963).
- 14) R. Langen, I-J. Chang, J.P. Germanas, J.H. Richards, J.R. Winkler and H.B. Gray : *Science* **268**, 1733 (1995).