酢酸ナトリウム過飽和溶液中における 金ナノ結晶の分散状態とその高精度 1 分子回転動態観察[†]

松下祐福¹・関口博史²・一柳光平³・池崎圭吾¹・後藤佑児⁴・佐々木裕次^{1,2}

¹東京大学大学院新領域創成科学研究科 ☎ 277-8561 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

²高輝度光科学研究センター ☎ 679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

³高エネルギー加速器研究機構 ☎ 305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

⁴大阪大学蛋白質研究所 ☎ 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3 番 2 号

(2015 年 2 月 16 日受付；2015 年 8 月 25 日掲載決定)

Observation of High Accuracy Rotational Dynamics and Dissolution Characteristics of Gold Nanocrystals on Sodium Acetate Supersaturated Solution

Yufuku MATSUSHITA¹, Hiroshi SEKIGUCHI², Kouhei ICHIYANAGI³, Keigo IKEZAKI¹, Yuji GOTO⁴ and Yuji C SASAKI^{1,2}

¹Department of Frontier Science, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwano-ha Kashiwa, Chiba 277-8561

²JASRI/SPring-8, 1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198

³High Energy Acceleration Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801

⁴Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

(Received February 16, 2015 ; Accepted August 25, 2015)

The comprehension of supersaturated phenomena in solution is one of the most important issue. For example, development of industrial crystallization processes, elucidation of bio-mineralization process, and protein abnormal aggregation process. In this study, we focused on the development of a novel method to observe the solution structure of supersaturated solution in nano-scale level by monitoring dissolved gold nanocrystals dynamics also known as Diffracted X-ray Tracking (DXT). From this study, we established a dissolution system of gold nanocrystals on the sodium acetate solution (6.4 M) and we succeeded in observing rotational dynamics of a dispersed single gold nanocrystal in 100 μ s time scale resolution.

KEYWORDS : supersaturated solution, diffracted X-ray Tracking, single molecule measurement

1. はじめに

溶液からの晶析技術は、食品や医薬、工業などの幅広い産業分野において、結晶構造や粒径の制御、不純物溶質の分離行程など、無機・有機系結晶からタンパク質結晶に至る様々な溶質群の析出に広く用いられている。これらの析出プロセスは一般的に、通常の溶解度よりも多くの溶質を含む過飽和溶液状態からの結晶核形成をドラ

イビングフォースとしている。

現在までの析出物の結晶構造や粒径の単分散性などのモルフォロジーを決定する際のスクリーニングは、析出結果に影響すると考えられるパラメータ（共存溶質の種類や濃度、pH など）を変え、トライアンドエラーを繰り返す方法で達成されている¹⁾。特に、タンパク質の結晶化に関しては、膨大な結晶化条件を自動化するスクリーニングキットが開発されているものの、それぞれのタンパク質の結晶化至適条件を理論的に結論付けることはできていない。

溶液からの結晶成長は、上述した例のみにとどまら

[†] 第 34 回表面科学学術講演会（2014 年 11 月 6 日～8 日）にて発表

E-mail : 8113178469@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ず、自然界の中にも多く存在する。甲殻類やサンゴ礁を構成する炭酸カルシウム (CaCO_3) は多くの水圏中の生態系で利用され、バイオミネラリゼーションという現象として地球上の炭素循環を担っている²⁾。炭酸カルシウムを合成する化合物は CO_2 , Ca^{2+} ならびに HCO_3^- である。これらは水圏中に過剰量溶け込んでおり、すぐにも炭酸カルシウムが析出可能な過飽和状態として存在している。特に、自身の表面を炭酸カルシウムの殻で覆う円石藻 (*Emiliania huxleyi*) と呼ばれる藻類は種族や遺伝的な差異によって実に様々なモルフォロジーの炭酸カルシウム固体を過飽和状態から生成することが知られているが、それらの形成機構については未だ明らかになっていない³⁾。そのほかにも、氷の多形な結晶構造や、タンパク質の異常凝集過程⁴⁾、ガラス転移点における溶液物性⁵⁾、ドラッグデリバリーによる効率的な体内薬剤輸送技術開発⁶⁾など、過飽和現象の理解とその応用は多くの自然現象の理解や産業利用においてきわめて重要な課題である。これらの現象を詳細に理解するためには、よりミクロなスケールにおける過飽和溶液の局所的な溶質群の構造やそれらの振る舞い、特にダイナミクス情報を抽出する必要がある。

本研究では、過飽和溶液のナノ領域における局所的な溶液構造の理解を目的として、過飽和溶液中に金ナノ結晶を分散させ、それらの分散状態と溶質群との相互作用に関する知見データの取得とともに、X線1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking; DXT)⁷⁾を応用した金ナノ結晶1粒子からのラウエ回折斑点追跡による過飽和溶液中の局所的な高精度溶液構造観察法の技術開発を行った。

2. 実験条件

本実験では、過飽和溶液の中でも、加熱と急冷の操作で簡単に調製可能で、比較的高い過飽和度を示す酢酸ナトリウム過飽和水溶液を実験対象とした。分散状態を調べるため、劈開した KCl (100) 基板 (表面積: 1 cm^2) 表面へエピタキシャル成長させた金ナノ結晶⁸⁾を純水へ浸漬することで KCl の溶解と同時に、金ナノ結晶を純水へ分散させた (操作 1)。そこへ、溶解度を超えるような酢酸ナトリウム三水和物 (136.08 g/mol , 融点: 58°C) を加え、 80°C の条件で、5 分間加熱した (操作 2)。緩やかに常温へと戻すことで金のナノ結晶が分散した安定な酢酸ナトリウム過飽和溶液を作成した (操作 3)。また、これを超音波照射と攪拌機を用い、よく攪拌した (操作 4)。

Fig. 1 に DXT の原理図を示す。本手法は溶液中に分散した金ナノ結晶 1 粒子からのラウエ回折斑点を θ , χ の 2 軸回転運動として計測する手法である。実験は

Fig. 1. Principle of Diffracted X-ray Tracking (DXT).

SPring-8 BL40XU で行い、 15.2 keV を中心とするピンクビーム X 線 ($14\sim 16\text{ keV}$, ビーム径 $50\text{ }\mu\text{m (W)} \times 200\text{ }\mu\text{m (V)}$) を入射させて測定を行った。サンプルホルダーは $50\text{ }\mu\text{m}$ 厚みのポリイミドフィルムを用い、そこへ 6.4 M 酢酸ナトリウム過飽和溶液 $500\text{ }\mu\text{L}$ に対して、3 枚の KCl 基板上に成長した金ナノ結晶を分散させた (金ナノ結晶粒子 10^9 個/mL 相当)。その後よく攪拌した後に $20\text{ }\mu\text{L}$ を厚さ $50\text{ }\mu\text{m}$ のフィルム上に滴下して測定した。サンプルと検出器間距離は 100 mm に設定し、ナノ結晶からの回折斑点の 2 軸 (θ , χ) 運動を X 線イメージングシステム V5445P (Hamamatsu photonics) と CMOS カメラ (Photron, FASTCAM SA-1.1) を用いて $100\text{ }\mu\text{s/f}$ (露光時間 10 ms) で撮影した。単一以上の条件で、 θ , χ 軸の単位ピクセルあたりの精度はそれぞれ 0.65 , 3.63 mrad である。測定温度は 22°C の条件で行った。

3. 結果と考察

Fig. 2 に実験条件の操作 1~4 で得られたサンプルの外観を示す。純水に分散している金ナノ結晶 (操作 1) は、表面プラズモン共鳴により、紫色-赤色に色を呈している。そこへ、酢酸ナトリウム三水和物を混合させ、加熱処理をして常温へ戻したサンプル (操作 3) は二層に分離していることがわかる。それぞれ上層部分は水溶媒相、下層部分は融点を超えて液相に相変化した酢酸ナトリウム三水和物液体である。また、金ナノ結晶の表面プラズモン共鳴による呈色は上層部分の水溶媒相にのみ確認された。さらに、超音波照射と攪拌を施した操作 4 に関しては、水溶媒と酢酸ナトリウム三水和物液体の界面が消え、表面プラズモン共鳴を示す金ナノ結晶がサンプル系のすべてに均一に分散していることが確認でき

Fig. 2. Gold nanocrystals dispersion and dissolution experiment. Gold nanocrystals are able to dissolve only water solvent systems.

る。

次に、操作3と操作4のサンプルから結晶化させた結果を **Fig. 3** に示す。操作3のサンプルでは、下層部分の酢酸ナトリウム3水和物液体のみ結晶化した（操作3-1）。また、操作4のサンプルではすべての領域で均一に結晶成長が進行した（操作4-1）。このことから、分散している金ナノ結晶は水層にのみ分散し、結晶相へと相転移する酢酸ナトリウム三水和物液相へは分散できないことが本実験より明らかになった。これは、負電荷を帯びている金表面に水溶媒による電気二重層が形成しているため⁸⁾、水層から酢酸ナトリウム三水和物液相にアクセスできないと考えられる。これらの帰属により、金ナノ結晶のダイナミクス情報は、金ナノ結晶近傍に存在する過飽和溶液中結晶化前駆状態にある酢酸ナトリウム溶質群の局所的な振る舞いのみを間接的に反映すると考えられる。これらは主に、バルク溶液中の局所粘性分布や、結晶核形成時などにおける溶質分子の局所的な集合状態などの実計測することができる。また、今後は高分子膜や官能基などを金ナノ結晶表面へ化学修飾することで、過飽和溶液中の結晶相へ相転移する溶質分子群の相互作用を評価することが可能であると考えられる⁹⁾。

次に、6.4 M 酢酸ナトリウム過飽和溶液中に分散した金ナノ結晶1粒子からのDXTにより観測されたラウエ回折斑点とその100 μs 間隔での軌跡と回折斑点の追跡より得られた2軸回転方向 (θ , χ) における角度変位 (mrad) を **Fig. 4** に示す。この結果より、サブマイクロ

Fig. 3. Crystallization from the two phase separated and a homogeneous distribution mixture system with dissolved gold nanocrystals.

Fig. 4. Traces of Laue diffraction spots from gold nanocrystals on sodium acetate supersaturated solution.

秒の時間オーダーで、過飽和溶液中の金ナノ結晶1粒子の動態を良好なデータとして観測できることが示された。特に、 θ 方向の角度変位は、10 mrad 以内のきわめて微小な回転動態を、ブラウン運動特有のランダムウォークとして観測している。一方、この時間スケールでは χ 方向の運動は θ 方向のようなランダムウォークを再現せず、一方向に拡散していく動態として観測された。この要因として、結晶形状の影響が考えられるが、**Fig. 5**

Fig. 5. AFM image of gold nanocrystals on KCl substrate.

に示した KCl 基板の上にエピタキシャル成長した金ナノ結晶の AFM (Atomic force microscopy) による観測では金ナノ結晶は球に近い形をとっていることが確認される。これらの結果より, Fig. 4 に示す θ , χ それぞれの軸におけるダイナミクスの異方性に関しては一つのトレースのみでは詳細な説明をすることはできず, 今後, 100~300 程度のトレースの統計処理を用いることで, それぞれの軸に含まれる溶液特性の情報を整理する必要があると考えられる。また, 不飽和や飽和, 過飽和条件の比較や過飽和度などのパラメータ依存性, さらには過飽和度の違いによる生成結晶物のモルフォロジーや結晶構造情報などを電子顕微鏡や X 線結晶構造解析などの結果と合わせて議論することで, 核形成, 結晶成長機構などの詳細なメカニズム解明に向けて研究を進めていきたい。

4. む す び

本研究では, DXT を用いた酢酸ナトリウム過飽和溶液中に分散する金ナノ結晶の微小回転動態観察を目的とした技術開発を行った。

用いた金ナノ結晶は過飽和溶液中の水溶媒相部分にのみ分散できることが明らかになった。

DXT による過飽和溶液中の金ナノ結晶 1 粒子の回転動態を 100 μ 秒の時間分解能で測定することに成功した。

今後の研究では, 詳細なデータ解析として, 統計処理による評価を行うことで, 過飽和溶液の特徴的な物性抽出を試みたい。また, 金ナノ結晶の形状や表面特性の改質による検出感度の向上や従来法の粘性計測や X 線小角散乱法などのマクロな実験結果との比較, さらには暗視野顕微鏡を用いた金ナノ結晶 1 粒子の並進動態計測を用いた複合的な研究に発展させていきたい。

文 献

- 1) 小針昌則: 日揮技術ジャーナル **3**, 4 (2014).
- 2) A. Poulton, T. Adey, W. Balch and P. Holligan: Deep Sea Res. Part 2 Top. Stud. Oceanogr. **54m** 538 (2007).
- 3) B. Read, J. Kegel, M. Klute, A. Kuo, S. Lefebvre, F. Maumus, C. Mayer, J. Miller, A. Monier, A. Salamov, J. Young, M. Aguilar, J. Claverie, S. Frickenhaus, K. Gonzalez, E. Herman, Y. Lin, J. Napier, H. Ogata, A. Sarno, J. Shmutz and D. Schroeder: Nature **499**, 209 (1905).
- 4) Y. Yoshimura, Y. Lin, H. Yagi, YH. Lee, H. Kitayama, K. Sakurai, M. So, H. Ogi, H. Naiki and Y. Goto: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **109**, 14446 (2012).
- 5) E. Rössler: Phys. Rev. Lett. **65**, 1595 (1990).
- 6) J. Bevernage, J. Brouwers, M. Brewster and P. Augustijns: Int. J. Pharm. **453**, 25 (2013).
- 7) H. Sekiguchi, Y. Suzuki, Y. Nishino, S. Kobayashi, Y. Shimoyama, W. Cai, K. Nagata, M. Okada, K. Ichiyanagi, N. Ohta, N. Yagi, A. Miyazawa, T. Kubo and Y.C. Sasaki: Sci. Rep. **4**, 6384 (2014).
- 8) M. Giesbers, J.M. Kleijn and M.A.C. Stuart: J. Colloid Interf. Sci. **1**, 88 (2002).
- 9) D.V. Leff, L. Brandt and J.R. Heath: Langmuir **12**, 4723 (1996).