

ビデオ映像を活用した食塩結晶化過程の分子レベル解析

中室 貴幸¹, 中村 栄一²

¹ 東京大学総括プロジェクト機構, ² 東京大学理学部

概要 食塩結晶化の制御に資する知見を, 原子分解能を有する透過電子顕微鏡(TEM)ビデオ観察から獲得することを目的とする。結晶化は確率論に従う科学現象であり, 精緻に制御することは現在の成熟した科学技術を以ってしても困難である。結晶化制御は人類の夢であるが, この課題を解決に導くための直接的実験手法および機構研究の欠如が問題になっている。すなわち, 原子, 分子, イオンが如何にして集合体を形成し, 結晶核を構築し, そして結晶へと成長していくかに関する実験的描像の獲得が, 究極的には結晶化の制御に直結すると着想した。

申請者のグループでは, 原子分解能を有する TEM を用いて, 単分子および分子集合体の動的挙動を精緻に解析する独自の手法を開発している(単分子原子分解能時間分解電子顕微鏡法, Single-Molecule Atomic-Resolution Time-resolved Electron Microscopy, SMART-EM)。

2021 年, 新たなサンプル調製法の開発をもとに, 食塩(NaCl)の核形成が起こる瞬間の捕捉に成功した。全部で 96 原子からなる結晶核が, 9 回連続して繰り返して現れることを見出し, つづく結晶成長過程も時間分解能として 40 ミリ秒の分子動画から解析した。この予備的知見をさらに発展させ, 結晶化現象の真髄を掌握する実験を本申請研究として執り行った。

先行研究に則って, NaCl を観察場であるカーボンナノチューブの中に内包した。原子分解能の TEM 観察は, 球面収差補正装置(点分解能: 0.10 nm)を備えた JEM-ARM200F 装置を用いて, 298 K, 加速電圧 80 kV, 1×10^{-5} Pa の条件で実施した。

最先端の K3-IS カメラを利用した撮影条件の最適化を行い, 300 fps (~3 ms / frame) を超える高速撮影から結晶成長における非平衡的な動態の顕在化に成功した。すなわち, 結晶面成長においては, 分子集合体がある程度の大きさまで構造が成熟するまで結晶面への付着がおこらず, 結晶面を動的に浮動することが初めてあきらかになった。すなわち, Floating island (FI) と呼ぶべき結晶成長における中間体を発見した。たとえホモエピキシーであっても, バルク特徴の結晶面と分子性の nucleation cluster においては構造が大きく違っているために FI の浮動性が現れる。また Monte Carlo シミュレーションとの比較によって, その拡散が <110> 方向に起こることを明らかにした。

今後の課題としては, 容器の大きさによる結晶化挙動への影響が考えられるので検討を進めていきたい。また, 脱溶媒和したあとの結晶面近傍での挙動の良いモデルとして今回の結果は解釈されるが, 理論計算などの検討から水の影響についても考察を深めていくことによって, 結晶化挙動の制御を目指していく。すでにアウトリーチ活動を行っており, 今後教育へと展開していく予定である。

1. 研究目的

食塩結晶化の制御に資する知見を, 原子分解能を有する透過電子顕微鏡(TEM)ビデオ観察から獲得することを目的とする。結晶化は確率論に従う科学現象であり, 精

緻に制御することは現在の成熟した科学技術を以ってしても困難である。結晶化制御は人類の夢であるが, この課題を解決に導くための直接的実験手法および機構研究の欠如が問題になっていると考える。すなわち, 原子, 分

子、イオンが如何にして集合体を形成し、結晶核を構築し、そして結晶へと成長していくかに関する実験的描像の獲得が、究極的には結晶化の制御に直結すると着想した。申請者のグループでは、かねてより原子分解能を有する TEM を用いて、単分子および分子集合体の動的挙動を細緻に解析する独自の手法を開発している(単分子原子分解能時間分解電子顕微鏡法, Single-Molecule Atomic-Resolution Time-resolved Electron Microscopy, SMART-EM)。2021 年, 新たなサンプル調製法の開発をもとに, 食塩 (NaCl) の核形成が起こる瞬間の捕捉に成功した⁽¹⁾。全部で 96 原子からなる結晶核が, 9 回連続して繰り返して現れることを見出し, つづく結晶成長過程も時間分解能として 40 ミリ秒の分子動画から解析した。この予備的知見をさらに発展させ, 結晶化現象の真髄を掌握する実験を本申請研究として執り行う。学術的な発展に留まらず, 教育への展開も想定している。結晶化現象という初等教育でも取り扱われる重要な課題に対して, 分子動画という新たな教育ツールの創出をもとに, 小中学生の科学に対する興味喚起を目指す (Fig. 1)。

2. 研究方法

申請者の所属する研究グループで開発している, 単分子の原子分解能観察を可能とする SMART-EM 法を機軸として研究を行う⁽²⁾。水分散性カーボンナノチューブ (CNT) に食塩水を内包させ, 乾燥により TEM 用のサンプルを調製する。研究方法として, ①結晶成長における規則性の

顕在化, ②時間分解能の追求による原子描像の深化, を目指し, 最近当研究室に導入された高精細・世界最高速撮影が可能な K3-IS カメラの使い熟しから達成する。結晶成長初期段階における規則性の顕在化は, バルク結晶の均一性, 結晶多形・晶癖制御に資する知見の獲得に直結すると考えられる。また, 現在までの検討では, フレームレートとして 25 fps (40 ミリ秒/枚) の動画撮影が限界であり, 原子や分子の精緻な動的挙動を追跡することは困難であった。本研究では, 3845 fps という時間分解能として 150 倍の撮影手法の確立から, 結晶化機構の掌握を目指して検討を進める。高速のビデオ撮影から, ステップ生成や転位点の顕在化などを見込むことができ, その制御に資する知見獲得への第一歩になると想定している。

2. 1 試料調整

室温で, 水分散性 CNT (0.5 mg) を飽和 NaCl 水溶液 (1 mL) に分散させた。この分散液を 24 時間攪拌した後, PTFE フィルター (ADVANTEC, 孔径: 0.2 μm) でろ過した。得られた濾過物をメタノールで洗浄後, 真空下で十分に乾燥させた (0.5 mg)。このようにして得られた黒色粉末 (NaCl@CNT) は大きな凝集体を形成するために, 窒素気流下でメタノール分散させながらメノウ乳鉢で 3 分間穏やかに粉碎した。分散液を桐山 5A フィルター (孔径 7 μm) でろ過し, ろ液 (10 μL) を TEM マイクログリッド (NS-C15) 上にドロップキャストし, 真空下で乾燥させた。

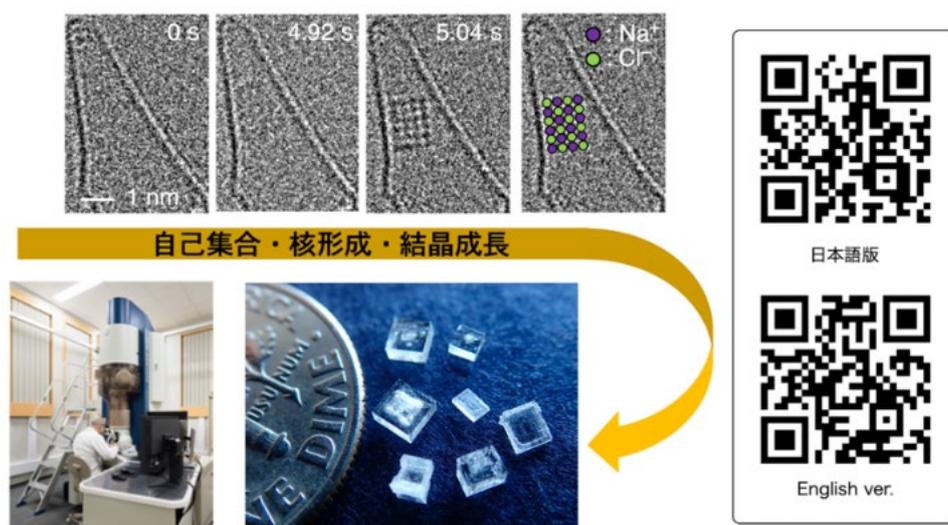


Fig. 1 研究の概要.

本申請研究では結晶成長過程に主眼を置いた。

2. 2 SMART-EM 観察

原子分解能の TEM 観察は、球面収差補正装置(点分解能:0.10 nm)を備えた JEM-ARM200F 装置を用いて、298 K, 加速電圧 80 kV, 1×10^{-5} Pa の条件で実施した。CMOS カメラ(OneView-IS)と直接電子検出カメラ(K3-IS, Counted mode)で、TEM 観察を行った。試料の原子分解能のビデオを記録するために、まずグリッド上の CNT 集合体を低倍率で撮影し、更なる観察に適した視野を検索した。続いて視野の thermal drift を最小化するために数分待ったのち、高倍率に変更してビデオ撮影を開始した。撮影のデフォーカス値は、撮影中に視認性を高めるために若干修正を行った。TEM 撮影はアンダーフォーカス(デフォーカス値:-10 nm)で記録しており、これは画像のコントラストと構造情報を最良に与える典型的な値である。

2. 3 SMART-EM 解析

撮影した TEM 画像群の解析のためには、適切な画像処理を行う必要があった。OneView-IS で記録したデータセットは、各画像の相互相関を確認することで試料のドリフトや回転を最小限に抑えるように位置合わせを行い、バンドパスフィルター処理を施した³⁾。CNT のグラファイト格子のモアレパターンが NaCl クラスタ/結晶画像に干渉する場合は、Fiji ソフトウェアに実装されている高速フーリエ変換ソフトウェアを用いて適切にフィルタリングした。ミリ秒での原子分解能情報の獲得を目指して、K3-IS で撮影した画像群は、Binning 条件の最適化をおこなった。TEM 画像群の明るさとコントラストは解析に必要な場合に適応しており、線形調整を施した。

3. 研究結果⁴⁾

Fig. 2a は、64.19 ms の時間間隔で連続する 2 つのフレームであり、8 x 9 配列のナノ結晶((8,9)NC と表記)の(100)面上に新しい層(#9)が形成している様子を示している。先行研究を参照して NC の電荷中性性条件と CNT の円錐形状を考慮すると、この NC はサイズ $9 \times 9 \times 8$ (648 原子)または $9 \times 9 \times 10$ (810 原子)であると推測される。

Fig. 2b は、合計 2 秒間、フレームレートとして $3.38 \text{ ms frame}^{-1}$ で撮影されたビデオから抽出した 8 フレームである。これらは、本実験で特定した浮動性の中間体(Floating Island, FI) (**Fig. 2c**)の形成と移動を示したものであり、NC の#8 上の#9 層目形成に関するエピタキシー現象の 1.7 秒間(-1542.45 ms~114.92 ms)に対応する。FI 形成は、

複数の NC について解析した結果、2 秒から 10 秒以上に 1 回の頻度で起こる希少な現象であることがわかった。この観察事実は、従来の学術論文でしばしば言及されてきたように、欠陥のない結晶面上での核形成が不利なプロセスであることに関する原子レベルでの実験的裏付けである。

3.38 ms のフレーム群に関してさらに精査すると、最初は 0.5 nm の長さ(l)で、NaCl 1 単位に相当する FI が形成されることがわかる(**Fig. 2d**)。この FI は確率的に NaCl の結晶面を移動し、1 ユニットから 2 ユニットの間でサイズを変えている(**Fig. 2c**)。最も特徴的なパラメータは、層間距離 d が平均 0.34 nm と大きく(**Fig. 2e**)、バルク結晶の NaCl (298 K で 0.282 nm)よりも 23%長い値であり、NC 表面と FI の格子不整合の原因になっている。81.12 ms の時点で、FI は CNT の左側の壁に付着し、 d の値が 0.28 nm に急減したことは#8 層に着地したと解釈できる(**Fig. 2e**)。#9 層は 94.92 ms で成長を始め、約 30 ms 後に層として完成した(**Figs. 2d, e**)。

4. 考察

Fig. 2d を注意深く観察すると、FI 形成とステップ成長に関する原子論的な情報のうち、いくつかの注目すべき部分があることがわかる。まず、94.64 ms 以前の FI のサイズは 1~2 NaCl ユニットの間で変動していた(正方形の二量体または八量体)のに対し、94.64 ms 以降のテラスの伸びは 0.5 ユニット、つまり NaCl として 1 列分であった。

第二に、テラスの伸長は 0 次で起こったことが示唆されたことであり、多数の単一 NaCl イオン対が NC の(100)面に衝突しているが、二量体化して FI を形成することはほとんどないことが示唆された。一方、テラス成長の頻度が高いことから、NC 表面に衝突した NaCl イオン対が 1 つずつ段差に付着する頻度が高く、この過程が 2 量体の形成よりもエネルギー的にはるかに有利であることがわかる。これらの半定量的なデータセットは、核生成と成長に関する従来の常識が実験的に支持されることに対応するだろう。

FI 拡散のメカニズムをさらに深く理解してみたい。その目的に、298 K で 648 原子の結晶上の 16 原子角の NaCl クラスタの軌道をモンテカルロシミュレーションを行った(**Fig. 2f**)。クラスタの<100>方向(青)と<110>方向(赤)の 2 つの拡散軌道について、エネルギー論と元の位置からの変位(r)に対する距離 d を比較した(**Figs. 2g, h**)。

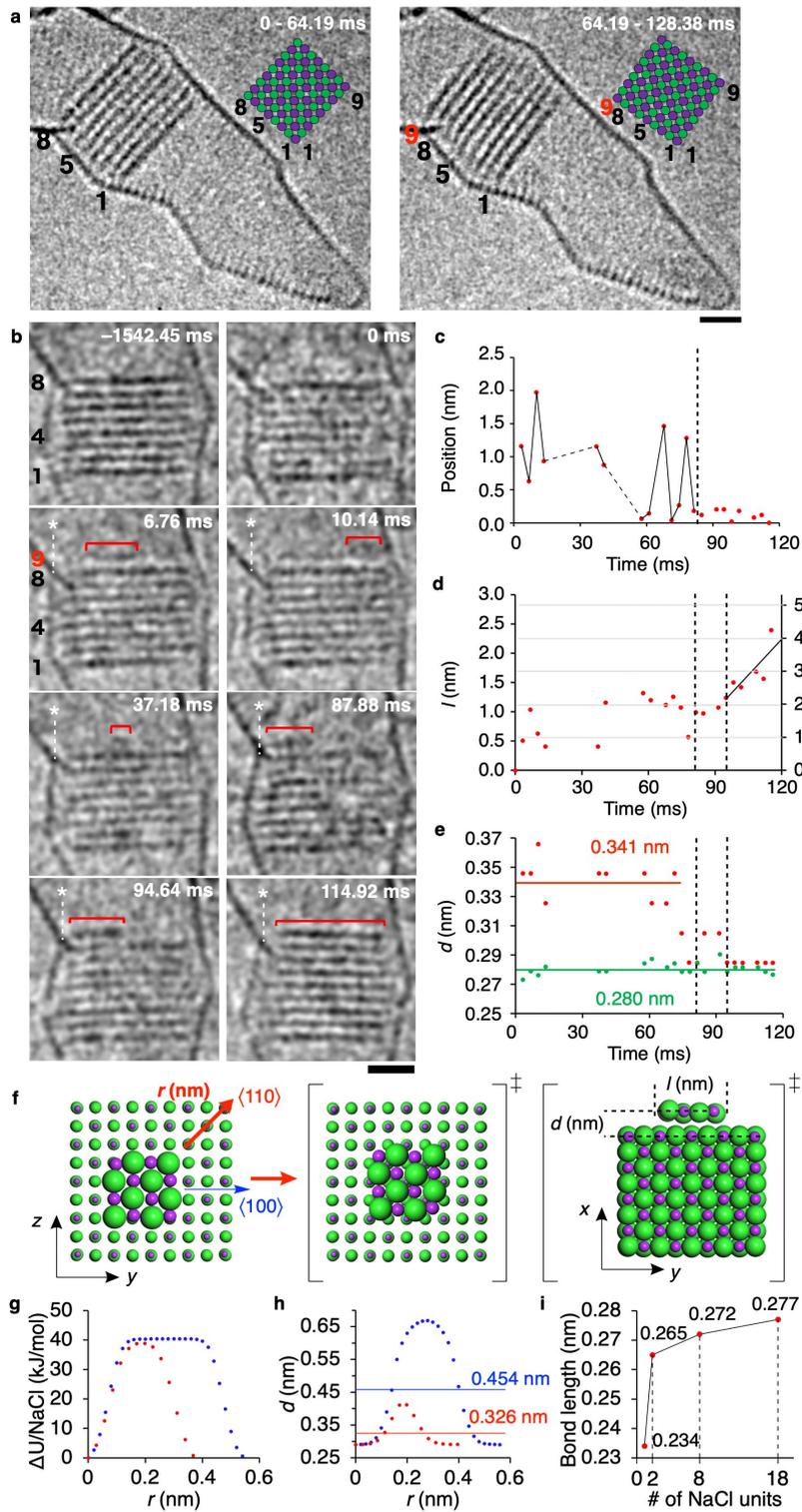


Fig. 2 研究結果の概要.

- (a) (8,9)NC から(9,9)NC への成長の 20 フレームスタック画像. (b) NaCl 横方向成長の代表的な TEM 画像. 表面クラスターは赤いバーで示す. スケールバーは 1 nm. (c) 表面クラスターの位置の時間発展. 位置は CNT の左壁とクラスターの左端との間の距離として定義される. (d) 表面クラスターの長さの時間変化. (e) 表面クラスター上の層間距離の時間変化 (赤) と格子面上の平均値 (緑). (f) クーロンポテンシャルとレナードジョーンズポテンシャルを用いた表面クラスター移動の軌跡のモンテカルロシミュレーション. (g) 2 つの軌跡における FI 移動のポテンシャルカーブ. (h) FI マイグレーションにおける d の変化. 実線は時間平均の d 値を示す. (i) 真空中における大きさの異なる正方形の NaCl クラスター内の Na-Cl 距離. ©2022 American Chemical Society.

<110>軌道の方が活性化エネルギー障壁の最大値幅が狭く、最大の d 値も小さいので、<100>軌道よりも優先したと考察される。<110>軌道の平均 d 値 0.326 nm は、実験値の d 値 0.341 nm とよく一致し(Fig. 2e), Fig. 2b に見られる単層クラスターが<110>方向に急速な熱運動をしていることが強く示唆された。

今回の助成研究で発見した FI の実態ならびに意義はなんだろうか。Fig. 2i に示す真空中で計算した平板な正方形の NaCl クラスターにおける Na - Cl 距離のサイズ依存性は、FI が小さいときに深刻な格子不整合があることを示唆している。すなわち Fig. 2f に示すクラスターでは、NaCl イオン 1 対の 0.234 nm から NaCl ユニット 8 対の 0.272 nm まで急激に距離が長くなっていることがわかる。この 0.272 nm の結合長は、NC における 0.28 nm の格子サイズよりまだ3%短い。なお上述のように、 d は l が 2 NaCl になった 81.12 ms(Fig. 2e)から減少し始め、FI が NC 表面に完全に降り立ったのは l が 2.5 NaCl になった 94.64 ms である。このように、格子不整合は FI が浮遊する大きな理由であり、その他に不利な表面エネルギーやエントロピーなどのいくつかの理由があることがわかった。

5. 今後の課題

本助成研究では、原子分解能を有するビデオ映像撮影から食塩の結晶化制御に資する知見獲得を目指した。そのために、最先端の K3-IS カメラを利用した撮影条件の最適化を行い、300 fps(~3 ms / frame)を超える高速撮影から結晶成長における非平衡的な動態の顕在化に成功した。すなわち、結晶面成長においては、分子集合体

がある程度の大きさまで構造が成熟するまで結晶面への付着がおこらず、結晶面を動的に浮動することが初めてあきらかになった。また Monte Carlo シミュレーションとの比較によって、その拡散が<110>方向に起こることを明らかにした。

今後の課題としては、容器の大きさによる結晶化挙動への影響が考えられるので検討を進めていきたい。また、脱溶媒和したあとの結晶面近傍での挙動の良いモデルとして今回の結果は解釈されるが、理論計算などの検討から水の影響についても考察を深めていくことによって、結晶化挙動の制御を目指していく。すでにアウトリーチ活動を行っており⁶⁾、今後教育へと展開していく予定である。

6. 文献

- (1) T. Nakamuro, M. Sakakibara, H. Nada, K. Harano, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* 143, 1763-1767 (2021).
- (2) 原野幸治, 中室貴幸, 中村栄一, 顕微鏡, 57, 59-64 (2022).
- (3) Y. Kratish, T. Nakamuro, Y. Liu, J. Li, I. Tomotsuka, K. Harano, E. Nakamura, T. Marks, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 94, 427-432. (2021).
- (4) M. Sakakibara, H. Nada, T. Nakamuro, E. Nakamura, *ACS Cent. Sci.* 8, 1704-1710 (2022).
- (5) 東京大学理学部プレスリリース
(<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2022/8201/>,
<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/en/info/8192/>)

Molecular Level Analysis of Salt Crystallization Process Using Video Images

Takayuki Nakamuro, Eiichi Nakamura

The University of Tokyo

Summary

The objective of this project is to obtain knowledge that contributes to the control of salt crystallization from transmission electron microscopy (TEM) video observations with atomic resolution. Crystallization is a scientific phenomenon that follows stochasticity and is difficult to control precisely even with today's mature science and technology. Crystallization control is a dream of mankind, and I believe that the lack of direct experimental methods and mechanistic research to solve this problem is a problem. Therefore, I hypothesized that the acquisition of an experimental picture of how atoms, molecules, and ions form aggregates, construct crystal nuclei, and grow into crystals would ultimately lead to the control of crystallization. The applicant's group has long been developing a method to precisely analyze the dynamic behavior of single molecules and molecular aggregates using TEM with atomic resolution (Single-Molecule Atomic-Resolution Time-resolved Electron Microscopy, SMART-EM). In 2021, based on the development of a new sample preparation method, we succeeded in capturing the moment when salt (NaCl) nucleation occurs. The subsequent crystal growth process was analyzed from molecular videos with a time resolution of 40 milliseconds. We have further developed this preliminary knowledge and conducted experiments to grasp the essence of the crystallization phenomenon in this application study.

In accordance with a previous study (T. Nakamuro, M. Sakakibara, H. Nada, K. Harano, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* 143, 1763-1767 (2021)), NaCl was encapsulated in carbon nanotubes as the observation field. Atomic-resolution TEM observations were performed using a JEM-ARM200F instrument equipped with a spherical aberration corrector (point resolution: 0.10 nm) at 298 K, an acceleration voltage of 80 kV, and 1×10^{-5} Pa.

In this research, I aimed to obtain knowledge for controlling salt crystallization from video imaging with atomic resolution. For this purpose, I optimized the imaging conditions using the state-of-the-art K3-IS camera and succeeded in revealing the non-equilibrium dynamics during crystal growth through high-speed imaging at over 300 fps (~3 ms/frame). In the case of crystal growth, it was revealed for the first time that molecular aggregates do not attach to the crystal face of NaCl until their structure matures to a certain size, and that they dynamically float on the crystal face. We discovered an intermediate in crystal growth that we call the floating island (FI). Even in homoepitaxy, the structure of the crystal plane of bulk features and the molecular nucleation cluster is very different, and thus the floating nature of FI appears. Comparison with Monte Carlo simulations revealed that the diffusion occurs in the <110> direction (M. Sakakibara, H. Nada, T. Nakamuro, E. Nakamura, *ACS Cent. Sci.* 8, 1704-1710 (2022)).

Future issues include the possible influence of container size on crystallization behavior, which will be investigated. Although the present results can be interpreted as a good model for the behavior near the crystalline surface after desolvation, we will further investigate the influence of water through theoretical calculations in order

to control the crystallization behavior. Outreach activities are already underway and will be expanded to include education.