

平成 21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510127

研究課題名（和文） 走査プローブ法を用いた「可逆な」単一生体分子等操作法の開発

研究課題名（英文） Development of reversible manipulation methods for single biomolecules by using scanning probe microscopy

研究代表者

梅村 和夫 (Kazuo Umemura)

東京理科大学・理学部第二部物理学科・准教授

研究者番号：60281664

研究成果の概要：

本研究では、温度応答性ポリマー等の環境応答性分子を用いて、原子間力顕微鏡（AFM）等による単一分子操作等技術に役立つ知見、特に AFM 探針の先端での「可逆」な応答が可能な実験系の構築を行った。その結果、AFM 探針にタンパク質分子を吸着させた状態で、温度を変化させながらポリマー表面への吸着力を制御することに成功した。最近開発されたプラトー探針を用いると極めて安定した測定が可能となり、10回温度変化を繰り返しても可逆な制御が可能だった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2100000	630000	2730000
20年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノバイオサイエンス

キーワード：原子間力顕微鏡、環境応答性、ナノデバイス、表面修飾

1. 研究開始当初の背景

AFMをはじめとしたプローブ顕微鏡を用いた分子等操作技術は、色素等を用いないで直接ナノレベル、分子レベルの加工や計測ができ、ナノバイオチップ作製等に应用可能な手法として認知されてきている。

これまでに報告されてきた研究例としては、AFM 探針を基板上の分子等に押しつけて探針に付着させたのち再度基板に押しつけて脱離させる方法、AFM 探針に塗布した分子溶液を基板表面に転写する方法（ディップペ

ン）、ひも状分子の両端を AFM 探針と基板表面とにそれぞれ結合させて分子内力を測定する方法等が挙げられる。しかしながら、それらの方法の多くは不可逆な実験過程であり、また生体分子等に強い力をかけてしまう実験系も多い。

そこで本研究では、AFM 探針先端での可逆な実験過程を無理なく実現するための実験系の構築を試みることにした。具体的な方法として、温度応答性等周囲の環境に応じて性質を変えるポリマー等を用いることで、温度

変化とともに可逆に吸着力を制御することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、温度応答性ポリマー等の環境応答性分子を利用して、AFM 探針の先端での可逆な分子操作等実験系を確立することであった。

可逆な応答を実現するための要件としては、原理的に可逆な実験プロセスであることが必須である。実験過程で生体分子等が損傷を受けるようなシステムではなく、環境条件によって無理なく制御可能な実験系を組む必要がある。さらに、探針や基板の表面修飾技術、またその表面構造や耐久性の評価が必要である。また、AFM を用いた実験に付随して、探針先端の構造評価実験、試料作製手順の改良等を行うことも必要である。

3. 研究の方法

環境応答性の分子材料としては、温度応答性ポリマー (Poly(N-isopropylacrylamide), 以下 PNIPAAm と略す)、また PNIPAAm で表面コートしたシャーレ、さらに温度応答性の磁性ビーズについて AFM 測定への応用を試みた。

生体分子としては、牛血清アルブミン (BSA) を使い、ポリマー表面へ展開、あるいは探針表面に吸着させて用いた。

AFM カンチレバー及び探針としては、約 10 nm の先端曲率半径を持ちばね定数が 0.06 N/m のもの (一般的なカンチレバー) と、最近開発された針先が平面のプラトー探針を持ちばね定数が 0.13 ~ 0.18 N/m のもの (プラトータイプ) とを用いた。

これらの生体分子、有機材料、カンチレバー等を組み合わせて、各種条件下でフォースカーブ測定を中心とした実験を行った。また、これらの実験条件を最適化するために、基板の改良などの実験をも行った。測定環境は水中、緩衝液中、大気中であり、温度変化のレンジは室温から約 40 度までとした。

4. 研究成果

(1) 温度応答性ポリマー表面の AFM 観察

まず通常の探針を用いて、室温から 40 度程度まで、さまざまな温度条件下で温度応答性ポリマーの AFM 観察を行った。乾燥状態では大きな構造変化を認めなかったが、水中観察では温度が上がるにつれてクラスター状の構造が生じることが明らかになった。温度上昇と下降の繰り返し観察、また異なる試料での繰り返し実験などを行って見たが、再現性よくこの現象がみられることがわかり、

このポリマー表面の構造変化が可逆であることが観察から直接示された。

図 1 に観察例を示す。水温が 30 度では平坦な表面に見えている (上段) が、38 度ではクラスター状の構造が見え (中段)、再び 30 度に戻すと平坦な表面に戻る (下段)。すなわち、表面観察の観点からは再現性よく可逆な構造変化が確認できた。

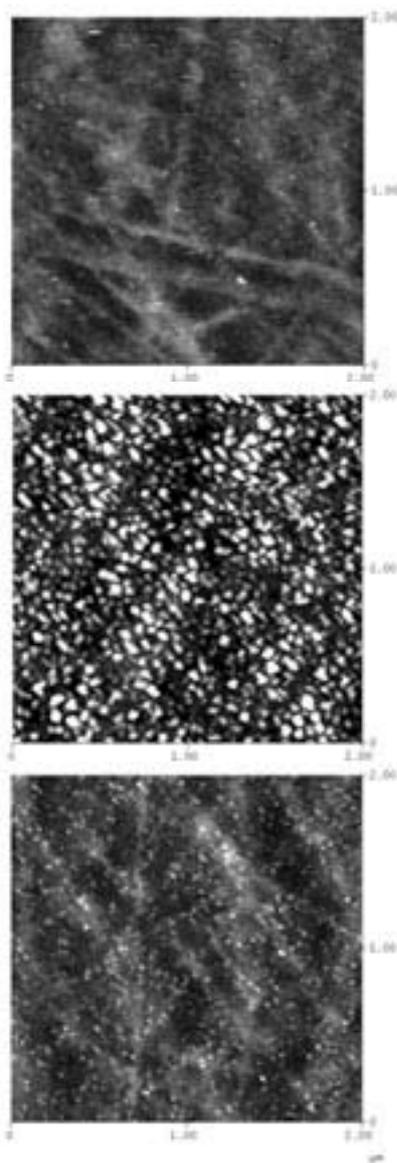


図 1 温度応答性ポリマーの表面構造変化の AFM 観察 (上段: 水温 30 度、中段: 水温 36 度、下段: 水温 30 度) 観察範囲は 2 ミクロン四方

(2) ポリマー表面への BSA 吸脱着①

通常のカンチレバーを用い、探針表面をまず 3-アミノプロピルトリエトキシシランで修飾し、さらにその表面に BSA を吸着させて、水中で温度を室温から 39 度まで変化させ、基板 (温度応答性ポリマー) 表面との相互作用

用測定を行った。

その結果、低温ではほぼ吸着力がゼロであり、高温ではBSAとポリマーとの吸着力が生じることがわかった。この現象は再現性があり、繰り返して温度変化させても同様の結果が得られた。すなわち、探針表面で吸着力を可逆に制御することが可能だった。

ただし、探針を変えた場合のばらつきはあり、また温度変化を繰り返した時に力の値がばらつくこともあった。

図2に測定例を示す。室温では吸着力が見られず(上段)、高温では吸着力が生じ(中段)、再び室温に戻すと吸着力は見られなかった(下段)。

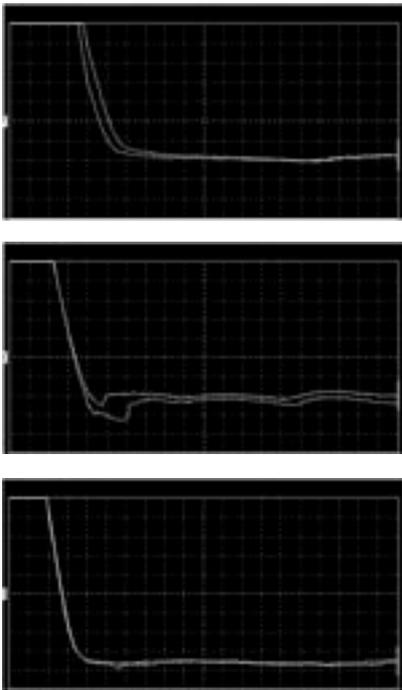


図2 BSA-ポリマー間のフォースカーブ測定(上段:低温、中段:高温、下段:低温。縦軸目盛は5 nm/div)

(3) ポリマー表面へのBSA吸脱着②

先端が平面となっているプラトー探針を用いて、(2)と同様の実験を行った。この場合は、吸脱着の再現性があがった。しかしながら、水中での実験ではタンパク質-ポリマー間の相互作用とは思えない相互作用が働き、フォースカーブ制御が難しいことも判明した。

このゆがみは温度とは関係がなく、低温でも高温でも同様に表れた。表面積が大きくなったことで、通常の探針では無視できていた非特異的な相互作用が無視できなくなったと考えられる。

図3にフォースカーブ測定例を示す。タンパク質-ポリマー間の吸着に由来すると思わ

れる力も表れているが、カーブ全体がゆがんでいる。



図3 BSA-ポリマー間の高温でのフォースカーブ測定(縦軸目盛は5 nm/div)

(4) ポリマー表面へのBSA吸脱着③

プラトー探針を用いた実験系でのフォースカーブの歪みを是正するため、電解質溶液中で同様の測定を行った。この場合はゆがみの少ないフォースカーブが得られ、またタンパク質-ポリマー間相互作用も可逆な相互作用として計測できた。温度変化を繰り返したときの再現性も高く、10回以上温度変化を繰り返してもほぼ一定の吸脱着挙動がみられた。さらに、カンチレバーを交換したときの再現性が高いことも分かった。

図4に測定例を示す。室温では吸着力が見られず(上段)、高温では強い吸着力が生じ(中段)、再び室温に戻すと吸着力は見られなかった(下段)。

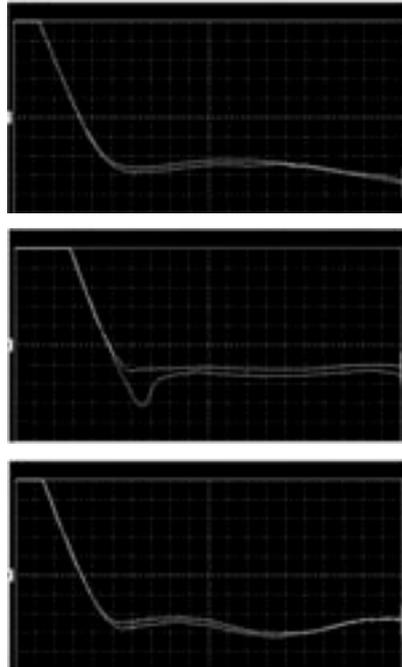


図4 BSA-ポリマー間のフォースカーブ測定(上段:低温、中段:高温、下段:低温。縦軸目盛は10 nm/div)

プラトー探針では探針先端の表面積が広いにも関わらず、低温では吸着力がほぼゼロであった。温度による可逆な吸脱着が精度よく行われていることを示している。

(5) 実験後の探針評価

フォースカーブ測定後の探針先端の構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) で評価した。探針先端の形状は、表面修飾した後もそれほどばらつきはなく、特にプラトー探針の表面は平坦さを保っていることが判明した。

図5に探針先端のSEM画像を示す。

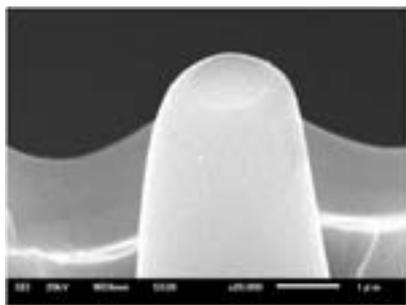


図5 BSAを吸着させてAFM測定した後のプラトー探針のSEM像。スケールバー：1 μm。

(6) その他の材料、基板検討等

温度応答性ポリマーについて、ポリマーを基板側ではなく探針側に塗布した実験系も試みた。また温度応答性ビーズと温度応答性ポリマーを併用してビーズの基板上での位置を制御する実験を試みた。これらの場合には耐久性や再現性等について今後解決すべき課題があり、今後も継続して研究推進する予定である。

このほか、AFM測定の際に位置決めを容易にするための基板を作製し、実際に使えることを確認した。

(7) まとめ

本研究では、温度応答性ポリマー等の環境応答性分子・ビーズを用いて、温度変化を伴いながらAFM探針先端での可逆な相互作用制御を行った。特にプラトー探針を用いると実験の再現性を高めることができ、定量的な議論に有効であった。この成果についてはすでに学会発表を行っており、今後論文発表の予定である。これに先立ち、実験中に位置決めしやすい基板を作製し、その成果はすでに論文発表済みである。

本研究の1年目は武蔵工業大学で、2年目は研究代表者の移籍により東京理科大学での実施となった。その結果、装置等の使用環境が若干変化したため、当初はプラトー探針

を用いた実験は盛り込まないつもりだったがこれを追加し、また論文発表については基板改良について先に行い、本報告で主に述べた可逆応答に関する内容は研究期間終了後に投稿することとした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

(1) Y Maeda, Y Gao, M Nagai, Y Nakayama, T Ichinose, R Kuroda, K Umemura. Nanoscopic deformation of a nafion film surface caused by annealing studied using atomic force microscopy and a patterned substrate. *Ultramicroscopy*, 査読有, 108, 2008年, 529-535.

(2) Kazuo Umemura, Reiko Kuroda, Yanfeng Gao, Masayuki Nagai, Yuta Maeda. Direct observation of deformation of nafion surfaces induced by methanol treatment by using atomic force microscopy. *Appl. Surf. Sci.*, 254, 23, 2008年, 7980-7984.

[学会発表] (計 2件)

(1) Kazuo Umemura, Reiko Kuroda, Akihiko Kikuchi. In situ imaging and force measurements of an poly(N-isopropylacrylamide) surface by atomic force microscopy. Asia Biophysics Symposium, January 11-15, 2009, Hongkong Science and Technology University, Hongkong.

(2) Kazuo Umemura, Reiko Kuroda, Akihiko Kikuchi. In situ imaging and force measurements of an poly(N-isopropylacrylamide) surface by atomic force microscopy. 第46回日本生物物理学会年会, 2008年12月4日, 福岡国際会議場.

[その他]

研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページ
http://www.rs.kagu.tus.ac.jp/biophys/index_jp.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 和夫