

機関番号：13301
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21810009
 研究課題名（和文）液中原子分解能 AFM を用いた蛍光プローブ分子拡散計測法の信頼性検証
 研究課題名（英文）Reliability evaluation of fluorescence probe method for molecular diffusion measurement in lipid bilayer by atomic force microscopy
 研究代表者
 浅川 雅 (ASAKAWA HITOSHI)
 金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・助教
 研究者番号：90509605

研究成果の概要（和文）：蛍光プローブ標識による分子拡散計測の信頼性を原子分解能を有する原子間力顕微鏡（AFM）を用いた直接計測で評価するために、AFM 装置および周辺機器の開発を行った。AFM 試料ホルダに光学窓や溶液フロー機能を組み込み、周波数変調 AFM（FM-AFM）により脂質二重層上に存在するサブナノメートルの表面形状を直接観察できることを示した。この試料ホルダは落射型蛍光顕微鏡による観察を考慮した設計となっており、FM-AFM 計測との比較により蛍光プローブ分子拡散計測法の信頼性を評価できるようになった。

研究成果の概要（英文）：In this project, an atomic force microscopy (AFM) instrument was developed to evaluate the reliability of fluorescence probe methods for molecular diffusion measurements in lipid bilayers. A sample holder developed in this project is usable in both the molecular-resolution AFM imaging and fluorescence measurements under the same condition. As the developed AFM instrument allows us to compare the data of molecular diffusion obtained by both methods, the capability should be useful for the reliability evaluation of fluorescence probe methods for molecular diffusion measurements.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010 年度	980,000	294,000	1,274,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：ナノバイオサイエンス

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：原子間力顕微鏡・ナノテクノロジー・生体膜・脂質二重層

1. 研究開始当初の背景

脂質二重層を基本骨格にもつ細胞膜は、高い流動性を有している。その流動性は、細胞膜を介したシグナル伝達や分子輸送などダイナミックな生命現象に深く関与している。そのため脂質分子の拡散挙動を分子レベル

で明らかにすることは生命現象の理解に極めて重要である。現在、脂質分子の拡散挙動を直接観察することが極めて困難であるため、蛍光プローブを脂質分子にラベルし、蛍光顕微鏡でその動きを観察する蛍光プローブ標識法が広く利用されている。蛍光プローブ

ブ標識法をベースにした FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 法は、特定エリアの蛍光分子を褪色させ、分子拡散によって生じる蛍光強度の回復を経時的に計測する手法である。この FRAP 法により脂質分子の拡散速度係数を簡便に計測できるようになった。しかしながら、蛍光プローブ標識が脂質分子の拡散運動に与える影響が指摘されている。例えば、大きな分子量を持つ蛍光プローブが標識された場合、その立体障害により分子拡散運動が阻害される。この立体障害による影響を抑えるため、蛍光プローブは脂質分子の先端に存在する極性頭部へ化学修飾されることが多い。しかし、極性頭部の陰イオン構造は生理溶液中の陽イオン (Na^+ など) と相互作用することで細胞膜の流動性を変化させることが報告されている。このように蛍光プローブ標識法を光褪色後蛍光回復法 (FRAP) 法などへ応用する場合、蛍光プローブ標識が分子拡散運動に与える影響を十分に考慮する必要がある。しかしながら、従来手法では非標識分子の動的挙動を直接観察できないため、その影響を調べることは困難であった。そのため蛍光プローブ標識法による脂質分子の拡散速度計測の信頼性についてはさらなる検討が必要である。

このような研究動向の中で、ナノテクノロジーの進展に伴い発展してきたナノ計測技術の一つである周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) は、近年、液中環境下での原子分解能観察が可能となった。この FM-AFM は、液中で脂質 1 分子を分子分解能で直接観察できる現在唯一の計測手法である。これまで我々はモデル細胞膜としてマイカ基板上に形成した脂質二重層の液中 FM-AFM 計測を行ない、分子分解能観察に成功した。その結果、非標識の脂質分子は蛍光プローブ標識法で算出される拡散速度よりも極めて拡散運動性が低く、個々の脂質分子が粒状の凹凸として観察できた。この拡散運動性が低下する原因として、マイカ基板と脂質分子との相互作用による影響が指摘されることもあるが、蛍光プローブ標識法もマイカ基板を用いた実験が行われており、単純な基板の影響ではないと考えられる。

ここまでの研究背景から、蛍光プローブ標識法の信頼性の検討が必要であることに気づいた。蛍光プローブ標識法による分子拡散計測は、蛍光標識分子を 0.1% 程度の少量だけ

混合して行われる。よって極めて低い割合で混合された蛍光プローブ標識分子の拡散速度 (D_L) から、残り 99.9% の非標識分子の拡散速度 (D_0) を議論しているのである。ここで FM-AFM と蛍光プローブ標識法から算出される脂質拡散速度が一致しない点について考察すると、脂質二重層内を蛍光プローブ標識された脂質分子だけが高速にホッピング拡散運動している可能性が考えられる。つまり、両計測手法から得られる分子拡散速度の差異は、蛍光プローブ標識の影響をある程度反映している可能性が考えられる。しかしながら、これらの実験では、使用された固定化基板・測定温度など実験条件が異なるため、蛍光プローブ標識の影響であることを証明することは困難であった。

2. 研究の目的

蛍光プローブ標識分子を用いた手法で観察される分子拡散が、非標識分子の拡散挙動を反映しているかどうかを明らかにするためには、蛍光標識および非標識分子を 1 分子レベルで直接観察し、蛍光プローブ標識が分子拡散運動に与える影響を評価できる新しい分析手法の開発が求められている。そこで本研究では、モデル生体膜中の蛍光標識された脂質分子および非標識分子の拡散挙動を液中分子分解能で観察するために周波数変調 AFM (FM-AFM) を利用する。また FM-AFM 観察と蛍光プローブ標識法による計測を全て同じ条件で行い、正確に比較することで分子拡散計測法としての信頼性を検証することを目指し、AFM 装置の改良と周辺機器を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AFM 計測セルの開発

従来、液中 AFM の計測用セルには、化学薬品耐性や機械加工性を考慮してポリマー樹脂材料が使われてきた。それらは光学顕微鏡観察を想定していないため、可視光を透過しない材料が選択される。本研究では計測セルの中央に光学窓を設置し、光学顕微鏡での観察が容易に行えるように設計した。その光学窓は試料基板に隣接して存在するため、熱的ドリフトに大きな影響が出やすい。そのため熱膨張係数が低い材料を用いた。この計測用セルの設計により、液中 FM-AFM 計測後の脂質二重層をそのまま蛍光顕微鏡を用いた分子拡散計測へ利用することができる。つまり同じサンプルで二つの計測手法を同時に比較することが可能となった。これにより

サンプル調製の再現性を議論する必要がなくなり、計測手法間の差異についてより正確に比較・検証できる。さらに AFM 計測セル内にペルチエ素子を配置し、試料と観察溶液の温度を高精度に制御を可能なシステムとした。また AFM 計測セルにプッシュプルポンプを接続したフロー型 AFM セルを開発した。これにより、AFM 探針を交換することなく異なる溶液条件での計測が可能となった。

(2) モデル生体膜の調製方法

本研究で使用した蛍光標識分子は極性頭部に NBD (ニトロベンゾオキサジアゾール) もしくはローダミンの蛍光基が導入されたリン脂質構造を有する。これら蛍光標識分子をリン脂質 DPPC もしくは DOPC に 0.1–10 モル%の濃度で混合し、100 nm の孔径を有するメンブレンを用いた Extruder 法により脂質ベシクルを調製した。さらにベシクルフュージョン法によりモデル生体膜として平面脂質二重層をへき開したマイカ基板上に調製した。これを緩衝溶液で十分にリンスし、未吸着のベシクルを取り除き、モデル生体膜として両計測手法に用いた。

(3) FM-AFM 計測

AFM 計測では、先鋭化された探針を先端に有するカンチレバーを力センサとして用いる。FM-AFM 観察では、短針先端に働く相互作用力を共振周波数付近で振動させたカンチレバーの周波数シフト (Δf) として計測しながら、それが一定になるようにフィードバック制御することで短針-試料間距離を制御する。その状態で探針を水平方向に走査し、探針の軌跡から表面形状像を得る。

一方、フォースカーブ測定では共振周波数で振動させたカンチレバーを試料表面に近づけていく。すると相互作用力によりカンチレバーの振動周波数が変化し、その変化量 Δf を記録し、 Δf を力に変換することで探針-試料間距離と相互作用力の関係を知ることができる。さらに AFM 探針で脂質二重層を貫くペネトレーションフォース (Fp) 測定を行い、その溶液条件下における脂質二重層の機械強度を評価した。

4. 研究成果

(1) AFM 計測セルの評価

FM-AFM を用いた分子分解能観察と蛍光顕微鏡観察のいずれにも使用できる AFM 計測セルを開発した。この計測セルには、光学窓や溶液フローシステムを組み込んだが、これを使用してマイカ表面の原子像を液中で観察することができた。このことからモデル生体膜の分子分解能 AFM 観察に十分な性能を有することを示した。

また計測セルに組み込んだペルチエ素子により、15°C–40°C の範囲で高精度 ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) に温度制御しながら AFM 計測や蛍光顕微鏡観察ができるようになった。さらに溶液フロー機能を用いることで、0.1 $\mu\text{l/h}$ –100 ml/h の流速で溶液交換が可能となった。溶液条件を変えながらカンチレバーを交換せずに同じ観察位置で連続して AFM 計測が行えるようになった。今後、フロー溶液の温度も計測溶液と同じように制御できるシステムを付加する予定である。

(2) モデル生体膜の調製方法の検討

脂質二重層形成の再現性は分子拡散計測データの定量性を左右するため、マイカ基板上に脂質二重層を 1 層のみ形成することができる調製条件を検討した。具体的には、脂質二重層形成に使用する溶液としてモデル生体膜研究で広く用いられる HEPES 緩衝液・リン酸緩衝液を選択し、添加する塩化ナトリウムでイオン強度を変化させながらマイカ基板上に形成される脂質二重層の分子スケールでの形状、被覆率、物理的性質を液中 FM-AFM により高分解能観察した。その結果、HEPES 緩衝液・リン酸緩衝液のどちらでも被覆率が高く、脂質二重層を 1 層のみ形成できる条件をほぼ確立した。この結果、再現性良くモデル生体膜を調製できるようになり、両計測手法で求められる分子拡散速度をより正確に比較することが可能となった。

(3) モデル生体膜上でのフォースカーブ計測

本課題で開発した AFM 計測セルの評価ならびに脂質二重層形成の再現性を調べるために、脂質二重層上でのフォースカーブ測定を行った。Hepes/NaCl (10/100 mM) および Hepes/NaCl/CaCl₂ (10/100/3 mM) 中で DPPC 二重層上において測定した相互作用力-距離曲線から、Ca²⁺イオンの存在下では遠距離力が大きく抑制されることが分った。これは、Ca²⁺イオンが Na⁺イオンよりも強く脂質分子頭部と相互作用して、脂質膜表面に形成される電気的二重層の広がりを抑制することを示唆している。このフォースカーブの減衰距離から HEPES/NaCl (10/100 mM) (HEPES 溶液) 中で作製した脂質二重層上では約 4 nm の探針-試料間距離から長距離斥力が生じていることが分かる。さらに溶液フローシステムを用いて (i) HEPES 溶液 → (ii) PBS 溶液 → (iii) HEPES 溶液と交換して計測し、長距離斥力の減衰距離を比較した。その結果より、HEPES を用いて脂質二重層を調製し、そのままフォースカーブ計測した場合にのみ大きな長距離斥力が生じ、一度 PBS 溶液に交換すると長距離斥力は抑制され、再度 HEPES 溶液

に交換しても大きな長距離斥力は働かないことが分った。ここで HEPES 溶液と PBS 溶液に含まれる NaCl の濃度が異なることに注目した。そこで溶液中の NaCl 濃度を変えながらペネトレーションフォース Fp (膜貫通力) 測定を行った。その結果、NaCl 濃度を段階的に高くすると Fp 増加していくがもう一度 NaCl を低い濃度に交換しても Fp は高いままであることが分った。これはフォースカーブ測定で得られた不可逆的な変化が確認された。この結果は溶液中の Na⁺イオンが生体膜と局所的に相互作用し、生体膜の拡散や構造に不可逆的な効果を与えており、その結果、長距離斥力や機械強度が不可逆的な変化を示したことを示唆している。

これらの結果は、本課題で開発した溶液フロー機能を付与した AFM 計測セルが、溶存イオンなどの溶液条件が脂質膜-水界面に広がる力分布へ与える影響をナノスケールで直接計測することに有用であることを示している。

(4) モデル生体膜の蛍光顕微鏡観察

NBD もしくはローダミンを頭部に修飾したリン脂質分子を DPPC もしくは DOPC に混合し、HEPES 溶液および PBS 溶液を用いて AFM 計測セル中のマイカ基板上に脂質二重層を形成した。これを落射蛍光顕微鏡を用いて AFM 計測と同じ条件で観察した。その結果、蛍光修飾分子の濃度が 0.1-1 mol% では、10 μm 程度の領域では均一な蛍光像が得られた。これはマイクロメートルスケールの領域で 1 層の脂質二重層を形成していることを示している。この脂質二重層の中央部分に絞りを利用して強い励起光を照射することで蛍光を褪色させ、その後、中央部分の蛍光強度の回復を計測できることを確認した。これにより、今回開発した AFM 計測セルが FRAP 法などの蛍光プローブ標識法による分子拡散計測にも利用できることを確認した。

(5) モデル生体膜の FM-AFM 計測

蛍光顕微鏡観察に用いた同じ条件の脂質二重層を液中 FM-AFM 観察した。その表面に存在するサブナノメートルの局所構造を直接計測することができた。これらの結果は、本課題で開発した AFM 計測セルを用いることで、蛍光顕微鏡および液中 FM-AFM による分子拡散評価を全て同じ条件で行うことが可能となり、今後、蛍光分子の構造や修飾部位が分子拡散に与える影響を検証できるようになったことを示している。今後、本研究で開発した AFM 装置や計測セルを利用して種々の蛍光分子が標識された脂質分子の拡散挙動について、分子スケールの理解が進むことが期待される。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 福間剛士, 浅川雅, 脂質膜/水界面の 3 次元走査型原子間力顕微鏡による分子スケールイメージング, 日本生物物理学会第 48 回年会, 2010 年 9 月 20 日, 東北大学 (宮城県)
- ② Asakawa H., Ikegami K., Hayasaka T., Setou M. and Fukuma T., Submolecular-scale imaging of tubulin assemblies by FM-AFM in liquid, 13th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, 2010. 8. 4. Kanazawa (Ishikawa).
- ③ Asakawa H., Nishimura K., Yoshioka S. and Fukuma T., Distribution of Water Molecules Adjacent to Biological Membranes Visualized by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy, 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2009. 12. 11, Atagawa (Shizuoka)

[その他]

・ホームページ
<http://fukuma.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

・アウトリーチ活動
まちなかサイエンスセミナー・若手が伝える最先端科学, 2010 年 12 月 4 日, アートシアターいしかわ (石川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 雅 (ASAKAWA HITOSHI)
金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・助教
研究者番号: 90509605