

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14603

研究課題名（和文）カーボンナノチューブ探針を用いた染色体のナノスケール3次元AFM計測技術の開発

研究課題名（英文）Development of 3D-AFM for visualizing chromosomes by carbon nanotube tip

研究代表者

宮澤 佳甫（Miyazawa, Keisuke）

金沢大学・フロンティア工学系・助教

研究者番号：40845525

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、液中原子間力顕微鏡（AFM）で用いるためのカーボンナノチューブ（CNT）探針を開発し、CNT探針でヒトの染色体の表面と内部を3D-AFM計測することで、従来のAFMでは困難だった染色体の3次元立体構造を可視化することに成功した。また、開発したCNT探針を用いてDNAの液中観察を行い、従来のDNA観察で問題となっていたDNAの見かけ上の形状の膨潤の問題が解消され、直径2 nmのDNAの形状をとらえつつDNA表面のらせん構造を同時に観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、従来のAFMでは困難であった生体試料の内部計測が可能となり、本研究で用いた染色体だけではなく、細胞核、ゴルジ体、ミトコンドリアなどの各オルガネラの液中3次元計測の可能性が拓かれた。これは、液中AFMの応用可能性を大きく広げる成果であり、液中AFMが生物学や医学・薬学などの各分野に普及し、生体試料に関するナノレベルの新たな構造・力学情報に関する知見を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a carbon nanotube (CNT) tip used for in-liquid atomic force microscopy (AFM) and succeeded in visualizing the three-dimensional structure of human chromosomes by 3D-AFM with the CNT tip, which was difficult to achieve with conventional AFM. In addition, we performed the measurement of DNA in liquid using the developed CNT tip, and the problem of swelling of the apparent shape of DNA using conventional AFM tip was solved, and the helical structure of the DNA surface was successfully observed simultaneously while measuring the shape of DNA with a diameter of 2 nm.

研究分野：計測工学

キーワード：原子間力顕微鏡 カーボンナノチューブ 染色体

1. 研究開始当初の背景

近年、超解像顕微鏡やクライオ電子顕微鏡の発明により、液中計測が求められる生物試料においても一分子計測や原子レベルの液中構造解析が実現している。しかしながら、これらの最先端計測技術においても、超解像顕微鏡では蛍光染色やレーザー照射によるダメージ、電子顕微鏡では電子線染色や試料の凍結、電子線によるダメージの課題がある。この問題を解決するために、生体試料の表面や内部を液中環境下かつ低侵襲でナノスケール計測できる手法の開発が強く求められている状況であった。

このような背景の中で、原子間力顕微鏡 (AFM) は、液中環境下で非染色かつ低侵襲の原子・分子スケール計測が可能な画期的な計測手法であり、幅広い研究分野から注目されていた。AFM は、鋭く尖った探針が付いたカンチレバー (片持ち梁) を用いる。探針が試料表面から受ける相互作用力をカンチレバーの変形量で検出し、この相互作用力を一定に保ちながら探針を試料表面上で走査することで、試料表面の形状像を取得することができる。AFM は、原理的には試料の内部構造を観察することは困難であるが、近年開発された 3 次元原子間力顕微鏡 (3D-AFM) は、AFM 探針を試料内部で 3 次元的に走査して探針が受ける 3 次元相互作用力を取得することで、試料内部の立体構造のナノスケール計測が可能な革新的な手法である。これまで、3D-AFM で水和構造や自己組織化膜 (脂質膜・界面活性剤・潤滑層) など、10 nm 以下の厚みを持った揺動する分子の 3 次元立体構造を原子・分子レベルで可視化されてきた。また、近年は AFM 探針を直径 100 nm 程度の円柱形に加工したニードル探針を用いることで、1 μm 以上の厚みを持った細胞やその内部構造の 3D-AFM 計測も実現し、細胞核やアクチンフィラメントなどの計測例も報告されてきた。しかしながら、その中間領域であるメゾスケール (10 nm ~ 100 nm 程度) の厚みを持った立体構造はこれまでに 3D-AFM で可視化されていない。これは、先行研究で用いられた探針は直径が大きく、探針を染色体の深部まで挿入できないことが理由であり、メゾスケールの生体試料内部の構造観察に適したニードル探針の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、メゾスケールの生体試料であるヒトの染色体の内部に挿入できるニードル探針を開発し、3D-AFM を用いて染色体の 3 次元構造をナノスケールで可視化することを目的とした。染色体は、DNA とタンパク質の繊維状構造 (クロマチン) が 3 次元的に折りたたまれることで構成されているが、その詳細な凝集構造は未だ明らかになっていない。3D-AFM で染色体の内部構造を可視化するためには、探針の直径がクロマチン繊維の直径 (30 nm) よりも小さく、染色体の厚み (500 nm 以上) よりも長く、なおかつ計測中に折れない探針を作製する必要がある。従来 AFM で使用されてきた Si 製の探針や EBD (電子線照射カーボン) 探針でも直径 100 nm 以下のニードル探針を作製することは可能だが、探針の直径が小さいと 3D-AFM 計測中に容易に折れてしまう。このように、染色体は、3D-AFM 計測に耐える実用的なニードル探針を作製するのが一番困難なメゾスケール計測領域にある。そこで本研究では、機械的・熱的に安定しているカーボンナノチューブ (CNT) に着目し、染色体の 3D-AFM 計測を可能にする直径 30 nm 以下、長さ 500 nm 以上の CNT 探針を作製し、染色体の内部構造を可視化することを目指した。

3. 研究の方法

(1) CNT 探針の開発 (3D-AFM の基盤技術開発)

直径 30 nm 以下、長さ 500 nm の CNT 探針を作製するために、電子顕微鏡内に XYZ と回転の合計 4 軸駆動が可能なマニピュレーターを搭載する。そして、マニピュレーターを用いて CNT を AFM 探針の先端に固定し、電流で CNT の中心を加熱することで切断する (図 1)。電流で CNT を加熱切断することで、CNT の先端は綺麗に閉じた構造で終端させる。また、CNT 探針の機械的強度を向上し、さらに探針側面と染色体の摩擦を制御するために、原子層堆積法 (ALD) を用いて原子レベルで平坦なアルミナ層を CNT の周囲にコートする。これにより、AFM 計測中の探針の破損や、探針が染色体に与えるダメージ (染色体の変形や破損) を抑制する。

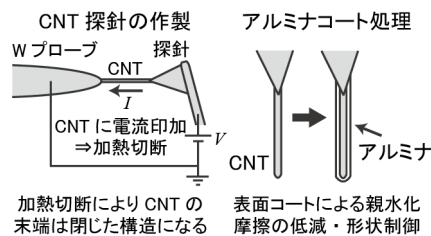


図 1 先鋭プローブの開発。

(2) 染色体の単離と基板への固定 (染色体試料調製)

染色体の単離方法や AFM 計測は既に研究例が報告されており (T. Ushiki et al., 2008 など)、まずは同じ手順で染色体を細胞から単離して基板に固定できるかどうか検討する。細胞は、ヒトのがん細胞である HeLa 細胞を用いる。

(3) 単離した染色体の 3D-AFM 計測 (3D-AFM 実験)

ガラス基板上に固定した染色体の液中 3D-AFM 計測を行う。3D-AFM 像を取得し、得られたコントラストと染色体の立体構造の関係性を検証する。また、探針の走査速度や走査方法を検討し、3D-AFM 像のコントラストや分解能の変化を比較することで、染色体計測に最適な実験パラメーターを見つける。

4. 研究成果

(1) CNT 探針の作製

図 2 に、開発した装置で作製した CNT 探針の SEM 像を示す。直径 30 nm 以下、長さ 500 nm 程度の形状のニードル探針を作製することができた。CNT 探針に電流を流して加熱切断する際に、カンチレバー等に導電性の悪い素材が含まれていると図 2 のように過電流が流れて CNT 探針先端が変形することがあった。そこで、CNT 探針作製直前にスパッタコーターでカンチレバーおよび探針全体にプラチナを 10~30 nm 程度の厚みで成膜することで、CNT 切断時の電流値を抑えることができた。これにより、切断時の加熱温度を抑えることができ、CNT 探針先端の変形を抑制することができた。

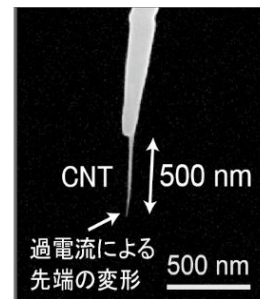


図 2 CNT 探針の SEM

(2) 分裂期の染色体サンプルの作製

HeLa 細胞をカルノア溶液で固定化した後に、低張液処理した後にスライドガラス上に滴下することで細胞を破裂させ、分裂期の染色体標本をガラス基板上に作製した。図 3 は、作製した染色体標本の光学顕微鏡像と、その中の染色体の一つを AFM で計測した像である。分裂期の染色体の特徴的な X 字の形状だけでなく、その表面の微細構造も 30 nm 程度の分解能で明瞭に可視化することができた。

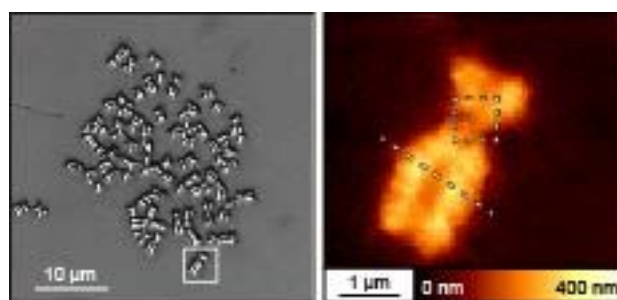


図 3 染色体の光学顕微鏡像と AFM 像。

(3) 染色体の 3D-AFM 計測

次に、開発した CNT 探針 (図 2) を用いて、ヒトの染色体内部で 3D-AFM 計測を行った。図 4 は、取得した 3D-AFM 像 (力勾配像) から抽出した XZ 断面図である。探針が染色体に接触していない領域では力勾配は弱いですが、探針が染色体に接触して内部に挿入されると力勾配が増加し、染色体内部で局所的なコントラストが得られることが分かった。また、この局所コントラストは、染色体の長軸に沿って周期的なコントラストとなっており、ギムザ染色等のバンド構造と相関すると考えられる。すなわち、染色体を構成するクロマチンの密度分布に相当すると考えられる。これを明らかにするためには、各種染色法によるバンド構造との比較やクライオ電子顕微鏡画像との比較が必要である。また、その他にも探針走査速度を変化させた時に、3D-AFM 像のコントラストが変化することが分かった。これは、染色体の緩和時間が関係すると考えられ、緩和時間に対して最適な探針走査速度で計測することで、染色体の内部構造を強く反映したコントラストを得られる可能性が示唆された。探針走査速度の詳細な条件出しを行うためには、AFM シミュレーションとの比較が必要である。

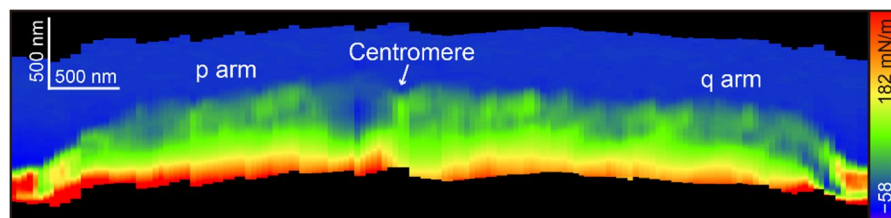


図 4 3D-AFM 像の XZ 断面図。

上記の通り、本研究ではヒトの分裂期の染色体内部を可視化するための CNT 探針を作製し、その CNT 探針を用いて染色体内部で 3D-AFM 計測を行うことで、染色体内部の密度分布を反映した 3D-AFM 像を得ることに成功した。今後、空間分解能の向上や、得られた 3D-AFM 像のコントラストの起源を慎重に検討する必要があるが、従来の 3D-AFM では計測が困難であったメゾスケールの生体試料の内部構造計測を実現する重要な成果を得ることができた。本研究で得られた知見を基に、今後さらに 3D-AFM 計測の基盤技術と応用計測が発展し、生体試料を扱う様々な研究分野に本手法が普及することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ichikawa Takehiko, Wang Dong, Miyazawa Keisuke, Miyata Kazuki, Oshima Masanobu, Fukuma Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Chemical fixation creates nanoscale clusters on the cell surface by aggregating membrane proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03437-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sumikama Takashi, Federici Canova Filippo, Gao David Z., Penedo Marcos, Miyazawa Keisuke, Foster Adam S., Fukuma Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Computed Three-Dimensional Atomic Force Microscopy Images of Biopolymers Using the Jarzynski Equality	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5365 ~ 5371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.2c01093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ikarashi Takahiko, Nakayama Kyosuke, Nakajima Naoki, Miyata Kazuki, Miyazawa Keisuke, Fukuma Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Visualizing Molecular-Scale Adsorption Structures of Anti-freezing Surfactants on Sapphire (0001) Surfaces at Different Concentrations by 3D Scanning Force Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 44947 ~ 44957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.2c10475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yurtsever Ayhan, Wang Pei-Xi, Priante Fabio, Morais Jaques Ygor, Miyazawa Keisuke, MacLachlan Mark J., Foster Adam S., Fukuma Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular insights on the crystalline cellulose-water interfaces via three-dimensional atomic force microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abq0160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hao Yajiao, Yu Lin, Miyazawa Keisuke, Zhang Shengrui, Liu Mo, Yu Zhongqi, Liu Jun, Yu Yang, Li Song, Xu Shujue, Fukuma Takeshi, Xiao An Zhang Sean, Li Minjie	4. 巻 -
2. 論文標題 Highly Stable Triangular Single Layer 2D Assemblies: Synthesis and Their Stimuli Responsive Elastic and Anisotropic Curling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ange.202302365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsujioka Masatsune, Miyazawa Keisuke, Ohmuraya Masaki, Nibe Yoichi, Shirokawa Tetsuya, Hayasaka Haruko, Mizushima Tsunekazu, Fukuma Takeshi, Shimizu Shigeomi	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of a novel type of focal adhesion remodelling via FAK/FRNK replacement, and its contribution to cancer progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-023-05774-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Sho, Urata Shingo, Suga Kent, Fukuma Takeshi, Hayashi Yasuo, Miyazawa Keisuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Three-dimensional ordering of water molecules reflecting hydroxyl groups on sapphire (001) and -quartz (100) surfaces	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 13262 ~ 13271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3nr02498a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichikawa Takehiko, Alam Mohammad Shahidul, Penedo Marcos, Matsumoto Kyosuke, Fujita Sou, Miyazawa Keisuke, Furusho Hirotooshi, Miyata Kazuki, Nakamura Chikashi, Fukuma Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol for live imaging of intracellular nanoscale structures using atomic force microscopy with nanoneedle probes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102468 ~ 102468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Development of nanoendoscopy-AFM for visualizing intracellular nanostructures of living cells
3. 学会等名 IEEE-NEMS2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 宮澤佳甫、Marcos Penedo Garcia、岡野直子、古庄公寿、市川壮彦、Alam Mohammad Shahidul、宮田一輝、中村史、福間剛士
2. 発表標題 生きた細胞内部の分子構造動態を可視化するためのIn-cell AFM技術の開発
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Keisuke Miyazawa, Takeshi Fukuma
2. 発表標題 Intracellular live imaging of organelle structures and mechanical properties by nanoendoscopy using AFM
3. 学会等名 The 100th Anniversary Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 K. Miyazawa, M. Penedo, N. Okano, H. Furusho, T. Ichikawa, M. S. Alam, K. Miyata, C. Nakamura, T Fukuma
2. 発表標題 Development of nanoendoscopy-AFM for visualizing intracellular nanostructures of living cells
3. 学会等名 The 22nd International Vacuum Congress (IVC-22) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1 . 発表者名 K. Miyazawa, M. Penedo, N. Okano, H. Furusho, T. Ichikawa, M. S. Alam, K. Miyata, C. Nakamura, T Fukuma
2 . 発表標題 Development of Nanoendoscopy-AFM for Visualizing Intracellular Nanostructures of Living Cells
3 . 学会等名 AVS 68th INTERNATIONAL SYMPOSIUM & EXHIBITION (国際学会)
4 . 発表年 2022年 ~ 2023年

1 . 発表者名 R. Kojima, K. Miyazawa, A. M. Shahidul, K. Sivashanmugan, T. Sumikama, R. Omura and T. Fukuma
2 . 発表標題 Visualizing 3D internal structure of cell nucleus by 3D-AFM
3 . 学会等名 AFM BioMed Conference 2022 (国際学会)
4 . 発表年 2022年 ~ 2023年

1 . 発表者名 R. Kojima, K. Miyazawa, K. Teramae, T. Sumikama, M. Meguro, K. Imadate, N. Okano, S. Horike, K. Hirahara T. Fukuma
2 . 発表標題 Development of a Method for Visualizing Nanometer-Scale Three-Dimensional Structures of Chromosomes by Three-Dimensional Atomic Force Microscopy
3 . 学会等名 AVS 68th INTERNATIONAL SYMPOSIUM & EXHIBITION (国際学会)
4 . 発表年 2022年 ~ 2023年

1 . 発表者名 児島 亮平, 宮澤 佳甫, Alam Mohammad Shahidul, Kundan Sivashanmugan, 炭電 享司, 太村 理沙, 福間 剛士
2 . 発表標題 細胞核内部の3次元構造を可視化する3D-AFM の開発
3 . 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4 . 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 松森海晴、宮澤佳甫、熊倉直祐、白須賢、福間剛士
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いたウリ類炭疽病菌の付着器の膨圧計測
3. 学会等名 第70回 応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 宮澤 佳甫, Penedo Marcos, 岡野 直子, 古庄 公寿, 市川 壮彦, Mohammad Shahidul Alam, 宮田 一輝, 中村 史, 福間 剛士
2. 発表標題 ナノ内視鏡AFMによる生細胞内部の構造・力学特性計測
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第79回学術講演会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 宮澤 佳甫, 熊倉 直祐, 松森 海晴, 白須 賢, 福間 剛士
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌の付着器の細胞壁のナノスケール構造計測
3. 学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 宮澤 佳甫, 奥西 昂, 中山 隆宏, 福間 剛士
2. 発表標題 液中原子分解能AFM計測に適した電子線堆積カーボン探針の作製
3. 学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 宮澤 佳甫, 永井 生, 浦田 新吾, 菅 健斗, 福間 剛士, 林 泰夫
2. 発表標題 サファイア(001)と -クォーツ(100)表面の3次元水和構造解析
3. 学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 K. Miyazawa, T. Fukuma
2. 発表標題 Atomic-Scale Hydration Structures Visualized by Three-Dimensional Atomic Force Microscopy (3D-AFM)
3. 学会等名 AVS69 (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 K. Miyazawa, M. Penedo, H. Furusho, T. Ichikawa, M. S. Alam, K. Miyata, C. Nakamura, T. Fukuma
2. 発表標題 Nanoendoscopy-AFM for Visualizing Intracellular Nanostructures of Living Cells
3. 学会等名 Microscopy and Microanalysis 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------