

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24221008

研究課題名(和文)複合機能プローブシステムによるバイオ・ナノ材料の分子スケール機能可視化

研究課題名(英文)Molecular-scale functional visualization of bio- and nano-materials by AFM functional probes

研究代表者

山田 啓文(YAMADA, Hirofumi)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：40283626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 144,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、液中動作可能な高分解能周波数変調原子間力顕微鏡(AFM)イメージング技術およびデュアルプローブAFM技術に基づき、さまざまな生体分子の機能・構造を分子スケールで識別して可視化する、新たな分子機能イメージング法を確立した。これによって、たんぱく質分子ドメインの直接可視化、分子レベルでの特異結合サイトの同定、結合力の定量評価が可能となった。また、複雑な表面構造をもつ生体分子に対しても、その生化学活性に直接関連する水和構造や局所電荷密度を分子レベルで可視化、マッピングすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Based on both high-resolution frequency modulation atomic force microscopy (AFM) and dual probe AFM techniques, working in liquids, we have successfully realized a novel method for the visualization of molecular-scale bio-functions in addition to structural imaging of biomolecules. The method allows us to directly investigate various biomolecules in a wide variety of aspects such as direct visualization of protein domains, molecular-scale identification of specific binding sites and quantitative force analysis of binding interactions. Furthermore, we succeeded in the visualization of hydration structures and local charge densities of biomolecules, which are directly related to biochemical activities.

研究分野：表面物理学, ナノ計測, 分子エレクトロニクス

キーワード：ナノ計測 原子間力顕微鏡 水和構造計測 3次元フォースマップ

1. 研究開始当初の背景

近年、生体試料の分子レベル評価には原子間力顕微鏡 (AFM) が広く用いられており、生体機能可視化についても、生化学修飾探針を用いて特異的相互作用を検出する手法や、タンパク質分子内の水素結合を解析するフォース分光法などが開発されている。しかし、探針修飾による分解能の低下や、機能・構造情報の明瞭な分離が困難など、高分解能イメージング法としては大幅な改善が求められていた。

2. 研究の目的

本研究代表者らにより開発されてきた高分解能周波数変調 (FM) AFM 技術およびデュアルプローブ AFM 技術に基づき、生体膜上のさまざまな生体分子の機能・構造を識別して分子レベルで可視化する、新たな分子機能イメージング法を確立し、これら生体分子機能発現の微視的機構を解明することを目的とする。さらに、一般的なナノ構造体の機能・物性の分子スケール可視化への応用も目指す。

3. 研究の方法

以下の 4 つの研究テーマ、すなわち (1) デュアルプローブ AFM による生体機能可視化技術の確立、(2) 生体分子刺激探針による生機能発現の測定、(3) 生体分子近傍の水和構造可視化、(4) 生体分子近傍の静電相互作用の可視化、に沿って、参画研究者および連携研究者間の緊密な連携を図りつつ研究を推進する。

4. 研究成果

(1) デュアルプローブ AFM による生体機能可視化技術の確立

本研究では、最小移動ステップ幅が 10 nm 以下の慣性駆動型の探針駆動機構を備えたデュアルプローブ AFM 装置を新たに設計・作製した。これにより、通常探針と生化学修飾探針で同一領域を同時に計測することが可能となった。一方、溶液環境下では 2 つのプローブの動作干渉が問題となるが、光熱励振法を導入することでこの問題を解決した。さらに、この光熱励振により相互作用力の定量測定が可能となり、保存力と散逸力を完全に分離して計測することに成功した。この成果は *Phys. Rev. Lett.* 誌に掲載された (論文⑨)。この定量的相互作用測定技術は、生化学修飾による構造・機能情報の分離検出に大きな役割を果たす。

また、マウス由来の IgG 抗体の Y 字型構造を高分解能観察し、抗体内のドメイン構造を識別することに成功した (図 1(a))。この IgG 抗体が特定の溶液環境下において 6 量体を形成し、さらにはこの 6 量体が 2 次元結晶を形成することを新たに見いだした (図 1(b))。また、6 量体は抗原性分子に結合し、非抗原性分子には結合しないことを AFM 直接観察

により見だし、6 量体形成後も抗原活性が保たれることを明らかにした。これらの成果は *Nature Materials* 誌 (論文⑦) に掲載された。

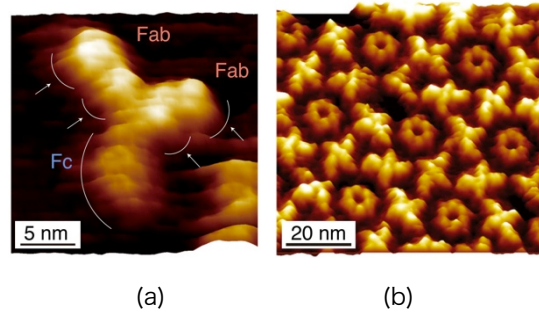


図 1: (a) マウス由来の IgG 抗体および (b) その 6 量体の 2 次元結晶の FM-AFM 像。

一方、抗原抗体反応のように、特定のターゲット分子に特異結合する生体分子系においては、結合前後で顕著な構造変化を生じるため、この構造変化を直接的に捉えることは、生体分子の機能発現における微視的機構を探る上で非常に有効である。しかしながら、通常の装置では、上記のようなターゲットに結合する分子を注入する際には探針周辺に大幅な擾乱をもたらし、注入後の高分解能観察を著しく阻害する。本研究では、ターゲット周辺のみ極微量の分子を注入するピペット型ナノプローブを新たに開発し、通常の AFM 探針の近傍にこのピペット型ナノプローブを位置決めすることで、局所領域での極微量リガンド注入を可能にした (図 2)。

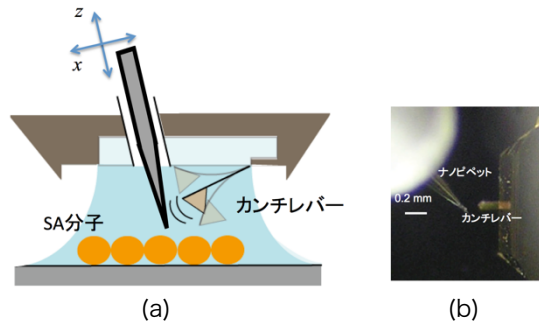


図 2: (a) ナノピペットを用いた分子導入機構の模式図。 (b) 光学顕微鏡写真。

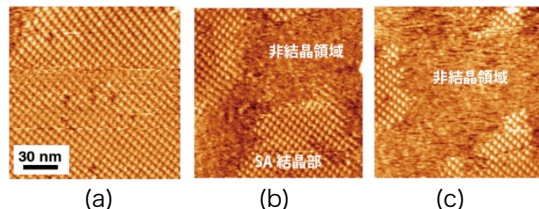


図 3: (a) biotin 分子注入前、(b) biotin 溶液 (500 nM) 20 μ l 注入後、(c) さらに同溶液 5 μ l 注入後の Streptavidin (SA) 2 次元結晶の FM-AFM 像。

このナノピペットによってマイカ基板上に形成された streptavidin (SA) 2 次元結晶に biotin を注入したところ、SA に biotin が結合することで SA 間相互作用が弱まり、2 次元結晶

の結晶端部から非結晶化していく様子を捉えることに成功した (図3)。

(2) 生体分子刺激探針による生機能発現の測定

SA 分子は、biotin 化した脂質分子を含む脂質 2 分子膜上で 2 次元結晶を形成する。この SA 結晶中における SA 分子は、biotin との結合サイト (ポケット) を結晶表面に露出させるように配向する。一方、SA 分子はマイカ基板上においても 2 次元結晶を形成するが、マイカ上での結合サイトは結晶側面に向いている。われわれは、これら分子方位の異なる 2 つの 2 次元結晶が共存する試料を作製した (図 4)。この試料は、SA-biotin の結合状態を分子レベルで評価するためのモデルプラットフォームとして利用可能である。

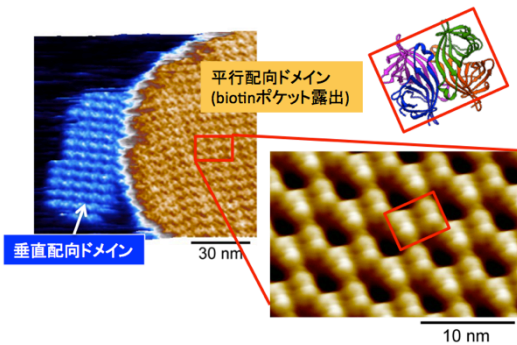


図 4: Streptavidin (SA) 2 次元結晶膜の配向制御および分子分解能観察 (右下図では 4 量体構造 (赤枠内) が見える)。

本研究では、biotin 修飾探針を作製し、SA 2 次元結晶上でフォースマッピング実験を行った。探針作製に当たっては、先ず探針をアミノ基で修飾した後、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を有するリンカー分子で biotin 修飾した。

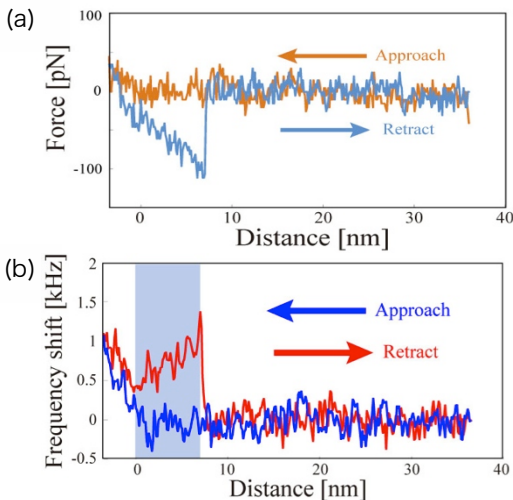


図 5: biotin 修飾探針を用いた Streptavidin 2 次元結晶膜上のフォースカーブ. (a) 接触力 (カンチレバーたわみ). (b) 周波数応答 (FM-AFM)。

探針を共振周波数近傍で振動させた状態で、試料に接近・後退を繰り返し、カンチレバーの接触力と共振周波数変化 (FM-AFM) を同時測定することで、2 種類のフォースカーブを取得した (図 5)。どちらの測定においても、探針後退と接近の間で曲線にはヒステリシスが見られ、後退時の 7 nm 程度の位置で急峻に変化し、その後は接近時の曲線にほぼ戻った。この結果は、接触後に SA-biotin 間に特異結合が生じ、PEG 鎖が引き延ばされて、引力 (負の接触力) および共振周波数の増加が検出され、結合が切れた瞬間に力も共振周波数も元の状態に戻ることを示している。

本実験により、FM-AFM を用いて分子レベルでの結合サイトの同定や定量的な特異結合力が評価可能であり、また結合前後の状態を分子レベルで評価することができる事が確認された。

(3) 生体分子近傍の水和構造可視化

本研究では、FM-AFM を用いた 3 次元フォースマッピングによる水和構造計測技術を確立するため、構造が比較的単純な無機結晶をモデル試料として FM-AFM 計測結果と分子動力学 (MD) シミュレーションによる水分子密度プロファイルと比較することで、探針による影響や解析方法の最適化の検討を行った (図 6)。この成果は *J. Phys. Chem. C* 誌に掲載された (論文②)。

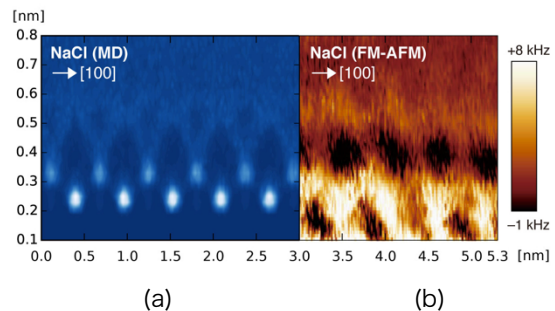


図 6: NaCl(001)の固液界面における(a) 水分子密度 (MD 計算) および(b) FM-AFM による 2 次元周波数シフトマップ図。

生体分子のモデル試料として、脂質二重膜上の SA 2 次元結晶の 3 次元フォースマッピングによる水和構造計測を行ったところ、biotin 結合サイト近傍の複雑な 3 次元水和構造を反映した 2 次元周波数シフトマップの取得に成功した (図 7)。

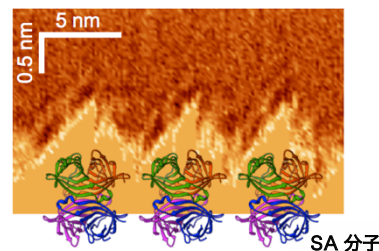


図 7: SA 2 次元結晶膜上の水和構造 (2 次元周波数シフトマップ)。

一方、一般に複雑な表面構造をもつ生体分子については、安定な3次元水和構造測定は容易ではなかった。本研究では、計測時間の短縮、機械系および測定系におけるさまざまなドリフト要因を改善することで、安定な3次元フォースマッピング法を実現し、実際に、プラスミド DNA 周囲の水和構造を分子レベルで可視化することに成功した(図8)。一方、プラスミド DNA の2重らせん構造の高分解能FM-AFM観察に関する成果が *ACS Nano* 誌(論文⑩)に掲載され、各方面から注目を集めた。

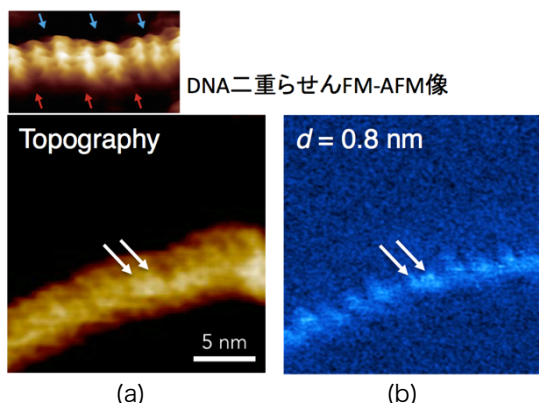


図8: DNA分子の3次元フォースマップデータから再構成された(a)形状像および(b)DNA上の水和構造を反映するXY(2次元)周波数シフトマップ(d はおよそ分子表面からの距離を表す)。

(4) 生体分子近傍の静電相互作用の可視化

生体分子は、周囲のイオン濃度や pH などに応じてその表面電荷分布を変えるが、この変化は生体分子間相互作用に直接的に影響を与える。電解質中に存在する電荷はその周りに電気二重層を形成するため、大気、真空中と比べて、静電気力測定は遥かに複雑となる。

本研究では、通常交流電界が遮蔽されてしまう電解質液中においても、高周波電界を用いることで、局所誘電応答計測が可能であることを見いだした。一方で、通常先の鋭探針を用いて局所表面電荷計測を行うことは困難であることが分かった。このため、3次元フォースマッピングにより探針-試料間にはたらく電気二重層力の距離依存性を計測し、これを解析することで生体分子表面の電荷密度を求める方法を新たに開発した。

実際に、3次元フォースマップ法を用いた電気二重層力計測によって、界面活性剤分子(ドデシル硫酸ナトリウム)がグラファイト固体基板上で形成する表面ミセル構造の帯電表面の電荷密度を得ることに成功した。なお、3次元電気二重層力分布から局所電荷密度を求めるためには、境界条件を含む Poisson-Boltzmann 方程式を解く必要があるが、われわれは、変形グリーン関数法という計算法を新たに開発し、これによって実験で得られた試料形状および電気二重層力分布からミセル構造の局所電荷密度を求めることにも成功した。この成果は *J. Chem. Phys.*

誌に掲載された(論文⑥)。

一方、生体分子近傍の静電相互作用可視化計測として、電荷分布・構造が既知の DNA/ポリ L リジン膜系と探針の間にはたらく局所静電気力(電気二重層力)を3次元フォースマッピング法により測定し、この測定結果を理論計算から得られるフォースカーブと比較することで、局所電荷密度を求めることに成功した(図9)。得られた DNA 上の電荷密度は、先行研究の巨視的計測法で得られた結果にほぼ一致した。この成果は *Nanotechnol.* 誌に掲載された(論文④)。以上のように、3次元フォースマッピングによる電気二重層力計測により局所表面電荷密度を求めることができることが示された。

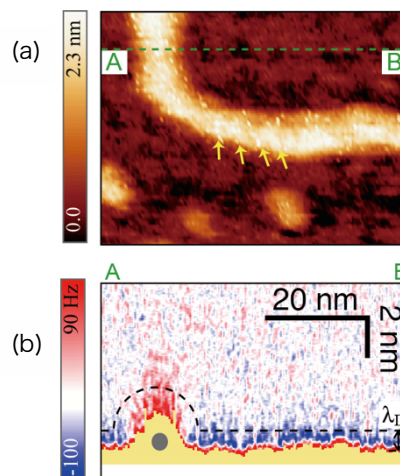


図9: (a) ポリ L リジン膜上の DNA の表面形状像 (b) (a) 図内の A-B 上の静電気力分布を反映する 2次元周波数シフトマップ. DNA 上の電気二重層電荷は二重らせん鎖上のリン酸基の負電荷に対応して正となる。

また、3次元フォースマッピングによって、(3)で述べた生体分子近傍の水和構造と電気二重層の関連性を調べるため、これらの同時可視化を行った。

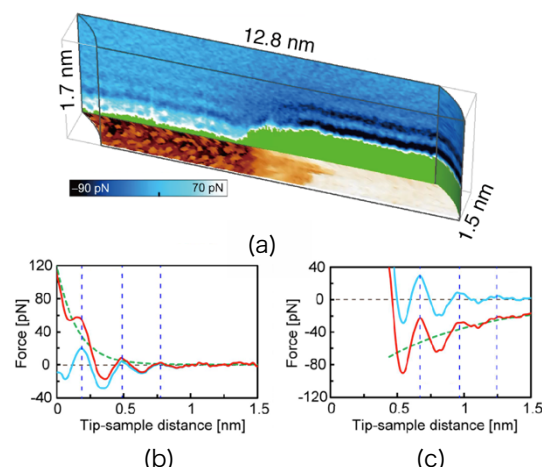


図10: (a) Clinoclure (001) 固液界面における3次元フォースマップ. (b) Talc-like 層上におけるフォースカーブ. (c) Brucite-like レイヤー層上におけるフォースカーブ.

特に層状珪酸塩鉱物結晶 Clinochlore は、正および負帯電層を含んでおり、水和構造と電気二重層の関係性を調べる上で、適切なモデル試料となる。その固液界面における3次元フォースマップを図 10(a)に示す。Clinochlore は、珪酸塩四面体層 (Talc-like 層) および酸素八面体層 (Brucite-like 層) が交互に積層した構造をとっており、へき開面にはその両者がほぼ同面積露出したステップ・テラス構造を示す。また、四面体層は負帯電、八面体層は正帯電している。表面近傍のフォースカーブ (図 10(b), (c)) は、振動的な水和構造とともに (赤曲線)、背景力としてはたらく電気二重層力 (緑曲線) を示す。この曲線の減衰長は Debye 遮蔽長 (0.9 nm) に相当する。これらの特徴は、図 10(a) の3次元フォースマップにも背景の明暗コントラストなどに現れている。以上のように、測定条件を適切に設定することで、FM-AFM による3次元フォースマッピングによって水和構造計測と表面電荷密度計測を同時に行うことが可能であることが確認された。

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 10 件)

- ①A. Yao, K. Kobayashi, S. Nosaka, K. Kimura & H. Yamada: “Visualization of Au Nanoparticles Buried in a Polymer Matrix by Scanning Thermal Noise Microscopy”, *Scientific Reports*, **7**, 42718 (2017).
DOI: 10.1038/srep42718
- ②F. Ito, K. Kobayashi, P. Spijker, L. Zivanovic, K. Umeda, T. Nurmi, N. Holmberg, K. Laasonen, A. S. Foster, and H. Yamada: “Molecular Resolution of the Water Interface at an Alkali Halide with Terraces and Steps”, *J. Phys. Chem. C*, **120**, 19714–19722 (2016).
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05651
- ③Y. Yamagishi, K. Kobayashi, K. Noda, H. Yamada: “Visualization of trapped charges being ejected from organic thin-film transistor channels by Kelvin-probe force microscopy during gate voltage sweeps”, *Applied Physics Letters*, **108**, 093302 (2016).
DOI: 10.1063/1.4943140
- ④K. Umeda, K. Kobayashi, N. Oyabu, K. Matsushige, and H. Yamada: “Molecular-Scale Quantitative Charge Density Measurement of Biological Molecule by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Aqueous Solutions”, *Nanotechnol.*, **26**, 285103 (2015).
DOI: 10.1088/0957-4484/26/28/285103
- ⑤Y. Araki, K. Tsukamoto, R. Takagi, T. Miyashita, N. Oyabu, K. Kobayashi, and H. Yamada: “Direct Observation of the Influence of Additives on Calcite Hydration by Frequency

Modulation Atomic Force Microscopy”, *Crystal growth & design*, **14**, 12, 6254–6260 (2014).

DOI: 10.1021/cg500891j

⑥K. Suzuki, K. Kobayashi, N. Oyabu, K. Matsushige, and H. Yamada: “Molecular-Scale Investigations of Structures and Surface Charge Distribution of Surfactant Aggregates by Three-Dimensional Force Mapping”, *The Journal of Chemical Physics*, **140**, 054704 (2014).

DOI: 10.1063/1.4863346

⑦S. Ido, H. Kimiya, K. Kobayashi, H. Kominami, K. Matsushige, and H. Yamada: “Immunoactive Two-Dimensional Self-assembly of Monoclonal Antibodies in Aqueous Solution Revealed by Atomic Force Microscopy”, *Nat. Mater.*, **13**, 264–270 (2014).

DOI: 10.1038/nmat3847

⑧K. Kobayashi, N. Oyabu, K. Kimura, S. Ido, K. Suzuki, T. Imai, K. Tagami, M. Tsukada, and H. Yamada: “Visualization of hydration layers on muscovite mica in aqueous solution by frequency-modulation atomic force microscopy”, *The Journal of Chemical Physics*, **138**, 184704 (2013).

DOI: 10.1063/1.4803742

⑨A. Labuda, K. Kobayashi, K. Suzuki, H. Yamada, and P. Grütter: “Monotonic Damping in Nanoscopic Hydration Experiments”, *Phys. Rev. Lett.*, **110**, 066102 (2013).

DOI: 10.1103/PhysRevLett.110.066102

⑩S. Ido, K. Kimura, N. Oyabu, K. Kobayashi, M. Tsukada, K. Matsushige, and H. Yamada: “Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization of Native DNA in Aqueous Solution”, *ACS Nano*, **7**, 1817–1822 (2013).

DOI: 10.1021/nn400071n

[学会発表] (計 6 件)

①H. Kominami, K. Kobayashi and H. Yamada: “High-resolution imaging of different DNA conformations by FM-AFM”, 24th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (2016.12.14–16, Honolulu, USA)

②H. Yamada: “Molecular-scale Investigations of Solid-Liquid Interfaces by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, The 16th European Microscopy Congress, (2016.8.28–9.2, France) (**Invited**)

③M. Miyamoto, H. Kominami, K. Kobayashi, H. Yamada: “Molecular-scale imaging of two-dimensional streptavidin crystals in solution by FM-AFM”, The 19th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2016) (2016.7.25–28, Nottingham, UK)

④H. Yamada: “Molecular-Scale Investigations of Solid-Liquid Interfaces by Frequency

Modulation Atomic Force Microscopy”, 10th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices’ 15 (2015.10.25- 30, Matsue) **(Invited)**

⑤ K. Kimura, K. Kobayashi, A. Yao, H. Yamada: “Subsurface Visualization of Soft Matrix using 3D-Spectroscopic Atomic Force Acoustic Microscopy”, AVS 62nd International Symposium & Exhibition (2015.10.18-23, San Jose, USA)

⑥ K. Kobayashi, A. Noda, T. Yamashita, and H. Yamada: “Intramolecular structure imaging and orientation manipulation of endohedral metallofullerenes using room-temperature FM-AFM”, The 18th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (2015.9.7-11, Cassis, France)

[図書] (計 2 件)

① H. Yamada, K. Kobayashi: “Atomic Force Microscopy in Nanobiology”, ed. K. Takeyasu, *Pan Stanford Publishing*, Chapter 6, “High-Resolution Imaging of Biological Molecules by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, pp. 85-110 (2014.5).

② K. Kobayashi, H. Yamada: “Noncontact Atomic Force Microscopy Vol. 3”, eds. S. Morita, F. J. Giessibl, E. Meyer, R. Wiesendanger, *Springer*, Chapter 19, “Recent Progress in Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquids”, pp. 411-433 (2015.6).

[その他]

ホームページ等

<http://piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp/d/jp/research/bio-nanoprobe>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 啓文 (YAMADA, Hirofumi)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号： 4 0 2 8 3 6 2 6

(2) 研究分担者

小林 圭 (KOBAYASHI, Kei)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号： 4 0 3 3 5 2 1 1

平田 芳樹 (HIRATA, Yoshiki)
産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員
研究者番号： 1 0 3 5 7 8 5 8

(3) 連携研究者

日詰 光治 (HIZUME, Kohji)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号： 1 0 3 7 8 8 4 6