

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成27年度採択分
令和2年3月31日現在

高分解能原子間力顕微鏡・分光法による生体分子間認識・
相互作用力の直接可視化

Direct visualization of molecular recognition forces by
high-resolution atomic force microscopy and spectroscopy

課題番号：17H06122

山田 啓文 (YAMADA, HIROFUMI)

京都大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

本研究は、生体分子の細胞生理機能における微視的役割を解明することを目的として、周波数変調原子間力顕微鏡法（FM-AFM）を動作基盤とする高度3次元フォースマップ技術を用いた新たな分子機能イメージング法を確立する。

研究分野：ナノ・マイクロ科学、ナノバイオサイエンス

キーワード：単一分子フォース分光法、原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

周波数変調原子間力顕微鏡(FM-AFM)をベースとする3次元フォースマップ法は、水和構造や電荷分布を直接可視化する強力な手法であるが、その主な計測範囲は試料表面近傍の非接触領域となる。一方、分子間相互作用力検出のためには、相互作用が強くはたらく領域（特異結合領域）での測定が必要となるが、その有効作用時間は極めて短く、検出確率が著しく低くなることから、測定法の本質的な改善が求められていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、3次元フォースマップ技術をさらに高度化し、AFM探針の精密運動制御法を新たに開発することで、複雑な立体構造をもつ生体分子に対しても安定なフォースマップ測定を実現する。これにより、生体分子周囲の水和構造力・電荷密度の可視化、さらには単一分子レベルでの生体分子間認識・相互作用計測を可能とし、固液界面物性という物理的視点に立脚した、新たな分子機能イメージング法を確立し、細胞生理機能における微視的役割を解明する。

3. 研究の方法

以下の4つの研究テーマ、すなわち (1) 3次元フォースマップ法の高度化、(2) 生体分子間認識・相互作用の可視化、(3) 生体分子周囲の水和構造可視化、(4) 生体分子上の局所電荷密度計測・分子周囲のイオン分布可視化、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. これまでの成果

(1) 3次元フォースマップ法の高度化

生体分子周囲の水和構造と局所電荷密度の高分解能同時観察の可能性を検証するため、まず、FM-AFMベースの高度フォースマップ法によって水和構造力と電気二重層力の分離検出実験を行った。この検証実験には、表面構造と電荷分布が既知のテスト試料（正／負電荷交互積層構造をもつケイ酸塩結晶）が用いられた。各々の表面で、異なる水和構造と、異なる極性の電荷密度が測定でき、原子レベルでの分離検出が可能であることを示すことに成功した。この研究成果は *Nature Communications* 誌（代表論文5）に掲載された。一方、リガンド-受容体分子間の相互作用マッピング計測法を確立するため、biotin修飾したAFM探針と streptavidin (SA) 試料間の特異結合力のマッピングにおける計測パラメータの最適化を行った。新たな帰還制御フォースマップ法を用いて、計測することにより、SA4量体内の単量体ドメインを分解する解像度を維持した状態で結合力を計測することに成功した。

(2) 生体分子間認識・相互作用の可視化

マウスのIgG抗体分子は自己組織的に6量体を形成し、さらにその6量体が2次元結晶を形成することが知られていたが、このIgG分子の自己組織性は、サブクラスや種が変わっても広く発現することをAFM観察によって見いだした。この研究成果は *RSC Advances* 誌（代表論文4）に掲載された。

DNA複製の初期過程で形成されるMCM複合体と2重鎖DNAは、DNA鎖がMCMの中心を貫通するように結合していると考え

られていたが、その詳細は不明であった。本研究において、DNA-MCM 複合体の AFM 観察によって、その結合状態の直接可視化によって、DNA 鎖は MCM 複合体を貫通せず、側面から抜ける様子が捉えられた。この結合様式は、これまでのモデルとは異なっており、従来とは異なるメカニズムで複合体が形成されることが示唆された。

(3) 生体分子周囲の水和構造可視化

生体分子周囲の水和構造可視化に向けて、さまざまな官能基をもつアルカンチオール分子の自己組織化単分子膜 (SAM) を作製し、水和構造計測を行った。ヒドロキシ基をもつアルカンチオール分子の SAM について、分子配向の超構造の有無により水和構造の周期が異なることを明らかにした。この研究成果は *Langmuir* 誌 (代表論文 3) に掲載された。

DNA 周囲の水分子は、DNA-タンパク質複合体を形成する際の会合形成などに重要な役割を果たす。水和構造計測はこれまで 3次元フォースマップ法の中でも垂直走査モード (各点で探針を垂直走査) を用いて行われてきたが、このモードでは試料面内の分解能が低下する。そこでこのモードと水平走査モード (高さ一定モード) を組み合わせることで分解能の低下を避け、水分子密度分布解析を実現した。実際、プラスミド DNA の水和構造計測を 2つのモードを用いた 3次元フォースマップ法によって行い、DNA のバックボーンを構成するリン酸基上で水分子が構造化されていることを明らかにした。

(4) 生体分子上の局所電荷密度計測・分子周囲のイオン分布可視化

DNA は特定の条件下では、通常の右巻き (B-DNA) とは異なり、左巻きの 2重らせん構造 (Z-DNA) になる。この Z-DNA は、「転写」と呼ばれる、タンパク質合成時の RNA 生成過程に関与する。本研究では、Z-DNA および B-DNA の高分解能観察を行うとともに、フォースマップ法によって、2つの DNA の帯電状態の差異を明らかにすることに成功した。この結果は、タンパク質と DNA の結合メカニズム解明に大きく寄与することが期待される。この研究成果は *Scientific Reports* 誌 (代表論文 1) に掲載された。

生体分子揺らぎの 3次元可視化に向けて、空間揺らぎが FM-AFM における散逸エネルギーとして反映されることから、散逸計測マッピングに期待が寄せられている。固体液体界面における散逸計測マッピングによって、水和殻内の水分子の粘性の分布を分子レベルで可視化することに成功した。この研究成果は *Phys. Rev. Lett.* 誌 (代表論文 5) に掲載された。

5. 今後の計画

タンパク質分子内のドメイン間のナノ力学応答の違いを測定し、生体機能との関連を明らかにする。特に、タンパク質内のヘリックス、シート、ループ構造などの二次構造の違いと、局所弾性および局所弾性エネルギー損失との関連について解析する。また、生体分子周囲の水和殻がタンパク質構造の柔軟性に影響することが示唆されており、分子周囲水和構造と生体分子弾性との関連性という観点でも研究を進める。

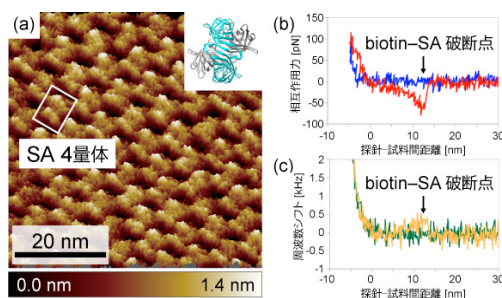


図 1 : (a) biotin 修飾探針を用いて得られた streptavidin (SA) 2次元結晶の FM-AFM 像。インセットは SA4 量体のモデル。(b) フォースカーブ、および (c) 共振周波数シフトカーブ (FM-AFM) は同時に取得された SA-biotin の結合力を示す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. H. Kominami, K. Kobayashi and H. Yamada: “Molecular-scale visualization and surface charge density measurement of Z-DNA in aqueous solution”, *Scientific Reports*, **9**, 6851 (2019.5.2)
2. K. Umeda, K. Kobayashi, T. Minato, and H. Yamada: “Atomic-Level Viscosity Distribution in the Hydration Layer”, *Physical Review Letters*, **122**, 116001 (2019.3.21)
3. A. Fujita, K. Kobayashi and H. Yamada: “Investigation of Local Hydration Structures of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers with Different Molecular Structures by FM-AFM”, *Langmuir*, **34** (50), 15189-15194 (2018.11.15)
4. H. Kominami, K. Kobayashi, S. Ido, H. Kimiya and H. Yamada: “Immunoactivity of self-assembled antibodies investigated by atomic force microscopy”, *RSC Advances*, **8**, 29378-29384 (2018.8.20)
5. K. Umeda, L. Zivanovic, K. Kobayashi, J. Ritala, H. Kominami, P. Spijker, A. S. Foster and H. Yamada: “Atomic-resolution three-dimensional hydration structures on a heterogeneously charged surface”, *Nature Communications*, **8**, 2111 (2017.12.13)

(受賞)

第 37 回表面科学学術講演会 講演奨励賞
梅田健一「液中動作 3D-FM-AFM および MD 計算を用いたイオン液体水溶液の溶媒和構造の解明」(2018.12)

ホームページ等

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