

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18883

研究課題名（和文）熱ゆらぎ高速AFMによる構造物性可視化技術の開発

研究課題名（英文）Development of Visualization Method to Observe Structural Properties by Thermal Fluctuation High-Speed AFM

研究代表者

山本 大輔（Daisuke, Yamamoto）

福岡大学・理学部・教授

研究者番号：80377902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：原子間力顕微鏡カンチレバーの熱揺らぎに含まれる物理量を利用してナノ構造物性を可視化する技術の開発を行った。カンチレバーの熱揺らぎの大きさ、速度揺らぎ、たわみ量からエントロピーカーブを生成し、構造物性評価を試みた。しかしながら、現状では重要な熱力学量であるエントロピーを完全に再構成することができなかった。一方、カンチレバーの速度揺らぎを用いたイメージングでは高いコントラストで画像を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原子間力顕微鏡はナノメートルスケールの大きさをもつ試料を水溶液中で観察が可能な装置であり、タンパク質などの生体分子の観察に広く用いられている。測定にはカンチレバーと呼ばれる微小な板バネが用いられる。観察時に生じるカンチレバーの熱的な挙動の変化を捉え、画像化することに成功した。これにより、これまで検出することができなかった構造物性の可視化につながり、原子間力顕微鏡を用いた研究手法の発展に寄与することができる。

研究成果の概要（英文）：An atomic force microscopy imaging method was developed to observe nano-structural properties using the thermal fluctuation of cantilevers. Entropy curves were reconstructed from the magnitude of thermal fluctuation, velocity of fluctuation, and deflection of the cantilever. However, complete reconstruction of entropy could not be achieved. On the other hand, high-contrast fluctuation velocity images of samples were successfully obtained.

研究分野：生物物理学

キーワード：走査プローブ顕微鏡 原子間力顕微鏡 カンチレバー 構造物性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原子間力顕微鏡 (AFM) は、カンチレバーと呼ばれる微小な板バネの先端に取り付けた探針と試料との間に生じる相互作用を検出することで試料表面構造を画像化する装置である。水溶液中で試料を観察することが可能であり、タンパク質など生体分子の観察に広く用いられている。従来、AFM 測定においては、カンチレバーのたわみ、振動振幅、位相などの力学的な物理量が検出量として用いられてきた。一方、近年ではカンチレバーの熱的なたわみ揺らぎを用いたイメージング手法 (熱揺らぎ一定モード AFM) の開発が行われおり、従来の力学的応答の検出をベースとした AFM 測定法よりも探針試料間にはたらく力を大幅に低減させることが可能になってきた。熱揺らぎは熱統計力学的な物理量であり、このようなパラメーターを用いた AFM イメージング研究は緒についたばかりである。そのため、熱揺らぎ AFM には機能拡張の余地が大きい。熱揺らぎ一定モード AFM が試料の非常に柔軟なナノ構造を観察できる能力にさらに熱力学的な物理量の検出能力を加えることができれば、タンパク質が機能する際に生じる構造変化と同時に局所構造に内在する構造物性の変化をナノメートルオーダーの空間分解能で解析することが可能になると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、カンチレバーの熱力学パラメーターを利用してナノ構造物性を可視化する新規な高速 AFM 測定法を開発することが目的である。そのために、測定可能なカンチレバーの物理量から熱力学的な物理量、すなわち内部エネルギー、自由エネルギー、エントロピーを再構築し、熱力学パラメーターを利用したイメージング手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) カンチレバーの熱力学パラメーター検出法の開発

熱力学において重要なパラメーターである内部エネルギー E 、自由エネルギー F 、エントロピー S の間には $F = E - TS$ の関係がある。ここで T は絶対温度である。測定によって直接得ることのできる物理量はカンチレバーのたわみ、熱的なたわみ揺らぎの大きさ、揺らぎの速度である。 E はたわみと速度揺らぎから構築し、 F は試料の移動量とカンチレバーのたわみから構築する。得られた E と F から S のカーブを生成する。カンチレバーのたわみ揺らぎの大きさと速度揺らぎを検出する装置を高速 AFM 装置に組み込む。たわみ揺らぎの大きさ検出器はすでに構築済みであり、速度揺らぎ検出器を作製し性能を評価する。これらの検出器を用いてカンチレバーの熱力学パラメーターを再構築する。

(2) 試料の観察による有効性の検証

観察試料には脂質膜や紫膜を用い、基板にはへき開した雲母を用いる。速度揺らぎ検出器を組み込んだ AFM を用いて熱揺らぎ一定モードで測定し、同時に速度揺らぎ像のイメージングを行う。熱力学パラメーターの構築には試料を探針に近づける際に生じるカンチレバーの静的なたわみと動的な熱揺らぎのカーブを用いる。

4. 研究成果

(1) 速度揺らぎイメージング

研究開始当初に試作した速度揺らぎ検出器を用いたイメージングを行った結果、ノイズが多く定常的に速度揺らぎ像を得ることが困難であった。速度揺らぎ検出器内の各電気経路における信号を詳細に評価した。その結果、電気ノイズに由来する成分が半分以上占めていることが分かった。ノイズを増幅している経路に適切なフィルター回路を設計することで、出力信号に含まれるノイズを大幅に低減させ、カンチレバー速度揺らぎの検出感度を向上させることができ、安定的に速度揺らぎ像が得られるようになった。

性能向上した速度揺らぎ検出器によるイメージング性能を評価するため、雲母基板上に平面化させた DPPC/DOPC 混合脂質膜のイメージングを行った。DPPC と DOPC は室温において同一膜内で相分離し、硬い DPPC の領域と柔らかい DOPC の領域を同時に観察することができる。熱揺らぎ一定モードで表面構造像を得ると同時に速度揺らぎのイメージングを行うと、各領域で速度揺らぎ像に明瞭なコントラストが得られた。生体試料である紫膜でも同様に領域の違いによってコントラストを得ることができた。マイカ基板上に吸着した高分子試料でもマイカ基板と試料との間に明瞭なコントラストが観察された。このことから、熱揺らぎ一定モード AFM における速度揺らぎイメージングは様々な観察系を対象とした物性測定に用いることができると考えられる。

(2) 熱揺らぎ減衰曲線測定

カンチレバーの速度揺らぎ像にコントラストが生じる要因を解析した。探針試料間距離に依存した熱たわみ揺らぎの大きさと速度揺らぎの減衰カーブをそれぞれ得るため、測定プログラムと解析プログラムを構築した。カンチレバーQ値の探針試料間距離依存性を評価するため、測定カーブを細かいセグメントに分け、セグメントデータごとに高速フーリエ変換ならびに相関関数を用いて周波数特性の解析を行った。いずれの方法でもQ値の探針試料間距離依存性を評価することができた。共振周波数とQ値が既知のローパスフィルタを用いた予備的な評価をもとに、高速フーリエ変換による方法を採用した。

探針試料間距離が1ナノメートル程度の近傍では、Q値の減少幅が大きかった。表面近傍で水の粘性が高くなるためと考えられる。Q値の減少はカンチレバー熱たわみ揺らぎと速度揺らぎの周波数特性を変化させるため、試料によるQ値減少特性の違いが速度揺らぎ像のコントラスト生成の一因と推察される。一方で、熱たわみ揺らぎの大きさ自体が試料表面近傍で大きくなる現象がしばしば観察された。たわみ揺らぎの大きさの変化は速度揺らぎ像のコントラストに影響を与える。たわみ揺らぎが大きくなる領域のセグメントデータを詳細に解析した。その領域ではカンチレバーのたわみがふたつ以上の正規分布で表される分布をしていた。各正規分布の中心位置は表面近傍に形成される水和層の厚みに近く、このことから水和層がカンチレバーの熱揺らぎ挙動に影響していることがわかった。以上のことから、観察対象である試料の物性自体に加えて、表面近傍での粘性の変化と水和構造が速度揺らぎ像のコントラストに寄与すると推察される。いずれが主にコントラスト生成の大きな要因となっているか今後明らかにする予定である。

(3) カンチレバー熱力学パラメータの再構築

カンチレバーの内部エネルギー E 、自由エネルギー F 、エントロピー S の探針試料間距離に依存したカーブを得るために、カンチレバーのたわみ信号と速度揺らぎの曲線を同時に測定した。データを細かいセグメントに分けて解析した。各セグメントの解析に十分なサンプリング数を確保するため、一度の測定で膨大なサンプリング数が必要であった。熱たわみ揺らぎの大きさはたわみ信号から算出した。熱たわみ揺らぎ検出器を用いてたわみ揺らぎ信号を得ることも可能である。しかしながら、熱たわみ揺らぎ検出器は内部にハイパスフィルターを含みカンチレバーたわみ揺らぎ信号の低周波成分を除去する。全周波数領域を含むたわみ揺らぎを解析するために本研究では熱たわみ信号から揺らぎの大きさを解析した。

カンチレバーのばね定数と各セグメントのたわみ信号からカンチレバーの弾性エネルギーの時間平均を求めた。運動エネルギーの時間平均は速度揺らぎ検出器の出力信号から得た。それらの和を E とした。 F はカンチレバーのたわみから算出される探針試料間相互作用力を試料位置で積分して得た。これらふたつのパラメータから S カーブを構築した。熱揺らぎ曲線を得る過程を等温過程とすると、 S の変化はカンチレバーに出入りする熱量を反映する。熱揺らぎが減少するためカンチレバーの熱エネルギーの一部が周囲の水に移動し S は減少関数になると考えられた。しかしながら予想に反して、測定によって得られた S カーブは試料表面付近で極大を示した。実験データと比較するために S カーブの理論式を構築した。予想通り、理論カーブは極大を示さない減少曲線であった。実験で得られた S カーブが極大を示す原因を詳細に検討した。その結果、探針試料間の遠隔相互作用による位置エネルギーが影響していることが分かった。相互作用は探針先端の状態に依存し、制御困難である。したがって、高い再現性で S カーブを得ることは研究期間内では困難であった。

(4) 水和構造による熱揺らぎ挙動の評価

探針試料間距離に依存した熱揺らぎカーブ測定では、試料表面近傍で熱たわみ揺らぎが大きくなる現象がしばしば測定された。ときにはたわみ揺らぎの大きさが表面水和構造を反映して明確な振動を示した。同時に得られる速度揺らぎカーブも振動を示したが、その曲線は熱たわみ揺らぎとは挙動が異なっていた。水和構造による速度揺らぎの変化は水和層間を移動する頻度あるいは水和層の安定性にも依存すると考えられる。さらなる検証が必要であるが、ここで得られた結果は、タンパク質表面に存在する水和構造の解析にカンチレバー熱揺らぎを利用できる可能性があることを示している。

(5) 熱揺らぎ減衰曲線への溶液環境の評価

本研究による解析で、試料表面近傍で生じるカンチレバー熱揺らぎの変化には複数の要因があることが推察された。表面近傍はバルクと異なる性質を持つ。本研究で得られた結果を総合すると、熱揺らぎAFMにより固液界面の物性解析が可能であると言える。熱揺らぎの探針試料依存性がバルク水溶液の性質に影響を受けるか検証した。粘性に注目し、粘性の大きく異なる水溶液

中で熱たわみ揺らぎ減衰カーブを測定した。熱たわみ揺らぎの減衰挙動は、水溶液の粘性に大きく影響を受けないことが分かった。減衰特性は熱たわみカーブの理論式から得られる結果と良い一致を示した。水溶液の粘性が大きくなるとカンチレバー熱揺らぎのスペクトル密度が低周波数側へシフトする。試料表面の極近傍ではカンチレバーのQ値の減少幅が大きいため、この効果は熱揺らぎ検出に関係する。影響の程度を評価するため、スペクトル密度解析を行った、その結果、実験で用いた粘性の程度、すなわち実用的な程度であれば測定自体に大きな影響を与えないことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Iwamoto Masayuki, Morito Masayuki, Oiki Shigetoshi, Nishitani Yudai, Yamamoto Daisuke, Matsumori Nobuaki | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Cardiolipin binding enhances KcsA channel gating via both its specific and dianion-monoanion interchangeable sites | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 108471 ~ 108471 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108471 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Daisuke | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 AFM Imaging of Biological Macromolecules on Supported Lipid Bilayers | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 MEMBRANE | 6. 最初と最後の頁 10 ~ 14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.47.10 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本大輔、西谷雄大 |
| 2. 発表標題 チラコイド膜における動的な高次分子構造の高速AFMによる可視化 |
| 3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西谷雄大、山本大輔 |
| 2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いた植物光合成膜におけるタンパク質複合体の動態観察 |
| 3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本大輔 |
| 2. 発表標題 チラコイド膜内ダイナミクスの高速原子間力顕微鏡による分子レベル撮像 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第87回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西谷雄大、山本大輔 |
| 2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いたホウレンソウチラコイド膜内タンパク質複合体の動態観察 |
| 3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Daisuke Yamamoto |
| 2. 発表標題 Observation of photosynthetic proteins in thylakoid membrane by high-speed atomic force microscopy |
| 3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本大輔 |
| 2. 発表標題 チラコイド膜中に存在する光化学系II超複合体の高速AFMによる可視化 |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 山本大輔 |
| 2. 発表標題 熱揺らぎ一定モード原子間力顕微鏡の開発 |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井手美里、山本大輔 |
| 2. 発表標題 高速AFMによるグラナ膜に内在するPSII側方運動の可視化 |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本大輔 |
| 2. 発表標題 チラコイド膜内光合成タンパク質の高速AFMによる構造ダイナミクス解析 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|