

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14602

研究課題名（和文）生体分子表面・界面の電位分布をナノスケール計測する液中AFMの開拓

研究課題名（英文）Advancing In-liquid AFM for Nanoscale Measurement of Potential Distribution at Biomolecular Surfaces and Interfaces

研究代表者

平田 海斗（Hirata, Kaito）

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：50909984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、液中で局所的な表面電位を計測できるオープンループ電位顕微鏡（OL-EPM）を初めて生体分子計測へと応用するための技術確立を行った。具体的には、電位計測に必要な基板およびOL-EPMの検出器であるカンチレバーの開発である。これらを用いて、正負の電荷を頭部に有する脂質分子による二重層膜へと応用した。結果として頭部の電荷を反映した電位分布が得られ本技術は生体分子計測へと応用できる可能性を示すことに成功した。今後、本研究で開発した基盤技術をベースとして様々な生体分子計測へと展開することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年では生命現象への原子間力顕微鏡（AFM）の進展が目覚ましい。しかし、表面電荷・電位を局所計測できる技術は確立されておらず、生体分子機能において液中イオンや生体分子の表面電荷が関係する現象の理解が進んでいない。本研究で確立してきた基盤技術により生体分子の「電荷・電位」計測を可能にすることで、従来技術では困難であったイオンチャネルによるイオン輸送や膜分解ペプチドの静電的相互作用による脂質分子の吸着・脱離など、生体分子/溶液界面の電位分布が関係するとされる生体分子機能のナノレベルでの機序解明に貢献する。それらは、創薬・医学の学術的な理解に必要であり、生命科学分野の発展に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a method to apply open-loop electric potential microscopy (OL-EPM), which is able to measure local surface potential in liquid, to biomolecular measurements for the first time. Specifically, we developed the conductive substrate for the potential measurement and the cantilever, which serves as the detector for OL-EPM. These components were applied to a supported lipid bilayer with positively and negatively charged heads. The results showed a potential distribution reflecting the head charges, indicating that this technique has the ability to measure the potential distribution of biomolecules. In the future, the foundational technology developed in this study can serve as a basis for the potential measurement of various biomolecules.

研究分野：ナノ計測工学

キーワード：原子間力顕微鏡 液中電位計測 生体分子 脂質二重層膜

1. 研究開始当初の背景

近年では生命現象への原子間力顕微鏡 (AFM) の進展が目覚ましい。高速 AFM や 3D-AFM などの生体分子計測技術が発展し、構造理解による生体分子機能解明に貢献している。しかし、表面電荷・電位を局所計測できる技術は確立されておらず、生体分子機能において液中イオンや生体分子の表面電荷が関係する現象の根本的な理解が進んでいない。

このような課題を解決すべく、我々は、AFM ベースの液中電位計測技術 (OL-EPM) を開発し (図 1)、これまでは腐食や触媒へと応用してきた。本技術は様々な分野のナノスケール研究に貢献すると期待できる。

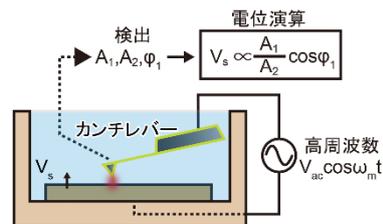


図 1 : OL-EPM の装置構成

2. 研究の目的

生体分子計測へと OL-EPM を応用するための基盤技術の確立 (探針や測定基板の開発) と DOEPC や DOPG、DPPC などの支持脂質二重奏膜 (SLB) を測定することで本技術が脂質分子へと応用計測できる可能性を示す。また、このときの電位可視化メカニズムなどを調べる。

3. 研究の方法

- ①導電性基板上に SLB を形成させる手法を確立
- ②超小型カンチレバーの検討と電子線堆積法を用いた Au 探針作製法を開発
- ③開発した基板、探針を用いて OL-EPM により SLB の電位計測

4. 研究成果

①導電性基板上に SLB を形成させる手法を確立

AFM 計測では、雲母の様な親水性を持つ基板上に SLB を展開することが多いが、OL-EPM では、探針-試料間に電圧印加する必要があるため、導電性基板が要求される。しかし、導電性基板上に形成された SLB の AFM イメージングの例は少なく、最適化されていない。

この問題点を解決する為に、基板の選定とその表面修飾を検討することで SLB を導電性基板上に、容易に展開できる条件を模索した。SLB はその種類で異なるが、厚みは基本的に 4~6 nm 程度であり、平面に展開するには、基板もそれ相応の平坦さが要求される。そこで、雲母表面に Au(111) 薄膜を蒸着し、その表面にアルカンチオール自己組織化膜 (SAM) を修飾することで、金膜表面に機能性を持たせ、極めて平らな表面を有する電極の作成を試みた。

Au(111) 基板は直径 12 mm の雲母表面に真空蒸着法でエピタキシャル成長させ、アルカンチール SAM の成膜方法として液相法を用いた。SLB は、ベシクルフュージョン法によりアルカンチオール SAM/Au 基板上に形成された。

まず、親水基を有する OH 末端アルカンチオール分子による SAM を形成し、DOEPC の SLB 形成を試みた。ベシクル状態で吸着しているだけであり、SLB が形成されていないことが分かる (図 2a)。次に、基板表面と脂質の相互作用を強めるため、末端が負電荷を持つ 10-Carboxy-1-heptanethiol (COOH 末端 SAM) とヘッドグループが正電荷に帯電している DOEPC の組み合わせを用いた。COOH 末端 SAM 上に DOEPC の SLB が形成されている。Au のテラス上では、mica と比較して遜色の無い、極めて平らに膜が展開できていることが確認できる (図 2b)。

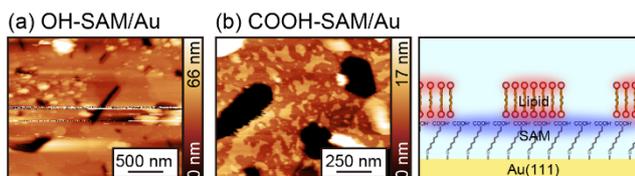


図 2 : (a) OH 末端 SAM 上と COOH 末端 SAM 上でそれぞれ DOEPC を展開した結果

②FIB を用いた Au 探針の開発

これまで、ばね定数・共振周波数が高い小型カンチレバー (AC55) を使用して液中 OL-EPM 計測を行ってきた。しかし AC55 は、高ばね定数 (60 N/m 程度)、低振幅な為に、柔らかい対象物を計測する際にその構造を破壊してしまうことがある。この問題の解決策として、柔らかいカンチレバーを使用することが挙げられる。一方で、OL-EPM 計測の原理上、共振周波数が高くてはならない (典型的には 1MHz 以上)。共振周波数とばね定数はトレードオフな関係にあり、その様なカンチレバーは限られてくる。この課題解決に向けて本研究では、AC55 以外のカンチレバーの検討を行った。USC-f2-k3 は、超小型化によって AC55 と同等程度の共振周波数を有し

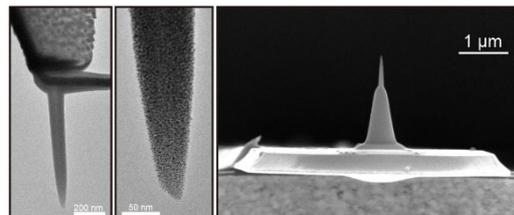


図 3 : (a, b) Au 探針の TEM 像。(c) USC-f2-k3 に作製した Au 探針の SEM 像。

ていながら、ばね定数は AC55 の 30 分の 1 程度である (2 N/m)。本カンチレバーを用いれば上記問題を改善できる可能性がある。しかし、極めて柔らかく、レバーが薄い為、従来のスパッタリングにより、Au 薄膜を生成するとカンチレバー全体に成膜されてしまい、その重さに耐えきれなくなったレバーが曲がってしまうという問題が生じた。カンチレバーの変位検出に光てこ法を採用している AFM ではこれによってフォトディテクタの検出範囲を超えてしまいカンチレバーの変位を検出できない。この問題を解決するために、スパッタリングではなく、FIB を用いて探針先端を切削し、電子線堆積法により残っている探針のみに対して局所的に Au 膜を成膜、さらにその上から Au 探針を形成させた。レバーと母材は購入時点で Au 薄膜 30 nm が成膜されており、これにより導通を取ることができる。また、Au 探針にすることで従来よりも非常に先端径の小さい Au 探針を開発することに成功した (図 3)。

③開発した基板、探針を用いて OL-EPM により SLB の電位計測

図 4 に異なる電荷を頭部に有する SLB 膜を OL-EPM 計測した結果を示す。正電荷を頭部に有する EDOPC の SLB は、上述した方法で得られた。一方で、負電荷を頭部に有する DOPG の SLB は、ベシクル溶液を基板に滴下して、1 M の $MgCl_2$ 溶液を 3 μL 追加で滴下することで得られた。COOH 末端 SAM 膜を 2 価のイオンを用いて修飾することで負電荷脂質分子でも同様に SLB 膜を形成できることを確認した。

次に、OL-EPM で取得した結果を見ると、DOEPC の場合、SLB 膜が形成されている部分が周囲の SAM 膜よりも電位が高くなっている。また、電位分布は、Au 基板の溝を除いて、凹凸に左右されず得られた電位分布が形状効果による影響でないことを示す。一方で DOPG の場合、DOEPC の電位分布とは反対に、SLB 周囲の Mg^{2+}/SAM よりも電位が低い。また、DOEPC の場合と比較して周囲の電位差が非常に小さい。これは Mg^{2+} イオンが SAM 膜だけでなく、脂質分子上にも吸着して脂質分子の電荷を補償した可能性が考えられる。このように、2 種類の異なる SLB 膜を導電性基板上に再構成して OL-EPM 計測を行うことでそれぞれの頭部電荷を反映した分布を得ることに成功した。また、数 nm 程度の薄膜であれば絶縁層でも電位計測が可能であることを実験的に実証した。本報告書には記載していないが、COMSOL を用いた有限要素法シミュレーションも行っており、簡易的な液中での実験系を構築し、探針 - 試料間に交流バイアスを印可した時の挙動について調査した。薄さ数 nm 程度の分子膜であれば、探針が検出できる程度の強度で電界が生じていることも分かっている。

COOH 末端 SAM と DOEPC それぞれの上で電位距離依存性を取得したものを図 5 に示す。長距離力による影響を補正することでバルク溶液に対する界面の電位状態を得ることができる。DOEPC と SAM それぞれで正と負の値を示している (図 5d)。OL-EPM で得られる電位は、界面近傍で概ね分子の表面電荷に由来するものであることがわかった。また、ゼータ電位による結果 (図 5c) は、DOEPC 10 mV 程度、COOH-SAM -40 mV 程度と OL-EPM で得られている電位値 (長距離力補正後) と概ねそのオーダーが一致していることが分かる。一方で電位の探針距離依存性を見ると 10 nm 以上では、わずかに電位が減少傾向にある。水分子の配向や COOH-SAM の配向に由来する双極子モーメントの影響が反映されている可能性が挙げられる。

次に、OL-EPM で取得した結果を見ると、DOEPC の場合、SLB 膜が形成されている部分が周囲の SAM 膜よりも電位が高くなっている。また、電位分布は、Au 基板の溝を除いて、凹凸に左右されず得られた電位分布が形状効果による影響でないことを示す。一方で DOPG の場合、DOEPC の電位分布とは反対に、SLB 周囲の Mg^{2+}/SAM よりも電位が低い。また、DOEPC の場合と比較して周囲の電位差が非常に小さい。これは Mg^{2+} イオンが SAM 膜だけでなく、脂質分子上にも吸着して脂質分子の電荷を補償した可能性が考えられる。このように、2 種類の異なる SLB 膜を導電性基板上に再構成して OL-EPM 計測を行うことでそれぞれの頭部電荷を反映した分布を得ることに成功した。また、数 nm 程度の薄膜であれば絶縁層でも電位計測が可能であることを実験的に実証した。本報告書には記載していないが、COMSOL を用いた有限要素法シミュレーションも行っており、簡易的な液中での実験系を構築し、探針 - 試料間に交流バイアスを印可した時の挙動について調査した。薄さ数 nm 程度の分子膜であれば、探針が検出できる程度の強度で電界が生じていることも分かっている。

COOH 末端 SAM と DOEPC それぞれの上で電位距離依存性を取得したものを図 5 に示す。長距離力による影響を補正することでバルク溶液に対する界面の電位状態を得ることができる。DOEPC と SAM それぞれで正と負の値を示している (図 5d)。OL-EPM で得られる電位は、界面近傍で概ね分子の表面電荷に由来するものであることがわかった。また、ゼータ電位による結果 (図 5c) は、DOEPC 10 mV 程度、COOH-SAM -40 mV 程度と OL-EPM で得られている電位値 (長距離力補正後) と概ねそのオーダーが一致していることが分かる。一方で電位の探針距離依存性を見ると 10 nm 以上では、わずかに電位が減少傾向にある。水分子の配向や COOH-SAM の配向に由来する双極子モーメントの影響が反映されている可能性が挙げられる。

COOH 末端 SAM と DOEPC それぞれの上で電位距離依存性を取得したものを図 5 に示す。長距離力による影響を補正することでバルク溶液に対する界面の電位状態を得ることができる。DOEPC と SAM それぞれで正と負の値を示している (図 5d)。OL-EPM で得られる電位は、界面近傍で概ね分子の表面電荷に由来するものであることがわかった。また、ゼータ電位による結果 (図 5c) は、DOEPC 10 mV 程度、COOH-SAM -40 mV 程度と OL-EPM で得られている電位値 (長距離力補正後) と概ねそのオーダーが一致していることが分かる。一方で電位の探針距離依存性を見ると 10 nm 以上では、わずかに電位が減少傾向にある。水分子の配向や COOH-SAM の配向に由来する双極子モーメントの影響が反映されている可能性が挙げられる。

④その他の応用

開発した基板と Au 探針を用いて、その他の生体分子計測へと応用を行った。具体的には Sphingomyelin(SM)にコレステロールを添加有無で電位がどう変化するかの比較や A5 の電位計測にも成功した。

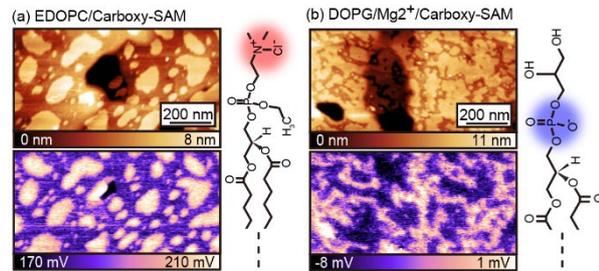


図 4 : (a, b) COOH 末端 SAM 上に展開した DOEPC (正電荷脂質) と DOPG (負電荷脂質) の OL-EPM 計測結果。

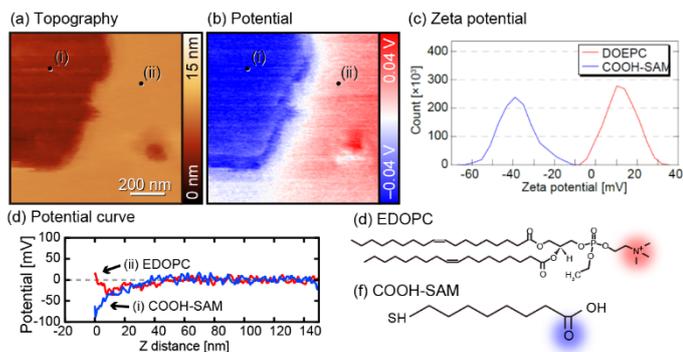


図 5 : DOEPC および COOH 末端 SAM 上で取得した形状および電位像と電位距離依存性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yurtsever Ayhan, Sun Linhao, Hirata Kaito, Fukuma Takeshi, Rath Siddharth, Zareie Hadi, Watanabe Shinji, Sarikaya Mehmet	4. 巻 17
2. 論文標題 Molecular Scale Structure and Kinetics of Layer-by-Layer Peptide Self-Organization at Atomically Flat Solid Surfaces	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 7311 ~ 7325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.2c10673	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 -

1. 著者名 Yamamoto Shinnosuke, Taniguchi Daiki, Okamoto Takahiro, Hirata Kaito, Ozawa Takahiro, Fukuma Takeshi	4. 巻 127
2. 論文標題 Nanoscale Corrosion Mechanism at Grain Boundaries of the Al-Zn-Mg Alloy Investigated by Open-Loop Electric Potential Microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 5281 ~ 5288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.2c08322	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 -

1. 著者名 Hirata Kaito, Okamoto Takahiro, Kitagawa Takuya, Tomitori Masahiko, Ozawa Takahiro, Fukuma Takeshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Size Dependent Corrosion of Al Fe Intermetallic Particles at Al Mg Alloy Surfaces Investigated by In Liquid Nanoscale Potential Measurement Technique	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 2207859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.202207859	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱崎 大暉, 平田 海斗, 角野 歩, 山本 伸之介, 福岡 剛士
2. 発表標題 液中オープンループ電位顕微鏡を用いた正電荷脂質二重層の表面電位計測
3. 学会等名 春季応用物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西沙和、近江純一、谷口大騎、山本伸之介、平田海斗、水島大地、伊藤元雄、福間剛士
2. 発表標題 液中局所電位分布計測技術を用いたTi合金表面におけるナノスケールカソード反応解析
3. 学会等名 応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本伸之介, 水島大地, 平田海斗, 福間剛士
2. 発表標題 液中電位分布計測技術を用いた炭素鋼のナノスケールその場解析
3. 学会等名 第69回材料と環境討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西沙和、近江純一、谷口大騎、山本伸之介、平田海斗、水島大地、伊藤元雄、福間剛士
2. 発表標題 液中局所電位分布計測技術を用いたTi合金表面におけるナノスケールカソード反応解析
3. 学会等名 第69回材料と環境討論会、久留米シティプラザ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S.Yamamoto, D. Taniguchi, K. Hirata, T. Ozawa, T. Fukuma
2. 発表標題 Corrosion Mechanism of Aluminum Alloy at Grain Boundaries Investigated by in-Liquid Nanoscale Potential Measurement Technique
3. 学会等名 AVS 68th INTERNATIONAL SYMPOSIUM & EXHIBITION, (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学福間研究室ホームページ
<http://fukuma.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

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
---------	---------