

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286057

研究課題名(和文)3次元フォースマップ法による生体分子表面の水和構造・電荷分布の可視化と相関の解明

研究課題名(英文) Investigation of hydration structures and surface charges on biomolecules by three-dimensional force mapping

研究代表者

小林 圭 (Kobayahi, Kei)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：40335211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：液中動作周波数検出型AFM(FM-AFM)により試料表面上での各点で周波数シフトカーブを取得することで固液界面空間における相互作用力分布を可視する2次元・3次元フォースマップ法を用い、生体試料表面における電荷密度と水和構造を評価する手法を開発した。50 mM塩化ニッケル水溶液中において、マイカ基板上的のプラスミドDNA上で3次元周波数シフトマップを取得し、水和構造に起因する複雑なコントラストパターンの観察に成功した。また、塩化カリウム水溶液中においてポリリジン膜でコートされたマイカ基板上的のラムダDNA上で3次元周波数シフトマップを取得し、周波数シフトカーブの解析によりDNAの電荷密度を算出した。

研究成果の概要(英文)：We recently developed frequency-modulation atomic force microscopy (FM-AFM) in liquids and made it possible to explore solid-liquid interface properties such as the hydration structures and surface charges with a nanometer-scale resolution. In this project, we employed FM-AFM to study the hydration structures and surface charges of biomolecules such as DNA by using two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) force mapping techniques. We obtained a 3D frequency shift map on a plasmid DNA molecule in a buffer solution with 50 mM nickel chloride. The map showed complicated contrast patterns with a sub-nanometer-scale resolution, which reflect the hydration structures around the DNA molecule. We also obtained a 3D frequency shift map on a lambda DNA molecule adsorbed on a poly-L-lysine (PL) layer on a mica substrate in potassium chloride solutions. By analyzing the frequency shift versus distance curves, we estimated the charge density of the lambda DNA molecule and the PL layer.

研究分野：工学

キーワード：走査プローブ顕微鏡 原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

原子間力顕微鏡 (AFM) は、生体試料を液中においてナノスケール分解能で観察できる唯一のツールである。ダイナミックモード AFM は、試料にダメージを与えにくい利点がある一方、液中ではカンチレバーの機械的 Q 値が 10 以下と極端に低下してしまうため、力検出感度が低下してしまうことが問題となっていた。

われわれは、液中でも安定にカンチレバーを自励共振させることができる制御回路を開発し、また、ショットノイズ限界に近いノイズ性能を有する変位検出系を開発し、周波数検出型ダイナミックモード AFM (FM-AFM) を液中動作させることに成功し、マイカの原子像や紫膜の分子像観察、さらには DNA 分子の二重らせん構造を世界最高分解能で観察することに成功した。また、試料表面 / 溶液界面において、試料表面上での各点においてカンチレバー周波数シフト-距離カーブを取得し、これを繰り返すことで相互作用力分布を 2 次元または 3 次元で可視化できる 2 次元・3 次元フォースマップ法を開発した。

2. 研究の目的

2 次元・3 次元フォースマップ法を用いて、水和力と電気二重層力の 2 次元または 3 次元分布を精密に計測することで、生体試料表面における電荷密度と水和構造を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに原子レベルで平坦な基板、またはそれに吸着した平坦分子膜においては、水和構造計測に成功していたが、数 nm またはそれ以上の凹凸を有する生体分子周辺では、水和構造計測が困難であった。本研究では、フォースマップ法において試料上の各点において取得するフォースカーブにおいて、カンチレバーの周波数シフト、つまり斥力相互作用が一定以上の値となれば近接を停止する方法をとり、生体分子上での安定なフォースマップ計測技術を確立する。

また、生体試料表面において、電気二重層力を精密に測定し、非線形 Maxwell-Boltzmann 方程式に基づくモデル計算との比較により、生体試料表面の電荷密度を算出する。

4. 研究成果

粘着テープでへき開した白雲母基板上へ、プラスミド DNA (pUC18) の試料溶液 (1 ng/μl) を約 10 μl 滴下し、DNA を基板に吸着させるため 15 分程度放置した後、50 mM NiCl₂ を溶解した超純水 (観察溶液) を滴下し、基板を洗浄した。さらに、観察溶液を 100 μl 滴下し、基板表面を乾燥させることなく試料を AFM 装置へと移動し、溶液中で AFM 観察を行った。

図 1 (左) は 3 次元フォースマップ実験を行った pUC18 の液中 FM-AFM 表面形状像である。図 1 中の直線 P-Q を通る垂直断面 (z-x 面) と、これに平行な複数の断面において 2 次元周波数シフトマップを行い、3 次元周波数シフトマップを得た。図 1 (右) は、3 次元周波数シフトマップにおける、各周波数シフトカーブにおいて、周波数シフトが +150 Hz となった時の探針-試料間距離を画像化したもの (等周波数シフト面) であり、赤線が直線 P-Q の位置に相当する。

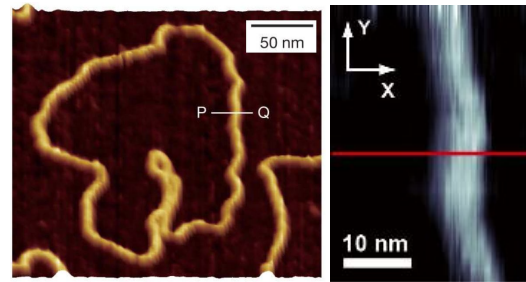


図 1: プラスミド DNA (pUC18) の液中 FM-AFM 表面形状像 (左) および 3 次元周波数シフトマップから再構成した等周波数シフト面 (右)

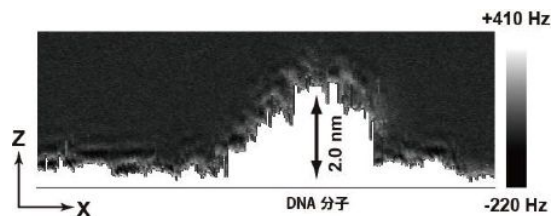


図 2: プラスミド DNA における 2 次元周波数シフトマップ (33.6 nm × 4.5 nm)

図 2 は、図 1 (左) の直線 P-Q を通る垂直断面における 2 次元周波数シフトマップである。縦軸が z 軸 (高さ) 横軸が x 面内に対応している。また、像のコントラストは周波数シフト分布を表しており、明るい方が正方向の周波数シフト (斥力方向) に対応している。図 2 の 2 次元周波数シフトマップの下方、すなわち基板表面近傍の灰色の単調なコントラストの領域は、斥力相互作用が一定以上の値となり、フォースカーブが取得できなかった領域に対応する。すなわち、単調なコントラストの領域とそうでない領域の境界位置を、近似的な表面位置とみなすことができる。したがって、図 2 の 2 次元周波数シフトマップの中央で 2 nm 程度隆起した表面構造が、プラスミド DNA の断面に対応している。プラスミド DNA 表面上で観察される振動的な周波数シフト分布は、DNA 表面の局所水和構造に誘起された水和力を反映している。

次に、液中 FM-AFM による 2 次元・3 次元フォースマップングにより DNA の電荷密度計測を行った。DNA は 2 本のヌクレオチド鎖がそれぞれ相補する塩基が結合し、塩

基対を形成している。ヌクレオチド鎖には 0.34 nm おきにリン酸基があり、水溶液中においてはリン酸基上のプロトン解離により DNA 分子は負に帯電する。一方、探針表面に露出している酸化シリコンの PZC (零電荷電位) は pH = 1.7–3.5 であり、水溶液中において負に帯電するため、DNA 分子上では斥力的な電気二重層力が検出されると考えられる。

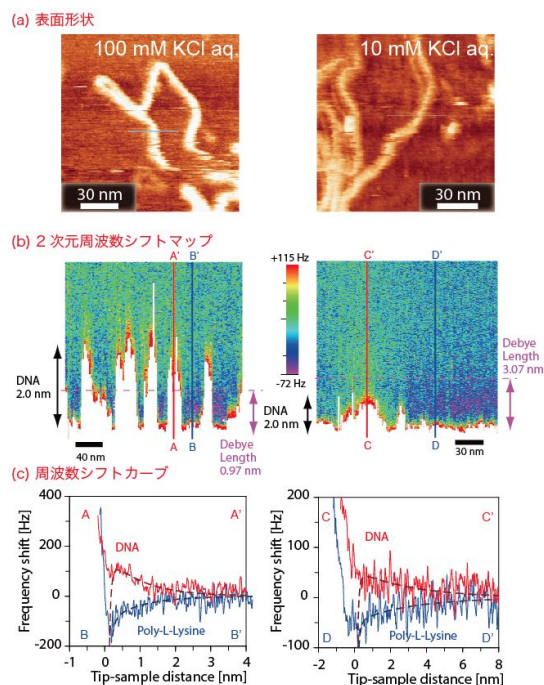


図 3: 100 mM および 10 mM KCl 水溶液中で観察した PL 膜上の lambda DNA 分子の表面形状像 (上)、2 次元周波数シフトマップ (中)、周波数シフトカーブ (下)

本研究では、白雲母基板を poly-L-lysine (PL) でコートすることにより比較的平坦かつ正帯電の基板を得た。PL 水溶液をへき開した白雲母基板上にキャストし、5 分間放置した後、リンス後に乾燥させた基板に、lambda DNA 水溶液 (1 ng/μl) を滴下し、やはり 5 分間放置後に KCl 水溶液中でリンスし、KCl 水溶液を滴下後、乾燥させることなく試料を AFM 装置へと移動し、溶液中で AFM 観察を行った。

図 3 (上) は、100 mM および 10 mM KCl 水溶液中において観察した PL 膜に固定された lambda DNA 分子の表面形状像を示す。カンチレバーの振動振幅値は 0.5 nm p-p とした。図 3 (中) は 100 mM および 10 mM KCl 水溶液中において取得した 2 次元周波数シフトマップ像である。黄緑色に見えている部分が引力相互作用に相当し、紫色に見えている部分が斥力相互作用に相当する。

DNA 分子の上では電気二重層力による斥力相互作用、基板上では静電気力による引力相互作用が観察されていることが分かる。また、100 mM KCl 水溶液中における Debye

長は 0.97 nm であり、DNA 分子の直径 2 nm の半分程度である。そのため、基板からの拡散二重層は DNA 分子上面に形成された拡散二重層と混合していないことが分かる。一方、10 mM KCl 水溶液中では Debye 長は 3.07 nm であり、基板からの拡散二重層が分子の上面よりも上にまで到達していることが分かる。

図 3 (下) に示すように、2 次元周波数シフトマップから周波数シフト-距離カーブを抜き出し、球-平面間にはたらく電気二重層力の式を用いて電荷密度の計算を行った。その結果、10 mM KCl の結果からは、DNA 分子の電荷密度は -0.072 C/m^2 、100 mM KCl の結果からは -0.19 C/m^2 となった。DNA 分子鎖において 0.34 nm おきにリン酸基由来の負電荷があることを考慮すると、DNA 分子上の電荷密度は -0.3 C/m^2

程度と見積もることができる。一方、実際の実験系では DNA 分子は正に帯電した基板表面に静電的に吸着した状態で存在するため、DNA 分子の基板側に位置する電荷は中和されており、これよりは電荷密度が低いと考えられ、100 mM KCl 水溶液中で得られた電荷密度は妥当と言える。一方、10 mM KCl 水溶液中では Debye 長が DNA 分子の直径より大きいいため、PL 上と DNA 上の拡散二重層が混合してしまっており、DNA 単独の電荷密度測定は困難であることが推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

小林 圭、山田 啓文、周波数変調原子間力顕微鏡による抗体分子の高分解能観察、生物物理、査読有、56 巻、2016、<http://www.biophys.jp/pub/pub01.html>

K. 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, Nanotechnology, 査読有, Vol. 26, No. 28, pp. 285103(1-9), DOI: 10.1088/0957-4484/26/28/285103

K. Suzuki, K. Kobayashi, A. Labuda, K. Matsushige, and H. Yamada, Accurate formula for dissipative interaction in frequency modulation atomic force microscopy, Applied Physics Letters, 査読有, Vol. 105, No. 23, pp. 233105 (1-5), DOI: 10.1063/1.4903484

K. 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, 査読有, Vol. 140, No. 5, pp. 054704 (1-7), DOI: /10.1063/1.4863346

S. 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, Nature Materials, 査読有, Vol. 13, No. 3, pp.264-270, DOI: 10.1038/nmat3847

K. 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, 査読有, Vol. 138, NO. 18, pp. 184704(1-7), DOI: 10.1063/1.4803742

K. Umeda, K. Kobayashi, N. Oyabu, Y. Hirata, K. Matsushige, and H. Yamada, Analysis of capacitive force acting on a cantilever tip at solid/liquid interfaces, Journal of Applied Physics, 査読有, Vol. 113, No. 15, pp.154311(1 - 11), DOI: 10.1063/1.4801795

〔学会発表〕(計 46 件)

長谷川 俊、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM による SrTiO₃(100)面上の固液界面構造評価(2)、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 21 日(東京)

梅田 健一、小林 圭、山田 啓文、3D-FM-AFM を用いた固液界面における局所水和構造と表面原子構造との相関に関する研究、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 21 日(東京)

木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、液中 FM-AFM による plasmid DNA のナノスケール水和構造計測、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日(東京)

宮本 眞之、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM による脂質二重膜上 streptavidin 2 次元結晶の分子スケール構造観察、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日(東京)

崔 子鵬、小林 圭、平田 芳樹、山田 啓文、各濃度溶液中における Streptavidin 2 次元結晶の液中 FM-AFM 高分解能構造観察、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日(東京)

濱田 貴裕、宮本 眞之、木南 裕陽、小林

圭、山田 啓文、biotin 結合による streptavidin 2 次元結晶の構造変化のその場評価、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日(東京)

長谷川 俊、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM による SrTiO₃(100)面上の固液界面構造評価、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日(東京)

木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、B-Z 転移を含む DNA の液中 FM-AFM 高分解能観察、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日(東京)

宮本 眞之、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、3次元フォースマッピングによる Streptavidin 2 次元結晶の水和構造観察、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日(東京)

K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale analysis of hydration structures on heterogeneous surfaces by three-dimensional force mapping, 18th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, 2015 年 9 月 8 日(フランス)

H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale visualization of different DNA conformations by using FM-AFM, 8th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, 2015 年 9 月 8 日(フランス)

K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, Relationship between surface structures/charges and local hydration structures studied by 3D-liquid-FM-AFM, 17th International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM 2015), 2015 年 6 月 22 日(ブラジル)

梅田 健一、小林 圭、山田 啓文、液中動作 FM-AFM を用いたイオン液体の局所溶媒和構造と表面構造/電荷との相関に関する研究、第 62 回応用物理学会春季学術講演会、2015 年 3 月 14 日(神奈川)

崔 子鵬、宮本 眞之、木南 裕陽、小林 圭、平田 芳樹、山田 啓文、マイカ基板上に形成される Streptavidin 2 次元結晶の液中 FM-AFM 高分解能構造観察、第 62 回応用物理学会春季学術講演会、2015 年 3 月 14 日(神奈川)

長谷川 俊、小林 圭、山田 啓文、アルカリハライド結晶のステップ周辺における水和構造評価(2)、第 62 回応用物理学会春季学

術講演会、2015年3月14日(神奈川県)

鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、FM-AFMによる界面活性剤分子集合体構造の形成過程評価(3)、第62回応用物理学会春季学術講演会、2015年3月14日(神奈川県)

黄 雲飛、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、液中FM-AFMによる免疫グロブリンM(IgM)の抗原結合評価、第62回応用物理学会春季学術講演会、2015年3月13日(神奈川県)

木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、液中FM-AFMによる左巻きDNAの高分解能観察、第62回応用物理学会春季学術講演会、2015年3月11日(神奈川県)

宮本 眞之、木南 裕陽、崔 子鵬、小林 圭、山田 啓文、FM-AFMによるStreptavidin 2次元結晶の液中高分解能観察、第62回応用物理学会春季学術講演会、2015年3月11日(神奈川県)

H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale visualization of DNA strands with non-B DNA conformations using FM-AFM in liquids, 22nd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM 22), 2014年12月12日(静岡)

②1 Y. Huang, H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, High-resolution imaging of IgM antibody molecules by FM-AFM in aqueous solutions, 7th International Symposium on Surface Science (ISSS 7), 2014年11月5日(島根)

②2 H. Kominami, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale visualization of self-assembled structures of biomolecules using FM-AFM in liquids, 7th International Symposium on Surface Science (ISSS 7), 2014年11月5日(島根)

②3 K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, Relationship between surface structures/charges and local hydration structures studied by FM-AFM in liquids, 7th International Symposium on Surface Science (ISSS 7), 2014年11月3日(島根)

②4 梅田 健一、小林 圭、山田 啓文、液中動作FM-AFMを用いた局所水和構造と表面構造/電荷の相関に関する研究(2)、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月19日(北海道)

②5 木南 裕陽、井戸 慎一郎、小林 圭、山田 啓文、液中動作FM-AFMによるIgG抗体

分子6量体形成の抗体種依存性、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月19日(北海道)

②6 黄 雲飛、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、液中FM-AFMによる免疫グロブリンM(IgM)構造評価、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月19日(北海道)

②7 長谷川 俊、鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、アルカリハライド結晶のステップ周辺における水和構造評価、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月19日(北海道)

②8 李 文堯、鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、Avidin-biotin相互作用のFM-AFMフォースマップ評価、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月19日(北海道)

②9 崔 子鵬、木南 裕陽、小林 圭、平田 芳樹、山田 啓文、バイオセンシングに向けた機能性タンパク質のFM-AFM構造観察、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月18日(北海道)

③0 K. Umeda, K. Kobayashi, and H. Yamada, Relationship between local hydration structures and surface structures/charges studied by liquid-FM-AFM, 17th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2014), 2014年8月6日(茨城)

③1 H. Kominami, S. Ido, K. Kobayashi, and H. Yamada, Molecular-scale investigation of antigen binding to IgG antibody self-assembly using frequency-modulation AFM in liquids, International Conference on Nanoscience and Technology (ICN+T 2014), 2014年7月21日(米国)

③2 梅田 健一、小林 圭、山田 啓文、液中動作FM-AFMを用いた局所水和構造と表面構造/電荷の相関に関する研究、第61回応用物理学会春季学術講演会、2014年3月19日(神奈川県)

③3 伊藤 史晃、梅田 健一、鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、アルカリハライド結晶ステップ近傍における水和構造評価、第61回応用物理学会春季学術講演会、2014年3月19日(神奈川県)

③4 木南 裕陽、井戸 慎一郎、木宮 宏和、小林 圭、山田 啓文、液中動作FM-AFMによるIgG抗体分子への抗原吸着評価、第61回応用物理学会春季学術講演会、2014年3月19日(神奈川県)

③5 鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM

の減衰係数導出法、第 61 回応用物理学会春季学術講演会、2014 年 3 月 18 日 (神奈川)

③⑥ H. Kominami, S. Ido, H. Kimiya, K. Kobayashi, and H. Yamada, Immunoactivity of IgG antibody assembly investigated by FM-AFM, 12th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN-12) and 21st International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM21), 2013 年 11 月 5 日 (茨城)

③⑦ F. Ito, K. Suzuki, K. Kobayashi, and H. Yamada, Visualization of hydration structures at the interface between alkali halide crystal surface and aqueous solution, International Conference on Nanoscience and Technology (ICN+T 2013), 2013 年 9 月 10 日 (フランス)

③⑧ 鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM による界面活性剤分子集合体構造の形成過程評価(2)、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、2013 年 9 月 19 日 (京都)

③⑨ 伊藤 史晃、鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、アルカリハライド単結晶上の水和構造評価(2)、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、2013 年 9 月 19 日 (京都)

④⑩ 梅田 健一、鈴木 一博、小林 圭、山田 啓文、界面活性剤分子集合体上での FM-AFM フォースマップの詳細解析(2)、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、2013 年 9 月 19 日 (京都)

④⑪ 崔 子鵬、木南 裕陽、小林 圭、山田 啓文、FM-AFM による生体高分子上の分子スケール水和構造評価、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、2013 年 9 月 19 日 (京都)

④⑫ 木南 裕陽、井戸 慎一郎、木宮 宏和、小林 圭、山田 啓文、周波数変調方式 AFM を用いた IgG 抗体分子集合体の抗原認識能評価、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、2013 年 9 月 17 日 (京都)

④⑬ K. Suzuki, K. Kobayashi, N. Oyabu, K. Matsushige, and H. Yamada, Molecular-scale fluctuation of surfactant micelle structures on graphite”, 16th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2013), 2013 年 8 月 7 日 (米国)

④⑭ F. Ito, K. Suzuki, K. Kobayashi, and H. Yamada, Visualization of hydration structures at interfaces between ionic

crystal surfaces and aqueous solutions, 16th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2013) 2013 年 8 月 7 日 (米国)

④⑮ A. Labuda, K. Kobayashi, K. Suzuki, H. Yamada, P. Grütter, M. Lysy, D. Bocek, D. A. Walters, R. Proksch, J. P. Cleveland, Monotonic damping in nanoscopic hydration experiments measured by photothermal AFM, 16th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2013), 2013 年 8 月 7 日 (米国)

④⑯ K. Umeda, F. Ito, K. Suzuki, K. Kobayashi, and H. Yamada, Precise analysis of frequency shift curves at surfactant-solution interfaces, 16th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2013), 2013 年 8 月 7 日 (米国)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小林 圭 (KOBAYASHI, Kei)
京都大学・白眉センター・特定准教授
研究者番号 : 4 0 3 3 5 2 1 1