

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600101

研究課題名(和文) 3次元フォースマッピング法による生体分子の揺らぎ計測

研究課題名(英文) Application of 3-dimensional force mapping method to the measurement of biomolecule fluctuations

研究代表者

山田 啓文 (YAMADA, Hirofumi)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40283626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：周波数変調原子間力顕微鏡に基づく3次元フォースマッピング法を用いて、柔構造をもつ生体分子の高分解能イメージングを確立するとともに、生体分子周囲の相互作用力場および分子揺らぎの直接計測を実現した。具体的には、液中フォースマッピング法を改善し、高感度・高速化するとともに、定量的な相互作用力計測を実現し、試料揺らぎを反映する散逸エネルギーの測定を高速化した。また散逸解析において重要となる固液界面における散逸信号と減衰の関係を明らかにした。これらの計測・解析法の改善により、生体分子周囲における水和構造、散逸エネルギーさらには分子揺らぎを可視化することに成功し、分子の緩和時間を推定することができた。

研究成果の概要(英文)：Direct measurements of interaction force field in close proximity to biomolecules, having soft structures, and the spatial distribution of their molecular fluctuations have been realized by the 3-dimensional force mapping method based on frequency modulation atomic force microscopy, which has a molecular-scale imaging capability. The force sensitivity and the detection response time were particularly improved. The measurement time for the dissipation energy directly reflecting the sample fluctuation was also improved. Furthermore, the present method allows us to conduct the quantitative force measurement. The relationship between the dissipation signal and the damping coefficient at a solid-liquid interface was clearly analyzed. Finally 3D map of the hydration structure and the dissipation energy, in connection to the molecular fluctuation, near biomolecules was successfully obtained. The relaxation time of a molecular assembly was estimated from the dissipation measurement.

研究分野：表面科学

キーワード：走査プローブ顕微鏡 3次元フォースマッピング技術

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質や生体膜など生体分子の機能発現過程においては、生体分子のもつ柔構造およびその揺らぎが重要な役割を担っている。例えば、タンパク質分子の活性サイトにおける特異的結合の確率は、分子の構造的な柔軟性およびその構造揺らぎがなければ、著しく低下し、結合反応は実効的に阻害される。しかしながら、こうした柔構造や揺らぎを分子スケールで直接的に計測評価することは困難であり、機能発現の微視的機構に対する理解は、主に理論計算による結果に立脚している。

近年、周波数変調原子間力 (FM-AFM) 技術の飛躍的な進展に伴い、溶液中においても試料表面構造の原子・分子スケール観察が可能となった。また、本研究代表者らによって開発された 3 次元フォースマッピング法および光熱励振 (保存力と散逸力の分離) による定量的相互作用力計測法によって、分子レベルの水和構造計測やナノスケール電気 2 重層解析などへの応用も進められている。従来、定量性の問題から、散逸力 (エネルギー) の測定は重視されなかったが、定量散逸計測が実現したことにより、分子揺らぎの直接計測への期待が高まってきた。最近、代表者らは、揺らぎが大きいと考えられている、表面活性剤分子の表面ミセル構造において、表面水和構造と揺らぎの強い相関、および散逸エネルギーの特異な距離依存性を見いだした。こうした研究背景の下、3 次元フォースマッピング法を用いた、生体分子の柔構造および揺らぎの分子レベル計測についての研究を開始した。

### 2. 研究の目的

研究代表者らによって、これまでに開発されてきた周波数変調原子間力顕微鏡をベースとする 3 次元フォースマッピング法および光熱励振 (保存力と散逸力の分離) による定量的相互作用力計測法を基盤として、柔構造をもつ生体分子の分子イメージングを実現するとともに、生機能発現過程に強く関連する、生体分子の揺らぎの大きさと揺らぎに伴う緩和時間を推定し、生体分子近傍の水和構造と分子の揺らぎの関係を明らかにすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

柔構造をもつ生体分子の分子イメージングを実現するとともに、生体分子の分子スケール揺らぎを計測し、生体分子近傍の水和構造と分子の揺らぎの関係を明らかにするために以下に記載する研究テーマを遂行する。

#### (1) 液中 3 次元フォースマッピング法の高度化

液中 3 次元フォースマッピング法を改善し、高感度・高速化するとともに、定量的な原子・分子スケール相互作用力計測を実現する。

#### (2) 散逸計測法の高速化・散逸信号の解析

3 次元フォースマッピング法の高度化に伴い、試料揺らぎを反映する散逸エネルギーの計測の高速化を図る。

#### (3) モデル生体試料の作製

生体分子近傍の水和構造と散逸・揺らぎとの関係を明らかにするために、生体膜のモデル系として脂質分子膜系を構築し、さらにはこれら脂質分子内/上に結合したタンパク質分子試料系を作製する。

#### (4) 生体分子周囲の水和構造可視化・分子揺らぎ計測

生体分子周辺における水和構造を可視化し、モデル生体膜系、タンパク質分子や DNA など、種々の生体分子と水和構造と分子の関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 液中 3 次元フォースマッピング法の高度化

本研究課題では、FM-AFM をベースとする 3 次元フォースマッピング技術を利用して、柔構造をもつ生体分子の分子イメージングを実現し、生体分子近傍の水和構造を可視化するとともに、生体分子の揺らぎ計測を行った。このためには定量的な相互作用力計測が必須となるが、これは保存力と散逸力の分離が可能となる光熱励振法を用いることで実現された。

3 次元フォースマッピング法では、試料表面上の 3 次元空間での各点 (x, y, z) における保存力・散逸力データを取得する (図 1 参照)。

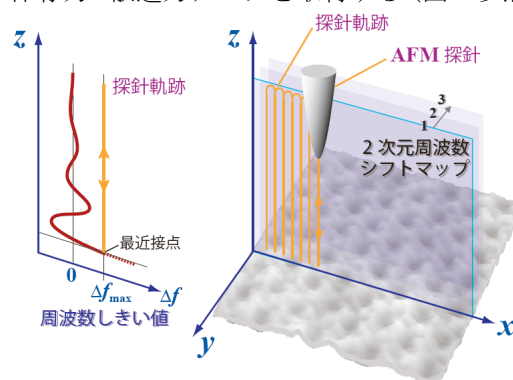


図 1 : 3 次元フォースマッピング法. 左 : 周波数シフトカーブにおける周波数しきい値 ( $\Delta f_{max}$ ).  $\Delta f_{max}$  により探針の  $z$  振動を制御することによって、複雑な形状をもつ試料のフォースマッピングが可能とする. 右 : 3 次元フォースマッピングの動作原理図.

3 次元計測であるために、その測定時間は極めて長くなり、特に高分解能計測においては測定中の装置の機械・熱ドリフトが大きな問題となる。本研究では、データ取得時間の短

縮化のために、探針/試料の走査速度を向上するとともに、AFM 制御帯域を拡大するなど装置を改善した。一方、FM-AFM においては、カンチレバー振動の周波数スペクトルに装置系の機械特性の影響が入ると、定量的な力測定が困難になることが知られている。このため、カンチレバーの励振には、光熱励振法などカンチレバー部分だけを局所的に励振する方法を用いて定量的相互作用力測定が可能なるように改良した。また、高分解能計測を阻害する機械・熱ドリフトに対しては、装置に低熱膨張率の材料を使用することで熱・機械特性を改善し、さらには、装置を精密恒温槽内に設置することで、周囲環境温度を高精度で一定に維持することに成功した。

## (2) 散逸計測法の高速度化・散逸信号の解析

液中 3 次元フォースマッピング法の高度化に伴い、散逸計測も高速化することが必要不可欠となる。散逸計測は基本的にはカンチレバーの振動振幅の変化の検出であるが、振幅制御を行う自動利得制御器 (AGC) の帯域を従来の 1 kHz より、新たに 3 kHz まで広くするよう改良した。また、散逸エネルギーの定量的な評価のために、散逸信号感度の周波数依存性を検討した。

散逸信号は、カンチレバーの振動エネルギーの散逸に直接的に相当する測定量であり、力学振動系における減衰係数 (摩擦/粘性) に強く関連するが、その正確な物理的対応は明確でなく、散逸信号 (= 散逸エネルギー:  $P_{dissip}$ ) と減衰係数 (= ダンピング:  $\gamma$ ) の関係についての解析が求められていた。研究代表者らは、上記  $P_{dissip}$  と  $\gamma$  の関係が、FM-AFM における周波数シフトと相互作用力の関係に似ているところから、いわゆる Sader の式を導出する際の手法を適用し、 $P_{dissip}(z)$  と  $\gamma(z)$  の間に成り立つ解析的な関係を導き出すことに成功した。固液界面において実際に測定された  $P_{dissip}(z)$  から、この解析的な関係式を用いて、 $\gamma(z)$  の起源を考察することにより、カンチレバー振動に大きな減衰を引き起こす、分子レベルの界面層に強く拘束される液体層 (吸着水和層) の存在が明らかにされた (図 2 参照)。

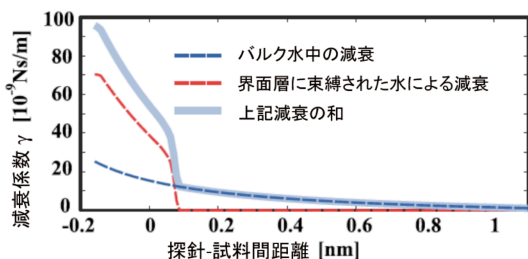


図 2 : 新たに導出された  $P_{dissip}(z)$ - $\gamma(z)$  の解析的関係式から得られる減衰係数の距離依存性。グラフ中の赤点線は、分子レベルの界面層に強く拘束される液体層による減衰を示す。

## (3) モデル生体試料の作製

本研究では、細胞の生体膜モデルとして脂質二分子膜を用いた。DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) 膜の場合、先ず粉末試料を有機溶媒に溶解、乾燥し、析出した DMPC 薄膜を水和させてベシクルを作製し、マイカ表面に堆積することで脂質二分子膜を作製した。図 3 に、フォースマッピング法により得られた DMPC 上の 2 次元周波数シフト・散逸マップを示す。さらに、たんぱく質分子修飾した脂質膜作製のために、biotin 修飾脂質分子 (biotin-cap-DOPE: dioleoyl phosphatidylethanolamine) と DOPC (dioleoyl phosphatidylcholine) と DOPS (dioleoyl phosphatidylserine) の混合 2 分子膜を作製し、streptavidin 分子を吸着した脂質 2 分子膜を作製することに成功した。

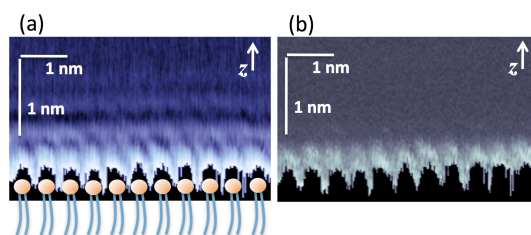


図 3 : DMPC 脂質膜上の 2 次元フォースマッピング像 ( $x$ - $z$ )。 (a) 周波数シフト像。脂質分子に相当する凹凸表面上に存在する 4 層の水和構造が可視化されている。表面の凹凸は脂質分子の一つずつに対応する (図下部のモデルを参照)。 (b) (a) と同時に取得された散逸エネルギー像。表面に近づくに連れて散逸は単調に増加しており、(a) と異なって層状のパターンは形成されない。

## (4) 生体分子周囲の水和構造可視化・分子揺らぎ計測

マイカのような原子的平坦性を有する固体結晶表面上の 3 次元フォースマッピングは既の実現しているが、生体分子ではその複雑な表面構造のため、フォースマッピングを実施するにはより精密な探針制御が必要となる。本研究では、探針制御のアルゴリズムを検討するとともに、探針駆動・制御部の周波数帯域および総合応答特性を改善し、複雑な表面構造上においても精度よく探針が追従するように改善した。これらの改善によって、リガンド活性をもつタンパク質分子 (streptavidin) や DNA 分子周囲の 3 次元水和構造や局所電荷分布が明瞭に可視化された (図 4 参照)。さらに、生体分子の生機能に強く関連する分子揺らぎの直接観測を目指して、生体膜を構成する脂質分子に代表される両親媒性分子の膜に対して、3 次元フォースマッピングを用いてその保存力および散逸力の局所分布計測を行い、膜に局所応力が加わった際のエネルギー変化を非平衡統計力学により解析した。膜上で得られたフォースマッピング (FM-AFM) による保存力カーブは、静的フォースカーブと一致しないが、



これは膜内分子の緩和過程が影響していると考えられる。同時に得られた散逸力カーブの変化との整合性を考慮すると、分子の膜内緩和時間が数  $\mu\text{sec}$  になることが新たに分かった。

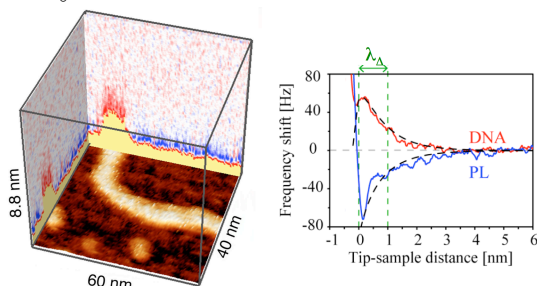


図4：左：正電荷をもつポリリジン（PL）膜上に堆積したプラスミドDNA表面近傍における3次元周波数シフトマップ。DNAは2重鎖上のリン酸基列のため負電荷をもつ。図中の領域がそれぞれ正帯電・負帯電の電気2重層に対応する。右：PL（青）およびDNA（赤）上の周波数シフトカーブ（フォースカーブに対応）。各々の電荷符号に応じて、引力/斥力の相互作用がはらたく、 $\lambda_D$ は電気2重層の遮蔽長を表す。

#### 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 4 件）

(1) 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, 26, 285103 (2015). DOI: 10.1088/0957-4484/26/28/285103

(2) 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, 105, 233105 (2014). DOI: 10.1063/1.4903484

(3) Y. 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*, 査読有, 14, 6254-6260 (2014). DOI: 10.1021/cg500891j

(4) K. Umeda, K. Kobayashi, N. Oyabu, Y. Hirata, K. Matsushige, and H. Yamada: “Practical aspects of Kelvin-probe force microscopy at solid/liquid interfaces in various liquid media”, *Journal of Applied Physics*, 査読有, 116, 134307 (2014). DOI: 10.1063/1.4896881

〔学会発表〕（計 26 件）

(1) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2016.3.19-22, 東京工業大学)

(2) 黄 雲飛, 馬 志鵬, 木南 裕陽, 小林 圭, 山田 啓文, 田畑 修: “液中 FM-AFM による DNA オリガミにおける crossover 構造評価 (2)”, 第 63 回応用物理学関係連合講演会 (2016.3.19-22, 東京工業大学)

(3) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2016.3.19-22, 東京工業大学)

(4) H. 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),(招待講演)

(5) 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 76 回応用物理学関係連合講演会 (2015.9.13 -16, 名古屋国際会議場)

(6) 黄 雲飛, 馬 志鵬, 木南 裕陽, 小林 圭, 山田 啓文, 田畑 修: “液中 FM-AFM による DNA オリガミにおける crossover 構造評価”, 第 76 回応用物理学関係連合講演会 (2015.9.13 -16, 名古屋国際会議場)

(7) H. Kominami, K. Kobayashi, H. Yamada: “Molecular-scale visualization of different DNA conformations by using FM-AFM”, The 18th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (2015.9.7-11, Cassis, France)

(8) K. Umeda, K. Kobayashi, H. Yamada: “Molecular-scale analysis of hydration structures on heterogeneous surfaces by three-dimensional force mapping”, The 18th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (2015.9.7-11, Cassis, France)

(9) H. Yamada: “Molecular-scale Visualization of Solid-Liquid Interfaces by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, NIMS Conference 2015 (2015.7.14-16, Tsukuba) (招待講演)

(10) K. Umeda, K. Kobayashi and H. Yamada: “Relationship between surface structures/charges and local hydration structures studied by 3D-liquid-FM-AFM”, International Scanning Probe Microscopy Conference (2015.6.21-24, Rio De Janeiro, Brazil)

(11) H. Kominami, K. Kobayashi and H. Yamada: “Visualization of biomolecules-solution interfaces by frequency modulation AFM and 3D force mapping”, International Scanning Probe

Microscopy Conference (2015.6.21-24, Rio De Janeiro, Brazil)

(12) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2015.3.11-14, 東海大学)

(13) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2015.3.11-14, 東海大学)

(14) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2015.3.11-14, 東海大学)

(15) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2015.3.11-14, 東海大学)

(16) 山田 啓文, 小林 圭:“FM-AFM および 3 次元フォースマッピング法による生体分子-溶液界面構造の可視化”, 第 62 回応用物理学関係連合講演会 (2015.3.11-14, 東海大学)

(17) H. Yamada: “Molecular-scale visualization of self-assembly of biomolecules by frequency modulation atomic force microscopy in liquids”, The XVII Linz Winter Workshop 2015 (2015.1.31-2.2, Linz, Austria)(招待講演)

(18) H. Kominami, K. Kobayashi, 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 (2014.12.11-13, Atagawa)

(19) Y. Huang, H. Kominami, K. Kobayashi and H. Yamada: “High-resolution Imaging of IgM Antibody Molecules by FM-AFM in Aqueous Solutions”, The 7th International Symposium on Surface Science (2014.11.3-7, Matsue)

(20) H. Kominami, K. Kobayashi and H. Yamada: “Molecular-scale Visualization of Self-Assembled Structures of Biomolecules Using FM-AFM in Liquids”, The 7th International Symposium on Surface Science (2014.11.3-7, Matsue)

(21) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2014.9.17-20, 北海道大学)

(22) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2014.9.17-20, 北海道大学)

(23) 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 回応用物理学関係連合講演会 (2014.9.17-20, 北海道大学)

(24) K. Umeda, K. Kobayashi, H. Yamada: “Relationship between local hydration structures and surface structures/charges studied by liquid-FM-AFM”, The 17th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (2014.8.4-8, Tsukuba)

(25) H. Kominami, S. Ido, K. Kobayashi, 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 (2014.7.20-25, Colorado, USA)

(26) H. Yamada, H. Kominami, K. Umeda, H. Suzuki, K. Kobayashi: “Molecular-scale visualization of biomolecules and their biochemical functions by frequency modulation atomic force microscopy”, 5th Multifrequency AFM Conference (2014.6.16-18, Madrid, Spain)(招待講演)

[その他]

ホームページ等

京都大学工学研究科電子材料物性研究室  
<http://piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp/d/jp>

## 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: 40283626

### (2) 連携研究者

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: 40335211

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: 10357858