

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成 24 年度採択分  
平成 27 年 3 月 16 日現在

複合機能プローブシステムによるバイオ・ナノ材料の分子  
スケール機能可視化  
Molecular-scale functional visualization of bio- and  
nano-materials by AFM functional probes

課題番号：24221008

山田 啓文 (YAMADA HIROFUMI)

京都大学・大学院工学研究科・准教授



研究の概要

周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) 技術および多環境動作デュアルプローブ AFM 技術に基づき、機能情報と構造情報を分子レベルで明確に識別し、生体膜上のさまざまな機能性分子の機能・構造を分子スケールで可視化し、それらの細胞生理機能における微視的役割を解明する新たな分子機能イメージング法を確立する研究である。

研究分野：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ計測、原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

近年、生体試料の分子レベル評価には原子間力顕微鏡 (AFM) が広く用いられており、生体機能可視化についても、生化学修飾探針を用いて特異的相互作用を検出する手法や、タンパク質分子内の水素結合を解析するフォース分光法などが開発されている。しかし、探針修飾による分解能の低下や、機能・構造情報の明瞭な分離が困難など、高分解能イメージング法としては大幅な改善が求められていた。

2. 研究の目的

本研究代表者らにより開発されてきた高分解能周波数変調 (FM) AFM 技術およびデュアルプローブ AFM 技術に基づき、生体膜上のさまざまな生体分子の機能・構造を識別して分子レベルで可視化する、新たな分子機能イメージング法を確立し、これら生体分子機能発現の微視的機構を解明することを目的とする。さらに、一般的なナノ構造体の機能・物性の分子スケール可視化への応用も目指す。

3. 研究の方法

以下の 4 つの研究テーマ、すなわち (1) デュアルプローブ AFM による生体機能可視化技術の確立、(2) 生体分子刺激探針による生機能発現の測定、(3) 生体分子近傍の水和構造可視化、(4) 生体分子近傍の静電相互作用の可視化、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) デュアルプローブ AFM による生体機能可視化技術の確立

本研究では、最小移動ステップ幅が 10 nm 以下の慣性駆動型の探針駆動機構を備えたデュアルプローブ AFM 装置を新たに設計・作製した。これにより、通常探針と生化学修飾探針で同一領域を同時に計測することが可能となった。一方、溶液環境下では 2 つのプローブの動作干渉が問題となるが、新たに光熱励振法の導入することでこの問題を解決した。さらに、この光熱励振により相互作用力の定量測定が可能となり、保存力と散逸力を完全に分離して計測することに成功した。この成果は *Phys. Rev. Lett.* 誌 (代表論文 4) に掲載された。この定量的相互作用測定技術は、生化学修飾による構造・機能情報の分離検出に大きな役割を果たす。また、マウス由来の IgG 抗体の Y 字型構造を高分解能観察し、抗体内のドメイン構造を識別することに成功した。この IgG 抗体が特定の溶液環境下で 6 量体を形成し、さらには 6 量体が 2 次元結晶を形成することを新たに発見した。この成果は、*Nature Materials* 誌 (代表論文 2) に掲載され、各方面から注目を集めた (図 1)。

(2) 生体分子刺激探針による生機能発現の測定

(1) で述べた抗体 2 次元結晶は抗原-抗体の結合状態に関する分子レベルで評価することができるプラットフォームとして利用することが可能であり、現在、この抗体に対す

る抗原 (HSA: ヒト血清アルブミン) を刺激プローブとする探針を作製し、抗体 2 次元結晶上でフォースマッピング実験を行った。探針作製に当たっては、先ず分子両端にシラノール基とイミド基を持つ化合物を作製し、これを表面修飾剤として、Si 探針表面に抗原性の HSA 分子を結合させた。実際に、この HSA 修飾探針と IgG 抗体分子の間にはたらく特異的相互作用を検出することで、生体分子刺激探針として動作することを確認した。

### (3) 生体分子近傍の水和構造可視化

UV オゾン処理を施した親水性 SiO<sub>2</sub> 探針、オクタデシルトリエトキシシランの自己組織化単分子膜で修飾した疎水性探針を用いて、マイカー-水界面における 2 次元フォースマッピングを行い、試料表面に平行な 2 次元的水和構造が可視化することに成功した。親水性探針と比べて疎水性探針では、水和力の計測感度が低くなることが明らかとなり、生体分子周辺の水和構造観察には親水性探針が最適であると判断した。この親水性探針を用いてプラスミド DNA 周辺の複雑な 3 次元水和構造計測を反映した 2 次元周波数シフトマップの取得に成功した。この結果は、2 重らせん構造の高分解能 FM-AFM 像とともに、*ACS Nano* 誌 (代表論文 5) に掲載され、各方面から注目を集めた。現在、連携研究者である国立遺伝研の日詰光治氏から試料提供を受け、DNA-タンパク質分子複合体の観察に取り組んでいる。

### (4) 生体分子近傍の静電相互作用の可視化

FM-AFM フォースマッピングにより探針-試料間にはたらく電気二重層力の距離依存性を計測し、これを解析することで生体分子表面の電荷密度を求める方法を新たに開発した。検証実験として、界面活性剤分子ミセル上でフォースマッピングを行い、分子ミセル上の電荷密度分布計測に成功した。この成果は *J. Chem. Phys.* 誌 (代表論文 1) に掲載された。また、通常交流電界が遮蔽される電解質液中においても、高周波電界を用いることで、局所誘電応答計測が可能であることを見いだした。この成果は *J. Appl. Phys.* 誌 (代表論文 3) に掲載された。

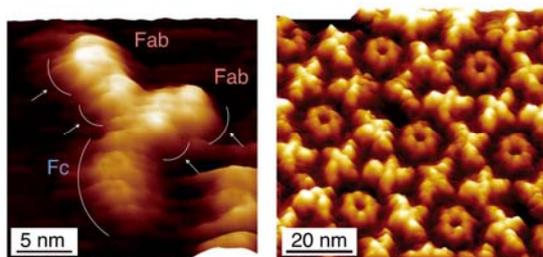


図 1 マウス由来 IgG 抗体およびその 6 量体の 2 次元結晶の液中 FM-AFM 像。

### 5. 今後の計画

- ・ターゲット周辺のみならず極微量の分子を注入することが可能なピペット型ナノプローブの開発
- ・より精密な生体分子周囲の水和構造可視化のための安定な 3 次元フォースマッピング法の確立、および保存力・散逸エネルギーの 3 次元同時マッピングによる生体分子揺らぎの可視化
- ・定量的な電気二重層力計測による精密な静電相互作用の可視化、および複雑な電界分布をもつ生体分子近傍における局所誘電応答可視化の実現

### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. 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", *J. Chem. Phys.*, **140**, 054704 (2014).
2. 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*, **13**, 264-270 (2014).
3. 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", *J. Appl. Phys.*, **113**, 154311 (2013).
4. A. Labuda, K. Kobayashi, K. Suzuki, H. Yamada, and P. Grütter: "Monotonic Damping in Nanoscopic Hydration Experiments", *Phys. Rev. Lett.*, **110**, 066102 (2013).
5. S. Ido, K. Kimura, N. Oyabu, K. Kobayashi, M. Tsukada, K. Matsushige, H. Yamada: "Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization of Native DNA in Aqueous Solution", *ACS Nano*, **7**, 1817-1822 (2013).

(受賞)

ATI Poster Award

- ・H. Kominami, S. Ido, K. Kobayashi, H. Yamada: "Investigation of antigen binding to IgG antibody assembly by FM-AFM in liquids", The 17th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (August 4-8, 2014, Tsukuba)

・The 20th ICSPM Poster Award

- K. Umeda, Y. Hirata, N. Oyabu, K. Kobayashi and H. Yamada: "Quantitative charge density measurement of biomolecule in aqueous solutions by FM-AFM with force mapping technique" (2012. 12.17-19, Okinawa)

ホームページ等

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