

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19810006
 研究課題名（和文） 液中原子分解能原子間力顕微鏡の多機能化と生体膜研究への応用
 研究課題名（英文） Multi-fictionalization of atomic-resolution in-liquid AFM for Studying biological membranes
 研究代表者
 福間 剛士（FUKUMA TAKESHI）
 金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任准教授
 研究者番号：90452094

研究成果の概要：

本研究では、液中で原子スケール（1 nm 以下）の構造を観察できる原子間力顕微鏡と呼ばれる計測装置を改良して、観察に使用する液体の温度やそこに含まれるイオンの濃度を精密に制御できるようにした。さらに、生体の基本的なパーツである生体膜の分子スケールの研究へと開発した装置を応用し、生体膜の主たる構成成分である脂質分子とコレステロールの複合体の構造を分子レベルで観察することに世界で初めて成功した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,360,000 | 0 | 1,360,000 |
| 2008年度 | 1,350,000 | 405,000 | 1,755,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,710,000 | 405,000 | 3,115,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：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：原子間力顕微鏡、生体膜、ナノバイオサイエンス、原子分解能観察、分子分解能観察、ナノテクノロジー、生物物理学、脂質二重層

1. 研究開始当初の背景

近年目覚ましい進展を遂げたナノスケール分析技術を分子細胞生物学の研究へと応用し、さらに、そこで得られた知見を将来の新規ナノデバイス創生へと還元しようとする、いわゆるナノバイオテクノロジーと呼ばれる新融合領域が現在世界中の注目を集めている。しかしながら、従来のナノスケール分析技術の多くは生体試料の研究へとそのまま応用することが困難であり、さらなる技術開発を必要としている。そのため、先端ナノ分析ツールのバイオサイエンスへの応用開

発が現在急務となっている。

研究代表者は、これまで周波数変調方式原子間力顕微鏡（FM-AFM）と呼ばれる最先端のナノ分析ツールの開発に携わり、それをを用いて溶液中での FM-AFM による原子分解能観察に世界で初めて成功した。この技術は、従来不可能であった生体試料の構造や生命現象の原子スケール観察を可能にするものとして大きな注目を集めている。しかしながら、観察に使用する液体の温度や濃度などを精密に制御して、FM-AFM による原子・分子レベルの観察が行われた例はまだない。そのため、

溶液条件によって構造や物性が大きく変化する生体試料の観察を行い信頼性の高いデータを得ることは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで研究代表者が開発してきた高分解能 FM-AFM の装置・手法にさらなる改良を加え、より系統的な生命科学の研究が可能なものに発展させることを第一の目標としている。さらに、開発した装置を用いて生体膜の様々な機能性に深く関係するリン脂質やコレステロールなどの異分子複合体を生理溶液環境下で分子分解能観察し、その挙動を分子レベルで明らかにすることを第二の目標としている。これにより、開発した装置・手法の実用性が示されるとともに、重要な分子生物学的課題である生体膜機能の分子レベルでの理解に進展が得られるものと期待される。以下では、それぞれの研究目標についてより具体的な内容と背景を説明する。

(1) 液中原子分解能 AFM の多機能化

原子間力顕微鏡 (AFM) では、先鋭化された探針を備えたカンチレバーと呼ばれる片持ち梁を力検出器として用いる。探針を試料表面に接近させ、探針-試料間に働く相互作用力を検出し、それを一定に保つように探針の垂直位置を制御しながら水平方向に走査する。このとき、探針の垂直位置の変化をその水平位置に対して記録することで試料の三次元形状像を得る。

従来、探針を試料に接触させて、カンチレバーのたわみから相互作用力を検出するコンタクトモードが溶液中での高分解能観察には用いられてきた。しかしながら、この動作モードでは探針-試料間に働く水平方向の摩擦力を原理的に避けることができず、基板上に孤立した生体分子や弱い力で相互作用する分子複合体などを非破壊観察することができないという問題点があった。この問題を解決するために、カンチレバーをその共振周波数近傍で垂直方向に振動させ、探針-試料間相互作用によって生じたカンチレバーの振動振幅あるいは振動周波数の変化から相互作用力を検出するダイナミックモードが開発された。この動作モードでは水平方向の摩擦力が大幅に軽減され、孤立した生体分子の観察などが可能となった。しかしその一方で、カンチレバー共振の Q 値の大幅な低下などから溶液中での原子・分子分解能観察は実現していなかった。

2005 年、研究代表者はそれまでの周波数検出方式ダイナミックモード AFM (FM-AFM) に大幅な改良を施し、真空・大気・溶液中のあらゆる環境下でサブナノメートルの分解能を達成可能なマルチ環境型 AFM を開発した。そ

れにより、世界で初めてダイナミックモード AFM による液中原子分解能観察に成功した。研究代表者は、さらに装置と手法に改良を重ねることで、生理溶液環境下の脂質二重層表面に形成された個々の水和層やイオン分布を直接原子・分子スケールで観察し、この手法が従来不可能であった生体分子系の原子スケール観察を可能とする革新的な技術であることを明らかにした。

研究代表者が開発した FM-AFM は溶液中での原子分解能観察を可能としたが、分子生物学的な研究を系統的に行うために必須の機能である溶液の温度や濃度を制御する機能が備わっていなかった。たとえば、これまでの液中 FM-AFM による高分解能観察は、すべて気液界面が露出している、いわゆるオープンセルと呼ばれる試料ホルダを用いて実験が行われてきた。オープンセルでは液体の揮発が避けられないため、実験中に緩衝溶液のイオン濃度や pH が変化するという問題点がある。特に、37 度などの生物学的に重要な温度で実験を行う場合には、溶液の蒸発速度が増大するため、この問題はより深刻なものとなる。また、観察位置を変えずに、溶液に含まれるイオンや様々な分子 (ペプチドやタンパク質など) の濃度を制御できないため、それらが観察対象にもたらす影響を正確に調べることは困難であった。一方これまでも、細胞などの比較的大きな試料の低分解能 (> 10 nm) 観察に対しては、温度・濃度制御機能を備え、密閉された溶液環境での観察を実現する、環境制御型クローズドセルが実用されてきた。しかしながら、従来の環境制御型クローズドセルは比較的大型で剛性も低いため、観察中の試料ドリフトの増大や試料スキャナの共振周波数の低下を招き、高分解能観察には適さなかった。本研究では、安定性や分解能といった AFM 性能を損なわずに溶液の温度・濃度制御を実現し、液中原子分解能 AFM の機能性を大幅に改善することを目標とする。

(2) 生体膜中の異分子複合体の分子スケール構造分析

生体膜は、細胞や細胞小器官の隔壁を構成する、生体における最も基本的な構成要素のひとつである。生体膜は、水、イオン、その他小分子の膜輸送を司り、膜内外のイオン濃度調整や細胞間のシグナル伝達に大きな役割を果たす。そのため、これまでに様々な手法によりその構造・機能が研究されてきた。それによれば、生体膜はグリセリン脂質と呼ばれる両親媒性分子の二重層を主たる構成要素とし、それにスフィンゴ脂質、コレステロール、タンパク質などが複雑に混ざり合った複合体として機能する。生体は、脂質二重層に含まれる分子種とその混合割合を多

彩に変化させることで、異なる膜の流動性や表面物性を実現している。たとえば、リン脂質二重層には流動相 (fluid phase) と呼ばれる流動性の高い相と、ゲル相 (gel phase) と呼ばれる流動性の低い相が存在するが、これらの相を持つ脂質二重層がコレステロールと複合体を形成すると、膜の流動性がそれぞれ低下および向上することが知られている。さらに、このような膜の流動性の違いが膜タンパク質の機能や生体膜の融合などの生物学的プロセスに対して重大な影響を及ぼすことが知られている。

このように、生体膜内での様々な分子の複合化がもたらす膜の物理的・化学的物性への影響の重要性は広く認識されている。その一方で、こういった異分子複合化の分子スケールでの発現メカニズムに関しては未解明の点を多く残している。たとえば、コレステロール分子が脂質二重層内でどのように脂質分子と相互作用し、どのような構造の複合体を形成するのかといった点や、その複合体がドメインを形成した場合のサイズや安定性なども未解明のまま残されている。また、それらに対するイオン濃度や環境温度の影響も分子レベルでは明らかになっていない。このような生物学的現象を分子スケールで理解することは、分子生物学の重要な課題であるとともに、生体分子機能を模倣して将来のナノデバイス応用へと発展させようとするナノバイオテクノロジーの要請に答えるものでもある。

生体膜中の異分子複合体の分子スケールでの理解が、未だ困難な課題として残されている大きな要因として、生理環境下にある生体分子を直接分子スケールで観察することの技術的な難しさを挙げることができる。たとえば、電子顕微鏡では生体分子を生理溶液環境下で分子分解能観察することができない。また、光学顕微鏡ではサブナノメートルの分解能を得ることができない。さらに X 線などを利用した回折法ではマイクロメートル以上の領域を平均した情報を得ることになり、分子スケールの構造を直接観察することはできない。一分子蛍光法により分子の軌跡を追うことは可能ではあるが、分子複合体の構造を直接知ることはできない。研究代表者の開発した原子分解能 FM-AFM は、生理環境下での分子分解能観察が可能であるという大きな特長を持つため、生体分子複合体の構造を原子・分子スケールで観察できる可能性がある。本研究では、生体試料観察のための機能性を大幅に改善した原子分解能 FM-AFM を用いて、モデル生体膜中に形成されるグリセロリン脂質分子、コレステロール、スフィンゴ脂質の異分子複合体を直接分子分解能観察することで、その構造と挙動を分子スケールで解明することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 液中原子分解能 AFM の多機能化

原子スケールのイメージングでは、探針-試料間相対位置の熱的・機械的ドリフトの影響が一般には無視できない。ドリフトによる AFM 像の歪みを許容範囲内に抑えるためには、十分にドリフトを抑制し、走査速度を現実的に実用可能な長さに収める必要があり、その条件下で原子スケールの空間分解能が得られなければ信頼性のあるデータは得られない。

また、生物学的実験にしばしば用いられる化学合成されたペプチドや DNA などの生体試料の多くは、極微量でも非常に高価であるため、実験に必要な溶液量は最小限に抑えることが望ましい。本研究では、300 μ l 以下の溶液容量を目標仕様とする。これは一般的な環境制御型クローズドセルの必要溶液量 (通常 1 ml 以上) に比べて大幅な容量低減を目標とすることになる。

従来の高分解能 AFM にはチューブ型のピエゾスキャナが用いられる場合が多かったが、本研究ではシアーピエゾタイプのスキャナを用いることで、小型化と共振周波数の向上を図る。これによりドリフトの抑制とイメージング速度の向上が期待される。

試料ホルダに 0.5 mm ϕ 程度の入出水ポートを設け、そこにテフロンチューブを接続することで、外部からの液体置換や外来物質の注入を可能とする。

従来、温度制御は試料ホルダにヒータを組み込むことで行っていたが、本研究では、探針から試料にいたるメカニカルパスに含まれる全ての部位 (20 \times 20 \times 20 cm^3 程度の大きさ) を恒温槽で囲み、0.1 $^{\circ}\text{C}$ 単位での精密な温度制御を実現する。これにより、溶液の温度制御だけでなく、観察時に生じる熱ドリフトの大幅な抑制を実現する。

(2) 生体膜中の異分子複合体の分子スケール構造分析

① 研究対象分子

脂質分子としては、動物細胞中にもっとも多く見られるホスファチジルコリン(PC)を head group として持つ、Dipalmitoylphosphocholine を用いる。ステロイドとしては動物細胞中で豊富に見られるコレステロールを用いる。

② 試料作製方法

vesicle fusion 法を用いて、へき開したマイカ基板上にモデル生体膜を作製する。このとき、vesicle を作製するもととなる溶液に、上記の異分子を様々な混合比で混ぜ合わせることで、モデル生体膜中に形成される分子複合体の構造やそのドメイン形成に対する異分子混合比の影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 液中原子分解能 AFM の多機能化

本研究では、溶液中で原子分解能観察が可能な原子間力顕微鏡 (AFM) に、溶液の濃度や温度を制御する機能を付け加え、それを使って精密に制御された溶液環境での分子スケール生体膜研究を行うことを可能とした。

AFM 観察時に、観察位置を変更することなく溶液を置換できるシステムを完成させた。さらに、この溶液置換システムを電動で制御可能とし、溶液置換の速度や時間を精密に制御できるようにした。

また、温度制御に関しては、溶液だけではなく装置全体を銅製の断熱容器で囲み加熱するシステムを開発した。これにより、温度を変化させたときの装置内部の温度分布を 1 度以下に収めることに成功し、その平均値を 0.1°C 単位の正確さで制御することを可能とした。

これらの開発の結果、温度や濃度を精密に制御した溶液環境下で、原子スケールの構造を観察できるようになった。

液中 FM-AFM による原子分解能観察技術は極めて新しく、世界でも数グループでしか実現していない。本研究では、その原子・分子分解能を維持したまま、溶液温度や濃度を精密制御するシステムを導入した点が非常に革新的である。この開発によって、生体分子の観察を高い信頼性で行うことが可能となった点は、FM-AFM の生物学的研究への応用を大きく前進させる重要な成果である。

(2) 生体膜中の異分子複合体の分子スケール構造分析

開発した装置を用いて、モデル生体膜の分子スケール構造観察を行った。代表的な脂質分子である DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) 分子の二重層をベースとして、それにコレステロールを含有させたモデル生体膜をマイカ基板上に作製した。その構造を開発した装置を用いてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS 溶液) 中で観察した。その結果、コレステロールの DPPC 分子間への挿入により、DPPC 分子の配列に不規則性や欠陥が増加することがわかった。また、DPPC のみのモデル生体膜が擬六方の 2 次元結晶構造を有しているのに対し、コレステロールが 30% 以上混入されると、それが斜方晶の 2 次元結晶構造へと変化することが新たにわかった。このような分子スケールの異種分子複合体の形成やその構造は、膜輸送や膜内の分子拡散、さらにはラフト構造形成に深く関与しているとされ、これまで盛んに研究が行われてきたが、分子スケールでその複合体構造を直接観察した例はこれまでになく、この分野における大きな進展が得られた。

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 1 件)

Hitoshi Asakawa and Takeshi Fukuma, “Molecular-scale arrangement and mechanical strength of phospholipid/cholesterol mixed bilayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy in liquid”, *Nanotechnology* 20 (2009), in press.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 招待講演

1. Takeshi Fukuma, “Visualizing Lipid/Water and Lipid/Ion Interactions at the Biological Interfaces With Angstrom-Resolution by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, *Biophysical Society 53rd Annual Meeting*, 3 Mar., 2009, Boston, U.S.A.

2. 福岡剛土, 「液中 AFM 観察技術の発展とナノバイオサイエンスへの応用」、科学技術振興財団 第 6 回生体分子イメージングの新たな技術開発に関する研究会、2009 年 2 月 23 日、愛知県産業貿易館西館 (名古屋)

3. Takeshi Fukuma, “Molecular-Scale Investigations on Model Biological Membranes by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, *The XI Linz Winter Workshop 2009*, 6–9 Feb., 2009, Linz, Austria.

4. 福岡剛土, 「周波数変調原子間力顕微鏡モデル生体膜上に形成された水和そう分子分解能観察」、日本生物物理学会第 46 回年会、福岡国際会議場 (福岡)、2008 年 12 月 3 日

5. 浅川雅, 「周波数変調 AFM によるコレステロール-脂質二分子膜の分子分解能観察」、日本生物物理学会第 46 回年会、福岡国際会議場 (福岡)、2008 年 12 月 3 日

6. 福岡剛土, 「液中原子間力顕微鏡による生体分子/生理溶液界面現象の分子分解能観察」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、東京大学 (東京)、2008 年 11 月 17 日

7. 福岡剛土, 「周波数変調 AFM 技術の開発とその有機分子・バイオ系への応用」、第 1 回若手研究者支援のための産学共同 GCOE 国内シンポジウム、京王プラザホテル (札幌)、2008 年 10 月 3 日

8. 浅川雅, 「周波数変調 AFM による生体膜モデルの液中分子分解能観察」、

2008 年電気化学会北陸支部 秋季大会、
富山大学（富山）、2008 年 9 月 25 日

9. Hitoshi Asakawa “Molecular Resolution Imaging of Cholesterol/Lipid Bilayer by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, The 11th International Conference on Non-contact Atomic Force Microscopy, 17 Sep., 2008, Madrid, Spain.

10. 福間剛士、「高分解能液中 AFM のナノバイオサイエンスへの応用」、日本学術振興会第 141 委員会 第 131 回研究会、東京大学 生産技術研究所（東京）、2008 年 2 月 25 日

11. 福間剛士「高分解能原子間力顕微鏡のナノバイオサイエンスへの応用」、第 10 回バイオサイエンスシンポジウム「計測技術の最前線-分子から細胞まで」、金沢大学（金沢）、2007 年 11 月 9 日

〔図書〕（計 1 件）

S. P. Jarvis, J. E. Sader, T. Fukuma Frequency, “Modulation Atomic Force Microscopy in Liquids”, Applied Scanning Probe Methods VIII - Scanning Probe Microscopy Techniques (Chap. 9, pp. 315-350), B. Bhushan, H. Fuchs, M. Tomitori (Eds.), (Springer, New York, 2008)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福間 剛士 (FUKUMA TAKESHI)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任准教授

研究者番号：90452094

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

浅川 雅 (ASAKAWA HITOSHI)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・博士研究員