

周波数変調原子間力顕微鏡によるモデル生体膜上に形成された水和層の分子分解能観察

福間剛士 金沢大学フロンティアサイエンス機構 / 日本科学技術振興機構さきがけ

1. はじめに

生体膜はリン脂質、コレステロール、タンパク質などのさまざまな分子で構成されており、一方、それを取り囲む生理溶液も、水分子、イオン、小分子などの多様な物質で構成されている。これら2つの領域が接する界面においては、それぞれの領域を構成する分子やイオンが複雑に相互作用することで複合体を形成し、それが生体膜の構造や機能に多大な影響を与えている。したがって、生体膜/生理溶液界面で生じる相互作用や、その結果として生じる複合体形成の詳細を分子レベルで理解することは、生体膜の構造や機能を決定する分子レベルの起源を理解するために必要不可欠である。

周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM)¹⁾ は原子スケールの空間分解能をもつ表面計測技術である。しかしながら、従来その利用環境は超高真空中に限られていたため、それが生物・化学分野での応用の妨げとなっていた。近年著者らは、FM-AFMの装置と手法に大幅な改良を加え²⁾、液中でのFM-AFMによる原子分解能観察を世界ではじめて可能にした³⁾。本稿では、この最新のFM-AFM技術を用いて行った、脂質二重層/リン酸緩衝生理食塩水 (PBS 溶液) 界面の水和現象に関する研究例を紹介する⁴⁾。

2. 水和力の FM-AFM 測定

FM-AFM では、数 nm 程度の先端半径をもつ探針に働く相互作用力 (F_t) を pN オーダの力分解能で測定する。ここで、**図 1a** に示すように探針を脂質膜/溶液界面へと近付けると、探針は、試料表面を構成する分子だけでなく、水分子やイオンとも相互作用する。したがって、界面近傍において水分子やイオンの分布に偏りがあれば、計測される F_t にもそれが反映される。この性質を利用して、AFM により水分子やイオンの分布を分子レベルで計測できる。

マイカ基板上に作製した Dipalmitoylphosphatidylcho-

line (DPPC) 二重層に、PBS 溶液中で探針を徐々に近付けていき、その過程で生じる F_t の変化を距離に対してプロットすると、**図 1b** に示すような力-距離曲線 (フォースカーブ) が得られる。図から、フォースカーブは2つのピークをもつ振動的なプロファイルを示すことがわかる。2つのピーク間の距離はおよそ 0.25 nm となっており、ちょうど水分子1個分の直径に一致している。

DPPC/溶液界面では、脂質-水分子間の相互作用により、水分子の分布に偏りが生じている。分子動力学シミュレーションによれば、水分子の密度は脂質頭部からの距離に対して 0.2-0.3 nm の周期で振動的に増減することが知られており⁵⁾、本実験で得られたフォースカーブとよい一致を示している。この結果は、FM-AFM により、水分子の密度分布を直接計測評価できることを示している。

FM-AFM は、X線や中性子線を用いた反射・回折測定法とは異なり、ナノスケールの局所領域における水分子の分布を計測できる。したがって、それらの従来手法では平均化されて見えなかった局所的な情報が得られるものと期待される。

3. 水和層の FM-AFM 観察

前述のように、FM-AFM では探針に働く力 F_t を測定する。ここで、測定した F_t が一定となるように、探針の垂直位置を制御し、その状態で探針を水平方向に走査すれば、探針は試料の凹凸をなぞるように上下するため、その際の探針の軌跡から試料の表面形状を知ることができる。ただし、フォースカーブが**図 1b**のような振動的な挙動を示す場合、探針の垂直位置は F_t に対して必ずしも一意的に定まらない。たとえば、 F_t が**図 1b**中に点線で示した値になるよう探針-試料間距離 (探針の垂直位置) を制御する場合、**図 1b**中に1-3で示した複数の安定点が存在する。したがって、これらの安定点の間を走査中に移動する可能性がある。

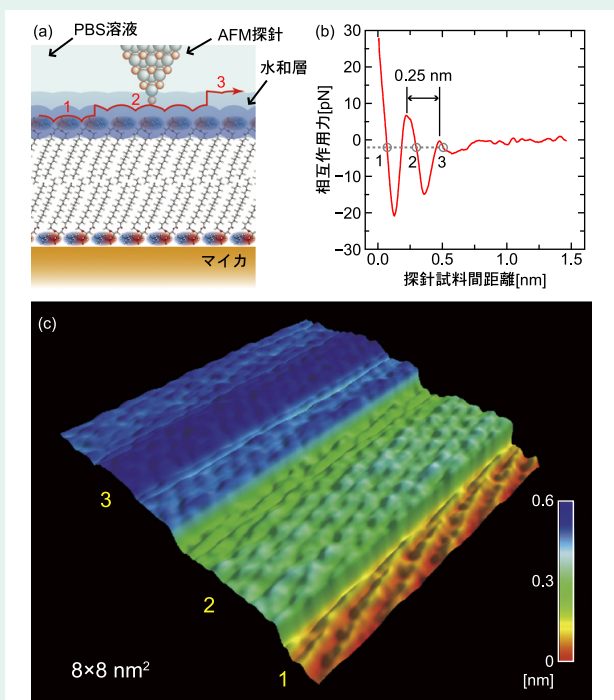


図 1 DPPC 二重層 /PBS 溶液界面の FM-AFM 観察^{4), 8)}. (a) 模式図. (b) フォースカーブ. (c) FM-AFM 像. (電子ジャーナルではカラー)

図 1c はそのような現象を示す FM-AFM 像の例である. この FM-AFM 像を取得する際、探針は図の右下から左上へと走査した. 図中のテラス 1 上では、探針は DPPC 頭部上で走査されており、分子スケールの凹凸が観察されている. テラス 1 上を走査中に、探針は約 0.26 nm 高い位置にあるテラス 2 へと移動する. この段差はやはり水分子 1 個分の大きさにはほぼ一致しており、テラス 2 が第一水和層上に相当することがわかる. ここでも分子の周期を反映した凹凸が観察される. さらに、テラス 2 上を走査中にも探針は約 0.23 nm 高い第二水和層 (テラス 2) 上へと移動する. ここでも、分子スケールの周期構造がわずかに確認できる.

以上の結果から、脂質膜表面の水和現象に関して、いくつかの重要な知見が得られる. この FM-AFM 像は $8 \times 8 \text{ nm}^2$ の領域を約 85 秒かけて探針を走査することで取得された. これは、DPPC 二重層上の水和層がナノスケールの広がりをもって安定に存在していることを示している. また、水和層上でも分子スケールの凹凸が観察されたという結果は、脂質頭部と相互作用している水分子が、脂質頭部の立体構造を反映した

3 次元的な分布を有していることを示している.

また、技術的側面から考えてみると、本実験結果から、液中 FM-AFM が個々の水和層を非破壊で分子分解能観察できるほど弱い相互作用力で、界面における構造や分子の分布を計測できることがわかった. これは、柔らかい試料を計測対象とするナノバイオサイエンス分野での FM-AFM の実用性を示す重要な結果といえる.

4. まとめ

本稿では、液中 FM-AFM を用いた、DPPC/PBS 溶液界面の水和現象に関する研究例を紹介した. FM-AFM は、垂直方向だけでなく、水平方向にも分子スケールの実空間分解能をもつという、他に類をみない特長を有している. また、個々の分子間相互作用を検出可能なほどの高い力分解能も有しているため、生体膜を構成する分子の構造だけでなく、そこで生じる水分子との相互作用をも可視化できる. 実際、ここで紹介した脂質-水分子間の相互作用以外にも、著者らは脂質-イオン間⁶⁾、脂質-コレステロール間⁷⁾の相互作用や複合体形成に関しても FM-AFM を用いた研究例を報告している. 本稿を通して、より多くの方々に液中 FM-AFM の特長を知っていただき、幅広い生物物理学分野での研究へと役立てていただければ幸いである.

文献

- 1) Albrecht, T. *et al.* (1991) *J. Appl. Phys.* **69**, 668-673.
- 2) Fukuma, T. *et al.* (2005) *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 053704.
- 3) Fukuma, T. *et al.* (2005) *Appl. Phys. Lett.* **87**, 034101.
- 4) Fukuma, T. *et al.* (2007) *Biophys. J.* **92**, 3603-3609.
- 5) Berkowitz, M. L. *et al.* (2006) *Chm. Rev.* **106**, 1527-1539.
- 6) Fukuma, T. *et al.* (2007) *Phys. Rev. Lett.* **98**, 106101.
- 7) Asakawa, H. *et al.* (2009) *Nanotechnol.* **20**, 264008.
- 8) Fukuma, T. (2009) *Jpn. J. Appl. Phys.* **48**, 08JA01.



福岡剛士

福岡剛士 (ふくま たけし)

金沢大学フロンティアサイエンス機構特任准教授
2003 年京都大学大学院工学研究科博士後期課程
修了(工学博士). 同年日本学術振興会特別研究員
(PD). 04 年 21 世紀 COE 博士研究員. 05 年 Trinity
College Dublin, 主任研究員. 07 年より現職.
研究内容: 原子間力顕微鏡技術の開発とナノバイ
オサイエンスへの応用

連絡先: 〒 920-1192 石川県金沢市角間町
E-mail: fukuma@staff.kanazawa-u.ac.jp
URL: <http://fukuma.w3.kanazawa-u.ac.jp>

