

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710142

研究課題名(和文) 3次元走査型原子間力顕微鏡による生体膜/生体液界面のナノ空間計測

研究課題名(英文) Investigation of Nanospace at Biological Membrane/Biological Solution Interfaces by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy

研究代表者

浅川 雅 (Asakawa, Hitoshi)

金沢大学・バイオAFM先端研究センター・助教

研究者番号：90509605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：3次元走査型原子間力顕微鏡(3D-SFM)による生体膜/生体液界面の分子分解能解析を目指して、安定性・再現性の向上のために液体密閉型AFMセルを設計・開発した。その結果、長時間安定に原子分解能AFM観察が行えることを実証した。さらにDPPC二重膜/水界面の3D-SFM計測により、水和構造に加えて高い構造自由度を有するPC頭部構造の3次元空間分布も可視化できることを明らかにした。これらの結果より、3D-SFM計測が生体膜/生体液界面のナノ計測技術としての有用性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this project, I have developed a closed fluid cell with liquid-sealing mechanism to improve the stability and the reproducibility of three-dimensional scanning force microscopy (3D-SFM). The results showed the applicability of the developed closed fluid cell to atomic-scale AFM experiments. In addition, I demonstrated the 3D visualization of hydration structures and lipid headgroups at the interface between DPPC bilayer and water by 3D-SFM. The results suggest the applicability of 3D-SFM imaging to molecular-scale studies of biological membrane/biological solution interfaces.

研究分野：複合新領域

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 脂質二重膜 生体膜 水和構造 ナノ計測

1. 研究開始当初の背景

生体膜とそれを取り囲む生体液には、脂質・水分子・イオン・生理活性分子など様々な生体分子が存在する。その生体膜と生体液の界面においては、分子間の相互作用により脂質-水分子・脂質-イオンなどの複合体が形成され、それが生体膜の構造・機能に大きな影響を与えていると考えられている。これまで生体膜/生体液界面に形成される複合体の解析には、分光学的手法が用いられてきた。一方、生体膜は脂質・タンパク質などが自己会合し、化学組成や流動性の異なるナノメートルサイズの脂質ドメインが存在するなど、不均一な構造を持つ。生体膜/生体液界面における複合体形成と生体膜機能との関係を理解するためには、脂質ドメインなどの局所領域に形成される水和層やイオン複合体を分子スケールで直接計測できる新しい手法が必要であった。

他方、ナノテクノロジーの進展に伴い発展してきた計測技術をベースに、生命現象の原子・分子分解能計測を目指した分野横断的な研究が行われている。そのなかで原子間力顕微鏡(AFM)は、生体試料を生理溶液環境下で直接計測できるという特徴を持つ。特に周波数変調AFM(FM-AFM)は、2005年に液中環境下での原子分解能観察が可能となった。さらにFM-AFMがもつ液中原子分解能をそのまま利用し、同時に3次元の界面空間に形成される複合体を原子・分子分解能で可視化できる新しいAFM計測法を模索してきた。そして、探針をXYに加えてZ方向にも高速に走査しながら探針先端に働く相互作用力を連続的に計測する3次元走査型原子間力顕微鏡(3D-SFM)を開発するに至った。

2. 研究の目的

近年開発された3D-SFMを生体分子/溶液界面の分子分解能観察へ応用展開することで、これまで議論が困難であった分子レベルでの界面現象と生体分子機能との関係を解明することに大きく寄与できると考えた。特に本研究期間内では、生体膜/生体液の界面に研究対象を絞り、生体膜の組成や流動性とそのナノ局所領域に形成される複合体の実空間分布の関係について分子レベルで解明することを目指した。これを実現するために、以下の研究課題に取り組んだ。

(1) 密閉型3D-SFMの設計・製作：溶液条件を高精度に制御可能な密閉型3D-SFMを製作する。一般的に、観察溶液の蒸発による溶液条件(塩濃度、pH)の変化を抑制するために、0リングなどを用いた密閉セルが用いられるが、機械振動の伝搬パスが増えることでノイズ成分を増大させることや、可動範囲が0リングの変形量に制限されることが大きな問題である。そこで応募者は機械振動の伝搬パスをつくらず、可動範囲を

制限しない新しい発想に基づく密閉型の試料セルを製作・評価する。

(2) 脂質膜/水界面の3D-SFM計測：リン脂質の最も代表的なジパルミトルフوسفアチジルコリン(DPPC)の脂質二重膜を調製し、脂質膜/水界面を3D-SFMで計測する。3D-SFMによって、生体膜/水界面における水和構造の3次元分布を可視化できるか検討する。さらにマイカなど固い材料表面とは異なり、柔らかく揺動表面構造を有する生体分子表面で3D-SFM計測を行なうことで生じる問題点を検証することを目的とした。

(3) 相分離脂質膜の3D-SFM計測：脂質膜の流動性が異なるゲル相/流動相からなる相分離膜や、多層状脂質二重膜を調製し、3D-SFM計測により流動性など膜物性の違いによって生じる3次元力分布の変化を可視化できるか検討した。

3. 研究の方法

(1) 密閉型3D-SFMの設計・製作：観察用液体の蒸発を抑える密閉空間を形成し、スキャナーなどの駆動部と力検出部を機械的に分離するために、液体を用いる液体密閉型セルを考案した。この液体密閉型セルでは、駆動部であるスキャナーを固定する部材とカンチレバーを固定する部材は、密閉用液体のみで接続される。

液体密閉型セルによる観察用液体の蒸発抑制効果を、観察用液体の重量変化を直接計測することで評価した。さらにカンチレバーの変位検出で広範に利用される光てこ法における安定性向上について、垂直方向の変位信号の長時間安定性を評価した。

(2) 脂質膜/水界面の3D-SFM計測：DPPC二重膜をベシクルフュージョン法によりマイカ上に形成した。このDPPC二重膜をHEPES緩衝液中に浸漬し、3D-SFM計測を行った。AFMカンチレバーにはPPP-NCHAD(ナノワールド社製)を用い、自作の低ノイズAFMとコントローラ(ARC2、アサイラムリサーチ)位相同期回路(OC4、ナノニス)を組み合わせた3D-SFMシステムを用いた。

(3) 相分離・多層状脂質二重膜の3D-SFM計測：

DPPC/DOPC相分離膜：DPPC/DOPC相分離膜をベシクルフュージョン法でマイカ上に形成し、緩衝液中で3D-SFM計測を行った。得られた垂直方向の力分布から、長距離力成分の減衰距離と流動性の関係について考察した。

DPPC多層状脂質膜：緩衝液の含有イオン種・濃度を調整することで、DPPC二重膜が複数層重なった多層状DPPC二重膜

を形成し、そのステップ近傍で3D-SFM計測を行った。

4. 研究成果

(1) 密閉型3D-SFMの設計・製作：液体密閉型セルを試作し、観察用液体の蒸発抑制効果を評価した(図1)。その結果、液体密閉により観察用液体の蒸発は著しく抑制され、40時間計測を続けても観察用液体の重量はほとんど変化しなかった。

この観察用液体の蒸発抑制は、AFM計測の安定性にも大きく向上することが期待される。多くの液中AFM計測では、電解質イオンが溶解した水溶液を観察用溶液として使用するが、水の蒸発により溶解物が濃縮される。その濃縮により観察用液体の屈折率が変化すると、カンチレバーの変位量を検出するレーザー光の光路が変化してしまう。実際に、開放型AFMセルを用いた場合、垂直方向の変位信号が大きく変化する(図2)。一方、液体密閉型AFMセルを用いた場合、変位信号が長時間一定に保たれることが分かった。

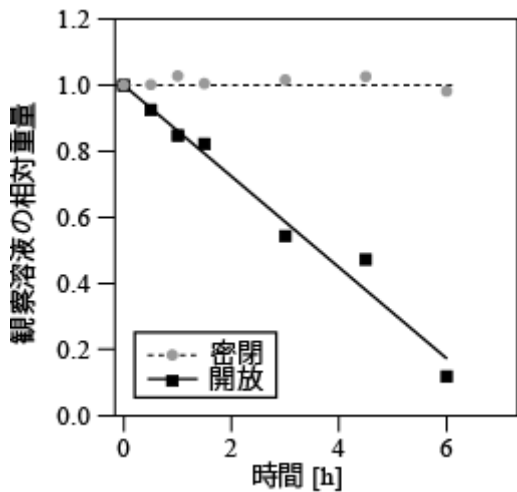


図1

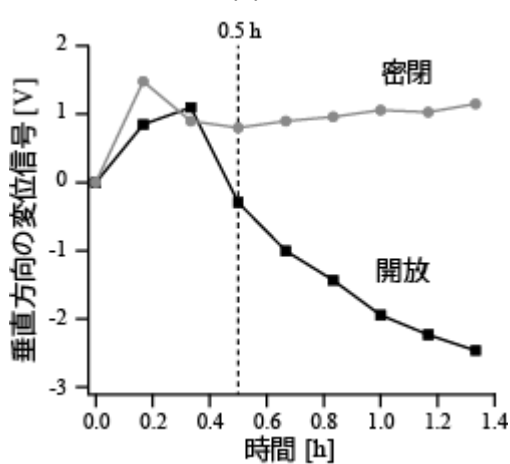


図2

ここで開発した液体密閉型AFMセルを用いて、マイカの液中AFM観察を周波数変調(FM)モードで行った結果、長時間安定に原子分解能像が得られることが分かった

(図3)。この成果は、液体密閉型セルが3D-AFMのみならず、従来のAFMイメージングの安定性向上にも極めて有用であることを示している。

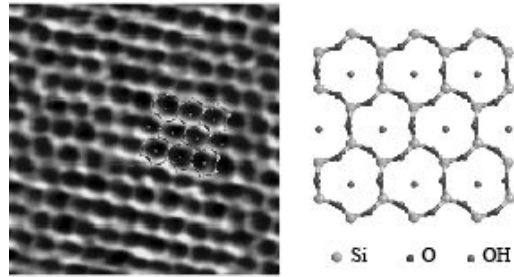


図3

(2) 脂質膜/水界面の3D-SFM計測：DPPC/HEPES緩衝液界面で得られた3D-SFM像から、それぞれ異なる方向のDPPC分子列に沿ってZ断面を取得した(図4aおよび4b)。Z断面下部の力分布は、脂質頭部の空間分布を反映することがフォース-距離曲線(図4c)の詳細な解析から分かった。傾きを持った特徴的な力分布が図4aのみで現れており、これは脂質頭部がある一定方向に傾いた空間分布を有することを示している。

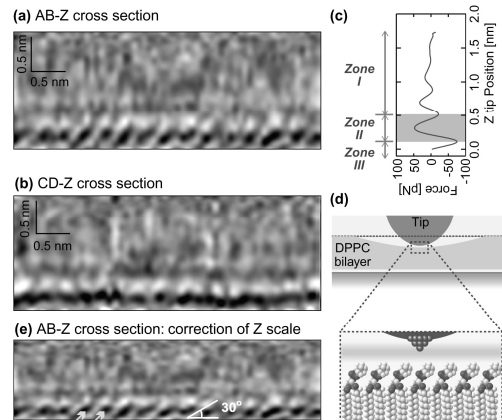


図4

脂質二重層はAFM探針よりも非常に柔らかいため、探針-試料間に働く長距離斥力により変形する(図4d)。この脂質二重層の変形によって生じる3D-SFM像のひずみを定量的に補正した。その結果、図4aで可視化された力分布は、脂質膜に対して30°傾いていることが分かった(図4e)。これは既にMDシミュレーションで報告されている結果と良く一致する。これらの結果は、3D-SFMが高い構造自由度を有する脂質頭部の3次元分布を可視化できることを示している。

この結果は、3D-SFM計測を生体分子/水界面の解明に応用した場合、水和構造だけではなく、分子表面に存在する揺動構造の3次元分布も可視化できる可能性を示している。今後、3次元力分布のコントラストメカニズムなど、より定量的な理解を進める必要がある。

(3) 相分離・多層状脂質膜の3D-SFM計測

DPPC/DOPC相分離膜および多層状脂質膜の境界領域を3D-SFM計測し、そこで得られた垂直方向の力分布から、長距離力成分の減衰距離や流動性の関係について検討した。

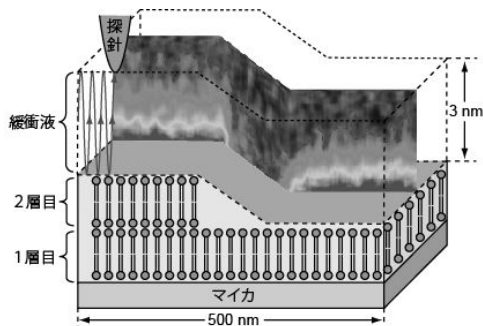


図5

図5はマイカ上に形成した多層状DPCC二重膜を3D-SFM計測している模式図である。この計測により、図6で示す形状像と3D-SFM像が得られる。各XY位置におけるZ方向のカプロファイルに対して、DLVO理論をもとにフィッティング解析を行った。その結果、表面電荷密度や脂質膜の立体力に起因する減衰距離の差をナノスケール分解能で可視化できることを示した(図6)。これらの結果は、3D-SFMが表面揺動構造や水和構造の3次元分布を可視化する構造計測に留まらず、3次元力分布データを詳細に解析することで、電荷密度や脂質膜の流動性などを同時計測できることを示している。

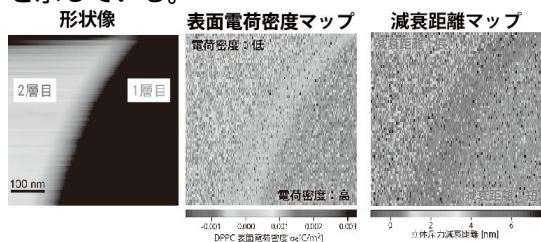


図6

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3件)

H. Asakawa, Y. Katagiri, T. Fukuma, Closed Fluid Cell with Liquid-Sealing Mechanism for Stable and Flexible Operation of Liquid-Environment Atomic Force Microscopy, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, 52, 2013, 110109 (5 Pages).

DOI: 10.7567/JJAP.52.110109

E. T. Herruzo, H. Asakawa, T. Fukuma, R. Garcia, Three-dimensional

quantitative force maps in liquid with 10 piconewton, angstrom and sub-minute resolutions, Nanoscale, 査読有, 5, 2013, 2678-2685.

DOI: 10.1039/C2NR33051B

H. Asakawa, S. Yoshioka, K. Nishimura, T. Fukuma, Spatial Distribution of Lipid Headgroups and Water Molecules at membrane/Water Interfaces Visualized by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy, ACS Nano, 査読有, 6, 2012, 9013-9020.

DOI: 10.1021/nn303229j

〔学会発表〕(計9件)

小林大貴、浅川雅、福間剛士、3次元走査型力顕微鏡による多層状脂質二重膜のナノスケール計測、第61回応用物理学会春季学術講演会 青山学院大学 2014年3月19日

H. Asakawa et al., Nanoscale flexible chains at solid/liquid interfaces visualized by 3D-SFM, 16th International Conference on non-contact Atomic Force Microscopy(nc-AFM2013) 6 Aug., 2013, Maryland, USA

鈴木啓太、浅川雅、福間剛士、周波数変調AFMによるリン脂質混合膜における相分離構造の3次元計測、第60回応用物理学会春季学術講演会、2013年3月28日、神奈川県立神奈川工科大学、神奈川県

浅川雅、3次元走査型原子間力顕微鏡による脂質膜/水界面の分子分解能イメージング、第22回インテリジェント材料/システムシンポジウム、2013年1月8日、東京女子医科大学、東京都

浅川雅、高分解能原子間力顕微鏡によるナノバイオ界面の3次元空間計測、第4回NMMSセミナー、2013年3月1日、東京大学、東京都

H. Asakawa, 3D scanning force microscopy for subnanometer-scale investigations on biological interface, Catalysis Research Center(CRC) International Symposium, New Challenges on the Bio-interfaces: Structures and Dynamics, 6 Feb., 2013 Hokkaido Univ., Hokkaido

浅川雅、液中周波数変調AFMのナノバイオ界面計測への応用、第73回応用物理学会学術講演会、2012年9月11日、松山大学、愛媛県

H. Asakawa et al., Visualizing Molecular Arrangements at the Surface of Cylindrical Protein Structures by FM-AFM in Liquid, 14th International Conference on Non-Contact Atomic

Force Microscopy (NC-AFM2011), 19
Sep., 2011, Lindau, Germany
浅川雅、液中高分解能原子間力顕微鏡の
開発と生体分子計測への応用 生物物
質科学フォーラム、2012年3月9日、北
陸先端科学技術大学院大学、石川県

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：密閉型 AFM セル
発明者：福間剛士、浅川雅、片桐由智
権利者：金沢大学
種類：特許権
番号：PCT/JP2012/007326
出願年月日：2012年11月15日
国内外の別：国内・外国

〔その他〕

ホームページ等
<http://fukuma.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 雅 (ASAKAWA, Hitoshi)
金沢大学・理工研究域バイオ AFM 先端研究
センター・助教
研究者番号：90509605