独立行政法人
科学技術振興機構
Japan Science and Technology Agency

JST理事長定例記者説明会
（JST東京本部別館，2014年5月19日）

Kyoto University

活きたナノ世界を観る

– 液中AFMがもたらす原子分解能の世界 –

京都大学 工学研究科 電子工学専攻
山田 啓文

JST先端計測分析技術・機器開発プログラム
「大気中・液中で動作する原子分解能分析顕微鏡」

チームリーダー：粉川 良平（(株)島津製作所）
サブリーダー：　山田 啓文（京都大学）
担当開発総括：　澤田 嗣郎（東京大学名誉教授）

説明概要

★生理環境下で動作する原子間力顕微鏡による生体分子の直接可視化

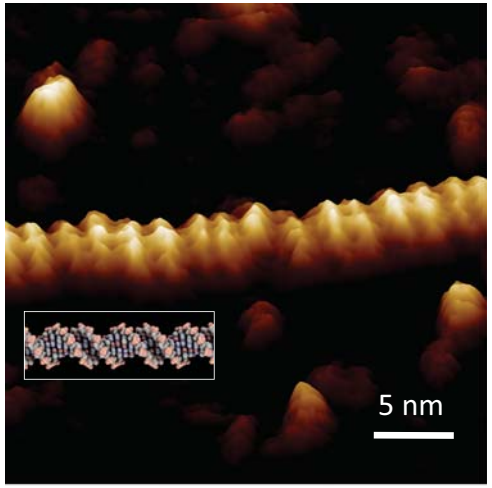
周波数変調原子間力顕微鏡 (Frequency modulation AFM: FM-AFM)

（液中動作で原子・分子スケールの解像力）

→ ライフサイエンス，バイオナノテクノロジー

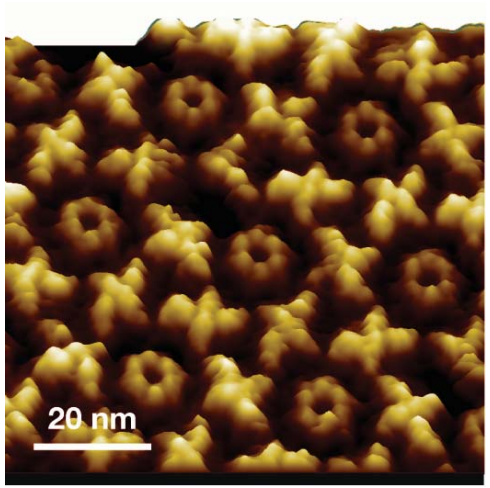
→ 固液界面研究（電池電極解析，イオン吸着，地質探査，生化学）

DNA二重らせん構造



S. Ido, K. Kimura *et al.*,
ACS Nano 7, 1817 (2013).

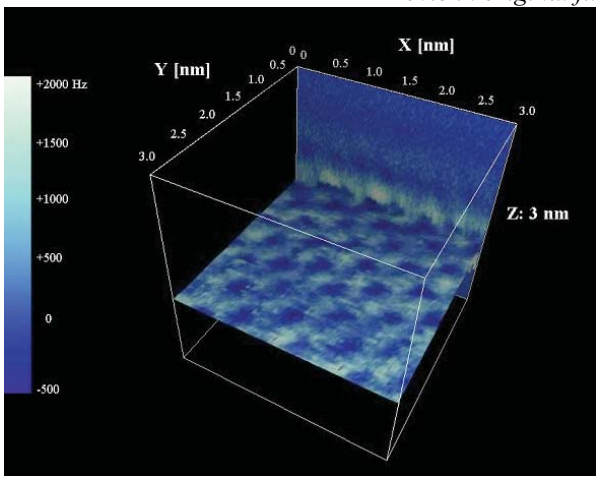
免疫グロブリンG抗体



S. Ido, H. Kimiya *et al.*,
Nature Materials 13 264 (2014).

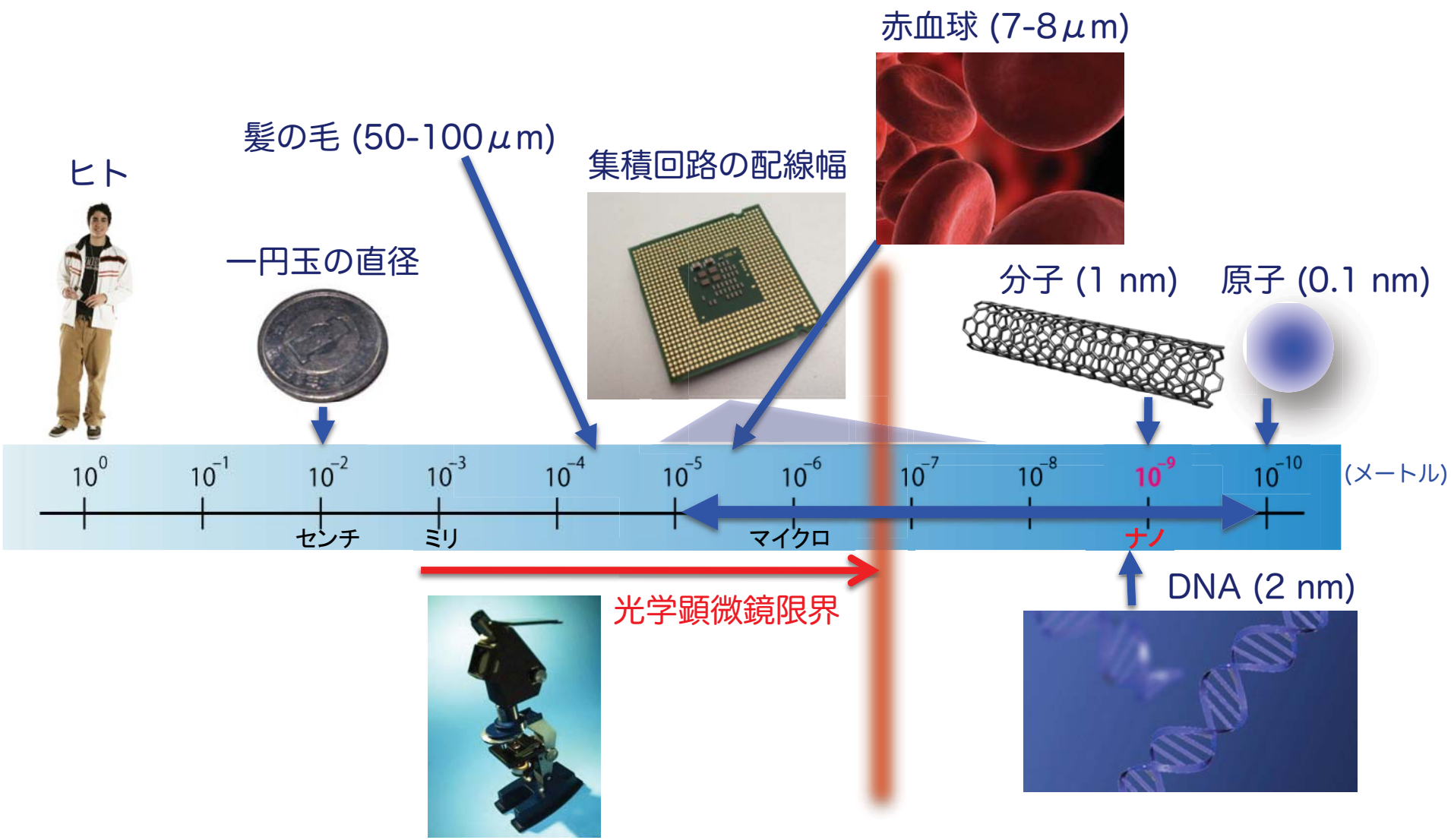
固液界面による水分子の３次元分布可視化

Movie in original file



K. Kobayashi, N. Oyabu *et al*,
J. Chem. Phys. 138, 184704 (2013).

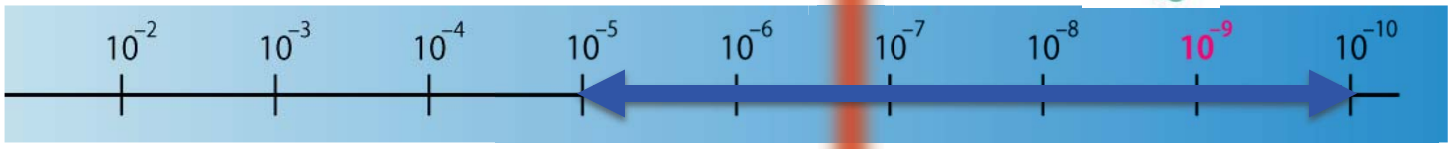
ナノメートルの世界


赤血球 (7-8μm)
髪の毛 (50-100μm)
集積回路の配線幅
ヒト
一円玉の直径
分子 (1 nm)
原子 (0.1 nm)
10^{0}
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
10^{-6}
10^{-7}
10^{-8}
10^{-9}
10^{-10}
(メートル)
センチ
ミリ
マイクロ
ナノ
光学顕微鏡限界
DNA (2 nm)

ナノメートル世界の観察

タンパク質
(~5 nm)

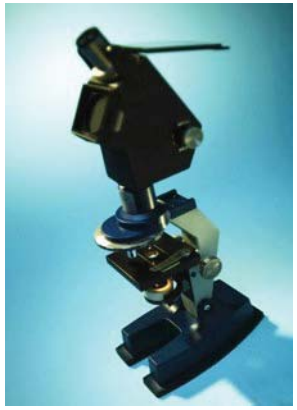
DNA (2 nm)



(メートル)

光学顕微鏡限界

光学顕微鏡



原子間力顕微鏡(AFM)

生理環境下観察！
(活きた“*in vivo*”試料)

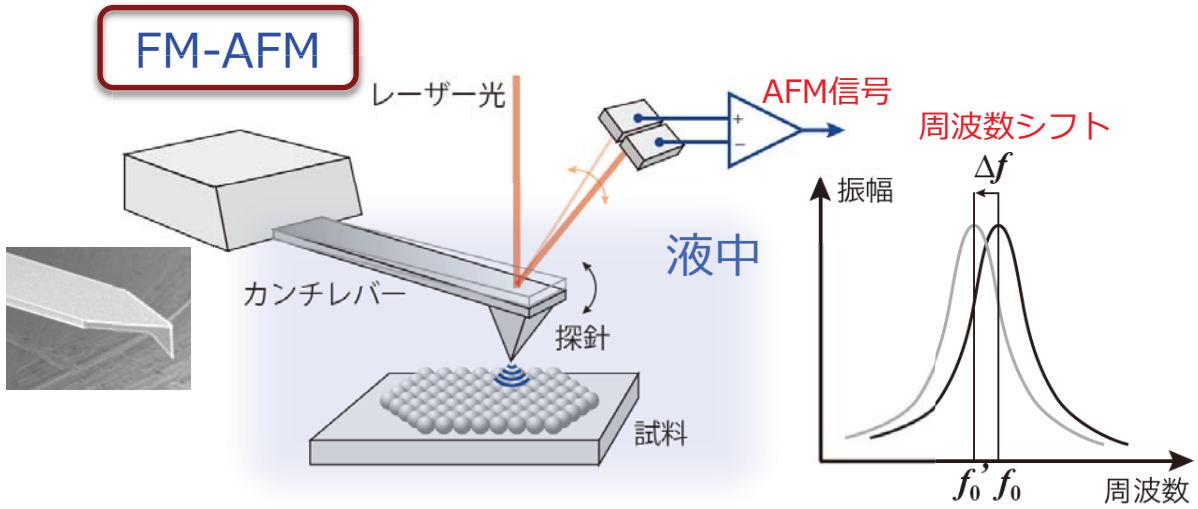
液中

真空中

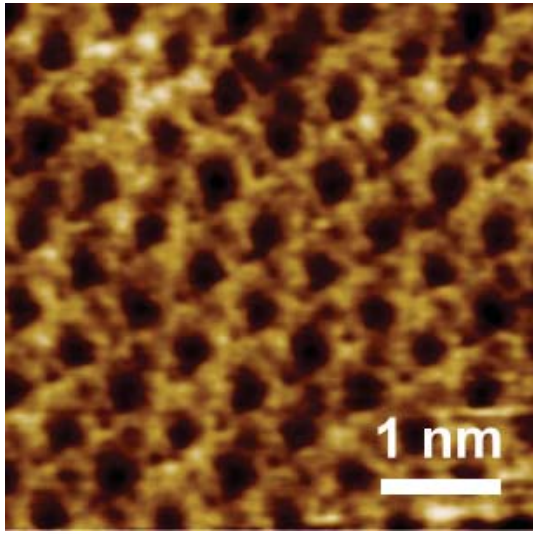
電子顕微鏡

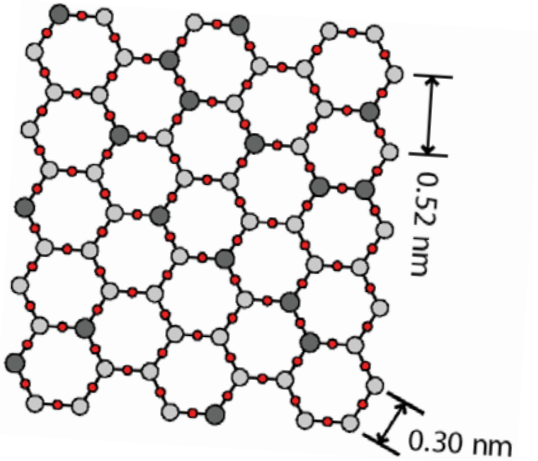
非生理環境
(乾燥/金属コート試料)

液中で動作する高分解能FM-AFMの開発



白雲母 (マイカ) 基板表面の
液中原子分解能観察





液中高分解能AFMの開発

JST先端計測分析技術・機器開発プログラム

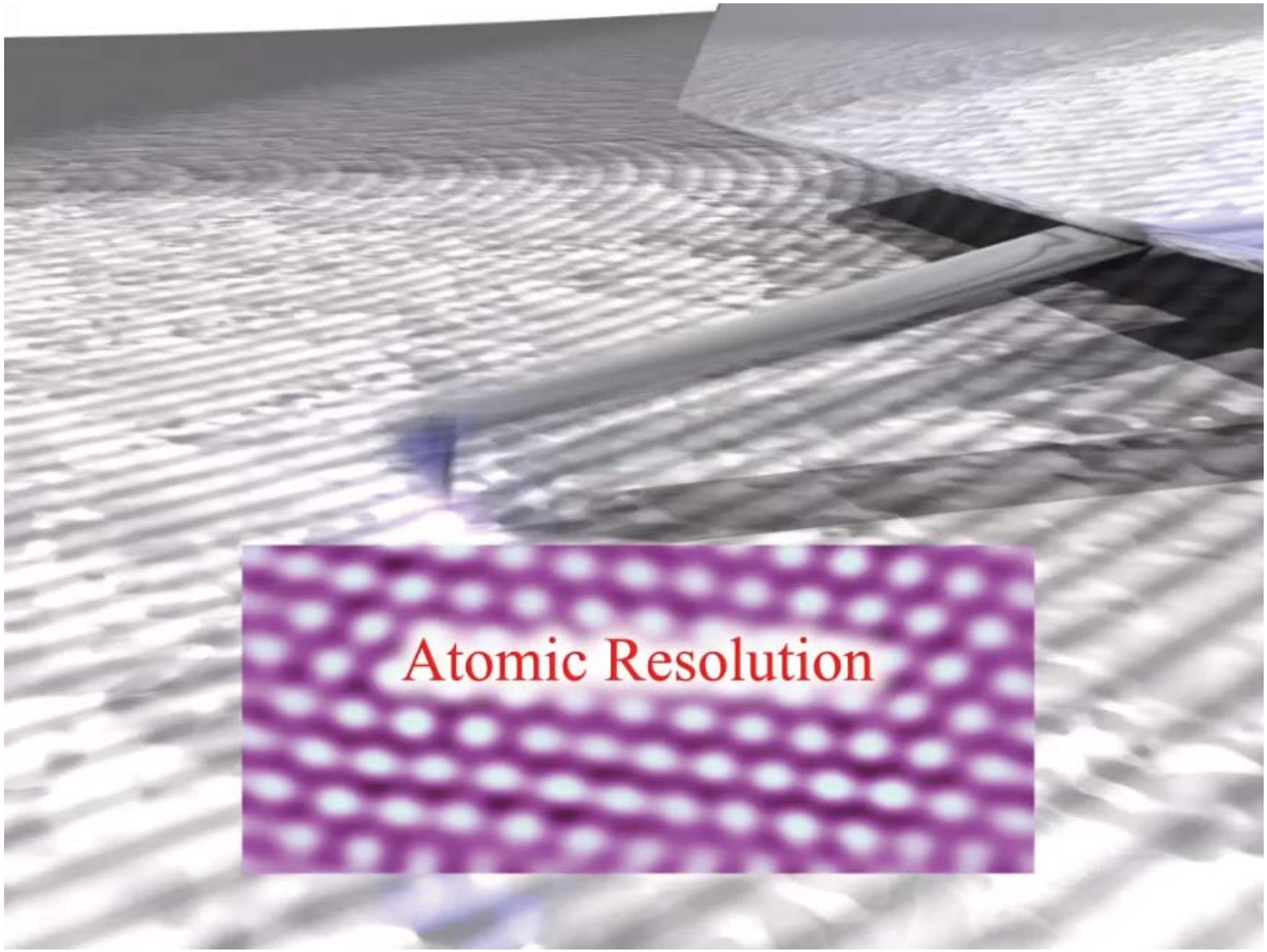
高感度・低雑音化に成功

結晶材料等の原子分解能観察

生体試料への応用に成功！
・試料調整・イメージング条件の最適化

DNA・タンパク質の分子分解能観察

Frequency modulation AFM (FM-AFM)



Movie in original file

高分解能走査型プローブ顕微鏡の開発 (島津製作所)

SHIMADZU
Excellence in Science

JST先端計測分析技術・機器開発プログラム
「大気中・液中で動作する原子分解能分析顕微鏡」

SPM-8000FM

(2014・1月リリース)

チームリーダー：粉川 良平（(株)島津製作所）
サブリーダー：　山田 啓文（京都大学）
担当開発総括：　澤田 嗣郎（東京大学名誉教授）

DNA二重らせん構造の液中高分解能観察

S. Ido, K. Kimura, N. Oyabu, K. Kobayashi, M. Tsukada, K. Matsushige, H. Yamada, *ACS Nano* 7, 1817 (2013).

DNA研究の背景１：生体分子の構造と機能の関係

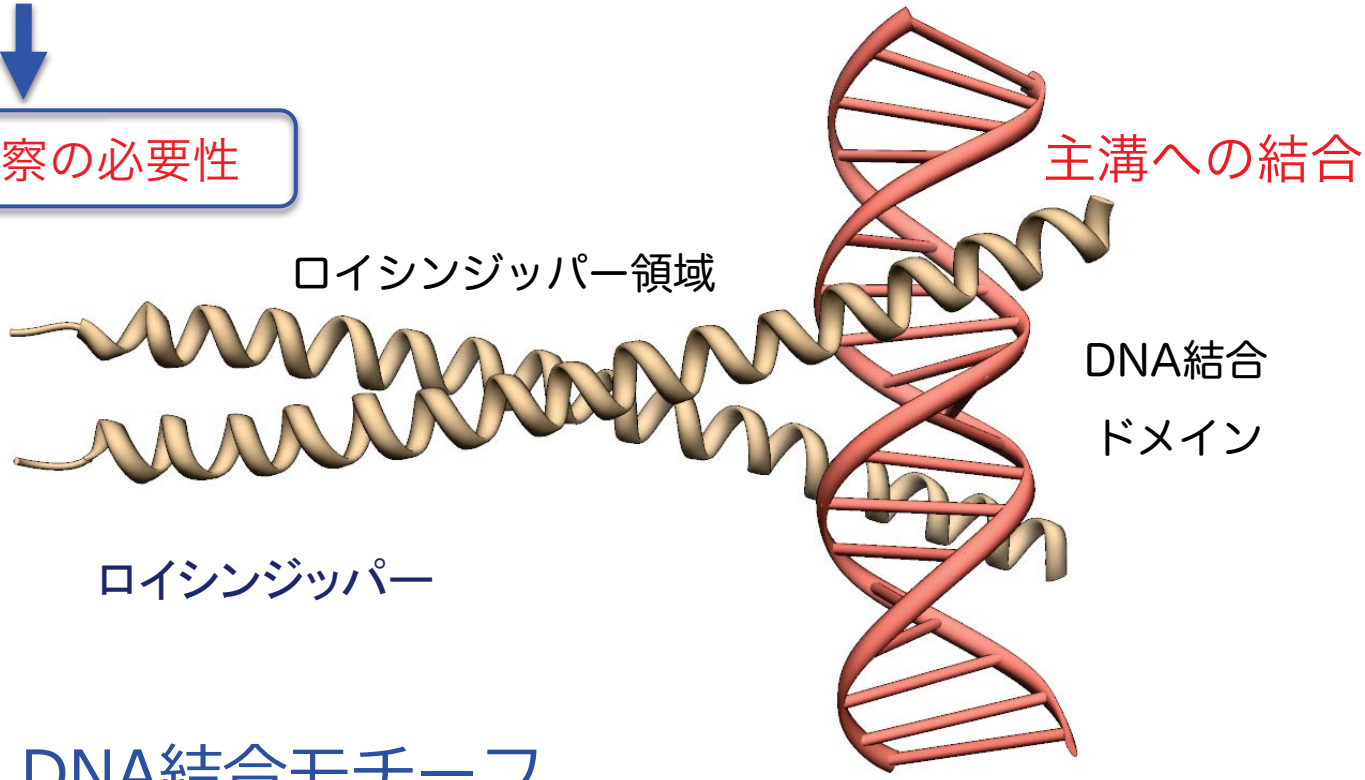
生体分子の機能発現の解明

・DNAにおける遺伝子発現機構詳細の解析

遺伝子発現調節タンパク質分子
(DNA-複合タンパク質) → 複製・転写・修復

↓

直接観察の必要性

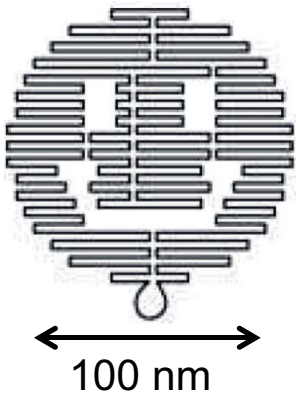


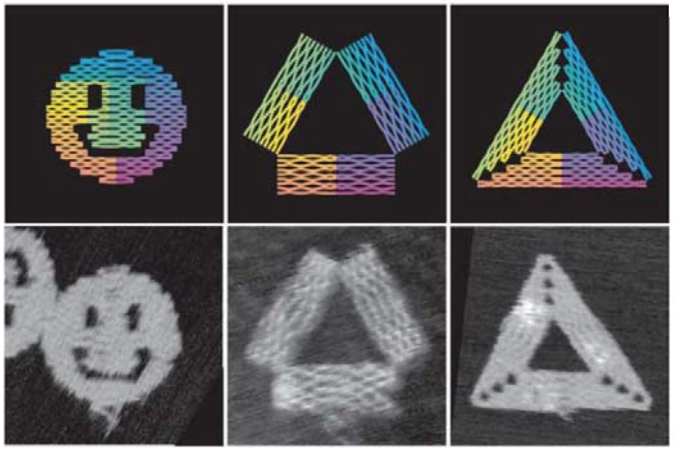
DNA結合モチーフ

DNA研究の背景２：ナノバイオテクノロジーの発展

DNAオリガミ (DNAナノテクノロジー)

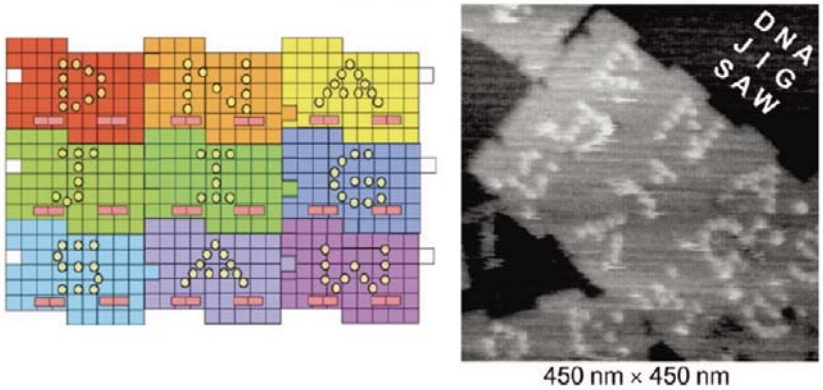
→ 自己組織パターニング，バイオテンプレート
DNAコンピューティング，DNAチップ → DNA結合様式の可視化





P. W. K. Rothemund *Nature* **440,** 297 (2006).

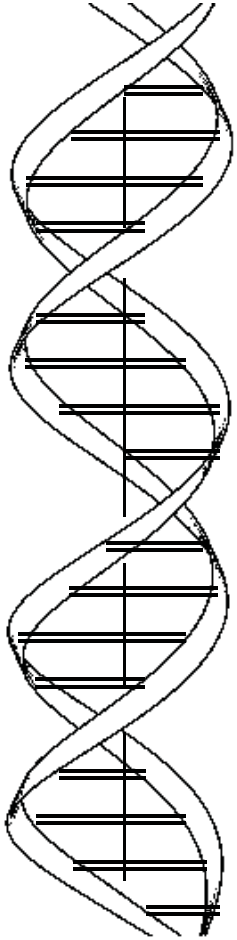
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, copyright (2006).



A. Rajendran *et al. ACS Nano* **5,** 665 (2011).

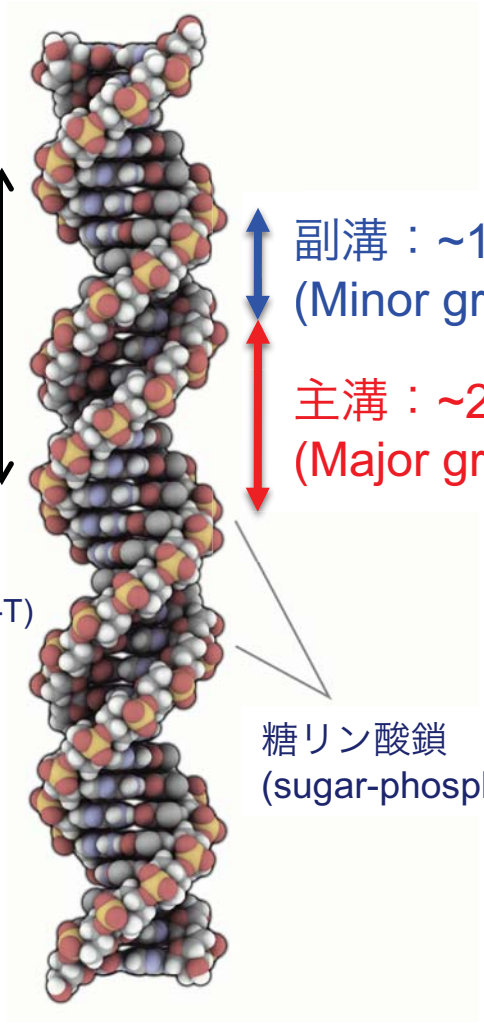
Reprinted with permission from (*ACS Nano* **5,** 665, 2011, A. Rajendran *et al*). Copyright (2011) American Chemical Society.

二重らせんDNA (B-DNA) の基本構造



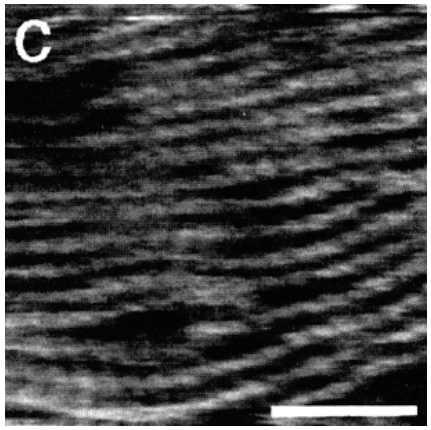
Watson-Crick Model

J. D. Watson & F. H. C. Crick
Nature **171,** 737-738 (1953).

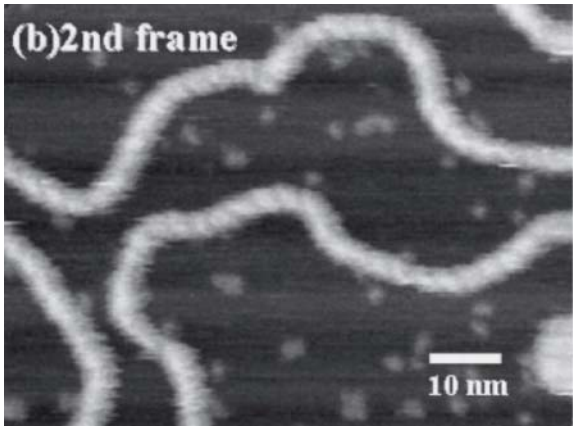


AFMによるDNAの液中観察 (これまでの研究事例)

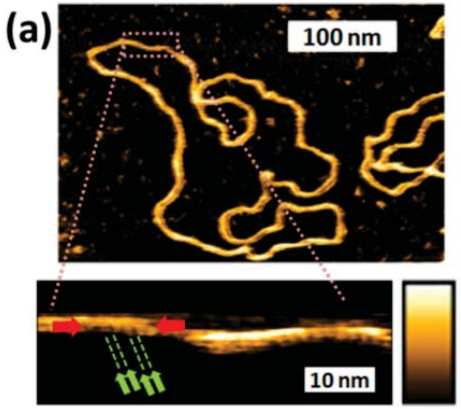
かろうじてらせんピッチが見える
（主溝・副溝は見えない）



J. Mou *et al. FEBS Lett.*
371, 279 (1995).

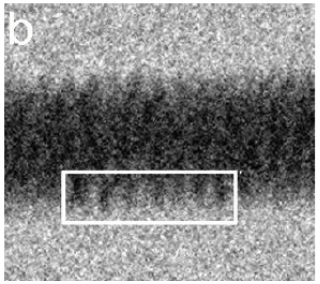


M. Kitazawa *et al. JJAP*
50, 08LB14 (2011).
Copyright (2011) Japan Society of Applied Physics



C. Leung *et al. Nano Lett.*
12, 3846 (2012).

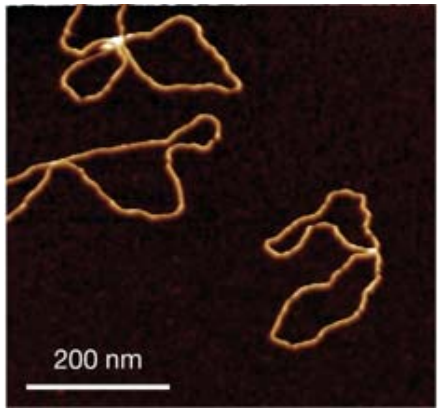
参考)
電子顕微鏡によるDNAバンドル観察
(DNA７本のバンドル)

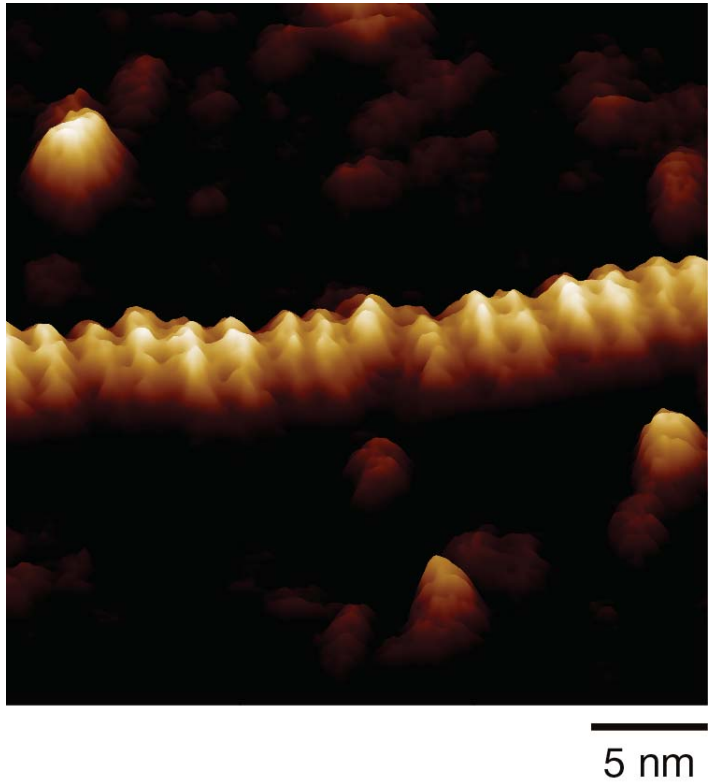


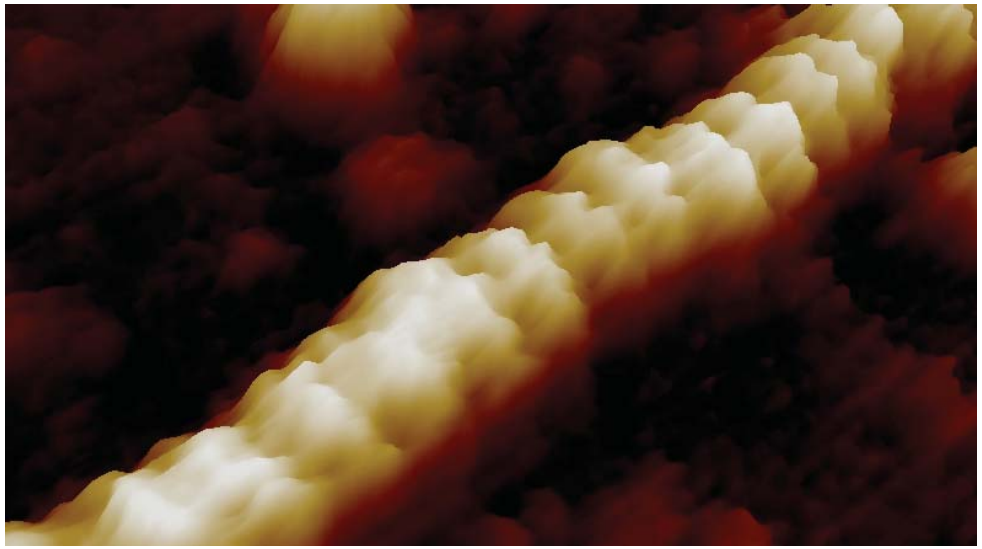
Francesco Gentile *et al.*
Nano Lett. **12**, 6453 (2012).

Reprinted with permission from (*Nano Lett.* **12,** 3846, C. Leung *et al,* and *ibid* **12**, 6453, F. Gentile *et al*). Copyright (2012) American Chemical Society.

プラスミドDNA高分解能液中FM-AFM像



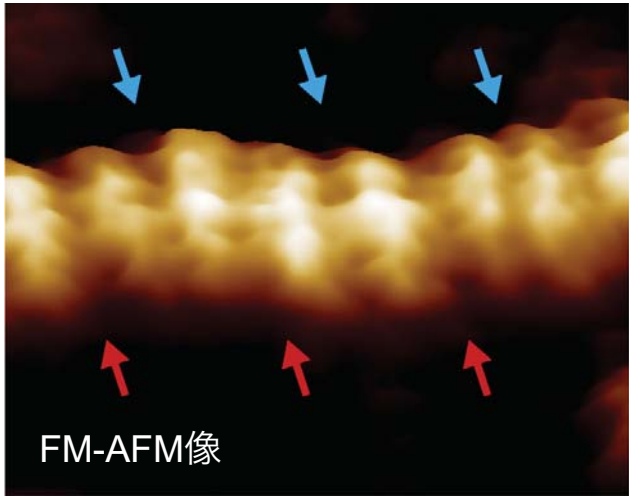


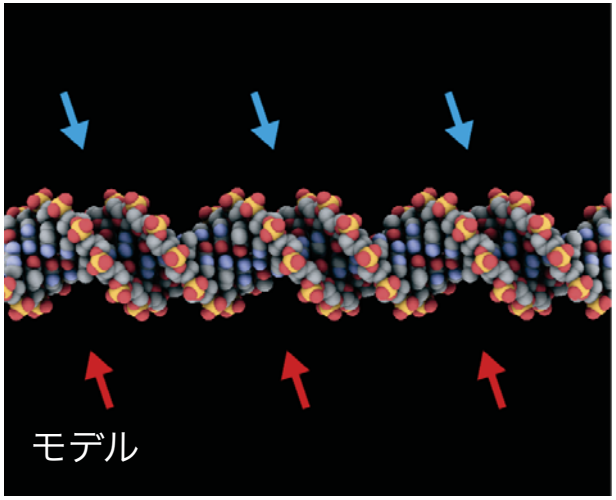


Movie in original file

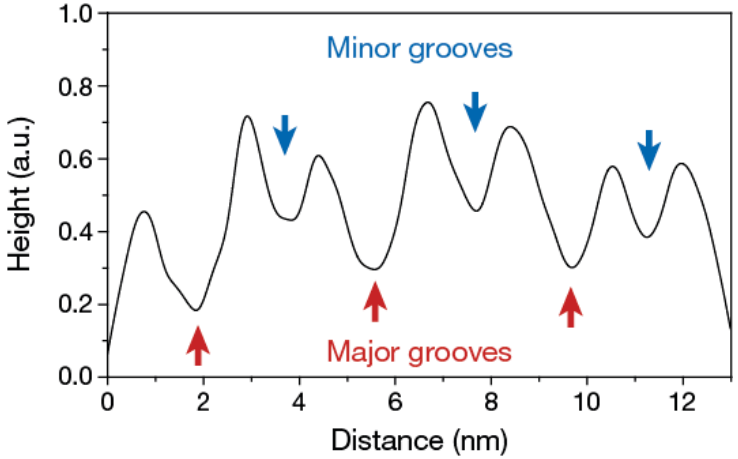
プラスミドDNA部分拡大像

→ 主溝 (Major groove)　→ 副溝 (Minor groove)

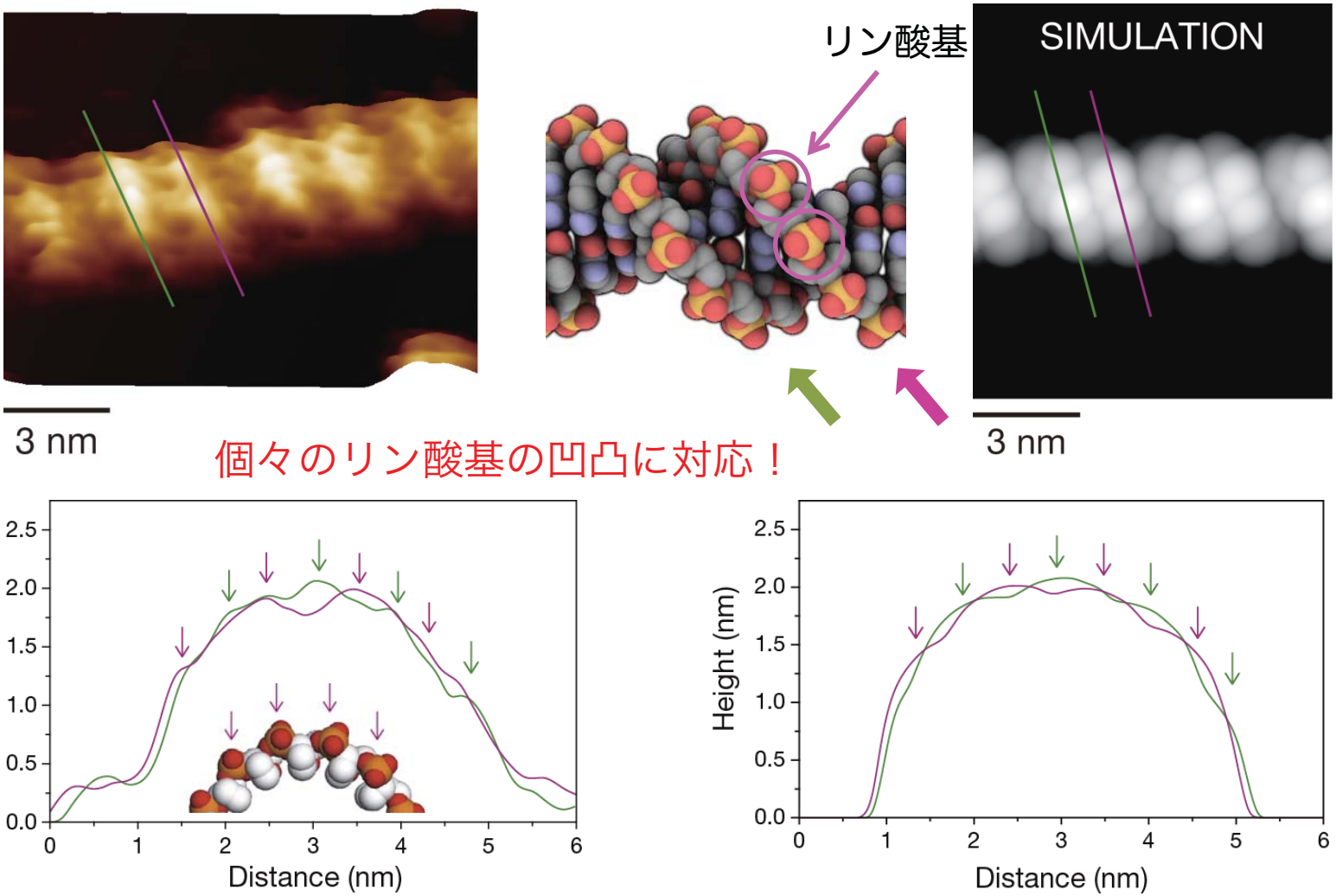




DNA鎖に沿っての凹凸断面プロファイル

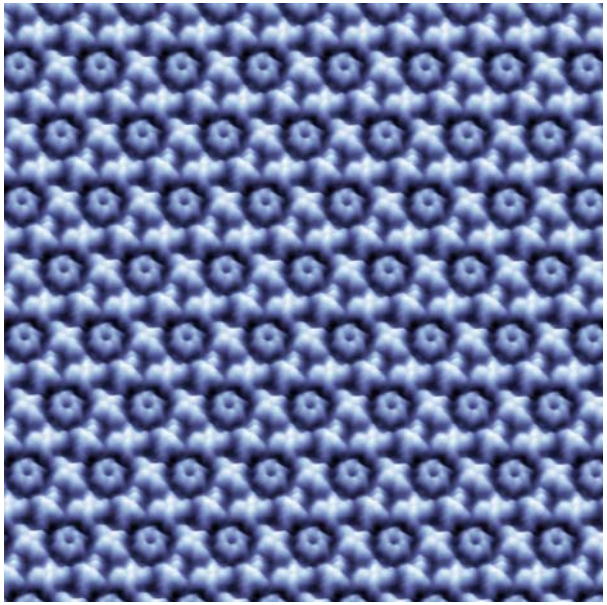


実験とシミュレーションの比較



抗体分子の構造・機能の直接可視化および６量体・２次元結晶形成の発見

– パナソニック(株)・木宮氏との共同研究 –

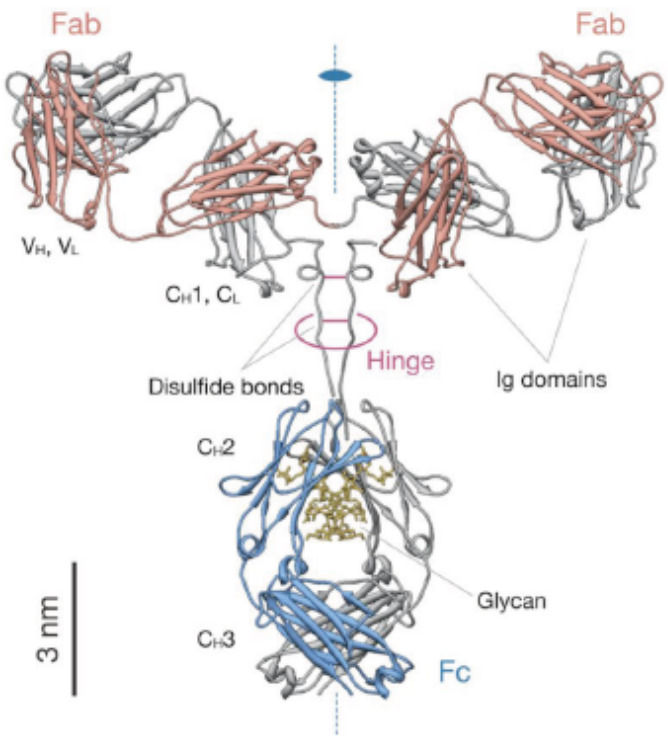


S. Ido, H. Kimiya, K. Kobayashi, H. Kominami, K. Matsushige, H. Yamada, *Nature Materials* 13 264 (2014).

抗体 (免疫グロブリン) 分子の基本構造

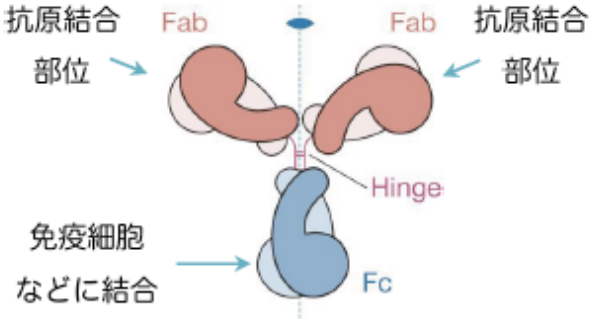
免疫グロブリン (Ig: Immunoglobulin)
5つのクラス(G, M, A, D, E)

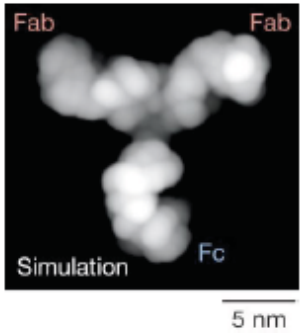
免疫グロブリンG (immunoglobulin G: IgG)



- Fab (fragments, antigen-binding) 領域 (2か所)
- Fc (fragment, crystallizable) 領域 (1か所)
- Hinge 領域 (可動性の高いペプチド鎖)

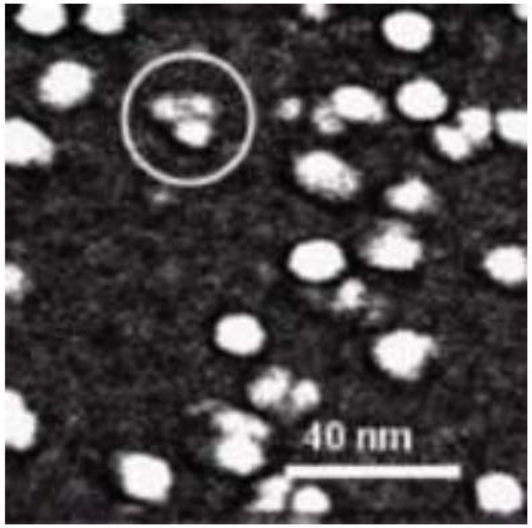
予測AFM像に基づくIgG分子の粗視化モデル





抗体分子のAFM観察 (先行研究例)

大気中におけるIgG抗体分子観察例



S. Patil et al. *J. Mol. Recognit*. **20**, 516 (2007).

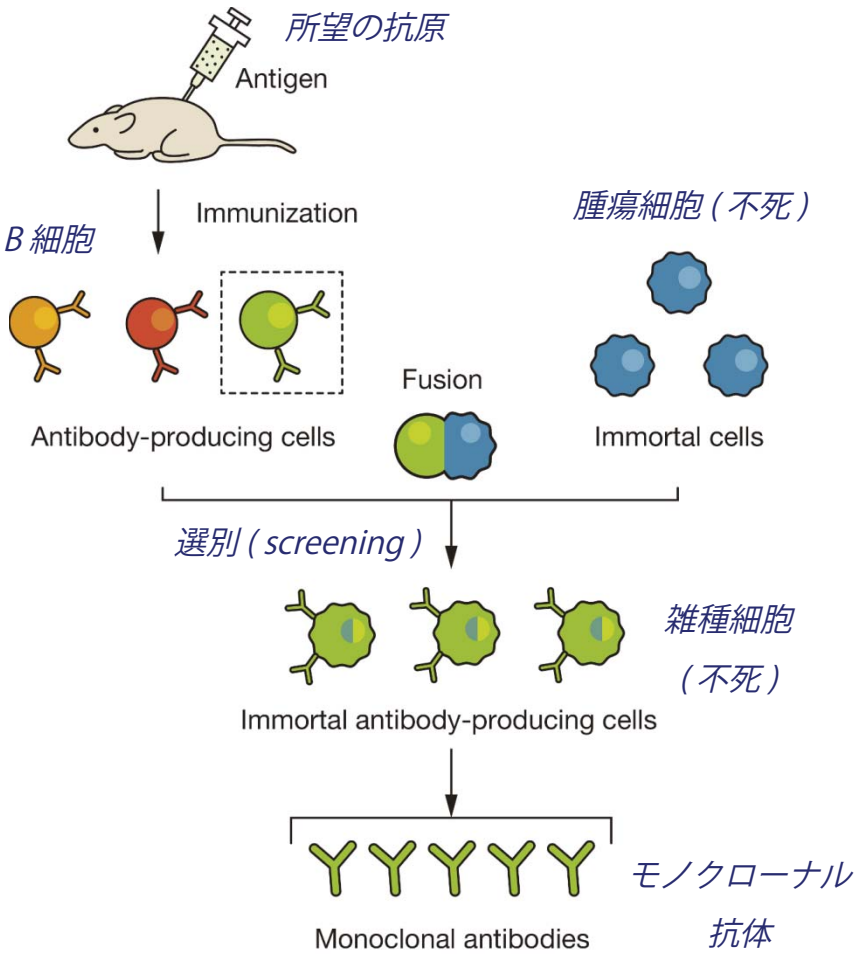
Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

抗体分子の特徴的なＹ字構造を３つの輝点として捉えた観察例はあるが,

サブ分子スケールでの構造については不明

Biological sample

Monoclonal antibodies specific to HSA



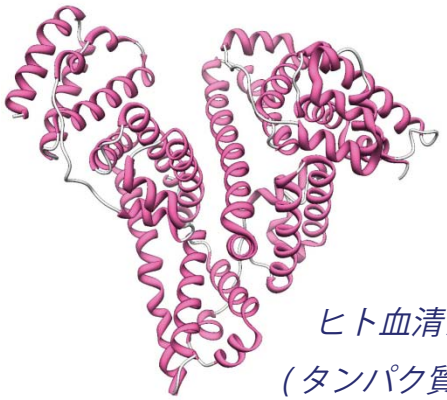
Polyclonal

→ 多様な異物を認識 (抗原結合部位の構造多様性)

Monoclonal

→ 単一の抗原 (epitope) を認識する抗体のコピー

- Antigen: human serum albumin (HSA)

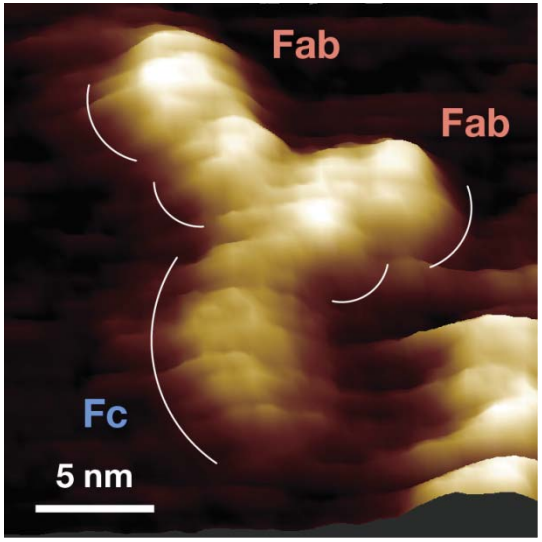


ヒト血清アルブミン
(タンパク質分子の一種)

Antibody structure in $ZnCl_2$ solution

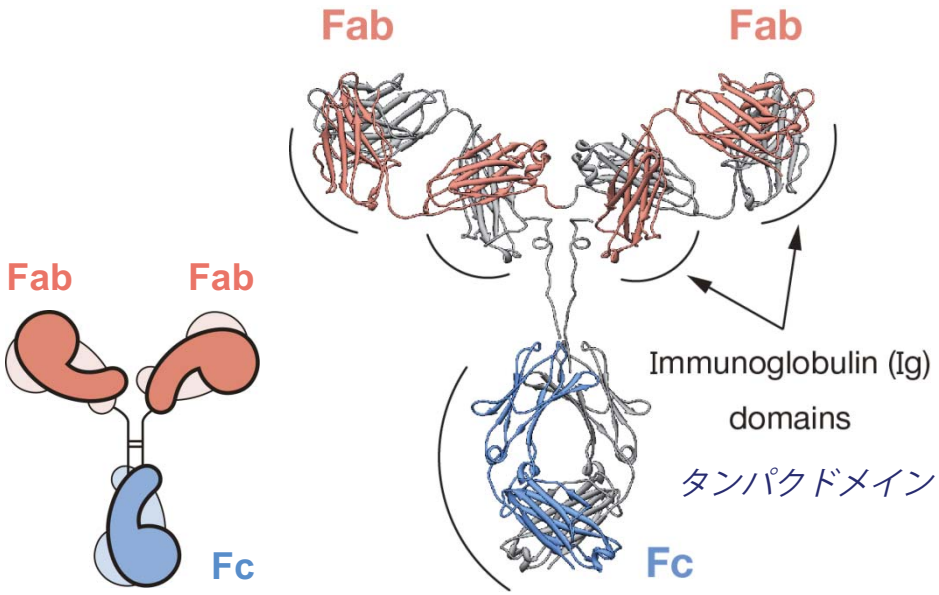
Y-shaped structure (antibody monomer)

FM-AFM image in liquid



(mica substrate)

基板から測った高さの差 (約 0.7 nm) から
Fab / Fc 領域を識別可能



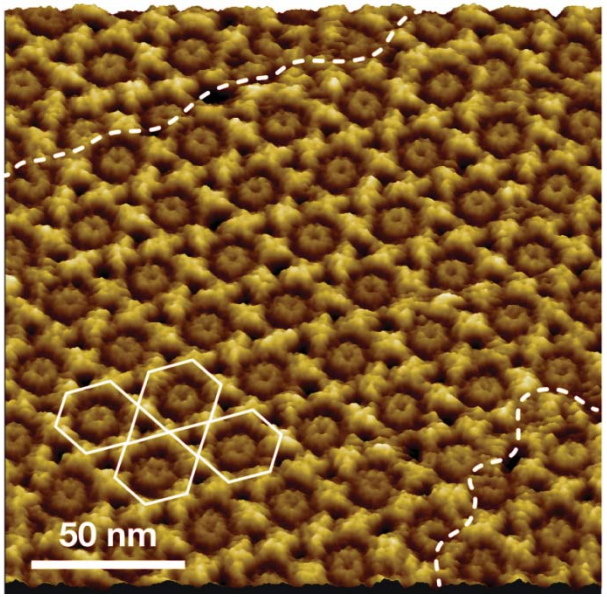
Fab 上の輝点はタンパク質ドメイン
(免疫グロブリン (Ig) ドメイン) に対応

Antibody structure in $MgCl_2$ solution

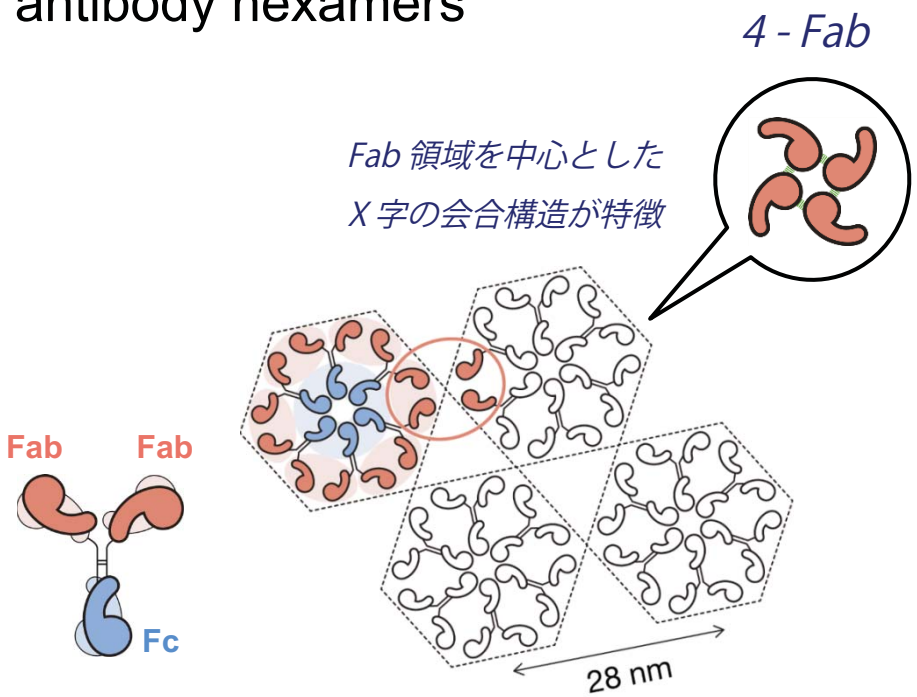
(*condition of the high surface concentration of antibodies)

2D crystal of antibody hexamers

FM-AFM image in liquid



(mica substrate)



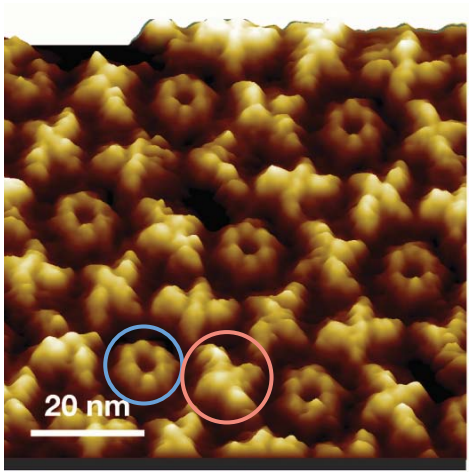
Fab-Fab interactions → 2D crystal formation

Fab 間の引力的な相互作用による結晶化

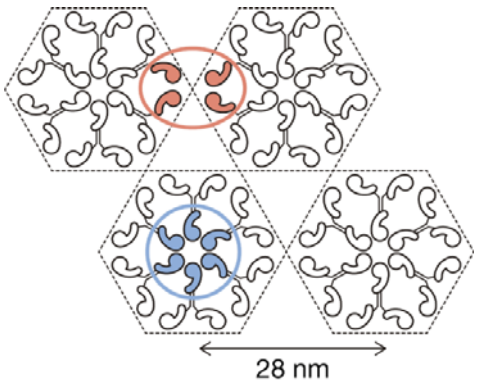
（6 量体構造の安定化にも寄与）

High-resolution FM-AFM images

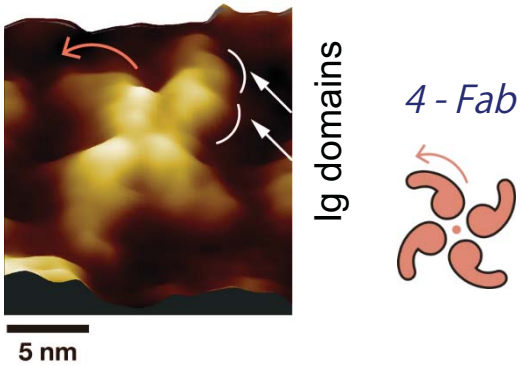
Submolecular structure of the antibody crystal



(mica substrate)

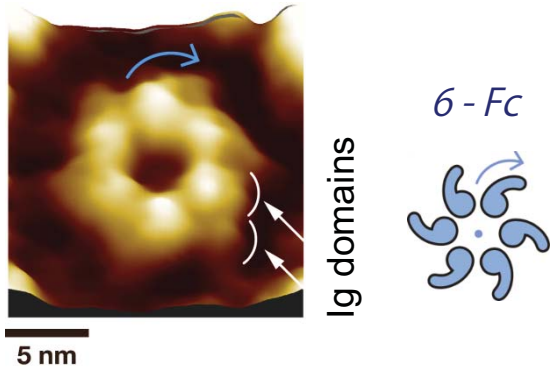


1. 4-Fab assembly



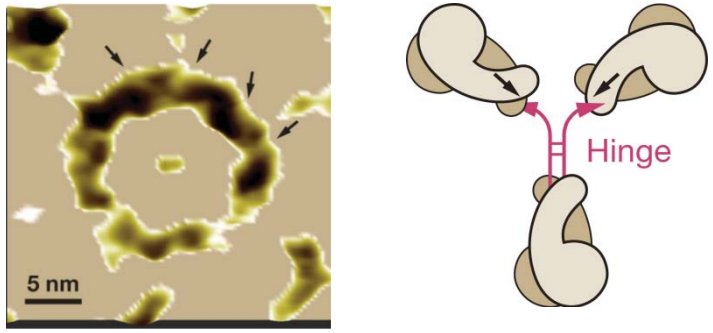
左巻き X 字構造 (Fab-Fab 相互作用)

2. 6-Fc assembly



右巻き環状構造 (Fc-Fc 相互作用)

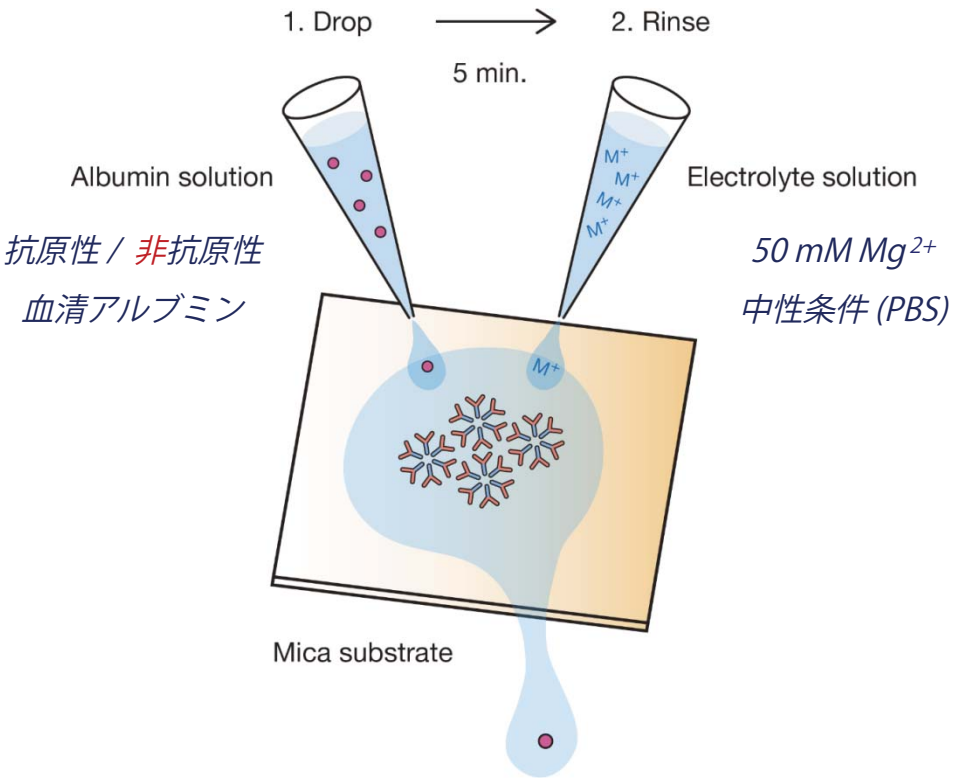
3. Hinge regions



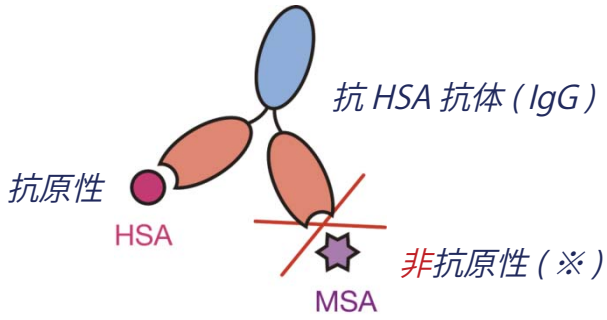
ヒンジ領域の枝分かれしたポリペプチド鎖 1 本を分解して観察

Imaging of antibody-antigen interaction

Sample preparation for FM-AFM



抗体分子の２次元結晶形成を確認したうえで
抗原性・非抗原性の血清アルブミン分子を結晶表面に作用



Antigenic serum albumin
(human serum albumin: HSA)

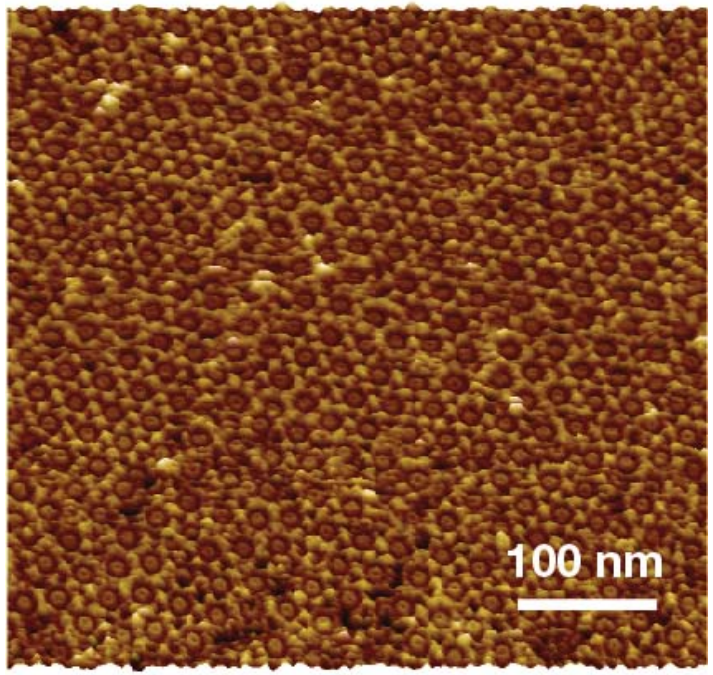
Non-antigenic serum albumin
(mouse serum albumin: MSA) ※

※ 非特異的な吸着の有無を確認する目的

2D antibody crystals with non-antigenic albumin (MSA)

Before adding MSA

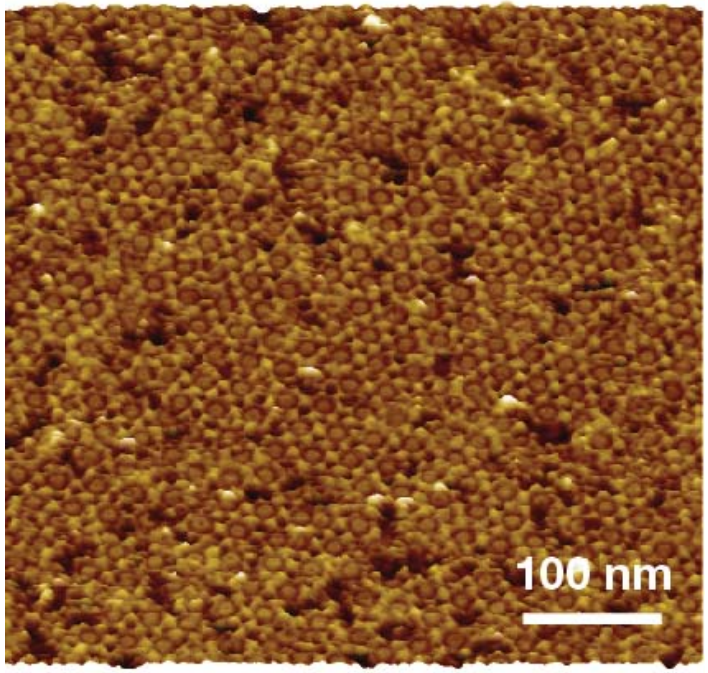
FM-AFM image in liquid



(mica substrate)

After adding MSA (0.5 μM)

FM-AFM image in liquid



(mica substrate)

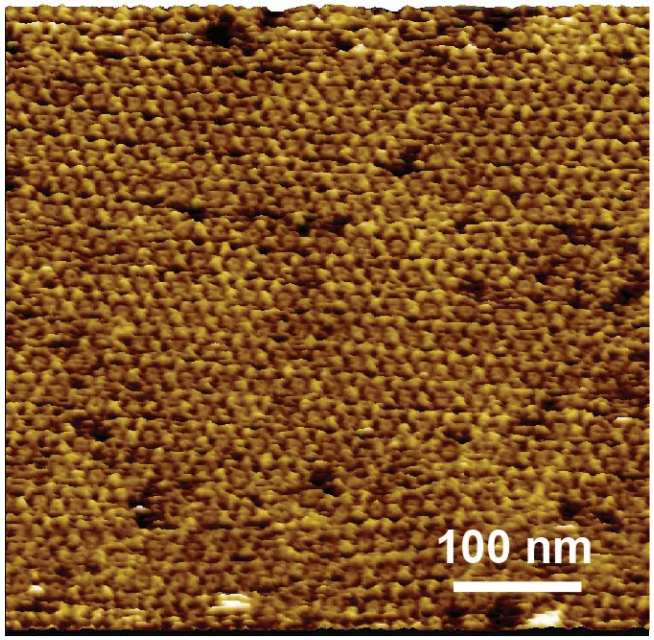
結晶表面への (非特異) 吸着分子なし

(わずかな欠陥の増大は基板のリンスの影響)

2D antibody crystals with antigenic albumin (HSA)

Before adding HSA

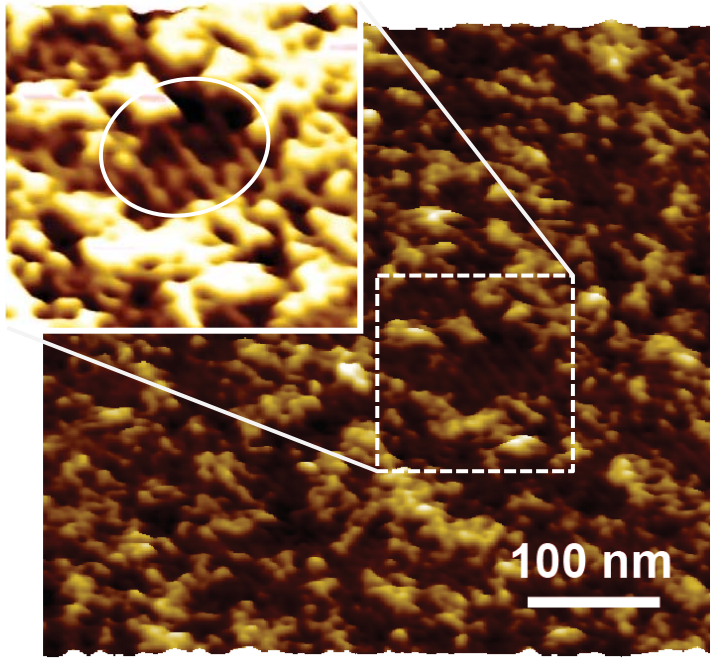
FM-AFM image in liquid



(mica substrate)

After adding HSA (0.5 μM)

FM-AFM image in liquid



(mica substrate)

抗体２次元結晶表面に多数の吸着分子を確認

（２次元結晶は破壊されていない）

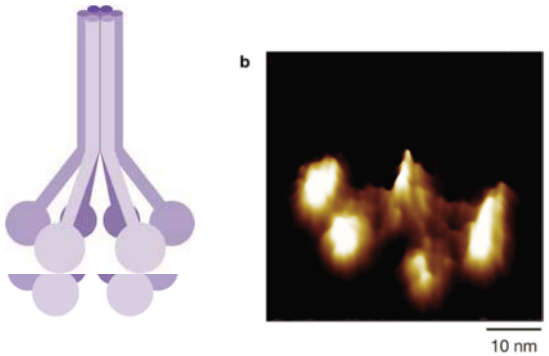
今後の展望（ライフサイエンスへの展開）

生体機能の分子レベル解析

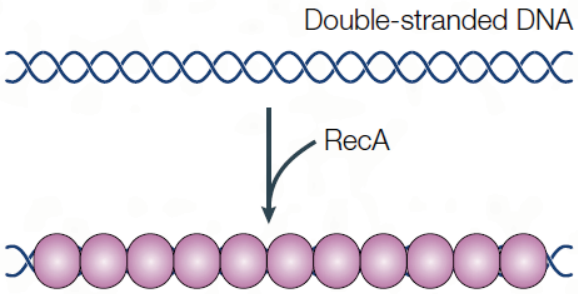
免疫機構の分子レベル解明

IgG分子の多量体化

→ 液性免疫反応
の効率的促進可能性

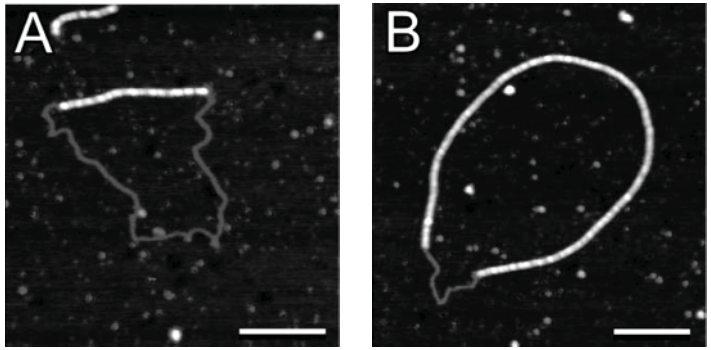


DNA-タンパク複合体
(DNA複製, 転写, 修復機構)



M. M. Cox & J. R. Battista *Nat. Rev. Microbiol.* **3,** 882 (2005).

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd:
Nature Reviews Microbiology, copyright (2005).

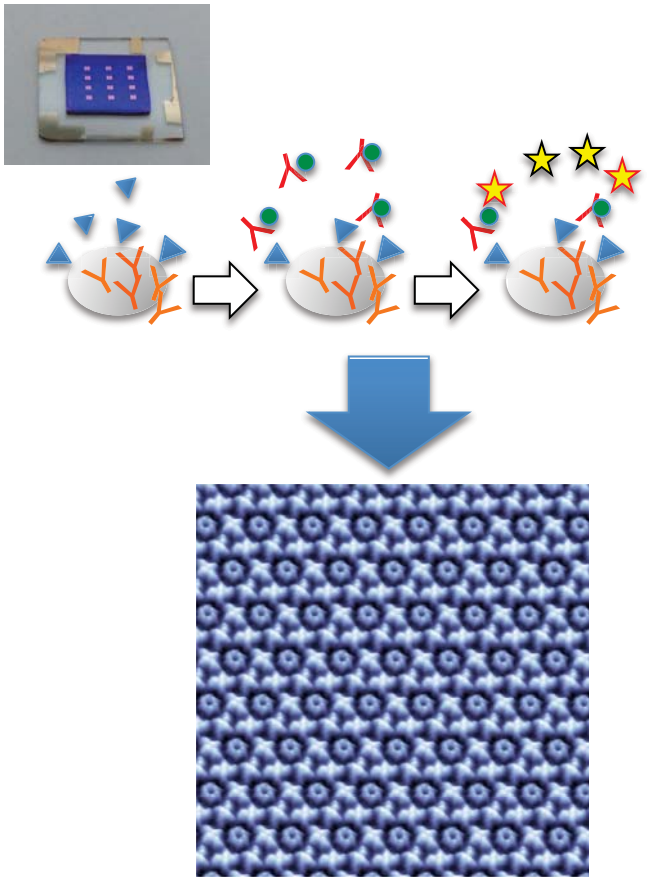


B. D. Sattin & M. C. Goh *Biophys. J.* **87,** 3430 (2004).

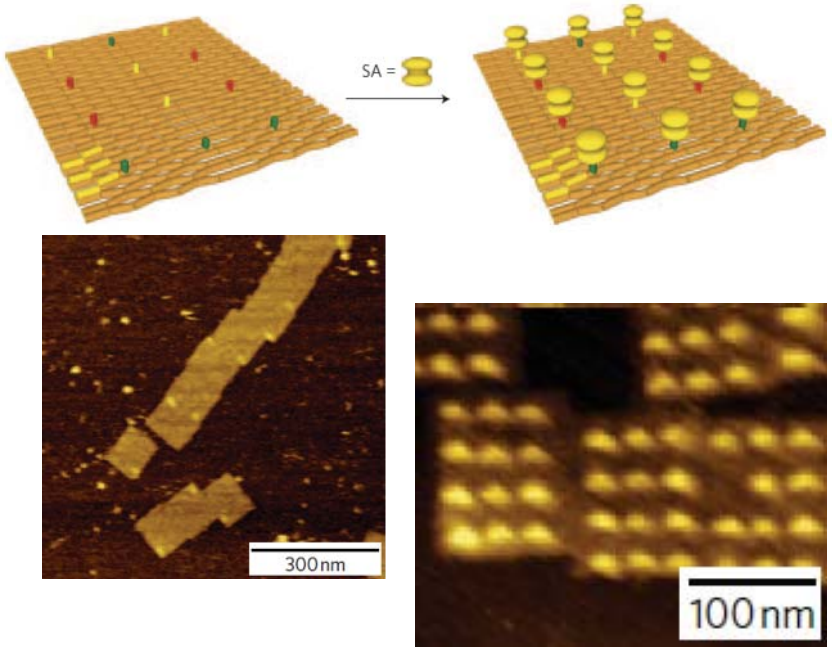
今後の展望（バイオエンジニアリングへの展開）

バイオマテリアルの工学応用 → バイオデバイス, センサ, DNAチップ

バイオナノエンジニアリング
(抗体センサー,プラットフォーム)



DNAナノテクノロジー



N. V. Voigt *et al. Nat. Nanotechnol.* **5,** 200 (2010).

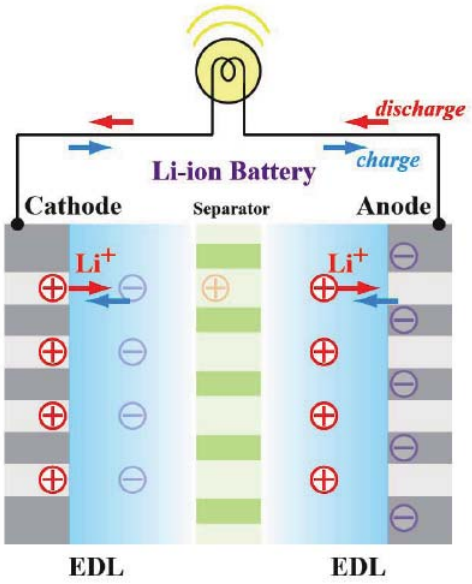
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd:
Nature Nanotechnology, copyright (2010).

固液界面研究への展望：電解質中の電極上の分子スケール電荷分布解析

電気二重層解析 → 電池電極, 電気二重層キャパシタ

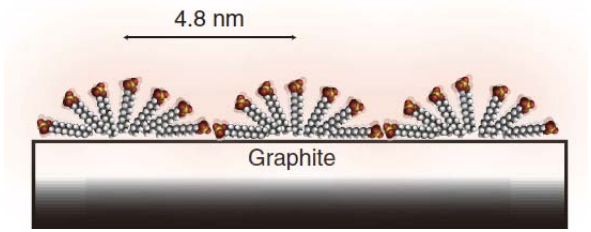
Li-ion Battery

Cathode: *Graphite*

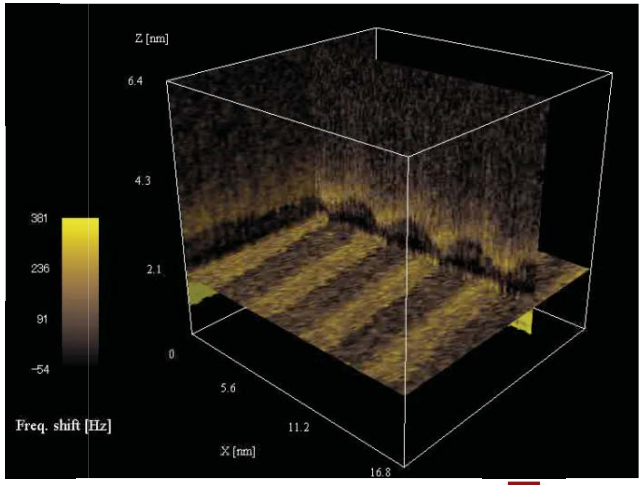


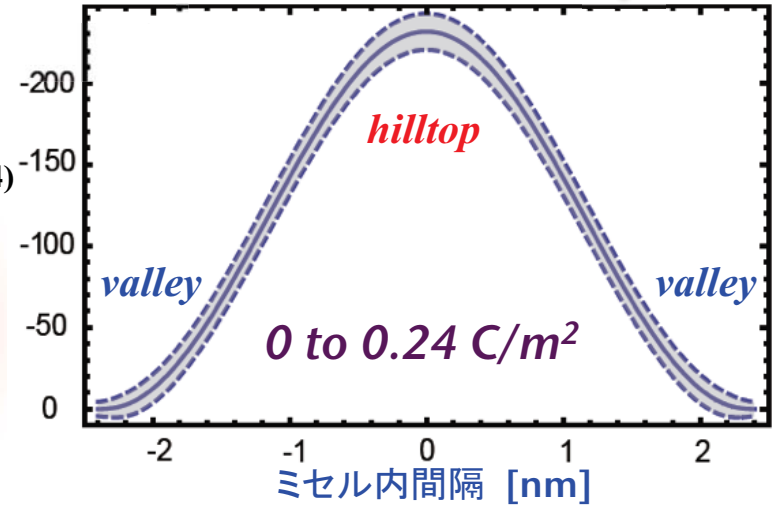
Anode: $LiCoO_2$

K. Suzuki, K. Kobayashi *et al*,
J. Chem. Phys. 140, 054704 (2014)



3Dフォースマッピング法による電解質中の
分子ミセル上の電気二重層力可視化
(XYZ: 16.8 nm × 16.8 nm × 6.4 nm)



Movie in original file

分子ミセル上電荷密度 [C/m²]