

# 研究終了報告書

## 「生物の表面と内部を可視化する超解像液中 AFM」

研究期間：2020 年 12 月～2023 年 3 月

研究者：宮澤 佳甫

### 1. 研究のねらい

バイオテクノロジー研究分野において、生物の構造や機能を理解し、それを新規生体機能の発現や環境・農業・医療分野の応用に繋げるためには、「生物の表面や内部を液中環境下で直接可視化するイメージング解析技術」が必要不可欠である。本研究ではこの点に着目し、「生体試料を分子スケールでその場観察するための超解像液中原子間力顕微鏡 (AFM) の開発」を目指した。これまで、宮澤らは AFM の空間分解能や計測手法を向上することで、結晶表面や生体試料表面の表面・界面の構造を液中環境下かつ原子・分子スケールで安定に計測することに成功してきた。しかしながら、この液中 AFM で可視化できる試料には未だ多くの制約があり、「研究室レベルで作製された原子・分子レベルで平坦な理想的な試料」の計測に限られていた。例えば、バイオ関係の分野においては、「原子レベルで平坦なマイカ表面に展開された脂質膜表面や DNA」が近年の分子スケール計測研究例として挙げられるが、「細胞表面の脂質膜の構造やその表面のイオンチャネル」や「細胞内の染色体の DNA の折り畳み構造」等、実際の複雑な生体試料の分子スケール液中 AFM 計測については、AFM 計測の複雑さや高い難易度の問題によって未だ達成されていない。これを実現するためには、複雑な生体試料表面の形状を計測することができる鋭い探針が必要である。また、AFM は原理的に計測試料の表面しか計測することができず、試料の内部を観察することはできない。例えば、AFM では動物細胞においては細胞表面の細胞膜近傍しか観察することができないが、細胞の内部には、細胞核・ミトコンドリア・アクチンフィラメント・ゴルジ体などの重要なオルガネラが沢山存在している。AFM を用いて生きた細胞内部の構造を可視化するためには、細胞内部に探針を直接挿入し、細胞に与えるダメージを極力低減させた状態で計測することができる鋭い探針の開発が必要である。

上記のような現状の AFM の計測限界を解決し、より複雑かつ立体的な生体試料の表面と内部を計測するためには、極限まで細く尖らせた鋭い探針の開発が必要である。本研究では、独自に開発する探針作製技術を用いて原子レベルで制御した鋭い探針を開発し、生きた生体試料の表面や内部を低侵襲かつ非染色で直接可視化する超解像液中 AFM を実現する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、生体試料の表面や内部を非染色・低侵襲で観察することができる 3 次元原子間力顕微鏡 (3D-AFM) を開発した。従来の AFM は、液中環境下で試料の表面の構造や力学特性をナノスケールで計測することはできたが、試料の 3 次元内部構造を観察することは原理的に不可能だった。一方で、本研究では、AFM で一般的に用いられる円錐形の探針形状を改良して直径 200 nm 以下の鋭い探針を作製し、それを直接生体試料の



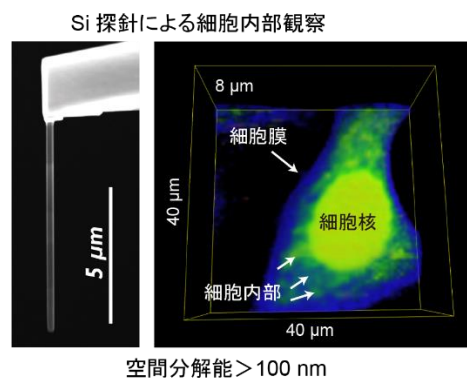
内部に挿入することで、ヒトやラットの生細胞内部や、ヒトの染色体のクロマチン凝集構造などの生体試料の内部を観察することに成功した。これにより、従来の光学顕微鏡や電子顕微鏡のための染色や固定化、凍結等の処理をしなくても、3D-AFM で生きたままの生体試料内部のナノスケール構造や動態を直接計測することが可能となった。

#### **【Si 探針を用いた細胞内部観察】(図 1a および成果論文 1)**

従来の円錐形の Si 探針を集束イオンビーム(FIB)で切削し、直径 100 nm、長さ 8  $\mu\text{m}$  のニードル探針を作製した。次に、ガラスボトムディッシュ表面に培養したヒトの子宮頸がんの生細胞を準備し、作製したニードル探針を用いて 37°C の環境下で 3D-AFM 計測を行った。その結果、細胞表面の細胞膜だけでなく、細胞内部のアクチンフィラメントや細胞核の構造を 100 nm 程度の空間分解能で観察することに成功した(図 1a)。

#### **【カーボンナノチューブ探針を用いた染色体内部観察】**

図 1a の成果は従来の常識を覆す革新的な手法であったが、探針の素材である Si の性質により、直径が 100 nm 以下のニードル探針を作製することが困難であることが分かった。これにより、空間分解能も 100 nm 以上に制限されてしまうことが分かった。そこで、ACT-X の研究期間中に、原子レベルで周期的な結晶構造を持つカーボンナノチューブを用いることで、機械的強度を維持したまま直径を小さくした探針を開発した。これにより、例えば単離したヒトの分裂期の染色体の計測では、染色体を構成するクロマチンの繊維状構造を 100 nm 以下の分解能で可視化することに成功した。



**図 1: ACT-X の研究で得られた成果の概要。ニードル探針を用いて生きた細胞内部の構造を直接可視化した。(金沢大・宮澤)**

#### (2) 詳細

##### **研究テーマ①「液中 AFM 用探針の開発」**

まずは、液中 AFM 用探針を作製する手法の開発に取り組んだ。汎用的な AFM (2D-AFM) では、図 2a に示すように、先端径 10 nm 程度の円錐形の探針を用いて試料表面をなぞり、その時に探針が動いた軌跡を記録することで試料表面の形状像を取得する。試料表面が分子レベルで平坦な場合は、探針先端原子さえ突出していれば原理的に分子像が取得可能だが、DNA のように探針先端径に近いナノサイズの凹凸がある試料は探針先端のナノサイズの形状により本来の構造と比べて水平方向に膨らんだ画像となる。そのため、理想的には原子レベルで尖った尖鋭ニードル探針が必要である。また、近年我々が開発して

いる 3 次元 AFM(3D-AFM)では、探針を試料の内部に直接挿入して内部構造を可視化する。例えば、動物細胞の内部計測では探針が細胞表面の細胞膜を貫いて内部にアクセスする必要があるが、従来の円錐形の探針では細胞に大きな穴を開けてしまい、計測中に細胞が死んでしまったり構造を大きく破壊したりしてしまう。一方で、図 2b に示すように、探針が穴を開けても細胞が自己修復できる程度の小さな穴しか空けないような尖鋭ニードル探針が作製できれば、3D-AFM を用いて低侵襲かつ非染色で生きた細胞内部を直接観察することができる。

これを実現するために、本研究ではまずは図 2c に示すような3種類のニードル探針を開発した。まず、集束イオンビーム(FIB)を用いて従来の円錐形の Si 探針を切削することで、直径 200 nm 以下、長さ 5  $\mu\text{m}$  以上の探針を作製した。また、電子顕微鏡の中で電子線を点照射する電子線堆積法を用いて、アモルファスカーボン素材の直径最小 40 nm 程度、長さ最大 5  $\mu\text{m}$  の探針を開発した。さらに、電子顕微鏡内にマニピュレーターを設置し、カーボンナノチューブ(CNT)を探針先端に接着することで直径最小 5 nm(先端径 1 nm)、長さ最大 1  $\mu\text{m}$  の探針も作製した。これらの探針は、それぞれ形状や機械的強度、表面物性が異なり、観察したい対象のスケールや特性に合わせてどの探針を選択する必要がある。本研究では、各探針を用いて生体試料の表面・内部計測を行い、従来の AFM 計測と比べて分解能の向上や新規計測手法の提案が可能かどうか検証した。

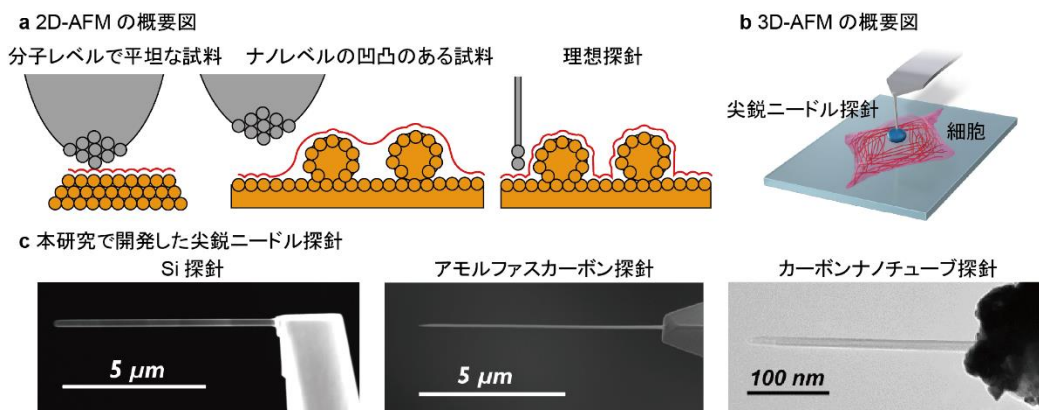


図 2: 液中 AFM 用ニードル探針の開発

### 研究テーマ②「2D-AFM の分解能向上」

本研究で開発したニードル探針を用いて、まずは 2D-AFM 像の分解能が改善するかどうか検証した。まずは、汎用的な Si 探針で pUC19 DNA の AFM 像を取得した。pUC19DNA は円環状の二重らせん DNA であり、本来の直径は 2 nm である。取得した AFM 像から、DNA の高さは 2 nm で正しい値となっているが、横幅は 10 nm だった。これは、図 2a に示した通り、ナノサイズの探針形状が DNA 表面をなぞる際に本来の構造よりも膨張して計測してしまうことが要因である。一方で、先端径 2 nm のカーボンナノチューブ(CNT)探針で計測すると AFM 像に見られる DNA の横幅が細くなっており、実際に本来の直径と同じ 2 nm の太さになっていることが分かった。また、DNA の主溝と副溝が区別できる程度に高い分解能

で DNA の二重らせん構造を可視化できていることが分かった。上記の通り、CNT 探針を用いて DNA のモデル系を用いた 2D-AFM 計測を行うと、従来の Si 探針と比べて分解能が向上することを示した。

### 研究テーマ③「3D-AFM による細胞内部計測」

本研究で開発した Si 探針やアモルファスカーボン探針を用いて、動物細胞の内部を可視化する 3D-AFM 計測技術の開発に取り組んだ。モデル系として、ヒトの子宮頸がん細胞である HeLa 細胞を用いた。図 3a に示すようにガラス基板の表面に HeLa 細胞を培養し、図 3b の尖鋭化させたニードル探針を用いて細胞内部で 3D-AFM 計測を行う。図 3c のように細胞内でフォースカーブ(探針が受けた相互作用力の垂直 Z 位置依存性)を取得すると、細胞膜に探針が接触する時に局所的な斥力ピークが生じ、その後はガラス基板に接触して再びフォースが増加する。これを図 3d の光学顕微鏡の赤線範囲内(40 μm×40 μm×8 μm、64×64×1,200 ピクセル)全点で行い、各点で探針が受けた相互作用力の変化をカラーコントラストで色付けすると、図 3e に示すように細胞表面および内部の細胞核に相当する部分を 1 つの 3 次元画像として取得することができた。また、本計測後には蛍光染色や細胞分裂観察を行い、細胞が生き残った状態のまま細胞分裂能も有した状態であることを確認した。

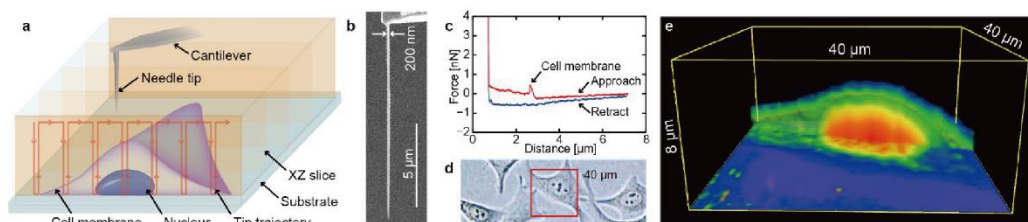


図 3: 3D-AFM による HeLa 細胞の細胞内構造観察

(a: 3D-AFM 計測の概要図、b: 使用したニードル探針、c: ニードル探針で取得した細胞内のフォースカーブ、d: 光学顕微鏡像、e: d の赤線内で取得した 3D-AFM 像)

### 研究テーマ④「3D-AFM によるヒトの分裂期の染色体計測」

研究テーマ③では、図 2c に示した Si 探針やアモルファスカーボン探針を用いた。これらの探針は、数 μm 程度の厚みのある比較的大きな細胞内構造の可視化には有効だったが、その一方で超解像顕微鏡の計測限界を超えるような 40 nm を切る空間分解能の計測は困難であった。それは、Si 探針やアモルファスカーボン探針の直径はせいぜい 40 nm 程度までしか小さくすることができず、それによって空間分解能の限界が決まってしまうことが原因である。そこで、3D-AFM で空間分解能の向上を達成するために、CNT を用いた 3D-AFM 計測に取り組んだ。モデル系として、HeLa 細胞から単離した分裂期の染色体を計測した。まず、直径 30 nm 程度、長さは 300 nm 程度の形状の CNT 探針を作製した。次に、実際に CNT 探針を染色体内部に挿入して AFM 像を取得すると、染色体内部の繊維状構造が確認された。この繊維状構造の分解能は 30 nm 程度であり、染色体を構成するクロマチンの繊維の直径とほぼ一致する値である。AFM 像は染色体の表面と内部の構造を反映した像を表しており、染色体の表面と内部を高い分解能で同時に計測することに成功した。

### **その他「炭疽病菌の付着器の膨圧計測」(ACT-X 内:理研・熊倉氏との共同研究)**

ACT-X の「環境とバイオテクノロジー」領域内の共同研究として、理研の熊倉氏と炭素病菌の付着器の AFM 計測実験を行った。付着器は、胞子が植物細胞表面に付着して菌を食部細胞内部に挿入する際に、強い膨圧をかけて植物細胞の細胞壁を貫くことが知られている。一方で、付着器が強い膨圧をかけるメカニズムについてはまだ未解明な点が多く、付着器の細胞壁の構造や付着器の膨圧の形成メカニズムの検証が求められている。そこで、本研究では AFM を用いて「①付着器の細胞壁の構造解析と、②付着器の膨圧計測」に取り組んだ。

まず、炭疽病菌の胞子をプラスチック表面に散布し、付着器を形成した。その後、超純水に浸した後に、液中 AFM を用いて通常の Si 探針で付着器の表面構造を観察した。付着器自体の高さが 5  $\mu\text{m}$  以上と高く、AFM で安定に計測することが困難だったため、AFM の探針走査方法自体を検証した。これらの条件検討を行った上で付着器の全体像およびその拡大像を取得すると、グルカンと思われる繊維状構造の間にそれを架橋する大小様々なサイズの粒子状構造や穴が確認された。また、細胞表面も動物細胞と比べて粘性(吸着力)が高い性質を持つことが分かった。

一方で、AFM を用いた膨圧計測についてはまだ知見が少なく、計測手法の確立と理論の構築を進めている段階である。実験的には、付着器全体を押し込むための自作探針を作製した。直径 8  $\mu\text{m}$  の自作コロイドプローブで付着器の弾性率を計測すると、胞子と比べて付着器の領域だけ高い弾性率が確認された。一方で、膨圧の計算のためには細胞壁の厚さや細胞壁のみの弾性率を仮定する必要があるが、現在他の手法と組み合わせて膨圧を計算する準備を進めている。

本共同研究を通して、私自身初めての微生物培養を経験し、それに合わせた AFM 計測手法の開発に取り組むことができた。まだ共同研究はスタートしたばかりであり、この先も計測手法を確立しながら手探りで共同研究を進める必要があるが、「環境とバイオテクノロジー」の分野に貢献すべく、AFM でユーザーの期待に応える情報を抽出できるように精力的に共同研究を推進していきたい。

### 3. 今後の展開

本研究で開発した手法は、「細胞が生きたままの状態で微生物・植物の表面や内部をナノスケールで直接観察」することができる画期的な計測である。この手法により、生きた細胞が持つ構造や機能(防御・膨圧・硬さ・弾性・物質送受・細胞間連絡・センサー)をナノスケールで直接観察することができる。これにより、数年レベルの短期的には、従来の顕微鏡手法(光学顕微鏡や電子顕微鏡)では明らかにできなかった原子・分子レベルの構造や動態、各種機能の発現メカニズムに関する新たな知見が得られるようになる。そして、まずは ACT-X の「環境とバイオテクノロジー」に関係する分野において、各研究者が研究している生体試料について未解明な点を明らかにすることができると考えている。

また、10年以上先の長期的な見込みでは、本手法は新たな材料開発・創薬・機能発現にも直接貢献できると考えている。本手法を用いて微生物や植物を計測した結果得られた原子・分子レベルの新たな知見を基に、産学様々な研究開発現場で新たな機能を生み出す構造体を作製し、それが実際に作用するかどうかを顕微鏡で直接確かめる。その上で実際の製品に実装し、これまでの製品には無かった新たな価値を付与する。顕微鏡技術を基にこの研究開発サイクルが有効に回ることで、従来の常識を覆す新規性能を備えた製品の開発や、研究期間の短縮・低コスト化などが推進されると予想している。例えば、植物由来のセルロースナノファイバーを用いた高耐久材料の開発、安価で安全性の高い農薬(または医薬品)開発、化学的に精製されたフッ素膜に代わる疎水性と撥油性の両方を兼ね備えた生体試料由来の防汚膜など、AFMを含む各種顕微鏡が応用されていない研究分野が沢山ある。私自身は、これらの研究分野に最先端の顕微鏡が普及・応用され、各研究分野の研究が飛躍的に発展することで、科学技術の発展がゆくゆくは人々に便利で豊かな生活として還元される将来が来ることを強く期待している。

#### 4. 自己評価

個人的な研究成果については、概ね当初の計画通りの成果が得られたと考えている。ACT-Xの研究費を活かし、直径30nm以下のCNT探針を作製することで、これまでの3D-AFMでは計測できなかった染色体のクロマチンの繊維状構造の観察も実現することができた。今回は主に動物細胞であるヒトの細胞を扱ったが、論文発表後に徐々に国内外の招待講演(蛋白質科学会・IEEE-NEMS等)の数も増え、医学・生物学分野から注目されている実感がある。一方で、論文発表については少し出遅れており、2022年の8月から順次得られた結果の論文執筆を進めている。ACT-Xの研究期間が終わる前後には論文発表できるように、急いで論文を仕上げている。

ACT-X内での共同研究は、私が採択当初に予想していた以上に人脈のネットワークが広がった。総括やアドバイザーの先生方だけではなく、領域内の研究者からもセミナーや共同研究の依頼が多く、私のこれまでの研究内容を広い分野の方に知っていただく機会を得ることが出来た。特に、「2. その他」に記載した理研の熊倉氏との共同研究は、ACT-Xが無ければ実現しなかった貴重な共同研究であり、炭疽病菌について最前線で活躍している熊倉氏と活発に実験を進め、競争力のある成果が出せそうな状況まで進むことができたことは大変有難かった。本共同研究成果も現在論文用のデータ取得の最終段階であり、ACT-Xの研究機関が終わるまでには論文発表したいと考えている。その他にも共同研究の依頼が幾つか来ているので、各研究者のニーズに合う情報を抽出できるような新たなAFMを開発し、各研究分野の発展に貢献していきたい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. M. Penedo, K. Miyazawa, N. Okano, H. Furusho, T. Ichikawa, M. S. Alam, K. Miyata, C. Nakamura, T. Fukuma, Visualizing intracellular nanostructures of living cells by nanoendoscopy-AFM, Science Advances, 2021, 7, eabj4990

宮澤が独自に開発したSi製ニードル探針を用いて、原子間力顕微鏡でヒトの子宮頸がん細胞やラットの繊維芽細胞内部の細胞核やアクチンフィラメントなどの3次元立体構



造を、非染色・非破壊で計測することに世界で初めて成功した。

2. T. Ichikawa, D. Wang, K. Miyazawa, K. Miyata, M. Oshima, T. Fukuma, Chemical fixation creates nanoscale clusters on the cell surface by aggregating membrane proteins, COMMUNICATIONS BIOLOGY, 2022, 5, 487

宮澤が独自に開発した窒化シリコンメンブレン膜の上に細胞を培養し、原子間力顕微鏡で細胞の固定化によるヒトの細胞表面構造の変化を分子レベルの分解能で計測した。

3. A. Yurtsever, P. Wang, F. Priante, Y. M. Jaques, K. Miyazawa, M. J. MacLachlan, A. S. Foster, T. Fukuma, Molecular insights on the crystalline cellulose-water interfaces via three-dimensional atomic force microscopy, Science. Advances, 2022, 8, eabq0160

宮澤が独自に開発した画像処理手法を用いて、原子レベルの AFM 像と分子動力学シミュレーションの結果を比較した。その結果、セルロースナノクリスタルの原子レベルの欠陥構造を世界で初めて明らかにした、

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・招待講演

K. Miyazawa, “Development of nanoendoscopy-AFM for visualizing intracellular nanostructures of living cells”, IEEE-NEMS2022, Apr. 14-17, 2022 (Online, hosted by IEEE, USA)

・招待講演

宮澤佳甫、Marcos Penedo Garcia、岡野直子、古庄公寿、市川壮彦、Alam Mohammad Shahidul、宮田一輝、中村史、福間剛士「生きた細胞内部の分子構造動態を可視化するための In-cell AFM 技術の開発」、第 22 回日本蛋白質科学会年会、2022 年 6 月 8 日、つくば国際会議場(つくば)

・招待講演

宮澤佳甫、「液中サブナノスケール原子間力顕微鏡の開発と材料・バイオ研究分野への応用展開」、AGC 株式会社 分析・評価・解析技術主催講演会、2022 年 7 月 19 日、AGC 株式会社(横浜)

・国際学会発表

※K. Miyazawa, M. Penedo, N. Okano, H. Furusho, T. Ichikawa, M. S. Alam, K. Miyata, C. Nakamura, T. Fukuma, “Development of nanoendoscopy-AFM for visualizing intracellular nanostructures of living cells”, The 22nd International Vacuum Congress (IVC-22), Sapporo, Japan (11-16 Sep., 2022)

・受賞

K. Miyazawa, Canon Anelva Prize at IVC-22 for Young Researcher, “Development of nanoendoscopy-AFM for visualizing intracellular nanostructures of living cells”, 2022/09/16, IVC-22 conference