

フォーカス 26 <第18回> : 成果事例クローズアップ (京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク)
炭酸カルシウム結晶表面の液中原子分解能イメージング

東北大学 荒木優希, 塚本勝男
 京都大学 大藪範昭, 小林圭, 山田啓文



(左から) 東北大学 荒木優希, 塚本勝男



(左から) 京都大学 大藪範昭, 小林圭, 山田啓文

1. はじめに

骨や貝殻などの生物における重要な硬組織は無機鉱物(バイオミネラル)から構成される。このバイオミネラルは、後述する生体鉱物形成作用(バイオミネラリゼーション)によって作られるが、そのメカニズムについては依然不明な点が多い。東北大学では、常温・常圧環境にもかかわらず、高圧相で安定となる炭酸カルシウム結晶を作り出す、この貝の結晶成長メカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めていたが、この研究では溶液中における成長結晶表面の構造変化を捉えることが必要不可欠となる。こうした中、先進の周波数変調方式原子間力顕微鏡(FM-AFM)技術に基づき、京都大学・山田グループが開発した、液中環境で高分解能表面観察が可能なAFMプローブシステムを、京都・先端ナノテク総合支援ネットワークを通じて、利用できることを塚本、荒木らは知り、共同利用支援を受けるに至った。上記FM-AFM装置を用いることで、溶液中での炭酸カルシウムの結晶成長過程を原子レベルで観察することに成功した。

2. 身近に存在する「結晶」

「結晶」と聴いて、まず何を思い浮かべるだろうか。石

英結晶、雪の結晶、塩の結晶・・・自然界は、さまざまな「結晶」であふれている。しかし、結晶がわれわれの生活に密接に関わっていることは意外に知られていない。先に挙げたものの他にも、チョコレートやバターなどの油脂、胆石などの体内に形成する結石、骨や歯なども結晶から成っている。これらの結晶がどのように形成・成長するのか、温度や圧力、添加物の効果でどのように物性が変わるのか、という結晶成長メカニズムの解明は食品、医療、工業など様々な分野で重要な課題である。

3. 生体による鉱物形成作用 -バイオミネラリゼーション-

一般に結晶の成長メカニズムは、結晶が形成する環境、添加物など、様々なファクターによって異なる。その中でも、生体が関与する結晶化作用は「バイオミネラリゼーション」と呼ばれている。バイオミネラリゼーションという言葉は世間に浸透していないが、われわれの歯や骨の形成もバイオミネラリゼーションによるもので、非常に身近な現象であることがわかる。数あるバイオミネラリゼーションの中で、本研究の対象は貝殻のバイオミネラリゼーションである。これも存外知られていない事実であるが、貝殻も結晶から構成されている。多くの海洋生物の殻の主成分は炭酸カルシウム結晶(CaCO_3)で、貝の場合には外套膜から分泌される特殊なタンパク質と炭酸カルシウム結晶との相互作用によって、結晶の形態、組織が制御されている[1]。特に、アワビやアコヤガイといった暖かい海に生息する二枚貝では、地表環境では起こり得ない現象が見られることが古くから知られている。常温・常圧下では、炭酸カルシウム結晶の安定相である

* 問い合わせ：
 京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク
 京都大学
 〒615-8530 京都市西京区京都大学桂 インテックセンター 205
 京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク事務室
 電話：075-383-2139
 E-mail：nano-net@nsn.kyoto-u.ac.jp

カルサイトが一般的に見られ、有孔虫やウニの殻はカルサイトから構成されている。これに対し、アワビなどの殻には、高压相であるアラゴナイトがカルサイトと共存している。アラゴナイトが常温常圧下で安定に存在するメカニズムは明らかになっていないが、これまでの先行研究によって、貝が分泌するタンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている [2][3]。さらに、近年の分析技術の発達により、アスパラギン酸を始めとする酸性アミノ酸の配列が重要であることまでわかってきた [4]。では、炭酸カルシウム結晶とそれらのアミノ酸の配列がどのように作用してアラゴナイトは形成されるのだろうか？

4. 結晶成長その場観察の重要性

結晶の形成メカニズムを明らかにするために多くの手法が存在するが、結晶の形成過程の「その場」観察は、起こっている現象を忠実に理解するために重要である。これまでも、種々のタンパク質を添加した系でのその場観察実験が行われている [5][6]。それらの実験では、貝殻の形成を模擬して、複数のタンパク質から成る有機物膜やカルサイト結晶を基板として、その表面に結晶を成長させている。その際、結晶表面観察には原子間力顕微鏡 (AFM) が頻繁に用いられている。AFM は、観察環境や試料を選ばない高分解能観察装置である。しかし、一般的に用いられているコンタクトモードやタッピングモードでは、真の原子分解能を引き出すのは非常に難しい。したがって、原理的には原子レベルの観察が可能であるものの、結晶表面に生じる成長丘の形態や、成長ステップの形状の観察が主な用途となっている。これまで

の実験では、アラゴナイトが形成する瞬間は捉えられていない。アラゴナイト形成の観察において問題となるのが、どのようにして「結晶成長その場観察」と「結晶相の同定」を同時に行うかということである。その場観察中に結晶相の同定ができなければ、基板上にアラゴナイトがいつ形成したのかを確認することができない。結晶相同定の一般的な手法である分光法や XRD などは、主に大気中で有効な方法である。また、基板表面に形成した原子一層分のアラゴナイトを検知することはできない。

そこで、本研究で着目したのは、カルサイトとアラゴナイトの結晶構造の違いである。もし、溶液中で結晶表面を原子分解能で観察することができれば、結晶表面の原子配列の変化から結晶相を同定することができる。また、アラゴナイトが形成する瞬間を原子レベルでみることができ、タンパク質がどのように結晶構造を変化させているかを直に見ることができるとは思えない。このアイデアを持ちつつ、溶液中で結晶表面を原子レベルで観察できる装置はあるか、と考えていたところ出会ったのが、京都大学工学研究科において開発された周波数変調方式原子間力顕微鏡 (FM-AFM) である。FM-AFM は、探針を試料表面に接触しないように走査させ、結晶表面原子と探針の相互作用によって変化するカンチレバーの周波数の微小変化を検知し、表面形状を観察することができる。通常、溶液中ではカンチレバーの動きが溶液の抵抗を受けてしまうため、Q 値が低下して原子分解能を引き出すことが難しくなる。しかし、カンチレバーの変位検出系の低ノイズ化、微小振幅 FM 検出が実現したことにより、溶液中において真の原子分解能を有することが確認されている [7]。

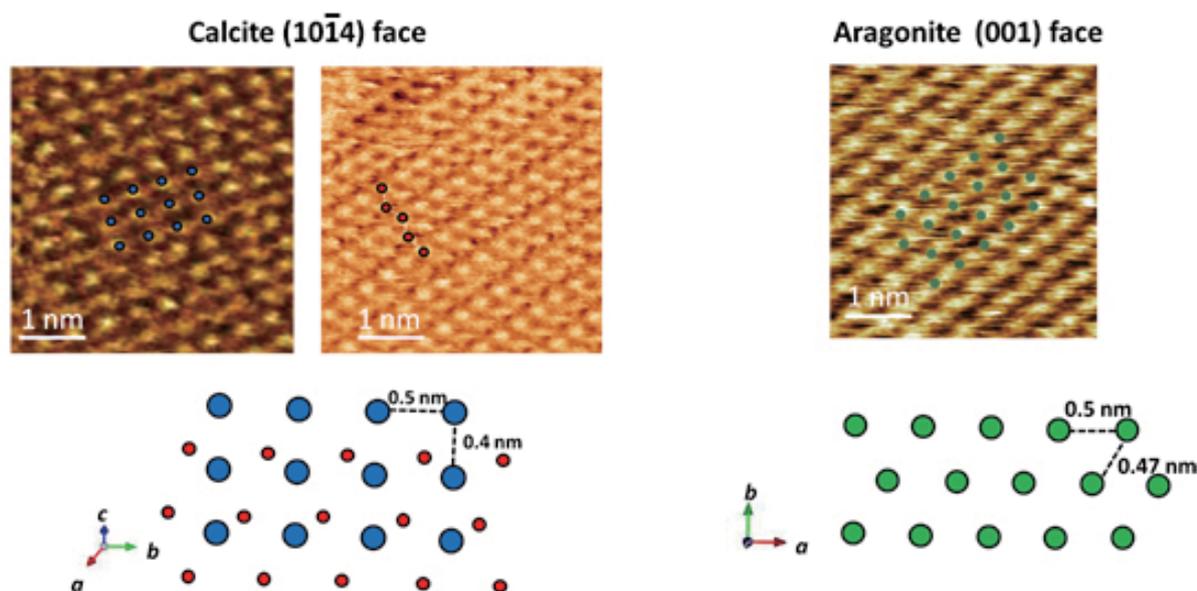


図1 カルサイト (1014) 面, アラゴナイト (001) 面の原子配列 (上) と原子配列のモデル図 (下)。青はカルサイトのカルシウム原子, 赤は酸素原子を, 緑はアラゴナイトのカルシウム原子を表している。

5. FM-AFM によるカルサイト、アラゴナイト表面の原子分解能観察

本研究では、数ミリ大のカルサイト結晶を基板として、その表面の原子配列の変化を観察することが目的である。したがって、まずは超純水中でカルサイトとアラゴナイトそれぞれの単結晶表面の観察を行い、原子配列の違いが明瞭に見られるかを確認した。基板として用いるカルサイト劈開面の観察は、既に本装置を用いた観察結果が報告されているが [8]、本観察でもカルシウムのパターンと酸素原子のパターンが特徴的に見られた (図 1 左)。一方、AFM に限らず、アラゴナイト表面の観察は光学顕微鏡でもほとんど行われていない。FM-AFM を用いてアラゴナイト単結晶の表面観察を行ったところ、明瞭なカルシウムの配列が観察された (図 1 右)。これらの観察結果から、原子分解能観察でカルサイトとアラゴナイトを明瞭に区別できることを確認した上で、次のような実験を行った。

6. アラゴナイト形成過程の原子レベルその場観察

成長溶液に添加する有機物としては、合成ポリペプチドを用いた。この合成ポリペプチドは、アコヤガイに含まれるタンパク質のアミノ酸配列を模擬したもので、アラゴナイトの形成を促すことが確認されている [4]。合成ポリペプチドを添加した炭酸カルシウム過飽和溶液をカルサイト基板上に数 10 μ l 滴下し、その原子配列の変化をその場観察した。溶液を基板上に滴下してから約 90 分後に、表面の原子配列に変化が見られた (図 2)。それまで表面に見られたカルサイト表面の酸素原子のパターンの画面上半分が異なるパターンになっている。さらにその直後の走査では、画面全体がこのパターンに完全に変化

した。新しく現れたこのパターンを解析してみると、アラゴナイト表面のカルシウムのパターンと合致し、アラゴナイト形成の瞬間を観察していることが明らかとなった。すなわち、カルサイトからアラゴナイトへの相転移が起こるといふ、アラゴナイト形成メカニズムの新たな可能性を示唆する結果が得られた。この結果の詳細については、近く専門誌にて報告する予定である。

FM-AFM を結晶成長観察に適用したことによって、アラゴナイト形成メカニズムを原子レベルで理解することが可能となった。今後も形成過程の観察から、ポリペプチドがどのようにアラゴナイトを形成させているのかを明らかにしたい。特に、相転移が起こる際に結晶構造がどのように、どこから変化しているのかを捉えることが課題である。

7. おわりに

FM-AFM の共同利用により、結晶成長過程の原子レベルその場観察という、世界に先駆けた大きな成果を挙げることができた。この結果は、アラゴナイト形成メカニズムの解明に向けて、新たな視点を与えるものであると確信している。

本研究を通して、観察装置や分析技術の開発がさまざまな分野の発達につながっていることを強く実感している。技術の向上によって数多くの観察・分析装置が発展し続けているが、これらの装置は他の分野と広く関わることで新たな用途を見出される。他分野との関わりを積極的にもたらすという点で、京都・先端ナノテク総合支援ネットワークは非常に重要な存在であると感じている。FM-AFM が最新鋭の結晶表面観察装置として、様々な分野で活躍していくであろうことは想像に難くないが、それを推進するためにも学際的研究を目指していきたい。

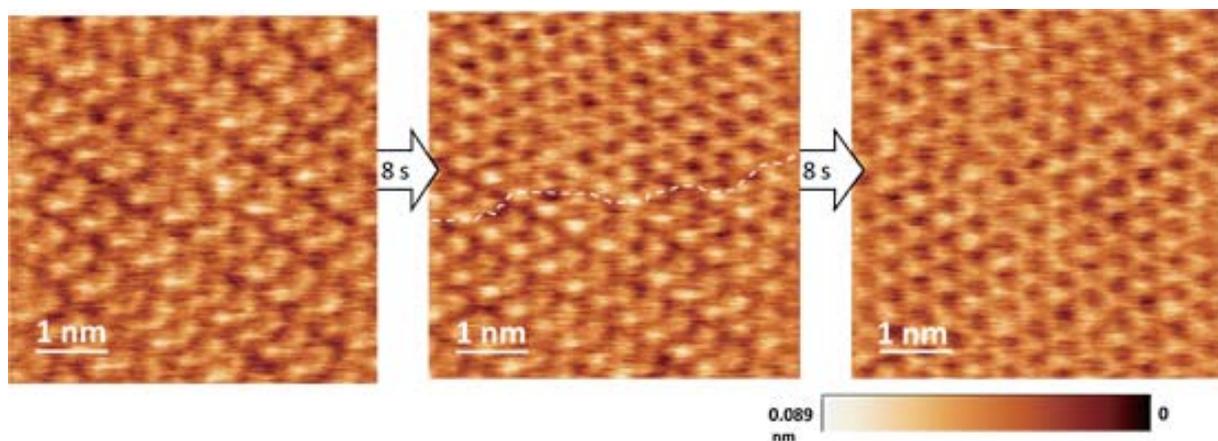


図 2 合成ポリペプチド、マグネシウムを添加した成長溶液中でのカルサイト基板表面の原子配列の変化。このときの一回のスキャンにかかった時間は約 8 秒。

参考文献

- [1] 渡辺哲光 "バイオミネラリゼーション - 生物が鉱物を作ることの不思議 -", 東海大学出版会 (1997)
- [2] A. M. Belcher, X. H. Wu, R. J. Christensen, P. K. Hansma, G. D. Stucky and D. E. Moese, *Nature*, 381, 56-58 (1996).
- [3] F. Nudelman, E. Shimon, E. Klein, M. Rousseau, X. Bourrat, E. Lopes, L. Addadi and S. Weiner, *J. Struct. Biol.*, 162, 290-300 (1996).
- [4] R. Takagi and T. Miyashita, *Zoolog. Sci.*, 27, 416-426 (2010).
- [5] D. A. Walters, B. L. Smith, A. L. Belcher, G. T. Paloczi, G. D. Stucky, D. E. Morse and P. K. Hansma, *Biophys. J.*, 72, 1425-1433 (1997)
- [6] J. B. Thompson, G. T. Paloczi, J. H. Kindt, M. Michenfelder, B. L. Smith, G. Stucky, D. E. Morse and P. K. Hansma, *Biophys. J.*, 79, 3307-3312 (2000).
- [7] T. Fukuma, M. Kimura, K. Kobayashi, K. Matsushige and H. Yamada, *Rev. Sci. Instrum.* 76, 053704 (2004).
- [8] S. Rode, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada and A. Kuhnle, *Langmuir*, 25(5), 2850-2853 (2009)

(東北大学理学研究科 荒木優希)