

201103008B

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成21年度 ～ 23年度 総合研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成24(2012)年 5月

201103008B

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成21年度 ～ 23年度 総合研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究 有江隆之	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 8
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 9

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

研究代表者 有江 隆之 大阪府立大学工学研究科助教

研究要旨 遺伝性疾患であるヘモグロビン異常がマラリアに耐性を有することは広く知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究では原子間力顕微鏡およびカーボンナノチューブを用い、感染赤血球表面上の突起状構造が、血管内皮細胞へ接着するプロセスを一分子レベルで解明することを目的とする。具体的には、ナノチューブ片持ち梁先端に、タンパク質を部位特異的に捕捉し、対向に設けたプローブ先端に固定したタンパク質との相互作用をナノチューブの撓みから検出する要素技術を確認した。得られた力はタンパク質間、抗原-抗体間の相互作用とも200pN前後であり、従来の手法で計測されたものと同等で妥当な値であると言える。さらに原子間力顕微鏡を用い、ヘモグロビンCやヘモグロビンS以外の遺伝型ヘモグロビン異常でも、感染細胞表面に特異な構造変化が見られたことから、これらの構造変化がヘモグロビンの種類によらず共通のものであることを示し、我々が提案するマラリア耐性メカニズムがこれらの異常ヘモグロビンに共通であることを示した。今後は実際に感染細胞表面に分布するマラリア由来のタンパク質と血管内皮細胞との相互作用力を計測し、ヘモグロビンの種類による結合力の違いを解明するとともに、原子間力顕微鏡による表面分布の違いとの相関を明らかにすることで、総合的にヘモグロビン異常によるマラリア耐性メカニズムを解明する。

A. 研究目的

マラリアは結核、HIV/AIDSと共に世界三大感染症の一つで、アフリカ、東南アジアを中心に主に熱帯、亜熱帯地方で流行している感染症である。ヒトに感染する寄生虫の中で、特に重篤なケースをもたらすものが*Plasmodium falciparum*であり、感染赤血球表面にノブと呼ばれる突起状構造を発現し、脳や各器官の毛細血管内皮に接着することで血流を阻害、最悪のケースではヒトを死に至らしめる。これまでアフリカや東南アジアの特定の地域で見られる、ヘモグロビンSやヘモグロビンCに代表される遺伝性疾患であるヘモグロビン異常が、重篤なマラリアになるリスクを低減させることが知られており、我々はヘモグロビン異常が、赤血球表面のノブの形状を大きく変化させることを発見し、この形状変化が重篤なマラリアの発症を引き起こすリスクを低減させるというモデルを提案してきた[1,2,3]。このモデルでは表面形状の違いにより、寄生虫由来の赤血球表面に発現するタンパク質であるPfEMP-1による細胞接着が低減され、感染細胞が免疫システムにより除去されるのを促進するというものである。およそ60のvar遺伝子からエンコードされるPfEMP-1は、短期間にその発現形態を変化させるため、免疫システムからの除去や感染赤血球をターゲットにしたワクチンの開発を困難にしてきた。これらを明らかにするためには発現後に分子レベルで計測することが必要不可欠であるが、生物化学的手法では現在のところ不可能である。本研究ではマラリア由来のタンパク質と血管内皮細胞上のレセプターとの相互作用を一分子レベルで計測することを目的とする。

カーボンナノチューブはグラファイトシートを丸めた円筒構造をとり、機械的な強度が高く、物理的・化学的に非常に安定な炭素からなる物質である。本研究では、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた感染細胞表面の観察に加え、カーボンナノチューブ片持ち

梁を用いた、新しい一分子計測技術を開発した。ナノチューブのバネ定数はおよそ 10^4 N/mオーダーであり、一般的なAFMで用いられるシリコンやシリコンナイトライドカンチレバーと比較して2桁小さい。バネ定数が小さいほど、力を受けたときに撓む距離が大きくなるので、検出が容易となり一分子計測に適している。さらに光学顕微鏡下で観察を行うので、タンパク質を蛍光標識し可視化した状態での相互作用力計測が可能である。ナノチューブ先端はグラファイトで閉じた構造を有するが、開端する事により、部位特異的にタンパク質一分子を捕捉することができる。ここで固定する分子を変更すると、様々な分子間相互作用を単一分子レベルで計測することが可能となり、あらゆる病原体やウイルスと細胞との相互作用を明らかにするための知見を供することが期待される。

B. 研究方法

図1に測定装置の概略を示す。用いたナノチューブ

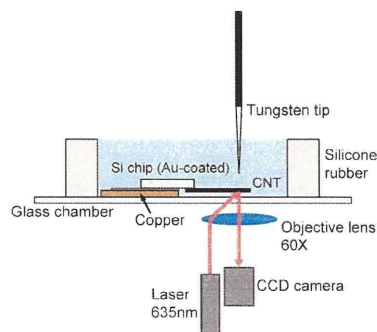


図1 抗原-抗体間の相互作用力計測装置

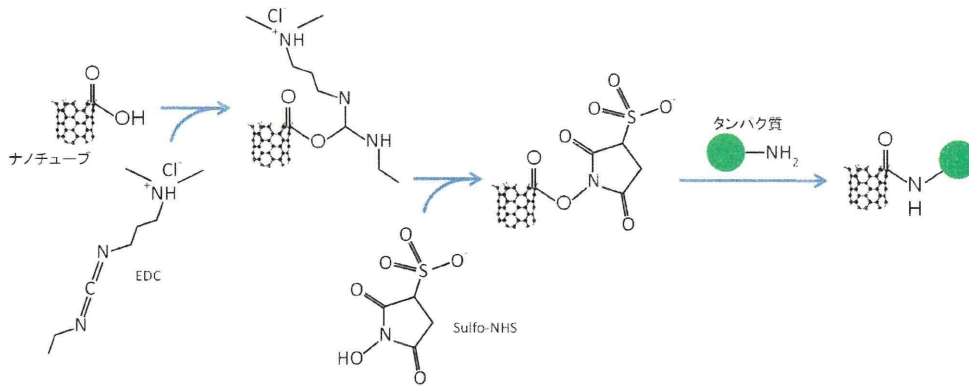


図2 EDCとsulfo-NHSを用いた、ナノチューブ先端へのタンパク質固定反応

は化学気相成長法により合成後、1500°Cで熱処理を施し結晶性を高めたものである。片持ち梁状にしたナノチューブ先端をレーザー光により照射し、先端のみを開端し酸化する。カルボキシル基を導入したナノチューブ先端を1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl (EDC) と N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS)の混合液に反応[4]させることで、タンパク質結合サイトとなる、sulfo-NHSエステルをナノチューブ先端のみに作成する(図2)。またAFMプローブ先端の化学修飾として、シランカップリング剤とアルデヒドを用いた簡便な手法も確立した(図3)。これは今後ナノチューブ片持ち梁を用いた一分子相互作用力計測の対向のプローブや、AFMを用いた細胞表面の分子認識観察に適用することが出来る。

分子間相互作用力計測は、ナノチューブ表面にレーザー光を照射し、反射した光をCCDカメラで撮影

して行った。ナノチューブは長さ比較して直径が極端に小さい擬一次元構造をとるので、ナノチューブからの反射光は理想的なガウス関数でフィッティングすることが出来る。タンパク質を固定したタングステンプローブをナノチューブ片持ち梁先端に接触させナノチューブ先端にタンパク質を固定する。その後タングステンプローブを引き離すときのナノチューブの撓みを計測することで、相互作用力を計測することが出来る。ナノチューブのバネ定数は別途既知のバネ定数をもつAFMプローブで力を加え、撓みを計測することで、正確に求めることが出来る。これにより一分子間相互作用力を精度良く算出することが可能である。

ヘモグロビンCやヘモグロビンSで見られた感染赤血球の特異な構造変化が、他の遺伝型ヘモグロビン異常でも同様に見られるかを確認するために、AFMを用いて感染赤血球表面の詳細な構造解析を行った。用いた赤血球は胎児ヘモグロビンであるヘモグロビンFと地中海地方で良く確認されるヘモグロビン異常である α -thalassemiaをもつものである。試料は現地でparaformaldehydeにより固定し、実験室に運ばれたものをカバーガラス上に配置したものである。マラリア感染のステージを蛍光顕微鏡で観察できるように、固定後の細胞内のマラリア寄生虫のDNAをYOYO-1で染色し、乾燥させた。AFM観察は室温、大気中で行った。

(倫理面への配慮)

本研究を通して使用したマラリア感染赤血球試料は、米国立感染症研究所(NIAID)の研究協力者がアフリカで、NIAIDの定める規程に基づいて患者の同意・協力の下採取し、既に固定された状態で匿名の下取り扱うため、この項目には直接該当しない。

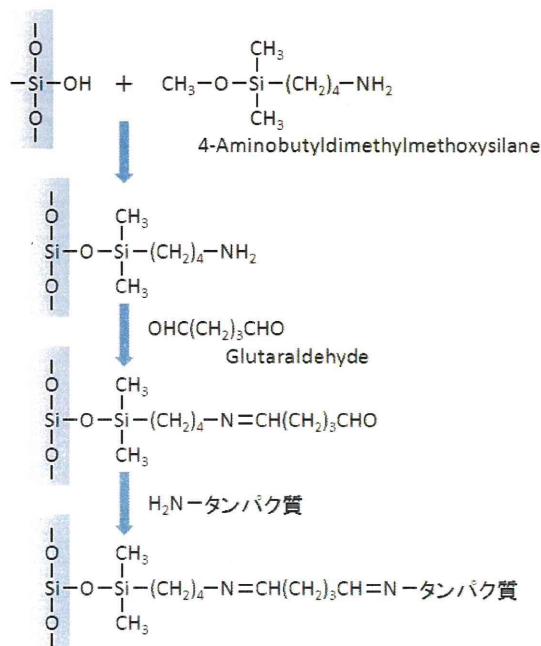


図3 AFM プローブ先端へのタンパク質固定反応

C. 研究結果と考察

ナノチューブを用いたタンパク質相互作用力計測

ナノチューブ先端は大気中でレーザー光により酸化することで開端し、その部位にはカルボキシル基が導入されタンパク質とクロスリンカーを介して共有結合する。図4にレーザー光照射前後の電子顕微鏡写真を示す。明らかに形状が変わり、先端が酸化してなくなっているのが分かる。

正確に相互作用力が計測可能かを調べるために、測定系の安定性と感度を測定した。図5に反射光のガウ

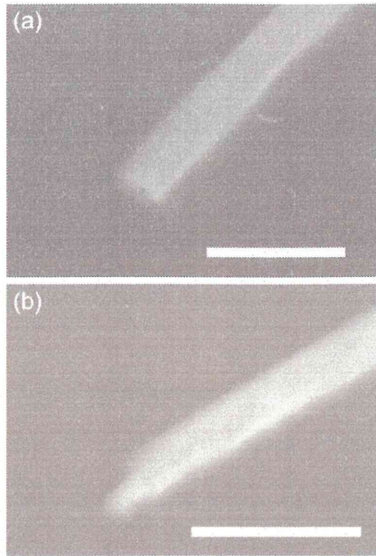


図4 開端前後のナノチューブ先端の電子顕微鏡写真

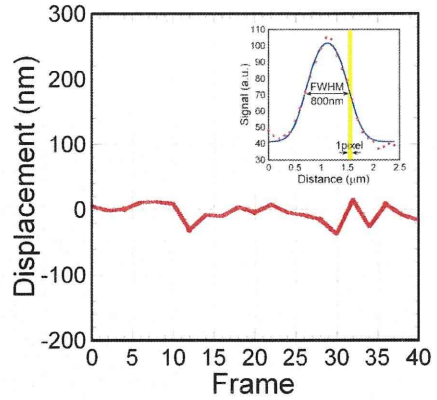


図5 ナノチューブ片持ち梁からの反射光の輝度プロファイルと時間安定性

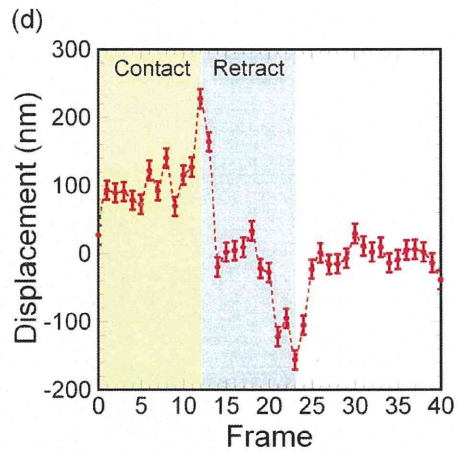
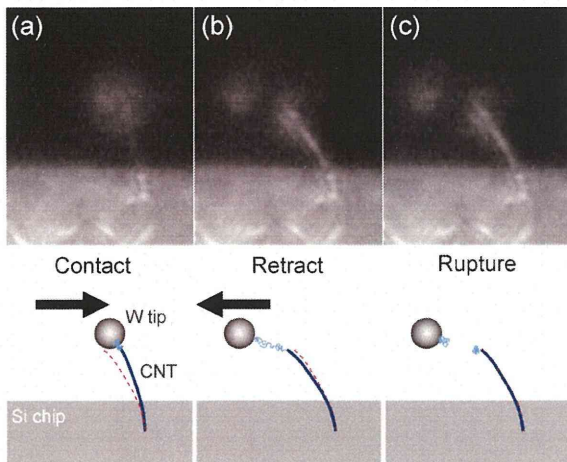


図6 ナノチューブ片持ち梁を用いた相互作用力計測の様子(a)タンパク質をナノチューブ先端に固定(b)固定後、タングステンプローブを引き離すとナノチューブが撓む(c)結合が切れた直後、ナノチューブが元の位置に戻る様子(d)a~cの一連の行程中のナノチューブの撓みの時間依存性

ス型関数へのフィッティングと、静止したナノチューブからの信号の時間依存性を示す。ナノチューブからの反射光は、ナノチューブの直径が小さいためにガウス型の関数でフィッティングする事が出来、ピークの変位から数学的にナノチューブの変位を算出する事が可能である。図5挿入図の反射光輝度プロファイルから、半値全幅はおよそ800nm、CCDの1ピクセル幅は焦点面で100nmであった。ピークの時間安定性では、標準偏差がおよそ14nmとなった。本研究で用いたナノチューブのヤング率がおよそ100~700GPaである[5]ことからバネ定数を算出すると、 $5.0 \times 10^{-4} \sim 3.4 \times 10^{-3} \text{N/m}$ 、本システムの力分解能は6.8~48pNと見積もられた。

次に実際ナノチューブ片持ち梁先端を図2に示した反応で活性化したあとCD36を固定し、実際にCD36の結合が切れたときのナノチューブの撓みを測定した。CD36はマラリア感染赤血球が血管内壁細胞や他の赤血球と接着する際のレセプター分子の一つである。図6に一連の行程を示す。まず図6(a)のようにタンパク質を結合させたタングステンプローブをナノチューブに接触させ、タンパク質と活性化さ

せたナノチューブを結合させる。その後タングステンプローブを引き離すことでタンパク質を伸張させる(図6(b))。タンパク質間/タンパク質内の結合が切れるとナノチューブが元の位置に戻る(図6(c))が、元に戻る直前の撓みを計測することで、結合力を測定する。図6(d)にナノチューブからの反射光をガウス型関数でフィッティングし、検出したピーク位置の時間依存性を示す。黄色の範囲はナノチューブが押されている領域、青色の範囲はナノチューブが引っ張られている領域を表す。図より結合が切れる直前のナノチューブの変位が156nmと見積もることが出来た。ナノチューブの直径が70nm、長さが9μmであり、ここからバネ定数はおよそ1.0mN/mと算出されることから、このときの結合力はおよそ150pNである。ナノチューブとタンパク質間に働く共有結合力は6.5nNである[4]ので、この結合は共有結合よりもむしろ、イオン結合や静電気力などの弱い結合を計測したものと考えられる。

より正確に一分子間相互作用を計測するために、バネ定数の予め分かっているAFMプローブ(0.035N/m)によりナノチューブを撓ませたときの、

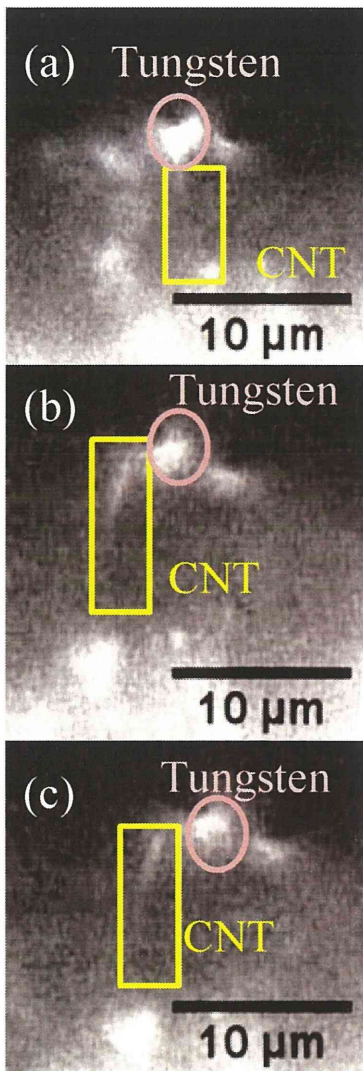


図7 ナノチューブ (CNT) 片持ち梁を用いた抗原-抗体間相互作用力計測

力と変位の関係から、ナノチューブのバネ定数を見積もった。用いたナノチューブは直径67nm、16.3μmであり、計測したバネ定数は $6.4 \times 10^{-4} \text{N/m}$ であった。これらの値からヤング率を求めると、940GPaとなった。この値を用いることにより、抗原-抗体間相互作用力をより正確に求めることが可能になる。

より正確に一分子相互作用力を計測するため、対向のプロブに固定する分子の量を極少量にして抗原-抗体間の相互作用力を計測した。図7に一連の計測の様子を示す。ナノチューブ先端にヤギ産免疫グロブリンGを固定し、対向のタングステンプロブ先端にその抗体を配置して、抗原-抗体を結合させた後、ナノチューブ片持ち梁を離れたときの撓みから相互作用力を見積もった。一連の計測過程を図4に示す。まず図7 (a) のようにナノチューブをタングステンを押しつけることにより抗原抗体を結合させた後、ナノチューブを離していくと、ナノチューブ先端に結合させた抗原とタングステンプロブに接着した抗体との相互作用によりナノチューブが撓んだ (図7(b)、図7(c))。ナノチューブを一定の速度で離れたときの代表的な撓み曲線を図8に示す。相互作

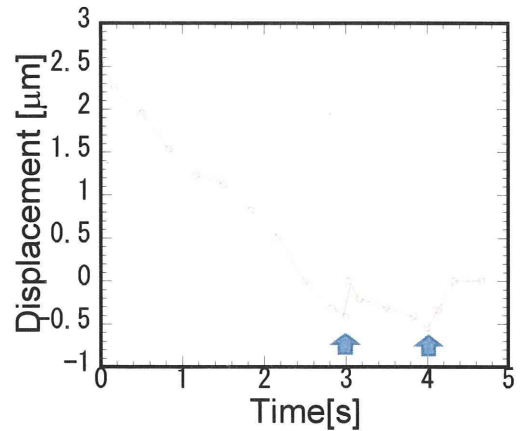


図8 代表的なナノチューブ片持ち梁の撓み曲線

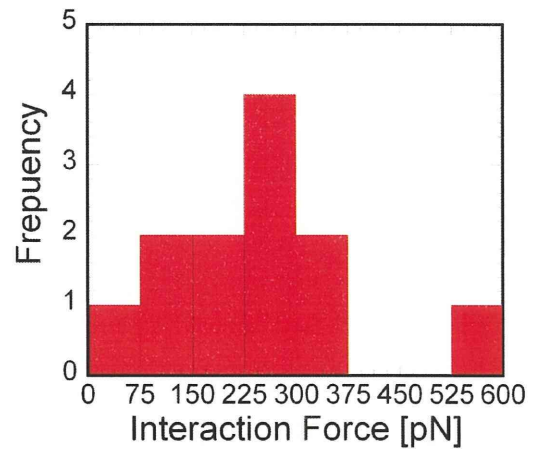


図9 相互作用力の分布

用力に関するピークが矢印で示したように2カ所あり、それぞれタンパク質が解けたところ、抗原-抗体間の結合が解けたところだと考えられる。また2回目の相互作用力を複数回計測した結果が図9である。これより今回測定した抗原-抗体間の相互作用力は $270 \pm 140 \text{pN}$ であると見積もられた。これはこれまでAFMなどを用いて計測された一分子間相互作用力と同程度であり、妥当な値と言える。

AFMを用いた様々なヘモグロビン型の解析

我々はこれまでヘモグロビンCやヘモグロビンS等の遺伝型ヘモグロビン異常がマラリア耐性を示すことを明らかにし、これらの耐性メカニズムは、感染赤血球表面に発現した特異な構造変化が引き起こしている可能性があることを示してきた。本研究ではこれら二つのヘモグロビン型の他に、新たに胎児ヘモグロビンであるヘモグロビンFと、地中海沿岸部に多く見られる α -thalassemiaについても同様にAFMによる解析を行い、特異な構造変化がヘモグロビン型に依存するかどうかを調べた。図10上段にヘモグロビンFをもった感染赤血球表面のAFM像を示す。ヘモグロビンCやヘモグロビンSと同様、通常型

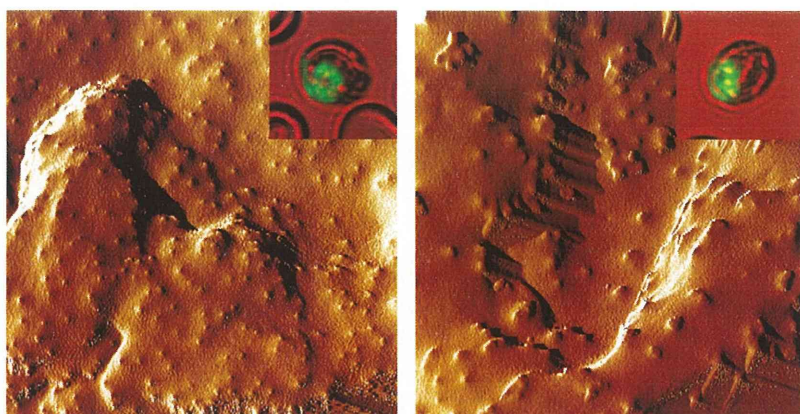
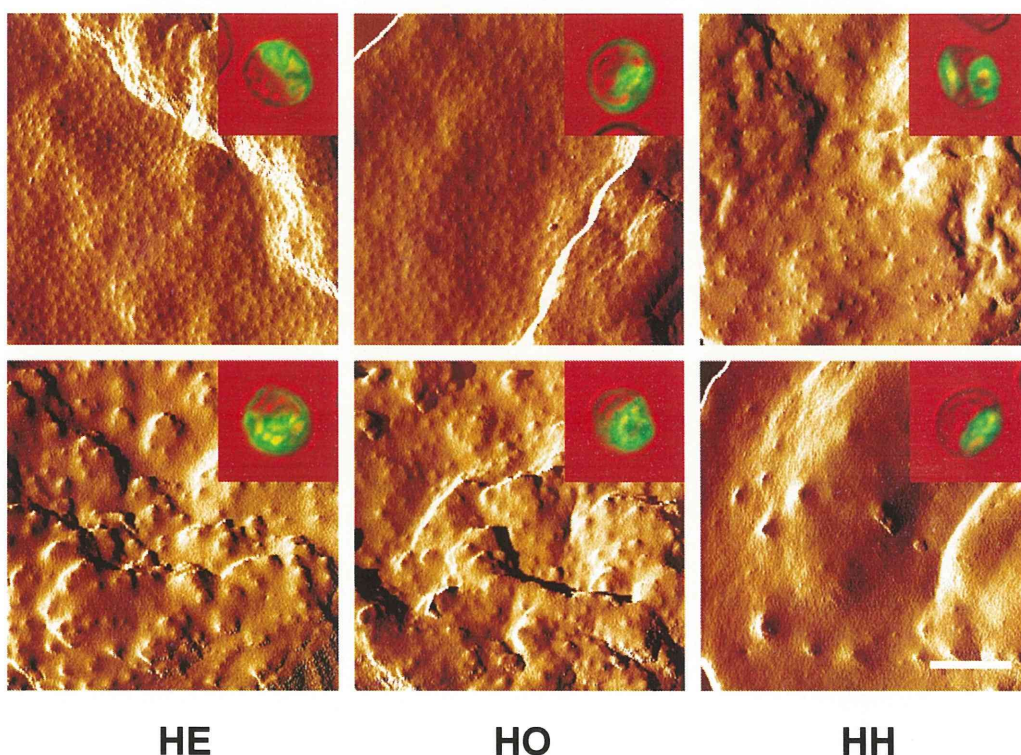


図9 ヘモグロビンFをもつ感染赤血球表面のAFM像



HE

HO

HH

図10 α -thalassemiaをもつ感染赤血球表面のAFM像

の構造変化(図9左)の他に特異的な構造変化(図9右)が見られた。通常型では突起構造の大きさは約50nm、特異的なものは100nm程度であった。またAFM像から明らかなように特異型では密度が小さくなっていた。これはマラリアから発現する、構造変化を引き起こすタンパク質の量は変化がないことを表している。同様の結果は蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡でも確認された[6]。これらの構造変化はヘモグロビンCやヘモグロビンSと同様、細胞膜内側に酸化したヘモグロビンが凝集・堆積し、マラリア由来のタンパク質とコンプレックスを形成して出来ていると考えられる。

図10に α -thalassemiaをもつマラリア感染赤血球表面のAFM像を示す。左からヘテロ、ホモ、ヘモグ

ロビンH症の感染赤血球である。表面の突起構造の詳細な解析から、感染細胞の構造変化は、通常のヘモグロビンAと同様なもの(図10上半分)の他に、ヘモグロビンCやヘモグロビンSで見られた特異な構造変化を持つもの(図10下半分)も数多くあり、これらの構造変化は遺伝型ヘモグロビン異常に共通であることが分かった。これらの特異な構造変化では、突起状構造の大きさが通常と比較して60%以上も大きくなるが密度は低くなり、密度が高く一様な分布を示す通常型とは大きく異なる。この結果からも赤血球表面に発現するマラリア由来のタンパク質は異常ヘモグロビンに依らず一定であり、細胞膜内側に点在したヘモグロビンの凝集体とともに巨大な構造を形成し、その結果表面の特異な構造変化を引き起こ

している [7]。このように遺伝型ヘモグロビン異常に見られる構造変化は、ヘモグロビンの種類に依らず常に発現しており、これらの特異な構造変化がマラリアに対する耐性に繋がっていると示唆される。

D. 結論

本研究では遺伝型ヘモグロビン異常のマラリア耐性メカニズムを解明するため、分子間相互作用力を計測する要素技術を確立した。具体的にはカーボンナノチューブ片持ち梁を用い、タンパク質間の相互作用を光学顕微鏡下で測定する手法を開発した。ナノチューブは通常のAFMプローブに比べ、バネ定数が一桁～二桁も小さく、同じ力を検出する場合でも変位が大きくより正確に計測することが出来る。さらにこれまでの原子間力顕微鏡や光マニピュレーションを用いた手法に比べ、簡便な装置で計測可能であり計測中にタンパク質の挙動を蛍光により観察することもできる。

マラリア感染細胞が血管内壁細胞や他の赤血球と接着する際のレセプターであるCD36を用いた相互作用力計測では、およそ150pNの結合力を計測した。これはナノチューブ先端とタンパク質間の相互作用力よりも遙かに小さく、分子間の弱い結合を検出したものであると考えられる。

さらに高精度で一分子間相互作用力計測を実現するため、より分子濃度を希釈した試料を用いて計測を行った。さらに結合力を正確に算出するため、予めバネ定数が分かっているAFMプローブを用いた変位計測からナノチューブのバネ定数を見積もった。長さ16.3 μ m、直径67nmのナノチューブではバネ定数はおよそ 6.4×10^{-4} N/mとなり、ヤング率は940GPaとなった。この値を用いて抗原-抗体反応の結合力を算出すると、 270 ± 140 pNとなり一分子間の反応として妥当な結合力を計測することができた。

ヘモグロビンFや α -thalassemiaをもつ感染赤血球表面のAFM観察から、特異な構造変化はヘモグロビン型共通に発現していることが明らかになった。これは特異な構造変化からくるマラリア耐性がヘモグロビンCやヘモグロビンSだけでなく、さまざまなヘモグロビン型に共通である可能性があることを示唆する。

今後は実際に感染細胞表面に発現したマラリア寄生虫由来のタンパク質と、血管内壁細胞上タンパク質との相互作用力を計測し、ヘモグロビンの種類による結合力の違いを解明するとともに、原子間力顕微鏡による表面分布の違いとの相関を明らかにすることで、総合的にヘモグロビン異常によるマラリア耐性メカニズムを解明する。

E. 参考文献

[1] R. M. Fairhurst, D. I. Baruch, N. J. Brittain, G. R. Ostera, J. S. Wallach, H. L. Loang, K. Hayton, A. Guindo, M. O. Makobongo, O. M. Schwartz, A. Tounkara, O. K. Doumbo, D. A. Diallo, H. Fujioka, M. Ho, and T. E. Wellems, Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria, *Nature* **435**, 1117 (2005).

[2] T. Arie, R. M. Fairhurst, N. J. Brittain, T. E. Wellems, and J. A. Dvorak, Hemoglobin C modulates the surface topography of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *J. Struct. Biol.*

150, 163 (2005).

[3] R. Cholera, N. J. Brittain, M. R. Gillrie, T. M. Lopera-Mesa, S. A. Diakite, T. Arie, M. A. Krause, A. Guindo, A. Tubman, H. Fujioka, D. A. Diallo, O. K. Doumbo, M. Ho, T. E. Wellems, and R. M. Fairhurst, Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 991 (2008).

[4] H. Maruyama, S. H. Yoshimura, S. Akita, A. Nagataki, and Y. Nakayama, Covalent attachment of protein to the tip of a multiwalled carbon nanotube without sidewall decoration, *J. Appl. Phys.* **102**, 094701 (2007).

[5] S. Sawaya, T. Arie, and S. Akita, Diameter-dependent dissipation of vibration energy of cantilevered multiwall carbon nanotubes, *Nanotechnology* **22**, 165702 (2011).

[6] C. Amaratunga, T. M. Lopera-Mesa, M. J. Brittain, R. Cholera, T. Arie, H. Fujioka, J. R. Keefer, and R. M. Fairhurst, A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to *Plasmodium falciparum* malaria, *PLoS ONE* **6**, e14798 (2011).

[7] M. A. Krause, S. A. S. Diakite, T. M. Lopera-Mesa, C. Amaratunga, T. Arie, K. Traore, S. Doumbia, D. Konate, J. R. Keefer, M. Diakite, and R. M. Fairhurst, α -thalassemia impairs the cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *PLoS ONE* **7**, e37214 (2012).

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Arie, S. Sawano, and S. Akita, A multi-walled carbon nanotube cantilever for interaction force sensing in liquid, *AIP advances*, **2**, 012144 (2012).

2. 学会発表

澤野峻一、有江隆之、秋田成司
生体分子相互作用力計測に向けた片持ち梁カーボンナノチューブの変位検出
第71回応用物理学会学術講演会、講演要旨集17-156.

S. Sawano, T. Arie, and S. Akita
Displacement measurement of carbon nanotube in liquid toward interactive force sensing of biological molecules
MNC2010, 23th International Microprocesses and Nanotechnology Conference

T. Arie, S. Sawano, and S. Akita, Displacement Measurement of a Carbon Nanotube Cantilever in Liquid for Protein Interaction Force Sensing, 11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, 234.

寺田有希, 秋田成司, 有江隆之
片持ち梁カーボンナノチューブを用いた抗原抗体間の相互作用力測定
第42回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム

講演要旨集, 113.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Arie S. Sawano S. Akita	A multi-walled carbon nanotube cantilever for interaction force sensing in liquid	AIP Advances	2	012144	2012

March 2012

Reprinted from
Volume 2 Number 1

AIP | Advances

A Multi-Walled Carbon Nanotube Cantilever for Interaction Force Sensing In Liquid

Takayuki Arie, Shunichi Sawano, and Seiji Akita

A multi-walled carbon nanotube cantilever for interaction force sensing in liquid

Takayuki Arie,^{1,2,a} Shunichi Sawano,¹ and Seiji Akita^{1,2}

¹*Department of Physics and Electronics, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531, Japan*

²*CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan*

(Received 1 November 2011; accepted 18 January 2012; published online 14 February 2012)

We demonstrated the measurement of interaction force between molecules using a multi-walled carbon nanotube cantilever under light microscopy. The deflection of the nanotube cantilever was monitored at the video frame rate during the force measurement. We also investigated the detection sensitivity and stability of our deflection detection system, and indicated that the measurement of “nm order” displacement can be achieved in water by our optical detection technique. The interaction force we measured using a cantilevered nanotube was 230 pN, possibly indicating the force required to rupture the weak bonds between the adsorbed polymers on the tungsten tip and proteins at the tip of the nanotube cantilever. *Copyright 2012 Author(s). This article is distributed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.* [<http://dx.doi.org/10.1063/1.3688763>]

I. INTRODUCTION

Measurement of forces acting on biological molecules is essential to understanding their function in protein folding-unfolding, and ligand-receptor and antigen-antibody reactions. Carbon nanotube (CNT) is a candidate for ideal mass¹⁻⁵ or force⁶⁻⁹ sensing devices, due to its extraordinary characteristics. We have recently studied the energy losses of the CNT oscillation,^{10,11} and the influence of the viscous fluid to the CNT oscillation at various temperatures toward mass measurement of biological molecules.¹² However, with the resonance of CNTs, we are unable to measure the static minute force such as interactions of proteins attached to a CNT. The measurement of the static displacement of a CNT tip is required to use the CNT cantilever as a force sensing device.

Optical detection is one of the displacement measurement methods of the CNT cantilevers.¹⁰ This technique can be applied to real-time observation of conformational changes of biological molecules with a fluorescence microscope.¹³ Since biological molecules can be labeled with fluorescent dye, we can possibly visualize the real-time appearance of folding-unfolding, and/or attaching-detaching of biological proteins while measuring the force by using CNT cantilevers. The real-time visualization using our detection technique is one of the advantages over a widely-used force sensing technique to measure interactions between molecules, atomic force microscopy.

The spring constant k of a cantilevered CNT is an important element for determining the resolution of force sensing, followed by

$$\Delta F = k \Delta x, \quad (1)$$

where ΔF is the applied external force, Δx is the displacement of a CNT tip. The typical spring constant of cantilevered CNTs is around 10^{-4} N/m. This value is two orders of magnitude lower than that of conventional Si or Si₃N₄ cantilevers, implying that CNTs can be used as an ultrasensitive interaction force sensing device of biological molecules. In this study we investigated the static displacement of a multi-walled CNT cantilever in water to estimate the detection sensitivity of our

^aElectronic mail: arie@pe.osakafu-u.ac.jp



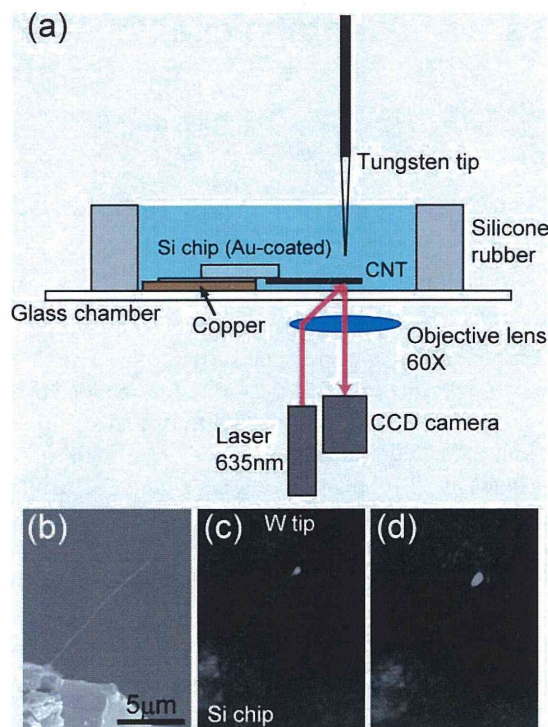


FIG. 1. (a) Schematic diagram of the experimental setup using an inverted optical microscope. (b) Representative scanning electron and (c, d) optical microscope images of a multi-walled CNT cantilever. Note the difference in the scattered light intensity from the CNT tip between (c) nondisplacing and (d) displacing CNTs.

optical detection system, and performed the measurement of molecular interaction force using our optical detection technique.

II. METHODS

Figure 1(a) shows a schematic diagram of our optical detection system. The measurement of the CNT displacement was performed by the irradiation of 635 nm laser to the CNT cantilever in water by optical detection under an inverted optical microscope. The fabrication process of cantilevered CNTs is described elsewhere.¹² Briefly, multi-walled CNTs used were synthesized by chemical vapor deposition, followed by a post annealing at temperatures higher than 1500 °C to improve their stiffness. Individual CNTs were then aligned at the edge of a Si chip by an AC electrophoresis method. Figure 1(b) shows a typical scanning electron micrograph of the CNT cantilever used in this study. When CNTs displace by applying a DC voltage between the substrate and tungsten tip, the scattered light intensity from the CNT tip changes compared to nondisplacing CNTs (Figs. 1(c) and 1(d)). We then analyzed a series of images recorded with a CCD camera, with which the changes in the scattered light intensity can be calculated at each pixel of images between nondisplacing and displacing CNTs. As CNTs displace, the change in the scattered light increases as noted in Figs. 1(c) and 1(d).

To chemically activate the tip of a CNT cantilever, we induced defects onto the CNT tip by high power (~ 20 mW) laser irradiation in air. In this way, the CNT tip was opened, as shown in Figs. 2(a) and 2(b), and carboxyl groups were induced by the oxidation. Subsequently, we used a typical di-imide-activated amidation process to conjugate proteins with the carboxyl groups at the open-ended tip of the sharpened CNT.¹⁴ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl (EDC), which acts as a zero-length cross-linker, was mixed with N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS). The CNTs were immersed into the mixture in the glass chamber to activate the CNT tip.¹⁵

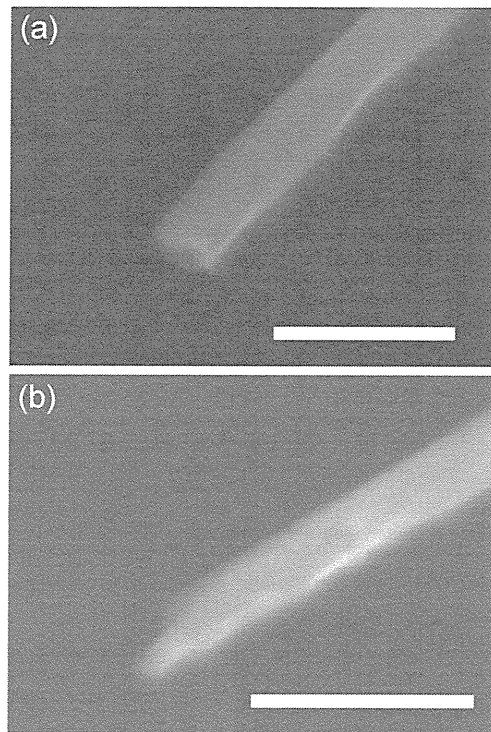


FIG. 2. Scanning electron micrographs of a CNT tip (a) before and (b) after the laser irradiation in air. Carboxyl groups were introduced at the open-ended CNT tip by the oxidation. Bars in (a) and (b) denote 200 nm.

After 1 h reaction, the EDC and sulfo-NHS solution were washed away with borate buffered saline (50 mM, pH=7.9) to avoid nonspecific binding of the proteins.

For binding proteins, we first coated a tungsten tip with poly-L-lysine, which promotes the attachment of the proteins. The proteins were then attached to the tungsten tip to react with an activated CNT tip. In this study, we used CD36, an integral transmembrane protein of vertebrate cells, especially known as a binding receptor on endothelium to the erythrocytes infected with malaria.¹⁶ For the force measurement, a CD36-attached tungsten tip was engaged to an activated CNT tip to form amino bonds between semi-stable amine-reactive NHS-esters at the CNT tip and proteins, resulting in producing CNT-CO-NH-protein bonds. The reaction was performed in borate buffered saline for several seconds. By using our optical detection technique, we captured the change in displacement of the activated CNT by engaging and disengaging the CD36-coated tungsten tip repeatedly.

III. RESULTS AND DISCUSSION

Accurate detection of the displacement of a CNT cantilever is very crucial for the force resolution. Prior to the measurement of interaction forces between molecules, we measured the measurement sensitivity and stability of the CNT cantilever in water using our optical detection system. The diameter of the CNT used was less than 80 nm, which is much smaller than the diffraction limit of light. Therefore, the image captured by a CCD camera is mainly the scattered light from the CNT surface. To discuss the spatial resolution of our setup, we estimated the stability of Gaussian peak position of sectional intensity profiles of the CNT (Fig. 3 inset). The full width at half maximum is ~ 800 nm, and 1 pixel of the CCD corresponds to ~ 100 nm at the objective plane in our setup. Slenderness of CNTs is another advantage for accurate displacement measurement because the intensity profile can be fitted to Gaussian function, enabling the unambiguous identification of the CNT deflection by measuring the Gaussian peak position mathematically as used in fluorescence

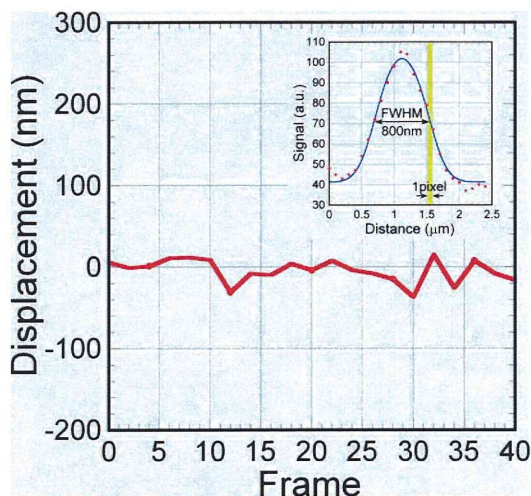


FIG. 3. The Gaussian peak position of sectional intensity profiles of a CNT tip. Inset is a cross sectional profile of a CNT cantilever in water.

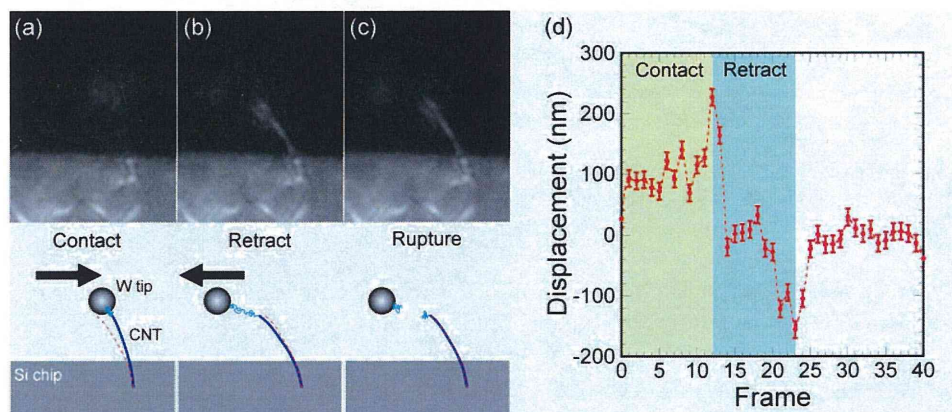


FIG. 4. Optical micrographs during the attraction between the CNT tip and proteins attached to the tungsten tip, when (a) the CNT was pushed by the tungsten tip, (b) the CNT was pulled by the interaction force, and (c) the CNT came back to the initial position, with corresponding schematic illustrations. The dotted red lines in the corresponding illustrations denote the initial position of the CNT. (d) Representative displacement curve of the CNT tip during a series of the reaction process as shown in (a) to (c).

microscopy analyses.^{17,18} Figure 3 shows the relative sectional profile peak position with respect to the video frame. The standard deviation of the position was estimated to be 14 nm. Therefore, despite the disturbances such as Brownian motion and thermal noise in water, the resolution of 14 nm can be achieved for the deflection detection. Based on our previous report, the average Young's modulus of the multi-walled CNTs used is 300 GPa.¹⁹ Since the multi-walled CNTs are equivalent to homogeneous cylinders,²⁰ we estimate the spring constant as 1.46×10^{-3} N/m. Therefore, the force resolution is 20 pN using the CNT cantilever with our experimental setup. This indicates that the CNT cantilever can be applied to measure the extremely small forces such as the interaction force of biological molecules.

We performed the measurement of interaction forces between molecules by engaging and disengaging the tungsten tip as shown in Fig. 4. When the tungsten tip pushed the CNT cantilever as shown in Fig. 4(a), the CNT tip was bent with the distance of 200 nm. The CNT was then pulled to measure the interaction force between molecules as shown in Fig. 4(b). The CNT came back to the initial position when the bond between molecules ruptured (Fig. 4(c)). Figure 4(d) shows the displacement of the CNT tip with respect to the video frame during a series of the reaction

as shown in Fig. 4(a) to 4(c). The displacement of the CNT tip was 156 ± 14 nm when the CNT detached the tungsten tip. With the spring constant of 1.46×10^{-3} N/m as estimated above, the force was calculated to be 230 pN. According to *ab initio* calculations in our previous report,¹⁵ the force required to break the covalent bond between an activated CNT tip and proteins is about 6.5 nN. Since the force estimated from our experimental results was much weaker than the covalent binding force obtained by *ab initio* calculation, the force we measured using the CNT cantilever was not the force to break the covalent bonding between the activated CNT tip and proteins, but rather the weaker rupture force between the adsorbed polymers²¹ on the tungsten tip and the proteins.

In conclusion, we performed the measurement of the interaction force between molecules using a multi-walled CNT cantilever with our optical detection technique. The interaction force was 230 pN, much weaker than the covalent binding force calculated by *ab initio* calculation, possibly indicating that the force we measured was the rupture force between the adsorbed polymers and the proteins. Finally, the optical detection technique can be applied to measure the minute force such as binding force or folding-unfolding force between biological molecules, which will be the further study.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by Grant-in-Aid for Scientific Research and Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT), and Health and Labour Sciences Research Grants on Research on global health issues, Ministry of Health, Labour and Welfare.

- ¹ P. Poncharal, Z. L. Wang, D. Ugarte, and W. A. de Heer, *Science* **283**, 1513 (1999).
- ² M. Nishio, S. Sawaya, S. Akita, and Y. Nakayama, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 133111 (2005).
- ³ M. Nishio, S. Sawaya, S. Akita, and Y. Nakayama, *J. Vac. Sci. Technol. B* **23**, 1975 (2005).
- ⁴ S. Sawaya, S. Akita, and Y. Nakayama, *Appl. Phys. Lett.* **89**, 193115 (2006).
- ⁵ K. Jensen, K. Kim, and A. Zettl, *Nat. Nanotechnol.* **3**, 533 (2008).
- ⁶ N. Choi, T. Uchihashi, H. Nishijima, T. Ishida, W. Mizutani, S. Akita, Y. Nakayama, M. Ishikawa, and H. Tokumoto, *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 3707 (2000).
- ⁷ T. Uchihashi, N. Choi, M. Tanigawa, M. Ashino, Y. Sugawara, H. Nishijima, S. Akita, Y. Nakayama, H. Tokumoto, K. Yokoyama, S. Morita, and M. Ishikawa, *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, L887 (2000).
- ⁸ G. Singh, P. Rice, and R. L. Mahajan, *Nanotechnology* **18**, 475501 (2007).
- ⁹ S. Kwon, H. Park, H. C. Shim, H. W. Lee, Y. K. Kwak, and S. Kim, *Appl. Phys. Lett.* **95**, 013110 (2009).
- ¹⁰ S. Fukami, T. Arie, and S. Akita, *Jpn. J. Appl. Phys.* **48**, 06FG04 (2009).
- ¹¹ S. Fukami, T. Arie, and S. Akita, *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**, 06GK02 (2010).
- ¹² S. Sawano, T. Arie, and S. Akita, *Nano Lett.* **10**, 3395 (2010).
- ¹³ S. Kwon, H. W. Lee, H. Park, and S. Kim, *Meas. Sci. Technol.* **21**, 085104 (2010).
- ¹⁴ W. J. Huang, S. Taylor, K. F. Fu, Y. Lin, D. H. Zhang, T. W. Hanks, A. M. Rao, and Y. P. Sun, *Nano Lett.* **2**, 311 (2002).
- ¹⁵ H. Maruyama, S. H. Yoshimura, S. Akita, A. Nagataki, and Y. Nakayama, *J. Appl. Phys.* **102**, 094701 (2007).
- ¹⁶ J. W. Barnwell, A. S. Asch, R. L. Nachman, M. Yamaya, M. Aikawa, and P. Ingravallo, *J. Clin. Invest.* **84**, 765 (1989).
- ¹⁷ R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, *Biophys. J.* **82**, 2775 (2002).
- ¹⁸ P. Spence, V. Gupta, D. J. Stephens, and A. J. Hudson, *Eur. Biophys. J.* **37**, 1335 (2008).
- ¹⁹ S. Sawaya, T. Arie, and S. Akita, *Nanotechnology* **22**, 165702 (2011).
- ²⁰ S. Akita, H. Nishijima, Y. Nakayama, F. Tokumasu, and K. Takeyasu, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **32**, 1044 (1999).
- ²¹ R. Lévy and M. Maaloum, *J. Phys.: Condens. Matter* **16**, 7199 (2004).