

# 生体分子の動的プロセスを直接可視化する高速 AFM

## High-speed Atomic Force Microscopy for Directly Visualizing Dynamic Biomolecular Processes

安 藤 敏 夫

Toshio Ando

金沢大学理工研究域数物科学系

**要 旨** タンパク質の機能メカニズムの解明に向けて、個々のタンパク質分子の動的プロセスを高い空間時間分解能で直接可視化できる高速 AFM を開発した。AFM に含まれるすべてのデバイスを高速化し、スキャナーの振動抑制技術や探針・試料間接触力の低減化技術を開発した。条件にもよるが、1 画像を 40 ~ 70 ms の時間で撮ることが可能となった。しかも、デリケートなタンパク質間相互作用を乱さずにイメージングできる。この新規顕微鏡によりタンパク質の機能中のダイナミックな振る舞いを直接映像として捉えることに成功し、且つ、その映像データからタンパク質の機能メカニズムを解明できることを実証した。本稿では、高速 AFM 開発の動機をまず述べ、装置開発の概略、得られた映像、今後の展望について解説する。

**キーワード**：原子間力顕微鏡，イメージング，タンパク質，動的プロセス，可視化

### 1. はじめに

より直接的な理解はすべての科学に求められる。データと結論の間に仮定や込み入った解釈ができるだけ入り込まないことが理想である。タンパク質の研究でも同様である。ナノメータサイズのタンパク質の精緻且つ高度な機能がどのように実現されているかをめぐる研究において、アボガドロ数に近い分子数の集団を相手に研究が長い間進められてきた。例えば、筋収縮のメカニズムを探る研究では、試験管の中で起こる生化学的な反応 (ATP 分解反応) を測定する一方、筋ファイバーの電子顕微鏡観察による構造解明や、筋ファイバーの X 線回折像から収縮力の発生に関わると推定されるタンパク質の動きを探ることが長い間行われてきた。優れた研究者のひらめきにより分子メカニズムが提唱されたものの、その是非はなかなか決着しない。今から 20 数年前に、この状況を打破すべく 1 分子生物学が誕生した。個々の分子の振る舞いを、ラベル分子が発する蛍光の輝点の動的観察から探る手法である。種々の蛍光分子、明るい光学顕微鏡、感度の高いビデオカメラ、エバネッセント照明という技術がそれを可能にした。この手法及び光ピンセットを利用したナノメータ計測により、以前とは比較にならない直接さでタンパク質の働きの詳細が明らかにされた。それでもなお、蛍光輝点の振る舞いからタンパク質の振る舞いを推測するしかなく、同じデータであっても解釈の違いにより、異なる結論に達することもある。す

なわち、直接性の程度が未だ不十分ということである。ラベルを介さず直接タンパク質分子の構造形態とそのダイナミックな振る舞いを同時に観察することができれば、この直接性の程度は飛躍的に高まるはずである。それを可能にする技術は何か？ 液中にある試料をナノメータの解像度で直接観察できる唯一の顕微鏡、原子間力顕微鏡 (AFM)、を高速化した高速 AFM 以外にはなさそうである。こう考えたのは今から 15 年以上も前のことであった。意外ではあるが、バイオ用に限らず高速 AFM の開発に取り組んだ研究室は非常に少ない<sup>1,2)</sup>。私の研究室<sup>3)</sup> 以外に、スタンフォード大の Quate 研<sup>4)</sup>、UC Santa Barbara の Hansma 研<sup>5)</sup>、Bristol 大の Miles 研<sup>6)</sup> のみであった。現在でも装置開発を継続しているのは我々の研究室と以前 Hansma 研のポスドクであった Schitter の研究室 (Delft 工科大) だけである。

### 2. AFM によるイメージングの原理と高速化への技術的課題

図 1 に、Tapping Mode AFM 装置の概略を示す。共振周波数で Z 方向に振動しているカンチレバーの探針が試料に接触すると、振幅・位相が変化する。カンチレバーのたわみ量に比例する信号が 2 分割フォトダイオードの出力電圧の差として出力され、振幅計測器 (或いは、RMS-DC 変換器) によって振幅値 (或いは、RMS 値) に変換される。この振幅値と振幅の目標値 (セットポイント振幅) との差信号 (エラー信号) を比例・積分・微分した信号が PID フィードバック回路から出力される。この出力をピエゾドライバーに入力し、Z スキャナーを、エラー信号を最小化するように動かす。この動作により、XYZ スキャナーは試料表面をなぞるように

〒 920-1192 金沢市角間町  
TEL: 076-264-5663; FAX: 076-264-5739  
E-mail: tando@kenroku.kanazawa-u.ac.jp  
2009 年 12 月 31 日受付

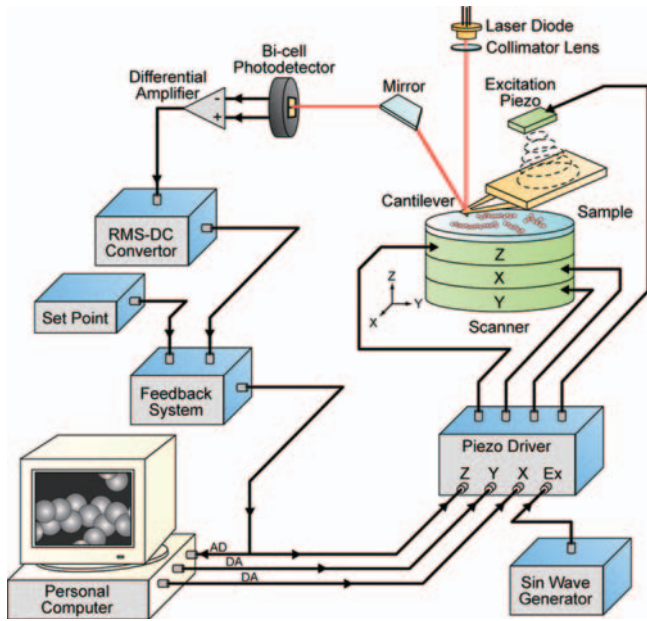


図1 Tapping Mode AFM 装置の概略図。

動く。従って、PID 回路の出力を XY 各点についてプロットすると、基板に載せた試料の形状が再現される。Tapping Mode では、探針が上下に振動するため、探針・試料の接触時間は短く、探針から試料に横方向の力はほとんど作用しない。それ故、この Mode は生体分子の観察に最も多く利用されている。

市販の AFM では 1 画像を撮るのに分のオーダーの時間がかかる。高速バイオ AFM 実現の第一の技術的課題は、フィードバックループに含まれるすべてのデバイス的高速化である。他の顕微鏡と比べ AFM のイメージング速度が遅い最大の要因は機械走査と力学的検出(カンチレバー)にある。従って、スキャナーとカンチレバーの高速化は特に重要である。第 2 の課題は、高速走査によって生ずる機械振動のダンピング、第 3 の課題は高速性と低侵襲性の両立である。

### 3. 可能な最高イメージング速度とフィードバック帯域

走査範囲  $W \times W$  を走査線数  $N$  本でイメージングするのにかかる時間を  $T$  とすると、X 方向の走査速度は  $V_s = 2WN/T$  で与えられる。試料が周期入のサイン波形状をしていると仮定すると、探針・試料間距離を一定に保つために試料ステージを Z 方向にフィードバック走査する周波数は  $f = V_s/\lambda$  で与えられる。フィードバック帯域  $f_B$  は  $f$  以上でなければならないので、式 (1) が成り立つ。

$$f_B \geq 2WN/\lambda T. \quad (1)$$

フィードバック制御は後追い処理なので、試料ステージの動きは試料表面を遅延なくトレースすることはできない。各デバイスの遅れ時間の総和、PID 制御回路でエラー信号を積分する時間  $\tau_i$ 、そして、パラシューティング時間  $\tau_p$  によってフィードバック帯域は決定される。ここでパラシューティ

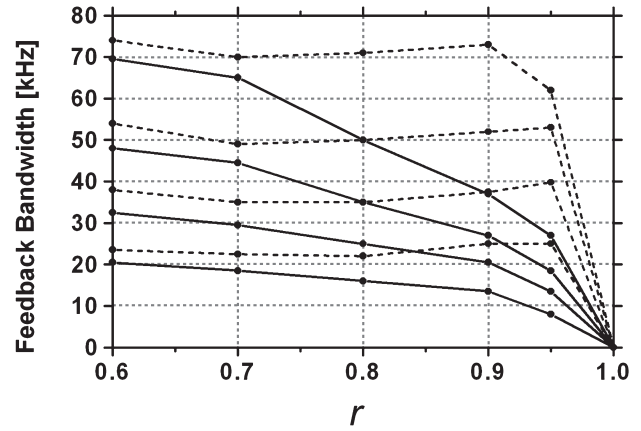


図2 フィードバック帯域とセットポイントとの関係。実線：通常の PID 制御の場合、破線：ダイナミック PID 制御の場合。それぞれの 4 組の線は上から下に、 $2A_0/h_0=5, 2, 1, 0.5$  の場合に対応する。

ングとは、試料の急な降り勾配で探針が試料表面から完全に離れ、再着地までに時間がかかることを意味する。通常フィードバック帯域は  $45^\circ$  の位相遅れが生ずるフィードバック周波数で定義され、フィードバック帯域  $f_B$  は以下のように表される<sup>7)</sup>。

$$f_B = \alpha \frac{f_c}{8} \left( 1 + \frac{2Q_c}{\pi} + \frac{2Q_s f_c}{\pi f_s} + 2f_c(\tau_p + \tau_i + \delta) \right). \quad (2)$$

ここで、 $f_c$  と  $f_s$  はそれぞれカンチレバー（水中）と Z スキャナーの最低共振周波数、 $Q_c$  と  $Q_s$  はそれぞれカンチレバーと Z スキャナーの Q 値、 $\delta$  は上述したデバイス以外の応答時間の総和、 $\alpha$  は PID 回路の（比例+微分）による位相遅れ補償効果を表す。 $\tau_i$  と  $\tau_p$  は色々なパラメータの関数で、解析的に表現することは難しいが、実験と理論的考察との照合により、以下のように求められた<sup>8)</sup>。

$$\tau_p = (\tan\beta/\beta - 1)/f_c, \quad (3)$$

$$\tau_i = 4h_0 \sin(\varphi/2)/(A_0 f_c). \quad (4)$$

ここで、 $\beta$  は

$$\beta = \cos^{-1}[A_s(1-r)/\{5h_0 \sin(\varphi/2)\}] \quad (5)$$

であり、カンチレバーの自由振動振幅  $A_0$ 、サイン波形状をした試料の最大の高さ  $h_0$ 、無次元のセットポイント振幅  $r$  の関数である。 $A_s$  を peak-to-peak のセットポイント振幅とすると、 $r = A_s/(2A_0)$  となる。 $\varphi$  は試料表面トレーシングの位相遅れ（フィードバック帯域の走査周波数では  $45^\circ$ ）である。図 2 に示すように、フィードバック帯域はセットポイントを大きくしていくと下がるが、これはパラシューティングが  $r$  の増大とともに著しくなるからである。また、 $2A_0/h_0$  の減少とともに、フィードバック帯域は下がる。フィードバック帯域は目安であり、 $45^\circ$  の位相遅れで生ずる探針・試料間にかかる力が強すぎる試料では、式 (2) が与える周波数よりもフィードバック走査周波数が小さくなるように、イメージング速度を下げる必要がある。

#### 4. 装置開発の概略

概略だけを述べる。詳細に関しては最近の総説を参照されたい<sup>8)</sup>。オリンパスと共同で窒化シリコン製の微小カンチレバー（長さ  $6\ \mu\text{m}$ 、幅  $2\ \mu\text{m}$ 、厚さ  $90\ \text{nm}$ ）を開発した（図 3a）。大気中での共振周波数は  $3.5\ \text{MHz}$ 、水中では  $1.2\ \text{MHz}$ 、ばね定数は  $0.1\sim 0.2\ \text{N/m}$ 、水中での  $Q$  値は  $2\sim 3$  である。探針は十分に先鋭化されていないので、フェノール結晶を昇華させ、Electron Beam Deposition (EBD) 法により針を形成させた。更にプラズマエッチング処理し、約  $4\ \text{nm}$  の先端曲率半径を得た。

$Y$  ピエゾが  $X$  ピエゾを  $Y$  方向に変移させ、 $X$  ピエゾが  $Z$  ピエゾを  $X$  方向に変移させ、 $Z$  ピエゾが試料ステージを  $Z$  方向に変移させる構造のスキナーを開発した（図 3b）。振動を抑制するために、最も高い走査周波数が要求される  $Z$  スキナーに 2 種のカウンターバランス法を採用した：(1) 2 つの  $Z$  ピエゾを同時に、同じ距離だけ反対向きに変移させる<sup>3)</sup>、(2) ひとつのピエゾ素子の固定法を工夫して、質量中心が変移しないようにする。小さいピエゾ素子の固定が容易な (1) の方法を採用した場合、片端固定のため共振周波数はピエゾ素子の自由振動の共振周波数 ( $400\ \text{kHz}$ ) の半分以下に下がる ( $171\ \text{kHz}$ )。小さいピエゾ素子の固定法を種々試みたところ、 $Z$  ピエゾの変移方向に平行な 4 辺を固定する方法が最も有効であった<sup>9)</sup>。利用できる最大変位は、片面固定の場合の半分になるが、固定による共振周波数の低下はほとんど起こらず、自由振動の共振周波数をほぼ維持できた ( $370\ \text{kHz}$ )。  $X$  ピエゾについては、両端をフレクチャーで挟むカウンターバランス法を採用した（図 3b）。3 軸間のクロストークが生じないように、変位方向に柔らかく、変位に直角な方向に硬いフレクチャー（板ばね）を用い、また、モノリシック加工により、 $60\ \text{kHz}$  の共振周波数を得た。

$X$  走査波形は既知且つ周期的であるので、逆伝達補償のフィードフォワード制御によって  $60\ \text{kHz}$  の共振ピークをダンピングした。または、三角波の角を丸めた波形でドライブする方法も有効であった。 $Z$  走査波形は既知でないので、フィードバックによる振動抑制法として知られる  $Q$  値制御法を採用した。走査対象の速度に比例する信号の位相を  $180$  度反転させ、それを走査駆動信号に加える方法である。見かけ上、摩擦力（粘性抵抗）を増加させることになるため、振動がダンピングされる。この方法の  $Z$  スキナーへの適用では、 $Z$  スキナーの変位もしくは速度を計測しなければならないが、実際には非常に難しい。そこで、実際の  $Z$  スキナーとほぼ同じ伝達関数をもつ擬似スキナー（LRC 回路）の出力を利用する方法を我々は開発した<sup>10)</sup>。

高速振幅計測器として、サイン波振動のピークとボトムの電圧値をホールドし、その差を振幅値として出力する回路を以前開発した<sup>3)</sup>。半周期ごとに振幅値を更新できるが、2 点の電圧しか利用していないため、ノイズを捨てる。そこで、1 周期ごとに振動の 1 次フーリエ係数を求め、その係数から

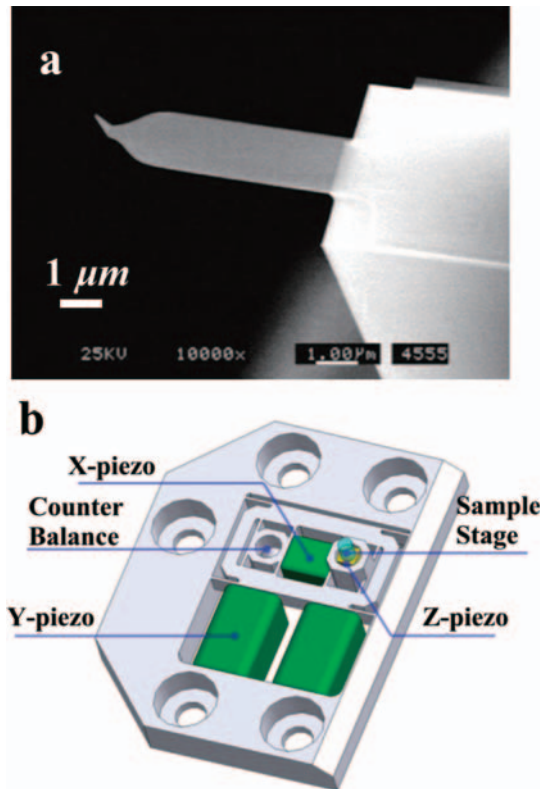


図 3 微小カンチレバーの SEM 像 (a) と高速スキナーの模式図 (b)。

振幅値を出力するアナログ・デジタルハイブリッド回路を開発した。フーリエ法の方が、カンチレバーの熱揺らぎの影響を受けにくいため、ノイズはピークホールド法の  $1/4$  程度になった<sup>8)</sup>。

上述のデバイスと次節で述べるダイナミック PID 制御法・ドリフト補償法以外に、高速位相検出器<sup>11)</sup>、フィードフォワード制御法<sup>12)</sup>、任意伝達関数に対する逆伝達関数自動生成回路<sup>13)</sup>、カンチレバーの光駆動法<sup>13)</sup>などを開発した。エレクトロニクスのほとんどはアナログ回路を採用している。FPGA や DSP を利用したデジタル回路よりも高速だからである。しかし、装置の改良の度に回路を新たに製作しなければならないが、効率が悪い。最近、デジタルの FPGA ボードに対応するアナログの FPAA ボードが製品化され始め、ソフトウェアで回路を変更することが可能になってきた。この新しい手法を組み入れる検討を現在進めている。

#### 5. 高速性と低侵襲性との両立

低侵襲性を図るためには探針が試料を叩く力を小さくする必要がある。それには、セットポイント  $r$  を  $1$  に近付けないといけないが、パラシューティングが頻繁に起こり、フィードバック帯域が著しく下がるため、低侵襲性と高速性は両立しない。試料の降り勾配でパラシューティングが起こった場合、カンチレバーは自由振動し、そのときのエラー信号は  $2A_0(1-r)$  で飽和する。 $r$  が  $1$  に近いと、飽和エラー信号は小



さくフィードバック走査は遅くなり、パラシューティングが長く続く。試料の昇り勾配では、カンチレバーの振幅はセットポイント振幅よりも小さくなるが、振幅がゼロにならない限りエラー信号は飽和することはない。このエラー信号の非対称性が問題の本質である。この非対称性をみかけ上なくすダイナミック PID 制御法を開発した<sup>7)</sup>。カンチレバー振幅に応じて、PID フィードバックのゲインをダイナミックに自動調整する。この効果は劇的であり、セットポイント  $r$  を 0.95 程度まで上げてパラシューティングが起らない (図 2 の破線)。これにより、カンチレバー探針が試料に軽く接触する状態で高速走査することが可能になった。しかし、まだ問題がある。例えば、 $A_0 = 1$  nm,  $r = 0.9$  とした場合、 $2A_0(1-r)$  は 0.2 nm しかない。従って、カンチレバーの自由振動振幅をオングストロームレベルで一定になるように、カンチレバーの励振効率を制御する必要がある。しかし、走査中に自由振動振幅を計測できない。そこで、励振効率のドリフトによる探針・試料間の接触の強さの変動をモニターするために、カンチレバー振動の 2 次共振振幅をモニターし、それが一定になるように励振パワーを調節する制御を試みた。制御の時定数は高速 AFM の 1 画像取得時間よりも長くし、試料の凹凸に起因する 2 次共振振幅の変動に影響されず、平均の接触力を一定に保つようにした。  $r \sim 1$  でも長時間安定なイメージングが可能になった<sup>7)</sup>。

以上の技術によりどの程度の力が試料にかかっているか見積もってみよう。開発した微小カンチレバーのばね定数  $k_c$  は 0.1 ~ 0.2 N/m で、水中での Q 値 ( $Q_c$ ) は約 2.5 である。もろい試料では、カンチレバーの自由振動振幅  $A_0$  を 1 ~ 2 nm に、セットポイント  $r$  を 0.9 程度に設定している。従って、探針が試料を叩く力  $k_c A_0 \sqrt{1-r^2}/Q_c$  は 17 ~ 70 pN 程度である。モータタンパク質が発生する力は数 pN であるから、かなり大きな力で試料を叩いていることになる。しかし、対象に変化を与える物理量は力そのものではなく激力 (力 × 力が作用する時間) である。カンチレバーの水中での共振周波数  $f_c$  は ~ 1.2 MHz であり、力が作用する時間は 100 ns 以下である。従って、激力は小さい。

## 6. タンパク質の動的イメージング

### 6.1 Bacteriorhodopsin

高度好塩菌 *Halobacterium Salinarum* の細胞膜には紫色のパッチ (紫膜) が存在し、この紫膜は bacteriorhodopsin (bR) の 2 次元結晶である。結晶中で bR は 3 量体を形成し、3 量体は六方格子状に配置されている。円状の 2 次元結晶の外側に bR 分子の密度が低い領域が存在する。この境界部を観察したところ、bR が結合・解離を繰り返す様子が見えた<sup>14)</sup> (図 4a-c ; bR のいくつかの高速 AFM 映像は [http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/bR\\_movies.htm](http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/bR_movies.htm) に掲載)。単体、2 量体の結合・解離も観察されるが、ほとんどが 3 量体で結合・解離していた。すなわち、濃度の低い周辺部で bR はすでに 3 量体を形成している。結晶内部では各 3 量体は 6 個の結合

手で周辺の 3 量体と結合しているが、境界部では 1, 2, あるいは、3 個の結合手で結合する (図 4d)。それぞれの結合手の数に応じて、3 量体の結合寿命は異なっていた。結合手が 2 個の場合の平均寿命  $\tau_2$  は 0.19 s, 3 個の場合の平均寿命  $\tau_3$  は 0.85 s であった。この違いは結合の自由エネルギーの差  $E_3 - E_2$  による。すなわち、

$$\tau_2/\tau_3 = \exp[(E_3 - E_2)/k_B T], \quad (6)$$

ここで、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は絶対温度である。従って、結合手一本あたりの結合エネルギーは  $-1.5 k_B T$  (300 K で  $-0.9$  kcal/mol に対応) と決定された。

bR は 7 本の膜貫通型  $\alpha$  ヘリックス 7 本 (A-G) と色素レチナールから成る。ヘリックス G の Lys216 にシッフ塩基を介して共有結合しているレチナールが緑色の光を吸収すると *all-trans* から *13-cis* に異性化する。この異性化が引き金となって、bR は構造変化し、それに伴い細胞質側から細胞外側にプロトンが運ばれる。分光学的に区別できる中間体 (K, L, M, N, O) が存在し、 $M \rightarrow N$ ,  $N \rightarrow O$  の遷移は ms の時間で起こるのに対し、それ以外の遷移はずっと速く起こる。他方、光吸収に伴う bR 分子の構造変化については、X 線結晶構造解析や電子顕微鏡観察による研究はあるものの、詳しいことはよく分かっていない。そこで、光照射に伴う bR 分子の変化を高速 AFM で観察した。ワイルドタイプ (WT) のフォトサイクルは 10 ms 程度で完了するため、10 ms のイメージング速度でも光照射に伴う bR 分子の形態的な変化を捉えることはできなかった。そこで、D96N ミュータントを観察した<sup>15)</sup>。D96 はプロトンの通過経路に位置し、 $M \rightarrow N$ ,  $N \rightarrow O$  の遷移に関係している。従って、D96N のフォトサイクルは

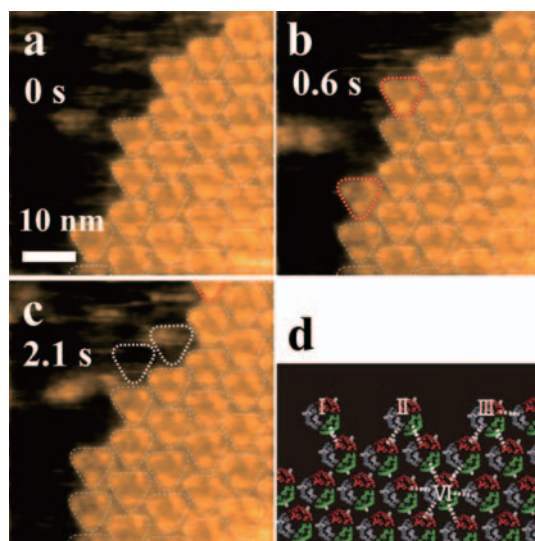


図 4 結晶領域と非結晶領域の境界部の AFM 像 (a, b, c)。赤い破線で囲った bR 分子は新たに結合した bR3 量体を表す。白の三角形は以前に結合していた 3 量体を表す (2.1 s)。イメージング速度は 3.3 frames/s。Z 方向の輝度の範囲は 3.8 nm。(d) 結晶のエッジ部での bR3 量体の結合 (I, II, III) と結晶内部での結合 (VI) の模式図。ローマ数字は結合手 (破線) の数を表す。

～10 s と極めて長い。しかし、プロトンポンプの機能は持っている。

紫膜の細胞外側の面では、光照射に伴う変化は観察されなかったが、細胞質側で大きな変化が観察された (図 5a, b)。各 bR 分子の重心位置は、3 量体の中心から外側に約 0.7 nm 移動し、且つ、反時計周りに約 7.5 度回転した。結晶構造との比較から、E-F ヘリックスループが大きく移動し、それ以外はほとんど動かず、その結果、bR 表面は 2 つの突起に分かれた。また、この大きな移動に伴い、隣り合う 3 量体にそれぞれ属する最隣接 bR の 3 つ組 (3 量体と区別するために Trefoil と名付けた) は強く接触するように観察された (図 5c, d の模式図を参照)。この強い接触はフォトサイクルに何らかの影響を及ぼしているに違いない。それを調べるために、照射する光強度を変えて励起される bR 分子の数を調節した。光強度が弱い場合、ひとつの Trefoil 中の bR3 分子の内 1 分子だけが励起され構造変化した。光 off 後の基底状態への遷移時間を測定したところ、励起寿命は約 7 s であった。一方、光強度を強くした場合には、ひとつの Trefoil 内で 2 ないしは 3 分子が励起された。興味深いことに、平均励起寿命は約 2 s と約 13 s に大きく分かれた。励起寿命の短い分子は光照射中に何回かフォトサイクルを行う。更に詳しく見てみると、光照射して最初に励起された bR 分子が長い励起寿命をもち、後で励起された bR 分子が短い励起寿命をもつことが判明した。また、短い励起寿命をもつ分子の励起寿命の分布は単一指数関数に従うのに対し、長い寿命をもつ分子では山型の分布を示した。以上のことから、Trefoil 内での bR 分子間相互作用により、正・負の協同性が同時に生ずることが明らかとなった。重要なことは、この協同性は 3 量体中での bR 分子間相互作用によるものではないことである。正・負の協同性が同時に現れる結果、それらの効果は打ち消

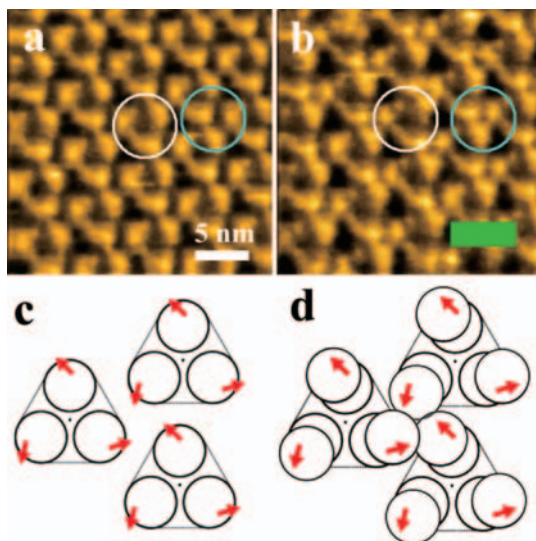


図 5 細胞質側の bR2 次元結晶面の光照射による構造変化を捉えた AFM 像 (a, b) とその模式図 (c, d)。(a, c): 光照射前, (b, d): 光照射中。白い円で囲った部分は 3 量体, 水色の円で囲った部分は Trefoil を示す。イメージング速度は 1 frame/s。

しあう。すなわち、全体としては、フォトサイクルタイムは光強度に依存せず一定に保たれるが、これは正・負の協同性が共存することによって実現されている。

## 6.2 myosin V の歩行運動

Myosin V は ATP の加水分解のエネルギーを使って actin filament 上を 1 分子で連続的に歩行するモータータンパク質である<sup>16)</sup>。図 6a に示すように、N 端にあるモータードメインに長いネックが続く。ネックは 6 個の IQ モチーフをもち、そこに Calmodulin が結合している。モータードメインとネックを合わせて頭部 (head) と呼ぶことにする。ネックの先には Coiled-coil の尾部があり、尾部の先 (C 端) に輸送すべきカーゴが結合する。1 分子蛍光技術を使って、72 nm の歩幅で、Hand-over-hand 様式 (2 つの頭部が交互に前足と後ろ足になる) で運動することが明らかにされている<sup>17-19)</sup>。しかし、歩行メカニズムに関して、未解明な重要問題が多く残されている。(1) 分子を前進させる駆動力 (パワーstroke: PWS) は何か? (2) PWS 発生は ATPase 反応とどのようにカップルしているのか? (3) Hand-over-hand 様式の運動を実現している分子基盤は何か?

上記 (1), (2) については従来以下のように考えられてきた。ATP が分解し ADP-Pi になると、モータードメインとネックの相対的角度が変化し (図 6c)、Pre-PWS 構造を取る。Pre-PWS 構造を取ると前足のモータードメインは actin に結合できるようになる (図 6d)。Actin に結合すると Pi が素早く解離し、モータードメインとネックの相対的角度は元に戻り、Post-PWS 構造を取る。その結果、actin に結合したままの前足は屈曲し後ろ足を前方に引っ張る (図 6e)。前方に引っ張られた後ろ足から ADP が解離し、新しい ATP が結合する結果、後ろ足は actin から解離し (図 6f)、前方に移動した後 actin に結合する。Pre-PWS と Post-PWS の構造が ATPase 反応の中間体にタイトにカップルしているという考え方である。ADP-Pi を模擬する ATP アナログや ADP を結合した筋肉の myosin II や myosin V の結晶構造から、Pre-PWS と Post-PWS の構造が実際に存在するという主張が多くなされてきたが、ADP-Pi 結合の構造から ADP 結合の構造への遷移が駆動力になるという証拠は実際にはない。

Actin filament 上を歩く myosin V を撮影する場合、actin filament を基板に固定し、myosin V は基板から自由にしなければならない。この試料系に限らず、ダイナミックな分子プロセスの高速 AFM 観察では、基板に特別な工夫を要することが多い。極性基を外側に出した中性リン脂質の 2 重層膜はタンパク質を非特異的に吸着しないことが知られている。そこで、マイカ基板表面に中性リン脂質、biotin-cap リン脂質の他に正電荷をもつリン脂質 5% からなる 2 重層の平面膜を形成させた。正電荷をもつリン脂質を加える理由は、myosin V を平面膜に若干吸着させ、横倒しの myosin V を観察するためである。部分的に biotin 化した actin filament を streptavidin を介して平面膜に固定した。

以下に我々の観察結果を述べるが、未だ原論文として公表



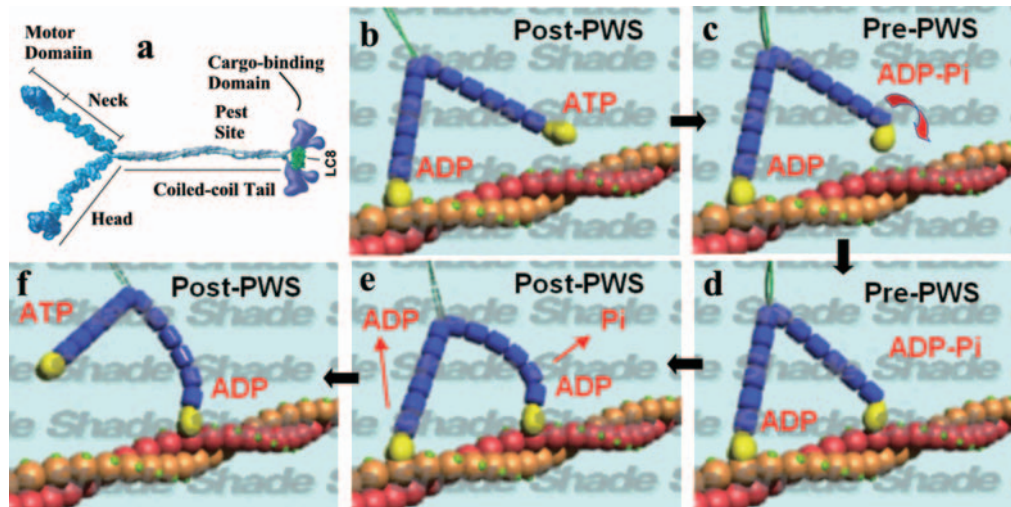


図6 Myosin Vの構造の模式図 (a) と歩行モデル (b-f).

していないので、肝心の画像データやグラフをお見せできないことをお許し願いたい。低濃度ATP存在下でactin filament上を約40 nmのステップサイズで連続的に一方に運動するM5-HMM (myosin Vの尾部を一部切除した) 分子を鮮明な映像として撮影することに成功した (1画像を図7に示す)。両頭部がactinに結合した分子の後ろ足のモータドメインとネックの接合部はV字を示し、前足のそれは滑らかである。また、短い尾部は進行方向の反対側を向く。この特徴から、運動していない場合でもactin filamentの極性 (myosin Vはプラス端に向かって運動する) を知ることができる。観察された運動速度は、同じバッファー溶液条件下の蛍光顕微鏡観察の結果とほぼ同じであった。すなわち、探針・試料、試料・基板表面の相互作用は無視できる程度である。歩行する瞬間は非常に速く、捉えることはできなかった。そこで、歩行を遅くするために基板にstreptavidin分子を過剰にばら撒いたところ、歩行する瞬間を捉えることができた。後ろ足がactinから解離すると、前足はactinに対して反やじりの向きからやじりの向きに回転した (図7において、後ろ足の向きをやじりの向き、前足の向きを反やじりの向きと呼ぶことにする)。前足は常に直線状をしており屈曲しない。重要な結論、「PWSとは前足の回転である」、を得ることができた。

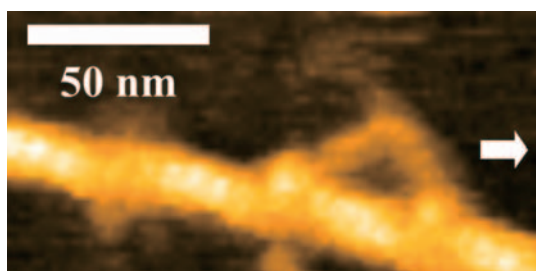


図7 歩行中のM5-HMMのAFM像。イメージング速度は7 frames/s。矢印は歩行する向きを表す。

ADP存在下とヌクレオチドフリーの条件下で、両足でactinに結合したM5-HMMを観察した。ADP濃度が高い場合はATP存在下と同様に前足は直線状をしているのに対し、ヌクレオチドフリーの場合には、前足は大きく屈曲していた。このことは、ADP存在下において前足にADPが結合しているかどうかを、前足の形状を見ることで判断できることを示している。直線状にある前足の寿命をADP濃度の関数として測定し、前足からのADPの解離速度を見積もったところ、0.1/sであった。すなわち、平均で10秒に1回しかADPは前足から解離しない。1  $\mu\text{M}$  という低濃度ATP存在下でさえ、M5-HMMは10秒間に何歩も歩く。従って、ATP存在下でM5-HMMが歩行しているとき、前足からはADPは実質的に解離せず、後ろ足からのみADPが解離する。すなわち、ADPの解離、それに続くATPの結合、その結果生ずるactinからの解離は後ろ足でしか起こらない。すなわち、何故myosin VはHand-over-hand様式で歩くことができるかの明快な答が得られた。また、前足からはADPが解離しないことは、前足によるPWS発生はケミカルな遷移によるものではないことを示している。PWSの源は、前足が反やじりの向きでactinに結合することによる分子内張力にある。実際、単頭のmyosin VはADP存在下でも、ヌクレオチドフリーの条件下でもやじりの向きでactinと結合する。しかし、ADPを結合した前足のモータドメインとネック部の接合部はある程度柔らかいため、前足は直線の形をほぼ保ったまま反やじりの向きでactinと結合できる。actinとの結合による自由エネルギーの低下の方が、反やじりの向きでactinに結合することによって生ずる分子の歪みに伴う自由エネルギーの増加に勝っている。この歪みによる分子内張力がPWSの原動力になっている。

### 6.3 脂質平面膜の形成過程

上述したように中性リン脂質の平面2重層膜はタンパク質への非特異的吸着がなく、タンパク質の機能ダイナミクスを高速AFM観察するときに便利な基板である<sup>20</sup>。リポソーム

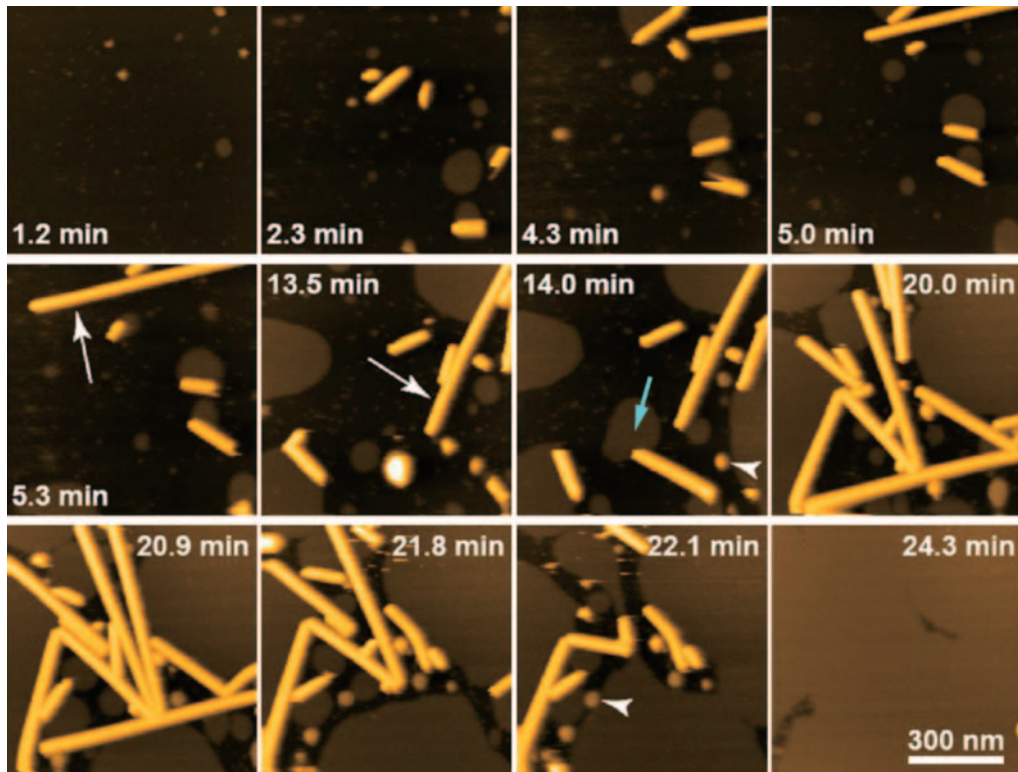


図8 リポソームから平面膜が形成されるまでのプロセスを捉えたAFM像。イメージング速度は1.03 frame/s。やじりはリポソームを、白い矢印は成長中のナノチューブを、水色の矢印は平面膜に先端部で相互作用しているナノチューブを指す。

をマイカ表面に載せたあとにどのようなプロセスを経て平面膜になるのかに興味をもって、このプロセスを観察した<sup>21)</sup>。ここでは、観察結果の意味や解釈に立ち入らず、観察結果のみを紹介する。脂質 DOPC/DOPS/biotin-cap-DPPE (3:1:1 w/w) からなるリポソームを、カルシウムを含むバッファー溶液に懸濁し、マイカ表面に既に載せた同じバッファー溶液中に流し入れ、直ぐに観察を行った (図8: 動画は <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/BBA/lipid.htm> に掲載)。リポソームを流し入れた直後の観察で、球形のリポソームの他に短いチューブ状のものが若干観察された。マイカ表面との強い親水性相互作用のため、球形のリポソームは基板に接触した直後に壊れ小さいパッチ状の平面膜になるのに対し、短いチューブ状のものは壊れずに、均一な直径 (約 20 nm) をもった長いナノチューブへと成長していった。2本のナノチューブは端同士で結合し、1本のナノチューブへと融合する様子も観察された。ナノチューブは平面膜とも相互作用する。ナノチューブ側面がパッチ状の平面膜のエッジ部に接触する場合の他に、ナノチューブの先端が平面膜のエッジ部で接触する場合も多く観察された。後者の場合、パッチ状の平面膜の大きさが小さくなっていく様子が多く観察され、脂質分子が平面膜からナノチューブに移動していると推定される。時間の経過とともに、平面膜の面積が増大していくとともに、ナノチューブの長さ、密度が増大していった。その結果、ナノチューブは互いに押し合う状況になり、真っ直ぐなナノチューブが曲がる様子も観察された。曲がったナノチューブ

は壊れ平面膜間のギャップを埋める結果、平面膜は急激に広がった。

#### 6.4 Streptavidin 2次元結晶の格子欠陥の運動

Streptavidin は  $D_2$  二面体対称性をもつホモ 4 量体で、それぞれのサブユニットはひとつの biotin (ビタミン H) を強く結合する (図 9a)。他のタンパク質に非特異的に吸着しないため、biotin を含む脂質平面膜上に形成させた streptavidin 2次元結晶はタンパク質の動的プロセス観察の基板として有効である。脂質側を向いた面は biotin 脂質と結合するが、反対側の biotin 結合部位は空いている。従って、この 2次元結晶面上に biotin 化したタンパク質を直接固定できるとともに、biotin と Ni-NTA を両端にもつ分子を介して His-tag をもつタンパク質を選択的に固定できる。イオン強度や pH に応じていくつかの異なる格子構造をもつ結晶が形成される。

Streptavidin 2次元結晶を観察すると、たまに空隙欠陥が残り、それがブラウン運動する様子が観察された。この運動を系統的に調べるために、欠陥のない 2次元結晶 (C222 結晶: この命名は正しくないがよく使われている; 模式図を図 9b に示す) をカンチレバー探針で強く叩き、単一空隙欠陥をいくつか形成させた。単一空隙欠陥のブラウン運動は異方性を示した (図 9c)<sup>22)</sup>。拡散定数は a 軸方向で  $D_a = 20.5 \text{ nm}^2/\text{s}$ 、b 軸方向で  $D_b = 48.8 \text{ nm}^2/\text{s}$  であった。空隙欠陥が移動することは、それに隣接する streptavidin 分子が空隙に移動することを意味する。移動するためには、streptavidin 間の結合を切る必要がある。a 軸に沿って分子が移動する場合には、



2つの○結合 (biotin を結合していないサブユニット間の結合) とひとつの●結合 (biotin を結合しているサブユニット間の結合) が切れる. 他方, b 軸に沿って移動する場合には, ひとつの○結合と2つの●結合が切れる.  $D_a < D_b$  は従って, ○結合の方が●結合よりも強いことを意味する.  $(2○ + ●) - (○ + 2●) = ○ - ●$  であるので, 拡散定数の違いは, ひとつの○結合の自由エネルギー ( $E_○$ ) とひとつの●結合の自由エネルギー ( $E_●$ ) の差で決まっている. すなわち,

$$D_b/D_a = \exp[-(E_○ - E_●)/k_B T]. \quad (7)$$

この関係から,  $E_○ - E_● = -0.88 k_B T$  (300 K で  $-0.52$  kcal/mol に対応) と決定された.

単一空隙欠陥の運動をしばらく観察していると, 2つの欠陥が融合し2空隙欠陥になる様子も見られた (図9d). 一旦融合すると, 2つに分裂することはない. 更に大きな欠陥へと成長する様子も観察された. 興味深いことに, 大きな欠陥 (4空隙欠陥程度まで) になるほど拡散定数が大きくなった. 以上の観察結果は, バルク溶液中に streptavidin が存在し基板表面で結晶成長するとき, 欠陥のない2次元結晶が形成されるプロセスを示唆している. 単一空隙欠陥は小さく, バルク溶液中にある分子がその欠陥を埋めることは容易ではない. 融合し, 空隙欠陥が大きくなりブラウン運動が速くなると更に融合が加速され, 空隙欠陥は更に大きくなり, バルク中の分子で容易に埋められるようになる. この仮説は, 結晶形成過程を直接観察することで実証されなければならないが,

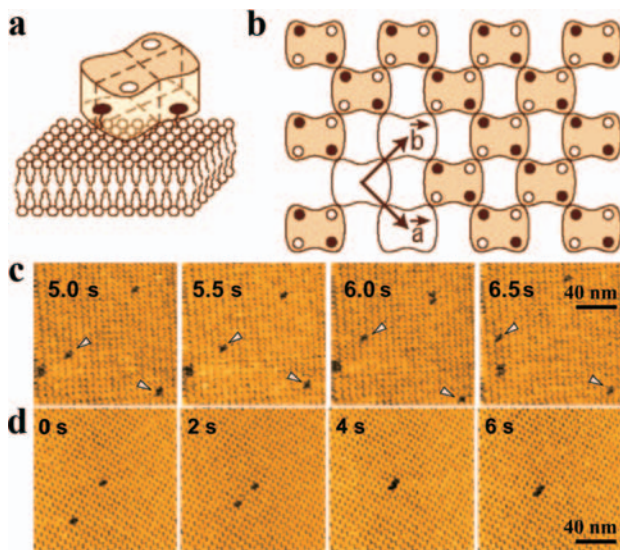


図9 Streptavidin 2次元結晶中の単一空隙欠陥の異方性ブラウン運動. (a) biotin を含む脂質平面膜に結合する streptavidin 分子の模式図. 黒丸は biotin を結合していることを表す. (b) C222 結晶中の streptavidin 分子の配置の模式図. 黒丸は biotin を結合している部分, 白丸は biotin を結合していない部分を現す. (c) 単一空隙欠陥のブラウン運動を捉えた AFM 像. 2種のやじりで2つの空隙欠陥を指す. イメージング速度は 2 frames/s. (d) 2つの空隙欠陥が近づいて融合する様子を捉えた AFM 像. イメージング速度は 2 frames/s.

## 7. 今後の展望

他の手法ではなかなか解明できないタンパク質の動的分子プロセスや機能メカニズムを高速 AFM による観察で容易に解明できることを上述の研究で実証した. まだ, 観察に成功している系はそれほど多くないが, このレベルの性能をもった高速 AFM による観察で解かれる問題は多く存在する. 分子プロセスに速いブラウン運動が含まれる場合には, ブラウン運動を抑える何らかの工夫が必要である. 酵素反応が速過ぎてその過程で起こる現象を捉えることができない場合には, 反応速度を下げるミュートーションが有効である. 或いは, 観察領域を狭めてイメージング速度を上げることも可能である (但し, 現在のところ 10 ms/frame 程度まで). 装置の更なる高速化も必要であるが, 現在の装置原理をそのまま使うとすると, せいぜい2倍程度の高速化が期待できる程度である. 生体分子の動的プロセスの観察では, 検出したい現象を捉えるための基板や試料の工夫が重要である. 今後そのためのノウハウが色々な試料系の試行観察を通して集積される必要がある. 装置は今のところ世界的にみても数研究室にしか普及していない. 今後数年で装置がメーカにより製造され, 世界的に普及するものと期待している.

現状の高速 AFM では, 生きた細胞の表面で起こる分子プロセスや細胞内で起こるオルガネラや細胞骨格のダイナミクスを観察できない. しかし, この点も今後大きく変わるものと見込まれる. 未だ大気中でしか実証されていないが, 超音波と AFM を組み合わせると, 細胞内を観察できることが既に報告されている<sup>23)</sup>. 試料基板の下から周波数  $f_1$  の超音波を放射し, カンチレバーに周波数  $f_2$  の超音波を伝播させる. 試料表面と探針との距離が近づき或る臨界点を超えると, 探針先端で2つの超音波は非線形干渉し,  $|f_1 - f_2|$  の周波数をもつ音波が発生する. この差周波数をカンチレバーの共振周波数に一致させておくと, カンチレバーは効率よく励振される. 試料ステージ下から伝播してきた超音波はその伝播経路にある試料によって振幅や位相が変調される. 従って, その変調はカンチレバーの振動に反映されるので, カンチレバーの振動や位相を計測することで, 超音波の経路にある物体を検出できる. この物体が試料表面の下にあっても検出できるので, 細胞内部を観察できる. もちろん, Z 方向に分解能をもたないが, 電子線トモグラフィーなどと同様に, 超音波の伝播方向を変えることで Z 方向にも分解能を持たすことが可能である. XY 方向については, 探針先端で起こる非線形干渉を利用しているため, 空間分解能は超音波の波長に依存しない. 但し, 超音波の変調の程度は物体の密度によるため, 密度の差が小さい場合には弱いコントラスト像しか得られない. 超音波の周波数を上げることによりコントラストは増強される. 水中ではカンチレバーの Q 値が小さく, 超音波の非線形干渉も弱いいため, カンチレバーはほとんど励振されない. Q 値制御にとって Q 値を上げるなどの工夫が必要である.

非線形干渉は, 探針と試料が接近しそれらの距離がある臨



界点を越えたところで起こるため、探針先端が試料表面に接触していなくても非線形干渉は起こる可能性がある。試料表面近傍に形成される超音波の波面と探針先端に伝わってきた超音波の波面との相互作用であるので、試料そのものに大きな力は作用しないと考えられる。非接触イメージングが可能になると、極めて柔らかい生きた細胞膜上で起こる分子プロセスの動的観察が可能になる。更には、カンチレバーは硬くても試料にダメージはなく、それ故、共振周波数の更に高いカンチレバーも利用できる。従って、現状の高速 AFM のイメージング速度を遥かに超える超高速 AFM も決して夢ではない。夢の実現を目指してもっと多くの研究者がこの新規分野に参入することを期待したい。

## 8. おわりに

本研究の出発点は今から 15 年以上前に遡る。高速 AFM の開発にこれまで関わった多くの学生さんに感謝したい。また、最近の研究では、内橋貴之准教授、博士課程の学生さんであった宮城篤君、山下隼人君、現在ポスドクである古寺哲幸君、山本大輔君、柴田幹大君、谷口雅昭君の頑張りに感謝したい。最後に、本研究をこれまで資金面で支援して頂いた JST、三菱科学財団、日本学術振興会、文部科学省に深く感謝申し上げる。

## 文 献

- 1) Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N., Yamamoto, D., Taniguchi, M., Miyagi, A. and Yamashita, H.: *J. Mol. Recognit.*, **20**, 448–458 (2007)
- 2) Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N., Yamamoto, D., Taniguchi, M., Miyagi, A. and Yamashita, H.: *Pflügers Archiv-Eur. J. Physiol.*, **456**, 211–225 (2008)
- 3) Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K. and Toda, A.: *Proc. Natl. Acad. USA*, **98**, 12468–12472 (2001)
- 4) Minne, S.C., Yaralioglu, G., Manalis, S.R., Adams, J.D., Zesch, J., Atalar, A. and Quate, C.F.: *Appl. Phys. Lett.*, **72**, 2340–2342 (1998)
- 5) Viani, M.B., Schäffer, T.E., Paloczi, G.T., Pietrasanta, L.I., Smith, B.L., Thompson, J.B., Richter, M., Rief, M., Gaub, H.E., Plaxco, K.W., Cleland, A.N., Hansma, H.G. and Hansma, P.K.: *Rev. Sci. Instrum.*, **70**, 4300–4303 (1999)
- 6) Humphris, A.D.L., Miles, M.J. and Hobbs, J.K.: *Appl. Phys. Lett.*, **86**, 034196 (2005)
- 7) Kodera, N., Sakashita, M. and Ando, T.: *Rev. Sci. Instrum.*, **77**, 083704 (2006)
- 8) Ando, T., Uchihashi, T. and Fukuma, T.: *Prog. Surf. Sci.*, **83**, 337–437 (2008)
- 9) Fukuma, T., Okazaki, Y., Kodera, N., Uchihashi, T. and Ando, T.: *Appl. Phys. Lett.*, **92**, 243119 (2008)
- 10) Kodera, N., Yamashita, H. and Ando, T.: *Rev. Sci. Instrum.*, **76**, 053708 (2005)
- 11) Uchihashi, T., Yamashita, H. and Ando, T.: *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 213112 (2006)
- 12) Uchihashi, T., Kodera, N., Itoh, H., Yamashita, H. and Ando, T.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45**, 1904–1908 (2006)
- 13) Yamashita, H., Uchihashi, T., Kodera, N., Miyagi, A., Yamamoto, D. and Ando, T.: *Rev. Sci. Instrum.*, **78**, 083702 (2007)
- 14) Yamashita, H., Voitchovsky, K., Uchihashi, T., Antoranz Contera, S., Ryan, J.F. and Ando, T.: *J. Struct. Biol.*, **167**, 153–158 (2009)
- 15) Shibata, M., Yamashita, H., Uchihashi, T., Kandori, H. and Ando, T.: *Nature Nanotech.* doi: 10.1038/NNANO.2010.7 (in press)
- 16) Sakamoto, T., Amitani, I., Yokota, E. and Ando, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272**, 586–590 (2000)
- 17) Yildiz, A., Forkey, J.N., McKinney, S.A., Ha, T., Goldman, Y.E. and Selvin, P.R.: *Science*, **300**, 2061–2065 (2003)
- 18) Forkey, J.N., Quinlan, M.E., Shaw, M.A., Corrie, J.E. and Goldman, Y.E.: *Nature*, **422**, 399–404 (2003)
- 19) Warshaw, D.M., Kennedy, G.G., Work, S.S., Kremtsova, E.B., Beck, S. and Trybus, K.M.: *Biophys. J.*, **L30–L32** (2005)
- 20) Yamamoto, D., Nagura, N., Omote, S., Taniguchi, M. and Ando, T.: *Biophys. J.*, **97**, 2358–2367 (2009)
- 21) Giocondi, M.-C., Yamamoto, D., Lesniewska, E., Milhiet, P.-E., Ando, T. and Legrimellec, C.: *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, doi: 10.1016/j.bbamem.2009.09.015 (in press)
- 22) Yamamoto, D., Uchihashi, T., Kodera, N. and Ando, T.: *Nanotechnol.*, **19**, 384009 (2008)
- 23) Shekhawat, G. and Dravid, V.P.: *Science*, **310**, 89–92 (2005)