

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19042

研究課題名（和文）かぎりなくタンパク質に優しい高速原子間力顕微鏡の開発

研究課題名（英文）Development of high-speed atomic force microscope with minimum load for observing protein molecules

研究代表者

山本 大輔（YAMAMOTO, Daisuke）

福岡大学・理学部・教授

研究者番号：80377902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：原子間力顕微鏡（AFM）測定において探針 - タンパク質試料間に働く相互作用をかぎりなく低減させる新規なAFMを開発した。本方法による探針とタンパク質試料との間に働く力を見積もった。その結果、従来の高速AFMと比較して力を低減できることがわかった。GroELを測定し、本方法によりタンパク質に対する侵襲性が低く抑えられることを確認した。また、バクテリオロドプシンの測定では、サブユニット内にこれまでのAFM測定では観察されなかった膜面からの突出部位が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は柔軟な分子機械であるため、そのありのままの動態を解析するためには、測定がタンパク質に与える擾乱を可能な限り低減させる必要がある。本研究で開発したAFM測定法は、探針 - 試料間相互作用の大きさを極めて小さくすることができる。そのため、従来のAFM測定法と比較して、タンパク質が本来供えている構造動態を乱すことなく測定することができると考えられる。本手法を拡張することで、将来的に多様なAFM測定法が開発されることにつながることも期待される。

研究成果の概要（英文）：A novel method of atomic force microscopy (AFM) was developed to enable the observations of biological molecules with very low loading force. This method was introduced to high-speed AFM and protein molecules were examined. The force acting between the probe tip and the sample surface was estimated. It was found that the loading force is significantly small compared to the conventional high-speed AFM. It was confirmed that this novel method significantly reduces the invasiveness to the protein GroEL compared to the conventional high-speed AFM. Furthermore, surface structure unprecedented by conventional AFM observations was found on membrane protein bacteriorhodopsin.

研究分野：生物物理学

キーワード：走査プローブ顕微鏡 ナノバイオ 蛋白質 原子間力顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) は、個々のタンパク質分子のナノ構造ダイナミクスを 0.1 sec/frame 程度の時間分解能で直接観察することのできる顕微鏡である。タンパク質分子の構造変化をナノメートル程度の空間分解能でリアルタイムに観察できることから、これまでに多くのタンパク質分子について高速 AFM を用いた観察が行われ、機能動態の解析がなされてきた。

一般的に、高速 AFM ではタッピングモードと呼ばれる測定モードが用いられる。タッピングモードでは、カンチレバーを強制振動させ、その際にカンチレバー先端に取り付けられた探針と試料との間に働く相互作用による振幅の減少量を検出することで、試料の表面構造を画像化する。高速 AFM で一般的に用いられるタッピングモードによる測定では数 $k_B T$ 程度のエネルギーを探針が試料を叩く毎に (~ 600 kHz) 試料に与える。このエネルギーの大きさあるいはタッピング力は必ずしも無視できるものではなく、探針 - 試料間の相互作用がタンパク質に対して与える擾乱が問題になることがある。脆弱なタンパク質に対しては構造自体を保持させたままイメージングすることすら難しく、剛直なタンパク質に対しても、その機能を損なわないまでもある程度の擾乱を与えていることが容易に予想される。タンパク質分子の構造ならびにその動態を、分子が本来備えているままに乱すことなく測定するためには、新しいコンセプトによる新規な高速 AFM 測定モードの開発が強く望まれる。

2. 研究の目的

高速 AFM 測定において探針 - 試料間相互作用をかぎりなく小さくすることを可能とする新規な AFM 測定法を開発する。これまでに多くの AFM 測定モードが開発されているが、それらはカンチレバーの振幅や共振周波数の変化など、力学的な物理量を測定量としている。本研究では、探針 - 試料間相互作用を検出するために、カンチレバーの熱揺らぎを測定量として用いる。通常、カンチレバーの熱揺らぎは精密測定を阻害するノイズであり排除すべき対象として考えられている。本研究ではカンチレバーの熱揺らぎを逆にとり、積極的にシグナルとして利用することで探針 - 試料間の相互作用を $k_B T$ 程度(溶媒分子の持つエネルギー程度)に抑える。これにより、高速 AFM 測定において探針が生体試料に与える擾乱を大幅に低減させる。本方法は、接触型の AFM 測定モードとしては考え得る限り試料に優しい測定方法と考えられ、特にタンパク質など柔軟な構造物のナノ測定において非常な威力を発揮すると期待される。

3. 研究の方法

カンチレバーの熱揺らぎ信号を得るために、熱揺らぎ検出回路を作製し、高速 AFM 装置へ組み込んだ(図 1)。探針を試料表面へアプローチする際にカンチレバーの熱揺らぎにどのような変化が生じるか未知であったため、熱揺らぎの減衰特性について理論式を導出し、計算によって熱揺らぎの減衰カーブを得た。この理論カーブと測定によって得たカンチレバーの熱揺らぎ減衰曲線と比較し、理論式の妥当性を検証した。カンチレバーの熱揺らぎ減衰曲線はフォースカーブ測定により得た。タンパク質試料の AFM 測定については、熱揺らぎ信号を PID フィードバック回路へ入力し、探針が試料と相互作用することによって変化する熱揺らぎ信号が一定値に保たれるように試料を z 方向に上下動させた。ここでは、この AFM 測定法を熱揺らぎ一定モードと呼ぶ。タンパク質試料としては GroEL とバクテリオロドプシン(bR)を用い、従来の AFM で用いられるタッピングモード、コンタクトモードと熱揺らぎ一定モードで測定を行った。

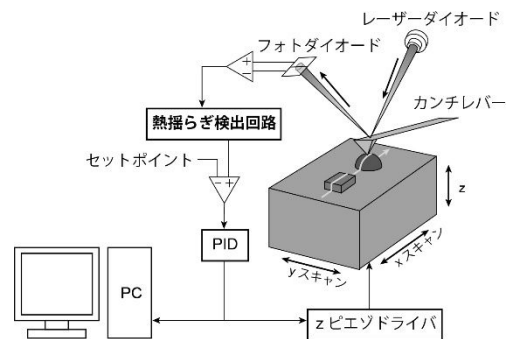


図 1: 熱揺らぎ一定モード AFM 装置の構成

4. 研究成果

(1) 熱揺らぎ一定モード高速 AFM の開発

熱揺らぎ検出回路を現行の高速 AFM 装置に組み込み、熱揺らぎ一定モードの測定を可能とした。当初はカンチレバーの熱揺らぎ信号と比較して装置由来の電気的なノイズが大きくフィードバックの動作が不安定であったため、高速 AFM 装置の改変を行った。カンチレバーの変位検出に用いるレーザーをノイズの低いものに置き換える等、装置のノイズを低減することで、微弱なカンチレバーの熱揺らぎ信号を高い S/N で検出することが可能となった。

(2) カンチレバー熱揺らぎの減衰特性

探針が試料と相互作用する際にカンチレバーの熱揺らぎがどのように変化するか、理論式を導出し、計算によって熱揺らぎの減衰カーブを得た(図 2)。その結果、以下のような減衰特性となると見積もられた。1) 試料表面が探針のつり合いの位置よりも遠方であるとき(非接触状態)カンチレバーの熱揺らぎの大きさはエネルギー等分配則から見積もられる値と一致する。2) 試

料表面がカンチレバーに近づき探針と接触しはじめると（準接触状態）熱揺らぎが大きく減少する。3) 試料表面がさらにカンチレバーに近づくと、カンチレバーの熱揺らぎがたわみ量に比べて無視できる程度に小さくなり探針が試料表面と常に接触していると見なせる状態（接触状態）になる。熱揺らぎ一定モードにおいては、準接触状態で測定を行う。熱揺らぎの減衰特性と

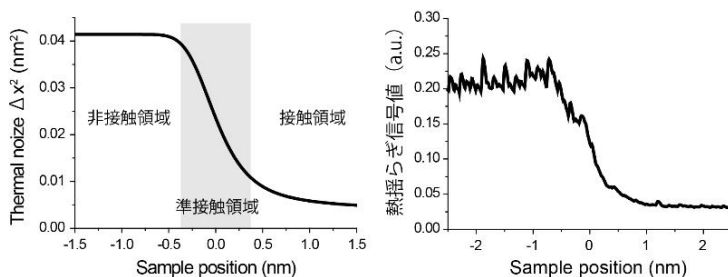


図 2: カンチレバー熱揺らぎの減衰特性。理論カーブ（左）と実測カーブ（右）。

同時に探針 - 試料間に働く力を計算し、相互作用の大きさを見積もった。その結果、準接触領域において探針 - 試料間に働く力の大きさは 5-50 pN 程度であり、AFM 測定する際に設定する値として適当と思われる熱揺らぎの減衰量においては、力の大きさは 10 pN 程度であると見積もられた。

実際のカンチレバーの熱揺らぎ減衰曲線はフォースカーブ測定により得た（図 2）。全体的な減衰特性は理論式と一致することから、導出した理論式は妥当なものであると考えられる。フォースカーブの信号には微少ではあるものの装置由来のノイズが含まれるために探針-試料間相互作用の大きさについては正確に見積もることが困難であったが、AFM 測定時に働く力の大きさは約 10pN 程度であると考えられる。

(3) GroEL の測定

GroEL はダブルリング構造を形成するタンパク質である。GroEL を構成するふたつのリングは、高速 AFM 測定中にタッピング力によって解離しやすいことが知られている。そのため、GroEL を長時間にわたって高速 AFM で測定することには困難であることが多い。GroEL をマイカ基板へ吸着させ、タッピングモード、コンタクトモード、熱揺らぎ一定モードの各スキャンモードで測定し、それぞれの測定モードの GroEL に対する侵襲性を比較した。タッピングモードにおいては GroEL のリングが解離していく様子が観察され、コンタクトモードで測定した場合には GroEL のリング構造を測定することすら困難であった。熱揺らぎ一定モードで測定した場合には、タッピングモードと比較して、GroEL リングの解離が大きく抑えられた（図 3）。このことから、熱揺らぎ一定モードが最も GroEL に対する侵襲性が低いことがわかった。さらに、ひとつのリングを構成する 7 つのサブユニットも観測することもでき、熱揺らぎ一定モードはタッピングモードと同等程度の空間分解能を有することがわかった。

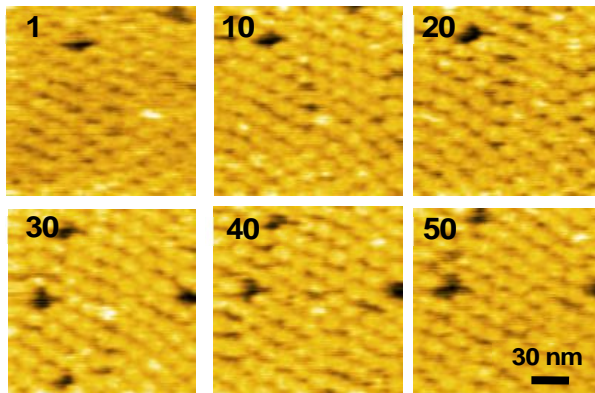


図 3: GroEL の熱揺らぎ一定モード AFM 画像。数字はフレーム番号

一方、タッピングモードによる測定と比較して、熱揺らぎ一定モードではフィードバック速度が大幅に低下し、5 sec/frame 程度の測定時間を要することが明らかとなった。また、GroEL のリングが解離すると、隣接する GroEL のリングが解離しやすい現象が観察された。これは熱揺らぎ一定モードのフィードバック速度が十分でないために横方向への力が探針から加えられたためと考えられる。熱揺らぎ一定モードにおいてフィードバック速度が低下する理由は現時点では不明であるが、速度低下を引き起こす要因が将来的に明らかになれば、本測定モードによる高リアルタイム測定への道が開かれるものと思われる。

(4) bR の測定

bR は高度好塩菌の細胞膜に存在し、紫膜の中で 2 次元結晶を形成する。bR は 3 量体を形成する 7 回膜貫通型のタンパク質であり、これまでの AFM 測定でヘリックス E と F を結ぶ EF ループが細胞質側において最も突出している箇所として観察されている。熱揺らぎ一定モードによる測定により bR 分子内の微細構造をどの程度観察することができるか試み、タッピングモードならびにコンタクトモードで得られた画像との比較を行った。熱揺らぎ一定モードにより、紫膜中における bR の 3 量体構造を直ちに観察することが可能であった。このことから、熱揺らぎ一定モードは膜タンパク質の高分解能測定に向いている測定法であることが示唆される。従来のコンタクトモードやタッピングモードと比較すると、熱揺らぎ一定モードとコンタクトモードにおいて高い空間分解能で bR の表面構造が観察され、各サブユニットには膜面から数 nm 突出し

ている箇所を確認することができた。過去に bR の AFM 測定がなされた文献との比較により、この突出部は EF ループに相当する構造であると推測される。以上の結果は、熱揺らぎ一定モードは従来の測定モードと比較して小さい力で測定できるのみならず、空間分解能においても従来の AFM 測定法に匹敵するものであると結論できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kubota-Kawai Hisako, Mutoh Risa, Shinmura Kanako, Setif Pierre, Nowaczyk Marc M., Rogner Matthias, Ikegami Takahisa, Tanaka Hideaki, Kurisu Genji	4. 巻 4
2. 論文標題 X-ray structure of an asymmetrical trimeric ferredoxin-photosystem I complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 218 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0130-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Grabsztunowicz Magda, Mulo Paula, Baymann Frauke, Mutoh Risa, Kurisu Genji, Setif Pierre, Beyer Peter, Krieger Liszkay Anja	4. 巻 -
2. 論文標題 Electron transport pathways in isolated chromoplasts from <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Charoenwattanasatien Ratana, Tanaka Hideaki, Zinzus Karen, Hochmal Ana K., Mutoh Risa, Yamamoto Daisuke, Hippler Michael, Kurisu Genji	4. 巻 74
2. 論文標題 X-ray crystallographic and high-speed AFM studies of peroxiredoxin 1 from <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X17018507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mosebach Laura, Heilmann Claudia, Mutoh Risa, Gabelein Philipp, Steinbeck Janina, Happe Thomas, Ikegami Takahisa, Hanke Guy, Kurisu Genji, Hippler Michael	4. 巻 134
2. 論文標題 Association of Ferredoxin:NADP+ oxidoreductase with the photosynthetic apparatus modulates electron transfer in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Photosynthesis Research	6. 最初と最後の頁 291 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11120-017-0408-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Setif Pierre, Mutoh Risa, Kurisu Genji	4. 巻 1858
2. 論文標題 Dynamics and energetics of cyanobacterial photosystem I:ferredoxin complexes in different redox states	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 483 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2017.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 太田明香音、武藤梨沙、得津隆太郎、皆川純、山本大輔
2. 発表標題 強光下における光合成膜内タンパク質の動的挙動解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本大輔
2. 発表標題 ホウレンソウグラナ膜における光化学系II分子間相互作用の高速AFMによる解析
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本大輔、武藤梨沙
2. 発表標題 ホウレンソウ由来ストロマメラに内在するF0 c-リングの原子間力顕微鏡による観察
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武藤梨沙
2. 発表標題 光化学系I-フェレドキシン複合体の構造解析
3. 学会等名 NMR若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Nakaniwa, R. Mutoh, K. Fushimi, A. Yasuda, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, C. Azai, H. Tanaka, S. Itoh, H. Oh-oka, G. Kurisu
2. 発表標題 X-ray structure of the type-I reaction center from <i>Heliobacterium modesticaldum</i> at 3.2 resolution
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Risa Mutoh, Takahiro Iida, Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 The dynamics of photosystem 2 and light-harvesting complex 2 in spinach grana membrane revealed by high-speed AFM
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	武藤 梨沙 (MUTOH Risa) (10622417)	福岡大学・理学部・助教 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------