

## 自己評価報告書

平成23年4月9日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20221006

研究課題名（和文） 生命現象の解明に資する革新的高速 AFM の開発

研究課題名（英文） Innovative High-speed AFM for Elucidating Vital Phenomena

研究代表者

安藤 敏夫 (Ando Toshio)

金沢大学・数物科学系・教授

研究者番号：50184320

研究分野：ナノバイオロジー・生物物理学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：1 分子イメージング、高速 AFM、ダイナミクス、タンパク質、細胞

## 1. 研究計画の概要

我々が世界に先駆けて開発した高速 AFM を完成させ、この新顕微鏡の生命科学における有効性・革新性を具体的に実証する。また、高速 AFM が適用できる試料系を分子から細胞などに拡大するために、カンチレバー Tip 走査方式の高速 AFM、非接触高速 AFM、及び、高速内視 AFM といった次世代高速 AFM を開発する。それにより、細胞表面で起こる分子プロセスや細胞内オルガネラの動的プロセスをも観察可能にする。

## 2. 研究の進捗状況

①改良とイメージング：既に開発した高速 AFM のノイズ低減化を進め、これまでよりも低侵襲性と解像度が改善され、タンパク質機能を阻害せずに鮮明な映像が得られるようになった。その結果、光に応答して構造変化するバクテリオロドプシンやアクチンフィラメントに沿って歩くミオシン V の高解像撮影に成功した (Nat. Nanotechnol. 2010; Nature, 2010)。

②Tip-走査方式の高速 AFM：細胞のように大きい試料系にも適用可能な高速 AFM を実現するために、試料ステージ走査方式からカンチレバー Tip (探針) 走査方式に変更するとともに、広範囲走査できるスキャナや振動ダンピングの技術を開発した。Tip 走査方式への変更に伴って要求されるカンチレバー走査のトラッキング、カンチレバーの強固な支持の問題に取り組み、前者については高精度のトラッキングを実現した。後者については、未だ改善の余地はあるものの、固定ジグの工夫によりある程度問題は解決された。スキャナについては、30  $\mu\text{m}$  の走査範囲でも高速に XY 走査可能になった。これらの要素技術を組

み込んだ高速 AFM を試作し、2 frames/s のイメージング速度を達成した。

③非接触高速 AFM：試料ステージを超音波で励振し、試料表面近傍で生ずる水の振動をカンチレバーで検出する方法を試みた。800 nm 間隔、段差 1  $\mu\text{m}$  の凹凸を施した Si 基板の場合、探針を基板表面から 100  $\mu\text{m}$  離れた条件下でも鮮明な凹凸像が位相像に現れた。直径 340 nm のビーズの場合には、80 nm 程度離れた条件下でビーズが観察された。但し、カンチレバーのレバー部で水の振動を検出しているものと推定される。

④高速内視 AFM：細胞内部の構造を高解像でイメージングできる高速内視 AFM を実現することを目標に取り組んでいる。表面下にある物体・構造を観察できたという先行研究（超音波の非線形干渉を利用する方法）に倣い、まずは先行研究の追試から開始した。一定の条件下であれば表面下構造が観察可能であることを確認した。例えば、基板に撒いた鉄微粒子を薄くポリマー被覆した試料では、超音波位相像に鉄微粒子が鮮明に観察された。しかし、ポリマーを厚くすると（但し、超音波の波長に比べ十分薄い）、位相像は表面のトポグラフィー像とほぼ同じであった。

これらの観察から、表面下の構造体が観察されるのは、表面下にある物体・構造の存在が試料表面の硬さに反映される結果であると結論した。従って、先行研究の像形成に関する解釈は間違いである。そこで、既存の走査型超音波顕微鏡法を検討し、その空間分解能を超音波の探針検出により飛躍的に上げることが表面下構造の高解像観察を実現するに最も有効な方法であるとの結論を得た。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

個々のテーマの達成度には差はあるが、全体として順調に研究は進んでいると判断している。本研究以前から長く取り組んできた技術開発の延長線上にあるテーマは、当然ながら十分に達成され、高速 AFM の生命科学における有効性・革新性は明快に実証された。本研究で新規に取り組んだ大きな試料にも適用できる Tip 走査方式の高速 AFM の開発も順調に進捗しており、本研究終了までには 10 Frame/sec の撮影速度と蛍光顕微鏡観察との同時観察も達成されるものと見込まれる。本研究で新規に取り組んでいる非接触高速 AFM については、試料ステージの超音波励振の利用で実現が見込まれるデータを得た。また、本研究で新規に取り組んでいる高速内視 AFM の開発は最も革新的だが同時に最も困難なテーマあるものの、新しい方向で実現の可能性のある程度見えてきた。

#### 4. 今後の研究の推進方策

順調に進んでいる課題はそのまま順調に進むものと予想している。非接触高速 AFM については、探針で超音波を効率よく検知するために、カンチレバーと探針の形状を種々検討する。高速内視 AFM については、分解能は悪いものの細胞を透視できることが実証されている走査型超音波顕微鏡をベースにして、超音波の伝播にかかる時間の利用と、カンチレバー探針による超音波検出により、表面とは独立に表面下にある構造体を高い空間分解能で観察可能になるものと予想している。この原理さえ確立させられれば、そのあとの進捗は速いものと期待している。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件) すべて査読有り

- ① N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy", *Nature* **468**: 72-76 (2010).
- ② M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, and T. Ando, "High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photo-activated bacteriorhodopsin", *Nature Nanotechnology* **5**, 208-212 (2010).
- ③ D. Yamamoto, N. Nagura, S. Omote, M. Taniguchi, and T. Ando, "Streptavidin 2D crystal substrates for visualizing biomolecular processes by

atomic force microscopy", *Biophys. J.* **97**(8): 2358-2367 (2009).

- ④ H. Yamashita, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, S. Antoranz Contera, J. F. Ryan, and T. Ando, "Dynamics of bacteriorhodopsin 2D crystal observed by high-speed atomic force microscopy", *J. Struct. Biol.* **167**: 153-158 (2009).
- ⑤ T. Ando, T. Uchihashi, and T. Fukuma, "High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes", *Prog. Surf. Sci.* **83**: 337-437 (2008).

[学会発表] (計 93 件)

- ① T. Ando, "Direct visualization of walking myosin V molecules by high-speed atomic force microscopy", Motility Subgroup Symposium at Biophysical Society 55th Annual Meeting (Baltimore, Maryland, March 5, 2011).
- ② T. Ando, "High-speed AFM for dynamic visualization of biomolecular processes", The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting Symposium "Breaking Diffraction Barrier" (San Diego, December 9, 2009).

[図書] (計 3 件)

- ① T. Ando, T. Uchihashi, Chapter 17 (pp. 487-523), "High-speed atomic force microscopy" In "Handbook of Single-Molecule Biophysics", Peter Hinterdorfer & Antoine van Oijen (Eds.), Springer-Verlag (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 原子間力顕微鏡及びそのカンチレバー支持具

発明者: 安藤敏夫, 岡崎康孝, 内橋貴之  
権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 出願 2010-126027

出願年月日: 2010 年 6 月 1 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 5 件)

名称: 走査プローブ顕微鏡

発明者: 安藤敏夫, 坂下満, 内橋貴之  
権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 第 4474556 号

取得年月日: 2010 年 3 月 19 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>