

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21681017

研究課題名（和文） タンパク質の動態と化学反応の同時計測可能な高速原子間力・蛍光顕微鏡の開発

研究課題名（英文） Development of high-speed atomic force/fluorescence microscopy for simultaneous observation of protein dynamics and chemical reactions

研究代表者

内橋 貴之（TAKAYUKI UCHIHASHI）

金沢大学・数物科学系・准教授

研究者番号：30326300

研究成果の概要（和文）：

タンパク質一分子の構造ダイナミクスとそれに共役した化学反応の同時観察に向けて、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）と全反射蛍光顕微鏡の同時観察可能な複合装置の開発を行った。AFM 本体の小型化と光学トラッキングにより光学顕微鏡に搭載可能なスタンドアロン型高速 AFM の試作機を製作した。この装置で GroEL を 3 frames/s (fps) のフレームレートで高速 AFM イメージングできた。さらに、高速 AFM と蛍光顕微鏡で直径 40nm の蛍光性ビーズを同視野観察できることを確認した。また、高速 AFM による細胞およびバクテリア観察に向けた広範囲走査可能なスキャナーを試作した。テコ法による変位拡大機構とアクティブダンピング法による振動制御を行った結果、40  $\mu$ m の走査範囲を観察できるようになった。これを枯草菌の溶菌過程の観察に適用し、枯草菌の表面がリゾチームにより破壊されていく様子を観察することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a combined high-speed atomic force microscopy (AFM) with fluorescence microscopy towards simultaneous observation of single-molecule conformational change of protein and chemical reaction such as ATP binding process. For a stand-alone-type high-speed AFM which can be mounted on an optical microscope, miniaturization of AFM head was carried out and the optical tracking system was developed. Using this system, we succeeded in observing GroEL at a frame rate of 3 frames/s. Further, we confirmed that it enables us to simultaneously obtain AFM and fluorescent images at same area. We also developed a wide-range scanner for fast imaging of bacterial cells and applied it to observation of bacteriolysis reaction of *Bacillus subtilis* induced by lysozyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：複合新領域

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、ナノ計測、ナノプローブ、蛍光顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

生命活動を担うタンパク質や核酸などの

生体分子は、自らの構造変化や生体分子間の相互作用などのダイナミクスによりその機能を発現している。機能しているタンパク質の構造を直接かつリアルタイムに観察することが出来れば、タンパク質が機能するメカニズムの理解が深まるに違いない。そのため我々のグループでは、溶液中で生体分子をナノメートルスケールの解像度で観察できる唯一のツールである、AFMの高速化に10年以上に渡って取り組んできた。

様々な要素技術の開発により、最近になって溶液中の生体分子を1秒以下のイメージング速度で観察できるようになり、アクチンフィラメントに沿ったミオシンVの歩行運動や、負の協同性を示すGroEL-GroESの結合解離といった動的分子過程を撮影し、高速AFMの有効性を実証してきた。しかしながら、AFM観察では1分子の構造に関する情報のみしか得られないため、例えば運動性タンパク質ATPaseなどでは、AFMで観察される構造変化がATP加水分解サイクルのどの反応と共役しているかを明確に議論することは困難である。また、特有の形を持たない球状のタンパク質などの場合には、AFMで観察されている構造だけから、観察されているものが真に目的としているタンパク質かどうか判定することは困難であるという問題もあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、一分子の動態と共役した化学反応プロセスを可視化するための高速原子間力/蛍光顕微鏡複合機を開発する。従来、タンパク質の一分子観察には蛍光顕微鏡が広く用いられてきており、多色蛍光を用いてATPの結合から加水分解によるADPへの化学変化と解離に至るまでの化学的プロセスと分子の移動のような機械的プロセスの同時計測が行われてきた。一方、高速AFMでは一分子の移動だけでなく、構造変化も計測できることから、蛍光輝点との同時観察によりATPの化学反応と構造変化の相関を明らかにできるものと期待される。これまで我々は高速AFM観察により

ミオシンVがアクチンフィラメント上をハンドオーバーハンド様式により歩行運動していることを明らかにしてきたが、ミオシンVの構造変化がATP加水分解サイクルのどの反応により生じているかは従来得られている知見を基に推測するしかなかった。蛍光顕微鏡との同時観察を実現することで、タンパク質の運動機能の発現メカニズムに関してより詳細な知見が得られる。また、AFMでは主に形状から被測定物の特定を行なうために、分離精製した単一あるいは2, 3種類のタンパク質が共存した状況での測定に限定されていた。一方、蛍光顕微鏡ではあらかじめ目的のタンパク質を蛍光色素で修飾することで、複数タンパク質が共存した状況でも目的のタンパク質を容易に識別できる。

## 3. 研究の方法

高速AFMと光学顕微鏡を一体化させるために、高速AFMのデザインを一新する。従来の高速AFMはサンプルステージをX, Y, Zに走査するサンプルスキャン方式であった。しかし、サンプルスキャン方式では光学顕微鏡観察の際に、対物レンズとステージ間にカンチレバーがあるため、観察視野が遮られてしまい光学顕微鏡観察ができない。カンチレバーをX, Yに走査するティップスキャン方式によるスタンドアロン型高速AFMを開発する。ティップスキャン方式ではカンチレバーの走査に追従して変位検出用レーザーの光軸もスキャンさせる必要があるため、そのための光学トラッキングシステムを開発する。具体的には、小型対物レンズをX-Yスキャナーに搭載し、カンチレバー走査用スキャナーと同期して走査するダブルスキャナー方式の検討を行う。また、高速AFMを光学顕微鏡ステージへ搭載するためにはコンパクト化が必須である。そのための光学系、機械動作部の設計を大幅に見直す。さらに、高速AFMと蛍光顕微鏡の観察範囲をできるだけ近づけるために、広範囲かつ高速動作可能なスキャナーの開発を行なう。高速走査技術や振動制

御技術はすでに我々の研究室で開発してきたものを新規顕微鏡用に最適化していく。

これらの開発により高速 AFM・蛍光顕微鏡システムが完成した後は、蛍光標識した分子に対して蛍光像と AFM 像が同時に観察できることを確認する。最終段階で、ミオシン V やダイニンなどのモータータンパク質の歩行運動と蛍光 ATP を用いた ATP の結合、加水分解による蛍光輝点の明滅などを観察する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 光学トラッキングシステム

変位検出用レーザーをカンチレバーに集光するために対物レンズを用いる。通常の高速度 AFM では光学顕微鏡用の 20 倍対物レンズを使用するが、ティップスキャン型 AFM ではカンチレバーのスキャンに追従してレーザースポットも移動する必要がある。レンズを高速に走査するために質量の小さな DVD 用レンズを使用した。図 1 に示すように、カンチレバー用とレンズ用スキャナーを対向配置してレーザースポットが常にカンチレバー背面に照射されるようにトラッキングを行う。図 2 にトラッキング性能の評価結果を示す。AFM カンチレバーを振動させながら 2 次元走査を行い振動振幅を画像化した。トラッキングが行われていない時は、カンチレバーの 2 次元走査でレーザースポットがカンチレバー背面から外れるために、振動振幅が変化し画像のコントラストが変化している。一方、トラッキングを行った場合は、光学感度は常に一定に保たれるために、振幅も一定となり画像のコントラストは一様になっている。これによりダブルスキャナー方式の光学トラッキングが有効であることが確認できた。

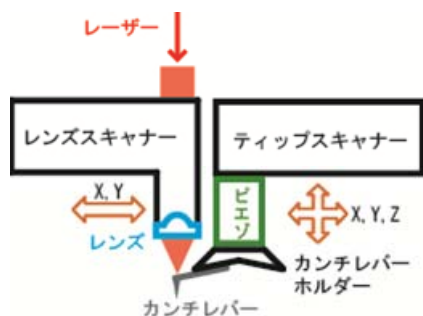


図 1 ダブルスキャナーによる光学トラッキングの模式図。

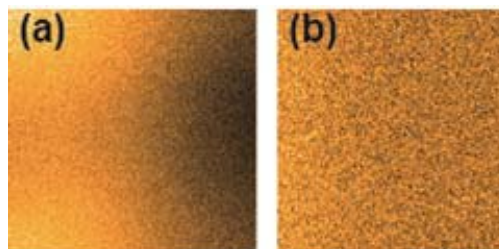


図 2 光学トラッキングの評価. (a)トラッキング制御が(a)オフと(b)オンでの振幅イメージ. 走査範囲: 900 nm × 900 nm.

##### (2) スタンドアロン型 AFM

従来の高速 AFM は光学系部分が大きいため光学顕微鏡ステージに搭載することはできない。今回、レンズスキャナーに全ての光学系部品を内蔵し、出来る限りのコンパクト化を図った。蛍光像との同時観察のために変位検出レーザーには波長 970 nm のコリメートレンズ内蔵型赤外レーザーを用いた。偏向ビームスプリッター、 $\lambda/4$  板、ダイクロイックミラー間の距離もできる限り短くした。またダイクロイックミラーは三つの微調ねじで角度を調節することができ、レーザー光を対物レンズの位置に調整することが可能である。フォトダイオードも微調ねじにより、位置調整することができる。試作した高速 AFM ヘッドを光学顕微鏡に搭載した写真を図 3 に示す。その他、カンチレバーの固定方法やホルダーの形状の検討、アクティブダンピング法による振動制御など様々な検討し高速化を図った。

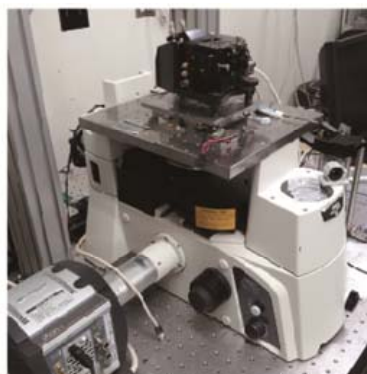


図 3 試作した高速 AFM/蛍光顕微鏡複合機の外観。

### (3) 高速 AFM イメージング

開発した高速 AFM の高速イメージング性能の評価を行った。試料としてマイカ基板に吸着した GroEL を用いた。GroEL は 7 量体リングが 2 つ重なった構造をしており、AFM ティップからの荷重により容易に上部リングが破壊されるため、AFM の低侵襲性評価には最適である。図 4 にフレームレートを変えて取得された高速 AFM 像を示す。3 fps までは GroEL のリング構造が破壊されずに観察されるが、10 fps ではフィードバック帯域の不足により分子が破壊されている。これから、3 fps 程度でタンパク質が破壊されずに観察できることがわかる。

次に、ガラス基板に吸着させた直径 40 nm の蛍光ビーズを用いて蛍光像と AFM 像の同視野観察を試みた (図 5)。蛍光像の四角で囲った範囲を高速 AFM で画像化している。蛍光像で見られる粒子とほぼ同じ配置で高速 AFM 像に粒子が観察できた。AFM ティップを試料に押し付けてビーズを除去すると、その範囲で蛍光像のコントラストが消失することを確かめた。これにより高速 AFM と蛍光顕微鏡の同時・同視野観察が行えることを確認した。

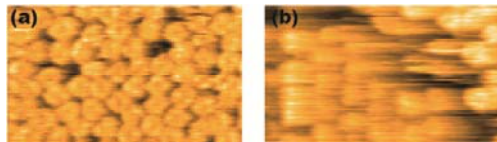


図 4 GroEL の高速 AFM 像. フレームレート: (a) 3 fps, (b) 10 fps 走査範囲: 150 nm × 90 nm.



図 5 高速 AFM/蛍光顕微鏡による  $\phi$  40nm の蛍光性ビーズの同時観察像. AFM 像の走査範囲は 800 nm × 800 nm.

### (4) 広範囲スキャナーの開発

高速 AFM の最大観察範囲は  $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$  程度で、蛍光顕微鏡の観察視野よりかなり小さい。そのため、同視野観察のための位置合わせが困難であるとともに、細胞やバクテリアのような大きなサイズの試料を観察することができない。この問題を解決するために、広範囲走査可能なスキャナーを新たに設計・試作した。テコの原理により piezo 素子の変位を拡大する方法を検討した。伸び係数  $10 \mu\text{m}$  の piezo 素子をテコ比が約 4 倍の構造体 (図 6) に組み込むことで約  $40 \mu\text{m}$  の走査範囲を得ることができた。使用した piezo 素子は質量が大きく、そのため共振周波数が 1.7kHz と低いために三角波の走査信号で容易に振動を起こす。振動を低減するために、あらかじめ piezo 素子の周波数特性を変位系で計測しておき、この伝達特性を打ち消すような逆伝達特性フィルターで処理した三角波で走査を行った。これにより共振周波数の低下により生じる振動を抑制することに成功した。

その結果  $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$  の走査範囲を 10 秒以下でイメージングできるようになった。バクテリアの観察に応用し、リゾチームによる枯草菌の溶菌過程を観察することに成功した。

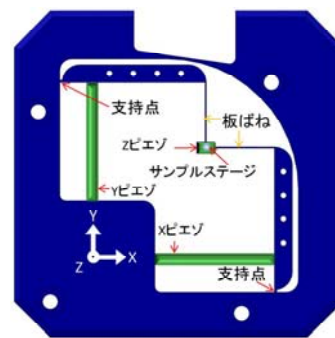


図 6 広範囲スキャナーの構造.

## 5. 主な発表論文等

(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 8 件)

1. T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, "Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy", *Nature Protocols* (in press). (査読有)
2. K. Igarashi\*, T. Uchihashi\*, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, T. Okamoto, M. Penttilä, T. Ando, and M. Samejima Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface, *Science* **333**, 1279-1282 (2011). (\*共同筆頭著者) (査読有)
3. T. Uchihashi\*, R. Iino\*, T. Ando, H. Noji, High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F<sub>1</sub>-ATPase, *Science* **333**, 755-758 (2011). (\*共同筆頭著者) (査読有)
4. M. Shibata, T. Uchihashi, H. Yamashita, H. Kandori, and T. Ando Structural changes in bacteriorhodopsin in response to alternate illumination observed by high-speed atomic force microscopy, *Angew. Chem. Int. ed.* **50**, 4410-4413 (2011). (査読有)
5. S. Inoue, T. Uchihashi, D. Yamamoto, and T. Ando, Direct Observation of Surfactant Aggregate Behavior on a Mica Surface using High-Speed Atomic Force Microscopy", *Chem. Commun.* **47**, 4974-4976 (2011). (査読有)
6. D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita, S. Nishikori, T. Ogura, M. Shibata, and T. Ando, High-speed atomic force microscopy techniques for observing dynamic biomolecular processes, *Methods Enzymol.* **475** (Part B): 541-564 (2010). (査読有)
7. D. Yamamoto, A. Taoka, T. Uchihashi, H. Sasaki, H. Watanabe, T. Ando, and Y. Fukumori, Visualization and structural analysis of the bacterial magnetic organelle magnetosome using atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 9382-9387 (2010). (査読有)
8. 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). (査

読有)

[学会発表] (計 16 件)

### 国際会議招待講演

1. T. Uchihashi, "Direct Visualization of Proteins in Action by High-Speed Atomic Force Microscopy", The 10th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC 10), The University of Western Australia (Perth, Australia) (6, Feb., 2012).
2. T. Uchihashi, "Conformational Dynamics of Biological Molecules Captured by High-Speed AFM", MNC 2010, 24<sup>th</sup> International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Rihga Royal Hotel Kokura(福岡県) (10, Nov., 2010).
3. T. Uchihashi, "Watching protein dynamics in action with high-speed AFM", 167 Committee satellite workshop on SPM, 石川県立音楽堂(石川県) (4, Aug, 2010)
4. T. Uchihashi, "Direct visualization of dynamic processes on biomolecules with high-speed AFM", AFM BioMed Conference (3<sup>rd</sup> International Meeting on AFM in Lifesciences and Medicine), Hotel Isrta(Red Island, Croatia) (13, May, 2010).
5. T. Uchihashi, "Direct Visualization of Protein Dynamics using High-Speed AFM", International Symposium on Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembrane, Kyoto University(京都府) (8, Sep., 2009).

### 国内会議招待講演

6. 内橋貴之, 古寺哲幸, 安藤敏夫, "高速原子間力顕微鏡で探るタンパク質のダイナミクス", 日本表面科学会 平成 23 年度 関西支部セミナー, 京都大学, 京都府(2012 年 3 月 7 日)
7. 内橋貴之, 古寺哲之, 安藤敏夫, "高速原子間力顕微鏡で明らかにするタンパク質のダイナミクス", 日本顕微鏡学会走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 分科会 平成 23 年度 オープン研究会 走査型プローブ顕微鏡における最先端技術～イノベーションのキーテクノロジー～, 独立行政法人物質・材料研究機構, 茨城県 (2011 年 12 月 12 日)
8. 内橋貴之, 柴田幹大, 山下隼人, 神取秀樹, 安藤敏夫, "High-Speed Atomic Force Microscopy: a tool for elucidating structural dynamics of membrane proteins", 第 49 回日本生物物理学会年会 シンポジウム, New experimental tools for structural changes of membrane proteins:

Beyond X-ray structure, 兵庫県立大学, 兵庫県 (2011年9月17日)

9. 内橋貴之, 安藤敏夫, “Real-time imaging of protein molecules in action by high-speed AFM”, 第63回細胞生物学会大会 Symposium: Frontier in Imaging Technology for Cell Biology, 北海道大学, 北海道 (2011年6月28日)

10. 内橋貴之, “高速AFMを用いた膜超分子のダイナミクス観察”, 第36回生体エネルギー研究会, 大阪大学, 大阪府 (2010年11月18日)

11. 内橋貴之, “AFMを用いたタンパク質研究の現状と展望について”, 新世代研究所・バイオSPM研究会BNM(Bio-Nano Mechanics)研究会, 新世代研究所, 東京都 (2010年11月16日)

12. 内橋貴之, “生体分子の機能動態を可視化する高速AFM技術”, 平成22年度計測自動制御学会関西支部講習会ナノ・マイクロスケールにおける最新トピック—計測から設計開発まで—, 学校法人常翔学園大阪センター, 大阪府 (2010年6月10日)

13. 内橋貴之, 安藤敏夫, “高速AFMによるバイオ分子の液中動的観察”, 日本顕微鏡学会第34回関東支部講演会, 帝京大学医学部, 東京都 (2010年3月20日)

14. 内橋貴之, “高速原子間力顕微鏡による生体分子のダイナミクス観察～現状と将来展望～”, ナノプローブテクノロジー第167委員会第56回研究会, (独)情報通信研究機構本部, 東京都 (2009年11月10日)

15. 内橋貴之, “高速AFMイメージング技術で見る生体分子の機能動態”, 第20回化学とマイクロ・ナノシステム研究会・ISMM2009, 金沢エクセルホテル東急, 石川県 (2009年11月9日)

16. 内橋貴之, “高速AFMによる生体分子のナノダイナミクス計測”, 第9回日本蛋白質科学会年会, 本全日空ホテルニユースカイ, 熊本県 (2009年5月22日)

[図書] (計3件)

1. T. Uchihashi, T. Ando, High-Speed Atomic Force Microscopy for Dynamic Biological Imaging, “*Life at the Nanoscale: Atomic Force Microscopy of Live Cells*”, edited by Y. F. Dufrêne, Pan Stanford Publishing (Singapore), 163-184 (2011).

2. T. Uchihashi, T. Ando, High-speed AFM and biomolecular processes, “*Atomic Force Microscopy in Biomedical Research :*

*Methods and Protocols*”, edited by B. P. Carlo and R. Davide, Humana Press (USA), 285-300 (2011).

3. 内橋貴之, 安藤敏夫, AFMを用いた酵素反応解析, “AFMを用いた酵素反応解析”(第1章第2編第6節p. 67) in “酵素利用技術大系” 小宮山真 監修, NTS出版 (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 原子間力顕微鏡及び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: 特願 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3件)

1. 名称: Scan type Probe Microscope

発明者: T. Uchihashi, H. Yamashita, T. Ando

権利者: Kanazawa University

種類: US Patent

番号: US8065908B2

取得年月日: 2011年11月29日

国内外の別: 国外

2. 名称: Scan type Probe Microscope and Cantilever Drive Device

発明者: T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita

権利者: Kanazawa University

種類: 特許

番号: US 7958565 B2

出願年月日: 2011年6月7日

国内外の別: 国外

3. 名称: Atomic Force Microscope

発明者: T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, N. Takahashi

権利者: Kanazawa University

種類: 特許

番号: US 7975315 B2

出願年月日: 2011年6月5日

国内外の別: 国外

[その他]

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内橋 貴之 (TAKAYUKI UCHIHASHI)

金沢大学・数物科学系・准教授

研究者番号: 30326300