

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18943

研究課題名（和文）単一タンパク質の構造と局所物性のダイナミクスを可視化できる顕微鏡技術の開発

研究課題名（英文）Development of microscopy techniques to simultaneously visualize the dynamics of the structure and local physical properties of a single protein

研究代表者

内橋 貴之（Uchihashi, Takayuki）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30326300

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：高速AFMに近赤外レーザーを導入し、カンチレバーを光熱励振することで、共振周波数より低い周波数でカンチレバーを安定に励振できるようにした。オフレゾナンスでのカンチレバー励振により、探針が試料に接触する際のカンチレバーの変位を計測できることを確認した。現在、探針が試料に接触する前後のカンチレバー変位のみを計測し、データ数を減らすソフトウェアを実装中であり、近い将来、AFMイメージングと同時に全ピクセルでフォースカーブを取得し、機械特性や表面電荷分布の一分子スケールマッピングが実現できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、高速AFMにおいてカンチレバーの光熱励振を用いたオフレゾナンス励振法を実装し、AFMイメージングと同時に各ピクセルでのフォースカーブ計測の基盤を確立した。本手法により、生体分子の構造と物性の相関を直接観察できるようになり、分子の機能メカニズムの理解が深まると期待される。また、本技術は創薬、バイオセンサー、ナノデバイスなど幅広い分野での応用が期待され、新たな創薬ターゲットの発見や材料開発の効率化にもつながる可能性がある。本研究は、基礎科学の発展だけでなく、産業応用や社会全体に対しても大きなインパクトを与える可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：A near-infrared laser was introduced into a high-speed atomic force microscope (AFM) to enable stable excitation of the cantilever at frequencies lower than the resonance frequency through photothermal excitation. It was confirmed that the displacement of the cantilever can be measured when the probe contacts the sample by exciting the cantilever at off-resonance frequencies. Currently, software is being implemented to measure only the cantilever displacement just before and after the probe contacts the sample, reducing the amount of data. In the near future, it is expected that force curves can be acquired at all pixels simultaneously with AFM imaging, enabling single-molecule scale mapping of mechanical properties and surface charge distributions.

研究分野：生物物理学

キーワード：高速原子間力顕微鏡 一分子計測 機械特性 表面電荷分布 ダイナミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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、活性部位での反応に伴う構造変化と局所的な物性変化、生体分子間の相互作用などの様々なダイナミクスを経て機能を発現している。従って、生命機能の動作原理を理解するためには、タンパク質の構造と物性の時空間ダイナミクスの計測と詳細な解析が必須である。X線回折や電子顕微鏡に代表される構造解析法と高速AFM技術の進歩によって、生体分子の"構造"に関して静的および動的情報の両方が得られるようになってきた。一方で、タンパク質の硬さや表面電荷の局所分布は、構造そのものよりも機能に重大な影響を与えているにもかかわらず、これらを解析できる手段は極めて限られている。一分子のダイナミクスとなると計測手段は全く存在しない。高速AFMは今のところ、機能しているタンパク質の一分子ダイナミクスを撮影できる唯一の顕微鏡であることから、一分子の物性ダイナミクス計測は高速AFMをベースとした機能拡張でしか実現できないと考えられる。これまでも高速AFM技術をベースにした物性計測の技術開発を行ってきた。高速位相検出法で粘弾性分布の定性イメージングが可能になり、また、in-line force curve法で画像の任意の位置で機械特性の定量計測ができるようになった。しかし、タンパク質の構造イメージングと同じ時空間分解能で様々な物性特性の定量値をマッピングできるマルチモーダルイメージングは実現できていなかった。

2. 研究の目的

タンパク質は、自らの構造と物性を巧みに変化させることによりその機能を遂行していることから、それらの変化を克明に捉えることは、作動原理を理解するための基盤となる情報を与える。高速AFM技術の発展により、タンパク質が機能している姿(構造)はリアルタイムで可視化できるようになった。しかしながら、タンパク質一分子の局所物性の時空間ダイナミクスを計測できる技術は皆無である。本研究の目的は、溶液環境にある生体分子の構造と同時に、機械特性や電荷などの物性分布とそれらの時空間ダイナミクスを、1 nm以下の空間分解能、100 ms以下の時間分解能で可視化できるマルチモーダル単一分子イメージング技術を開発することである。具体的には、高速AFMイメージング中にプローブ-試料間の力学的相互作用を全て記録し、そこから試料の局所物性をリアルタイムに抽出する技術を開発するものである。

3. 研究の方法

AFMではプローブ-試料間距離に対するカンチレバーの変位を記録した、“フォースカーブ”と呼ばれる曲線から試料の局所的機械特性を定量計測できる。プローブを試料に押し込んだ際のカンチレバーの変位から弾性率、往復カーブのヒステリシスから散逸エネルギー(粘弾性)、プローブが試料から離れる際の引力から凝着力の定量値を得る。画像の各ピクセルでフォースカーブを取得し、これら機械特性をマッピングするAFM測定法として“Force Volume”モードが広く使われているが、1枚の画像を得るのに数分以上の時間がかかるため、ダイナミクス計測は不可能である。一方、高速AFMでは、振動させたカンチレバーの振幅を一定に維持するようにプローブ-試料間距離をフィードバック制御して、試料の表面構造を画像化している。高速AFMイメージング中に、振動しているカンチレバーの変位を全て記録し、それから各ピクセル位置での機械特性情報を抽出できれば、表面構造と機械特性の高速同時イメージングが可能になるはずである。具体的には、カンチレバーの振動と試料のラスタ走査をピクセル毎に同期させ、各

ピクセル位置で1回だけプローブが試料に接触するようにする。カンチレバー周辺機械部の振動を避け、カンチレバーのみを正確に振動させるために、赤外レーザーの光強度変調による光熱歪みを利用してカンチレバーを励振する。レーザーの強度変調で直接カンチレバーを振動させることで、カンチレバーの振動信号をフォースカープに変換できる。振幅フィードバックで通常の高速 AFM イメージングを行いながら、同時に各ピクセルでのカンチレバーの変位を記録することで、構造イメージングと同じ分解能で局所機械特性の情報を得ることができると考えられる。

4. 研究成果

まず、高速 AFM にカンチレバーの変位検出レーザー（波長：670 nm）に加えて、カンチレバー励振用に波長 980nm の近赤外レーザーを付加した(図 1)。近赤外レーザーのパワーを変調することで光熱膨張によるカンチレバーの変位を利用してカンチレバーを励振できるようにした。カンチレバーの変位効率率は 0.1 nm/mW 程度であった。通常カンチレバーの振動振幅は 10 nm 以下で測定を行うので、100 mW 以上の赤外レーザーを使うことで十分な振動振幅が得られる。

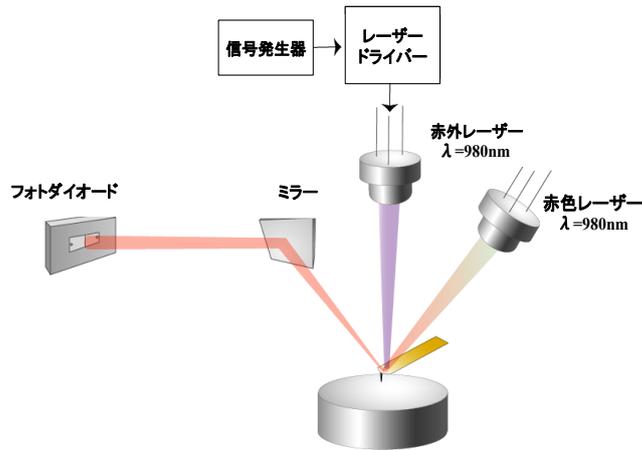


図 1 レーザー照射によるカンチレバー駆動の装置構成。

図 2 にレーザー照射で励振したカンチレバーの応答特性を示す。ゲイン、位相ともに滑らかに変化していることが確認できる。点線は理想的なゲインの周波数応答である。理想的にはゲインは共振周波数付近まで一定で、その後低下する。一方、実験ではゲインは数十 Hz から下がり始めている。また、位相の遅れも共振周波数付近で 100° 以上にもなっている。これは、熱膨張によるカンチレバーの変位に応答遅れが生じているためであるが、共振周波数以外で目立った振幅ピークは見られないことから、共振周波数より低い周波数 (off-resonance) での励振が可能であることが確かめられた。

次に純水中で共振周波数 850 kHz のカンチレバーを 652 kHz でレーザー励振しながらマイカ基板に接触したときのカンチレバーの変位を計測した。図 3 (a)の赤線がカンチレバーの変位で、黒点線は探針がマイカ表面に接触していないときの自由振動の軌跡を示している。青線は赤と黒点線の軌跡の差である。これから横軸を距離、縦軸をカンチレバーの変位

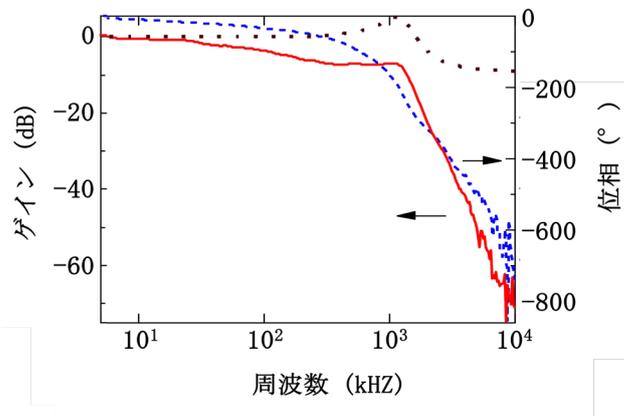


図 2 レーザー駆動によるカンチレバーの周波数応答。

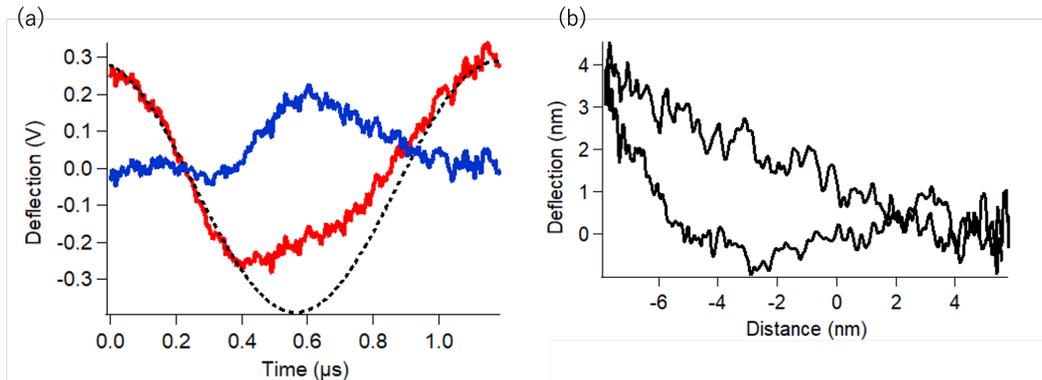


図3 基板と接触時のカンチレバー振動. (a) カンチレバー振動. 赤: マイカ基板と接触時. 黒点線: 自由振動時. 青: 接触時の変位から自由振動を差し引いた差分信号. (b) 横軸を探針-試料間距離、縦軸をカンチレバー変位の差分信号にとったフォースカーブ.

としてプロットしたフォースカーブ（ただし、縦軸は力ではなくカンチレバーの変位で表示している）を図3(b)に示す。この結果から off-resonance での励振により探針が試料に衝突した際のカンチレバーの変位を計測できていることが確認できた。

一方で、カンチレバーの軌跡を全て記録すると使用しているデジタルオシロスコープのメモリをオーバーしてしまうこともわかった。このため、カンチレバーの軌跡のうち、探針が試料表面に接触する一部のみを計測することでデータ数を減らすソフトウェアを現在実装中である。これにより、近い将来 AFM イメージングと同時に全ピクセルでフォースカーブを取得し、機械特性や表面電荷分布の一分子スケールマッピングが実現できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Uchihashi
2. 発表標題 Local mechanical indentation combined with high-speed AFM
3. 学会等名 Workshop on Computational Biophysics of Atomic Force Microscopy ; A Lecture Course Approach (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------