

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		ANDO TOSHIO					
①研究代表者氏名		安藤 敏夫		②所属研究機関・部局・職 金沢大学・大学院自然科学研究科・教授			
③研究課題名	和文	最高速 AFM が解き明かす生物分子モーターのナノ構造ダイナミクス					
	英文	Development of a high-speed atomic force microscope and elucidation of the nano-structural dynamics of biological molecular motors					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		16,900	16,300	14,800	11,100	11,100	70,200
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
安藤 敏夫	金沢大学・大学院自然科学研究科・教授	生物物理学		すべて			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>タンパク質分子機械の動作の仕組み解明において最も不足している重要な情報は構造ダイナミクスである。その情報を得るには、高い空間解像度と有効な時間軸を同時に持ちえる技術が必要である。我々は100x100ピクセルからなる画像を80msで撮れる高速AFMを世界に先駆けて開発した。高速AFMは高い空間解像度と数十msの時間分解能を同時にもつ点で、他にはない優れた特徴をもつ『生命科学待望の夢の顕微鏡』である。本研究の目的は、高速AFMの性能を更に向上させ、生物分子モーターの機能動態を捉えることにより、新しいナノバイオロジー研究を切り拓くことにある。手に取るように見るその分子の動きから、これらの分子モーターの働く仕組みを明らかにする。ATPの加水分解でドライブされる構造変化や、トラックと相互作用して滑り運動したり力を発生している最中のナノ動態を、50フレーム/sの速度、2~3nmの空間分解能をもつ映像として捉える。その初めて見る映像は、ATPase反応にドライブされて分子モーターのどの部分がどのような変化をし、どのような構造形態変化が滑り運動や力発生を可能にしているかを極めて具体的な形で教えてくれるであろう。</p>							

⑦ これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

1. 高速スキャナー： フィードバックループに含まれる要素の中で最も遅いデバイスであるZスキャナーの帯域・応答速度を上げた。帯域・応答速度を制限する要因はピエゾ素子の共振である。そこで、新しいアクティブダンピング法を開発した。走査中に高速に変動するZスキャナーの変位を計測し、その信号を用いてアクティブダンピング用の信号を作ることは実際にはできない。そこで、Zスキャナーと同じ共振特性をもつLCR回路 (Mock Z-Scanner) の出力をアクティブダンピングに用いる新しい方法を開発した。図 1 に示すように、共振は完全に消去され、ももとのZピエゾの共振周波数 (150 kHz) まで帯域を拡大した。また同時に、Q値が 18 から 0.5 に減少したため、応答速度は 36 倍増大した (図 2)。

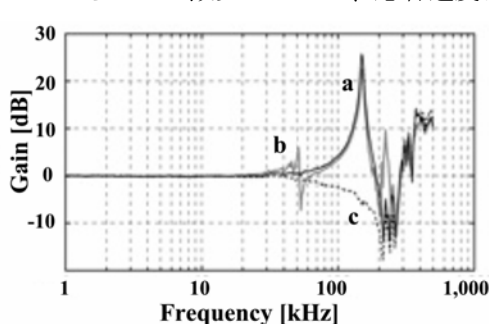


図1 Zスキャナーのオープンループ伝達関数. a, b, アクティブダンピングなし; c, アクティブダイビングあり.

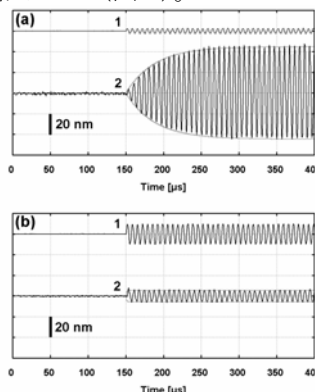


図2 Zスキャナーの応答速度に与えるアクティブダンピングの効果. a, アクティブダンピングなし; b, アクティブダンピングあり. 150 μs から 150kHz のサイン波駆動電圧 ("1") をかけたときの Z スキャナーの変位 ("2") を示す。

2. フィードバック帯域についての理論的考察： フィードバック帯域は色々なパラメータに支配されているが、その定量的関係が明らかにされていない。装置改良に指針を与えるために、フィードバック帯域を理論的に考察し、諸パラメータを含む定量的関係を明らかにした。式(1)、(2)に結論を示す。

$$f_s < \frac{f_c}{\pi} \sin^{-1} \left[\frac{(1-r)A_0}{h} \right] \quad (1), \quad f_s < \frac{f_c}{8} / (1 + f_c \Delta\tau) \quad (2)$$

ここで、 f_s はフィードバック周波数、 f_c はカンチレバーの共振周波数、 h は試料の最大の高さ、 A_0 はカンチレバーの自由振動振幅、 rA_0 は走査中に維持すべき振幅 (セットポイント)、 $\Delta\tau$ はカンチレバーの応答や回路の遅延時間の合計である。カンチレバーの共振周波数を 800kHz、試料の高さとカンチレバーの自由振動振幅の比 (A_0/h) を 1、或いは、2 とした場合のフィードバックの帯域を $r = (\text{セットポイント} / \text{自由振動振幅})$ の関数として求めると図 3 のようになる。図 4 には (A_0/h) のフィードバック帯域に与える影響を示す。重要な結論は、(a) フィードバック帯域はカンチレバーの共振周波数の 1/8 を超えることができない、(b) 試料の高さに対するカンチレバー振幅の比が小さくなるとフィードバック帯域が下がる、(c) セットポイントをカンチレバーの自由振動振幅に近づけていくとフィードバック帯域は下がる。(b), (c) から、探針から試料にかかる力を小さくすることと高速走査は相容れない性格のものであることが明らかである (動的 PID 制御法 (後述) はこれを克服できる)。また、カンチレバーの共振周波数がフィードバック帯域の上限を決めている点が明らかになった。

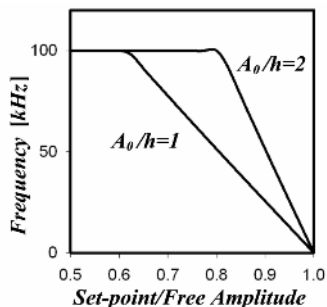


図3 セットポイントとフィードバック帯域の関係

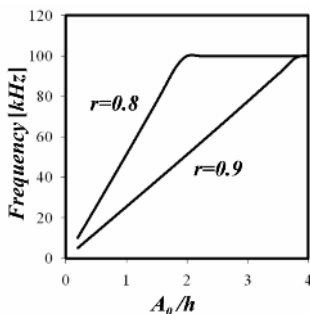


図4 振幅とフィードバック帯域との関係

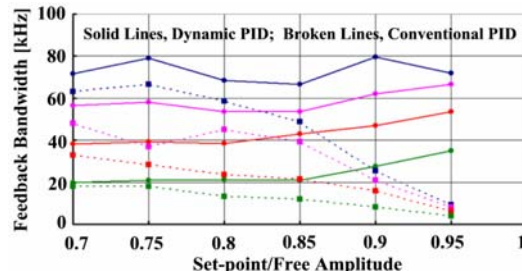


図5 通常の PID 制御と動的 PID 制御のフィードバック帯域のセットポイント依存性。自由振動振幅 / 試料の最大高さは上の線から下に向かって、1, 0.5, 0.25, 0.125 に設定されている。

3. 動的PID制御：上記の理論的考察で明らかのように、通常のPID制御では探針・試料間に働く力を弱くするためにセットポイントを大きくし、探針が試料表面すれすれに触るようにするとフィードバック帯域が下がってしまう。本研究開始時点で掴んでいた動的PID制御のアイデアを具体化し、いくつかの可能性を検討した結果、図5に示すように帯域がセットポイントに依存しないようにすることに成功した。この開発の成功により、「試料への優しさ」と「高速性」をある程度両立できるようになった。動的PIDではPID制御のゲインを探針・試料間に働く力に応じて動的に調節する。従って、探針が試料を強く押し込んでしまうのを防ぐためにも適用できる（図6）。

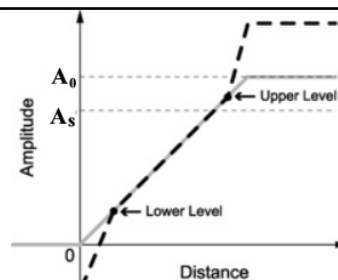


図6 動的PID制御の概念図。フィードバックゲインをカンチレバーの振幅に応じて変更する（破線のように振幅をみかけ上変更しPIDに入力）。

4. バイオイメージング：本研究開始以前ではアクチンフィラメントや微小管といった比較的脆い試料がイメージング中に徐々に壊れていくという深刻な問題があった。上記のスキャナーの改良、動的PID制御法の開発などにより、フィードバック帯域が向上し、且つ、探針が試料を押す力が大幅に軽減され、これらのタンパク質集合体は壊れることがなくなった。そればかりでなく、ATP存在下におけるアクチンとミオシンV間の極めて弱い相互作用をも乱さずにイメージングすることができるようになった。その結果、マイカ基板に緩く吸着したミオシンV分子がアクチンフィラメントと相互作用して滑り運動を起こしているときの振る舞いを高い解像度で見ることが可能になった（図7）。但し、弱い力を優先せざるを得ず、イメージング速度はまだ上げられない。比較的丈夫なミオシンVだけを撮る場合には、最高で50ms/フレームでイメージングできる。動画は<http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/afm-movies.htm>に掲載してある。



図7 滑り運動相互作用中のアクチンフィラメントとミオシンV。数字はフレーム番号。フレームレートは160ms/フレーム。ミオシンV2分子（片方の頭部だけ）に相互作用しているアクチンフィラメントが左側に移動している。

5. 新しい励振法：小さいホーンを介してカンチレバーを直接音波励振する方法はうまくいかなかった。そこで、光を利用した熱膨張励振を試みたところ、カンチレバーの共振周波数で最大20nmの振幅（光パワー15mW）を得ることができた。熱応答周波数は比較的高く、150kHz程度であった。この応答は一次ローパスフィルタの伝達関数で表せ、従って、逆伝達関数位相補償を施すことでフィルター効果を除去できた。この直接励振法を用いてカンチレバーのQ値を小さくすることもでき、共振するカンチレバーの応答速度を上げることができた。

6. トランジェント法の導入：Caged化合物に紫外線パルスを照射し、化合物の濃度を短時間に上昇させ、化合物がタンパク質に作用する前後を高速イメージングするトランジェント法を導入した。紫外線パルス照射によるカンチレバーの擾乱の問題は、単発のエネルギーを小さくし、高周波で繰り返し照射するとともに、照射のタイミングをイメージングに関係しないY方向の戻り走査時に行うようにした。また、このとき試料ステージをカンチレバーから一時的に遠ざけておく工夫を行った。例えば、Caged-ATPをGroEL-GroES系に適用し、ATP生成直後にGroESがGroELに結合する様子をイメージングできた（図8）。

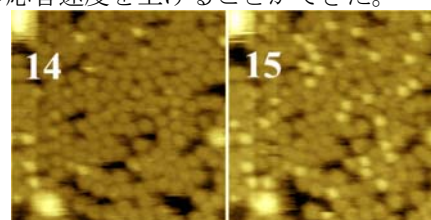


図8 Caged-ATP から ATP を生成した直後に起こるGroESのGroELへの結合。フレーム15の直前に紫外線照射した。輝度の高いところがGroEL-GroES複合体。

7. カンチレバーの改良：以前よりも共振周波数が高く、ばね定数の小さいカンチレバー（水中共振周波数800kHz、ばね定数100pN/nm）をオリンパスが開発した。探針は付いているが先鋭化されていない。そこで、EBD法で探針を付け、更にプラズマエッチングすることにより、先端曲率半径約4nmの探針を形成することができた（図9）。

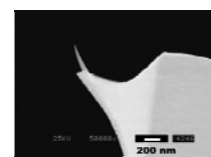


図9 先鋭化探針をもつカンチレバーの電顕写真。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

脆い生体試料を壊さないばかりでなく、極めて弱いタンパク質間相互作用も乱さずにある程度の高速イメージングが可能になったことは格段の進歩である。それは、高速スキャナーの新しいアクティブダンピング法や、状況に応じてゲインを動的に調節できる動的PID制御法の開発に負っている。

この成果により、例えば、ダイニンC分子のステム部がATPase反応に駆動されて実際に動く様子や、アクチンフィラメントと相互作用して滑り運動を起こしているミオシンV分子の振る舞いを直接見ることができるようになった。このような観察は従来技術では全く不可能であったわけで、文字通り時代を画する画期的な成果であると自負している。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

原著論文

- 1. N. Kodera, H. Yamashita, and T. Ando: Active Damping of the Scanner for High-speed Atomic Force Microscopy. Rev. Sci. Instrum. (in press).
- 2. N. Kodera, T. Kinoshita, T. Ito, and T. Ando: High-resolution Imaging of Myosin Motor in Action by a High-speed Atomic Force Microscope.. Adv. Exp. Med. Biol. 538:119-127 (2003).
- 3. T. Ando, N. Kodera, Y. Naito, T. Kinoshita, K. Furuta, and Y.Y. Toyoshima: A High-speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules in Action. ChemPhysChem 4:1196-1202 (2003).

解説・総説

- 1. 安藤敏夫「最新機器の挑戦 高速原子間力顕微鏡」 化学 59(9):42-43 (2004).
- 2. 安藤敏夫、古寺哲幸 「生体分子のナノ動態撮影 - リアルタイムAFM -」 バイオインダストリー 21(6):10-19 (2004).
- 3. 安藤敏夫「モータータンパク質の運動が高速AFMで見えた！」 化学 59(1):28-29 (2004).
- 4. 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡 - 生体分子のナノダイナミクス撮影 -」 応用物理 72(10):1304-1308 (2003).

著書

- 1. 安藤敏夫 「リアルタイムで“見る”ナノの世界 分子の動きを捉える」 9章 p.121-149 in 「ナノバイオロジー」 竹安邦夫編集 共立出版 (2004).
- 2. 安藤敏夫 「生体分子の高速ダイナミクス撮影」 4章4節 p.395-406 in 「ナノバイオテクノロジーの最前線」 植田充美監修 シーエムシー出版 (2003).

国際会議等招待講演

- 1. T. Ando: 「Dynamic Behavior of Myosin V and Reconstructed HMM Studied by Single Molecule Assay and High-speed AFM」. the University of Colima, Colima, Manzanillo, Mexico, International Symposium on “Muscle Contraction and Cell Movement” 1.20-26.2005.
- 2. T. Ando: 「High-speed AFM」. Kobe Institute, Oxford-Kobe Seminar: UK-Japan Collaborations in Bionanotechnology, 7.1-3.2004.
- 3. T. Ando: 「High-speed Atomic Force Microscopy for Viewing Protein Molecules at Work」. MIT (Boston) Dept. of Mechanical/Biological Engineering, MIT Seminar, 2.20.2004.
- 4. T. Ando: 「Nanometer-scale dynamic behavior of motor proteins revealed by high-speed AFM」. Nara, Japan, The 19th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology, 12.3-4.2003.
- 5. T. Ando: 「Motor Proteins at Work Imaged by High-speed Atomic Force Microscopy」. Sydney, Australia, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 8.28.2003.
- 6. T. Ando: 「A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action」. Linz, Austria, Vth Annual Linz Winter Workshop on Single Molecule Techniques in Biophysics and Drug Discovery, 1.31-2.3.2003.

国内会議等招待講演

1. 安藤敏夫：「高速AFMが切り拓く新しいタンパク質研究の可能性」．東京臨海副都心、日本薬学会年会シンポジウム「新たな生命科学分野を切り開く分子イメージング」3.29.2005.
2. 安藤敏夫：「高速原子間力顕微鏡が拓く新しいナノバイオロジーの可能性」．京都国際会議場、日本生物物理学会第42回年会シンポジウムシンポジウム「ナノバイオエンジニアリングの基礎としての生物物理学」、12.13-15.2004.
3. 古寺哲幸、宮城篤、前田大輔、榊原斉、大岩和弘、安藤敏夫：「高速AFMによるダイニン・ミオシンVのダイナミクス観察」．京都国際会議場、日本生物物理学会第42回年会シンポジウム「分子モーター研究の新潮流」、12.13-15.2004.
4. 安藤敏夫：「高速原子間力顕微鏡」．特許庁（東京）、特許庁研修講義、12.8.2004.
5. 安藤敏夫：「高速AFMが拓く新しい分子生命科学の可能性」．金沢大癌研究所、第3回北陸ポストゲノム研究フォーラム、11.30.2004.
6. 安藤敏夫：「高速原子間力顕微鏡で動く分子を見る」．名古屋大学、日本顕微鏡学会 シンポジウム、11.8-9.2004.
7. 安藤敏夫：「生物分子モーターのナノ構造ダイナミクス」．名古屋大学工学部、VBLシンポジウム「生体高分子の1分子イメージングと構造の物性と機能」、10.17.2004.
8. 安藤敏夫：「生体分子の高速AFM観察」．東北学院大、応用物理学会 薄膜表面分科会企画シンポジウム「カンチレバー技術の最前線 -作成から応用まで-」、9.1.2004.
9. 安藤敏夫：「特別講演：高速AFMが拓く新しい生体分子研究」．理化学研究所、レーザー顕微鏡研究会、7.1-2.2004.
10. 安藤敏夫：「蛋白質の動きを観察する高速原子間力顕微鏡」．熊本大学、熊本大学拠点形成研究B「原子レベルの生命機能と細胞システムへの展開」主催ミニシンポジウム「蛋白質の構造と動きを見る」、3.9.2004.
11. 安藤敏夫：「高速原子間力顕微鏡（生体分子のナノダイナミクス撮影装置）の最近の展開」．東京工業大学、日本学術振興会 第167委員会セミナー、1.29-30.2004.
12. 安藤敏夫：「高速AFMによる生体分子のナノダイナミクス撮影」．名古屋工業大学、応用物理学会東海支部基礎セミナー「バイオナノテクノロジー」、1.23.2004.
13. 安藤敏夫：「高速原子間力顕微鏡 タンパク質のナノ動態撮影」．東北大学、東北大学多元物質科学研究所ミニシンポジウム、1.14.2004.
14. 安藤敏夫：「企画講演 高速AFMで見るタンパク質のナノ動態」、金沢、日本薬学会第25回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、11.13.2003.
15. 安藤敏夫：「第30回記念企画招請講演 高速原子間力顕微鏡 -液中ナノメーター世界の高速撮影-」 第30回電顕皮膚生物学会学術大会、9.13.2003.
16. 安藤敏夫：「動態観察原子間力顕微鏡の開発とモーター蛋白質のダイナミクス」．大阪大学、阪大基礎工学部生物工学科セミナー、5.14.2003.
17. 安藤敏夫：「高速AFMでタンパク質の動きを見る」．東京国際フォーラム、公開シンポジウム バイオイメージングとナノテクノロジー、2.20-21.2003.

一般発表

1. T. Ando, N. Kodera, A. Miyagi, and H. Yamashita : 「Further Improvement of the High-speed Atomic Force Microscope」. Los Angels, USA、米国生物物理学会 2.12-16.2005.
2. M. Yokokawa, A. Yagi, N. Sakai, T. Ando and K. Takeyasu : 「Single Molecule Analysis of Protein-protein Interaction by Fast Atomic Force Microscopy」. Los Angels、米国生物物理学会、1.12-16.2005.
3. 又多恵子、古寺哲幸、宮城篤、安藤敏夫: 「タンパク質のAFM映像を原子モデルに照らして理解するための解析法」. 京都国際会議場、日本生物物理学会第42回年会、12.13-15.2004.
4. 前田大輔、宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫: 「高速AFMによるタンパク質の動態撮影に資する基板開発」. 京都国際会議場、日本生物物理学会第42回年会、12.13-15.2004.
5. 伊藤悠徳、内橋貴之、安藤敏夫: 「高速AFMの性能向上のための改良」. 京都国際会議場、日本生物物理学会第42回年会、12.13-15.2004.
6. 宮城篤、前田大輔、古寺哲幸、大岩和弘、安藤敏夫: 「高速原子間力顕微鏡によるモータータンパク質分子の動態観察」. 京都国際会議場、日本生物物理学会第42回年会、12.13-15.2004.
7. 宮城篤、古寺哲幸、前田大輔、安藤敏夫: 「高速AFMによるモータータンパク質などの動態撮影」. 大阪千里ライフサイエンスセンター、生体運動合同班会議、1.7-9.2005.
8. 小出博史、木下達也、安藤敏夫: 「ミオシンVの化学修飾と運動特性」. 大阪千里ライフサイエンスセンター、生体運動合同班会議、1.7-9.2005.
9. N. Kodera, Y. Naito, A. Miyagi, T. Ando, H. Sakakibara & K. Ooiwa : 「Dynamic Behavior of Motor Proteins in Action Captured by High-speed Atomic Force Microscope」. Baltimore, USA、米国生物物理学会、2.14-18.2004.
10. M. Yokokawa, S. Yoshimura, Y. Naito, T. Ando, A. Yagi, H. Takahashi & K. Takeyasu: 「Real-time AFM Analysis of DNA-enzyme Reaction」. Baltimore, USA、米国生物物理学会、2.14-18.2004.
11. 古寺哲幸、内藤康行、宮城篤、安藤敏夫: 「高速AFMが捉えたモータータンパク質のナノ動態」. 東京大学駒場、生体運動合同班会議、1.8-10.2004.
12. 宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫: 「高速AFM用カンチレバーのフッ素修飾」. 新潟朱鷺メッセ、日本生物物理学会第41回年会、9.23-25.2003.
13. 又多恵子、安藤敏夫、小椋輝: 「高速AFMによるFtsH2次元結晶のイメージング」. 新潟朱鷺メッセ、日本生物物理学会第41回年会、9.23-25.2003.
14. 古寺哲幸、内藤康行、宮城篤、安藤敏夫: 「高速AFMの改良」. 新潟朱鷺メッセ、日本生物物理学会第41回年会、9.23-25.2003.
15. 内藤康行、榊原斉、大岩和弘、安藤敏夫: 「高速AFMによる単頭ダイニンの動態撮影」. 新潟朱鷺メッセ、日本生物物理学会第41回年会、9.23-25.2003.
16. N. Kodera, Y. Naito, T. Ito & T. Ando: 「Improvements on a High-speed Atomic Force Microscope」. San Antonio, USA、米国生物物理学会、3.1-5.2003.