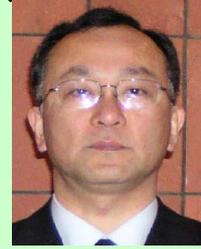


最高速 AFM が解き明かす生物分子モーターのナノ構造ダイナミクス

Development of a highest-speed atomic force microscope and elucidation of the nano-structural dynamics of biological molecular motor

安藤 敏夫 (Ando Toshio)

金沢大学・大学院自然科学研究科・教授



研究の概要

我々が世界に先駆けて開発した高速 AFM の性能を飛躍的に向上させて、~2 nm の空間分解能とビデオレートの時間分解能を併せ持つ世界最高性能の顕微鏡を開発する。その革新的顕微鏡を用いて生物分子モーターの機能動態を捉え、その機能解明に迫る。それにより、新しいナノバイオロジー研究を切り拓く。

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：生物分子モータ、1分子ナノ計測、AFM、ダイナミクス、タンパク質

1. 研究開始当初の背景・動機

ダイナミクスはタンパク質の重要な属性のひとつである。タンパク質分子機械の機能は、ダイナミックな構造変化と他の分子とのダイナミックな相互作用によって生ずる。一方、超えがたい技術的困難により、機能メカニズムの解明において最も不足している重要な情報もダイナミクスである。その技術的困難を打破して、高い空間分解能と有効な時間軸を併せ持つ新しい顕微鏡を開発する必要がある。

2. 研究の目的

我々が世界に先駆けて開発した高速 AFM の性能を、タンパク質のナノ機能動態を捉えることのできるレベルに向上させる。その革新的な顕微鏡を用いて、生体分子モーターの振る舞いを手に取るように見て、その機能解明に迫る。

3. 研究の方法

AFM は様々なデバイスから構成されている。そのほとんどはフィードバックループに含まれるため、それらほとんどすべてのデバイスを高速化に向け改良する。ここで念頭に置かなければならないことは、我々の対象する試料はダイナミックな分子間相互作用を含むという点である。このような相互作用は弱く、カンチレバー探針との接触により大きく乱されてしまう。従って、高速性と接触力の低減化を両立できる技術の開発が必須である。

開発初期段階では、既に開発した高速 AFM をベースにして、改良試作したデバイスの性能評価を進め、一通り試作が済んだ

ところで、改良型高速 AFM を新規に製作する。試作や性能評価のために、周波数解析装置、センサーアンプ、レーザなどを購入する。開発すべきデバイスや技術の具体的な項目は以下の通り。(a) 高速スキャナー機械部、(b) 機械振動を除去するアクティブダンピング技術、(c) 高速性と試料への優しさを両立させる新しいフィードバック制御法、(d) 広帯域・低ノイズ特性をもつ光ポジションセンサー、(e) 高速位相検出装置、(f) カンチレバー励振効率のドリフト補償装置、(g) フィードフォワード制御法、(h) 光照射によるカンチレバーの励振及び駆動手法、(i) Caged 化合物の紫外線照射を利用したトランジェント法、(j) 高速ピエゾドライバー、(k) カンチレバー振幅の高速計測装置。その他に、装置プラットフォームとなる操作プログラムソフト及び画像ハンドリング・解析のためのプログラムソフトがある。カンチレバーの開発にはオリンパスの協力を得る。

装置開発がほぼ完了するまでのイメージング実験は、装置の性能評価を目的に行う。それ以降のイメージングは機能解明を目指して行う。生物分子モーター（特に長年研究してきたミオシン V）の他にも、その都度観察に適した試料系のイメージングも行う。これら試料の調製と 1 分子活性測定などのために、超遠心機やビデオカメラなどを新規に購入する。

4. 研究の主な成果

上記デバイス・技術の開発はすべて完了したが、主なものを以下に概説する。

[1] **高速スキャナー**：Xスキャナーの最低共振波数50-60kHzを達成した。Zスキャナーについては、ピエゾ素子の固定法などを工夫することで370kHzを達成した。

[2] **アクティブダンピング**：Xスキャナーの共振はフーリエ変換を利用した逆伝達補償により完全に除去できた。Zスキャナーの共振は、Zスキャナーの伝達関数 $G(s)$ と同じ伝達関数で特徴付けられるLRC回路を擬似Zスキャナーとして、それにフィードバック補償(Q値制御)を掛ける方式と、開発した逆伝達関数を自動生成する汎用性の高い回路を利用してフィードフォワード補償を掛ける方式により除去できた。フィードフォワード補償の場合には、Zスキャナーの帯域は500kHzまで達した。

[3] **光熱効果を利用した距離制御**：微小カンチレバーを照射光によってたわませることで、探針・試料間の距離を制御する方法を開発した。変位効率は1nm/mWと低いが実用レベルである。光熱効果の応答は遅いが、上述の逆伝達関数自動生成回路を用いて補償した。微小カンチレバーの水中共振周波数は1.2MHzと高いため、帯域を700kHzまで上げることに成功した。その結果、250nm四方の走査範囲、100本の走査線の条件で、33フレーム/sのイメージング速度を達成した。

[4] **ダイナミックPID制御**：カンチレバー振幅のセットポイントを自由振動振幅に近づけると、探針が試料を叩く力を弱くすることができる。しかし、この条件では探針が試料の急な降り勾配で試料表面から完全に離れ再着地するまで長い時間がかかり(パラシューティング)、その間試料形状の情報も失われる。また、このパラシューティングにより、フィードバック帯域は大幅に落ちる。即ち、「試料への優しさ」と「高速性」は両立しない。この深刻な問題を解決するために、新しいPID制御法(ダイナミックPID制御法)を開発した。これを更に有効にするために、光テコセンサーの低ノイズ化(同時に広帯域化)とカンチレバー励振効率のドリフト補償法を開発を行った。その結果、セットポイントを自由振動振幅の0.9-0.95に設定してもパラシューティングが起らず、安定にイメージングできるようになった。

[5] **イメージング**：ミオシンVがアクチンフィラメント上を連続的に運動する様子を捉えることに成功した。機能解明まで進めるため、いくつかの化学状態でのミオシンVも観察したところ、(a)ライガーとADP状態では後ろの頭部しかアクチンに結合しないこと、(b)ADP・Pi状態を模擬するAMP・PNP存在下では両頭部ともアクチンに結合すること、(c)後ろの頭部がアクチンから解離する直前に前足が屈曲すること、などを

見出した。以上の一連の振る舞いから、プロセス運動するメカニズムの全貌がほぼ明らかとなった。以上の他、ダイニンが微小管上を移動する様子、試料基板に用いるストレプトアビジン2次元結晶の格子欠陥の異方性ブラウン運動などの動態観察に成功し、高速AFMが生体分子の機能メカニズム解明にとって直接的かつ迅速な解析手法であることが実証された。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

タンパク質やDNAなどの生体分子が機能しているときの動的な振る舞いを手に取るように見ることなど、非現実的な夢でしかないと考えられてきた。この夢を実現する技術を開発し、機能解明に迫る映像が得られることを実証したことは、画期的な成果である。このような観察を可能にする高速AFMは世界のどこにもなく、世界を大きく先導する成果となった。今後この手法は世界に普及し、生命科学の発展に貢献するものと期待される。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. **T. Ando**, T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, M. Taniguchi, A. Miyagi, and H. Yamashita, Invited Review: High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. *Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol.* **456**: 211-225 (2008).
2. **T. Ando**, T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, M. Taniguchi, A. Miyagi, and H. Yamashita Review: High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes, *J. Mol. Recognit.* **20**: 448-458 (2007).
3. H. Yamashita, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, D. Yamamoto, and **T. Ando**, Tip-sample distance control using photothermal actuation of a small cantilever for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **78**:083702 (5 pages) (2007).
4. T. Uchihashi, H. Yamashita, and **T. Ando**, Fast phase imaging in liquids using a rapid scan atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.* **89**, 213112 (2006).
5. N. Kodera, M. Sakashita, and **T. Ando**, A dynamic PID controller for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **77**(8): 083704 (7 pages) (2006).
6. **T. Ando**, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita, and M. Sakashita, High-speed atomic force microscopy for studying dynamic behavior of protein molecules at work. *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(3B):1897-1903 (2006).
7. N. Kodera, H. Yamashita and **T. Ando**, Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **76**:053708 (5pages) (2005).

ホームページ等

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