

生命現象の解明に資する革新的高速AFMの開発

Innovative high-speed AFM for elucidating vital phenomena

安藤 敏夫 (ANDO TOSHIO)

金沢大学・数物科学系・教授



研究の概要

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、この技術で観察可能な試料系を拡大させるために、Tip走査方式の高速AFM、非接触高速AFM、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、細胞表面での分子プロセスや細胞内オルガネラの動態をも観察可能にする。

研究分野：新複合領域

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、高速AFM、ダイナミクス、タンパク質、細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究開始1年前には、私が15年の歳月をかけて開発してきた高速AFMは、タンパク質の動態を機能を乱さずに撮影できる性能にあと一歩で到達できる段階にあった。例えば、アクチンフィラメント上を歩くミオシンVの観察も確率が低くノイズであったものの可能であった。従って、分子動態を観察できる高速AFMが完成するのは時間の問題と考え、次の5-10年先に向け更に革新的な高速AFMの開発を決意した。2005年に米国のグループが、超音波の非線形干渉を利用して、大気中ではあるが、表面下にある構造や細胞内部を観察できることをサイエンス誌に報告していた。このこともこの決意を後押しするひとつの要因であった。

2. 研究の目的

高速AFMを完成させ、タンパク質の機能動態を観察することにより、この顕微鏡の有効性・革新性を実証する。その技術と超音波技術などと融合させて、細胞研究にも利用可能な次世代高速AFMを実現させる。

3. 研究の方法

エレクトロニクスの低ノイズ化と種々の観察条件の最適化により、精製されたタンパク質の動態観察用高速AFMを完成させ、いくつかの試料系の動態観察を行う。大きな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Tip-走査方式に変更するとともに、広範囲スキャナや振動ダ

ンピング技術を開発する。非接触条件は、試料ステージを超音波励振し、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ことにより実現させる。内視機能については、先行研究の追試から始め、確認され次第そのシステムを高速AFMに導入する。

4. これまでの成果

タンパク質分子の動態を、機能を乱さずに高速動画撮影できる高速AFMを完成させた。また、ミオシンVの歩行運動の高解像撮影(Nature, 2010)や光に応答して構造変化するバクテリオロドプシンの高解像撮影(Nat. Nanotechnol., 2010)に成功した。

大きな試料の観察に適したTip-走査方式への変更に伴う課題を解決する以下の技術を開発した。①カンチレバー走査を高速且つ正確にトラッキングできる光てこ光学系、②振動しにくいカンチレバーチップ固定ジグ、③広域スキャナと振動ダンピング技術。これら要素技術を組み込んだ高速AFMを試作し、広範囲でも高速にXY走査できる性能と2 frames/sのイメージング速度を達成した。

非接触条件の撮影は超音波の利用で可能となった。実際、Si基板表面に段差を付けた試料やラテックスビーズが非接触で観察された。但し、レバー部分で超音波を検出しているものと推定される。

表面下構造を観察できたという先行研究の検証を丹念に行った。多くの実験を通して、以下の結論に至った。試料下部から伝搬してきた超音波が試料内部にある物体で変調さ

れ、その変調が超音波の非線形干渉を介してカンチレバーで検出される結果、表面下にある物体が観察できるという先行研究の解釈は間違いである。試料内部にある物体の存在が試料表面の硬さ(弾性)に反映される結果、あたかも内部にある物体が観察されるかのように見えるだけである。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。

5. 今後の計画

完成させた高速 AFM による応用研究を進め、この高速 AFM の生命科学における革新性・有効性をいくつかの試料系に絞って更に実証する。Tip-走査方式の高速 AFM については、本研究終了までに 10 frames/s の撮影性能をもつプロトタイプ機を完成させる。この装置は非接触高速 AFM や高速内視 AFM のプラットフォームにもなるものである。非接触 AFM については、空間分解能を上げるために、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、空間分解能は低い細胞内部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の原理をベースにして、超音波の伝播にかかる時間の利用と、カンチレバーによる超音波検出により、表面化にある構造体を高い空間分解能で観察可能な高速 AFM の原理を確立させ、試験観察を行う。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)論文(計 17 件)以下は代表的なもの

- 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", *Angewandte Chemie International edition* (published online).
- 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).
- P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieu, P. Dosset, Ch. Le Grimellec, J.-M. Verdier, S. Marchal, and T. Ando, "Deciphering the structure, growth and assembly of amyloid-like fibrils using high-speed atomic force microscopy", *PLoS One* **5** (11): e13240 (8 pp) (2010).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, "Anisotropic diffusion of point defects in two-dimensional crystal of streptavidin observed by high-speed atomic force microscopy", *Nanotechnology* **19**: 384009 (9 pp) (2008).

特許(計 3 件) 2 件を以下に示す。

- 安藤敏夫, 岡崎康孝, 内橋貴之, 「原子間力顕微鏡及びカンチレバー支持具」, 金沢大学, 2010 年 6 月 1 日, 特願 2010-126027.
- 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸, 山本哲朗, 「走査プローブ顕微鏡」, 金沢大学, 特願 2008-275981, 2008 年 10 月 27 日.

受賞(計 4 件)

- 安藤敏夫: 日本学術振興会 榊賞 (2008 年 9 月 16 日)
- 安藤敏夫: 日本表面科学会 学会賞 (2010 年 5 月 22 日)
- 内橋貴之: 日本学術振興会 ナノプローブテクノロジー賞 (2010 年 8 月 4 日)
- 安藤敏夫: 材料科学技術振興財団 山崎貞一賞 (2010 年 9 月 16 日)

ホームページ

http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biop_hys/index.htm