

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分
平成27年3月31日現在

高速バイオAFMが拓く新構造生物学

Opening up New Structural Biology by High-speed Atomic Force Microscopy

課題番号：24227005

安藤 敏夫 (ANDO TOSHIO)

金沢大学・数物科学系・教授



研究の概要

代表者は、高い空間分解能と時間分解能を併せ持ち、機能を損なわずに水中に在るタンパク質分子を直接可視化できる高速AFMを世界に先駆けて開発することに成功した。本研究では、これまでの成果をベースに、生細胞や細胞内オルガネラなどの動態やその表面で起こる分子プロセスのその場観察をも可能にする技術開発を行い、それにより新しい構造生物学を開拓する。

研究分野：生物物理学、ナノバイオサイエンス

キーワード：構造生物、1分子計測・操作、バイオイメージング、タンパク質、細胞

1. 研究開始当初の背景

代表者は20年前に高速AFMの開発に着手し2008年に完成させ、その後Myosin Vの歩行運動やF₁-ATPaseの構造回転などを高速・高解像撮影することに成功し、従来技術では不可能な発見ができることを実証した。こうして、タンパク質分子の構造と動的振る舞いを、プローブを介さずに直接観察するという生命科学の夢がようやく実現された。

2. 研究の目的

この最近の急速な進展と、英国で改良された走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)が実用段階に入ったことなどに鑑み、タンパク質分子の動態観察を継続しつつも、次なる目標を設定した。分子よりも遥かに大きい細胞や細胞内オルガネラの動的形態変化やそれらの表面で起こる分子プロセスをも高解像観察可能な高速AFM、及び、試料に非接触でダイナミクスを観察可能な高速SICMを実現し、その性能を実証するという「困難ではあるが探究すべき重要な目標」を設定した。また、表面しか観察できないこれらの顕微鏡の能力を補うために、蛍光像と表面形状像を同時に取得可能とすることも目標とした。

3. 研究の方法

研究内容は大きく分けて3つに分類される。(A)装置関連の技術開発、(B)新しく開発する技術・装置の性能を実証するイメージング研究、(C)高速AFMによる多様なタンパク質系の観察と機能発現機序の解明研究。(A)については、(i)走査範囲を格段に拡大

した広域スキャナーの開発、(ii)広域スキャナーの非線形性補償と振動抑制法の開発、(iii)蛍光顕微鏡及び関連する光学技術を高速AFMに導入するための技術開発、(iv)イオン伝導計測の高速化と低ノイズ化による高速SICMの実現。(B)については、細菌、ニューロンも含む真核細胞、分離調製した細胞内オルガネラのダイナミックな現象を撮影し、装置性能を実証する。(C)については、これまでに手掛けてきたモータータンパク質や天然変性タンパク質の他、多くの連携研究者の協力を得て、DNA関連のタンパク質、AAAタンパク質、膜タンパク質など多様なタンパク質系を対象に、機能発現機序の解明を行う。

4. これまでの成果

紙面が限られているので、いくつか絞る。広域・高速スキャナーの開発：第3種テコ法による拡大機構を利用して約50×50μm²の走査範囲を確保し、低共振周波数故に望ましくない振動が発生する問題を逆伝達補償法などにより解決するとともに、広域であるが故に生ずる非線形性や走査軸間の干渉をフィードフォワード制御や回路技術により解決した。これにより、X方向に1kHzで走査しても望ましくない振動を起こさずに走査できる広域・高速スキャナーを完成させた。この走査速度は、100本の走査線の場合、10frames/sのイメージング速度に対応する。簡易蛍光顕微鏡の導入と細胞動態の観察：広域/高速スキャナーを搭載した高速AFM装置で細胞動態を実際に観察できるか実証研究

を行った。これまでの高速 AFM に付属している光学顕微鏡では細胞は見えないため、探針を細胞の特定位置にポジショニングできない。そこで、簡易蛍光顕微鏡を導入し、GFP をトランスフェクトした細胞を可視化できるようにした。この高速 AFM により、真核細胞で起こるエンドサイトーシス、アクチンによる逆行流動、ニューロンで起こる樹状突起の成長・分岐や膜のラフリング運動などの動的な現象を光学顕微鏡よりも遥かに高い解像度で捉えられることを実証した。

インターラクティブ高速 AFM の開発: カンチレバー探針はイメージングばかりでなく試料を操作することにも使える。そこで、当初の計画になかったが、ディスプレイ上に現れる高速 AFM 像のピクセル位置 (分子の局所位置に対応) を指定すると、次のフレーム走査中に探針が指定した分子局所に来ると探針から大きな力を加え、その後すぐに通常のイメージングモードに戻る一連の動作を実行するインターラクティブ高速 AFM を開発した。**高速 SICM の開発:** SICM は非接触イメージングという優れた特徴を有するが、イオン伝導計測にかなり時間がかかり、極めて遅い。そこで、プローブであるガラスキャピラリの電気抵抗と電気容量をいくつかの工夫により低減させ、従来の 100 倍の速度を実現した。また、Z ピエゾからの放射ノイズを遮蔽するなどの工夫により感度を 20 倍上げることに成功し、それにより空間分解能を上げることも可能になった。現在はこれらの技術を組み込んだ装置を製作中である。

タンパク質のイメージング研究: インターラクティブ高速 AFM の技術を Myosin V に適用し、ADP 存在下で Actin 線維に 2 本足で結合した分子の後ろ足を Actin から解離させた。その結果、この分子は一步前進し、これを繰り返すと何歩も一方向に歩き、ATP-free での歩行運動が観察された。この成果は、Myosin V に限らず ATP をエネルギー源とする多様なタンパク質分子機械における ATP 加水分解の役割を一から問い直すものであり、極めて画期的な成果である。天然変性タンパク質 (IDP) については、天然変性領域 (IDR) の両端距離の平均値がアミノ酸配列に依らず残基数だけで決まるという一般則を見出した。IDP を観察するだけで残基数が決められるため、オーダーした領域と IDR との境界を残基レベルで特定できるため、この一般則は構造解析が難しい IDP の研究に貢献する。その他にもリング状シャペロンの ATPase 反応に伴う協同的構造変化や回転、2 頭の Myosin に似た DNA 修復タンパク質のネック部の会合や伸縮運動と DNA 鎖間の架橋、時計タンパク質間の動的な協同的結合・解離など、機能に密接に関係するダイナミックな分子動態を捉えることに成功し、高速 AFM イメージングの威力を更に実証した。

5. 今後の計画

高速 AFM 関連の技術/装置開発は予想を超えて進展したため、実証研究を超えて、細胞や細胞内オルガネラを対象に本格的な応用研究に着手する時期に来ていると考えている。イオン伝導計測の高速化と低ノイズ化も、予想を超えたレベルまで進展したため、高速 SICM 装置を早く完成させて実証研究を進める。タンパク質のイメージングについては、現在手掛けている研究を継続し完了させるとともに、開発の過程で新たに発案した研究も進めたいと考えている。例えば、前述とは異なる方法でタンパク質分子を操作して機能を乱したときの動作の観察や、ガラスキャピラリの開口部にあるナノポアに膜タンパク質を含む脂質二重層膜を張り、電位をかけてイオンチャネルの動作を観察するか、タンパク質輸送装置における輸送過程を観察するといった新しい観察にも挑戦したい。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. T. Davies et al., CYK4 promotes anti-parallel microtubule bundling by optimizing MKLP1 neck conformation, *PLoS Biol.* (in press).
2. M. Shibata et al., Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells, *Scientific Reports* **5**, Article No. 8724 (2015).
3. N. Kodera, T. Ando, The path to visualization of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy, *Biophys. Rev.* **6**, 237-260 (2014).
4. T. Ando, T. Uchihashi, S. Scheuring, Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy, *Chem. Rev.* **114**(6), 3120-3188 (2014).
5. S. Fukuda et al., High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope, *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 073706 (2013).
6. H. Watanabe et al., Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 053702 (2013).
7. H. Yamashita et al., Role of trimer-trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by high-speed atomic force microscopy, *J. Struct. Biol.* **184**, 2-11 (2013).
8. 島津科学技術振興財団 島津賞 (2013)
9. 全国発明表彰発明特別賞 (2013)
10. 文部科学大臣表彰 科学技術賞 (2013)
11. UPenn NBIC Award for Research Excellence in Nanotechnology (2012)

ホームページ等

http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophysics/index_J.htm