

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 16 年度採択研究代表者

安藤 敏夫

(金沢大学大学院自然科学研究科 教授)

「タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発」

1. 研究実施の概要

タンパク質の機能解明に資する「タンパク質ナノ動態高速撮影装置（高速 AFM）」を開発する。形状ばかりでなく物性マップの動態をも撮影できる装置とする。また、いくつかの試料系の動態を捉え、その機能解明を目指す。これまでのところ、上記の目標を実現すべく、装置に含まれるデバイスの最適化や新しいデバイスの開発を行うとともに、物性マップ取得のための方法論を検討してきた。また、観察に適した AAA タンパク質とその基質、DNA 関連のタンパク質などの発現方法の検討や基板の開発を行い、試験的なイメージングはモータタンパク質、DNA 関連タンパク質などについて行った。装置については、目標とする性能にかなり近づけるデバイスをほぼ開発できており、今後はこれらをすべて組み込んだ高速 AFM を完成させる。完成後は、実際のイメージングに力点をおいた研究にシフトしていく。また、検討した物性マップ取得手法を具体的な装置として製作し、評価を行う。

2. 研究実施内容

[1] 高速 AFM のデバイス開発

タンパク質の機能を乱さないほど探針・試料間に働く力を軽減し、且つ、高速走査を可能にするために、様々な技術開発を進めてきた。以下にそれらを説明する。

(a) フィードバック帯域の理論的考察：目標性能を満たす高速 AFM 装置に必要なデバイスの開発に指針を与えるために、多数の因子が複雑に絡むフィードバック帯域の理

論的考察を行い、実験結果を説明できる解析的な式を導くことができた。その結果、カンチレバー振動振幅のセットポイント／自由振動振幅 (r)、自由振動振幅／試料の最大高さ ($2A_0/h_0$) という 2 つの比がフィードバック帯域に大きな影響を与えることを定量的に明らかにした (図 1、線に付けた数字は $2A_0/h_0$ の値)。

(b) 高速スキャナー：高速化にとってボトルネックになっており、且つ、開発が難しいデバイスである。 piezo のスキャナーへの組み込みを工夫して共振周波数を稼ぐことを検討し

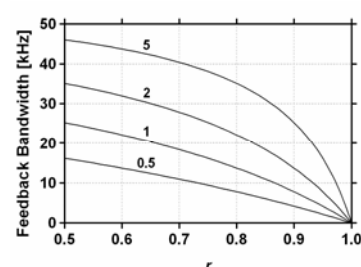


図 1

た。ピエゾ素子の固定法をいくつか試みたところ、共振周波数を自己共振周波数に維持できる固定法を見出した。

(c) **カンチレバーの光励振・駆動**：音響励振法ではカンチレバーを直接励振できず、その結果 Q 値を小さくする Q 値制御ができない。そこで、カンチレバーにレーザー光を当てて、熱膨張によりカンチレバーを変位(共振)させる方法を試みた。405nm のレーザー光の場合、約 10nm/mW の静的変位が得られた。また、遅い熱の伝導・拡散過程を逆伝達関数で補償を試みたところ、カンチレバーは高速に応答し、カンチレバーの Q 値を小さくする制御が実現できた。

(d) **フィードバック制御法の開発と評価**：既の開発した動的 PID 制御の特性を詳しく評価した。セットポイントを上げてフィードバック帯域がそれほど下がらず、探針を試料に軽く触る条件でも高速走査を可能にする優れた制御法であることを明らかにした。

(e) **カンチレバーの励振効率のドリフト補償**：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ると、自由振動振幅のサブナノメータのドリフトでもイメージングを不安定にさせる。そこで、カンチレバー振動の 2 次共振振幅の長時間平均を一定に保つ制御系を製作し、セットポイントを上げて安定なイメージングが可能になった。

(f) **フィードフォワード制御法**：フィードフォワード制御は見かけ上試料の高さを低くするため、図 1 から明らかなようにフィードバック帯域が向上する。そこで、1 ライン走査毎にフィードフォワード制御するための回路を開発し、その優れた効果を確認できた。

(g) **高速位相検出法**：エネルギー散逸を伴う探針・試料間相互作用から試料の物性情報を得ることが可能である。微小カンチレバーは溶媒の粘性抵抗を受けにくく、従って、探針・試料間で起こるエネルギー散逸を敏感に検出できるはずである。そこで、高速位相検出回路を開発し、試料形状と同時に粘弾性マップを高速にイメージングすることに成功した。

[2] 基板開発とイメージング

マイカ基板表面を種々の手法で修飾し、平滑且つ選択吸着可能な基板作成を試みた。その結果、LB 膜、もしくはリポソームの基板上での開裂で形成される 2 重層膜が最も有望であることが分かった。Biotin の付いたリピッドの場合、Streptavidin を 2 次元結晶のように高密度且つ平滑に敷き詰めることができるよう

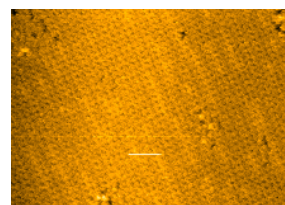


図 2

になった(図 2)。イメージングについては、ミオシン V のアクチン上での動的な振る舞い、GroEL の ATP や GroES の結合に伴う高さの動的な変化、二クレオソームのリモデリングなどを試験的に調べた。

[3] 物性マップ取得手法の検討

タンパク質の物性、特に極性(親水性・疎水性)をマッピングするために、探針・試料間相互作用検出の高感度化、及び、極性情報を得るための探針の修飾について検討した。

高感度化については、位相情報は振幅よりも感度が高いことを明らかにし、また高速位相測定回路を開発した。探針の修飾（極性変化）については、半導体探針に光を照射し、電子正孔対生成にともなう表面電位変化を利用する方法を検討し、表面電位の検出が可能であることを確認できた。また、フォトクロミック色素の光照射による異性化反応を利用するために、色素を探針に結合させるカップリング剤や色素誘導体を調査した。また、試験的に基板をパターン状に異性化させ、その分極分布が力学的に検出できるかを走査型ケルビンプローブ顕微鏡で調べた。

[4] AAA タンパク質

AAA タンパク質は ATP のエネルギーを利用して、タンパク質やその会合体を変換する特殊な分子シャペロンである。この変換の様子を高速 AFM で捉え、その機能解明を目指している。主に 2 つの系で、高速 AFM 観察に適用させるための準備研究を行った。

(a) **線虫由来 p97** : 線虫で明らかにした p97 のポリグルタミン凝集体形成の緩和の現象を *in vitro* 系で確認するために、p97 ホモログ (C06A1.1、C41C4.8) を昆虫細胞・バキュロウィルスの発現系により精製した。P97 の基質としてハンチンチンのエキソン 1 及びアトロフィン 1 由来のポリグルタミン鎖を GST との融合タンパク質として精製した。GST 部をプロテアーゼで切断することにより、凝集反応が開始すること、また、種々の形態の凝集体構造ができることを観察した。現在、p97 のポリグルタミン凝集体への作用を分光法と AFM 観察により調べている。

(b) **Katanin 及び Spastin** : 微小管切断タンパク質である katanin の作用機構を高速 AFM で明らかにすることを目標に、まず昆虫細胞・バキュロウィルス発現系で katanin を精製し、ATPase 活性を確認した。また同様に微小管切断作用をもつ spastin の線虫ホモログを精製し、その ATPase 活性と微小管作用を確認した。

[5] DNA 関連タンパク質

DNA の複製・修復・組み換えなどに関与する超分子複合体の作用機序を、高速 AFM 観察を通して明らかにすることを目標に、多数ある系から高速 AFM 観察に適した試料系の候補を探索した。クランプ・クランプロード・DAN 複合体の単粒子解析の結果、動的な変化は小さいことが予想され、高速 AFM 観察には向いていないと予想された。

(a) **RuvA・RuvB・Holliday 分岐複合体** : この複合体の結晶構造解析や単粒子解析などをこれまで行ってきた。その結果から、この系は高速 AFM 観察に適した試料であると判断され、その安定複合体の高速 AFM 観察を試験的に行った。予想したよりも高解像でイメージングできることを確認した。

(b) **クロマチンのリモデリング** : クロマチンリモデリング因子による立体構造変換過程は高速 AFM で捉えるに適した試料系であると判断した。変換過程の動的観察を目標に、ヌクレオソームやリモデリング因子の精製を行った。また、ヌクレオソームの高速 AFM 観察を

試験的に行った。

3. 研究実施体制

「高速 AFM 開発」グループ

- ① 研究分担グループ長：安藤 敏夫（金沢大学、教授）
- ② 研究項目：
 - 高速 AFM の開発
 - 試料観察と基板の開発
 - AFM 像解析のためのプログラム開発

「物性マッピング機能開発」グループ

- ① 研究分担グループ長：菅原 康弘（大阪大学、教授）
- ② 研究項目：
 - 物性マッピング機能の開発

「AAA タンパク質研究」グループ

- ① 研究分担グループ長：小椋 光（熊本大学、教授）
- ② 研究項目：
 - AAA タンパク質の調製と改変

「DNA 関連タンパク質研究」グループ

- ① 研究分担グループ長：森川 耿右（大阪大学、教授）
- ② 研究項目：
 - DNA 関連タンパク質の調製と改変

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N., Miyagi, A., Nakakita, R., Yamashita and Sakashita, M., “High-speed Atomic Force Microscopy for Studying Dynamic Behavior of Protein Molecules at Work”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(3B): 1897-1903 (2006).
- Uchihashi, T., Kodera, N., Ito, H., Yamashita, H. and Ando, T., “Feed-forward Compensation for High-speed Atomic Force Microscopy Imaging of Biomolecules”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(3B): 1904-1908 (2006).
- Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N., Miyagi, A., Nakakita, R., Yamashita, H. and Matada, K., “High-speed AFM for Studying the Dynamic Behavior of Protein

Molecules at Work” , *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **3**: 384-392 (2005).

- Kodera, N., Yamashita, H. and Ando, T., “Active Damping of the Scanner for High-speed Atomic Force Microscopy” , *Rev. Sci. Instrum.* **76**: 053708 (5pages) (2005).
- Yakushiji, Y., Nishikori, S., Yamanaka, K., and Ogura, T., “Mutational analysis of the functional motifs in the ATPase domain of *C. elegans* fidgetin homologue FIGL-1: Firm evidence for an intersubunit catalysis mechanism of ATP hydrolysis by AAA ATPases.” , *J. Struct. Biol.* (in press)
- Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T., “Characterization of mutants of the *Escherichia coli* AAA protease, FtsH, carrying a mutation in the central pore region” , *J. Struct. Biol.* (in press)
- Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T., “Flavodoxin, a new fluorescent substrate for monitoring proteolytic activity of FtsH lacking a robust unfolding activity” , *J. Struct. Biol.* (in press)
- Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T., “An AAA protease FtsH can initiate proteolysis from internal sites of a model substrate, apo-flavodoxin” , *Genes Cells*: **11**, 261-268, 2006.

(2) 特許出願

平成 17 年度特許出願件数：3 件 (CREST 研究期間累積件数：4 件)