

「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い、これらを組み込んだ高速 AFM を製作した。イメージング速度はビデオレートを実現した。既に成功している Myosin V のアクチンフィラメント上でのプロセッシブ運動、シャペロニン GroEL-GroES の反協同的相互作用の観察例を増やし、メカニズム解明に迫るレベルに達した。新たに得た成功例として、ヌクレオソームのリモデリング因子である FACT が長い非構造領域をもつことを見出し、アミノ酸配列との関係を明らかにした。また、Streptavidin の 2 次元結晶中の格子欠陥のブラウン運動が異方性をもつことを見出し、結晶構造中のタンパク質間結合が Biotin との結合で弱くなることを明らかにするとともに、結合のエネルギーの定量化にも成功した。また、酵母の双頭ダイニンが微小管に沿って運動する様子の観察にも成功している。他の試料系については、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や基板の検討や試験的イメージングを継続している。装置関連で唯一残されている探針・試料間にかかる力の軽減化手法の新しいアイデアを得て、そのデバイス開発に着手した。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

[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。本年度行った内容を以下に記す。

(a) 高速スキャナー：スキャナーは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ため、研究を継続してきた。去年度の段階で 500kHz の帯域を実現したが、低周波側に残る共振を除去することはできなかった。そこで、ピエゾ素子の新しい固定法をいくつか検討し、最も有望な固定法を見出すことができた。その結果、低周波側に共振をもたず、500kHz 付近にのみ共振ピークをもつ Z スキャナーを開発することに成功した。これにより、高速スキャナーの開発は完了したと考えている (論文準備中)。

(b) 探針・試料間に働く力の軽減化：既に開発した動的 PID 制御法により力の軽減化はかなりのレベルまで達成した。しかし、弱いタンパク質間相互作用を完全に乱さない程度には至っていない。この壁を破るべく様々な試みを行ってきたが、試料との接触で生ずるカンチレバー振動の変化をより高感度で検出する方法でしかこの壁を破ることはできそうもないという結論に至った。

これまでは、カンチレバー振動の変化を振幅、或いは位相の変化で捉えていた。探針・試料間接触により高調波が生ずるが、振幅・位相の検出ではこれを有効に利用していない。カンチレバー振動の振幅や位相を変化させる要因は、力積 (力×時間) であり、また、接触はカンチレバー振動周期の 1/10 程度以下の時間 (100 ns 以下) 内で起こるため、作用する激力は大きい。従って、激力を検出することができれば、接触を高感度に検出できるはずである。しかし、激力の周波数成分は、カンチレバーの基本振動周波数 f_0 の整数倍 (高調波) に亘っており、それらの成分を取り出して加算する必要がある。すなわち、

$$f(t) \approx \sum_{n=1}^{\infty} (1-n^2) (A_n \cos n\omega_0 t + B_n \sin n\omega_0 t) \quad (1)$$

ここで、 A_n , B_n はカンチレバーの振動信号のフーリエコサイン・サイン係数である。基本波には、励振力が含まれているため除く必要がある。実際に力信号が得られるかどうかを、マイカ表面に周期的に接触しているカンチレバーの振動信号を解析することにより確認したところ、図 1 に示すように、含める高調波成分を多くすると、鋭い力信号が現れることが判明した。しかし、激力のピークは非常に狭い範囲にあるため、(1)式に従い力信号を合成してピーク値を S/H することは難しい。ピークは、カンチレバー振動の底付近に生ずることから、接触する時間 $t_0 = (\pi + 2k\pi + \varphi) / \omega_0$ ($\tan \varphi = B_1 / A_1$) から、ピーク力を求めることができる。このピーク力をリアルタイムで求める回路を現在開発中である。



図 1 : カンチレバーの振動信号からの力信号の合成

(c) **高速振幅計測** : これまで用いていた高速振幅計測は半周期毎に振幅値を更新できるが、カンチレバー振動信号をピークホールドする手法であるため、ノイズが大きい。そこで、1周期毎にしか更新できないが、ノイズに強いフーリエ法で振幅値を求める方法を開発した。その結果、カンチレバーの熱ゆらぎの影響を抑えることに成功した (図 2)。この内容、及び、高速 AFM 技術全般の集大成を、Prog. Surf. Sci. の Invited Review に投稿した。

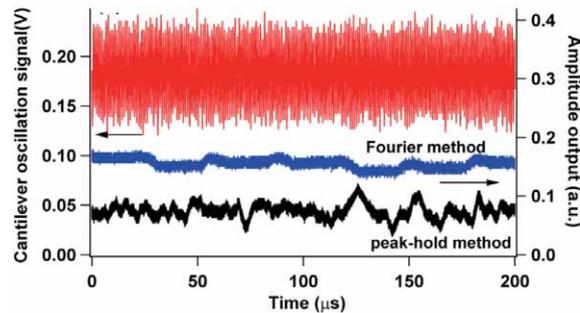


図 2 : Peak-hold 法と Fourier 法の比較。赤い線はカンチレバーの振動信号

[2] イメージング

装置開発から実際のイメージ実験に我々の努力をシフトすることができるようになったことから、イメージングの成功例が増えつつある。ミオシン V と GroEl-GroES の研究成果は、現在論文準備中である。ここでは他の 2 例を挙げる。

(a) **Streptavidin 2 次元結晶中での点欠陥の運動** : Biotin を含む脂質平面 2 重層膜上に形成させた Streptavidin の 2 次元結晶 (C_{222} 対称性結晶) 中に Monovacancy 欠陥を作りそのブラウン運動を観察したところ、2 つの結晶軸に関して異方性をもつことが判明した (図 3) ; ($D_b / D_a = 2.4$)。a 軸は biotin-unbound サブユニット間結合が列を成す方向、b 軸は biotin-bound サブユニット間結合が列を成す方向である。この異方性から、biotin-bound サブユニット間結合は biotin-unbound サブユニット間結合よりも弱く、その自由エネルギー差は $0.88k_B T$ であることが明らかになった。また、結晶成長速度の時間依存性の情報を考慮すると、各サブユニット間結合の自由エネルギーは、 $-0.88k_B T$ と $-1.76k_B T$ であることも見積もられた。(Nanotechnology 誌に投稿済み)。

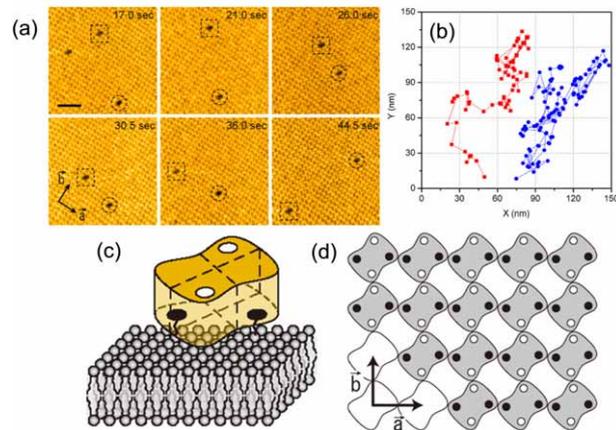


図 3 : Streptavidin 2 次元結晶 (C222) 中の Monovacancy 欠陥の異方性ブラウン運動。(a)AFM 像 (150x150 nm²) , (b) 2つの点欠陥の軌跡, (c)脂質膜上での Streptavidin 分子中の Biotin 結合部位, (d)C222 結晶中の Streptavidin の配置と biotin 結合部位 (白丸は Biotin-unbound, 黒丸は Biotin-bound を示す)。

(b) FACT の Intrinsically Disordered (ID) Region : クロマチン・リモデリング因子 FACT

(Heterodimer) を高速 AFM 観察したところ、2本の長いひも状のもの (ID 領域) が FACT 本体から突き出て激しくブラウン運動していることを見出した。ID 領域は転写、翻訳、細胞情報伝達などに重要な役割を果たしていると考えられており、FACT の機能においても重要と考えられる。アミノ酸配列からも2つの ID 領域が予測され、ひとつの ID 領域は DNA 結合領域 (HMG Box 領域) を挟んで存在することも予測された。そこで、この予測の成否を、予測される ID 領域のうちひとつずつ欠けた Deletion Mutants を作成し、AFM 観察で調べたところ、予測が正しいことが明らかとなった。ID 領域の同定は他の方法では困難であり、高速 AFM が新しい有効な方法になり得ることを示すこととなった (現在論文執筆中)。

[3] 物性マッピング機能開発

試料の様々な物性の変化を高速に捉えるためには、探針と試料との間に何らかの外部刺激を与え、それに対する微弱な力学応答を高感度・高速に捉えて画像化することが重要となる。そこで、探針と試料との間に働く力を軽減するためのイメージングモードと、エネルギー散逸などの物性の動的変化を高速に捉えて画像化する方法について検討した。

(a) 高感度・高安定なイメージングモードを考案・実証 : これまでの研究により、カンチレバーの位相変化から探針・試料間の相互作用を検出するイメージングモード (位相変調モード) は、従来のイメージングモード (振幅変調モード) に比べて、一桁以上の力検出感度の向上が可能であることが判明している。しかし、カンチレバーの励振振幅が一定の場合には、探針・試料間の非線形相互作用力に起因して、位相の探針・試料間距離依存性に不連続が生じ、安定なイメージングが困難である。これは、位相変調モードでのイメージングの極めて深刻な問題であり、これまで位相変調モードが使われてこなかった最も大き

な原因でもあった。この問題に対しては、カンチレバーの振動振幅を一定にすることにより、この不連続を完全に除去でき、極めて安定にイメージングできることを数値シミュレーションと実験により世界で初めて明らかにした（原著論文 8）。また、位相シフターと増幅器とからなるフィードバックループを追加することにより、カンチレバーの実効的 Q 値を低下させることができ、力の検出感度を低下させることなく、さらに高速なイメージングが可能となることを見出した（原著論文 7）。

(b) 形状とエネルギー散逸の高速同時測定法の開発：位相変調モード AFM におけるエネルギー散逸の関係式を理論的に導出し、カンチレバーの振動振幅を一定にするための制御信号からエネルギー散逸が得られることを明らかにした。また、カンチレバーの励振方法として、音響励振法と光熱励振法を比較・検討し、光熱励振法を用いることによりカンチレバーの振動振幅の高速制御が可能であることを明らかにした。高速振幅測定回路、高速位相検出回路、高速フィードバック回路からなる測定回路を構築し、表面形状とエネルギー散逸の同時撮像速度として、100 ms/frame を達成した（原著論文 5）。今後、生体試料の粘弾性やそのゆらぎ、水和殻などを高速に撮像できるかどうかを検討する。

[4] AAA タンパク質

AAA 型シャペロンによる基質タンパク質やその会合体の構造変換の様子を高速 AFM で捉え、その機能解明を目指している。今年度は 2 つの系について検討した。

(a) Katanin：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、昆虫細胞・バキュロウイルスの発現系により精製したウニ katanin について、ATP 依存的微小管切断の条件を検討し、AFM 観察を行った。その結果、katanin と ATP 存在下で、微小管の格子構造が壊れていく様子を観察できた（図 4）。なかには切断にまで至る破壊が観察できた。Katanin を添加しない対照の実験系では微小管の構造変化は観察されなかったため、katanin による切断過程を見ている可能性が高いと考えている。今後はさらに解像度を上げ、また katanin 自体の観察もめざし、変異体 katanin を用いた実験も進める予定である。

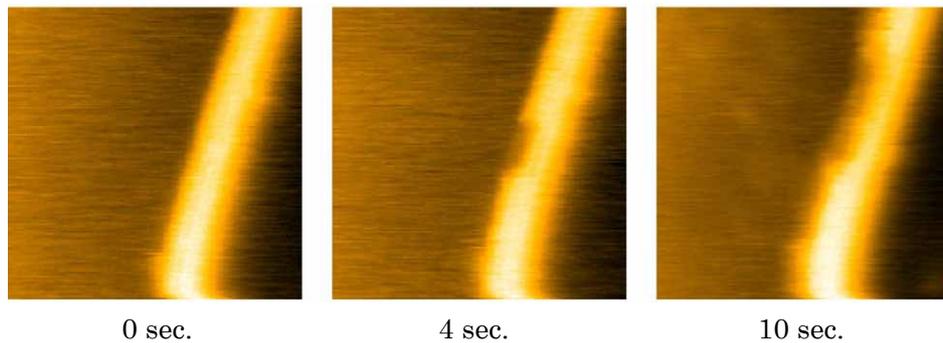


図4：Katanin による微小管格子構造の破壊。マイカ上に変異キネシンで微小管を固定し、katanin と ATP を添加して、高速 AFM で微小管構造を経時的に観察した。

(b) 大腸菌 FtsH：ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の基質分解機構を高速 AFM で明らかにすることを目標に、GST-flavodoxin-GFP の末端に His₆ タグを付加したモデル基質を構築し、その分解を確認した。マイカ基板上に NTA で修飾した脂質の二重層を形成させ、その上に固定した。AFM 観察したところ、基質は基板に固定化できていたが、各ドメイン (GST, Flavodoxin, および GFP) を識別することはできなかった。一方、FtsH の基板への固定も試み、マイカ基板の脂質二重層に FtsH を埋め込んで固定化できることを確認した。基質を添加し膜に埋め込んだ FtsH による基質分解過程を観察したい。

[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、多数の試料系から高速 AFM 観察に適した候補を探索した。

(a) RuvA・RuvB・Holliday 分岐複合体：昨年引き続き RuvAB 複合体の試料供給と Holliday 分岐 DNA の設計を行う一方、電子顕微鏡観察により複合体の安定性を調べた。その結果アームの長さが 50 塩基対からなる中程度の鎖長の分岐 DNA との複合体が安定であり (図5)、RuvB は HJ のアームの方向に対して loading preference を有している事が判った。しかし、この複合体に対応する AFM 像を得ることはできなかった。

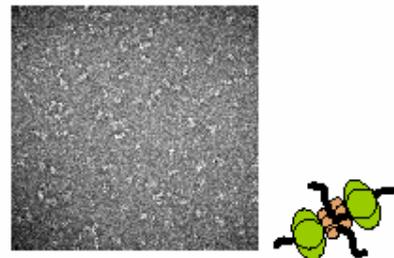


図5：RuvA-RuvB-HJ 複合体の電顕像とモデル

とはできなかった。基盤上で安定な複合体を形成させ、更に分岐点移動反応を実現する至適条件を検討するために、溶液の pH、カチオンの影響、陽イオン化合物の添加を試みた。

(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である FACT の詳細な電子顕微鏡 (EM) 観察、原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を行った。様々なサイズの粒子が観察され、FACT がオリゴマー状態で存在する事が示唆された。一部 15 nm ほどの大きさの分子が両観察で検出され、これが FACT モノマーであると推定された。FACT モノマーの AFM 観察

像を注意深く解析したところ、大きな楕円状の物体からヒゲのような線状のものが出ている分子像が観察された。この線状の tail 構造は、FACT に多く含まれる不規則構造 (intrinsically disorder; ID) 領域であると考えられる。詳しい AFM 観察結果については上述した通り。このように、クロマチンリモデリングに関連した FACT の tail 構造を示したのは世界ではじめてである。この手法は他の ID 構造を多く含む蛋白質にも応用できる汎用性の高い手法であり、ID 構造の分子運動を解明するのに大きく貢献すると期待される。

構造解析に適した DNA 配列 601 からなるプラスミド DNA を構築し、大腸菌で発現、精製したコアヒストンを用いて、15mer, 20mer-オリゴヌクレオソームを再構成した。これらの試料の EM 及び AFM 観察を試みたところ、15 個、20 個のモノヌクレオソームが数珠状に連なったオリゴヌクレオソームの形成が確認できた (図 6)。

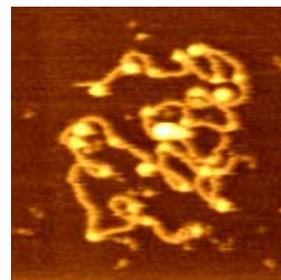


図 6 : 15 ヌクレオソームの AFM 像

(c) **新規試料の探索** : 新規試料の一つとして脂質代謝において重要な脂肪酸 β 酸化多機能酵素複合体を調製し、AFM 観察を行ったが、ドメイン構造の詳細は観察できなかった。

3. 研究実施体制

(1) 「高速 AFM 開発」グループ

① 研究分担グループ長 : 安藤 敏夫 (金沢大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・ 高速 AFM の開発
- ・ 試料観察と基板の開発
- ・ AFM 装置のプラットフォーム及び AFM 像解析のためのプログラム開発

(2) 「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 (大阪大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・ 物性マッピング機能の開発

(3) 「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 (熊本大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・ AAA タンパク質の調製と改変

(4) 「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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Ando T., Uchihashi T., Kodera N., Yamamoto D., Taniguchi M., Miyagi A., and Yamashita, H. "Invited Review: High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes", *Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol.* **456**:211-225 (2008)
2. Ando T., Uchihashi T., Kodera N., Yamamoto D., Taniguchi M., Miyagi A., and Yamashita H. "Review: High-speed Atomic Force Microscopy for Observing Dynamic Biomolecular Processes", *J. Mol. Recognit.* **20**: 448-458 (2007).
3. Shinohara K., Kodera N., and Ando T. "Single Molecular Imaging of a micro-Brownian Motion and a Bond Scission of a Supramolecular Chiral π -conjugated polymer as a Molecular Bearing Driven by Thermal Fluctuations", *Chem. Lett.* **36**: 1378-1379 (2007).
4. Yamashita H., Uchihashi T., Kodera N., Miyagi A., Yamamoto D., and Ando T. "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).
5. Li, Y. J., Kobayashi, N., Naitoh, Y., Kageshima, M. and Sugawara, Y. (Osaka Univ.), "Phase Modulation Atomic Force Microscopy in Constant Excitation Mode Capable of Simultaneous Imaging of Topography and Energy Dissipation", *Appl. Phys. Lett.*, **92**(12), (2008) 121903 (3 pages).
6. Kobayashi, N., Li, Y. J., Naitoh, Y., Kageshima, M. and Sugawara, Y. (Osaka Univ.), "Theoretical Investigation on Force Sensitivity in Q-Controlled Phase-Modulation Atomic Force Microscopy in Constant-Amplitude Mode", *J. Appl. Phys.*, **103**(5), (2008) 054305(4 pages).
7. Sugawara, Y., Kobayashi, N., Li, Y. J., Naitoh, Y., and Kageshima, M. (Osaka Univ.), "Elimination of Instabilities in Phase Shift Curves in Phase Modulation Atomic Force Microscopy in Constant Amplitude Mode", *Appl. Phys. Lett.*, **90**(19), (2007) 194104(3 pages).

8. Mayanagi, K., Fujiwara, Y, Miyata, T., and Morikawa, K. (Osaka Univ.), "Electron microscopic single particle analysis of a tetrameric RuvA/RuvB/Holliday junction DNA complex", *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **365**: 272-278 (2008).
9. Fujiwara, Y., Mayanagi, K., and Morikawa, K. (Osaka Univ.), "Functional significance of octameric RuvA for a branch migration complex from *Thermus thermophilus*", *Biophys. Res. Commun*, **366**: 426-431 (2008).
10. Sasagawa, Y., Yamanaka, K. and Ogura, T. (Kumamoto Univ.) ER E3 ubiquitin ligase HRD-1 and its specific partner chaperone BiP play important roles in ERAD and developmental growth in *C. elegans*. *Genes Cells* 12, 1063-1073, 2007.
11. Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K. and Ogura, T. (Kumamoto Univ.) The *C. elegans* homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 359,157-162, 2007.

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:0 件 (CREST 研究期間累積件数:7 件)