

「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・理工研究域数物科学系・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。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。装置の性能は理論的限界のレベルをほぼ達成している。まだ十分には解決していない課題（探針・試料間にかかる力の更なる軽減化）については継続して改善策を検討し、解を見出せつつある。装置開発から応用研究に重心をシフトさせ、興味ある現象をいくつかの試料系で見出すことに成功した。今年度の最も大きな成果は、バクテリオロドプシン（bR）の紫膜中での光応答反応の高解像イメージングである。現在論文投稿中である。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ング運動、及び、シャペロニン GroEL-GroES の反協同的相互作用の観察結果については、データに磨きをかけ、現在論文にまとめている。他の試料系では、小胞体からタンパク質を引き出して分解する経路に関わる AAA タンパク質 p97 の機能に直結すると思われる構造変化、姉妹染色体をつなぎ留めておくコヒーシンのいくつかの状態のイメージングにも成功している。また、イメージングにより天然変性構造領域（ID 領域）をもつことが見出されたクロマチンリモデリング因子 FACT のリン酸化の機能との関わりについても興味ある結果を得た。

### 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

- (a) 高速スキャナー：ピエゾ素子の固定法を工夫することで、安定且つ高い共振周波数（500kHz）をもつ Z スキャナーの開発に成功した<sup>1)</sup>。また、そのアクティブダンピングにも成功し、250kHz 程度の帯域を達成した。
- (b) 探針・試料間に働く力の軽減化：力の軽減化の課題にこれまで継続して取り組んできた。

我々は既にダイナミック PID 法による軽減化に成功しているが、それ以上の軽減化を可能にする手法を更に検討した。カンチレバーに作用している力を検出できれば、目標とする軽減化は達成されると見込まれる。そこで、カンチレバーの変位信号から力を決定する所謂「逆問題」をリアルタイムに実行する回路の試作を去年度より進めてきた。力は短時間(100ns 以下)にしか作用しないため、力信号のピークを捉えることは困難と考え、ピークの時間を演算で求め、その時間におけるピーク値を算出するアナログ・デジタル回路をまず検討した。その結果、この演算には時間がかかり過ぎ、高速性を犠牲にせざるを得ないことが判明した。そこで、力信号のピーク値をホールドする手法に立ち返って検討したところ、数百 ns の遅れでピーク検出できる見通しを得た。

(c)フィードバック帯域の向上:既にフィードバック帯域は理論的限界のレベルにほぼ到達している。この成果に結びついた技術開発のすべてを大部の総説(審査有り)にまとめた<sup>2)</sup>。この理論的限界を破るべく、フィードバックループ全体の遅れを逆伝達補償する方式を検討した。既に開発に成功している近似逆伝達関数自動生成回路<sup>3)</sup>を適用することにより、帯域を或る程度向上させられる見通しが得られた。

## [2] イメージング

(a)成果のまとめ:Streptavidin2次元結晶中での点欠陥の運動と結晶形成過程におけるその役割<sup>4)</sup>、及び、クロマチンリモデリング因子 FACT の ID 領域の発見とその物性解析<sup>5)</sup>の成果を論文として発表した。

(b)bR2次元結晶のダイナミクス:紫膜を高解像度で高速 AFM 観察すると、bR の規則正しい格子構造領域の境界部がダイナミックな平衡にあることを見出した(図1)。興味あることに、この平衡はbR3量体で起こっており、2量体、1量体は僅かにしか存在しない。すなわち、bR密度が極めて低い非結晶構造領域においてすでに3量体が形成されている。この境界部で3量体は結合・解離を頻繁に行い、結合寿命は指数関数分布をもつ。また、結合寿命の長さは、境界部でのbR3量体間の結合に含まれるボンドの数に依存していた。この依存性からボンド1つ当たりの結合エネルギーが $1.5 k_B T$ と求められた。また、境界部ではひとつのボンドで結合しその点を軸として回転する様子も観察された。bR の原子モデルの2次元結晶との比較から、この結合部位がW10-12に対応することも見出された。現在論文投稿中。

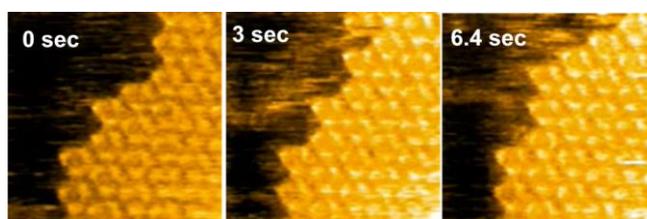


図1:bR2次元結晶の境界部における動的平衡の高速 AFM 像。イメージング速度:3.3 frames/s, スケールバー:10 nm。

(c)紫膜中の bR の光応答:bR の光サイクルにおける構造変化を捉えるべくこれまで研究を進めてきたが、はっきりした変化を捉えることはできなかった。光サイクルは 10 ms 内に完了する速い反応であり、その速い変化は最高 60 frames/s のイメージング速度でも捉えることは困難であっ

た。そこで、光反応サイクルが遅くなるミュータントを調製し、その光応答をイメージングした(図2)。一見すると、3量体中の bR 間の間隔が狭まった構造を取るように見えるが、実際には逆に3量体中の bR 間距離は大きくなり、その結果、異なる3量体に属する bR 分子は互いに接触し、あたかも新しい3量体が形成されたように見える(3つの隣接する3量体に属するこの最隣接 bR の3つ組を Trefoil と名付ける)。照射する光の強度が弱い場合には、Trefoil 中の bR 1 分子だけが励起され大きな構造変化を示すが、その励起寿命は約7秒であった。光強度が強い場合には、Trefoil 中の2ないし3分子が励起され、その結果、Trefoil 中の分子は接触する。これら接触している個々の分子の振舞いを詳しく見ると、それらの励起寿命は励起されるタイミングに大きく依存していた。後から励起された bR 分子は頻繁に励起-基底-励起状態のサイクルを繰り返すが、先に励起された bR 分子は励起状態に長く留まっていた。すなわち、後から励起された bR 分子の励起寿命は短く、逆に先に励起された bR 分子の励起寿命は長くなる。すなわち、Trefoil 内での bR 分子間相互作用により、正・負の協同性が同時に現れる。興味深いことに、この正負の協同性の結果として、全体の bR 分子の平均励起寿命は照射する光強度が弱い場合とほとんど同じになる。この協同性は、bR のプロトンポンプの効率を光強度に依存せずに維持するメカニズムとして働くことになる。このようなメカニズムは他の手法では見出すことは非常に困難であり、分子の動的な振る舞いを直接見る我々の手法が如何に効果的かを示す格好の例となった。これまで X 線結晶構造解析や電子顕微鏡で捉えられなかった大きな構造変化、そのダイナミクス、及び分子間相互作用による協同性を捉えられたことから、高速 AFM 観察の有効性がはっきりと示された成果である。この新しい bR 間接触により暗状態への遷移が速まることを見出した。現在論文投稿中。

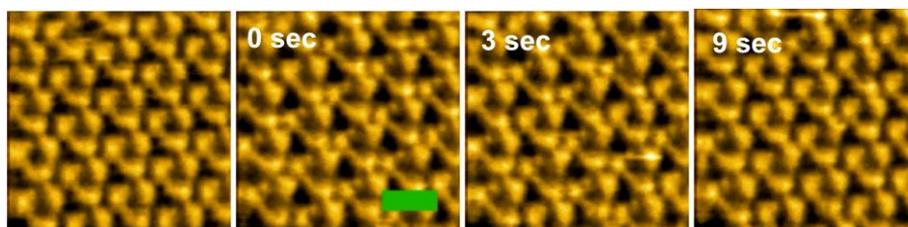


図2:bR の光応答の AFM 像。1 番目の像は光照射前。時刻1秒で光照射オフ。

### [3] 物性マッピング機能開発

カンチレバーの振動振幅を一定にする位相変調 (PM) 方式の AFM は、従来の振幅変調 (AM) 方式の AFM に比べて、力の検出感度が一桁以上向上し、しかも、探針・試料間の非線形相互作用力に起因する不安定性が完全になくなるため、極めて安定なイメージングが可能である。この新しい方式の AFM を高速に動作させるための方法と、試料の様々な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理論的・実験的に検討した。

(a)新しい高感度・高安定なイメージングモードの高速動作の実証: 水中のカンチレバーにレーザー光を照射してカンチレバーを励振する光熱励振法では、有限な熱伝導速度の影響により周波数の増加とともに位相が大きく遅れることが判明した。そこで、位相補償法を適用することにより、この位相遅れの問題を解決し、高速にカンチレバーの振動振幅と位相を検出できるよう

にした。また、高速振幅測定回路、高速 AGC 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実際に構築し、共振周波数が約 600kHz のカンチレバーを用いて、10 frame/sでの高速撮像が可能であることを明らかにした。

**(b)エネルギー散逸の高速測定の実証:**位相変調(PM)方式AFMでは、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、探針・試料間のエネルギー散逸を測定することができる<sup>7)</sup>。カンチレバーの振動振幅を一定にするための高速 AGC 回路のパラメータを最適化することにより、撮像速度を低下させることなく、表面形状とエネルギー散逸を同時に測定できることを実証した。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。

**(c)2次の共振モードを利用した新しい物性測定法の開発:**カンチレバーを1次の共振モードだけでなく2次の共振モードでも振動させ、探針・試料間に非線形な力学的相互作用を引き起こすことにより、生体試料の物性を測定する方法について検討した。理論的検討から、2次の共振モードの位相情報は、探針・試料間に働く保存力、すなわち、弾性に比例することを見出した。実験的には差動型のサンプル・ホールド回路を用いることにより低ノイズ検出を実現し、表面形状とエネルギー散逸、弾性の3つの情報を高速(10 frame/s)に同時測定することに世界で初めて成功した。

#### [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および AAA 型シャペロン自体の会合過程や ATP 依存的動態を高速 AFM で捉え、その機能解明を目指している。

**(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、ATP 存在下で、katanin による微小管の格子構造の破壊過程の観察に昨年度成功した。今年度はさらに解像度を上げ、katanin 自体の観察もめざしたが、大きな進展はなかった。

**(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、FtsH あるいはモデル基質のマイカ基板上への固定を試みたが、基質分解過程を観察するのに有効な固定法の改善はなかった。

**(c) p97:**多機能 AAA タンパク質 p97 の ATP 加水分解サイクルにおけるドメインの構造変化を観察するため、N 末端に His タグをつけて Ni-NTA 脂質上に固定し観察した。p97 が脂質膜の上に規則正しく敷き詰められており、ヌクレオチド非存在下で不規則な高さの変化(Brown 運動によると考えられる)が観察された。またマイカに直接 p97 を固定したところ、6 量体構造が明瞭に認められ、リング中央の孔も確認できた(図3)。今後ヌクレオチド依存的な p97 の構造変化やアダプター分子との結合構造を明らかにしたい。

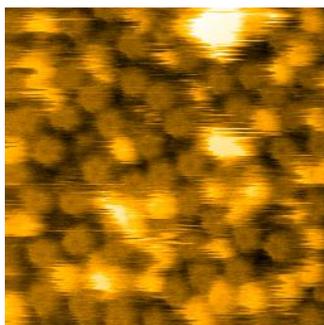
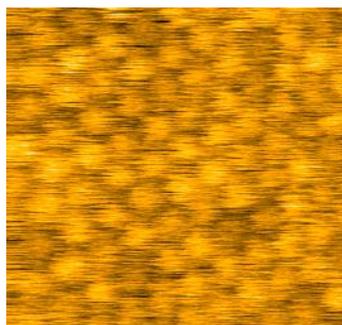


図3: (左) Ni-NTA 脂質上に固定した p97 の 6 量体リング。(右) マイカ上に直接固定した p97。走査範囲は 150nm×150nm。

(d) ClpB, Hsp104, ClpX を精製し、Sup35 線維、FtsZ 線維の形成に及ぼす効果と断片化条件を検討した。その結果、Hsp104 による Sup35 の脱凝集活性および ClpX による FtsZ 線維形成の抑制効果を *in vitro* で確認した。今後、これらの反応を高速 AFM で観察したい。

(e) 高速 AFM の設置: 金沢大学のデッドコピーを、11 月に熊本大学小椋研究室に設置し、動作確認を行った。

#### [5]DNA 関連タンパク質

DNA の複製、転写、修復に関与する超分子複合体の作用機構を、高速 AFM 観察によって明らかにする事を目標に研究を遂行した。この手法に適合し、且つ生物学的に重要なターゲットを見出すことは容易ではないため、広い視野から実験操作、ターゲットの選定を行った。

(a)RuvA・RuvB・Holliday 分岐点複合体: 昨年に引き続き RuvA、RuvB の試料供給と Holliday 分岐(HJ) DNA の試料調製を行った。合成 DNA を利用して、AFM 観察に適した HJ DNA の大量調製法を確立するため、系統的に DNA アームの長さを変えることを検討した。50 塩基対からなる二重鎖 DNA のアームを、50 塩基対からなる HJ DNA コアの東西南北4方向又は東西2方向にライゲース反応によってアームを伸張することを試みた。しかし、HJ-アーム分子間連結の効率が HJ-HJ 分子間連結に比べかなり低いこと、及び粘着末端の配列による優位性が原因で、長いアームをもつ HJ DNA を大量に調製する事は困難であった。引き続き、オックスフォード大学の D. J. Sherratt 教授から供与されたプラスミドを用いて *in vivo* で組換えを開始させる HJ DNA 調製法を試みたところ、HJ の形成を AFM によって確認できた(図4参照)。更に、複合体観察に適した基板との結合条件を検討した結果、前述の HJ DNA コアと RuvA 蛋白質分子からなる複合体が安藤グループの AFM で視覚化された(図5参照)。

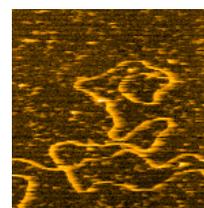


図4

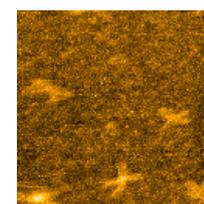


図5

(b)クロマチンリモデリング: FACT-ID (intrinsically disorder;天然変性)領域の機械的特性の解析を新たに行った。FACT-ID 領域は非常に細く柔軟なため、これまで直接可視化することは困難であったが、高速 AFM の導入によって水溶液中で揺動している ID 領域の視覚化に成功した。また、ここで得られた画像情報から ID 領域の機械特性を見積もることも成功し、この結果から FACT-ID 領域は柔らかな性質を持ち、構造を持った蛋白質よりも変性した蛋白質に近い特性であることが判明した<sup>5)</sup>。ID 領域の機械特性を動画像から直接見積もることは従来の技術では困難であり、これまでも報告がない。FACT-ID 領域は基板への吸着が穏やかなために ID 領域の自然な状態の特性を見積ることが可能になったものと推測する。

次に FACT の機能的特性を解明するため、昆虫細胞系の発現を試みた。発現した FACT 分子は大腸菌のものより凝集体を形成しにくく、性質の改善が認められた。この FACT 分子を用いてヌクレオソームとの相互作用を解析したところ、非常に弱い結合しか認められなかった。しかし、FACT を脱リン酸化処理したところ、結合活性が復活したことから、FACT のリン酸化型はヌクレオソームに結合できないことが判った。リン酸化部位を特定したところ、ID 領域に集中しており、ID 領域でのリン酸化、脱リン酸化が FACT の構造変化を引き起こして、機能を発揮している事が強く示唆された。大腸菌から取得した FACT のヌクレオソームとの複合体の AFM 観察も行った。しかし、期待されたような観察像は今のところ得られていない。基板との吸着による複合

体の破壊が観察を困難にしていることも考えられる。

(c)コヒーシン複合体:DNA 関連タンパク質複合体の新規試料として、姉妹染色分体連結に関与するコヒーシン複合体の高速 AFM 観察を行った(図6)。その結果、Smc1-Smc3 ヘテロ二量体は、これまでに電子顕微鏡により報告されている V 字型の形状をとっており、溶液中で激しく揺動している様子が観察できた。更にコヒーシン三量体を観察したところ、リング状の複合体を捉えることができた。このコヒーシン三量体中の Scc1 サブユニットを切断したところ、リングが開環し、Smc1-Smc3 二量体のような振舞いを示すことが確認できた。これらの結果は、この試料が AFM 観察のターゲットとして有効であることを示唆している。

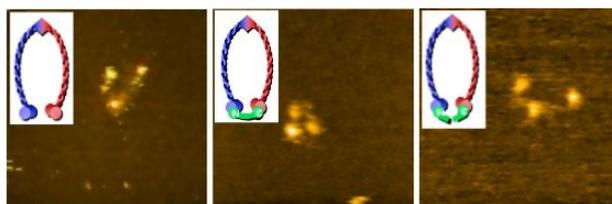


図6: コヒーシン複合体の高速 AFM 像。左から Smc1-Smc3 二量体、コヒーシン三量体、Scc1 切断コヒーシン三量体

(d)新たに導入された AMF 装置の立ち上げ:森川グループと小椋グループのそれぞれに高速 AFM の導入を行った。実際、森川グループに導入された装置を使用して、FACT の ID 領域の AFM 観察を行った。その結果、安藤グループと同程度の質の画像を観察することができた。FACT-ID 領域は溶液中で激しくブラウン運動をする非常に細い構造である( $< 1\text{nm}$ )ため、高速且つ低ノイズの AFM でなければ観察することはできない。つまり、森川グループに導入された AFM も高速 AFM として十分な性能をもつことを証明できた。

### 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、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、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・改変と AFM 観察

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. T. Fukuma, Y. Okazaki, N. Kodera, T. Uchihashi, and T. Ando, High resonance frequency force microscope scanner using inertia balance support, *Appl. Phys. Lett.* 92:243119 (2008).
2. 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).
3. T. Ando, Control techniques in high-speed atomic force microscopy, *Proceedings of the American Control Conference*, art. no. 4586984, pp. 3194-3200 (2008).
4. 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, *Nanotechnol.* 19: 384009 (9 pp) (2008).
5. A. Miyagi<sup>1</sup>, Y. Tsunaka<sup>2</sup>, T. Uchihashi<sup>1</sup>, K. Mayanagi<sup>3</sup>, S. Hirose<sup>4</sup>, K. Morikawa<sup>2</sup>, and T. Ando<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Osaka Univ., <sup>3</sup>Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, <sup>4</sup>National Institute of Genetics), Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy, *Chem. Phys. Chem.* 9(13):1859-1866 (2008).
6. 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).
7. Y. J. Li, N. Kobayashi, H. Nomura, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, High-speed phase-modulation atomic force microscopy (PM-AFM) in constant-amplitude (CA) mode capable of simultaneous measurement of topography and energy dissipation, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 47(7B), 6121-6124 (2008).
8. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, Phase modulation atomic force microscopy in constant excitation mode capable of simultaneous imaging of topography and energy dissipation, *Appl. Phys. Lett.* 92(12): 121903(1-3) (2008).
9. S. Nishikori, K. Yamanaka, T. Sakurai, M. Esaki, and T. Ogura, p97 homologs

from *C. elegans*, CDC-48.1 and CDC-48.2, suppress the aggregate formation of huntingtin exon1 containing expanded polyQ repeat. *Genes Cells* 13: 827-838 (2008).

10. S. Yamauchi, N. Higashitani, M. Otani, A. Higashitani, T. Ogura, and K. Yamanaka, Involvement of HMG-12 and CAR-1 in the cdc-48.1 expression of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 318: 348-359 (2008).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 2 件 (CREST 研究期間累積件数 : 9 件)