

Manufacture of Scanning Force Microscope for Biological Research

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ando, Toshio メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/46865 |

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



生物研究用走査型プローブ顕微鏡の製作

(課題番号 06558099)

平成6—8年度科学研究費補助金(基盤研究A)

研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 安藤敏夫
(金沢大学理学部教授)

生物研究用走査型プローブ顕微鏡の製作

(課題番号 06558099)

平成6—8年度科学研究費補助金(基盤研究A)
研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 **安藤敏夫**
(金沢大学理学部教授)



8000-60992-4

金沢大学附属図書館

目次

| | | |
|-------|-------------------------|----|
| 1 | はじめに | 3 |
| 2 | 研究発表 | 6 |
| 3 | 研究の目的 | 11 |
| 4 | AFM 2号機の製作 | 13 |
| 4.1 | 蛍光顕微鏡との組み合わせ | 13 |
| 4.2 | スキャナー | 13 |
| 4.3 | AFMヘッド | 15 |
| 4.4 | その他 | 18 |
| 4.4.1 | モーター | 18 |
| 4.4.2 | 加工材料 | 20 |
| 4.4.3 | ピエゾドライブ電源 | 20 |
| 5 | AFM2号機による形状観察 | 21 |
| 5.1 | 回折格子 | 21 |
| 5.2 | ミオシン頭部 (S1) | 22 |
| 6 | AFM高速化に向けた準備研究 | 24 |
| 6.1 | 高速スキャナー | 24 |
| 6.1.1 | 高速ピエゾ素子 | 24 |
| 6.1.2 | スキャナーのデザイン | 24 |
| 6.2 | 高速スキャナーの運転試験 | 26 |
| 6.3 | 高速走査用カンチレバーの試作 | 26 |
| 6.4 | 臨界角プリズム変位検出法を採用したAFMの試作 | 29 |
| 6.4.1 | 焦点エラー検出法の原理 | 30 |
| 6.4.2 | 試作AFM装置の構造 | 30 |
| 7 | 分子間相互作用の研究 | 33 |
| 7.1 | HMMのラベリング | 33 |
| 7.2 | 蛍光ラベリング | 35 |
| 7.3 | HMM1分子の捕捉 | 35 |
| 7.4 | アクチン・HMM間のライガー相互作用場の計測 | 37 |

| | | |
|-------|---------------------------|----|
| 7.5 | ATP・HMM反応に伴うHMM分子の構造変化の検出 | 39 |
| 7.5.1 | ATPアナログの合成 | 39 |
| 7.5.2 | 非特異的結合の無い基板の調製 | 39 |
| 7.5.3 | ATP固定基板の調製 | 40 |
| 7.5.4 | 探針のビオチン化 | 40 |
| 7.5.5 | HMM1分子の捕捉 | 41 |
| 7.5.6 | HMM分子の構造変化の検出 | 41 |
| 7.5.7 | 結果 | 43 |
| 8 | まとめ | 51 |

成果（論文）

1. Scanning Force Microscopy of the Interaction Events between a Single Molecule of Heavy Meromyosin and Actin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **234**, 178-182 (1997)
2. Innocuous Labeling of the Subfragment-2 Region of Skeletal Muscle Heavy Meromyosin with a Fluorescent Polyacrylamide Nanobead and Visualization of Individual Heavy Meromyosin Molecules.
J. Biochem. **119**, 1024-1032 (1996)
3. 原子間力顕微鏡で見た分子モーター
in 『生体分子モーターの仕組み』 共立出版 (1997)
4. 原子間力顕微鏡とその応用：液中にある生の生物試料の観察・操作・計測
細胞工学 **17**, 458-468 (1998)

付録

- 付録1 AFM2号機の設計図
- 付録2 高速スキャナーの設計図
- 付録3 分子間相互作用計測のためのプログラムソフト

1 はじめに

溶液中で生きた状態にある生物試料をナノメートル精度で観察できる顕微鏡は原子間力顕微鏡 (AFM) だけである。もちろんAFMで真空中や大気中にある試料を観察できるが、液中観察できる点にこそその存在価値があると思われる。AFMがいくつかのメーカーから市販されて数年を経たが、メーカーの製品は広い範囲の分野を視野に入れているため、生物試料の観察・操作などに現れる特有な要求を満たすことができない。当研究代表者は平成3年度から5年度にわたって『生物材料の観察に適した原子間力顕微鏡の開発』というテーマで文部省科学研究費一般研究 (B) の援助のもとで、AFMのプロトタイプの試作を行った。そこでは、AFMを倒立型蛍光顕微鏡と一体にした。この一体化により、探針を観察したい試料にピンポイントアプローチできるようになった。これが大きな利点をもつことはその後の研究で明らかになった。これに刺激されてメーカー側でも倒立型蛍光顕微鏡と組み合わせたAFMの製品化が行われだした。本研究の目的はただ単に装置を製作するというだけではない。実際に製作すると同時に、AFMの生物研究への新しい応用を開発することにある。それにより、これまで全く試みることが出来なかった研究を可能にすることをねらった。装置についてはプロトタイプの製作の経験を活かして、プロトタイプ機で不十分であった点を改良すること、また、走査速度を飛躍的に上げるにはどうしたら良いかを見出すための試行研究を行うことに主眼を置いた。応用研究については、液中にあるタンパク質をどこまで解像度をあげてみるができるかを試みること、分子間相互作用を真に1分子レベルで計測する手法を開発すること、また、タンパク質の表面物性のマッピングを行う手法を開発することを主要な目的とした。装置については、プロトタイプ機の弱点であった遅い走査速度、暗い蛍光像、無視できないドリフトなどを克服できた。また、高速化への準備として新しいスキャナー、変位計測系、制御回路、カンチレバー作製法について方向を見出すことができた。現在高速化の研究を本格的に進めているが、本研究で行った準備研究が大いに役だっている。どこまで高い解像度でタンパク質を見ることが出来るかに関しては、ミオシン頭部のAFM像がX線結晶解析で得られている形状と比較し得るほどに明瞭で、ATP結合部位やクレフト構造まで特定できたという所まで到達できた。分子間相互作用の研究では、真に1分子レベルで相互作用の力の場を求めることができ、またタンパク質1分子の構造変化を力学計測を通して観察できるまでになった。これらの応用研究は本研究で初めて可能になったものばかりである。これを可能にしたのは装置の開発という点ばかりでなく、目的に応じてソフトウェアを自在につくることができるという自作することにもなう大きな自由度にあったと言って良いであろう。まだ発展段階にあるAFMにおいては応用の範囲がどんどん広がっていく。市販のハード・ソフトに頼っ

ては自由度が狭まり新しい研究に制限が生ずる。このような発展段階においては、実際に生物試料を対象にしている研究者が装置を開発していくことは非常に有益であると強く感ずる。本研究の遂行を可能にして頂いた文部省科学研究費補助金による多大なご援助に深く感謝したい。

研究組織

研究代表者： 安藤 敏夫 (金沢大学理学部教授)
研究分担者： 林 美明 (オリンパス光学工業
第二開発部・学術応用G係長)
武信 貴亮 (オリンパス光学工業
第二開発部・商品企画G研究員)

研究経費

| | | |
|-------|-------|----|
| 平成6年度 | 870 | 万円 |
| 平成7年度 | 220 | 万円 |
| 平成8年度 | 80 | 万円 |
| 計 | 1,170 | 万円 |

2 研究発表

[学術雑誌・一般誌]

1. "Scanning Force Microscopy of the Interaction Events between a Single Molecule of Heavy Meromyosin and Actin."
H. Nakajima, Y. Kunioka, K. Nakano, K. Shimizu, M. Seto, and T. Ando
Biochem. Biophys. Res. Commun. **234**, 178-182 (1997)
2. "Innocuous Labeling of the Subfragment-2 Region of Skeletal Muscle Heavy Meromyosin with a Fluorescent Polyacrylamide Nanobead and Visualization of Individual Heavy Meromyosin Molecules."
Y. Kunioka, and T. Ando
J. Biochem. **119**, 1024-1032 (1996)
3. 「原子間力顕微鏡とその応用 -液中にある生の生物試料の観察・操作・計測」
安藤敏夫
細胞工学 **17(3)**、458-468 (1998)

[著書]

1. 原子間力顕微鏡で見た分子モーター
安藤敏夫
2章 4 in 「生体分子モーターの仕組み」 共立出版 日本生物物理学会シリーズ・
ニューバイオフィジックス刊行委員会 編 p.117-130 (1997)

[口頭発表]

1. 清水光太郎、安藤敏夫
蛍光顕微鏡に組み込まれた原子間力顕微鏡による生体試料の液中観察
日本生物物理学会第32回年会 1994年9月29日
2. 中島秀郎、国岡由紀、安藤敏夫
蛍光顕微鏡に組み込まれたAFMによる筋タンパク質1分子力学特性の研究
日本生物物理学会第32回年会 1994年9月30日
3. 安藤敏夫
アクトミオシンモーターの1分子生理学
筋収縮・細胞運動研究会 1994年12月16日

4. 安藤敏夫
アクトミオシンの1分子生理学研究
生体運動合同班会議 1995年1月6日
5. 安藤敏夫
アクトミオシンの1分子計測
生理学研究所ディスカッションミーティング 1995年1月28日
6. 網谷一郎、安藤敏夫
ATP加水分解の可視化
日本生物物理学会第33回年会 1995年9月25日
7. 中島秀郎、国岡由紀、安藤敏夫
蛍光顕微鏡に組み込まれた原子間力顕微鏡によるアクトミオシン間の力測定
日本生物物理学会第33回年会 1995年9月25日
8. 国岡由紀、足立健吾、安藤敏夫
磁力によりブラウン運動を抑制した単一HM分子のアクチンフィラメント上での運動
日本生物物理学会第33回年会 1995年9月25日
9. 安藤敏夫
磁性・蛍光性超微粒子の調製とHMM分子の磁気捕捉
日本生物物理学会第33回年会 1995年9月25日
10. 足立健吾、安藤敏夫
綱引きアクチンフィラメントの揺らぎ運動の解析
日本生物物理学会第33回年会 1995年9月25日
11. 安藤敏夫
Atomic Force Microscopic Study of Actomyosin Motor
東京工業大学生命理工学部セミナー 1996年6月11日
12. 瀬戸勝、国岡由紀、安藤敏夫
蛍光顕微鏡に組み込まれた原子間力顕微鏡によるアクトミオシン間の力測定
日本生物物理学会第34回年会 1996年11月7日

13. 国岡由紀、足立健吾、坂本武史、安藤敏夫
単一HMM分子の運動
日本生物物理学会第34回年会 1996年11月7日
14. 高畑一彦、安藤敏夫、林美明、戸田明敏
高速走査型原子間力顕微鏡の開発
日本生物物理学会第34回年会 1996年11月7日
15. 安藤敏夫
原子間力顕微鏡によるアクトミオシンモーターの1分子力学計測
日本生物物理学会第34回年会 1996年11月7日
16. 網谷一郎、西田直子、安藤敏夫
ATP ターンオーバーの可視化
日本生物物理学会第34回年会 1996年11月8日
17. 安藤敏夫、網谷一郎、瀬戸勝、坂本武史
アクトミオシンモーターの1分子生理現象論と構造学の結合
生体運動合同班会議 1997年1月7日
18. 安藤敏夫
走査型プローブ顕微鏡 基調講演
日本電子顕微鏡学会分科会 1997年2月23日
19. 足立健吾、安藤敏夫
落射蛍光顕微鏡による蛍光色素1分子の可視化
日本生物物理学会第35回年会 1997年10月10日
20. 佐伯将幸、宮川幸造、安藤敏夫
Photochromic カンチレバーによるタンパク質表面の物性マッピング
日本生物物理学会第35回年会 1997年10月10日
21. 瀬戸勝、網谷一郎、安藤敏夫
原子間力顕微鏡によるATP-HMM間の力測定
日本生物物理学会第35回年会 1997年10月11日

22. 滑川大介、安藤敏夫
AFM（原子間力顕微鏡）によるミオシン頭部の画像観察
日本生物物理学会第35回年会 1997年10月13日
23. 坂本武史、西田直子、安藤敏夫
単一HMM分子の運動
日本生物物理学会第35回年会 1997年10月13日
24. 西田直子、坂本武史、安藤敏夫
アクチンフィラメント2次元準結晶上のHMMの滑り運動
日本生物物理学会第35回年会 1997年10月13日
25. 坂本武史、西田直子、網谷一郎、安藤敏夫
HMM 1分子の滑り運動観察
生体運動合同班会議 1998年1月6日
26. 瀬戸勝、芝田健一郎、安藤敏夫
ATP反応に伴うHMM 1分子構造変化のAFMによる検出
生体運動合同班会議 1998年1月8日
27. 安藤敏夫
HMM 1分子の動態解析
重点領域研究研究成果発表会 1998年1月30日

研究成果
(解説)

生物研究用走査型プローブ顕微鏡の製作

金沢大学 理学部 物理学科

安藤 敏夫

3 研究の目的

1. 以前製作したAFM 1号機よりも走査速度、センサー感度を上げる。
2. 液中にある蛋白質1分子をどれだけ空間分解能を上げて観察できるものかつきとめる。
3. 分子間相互作用を1分子レベルで検出する方法を考案し、それをモーター蛋白質に応用し、これまで観察されなかったモーター蛋白質の振る舞いを見出す。
4. 高速スキャナーやセンサー系を設計・製作し、試験する。それにより、将来行う高速AFM開発の足がかりを掴む。
5. 高速AFMに適したカンチレバーの作製法を検討する。実際に作製を試み技術的問題点を抽出する。

我々の製作したAFM 1号機、市販されている装置、いずれも走査速度が遅く、1画像を撮るのに分のオーダーの時間がかかる。それにより機械的・電氣的ドリフトの影響を受けやすいことが、空間分解能が上がらないひとつの理由になっている。また、遅い走査速度のために我々が撮り得るのは実質的に静止画像のみである。これらの問題を解決するにはAFMを高速化するしかない。本研究では最終的な高速化までは目指さず、少なくともドリフトの影響を受けにくい程度の高速化を目指した。しかし、最終的な高速化、すなわち、1画像をビデオレートで撮れるほどの高速化も視野に入れて、そのための準備研究も行った。生命科学におけるAFMの役割は画像を撮るばかりではない。生体分子は互いに相互作用して単独では得られない機能を実現している。分子間相互作用はこれまで物理的に調べられておらず、ほとんどが反応動力学で語られてきた。分子間に働く力の場を求めたり、分子の動的構造変化を物理的に捉えることはこれからますます重要になってくる課題である。多数の分子を対象にすると、平均化のために分子の実際の振る舞いを見落としてしま

う。分子間相互作用を真に1分子レベルで捉える方法を開発することが重要となる。本研究でその方法を開発し、これまで観察不可能であった蛋白質の振る舞いを捉えることを目指した。

4 AFM 2号機の製作

平成2年度から5年度にわたり、我々は「生物材料の観察に適した原子間力顕微鏡の開発」（課題番号 03455011）というテーマで文部省科学研究費補助金（一般研究B）のもとにAFM 1号機を既に製作した。その成果は平成7年3月に提出した研究成果報告書に詳しい。そこでは、詳しい設計図と開発したプログラムソフトウェアをすべて公開している。本研究ではプログラムソフトについては一部の小さい修正を除いては1号機のそれを踏襲しているため、本報告書では分子間相互作用測定のために新しく開発したソフトウェアの部分のみを最後に付した。

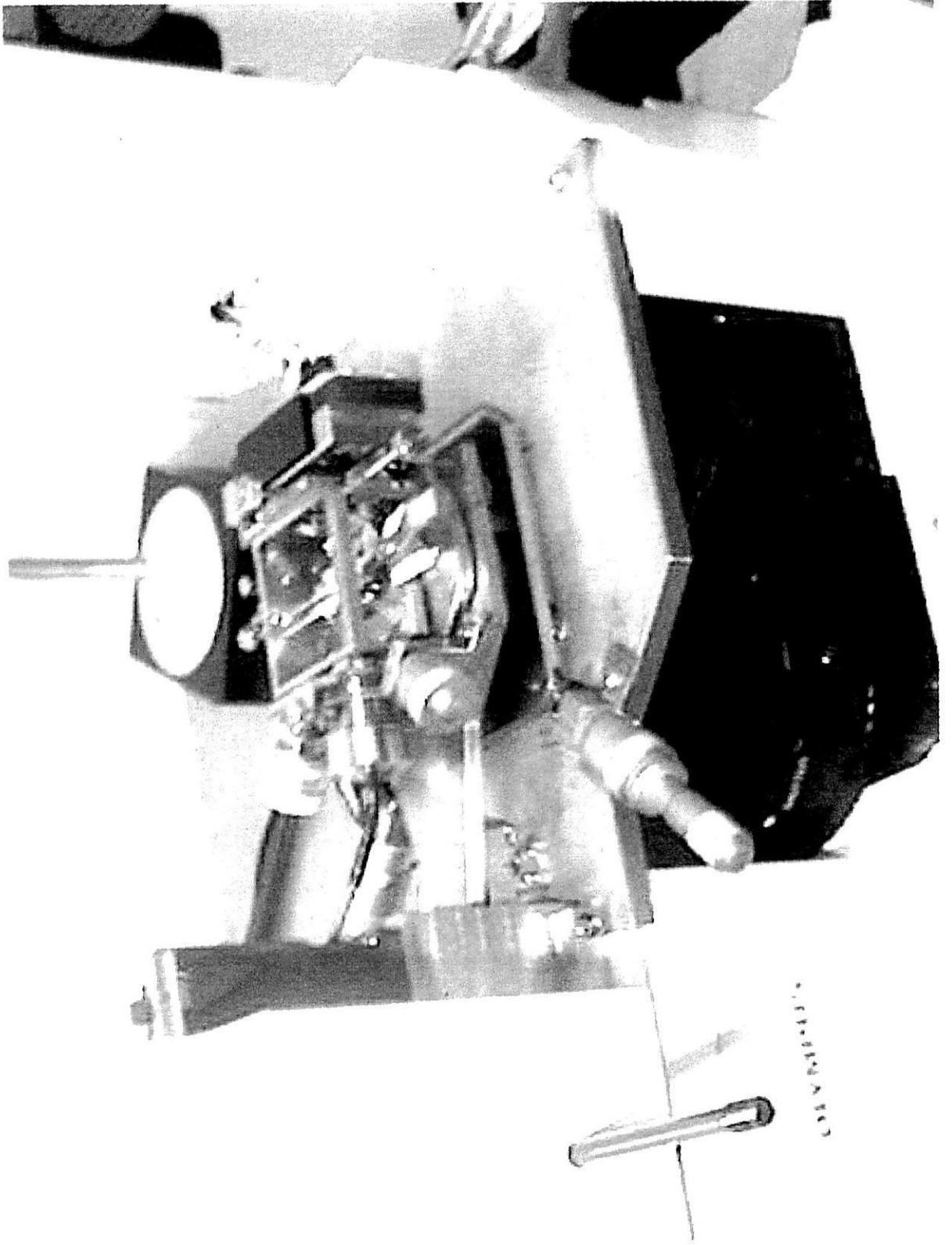
4.1 蛍光顕微鏡との組み合わせ

生物試料を研究対象にしたときにはAFM単独では応用が限られてしまう。蛍光顕微鏡は生体分子を蛍光染色すれば1分子であってもその局在が判る。例えば、カンチレバー探針先端に蛋白質1分子を捕捉して分子間相互作用を測定する場合や、蛋白質の酵素反応と蛋白質の形状・力学特性を同時観察する場合など、色々な研究目的に対して蛍光顕微鏡とAFMとの組み合わせは極めて有意義である。それ故、AFM装置は1号機と同様に倒立型蛍光顕微鏡と組み合わせた（図4.1参照）。1号機作製時点で入手できた蛍光顕微鏡は暗いものしかなかった。しかし、2号機の開発開始時点では市販の蛍光顕微鏡は著しく進歩し、蛍光性分子1分子でも観察できるものが出てきた。そこで、最良と考えられたIX70（オリンパス光学工業）倒立型蛍光顕微鏡を選択した。この顕微鏡は明るくだけでなく、その土台が以前の機種よりもかなりしっかりしており、AFMとの組み合わせには適していた。

4.2 スキャナー

市販のAFMのスキャナーは円筒ピエゾ一つでXYZ3軸を走査する。3軸の近似的独立走査を保証するために、円筒ピエゾは長くなければならず、その結果共振周波数が低い。低共振周波数のため走査速度は遅い。我々の1号機では小さいピエゾ素子で3軸完全独立走査を行うために、サンプルステージとなる円筒ピエゾをX、Yピエゾで動かす方式を採用した。摩擦を避け滑らかに円筒ピエゾを水平に走査するために、円筒ピエゾを鏡面研磨した基板に置いた小さいステンレス球3個の上に載せた。今回も同じ方式を採用した。但し、円筒ピエゾの中空部に対物レンズを挿入するために、円筒ピエゾは大きくなってしまい、共振周波数が低い。そこで、2号機ではサンプルステージとなる円筒は石英で作り、その

図4.1 AFM2号機の全体の外観



円筒を共振周波数の高い積層ピエゾで片持ち上げする方式を採用した（図 4.2 参照）。円筒の直径が約 40mm で Z 変位は極く僅か（最大でも 1 μ m 程度）であるため、片持ち上げによるサンプルステージの傾きは無視できる。X、Y 走査の押し返し用に 1 号機ではシリコンゴムを採用したが、X、Y 走査が速くなると押し返しが間に合わなくなる。X、Y 走査に干渉を持たせず、且つ、XY 走査される基板を 1 層だけにするために新しい機構を考案した。押し返し方式ではなく、引き寄せ方式である。図 4.3 に示すように、XY 走査基板と X ピエゾ間、XY 走査基板と Y ピエゾ間それぞれに直径 0.4mm のルビー真球を挟み、その間隔を隔てて XY 走査基板とピエゾを 2 つの磁石（直径 3mm と 2mm）で引き寄せた。この引き寄せは十分強く走査中にルビー真球がはずれることはない。また、ルビー真球があるために、X ピエゾが XY 走査基板を X 方向に走査している間 Y ピエゾは全く抵抗にならない。もちろん XY の直交出しは厳密でなければならない。また、ルビー真球の接触面は光学研磨されたサファイアの板である。使用したピエゾ素子は以下の通り。

- X・Y 走査用：

AE0505D08(NEC)、静電容量 0.75 μ F、伸び係数 53nm/V、共振周波数 100kHz

- Z 走査用：

AE0203D04(NEC)、静電容量 90nF、伸び係数 27nm/V、共振周波数 400kHz

4.3 AFM ヘッド

AFM ヘッドはカンチレバーの変位計測の光学系とセンサーから成る。変位計測法は構造が簡単になる光テコ法を 1 号機と同様に採用した。1 号機ではヘッドが比較的大きく音の影響が若干あった。また、レーザー光をカンチレバー背面で絞り切れず、またセンサー位置での反射光が若干広がり過ぎるという問題があった。そこで、2 号機では、AFM ヘッドをもっとコンパクトになるように設計した（図 4.4 参照）。レーザー光を水平に出射させ、ショートパスフィルターで反射させてカンチレバーに導く。反射光はミラーにより水平にしてセンサーに当たるようにした。レーザースポット径をできるだけ小さく、且つセンサー位置での反射光スポットを小さくすることはトレードオフの関係にある。それで、可能な範囲でできるだけ NA の大きいフォーカシングレンズで小さいスポットに絞るとともに、センサー位置をできるだけカンチレバーに近づけた。出射レーザー光をショートパスフィルターで反射させた理由は、ヘッド上部からカンチレバーや試料を見ることができるようになるためである。使用した部品は以下の通り。

図4.2 Zピエゾと円筒試料ステージの配置

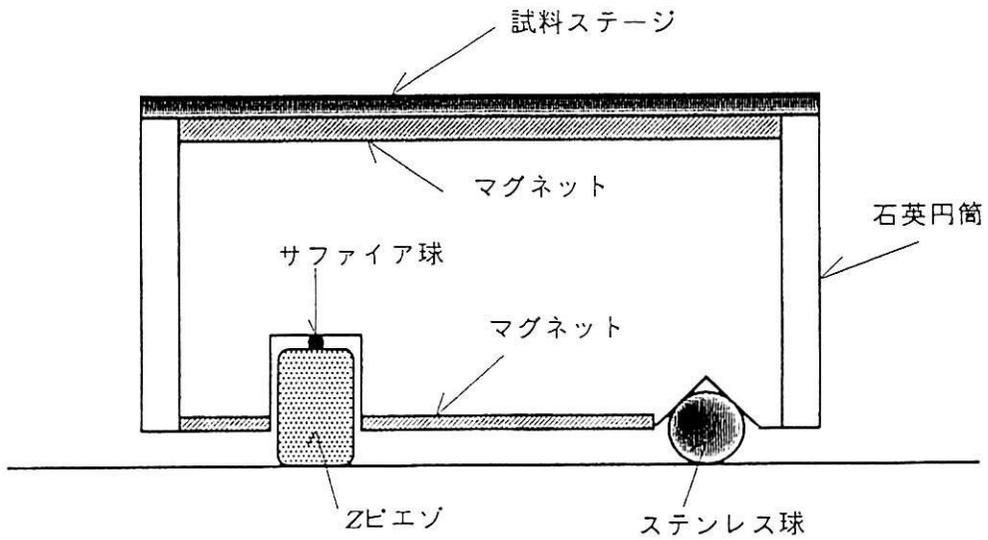


図4.3 XY走査部の機構

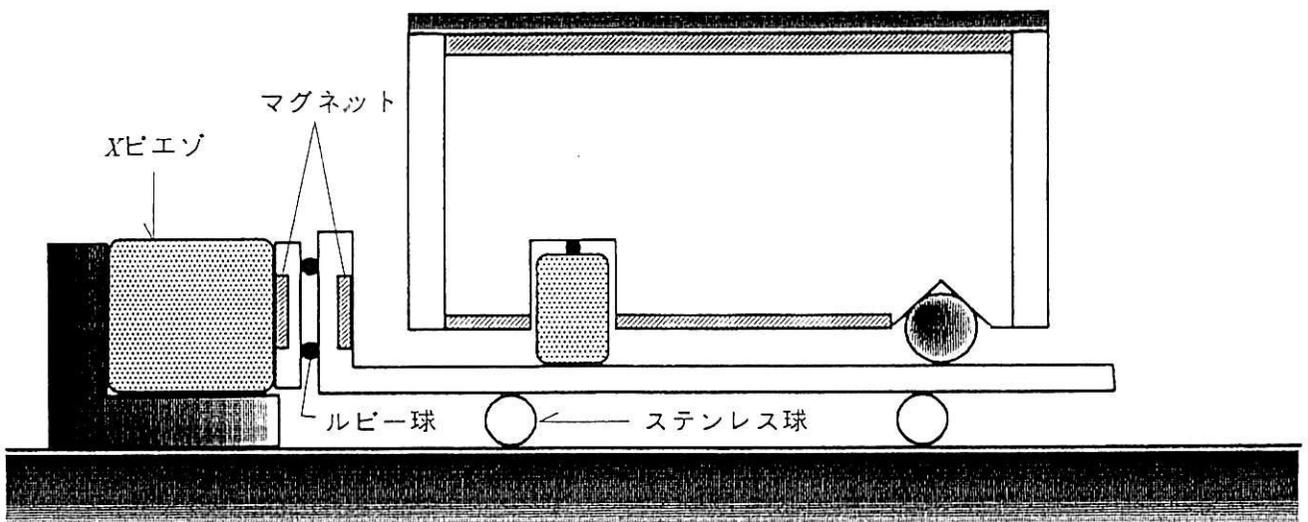
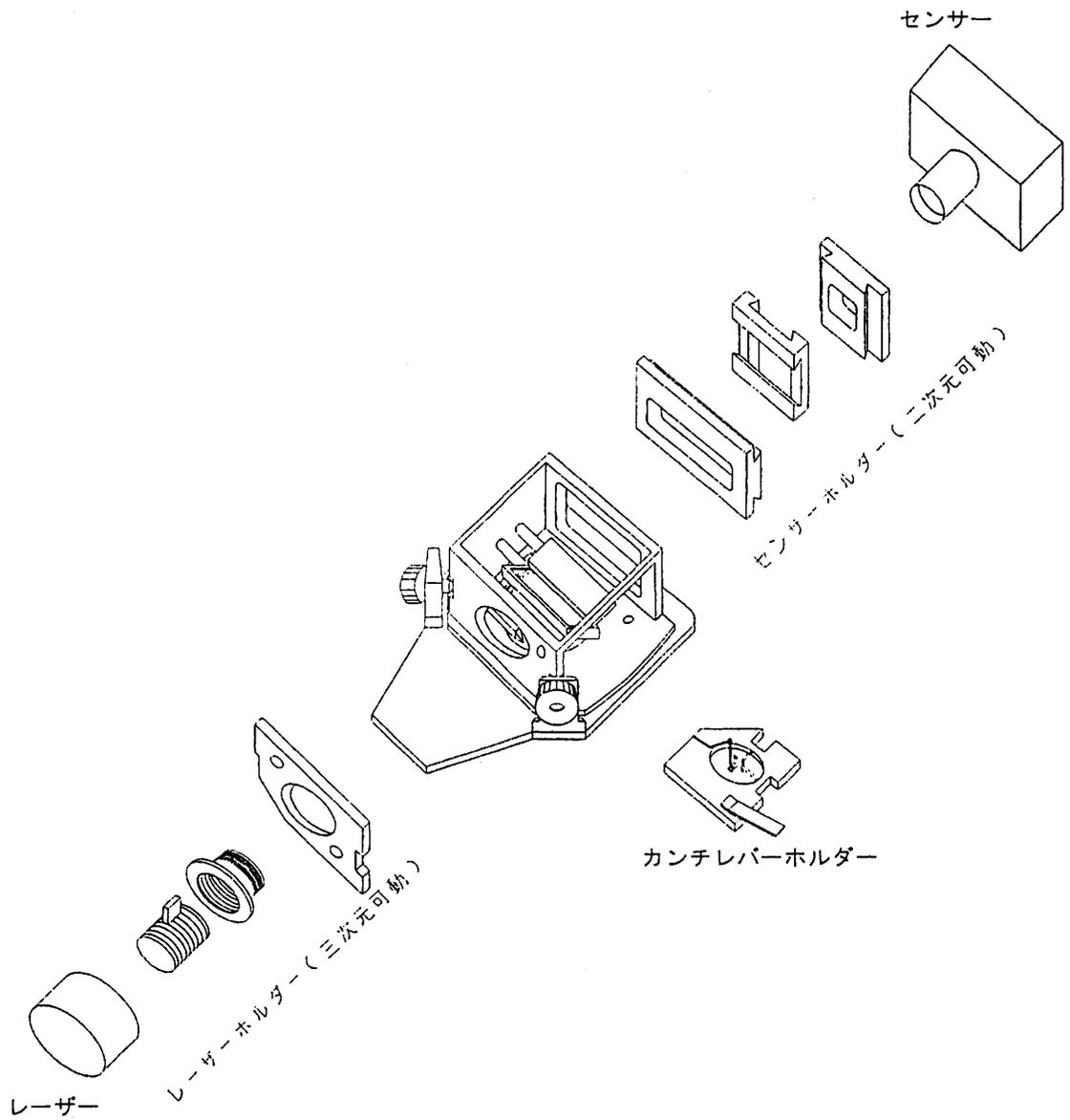


図4.4 AFMヘッドの構造



- レーザー：
 - 半導体レーザー、東芝 TOLD9140(S)、出力 20mW、波長 685nm
- コリメートレンズ：
 - キノ・メレスグリオ 06GLC002、焦点距離 6.5mm、NA 0.615
- フォーカシングレンズ：
 - キノ・メレスグリオ 06GLC005、焦点距離 48mm、NA 0.083
- ショートパスフィルター：
 - 日本真空光学 入射角 45°、680nm での反射率>98%
- ミラー：日本真空光学 角形平面ミラー
- センサー：
 - 四分割フォトダイオード 浜松ホトニクス S1651
- センサーアンプ：
 - 浜松ホトニクス 特注品 PDM4419、応答速度 1MHz

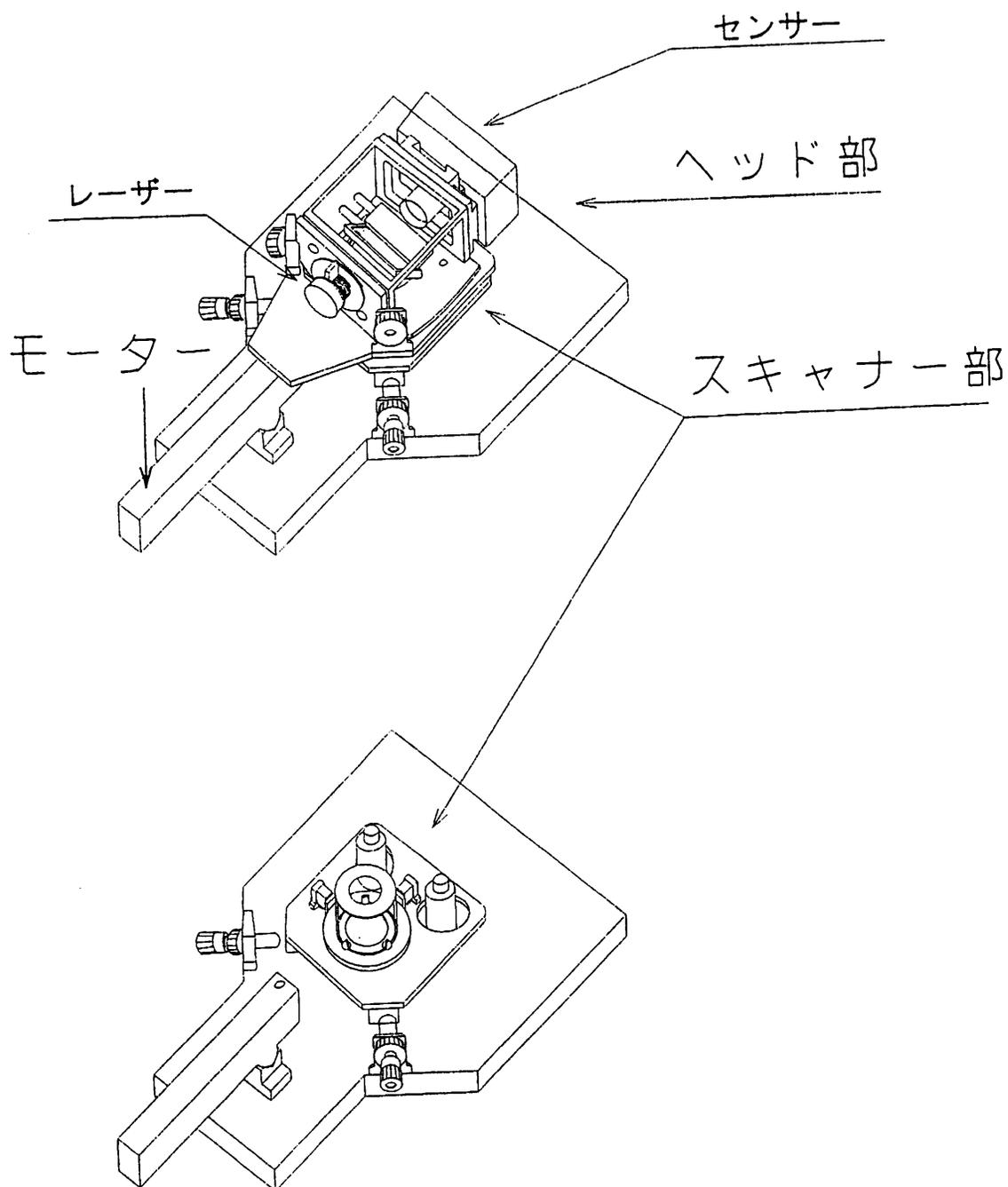
4.4 その他

4.4.1 モーター

図 4.5 にスキャナーと AFM を組み合わせた図を示す。モーターはハーモニックギア内蔵のステッピングモーターである。ギア比が大きく基本ステップ角が 0.0072° と極めて小さい。しかし、ギアが大きいためかさばり、蛍光顕微鏡に取り付けた基板の下に入れることができなかった。そこで、その基板上部にモータを固定し、AFM ヘッドをテコ方式で支え、モーター軸に取り付けた前進ネジの上下を逆向きに伝達する方式を採らざるを得なかった。

- ステッピングモーター：
 - オリエンタルモーター UPD533HG2-NA
- ステッピングモータードライバー：
 - オリエンタルモーター UDX5107N
- ステッピングモーター制御ボード：
 - ハイバーテック HP98-PPD203

図4.5 AFM部の全体像



4.4.2 加工材料

金属加工部品には熱膨張率の極めて小さい合金 スーパーインバーを使った。但し、モータとAFMヘッドをつなぐテコ用の角材は剛性の高いステンレス製である。それ以外の加工部分は石英、サファイアである。これらの加工は（株）ジャパンセルに外注した。

- スーパーインバー：
ニラコ（株） 熱膨張率 0.13

4.4.3 ピエゾドライブ電源

1号機の時よりも piezo の共振周波数を大幅に上げたために、それに見合う高速な piezo ドライブ電源が必要であった。それほど高速な電源は市販されておらず、100kHz まで使えるものを特注で製作して頂いた。

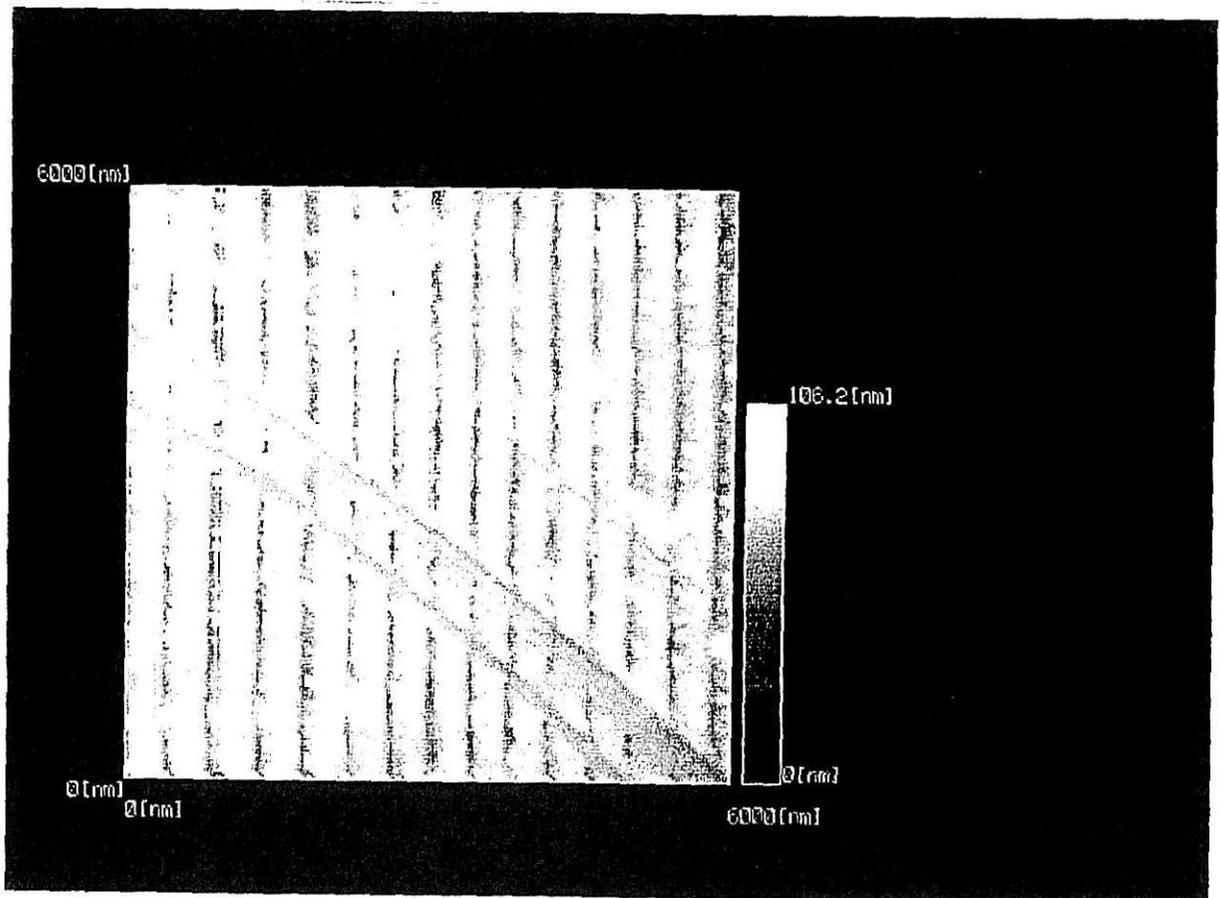
- piezo ドライブ電源：
メステック（株） 特注品 M-2615、3CH、1.5A、150V、100kHz

5 AFM2号機による形状観察

5.1 回折格子

先ず、2号機のXYピエゾのヒステリシス特性を計測し、その補正関数を求める目的で回折格子の観察を行った。回折格子として1mm中に2400本(間隔416.7nm)の溝をもつものを使用した。最初ヒステリシス補正をせずに試料を走査し、得られた像の溝間隔と加えた電圧との関係からヒステリシスを求めた。この特性から補正関数を求め、これに基づき補正をかけて走査すると図5.1に示すような周期の揃った回折格子の像が得られた。数カ所斜めに走る線は回折格子に付いてしまった傷である。各凸部左側面付近に小さな顆粒状に見えるものは購入した回折格子に最初から付いていたものである。

図5.1 回折格子のAFM像



5.2 ミオシン頭部 (S1)

AFM 1号機で既にアクチンフィラメント、筋原線維、HMMなどの像を撮った。HMMについては双頭構造ははっきりと観察できた。しかし、低倍率できれいな像を得たのち、高倍率で撮ろうとすると、像はひどくなってしまった。これは、低倍率観察では無視できた装置のドリフトが高倍率観察では無視できなくなるためである。AFM 2号機は1号機に比べコンパクトであり、走査速度も速くできるので、ドリフトの影響を受けにくいと想像される。そこで、ミオシンをキモトリプシン処理して得たS1の高倍率観察を試みた。図5.2が得られた像である。S1が単なる球形ではなく、はっきりとした或る形の輪郭を持っていた。但し、S1の形状はもっと細長いはずであるのに、実際にはそうゆうふうには見えなかった。ミオシン頭部の原子モデルを色々な角度で眺め回すと、得られたAFM像と極めて良く一致する側面が存在した。図5.3にその原子モデルの図を示す。原子モデルのライトチェーン結合領域 (LCドメイン) がAFM像では全く見えていないことが分かる。それ以外の部分 (コアドメイン) では小さな特徴まで良く一致していた。おそらく、基板であるマイカ表面にS1はコアドメインで結合し、LCドメインはマイカ表面から離れて突き出ており、且つ、かなりフレキシブルであるためにAFMでは見えていないのではないかと思われる。コアドメインにはATP結合部位と頭部先端に大きなクレフトが存在する。AFM像でもそれらがはっきりと観察された。これほど高倍率で構造の子細がAFMで観察できた例はこれが初めてである。2号機の高い性能を示す例証となった。用いたカンチレバーはオリンパス光学工業のOMCL-TR400PSである。探針先端曲率半径は15nm以下と公証されている。もっと先端曲率半径の小さいカンチレバーをもちいれば、更に微細な構造まで観察できるものと予想される。今後の課題である。

図5.2 ミオシンサブフラグメント1のAFM像

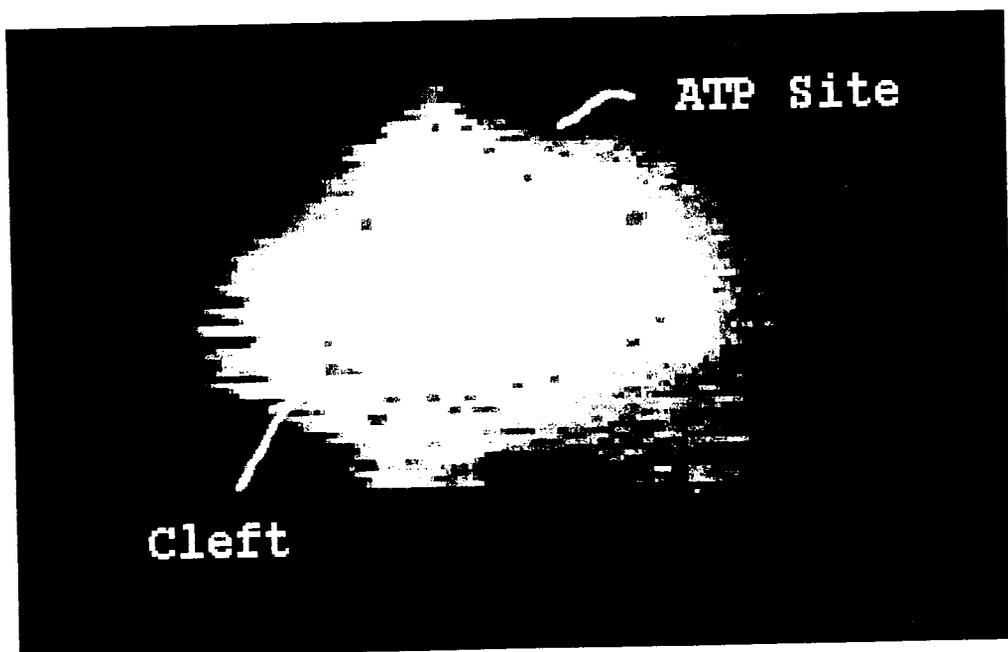
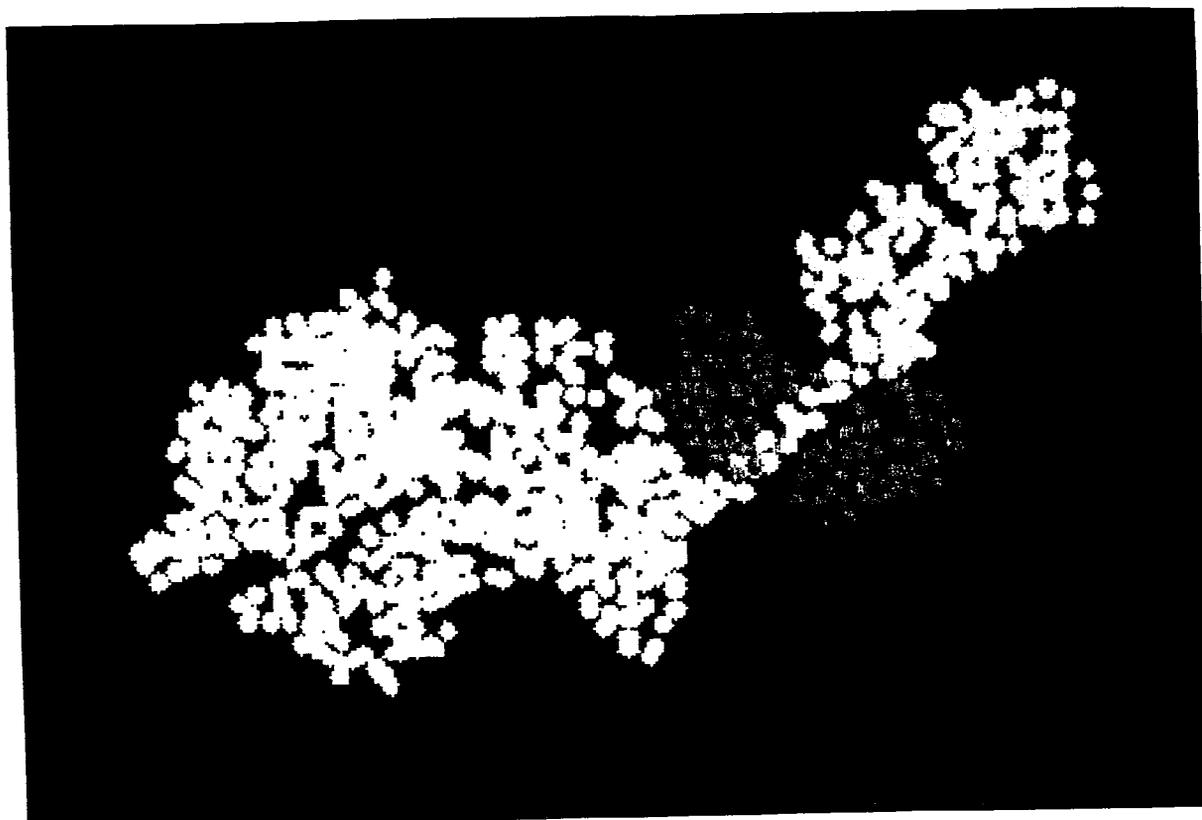


図5.3 ミオシン頭部の原子モデル



6 AFM高速化に向けた準備研究

実際に使える中速AFMを実際に完成させるという課題の他に、もっと高速なAFMを製作するための準備研究も本課題研究の一つであった。

6.1 高速スキャナー

6.1.1 高速ピエゾ素子

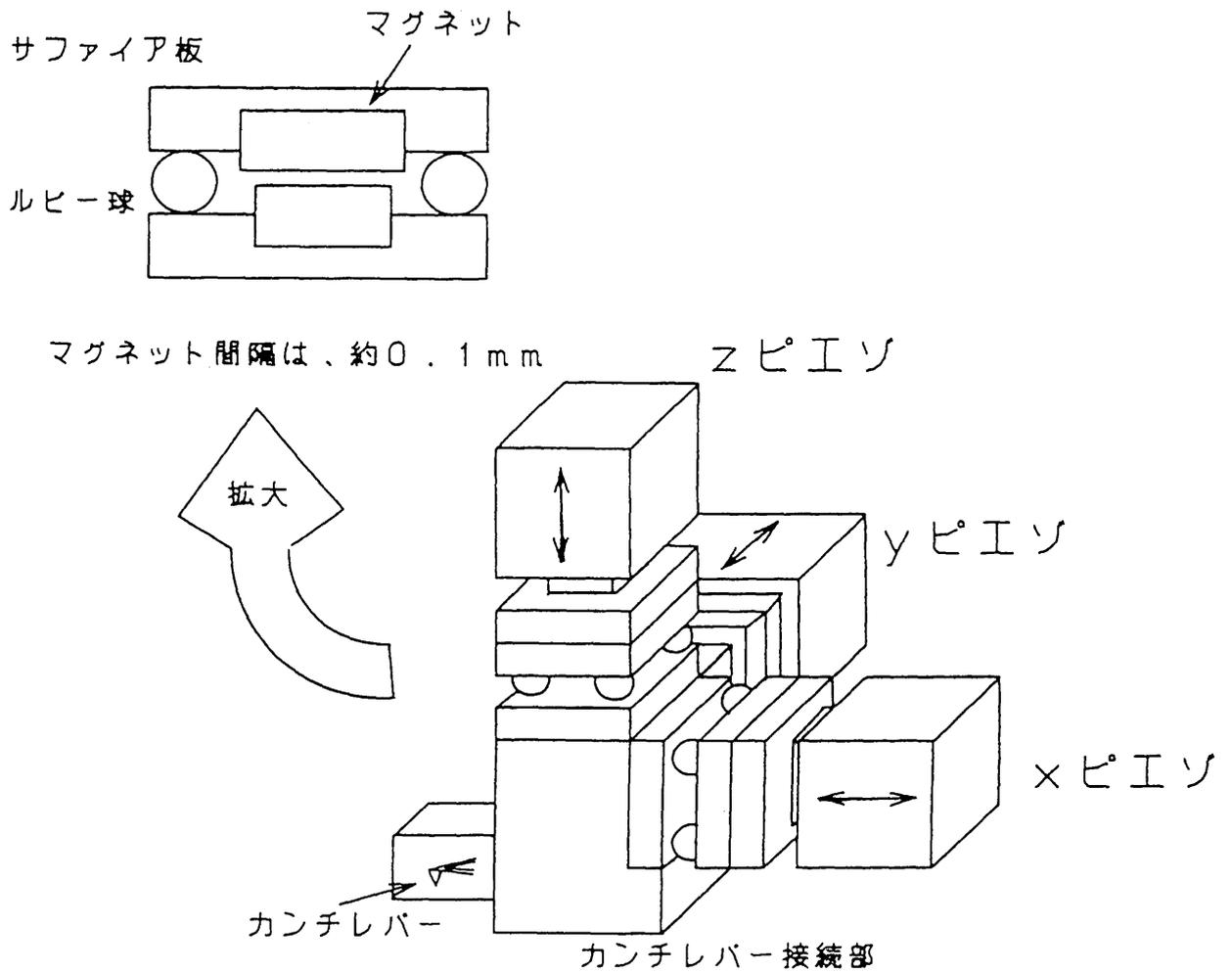
高速化の要点はいくつかあるが、最も重要な部分はスキャナーである。スキャナーを高速化するためには、まずピエゾ素子自体の共振周波数が高くなければならない。また、スキャナーの可動部分の大きさ・質量は小さくなくてはならない。市販されているピエゾ素子で最大の共振周波数をもつもので、200kHzである。NECにお願いしてもっと共振周波数の高い積層型ピエゾ素子を作製して頂いた。その共振周波数は500kHzである。これ以上のもは現時点では入手不可能である。以下にNECが作製したピエゾ素子の仕様をまとめる。

- 外形寸法： 2.3×2.9×2.8mm
- 静電容量： 55nF
- $\tan\delta$ ： 3.3%
- 静的駆動時の定格電圧： 120VDC
- 絶縁抵抗： $1.8 \times 10^{10}\Omega$
- (静的) 変位量： $1.7\mu\text{m}/100\text{V}$

6.1.2 スキャナーのデザイン

高速走査に耐える軽量・小型のスキャナーの構造をいろいろと検討した結果、図6.1に示すものを最終設計案に採用した。試料ステージを走査する代わりに、カンチレバーを走査することにした。XYZのスキャナーを直角に組み合わせる。各軸の走査が他の軸に影響を与えないようにするために、各軸の駆動方向に垂直な面に沿って極めて滑らかに滑る機構を考案した。図6.1の左上の挿入図にあるように、中央にマグネットディスクを貼った2枚のサファイア板を直径0.4mmのルビー球を介して向かい合わせた。ルビー球は固定されていないのでサファイア板は滑らかに滑る。マグネットディスクが水平方向にあまり力

図6.1 高速スキャナーのデザイン



カンチレバー接続部及び、ピエゾサファイア板接続部は石英
またルビー球により1方向以外の摩擦を軽減している

を発生させないように、向かい合うマグネットディスクの直径を少し変えてある。実際に部品を組み上げるのに大変苦勞をした。3軸の直角出しが不正確だとルビー球がはずれてしまう。各部品の接着は平行性が保たれるように、向かい合った平行平板（マイクロメーター用のアンビルを用いた）に挟んで行った。一つの接着に丸一日かけ、少しずつ組み上げていった。駆動される部分の質量は0.4gしかない。スキャナー全体は数mm角と極めて小さい。設計図面を付録にまとめた。

6.2 高速スキャナーの運転試験

上記スキャナーは我々のAFM 1号機のカンチレバーホルダーを改造したものの上に搭載したので、カンチレバーホルダー以外の部分は1号機そのものを使用した。試料としてオリンパス光学工業のAFM用標準試料を液中で用いた。高速走査用のカンチレバーは存在しないので、オリンパス光学工業のOMCL-TR400PSのレバー長200 μ mのもの（共振周波数13kHz）を取り合えず用いた。スキャナーが高速に動作するかどうかだけの試験であるので、 piezo素子のヒステリシス補正はしなかった。図6.2と図6.3に色々な走査速度で得られた画像を示す。最も遅い走査速度で、1画像取得時間は62秒、最も速い場合で0.15秒である。走査速度に依存せず、同じ様な画像が得られることが分かる。走査速度が速くなると画像の所々に白い線が入る。これはカンチレバーの跳びのためである。カンチレバー自身の共振周波数が低いのでこの点は仕方がない。スキャナー自身は高速でも低速の場合と同様にきちんと水平方向に走査できていることが確認された。

6.3 高速走査用カンチレバーの試作

高速AFMの開発を成功させるもう一つの重要な要素はカンチレバーである。コンタクトモード用に市販されているカンチレバーの共振周波数はせいぜい40kHz程度である。ビデオレートで画像を撮れるほど高速にするためにはカンチレバーの共振周波数は500kHz以上なければならない。我々の高速化の目的は液中にある生物試料の動態連続観察にある。液中ではダンピングの効果があるので、カンチレバーは極めて小さくなければならない。

共振周波数 f_0 をもつカンチレバーが周期 λ の凹凸をもつ試料表面を速度 V で走査するとき（大気中で）、カンチレバーが試料凹凸に追従するためには、

$$f_0 > \frac{V}{\lambda}$$

の条件が満たされなければならない。例えば、100nm四方の領域を30msecで走査すると、走査速度は667 μ m/secになる。1nmの起伏を観察すると考えると、カンチレバーの共振周

図6.2 標準試料の高速走査AFM像

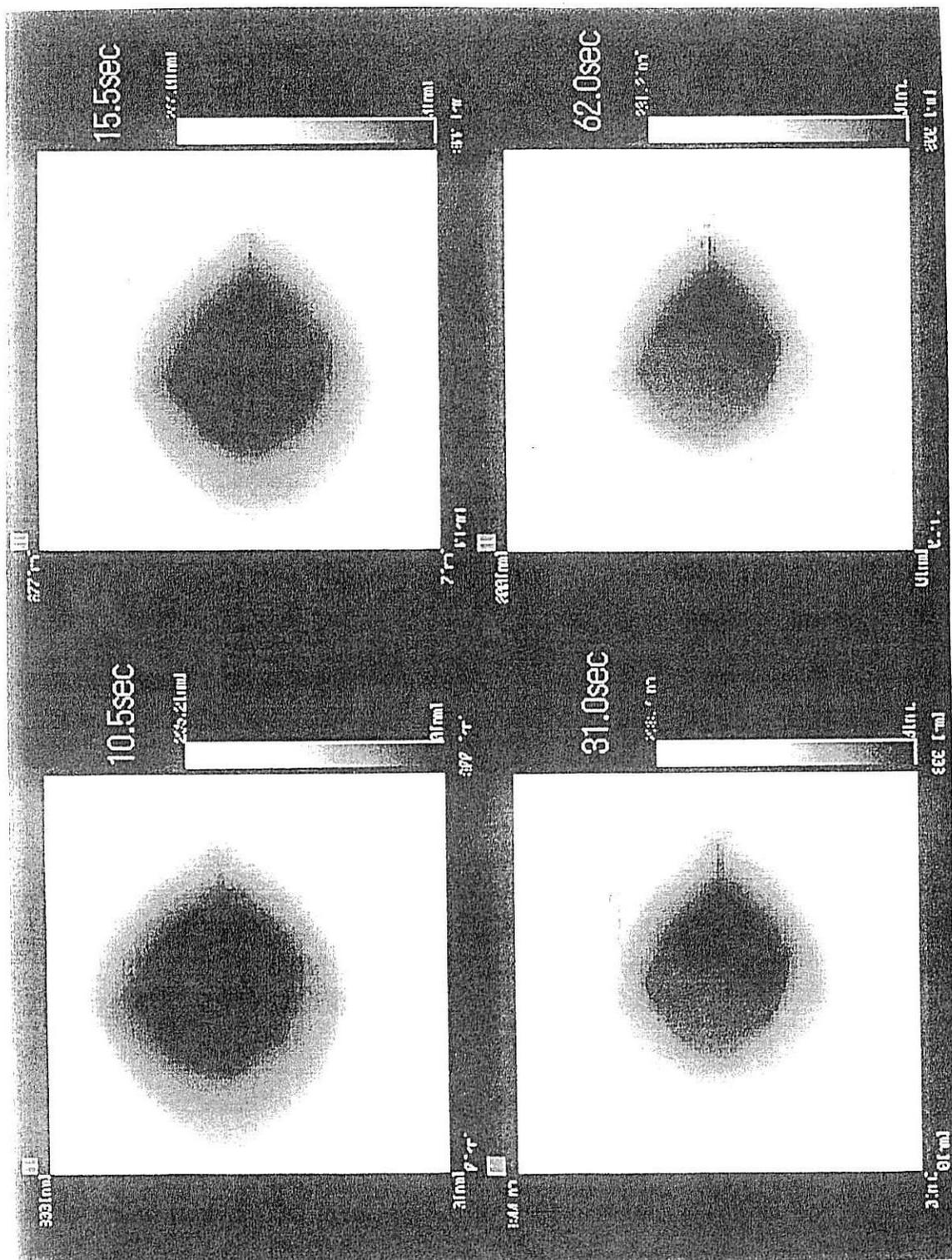
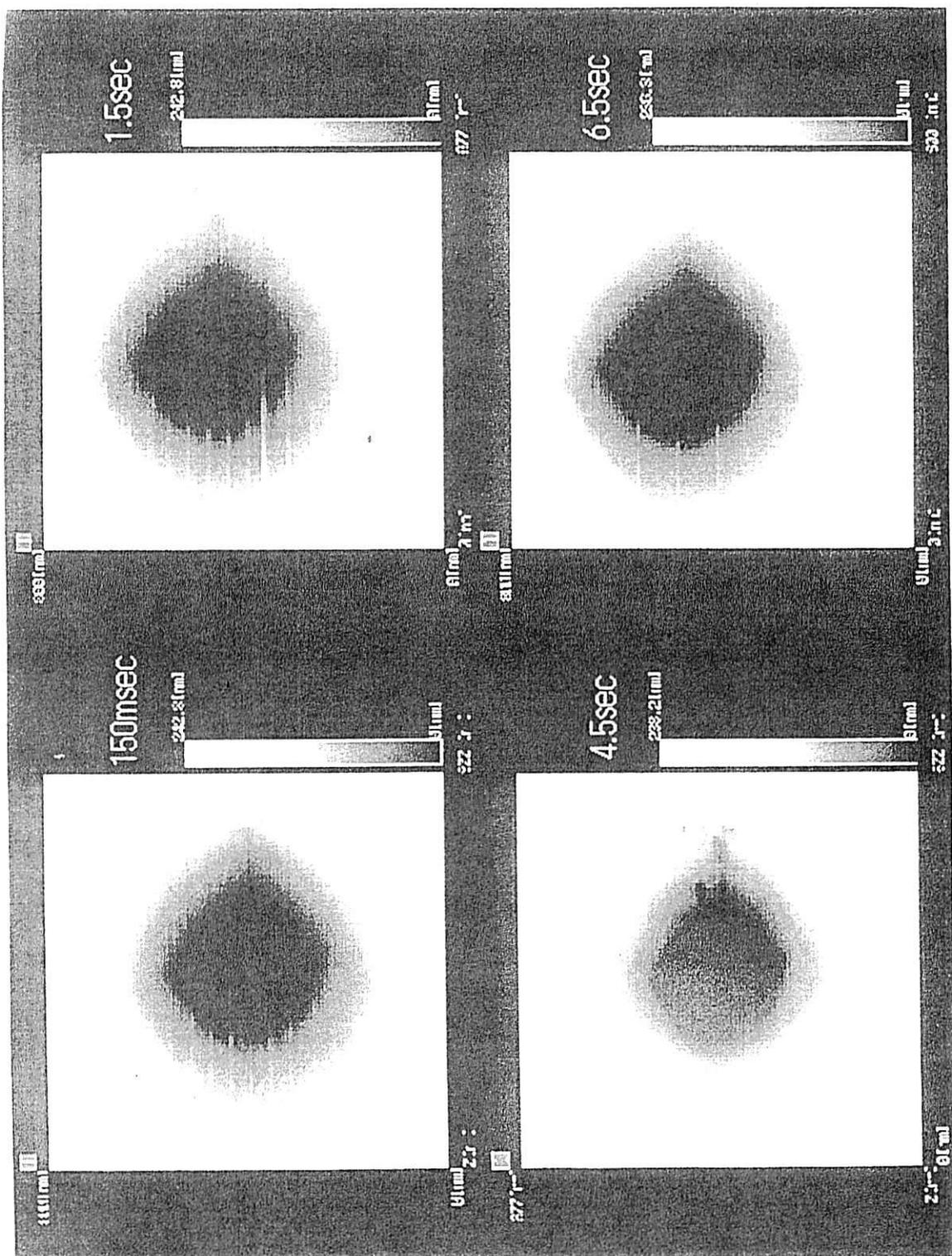


図6.3 標準試料の高速走査AFM像



波数は667kHz以上でなければならない。現在広く使われているサイズのカンチレバーでは、ダンピングにより共振周波数は大気中に比べ数分の1になってしまう。

短冊形のカンチレバー（幅 w 、長さ l 、厚さ d ）の共振周波数は以下のように与えられる。

$$f_0 = \frac{(1.875)^2 d}{2\pi l^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}}$$

ここで、 E 、 ρ はそれぞれ、カンチレバー材料のヤング率と密度である。またバネ定数 k は以下のように決まる。

$$k = \frac{wd^3}{4l^3} E$$

材料が窒化シリコンの場合（ $E = 1.46 \times 10^{11}(\text{N/m}^2)$ 、 $\rho = 3100\text{kg/m}^3$ ）で数値計算すると、長さが14 μm 、幅5 μm 、厚さ100nmの形状で

$$k = 66\text{pN/nm}, \quad f_0 = 567\text{kHz}$$

になる。すなわち従来のサイズの十分の1程度のカンチレバーを作製しなければならないことがわかる。とくにレバーの厚さを100nmと薄くすることが必要となる。極めて作製が難しそうであるが、とにかく我々は作製にチャレンジした。失敗しても何か今後に向け有益な知識が得られるに違いない。実際に100nm厚のものを作製したが、金コートするとレバーが反ってしまった。その結果レーザー反射光が広がってしまい使い物にはならなかった。失敗であったが、今後の作製計画に見通しを付けることができた。最も重要な点は、エッチング加工が探針とレバーを一体にすると難しいという点である。従って、今後はレバーのみをエッチング加工し針無しレバーを作製し、針は電子ビーム堆積法で成長させることにした。現在も開発を続行している。

6.4 臨界角プリズム変位検出法を採用したAFMの試作

上述したように、共振周波数が充分高く、且つ柔らかいカンチレバーのサイズは従来のサイズの1/10程度になる。カンチレバーのサイズが小さくなると光テコ法のように半導体レーザーの光をNAの小さいレンズで絞ると、そのスポットサイズはカンチレバーと同程度になってしまう。NAの大きなレンズと光テコ法を調和させることは難しい。NAの大きなレンズでレーザー光を小さく絞っても変位計測できる方法を採用しなければならない。このような変位検出法として臨界角プリズムを利用した焦点エラー検出法がある。そこで、将来高速AFMを開発する準備研究としてこの検出法を採用したAFM装置を製作することにした。ここでは、最終的な高速化は目指さず、従来のAFMよりも1桁走査時間を短縮で

きる程度の中速のAFMを試作した。

6.4.1 焦点エラー検出法の原理

図6.4に焦点エラー検出法の原理を示す。半導体レーザーから出た直線偏光した光は偏光プリズムの後 $1/4\lambda$ 板を通して円偏光になる。これを対物レンズで絞ってカンチレバー背面に当てる。カンチレバー面が対物レンズの焦点面と一致すると反射光は平行光になる。反射により円偏光の周り方が逆向きになる。従って、再度 $1/4\lambda$ 板を通ると直線偏光になるが、その偏光は入射光のそれとは垂直になる。従って、反射光は偏光プリズムをそのまま通過する。通過した光は臨界角プリズムの臨界角度で入射するので、プリズム面で全反射して平行光のまま2分割フォトダイオードに入射する。カンチレバーが変位して反射面が対物レンズの焦点位置より遠くなると、反射光は平行光にならず、収束光となる。それ故、反射光の半分は臨界角より大きな角度で臨界角プリズム面に当たり全反射するが、残りの半分は臨界角より小さな角度で当たるために透過する。従って、2分割フォトダイオードのそれぞれに当たる光の強度に差が生ずる。この差とカンチレバー反射面の対物レンズ焦点面からのずれはある範囲で比例関係にあるので、2分割フォトダイオードの差出力から変位が計測できることになる。

6.4.2 試作AFM装置の構造

この装置では蛍光顕微鏡に組み込まないスタンドアローン型にした（図6.5参照）。XY走査とZ走査を分け、XY走査で試料ステージを走査し、Z走査でカンチレバーを走査する方法を採用した。Z走査に一番高速性が要求されるので、Zピエゾに大きな質量のものを連結したくなかったためである。XY走査とZ走査を分けたことで、XY走査される試料ステージも軽量化することができた。試料ステージは熱膨張率の小さい石英を加工して作製した。XYの走査メカニズムは2号機と同様である。Zピエゾに接着した磁石の付いた石英ブロックにL字に曲げた鋼を磁石の力で引きつけ、その引きつけの力でカンチレバーを鋼と石英ブロックの間に挟み込むことで、カンチレバーをZピエゾに連結する方法を考案した。この装置は極く最近完成したばかりであり、動作は未だ確認していない。

図6.4 焦点エラー検出による変位検出の原理

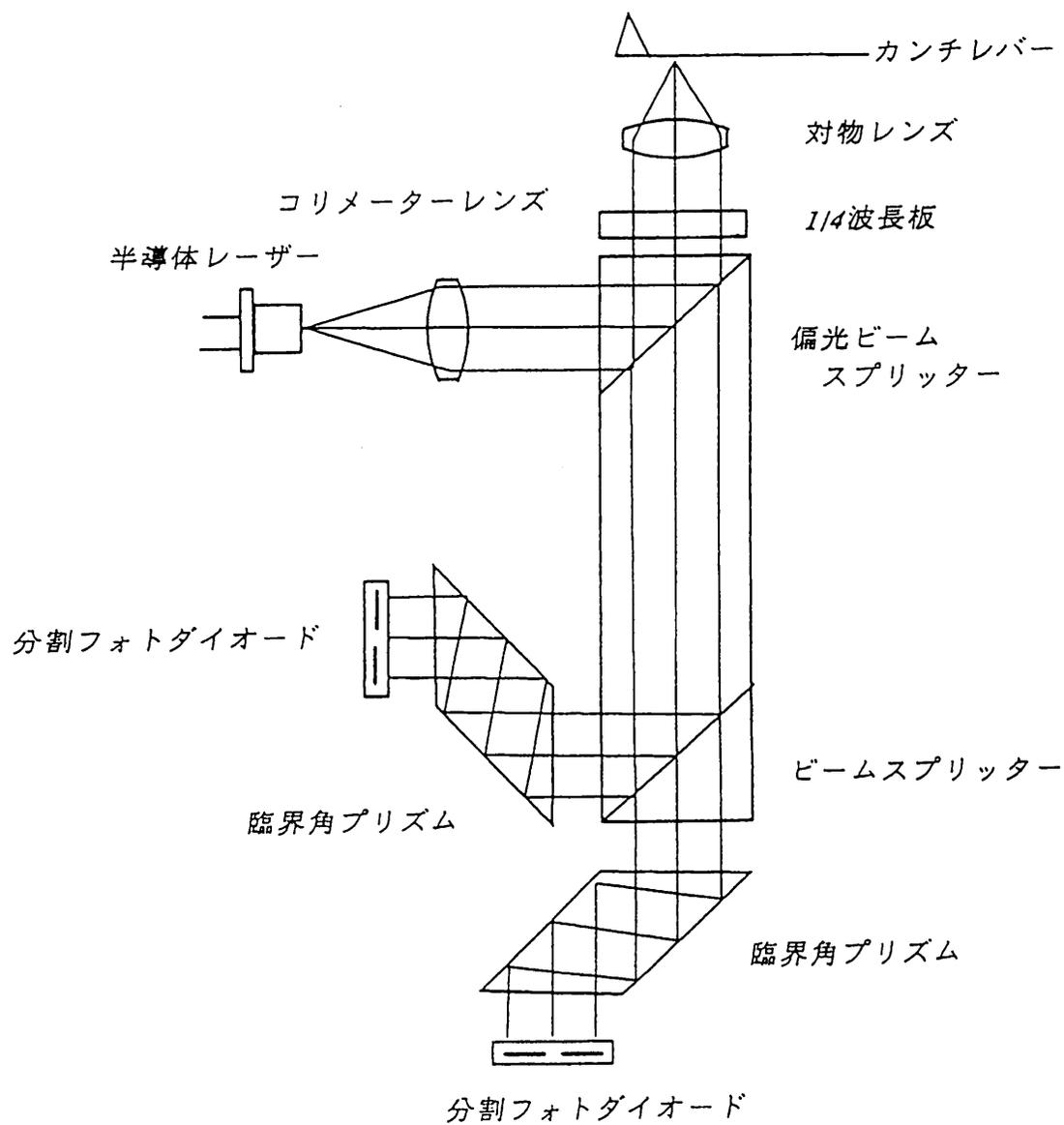
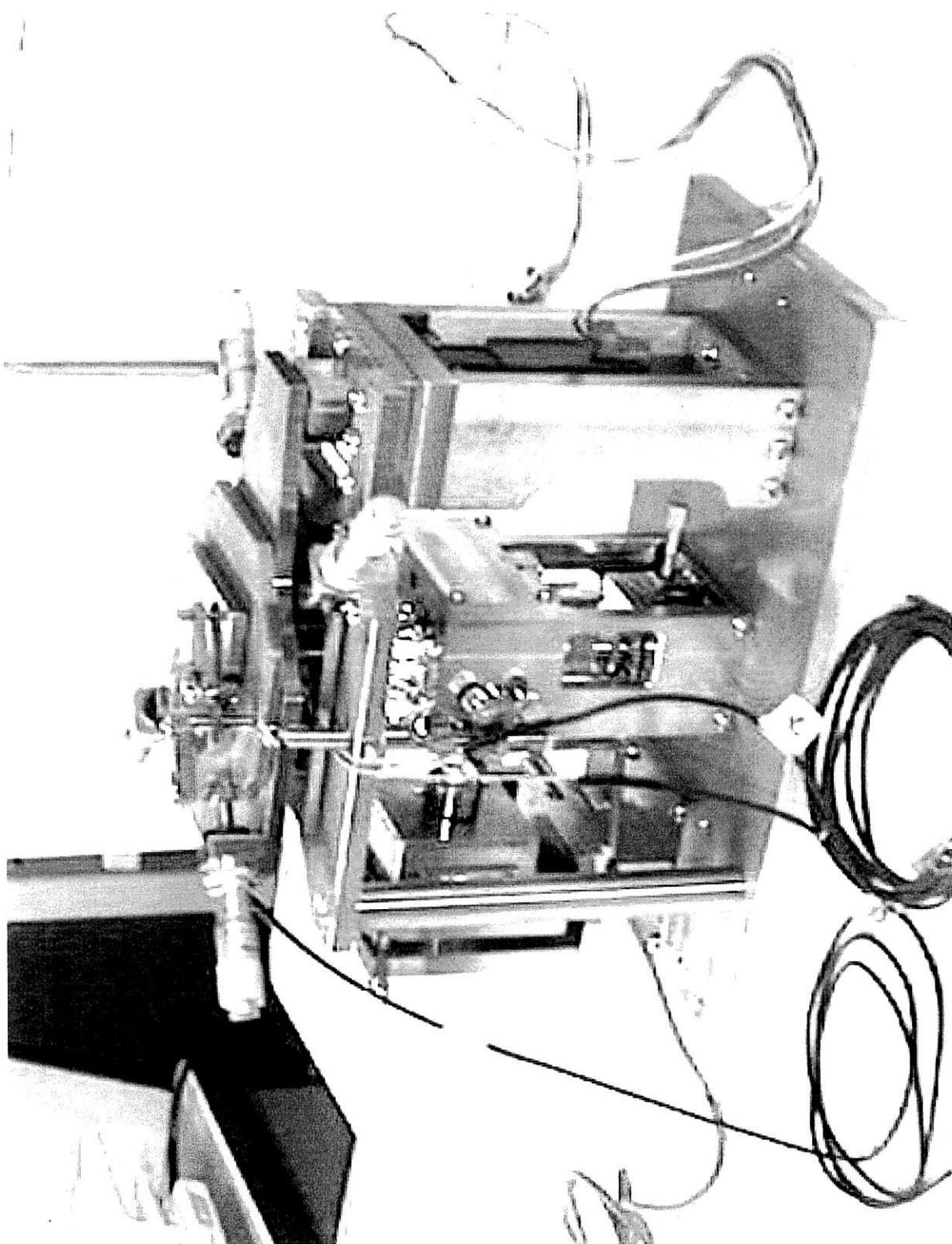


図6.5 焦点エラー検出法を採用したAFM装置の外観



7 分子間相互作用の研究

本課題研究ではハードウェアの製作も重要な課題の一つであるが、AFMによる分子間相互作用の研究を1分子レベルで行う方法の開発も重要課題の一つであった。これまでAFMによる分子間相互作用の研究は世界的にみても数えるほどしかなくない。且つ、真に1分子レベルで研究した例は皆無である。数分子以上が相互作用に関わっており、1分子の特性を明瞭に求めることはほとんどなされていない。我々は、カンチレバー探針先端に蛋白質を1分子だけ捕捉するための方法を先ず開発しなければならなかった。AFM以外の周辺技術（生化学、高分子化学）が必要であった。

我々は蛋白質としてアクチンモーター蛋白質系に絞ってこの周辺技術を開拓した。ミオシンのサブフラグメントであるHMMを探針先端に捕捉することにした。そのための戦略を以下の様に設定した。

1. 捕捉にはアビジン・ビオチン間の強い親和性を利用する。
2. HMMを蛍光標識し、個々のHMM分子の局在を可視化する。
3. 可視化されたHMM 1分子に探針を近づけて捕捉する。

7.1 HMMのラベリング

HMMを蛍光標識する上で最も重要な点は、蛍光標識によってHMMの機能を損なってはならないという点である。これまでHMMの化学修飾は多くなされてきたが、それらはいずれも機能を多かれ少なかれ損なうものであった。そこで化学修飾法は採らず、酵素反応修飾法を試みた。トランスグルタミナーゼ (TGase) は蛋白質のグルタミン残基のアミド基をアタックし、活性化する。活性化されたアミド基は外部に加えたアミノ基と置換反応する。そこで外部アミノ基としてビオチンカダベリンを用いることにした。実際に行ってみると、ビオチンがHMMに最大4分子導入されることが分かった。ラベルされたHMMのMg-ATPase活性、Actin-Activated ATPase活性を測定してみると、ラベルによる活性に変化は全く見られなかった (図7.1参照)。また、このラベルされたHMMでアクチンフィラメントの滑り運動を観察したところ、滑り速度はインタクトなHMMの場合と変わりがなかった。こうして、機能を損なわないラベリングが成功した。HMMのどこに修飾が起こったかを、ダンシルカダベリンでラベルされたHMMをトリプシンで限定分解して調べたところ、カダベリンはすべてHMMのS2部に局在していた。

図7.1 TGaseを利用した修飾のHMMの活性への影響

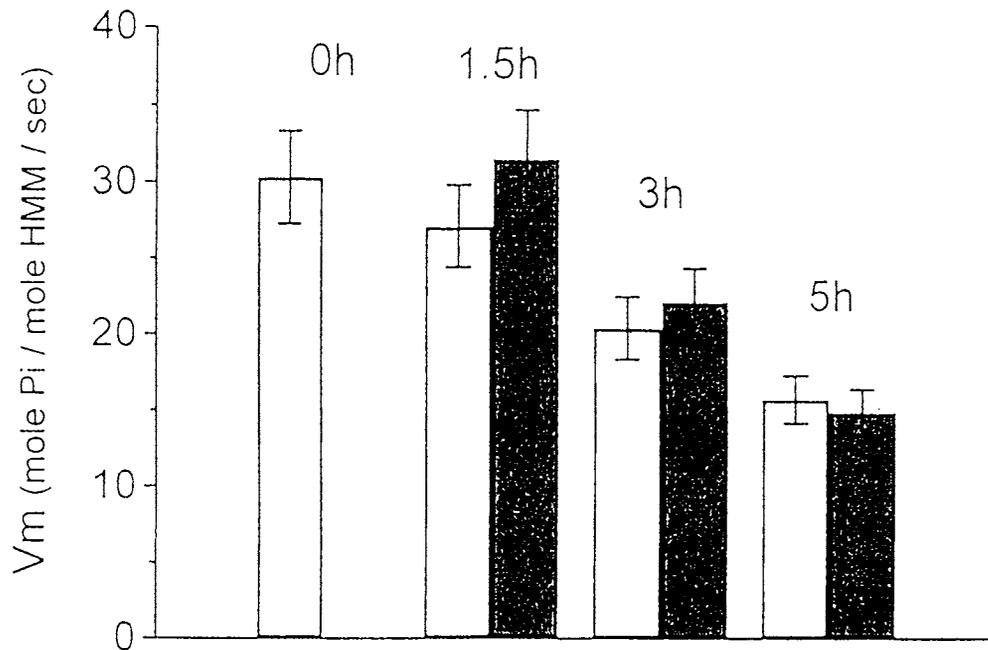


Table 1: Sliding velocity of actin filaments on HMM and HMM-bead complexes.

| | Nitrocellulose-coated cover slip ($\mu\text{m}/\text{sec}$) | UltraAvidin-bead-coated cover slip ($\mu\text{m}/\text{sec}$) |
|-------------------------------|--|--|
| Control ^a | 4.8 ± 1.0 (n=34) | — ^c |
| Biotinylated HMM ^b | 4.7 ± 0.9 (n=34) | 4.5 ± 0.8 (n=35) |

Data in the Table are mean velocities \pm S.D. for the number of observation indicated in parentheses. (a) HMM incubated for 3 h without transglutaminase. (b) HMM incubated for 3 h in the presence of transglutaminase and biotincadaverine. (c) No actin filaments were found on the surface due very likely to the absence of attached HMM.

7.2 蛍光ラベリング

我々のAFM 1号機はオリンパス光学工業のIMT2倒立型蛍光顕微鏡の上に載っている。この顕微鏡はIX70に比べて暗い。それ故、個々のHMM分子の可視化には、HMM1分子にかなり多数の蛍光性分子を導入しなければならない。そこで、アビジンコートされた蛍光性ビーズをビオチン化HMMに導入することにした。市販のビオチン化蛍光性ビーズを試みたが、いずれも非特異的に蛋白質に結合してしまい使えるものが無かった。そこで、自らビーズを調製する道を選んだ。ポリアクリルアミドは蛋白質に全く結合しないので非常に都合が良い。しかし、ポリアクリルアミドで小さいビーズを調製する方法は確立されていなかった。多くの試行錯誤の後、逆相マイクロエマルジョン中でアクリルアミドを重合させる方法で直径30nm程度のビーズを作る方法を確立させた。このビーズを無水エチレンジアミン中で熱することにより、アミノ基を多数導入することができた。このアミノ基にアミノ基反応性の蛍光色素Cy3とビオチンを反応させた。これに、アビジンとして非特異的吸着の無いストレプトアビジンを結合させた。このストレプトアビジンコートされた蛍光性ビーズ大過剰とビオチン化されたHMMをまぜ、アクチンアフィニティーカラムでHMM-ビーズ複合体を精製した。この複合体を電子顕微鏡とAFMで観察したところ、ビーズはすべてHMMのS2先端部（S2-LMMジャンクション）だけに結合していた（図7.2）。また、導入されたビオチンが4分子にも拘わらず、結合したビーズはHMMに1個だけであった。このことはビオチン導入部位が非常に近くにあることを意味する。S2部のアミノ酸配列を調べてみるとグルタミン残基は色々な部分に存在するが、TGaseでアタックされるフレキシブルな領域にあるグルタミン残基はS2先端部分に4個あるのみであった。S2先端にビーズを導入できたことは非常に幸いであった。

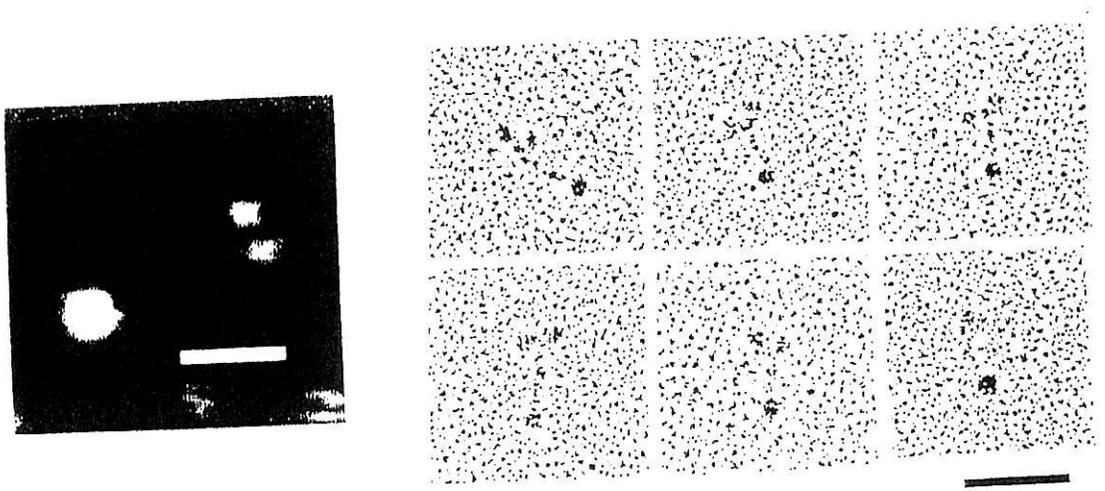
7.3 HMM1分子の捕捉

まず、カンチレバー探針先端をビオチン化する。このために次の方法を採用した。

- ビオチン化シランの希薄メタノール溶液をカバーガラスに垂らし軽く乾燥させる。これにカンチレバー探針を接触させたのち、針を乾かす。

カバーガラス表面にポリリジンをコートし、それにアクチンの束（ローダミンファロイジンで蛍光染色）を固定した。低濃度のHMMビーズ溶液をその上にたらししてから十分に洗う。蛍光顕微鏡でアクチンの上に結合している個々のHMM-ビーズの局在を確認する。カンチレバー探針をその1個のHMM-ビーズに近づける。探針も蛍光顕微鏡で見ることができるので比較的容易に行えた。ビーズの像の真上に探針先端を持ってくるように試料ス

図7.2 調製したHMM-ビーズのEM像とAFM像



テージを調整し、その後コンスタントフォースモードで $1\mu\text{m}$ 四方をゆっくりと走査する。光学顕微鏡で位置を合わせたといっても、接触できるほどまで近づけたかどうかは定かでないので、この走査の途中で接触するのを待つしかない。通常1回の走査で捕捉することができた。捕捉の確認は、走査後カンチレバー探針を試料基板から上方に引き上げて、蛍光性ビーズが試料基板から無くなり探針先端に移動することを観察することで容易に行えた。ただし、以上の諸過程を迅速に行わないと蛍光性ビーズが退色してしまいこの確認ができなくなってしまう。

7.4 アクチン・HMM間のライガー相互作用場の計測

HMM1分子を捕捉したカンチレバーをアクチンの束に対して近づけたり遠ざけたりしたときのレバーの応答の様子（フォース・ディスタンス曲線）を図7.3に示す。また、この曲線から推測される様子を図7.4に示す。詳細な解析過程は参考文献に詳しく載せているので、ここでは得られた定量的結論のみを述べる。ミオシン頭部とアクチンは 5.4nm 離れたところで互いを認識する。この認識距離において互いの間に 1.9pN の力が働き、 $1.82\text{pN}/\text{nm}$ の力の勾配が存在する。結合した両者を引き離すのに必要な力は 14.8pN で、完全に引き離されるまでに、 $1.7\sim 2.5\text{nm}$ の伸びが両分子間に起こる。このような定量的に詳細な蛋白質間相互作用の場の記述はこの研究が初めてである。これも妥協せずに、真に1分子だけを捕捉することを追求した結果である。

図7.3 HMM-Actin相互作用のフォース・ディスタンス曲線

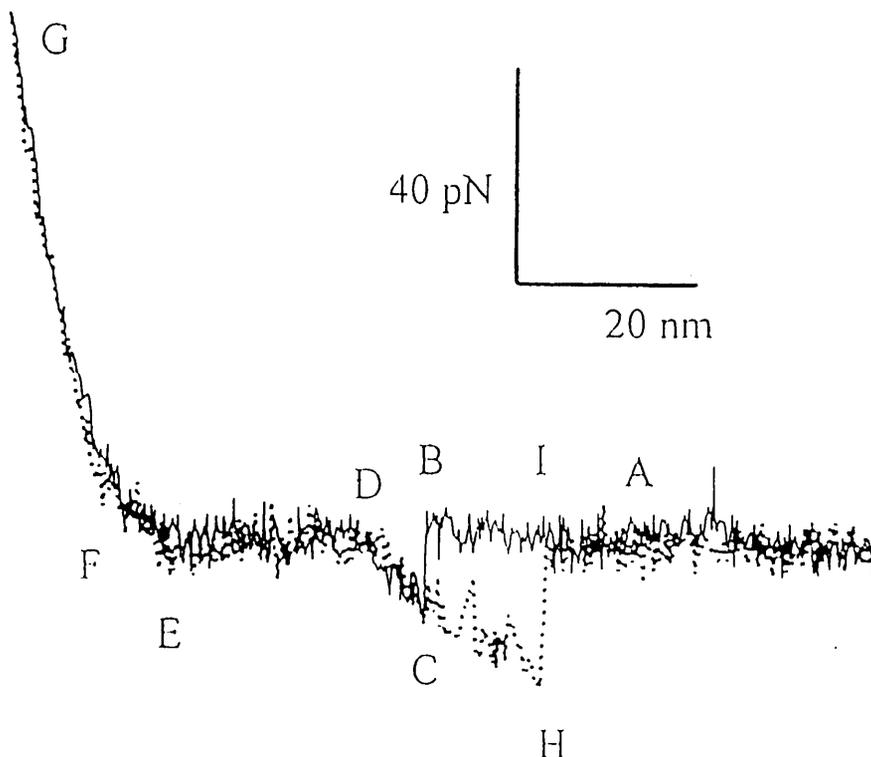
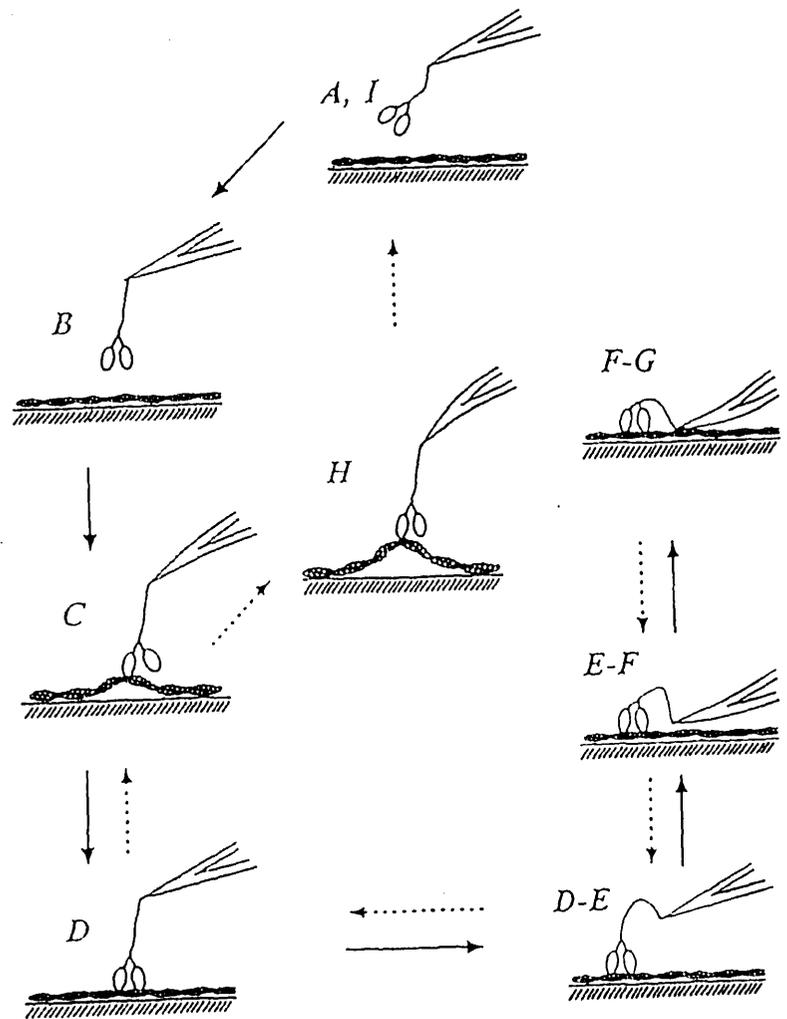


図7.4 フォース・ディスタンス曲線から推測される HMM-Actin相互作用の様子



7.5 ATP・HMM反応に伴うHMM分子の構造変化の検出

ATPとHMMが反応するとATPは直ちに分解されADPとPiになるが、これらは活性中心に長く留まる(M・ADP・Pi中間体)。アクチンが存在する場合には、この中間体の寿命は短くPi、ADPの順でそれらは外部に放出される。この放出過程で化学エネルギーから力学エネルギーへの変換が起こる。従って、M・ADP・Pi中間体は高エネルギー状態にあると言える。この状態のときミオシン頭部がどのような状態にあるかを知ることは極めて重要であるが、これまでこの状態は分光学的方法などの限られた方法でしか調べることができなかった。AFMを用いればこの状態を力学的状態として把握できるに違いない。すなわち、一種の力学的緊張状態にあるかどうか、どのくらい大きな分子変形が起こっているかどうかなどを明らかにすることができるに違いない。既にHMM1分子を探針先端に捕捉することに成功したので、この捕捉されたHMMにATPを作用させれば、力学的緊張状態を検出できるに違いない。但し、捕捉されたHMM分子が自由にブラウン運動できる状態ではHMMの力学的緊張をカンチレバーに伝えることはできない。そこで、ATPを基板に固定し、活性中心を基板に、S2先端をカンチレバー探針先端に捕捉しておいてそれらの間に弛みをなくせば、ミオシン頭部の力学的緊張をカンチレバーに伝えることができる。

7.5.1 ATPアナログの合成

ミオシン頭部活性中心にATPがどのように結合するかはミオシン頭部・ヌクレオチド複合体のX線結晶解析より既に分かっている。それによれば、ATPのリボース部は活性中心の外を向いている。従って、リボース部を化学修飾しても基質として働き得る。CDI法を利用して、先ずATPのリボースOH基にFmoc-Glyを結合させる。Fmoc基はPiperidineで外して、ATP-Gly-NH₂とする。このアミノ基に鎖が長い(3nm程度)Biotin-(AC₅)₂-Sulfo-Osuを反応させる。精製はC18の逆相HPLCを用いた。

7.5.2 非特異的結合の無い基板の調製

蛋白質や蛍光性ポリアクリルアミドビーズに対して吸着を起こさない基板を作る必要がある。また、ビオチン化ATPを固定化できる基板でなければならない。アクリルアミドは様々な物質に対して吸着を起こさず理想的である。アクリルアミドをガラス基板にコートする方法を開発した。

1. カバーガラスを洗剤中で超音波洗浄し、次に7:1(vol/vol) 硫酸：過酸化水素中80°Cで洗浄する。
2. お湯で十分に濯いだのち、メタノール中に保存。

3. エアブローで乾かし、3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate を蒸着する。密閉容器中で40°C、90分間放置。
4. メタノールで軽く洗い、120°Cで90分間焼く。
5. 1% (w/v) アクリルアミド500 μ lに2.5% ペルオキシ2 硫酸カリウム 20 μ l、10% TEMED 5 μ lを加える。これをシラン蒸着したカバーガラスに10 μ l程度垂らし、洗浄したスライドガラスを被せる。40°Cのオーブン中で90分間放置。
6. 蒸留水で洗い、エアブローで乾燥させる。
7. 基板に負電荷を導入する場合には、上記1% アクリルアミドに0.1% アクリル酸を加える。
8. 基板にSH基を導入する場合には、上記1% アクリルアミドに0.1% N,N'-bis(Acryloyl) cystamine を加える。S-S bondは β メルカプトエタノールで解裂する。

7.5.3 ATP 固定基板の調製

カバーガラス1枚を2つの領域に分ける。一つには負電荷を導入する。他方にはSH基を導入する。負電荷を導入した領域にHMM-ビーズを吸着させたのちにカンチレバー探針先端でそのHMM-ビーズを捕捉するためである。SH基を導入した領域にはATPを固定する。2つの領域に分けたカバーガラスに5mM Biotin-PEAC₅ maleimide を10 μ l程度垂らし、スライドガラスを被せ、40°Cのオーブン中に3時間インキュベートしてBiotinを基板に導入する。このBiotin化基板にストレプトアビジンを結合させ、良く洗ったのち、Biotin化ATPを結合させて、ATP固定基板を調製した。

7.5.4 探針のビオチン化

カンチレバー探針先端のビオチン化は、ここでは以前の方法を改良し、ビオチン化BSAを針先端に吸着させることで行った。

1. BSAとアミノ基反応性ビオチン (Biotin-(AC₅)₂-sulfo-Osu)とをモル比で1:50で混合し、ほう酸バッファー(pH 9.3)中で、30°C、4時間反応させた。G25ゲル濾過カラムで未反応のビオチンを分離し、ビオチン化BSAを精製した。
2. ビオチン化BSA溶液に針を漬けるとき、溶液が針全体に接するのを防ぐために、ビオチン化BSAを染み込ませたアクリルアミド基板に針を接触させる方法を探った。こ

のアクリルアミド基板は30% アクリルアミドを厚くカバーガラス上で重合させたものである。

3. ビオチン化BSAを染み込ませたアクリルアミド基板をAFMの試料ステージに載せる。カンチレバーの撓みをモニターしながら、探針を基板にエンゲージさせる。エンゲージさせてから数分放置したのち、カンチレバーを基板から引き離す。こうしてビオチン化したカンチレバーはデシケーター中で乾燥させる。

7.5.5 HMM1分子の捕捉

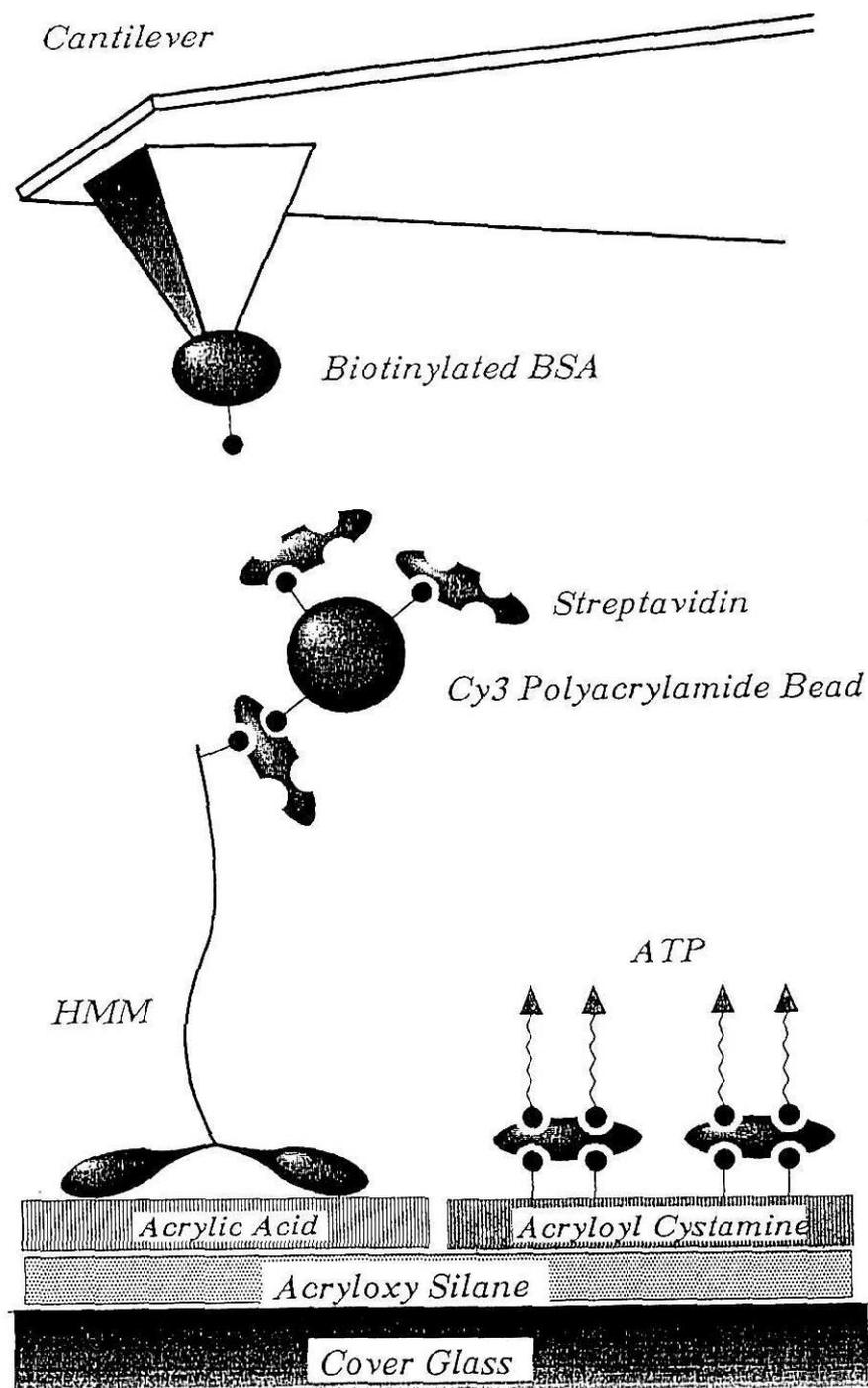
試料系及び1分子捕捉の仕方を図7.5に示す。

1. 負電荷を導入したカバーガラスの領域にHMM-ビーズを垂らし数分間放置後、buffer F (25mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, 25mM Imidazole-KOH, pH 7.6) で濯ぐ。
2. 濯いだあとは、蛍光の消光を防ぐために、Buffer Fに酸素除去試薬 (4.5mg/ml グルコース、0.36mg/ml Catalase、0.22mg/ml Glucoseoxidase、1mM β Mercaptoethanol) を加えた溶液に置換する。
3. AFM装置が載った蛍光顕微鏡でHMM-ビーズの吸着の程度を確認する。
4. 一つのHMM-ビーズの蛍光輝点にビオチン化したカンチレバー探針の像が重なるように試料ステージとAFMヘッドの位置を調整する。
5. その位置を中心として1 μ 四方をコンスタントフォースモード (力 10pN) でゆっくりと走査する。
6. ステッパーモーターでカンチレバーを基板から引き離し、HMM-ビーズの蛍光輝点が基板から離れていくことを確認する。
7. 蛍光輝点が基板にあるままのときには、再度位置調整し走査する。

7.5.6 HMM分子の構造変化の検出

1. HMM-ビーズを捕捉後、試料ステージを移動してカンチレバーの下にATP固定領域をもってくる。
2. ATP基板と探針との距離を確認するために、フォースディスタンスカーブを数回測定する。

図7.5 基板・試料と1分子捕捉の方法



3. 基板から探針先端を 70nm 離し、その位置を中心として $\pm 40\text{nm}$ 上下させる。
4. 上下走査中に設定した力 (約 20pN) がカンチレバーにかかった時点で上下動を停止し、カンチレバーの撓みをサンプリングする。
5. 十分なデータをサンプリング後、カンチレバーを基板から引き離し、破断力を測定する。
6. 試料ステージを僅かに水平方向に移動させ、上記の過程を繰り返す。

7.5.7 結果

図 7.6 に変位検出系のノイズレベルを示す。5 μsec ごとにサンプリングした結果を 10、100、1000 回平均した場合をそれぞれ示す。1000 回平均した場合には、ノイズレベルは $\pm 2.5\text{pN}$ (変位に換算すると、 $\pm 0.125\text{nm}$) であった。

HMM が ATP を結合したとき、HMM 頭部にどのような変化 (一過性、振動性など) が起こるか予想できなかったが、実際に測定したところ、図 7.7 に示すような振動現象が現れた。振動の振幅は $\pm 20\text{pN}$ (変位に換算して $\pm 1\text{nm}$) であった。振動数はかなり大きく、1000 回平均のサンプリングでは振動数は特定することができなかった。図 7.7 の場合には振動現象は約 10 秒間持続した。この間振幅は時間とともに減衰した。この振動現象が HMM 頭部の構造変化を反映しているものかどうかは直ぐには分からない。構造変化以外の可能性として考えられるものとして、HMM 頭部が ATP と結合・解離を繰り返していることが考えられる。この場合には、試料ステージを下げて、HMM を ATP から遠ざければ ATP から解離した状態で遠ざけることになるので、破断は観察されないはずである。そこで、振動している間、あるいは振動が静まったあとに、試料ステージを下げてカンチレバーの応答を観察した。図 7.8 と図 7.9 に示すように、破断が観察された。図 7.8 は図 7.7 の振動観察が終わった直後に試料ステージを下げたときに観察された破断である。同じ大きさ (14pN) の破断が 2 回続いて観察されている。2 つの破断の間隔は 16nm であった。この 2 回の破断は HMM が双頭であり、各破断はそれぞれの頭部における破断と考えられる。頭部の長さ、約 20nm を考慮すると、16nm の間隔は頭部が基板に対して水平から垂直に強制的に傾けられたための変位と考えられる。図 7.9 の破断は振動が観察されている間に試料ステージを下げたときに観察されたものである。破断が観察されたことから、HMM 頭部が基板の ATP と結合・解離を繰り返しているために振動が起きているのでは無いことが明らかになった。従って、振動は HMM 頭部の構造変化を反映していると結論される。この振動現象が

ら、HMM頭部はATPを結合した状態（実際にはADP・Piを結合した状態）において、2つの構造をとることが分かる。この2構造間の変形は約1nmである。この2つの構造間を往復することで振動現象が起こっているものと考えられる（図7.10参照）。なぜ振動が起こるのであろうか。HMM頭部自身が積極的に振動しているのであろうか。我々は、この振動はカンチレバーというバネによる外力がHMM頭部にかかっているからであると想像する。図7.11にATPを結合したHMM頭部のポテンシャルエネルギーの想像図を示す。HMM頭部は深い谷に通常は捉えられる。しかし、実際にはHMM頭部にはカンチレバーのバネによる外力がかかっている。従って、カンチレバーとHMM頭部の両方を合わせた系を考えなければならない。両方のポテンシャルエネルギーの和は同じ程度の深さをもつ2つの谷を形成する。この2つの谷の間には低い山のポテンシャルが存在する。熱揺動により、この山を越えて2つの谷の間を行ったり来たりすることにより振動が起こるものと想像される。このメカニズムの正否がどうであろうとも、我々の1分子レベルの観察でHMM頭部に2nm程度の変形がATPの結合により起こることが明らかにされた。この構造変化は外部に力（40pN）を及ぼし、仕事をするができることが実験的に示された。このエネルギーはATPの結合あるいは加水分解に由来するものと想像される。この点に関しては、更に実験を進めなければならない。不思議に思える点がひとつある。それは、振動中にカンチレバーにかかる最大の力は約40pNである。作用反作用の原理からHMM頭部にも同じ大きさの力が作用している。しかし、破断力の大きさは高々14pNである。振動中に破断が起こってもおかしくない。このことは図7.10の右の状態では大きな引っ張りの力が働いてもATPはHMM頭部からはずれない構造になっており、左の状態ではATPが小さな力で抜き取られやすい構造になっていることを示しているに違いない。カンチレバーとHMM頭部を合わせた系が振動できることは、エネルギーが外部に直ぐに散逸しないことも示している。HMM頭部がエネルギーを蓄えることのできる分子機械であることを意味し、モーター蛋白質として都合よく設計された分子であることの明かしであると思われる。

図7.6 変位検出系のノイズレベルと平均化の効果

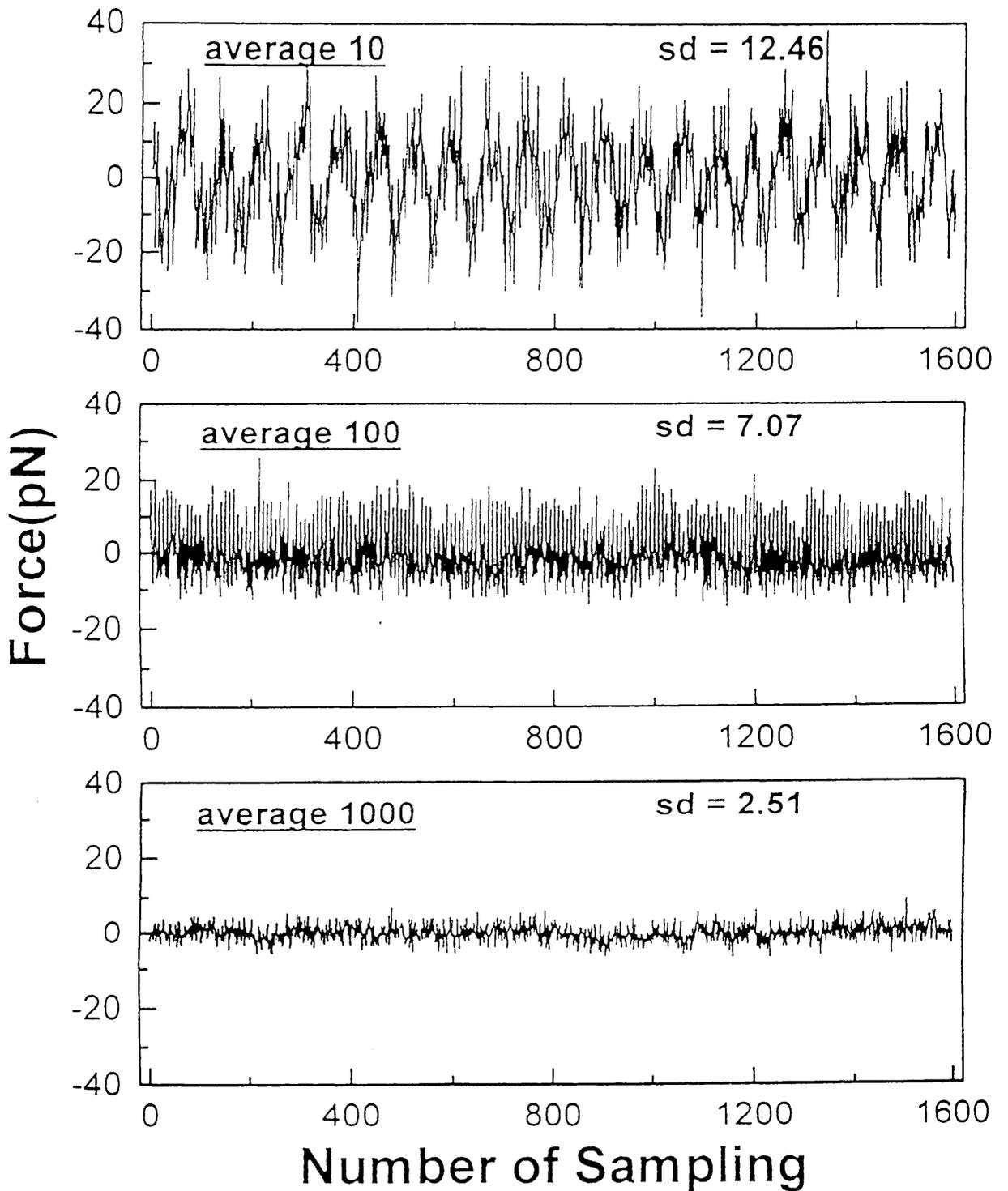


図7.7 HMM-ATP相互作用に伴う振動現象

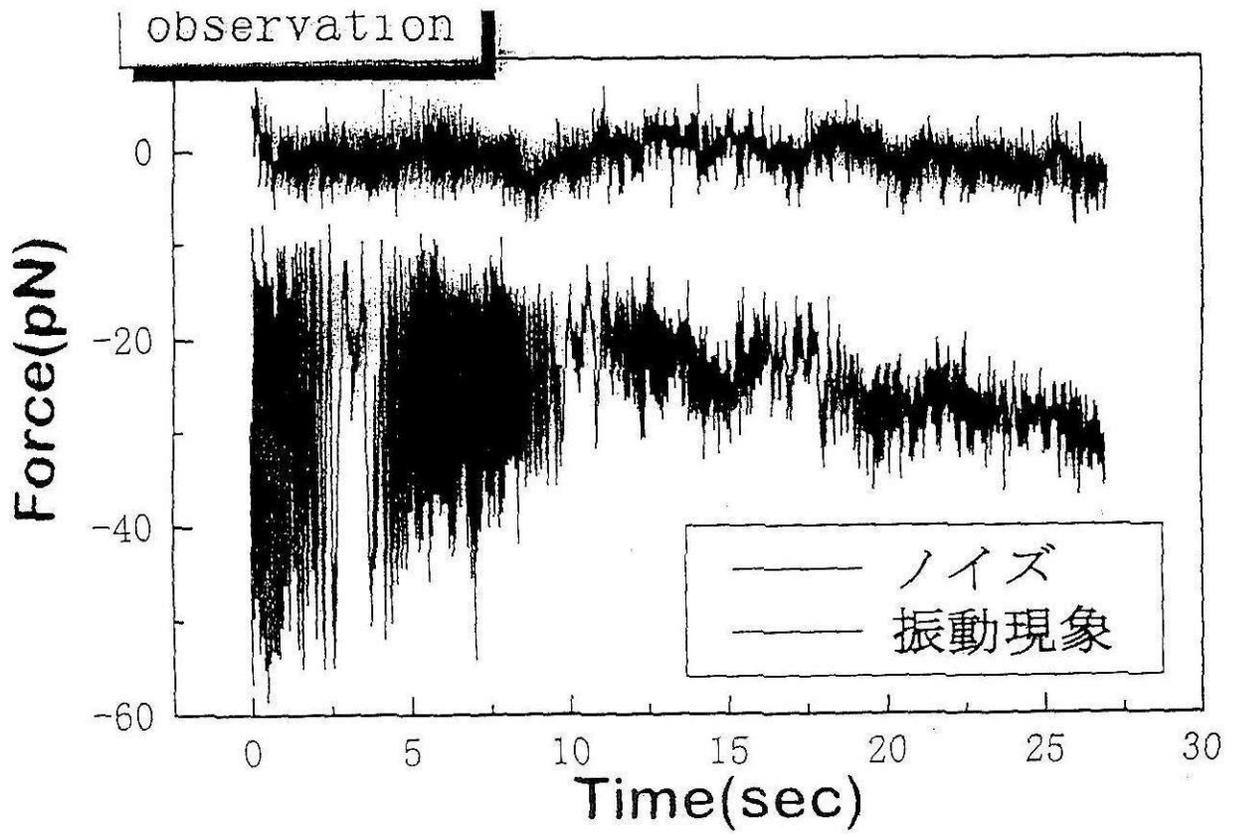


図 7.8 振動現象後に見られる破断

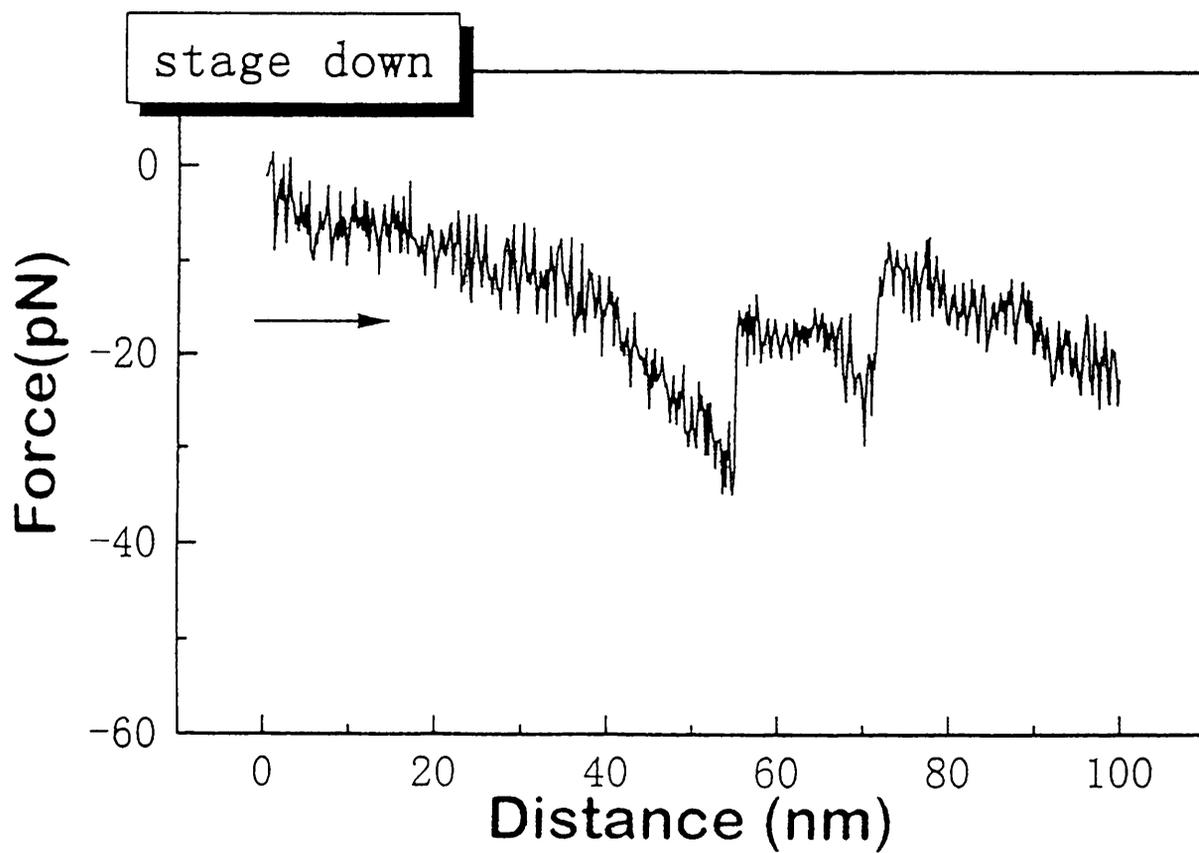


図7.9 振動中に見られる破断

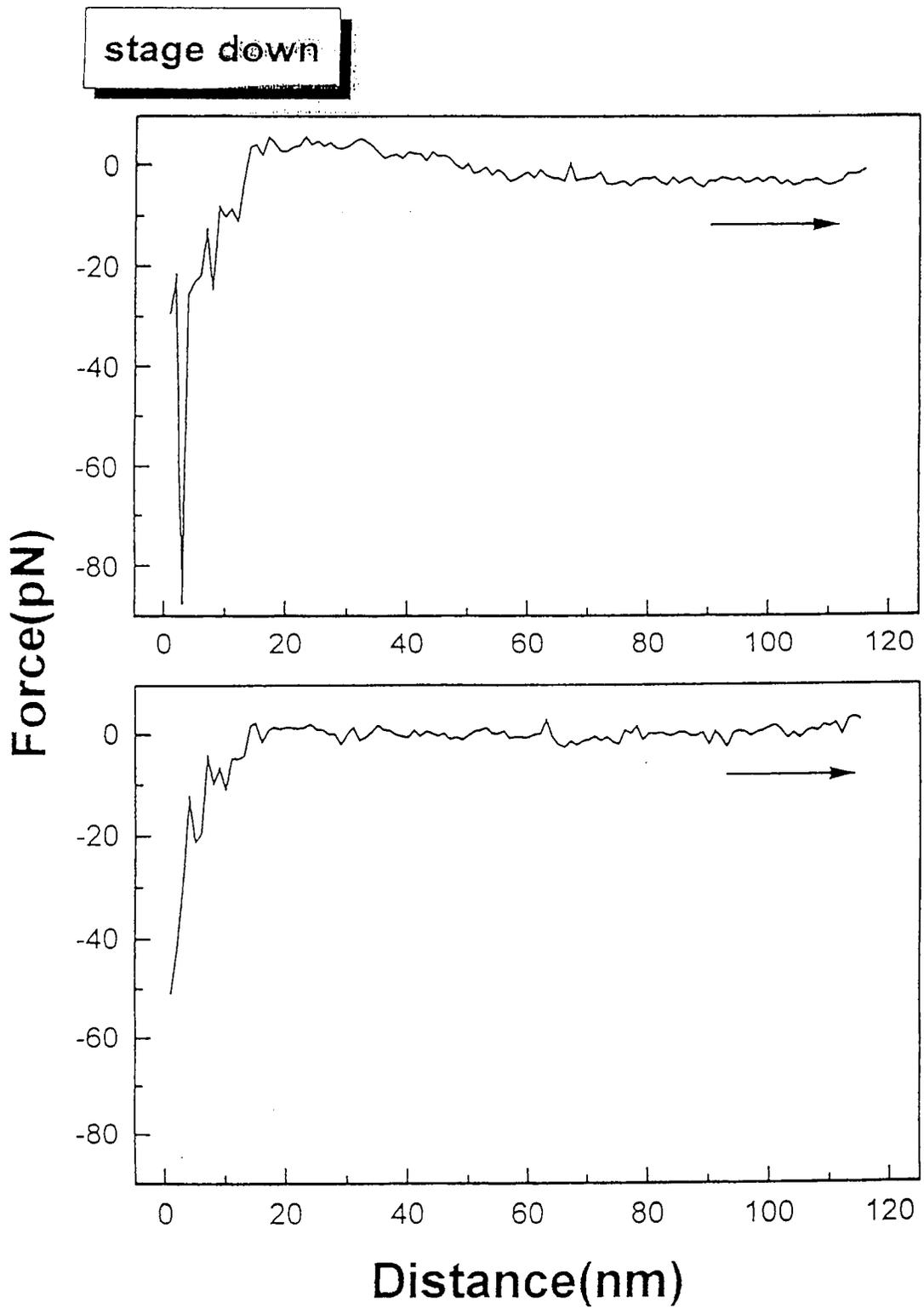


図7.10 振動現象中に起こっている2つの状態

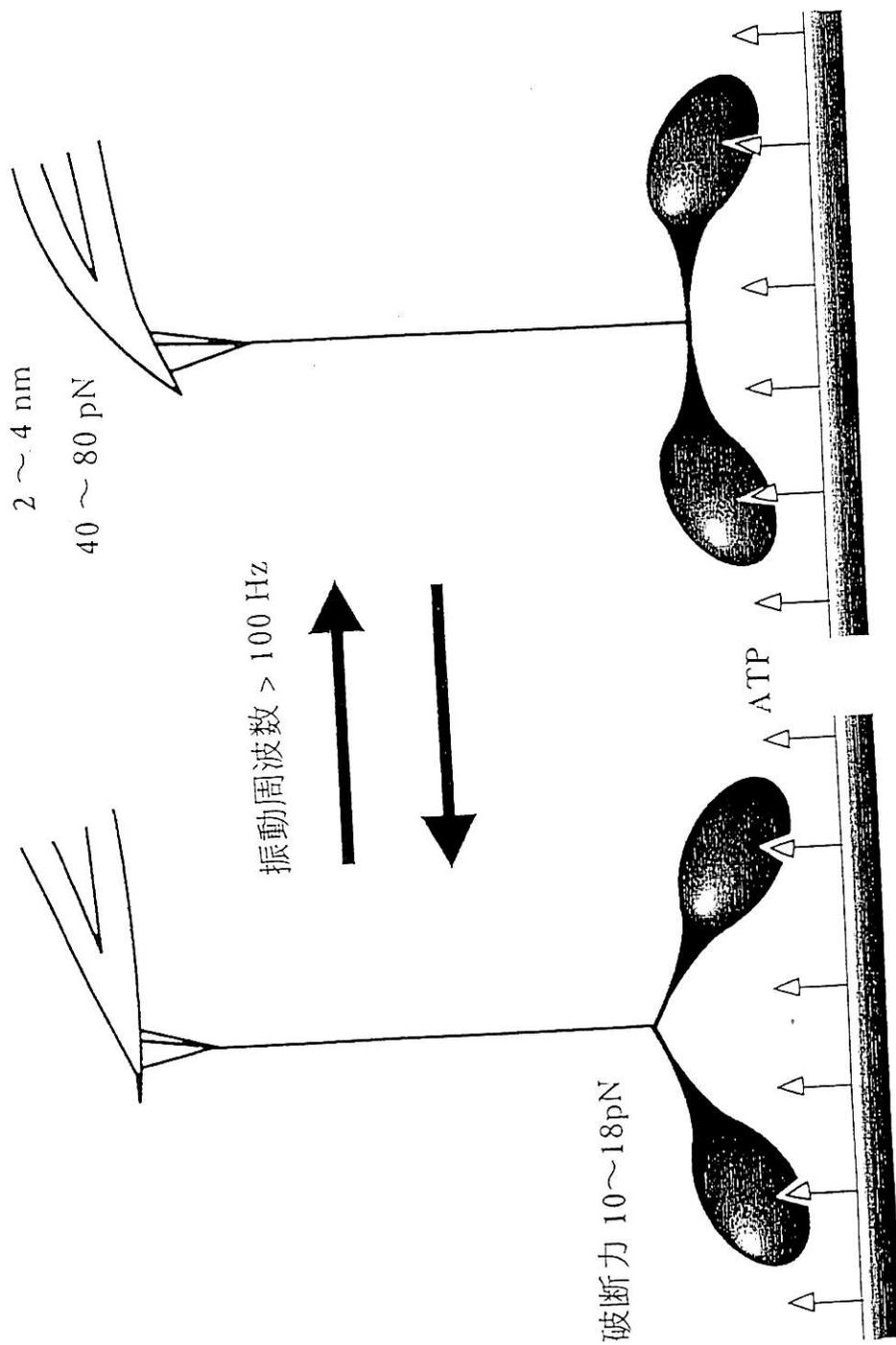
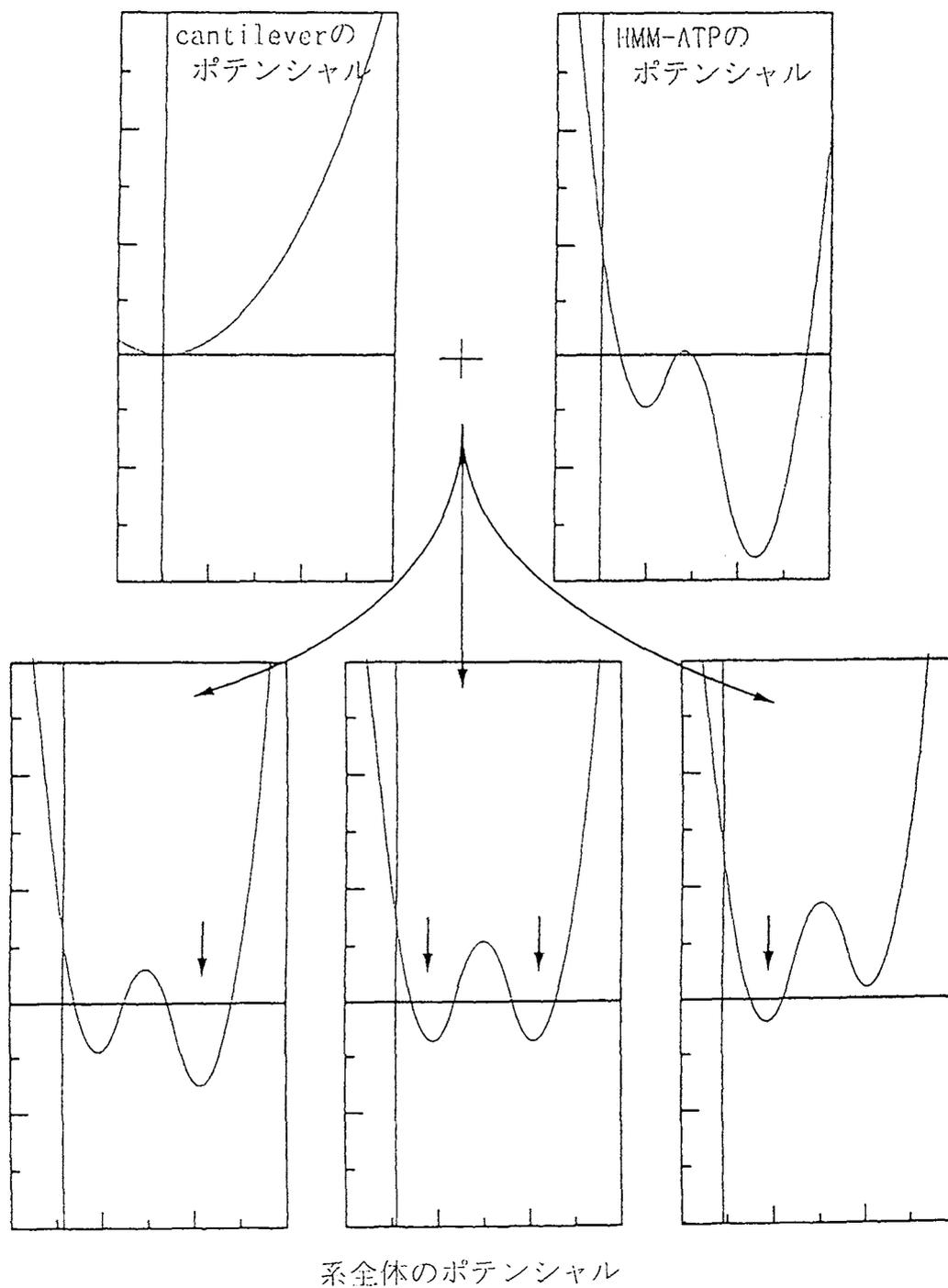


図7.11 HMMとカンチレバーのポテンシャルの合成



8 成果の要約

本課題研究で得られた成果を以下に箇条書きする。

1. 蛍光顕微鏡に組み込まれた AFM2 号機を完成させた。この装置は従来の装置より比較的高速に走査でき、その結果ドリフトの影響を受けにくい。
2. 製作した 2 号機を用いてミオシン頭部 (S1) の鮮明な AFM 像を撮ることができた。X 線結晶解析で得られている S1 の原子モデルと細かい点まで比較できる解像度の高い像であった。ATP 結合部位や頭部先端にあるクレフト構造まで観察できた。
3. 分子間相互作用を真に 1 分子レベルで計測することに成功した。
4. HMM1 分子とアクチン間に働く力の場を定量的に求めることができた。
5. HMM1 分子と ATP との相互作用による HMM 頭部の構造変化を世界に先駆けて観察することができた。構造変化の振動という新しい現象を発見することができた。
6. 高速 AFM を近い将来実現するための準備研究を行った。高速走査できるスキャナーを設計・製作することができた。高速 AFM に適した変位検出法を採用した AFM を試作した。高速走査に適したカンチレバーの作製を試み問題点を抽出できた。