

総説

高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の動態撮影

安藤敏夫, 古寺哲幸 金沢大学理工研究域数物科学系

Proteins are dynamic in nature and work at the single-molecule level. Reflecting this fact, single-molecule fluorescence microscopy has been widely exploited to understand how proteins operate. However, what we can observe thereby is the dynamic behaviour of individual fluorescent spots (each being emitted from a fluorophore attached to a selected locus of the molecule), not of the protein molecules themselves. The structure of proteins has been studied by electron microscopy, X-ray crystallography and NMR, but the obtained structures are essentially static. This long-standing problem prevailing throughout biological research has been recently overcome by the development of high-speed atomic force microscopy that enables simultaneous recording of the structure and dynamics of functioning biomolecules with high spatiotemporal resolution.

atomic force microscopy / AFM / high-speed AFM / imaging / dynamics / myosin V

1. 実験の直接性

実験結果と導かれる結論（あるいは真実）の間には距離がある。その距離が大きいつきには（いい換えれば、実験の直接性が低いときには）、実験データの解釈と推理が重要である。同じ実験データでも、解釈・推理の違いにより異なる結論にいたることもある。いずれの結論も正しくないことさえある。一方、実験の直接性がきわめて高い場合には、解釈・推理は重要ではなく、人によらず、実験データから同じ結論にいたり、真実を見いだす。サイエンスの歴史は直接性を高める技術開発の歴史でもある。このようにわれわれは考えるが、解釈や推理こそ価値がありサイエンスであると考えられるであろう。しかし、肝心なことは重要な真実を見いだすことにある。それもできるだけ早く。

生体分子の機能メカニズムを探る生物物理学的研究では、個々のタンパク質分子の機能中の振舞いを知るために、1分子生物学¹⁾が柳田敏雄らにより約25年前に創成され、現在では世界に広がり多くの成果が生まれている。アボガドロ数的な分子集団を扱っていた時代とは比較にならないほど、タンパク質の機能メカニズムに関するわれわれの理解は深まった。やはり、直接的理解をめざすことは正しい。

2. 構造とダイナミクス

1分子生物学を支えるおもなツールは光学顕微鏡である。タンパク質に大きな粒子、あるいは、蛍光分子をラベルして、それらを光学観察する。しかし、タンパク質分子そのものは観察に現れない。粒子や蛍光輝点の振舞いからタンパク質分子の振舞いを推測することになる。回折限界を破る超高解像度蛍光顕微鏡が最近いくつか開発されているが²⁾、どんなに空間分解能を上げて、観察できるのはあくまでも蛍光輝点である。また、見たいものだけを見る手法であり、これは長所になることもあるが、見えないものは無視せざるを得ない。他方、タンパク質の構造は、X線結晶構造解析、電子顕微鏡、NMR、あるいは、原子間力顕微鏡（AFM）で調べられる。だが、実質的に静止構造しか得られない。すなわち、構造とダイナミクスを同時に観察することはできない。これは生命科学全体を支配している技術的な障壁である。実験技術の直接性はいまだ十分でない。この状況を打破すべく、われわれは高速AFMの開発を15年以上にわたり進めてきた。

3. AFMの原理

AFMは1986年にチューリッヒのIBM研究所で誕生した³⁾。AFMは固体表面の原子配置を観察することを

Video Imaging of Protein Molecules in Action by High-speed Atomic Force Microscopy

Toshio ANDO and Noriyuki KODERA

Department of Physics, College of Science and Engineering, Kanazawa University

目的に開発された技術ではあるが、誕生後の比較的早い時期に水中に在る生物試料の観察も可能であることが UCSB の Paul Hansma らにより示された⁴⁾。AFM は、柔らかい片持ち梁（カンチレバー）の自由端に付いた探針を試料表面に接触させてイメージングする触診顕微鏡である。AFM のイメージングモードにはいくつかあるが、脆く柔らかい生体分子に適したタッピングモードでは、カンチレバーを第 1 次共振周波数で励振する。レバー先端に付いた探針が基板表面に載った試料の表面をたたくと、振幅は減少する。試料ステージを XY 走査しつつ、この振幅が目標値に維持されるように試料ステージを Z 方向にも走査する（フィードバック走査）。このようにすると、試料ステージの動きは試料表面をなぞることになるため、フィードバック走査信号をコンピュータに取り込み、XY 各点においてフィードバック走査信号をプロットすると、試料形状が再現される。探針は上下に振動しているため、探針・試料間に横方向の力はほとんど作用しない。

4. 高速 AFM の開発

AFM の高速化の研究は、半導体表面の評価やナノリソグラフィーの迅速化を目的に Stanford 大の Calvin Quate のグループにより 1991 年頃に開始された。自己検知・自己駆動型のカンチレバーやカンチレバーアレイを MEMS 技術で開発することで高速化が図られたが⁵⁾、液中の生物試料観察には適さない手法であった。1993 年頃に、Paul Hansma のグループとわれわれのグループは独立に、生物試料観察用の高速 AFM の開発に着手した。水溶液中で動くタンパク質が 2001 年にわれわれのグループによってはじめて可視化された⁶⁾。Paul Hansma のグループはある程度的高速化を実現したが⁷⁾、2005 年頃に高速 AFM の開発研究を中止し、骨の AFM 観察の研究に移った。われわれのグループは開発研究を継続し現在にいたっている。Bristol 大の Mervin Miles のグループも 2000 年頃から高速 AFM を開発し、ビデオレートを超えるイメージング速度を実現しているが⁸⁾、フィードバック制御をしていないため、生物試料の動態観察はできない。

われわれの高速 AFM は、装置に含まれるすべてのデバイス（カンチレバー、スキャナー、センサー、振幅計測器など）の高速化、スキャナーの振動抑制、高精度フィードバック制御などの技術開発により実現された。詳しくは総説を参照されたい^{9),10)}。現在の速度性能は理論限界にほぼ達しており、フィードバック帯域は 100 kHz を越す。250 nm 四方の走査範囲の場合、試料

にもよるが 1 画像を最短 30 ms で撮れる。XY 方向の空間分解能は 2-3 nm、Z 方向の空間分解能は 0.1-0.2 nm である。探針が試料を強く叩いて弱いタンパク質間相互作用を乱すに違いないと思われるであろうが、後述するように乱すことはない。試料に直接影響する力学量は力の大きさ自身ではなく、撃力（力×力の作用時間）である。カンチレバーの水中での共振周波数は 1 MHz を超えるため、力の作用時間は 100 ns 程度しかない。力のピーク値は約 30 pN と大きいですが、撃力は小さい。

5. バイオイメージング

5-1. バクテリオロドプシン

弱いタンパク質間相互作用が探針の接触で乱されないことを示すために、紫膜中のバクテリオロドプシン (bR) の結晶領域と非結晶領域の境界部で起こる bR3 量体の結合・解離の観察についてまず述べる。紫膜中では bR は 3 量体を形成し、3 量体は六方格子状に結晶化している。紫膜の断片をマイカ表面に載せて、結晶の境界部を観察すると、非結晶領域で既に形成されている 3 量体が結晶境界部に結合し解離するようすが観察される (図 1a-c)¹¹⁾。脂質膜表面とマイカ表面の間には水の層があり、bR はマイカ表面に直接接していないため非結晶領域では膜中を自由に拡散してい

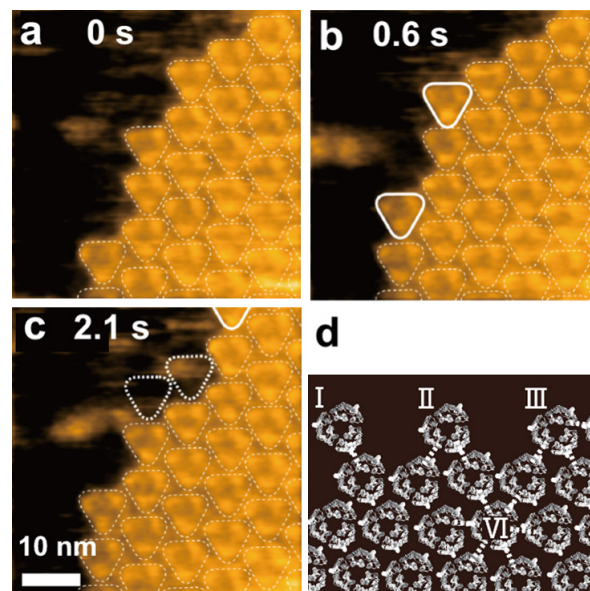


図 1 紫膜の結晶領域と非結晶領域の境界部の AFM 像 (a, b, c)。実線の三角形で囲った部分は新たに結合した bR3 量体を表す。太い破線の三角形は以前に結合していた 3 量体を表す (2.1 s)。イメージング速度は 3.3 frames/s。Z 方向の輝度の範囲は 3.8 nm。 (d) 結晶のエッジ部での bR3 量体の結合 (I, II, III) と結晶内部での結合 (VI) の模式図。ローマ数字は結合手 (破線) の数を表す。(電子ジャーナルではカラー)。

る。結晶内では1つの3量体は近接する3量体と6つの結合手を介して結合しているが、境界部では、場所により1-3つの結合手を介して結合する(図1d)。2つの結合手で結合している3量体の結合寿命は指数関数分布し、平均結合寿命 τ_2 は 0.17 ± 0.06 sであった。3つの結合手の場合の平均結合寿命 τ_3 は 0.85 ± 0.08 sであった。この寿命の違いはそれぞれの場合の結合エネルギー E_2 と E_3 の差と次のように関係している。

$$\tau_2/\tau_3 = \exp[(E_3 - E_2)/k_B T] \quad (1)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度である。 $E_3 - E_2$ は1つの結合手あたりの結合エネルギーに相当し、 $-1.5 k_B T$ と見積もられる。ところで、結合寿命はイメージング速度に依存しなかった。すなわち、わずか $-3 k_B T$ しかない弱い結合でも探針と試料の接触に影響されない。bRの光照射に伴う動的構造変化の高速AFM観察については生物物理学会誌に最近掲載された柴田幹大の記事¹¹⁾と原論文¹²⁾を参照されたい。

5-2. ミオシンVの歩行運動

等価な2本足をもつミオシンVはアクチンフィラメントに結合したあとアクチンから解離せずに1分子で長距離運動する¹³⁾。この性質(プロセスビティ)のお陰で、1分子生物学手法を用いて詳しく研究され、約36 nmのステップ¹⁴⁾でハンドオーバーハンド運動¹⁵⁾することが明らかにされている。また、かなり間接的な手法によってではあるが、ADPの解離速度定数とATPの結合速度定数が前足と後ろ足で異なることが示唆されている¹⁶⁾。また、蛍光ATPを利用した坂本武史らの研究により、ATP1分子の消費と1歩の前進運動が1対1にカップルしていることも直接示されている¹⁷⁾。

しかしながら、この歩行運動が実際にどのように起こっているのか、前進の駆動力となる張力発生が分子のどの部分でまたどの段階で起こっているのか、張力緩和と前進運動がどのように関係しているのかなどについては明確なデータはなく、包括的な理解にはいたっていない。それゆえ、ミオシンVは、高速AFMによる分子動態の直接観察によって既知の事実も含めどのようなことまで知り得るのかを示す上で、絶好の試料である。ここでは得られた結果を概説する。詳細については原論文¹⁸⁾を参照されたい。映像データは著者のホームページで見られる。

アクチンフィラメントに沿って運動するミオシンV(ここでは、長い尾部を除去したM5-HMMを用いた)を観察するために、ビオチン脂質を含む脂質2重層膜を

利用した。電気的に中性な脂質の極性基はタンパク質を吸着しない。しかしこの条件ではM5-HMMは多くの場合アクチンフィラメントの上部を動かすため分子形態を捉えにくい。そこで、正電荷をもつ脂質DPTAPを若干加え、M5-HMMが横向きで基板に載るようにした。図2に示すように、歩行しているM5-HMM分子を鮮明に捉えることができた。また、観察されたM5-HMMの歩行速度は、基板がDPTAPを含まない場合には、蛍光顕微鏡観察で計測されたものと一致する。すなわち、探針と試料の接触はモータ活性に影響しない。

1歩進む過程は非常に速く、その途中の過程を捉えるには工夫が必要であった。前進運動を穏やかに阻害するために過剰のストレプトアビジン分子を基板表面に撒いたところ、歩行中の過程を捉えることができた。後ろ足がアクチンから解離すると、ほぼ真っ直ぐな前足が後方に傾いた向きから前方に傾いた向きに自動的に回転する。この回転は、筋肉の研究でHugh Huxleyによって提唱されていたLever ArmのSwingそのものであり¹⁹⁾、ここではじめて実証された。この回転に伴って前進するネック・ネック接合部の周りを後ろ足は回転し、アクチンフィラメントから大きく離れ、やがて前方のアクチンに結合し、一步の運動が完了する。この1つの映像の中に、これまでの研究で明

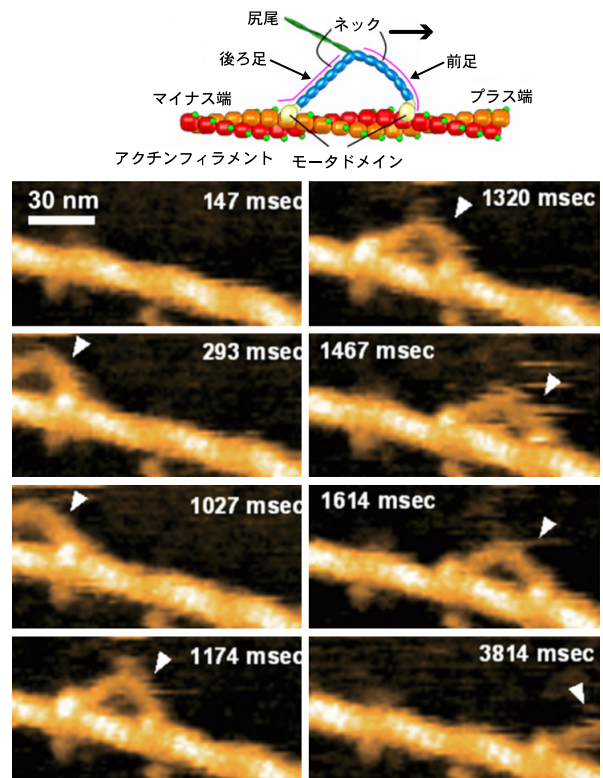


図2 歩行するミオシンVを捉えたAFM像と模式図(上段)。イメージング速度、7 frames/s。(電子ジャーナルではカラー)。

らかにされた複数の事実が視覚的証拠として同時に現れるだけでなく、前進駆動が前足の屈曲（モータドメイン・ネック接合部付近での曲がり）ではなく回転で起こっていること、解離した後ろ足は前進中にアクチンには接していない事実が明瞭に観察される。また、後ろ足の解離によって前足が自動的に回転することから、この回転のための張力が2本足でアクチンに結合している分子内（前足）にすでに存在していることがわかる。さらには、アクチン上に留まっている間、前足が時折アクチンから解離し直ぐに再結合する振舞い（Foot Stomping と命名）が新たに見いだされた。

ヌクレオチドなしの条件でも、M5-HMMは2本足で同じアクチンフィラメントに結合する。しかし、ヌクレオチドが存在する場合と異なり、前足は大きく屈曲した。したがって、前足の形態を観察すれば、前足にヌクレオチドが結合しているかどうか判断できる。そこで、前足が真っ直ぐな形態をとる寿命をADP濃度の関数として計測し、前足でのADPの解離速度定数を見積もった。結果は0.1/sとなった。すなわち、平均で10秒間に1回前足からADPが解離する。しかし、10秒間にM5-HMMは何歩も歩く。すなわち、歩行しているM5-HMMでは前足からADPが解離することはなく、ADPの解離、それに続くATPの結合、その結果起こるアクチンからの解離は後ろ足でしか起こらない。これは、ハンドオーバーハンド運動が起こる分子基盤である。このことは間接的な実験データから以前示唆されていたものではあるが、この観察により直接的証明が与えられた。

6. 今後の展開

タンパク質の構造とダイナミクスの同時観察はパワフルな新しいアプローチである。ミオシンVの高速AFM観察の例でも分かる通り、1つの分子映像の中に多くの事実を同時に見だすことができ、それも、視覚的証拠であるため非常に直接的でわかりやすい。他の手法で明らかにされた、あるいは、推測されてきた分子の振舞いのすべてが分子映像に現れていることは、この新しい手法が信頼できることを証明している。また、今まで気がつかれていなかった事実も映像に現れ、運動メカニズムのより詳細な理解へと導いた。今後は、さまざまな生体分子が高速AFMで観察され、その分子映像が直接語る多くの事実が発見されるであろう。また、すでに推測されている事実の視覚的証拠でさえ大きな価値がある。

この装置を世界の多くの研究者に活用していただく

ための活動をわれわれは企業と一緒に進めており、おそらく1-2年以内には市販されるものと予想している。細胞観察も可能な次世代高速AFMも開発中である。

謝辞

高速AFMの開発にこれまでかかわった多くの学生さんに感謝したい。最近の研究では、内橋貴之准教授、宮城篤君、山下隼人君、山本大輔君、柴田幹大君の頑張りに感謝したい。最後に、本研究をこれまで資金面で支援していただいたJST、三菱科学財団、日本学術振興会、文部科学省に深く感謝申し上げる。

文献

- 1) Yanagida, T., Ishii, Y. (2009) *Single Molecule Dynamics in Life Science*, Wiley-VCH.
- 2) 藤田克昌 (2010) *生物物理* **50**, 174-179.
- 3) Binnig, *et al.* (1986) *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933.
- 4) Gould, S. *et al.* (1987) *Nature* **332**, 332-334.
- 5) Minne, S. C. *et al.* (1995) *Appl. Phys. Lett.* **67**, 3918-3920.
- 6) Ando, T. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12468-12472.
- 7) Vianni, M. B. *et al.* (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 644-647.
- 8) Humphris, A. D. L. *et al.* (2005) *Appl. Phys. Lett.* **86**, 034106.
- 9) Ando, T. *et al.* (2008) *Pflügers Archiv -Eur. J. Physiol.* **456**, 211-225.
- 10) Ando, T. *et al.* (2008) *Prog. Surf. Sci.* **83**, 337-437.
- 11) Yamashita, H. *et al.* (2009) *J. Struct. Biol.* **167**, 153-158.
- 12) 柴田幹大 (2010) *生物物理* **50**, 302-303.
- 13) Shibata *et al.* (2010) *Nat. Nanotech.* **5**, 208-212.
- 14) Sakamoto, T. *et al.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 586-590.
- 15) Yildiz, A. *et al.* (2003) *Science* **300**, 2061-2065.
- 16) Purcell, T. J. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13873-13878.
- 17) Sakamoto, T. *et al.* (2008) *Nature* **455**, 128-132.
- 18) Kodera, N. *et al.* (2010) *Nature* **468**, 72-76.
- 19) Huxley, H. (1969) *Science* **164**, 1356-1365.

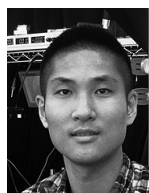


安藤敏夫

安藤敏夫 (あんどう としお)

金沢大学理工研究域数物科学系教授
1980年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了。同年UC San Francisco 博士研究員、83年同助手、86年金沢大学理学部講師、96年より現職。研究内容:モータタンパク質、高速AFMの開発とバイオ応用の研究

連絡先: 〒920-1192 石川県金沢市角間町
E-mail: tando@kenroku.kanazawa-u.ac.jp
URL: <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>



古寺哲幸

古寺哲幸 (こでら のりゆき)

金沢大学理工研究域数物科学系助教
2004年日本学術振興会特別研究員。05年金沢大学大学院自然科学研究科修了、同年CREST博士研究員、10年より現職。

研究の内容:モータタンパク質、高速AFMの開発とバイオ応用の研究
連絡先: 〒920-1192 石川県金沢市角間町
E-mail: ikuyo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp