

—金沢大学サテライト・プラザ ミニ講演—

会場 金沢大学サテライト・プラザ

日時 平成14年7月5日(金)午後6時～7時30分

テーマ 超高性能顕微鏡を開発して生命現象の謎に迫る

—高速原子間力顕微鏡の開発と動くタンパク質分子の観察—

講師 安藤 敏夫(金沢大学理学部教授)

原子間力顕微鏡は16年前にこの世に生まれたものですが、その撮影速度は極めて遅く、それ故、我々の見える世界が限られ、動くものは見るできないという限界がありました。今回、高速化をすることによってこの限界を破り、動くタンパク質を見ることができるようになったわけです。内容はいたって単純なのですが、装置の開発について細々と話

しますと堅苦しくなりますので、そういうところはできるだけ飛ばして、生物の楽しいところをふんだんに、顕微鏡と関連づけながらお話ししたいと思います。

今日のお話ですが、最初は生物に見られる動きについて。ここに居られる皆さんは、生物の動く世界を顕微鏡で見る機会はなかなかないと思いますので、そういう映像をまずご紹介します。次に、そういう映像を得る顕微鏡の発展、そして、タンパク質とは何かということをお話しします。生命科学において、タンパク質というのは非常に重要な研究対象なのですが、これまでは水の中にあるタンパク質を見ることは困難でした。それが原子間力顕微鏡の誕生によって、ようやく見ることができるようになったということで、原子間力顕微鏡とはいったい何なのかというお話。そして、非常に遅かった撮影速度をいかに高速化したかというお話をし、最後に動くタンパク質の映像をご紹介します。

話に入る前に、大きさのスケール、長さの単位についておさらいをしておきます。1メートルの1000分の1が1ミリメートル(mm)。さらに1000分の1がマイクロメートル(μm)、さらに1000分の1がナノメートル(nm)、さらに1000分の1がピコメートル(pm)です。こういう言葉がよく出てきますので、理解しておいてほしいと思います。

最近、ナノテクノロジーという言葉をよく聞きますが、ナノというのは正確にはナノメートルのことで、 $1\mu\text{m}$ の1000分の1の世界です。生物でいいますと、アメーバの大きさが $100\mu\text{m}$ ぐらい、普通の細胞が $10\mu\text{m}$ から数 μm です。ウイルスというのは細胞ではなく、RNAもしくはDNAとタンパク質の集合体ですが、これはぐんと小さくなって 100nm ぐらいです。タンパク質はそれよりも1けたほど小さくなって、数nmから $20\sim 30\text{nm}$ です。

そのさらに 10 分の 1 が原子で、水素原子の大きさが大体 0.1nm、炭素原子で 0.3nm です。

我々の肉眼で認識できる光（可視光）の波長は大体数百 nm で、1 μm よりも若干下になります。X線も光ですが、その波長は 1 nm から 0.01nm ぐらいまであります。電子線の波長というのは聞き慣れない言葉かもしれませんが、電子というのは粒で、それが小さい世界に入ると波の性質を持つようになるのです。粒を加速すると速度を持って、運動量を持つことになるのですが、運動量を持つとある波の波長が生まれます。電子顕微鏡というのは数十 kV とか百 kV で加速するわけで、そのときの電子線の波長は、これぐらいの非常に短いもの（10pm 程度）になります。

我々は何物を見るときに光や電子線を使いますが、普通、その波長よりも長いものしか見えません。したがって、アメーバや細胞を見るときには可視光の顕微鏡で見ますし、それよりも小さいウイルスやタンパク質の世界を見ようとするときには、電子顕微鏡を使わなければなりません。例えば、野口英世さんは黄熱病の原因を光学顕微鏡で探しましたが、結局見つからなかったというのはウイルスだったからです。X線も使えるではないかという話があるのですが、X線に使えるよいレンズがなく、X線顕微鏡ではせいぜいこのぐらいの世界（数十 μm ）しか見ることはできません。

これから、生物の動きを示す映像をいくつかお見せしますが、まず、それを楽しむための予備知識のお話をします。生物は動くことを特徴としており、筋肉を動かしたり、肉眼では見えませんが、細胞の中でもいろいろな動きがあるのです。そういう動きをつかさどっているタンパク質（モータータンパク質）は、これまで知られているものとしてはミオシン、キネーシン、ダイニンという 3 種類が挙げられます。例外的なものもありますが、すべての生物はこれで動いているということです。ミオシンはアクチンと、そしてキネーシンとダイニンはマイクロチュービュルと相互作用して、力を出し運動を起こします。

ミオシン・アクチンについて、代表的な例である筋肉でご説明します。筋肉の細胞の中にはこのようなユニットがたくさん詰まっています、Zバンドから細い線が出ています。これはアクチン分子が二重らせんで重合して、細いフィラメントを形成したものです。緑色で書いてあるのがミオシン分子の集まりで、太いフィラメントを形成しています。このアクチンとミオシンの間で力を発生して、2つのZバンドが中央に寄ってくる。違う言い方をすると、ミオシン分子がアクチンを内側に引っ張って、それによって筋肉細胞が収縮するということが起こります。

これには当然、エネルギーが必要になります。そのエネルギーの源はATP（アデノシントリリン酸）と呼ばれるリン酸化合物です。3個のリン酸を持つATPがリン酸を1個放出して2個のリン酸を持つADPになるという反応によって、エネルギーを獲得するのです。この分解で得られる化学エネルギーを力学的エネルギーに変換して、いろいろな運動を引き起こします。

それ以外に少し変わったものもありまして、それはアクチン・チュービュリンの重合です。チュービュリンというのは非常に小さい丸いタンパク質分子ですが、それが寄り集まっ

て棒状のマイクロチュービュルを形成します。その片方の端は、チュービュリンが付きやすく、離れにくい。もう一方は、離れやすくて付きにくいという性質を持っています。これを放っておくと、片方はどんどん伸びていき、もう片方はどんどん外れていくので、チュービュルの固まり自身が一方に動いていくのです。これをトレッドミリングというのですが、とにかく、このような重合によってものが運動していくということが起こりうるわけです。そういうものを利用した生物の運動も、結構多く見られます。

最初に、光学顕微鏡で見る世界をご紹介します。皆さんも小学校・中学校時代に光学顕微鏡をお使いになったことがあると思いますが、まず簡単におさらいをしておきます。仕組みはいたって簡単で、ここに物体があって、ここにレンズがあります。このレンズの前焦点位置に物体があると実像がここに形成されます。この焦点距離を f_1 、焦点位置から像までの距離を Δ とすると、この三角形とこの三角形は相似の関係にあるので、 Δ / f_1 という倍率が出ます。

しかし、これだけでは 100 倍ぐらいまでしか拡大できないので、さらにここにレンズを乗せて、ここまで来た光を目の方に屈折させてやります。目の方は、この光がこちらからやってくると誤解するわけです。その結果、拡大した虚像が目で見えることになります。これも、この三角形とこの三角形は相似の関係になるので、比は f_2 対この長さです。これは明視の距離 D (250mm) にほぼ等しい。そうすると倍率は D / f_2 。 Δ / f_1 が 100 倍、 D / f_2 が 10 倍とすると、全体で 1000 倍。したがって、数 μm の物体は数 mm として目の中に入ってくることになります。こうしてものを拡大して見ることができるのです。

最初は楽しい映像です。これはケラトサイトという細胞をシャーレで培養しているのですが、このようにひだのようなもの（足）を出して前に進みます。この足は、実はアクチン分子が重合して、前に押し出されているのです。

次の映像はアメーバですが、かなり大きくて、0.1 mm ぐらいあると思います。これも足を出して動くのですが、その様子を光学顕微鏡でとらえたものです。アクチン分子を重合して前に突き出している、これを仮足といいます。細胞内の顆粒（つぶつぶのもの）も一緒に押し出されています。これは細胞の核です。こういう世界を光学顕微鏡でのぞくことができます。

これは私たちの心臓の細胞をシャーレの中で培養しているのですが、シャーレの表面に張ってあるゴム製のものに心筋細胞がくっついていきます。細胞が収縮するとゴムが引っ張られて、しわができます。今、自分たちの体の中で、こういう細胞が一生懸命ビーティングしているのです。

これはもう少しドラマチックな映像で、動物細胞にリステリアという細菌が感染したのです。リステリアは自分自身では運動する能力はありませんが、感染した細胞の中のアクチン分子の重合を促進する能力を持っており、この細菌のついたところでアクチンが重合していくのです。ここで、アクチンのフィラメントの密度の高いところが彗星の尾のように見えています。

これは、先程のバクテリアと細胞の抽出物を混ぜた人工的な系です。バクテリアの方は、グリーンフルオレッセントプロテイン（GFP）との融合タンパク質にして光らせているのです。蛍光で光ります。アクチンには別の蛍光物質が付けてあり、密度の高いフィラメントが光って見えています。アクチンが重合して押し出され、それでバクテリアは運動しているのです。

最後の方で蛍光のお話が出てきました。先程、光の波長より小さいものは見えないと言いましたが、蛍光を使うとそれが見えてしまうのです。「見えない」というのは、光の波長の長さの中に2つのものがあると、その2つのものが識別できないという意味なのですが、蛍光を使うと、そこにもものがあるということはわかるわけです。しかし、その実体そのものが見えているわけではない。この蛍光の光を利用したのが蛍光顕微鏡です。

蛍光というのは盛んに利用されていますが、どういうものかを簡単にお話しします。ガラスについた蛍光物質に例えば黄色い光を当てると、蛍光物質は当てた光よりも波長の長い光、例えば赤い光を出します。黄色い光は吸収し、赤い光は通すようなフィルターをその先に設けておいて、レンズで光を集めると、周りは真っ暗で、その中に赤い光がぱっと光るのです。これは、昼間は星が見えないけれども、夜は暗い星でも見えるのと同じ原理です。

この映像は、中心体というところからマイクロチュービュルが重合して成長する様子を示しています。マイクロチュービュル自身の太さは大体25nmなので、普通の光学顕微鏡では見えないのですが、蛍光で光らせて見えているのです。マイクロチュービュルは重合して成長していくと、あるところでぷつんと切れるというおもしろい性質を持っています。ダイナミック・インスタビリティと呼ばれています。このように、蛍光を使うと、細胞レベルよりもずっと小さい世界を見ることができます。

これは、筋肉の中のミオシンを抽出・精製したものをガラスの表面につけておき、蛍光性分子をつけたアクチンフィラメントを載せ、そこにATPをたらずとアクチンフィラメントが運動を始めるという、人工的な運動系です。

これは京都大学の月田先生が撮られた非常にダイナミックな映像です。EB1というタンパク質は、マイクロチュービュルの成長する方の端についているキャップタンパク質に結合しています。ここでは、EB1に、グリーンフルオレッセントプロテインを融合させたものを使っています。ここではEB1しか見えないのですが、これはマイクロチュービュルの先端についていますので、マイクロチュービュルが成長すると、EB1も動くわけです。中心体から多くのマイクロチュービュルが成長していくのがよく分かります。

次の映像は、マイクロチュービュルのチュービュリンの方にGFPを融合させたものです。マイクロチュービュルは、細胞の中にこんなにたくさんネットワークを作っています。ふだんはこのようなものは見えません。端の方でダイナミック・インスタビリティが起こっているのが分かります。

これはカラーで、非常に楽しい映像です。これはハエの細胞で、分裂するところです。

これはDNA、染色体です。青く見えています。緑色がマイクロチュービュルでできた紡錘糸で対の染色体を別々の中心体の方へ引っ張って分裂させています。どうして同期して分裂するのかあまりよく知らないですが、多くの細胞がタイミングを合わせて分裂します。

こうして光学顕微鏡で見る世界というのは、結構楽しい世界です。いろいろな細かい物質は普通の光を使った顕微鏡では見えないので、こういう色々な工夫をしてやると見えるようになるわけです。

これはうちの研究室でやっていることですが、蛍光にもう一工夫加えると、もう少しすごいことができるのです。これが蛍光を照らすための光、これがカバーガラスですが、光がカバーガラス（屈折率の大きいもの）から水（屈折率の小さいもの）へ移りますと、全反射が起こります。全反射というのは、一般には光が全部反射されてしまうと思われているかもしれませんが、実は、光はいったん100nmほど中に入ってから出てきます。100nmというと波長よりも短いわけです。そうすると、ガラス表面から遠いところにある蛍光性分子は真っ暗で見えず、カバーガラスに非常に近づいた分子だけが光って見えるのです。

この実験では、カバーガラスにアクチンフィラメントをつけ、ミオシンVという脳の物質輸送にかかわるタンパク質に蛍光性分子を1分子つけています。蛍光性分子1分子を見ようというのはしんどいわけですが、それでもこのようにぴかっと光って見えます。これは擬似カラーで色をつけてありますが、実際にはこのように見えます。ミオシンV一個一個の分子が、アクチンフィラメントに沿って動きます。ハイウェイを車が走るような感じです。筋肉のミオシンでこのようなことをしても、離れてしまい何も起こりませんが、脳のミオシンVというのは、いったんアクチンにつくと、ずっとついたままで動いていきます。ですから、物質輸送に非常に適した性質を持っているわけです。

次は電子顕微鏡で見る、もっと小さい世界です。電子顕微鏡というのは光の代わりに電子を使うわけですから、光源の代わりに電子銃、ガラスレンズの代わりにマグネットレンズを使う点だけが光学顕微鏡と違って、先程お話しした光学顕微鏡の原理と全く同じことをやっています。ただ、電子線の波長が非常に短いので、細かい世界が見えてくるのです。

どういう細かい世界が見えるかというと、これは心筋細胞です。これが収縮する1ユニットですが、Zバンドから細い線が出ていて、真ん中にミオシンの太い線が見えます。これがミトコンドリアで、ATPを合成しています。こういう、より細かい世界が実体として見えます。

もう少し拡大してみますと、太いフィラメントがよりはっきり見えます。細い線との間を細かいものがたくさん橋かけしていますが、これがミオシン分子一個一個です。そういうものも見えるのです。

もう1つ、電子顕微鏡試料にロータリーシャドウィングという手法でコントラストを付けて、個々の分子を見ることができます。これはミオシン分子です。これは光学顕微鏡では絶対にできません。

今お見せした電子顕微鏡の像の中には、動くものは一つもありませんでした。実はないので。電子顕微鏡で見られるのは乾いた世界ですから、生きたイカをスルメ状態にして見なければいけない。スルメを見てイカを想像しなければいけないという点で、非常に苦しいところなのです。それに加えて、電子線というのはタンパク質のように非常に軽い原子からできているものを通してしまいますので、普通は重金属で染色しなければいけないというやっかいなものです。したがって、生物の動きを電子顕微鏡で楽しむということはできないのです。

ここで、タンパク質についておさらいをしておきましょう。タンパク質というのは、カーボンに水素、COOH（カルボキシル基）、NH₂（アミノ基）、そして側鎖（R）が結合したもので、非常に軽い原子からできています。水素、COOH、NH₂の部分は共通で、側鎖の部分が20種類ありますので、アミノ酸としては20種類あるのです。

まず、一番小さいグリシンというアミノ酸の立体的な像をご紹介します。ここに真ん中のカーボンがあり、ここに2つあるのが側鎖と水素です。グリシンの側鎖は、20種類のうち一番軽い水素です。青いのが窒素、赤いのが酸素で、この部分がNH₂です。今はNH₂がNH₃⁺に、COOHがCOO⁻というかたちになっています。これがグリシンという一番小さいアミノ酸です。

これはリジンというアミノ酸です。この絵ではNH₃になって電荷を持ったかたちになっていますが、先程とそれほど変わりません。これがアスパラギン酸です。アルギニン。グルタミン酸。ヒスチジン。アスパラギン。スレオニン。グルタミン。チロシン。セリン。ロイシン。フェニルアラニン。

システインには、今まで入っていなかった黄色いものが入っていますが、これはイオウ原子です。この部分がSHです。そして、アラニン。イソロイシン。メチオニン。メチオニンもイオウ原子を含んでいます。そして、バリン。プロリンというのは少し変わってまして、ここにリングを作っています。これが中心となるカーボンですが、NH₂が回り込んでいます。これだけが非常に変わっています。これはトリプトファンです。5員環と6員環をもっておりかなり大きいアミノ酸です。

このように、ほとんどは炭素、水素、窒素、酸素という非常に単純な原子からできています。これがNH₂とCOOHの脱水縮合で一次的につながっていくわけです。しかし、つながったからといって、これだけではタンパク質にはなれません。まだ細いひもにすぎないのです。

このように、タンパク質というのはきれいなある一定の立体的な形に折れたたまって、初めて機能を生じます。これはアクチン分子で、大きさは5 nm ぐらいです。それが二重らせんを自動的に形成して、細いフィラメントになるのですが、この自動的に形成するというのが生物のすごいところなのです。

例えば、我々人間に置き換えて考えるとすぐわかるのですが、こういう部品を作るには設計図がいりますし、作り上げた部品から機械を作ろうとすると、製作工程の図画が必要

になります。箱の中に部品を入れて、がちゃがちゃとやると洗濯機が出てくるなどということはありません。それに対して生物の機械というのは、水の中に分子を入れてがちゃがちゃとやると、自動的にできてしまうのです。

タンパク質と一言で言いますが、実は10万種類以上あるわけです。大きさは、数nmから20~30nmと非常に小さい世界です。にもかかわらず、いろいろな機能を持っています。例えば、リボソームというタンパク質は、メッセンジャーRNAの塩基配列に従ってアミノ酸をつなげていきます。シャペロニンも、そうやってできたひもを空孔の中に入れてがちゃがちゃやって、きちんとした構造を持ったタンパク質にしてしまいます。モータータンパク質の場合には、こういうフィラメントの上を走ります。非常に多彩なタンパク質が存在しているわけです。したがって、生命というのは、人間の世界ではまだできていないナノテクノロジーをすでに発明して、実際に使っているのです。

次にタンパク質の動きというのを見たいと思うのですが、これは神経細胞で、細胞体が真ん中にあります。神経細胞というのは、細い線維を次の神経細胞につないでネットワークを組んでいます。必要なタンパクの合成は細胞体の中で行われていますが、端の方でもいろいろな機能をしているわけですから、合成されたタンパク質を運ばなければいけません。このとき、拡散で運ぶのでは能率が悪すぎるので、モータータンパク質を利用して運んでいるのです。つまり、輸送にかかわっているわけです。

これが先程紹介したミオシンVで、タンパク質のいっぱい詰まったカーゴというものを運んでいきます。どういうふうに運んでいくかということは見ることができないので、想像するしかありません。アニメーションの世界でしかないわけです。この絵は人が歩いているところに似すぎているのですが、本当かもしれないし、うそかもしれない。仮説にすぎません。タンパク質のようにナノの世界に入っていくと、我々は想像してアニメーションを作るといって動きを楽しむしかないわけです。

もう少し、タンパク質の動きを想像してアニメーションにした動画をお見せします。これはキネーシンというモータータンパク質の一つで、マイクロチュービュルの上を走ります。キネーシンは物質輸送にもかかわってしまっていて、こういう2つの頭を持っています。ネックリンカーという赤く描いたものが生えていますが、これと青い部分との相互作用が運動するために重要であるという説に基づいて、アニメーションが作られています。

タンパク質の生理作用の分子機構を研究している人は、色々なデータから想像してこういうイメージでいろいろものをとらえるわけです。何かおもちゃのようですが、本当かうそかということは何れもわかりません。このキネーシンはベールさんによって見つけられました。彼が学生のとときです。今は私が以前働いていたカリフォルニア大学サンフランシスコ校の教授です。

今のはキネーシンのアニメーションでしたが、実際にこのキネーシンがものを運ぶ様子というのは、実は、我々はこんなふうにはしか見ることができないのです。これはマイクロチュービュルです。位相差顕微鏡で観察したものです。キネーシンとダイニンというのは

ものを運ぶのですが、互いに反対方向に運ぶのです。そういう機能を細胞が必要としているのです。

次はATP合成酵素の話です。東京工大の吉田先生が、F₁というATP合成酵素の中の一部が回転するというのを、実験によって確認しました。その説は、ボイヤーという人がずいぶん昔に説として出したのですが、だれも証明できませんでした。それを吉田先生が証明して見せたことで、ボイヤー博士がノーベル賞を受賞したといういきさつがあります。これは3年ほど前です。

この絵ですが、ミトコンドリアの中にありますF₁, F₀という2つのユニットがあり、F₀の方は膜の中に埋め込まれています。そこから出たシャフトがF₁の真ん中に来ます。こちらは水素イオン濃度が高く、こちらは低くなっていて、水素イオン濃度の勾配を利用して、このシャフトを回転させ、それによって、このF₁の全部で6個のタンパク質からなるリングの構造を変えるのです。そうすると、この細胞の中にあるADPという2リン酸と無機リン酸をくっつけて、ATPを合成します。逆に、ATP濃度が非常に高くなってプロトン濃度が非常に薄いと、ATPを分解して、これは逆回りに回転するということが想像されています。

時計回りに回っています。F₁でATPを合成している場合です。もっと細かく見ると、このようなひらひらした構造になっています。これは実体に大変近いものです。

シャフトをこう回すのです。こう押して、押されると変形する。そのときにATPを合成しています。

今度は逆回りです。ATPを分解します。上から見ると、反時計回りです。回転を見るために、シャフトに蛍光分子をつけたアクチンフィラメントを付けています。それによってこの回転する運動を見ることに成功したのです。

こういう世界、アニメーションですけれども、回転する仕組みを理解できたかのように感じることができます。

タンパク質の動きは、なぜアニメーションの世界でしか見ることができないのか。それはごくあたりまえのことで、水溶液中のナノメーター世界の動きを見る顕微鏡は、存在しないからです。

原子間力顕微鏡が誕生したのは1986年、今から16年前のことです。スイス、チューリッヒのIBM研究所のビニツヒ博士が発明しました。その顕微鏡は水溶液中のナノメーター世界を見ることのできる唯一の顕微鏡で、つまり、それまでは不可能だったのです。ただし、ビニツヒ博士が発明した原子間力顕微鏡でも、動きを見ることはできませんでした。

これは16年前の写真で、ビニツヒ博士は当時35歳ぐらいです。こちらがローラー博士です。この2人は原子間力顕微鏡の前にトンネル顕微鏡を発明して、ノーベル賞を受賞しています。

どんな顕微鏡なのかということですが、仕組みはとても簡単です。ここに試料を動かすステージがあり、その上に試料が乗っています。これがカンチレバーで、先端のところが

針と柔らかいレバーをつけたものです。上からレーザー光を当てて、このレバーに当たった反射光を見ます。針が試料にぶつかってレバーが上下すると、反射光の角度が変わりますので、それによって、この試料の高さを見るわけです。試料ステージを水平方向に動かしながら、各点の高さを読み取るという、非常に単純な顕微鏡です。ただし、実際に使えるものにしようとするとき、いろいろな修正が必要になってきます。

では、どういう修正が必要かということです。これはただ試料ステージを横に動かしてレバーが上下するのを見るというものですが、これでは、試料が高くなっているところでは針先が試料を押し込んでしまい、逆に、へこんだところでは針先と試料が離れてしまうという問題があります。

そこで、試料が出っ張っているときには試料ステージを下げ、へこんだところに来たら試料ステージを上げて、針と試料にかかる力を一定にしてやるのです。しかし、これでもまだ問題があって、スキャンしている間に針が試料をひっかいてしまう、もしくは、吸着が弱いと、試料がはがれてどこかに行ってしまうかもしれません。

それを改善するために、今度はレバーを振動させながら試料を針でたたきます。試料にぶつかる時、それ以上行けなくなるので、振幅が減少します。その振幅を読むことによって試料の高さを知ることができるのです。この振幅を一定にするように、試料ステージを上下してやります。

2番目と3番目のモードでは、試料ステージの動きというのは、試料の形そのものに沿って動く。試料をなぞっていくわけです。生物の試料は柔らかく、また機能を損なわないために試料を基板に弱く吸着する必要があるため、今は3番目のモード(タッピングモード)が主流です。

実際の装置はこのような構成になっており、周りにいろいろものがないと機能しません。スキャナーが試料ステージを動かす。カンチレバーにレーザー光を当て、反射ビームを2分割フォトダイオードに導きます。2つのフォトダイオード出力の差からレバー上下の動きを知ることができます。このフォトダイオード出力の差を増幅し、振幅値を出すためにRMS-DCコンバーターがあり、その信号に基づいて試料ステージを上下に動かすためにフィードバック回路がある。こういったものが周りにつきます。

カンチレバーというのは、日本語ではなくて「片持ち梁」という意味の英語で、市販されています。長さが約200 μ m、三角形状が普通で、裏側に針がついています。その針を拡大したのがこれですが、通常はピラミッド型をしており、先端は非常に細くなって、先の先は見えないかもしれません。市販品だと先端の半径が約10~15nmです。

原子間力顕微鏡でどれぐらい小さいものが見えるかというのは、試料によって違ってきます。原子レベルの凹凸しかないような平らな試料の場合には、針先の原子1個で試料にさわられるので、原子レベルの解像度、つまり原子が見えるのです。

原子が見えるところをお見せします。小さいのはノイズですが、この大きく見えるのが原子一個一個です。これは2テルルモリブデンという結晶の像です。このように原子一個

一個を見ることができません。

試料の凹凸が大きくなると、例えばへこんでいると、そこには針が触れません。つまり、そこは見えないわけです。かつ、針の側面でも試料にさわってしまうのです。装置の方は、それを針の真ん中でさわっていると認識してしまうので、実際のものよりも横幅が大きく見えてしまうという弱点があります。

高さの解像度は非常に高く、1 nm 以下、オングストロームオーダーです。試料の凹凸が大きい場合でも高さの分解能は非常に正確で1 nm 以下、横方向の分解能は1 ~ 3 nm になります。

これは全部うちの研究室で撮った生物試料の像です。これは筋原線維です。ここにZバンドがあって、そこからアクチンフィラメントが生えています。これはアクチンフィラメントの束で、2重らせんの周期、約35nmが見えています。これはミオシンで、2つの頭があって、しっぽがあります。これは頭の部分を拡大したものです。ATPの結合部位まで見えます。このぐらい解像度が高いということです。

そのほかに、これはバクテリアの膜の表面にある、水分子が通り抜ける穴が見えています。スケールは10nmです。これはバクテリオロドプシンというのですが、光を受けて、水素イオン濃度の勾配を作ります。このスケールバーは2 nm ですから、非常に高い解像度です。これは、RNAポリメラーゼなのですが、白い丸にしか見えていません。ここに見えているのがDNAです。DNAの情報に基づいて、RNAを合成している最中をコマ撮りしたものです。このコマ撮りのスピードは非常に遅くて、60秒おきです。実はもっと速いのですが、たまたまポリメラーゼの活性が低くて、非常にゆっくり合成しているので見えたわけです。

今お話ししましたように、AFMの最大の弱点というのは撮影が非常に遅いということです。1つの映像を撮るのに、分のオーダーがかかります。この弱点が解決されないまま、16年が過ぎていきます。

世界中のAFMの利用者たちは、このように映像が全部出てくるまで、1~2分間待っていないといけないのです。それだけではなく、これがもし動いていたとすれば、像になりません。動きが見えないというのではなくて、動いていたら見えないのです。

そこで、原子間力顕微鏡を速くするには何をしなければいけないかということです。まず、カンチレバーを小さいものに改良する。カンチレバーの振動を読む測定装置を改良する。小さいカンチレバーに対応できる光学系を開発する。そして、試料ステージをX方向とZ方向に動かすわけですが、高速に、しかもナノメートル精度で動かさなければいけない。これはもっとも難しいことです。今までにも、世界のいくつかの研究所で高速化しようという試みはもちろんあったのですが、難しくできなかったのです。一番の難関はここであったと思います。

なぜカンチレバーを改良しなければいけないかという話ですが、タッピングモードというのは、このように針先で試料をたたきます。試料の高さを振幅によって知るわけですが、

1回は振れないと振幅を読めません。つまり、画像の各ピクセル当たり、カンチレバーは最低1回は振動してくれないといけない。つまり、この振動数を f_c とすると、1秒間に f_c 回振動するので、1回振動するのにかかる時間は $1/f_c$ 秒です。この時間で1ピクセルの情報を得るとすると、画素数は $N \times N$ だとして、1映像を撮るのにかかる時間は $2 \times (N^2) / f_c$ です。2というのは1ラインを往復するために現れます。そうすると、 100×100 ピクセルからなる画像を0.08秒で撮ろうとすると、カンチレバーは1秒間に25万回振れなければならないということになるわけです。それも、水という非常に粘性の高い溶媒の中です。これはなかなか大変です。そういうカンチレバーを我々が開発しました。

共振周波数を上げること自体はそれほど難しくありませんが、それで硬くなってしまうと生物試料が壊れてしまいますから、バネ定数は小さくしなければならない。これはバネになっているわけですが、要するに、バネ定数を非常に小さくして、1秒間にたくさん振れるというものを作らなければならないということです。そうすると、計算上、市販品に比べてこれぐらいの大きさのものを作らなければならないことになります。実際にそういうものを作りました。幅が $2 \mu\text{m}$ 、長さが $9 \mu\text{m}$ 、厚さが 140nm 。肉眼ではとても見えません。

残念ながら、針と一緒に作ることができなかったので、針はあとからつけるのですが、ピンセットでつかんで接着剤でつけるなどということはいけません。どういうトリックを使うかという、電子顕微鏡の中で電子線を1点に当てます。そうすると、電子顕微鏡の試料室の中にある混ざったガス分子—ほとんど真空ポンプのオイルのガス分子—が重合します。成長する早さはおおよそ1秒間あたり 5nm で、 $1 \mu\text{m}$ ほど成長させます。先端が大体 $5 \sim 8\text{nm}$ の非常に細い針ができます。

このカンチレバーの水の中での共振周波数は1秒間に45万~65万回ですので、先程の能力は十分クリアしています。バネ定数も小さいものですので、これで1つクリアしました。

今言った条件は、1回の振れで振幅が読めて、それで試料の高さが測れるという話です。何回も振れてからしか読めない回路だと、カンチレバーはもっとたくさん振れてくれないとだめですが、実際にそんなものを作るのは不可能です。したがって、1回の振れですぐに振幅が読める回路でなければならないわけです。振動しているピークごとにぱっとデータをつかんで、その差を出力してやると、振幅が読み取れます。1回でぱっと読み取れる回路を我々は作りました。

次に、カンチレバーが市販品の $1/10 \sim 1/20$ と非常に小さくなったので、光を当てて、その反射光をどこか外に取り出すということはいけません。レンズとカンチレバーが非常に近くなっている。そこで、入射光と反射光を同じレンズでつかまえるという光学系を用意しました。

もう1つ、試料ステージを速く動かさなければいけません。どのぐらい速く動かさなければ

ばいけないかという計算をしてみます。この空間的な周波数を λ とし、これを水平方向に速度 V_s で動かすと、空間周波数 $1/\lambda$ は時間周波数 V_s/λ に変換されます。試料のでこぼこをなぞるためにこの周波数で試料ステージを上下に動かしてやるのです。

そうすると、試料ステージを上下させるフィードバックの速さは、ここで計算される値よりもずっと高くなります。具体的に数値を代入してみますと、フィードバックをかける速さは50kHzになります。これはどうということはないと思うかもしれませんが、機械的にこれを50kHzで動かしても、1nmの振動も起こさないように動かさなければならないというのは、なかなか難しいのです。

速く動かしても振動しない機械を作ることは、とても困難です。速く動かせる機械にするにはどうしたらいいかというと、例えば50kHzで動かそうとすると、機械系の共振周波数はその数倍なければならない。共振というのは皆さんもご存じだと思うのですが、共振周波数に乗ってくると、勝手に大きく振動するのです。音叉を共鳴箱に入れるとウーンとなりますね。周波数に乗ってくると勝手に大きく振動してしまうのが共振という現象ですが、機械的に共振が起こってはいけないのです。

それと、高い剛性も必要ですが、これは理論的に不可能です。これについて説明しますと、質量のあるものを動かすと、例えば鉄砲を撃って玉が飛んでいくと、ピストルは後ろに押されます。ですから、試料ステージを上下に動かすと、反力がかかるのです。どれぐらいかということ計算してみます。1gのものを10nm、50kHzで振動させると、反力の大きさは最大で1N。つまり、100gの物体にかかる重量の大きさになりますが、100gをぼーんとやって1nmも動かないという剛性は、とても不可能です。つまり、高速原子間力顕微鏡を実現するスキャナーを作ることは不可能ということになります。

これはそれほど突飛なアイデアではないと思いますが、これが上下に伸び縮みするときに、それと反対側にも同じピエゾを付けて、それと同じ距離だけ同時に反対向きに動かします。すると反力が中和されます。従ってこの工夫により、剛性はそれほど高くなくてもなんとかなる。あと、共振周波数が低いわけで、勝手に振れてしまうのは明らかなのですが、無理やり強い力で押さえ込んでいます。共振はしたのだけれども、無理やり押さえ込んで揺れないようにした。そういう単純なアイデアです。

それを装置として組み上げたものがこの絵ですが、これは一見普通の光学顕微鏡のように見えます。これは光学顕微鏡です。そこに原子間力顕微鏡を載せているのです。一枚の板にすべての部品を載せるか吊り下げています。光学顕微鏡は図体が大きく共振周波数はかなり低くなります。それ故、絶えず大きく揺れていますが、すべての部品が同時に揺れているので、それらの間の距離は一定に保たれています。

こうやって作った装置で、 100×100 、つまり1万点の画素数のある画像ですと80msec(0.08秒)で、 50×50 に画素数を減らしてやると0.02秒で撮れます。テレビの映像の速さはどれぐらいかというと、1画面で33msecです。ですから、ほとんどビデオ映像に近い映像がこの装置で撮れます。

これはミオシンVの映像です。我々が最初に撮ったタンパク質の動く映像です。これは今、ATPが入っていませんが、ここにATPを入れました。そうすると、しっぽが動いてスイングしたように見えます。この試料にはアクチンはないので、ATPの分解速度が非常に遅いのです。1個分解するのに何十秒もかかるので、その間、この映像をずっと撮り続けるというのは大変しんどくて、まだできていません。ATPによる変化を捉えるにはもう一工夫必要です。

従来の原子間力顕微鏡では、こういうスピードで撮っています。1ライン絵を描いている間に、高速原子間力顕微鏡では10コマの映像を撮っています。つまり、1000倍速いのです。

これはご存じかもしれませんが、私よりも説得力のある話し方ですので、ご紹介します。

ニュースビデオ（1分30秒）

このようにして装置ができたわけです。20世紀には、タンパク質の動きを見ることはできませんでしたし、想像したものを表現する手段としてはアニメーションしかありませんでした。しかし、ようやくその実体をとらえることのできる時代に突入したのではないかと思います。

これは先程から何回も出てきましたミオシンですが、ミオシンがどうやってアクチンを引っ張るかというのをアニメーションにしたものです。

（2分）

ここに我々の撮った映像が紹介されています。先程からずっとお見せしている映像なのですが、実は『Molecular Biology of the Cell』という、世界的に広まっている教科書があります。その第4版が今年出たばかりなのですが、CD-ROMの付録が付いていて、それでいろいろな映像を楽しむことができるので、それを勝手に利用させていただいたのです。

手に取るように分子の動きを見ることによって、タンパク質の働く仕組みの理解は格段に進むでしょう。21世紀になって、我々はこういうことが可能になったわけですので、高速原子間力顕微鏡がこれから切り開くであろう新しい生命科学に期待したいと思います。

最後に、この研究に協力していただいた方々を紹介します。斉藤究助手、院生の丸山君、古寺君、高井君、伊藤君。恒川さんと向井さんには工作室で金属加工をいろいろやっていただきました。オリンパスの戸田さんとは、カンチレバーの開発を共同してやってきました。以上です（拍手）。

質疑応答

(質問者1) カンチレバーの材質は。

(安藤) まず密度が小さくて、かつ硬いということです。そういう材質というのはあまりないのですが、ガラスやアルミニウムが一番いいのです。この場合は、窒化シリコンというガラスを使っています。アルミも大体同じぐらいの密度と硬さなのですが、加工がやっかいで、酸化したりということがあります。

(質問者1) 非常に素人的な発想なのですが、1本のカンチレバーでスキャンしていくよりも複数でやった方が速いのではないかと思うのですが。

(安藤) それはすばらしいアイデアで、実は、ビニツヒ博士らとともに原子間力顕微鏡を開発したスタンフォード大学のクエートさんは、それをやっています。ただし、その対象は半導体などで、広い範囲をイメージングする必要があります。そのアイデアを生物系にも利用できなくはないのです。

(質問者2) 細胞膜の状態とかイオンチャンネルを研究しているものですが、それを実際にAFMで見るとしたら、試料はどの程度まで調整されているとか、その辺の状況は？ただ細胞を持って行って、特定の分子を見るというのはどうなのでしょう。

(安藤) 細胞の硬さを見るのは、わりと簡単です。押し込んだ距離に対して、カンチレバーがどれぐらいたわんだか見るのです。硬ければ押し込んだ距離だけたわみますし、柔らかいと、押し込んでもぐっといってしまうのでたわまないのです。それを一点一点見て、細胞の硬さ分布を測定するというのは、実際にやられています。

細胞をただ持ってくればいいのかということですが、ただ持ってくればいいと思います。

(質問者2) ただ、何百種類というタンパク質があると思うので、この分子だというのは。

(安藤) 形だけではなくて、化学的にタンパク質を識別しないといけません。例えば、同じ丸い分子でも、これがAというタンパク質、これはBというふうに分けなければいけない。それは難しいですが可能でしょうね。

例えば、Aというタンパク質につくような基質分子を針先につけてやると、Aには吸着して、Bには吸着しない。吸着するとカンチレバーのレスポンスが変わりますので、その違いによってAという分子がここにあるということはわかると思います。

(質問者2) 具体的には抗体などでも。

(安藤) そうです。

(質問者3) たくさんあるタンパク質の中でミオシンを選ばれるまでの道程を簡単にお伺いしたいのですが。今日のお話で私が非常におもしろいと思ったのは、マイクロチュービュルのダイナミック・インスタビリティなのですが、ああいうものを高速原子間力顕微鏡で追うようなことはお考えになっているのでしょうか。

(安藤) この研究を発表したあと、反響をいただいて、多くの観察依頼があったのですが、今は装置が1台しかないので、手を広げられないのです。今、マイクロチュービュルやダイニンを研究されている東京大学の豊島陽子さんと一緒に、マイクロチュービュルに沿ったキネーシンの運動、アクチンフィラメントに沿ったミオシンVの運動をとらえようとしています。

ポリメリゼーションとか脱重合という現象も、結構見やすい現象です。それは1つのタンパク質系で実験できることと、溶液中に適当にフリーのものを浮かせておくこともできる。あと、2つのタンパク質、例えば我々が今やっているようなアクチンとミオシンの相互作用や、マイクロチュービュルキネーシンの観察でやっかいなのは、1つのタンパク質は基板に固定して、もう一方は自由にしておきたい。両方ともついてしまうと、何も見えなくなってしまいます。そういう苦労があります。それに対して、マイクロチュービュルの重合というのは、わりと処理が簡単です。2つに対して違う処理をする必要はないのです。

アクチンの重合とか、マイクロチュービュルのダイナミック・インスタビリティというのは、見るにはわりと見やすいかなと。ただ、そこから得られる情報が、蛍光で見たときの情報とそれほど違わないかもしれない。細かいことまでわからないかもしれないのです。蛍光で見た方が早いのではないかとと言われてしまうと、この原子間力顕微鏡を生かせる道がないのですが。

(質問者3) 見せていただいた映像の中にスケールが入っていましたが、ナノメートルオーダーのスケールというのは、どういうものを基準にして決めているのですか。

(安藤) 今、そういう標準試料が売られています。もちろんナノメートルオーダーではなくて100nm, 200nmですが、それを基準にしてスケールを決めています。

もう1つ簡単な方法は、大きさのそろったビーズが売られているのです。100nmとか、きちんとそろっている。それを基板に蜜につけて見る。大きさそのものは針の太さの影響を受けますが、その周期は、針が太くても細くても同じです。それでスケールの補正がで

きるのです。