

# Development of high-speed atomic force microscope combined with single-molecular fluorescence microscope

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: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/45431">http://hdl.handle.net/2297/45431</a>

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



# 高速原子間力/一分子蛍光顕微鏡複合機 の開発

Development of high-speed atomic force microscope  
combined with single-molecular fluorescence microscope

福田 真悟

## 英文要旨

Since the realization of high speed atomic force microscope (HS-AFM) around 2008, HS-AFM is a routinely tool to investigate biological macromolecular ranging from purified protein to live cells, which facilitates our understanding of how biological molecular work and function. Now the next generation type of HS-AFM is being desired, which can gain multiple information inaccessible only with HS-AFM. AFM is a label free technique which works non-specifically and has a drawback for the complex system involved multiple molecules, that is difficult to identify the target molecular. On the other hand, optical microscope can give this specificity by fluorescence labelling. Moreover it is capable of imaging of small molecular such as nucleotide which cannot be observed in AFM. So, optical microscope is not only complementary for HS-AFM, but combined system of HS-AFM and optical microscope would be a more powerful and innovative tool for biological science. To combine HS-AFM with optical microscope, high speed scanner with mechanical holding method for cantilever chip and laser beam tracking device for cantilever movement, compact and rigid HS-AFM head were developed. The excellent performance of combined system of HS-AFM/optical microscope developed here is demonstrated by imaging of rotor-less  $F_1$ -ATPase ( $\alpha_3\beta_3$  complex) with high spatiotemporal resolution, and simultaneous topographic / fluorescence imaging of Cy3-labelled *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase (*TrCel7A*) moving on cellulose.

## 和文要旨

2008年に実用レベルの高速原子間力顕微鏡(AFM)が誕生して以来、高速 AFM は精製単離されたタンパク質から生細胞まで様々な生体分子に適応され、分子の構造ダイナミクスを明らかにしてきた。高速 AFM は市販化もされ、生命科学における常用的な装置となりつつあるなかで、高速 AFM をより多機能に、より多様な試料系に適用するために別の顕微鏡技術と組み合わせた次世代型の高速 AFM の開発が望まれている。そのひとつが光学顕微鏡との複合化である。AFM は探針と基板表面にある試料の相互作用を検出し画像化するので、基板にあるすべてのものが観察される。そのため、複数種の分子が混在する系において観察している分子が目的の分子かどうか判断することが難しい。一方、光学顕微鏡法では任意の分子を蛍光染色することで、目的の分子のみを可視化することができる。また、AFM では観察することのできないヌクレオチドなどの低分子化合物を可視化することも可能である。よって、高速 AFM と光学顕微鏡の複合化は高速 AFM の弱点を補うばかりではなく、高速 AFM の適用範囲を飛躍的に拡張し、両手法から得られる多元的な情報から生体分子の作動機構に関する新たな知見が得られると期待される。

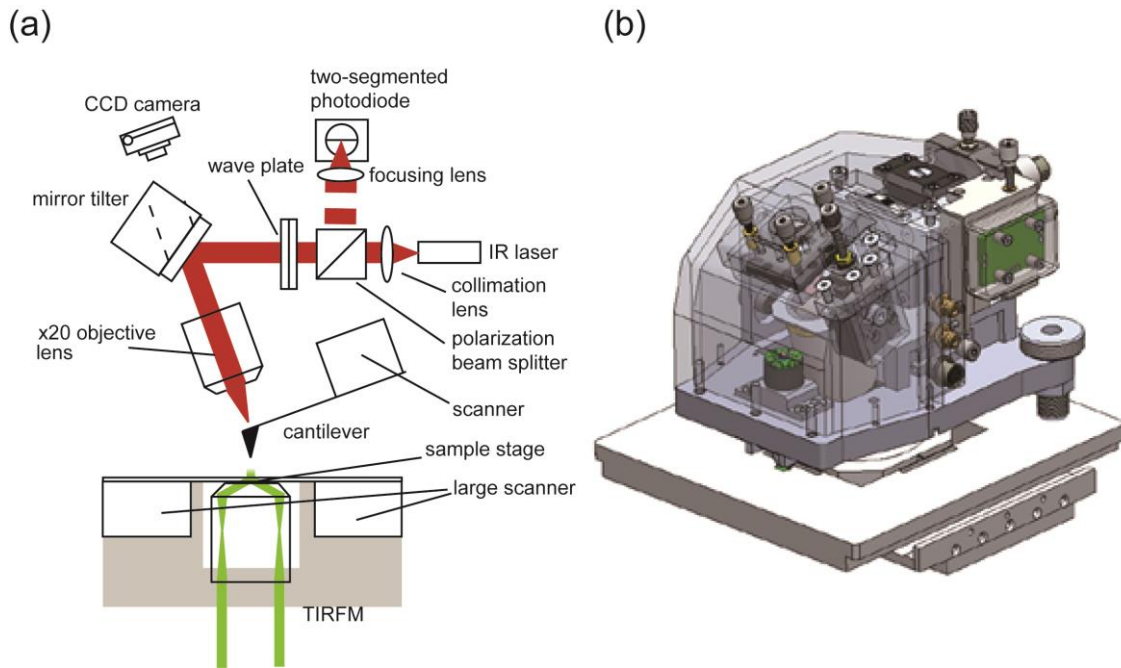


図.1 プローブ走査型高速 AFM

(a) プローブ走査高速 AFM の光学系。すべての光学部品を顕微鏡上部に配置し、倒立型の光学顕微鏡と組み合わせることができる。(b) 製作した高速 AFM ヘッドの 3D モデル。

従来の高速 AFM の機構を見直し、光学顕微鏡と複合化可能なプローブ走査型高速 AFM (図 1)の開発を行った。具体的には、機械的なカンチレバー固定法を有する高共振周波数のスキャナーやカンチレバーの動きを正確に追従できるレーザートラッキング法、コンパクトな光でこの光学系の開発を行った。開発したプローブ走査型高速 AFM を用いて、ミオシン V のアクチンフィラメント上における歩行運動、回転子のない  $F_1$ -ATPase( $\alpha_3\beta_3$  複合体) において、ATP 加水分解反応に伴い  $\beta$  サブユニットが協同的に構造変化をおこす様子 (図 2) の観察に成功し、プローブ走査型高速 AFM が生体分子の機能を乱すことなくタンパク質の構造変化を可視化できることを実証した。

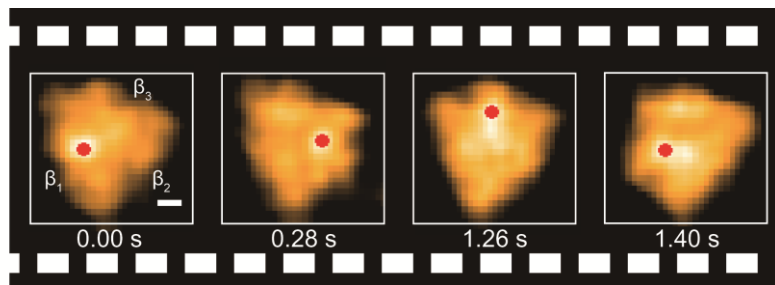


図 2.  $\alpha_3\beta_3$  複合体の高速 AFM 像

画像上の赤い丸は各画像の最も高いピクセルを示し、開構造をとっている  $\beta$  サブユニットを表す。フレームレートは 7.14 frames/sec (fps) 。スケールバーは 2 nm を表す。

プローブ走査型高速 AFM を光学顕微鏡に組み込み、タンパク質一分子を対象として高速 AFM / 蛍光顕微鏡観察を行ったが、観察視野の大きさ、および空間分解能の違いから高速 AFM で観察された分子を蛍光顕微鏡画像上で正確に特定することが難しかった。そこで、高速 AFM と蛍光顕微鏡画像を正確に関連づけすることができる電場増強高速 AFM 蛍光顕微鏡相関法の開発を行った。AFM プローブを金属修飾することで探針近傍の蛍光を増強し、蛍光顕微鏡画像上で AFM の観察領域を容易に特定できるようになった。この手法を用いて、蛍光ラベルしたセルロース分解酵素(*TrCel7A*)がセルロース結晶上を加水分解しながら移動していく様子を高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時観察することに成功した(図 3)。また、光の回折限界を超える空間分解能を有する走査型近接場顕微鏡をプローブ走査型高速 AFM に組み込み、高速 AFM / 超解像光学顕微鏡複合機の開発を行った。レーザー光が探針先端と最もよく相互作用するように光学顕微鏡の光学系を構築し、探針の金属修飾方法を検討した。その結果、時間分解能 3.6 秒で光の回折限界を大きく上回る 87 nm の空間分解能を達成する超解像光学イメージングに成功した。

今後、本研究で開発した顕微鏡および手法が生体分子の構造動態を解析する主要なツールとなることが期待される。

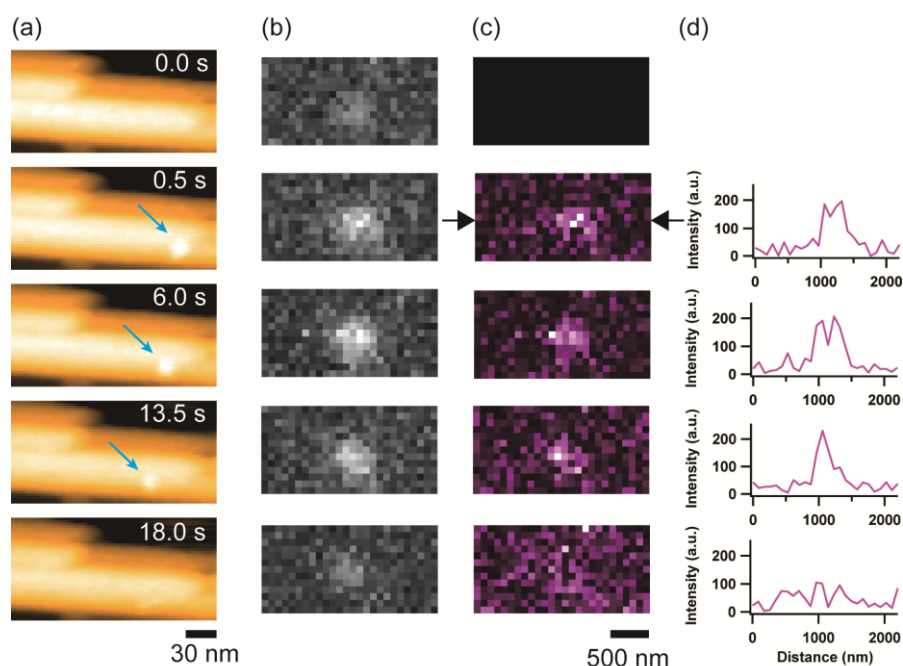


図 3. 高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察

(a) 高速 AFM 像。TrCel7A を青矢印で示す。(b) 蛍光顕微鏡像。(c) 各蛍光像を 0.0 s の蛍光像から差分して作成した差分蛍光像。(d) 蛍光差分像の矢印で示した部分のラインプロファイル。フレームレートは 2 fps であった。高速 AFM と蛍光顕微鏡像の相関は 36 フレームの間、継続した。

## 学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

高速原子間力/一分子蛍光顕微鏡複合機の開発

2. 論文提出者 (1) 所 属 数物科学 専攻

(2) 氏 名 福田 真悟

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

高速 AFM は生体分子のダイナミクスを高い時空間分解能で可視化できる強力な装置であり、これまで様々なタンパク質の機能発現の分子メカニズムを明らかにしてきた。高速 AFM が生命科学における常用的な装置になりつつある中で、高速 AFM をより多機能に、より多様な試料系に適用するための次世代型高速 AFM の開発が望まれてきた。福田君は、高速 AFM の多機能化に向けて一分子蛍光顕微鏡と高速 AFM の複合化装置の開発に取り組んだ。倒立型蛍光顕微鏡に搭載可能なプローブ走査型高速 AFM の製作を目指して、レーザートラッキング技術、カンチレバーの機械固定法などの要素技術を開発した。結果、蛍光標識タンパク質の動態と蛍光軌跡を同時取得することに成功した。一方、高速 AFM と蛍光顕微鏡の観察視野は 10 倍以上異なるために、両手法で得られた画像の位置相関を決定することが困難であった。この問題を克服するために、金属コートティップによる電場増強効果を利用した蛍光強度の増大に取り組み、蛍光強度を 2 倍程度増幅することに成功し、高速 AFM 像と蛍光顕微鏡像の観察位置を容易に決定出来るようになった。さらに、局在表面プラズモン共鳴を利用した超解像蛍光顕微鏡の開発にも取り組み、従来の蛍光顕微鏡の空間分解能を大幅に上回る約 50nm の分解能で蛍光ビーズを画像化することにも成功した。高速 AFM/一分子蛍光顕微鏡複合機は、多くの応用が期待され高速 AFM の多機能化の大きな一歩となることから、これらの成果は博士（理学）の学位に値するものと判断した。

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格  
(2) 授与学位 博士(理学)