1PA013

生きた細胞のAFM弾性マッピングと細胞骨格の免疫蛍光観察
○芳賀 永、佐々木 茂雄、川端 和重、伊藤 悦朗、牛木 辰男¹、
三本木 孝 (北大・院・理、¹新潟大・医)

細胞の運動や形態変化は、細胞を構成する骨格、膜、生体分子など多くの構成要素が複雑に関係しあって生じるマクロな協調現象であるため、全体としての振舞いを個々の構成要素の振舞いから予想することが困難な現象である。我々は、個々の要素にはとられず、細胞を1つの『非線形非平衡システム』としてとらえ、各部分の局所的な力学量の関係から細胞の運動や形態変化を理解する立場で研究を進めている。

本研究の目的は、生きた細胞の局所的な弾性マップを原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて測定し、細胞の形態と弾性分布との関係を明らかにすることである。今回は、生きたマウス繊維芽細胞 (NIH3T3) の弾性マップを測定し、測定時の細胞骨格 (アクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメント) の分布を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いて免疫蛍光観察を行った。細胞の弾性分布と細胞骨格の分布を比較した結果、以下の事が明らかとなった。

- 1) 弾性マップに見られる堅い繊維状の構造は、アクチンフィラメントからなるストレスファイバーに対応している。
- 2) 細胞体の核付近は、その周辺部に比べて約 10 倍柔らかい。
- 3) 細胞の弾性は、アクチンフィラメントだけでは説明できない。微小管や中間径フィラメントなども考慮する必要がある。

本年会では、cytochalasinB や colchicine などを使ってそれぞれの細胞骨格を選択的に分解した場合の弾性分布についてもあわせて報告する予定である。

H. Haga, S. Sasaki, K. Kawabata, E. Ito, T. Ushiki, T. Sambongi: Elasticity Mapping of Living Cells by AFM and Immunofluorescence Observation of Cytoskeleton.

1PA015

金基板上に吸着させたタンパク質の
AFMによる粘弾性測定研究
○三井圭太、荒川秀雄、+中嶋 健、+原 正彦、猪飼 篤
(東工大・生命理工、+理研・フロンティア)

近年、走査型プローブ顕微鏡が単に顕微鏡としてだけではなく、ナノレベルの物性測定的手段となり、非常に局所的な物理的・化学的な性質を直接的にとらえることが可能となってきた。これにより、分子の集団の平均的な状態を問わずに、直接1分子の状態を測定する道が開けてきている。一方、タンパク質のfoldingとunfoldingへの道筋が複数あるであろう事や分子ごとに違う道筋をたどる可能性がある事を考えると、タンパク質のfolding-unfoldingの詳細を知るためには、各1分子について解析していく必要があり、以前より我々は原子間力顕微鏡を用いて、1分子のタンパク質の延伸に伴う物性を測定してきた。基板と原子間力顕微鏡 (AFM) の探針の間に分子を挟みこむように固定する必要性から、我々が以前から用いていた、金とSH基の強い吸着力を利用してこの測定を実現している。基板として金の単結晶面を使う事で、常に一樣かつ原子レベルで平坦な表面を用意し、試料であるタンパク質には遺伝子工学的にSH基を導入している。この方法で再現性の高いフォースカーブが得られることを昨年の年会で報告した。最近では、理論面からもタンパク質を含む高分子との関連から、ナノレベルの粘弾性の測定が求められている。今回、この目的のためにAFMのピエゾコントローラーとその制御ソフトを用意し、特にマクロな粘弾性測定と同様な正弦波の入力を可能にした。この測定中、ある適当な伸長距離において、一見分子のストレスに対する応答が180度位相がずれて測定されるという古典的な粘弾性理論では説明のつかない挙動が観察された。発表当日はこの理論的解釈についても触れる予定である。

K. Mitsui, H. Arakawa, K. Nakajima, M. Hara, A. Ikai : AFM Rheology study of protein adsorbed on gold surface

1PA014

AFM Force Modulation 法による生きた細胞の粘弾性測定
○永山 昌史、芳賀 永、川端 和重、伊藤 悦朗、三本木 孝
(北大・院・理)

我々は、生きた細胞のマクロな運動を解明するために、力学量である粘弾性の時空間的な分布に注目し、運動との関係を調べている。AFMによるForce Modulation法[1]は、試料の弾性だけでなく粘性についての情報も得られるので、細胞のような粘弾性体を測定する上で非常に有効な手段である。

しかし今までは、得られた粘弾性分布に対し、いくつかの問題点が残されていた。例えば、弾性や粘性の大小関係が明らかに反転している場合や、両者が全く同じ分布を示す場合があった。これらは、Force Modulation法によって得られた振幅と位相に関するデータが、試料本来の粘性・弾性にうまく分離できていないことによるものである。

今回我々は、Force Modulation法に対し、以下の改良を加えた。

- ① 振幅と位相の原点に関する不定性を取り除くため、ガラス基盤を基準とし全てのデータを相対値として取り扱った。
- ② 装置の機械的共振による影響と溶液の粘性による影響が無視できるように、加振周波数を極力下げ、適切な堅さのカンチレバーを用いた。

生きた繊維芽細胞 (NIH3T3-3) の粘弾性分布を、これらの改良したForce Modulation法を用いて測定した結果、定性的な弾性分布と粘性分布を得ることに成功した。両者を比較すると、2つは独立した異なる分布を示している。このことは、試料の粘性と弾性をうまく分離できていることを示唆している。さらに、弾性分布についてはForce Mapping法による定量的な弾性率分布と対応することを確認した。これにより、得られた結果の定量性についても議論できると考えている。年会では、粘性分布についての議論も併せて報告する予定である。

[1] M. Radmacher, *et al.*: Biophys. J. **64** (1993) 735.

M. Nagayama, H. Haga, K. Kawabata, E. Ito, T. Sambongi : Imaging Viscoelasticity of Living Cells using Force Modulation Mode in AFM

1PA016

Mechanical Stretching of Carbonic Anhydrase B by Atomic Force Microscopy
○Tong Wang, Atsushi Ikai (Faculty of Bioscience, Tokyo Inst. of Technology)

Atomic Force Microscopy (AFM) was used to mechanically unfold and refold the globular protein, carbonic anhydrase B (CAB). For this purpose, the protein was engineered to endow it with -SH groups at its N- and C- termini and was fixed to the silanized surface of a silicon wafer using a long cross-linker, containing PEG, to avoid any physical absorption of protein to the surface. A silicon nitride tip of AFM was modified with a reactive end to -SH and was brought into contact with the protein on the silicon surface. Subsequent force curve measurements showed occasional stable bond formation, and the force-extension relationship obtained from such curves showed distinct characteristics for the native, denatured and intermediate forms of CAB. The native CAB was hard to be unfolded to its full extension before the covalent cross-link was broken, probably due to the presence of a "knot" structure close to its C-terminus. After exposure to 2M GdmCl, a residual core structure was sometimes encountered, in agreement with a study using fluorescence and NMR spectroscopy. After the breakdown of this core structure, the entire molecule could be extended as a random coil close to its full length. When piezo movement distance was limited, CAB was unfolded to a certain length and was refolded back. During this process, we occasionally could observe curves different from random coil stretching, probably representing formation of intermediate forms.