3G1030

高速AFMの開発：生体分子のリアルタイム観察にむけて

○古寺 哲幸、矢田部 桂、伊藤 啓浩、内藤 康行、安藤 敏夫
(金沢大院・理・物理)

原子間力顕微鏡 (AFM) は、液中における高分解能観察を特徴とし、生きた生体分子のナノメーター世界を観察することを可能にする唯一の顕微鏡である。しかしその走査速度は、生体分子の起こす現象に比べ非常に遅く、1 画像を得るの分オーダーの時間を要してしまう。そのため、AFM で得られる画像は静止画のみであり、生体分子の機能動態の記述に必要な情報を得ることはできなかった。そこで、我々は AFM に含まれる諸デバイスを大幅に改良することにより走査速度を飛躍的に向上させた高速 AFM の開発にこの数年間取り組んできた。前年度までの改良で、80ms/frame の画像取得レートを持った AFM を実現し、水溶液中においてマイカ表面に緩やかに固定された Myosin V 分子が動く様子を動画像として捉えることに成功した。

動態観察可能な試料系を拡大するためには更なる高速化が要求されると同時に機械的振動を更に抑制する必要がある。ところで、アクチンフィラメントや微小管といった弱い構造を持った試料を観察した場合、探針 - 試料間に生ずる大きな力により試料が走査中に壊されてしまう。このことは、生体分子の機能動態を捉えるべく開発された高速 AFM にとって致命的な問題である。一方、同一分子を観察しながら瞬時に溶液の組成を変えることができれば、得られた画像から溶質が分子に与える影響を直接示すことができる。そのためには観察中に溶液条件を操作できる改良が必要である。

上記の問題解決のために現在、(1) 更なる高速・安定化、(2) 探針 - 試料間の力の軽減、(3) Caged 化合物を用いた溶液条件を操作できる実験系の開発、を進めている。本講演では、高速 AFM で得られた画像を紹介しながらそれぞれの進行状況を報告したい。

N.Kodera, K.Yatabe, T.Ito, Y.Naito, and T.Ando : The development of a high-speed atomic force microscope for real-time observation of biological molecules.

3G1100

フリーズフラクチャー・エッチング法のクライオ原子間力顕微鏡への適用

○山本 大輔、谷 孝二、五藤 俊明、神山 勉 (名大院・理・物理)

フリーズフラクチャー・エッチング法は電子顕微鏡での生体膜試料の観察に一般的に用いられる手法である。凍結した試料を割断し、割断面の氷を昇華させる事で生体膜や膜たんぱく質を表面構造として観察する事ができる。我々は、この手法を窒素ガス雰囲気中、 -140°C 以下の低温で生体試料を観察する事ができるクライオ原子間力顕微鏡に適用してきた。電子顕微鏡で凍結試料のフラクチャー面を観察するためには試料表面を金属でコートしてレプリカを作成する必要があるが、レプリカを作成すると同一試料表面の経時変化を観察する事ができなくなる。クライオ原子間力顕微鏡ではレプリカを作成する必要が無く、表面を直接観察できるため、エッチング法によって試料表面の構造が変化する前後を比較する事ができる。我々はこれまでの実験で、生体膜試料は低温において探針との相互作用による変形が少なくなる事、試料表面に付着した氷がエッチング法によって窒素ガス雰囲気中で昇華する事を明らかにしてきた。これらの事により、低温においてより高分解能で生体膜試料の表面構造が観察できる事、また、大気圧のガス中でもフラクチャー面のエッチングが可能である事が示唆された。今回は、試料に大腸菌の懸濁液を用い、液体プロパンで凍結した試料表面のエッチングを試みた。エッチング法によって試料表面の氷を昇華させることで、氷包埋された大腸菌が試料表面に浮き出てくる様子を観察する事ができたので報告する。

D. Yamamoto, K. Tani, T. Gotoh and T. Kouyama : Cryogenic atomic force microscope equipped with a freeze-fracture and etching apparatus

3G1045

周波数フィードバックでの液中 AFM イメージング

○関口 博史、岡嶋 孝治、荒川 秀雄、猪飼 篤 (東工大・生命理工・分子生命科学)

原子間力顕微鏡は、染色や固定などの特殊な処理をすることなく高解像度の画像が得られ、また溶液中での観察が可能のため、DNA やタンパク質、細胞といった生体試料の観察に広く利用されている。しかし、溶液中での観察は空気中での観察よりも難しく、高解像度でのイメージングには試料の固定や二次元結晶化が必要となることが多い。この原因の一つは、探針走査の力が試料にとって大きいために、試料に変形あるいは損傷が起きているためだと考えられる。

そこで我々は、より弱い力での走査を目的とし、カンチレバーの共鳴周波数の変化から力を検出する方法の液中 AFM への適用を試みた。具体的には、カンチレバーを自動発振させ、その発振周波数の変化をフィードバックして画像を得る系を作成、適用している。この方法は、従来の固定周波数で励振させ振幅の変化で力を検出する方法より、遠距離から応答し、また敏感であった、この方法により 100pN 以下の微弱な力での液中イメージングが可能となり、従来の方法ではおしつぶされて見えていた繊維状タンパク質 (assembled tau protein) が、変形を最小限に抑えた状態で画像化できた。本発表では、液中タンパク質イメージングについて、本方法と従来の方法とを比較し、議論する。

H. Sekiguchi, T. Okajima, H. Arakawa and A. Ikai : Frequency Feedback AFM Imaging in Liquid

3G1115

光コヒーレンス断層法 (OCT) によるラット脳微小血管及び神経組織の 3 次元画像計測

○里村 泰光^{1,2}、関 淳二²、大井 康浩³、精山 明敏¹、柳田 敏雄¹ (¹ 阪大院・医学系・情報生理、² 国立循環器病センター 研究所生体工学部、³ 阪大・歯学部・顎口腔病態制御)

光コヒーレンス断層法 (OCT) は、強い光散乱性を示す生体組織に対して 10 ミクロン程度の空間分解能で数 mm の深さまでの断層像を得ることができる手法である。本方法はこれまで、眼底や腸管など少数の部位における組織構築の観察にのみ利用されていたが、脳皮質は厚さが 2~3 mm と本手法が適用可能な範囲にあり、光学顕微鏡では得ることの出来ない微小血管や神経細胞の三次元構築を in vivo に観察できる可能性がある。そこで本研究では、光コヒーレンス断層法を用いた微小血管や神経細胞の三次元構築を in vivo に解析可能なシステムの開発を目指している。今回我々は、光源に波長 813 nm および 940 nm の 2 種類の SLD を選択的に用いることの出来る装置を開発し、ラット脳皮質において組織および微小血管の 3 次元構築の計測を行い本システムの有効性を探った。その結果、波長 813 及び 940 nm において深さ方向分解能が 16, 6.3 μm であること、測定可能深度が 0.7-1 mm であることを確認した。ラット脳切片を用いた in vitro 計測から、各波長でのラット脳皮質の屈折率が 1.4-1.5 であること、白質 (有髄神経線維) は非常に強い散乱特性を示すことが明らかとなった。また、in vivo 計測では脳表から 100-200 μm に線状に繋がった散乱体が存在すること、微小血管内腔及び下部は信号強度が低下すること、更に脳軟膜血管の断層像では血管の走行が硬膜の有無で異なること等が観察された。

Y.Satomura, J.Seki, Y.Ooi, A.Seiyama and T.Yanagida : 3-D OCT imaging for microvessels and nervous tissue of rat brain