B369

高速 AFM による単頭ダイニンの動態撮影

○内藤 康行¹、榎原 斉²、大岩 和弘²、安藤 敏夫¹ (¹ 金沢大院・自然科学、² 通総研・関西・生体物性)

原子間力顕微鏡 (AFM) は、液中での高分解能観察を可能とし、生きた生体分子を 1 分子レベルで観察することができる。我々は高速 AFM を開発し、2001 年に最高 80 msec/frame を実現させ、今なお改良に取り組んでいる。この高速 AFM を用いて、タンパク質の構造変化を捉えることを目指している。

微小管と相互作用して運動する「キネシン」・「双頭ダイニン」を観察したことを我々は以前に報告した。この観察ではキネシン・ダイニンのステップサイズや構造変化を解像するには到らなかった。その理由は、(1) 運動を追跡するには広い範囲を走査する必要があり、広い範囲の走査には時間がかかってしまう、(2) 広い範囲であるために 1 ピクセルあたりに高い解像度を得られない、ためであった。高速走査を試みたが、走査範囲を狭めねばならず、それ故運動の瞬間を捉えられる確率は低くなり未だ成功には到っていない。そこで単純な系であるモータータンパク質のみを観察することにした。試料として、大岩氏 (通総研・関西) らによって精製された「単頭ダイニン」を用いることにした。単頭ダイニンの ATPase サイクル中の構造変化は、大岩氏らにより電子顕微鏡で観察されている (Nature 421, 715(2003))。我々は高速 AFM で単頭ダイニンを観察することにより、動的な変化を捉えることを目指している。

水溶液中で単頭ダイニンをマイカ上に吸着させ連続撮影をし、Head 部・Stalk 部・Stem 部を解像することができた。一部には Stalk 部・Stem 部がブラウン運動しているものも観察された。現在、ATPase 反応による構造変化とブラウン運動を区別するために、Caged ATP と UV レーザーを用いた実験を行っている。本年度では、これらの実験結果を報告したい。

Y.Naito, H.Sakakibara, K.Oiwa, T.Ando : Imaging single dynein molecules using a high-speed atomic force microscope (AFM)

B371

高速 AFM による FtsH 2 次元結晶 のイメージング

○又多 恵子¹、安藤 敏夫¹、小椋 光² (¹ 金沢大院・理・物理、² 熊本大学発生病学研究センター)

大腸菌の FtsH は最初に発見された AAA プロテアーゼで、大腸菌 ATP 依存性プロテアーゼのなかで FtsH は唯一の膜タンパク質であり、内在性膜タンパク質の分解にかかわるという特徴をもっている。また、FtsH はホモオリゴマーを形成していることはわかっているが、何量体であるかは正確にはわかっていない (Shotland et al., Molecular Microbiology, 1997, 24, 1303-1310)。

本研究では、当研究室で開発した高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて、FtsH と他のタンパク質との相互作用を捉えることを目標としている。FtsH は非常に小さな (直径 6~7nm) タンパク質であるので、これを安定にすることができ、かつ解像度のよい画像が得られると期待できる 2 次元結晶を作成した。高速 AFM で得られた 2 次元結晶の画像を交えて、FtsH の構造について議論したい。

K.Matada, T.Ando, T.Ogura : Imaging FtsH 2D crystal using high-speed AFM.

B370

高速 AFM の改良

○古寺 哲幸、内藤 康行、宮城 篤、安藤 敏夫 (金沢大院・自然科学)

我々は、機能するタンパク質の構造形態のナノダイナミクス情報を捉えるべく、原子間力顕微鏡 (AFM) の走査速度を飛躍的に向上させた高速 AFM の開発に取り組み、液中に在るタンパク質分子が動く様子を 80ms/frame の映像として観察することに成功している。(T. Ando et al., PNAS 98, 12468 (2001))。今回、この高速 AFM の性能を更に向上させるために、以下の 4 つの改良に取り組んだ。[1] 探針-試料間の力の軽減: アクチンや微小管が連続イメージングの最中に破壊されていく様子が観察された。そこで、探針-試料間に働く力の軽減に取り組んだ (走査速度を制限するカンチレバーの Q-control は用いない)。[2] 構造形態変化とブラウン運動の識別: タンパク質分子の運動には、生理的な作用に伴う構造形態変化とブラウン運動が常に混在しており、高速 AFM はそれらを映像から判断しなければならない。そこで、Caged 化合物を利用できる光学系を開発し、それらの識別に取り組んだ。[3] フィードバックの特性評価: AFM のフィードバックの特性を評価することは、AFM の走査が生体試料に与える力を見積もる上で非常に重要なことである。しかし、機械部 (カンチレバーとスキャナー) のドリフトがこの評価を不正確にしていた。そこで、ドリフトの少ないエレクトロニクス (ダイオードと 2 次 LPF) で機械部を模擬する回路を作成し、この評価に取り組んだ。[4] スキャナーの Q-control: フィードバック制御の帯域は、スキャナーの共振周波数 (f) とその Q 値 (Q) によってほぼ ($\pi f/Q$) で決まる。そこで、Q-control をスキャナーに適応し Q 値を下げることににより、既存のスキャナーの制御帯域を上げることに取り組んだ。本発表ではそれぞれの進行状況を報告する。

N. Kodera, Y. Naito, A. Miyagi, & T. Ando : Improvements on a high-speed atomic force microscope

B372

非対称位相板の理論と電子顕微鏡への応用

Radostin Danev、○永山 國昭 (CIBS, ONRI (岡崎研究機構・統合バイオ))

Most phase plates used in optical systems are rotationally symmetric. One such type is the well known Zernike phase plate, which also has recently been applied to TEM [1]. It modifies equally the phases of all scattered waves allowing for in-focus phase contrast to be realized in TEM.

Asymmetrical phase plates, on the other hand, can produce new and in some ways superior types of phase contrast. They modulate only part of the Fourier space in an asymmetric fashion. Example of such phase plate is the half-plane pi-phase plate. It retards by pi the phases of half of the Fourier space. The resulting contrast named Difference Phase Contrast [2] (or Hilbert Phase Contrast[3]) is similar to DIC (Differential Interference Contrast) in light microscopy. The image has topographic appearance. The pseudo 3D look in the image does not represent the surface topology of the sample but the phase information in the exit electron wave. The theory of phase contrast behind the asymmetric phase plate is described. Experimental images of various samples are presented.

1. R. Danev, K. Nagayama, Ultramicroscopy 88 (2001) 243.
2. R. Danev, H. Okawara, N. Usuda, K. Kametani, K. Nagayama, J. Biol. Phys. 28 (2002) 627.
3. K. Nagayama and R. Danev, Microscopy & Analysis 34 (2003) in press.

R. Danev and K. Nagayama : Theory of asymmetrical phase plates and its application to TEM