2P289

高速AFMによるタンパク質分子の動態撮影に資する基板開発

○前田 大輔、宮城 篤、古寺 哲幸、安藤 敏夫（金沢大院・自然科学）

当研究室において開発された高速原子間力顕微鏡（高速AFM）は水溶液中で生きた生体分子を1分子レベルで最高80ms/frameで観察することを可能にした。現在も、更なる高速化、生体試料への力の軽減、高解像化を目指した高速AFMの改良は続いている。我々はこの高速AFMを用いて基質との反応に伴うタンパク質の構造変化、及びタンパク質同士の相互作用による構造変化の解析を目指している。

AFMによる動態観察は静止観察や蛍光観察とは異なり、以下に示す非常にシビアな基板条件を満たす必要がある。・高速AFM観察に耐えうる基板の条件(1)ナノメーターオーダーでフラットなこと(平滑性)(2)目的のタンパク質のみを固定できること(選択固定)(3)固定が緩やかであること(適度な固定)(4)高速連続撮影に耐えられること(安定性)

条件(1)に関してはマイカ基板の修飾を行わずに観察溶液のイオン濃度や種類を変えることによりタンパク質を基板に固定する方法や電荷を持った比較的小さい分子をマイカ基板に捲くことによりフラットな基板は作ることができている。しかし、これらの基板は目的としているタンパク質以外のタンパク質も吸着してしまい条件(2)を満たすことができていない。だが、基板への吸着も分子全体が吸着しているわけではなく1部分のみの吸着の場合もあるのでそれらを解決することにより理想の系に近づくと考えられる。或いは、全く何も吸着しない基板ができれば、それを部分的にナノ精度で改変して最初に固定したタンパク質以外は何も吸着しないようにできる可能性がある。

今回の発表では実際のAFM画像を用いてアクチン-ミオシンV系における基板修飾の与える影響について報告したい。

D.Maeda A.Miyagi N.Kodera T.Ando : Preparation of substrata for high-speed AFM imaging of protein molecules at work

2P291

高速原子間力顕微鏡によるモータータンパク質分子の動態観察

○宮城 篤¹、前田 大輔¹、古寺 哲幸¹、大岩 和弘²、安藤 敏夫¹（¹金沢大学院・自然科学研究科、²通信総合研究所）

原子間力顕微鏡（AFM）は水溶液中の試料をナノ解像度で見ることのできる唯一の顕微鏡である。しかし従来のAFMは走査速度が遅く静止画像しか得られなかった。我々の研究室ではAFMの高速化に取り組み、80ms/frameの画像取得が可能になった。現在も更なる高速化、高解像化、探針-サンプル間の力の軽減を目指して改良が続けられている。特に、力の軽減は弱いタンパク質間相互作用を乱さずにイメージングする上で極めて重要であり、そのための改良に力点を置いて装置の改良を進めてきた。この装置を用いて、我々は現在アクチン-ミオシンV系とダイニンCの動態観察を行っている。

●ダイニンC：ATPが定期的に存在するときのダイニンCの振る舞いを観察した。ステムは2つの位置を取り、その位置が変化する頻度はATPaseレートにほぼ等しく、ステムの運動がATPase反応に駆動されていることが明らかになった。

●アクチン-ミオシンV系：マイカ基板に高い密度で固定されたミオシンVの上をアクチンフィラメントが滑り運動する様子を捉えることに成功した。その運動速度は同じ溶液条件で行った蛍光観察の結果と一致していた。探針が試料を押す力が以前よりも大きく軽減化されたために、このような観察が初めて可能になった。但し、この運動観察では解像度がまだ十分でない。ミオシンVの密度を下げた場合には、解像度は改善され、個々のミオシンVとアクチンフィラメントとの相互作用が観察された。しかし、その相互作用におけるミオシンVの振る舞いをひとつの描像として表現できるまでには至っていない。

現在、紫外パルス光を高速AFMに導入し、Caged-ATPからATPが放出される前後のモータータンパク質の動態を観察することも試みている。今回の発表では、以上の試みと得られた動態観察の結果を報告する。

A. Miyagi, D. Maeda, N. Kodera, K. Oiwa and T. Ando : Dynamic behavior of motor proteins captured by high-speed AFM

2P290

高速AFMの性能向上のための改良

○伊藤 悠徳、内橋 貴之、安藤 敏夫（金沢大院・自然科学）

我々は、運動しているタンパク質の液中での動態観察をすべく、従来の原子間力顕微鏡（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、2001年には最高80 msec/frameを実現し、液中におけるタンパク質の構造変化の様子を映像として捉えることに成功した。しかし目標としている性能（走査速度、分解能、試料へかかる力の軽減等）には及ばず、多くの改良を必要としている。改良はカンチレバー、スキャナー、センサー、制御系等、全ての分野でクリアされなければならないが、一部分だけが秀でていても良い画像は撮れない。よって我々は、全ての分野で改良を行い、高速AFMの性能のさらなる向上を目指している。

例えば、センサーアンプや二分割フォトダイオードなどからなる検出器系も、改良において重要な部分の一つである。カンチレバーからのレーザーの信号には様々な情報（振幅、周波数、位相、ノイズ等）が含まれているが、その信号から必要とする情報を、いかにして高い精度で抽出するかが重要であり、この抽出が低精度であれば画像の解像度は低下してしまう。検出器系は情報抽出の第一段階にあたり、その分解能、周波数帯域が重要となってくる。そこで我々は、検出器系の主な改良として、センサーアンプの周波数帯域を上げ、より高精度で波形を検出できるようにした。そして二分割フォトダイオードについては、レーザーが入射する前にスリットを置く改良を試みた。レーザーを回折させ、その幅を細くすることで、レーザーの位置変位のわずかな変化も検出しようとするものである（分解能の向上）。

本発表ではこれらの、いくつかの改良の経過を報告したい。

H.Ito,T.Uchihashi,T.Ando : Improvements in the high-speed AFM

2P292

相補的DNA鎖間に働く力の直接測定

○日比野 政裕、藤川 純平（室蘭工大・応用化学）

DNAやたんぱく質の分子認識や自己組織化を解明することは重要な課題である。そのためには分子間に働く相互作用を理解する必要がある。原子間力顕微鏡（AFM）を利用するとナノメートルの空間分解能で、ピコニュートンからナノニュートンのスケールの力を直接測定することができる。そこで本研究ではAFMを用いて一対の相補的DNA鎖間に働く結合力（破断力）の直接測定を試みた。

DNAは5'末端をチオール基で修飾したものをを用いた。AFMの探針の先端には直径5~20 μmガラスビーズを取り付け、このビーズ表面を一本鎖DNAで修飾した。それと相補的な一本鎖DNAをカバーガラス基板表面に固定した。測定は100 mM KCl溶液中で行った。

カバーガラス基板表面と探針先端のガラスビーズ表面を接触させた後、探針を基板から引き離す際に、百数十ピコニュートンの不連続な力を検出した。30base pairsの相補的DNAを用いた場合、この力の分布を取るとピークは約180pNであった。また、30base pairsの配列を2回繰り返した60base pairsの長さのDNAで同様の実験を行った結果、180pNと2倍の360pNにピークが出現した。このことより30base pairs当たりのDNA鎖間の破断力は180pNと見積もられる。DNA塩基間の水素結合の強さに換算すれば2.3pNとなる。

また、破断力を詳細に検討したところ、DNA鎖を引張ると100pN付近で一定の張力が検出され、その後、急激に大きな力がかかって180pNに達すると力が消失することがわかった。このことはDNA鎖に構造転移が起こることを示唆する。

現在、破断力のpH依存性を検討中である。中性付近の領域では、溶液のpHに関わらず破断力のピークは180pN付近に見られ、この領域付近での破断力のpH依存性は小さい。

M.Hibino and J.Fujikawa : Direct measurement of unbinding force between complementary strands of DNA