

研究課題別評価書

1. 研究課題名

生体単一分子ダイナミクスの多次元計測法

2. 氏名

影島賢巳

3. 研究のねらい

タンパク質に代表される生体高分子の構造相転移現象は、生命現象においてきわめて本質的な役割を演じている。その中で大きな関心を集めている側面の一つが、特定の空間構造を形成（フォールディング）する過程である。一般に、タンパク質は複雑で階層的な空間構造を持つため、そのフォールディング時間のスケールも同様に階層的で幅広い時間スケールにわたる。そこで、本研究では、生体分子を1つの高分子鎖とみなし、時間スケールに代表されるその動的性質を、高分子物理の視点から捉えられないかと考えた。

一般に高分子や流体などの複雑系の非平衡応答は、その外力に対する弾性的な応答と粘性的な応答で決まる、ある特徴的な緩和時間を持つ。タンパク質のフォールディング現象を、天然状態という自由エネルギーの極小へと落ち込んでいく非平衡過程と見なせば、フォールディング時間は、その構造がもつ種々の緩和時間の重ね合わせで表わされるはずである。実際に、cytochrome c や tryptophan cage といったタンパクのフォールディング時間が、分子鎖内の内部摩擦に支配されていることを示唆する報告が最近相次いでなされている。このような非平衡過程を詳細に議論するには、多数分子の集団計測における統計性を排除した単一分子レベルでの計測を行うことが有用である。

そこで、本研究では、近年提案されている単一分子計測の手法の中で、もっとも動的応答計測に優れた原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、分子鎖を伸張してその構造を段階的に変化させながら、粘弾性を計測する手法を極限まで突き詰めることにした。具体的には、(1)従来型の装置を用いて粘弾性応答を計測し、これが分子の構造相転移現象と結び付けられることを示すこと、さらに、(2)広帯域で計測可能な AFM 装置を開発して、周波数依存の粘弾性応答計測を行い、ダイナミクスを議論すること、の2点を目的とした。

4. 研究成果

一般に、立体構造をとる生体高分子の両端を捕捉して張力を印加すると、分子は力学的に構造相転移して最終的にはランダムコイル化し、真っ直ぐな鎖へと引き伸ばされていく。ランダムコイル化するまでの途上では、この経路上に存在する中間体を経由していくと考えられ、各状態での粘弾性計測を計測すれば、この特定のフォールディングの経路を力学的に追跡できることになる。ここでもし、周波数を広帯域で可変にできれば、各状態の特徴的な緩和時間応答を切り分けられるであろう、というのが本研究の着眼点である。

原子間力顕微鏡(AFM)の力センサーとして使用されるカンチレバーは良好な弾性体であり、その振動は調和振動子で比較的良好に表わされる。従って、振動現象を利用して粘弾性応答を計測する常套的アプローチが使用可能であり、その局所性と併せて考えると、他の研究手法にはない、微視的・局所的な粘弾性応答計測手段となりうるということがわかる。実際に、さきがけ研究採択以前に、単一ペプチド分子内の粘性的な散逸量が弾性とともにAFMを用いて計測できることを示している¹⁾。

そこで、高次構造をもつタンパク質分子への適用可能性を検討するため、試験的に、筋肉中の巨大タンパク質であるコネクチン分子の伸張に伴う力及び粘弾性プロファイルを計測した²⁾。この計測は、市販の液中用AFM装置に電磁石を付加して、磁気粒子を取り付けたカンチレバーに 600 Hzの変調をかけながら実施した。この分子は、 β シートがバレル状に構造化したドメインが直列に多数連なった構造を持つ。1つのドメインが張力により転移する様子の力および弾性プロファイルを図1に示す。張力を増していくと以前に崩壊したドメインがランダムコイル的に応答しエントロピー弾性を示すが、張力が増加してあるレベルに達するとドメイン内の特定の

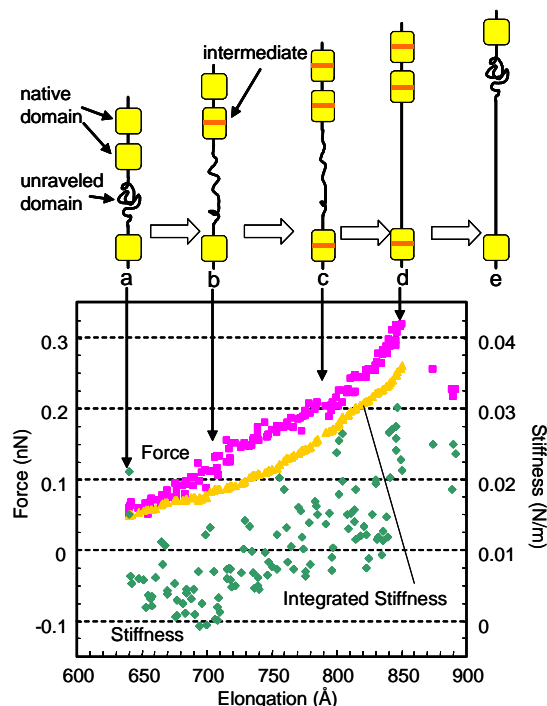


図1 コネクチン分子1ドメインの伸張中の力、分子弾性、およびその積分のプロファイル。

崩壊する(図 1d-e)。データを見ると、力のプロファイルには中間体への転位による変曲点が現われているが、分子弾性を伸張距離で積分したプロファイルにはこれが見られない。これは、600 Hzの変調周波数では中間体への転位が不可逆的・非平衡な応答であるために生じていると解釈される。しかし、同程度の周波数でも変調振幅を増加させた場合には、中間体への転移にあわせて分子弾性にピークが現われているように見えるデータもある。力学的な変調が相転移現象自体に影響している可能性もあり、解釈には今後の検討を要する。

通常、ドメインの完全な崩壊は瞬時に起こるが、1つのデータ中の1つのドメインについてだけ、50 ms程の長い崩壊が観測され、粘性抵抗係数も特異的な挙動を示した。その原因は不明であるが、この際の粘弾性データから特徴的な緩和時間を算出すると 10^{-4} sとなり、高分子鎖が溶媒の粘性抵抗から直接受ける摩擦に起因する緩和時間より2桁程度大きな値になる。これは、溶媒摩擦以外の内部摩擦メカニズムの存在を示唆する結果であり、1分子粘弾性計測が高分子物理の分野で新しい知見を与えうることを示唆している。

しかし、複雑な高分子の緩和現象を分析するには、単一の周波数での計測では十分ではなく、周波数を変えて各緩和モードをその応答時間で切り分けていく過程が不可欠である。図2はこれを模式的に表わした図である。このような計測を実現するため、新規な AFM の開発を以下のよう

に行った。AFM を用いて周波数応答を計測しようとする際に、もっとも障害となるのは、その帯域の狭さである。帯域を制限する要因はいくつか挙げられるが、最大の障害はカンチレバーの共振周波数である。近年、カンチレバー製作技術が向上し、0.1 N/m という比較的小さい弾性定数を保ちながら、1 MHz という共振周波数を持つものも開発されるようになったので、このようなカンチレバーを利用し、かつ、共振より十分低い範囲で周波数域で任意に変化させて周波数

応答を計測することは可能である。また、カンチレバーの共振現象を逆に利用し、高次共振の周波数で粘弾性応答を計測すれば、離散的な周波数ではあるが、やはり粘弾性の周波数依存を計測することは可能である。これを実現するには、以下のような AFM 装置が必要である。①溶液環境でも、粘弾性計測に障害となる寄生振動を引き起こすことなく、カンチレバーを制御性よく励振できる機構を有すること。②上記のカンチレバーの振動を、十分な帯域で検出できること。③カンチレバーの変位を計測するためのレーザー光スポットが、1 MHz の共振を持つ微小なカンチレバーにも対応できるように十分小さいこと。④十分な計測感度を持つため、全測定帯域において、理論限界である熱振動ノイズにリミットされる高い S/N 比を持つこと。そこで、これらの条件を満たす装置を開発することにした。

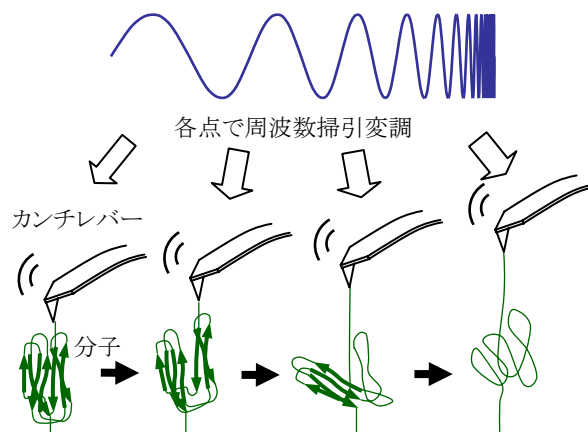


図2 最終目標とする生体分子の力学的構造相転移と粘弾性スペクトル測定概念図。

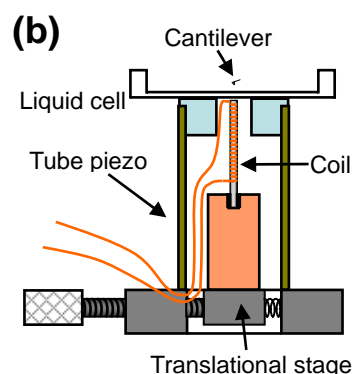
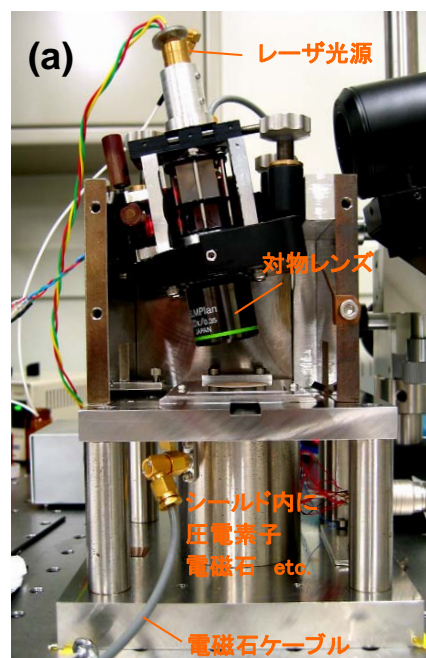


図3 (a)開発した AFM 本体の外観。
(b)溶液セル・電磁石周辺の断面図。コイルはセル直下に近接し、水平方向に可動。

①で挙げた、寄生振動のないカンチレバー励振方法として、カンチレバーだけに限定して力を印加することのできる磁気励振法を採用した。これは、粒子もしくは薄膜状の永久磁石をカンチレバーに付与し、外部から電磁石によって交番力で励振する方式であり、励振力を電氣的に制御しやすい利点をもつ。しかし、一般的に電磁石は誘導性負荷であり、高周波で電流駆動

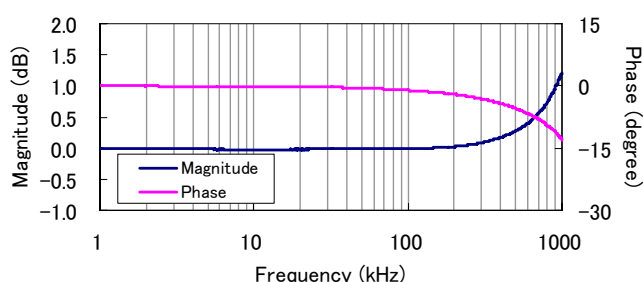


図4 電磁石に流れる電流の周波数特性。電流設定値 850 mA_{p-p}で計測。1 MHzまでの範囲でゲイン変動量 1.5 dB以下、位相遅れ 15° 以下に制御されている。

することは困難である。そこで、小さなインダクタンスで集中した磁場勾配を実現するため、初期透磁率が 1MHz程度までフラットなフェライト材を用いて直径 1mm、全長 15mmのコアを製作し、4.5 μ Hの電磁石とした。図3に装置全体の外観と、電磁石周囲の断面図を示す。電磁石は、励振力が極大となる位置に調整できるよう、並進ステージの上に取り付けている。電磁石を駆動する回路には、OPアンプで作られる電圧—電流変換回路に広帯域・大電流の増幅器をブースターとして挿入したものを製作した。その結果、図4に示すように 1 MHzまでの帯域にわたって、1A_{p-p}近い振幅レベルでほぼ平坦な電流特性を実現することができ、高周波磁気励振が可能になった。

光学系は、光学顕微鏡用の無限遠光学系仕様対物レンズを用い、真円ビームを持つ波長 635 nm の半導体レーザを光源として構成した。ショットノイズを低減させるため、フォトダイオードの極板上での不要なビーム部分をカットできるように、入射段にスリットを用いてビームを整形したため、カンチレバー上でのビームスポットは縦長な形状になっている。このスポットの横幅は入射ビーム束の径に反比例し、直径 4 mm のビームのレーザを使用した場合の値は約 1.8 μ m となり、前述の微小カンチレバーにも対応可能なものとなった。

カンチレバーの変位を検出する電気系は、広帯域で応答する SiPINフォトダイオードを反射光のセンサーとして用い、この光電流を高速 FET 入力の OPアンプで電圧変換する構成をとり、約 10 MHz の帯域を実現した。この信号を処理するための加減算回路等も、この帯域を損なわないように、ビデオ信号用の OPアンプ等を使用して十分広い帯域を持つように構成した。

図5に、市販のカンチレバー上のビームスポットの様子と、これを用いて大気中で計測したノイズ特性を示す。カンチレバーの 3 次までの熱振動ピークが明瞭に見えており、1 MHz 以下の領域ではバックグラウンドの電気系ノイズはこれよりも有意に低いことから、この帯域ではこの装置は熱振動にリミットされた良好な S/N 比を持っていることがわかる。

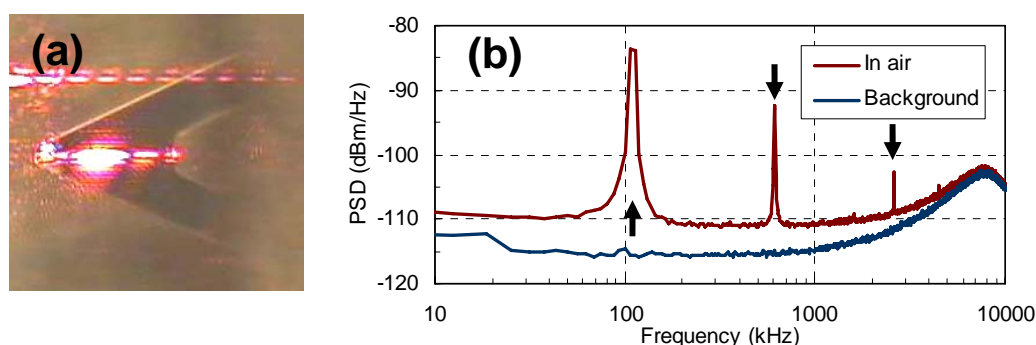


図5 (a)全長 $85\mu\text{m}$ のカンチレバー上のレーザスポット。回折による複数のスポットが見えているが、中央の最強のものが真のスポット。光路に挿入されたスリットのために縦長になっている。(b)その熱振動ノイズのパワー密度スペクトル(赤)。矢印で示すのが3次までの共振ピーク。レーザ光源をオフにして測定した電気系のバックグラウンドノイズ(青)も示す。

図6に、Nd-Fe-B の永久磁石粒子を貼付した弾性定数 0.1 N/m 、全長約 $37\mu\text{m}$ のカンチレバーの写真と、これを純水中で磁気力を用いて強制振動させた振幅と位相の周波数特性を示す。この図からわかるように、この帯域内で不要な寄生振動は観測されず、 1 MHz の帯域内にある3次までの共振ピークが明瞭に観測され、これらのピーク位置で位相がほぼ 180° 転回する、ローレンツ型共鳴曲線の特徴が明瞭に現われている。これは、液中では磁場による励振によってはじめて計測可能となったものである。1次ピークより高い周波数帯では、共振をはずれた領域の応答関数は、変位検出用レーザ光スポットがカンチレバー振動の節や腹にまたがるため非常に複雑であり、これらの周波数領域の情報を取り出すことは困難である。しかし各共振ピークをローレンツ型共鳴曲線で近似し、かつ1次ピークよりも十分低いオフレゾナンス領域での計測をも併用することによって、広帯域の離散周波数で粘弾性スペクトルを得ることが可能になった。

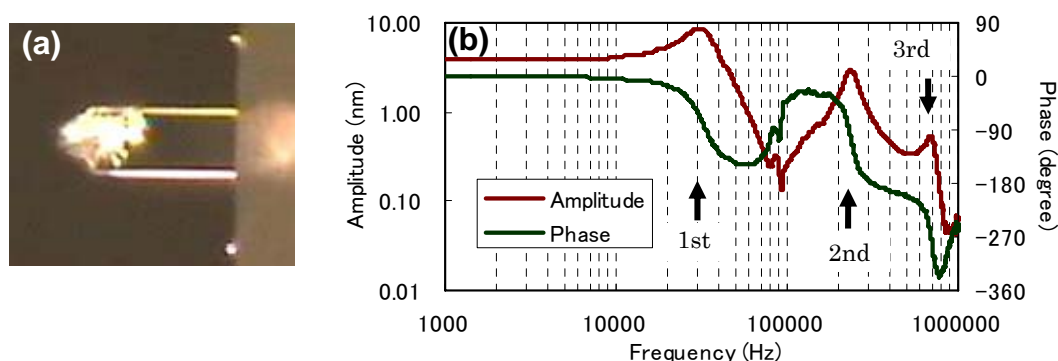


図6 (a)磁石粒子を貼付した全長 $35\mu\text{m}$ のカンチレバー。(b)これを磁気力で強制振動させた特性。3次までの共振ピークとこれに付随した位相の転回が見える。

そこで、予備実験として、生体分子よりも単純な構造を持つ多糖類であるデキストランの高分子鎖を AFM 探針が捕捉した状態で周波数掃引を行った結果、得られたカンチレバーの共振スペクトルから、複数の離散周波数での分子の粘弾性を算出することができた。しかし、装置の安定性や測定状況から判断してデータの信頼度はまだ問題があるうえ、物理的解釈においても検討を要する面があり、あくまでも試験的な結果と認識している。装置のさらなる改良と解析方法の確立

を目指して今後も研究に取り組み予定である。

また、共振周波数約 1 MHz の高周波カンチレバーの磁気変調も試みた。このカンチレバーは全長が約 $10\ \mu\text{m}$ 、横幅が $2\ \mu\text{m}$ 約と非常に小さく、磁気粒子を貼付する方法ではその有効質量が増えすぎて共振周波数が下がる恐れが高かったため、強磁性である Co の薄膜を蒸着して行った。しかし、現時点では実用に耐えるような振幅の磁気変調は実現できていない。これは、カンチレバーの面積が小さいため付与できる磁性体の体積が限られているためであると考えられる。より磁場を集中させて、急峻な磁気勾配を実現するなどの工夫が必要と思われ、今後の検討事項としたい。

参考文献

- [1] M. Kageshima, S. Takeda, A. Ptak, C. Nakamura, S. P. Jarvis, H. Tokumoto and J. Miyake, Jpn. J. Appl. Phys. Lett. 43 (2004)L1510.
- [2] M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, Y. Naitoh and Y. Sugawara, AIP Conference Proceedings, Vol. 982, 2008.

5. 自己評価

研究を進行させていく過程で、研究の基礎となる高分子物理だけではなく、より一般のソフトマターを中心とする非平衡系・複雑系の物理学など、これまで触れる機会の少なかった知識や概念などを積極的に吸収した。その結果として、研究着想時と比べると、現象に対する自身の物理的認識は大きく進歩し、また描像も明瞭になった反面、当初の構想とは若干異なってきた点も多々あり、それに伴い研究方針も多少の修正を余儀なくされた。従って、単純に当初の目的のどれだけが達成できたかという形で評価することはできない。ただし、研究開始時の最大の研究目標は、先の図2にその概念を示すように、単一の生体分子鎖の力学的な構造相転移現象の各段階での粘弾性周波数スペクトルを取得し、それを構造相転移と結びつける手法を実現することであり、この点においては現在の認識と大きな隔たりはない。

新しい AFM 装置の開発では、さきがけ採択後に装置の仕様の検討から始めたことに加え、想定外の設計変更や試行錯誤も多分に余儀なくされ、実質的に研究期間と労力の大半を割かざるを得なかった。結果的に、研究期間内で実現された成果は、まだ最終目標まで到達するものではない。しかし、目指した測定をほぼ可能とする装置が開発でき、予備実験のデータも得られ始めていることなどから、最終目標に向けて確実に近づく途上にあるものと位置づけている。

また、ここで開発し、ようやく実用レベルに近づけた装置は、いわば今後の研究の上での重要なプラットフォームであり、これを手にできたことは、自身の研究の将来の可能性が大きく拓けるものであると考えている。過去に定めた目標に対してではなく、未来に対して持つ意義において、本さきがけ研究で実施した研究は計り知れない価値を持つものであると確信していることを申し添えておきたい。

6. 研究総括の見解

原子間力顕微鏡を利用して、タンパク質単一分子の構造相転移に伴う粘弾性応答の時間スケ

ール依存性計測の解明に挑戦した。タンパク質分子内の多面的な力学特性をAFMの磁場変調を利用して計測する提案である。主たる成果は次の2点である。

- ①コネクチン分子を用いて巨大たんぱく質の粘弾性プロファイルを測定し、高次構造をもつタンパク質の力学特性の概要と、その精密測定に必要な新規 AFM の目標仕様を明らかとした。
- ②外部電磁石によりカンチレバーだけに限定して力を印加する励振方式により、1MHz までの幅広い帯域でタンパク質のコンフォメーションの精密測定が可能な新方式 AFM を完成させた。

また、新方式 AFM を用いてデキストラン高分子鎖の粘弾性測定の予備実験を行い、磁気力によるカンチレバーの強制振動により液中での測定が可能な見通しも得ている。

研究成果は1篇の原著論文、2件の学会招待講演にまとめられている。

かなり挑戦的な提案であり、装置作製に時間がかかり当初計画の生体高分子の1分子粘弾性測定を達成するまでには至っていない。測定装置はほぼ完成することができたので、研究期間終了後もこの研究を継続し、生体高分子のみならず、合成高分子も含めた1分子粘弾性スペクトル測定を行い、高分子物理学の進展に寄与していただきたい。タンパク質分子の物性を単一分子レベルで探る AFM 装置開発において磁気力の確保、検出系の最適化とノイズ抑制などに取り組み、目的の測定を可能とする装置を完成したことは高く評価できる。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, Y. Naitoh and Y. Sugawara “Viscoelasticity and Dynamics of Single Biopolymer Chain Measured with Magnetically Modulated Atomic Force Microscopy”, AIP Conference Proceedings, Vol. 982, 2008

(2)特許出願 なし

(3)著書

- ・ 影島賢巳、“タンパク質の力学プロファイルをはかる”、バイオニクス、2005

(4)学会発表

口頭発表(国際)

- ・ M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, S. Kimura, Y. Naitoh and Y. Sugawara “Viscoelastically Analyzed Unfolding Process of Single Biopolymer with Intermediate”, International Conference on Nanoscience and Technology (ICN&T) 2006, 2006
- ・ M. Kageshima, Y. Hirata, T. Inoue, S. Kimura, Y. Naitoh and Y. Sugawara “Equilibrium and non-equilibrium processes and internal friction in dynamics of single biopolymer”, Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (KWAFFM' 07), 2007

ポスター発表(国際)

- ・ M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, Y. Naitoh and Y. Sugawara “Viscoelasticity and Dynamics of Single Biopolymer Chain Measured with Magnetically Modulated Atomic Force Microscopy”、The 5th International Workshop on Complex Systems、2007
- ・ M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, S. Kimura, Y. Naitoh and Y. Sugawara “Viscoelasticity measurement to probe equilibrium and non-equilibrium properties in transformation of single biopolymer chain”、International Conference on Nano Science and Technology、2007
- ・ M. Kageshima, T. Chikamoto, Y. Naitoh, Y. J. Li and Y. Sugawara, “Wide-band magnetic excitation of atomic force microscopy cantilever for study of soft matter dynamics”、15th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM15)、2007

(5) 招待講演

招待講演(国内)

- ・ 影島賢巳、“生体単一分子の力学的プロファイル計測”、日本顕微鏡学会第61回学術講演会、2005
- ・ 影島賢巳、“生体単一分子の力学プロファイル計測”、日本分析化学会第 55 年会、2006

(B) その他の主な成果

なし