



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                                   |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 原子間力顕微鏡の仕組みと光合成膜試料観察への応用                                                                          |
| Author(s)        | 山本, 大輔; 山野, 奈美                                                                                    |
| Citation         | 低温科学, 83, 229-236                                                                                 |
| Issue Date       | 2025-03-29                                                                                        |
| DOI              | <a href="https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.229">https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.229</a> |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/94801">https://hdl.handle.net/2115/94801</a>                 |
| Type             | departmental bulletin paper                                                                       |
| File Information | 22_p229-236_LT83.pdf                                                                              |



# 原子間力顕微鏡の仕組みと光合成膜試料観察への応用

山本 大輔<sup>1)</sup>, 山野 奈美<sup>2)</sup>

2024 年 11 月 29 日受付, 2024 年 12 月 28 日受理

光合成膜で起こるエネルギー移動や電子伝達反応の理解には、膜内におけるタンパク質の配置に関する情報を得ることは必要不可欠である。原子間力顕微鏡(AFM)は、溶液環境を保ったまま光合成膜内のタンパク質を一分子レベルで観察できる手法であり、紅色細菌から高等植物に至るまで、様々な生物の光合成膜におけるタンパク質分布を明らかにしてきた。本稿では、AFMの測定原理と空間分解能について解説するとともに、近年開発されたAFMの高速化技術についても取り上げる。また、実際に光合成膜を観察する際のサンプル処理方法と、AFMを用いて光合成膜を観察した代表的な研究例について紹介する。

## Mechanism of Atomic Force Microscopy and its Application to Photosynthetic Membranes

Daisuke Yamamoto<sup>1</sup>, Nami Yamano<sup>2</sup>

To understand the well-organized photosynthetic reaction, it is important to obtain information on the distribution and orientation of proteins in the membrane. Atomic force microscopy (AFM) is one of the most powerful tools for visualizing the protein structure at the molecular level under physiological conditions. AFM has been applied to various photosynthetic membranes from photosynthetic bacteria, cyanobacteria, and higher plants. In this CHAPTER, we first explain working principle, spatial resolution of AFM, and data interpretation. Next, several representative imaging research of photosynthetic membranes using conventional AFM and high-speed AFM are introduced.

キーワード：原子間力顕微鏡, 高速原子間力顕微鏡, 光合成膜

Atomic force microscopy, high-speed AFM, photosynthetic membrane

### 1. はじめに

原子間力顕微鏡 (Atomic force microscope: AFM) (Binnig et al. 1986) は1986年にBinnigらによって開発された顕微鏡である。カンチレバーと呼ばれる微小な板バネの先端に取り付けられた探針で試料表面を走査し、試料の表面構

造を取得する。ナノメートルオーダーの空間分解能を有し、大気中、真空中、液中を問わず様々な環境下にある試料を直接観察可能であり、現在では生体試料への応用が広く行われている。代表的なタンパク質構造解析手法であるX線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法と比較すると空間分解能が一桁低く、また、得られる構造は表面

連絡先

山本 大輔

福岡大学理学部

〒 814-0180 福岡県福岡市城南区七隈 8 丁目 19-1

Tel: 092-871-6631

Email: dyamamoto@fukuoka-u.ac.jp

1) 福岡大学理学部

Faculty of Science, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

2) 福岡大学理学部

Faculty of Science, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

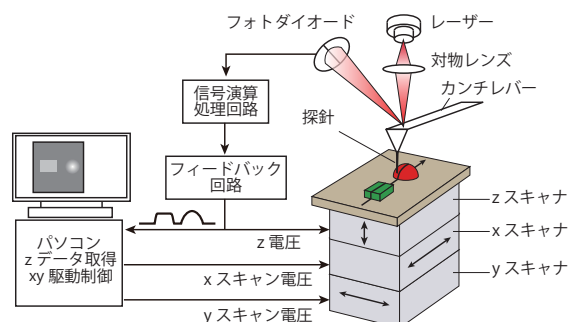


図1：AFM装置の模式図。カンチレバー背面に照射されたレーザー光の反射光をフォトダイオードで検出し、信号が一定値となるようにフィードバック回路により試料を $z$ 方向へ上下動させる。上下動の $z$ 電圧をパソコンで読み取り、表面構造を疑似カラー表示する。

形状のみである。そのため、タンパク質の構造解析という点ではこれらの手法に数段階劣る。一方で、AFMは生体膜に内在するタンパク質を1分子レベルで直接可視化することができ、タンパク質レベルまで可溶化することなく膜内に存在するままの構造を捉えることができるという点で大きな利点がある。

本稿では、AFMの動作機構について解説し、その後、AFMによる光合成膜試料の観察例とそれらから得られる光合成システムの実像について紹介する。

## 2. AFMの仕組み

ここでは、AFMの仕組みを概観する。代表的なAFM測定方法であるコンタクトモード、タッピングモードならびに近年広がりつつある高速AFMについて述べ、AFM測定において実際に留意すべき点についても触れる。

### 2.1 AFMの測定原理

AFMによる画像化の原理は光学顕微鏡など波の結像を原理とする顕微鏡とは大きく異なり、探針先端と試料表面との局所的な相互作用の検出を基にしている。図1にAFM装置の概要を示す。探針先端を試料と相互作用する距離まで近接させ、2次元走査する。その際に探針と試料との間に生じる相互作用が一定となるように探針または試料を上下動させる。各 $xy$ 座標における上下動の量( $z$ 座標)を疑似カラー表示することで表面構造像を得る。AFMの測定原理はこのように比較的単純なものであるが、生体試料のナノ構造を直接観察するためには、試料が探針から受ける力の精密なコントロール、ナノメートルオーダーの先端曲率半径を持つ鋭い探針、高い精度の $xyz$ 試料位置

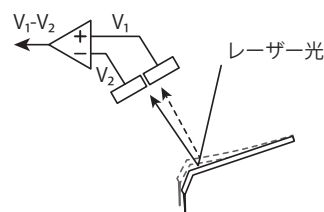


図2：光てこ法。カンチレバーのたわみにより生じる反射光の角度変化を二分割フォトダイオードで検出する。それぞれの受光素子から出力される電圧の差( $V_1 - V_2$ )がたわみ量に比例する。

制御など、多くの技術的な要件がある。

生体試料を非破壊でAFM観察するためには、測定中に作用する力を最小限に保つ必要がある。膜タンパク質であるバクテリオロドプシンのAFMによる観察例では、探針先端で100 pNよりも大きい力を加えるとEヘリックスとFヘリックスを結ぶループ構造が押しつぶされ観察されなくなることが報告されている (Müller et al. 1995a)。タンパク質の表面構造を高い信頼性で得るためには、100 pNもしくはそれ以下の力であることが要求される。生体試料の測定には0.1 N/m程度のパネ定数をもつ柔らかいカンチレバーが一般的に用いられる。このパネ定数は、探針先端に加わる100 pNの力によってカンチレバーが1 nmたわむ硬さに相当する。相互作用力を10 pNのオーダーに保つためには探針先端の変位、すなわちカンチレバーのたわみをオングストロームオーダーの精度で検出し制御する必要があることを意味する。

カンチレバーのたわみ量は、背面に集光したレーザー光の反射を計測することで得ることができる。カンチレバーがたわむとレーザー光の反射角が変化し、二分割フォトダイオードに入射する位置がわずかに変化する。入射位置は、分割されたフォトダイオードのそれぞれに入射された光量の差として出力される (図2)。この方法は光てこ法 (Meyer and Amer 1988) と呼ばれ、簡便かつ高い精度を有するためAFM装置で広く採用されている。我々のAFM装置でも光てこ法を採用しており、およそ20 nmの変位で1 V出力される程度の感度を有する。検出装置の電気ノイズが5 mVであれば1 Åの変位を検出でき、力分解能は10 pN程度となる。しかしながら、このように高い感度を持つ装置であっても、相互作用力を10 pN未満に保つことは容易ではない。カンチレバーのたわみが熱揺らぎによ

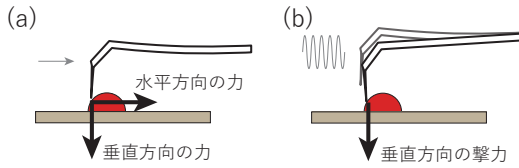


図3: AFM測定モードの模式図. (a)コンタクトモード. (b)タッピングモード.

て変動するためである. カンチレバーの熱揺らぎ量の二乗  $\Delta z^2$  はエネルギー等分配則に従い,

$$\frac{1}{2} k \Delta z^2 = \frac{1}{2} k_B T$$

と表される. ここで,  $k$  はカンチレバーのバネ定数,  $k_B$  はボルツマン定数,  $T$  は絶対温度である. 0.1 N/m のカンチレバーを用いた場合, 室温においてカンチレバーの揺らぎ  $\sqrt{\Delta z^2}$  は 2 Å 程度となる. 探針先端を試料に確実に相互作用させるために熱揺らぎを乗り越えた領域で測定するならば, 20 pN 以上の力が必要と見積もられる.

探針先端と試料との間の距離の制御や試料の  $xy$  二次元スキンをオングストロームオーダーの精度で行うために, ピエゾ素子が用いられる. ピエゾ素子とは, 電圧を加えると伸縮などの変形を生じるデバイスである.  $xyz$  の 3 軸にそれぞれピエゾ素子を配することで, 各軸方向の制御が可能である. 一度にスキャンできる最大スキャン範囲は AFM 装置あるいはそれぞれの製品に用意されているスキナの種類により異なり,  $xy$  方向に 1 ~ 100  $\mu\text{m}$  程度,  $z$  方向に 1 ~ 10  $\mu\text{m}$  程度である. 最小スキャン範囲は  $xy$  制御の位置ノイズ等によって制約される. 仮に 1 V の電圧を印加した際に 10 nm 伸縮するピエゾ素子であれば, 1 mV の電気ノイズによる位置ノイズは 0.1 Å である. 1 V で 100 nm 伸縮するピエゾであれば位置ノイズは 1 Å となる. すなわち, 高分解能測定など高い位置精度が要求される場合には, 最大可能スキャン範囲が狭いスキナを用いる方が有利である.

## 2-2 測定モード

AFM には様々な測定モードが存在する. AFM 測定モードは, カンチレバーのどのような物理量を用いて探針-試料間相互作用を検出するかにより分類される. ここでは, 生体試料観察に広く用いられるコンタクトモードとタッピングモードについて解説する.

コンタクトモード (contact mode) は, 探針先端を試料表

面に常時接触させながらスキャンする方法であり (図 3a), いくつかの膜タンパク質について高分解能観察がなされている (Müller et al. 1995b, Scheuring et al. 1999). 探針が試料から受ける斥力により, カンチレバーは  $z$  方向にたわむ. その位置  $z_c$  の変化をフィードバック信号として用いる. スキャンの間, たわみ量すなわち斥力の大きさが一定値になるように探針-試料間距離が制御される. コンタクトモードでは, 50 pN 以上の斥力で画像取得がなされることが多い. コンタクトモードにおいて生じる力は, フックの法則により  $F = k(z_c - z_0)$  と表される. ここで  $z_0$  は外力が作用していないときのカンチレバーの平衡位置である. 一方で, 外力が働かない状態であってもカンチレバーの平衡位置  $z_0$  は変動する. それにより斥力の大きさが変化するため, スキャン中に観察者が画像を確認しながら手で調節する必要が生じる. また, コンタクトモードにおいては探針先端を常時接触させながら横方向へ動かすため, 凹凸の大きい試料の場合には横方向への力が生じる. そのため, コンタクトモードは水溶性タンパク質よりも, 表面の粗さが 1 nm 程度である膜タンパク質試料の観察に向いている. 凹凸の大きい試料に対しては, 次に述べるタッピングモードが適している.

タッピングモードは, カンチレバーを強制的に振動させ (図 3b), その振幅値をフィードバック信号として用いる. 探針と試料との相互作用による振幅値の変化を検出することから, 振幅変調モード (amplitude modulation mode) ともよばれる. 試料表面をスキャンする間, 振動振幅は一定値に保たれる. 探針先端は振動の 1 周期ごとに試料に接触し, それ以外の時間は非接触状態となる. コンタクトモードと比較してスキャン中に横方向へ生じる力を大幅に低減することができる. そのため, コンタクトモードでは観察が極端に難しい試料であっても, タッピングモードでは観察可能な場合がある. タッピングモードにおいて生じる  $z$  方向への斥力は振動 1 周期を通した力の平均値で表されることが多い. 試料との相互作用がない状態の振幅 (自由振動振幅) を  $A_0$ , スキャン中の振動振幅を  $A$ , カンチレバーの  $Q$  値を  $Q$  とすれば, 斥力の平均値  $\langle F \rangle$  は次の式で表すことができる (García 2010).

$$\langle F \rangle = \frac{k A_0}{2Q} \left[ 1 - \left( \frac{A}{A_0} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

この式より, タッピングモードにおいて力を小さく保つためには, 自由振動振幅  $A_0$  を小さく, スキャン中の振動振幅  $A$  は可能な限り自由振動振幅に近い値に設定することが重要であることが分かる. 一方で, 自由振動振幅が小

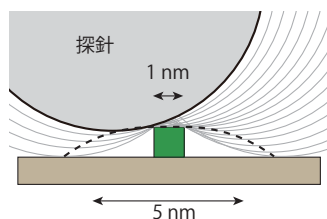


図4: 探針曲率半径によるAFM水平方向分解能への影響. 点線: 探針曲率半径を5 nm, 試料の高さと幅を1 nmと仮定したときの探針先端の軌跡. AFM表面構造は5 nm程度の幅をもった構造として観察される.

さすぎる場合には試料への横方向への力が発生しやすくなる. そのため, タンパク質試料を観察する場合には $A_0$ は1 nm程度以上に設定される. なお,  $Q$ 値は品質係数ともよばれ, 媒質の粘性に逆比例する量である. 我々が通常タッピングモード測定で適用するパラメーター ( $k = 0.1 \sim 0.2$  N/m,  $Q \sim 1$ ,  $A_0 \sim 1$  nm,  $A \sim 0.9$  nm) の場合, タッピング力の平均値は20 ~ 40 pN程度と計算される. この値はあくまでも非接触状態の時間も含めた平均値であり, タッピング力のピーク値( $F_{\text{peak}}$ )はさらに大きい. その計算式(Hu and Raman 2007)を用いると, 試料のヤング率を100 MPa, 探針先端の曲率半径を2 nm, タッピングのパラメーターを先ほどと同じと仮定したとき,  $F_{\text{peak}}$ は $\langle F \rangle$ の5倍程度と計算される. カンチレバーの強制振動は, 一般的に, カンチレバー付近に取り付けた振動子によって機械的に生じさせる. その励振効率率は時間とともに変化し, そのため, 自由振動振幅 $A_0$ は長時間にわたり変動する. これにより, コンタクトモードの場合と同様に力が変動するため, 観察者による調整が必要となる.

### 2-3. 空間分解能

AFMによるタンパク質観察において, サブユニット構造が明瞭に観察される場合がある. このような高分解能測定では, 横方向の空間分解能は1 nm程度であると見積もられる (Fechner et al. 2009). AFM測定における空間分解能は, 主に探針先端の形状により制限される. 先端の鋭い探針であるほど横方向分解能は高くなる. 市販のカンチレバーでは, 曲率半径10 nm以下の探針先端をもつものが入手可能である. また, 電子ビームによりカンチレバー先端に探針を成長させる方法(Electron Beam Deposition: EBD) (Wendel et al. 1995) を用いれば, 探針を自作することもできる. いずれの場合においても, 探針先端の形状がAFMの横方向分解能に大きく影響する. 仮に図4のような高さ1 nmの試

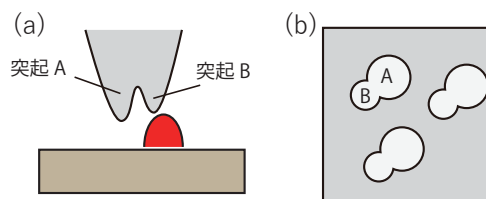


図5: ダブルチップによるアーチファクト. (a) ダブルチップを持つ探針によるAFM観察の模式図. (b) ダブルチップにより得られるAFM像の模式図. A: 突起Aによる構造. B: 突起Bによる構造.

料を曲率半径5 nmの探針でスキャンすると, 探針先端の軌跡, すなわちAFM測定により得られる表面構造像は半値全幅で4 nm広がることになる. これはタンパク質のサブユニット構造を1 nmの空間分解能で可視化できることと矛盾しているように思われる. このことは, 探針先端の形状は必ずしも球形ではなく, 局所的に突出した構造をもつことを示唆している. 突出箇所が探針先端にあれば高い空間分解能でAFM画像を得ることができる. ただし, 探針先端の形状を正確に制御することは困難であり, 高分解能観察が可能な探針であるか否かは運によるところが大きい. なお, 近年ではデータ解析方法や情報処理により, 探針形状の影響を低減し分解能を上げる技術も進展している (Heath et al. 2021, Matsunaga et al. 2023).

AFM測定において探針で試料をスキャンする間, 探針先端は常に同じ形状を保っているとは限らない. 試料との相互作用による先端形状の変化あるいはコンタミの付着により, 突然画質が変化することがある. 探針の先端形状による効果をタンパク質の構造と混同することのないように, データの解釈に注意を払う必要がある. 特にダブルチップと呼ばれる効果には注意を要する. 探針先端にふたつの突起があると, それぞれの突起先端が同じ構造をなぞることになる. 結果として, ある突起Aによる表面構造と突起Bによる表面構造とが1枚の画像の中に重なった画像が得られる (図5). 全ての分子が同じ向きにそろっているように見えることがあるが, そのような画像が得られた場合にはまずダブルチップの可能性を考える必要がある.

### 2-4. 高速AFM

2001年に高速AFMが報告 (Ando et al. 2001) されて以降, 現在に至るまでAFM装置の高速化と関連技術の開発が進んできた. それ以前は1枚の画像を得るのに数分以上要し

ていたものが0.1秒以下で画像取得が可能になり、近年では1秒間に50枚の画像取得性能を有するAFMも市販されている。ここでは、AFMの高速化技術の概要を述べる。

AFM測定は、試料(もしくはカンチレバー)の $xy$ スキャンと同時に相互作用力を一定に保つための $z$ 方向へのフィードバック動作を伴う。その機械的な動作をいかに速くできるかが高速化の要点である。質量の大きな試料台(もしくはカンチレバーホルダ)を急激に動作させると過渡的な振動が生じる。その機械的な特性のため、1枚のAFM画像を得るのに必要な時間が制限される。例えるなら、下端におもりをぶら下げたバネの上端を手で上下動させ、そのときおもりと手の上下動を同じにするためには、ゆっくりと上下させる必要があるのと同じである。速く動かせばバネの不要な伸び縮みや振動が生じてしまい、正しい表面構造を得ることができない。このようなAFM構成部品の過渡的な応答を小さくするためには、おもりの質量を減らす、つまり機械的な動作をする部品のサイズを小さくすればよい。そのため、高速AFMのスキャナでは小型のピエゾ素子が用いられ、特殊な形状のスキャナ(Marchesi et al. 2021)を除けば $xy$ 方向の動作範囲は1～数 $\mu\text{m}$ 程度、 $z$ 方向は数百 $\text{nm}$ ～1 $\mu\text{m}$ 程度となる。さらに過渡的な振動を能動的に抑制するアクティブダンピングにより、スキャナの動作速度はより高められる(Kodera et al. 2005)。

スキャナだけでなく、探針と試料との相互作用により生じるカンチレバーの応答速度の向上も高速化において重要である。カンチレバーの応答速度を向上させるためには、スキャナの部品と同様、質量を減らせばよい。つまりカンチレバーそのものの大きさを小さくすればよい(Viani et al. 2000)。そのため、高速AFMで使用されるカンチレバーは、一般的なカンチレバーよりも一桁サイズが小さく、長さ10 $\mu\text{m}$ 程度である。カンチレバーの応答速度は、同程度のバネ定数であれば、共振周波数が高いほど速くなると考えてよい。高速AFM用のカンチレバーは小さいバネ定数と高い共振周波数が両立するように設計されており、大気中で1 MHz以上の共振周波数を持つものが販売されている。実際に溶液環境中で使用する場合には、周囲の水の存在により共振周波数は低下する。そのため、タッピングモードで用いる励振周波数は大気中の共振周波数のおよそ1/3になる。

タッピングモードAFMにおいては、カンチレバーの振動振幅をフィードバック信号として用いる。そのため、高速AFMでは振動振幅の計測における遅延を小さくすることにも力が注がれている。高速AFMが開発された当初は振幅計測の遅延としてカンチレバー振動周期の1/2の時

間を要していたものが、現在ではほぼ無視できる程度の遅延時間で振幅値を計測することが可能である(Umeda et al. 2021)。その他、 $x$ 方向への順方向スキャン時にのみ画像を取得する方法(Fukuda and Ando 2021)や、順方向スキャンで得られた画像と逆方向スキャンで得られた画像を重ね合わせる方法(Kubo et al. 2023)により、画像取得時間の短縮が図られている。

### 3. AFMの光合成研究への応用

光捕集に始まる一連の光合成反応は、流動的な膜の中で光合成タンパク質が高度に組織化されることで達成される。AFMは、光合成膜内のタンパク質の配置や相互作用を、高解像度かつ生理条件下で直接観察することができる有用な手法である。ここでは、AFMで観察するためにサンプルに求められる条件、およびAFMを用いた代表的な研究について紹介する。

#### 3.1 AFM観察の実際

高分解能のAFM像を取得するには、サンプルとなる光合成膜はできるだけ平坦である必要がある。シアノバクテリアのチラコイド膜や、一部の光合成細菌でみられるラメラ状クロマトフォアのような平面膜であれば、細胞から単離された膜を必要に応じて精製したのち、そのまま基板であるマイカに吸着させて観察される。高等植物のチラコイド膜のように膜が三次元構造を形成している場合、低濃度の界面活性剤で可溶化し、膜を断片化させる必要がある。これをショ糖密度勾配やゲルろ過カラムで精製することで観察用のサンプルが調製される。ホウレンソウやシロイヌナズナからAFM観察用の膜を単離する場合、界面活性剤としてジギトニンが広く用いられており、ルーメン側が表に向いた反転グラナ膜や乖離したストロマラメラを観察することが可能である。しかしながら、界面活性剤の使用は膜構造が変化するリスクを伴う。観察目的に応じた界面活性剤の選択と可溶化濃度の最適化が必要である。

得られたAFM像には、必要に応じてノイズリダクション等の画像処理が施される。現在、AFMの空間分解能は、膜水平方向に1 nm、高さ方向に0.1 nmに達する。そのため、PSI、PSIIの表在性サブユニットや、Cyt  $b_6f$ のルーメン側サブユニットなど、膜面から3–4 nm飛び出ているタンパク質であれば、AFMで捉えることは比較的容易である。一方、膜面との高低差が小さいアンテナタンパク質や、逆にATPaseのCF<sub>1</sub>サブユニットなど、膜面からの突出が大

きく針との相互作用で容易に乖離してしまうタンパク質は観察が難しく、測定やデータ解析に工夫が求められる。また、光合成膜を占めるメジャーなタンパク質については、既に構造が解かれており、その三次元座標がPDBバンクに登録されている。この原子座標をもとにAFM像をシミュレーションし (Amyot and Flechsig 2020)、取得されたAFM像と照らし合わせることで、タンパク質の帰属やサブユニットの結合の有無に関する情報を得ることが可能である。

### 3-2 AFMを用いた複合体高次構造の観察

これまでに、紅色細菌、紅藻、シアノバクテリア、植物において、光合成膜におけるタンパク質の分布と構造がAFMにより明らかにされてきた (Wood et al. 2018, Liu et al. 2013, Sturgis et al. 2009, Zhao et al. 2016)。膜構造は、ネガティブ染色やクライオ電子線トモグラフィーでも調べられてきたが、これらの手法でin situのタンパク質構造を見るには、多数の分子に対して画像の平均化処理が必要になる。一方AFMは、単一の分子を比較的高い分解能で観察できるため、個々の分子の構造的特徴や複合体形成の違いを直接評価することが可能である。そのため、光合成膜内での多様な複合体形成や高次構造をとらえることに力を発揮してきた。例えば、シロイヌナズナから単離されたグラナ観察では、大部分のPSIIはLHCIIと複合体を作りグラナ中でランダムに配向しているが、一部のPSII複合体は、結晶状に規則正しく配列したアレイ構造を形成していることが明らかになった (Tietz et al. 2015)。またアレイ構造の形成が、膜脂質の脂肪酸不飽和度や光阻害の程度、さらに、ホウレンソウのグラナでは温度に依存することがAFM観察により明らかになった (Tietz et al. 2015, Onoa et al. 2014, Sznee et al. 2011)。グラナのタンパク質密度は70-80%ときわめて高い。そのため膜面積の大部分を占めるPSII複合体がランダムに配向した場合、プラストキノンの拡散可能距離は短く、隣接するCyt  $b_6f$ との間でしか電子のやり取りをできない。一方、アレイ構造が形成されるとタンパク質格子の合間を縫ったより長距離の拡散が可能になる。そのため、グラナで観察されたPSII複合体の高次構造化は、生理環境に応答した電子伝達制御に関連していると考えられている (Ruban et al. 2015)。

生理環境に応答した複合体高次構造の変化は、シアノバクテリアのチラコイド膜においてもとらえられている。シアノバクテリアは集光アンテナとして水溶性タンパク質であるフィコビリソームを有するが、鉄欠乏条件下では膜貫通アンテナタンパク質であるIsiAが発現し、PSIの

周りにリング状の会合体として結合する。*Synechococcus elongatus* PCC 7942のチラコイド膜では、強光ストレスによってもIsiAが蓄積することがAFMによる観察で確認された (Zhao et al. 2020)。これまで、電子顕微鏡をもちいた単粒子解析より、PSIは一層もしくは二層のIsiAリングを有する構造であると報告されていたが、AFMによる詳細な観察の結果、PSIには単層のIsiAリングを有するものから、四層以上のリングと極めて大きい複合体を形成しているものまで存在することが明らかになった。またシアノバクテリアでは、光強度だけでなく、光の波長に応答した複合体高次構造の変化も確認されている。通常PSIにはChl  $a$ が結合するが、いくつかのシアノバクテリアでは、遠赤色光培養により長波長光を吸収できるChl  $d$ やChl  $f$ をPSIに結合させることが知られてきた。三種類のシアノバクテリア*Chroococcidiopsis thermalis* 7203, *Synechococcus sp.* PCC 7335, *Chroococcidiopsis fritschii* 9212では、単量体や二量体といった不規則な対称性にあったPSIが遠赤色光順応に伴い三量体化する様子がAFMによりとらえられ、シアノバクテリアがマクロな構造変化を通して光環境に適応していることが明らかになった (MacGregor-Chatwin et al. 2022)。

### 3-3. 高速AFMを用いた光合成反応ダイナミクスの可視化

光合成反応の多くのプロセスは、タンパク質の移動や構造変化を伴う。例えば、プラストシアニンによる電子輸送、酸化損傷を受けたPSIIのグラナからストロマラメラへの水平移動とFtsHによるD1分解、励起バランスを調節するためにLHCIIがPSIIからPSIへとシャトルされるステート遷移などである。近年、イメージング速度を各段に向上させた高速AFM技術が開発され (Ando et al. 2001, Ando et al. 2024)、これらの反応ダイナミクスを直接動画として可視化する試みが進められつつある。光合成膜におけるタンパク動態に関する研究は、古くから蛍光消光回復法 (FRAP) や蛍光相関分光法 (FCS) を用いて行われてきた (Kirchhoff et al. 2014)。しかし、これらの手法では、追跡できる対象が蛍光を発する光合成タンパク質に限られる。また各タンパク質の室温下での蛍光波長は近いため、特定のタンパク質に関する情報を抜き出すハードルは高い。目的タンパク質にサブミクロンサイズの標識をつけ顕微鏡で追跡する一分子追跡法 (SPT) を用いた動態評価も行われてきたが、標識粒子の立体障害によりタンパク質の移動域に制限がでてしまうという問題点がある (Consoli et al. 2005)。高速AFM像として、溶液中で非破壊かつ無修飾の状態、膜内での各タンパク質のふるまいを計測でき

ば、様々な光合成反応に詳細な説明を与えることが可能になる。

高速AFMを適用した研究例として、B. Onoaらによるホウレンソウ由来グラナの観察がある (Onoa et al. 2020)。分解能の問題でCyt *b<sub>6</sub>f*とPSIIの区別には至らなかったものの、これら二量体タンパク質がグラナで拡散する様子が動画として初めてとらえられた。大部分のグラナにおいて二量体タンパク質は $\sim 10 \text{ nm}^2$ の局所領域内での拡散を示したが、一部のグラナでは光応答における過渡的な状態と予想される、極めて大きな移動性を示すことが明らかになった。また、高速AFMはグラナにおけるPSIIの構造変化の追跡にも用いられている (Tokano et al. 2020)。PSIIの膜表在性サブユニットであるPsbPとPsbOがプローブとの相互作用により段階的に乖離していく様子がとらえられた。この膜表在性タンパク質の乖離と、さらにはMnCaクラスターの分解が、CP43のルーメン側ドメインに構造的ゆらぎをもたらすことが高速AFMで明らかになり、このドメインのMnCaクラスター構築への重要性が示唆されることとなった。今後、高速AFMを用いた研究が進み、光を含めた生理環境の変化が、どのように光合成タンパク質の物性や構造、そしてマクロな配置の変化をもたらすのか、分子スケールで理解されることが期待される。

## 謝辞

本稿で紹介した研究の一部は科研費21H05040, 23H04963の助成を受けて実施されたものです。

## 参考文献

- Amyot, R. and Flechsig, H. (2020) BioAFMviewer: An Interactive Interface for Simulated AFM Scanning of Biomolecular Structures and Dynamics. *PLoS Comput. Biol.* 16: e1008444
- Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K. and Toda A (2001) A High-speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 98: 12468-12472
- Ando, T., Fukuda, S., Ngo, K.X. and Flechsig, H., (2024) High-speed Atomic Force Microscopy for Filming Protein Molecules in Dynamic Action. *Annu. Rev. Biophys.* 53: 19-39
- Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. (1986) Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56: 930-933
- Consoli, E., Croce, R., Dunlap, D.D. and Finzi, L. (2005) Diffusion of Light-harvesting Complex II in the Thylakoid Membranes. *EMBO Rep.* 6:782–786.
- Fechner, P., Boudier, T., Mangelot, S., Jaroslowski, S., Sturgis, J.N. and Scheuring, S. (2009) Structural Information, Resolution, and Noise in High-resolution Atomic Force Microscopy Topographs. *Biophys. J.* 96: 3822-3831
- Fukuda, S. and Ando, T. (2021) Faster High-speed Atomic Force Microscopy for Imaging of Biomolecular Processes. *Rev. Sci. Instrum.* 92: 033705
- García, R. (2010) *Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy*; Wiley-VCH.
- Heath, G.R., Kots, E., Robertson, J.L., Lansky, S., Khelashvili, G., Weinstein, H., et al. (2021) Localization Atomic Force Microscopy. *Nature* 594: 385-390
- Hu, S. and Raman, A. (2007) Analytical Formulas and Scaling Laws for Peak Interaction Forces in Dynamic Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 91: 123106
- Kirchhoff, H. (2014) Diffusion of Molecules and Macromolecules in Thylakoid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1837: 495–502.
- Kodera, N., Yamashita, H. and Ando, T. (2005) Active Damping of the Scanner for High-speed Atomic Force Microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 76: 053708
- Kubo, S., Umeda, K., Kodera, N. and Takada, S. (2023) Removing the Parachuting Artifact using Two-way Scanning Data in High-speed Atomic Force Microscopy. *Biophys. Physicobiol.* 20: e200006
- Liu, L.N. and Scheuring, S. (2013) Investigation of Photosynthetic Membrane Structure using Atomic Force Microscopy. *Trends. Plant Sci.* 18:277–286.
- Marchesi, A., Umeda, K., Komekawa T., Matsubara, T., Flechsig, H., Ando, T. et al.. (2021) An Ultra-wide Scanner for Large-area High-speed Atomic Force Microscopy with Megapixel Resolution. *Sci. Rep.* 11: 13003
- Matsunaga, Y., Fuchigami, S., Ogane, T. and Takada, S. (2023) End-to-end Differentiable Blind Tip Reconstruction for Noisy Atomic Force Microscopy Images. *Sci. Rep.* 13: 129
- Müller, D.J., Buldt, G. and Engel, A. (1995a) Force-induced Conformational Change of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 249: 239-243
- Müller, D.J., Schabert, F.A., Büldt, G. and Engel, A. (1995b) Imaging Purple Membranes in Aqueous Solutions at Sub-nanometer Resolution by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 68: 1681-1686

- MacGregor-Chatwin, C., Nürnberg, D.J., Jackson, P.J., Vasilev, C., Hitchcock, A., Ho, M.Y., et al. (2022) Changes in Supramolecular Organization of Cyanobacterial Thylakoid Membrane Complexes in Response to Far-red Light Photoacclimation. *Sci. Adv.* 8: 1–16.
- Meyer, G. and Amer, N.M. (1988) Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 53: 1045–1047
- Onoa, B., Schneider, A.R., Brooks, M.D., Grob, P., Nogales, E., Geissler, P.L., et al. (2014) Atomic Force Microscopy of Photosystem II and its Unit Cell Clustering Quantitatively Delineate the Mesoscale Variability in *Arabidopsis* Thylakoids. *PLoS One*. 9: e101470
- Onoa, B., Fukuda, S., Iwai, M., Bustamante, C. and Niyogi K.K. (2020) Atomic Force Microscopy Visualizes Mobility of Photosynthetic Proteins in Grana Thylakoid Membranes. *Biophys. J.* 118: 1876–1886.
- Ruban, A.V. and Johnson, M.P. (2015) Visualizing the Dynamic Structure of the Plant Photosynthetic Membrane. *Nat. Plants* 1: 15161
- Scheuring, S., Ringler, P., Borgnia, M., Stahlberg, H., Müller, D.J., Agre, P., et al.. (1999) High Resolution AFM Topographs of the *Escherichia coli* Water Channel Aquaporin Z. *EMBO J.* 18: 4981–4987
- Sturgis, J.N., Tucker, J.D., Olsen, J.D., Hunter, C.N. and Niederman, R.A. (2009) Atomic Force Microscopy Studies of Native Photosynthetic Membranes. *Biochemistry.* 48: 3679–3698.
- Sznee, K., Dekker, J.P., Dame, R.T., van Roon, H., Wuite, G.J.L. and Frese, R.N. (2011) Jumping Mode Atomic Force Microscopy on Grana Membranes from Spinach. *J. Biol. Chem.* 286: 39164–39171.
- Tietz, S., Puthiyaveetil, S., Enlow, H.M., Yarbrough, R., Wood, M., Semchonok, D.A. et al. (2015) Functional Implications of Photosystem II Crystal Formation in Photosynthetic Membranes. *J. Biol. Chem.* 290: 14091–14106.
- Tokano, T., Kato, Y., Sugiyama, S., Uchihashi, T. and Noguchi, T. (2020) Structural Dynamics of a Protein Domain Relevant to the Water-Oxidizing Complex in Photosystem II as Visualized by High-Speed Atomic Force Microscopy. *J. Phys. Chem.* 124: 5847–5857
- Umeda, K., Okamoto, C., Shimizu, M., Watanabe, S., Ando, T. and Kodera, N. (2021) Architecture of Zero-latency Ultrafast Amplitude Detector for High-speed Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 119: 181602
- Viani, M.B., Pietrasanta, L.I., Thompson, J.B., Chand, A., Gebeshuber, I.C., Kindt, J.H., et al. (2000) Probing Protein-protein Interactions in Real Time. *Nat. Struct. Biol.* 7: 644–647
- Wendel, M., Lorenz, H. and Kotthaus J.P. (1995) Sharpened Electron Beam Deposited Tips for High Resolution Atomic Force Microscope Lithography and Imaging. *Appl. Phys. Lett.* 67: 3732
- Wood, W.H.J., MacGregor-Chatwin, C., Barnett, S.F.H., Mayneord, G.E., Huang, X., Hobbs, J.K., et al. (2018) Dynamic Thylakoid Stacking Regulates the Balance between Linear and Cyclic Photosynthetic Electron Transfer. *Nat. Plants*, 4: 116–127.
- Zhao, L.S., Su, H.N., Li, K., Xie, B.B, Liu, L.N., Zhang, X.Y., et al. (2016) Supramolecular Architecture of Photosynthetic Membrane in Red Algae in Response to Nitrogen Starvation. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.*, 1857, 1751–1758.
- Zhao, L.S., Huokko, T., Wilson, S., Simpson, D.M., Wang, Q., Ruban, A.V., et al. (2020) Structural Variability, Coordination and Adaptation of a Native Photosynthetic Machinery. *Nat. Plants.* 6: 869–882.