



理工研究域  
バイオAFM先端研究センター

金沢大学理工研究域  
バイオ AFM 先端研究センター

# 活 動 報 告 書

2010—2014 年度

2015年3月20日

# 金沢大学 理工研究域 バイオ AFM 先端研究センター

## 2010-2014 年度 活動報告書

### 目 次

はじめに	2
1. センターの陣容整備	4
2. センターの予算	4
3. 学外協力研究者と研究内容のキーワード	4
4. 学外共同研究者と研究内容のキーワード	5
5. バイオ AFM 夏の学校	7
6. セミナーの開催	7
7. アピールポイント	9
8. 研究の概要・成果・進捗状況	11
8.1. 高速 AFM 関連の技術開発研究	11
8.2. 高速 AFM によるバイオイメージング研究	26
8.3. 超解像液中 FM-AFM 関連の技術開発	57
8.4. 超解像 FM-AFM の応用研究	59
8.5. イメージング研究に向けた分子・細胞系の探索	62
9. 発表論文（英文雑誌）	65
10. 発表論文（英文書籍）	70
11. 日本語雑誌/書籍の解説・総説記事	71
12. 招待講演（国際会議・海外の会議）	72
13. 招待講演（国内会議）	77
14. 特許出願 及び 登録済特許	83
15. 受賞	84
16. 外部資金獲得状況	84
17. その他（学会・シンポジウム開催，新聞報道など）	87

## はじめに

タンパク質は生命の機能素子である。筋収縮、細胞分裂、遺伝子情報の読み取り、記憶、思考といった全ての生命現象はタンパク質の作用によって生ずる。また、タンパク質の異常は疾病を起こす。それ故、タンパク質の働く仕組みの解明は生命科学における最重要課題の一つである。様々な手法を駆使して研究が進められてきたが、構造解析と動態解析が主要なアプローチである。X線結晶回折、電子顕微鏡、NMRといった構造生物学的手法により、多くのタンパク質の構造が詳細に明らかにされてきた。しかし、得られる情報は静止構造に限られ、構造を大きく変え、動的に相互作用を変える多くのタンパク質系に対しては、詳細な静止構造の有効性は限定的である。一方、蛍光顕微鏡に代表される1分子挙動解析技術も開拓・利用されているが、光学的手法であるため、回折限界を破る超解像であっても、タンパク質分子そのものを観察できない。すなわち、構造と動的挙動を同時観察可能な技術が存在しない。この技術の欠如こそが、動的なタンパク質の機能発現機序の解明を困難にしてきた大きな要因であった。

原子間力顕微鏡（AFM）はもともと固体表面の原子像を撮ることを目的に1986年に開発された技術であるが、試料環境を選ばず、導電性、絶縁性といった試料の性質に関係なく試料表面を高解像で可視化できる。それ故、水溶液中にあるタンパク質分子の表面構造を1-2 nm（ときには、サブナノメートル）の空間分解能で観察可能な唯一の顕微鏡である。しかし、試料表面上の各点毎にカンチレバー探針と試料との相互作用を検出する手法であるため、1画像を撮るのに分のオーダーの時間を要し、実質的に静止像しか撮れない。この限界を克服すべく、安藤は振幅変調（AM）AFMの高速化に向け1993年頃に様々な技術開発に着手した。その後、古寺が加わり2001年に高速AFMの初期装置を構築した。更にその後、内橋も加わった強力なチームの下、初期装置の様々な改良を経て、2008年に実用レベルの高速AFMが世界に先駆けて実現された。この高速AFMは、サブ100 msの時間分解能と低侵襲性を有するため、機能を阻害せずにタンパク質分子の動態を観察可能である。実際、いくつかのタンパク質系を対象とした機能動態観察により、この新規顕微鏡の革新性、有効性が実証された。

一方、周波数変調（FM）AFMはサブ原子レベルの超解像度を実現したが、原子解像度も超解像度も超高真空の環境下でしか実現されておらず、液中環境下で原子解像度を得ることは不可能とされていた。2005年、福間らは、FM-AFMのノイズを格段に低減する技術を開発し、世界で初めて液中FM-AFMによる原子分解能観察を実現した。

このように、金沢大学は世界最先端の液中AFM技術を2つ有することとなった。地方大学としては非常に稀なことである。折しも、大学の特徴ある優れた研究を強力に推進し、それを牽引力として大学全体の研究力を強化するという大学の方針が打ち出され、各研究域に2つの研究センターを設立することが中村信一前学長の英断により決定された。こうして、2009年後半からの準備段階を経て、理工研究域内に4部門から成るバイオAFM先端研究センター（以下、センター）が2010年10月に設立された。その後、学外から採用されたテニュアトラック教員3名が加わり、2012年7月に陣容が整った。

センターのメンバーは、物理学、工学、生物学のバックグラウンドをもち、分野横断型の研究推進に相応しい構成になっている。センターは、①高速AFM研究開発部門、②イメージング研究部門、③超解像AFM研究開発部門、④分子・細胞研究部門、の4部門から成るが、分野横断研究を推進するために、部門間の境界は互いに重なっており、技術開発するメンバーもバイオ応用研究を行い、バイオ応用研究するメンバーも必要な技術を提言し技術開発に貢献するとともに、ときには自ら新技術を開

発する。センターの最も重要な使命は、新しい生命科学を開拓・探究することにある。『新しい技術は新しい発見を可能にし、新しい発見は新しいアイデアを生む』という信念の下、メンバーが連携し、新しい生命科学の創成とその世界普及を目指している。革新的独自技術の創造によって、他の機関では困難な独創的ナノバイオ研究を推進することが本センターの大きな特色である。我々の活動の使命は、新技術の開発自身にあるのではなく、その技術を武器に自ら生命科学を開拓していくことにある。更に言えば、技術開発は原理検証で終わるものではなく、バイオ研究における有効性・革新性を実証し、広く応用展開を図り、新しい研究手法を世界に普及させるまで追求せねばならない。それによって初めて新技術の真価が認められ、本センターが世界の中でもひと際目立つ特色ある研究集団として世界から評価されるようになって考えている。また、このように世界トップを目指す独創的研究環境の現場で、若い人材を育成していくことも本センターの重要な使命である。



図1. センターの組織図

本報告書は 2010 年度から 2014 年度までの 5 年間に行われたセンターの諸活動の概要をまとめたものである。研究については、以前から手掛けていたテーマから最近着手したものまで含んでおり、前者については主要な発表論文の概要に、後者については進捗状況の報告となっている。また、外部からセンターに新たに加わったメンバーにとっては、新しい環境でスタートしてから未だ 2-3 年しか経っていないため、主にこれまでの準備的な研究の進捗報告となっている。発表論文リストに加え、招待講演、特許出願、受賞、外部資金獲得などについてもリストアップしている。

本センターの活動をご支援して頂いている文部科学省と金沢大学に、また、我々の活動に助言と激励を頂いているアドバイザーボードの先生方に感謝申し上げますとともに、共同研究などでご協力頂いている多くの研究者に御礼申し上げます。

## 1. センターの陣容整備

センターが設立された2010年10月1日以降、専属のTT准教授2名、TT助教2名、任期付き助教1名の計5名が着任し、併任の5名と併せ、計10名から成るセンターの陣容が整った。

TT准教授・イメージング研究部門：古寺哲幸（2010年10月着任）  
任期付き助教・超解像AFM研究開発部門：浅川雅（2010年10月着任）  
TT准教授・イメージング研究部門：紺野宏記（2011年11月着任）  
TT助教・イメージング研究部門：中山隆宏（2012年4月着任）  
TT助教・高速AFM研究開発部門：渡辺信嗣（2012年7月着任）

## 4 部門の構成

高速AFM研究開発部門	安藤敏夫, 内橋貴之, 渡辺信嗣
イメージング研究部門	安藤敏夫, 紺野宏記, 古寺哲幸, 中山隆宏
超解像AFM研究開発部門	福間剛士, 浅川雅
分子・細胞研究部門	田岡東, 福森義宏（H26年度から理事就任のため退職）

## 2. センターの予算

- 文部科学省のTT制度：TT教員4名の内3名の人件費及びスタートアップ資金に充当
- 文部科学省の個人選抜型TT制度：TT教員1名の研究資金に充当
- 特別経費（概算要求予算）：文科省からの支給と学内負担分（H.24-28年度）  
夏の学校の消耗品と参加者の旅費・宿泊費、ポスドク1名の雇用、学外協力研究員の旅費・宿泊費、エクスポララボ使用料、研究費に充当
- 共通基盤経費：基礎分1,000,000円＋外部資金の間接経費×係数  
夏の学校参加者の旅費・宿泊費、セミナー講師の旅費・謝金、アドバイザーの旅費・謝金などに充当

## 3. 学外協力研究者と研究内容のキーワード

1. F<sub>1</sub>-ATPase, ClpB, セルラーゼ  
飯野亮太, 岡崎統合バイオサイエンスセンター・分子科学研究所
2. セルラーゼ、キチナーゼ  
五十嵐圭日子, 東京大学大学院農学生命科学研究科
3. バイオセンサ  
春山哲也, 九州工業大学大学院生命体工学研究科
4. アメーバ運動機構  
島袋勝弥, 宇部工業高等専門学校・物質工学科
5. Dnmt1, Uhrf1  
有田恭平, 横浜市立大学・生命医科学研究科
6. Secトランスロコン  
塚崎智也, 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

#### 4. 学外共同研究者と研究内容のキーワード

上記の学外協力研究員の他にも、多様なテーマで他機関の多くの研究者と共同研究を推進している。

##### 海外

1. KaiABC  
Carl Johnson & Tetsuya Mori: Dept. of Biological Sciences, Vanderbilt Univ., USA
2. 高速 AFM による電気化学計測  
Michael Higgins: Intelligent Polymer Research Institute, Univ. of Wollongong, Canada
3. 高速 AFM の光学系  
En-Te Hwu: Dept. of Physics, Academia Sinica, Taiwan
4. AFM の分子動力学シミュレーション  
Adam S. Foste: Dept. of Applied Physics, Aalto Univ., Finland
5. AFM の分子動力学シミュレーション  
Alexander L. Shluger: Dept. of Physics and Astronomy & LCN, Univ. College London, UK
6. 天然変性タンパク質  
Sonia Longhi: AFMB UMR, Aix-Marseille Univ. & CNRS, AFMB UMR, France  
Jeffrey Hansen: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Colorado State Univ., USA
7. RecBCD  
半田直史: Dept. of Microbiology, UC Davis, USA
8. Myosin VI  
Lee H. Sweeney: School of Medicine, Univ. of Pennsylvania, USA
9. Myosin X  
池辺光男: Dept. of Cellular and Molecular Biology, Univ. of Texas Health Science Center, USA
10. Centralspindlin  
三嶋将紀: Warwick Medical School, Univ. of Warwick
10. CPB/p300  
Peter Tompa: VIB Dept. of Structural Biology, Vrije Univ. Berjium
12. Antibody-antigen  
Peter hinterdorfer: Institute for Biophysics, Johannes Kepler Univ. Linz, Austria
13. Lipid membranes  
Pierre-Emanuel Milhiet: Centre de Biochimie Structurale, INSERM, France
14. Membrane proteins  
Simon Scheuring: U1006 INSERM / Univ. Aix-Marseille, France

##### 国内

1. FliK  
相沢慎一：広島県立大学・生命環境学部
2. アクチン結合タンパク質  
上田太郎：産業技術総合研究所・セルメカニクス研究グループ
3. Hef  
石野良純：九州大学・大学院農学研究院
4. PQBP-1  
水口峰之：富山大学・大学院薬学研究部
5. 薬剤排出トランスポーター  
村上聡：東京工業大学・大学院生命工学研究科
6. マイコプラズマ  
宮田真人：大阪市立大学・大学院理学研究科

7. FACT  
森川耿右：国際高等研究所
8. F-ATPase, V-ATPase  
野地博行 & 上野博史：東京大学・大学院工学研究
9. バテリオロドプシン  
神取秀樹：名古屋工業大学・生命物質工学科
10. キチナーゼ  
渡邊剛志 & 杉本華幸：新潟大学・大学院自然科学研究科
11. ClpB  
渡辺洋平：甲南大学・理学部生物学科
12. V-ATPase  
村田武士：千葉大学・大学院理学研究科
13. FliI  
今田勝己：大阪大学・大学院理学研究科
14. ダイナミン  
竹居孝二：岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科（医学系）
15. ダイニン  
豊島陽子：東京大学・大学院総合文化研究科
16. 膜孔形成毒素  
小林俊秀：理化学研究所・基幹研究所
17. 味覚受容体  
山下敦子：岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）
18. オートファジー  
野田展生：公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所
19. MukBEF  
仁木宏典：国立遺伝学研究所・系統生物研究センター
20. Artificial protein cage  
Jonathan Heddle：理化学研究所・基幹研究所
21. AAA Proteins  
小椋 光：熊本大学・発生医学研究所
22. 光触媒  
横野照尚：九州工業大学・大学院工学研究院
23. チュービュリン  
瀬藤利光：浜松医科大学・医学部
24. K<sup>+</sup>チャネル (KcsA)  
老木成稔：福井大学・医学部
25. ナノファイバー  
坂元博昭：福井大学・テニユアトラック推進本部
26. 糸状性好熱細菌の滑走運動  
春田 伸：首都大学東京・理工学研究科
27. ユビキチン  
岩井一宏：京都大学・大学院医学研究科
28. バクテリアのユビキチン様タンパク質  
金井 保：京都大学・大学院工学研究科
29. プロテアソーム  
佐伯 泰：東京都医学総合研究所
30. 酵母プリオン  
田口英樹：東京工業大学・大学院生命理工学研究科

31. 酵母プリオン  
田中元雅：理化学研究所・脳科学総合研究センター
32. 光合成、酸化ストレス  
西山佳孝：埼玉大学・大学院理工研究科
33. 微小管  
岡田康志：理化学研究所・QBiC 生命システム研究センター

## 5. バイオ AFM 夏の学校

文部科学省の支援を受けて、金沢大学発の高速 AFM と超解像液中 AFM の普及活動の一環として、主に国内の大学院学生や若手研究者を対象に hands-on 形式の 1 週間に亘る夏の学校を 2012 年度から毎年 8 月に開催してきた。国内旅費と宿泊費を受講生全員に支給し、実習も無料である。応募者数は毎年、高速 AFM には 20-30 名、超解像 AFM には数名-10 名あり、徐々に増えている。装置の台数と講師の数に限界があるため、研究テーマ等から選考し、高速 AFM では 10-20 名に、超解像 AFM では 3-4 名に受講生を絞っている。センターの教員、学生その他、(株)生体分子計測研究所の技術者 1-2 名が加わり、講師役を務めてきた。初日の午後に AFM に関する一般的な話と、高速 AFM 及び超解像 AFM の装置の詳細、取り扱いにおける注意事項等に関する講義を行い、二日目には標準的な試料を用いて装置の操作を訓練する。三日目から六日目まで自ら装置を操作して、各自が持参した試料の観察を行う。最終日には受講生全員が研究背景や観察結果を発表、議論する。実習は分かれて行うため受講生同士が会う機会が少ないので、中日の夕方からピアガーデンなどで親睦をはかっている。最終日の夜は打ち上げの食事会で盛り上がる。

受講生のうち何名かは金沢大学を再訪し、AFM 観察を行って各自の研究に利用している。また、高速 AFM が設置してある他大学で高速 AFM 観察を行っている受講生が何名かいる。この行事は徐々に広く知られるようになってきており、夏の学校は金沢大学発の AFM 技術の普及に効果を上げてきている。少ないが海外からの受講生もあり、来年度からは海外にもアナウンスする予定。

第 1 回：2012 年 8 月 5-10 日（受講者総数 14 名）

第 2 回：2013 年 8 月 19-25 日（受講者総数 17 名）

第 3 回：2014 年 8 月 18-24 日（受講者総数 24 名）

## 6. セミナーの開催

2012 年度からセンター主催で毎年公開セミナーを開催してきた。センターのメンバーの共同研究者や、来訪が予定されていた研究者などを講師に招いている。センターでの共同研究活動に役立つばかりでなく、金沢大の学生や教員が多方面に亘る最前線の仕事を知る機会にもなり、有効な活動である。

### 2014 年度

第 1 回：平成 26 年 5 月 30 日（金）

村上 聡 教授（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

「多剤耐性の分子機構」

第 2 回：平成 26 年 11 月 5 日（水）

野田岳志 准教授（東京大学医科学研究所感染症国際研究センター）

「インフルエンザウイルスのゲノムパッケージ機構」

第 3 回：平成 27 年 1 月 9 日（金）

岩井一宏 教授（京都大学大学院医学研究科細胞機能制御学）  
「ユビキチン修飾系:その多様性と多彩な機能」

第4回：平成27年1月15日（木）

Prof. Simon Shin (Center for Applied Life Science Hanbat National University)

"AFM characterization of the nucleation process of bodily proteins related to major diseases: A Proposal"

第5回：平成27年3月5日（木）

春田 伸 准教授（首都大学東京 理工学研究科 生命科学専攻）

「糸状性好熱細菌の滑走運動」

第6回：平成27年3月6日（金）

村田武士 教授（千葉大学大学院理学研究科化学コース）

「V-ATPase の回転メカニズム」

## 2013 年度

第1回：平成25年9月25日（水）

Staff scientist, Paul Ashby (Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Lab) “Toward imaging membrane protein assembly and dynamics with in-situ atomic force microscopy”

第2回：平成25年11月13日（水）

有田恭平准教授（横浜市立大学生命医科学研究科）

「UHRF1 タンパク質によるエピジェネティックな情報の読み取り機構の構造基盤」

第3回：平成25年11月19日（火）

Prof. Ruben Perez (Departamento de Fisica Teorica de la Materia Condensada, Modulo C-5 Universidad Autonoma de Madrid)

“Understanding AFM contrast: from oxides to biomolecules in liquid”

第4回：平成25年11月19日（火）

Dr. En-Te Hwu (Academia Sinica, Taiwan) “Astigmatic detection system based atomic force microscope & nano positioning systems”

第5回：平成25年11月22日（金）

小椋 光教授（熊本大学発生医学研究所）

「多彩な細胞機能を司る AAA 型分子シャペロン/プロテアーゼの分子機構」

第6回：平成25年11月22日（金）

竹居孝二教授（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

「ダイナミン GTP アーゼによる生体膜と細胞骨格の制御」

第7回：平成25年12月10日（火）

相沢慎一教授（県立広島大学生命環境学部）

「風来坊 K の迷走一べん毛フックの長さ制御タンパク質 FliK」

第8回：平成26年1月8日（水）

佐伯 泰副参事研究員（公益財団法人東京都医学総合研究所）

「細胞内タンパク質分解装置プロテアソーム研究の最前線」

第9回：平成26年3月14日（金）

仁木宏典教授（国立遺伝学研究所）

「原核細胞における DNA 分配 コンデンシンによる核様体の再形成」

第10回：平成26年3月14日（金）

丹羽達也助教（東京工業大学）

「無細胞タンパク質合成系を利用したタンパク質凝集および分子シャペロン機能の網羅解析」

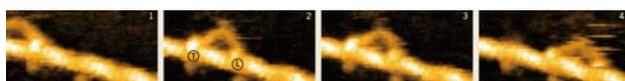
## 2012 年度

- 第 1 回：平成 24 年 9 月 7 日（金）  
秋山修志教授（分子科学研究所）  
「タンパク質が奏でる 24 時間周期の生体リズム」
- 第 2 回：平成 24 年 10 月 4 日（木）  
木下和久博士（理研基幹研究所平野研究室）  
「コンデンシン複合体再構成の現状」
- 第 3 回：平成 24 年 10 月 24 日（水）  
Prof. Adam Foster (Dept. of Applied Physics, Aalto University, Helsinki, Finland)  
“Modelling the interface of water with insulating surfaces”
- 第 4 回：平成 24 年 11 月 27 日（火）  
田口英樹教授（東京工大生命理工学研究科）  
「タンパク質ワールドの理想と現実：凝集・シャペロン・プリオン」
- 第 5 回：平成 24 年 12 月 27 日（木）  
由井宏治准教授（東京理科大・理・第一部化学科）  
「金属配位型ペプチド脂質ナノチューブの自己集合構造制御と分光計測」
- 第 6 回：平成 25 年 1 月 16 日（水）  
Prof. David Haviland (Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden)  
“High speed mechanical surface analysis with intermodulation atomic force microscopy”
- 第 7 回：平成 25 年 1 月 24 日（木）  
今田勝巳 教授（大阪大学理学研究科）  
「細菌べん毛構築のしくみ」
- 第 8 回：平成 25 年 1 月 24 日（木）  
南野徹 准教授（大阪大学生命機能研究科）  
「細菌べん毛モーターの回転ダイナミクス」
- 第 9 回：平成 25 年 2 月 8 日（金）  
小野賢二郎講師（金沢大学附属病院神経内科）  
「アルツハイマー病  $\beta$  アミロイド蛋白凝集機構解明から予防・治療薬開発へ」
- 第 10 回：平成 25 年 2 月 20 日（水）  
塚崎智也助教（東京大学・理学系研究科）  
「タンパク質膜透過装置 Sec トランスロコンの構造生物学」

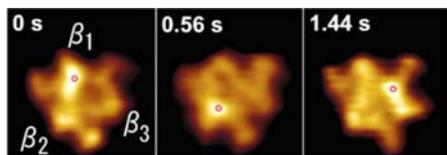
## 7. アピールポイント

「はじめに」でも述べたように、高速 AFM と液中超解像 FM-AFM は金沢大学発の世界に誇る世界最先端の AFM 技術である。従来技術では見えなかった液中のダイナミックな世界や超微細な世界を初めて見えるようにしたブレイクスルー技術であり、8.2, 8.4, 8.5 節で紹介するような応用研究が進んでいる。応用研究は注目を浴びることが多いが、技術開発研究は地味である。最終装置・技術は個々の要素技術開発の集大成であるので、集大成されるまではあまり注目されることはない。だが、そのような地味な研究を根気よく継続して初めてブレイクスルーは生まれる。

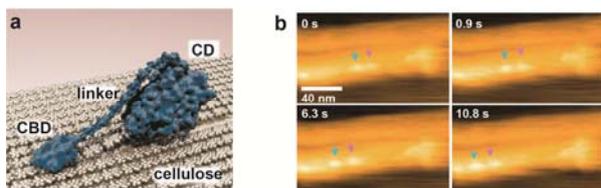
さて、ここでは本センターのアピールポイントを分かりやすく示すことにする。まずは、インパクトファクターの高い雑誌に掲載され、注目された応用研究の論文や総説を図 2 に、またセンター設立前に行われ、これらの応用研究を支えた技術開発の論文の中で引用回数の多いの論文を図 3 に紹介する。引用回数（SCOPUS で調査）は 2014 年 3 月 21 日時点のものである。



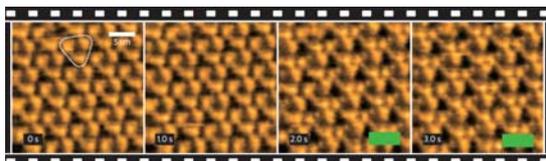
Nature (2010), Impact factor 36, Citation 201



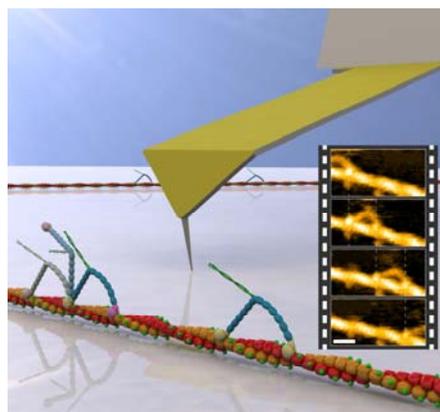
Science (2011), Impact factor 31, Citation 103



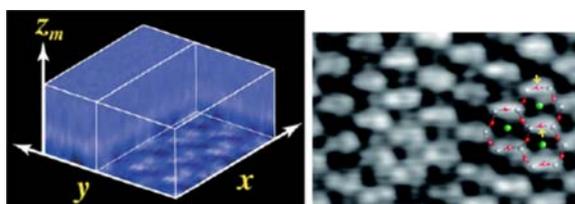
Science (2011), Impact factor 31, Citation 152



Nature Nanotechnology (2010), Impact factor 30, Citation 108

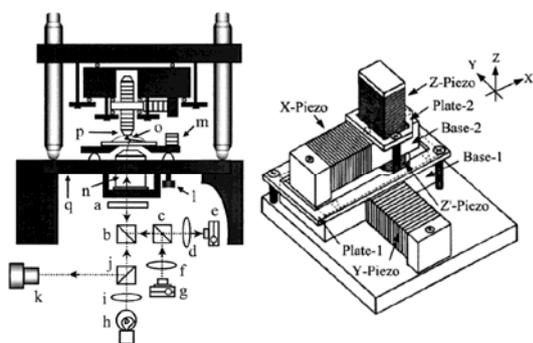


Chemical Review (2014), Impact factor 45, Citation 15

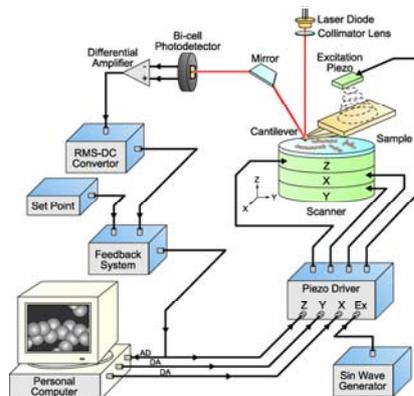


Physical Review Letters (2010), Impact factor 7.6, Citation 114

図2. インパクトファクターの高い雑誌に掲載され注目された応用研究の論文と総説



Proceedings National Academy of Science USA (2001), Impact factor 10.6, Citation 452



Progress in Surface Science (2008), Impact factor 5.4, Citation 183

図3. 応用研究を支えた技術開発の論文

当センターの研究のアクティビティの高さ，研究業績の質の高さ，注目度などのバロメータとなる最近5年間の数字を以下に挙げておく（詳細は，9節以降に記載）。

- ・ 英文学術誌での発表論文総数：69 編（いずれも標準の水準を超える質の高い論文）
- ・ 受賞：17 件（5 年以前も合わせると 30 件）
- ・ 国際会議と海外のシンポジウムなどへの招待講演数：112 件
- ・ 国内会議への招待講演数：106 件

- ・外部資金獲得額：約 8 億円（科学研究費補助金：基盤研究 S，基盤研究 A，若手研究 A，若手研究 B，新学術領域研究、挑戦的萌芽研究など；科学技術振興機構：CREST，さきがけ，先端計測など）

その他に開発技術の製品化に関連して、以下の数字（過去全体に亘る）を挙げておく。

- ・取得（登録済）特許数：26 件
- ・特許実施ロイヤルティ：2 億円以上
- ・製品化された高速 AFM 装置の販売台数：約 40 台（最近 4 年間）

## 8. 研究の概要・成果・進捗状況

### 8.1. 高速 AFM 関連の技術開発研究

タンパク質分子の機能動態を撮影する実用レベルの高速 AFM 装置は 2008 年に完成しているが、その更なる性能向上に加え、個別の対象に応用する上で必要になる周辺応用技術、広範な試料系や現象に高速 AFM を適用可能とするための機能拡張技術など、未だ開発すべき課題が多く残されている。例えば、タンパク質分子よりも遥かに大きな細胞の動態を撮影可能とするには、スキャナーの走査範囲を大幅に拡大するとともに、共振周波数の低い大型スキャナーの振動を抑制する技術が新たに必要になる。現在の高速 AFM では試料ステージ側を走査しているが、高速性を重視するため、また、Z 方向に走査したときに生ずる水圧の影響を軽減するために、試料ステージは直径 1.5 mm 程度の大きさにせざるを得ない。従って、培養した細胞が入ったシャーレーなど大きな試料系に適用できない。試料ステージ走査に代わり、カンチレバー探針走査方式に変更しなければならないが、カンチレバーのたわみを計測する光てこ光学系に装備されているレーザービームをカンチレバー走査に同期して走査し、XY 走査されるカンチレバー上の常に同じ位置にレーザービームをフォーカスする必要がある。蛍光顕微鏡はバイオ研究と相性がよいが、試料ステージ走査型の高速 AFM と組み合わせると、蛍光像が動いてしまうという問題ばかりでなく、蛍光顕微鏡の光学系と構造上相容れないといった深刻な問題がある。以上のような技術的課題を克服・達成し、高速 AFM を生命科学に更に広く有効な装置とするために、我々は様々な開発研究をこれまで進めてきた（図 4）。

個々の高速 AFM の応用において、様々な周辺技術も要求される。例えば、試料温度を上げるといった要求があるが、加熱に伴う溶液の対流によってレーザービームの進行やカンチレバーの動作が不安定になるという問題が生ずる。また、観察中に溶液を交換、タンパク質やリガンドを含む溶液を添加、或いは、ケージド化合物を閃光分解しリガンドをイメージング中に一瞬放出させるといった要求もあ

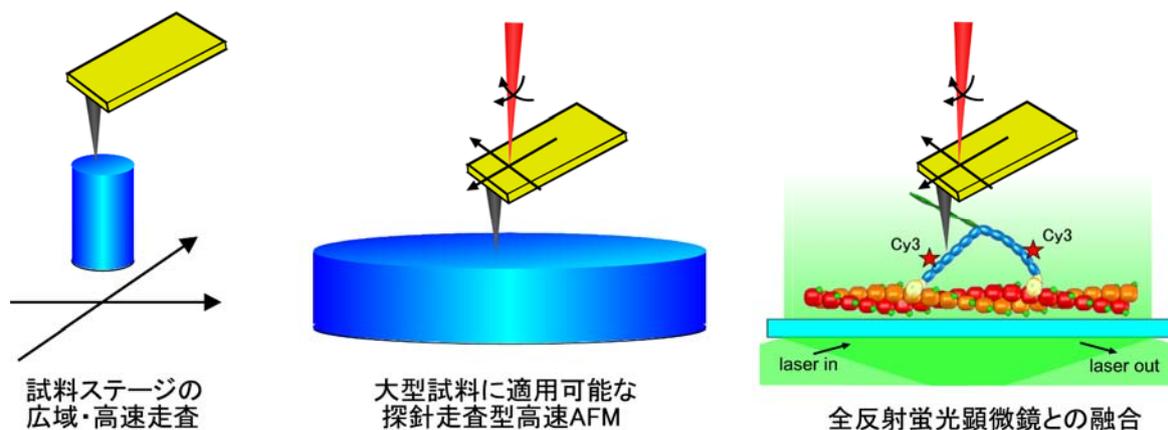


図 4. バイオ研究が要求する高速 AFM 関連の技術開発課題の例

るが、溶液インジェクションや強い閃光がカンチレバーの動作を不安定にさせるという問題がある。我々はこれらの障害を回避、或いは、除去し得るいくつかの応用技術の開発研究も進めている。

液中 AFM ではカンチレバー探針を試料表面に接触させる必要がある。この接触の力は現在の高速 AFM で既にかなり軽減され、タンパク質の機能を損なわないレベルにある。しかし、極めて柔らかい真核細胞の膜は容易に変形し、それ故、その膜上に存在するタンパク質分子を可視化できない。一方、走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM) では、プローブであるガラスキャピラリの先端を試料に接触させずに試料表面を検出できるため、柔らかい細胞のイメージングや局所の電気生理計測に適している。しかし、イオン伝導計測に時間がかかるため、SICM のイメージング速度は極めて遅い。また、空間分解能も AFM より低い。これらの限界を破る高速走査型のイオン伝導顕微鏡の開発も進めている。

以下に、これまで進めてきた技術開発研究の概要、成果、進捗状況をテーマ毎に報告する。

### 8.1.1. インタラクティブモードの開発

タンパク質分子の動態を観察しながら、その分子を操作できるインタラクティブモードを開発した。その原理は以下の通り (図 5)。イメージング中に画像の特定位置 (分子に力を強く作用させる部位) にマウスを移動させ、クリックすることにより、

そのピクセル位置の XY 座標を読み込む。その次のフレーム走査で、走査位置が指定したピクセルに相当する位置に来たときに、予め定めた電圧をパソコンの D/A ボードから発生させ、その電圧を PID 制御回路のセットポイント電圧に加え、カンチレバーのセットポイント振幅を小さくする。それにより、試料ステージが探針側に移動し、通常よりも大きな力が探針から試料に加わる。走査位置が次の位置に移動すると、D/A ボードから発生させる電圧をゼロに戻し、通常のイメージングに戻る。1 ピクセルでの力の印加では対象分子の動作に影響を与えにくい場合には、マウスで指定したピクセルを中心とする複数のピクセルでも同じ動作を行うこともできる。高速 AFM 装置側では、このセットポイント振幅の低下は試料の高さが低いものと解釈する結果、強く力を加えた箇所は低い輝度として画像に記録される。8.2.15 節で述べるように、このモードを利用してアクチン線維に結合したミオシン V の頭部をアクチンから解離させ、その後起こる分子の挙動観察から化学・力学エネルギー変換について重要な発見が為された。F<sub>1</sub>-ATPase や V<sub>1</sub>-ATPase でも、力の印加の効果調べる研究を進めている。

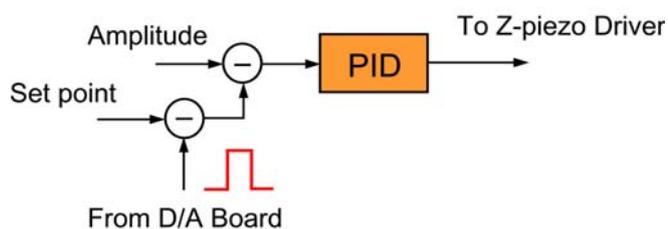


図 5. インタラクティブモードの動作原理

### 8.1.2. Tip 走査型高速 AFM 装置の開発 (Fukuda et al. Rev. Sci. Instrum. 2013; Fukuda et al. Submitted to Rev. Sci. Instrum.)

上述したように、これまでの高速 AFM では試料ステージ側を三次元走査している。これは装置構成がシンプルになるという利点があるからであるが、サイズが大きく、質量の大きな試料は扱えないばかりでなく、バイオ研究に相性のよい蛍光顕微鏡をフルに導入出来ないという欠点がある。そこで、Tip 走査型高速 AFM 装置の開発を進めてきた。Tip 走査方式の装置上の最重要課題は、カンチレバーのたわみ検出に用いる光てこ光学系 (Optical Beam Deflection センサー) のレーザー焦点位置をカンチレバーの XY 方向の運動に同期させて走査しなければならないという点にある。遅い AFM ではこの課題解決は容易でありいくつかのトラッキング手法が実現されているが、高速 AFM では難しく実現されていなかった。我々は、ミラーの角度を走査する手法と振動抑制技術でこのトラッキングを実現した

(図 6)。OBD センターのレーザー光を集光するに用いる対物レンズを通して、カンチレバーとレーザースポットを観察しながらそれらの位置調整をする必要があるため、ミラーとしてダイクロイックミラーを採用した。また、蛍光像の同時観察を念頭に、980nm のレーザー光を OBD センサーに用い、ダイクロイックミラーは短波長を透過、長波長を反射するタイプとした。集光レンズとして、超長作動距離 (24mm) の対物レンズ (CFI L Plan EPI ELWD,  $\times 20$ , NA, 0.35, Nikon) を採用し、直径 2-3  $\mu\text{m}$  の焦点スポットが得られた。1 対のピエゾ素子を逆向きに変位させることでミラーを回転させる。X-tilter の最大角度変化は  $\pm 4.8 \times 10^{-4}$  radian で、対物レンズの焦点距離が 20 mm であることから、焦点スポットは約 19  $\mu\text{m}$  変位することになるが、CCD カメラを用いた計測から最大 20  $\mu\text{m}$  X 方向に変位することが確認された。Y 方向は 16  $\mu\text{m}$  である。カンチレバーからの反射光は同じ対物レンズでコリメートされ、ダイクロイックミラーで反射され、 $\lambda/4$  板、偏光ビームスプリッター、集光レンズを通して OBD センサーに搭載された位置センサー (分割 Si PIN フォトダイオード) に導かれる。従って、ミラー Tilter の回転により、フォトダイオード受光面でのレーザー光の入射位置が変わるため、フォトダイオードからの差出力 (カンチレバーの変位に対応) の DC 値が変動することになる。しかし、高速 AFM では Tapping モードを採用しているため、イメージングに使われるのは AC 信号であり、この DC 値の低周波変動はイメージングに影響しない。

製作した X-tilter の共振周波数は 2.2 kHz であった。それ故、1 kHz の通常の三角波で走査すると、図 7a の赤線に示すように、望ましくない振動が発生する。この問題は以下の逆伝達補償法で解決した。振幅  $X_0$ 、基本角周波数  $\omega_0$  をもつ連続した 2 等辺三角波のフーリエ変換は以下の Eq. (1) で与えられる。

$$F(\omega) = 2\pi X_0 \left[ \frac{1}{2} \delta(\omega) - \frac{2}{\pi^2} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \frac{1}{k^2} \delta(\omega - k\omega_0) \right] \quad (k: \text{odd}). \quad (1)$$

周波数応答 (ゲイン  $g$ , 位相  $\theta$ ) をもつ X-tilter の伝達関数は  $G(i\omega) = g(\omega) \times e^{i\theta(\omega)}$  で表わされるが、それをドライブする逆伝達補償された信号  $D_X(t)$  は  $F(\omega)/G(i\omega)$  の逆フーリエ変換で与えられ、Eq.(2) で表わされる。

$$D_X(t) = \frac{1}{\alpha} \times \left[ \frac{X_0}{2} - \frac{4X_0}{\pi^2} \sum_{k=1}^{+\infty} \frac{1}{k^2} \frac{1}{G(ik\omega_0)} \cos(k\omega_0 t) \right] \quad (k: \text{odd}), \quad (2)$$

ここで、 $\alpha$  (nm/V) はピエゾ素子の変位係数である。Eq.(2) は無限級数であるが、実際には最初の 10 項までで十分である。この補償されたドライブ信号 (図 7b の黒線) でドライブすると、図 7b の赤線で示すように、X-tilter は望ましくない振動を起こさずに回転した。

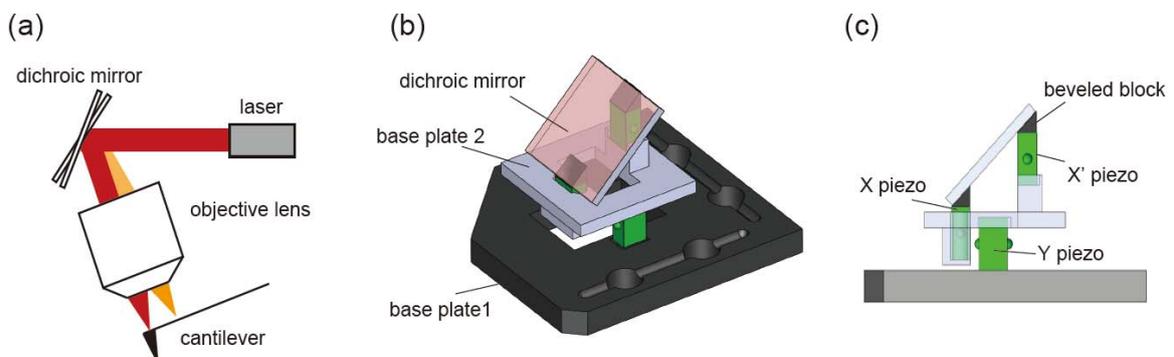


図 6. ミラー Tilter によるトラッキング。(a) 原理図, (b), (c) ミラー Tilter の全体図(b)と側面図(c)。

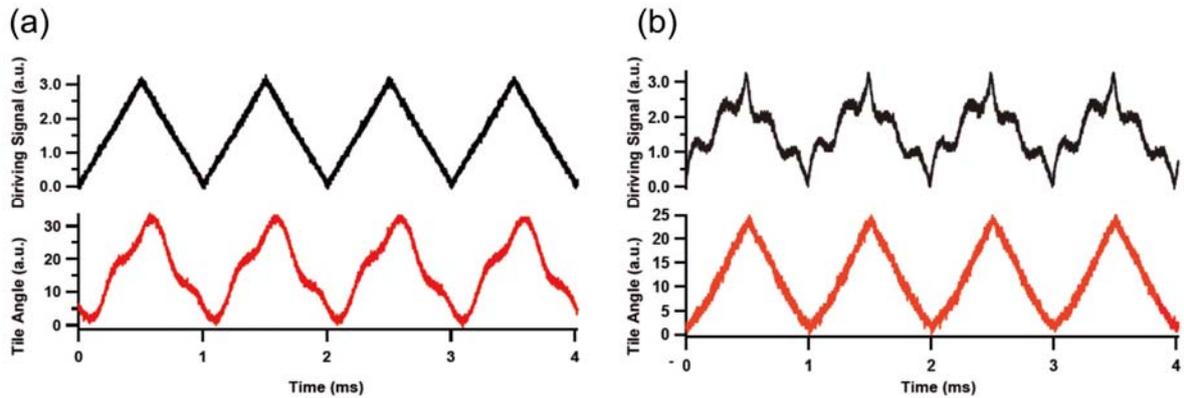


図7. 逆伝達補償法による X-Tilter の振動抑制。(a) 補償しない場合、黒線の三角波で走査すると X-Tilter の回転(赤線)は振動する。(b) 補償した場合、ドライブ信号は黒線のようになり、X-tilter はスムーズに回転する(赤線)。

このトラッキング法の精度を調べるために、カンチレバー探針を基板に接触させずに XY 走査したときのカンチレバーの振幅信号を画像化した。1 フレーム/秒 (fps) でイメージングすると、図 8a に示すように、トラッキング回路を OFF にした場合には、画像はコントラストをもち、赤線上で測定した振幅プロファイルは $\sim 1.4 \text{ nm}_{\text{p-p}}$ の変化を示した。トラッキング回路を On にした場合には、図 8b に示すように、振幅値の変動は僅かに $\sim 0.2 \text{ nm}$ であった。この高い精度は 10 fps でイメージングしても確認された。こうして、Tip 走査型高速 AFM で必須となるカンチレバー運動の高速トラッキング法が確立された。

残る課題として、カンチレバー素子の Z スキャナーへの固定法の問題がある。一見簡単そうに見える課題だが、実際には難しい。固定ジグの質量により共振周波数が下がる問題に加え、固定時に力を加えると Z スキャナーが壊れるという問題がある。通常、固定ジグを Z ピエゾに直接取り付ける方法が採用されているが、福間グループから発表されているように、共振周波数は大幅に下がる。接着固定することも可能だが、カンチレバーを頻繁に交換するには適さない。そこで、種々の固定法と固定ジグを検討した結果、以下に示す有効な方法を見出した。

図 9a-c に示すように、固定ジグを Z ピエゾに直接搭載せず、Z ピエゾの両脇に立てた支柱に板ばねを橋渡しし、その板ばねと Z ピエゾの間にカンチレバー素子を挟み、板ばねを支柱にねじで固定した。この方法により、ねじを押し力は支柱に直接かかり、カンチレバーと Z ピエゾには直接作用しない。また、板ばねの質量は小さく、また、支柱に支えられているため、Z ピエゾが駆動する質量は小

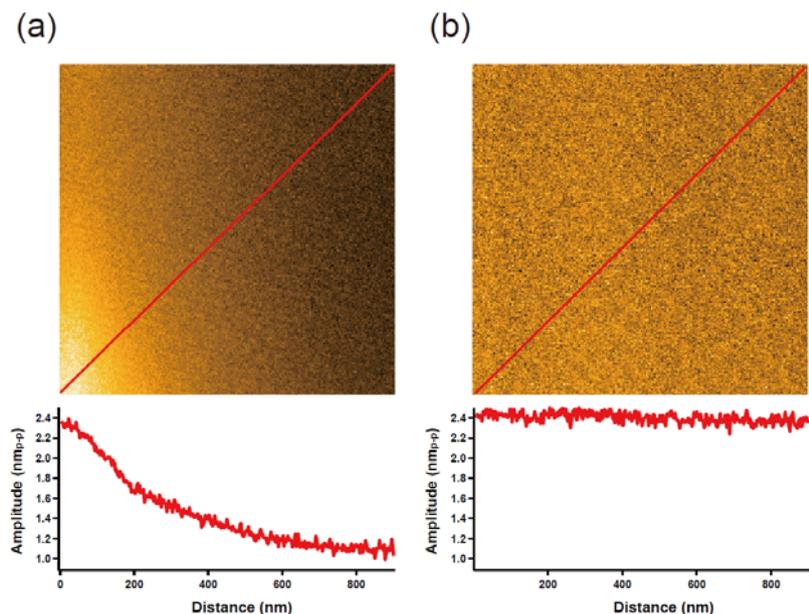


図8. カンチレバートラッキング法の精度を示すカンチレバー振動振幅の像。(a)トラッキング回路 OFF の場合、(b)トラッキング回路 On の場合。

さい。カンチレバー素子のベース部先端位置（レバーが突き出る部位）での振動を測定したところ、図 9d の破線で示す振動特性が得られた。カンチレバーを Z ピエゾに固定しても、何も載せないときの Z ピエゾの共振周波数 110 kHz からほとんど変化しないことが分かる。だが、低周波側に小さい振幅の振動が観察された。そこで更に、板ばねに薄い弾性体コートをしたところ、図 9d の実線で示すように、これらの振動もほぼ除去された。こうして第 2 の課題も解決され、Tip-走査型の高速 AFM がほぼ実現された。残る課題は、この装置で利用する広域走査可能なスキャナーの製作だけである。

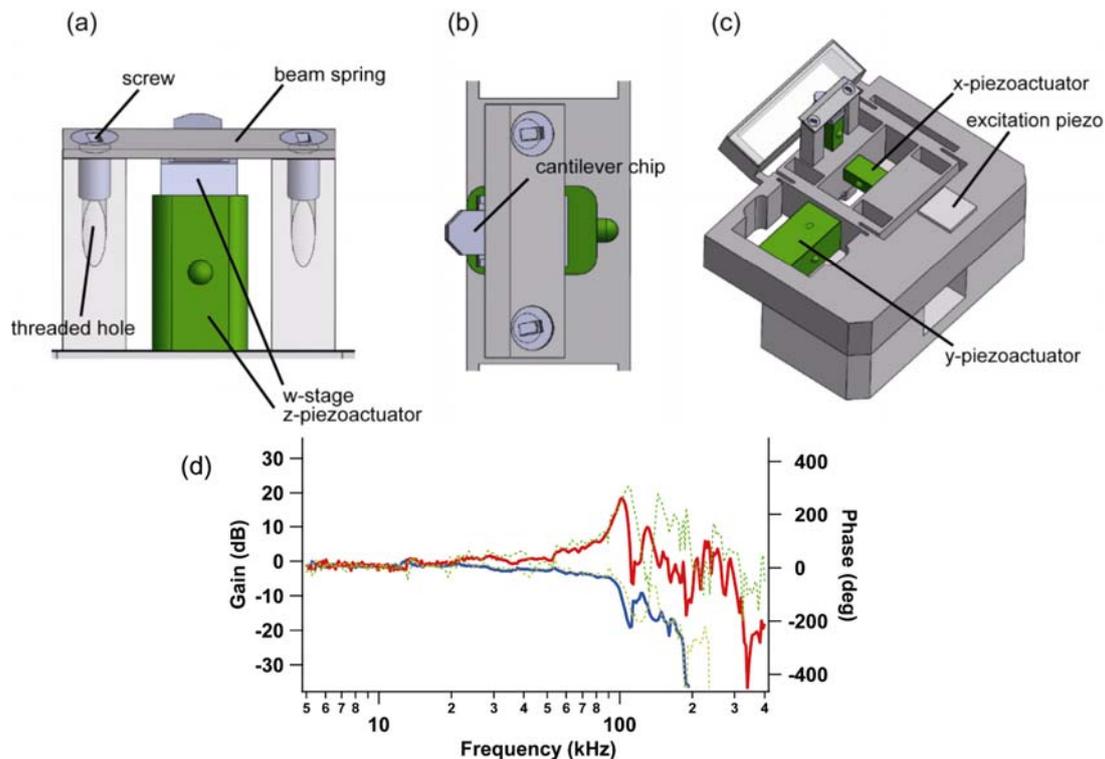


図 9. カンチレバー素子の Z ピエゾへの固定法。(a, b) 固定を示す側面図(a)と上面図(b)。(c) Tip スキャナーの像体図。(d) 固定されたカンチレバー素子の振動特性。(破線)弾性体コートのない板ばねの場合、(実線)弾性体コートのある板ばねの場合。

この Tip 走査型高速 AFM はごく最近実現したばかりであるので、未だ本格的なイメージング研究に利用されていないが、倒立型蛍光顕微鏡のステージに載せて、1 分子レベルの全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) 像と高速 AFM 像を同時に取得した例を以下に示す。Chitinase A は加水分解により chitin 線維を分解する酵素であり、線維上を一方向に連続的に運動すると想像されていたが、高速 AFM により最近実証された。Cy3 で chitinase A をラベルし、結晶性 chitin 線維をカバーガラス上にスピコートして 3 fps で観察した。図 10 の上のパネルに示すように、0.99 s でひとつの chitinase A 分子が線維に結合し、その後右上方に運動する様子が高速 AFM 観察された。一方、下のパネルに示すように、同じタイミングで蛍光スポットが現れ、わずかに右方向に運動する TIRFM 像が得られた。TIRFM の視野は高速 AFM のそれよりかなり広いため、蛍光スポットの動きは高速 AFM 像に比べ極くわずかにしか見えない。

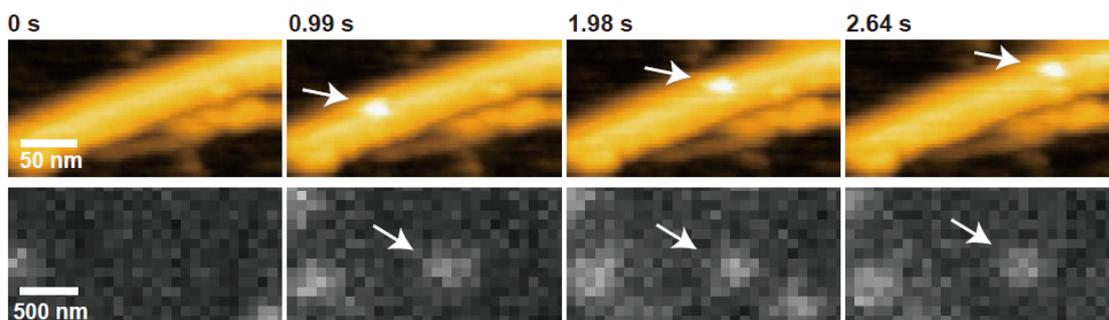


図 10. Chitin 線維上を運動する Chitinase A 分子を高速 AFM と TIRFM で同時に捉えた像。(上のパネル) 高速 AFM 像, (下のパネル) TIRFM 像。

Tip 走査型高速 AFM は大きな可能性を秘めている (図 11)。高速 AFM 装置の下の空間は空いているため, 上記のように倒立型蛍光顕微鏡を容易に導入できる。従って, 様々な光学技術を高速 AFM に導入可能である。例えば, 光ピンセットシステムを導入できる (図 11a)。AFM も光ピンセットもタンパク質や細胞における力計測に利用されてきたが, 外力作用下, 或いは, 力を発生しているタンパク質分子を直接見ることはできず, 測定される唯一のデータである力-距離曲線と蛍光輝点の像から対象で起こっている現象を推測してきた。光ピンセットの外力作用下にあるタンパク質分子の構造と挙動を高速 AFM で観察できるようになれば, 例えば, 外力作用下にあるモータータンパク質の振る舞いや, タンパク質分子のフォールディング・リフォールディング過程を可視化できるようになり, 従来技術では不可能な新しい発見がもたらされるに違いない。また, Tip-enhanced 蛍光顕微鏡法も導入可能である (図 11b)。この顕微鏡は, 金属探針, 或いは, Si 探針にレーザー光を当てると, その探針の周りの狭い空間で光の電磁波が著しく増強される現象を利用した技術であり, 10 nm 以下の空間分解能が実証されている。しかし, STED や PALM といった超解像蛍光顕微鏡が既に実現されたため, Tip-enhanced 蛍光顕微鏡法は全く実用されていない。この技術を Tip 走査型高速 AFM に導入すれば, 試料の完全に同じ XY 位置にピクセルをもつ高速 AFM 像と超解像蛍光顕微鏡像を同時取得することが可能になる。従って, これら 2 種の像の位置相関を調べる必要がないという利点がある。また, 探針から離れた位置にある蛍光性分子の輝度は近傍にある蛍光性分子のそれより大幅に低くなるため, 比較的高濃度の蛍光性基質を添加できる利点もある。以上の他にも, 試料ステージ側に様々な工夫を施すことが可能になるため, 例えば,

基板に空けた小さい孔に脂質二重層膜を張り, その膜の両側間に電位をかけて膜中に埋まった電位依存性イオンチャンネルの構造

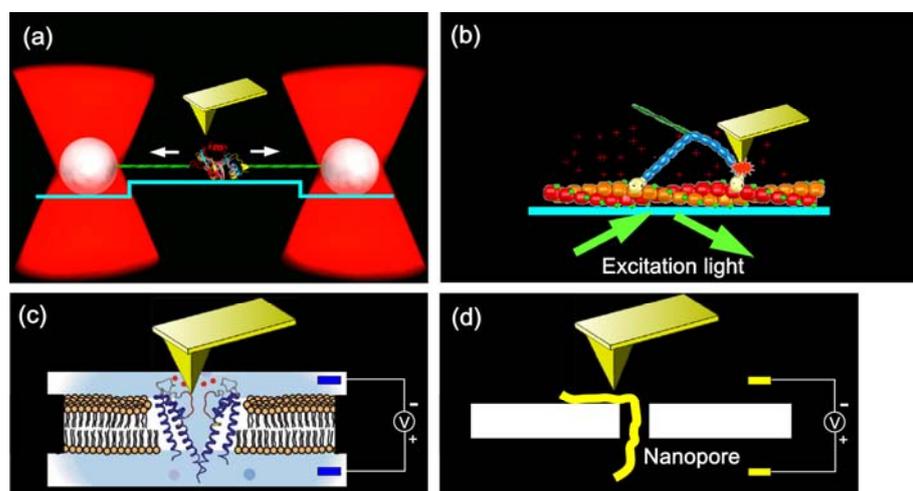


図 11. Tip-走査型高速 AFM の可能性。(a) 光ピンセットの導入, (b) Tip-enhanced 超解像蛍光顕微鏡の導入, (c) イオンチャンネルの観察, (d) Nanopore を通過する分子の観察。

動態を可視化するとか（図 11c）、電位に引かれてナノメートルサイズの孔を通過していく分子を可視化する（図 11d）といったことも可能になる。

### 8.1.3. 広域/高速スキャナーの開発 (Watanabe et al. Rev. Sci. Instrum. 2013)

分離精製したタンパク質分子の機能動態撮影に成功してきた試料ステージ走査型高速 AFM ではあるが、高速性を重視してきたため、走査範囲は $\sim 2 \times 4 \mu\text{m}^2$ と狭い。高速 AFM の次なるターゲットは分子よりも遥かに大きい細胞や細胞内オルガネラであり、広域/高速走査技術の開発は必須である。広域走査可能なスキャナー自身の開発はそれほど困難ではないが、高速性との両立は難しい。これまで提案されてきた手法は、ラスタ走査に代わる、cycloid や Lissajous 曲線などの走査であるが、広域走査で必須

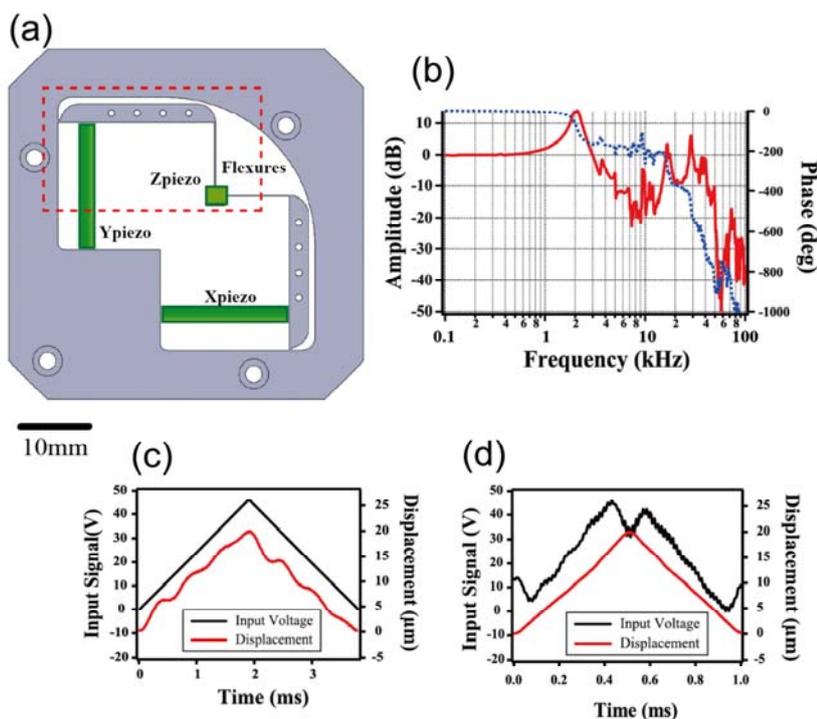


図 12. 広域スキャナーと振動特性。(a) 第 3 テコ法による変位拡大機構を利用した広域スキャナーの構造, (b) 周波数特性, (c) 250 Hz の走査信号（黒線）で駆動したときの変位（赤線）, (d) 逆伝達補償と三角波の丸めの両方を採用した 1 kHz の走査信号で駆動したときの変位（赤線）。

な piezo のヒステリシス補償が困難であるという問題や、カンチレバーをねじる力が作用するという問題があり、実用されていない。我々はこの難しい課題に取り組み、実用レベルの広域/高速走査技術を実現した。大きな変位を得るには piezo 素子の変位を拡大する必要がある。拡大機構として図 12a に示す第 3 種テコ法を採用した。長さ 25 mm のレバーの一端を支点としてフレームに固定し、100V で  $11.6 \mu\text{m}$  変位する共振周波数 69 kHz の piezo 素子を支点から 5mm の位置に接着した。従って、計算上テコ比は 5 である。このデザインにより、 $\sim 46 \times 46 \mu\text{m}^2$  の領域を走査可能となった。但し、当然のことながら共振周波数は低く、X スキャナー、Y スキャナーとも約 2 kHz であった（図 12b）。従って、X スキャナーを低周波（250 Hz）で走査しても、図 12c に示すように、望ましくない振動が発生する。Z 方向のフィードバック走査帯域の限界を考えれば、広領域を高周波走査することはあり得ないが、広領域をイメージングしたあとに、狭い領域を高周波走査する必要がある。例えば、走査線を 100 本として、10 fps のイメージング速度を実現するには、1 kHz で X 走査する必要がある。ミラーTilter で適用した逆伝達補償のみ、或いは、三角波を若干丸めるだけでは、滑らかな 1 kHz 走査は困難であった。そこで、これらの二つの手法を以下のように組み合わせる手法を試みた。三角波を丸めるのにローパスフィルターが利用されているが、波形の歪みが大きくなる。そこで、高調波成分を除いたフーリエ級数で丸めた三角波を合成し、それを逆伝達補償した。この方法で得た 1 kHz の駆動信号（図 12d の黒線）でドライブしたところ、図 12d の赤線で示すように、X スキャナーはスムーズに変位した。

三角波の頂点付近での線形からのずれは約 10%と小さく、また、頂点付近の走査は画像の端に対応するため実用上問題にならない。Y スキャナーの走査信号は、走査位置を原点に戻す急峻な部分を含むため、大きな望ましくない振動が発生する。この問題は、数ピクセル分に対応する時間をかけて原点に戻すことで容易に解決された。この時間遅延のイメージング速度に与える影響は 5%程度しかなく、全く問題ない。

しかし、図 13a の矩形格子の像で示すように、広域走査の場合、 piezo素子のヒステリシス効果が顕著になるため、画像は歪む。変位センサーを用いた closed-loop 補償法は帯域が低く、高速走査に向かないため、open-loop の feedforward 補償法を適用した。変位—電圧曲線  $d = d(V)$  を測定し、与えられた変位  $d_0$  とそのときの電圧  $V_0$  でこの曲線を規格化したのち、 $\bar{V} = \bar{V}(\bar{d})$  (ここで、 $\bar{d} \equiv d/d_0$ ,  $\bar{V} \equiv V/V_0$ ) を得る。そして、この  $\bar{V} = \bar{V}(\bar{d})$  曲線を多項式でフィットさせる。この多項式を用いて、望みの最大変位を得る駆動信号を計算し、D/A ボードから発生させる。図 13b に示すように、このヒステリシス補償により、像の歪みは大幅に減少した。しかし、矩形であるはずの格子が菱形に歪んでいる (図 13c)。この歪みは、拡大機構にあるレバー先端が X 方向ないしは Y 方向に平行に変位しないために起こる。X スキャナーを駆動したときの Y スキャナーの受動的な変位の割合は 0.017, Y スキャナーを駆動したときの X スキャナーの変位の割合は 0.023 であった。そこで、ひとつの piezo素子を駆動する信号に適度な係数 ( $<1$ ) を掛けた信号を他方の piezo素子を駆動する信号に加算することにより、XY スキャナー間の干渉を除去した。これにより、図 13d に示すように、菱形の歪みは解消された。

100 V で約 46  $\mu\text{m}$  変位させるために、D/A ボードの信号を 10 倍増幅するが、この広域スキャナーで狭領域を走査する場合、12bit の D/A ボードでは分解能が 11 nm しかないという問題がある。そこで、分解能を上げ、且つ、広域のポジショニング性能を維持するために、2ch の piezoドライバを製作した。1ch はゲイン可変とし走査用に利用し、2ch はゲイン  $\times 10$  としてポジショニングに利用する。

以上の開発により、像を歪ませずに広領域を比較的速く走査でき、且つ、狭領域を 1 kHz で高速に X 走査できる (100 本の走査線で 10 fps のイメージング速度を有する) 広領域観察用の高速スキャナーが完成した。このスキャナーを使った細胞動態の観察例を 8.2.4 節に示す。

#### 8.1.4. 簡易蛍光顕微鏡の試料ステージ走査型高速 AFM への導入 (Shibata et al. Sci. Rep. 2015)

上記の広域高速スキャナーを利用して細胞を観察するには、細胞の特定部位に探針をポジショニングする必要があるが、試料ステージ走査型の高速 AFM 装置の光学系では細胞を光学観察できない。そこで、GFP をトランスフェクトした細胞を蛍光観察できるように、図 14a に示す簡易型の蛍光顕微鏡を導入した。蛍光励起用の照明光源、ダイクロイックミラー、光学フィルターを新たに加えたシンプルなものである。図 14b に示すように、この光学系の配置ではカンチレバーが影になるため、GFP を

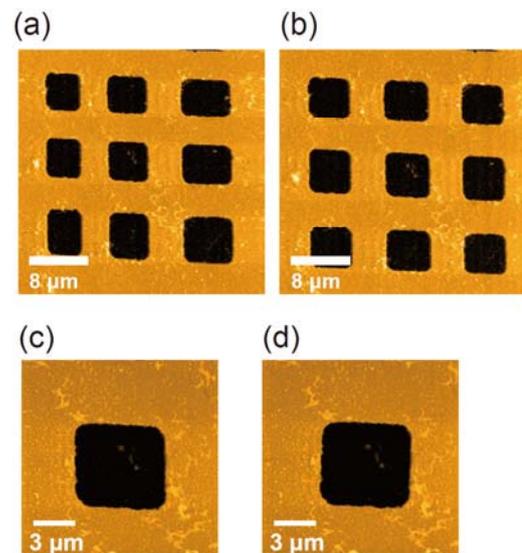


図 13. piezoのヒステリシスと変位拡大機構における XY 走査干渉の補償の効果を示す格子状標準試料の AFM 像。(a) 補償なし、(b) ヒステリシス補償のみ、(c) ヒステリシス補償のみ、(d) ヒステリシス補償と干渉補償の両方を行った場合。

導入した細胞を蛍光観察しながら特定の部位にカンチレバーをポジショニングすることが可能である。

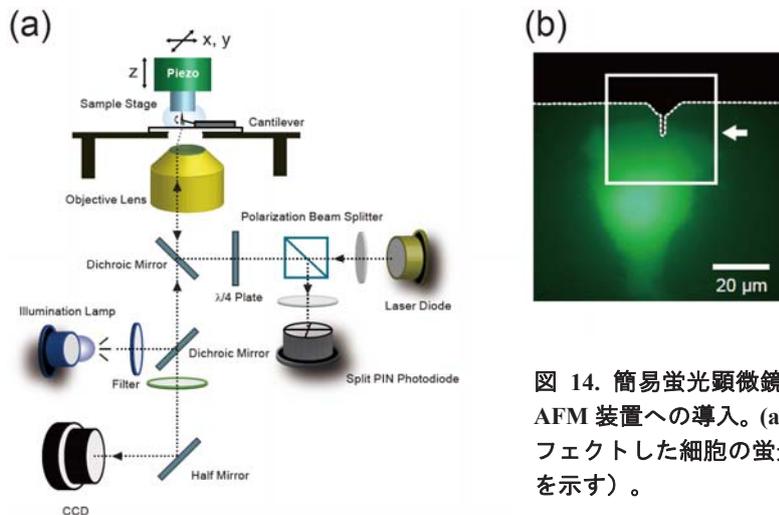


図 14. 簡易蛍光顕微鏡システムの試料ステージ走査型高速 AFM 装置への導入。(a) 光学系の配置, (b) GFP をトランスフェクトした細胞の蛍光像(点線はカンチレバーのエッジ部を示す)。

### 8.1.5. 高速走査型イオン伝導顕微鏡 (高速 SICM) の開発 (S. Watanabe et al. Manuscript in preparation)

SICM は電解液中にてナノ開口を有するガラスキャピラリをプローブとして利用して開口を流れるイオン電流を計測することで、試料表面とプローブとの物理的接触なしに試料表面形状を得ることができる。このため、柔らかい生細胞膜の生理溶液下での形状観察などに威力を発揮し、その有効性が広く実証されている。この技術を、AFM では観察困難な、生体膜上に存在するタンパク質分子の動態観察を可能にするレベルにまで発展・深化させることを目的とし、本研究を推進した。

SICM の水平方向解像度はキャピラリの開口径と同程度となる。従って、タンパク質分子を観察するためには、数 nm の開口を有するのキャピラリを走査プローブにしなければならない。このようなキャピラリを作成することは困難ではないが、SICM による膜上のタンパク質分子の観察はこれまでに成功していない。開口径が小さくなるとともに、キャピラリのインピーダンスは増大し、イオン電流が減少してしまう。微小なイオン電流を検出するためには、検出器の動作上、検出帯域（速度）を落とす必要が生じるが、これにより、イメージングの際に試料表面から開口径程度の距離まで接近するプローブが、容易に試料表面に接触し破損してしまう。このため、従来 SICM の実用的な空間分解能は 50 nm 程度、イオン電流検出帯域は数 kHz 程度にとどまっている。また、画像取得時間を支配する Z スキャナーの帯域も 1 kHz 程度が限界であり、画像取得時間が数分以上の従来 SICM では数秒内あるいはそれ以上に速く起きる動態の観察は不可能だった。これらの限界を突破して、高時空間分解能を有する SICM を実現するために、A. イオン電流検出器の高速化と低ノイズ化, B. 高速プローブ/試料スキャナーの開発, に取り組んだ。それぞれの内容の詳細を以下に記す。

非公開

非公開

非公開

非公開

非公開

## b2. 試料ステージの高速 Z スキャナー

リング型の piezo 素子のペアを用いて、試料ステージ走査用に可動範囲  $2\ \mu\text{m}$  の Z スキャナーを開発した(図 22a)。光学顕微鏡が試料にアクセスするための直径  $2.5\ \text{mm}$  のホールを確保しつつ、リング piezo 素子に自信のばね定数の  $\sim 1/10$  程度の負荷を円形板バネで施した。これによって放射ノイズを抑えるとともに、Z 方向の共振周波数  $\sim 200\ \text{kHz}$  を達成した(図 22b)。適切な重量の構造体を介して、高速 Z スキャナーを走査範囲  $100\ \mu\text{m}$  四方の XY スキャナーと結合することで、高速 Z スキャナーと広範囲 XY スキャナーの共振をデカップルした。

非公開

## 開発した技術により達成される時間空間分解能

SICM はキャピラリの破損を避けるために、イメージングモードはホッピングモードが用いられる。このモードでは、画像取得時間の速さを評価する指標の一つとして、ホッピング振幅を1ピクセル取得可能時間で割ったアプローチ速度[m/s]を用いる。アプローチ速度はキャピラリ開口径に依存し、これまで開口半径 50 nm のキャピラリを用いて 500 [nm/ms]を達成した報告が SICM 画像取得時間の最速であった。本研究の技術開発により、現時点で、開口半径 5 nm のキャピラリを用いて 1500 [nm/ms]を達成しており、これは 50 nm の開口半径プローブを用いた場合、上記報告の 30 倍の 15000 [nm/ms]のアプローチ速度に相当する。従って、市販の SICM 装置(アプローチ速度 50 [nm/ms])から 300 倍、現時点の最速となる SICM の報告から 30 倍の高速化が達成されたことになる。更に、既開発済の疑似スキヤナー(LRC 回路)を利用した Q 値制御を用いることで、さらなるアプローチ速度の向上も期待され、現在実装を進めている。

### 8.1.6. 応用のための周辺技術の開発

8.1 の概要で述べたように、高速 AFM 装置ばかりでなく個々の試料対象に要求される応用のための周辺技術の開発も進めてきた。

**A. 溶液インジェクションシステム：**観察試料溶液にタンパク質やリガンドなどの溶液を添加するための溶液インジェクションシステムを、送液ポンプを利用して作製した。この溶液の添加で注意しなければならない点は、観察試料溶液の体積には上限があることである。上限を超えると、溶液が Z ピエゾ素子を濡らし、ショートして Z ピエゾ素子を破壊してしまうからである。そこで、観察溶液の一部をポンプで抜きだしながら同時に溶液を観察溶液中にインジェクトできるように Push-pull 方式とした。光学顕微鏡下で、インジェクション用のガラスキャピラリ先端を AFM の観察領域の近くにポジショニングし、溶液添加の効果を効率よく観察できるようにした。

**B. 観察溶液の温度制御系：**好熱細菌由来のタンパク質は室温では活性が低いことが多く、温度を 40-50°C まで上げる必要がある。しかし、単純にヒータで昇温させると、溶液に対流が起こり、光てこ光学系のレーザー光の進行が歪められと同時に、カンチレバー振動の振る舞いに影響が出る。できるだけ温度の斑が生じないように、広い面積で加熱する必要があるが、試料下部から試料ステージ、カンチレバー、光てこ光学系のレーザースポットを対物レンズで観察する必要があるため、試料下部は透明でなければならない。

そこで、可視光に対して透過率の高い導電性ガラス (ITO ガラス) に通電して加熱をする方法で昇温制御系の開発を行った(図 23)。温度を 50°C まで上げてカンチレバーの振る舞いを調べたが、温度上昇とともにカンチレバーの共振周波数は上がるものの、計測された振幅ノイズは温度に依らず一定であった。脂質平面

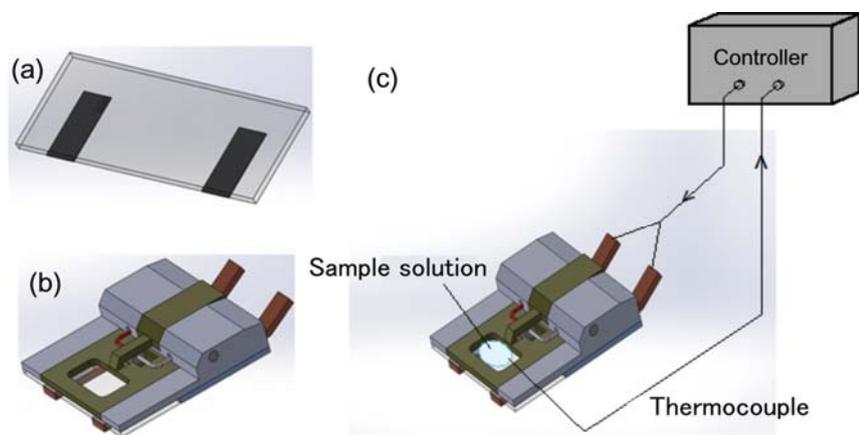


図 23. ITO ガラスを利用した試料溶液の温度制御系。(a) ITO コートされた石英ガラス板。黒い部分は電極。(b) 温度可変溶液チャンバーとカンチレバーホルダ。(c) 熱電対と PI 制御で温度制御。

膜を AFM 観察して、温度上昇による脂質膜の流動性と形状の変化を確認した。

**C. カンチレバー探針：**試料観察中に探針が汚れることにより AFM 像が劣化する問題に長く苦しめられているが、よい解決策が見出せないでいる。基板にのみタンパク質が存在する系ではこの問題は少ないため、溶液中に浮遊しているタンパク質が探針に吸着するものと判断している。また、脂質平面膜上にタンパク質を固定した場合も同様の問題があるため、脂質分子も探針に吸着するものと思われる。探針は、フェノールガス雰囲気下で走査型電子顕微鏡 (SEM) の電子線を、元々付いているカンチレバー探針にスポット照射することにより形成させ、それを Ar ガス雰囲気下でプラズマエッチングすることにより先鋭化させて、作製している (Electron Beam Deposited 探針)。材質はおそらくアモルファスカーボンであるため、疎水性と思われる。そこで、探針を親水性にすることを試みている。例えば、EBD 探針を  $N_2$  雰囲気下でプラズマエッチングして、探針表面を炭化窒素 ( $C_3N_4$ ) に変換した後、硝酸に浸し、-OH ないしは -OOH にする方法などを試みたが、汚れにくい探針の作製に未だ成功していない。

**D. タンパク質の基板への固定法の開発：**これまでに我々が利用してきた基板は以下の通り。(i)無処理のマイカ、(ii)アミノシランコートマイカ、(iii)グルタルアルデヒド処理したアミノシランコートマイカ (タンパク質のアミノ基に反応し固定)、(iv)Ni ないしは Co を吸着させたマイカ (His タグを付けたタンパク質の固定)、(v)マイカ上に展開した脂質の二重層膜 (正電荷をもつ脂質で静電的にタンパク質を固定；ビオチン化脂質でストレプトアビジンを介してビオチン化タンパク質を固定)、(vi)脂質の平面二重層膜上に形成させたストレプトアビジンの二次元結晶 (ビオチン化したタンパク質を固定)。8.2 節でも述べるように、特異的固定や配向固定が多くの場合要求されるため、タンパク質へのタグの導入とそのタグを吸着する基板の調製が重要となる。そこで、Avi-tag を組み込んだタンパク質の Biotin ligase によるビオチン化や、LPXTG モチーフを組み込んだタンパク質の Sortase によるアミノグリシンを含むペプチド鎖をコートした基板への固定、あるいは、アミノ基反応性 dendrimer をコートした基板へのタンパク質の固定といった手法が利用できないか検討を開始した。

## 8.2. 高速 AFM によるバイオイメージング研究

2008年に完成した高速AFM装置を用いて、分離精製したタンパク質が溶液中で機能しているときのダイナミックな動作を高速AFM観察し、サブ分子の空間分解能、サブ100 msの時間分解の動画映像から、タンパク質が機能する仕組みを詳細に解明する研究を進めている。特に機能発現機序の詳細解明に迫るインパクトある成果を得ることを目指し、構造動態が機能に密接に関係する (と想定される) タンパク質系を中心にイメージング研究を進めている。

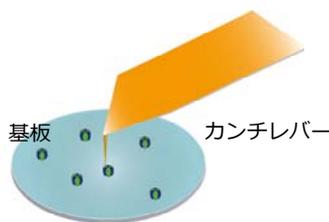
タンパク質が機能している様子のイメージングを最終的に成功させるには、試料系や試料を載せる基板を高速 AFM イメージング向けに最適化する必要がある (図24)。この最適化の必要性和問題点は、種々の異なる性格をもつタンパク質系 (モータータンパク質、DNA 結合タンパク質、AAA タンパク質、膜タンパク質など) を実際にイメージングすることにより初めて知ることができる。高速 AFM も通常の AFM と同様に溶液中に浮いている試料を見ることはできない。試料を基板に載せる必要があるが、強く吸着して試料の構造や機能を乱すことは避けなければならない。逆に緩く吸着して激しくブラウン運動してはまったく観察できない。また、タンパク質の特定の部位を観察するために、タンパク質の配向を制御して基板に固定する必要もある。さらには、異なる種類の分子が相互作用する系を観察するためには、一方の分子は基板に固定され、他方は溶液中を自由に拡散している状況が必要である。従って、タンパク質にどのようなタグを付け、そのタグに応じてどのような基板を調製しなけれ

ばならないかを試料系に応じて十分に検討する必要がある。また、実際のイメージングの際の各種パラメーター（カンチレバーの振動振幅、セットポイント、フレームレート、走査範囲など）も観察するタンパク質毎に最適化しなければならない。高解像な像を再現性よく得るためには、AFM探針の作成条件も検討する必要がある。本センター発足以来、様々なタンパク質試料に対してこの一連の作業を行い、多くのノウハウを蓄積しつつある。

開発部門で開発された広視野観察用スキャナーを活用した応用研究も進めている。これにより、エンドサイトーシス、膜のラフリング運動、糸状仮足（ニューロン樹状突起）の形成過程といった生きた細胞で起こる動的な現象の可視化による新しい細胞生物学研究を開拓しつつある。

以下に、これまで進めてきた応用研究の概要、成果、進捗状況をテーマ毎に報告する。

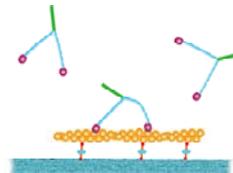
#### 試料と基板の調製



\* 配向制御



\* 特異吸着



#### イメージング条件の最適化

- \* 振動振幅
- \* セットポイント
- \* フレームレート
- \* 走査範囲
- \* etc.

#### 探針作成条件の最適化

\* 探針の長さ



\* 先鋭化条件

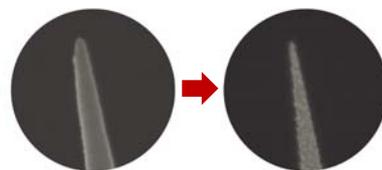


図 24. イメージング研究を成功させるために要求される検討事項

### 8.2.1. バクテリオロドプシンの光誘起構造変化の観察 (Shibata et al. Nat. Nanotechnol. 2010; Shibata et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2011; Yamashita et al. J. Struct. Biol. 2013)

バクテリオロドプシン (bR) は光エネルギーを利用してプロトンを細胞膜の内から外へ輸送する光駆動プロトンポンプである。bR は発色団としてレチナルを含んでおり、光吸収によりレチナルは *all-trans* 型から *13-cis* 型に異性化し、一連の光反応サイクルが開始されると同時に bR に構造変化が起こり 1 個のプロトンが細胞質側から細胞外側へポンプされる。bR の研究の歴史は長く、光励起に伴う構造変化に関しては、電子顕微鏡や X 線回折法、NMR などで研究が進んでおり、M 中間体で細胞質側の F ヘリックスが変位することなどが示されているが、生理環境下で構造変化を直接とらえる手法はなかった。そこで、高速 AFM で光サイクルに伴う bR の構造変化の直接観察を行った。

光サイクルが約 10 s と野生型に比べて 1 千倍程度長い D96N 変異体を観察した。図 25a, b にそれぞれ波長 532 nm の緑色光を照射する前と照射中の bR 二次元結晶（細胞質側）の高速 AFM 像を示す。これらの AFM 画像を見比べると光照射前後で構造に大きな変化が見られる。光照射前では規則正しい三量体の配列（図中三角形）が見え、光照射により三量体の各 bR 分子が三量体の中心から外側に移動する。その結果、隣り合う三量体の bR 分子が大きく接近し、あたかも新しい組み合わせの三量体（Trefoil と命

名) が形成されたかのように観察される。この構造変化は光On/Offを繰り返すと繰り返し観察され高い再現性を示した。また、この構造変化は緑色光特異的に起こった。図25cは各bR分子の像の重心位置を解析し、光OffとOn時の重心位置を光Off時のAFM像に重ね合わせたものである。各重心位置は三量体の外側に0.7~0.8 nm移動し、且つ、三量体の中心の周りを反時計方向に約8度回転することがわかった。また、励起光強度を変化させ、Trefoil内で励起される分子数を1~3個にしたときに励起状態(構造変化している状態)の寿命が異なることを見出した。励起分子が1個の場合には、寿命は7秒であるのに対し、2~3個の場合には、後で励起された分子の寿命は短い(2秒)のに対して、最初に励起された分子の寿命は長い(13秒)ことが判明した。これにより、Trefoil内で励起されたbR分子間の相互作用により、プロトンポンプ活性に正負の協同性が生まれることが新たに見出された。

bRのフォトサイクルがpHに依存し、アルカリ性で光反応が遅くなることがよく知られている。そこで、フラッシュ光励起を用いて、いくつかの異なるpHにおいて、M中間体の寿命を分光法で計測し、それを異なるpHでAFM観察される励起状態の寿命と比較した(図25d)。可視吸収分光法で計測されたM中間体の寿命はpHの上昇とともに長くなり、その値は $3.4 \pm 0.025$  s (pH 7),  $14 \pm 0.034$  s (pH 8),  $33 \pm 0.080$  s (pH 9)であった。一方、AFMで検出された励起寿命も同様にpHの上昇とともに長くなり、その値は $6.7 \pm 0.10$  s (pH 7),  $25 \pm 0.25$  s (pH 8),  $48 \pm 0.59$  s (pH 9)であった。励起寿命がpHの上昇とともに長くなることは、観察された構造変化が探針・試料間接触によるアーティファクトでないことを示している。分光法で見られるM中間体の寿命よりもAFMで観察された構造変化の寿命の方がいずれのpHでも長いことは、構造変化がM中間体以降(すなわち、N中間体で)も続いていることを示唆していると考えられる。bRの構造変化を詳細に解析することで、一分子の構造変化は隣り合ったトライマー内の分子の励起状態に影響をおよぼす協同性があることも見出した。

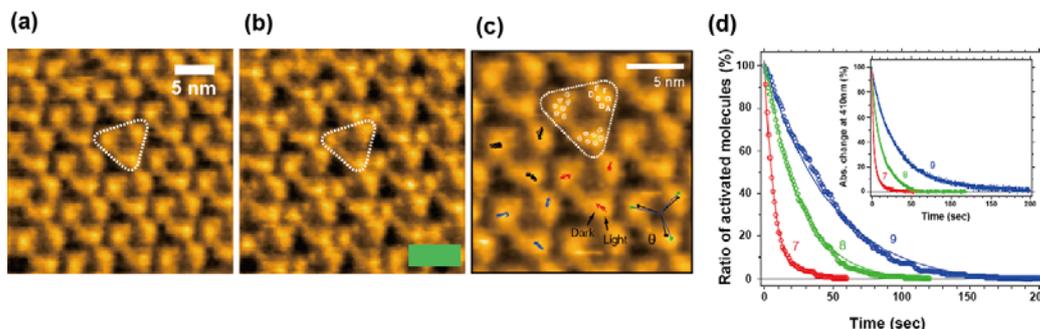


図 25. バクテリオロドプシン(bR)の光誘起構造変化の高速 AFM 観察。(a)光照射前と(b)照射後の bR (細胞質側) の高速 AFM 像 (1fps)。2つの三角形は同じ bR の三量体を示し、緑色のバーはグリーンレーザー(532 nm, 0.5  $\mu$ W)照射中を表している。(c) 各 bR 分子の重心位置の軌跡を光照射 OFF の AFM 像に重ねた像 (Dark:光 OFF, Light: 光 ON)。アルファベットは7本の  $\alpha$ ヘリックス。(d) AFM で観察された励起状態の bR の緩和とその pH 依存性。挿入図は可視吸収分光法で測定された M 中間体の緩和を示す。どちらも減衰は単一指数関数に従う(実線)。

bRの高速AFM観察に関しては、その他にも次のような成果を得ている。

- レチナールの13-*cis*型から*all-trans*型への逆反応が起こることが知られている青色光(波長 410 nm)と正反応を起こす緑色光を交互に照射しながら観察した。緑色光で励起された構造変化は青色光の照射で直ちに基底状態に戻る様子が観察された。このことから、レチナールの異性化状態とタンパク質の構造変化が強くカップルしていることが分かった。
- 二次元結晶を形成する bR 三量体間の相互作用部位と推定されるアミノ酸位置に変異を導入した bR

を調製し、二次元結晶の脱結晶化を行い、孤立した bR での光励起構造変化を観察した。bR 三量体間の相互作用がトリプトファンとフェニルアラニンの芳香族環のスタッキング相互作用によることを明らかにした。また、脱結晶化した bR では構造変化する分子の割合が低下することが分かり、bR 三量体の相互作用によって光サイクルが変調されることを明らかにした。

### 8.2.2. 回転子の無い $F_1$ -ATPase 分子回転の直接可視化 (Uchihashi et al., Science 2011)

$F_1$ -ATPase は ATP 合成酵素の一部であり、単離した  $F_1$ -ATPase は  $\alpha$  と  $\beta$  のサブユニットが 3 つずつ交互にならんで形成する  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングに、回転子である  $\gamma$  サブユニットが突き刺さっている。ATP の加水分解により回転子を一方に回転することが知られている。ATP との結合に寄与するアミノ酸残基は  $\beta$  サブユニットに存在し、ATP または ADP を結合した 2 つの  $\beta$  サブユニットは“閉じた (closed) 構造”、ヌクレオチドを結合していない 1 つの  $\beta$  サブユニットは“開いた (open) 構造”をとっている。このため、 $\beta$  サブユニットは ATP の結合にともない open 状態から closed 状態へと大きくその構造が変化し、 $\gamma$  サブユニットの一方への回転を駆動する。 $F_1$ -ATPase の結晶構造から、閉じた  $\beta$  サブユニットは  $\gamma$  サブユニットを押し込んでいるように見え、開いた  $\beta$  サブユニットは  $\gamma$  サブユニットに押されているように見えることから (図 26a)、この“押し引き”が化学反応と構造変化のタイミングの制御に重要であるというのがこれまでもっとも有力な説であった。しかしながら、 $\gamma$  サブユニットを短くして  $\beta$  サブユニットとの接触点を大きく減らしても  $F_1$ -ATPase は一方に回転できるという報告がなされ、このモデルが必ずしも正しくはない可能性が示唆された。高速 AFM により  $\beta$  サブユニットの構造変化を直接観察することで、回転子がなくても  $F_1$ -ATPase は“回転”するのかどうか調べた。

大きく構造変化すると考えられる C 末端側を AFM 観察するために、 $\beta$  サブユニット N 末端側に Lys タグを付与し、さらに観察基板であるマイカ基板をアミノシランで被覆して、グルタルアルデヒドにより両者のアミノ基を架橋した。これにより  $\alpha_3\beta_3$  複合体の N 末端側を基板に固定した。ヌクレオチドなしの条件では、観察された全ての分子で高さが約 9 nm の疑似 6 回対称のリング構造が観察された。また、高分解能像 (図 26b) ではリング内の 3 つのサブユニットが他の 3 つよりも明るく観察されることから、表面側に若干突き出ていることがわかった。 $\gamma$  サブユニットを取り除いた結晶構造を剛体球モデルとしてコーン状プローブ (先端径 0.5 nm) でなぞった AFM のシミュレーション像 (図 26c) を構成したところ、観察像に良く一致した。シミュレーション像では、リング構造を構成する 6 つのサブユニットのうち、 $\beta$  サブユニットに相当する 3 つは開いた構造をとっており  $\alpha$  サブユニットよりも高く突き出た構造をみせている。これから AFM 像で高く突き出た 3 つのサブユニットが  $\beta$  サブユニットであることがわかる。AMPPNP の存在下で観察された C 末端側の AFM 像 (図 26d) はヌクレオチドがない場合とは構造が大きく変化していた。この AFM 像もシミュレーション像 (図 26e) に非常に良く一致し、2 つの  $\beta$  サブユニットが閉じた構造に変化し、1 つの  $\beta$  サブユニットのみが開いて高く突き出た非対称な構造をとっていた。すなわち、 $\gamma$  サブユニットをもつ  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体と同様の構造である。AMPPNP 存在下では 3 つの  $\beta$  サブユニットが全て閉じたり、1 個だけ閉じたりした構造は全く観察されなかったことから、 $\gamma$  サブユニットがなくても、3 つの  $\beta$  サブユニットのうち 2 つのみにヌクレオチドが結合し、残りひとつには結合しないことが強く示唆された。また、ヌクレオチドなしや AMPPNP 存在下では  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングの構造は基本的に静的で観察の間変化しなかった。

ATP の存在下で 12.5 fps のイメージング速度で観察したところ、AMPPNP の存在下と同様に 1 つの  $\beta$  サブユニットのみが開いた非対称な構造だけでなく、 $\beta$  サブユニットの開閉のダイナミックな構造変化が観察された (図 26f)。特筆すべきは、開いた構造の  $\beta$  サブユニットが閉じると、反時計回り方向にあ

る閉じた構造の $\beta$ サブユニットが同時に開くという協同的な構造変化が見られた点である。前述したように、開いた構造の $\beta$ サブユニットは表面に突起が見られる。そこで、一分子の画像で最も高輝度のピクセル位置をフレームごとにトレースし、その位置の分子の中心位置に対する角度の累積回転角をグラフ化した(図26g)。反時計回りの角度変化を正にとると、累積回転角は時間とともに増加し、 $\beta$ サブユニットの開閉が時間の経過とともに反時計回りに遷移していく様子が明確に見られた。

以上の結果から、 $F_1$ -ATPaseの一方方向への回転を支える構造的な基盤は $\alpha_3\beta_3$ 固定子リング自体に内蔵されており、回転子である $\gamma$ サブユニットとの相互作用は必須でないことが明らかになった。結晶構造からわかるように、 $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングにある3つの $\beta$ サブユニットは互いに直接には相互作用していないので、おそらくは $\alpha$ サブユニットとの相互作用を介して化学反応と構造変化のタイミングが制御されていると思われる。実際に、ひとつの $\alpha$ または $\beta$ サブユニットがイメージング中に探針からの力により解離すると、 $\beta$ サブユニットの構造変化の頻度は極端に低下するとともに、一方方向への構造変化の遷移は見られなくなる。一方で、残った $\alpha$ サブユニットを挟んだ2つの $\beta$ サブユニット間で、開いた構造と閉じた構造がシーソーのように遷移することも観察されたので、 $\alpha$ サブユニットを介した若干の協同性は残るものと考えられる。また、 $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングの一方方向への回転の効率(90%弱)や速度(2  $\mu$ M ATPの条件で0.2 Hz)は、 $\gamma$ サブユニットのある場合(100%, 約10 Hz)に比べ低下していることも確かであった。このことは、正確で速い回転触媒反応の実現には、固定子リングのサブユニット間の相互作用だけでなく、回転子である $\gamma$ サブユニットとリングとの相互作用も重要であると考えられる。

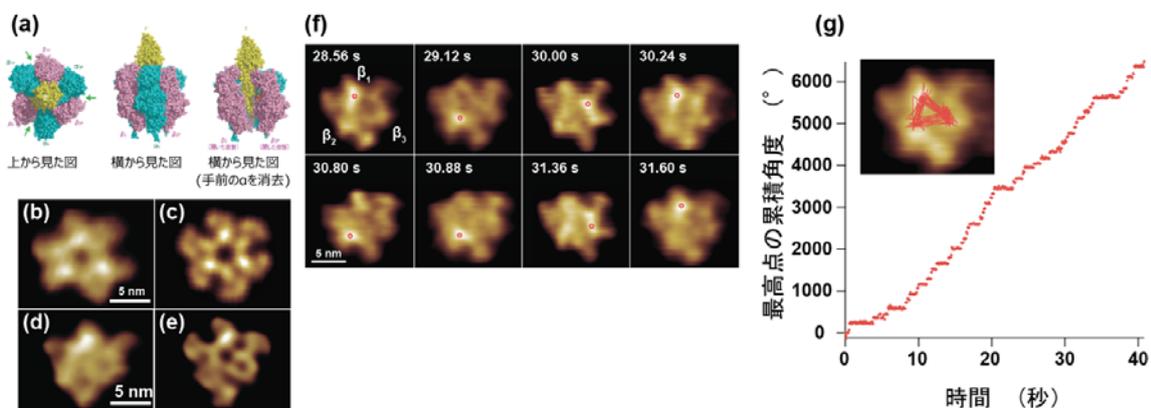


図 26. 高速 AFM による回転子のない  $F_1$ -ATPase の観察。(a) ヌクレオチド結合状態における  $F_1$ -ATPase の結晶構造(上面および側面図)。(b)-(e) ATP 非存在下での  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングの(b)AFM 像と(c)シミュレーション像。(d)と(e)はそれぞれ AMPPNP 存在下での AFM 像とシミュレーション像。(f) 2  $\mu$ M ATP 存在下での  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングの高速 AFM 像(80 ms/frame)。赤丸は“開いた”状態の $\beta$ サブユニットを示している。(g) 開いた $\beta$ の反時計回りの累積角度の時間変化。

### 8.2.3. 結晶性多糖分解酵素の運動観察 (Igarashi et al. Science 2011; Igarashi et al. Nat. Commun. 2014; Nakamura et al. J. Amer. Chem. Soc. 2014; Shibafuji et al. J. Biol. Chem. 2014)

セルロースやキチンなどの結晶性構造多糖は、地球上で最も大量に生産されるバイオマスであり、その分解メカニズムの解明は巨大なバイオマス資源の有効活用のために重要である。しかしながら、結晶性多糖の分解メカニズムはこれまで間接的な計測方法で推定せざるを得なかった。高速 AFM で一つ一つの分子の動きと働きを明らかにし、酵素による結晶性構造多糖の分解メカニズムの解明を目的に、

多糖分解酵素であるセルラーゼやキチナーゼの運動観察を行った。

#### A. 結晶性セルロース上でのセルラーゼの連続移動の観察

セルロースは、化学的に安定な  $\beta$ -1,4-結合と分子内および分子間の水素結合によって結晶性セルロース（セルロース I）を形成しているため難分解性のバイオマスである。一方で、自然界において、セルロースは微生物によって常温、常圧下で分解されており、この反応を担っているのが一般的にセルラーゼと総称されるセルロース分解酵素である。セルラーゼはセルロース鎖を加水分解する活性ドメインとセルロース結合性ドメインを有し（図 27a）、セルロースを加水分解しながら、解放されるエネルギーを利用してセルロース表面を連続的に移動するものと推測されていた。しかし酵素反応の場は固液界面であり、かつ、強固な水素結合で形成されているセルロースが基質であるため、加水分解反応が遅くなるのは自明であると考えられてきた。実際、生化学的測定から見積もられたセルラーゼの移動速度は 1 nm/min と非常に遅いものであった。高速 AFM でセルラーゼが結晶性セルロースを加水分解しながら運動する様子を直接観察することで、セルラーゼによるセルロースの分解メカニズムと分解速度の律速要因を明らかにすることを目的に研究を行った。

子囊菌 *Trichoderma reesei* が生産するセルラーゼ（*TrCel7A*）を用い、グラファイト基板上に撒いた緑藻由来の高結晶性天然セルロース上での挙動を高速 AFM で観察した。天然セルロースでは *TrCel7A* 分子がモノレールのように一列に並んで進んでおり（図 27b）、移動したり止まったりしている様子が観察された。セルロース上を動く *TrCel7A* 分子の挙動を詳細に調べたところ、*TrCel7A* 分子は止まっている状態（平均速度は毎秒-0.32 nm）と動いている状態（毎秒 7.1 nm）を断続的に繰り返していることが分かり（図 27c,d）、道路を走る自動車のように「止まる」、「動く」という動作を繰り返してた。

基質としてセルロース Iに加えて、アンモニア処理してセルラーゼによる分解活性が向上したセルロース III<sub>1</sub>を用い、*TrCel7A* による二種類の結晶性セルロースの分解を比べた。セルロース Iではセルラーゼ分子がモノレールのように一列に並んで進んでいるのに対して、セルロース III<sub>1</sub>では、結晶の表面全体を酵素が進んでいることが分かった。この現象に関しても、結晶性セルロース表面を動く酵素分子を自動車として例えると、セルロース I上には「車線」が 1 レーンしか無いのに対して、セルロース III<sub>1</sub>では複数の車線があるために、セルロース III<sub>1</sub>の分解性が高くなることが示唆された。また、セル

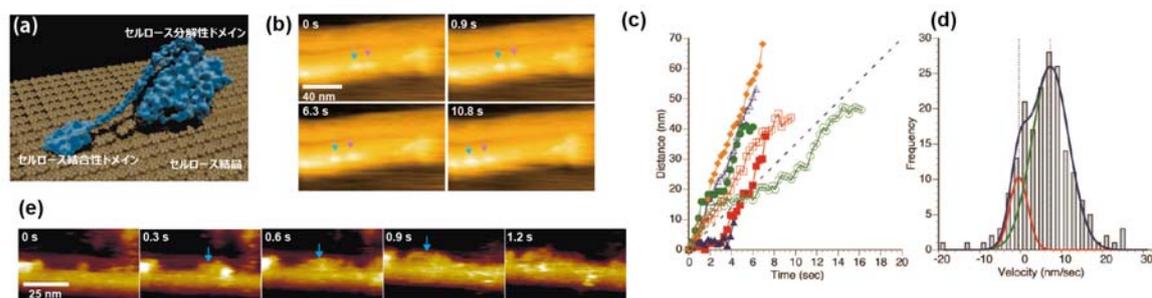


図 27. セルラーゼ (*TrCel7A*)による結晶性セルロースの分解過程の高速 AFM 観察。(a) セルラーゼがセルロース表面に結合している様子を表した模式図。(b) 天然セルロース結晶を一方方向に移動する *TrCel7A* (0.3 s/frame)。(c) いくつかの *TrCel7A* 分子に対する移動距離の時間変化。(d) 移動速度のヒストグラム。2つのガウス分布（緑線：中心値、7.1 nm/s; 赤線：中心値、-0.32 nm/s）でフィッティングできる。(e) *TrCel7A* 分子がセルロース結晶上を右から左に移動しており、時間経過とともにセルラーゼが“渋滞”を起こしている(3.3 fps)。

ラーゼが同じ（実際には多少ずれているが）車線を前後で通っていくとき、直前の分子が何かしらの理由で動けなくなると、後続の *TrCel7A* 分子による「渋滞」が起こってしまう様子も観察された。さらに、別の酵素（*TrCel6A*）を添加することで、結晶性セルロースの表面に「入口」と「出口」が作られて、*TrCel7A* が渋滞せずに効率良く動けるようになっている様子も観察された。アンモニア処理が結晶性セルロースの分解速度を向上すること、*TrCel6A* と *TrCel7A* の二つの酵素を使用することで効率良くセルロースが分解されることはこれまでも報告されていたが、これらの現象が「セルラーゼの渋滞解消」によって説明できることが明らかになった。

*TrCel7A* に加えてキノコ的一种である *Phanerochaete chrysosporium* が生産する2つのセルラーゼ（*PcCel7C* 及び *PcCel7D*）でも高速 AFM 観察を行い、分解反応の速さと連続的に分解反応できる回数（プロセスビティ）を比較したところ、移動速度が速いセルラーゼほどプロセスビティが低く、両者の間には「トレードオフ」の関係があることが分かった。また、結晶性セルロース上を速く動く酵素よりもプロセスビティが高い酵素の方が、効率的に結晶性セルロースを分解できる事も明らかとなった。

## B. キチナーゼの双方向高速移動の観察

キチンはエビやカニなどの殻に含まれる物質としてよく知られており、N-アセチルグルコサミンが千個～数万個つながった直鎖状の多糖ポリマーである。セルロースと同様にキチンも不溶性で強固な結晶構造からなるため、分解利用するには高温や強酸で化学処理する必要があるが、バクテリアが産出する酵素であるキチナーゼは、常温常圧の温和な環境でキチンの  $\beta$ -1,4 結合を加水分解できる。これまで、キチナーゼの分解速度や連続分解回数などのプロセスビティについて知るための有効な手法がなかった。高速AFMによりキチナーゼが結晶性キチンを加水分解しながら移動する様子を直接観察することで、二種類のキチナーゼの双方向移動やそれぞれの酵素の分解速度などを明らかにした。

深海に生息するサツマハオリムシから調製した結晶性の  $\beta$  キチンを基板に固定し、*Serratia marcescens*由来の酵素（キチナーゼAとB）が加水分解する様子を高速AFMで観察したところ、二種類の酵素は同一キチン上を逆方向に移動している様子が観察された（図28a）。これまでも、構造解析によりキチナーゼAとBでは、キチンを分解する活性ドメインがキチン結合ドメインに対して逆向きに付いていることから、二つの酵素は逆方向に分解するのではないかと推測されてきたが、実際に逆方向に反応している分子の動きを初めて捉えることができた。また、分子の移動速度はキチナーゼAで71 nm/s、キチナーゼBで47 nm/sで（図28b）と見積もられ、セルラーゼのセルロース上での移動速度 7 nm/sに比べてきわめて速いことがわかった。また、酵素がキチンから解離するまでの連続反応回数は、キチナーゼAとBでそれぞれ約21回と約13回となり、生化学的解析から推定された値（Aで9.1回、Bで3.4回）よりも2~4倍も大きいことがわかった。これらのことから、溶液中の全酵素分子のうち、10% 程度の分子だけが実際にプロセスビティな分解反応を担

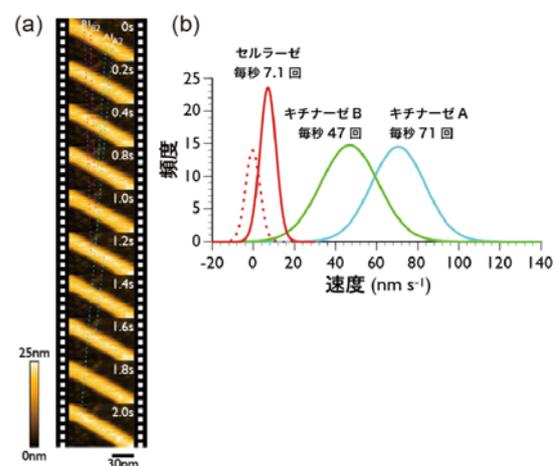


図 28. キチナーゼによる結晶性キチンの分解過程の高速 AFM 観察。(a) 結晶性キチン表面を双方向に動く 2 種類のキチナーゼ（キモグラフ, 5 fps）。(b) セルラーゼとキチナーゼ A および B の基質表面の移動速度。

っていることが示唆された。

#### 8.2.4. 細胞動態の観察 (Watanabe et al. Rev. Sci. Instrum. 2013; Shibata et al. Sci. Rep. 2015)

開発部門で新規に開発した広域スキャナーを真核細胞の観察に応用し、エンドサイトーシスによる細胞膜でのピットの生成・消滅過程や細胞膜の波打運動などの細胞膜ダイナミクスを観察し、新規装置の有効性を実証した。

高速 AFM で観察する細胞の領域を特定し、カンチレバー探針と細胞の位置合わせをするために、高速 AFM に蛍光照明を組み込み込んだ。これにより、GFP を発現した細胞を蛍光顕微鏡観察しながら容易に探針と細胞の位置合わせが出来るようになった (図 29a)。図 29a に示す COS-7 細胞の辺縁領域を高速 AFM で観察したところ、細胞膜の波打運動や糸状仮足の伸長と退縮、突起構造が拡散する様子などを観察することができた (図 29b, c)。よく知られたアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D を観察溶液に加えると、これら細胞膜のダイナミックな現象は起こらなくなった。続けて、観察溶液を交換してサイトカラシン D を洗い流した後に高速 AFM 観察したところ、細胞膜の波打運動や糸状仮足の運動が再び観察されるようになった。このことから、高速 AFM で観察されたこれらの細胞膜の運動はアクチンの重合により生じていると考えられる。この他にも、ダイナミン依存的エンドサイトーシスによる細胞膜でのピットの形成や消滅過程など、光学顕微鏡では容易に得ることができない解像度で細胞膜や膜表面のダイナミクスを可視化出来ることを示した。

我々は脳海馬ニューロンのシナプスで起こる記憶・学習の基盤となるスパインの体積増大とその増大を支える細胞骨格変化や受容体のリクルートメントなどを高速 AFM 観察することを目指して、米国 Florida Max Planck 研究所の安田研究室と共同研究を進めてきた。新生ラットの脳から海馬を摘出し、

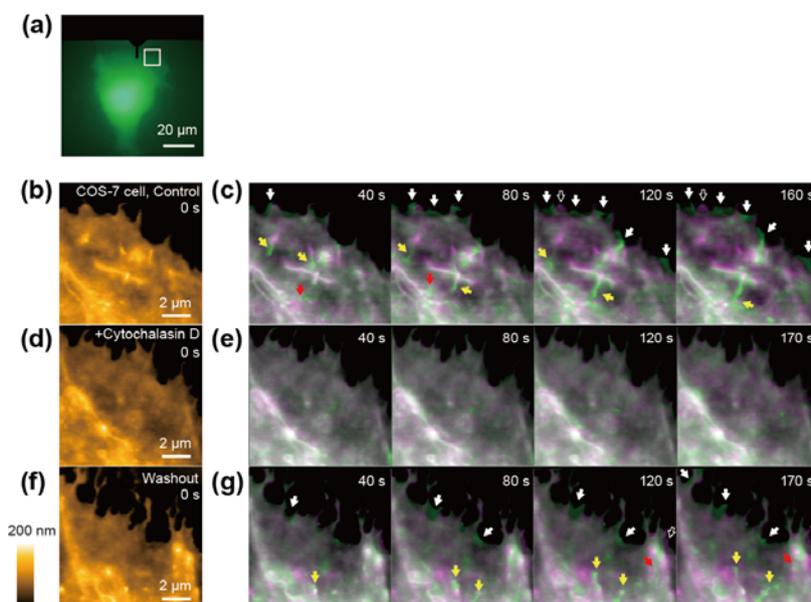


図 29. COS-7 細胞の動態観察。(a) GFP を発現した COS-7 細胞と AFM ティップの位置合わせ。影が AFM のカンチレバーに対応し、四角形は(b)-(g)の AFM 像を取得した領域を示している。(b), (c), (f) は、それぞれ観察溶液にサイトカラシン D がいない場合、サイトカラシン D を加えた場合、さらにサイトカラシン D を洗浄後の COS-7 細胞辺縁部の高速 AFM 像 ( $t = 0$  s)。(c), (e), (g) はそれぞれ (b), (d), (f)に対する異なる時間での高速 AFM 像 (10 s/frame)。緑色で描かれた時間  $t = 0$  s の像に各時間の高速 AFM 像をマゼンタ色で重ねて描かれている。白色と黒抜き矢印は、それぞれ各時間で新たに現れた構造と消滅した構造を示している。黄色と赤色矢印は膜上で移動している突起構造を示している。

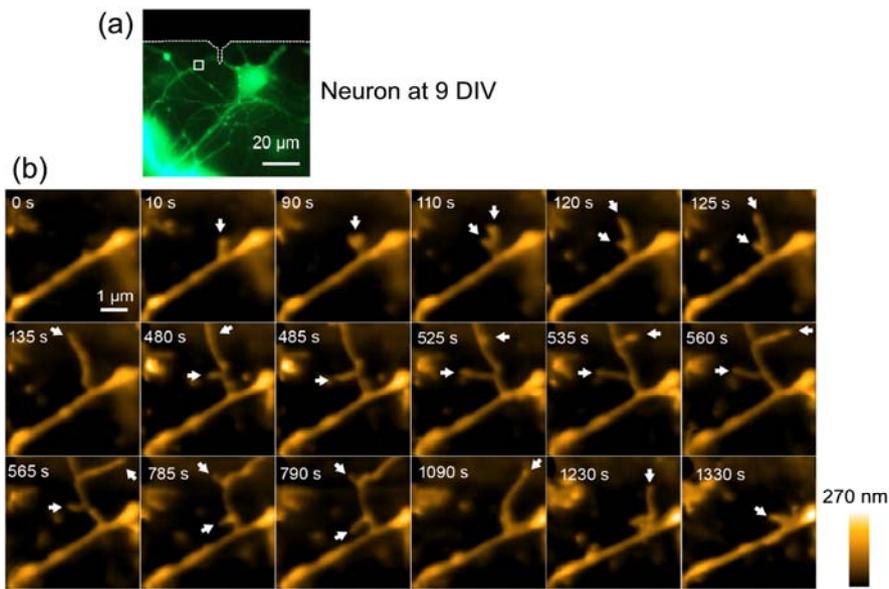


図 30. 海馬ニューロンの培養細胞で起こる樹状突起の成長，分枝，退化。(a) 蛍光像，(b) 高速 AFM 像。

細胞を分離してグリア細胞上で培養し，シナプス形成に至ったニューロンで高速 AFM 観察することを旨としたが，細胞培養がうまく進まなかったため，目標とした観察に至っていない。しかし，図 30b に示す樹状突起の成長，分枝，退化や，ニューロンのそばにあるグリア細胞の膜ラフリング運動などのダイナミックな過程を光学顕微鏡では捉えることの難しい現象を撮影することに成功した。

### 8.2.5. ClpB リング構造のダイナミクス観察 (Uchihashi et al. Manuscript in preparation)

タンパク質はさまざまなストレスや環境変化により変性し，さらには凝集してしまうことがある。しかし，原核生物では ClpB（出芽酵母ではそのホモログである Hsp104）によって，ATP 加水分解のエネルギーを利用して，凝集したタンパク質を Hsp70 と協力して解き，活性ある天然状態へと修復することができる。ClpB/Hsp104 は AAA<sup>+</sup>タンパク質とよばれるタンパク質ファミリーに属しており，AAA<sup>+</sup>タンパク質は共通して六量体からなるリングを形成し，さまざまな基質を ATP 加水分解依存的に中央の孔に引き込むことにより基質の分解や脱凝集を行うと推測されている。単量体の結晶構造解析により，ClpB は AAA-1 ドメインと AAA-2 ドメインの 2 つの ATPase ドメインをもち，その間に M ドメインとよばれる脱凝集活性に必須な独自のドメインをもつことが明らかにされている（図 31a）。またクライオ電子顕微鏡解析から ClpB は六回回転対称なリング構造を形成し，ヌクレオチド状態に依存して M ドメインの構造が大きく変化すると考えられている（図 31a）。しかしながら，実際に六量体リングにどのような構造変化が起こって凝集タンパク質をほぐしているのか，構造ダイナミクスと脱凝集活性との関係は理解されていない。そこで，高速 AFM で好熱菌由来 ClpB の ATP 依存的構造変化の可視化を進めている。

ClpB を 2mM 濃度の ATP 存在下，55°C で 2 分間インキュベーションした後にマイカ基板に吸着させて高速 AFM 観察を行った。観察された ClpB 六量体は，ほとんどが切れたリング（図 31b）やリング内の 2 個のサブユニット位置が高くなった楕円形の非対称リング構造（図 31c）であった。円対称な六量体リング（図 31d）は非常に少なく，また，驚いたことに円対称なリングの多くは七量体であった（図 31e）。ATP 濃度を変えて測定したところ，比較的低い ATP 濃度（100 μM）では切れたリングが 70%

近くを占め、ATP 濃度を高くすると切れたリング構造の割合が減り、非対称なリング構造の割合が増加した。一方、対称なリングの割合は ATP 濃度によらず 5%であった。このことから、ClpB の六量体リングのメジャーな構造は非対称なリング構造であると考えられる。

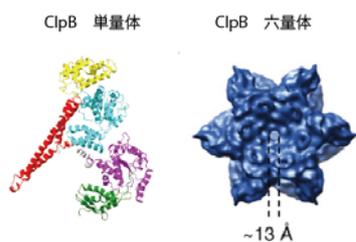
ATP  $\gamma$ S の存在下では対称リングの割合が 20%近くまで増加した。また、AAA-1 と AAA-2 ドメインの両方で ATP 結合能は有するが ATP を分解できない変異体 (E279Q/E678Q) では、60%近くの割合で対称な六量体リングが観察された。このことから、ATP の結合により六量体リングは円対称なリングを形成するが、ATP の加水分解によりリング内に歪が生じて非対称リング構造になるのではないかと考えられる。

ATP 存在下で ClpB 六量体のダイナミクスを観察したところ、非対称なリング構造が切れたり、リング構造が復元したりして構造が大きく揺らいでいる様子が観察された。ATP 濃度を高くすると、構造揺らぎの頻度も高くなったことから、リングの構造揺らぎは ATP 依存的に生じているものと考えられる。

AAA-1 もしくは AAA-2 のどちらか一方の ATPase 活性を欠損した変異体を観察したところ、リング構造の揺らぎは AAA-2 ドメインへの ATP の結合と加水分解によるものであることがわかった。また、脱凝集活性が低下した変異体 (E423A) では対称リングが多く観察され、脱凝集活性が高い変異体 (Y494D) ではほとんどの六量体は切れたリング構造であった。このことから、六量体リングの歪みが脱凝集活性に寄与していることが示唆された。

現在、これらデータを解析し論文にまとめようとしているところである。一方で、ClpB に基質が結合し脱凝集する過程は未だ観察に成功していない。主な理由は基質と ClpB の親和性が低く、基質が結合している分子がほとんど高速 AFM で観察できないためである。現在、基質 (YFP) と ClpB を結合した試料を調製しており、今後、凝集した基質の結合と脱凝集過程を捉えるよう実験を進めていく。

(a)



非公開

(f) [ATP] = 0.5 mM

非公開

### 8.2.6. 時計タンパク質 KaiA/B/C 複合体の観察

シアノバクテリアの概日時計システムは Kai 遺伝子群がコードする 3 つの Kai タンパク質 (KaiA, KaiB, KaiC) から成る。このシステムは ATP を消費しながら KaiC のリン酸化・脱リン酸化, さらには複合体形成能を概日周期的に変動させており, 3 つの Kai タンパク質の離散・集合が概日周期に極めて重要である。3 つのタンパク質がどのように相互作用するかについて, これまで生化学的あるいは電子顕微鏡の単粒子解析により研究が進められてきたが, 結合・解離のダイナミクスについて調べる手法はなかった。高速 AFM により Kai タンパク質の離散集合過程を 1 分子レベルで可視化し, 概日周期発生とその頑強性の機構を理解することを目的に研究を進めている。

KaiC は ATP 存在下でドーナツを 2 つ重ねたような形の六量体構造を形成し, N 末端側半分は CI ドメイン, C 末端側半分は CII ドメインと呼ばれている (図 32a)。KaiA あるいは KaiB が KaiC の 2 つのリングドメインのどちらに結合するかについて, いくつかのモデルが提案されており, どちらの面に結合するかを決定することは時計機能を理解するための基盤となる情報である。KaiC の配向を制御して基板に固定するために, KaiC へのビオチンや His-tag などの標識付与と基板の修飾方法を検討した。最終的に, マイカ基板では CI 側, アミノシラン処理したマイカ基板では CII 側を上に向けて固定することが出来た (図 32b,c)。CII 側にはテイル状の C 末端ドメインが存在するために, リング中心の孔が解像されないが, CI 側では孔が観察できるので, 高速 AFM 像からどちらの面を観察しているか特定できる。

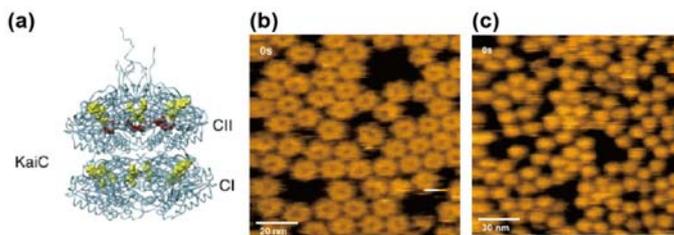


図 32. Kai タンパク質の複合体形成の高速 AFM 観察。(a) KaiC 六量体の構造モデル。(b) KaiC-CI ドメインの AFM 像 (マイカ基板に吸着)。(c) KaiC-CII ドメインの AFM 像 (アミノシラン処理マイカ基板に吸着)。(d)リン酸化 KaiC-CII ドメインへの KaiA の結合 (1 s/frame)。(e) 脱リン酸化 KaiC-CII ドメインへの KaiA の結合 (0.8 s/frame)。(f) リン酸化 KaiC-CI ドメインへの KaiB の結合 (2 fps)。



KaiA と KaiB の KaiC への結合は, KaiC 単量体にある 2 ヶ所のリン酸化部位のリン酸化状態に依存することが知られている。そこで, リン酸化を模擬する変異体 (S431D) と脱リン酸化を模擬する変異体 (S431A/T431A) に対して, KaiA および KaiB との複合体形成を観察した。



非公開

### 8.2.7. 回転子のない $V_1$ -ATPase の構造変化の観察

$V$ -ATPase は ATP により駆動されるイオンポンプとして機能しており,  $F$ -ATPase に類似した親水性の  $V_1$ -ATPase と膜内在性の  $V_0$ -ATPase から構成される。 $V_1$ -ATPase は ATP の加水分解のエネルギーを利用し, ヘテロ六量体  $A_3B_3$  複合体リングの中心孔で, 中心軸である DF 複合体が回転する分子モーターである。X 線結晶構造解析によってヌクレオチド結合型および非結合型の  $A_3B_3$  複合体の構造が解かれ,  $A_3B_3$  複合体の非対称な構造やヌクレオチドとの結合により起こる構造変化が明らかにされている (図 33a)。 $V_1$ -ATPase と  $F_1$ -ATPase は構造, 機能ともに高い類似性を持つが,  $V_1$ -ATPase でも  $F_1$ -ATPase と同じように, 回転子がない六量体リング内でサブユニットのヌクレオチド状態とそれに共役した構造変化が協同的に回転伝搬するかどうかは自明ではない。また,  $A_3B_3$  複合体はヌクレオチド非結合型でも非対称な構造をしていることや, ATP 加水分解の速度など,  $\alpha_3\beta_3$  複合体 ( $F_1$ -ATPase) とは異なる部分も多くある。高速 AFM で  $A_3B_3$  複合体の構造変化を可視化し, リング内協同性の有無を明らかにするとともに, 回転触媒機構の解明を目指して観察を進めている。

結晶構造解析から  $A_3B_3$  複合体は C 末端側で大きく構造変化すると考えられるため, 腸内連鎖球菌から精製した  $A_3B_3$  複合体の N 末端側を His-Tag で標識した試料を調製し, マイカ基板を Ni で処理してから基板に固定した。ヌクレオチドが無い場合, 3 つのプロブからなる三角形の構

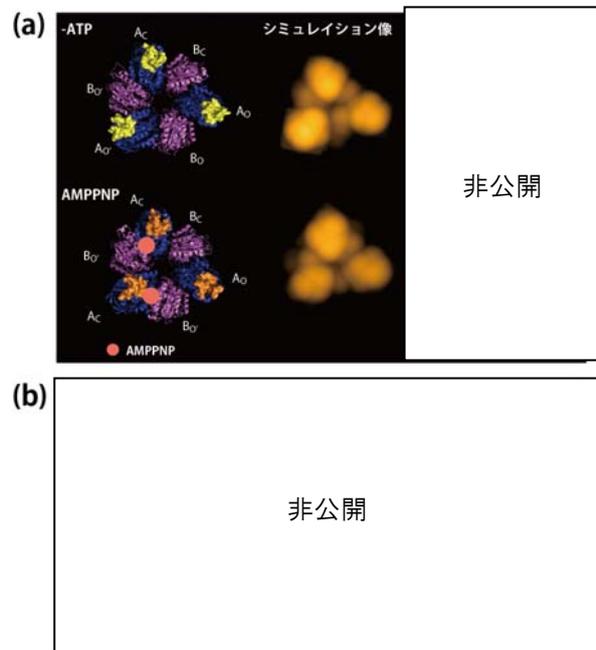


図 33.  $V_1$ -ATPase の高速 AFM 観察。(a) ヌクレオチド非結合型および AMPPNP 結合型の結晶構造, シミュレーション像と高速 AFM 像。(b) 10  $\mu$ M-ATP  $\gamma$ S 存在下での  $A_3B_3$  複合体の構造ダイナミクス (10 fps)。Open 構造の A サブユニットが丸で囲まれている。

造が観察された。 $A_3B_3$  複合体の触媒サブユニットである A サブユニットは非触媒サブユニットの B サブユニットに比べてサイズが大きいことから、観察された 3 つのプロブは A サブユニットに対応していると考えられる。実際、結晶構造から構成されたシミュレーション像は高速 AFM 像によく一致し、ヌクレオチド非結合型でも非対称な構造をとっていることが確認できた (図 33a 上側)。すなわち、3 つの A サブユニットのうちの 1 つは  $A_3B_3$  複合体のリングの中心に向かいシフトしている Closed 構造 ( $A_C$ ) をとり、残り 2 つの A サブユニットは互いによく似た Open 構造 ( $A_O$  および  $A_{O'}$ ) をとっていた。AMPPNP 結合型でも、シミュレーションと AFM 像に良い一致が見られた (図 33a 下側)。

次に、 $2\ \mu\text{M}$  の ATP 濃度で高速 AFM 観察を行ったところ、3 つの A サブユニットの位置がリング中心あるいは外側に向かってシフトする様子が観察されたが、A サブユニットの位置変化はほとんどランダムに観察され、明瞭な一方向への伝播は見えなかった。その後、 $A_3B_3$  複合体は ATP 加水分解速度が  $30\text{--}40/\text{s}$  と非常に高いことが判明したので、加水分解速度が遅い ATP  $\gamma\text{S}$  中で観察を行った (図 33b)。 $10\ \mu\text{M}$  の ATP  $\gamma\text{S}$  濃度で観察を行ったところ、Open 構造にある A サブユニットの位置が反時計回りに順番に伝搬する様子が観察できた。この結果から、 $F_1\text{-ATPase}$  の  $\alpha_3\beta_3$  複合体と同様に、回転子がなくてもリング内での協同的構造変化が生じることがわかった。今後、さらに構造変化頻度のヌクレオチド濃度を測定するとともに、ADP 結合状態などの中間構造の観察など詳細に調べていく予定である。

### 8.2.8. FliI の構造変化の観察

FliI はべん毛基部体にあるタンパク質輸送装置の一部で、べん毛を構成するタンパク質を結合し輸送ゲートまで運ぶ役割の一部を担っていると考えられている。FliI は ATP 加水分解酵素で、ヌクレオチドの結合により六量体リング構造を形成する。輸送基質タンパク質のシャペロンであると考えられている FliJ が FliI 六量体リングの中心穴に挿入されている。X 線結晶構造解析から FliI と FliJ の構造はそれぞれ  $F_1\text{-ATPase}$  の  $\alpha/\beta$  サブユニットおよび  $\gamma$  サブユニットと非常に類似していることがわかっている。 $F_1\text{-ATPase}$  との類推から FliI/FliJ 複合体でも ATP の加水分解により FliI が回転する回転モーターではないかと思われているが、FliI が回転するという実験的証拠は得られていない。また、FliI が ATP の加水分解によりどのような構造変化をするのかも分かっていない。そこで、高速 AFM 観察により FliI が  $F_1/V_1\text{-ATPase}$  のように ATP の加水分解による構造変化を起こすのか、さらに構造変化に協同性があるのかを検証するために観察を行っている。

サルモネラ菌から精製された FliI を観察した。FliI の六量体形成のために、 $1\ \text{mM}$  の  $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4$  下で数分インキュベーションを行った後にマイカ基板に吸着させた。 $F_1/V_1\text{-ATPase}$  からの類推から、FliI が構造変化を起こすとすれば C 末端側であろうと考えられる。また、FliI の構造とアミノ酸配列から FliI



図 34. FliI 六量体の高速 AFM 観察。(a) サルモネラ由来 FliI の N 末端側の高速 AFM 像。(b) 好熱菌由来 FliI の N 末端側の高速 AFM 像。(c) 好熱菌由来 FliI の C 末端側の高速 AFM 像。

の N 末端は正電荷が豊富なために、負電荷をもつマイカ基板には N 末端側が吸着すると期待された。ADP・AlF<sub>4</sub> で高速 AFM 観察を行ったところ、6 つの突起をもつ多量体構造が観察された (図 34 a)。観察された形状から FliI 多量体はホモ六量体であるにもかかわらず、二量体が 3 個集合して六量体を形成しているように見える。一方で、六量体リング構造から期待されるリングの中心孔は観察されなかった。この原因として、FliI は C 末端側を下に基板に吸着しており、AFM で観察している面は N 末側である可能性が考えられた。F<sub>1</sub>-ATPase の  $\alpha_3\beta_3$  や V-ATPase の A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> 複合体も N 末端側は C 末端側に比べてリングのサイズが小さいことから、FliI でも同様のリング構造をしていると考えられる。そこで、N 末端側を His-tag で標識し Ni/マイカ基板での観察を試みたがリング形状は観察できなかった。サルモネラ菌由来の FliI は非常に不安定で精製後数日で凝集してしまうために、長期に渡って実験をすることが出来ないことが律速となっていた。

最近になって、好熱菌から FliI を精製することに成功し、FliI が凝集することなく非常に安定であることがわかった。好熱菌由来 FliI を観察したところ、長期に渡って安定に六量体構造を観察できるようになった。また、N 末端に His-tag を付けた FliI で Ni 処理したマイカ基板上ではリング構造が観察できた (図 34b, c)。しかし、好熱菌由来の FliI は ATPase 活性の至適温度が 40°C 付近にあり室温ではほとんど ATP を加水分解しない。現在、開発部門において 40°C 程度まで観察溶液の温度を上げて観察できるカンチレバーホルダーを開発している。これが完成次第、FliI の構造ダイナミクスの観察を進めていく。

### 8.2.9. 歩行運動中のミオシン V の観察 (Kodera et al. Nature 2010)

ミオシン V はモータータンパク質の一種で、細胞内でアクチン線維に沿って物質輸送を担っている。構造的には、2 本の等価な足を持ち、それぞれの脚はモーター部位と長いネック部位から成っている (図 35a)。これまで蛍光観察手法や光ピンセット法などにより、ミオシン V の運動は集中的に研究され、アクチン線維に沿って約 36 nm のステップで、ハンドオーバーハンド様式 (人が歩くように 2 本の足が交互に前進する様式) で連続的に運動することが既に知られていたが、この歩行中の分子の振舞いや前進運動を駆動する張力発生のメカニズムの詳細はよく分かっていなかった。これらの問題を解明するために、高速 AFM で歩行運動中のミオシン V 分子 (球状尾部を除去した M5-HMM を用いた) の直接観察に取り組んだ。

様々な観察基板を試みたが、最終的に、ビオチン化脂質 (Biotin-cap DPPE) を含む脂質二重層膜を用いることにした (図 35b)。脂質二重層膜の主成分は、電気的に中性な極性基をもった脂質 (DPPC) にした。これにより、タンパク質の非特異的な吸着を完全に抑えることができた。アクチン線維はわずかにビオチン化したものを用い、脂質二重層膜上にはストレプトアビジンを介して特異的に固定できた。この基板上でもミオシン V の歩行運動を観察することができたが、多くのミオシン V がアクチン線維の上部を運動するため、高い解像度で分子形状を捉えるのが難しかった。そこで、正電荷を持つ脂質 (DPTAP) を脂質二重層膜中に若干加え、ミオシン V がアクチン線維の側面を運動するようにした。これにより、歩行しているミオシン V を鮮明にとらえることができるようになった (図 35c)。また、ミオシン V の歩行速度は、蛍光顕微鏡法などで計測されたものとはほぼ一致した。これより、AFM 探針と試料の相互作用、試料と観察基板の相互作用は、ミオシン V のモーター活性にほとんど影響を与えないことが明確となった。

ミオシン V が 1 歩進む過程は非常に速く、その途中の過程を捉えるには工夫が必要だった。過剰のストレプトアビジンを基板表面に撒いたところ、前進運動が穏やかに阻害され、歩行中の過程を捉

えることができた (図 35d, e)。ミオシン V の後ろ足がアクチンから解離すると、ほぼ真っ直ぐな前足が後方に傾いた向きから前方に傾いた向きに自動的に回転した。この回転は、筋肉の研究で H. E. Huxley によって提唱されていた Swinging Lever-arm 運動そのものであり、ここではじめて実証された。この回転に伴って前方に移動したネック-ネック接合部の周りを後ろ足は回転し、やがて前方のアクチン線維に結合し、一步の運動が完了した。この 1 つの映像の中には、これまでの研究で明らかにされた複数の事実が視覚的証拠として同時に含まれていただけではなく、前進駆動が前足の屈曲 (モータードメイン/ネック接合部付近での折れ曲がり) ではなく回転で起こっていること、解離した後ろ足は前進中にアクチン線維に接していない事実が明瞭に観察された。また、後ろ足の解離によって前足が自動的に回転するように見えることから、この回転のための張力が 2 本足でアクチン線維に結合している分子内 (前足) にすでに存在していると推測された (後述参照)。

さらには、ミオシン V がアクチン線維に留まっている間、前足が時折アクチン線維から解離し直ぐに再結合する振舞い (Foot stamping と命名) が新たに見いだされた (図 35f)。また、ヌクレオチドなしの条件でも、M5-HMM は 2 本足で同じアクチン線維に結合できることが分かった。しかし、ヌクレオチドが存在する場合と異なり、前足は大きく屈曲している割合が多かった (図 35g)。この事実により、前足の形態を観察することによって、前足にヌクレオチドが結合しているかどうかを判断できた。前足が真っ直ぐな形態をとる寿命を ADP 濃度の関数として計測し、前足での ADP の解離速度定数を見積もると、結果は  $0.1 \text{ s}^{-1}$  となった。すなわち、平均で 10 秒間に 1 回、前足から ADP が解離

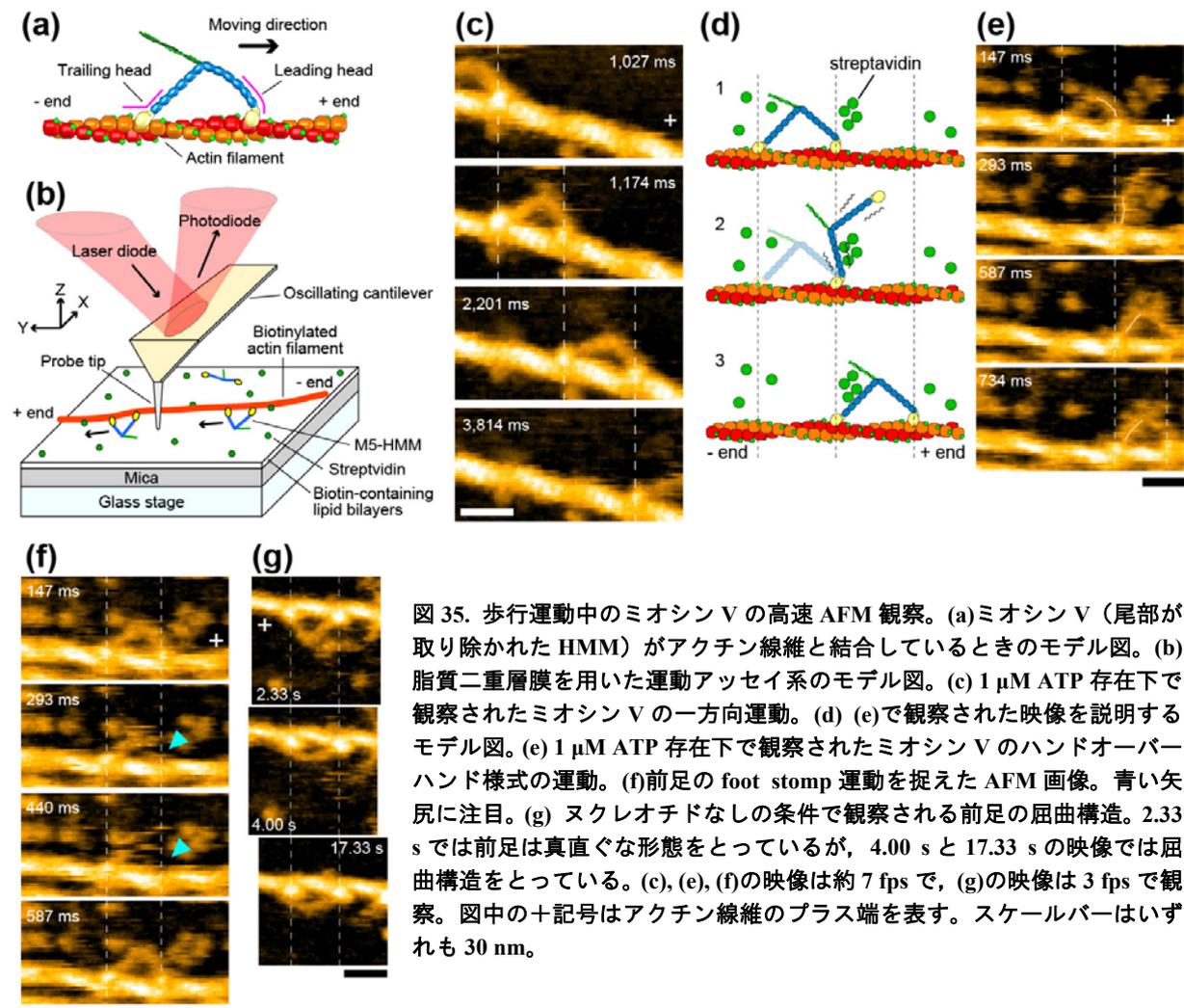


図 35. 歩行運動中のミオシン V の高速 AFM 観察。(a) ミオシン V (尾部が取り除かれた HMM) がアクチン線維と結合しているときのモデル図。(b) 脂質二重層膜を用いた運動アッセイ系のモデル図。(c)  $1 \mu\text{M}$  ATP 存在下で観察されたミオシン V の一方向運動。(d) (e) で観察された映像を説明するモデル図。(e)  $1 \mu\text{M}$  ATP 存在下で観察されたミオシン V のハンドオーバーハンド様式の運動。(f) 前足の foot stamping 運動を捉えた AFM 画像。青い矢尻に注目。(g) ヌクレオチドなしの条件で観察される前足の屈曲構造。2.33 s では前足は真っ直ぐな形態をとっているが、4.00 s と 17.33 s の映像では屈曲構造をとっている。(c), (e), (f) の映像は約 7 fps で、(g) の映像は 3 fps で観察。図中の + 記号はアクチン線維のプラス端を表す。スケールバーはいずれも 30 nm。

することになる。10 秒間にミオシン V は何歩も歩くことから、歩行しているミオシン V の前足から ADP が解離することはなく、ADP の解離、それに続く ATP の結合、その結果起こるアクチン線維からの解離は、後ろ足でしか起こらないことが結論される。このことは、間接的な実験データから示唆されていたハンドオーバーハンド運動が起こる分子基盤であるが、この高速 AFM 観察により直接的な証明が与えられた。また、ATP 非存在下でも観察される Foot stomping やコイルドコイルがほどけた後の前足の自発的な回転運動の存在は、これまで広く信じられているミオシンの力発生メカニズムに再考を迫るものである（8.2.14 節のミオシン V のインタラクティブイメージングに続く）。

### 8.2.10. 天然変性タンパク質 (Hashimoto et al. Biophys. J. 2013; Ishino et al. J. Biol. Chem. 2014; Kodera et al. J. Mol. Biol. 2015)

これまで、タンパク質が機能するためには個々のタンパク質に特徴的な立体構造があることが重要であると考えられてきた。しかし、近年、天然状態で、全長もしくはタンパク質中の長大な領域が変性状態（決まった構造をとらない）でありながら、翻訳、転写、シグナル伝達などの重要な生理的役割を果たすタンパク質群があることが分かってきている。これらのタンパク質群は、天然変性タンパク質（Intrinsically Disordered Protein, 以下 IDP）と呼ばれ、従来のタンパク質とは異なる未知の機能発現機序を有する可能性が高いことから、現在、国内外で精力的に研究がおこなわれている。IDP 研究の重要性は徐々に認知されてきているが、IDP の構造研究にはこれまでパワフルだった手法が使えない。例えば、電子顕微鏡法では天然変性領域（Intrinsically Disordered Region, 以下 IDR）は細すぎて可視化できず、IDR は結晶化しないため X 線結晶構造解析できない。NMR 法は唯一 IDR の局所構造を解析できるが、解析できる分子量に制限があり、また、分子の平均的な振舞いしか解析できない。一方、我々は 2008 年に、高速 AFM が全長の IDP の構造形態を、細くてゆらゆらと動く IDR の動態も含めて、1 分子レベルで解析できることを示した。その後いくつかの IDP を高速 AFM 観察し、個々の構造形態の解析だけでなく、IDR に共通な構造的な性質を見出すことに成功している。以下に、これまでに IDP を高速 AFM 観察した結果を述べる。

#### A. FACT (Hashimoto et al. Biophys. J. 2013)

FACT は、クロマチンリモデリングに関わるタンパク質複合体で、SSRP1 と SPT16 の 2 つのサブユニットから構成されている。どちらのタンパク質にも長大な IDR が含まれているが、SSRP1 の IDR 内の酸性に富んだ領域（以下、A-IDR）は高度にリン酸化の修飾を受ける。このリン酸化された A-IDR が、長大な IDR に含まれる Highly-Mobility-Group ドメイン（HMG ドメイン）と塩基性に富んだ IDR（以下、B-IDR）と相互作用することで、FACT とヌクレオソーム DNA との相互作用が阻害されるとということが知られていた。この構造的な証拠を得るために、*Drosophila* で発現された dFACT-WT と dFACT-10SA の高速 AFM 観察をそれぞれ行った。dFACT-WT は A-IDR が高度にリン酸化された野生型のもので、dFACT-10SA は A-IDR のリン酸化が起こらないように A-IDR に含まれる 10 か所のセリン残基をアラニン残基に置換した変異型である。

高速 AFM 観察の結果、dFACT-WT と dFACT-10SA とともに、大きな球状部位 ( $GD_1$ ) から細いひも状構造 (SSRP1 の IDR) が伸びているのが観察された (図 36a, b)。IDR をよく見ると、WT のほうが 10SA のものよりやや短く見え、IDR のほぼ中央部と端に小さな球状部位 ( $GD_2$  と  $GD_3$ ) が観察された。このうち中央部の  $GD_2$  は現れたり、消えたりしており、WT でより長い間現れる。これらの形状的特徴をモデル化して解析すると (図 36c)、WT の IDR の全長が 10SA よりも短く見えるのは、 $GD_1$  から

GD<sub>2</sub>までの距離が約2 nm 短くなっていることに起因することが分かった (図 36d)。また, GD<sub>2</sub>の高さ分布より, WT の GD<sub>2</sub>は 1.6-1.7 nm 程度の高い状態に多くあるのに対して, 10SA の GD<sub>2</sub>は 1.1 nm 程度の低い状態に多くあるということが分かった (図 36e)。重要なのは, これらの構造的特徴が静的ではなく動的に遷移しているということを直接的に示せたことである。また, GD<sub>2</sub>の位置は予測される HMG ドメインの位置と一致していた。既報の HMG ドメインの高さが 1.1 nm であることと, ここで測定した IDR の平均的な高さが約 0.5 nm であることを考慮すると, この高速 AFM 観察によって, 次のことが結論された。(1) SSRP1 の長大な IDR に含まれる A-IDR が HMG ドメインと B-IDR と静電相互し, 部分的に小さな球状構造を形成する。(2) この小さな球状部位の形成と消失は動的な平衡状態にある。(3) A-IDR が高度にリン酸化されることによって, この平衡状態が球状部位を形成する側に偏る。(4) FACT がこの小さな球状部位を形成することが, ヌクレオソーム DNA との相互作用を弱くしている構造基盤である。

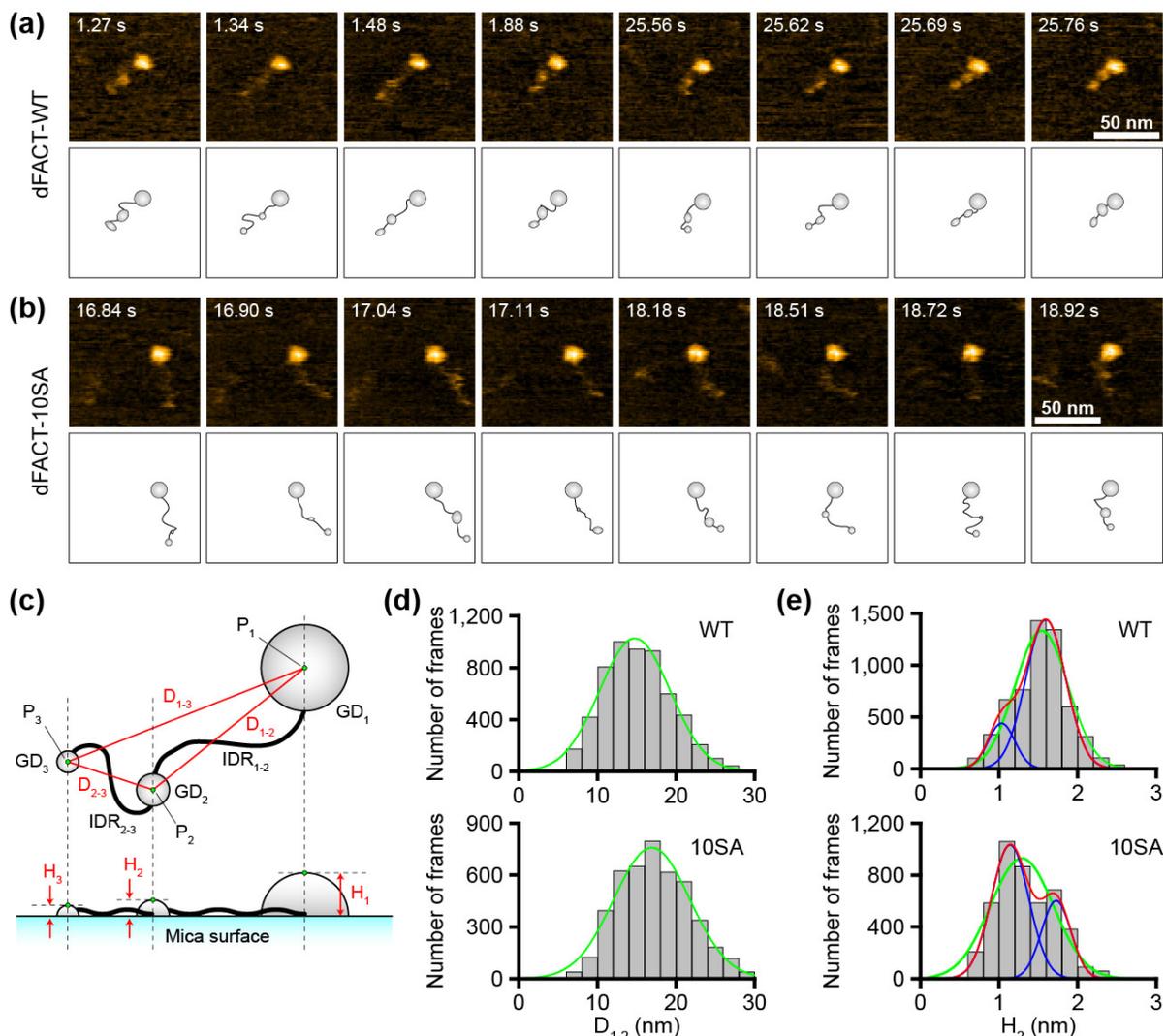


図 36. dFACT の高速 AFM 観察。(a) dFACT-WT, (b) dFACT-10SA の形状を捉えた代表的な高速 AFM 像。14 fps で撮影。直下にあるイラストは, (c) のモデル構造を元に描かれている。(c) 高速 AFM によって観察された dFACT の分子形状を表すモデル図。上段は上から観察したときのモデル (AFM 観察像に対応), 下段は横から見た時のモデル。灰色の球形は球状部位を, 黒色のひも状の線は IDR をそれぞれ表す。(d) GD<sub>1</sub> から GD<sub>2</sub> までの距離 ( $D_{1-2}$ ) 分布。上段は WT, 下段は 10SA のもの。(e) GD<sub>2</sub> の高さ ( $H_2$ ) の分布。上段は WT, 下段は 10SA のもの。それぞれの分布は 1.6-1.7 nm と 1.1 nm 付近にピークを持った。高い方は HMG ドメインに IDR が結合したときの高さ, 低い方は HMG ドメイン単独の高さ。

## B. Hef (Ishino et al. J. Biol. Chem. 2014)

Hef は、古細菌に含まれるタンパク質で、DNA 複製中にできる複製フォークの修復を担っていると考えられている。生化学的解析により、Hef はモノマーの C 端側を介してホモダイマーを形成すること、N 端側には DNA のフォーク構造で活性化するヘリケース部位があること、C 端側には損傷した DNA に特異的なエンドヌクレアーゼ部位があることが分かっている。構造的には、X 線結晶構造解析で、N 端のヘリケース部、C 端側のヌクレアーゼ部の構造がそれぞれ原子レベルで解かれている。しかしながら、中間領域の構造については、長大な IDR が存在することが示唆されていたが、その直接的な証拠はなかった。そこで、中間領域の構造形態を明らかにするために、*T. Kodakaraensis* で発現された TkoHef の高速 AFM 観察を行った。

TkoHef WT を観察すると、1つの小さな球状部位から2本の細くてフレキシブルなひも状構造が出ており、そのそれぞれの先に大きな球状部位がつながったような分子形状が観察された(図 37a)。一方、C 端側のダイマー形成部位を変異させた TkoHef-m を観察すると、1つの大きな球状部位が1本のひも状構造で小さな球状部位につながっている分子形状が観察された(図 37b)。これにより、Hef 分子は小さな球状部位でダイマー構造を形成していることが示唆された。X 線結晶構造解析によれば、

ヘリケース部位はヌクレアーゼ部位よりも大きいことが分かっているので、高速 AFM で観察された大きな球状部位と小さな球状部位は、それぞれ、N 端側のヘリケース部位と C 端側のヌクレアーゼ部位であることが分かった。このことは、ヘリケース部位の立体構造を反映した非対称な“c 字様”の形状が、大きな球状部位にときどき観察されることによってもサポートされる(図 37b の 0.40 s や 4.22 s など)。また、IDR を欠損させた TkoHef $\Delta$ ID を観察すると、大きな球状部位と小さな球状部位が、これまで見ていたひも状構造を介さずに、連結している分子形状が観察された(図 37c)。これらの観察の結果、Hef の中間領域には確かに IDR が含まれていることを直接的に示すことができた。

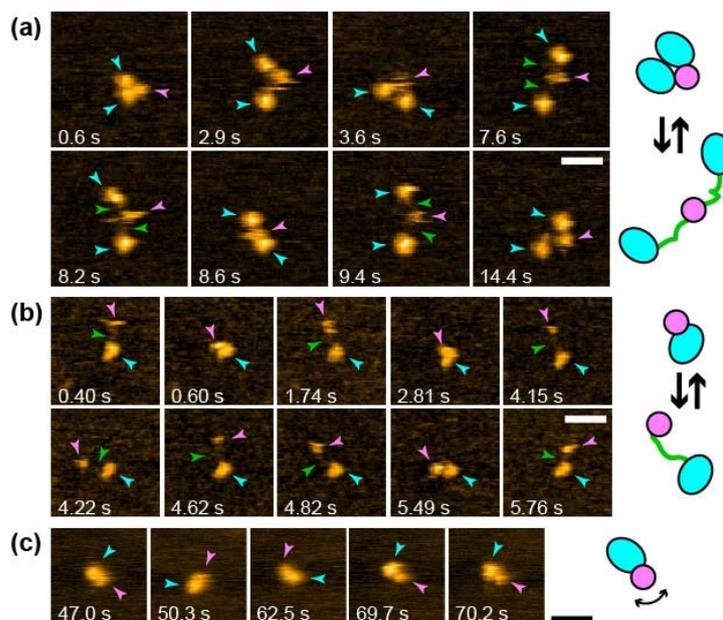


図 37. TkoHef の高速 AFM 観察。(a) TkoHef-WT, (b) TkoHef-m, (c) TkoHef $\Delta$ ID の高速 AFM 像。スケールバーは 30 nm。Z のスケールは、(a)が 0-5 nm, (b,c)は 0-3.5 nm。図中の青、ピンク、緑の矢尻はそれぞれ、TkoHef のヘリケース部位、ヌクレアーゼ部位、IDR を表す。右端には各分子のモデル構造を示す。各部の色は矢尻の配

## C. FliK (Kodera et al. J. Mol. Biol. 2015)

バクテリアのべん毛の菌体に近い部分には、フックと呼ばれるカギ型の構造があるが、その長さは FliK と呼ばれる分泌性のタンパク質によって、約 55 nm に制御されている。FliK が分泌されたときにだけフック長が制御されることから、FliK はフックの長さを“テープメジャー”のように物理的に計測しているというモデルが提唱されている。生化学的には、N 端がべん毛の成長端に結合できること、

C 端が分泌ゲートと相互作用し、分泌するタンパク質を切りかえる役割を担っていることが分かっている。この切り替えがうまくできない FliK の変異体を持つ菌は、ポリフックと呼ばれる長さが異常に長いフックを持つべん毛が生えることが知られている。構造的には、N 端側はグリシンやプロリンが豊富であることから IDR であることが示唆され、NMR によっても IDR として計測されていた。一方、C 端は小さな構造ドメインであることが、NMR によって示唆されていた。しかしながら、1 分子レベルでの直接的な構造証拠は存在しなかった。そこで、高速 AFM によって FliK の構造形態の直接観察に取り組んだ。また、ポリフックを誘導する FliK の変異体も観察し、野生型のものとその構造形態を比較した。

野生型の FliK (FliK-WT) を観察すると、大きな球状部位と小さな球状部位がひも状構造でつながれている分子形状が観察された (図 38a)。2つの球状部位の高さは、それぞれ  $2.7 \pm 0.1$  nm,  $2.0 \pm 0.3$  nm であり (図 38b), 2つの球状部位間の長さは約 11 nm だった (図 36c)。観察された大小の球状部位が N 端と C 端のどちらなのかを明らかにするために、FliK の変異体を用いて観察を行った結果、大きな球状部位が N 端、小さな球状部位が C 端であることが判明した。さらに、2つの球状部位間の距離が長くなると、大きな球状部位の高さは変わらないが、小さな球状部位の高さが低くなることが分かった。また興味深いことに、ポリフックを誘導する FliK の変異体の大きな球状部位は、2つの球状部位間の距離が長くなると、高さが低くなる傾向があった。これらのことは、制御された長さのフックを作るためには、FliK の N 端は構造的に安定で、C 端は構造的に不安定であることが重要であることを示唆している。これらの結果より、フックの成長過程において、FliK の N 端はフックの成長端で絶えず構造を作ろうとしており、FliK の残りの部分を細胞外に引っ張り上げようとしていることが考えられる。

フックが短いときは、C 端側が N 端によって直ちに引っ張りあげられるため、フックタンパク質 (FlgE) からべん毛タンパク質 (FliC) へと分泌タンパク質を切り替えるためのスイッチングが十分に行われる前に、FliK が分泌されてしまい FlgE が分泌され続けるのに対し、フックがある長さに到達すると、FliK の N 端が残りの部分を引っ張り上げるのに十分な力を発揮できないので、C 端が分泌スイッチを切り替えるのに十分な時間が与えられるのだろう。高速 AFM によって、FliK の構造的特徴を明らかにすることによって、べん毛フック長の制御メカニズムに対して新しい洞察を与えることができたと言える。

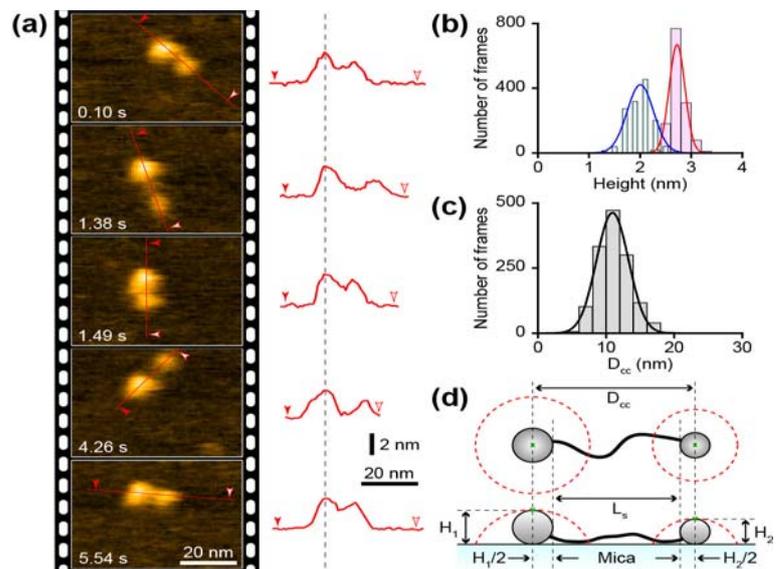


図 38. FliK-WT の高速 AFM 観察。(a) 典型的な FliK-WT を撮影した AFM 像。~20 fps で撮影。Z のスケールは 0-3.5 nm。各 AFM 像の横には AFM 像中に引かれた赤線に沿った断面図が描かれている。大きな球状部位の一番高い位置が縦の破線に沿って並べられている。(b) 2つの球状部位の高さ分布。ピンクが大きな球状部位、青が小さな球状部位を示す。(c) 2つの球状部位間の距離分布。(d) 高速 AFM によって観察された FliK の分子形状を表すモデル図。上段は上から観察したときのモデル (AFM 観察像に対応)、下段は横から見た時のモデル。灰色の球形は球状部位を、黒色のひも状の線は IDR を表す。

### 8.2.11. コフィリンによって誘起されるアクチン線維の構造変化の観察 (Ngo et al. e-Life 2015)

コフィリンはアクチン結合タンパク質 (Actin Binding Protein, 以下 ABP) の一種で, アクチン線維を切断したり, アクチン線維のマイナス端側の脱重合を活性化したりする性質を持ち, 細胞でのアクチンの動態に必須の役割をもつ。これまでに, (1) コフィリンはアクチン線維に協同的に結合し (ランダムには結合しない), アクチン線維上でクラスターを形成すること, (2) コフィリンが結合したアクチン線維はさらによじられ, アクチン線維のらせんピッチが 25%程度短くなること, (3) アクチン線維上にできたコフィリンクラスターの回りには, コフィリンが結合していないアクチン線維の部分まで構造変化が伝搬している可能性があること (協同的に起こる構造変化), (4) アクチン線維はコフィリンクラスターとコフィリンが結合していないアクチン線維の境目で切断されやすいこと, が分かっている。しかしながら, (3)に関しては, 直接的な構造的な証拠が乏しいこと, また, 協同的な構造変化が起こるとして, アクチン線維の両方向に伝搬するのか, それとも, 一方向に伝搬するのかは分かっておらず, どれほどの距離伝搬するのかも分かっていない。また, コフィリンクラスターの成長の方向についても, 両方向性なのか一方向性なのか分かっていない。(4)については, 蛍光顕微鏡の空間分解能で導かれた結論であるため, より高い空間分解能をもった手法で解析することが望まれていた。そこで, これらの未解決問題を解決するために, 高速 AFM を用いてアクチン線維に結合していくコフィリンを観察した。

既報の結果と一致して, コフィリンがアクチン線維に結合すると, アクチン線維の高さが 8.6 nm から 10.6 nm と上昇し, アクチン線維のらせんピッチ (HHP) が 37 nm 程度から 27 nm 程度に減少した。次に, コフィリンクラスターの回りの, コフィリンが結合していない部分をよく観察すると, 一方向だけアクチンの HHP が短くなっていた。ミオシンの頭部 (S1) を溶液中加入し, アクチンの極性を確認すると, HHP が短くなっているのはアクチン線維のマイナス端側だけで, HHP 1 つ分だけが短くなっていた (図 39a-c)。また, アクチン線維にコフィリンが 1 分子付いただけでは, これらの構造変化は誘起されなかった。次に, コフィリンクラスターの成長過程を観察すると, これもまたアクチンのマイナス端方向に, ほとんどの場合, 成長していた (図 39d)。これら性質は, アクチンに結合しているヌクレオチド状態に依存しなかったことから (図 39e), コフィリンはアクチンのヌクレオチド状態を認識してアクチンに結合しているというよりは, アクチンの非対称な構造そのものを認識して結合していることが導かれた。さらに, アクチン線維の切断位置とコフィリンクラスターとの関係を詳細に調べた。アクチン線維の切断は, コフィリンクラスター内の両端の高くなった部位間で最も頻繁に起こり, 次に, コフィリンクラスターとコフィリンが結合していない境界部で起こりやすかった。一方, コフィリンクラスター内部やコフィリンが結合していないアクチン線維の内部領域では, 線維の切断は起こりにくかった (図 39f, g)。以上により, コフィリンの機能発現機序に関して, 理解を深めることができた (図 39h)。この結果は, 溶液中の活きたアクチン線維の構造をここまで高い空間分解能で観察できた例は他にないという点, さらに ABP との結合やそれに伴う線維のダイナミクスまで詳細に観察されたという点で特筆すべき成果である。さらに, ABP の結合によって誘起されるアクチン線維の構造変化の一方向性の伝搬は, 他の ABP でも見られる可能性があり, アクチン線維の細胞内での動態や生理的役割を考える上で今後考慮しなければならない重要な要素となるだろう。

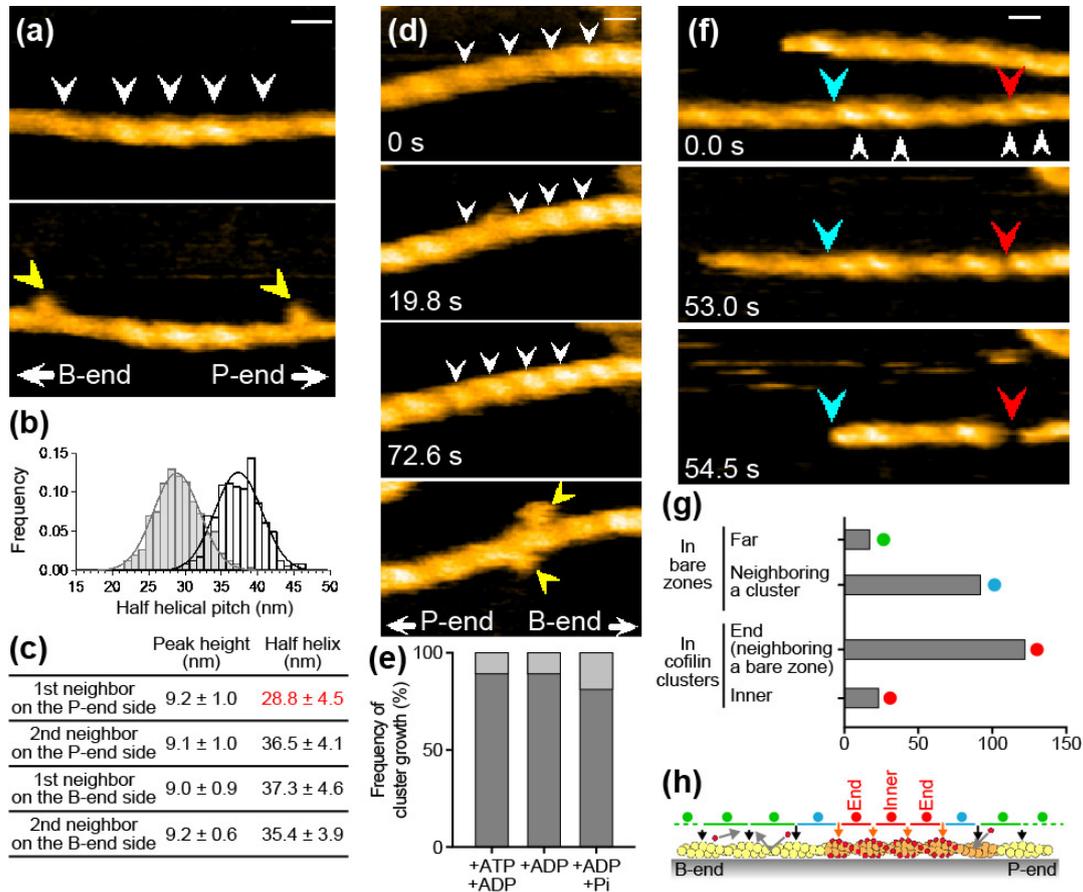


図 39. 高速 AFM で観察したコフィリンのアクチン線維への協同的結合。(a) アクチン線維上に形成されたコフィリンクラスターの AFM 像。5 つの白い矢尻の中 3 つがコフィリンクラスターを表す。左側 2 つの矢尻間の距離が長いのに対して、他の矢尻間の距離が短いことに注目。下段の AFM 像で、アクチン線維に結合したミオシン S1 の矢尻構造より (黄色の矢尻) アクチンの極性が分かる。ここでのスケールバーはすべて 25 nm。(b) コフィリンクラスターの周りの HHP の分布。灰色はマイナス端側、白色はプラス端側を表す。(c) コフィリンクラスターの周りの HHP とピークの高さのまとめ。コフィリンクラスターの一つ隣の HHP だけが短くなっていることが分かる。(d) コフィリンクラスターの成長方向を捉えた AFM 像。一番下の画像のミオシン S1 の結合様式より、アクチンの極性が分かる。(e) アクチンの各ヌクレオチド状態におけるコフィリンクラスターの成長方向の頻度。濃い灰色がマイナス端方向に、薄い灰色がプラス端方向に成長した場合の頻度を表す。(f) コフィリンクラスターとアクチン線維切断位置の関係を観察した AFM 像。白い矢尻がコフィリンクラスターの位置を示す。青と赤の矢尻は、それぞれ(g)の色分けと同じ。(g) アクチン線維の切断箇所をまとめ。(h) 観察された現象をシンプルにまとめたモデル図。

## 8.2.12. Centralspindlin の構造形態の観察 (Davies et al. PLoS Biol. In press)

細胞質分裂において、中央紡錘体の付近には微小管が逆並行に並び束化されている領域があるが、その領域の形成には Centralspindlin と呼ばれるキネシン様タンパク質の働きが必須である。Centralspindlin は、キネシン 6 とモーター活性のない CYK4 と呼ばれるタンパク質の 2:2 のヘテロ四量体であることが知られている。キネシン 6 の特徴として、通常のキネシンと比べて非常に長いネックリンカーを持つことが挙げられる。生化学的な解析により、CYK4 はキネシン 6 の長いネックリンカーに結合していることが示唆されていたが、直接的な構造証拠はなかった。そこで

高速 AFM で Centralspindlin の構造形態の直接観察に取り組んだ。

Centralspindlin のコンストラクトとして、線虫のキネシン 6 に対応する ZEN-4 を主に用いた。ZEN-4 の 775 番目以降のアミノ酸に蛍光タンパク質 (mAG) を付加した Z775mAG と、CYK4 の ZEN-4 に結合する最小ユニットであることが知られている 120 番目のアミノ酸までの C120 との複合体を観察すると図 40a のような“ダガー状”の分子形状が観察された。様々なコンストラクトを用いてそれぞれの部位を特定すると、2 つの大きな球状部位はキネシン 6 のモータードメイン (黄色)、モータードメインにはさまれて突起のように出ているように見えるのが C120 (水色と赤色)、突起と反対側に伸びている細いひも状構造がキネシン 6 のコイルドコイルドメイン (ピンク色)、激しく揺らぐ 2 つの小さな球状部位が mAG (緑色) であることが分かった。この結果は、生化学的な解析からの予測と矛盾しないが、C120 の結合様式を詳細に明らかにすることができたと言える。また、HeLa 細胞から精製したヒト Centralspindlin の全複合体も同様の構造形態をしていることを示すことができた。

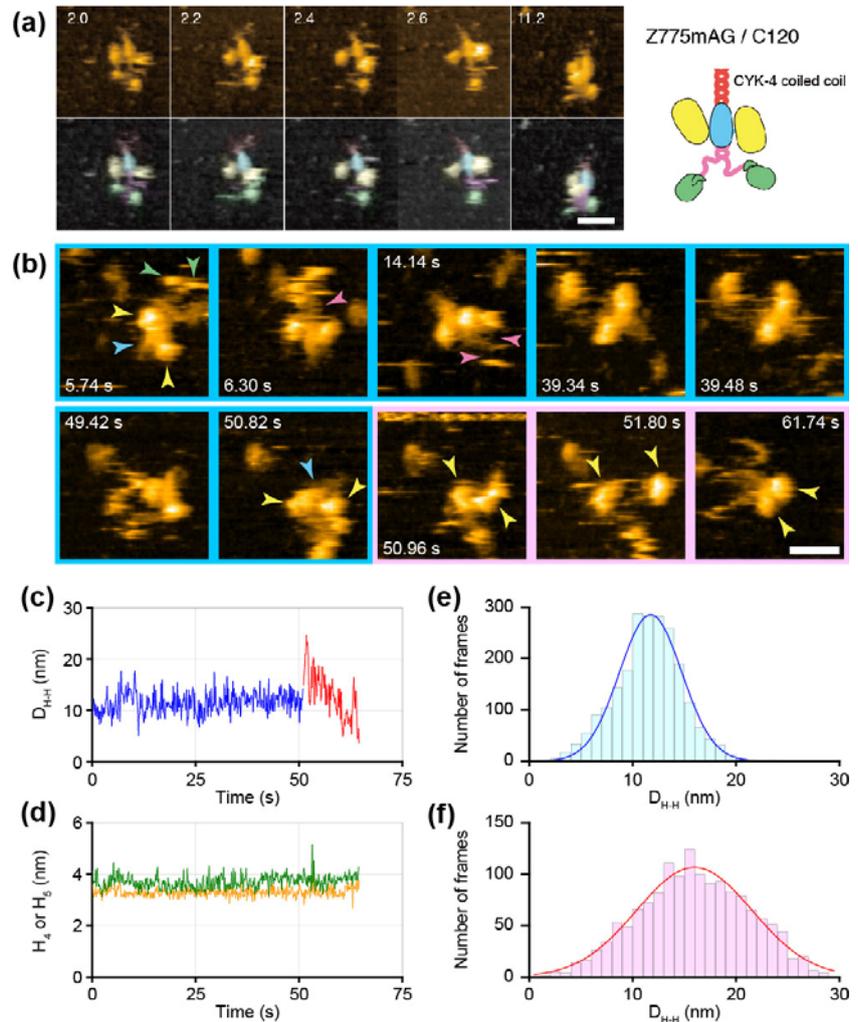


図 40. Centralspindlin の高速 AFM 観察。(a) Z775mAG/C120 複合体の AFM 像。すべてのスケールバーは 20 nm を表す。上段は生画像。下段はドメインごとに色分けを行った (色分けについては本文参照)。右図は分子形状を表すモデル図。(b) Z775mAG/C120 複合体から C120 が解離する現象を捉えた AFM 像。背景がピンクになっているところから C120 が解離している。図中の矢尻の色は(a)のモデル図での色分けに対応。(c) (b)の映像のモータードメイン間の距離の経時変化。青線は C120 解離前、赤線は解離後を表す。(d) (b)の映像のモータードメインの高さの経時変化。(e) C120 が解離する前のモータードメイン間の距離分布。(f) C120 が解離した後のモータードメイン間の距離分布。

この結果は、生化学的な解析からの予測と矛盾しないが、C120 の結合様式を詳細に明らかにすることができたと言える。また、HeLa 細胞から精製したヒト Centralspindlin の全複合体も同様の構造形態をしていることを示すことができた。

また、観察途中で C120 が複合体から解離する様子がたまたま観察された (図 40b)。C120 が解離するとモータードメイン間の距離が長くなったり短くなったりしていた (図 40b, c)。これを詳しく見ると、C120 が解離する前のモータードメイン間の距離は  $12 \pm 3 \text{ nm}$  であったのに対し (図 40e)、解離後のものは  $16 \pm 6 \text{ nm}$  であった (図 40f)。一方、C120 の解離前後でモータードメインの高さは変化しなかった (図 40d)。以上のことから、C120 はキネシン 6 のモータードメイン間の距離を一定に保つ働きがあると言え、観察された構造形態と併せて考えると、C120 はキネシン 6 の 2 つのモータードメインが同時に同じ微小管に結合できないような立体障害を作っていることが示唆される。さらにキネシンがコイルドコイルの回りに 2 回の回転対称であることを考慮すると、この立体障害は、Centralspindlin が微小管を逆並行に並べる構造的基盤になっていると考えられる。

### 8.2.13. 抗体-抗原反応の 1 分子観察 (Preiner et al. Nat. Commun. 2014)

抗体分子の抗原分子への結合は、獲得免疫において非常に重要な現象であり、その反応機構の理解は、病気の治療や診断法として注目されている抗体医療の発展に欠かせない。この重要性にも関わらず、抗体・抗原の結合と解離に関わる分子プロセスは、1 分子レベルでは全く理解されていなかった。そこで、いくつかのタンパク質に同じ抗原エпитープを融合させたタンパク質を作成し、それぞれのタンパク質の二次元結晶を作成した。二次元結晶の上には、結晶化されているタンパク質の形状に合わせた間隔や配向性で抗原エпитープが位置するようにした。その上に、抗原エпитープを認識する抗体分子 (IgG) を結合させ、その様子を高速 AFM 観察した。ちなみに、1 つの IgG 分子には抗原エпитープを認識する Fab 部位が 2 つある (図 41b)。

バクテリオロドプシンの二次元結晶 (2 回対称性なし、ユニットセル:  $a = b = 6.2 \text{ nm}$ ,  $\gamma = 120^\circ$ ) の上では、IgG は 2 つの Fab 部位を足のようを使って、まるで 2 次元結晶の上を歩くかのように、ゆっくりと二次元拡散運動を行った (図 41a-c)。一方、ストレプトアビジンの二次元結晶 (2 回対称性あり、ユニットセル:  $a = b = 5.9 \text{ nm}$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ) の上では、IgG は一か所に留まり、移動することはなかった (図 41d, e)。次に、バクテリア S-layer の二次元結晶 (p4 対称性あり、ユニットセル:  $a = b = 13.1 \text{ nm}$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ) の上で観察してみると、IgG は非常に速い二次元拡散運動を行った (図 41f, g)。また、驚くべきことに、同じバクテリア S-layer の二次元結晶の上で、単頭にした Fab の結合を観察すると、Fab は一か所に長い間留まった後、二次元結晶表面から解離した (図 41h)。これらの観察結果から導かれることは、IgG は抗原間の距離や配向性に依りて、抗原との結合寿命を変えているということである。抗体の IgG 分子の 2 つの Fab が抗原と結合すると、抗原-抗原間距離に応じた張力が IgG 分子内に生じ、この張力が強くなると、片方の Fab が抗原から離れ、近くの抗原に再結合することが起こっていると考えられる。

IgG は 2 つの Fab を持つので、それぞれが抗原と強く結合することにより、Fab 単体と比べて、解離しにくい性質があるとこれまで信じられてきた。また、抗体-抗原の結合は静的であって、IgG と抗原間の結合でさえも all-or-nothing 的な結合メカニズムに従うと考えられてきた。しかし、今回の高速 AFM 観察によって、抗体・抗原反応は極めて動的であり、さらにその反応の強さは、そのジオメトリにも大きく依存することが明らかとなった。今回の結果は、獲得免疫のメカニズムを考える上で非常に重要な寄与を果たすだろう。また、抗体を用いたバイオテクノロジーや医薬品の開発は進んでいくと考えられるが、ここでの成果はその開発指針の一つとして、大きな貢献を果たすだろう。

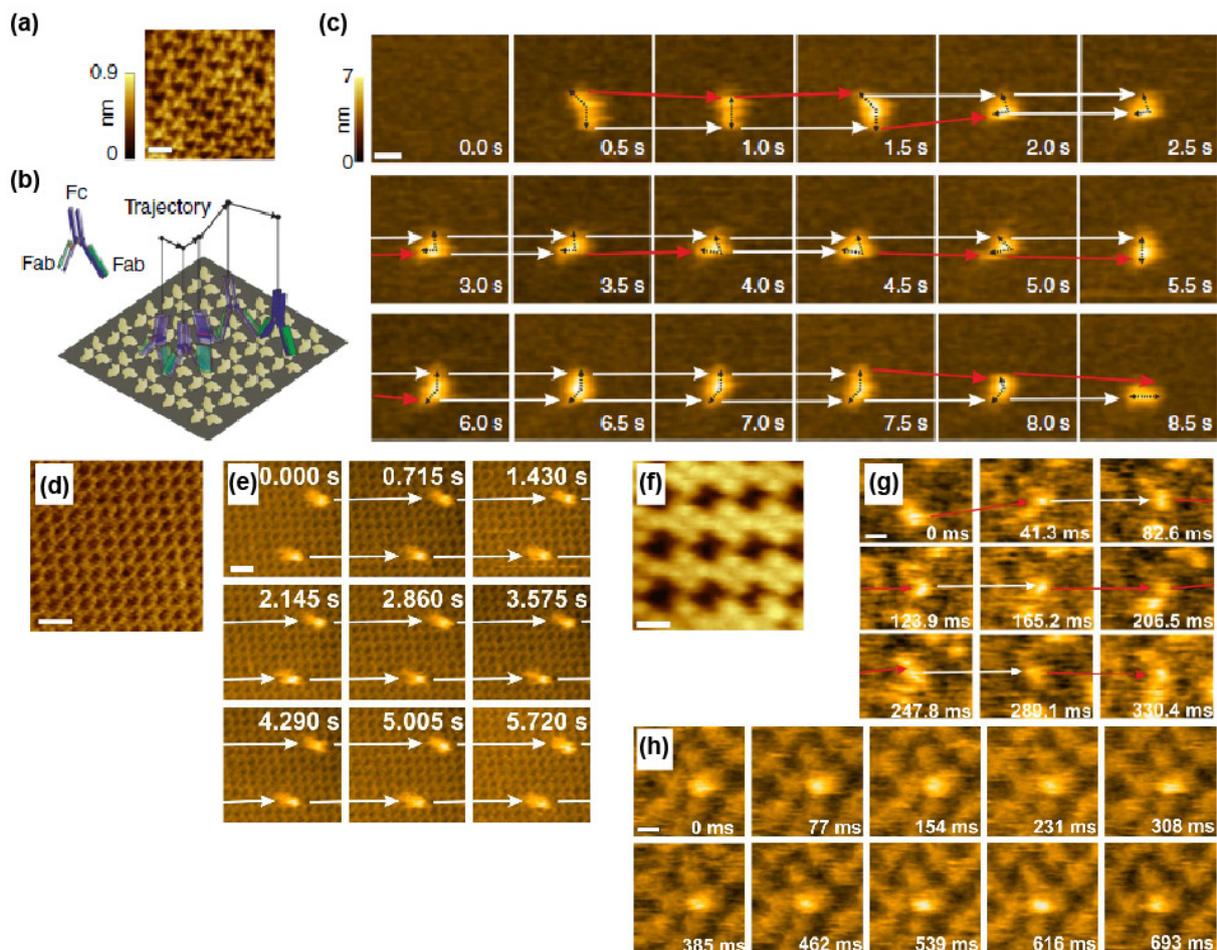


図 41. 抗体・抗原反応の高速 AFM 観察。(a) バクテリオロドプシンの 2 次元結晶の AFM 像。(b) 実験の模式図。(c) バクテリオロドプシンの 2 次元結晶の上で観察される IgG 分子のゆっくりした 2 次元拡散運動。(d) ストレプトアビジンの 2 次元結晶の AFM 像。(e) ストレプトアビジンの 2 次元結晶の上で観察される IgG 分子。1 か所から動かない。(f) バクテリア S-layer の 2 次元結晶の AFM 像。(g) バクテリア S-layer の 2 次元結晶の上で観察される IgG 分子の速い 2 次元拡散運動。(h) バクテリア S-layer の 2 次元結晶の上で観察される Fab フラグメント。1 か所から動かない。すべての AFM 像のスケールバーは 10 nm。

#### 8.2.14. ミオシン V のインタラクティブイメージング (Kodera et al. Manuscript in preparation)

上述のように、高速 AFM を用いて歩行運動中のミオシン V を直接観察し、歩行メカニズムについての理解を深めることができたが、そこでの観察結果の中には、ミオシン V の興味深い振る舞いが含まれていた。それは、2 つの足でアクチン線維に結合しているときに起こる、①前足の Foot stomping と、②コイルドコイルがほどけた後に続いて起こる前足のレバーアームの自発的な回転運動で、これらの現象は ATP 非存在下でも観察された。このことは、ミオシン V は前進運動を駆動するために必要な分子内張力の獲得だけでなく、実際のレバーアーム運動さえも ADP・Pi 結合状態を経由することなく起こせることを示唆している。このことは、前足のレバーアームのスイングは、アクチンから後ろ足が解離すると自発的に起こることを暗示している。もしこれが正しければ、ATP の結合エネルギーがアクチンから後ろ足を引き離す最も大きなエネルギーを要する力学過程に使われ、ATP 加水分解後の化学反応は後ろ足解離後の外からエネルギーを必要としない（つまり、化学・力学エネルギー変換を必要としない）力学過程が一方向に進むのを保証しているだけであるという結論が導かれる。この保証には高々

$2k_B T$  のエネルギー差があれば十分である。この考えは、広く信じられているミオシンモーターの化学・力学カップリングの考え方と明らかに矛盾する。我々の観察結果が導くこの驚くべき結論を実験的に確かめるために、開発部門で開発されたインタラクティブ高速 AFM を用いて、ATP 非存在下でアクチンと 2 本足で結合しているミオシン V の後ろ足を解離させる実験を行った。

インタラクティブモードの具体的な手順を図 42a に示す。初めに、通常の高速 AFM イメージングを行い、力学的刺激を与える対象物を見つける。次に、力学的刺激を与えたい部位（今回の場合はアクチン線維に 2 本足で結合しているミオシン V の後ろ足）と力の強さを指定する。刺激を与えたいタイミングで、プログラムのサブルーチンを呼び、AFM 探針が指定の部位に来たときにだけ探針から試料に大きな力を作用させる（具体的にはフィードバック目標振幅値を小さくする）。その後、通常の

非公開

高速 AFM 観察モードに戻る。力が強く及ぼされる領域は、高さが低く見える（画像としては周りよりも暗く見える）。約 100 pN の力学的刺激を加えると、ほぼ 100% の確率でミオシン V の頭部をアクチン線維から解離させることができた。ミオシンがアクチンから解離したかは、刺激領域にミオシン V の頭部が見えるか否かで判断できた（解離すると見えなくなる）。

この方法を ADP 存在下でアクチンに 2 本足で結合しているミオシン V に適応したところ、後足が AFM 探針の作用で解離すると、ミオシン V は ATP 存在下で観察されたように一歩前進運動を行った（図 42b）。この前進運動は後足を解離させる度に誘起され、何歩も前進運動した。後ろ足の力学的に刺激によって誘起される前進運動の成功率は 90% 程度だった。この結果は、ミオシン V の分子内張力の獲得と力発生に ATP の加水分解反応が必須でないことを示しており、我々の仮説を強くサポートしている。また、同様の手法で、アクチン線維に 2 本足で結合しているミオシン V の前足をこの手法で何度解離させても、ミオシン V は前方にも後方に進まないことが分かった（図 42c）。これらの結果は、ミオシンモーターの化学・力学エネルギー変換の本質に迫る重要な結果である。

また、これらの現象はヌクレオチドなしの条件でも同様の傾向を示したが、ADP 存在下と比べて、後ろ足を解離させた時の前進運動の成功率がいくぶん低下するようであった。現在、ヌクレオチドなしの条件での観察例の増加と美しい映像を得るための実験を行っている。

### 8.2.15. 足の短いプロセッシブミオシンの観察

ミオシン VI と X は、構造的には短い脚しか持たないにも関わらず、大きな歩幅でアクチン線維に沿って動くことが蛍光顕微鏡法により見出されている。しかし、アクチン線維に結合したこれらの分子構造情報はなかった。高速 AFM で、これらのミオシンの歩行運動中の構造動態を撮影することに成功し、確かに大きな歩幅を確保するような構造形態をとって歩行していることを明らかにした。ミオシン X に関しては、詳細な運動解析を行い、ミオシン V よりも運動中に前脚の解離が起こりやすいことを明らかにした。これは、ミオシン X が前脚にフレキシブルな構造を持つことに由来していると考えられる。

### 8.2.16. 天然変性タンパク質 (Dora et al. Manuscript in preparation)

上記の論文にした研究以外にも、天然変性タンパク質 (IDP) について興味深い観察結果が得られてきている。

#### A. PQBP-1

PQBP-1 は核内に存在する IDP で、ポリグルタミン病に関わるタンパク質に結合する。構造的には、WWD とよばれる RNA ポリメラーゼ II の大きなサブユニット Pol II と相互作用する部位が唯一構造をとり、他のドメインは天然変性領域 (IDR) であることが NMR 計測により示唆されている。高速 AFM でその構造形態を可視化すると、NMR の観察と矛盾なく、小さな球状部位から長いひも状構造が認められた（図 43b）。さらに、ひも状構造が確かに IDR であるかを調べるために、IDR に対応すると考えられている部位のアミノ酸を短くした変異体（図 43a）を観察、確かにひも状構造が短くなることが観察された（図 43c-e）。よって、観察されているひも状構造は IDR であると結論される。さらに、各コンストラクトの IDR の End-to-end 距離 ( $R$ ) の解析を行った（図 43g-j）。面白いことに、IDR に含まれるアミノ酸数と  $R^2$  の平均値に比例関係があることが分かった（図 43k）。比例定数  $\beta$  は 1.64 と求められた。この関係に FACT で観察されていた  $R$  の平均値を代入してみても同様に比例関係が成立していた。この結果は、アミノ酸配列に関わらず、IDR であれば同じような機械的性質を持つことを示

している。長い IDP の中には、しばしばアミノ酸数が未知の球状部位が含まれていることがあるが、ここで導かれた法則を用いれば、未知の IDR の中に含まれる残基数や球状部位に含まれる残基数を予測できるようになる。IDR の構造解析が遅れている中、この法則は構造解析をサポートする重要な役割を果たすと期待される。

## B. NTAIL, PNT, Sic1

麻疹ウイルスに関連する IDP (Ntail と PNT)、酵母の細胞周期を調整する IDP (Sic1) の高速 AFM 観察に取り組んでいる。これらの IDP はマイカ上を激しくブラウン運動するので、アンカーとして GFP を C 端側に融合させた。それぞれの IDR を観察すると、IDR の先端にフォールディングとアンフォールディングを繰り返す小さなドメインがあることを見出した。さらに、その小さなドメインの構造的な安定性は IDP 毎に違っていた。また、PQBP-1 の観察結果から導かれた上記の  $R$  に関する法則を用いて、各 IDR に含まれる残基を見積もることができた。

## C. MeCP2

MeCP2 はメチル化した DNA に結合し、転写を制御する IDP で、神経の発達にも関与し、変異によっては Rett syndrome などの進行性の神経疾患などにつながる。単独の MeCP2 の高速 AFM 観察の結果、長大な IDR の中にメチル化 DNA 結合部位 (MBD) に対応する小さな球状部位が観察された。面白いことに、この MBD と思われるこの部位は球状構造とひも状構造の間の遷移を繰り返していた。WT で

非公開

は MBD が構造をとっている寿命は長かったが, Rett syndrome を誘導する変異が MBD に入ったコンストラクトを観察すると, MBD はほとんど構造をとることがなくなった。その他, 面白いことに MBD 以外のところを欠如した変異体でも MBD の構造安定性が変化することも見出された。さらに, MeCP2 が DNA と結合し, DNA を凝集させる過程を可視化することにも成功している。この過程で, MeCP2 は DNA が折れているところ, 2 本の DNA 間の距離が近いところに局在しやすい性質を示した。以上の結果は, IDP とパートナー分子が結合する様子を可視化することに成功した初めての例で, 今後, Rett syndrome など誘起する変異体と DNA の凝集活性を関連付けることができれば, インパクトの高い成果を上げられると期待される。

### 8.2.17. ユビキチンによるタンパク質翻訳後修飾のダイナミクス

タンパク質の翻訳後修飾の1つであるユビキチン化は, ユビキチン-プロテアソーム系による細胞内タンパク質の品質管理にとどまらず, DNA 修復, 細胞周期, 転写, 翻訳, シグナル伝達, 免疫などほぼすべての細胞内プロセスの制御に関与している。このユビキチン修飾のメカニズムに対する理解をさらに深めるには, リアルタイムでユビキチン修飾の動的分子プロセスを動画映像で直視することが非常に有用である。高速 AFM は, 高い空間, 時間分解能を併せもつため, タンパク質の形状とその動きを同時に観察できるという他の装置にない特徴がある。これまでの分子生物学, 生化学, 構造生物学的手法に加え, 高速 AFM を用いた分子ダイナミクスのリアルタイム観察により, ユビキチン修飾に対してこれまで以上にシームレスな構造機能相関の解明が期待できる。

タンパク質のユビキチン化は, 複数のユビキチン化関連酵素により行われ, ユビキチンを E1→E2→E3→基質タンパク質の順に受け渡すことで完結する。また, ユビキチン化関連酵素の中でも最終的にタンパク質にユビキチンを付加する役割を担っている E3 ユビキチンリガーゼ(E3)は, HECT 型と RING 型に大別できるが, そのどちらの E3 においてもユビキチン受け渡しの際に E3 自身が大きく構

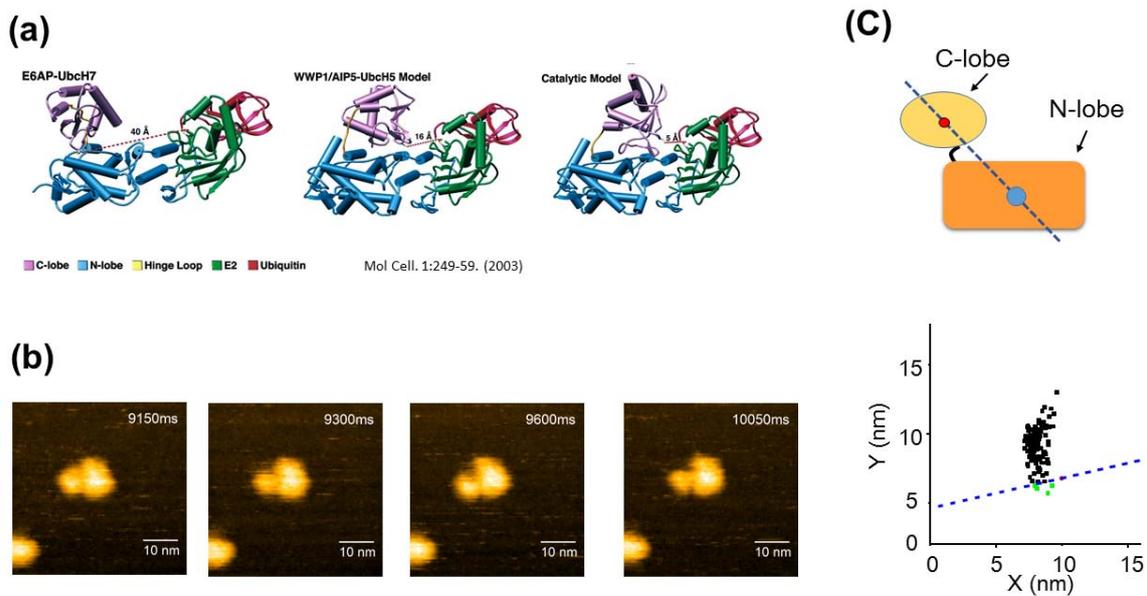


図 44 E3 ドメインの構造変化の高速 AFM 観察。(a) ユビキチンの受け渡しに伴う E3 の構造変化モデル。(b) E3 ドメインの高速 AFM 像。(c) C-lobe の重心位置の分布図

造変化する可能性が示唆されている。本研究では、E3 のドメイン部分の高速 AFM 観察を行い、X 線構造解析を中心とした構造生物学的手法により推定されていた大きな構造変化（図 44a）をリアルタイムで検証することに成功した（図 44b,c）。これは、E3 のドメイン部分の構造変化をリアルタイムで観察した最初の事例である。本結果より HECT 型の E3 ドメインは、大きく構造変化し、それにより触媒システインを持つ C-lobe が N-lobe に結合した E2-Ub に接近できると考えられる。今後は、E2→E3→基質タンパク質間のユビキチン受け渡しのダイナミクスをリアルタイム観察し、その動的分子プロセスを明らかにする。

### 8.2.18. Prx の酸化ストレス依存的なオリゴマー形成過程のダイナミクス (Konno et al. Manuscript in preparation)

ペルオキシレドキシシン (Prx) は、22 kDa のモノマーもしくはそれらが 10 個会合したデカマー（リング状構造）で存在し、酸化ストレス( $H_2O_2$ )の分解を触媒する。しかし、過剰の  $H_2O_2$  存在下では、モノマーおよびデカマーが会合し 1000 kDa 以上の高分子オリゴマー(HMW)を形成することが報告されている。この高分子オリゴマー化により、その本来の機能である  $H_2O_2$  の分解以外にもタンパク質のフォールディングを手助けするシャペロンとして機能する。すなわち、2 種類の全く異なる機能をタンパク質のモノマー化、オリゴマー化により実現しているという非常に興味深い酵素である。この高分子オリゴマー形成過程を高速 AFM で観察すれば、これまで得られなかったまったく新しい分子会合過程の詳細をリアルタイムに観察でき、機能メカニズムに対する洞察が得られるものと期待される。また、分子シャペロンとして機能する Prx の高分子オリゴマー構造状態については、その構造自体にいくつかのモデルが提唱されて

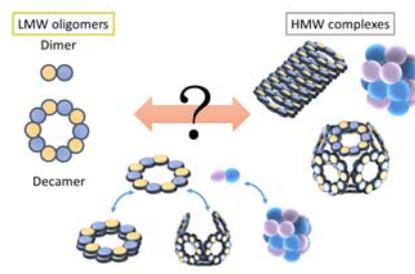


図 45. Prx の酸化ストレスによるオリゴマー形成の種々のモデル

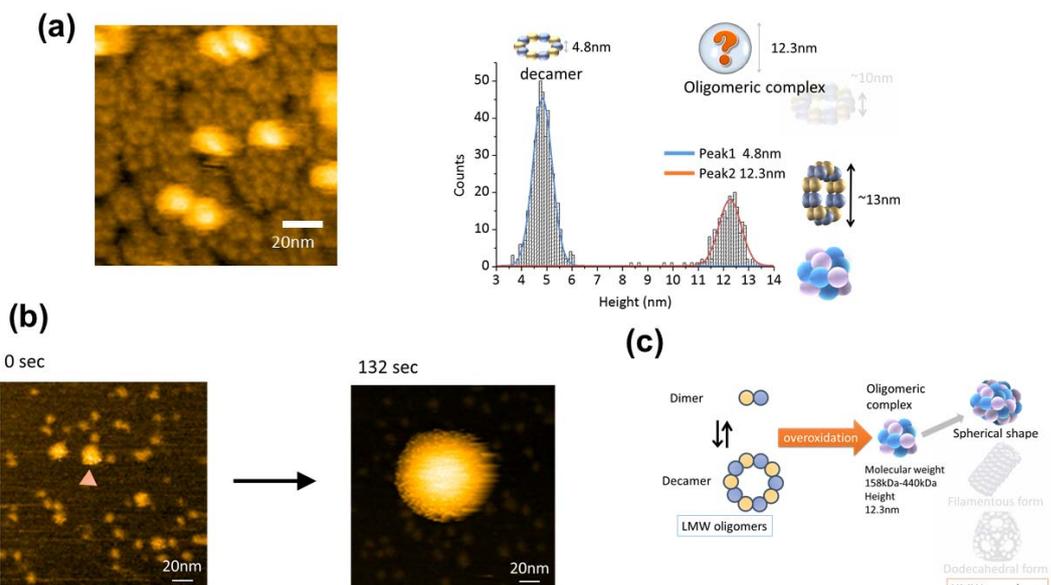


図 46. Prx の  $H_2O_2$  によるオリゴマー形成の高速 AFM 観察。(a)  $H_2O_2$  による中間体形成とその高さのヒストグラム。(b) 高分子オリゴマーの形成過程の高速 AFM 像。(c) 高速 AFM 観察から示唆されるオリゴマー形成過程モデル。

いるものの、明確な見解は未だない（図 45）。本研究では、はじめに Prx の  $\text{H}_2\text{O}_2$  の有無でその形状を比較した。その結果、これまでの知見にはない中間状態の存在を示唆する結果を得た（図 46a）。また、確率は低いが、Prx の高分子オリゴマー形成過程をリアルタイムで観察することに成功した（図 46b）。その生成過程および生成後の形状より、少なくとも HMW はリング状のデカマー構造が積み重なってできた筒のような構造体を作るというモデルは当てはまらないと考えられる（図 46c）。

**8.2.19. コラゲナーゼがコラーゲンを分解するときの動態の観察** (Nakayama et al. Manuscript in preparation)



非公開

**8.2.20. アミロイド $\beta$ の凝集過程の観察** (Nakayama et al. Manuscript in preparation)

非公開

非公開

### 8.3. 超解像液中 FM-AFM 関連の技術開発

周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) は、液中においてサブナノスケールの分解能で表面形状を観察できる技術である。2005 年に、初めて液中 FM-AFM による原子分解能観察例が報告されて以来、マイカ、カルサイトなどの鉱物結晶の他に、バクテリオロドプシン (bR)、GroEL、アミロイド線維などの、比較的 AFM 計測事例の多い試料に関して、高分解能観察例が報告されてきた。その結果、比較的安定な表面構造の観察については、応用技術が確立しつつある。

一方で、それらの応用研究の中で明らかになってきた技術的な課題もある。まず、固液界面においては、水和層、電気二重層、表面構造の揺動などの影響により、真空中や大気中に比べて、界面の影響が比較的広い垂直範囲に及ぶ場合が多い。そのため、従来の AFM で取得してきた二次元凹凸像では十分な情報が得られない場合がしばしばある。そこで、我々は三次元界面空間の可視化技術の開発に取り組んだ。

もう一つの課題として、従来の液中 FM-AFM では、表面形状は観察できるが、物性情報を同時取得できなかったために、表面を構成する異なる物質の識別や同定が難しかった。大気中・真空中の AFM では、ケルビンプローブ原子間力顕微鏡 (KFM) を用いた表面電位分布計測技術が、代表的な物性計測技術として挙げられる。しかし、表面電位分布をナノスケールで計測する技術はこれまでに報告がない。表面電位分布計測技術には、バイオ分野だけでなく、電極反応や触媒反応などに関連した電気化学分野でも、非常に高い需要がある。そこでわれわれは、AFM をベースとしたナノスケール液中電位分布計測技術を開発している。

FM-AFM は、従来超高真空中で、原子レベルに平坦な表面を観察することが多かったため、測定帯域をできるだけ狭くして、低速に観察を行う場合が多かった。一方、液中応用では、表面の凹凸、不均一性、揺動が比較的大きい場合が多いため、比較的高い動作帯域で、高速に走査する必要がある場合が多い。そのため、現在の装置の動作速度では、動的な挙動の観察ができないだけでなく、大きな分子集合体の非破壊観察や、不均一な表面構造の高分解能観察が難しい場合が多く、観察対象を制限する大きな要因となっていた。そこで本研究では、液中 FM-AFM の高速化に取り組んでいる。

以下に、これまで進めてきた技術開発研究の概要、成果、進捗状況をテーマ毎に報告する。

#### 8.3.1. 三次元力分布計測技術の開発 (Fukuma et al. Phys. Rev. Lett. 2010; Fukuma et al. Sci. Technol. Adv. Mater. 2010)

固液界面で、AFM 探針を XY 方向だけでなく、Z 方向にも走査し、その間に生じた探針にかかる力の変化をリアルタイムに計測することで、三次元力分布を計測する技術を開発した。固液界面においては、水分子が表面と相互作用することで、不均一な分布 (水和構造) を示す。探針が受ける力は、水分子の密度分布に応じて、変化するため、力分布像から、三次元水和構造を計測できる可能性がある。図 49 には、マイカ/水界面で取得した三次元力分布像を示している。この図から、表面に一樣に分布する水和層に相当する力分布と、局在する吸着水に相当するサブナノスケールの局所力分布が観察されていることが分かる。これらの特徴は、過去の研究においてモンテカルロ

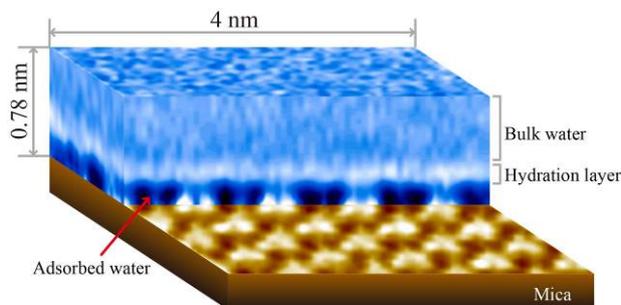


図 49. マイカ/水界面で取得した三次元力分布像。水和層と吸着水の三次元分布がサブナノスケールで可視化されている。

シミュレーション等で予測された水和構造とも良く一致しており、本技術により 3 次元水和構造が観察できる可能性を強く示唆している。

**8.3.2. 液中電位分布計測技術の開発** (Kobayashi et al. Rev. Sci. Instrum. 2010; Kobayashi et al. J. Appl. Phys. 2011; Kobayashi et al. Rev. Sci. Instrum. 2012)

ケルビンプローブ原子間力顕微鏡 (KFM) では、探針-試料間に直流および交流のバイアス電圧を印加する。液中では、直流バイアスを印加することにより、試料もしくはカンチレバーの表面での電気化学反応や、表面・界面における電荷やイオンの再配置が生じ、不要な表面応力が生じるだけでなく、測定対象である電位分布自体に多大な影響を与えることがある。この問題を解決するために、我々はオープンループ電位顕微鏡 (OL-EPM) という手法を新たに考案した。この方法では、探針-試料間に比較的高い周波数 ( $\omega_m$ ) の交流電圧を印加する。そして、それによって誘起された静電気力の  $\omega_m$  および  $2\omega_m$  成分を検出し、それらの値から表面の局所電位分布を計算により求める。この方法では、高周波バイアス信号のみを用いるために、表面応力や電気化学反応の影響を大きく低減でき、液

中においても、ナノスケールの分解能で表面電位分布を計測できる。図 50 は、COOH および NH<sub>2</sub> 基で表面を修飾したラテックスビーズの表面形状像および表面電位像である。この結果から、サイズの大きな COOH 末端ビーズの方が、負に帯電しているために低い電位を示していることが分かる。

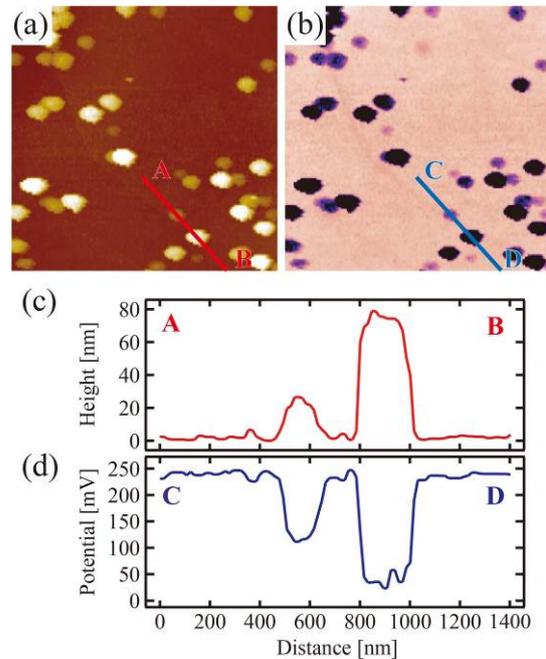


図 50. OL-EPM で取得した COOH および NH<sub>2</sub> で末端したラテックスビーズの液中表面形状像および電位分布像。

**8.3.3. 液中 FM-AFM の高速化** (Fukuma et al. Rev. Sci. Instrum. 2011; Miyata et al. Rev. Sci. Instrum 2013; Miyata et al. Appl. Phys. Lett. 2013; Akrami et al. Rev. Sci. Instrum. 2014)

液中 FM-AFM の動作速度を、原子分解能を維持したまま向上させるためには、2 つの条件を満たす必要がある。まず、最小検出力限界 ( $F_{min}$ ) を改善することである。 $F_{min}$  は帯域を広げるほど増大 (悪化) する。一方、原子分解能で表面を計測するためには、10 pN 以下の  $F_{min}$  が望まれる。したがって、これを維持したまま広帯域化するためには、 $F_{min}$  を減少させる工夫が必要となる。我々は、小型カンチレバーを用いることで、従来、150 kHz 程度だった液中での共振周波数を、3.5 MHz 程度まで向上させた。これにより、1 sec/frame 程度の高速イメ

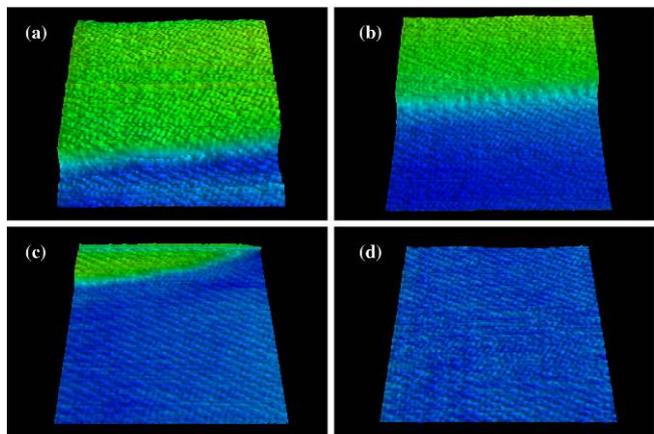


図 51. 開発した高速超解像 AFM により観察したカルサイト結晶溶解過程の原子分解能観察像。20 × 20 nm<sup>2</sup>. 2s/frame. 500 × 500 pix<sup>2</sup>. (a) 0 s. (b) 20 s. (c) 40 s. (d) 60 s.

ージング時にも、十分な力感度が得られるレベルまで、 $F_{\min}$ を改善できた。次に、実際に広帯域な観察を実現するためには、探針-試料間距離制御ループの帯域を向上させる必要がある。そのために、我々は、スキャナーと高圧アンプ、カンチレバーの変位検出器および励振機構、自動制御回路、周波数シフト検出器など、ほぼすべての構成要素の帯域や遅延を抑制する改善を達成した。その結果、10 kHz程度の測定帯域でも原子スケールのイメージングが可能な高速 FM-AFM を開発することに成功した。右図は、開発した高速超解像 AFM を用いて、純水中で観察したカルサイト結晶溶解過程の原子分解能観察像である。原子ステップの移動の様子とともに、原子スケールのコントラストが明瞭に観察されており、真の原子分解能が得られていることが分かる。このような、原子スケールの動的挙動を固液界面で観察することは、これまでの技術では難しかったため、今後、様々な固液界面現象への応用研究が期待される。

#### 8.4. 超解像 FM-AFM の応用研究

上に述べた通り、我々は 2005 年に液中 FM-AFM による初めての液中原子分解能観察に成功して以来、その性能の向上や応用技術の開発に取り組んできた。このように開発した技術を用いて、他の研究グループでは困難な、固液界面におけるサブナノスケールの研究に取り組んできた。

第一に、従来の技術はで、生体分子集合体の表面構造をナノスケールで可視化することはできても、サブナノスケールで観察することは非常に困難であった。そこで我々は、液中 FM-AFM を用いて、脂質膜やチューブリン集合体などの表面構造を高分解能観察し、従来に比べて、どのような新しい情報が得られるのかを検討してきた。

第二に、従来の AFM 技術では、二次元的な表面構造を高分解能に観察することはできるが、その表面に存在する水和構造を可視化することはできなかった。そこで、我々は三次元走査型力顕微鏡 (3D-SFM) を開発し、マイカ/水界面で測定した力分布像が、シミュレーションで予測された水和構造と良く一致することを示した。ただし、このような測定をやわらかい生体分子試料表面で行った場合に、どのような結果が得られるのか分かっていなかった。そこで、我々は、3D-SFM を脂質膜などのやわらかい試料と水の界面に適用し、どのような情報が得られるのかを検討した。

最近では、固液界面の三次元力分布像の観察が可能になり、その水和・揺動構造計測への応用が盛んに検討されるようになってきた。しかし、得られた力分布像と表面の分子機能との関連を論じるまでには至っていない。そこで我々は、産業的に重要な機能を持つ分子/水界面において三次元力分布計測を行い、表面機能の起源に関する新しい情報を得るための研究に取り組んできた。

以下に、これまで進めてきた応用研究の概要、成果、進捗状況をテーマ毎に報告する。

##### 8.4.1. チューブリン分子集合体の表面構造に関する研究 (Asakawa et al. Biophys. J. 2011)

細胞骨格である微小管を形成するチューブリンは、モータータンパク質など多くの機能性タンパク質と相互作用することで機能を発揮する。機能性タンパク質と相互作用する微小管の外側表面には長さ数 nm の C 末端が高密度に存在し、分子間相互作用の制御に関わっていると考えられているが、X 線結晶構造解析では検出できていない。そこで液中 FM-AFM のサブナノスケール計測によって C 末端など分子間相互作用に関わる表面構造を実空間で可視化することを目指した。

微小管は中空筒状構造であり、そのまま基板に固定しても熱揺動や高分解能に観察することができず、探針操作で破壊することも多かった。そこでチューブリンをシート状に集合させて、個々の分子がマイカ基板に直接固定化されるように工夫した。その結果、チューブリン表面に存在する  $\alpha$ -ヘリッ

クスのらせん構造などサブナノスケールの構造を可視化することが可能となった。この AFM 像と分子モデルを詳細に比較することで、C 末端の位置を特定することに成功し、そこには高さ 0.5 nm の突出構造として可視化されることが分かった (図 52)。現在、三次元空間に広がった C 末端の平均密度分布を三次元力分布計測技術によって計測できるかどうか検討している。

チューブリンのもう一つの興味として、分子集合体構造の形成が挙げられる。チューブリンは微小管と呼ばれる中空筒状構造以外にも、オープンシート状集合体、ヘリックス状集合体など多様な分子集合体を形成することが知られており、その多様性が微小管の形成過程や機能発現に重要である可能性が示されている。また、それらの分子集合体の局所部位に存在する欠損やシームラインと呼ばれる継ぎ目構造などは計測手法が限られており、その実体は十分に理解が進んでいない。これまでに固定化基板との相互作用と微小管の機械的強度を制御することで、オープンシート状集合体や微小管の中筒状集合体が潰れた扁平状集合体を調製し、液中 FM-AFM で観察できるようになった。オープンシート状集合体を AFM 観察すると、サブナノスケール構造から  $\alpha$   $\beta$  ヘテロ二量体やシームラインを同定することができた。また扁平状集合体によって微小管外側表面のサブナノスケール観察も可能となり、分子配向や C 末端位置の同定を行っているところである。

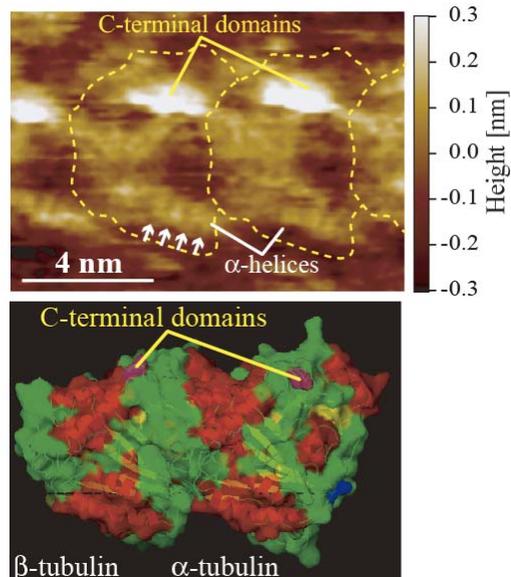


図 52. チューブリンの液中 FM-AFM 像および分子構造 (PDB ID: 1jff)

#### 8.4.2 脂質膜/水界面の三次元水和・揺動構造に関する研究 (Asakawa et al. ACS Nano 2012)

生体膜とそれを取り囲む生理溶液の界面には、サブナノメートルの厚みを持った水和構造が存在することが報告されている。その水和構造を形成する水分子はバルク中とは性質が大きく異なり、膜融合や膜透過性など生体機能へ深く関与すると考えられている。しかし従来の分析手法では、表面から垂直方向にナノメートルスケールで広がりを持った水和構造の三次元空間分布を直接観察できなかった。一方、我々の開発してきた 3D-SFM を用いてマイカなど比較的硬い表面における水和構造の三次元計測に成功してきた。しかし、脂質膜などの柔らかい試料に 3D-SFM を応用した例は無く、水和構造など固液界面における有用な情報が得られるかどうか分からなかった。

そこでモデル生体膜として広く用いられてきたリン脂質 DPPC 二重層を観察対象として、DPPC/HEPES 緩衝液界面で 3D-SFM 計測を試みた。得られた 3D-SFM 像には、分子充填構造に起因する DPPC 分子列が XY 断面に可視化された。そこで、それぞれ異なる方向の DPPC 分子列に沿って Z 断面を取得した。Z 断面下部の力分布は、脂質頭部の空間分布を反映することがフォース-距離曲線の詳細な解析から分かっている。傾きを持った特徴的な力分布がある方向のみで現れており、これは脂質頭部がある一定方向に傾いた空間分布を有することを示している。脂質二重層は AFM 探針よりも非常に柔らかいため、探針-試料間に働く長距離斥力により変形する。この脂質二重層の変形によって生じる 3D-SFM 像のひずみを定量的に補正してみた。その結果、Z 断面下部に可視化された力分布は、脂質膜平面に対して 30° 傾いていることが分かった。これは既に MD シミュレーションで報告されている脂質頭部の立体構造の結果と良く一致している。これらの結果は、3D-SFM が固液界面の水和構造

だけにとどまらず、大きな構造自由度を有する脂質頭部の三次元分布を可視化できることを示している。

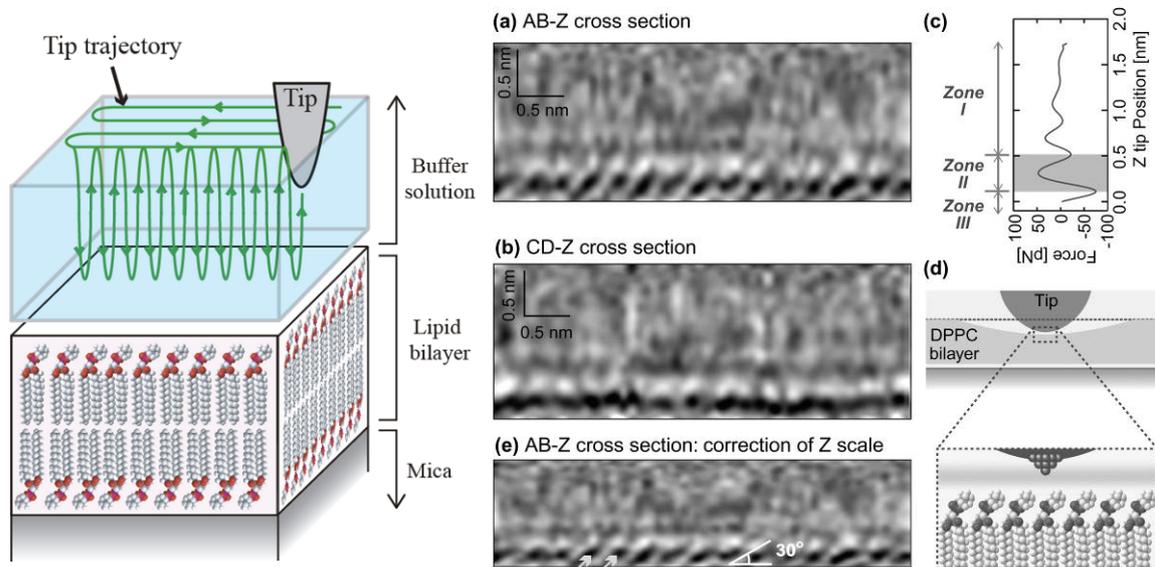


図 53. DPPC/HEPES 緩衝液界面の 3D-SFM 計測

図 54. DPPC/HEPES 緩衝液界面の 3D-SFM 像。(a) (b) 異なる DPPC 分子列に沿って取得した Z 断面, (c) 平均フォースマップ, (d) 探針試料間相互作用による膜変形 (e) 膜変形による効果を補正した Z 断面

#### 8.4.3. エチレングリコール末端自己組織化単分子膜のタンパク質吸着抑制能に関する研究 (Asakawa et al. Manuscript in preparation)

生体分子やナノ粒子の吸着を抑制する表面修飾技術は、生体材料や環境浄化技術など広範な分野で必要とされている。これまでヘキサエチレングリコール末端を有するアルカンチオール自己組織化膜 (EG<sub>6</sub>OH-SAM)は、吸着抑制表面モデルとして多くの研究が行われてきた。しかし、吸着分子が表面に接近する際に生じる相互作用力を分子スケールで直接計測することは難しく、未だ分子論的理解は不十分である。この課題を解決するためには、表面構造や三次元空間に広がるエネルギー障壁を実空間計測できるナノ分析手法の確立が望まれる。そこで、本研究では我々の開発してきた三次元走査型力顕微鏡(3D-SFM)を用いて、分子吸着抑制に関わる相互作用力分布をサブナノスケール分解能で可視化できるか検討した。

まず吸着抑制能を持たない OH 末端 SAM (OH-SAM)と吸着抑制モデル EG<sub>6</sub>OH-SAM を 50 mM NaCl 水溶液中で 3D-SFM 計測した。得られた 3D-SFM 像の Z 断面を解析すると、層状の水和構造が OH-SAM 表面のみで可視化されることが分かった。ここで各 XY 位置における垂直方向のカプロファイルと比較すると、OH-SAM 表面には水和構造に起因する振動的な相互作用力が現れるのに対して、EG<sub>6</sub>OH-SAM 表面では全てのカプロファイルが単調な斥力増加を示すことが明らかとなった。ここでカプロファイルに見られる極大・極小値の差を障壁深さと定義して、その二次元分布像を計算した。その結果、OH-SAM 表面のみで大きな障壁がサブナノスケールで分布していることが分かった。この局所的な障壁分布の特徴が分子吸着抑制能の発現に重要であると考えられる。以上のように、液中 3D-SFM によって分子吸着抑制に関わる相互作用力分布を三次元計測できることを示した。

非公開

## 8.5. イメージング研究に向けた分子・細胞系の探索

実用レベルの高速AFMが2008年に完成してから未だ数年しか経っていないが、いくつかのタンパク質系の機能動態撮影が行われ、インパクトある成果が安藤グループにより出されてきた。それ故、今後益々多様な系を対象に同様のインパクトある成果が出てくるものと期待される。しかし、高速AFMは万能ではなく、また、インパクトある動画映像を得るには適した試料系を選択することが重要である。また、分離精製したタンパク質系ばかりでなく、細胞や細胞内オルガネラの現場でのタンパク質分子の機能動態や細胞で起こる動的現象を可視化することも生命科学では望まれている。我々は、そのことを視野に入れて、高速AFM観察に適した生物試料系の探索を行っている。その一環として現在、細菌を対象にその探索研究を進めている。

### 8.5.1. 磁性細菌の表面構造の観察 (Yamashita et al. J. Mol. Biol. 2012)

生細胞表面に存在する生体分子のイメージングの可能性を探るため、生きた細菌（磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1）の表面構造の高速 AFM 観察を行った。まず、細胞に損傷を与えることなく生きたままの状態、マイカ基板に固定する方法を開発した。観察には、液体培地中で培養した対数増殖期の細胞を用いた。細胞懸濁液をポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドで化学修飾したマイカ基板上に載せ、細胞を固定した。固定した細胞の生存は、生・死二重蛍光染色法（LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit）を用いて調べた。その結果、基板に固定されたほぼすべての細胞が固定後少なくとも3時間は生存していることを確認した。基板に固定した細胞を液体培地中で AFM 観察したところ、細胞の形態や大きさはこれまで電子顕微鏡観察や光学顕微鏡観察で得られた知見と矛盾ないものであった（図 56a）。また、細胞への損傷は観察されず、基板への固定操作や AFM 観察の過程で細胞はダメージを受けないことが確認できた。

*M. magneticum* AMB-1 の細胞表層を高倍率で観察したところ、細胞の表層が網目状（または蜂の巣状）の構造体により隙間無く完全に被われていることが明らかになった（図 56b）。網目構造の大きさは、直径が  $7.3 \pm 1.4$  nm、深さは  $0.85 \pm 0.52$  nm でほぼ均一な大きさであった。液体培地中で細胞表面の網目構造の動態を観察した結果、網目構造は細胞表面を水平方向にランダムに移動していることが分かっ

た (図 56c)。網目構造の拡散係数を求めたところ、平均で  $3.2 \text{ nm}^2/\text{秒}$  であった。これまで報告されている細胞内の可溶性タンパク質や膜タンパク質の拡散係数は  $\mu\text{m}^2/\text{秒}$  のオーダーであり、網目構造の拡散係数は著しく低い。このことから、細菌の外膜の表面は、分子が密に充填された非常に混み合った環境であることが示唆された。

一方、*M. magneticum* AMB-1 から調製した外膜断片の AFM 観察でも同様の網目構造が観察された。このことから、網目構造は外膜に局在する分子により構成されていることが分かった。さらに、精製した外膜において、AFM 探針を用いた微解剖実験を行ったところ、三量体構造の分子が網目構造を構成していることが示された。外膜画分に含まれるタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、得られたタンパク質バンドを質量分析器で同定したところ、外膜画分に含まれる主要なタンパク質はポーリンであった。そこで、既知のポーリンの結晶構造から、シミュレーションによりポーリンの AFM 像を構築し、観察像と比較した。その結果、三量体構造をもつ分子の観察像は、ポーリン分子を細胞外側方向から観察したシミュレーション AFM 像とよく一致した。以上の結果から、*M. magneticum* AMB-1 の外膜表面に観察された網目構造は、少なくとも部分的には外膜にもっとも多く存在するタンパク質であるポーリンによって構成されていることが明らかになった。

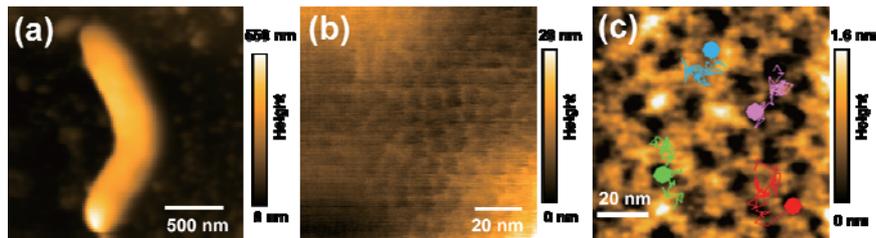


図 56. 磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1 の生細胞 AFM 観察。(a) 液体培地中において低倍率で観察した *M. magneticum* AMB-1 の細胞。(b) 細胞表面に観察された網目構造の高倍率 AFM 像。(c) 生細胞表面で観察された網目構造の動態。それぞれの網目構造の移動軌跡 (観察時間: 82 秒間) を示した。網目構造が細胞の表面をゆっくりと水平方向に移動する様子を確認できた。

### 8.5.2. グラム陰性細菌の表面構造の観察 (Oestreicher et al. Micron 2015)

磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 で確認された外膜表層の網目構造が、グラム陰性細菌に普遍的な構造であるのかを明らかにするため、グラム陰性細菌のモデル生物である大腸菌や、光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の生細胞の表面構造を観察した。細胞の固定方法は、*M. magneticum* AMB-1 に用いた方法と同様で、ポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドで化学修飾したマイカ基板に細胞を固定した。その結果、これらの細菌でも細胞を生きた状態で少なくとも 3 時間保つことができ、生細胞の AFM 観察を行うことができた。また、AFM 観察の結果、大腸菌や *R. sphaeroides* の細胞表面も、*M. magneticum* AMB-1 の表面と同様の網目構造で被われていた。網目構造は、大腸菌では直径が  $8.0 \pm$

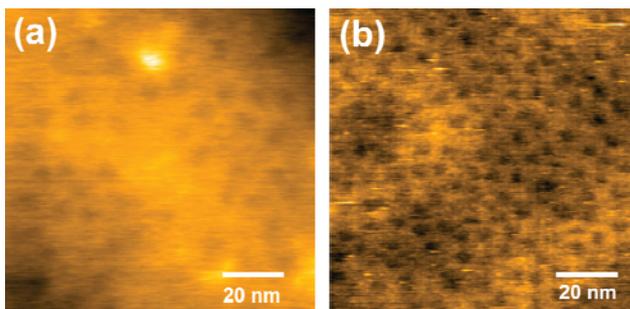


図 57. 大腸菌と光合成細菌 *R. sphaeroides* の生細胞 AFM 観察。(a) 大腸菌 MG1655 と (b) *R. sphaeroides* の細胞表層の AFM 像。生細胞をマイカ基板上に固定し、液体培地中で観察した。いずれの細胞にも類似した大きさの網目構造が観察された。

1.5 nm, *R. sphaeroides* では  $6.6 \pm 1.1$  nm とほぼ同じ大きさであった。このことから、この構造がグラム陰性細菌の外膜表面に普遍的にみられることを明らかにした。また、本研究から高速 AFM による生細胞観察法は多種類の細菌に適用可能であり、微生物学における新しい解析手法となることが期待できる。

### 8.5.3. 磁性細菌のオルガネラ「マグネトソーム」の構造解析 (Yamamoto et al. PNAS 2010; Taoka et al. Manuscript in preparation)

磁性細菌は環境中から鉄イオンを取り込み、磁鉄鉱（磁石）を合成し、マグネトソームと呼ばれるナノサイズのオルガネラに蓄える（図 58a）。マグネトソームを磁気コンパスのように用いることによって、磁性細菌は地磁気を感知し、地磁気に沿って移動することで、生育に適した環境へと移動する。我々は、マグネトソームの構造とその機能を明らかにすることにより、原核細胞のオルガネラの働きや形成過程、生物鉱物化作用、生物磁気感知の仕組みの解明を目指している。磁性細菌の破碎液から磁石を用いてマグネトソームを精製し、AFM により観察した（図 58b）。AFM によるマグネトソームの粒径解析や微解剖実験の結果、マグネトソームが厚さ約 7 nm の有機層で被われていることが明らかとなった。そこで、マグネトソームに最も多く含まれるタンパク質である MamA のマグネトソーム内局在を、抗 MamA 抗体で処理したマグネトソームを AFM で観察することで解析した。その結果、MamA はマグネタイトを被うリン脂質膜の外側でタンパク質の殻を形成し、マグネトソームを被う有機層を形成していることが示唆された（図 58c）。また、MamA は、直径 14~20 nm、高さ 4.5~6.5 nm の扁平な球形をしたホモオリゴマーを形成することも明らかになった。さらに、精製したマグネトソームと MamA タンパク質を用いた再構成実験により、MamA はマグネトソーム鎖状構造を安定に保つことに寄与していることも示唆された。本研究は、世界で初めての原核細胞オルガネラの詳細な構造解析を行ったものであり、研究成果を論文に発表した。一方、MamA は可溶性タンパク質であり、マグネトソームに局在するためには、マグネトソームに存在する分子との相互作用が必要と考えられる。最近、MamA とマグネトソーム膜に局在する膜タンパク質 Mms6 が相互作用することを見いだした（論文投稿準備中）。現在、マグネトソームの構造がどのようにして形作られているかについて研究を進めている。

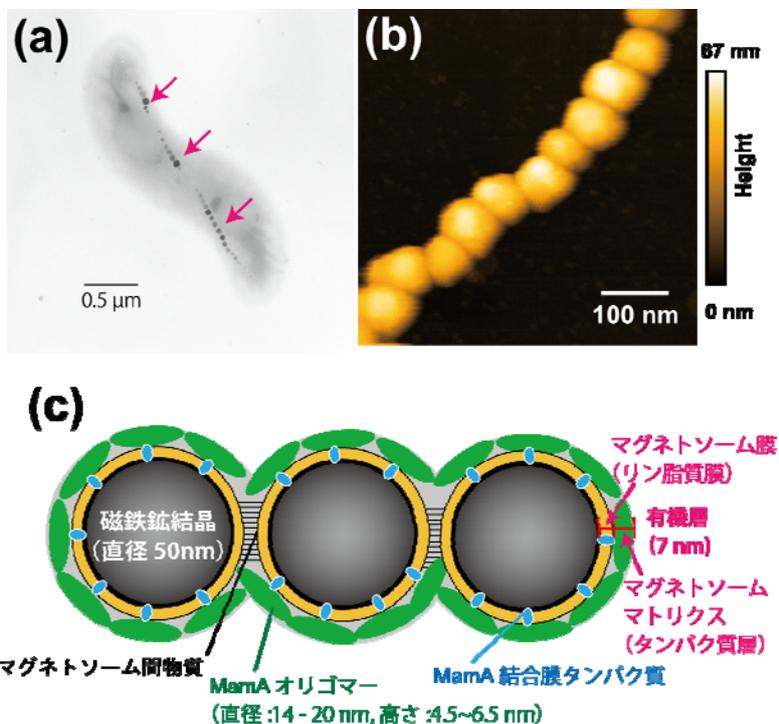


図 58. マグネトソームの構造 (a) 磁性細菌 *M. magneticum* AMB-1 の透過型電子顕微鏡写真。細胞中央の直鎖状に配置された黒い粒子が磁気センサーとして働くマグネトソーム（矢印）。(b) 細胞から精製したマグネトソームの AFM 像 (c) マグネトソームの構造モデル図。

## 9. 発表論文 (英文雑誌)

### 安藤・内橋・古寺・渡辺

1. T. Davies, N. Kodera, G. S. Kaminski-Schierle, E. J. Rees, M. Erdelyi, C. F. Kaminski, T. Ando and M. Mishima, "CYK4 promotes antiparallel microtubule bundling by optimizing MKLP1 neck conformation", *PLoS Biol.* (in press). [IF = 11.77](#)
2. M. Shibata, T. Uchihashi, T. Ando and R. Yasuda, "Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells", *Scientific Reports* **5**, Article# 8724 (2015). [IF = 5.078](#)
3. M. Imamura, T. Uchihashi, T. Ando, A. Leifert, U. Simon, A. D. Malay and J. G. Heddle, "Probing structural dynamics of an artificial protein cage using high-speed atomic force microscopy", *Nano Lett.* **15**, 1331-1335 (2015). [IF = 12.94](#)
4. K. Xuan Ngo, N. Kodera, E. Katayama, T. Ando and T. Q.P. Uyeda, "Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy", *e-Life* **4**, e04806 (2015). [IF = 8.519](#)
5. N. Kodera, K. Uchida, T. Ando, and S. Aizawa, "Two-ball structure of the flagellar hook-length control protein FliK as revealed by high-speed atomic force microscopy", *J. Mol. Biol.* **427**, 406-414 (2015). [IF = 3.959](#)
6. S. Ishino, T. Yamagami, M. Kitamura, N. Kodera, T. Mori, S. Sugiyama, T. Ando, N. Goda, T. Tenno, H. Hiroaki, and Y. Ishino, "Multiple interactions of the intrinsically disordered region between the N-terminal helicase and C-terminal nuclease domains of the archaeal Hef protein", *J. Biol. Chem.* **289**, 21627-21639 (2014). [IF = 4.6](#)
7. J. Preiner, N. Kodera, J. Tang, A. Ebner, M. Brameshuber, D. Blaas, N. Gelbmann, H. Gruber, T. Ando and P. Hinterdorfer, "IgGs are made for walking on bacterial and viral surfaces", *Nature Commun.* **5**, 4394 (8 pp) (2014). [IF = 10.742](#)
8. T. Ando, "High-speed AFM imaging", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **28**, 63-68 (2014). [IF = 9.113](#)
9. N. Kodera and T. Ando, "The path to visualization of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy", *Biophys. Rev.* **6**, 237-260 (2014).
10. Y. Shibafuji, A. Nakamura, T. Uchihashi, N. Sugimoto, S. Fukuda, H. Watanabe, M. Samejima, T. Ando, H. Noji, A. Koivula, K. Igarashi, and R. Iino, "Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of *Trichoderma Reesei* cellobiohydrolase I (Cel7A) hydrolyzing crystalline cell", *J. Biol. Chem.* **289**, 14056-14065 (2014). [IF = 4.6](#)
11. T. Ando, T. Uchihashi, and S. Scheuring, "Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy", *Chem. Rev.* **114**(6), 3120-3188 (2014). [IF = 45.661](#)
12. A. Nakamura, H. Watanabe, T. Ishida, T. Uchihashi, M. Wada, T. Ando, K. Igarashi, and M. Samejima, "Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose", *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4584-4592 (2014). [IF = 11.444](#)
13. K. Igarashi, T. Uchihashi, T. Uchiyama, H. Sugimoto, M. Wada, K. Suzuki, S. Sakuda, T. Ando, T. Watanabe, and M. Samejima, "Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin", *Nature Commun.* **5**, 3975 (2014). [IF = 10.742](#)
14. M. H. Fauzi, S. Watanabe and Y. Hirayama, "Nuclear magnetometry studies of spin dynamics in quantum Hall systems", *Phys. Rev. B* **90**, 235308 (8 pp) (2014). [IF = 3.664](#)
15. K. Noi, D. Yamamoto, S. Nishikori, K. Arita-Morioka, T. Ando and T. Ogura, "High-Speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97", *Structure* **21**, 1992-2002 (2013). [IF = 6.794](#)
16. N. Yilmaz, T. Yamada, P. Greimel, T. Uchihashi, T. Ando, and T. Kobayashi, "Real-time visualization of assembling of a sphingomyelin-specific toxin", *Biophys. J.* **105**, 1397-1405 (2013). [IF = 3.976](#)
17. S. Fukuda, T. Uchihashi, R. Iino, Y. Okazaki, M. Yoshida, K. Igarashi, and T. Ando, "High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope", *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 073706 (2013). [IF = 1.584](#)
18. H. Watanabe, T. Uchihashi, T. Kobashi, M. Shibata, J. Nishiyama, R. Yasuda, and T. Ando, "Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy", *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 053702 (2013). [IF = 1.584](#)
19. M. Hashimoto, N. Kodera, Y. Tsunaka, M. Oda, M. Tanimoto, T. Ando, K. Morikawa, and S. Tate, "Phosphorylation-coupled intramolecular dynamics of unstructured regions in chromatin remodeler FACT",

- Biophys. J.* **104**, 2222-2234 (2013). [IF = 3.976](#)
20. H. Yamashita, K. Inoue, M. Shibata, T. Uchihashi, J. Sasaki, H. Kandori, and T. Ando, "Role of trimer-trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by high-speed atomic force microscopy", *J. Struct. Biol.* **184**, 2-11 (2013). [IF = 3.369](#)
  21. T. Ando, "Molecular machines directly observed by high-speed atomic force microscopy", *FEBS Lett.* **587**, 997-1007 (2013). [IF = 3.341](#)
  22. T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera, "High-speed AFM and applications to biomolecular systems", *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 393-414 (2013). [IF = 12.25](#)
  23. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy", *Microscopy* **62**, 81-93 (2013). [IF = 1.632](#)
  24. M. H. Fauzi, S. Watanabe and Y. Hirayama, "Spin phase transition studies to probe spin dynamics in quantum Hall system", *J. Phys.: Conf. Ser.* **456**, 012010 (4 pp) (2013).
  25. T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera, "High-speed atomic force microscopy", *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**, 08KA02 (15 pp) (2012). [IF = 1.057](#)
  26. H. Yamashita, A. Taoka, T. Uchihashi, T. Asano, T. Ando, and Y. Fukumori, "Single molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM", *J. Mol. Biol.* **422**, 300-309 (2012). [IF = 3.959](#)
  27. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy coming of age", *Nanotechnology* **23**, 062001 (27 pp) (2012). [IF = 3.672](#)
  28. N. Nojima, H. Konno, N. Kodera, K. Seio, H. Taguchi, M. Yoshida, "Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA backbone", *PLoS One* **7**, e52534 (5 pp) (2012). [IF = 3.73](#)
  29. K. Igarashi, T. Uchihashi, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, M. Penttilä, T. Ando, and M. Samejima, "Visualization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* moving on crystalline cellulose using high-speed atomic force microscopy", *Methods Enzymol.* **510**, 169-182 (2012). [IF = 2.194](#)
  30. T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, "Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy", *Nature Protocols* **7**, 1193-1206 (2012). [IF = 13.14](#)
  31. T. Ando and N. Kodera, "Visualization of mobility by atomic force microscopy", *Methods Mol. Biol.* **896**, 57-69 (2012). [IF = 1.29](#)
  32. M. H. Fauzi, S. Watanabe, and Y. Hirayama, "Microscopic characteristics of dynamic nuclear polarization and selective nuclear depolarization at the  $\nu = 2/3$  spin phase transition", *Appl. Phys. Lett.* **101**, 162015 (3 pp) (2012). [IF = 3.515](#)
  33. M. H. Fauzi, S. Watanabe, N. Kumada, and Y. Hirayama, "All electrical probe of nuclear spin polarization and relaxation by spin phase transition peaks of the filling fraction  $\nu = 2/3$  quantum Hall effect", *J. Korean Phys. Soc.* **60**, 1676-1679 (2012). [IF = 0.425](#)
  34. T. Uchihashi and T. Ando, "High-speed atomic force microscopy and biomolecular processes", *Methods Mol. Biol.* **736**, 285-300 (2011). [IF = 1.29](#)
  35. K. Igarashi, T. Uchihashi, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, T. Okamoto, M. Penttilä, T. Ando, and M. Samejima, "Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface", *Science* **333**, 1279-1282 (2011). [IF = 31.201](#)
  36. A. Laisne, M. Ewald, T. Ando, E. Lesniewska, and D. Pompon, "Self-assembly properties and dynamic of synthetic proteo-nucleic building blocks in solution and on surfaces", *Bioconjugate Chem.* **22**, 1824-1834 (2011). [IF = 4.93](#)
  37. A. Miyagi, T. Ando and Y. L. Lyubchenko, "Dynamics of nucleosomes assessed with time-lapse high speed atomic force microscopy", *Biochemistry* **50**, 7901-7908 (2011). [IF = 3.422](#)
  38. T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando, and H. Noji, "High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase", *Science* **333**, 755-758 (2011). [IF = 31.201](#)
  39. M. Shibata, T. Uchihashi, H. Yamashita, H. Kandori, and T. Ando, "Structural changes in bacteriorhodopsin in response to alternate illumination observed by high-speed atomic force microscopy", *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 4410-4413 (2011). [IF = 12.730](#)
  40. Y. L. Lyubchenko, L. S. Shlyakhtenko, and T. Ando, "Imaging of nucleic acids with atomic force microscopy", *Methods* **54**, 274-283 (2011). [IF = 4.197](#)
  41. S. Inoue, T. Uchihashi, D. Yamamoto, and T. Ando, "Direct observation of surfactant aggregate behavior on a mica surface using high-speed atomic force microscopy", *Chem. Commun.* **47**, 4974-4976 (2011). [IF = 6.169](#)

42. Masashi Nishimori<sup>1</sup>, Hirokazu Hasegawa<sup>1</sup>, Susumu Sasaki, Shinji Watanabe and Yoshiro Hirayama, "Observation of strains caused by heterostructure interfaces", *Phys. Status. Solidi (c)*, **8**(2): 399-401, (2011).
43. N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy", *Nature* **468**, 72-76 (2010). IF = 36.101
44. P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieu, P. Dosset, Ch. Le Grimellec, J.-M. Verdier, S. Marchal, and T. Ando, "Deciphering the structure, growth and assembly of amyloid-like fibrils using high-speed atomic force microscopy", *PLoS One* **5**, e13240 (8 pp) (2010). IF = 4.411
45. D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita, S. Nishikori, T. Ogura, M. Shibata, and T. Ando, "High-speed atomic force microscopy techniques for observing dynamic biomolecular processes", *Methods Enzymol.* **475** (Part B), 541-564 (2010). IF = 2.194
46. D. Yamamoto, A. Taoka, T. Uchihashi, H. Sasaki, H. Watanabe, T. Ando, and Y. Fukumori, "Visualization and structural analysis of the bacterial magnetic organelle magnetosome using atomic force microscopy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 9382-9387 (2010). IF = 10.6
47. M. Nishimori, S. Sasaki, S. Watanabe, and Y. Hirayama, "Strains in heterostructures detected by standard NMR", *Physica E*, **42**(4): 999-1003, (2010). IF = 1.436
48. S. Watanabe, S. Sasaki, S. Sato, M. Nishimori, N. Isogai and Y. Matsumoto, "Magnetic-field gradient in nanostructures detected by nuclear spins", *Physica E* **42**(4): 1004-1006, (2010). IF = 1.436
49. S. Watanabe, M. H. Fauzi, N. Kumada, and Y. Hirayama, "Nuclear spin polarization and relaxation probed by spin phase transition peak", *Phys. Status. Solidi (c)* **10**: 2570-2573, (2010).

#### 福岡・浅川

1. K. Miyazawa, H. Izumi, T. Watanabe-Nakayama, H. Asakawa, T. Fukuma, "Fabrication of electron beam deposited tip for atomic-scale atomic force microscopy in liquid", *Nanotechnology* **26**, 105707 (2015). IF = 3.672
2. S. M. R. Akrami, K. Miyata, H. Asakawa, T. Fukuma, "High-speed Z tip scanner with screw cantilever holding mechanism for atomic-resolution atomic force microscopy in liquid", *Rev. Sci. Instrum.* **85**, 126106 (2014). IF = 1.584
3. R. Yamasaki, Y. Takatsuji, M. Lienemann, H. Asakawa, T. Fukuma, M. Linderd, T. Haruyama, "Electrochemical properties of honeycomb-like structured HFBI self-organized membranes on HOPG electrodes", *Colloids and Surfaces B* **123**, 803-808 (2014). IF = 4.287
4. S. M. R. Akrami, H. Nakayachi, T. Watanabe-nakayama, H. Asakawa, and T. Fukuma, "Significant improvements in stability and reproducibility of atomic-scale atomic force microscopy in liquid", *Nanotechnology* **25**, 455701 (8 pp) (2014). IF = 3.672
5. N. Inada, H. Asakawa, Y. Matsumoto and T. Fukuma, "Molecular-scale surface structures of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy in aqueous solution", *Nanotechnology* **25**, 305602 (10 pp) (2014). IF = 3.672
6. H. Sakamoto, H. Asakawa, T. Fukuma, S. Fujita and S. Suya, "Atomic force microscopy visualization of hard segment alignment in stretched polyurethane nanofibers prepared by electrospinning", *Sci. Technol. Adv. Mater.* **15**, 015008 (6 pp) (2014). IF = 2.613
7. K. Amano, K. Suzuki, T. Fukuma, O. Takatashi, H. Onishi, "The relationship between local liquid density and force applied on a tip of atomic force microscope: A theoretical analysis for simple liquids", *J. Chem. Phys.* **139**, 203104 (7 pp) (2013). IF = 3.142
8. N. Kobayashi, S. Itakura, H. Asakawa, T. Fukuma, "Atomic-Scale Processes at the Fluorite-Water Interface Visualized by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy", *J. Phys. Chem. C* **117**, 24388-24396 (2013). IF = 4.835
9. K. Miyata, H. Asakawa, T. Fukuma, "Real-time atomic-resolution imaging of crystal growth process in water by phase modulation atomic force microscopy at one frame per second", *Appl. Phys. Lett.* **103**, 203104 (4 pp) (2013). IF = 3.515
10. H. Asakawa, Y. Katagiri, T. Fukuma, "Closed Fluid Cell with Liquid-Sealing Mechanism for Stable and Flexible Operation of Liquid-Environment Atomic Force Microscopy", *Jpn. J. Appl. Phys.* **52**, 110109 (5 pp) (2013). IF = 1.057
11. K. Miyata, S. Usho, S. Yamada, S. Furuya, K. Yoshida, H. Asakawa, T. Fukuma, "Separate-type scanner and wideband high-voltage amplifier for atomic-resolution and high-speed atomic force microscopy", *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 043705 (8 pp) (2013). IF = 1.584

12. E. T. Herruzo, H. Asakawa, T. Fukuma, R. Garcia, “Three-dimensional quantitative force maps in liquid with 10 piconewton, angstrom and sub-minute resolutions”, *Nanoscale* **5**, 2678-2685 (2013). [IF = 6.739](#)
13. H. Asakawa, S. Yoshioka, K. Nishimura, and T. Fukuma, “Spatial distribution of lipid headgroups and water molecules at membrane/water interfaces visualized by three-dimensional scanning force microscopy”, *ACS NANO* **6**, 9013 (8 pp) (2012). [IF = 12.033](#)
14. N. Kobayashi, H. Asakawa, and T. Fukuma “Dual frequency open-loop electric potential microscopy for local potential measurements in electrolyte solution with high ionic strength”, *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 033709 (7 pp) (2012). [IF = 1.584](#)
15. T. Fukuma, K. Onishi, N. Kobayashi, A. Matsuki, and H. Asakawa, “Atomic-resolution imaging in liquid by frequency modulation atomic force microscopy using small cantilevers with megahertz-order resonance frequencies”, *Nanotechnology* **23**, 135706 (12 pp) (2012). [IF = 3.672](#)
16. H. Asakawa, K. Ikegami, M. Setou, N. Watanabe, M. Tsukada, and T. Fukuma, “Submolecular-scale imaging of  $\alpha$ -helices and C-terminal domains of tubulins by frequency modulation atomic force microscopy in liquid”, *Biophys. J.* **101**, 1270-1276 (2011). [IF = 3.976](#)
17. N. Kobayashi, H. Asakawa, and T. Fukuma, “Quantitative potential measurements of nanoparticles with different surface charges in liquid by open-loop electric potential microscopy”, *J. Appl. Phys.* **110**, 044315 (5 pp) (2011). [IF = 2.168](#)
18. T. Fukuma, S. Yoshioka, and H. Asakawa, “Wideband phase-locked loop circuit with real-time phase correction for frequency modulation atomic force microscopy”, *Rev. Sci. Instrum.* **82**, 073707 (5 pp) (2011). [IF = 1.584](#)
19. A. Iwanaga, H. Asakawa, T. Fukuma, M. Nakamichi, S. Shigematsu, M. B. Linder, and T. Haruyama, “Ordered nano-structure of a stamped self-organized protein layer on a HOPG surface using a HFB carrier”, *Colloid Surface B* **84**, 395-399 (2011). [IF = 4.287](#)
20. N. Kobayashi, H. Asakawa, and T. Fukuma “Nanoscale potential measurements in liquid by frequency modulation atomic force microscopy”, *Rev. Sci. Instrum.* **81**, 123705 (4 pp) (2010). [IF = 1.584](#)
21. T. Fukuma “Water distribution at solid/liquid interfaces visualized by frequency modulation atomic force microscopy”, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **11**, 033003 (18 pp) (2010). [IF = 2.613](#)
22. N. Satoh, T. Fukuma, K. Kobayashi, S. Watanabe, T. Fujii, K. Matsushige and H. Yamada “Near-field light detection by conservative and dissipative force modulation methods using a piezoelectric cantilever”, *Appl. Phys. Lett.* **96**, 233104 (3 pp) (2010). [IF = 3.82](#)
23. T. Ichii, T. Fukuma, T. Yoda, K. Kobayashi, K. Matsushige and H. Yamada “Submolecular-scale investigations on metal-phthalocyanine monolayers by frequency modulation atomic force microscopy”, *J. Appl. Phys.* **107**, 024315 (5 pp) (2010). [IF = 2.064](#)
24. T. Fukuma, Y. Ueda, S. Yoshioka, and H. Asakawa “Atomic-scale distribution of water molecules at the mica-water interface visualized by three-dimensional scanning force microscopy”, *Phys. Rev. Lett.* **104**, 016101 (4 pp) (2010). [IF = 7.621](#)

## 紺野・中山

1. Miyazawa K, Izumi H, Watanabe-Nakayama T, Asakawa H, Fukuma T. “Fabrication of electron beam deposited tip for atomic-scale atomic force microscopy in liquid”, *Nanotechnology* **26** 105707 (2015). [IF = 3.672](#)
2. F. Buchert, H. Konno, T. Hisabori, “Redox regulation of CF1-ATPase involves interplay between the  $\gamma$ -subunit neck region and the turn region of the  $\beta$ DELSEED-loop”, *Biochim. Biophys. Acta.* **1847**, 441-450 (2015). [IF = 4.66](#)
3. K. Yoshida, Y. Matsuoka, S. Hara, H. Konno, T. Hisabori, “Distinct redox behaviors of chloroplast thiol enzymes and their relationships with photosynthetic electron transport in arabidopsis thaliana”, *Plant Cell Physiol.* **55**, 1415-1425 (2014). [IF = 4.978](#)
4. E. Sunamura, K. Kamei, H. Konno, N. Tamaoki, T. Hisabori, “Reversible control of F1-ATPase rotational motion using a photochromic ATP analog at the single molecule level”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 358-363 (2014). [IF = 2.281](#)
5. S. M. R. Akrami, H. Nakayachi, T. Watanabe-nakayama, H. Asakawa, T. Fukuma, “Significant improvements in stability and reproducibility of atomic-scale atomic force microscopy in liquid”, *Nanotechnology* **25**, 455701 (8 pp) (2014). [IF = 3.672](#)
6. T. Watanabe-Nakayama, M. Saito, S. Machida, K. Kishimoto, R. Afrin, ”Requirement of LIM domains for

- the transient accumulation of paxillin at damaged stress fibres”, *Biology Open*. 2:667-674 (2013). [IF = 4.556](#)
7. T. Hisabori, E. Sunamura, Y. Kim, and H. Konno, “The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery”, *Antioxid. Redox. Signal*, **19**(5), 1846-1854 (2013). [IF = 7.667](#)
  8. J. Kishikawa, T. Ibuki, S. Nakamura, A. Nakanishi, T. Minamino, T. Miyata, K. Namba, H. Konno, H. Ueno, K. Imada, and K. Yokoyama, “Common evolutionary origin for the rotor domain of rotary ATPases and flagellar protein export apparatus”, *PLoS One* **8**(5), e64692013 (2013). [IF = 3.534](#)
  9. S. Machida, T. Watanabe-Nakayama, M. Saito, R. Afrin, and A. Ikai, “Fabricated cantilever for AFM measurements and manipulations: Pre-stress analysis of stress fibers”, *Micron* **43**(12), 1380-1389 (2012).
  10. T. Nojima, H. Konno, N. Kodera, K. seio, H. Taguchi, and M. Yoshida, “Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA backbone”, *PLoS One*. **7**(12), e52534 (2012). [IF = 3.73](#)
  11. E. Sunamura, H. Konno, M. Imashimizu, M. Mochimarui, and T. Hisabori, “A conformational change of the  $\gamma$  subunit indirectly regulates the activity of cyanobacterial  $F_1$ -ATPase”, *J. Biol. Chem.* **287**(46), 38695-38704 (2012). [IF = 4.651](#)
  12. H. Konno, T. Nakane, M. Yoshida, H. Ueoka-Nakanishi, S. Hara, and T. Hisabori, “Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes”, *Plant Cell Physiol.* **53**, 626-634 (2012). [IF = 4.134](#)
  13. S. Toyabe, T. Watanabe-Nakayama, T. Okamoto, S. Kudo, and E. Muneyuki, “Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of  $F_1$ -ATPase”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(44), 17951-17956 (2011).
  14. M. Imashimizu, G. Bernat, E. Sunamura, M. Broekmans, H. Konno, K. Isato, M. Roegner, and T. Hisabori, “Regulation of  $F_0F_1$ -ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits is significant for light/dark adaptation”, *J. Biol. Chem.* **286**, 26595-26602 (2011). [IF = 4.773](#)
  15. T. Yoshida, H. Tsuge, H. Konno, T. Hisabori, and Y. Sugano, “The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue”, *FEBS J.* **278**, 2387-2394 (2011). [IF = 3.79](#)
  16. N. Gomi, S. Yoshida, K. Matsumoto, M. Okudomi, H. Konno, T. Hisabori, and Y. Sugano, “Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products”, *Biodegradation.* **22**, 1239-1245 (2011). [IF = 2.017](#)
  17. H. Konno, A. Isu, Y. Kim, T. Murakami-Fuse, Y. Sugano, and T. Hisabori, “Characterization of the relationship between ADP-inhibition and  $\epsilon$ -inhibition in cyanobacterial  $F_1$ -ATPase”, *J. Biol. Chem.* **286**, 13423-13429 (2011). [IF = 4.773](#)
  18. Y. Kim, H. Konno, Y. Sugano, and T. Hisabori, “Redox regulation of rotation of the cyanobacterial  $F_1$ -ATPase containing thiol regulation switch”, *J. Biol. Chem.* **286**, 9071-9078 (2011). [IF = 4.773](#)
  19. A. Ikai, T. Watanabe-Nakayama, S. Machida, M. Saito, and R. Afrin, “Mechanics of intracellular stress fibers: A short review”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **50**(8), 08LA04 (8 pp) (2011). [IF = 1.057](#)
  20. T. Watanabe-Nakayama, S. Machida, I. Harada, H. Sekiguchi, R. Afrin, and A. Ikai, “Direct detection of cellular adaptation to local cyclic stretching at the single cell level by atomic force microscopy”, *Biophys J.* **100**(3), 564-72 (2011). [IF = 3.976](#)
  21. T. Watanabe-Nakayama, S. Machida, R. Afrin, and A. Ikai, “Microscope for manipulation of micro-objects: use of fabricated cantilever with atomic force microscope”, *Small* **6**(24), 2853-2857 (2010). [IF = 7.333](#)
  22. E. Sunamura, H. Konno, M. Imashimizu-Kobayashi, Y. Sugano and T. Hisabori, “Physiological impact of intrinsic ADP inhibition of cyanobacterial  $F_0F_1$  conferred by the inherent sequence inserted into the gamma subunit”, *Plant. Cell. Physiol.* **51**(6), 855-865 (2010). [IF = 4.257](#)

## 福森・田岡

1. Z. Oestreicher, A. Taoka, Y. Fukumori, “A comparison of the surface nanostructure from two different types of gram-negative cells: *Escherichia coli* and *Rhodobacter sphaeroides*”, *Micron* **72**, 8-14 (2015). [IF = 2.062](#)
2. N. Numoto, T. Nakagawa, R. Ohara, T. Hasegawa, A. Kita, T. Yoshida, T. Maruyama, K. Imai, Y. Fukumori, K. Miki, “The structure of a deoxygenated 400 kDa haemoglobin reveals ternary- and quaternary-structural changes of giant haemoglobins”, *Acta Cryst.* **D70**, 1823-1831 (2014). [IF = 7.232](#)
3. A. Taoka, Y. Eguchi, S. Mise, Z. Oestreicher, F. Uno, Y. Fukumori, “A magnetosome-associated cytochrome MamP is critical for magnetite crystal growth during the exponential growth phase”, *FEMS Microbiol. Lett.* **358**(1), 21-29 (2014). [IF = 2.723](#)
4. A. Taoka, J. Kondo, Z. Oestreicher, and Y. Fukumori, “Characterization of uncultured giant rod-shaped

- magnetotactic Gammaproteobacteria from a fresh water pond in Kanazawa, Japan”, *Microbiology-SGM*. **160**, 2226-2234 (2014). IF = 2.835
5. W. Sato, R. Mizuuchi, N. Irioka, S. Komatsuda, S. Kawata, A. Taoka, Y. Ohkubo, “Extranuclear dynamics of  $^{111}\text{Ag}$  ( $\rightarrow^{111}\text{Cd}$ ) doped in AgI nanoparticles”, *Chem. Phys. Lett.* **609**, 104-107 (2014). IF = 2.088
  6. J. Jandaruang, J. Siritapetawee, C. Songsiriritthigul, S. Preecharram, A. Taoka, A. Dhiravisit, Y. Fukumori, S. Thammasirirak, “Purification, characterization, and crystallization of *Crocodylus siamensis* hemoglobin”, *Protein J.* **33**(4), 377-385 (2014). IF = 1.039
  7. N. Sato, S. Ishii, H. Sugimoto, T. Hino, Y. Fukumori, Y. Sako, Y. Shiro, T. Tosha, “Structures of reduced and ligand-bound nitric oxide reductase provide insights into functional differences in respiratory enzymes”, *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **82**(7), 1258-1271 (2014). IF = 2.921
  8. A. Noguchi, A. Ikeda, M. Mezaki, Y. Fukumori, M. Kanemori, “DnaJ-promoted binding of DnaK to multiple sites on  $\sigma^{32}$  in the presence of ATP”, *J. Bacteriol.* **196**(9), 1694-1703 (2014). IF = 2.688
  9. S. Sakaguchi, A. Taoka, and Y. Fukumori, “Analysis of magnetotactic behavior by swimming assay”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **77**, 940-947 (2013). IF = 1.206
  10. M. Yamanaka, Y. Ishizaki, T. Nakagawa, A. Taoka, and Y. Fukumori, “Purification and characterization of coacervate-forming cuticular proteins from *Papilio xuthus* Pupae”, *Zoological Sci.*, **30**, 534-542 (2013). IF = 0.876
  11. H. Yamashita, A. Taoka, T. Uchihashi, T. Asano, T. Ando, and Y. Fukumori, “Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM”, *J. Mol. Biol.* **422**, 300-309 (2012). IF = 3.905
  12. H. Suzuki, A. Ikeda, S. Tsuchimoto, K. Adachi, A. Noguchi, Y. Fukumori, and M. Kanemori, “Synergistic binding of DnaJ and DnaK chaperone to the heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$  assures its characteristic high metabolic instability: Implications for the heat shock protein 70 (Hsp70)-Hsp40 mode of function”, *J. Biol. chem.* **287**, 19275-19283 (2012). IF = 4.651
  13. T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata, and Y. Shiro, “Structural basis of biological N<sub>2</sub>O generation by bacterial nitric oxide reductase”, *Science*, **330**, 1666-1670 (2010). IF = 31.364
  14. D. Yamamoto, A. Taoka, T. Uchihashi, H. Sasaki, H. Watanabe, T. Ando, and Y. Fukumori, “Visualization and structural analysis of the bacterial magnetic organelle magnetosome using atomic force microscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 9382-9387 (2010). IF = 9.8

## 10. 発表論文（英文書籍）

### 安藤・内橋・古寺・渡辺

1. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, “Development of high-speed AFM and its biological applications”, Chapter 8, pp.143-176 in *Atomic Force Microscopy in Nanobiology* (K. Takeyasu Ed.) Pan Stanford Publishing, Singapore (2014).
2. T. Ando and T. Uchihashi, “High-speed AFM and imaging of biomolecular processes”, Chapter 19, pp.713-742 in *Nanoscale Liquid Interfaces: Wetting, Patterning, and Force Microscopy at the Molecular Scale* (T. Ondarcuhu, J.-P.e Aimé Eds.), Pan Stanford Publishing (2013).
3. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, “Nanovisualization of proteins in action using high-speed AFM”, Chapter 5, pp.119-147 in *Single-molecule Studies of Proteins. Biophysics for the Life Sciences Vol.2*, (A. Oberhauser, Ed.), Springer (2013).
4. T. Ando and N. Kodera, “Visualization of mobility of atomic force microscopy”, Chapter 4, pp.57-69 in *Springer series Methods in Molecular Biology, Vol. 897, part 1 Experimental Tools for the Intrinsically Disordered Protein Analysis* (V. N. Uversky and A. K. Dunker, Eds.), Springer (2012).
5. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, M. Shibata, D. Yamamoto and H. Yamashita, “High-speed AFM for observing dynamic processes in liquid”, Chapter 7, pp.189-209 in *Atomic force microscopy in liquid* (A. N. Baró and R. G. Reifengerge Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH (2012).
6. T. Ando, “Techniques for developing high-speed AFM” Chapter 1, pp.1-16 in “Control Technologies for Emerging Micro and Nanoscale Systems” (Lecture Notes in Control and Information Sciences, Vol.413) (E. Eleftheriou and S.O. Reza Moheimani, Eds.), Springer (2011).
7. T. Uchihashi and T. Ando, “High-speed atomic force microscopy for dynamic biological imaging”, Chapter 8, pp.163-184 in “Life at the Nanoscale - Atomic force Microscopy of Live Cells” (Yves Dufrene, Ed.), Pan

Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore (2011).

8. T. Uchihashi, T. Ando, "High-speed Atomic Force Microscopy and Biomolecular Processes", Chapter 18, pp.285-300 in "Atomic force microscopy in biomedical research: Methods and Protocols" (Methods in Molecular Biology Vol. 736), (P. C. Braga & D. Ricci, Eds.), Humana Press (2011).

#### 紺野・中山

1. Watanabe-Nakayama T, Machida S, Saito M, Afrin R, Ikai A. " Mechanical Properties of Cytoskeletal Structures and their Response to Externally Applied Forces", Chapter 7, pp.155-176 in Cells, Forces and the Microenvironment, (C. M. Cuerrier, A. E. Pelling Eds.) Pan Stanford Publishing, Singapore (2015).

#### 福岡・浅川

1. T. Fukuma, "Atomic-resolution frequency modulation", Chapter 13, pp.237-252 in Fundamentals of Picoscience (K. D. Sattler Ed.) CRC Press, London (2013).
2. T. Fukuma, "Molecular-resolution FM-AFM imaging of biological systems", Chapter 18, pp.681-712 in Nanoscale Liquid Interfaces (T. Ondarçuhu, J.-P. Aimé Eds.) Pan Stanford Publishing, Singapore (2013).
3. T. Fukuma, M. J. Higgins, "Dynamic-mode AFM in liquid", Chapter 4, pp. 87-120 in Atomic Force Microscopy in Liquid (A. M. Baro, R. G. Reifengerger Eds.) WILEY-VCH (2012).

### 11. 日本語雑誌/書籍の解説・総説記事

#### 安藤・内橋・古寺・渡辺

1. 安藤敏夫「機能動作中のタンパク質分子を動画撮影する高速AFM」, 実験医学(増刊) **32**(10): 45-49 (2014)
2. 内橋貴之「高速原子間力顕微鏡による生体試料のダイナミクス観察」, 膜誌 **39**(5): 322-328 (2014)
3. 杉本華幸, 五十嵐圭日子, 内橋貴之, 鈴木一史, 渡邊剛志「キチナーゼによる結晶性キチンのプロセッシング(連続的)な分解機構の解明」, 日本応用糖質化学会誌 **4**(2): 107-112 (2014)
4. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡による生体分子のナノ動体撮影」, 日本物理学会誌 **69**(7): 459-464 (2014).
5. 内橋貴之, 飯野亮太, 安藤敏夫, 野地博行「高速AFMによるF<sub>1</sub>-ATPase分子回転の直接可視化」, 生化学 **86**(2): 127-136 (2014)
6. 安藤敏夫「19章 ナノ動態を捉える高速AFM」(pp.239-251) in 1分子生物学(原田慶恵・石渡信一編集, 化学同人)(2014年9月)
7. 内橋貴之, 安藤敏夫「23章 原子間力顕微鏡による膜タンパク質のダイナミクス研究」(pp.196-203) in 膜タンパク質構造研究(岩田想編集, 化学同人)(2013年8月)
8. 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡 — 歩行運動中のミオシンVの可視化」 生体の化学 <特集>「顕微鏡で物を見ることの新しい動き」 **64**(6): 551-557 (2013)
9. 五十嵐 圭日子, 内橋 貴之, 鮫島 正浩, 安藤 敏夫: 高速原子間力顕微鏡による結晶性セルロース酵素分解のリアルタイム1分子イメージング, 生物物理 **53**(3): 140-144 (2013)
10. 内橋貴之, 安藤敏夫: 高速AFM開発について, 精密工学会誌 **79**(3): 218-228 (2013)
11. 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡によるバイオイメージング」映像情報メディア学会誌2013年9月号 <特集>「バイオイメージ・インフォマティクス」 **67**(9): 753-759 (2013)
12. 安藤敏夫「総合報告: 原子間力顕微鏡の今後と展望」, 光学 **42**(2): 68-76 (2013)
13. 内橋貴之, 古寺哲幸「リアルタイム原子間力顕微鏡の開発とたんぱく質の機能動態イメージング」, 光学 **42**(2): 89-94 (2013).
14. 安藤敏夫「5.2節: 高速AFMによるタンパク質1分子挙動解析」(pp. 170-182) 試料分析講座「タンパク質分析」(日本分析化学会編, 丸善出版)(2012年11月30日)
15. 安藤敏夫「ナノメータ世界の動態を動画撮影する高速AFM」, O plus E 特集: 最新AFM技術 **34**(3): 217-222 (2012)
16. 安藤敏夫「歩くタンパク質 "ミオシンV" を捉えた!」化学 **66**(3): 55-59 (2011年3月)
17. 安藤敏夫, 古寺哲幸「高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の動態撮影」生物物理 **51**(1): 022-025 (2011)

18. 安藤敏夫 Visual Review 「高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の高解像・動画観察」感染・炎症・免疫 **40**(4): 31-37 (2010)
19. 安藤敏夫 「生体分子の動態を捉える高速原子間力顕微鏡」表面科学 **31**(8): 405-410 (2010)

#### 福間・浅川

1. 福間剛士 「原子間力顕微鏡による高速液中原子分解能観察の実現」, 電気学会誌 **134**: 820-823 (2014)
2. 長谷部徳子, 伊藤健太郎, 福間剛士, 大石新之介, 金周龍 「フィッシュントラック年代測定における多様化する観察法」, 号外地球 **62**: 124-128 (2013)
3. 福間 剛士 「液中周波数変調AFM を用いた固液界面構造の三次元計測」表面科学 **34**: 476-481 (2013)
4. 福間 剛士 「FM-AFMによる固液界面の水和層やイオンの可視化」 触媒 **53**: 210-215 (2011)
5. 福間 剛士 「原子間力顕微鏡を用いた固液界面の原子スケール観察」 顕微鏡 **45**: 237 (6 pp) (2010)
6. 福間 剛士 「周波数変調原子間力顕微鏡によるモデル生体膜上に形成された水和層の分子分解能観察」生物物理 **50**: 092-093 (2010)

#### 福森・田岡

1. 田岡東, 福森義宏 「高速原子間力顕微鏡を用いたバクテリアの生細胞イメージング」, 化学と生物 (in press).
2. 福森義宏, 田岡東 「磁性細菌オルガネラ「マグネトソーム」の構造機能相関の解明」, 生物物理 **54**(1): 11-14 (2014)
3. 福森義宏 アトモスフィア: 「生化学実験」と「モノづくり」のイノベーション, 生化学 **85**(11):959 (2013)

## 12. 招待講演 (国際会議・海外の会議)

#### 安藤

1. T. Ando and T. Uchihashi, "High-speed AFM studies on ring-shaped ATPases", XVII Linz Winter Workshop 2015 (Johannes Kepler University Linz, Jan. 31-Feb. 2, 2015).
2. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for directly capturing dynamic biomolecular and cellular processes on video", Seminar at the Department of Chemistry, Pohang University of Science and Technology (POSTECH, Pohang, Korea, Dec. 5, 2014).
3. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for directly capturing dynamic biomolecular and cellular processes on video", Seminar at the Department of Chemistry, Korean Advanced Institute of Science and Technology (KAIST, Daejeon, Korea, Dec. 4, 2014).
4. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for directly capturing dynamic biomolecular and cellular processes on video", Seminar at the Department of Physics and Astronomy, Seoul National University (SNU, Seoul, Korea, Dec. 3, 2014).
5. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy", Speech at the awarding ceremony of Doctor Honoris Causa (President House of Aix-Marseille Univ., Pharo, Marseille, France, Nov. 18, 2014).
6. T. Ando, "Introduction to AFM: history, principles, applications and HS-AFM breakthroughs", Student Tutorial at the Aix-Marseille University (Luminy Campus, Aix-Marseille Univ., France, Nov. 18, 2014).
7. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for filming of biomolecular processes", Seminar at the Aix-Marseille University (INMED Auditorium, Luminy Campus, Aix-Marseille Univ., France, Nov. 17, 2014).
8. T. Ando, "Chemo-mechanical coupling in walking myosin V revealed by high-speed AFM", Seminar at the NIH NHLBI (NIH, Bethesda, Maryland, USA, Oct. 24, 2014)
9. T. Ando, **Plenary talk** "Filming dynamic biomolecular and cellular processes by high-speed AFM", NIH-Japan-JSPS Symposium (NIH Clinical Center, Bethesda, Maryland, USA, Oct. 23-24, 2014).
10. T. Ando, "Direct visualization of dynamic biomolecular and cellular processes by high-speed atomic force microscopy", Distinguished Lecture in Biological Engineering at the EPFL-SV-IBI (Lausanne, Switzerland, Oct. 20, 2014).
11. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for filming dynamic biomolecular and cellular processes",

- Seminar at the Department of Physics, Academia Sinica (Taipei, Taiwan Oct. 7, 2014).
12. T. Ando, **Plenary talk** "High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic processes", VASSCAA-7 (The 7th Vacuum and Surface Sciences Conference of Asia and Australia) (National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, Oct. 5-10, 2014).
  13. T. Ando, **Plenary lecture** "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy", 6th Special Conference of the International Society for Neurochemistry: Dynamic Change of nanostructure in the Brain in Health and Disease - Cutting Edge of the Technical Innovation (Tokyo, Japan, September 20-22, 2014).
  14. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for dynamic nano-visualization of biomolecular and cellular processes", 18th International Microscopy Congress (Prague, Czech Republic, September 7-12, 2014).
  15. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for filming dynamic biomolecular and cellular processes", International Conference on Scanning Probe Microscopy on Soft Polymer Materials (Toronto, September 2-6, 2014).
  16. T. Ando, **Plenary talk** "High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic processes", Satellite Symposium of NC-AFM 2014 on Nano Mechanics for Green Innovation and Life Sciences (Tsukuba International Congress, August 4, 2014).
  17. T. Ando, "Filming biomolecules in action by high-speed AFM", Gordon Research Conference 2014 - Single molecule approaches to biology - (Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy, July 13-18, 2014).
  18. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy", NanoKorea 2014 (Coex, Seoul, Korea, July 2-4, 2014).
  19. T. Ando, "High-speed AFM - Its current state and prospects", ISPM 2014 (Sogang University, Seoul, Korea, June 30-July 3, 2014).
  20. T. Ando, **Plenary talk** "Mechanism of energy conversion in walking myosin V revealed by high-speed AFM imaging", "From solid state to Biophysics" VII International Conference (Cavtat, Croatia, June 8-13, 2014).
  21. T. Ando, "Filming dynamic molecular and cellular processes by high-speed atomic force microscopy", UCSF/Mission Bay Seminar (San Francisco, USA, April 24, 2014).
  22. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for observing nano-scale dynamic events in liquids", 2014 MRS Spring Meeting: Advances in scanning probe microscopy for material properties (San Francisco, USA, April 21-25, 2014).
  23. T. Ando, "The development of high-speed AFM: A curious journey of a scientist", Campus seminar at the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry in Göttingen" (Göttingen, Germany, March 19, 2014)
  24. T. Ando, "Filming biomolecular and cellular processes by high-speed AFM", Euro AFM Forum 2014 (Göttingen, Germany, March 17-19, 2014).
  25. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy that captures dynamic molecular and cellular processes on video", Kitasato Joint Meeting 2014 "Molecular Control of Cellular Function: Seeing, Thinking, and Believing" (Kitasato University School of Pharmacy, Tokyo, Feb. 21, 2014).
  26. T. Ando, "High-speed AFM for filming biomolecular and cellular processes", 2014 RNBI Winter School (Hula Valley, Israel, Feb. 9-14, 2014).
  27. T. Ando, "High-speed AFM: Technical progress and application to myosin V", XVI. Linz Winter Workshop (Linz, Austria, Jan. 30-Feb.3, 2014).
  28. T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera, **Plenary lecture** "High-speed atomic force microscopy filming dynamic biomolecular processes", ACSIN12 & ICSPM21 (Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, Nov. 5-8, 2013).
  29. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy that captures dynamic molecular and cellular processes on video", Univ. of Basel, Center for Molecular Life Sciences Seminar (Basel, Switzerland, Oct. 15, 2013).
  30. T. Ando, "Video imaging of molecular and cellular processes by high-speed atomic force microscopy", Karolinska Institute CMB/LICR Seminar (JSPS-KVA Program) (Stockholm, Sweden, Oct. 10, 2013).
  31. T. Ando, "The development of high-speed atomic force microscopy", KTH Royal Institute of Technology Applied Physics Seminar (JSPS-KVA Program) (Stockholm, Sweden, Oct. 10, 2013).
  32. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy", Symposium on "Nanoscale 3D tomography, time-resolved imaging and dynamic characterization of nanostructured materials and devices" at 2013 JSAP-MRS Joint Symposia (Doshisha Univ. Shintanabe campus, Sept. 16-20, 2013).

33. T. Ando, "High-speed AFM for filming dynamic biological processes", Archie Howie Symposium at EMAG-2013 (Univ. of York, UK, Sept. 4-6, 2013).
34. T. Ando, "Video imaging of dynamic molecular and cellular processes by high-speed atomic force microscopy", Cold Spring Harbor Asia Conference on "New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms" (Suzhou, China, August 20-23, 2013).
35. T. Ando, **Keynote speech** "Applications of high-speed atomic force microscopy", XX International Summer School "Nicolas Cabrera", Biomolecules and Single Molecule Techniques (Residencia "La Cristalera", Miraflores de la Sierra, Madrid, Spain, July 21-26, 2013).
36. T. Ando, **Keynote speech** "Development of high-speed atomic force microscopy", XX International Summer School "Nicolas Cabrera", Biomolecules and Single Molecule Techniques (Residencia "La Cristalera", Miraflores de la Sierra, Madrid, Spain, July 21-26, 2013).
37. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for biology", ISPM 2013 (Dijon, France, July 1-4, 2013).
38. T. Ando, **Plenary talk** "Filming dynamic processes by high-speed AFM", UK-SPM 2013 (Leeds, UK, June 26-27, 2013).
39. T. Ando, "Progress of high-speed AFM technology", 5th AFM BioMed Conference (Shanghai, China, May 7-11, 2013).
40. T. Ando, "Protein molecules in action filmed by high-speed atomic force microscopy", 38<sup>th</sup> Lorne Conference on Protein Structure and Function (Lorne, Victoria, Australia, Feb. 10-14, 2013).
41. T. Ando, "Filming dynamic processes of proteins by high-speed AFM", 57th Annual Meeting of Biophysical Society: Workshop-4 Time-resolved AFM of Biological Systems (Philadelphia, USA, Feb. 2-6, 2013).
42. T. Ando, **Keynote lecture** "High-speed atomic force microscopy filming protein molecules in action", 1st Bioscience and Biotechnology International Symposium on "Biomolecular Assemblies from Nano to Micro"(Suzukake Hall, Suzukakedai campus, Tokyo Institute of Technology, Jan. 30, 2013).
43. T. Ando "Dissecting dynamic IDP structure by high-speed AFM imaging", 2nd International Symposium on Intrinsically Disordered Proteins (RIKEN Yokohama Institute, Jan. 23-24, 2013).
44. T. Ando "High-speed atomic force microscopy capable of filming dynamic processes in biomolecule selfassembly", 2012MRS Fall Meeting Symposium "Fundamentals of selfassembly of biomolecular and biomimetic systems (Boston, Nov. 26-30, 2012).
45. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy: Nanoscale visualization of dynamic biomolecular processes", Keynote speech for NanoDay@Penn (Univ. of Pennsylvania, Philadelphia, USA, Oct. 24, 2012).
46. T. Ando and N. Kodera, "High-speed AFM and mechanochemical coupling in walking myosin V", UK-Japan symposium for mechanochemical cell biology (Scarman House, Univ. of Warwick, August 23-24, 2012).
47. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for recording dynamics of biomolecules", International Conference of Nanoscience + Technology (Sorbonne, Paris, France, July 23-27, 2012).
48. T. Ando, **Keynote speech** "High-speed atomic force microscopy for filming biological dynamics", Seeing at the Nanoscale Conference 2012 (University of Bristol, UK, July 9-11, 2012).
49. T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera, "High-speed atomic force microscopy for biology", International Scanning Probe Microscopy Conference (Toronto, Canada, June 15-18, 2012).
50. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy coming of age", 2012 NUANCE-BRUKER International Symposium on Scanning Probe Microscopy for Energy Application and Quantitative Nano-Biomechanics (Northwestern University, Evanston, USA, April 5, 2012).
51. T. Ando, "Nanoscale video imaging of proteins in action by high-speed AFM", ABRF 2012 (Orland, Florida, USA, March 17-20, 2012).
52. T. Ando, "Current state of high-speed AFM: its advantages & limitations", 6th international conference on Structural Analysis of Supramolecular Assemblies by Hybrid Methods (Lake Tahoe, CA, USA, March 14-18, 2012).
53. T. Ando, N. Kodera, T. Uchihashi, "High-speed Atomic Force Microscopy coming of age", 19th International Colloquium of Scanning Probe Microscopy (Lake Toya, Hokkaido, Japan, Dec. 19-21, 2011).
54. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for filming biomolecular processes", AVS 58th Annual International Symposium, Applied Surface Science Div., Advances in Scanning Probe Microscopy

(Nashville, TN, USA, Oct. 30 - Nov. 4, 2011).

55. T. Ando, "High-speed bio-AFM coming of age", 4th AFM BioMed Conference (Institut Curie, Paris, 23-27 August, 2011).
56. T. Ando, "Direct observation of molecular machines by high-speed atomic force microscopy", 25th Anniversary Symposium of Protein Society: Molecular Machines (Boston, MA, USA, 23-27 July 2011).
57. T. Ando, "Motor proteins in action filmed by high-speed AFM", Gordon Research Conference on Muscle and Molecular Motors (New London, NH, USA, 10-15 July 2011).
58. T. Ando, "Direct and dynamic visualization of protein molecules in action by high-speed AFM", European Science Foundation Research Conference on Biological Surfaces And Interfaces (Sant Feliu de Guixols, Spain, 26 June - 1 July 2011).
59. T. Ando, "Dynamic imaging of protein molecules in action by high-speed atomic force microscopy", 5th IUMAS & ALC'11 Conference (Olympic Parktel, Seoul, Korea, May 23-27, 2011).
60. T. Ando, "Direct visualization of walking myosin V molecules by high-speed atomic force microscopy", Motility Subgroup Symposium at Biophysical Society 55th Annual Meeting (Baltimore, Maryland, March 5, 2011).
61. T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodeara, "Dynamic processes of proteins filmed by high-speed AFM", XIII Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 4-7, 2011).
62. T. Ando, Plenary talk "Video imaging of biomolecular processes by high-speed AFM", IEEE MEMS2011 Conference: The 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (Cancun, Mexico, January 23-27, 2011).
63. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy and nano-visualization of dynamic processes and structural changes of proteins", 3rd International Symposium on Atomically Controlled Fabrication Technology (Osaka Univ. Nakanoshima Center, November 25-26, 2010).
64. T. Ando, "Direct imaging of dynamic biomolecular processes by high-speed AFM", International Symposium on Protein Structure and Dynamics: From Molecules to Assembly (Nagoya Univ., November 23-24, 2010).
65. T. Ando, "Dynamic imaging of biomolecular processes by high-speed AFM", Recent Advances and Future Prospects for Visualizing Macromolecular Complexes and Cellular Structures (NIH, Bethesda, USA, October 12-13, 2010).
66. T. Ando, "High-speed AFM imaging of intrinsically disordered proteins", IRB Barcelona BioMed Conference on Intrinsically Disordered Proteins in Biomedicine (Barcelona, Spain, October 4-6, 2010).
67. T. Ando, "Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy", Gordon Research Conference "Intrinsically Disordered Proteins" (Davidson College, Charlotte, North Carolina, USA, July 11-15, 2010).
68. T. Ando, "Dynamic visualization of protein molecules in action by high-speed AFM", Seminar at the London Center for Nanotechnology (LCN, University College London, July 2, 2010).
69. T. Ando, **Plenary lecture** "Dynamic visualization of protein molecules in action by high-speed AFM". UK-SPM 2010 (ExCel, London, June 30-July 1, 2010).
70. T. Ando, "High-speed AFM and visualization of biomolecular processes", From Solid-state Physics to Biophysics V (Cavtat, Croatia, June 12-19, 2010).
71. T. Ando, "Walking mechanism of myosin V revealed by high-speed AFM imaging", XII Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 5-8, 2010).
72. T. Ando, "Instrumentation of high-speed AFM and dynamic imaging of motor protein myosin V", Seminar at University of Nebraska Medical Center (Omaha, USA, January 8, 2010).

## 内稿

1. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscope for imaging of biomolecular dynamics at solid surface" 10th Annual International Electromaterials Science Symposium (Wollongong, Australia, Feb. 11 - 13, 2015).
2. T. Uchihashi, "Visualization of single molecule dynamics at work with high-speed atomic force microscopy", The 7th Biennial Australian Colloid & Interface Symposium (Hobart, Tasmania, Australia, Feb. 1 - 5, 2015).
3. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscope for studying dynamic interactions in biomolecular

system", The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (Mie, Japan, Jan. 10 - 11, 2015).

4. T. Uchihashi, "Single-molecule imaging of proteins at work with high-speed atomic force microscopy" 16<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins (Shiga, Japan, Oct. 5 - 10, 2014).
5. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscopy for imaging of protein dynamics", Agilent Nanomeasure 2014 (Beijing, China, September 16 - 17, 2014).
6. T. Uchihashi, "Visualization of single molecule dynamics at work with high-speed atomic force microscopy" Single Protein Dynamics in *Cellulo* 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses (Okinawa, Japan, April 21 - 25, 2014).
7. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, "Application of high-speed atomic force microscopy –from proteins to Cells", 12th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (Auckland, New Zealand, Dember 8-13, 2013).
8. T. Uchihashi and T. Ando, "High-Speed Atomic Force Microscopy for Imaging of Protein Dynamics", 2013 MRS Fall Meeting, Symposium LL: Advances in Scanning Probe Microscopy (Boston, USA, December 13, 2013).
9. T. Uchihashi, "High-speed AFM for observing cell dynamics", 4th Asia-Pacific Symposium on Nanobionics (Melbourne, Australia, November 14-15, 2013).
10. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, "Single-molecule imaging of proteins at work with high-speed atomic force microscopy", IMS Workshop on Hierarchical Molecular Dynamics: From Ultrafast Spectroscopy to Single Molecule Measurements (Okazaki, May 25-26, 2013).
11. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes", XXI International Materials Research Congress (Cancun, Mexico, August 11-16, 2012).
12. T. Uchiashi, "High-speed atomic force microscopy: A tool for nanobionics", 3rd Asia-Pacific Symposium on Nanobionics (Wollongong, Australia, September 19-21, 2012).
13. T. Uchihashi, "Image analysis of HS-AFM movies for dynamic events on biological molecules: F<sub>1</sub>-ATPase and cellulase", 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop (Kanazawa, Japan, Nov. 5-8, 2012).
14. T. Uchihashi, M. Shibata, H. Yamashita, K. Inoue, H. Kandori, and T. Ando, "Direct visualization of photo-induced conformational change in bacteriorhodopsin", 5<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference for Photobiology (Nara, Jul. 30 – Aug. 1, Japan).
15. T. Uchihashi and T. Ando, "Conformational Dynamics of Biological Molecules Captured by High-Speed AFM, 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (Kokura, Japan, Nov. 9-12, 2010).
16. T. Uchihashi, "Watching protein dynamics in action with high-speed AFM", 167 Committee satellite workshop on SPM (Kanazawa, Japan, Aug. 4, 2010).
17. T. Uchihashi and T. Ando, "Direct visualization of dynamic processes on biomolecules with high-speed AFM", AFM BioMed Conference: 3<sup>rd</sup> International Meeting on AFM in Lifesciences and Medicine (Red Island, Croatia, May. 12-15, 2010).

## 古寺

1. N. Kodera, "High-speed atomic force microscopy for video imaging of functioning biological molecules", 2nd International Conference and Exhibition on Materials Science & Engineering (Las Vegas, USA, October 7-9, 2013).
2. N. Kodera, SK. Dora, and T. Ando, "Imaging study on intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy", *XV. Annual Linz Winter Workshop* (Linz, Austria, February 15-18, 2013).
3. N. Kodera, SK. Dora, and T. Ando, "Imaging study on intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy", *3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop* (Kanazawa, Japan, November 5-8, 2012).
4. N. Kodera, D. Safer, H.L. Sweeney, and T. Ando, "Direct observation of functioning myosin V and VI by high-speed atomic force microscopy", *XIII Linz Winter Workshop* (Linz, Austria, February 2-7, 2011).
5. N. Kodera, Y. Takhara, M. Miyata, and T. Ando, "Structural dynamics of Gli349 and Gli521 isolated from the gliding machinery of *Mycoplasma mobile* studied by high-speed atomic force microscopy", *The 5th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology* (Nagasaki, Japan, October 19-21, 2011).
6. N. Kodera, D. Yamamoto, and T. Ando, "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy", *AFM BioMed Conference* (Institut Curie, Paris, France, August 24-27, 2011).

## 福岡

1. T. Fukuma, “Instrumentation and applications of liquid-environment FM-AFM”, XXI International Summer School “Nicolas Cabrera” (Madrid, Spain, July. 14-18, 2014).
2. T. Fukuma, K. Miyata, N. Kobayashi, H. Asakawa, “Improving Fundamental Performance of Liquid-Environment FM-AFM” 2013 MRS Fall Meeting & Exhibit (Boston, USA, Dec. 2, 2013).
3. T. Fukuma, “Atomic-scale imaging of solid/liquid interfaces” 7th Japanese-French Frontiers of Science Symposium (Otsu, Japan, Jan. 18, 2013).
4. T. Fukuma, H. Nakayachi, K. Miyata, N. Kobayashi, and H. Asakawa, “Atomic-resolution imaging in liquid by FM-AFM using small cantilevers with megahertz-order resonance frequencies”, MRS Fall Meeting (Boston, USA, Nov. 27, 2012).
5. T. Fukuma, H. Asakawa, and N. Kobayashi, “Visualizing subnanometer-scale distribution of water at solid/liquid interfaces by three-dimensional scanning force microscopy”, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1) (Nagoya, Japan, Nov. 12, 2012).
6. T. Fukuma, H. Asakawa, N. Inada, and Y. Katagiri, “High-resolution imaging of mobile water and fluctuating surface structures at nanobio interfaces by 3D scanning force microscopy”, 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop (Kanazawa, Japan, Nov. 8, 2012).
7. T. Fukuma, “Subnanometer-scale imaging of nanobio interfaces by FM-AFM”, XXI International Materials Research Congress (IMRC-2012) (Cancun, Mexico, Aug. 13, 2012).
8. T. Fukuma “Subnanometer-resolution liquid-environment AFM for investigations on biological interfaces”, The First International Conference on Materials, Energy and Environments (ICMEE 2012) (Toledo, USA, May. 10, 2012).
9. T. Fukuma, “Atomic-scale studies on hydration structures at solid/liquid interfaces by FM-AFM”, Fundamental Aspects of Friction and Lubrication (Leiden, the Netherlands, Apr. 19, 2012).
10. T. Fukuma, “Visualizing Nanobio-interfaces by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, 2011 Korea Japan Symposium on Molecular Science (Busan, Korea, Jul. 8, 2011).
11. T. Fukuma, “Subnanometer-scale Imaging of Interfacial Water by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, Miniworkshop on Aqueous Interfaces in Physics, Chemistry and Biology (Taipei, Taiwan, Nov. 27, 2010).
12. T. Fukuma, “Subnanometer-scale Visualization of Nanobio-interfaces by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy”, BIT's 1st Annual Congress of Nanomedicine 2010 (Beijing, China, Oct. 25, 2010).
13. T. Fukuma, “Subnanometer-resolution FM-AFM Imaging of Biological Systems in Liquid”, 167 Committee Satellite Workshop on SPM (Kanazawa, Japan, Aug. 4, 2010).

## 浅川

1. H. Asakawa, T. Fukuma, “3D scanning force microscopy for subnanometer-scale investigations on biological interfaces” Catalysis Research Center(CRC) International Symposium, New Challenges on the Bio-interfaces: Structures and Dynamics (Sapporo, Japan, Feb. 6, 2013).

## 福森

1. Y. Fukumori, “Dynamic movement of live bacterial cell surface captured by high-speed”, AFMIGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions (Nagoya Univ., September 1-3, 2013).
2. Y. Fukumori, A. Taoka, and T. Ando, “High-speed atomic force microscopy unveils real images of magnetotactic bacteria and magnetosomes”, 3rd International Magnetotactic Bacteria Meeting (University of California, Berkeley, USA, June 11-14, 2012).

## 田岡

1. A. Taoka, C. Uesugi, Z. Oestreicher, K. Morii, A. Kiyokawa, Y. Fukumori, “Fluorescence live-cell imaging for visualizing the subcellular dynamics of magnetosomes”, 4th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas–CBPF, Rio de Janeiro, Brazil, September 15-18, 2014).

## 13. 招待講演（国内会議）

## 安藤

1. 安藤敏夫, 古寺哲幸, 内橋貴之「高速 AFM で観る分子動態と生体エネルギー変換」, 日本生体エネルギー研究会第 40 回討論会 (愛媛大学, 松山, 2014 年 12 月 11-13 日)
2. 安藤敏夫「タンパク質分子の機能動態を直接可視化する高速 AFM」, 東京都医学総合研究所セミナー (東京, 2014 年 3 月 13 日)
3. 安藤敏夫 島津賞受賞記念講演「高速原子間力顕微鏡の開発とそのタンパク質分子への適用に関する研究」 (京都ホテルオークラ, 2014 年 2 月 17 日)
4. 安藤敏夫 **Plenary talk** 「生体分子を動画撮影する高速 AFM」, 日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム (名古屋, ウィンク愛知, 2013 年 11 月 15 日)
5. 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡で見るタンパク質の機能動態」, 岡山大学医学科 生化学特論 (岡山大学医歯薬系, 2013 年 11 月 14 日)
6. 安藤敏夫 "Direct visualization of dynamic molecular and cellular processes at high spatiotemporal resolution", 岡山大学第 90 回 ITP セミナー (岡山大学 J-Hall, 2013 年 11 月 13 日)
7. 安藤敏夫「高速 AFM による作動中のタンパク質の高解像撮影」, 第 7 回分子科学討論会 (京都テルサ, 2013 年 9 月 24-27 日)
8. 安藤敏夫「バイオ分子のダイナミクスを直接可視化する高速 AFM」, 第 62 回高分子討論会 (金沢大学, 2013 年 9 月 11-13 日)
9. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸「生物試料の高速・超解像度 AFM 観察」, 第 93 春季日本化学会年会アドバンスト・テクノロジー・プログラム 新材料開発最前線 (自己組織化技術, 融合マテリアルが支えるバイオミメティクス研究の最前線) (立命館大学くさつキャンパス, 2013 年 3 月 24 日)
10. 安藤敏夫「分子・細胞の動的挙動を高解像撮影する高速 AFM」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー 中枢神経研究を拓く新しい潮流 (大阪大学蛋白質研究所, 2013 年 3 月 8-9 日)
11. 安藤敏夫, "Dynamic observation of structure and function of proteins by high-speed AFM". 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「膜機能タンパク質の構造と機能の動的変化へのアプローチ」(福岡国際会議場, 福岡, 2012 年 12 月 11-14 日)
12. 安藤敏夫, "Dynamic imaging of biomolecules and cells by high-speed AFM". 第 35 回日本神経科学会年会シンポジウム "New approaches in functional molecular neurobiology" (名古屋国際会議場, 名古屋, 2012 年 9 月 18-21 日)
13. 安藤敏夫「タンパク質の機能中の構造と挙動を直視する高速 AFM」, 第 21 回日本バイオイメーシング学会学術集会シンポジウム「バイオイメーシングのフロンティア」(京都国際会館, 京都, 2012 年 8 月 27-28 日)
14. 安藤敏夫「動作中の蛋白質分子の高速 AFM によるナノビデオ観察」, 第 12 回日本蛋白質科学会年会シンポジウム「YouTube 時代の構造生物学」(名古屋国際会議場, 2012 年 6 月 20-22 日)
15. 安藤敏夫「高速 AFM で探るタンパク質の機能メカニズム」, 第 39 回生体分子科学討論会 (東北大学片平さくらホール, 仙台, 2012 年 6 月 8-9 日)
16. 安藤敏夫, "Realtime analysis of structural rearrangements of proteins by high-speed AFM", 生理学研究所大学院講義 (愛知県, 東岡崎, 2012 年 5 月 25 日)
17. 安藤敏夫「高速 AFM 装置の事業化 ―その経緯と諸問題―」, 第 72 回分析化学討論会 シンポジウム「産業のチカラ・イノベーションの駆動力となる分析化学」(鹿児島大学工学部・郡元キャンパス, 2012 年 5 月 19-20 日)
18. 安藤敏夫「高速バイオ SPM イメーシングのロードマップ」, ナノプローブテクノロジー167 委員会第 66 回研究会「バイオイメーシング・計測技術の最先端」(産業技術総合研究所臨海副都心センター別館, 東京都江東区, 2012 年 4 月 19 日)

## 内橋

1. 内橋貴之 “高速原子間力顕微鏡によるタンパク質のダイナミクスと物性計測”, 第 9 回 NIBB バイオイメーシングフォーラム「物理特性のイメージング」(基礎生物学研究所, 2015 年 1 月 27 日)
2. 内橋貴之 “高速原子間力顕微鏡の開発とバイオ応用”, 新世代研究所水和ナノ構造・界面ナノ科学合同研究会「固液界面の水和ナノ構造と生体高分子ダイナミクス」(伊豆長岡温泉 天坊, 2015 年 1 月 25 日)
3. 内橋貴之 “Cooperative Conformational Change in Ring-Shaped ATPase Observed by High-Speed AFM”, 第 52 回日本生物物理学会年会 Japan-China-Taiwan Joint Symposium on Cooperativity in

- Supramolecular Machine (札幌国際会議場, 2014 年 9 月 26 日)
4. 内橋貴之, 「高速 AFM による生体試料のダイナミクス観察」, 日本膜学会第 36 回年会 境界領域シンポジウム「膜解析の最前線～生体膜・膜タンパク質から模擬膜, ソフトマターまで～」(早稲田大学, 2014 年 5 月 13 日)
  5. 内橋貴之, 飯野亮太, 渡辺洋平, 野地博行, 安藤敏夫, "HS-AFM observations of conformational dynamics of ring-shaped ATPases: F1 and ClpB", 231st IMEG seminars & Minisymposium: ATP/GTP 駆動分子マシナリーの高速 AFM イメージングと分子機構解明の進展(熊本大学発生医学研究所, 2014 年 2 月 20 日)
  6. 内橋貴之「高速原子間力顕微鏡による生体試料の動的構造解析 ～一分子から細胞まで～」第 1 回新学術領域「植物環境感覚」「少数性生物学」ジョイントシンポジウム(大阪大学中之島センター, 2013 年 12 月 17 日)
  7. 内橋貴之「研究者になるということ」2013 年北大情報系若手連携シンポジウム(北海道大学, 2013 年 11 月 29 日)
  8. 内橋貴之「高速原子間力顕微鏡 ～分子の動きを直視して理解する～」, 生物物理若手の会 第 53 回夏の学校(伊豆長岡温泉 えふでの宿, 2013 年 9 月 7 日)
  9. 内橋貴之「高速 AFM によるタンパク質機能動態の直接観察」, 日本生化学会九州支部例会シンポジウム「タンパク質構造の動きと機能発現」(佐賀大学, 2013 年 5 月 18 日)
  10. 内橋貴之, 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の一分子ダイナミクス計測」, 第 90 回 日本生理学会大会, 日本生物物理学会連携シンポジウム: 新しい計測で生命科学を切り拓く(タワーホール船堀, 2013 年 3 月 27 日)
  11. 内橋貴之「高速 AFM による生体分子のダイナミクス解析」, KEK PF 第 1 回先進的観測技術研究会(KEK 小林ホール つくば, 2012 年 12 月 26 日)
  12. 内橋貴之「高速 AFM を用いた 1 分子ダイナミクス」, 第 85 回日本生化学会大会 シンポジウム"少数性・生化学の新たな視点"(福岡国際会議場, 福岡, 2012 年 12 月 14-16 日)
  13. 内橋貴之「高速 AFM によるバイオ分子の液中動的観」, 生体分子機能解析のための走査型プローブ顕微鏡手法研究部会(湯沢ニューオータニホテル, 2012 年 12 月 9 日)
  14. 内橋貴之「高速原子間力顕微鏡でイメージングするタンパク質の一分子ダイナミクス」, 第 12 回名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー(名古屋大学 坂田・平田ホール, 2012 年 11 月 29 日)
  15. 内橋貴之「高速原子間力顕微鏡で可視化するタンパク質の機能動態」, 第 52 回生命科学夏の学校(西浦温泉 ホテルたつき, 蒲郡, 2012 年 8 月 25 日)
  16. 内橋貴之, 古寺哲幸, 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡で探るタンパク質のダイナミクス」, 日本表面科学会 平成 23 年度関西支部セミナー(京都大学, 2012 年 3 月 7 日)
  17. 内橋貴之, 古寺哲之, 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡で明らかにするタンパク質のダイナミクス」, 日本顕微鏡学会走査型プローブ顕微鏡(SPM)分科会 平成 23 年度オープン研究会 走査型プローブ顕微鏡における最先端技術～イノベーションのキーテクノロジー～(独立行政法人物質・材料研究機構, 2011 年 12 月 12 日)
  18. 内橋貴之, 柴田幹大, 山下隼人, 神取秀樹, 安藤敏夫, "High-speed atomic force microscopy: a tool for elucidating structural dynamics of membrane proteins", 第 49 回日本生物物理学会年会シンポジウム, New experimental tools for structural changes of membrane proteins: Beyond X-ray structure(兵庫県立大学, 2011 年 9 月 17 日)
  19. 内橋貴之, 安藤敏夫, "Real-time imaging of protein molecules in action by high-speed AFM", 第 63 回細胞生物学会大会 Symposium: Frontier in Imaging Technology for Cell Biology(北海道大学, 2011 年 6 月 28 日)
  20. 内橋貴之「高速 AFM を用いた膜超分子のダイナミクス観察」, 第 36 回 生体エネルギー研究会(大阪大学銀杏会館, 2010 年 11 月 18-20 日)
  21. 内橋貴之「AFM を用いたタンパク質研究の現状と展望について」, 新世代研究所・バイオ SPM 研究会 BNM (Bio-Nano Mechanics) 研究会(新世代研究所, 東京, 2010 年 11 月 16 日)
  22. 内橋貴之「原子間力顕微鏡を利用した生物物理研究 現状と将来展望」, 名古屋大学工学研究科テクノ・シンポジウム「生物物理の未来研究会」(名古屋大学工学研究科, 2010 年 9 月 10 日)
  23. 内橋貴之「生体分子の機能動態を可視化する高速 AFM 技術」, 平成 22 年度計測自動制御学会関西支部講習会ナノ・マイクロスケールにおける最新トピックスー計測から設計開発までー(学校法人常翔学園 大阪センター, 2010 年 6 月 10 日)

## 古寺

1. 古寺哲幸「液中ナノメートル世界をビデオ撮影できる高速原子間力顕微鏡」, 大阪市立大学大学院理学研究科/理学部 生物学科 Seminar series (大阪市立大学, 2015年2月13日)
2. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫「高速 AFM の開発とバイオへの応用」, 日本学術振興会「先端ナノデバイス・材料テクノロジー第151委員会」平成26年度第5回研究会「先端ナノ計測技術と材料」(早稲田大学研究開発センター, 2014年11月14日)
3. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫「新規高速 AFM 走査モードで解明するミオシン V の化学-力学エネルギー変換機構」, 第14回日本蛋白質科学会年会 (ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア, 2014年6月25-27日)
4. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫, "Walking mechanism of myosin V revealed by high-speed AFM", 231st IMEG seminars & Minisymposium: ATP/GTP 駆動分子マシナリーの高速 AFM イメージングと分子機構解明の進展 (熊本大学発生病学研究所, 2014年2月20-21日)
5. 古寺哲幸, 内橋貴之, 八木健太, 安藤敏夫, "Chemomechanical coupling mechanism of myosin V revealed by high-speed AFM", 第51回日本生物物理学会年会若手招待講演 (国立京都国際会館, 2013年10月28-30日)
6. 古寺哲幸 「機能中のタンパク質をリアルタイム撮影できる高速原子間力顕微鏡」, 第22回日本バイオイメージング学会学術集会, (東京大学薬学部講堂, 2013年9月14-16日)
7. 古寺哲幸 「高速原子間力顕微鏡による生体分子のナノ動態撮影」, 第68回日本物理学会年次大会 (広島大学・東広島キャンパス, 2013年3月26-29日)
8. 古寺哲幸, 田原悠平, 笠井大司, 宮田真人, 相沢慎一, 安藤敏夫 「高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) で捉えた運動マシナリー」, 第85回日本生化学会大会 (福岡国際会議場 福岡, 2012年12月14-16日)
9. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫 「高速原子間力顕微鏡による生体分子のライブイメージング」, 生理研研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」(岡崎コンファレンスセンター, 2012年10月24-25日)
10. 古寺哲幸 受賞講演「高速 AFM によるミオシン V の運動機構に関する研究」, ナノプローブテクノロジー第167委員会 第68回研究会(旅館清山コンベンションホール, 福島県, 2012年10月18-19日)
11. 古寺哲幸 「高速スキャン AFM」, 平成24年度 新学術領域研究 キックオフミーティング 運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性 (名古屋大学, 2012年9月24日)
12. N. Kodera, T. Uchihashi, T. Ando, "Direct observation of structural dynamics of biological molecules by high-speed atomic force microscopy", 第50回日本生物物理学会年会 (名古屋大学, 2012年9月22-24日)
13. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡による生体分子の構造ダイナミクスの観察」, 高分子学会 バイオ・高分子研究会 (三谷温泉・松風園 愛知県, 2012年9月21-22日)
14. 古寺哲幸「液中ナノメートル世界をリアルタイム観察する高速原子間力顕微鏡」, 第6回基礎・臨床交流セミナー (金沢大学医学部, 金沢, 2011年5月11日)
15. 古寺哲幸 "Simultaneous observation of structure and dynamics of functioning proteins by high-speed atomic force microscopy", The 1519th Biological Symposium (国立遺伝学研究所, 三島, 2011年7月26日)
16. 古寺哲幸「機能中のタンパク質の構造と動きを同時観察する高速原子間力顕微鏡」, 第6回構造生物学に関する先端技術講演会-NMR, AFM, EM 解析のトピックス (九州大学医学部, 福岡, 2011年9月2日)
17. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫「液中ナノメートル世界をリアルタイム観察する高速原子間力顕微鏡」, 日本顕微鏡学会第67回学術講演会 (福岡国際会議場, 福岡, 2011年5月16-18日)
18. 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫 "Simultaneous observation of structure and dynamics of functioning bio-molecules by high-speed atomic force microscopy", 第49回日本生物物理学会年会 (兵庫県立大学 姫路書写キャンパス, 姫路, 2011年9月16-18日)

## 福岡

1. 福岡剛士「周波数変調原子間力顕微鏡を用いた原子スケール三次元局所水和構造計測」水和ナノ構造・界面ナノ科学合同研究会「固液界面の水和ナノ構造と生体高分子ダイナミクス」(伊豆の国, 2015年1月24-25日)

2. 福間剛士, 浅川雅, 宮田一輝, 稲田なつみ, 宮澤佳甫「液中周波数変調原子間力顕微鏡による固液界面現象のサブナノスケール観察」第 55 回真空に関する連合講演会 (大阪, 2014 年 11 月 18-20 日)
3. 福間剛士「液中周波数変調原子間力顕微鏡を用いた無機結晶表面の原子分解能観察」2014 年度第 2 回界面ナノ科学研究会 (東京, 2014 年 11 月 14 日)
4. 福間剛士, 宮田一輝, 稲田なつみ, 宮澤佳甫, 浅川 雅「液中高分解能原子間力顕微鏡技術の開発とその固液界面研究への応用」第 34 回表面科学学術講演会 (松江, 2014 年 11 月 6-8 日)
5. 福間剛士「液中周波数変調 AFM を用いた原子スケール固液界面計測」アサイラム AFM セミナー (東京, 2014 年 7 月 29-30 日)
6. 福間剛士「高分解能液中 AFM を用いた局所水和構造の三次元イメージング」, 研究会「水シグナリングの分子動態から病態へ」 (福井, 2014 年 3 月 5 日)
7. 福間剛士「先端 AFM 技術を用いた学術・産業分野における研究の重要性と課題」, CRDS ナノテクノロジー・材料分野俯瞰ワークショップ「ナノ計測技術領域」分科会 (東京, 2014 年 2 月 7 日)
8. 福間剛士「液中 FM-AFM による生体分子のサブナノスケール観察と SPM シミュレータによる解析」第 5 回走査プローブ顕微鏡シミュレータ導入セミナー (東京, 2013 年 12 月 11 日)
9. 福間剛士「原子間力顕微鏡による液中電位分布計測技術」イノベーションジャパン 2013 (東京, 2013 年 8 月 30 日)
10. 福間剛士, 稲田なつみ, 片桐由智, 浅川雅「液中周波数変調 AFM を用いた固液界面構造の三次元計測」第 15 回高分子表面研究討論会 (東京, 2013 年 2 月 1 日)
11. 福間剛士「液中周波数変調 AFM を用いた生体試料の液中サブナノスケール観察」分子研研究会「生物物質科学の展望」 (岡崎, 2013 年 1 月 11 日)
12. 福間剛士「超高分解能液中原子間力顕微鏡の開発と固液界面計測への応用」, 熊本大学自然科学研究科 AGEIN 学生主催特別講演会 (熊本, 2012 年 12 月 12 日)
13. 福間剛士, 宮田 一輝, 浅川雅「液中 FM-AFM の基本性能の改善」日本学術振興会第 167 委員会 第 68 回研究会 (福島, 2012 年 10 月 18 日)
14. 福間剛士「液中原子間力顕微鏡による原子スケール固液界面計測」環境化学系合同ゼミ第 30 回記念講演会 (金沢, 2012 年 6 月 25 日)
15. 福間剛士「液中周波数変調 AFM の性能改善と多機能化」日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会 (つくば, 2012 年 5 月 16 日)
16. 福間剛士「液中周波数変調 AFM の開発と固液界面計測への応用」第 5 回 SFG 研究会 (仙台, 2012 年 3 月 11 日)
17. 福間剛士「高分解能液中原子間力顕微鏡による固液界面の原子スケール計測技術」 (金沢大学, 理学談話会 (金沢, 2012 年 2 月 22 日)
18. 福間剛士「脂質二重膜上に形成された水和構造の三次元 AFM 観察」第 31 回 表面科学学術講演会 (東京, 2011 年 12 月 15 日)
19. 福間剛士「水中の原子・分子を高分解能でとらえる顕微鏡」日本海イノベーション会議 (金沢, 2011 年 12 月 10 日)
20. 福間剛士「液中ナノイメージング技術の開発とバイオサイエンスへの応用」第 4 回金沢大学未来開拓シンポジウム (東京, 2011 年 10 月 29 日)
21. 福間剛士「工系研究分野における成果発表に関する実践的ノウハウ」グローバルな学術世界と研究 (金沢, 2011 年 10 月 25 日)
22. 福間剛士「生体膜界面での液体構造」第 5 回分子科学シンポジウム (岡崎, 2011 年 6 月 28 日)
23. 福間剛士「周波数変調原子間力顕微鏡の固液界面計測への応用」第一回走査プローブ顕微鏡シミュレータの開発セミナー (東京, 2011 年 3 月 8 日)
24. 福間剛士「液中周波数変調原子間力顕微鏡の開発とその生体膜研究への応用」分子アンサンブル 2010 (和光, 2010 年 11 月 16 日)
25. 福間剛士「周波数変調 AFM による固液界面計測技術の発展と将来展望」日本顕微鏡学会シンポジウム (金沢, 2010 年 11 月 12 日)
26. 福間剛士「原子間力顕微鏡を用いた固液界面の原子分解能イメージング」分子研研究会「グリーンイノベーションのための表面・界面化学」 (岡崎, 2010 年 10 月 6 日)
27. 福間剛士「周波数変調 AFM によるナノバイオ界面の高分解能イメージング」有機バイオ SPM 研究会・2010 (千葉, 2010 年 9 月 3 日)

28. 福間剛士「固液界面の原子分解能イメージング技術」科学・技術フェスタ in 京 平成 22 年度産学官連携推進会議（京都，2010 年 6 月 5 日）
29. 福間剛士「超高分解能原子間力顕微鏡を用いた液中界面イメージング」日本顕微鏡学会 第 66 回学術講演会（名古屋，2010 年 3 月 26 日）
30. 福間剛士「AFM で探る脂質二重膜界面の溶液構造」日本化学会 第 90 春季年会（2010）（東大阪，2010 年 3 月 26 日）
31. 福間剛士「液中周波数変調 AFM による生体試料の分子スケール観察」2010 年（平成 22 年）春季第 57 回応用物理学関係連合講演会（平塚，2010 年 3 月 19 日）
32. 福間剛士「原子分解能を有する液中三次元イメージング技術の確立」JST イノベーションプラザ石川新技術発表会 2010（金沢，2010 年 1 月 28 日）

### 浅川

1. 浅川雅「三次元走査型原子間力顕微鏡を用いたソフトマター/水界面のナノ空間計測」JAIST ソフトマター研究ユニット第 3 回 異分野融合セミナー（能美，2015 年 2 月 18 日）
2. 浅川雅， 福間剛士「液中で原子分解能計測を可能とする周波数変調原子間力顕微鏡」計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2014（金沢，2014 年 9 月 18 日）
3. 浅川雅「液中原子分解能を有する原子間力顕微鏡のナノバイオ界面計測への応用」，JST CRDS 科学技術未来戦略ワークショップ「インタラクティブバイオ界面の創製」（東京，2014 年 1 月 15 日）
4. 浅川雅， 稲田なつみ， 片桐由智， 鈴木啓太， 福間剛士「高分解能原子間力顕微鏡によるナノバイオ界面の三次元空間計測」，第 4 回 NMMS セミナー（東京，2013 年 3 月 1 日）
5. 浅川雅「液中周波数変調 AFM のナノバイオ界面計測への応用」2012 年秋季 第 73 回 応用物理学会学術講演会（愛媛，2012 年 9 月 11 日）
6. 浅川雅「液中高分解能原子間力顕微鏡の開発と生体分子計測への応用」生物物質科学フォーラム（金沢，2012 年 3 月 9 日）

### 紺野

1. 紺野宏記「葉緑体 ATP 合成酵素の活性調節機構」，北陸植物学会 2013 年度北陸地区インターキャンパスセミナー（金沢大学サテライト・プラザ，2013 年 6 月 23 日）

### 福森

1. 福森義宏「脱窒と酸素呼吸に関する進化的考察」第 37 回分子生物学会年会シンポジウム「生命の起源・進化・本質」（浜松アクティビティコンgresセンター，静岡，2014 年 11 月 25 日）
2. 福森義宏“Diversity and Evolution of Manetotactic Bacteria”，環境微生物系学会合同大会 2014 シンポジウム”Marvelous strategy for bacterial survival–Sensing, Response & Evolution”（パシフィコ横浜，神奈川県，2014 年 10 月 24 日）
3. 福森義宏「高速原子間力顕微鏡による細菌外膜構造の動態イメージング」第 49 回日本細菌学会中部支部総会（金沢大学医学部十全講堂，石川，2012 年 11 月 9 日）

### 田岡

1. 田岡 東， 山下隼人， Zachery Oestreicher， 福森義宏「高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）で「みる」バクテリアの細胞表層」環境微生物系学会合同大会 2014 シンポジウム「微生物を見る」（浜松アクティビティコンgresセンター，静岡，2014 年 10 月 22 日）
2. 田岡 東， 山下隼人， Zachery Oestreicher， 福森義宏「高速 AFM を用いた細菌表層構造の生細胞イメージング」ナノプローブテクノロジー第 167 委員会 第 76 回研究会（キャンパスプラザ京都，京都，2014 年 10 月 23 日）
3. 田岡 東， 山下隼人， Zachery Oestreicher， 福森義宏「高速原子間力顕微鏡（High-speed AFM）を用いた微生物細胞表層の可視化」日本農芸化学会 2014 年度大会（明治大学生田キャンパス，2014 年 3 月 30 日）
4. 田岡東， 福森義宏，”Nano-scale structural analysis of living bacterial cell surface”，第 86 回細菌学会総会（千葉幕張メッセ，ワークショップ・コンペーパー，2013 年 3 月 19 日）

## 14. 特許出願 及び 登録済特許

### 安藤

1. 安藤敏夫, 福田真悟「走査型プローブ顕微鏡」, 2014 年年 9 月 25 日出願 (特願 2014-194987)
2. 安藤敏夫, 岡崎康孝, 内橋貴之「原子間力顕微鏡及びカンチレバー支持具」, 金沢大学, 2010 年 6 月 1 日 (特願 2010-126027)
3. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸, 山本哲朗, 「走査プローブ顕微鏡」特許第 5277378 号 (2013 年 5 月 31 日)
4. 福間剛士, 安藤敏夫, 岡崎康孝「走査型プローブ顕微鏡 用のスキャナー装置」特許第 5268008 号 (2013 年 5 月 17 日)
5. 安藤敏夫, 内橋貴之, 山下隼人「走査型プローブ顕微鏡」特許第 5252389 号 (2013 年 4 月 26 日)
6. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸, 山下隼人「走査プローブ顕微鏡およびカンチレバー駆動装置」特許 第 5164147 号 (2012 年 12 月 28 日)
7. 安藤敏夫「走査型プローブ顕微鏡およびアクティブダンピング駆動制御装置」特許第 4931088 号 (2012 年 2 月 24 日)
8. 安藤敏夫, 戸田明敏, 「走査機構およびこれを用いた機械走査型顕微鏡」特許第 4797150 号 (2011 年 8 月 12 日)
9. 安藤敏夫, 斎藤究, 戸田明敏「走査型プローブ顕微鏡」特許第 4646049 号 (2010 年 12 月 17 日)
10. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸, 高橋直尚「原子間力顕微鏡」特許第 4496350 号 (2010 年 4 月 23 日)
11. 安藤敏夫, 坂下満, 橋貴之「走査型プローブ顕微鏡」特許第 4474556 号 (2010 年 3 月 19 日)
12. 安藤敏夫, 林美明 「走査型プローブ顕微鏡および分子構造変化観測方法」特許第 4448493 号 (2010 年 1 月 29 日)
13. 安藤敏夫, 酒井信明「走査型プローブ顕微鏡」特許第 4083517 号 (2008 年 2 月 22 日)
14. 安藤敏夫, 古寺哲幸, 酒井信明「アクチュエータ制御方法及びその装置ならびに走査プローブ顕微鏡」特許第 4455046 号 (2008 年 2 月 12 日)
15. T. Fukuma, T. Ando and Y. Okazaki, "Scanning device for scanning probe microscope", US 8217367 B2 (July 10, 2012)
16. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera and N. Takahashi, "Atomic force microscope", US 7975315 B2 (July 5, 2011)
17. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera and H. Yamashita, "Scan type probe microcope and cantilever drive device", US 7958565 B2 (June 7, 2011)
18. T. Ando, M. Sakashita and T. Uchihashi, "Scanning probe microscope", US 7954165 B2 (May 31, 2011)
19. T. Ando, "Scanning probe microscope and active damping drive control device", US 7975314 B2 (July 5, 2011)
20. T. Ando and Y. Hayashi, "Scanning probe microscope and molecular structure change observation method", US 7556968 (July 2, 2009)
21. T. Ando and A. Toda, "Scanning unit and scanning microscope having the same", US 6617761B2 (Sep. 9, 2003)
22. T. Ando and Y. Hayashi, "Probe scanning mechanism for a scanning probe microscope", US 6118121 (Sep. 12, 2000)
23. T. Ando and Y. Hayashi, "Probe scanning mechanism for a scanning probe microscope", US 5912461 (June 15, 1999)

### 福間・浅川

1. 浅川雅, 福間剛士, 小林大貴「走査型プローブ顕微鏡用カンチレバー及び走査型プローブ顕微鏡」, 2014 年 2 月 21 日出願 (特願 2014-031312)
2. 本棒享子, 大橋健也, 池田光晴, 福間剛士, 小林成貴, 尾形奨一郎「液中電位計測技術を用いた金属の耐食性評価方法及び評価装置」, 2013 年 7 月 22 日 PCT 出願 (PCT/JP2013/069728)
3. 福間剛士, 安藤敏夫, 岡崎康孝「走査型プローブ顕微鏡 用のスキャナー装置」特許第 5268008 号 (2013 年 5 月 17 日)
4. 福間剛士, 宮田一輝「信号検出回路及び走査型プローブ顕微鏡」, 2013 年 3 月 28 日出願 (特願 2013-070575)
5. 福間剛士, 浅川雅, 片桐由智「密閉型 AFM セル」, 2011 年 11 月 15 日出願 (特願 2011-249451)
6. 福間剛士, 小林成貴「電位計測装置, 及び原子間力顕微鏡」, 2011 年 9 月 12 日出願 (特願 2011-198811)

7. 小林成貴, 福間剛士, 浅川雅「液中電位計測装置、及び、原子間力顕微鏡」, 2010年11月5日出願(特願2010-248744)
8. 小林成貴, 福間剛士, 浅川雅「液中電位計測装置、及び、原子間力顕微鏡」特許第5594795号(2014年8月15日)
9. 浅川雅, 福間剛士「カンチレバー励振装置及び走査型プローブ顕微鏡」(2014年8月1日)
10. 福間剛士, 植田泰仁「走査型プローブ顕微鏡」特許第5283089号(2013年6月7日)
11. 福間剛士, 三谷悠士「走査型プローブ顕微鏡」(2014年5月23日)
12. T. Fukuma and Y. Mitani, "Scanning Type Probe Microscope", US 8387159 B2 (February 26, 2013)
13. T. Fukuma, T. Ando and Y. Okazaki, "Scanning device for scanning probe microscope", US 8217367 B2 (July 10, 2012)

## 15. 受賞

### 安藤

1. 安藤敏夫: Doctor Honoris Causa from the Aix-Marseille University (2014年11月18日)
2. 安藤敏夫: 島津科学技術振興財団 島津賞(2014年2月17日)
3. 安藤敏夫: 金沢大学功労表彰メダル(2013年11月2日)
4. 安藤敏夫: 全国発明表彰発明特別賞(発明協会会長賞)(2013年6月18日)
5. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸: 文部科学大臣表彰 科学技術賞(開発部門)(2013年4月16日)
6. 安藤敏夫: 日本顕微鏡学会 和文誌賞(2011年5月17日)
7. 安藤敏夫: 金沢市文化賞(2012年10月3日)
8. 安藤敏夫: Univ. of Pennsylvania NBIC Award for Research Excellence in Nanotechnology (2012年10月24日)
9. 安藤敏夫: 日本顕微鏡学会 和文誌賞(2011年5月17日)
10. 安藤敏夫: 材料科学技術振興財団 山崎貞一賞(2010年9月16日)
11. 安藤敏夫: 日本表面科学会 学会賞(2010年5月22日)

### 内橋

1. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸: 文部科学大臣表彰 科学技術賞(開発部門)(2013年4月16日)
2. 内橋貴之: 日本学術振興会 ナノプローブテクノロジー賞(2010年8月4日)

### 古寺

1. 古寺哲幸: 日本生物物理学会第9回若手奨励賞(2013年10月29日)
2. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸: 文部科学大臣表彰 科学技術賞(開発部門)(2013年4月16日)
3. 古寺哲幸: 褒章内田賞(循環器研究振興基金賞)(2012年2月18日)
4. 古寺哲幸: 日本学術振興会 ナノプローブテクノロジー奨励賞(2012年4月19日)

### 福間

1. 福間剛士: 平成23年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2011年4月11日)

### 浅川

1. 浅川雅: 日本学術振興会ナノプローブテクノロジー奨励賞(2013年7月22日)

## 16. 外部資金獲得状況

### 安藤

1. 科学研究費補助金・新学術領域研究「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術ータンパク質が動作する姿を活写するー」(プロジェクトリーダー: 神田大輔 九州大学教授)「高速AFMの高度化技術の開発とタンパク質の動作機序解析」, 2014~2018年度, 予算総額: 108,400,000円(計画班代表)
2. JST/CREST(ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術)「ATP/GTPが駆動するタンパク質マシナリーの動的構造生命科学」, 2013~2018年度, 予算総額: 96,875,000円(代表)

3. 科学研究費補助金・基盤研究(S)「高速 AFM が拓く新構造生物学」, 2012~平成 2016 年度, 予算総額: 165,800,000 円 (代表)
4. JST/先端計測分析技術・機器開発プログラム, 「プローブスキャン方式高速 AFM 用スキャナーの開発」, 2012~2015 年度, 予算総額 (予定) : 37,040,000 円 (サブリーダー)
5. ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム・研究 Grant, “Visualizing nanometer-scale structural plasticity of synapses in real time using AFM”, 2011~2015 年度, 予算総額: 30,000,000 円 (サブリーダー)
6. 科学研究費補助金・新学術領域研究「天然変性蛋白質」, 「天然変性タンパク質の新規構造解析法の開発」, 平成 2009~2013 年度, 予算総額: 39,000,000 円 (分担)
7. 文部科学省 地域イノベーション戦略支援プログラム・ほくりく健康創造クラスター (広域プログラム) 「高速バイオ AFM 国際コンソーシアム」, 2008~2012 年度, 予算総額: 41,673,000 円 (代表)
8. 文部科学省 地域イノベーション戦略支援プログラム・ほくりく健康創造クラスター, 「生きた細胞の微細構造動態を高速撮影する顕微鏡の開発」, 2008~2012 年度, 予算総額: 301,456,000 円 (代表)
9. 科学研究費補助金・基盤研究(S)「生命現象の解明に資する革新的高速 AFM の開発」, 2008~2011 年度, 予算総額: 149,800,000 円 (代表)

### 内橋

1. 科学研究費補助金・新学術領域研究「高速原子間力顕微鏡を用いた一分子操作と構造ダイナミクス制御」, 2014~2015 年度, 予算総額: 6,080,000 円 (公募研究代表)
2. 科学研究費補助金・新学術領域研究「高速 AFM を用いた Kai タンパク質の複合体形成過程のダイナミクス観察」, 2014~2015 年度, 予算総額: 6,210,000 円 (公募研究代表)
3. 科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究「高速 AFM による膜タンパク質の機能動態観察のための中空平面膜基板の開発」, 2014~2015 年度, 予算総額: 3,900,000 円 (代表)
4. 科学研究費補助金・基盤研究(A) 「高速 AFM/一分子蛍光複合機で明らかにするリング状 ATPase の協同的構造変化」, 2012~2014 年度, 予算総額: 40,480,000 円 (代表)
5. 科学研究費補助金・新学術領域研究 「少数分子生体システムの再構成-複合体構成分子の数の制御と理論検証-」, 2011~2015 年度, 予算総額: 24,000,000 円 (分担)
6. 科学研究費補助金・基盤研究(B) 「リニアモータータンパク質糖質加水分解酵素の 1 ナノメートルステップの 1 分子計測」, 2012~2014 年度, 予算総額: 1,500,000 円 (分担)
7. 科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究 「生体・人工ハイブリッド回転ナノモーターの創製」, 2012~2013 年度, 予算総額 (予定) : 1,200,000 円 (分担)
8. JST・先端的低炭素化技術 (ALCA) 「セルロース系バイオマスからの化成品原料と電気の複合生産」, 2011~2012 年度, 予算総額: 23,600,000 円 (分担)

### 古寺

1. JST・さきがけ「新規高速原子間力顕微鏡で解き明かすミオシン V の化学-力学エネルギー変換機構」, 2013~2015 年度, 予算総額: 39,000,000 円 (代表)
2. 科学研究費補助金・若手研究(B)「高速原子間力顕微鏡による脚の短いプロセシブミオシンの運動メカニズムの解明」, 2012~2014 年度, 予算総額: 3,600,000 円 (代表)
3. 財団法人中島記念国際交流財団 (日本人若手研究者研究助成金) 「高速原子間力顕微鏡による生体分子の機能メカニズムの研究」, 2012~2012 年度, 予算総額: 4,600,000 円 (代表)
4. 科学研究費補助金・研究活動スタート支援「高速原子間力顕微鏡によるミオシン 6 の運動メカニズムの解明」, 2010~2011 年度, 予算総額: 2,420,000 円 (代表)

### 渡辺

1. 科学研究費補助金 若手研究(B) 「イオン伝導顕微鏡による液中環境下での高速三次元ナノイメージング技術の開発」, 2014~2016 年度, 予算総額: 3,100,000 円 (代表)
2. 北陸銀行若手研究者助成金「ナノスケールの生体分子の速い動きを直接観測できる革新的ナノピペット顕微鏡の開発」, 2013 年度, 予算総額: 700,000 円 (代表)

## 福岡

1. 科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「窒化シリコンメンブレンを用いた力検出器による液中原子間力顕微鏡の飛躍的性能向上」, 2014~2016年度, 予算総額: 3,000,000円(代表)
2. 科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「液滴表面の自己組織化分子層のAFM その場観察の実現」, 2014~2015年度, 予算総額: 1,000,000円(分担)
3. 科学研究費補助金 若手研究(A)「高速・高安定三次元走査型力顕微鏡による水和・揺動構造変化のサブナノスケール計測」, 2013~2016年度, 予算総額: 18,500,000円(代表)
4. JST/知財活用支援事業 知財活用促進ハイウェイ「高速振幅・位相・周波数検出器を用いた液中原子分解能高速AFMの実用化」, 2013年度, 予算総額: 2,307,000円(代表)
5. JST/CREST 先導的物質変換領域(ACT-C)「CO<sub>2</sub>の資源化を実現するナノ構造を制御した光触媒電極の構築」, 2012~2018年度, 予算総額: 43,000,000円(分担)
6. JST/知財活用支援事業 知財活用促進ハイウェイ「三次元水和構造のサブナノスケール観察技術の実用化」, 2012年度, 予算総額: 2,396,000円(代表)
7. NEDO/産業技術研究助成事業(若手研究 Grant)「周波数変調ケルビンプローブ原子間力顕微鏡による固液界面での原子スケール表面構造・電位分布同時計測技術の開発」, 2009~2013年度, 予算総額: 58,000,000円(代表)
8. 科学研究費補助金 若手研究(A)「赤外分光法と原子間力顕微鏡の融合による液中での単一分子観察・同定技術の開発」, 2009~2011年度, 予算総額: 19,900,000円(代表)
9. 共同研究経費(JPK)「液中原子分解能観察が可能なFM制御方式AFMの開発」, 2011~2014年度, 予算総額: 190,800円(代表)
10. 共同研究経費(日立製作所), 2012~2014年度, 予算総額: 9,000,000円(代表)
  - 2012年度:「原子間力顕微鏡を用いた計測技術及び設備の開発」3,000,000円
  - 2013年度:「原子間力顕微鏡を用いた計測技術及び設備の開発」3,000,000円
  - 2014年度:「オープンループ顕微鏡等の液中計測の研究」3,000,000円
11. 共同研究経費(資生堂), 2012~2014年度, 予算総額: 5,714,400円(代表)
  - 2012年度:「AFMを用いた化粧品関連試料の測定」1,904,800円
  - 2013年度:「AFMを用いた化粧品関連試料の測定」1,904,800円
  - 2014年度:「AFMを用いた角層細胞の評価・解析」1,904,800円
12. 共同研究経費(荏原製作所), 2012~2014年度, 予算総額: 4,520,000円(代表)
  - 2012年度:「固液界面の表面電位評価方法の構築」1,260,000円
  - 2013年度:「固液界面の表面電位評価方法の構築」1,260,000円
  - 2014年度:「固液界面の表面電位評価方法の構築」2,000,000円
13. 共同研究経費(神戸製鋼所)「アルミ基材中の晶出物の溶解挙動」, 2014年度, 予算総額: 952,400円(代表)
14. 共同研究経費(JSR)「非水分散系顔料分子の界面吸着構造解析に関する研究」, 2014年度, 予算総額: 50,000円(代表)
15. 共同研究経費(デンソー)「FM-AFMを用いた固液界面における分子吸着現象の解明」, 2014年度, 予算総額: 476,200円(代表)
16. 共同研究経費(モレスコ)「FM-AFMを用いたHD表面の観察」, 2014年度, 予算総額: 600,000円(代表)

## 浅川

1. JST/さきがけ「ゲスト分子-空間空隙相互作用の原子スケール三次元AFM計測技術の開発」, 2014~2017年度, 予算総額: 39,730,000円(代表)
2. 科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「探針側方のナノ構造体を検知する非破壊AFMの開発と生体分子集合体計測への応用」, 2014~2016年度, 予算総額: 2,900,000円(代表)
3. JST/A-STEP(探索タイプ)「急峻勾配を有するナノ構造体の原子・分子分解能を実現するAFM手法の開発」, 2012~2013年度, 予算総額: 1,307,693円(代表)
4. 科学研究費補助金 若手研究(B)「三次元走査型原子間力顕微鏡による生体膜/生体液界面のナノ空間計測」, 2011~2013年度, 予算総額: 3,400,000円(代表)

## 紺野

1. 科学研究費補助金・新学術領域研究(研究領域提案型)「ユビキチンによるタンパク質翻訳後修飾のダイナミクス」, 2013~2014年度, 予算総額: 9,000,000円(代表)
2. 科学技術人材育成費補助金・テニュアトラック普及・定着事業(個人選抜型), 2011~2015年度, 予算総額: 75,000,000円(代表)
3. 科学研究費補助金・基盤研究(C)「葉緑体型ATP合成酵素の活性調節機構を構造の側面から理解する」, 2011~2013年度, 予算総額: 5,333,000円(代表)

## 中山

1. 科学研究費補助金・研究活動スタート支援「アクチンストレスファイバーの力学応答に伴う構造変化の高速AFM観察」, 2012~2013年度, 予算総額: 1,800,000円, 平成24年度: 1,000,000円(代表) 平成25年度は重複制限により辞退
2. 公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団「第27回基礎医学医療研究助成金」 「高速原子間力顕微鏡を用いたジストロフィン-アクチン線維複合体の動的構造変化の観察」, 2012年度, 予算総額400,000円(代表)
3. 科学研究費補助金・若手研究(B)「高速原子間力顕微鏡を用いたコラゲナーゼによるコラーゲン消化メカニズムの解明」, 2013年度, 予算総額: 3,100,000円(代表)

## 福森

1. 科学研究費補助金 新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」, 「磁気感応運動マシナリーの構造機能相関」, 2012~2016年度, 予算総額: 97,590,000円(代表)

## 田岡

1. 科学研究費補助金 若手研究(B)「磁性細菌の磁気微粒子合成に関わる新奇ヘム蛋白質の機能解明」, 2013~2015年度, 予算総額: 3,200,000円(代表)
2. 公益財団法人発酵研究所 一般研究助成「有用微生物に細胞内磁気微粒子の形成能を付与するための基盤研究」, 2012~2013年度, 予算総額: 3,000,000円(代表)
3. 科学研究費補助金 新学術領域研究「動く細胞と場のクロストークによる秩序形成」(公募研究), 2011~2012年度, 「磁場を感知するバクテリアの磁気オルガネラを支える細胞骨格」, 予算総額: 6,000,000円(代表)
4. 科学研究費補助金 若手研究(B), 2010~2012年度, 「原核細胞の磁気オルガネラの生細胞イメージング-形成・機能メカニズムの解明」, 予算総額: 3,100,000円(代表)

## 17. その他

### 学会開催

1. 第31回日本生化学会北陸支部大会, 2013年5月25日, 金沢大学角間キャンパス総合教育講義棟, オーガナイザー: 福森義宏(日本生化学会北陸支部長)
2. 第30回日本生化学会北陸支部大会, 2012年5月26日, 金沢歌劇座, オーガナイザー: 福森義宏(金沢大学)
3. 第29回日本生化学会北陸支部大会, 2011年5月28日, 金沢大学角間キャンパス総合教育講義棟, オーガナイザー: 福森義宏(金沢大学)

### シンポジウム開催

1. 3<sup>rd</sup> Kanazawa Bio-AFM Workshop, 2012年11月5-8日, KKR Hotel Kanazawa, オーガナイザー: 安藤敏夫(金沢大学)
2. 日本農芸化学会 2014年度大会 シンポジウム「生体超分子の視覚化による新しい世界の発見」, 2014年3月30日, 明治大学生田キャンパス, オーガナイザー: 伊藤政博(東洋大), 福森義宏(金沢大)

### 報道など

### 2014年

1. 北國新聞 2014年6月17日「バイオマス（キチン）再利用へ分解確認 金大チーム独自顕微鏡で世界初」内橋貴之，安藤敏夫

## 2013年

1. 科学新聞 2013年12月20日「金沢大 安藤教授に島津賞 高速原子間力顕微鏡を完成」安藤敏夫
2. 京都新聞 2013年12月18日「安藤教授を表彰 島津賞」安藤敏夫
3. 読売新聞 2013年12月8日「島津賞に安藤・金沢大教授 原子間力顕微鏡性能向上」安藤敏夫
4. 毎日新聞 2013年12月7日「生命科学で成果 安藤教授 島津賞」安藤敏夫
5. 京都新聞 2013年12月6日「島津賞に安藤教授 原子間力顕微鏡高速化」安藤敏夫
6. 日刊工業新聞 2013年12月6日「島津賞に安藤教授 生命科学で成果」安藤敏夫
7. 日経産業新聞 2013年12月6日「金沢大の安藤氏 島津賞に選出」安藤敏夫
8. 北國新聞 2013年12月6日「島津賞に安藤金沢大教授を選出」安藤敏夫
9. 北陸中日新聞 2013年12月6日「島津賞に安藤金沢大教授 原子間力顕微鏡など評価」安藤敏夫
10. Web News Nanotechnology Now 2013年1月4日 “The guide to biomolecular movie-making (Kanazawa, Japan)” 内橋貴之，古寺哲幸，安藤敏夫
11. 読売新聞石川・富山版 2013年11月1日「技術者の目」，福間剛士

## 2012年

1. 生物物理 (Vol.52, No.1)2012年1月30日，「支部だより 北陸支部からのたより」福間剛士，浅川 雅
2. 北國新聞 2012年1月27日，「2011年度[第2回]金沢大学プログラム日本海イノベーション会議」福間剛士

## 2011年

1. 北國新聞 2011年12月11日「宇宙，原子の最前線 研究者2人が解説」，福間剛士
2. Nature Nanotechnology Research highlights 2011年9月 “Molecular motors: Watching how they work” 内橋貴之，安藤敏夫
3. Nature Japan 2011年8月25日「原子分解能を持つ液中FM-AFM（周波数変調原子間力顕微鏡）でさまざまな物質の構造や性質を可視化する」福間剛士
4. 朝日新聞 2011年8月6日「細胞内命のモーター見えた 顕微鏡で金大」内橋貴之，安藤敏夫
5. 毎日新聞 2011年8月6日「たんぱく質モーター 仕組み解明 金大研究グループ」内橋貴之，安藤敏夫
6. 北國新聞 2011年8月6日「分子モーターの回転解明 ナノサイズ機器に応用へ 独自の顕微鏡で金大チーム」内橋貴之，安藤敏夫
7. 毎日新聞 2011年8月6日「セルロース分解低下の原因確認 金大 酵素分子観察に成功」内橋貴之，安藤敏夫
8. 北陸中日新聞「セルロース分解速度低下 原因は分子渋滞 金大など解明」内橋貴之，安藤敏夫
9. 北国新聞 2011年8月6日「バイオ燃料生産効率化へ セルロース分解の障害解明」内橋貴之，安藤敏夫
10. 読売新聞 2011年8月5日「細胞内の運び屋」仕組み解明 金大グループ 定説覆す」内橋貴之，安藤敏夫
11. 北陸中日新聞 2011年8月5日 「ナノレベルの仕組み金大グループが解明 生体分子モーターの回転」内橋貴之，安藤敏夫
12. 北國新聞 2011年8月5日「分子モーターの回転解明 ナノサイズ機器に応用へ 独自の顕微鏡で金大チーム」内橋貴之，安藤敏夫
13. Zurich Instruments 社 News Letter (Q2/2011) 2011年7月7日，“Subnanometers & Piconewtons” 福間剛士
14. 科学新聞 2011年6月24日「科研費による成果 タンパク質の構造ダイナミクスを高解像観察できる顕微鏡の開発に世界で初めて成功」安藤敏夫
15. 北陸中日新聞 2011年4月12日「金大2氏 文科相表彰 平尾氏，福間氏 技術向上に貢献」福間剛士
16. 北國新聞 2011年4月12日「金大の2氏に文科大臣表彰」福間剛士

## 2010年

1. 金沢経済新聞 2010年12月8日「金沢大がサイエンスセミナー，若手研究者，最先端科学の魅力伝える」浅川 雅
2. 北国新聞 2010年12月5日「最先端の研究紹介 金大セミナー」，浅川 雅
3. 日刊工業新聞 2010年12月3日「バイオ分野に貢献 山崎貞一賞を受賞」安藤敏夫
4. 朝日新聞 2010年10月11日「歩くタンパク質撮った 金沢大」古寺哲幸，安藤敏夫
5. 毎日新聞 2010年10月11日「歩くタンパク質 金沢大など動画撮影に成功」古寺哲幸，安藤敏夫
6. 北国新聞 2010年10月11日「歩くタンパク質撮影 金大安藤教授ら 高性能顕微鏡を改良」古寺哲幸，安藤敏夫
7. 日刊工業新聞 2010年9月29日「山崎貞一賞に安藤氏ら5人」安藤敏夫
8. 北陸中日新聞 2010年9月18日「安藤金沢大教授が山崎貞一賞を受賞 計測評価分野で功績」安藤敏夫
9. 北陸中日新聞，2010年年5月18日「磁場感知する細菌」田岡 東，福森義宏
10. 北国新聞，2010年5月18日「細菌の磁気感知構造解明」田岡 東，福森義宏
11. Nature 誌 (Vol.464, pp.38-39)2010年3月4日 “When mica and water meet”，福間剛士