

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「生命現象の解明と応用に資する新しい
計測・分析基盤技術」

研究課題「タンパク質のナノダイナミクス高速撮影
装置の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成16年10月～平成22年3月

研究代表者：安藤 敏夫
(金沢大学理工研究域数物科学系 教授)

§ 1 研究実施の概要

タンパク質の構造と機能メカニズムの解明のためにこれまで様々な技術開発が行われてきた。しかし、水中に在って機能している個々のタンパク質分子そのものを高い空間・時間分解能で直接見る技術は存在せず、タンパク質分子の構造が機能中にダイナミックに変化する様子をサブ分子スケールの解像度で連続的に観察することは不可能であった。この不可能を可能にする顕微鏡(高速バイオ AFM)を開発し、機能しているタンパク質分子を映像として捉えることを目標として、本チームは研究を開始した。

AFM は水中にある試料を高い空間分解能でイメージングできる唯一の顕微鏡であるが、従来の AFM は1画像を撮るのに分のオーダーの時間を要する。AFM は様々なデバイスからなり、それらデバイスのほとんどがイメージング速度(走査速度)を律する。そこで、それらデバイスすべての高速化に向けた最適化や高速制御技術を開発する必要があった。また、観察対象が脆いタンパク質であり、ナイーブな分子間相互作用を含むことが多いため、高速性と低侵襲性の両立という困難な課題を達成する必要があった。様々な技術開発と観察実験を並行して進めながら、装置の問題点を、観察実験を通して明確にし、それを解決する技術開発に取り組むという作業を繰り返した。その結果、イメージング速度の理論的限界にはほぼ達する高速バイオ AFM 装置を開発することに成功した。走査範囲にもよるが、ナイーブなタンパク質間相互作用をも乱さずに1画像を 40-70ms で撮ることが可能になった。

タンパク質の動態イメージングでは、装置そのものも重要であるが、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。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(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た。高速 AFM も含め AFM は溶液中に浮いている試料を見るができない。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。従って、試料にどのような工夫を加え、どのような基板を調製しなければならないかを十分に検討する必要があった。

上述の装置、試料系への工夫、種々の性質をもつ基板の開発を進めた結果、次のようなタンパク質の動態観察に成功した。モータータンパク質であるミオシンVがアクチンフィラメントに沿って運動する様子、光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン(bR)が光照射によって構造変化する様子、bRの2次元結晶と非結晶領域の境界部においてbRトライマーが結合・解離する動的平衡の様子、ストレプトアビジン2次元結晶中にある格子欠陥の異方性拡散の様子などを捉えることに成功した。また、最近注目されているタンパク質の天然変性(ID)領域の実態を捉えることにも世界で初めて成功し、ID 領域の物理的特性を明らかにした。細胞内で種々の機能をもつことが知られている AAA タンパク質 p97 の機能に関係すると思われる動的構造変化を捉えることにも成功した。もちろん、種々工夫したが最終的な動態観察にまだ至っていないタンパク質系もある。

以上のように、我々のチームのグループ間の強い連携と個々のメンバーの努力により、機能しているタンパク質分子のダイナミックな振舞いを鮮明な映像として捉えるという生命科学のひとつの夢を実現した。いくつかの試料系については、得られた映像を通して機能解明に迫ることに成功し、世界に先駆けて開発した高速バイオ AFM の有効性を見事に実証した。こうして、本チームは、装置開発の成功に留まらず、将来大きく発展が期待される新研究領域を開拓することにも成功した。

§ 2. 研究計画に対する成果

(1) 当初の研究構想

機能している個々のタンパク質分子の動態をサブ分子スケールの解像度で直接観察できる高速バイオ AFM 装置を開発するとともに、この新しい顕微鏡法の有効性をいくつかの興味あるタンパク質分子の動態撮影を通して実証することを目標とした。また、分子の形状以外の情報(電荷や硬さといった物性)のマップを得る手法や、探針と試料の接触を超高感度に検出する手法を開発することも目指した。

4グループ間の連携により目標を達成すべく以下のような計画を立案した。金沢大の安藤グループは、高速バイオ AFM 装置の開発、イメージング実験、及び、基板の開発を担当し、阪大の菅原グループは物性マップ取得手法と超高感度検出技術の開発を担当する。熊本大の小椋グループと阪大の森川グループはそれぞれ AAA タンパク質と DNA 結合タンパク質の調製を担当する。安藤グループの高速走査技術を菅原グループの AFM に導入し、また、菅原グループの開発する技術を安藤グループに導入することにより、高速バイオ AFM に多機能性を与える。また、装置開発と並行して、どのような試料系が高速 AFM の観察対象として興味もたれるか、また、どのような試料系が高速 AFM の観察に適しているかの検討を行い、モータータンパク質と膜タンパク質の他に、DNA 結合タンパク質と AAA タンパク質のいくつかの試料の発現を進める。調製した試料の試験観察を行い、装置上の問題点を見出し、その問題点を克服するためのデバイスや技術の開発を行うという手順を繰り返す。それにより、装置の高性能化を進める。また、試験観察を通して試料系や基板の最適化を進める。以上の連携研究を進め、研究開始後約3年で高速バイオ AFM 装置をほぼ完成させる。その後、対象とした試料系の中から有望な試料系を選択し本格的なイメージング研究を進め、開発した高速バイオ AFM の有効性を実証する。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

研究構想に基本的に大きな変更はないが、マイナーな修正が必要であった。DNA 結合タンパク質と AAA タンパク質を調製するグループとイメージングを行うグループが別であり、調製したサンプルを直ぐに観察できない。比較的スムーズにイメージング研究が進展した試料系はイメージングを担当しているグループが調製しており、調製と観察を同じグループで行った方が、遥かに効率がよいことは明らかであった。そこで、4年目後半に小椋グループと森川グループに高速バイオ AFM 装置を設置した。

DNA 結合タンパク質の中で天然変性 (ID) 領域をもつ FACT タンパク質を観察することは当初の計画にはなかったが、観察によって ID 領域の実態を可視化できたことは大きな収穫であった。ID 領域の構造動態は分子動力学計算による解析でしか予測されていなかったが、その実態を捉えたことは世界初の成果である。

大気中にある固定した細胞ではあるが、細胞内の構造を超音波と AFM を組み合わせて観察可能であることが、米国の研究者により 2005 年に報告された。我々はこの手法を高速バイオ AFM に取り入れることはしなかったが、今後研究を進めるべき有望な課題となった。

§3 研究実施体制

(○：研究代表者または主たる共同研究者)

(1)「金沢大・安藤」グループ

① 研究参加者

| | 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|---|-------|------|-------------------------|---------------|
| ○ | 安藤 敏夫 | 金沢大学 | 教授 | H16.10～H22.3 |
| | 内橋 貴之 | 金沢大学 | 准教授 | H16.10～H22.3 |
| | 山本 大輔 | 金沢大学 | CREST研究員 | H17.10～H22.3 |
| | 古賀 恵子 | 金沢大学 | CREST研究員 | H17.10～H18.9 |
| | 古寺 哲幸 | 金沢大学 | CREST研究員 | H16.10～H22.3 |
| | 宮城 篤 | 金沢大学 | 博士後期課程学生 H20.4 から研究員 | H17.4～H20.8 |
| | 柴田 幹大 | 金沢大学 | 博士研究員(学振特別研究員 SPD) | H20.4～H22.3 |
| | 山下 隼人 | 金沢大学 | 博士後期課程学生 (学振特別研究員) | H19.4～H22.3 |
| | 安藤 彰良 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H20.3 |
| | 高橋 尚久 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H20.3 |
| | 新田 晋 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H19.9 |
| | 鈴木 健介 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H21.3 |
| | 表 冴子 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H21.3 |
| | 中根健一郎 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H21.3 |
| | 斉藤 優太 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H20.3 |
| | 名倉 直希 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H20.3 |
| | 木下 達也 | 金沢大学 | 博士後期課程学生 | H17.10～H18.3 |
| | 中北 諒 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H17.10～H19.3 |
| | 伊藤 悠徳 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H17.10～H18.3 |
| | 谷口 雅昭 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H17.10～H17.11 |
| | 今井 将之 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H20.4～H22.3 |
| | 岡崎 康孝 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H20.4～H22.3 |
| | 小山 ゆり | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H20.4～H22.3 |
| | 山本 哲郎 | 金沢大学 | 博士前期課程学生 | H20.4～H22.3 |

② 研究項目

- ・ 高速バイオ AFM の開発
- ・ 高速バイオイメージング
- ・ 基板の開発

(2)「阪大・菅原」グループ

① 研究参加者

| | 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|---|-------|------|----------|--------------|
| ○ | 菅原 康弘 | 大阪大学 | 教授 | H16.10～H22.3 |
| | 影島 賢己 | 大阪大学 | 准教授 | H16.10～H22.3 |
| | 内藤 賀公 | 大阪大学 | 助教 | H16.10～H22.3 |
| | 李 艶君 | 大阪大学 | 特任研究員 | H17.4～H22.3 |
| | 小林 成貴 | 大阪大学 | 博士後期課程学生 | H17.4～H22.3 |
| | 油屋 吉宏 | 大阪大学 | 博士前期課程学生 | H17.4～H19.3 |

| | | | | |
|--|-------|------|----------|-------------|
| | 野村 光 | 大阪大学 | 博士後期課程学生 | H18.4～H20.3 |
| | 川上 雅代 | 大阪大学 | 博士前期課程学生 | H19.4～H21.3 |
| | 高橋 恒平 | 大阪大学 | 博士前期課程学生 | H21.4～H22.3 |

②研究項目

- ・物性マッピング機能の開発

(3)「熊本大・小椋」グループ

①研究参加者

| | 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|---|--------|--------------------|-------|--------------|
| ○ | 小椋 光 | 熊本大学発生医学研究所 | 教授 | H16.10～H22.3 |
| | 山中 邦俊 | 熊本大学発生医学研究所 | 准教授 | H16.10～H22.3 |
| | 江崎 雅俊 | 熊本大学発生医学研究所 | 助教 | H18.6～H22.3 |
| | 石躍 由佳 | 熊本大学発生医学研究所 | D4 | H18.4～H22.3 |
| | 城島 愛 | 熊本大学発生医学研究所 | D2 | H18.10～H22.3 |
| | 鬼武 彰宣 | 熊本大学発生医学研究所 | D1 | H20.4～H22.3 |
| | 笹川 洋平 | 熊本大学発生医学研究センター | 博士研究員 | H17.4～H20.12 |
| | 錦織 伸吾 | 熊本大学発生医学研究センター | 博士研究員 | H17.4～H18.3 |
| | 福永 里美 | 熊本大学発生医学研究センター | 技術補佐員 | H18.4～H19.3 |
| | 薬師寺 恭文 | 熊本大学発生医学研究センター | D2 | H16.10～H17.9 |
| | 奥野 貴士 | 富山大学大学院 医学薬学研究部 | 准教授 | H16.10～H22.3 |
| | 櫻井 敏彦 | 鳥取大学大学院工学研究科 | 准教授 | H17.4～H22.3 |

②研究項目

- ・AAA タンパク質の調製改変と AFM 観察

(4)「阪大・森川」グループ

①研究参加者

| | 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|---|-------|------|-------|--------------|
| ○ | 森川 耿右 | 大阪大学 | 客員教授 | H17.10～H22.3 |
| | 宮城 篤 | 大阪大学 | 特任研究員 | H20.9～H22.3 |
| | 石川 桃代 | 大阪大学 | 特任研究員 | H17.10～H22.3 |

② 研究項目

- ・DNA 関連タンパク質の調製改変と AFM 観察

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 高速バイオ AFM の開発(金沢大学 安藤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

4.1.1. 走査速度とイメージング速度の理論的考察

AFMのイメージング速度を律する因子は多数あり、高速AFMの開発のためには、それらをどの程度改善すればどの程度のイメージング速度を達成できるかを定量的に示す指針が必要である。その指針を得るために、達成できるイメージング速度と装置に含まれるデバイスの特性や走査条件との関係を与える理論式を導出した。このような解析的な式の導出は以前にはなかった。

【画像取得時間とフィードバック帯域との関係】

走査範囲 $W \times W$ を走査線数 N 本でイメージングするのにかかる時間を T とすると、X方向の走査速度は、 $V_s = 2WN/T$ で与えられる。試料が周期 λ のサイン波形状をしていると仮定すると、探針・試料間距離を一定に保つために試料ステージをZ方向にフィードバック走査する周波数は、 $f = V_s/\lambda$ で与えられる。フィードバック帯域 f_B は f 以上でなければならないので、式(1)が成り立つ。

$$f_B \geq 2WN/\lambda T. \quad (1)$$

式(1)は、画像取得時間 T とフィードバック帯域 f_B との関係を与える。例えば、 $T = 30$ ms、 $W = 240$ nm、 $N = 100$ とすると、X方向の走査速度は 1.6 mm/s となり、 $\lambda = 10$ nm の場合には、 $f_B \geq 160$ kHz の帯域が必要になる。

【色々な因子の関数としてのフィードバック帯域】

フィードバックのクローズドループの中にはいくつかのデバイスが含まれており、それぞれは或る有限の応答速度をもつ。従って、試料ステージの動きは試料表面を遅延なくトレースすることはできない。各デバイスの遅れ時間の総和(オープンループの遅れ時間 τ_{open})とクローズドループにおける遅れ時間 τ_{closed} の関係は、フィードバックのゲインがほぼ1に保たれる場合には、 $\tau_{closed} = 2\tau_{open}$ で与えられる。デバイスの主な遅れは、カンチレバーの振幅を計測にかかる時間 τ_a 、カンチレバーの応答時間 τ_c 、Zスキャナーの応答時間 τ_s 、PID制御回路でエラー信号を積分する時間 τ_I 、そして、パラシューティング時間 τ_p である。ここでパラシューティングとは、試料の急な降り勾配で探針が試料表面から完全に離れ、再着地までに時間がかかることを意味する。試料表面トレースの位相遅れ ϕ と τ_{closed} との間には、 $\phi = 2\pi f\tau_{closed}$ の関係がある。通常フィードバック帯域は 45° の位相遅れが生ずるフィードバック周波数で定義される。以上により、フィードバック帯域 f_B は以下のように表される。

$$f_B = \alpha \frac{f_c}{8} \left(1 + \frac{2Q_c}{\pi} + \frac{2Q_s f_c}{\pi f_s} + 2f_c(\tau_p + \tau_I + \delta) \right) \quad (2)$$

ここで、 f_c と f_s はそれぞれカンチレバー(水中)とZスキャナーの最低共振周波数、 Q_s と Q_c はそれぞれZスキャナーとカンチレバーのQ値、 δ は上述したデバイス以外の応答時間の総和、 α はPID回路の(比例+微分)による位相遅れ補償効果を表す。また、 $\tau_a = 1/(2f_c)$ 、 $\tau_c = Q_c/(\pi f_c)$ 、 $\tau_s = Q_s/(\pi f_s)$ を用いた。 τ_I と τ_p は色々なパラメータの関数で、解析的に表現することは難しいが、実験と理論的考察との照合により、以下のように求められた。

$$\tau_p = (\tan \beta / \beta - 1) / f_c, \quad (3)$$

$$\tau_I = 4h_0 \sin(\phi/2) / (A_0 f_c). \quad (4)$$

ここで、 β は

$$\beta = \cos^{-1} [A_0(1-r) / \{5h_0 \sin(\phi/2)\}] \quad (5)$$

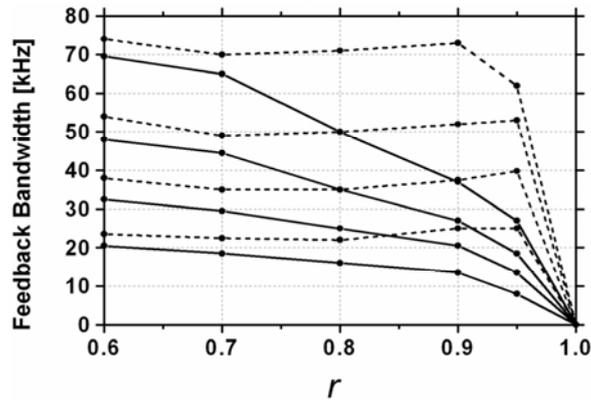


図 2: ダイナミック PID 制御と通常の PID 制御におけるフィードバック帯域の比較。破線はダイナミック PID 制御の場合、実線は通常の PID 制御の場合の実測値。各グループの曲線は上から $2A_0/h_0 = 5, 2, 1, 0.5$ の場合である。

4.1.3. 高速スキャナー

高速スキャナーを実現するためには、いくつかの条件が要求される。(a)高い共振周波数、(b)狭い周波数範囲内において少ない共振ピーク数、(c)十分な最大変位量、(d)小さい3軸間のクロストーク、(e)小さいQ値。これらの条件を満たすために我々が開発した技術を以下に述べる。

【スキャナーの機械設計とカウンターバランス】

ピエゾ素子の速い変位はその支持部に激力を及ぼし、支持部とその周囲の機械部を振動させ、その結果ピエゾ素子も振動する。振動を軽減するために、カウンターバランス法をZスキャナーに導入した。Zスキャナーのカウンターバランスの仕方には2つの方法がある。(1)2つのZピエゾを同時に、同じ距離だけ反対向きに変位させる、(2)ひとつのピエゾ素子の固定法を工夫して、質量中心が変位しないようにする。我々はこれまで、小さいピエゾ素子の固定が容易な(1)の方法を採用してきた。図1、2、及び図3aのデータはこの方法で製作したZ-スキャナーを採用した場合である。用いたピエゾ素子の自由振動の共振周波数は約 400kHz であるが、ピエゾ素子の片端を固定しているため、共振周波数は 171 kHz にまで下がっている(図3a)。

小さいピエゾ素子を変位する方向の中央で固定することは困難である。いくつかの固定法を試みたところ、Zピエゾの変位方向に平行な4辺を固定する方法が最も有効であった。利用できる最大変位は、片面固定の場合の半分になる。しかし、固定による共振周波数の低下はほとんど起こらず、自由振動の共振周波数をほぼ維持でき、実際、共振周波数 370 kHz を達成した(図3b)。

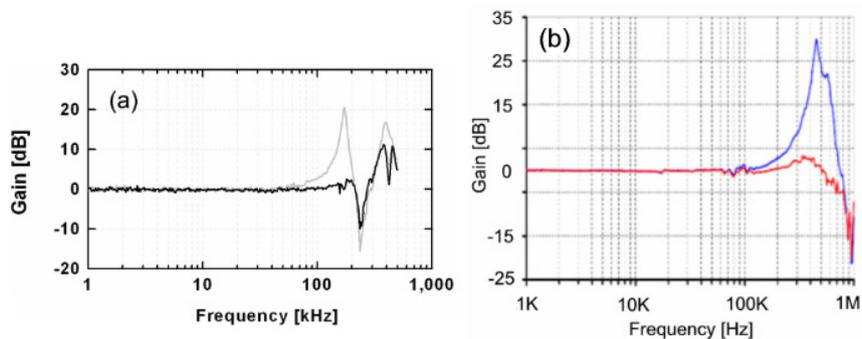


図 3: Z スキャナーの共振スペクトル。(a)灰色実線、Z ピエゾの片端固定方式のカウンターバランスの場合、(b)青線、ひとつの Z ピエゾの4辺固定の場合。(a)の黒実線と(b)の赤線は後述。

Xピエゾについては、両端をフレクチャーで挟むカウンターバランス法を採用している(図4)。スキャナーの構造に由来する共振周波数は、コンパクトな構造と大きな(ヤング率/密度)比で高くできるが、コンパクトな構造は3軸間のクロストークを生じ易い。我々は、変位方向に柔らかく、変位に

直角な方向に硬いフレクチャー(板ばね)を用いた。共振ピークの数減らすために、ピエゾ素子を除くすべての部分を一体加工した。

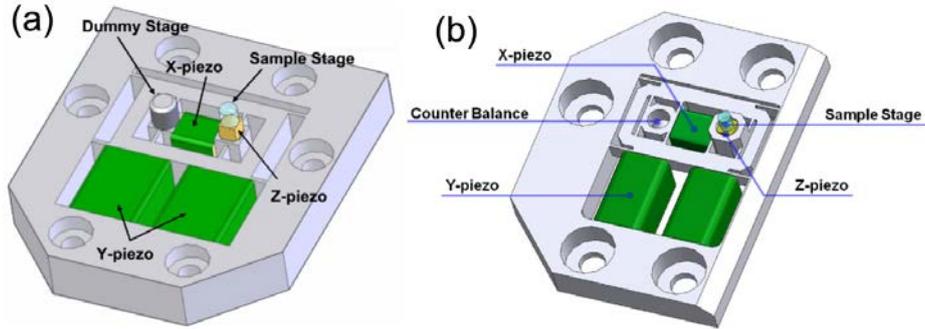


図 4: 高速スキャナーの構造。(a)2つの Z ピエゾを片端固定するカウンターバランス方式を採用した高速スキャナー(反対側の Z ピエゾは隠れている)、(b)ひとつの Z ピエゾの4辺を固定するカウンターバランス方式を採用したスキャナー。

【アクティブダンピング】

ピエゾドライブ信号に含まれるハーモニック周波数付近で共振を起こさないスキャナーを作ることには不可能である。それ故、望ましくない振動を除くアクティブダンピングは必須である。また、機械的・材質的制約により周波数帯域は限られるので、この限界を破りスキャナーの帯域を延ばすフィードフォワード法が必要である。

Xスキャナーのように周期的に走査する場合には、フィードフォワード法は容易に適用できる。振幅 X_0 、角周波数 ω_0 の X 走査波形(2等辺三角形の繰り返し)のフーリエ変換 $F(\omega)$ は

$$F(\omega) = 2\pi X_0 \left[\frac{1}{2} \delta(\omega) - \frac{2}{\pi^2} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \frac{1}{k^2} \delta(\omega - k\omega_0) \right] \quad (k : \text{odd}) \quad (6)$$

で与えられる。Xスキャナーの伝達関数を $G(\omega)$ とすると、 $F(\omega)/G(\omega)$ の逆フーリエ変換

$$X(t) = \frac{X_0}{2} - \frac{4X_0}{\pi^2} \sum_{k=1}^{+\infty} \frac{1}{k^2} \frac{1}{G(ik\omega_0)} \cos(k\omega_0 t) \quad (k : \text{odd}) \quad (7)$$

に比例する信号をドライバーに送ればよい。逆フーリエ変換に含まれる無限級数は、最初の10項程度を取れば十分である。この手法を実際のXスキャナーに適用した場合の結果を図5に示す。フィードフォワード制御をしない場合には、Xスキャナーの構造に由来する 60 kHz の共振が現れ(a)、それがZ方向の振動となって像に縦縞が生ずる(c)。制御した場合には共振は現れない(b, d)。上記の手法は有効であるが、三角波の角を丸めた波形でドライブする方法も有効である。角はイメージ像の左右両端に対応するため、丸めの影響は少ない。

Z走査に対しては予め走査波形を知ることができないため上記のような制御はできない。フィードバック法をZスキャナーに適用した場合、Zスキャナーの変位もしくは速度を計測しなければならないが、実際には非常に難しい。そこで、実際のZスキャナーとほぼ同じ伝達関数をもつ擬似スキャナー(LRC回路)の出力を利用する方法を我々は開発した。図3aの黒実線、図3bの赤実線はこのアクティブダンピング法を適用した場合の共振スペクトルである。この方法は極めて有効であるが、ピエゾ素子の共振周波数以上に帯域を伸ばすことはできない。そこで、逆伝達関数によるフィードフォワード制御によって共振を消すとともに帯域を伸ばす手法を検討した。この手法では、Zスキャナーの逆伝達関数と同じ特性をもつ回路を作製しなければならないが、その作製は容易ではない。そこで、擬似スキャナーを用いて、逆伝達関数を自動生成する回路を開発した。図6aの回路は、回路に遅れがなければゲイン $g = 1$ にすることができ、理想的な逆伝達関数を与える。実際にはアンプの遅れなどにより理想的な逆伝達関数にはならない。そこで、図6bのように、ひとつの擬似スキャナーを利用して多段ループにすることにより、理想的な逆伝達関数に近づける手法を開発した。

図7にこの手法をZスキャナーに適用した効果を示す。高周波側の振動のゲインが高くなっているが、 piezo素子自身もつ帯域以上の帯域が実現されている。この手法はpiezoのような2次共振系に適用するには若干無理があるが、熱伝達遅れのような1次遅れ系では効果的である(後述)。

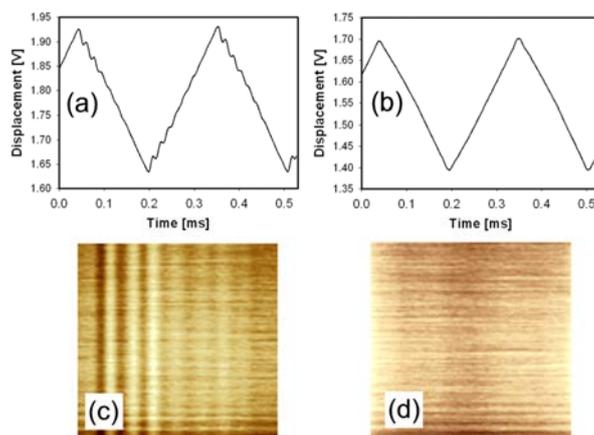


図5: Xスキャナーの振動の逆伝達フィードフォワード補償の効果。(a, b) Xスキャナーの変位波形。(c, d) 平滑な表面のイメージング像。左(a, c)はフィードフォワード補償のない場合。右(b, d)はフィードフォワード補償を施した場合。

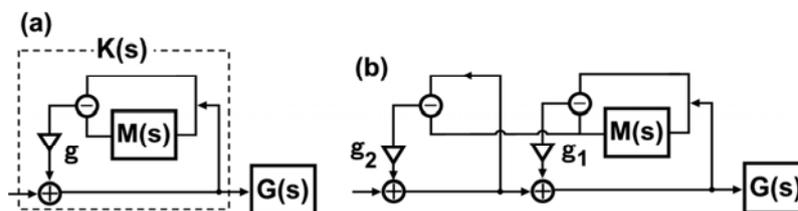


図6: 逆伝達関数自動生成回路のブロック図。(a) 単一ループタイプ。(b) 多重ループタイプ。 $M(s)$ は擬似Zスキャナー、 $G(s)$ はZスキャナー。実際には、位相遅れ補償用の(1+微分)回路や高周波ノイズ除去用のローパスフィルタないしはノッチフィルタを含む。

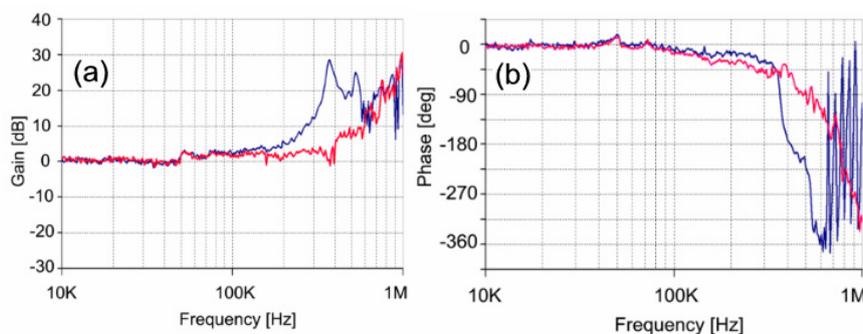


図7: 4辺固定のZスキャナーに逆伝達関数自動生成回路を用いたフィードフォワードアクティブダンピングを施した効果。(a) ゲインスペクトル、(b) 位相スペクトル。青線:ダンピングなしの場合、赤線:ダンピングありの場合。

4.1.4. 振幅計測回路

カンチレバーの振幅を半共振周期毎に計測するために、サイン波振動のピークとボトムの電圧値をサンプル・ホールド(S/H)し、その差を振幅値として出力する回路を我々は以前開発した(ピークホールド法)。この方法は最速であり、現在でもイメージングに用いているが、2つのタイミングだけでセンサー信号を捉えるため、ノイズを拾い易い。そこで、1周期で振幅信号を生成するフーリエ法を開発した。センサー出力信号の基本波成分のフーリエサイン・コサイン係数(A , B)を計算し、 $\sqrt{A^2 + B^2}$ を出力する。アナログ回路では平方根出力回路は実用的でないため、参照信号を励振信号に同期させて、位相をゼロに調節してフーリエコサイン成分だけを取り出す方法を採用した。この方法を実際に調べたところ、電気ノイズレベルは上述のピークホールド法と同程度であった(図8a)。しかし、フーリエ法では、カンチレバーの熱揺らぎ変位が平均化されるため、熱揺らぎの影響が小さく、ピークホールド法よりも優れている(図8b)。更にノイズを減らし、位相調整の不要なアナログ・デジタルハイブリッド方式のフーリエ回路の開発にも最近成功した。

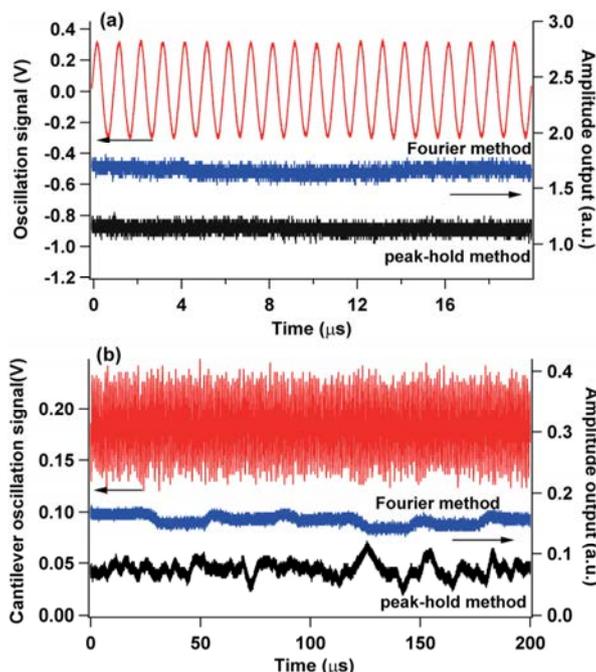


図 8: 2つの振幅計測法(ピークホールド法とフーリエ法)のノイズレベルの比較。赤線:入力信号。(a) 電気ノイズの比較。クリーンなサイン波とホワイトノイズ(実際の分割フォトダイオードセンサー出力のノイズレベル程度)を検出器に入力した。(b) 検出されたカンチレバーの振幅信号。

4.1.5. ドリフト補償

ダイナミック PID 制御により、セットポイント A_s をカンチレバーの Peak-to-peak 自由振動振幅 $2A_0$ にかなり近づけてもパラシューティングが起こらず鮮明な画像が得られる。しかし、例えば、 $A_0 = 1 \text{ nm}$ 、 $r = 0.9$ とした場合の両者の差 ($2A_0 - A_s$) は 0.2 nm しかない。従って、カンチレバーの自由振動振幅をサブオングストロームレベルで一定になるように、カンチレバーの励振効率を一定に維持する必要がある。しかし、カンチレバーの励振効率はドリフトするため、このような高い精度で効率を維持することは不可能である。例えば、励振効率が下がり自由振動振幅が小さくなると、装置は探針と試料との接触が強くなったものと判断し、フィードバックにより試料ステージを探針から遠ざけてしまう。ドリフトがサブナノメートルあれば、試料は探針から完全に解離し、イメージングが不可能になる。従って、ダイナミック PID 制御法の利点を生かすには、自由振動振幅を一定に保つように励振効率のドリフトを補償する必要がある。しかし、走査中に自由振動振幅を計測できない。そこで、励振効率のドリフトによる探針・試料間の接触の強さの変動をモニターするために、カンチレバー振動の 2 次共振振幅をモニターし、それが一定になるように励振パワーを調節する制御を試み

た。図9にカンチレバーの振動スペクトルを示す。1次成分に較べて極めて小さいものの2次共振を観測できた。そこで、2次共振振幅をロックインアンプで計測し、時定数が1-2秒の積分制御だけで2次共振振幅を一定に保つ制御を行った。この時定数は高速AFMの1画像取得時間よりも十分長いので、試料の凹凸に起因する2次共振振幅の変動に影響されず、自由振動振幅を一定に保つことができる(実際に自由振動振幅を検出できないが)。この制御法の効果を調べた結果を図10に示す。3分間連続にイメージングし、3分後に積分制御を切った。積分制御を切ると画像が撮れない。これは励振効率が3分後にはかなり落ちていて、自由振動振幅が0.4nm以上小さくなり、探針が試料から完全に離れたためである。この制御により、セットポイントを自由振動振幅にかなり近づけても長時間安定なイメージングができるようになった。

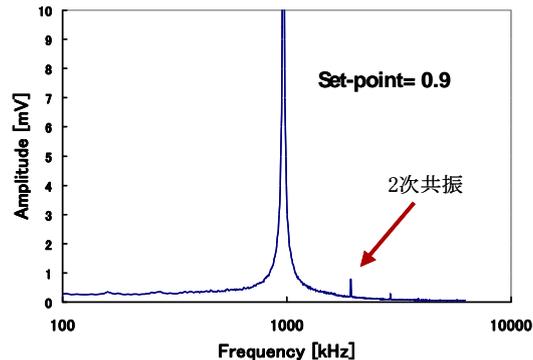


図9: 共振周波数で励振させたカンチレバーの探針を基板に接触させて、その振幅が自由振動振幅の90%になるようにしたときの、カンチレバー振動のパワースペクトル。

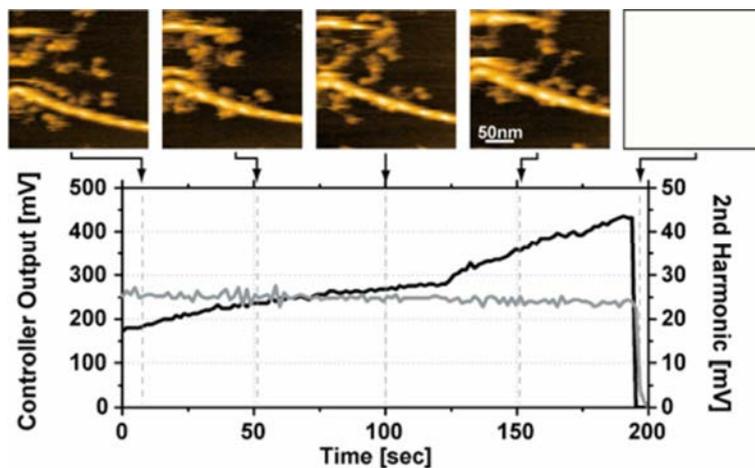


図10: 励振効率のドリフト補償の効果。黒い線: 積分制御の出力(ドリフトを表す)、灰色の線: 2次共振振幅(探針と試料との接触の程度が一定に維持されている)。試料はミオシンV+アクチンフィラメント。フレームレート=10/s、 $2A_0 - A_s = 0.4$ nm。

4.1.6. 高速位相検出法

我々はタンパク質試料の動的形状変化を高速に捉えるばかりでなく、物性マップの変化をも高速に捉えることも目標にした。探針・試料間相互作用はカンチレバーの振幅ばかりでなく、位相(励振信号とカンチレバーの振動との位相差)や共振周波数にも反映され、試料の凹凸以外の情報を位相や周波数検出により観測することがこれまで行われている。位相の変化は2つの異なるメカニズムで起こる。ひとつは、探針・試料間相互作用力 $F(z)$ の勾配 $k' = \partial F(z) / \partial z$ により、カンチレバーのばね定数 k が見かけ上 $k - k'$ に変化する。斥力 ($k' < 0$) ではばね定数は増加し、引力 ($k' > 0$) で

は減少する。その結果、カンチレバーの共振周波数は $\Delta f_c \approx -0.5f_c k'/k$ に従って変化する。すなわち、共振周波数変化は、カンチレバーの共振周波数が高ければ高いほど、ばね定数が小さければ小さいほど大きくなる。従って、高速AFM用の微小カンチレバーはこの点で通常のカンチレバーよりも有利である。励振周波数が固定の場合 (AM 法と PM 法) には、共振周波数の変化により振幅と位相が変化する。小さい共振周波数の変化を大きな位相の変化として捉えるためにはカンチレバーの Q 値を大きくする必要がある。Q 値が大きいと振幅の応答速度は遅いので (共振周波数、位相の変化は Q 値に依存せず速やかに起こる)、高速走査には向かない。カンチレバーの振動信号そのものを励振信号に用いる FM 法では励振周波数は共振周波数に常に一致し、位相差は 90 度に固定されているので、共振周波数の変化自身を検出する。位相が変化するもうひとつのメカニズムでは、探針・試料間の粘性抵抗係数 γ' が水溶液の粘性抵抗係数 γ に加わり、その結果、位相 δ が $\delta \gamma'/\gamma$ だけ変化する。高速走査用微小カンチレバーはサイズが小さく、その結果、水溶液の粘性抵抗係数は小さい。従って、探針・試料間の粘性抵抗を敏感に感ずる。

FM 法ではカンチレバーの自励振動を用いるため、カンチレバーの Q 値と振幅を独立に制御できない。Q 値を制御できなければ高速イメージングに向かない。そこで、AM 法を微小カンチレバーに適用し、高速に物性マッピングが可能かどうかを検討した。微小カンチレバーならば大きな共振周波数のシフトが起こり、その結果 Q 値が小さくても比較的大きな位相シフトが検出できると期待されるが、この位相シフトを高速に検出しなければならない。従来の手法ではこの位相シフトをロックインアンプで検出するため、検出に時間がかかる。そこで、新しい高速位相検出法を開発した (図 11)。この装置を用いて微小カンチレバー探針がマイカ表面に接触したときの位相シフト量を計測した結果、期待した通りの大きな位相シフトが起こった。位相シフトの方が振幅の変化よりも、探針・試料間相互作用に対して 3 倍程度感度が高かった。また、位相検出速度は従来の PLL 方式に比べ遥かに高かった。

ここで開発した高速位相検出器の主要なノイズは、フォトダイオードセンサーの電圧ノイズに起因するジッターである。ホワイトノイズ V_{RMS} を含むサイン波のジッター Δt_{RMS} は

$$\Delta t_{RMS} = \frac{V_{RMS}}{2\pi A f_{osc}}. \quad (8)$$

であり、S/H 回路のトリガータイミングの時間揺らぎを起こす。従って、位相エラーは

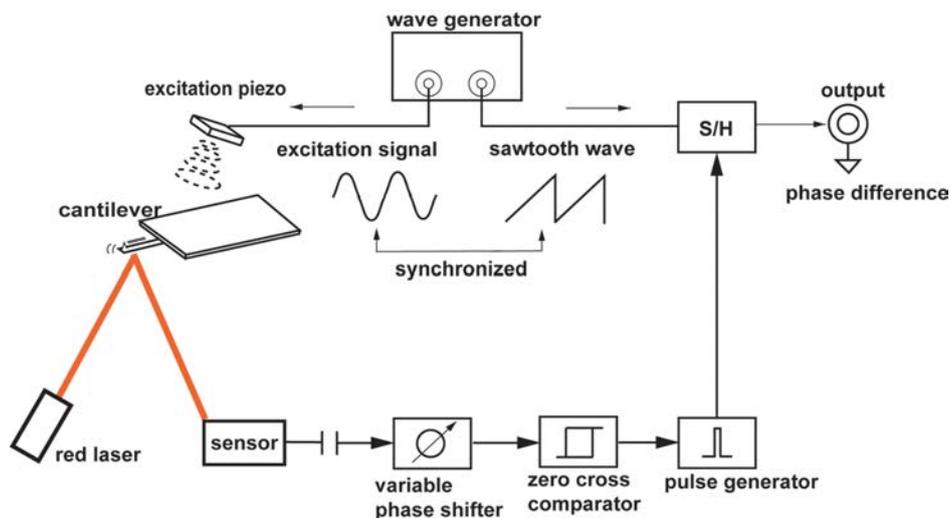


図 11: カンチレバー振動の高速位相検出法。位相調整できる 2ch 信号発生器からカンチレバー励振用のサイン波とのかぎり波を発生させる。センサーの信号を位相シフトさせたあとゼロクロスコンパレーターを用いてゼロクロス点でパルスを発生させる。このパルスによりのかぎり波の電圧をホールドする。すなわち、のかぎり波は位相電圧変換器として働く。カンチレバー振動の1周期ごとに位相を検出できる。また、位相調整をすることで、1周期の任意のタイミングで位相を検出することができる。

$$\Delta P_{RMS} = \frac{V_{RMS}}{2\pi A} \times 360^\circ = \frac{360^\circ}{2\pi(SNR)} \quad (9)$$

で与えられる。ここで、 A と f_{osc} はそれぞれ、サイン波の振幅と周波数である。ここで、 SNR はセンサーのS/N比であり、数MHzの帯域をもつ我々のセンサーではその値は17である。これは 3.3° の位相に対応する。実際のイメージングの帯域幅は100 kHz程度であり、ローパスフィルターを用いれば、位相ノイズを減らし、位相検出感度を上げることができる。この高速位相検出器を使った位相イメージングの結果は後述する。

4.1.7. カンチレバーの光駆動

Zスキャナーの帯域は用いるピエゾ素子の共振周波数でほぼ決まってしまう、せいぜい400 kHzが限界である。一方、微小カンチレバーの共振周波数は水中で1.2 MHzある。従って、カンチレバー自身を駆動することができれば、フィードバック帯域を上げることができ、結果、イメージング速度が向上する。カンチレバーを直接駆動することは、磁気力や100-300MHzの超音波圧を利用した試みが既に行われている。しかし、磁気力の利用の場合、カンチレバーの磁性コートや磁気ビーズの接着によりカンチレバーの共振周波数が下がってしまう。また、高い帯域をもつ磁場発生器を作ることも難しい。超音波圧の場合、試料にも超音波圧が作用するという問題がある。そこで、カンチレバーの光駆動を検討した。照射した光の一部がカンチレバーに吸収され熱に変換される。カンチレバーは金コートされているためバイメタルのように熱膨張してたわむ。

光駆動用の光源として、0-10 MHzの周波数範囲で強度変調できる980 nm IRレーザーを用いた。DC変位率は1.1 nm/mwであった。200 mWレーザーの光路中での光損失から、120 nmの最大変位が限界であった。405 nmのレーザーの場合にはこの10倍の変位が得られるが、タンパク質試料を不活性化してしまう問題があった。

予想したように、光照射に対するカンチレバーの変位応答は遅かった。矩形パルス照射した場合のカンチレバー変位応答はダブル指数関数で表され、その時定数は8.4 μ sと123 μ sであった(図12の挿入図)。この遅い応答は図12bの周波数応答スペクトルでも明らかである。図12aに示すように、逆伝達関数自動生成回路を用いた逆伝達補償より、これらの遅延をなくすことができた。 $2A_0/h_0 = 5$ の条件で、水中共振数端数1.2 MHz、Q値3の微小カンチレバーを用いて100 kHzのフィードバック帯域が得られた。共振周波数170 kHz、Q値0.5のピエゾを使ったZスキャナーの場合よりも43%高い。この高いフィードバック帯域により、 $240 \times 240 \text{ nm}^2$ の走査範囲、100本の走査線の条件で、ミオシンVを32 frames/sで撮影することができた(図13)。

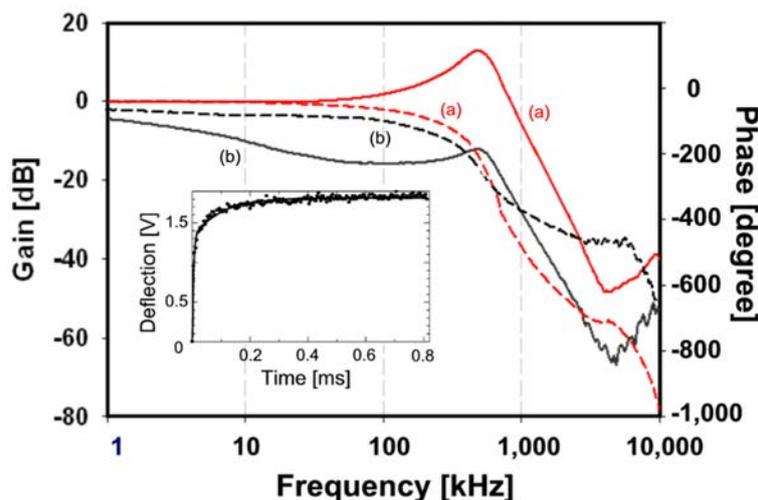


図 12: 逆伝達補償あり(a)となし(b)の場合の、強度変調 IR レーザーで駆動された微小カンチレバーのゲイン(実線)と位相(破線)の周波数スペクトル。挿入図: 逆伝達補償なしで、矩形波で変調されたレーザーで駆動されるカンチレバー変位の時間応答。

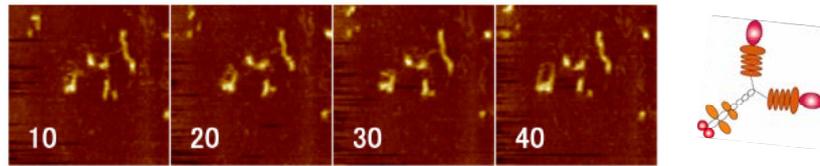


図 13: ビデオレートで撮影したミオシンVの AFM 像 (走査範囲 240 nm)。

4.1.8. ライン走査毎のフィードフォワード制御

ダイナミック PID 制御法はセットポイントを自由振動振幅に近づけてもフィードバック帯域がほとんど落ちないという優れた効果をもつ。しかしながら、試料の高さと自由振動振幅の比に対しては効果がない(図 2)。探針から試料にかかるタッピング力を小さくするためには、カンチレバーの自由振動振幅を小さくする必要があるが、試料の高さに較べて小さくするとフィードバック帯域は下がってしまう。試料が高い場合にはダイナミック PID のゲインを大きくできるが、試料には低いものと高いものが混在するのが普通であるので、ゲインを大きくすると低い試料に対してはパラシューティングを誘導してしまう。従って、探針・試料間に働く力を極めて小さくして高速走査を行うには、ダイナミック PID 制御だけでは不十分である。そこで、ライン走査毎のフィードフォワード制御法を導入することにした。1 ライン走査して試料の凹凸情報を記録し、その記録に基づき次のライン走査において試料ステージを上下させつつ、試料の凹凸情報を記録する方法である。隣り合う2つのライン間の試料の高さの差は小さいと考えられ、フィードフォワード制御は探針から見た試料のみかけの高さを低くする効果をもつ。試料が動いている場合には有効ではないか、或いは、逆効果になる可能性もあるが、高速 AFM での 1 ライン走査にかかる時間は短く、この時間内における試料の移動量は小さく、ほぼ試料が固定されているとみなすことができる。製作したフィードフォワード回路の構成図を図 14 に示す。コンピュータを介さず回路だけで制御を行っている。フィードバック制御の出力信号にエラー信号を加えたものを試料の高さ情報にしている。エラー信号を加えないと、実際の試料の形状とフィードバック信号との位相差がフィードフォワード出力信号に積算されていき、時間とともに位相差が増えていってしまうためである。また、フィードフォワード出力信号には1以下のゲインをかけている。これは2ライン間の高さの差がゼロではないので、そのまま出力すると却って逆効果の信号を出力してしまう可能性を回避するためである。

図 15 にフィードフォワード制御の効果を示す。縞を斜めにしても効果が見られる。但し、下段のように、縞を 45 度以上水平に近づけると効果が見られず、PID フィードバック制御が試料の高さをフルに調節してしまう。X方向の縞の周期を変えて、X走査による凹凸の時間周波数を変えて、フィードバック制御の位相がどれだけずれていくかを、フィードフォワード制御の有無で比較すると、図 16 に示すように、フィードフォワード制御により位相遅れの劇的な減少が見られた。

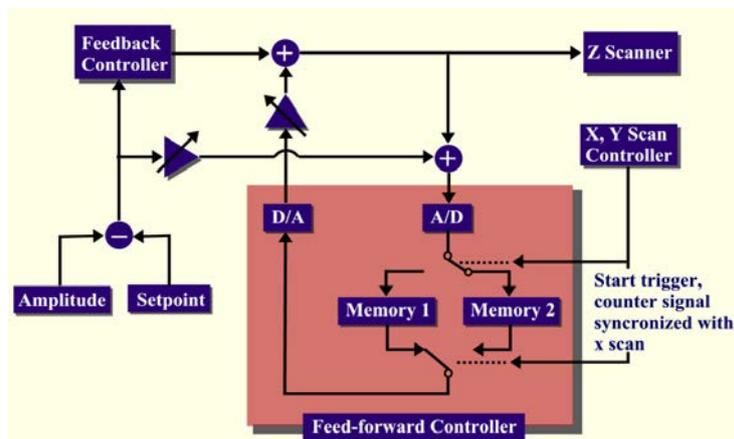


図 14: フィードフォワード制御回路のブロックダイアグラム。2系統のメモリーを交互に切り替えて、凹凸情報の読み込み、書き出しを行っている。

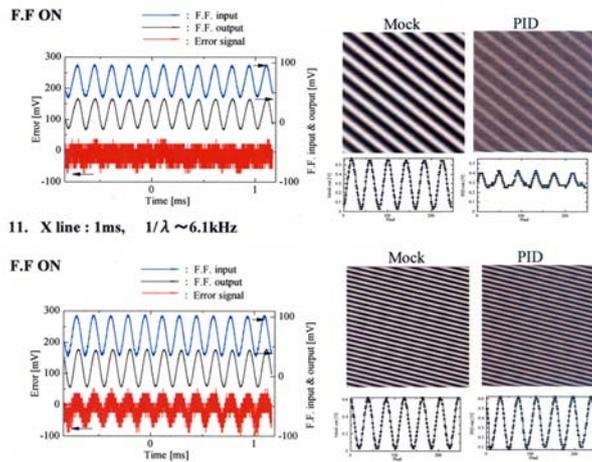


図 15: 縞状の試料の走る向きを変えた場合のフィードフォワード制御の効き方の違い。45 度 (上段) に走っている場合でも効果的でエラー信号は小さく、PID 制御はあまり試料の高さを調節していない。更に縞が走る方向を水平に近づけると(下段)、フィードフォワード制御は効果がなく、PID 制御がフルの制御をしてしまう。

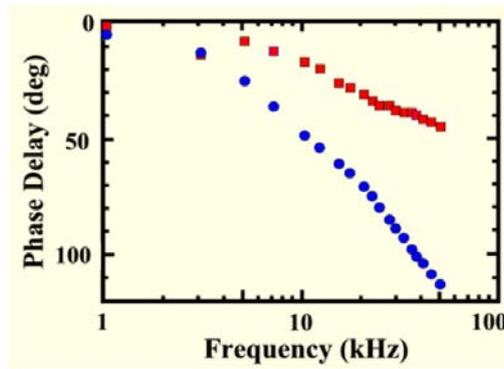


図 16: フィードバック帯域に与えるフィードフォワード制御の効果。セットポイントを 0.98 に設定している。フィードフォワード制御がない場合(●)にはフィードバック帯域(45 度の位相遅れが生ずる周波数)は 9kHz しかないが、フィードフォワード制御がある場合(■)は 51kHz にまで上がっている。

以上により、Y 方向に試料の高さの変化がそれほど大きくない場合には 1 ライン毎のフィードフォワード制御により、試料の見かけの高さが低くなり、PID 制御による試料ステージの高さ調節は小さくなり、フィードバック制御の負担が減少する。従って、フィードバック帯域が向上することが明らかになった。

4.1.9. その他の技術開発

【微小カンチレバーと探針】

微小カンチレバーの開発は、オリンパスが代表者を務めるJSTの先端機器開発事業において同時並行で進んでいたため、CRESTでは行わなかった。但し、オリンパスの微小カンチレバーの探針部分は十分に先鋭化されていない。そこで、先鋭化探針の作成法を以下3つの手法で検討した。(a)カーボンナノチューブ(CNT)をCVD法でカンチレバーに直接成長させる方法、(b)EBD法による探針成長と先鋭化エッチング、(c)Arイオンビーム法でカンチレバーにカーボンナノファイバー(CNF)を直接成長させる方法。

エタノールを炭素源とし、コバルトを触媒として真空加熱装置内でCNTをカンチレバーに成長さ

せた。元々ある探針にコバルトが集中し、そこからCNTが成長することを期待した。図17aに示すような理想的なCNT成長も見られた。しかしこのような探針ができる確率は低く、貴重な微小カンチレバーを無駄にしてしまうため、この方法は断念した。

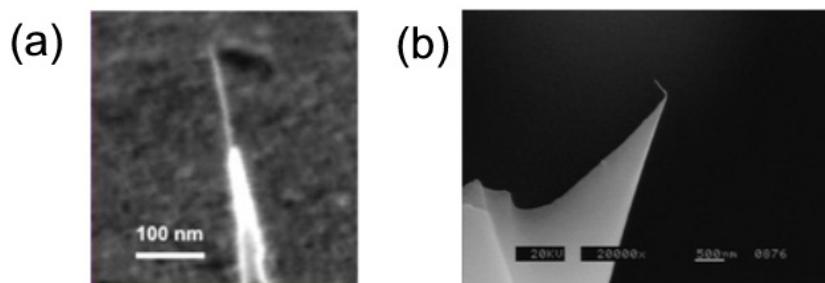


図 17: (a) CVD 法でカンチレバー探針に直接成長させた CNT 探針の SEM 像。(b) Ar イオン照射法でカンチレバー探針に直接成長させた CNF 探針の SEM 像。

名工大の種村研究室で最初に見出された CNF 成長の手法も試みたが、市販されている大きいカンチレバーではうまくいくものの、微小カンチレバーのように厚さが 90 nm しかない薄いものではイオン照射中にカンチレバーが曲がってしまい。それ故、探針の向きを制御することができなかった。

カンチレバー1本ずつに EBD 探針を作成するのは面倒であるが、確実な方法である。直径 0.1 mm の穴がたくさん空いたふたをもつ容器を作成し、その中に昇華物を入れる。それを SEM のチャンバー内に入れ、ふたの上にカンチレバーを置いて電子線をスポット照射する。最初は昇華物としてナフタレンを用いていたが、その EBD 探針を先鋭化したものは脆いことが分かった。そこでいくつかの昇華物を検討したところ、フェノール結晶が比較的丈夫な探針を形成することが判明した。この方法での EBD 探針の成長速度は約 20 nm/s で、先端曲率半径は約 17 nm であった(図 18)。これを Ar ガス雰囲気下で 16W のパワーでプラズマエッチングを 8 分間施すと、先端曲率半径は約 5 nm となった(図 18c)。

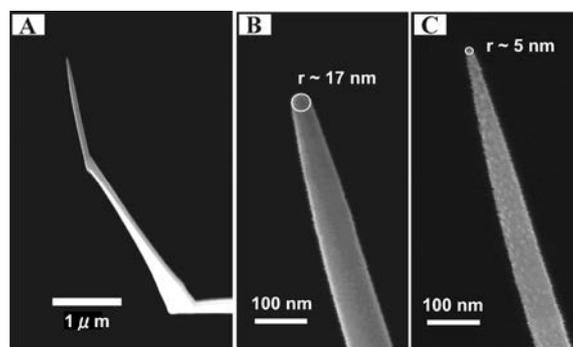


図 18 : (A) フェノールを原料として成長させた EBD 探針の SEM 像。デポジション時間は 90 秒。FE-SEM の加速電圧は 20 kV、作動距離 4 mm、アパーチャーは 30 μ m である。(B) エッチング前の探針先端。(C)エッチング後の探針先端。

【探針・試料間接触力の軽減化 (力検出)】

ナイーブなタンパク質間相互作用をも乱さずにタンパク質の機能動態をイメージングするためには、探針から試料に作用するタッピング力を小さく維持する必要がある。上述したようにカンチレバーの振幅よりも位相の方が探針・試料間接触に敏感であるが、硬い基板と柔らかいタンパク質試料では前者の方が位相変化は大きい。従って、位相信号をフィードバックに用いると試料の高さ情報が不正確になる。そこで、他の高感度検出法がないか検討した。

探針・試料間接触により高調波が生ずるが、振幅・位相の検出ではこれを有効に利用していない。カンチレバー振動の振幅や位相を変化させる要因は、力積(力×時間)であり、また、接触はカンチレバー振動周期の 1/10 程度以下の時間(100 ns 以下)内で起こるため、激力としては小さいが、作用する力のピーク値は大きい。従って、力のピークを検出することができれば、接触を高感度に検出できるはずである。しかし、力の周波数成分は、カンチレバーの基本振動周波数 f_c の整数倍(高調波)に亘っており、それらの成分を取り出して加算する必要がある。すなわち、

$$f(t) \approx \sum_{n=1}^{\infty} (1 - n^2) (A_n \cos n\omega_0 t + B_n \sin n\omega_0 t) \quad (10)$$

ここで、 A_n , B_n はカンチレバーの振動信号のフーリエコサイン・サイン係数である。基本波には、励振力が含まれているため除く必要がある。実際に力信号が得られるかどうかを、マイカ表面に周期的に接触しているカンチレバーの振動信号を解析することにより確認したところ、**図 19** に示すように、含める高調波成分を多くすると、鋭い力信号が現れることが判明した。しかし、力のピークは非常に狭い範囲にあるため、(1)式に従い力信号を合成してピーク値を S/H することは難しい。ピークは、カンチレバー振動の底付近に生ずることから、接触する時間 $t_0 = (\pi + 2k\pi + \varphi) / \omega_0$ ($\tan \varphi = B_1 / A_1$) から、ピーク力を求めることができる。このピーク力をリアルタイムで求める回路を製作した。しかし、カンチレバー振動の高周波成分の振幅は小さく、計算による解析では力信号が得られるものの、実際の回路ではノイズに埋もれてしまい、力信号は得られなかった。

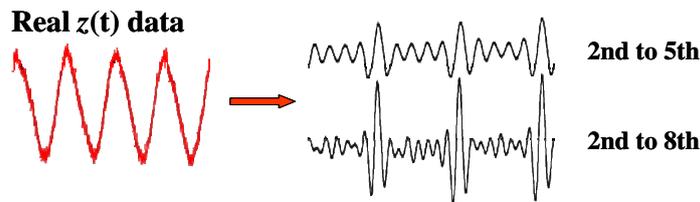


図 19: カンチレバーの振動信号からの力信号の合成

【探針・試料間接触の軽減化 (パラメトリック励振)】

振動系の振る舞いに応じて励振力を変調することをパラメトリック励振という。カンチレバーの振動の Q 値を制御するいわゆる Q コントロールもこの一種である。励振力を変調することで、タッピング力を小さくすることができるかを検討した。探針と試料が接触しカンチレバーの振幅が減少したときに励振力を小さくするとタッピング力を小さくできる可能性がある。そこで、**図 20** に示すようなシステムを用いた励振法をテストした。

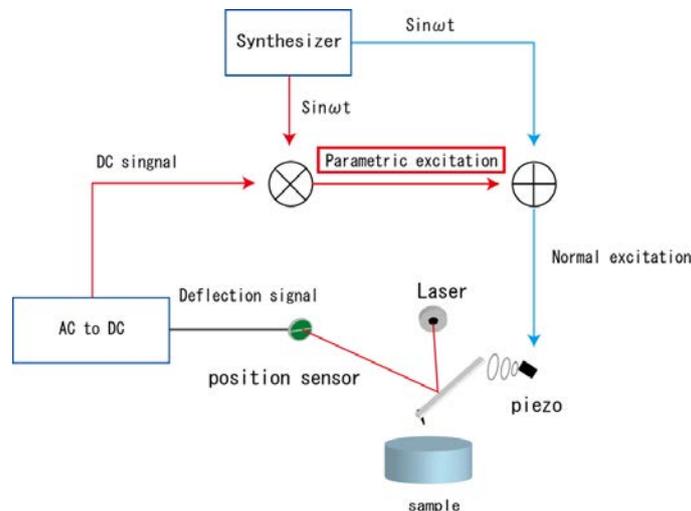


図 20: パラメトリック励振のための装置構成

励振信号を2成分に分け、ひとつは発信器からのサイン波、もうひとつは検出されたカンチレバーの振幅値に強度が比例するサイン波(パラメトリック成分)である。これらのサイン波の位相関係は調節できる。振幅計測の結果を励振信号に素早く反映させるために、励振用ピエゾ素子とカンチレバーを接触させ、励振信号伝達の遅延を最小限にした。パラメトリック成分の力軽減効果を調べるために、フォース-ディスタンス曲線の計測を行い、カンチレバーのDCたわみ量から力の大きさを見積もった。図21に示すように、確かにパラメトリック成分を増大させると、タッピング力が減少する。また、カンチレバーの共振周波数に対する励振の周波数との関係において、タッピング力をより大きく減少させる相対的な周波数領域があることも分かる。しかしながら、パラメトリック成分を増やすにつれて、探針・試料間のトランジェントな接触に対するカンチレバーの応答は遅くなることも判明した。このことは、カンチレバーのQ値の増大によるものか、もしくは、励振信号の伝達の遅延によるものかまだはっきりしていない。

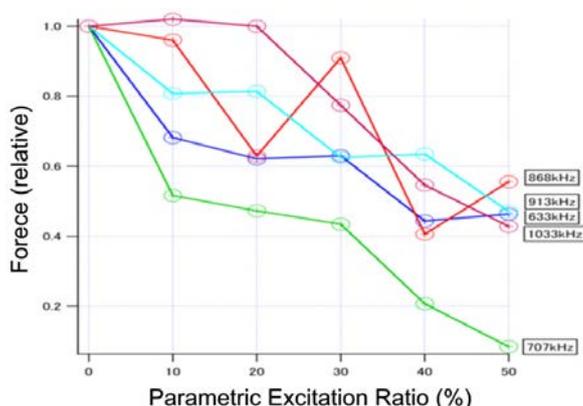


図 21: パラメトリック励振によるタッピング力の軽減化効果。パラメトリック励振成分を増加させると、タッピング力が減少することが分かる。カンチレバーの共振周波数約 800 kHz に対して励振の周波数を変えると、力の低減率を大きくする周波数があることが見つかった。

4.1.10. 成果の位置づけや類似研究との比較

高速バイオ AFM 装置の開発は上述のように多岐に亘り、それぞれの開発項目について成果の位置づけや類似研究との比較をすることはあまり意味がない。そこで、高速バイオ AFM の開発全体について述べることにする。

まず類似研究であるが、高速バイオ AFM の装置開発を行っている研究室は世界的にみて極めて少ない。国内では皆無であり、外国では英国ブリストル大の Miles 研究室、米国 UC サンタバーバラの Hansma 研究室、及び、以前 Hansma 研でポスドクであった Schitter のオランダ Delft 大の研究室しかない。Hansma 研究室は既に開発を中止しているし、Miles 研究室ではフィードバック制御の高速化を行っておらず、比較することは意味がない。Schitter 研では開発を継続しているが、制御系の開発に研究は絞られており、未だ十分な高速化は達成されていない。従って、実用になる高速バイオ AFM の開発を行っているのは世界の中で金沢大の安藤研究室しかないと言える。

高速 AFM に関連する研究として、制御関係の専門家が色々な工夫を提案しているが、コンピュータによる計算、もしくは、FPGA 回路や DSP による計算を必要とし、市販されている AFM を若干高速化するには役立つものの、我々が達成したような高速性能を実現するものではない。スキャナーの高速化に関しては、我々のスキャナーよりも走査範囲を広くしたものが Hansma 研究室で開発されているが、帯域は当然低い。

装置開発の成果の位置づけについては、イメージング実験の成果を見て頂ければ明らかであろう。

4. 2. 高速バイオイメーシング(金沢大学 安藤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

開発した高速バイオ AFM を用いて様々なタンパク質のイメージングを行った。小椋グループと森川グループと共同で行ったイメージング実験は、それらのグループの研究実施内容及び成果の項目で採り上げる。

4.2.1. モータータンパク質 ミオシンV

ミオシンVはハンドオーバーハンド様式でアクチンフィラメントに沿ってプロセスに運動する。しかし、その歩行中の分子の振舞いははっきりしておらず、歩行メカニズムも未だ決定されていない。歩行中の分子の振る舞いを高速バイオ AFM で直接見ることで、機能解明を目指した。その結果、以下に述べるように、分子スケールレベルで機能メカニズムを解明することに成功した。

【基板と試料の調製】

当初、基板にマイカ表面を用いた。ミオシンVの尾部を取り除いた M5-HMM はこの表面に強く吸着するため、イオン強度を上げて吸着を弱めた。アクチンフィラメントは大きいので基板に緩く吸着していても拡散は遅く、高速イメージングではその拡散は障害にならなかった。この系で ATP 存在下での歩行運動の観察を試みた。ごく稀に歩行運動を観察できたが、イオン強度が高いため、アクチンと M5-HMM の相互作用は弱い。また、実際に観察された歩行運動は蛍光顕微鏡観察で測定されている速さに比べ非常に遅かった。かなり時間をかけてこの系の観察を行った後、基板の改良を行うべきと結論した。

正負両電荷を極性基にもつ脂質の平面膜はタンパク質への非特異的吸着がないことが知られている。そこで、この特性をもつ脂質と極性基にビオチンをもつ脂質の混合系を用いて、マイカ表面に2重層膜を形成させた基板を調製した。部分的にビオチン化したアクチンフィラメントを、ストレプトアビジンを介してこの基板に固定した(図 22a)。この系で M5-HMM の運動は多く観察されたが、色々な配向で M5-HMM は運動し、M5-HMM を横方向から観察することは難しかった。そこで、基板に M5-HMM を若干吸着させるために正電荷をもつ脂質(DPTAP)を加えた。DPTAP の割合を振って観察を行い、最適濃度 5%を決定した。

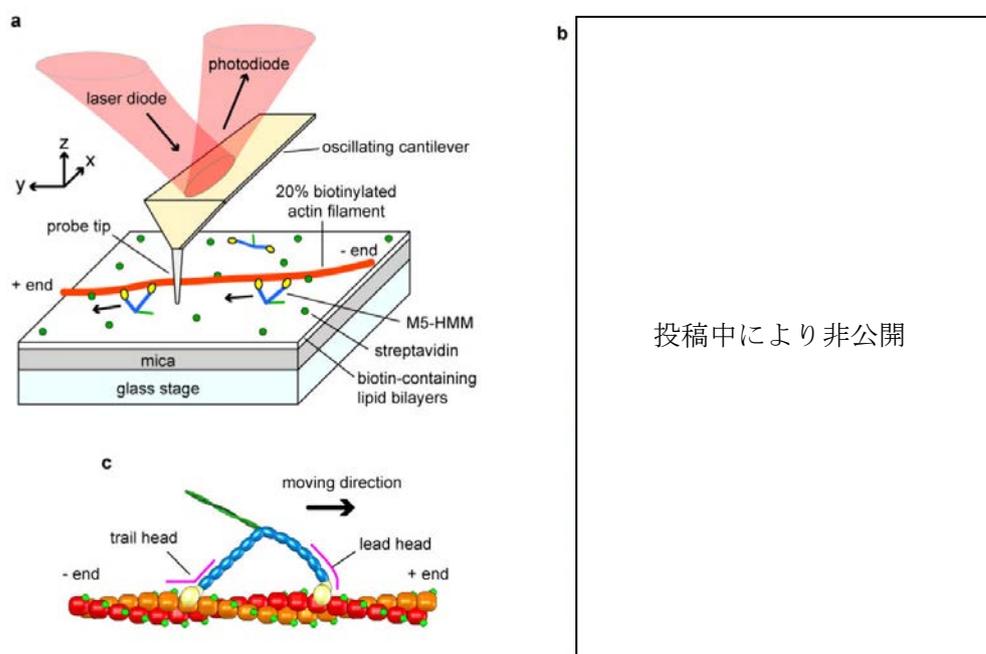


図 22: 高速バイオ AFM による歩行中の M5-HMM の直接的可視化。(a)アッセイ系の模式図。(b)1 μ M ATP 存在下で運動する M5-HMM の AFM 像。イメージング速度 146.7 ms/frame、スケールバー 30 nm。(c) 両足で結合した M5-HMM の形状の特徴。

【一方向のプロセッシブ運動】

歩行中の M5-HMM を高い解像度で撮影することに成功した(図 22b, 非公開)。約 36 nm のステップが明瞭であった。両頭部がアクチンに結合した M5-HMM は特徴的な形状を示した(図 22c)。ネック部がモータードメインの異なる場所から現れることを反映して、後ろ足のモータードメインとネック部はV字型の連結を、前足では滑らかな連結を示す。また、短い尾部は後方に向いている。これらの特徴は電顕観察の結果と一致する。後方への運動はごく稀にしか観察されなかった。

多くの歩行運動を観察したあとで、M5-HMM のアクチンへの結合について「方角則」があることに気がついた。すなわち、西から東に運動する M5-HMM はアクチンフィラメントに北側から結合し、東から西に運動する M5-HMM は南から結合する。この「方角則」はアクチンフィラメント上のモータードメインの特異的な配置を示唆している(図 23, 非公開)。

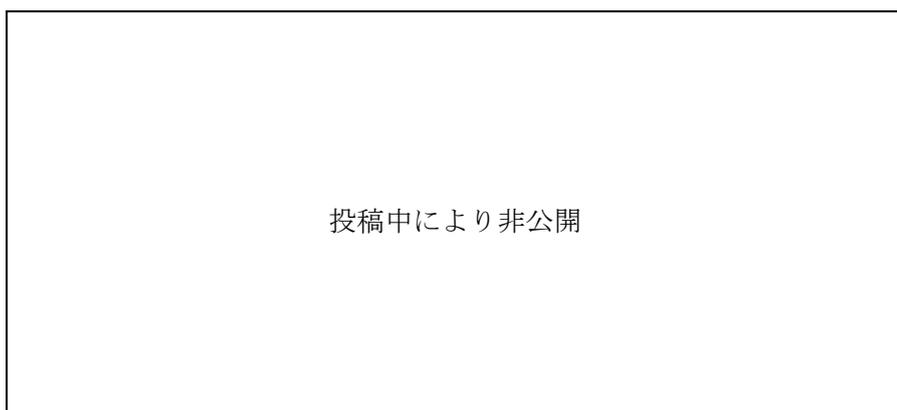


図 23: M5-HMM のアクチン結合様式と「方角則」。(a)両足結合の M5-HMM のスケッチ。(b, c) アクチンへの結合様式と「方角則」との関係。基板は結合できるアクチンモノマーを制限する。カラーで示した2つの M5-HMM は表面に最も接近し、そのモータードメインは基板表面と接触していない。モータードメインはその左腹でアクチンに結合するため、左側の分子は右側の分子よりも表面から遠い。この非対称性の程度は AFM 観察よりも低い。探針からのタッピング力ないしは基板との親和性により、左側の分子は面方向に歪められる。その歪みによりモータードメインとアクチンとの親和性が低下し、非対称性が増強されるものと推測できる。

【ハンドオーバーハンド運動とパワーストローク】

上記の AFM 観察では1フレームの時間内で1ステップは完了してしまい、ステップ中の分子の振る舞いは観察できていない。基板に余分のストレプトアビジン分子をばら撒くことにより、ステップ中の分子の運動が観察された(図 24, AFM 像は非公開)。後ろ足がアクチンから解離したあと、ほぼまっすぐな前足は反やじりの向きからやじりの向きに回転する。すなわち、アクチンに結合したモータードメインの周りの前足のレバーアームが回転することがパワーストロークそのものであることが初めて実証された。この回転は、ばら撒かれたストレプトアビジン分子に前足のレバーアームが接触して遅くなる。解離した後ろ足は前方に移動するネック-ネック連結部の周りに拡散したのち、同じアクチンフィラメント上の前方のアクチン分子と結合し、1ステップを完了する。こうして、蛍光顕微鏡で以前検出されたハンドオーバーハンド運動が、高解像の映像として初めて直接可視化された。インチワームモデルやバイアス拡散モデルから予想される M5-HMM の振る舞いはまったく観察されなかった。

【歩行運動のキネティクス】

色々な ATP 濃度下で歩行する M5-HMM を観察した。与えられた一定の ATP 濃度での歩行運動速度を計測し、その平均値(V)を $V = V_{max} / (1 + K_m / [ATP])$ の関係式にフィットさせた。正電荷の脂質 DPTAP が基板に存在しない場合、 V_{max} は 403 ± 7 nm/s で、同じバッファー溶液中での蛍光顕微鏡観察の結果と一致する。従って、基板と試料間、及び、探針と試料間の相互作用は弱

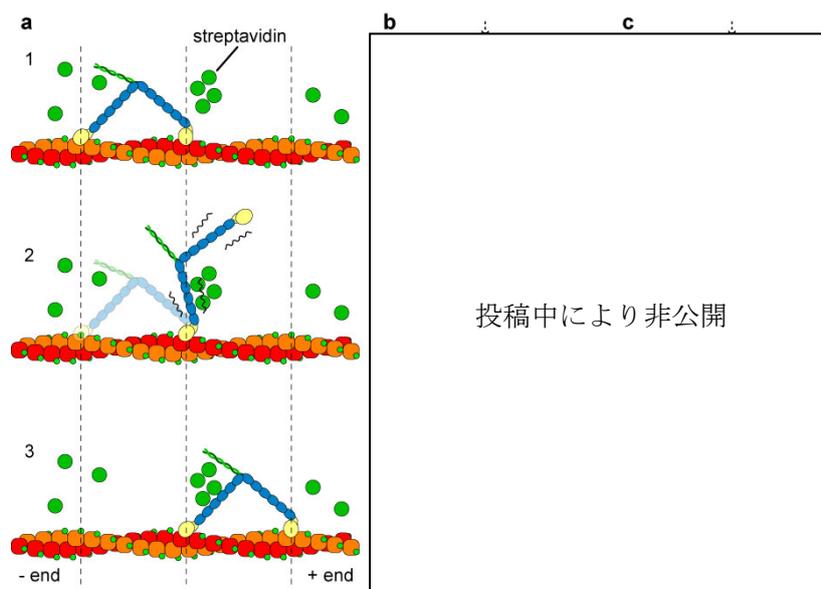


図 24: M5-HMM のハンドオーバーハンド運動の直接的可視化。(a) 観察された運動の模式図。(b, c) M5-HMM のハンドオーバーハンド運動を示す典型的な連続 AFM 像。(b) $1 \mu\text{M}$ ATP 存在下。(c) $2 \mu\text{M}$ ATP 存在下。スケールバー 30 nm、イメージング速度 146.7 ms/frame。前足のネック部を細い白線で強調してある。

く、モーター活性への影響は無視できる。 $5\% \text{DPTAP}$ が基板に含まれる場合には、 $V_{\text{max}} = 295 \pm 9 \text{ nm/s}$ 、 $K_m = 7.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$ 、平均ステップサイズ d_s は $41.1 \pm 7.5 \text{ nm}$ であった。

ATPase サイクル時間 T_{ATP} は、 $1/k_1[\text{ATP}] + 1/k_2$ でも与えられる。ここで、 k_1 と k_2 はそれぞれ、2 次 ATP 結合速度定数と 1 次 ADP 解離速度定数である。ADP の解離は主要な律速段階であり、低濃度 ATP では ATP の結合も律速段階になり、他の化学ステップはずっと速く起こるからである。1 ステップは 1 ATP 加水分解とタイトカップリングしているの、運動速度は $V = d_s/T_{\text{ATP}}$ とも表される。 $5\% \text{DPTAP}$ を含む基板で得られた上記の3つのパラメータの値から、 $k_1 = 0.9 \pm 0.3 / \mu\text{M/s}$ 、 $k_2 = 7.2 \pm 1.5 / \text{s}$ を得た。 k_1 の値は以前の報告とよく一致するが、 k_2 の値は同じバッファー条件で以前報告されている値の約 70% である。このことは、基板と試料間の弱い相互作用が ADP の解離を遅くしているものと思われる。

【直線状と鋭く屈曲した前足の形状】

いろいろな ADP 濃度下でアクチンフィラメントに結合した M5-HMM を観察した。 $50 \mu\text{M}$ ADP 中とヌクレオチドフリー(NF)下で観察した典型的な AFM 像を図 25a、25b (非公開) にそれぞれ示す。これらの条件下では、M5-HMM は両足でアクチンに結合していた。高い ADP 濃度下では、 $0.1 \mu\text{M}$ 及び $1 \mu\text{M}$ ATP 下で観察されたのと同様に、前足はほぼまっすぐであった。ADP 濃度を下げていくと、前足はより頻繁にまっすぐな形状と鋭く屈曲した形状の間を行き来した。この行き来は NF の条件でも観察されるので、2つの形状は平衡状態にある。 1 mM ADP 下ではまっすぐな形状の割合 (r) は 0.98、NF 下では 0.36 であった。 $1 \mu\text{M}$ ATP 下、そして $0.1 \mu\text{M}$ ATP 下でさえも、前足はほとんどまっすぐであった ($r = 0.98$)。従って、低濃度 ATP 下では、後ろ足はほとんどの時間 ATP の結合待ちにあるので、後ろ足からの ADP の解離によって前足の屈曲が起こるのではないことが分かる。つまり、部分的なワーキングストロークと考えられる前足の鋭い屈曲は歩行中に起こらない。

投稿中により非公開

図 25: (a)50 μ M ADP 存在下と(b)ヌクレオチドフリー下における両足結合した M5-HMM の連続イメージ。イメージング速度 333.2 ms/frame、スケールバー 30 nm。

【前足からの ADP の解離】

上記の結果は、少なくとも 0.1 μ M ATP 濃度以上では、後ろ足が ATP を結合しアクチンから解離するまで、前足は ADP を抱え込んでいることを示唆している。そうであれば、ADP 存在下で両足結合している M5-HMM の前足からの ADP の解離も非常に遅いはずである。そこで、ADP 濃度と前足がまっすぐな割合(r)の関係を定量的に解析した。まっすぐな前足の割合と ADP 濃度との関係は近似的に

$$r([ADP]) = \frac{r_D \cdot k_+ [ADP] + r_{NF} \cdot k_-}{k_+ [ADP] + k_-} \quad (11)$$

で与えられる。ここで、 $r_D = 0.98$, $r_{NF} = 0.36$, そして、 k_+ と k_- はそれぞれ、2 次 ADP 結合速度定数と 1 次 ADP 解離速度定数である。まっすぐな前足の割合と ADP 濃度との関係の実測データを式(11)にフィットさせ、 $K_d (= k_- / k_+) = 0.075 \pm 0.013 \mu$ M を得た。次に、前足がまっすぐな状態を取る平均寿命($\langle \tau_{ST} \rangle$)を色々な ADP 濃度下にあるアクチンに結合した M5-HMM の AFM 映像を解析して k_- を見積もった。 $\langle \tau_{ST} \rangle$ は、

$$\langle \tau_{ST} \rangle = n_{NF} / k_{S-B} + n_{ADP} / k_- \quad (12)$$

で与えられる。ここで、 k_{S-B} は NF 下での自動的な直線-屈曲遷移の速度定数であり、 n_{NF} と n_{ADP} はそれぞれ、一定 ADP 濃度下での NF と ADP 結合の前足の割合である (K_d の値から計算できる)。実測で得た $\langle \tau_{ST} \rangle$ と ADP 濃度の関係を式(12)にフィットさせて、 $k_{S-B} = 0.33 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ と $k_- = 0.18 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ を得た。式(12)よりも正確な解析をすると、 $k_{S-B} = 0.32 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ と $k_- = 0.100 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ となる。この前足からの ADP の解離速度定数は上で計測した後ろ足からの ADP 解離速度定数 ($k_2 = 7.2 \pm 1.5 \text{ s}^{-1}$) よりも約 70 倍小さい。また、 $k_- = 0.100 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ と $K_d (= k_- / k_+) = 0.075 \pm 0.013 \mu$ M から $k_+ = 1.3 \pm 0.3 \mu \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ が求まるが、単頭ミオシン V に対して溶液実験で

以前求められている対応する値 $12.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ よりも約 10 倍小さい。こうして、前足における反応は実質的に止まっているという決定的な証拠を得た。従って、ADP の解離、それに続く ATP の結合、そしてその結果起こるアクチンからの解離は後ろ足でしか起こらない。このキネティクスの強い非対称性はハンドオーバーハンド様式のパワーstroke 発生の分子基盤である。

【その他の観察結果】

両足結合した M5-HMM を観察していると、ヌクレオチド条件によらず、どちらかの足がアクチンから少しだけ解離した後素早くアクチンに再結合する様子 (Foot Stomp と呼ぶことにした) が見える。両足で頻度は異なり、前足でよく起こる。興味深いことに、前足が屈曲している場合には、前足の foot stomp の頻度は下がる。従って、非対称性は NF 下では小さくなる。Foot stomp 後再結合したときの2つのモータードメイン間の距離は 5 nm を単位として変わり、この変化の方向は foot stomp する前の2つのモータードメイン間の距離に依存した。すなわち、その距離が平均の距離よりも長い場合には、foot stomp 後は短くなり、一方、平均距離よりも短い場合には、foot stomp 後は長くなる。従って、foot stomp は最も自由エネルギーの低い状態を探す分子動作である。

Foot Stomp は別の観点から重要なことを示している。Pi 放出は頭部が actin に結合したあと素早く起こるので、Foot Stomp した前足には Pi は結合していない。それにも関わらず、前足はパワーstroke する。すなわち、ATPase 反応における化学的遷移なしに前足はパワーstroke できる。この事実はこれまで長く信じられてきたの考え方を覆すこととなった。

両足結合の M5-HMM を観察していると、短い Coiled-coil の尾部が解離することに時々出会う。試料ステージを動かして異なる領域をイメージングしていると最初のフレームで既に解離した分子にも出会うので、この解離は探針と試料との相互作用によるものではない。Uncoiling は、両足結合した分子内に張力が存在する証拠である。この解離において、前足は反やじりからやじりの向きに回転する。歩行中の前足がパワーstroke するときの振る舞いとまったく同じである。こうして、パワーstroke の源が、反やじりの向きで強制的に前足がアクチンに結合する結果生ずる分子内張力であることが直接証明された。

【成果の位置づけや類似研究との比較】

ミオシンVの歩行メカニズムの研究は、蛍光顕微鏡やレザートラップナノメトリーを利用して集中的に行われてきており、プロセッシビリティ、ハンドオーバーハンド様式は確立し、前足と後ろ足でのケミカルキネティクスの非対称性も示唆されていた。従って、まずは、高速バイオ AFM の映像は当然これらの事実を示していなければならない。実際示していたことは、高速 AFM 観察という新手法が信頼に足る手法であることを実証した。しかし、従来の手法が間接的であり、コンセンサスの得られた事実であったとしても、決定的ではないのに対して、分子を直接見てその動態を明らかにする本手法の直接性(それ故、決定的であること)は際立っており、得られたデータの解釈の正当性という点で従来の手法とは比較にならない。もちろん、多くの新しい発見も得られた。まず、後ろ足がアクチンから解離しない限りパワーstroke は生じないという点が挙げられる。これまでは、前足の回転の他に、前足の屈曲が後ろ足を引っ張ると考えられてきた。また、従来の研究では、前足の角度変化を連続的にモニターしていないために、1ステップ前後で起こる角度変化しか検出されていない。従って、角度変化が1ステップの歩行の結果なのか原因なのかが未解明であった。高速バイオ AFM の観察により、この角度変化が結果ではなく歩行の原因そのものであることが決定的となった。更に、両足結合した分子内に張力が発生していることを具体的に示し、前足が反やじりの向きで強制的にアクチンと結合していることが分子内張力発生の原因、つまり運動の駆動力の源であることも明確に突き止めた。また、重要なことに、前足による張力発生とパワーstroke には前足の化学的遷移なしに起こることを示した。最後に特筆すべきは、高速 AFM 観察が上記の多くの事実を短時間で突き止めた点である。

4.2.2. バクテリオロドプシン (bR) の光応答

ハロバクテリウムの細胞膜には bR 分子が2次元結晶となった紫膜のパッチが多く存在する。この2次元結晶内で bR は3量体を形成しており、この3量体が六方格子状に配列している。bR は7本の α ヘリックス(A-G)が膜を貫通している典型的な膜タンパク質である。bR 分子には色素分子レチ

ナルがシッフ塩基でヘリックス G の Lys216 に共有結合している。光がレチナルに吸収されると、オールトランスから 13 シスに異性化する。レチナルの異なる吸収スペクトルに対応する K、L、M、N、O の中間体がこの順で生じ、基底状態に戻る。M と N 中間体の寿命は長く、それ以外の中間体の寿命は極めて短い。異性化がトリガーとなって、一連の bR 分子の構造変化が起こる。この構造変化によりプロトンが細胞内から細胞外に汲み出される。すなわち、bR は光駆動のプロトンポンプである。bR の研究は歴史が長く、かなり詳細な情報があるにもかかわらず、bR 分子の構造変化を分子レベルで明確に捉えた報告はない。

高速バイオ AFM により、光照射にともなう bR2次元結晶の構造変化の検出を行った。ワイルドタイプを用い、走査範囲を狭めて 10 ms/frame の最高速度でイメージングを試みたが、はっきりした構造変化を捉えることはできなかった。フォトサイクルが 10 ms であり、時間分解能が足りない。そこで、フォトサイクルがワイルドタイプに比べ 1,000 倍遅い D96N ミュータントを用いることにした。Asp96 は細胞質側のプロトンの通り道である。この部分が Asn96 になると、プロトンは他の場所を通らざるを得ず、フォトサイクルが遅くなる。しかし、この D96N はプロトンポンプ機能をもっている。

【光照射前と照射中の bR の AFM 像】

図 26 に 532 nm の光照射前(a)と光照射中(b)の bR2次元結晶(細胞質側)の AFM 像を示す。光照射により非常に大きな変化が観察された。光照射前では規則正しい 3 量体の配列が見える。光照射により、3 量体の各 bR 分子が 3 量体の中心から外側に移動する。その結果、隣り合う 3 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 3 量体が形成されたかのように観察される。この変化は光 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。細胞外側では目だった変化は観察されなかった。本来の 3 量体と区別するために、それぞれが隣り合う 3 量体に属する最隣接 bR 分子の三つ組を Trefoil と呼ぶことにする。

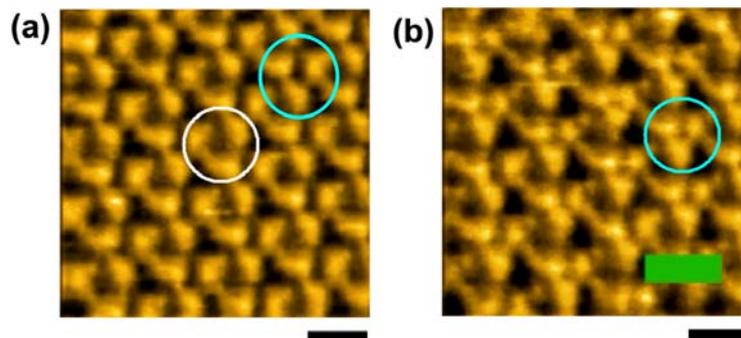


図 26: 光 off (a) と光 on 中 (b) の細胞質側の紫膜の AFM 像。イメージング速度 1 s/frame、スケールバー 5 nm。白い円は 3 量体を、水色の円は Trefoil を示す。緑色のバーはグリーンレーザー (532 nm、0.5 μ W) 照射中を表す。

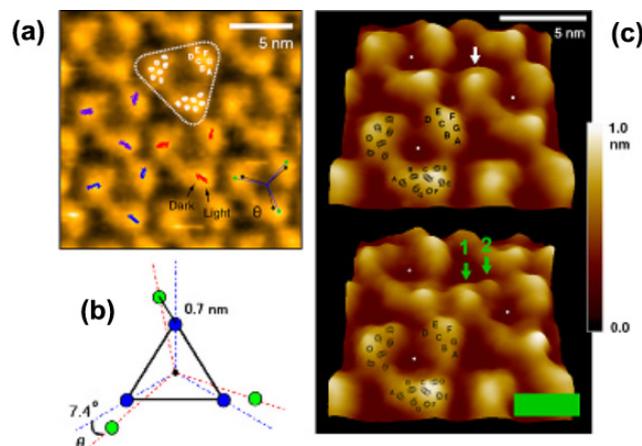


図 27: 光照射による bR 分子の変化を示す AFM 像。(a) 各 bR 分子の重心位置の軌跡を光 Off 時の AFM 像に重ねた像。(b) bR 分子の重心移動の計測結果。青が光 Off 時の重心位置、緑が光 On 時の重心位置を表す。(c) 光 Off 時(上)と光 On 時(下)の AFM 像の拡大図。ヘリックス A-G を重ねあわせて表示している。白い矢印は光 Off 時に観察される突起部、緑の矢印 1, 2 は分かれて見える 2 つの突起部を示す。

図 27a 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。各重心位置は外側に約 0.7 nm 移動し、且つ、反時計周りに 7.4 度回転する。光照射前後で bR 分子の形状を比較すると、緑色の矢印で示すように、光照射時に bR 分子の表面地形が主要な突出部とマイナーな突出部に分かれる(図 27b)。結晶構造で知られている 7 本の α ヘリックスの位置と合わせてみると、主要な突起部は E-F ループに対応し、マイナーな突起部はヘリックス A、B に対応していることが分かる。E-F ループが外側に移動し、それ以外はほとんど動かないために地形が2つに分かれたように見える。

【励起寿命の pH 依存性】

bR のフォトサイクルが pH に依存することはよく知られている。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 で高速バイオ AFM 観察される励起状態(構造変化している状態)の寿命と比較した(図 28)。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 ± 0.025 s (pH 7), 14 ± 0.034 s (pH 8), 33 ± 0.080 s (pH 9)であった。他方、高速バイオ 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 ± 0.10 s (pH 7), 25 ± 0.25 s (pH 8), 48 ± 0.59 s (pH 9)であった。

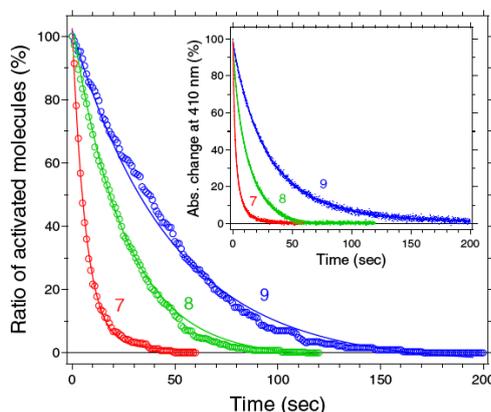


図 28: 高速バイオ AFM で検出された光照射で誘起される bR の構造変化の減衰とその pH 依存性。挿入図は分光法で測定された M 中間体の減衰を示す。どちらも減衰は単一指数関数に従う(実線)。

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・試料間接触によるものでないことを示している。M 中間体の寿命よりも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。

【Trefoil 内での bR 分子間相互作用】

光励起されて生ずる Trefoil 内では bR 分子同士が接触しているように観察される。この分子間相互作用がフォトサイクルに影響を与えるかを調べた。光の強度をいくつか変えて、イメージングを行った(図 29)。光の強度が弱い場合には、ほとんどの場合 3 量体中の 1 つの bR 分子しか励起されない(図 29a 左)。このときの励起分子の減衰曲線(寿命のヒストグラム)を図 29b に示す。励起寿命は 7.3 ± 0.58 s であった。光強度を強くすると、3 量体中の 2 つないしは 3 つの bR 分子が励起される(図 29a 右)。この図で明らかのように、長い励起寿命をもつ bR 分子と、光照射中に何回か構造変化を繰り返す bR 分子があることが分かる。詳しく見てみると、構造変化を繰り返す bR 分子は同じ 3 量体中の bR 分子の中で最も後で励起された分子であることが分かった(図 29b の青色で示す分子)。その励起分子の寿命のヒストグラム(図 29b 中段)から、平均寿命は 2.0 ± 0.16 s であった。一方、最初に励起された bR 分子の寿命のヒストグラム(図 29b 下段)は単一指数関数とならず、平均寿命は 13.3 s であった。

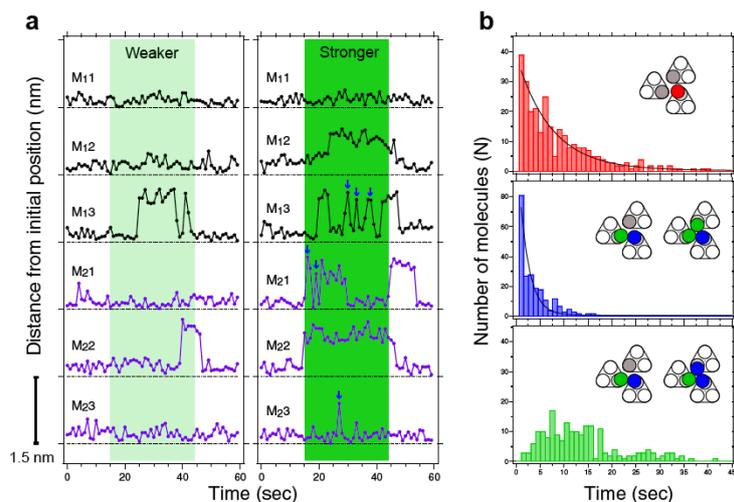


図 29: bR 間相互作用が D96N の励起状態減衰のキネティクスに与える協同的効果。(a) 2つの異なる Trefoil (M_n1-M_n3; n は異なる Trefoil を示す) を構成する6つの bR 分子の異なる光強度、pH7 下での重心位置の時間変化。緑色の領域は光照射時を表し、その濃さは光強度を表す (0.007 μ W と 0.5 μ W)。青い矢印は Trefoil 中の他の bR 分子の励起に続いて励起されたイベントを示す。(b) 上段: Trefoil 中でひとつの bR 分子 (赤) だけが励起された場合の励起寿命のヒストグラム、中段: ひとつの Trefoil 中で2つ以上の分子が励起され、それら励起された分子の内最も後で励起された bR 分子 (青) の励起寿命のヒストグラム、下段: ひとつの Trefoil 内で2つ以上の分子が励起され、それら励起された分子の内最初に励起された bR 分子 (緑) の励起寿命のヒストグラム。

以上のことから、bR 分子間の相互作用によって、励起寿命が短くなる分子と逆に長くなる分子が生ずることが分かった。すなわち、正の協同性と負の協同性が同時に現れ、且つ、この協同性は本来の3量体中の bR 分子間の相互作用ではなく、Trefoil 中の bR 分子間の相互作用で生ずる。正負の協同性の結果として、全体としての平均励起寿命は変化しているのであろうか。これを調べるために、光強度が弱いときと強いときで励起される分子の減衰を測定した (図 30)。光が弱い場合、ひとつの Trefoil 内でほとんどの場合ひとつの bR 分子しか励起されないが、たまに2つの bR 分子が励起されることもある。それらを区別せずに、すべての励起された分子の寿命のヒストグラムを取ったところ、単一指数関数分布となり、平均寿命は 5.4 ± 0.34 s であった。一方、光強度が強い場合も同様に単一指数関数分布となり、平均寿命は 6.1 ± 0.37 s となり、光強度が弱い場合とそれほど違いがない。すなわち、正・負の協同性は互いに相殺しあい、全体としては、フォトサイクルの時間は光強度に依存しない。フォトサイクルとプロトンポンプはタイトにカップルしているという想定される仮定で考えると、励起された bR 分子のプロトンポンピングの速さは、正負の協同性を介して、光強度に依存せず一定にたもたれることになる。

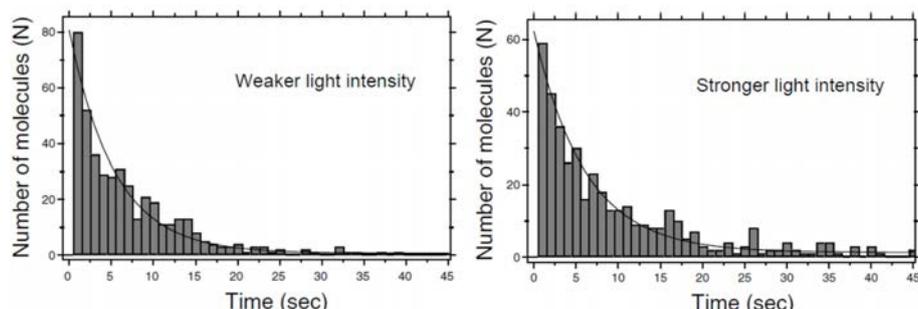


図 30: 異なる光強度下で励起された bR 分子の減衰。

【レチナール異性体と bR 分子の対応】

基底状態のレチナール(オールトランス)のピーク吸収波長は 570 nm で、最も寿命の長い M 中間体のピーク吸収波長は 410 nm である。M 中間体に、M 中間体が吸収する青い光を照射すると、シス型レチナールは基底状態にすばやく戻ることが知られている。bR 分子は光照射に伴うレチナールの異性化で確かに構造変化するが、強制的にレチナールの M 中間体を基底状態にもどしても、bR という大きなタンパク質の構造はレチナールという小さい分子の構造に常に1:1で追従するのであろうか。pH9 では励起状態の寿命は極めて長くなるので(48 秒)、緑色の励起光を Offしても励起状態はしばらく続く(図 31a, 非公開)。そこで、この緑色の光を Offしたあとで励起状態にある bR 分子中のレチナールを青い光によって強制的に基底状態に戻したときの bR 分子を観察した(図 31b, 非公開)。青い光照射と完全に同期して励起状態にある bR 分子は2フレーム(2 秒)内で基底状態にすばやく戻った。従って、bR のタンパク質の構造はレチナールの異性構造と1:1に対応していることが明らかになった(但し、レチナールのプロトン化には対応しない)。



図 31: pH9 において青い光の照射でレチナールの M 中間体を強制的に基底状態に戻したときの bR の構造変化。(a) 青い光を照射しない場合。(b)緑の光を Offした直後に青い光を照射した場合。

【成果の位置づけや類似研究との比較】

bR は 1970 年代から詳しく研究されているタンパク質である。従って、bR の光応答について多くの研究があり、多くの情報が集積している。構造に関しては、電子顕微鏡、X線結晶解析、NMR で研究されており、bR の結晶に光を当てた直後のX線回折からヘリックス F が 0.1 nm 変位する報告や、励起状態を模擬するミュータントの電子顕微鏡観察により、ヘリックス F が 0.35 nm 変位し、それに追従して E-F ループが 0.3 nm 外側に移動することが示唆されている。しかし、未だにコンセンサスに至っていない。構造に関する情報は静的、アンサンブル平均手法でしか得られないため、他のタンパク質と同様、ダイナミックな構造変化に関する bR の情報は限られている。bR の動的構造変化の観察は我々の研究が初めてである。従来言われている変化よりも遥かに大きな変化が検出された。また、高速 AFM 観察が導いた新しい発見、すなわち、比較的強い光照射で起こる Trefoil 内での分子間相互作用による正負の協同性の出現は、他の手法では決して検出できない。個々の分子の構造変化を、時間を追って観察できる我々の手法の威力がはっきりと証明された。

4.2.3. ストレプトアビジン2次元結晶中の空隙点欠陥の運動

ストレプトアビジンは D_2 二面体対称性をもつホモ4量体で、それぞれのサブユニットはひとつのビオチンを結合する。ビオチンを含む脂質平面膜上でストレプトアビジンは容易に2次元結晶化するため、その結晶は脂質膜上での2次元結晶あるいは一般的なタンパク質結晶の理想的なモデルとして研究されてきた。このストレプトアビジンの2次元結晶では、脂質側に面した2つのビオチン結合部位はビオチンと結合しており、残る2つのビオチン結合部位は反対側を向いておりビオチンを結合していない(図32c)。 D_2 二面体対称性のため、ほぼ長方形をした上面の形を確認できれば、ビオチン結合部位の局在が分かる。図31cに示すように、脂質側の面では左上と右下の2つのサブユニットのビオチン結合部位(黒丸)が脂質側を向いている。この2次元結晶中におけるストレプトアビジン分子の配置は透過型電子顕微鏡(TEM)とAFMを用いてこれまで調べられており、pH、イオン強度、脂質膜上でのビオチンの濃度といった結晶化条件に依存して、ストレプトアビジンは明瞭な異なる結晶配置($P1$, $P2$, $C222$ 対称性)で自己集合することが明らかとなっている。また、結晶成長速度に異方性があり、その結果、結晶はマクロな特徴ある形態を示すことが知られている。しかし、結晶成長異方性と分子間結合との関係について一致した結論が得られていない。

高速バイオAFMによる空隙点欠陥の運動観察により、この関係の明瞭な結論を得、分子間結合の自由エネルギーが決定された。また、欠陥のない結晶に成長するメカニズムが示唆された。

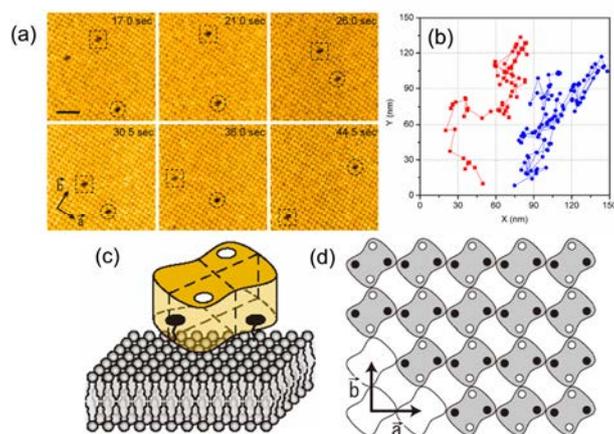


図 32: ストレプトアビジン2次元結晶 ($C222$) 中の単一欠陥の異方性ブラウン運動。(a) AFM 像 ($150 \times 150 \text{ nm}^2$), (b) 2つの点欠陥の軌跡, (c) 脂質膜上でのストレプトアビジン分子中のビオチン結合部位, (d) $C222$ 結晶中のストレプトアビジンの配置とビオチン結合部位(白丸はビオチンを結合していない部位、黒丸はビオチンを結合した部位を示す)。

【単空隙点欠陥の異方性拡散】

ストレプトアビジン2次元結晶のAFM像を図32aに示す。直方晶系 $C222$ をしており、格子定数は、 $a = 5.9 \pm 0.1 \text{ nm}$, $b = 5.9 \pm 0.3 \text{ nm}$, $\gamma = 92 \pm 3^\circ$ である。図32dに、 $C222$ 結晶における分子配置の模式図を示す。ビオチン結合サブユニット間の分子間接触はひとつの結晶軸(a軸)に沿って連続しており、ビオチン非結合サブユニット間の分子間接触はもうひとつの結晶軸(b軸)に沿って連続している。

振動するカンチレバー探針が試料を叩く力を大きくすることで、ストレプトアビジン2次元結晶中に単空隙点欠陥を容易に形成できる。図32aに示すように、この点欠陥は結晶中を拡散する。バルクの溶液中にはストレプトアビジンは存在しないので、この拡散は点欠陥に隣接するストレプトアビジンが点欠陥に移動することによって起こる。図32bに2つの単空隙欠陥の拡散の軌跡を示す。明らかに結晶軸に対して異方性があり、b軸に沿った移動の方がa軸に沿った移動よりも速い。色々な時間差での移動量の平均2乗変位を時間に対してプロットすると直線となることから、この移動はランダムウォークで起こっていることは明らかである。a軸に沿った移動の拡散定数は $D_a = 20.5 \text{ nm}^2/\text{s}$

で、b軸に沿っては $D_b = 48.8 \text{ nm}^2/\text{s}$ であった。これらの拡散定数の値は、結晶軸とX走査方向が異なる試料でもほぼ同じであったことから、この拡散の異方性はストレプトアビジンC222結晶中における単空隙点欠陥の性質によるものであると結論される。

$D_b > D_a$ という異方性は、ビオチン結合サブユニット間の引力相互作用とビオチン非結合サブユニット間の引力相互作用の自由エネルギーに差があることに由来する。単空隙欠陥の隣にあるストレプトアビジン分子がa軸に沿って空隙に移動する場合、2つのビオチン非結合サブユニット間の結合(u-u結合)と、1つのビオチン結合サブユニット間の結合(b-b結合)が切れる。他方、b軸に沿って移動する場合には、1つのu-u結合と2つのb-b結合が切れる(図32d参照)。従って、a軸及びb軸に沿った単一ステップ移動の活性化エネルギー(E_a と E_b)の差は、u-u結合が形成されるとき自由エネルギーの変化 G_{u-u} とb-b結合が形成されるとき自由エネルギーの変化 G_{b-b} との差に単純に対応している。すなわち、 $E_a - E_b = G_{u-u} - G_{b-b}$ である。従って、 $D_b > D_a$ の関係は $G_{u-u} < G_{b-b}$ の関係を与える。つまり、u-u結合の親和性はb-b結合の親和性よりも高い。拡散係数の比(D_b/D_a)は、 $D_b/D_a = \exp[-(E_b - E_a)/(k_B T)]$ で与えられる。ここで、 k_B はBoltzman定数、 T は絶対温度($T \sim 300 \text{ K}$)である。こうして、観察された $D_b/D_a \sim 2.4$ から、自由エネルギー差 $G_{u-u} - G_{b-b}$ は約 $-0.88 k_B T$ と求められ、それは -0.52 kcal/mol に対応する。ビオチンの結合がサブユニット間の分子間結合を弱くすることは、形成された2次元結晶が接しているバルクの溶液にビオチンを加えることで確認できた。連続的にイメージングしている間にビオチン溶液を試料チャンバーに加えイメージングを継続すると、しばらくして一瞬に2次元結晶が崩壊する様子が観察された。

以前の研究では、タンパク質の2次元結晶の異方性は結晶の形態から評価されてきた。ストレプトアビジンのC222結晶のアスペクト比は2-3(我々が用いた中性pHでは約2)である。この値は拡散係数の比($D_b/D_a \sim 2.4$)とほぼ一致するが、これは偶然であると思われる。結晶形態の非等方性と分子間結合の自由エネルギーに関するWolff則によれば、結晶のアスペクト比は結晶軸方向に沿った分子間引力相互作用の自由エネルギーの比に比例する。従って、 $G_{u-u}/G_{b-b} \sim 2$ となるが、この関係と $G_{u-u} - G_{b-b} \sim 0.88 k_B T$ から、 $G_{u-u} \sim -1.76 k_B T$ 、 $G_{b-b} \sim -0.88 k_B T$ と求められる。これらの数値は、2次元結晶の形成が起こるためには横方向の相互作用のエネルギーはおおよそ $1 \sim 5 k_B T$ の範囲になければならないという見積もりとよく一致する。

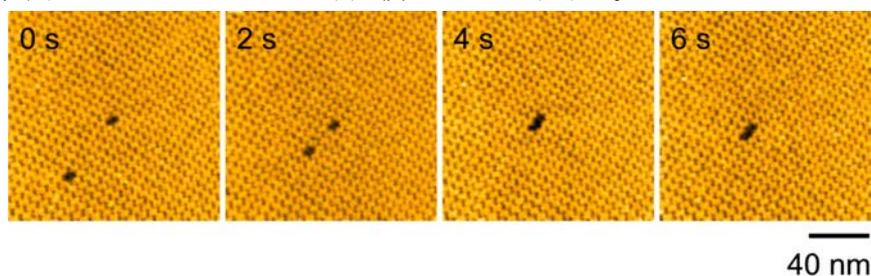


図 33: 空隙欠陥の融合を捉えた AFM 像。

【複空隙点欠陥の拡散】

複数の単空隙点欠陥が存在するストレプトアビジンの2次元結晶をしばらくイメージングしていると、それらが接近して融合し2空隙点欠陥となり(図 33)、更に時間が経つと融合が進み、サイズの大きな複空隙点欠陥が形成される様子が観察された。融合と逆の反応、すなわちサイズの大きな点欠陥から小さい点欠陥へ分裂はめったに観察されなかった。分裂は起こっているはずであるが、分裂した直後に形成される2つの点欠陥の両方に接するストレプトアビジン分子に含まれる分子間サブユニット・サブユニット結合の数は2つしかなく、その結果素早くどちらかの点欠陥に移動してしまうと考えられる。この速い移動は 0.5 s/frame のイメージング速度では捉えられていないと考えられる。分裂は過渡的にしか生ぜず、融合が優位に進むことは、バルクの溶液中のストレプトアビジンが存在する下で結晶成長が進むときに欠陥の少ない結晶が形成されるのに重要な働きをしているものと思われる。単空隙点欠陥や2空隙点欠陥はバルク中のストレプトアビジンにアクセスしづらく、欠陥は埋まりにくい。小さい点欠陥が融合し大きな点欠陥になることで、その大きな点欠陥はバル

中のストレプトアビジンを容易に取り込めるようになる。その結果、融合により一旦大きくなったひとつの点欠陥は直ぐにひとつの小さい点欠陥になり、結局、小さい点欠陥の数が減少する。融合が起こらないと、小さい点欠陥の数は容易に減らない。

興味深いことに、サイズの大きい点欠陥の拡散は単空隙欠陥に比べて速い。3以上の空隙点欠陥のa軸方向とb軸方向の拡散定数はそれぞれ、対応する単空隙点欠陥の拡散定数よりも大きい。2つの小さい点欠陥の融合により1つの大きな点欠陥が形成され、その大きな点欠陥のより速い運動によって他の点欠陥との融合が加速される。その第2の融合により、融合した欠陥は更に速く動く。この加速効果は、バルク中にストレプトアビジンが存在するときの結晶成長において小さい点欠陥の数が減少するのを促進することは明らかであろう。

【成果の位置づけや類似研究との比較】

上記の点欠陥の高速AFM観察は、ストレプトアビジン以外の2次元結晶にも広く適用でき、それ故、様々なタンパク質の2次元結晶の結晶成長プロセスのメカニズムの理解に有効と考えられる。上記の観察と考察から得られた結晶成長のメカニズムが普遍的に成り立つかは今後に残された課題である。また、バルクの溶液中にフリーなタンパク質が存在するときの結晶成長における初期過程(核形成)や、核や比較的大きく成長した結晶のエッジ部での成長過程、点欠陥の生成・消滅過程など高速AFMで観察するに興味ある課題が多く残されている。ここで例証したように、高速バイオAFM観察はタンパク質の機能動態ばかりでなく、タンパク質結晶の物理化学的研究にも大いに威力を発揮する新しい手法である。

4.2.4. その他のイメージング

紙面が限られているので、ここでは上述したタンパク質以外のイメージング研究の概略だけを述べる。

【GroEL-GroES の反協同的相互作用】

GroEL は 14 個の同じ ATPase サブユニットから構成され、7 つでリング構造を形成し、2つのリングは背中合わせで結合している。ATP の結合に関して同じリング中では正の協同性が働き、リング間では負の協同性が働くことが、生化学的研究によって示唆されている。コシャペロンである GroES は ATP を結合したリングに結合する。従って、負の協同性の結果、GroES は2つのリングに同時には結合できず、どちらか一方のリングにしか結合できないと提唱されている。しかし、この問題に対する明確な証拠は得られていない。

リングと GroES の結合・解離のダイナミクスを観察するために、**図 34a** に示すようにストレプトアビジンの2次元結晶の上に赤道部分がビオチン化された GroEL を固定した。ストレプトアビジンはタンパク質を非特異的に吸着しないため、加えた GroES は溶液中に浮いている。**図 34b** の高速 AFM 像に示すように、ATPase 反応に制御された GroEL・GroES 間の結合・解離が観察された。2つのリングに GroES が交互に結合する。反協同性が存在することの明確な証拠が映像として捉えられた。しかし、この交換の直前に両方のリングに GroES が結合した中間体(**図 34b** の 4.6 秒、20.1 秒、25.5 秒目のフレーム)が存在することを突き止めた。従って、GroEL-GroES 間の反応スキームに修正を迫る結果となった。

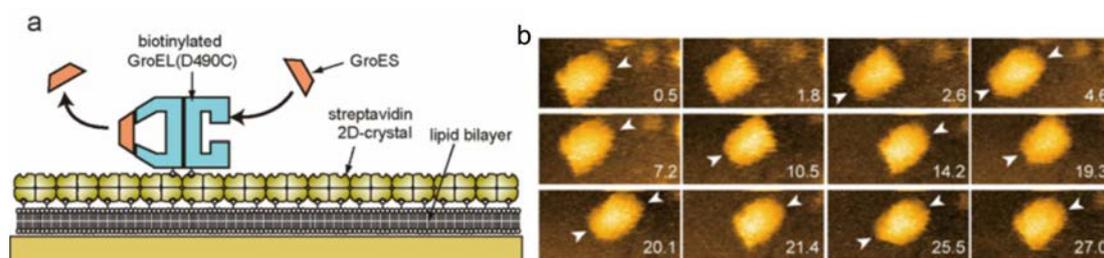


図 34: ATP 存在下での GroEL-GroES の結合・解離のダイナミクス。(a) アッセイ系の模式図。(b) 高速バイオ AFM による観察結果。

【bR2次元結晶のダイナミクス】

どのような結晶も非結晶領域と動的な平衡にある。この動的平衡を、紫膜における bR の2次元結晶で直接観察した(図 35)。興味深いことに、この平衡は bR3量体で起こっており(82%)、2量体、1量体は僅かにしか存在しない。すなわち、bR 密度が極めて低い非結晶領域においてすでに3量体が形成されている。この境界部で3量体は結合・解離を頻繁に行い、結合寿命は指数関数分布をもつ。また、結合寿命の長さは、境界部での bR3量体間の結合に含まれるボンドの数に依存していた。2つのボンドで結合した bR3量体の結合寿命 (0.19 ± 0.01 s)と3つのボンドで結合した寿命 (0.85 ± 0.08 s)から、ボンド1つ当たりの結合エネルギーが $1.5 k_B T$ と求められた。また、境界部では3量体がひとつのボンドで結合し、その点を軸として回転する様子も観察された。bR の原子モデルの2次元結晶との比較から、この結合部位が W10-12 に対応することも見出された。

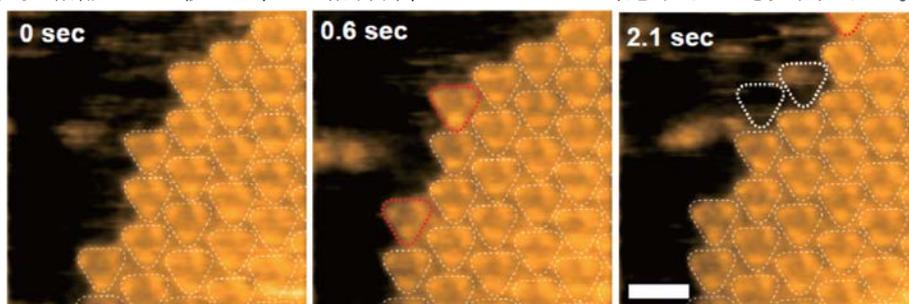


図 35: bR2次元結晶の境界部における動的平衡の高速 AFM 像。イメージング速度: 3.3 frames/s、スケールバー 10 nm。赤線で囲った箇所は新しく結合した bR3量体を示す。

【アネキシンVの2次元結晶のダイナミクス】

アネキシン V はリン脂質結合性タンパク質で膜輸送や細胞分化、情報伝達などに関連した多様な機能を持つと考えられている。アネキシン V は Ca^{2+} 存在下で負電荷を持つ脂質に強く結合するため、ホスファチジルセリン(PS)を含有した脂質膜上で 2 次元結晶を形成する。高速 AFM で結晶成長過程や分子の拡散等の観察を行った。

観察溶液中にアネキシン V が高濃度存在しても、 Ca^{+} イオンが含まれていない状態では結晶化せず、脂質表面のみが観察された。AFM 観察中に塩化カルシウム溶液(最終濃度 3mM)を注入すると、注入直後から結晶成長核となるアネキシン V の3量体の脂質膜への吸着が起こった。時間経過により核が成長していくとともに、2次元結晶化が進行していく様子を捉える事ができた。また、EGTA 注入により結晶の崩壊過程を観察することもできた。

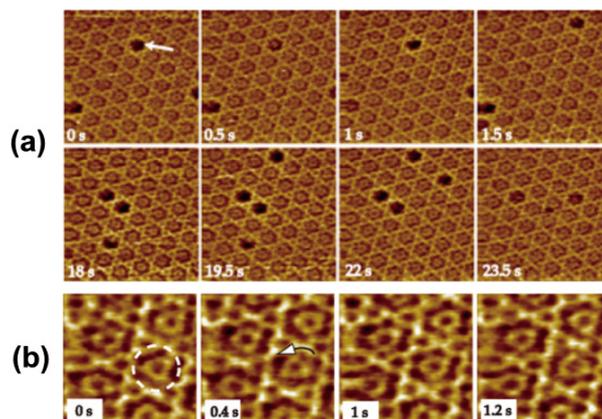


図 36: アネキシンの2次元結晶におけるダイナミックな現象を捉えた高速 AFM 像。(a) 蜂の巣状構造の穴へアネキシン V トライマーが結合・解離している様子。走査範囲は $150 \text{ nm} \times 150 \text{ nm}$ でイメージングレートは 0.5 s/frame 。(b) トラップされたアネキシン V トライマーは 60 度ステップで回転拡散している。走査範囲は $50 \text{ nm} \times 50 \text{ nm}$ でイメージングレートは 0.2 s/frame 。

アネキシンVは蜂の巣状の2次元結晶構造をとり、蜂の巣の中心穴に入り込むトライマーは電子顕微鏡で明瞭に観察されないことから、脂質に非常に弱く吸着していると考えられている。高速AFMで観察すると、穴にトラップされているトライマーは結合と解離を繰り返していることが分かった(図 36a)。例えば、図 36a:0s で矢印で示した位置の穴では、フレームごとにトライマーが結合したり、解離したりしている様子が見られる。結晶全体に渡って同様の現象が観察された(18s~23.5s)。また、穴に弱く結合したトライマーは図 36b に示すように、周囲のトライマーと相互作用しながら 60 度ステップで回転拡散している様子も観察することができた。

4.2.5. 高速位相イメージング

試料表面の物性マップをイメージングする目的で我々が開発した高速位相検出器では、カンチレバー振動の 1 サイクル中の任意のタイミングで位相検出できる(1 サイクル中の複数点で同時に位相を計測することも原理的に可能である)。従来のロックインアンプを用いた位相検出ではこのようなことはできず、少なくとも数回以上の探針・試料間接触で起こる位相変化を捉えるだけである。

【位相検出タイミングと位相コントラストの関係】

位相イメージングの標準試料としてよく用いられるポリブタジエン(PB)ーポリスチレン(PS)ブロック共重合ポリマーのフィルムを用いて、位相検出タイミングと位相コントラストの関係を水中で調べた。図 37 に示すように、1周期内の異なる時間領域(i-iv)(図 37a)で異なる位相コントラストが得られた。探針が接触して離れた直後(i)では位相コントラストは弱い(図 37b)。(ii)の領域では、明確なコントラストが得られ、PB 領域で $+5^\circ$ の相対的な位相進みであった(図 37c: 暗く見える部分で相対的に位相が進んでいる)。比較的柔らかいPB領域と比較的硬いPS領域はトポグラフィー像の探針押し込み依存性から判断できる。(iii, iv)の領域では $+10^\circ$ の相対的な位相進みであった(図 37d)。このような位相コントラストの検出タイミング依存性が存在することは初めての発見であった。驚いたことに、大気中の観察では、位相コントラストが逆転していた(図 37e: 破線で囲ったPB領域では位相が相対的に遅れている)。また、検出タイミングに依存した位相コントラストは観察されなかった。これは、大気中ではカンチレバーのQ値が高いためである。

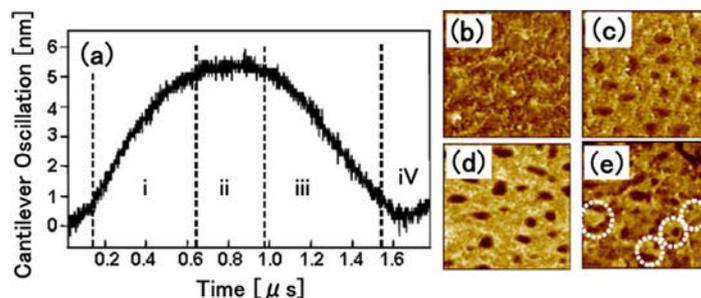


図 37: PB-PS ブロック共重合ポリマーフィルムの位相コントラスト像の位相検出タイミング依存性。(a) カンチレバーの振動波形と位相検出タイミング領域(i-iv)。(b, c, d) それぞれ、位相検出タイミング(i), (ii), (iii)で得られた位相コントラスト像。暗く見える部分(PB)で位相が相対的に進んでいる。(e) 大気中で得られた位相コントラスト像。破線で囲った部分はPB領域。

上記の位相コントラストの検出タイミング依存性を理解するために、PB領域とPS領域のそれぞれについて検出タイミングを(i)から(iv)に移動させていったときの変化や、位相ディスタンスカーブを計測した。その結果、PB、PSのどちらの領域でも位相は遅れているが、PB領域ではその位相遅れは検出タイミングにほぼ依存しないのに対して、PS領域では(i)から(iv)に移動させるにつれて位相遅れが大きくなることが分かった。また、(i)の領域ではPB領域とPS領域での位相遅れは同じ程度であった。以上の観察結果は以下のように解釈できる。位相変化には主に2つの要因が絡んでいる。まず、探針・試料との斥力相互作用により位相が進む。他方、探針と試料との吸着などの原因によってカンチレバーの運動エネルギーが散逸し、位相が遅れる。弾性的斥力相互作用ではエネルギーは散逸しないため、斥力による位相の進みは探針が試料から離れると減少してしまう。

それに対して、エネルギー散逸がある場合には、位相の遅れはしばらく維持される。(i)の領域では位相の進みと遅れがある程度相殺され、遅れが若干優勢である。(iii)や(iv)の領域になると、位相の遅れだけがほぼ表れる。PS は PB に比べて探針とのエネルギー散逸をともなう相互作用が強い
ため、(iii)や(iv)の領域で PS と PB 領域のコントラストが明瞭になる。

【タンパク質の位相イメージング】

まず、ミオシンフィラメントを試料として、カンチレバーの振幅をフィードバック入力信号として一定に保ちながら走査する AM イメージングモードで、トポグラフィーと位相コントラスト像の同時取得を行った(図 38)。この観察では、位相検出タイミングは最も大きな位相コントラストが得られるように設定している。トポグラフィーではミオシンフィラメントは滑らかに見える。他方、位相コントラスト像では、より詳細な構造が観察される。ここで、ミオシンフィラメント上での位相はマイカ上での位相よりも遅れている。これは、ミオシンフィラメントがマイカよりも粘弾性が大きいと判断される。

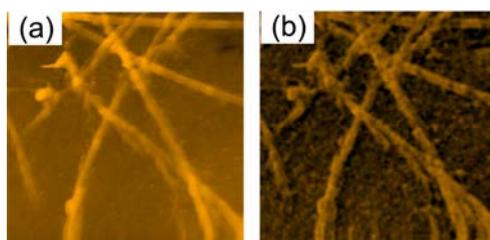


図 38: ミオシンフィラメントのトポグラフィー像(a)と位相コントラスト像(b)。イメージング速度 4s/frame、走査範囲 $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 。

カンチレバー探針と試料との相互作用によるカンチレバー振動の振幅変化よりも位相の方が大きく変化する。従って、位相をフィードバック入力信号として一定に保ちながら走査する PM モードイメージングの方が、AM イメージングモードより鮮明な像が得られることが期待される。そこで、マイカ表面上でリング面がマイカ表面に吸着した GroEL の PM イメージングを行った(図 39)。マイカに吸着した GroEL の観察では、AM モードを用いた場合に注意深くイメージングしないと上側のリングが解離してしまうことがあるが、PM イメージングではそのようなことは起こらずに安定したイメージングできた。また、AM イメージングに比べ高い解像度の像が得られた。

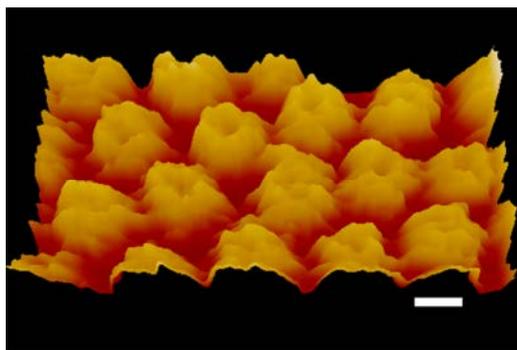


図 39: PM モードで撮った高解像の GroEL 像。スケールバー 10 nm、イメージング速度 480 ms/frame。

【成果の位置づけや類似研究との比較】

高速位相検出器を開発し、上述した計測や観察を行ったが、本来の目的であったタンパク質の物性マップをイメージングする目的には使っていない。PS-PB ブロック共重合ポリマーのように 2 つの領域で物性が大きく異なる試料では、明瞭な位相コントラスト像は得られるものの、タンパク質の異なる部位での物性差は小さく、明瞭な位相コントラストは得られない。大きな位相コントラストは、

針に特定の分子を付け、その分子と試料間で特異的な相互作用がある場合に得られるものと期待されるが、そのような実験を行うことは時間的に無理であった。しかし、高速位相イメージングの実現は世界初の成果である。

4. 3. 基板の開発(金沢大学 安藤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

従来の AFM を使った生体分子のイメージングでも基板はイメージングの成功にとって重要な因子であり、これまでに色々なタイプの基板が開発されている。しかし、遅い走査のイメージングでは試料を動かないように固定するための基板を調製することが主な目的であった。一方、高速バイオ AFM では、生体分子が機能しているときの様子をイメージングするため、生体分子を基板に強く固定することは避けなければならないことが多く、これまで AFM 用に開発されてきた基板をそのまま使えることは稀である。動的イメージングでは、基板に要求される条件はいままでの静的 AFM イメージングよりもきつい。

動的なタンパク質間相互作用のイメージングでは、一種のタンパク質を基板に固定し、その相手となるタンパク質は基板に固定できない。従って、選択的固定が可能な基板が必要になる。また、固定によってタンパク質の機能が損なわれないようにしなければならない。また、個別のタンパク質系の観察に適した基板をそれぞれ調製しなければならない。多くの種類のタンパク質に使える汎用的な基板はない。また、同じタンパク質が観察対象であっても、何を観察するかによっても基板をそれぞれに調製しなければならない。以下に、我々の基板開発の内容をまとめる。

4.3.1. 脂質平面2重層膜のマイカ支持基板

親和性の調節ができ、試料選択性のある基板として脂質平面2重層膜のマイカ支持基板は有用である。Phosphatidyl choline (PC)や phosphatidyl ethanolamine (PE)といった正負両電荷を極性基にもった膜表面はタンパク質への非特異的吸着がない。ビオチンや Ni-NTA といった機能性基を極性基にもつ脂質は市販されている。静電的吸着のために、負電荷をもつ極性基 phosphatidylserine (PS), phosphoric acid (PA)、及び、phosphatidylglycerol (PG)が使える。正電

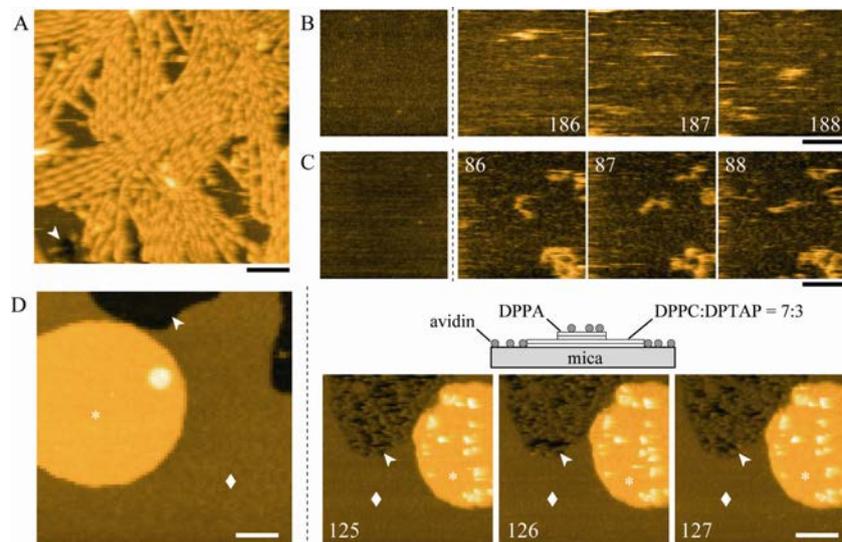


図 40: 電荷をもつ平面脂質膜上へのタンパク質の静電的吸着。(A) 正電荷をもつ平面膜上 (DPPC:DPTAP = 7:3 w/w) に吸着させたアクチンフィラメントのパラクリスタルの AFM 像。スケールバー 100 nm。(B, C) M5-HMM の移動度に与える正電荷表面密度の影響を示す高速 AFM 像。(B)の脂質成分は DPPC:DPTAP = 7:3 (w/w)、(C)は DPTAP のみ。最も左側の像は M5-HMM を加える前の像。イメージング速度 101 ms/frame、スケールバー 100 nm。(D) 正電荷の平面脂質膜上に形成させた負電荷の脂質膜の AFM 像。塩基性タンパク質アビジンが負電荷の脂質膜上(*)と裸のマイカ表面上(矢じり)だけに観察される。最も左側の大きな像はアビジンを加える前。イメージング速度 418 ms/frame、スケールバー 100 nm。

荷をもつ極性基として、trimethylammoniumpropane (TAP) と ethylphosphatidylcholine (EPC) が使える。

不飽和炭化水素を2本のアルキル鎖それぞれにもつ Dioleoyl-phosphatidyl-choline (DOPC)の位相転移温度(T_m)は約 -20°C であるため、室温ではその平面膜は高い流動性をもつ。従って、タンパク質の2次元結晶形成に用いることができる。不飽和炭化水素をアルキル鎖に含まない Dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC)の T_m は約 41°C と高く、低い流動性の平面脂質膜の調製に適している。

以上の種々の性質を利用して目的に適した基板を作成した。

【静電的吸着を利用した平面脂質2重層膜基板】

ミオシンVのアクチンフィラメントに沿った運動観察では、DPPC を主成分として、正電荷をもつ DPTAP の濃度を調節し、ビオチンを極性基にもつ biotin-cap-DPPC を10%ほど加えたものを用いた。DPTAP の場合、その割合を大きく変えても相分離は起こらず正電荷の割合を自由に変えることができた。図 40A, B, C に DPPA 濃度を変えた基板に対するタンパク質の吸着例を示す。

一方、負の電荷をもつ平面脂質膜の調製は難しかった。DPPG を含む平面脂質膜はマイカ表面の広い範囲に亘り形成させることができた。しかし、DPPG の負電荷は極性基の先端に位置していないため、塩基性タンパク質でも弱くしか吸着できない。極性基の先端に負電荷をもつ DPPA ($T_m = 67^\circ\text{C}$) や DPPS ($T_m = 54^\circ\text{C}$) では、負の電荷をもつマイカ表面上では平面膜は形成されなかった。そこで、負の電荷をもつ平面脂質膜上に DPPA を含む平面脂質膜を形成できないか検討した。未だ完全には成功していないが、少なくともパッチ状の負電荷の平面脂質膜は形成できた(図 40D)。

【特異的相互作用を介した試料の固定】

「ビオチンとストレプトアビジン」、「his-タグと Ni-NTA」といった強い親和性をもつ特異的結合ペアはタンパク質の選択的固定に使える。M5-HMM の運動観察ではアクチンフィラメントの選択的固定に前者のペアを用いた。発現したタンパク質の精製に便利であるため、his-タグを発現タンパク質に導入することが多く、Ni-NTA をもつ平面脂質膜は有用である。また、Ni-NTA は低分子なのでイメージングを邪魔しない。Ni-NTA を含む基板の調製では、(a) Ni-NTA を含む脂質を平面脂質膜に混合する方法と、(b) ビオチンを含む平面脂質膜上にストレプトアビジンの2次元結晶を形成させ、そこにビオチンと Ni-NTA をそれぞれ分子の端にもつ分子を結合させる方法の2つが利用できる。発現した AAA タンパク質 p97 を前者の方法で作成した平面脂質膜上に固定した試料の AFM 像を図 41 に示す。His-タグが p97 の特異的部位にあるため、結合した p97 は一定の配向で基板に固定される。

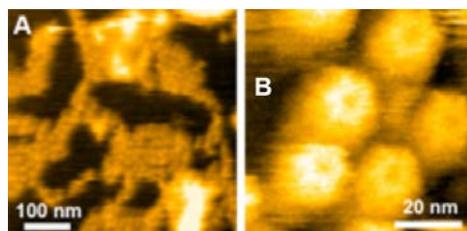


図 41: それぞれのサブユニットの N 端に his-tag をもつ p97 を Ni-NTA を含む平面脂質膜上に結合させた試料の AFM 像。(A) Ni-NTA 脂質が分離していることを示す。(B) C 端の D2 ドメインのリング構造。

4.3.2. ストレプトアビジンの2次元結晶基板

ビオチン脂質を含む流動性の高い平面脂質2重層膜上に形成させたストレプトアビジンの2次元結晶は図 42 に示すように表面が平滑であり、且つ、タンパク質への非特異的吸着を示さず、ビオチンを結合したタンパク質の選択的固定に有用である。この平面はビオチンを複数導入したタンパ

ク質やタンパク質重合体をしっかり固定できる(図 43c)。しかし、タンパク質1分子当たりビオチンを1分子しか導入しない孤立タンパク質では、固定点の周りをタンパク質が激しく動くため、高速バイオ AFM でも像をとることはできなかった(図 43a, b)。ビオチンを2つ含む反応性試薬が市販されているが、これを用いると固定点の周りの回転は少なくなるものの、フレキシブルなジョイントをもつタンパク質ではそのジョイントの周りを固定されていない部分が激しくブラウン運動する。

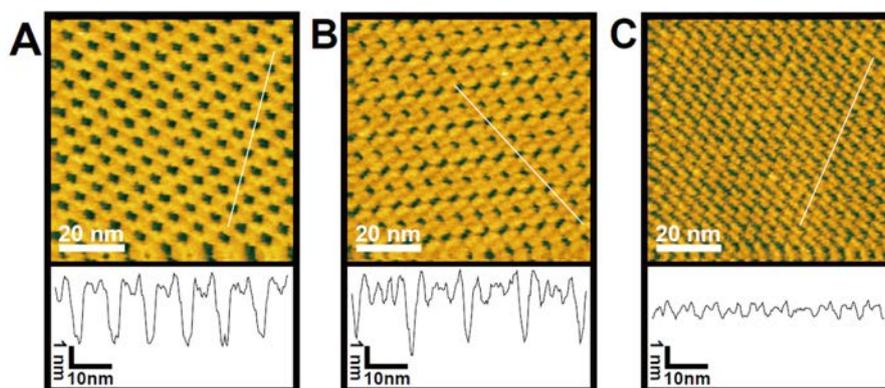


図 42: 3種の格子構造をもつストレプトアビジンの2次元結晶のAFM像と表面粗さ。空間群の対称性は、(A) $C222$ 、(B) $P2$ 、(C) $P1$ (すべて $P2$ 対称性をもつが、ここではよく使われている表記を用いた)。下段は上段のAFM像中にある白線上の表面プロファイルである。 $P1$ 結晶が最も平滑である。

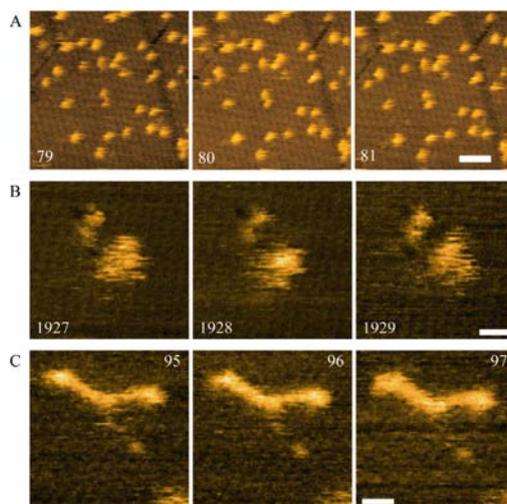


図 43: ストレプトアビジン2次元結晶上に結合させたビオチン化タンパク質の高速 AFM 像。(A) $P1$ 結晶上に結合したカルモジュリン。ビオチンが1分子しか導入されていないため、2つの球部がフレキシブルなリンカーで連結されたダンベル型の構造が見えていない。スケールバー 20 nm。(B, C) $C222$ 結晶上に結合した M5-HMM。スケールバー 20 nm、イメージング速度 487 ms/frame。(B) 2つあるネックの片方にしかビオチンを導入していない場合。分子が速く動いて分子形状を捉えられない。(C) 両方のネックにビオチンを導入した場合。

4.3.3. 脂質平面膜上のタンパク質の運動抑制

ストレプトアビジン結晶上でのタンパク質の運動と同様、平面脂質膜に結合させるための機能性基(ビオチンや his-タグ)をひとつだけ導入した孤立タンパク質分子も激しくブラウン運動してしまう。この運動を抑制するための方法を検討した。

【アネキシンの2次元結晶の利用】

既に述べたように、アネキシンはカルシウム依存的に、極性基に PS を含む脂質膜に結合することが知られている。また、PS を含む平面脂質膜上で2次元結晶を形成する。この2次元結晶の空隙欠陥に観察対象であるタンパク質をトラップすることが可能であると思われる。カルシウムを加える必要があることや小さなタンパク質には利用できないという限界はあるが、ある程度有効な方法と思われる。試験的にストレプトアビジン分子を空隙にトラップできるかを試みた(図 44)。図 44A のように空隙が形成される。アネキシンと一緒にストレプトアビジンを平面脂質膜上に載せ、結晶成長させて観察した像を図 44B に示す。アネキシンを加えない場合には、平面膜の流動性のために、ストレプトアビジンはイメージングできない(図 44c)。

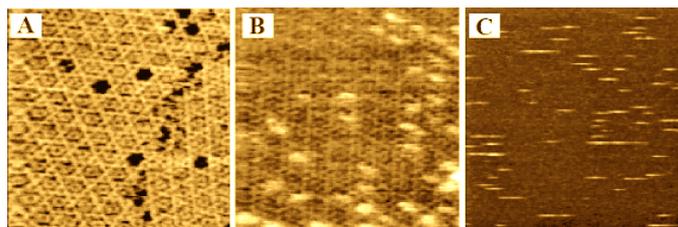


図 44: アネキシン 2 次元結晶中の空隙欠陥へのストレプトアビジン分子のトラップ。(A) 空隙欠陥をもつアネキシン 2 次元結晶の AFM 像。脂質成分は、DOPC:DOPS:biotin-cap-DOPE = 0.65: 0.34: 0.01 (w/w)。(B) 空隙欠陥にトラップされたストレプトアビジンの AFM 像。(C) ストレプトアビジンだけを平面脂質膜上に載せた試料の AFM 像。走査範囲はすべて 200 × 200 nm。

【2次元結晶化】

孤立タンパク質だけを観察するのであれば、そのタンパク質を平面脂質膜上で2次元結晶化させることも有効である。高濃度にパッキングされる結果、タンパク質分子は大きくは拡散しない。2次元結晶を形成しない場合でも、そのタンパク質分子の拡散を抑えられる。ミオシンのような分子には向かないが、コンパクトな形状をしたタンパク質に有効と考えられる。我々は AAA タンパク質 p97 にこの方法を利用した(小椋グループの報告に記載)。

【成果の位置づけや類似研究との比較】

平面脂質膜に基づく基板を観察すべき試料系に合わせる検討を種々行った。平面脂質膜の形成やその表面上でのタンパク質の2次元結晶化の研究はすでに多くなされており、それらを利用した。従って新規な研究ではないが、高速バイオ AFM の観察基板の観点では研究されてこなかったという意味では新しい。ここで行った種々の基板の検討結果は、イメージングの研究に活かされており、今後のイメージング研究においても利用できる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

高速バイオ AFM の開発、高速バイオイメージング、基板の開発の実施内容、成果について上で詳述したが、今後期待される効果についてここでまとめて述べる。

高速バイオ AFM 装置については、今後この装置が世界に広く普及するものと期待している。装置の普及にはメーカーによる製品化が必須であるが、この装置の有効性をアピールしなければメーカーは動かない。また、この装置を必要とする研究者が多いこともメーカーを動かすに必要である。上述した高速バイオイメージングの成果のうち最も興味深い M5-HMM の歩行運動の成果が近く出版されることにより、高速バイオ AFM の需要は高まるものと期待している。また、高速バイオ AFM の国際コンソーシアムを設立し、EU の4研究室に既に装置を設置し、米国の1研究室にも最近設置した。これらの研究室が今後出す成果も需要を高める原動力になるものと期待している。高速バイオ AFM イメージングでは観察に適した試料と基板の調製は必須であり、我々が種々検討した方法が今後活かされるものと期待している。高速バイオ AFM を使う研究者人口が今後増大すれ

ば、試料と基板に関して更に多くの検討が進み、研究を加速し、且つ、高速バイオ AFM の世界的普及を加速するものと期待される。また、従来の間接的手法による研究ではなかなか決着がつかないタンパク質の機能解明が、高速バイオ AFM による機能動態の直接観察により急速に進むものと期待できる。また、分子メカニズム解明に向けた研究者の発想が大きく変化するに違いない。以上のことから、高速バイオ AFM は生命科学に革新をもたらす。また、本研究で得られた成果は、高速バイオ AFM の次世代バージョンの開発を後押しするものと期待される。

4. 4 物性マッピング機能の開発(大阪大学 菅原グループ)

(1)研究実施内容及び成果

《研究のねらい》

水中にある個々のタンパク質分子のナノメータ世界に潜む巧妙な仕組みを解明するためには、静止構造の解明だけでは不十分であり、時々刻々変化する構造(動的構造)や、エネルギー散逸、親水性・疎水性、表面電位と言った様々な物性の動的変化を高速に捉えて画像化することが重要である。ダイナミックに変化する個々の生体分子の構造を高速に画像化することができるようになった現在、次の重要なステップは、様々な物性の動的変化を高速に捉えることである。タンパク質分子に局在するこれらの物性を、構造情報と分離して高精度で測定する方法が開発されれば、生体機能を理解するうえでブレイクスルーとなることは間違いない。そこで本研究では、物性マップをナノ解像で得ることのできる「マルチ高速AFM」を開発することをめざす。具体的には、AFMの高感度化を実現するとともに、高速・高感度な物性測定法を開発し、この装置が、タンパク質分子の機能解明のための強力な最先端の計測機器であることを実証することをめざす。

【高感度・高安定なイメージングモードの考案】

試料の様々な物性の変化を高速に捉えるためには、探針と試料との間に何らかの外部刺激を与え、それに対する微弱な力学応答を高感度・高速に捉えて画像化することが重要となる。現在の高速AFMでは、探針が表面に周期的に接触し、その時のカンチレバー(板ばね)の振動振幅の変化から、探針・表面間の相互作用力を検出するイメージングモード(振幅変調モード、あるいはタッピングモード)が用いられている。振幅変調(AM)モードでは、十分な力検出感度が得られず、十分な信号雑音比(SN比)を確保するためには、どうしても帯域幅を狭めなければならない。これは、マルチ高速AFM開発において本質的な問題点となる。そこで、マルチ高速AFMに適する新たな高感度なイメージングモードに関して検討した。なお、このイメージングモードに関する検討は、探針と試料との間に働く力を軽減し、生体分子の動的構造をソフトに撮像する高速AFMの高性能化にも寄与することになる。

まず、カンチレバーの周波数変化(周波数シフト)から探針・試料間の相互作用を検出するイメージングモード(周波数変調モード)が、高速AFMに適用できるかどうかを考えてみた。周波数変調モード(FM)は、従来のイメージングモード(振幅変調モード)に比べて、一桁以上の力検出感度の向上が可能である。周波数変調モードでは、周波数シフトの検出回路として、一般に位相ロックループ(PLL)回路を使用するが、このPLL回路は、位相検出回路、電圧制御発振器(VCO)、ループフィルターからなるループ回路構成となるため、応答速度が遅く高速AFMには適さないという問題点がある。また、カンチレバーは、発振器からの信号により常に励振されているのではなく、正帰還ループを用いてカンチレバー自体の振動信号により励振されているため、何らかの理由により探針が試料に強く接触した場合、カンチレバー自体の振動が停止してしまう。このカンチレバーの振動停止は、イメージングそのものをだめにし、探針と試料に強いダメージを与えてしまうという問題点もある。

そこで、カンチレバーの位相変化から探針・試料間の相互作用を検出するイメージングモード(位相変調モード)について検討した。理論的検討より、カンチレバーの位相変化から探針・試料間の相互作用を検出するイメージングモード(位相変調モード)が、周波数変調モードと同様に、

従来の振幅変調モードに比べて、一桁以上の力検出感度の向上が可能であることを明らかにした(N. Kobayashi et al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45**(30), L793, 2006.)。

しかし、研究を進める中で、カンチレバーの励振振幅が一定の場合には、探針・試料間の非線形相互作用(双安定性)に起因して、位相の探針・試料間距離依存性に不連続が生じ、安定なイメージングが困難であることが判明した。これは、位相変調(PM)モードでのイメージングの極めて深刻な問題であり、PMモードがこれまで使われてこなかった最も大きな原因でもある。この問題に対しては、カンチレバーの振動振幅が一定となるように制御すれば(図1)、探針・試料間の非線形相互作用に起因する不安定性(双安定性)が完全になくなり、極めて安定なイメージングが可能となることを数値シミュレーションと実験により世界で初めて明らかにした(図2)(Y. Sugawara et al., *Appl. Phys. Lett.*, **90**(19), 194104, 2007.)。

なお、カンチレバーの振動振幅を一定に保ちながら、カンチレバーの位相変化から探針・試料間の相互作用を検出する新しいイメージングモード(位相変調モード)は、探針・試料間の相互作用力を劇的に軽減させることができるだけでなく、カンチレバーの位相シフトを位相検出回路で検出し、ループ回路を使用しないため、応答速度が速く高速AFMに適するという利点がある。また、カンチレバーは、常に発振器からの信号により励振されているので、周波数変調モードのような振動停止の問題は生じず、探針や試料に強いダメージを与えてしまうこともない。さらに、熱ドリフトによるカンチレバーの共振周波数の変化や溶液の体積変化は、カンチレバーの励振効率の変化を引き起こすが、新しいイメージングモードでは、カンチレバーの振動振幅を一定に保つことにより、励振効率の変化を自動的に補償することが可能となる。このため、非常に弱い探針・試料間相互作用で極めて安定な長時間イメージングを実現できるという利点もある。

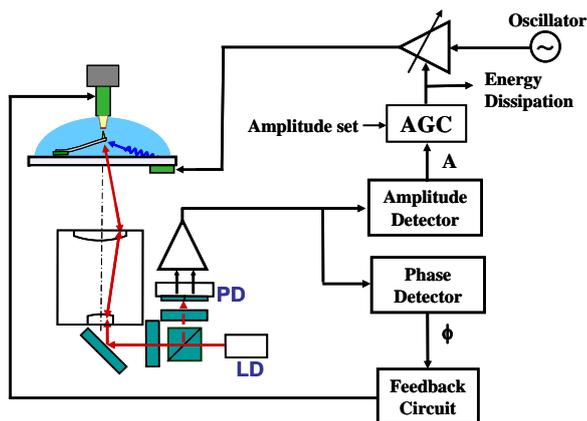


図1 振動振幅一定の位相変調 AFM の構成。微弱な探針・試料間相互作用力を用いた安定な形状測定とエネルギー散逸測定が可能。

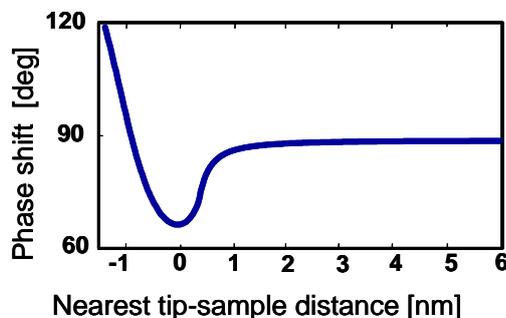


図2 振動振幅一定・位相変調 AFM における位相の探針・試料間距離依存性。これまで問題とされてきた位相の不連続性が完全に除去された。

表1 各種測定方式の比較

| 測定方式 | 振幅変調 (AM) | 周波数変調 (FM) | 位相変調 (PM) |
|------|-----------|------------|-----------|
| 検出感度 | ○ | ◎ | ◎ |
| 高速性 | ◎ | △ | ◎ |
| 安定性 | ◎ | ○ | ◎ |

【新しいイメージングモードの高速動作の実証】

新たに考案したイメージングモードでは、カンチレバーの振動振幅を一定に保持しながら、探針・表面間相互作用によるカンチレバーの位相シフトを捉えてイメージングを行う。そのため、カンチレバーの1周期ごとの振動振幅や位相を高感度・高速に測定することが重要となる。振動振幅や位相測定に使用しているサンプル・ホールド回路のノイズは、サンプリング時のスイッチングノイズ

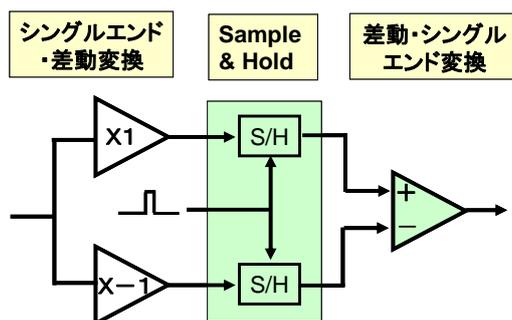


図3 振動振幅・位相検出回路の低ノイズ化

や電圧保持時の電圧ドロップが大きな原因となっている。そこで、サンプル・ホールド回路の構成をシングルエンド型から差動変換型に変更することにより(図3)、同相ノイズ成分をキャンセルし、大幅なノイズ低下を実現し、振動振幅と位相シフトを高感度・高速に測定できるようにした。

また、水中のカンチレバーにレーザー光を照射してカンチレバーを励振する光熱励振法では、有限な熱伝導速度の影響により周波数の増加とともに位相が大きく遅れることが判明した。そこで、比例回路と微分回路を利用した位相補償法を適用することにより、この位相遅れの問題を解決し、高速にカンチレバーの振動振幅と位相を検出できるようにした。さらに、高速振幅測定回路、高速AGC回路、高速位相検出回路、高速フィードバック回路からなる測定回路を実際に構築し、共振周波数が約600kHzのカンチレバーを用いて、10 frame/sでの高速撮像が可能であることを明らかにした。これは、位相変調モードを用いて高速AFMを実現できることを世界で初めて実証した成果である。

【試料形状とエネルギー散逸の高速同時マッピング法の開発】

探針・試料間の力学的な相互作用によって散逸されるエネルギーは、生体試料や水和殻の粘性やゆらぎ、探針・試料間相互作用の凝着ヒステリシス過程など、非常に多くの貴重な物理情報を含んでいると考えられる。振幅変調モードのAFMに関しては、カンチレバーの位相が探針・試料間のエネルギー散逸に比例することが明らかにされているが、新たな高感度なイメージングモードである位相変調モードに対しては、エネルギー散逸を測定する方法は全く検討されていない。そこで、位相変調モードのAFMに対して、形状とエネルギー散逸を高速に同時測定する方法について検討した。まず、エネルギー散逸の関係式を理論的に導出し、位相変調モードに対しては、カンチレバーの振動振幅を一定にするためのフィードバック信号が、エネルギー散逸に比例することを明らかにした(図1)(Y. J. Li et al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **47(7B)**, 6121, 2008.)。また、カンチレバーの振動振幅を一定にするための高速AGC回路のフィードバックを高速化するとともにフィードバックパラメータを最適化することにより、撮像速度を低下させることなく、表面形状とエネルギー散逸を同時に測定できることを実証した。今後、生体試料の粘弾性やそのゆらぎ、水和殻などを高速に撮像できるかどうかを検討する。

【分極可変探針を用いたタンパク質の親水性・疎水性測定法の開発】

AFMを用いて分極情報を測定する手段としては、従来からケルビンプローブ顕微鏡法などが知られているが、これは、試料-探針間にバイアス電圧を印加する必要があり、その動作には、試料表

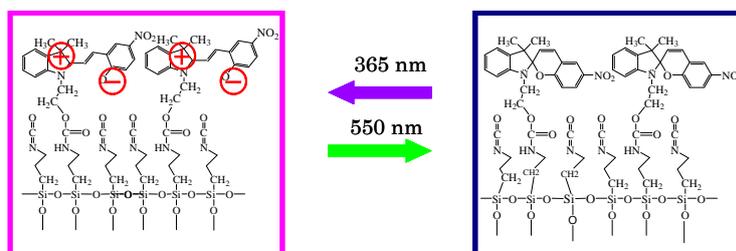


図4 シランカップリング剤を用いてシリコン探針に結合させたヒドロキシスピロピラン単分子層の光照射による構造変化。

面・探針表面ともに電極との電荷の授受が可能であることを前提としている。これは、溶液環境に置かれた生体試料に対して普遍的に適用できる方法とは到底いえない。そこで、生体試料の分極の動的変化を高速に捉えるために、光による異性化反応で分極の有無が切り替わるフォトクロミック材料で探針を修飾し、外部からの刺激光により探針の分極を高速で切り替えながら、親水性・疎水性計測を行う方法について検討した。

まず、フォトクロミック分子(スピロピランおよびアゾベンゼン)の間に適度な割合のスペーサ分子を共吸着させることにより、分子の密集による立体障害を排除し、2種の光照射によって完全に可逆的な異性化反応を実現でき(図4)、探針の分極を完全に制御できることを確認した(図5)。なお、シリコン探針の先鋭度を損なわない最低限の膜厚と、試料・探針間の相互作用に対して十分な耐久性を持つ修飾方法として、シランカップリング剤による化学結合を利用した。今後は、異性化反応に要する時間をより短縮することなどを念頭において探針の改良に取り組み、実際のAFM計測への応用へと発展させていく予定である。

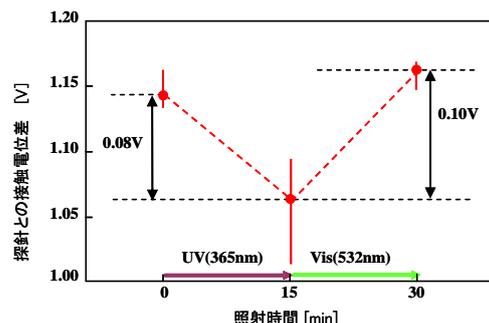


図5 ヒドロキシスピロピラン修飾探針の光照射による表面電位の変化。

【2次の共振モードを利用した新しい物性測定法の開発】

カンチレバーを1次の共振モードだけでなく2次の共振モードでも同時に振動させ、探針・試料間に非線形な力学的相互作用を引き起こすことにより、生体試料の物性を測定する方法について検討した(図6)。理論的検討から、2次の共振モードの位相情報は、探針・試料間に働く保存力、すなわち、試料の弾性情報に比例することを見出した。1次と2次の共振モードを同時に用いることにより、試料形状とエネルギー散逸、弾性の3つの情報を高速(10 frame/s)に同時測定することに世界で初めて成功した(図7)(Y. J. Li et al., *Ultramicroscopy*, in press)。現在、生体試料を高速に多機能イメージングできるかどうかを検討している。

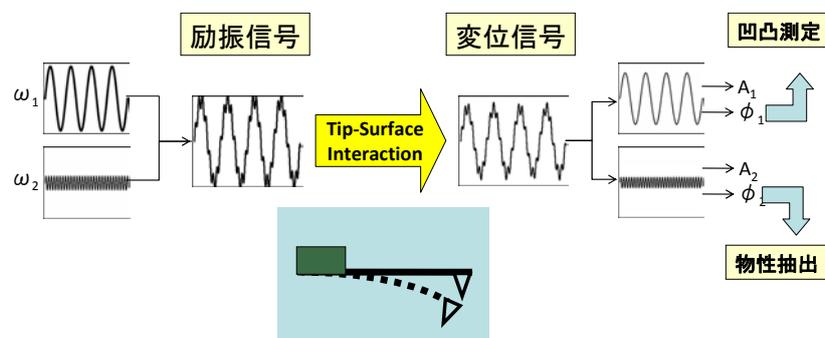
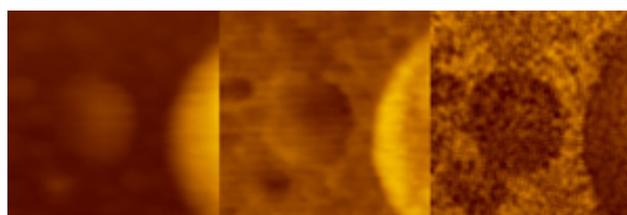


図6 2次の共振モードを利用した物性測定概念図



(a)形状 (b)エネルギー散逸 (c)弾性

図7 (a)形状、(b)エネルギー散逸、(c)弾性のマルチ高速 AFM 測定例(試料:高分子ブレンド膜)

(2)研究成果の今後期待される効果

<成果の今後の展開見込>

カンチレバーの振動振幅を一定に保ちながら、カンチレバーの位相変化から探針・試料間の相互作用を検出する位相変調モード AFM は、タッピングモード AFM に比べて、探針・試料間の相互作用力を劇的に軽減させることができる。実際、すでに国内外の研究グループが位相変調モード AFM の高いポテンシャルに着目し実験を行っており、水中でマイカ表面を原子分解能で観察することにも成功している (*S. Nishida, Rev. Sci. Instrum.*, **79**(12), 123703, 2008) (*L. P. Van, J. Appl. Phys.*, **104**(7), 074303, 2008)。したがって、位相変調モードの高速 AFM は、これまでのタッピングモードの高速 AFM ではイメージングできなかった非常に微弱なタンパク質の動的な振る舞いをリアルタイムに追跡できるようになると期待される。その結果、これまでに予想されていなかったような新しい現象をイメージングできる可能性がある。

また、位相変調モード AFM では、位相シフターと増幅器とからなるフィードバックループを追加することにより、カンチレバーの実効的 Q 値を制御することが可能である。実効的 Q 値をさらに小さくすることにより、撮像速度のさらなる高速化も期待できる。しかも、探針・試料間相互作用力の感度を低下させないため、極めて革新的な高速・高分解能なタンパク質のイメージング技術になる可能性が高い (*N. Kobayashi et al., J. Appl. Phys.*, **103**(5), 054305, 2008)。

さらに、位相変調モード AFM では、位相シフトの探針・試料間距離依存性に不連続がなくなったため、全ての探針・試料間距離における相互作用力やポテンシャルエネルギーの導出が可能になる。実際、すでにドイツの研究者が位相シフトの探針・試料間距離依存性から相互作用力やポテンシャルエネルギーを求めるための関係式を理論的に導出しており (*H. Hölsher, J. Appl. Phys.*, **103**(6), 064317, 2008)、位相変調モード AFM によるフォース分光が可能となりつつある。このようなフォース分光により得られる力学情報は、タンパク質分子に作用する様々な力の起源を分離したり、識別したりすることにつながると期待される。

他方、試料形状とエネルギー散逸、弾性の3つの情報をナノ解像で高速に同時測定可能なマルチ高速 AFM は、タンパク質の機構解明に大きなインパクトを与える詳細な映像データを提供できるようになると期待される。エネルギー散逸と弾性は、生体試料や水和殻の粘性やゆらぎなどに関係した貴重な物理情報を含んでいると考えられ、タンパク質の動的な振る舞いを解明する極めて貴重なデータとなる可能性が高い。タンパク質分子の機能解明のための強力な最先端の計測機器としてのマルチ高速 AFM の有効性は、現在のところ、まだ実証されていないが、近い将来、必ず証明されると確信している。

<想定される科学技術や社会への波及効果>

試料形状とエネルギー散逸、弾性の3つの情報をナノ解像で高速に同時測定可能なマルチ高速 AFM は、生命科学における革新的なツールとして位置づけられ、生体機能を理解するための貴重な映像データを提供できることは間違いない。一方、溶液中の固体表面で起こる動的現象は数多く存在する。例えば、触媒表面での反応、固体表面での2次元結晶成長、電極表面での水素発生反応などが挙げられる。しかし、その動的現象をナノメートルの空間分解能でリアルタイムに追跡できる有効な技術は極めて少ない。本研究で開発したマルチ高速 AFM は、このような科学技術分野においても革新的なツールとして位置づけられ、広く用いられていくと期待される。すなわち、マルチ高速 AFM は、解明が遅れている溶液中の表面科学の様々な課題を解決する革新的なキーテクノロジーであり、その社会的波及効果は極めて大きい。

4. 5 AAA タンパク質(熊本大学 小椋グループ)

(1)研究実施内容及び成果

AAA 型シャペロンによる基質タンパク質やその会合体の構造変換の様子および AAA 型シャペロン自体の会合過程や ATP 依存的動態を高速 AFM で捉え、その機能解明を目指した。

(a) 線虫由来 p97: 多機能 AAA タンパク質 p97 は 6 量体のリング構造を形成し、それぞれのサブユニットは N、D1、D2 ドメインの 3 つのドメイン構造から成る。p97 の ATP 加水分解サイクルにおける各ドメインの構造変化を観察するため、マイカに直接 p97 を固定し高速 AFM 観察を行った。フレームレート 0.1sec/frame での高速 AFM 観察で p97 の 6 量体構造とリング中央の孔が明瞭に認められたため、p97 の構造変化を観察可能と期待された。ATP 存在下において高速 AFM 観察を行ったところ、p97 リングのサブユニットが 6 量体の対称軸に対して繰り返し角度変化する様子を捉えることに成功した(図 1 左 0.2sec、0.6sec、0.8sec)。この結果は、p97 の ATP 加水分解活性による構造変化を可視化可能であることを示唆している。しかしながら、多くの p97 分子ではこの構造変化を繰り返し測定することはできなかつた。これは、マイカ基板に固定された p97 の ATP 加水分解活性が水溶液中と比較して 1/10 以下に低下するためであると考えられる。N 末端(N ドメイン)あるいは C 末端(D2 ドメイン)に His タグを持つ p97 をマイカに固定し、His タグ抗体を用いてマイカ上における p97 の向きを検証したところ、ほぼ全ての p97 は N ドメインを水溶液側に、D2 ドメインをマイカ側に向けて固定されていることがわかった。D2 ドメインが p97 の ATP 加水分解活性を担っているため、マイカとの相互作用によって p97 の ATP 加水分解活性が著しく影響を受けて構造変化を起こしにくくなったと推測できる。p97 の ATP 加水分解活性および構造変化への基板による影響を排除するため、脂質膜基板、ストレプトアビジン二次元結晶基板の適用を検討した。N 末端に His タグを持つ p97 を Ni-NTA 脂質膜上に固定し観察したところ、p97 が二次元結晶状に敷き詰められ、ヌクレオチド非存在下で不規則な高さ変化をする様子が観察された。しかしながら、この二次元結晶は p97 が活性を持たない酸性の pH 領域でしか得ることができず、また再現性にも乏しく、p97 の構造変化を観察するための測定系としては不適合であった。p97 を二次元結晶を形成させずに脂質膜基板に固定する方法も検討したが、脂質膜自体の流動性によって p97 が側方拡散してしまうなどの問題があり、これを解決することができなかつた。そこで、ストレプトアビジン二次元結晶基板の適用を試みた。ストレプトアビジン二次元結晶基板表面を、ビオチンを介して Ni-NTA 化することで、N 末端に His タグを持つ p97 を固定し、リング構造を観察することに成功した。N ドメインが His タグを介して基板に固定されているので、観察されたリングは D2 ドメインと考えられる。しかしながら、これまでのところストレプトアビジン基板上では p97 の 6 量体構造と ATP 加水分解サイクルに伴う D2 ドメインの構造変化を明瞭に観察するには至っていない。今後、ヌクレオチド依存的な p97 の構造変化をより詳細に解析するとともに、アダプター分子との結合構造を明らかにしたい。

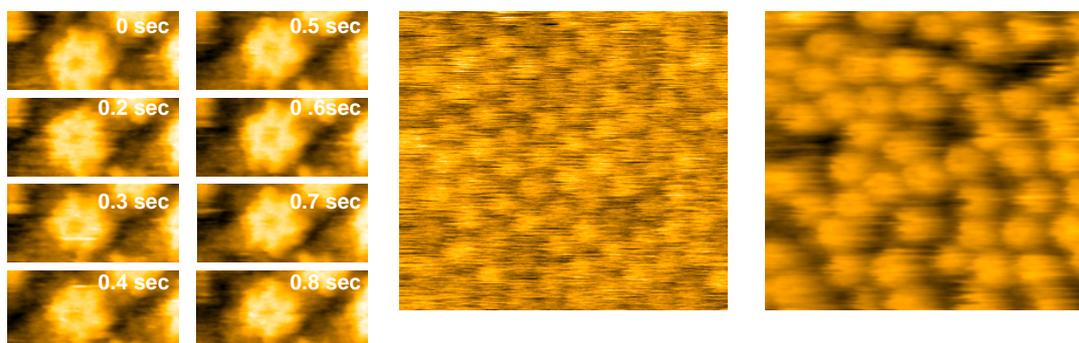


図 1: (左)マイカ基板上に固定した p97 の 6 量体リング。(中)Ni-NTA 脂質膜に固定した p97。(右)ストレプトアビジン基板に固定した p97。走査範囲;(左)40nm × 20 nm。(中、右)150nm × 150nm。

(b) **ウニ由来 Katanin:** 微小管切断タンパク質である katanin の作用機構を高速 AFM で明らかにすることを目標に、ウニ katanin について、ATP 依存的微小管切断の条件を検討し、AFM 観察を行った。

実験開始当初は、1)マイカ基板に吸着する微小管の量が少なすぎたり、2)AFM 走査中に探針によって微小管が容易に破壊されてしまうという問題があった。微小管の吸着量に関しては、マイカ基板に変異キネシンを吸着させてから、そのキネシンに微小管を結合させることによって改善することができた。また破壊問題は、高速 AFM の種々の改良(低ノイズ化による小振幅での測定と変位検出用レーザーパワーの低減、パラメトリック共振法によるタッピング力の低減)によりかなり改善され、比較的長時間にわたって微小管を高速観察できるようになった。

最初に低速 AFM を用いて、キネシン基板に固定された微小管がカタニン p60 により切断される条件を検討した。その結果、カタニンと反応させていないときは、微小管はほとんど途中で切れることなく観察されている(図 2(a))が、基板に固定した微小管と p60 を 10mM ATP 存在下で6分間反応させることで、ところどころ微小管が切断されている様子が確認できた(図 2(b))。ATP 存在下で p60/p80 複合体と微小管を高速 AFM 観察すると、微小管側面にカタニンが、多数結合し、それらが側面を動いたり、結合・解離する様子(図 3)が見られた。

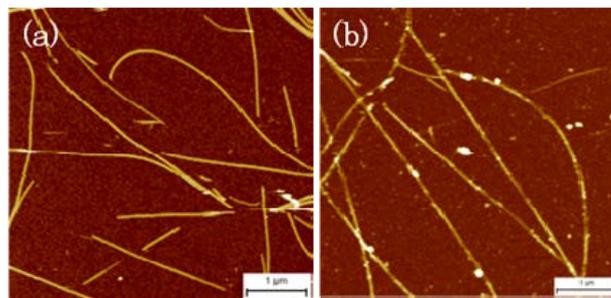


図 2:カタニンと(a)反応前および(b)反応後の低速 AFM 像。

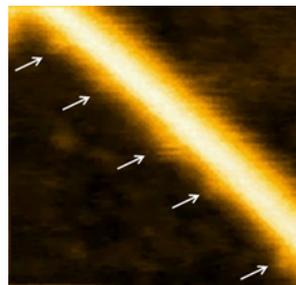


図 3 : p60/p80 が微小管に結合している様子。

Katanin 分子は像の中に観察されていないが、微小管の格子構造が壊れていく様子を観察できた(図 4)。なかには切断にまで至る破壊が観察できた。Katanin を添加しない対照の実験系では微小管の構造変化は観察されなかったため、katanin による切断過程を見ている可能性が高いと考えている。今後はさらに解像度を上げ、また katanin 自体の観察もめざし、変異体 katanin を用いた実験も進める予定である。

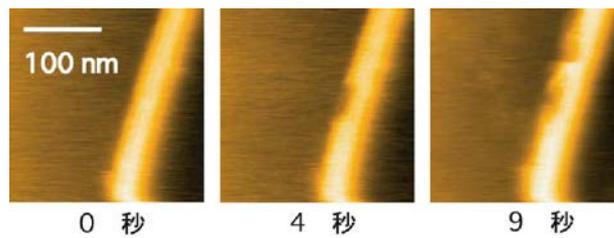


図 4: Katanin による微小管格子構造の破壊。マイカ上に変異キネシンで微小管を固定し、katanin と ATP を添加して、高速 AFM で微小管構造を経時的に観察した。

(c) 大腸菌 ClpX と FtsZ: 細胞分裂関連タンパク質 FtsZ の構造変化を高速 AFM で観察した。その結果、FtsZ は GTP 依存的に構造変化 (bending、bundling、disassembly-reassembly) に富む線維状のポリマーを形成することを明らかにした (図 5)。さらに、ClpX が FtsZ 線維形成を ATP 非依存的に抑制することを明らかにした。

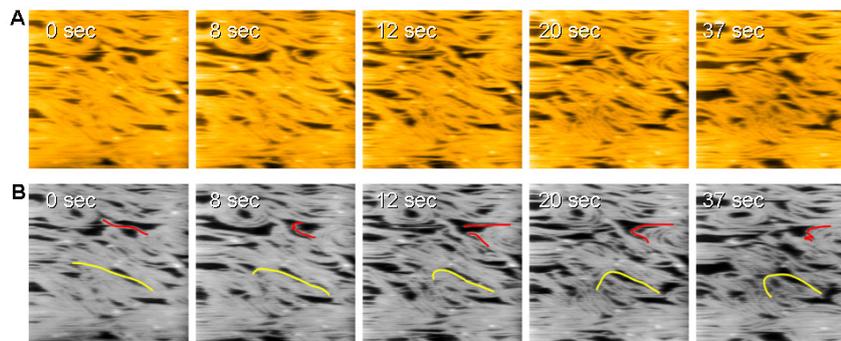


図 5: (A) マイカ上に直接固定した FtsZ 線維の構造変化。(B) A のうち特徴的な構造変化を赤と黄色で強調した。サイズは 400nm × 400nm。

(d) 酵母 Hsp104 とアミロイド凝集体: 酵母 Hsp104 が細菌由来タンパク質のアミロイド凝集体に作用する様子を高速 AFM で観察し、線維状タンパク質 (アミロイド) に球状タンパク質 (Hsp104) が結合し、断片化している過程を観察することができた (図 6)。今後、神経変性疾患に関与するアミロイド凝集体 (polyQ、TDP-43) や酵母プリオン Sup35 アミロイド凝集体の断片化および線維形成の促進の過程を観察したい。

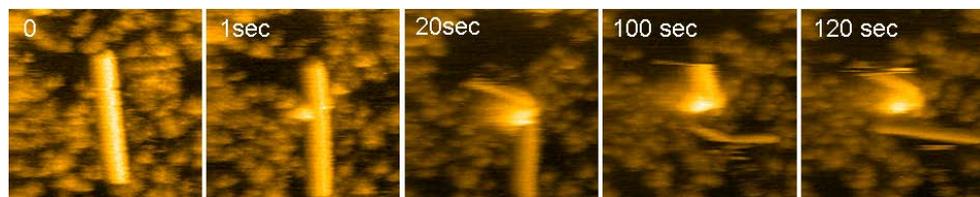


図 6: マイカ上に直接固定したアミロイド線維の断片化。サイズは 200nm × 200nm。

(e) 大腸菌 FtsH: ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の基質分解機構を高速 AFM で明らかにすることを目標に、GST-flavodoxin-GFP の末端に His₆ タグを付加したモデル基質を構築し、その分解を確認した。マイカ基板上に NTA で修飾した脂質の二重層を形成させ、その上に GST-flavodoxin-GFP を固定した。AFM 観察したところ、基質は基板に固定化できていたが、各ドメイン (GST、Flavodoxin、および GFP) を識別することはできなかった。一方、FtsH の基板への固定も試み、マイカ基板の脂質二重層に FtsH を埋め込んで固定化できることを確認した。しかし、基質

分解過程の AFM 観察には至っていない。

(f) AAA タンパク質のオリゴマー構造の比較: AAA タンパク質の溶液中のオリゴマー構造とその安定性を生化学的実験と高速 AFM により評価した。p97 は安定な 6 量体リング構造を形成するが、ClpX は不均一なオリゴマーを形成し、ATP 存在下では 6 量体以上の多量体を形成することがわかった。一方、ClpB(大腸菌由来)や Hsp104 は ATP 非存在下で 7 量体を形成し、ATP 存在下では 6 量体を形成することを生化学的手法により確認した。今後、高速 AFM でこれらのオリゴマー状態の変化を観察するとともに、その生理的な意義を明らかにしたい。

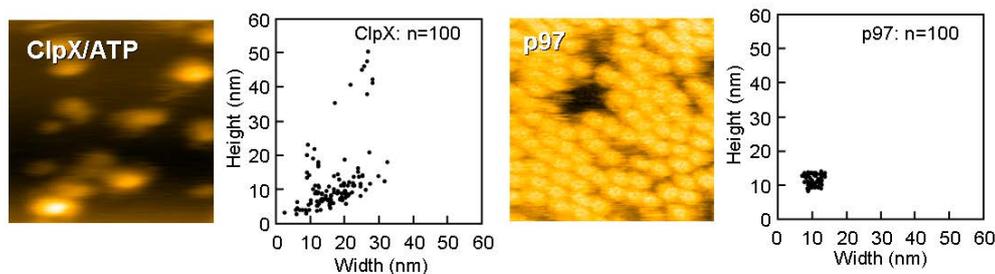


図 7: ClpX と p97 のオリゴマー構造の比較。グラフは AFM 像から得られた幅と高さをプロットしたものの。画像のサイズは 200nm×200nm。

(2)研究成果の今後期待される効果

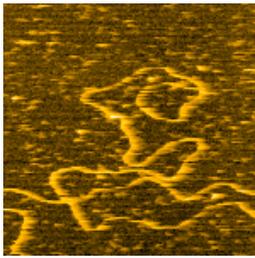
いくつかの系で具体的なデータが取得できてきており、あと一歩で劇的な展開が期待できるところまできている。AAA 型シャペロンのいくつかは、ヒト疾患、特にタンパク質凝集体が蓄積するヒト疾患との関連性が示唆されており、タンパク質凝集体モジュレーターとして注目されている。特にタンパク質の unfolding やタンパク質複合体の disassembly は、他の分子シャペロンには無い特徴である。これらの過程を高速 AFM でつぶさに観察することで、それらの分子機構の解明が格段に進むばかりか、ヒト疾患の発症機序の解明、予防・治療戦略の確立にも資する。

4. 6 DNA 関連タンパク質(大阪大学 森川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

DNA の複製、転写、修復に関与する超分子複合体の作用機構を、高速 AFM 観察によって明らかにすることを目標に研究を遂行した。この手法に適合し、且つ生物学的に重要な DNA 関連タンパク質のターゲットを見出すことは容易ではないため、広い視野からターゲットの選定を行った。この結果、ターゲットタンパク質と AFM 基板との適合性が、多くの場合 AFM 観察を可能、不可能を決定することが判った。

(a) RuvA・RuvB・Holliday 分岐点複合体: RuvA、RuvB の試料供給と Holliday 分岐(HJ)DNA の試料調製を行った。特に AFM 観察に適した様々な HJ DNA の設計を検討した。基板との安定な結合を考慮して、基板への固定を視野に入れたビオチン化 HJ DNA、長さの異なるアームを有する合成 HJ DNA、およびプラスミド由来の HJ DNA を調製し、AP マイカ基板上での HJ の形成を AFM 観察によって確認した(図1)。しかし AP 基板に対する吸着がタンパク質と DNA との間で大きく異なり三者複合体の AFM 観察像を再現よく得ることは困難であった。



(図 1)

(b)クロマチンリモデリング:構造解析に適した DNA 配列と、コアヒストンを用いて、モノヌクレオソーム、テトラヌクレオソーム、15mer, 20mer-オリゴヌクレオソームを再構成した。これらのヌクレオソームに関しては再現性の高い試料調製が可能となった。実際、オリゴヌクレオソームの EM 及び AFM 観察を試みたところ、4、15 個、20 個のモノヌクレオソームが数珠状に連なったオリゴヌクレオソームの形成が確認できた(図 2)。これらの試料の AFM 観察を行う事で、問題点も明確となった。即ち、AFM の測定針に

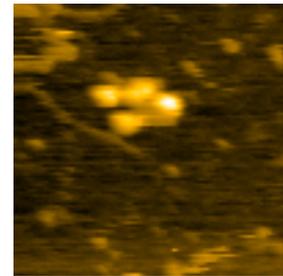


図 2: テトラヌクレオソームの AFM 像

よって、ヌクレオソーム構造が経時的に破壊されるという問題と、マイカ基板との相互作用によって、試料の変性も含めて予測できない影響を受けるという問題である。前者については、装置側の改良を行う事で、ヌクレオソームが壊れるスピードをかなり遅くする事ができるようになった。また、後者については、Buffer 条件を検討する事で若干の改善がみられた。

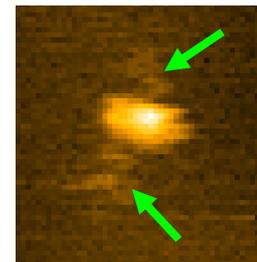


図 3: FACT の AFM 像

FACT に関しては大腸菌及び昆虫細胞での大量発現、精製系が確立し、AFM 観察も順調に行われた。FACT 単独の AFM 観察像を注意深く解析したところ、大きな楕円状の物体からヒゲのような線状のものが出ている分子像が観察された (図 3)。この線状の tail 構造は、FACT に多く含まれる天然変性(intrinsically disorder; ID) 領域であると考えられる。そこで、FACT の二次構造予測により ID 構造と予測された領域を欠失させた変異

体を作製し、AFM 観察を行ったところ、それぞれの tail 構造が欠失した FACT 分子が観察された。このように、クロマチンリモデリングに関連した FACT の天然変性領域を溶液中の“生”の状態でも直接可視化したことは世界最初の成功例として注目される。次に、高速 AFM 観察で得られた画像情報から ID 領域の物理化学的特性を見積もった。その結果、FACT-ID 領域は柔軟で、通常の球状蛋白質よりも変性した蛋白質に近い特性をもつ事が判明した。ID 領域の物理化学的特性を動画像から直接見積もることは、従来の技術では困難でこれまでもデータがなく、これが最初の報告である。また、この手法は他の ID 構造を多く含む蛋白質にも応用できる汎用性の高い手法であり、ID 構造の分子運動を解明する上で大きく貢献すると期待される。

当初の計画に従って、大腸菌及び昆虫細胞から取得した FACT とヌクレオソームとの複合体の AFM 観察を行った。しかし、期待されたような観察像は得られなかった。前述したように、問題は基板との吸着による複合体の破壊が観察を困難にする事で、本質的な解決が必要とされる。一つの方策として、Buffer 条件の検討や脂質二重膜など新たな基板を試したが、解決には至らなかった。

(c) Smc ファミリー蛋白質

(i)コヒーシン複合体(酵母由来):コヒーシン複合体は真核生物の姉妹染色分体接着を担う蛋白質複合体である。この複合体は Smc 蛋白質 Smc 1、Smc3 及び非 Smc 蛋白質 Sec1、Sec3 より構成される。これまでの生化学的解析より、Smc1-Smc3-Sec1 三量体はリングを形成し、このリングが姉妹染色分体を内包していると考えられている。一方、電子顕微鏡や AFM を使った観察より、Smc1-Smc3 二量体は V 字状で、Smc1-Smc3-Sec1 三量体はリング状である事が報告されている。しかし現在のところ、この複合体の溶液ダイナミクスは不明で、V 字状の Smc1-Smc3 二量体がどのようにリングを形成し、DNA 内包に至るか明らかになっていない。今回我々はコヒーシン複合体の溶液動態を調べる目的で生体分子を非染色条件下溶液

中で観察できる高速 AFM を使用し、解析を行った。その結果、Smc1-Smc3 二量体は三つの球状ドメインが二つの紐状コイルドコイルで連結されており、激しく揺動していた (図 4)。それぞれの Smc 蛋白質のコイルドコイル長はこれまで報告されているように約 50nm であった。Smc3 の詳細な解析より Smc3 のコイルドコイルは解けている事がわかった。その一方の中程に小さな球状ドメインが観察され、様々な欠失ミュータントを用いた実験の結果、Smc3 の C 末端付近にこの球状ドメインが存在することが判明した。この小さな球状ドメインはこれまでに報告がなく、今回が新しい発見である。

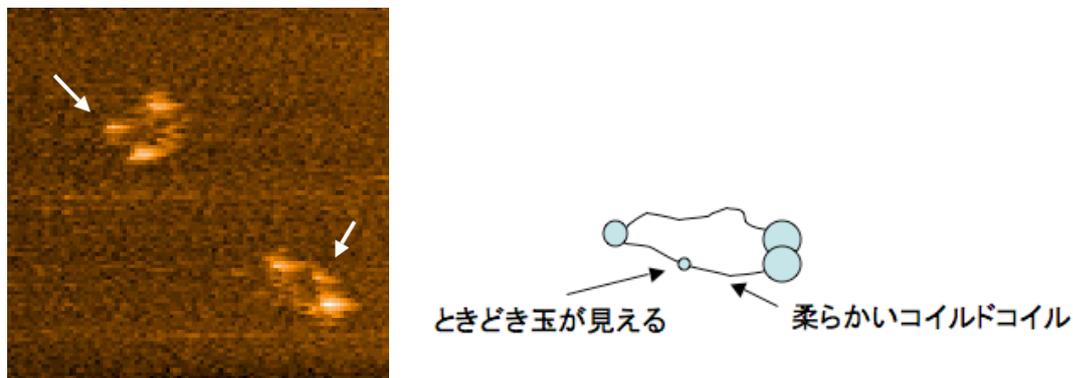


図 4: コヒーシン複合体の AFM 像と模式図。

(ii) Smc (*Pyrococcus furiosus* 由来): 酵母コヒーシンの古細菌ホモログである Smc はホモ二両体を形成し、コヒーシン同様に長いコイルドコイル領域が予想されている。しかし、観察の結果は柔軟なコイルドコイルを持つコヒーシンとは大きく異なり、非常に固い棒状のコイルドコイルが観察された (図 5)。この棒状コイルドコイルには屈曲しやすい部分が 2カ所存在することがわかった。これらはヒンジ領域とヘッドの中程とヘッドの付け根に位置している。一次配列から *P. furiosus* の Smc にはコイルドコイルの切れ目が予想されており、今回観察された屈曲しやすい部分はそれに対応する位置に観察されている。

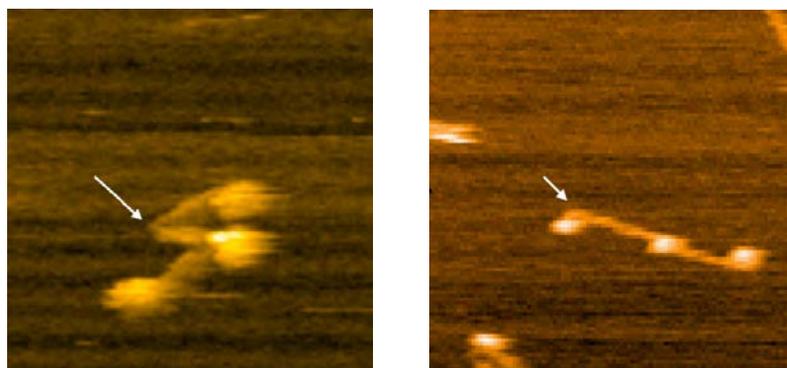


図 5: Smc ホモ2量体の AFM 像。

(iii) Rad50 (*P. furiosus* 由来): Rad50 はコヒーシン複合体や Smc と同様に長いコイルドコイル領域を持っている。高速 AFM による観察結果からはわずかに湾曲した非常に固いコイルドコイルが観察された。このコイルドコイルは Smc のものよりも固く、折れ曲がりには観察されなかった。これらの観察結果から、コイルドコイル領域は蛋白質の種類によって多様な性質を持つことがわかった。

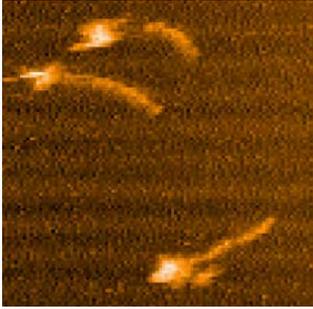


図 6: Rad50 の AFM 像。

(2)研究成果の今後期待される効果

(a)RuvA・RuvB・Holliday 分岐点複合体:三者複合体の観察の成功に引き続き、脂質二重膜上での HJDNA は適度にゆらいていることから、脂質二重膜は、不安定な三者複合体中の RuvA、RuvB による相同組み替え反応機構を観察するには最適な基板となるかもしれない。性質の異なる DNA とタンパク質が関与している多くの重要な生命活動が、不安定な超分子複合体を形成している事を考えれば、この観察系は、有用な例となるであろう。

(b)クロマチンリモデリング:FACT の AFM 観察から示唆されたように、高速 AFM が不規則構造の同定に利用できる事実は重要な発見である。実際、真核生物の転写制御因子やクロマチンリモデリング因子には、構造をもたない天然変性領域が非常に多く存在し、その領域が異種間で高く保存されており、重要な機能をもっている事实在が判明しつつある。しかし、天然変性領域の動的挙動とその機能の関係はいまだ明確になっていない。その主な原因は天然変性領域を解析する決定的な手法がこれまで存在しなかったことにある。実際、X 線結晶構造解析や電子顕微鏡観察では天然変性領域を直接観察する事は不可能である。したがって、「高速 AFM 観察が蛋白質の不規則構造の分子挙動を解析する手段となる」ことを提案し、手法として一般化できれば、今後の蛋白質機能研究に大きな貢献をするであろう。

また、先にあげた問題点の一つである基板への結合による試料への悪影響を防ぐために、新たな発想を基礎にした AFM 観察基板の開発に関する研究が、今後非常に重要になってくると考える。

(c) Smc ファミリー蛋白質:本研究によってコヒーシ複合体がそのコイルドコイル中に小さな球状ドメインを持つことがわかった。この小さなドメインは常に観察される訳ではなく、連続観察中に見えたり見えなかったりすることから、安定した構造でない可能性が示唆される。このような性質は他の観察手法では研究することが困難であるため、高速 AFM を使って他の蛋白質においても同様な未知のドメインを発見できるかもしれない。

Smc の観察では棒状の固いコイルドコイルの一部に屈曲しやすい部分が発見することができた。この屈曲は Smc の固いコイルドコイル構造に柔軟性を持たせる役割を果たせることから、この屈曲によってコヒーシ複合体のようなリング構造を Smc に取らせることが可能になるかもしれない。今後の課題の一つである。

Rad50 のコイルドコイルは Smc よりもさらに固い構造であった。またわずかに湾曲しており、これは Smc には見られない特徴である。一次配列からコイルドコイルと予想されている領域においても、コヒーシ、Smc、Rad50 と多様な姿を観察することができた。同じ Smc ファミリー蛋白質においてもこれだけの違いがあり、今のところその意義は不明であるが、今後機能との相関関係が明らかになった場合にはその意義が判明するかもしれない。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 1件、国際(欧文)誌 44件)

1. N. Kodera, H. Yamashita and T. Ando, Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **76**:053708 (5 pp) (2005).
2. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita, and K. Matada, High-speed AFM for studying the dynamic behavior of protein molecules at work, *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **3**:384-392 (2005).
3. T. Uchihashi, N. Kodera, H. Ito, H. Yamashita, and T. Ando, Feed-forward compensation for high-speed atomic force microscopy imaging of biomolecules, *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(3B):1904-1908 (2006).
4. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita, and M. Sakashita, High-speed atomic force microscopy for studying dynamic behavior of protein molecules at work, *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(3B):1897-1903 (2006).
5. H. Koide, T. Kinoshita, Y. Tanaka, S. Tanaka, N. Nagura, G. Meyer zu Hörste, A. Miyagi, and T. Ando, Identification of the specific IQ motif of myosin V from which calmodulin dissociates in the presence of Ca^{2+} , *Biochemistry* **45**(38): 11598-11604 (2006).
6. N. Kodera, M. Sakashita, and T. Ando, A dynamic PID controller for high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **77**(8): 083704 (7 pp) (2006).
7. T. Uchihashi, H. Yamashita, and T. Ando, Fast phase imaging in liquids using a rapid scan atomic force microscope, *Appl. Phys. Lett.* **89**: 213112 (2006).
8. Y. Yakushiji, S. Nishikori, K. Yamanaka, and T. Ogura, Mutational analysis of the functional motifs in the ATPase domain of *C. elegans* fidgetin homologue FIGL-1: Firm evidence for an intersubunit catalysis mechanism of ATP hydrolysis by AAA ATPases. *J. Struct. Biol.* **156**: 93-100 (2006).
9. T. Okuno, K. Yamanaka, and T. Ogura, Characterization of mutants of the *Escherichia coli* AAA protease, FtsH, carrying a mutation in the central pore region. *J. Struct. Biol.* **156**: 109-114 (2006).
10. T. Okuno, K. Yamanaka, and T. Ogura, Flavodoxin, a new fluorescent substrate for monitoring proteolytic activity of FtsH lacking a robust unfolding activity. *J. Struct. Biol.* **156**: 115-119 (2006).
11. T. Okuno, K. Yamanaka, and T. Ogura, An AAA protease FtsH can initiate proteolysis from internal sites of a model substrate, apo-flavodoxin. *Genes Cells* **11**: 261-268 (2006).
12. M. Kageshima, S. Togo, Y. J. Li, Y. Naitoh, and Y. Sugawara, Wide-band and hysteresis-free regulation of piezoelectric actuator based on induced current for high-speed scanning probe microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **77**(10): 103701(1-6) (2006).
13. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, High-Sensitivity force detection by phase-modulation atomic force microscopy (PM-AFM), *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(30): L793-L795 (2006).
14. S. Morita, H. Yamada, and T. Ando, Japan AFM roadmap 2006, *Nanotechnol.* **18**: 084001 (10 pp) (2007).
15. K. Shinohara, N. Kodera, and T. Ando, Single Molecular Imaging of a micro-Brownian Motion and a Bond Scission of a Supramolecular Chiral π -conjugated polymer as a Molecular Bearing Driven by Thermal Fluctuations, *Chem. Lett.* **36**: 1378-1379 (2007).
16. H. Yamashita, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, D. Yamamoto, and T. Ando, Tip-sample distance control using photothermal actuation of a small cantilever for high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **78**:083702 (5 pp) (2007).
17. Y. Sasagawa, K. Yamanaka, and T. Ogura, ER E3 ubiquitin ligase HRD-1 and its specific partner chaperone BiP play important roles in ERAD and developmental growth in *C. elegans*. *Genes Cells* **12**: 1063-1073 (2007).
18. Y. Matsushita-Ishiodori, K. Yamanaka, and T. Ogura, The *C. elegans* homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**:157-162 (2007).

19. Y. Sugawara, N. Kobayashi, M. Kawakami, Y. J. Li., Y. Naitoh, and M. Kageshima, Elimination of instabilities in phase shift curves in phase modulation atomic force microscopy in constant amplitude mode, *Appl. Phys. Lett.* **90**(19): 194104(1-3) (2007).
20. T. Ando, Control techniques in high-speed atomic force microscopy, *Proceedings of the American Control Conference*, art. no. 4586984, pp. 3194-3200 (2008).
21. T. Fukuma, Y. Okazaki, N. Kodera, T. Uchihashi, and T. Ando, High resonance frequency force microscope scanner using inertia balance support, *Appl. Phys. Lett.* **92**:243119 (2008).
22. A. Miyagi, Y. Tsunaka, T. Uchihashi, K. Mayanagi, S. Hirose, K. Morikawa, and T. Ando, Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy, *Chem. Phys. Chem.* **9**(13):1859-1866 (2008).
23. D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, Anisotropic diffusion of point defects in two-dimensional crystal of streptavidin observed by high-speed atomic force microscopy, *Nanotechnol.* **19**: 384009 (9 pp) (2008).
24. S. Nishikori, K. Yamanaka, T. Sakurai, M. Esaki, T. and Ogura, p97 homologs from *C. elegans*, CDC-48.1 and CDC-48.2, suppress the aggregate formation of huntingtin exon1 containing expanded polyQ repeat. *Genes Cells* **13**: 827-838 (2008).
25. S. Yamauchi, N. Higashitani, M. Otani, A. Higashitani, T. Ogura, and K. Yamanaka, Involvement of HMG-12 and CAR-1 in the *cdc-48.1* expression of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **318**: 348-359 (2008).
26. Y. J. Li, N. Kobayashi, H. Nomura, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, High-speed phase-modulation atomic force microscopy (PM-AFM) in constant- amplitude (CA) mode capable of simultaneous measurement of topography and energy dissipation, *Jpn. J. Appl. Phys.* **47**(7B): 6121-6124 (2008).
27. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, Phase modulation atomic force microscopy in constant excitation mode capable of simultaneous imaging of topography and energy dissipation, *Appl. Phys. Lett.* **92**(12): 121903(1-3) (2008).
28. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, Theoretical investigation on force sensitivity in Q-controlled phase-modulation atomic force microscopy in constant-amplitude mode, *J. Appl. Phys.* **103**(5): 054305(1-4) (2008).
29. K. Mayanagi, Y. Fujiwara, T. Miyata, and K. Morikawa, Electron microscopic single particle analysis of a tetrameric RuvA/RuvB/Holliday junction DNA complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**: 272-278 (2008).
30. Y. Fujiwara, K. Mayanagi, and K. Morikawa, Functional significance of octameric RuvA for a branch migration complex from *Thermus thermophilus*, *Biophys. Res. Commun.* **366**: 426-431 (2008).
31. H. Iwase, H. Choi, M. Akabori, T. Suzuki, S. Yamada, D. Yamamoto and T. Ando, Fabrication of 3D micro-cantilevers based on MBE-grown strained semiconductor layers, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **40**(6): 2210-2213 (2008).
32. K. Shinohara, N. Kodera, and T. Ando, Single-molecule imaging of a micro-Brownian motion of a chiral helical π -conjugated polymer as a molecular spring driven by thermal fluctuations, *Chem. Lett.* **38**(7): 690-691 (2009).
33. H. Yamashita, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, S. Antoranz Contera, J.F. Ryan, and T. Ando, Dynamics of bacteriorhodopsin 2D crystal observed by high-speed atomic force microscopy, *J. Struct. Biol.* **167**: 153-158 (2009).
34. Y. Matsushita-Ishiodori, K. Yamanaka, H. Hashimoto, M. Esaki, and T. Ogura, Conserved aromatic and basic amino acid residues in the pore region of *C. elegans* spastin play critical roles in microtubule-severing. *Genes Cells* **14**: 925-940 (2009).
35. Y. Tsunaka, J. Toga, H. Yamaguchi, S. Tate, S. Hirose, and K. Morikawa, Phosphorylated intrinsically disordered region of FACT masks its nucleosomal DNA binding elements, *J. Biol. Chem.* **284**: 24610-24621(2009).
36. D. Yamamoto, N. Nagura, S. Omote, M. Taniguchi, and T. Ando. Streptavidin 2D crystal substrates for visualizing biomolecular processes by atomic force microscopy, *Biophys. J.* **97**(8): 2358-2367 (2009).

37. I. Casuso, N. Kodera, C. Le Grimmellec, T. Ando, and S. Scheuring, Contact mode high-resolution high-speed atomic force microscopy movies of the purple membrane, *Biophys. J.* **97** (5): 1354-1361 (2009).
 38. S. Sugimoto, K. Yamanaka, S. Nishikori, A. Miyagi, T. Ando, and T. Ogura, AAA⁺ chaperone ClpX regulates dynamics of prokaryotic cytoskeletal protein FtsZ, *J. Biol. Chem.* **285**: 6648-6657 (2010).
 39. M.-C. Giocondi, D. Yamamoto, E. Lesniewska, P.-E. Milhiet, T. Ando, and C. Le Grimmellec, Surface topography of membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1978**: 703-718 (2010).
 40. M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, and T. Ando, High-speed atomic force microscopy visualization shows dynamic molecular processes in photo-activated bacteriorhodopsin, *Nature Nanotech.* doi:10.1038/NNANO.2010.7 (in press, published online).
 41. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, Multifrequency High-speed phase-modulation atomic force microscopy in liquids, *Ultramicroscopy* (in press).
 42. N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, Mechanochemistry of myosin V motility, *Science* (Submitted).
 43. P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieu, P. Dosset, C. Le Grimmellec, 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* (submitted).
 44. 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* (submitted).
1. 小林成貴、李艶君、内藤賀公、影島賢巳、菅原康弘、"Q 値制御法による位相変調方式原子間力顕微鏡の感度向上", 表面科学, **28**(9): 532-535 (2007).

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

(和文) 18 件、欧文 11 件)

1. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D Yamamoto, M. Taniguch, A. Miyagi, and H. Yamashita, Review: High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes, *J. Mol. Recognit.* **20**: 448-458 (2007).
2. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, M. Taniguchi, A. Miyagi, and H. Yamashita, Invited Review: High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes, *Pflügers Archiv -Eur. J. Physiol.* **456**:211-225 (2008).
3. T. Ando, High-speed SPM Chapter 14 (pp.109-116) in "High-speed SPM: Roadmap of scanning probe microscopy", Seizo Morita (Ed.), Springer-Verlag (2006): ISBN-10: 3540343148, ISBN-13: 9783540343141.
4. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, M. Taniguchi, A. Miyagi, and H. Yamashita, High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of biomolecular processes, Chapter 12 (pp.277-296) in "Single Molecule Dynamics in Life Science", T. Yanagida & Yoshiharu Ishii (Eds.) Wiley-VCH (2008): ISBN-10: 3-527-31288-9, ISBN-13: 978-3-527-31288-7.
5. T. Ando, T. Uchihashi, and T. Fukuma, High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes, *Prog. Surf. Sci.* **83**: 337-437 (2008).
6. T. Okuno, and T. Ogura, FtsH protease, a eubacterial membrane-bound AAA protease, pp.87-114 in "In ATP-dependent proteases" (Research Signport, ed. E. Kutejova) (2008).
7. T. Ogura, Y. Matsushita-Ishiodori, A. Johjima, M. Nishizono, S. Nishikori, M. Esaki, and K. Yamanaka, From the common molecular basis of the AAA protein to various

- energy-dependent and -independent activities of AAA proteins, *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 68-71 (2008).
8. T. Ando, and T. Uchihashi High-speed atomic force microscopy, Chapter 17 (pp.487-523) in "Handbook of single-molecule biophysics", Peter Hinterdorfer & Antoine van Oijen (Eds.), Springer-Verlag (2009): ISBN: 978-0-87-76496-2.
 9. 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.* (in press).
 10. T. Uchihashi, and T. Ando, High-speed atomic force microscopy for the dynamic imaging of protein crystals, in "Life at the nanoscale: atomic force microscopy of live cells", Yves F. Dufrêne (Ed.), Pan Stanford Publishing (Submitted).
 11. T. Uchihashi, and T. Ando, High-speed AFM and biomolecular processes, in "Atomic Force Microscopy: its use in Biomedical Researches", Pier Carlo Braga (Ed.) Humana Press (Submitted).
1. 安藤敏夫、「高速原子間力顕微鏡」、*化学* **59**(9): 42-43 (2004).
 2. 安藤敏夫、「リアルタイムで"見る"ナノの世界 分子の動きを捉える」(9章 p.121-149) in 「ナノバイオロジー」竹安邦夫編集 共立出版 (2004).
 3. 安藤敏夫、古寺哲幸、「高速ビデオレート AFM」、計測と制御 **45**(2): 99-104 (2005).
 4. 安藤敏夫、「生体分子の挙動を高速 AFM で見る」、*バイオニクス* **11**: 26-31 (2005).
 5. 安藤敏夫、「高速 AFM - タンパク質分子の動的振舞いの観察」(トピックス編3章 p.109-113) in 「わかる実験医学シリーズ バイオイメージングがわかるー細胞内分子を観察する多様な技術とその原理」高松哲郎編集 羊土社 (2005).
 6. 安藤敏夫、「高速 SPM」(4章5節 p.99-105) in 「走査型プローブ顕微鏡 最新技術と未来予測」森田清三編集 丸善 (2005).
 7. 安藤敏夫、「高速 AFM」(2章10節 p.150-156) in 「ナノオプティクス・ナノフォトニクスのすべて」河田聡編集 フルンティア出版 (2006).
 8. 安藤敏夫、「タンパク質のナノダイナミクスを見る高速撮影装置」、*精密工学会誌* **72**(11): 1315-1318 (2006).
 9. 安藤敏夫、「リアルタイム AFM イメージング」(13章 p.140-151) in 「ナノバイオ計測の実際」三原久和、小島英理、馬場嘉信 編集 講談社サイエンティフィック (2007).
 10. 安藤敏夫「AFM による分子イメージング」(7章7節 p.758-768) in 「非侵襲・可視化技術ハンドブック」小川誠二、上野照剛 監修 NTS 出版 (2007).
 11. 安藤敏夫、「走査型プローブ顕微鏡」(9章3節 p.509-513) in 「生物物理学ハンドブック」石渡信一、桂 勲、桐野豊、美宅茂樹 編集 朝倉書店 (2007).
 12. 安藤敏夫、「高速 AFM によるタンパク質の観察」、*応用物理* **77**(19): 1181-1192 (2008).
 13. 安藤敏夫、「生命科学に資する高速原子間力顕微鏡」、*バイオインダストリー* **26**(2): 21-30 (2009).
 14. 安藤敏夫、「ビデオレート高速バイオ原子間力顕微鏡」、*真空* **51**(12): 783-788 (2009).
 15. 安藤敏夫、「AFM 高速測定」(発展編2章2節 p.292-302) in 「実験物理学シリーズ6 走査プローブ顕微鏡」重川秀実、吉村雅満、河津璋 編集 共立出版 (2009).
 16. 安藤敏夫、「生体分子の動的プロセスを直接可視化する高速 AFM」、*顕微鏡* **45**(1) (in press).
 17. 内橋貴之、安藤敏夫、「AFMを用いた酵素反応解析」 in 「酵素活用ハンドブック」中村聡、中村亨、津本浩平 編集 NTS (投稿)
 18. 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* (投稿).

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 58 件、国際会議 63 件)

1. T. Ando, "Dynamic behavior of myosin V and reconstructed HMM studied by single molecule assay and high-speed AFM", International Symposium on Muscle Contraction and Cell Movement (Colima University, Colima, Mexico, January 20-26, 2005).
2. T. Ogura, "Mechanistic studies on the membrane-bound AAA protease, FtsH, in *Escherichia coli*", 2nd International Symposium of the DFG Priority Program 1132. Proteolysis in Prokaryotes: Protein Quality Control and Regulatory Principles (Harnack-Haus, Berlin, Germany, April 20-23, 2005).
3. T. Ando, Plenary Lecture: "High-speed AFM for studying the dynamic behavior of protein molecules at work", STM '05 (13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques (Sapporo, Japan, July 6, 2005).
4. T. Ando, "High-speed AFM and its potential to explore nano-biology", International Conference "Seeing at the Nanoscale III" (the University of California, Santa Barbara, USA, August 14, 2005).
5. T. Ogura, T. Okuno, Y. Yakushiji, M. Nishizono, S. Nishikori, and K. Yamanaka, "Mechanistic studies on *E. coli* FtsH and *C. elegans* AAA proteins", The Sixth International Conference on AAA Proteins (Schloss Seggau, Southern Styria, Austria, September 14-18, 2005).
6. K. Yamanaka, T. Yamada-Inagawa, Y. Matsushita, S. Yamauchi, Y. Sasagawa, S. Nishikori, M. Nishizono, and T. Ogura, "Characterization of AAA proteins related to human genetic disorders in *C. elegans*", International Symposium on Life of Proteins, Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell (「タンパク質の一生」国際会議), (Awaji, JAPAN, October 30- November 3, 2005).
7. T. Ando, "High-speed AFM for studying the dynamic behavior of proteins at work", International Symposium of Surface Science and Nanotechnology 4 (the Omiya Sonic Center, Omiya, Japan, November 14, 2005).
8. T. Ando, "Rapid scan atomic force microscopy", Okinawa Institute Science & Technology International Workshop on "Single Molecule Analysis" (Bankoku Shinryokan, Okinawa, Japan, April 16-22, 2006).
9. K. Morikawa, "Structural view of the clamp-loading mechanism onto DNA", Workshop on "Biostructural Chemistry" (Greece, 12-15 May 2006).
10. T. Ando, "High-speed AFM", SPM 2006 Conference (Scanning Probe Microscopy, Sensors & Nanostructures) (Montpellier-La Grande Motte, France, June 3-6, 2006).
11. K. Morikawa, "Structural view of the clamp-loading mechanism onto DNA", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, June 18-23, 2006).
12. T. Ando, "High-speed AFM and its potential to explore nano-biology", Symposium "Single Molecule Biology" in the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (Kyoto, Japan, June 19, 2006).
13. T. Ando, "Rapid scan atomic force microscopy", 9th International Conference on Non-contact Atomic Force Microscopy (Kobe, Japan, July 16-20, 2006).
14. T. Ando, "Instrumentation of high-speed AFM and observation of protein dynamics", 1st Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (Kanazawa, Japan, January 16-18, 2007).
15. T. Uchihashi, "Improvements in the high-speed AFM and observation of membrane proteins", 1st Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (Kanazawa, Japan, January 16-18, 2007).
16. T. Ando, "Protein dynamics captured by high-speed AFM", IX Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 3-5, 2007).
17. T. Ando, "Dynamic behaviors of proteins at work captured by high-speed atomic force microscopy", AFM BioMed Conference 2007 (Barcelona, Spain, April 19-21, 2007).
18. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for visualizing dynamic biomolecular processes", International Scanning Probe Microscopy Conference (Jeju, Korea, June 11-14, 2007).
19. K. Morikawa, "Structural view of the clamp-loading mechanism onto DNA", Albany 2007, The 15th Conversation (Albany, USA, June 19, 2007).
20. T. Ando, "Development of high-speed atomic force microscope for studying biological

- macromolecule”, 13th International Conference on Surface Science (ICSS-13), International Conference on Nanoscience and Technology 2007 (ICN+T 2007) (Stockholm, Sweden, July 2-6, 2007).
21. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, “Development of high-speed simultaneous measurement of topography and energy dissipation with phase modulation AFM”, 15th Annual International Conference on Composites or Nano Engineering (ICCE-15), (Haiko, China, July 15-21, 2007).
 22. T. Ogura, “From common molecular basis of the AAA ATPase to various energy-dependent and independent activities of AAA proteins”, The 7th International conference on AAA proteins, (Royal Agricultural College, Cirencester, UK, September 9-13, 2007).
 23. T. Uchihashi and T. Ando, “Protein dynamics captured by high-speed AFM”, Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium (Osaka, September 26-28, 2007).
 24. T. Ando, “High-speed AFM for visualizing biomolecular processes”, 6th International Workshop on Scanning Probe Microscopy in Life Sciences (Berlin, Germany, October 9, 2007).
 25. T. Ando, “Dynamic biomolecular processes dissected by high-speed AFM”, Atomic Level Characterization '07 International Conference (Kanazawa, Japan, October 28-November 2, 2007).
 26. T. Ando, “High-speed atomic force microscopy for visualizing biomolecular processes.”, 9th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (Tokyo, Japan, November 11-15, 2007).
 27. T. Ando, “Visualization of dynamic biomolecular processes by high-speed AFM”, Xth Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 15-18, 2008).
 28. T. Ando, “High-speed AFM for studying dynamic biomolecular processes”, Symposium on High Bandwidth Dynamic Atomic Force Microscopy, American Physics March Meeting (New Orleans, March 10-14, 2008)
 29. T. Ando, "High-speed AFM and video shooting of dynamic biomolecular processes", Focus on Microscopy 2008 (Osaka-Awajishima, Japan, April 13-16, 2008).
 30. T. Uchihashi, “High-Speed AFM for visualizing biomolecular processes: nanoelectronics and molecular biology”, International Conference: From Solid State To BioPhysics IV (Dubrovnik, Croatia, June 6-13, 2008) .
 31. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita, and N. Takahashi, “Control techniques in high-speed atomic force microscopy”, American Control Conference (Seattle, USA, June 11-13, 2008).
 32. T. Ando, “Dynamic biomolecular processes revealed by high-speed AFM”, Seeing at the Nanoscale VI (Berlin, Germany, July 9-11, 2008).
 33. T. Ando, “Nano-visualization of dynamic biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy”, Gordon Research Conference (Single Molecule Approaches to Biology) (Colby-Sawyer College, New Hampshire, USA, August 17-22, 2008).
 34. T. Ando, T. Uchihashi, D. Yamamoto, and N. Kodera, “High-speed AFM and nano-visualization of dynamic biomolecular processes”, 4th Vacuum and Surface Sciences Conference of Asia and Australia (VASSCAA-4) (Matsue, Japan, October 29-31, 2008).
 35. T. Uchihashi, "High-speed AFM for visualizing biomolecular processes", 39th NIPS International Symposium & 7th OIB Symposium: Frontier of Biological Imaging (Okazaki, Japan, November 10-13, 2008).
 36. T. Ando, "Visualization of biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy", 2nd International Seminar on Nanosciences and Nanotechnologies (Havana, Cuba, November 13-17, 2008).
 37. N. Kodera, "High-speed atomic force microscopy for imaging biological molecules in action", Physico-Chimie Curie Seminar (Paris, France, December 10, 2008).
 38. T. Uchihashi, “Direct observation of single protein dynamics with high-speed AFM”, 6th Asian Biophysics Association Symposium, 27th Hong Kong Society of Neurosciences Annual Meeting (Hong Kong, China, January 11- 15, 2009).

39. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, "Development of multi-functional high-speed NC-AFM for biological science", International Symposium on Nanomedicine and Asian Core Symposium -Nano and Biomedical Molecular Science, (Okazaki, Japan, February 4-7, 2009).
40. T. Ando, "Dynamics in bacteriorhodopsin captured by high-speed AFM", XIth Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 6-9, 2009).
41. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy and direct visualization of biomolecular processes", 24th New Zealand Conference on Microscopy (Rotorua, New Zealand, February 10-13, 2009).
42. T. Ogura, S. Nishikori, K. Yamanaka, and M. Esaki, "Roles of p97/VCP, a multifunctional AAA chaperone, in protein oligomerization and aggregation in neurodegenerative diseases", BIT Life Sciences'2nd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2009) (Seoul, South Korea, 2-4 April 2009).
43. T. Ando, "Direct visualization of biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy", 4th Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics (Jeju, South Korea, May 27-29, 2009).
44. Y. Sugawara, "Phase modulation atomic force microscopy in constant amplitude mode", The XI International Scanning Probe Microscopy Conference 2009, (Madrid, Spain, June 18, 2009).
45. T. Ogura, Y. Matsushita-Ishiodori, K. Yamanaka, S. Nishikori, and M. Esaki, "Molecular mechanisms of homologs of spastin and p97/VCP related to human genetic disorders." 8th International Conference on AAA Proteins (Toronto, Canada, 12-16 July 2009).
46. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy and direct visualization of biomolecular processes", 5th International Symposium on Scanning Probe Spectroscopy and Related Methods (Poznan (Wasowo), Poland, July 19-22, 2009).
47. T. Ando, "High-speed atomic force microscopy for visualizing dynamic biomolecular processes", Symposium in the International Congress of Physiological Sciences, "Challenges in the Integration of Multiscale Biomechanical Systems" (Kyoto, Japan, July 30, 2009) .
48. T. Uchihashi and T. Ando, "Direct visualization of protein dynamics using high-speed AFM", International Symposium on Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes (Kyoto, Japan, September 8-10, 2009).
49. T. Ando, "High-speed AFM instrumentation and study on the walking mechanism of myosin V", Seminar at Univ. of Montpellier (Montpellier, France, September 21, 2009).
50. T. Uchihashi, "High-resolution imaging of biological molecules using high-speed AFM", Seminar at Univ. of Montpellier (Montpellier, France, September 21, 2009).
51. T. Ando, "High-speed AFM instrumentation and study on the walking mechanism of myosin V", Seminar at Univ. of Bourgogne (Dijon, France, September 25, 2009).
52. T. Uchihashi, "High-resolution imaging of biological molecules using high-speed AFM", Seminar at Univ. of Bourgogne (Dijon, France, September 25, 2009).
53. T. Ando, "High-speed AFM instrumentation and study on the walking mechanism of myosin V", Seminar at Institute Curie (Paris, France, September 28, 2009).
54. T. Uchihashi, "High-resolution imaging of biological molecules using high-speed AFM", Seminar at Institute Curie (Paris, France, September 28, 2009).
55. T. Ando, "High-speed AFM for dynamic visualization of biomolecular processes", The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, Symposium "Breaking Diffraction Barrier" (San Diego, USA, December 9, 2009).
56. T. Ando, Keynote Speech "High-speed AFM for dynamic visualization of biomolecular processes", Workshop on dynamics and control of micro and nanoscale systems (IBM Research Institute, Zurich, Rüschlikon, Switzerland, December 10-11, 2009).
57. M. Shibata, "Direct watching of bacteriorhodopsin structural response to photo-activation", Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
58. D. Yamamoto, M. Taniguchi and T. Ando, "High-resolution dynamic imaging of chaperonin GroEL-GroES reaction", Watching Biomolecules in Action, (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).

59. N. Kodera, D. Yamamoto, and T. Ando, "Walking mechanism of myosin V dissected by high-resolution dynamic imaging", Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 60. T. Uchihashi, "High-speed AFM observation of protein crystals", Seminar at University of Nebraska Medical Center (Omaha, USA, January 7, 2010).
 61. 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).
 62. T. Ando, "Walking mechanism of myosin V revealed by high-speed AFM imaging", XII Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 5-8, 2010).
 63. M. Shibata, "Direct watching of bacteriorhodopsin by high-speed atomic force microscopy", Seminar at Duke University (Durham, USA, February 19, 2010)
1. 安藤敏夫, 「生物分子モーターのナノ構造ダイナミクス」, VBLシンポジウム「生体高分子の1分子イメージングと構造の物性と機能」, (名古屋大学工学部 2004年10月18日).
 2. 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡で動く分子を見る」, 日本顕微鏡学会 シンポジウム(名古屋大学 2004年11月8-9日).
 3. 安藤敏夫, 「高速AFMが拓く新しい分子生命科学の可能性」, 第3回北陸ポストゲノム研究フォーラム(金沢大癌研究所 2004年11月30日).
 4. 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡」特許庁研修講義, 特許庁(東京 2004年12月8日).
 5. 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡が拓く新しいナノバイオロジーの可能性」, 日本生物物理学会第42回年会シンポジウム「ナノバイオエンジニアリングの基礎としての生物物理学」(京都 2004年12月13-15日).
 6. 古寺哲幸, 宮城篤, 前田大輔, 榊原齊, 大岩和弘, 安藤敏夫, 「高速 AFM によるダイニン・ミオシンVのダイナミクス観察」, 日本生物物理学会第42回年会シンポジウム「分子モーター研究の新潮流」(京都 2004年12月13-15日).
 7. 安藤敏夫, 「高速 AFM が切り拓く新しいタンパク質研究の可能性」, 日本薬学会年会シンポジウム「新たな生命科学分野を切り拓く分子イメージング」(東京臨海副都心 2005年3月29日).
 8. 安藤敏夫, 指定講演「高速 AFM による生体分子のナノダイナミクス撮影」, 日本顕微鏡学会第61回学術講演会 シンポジウム「原子間力顕微鏡の新展開」(つくば国際会議場, 2005年6月1日).
 9. 安藤敏夫, 「高速 AFM の開発とナノバイオロジーへの展開」, マイクロビームアナリシス第141委員会 第120回研究会(淡路島夢舞台国際会議場, 2005年6月9日~10日).
 10. 菅原康弘, 「薄膜の界面・表面特性評価—SPMによる評価—」, 日本学術振興会薄膜第131委員会基礎講座, (武蔵工業大学, 2005年10月11日).
 11. 安藤敏夫, 「高速 AFM」, 表面分析研究会 PSA-05(石川県音楽堂, 2005年10月17日~18日).
 12. 菅原康弘, 「プローブ顕微鏡による生体環境中ナノ構造可視化技術」, ヒューマンライフサイエンスフォーラム 2005, 大阪, 全科展 in 大阪 2005 およびバイオフォーラム 2005,(大阪, 2005年10月20日).
 13. 安藤敏夫, 「高速 AFM が切り拓く新しいタンパク質研究の可能性」, バイオイメージング学会第14回大会(東京大学農学部弥生講堂, 2005年10月26日~28日).
 14. 菅原康弘, 「原子間力顕微鏡入門 —振幅変調(AM)モードと周波数変調(FM)モードの基礎と測定量—」, 電子顕微鏡学会 SPM 分科会, (京都大学, 2005年11月22日).
 15. 安藤敏夫, 特別講演「生体分子・超分子のダイナミクス観察を可能にする高速 AFM」, 特定領域「生体超分子構造」第2回公開シンポジウム 生体超分子—構造・機能解明への果敢なる挑戦(KKR 金沢, 2005年12月12~13日).
 16. 安藤敏夫, 「生体分子の活動を観る高速 AFM の現状と今後の展開」, 文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクト第3回分野横断スクール「ナノバイオスクール:生体細胞を観る」(東京コンファレンスセンター・品川, 2006年1月16~17日).

17. 小椋 光, 「膜蛋白質の品質管理を司る FtsH/paraplegin プロテアーゼ」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー Membrane-proximal proteolysis: 膜近傍におけるプロテオリシス研究の最先端, (大阪大学蛋白質研究所, 大阪, 2006 年 2 月 21 日).
18. 菅原康弘, 「AFMの現状と将来」, 2006 年春季第 53 回応用物理学関係連合講演会(シンポジウム「走査プローブ顕微鏡のロードマップ」), (武蔵工業大学, 2006 年 3 月 23 日).
19. 大山 拓次, 森川 耿右, 「立体構造からみた DNA 複製および修復の分子機構: クランプローディング複合体を中心に」, 第6回日本蛋白質科学会年会, (京都, 2006 年 4 月 24-26 日).
20. 鈴木博文, 宮田知子, 大山拓次, 真柳浩太, 石野良純, 森川耿右, 「DNA 複製に関わる AAA+タンパク質複合体の電子顕微鏡構造解析」, 第6回日本蛋白質科学会年会, (京都, 2006 年 4 月 24-26 日).
21. 安藤敏夫, 「生体分子のナノ動態を撮影する高速AFM」, 日本化学会「可視化研究の最前線」講演会(日本化学会7階ホール・東京御茶ノ水, 2006 年 6 月 28 日).
22. 安藤敏夫, 「高速AFMの開発 ～生体分子のナノ動態撮影～」, 文部科学省科学研究補助金特定領域「バイオ操作」第3回公開シンポジウム特別講演(名古屋大・野依学術交流館ホール, 2006 年 6 月 30 日).
23. 安藤敏夫, 「生体分子のナノダイナミクス高速撮影装置の開発～動作中のタンパク質の動画観察～」, 未踏科学技術協会バイオ・ナノテクフォーラム 先端課題メンタリング講座 シリーズ「イノベーションのためのナノマテリアル・ナノプロセス講座」(全 4 回)第1回(東京虎ノ門未踏科学技術協会会議室, 2006 年 8 月 10 日).
24. 安藤敏夫, 「バイオ(高速)原子間力顕微鏡」, 文部科学省第一回ナノバイオスクール「生命現象を知る」(人材開発センター富士吉田研修所, 2006 年 8 月 24-26 日).
25. 安藤敏夫, 「生体分子ナノダイナミクス撮影装置ー高速 AFMー」, 第 44 回茅コンファレンス「物性研究における計測技術の最前線～観る技術は今～」(裏磐梯ロイヤルホテル, 2006 年 9 月 8-11 日).
26. 安藤敏夫, 「高速 AFM イメージング技術の現状と世界の動向」, 日本ビーコ SPM 新技術セミナー(日本ビーコ東京本社, 2006 年 10 月 18 日).
27. 安藤敏夫, 「高速AFMで捉えるタンパク質のナノ機能動態」, 大阪大学生命機能研究科 研究交流会セミナー(大阪, 2006 年 12 月 13 日).
28. 安藤敏夫, 「細胞測定・観察(高感度・高速 AFM)」, 新世代研究所第3回バイオ SPM 研究会(新潟市岩室温泉(ゆもたや) 2006 年 12 月 20 日).
29. 安藤敏夫, 「生体分子の動態を撮影する高速 SPM」, 日本応用物理学会春の年会 シンポジウム「SPMによる液中観察の新展開」(青山学院大学相模原キャンパス, 2007 年 3 月 28 日).
30. 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡の開発と生命科学への応用」, ナノ粒子研究会第39回講演会「ナノ計測技術の最前線とナノ粒子」(航空会館(東京都港区西新橋) 2007 年 5 月 11 日).
31. 安藤敏夫, 「分子の動きを高速でとらえる顕微鏡の開発」, 日本海イノベーション会議第1回フォーラム(北国新聞会館20階ホール 2007 年 7 月 28 日).
32. 安藤敏夫, 「生体分子のダイナミクスを可視化する高速 AFM」, 応用物理学会秋の年会, 第29 回応用物理学会論文賞受賞記念講演, (北海道工業大学 2007 年 9 月 4 日).
33. 安藤敏夫, 「タンパク質1分子のリアルタイム AFM イメージング」, 分析化学会第56年会, 特別シンポジウム「ナノ分析・計測化学が変えるバイオ研究」(徳島大学工学部, 2007 年 9 月 21 日).
34. 安藤敏夫, 「生体分子の振る舞いを直接見る高速 AFM」, (新潟大学物理学科コロキウム 2007 年 12 月 4 日).
35. 石野良純, 清成信一, 西田洋一, 真柳浩太, 白井 剛, 森川耿右, 「PCNA を中心とした DNA 複製装置複合体の形成と再編に関する研究」, 生体超分子構造 公開シンポジウム(大阪, 2007 年 12 月 18-19 日).
36. 安藤敏夫, 「タンパク質の動的分子プロセスを直視する高速原子間力顕微鏡」, 村田製作所講演会(村田製作所野洲事業所 2008 年 5 月 9 日).

37. 安藤敏夫, 榊賞受賞記念講演「高速 AFM の開発とタンパク質のナノ機能動態の観察」, 日本学術振興会第 141 委員会 133 回研究会(名古屋工業大学 2008 年 9 月 16 日).
38. 津中康央, 森川耿右, 「クロマチンリモデリング因子 FACT とヌクレオソーム DNA の結合機構」大阪大学蛋白質研究所セミナー(大阪大学コンベンションセンター, 2008 年 10 月 30 日).
39. 安藤敏夫, 「ライフサイエンスの貢献する高速原子間力顕微鏡の発明」, KUTLO-NITT シンポジウム(日本海城大学連携技術移転機能発足記念)(金沢大学 2008 年 11 月 28 日).
40. 安藤敏夫, 「高速走査プローブ顕微鏡を用いたタンパク質分子の動的観察」, 第 16 回 エレクトロニクス基礎研究所公開シンポジウム 原子・分子レベルでの材料創製とキャラクタリゼーション「次世代ソフトマテリアルを考える」(大阪電気通信大学 2008 年 12 月 12 日).
41. 安藤敏夫, 「生体分子の動的プロセスを可視化する高速 AFM」, 学振「未踏・ナノデバイステクノロジー 第 151 委員会」研究会「ナノ計測の先端共用施設利用とナノ時空研究の一側面」(物質・材料研究機構(NIMS), 2009 年 1 月 30-31 日).
42. 安藤敏夫, 「液中高速 AFM」, 国際高等研究所「高度計測技術の発展と埋没」平成 20 年度第 2 回研究会, 走査型プローブ顕微鏡の現状と問題 国際高等研究所, けいはんな, 2009 年 2 月 21 日).
43. 津中康央, 榊純子, 山口寛人, 榊真一, 広瀬進, 森川耿右, 「クロマチンリモデリング因子 FACT 天然変性領域のリン酸化によるヌクレオソーム DNA 結合阻害の分子機構」, 第9回日本蛋白質科学会年会(熊本, 2009 年 5 月 20-22 日).
44. 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速 AFM による生体分子のナノダイナミクス計測」 第9回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム「タンパク質のダイナミクス計測のためのイメージング技術」(熊本, 2009 年 5 月 20-22 日).
45. 柴田 幹大, 山下 隼人, 内橋 貴之, 神取 秀樹, 安藤 敏夫, 「バクテリオロドプシンの光励起に伴う姿を高速原子間力顕微鏡 (AFM) で捉える」, 生理学研究所 研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える--静止画から動画へ--」(岡崎カンファレンスセンター, 2009 年 9 月 3-4 日).
46. 菅原康弘, 「液中 AFM の基礎と応用」, 応用物理学会有機分子バイオエレクトロニクス分科会・有機バイオ SPM 研究会,(幕張メッセ国際展示場, 2009 年 9 月 4 日).
47. 安藤敏夫, 「高速バイオAFM(原子間力顕微鏡)の開発」, 応用物理学会 特別企画シンポジウム「産学官連携と応用物理」(富山大学, 2009 年 9 月 8 日).
48. 菅原康弘, 「原子間力顕微鏡の高感度化・高速化・多機能化」, 2009 年秋季第 70 回応用物理学会学術講演会(シンポジウム「非接触原子間力顕微鏡で拓くナノテク最前線」), (富山大学, 2009 年 9 月 8 日).
49. 柴田幹大, 「高速原子間力顕微鏡(AFM)を用いたバクテリオロドプシンの動態観察」, 第 15 回薬理学教室セミナー (慶応大学, 2009 年 10 月 26 日).
50. 安藤敏夫, 「生体分子の動態を捉える高速原子間力顕微鏡」, 第29回日本表面科学会学術講演会 シンポジウム「急速に進歩する非接触原子間力顕微鏡」(東京、タワーホール船堀, 2009 年 10 月 27 日)
51. 柴田幹大, 山下隼人, 内橋貴之, 神取秀樹, 安藤敏夫, "High-speed atomic force microscopy visualization reveals dynamic molecular processes in photo-activated bacteriorhodopsin" 日本生物物理学会(アスティ徳島, 2009 年 10 月 30 日-11 月 1 日)(若手招待講演).
52. 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速AFMイメージング技術で見る生体分子の機能動態」, 第 20 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会・ISMM2009, (金沢, 2009 年 11 月 9 日).
53. 安藤敏夫, 「機能中のタンパク質の動態を直接見る」, 大阪市大生物学科セミナー (大阪市大, 2009 年 11 月 10 日).
54. 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速 AFM イメージング技術で見る生体分子の機能動態」, Joint Symposium of 20th CHEMINAS, ISMM 2009 & NT 2009 (金沢, 2009 年 11 月 10 日).
55. 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ダイナミクス観察 ～現状と将来展望～」, ナノプローブテクノロジー第167委員会 第56回研究会「ナノ・バイオテクノロジー

の現状と展望—ナノプローブ技術に期待されるもの—, ((独)情報通信研究機構本部 2009年11月11日).

56. 安藤敏夫、「生命活動のより直接的理解を目指す生物学への SPM 技術の貢献」, 第4回 ATI 合同研究会 「—科学は融合する— バイオ・医学とナノサイエンス」(長野 ホテルメトロポリタン、2009年11月13日).
57. 安藤敏夫、基調講演「高速 AFM の現状と将来展望」, (株)生体分子計測研究所 創立10周年記念「高速(動画)AFM シンポジウム」(東京 浅草ビューホテル、2009年12月20日).
58. 柴田幹大、「高速原子間力顕微鏡(AFM)を用いた光励起によるバクテリオロドプシンの動態観察」, 生物物理学中部支部セミナー(名古屋工業大学、2010年2月12日).

口頭発表 (国内会議 40 件、国際会議 25 件)

1. Y. Sugawara, "High sensitive dynamic force microscopy in liquids", The 12th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, (Atagawa, Japan, December 9, 2004).
2. Y. Sugawara, K. Fujii, Y. Naitoh, and M. Kegeshima, "Sub-nanometer resolution dynamic force microscopy in liquid", 13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques (STM'05), (Sapporo, Japan, July 3, 2005).
3. Y. Sugawara, K. Fujii, Y. Naitoh, and M. Kegeshima, "Atomic resolution dynamic force microscopy in liquids", China International Conference on Nanoscience & Technology (ChinaNANO2005), (Beijing, China, June 9, 2005).
4. K. Yamanaka, S. Yamauchi, Y. Sasagawa, S. Nishikori, Y. Okubo and T. Ogura, "Characterization of p97/VCP homologues in *C. elegans*", The Sixth International Conference on AAA Proteins, (Schloss Seggau, Southern Styria, Austria, September 14-18, 2005).
5. S.A. Contera, K. Voitchovsky, H. Yamashita, T. Uchihashi, N. Kodera, T. Ando, and J. F. Ryan, "Small amplitude sub-molecular resolution AC-AFM and High-Speed AC-AFM of purple membranes in fluid: non-continuum effects inside the double layer", Biophysics Meeting (Salt Lake City, February 18-22, 2006).
6. T. Uchihashi, H. Yamashita, and T. Ando, "Phase imaging with high-speed AFM", SPM 2006 Conference (Scanning Probe Microscopy, Sensors & Nanostructures), ((Montpellier-LaGrande Motte, France, June 3-6, 2006).
7. T. Uchihashi, H. Yamashita, T. Ando, K. Voitchovsky, S. Antranz Contera, and J. F. Ryan, "High-Resolution Dynamic imaging of membrane proteins with high-speed AFM", International Conference on Nanoscience and Technology 2006 (Basel, July 30-August 4, 2006).
8. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "High sensitive phase modulation atomic force microscopy with Q-control technique", The 14th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM14), (Atagawa, Japan, Dec. 8, 2006).
9. N. Kodera, "Structural dynamics of acto-myosin V revealed by high-speed AFM", 1st Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (Kanazawa, January 16-18, 2007).
10. D. Yamamoto, "Chaperonin GroEL-GroES action captured by high-speed AFM", 1st Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (Kanazawa, January 16-18, 2007).
11. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, H. Nomura, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Multi-functional high-speed atomic force microscope (AFM)", International Conference on Nanoscience & Technology, China 2007 (ChinaNANO2007), (Beijing, China, June 4-6, 2007).
12. Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "High-speed simultaneous measurement of topography and energy dissipation with phase modulation AFM in liquid", International Conference on Nanoscience and Technology (ICN+T 2007), (Stockholm, Sweden, July 2-4, 2007).
13. K. Yamanaka, Y. Sasagawa, S. Yamauchi, and T. Ogura, "Functional analysis of p97/VCP in *C. elegans*", The 7th International conference on AAA proteins, (Royal Agricultural College, Cirencester, UK, September 9-13, 2007).
14. Y. Sugawara, N. Kobayashi, M. Kawakami, Y. J. Li, Y. Naitoh, and M. Kageshima, "Elimination

- of instabilities in phase shift curves in phase modulation atomic force microscopy in constant amplitude mode”, The 10th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2007), (Antalya, Turkey, September 16-20, 2007).
15. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, “Development of high-speed phase modulation AFM capable of simultaneous imaging of topography and energy dissipation in liquid”, The 10th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2007), (Antalya, Turkey, September 16-20, 2007).
 16. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, “High-speed noncontact AFM capable of simultaneous imaging of topography and energy dissipation in liquid”, The 15th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM15), (Atagawa, Japan, Dec. 6-8, 2007).
 17. N. Kodera, D. Yamamoto, and T. Ando, “Structural dynamics of acto-myosin V studied by high-speed AFM”, Biophysics Meeting (Long Beach, February 2-6, 2008).
 18. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, “Development of phase modulation high-speed AFM in CA mode capable of simultaneous measurement of topography and energy dissipation”, International Conference on Nanoscience +Technology (ICN+T2008), (Keystone, Colorado USA, July 20-25, 2008).
 19. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, “Development of multi-functional high-speed phase modulation AFM in liquids”, The 5th International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (ISSS-5), (Waseda University, Tokyo, Japan, November 9-13, 2008).
 20. M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, and T. Ando, “Direct imaging of protein dynamics by high-speed atomic force microscopy: the case of bacteriorhodopsin photocycle”, 6th Asian Biophysics Association Symposium (Hong Kong, China, January 11-14, 2009).
 21. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, “Development of multifrequency high-speed AFM with the capability of imaging topography, energy dissipation and elasticity in liquid”, 2nd Multifrequency AFM Conference, (Madrid, Spain, June 15-16, 2009).
 22. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, “Development of multifrequency high-speed AFM with the capability of imaging elasticity in liquid”, International Conference on Nanoscience and Technology, China 2009 (ChinaNANO2009), (Beijing, China, September 1-3, 2009).
 23. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, “Development of multifrequency high-speed NC-AFM with the capability of simultaneous mapping topographic, energy dissipation and elasticity images in liquids”, 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM17) (Atagawa, Japan, December 11-13, 2009).
 24. A. Miyagi, Y. Tsunaka, T. Uchihashi, K. Mayanagi, S. Hirose, K. Morikawa, and T. Ando, “High-speed AFM analysis of protein domain architecture”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, 15-17 December 2009).
 25. P. E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieu, C. Le Grimellec, J. M. Verdier, S. Marchal, and T. Ando, “Real time imaging of lithostathine fibrils growth using high-speed AFM”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, 15-17 December 2009).
1. 宮城篤, 古寺哲幸, 前田大輔, 安藤敏夫「高速 AFM によるモータータンパク質などの動態撮影」, 生体運動合同班会議 (大阪千里ライフサイエンスセンター, 2005年1月7日~9日).
 2. 小出博史, 木下達也, 安藤敏夫「ミオシンVの化学修飾と運動特性」, 生体運動合同班会議 (大阪千里ライフサイエンスセンター, 2005年1月7日~9日).
 3. 小椋光, 「線虫の多機能 AAA 型シャペロン p97/VCP の細胞・発生的役割」, Joint Forum IFMS (京大再生研)/IMEG (熊大発生研)/理研 CDB (熊本, 2005年1月30-31日, 熊本大学発生医学研究センター).

4. 松下由佳, 山中邦俊, 小椋光, 「線虫を用いた AAA タンパク質 Spastin (C24B5.2)の解析」, 第 28 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「細胞機能のキープレーヤーAAA+タンパク質の世界」(福岡, 2005 年 12 月 7-10 日, ヤフードーム(他 5 会場)).
5. 内橋貴之, 山下隼人, 安藤敏夫, 「高速 AFM による生体物性計測に向けて」, 生体運動研究合同班会議(東大農学部弥生講堂, 2006 年 1 月 6-8 日).
6. 古寺哲幸, 山本大輔, 安藤敏夫, 「高速 AFM によるアクトミオシン V の動態観察」, 生体運動研究合同班会議(東大農学部弥生講堂, 2006 年 1 月 6-8 日).
7. 小林成貴, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「位相変調方式原子間力顕微鏡 (PM-AFM) の性能評価」, 2006 年春季第 53 回応用物理学関係連合講演会(武蔵工業大学, 2006 年 3 月 25 日).
8. 油屋吉宏, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「光異性化現象を用いた AFM 探針の親水性/疎水性制御法の開発」, 2006 年春季第 53 回応用物理学関係連合講演会(武蔵工業大学, 2006 年 3 月 26 日).
9. 菅原康弘, 東郷伸計, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 「Q 値制御を用いた原子間力顕微鏡用スキャナーの高速化」, 電磁力関連のダイナミクスシンポジウム(神戸国際会館, 2006 年 5 月 19 日).
10. 油屋吉宏, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「光異性化現象を用いた親水性/疎水性 AFM 探針の可逆制御」, 2006 年秋期第 67 回応用物理学関係連合講演会(立命館大学, 2006 年 8 月 29 日-9 月 1 日).
11. 小林成貴, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「Q 値制御法を用いた位相変調方式原子間力顕微鏡(PM-AFM)の性能評価」, 2006 年秋期第 67 回応用物理学関係連合講演会(立命館大学, 2006 年 8 月 29 日-9 月 1 日).
12. 小林成貴, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「Q 値制御法を用いた位相変調方式原子間力顕微鏡の性能評価」, 第 26 回表面科学講演大会(大阪大学, 2006 年 11 月 8 日).
13. 古寺哲幸, 山本大輔, 安藤敏夫, 「高速 AFM によるアクトミオシン V の動態観察」, 生体運動研究合同班会議 2007(金沢, 2007 年 1 月 9 日).
14. 田中慎一郎, 小出博史, 安藤敏夫, 「ミオシン V のカルシウム調節」, 生体運動研究合同班会議 2007(金沢, 2007 年 1 月 9 日).
15. 山下隼人, 内橋貴之, 安藤敏夫, 芝田幹大, 古谷祐詞, 神取秀樹, Kislun Voitchovsky, Sonia Antranz Contera, John F. Ryan, 「高速 AFM による膜タンパク質の高分解能動態イメージング」, 生物物理学会中部支部討論会, (岡崎統合バイオサイエンスセンター, 2007 年 3 月 16 日).
16. 内橋貴之, 山下隼人, 安藤敏夫, Kislun Voitchovsky, Sonia Contera, John Ryan, 「高速 AFM による膜タンパク質の高速・高分解能観察」, 2007 年春季第 54 回応用物理学関係連合講演会(青山学院大学相模原キャンパス, 2007 年 3 月 28 日).
17. 山下隼人, 内橋貴之, 古寺哲幸, 宮城篤, 山本大輔, 安藤敏夫, 「レーザー照射による AFM カンチレバーの直接駆動」, 2007 年春季第 54 回応用物理学関係連合講演会(青山学院大学相模原キャンパス 2007 年 3 月 29 日).
18. 李艶君, 小林成貴, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「高速 AFM 開発のためのスキャナーの高性能化」, 2007 年春季第 54 回応用物理学関係連合講演会(青山学院大学, 2007 年 3 月 29 日).
19. 菅原康弘, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 「誘導電流検出による原子間力顕微鏡用圧電スキャナーの高速化」, 第 19 回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム,(早稲田大学国際会議場, 2007 年 5 月 17 日).
20. 宮田知子, 鈴木博文, 大山拓次, 真柳浩太, 石野良純, 森川耿右, 「電子顕微鏡単粒子解析によってとらえた DNA クランプはめ込み複合体中のクランプ開環構造」, 第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ「タンパク質構造から展開する DNA 複製システムのダイナミクス」(福岡, 2007 年 12 月 7-10 日).
21. 名倉直希, 齊藤優太, 田中祐介, 安藤敏夫, 「頭部を基板に固定したミオシン V-S1 でのアクチン滑り運動」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜, 2007 年 12 月 21-23 日).

22. 谷口雅昭, 山本大輔, 古寺哲幸, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡を用いたシャペロニン GroEL における基質タンパク質の結合と解離の一分子観察」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜, 2007年12月21-23日).
23. 古寺哲幸, 山本大輔, 安藤敏夫, 「高速 AFM によるアクチン V の動態観察」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜, 2007年12月21日-23日).
24. 名倉直希, 斉藤優太, 安藤敏夫, 「ヘッドで固定されたミオシン V が駆動するアクチン滑り運動」, 生体運動研究合同班会議 2008(仙台市戦災復興記念館, 2008年1月7-9日).
25. 表冴子, 田中慎一郎, 名倉直希, 安藤敏夫, 「ミオシン V のカルシウム調節」, 生体運動研究合同班会議 2008(仙台市戦災復興記念館, 2008年1月7-9日).
26. 李艶君, 小林成貴, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「エネルギー散逸の測定可能な振幅一定・位相変調高速 AFM の開発」, 2008年春季第55回応用物理学関係連合講演会(日本大学, 2008年3月29日).
27. 山中邦俊, 笹川洋平, 小椋光, 「p97/CDC-48.1 による線虫生殖細胞の性決定の制御」, 第31回日本分子生物学会年会(神戸 2008年12月8日-12日).
28. 山下隼人, Kislun Voitchovsky², 内橋貴之, Sonia Antoranz Contera, John F. Ryan, 安藤敏夫, "Direct observation of bacteriorhodopsin molecular interaction in purple membrane by high-speed AFM", 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(神戸ポートアイランド, 2008年12月9-12日).
29. 中根健一郎, 古寺哲幸, 安藤敏夫, 「ミオシン V の 2 つのヘッドのアクチンとの結合様式」, 生体運動研究合同班会議(東京大学駒場 I キャンパス, 2009年1月9-11日).
30. 李艶君, 高橋恒平, 小林成貴, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「Q 値制御法を用いた振幅一定・位相変調・高速 AFM」, 2009年春季第56回応用物理学関係連合講演会(筑波大学, 2009年3月31日).
31. 高橋恒平, 李艶君, 小林成貴, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「粘弾性の同時イメージングが可能な Multifrequency 高速 AFM の開発」, 2009年春季第56回応用物理学関係連合講演会(筑波大学, 2009年3月31日).
32. 山本大輔, 名倉直希, 表冴子, 谷口雅昭, 安藤敏夫, 「ストレプトアビジン二次元結晶基板の高速 AFM 観察への適用」, 日本生物物理学会第47回年会, (アステイ徳島, 2009年10月30日-11月1日)
33. 山本大輔, 宮城篤, 安藤敏夫, 榊原斉, 「高速 AFM によるクラミドモナス ダイニン C 破壊過程の観察」, 日本生物物理学会第47回年会, (アステイ徳島, 2009年10月30日-11月1日).
34. 古寺哲幸, 山本大輔, 安藤敏夫, 「高速 AFM によって明らかになったアクチン V の運動メカニズム」, 生体運動研究合同班会議(中央大学理工工学部, 2010年1月9-11日).
35. 安藤敏夫 「タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発」, 生命現象解明のための計測分析 さきがけ・CREST 研究報告会(東京品川, コクヨホール, 2010年1月13日)
36. 安藤敏夫, 「タンパク質の天然変性領域の高速 AFM 観察と今後の展望」, 新学術領域研究「天然変性蛋白質」第1回公開シンポジウム(理化学研究所横浜研究所, 2010年1月19日).
37. 内橋貴之, 「高速 AFM によるバイオ分子の液中動的観察」, 日本顕微鏡学会 第34回関東支部講演会, 『エコロジーと顕微鏡テクノロジー』(帝京大学医学部, 東京, :2010年3月20日).
38. 山下隼人, 柴田幹大, 内橋貴之, 古谷祐詞, 山下高廣, 神取秀樹, 七田芳則, 安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡によるロドプシンの動態観察」, 分子研研究会 広がるロドプシンの仲間から“何がわかるか”“何をもらすか”(分子科学研究所, 岡崎, 2010年3月23-24日).
39. 柴田幹大, 山下隼人, 内橋貴之, 神取秀樹, 安藤敏夫 「バクテリオロドプシンの高速 AFM 観察:バクテリオロドプシンの直接観察から何がわかるか, 何をもらすか」, 分子研研究会 広がるロドプシンの仲間から“何がわかるか”“何をもらすか”(分子科学研究所, 岡崎, 2010年3月23-24日).
40. 安藤敏夫, 「ナノメートルスケールの動的プロセスを可視化する高速 AFM」, 電気化学会第77回大会シンポジウム「ナノスケール界面・表面の構造とダイナミクス(富山大学, 2010年3月

29 日).

ポスター発表

(国内会議 67 件, 国際会議 63 件)

1. T. Ando, N. Kodera, A. Miyagi, and H. Yamashita, "Further improvement of the high-speed atomic force microscope", Biophysics Meeting, (Los Angeles, USA, February 12-16, 2005).
2. M. Yokokawa, A. Yagi, N. Sakai, and T. Ando, K. Takeyasu, "Single molecule analysis of protein-protein interactions by fast scanning atomic force microscopy", Biophysics Meeting, (Los Angeles, USA, February 12-16, 2005).
3. K. Yamanaka, Y. Okubo, S. Yamauchi, and T. Ogura, "Characterization of p97/VCP homologues in *C. elegans*", 15th biennial International *C. elegans* conference, (UCLA, USA, June 25-29, 2005).
4. Y. Matsushita, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Characterization of a spastin homologue, a member of AAA proteins, in *C. elegans*", 15th biennial International *C. elegans* conference, (UCLA, USA, June 25-29, 2005).
5. T. Uchihashi, N. Kodera, H. Itoh, H. Yamashita, and T. Ando, "Feed-forward control for high-speed AFM imaging of biomolecules", STM '05 (13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques (Sapporo, July, 2005)).
6. S. Yamauchi, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Analysis of the expression regulation of two p97 homologues in *C. elegans*", International Symposium on Life of Proteins, Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell (「タンパク質の一生」国際会議) (Awaji, JAPAN, October 30- November 3, 2005).
7. Y. Sasagawa, K. Yamanaka, and T. Ogura, "*C. elegans* UBX genes are required for embryogenesis and spermatogenesis in hermaphrodites germline," International Symposium on Life of Proteins, Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell (「タンパク質の一生」国際会議) (Awaji, JAPAN, October 30- November 3, 2005).
8. Y. Matsushita, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Characterization of a spastin homologue, a member of AAA proteins, in *C. elegans*", International Symposium on Life of Proteins, Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell (「タンパク質の一生」国際会議) (Awaji, JAPAN, October 30- November 3, 2005).
9. H. Yamashita, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, S.A. Contera, N. Kodera, J.F. Ryan, and T. Ando, "High-resolution dynamic imaging of membrane proteins by high-speed AFM.", Biophysics Meeting (Salt Lake City, USA, February 18-22, 2006).
10. D. Tsuchiya, N. Shimizu, M. Ishikawa, Y. Suzuki, and K. Moikawa, "Ligand-induced domain rearrangement of fatty acid β -oxidation multienzyme complex", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, 18-23 June, 2006).
11. H. Suzuki, T. Miyata, T. Oyama, K. Mayanagi, Y. Ishino, and K. Morikawa, "Clamp-loading mechanism onto DNA revealed by electron microscopy and single particle image analysis", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, 18-23 June, 2006).
12. Y. Tsunaka, S. Tate, M. Okuwaki, K. Nagata, S. Hirose, and K. Morikawa, "Structural analysis of human nucleosome core particles", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, 18-23 June, 2006).
13. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "High-sensitive phase modulation AFM (PM-AFM)", 9th International Conference on Non-contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2006), (Kobe, Japan, July 16-20, 2006).
14. A. Aburaya, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Photoisomerization-based hydrophilicity/hydrophobicity control of AFM probe toward detection of surface polarization", 9th International Conference on Non-contact Atomic Force Microscopy

- (NC-AFM2006), (Kobe, Japan, July 16-20, 2006).
15. H. Yamashita, T. Uchihashi, and T. Ando, "Fast phase detection for high-speed AFM", International Conference on Nanoscience and Technology 2006 (Basel, Switzerland, July 30-August 4, 2006).
 16. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "High sensitive force detection by phase modulation AFM (PM-AFM)", International Conference on Nanoscience and Technology 2006 (ICN+T2006), (Basel, Switzerland, July 29-August 4, 2006).
 17. A. Aburaya, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Optical switching of hydrophilic/hydrophobic force Microscopy probe toward detection of surface polarization", International Conference on Nanoscience and Technology 2006 (ICN+T2006), (Basel, Switzerland, July 29-August 4, 2006).
 18. H. Yamashita, T. Uchihashi, D. Yamamoto, T. Ando, K. Voitchovsky, S. Antranz Contera, and J. F. Ryan, "High-resolution dynamic imaging of membrane proteins by high-speed AFM", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Japan, November 12-16, 2006).
 19. R. Nakakita, T. Uchihashi, and T. Ando, "Improvement of high-speed AFM scanner", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Japan, November 12-16, 2006).
 20. T. Uchihashi, H. Yamashita, N. Kodera, R. Nakakita, and T. Ando, "Direct driving of the high-speed AFM cantilever by photo-thermal expansion toward video-rate imaging of biomolecules", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Japan, November 12-16, 2006).
 21. D. Yamamoto, M. Taniguchi, and T. Ando, "Observation of GroEL-GroES action by high-speed atomic force microscopy". Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Japan, November 12-16, 2006).
 22. M. Taniguchi, D. Yamamoto, and T. Ando, "Single molecule imaging of chaperonin GroEL-GroES dynamics using high-speed atomic force microscopy", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Japan, November 12-16, 2006).
 23. N. Kodera, D. Yamamoto, and T. Ando, "Structural dynamics of acto-myosin V revealed by high-speed AFM", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Japan, November 12-16, 2006).
 24. N. Kodera and T. Ando, "Structural dynamics of acto-myosin V revealed by high-speed AFM", International Scanning Probe Microscopy Conference (Jeju, South Korea, June 10-14, 2007).
 25. D. Yamamoto, M. Taniguchi, and T. Ando, "Investigation of GroEL-GroES action by high-speed atomic force microscopy", International Scanning Probe Microscopy Conference (Jeju, South Korea, June 11-14, 2007).
 26. Y. Sasagawa, K. Yamanaka, and T. Ogura, "p97-UBXN complexes are essential for embryogenesis and gametogenesis in *Caenorhabditis elegans*", 16th biennial International *C. elegans* conference, (UCLA, USA, June 27-July 1, 2007).
 27. K. Yamanaka, Y. Sasagawa, and T. Ogura, "*C. elegans* p97, HRD-1 and BiP are required for ERAD and developmental growth", 16th biennial International *C. elegans* conference, (UCLA, USA, June 27-July 1, 2007).
 28. M. Esaki, K. Yamanaka, S. Nishikori, and T. Ogura, "Regions for substrate interaction in *C. elegans* p97 homologs", The 7th International conference on AAA proteins, (Royal Agricultural College, Cirencester, UK, September 9-13, 2007).
 29. Y. Matsushita-Ishiodori, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Characterization of the *C. elegans* homologue of spastin", The 7th International conference on AAA proteins, (Royal Agricultural College, Cirencester, UK, September 9-13, 2007).
 30. A. Johjima, S. Nishikori, T. Uchihashi, A. Miyagi, D. Yamamoto, T. Ando, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Mode of action of katanin on microtubules", The 7th International conference on AAA proteins, (Royal Agricultural College, Cirencester, UK, September 9-13, 2007).
 31. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Analysis of Q-controlled

- phase modulation AFM", The 10th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2007), (Antalya, Turkey, September 16-20, 2007).
32. N. Kodera, D. Yamamoto, and T. Ando, "Dynamic behavior of acto-myosin V visualized by high-speed AFM", 6th International Workshop Scanning Probe Microscopy in Life Sciences (Berlin, Germany, October 9, 2007).
 33. D. Yamamoto, M. Taniguchi, and T. Ando, "Chaperonin GroEL-GroES action revealed by high-speed atomic force microscopy", 6th International Workshop on Scanning Probe Microscopy in Life Sciences (Berlin, Germany, October 9, 2007).
 34. Y. Sugawara, N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, and M. Kageshima, "New imaging mode for atomic force microscopy without instabilities", The 15th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM15), (Atagawa, Japan, December 6-8, 2007).
 35. N. Kodera, D. Yamamoto, and T. Ando, "Dynamic behavior of acto-myosin V captured by high-speed AFM", X. Annual Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 16-19, 2008).
 36. Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Development of high-speed phase modulation AFM in CA mode in liquids", 11th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NCAFM-2008), (Madrid, Spain, September 16-19, 2008).
 37. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Multi-functional high-speed phase modulation AFM with topography, energy dissipation and elasticity", 16th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM16), (Atagawa, Japan, December 11-13, 2008).
 38. K. Takahashi, Y. J. Li, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Development of simultaneous imaging mode of viscoelasticity in multifrequency high-speed atomic force microscopy", 16th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM16), (Atagawa, Japan, December 11-13, 2008).
 39. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Local potential mapping using surface photovoltage in liquid", 16th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM16), (Atagawa, Japan, December 11-13, 2008).
 40. Y. Matsushita-Ishiodori, M. Esaki, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Analysis of microtubule severing by the *C. elegans* spastin homologue SPAS-1, a member of AAA proteins.", The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, (San Francisco, USA, December 13-17, 2008).
 41. M. Esaki, S. Nishikori, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Positive Cooperativity of the p97 AAA ATPase Is Critical for Cell Viability", The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, (San Francisco, USA, December 13-17, 2008).
 42. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Development of multifrequency high-speed AFM with the capability of imaging topography, energy dissipation and elasticity in liquid", The XI International Scanning Probe Microscopy Conference 2009, (Madrid, Spain, June 18, 2009).
 43. S. Sugimoto, M. Wachi, K. Yamanaka, and T. Ogura, "Remodeling of cell division protein FtsZ by AAA⁺ chaperone ClpX from *E. coli*", 8th International Conference on AAA Proteins, (Toronto, Canada, 12-16 July 2009).
 44. S. Nishikori, M. Esaki, K. Yamanaka, S. Sugimoto, and T. Ogura, "Positive cooperativity of the p97 AAA ATPase is critical for the function", 23rd annual symposium of the protein society "PROTEINS IN MOTION", (Boston, USA, July 25-29, 2009).
 45. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, "Development of multifrequency high-speed NC-AFM in liquid", 12th International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy (NC-AFM2009), (New Haven, USA, August 10-14, 2009).
 46. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima and Y. Sugawara, "Force enhancement of phase modulation atomic force microscopy using Q-control technique for high-resolution imaging in liquid", 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM17) (Atagawa, Japan, December 11-13, 2009).
 47. D. Yamamoto, A. Miyagi, K. Oiwa, T. Ando, and H. Sakakibara, "Structural characterization of

- dynein-c by high-speed AFM”, International Workshop Dynein 2009, (Kobe, Japan, November 1-5, 2009).
48. Y. Okazaki, T. Uchihashi, and T. Ando, “Development of stand-alone-type high-speed AFM for cell imaging”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 49. Y. Koyama, H. Koide, S. Tanaka, S. Omote, and T. Ando, “Myosin V motor activity depending on the number of calmodulin”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 50. D. Yamamoto, A. Miyagi, K. Oiwa, T. Ando, and H. Sakakibara, “Nano-dissection of *Chlamydomonas* Dynein-c by high-speed AFM”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 51. S. Sugimoto, A. Miyagi, T. Ando, and T. Ogura, “Single-molecule analysis of dynamics of bacterial cytoskeletal proteins FtsZ by high-speed AFM”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 52. T. Nishino, A. Miyagi, T. Ando, K. Morikawa, and K. Nasmyth, “Solution dynamics analysis of budding yeast chhesin complex by fast scanning AFM”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 53. M. Taniguchi, D. Yamamoto, N. Kodera, and T. Ando, “Direct observation of GroEL-substrate complexes by high-speed atomic force microscopy”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 54. H. Yamashita, M. Shibata, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, Y. Furutani, S. Antranz Contera, J. F. Ryan, H. Kandori, and T. Ando, “Direct observation of membrane protein dynamics by high-speed AFM”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December, 15-17, 2009).
 55. H. Watanabe, T. Uchihashi, and T. Ando, “Visualization of subsurface structures by high-speed ultrasonic force microscopy”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 56. T. Yamamoto, T. Uchihashi, and T. Ando, “Tapping-force reduction based on parametric excitation for high-speed AFM”. Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 57. N. Kobayashi, Y. J. Li, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, “Force enhancement of phase modulation atomic force microscopy using Q-control technique for high-resolution imaging in liquid”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 58. Y. J. Li, K. Takahashi, N. Kobayashi, Y. Naito, M. Kageshima, and Y. Sugawara, “Development of multifrequency high-speed phase-modulation atomic force microscopy in liquids”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 59. M. Kageshima, S. Kurachi, T. Ogawa, Y. Naitoh, Y. J. Li, and Y. Sugawara, “Wide-band viscoelasticity analysis of single polymer chain dynamics”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 60. K. Takahashi, Y. J. Li, T. Fujiwara, N. Kobayashi, Y. Naitoh, M. Kageshima, and Y. Sugawara, “Biotin-avidin interactions detected by multifrequency high-speed atomic force microscopy”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 61. M. Ewald, Y. Lacroute, D. Carriou, E. Lesniewska, E. Bourillot, N. Kodera, and T. Ando, “Observation of nanostructured surface by high-speed atomic force microscopy”, Symposium on Watching Biomolecules in Action (Osaka, Japan, December 15-17, 2009).
 62. M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, and T. Ando, “Direct visualization of photo-activated bacteriorhodopsin by high-speed atomic force microscopy”, Biophysical Society 54th Annual Meeting, (San Francisco, USA, February 20-24, 2010).
 63. T. Ando, N. Kodera, and D. Yamamoto, “Walking myosin V visualized by high-speed AFM”, Alpbach Workshop on Molecular Motors 2010 (Alpbach, Austria, March 20-26, 2010).

1. 又多恵子, 古寺哲幸、宮城篤、安藤敏夫「タンパク質のAFM映像を原子モデルに照らして理

- 解するための解析法」, 日本生物物理学会第42回年会(京都 2004 年 12 月 13-15 日).
2. 前田大輔、宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫「高速AFMによるタンパク質の動態撮影に資する基板開発」, 日本生物物理学会第42回年会(京都 2004 年 12 月 13-15 日).
 3. 伊藤悠徳、内橋貴之、安藤敏夫「高速AFMの性能向上のための改良」, 日本生物物理学会第42回年会(京都 2004 年 12 月 13-15 日).
 4. 宮城篤、前田大輔、古寺哲幸、大岩和弘、安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡によるモータータンパク質分子の動態観察」, 日本生物物理学会第42回年会(京都 2004 年 12 月 13-15 日).
 5. 田中祐介、木下達也、小出博史、安藤敏夫「量子ドットを用いたミオシンVの高分解能蛍光観察系の開発」, 日本生物物理学会第42回年会(京都 2004 年 12 月 13-15 日).
 6. 小出博史、木下達也、田中祐介、安藤敏夫「Ca²⁺存在下でのミオシンVの1分子観察」, 日本生物物理学会第42回年会(京都 2004 年 12 月 13-15 日).
 7. 木下達也、小出博史、田中祐介、安藤敏夫「単頭ミオシンVから再構成した擬似HMMの運動」, 日本生物物理学会第42回年会(京都 2004 年 12 月 13-15 日).
 8. 中北諒、古寺哲幸、安藤敏夫、「高速 AFM スキャナーの改良」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 9. 坂下満、古寺哲幸、安藤敏夫、「カンチレバー励振強度の制御による高速 AFM のイメージングの安定化」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 10. 伊藤悠徳、山下隼人、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、「自己励振を用いた高速 AFM の FM 検出イメージング」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 11. 内橋貴之、古寺哲幸、山下隼人、伊藤悠徳、安藤敏夫、「フィードフォワード補償による高速 AFM 距離制御の広帯域化」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 12. 山下隼人、古寺哲幸、宮城篤、伊藤悠徳、内橋貴之、安藤敏夫、「レーザ照射によるカンチレバーの直接駆動を用いた高速 AFM の距離制御」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 13. 古寺哲幸、宮城篤、山下隼人、中北諒、坂下満、伊藤悠徳、内橋貴之、安藤敏夫、「タンパク質分子の機能動態を捉える高速 AFM の開発」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 14. 宮城篤、古寺哲幸、榊原齊、大岩和弘、安藤敏夫、「高速 AFM によるダイニン C の動態観察」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 15. 谷口雅昭、宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫、「シャペロン GroEL に起こる構造変化の高速 AFM による解析」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 16. 田中祐介、小出博史、早川史洋、上田太郎、安藤敏夫、「ミオシンVの運動メカニズム」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 17. 小出博史、田中祐介、早川史洋、Gabriel Meyer zu Hoerste、安藤敏夫、「ミオシンVの Ca²⁺存在下で解離するカルモジュリンを結合してた IQ モチーフの同定」, 日本生物物理学会(札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日).
 18. 山中邦俊、大久保佳子、坂田幸子、小椋光、「線虫を用いた p97/VCP ホモログの機能解析」, 第 28 回日本分子生物学会年会, (ヤフードーム(他 5 会場), 福岡、2005 年 12 月 7-10 日).
 19. 山内清司、山中邦俊、小椋光、「線虫に重複して存在する p97 は異なる発現調節を受ける」, 第 28 回日本分子生物学会年会, (ヤフードーム(他 5 会場), 福岡、2005 年 12 月 7-10 日).
 20. 笹川洋平、山中邦俊、小椋光、「線虫 *C. elegans* において UBX 遺伝子群は胚発生と精子形成に必須である」, 第 28 回日本分子生物学会年会, (ヤフードーム(他 5 会場), 福岡、2005 年 12 月 7-10 日).
 21. 菅原康弘、小林成貴、川上雅代、李艶君、内藤賀公、影島賢巳、「不安定性のない振動振幅一定・位相変調方式 AFM の提案」, 2007 年秋季第68回応用物理学会学術講演会(北海道工業大学、2007 年 9 月 4-8 日).
 22. 李艶君、小林成貴、内藤賀公、影島賢巳、菅原康弘、「振動振幅一定・位相変調方式による

- 多機能高速AFMの開発」, 2007年秋季第68回応用物理学会学術講演会(北海道工業大学、2007年9月4-8日).
23. 小林成貴, 李艶君, 内藤賀公, 影島賢巳, 菅原康弘, 「Q 値制御法を用いた振動振幅一定モード位相変調方式 AFM の解析」, 2007 年秋季第68回応用物理学会学術講演会(北海道工業大学、2007年9月4-8日).
 24. 松下由佳, 山中邦俊, 小椋光, 「AAA タンパク質 spastin の線虫ホモログ SPAS-1 は微小管ダイナミクスに關与する」, 第 30 回日本分子生物学会年会、(横浜、2007年12月11日-15日).
 25. 城島愛, 錦織伸吾, 内橋貴之, 宮城篤, 山本大輔, 安藤敏夫, 山中邦俊, 小椋光, 「Katanin の微小管への作用」, 第 30 回日本分子生物学会年会、(横浜、2007年12月11日-15日).
 26. 田中慎一郎, 小出博史, 表冴子, 安藤敏夫, 「Calcium regulation of myosin V」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 27. 宮城篤, 津中康央, 内橋貴之, 真柳浩太, 広瀬進, 森川耿右, 安藤敏夫, 「高速 AFM による、タンパク質の Disorder 領域の可視化」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 28. 山下隼人, Kislun Voitchovsky, 内橋貴之, Sonia Antoranz Contera, 山本大輔, J. F. Ryan, 安藤敏夫, 「高速 AFM による bR2次元結晶の脱結晶化及び再結晶化過程のダイナミクス観察」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 29. 斉藤優太, 名倉直希, 田中慎一郎, 安藤敏夫, "Myosin V S1 tethered at its head can propel actin filaments movement", 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 30. 高橋尚久, 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速 AFM のための高速 AFM スキャナーとそのアクティブダンピングについて」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 31. 山本大輔, 谷口雅昭, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡による GroEL-GroES の結合・解離測定」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 32. 安藤彰良, 今井将之, 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡のスキャナーの改良」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 33. 真柳浩太, 清成信一, 白井剛, 石野良純, 森川耿右, 「DNA ligase/PCNA/DNA 複合体の単粒子解析」, 日本生物物理学会(パシフィコ横浜、2007年12月21-23日).
 34. 錦織伸吾, 山中邦俊, 江崎雅俊, 小椋光, 「線虫由来 p97 ホモログ CDC-48.1 の ATP 加水分解機構の解析」, 第 8 回日本蛋白質科学会年会、(東京、2008年6月10日-12日).
 35. 笹川洋平, 山中邦俊, 小椋光, 「UBX ファミリータンパク質は、精子形成過程、卵母細胞形成過程、初期胚発生における細胞極性を制御する」, 第 60 回日本細胞生物学会大会、(横浜、2008年6月29日-7月1日).
 36. 岡崎康孝, 内橋貴之, 福岡剛士, 古寺哲幸, 安藤敏夫, 「スキャナーの改良による高速AFMの高速化」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 37. 古寺哲幸, 山本大輔, 安藤敏夫, 「高速 AFM で可視化されたアクチオシン V の運動の詳細解析」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 38. 今井将之, 山本大輔, 谷口雅昭, 名倉直希, 安藤敏夫「シャペロニン GroEL-GroES 相互作用の一分子観察」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 39. 谷口雅昭, 山本大輔, 古寺哲幸, 安藤敏夫, 「高速 AFM によるシャペロニン GroELからの基質タンパク質の結合解離過程の観察」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 40. 山下隼人, Kislun Voitchovsky, 内橋貴之, Sonia Antoranz Contera, John F. Ryan, 安藤敏夫, "Direct observation of bacteriorhodopsin molecular interaction in purple membrane by high-speed AFM", 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 41. 柴田幹大, 山下隼人, 内橋貴之, 山田純也, 井原邦夫, 神取秀樹, 安藤敏夫, 「バクテリオロドプシン変異体の二次元結晶構造の高速AFM観察」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 42. 宮城篤, 内橋貴之, 津中康央, 内橋貴之, 真柳浩太, 広瀬進, 森川耿右, 安藤敏夫,

- “Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy”, 第46回日本生物物理学会年会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
43. 山本大輔、内橋貴之、古寺哲幸、安藤敏夫、「ストレプトアビジン二次元結晶における異方的な格子欠陥移動」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 44. 表冴子、田中慎一郎、小出博史、古寺哲幸、中根健一郎、「ミオシン V-S1 のカルシウム調節と ATPase 反応における構造変化の FRET 検出」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 45. 小山ゆり、木下達也、名倉直希、安藤敏夫、「レバーアームを用いない擬似双頭の運動」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場 2008年12月3-5日).
 46. 中根健一郎、古寺哲幸、安藤敏夫、「化学状態の違いによるアクチン・ミオシン V の結合様式」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5).
 47. 山本哲朗、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、「高速AFMによる非接触領域イメージングに向けた開発」, 日本生物物理学会(福岡国際会議場、2008年12月3-5日).
 48. 鬼武彰宣、「線虫 *fidgetin* ホモログ *FIGL-1* の細胞機能における SUMO の関与」, 第31回日本分子生物学会年会(神戸、2008年12月8日-12日).
 49. 松下由佳、江崎雅俊、山中邦俊、小椋光、「AAA タンパク質 *spastin* の線虫ホモログ *SPAS-1* による微小管切断機構の解析」, 第31回日本分子生物学会年会、(神戸、2008年12月8日-12日).
 50. 津中康央、宮城篤、梅純子、山口寛人、楯慎一、安藤敏夫、広瀬進、森川耿右、「クロマチンリモデリング因子 *FACT* とヌクレオソーム DNA の結合機構」, 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会合同大会(神戸、2008年12月9-12日).
 51. 西野達哉、森川耿右、Kim Nasmyth、「出芽酵母コヒーシ複合体の DNA 結合活性」, 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会合同大会(神戸、2008年12月9-12日).
 52. 江崎雅俊、錦織伸吾、山中邦俊、小椋光、「p97/VCP とタンパク質凝集体」, 第9回日本蛋白質科学年会、ワークショップ AAA ファミリー蛋白質と疾患(熊本、2009年5月20日-22日).
 53. 杉本真也、和地正明、小椋光、「大腸菌 AAA+シャペロン *ClpX* による細胞分裂関連タンパク質 *FtsZ* のリモデリング」, 第9回日本蛋白質科学年会(熊本、2009年5月20日-22日).
 54. 松下(石躍)由佳、吉永壮佐、山中邦俊、小椋光、寺沢宏明、「微小管切断 AAA タンパク質 *spastin* の線虫ホモログ *SPAS-1* の微小管結合ドメインの構造解析」, 第9回日本蛋白質科学年会(熊本、2009年5月20日-22日).
 55. 津中康央、梅純子、山口寛人、楯真一、広瀬進、森川耿右、「クロマチンリモデリング因子 *FACT* 天然変性領域のリン酸化によるヌクレオソーム DNA 結合阻害の分子機構」, 第9回日本蛋白質科学年会(熊本、2009年5月20日-22日).
 56. 宮城篤、津中康央、内橋貴之、真柳浩太、広瀬進、西野達也、安藤敏夫、森川耿右、「高速 AFM による蛋白質天然変性領域の観察」, 第9回日本蛋白質科学年会(熊本、2009年5月20日-22日).
 57. 岡崎康孝、内橋貴之、安藤敏夫、「細胞観察用 *tip-scan* 型高速原子間力顕微鏡の開発」, 日本生物物理学会(アステイ徳島、2009年10月30-11月1日).
 58. 山本大輔、宮城篤、安藤敏夫、「高速 AFM によるクラミドモナスダイニンC破壊過程の観察」, 日本生物物理学会(アステイ徳島、2009年10月30-11月1日).
 59. 小山ゆり、小出博史、田中慎一郎、表冴子、安藤敏夫、「ミオシンVのカルシウム調節」, 日本生物物理学会(アステイ徳島、2009年10月30-11月1日).
 60. 今井将之、安藤敏夫、「アクトミオシン II の高速 AFM 観察」, 日本生物物理学会(アステイ徳島、2009年10月30-11月1日).
 61. 柴田幹大、山下隼人、内橋貴之、神取秀樹、安藤敏夫、「高速原子間力顕微鏡(AFM)を用いたバクテリオロドプシンの光励起に伴う動態観察」, 日本生物物理学会(アステイ徳島、2009年10月30-11月1日).
 62. 谷口雅昭、山本大輔、古寺哲幸、安藤敏夫、「高速 AFM による GroEL-基質タンパク質複合体の直接観察」, 日本生物物理学会(アステイ徳島、2009年10月30-11月1日).

63. 山下隼人, 柴田幹大, 内橋貴之, 古谷祐詞, 山下高廣, 神取秀樹, 七田芳則, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡によるロドプシンの動態観察」, 日本生物物理学会(アステイ徳島, 2009年10月30-11月1日).
64. 宮川直也, 山本愛輔, 小椋光, 錦織信吾, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡によるATP加水分解反応中のp97の動態観察」, 日本生物物理学会(アステイ徳島, 2009年10月30-11月1日).
65. 山本哲朗, 内橋貴之, 安藤敏夫, 「パラメトリック共振モード高速AFMを用いた低侵襲性生体分子イメージング」, 日本生物物理学会(アステイ徳島, 2009年10月30-11月1日).
66. 渡辺大輝, 内橋貴之, 安藤敏夫, 「超音波高速原子間力顕微鏡による表面下構造のイメージング」, 日本生物物理学会(アステイ徳島, 2009年10月30-11月1日).
67. 吉田正人, 内橋貴之, 安藤敏夫, 「高速原子間力顕微鏡による探針試料間の相互作用の検出感度の向上」, 日本生物物理学会(アステイ徳島, 2009年10月30-11月1日).

(4)知財出願

①国内出願 (10件)

1. 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及びカンチレバー駆動装置」, 金沢大学, 2005年5月31日, 特願2005-159910.
2. 安藤敏夫・坂下満・内橋貴之, 「走査プローブ顕微鏡」, 金沢大学, 2005年12月19日, 特願2005-364797.
3. 内橋貴之・安藤敏夫・山下隼人, 「高速・高感度位相検出法及び高速AFMの高感度化」, 金沢大学, 2005年12月20日, 特願2005-366395.
4. 菅原康弘・影島賢巳, 「圧電素子の制御方法, 圧電素子の制御装置, アクチュエータ, 及び顕微鏡」, 大阪大学, 2006年7月27日, 特願2006-205376.
5. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・高橋尚久, 「原子間力顕微鏡」, 金沢大学, 2006年9月4日, 特願2006-238886.
6. 安藤敏夫, 「走査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」, 金沢大学, 2006年9月6日, 特願2006-241920.
7. 安藤敏夫・内橋貴之・山下隼人, 「走査プローブ顕微鏡」, 金沢大学, 2006年12月12日, PCT/JP2006/324723.
8. 安藤敏夫, 「走査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」, 金沢大学, 2007年7月27日, PCT/JP2007/064731.
9. 福間剛士・安藤敏夫・岡崎康孝, 「走査プローブ顕微鏡のスキヤナー装置」, 金沢大学, 「特願2008-147041, 2008年6月4日.
10. 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」, 金沢大学, 特願2008-275981, 2008年10月27日.

②海外出願 (5件)

1. 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」, 金沢大学, 2006年5月26日, PCT/JP2006/310535.
2. 安藤敏夫・坂下満・内橋貴之, 安藤敏夫・坂下満・内橋貴之, 「走査プローブ顕微鏡」, 金沢大学, 2006年10月12日, PCT/JP2006/320415.
3. 安藤敏夫・内橋貴之・山下隼人, 「走査プローブ顕微鏡」, 金沢大学, 2006年12月12日, PCT/JP2006/324723.
4. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・高橋尚久, 「原子間力顕微鏡」, 金沢大学, 2007年7月27日, PCT/JP2007/064732.
5. 安藤敏夫, 「走査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」, 金沢大学, 2007年7月27日, PCT/JP2007/064731.

(5)受賞・報道等

①受賞(8件)

1. 安藤敏夫,「北國文化賞」, 2005年11月3日.
2. 安藤敏夫, (有)金沢大学 TLO, オリンパス(株),「産学官連携功労者表彰(日本学術会議会長賞)」, 2007年6月16日.
3. 安藤敏夫, 内橋貴之, 古寺哲幸, 宮城篤, 山下隼人, 坂下満,「応用物理学会 JJAP 論文賞」, 2007年9月4日.
4. 山下隼人,「応用物理学会奨励賞」, 2007年9月4日
5. 安藤敏夫,「日本学術振興会 榊賞」, 2008年9月16日.
6. 柴田幹大,「日本生物物理学会若手奨励賞」, 2009年10月31日.
7. 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4月13日.
8. 安藤敏夫,「日本表面科学会賞」, 2010年5月22日.

②マスコミ(新聞・TV等)報道(14件)

1. 北陸中日新聞 朝刊 (2004年10月14日)
原子間力顕微鏡 金沢大・安藤教授ら開発
2. 北国新聞 朝刊 (2005年2月5日)
学術の森 金沢大学 安藤敏夫教授 予算却下を乗り越えて
3. 日経産業新聞 朝刊 (2005年5月20日)
金沢大 高速顕微鏡技術 米社に移転
4. 日本経済新聞 朝刊 (2005年5月20日)
高速顕微鏡で米社に技術供与 金沢大の収入2億円超
5. 北陸中日新聞 朝刊 (2005年5月20日)
金大発 技術の「金の卵」 世界初の高速原子間力顕微鏡
特許使用、米国メーカーと契約
6. 北国新聞 朝刊 (2005年5月20日)
高速顕微鏡 米で製品化 特許収入 10年で4億円
動くDNA 見えた 金大・安藤教授が開発
7. 北国新聞 朝刊 (2005年10月29日)
北国文化賞 道をひらく 動くタンパク質が見えた
8. 日経産業新聞 朝刊 (2005年11月18日)
テクノレンド たんぱく質、動画で観察 撮影速度1000倍速く
9. The Japan Journal Vol 3(1), 2 (May, 2006)
Breakthrough: AFMs Under the Microscope
10. 日経産業新聞 朝刊 1面 (2007年3月9日)
金沢大 顕微鏡撮影素速2.6倍 分子の動画鮮明
11. 日本経済新聞 朝刊 39面 (2007年3月10日)
顕微鏡で微細構造 動画撮影 世界最速レベルの開発(金沢大)
12. 北国新聞 夕刊 (2007年6月8日)
産学官連携功労表彰 安藤教授(金沢大)に
13. 北陸中日新聞 朝刊 (2007年6月9日)
産官学が連携 先進の成果 金沢大安藤教授 DNAを世界初撮影
14. 日刊工業新聞 朝刊 (2007年6月9日)
第5回産学官連携功労者 京都で16日に表彰

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- 本研究を進める前に既に出願したものと本成果で出てきた出願合わせて12件について、国内企業に向けて実施権許諾 1 件、海外企業に向けて実施権許諾1件を行った。また、更に出てきた成果に基づく出願 5 件について、国内の民間企業に向けて実施権許諾を1件行い、海外の民間企業に向けて実施権許諾を2件行った。他の出願1つについては、3件交渉中。
- (株)生体分子計測研究所は本研究で開発した高速バイオ AFM 装置を5台製作し、高速バイオ AFM の国際コンソーシアムのメンバーである EU4研究室と米国1研究室に販売した。この企業は実施権許諾権を持たないが、実施許諾した企業の了解を得ている。

① 社会還元的な展開活動

- 高速バイオ AFM の国際コンソーシアムを EU の4研究室と米国の1研究室と一緒に設立した。
- 得られた成果をこの国際コンソーシアムに提供した。

§ 6 研究期間中の主な活動 (ワークショップ・シンポジウム等)

| 年月日 | 名称 | 場所 | 参加人数 | 概要 |
|--------------|--|------------------|-------|---|
| H21/12/15-17 | JST/CREST シンポジウム "Watching Biomolecules in Action" | 大阪千里ライフサイエンスセンター | 173 名 | 高速バイオ AFM に関連する研究者と1分子生物学に関連する研究者が一同に会し、今後の発展の方向を探る国際会議 |
| H21/6/12-13 | チーム内ミーティング | 金沢大学 | 17 名 | 各グループの進捗状況を把握するため研究発表を行い、問題点と今後の方針について議論した。 |
| H20/10/3-4 | チーム内ミーティング | 大阪大学バイオ関連多目的研究施設 | 26 名 | 各グループの進捗状況を把握するため研究発表を行い、問題点と今後の方針について議論した。 |
| H19/10/19-20 | チーム内ミーティング | KKR ホテル金沢 | 30 名 | 各グループの進捗状況を把握するため研究発表を行い、問題点と今後の方針について議論した。 |
| H19/1/15-18 | Kanazawa Workshop on Bio-AFM | 金沢ニューグランドホテル | 52 名 | バイオ AFM 関係の国際ワークショップ |
| H19/1/7-9 | 生体運動研究合同班会議 | 金沢市文化ホール | 214 名 | 生体運動研究関連の研究発表会議 |
| H18//10/6-7 | チーム内ミーティング | くまもとエミナース | 25 名 | 各グループの進捗状況を把握するため研究発表を行い、問題点と今後の方針に |

| | | | | |
|--------------|------------|---------------------|-----|---|
| | | | | ついて議論した。 |
| H17/12/16-17 | チーム内ミーティング | 大阪大学先端科学イノベーションセンター | 27名 | 各グループの進捗状況を把握するため研究発表を行い、問題点と今後の方針について議論した。 |
| H16/12/27 | チーム内ミーティング | 金沢大学 | 22名 | チームの壮行会 |

【国際シンポジウム “Watching Biomolecules in Action 2009”】

本 CREST 研究で得られた成果を情報発信し、また、今後の展開を探ることを目的に 2009 年 12 月に千里ライフサイエンスセンターで開催した国際シンポジウム “Watching Biomolecules in Action 2009 (Single molecule biology symposium + 2nd Kanazawa Bio-AFM workshop)” について概要をここで報告する。シンポジウムのタイトルは本 CREST プロジェクトの研究内容を強く意識したものである。

まず、参加者についてみると、総数 173 名にのぼり、主催者側が学会などの組織をもたないシンポジウムにしてはかなり多くの研究者・学生に参加して頂けた。海外から 47 名の参加者があったことも大変よかった。自由応募にもかかわらず、フランス、ドイツ、スイス、カナダ、スウェーデン、トルコ、シンガポール、台湾から参加者があった。特にフランスからは 7 名が自由応募で参加された。海外からの招待講演者(全講演者の 41%)についてみると、1 分子生物学とそれに関連する分野で世界を先導している一流の研究者が多く参加された。都合で来られなかった方 (Sunney Xie, Stefan Hell, Yves Duferen, Peter Hinterdorfer) もあるが、その場合には実際に研究を進めておられるその研究室のシニア研究者もしくはポスドクに参加して頂いた。

我々のグループからは、高速 AFM によるタンパク質の機能動態イメージングに関する以下 4 件の研究成果を口頭発表した。Myosin V の歩行運動、Bacteriorhodopsin の光応答、シャペロニン GroEL-GroES の結合・解離反応、Nucleosome リモデリングタンパク質 FACT の天然変性領域のダイナミクスの動態観察である。Myosin V の歩行運動の発表が最初であったが、海外の研究者は強く反応し、多くの質問があった。探針が試料に接触する力の大きさと試料に与える影響がどのくらいあるのかという点に質問が多くあった。映像データからは影響が無視できるほど小さいことは明らかであるが、歩行する Myosin V 分子を初めて見る研究者にとっては信じ難い映像であり、また、探針と試料の接触は試料に大きな影響を与えているはずだという先入観があるからである。その後示した GroEL-GroES や Bacteriorhodopsin の映像に関しては、探針の影響に関する質問はほとんどなく、探針の影響は無視できるほど小さいということが十分認識されたようであった。高速 AFM が捉えた映像が示す内容は、対象とするタンパク質の機能メカニズムや構造変化について従来の研究で得られた結果と異なる場合があり、従来の研究結果及び解釈との違いや従来の研究ではどこに問題があったのかという質問・議論がなされた。このことは、多くの映像を見たことにより、高速 AFM が捉えた映像が示している内容の方が正しいに違いないと、短い間に海外の研究者が考えるようになったことを示唆している。金沢大学が中心となって設立した高速バイオ AFM 国際コンソーシアムの海外のメンバーや(株)生体分子計測研究所のプロトタイプ高速 AFM の使用者からも高速 AFM で捉えた映像 (Lithostathine のファイバー形成過程、抗原・抗体の結合のダイナミクス、Glycosidase の結晶性基質の分解反応に伴うプロセシブ運動、DNA 折り紙のダイナミクスなど) が紹介された。発表後の雑談では、高速 AFM がバイオの問題に既にこれだけ適用されていることに目を見張るといった感想や、高速 AFM 装置を早く入手したいという要望が多くあった。また、共同研究の申し出も何件かあった。以上のように、CREST における 5 年間の研究成果を発信し、新しい研究手法の有効性を国内外の研究者に実感して頂いたという点で、本シンポジウムの目的の半分は十分に達成されたと言ってよい。

CREST での研究成果を更に発展させ、次世代高速 AFM の開発に向けて我々は既に研究を着手している。超音波と高速 AFM を組み合わせて、細胞内や細胞表面で起こるダイナミクスの可視化を可能にする研究である。高速ではないが、先行研究を進めている Shekhawat の講演があり、どの程度彼らの研究が進んでいるのかを知ることができた。かなり大きな構造体しか可視化できておらず、細胞骨格のような密度の低い構造までは見えていない。また、深さ方向に対する分解能を有していない。CNT などの密度の高いものを細胞に入れて可視化している程度であった。また、静止画像しか得られておらず、細胞研究への有効性がまだ示されていなかった。彼との雑談のなかで、彼らが高速 AFM に強い関心があり、彼らの技術に高速 AFM を導入したいという話があった。今後共同研究を進めたいという申し出もあった。また、超音波に関する細かいノウハウの情報をいくつか得ることができた。彼らとの共同研究は今後次世代高速 AFM を開発する上で必要になると思われる。

本シンポジウムでは、上記のテーマ以外に、大きく分類すると、(a)従来型の1分子生物学手法(1分子蛍光・FRET イメージング、光・磁気ピンセット、AFM 力計測、AFM イメージング)によるタンパク質、DNA-RNA、細胞膜、細胞の研究、(b)超高解像光学顕微鏡、(c)新規蛍光ナノ粒子と GFP 関連の蛍光プローブ、(d)バイオ MEMS、(e)単一細胞の網羅的タンパク質・mRNA 解析、(f)新規解析装置のテーマで発表があった。当然ながら、(a)の発表が半数以上を占め、既に確立された1分子生物学手法に興味ある対象に広く適用拡大する方向で研究が進んでいることが明らかであった。確立している手法だけに、データの解釈や技術に関するよりは、個々の対象に関する質問・議論が多くあった。原核細胞の DNA 取り込み分子機械、内耳のモータータンパク質 prestin など、目を引く新しい対象に関する発表もあった。超解像光学顕微鏡については、STED 蛍光顕微鏡の原理的な話の他に、プローブのスイッチングを全く要しない金ナノ粒子を利用した photothermal heterodyne imaging の発展型の新規超解像法についての Cognet による講演が印象的であった。未だ解決すべき技術的な課題が両者にあるように感じられたが、今後これら及び STORM、PALM といった超解像光学顕微鏡が細胞生物学に広く適用されていくことが強く予感された。バイオ MEMS による微小分析ツール作成は技術的にかなり進んでいることが竹内氏の講演で示された。比較的簡易なバイオ MEMS ツールを利用した単一細胞の網羅的分析の話が Sunney Xie 研の Taniguchi によって、また、DNA・Protamine 結合による toroid 形成過程の観察が Brewer によって紹介された。

全体として、従来型の1分子生物学手法による研究が拡大発展している一方で、新規1分子生物学手法が発展しつつあり、今後益々この分野が発展することを強く予感させる会議であった。スケジュールの都合で総合討論に時間を取れなかったが、各自の研究の将来展望と1分子生物学が今後進むべきより良い方向を考える上で、本シンポジウムは良い機会を与えることができたと思われる。国際共同研究を進める話がコーヒープレイク中に多く聞かれ、本シンポジウムはその意味でも成功したと思われる。また、我々が CREST 研究で進めてきた高速 AFM の成果を海外の研究者に伝え、強い印象を彼らに与えることができたことは、大きな収穫であった。

§ 7 結び

【研究の目標等から見た達成度】

当初目標とした最大の課題『機能している個々のタンパク質分子の動態をサブ分子スケールの解像度で直接観察できる高速バイオ AFM 装置を開発するとともに、この新しい顕微鏡法の有効性を、いくつかの興味あるタンパク質分子の動態映像を撮ることにより実証すること』は見事に達成された。機能動態を明確にイメージングできた系は多くはないが、これまで不可能であった観察を可能にする夢の顕微鏡が実現したことは間違いない。

【成果の意義などの自己評価】

イメージング速度の理論限界をほぼ達成することができたことは大きな成果である。また、myosin V の歩行運動の可視化、bacteriorhodopsin の光応答の可視化はイメージング研究の中で最大の成果であった。特に myosin V の歩行運動の映像は海外の会議で発表すると、会場がざわ

めいたり、時には拍手が起こったりすることを何度も経験した。更に多くの興味ある試料系のダイナミクス観察は今後の大きな発展課題である。映像データ自身に対象の分子に関する多くの情報が含まれており、ひとつの映像から多くの事実を引き出すことができる。従来手法で多くの時間と労力をかけて得られるいくつもの発見が短時間で得られる。この手法は今後確実に活用される画期的な手法であることは疑いなく、それを実現した本 CREST 研究は優れた成果を上げたと自負している。

【今後の研究の展開】

探針と試料を接触させて試料を観察する高速 AFM が捉える映像はアーティファクトに違いがないという多くのバイオ系研究者の先入観は、我々が成功させた観察結果によって払拭されたに違いない。今後は、機能動態に関して情報がほとんどないタンパク質系で得た映像が真実を伝えていると確信をもってよい。

今後の研究の展開としては、大きく分けて2つある。(a)多くのタンパク質系の高速バイオ AFM 観察による機能解明、(b)高速バイオ AFM 装置の発展バージョンの開発。前者については、高速バイオ AFM 国際コンソーシアムの活動に加え、国内のバイオ系の研究者との共同研究によって推進していく予定である。この共同研究については、今回の経験を有効に生かす。後者については、(1)蛍光顕微鏡と一体型の高速バイオ AFM、(2)生きた細胞表面で起こる分子プロセスをもイメージングできる高速バイオ AFM、(3)細胞内で起こるオルガネラの動態を高解像度で観察できる高速バイオ AFM が実現できるものと期待しており、これらの発展バージョン装置の開発を目指す。それにより、高速 AFM 観察が可能な生物試料系が大幅に拡大される。また、高速 AFM 技術は我々の手を離れて独自に進化し、生命科学はもとより、界面化学、電気化学、高分子化学などの分野にも広く波及するものと期待される。

【プロジェクト運営】

プロジェクト運営と直接は関係しないが、試料調製グループとイメージンググループの効率的な連携が難しい点であった。イメージングした結果を直ぐに試料調製に反映させられなかった。これを解決するために、試料調製グループにも高速バイオ AFM を H20 年度の後半に設置したが、もう少し早く設置すべきであったように思う。装置の設置ばかりでなく装置を使いこなせる人材も重要であるが、限られたマンパワーでは無理があったと思う。ひとつの試料系に集中してイメージング研究するだけのマンパワーが不足していた。理想的には、試料も調製でき、その試料の背景をよく理解し、装置を使いこなせる人材をもっと養成する必要がある。それでも、そのような人材を何人か養成できたと思う。彼らがこれからこの新しく開拓した分野で活躍していくに違いない。研究費に関しては思う存分研究するだけの支援を頂き、大変感謝している。欲を言えば、もっと多くの博士研究員を雇用できていたら、イメージング研究の成功例をもっと増やせたのではないかと考えている。

【戦略的創造研究推進事業に対する意見、要望】

JST には研究に専念できるように色々配慮して頂き感謝している。成果を直ぐには求めないことも大変有り難かった(当然のことながら、最終的には大きな成果を出す気概で研究を進め、目標を達成することができた)。思う存分研究ができたと大いに感謝している。

本チームが達成した成果を今後に生かすことは大変重要であると考えている。世界を先導する世界初の成果を更に発展させるとともに、この新規開拓した分野で今後活躍する若い人材を育成し、我が国がこの分野で世界を継続的に先導するためには、何らかの事業継続が必要であり、是非支援をお願いしたい。CREST の成果を踏まえた発展型の事業の設立を強く願っている。

Photos



