

リアルタイム原子間力顕微鏡の開発とたんぱく質の機能動態イメージング

内橋 貴之^{*,**}・古寺 哲幸^{**}

Development of Real-Time Atomic Force Microscopy and Imaging of Protein Dynamics

Takayuki UCHIHASHI^{*,**} and Noriyuki KODERA^{**}

Direct and real-time visualization of single biological molecule is a straightforward and powerful approach to understanding the mechanisms of biomolecular processes. Recent advances of high-speed atomic force microscopy (AFM) opened a new possibility to visualize dynamic events of label-free proteins in action under physiological conditions, at subsecond to sub-100 ms temporal and submolecular resolution. Here we first overview the essential techniques that have enabled fast and low-invasive imaging of fragile biomolecules with AFM. Then, we show visualized conformational changes of functioning protein molecules, demonstrating the power of high-speed AFM.

Key words: high-speed atomic force microscopy, single molecule, conformational change

生命現象の理解には素過程としての個々の生体分子の機能発現メカニズムの理解がきわめて重要であり、生体分子の構造とその動態の把握が必須である。X線結晶構造解析に代表される構造解析手法によってたんぱく質から超分子複合体までの原子レベルでの立体構造情報を得ることができ、基本的に静止構造しか得られない。他方、生体分子の動的振る舞いについては蛍光顕微鏡で一分子レベルでの解析が可能になっているが、得られる情報は標識である蛍光分子の位置情報のみであり、生体分子の構造そのものを直接見ることはできない。原子間力顕微鏡 (AFM) は液中環境下で高分解能な構造解析ができることから、生体分子のダイナミックな振る舞いを経時観察しようとする試みも発明後すぐに開始されている。1989年には血液凝固因子が重合していく様子が約1分間隔で観察されており¹⁾、その後も、いくつかの生物試料で数十秒～数分のイメージング時間で撮影されているが²⁻⁵⁾、数あるAFMによる生体分子イメージングの報告の中でダイナミクス観察の報告はきわめて少ない。たんぱく質の構造動態をとらえるほど高速に、脆弱なたんぱく質を壊さずに、かつ一分子の構造変化

を検出できる解像度でイメージングするのは非常に困難であったためである。われわれのグループでは1993年ごろからAFMの高速化に着手し、2001年には80 ms/frameのイメージング速度でたんぱく質を画像化することに成功した⁶⁾。そのあとのさまざまな技術改良により、2008年ごろから本格的なたんぱく質のダイナミクス観察が可能になった⁷⁾。本稿ではAFM高速化のための要素技術について概説し、たんぱく質の機能動態を撮影した代表的な観察例を紹介する。高速化技術と観察結果の詳細に興味のある読者は、すでに出版されている総説を参照されたい⁷⁻⁹⁾。

1. 原子間力顕微鏡 (AFM) の高速化技術

基板に強く吸着し壊れにくい強固な試料系に対しては、音叉の振動を利用した試料ステージの高速走査や走査用圧電素子の振動を除去することにより、高速AFMイメージングは比較的容易に実現される¹⁰⁾。しかしながら、生体試料のように柔らかい試料で生理機能を乱すことなく観察することは簡単ではない。試料ステージの高速走査に加えて、探針が試料に及ぼす力をいかに弱く、かつ走査中に一

*金沢大学理工研究域数物科学系 (〒920-1192 金沢市角間町) E-mail: uchihast@staff.kanazawa-u.ac.jp

**金沢大学理工研究域バイオAFM先端研究センター (〒920-1192 金沢市角間町)

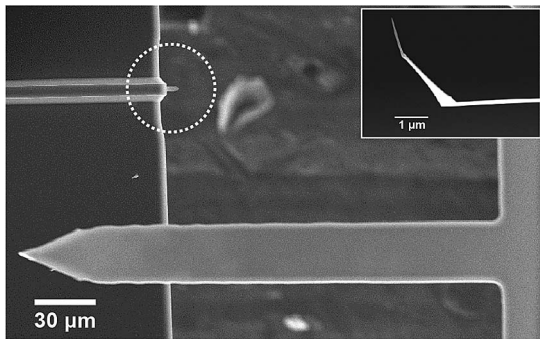


図1 微小カンチレバー（白丸で囲った部分，オリンパス BL-AC10DS）と通常のカンチレバー（オリンパス OMCL-AC240TS）の比較．挿入図は微小カンチレバー先端に取り付けた EBD (electron beam deposition) 探針．

定に保つかが肝心である．走査範囲 $W \times W$ [m²] の領域を Y 方向の走査線数 N [本] で 1 画像時間 T [s] で得るには，速度 $V_s = 2WN/T$ [m/s] で X 方向の走査を繰り返す必要がある．試料の凹凸が空間周波数 $1/\lambda$ [m⁻¹] の周期をもつとすると，探針と試料間の距離を一定に保つ，すなわち正確な試料の表面形状を取得するためには，探針は試料表面上を周波数 $f = V_s/\lambda = 2WN/T\lambda$ [Hz] で Z 方向に移動する必要がある．AFM ではカンチレバーの変位を検出して，それが設定値に一致するようにフィードバック制御を行う．つまり，現実には表面形状を検知してから制御する後追い制御なので，完璧に表面形状をトレースすることは困難である．一般にフィードバック帯域 f_B は位相遅れ 45° で定義されるので，試料のもろさに依存する最大許容位相遅れを θ_m [rad] とすると，フィードバック帯域は $f_B = \pi W N / (2\lambda T \theta_m)$ [Hz] 以上が要求される⁹⁾．たとえば，走査範囲 $W = 200$ nm，Y 方向の走査線数 $N = 100$ で空間周波数 $1/\lambda = 0.1$ m⁻¹ の試料で最大位相遅れ $\theta_m = 20^\circ$ の場合に，1 画像を 80 ms で画像化するためにはおおよそ 110 kHz 以上のフィードバック帯域が必要となる．これは通常の AFM のフィードバック帯域の 100 倍近い．フィードバック帯域は閉ループ中に含まれるさまざまな遅れ要素（カンチレバーや Z 圧電体の共振周波数，Q 値，カンチレバーの振幅計測時間，イメージング時の設定条件，試料の高さ）で決まる⁷⁾．これらの遅延を最小にするための技術（微小カンチレバー，光てこ光学系，高速振幅計測法，ダイナミック PID 法，高速スキャナー）を開発した．

1.1 微小カンチレバー

高速 AFM の動作モードはタッピングモードを採用している．タッピングモードではカンチレバーを共振周波数で振動させ，探針を試料表面に間欠的に接触させる．したがって，高速イメージングを実現するためには，高い共振

周波数をもつカンチレバーが必要となる．他方，探針が試料を叩く力を小さくするためには，柔らかいカンチレバーが必要である．これらの相反する要求を満たすためには，カンチレバーの形状は必然的に小さくなる．オリンパス（株）と共同で SiN 製の微小カンチレバーを開発した¹⁰⁾．すでに市販されているもので長さ 9~10 μm，幅 2 μm，厚さ 130 nm（BL-AC10DS：オリンパス）と，通常のカンチレバーの 1/10 以下のサイズである（図 1）．このカンチレバーで，溶液中での共振周波数は約 0.6 MHz，ばね定数は約 0.1 N/m，溶液中での Q 値は約 2 である．市販されていないが，これよりわずかにサイズが小さいカンチレバー（溶液中での共振周波数：約 1.2 MHz，Q 値：2~3，ばね定数：約 0.2 N/m，BL-AC7DS：オリンパス）も使用している．

通常 AFM カンチレバーの先端には先鋭な探針がついているが，微小カンチレバーの先端は曲率 25~100 nm のくちばし状になっており，AFM 観察に十分な分解能を得ることは難しい．そこで，走査型電子顕微鏡チャンパー内にフェノールガスを導入し，電子線の 1 点照射による EBD (electron beam deposition) 法で長さ約 1 μm のアモルファスカーボン探針を形成している（図 1 挿入図）．さらに，酸素あるいはアルゴン雰囲気中でプラズマエッチングを行うことで，カーボン探針の先端曲率半径を 4 nm 以下まで先鋭化できる．

1.2 光てこ検出

図 2 (a) に高速 AFM で用いている光てこ光学系の概略を示す⁶⁾．微小カンチレバーは通常のカンチレバーに比べてかなり小さいために，感度よくカンチレバーの変位を検出するためには，カンチレバー背面に照射されるレーザー光のスポットサイズを回折限界程度まで絞る必要がある．高 NA の対物レンズを使うので作動距離が短くなり，反射光を直接フォトダイオードに入射することはできない．長作動距離タイプの 20 倍の対物レンズを用いて，赤色レーザー光（波長 670 nm，パワー ~0.5 mW）を 3~4 μm のスポットサイズまで集光している（図 2 (b)）．カンチレバーからの反射光は対物レンズにより平行光に戻された後，λ/4 板と偏光ビームスプリッターにより入射光と分離され，反射光のみが 2 分割された Si-PIN フォトダイオードに入る．

光てこ法はカンチレバーの角度変化を検出するので，微小カンチレバーは高感度な変位検出に有利である．また，カンチレバーは熱ゆらぎによる変位ノイズをもつが，高い共振周波数をもつカンチレバーではノイズ密度 (m/√Hz) が小さくなる．さらに，タッピングモードでは共振周波数

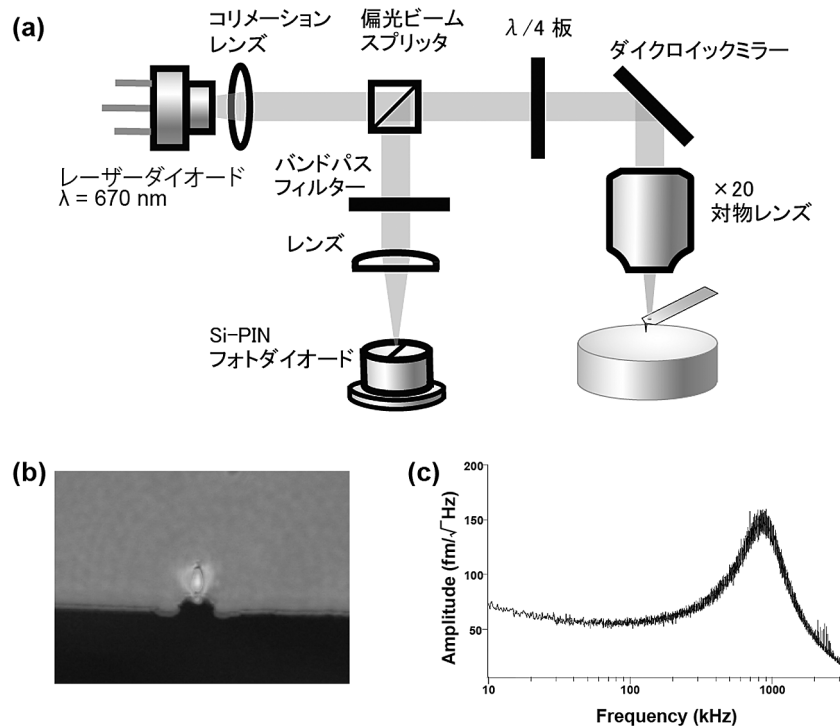


図2 (a) 光てこ光学系, (b) 赤色レーザーを照射した微小カンチレバー, (c) 溶液中におけるカンチレバーの熱雑音特性.

周りの周波数帯域のみの信号を検出するので熱雑音の影響を受けにくい。図2(c)に微小カンチレバーの熱雑音特性を示す。フロアノイズは $100 \text{ fm}/\sqrt{\text{Hz}}$ 以下で、柔らかいカンチレバー (0.2 N/m) でも比較的高感度な変位検出ができる。実際の測定でのカンチレバーの振動振幅は $1\sim 2 \text{ nm}$ 程度に設定され、 0.1 nm 程度の振幅変化に対してフィードバック制御を行っている。

1.3 高速振幅計測

カンチレバーの振幅検出にはロックインアンプやRMS-DCコンバーターは動作帯域が低すぎて使えないので、フーリエ法¹²⁾による高速振幅計測を行っている。フーリエ法ではカンチレバー振動信号の基本波成分 f_0 に対して、フーリエ級数のサイン係数 $A = \frac{1}{T} \int_0^T S(t) \sin(2\pi f_0 t) dt$ とコサイン係数 $B = \frac{1}{T} \int_0^T S(t) \cos(2\pi f_0 t) dt$ ($S(t)$ は入力信号, T は周期) を計算し $\sqrt{A^2+B^2}$ を出力する。この計算をFPGA (field-programmable gate array) で高速デジタル演算することで1周期ごとの振幅変化を検出できる。

1.4 ダイナミックPID制御

探針から試料に働く力を小さくするには、フィードバック制御の目標振幅値をできるだけ自由振動振幅に近い値に設定しなければならない。通常、自由振動振幅の80~90%程度に設定される。しかし、そのような状態では試料の急な下り勾配で探針は試料から完全に離れ、フィード

バック制御のエラー信号が飽和してしまう。フィードバックの積分ゲインが一定である場合、再び探針が試料表面に接触するまでに大きな遅れが生じる。この現象はパラシューティングと呼ばれ、フィードバック帯域を下げる一因となっている¹³⁾。パラシューティング時間を低減するために、目標振幅値と自由振動振幅の間に閾値を設け、振幅がこの閾値を超えたときにエラー信号を増幅させるダイナミックPID (proportional-integral-differential) 制御法を開発した¹³⁾。これにより、試料に作用する力を小さく維持したままで高速イメージングを行うことが可能になった。

1.5 高速スキャナーとダンピング技術

AFMのスキャナーはPZTを材料とする piezo素子で構成されるが、高速な変位で機械振動が発生しないよう高い共振周波数をもつ piezo素子が必要である。piezo素子のサイズを小さくすれば共振周波数を上げることは可能であるが、変位量も小さくなるので極端に小さい piezo素子を使うことはできない。そのために、自由共振周波数を下げないような piezo素子の支持方法の工夫や、共振を抑えるダンピング制御を行う必要がある。さらに、3軸間の干渉を極力小さくしなければならない。スキャナー本体は共振周波数を高くするために、硬くて軽い素材であるジュラルミンを一体加工してある。Z piezo素子と試料を載せる円柱ガラスステージ ($\phi: 2 \text{ mm}$) が固定されたブロックは X piezo素子で駆動され、それら全体を Y piezoが駆動する

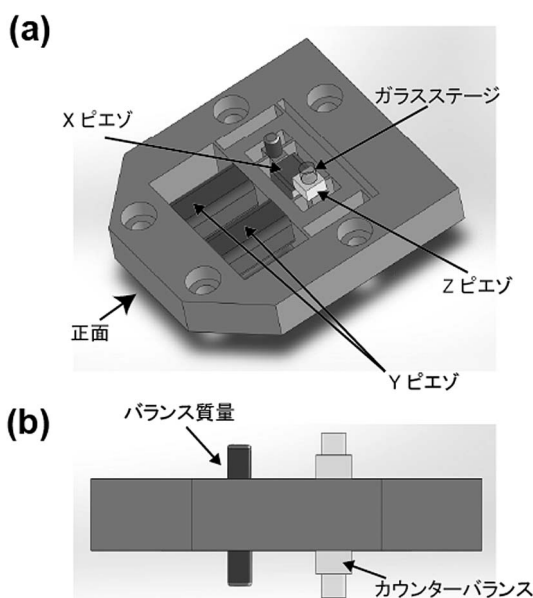


図3 高速スキャナーの構造。(a)全体図、(b)(a)の正面から見た図。

(図3 (a)). XY駆動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を用いることで干渉を少なくしている⁶⁾。

支持体に固定された piezoelectric 素子が急速に変位すると、支持部には大きな激力が働くため周囲の機械部を振動させる。この激力による振動を緩和するために、Z piezoelectric 素子の支持部の反対側に同等の piezoelectric 素子を固定し、2つの piezoelectric 素子を同時に反対向きに変位させるカウンターバランス法を導入した(図3 (b))⁶⁾。X piezoelectric は両面で固定されており、両端の質量が同じになるように Z piezoelectric と反対側のブロックにはバランス質量が取り付けられている(図3 (b))⁷⁾。

piezoelectric 素子の共振周波数付近では振動が増幅し、位相も180°以上遅れてフィードバック帯域を制限するため、共振を抑えるダンピング制御が必須である。Z piezoelectric 素子の動きはあらかじめ予測できないので、フィードバック制御でダンピングを行うしかない。しかしながら、Z piezoelectric の変位もしくは速度を高い精度で実測するのは現実には困難である。そこで、実際の Z piezoelectric 素子と同じ周波数特性をもつ LRC 回路を疑似スキャナーとして利用し、LRC 回路出力の微分成分(速度)でフィードバックループを組むことでアクティブダンピングを行っている¹⁴⁾。

2. たんぱく質の機能動態観察

高速 AFM で観察できるたんぱく質のダイナミックな現象は多岐にわたる。基質の結合や光照射などの外部刺激、あるいは外部環境(溶液組成、イオン濃度、温度)の変化

に対応した構造変化¹⁵⁻¹⁷⁾ やブラウン運動による構造ゆらぎ¹⁸⁾ だけでなく、基板上での分子の拡散過程や結合・解離¹⁹⁾ といった現象も一分子で追跡することができる。生体試料の観察にとどまらず、リン脂質や界面活性剤ベシクルの固体表面への吸着と平面膜への変換過程などの固液界面現象の観察にも応用されている^{20,21)}。ここでは、われわれのグループで得られたたんぱく質の機能動態の観察から、高速 AFM の威力が遺憾なく発揮できた代表的な観察結果を紹介する。なお動画は金沢大学安藤研究室の HP (<http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>) でご覧いただきたい。

2.1 ミオシン V の歩行運動

ミオシン V は細胞において物質輸送を担うモーターたんぱく質で、レールであるアクチンフィラメントに沿って長距離にわたって直線運動する²²⁾。ミオシン V は2本の等価な脚の構造をもち、それぞれの脚はモーター部位と長いネック部位から構成されている。これまで、さまざまな手法により運動様式の研究が行われており、ミオシン V は2本の脚を交互に振り出しながら約36 nm ステップで前進運動するハンドオーバーハンド様式で運動すると考えられている²³⁾。

ミオシン V がアクチンフィラメントに沿って動いている様子を高速 AFM で観察するには、観察アッセイ系に対していくつもの工夫が必要である。ミオシン V の動きを見たいのであるから、アクチンフィラメントは基板に固定されてミオシン V は基板に吸着しないことが第一条件である。かつ、ミオシン V の構造を見るには側面から観察しなければならない、つまりミオシン V がアクチンフィラメントの真上を走るようでは困る。さまざまな試行錯誤の結果、マイカ表面にビオチン化脂質と正電荷を含んだ脂質二重層膜を展開した基板が最適であった¹⁵⁾。ビオチン化脂質自体にはミオシン V は吸着せず、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固定できる。さらに、正電荷脂質(DPTAP)により負に帯電したミオシン V を脂質側へひきつけ、それにより側面から構造を観察できるようになった。

ATP 存在下で高速 AFM 観察した結果、ミオシン V が約36 nm のステップで一方向にプロセッシブ運動する様子を鮮明に観察することができた(図4 (a))¹⁵⁾。観察されたミオシン V の歩行速度は蛍光顕微鏡で計測された結果とほぼ同じであり、探針と試料の相互作用はモーター活性に影響を及ぼしていないと考えられる。ミオシン V が一方向に移動する様子を観察できたが、肝心の構造変化する過程は非常に速く、途中過程をとらえるにはもう一工夫必要であっ

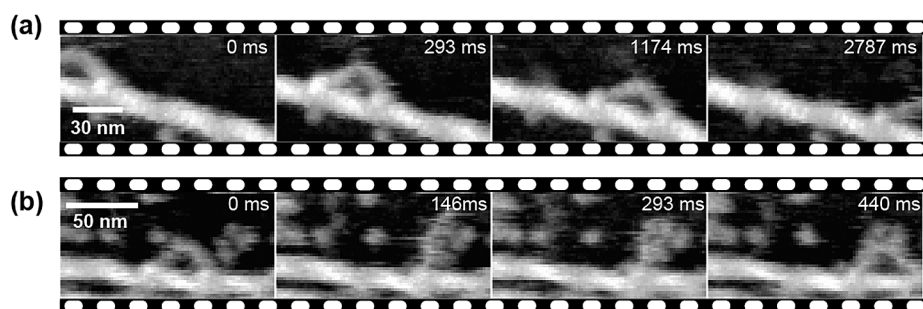


図4 (a) ミオシン V がアクチンフィラメントに沿って歩行している様子. (b) ミオシン V がハンドオーバーハンド様式で構造変化している様子. イメージング速度は 147 ms/frame.

た. 脂質膜上に過剰のストレプトアビジンをまいて, ストレプトアビジン分子を拡散障壁として利用した. これにより, 後ろ脚がアクチンから解離すると, ほぼ真っ直ぐな前脚が後方に傾いた向きから前方に傾いた向きに自動的に回転し, ブラウン運動していた後ろ脚は再びアクチンに結合して前脚になる様子, すなわちハンドオーバーハンド様式で動いている様子をとらえることができた (図 4 (b)).

2.2 バクテリオロドプシンの光励起構造変化

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の細胞膜に存在する膜貫通たんぱく質で, 光エネルギーを利用してプロトンを細胞膜の内から外へ輸送する光駆動プロトンポンプである. bR は細胞膜中で三量体を形成し, この三量体が六方格子状に配列した二次元結晶を構成している. bR は発色団としてレチナールを含んでおり, レチナールが光を吸収すると *all-trans* 型から *13-cis* 型に異性化し, 一連の光反応サイクルが開始され 1 個のプロトンが細胞質側から細胞外側へポンプされる. この光反応サイクル過程の最中に bR の細胞質側が構造変化することはよく知られていた²⁴⁾. しかし, 計測手法により構造変化の大きさは 0.1~0.35 nm 程度の幅があり, いまだコンセンサスは得られていない.

研究開始当初は野生型 bR の構造変化を観察しようとしたが, 野生型の光サイクルは約 10 ms 程度であり, 10 ms/frame で撮影しても明瞭な構造変化をとらえることはできなかった. そこで, 光サイクルが約 10 s と, 野生型にくらべて 1000 倍程度遅い D96N 変異体を用いた. 図 5 に, 波長 532 nm の緑色光を照射前と照射中の bR 二次元結晶の AFM 像を示す. 細胞質側 (図 5 (a), (b)) では光照射前後で大きな変化がみられる¹⁶⁾. 光照射前では規則正しい三量体の配列 (図中三角形) が見え, 光照射により三量体の各 bR 分子が三量体の中心から外側に移動する. この変化は光オン/オフを繰り返すと繰り返し観察され, 高い再現性を示した. 一方, 細胞外側 (図 5 (c), (d)) ではめだつた変化は観察されなかった. 光照射により構造変化した細胞

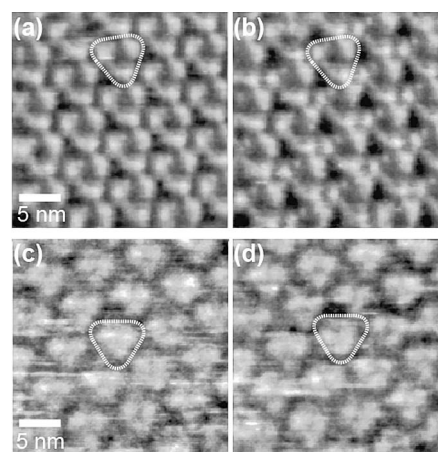


図5 光照射前 (a, c) と光照射中 (b, d) の bR (a, b: 細胞質側, c, d: 細胞外側) の高速 AFM 像. 三角形は bR 三量体を示している. イメージング速度は 1 ms/frame.

質側 bR 分子の重心位置の変化を解析したところ, 平均的な重心位置変化は約 0.7 nm であった. また, 構造変化した bR 分子が基底状態に戻るまでの時間を pH を変えて計測したところ, アルカリ状態では戻りが遅くなり, アルカリ条件でフォトサイクルが遅くなるというよく知られた事実と一致した. この観察結果は, これまでに多くの手法により報告されてきた細胞質側の *helix opening* による表面構造の変化と定性的に一致している. ただし, その最表面での変位量は, 従来考えられていた大きさ 0.1~0.3 nm よりもかなり大きいことがわかった.

本稿では, AFM の高速化に不可欠な要素技術の解説と, 高速 AFM で撮影されたたんぱく質の機能動態の代表例を紹介した. 高速 AFM はこれまでアンサンブル平均あるいは静止画としてしか観測できなかった生体分子の構造をリアルタイムで可視化できる唯一の技術である. 代表的な観察例で示したように, これまでさまざまな計測手法を駆使して明らかにされてきた事実や仮説が, 高速 AFM による 1 回の観察によって視覚的証拠として一目瞭然に明らかにすることができる.

最近では、われわれのグループだけでなく、高速 AFM を導入した各国の研究グループからもさまざまなたんぱく質や DNA への応用例が報告されつつある⁸⁾。一方で、AFM の高速化は生体試料のみならず表面科学分野でも需要は高いと思われる。本特集で解説されている高感度、高精度技術と高速化技術を組み合わせることができれば、原子スケールでの固体表面ダイナミクスも直接見えてくるであろう。最近ではいくつかのメーカーから数秒で画像取得できる AFM も販売され始めていることもあり、近い将来には高速イメージングが AFM の標準仕様になる日がくると期待される。

高速 AFM の開発は安藤研究室の多くの学生諸君の協力で進められてきたものであり、感謝する。また、本稿で紹介したミオシン V の研究は山本大輔博士 (福岡大学)、バクテリオロドプシンの研究は柴田幹大博士 (デューク大学)、山下隼人博士 (慶応大学)、神取秀樹教授 (名古屋工業大学) との共同研究の成果であり、厚くお礼申し上げる。

文 献

- 1) B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma and P. K. Hansma: "Imaging crystals, polymers, biological processes in water with the atomic force microscope," *Science*, **243** (1989) 1586-1589.
- 2) J. N. Lin, B. Drake, A. S. Lea, P. K. Hansma and J. D. Andrade: "Direct observation of immunoglobulin adsorption dynamics using the atomic force microscope," *Langmuir*, **6** (1990) 509-511.
- 3) C. Bustamante, D. A. Eerie, D. Keller: "Biochemical and structural applications of scanning force microscopy," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4** (1994) 750-760.
- 4) M. Guthold, M. Bezanilla, D. A. Eerie, B. Jenkins, H. G. Hansma and C. Bustamante: "Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** (1994) 12927-12931.
- 5) H. Lin, D. O. Clegg and R. Lal: "Imaging real-time proteolysis of single collagen I molecules with an atomic force microscope," *Biochemistry*, **38** (1999) 9956-9963.
- 6) T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito and A. Toda: "A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 12468-12472.
- 7) T. Ando, T. Uchihashi and T. Fukuma: "High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes," *Prog. Surf. Sci.*, **83** (2008) 337-437.
- 8) T. Ando: "High-speed atomic force microscopy coming of age," *Nanotechnology*, **23** (2012) 062001.
- 9) T. Ando, T. Uchihashi and N. Kodera: "High-speed atomic force microscopy," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **51** (2012) 08KA02.
- 10) L. M. Picco, L. Bozec, A. Ulcinas, D. J. Engledew, M. Antognozzi, M. A. Horton and M. J. Miles: "Breaking the speed limit with atomic force microscopy," *Nanotechnology*, **18** (2007) 044030.
- 11) M. Kitazawa, K. Shiotani and A. Toda: "Batch fabrication of sharpened silicon nitride tips," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42** (2003) 4844-4847.
- 12) J. Kokavecz, Z. Tóth, Z. L. Horváth, P. Heszler and Á. Mechler: "Novel amplitude and frequency demodulation algorithm for a virtual dynamic atomic force microscope," *Nanotechnology*, **17** (2006) S173-S177.
- 13) N. Kodera, M. Sakashita and T. Ando: "Dynamic proportional-integral-differential controller for high-speed atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **77** (2006) 083704.
- 14) N. Kodera, H. Yamashita and T. Ando: "Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **76** (2005) 053708.
- 15) N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa and T. Ando: "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy," *Nature*, **468** (2010) 72-76.
- 16) M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori and T. Ando: "High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photo-activated bacteriorhodopsin," *Nat. Nanotechnol.*, **5** (2010) 208-212.
- 17) T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando and H. Noji: "High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase," *Science*, **333** (2011) 755-758.
- 18) 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** (2008) 1859-1866.
- 19) H. Yamashita, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, S. A. Contera, J. F. Ryan and T. Ando: "Dynamics of bacteriorhodopsin 2D crystal observed by high-speed atomic force microscopy," *J. Struct. Biol.*, **167** (2009) 153-158.
- 20) S. Inoue, T. Uchihashi, D. Yamamoto and T. Ando: "Direct observation of surfactant aggregate behavior on a mica surface using high-speed atomic force microscopy," *Chem. Commun.*, **47** (2011) 4974-4976.
- 21) M.-C. Giocondi, D. Yamamoto, E. Lesniewska, P. E. Milliet, T. Ando and C. Le Grimmelc: "Surface topography of membrane domains," *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **1798** (2010) 703-718.
- 22) T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokota and T. Ando: "Direct observation of processive movement by individual myosin V molecules," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272** (2000) 586-590.
- 23) A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha1, Y. E. Goldman and P. R. Selvin: "Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization," *Science*, **300** (2003) 2061-2065.
- 24) J. K. Lanyi: "Bacteriorhodopsin," *Annu. Rev. Physiol.*, **66** (2004) 665-688.

(2012年9月11日受理)