

高速 AFM による F_1 -ATPase 分子回転の直接可視化

内橋 貴之¹, 飯野 亮太², 安藤 敏夫¹, 野地 博行²

原子間力顕微鏡 (AFM) は、液中にある試料をナノメートルスケールの空間分解能で観察できることから、タンパク質 1 分子のダイナミクスを可視化できる可能性を持つ装置である。しかし撮影速度が遅く、速い動的な分子過程を追跡できないという大きな問題を長く抱えていた。我々は種々のデバイスの高速化により、撮影速度を飛躍的に向上した高速 AFM を開発し、その結果、タンパク質の機能動態を直接観察することに成功した。高速 AFM で、回転ナノモーター F_1 -ATPase の固定子リングを観察したところ、 β サブユニットは回転子である γ サブユニットがなくても、三つのサブユニットが一方向に順番を守って ATP を加水分解し構造変化することを明らかにした。これにより、 F_1 -ATPase の一方向への回転は固定子リングにより駆動されていることを示し、回転子と固定子リングとの相互作用が協同性の実現に必要な不可欠であるとする従来の説を覆した。

1. はじめに

生体分子は自己集合や分子間相互作用、構造変換といったさまざまな動的現象を介して独自の生理的機能を発揮している。生体分子の機能メカニズムを明らかにするためには生化学的分析により得られる分子のアンサンブル(集合)平均としての情報に加えて、1 分子スケールの構造とそのダイナミクスを把握することもきわめて重要である。これまで、光学顕微鏡技術をベースとした多様な 1 分子観察手法が開発され、さまざまなタンパク質で大きな成果を収めてきている¹⁻³⁾。一方で、光学顕微鏡で観察できるのは、プローブで標識した分子が発する蛍光像、明視野像、暗視野像等の軌跡であり、その振る舞いからタンパク質の振る舞いを間接的に知ることしかできなかった。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・時間分解能で可視化することができれば、タンパク質あるいはその複合体の構造ダイナミクスの詳細をより直接的に知ることができると期待される。

1986 年に発明された原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy: AFM)⁴⁾ は固体表面の形状や物性 (弾性、電荷分布等) をナノメートルの解像度でイメージングできる装置として発展し、今ではナノサイエンス/テクノロジーに欠かせない計測ツールの一つとなっている。AFM の大きな特徴の一つは観察環境を選ばない点であり、タンパク質・核酸・染色体から細胞まで多岐にわたる生体試料の構造観察が行われている⁵⁾。生体分子の時間発展イメージングも AFM の発明直後から試みられ、1989 年には血液凝固因子の重合過程の観察例が報告されている⁶⁾。その後も、いくつかの生体試料で AFM による数秒～分スケールでのダイナミクス観察例がある⁷⁻¹¹⁾。しかしながら、脆弱なタンパク質を壊さず、その構造動態を捉えるほど高速に、かつ 1 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ことは非常に困難であった。

我々は 1993 年ごろから AFM の高速化のための技術開発を開始し、2001 年にマイカ基板に吸着したミオシン V の構造を 80 ms/frame で画像化することに成功した¹²⁾。その後も低侵襲かつ高分解能な高速イメージングを実現するためのさまざまな装置改良を行い、2008 年ごろにタンパク質の機能を著しく損なうことなく、そのダイナミクス観察を可能にする高速 AFM を完成させた¹³⁾。

¹ 金沢大学理工研究域/バイオ AFM 先端研究センター (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

² 東京大学大学院工学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Direct observation of rotary catalysis of rotorless F_1 -ATPase with high-speed AFM

Takayuki Uchihashi¹, Ryota Iino², Toshio Ando¹ and Hiroyuki Noji² (¹Department of Physics/Bio-AFM Frontier Research Center, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan, ²Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan)

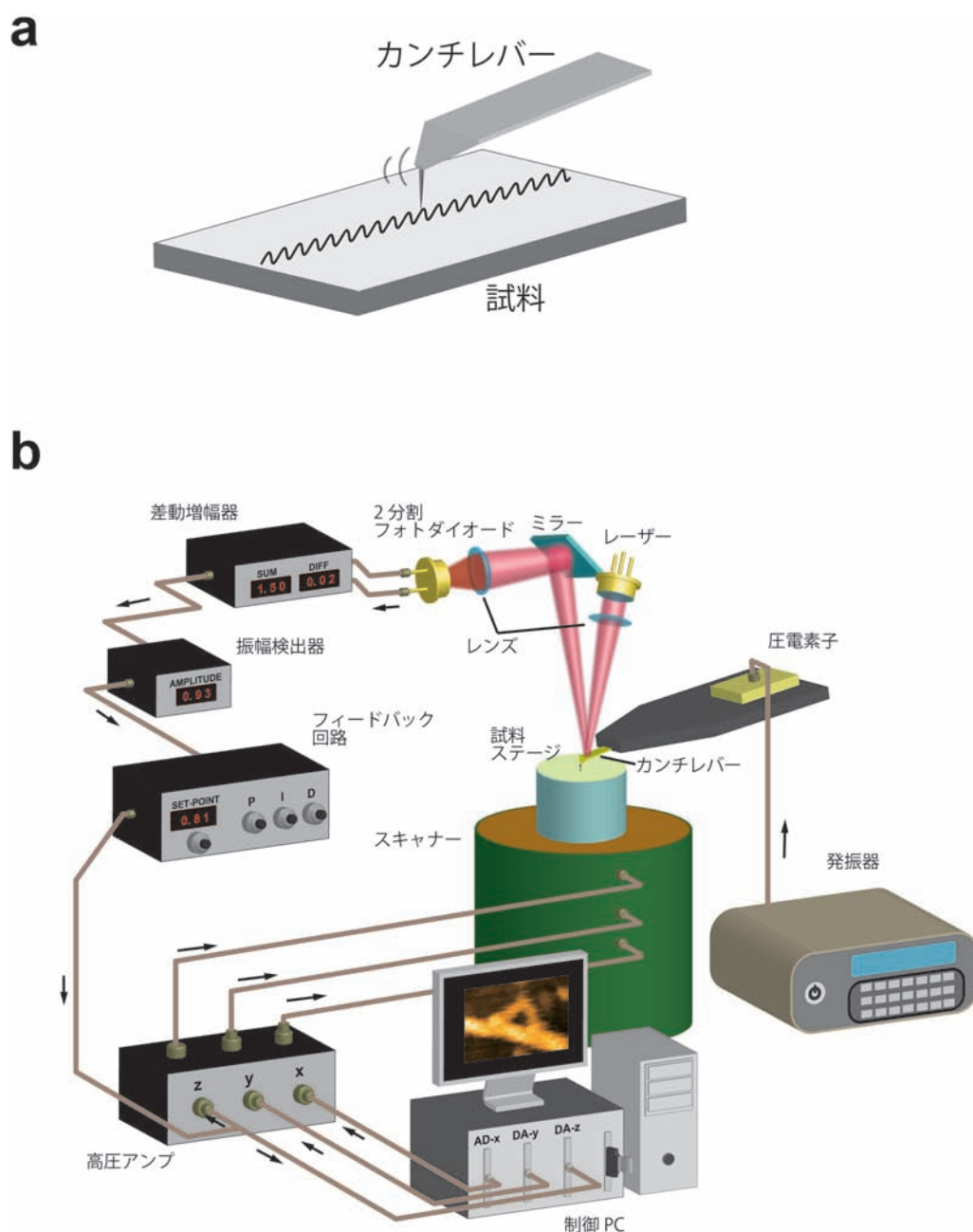


図1 高速 AFM の原理

(a) タッピングモードの模式図. (b) 高速 AFM の回路構成.

2. 高速 AFM の動作原理

AFM はカンチレバー (片持ち梁) の自由端についた先鋭な探針を試料表面に接触させ、探針と試料の力学的相互作用に基づいて表面の 3 次元形状を得る触針型顕微鏡である。AFM にはいくつかの動作モードが提案されているが、基板に弱く吸着した試料や生体分子のように柔らかい試料の観察には通常タッピングモードが使われる。タッピングモードでは探針が試料表面を軽く叩くように圧電素子によりカンチレバーを上下に振動させながら走査するため、探針と試料間に働く摩擦力を小さくすることができる (図 1 a)。探針が試料に間欠的に接触したときに生じるカンチレ

バーの振動振幅の変化を光でこの法で検出する。試料ステージを XY 方向にラスタ走査しながら、カンチレバーの振動振幅 (すなわち、探針が試料を叩く力) を常に一定値に保つよう、PID フィードバック制御 (振動振幅と目標値との差を比例・積分・微分操作した信号を Z ピエゾに印加することで、差分がゼロになるように振動振幅を維持する) により試料ステージを Z 方向 (上下方向) に移動させる。XY 方向の各ピクセル位置での PID 信号 (試料ステージの Z 方向の移動量に比例する) をコンピュータで記録することにより表面形状の 3 次元像が得られる (図 1 b)。

AFM の高速イメージングには、試料ステージの 2 次元高速走査に加えてカンチレバーの振幅を検出してから試料

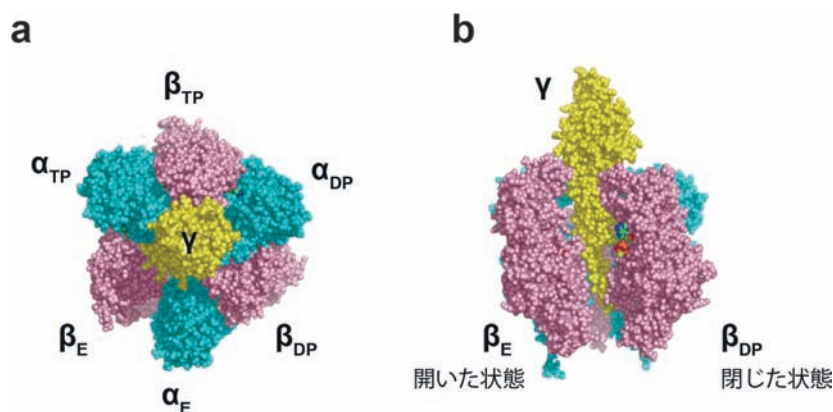


図2 F₁-ATPase の結晶構造

(a) 上から見た構造. (b) 横から見た構造. 手前の α サブユニットは消去してある.

ステージの Z 方向の移動までに至る一連のプロセスを高精度かつ高速に行わなければならない. $W \times W$ の領域を走査線数 N 本の画像として時間 T でイメージングする場合を考えると, X 方向の走査速度 V_s は $V_s = 2WN/T$ となる. 試料の表面形状を単純な周期 λ のサイン波と仮定すると, 試料表面の空間周波数は $f = V_s/\lambda$ [Hz] となる. この周波数を持つ表面形状を探針が正確にトレースする, すなわち探針と試料間に働く力を一定に保つためには, 少なくとも $V_s/\lambda = 2WN/T\lambda$ 以上の周波数で探針と試料間の距離を制御する必要がある. 例として, $T = 50$ ms, $W = 250$ nm, $N = 100$, $\lambda = 10$ nm の条件では 100 kHz 以上の動作周波数 (フィードバック帯域) が必要である. 通常の AFM ではこのフィードバック帯域は 10 kHz 程度である.

フィードバック帯域を広くし, 高速イメージングを実現するには, カンチレバーの振幅変化と Z 圧電素子の応答速度を上げ, 振幅計測器やフィードバック制御回路などの電子回路の遅延を少なくするほかに, 圧電素子の高速駆動で発生する振動を抑制する必要がある. また, 試料の降り勾配でも探針が試料から完全に離れずに軽く叩く状態を維持する必要がある. さらに, 溶液中で試料ステージを Z 方向に高速移動すると, カンチレバーと試料表面の間にある水圧の影響で試料の高さ計測にエラーや遅延が生じてしまうため, 水圧の影響をできるだけ受けないことも必要である. 高速 AFM 装置はこれらすべての条件を満たすように設計されており, フィードバック帯域は 100 kHz を超える. たとえば, カンチレバーについては, バネ定数を小さく保ちつつ応答速度を上げる (共振周波数を上げる) ために, 通常のカンチレバーの 1/10 程度のサイズ (長さ 6~10 μ m, 幅 2 μ m, 厚さ 90 nm) になっている. 水圧の上昇を抑えるために, 試料ステージの直径は 1.5 mm ほどしかない. こういったさまざまな工夫により, 探針が試料を叩いたときのカンチレバーの振幅減少を平均でわずか 0.1 nm 程度に保ったまま高速イメージングできる. 紙面の都合上, ここではこれ以上の詳細は割愛するが, 興味ある方は, 装置については文献 13) を, 基板調製や装置操作については文献 14) を参照していただきたい.

3. 高速 AFM の F₁-ATPase への応用

高速 AFM で観察できるタンパク質のダイナミクスは多岐にわたる. これまで, バクテリオロドプシンの光励起構造変化¹⁵⁾, アクチン線維に沿ったミオシン V の歩行¹⁶⁾, 回転軸のない F₁-ATPase で起こる構造変化の回転伝搬¹⁷⁾, セルロースを分解しながら一方向運動したり交通渋滞したりするセルラーゼ¹⁸⁾などの動態観察に成功している. また, 天然変性タンパク質のブラウン運動による構造揺らぎ¹⁹⁾や分子の拡散過程や結合・解離²⁰⁾といった現象も 1 分子で追跡することができる. 本稿では, F₁-ATPase の観察結果について詳細に述べ, 高速 AFM がタンパク質の働く仕組みを 1 分子レベルで明らかにするのに有用なツールであることを示したい.

1) F₁-ATPase

生体内で ATP の合成を担っている F₀F₁-ATP 合成酵素は生体内膜に埋もれた F₀ 部分と膜の外に突き出た F₁ 部分からなる. 膜上下のプロトンの濃度勾配により, プロトンが F₀ 部を通過する際のエネルギーを利用して F₁ 部分で ATP が合成される. この反応は可逆的であり, F₁ 部分での ATP 加水分解により F₀ 部分でプロトンを能動輸送するポンプとしても働く. 細菌由来の F₁ 部分は $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ の九つのサブユニットから構成されるが, $\alpha_3\beta_3\gamma$ のみでも強い ATP 加水分解活性を有することから, $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体だけで F₁-ATPase と呼ばれる. F₁-ATPase は α と β のサブユニットが三つずつ交互にならんで形成されるリング状の $\alpha_3\beta_3$ 複合体に, 棒状の γ サブユニットが突き刺さっている (図 2). ATP との結合に寄与するアミノ酸残基は β サブユニットに存在している. 今から 30 年以上前に Boyer は, 生化学的解析に基づき, 触媒部位である 3 か所の β サブユニット上のヌクレオチド状態がそれぞれ異なっており, γ サブユニットの回転に伴って三つの β サブユニットの状態が順番に変化する回転触媒説を提唱した²¹⁾. すなわち F₁-ATPase は, 三つの β サブユニットが ATP を加水分解す

ることによりそのヌクレオチド状態と構造を変化させ、かつ協同的に働くことで γ サブユニットを一方向に回転させる、回転モーターとして働くことが予想された。実際に1997年になって1分子観察により、 γ サブユニットがATPの加水分解に伴い反時計回りに回転することが証明された^{22, 23)}。

1994年に解かれた F_1 -ATPaseのX線結晶構造解析から、三つの β サブユニットは結合しているヌクレオチドの状態とそれに対応した構造が異なることが明らかになっている²⁴⁾。ATPまたはADPを結合した二つの β サブユニットは“閉じた構造”、ヌクレオチドを結合していない残りの β サブユニットは“開いた構造”をとっている(図2a)。このことから、 β サブユニットはATPの結合により開いた構造から閉じた構造へと大きく構造変化し、この構造変化が γ サブユニットの回転を駆動すると考えられている。また、閉じた状態から開いた状態への変化は反応生成物であるADPやリン酸の解離に伴い起こると考えられている^{25~27)}。回転子である γ サブユニットが反時計回りに360度回転すると、それぞれの β サブユニットは1回のATP加水分解反応を完了しリセットされる。 γ サブユニットが一方向に回転するためには、三つの β サブユニットの化学反応と構造変化のタイミングが厳密に制御されていることが必須である²⁸⁾。

F_1 -ATPaseの結晶構造を横方向からみると、 γ サブユニットのリングを貫く部分は、2本の α ヘリックスがねじれた剛直なコイルドコイル構造をとっており、閉じた構造の β サブユニットが剛直な γ サブユニットを押しているように見える。他方、開いた構造の β サブユニットは γ サブユニットに押されているように見える(図2b)。 γ サブユニットの凹凸と β サブユニットの構造変化が共役して、あたかもその構造により γ サブユニットの向きが支配されているかのようにみえることから、この“押し引き”が化学反応と構造変化のタイミングの制御に重要であるというのがこれまで最も有力な説であった²⁹⁾。このモデルでは一方向への回転の実現には γ サブユニットと β サブユニットとの相互作用が必須で、非対称な形をした γ サブユニットの回転角度が決まれば三つの β サブユニットの構造およびヌクレオチドの状態が自動的に規定される。いわば、 γ サブユニットが三つの β サブユニットの化学反応と構造変化のタイミングを支配する“独裁者”(dictator)として振る舞うというモデルである。しかしながら最近、 γ サブユニットを短くして β サブユニットとの接触点を大きく減らしても F_1 -ATPaseは一方向に回転できるという報告がなされ³⁰⁾、このモデルが必ずしも正しくはない可能性が示唆された。

このモデルを確かめるには、 γ サブユニットのない $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングの三つの β サブユニットが、順番を守ってATPを加水分解し構造変化するかを調べれば直接検証できる。しかしながら、光学顕微鏡を用いた F_1 -ATPaseの1分子リアルタイムイメージングでは、 γ サブユニットにプ

ラスチックビーズなどの可視化プローブを結合させて回転を観察するため γ サブユニットを取り除くことができない。別の方法として、個々の β サブユニットに蛍光色素を結合させその向きの変化から β サブユニットの構造変化を検出することも原理的には可能である²⁵⁾。しかしながら、近接する三つの β サブユニットに結合させた三つの蛍光色素の向きの変化を同時にモニターするのは容易ではない。そこで、我々は高速AFMで β サブユニットの構造変化を直接観察することにより、回転子がなくても F_1 -ATPaseは“回転”するのかどうか調べた¹⁷⁾。

2) 高速AFM観察

大きく構造変化すると考えられるC末端側をAFM観察するために、 β サブユニットN末端側にLysタグを付与し、さらに観察基板であるマイカ基板をアミノシランで被覆して、グルタルアルデヒドにより両者のアミノ基を架橋した。これにより $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングを方向特異的に基板に固定した。ヌクレオチドなしの条件では、観察されたすべての分子で高さが約9nmの疑似6回対称のリング構造が観察された。また、高分解能像(図3b)ではリング内の三つのサブユニットがほかの三つよりも明るく観察されることから、表面側に若干突き出ていることがわかった。 γ サブユニットを取り除いた結晶構造を剛体球モデルとして、コーン状プローブ(先端径0.5nm)でなぞってシミュレーション像(図3c)を構成したところ、観察像によく一致した。シミュレーション像では、リング構造を構成する六つのサブユニットのうち、 β サブユニットに相当する三つは開いた構造をとっており α サブユニットよりも高く突き出た構造をみせている。これからAFM像で高く突き出た三つのサブユニットが β であることがわかる。他方、観察された分子のうち約30%は図3dのように観察された。この像はN末端側を表面にしてシミュレーションされたAFM像(図3e)と非常によく一致することから、これらの分子はC末端側が基板に吸着していると考えられる。

アデニリルイミド二リン酸(AMPPNP、ATPの非加水分解性類似体でATP結合状態の構造をとると言われている)の存在下で観察されたC末端側のAFM像(図3f)はヌクレオチドがない場合とは構造が大きく変化していた。このAFM像もシミュレーション像(図3g)に非常によく一致し、二つの β サブユニットが閉じた(高さの)低い構造に変化し、一つの β サブユニットのみが開いて高く突き出た非対称な構造をとっていた。すなわち、 γ サブユニットを持つ $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体と同様の構造である。AMPPNP存在下では三つの β サブユニットがすべて閉じたり、1個だけ閉じたりした構造はまったく観察されなかったことから、 γ サブユニットがなくても、三つの β サブユニットのうち二つのみにヌクレオチドが結合し、残り一つには結合しないことが強く示唆された。また、ヌクレオチドなしやAMPPNP存在下では $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングの構造は基本的に

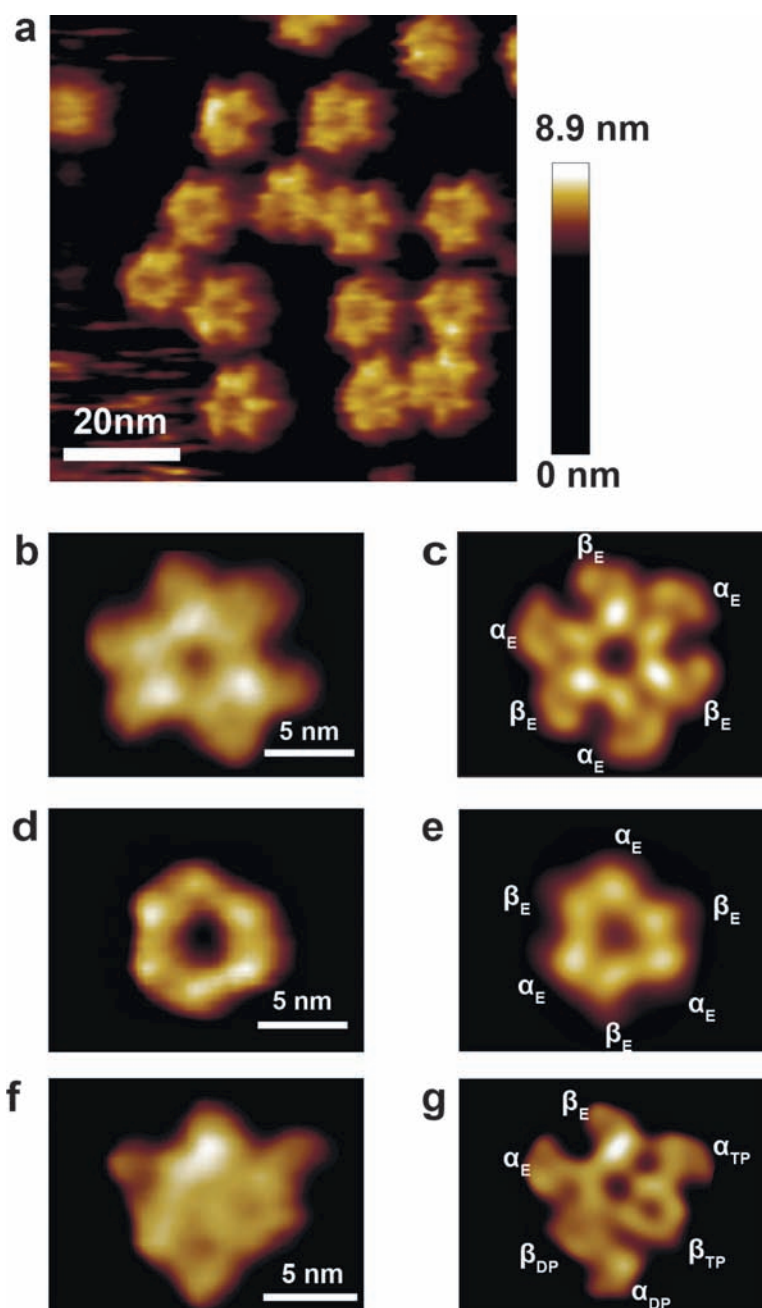


図3 $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングの高速 AFM 像

(a, b) スクレオチドがない場合の C 末端側の高速 AFM 像 (a: 1 s/frame, b: 80 ms/frame). (c) 結晶構造から構成された C 末端側のシミュレーション像. (d, e) N 末端側の (d) 高速 AFM 像と (e) シミュレーション像. (f, g) 2 mM-AMPPNP 存在下での C 末端側の (f) 高速 AFM 像と (g) シミュレーション像.

静的で、観察のあいだ変化しなかった。

一方、ATP の存在下で 80 ms/frame のイメージング速度で観察したところ、AMPPNP の存在下と同様に一つの β サブユニットのみが開いた非対称な構造をみせただけでなく、 β サブユニットの開閉のダイナミックな構造変化が観察された (図 4a)。特筆すべきは、開いた構造の β サブユニットが閉じると、反時計回り方向にある閉じた構造の β サブユニットが同時に開くという協同的な構造変化がみられた点である。前述したように、開いた構造の β サブユ

ニットは表面に突起がみられる。そこで、1 分子の画像で最も高輝度のピクセル位置をフレームごとにトレースし、その位置の分子の中心位置に対する累積回転角度をグラフ化した (図 4b)。反時計回りの角度変化を正にとると、累積回転角度は時間とともに増加し、 β サブユニットの開閉が時間の経過とともに反時計回りに遷移していくようすが明確にみられた。

高さの解析だけでなく画像相関による解析も行った。 $\alpha_3\beta_3$ 固定子リング内の一つの β サブユニットに対して、開

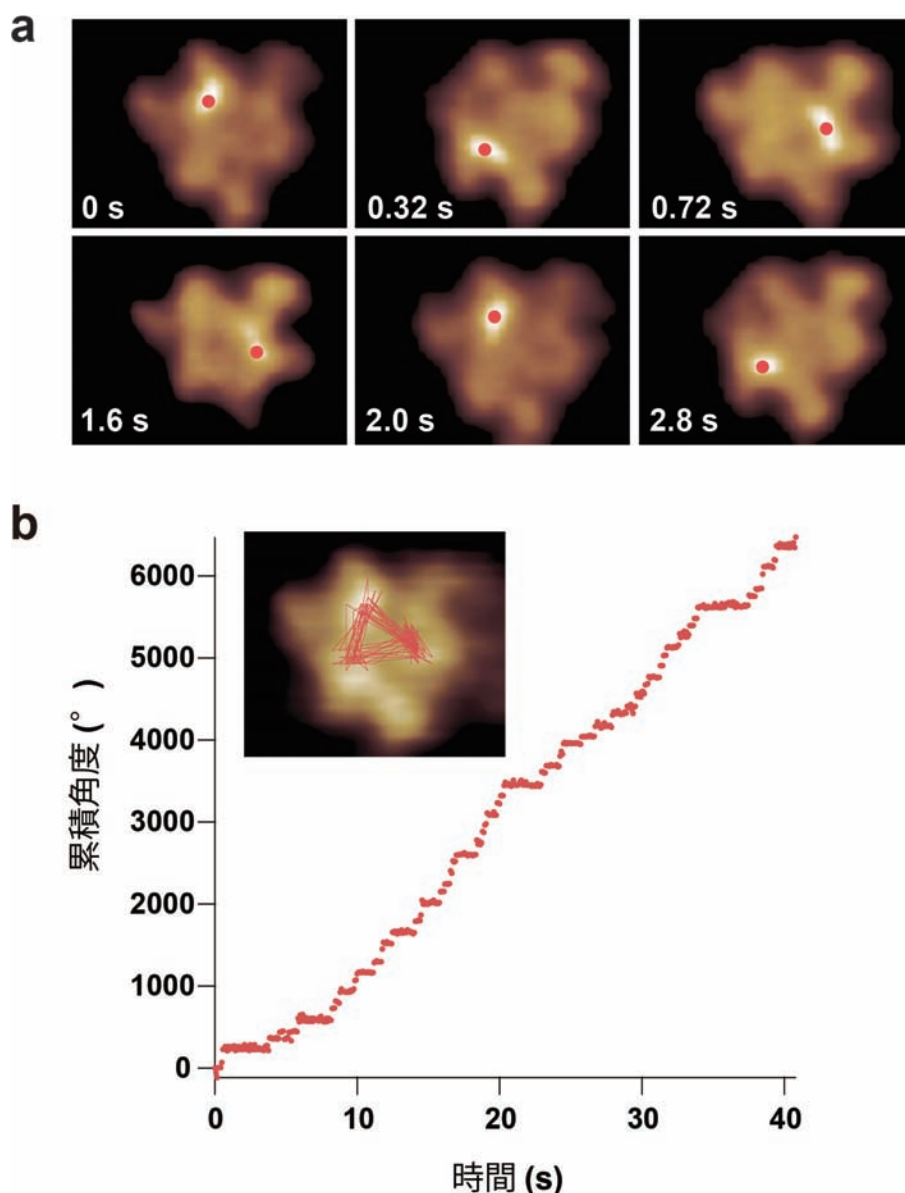


図4 2 μM ATP 存在下での高速 AFM 観察と累積角度解析

(a) 80 ms/frame で取得された一連の高速 AFM 像。フレーム内で最も輝度が高いピクセル位置（開いた構造の β サブユニットの位置）は●で示してある。(b) 最高輝度位置の分子の中心位置に対する回転角度（反時計回りを正にとった累積角度）。挿入図では AFM 像に最高輝度位置の軌跡を重ねて示している。

いた構造の β をリファレンス画像としてフレームごとの 2 次元相関係数を計算した。2 次元相関係数のヒストグラムを作ると明確な二つのピークがみられた（図 5a）。これから、2 次元相関係数により開いた構造と閉じた構造が明確に区別できることがわかる。図 5b に三つの β サブユニットに対して 2 次元相関係数の時間変化をプロットしたグラフを示す。背景が白色は開いた構造で灰色は閉じた構造の時間帯を示している。基本的には同じ時間では、三つの β サブユニットのうち一つの β のみが開いた構造をとっているが、ときおりそれ以外の状態もみられた。すべての観察されたフレーム（8,746 フレーム、ATP は 2~4 μM ）に対して三つの β サブユニットの状態を調べたところ、開いた構造（“O”）と閉じた構造（“C”）の割合は“CCO”

が 82%，“OOC”が 14.5%，“CCC”が 3%，“OOO”が 0.5% であった。開いた構造が閉じるまでの時間をヒストグラムにすると、単一指数関数でフィッティングできた（図 5c）。開いた状態の寿命の長さは ATP 濃度に反比例し、さらに、ATP 加水分解速度の逆数（時定数）とよい一致をみせた（図 5d）。これにより、 β サブユニットの構造変化は ATP 加水分解反応と共役して起こっていることが示された。

図 6 は“CCO”状態の時間変化をグラフ化したものであり、開いた構造の β が反時計回りに移動したときには +1、時計回りに移動したときには 1 を差し引いている。●印は“CCO”状態、×印はそれ以外の状態を示している。右肩上がりグラフは明確に開いた構造の β が反時

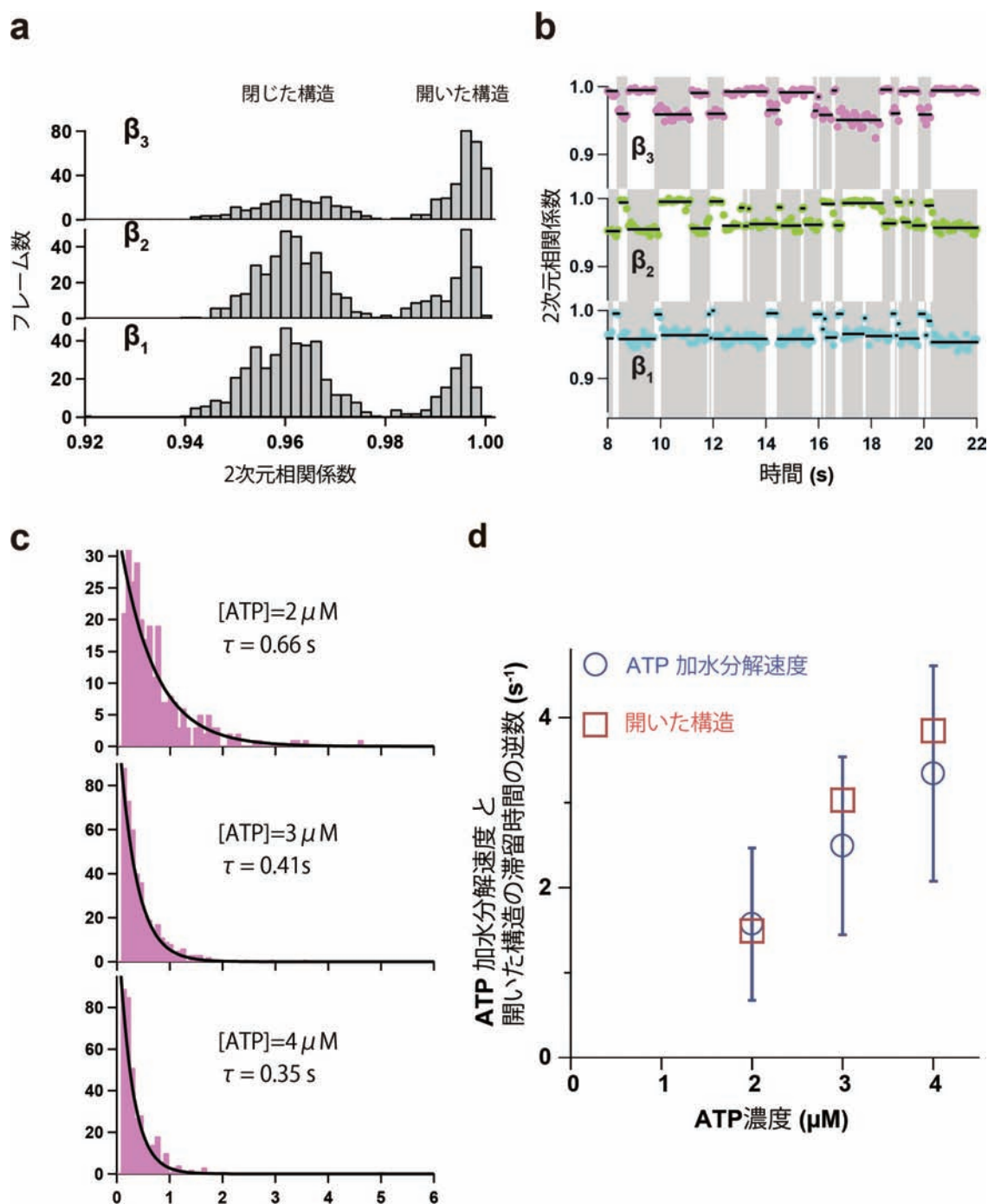


図5 高速AFM像の2次元相関係数解析

(a) 開いた β サブユニットをリファレンス画像として、フレームごとに三つの β サブユニット画像の2次元相関係数を計算しヒストグラム化してある。(b) 三つのサブユニットに対する2次元相関係数の時間変化。白色の背景は開いた構造、灰色は閉じた構造を示している。(c) ATP濃度を変えたときの、開いた構造をとる β サブユニットの滞留時間のヒストグラム。(d) ATP加水分解速度(○)と開いた構造(□)の速度定数の比較。

計回りに遷移していることを示している。“CCO”以外の状態(×印)は主に遷移直前にみられた。多くの場合は、開いた β が閉じる前に、その反時計回りに位置する閉じた構造の β が開いた構造になり、わずかの間だけ“OOC”状態になっていた。これは、開いた構造の β にATPが結合する前に、反時計位置にある β からADPが解離する可能性を示している。

以上の結果から、 F_1 -ATPaseの一方方向への回転を支える

構造的な基盤は $\alpha_3\beta_3$ 固定子リング自体に内蔵されており、回転子である γ サブユニットとの相互作用は必須でないことが明らかになった。結晶構造からわかるように、 $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングにある三つの β サブユニットは互いに直接には相互作用していないので、おそらくは α サブユニットとの相互作用を介して化学反応と構造変化のタイミングが制御されているのだと思われる。実際に、ひとつの α または β サブユニットがイメージング中に探針からの力に

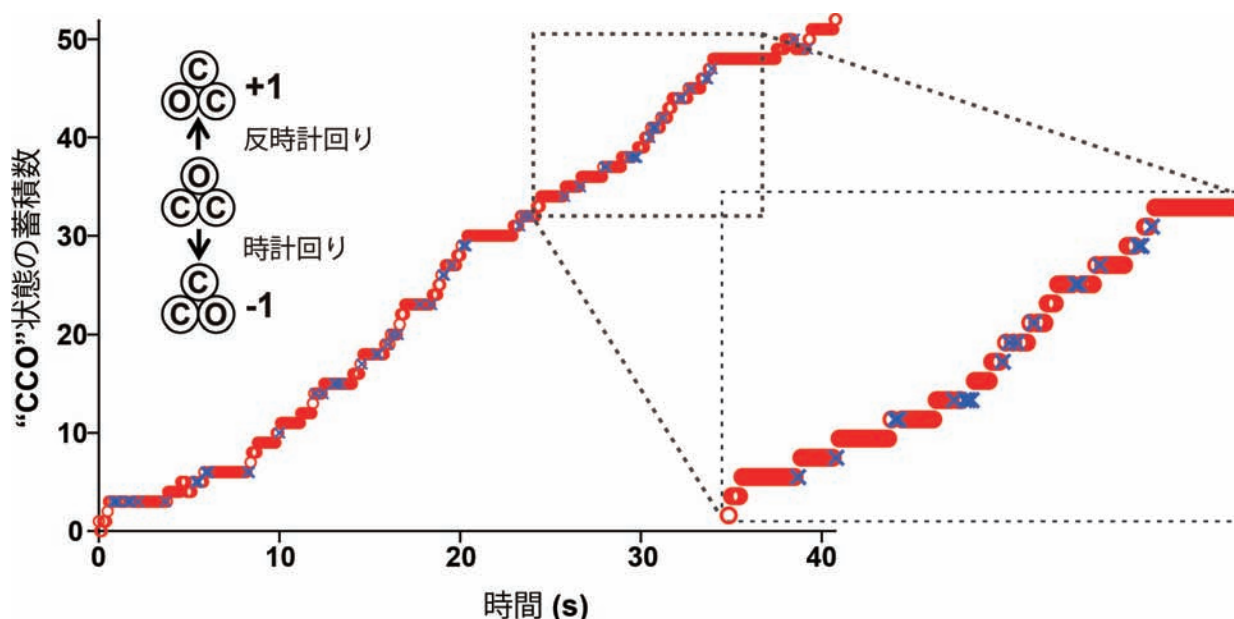


図6 三つの β サブユニットが“CCO”状態にある累積数
開いた構造の β サブユニットが反時計回りに遷移するときは+1を加算し、時計回りのときは1を差し引いている。三つの β サブユニットが“CCO”状態のときは●印、それ以外の状態は×印で示してある。

より解離すると、 β サブユニットの構造変化の頻度は極端に低下するとともに（図7）、一方向への構造変化の遷移はみられなくなる。一方で、残った α サブユニットをはさんだ二つの β サブユニット間で、開いた構造と閉じた構造がシーソーのように遷移することも観察されたので、 α サブユニットを介した若干の協同性は残るものと考えられる。また、 $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングの一方方向への回転の効率（90%弱）や速度（2 μ M ATPの条件で0.2 Hz）は、 γ サブユニットのある場合（100%，約10 Hz）に比べ低下していることも確かであった。このことは、正確で速い回転触媒反応の実現には、固定子リングのサブユニット間の相互作用だけでなく、回転子である γ サブユニットとリングとの相互作用も同等に重要であると考えられる。

4. まとめ

回転ナノモーター F_1 -ATPase の固定子リングを高速原子間力顕微鏡により観察することで、固定子リングにおいてトルクを発生する β サブユニットは回転子である γ サブユニットがなくても、三つのサブユニットが一方向に順番を守ってATPを加水分解し構造変化することを明らかにした。これにより、 F_1 -ATPaseの一方方向への回転は固定子リングにより駆動されていることを示し、回転子と固定子リングとの相互作用が協同性の実現に必要な不可欠であるとする従来の説を覆した。

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。これまで生化学的手法や1分子計測など、さまざまな解析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検証できるだけでなく、そこから新しい事実の発見も可能である。

最近では、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タンパク質やDNAへの応用例が報告されつつある。また、高速AFMの機能を拡張し、タンパク質の1分子観察にとどまらず細胞や細菌のダイナミクス観察への応用³¹⁾や1分子蛍光との同時観察も可能な複合機の開発も進んでいる³²⁾。今後、ユーザーの増加とともに生命科学の一つの研究ツールとして成熟していくことを期待する。

謝辞

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る。また、 F_1 -ATPaseの研究では谷川原瑞恵博士（現 塩野義製薬）、山下隼人博士（現 慶應義塾大学）、飯野理恵氏、奥野大地博士（現 理化学研究所）に多大な協力をいただいた。厚くお礼申し上げる。

文 献

- 1) Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., & Yanagida, T. (1995) *Nature*, 374, 555–559.
- 2) Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C., & Ha, T. (2008) *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 51–76.
- 3) Greenleaf, W.J., Woodside, M.T., & Block, S.M. (2007) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36, 171–190.
- 4) Binnig, B., Quate, C.F., & Gerber, Ch. (1986) *Phys. Rev. Lett.*, 56, 930–933.
- 5) Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications (A.M. Baró and R.G. Reifengerger eds.) (2012) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- 6) Drake, B., Prater, C.B. Weisenhorn, A.L., Gould, S.A.C., Albrecht, T.R., Quate, C.F., Cannell, D.S., Hansma, H.G., & Hansma, P.K. (1989) *Science*, 243, 1586–1589.

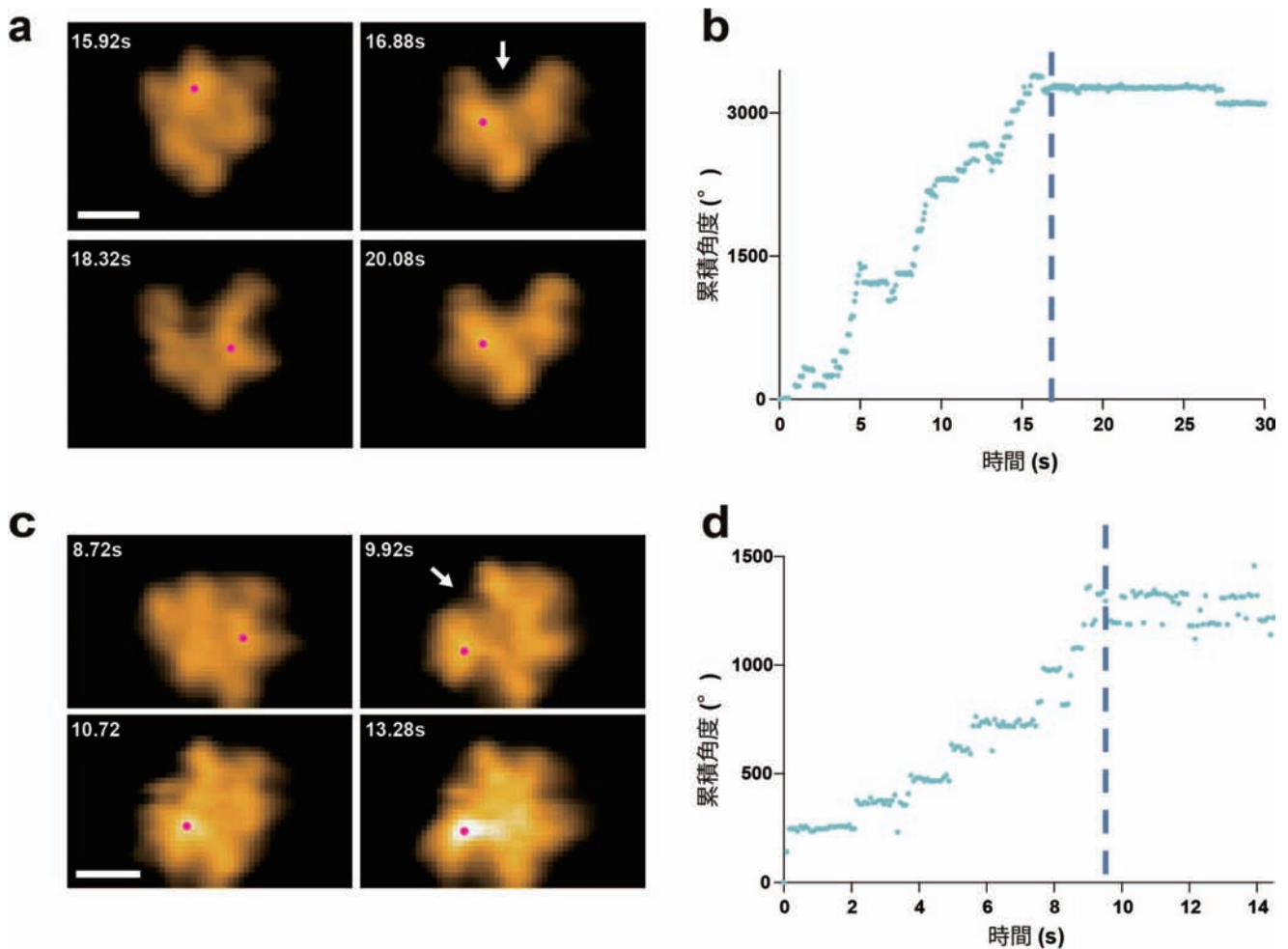


図7 $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングにおけるサブユニットの解離

(a) 高速 AFM 観察中に矢印位置の β サブユニットが欠損するようす。(b) 最高輝度位置の累積角度の時間変化。破線で示した時間で β サブユニットが失われている。(c) 高速 AFM 観察中に矢印位置の α サブユニットが欠損するようす。(d) 最高輝度位置の累積角度の時間変化。破線で示した時間で α サブユニットが失われている。(a), (c) 中のスケールバーは 5 nm。

- 7) Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, H.G., Zhu, X., Guthold, M., Bustamante, C., Kool, E.T., Kashlev, M., Hansma, P.K. (1997) *Biochemistry*, 36, 461–468.
- 8) Lin, J.N., Drake, B., Lea, A.S., Hansma, P.K., & Andrade, D. (1990) *Langmuir*, 6, 509–511.
- 9) Guthold, M., Bezanilla, M., Erie, D.A., Jenkins, B., Hansma, H.G., & Bustamante, C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12927–12931.
- 10) Bustamante, C., Erie, D.A., & Keller, D. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 750–760.
- 11) Lin, H., Clegg, D.O., & Lal, R. (1999) *Biochemistry*, 38, 9956–9963.
- 12) Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, E., Saito, K., & Toda, T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12468–12472.
- 13) Ando, T., Uchihashi, T., & Fukuma, T. (2008) *Prog. Surf. Sci.*, 83, 337–437.
- 14) Uchihashi, T., Kodera, N., & Ando, T. (2012) *Nat. Protoc.*, 7, 1193–1206.
- 15) Shibata, M., Yamashita, H., Uchihashi, T., Kandori, H., & Ando, T. (2010) *Nat. Nanotechnol.*, 5, 208–212.
- 16) Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., & Ando, T. (2010) *Nature*, 468, 72–76.
- 17) Uchihashi, T., Iino, R., Ando, T., & Noji, H. (2011) *Science*, 333, 755–758.
- 18) Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando, T., & Samejima, M. (2011) *Science*, 333, 1279–1282.
- 19) Miyagi, A., Tsunaka, T., Uchihashi, T., Mayanagi, K., Hirose, S., Morikawa, K., & Ando, T. (2008) *Chem. Phys. Chem.*, 9, 1859–1866.
- 20) Yamashita, H., Voitchovsky, K., Uchihashi, T., Contera, S.A., Ryan, J.F., & Ando, T. (2009) *J. Struct. Biol.*, 167, 153–158.
- 21) Gresser, M.J., Myers, J.A., & Boyer, P.D. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 12030–12038.
- 22) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinoshita, K. (1997) *Nature*, 386, 299–302.
- 23) Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita Jr., K., & Yoshida, M. (1998) *Cell*, 93, 1117–1124.
- 24) Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994) *Nature*, 370, 621–628.
- 25) Masaike, T., Koyama-Horibe, F., Oiwa, K., Yoshida, M., & Nishizaka, T. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 1326–1333.
- 26) Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike, S., Noji, H., Itho, H., Yoshida, M., & Kinoshita Jr., K. (2007) *Cell*, 130, 309–321.
- 27) Watanabe, R., Iino, R., & Noji, H. (2010) *Nat. Chem. Biol.*, 6, 814–820.
- 28) Ariga, T., Muneyuki, E., & Yoshida, M. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 841–846.
- 29) Wang, H. & Oster, G. (1998) *Nature*, 396, 279–282.

- 30) Furuike, S., Hossain, M.D., Maki, Y., Adashi, K., Suzuki, T., Kohori, A., Itho, H., Yoshida, M., & Kinoshita Jr., K. (2008) *Science*, 319, 955-958.
- 31) Watanabe, H., Uchihashi, T., Kobashi, T., Shibata, M., Nishiyama, J., Yasuda, R., & Ando, T. (2013) *Rev. Sci. Instrum.*,

84, 053702-053702-10.

- 32) Fukuda, S., Uchihashi, T., Iino, R., Okazaki, Y., Yoshida, M., Igarashi, K., & Ando, T. (2013) *Rev. Sci. Instrum.*, 84, 073706-073706-8.

著者寸描

●内橋貴之 (うちはし たかゆき)



金沢大学理工研究域准教授。博士(工学)。
■略歴 1993年広島大学理学部卒業。95年同大学院理学研究科修士修了。98年大阪大学大学院工学研究科博士修了。同年アトムテクノロジー研究体博士研究員。2000年姫路工業大学工学部助手。02年ダブリン大学トリニティカレッジ研究員。04年金沢大学大学院自然科学研究科助手。06年同助教授。08年より現職。

■研究テーマと抱負 高速AFMの開発と生体試料への応用。高速AFMを生命科学の汎用装置になれるように仕上げたい。

■ホームページ <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>

■趣味 テニスと音楽鑑賞。

●飯野亮太 (いいの りょうた)



東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻准教授。博士(理学)。

■略歴 1995年京都大学工学部卒業。97年同大学院工学研究科修士修了。2000年名古屋大学理学研究科博士修了。同年JST-ERATO研究員。05年大阪大学産業科学研究所特任助手、助手、助教。11年東京大学大学院工学系研究科講師。13年より現職。

■研究テーマと抱負 生体分子機械の1分子計測。物理化学、メカノケミストリー、改造、創製。新しい分子機械を創って生き物に戻し操作したい。「分子機械デザイン学」と「生体操作学」を目指しています。

■ホームページ <https://sites.google.com/site/ryotainophd/>

■趣味 家族で電車見学。

●安藤敏夫 (あんどう としお)



金沢大学理工研究域教授。金沢大学理工研究域バイオAFM先端研究センターセンター長。博士(理学)。

■略歴 1974年早稲田大学理工学部卒業。80年同大学大学院理工学研究科博士課程修了。同年カリフォルニア大学サンフランシスコ校博士研究員。83年同大学サンフランシスコ校助手。86年金沢大学理学部講師。92年同大学理学部助教授。

96年同大学理学部教授。2008年より現職。

■研究テーマと抱負 新技術は新発見に導くというのが研究の信条。独自に開発した高速AFM装置による分子動態の直視を通してタンパク質(特に広義のモータータンパク質)の詳細な機能発現機序の解明を現在進めている。

■ホームページ <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>

■趣味 園芸、音楽。

●野地博行 (のじ ひろゆき)



東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻教授。博士(理学)。

■略歴 1993年東京工業大学生命理工学部卒業。95年同大学院総合理工学研究科修士課程修了。97年同博士課程修了。98年科学技術振興事業団CREST研究員。2000年科学技術振興事業団さきがけ研究員。01年東京大学生産技術研究所助教授。05年大阪大学産業科学研究所教授。

11年より現職。

■ホームページ <http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>