

【各 Bio-SPM 技術の概要】

原子分解能/3D-AFM (FM-AFM)

FM-AFM (Frequency-modulation AFM) は、水溶液中で生体分子の表面構造をサブナノメートルスケールで観察することができます。また、3次元走査技術と組み合わせることにより、固液界面における水和構造やフレキシブルな構造体の分布を3次元で取得することができます (3D-AFM)。FM-AFM と 3D-AFM の画像取得レートは一般的に 1 min/frame です。観察条件を最適化できたときの空間分解能は、横方向に 0.3 nm、縦方向に 0.01 nm となります。しかし、生体分子の観察における実際の空間分解能は、装置がもつ空間分解能よりも、観察対象の表面構造のゆらぎによって決まってしまう。詳細は以下の文献をご覧ください。

1. H. Asakawa, S. Yoshioka, K. Nishimura, T. Fukuma, "Spatial Distribution of Lipid Headgroups and Water Molecules at Membrane/Water Interfaces Visualized by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy", **ACS Nano** 6, 9013-9020 (2012).
2. H. Asakawa, K. Ikegami, M. Setou, N. Watanabe, M. Tsukada, T. Fukuma, "Submolecular-Scale Imaging of α -Helices and C-Terminal Domains of Tubulins by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquid", **Biophys. J.** 101, 1270-1276 (2011).
3. T. Fukuma, "Water distribution at solid/liquid interfaces visualized by frequency modulation atomic force microscopy", **Sci. Technol. Adv. Mater.** 11, 033003 (18 pages) (2010).

高速 AFM

高速 AFM は水溶液中で動いている対象を動画観察することができます。画像取得レートは一般的に 100 ms/frame です。空間分解能は横方向に 2-3 nm、縦方向に 0.15 nm となります。機能中のタンパク質分子が高速 AFM で観察できた場合、それらの機能メカニズムに関わる重要な知見が得られることがあります。詳細は以下の文献をご覧ください。

1. T. Ando, T. Uchihashi, S. Scheuring, "Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy", **Chem. Rev.** 114, 3120-3188 (2014).

2. T. Ando, S. Fukuda, K. X. Ngo, "High-Speed Atomic Force Microscopy for Filming Protein Molecules in Dynamic Action", *Annu. Rev. Biophys.* 53, 19-39 (2024).
3. T. Uchihashi, N. Kodera, T. Ando, "Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy", *Nature Protocols* 7, 1193-1206 (2012).

走査型イオン伝導顕微鏡

SICM(Scanning Ion Conductance Microscope)は、ナノ開口を通過するイオン電流を計測するという特徴的な計測原理を持つため、活きた単一細胞を対象に、AFM計測ではできないナノスケールでの局所刺激や非接触イメージングが可能です。画像取得レートは一般的に 30-300 s/frame です。空間分解能は横方向に 10 nm、縦方向に 5 nm となります。詳細は以下の文献をご覧ください。

1. P. Novak, C. Li, A. I. Shevchuk, R. Stepanyan, M. Caldwell, S. Hughes, T. G. Smart, J. Gorelik, V. P. Ostanin, M. J. Lab, G. W. J. Moss, G. I. Frolenkov, D. Klenerman, and Y. E. Korchev, "Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy", *Nat. Methods* 6, 279-281 (2009).
2. V. O. Nikolaev, A. Moshkov, A. R. Lyon, M. Miragoli, P. Novak, H. Paur, M. J. Lohse, Y. E. Korchev, S. E. Harding, and J. Gorelik, "beta(2)-Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation", *Science* 327, 1653-1657 (2010).
3. Y. Zhou, M. Saito, T. Miyamoto, P. Novak, A. I. Shevchuk, Y. E. Korchev, T. Fukuma, Y. Takahashi, "Nanoscale Imaging of Primary Cilia with Scanning Ion Conductance Microscopy", *Anal. Chem.* 90, 2891-2895 (2018).

細胞測定 AFM

NanoLSI では、高速 AFM や 3D-AFM を基盤として、細胞の表面や内部における構造や動態、あるいは力学物性をナノスケールで計測するための AFM 技術も開発しています。高速 AFM では、細菌の分子スケール表面構造や神経細胞の末端部のナノ運動を可視化することに成功しています。また、3D-AFM を基盤に開発したナノ内視鏡 AFM 技術では、生細胞内部の細胞核やアクチン繊維の 3 次元観察や、細胞膜の

裏打ち構造の2次元ナノ動態計測、細胞核表面の硬さ計測などに成功しています。詳細は、以下の文献をご覧ください。

1. H. Yamashita, A. Taoka; T. Uchihashi, T. Asano, T. Ando, Y. Fukumori, “Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM”, *J. Mol. Biol.* 422 (2), 300-9 (2012).
2. M. Shibata, T. Uchihashi, T. Ando, R. Yasuda, “Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells”, *Sci. Rep.* 5, 8724 (2015).
3. M. Penedo, K. Miyazawa, N. Okano, H. Furusho, T. Ichikawa, S. Alam Mohammad, K. Miyata, C. Nakamura, T. Fukuma, “Visualizing intracellular nanostructures of living cells by nanoendoscopy-AFM”, *Sci. Adv.* 7 (52), eabj4990 (2021).
4. K. Kobayashi, N. Kodera, T. Kasai, Y. O. Tahara, T. Toyonaga, M. Mizutani, I. Fujiwara, T. Ando, M. Miyata, “Movements of Mycoplasma mobile gliding machinery detected by high-speed atomic force microscopy”, *mBio* 12: e00040-21 (2021).