

蛋白質 2 次元結晶の観察法

永 山 国 昭*

日本電子(株) 196 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

(1991 年 11 月 18 日 受理)

Methods for Observation of Two-Dimensional Protein Crystals

Kuniaki NAGAYAMA

Biometrology Lab, JEOL Ltd.
Musashino, Akishima, Tokyo 196

(Received November 18, 1991)

結晶のキャラクタリゼーションを抜きに蛋白質 2 次元結晶化の手法は進展しない。本稿では結晶の観察手法について高分解能、低分解能にわたって現状を概説する。電子顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡を高分解能観察の代表として多くの事例を紹介する。一方各種分光法および光学顕微鏡は低分解能法の標準計測手段であり、特にその場観察に威力を発揮している。蛋白質はナノメートルの世界の物質であり、高分解能その場観察は困難であるが、その情報が結晶化法にすぐれた指針を与えるので、究極のキャラクタリゼーション(観察法)と考えられる。

1. ま え が き

蛋白質の大きさは大略 2.0~20 nm の範囲にはいる。この大きさの物質を見る観察手段としては当然電子顕微鏡(電顕)が主流であった。また、ここ 2~3 年の動きとして走査型プローブ顕微鏡(SXM)¹⁾が新たな方法として浮上してきた。しかし 2 次元的に配列した蛋白質結晶では、個々の分子の形態のみならず、結晶構造、結晶の厚さ、蛋白質分子の結晶内配向などの新たな構造パラメータが研究対象となる。その場合、観察法として方法の境界を光学顕微鏡(光顕)、分光法などの低分解能観察手段に広げる必要がある。特に結晶成長などのその場観察をねらう研究では、光学顕微鏡の操作性の良さは捨てがたい。過去 6 年間水銀面上の蛋白質 2 次元結晶化を研究してきた経験(本誌特集吉村氏解説参照)から、結晶成長過程観察がたいへん重要なことがわかった。私達のプロジェクトでは蛋白質のモデルとしてその場観察可能なポリスチレンラテックスを用い、2 次元結晶化の研究を

進めている。そして結晶成長の直視は、きわめて大きな情報量のあることを知った²⁾。

蛋白質 2 次元結晶は新しい測定対象である。したがって観察法を過去の類縁分野に求めるのがまず素直な出発点である。生物学の分野では生体膜上の膜蛋白質結晶の電顕観察(電顕結晶解析法)が長い歴史をもっている³⁾。また近年、蛋白質およびその複合体を蛍光顕微鏡などで動態観察する方法も急速に発達してきた⁴⁾。他方表面科学の伝統として LB 膜などの有機薄膜の観察手段も重要である⁵⁾。LB 膜の分野ではまだ高分解能観察は表面 X 線回折法⁶⁾などの限定された方法に頼っているが、ここでも走査型トンネル顕微鏡の目ざましい応用発展が期待される⁷⁾。このように生物における微小形態観察と有機薄膜の構造研究の接点に蛋白質 2 次元結晶の観察法は位置づけられよう。本稿では、以下の点に問題を絞ってその手法の概説を行う。電顕、SXM による高分解能形態観察、光顕、偏光分光、SXM によるその場観察、そして表面、薄膜一般に内在する観察用試料調製の問題である。

* 新技術事業団永山たん白集積プロジェクト
〒305 つくば市東新井 18-1

2. 電子顕微鏡による結晶観察

電子顕微鏡には透過型 (TEM) と走査型 (SEM) およびその中間型 (STEM) がある。TEM の金属結晶の空間分解能は 0.1 nm に達するが、生物由来の 2 次元結晶で実現している最高性能は 0.35 nm である⁸⁾。SEM はフィールド型放射電子源の出現で 0.7 nm の分解能が出ているが、生物においては 1~2 nm が限界と思われる⁹⁾。分解能が上がらない最大の理由は蛋白質の電子線損傷により、高倍率像が撮れないためである。蛋白質構造解析に結晶を用いると電子線損傷が低減される。天然の 2 次元結晶である多くの膜蛋白質に対してはもっぱら蛋白質構造解析の手段として伝統的に TEM が用いられてきた。そしていくつかの技術革新により最近、蛋白質の高分解能構造が二、三提出されるに至った。R. Henderson の長年の苦勞は bacteriorhodopsin (バクテリオロドプシン) について 0.35 nm の立体構造となつて結晶する^{8,10)}。Kühlbrandt と Wang による 0.34 nm の chlorophyll 含有蛋白質 (light-harvesting complex) も最近提出された¹¹⁾。また、大腸菌外膜の PhoE porin の 0.35 nm 再構成像も得られている¹²⁾。そのほか低分解能だが cytochrome oxidase の 0.8 nm の結晶構造¹³⁾、光合成の反応中心の 2 nm 結晶¹⁴⁾、菌体表面の鞘である S-layer の 2.1 nm 結晶構造¹⁵⁾が得られている。分解能は結晶性の良さと結晶ドメインの大きさで決まる。膜蛋白質の結晶性は一般に人工的 2 次元結晶より良いようである。最近の高分解能 2 次元結晶解析の成果の背景には spot-scan

imaging¹⁶⁾、氷包埋¹⁷⁾などの観察手法、材料調製法の大きな改良があった。

水溶性蛋白質の人工的 2 次元結晶も本特集の解説にあるように種々試みられている。結晶性の指標となる分解能は最高 1.5 nm である。これは脂質単分子膜吸着法¹⁸⁾および水銀表面法¹⁹⁾両者で達成されている。膜蛋白質と比較して結晶の分解能が低いのは、もともとの結晶性の低さも一因だが、試料調製法が困難、特に急速凍結のような氷包埋法が使用できないこと、および電顕観察用グリッドへの転写過程における乱れなどがその原因と考えられる。したがって単分子膜面、水銀表面で結晶を高分解能で直接測定する観察法、後に述べる走査型トンネル顕微鏡法などが特に求められている。2 次元結晶は本質的に壊れやすい。したがって試料調製法の一層の改良が必要である。表 1 に人工的蛋白質 2 次元結晶の TEM 観察の現在までの成果をまとめた。

比較的高い分解能の結晶はすべて脂質を蛋白質結合性低分子や基質で修飾した場合である。単純な脂質吸着では良い結晶が得られないことを 20 年前に Fromherz が ferritin (フェリチン) を用いて報告している²⁰⁾。

蛋白質 2 次元結晶の SEM 観察の報告例はほとんどない。したがって本特集の古野らの解説が唯一手がかりを与える。参照されたい。

3. 走査型プローブ顕微鏡 (SXM) による結晶観察

3つの理由から SXM への期待は大きい。1つはプロ

表 1 人工的蛋白質 2 次元結晶の TEM 観察

蛋白質名	分子量 (KDa)	分解能 (nm)	単位セル (nm×nm)	文 献
<u>脂質単分子膜吸着法</u>				
ribosome	4,000	9.0	59.5×59.5	20)
抗 体	150	6.0	26.0×26.0	21)
cholera toxin	84	3.0	8.1× 8.1	22)
DNA gyrase B subunit	105	2.7	6.1× 7.6	23)
ribonucleotide reductase	260	1.8	11.0×27.7	24)
tetanus toxin	130	1.4	12.6× 8.4	25)
alcohol oxidase (高分子膜吸着)	592	1.8	12.5×12.5	26)
cholera toxin B subunit	58	1.5	12.0×13.1	18)
Ca ²⁺ -binding protein	68	5.0	17.8×17.8	27)
RNA polymerase II (Yeast)	500	2.0	40.0×23.0	28)
<u>水銀表面法</u>				
H ⁺ -ATPase (TF 1)	385	3.0, 1.8	10.4×10.4	19, 29)
ferritin	444	2.0	12.0×12.0	19)
L-P ring (flagella motor)	1,560	2.5	20.0×20.0	30)
chaperonin (T. Thermophilus)	900	3.0	12.4×12.4	31)

表 2 蛋白質 2 次元結晶の SXM 観察

蛋白質名	基 板	伝導性付与法	分解能 (nm)	文 献
S T M				
HPI layer (D. radiodurans)	マ イ カ	Pt-Ir-C 蒸着	—	36)
nicotinic acetylcholine receptor	HOPG	水 中	~10	37)
HPI layer	炭 素 膜	Pt-Ir-C 蒸着	~ 3	35)
T 4 phage polyhead	炭 素 膜	Pt-Ir-C 蒸着	~ 3	35)
nuclear envelope	マイクログリッド	Pt-C 蒸着	~ 3	35)
シート状 microtubule	炭 素 膜	—	—	38)
S-layer (M. hungatei)	HOPGから白金膜レプリカ			48)
S F M				
bacteriorhodopsin	マ イ カ	な し	1.1	39)
HPI layer	マ イ カ	な し	—	40)
S-layer (M. hungatei)	白金膜レプリカ	な し	—	48)

注：— はデータ明記なし

ープとしてトンネル電流のほか、原子間力、磁力、エバネッセント波、蛍光、熱流、イオン伝導、化学ポテンシャルなどの物理化学量が用いられること¹⁾。2つは水中や生試料でのその場観察が可能なこと³³⁾。そして3つ目は TEM を超える高い分解能である³⁴⁾。しかし金属、半導体結晶で実現しうるこれらの特長がすぐに生物試料に適用できるわけではない。この間の事情は TEM に似ており生物試料の宿命でもある。現在までの結果を総合するとトンネル顕微鏡 (STM)、原子間力顕微鏡 (SFM) 観察、共に TEM の分解能に比べ劣っている³⁵⁾。以下、原子分解能を期待されている STM と SFM に限って蛋白質 2 次元結晶への応用を概説する。

表 2 に今まで試みられた蛋白質結晶の結果をのせた。特に STM は、何を見ているのか同定しにくいので、TEM との比較観察を試みたもののみを検討した。生体試料の STM はその試料調製に工夫が必要である。特に試料をどう基板に移すか、基板に何を選ぶか、試料に伝導性をもたせるにはどうするかが問題となる。STM の基板として高配向黒鉛 (HOPG) が広く用いられているが、STM、TEM を同一試料について測定するには炭素薄膜のような TEM 用試料基板を用いざるをえない。表 2 中、マイカ、HOPG を用いた例は、したがって別に TEM 用の試料調製を行っている。2 次元結晶のようにたいへん変形しやすいものでは、やはり STM、TEM 共用の基板を用いるべきであろう。現在では、まだまだ STM による観察結果の信用性が低く、同一試料を TEM で観察して初めて像の解釈が可能であると考えられている。T4 phage A 型 polyhead の STM 像、TEM 像の同一試料による詳細な比較が行われたが^{32a)}、それからみる限り、TEM のほうが分解能が高い。白金粒子

蒸着を用いて蛋白質に伝導性を与え STM 観察を行っているが、STM 像の分解能は粒子サイズ、蒸着構造安定性などに左右される。HOPG 上で nicotinic acetylcholine receptor の水中 STM 像を観察した例では³⁷⁾、STM の分解能が約 10 nm と独立に測定された TEM 像の 2.2 nm 分解能⁴¹⁾に比べて著しく劣っていた。STM の原理から考え、一般に有機物の観察はできないと考えられていた。したがって金属蒸着なしの蛋白質 STM 像の分解能が低いのは、むしろ“モノ”が見えていないと解釈したほうがよいのかもしれない。また低分子のベンゼン⁴²⁾、脂質膜⁴³⁻⁴⁵⁾の高分解能 STM 像が報告されているが、これも基板を覆う“影”を見ているのではないかと想像したくなる。もちろん、同じ脂質膜でも、金属蒸着膜のレプリカをとればその STM 像は信頼できよう⁴⁶⁻⁴⁸⁾。

電気伝導度の問題がないという意味で最近では SFM に期待が向けられている。金属の場合、明らかに STM のほうが SFM より情報が多いが、生体試料では今までのところ、形態に関して情報量に差がないようである。例はまだ少ないが、表 2 に見るように SFM のほうが STM より分解能が高い例がある。ただし、操作性は STM のほうが圧倒的に良いとされており、極微粒子 (1 nm 以下) の蒸着法が開発されたり、水中での安定した観察法が見出されれば、STM はさらに応用の幅を広げる可能性がある。特に、蛋白質 2 次元結晶の観察に対して、STM 検出チップの改良 (先端曲率 1nm^{-1} 、高いアスペクト比)、極微電流 ($\sim 1\text{pA}$) を S/N 比よく増幅する高インピーダンス前置増幅器、および柔い試料を変形移動させない試料の固定化、不動化法の改良が必要と思われる。試料固定化の問題については試料調製の章で再度取り上げてみたい。

4. その場観察

結果でなく途中の過程を詳しく見るには、いわゆるその場観察 (in situ observation) が必要となる。しかし一般にその場観察は分解能が低く観測速度も遅いので、必要な情報、たとえば結晶成長のメカニズムを得られないことが多い。2次元結晶その場観察についても生物、半導体、材料分野での先端研究にその模範を求めなければならない。蛋白質に的を絞った蛍光顕微鏡のその場観察の最近の成果は筋肉の最小単位、アクチン-ミオシン系のすべり運動観察⁴⁹⁾と力発生計測⁴⁾である。また暗視野顕微鏡による超分子の動態観察も進んでいる^{50,51)}。さらに共に真空中ではあるが、TEM, STM によるその場観察の最先端も驚異的である。ガリウムヒ素半導体表面のエピタキシャル成長の詳細が TEM により直視され、新しい発見があった⁵²⁾。またシリコンの高温における液体-結晶転移のその場観察も STM の特性を生かした記念すべき報告がある⁵³⁾。もちろんこれらの先端研究にみられる高分解能のその場観察がすぐ蛋白質 2次元結晶で実現できるわけではない。しかしひとつの方向を示唆している。

その場観察は前述のリアルタイム法以外に時間を凍結して変化を断片的に観察する方法がある。成長速度が遅い場合これは可能である。TEM, SEM を用いる高分解能観察では現実的にこの方法以外生体試料をその場観察できない。急速凍結法による TEM が筋肉の研究で用いられている⁵⁴⁾。脂質膜に吸着したフェリチンの結晶化過程を時々電顕グリッドにすくい取り観察する方法は本特集の宇高、八瀬氏の解説にも詳しい。この結果、結晶成長を比較するとフェリチンの成長速度は脂質膜吸着法と水銀表面法 (吉村氏の解説) で 1,000 倍近く異なることがわかる。これは背後にある成長メカニズムの大きな違いを反映しているものと思われ、その場観察の重要性がますます高まっている。しかし前述のように蛋白質 2次元結晶の高分解能その場観察はまだ開発途上にあり実現していない。以下現在までの到達点と将来の可能性について見てみよう。

蛍光顕微鏡によるサブミクロン程度の 2次元結晶領域の成長は、水面上の単分子膜に関し広く用いられている^{5,55)}。脂質膜吸着法による蛋白質結晶の成長過程についても蛍光ラベルした streptavidin について研究されている^{56,57)}。種々の biotin 化脂質と streptavidin の相互作用によりいろいろな形態の 2次元結晶ができることが新しく見つかっている。結晶は蛋白質が特異的に脂質に吸着後、水平下で 2次元的に整列すると解釈されているが、なぜ水中で結晶せず、脂質吸着後のみ結晶誘導さ

れるのかそのメカニズムは不明である。この例でも結晶、非結晶の判定は生成後の蛋白質膜の TEM 像から得られている。結晶性および分子の配向状態をその場観察する決定的な方法は表面 X線回折法である。これは浅い角度 (0.15° 以下) で水面すれすれに X線を入射し全反射した X線の回折像から結晶回折を行うものである。10nm 程度の表面侵入長をもつため蛋白質でも 2次元結晶解析可能だが、まだ脂質⁵⁸⁾、アミノ酸界面活性剤⁶⁾などの単分子膜にしか適用されていない。

深さ方向の情報として重要なのは膜の厚さである。これは 2次元結晶の成長や多層膜生成の動的過程の良い指標を与える。偏光分光を用いたエリプソメトリーが伝統的に用いられてきた。脂質膜への血液蛋白 prothrombin の吸着量がこの方法で調べられている⁵⁹⁾。この方法は $2\mu\text{m}$ 程度の分解能までマイクロ化でき、さらに CCD などを利用してエリプソメータ顕微鏡も作られている⁶⁰⁾。また積層膜 (LB膜) ではあるが、蛋白質の 2次元面内での分子配向が偏光分光により計測されている⁶¹⁾。これは分解能が低く平均像しか得られないが、分子形態を直接観察することなしに分子配向を見るすぐれた方法といえる。同じ分光法として FT-IR 法も蛋白質構造、膜内配向の研究に偉力を発揮している。特に全反射吸収法 (ATR) は表面 X線と同じく蛋白質 2次元結晶に適した方法である。血漿アルブミンの LB 膜の研究⁶²⁾、バクテリオロドプシン膜の構造変化の研究⁶³⁾が報告されている。この方法は顕微鏡 FT-IR へと発展可能である。最近急速に発展した光学計測では表面プラズモンによる LB 膜観察がある。ラマン分光、エリプソメトリーが同時に見られ、構造、膜厚などの情報が得られる。

将来性から考え最も期待されるのは、位相差顕微鏡と STM の組合せによるその場観察だろう。可視光の水平方向の分解能は $0.5\mu\text{m}$ 程度だが、深さ方向は波長の $1/1,000$ まで検出できる。したがって水面上や水銀上での結晶ドメインは十分観察可能である。特に金属表面では高感度のその場観察が期待できる⁶⁴⁾。これに STM の高分解能性が加えられればかなり強力な動的過程のその場観察法となろう。STM については金 (111) 面上のチオアルカン鎖、リボヌクレアーゼ A の自己凝集過程の報告がある⁶⁵⁾。

5. 試料調製

対象の本来の形を保持したコントラストの良い顕微鏡像を得るには試料に対する種々の前処理、調製が必要である。特に蛋白薄膜のように壊れやすく、まわりの環境の影響を受けやすいものは試料調製に細心の注意が必要である。逆に安定な高分解能像が得られることは、応

表 3 各種試料調製技術

技 術 課 題	観 察 法	解 決 法
平坦試料基板	TEM	炭素薄膜, 非晶質氷薄膜, 有機薄膜
	SEM	マイカ, ガラス, 各種結晶 (シリコン, グラファイト, KCl, NaCl)
	STM	HOPG, マイカ, ガラス
像コントラスト	TEM	金属膜蒸着 (シャドウイング), レプリカ, 重金属染色
	SEM	金属膜蒸着, レプリカ, 局部凍結乾燥
	光 顕	蛍光染色
	STM	金属膜蒸着, レプリカ, 局部凍結乾燥, (染色)
試料変形防止 (ビーム損傷, flattening)	TEM/SEM	凍結乾燥, 氷包埋, グルコース包埋, 染色剤包埋, 急速凍結, アルデヒド固定
	STM/SFM	水中観察, 凍結乾燥, アルデヒド固定
試料不動化	TEM/SEM	化学吸着 (放電エッチング, 化学結合) 物理吸着 (電気吸着, 乾燥固化)
	STM/SFM	化学吸着 (化学結合)
試料転写	TEM	基板表面粘着化 (放電エッチング)
試料帯電防止	SEM	凍結, 金属蒸着

用の面からみて安定で配列の良い2次元蛋白結晶が転写などの操作で得られることを意味し、観察技術を超えた応用面での重要な意味をもつ。TEM, SEM, SXM における通常の調製法 (像コントラスト, 試料変形防止, 帯電防止) のほかに2次元結晶特有の問題として分子オーダーで平坦な試料観察用基板の作成, 基板への結晶転写などがある。表3は特に重要な調製技術について現在用いられている方法を列挙したものである。この表より同じ走査法である SEM と STM にきわめて多数の共通技術の存在することがわかる。表3は技術の大まかな分類で、たとえば TEM 用重金属染色には金属の種類, 正染色, 負染色などの多数のバリエーションがある。過去の経験からわれわれは真に平坦な固体表面を得ることがきわめて難しいことを知った。炭素薄膜ひとつにしても蒸着用基板として何を用いるべきか (マイカ, ガラス, シリコン), 蒸着面の裏表どちらがより平坦で転写に向いているかなどの未解決問題を含んでいる。また TEM, STM 共通試料作成の経験から, TEM の負染色法が STM に不向きなことも知った。そもそも STM は表面の凹凸を見る方法であるから, 染色や包埋に伴う試料以外の異物があつたのではもとの形はわからない。したがって TEM, STM 両者に共通の試料調製には相反する要求が含まれている。これをどう解決すべきか多くの技術課題が残されている。また SXM は分解能を上げるため極細の針で表面を引っかく技術である。柔らかい生物試料が変形しないと考えるほうが不自然であろう。したがって蛋白質が基板に物理的吸着されているだけでは走査針により簡単に移動させられると考えられる。変形

防止, 不動化として表3にあげる水中観察³⁷⁾, 化学結合 (ホスト-ゲスト反応)⁶⁶⁾が提唱されているが, その完成はまだみだである。

完全平坦固体基板面を作り, その化学的性質を粘着性に変え蛋白質2次元結晶を傷つけずに転写し, 変形しない蛋白質像を TEM, STM などでも高分解能で得ることが試料調製法の理想である。

6. あとがき

“観察できるものは加工できる”, これが工学の信条である。材料の高度化, 各種ファイン化学の発達, 半導体の高集積化, 生物の分子レベルの研究の進展は皆この原理の上に突き進んできた。蛋白質2次元結晶も例外ではない。したがってまず, 十分な, 時間-空間分解能の観察技術が確立され, つぎに “応用”, “工業化” への発展があると考えるべきである。幸い SXM の出現と各種電顕技術が蛋白質2次元結晶の分子レベルでの観測を可能にしている。これからの爆発的発展に期待したい。

原稿を注意深く読み適切な助言を賜った, 吉村英恭, 蝦名恵爾博士 (永山プロジェクト) に感謝申し上げます。

文 献

- 1) H. K. Wickramasinghe: J. Vac. Sci. Technol. A8, 363 (1990).
- 2) N. D. Denkov, O. D. Velez, P. A. Kralchevsky, L. B. Ivanov, H. Yoshimura and K. Nagayama: Nature, submitted.

- 3) R. M. Glaeser : *Annu. Rev. Phys. Chem.* **36**, 243 (1985).
- 4) Y. Harada, K. Sakurada, T. Aoki, D. D. Thomas and T. Yanagida : *J. Mol. Biol.* **216**, 49 (1990).
- 5) 宮野健次郎 : 日本物理学会誌 **45**, 317 (1990).
- 6) S. G. Wolf, L. Leiserowitz, M. Lahav, M. Deutsch, K. Kjar and J. Als-Nielsen : *Nature* **328**, 63 (1987).
- 7) I. Fujiwara, C. Ishimoto and J. Seto : *J. Vac. Sci. Technol.* **B9**, 1148 (1991).
- 8) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, F. Beckman and K. H. Downing : *J. Mol. Biol.* **213**, 899 (1990).
- 9) K. Tanaka : *J. Electron Microsc.* **38**, S102 (1989).
- 10) R. Henderson, J. M. Baldwin, K. H. Downing, J. Lepault and F. Zemlin : *Ultramicroscopy* **19**, 147 (1986).
- 11) D. N. Wang and W. Kühlbrandt : *J. Mol. Biol.* **217**, 691 (1991).
- 12) B. K. Jap, P. J. Walian and K. Gehring : *Nature* **350**, 167 (1991).
- 13) J. M. Valpuesta, R. Henderson and T. G. Frey : *J. Mol. Biol.* **214**, 237 (1990).
- 14) A. N. Barnakov, V. V. Demin, A. P. Kuzin, A. A. Zargarov, A. S. Zolotarev and N. G. Abdulaev : *FEBS Lett.* **265**, 126 (1990).
- 15) J. Austin, A. Engel, R. G. E. Murray and U. Aebi : *J. Ultrastr. Molstr. Res.* **102**, 255 (1984).
- 16) K. H. Downing : *Science* **251**, 53 (1991).
- 17) J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell and P. Schultz : *Quart. Rev. Biophys.* **21**, 129 (1988).
- 18) H.O. Ribi, D. S. Ludwig, K. L. Mercer, G. K. Schoolnik and R. D. Kornberg : *Science* **239**, 1271 (1988).
- 19) H. Yoshimura, M. Matsumoto, S. Endo and K. Nagayama : *Ultramicroscopy* **32**, 265 (1990).
- 20) P. N. T. Unwin and C. Taddei : *J. Mol. Biol.* **114**, 491 (1977).
- 21) E. E. Uzgiris and R. D. Kornberg : *Nature* **301**, 125 (1983).
- 22) R. A. Reed, J. Mattai and G. Schipley : *Biochemistry* **26**, 824 (1987).
- 23) L. Lebeau, E. Regnier, P. Schultz, J. C. Wang, C. Mioskowski and P. Oudet : *FEBS Lett.* **267**, 38 (1990).
- 24) H. O. Ribi, P. Reichard and R. D. Kornberg : *Biochemistry* **26**, 7974 (1987).
- 25) J. P. Robinson, M. F. Schmid, D. G. Morgan and W. Chiu : *J. Mol. Biol.* **200**, 367 (1988).
- 26) J. Vonck and E. F. J. van Bruggen : *Bioch. Biophys. Acta* **1038**, 74 (1990).
- 27) R. Newman, A. Tucker, C. Ferguson, D. Tsernoglou, K. Leonard and M. J. Crumpton : *J. Mol. Biol.* **206**, 213 (1989).
- 28) S. A. Darst, E. W. Kubalek, A. M. Edwards and R. D. Kornberg : *J. Mol. Biol.* **221**, 347 (1991).
- 29) H. Yoshimura, S. Endo, M. Matsumoto, K. Nagayama and Y. Kagawa : *J. Biochem.* **206**, 958 (1989).
- 30) T. Akiba, H. Yoshimura and K. Namba : *Science* **252**, 1544 (1991).
- 31) N. Ishii, H. Taguchi, M. Yoshida, H. Yoshimura and K. Nagayama : *J. Biochem.* **110**, 905 (1991).
- 32) P. Fromherz : *Nature* **231**, 267 (1971).
- 33) S. M. Lindsay, T. Thundat, L. Nagahara, U. Knipping and R. L. Rill : *Science* **244**, 1063 (1989).
- 34) G. Binning, H. Rohrer, Ch. Gerber and E. Wiebel : *Phy. Rev. Lett.* **49**, 57 (1982).
- 35) a) A. Stemmer, A. Hefti, U. Aebi and A. Engel : *Ultramicroscopy* **30**, 263 (1989).
b) A. Stemmer, R. Reichelt, R. Wyss and A. Engel : *Ultramicroscopy* **35**, 255 (1991).
- 36) M. Amrein, Z. Wang and R. Guckenberger : *J. Vac. Sci. Technol.* **B39**, 1276 (1991).
- 37) J. K. H. Hörber, F. M. Schuler, K. H. Witzemann, H. Schröter, H. Müller and J. P. Ruppertsberg : *J. Vac. Sci. Technol.* **B39**, 1214 (1991).
- 38) J. Simić-Krstić, M. Voelker, Z. Laušević, M. Andjelković, and D. Koruga : *Proc. of STM '91* (1991) p. 172.
- 39) H.-J. Butt, C. B. Prater and P. K. Hansma : *J. Vac. Sci. Technol.* **B9**, 1193 (1991).
- 40) F. Schabert, A. Hefti, A. Engel, E. Meyer, R. Overney and H.-J. Güntherodt : *Proc. of STM '91* (1991) p. 27.
- 41) A. K. Mitra, M. P. McCarthy and R. M. Stroud : *J. Cell. Biol.* **109**, 755 (1989).
- 42) H. Ohtani, R. J. Wilson, S. Chiang and C. M. Mate : *Phys. Rev. Lett.* **60**, 2398 (1988).
- 43) W. Mizutani, M. Shigeno, K. Watanabe, M. Sugi, M. Ono and K. Kajimura : *Jpn. J. Appl. Phys.* **27**, 1803 (1988).
- 44) L. Eng, H.-R. Hidber, L. Rosenthaler, U. Staufer, R. Wiesendanger and H.-J. Güntherodt : *J. Vac. Sci. Technol.* **A6**, 358 (1988).
- 45) R. Kuroda, E. Kishi, A. Yamamoto, K. Hatanaka, H. Matsuda, K. Eguchi and T. Nakagiri : *J. Vac. Sci. Technol.* **B9**, 1180 (1991).
- 46) 八田一郎 : *パリティ* **5**(2), 56 (1990).
- 47) 加藤 知, 宮本 宏 : *生物物理* **30**(3), 59 (1990).
- 48) B. L. Blackford and M. H. Jerico : *J. Vac. Sci. Technol.* **B9**, 1214 (1991).
- 49) Y. Yanagida, H. Nakase, M. Nishiyama and F. Oosawa : *Nature* **307**, 58 (1984).
- 50) T. Horio and H. Hotani : *Nature* **321**, 605 (1986).

- 51) S. Kudo, Y. Magariyama and S. Aizawa: *Nature* **346**, 677 (1990).
- 52) 井上直久: 日経サイエンス, 1991 年 6 月号, 116 (1991).
- 53) S. Kitamura, T. Sato and M. Iwatsuki: *Nature* **351**, 215 (1991).
- 54) J. E. Heuser, T. S. Reese, L. Y. Jan, Y. N. Jan, M. J. Dennis and L. Evans: *J. Cell Biol.* **81**, 275 (1979).
- 55) M. Lösche and H. Möhwald: *Rev. Sci. Instrum.* **55**, 1968 (1984).
- 56) R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf and S. Salesse: *Biochemistry* **28**, 8214 (1989).
- 57) A. Ahlers, R. Blankenburg, D. W. Grainger, P. Meller, H. Ringsdorf and C. Salesse: *Thin Solid Films* **180**, 93 (1989).
- 58) C. A. Helm, H. Möhwald, K. Kjaer and J. Als-Nielsen: *Biophys. J.* **52**, 381 (1987).
- 59) P. A. Cuyper: *J. Biochem. Biol.* **258**, 2426 (1983).
- 60) D. Beaglehole: *Rev. Sci. Instrum.* **59**, 2557 (1988).
- 61) 桑井正美, 安食秀一, 安田喜昭, 松倉浩, 杉野弘明, 豊玉英樹: 第 9 回次世代産業基盤技術シンポジウム予稿集 (1991) p. 347.
- 62) F. Dousseau, M. Therrien and M. Pezolet: *Appl. Spectrosc.* **43**, 538 (1989).
- 63) R. J. Jacobsen and D. G. Cornell: *Appl. Spectrosc.* **40**, 318 (1986).
- 64) C. D. Dushkin, H. Yoshimura and K. Nagayama: (unpublished data).
- 65) B. Farrell, G. Lee, R. D. Edstrom and D. F. Evans: *Proc. of STM '91* (1991) p. 172.
- 66) H. Hara, H. Miyazawa, K. Niki and H. Sasabe: *Proc. of STM '91* (1991) p. 176.