

ナノスケールの動的プロセスを可視化する高速 AFM



技術解説

山下隼人*

High-speed atomic force microscopy for visualizing dynamic processes at nanoscale

Key Words : High speed atomic force microscopy, Bio-imaging, Membrane protein

1. はじめに

原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) は、走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscopy, SPM) の一種で、1986年に走査型トンネル顕微鏡 (Scanning Tunneling Microscopy, STM) の発明でノーベル賞を受賞したゲルト・ビニッヒらにより開発された¹。STM や AFM の魅力は空間分解能の高さであり、光の波長 (回折限界) で空間分解能が制限されている光学顕微鏡に対し、STM、AFM は超高真空中では原子以下のレベルの形状観察も可能である。導電性試料の観察に限られる STM に対し、AFM は絶縁性の試料でも観察することができ、さらに観察環境 (真空、大気、溶液中) を選ばない。そのため AFM はこれまで様々な絶縁性材料やデバイスの研究に用いられてきた。また溶液中でもナノレベルの空間分解能で撮像可能なことから、タンパク質、核酸や細胞など、生体試料の観察にも応用されてきた^{2,3}。このように現在 AFM は広範な分野で利用されている。しかし、画像を1枚撮影するだけでも非常に時間がかかるという大きな弱点を持つ。効率が悪いだけでなく、試料の動的な現象を捉えることができない。走査速度を格段に向上させた高速 AFM の実現は、これまで他の顕微鏡では観察することが困難であったナノオーダーの空間分解能での動的現象の可視化を可能にし⁴、ナノ

スケールでの様々な研究分野に新展開をもたらしている⁵。

本解説では、高速 AFM を実現する要素技術の概略とそのイメージングへの応用としてバイオ研究の事例を中心に紹介する。

2. 高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM)

2.1 AFM とその高速化

AFM はカンチレバーの先端に付けた鋭い探針と試料との間に働く原子間力を検出する事により試料表面の形状を得る触針型顕微鏡である。いくつかの動作方式が提唱されているが、動的過程の観察に適した AC モードについて話を進める (図1)。

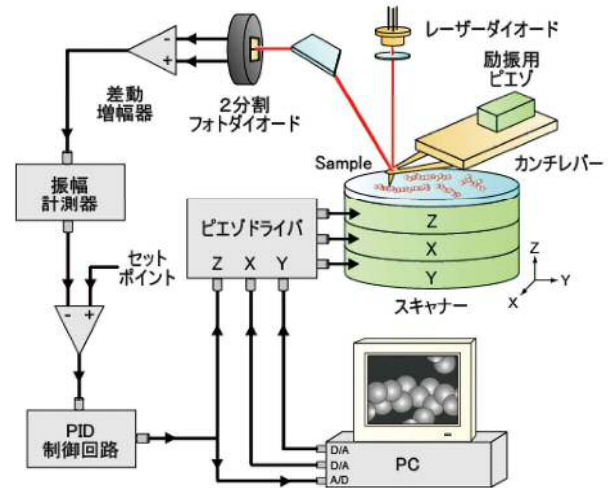


図1: AC モード AFM の模式図

AC モードでは圧電素子によりカンチレバーを Z 方向に振動させながら走査することで、探針と試料との接触を減らし、探針と試料間に働く摩擦力を小さくすることができる。探針が試料に接触した時のカンチレバーの振動振幅の変化は光てこ法により検出される。また、試料ステージの XY 走査中にカン



* Hayato YAMASHITA

1981年8月生
 金沢大学大学院自然科学研究科数物科学専攻博士後期課程修了 (2010年)
 現在、大阪大学 JST さきがけ兼任 基礎工学研究科 附属極限科学センター 助教 博士 (理学) 走査型プローブ顕微鏡、生物物理学
 TEL : 06-6850-6304
 FAX : 06-6850-6341
 E-mail : hyama@stec.es.osaka-u.ac.jp

チレバーの振動振幅（探針が試料を叩く力）が常に一定に保たれるよう、PID制御により試料ステージをZ方向にも走査させる（フィードバック走査）。この走査により試料ステージは試料表面をなぞるように動くため、Z方向の走査信号をX、Y各点でプロットすると試料表面形状が再現される。フィードバック制御において、それに関わる各デバイスの応答は遅延を持つため、フィードバックループが回るのに一定の時間がかかる。試料表面の多数の点で高さ情報を取得する間に、このループは各点で最低1回は回るため、像を得るのにかなりの時間を要する（通常のAFMでは1画像あたり数分）。例えば生体分子の機能過程はミリ秒から秒オーダーであるため、通常のAFMではこのような動的過程を捉えることはできない。そのため、AFMの高速化にはフィードバックループに含まれるすべてのデバイスの応答速度の向上が必須である。また動的過程を観察するには、試料を乱さず、かつ正確な表面形状を得ることも必要であるため、高速制御と探針が試料をたたき力を軽減することの両立が求められる。これらの課題を解決するための技術について、本稿ではカンチレバー、光てこ、振幅計測、スキャナーに絞って、技術解説する。

2.2 微小カンチレバー

ACモードのAFMではカンチレバーを共振周波数で振動させ、探針と試料を間欠接触しながら試料表面をトレースする。このため、表面の形状情報を取得するには各画素あたり1回以上の振動が必要となることから、撮影速度を向上させるには、高い共振周波数を持つカンチレバーが求められる。一方、試料を乱さず正確に表面形状の走査を行うには、探針が試料に与える力を小さくする必要がある。特に生体分子のような柔らかく脆い試料は力に弱く、走査中に容易に破壊されてしまう。そのため、バネ定数の小さなカンチレバーが求められる。短冊型（長さ l 、幅 w 、厚さ d ）のカンチレバーの共振周波数 f_c とバネ定数 k_c は一般に

$$f_c = 0.56 \frac{d}{l^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}} \quad (1)$$

$$k_c = \frac{wd^3}{4l^3} E \quad (2)$$

と表せる（ E ：ヤング率、 ρ ：密度）。

高い共振周波数と低いバネ定数という両方の条件を同時に満たすには、カンチレバーを薄くかつ小さくすることが選択肢の1つであることが(1)(2)の式から分かる。この指針により、図2（左下）のような高速イメージングに用いられる微小カンチレバー（短冊型窒化シリコンカンチレバー）が開発された⁶。すでに市販されているものは、長さ約 $10\ \mu\text{m}$ 、幅 $2\ \mu\text{m}$ 、厚さ $0.13\ \mu\text{m}$ であり、通常のカンチレバー（図2右上）のサイズと比較して1/10以下である。このカンチレバーの大気中、溶液中での共振周波数はそれぞれ約 $1.5\ \text{MHz}$ 、 $0.6\ \text{MHz}$ で、バネ定数は約 $0.1\ \text{N/m}$ 、溶液中での Q 値は約2である。

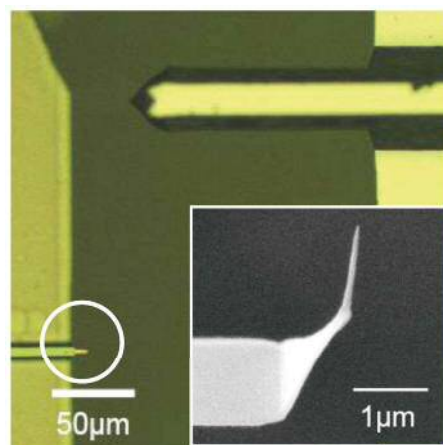


図2：カンチレバーサイズの比較。
（左下の白丸）微小カンチレバー（BL-AC10DS、Olympus）、（右上）通常のカンチレバー（Tap 300Al、Budget sensors）、（挿入図）微小カンチレバー先端に作製した探針のSEM写真

通常のカンチレバーには、先端に単結晶シリコンなどの先鋭な探針がついており、原子分解能での観察も行われている。微小カンチレバーも先端がバズピーク形状をしており、板状三角形突起が探針として機能する（窒化シリコン、高さ約 $0.8\ \mu\text{m}$ ）。しかし、比較的大きなサンプルや高分解能での観察には、更にアスペクト比が高く、尖った探針が求められる。そこで、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて、電子線の点照射による電子ビーム誘起堆積により先端に長さ約 $1\ \mu\text{m}$ 程度のアモルファスカーボン探針を作製している（図2挿入図）。さらに、アルゴンや酸素雰囲気中でプラズマエッチングを行うことで、カーボン探針先端の先鋭化を行っている。

2.3 光てこ光学系

AFM ではカンチレバーの変位を検出する方法として、レーザーなどの光をカンチレバー背面へ照射し、反射光をフォトダイオードで検出する「光てこ法」が広く用いられている(図1)⁷。カンチレバーの微小な撓みが反射光のわずかな角度変化に反映され、その角度変化が遠方で拡大されて検出される(光てこ)。この光てこ法で微小カンチレバーの変位を検出するには、対物レンズを使用して、レーザー光のスポットサイズを小さくする必要がある。一方、高NAの対物レンズを使用するとスポットサイズは小さくなるが、作動距離が短くなり、反射光を直接フォトダイオードへ入射することが出来ない。そこで、微小カンチレバーの変位を検出するため、偏光ビームスプリッターを使用した図3のような光学系を用いている⁴。垂直偏光した赤色レーザー光(波長670 nm)をコリメーターレンズで平行光にし、偏光ビームスプリッターを通過させた後、1/4波長版で円偏光にする。これを対物レンズで集光し、カンチレバー背面に照射する。カンチレバーからの反射光は再び対物レンズで集められ平行光に戻される。その後、1/4波長版を通過すると水平偏光になり、

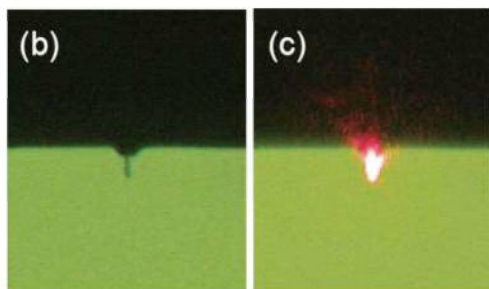
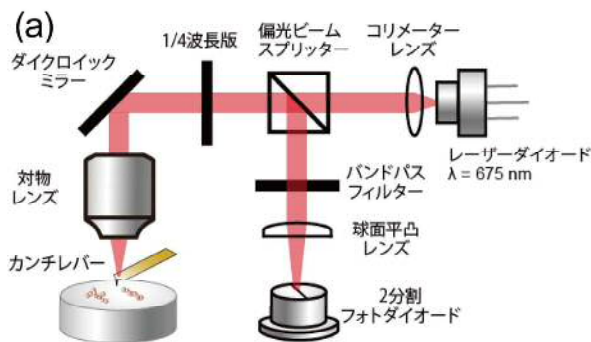


図3：(a) 対物レンズ型光てこ光学系の概略図、(b) レーザー照射前のカンチレバー、(c) 赤色レーザー光を照射後のカンチレバー

偏光ビームスプリッターにより直角に反射し2分割フォトダイオードに入射する。この光学系はアライメント調整が容易であると共に、短いカンチレバーの方が角度変化は大きいことから、微小カンチレバーの高感度な変位検出に有効である。

2.4 高速振幅計測

振幅変化を検出するAM-AFM (Amplitude modulation AFM) では、光てこ法によりフォトダイオードで検出されたカンチレバーの振動信号から振幅が計測される。従来のAFMの振幅計測にはロックインアンプやRMS-DCコンバーターなどが用いられているが動作帯域が低く、微小カンチレバーの高共振周波数の振幅を計測できないため、我々はフーリエ法を用いている⁸。カンチレバーの振動波形 $S(t)$ は基本周波数の整数倍の周波数を持つ正弦波と余弦波の重ね合わせである(フーリエ展開)。また、フーリエ係数は

$$a_n = \frac{2}{T} \int_0^T S(t) \cos(n\omega t) dt \quad (3)$$

$$b_n = \frac{2}{T} \int_0^T S(t) \sin(n\omega t) dt \quad (4)$$

と表せる。そこで、 $S(t)$ に $\sin(1\omega t)$, $\cos(1\omega t)$ を乗算し、1周期積分を行うことで基本周波数の係数 a_1, b_1 を求め、 $\sqrt{a_1^2 + b_1^2}$ を計算することにより基本周波数の振幅を求められる。この計算をFPGA (field-programmable gate array) で高速演算することで1周期ごとの振幅変化の検出を行っている。

2.5 高速スキャナーとアクティブダンピング

AFMのスキャナーは、電圧を印可することで変位する圧電素子(ピエゾ)を用いて、X,Y,Z方向の走査を行う。従来のAFMでは、一般的にチューブピエゾを用いてスキャナーが構成されているが、X,Y,Zの3軸間が互いに干渉し易く、共振特性が複雑である。そこで、X,Y方向をフレクチャー(板バネ)により変位させる図4のようなスキャナー構造を用いた⁹。YピエゾがXピエゾを含む構造をY方向に変位させ、XピエゾがZピエゾをX方向に変位させ、Zピエゾが試料ステージ(円柱ガラス)をZ

方向に変位させる構造となっている。フレクチャー構造は、変位方向には軟らかく変位に直角な方向に硬いため、干渉が少ない。また本体の共振周波数を高くするため、これらの構造をモノリシック加工で作成した。

一方、圧電素子を高速で駆動するには、高い共振周波数が必要となる。サイズの小さな圧電素子は、共振周波数が高いことから、高速駆動が必要な走査方向ほど、用いている圧電素子のサイズが小さくなっている (Y→X→Zの順に小さくなっている) (図4緑)。更にサイズを小さくすることで、共振周波数を向上させることも可能であるが、変位量も小さくなるため、イメージングに必要なダイナミックレンジを確保するには、使用できる圧電素子は限られる。そのため駆動帯域を下げないようなスキャナー構造の工夫や共振を抑えるためのアクティブダンピング制御を行っている。

例えば、支持部に固定された圧電素子を高速に駆動させると支持部に振動が伝わり、周辺の機械部を振動させる。この振動を緩和するため、Zピエゾの支持部の反対側に同等のピエゾを固定し、2つのピエゾを同時に反対向きに変位させるカウンターバランスを導入した (図4右)。Xピエゾは両側をフレクチャー構造で挟み、両側の質量が同じになるようにZピエゾと反対側にダミーステージ (バランス質量) を取り付け⁹。

X走査波形は既知かつ周期的であるので、フィードフォワード制御により、共振を抑制した。一方、Z走査波形はあらかじめ予測できないので、フィードバックによる振動抑制法として知られるQ値制御法 (アクティブダンピング) を用いた。制御対象の速度に比例する信号の位相を反転し、駆動信号へ加えることで、粘性抵抗を見かけ上増加させ、振動を抑制することができる。しかし、この方法ではZピエゾの変位もしくは速度を計測しなければならないが、走査中に同時に計測することは困難である。そこで、実際のZピエゾと同等の周波数特性をもつ伝達関数をLCR回路で作成し、その出力の微分成分 (速度) を、駆動信号へフィードバックすることにより、ダンピングを行っている¹⁰。

図5はここまで記載した技術を用いて、著者が作製した実際の高速AFM装置のヘッド部分を示している。下部が土台で、中央部分に光てこ光学系が内

蔵されており、上部にカンチレバーと高速スキャナーが設置されている。

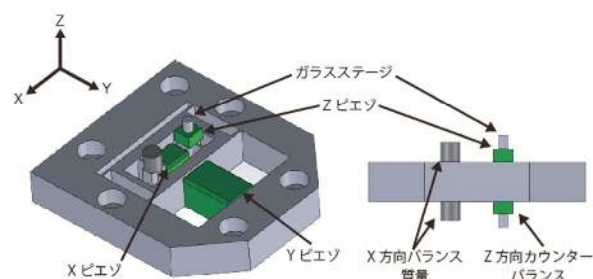


図4：高速スキャナーの全体図 (左) と側面図 (右)

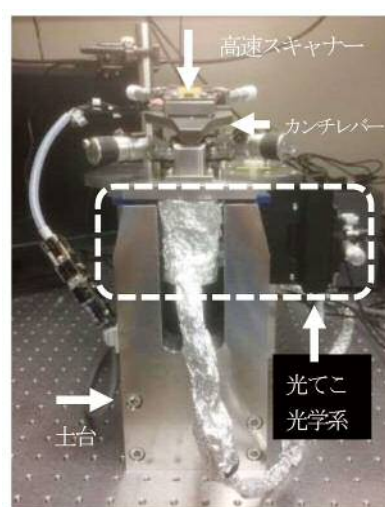


図5：高速AFM装置ヘッド部の外観

3. 膜タンパク質の動態観察

高速AFMの応用例は多岐にわたり、現在では様々な生体分子の動的なプロセスの可視化に高速AFMが用いられている。ブラウン運動による構造ゆらぎ¹¹だけでなく、基質の結合や光受容などの外部刺激に対する生体分子のコンフォメーション変化¹²⁻¹⁴や分子同士の結合解離¹⁵などのダイナミックなプロセスが1分子レベルで捉えられている。その中でも、著者はこれまで膜タンパク質に注目して動態研究を行ってきたので、その高速AFMによる成果の一部を本稿にて紹介する。

3.1 バクテリオロドプシン2次元結晶端での分子結合・解離過程の観察

bacteriorhodopsin (bR) は高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜に存在する膜タンパク質であり、光エネルギーを利用してH⁺を細胞内から細

胞外へ輸送する光駆動プロトンポンプである。bR試料は非常に安定であり、大量培養・精製可能なため、構造解析、分光など、これまでにさまざまな手法を用いて盛んに研究が行われており、膜タンパク質研究におけるモデルタンパク質となっている。

高度好塩菌の細胞膜には紫色のパッチ（紫膜）が存在しており、紫膜中でbRは2次元結晶を形成している。紫膜を単離精製して、高速AFM観察を行うと、図6(a)のように丸い膜パッチを観察することができる。この膜中央部を拡大して高速AFM観察を行うと、bRの2次元結晶を高分解能で観察することができた。結晶中でbRは3量体を単位（図6(b)白三角）として、六方格子状に配置していることが分かる。

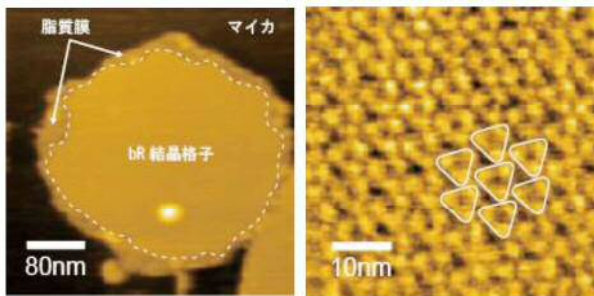


図6：(a) 紫膜のAFM像、(b) 膜中心部の拡大像

一方、紫膜の周縁部には2次元結晶と脂質膜との境界領域（図6(a)点線）が存在することが分かった。そこで、この領域を拡大して、高速撮影を行ったところ、図7で示すようにbR分子（白矢印）が2次元結晶に結合解離を繰り返している様子を撮影することに成功した¹⁶。この高速AFMの動画は、参考文献（16）をご覧ください。

これらの結合解離する分子は、単量体、2量体も観察されたが、ほとんどが3量体であったことから、周縁部の脂質膜中でbRはすでに3量体を形成していると考えられる。この3量体の2次元結晶端での結合寿命を解析したところ、結合寿命は指数関数分布をもつことが分かった。また結合手の数によって平均結合寿命が異なっていることが分かった。結晶内部では各3量体は6個の結合手で周辺の3量体と結合しているが、境界部では1～3個の結合手で結合する（図7右下）。結合手が2個の場合の平均結合寿命 τ_2 は0.19秒であったのに対し、3個の場合の寿命 τ_3 は0.85秒であった。この違いは結合エネ

ルギーの差 $E_3 - E_2$ に起因しており、

$$\tau_3 / \tau_2 = \exp[(E_3 - E_2) / k_B T] \quad (5)$$

と表せる (k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度)。

ここから、結合手1個の結合エネルギー

$E_1 = E_3 - E_2$ は $1.5 k_B T$ と求めることができた¹⁶。

(これは室温300Kにおいて、 0.9 kcal/mol に対応している。)

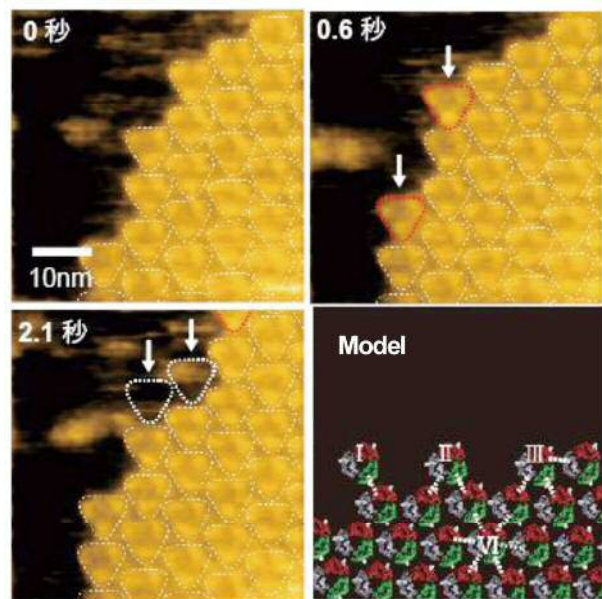


図7：結晶端におけるbR分子の結合解離過程

3.2 光照射に伴うbRの構造変化の観察

bRは7回膜貫通型の α -helixとレチナール（色素）から成り、レチナールが緑色の光を吸収するとall-transから13-cisへ異性化する。この異性化に伴って、光反応サイクルが開始され、bRの構造変化が起こり1個の H^+ が細胞質側から細胞外側へ運ばれる。bRの光励起に伴う構造変化は、電子顕微鏡やX線構造解析、NMRなどを用いて研究されており、M中間体において細胞質側のF-helixが変位することが示されている¹⁷。しかし、生理溶液環境下において、bR1分子の構造変化を直接可視化した例はなかった。そこで、光照射に伴うbRの構造変化を高速AFMで観察を行った。野生型の光反応サイクルは10ミリ秒程度であるため、高速イメージングでも捉える事は難しいが、光サイクルが10秒程度まで長くなるbRの変異体D96Nを用いることで、1分子内の構造変化を捉えることができた（図8）¹³。光照射前後の高速AFM像を見比べると、光照射に

より3量体内の各bR分子が3量体の中心から外側へ移動し、その結果、隣合う3量体のbR分子が接近していることが分かる。このような構造変化は、光照射のOn/Offを繰り返すと何度も再現された。また分子の重心位置の変化を解析した結果、約0.7nmであることが分かった。この高速AFMの動画は、参考文献(13)をご覧ください。

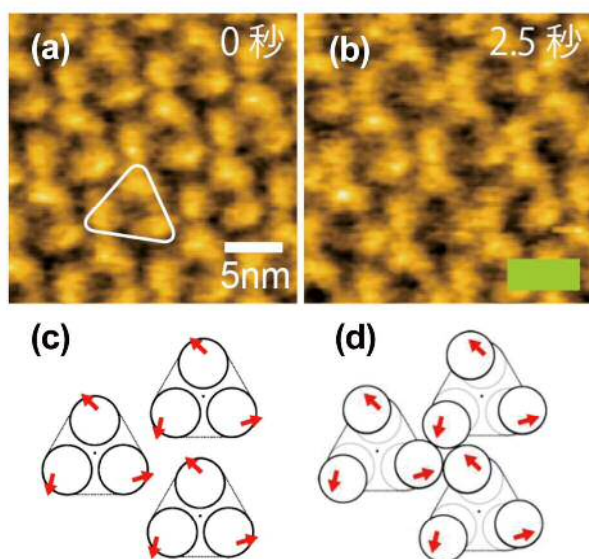


図8: bRの光照射に伴う構造変化の高速AFM像((a), (b))とその模式図((c), (d))。 (a)と(c)は光照射前、(b)と(d)は光照射中。イメージング速度は0.5秒/フレーム

3.3 分子集合しない変異体bRの高速AFM観察

bRは高度好塩菌の細胞膜中で3量体を基本単位として2次元結晶に分子集合しているが、その集合構造と機能との関係は良く分かっていない。H⁺輸送機能に関わるbRの構造変化は変異体D96Nを高速AFMで観察することで調べることができる。結晶集合しないbRを作成し、そのbR分子の光照射に伴う構造変化を観察できれば、集合したbRと集合していないbRでカイネティクスを比較することができる。そこで、結晶集合しないbR変異体の作製に取り組んだ。そのためには、まずbR3量体間の結合部位の同定を行う必要があった。3.1での結合手の考察を手掛かりに、3量体間に存在するアミノ酸を一つずつ置換した部位特異的変異体を準備し、高速AFM観察を行った。その結果、変異体W10IやY131Iでは図9(a)のように2次元結晶を形成していたが、W12IとF135Iでは2次元結晶が見られず、脂質膜中を3量体が拡散している様子が観察された

(図9(b))。このことから、3量体間の結合にはW12とF135が関与していることが分かった(図9(c))¹⁸。分子集合しないbR変異体(3量体は形成している)は、膜中を分子拡散しているため、1分子レベルでの構造変化を観察することは難しい。そこで、マイカ基板をアミノシランで修飾し、bRと架橋させることにより、基板への固定化を行った(図9(d))。固定されたbRを観察中に、3.2と同様の光照射実験を行ったところ、3量体内の各bR分子が3量体の中心から外側へ構造変化の様子が観察された。この高速AFMの動画は、参考文献(18)をご覧ください。

光照射に伴う構造変化を詳しく解析した結果、光照射後構造変化するまでの時間(Rise)が、分子集合したbRに比べ、分子集合していないbRで4倍程度遅くなっていることが分かった。一方、構造変化した後、もとの構造に戻るまでの時間(Decay)はどちらの分子も同じであった。これらの結果と分光実験から、bRは分子集合により、効率的なフォトサイクル機能を実現していることが明らかになった¹⁸。

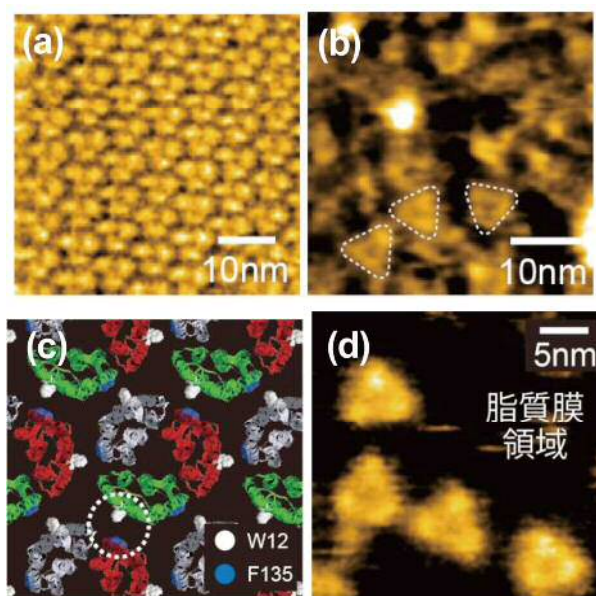


図9: 変異体bR、W10I (a)とW12I (b)のAFM像、(c) bR集合構造のモデル図、(d) 基板へアンカーした変異体bRのAFM像

4. 生細胞表面の分子動態観察

前項までの観察は、細胞から精製した膜中の膜タンパク質を高速AFMで観察したものであるが、生きた細胞中の膜タンパク質を直接観察することが出

来れば、膜タンパク質の機能解明がより進展することが期待される。これまで通常の AFM を用いてバクテリア細胞表面の微細構造の観察は行われているが^{19,20}、細胞膜分子の動態は可視化することができなかった。そこで、高速 AFM を用いて、グラム陰性細菌である磁性細菌の観察を行った。図 10(a) は高速 AFM で観察した磁性細菌の全体像である。この細胞表面を拡大した所、図 10(b) のように表面が網目状の微細構造で覆われている様子が観察された。さらに拡大すると、無数の孔を高分解能で可視化することができた (図 10(c))。また、しばらく撮影していると、この孔は膜中をゆっくりと動いていることが分かった (図 10(d))。この高速 AFM の動画は、参考文献 (21) をご覧頂きたい。この動きを解析した結果、拡散定数は約 $3 \text{ nm}^2/\text{sec}$ であった。そこで、これらの構造を構成する膜タンパク質を同定するため、この細菌の外膜を単離精製し、分析を行ったところ、分子量 40 kDa のポーリンが多量に含まれていることが分かった。高速 AFM による磁性細菌の観察から、細菌外膜中のポーリンのダイナミクスを細胞上で直接観察できることが分かった²¹。そこで、生きた細胞上での分子動態研究を進展させるため、現在、更に高分解能で観察するための AFM 技術の開発を進めている。

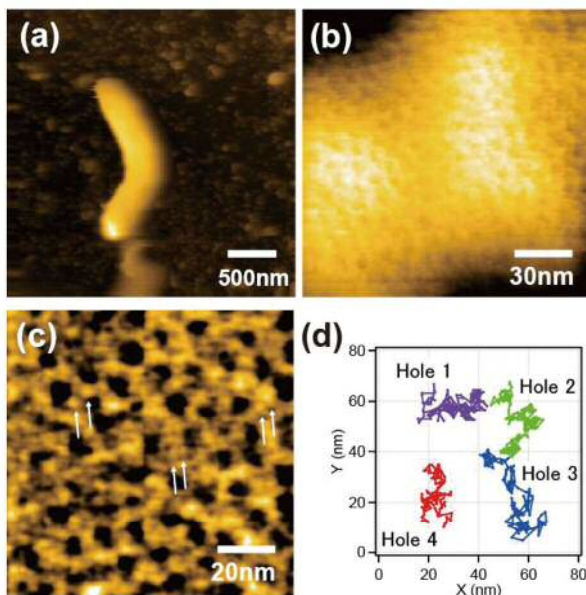


図 10 : (a) 細胞全体の高速 AFM 像、(b) 細胞表面の拡大像、(c) 網目構造の高分解能像、(d) 網目構造における孔の位置変化

5. 固体触媒材料表面の動的ナノプロセス

一見何の変哲もない無機固体でも、実際にはその組成や物性により多様で優れた機能を発揮し、我々の身の回りで幅広く用いられている。触媒作用はそのような固体表面の示す代表的な化学反応であり、エネルギー問題や公害問題の解決、工業製品の効率的な生産や燃料電池の開発などにとって重要な役割を果たす。このような触媒機能のミクロなスケールでのメカニズムが解明されると、高性能の触媒をデザインして作製する事が可能となる事から、最新の技術を用いて、様々な固体の表面反応や物性が調べられている。STM や AFM などの SPM 技術もその一つであり、固体触媒表面の原子配列、電子構造、原子・有機分子の吸着の様子が高空間分解能で明らかにされ、表面上の局所構造が触媒活性点として重要な役割を果たすのではないかと指摘されてきた。しかし、従来の SPM では反応過程を捉えることが出来ず、いまだ決定的な証拠は得られていない。

そこで我々は最近、高速 AFM の材料研究への応用を進めている。AFM による高分解能の観察には、非常に平坦化された試料表面が求められるが、幸いにも材料分野での原子分解能 SPM 研究の進展もあり、我々はすでに試料の準備方法とその技術を確立している²²。そこで、これらの技術を用いて高速 AFM 計測を行うことで、固体触媒材料表面上でナノスケールの動的反応過程の可視化に取り組んでいる。さらに、今後原子分解能 AFM の高感度、高精度技術と高速 AFM 技術を組み合わせることができれば、将来原子スケールでの固体表面ダイナミクスも直接可視化できる日が来ると期待される。

6. おわりに

本稿では、高速 AFM の主要な要素技術の解説と高速 AFM を用いたイメージングの応用例を紹介した。高速 AFM はすでに市販化されており、近年それを導入した各国の研究グループから様々な生体試料のナノスケールでの動的プロセス可視化への応用例が報告されている。しかしその応用範囲はまだまだ限られている。例えば医学的に重要なタンパク質の機能過程を高速 AFM で可視化できれば、その動作機構の研究を通して、疾患発症メカニズムの解明にもつながるものと考えられる。またバイオ分野だけでなく、材料・デバイス研究においても、ナノスケール、更

には原子スケールでの動的過程の可視化に応用できれば、これまでにない未開分野の開拓に繋がることから、今後様々な分野で需要が増していくものと期待される。

謝辞

本研究は、金沢大学の安藤敏夫教授、古寺哲幸博士、柴田幹大博士、福森義宏教授、田岡東博士、名古屋大学の内橋貴之教授、大阪大学の阿部真之教授との共同研究の成果であり、共同研究者の皆様に深く感謝致します。また本成果は、特別研究員奨励費、JSPS 科研費、JST さきがけ、武田科学振興財団、新世代研究所の支援を受けたものである。ここに謝意を表します。本装置にご興味のある方は、著者まで連絡を頂ければ幸いです。

参考文献

- 1 Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933 (1986).
- 2 Engel, A. & Muller, D. J. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 715-718 (2000).
- 3 Muller, D. J. & Dufrene, Y. F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* **21**, 461-469 (2011).
- 4 Ando, T. *et al.* A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12468-12472 (2001).
- 5 Ando, T., Uchihashi, T. & Scheuring, S. Filming Biomolecular Processes by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Chem. Rev.* **114**, 3120-3188 (2014).
- 6 Kitazawa, M., Shiotani, K. & Toda, A. Batch fabrication of sharpened silicon nitride tips. *Jpn. J. Appl. Phys. 1* **42**, 4844-4847 (2003).
- 7 Meyer, G. & Amer, N. M. Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **53**, 1045-1047 (1988).
- 8 Kokavecz, J., Toth, Z., Horvath, Z. L., Heszler, P. & Mechler, A. Novel amplitude and frequency demodulation algorithm for a virtual dynamic atomic force microscope. *Nanotechnology* **17**, S173-S177 (2006).
- 9 Ando, T., Uchihashi, T. & Fukuma, T. High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes. *Prog. Surf. Sci.* **83**, 337-437 (2008).
- 10 Kodera, N., Yamashita, H. & Ando, T. Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **76** (2005).
- 11 Miyagi, A. *et al.* Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Chemphyschem* **9**, 1859-1866 (2008).
- 12 Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R. & Ando, T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* **468**, 72+ (2010).
- 13 Shibata, M., Yamashita, H., Uchihashi, T., Kandori, H. & Ando, T. High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 208-212 (2010).
- 14 Uchihashi, T., Iino, R., Ando, T. & Noji, H. High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Rotary Catalysis of Rotorless F-1-ATPase. *Science* **333**, 755-758 (2011).
- 15 Yokokawa, M. *et al.* Fast-scanning atomic force microscopy reveals the ATP/ADP-dependent conformational changes of GroEL. *Embo J.* **25**, 4567-4576 (2006).
- 16 Yamashita, H. *et al.* Dynamics of bacteriorhodopsin 2D crystal observed by high-speed atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **167**, 153-158 (2009).
- 17 Lanyi, J. K. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 665-688 (2004).
- 18 Yamashita, H. *et al.* Role of trimer-trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by optical spectroscopy and high-speed atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **184**, 2-11 (2013).
- 19 Dupres, V., Alsteens, D., Pauwels, K. & Dufrene, Y. F. In Vivo Imaging of S-Layer Nanoarrays on

- Corynebacterium glutamicum*. *Langmuir* **25**, 9653-9655 (2009).
- 20 Andre, G. *et al.* Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nat. Commun.* **1** (2010).
- 21 Yamashita, H. *et al.* Single-Molecule Imaging on Living Bacterial Cell Surface by High-Speed AFM. *J. Mol. Biol.* **422**, 300-309 (2012).
- 22 Katsube, D. *et al.* A Preparation Method for Atomically Clean Sapphire Surfaces and High Resolution Topographic Method for Their Imaging by Non-Contact Atomic Force Microscopy. *Mater. Trans.* **56**, 1310-1313 (2015).

