

原子間力顕微鏡を用いた動的分子間力分光法 —Biotin-Streptavidin 結合ポテンシャルの分離測定—

谷中 淳^{1,2}・武内 修^{1,2}・重川秀実^{1,2}

¹筑波大学大学院数理物質科学研究科 ☎ 305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1

²CREST JST ☎ 305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1

(2009年7月8日受理)

Site-selective Analysis of Biotin-Streptavidin Interactions using Dynamic Force Spectroscopy

Atsushi TANINAKA^{1,2}, Osamu TAKEUCHI^{1,2} and Hidemi SHIGEKAWA^{1,2}

¹Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 1-1-1 Tsukuba, Ibaraki 305-8573

²CREST-JST, University of Tsukuba, 1-1-1 Tsukuba, Ibaraki 305-8573

(Received July 8, 2009)

Probing the step-by-step bonding processes induced by the individual interactions in a molecular complex and their variation with the surrounding conditions is a key factor for enabling further advances in biophysics and chemistry and their applications. Here, we demonstrate a methodology that realizes the site-selective anatomy of molecular interactions at the single-molecule level. With the combination of cross-linkers and the atomic force microscopy (AFM) that we developed to enable a precise analysis by dynamic force spectroscopy (DFS), direct and bridged interactions at each reaction site in a typical ligand-receptor system, streptavidin-biotin complex, were clearly distinguished and individually analyzed for the first time, providing a greater understanding of step-by-step progress of the bonding process. This methodology will provide a foundation for further advances in biophysics and chemistry and their applications, such as designing and controlling the mechanism of chemical reactions between functional molecules.

KEYWORDS : dynamic force spectroscopy, atomic force microscopy, molecular recognition, energy landscape, ligand-receptor

1. はじめに

DNA や抗原抗体などの機能性分子を利用して分子デバイス構築などへの応用を目指す場合^{1,2)}, 相互認識により特異的な結合を形成する2分子間の相互作用を, 溶液や温度など環境の変化に対して正しく理解することが非常に重要である。しかし, 一般に, 相互作用ポテンシャルを記述するための実験手段としては熱力学的解析が用いられてきた。熱力学は, 物質の反応を律するエネルギーや反応速度を巨視的に記述する場合, 極めて有効であるが, 機能性分子の複雑な構造から生じる反応の多様

性や限定性は, 局所的な機能分子の性質や反応過程により決定されるため, これまでの巨視的な反応の描写では, 機能性分子の局所的な相互作用を解明することは極めて困難で, 単分子レベルでの解析が必要不可欠といえる。

こうした問題を解決する方法として動的分子間力分光法 (Dynamic Force Spectroscopy : DFS) がある³⁻¹⁵⁾。DFS は結合している分子に直接動的に力を印加して結合を破断させ, そのときの破断力と力の印加速度 (Loading rate) の関係から分子間相互作用ポテンシャルを求める手法である。DFS は特定の2分子間相互作用ポテンシャル曲線および2分子間結合寿命を導出可能である点が特に優れている。

しかし、バイオメンブランフォースプローブを用いた従来の DFS 測定⁴⁾では、フォースプローブのバネ定数を 0.1–3.0 pN/nm と小さくできる点で優れている反面、サンプリングレートが 1 kHz 程度と低いため、高速に分子を引っ張るところでは正確な破断力を見積ることができない。また、装置が特殊で、温度変化や溶媒効果の測定には不向きであるため、環境変化に伴うポテンシャル曲線の精密な測定・評価には不十分である。そこで、我々は、まず、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて精密に DFS 測定を行うことが可能なシステムを開発した^{3,9)}。AFM は原子あるいは分子というスケールの空間分解能を持ち、印加する力を高精度で制御可能という利点があり^{5–9)}、サンプリングレートも 100 kHz まで高めることができる。また、温度変化や溶媒効果などの環境変化による局所的な相互作用変化を観察することも可能である。同システムの構築により、機能性分子の局所的な相互作用を評価することが可能になり、複数のポテンシャルを持つ分子を対象として詳細な解析が可能となった。本稿では、この装置を用いて、抗原抗体反応や分子マーカーとして有名な Streptavidin-Biotin 相互作用の DSF 解析を行い、Streptavidin と表面との化学結合の状態を操作する新しい手法と組み合わせることで、複数のポテンシャルを分離して解析することを可能にした研究³⁾について紹介する。

2. 実 験

AFM と DFS を組み合わせたシステムを構築するにあたり、DFS の理論を見直してみる^{3,4,9–15)}。2 分子間の結合ポテンシャルは、機能性分子の複雑な立体構造に起因したファンデルワールス力や静電気力、溶媒和の影響を強く受けることになるが、これらの影響を簡略化して、一次元の反応経路に、結合を破断させるのに必要な破断エネルギー障壁の一つ持つポテンシャルを考える。

結合した分子をそれぞれの側から引っ張り力を印加する。この時、外力によるポテンシャルの変化が主にエネルギー障壁の高さを変化させ、ポテンシャル形状変化への影響が小さいと仮定すると、印加した力のポテンシャルとの和によって分子間のポテンシャル曲線が変化する (Fig. 1)。印加する力の増加速度 (Loading Rate) が大きくなるほど大きな力で破断が生じることになる。このとき、破断する方向の反応速度は、

$$k_{-}(f) = \frac{1}{t_0} \exp(-E_b(f)/k_B T) \\ = \frac{1}{t_0} \exp(-(E_b(0) - fx_b)/k_B T) \quad (1)$$

ここで、 f は外力であり、 x_b は反応経路上で最安定位置

から測った障壁位置、 t_0 は結合寿命である。

破断は確率的に起こるので、個々の障壁に対しては、以下のように破断の過程を統計的に扱うことにより破断の確率分布を得ることができる。時刻 t において分子が結合状態にある確率を $S(t)$ とする。 $t=0$ において分子は結合状態にあるので、 $S(0)=1$ と表される。単位時間あたりの S の減少を表すと、

$$\frac{dS(t)}{dt} = -k_{-}(f(t))S(t) \quad (2)$$

となる。式 (2) を力のスケールに変更して

$$\left. \frac{d^2 S}{df^2} \right|_{f=f^*} = 0 \quad (3)$$

として積分すると、

$$f^* = k_B T/x_b \{ \ln(r_f) + \ln[\partial \ln(k_{-})/\partial f - \partial \ln(r_f)/\partial f]_{f=f^*} \} \quad (4)$$

f^* は最頻破断力である。

ここで、 r_f が一定の場合、 $\partial \ln(k_{-})/\partial f = 1$ 、 $\partial \ln(r_f)/\partial f = 0$ なので、最頻破断力 f^* は式 (5) に示すように力の印加速度 ($r_0 = df/dt$) の対数と直線関係になる⁹⁾。

$$f^* = k_B T/x_b \{ \ln(r_0) + \ln(t_0 x_b/k_B T) \} \quad (5)$$

式 (5) において、傾きはポテンシャル障壁の位置 x_b に依存しているので、力の印加速度 r_0 を変えて最頻破断力を求め、 r_0 の対数に対してプロットすると、直線の傾きからポテンシャル障壁の位置が求まることになる。

また、 r_0 が一定の場合、式 (2) は、

$$\frac{dS}{dt}(f) = P(f) \\ = C \exp\{(f-f^*)x_b/k_B T\} \exp[1 - \exp\{(f-f^*)x_b/k_B T\}] \quad (6)$$

である。ここで、 $P(f)$ 、 f 、 f^* 、 x_b 、 k_B 、 T および C はそれぞれ、破断頻度、破断力、最頻破断力、ポテンシャル障壁位置、ボルツマン定数、温度および定数である。ポテンシャル障壁を越えて起こる破断は、式 (6) のように最頻破断力 f^* を中心とする確率分布で表される⁹⁾。

AFM を用いて DFS 測定を行う場合、カンチレバーに分子鎖を修飾し、その分子鎖の先に測定対象とする機能性分子を固定する必要がある。これは、タンパク質などの分子では、カンチレバー先に直接分子を付けた場合、立体障害やカンチレバー先の質量などが問題になるからである。しかし、分子鎖をカンチレバー先に修飾した場合、分子を引っ張る際に分子鎖が伸びるため、力の印加速度 r_0 を一定に保つことが難しくなる^{9–15)}。カンチレバーを分子から離す速度が一定では必ずしも r_0 一定を保証しないからである。式 (5) および式 (6) は、 r_0 が一定であることを前提として導かれるため、印加する力

を制御して条件を満たす必要がある^{3,9)}。我々は、AFM にデジタル信号処理装置 (DSP) を組み合わせ、計測された力をフィードバックし、力の印加速度 r_0 を高精度に制御するよう装置を改良した^{3,9)}。サンプリングレ-

率は 100 kHz が可能である。

試料は分子標識などに用いられ、ligand-receptor では代表的な Streptavidin-Biotin^{18,19)}を用いた。Streptavidin は筒状の構造で、Streptavidin と Biotin は (1) アミノ酸残基 ASP128 や TYR43 との水素結合で形成される一番内側にある結合サイト、(2) SER45 や THR90 との水素結合で形成される中間の結合サイト、および (3) ASN49 や SER88 との水素結合で形成する一番外側の結合サイトで結合している。内側にあるアミノ酸残基の ASP128 から外側の SER88 までの距離はおよそ 1 nm である。結合ポテンシャルはこれら (1), (2) および (3) のアミノ酸残基との結合によって形成されており、極めて強固な結合を有している。

過去の DFS では、Streptavidin-Biotin のポテンシャル障壁を二つ (0.12 nm および 0.5 nm) 観察しており、MD 計算に基づいて、二つの障壁は、内側のアミノ酸残基との直接結合で生じる障壁とアミノ酸残基と水分子が架橋して生じた障壁であると報告されている⁴⁾。しか

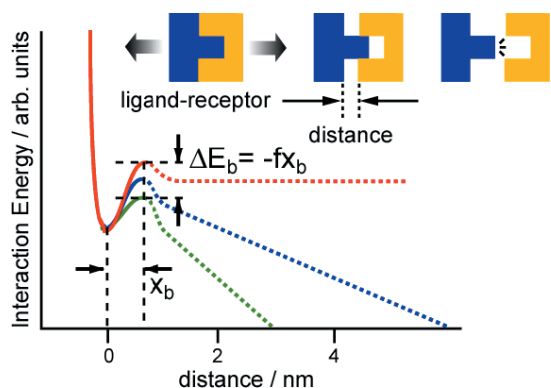


Fig. 1. Schematic diagram of the mechanism of Dynamic Force Spectroscopy.

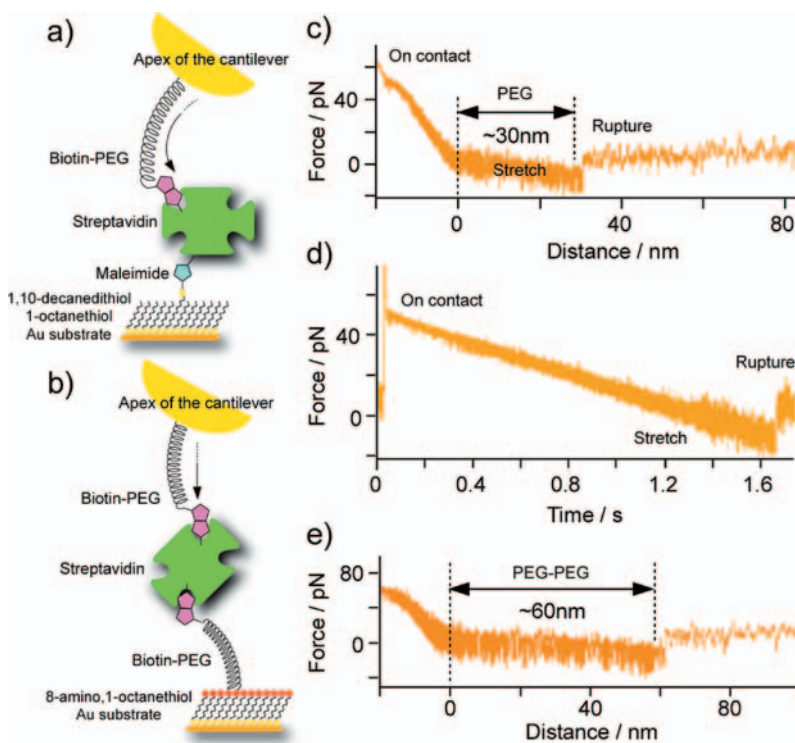


Fig. 2. Schematic illustrations of site-selective analysis using two types of cross-linker : (a) streptavidin is fixed to a SAM of 1, 10-decanedithiol/ 1-octanethiol (1/100 ratio) mixed solution on a Au-coated substrate via a streptavidin-maleimide structure, (b) streptavidin is fixed to a self-assembled monolayer (SAM) of 8-amino, 1-octanethiol molecules on a Au-coated substrate via a biotin-PEG-COO-NHS molecule. Two different forms of typical force curves obtained under the condition of Fig. 2 (a) as functions of (c) distance and (d) time. (e) Typical force curve obtained under the condition of Fig. 2 (b).

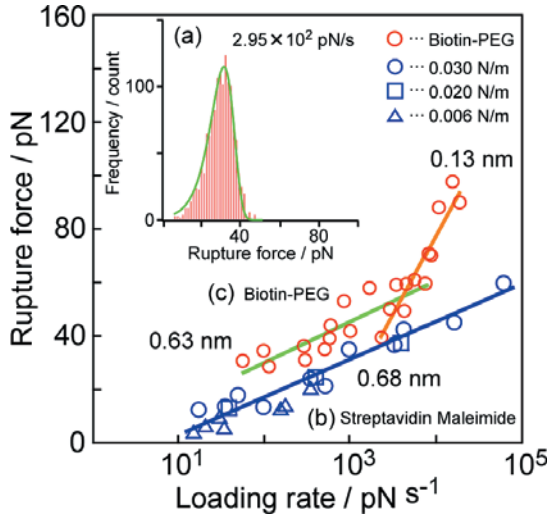


Fig. 3. (a) Typical histogram of rupture forces obtained for the condition of Fig. 2 (a) at the loading rate of 2.95×10^2 pN/s. Solid green line represents the theoretical fitting curve obtained using eq. 5 based on the method of analysis proposed in ref. 9. (b) and (c) indicate the relationship between the most frequent rupture force and the logarithm of the loading rate obtained in a 0.01 M phosphate (pH 7.4) solution with the conditions represented by Fig. 2 (a) and 2 (b), respectively. The barrier positions obtained from these using the least-squares fitting are estimated to be (b) 0.68 ± 0.05 nm and (c) 0.63 ± 0.09 and 0.13 ± 0.01 nm.

し、これまでの手法では、力の印加速度 r_0 が大きいところではサンプリングレートが十分ではないため、また、 r_0 が小さいところでは r_0 の値を一定に保つことが難しく、それぞれ、正確な破断力を得ることが困難で、障壁の詳細を議論するには十分ではなかった。実際、過去の論文を比較してみると、ある印加速度における破断力の値は文献の間で一致しておらず、障壁位置や結合寿命もまちまちである³⁻⁹⁾。

また、ポテンシャル障壁の数は議論しているものの、どの反応サイトのアミノ酸残基から生じる障壁であるのか、どのアミノ酸残基と架橋して生じた障壁であるのかという、機能性分子の特長を決定する局所的な結合ポテンシャルの明確な解析は行われていない。本研究では、(1) 新しく開発した AFM を用いることで、従来行われていなかった、力の印加速度一定での精密な DFS 解析を行うことを可能にし、(2) Streptavidin を表面に固定する際、Biotin-PEG 分子を用いて固定する方法と maleimide 基を用いて直接固定する方法で、Streptavidin-Biotin の相互作用ポテンシャルとの結合の深さを変更し、内側のポテンシャル障壁と外側のポテンシャル障壁を個々に観察することを試みた。

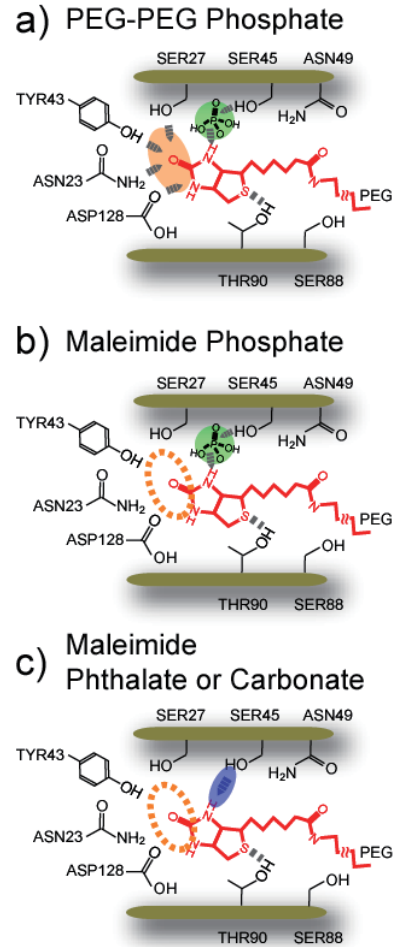


Fig. 4. Schematic illustrations of bond structures between biotin and streptavidin molecules discussed in this study: (a) and (b) under the conditions of Fig. 2 (b) and 2 (a) in a phosphate buffer solution, respectively. (c) under the condition of Fig. 2 (a) in a phthalate or a sodium carbonate buffer.

AFM を用いて DFS 解析を行う場合、Streptavidin を観察表面に固定し、カンチレバーの先に分子鎖と Biotin を固定する必要がある。結合サイトを選択的に解析することを目的として二つの条件で試料を製作した。Fig. 2 (a) および (b) に概念図を示すように、一方は、maleimide で Streptavidin を基板の近傍に固定、他方は、Biotin-PEG を用い、Streptavidin を固定した。後者は、前者に比べ自由な動きも期待される。カンチレバーは Olympus 社製 Bio-Lever 0.006 N/m, 0.030 N/m と AC-Lever 0.020 N/m の 3 つを使用した。

DFS 測定は液中、室温で行い、水溶液は pH7.4 0.01 M リン酸緩衝溶液である。実験はこれら反応させた表面およびカンチレバーを組み合わせて実験を行った。異なるそれぞれの印加速度 r_0 に対しフォースカーブを 5000-10000 回測定して破断力を見積もり、ヒストグラムを作

成した。

3. 結果および考察

Fig. 2 (c) に、Fig. 2 (a) の固定方法で、pH7.4 0.01 M リン酸緩衝溶液で測定した場合の、Biotin と Streptavidin の破断力を測定したフォース曲線を示す。Fig. 2 (c) において、表面から離れたカンチレバーの距離に対する印加された力の増加量は一定ではないが、Fig. 2 (d) において、時間に対する力の増加量は一定になっている。すなわち、DSP を用いたフォースフィードバックは力の印加速度一定を十分実現している。

Fig. 2 (e) に、Fig. 2 (b) で固定したときのカンチレバーの距離に対するフォース曲線を示す。Fig. 2 (c) の場合、破断が起こるまでの距離はおおよそ 30 nm で、これはカンチレバー先端の Biotin-PEG-COO-NHS の長さが 30 nm 程度であることを示しており、分子量 3400 の PEG 分子の長さに一致している。一方、Fig. 2 (e) の場合は、おおよそ 60 nm で破断が起こっている。これは PEG 分子の長さの 2 倍に相当し、このことから、Streptavidin が Fig. 2 (b) に示す通り、表面に PEG 分子を介して固定されていることがわかる。測定を 100 kHz の帯域で行っているため、市販の AFM では均されているカンチレバーの揺らぎが観られ、カンチレバーが表面から離れると振幅が増す様子が確認される⁹⁾。測定したフォースカーブは、自動解析のプログラムを用い、カンチレバーに力がかかっていない点を力 0 の点として破断点の値を決定する。複数破断がある場合は、そのフォースカーブは除去される。

Fig. 3 (a) に力の印加速度一定で測定した破断力のヒストグラムを示す。縦軸が破断頻度、横軸が破断力である。最頻破断力は、力の印加速度が 2.95×10^3 pN/s において、31.0 pN となった。式 (6) を用いると、破断力のヒストグラムの幅からポテンシャル障壁位置 x_b を求めることができ、0.69 nm と見積もられた⁹⁾。

Fig. 3 (b) および (c) に力の印加速度 r_0 の対数に対する最頻破断力をプロットした結果を示す。Fig. 3 (b) および (c) の結果は、それぞれ Fig. 2 (a) および (b) の方法で作成した構造の試料を用いて得られたものである。

Fig. 3 (b) において、各カンチレバーのバネ定数は 0.030 N/m (Bio-Lever)、0.006 N/m (Bio-Lever) および 0.020 N/m (AC-Lever) である。形状は Bio-Lever が長方形、AC-Lever が三角形である。バネ定数および形状は 3 つのカンチレバーで異なっているが、3 つのカンチレバーはすべて同じ直線となった。これは、AFM を用いた DFS 測定が、カンチレバーの形状 (長方形および

三角形)、カンチレバー先端の物質 (Au coat および Non-coat 窒化ケイ素) およびバネ定数 (0.006 N/m、0.020 N/m および 0.030 N/m) によって影響を受けないことを示している。

Fig. 3 (b) の傾きから、式 (5) を用いて障壁位置を見積もった結果、0.68 nm となった。この値は、先のヒストグラムに式 (6) をフィッティングした結果から得られた障壁位置によく一致しており、測定の正しさと、力の印加速度一定を精密に実現し DFS 測定を行えば一つのヒストグラムの幅からポテンシャル障壁位置を得ることは十分可能であることを示している^{3,9)}。

Fig. 3 (c) では、力の印加速度が 2×10^3 pN/s 以上のところで急激に傾きが変化した。傾きから求めたポテンシャル障壁位置は 0.13 nm と 0.63 nm となった。これは過去に報告されているポテンシャル障壁位置である 0.12 nm および 0.50 nm に一致している⁴⁾。また、0.63 nm は Streptavidin-maleimide を用いた Fig. 3 (b) の障壁位置 0.68 nm に一致している。0.13 nm の障壁位置は、Streptavidin の奥の反応サイトにあるポテンシャル障壁で、0.63 nm はそれよりも浅い位置にあるポテンシャル障壁であると考えられる。

表面と Streptavidin の間に PEG 分子がある場合は障壁が二つ観察され、表面との間に PEG 分子がない場合には障壁が一つ観察される結果になった。Fig. 3 (b) では Streptavidin が maleimide によって固定されているため、自由度が制限されることや、基板上の Streptavidin が表面からの疎水的な影響を強く受けることで、深い位置にある障壁による結合が阻害され、浅い位置にある障壁のみを観察できると考えている。

以上の結果を基に、どの反応サイトのアミノ酸残基から生じる障壁であるのかを考察する。0.13 nm の障壁位置は、Streptavidin の奥の反応サイトにあるポテンシャル障壁で、ASP128 や ASN23 などの深い位置にあるアミノ酸残基との直接結合から生じたポテンシャル障壁であると考えられる (Fig. 4 (a) を参照)。実際、過去の報告からも同様のことが言われており⁴⁾、また、Molecular Dynamics (MD) による計算^{16,17)}からも、破断距離が 0.2 nm より短いものは ASP128 や TYR43 などの、奥にあるアミノ酸残基との直接結合だと報告されている。

0.68 nm および 0.63 nm の位置にある障壁については、より詳細に検討するため、緩衝溶液の種類を変更し DFS を行った。過去の報告⁴⁾から言われているように 0.68 nm および 0.63 nm の位置にある障壁が Streptavidin のアミノ酸残基と Biotin の反応サイトとの間を架橋する水分子から生じるのであれば、緩衝溶液を変更しても障壁位置には変化が現れないと予想されるが、塩分子か

Table 1. Results obtained in this study.

pH	Fix type	Buffer solution	Potential barrier position(x_b)			
pH 7.4	Maleimide	Phosphate	—	—	0.68 nm	—
pH 4	Maleimide	Phthalate	—	0.29 nm	—	4.0 nm
pH 10	Maleimide	Carbonate	—	0.24 nm	—	1.4 nm
pH 7.4	PEG-PEG	Phosphate	0.13 nm	—	0.63 nm	—
pH 6.8	R. Merkel et al. ⁴⁾	Phosphate	0.12 nm	—	0.50 nm	—
Bonding type			Direct bond	Direct bond	Salt bridge	—
Amino acid residue			ASP128, TYR43, ASN23	SER27, SER45	SER27, SER45	—
Barrier positions by MD ¹⁷⁾		—	0.10 nm	0.26 nm	—	—
Reaction area			inner	middle	—	—

ら生じたものであるならば、緩衝溶液の分子を変更すれば障壁位置に変化が現れるはずである。

緩衝溶液をリン酸からフタル酸および炭酸へ変更した場合、0.2-0.3 nm 付近に障壁位置を確認できたが、0.6-0.7 nm 付近の障壁は観察されなかった。リン酸緩衝溶液では反応系や pH によらず 0.6-0.7 nm 付近の障壁を観察できたが 0.2-0.3 nm 付近の障壁位置は確認できなかった。これらの結果から、0.6-0.7 nm 付近の障壁は Biotin と Streptavidin のアミノ酸残基がリン酸イオンと架橋したために生じた障壁 (Fig. 4 (b) を参照)、0.2-0.3 nm 付近の障壁はアミノ酸残基との直接結合から生じた障壁であると考えられる (Fig. 4(c) を参照)。2-iminobiotin と Streptavidin の系では、硫酸イオンが SER27 と SER45 に架橋しているという報告があり¹⁸⁾、硫酸イオンと同様の過程がリン酸イオンでも生じていると思われる。緩衝溶液がフタル酸および炭酸の場合、0.2-0.3 nm 付近の障壁以外に 4.0 nm および 1.4 nm に障壁が現れた。内側のアミノ酸残基である ASP128 と外側のアミノ酸残基である SER88 の距離がおよそ 1 nm であることを考慮すると、これらの障壁は対象とするサイト以外の結合であると考えられる。詳細は現在検討中である。

この結果を MD と比較してみる¹⁷⁾。まず、0.2-0.3 nm 付近の障壁を比べてみると、MD 計算¹⁷⁾では、0.26 nm に SER45 と Biotin の結合で生じる障壁が存在する。このことから、0.2-0.3 nm 付近の障壁はアミノ酸残基との直接結合から生じた障壁であると考えられる (Fig. 4 (b))。一方、0.6 nm 付近の障壁については、MD 計算¹⁷⁾では 0.4 nm 以上の距離には結合ポテンシャルが現れていないが、これは緩衝液の分子が計算に入れられていないため、アミノ酸残基と緩衝溶液中の分子が架橋するとき生じる障壁を考慮されていないからである。したがって、SER45 とリン酸塩の架橋によって、0.26 nm の位

置にある SER45 と Biotin の結合で生じる障壁を変化させ、0.6-0.7 nm 付近の障壁になると考えられる (Fig. 4 (b))。フタル酸や炭酸の緩衝溶液を用いた場合で観察された 0.2-0.3 nm 付近の障壁がリン酸塩では観察されず、リン酸塩で観察された 0.6-0.7 nm 付近の障壁が、フタル酸や炭酸では観察されなかった結果は、このことを示唆している。観察された障壁位置を **Table 1** にまとめた。

こうして、個々のサイトでの結合の様子を詳細に解析することが可能になったことで、分子間相互作用の反応機構を、単一分子レベルで段階的に理解することも可能になるが、詳細は文献を参考にされたい³⁾。

4. ま と め

精密な DFS 測定を可能にする AFM のシステムを開発し、分子の固定法と組み合わせることで、Streptavidin-Biotin 分子間相互作用ポテンシャルの詳細を解析した。Streptavidin を表面に直接固定した場合、浅い位置にあるポテンシャル障壁のみが観察され、その位置は 0.68 nm で架橋による結合であることが示された。一方、Streptavidin を、PEG 分子を介して表面に固定した場合、浅いサイトに加えて深い位置にあるポテンシャル障壁も観察され、その位置は 0.13 nm と、深いサイトでの結合が直接結合であることが明らかになった。また、AFM では、溶媒の種類を変えることも可能で、これまで水分子により架橋されていると考えられてきた浅いサイトの結合が、リン酸分子の架橋によることが明らかになった。

個々のサイトでの結合の様子を詳細に解析することが可能になったことにより、分子間相互作用の反応機構を単一分子レベルで段階的に理解するなど、今後、新たな展開が期待される。

本研究は科研費（若手研究 B）19710109 の助成を受けたものである。

文 献

- 1) J.D. Badjic', V. Balzani, A. Credi, S. Silvi and J.F. Stoddart : *Science* **303**, 1845 (2004).
- 2) S. Yasuda, I. Suzuki, K. Shinohara and H. Shigekawa : *Phys. Rev. Lett.* **96**, 228303 (2006).
- 3) A. Taninaka, O. Takeuchi and H. Shigekawa : *Appl. Phys. Express*, in press.
- 4) R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie and E. Evans : *Nature* **397**, 50 (1999).
- 5) C. Yuan, A. Chen, R. Kolb and V.T. Moy : *Biochemistry* **39**, 10219 (2000).
- 6) A.B. Patel, S. Allen, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler and P.M. Williams : *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 1318 (2004).
- 7) M.O. Piramowicz, P. Czuba, M. Targosz, K. Burda and M. Szymoński : *Acta Biochimica Polonica* **53**, 93 (2006).
- 8) J. Wong, A. Chilkoti and V.T. Moy : *Biomolecular Engineering* **16**, 45 (1999).
- 9) O. Takeuchi, T. Miyakoshi, A. Taninaka, K. Tanaka, D. Cho, M. Fujita, S. Yasuda, S.P. Jarvis and H. Shigekawa : *J. Appl. Phys.* **100**, 074315 (2006).
- 10) E. Evans and K. Ritchie : *Biophys. J.* **72**, 1541 (1999).
- 11) E. Evans and K. Ritchie : *Biophys. J.* **76**, 2439 (1999).
- 12) A. Pierres, D. Touchard, A.-M. Benoliel and P. Bongrand : *Biophys. J.* **82**, 3214 (2002).
- 13) C. Friedsam, A.K. Wehle, F. Kühner and H.E. Gaub : *J. Phys. : Condens. Matter* **15**, S1709 (2003).
- 14) F. Pincet and J. Husson : *Biophys. J.* **89**, 4374 (2005).
- 15) J. Husson and F. Pincet : *Phys. Rev. E* **77**, 026108 (2008).
- 16) H. Grubmüller, B. Heymann and P. Tavan : *Science* **271**, 997 (1996).
- 17) J. Zhou, L. Zhang, L. Yongsheng, H.-K. Tsao, Y.-J. Sheng and S. Jiang : *J. Chem. Phys.* **125**, 104905 (2006).
- 18) P.C. Weber, D.H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski and F.R. Salemme : *Science* **243**, 85 (1989).
- 19) B.A. Katz : *J. Mol. Biol.* **274**, 776 (1997).