

研 究 報 告 書

「ビデオフレーム液中原子分解能AFMの開発」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：福間 剛士

1. 研究のねらい

原子間力顕微鏡(AFM)は、液中動作が可能であるため液中での生体分子イメージングへと従来から用いられてきた。しかしながら、原子スケールの構造・物性計測や原子操作を実現している超高真空AFMに比べ、液中AFMの性能は大きく劣っていた。超高真空中における原子分解能観察は、周波数変調AFM(FM-AFM)と呼ばれる動作モードを用いることにより実現していたが、これを液中で動作させることは非常に困難であると予想されていた。我々は、そのような予想を覆して、これを実現する技術を2005年に開発し、FM-AFMによる液中原子分解能観察を世界で初めて実現した。さらに、この技術を用いて生体分子や水和層などの、従来観察できなかった対象の原子・分子スケール観察を実現してきた。しかしながら、液中FM-AFMを生命現象の計測分析へと応用するためには、動作速度が遅すぎるという大きな問題があった。FM-AFM技術は、従来、超高真空中における原子レベルで平坦な表面の精密分析に用いられてきた。そのため、FM-AFMの典型的な動作条件は、1 frame/min以下の速度で、0.1 nm以下の凹凸を持つ表面を、 $10 \times 10 \text{ nm}^2$ 以下の走査範囲でイメージングするというものであり、比較的大きな揺動、凹凸、不均一性を持つ生体試料の表面を観察するためには、動作速度が不足している場合が多く、その応用範囲は限られていた。本研究では、この問題を克服するために、原子分解能を有する液中FM-AFMの動作速度を飛躍的に向上させる技術の開発に取り組んだ。さらに、開発した技術を用いて、従来技術では不可能だった生命現象の計測分析をサブナノメートル分解能で実現することを目標とした。

2. 研究成果

液中 FM-AFM の高速化

図1に、FM-AFMの装置構成を示す。AFMでは、鋭く尖った探針を先端に有する片持ち梁(カンチレバー)を力検出器として用いる。FM-AFMでは、このカンチレバーを機械的にその共振周波数で振動させ、それを試料表面へと近付ける。すると、探針-試料間に相互作用力が働き、カンチレバーの共振周波数がシフトする。この周波数シフト量を一定に保つように、探針-試料間距離を制御する。この状態で、試料を水平方向に走査すると、試料の垂直位置は試料表面の凹凸をなぞるように上下する。したがって、試料の垂直位置に比例した信号であるZスキャナの制御信号を、XYスキャナの制御信号に対して記録すれば、表面形状像が得られる。

FM-AFMの動作速度を向上させるためには、探針-試料間距離制御ループを構成するすべての要素を高速化する必要がある。本研究では、まずこれらの構成要素の動作速度を改善するための装置開発に取り組んだ。プリアンプ回路を改良することで、帯域を1 MHzから10 MHzに向上させた。カンチレバーの励振法をピエゾ励振法から光熱励振法へと改良することで、励振帯域を1 MHzから25 MHzに向上させた。位相同期ループ(PLL)回路の内部で使われる位相比較器を乗算式から減算式に変更することで、周波数検出帯域を1 kHzか

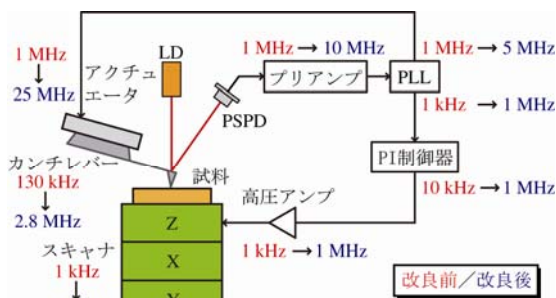


図1. FM-AFMの装置構成. 赤字と青字で示した周波数は、各構成要素の帯域または共振周波数の改良前後の数値である。

ら 1 MHz へ、カンチレバー励振帯域を 1 MHz から 5 MHz へと向上させた。PI 制御回路を高速 FPGA 回路へと組み込むことで、その帯域を 10 kHz から 1 MHz へと向上させた。高圧アンプ回路を改良することで、その帯域を 1 kHz から 1 MHz に向上させた。Z スキャナの新たな支持方法を提案し、その共振周波数を 1 kHz から 540 kHz へと向上させた。カンチレバーを小型化することで、共振周波数を 130 kHz から 2.8 MHz に向上させた。

これらの改良の結果、各構成要素の動作帯域を格段に向上させることに成功した。ただし、高いフレームレートでの高速 AFM イメージングを実現するためには、これらの要素技術を統合するためのシステム開発が必要となる。その中心となるのが、FPGA 回路を制御するファームウェアと、ホスト PC を制御するソフトウェアの開発である。これまで 2 年以上にわたって、これらのプログラムの開発に取り組んできており、あと少しで高速 AFM 動作を実現できる段階まで来ている。

高速イメージングの実現にまでは至らなかったが、AFM の構成要素を高速化することで、これまで不可能だった様々な計測が実現可能になった。なかでも、固液界面における 3 次元力分布計測の実現は最も大きな成果と言える。従来の AFM では、探針の試料表面からの高さを一定に保ちながら、試料を水平に走査することで、2 次元的な凹凸像を得る手法であった。しかし、固液界面では、固体表面と水分子が相互作用することによって、水分子の分布に局所的な偏りがみられ、その分布は 3 次元的な広がりを持っている。したがって、従来の AFM で得られる 2 次元画像では 3 次元的な広がりを持って生じる水和現象を計測・分析することが不可能に近かった。そこで我々は、従来の 2 次元走査型原子間力顕微鏡 (2D-SFM: 図 2(a)) を発展させた 3 次元走査型原子間力顕微鏡 (3D-SFM: 図 2(b)) を開発した。3D-SFM では、探針を水平方向に走査させると同時に、探針—試料間距離の制御帯域よりも高速に探針を Z 方向に走査させ、その間に生じる周波数シフト量の変化をリアルタイムに高速記録する。これにより、固体表面近傍の 3 次元空間 (固液界面空間) における 3 次元的な力分布を可視化できるようになった。たとえば、図 2(c) に示した 3D-SFM 像では、マイカ/水界面に形成された水和層と、マイカ表面に局所的に存在する吸着水の分布を反映した力分布が明瞭に観察されている。この結果は、X 線反射率測定やモンテカルロシミュレーションの結果とも良い一致を示している。固液界面の水分子の 3 次元分布を原子スケールの分解能で可視化できる技術はこれまでになく、生物学分野のみならず、触媒・摩擦・電気化学など水和が関係する様々な研究開発分野での応用が期待される。

液中 FM-AFM による生体分子イメージング

液中 FM-AFM を用いることで、生体試料の構造やその表面における水和分布をサブナノメートルスケールの分解能で可視化することができる。本研究で行った装置開発により、従来よりも動作速度が改善され、3 次元計測機能も備えた FM-AFM が利用可能となった。本研究では、この装置を用いて、モデル生体膜やチューブリン集合体の研究を行った。

我々はこれまで、液中 FM-AFM を用いてマイカ基板上に作製した DPPC 脂質二重層と PBS 溶液の界面を分子分解能で観察する研究を行ってきた。本研究では、この研究をさらに発展させて、DPPC/コレステロール (1:1) 混合膜を PBS 溶液中で観察した。図 3(a) にその

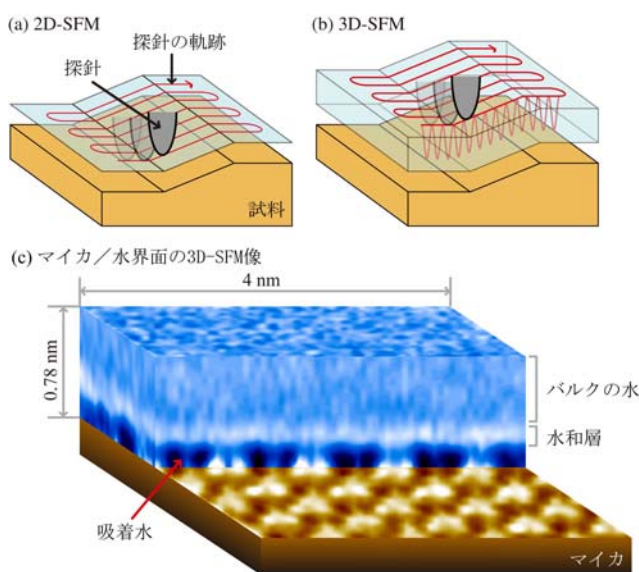


図 2. (a)2D-SFM と(b)3D-SFM の動作原理. (c)マイカ/水界面の 3D-SFM 像.

FM-AFM 像を示す。この FM-AFM 像では、左上から右下にかけて伸びる 0.71 nm 間隔のストライプ構造と、それを構成する 0.46 nm 間隔の輝点がそれぞれ観察されている。この FM-AFM 像を DPPC 二重層の FM-AFM 像と比較し、過去の文献の結果などを考慮して、我々は図 3(b)に示すような分子モデルを提案した。すなわち、この FM-AFM 像にみ

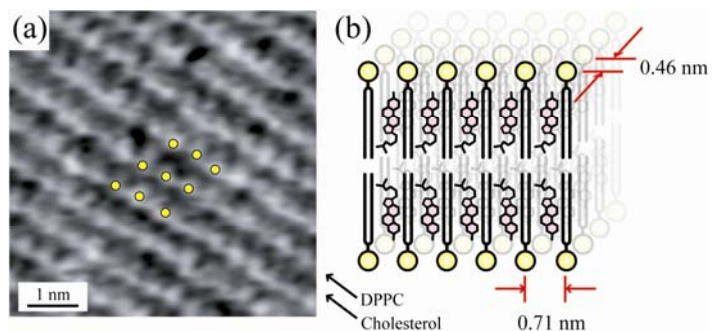


図 3. PBS 溶液中で取得した DPPC/コレステロール(1:1) 混合膜の FM-AFM 像と、(b)その構造モデル。

られるストライプ状の構造が DPPC 分子列に相当し、DPPC 分子列の間にコレステロール分子列が挿入されているというモデルである。このようなモデルは過去に MD シミュレーション等で短距離的な規則構造として予測されていたものではあるが、実験的に確認されたのはこれが初めてである。また、DPPC 膜と比べると、DPPC/コレステロール混合膜では、分子レベルの欠陥の増加、分子列の規則性の低下などが確認された。このような違いも分子レベルの観察で初めて明らかとなったものである。これらの結果は、コレステロールの挿入によって脂質膜の膜強度が増加し、分子流動性が増大するという、膜物性への影響の分子レベルの起源を明らかにするものであり、非常に有用な情報である。

3. 今後の展開

本研究により、液中 FM-AFM を高速化するための要素技術は、ほぼその開発を終了した。今後は、それらの要素技術の実用性を改善し、さらにそれらを統合して AFM システムとして動作させるための開発を進める。これにより、液中 FM-AFM の探針位置制御速度は飛躍的に向上し、より不均一で、凹凸が大きく、揺動するナノバイオ界面を可視化できる技術へと発展させていきたい。また、3次元計測技術については、これまでは水平方向の高分解能観察を実現するために、比較的小さな観察範囲を対象に実験を行ってきたが、より大きな観察範囲での3次元計測を行えるよう装置を改良し、ナノスケールの異種ドメイン間での水和構造・揺動構造の違いなどを可視化できる技術へと発展させていきたい。

本研究では、液中 FM-AFM を用いてモデル生体膜とチューブリン分子集合体の観察を行ってきた。モデル生体膜に関しては、これまで室温で安定なゲル相をとる DPPC 脂質膜、さらにそれにコレステロールを加えた DPPC/コレステロール混合膜を観察してきた。これらは、いずれも室温において比較的安定な構造をとっており、個々の分子を観察したり、それらと水分子との相互作用を計測するにはよい対象であった。しかし、今後は、よりダイナミックな動きを伴う脂質膜の挙動を調べるために、DPPC やスフィンゴ脂質などの飽和炭素鎖を持つ脂質分子と、DOPC などの不飽和炭素鎖を持つ脂質分子とコレステロールの3種類の分子を含む混合膜を用いて、そこに形成されるラフト構造と水和構造の関係を調べたい。さらに、その水和構造が、膜表面とタンパク質やペプチドとの相互作用に与える影響を分子レベルで調べたい。一方、微小管については、これまでチューブリン分子のシート状集合体を観察してきたが、最近ようやく微小管の構造を形成し、その表面における観察が可能になってきた。今後は、微小管の表面において C 末端の構造をサブナノスケールで観察していきたい。ここで、C 末端の構造は3次元的な揺らぎを持っている可能性が示唆されているため、我々の開発した3次元計測技術を用いて、揺動する C 末端の3次元分布を直接可視化したい。そして、その構造が分子種によって、または化学修飾前後に、どのような違いを示すのかを明らかにしたい。さらに、そのようなサブナノレベルの構造変化が、微小管とモータータンパク質との相互作用の制御にどのような役割を果たしているのかを明らかにしたい。

4. 自己評価

本研究では、液中 FM-AFM を高速化することで、大きな揺動、凹凸、不均一性を持つ生体試料の表面をサブナノメートルスケールで可視化できる技術を開発することを目標として研究を行った。その結果、液中 FM-AFM の構成要素を高速化する多くの要素技術が開発され、異種分子で構成されたモデル生体膜や、多数のチューブリン分子の集合体をサブナノメートルで観察できるようになった。FM-AFM 装置全体を高速化し、生体分子の動的挙動をサブナノメートルで可視化するところまでには至らなかったものの、そのための基盤を築くことができた。この結果をもとに、今後2、3年の間に、当初の目標が達成できるものと確信している。

また、高速化によって、生体分子／生理溶液界面において、揺動する水分子の3次元分布や、揺動する生体分子の3次元構造などが、直接サブナノスケールの分解能で可視化できる計測技術を開発することができた。この技術の開発は、当初の目的にはなかったが、このさきがけ研究を進めていく中で、その必要性に気づき、それを実現させたものである。明確な必要性があって、開発したため、開発直後から、その有用性を示すデータがいくつも得られている。この技術は、生命現象の計測分析はもちろん、固液界面現象を扱うあらゆる学術・産業分野での研究開発に寄与するものと確信している。

当初の研究計画の達成度としては7-8割程度と考えるが、その不足を補って余りある、大きな成果が、当初の計画になかった部分で得られている。したがって、総合して考えると当初目標としていた以上の大きな成果が得られたと考えている。

5. 研究総括の見解

FM-AFM を高速化することで生体膜構造(モデル膜)を原子分解能で3D イメージングする方法を開発したことは大きな成果である。高く評価したい。これには様々の要素技術の積み重ねがあってこそその成功だと思う。脂質-水界面における水和層の構造を可視化出来ただけでなく、微小管中にあるチューブリン分子のヘリックス構造が見えるようになったことは素晴らしい。さらに技術改良によって時間分解能を高めていただきたい。また、実際の生体膜とくにラフト構造も観測していただきたい。とにかく画期的な成果を挙げつつあると言えよう。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

<ul style="list-style-type: none"> • T. Fukuma, Y. Ueda, S. Yoshioka, H. Asakawa, “Atomic-Scale Distribution of Water Molecules at the Mica-Water Interface Visualized by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy”, Phys. Rev. Lett. 104 (2010) 016101.
<ul style="list-style-type: none"> • Y. Mitani, M. Kubo, K. Muramoto, T. Fukuma, “Wideband digital frequency detector with subtraction-based phase comparator for frequency modulation atomic force microscopy” Rev. Sci. Instrum. 80 (2009) 083705.
<ul style="list-style-type: none"> • H. Asakawa, T. Fukuma, “The molecular-scale arrangement and mechanical strength of phospholipid/cholesterol mixed bilayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy in liquid” Nanotechnology 20 (2009) 264008.
<ul style="list-style-type: none"> • T. Fukuma “Wideband low-noise optical beam deflection sensor with photothermal excitation for liquid-environment atomic force microscopy” Rev. Sci. Instrum. 80 (2009) 023707.
<ul style="list-style-type: none"> • T. Fukuma, Y. Okazaki, N. Kodera, T. Uchihashi, T. Ando, “High resonance frequency force microscope scanner using inertia balance support” Appl. Phys. Lett. 92 (2008) 243119.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 8 件(海外 4 件、国内 4 件)

発明者: 福間剛士、岡崎康孝、安藤敏夫
発明の名称: 走査型プローブ顕微鏡用のスキャナ装置
出願人: 金沢大学
出願日: 2008/6/4(国内出願)、2009/5/29(PCT 出願)

発明者: 福間剛士、三谷悠士
発明の名称: 走査型プローブ顕微鏡
出願人: 金沢大学
出願日: 2008/8/28(国内出願)、2009/7/16(PCT 出願)

発明者: 福間剛士、植田泰仁
発明の名称: 走査型プローブ顕微鏡
出願人: 金沢大学
出願日: 2009/2/2(国内出願)、2010/1/14(PCT 出願)

発明者: 浅川雅、福間剛士
発明の名称: カンチレバー励振装置及び走査型プローブ顕微鏡
出願人: 金沢大学
出願日: 2009/8/6(国内出願)、2010/8/6(PCT 出願)

(3) 受賞

- ・福間剛士、未踏科学技術協会 バイオ・ナノテクフォーラム 高木賞(2008 年 3 月)
- ・福間剛士、日本生物物理学会 第 4 回若手奨励賞(2008 年 12 月)
- ・浅川 雅、応用物理学会 第 56 回応用物理学会議 講演奨励賞(2009 年 9 月)
- ・福間剛士、日本 MRS 第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム 奨励賞(2010 年 1 月)

(4) 著書

- ・T. Fukuma, S. P. Jarvis, "Biological Applications of FM-AFM in Liquid Environment Noncontact Atomic Force Microscopy Volume 2" Chap. 16, pp. 329-345 S. Morita, F. J. Giessibl, R. Wiesendanger (Eds.), Springer 2009.
- ・S. P. Jarvis, J. E. Sader, T. Fukuma, "Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquids Applied Scanning Probe Methods VIII - Scanning Probe Microscopy Techniques" Chap. 9, pp. 315-350, B. Bhushan, H. Fuchs, M. Tomitori (Eds.), Springer 2008.

(5) 学会発表

学会発表(国際)

- ・H. Asakawa, K. Ikegami, T. Hayasaka, M. Setou, T. Fukuma, "Submolecular-scale imaging of tubulin assemblies by FM-AFM in liquid", 13th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2010), Kanazawa, Japan Aug., 2010.
- ・H. Asakawa, K. Nishimura, S. Yoshioka, T. Fukuma, "Distribution of Water Molecules Adjacent to Biological Membranes Visualized by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy", 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM17)

Atagawa, Japan, Dec., 2009.

• T. Fukuma, H. Asakawa, S. Yoshioka, “Three-dimensional Distribution of Water Molecules Visualized by 3D Scanning Force Microscopy with Atomic-Scale Resolution”, Hydrogen and Water in Condensed Matter Physics, ISSP-11, International Symposium 2009 (ISSP11), Kashiwa, Japan, Oct., 2009.

• H. Asakawa, Y. Ueda, T. Fukuma, “Anisotropic Hydration of Biological Molecules Visualized by Three-dimensional Scanning Force Microscopy”, 12th International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy and Casimir 2009 Workshop (NC-AFM 2009), New Haven, USA, Aug., 2009.

• T. Fukuma, Y. Ueda, “3D Scanning Force Microscopy at Solid/Liquid Interface”, 12th International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy and Casimir 2009 Workshop (NC-AFM 2009), New Haven, USA, Aug., 2009.

学会発表(国内)

• 福間剛士、浅川雅、“脂質膜/水界面の3次元走査型原子間力顕微鏡による分子スケールイメージング”、日本生物物理学会第48回年会(東北大学)、2010年9月20日

• 浅川雅、池上浩司、早坂孝宏、瀬籐光利、福間剛士、“液中周波数変調原子間力顕微鏡(FM-AFM)によるチューブリン表面構造の実空間観察”、日本生物物理学会第48回年会(東北大学)、2010年9月20日

• 吉岡俊輔、福間剛士、“周波数変調原子間力顕微鏡におけるリアルタイム位相補正技術の開発”、2010年(平成22年)春季第57回応用物理学関係連合講演会(東海大学)、2010年3月18日

• 福間剛士、吉岡俊輔、“液中3次元走査型原子間力顕微鏡の開発とその水和構造観察への応用”、2009年(平成21年)秋季第70回応用物理学学会学術講演会(富山大学)、2009年9月8日

• 浅川雅、西村謙一、吉岡俊輔、福間剛士、“3次元走査型原子間力顕微鏡によるモデル生体膜上に形成された水和構造の観察”、2009年(平成21年)秋季第70回応用物理学学会学術講演会(富山大学)、2009年9月8日

(6)招待講演

招待講演(国際)

• Takeshi Fukuma, “Subnanometer-scale Imaging of Interfacial Water by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy” Miniworkshop on Aqueous Interfaces in Physics, Chemistry and Biology, (Taipei, Taiwan), 27 Nov., 2010.

• Takeshi Fukuma, “Subnanometer-scale Visualization of Nanobio-interfaces by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy” BIT's 1st Annual Congress of Nanomedicine 2010 (Beijing, China), 25 Oct., 2010.

• Takeshi Fukuma, “Instrumentation and Applications of Liquid-Environment Frequency Modulation Atomic Force Microscopy” MRS fall meeting 2009 (Boston, USA), 1 Dec., 2009.

・ Takeshi Fukuma, “Molecular-Scale Investigations on Model Biological Membranes by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy” The XI Linz Winter Workshop 2009 (Linz, Austria), 6-9 Feb., 2009.

・ Takeshi Fukuma, “High-Speed Frequency Modulation Atomic Force Microscopy” 16th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM16) (Atagawa, Japan), 11 Dec., 2008.

招待講演(国内)

・ 福間剛士、“超高分解能原子間力顕微鏡を用いた液中界面イメージング”、日本顕微鏡学会第66回学術講演会(名古屋)、2010年5月26日

・ 福間剛士、“AFMで探る脂質二重膜界面の溶液構造”、日本化学会第90春季年会(2010)(東大阪)、2010年3月26日

・ 福間剛士、“液中周波数変調AFMによる生体試料の分子スケール観察”、2010年(平成22年)春季第57回応用物理学関係連合講演会(平塚)、2010年3月19日

・ 福間剛士、“三次元走査型原子間力顕微鏡を用いた固液界面空間の研究”、日本顕微鏡学会 SPM 研究部会 第12回研究会(湯沢)、2009年12月6日

・ 福間剛士、“周波数変調原子間力顕微鏡によるモデル生体膜上に形成された水和層の分子分解能観察”、日本生物物理学会第46回年会(福岡)、2008年12月3日