

Video-rate high-speed atomic force microscopy for biological sciences

著者	Ando Toshio, Uchihashi Takayuki, Kodera Noriyuki
雑誌名	Shinku /Journal of the Vacuum Society of Japan
巻	51
号	12
ページ	783-788
発行年	2009-01-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/18990

ビデオレート高速バイオ原子間力顕微鏡

安藤 敏夫^{1,2}、内橋 貴之^{1,2}、古寺 哲幸^{1,2}

Video-rate High-speed Atomic Force Microscopy for Biological Sciences

Toshio ANDO*^{1,2}, Takayuki UCHIHASHI^{1,2}, Noriyuki KODERA^{1,2}

¹Department of Physics, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

²CREST/JST, Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0075, Japan

(Received _____, Accepted _____)

*金沢大学理工研究域数物科学系 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

Abstract

The atomic force microscope (AFM) is unique in its capability to capture high-resolution images of biological samples in liquids. This capability becomes more valuable to biological sciences if AFM additionally acquires an ability of high-speed imaging. “Direct and real-time visualization” is a straightforward and powerful means of understanding biomolecular processes. With conventional AFM, it takes more than a minute to capture an image, while biomolecular processes generally occur on a millisecond timescale. In order to fill this large gap, various efforts have been carried out in the past decade. Here, we review these past efforts, describe the current state of the capability and limitations of our high-speed AFM, and discuss possibilities that may break the limitations, leading to an innovative high-speed bioAFM.

1. はじめに

機能している生体分子の構造・動作を直接見て、その機能する仕組みを理解することは生命科学のひとつの夢であった。その夢が今、ようやく現実のものとなった。液中のナノメーター世界を唯一観察できる原子間力顕微鏡(AFM)の走査速度を飛躍的に高めることで、実現された。これまで想像するしかなく、見るのが不可能であった極微世界のダイナミックな振舞いが手に取るように見える。

AFM が誕生した 1986 年の 3 年後既に、タンパク質の動作を見ようとする試みが Hansma らにより試みられた。Fibrinogen を酵素で消化して生成された Fibrin が凝集していく様子(血液凝固の分子過程)が約 1 分間隔で観察された¹⁾。もちろん鮮明な像ではないが、新しいツールを手にして未知の世界を見ようとする熱気が伝わってくる。しかし、この熱気が広がることはなかった。1 枚の画像撮影に分のオーダーの時間がかかるのに対して、生体分子プロセスは遙かに短い時間で起こるからである。AFM のイメージング速度を上げようとする方向に向かうのは当然のように思えるが、それに挑戦した研究者は極めて少ない。半導体ウェハの広い表面を高速に観察することを狙って、Quate のグループはいくつかの試みを行ったが²⁻³⁾、生物試料の高速観察に要求される条件は硬い試料のそれよりも遙かに厳しいため、高速 BioAFM につながることはなかった。

1995 年前後に、米国の Hansma 研究室と金沢大の我々の研究室は、互いに独立に高速 BioAFM の開発に着手した。微小カンチレバーや微小カンチレバーに最適化した光テコ光学系が Hansma 研で開発された⁴⁻⁵⁾。我々の研究室では、7 年の間途中の成果をまったく公表せず、最初の高速 BioAFM が完成した 2001 年に、80ms/frame で撮影した動くタンパク質分子の映像とともにその成果を発表した⁶⁻⁷⁾。この成果が大きな刺激となり、高速 AFM の開発が世界のいくつかの研究室でも開始されたが、タンパク質を破壊せずに撮影できるビデオレート高速 AFM は我々の研究室以外には未だ開発されていな

い.

2001 年以降現在まで、我々は高速 BioAFM の性能向上に向けた研究を継続し、その性能はほぼ理論的限界に達している。本稿では、この高速 BioAFM を実現した技術、現状の問題点と限界、その限界を破るであろう新しい方向などを紹介する。詳しくは総説⁸⁻¹⁰⁾を参照されたい。尚、動画像は <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/roadmap.htm> を参照されたい。

2. 高速 BioAFM の基本技術

以下の説明では、探針から試料に横方向の大きな力が作用しにくく、生物試料観察に適した Tapping mode を想定している。主に 3 点が高速 BioAFM 実現の鍵を握っている。(1)探針・試料間に働く力を一定に保つフィードバック走査の高速化、(2)スキャナーの振動抑制、(3)振動する探針が試料を叩く力の軽減化。

2.1 フィードバック走査の高速化

フィードバックループにはほとんど全ての AFM デバイスが含まれており、それらをすべて高速化する必要がある。フィードバック走査の速さは、各デバイスで生ずる遅れ時間の総和 $\Delta\tau$ でほぼ決まる¹¹⁾。簡単のために、試料が周期 λ のサイン波形状をしているとする。試料ステージを X 方向に速度 V_s で走査すると、固定 X 点で試料の高さは $f = V_s/\lambda$ の周波数で変化する。オープンループの遅れ $\Delta\tau$ により、クローズドループのフィードバック走査はほぼ $\Delta\phi = 4\pi f\Delta\tau$ だけ位相が遅れる。45 度の位相遅れが生ずる走査周波数をフィードバック帯域 f_B と定義すると、 $f_B = 1/(16\Delta\tau)$ となる。もちろん、この位相遅れにより余分の力が探針から試料に作用するため、この力が試料系を破壊、或いは、大きく乱してしまう場合には、有効なフィードバック帯域は $1/(16\Delta\tau)$ よりも低くなる。ところで、遅れ時間の主なものは、カンチレバーの振幅計測時間 τ_d 、カンチレバーの応答時間 τ_c 、Z スキャナーの遅れ時間 τ_s 、フ

フィードバック制御の PID 回路の遅れ時間（主に、エラー信号を積分する時間 τ_i ）である。その他に、パラシューティング時間 τ_p がある。パラシューティングとは、試料の急な降り勾配で探針が試料から完全に離れて、再着地までに時間がかかることを意味する。 τ_d の最小時間は $1/(2f_c)$, $\tau_c = Q_c/(\pi f_c)$, $\tau_c = Q_c/(\pi f_c)$ と表わせる。ここで、 f_c , Q_c はカンチレバーの共振周波数と Q 値, f_s , Q_s は Z スキャナーの共振周波数と Q 値である。 τ_i と τ_p は、試料の高さ h_0 とカンチレバーの自由振動振幅 A_0 との比や、カンチレバーの振幅のセットポイント r などの複雑な関数であり、厳密に求めることは難しいが、実験結果との照合により、ほぼ次のように表わせる（導出の一部は文献¹⁰⁻¹¹⁾を参照）。

$$\tau_i \approx 4h_0 \sin(\pi/8)/(A_0 f_c) \quad (1)$$

$$\tau_p \approx [(\tan \beta)/\beta - 1]/f_c \quad (2)$$

ここで、 $\beta \approx \cos^{-1}[2A_0(1-r)/\{5h_0 \sin(\varphi/2)\}]$ である。PID 回路の微分操作は位相遅れを若干改善するので、その改善効果を α と表わすと、フィードバック帯域はおおよそ

$$f_B = \alpha \frac{f_c}{16} \left(\frac{1}{2} + \frac{Q_c}{\pi} + \frac{Q_s f_c}{\pi f_s} + f_c(\tau_p + \tau_i) \right) \quad (3)$$

と表わされる。イメージング速度は、走査範囲を $L \times L$, 走査線数を N とすると、 $\lambda f_B / 2LN$ となり、試料の凹凸の細かさにも関係している。装置の速度性能をイメージング速度や X 走査速度で記載している論文が多いが、フィードバック帯域で表わすべきである。

カンチレバー関連：カンチレバーは τ_d と τ_c の両方に関わり、高い共振周波数が要求される。また、生物試料が対象であるため、バネ定数は小さい必要がある。この両者を同時に満たすには、小さく薄い微小カンチレバーが必要であるが、その変位検出に使う光てこ光学系のレーザースポットサイズとの関係で、極端に小さくすることはできない。それらのバランスの結果として、長さ約 6 μm , 幅 2 μm , 厚さ約 90 nm の

カンチレバーをオリンパスと共同で開発した。大気中共振周波数約 3.5 MHz, 水中共振周波数約 1.2 MHz, ばね定数約 0.2 N/m で, 水中での Q 値はおおよそ 2.5 である。従って, 水中では, 振幅計測の最小時間は 0.42 μ s, 応答時間は 0.66 μ s となる。最小時間で振幅計測するために, サンプル/ホールド (S/H) 回路を利用して振動信号のピークとボトムの電圧をホールドし, その差を振幅として出力する高速振幅計測回路を開発した⁶⁾。微小カンチレバーに半導体レーザー光を小さく絞るために 20 倍の長作動距離対物レンズを使い, 反射光を同じ対物レンズで集める光てこ光学系を開発した⁶⁾。入射光と反射光は偏光ビームスプリッターと $\lambda/4$ 板で分離した。半導体レーザー電源には高周波重畳を施し, 戻り光によるノイズの発生を小さくしている¹²⁾。4 分割センサーは PIN ダイオードで, センサーアンプの帯域は 20 MHz ある。

スキャナー: XYZ スキャナーの干渉を小さくするために, 図 1 に示すように, フレクシャー (板ばね) を利用した¹³⁻¹⁴⁾。また, 複雑な共振を防ぐためにピエゾ以外はモノリシック加工で製作した。ピエゾの速い変位で生ずる撃力を緩和するために, カウンターバランス方式⁶⁾を採用し, X ピエゾはその両端をフレクシャーで挟み, Z ピエゾは対向する位置にもうひとつのピエゾをベース部に固定した。共振周波数は X スキャナーが約 60 kHz, Z スキャナーが約 150 kHz である。最近では, ひとつの Z ピエゾの 4 辺だけで固定し, Z ピエゾが両向きに自由に変位する方式を採用している。この固定方法では, 非固定の場合の共振周波数とほぼ一致する 540 kHz の共振周波数が得られた¹⁵⁾。試料ステージは台形円錐状をしており, 試料基板を接着する面は 1 mm ϕ である。このように小さくするのは, 軽量化するためと, Z スキャナーの高速な変位に伴う水圧効果を小さくするためである⁷⁾。最大変位量は, X 方向 1 μ m, Y 方向 3 μ m, Z 方向は前者の固定方法で 2 μ m 弱, 後者の固定方法で 1 μ m 弱である。スキャナーの Q 値を小さくする方法 (アクティブダンピング) については次節で

述べる。

2.2 スキャナーの振動抑制

スキャナーの共振周波数を，走査周波数に含まれる調和周波数以上に上げることは不可能である．それ故，アクティブダンピングは必須である．アクティブダンピングには，ノッチフィルター，フィードバック，フィードフォワードの3方式がある（図 2a, b, c）．

X スキャナー：走査信号は予め三角波と定まっているので，X スキャナーの伝達関数 $G(s)$ の逆伝達関数と三角波のフーリエ変換を掛けたものを逆フーリエ変換した信号を D/A コンバータを介して出力するだけで，ダンピングできる⁹⁻¹⁰⁾．複数の共振ピークを持つような複雑な場合でもこの方法で対応できる．もちろん，これから述べる Z スキャナーに対する方法も利用できないわけではない．

Z スキャナー：簡単のために Z スキャナーが単一共振ピーク（共振角周波数 ω_1 ，Q 値 Q_1 ）を持つとして，ノッチフィルター方式をまず考える．このフィルターの伝達関数 $N(s)$ は

$$N(s) = \frac{s^2 + \omega_0 s / q + \omega_0^2}{s^2 + \omega_0 s / Q + \omega_0^2} \quad (4)$$

と表わせる． $\omega_0 = \omega_1$ ， $q = Q_1$ ， $Q \sim 0.5$ と設定すれば，フィルター処理後の伝達関数は $\omega_0^2 / (s^2 + \omega_0 s / Q + \omega_0^2)$ となり，Q 値を下げるができる．

次にフィードバック方式を考える．図 2b の全体の伝達関数を $R(s)$ とすると，

$$R(s) = \frac{G(s)}{1 - G(s)H(s)} \quad (5)$$

と表わされる．これが Q 値 $Q_0 (\sim 0.5)$ をもつようにするには

$$H(s) = \frac{1}{G(s)} - \frac{1}{R(s)} = \left(\frac{s^2}{\omega_1^2} + \frac{s}{Q_1\omega_1} + 1 \right) - \left(\frac{s^2}{\omega_0^2} + \frac{s}{Q_0\omega_0} + 1 \right) \quad (6)$$

と $H(s)$ を設定する． $\omega_0 = \omega_1$ と設定すると，

$$H(s) = - \left(\frac{1}{Q_0} - \frac{1}{Q_1} \right) \frac{s}{\omega_1} \quad (7)$$

となる．すなわち， $H(s)$ は単純な微分回路となる． $\omega_0 = \omega_1$ と設定したために，ダンピング後の帯域は元の共振周波数を超えない． $\omega_0 > \omega_1$ と設定すれば，超えることができるが， $H(s)$ は 2 回微分と 1 回微分が並列になったものになる．以上の説明では，Z スキャナーの予知できない速い出力変位が計測できると仮定しているが，実際には極めて難しい．我々はこの問題を Z スキャナーと同じ伝達関数で特徴付けられる回路を模擬スキャナーとして利用することを考案した¹⁶⁾．

フィードフォワード方式では $G(s)$ の逆伝達関数の特性をもつ回路を設計しなければならない．コンピュータで処理する方法もあり得るが，ビデオレート高速 AFM では現在のところアナログ方式しかない．しかし，単一共振の場合でさえ，その逆伝達特性の回路を設計することは容易ではない．しかし，フィードフォワード方式は，帯域を実際の共振周波数よりも伸ばすことが可能であり，利用できる piezo 素子の共振周波数に限界があることを考えると極めて有益である．我々は，任意伝達関数の逆伝達関数を自動生成する回路を考案した¹⁷⁻¹⁸⁾ (図 3a, b)．ゲイン g を 1 とすれば，図 3a の回路の伝達関数は $1/M(s)$ ($\sim 1/G(s)$) となる．実際には，回路に使うアンプなどの素子に遅れがあり， $g=1$ とすることはできず，理想的な逆伝達関数は得られない．しかし，図 3b のように複数連結することにより改善される．この方法を，後述するカンチレバーの光熱応答¹⁸⁾，及び，Z スキャナーに適用し¹⁰⁾，帯域を伸ばすことに成功している．

ところで，Z スキャナーの共振は一般に複数のピークをもつ．素共振が直列に繋がった共振系の場合には，上記いずれかのダンパー回路を直列に作用させれば，複数のピークをダ

ンピングできるが、並列に繋がっている場合には、上述した任意伝達関数の伝達関数を自動生成する方式以外では、複数のピークを同時にダンピングすることはできない。

2.3 Tapping 力の軽減化

パラシューティングは、走査中のカンチレバー振幅のセットポイントを深く（自由振動振幅に対するセットポイント振幅の割合 r を小さく）すれば回避できる。しかしこの場合、試料を強く叩くことになり、脆い生物試料やダイナミックに変動する弱いタンパク質間相互作用は破壊されるか、大きく乱されてしまう。つまり、試料を優しく叩くために必要な浅いセットポイントと高速走査は相容れない関係にある。パラシューティングが起こっても、PID 制御のゲインを大きくしておけば、パラシューティング時間は短縮されるが、逆に試料の昇り勾配の部分でオーバーシュートを起こし、パラシューティングを頻繁に誘発してしまい、安定な制御ができない。PID 制御のゲインを状況に応じて走査中に調節することができれば、この問題を解決できるはずである。そこで、セットポイント振幅と自由振動振幅の間に閾値を設け、カンチレバーの振幅がこの閾値を超えた場合にフィードバックゲインを上げる動的 PID 制御法を開発した¹¹⁾。セットポイント r を 0.9（ないしは、0.95）まで上げてても、パラシューティングは起こらず、フィードバック帯域は r に依存しなくなった。従って、試料を優しく叩くことと、パラシューティングによる遅延の回避が動的 PID によって同時に実現された。

3. 高速 BioAFM の周辺技術

3.1 高速位相イメージング

固定周波数の励振信号とカンチレバーの振動との位相差は、試料の物性情報を含むため、位相差像は形状以外に、例えばヘテロな成分分布に関する情報を与える。探針・試料間の相互作用が保存力の場合には、力の勾配によりカンチレバーの共振周波数がシフトし、その結果、位相がシフトする。位相

は斥力で進み，引力で遅れる．エネルギーが散逸する場合でも位相がシフトする（遅れる）．保存力の場合，共振周波数シフト量は約 $-0.5k'f_c/k_c$ となる．ここで， k' は力の勾配である．通常この周波数シフト量は小さいので，それに伴う位相シフトを高感度に検出するために，カンチレバーのQ値を上げざるを得ない．その結果，高速位相イメージングは不可能となる．微小カンチレバーでは， f_c/k_c は通常のカンチレバーよりも1,000倍程度大きいので，Q値を上げる必要がなく，高速位相イメージングが可能となる．非保存力の場合でも，微小カンチレバーでは溶液による抵抗力が小さく，大きな位相変化を期待できる．そこで，通常使われる遅いロックイン方式に代わる高速位相検出回路を開発し，50-100 ms/frameで位相像を得ることに成功した¹⁹⁾．通常の位相イメージングでは，何周期かに亘る平均の位相シフトを検出するため感度が低く，そのためにカンチレバーの振幅を1 nm程度に小さくして場の勾配内に探針が常に存在するようにしなければならない．我々の検出法では，カンチレバー振動の1周期中の任意のタイミングで位相検出できるため，最も大きな位相シフトが起こるタイミングを選ぶことができ，振幅を小さくする必要がない．更には，複数のタイミングで位相を検出でき，その結果，エネルギー保存・非保存の相互作用を区別して検出することが可能である．探針・試料の接触直後は，斥力による位相の進みとエネルギー散逸による位相の遅れが相殺する傾向にあるが，斥力による位相の進みはすぐに解消されるのに対し，エネルギー散逸による位相の遅れは暫く続く．実際，位相検出タイミングの違いにより，異なる位相像が得られた¹⁹⁾（図4）．

3.2 ドリフト補償

カンチレバーの励振効率のドリフトは厄介な問題である．励振用ピエゾの発熱によるものと思われるが，励振効率は通常時間とともに下がる．下がると，カンチレバーの振幅は小さくなるが，フィードバック回路は，この減少を探針が試料

に強く接触していると解釈し、試料ステージを探針から遠ざける。しまいには、探針は試料から完全に離れイメージング不能になる。この問題を以下の工夫により解決した。探針・試料間の接触で、カンチレバー振動は歪み、2倍波以上の高調波が現れる。そこで、時定数の大きなI制御回路で2倍波の振幅が一定になるように、励振信号を調節した。その結果、長時間安定なイメージングが可能になった¹¹⁾。

3.3 光熱効果によるカンチレバー駆動

Z スキャナーに比べて、我々の利用している微小カンチレバーの水中での共振周波数は1.2 MHzと高く、Q値も2-3と小さいため、高速に応答する。そこで、Z スキャナーに代わりカンチレバーを変位させて、探針・試料間の距離制御を行う方式を考案した¹⁸⁾。カンチレバーに直接力を作用させる仕方として、磁力²⁰⁾、光²¹⁻²²⁾、極めて高い周波数の超音波²³⁾があり得るが、設計が単純になる光を採用した。光吸収による発熱のため、金コート面が非コート面よりも膨張し、カンチレバーがたわむ。908 nmのレーザー光で1 nm/mW、405nmでは10 nm/mWの効率である（但し、レーザーパワーはレンズ出射口で測定したパワーである）。しかし、405nmの光は生物試料にも吸収されダメージを与えるので使えない¹⁸⁾。熱の伝導・拡散は遅く、微小カンチレバーのたわみは8.4 μ sと123 μ sの時定数で応答した。この遅れは、逆伝達関数自動生成回路を利用してほぼ完全に補償することができた。その結果、30 ms/frameの速度でタンパク質をイメージングすることに成功した¹⁸⁾。

4. 現状及び課題

上記の様々な高速化のための開発により、フィードバック帯域は120~150 kHzに達し、比較的丈夫なタンパク質では、走査範囲250 nm、100走査ラインの条件で、ビデオレート(33 ms/frame)で撮れるようになった。走査範囲を狭めれば、10 ms/frameでも撮影できる。また、ノイズは多いものの、マイ

カ表面の原子像も 28 ms/frame の速さでイメージングできる（走査範囲 5 nm x 2.5 nm）。また、いくつかのタンパク質系の機能動態の高速撮影にも成功しており^{8-10, 13-14, 24}、生命現象の機能解明などに資することができることを実証した。

フィードバック帯域については、Tapping Mode AFM として、ほぼ理論的限界の性能に達している。しかし、Tapping 力の軽減化は、極めて弱いダイナミックなタンパク質間相互作用を乱さないレベルまでには達しておらず、その改善は現時点で最大の課題である。その解決には、探針・試料間の接触検出の高感度化が重要であり、これまでにいくつかの試みを行った。振幅よりも位相の変化の方が硬い基板に対して敏感であるが、柔らかいタンパク質ではそれほど大きな違いがなかった。位相と振幅の両方が混ざった信号で接触を検出することも行った。すなわち、高速振幅計測回路の電圧ホールドを外部信号に同期して任意のタイミングで行い、最大の変化率が得られるタイミングに調節したが、タンパク質では位相の変化が大きくないため、大きな改善は得られなかった。そこで現在第3の高感度化の方法を検討している。探針・試料間の接触は極短い時間で起こるが、そのカンチレバー振動への影響は1周期以上に均されてしまう。その均された信号の振幅、位相を我々は検出してきた。接触力の力積は小さいが、力のピーク値は励振力の最大値とそれほど違わない。従って、接触力のピーク値を検出できれば、高い感度が実現される。カンチレバー振動信号から力を求める所謂逆決定問題である²⁵。振動信号にはノイズが含まれるため、振動信号をカンチレバーの運動方程式に代入しても、力信号はノイズに埋もれてしまう。そこで、振動信号のフーリエ級数係数 A_k 、 B_k を積分回路で求め、それを用いて力の近似値を

$$f(t) \approx \sum_{k=2}^n A_k (1 - k^2) \sin(k\omega_0 t) + B_k (1 - k^2) \cos(k\omega_0 t) \quad (8)$$

として得る。振動するカンチレバー探針を基板にわずかに接触させたときの実際の振動信号を用いて式(8)の計算を行った結果、4 - 5 倍波までを含めるとインパルス的な力波形が現

れた．この計算を実行する高周波アナログ回路を現在開発中である．基本角周波数の信号のフーリエ係数 A_1 , B_1 を積分で求め, $\sqrt{A_1^2 + B_1^2}$ を振幅として求める方法²⁶⁾も, ノイズが小さくなるので高感度検出法として有効かもしれない．

5. 高速 BioAFM の今後の展開

5.1 非接触超高速 BioAFM

Tapping Mode AFM として現状の高速 BioAFM のイメージング速度は理論的限界にほぼ達している．カンチレバーを更に微小化して共振周波数を 2 倍程度まで (バネ定数を現状の 0.2 N/m に維持したまま) 上げることは可能かもしれないが, それがほぼ限界である．試料に優しい条件を満たしたまま更に高速化することは可能であろうか．唯一の解は非接触の条件を得ることである．非接触が実現されれば, 硬いカンチレバーを利用でき, 共振周波数を上げることができる．ところで, 表面下の構造を AFM で可視化するために, 試料ステージ底から超音波を入射し²⁷⁻²⁸⁾, その超音波でカンチレバーを励振させる方法が開発されている．この方法を少し変形し, 試料ステージ底とカンチレバーホルダーから異なる周波数 (f_1 , f_2) の超音波を入射し, それらを探針で干渉させる方法が試みられている²⁹⁻³⁰⁾. f_1 と f_2 の差を f_c に一致させておくと, この干渉によりカンチレバーは共振する．試料を伝播してきた超音波の振幅と位相は試料表面下にある物体により変調を受けるため, カンチレバーの共振も変調を受ける．従って, 表面下の構造をイメージングできる．超音波の近接場検出であるため, 超音波の波長は空間分解能に関係せず, 横方向の分解能は通常の AFM と同様である．この方法により, 細胞内の構造 (感染した菌や核) が可視化された³⁰⁾. 試料表面下が均一の場合, 試料ステージから伝播してきた超音波振動の波面は試料の形状をなぞるものと思われる．違う見方をすれば, 試料表面は超音波の周波数で振動している．従って, 探針で起こる干渉は, 試料表面に沿って均一に起こるものと

期待される。また、干渉は探針が試料に接していなくても起こり得るので、非接触イメージングが可能である公算が高い。我々はこの非接触検出の予備的実験を行った。表面から約 2 nm 離れたところで、カンチレバーは f_c で共振し始め、更に近づくと振幅が増大し、接触したところから更に近づけていくと、振幅は減少した。すなわち、非接触検出が実証された¹⁰⁾。振幅は距離に対して 2 相性を示すが、DC たわみ信号を併用することにより、2 相性によるフィードバック走査の混乱を回避できる。超音波方式の非接触型 BioAFM が将来実現される可能性が高い。その実現により、分離精製されたタンパク質などの機能動態を超高速にイメージングできるとともに、極めて柔らかい生きた細胞表面で起こる微細構造の動態をも観察できるようになるものと期待される。現在のところ、非接触イメージングは、走査型イオン伝導顕微鏡³¹⁻³²⁾と近接場光顕微鏡 (SNOM) で実現しているが、どちらも高速走査の可能性は極めて低い (フィードバック走査を断念すれば別だが³³⁾) 。

5.2 高速内視 BioAFM

上述のように細胞内の可視化はすでに実現しており、この方法と我々が開発してきた高速走査技術との融合により、高速内視 BioAFM が実現する可能性は高い。但し、既に発表されている細胞内の可視化³⁰⁾では、Z 方向の分解能はないと考えられる。電子顕微鏡では試料を色々な向きに傾けて得た像から 3 次元像を再構成しているが、高速内視 BioAFM では試料ステージ底からの超音波の入射角度を変える必要がある。それ故、高速性がある程度犠牲になる。構造の大きい細胞内オルガネラの動態観察が可能になるものと予想される。分子については、金属粒子などを標識することにより、その動態が観察されるものと期待される。

5.3 その他の高速 BioAFM

短い鎖分子を介して特定の分子を付けた探針を利用して、

試料中にある特定分子の局在とトポグラフィー像の同時イメージング（分子認識 AFM）が既に確立している³⁴⁾。分子認識には2つの分子の会合が必要であるため、高速性をある程度犠牲にする必要はあるが、探針に付けた分子のみかけの高い濃度から判断するとサブ秒の分子認識イメージングは可能になると予想される。センサーやレーザの低ノイズ化により、液中原子解像 AFM も既に実現しており³⁵⁻³⁶⁾、我々の高速 AFM でもノイズがまだあるもののビデオレートで原子解像できていることから、超解像高速 AFM 実現の可能性は十分にある。

6. おわりに

生きた生体分子のナノ機能動態の観察が現実のものとなり、いくつかのタンパク質系で機能解明に迫る映像が得られるまでに高速 AFM 技術は進歩してきた。見えない世界で起こる生命現象を推測する従来の方法に代わり、直接見る時代がやってくることは時間の問題である。超高速化、超高解像化、生きた細胞表面で起こる分子プロセスや細胞内部オルガネラの動態の可視化といった次世代高速 AFM の可能性も出てきた。現在のところ、高速 AFM の開発者・ユーザーの数は非常に限られているが、この革新的顕微鏡技術の発展にもっと多くの研究者が参画することを期待している。

[文 献]

1. B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. C. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. F. Hansma and P. K. Hansma: *Science*, **243** (1989) 1586.
2. S. R. Manalis, S. C. Minne, A. Atalar and C. F. Quate: *Rev. Sci. Instrum.*, **67** (1996) 3294.
3. T. Sulchek, R. J. Grow, G. G. Yaralioglu, S. C. Minne, C. F. Quate, S. R. Manalis, A. Kiraz, A. Aydine and A. Atalar: *Appl. Phys. Lett.*, **78** (2001) 1787.

4. D. A. Walters, J. P. Cleveland, N. H. Thomson and P. K. Hansma: *Rev. Sci. Instrum.*, **67** (1993) 3583.
5. T. E. Schäffer, J. P. Cleveland, F. Ohnesorge, D. A. Walters and P. K. Hansma: *Rev. Sci. Instrum.*, **80** (1996) 3622.
6. T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito and A. Toda: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 12468.
7. T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito and A. Toda: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41** (2002) 4851.
8. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, M. Taniguchi, A. Miyagi and H. Yamashita: *J. Mol. Recognit.*, **20** (2007) 448.
9. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, A. Miyagi, M. Taniguchi and H. Yamashita: *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, **456** (2008) 211.
10. T. Ando, T. Uchihashi and T. Fukuma: *Prog. Surf. Sci.* (in press).
11. N. Kodera, M. Sakashit and T. Ando: *Rev. Sci. Instrum.*, **77** (2006) 083704.
12. T. Fukuma and S. P. Jarvis: *Rev. Sci. Instrum.*, **77** (2006) 043701.
13. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita and K. Matada: *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **3** (2005) 384.
14. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita and M. Sakashita: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45B** (2006) 1897.
15. T. Fukuma, Y. Okazaki, N. Kodera, T. Uchihashi and T. Ando: *Appl. Phys. Lett.*, **92** (2008) 243119.
16. N. Kodera, H. Yamashita and T. Ando: *Rev. Sci. Instrum.*, **76** (2005) 053708.
17. S. Morita, H. Yamada and T. Ando: *Nanotechnol.*, **18** (2006) 08401.

18. H. Yamashita, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, D. Yamamoto and T. Ando: *Rev. Sci. Instrum.*, **78** (2007) 78083702.
19. T. Uchihashi, T. Ando and H. Yamashita: *Appl. Phys. Lett.*, **89** (2006) 213112.
20. G. R. Jayanth, Y. Jeong and C.-H. Menq: *Rev. Sci. Instrum.*, **77** (2006) 053704.
21. N. Umeda, S. Ishizaki and H. Uwai: *J. Vac. Sci. Technol. B*, **9** (1991) 1318.
22. D. Ramos, J. Tamayo, J. Mertens and M. Calleja: *J. Appl. Phys.*, **99** (2006) 124909.
23. F. L. Degertekin, B. Hadimioglu, T. Sulchek and C. F. Quate: *Appl. Phys. Lett.*, **78** (2001) 1628.
24. D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando: *Nanotechnol.* (in press).
25. M. Stark, R. W. Stark, W. M. Heck and R. Guckenberger: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (2002) 8473.
26. J. Kokavecz, Z. Tóth, Z. L. Horváth, P. Heszler and Á. Mechler: *Nanotechnol.*, **17** (2006) S173.
27. D. C. Hurley, K. Shen, N. M. Jennett and J. A. Turner: *J. Appl. Phys.*, **94** (2003) 2347.
28. O. Hirotsugu, T. Jiayong, T. Toyokazu and H. Masahiko: *Appl. Phys. Lett.*, **83** (2003) 464.
29. M. T. Cuberes, H. E. Assender, G. A. D. Briggs and O. V. Kosolov: *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **33** (2000) 2347.
30. G. Shekhawat and V. P. Dravid: *Science*, **310** (2005) 89.
31. P. K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S. A. C. Gould and C. B. Prater: *Science*, **243** (1989) 641.
32. A. I. Shevchuk, G. I. Frolenkov, D. Sanchez, P. S. James, N. Freedman, M. J. Lab, R. Jones, D. Klenerman and Y. F. Korchev: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45** (2006) 2212.
33. A. D. L. Humphris, J. K. Hobbs and M. J. Miles: *Appl. Phys. Lett.*, **83** (2003) 6.

34. C. Stroh, H. Wang, R. Bash, B. Ashcroft, J. Nelson, H. Gruber, D. Lohr, S. M. Lindsay and P. Hinterdorfer : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101** (2004) 12503.
35. T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige and H. Yamada: Appl. Phys. Lett., **87** (2005) 034101.
36. B.W. Hoogenboom, M.E. Müller, H.J .Hug, Y. Pellmont S. Martin, P.L.T.M. Frederix, D. Fotiadis and A. Engel: Appl. Phys. Lett., **88** (2006) 193109.

図の説明

Fig.1: High-speed scanner structure.

Fig.2: Active damping methods. (a) Notch filtering method, (b) Feedforward control method, (c) Feedback control method.

Fig.3: Circuits for automatically producing an inverse transfer function of a given transfer function $G(s)$. $M(s)$ represents a “mock scanner” whose transfer function is approximately the same as that of the z-scanner. (a) Single-unit type, (b) Double-unit type.

Fig.4: Phase-contrast images depending on the phase-detection timing. The sample is a polystyrene-polybutadiene block copolymer. (a) Immediately after the tip-sample contact, (b) about a half period after the contact; the maximum phase-shift is about 5° , (c) at time when slightly less than one period of time passed (i.e., just prior to the contact); the maximum phase-shift is about 10° .

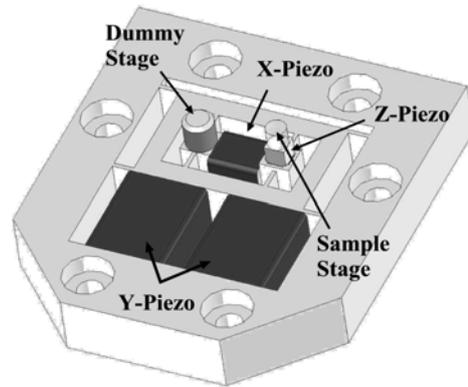


Fig.1

Size: small

T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera

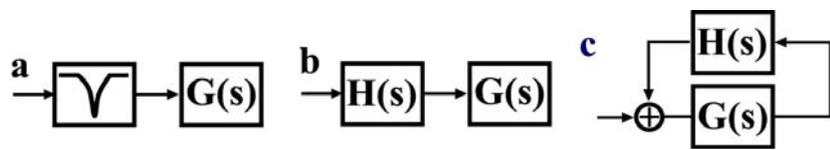


Fig.2

Size: small

T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera

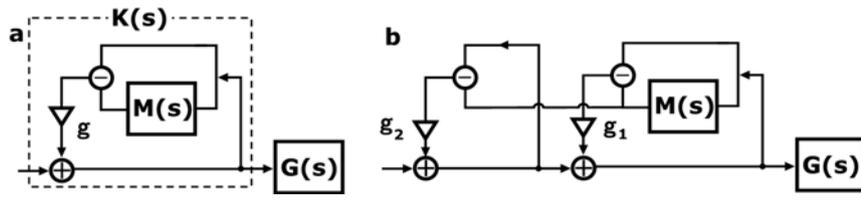


Fig.3

Size: large

T. Ando, T. Uchihashi, N. Koderu

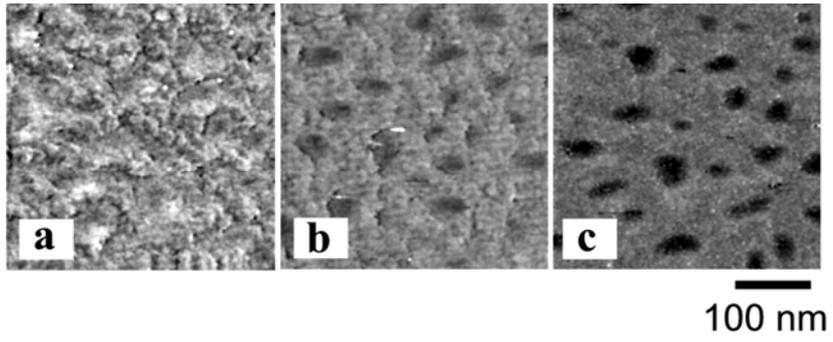


Fig.4

Size: small

T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera