

Development of wide-area scanner for high-speed AFM and applications

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/45395

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博 士 論 文

高速 AFM 用広域スキャナーの開発とその応用研究

金沢大学大学院自然科学研究科

数物科学専攻

学 籍 番 号 1223102007

氏 名 渡辺 大輝

主任指導教官名 安藤 敏夫

提出年月 平成 28 年 1 月 8 日

目次

要旨	4
第 1 章 序論.....	6
1.1 研究の背景	6
1.2 本学位論文の構成	10
1.2.1 高速 AFM の原理と装置 (第 2 章)	10
1.2.2 高速 AFM 用広域スキャナーの開発 (第 3 章)	10
1.2.3 広域スキャナーを用いた生体分子イメージング (第 4 章)	10
1.2.4 ティップスキャン型高速 AFM の広域化に向けた技術開発 (第 5 章)	11
第 2 章 高速 AFM の原理と装置	12
2.1 AFM の原理	12
2.2 画像取得時間とフィードバック帯域	13
2.3 高速 AFM デバイス	17
2.3.1 高速 AFM 用カンチレバー	17
2.3.2 光学系	18
2.3.3 高速振幅計測器	18
2.3.4 高速 AFM 用スキャナー	19
2.3.5 Z スキャナーのアクティブダンピング法	20
2.3.6 ダイナミック PID(Proportional-Integral-Derivative)制御法	21
第 3 章 高速 AFM 用広域スキャナーの開発	28
3.1 研究背景とその概要	28
3.2 広域スキャナーの設計	31
3.2.1 広域スキャナーの動作機構	31
3.2.2 広域スキャナーにおける圧電素子の選定	32
3.3 広域スキャナーの補正技術	38
3.3.1 X 方向走査における振動問題	38
3.3.2 ヒステリシス特性に起因した非線形性の補正	42
3.3.3 XY スキャナーの干渉補正	45
3.3.4 Z スキャナー	47
第 4 章 広域スキャナーによる生体分子イメージング	64
4.1 目的と概要	64
4.2 枯草菌の溶菌課程の観察	66
4.2.1 ペプチドグリカン層	66
4.2.2 枯草菌の広域イメージング	66
4.2.3 枯草菌の溶菌過程イメージング	67

4.3	哺乳類細胞のイメージング	73
4.3.1	簡易型蛍光顕微鏡装置の導入.....	73
4.3.2	哺乳類細胞の高速 AFM 観察.....	75
4.4	広域スキャナーによる高分解能観察	87
第 5 章	ティップスキャン型高速 AFM の広域化に向けた要素技術開発	91
5.1	目的と概要	91
5.2	レーザートラッキングシステム.....	93
5.2.1	ティップスキャン型高速 AFM	93
5.2.2	光学系.....	93
5.3	広域ミラーフィルタユニットの開発	98
5.3.1	ミラーフィルタユニット.....	98
5.3.2	ミラーフィルタユニットの広域化における戦略	101
5.3.3	ミラーフィルタユニットの性能評価.....	103
5.3.4	ティップスキャン型高速 AFM 用広域スキャナー	104
5.4	Z スキャナー変位に起因する X スキャナーの変位補正.....	116
第 6 章	総括.....	120
6.1	まとめ.....	120
6.2	展望	121
謝辞	122
参考文献	123

要旨

現在までに、高速 AFM によって生命現象を司るタンパク質のさまざまな機能動態が明らかになってきた。このような観察は高速 AFM が持つ高い空間分解能、高い時間分解能、及び、低侵襲性によるものである。これらの優れた性能は、ダイナミック PID 法、アクティブダンピング法、X スキャナーのフィードフォワード制御といった様々な技術開発により実現されてきた。

しかしながら、ほとんどの生命現象はタンパク質・糖質・脂質・核酸の複合体である細胞中で起こっている。これまで高速 AFM で得られた成果はタンパク質一分子の構造変化、もしくは複数分子の相互作用などについてであったが、生命現象の一部を切り取って観察していると言える。実際の生命現象は、タンパク質などあらゆる分子が相互的に、また複雑に作用した結果であるため、その動態を直接生細胞で観察することも強く望まれている。

そこで本研究では、高速 AFM の観察対象を細胞まで拡大するために、走査範囲を広領域に拡大し、また、その広領域をより高速に走査することを目指して新たな高速 AFM 用スキャナーを開発した。広領域走査に伴い、これまでの狭領域走査用の高速 AFM スキャナーでは起こることがなかったいくつかの問題が発生した。例えば、高速走査時の X 方向の振動、圧電素子固有のヒステリシス特性の顕在化、XY 方向走査時の干渉問題が発生した。それらを一つずつ解決していった結果、これまで最大で $6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ であった高速 AFM スキャナーの走査範囲を $45\ \mu\text{m} \times 45\ \mu\text{m}$ まで拡大することに成功した。また、そのスキャナーを用いてタンパク質分子よりも遥かに巨大な細菌、ここでは枯草菌のリゾチームによる溶菌過程の可視化やリゾチームの影響による表面粗さの時間変化を解析した。さらに、哺乳類細胞を観察するために既存の高速 AFM システムに簡易型の蛍光顕微鏡を導入し、目的細胞へのアプローチを容易に行えるようにし、細胞のエクソサイトーシスやエンドサイトーシスに伴う外膜変化を可視化することにも成功した。それに加え、走査信号を出力する D/A ボードの限界分解能を鑑みて、ピエゾドライバーの出力利得を調整することにより、より高分

解能な像を取得することにも成功した。

最近では、蛍光顕微鏡像と AFM 像を同時観察可能なティップスキャン型高速 AFM が開発され、タンパク質一分子の観察に成功している。しかし、タンパク質一分子スケールでの観察が限界であった。この一体型高速 AFM では、走査されるカンチレバーの XY 方向の動きを光テコ光学系でトラッキングするために、反射ミラーの傾きを走査している。このミラーの構造を最適化し、細胞観察が可能なレベルまでトラッキング範囲を拡大させた（従来の $20\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ から $53\ \mu\text{m} \times 32\ \mu\text{m}$ まで拡大）。さらに、この新規ミラーチルターの走査範囲に合致したカンチレバー走査用スキャナーを上述の変位拡大技術を応用しその走査範囲を拡大させた（従来の $6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ から $42\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ まで拡大）。

本研究で新しく開発され広域走査可能な高速 AFM スキャナーや、ティップスキャン型高速 AFM 向けに開発したトラッキング範囲拡大技術は、より複雑な系である細胞上で起こる生体分子のダイナミクスを可視化するに有効な技術であり、今後より広く活用されるものと期待される。

第 1 章 序論

1.1 研究の背景

地球上に存在する生物全てにおいて、「エネルギー代謝」、「物質代謝」、「分化」、「再生」、「複製」、「情報伝達」、「恒常性維持」、「死」などの様々な生命現象が起こっている。これら多様な生命現象を司るタンパク質は最も基本的な生体の構成要素であり、人工的な機械では到底実現することができない多彩な機能を発現する分子機械である。その仕組みを理解するツールとして、現在までに様々な技術が開発されてきた。タンパク質分子の構造学的な面では、オングストローム (Å) スケールでの構造が核磁気共鳴法 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) や X 線結晶回折などの手法で解析され、現在では簡単にその構造をデータベースから取得することができる。また、遺伝子工学の発展により野生型のタンパク質の任意のアミノ酸を置換することや、ドメインの欠損・追加を人為的に操作することが可能となり、より詳細なタンパク質の機能解明に寄与している。動態については、目的のタンパク質分子と蛍光物質を結合させ、レーザー等の励起光を照射することで発する蛍光シグナルを高感度 CCD カメラで捉える蛍光顕微鏡法が一分子生物学を牽引してきた。CCD カメラの高機能化に伴って、蛍光シグナルの位置情報を非常に精密に解析することが可能となり、これまで非常に多くの種類のタンパク質分子で時間・空間的な変化や数種類のタンパク質が混在した系での相互作用を捉えることに成功している。さらには目的分子にビーズを結合させ、集光させたレーザー光により捕捉・操作することでタンパク質間の結合力やタンパク質が発生する力も測定することが可能となっている。上述のように生体分子の構造と機能の解明のために様々な技術が開発・応用されてきたが、光学プローブを介せずにタンパク質一分子の構造と動態を直接観察する有効な手法が無かった。

「タンパク質一分子の構造と動態を直接観察する」ためには分子を十分に認識できるほどの高空間分解能と、機能を捉えるための高時間分解能が必須であるが、その要件を満たすと

期待されたのが原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy: AFM) [1] である。AFM は周りの環境 (真空中・液中・大気中) を問わず対象物をナノメートルのスケールで可視化することが可能である。しかしながら、従来型の AFM では安定な動作を得るために非常に遅い走査速度でしか稼働させることができず、1 画像を得るのに数分を要してしまうという重大な欠点があった。一方でタンパク質分子が機能する時間スケールは AFM のそれよりも遥かに短い。液中に在るタンパク質分子の構造動態をナノメートルスケールの分解能で観察するためには、AFM の画像取得時間を大幅に縮めることが必要不可欠である。

今までにいくつかの研究グループで AFM の高速化は試みられてきた。とりわけ、生体分子を対象とした AFM の高速化は Hansma のグループと金沢大学安藤のグループにより、1994 年頃から進められ、1998 年には DNA 分子を 1.7 s/frame という走査速度でイメージングした[2] と Hansma のグループから報告され、また安藤のグループは 2001 年にミオシン V 一分子を 80 ms/frame というイメージング速度で捉たと報告している[3]。これらの観察に利用された AFM では、基板上に弱く吸着した生体分子の観察に適したタッピングモード[4] を採用し、それに適した微小カンチレバーが開発された。また、さらなる走査速度向上のためにアクティブダンピング法[5] や、カンチレバー探針・試料間にかかる力を更に減少させるために、ダイナミック PID (Proportional Integral Derivative) 制御法[6] などの要素技術が開発された。これらの技術向上により、探針走査によるタンパク質分子へのダメージを最小限に抑え、且つ高速で走査することが可能になり、結果、様々なタンパク質分子の機能動態が明らかにされてきた[7]–[11]。

しかしながら、ほとんどの生命現象はタンパク質・糖質・脂質・核酸の複合体である細胞中で起こっている。これまではタンパク質一分子の構造変化、若しくは複数分子の相互作用を可視化してきたが、それは単に生命現象の一部を切り取って観察していることになる。生命現象は、あらゆるタンパク質分子が相互的に、また複雑に作用した結果であり、それを可視化することが強く望まれている。上で述べた蛍光顕微鏡法を細胞内分子に適用すること

で、細胞内でのタンパク質分子の振る舞いをイメージングすることも可能であり、さらには細胞内の温度分布も解析することが可能となっている[12]。しかし、これらの手法も蛍光性タンパク質や傾向色素を介して細胞膜内外で起こる動態を可視化するに留まっており、直接性に欠ける。一方、Korchev のグループは極小なガラスキャピラリー先端を流れるイオン電流を検出することで対象物を非接触でイメージングすることが可能な、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (Scanning ion-conductance microscope: SICM) を用いて、細胞膜上で起こるエンドサイトーシスを可視化することに成功した[13]。しかし、エンドサイトーシスに伴う細胞膜の詳細な形態変化を捉えるまでには至らなかった。

このような状況にあって、高時間・空間分解能を持つ高速 AFM を細胞観察に適用することができれば、生命現象に新たな知見をもたらすのではないかと期待される。しかし、これまで高速 AFM に用いられてきたスキャナーの最大走査範囲は高速性能を重視してきたため XY 方向で $6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ となっており、タンパク質分子の直接観察には適しているものの、細胞観察には適さない。そこで、走査範囲を拡大すべく、本研究課題において、スキャナーの構造を根本から見直し、新たに設計し直した。結果、XY 方向で $45\ \mu\text{m} \times 45\ \mu\text{m}$ まで走査範囲を拡大させることに成功し、また、この技術を用いてタンパク質分子よりも遥かに巨大なバクテリアや哺乳類細胞のナノスケールでのイメージングにも成功した。本研究で新たに開発された広域／高速走査スキャナーは、生きた細胞の動態変化を高空間・時間分解能でイメージングすることができるため、生命科学において今後広く活用されるものと期待される。

最近、蛍光顕微鏡像と AFM 像を同時取得可能なティップスキャン型高速 AFM が開発され[14]、タンパク質一分子の観察が行われた。しかし、タンパク質分子レベルの観察が限界であった。この一体型高速 AFM では、走査されるカンチレバーの XY 方向の動きを光テコ光学系でトラッキングするために、反射ミラーの傾きを走査している。このミラーの構造を最適化し、細胞観察が可能なレベルまでトラッキング範囲を拡大させた (従来の $20\ \mu\text{m} \times 3$

μm から $53 \mu\text{m} \times 32 \mu\text{m}$ まで拡大)。さらに、この新規ミラーチルターの走査範囲に合致したカンチレバー走査用スキャナーを上述の変位拡大技術を応用しその走査範囲を拡大させた（従来の $6 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ から $42 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ まで拡大）。Z 方向のスキャナーを大きく変位させた場合、X 方向にも変位してしまう問題が発生したが、ミラーチルターユニットに位相とオフセットを改変した走査信号を入力することでこの X 方向の変位を抑制することに成功した。

本研究で新しく開発され広域走査可能な高速 AFM スキャナーや、ティップスキャン型高速 AFM で適用された走査範囲拡大技術はより複雑な系である細胞上で起こる生体分子のダイナミクスの可視化に有効な技術であり、今後広く活用されることが期待される。

1.2 本学位論文の構成

1.2.1 高速 AFM の原理と装置 (第 2 章)

この章では、高速 AFM の原理と構成要素に関して説明する。また、高速化や試料に与えるダメージを軽減させるためにこれまで開発されてきた要素技術、Z スキャナーのアクティブダンピング法、ダイナミック PID 制御法についても併せて説明する。

1.2.2 高速 AFM 用広域スキャナーの開発 (第 3 章)

これまで高速 AFM に用いられてきたスキャナーは走査速度を優先させてきたために、最大でも $6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ の範囲が限界であった。そこで、XY 走査を行う構造を根本から見直すことで走査範囲の拡大に取り組んだ。従来のスキャナーでは板バネを XY 方向に直線的に押すことで変位させていたが、この方式では最大変位は圧電素子固有の最大変位までが限界である。そこでテコの原理をスキャナーに適用し、最終的な変位を圧電素子の最大変位の約 4 倍まで拡大させることに成功した[15]。現状の高速 AFM スキャナーでは起こることがなかった、最大走査範囲を拡大させるに伴う高速走査時の X 方向の振動、圧電素子固有のヒステリシス特性の顕在化、XY 方向走査時の干渉問題が発生した。この章ではこれらの問題への対策と、実際にその対策を適用した結果を説明する。

1.2.3 広域スキャナーを用いた生体分子イメージング (第 4 章)

広域走査型スキャナーの開発により、これまで不可能であった巨大なバクテリアや哺乳類細胞のライブイメージングが可能となった。実際に広域走査型スキャナーを用いて、枯草菌の溶菌過程の観察やラットカンガルー腎臓由来の PtK2 細胞のエクソサイトーシス現象のイメージング、さらにラット由来の 3Y1-B clone 細胞のエンドサイトーシス現象の可視化に成功した。また、細胞をイメージングする際にはタンパク質分子よりも巨大なため、カンチレバーと試料間の位置決めが重要な要素となる。そこで、従来の高速 AFM 装置に簡易

型蛍光顕微鏡を導入した[16]。この章ではこれらの結果に関して説明する。

1.2.4 ティップスキャン型高速 AFM の広域化に向けた技術開発 (第 5 章)

蛍光顕微鏡では蛍光標識された目的分子の挙動を蛍光像として観測し、高精度な位置解析によりその振る舞いを検出することができ、また多種類の分子が混在した系でも目的分子を識別ができるが、目的タンパク質分子の構造変化を可視化できない。一方、高速 AFM ではタンパク質一分子の動態を可視化できるが、分子のサイズや形で目的分子を認識するために、似たような形態のタンパク質分子が混在した系では識別が困難になる。このお互いの弱点を補って、さらに強力なツールとして期待されるのが蛍光顕微鏡一体型高速 AFM[14] である。しかし、タンパク質一分子スケールでの観察が限界であった。この一体型高速 AFM ではティップスキャン方式を採用しており、カンチレバー変位検出のためのレーザー光を反射ミラーの傾きを変えることで走査し、カンチレバーの XY 方向の動きをトラッキングしている。このミラーの構造を最適化して、XY 方向の最大トラッキング範囲を従来の $20\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ から $53\ \mu\text{m} \times 32\ \mu\text{m}$ まで拡大させることに成功した。さらに通常の高速 AFM 用広域スキャナーの技術をこの一体型高速 AFM にも適用することで、広域走査範囲のイメージングに成功した。

第2章 高速 AFM の原理と装置

2.1 AFM の原理

AFM は柔らかい板ばね（カンチレバー）の先端に付いている探針で試料表面をなぞり、探針・試料間の相互作用によって生ずるカンチレバーのたわみ量を試料表面各点で検出し、画像化する。そのため、使用する環境（真空中、液中、大気中）及び試料の物性を選ばないのが最大の特徴である。図 2-1 は AFM のシステム構成の模式図である。

AFM の探針－試料間に働く力は、カンチレバーのたわみから求められる。たわみ量の計測方式には、現在 AFM では一般的に用いられている光テコ法[4] がある。カンチレバーにレーザー光を当て、その反射光を 2 分割フォトダイオードで受ける。探針・試料間の相互作用によって生ずるカンチレバーのたわみにより、反射ビームの位置が変わり、各フォトダイオードに当たる光量に変化する。この各フォトダイオードからの出力の差が、カンチレバーのたわみに比例する。また、AFM にはいくつかの走査モードが存在するが、基板に弱く吸着したタンパク質分子のような柔らかい試料に最も適した走査モードとしてタッピングモード[17] がある。本研究においてもこのタッピングモードを採用している。このモードでは、カンチレバーホルダーに設置した piezo 素子を励振させてカンチレバーを共振周波数付近で振動させる。このカンチレバーの振動は、フォトダイオードの差動アンプによって検出され、その振動振幅を計測するために高速振幅計測回路に導かれる。振動するカンチレバーの探針が試料に接触するとカンチレバーの振幅が変化するが、このカンチレバーの振幅を一定に保つようにフィードバック制御により Z スキャナーを走査することで、試料の高さに依らず、一定の力での接触を維持することができる。試料ステージを XY 方向に走査しながら、Z 方向にフィードバック制御を行うと、試料ステージは試料の凹凸をトレースすることになる。したがって、スキャナーに加えた電圧を PC で読み取って 3 次元のグラフを描くと、試料の形状が再現される。

2.2 画像取得時間とフィードバック帯域

ひとつの画像を取得する一連の流れは高速 AFM においても同様であるが、その一連の流れに必要な時間を可能な限り短縮することで高速走査が実現される。一画像を取得するために必要な時間を T 、 X 方向の走査距離を L 、 Y 方向のピクセル数を N 、 X 方向の走査速度を V_s とすると T は以下のように表すことができる。

$$T = \frac{2L}{V_s} \times N \quad (\text{式 2.1})$$

ここで、 $2L$ になるのは X 方向に往復走査するためである。可能な画像取得速度は 2 つの因子で決まる。一つは X スキャナーの周波数帯域であり、もうひとつはフィードバック帯域である。 X スキャナーを完全にコントロールするためにはその共振周波数よりも十分に低い周波数で駆動しなければならない。そのため、 X 方向の走査速度を向上させるためには必然的に X スキャナーの共振周波数を高くしなければならない。次にフィードバック帯域であるが、試料の形状が空間的な周期 λ を持つ場合を考えた場合、試料ステージを V_s の速度で走査させると、空間周波数 $1/\lambda$ は時間周波数 V_s/λ に変換される。この時間周波数は、探針・試料間に働く力を一定に保つために、試料ステージを Z 方向に走査させる周波数ととらえることができる。フィードバック帯域 f_b は V_s/λ よりも広くする必要がある。したがって画像取得時間 T をフィードバック帯域で書きなおすと、

$$T > \frac{2L}{f_b \lambda} \times N \quad (\text{式 2.2})$$

となる。ここで、走査範囲が $250 \text{ nm} \times 250 \text{ nm}$ 、 Y 方向のピクセル数を 100、試料表面の凹凸の空間周波数を 0.1 nm^{-1} 、画像取得時間を 1 秒とした場合、フィードバック帯域は 5 kHz 以上と見積もることができる。タッピングモード AFM において、制御しなければならない量はカンチレバーの振幅値である。カンチレバーの振動振幅は試料表面に接触した際に小さく、試料表面から離れた際には大きくなる。この振幅値の変化を測定するには、最低でもカンチレバー振動周期の半分の時間は必要となる。カンチレバーの振動周期を f_c とすると、

振幅計測に起因するフィードバックの遅れは $1/2f_c$ となる。また、カンチレバーの振動振幅は試料表面に接触した時、直ちに变化するわけではない。 Q 値と呼ばれる共振スペクトルの鋭さを表す量と共振周波数によって決まる時間がかかる。その時間はカンチレバーの Q 値を Q_c とすると $Q_c/\pi f_c$ と表すことができ、これもフィードバックの遅れとなる。さらには、制御回路が働く時間と Z スキャナーが変位するのにかかる時間も考慮する必要がある。 Z スキャナーが変位する時間はカンチレバーの場合と同様に計算することができ、 Z スキャナーの Q 値を Q_s 、共振周波数を f_s とすると、 $Q_s/\pi f_s$ と表すことができる（但し、 Z スキャナーを階段波的に走査しない場合には、その限りではないが、以下では階段波で走査すると想定）。これらの遅れの他にも、フィードバックの遅れとなる要素がある。それは画像取得の際に起こるパラシューティングと呼ばれる現象である。パラシューティングとは、探針が試料表面から完全にはなれてしまった際、再び接触するまでに長い時間がかかる現象である。主に試料の高さが急激に低くなる場所で発生する。 Z スキャナーを駆動するフィードバック信号はカンチレバーの振幅値と目標振幅値の差で決まるため、探針が試料表面から完全に離れた場合のフィードバック信号はカンチレバーの自由振幅値と目標値の差に比例し、探針と試料表面がどれほど離れていても探針が試料表面に近づく速度は一定となる。つまり、パラシューティング時間は探針が試料表面から離れたときの探針-試料間の距離と、カンチレバーの自由振幅値と目標振幅の差(試料に探針を押し込む量)に比例する。よってパラシューティングを防ぐためには探針を試料に押し込めばよいのだが、探針を試料に押し込むと試料に加える力が大きくなってしまう。このパラシューティングにかかる時間を τ_p とし、またその他の遅れをまとめて δ とすると、遅れの総時間 $\Delta\tau$ は

$$\Delta\tau = \frac{1}{2f_c} + \frac{Q_c}{\pi f_c} + \frac{Q_s}{\pi f_s} + \tau_p + \delta \quad (\text{式 2.3})$$

となる。ここで、フィードバック帯域とは理想的な状況から位相が 45° 遅れる周波数と定義されるため、フィードバック帯域は

$$f_b = \frac{1}{8\Delta\tau} = \frac{1}{8\left(\frac{1}{2f_c} + \frac{Q_c}{\pi f_c} + \frac{Q_s}{\pi f_s} + \tau_p + \delta\right)} \quad (\text{式 2.4})$$

と表すことができる。

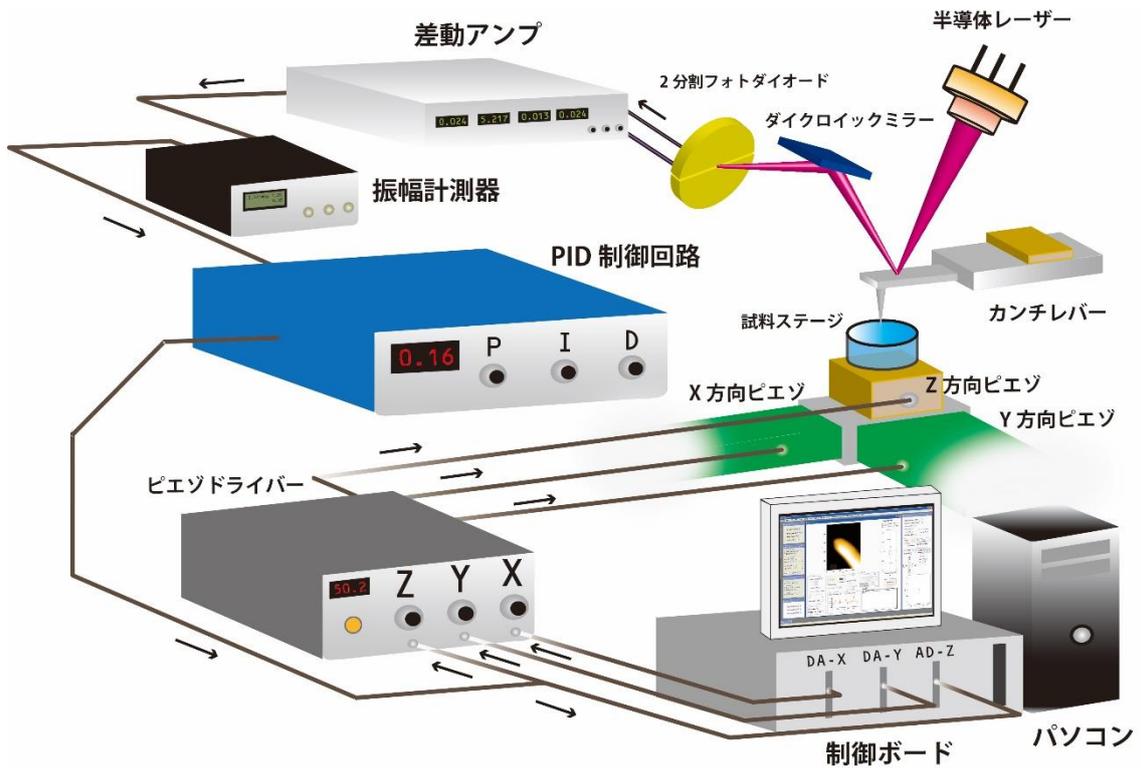


図 2-1 AFM システムの構成図

カンチレバーにスポット照射されたレーザー光の反射光が 2 分割のフォトダイオードに入り、振幅値が計算される。その振幅値をもとにフィードバック信号が生成され、Z スキャナーに入力される。同時に XY 方向に走査することで、試料表面の凹凸形状を画像化している。

2.3 高速 AFM デバイス

AFM の高速化に最も重要な事は、フィードバックの目標振幅からの差をいかに速く縮めることができるかということである。そのためにはシステムを構成している数々のデバイスを、限界まで高速化することが必須である。ここではそれぞれの要素デバイスに関して説明する。

2.3.1 高速 AFM 用カンチレバー

カンチレバーに関しては、高速走査と試料に与えるダメージの軽減を両立させるために必要な条件は、高い共振周波数と小さいバネ定数である。短冊形のカンチレバーの共振周波数 f_c とバネ定数 k_c は、 L :カンチレバーの長さ、 w :カンチレバーの幅、 d :カンチレバーの厚さ、 E :材質のヤング率、 ρ :材質の密度として、以下のように表すことができる。

$$k_c = \frac{wd^3}{4L^3} E \quad (\text{式 2.1})$$

$$f_c = 0.56 \frac{d}{L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}} \quad (\text{式 2.2})$$

これら 2 つの式より、高い共振周波数と小さいバネ定数という条件を満たすためには、カンチレバー自身のサイズを小さくする必要があることがわかる。高速 AFM 用の微小カンチレバーはオリンパス株式会社によって開発された[18]。サイズは $7\text{-}9 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m} \times 0.1 \mu\text{m}$ (長さ×幅×厚さ) となっており、バネ定数は約 $150\text{-}200 \text{ pN/m}$ である。カンチレバーの探針としては、走査型電子顕微鏡を用いてカンチレバーの先端に電子線を 1 点に集め、真空チャンバー内に充満させたフェノールを堆積させる電子ビーム堆積法を用いて作製される[19]。探針の長さは約 $1 \mu\text{m}$ 程度に設定する。図 2-2 に探針を付けたカンチレバー先端の電子顕微鏡写真を示す。

2.3.2 光学系

カンチレバーの変位検出には、一般的に光テコ法が用いられている。高速 AFM においても光テコ法が用いられているが、従来型の AFM と比較すると特殊な作りになっている。それは、使用するカンチレバーが非常に小さく、レーザースポットを細く絞るために光学顕微鏡用の対物レンズを使用している点である[3], [20]。カンチレバーの背面にスポット照射されたレーザーは反射され、再び対物レンズに戻り平行光となる。つまり、レーザーはほぼ同じ光路を戻ることになり、カンチレバーへ向かうレーザー光と反射光を分離させる必要がある。レーザーダイオードから出た光は、コリメートレンズによって平行光にされる。ここで、レーザーダイオードから出力されたレーザー光は直線偏光を持つ。レーザー光が偏光ビームスプリッターの偏光面と一致する偏光をもって入射すると、偏光ビームスプリッターを完全に透過する。偏光ビームスプリッターを出たレーザー光は $\lambda/4$ 板を通り、ダイクロイックミラーで反射する。ここで波長板を通過したレーザー光は円偏光に変換される。次に、対物レンズを通ったレーザー光がカンチレバーで反射すると、位相が 180° 変化する。このレーザー光が再び $\lambda/4$ 板を通過するときにもともとの偏光面と直交する直線偏光のレーザー光となる。そのため、カンチレバーでの反射光が再びダイクロイックミラーで反射されたレーザー光は、偏光ビームスプリッターを透過せず反射する。反射したレーザー光は、レーザーダイオードの波長の光を通すフィルターと、集光レンズを通過して、分割フォトダイオードに到達する。ダイクロイックミラーを通過する光でカンチレバーにレーザー光が当たる様子を CCD カメラで確認することができるため、アライメントが容易に行える。ここで、図 2-3 は上述の光路を示したブロック図である。

2.3.3 高速振幅計測器

励振させたカンチレバーの振幅は、2 分割のフォトダイオードからの信号をもとに振幅計測回路から出力される。フォトダイオードからの信号を 2 つに分け、片方の信号は位相を

90° 遅らせて、その信号がゼロ点をクロスする時点でタイミング信号を発生させる。この信号はサイン波のピークとボトムのタイミングを意味する。このタイミング信号をもとに、もう一方の信号のピークの値とボトムの値を別々のサンプル・ホールド回路でホールドし、そのホールドされた電圧の差を振幅値として出力する[3]。この高速振幅計測器は 2008 年ごろまで使用されていたが、ノイズ除去の目的でバンドパスフィルタ回路を通していているために遅れの原因となっていた。そこで開発されたのがフーリエ方式の高速振幅計測器である[20]。図 2-4(a)はそのフーリエ方式振幅計測器のブロック図である。まず、センサー信号は高速で A/D 変換され、デジタル乗算器で $\sin(\omega t)$, $\cos(\omega t)$ とそれぞれ掛け算される。掛け算の結果は $t = 2\pi/\omega$ の時間（これは 1 周期分に当たる）で積分される。ここで、乗算器への入力信号 $\sin(\omega t)$, $\cos(\omega t)$ は予め計算されており、デジタルの値でメモリに用意されているものである。1 周期後に得られた積分値はホールドされ、積分器の値はクリアされる。この積分演算を行うことで、 $\sin(\omega t)$, $\cos(\omega t)$ それぞれの係数、 A と B が算出される。この係数をそれぞれ自乗して、加算の後平方根をとると $\sqrt{A^2 + B^2}$ となり、この値が振幅値として出力される。このフーリエ方式振幅計測器は、前述のピークホールド方式振幅計測器と回路としてのノイズレベルに関しては大きく変わることはないが、カンチレバーの熱ゆらぎに対して強いという特性を持っている。また、図 2-4(b)はフーリエ式振幅計測器の実機写真である。

2.3.4 高速 AFM 用スキャナー

図 2-5 は現在使用されている高速 AFM 用スキャナーである。X,Y,Z すべての方向に積層型 piezoアクチュエーターが使用されている。構造的には、Z piezoに固定されたステージを X 方向の piezoが板バネを介して動かし、さらに X,Z piezoを一緒に Y 方向の piezoが板バネを介して動かすというものとなる[図 2-5(a), (b)]。赤矢印は圧電素子の動きを示している。最大の走査範囲は XYZ 方向で $1 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ となる。ここで、X 方向と Z 方

向にはカウンターバランス法 [20]が適用されている。まず X スキャナーでは、圧電素子が伸縮する二面を同じバネ定数を持つ板バネで挟み、Z スキャナーと対向する面にダミーのオモリを取り付けることで、両側の質量・弾性負荷を等しくしている。Z スキャナーに関しては、Z スキャナーの対向する面に全く同じ圧電素子と試料ステージを取り付け、それらを同期させて駆動させることで撃力を打ち消しあう。図 2-5(c)は高速 AFM 用スキャナーを横方向から見た図であり、Z スキャナーにおけるカウンターバランスと X スキャナーにおけるカウンターバランスがそれぞれ描かれている。ここで X 方向の圧電素子には NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0203D04F（自己共振周波数:261kHz、寸法:2 mm×3 mm×5 mm、150 V 印加時の最大変位量:4.6 μm）のものを使用、Y 方向には同様に NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0505D08F（自己共振周波数:138 kHz、寸法:5 mm×5 mm×10 mm、150V 印加時の最大変位量:9.1 μm）を使用しており、さらに Z 方向には PI 社製積層型ピエゾアクチュエーターPL033.30（自己共振周波数:367 kHz、寸法:3 mm×3 mm×2 mm、100V 印加時の最大変位量:2.2 μm）を使用している。さらに、試料を載せるステージは石英ガラスで作製されたものを使用しており、寸法は直径 Φ1.5 mm、長さ約 2 mm の円柱型で、重量は約 15 mg（株式会社ジャパンセル製）。その上に Φ1.5 mm にパンチされたマイカをエポキシ樹脂で接着して使用している。

2.3.5 Z スキャナーのアクティブダンピング法

フィードバック制御ループ内にはほとんどの電子回路と機械デバイスであるスキャナーとカンチレバーが含まれている。電子回路の帯域を向上させることは素子等の改良により、比較的容易に実現可能であるが、機械系の帯域を上げることは極めて困難である。機械系の周波数帯域を広げるということは、機械共振の周波数を上げるということを意味する。機械系の共振周波数よりも低い周波数で力を加えた場合には、その機械系は加えた力に追随して動作する。しかしながら機械系の共振周波数で力を加えた場合には、機械系の動きは力に

追従せずに、勝手に大きく振動してしまう。この問題の解決のために前述の板バネスキャナーが開発され、X方向の共振周波数は約 50 kHz まで向上した[20]。また、Z方向も同様に、対向する面に同一の圧電素子を配置し駆動させることでお互いの撃力を打ち消し合う形で問題を解決している。しかしながら、圧電素子自身もつ共振の Q 値が依然として高いという問題が残っている。この問題を解決するために、Q 値制御に基づくアクティブダンピング法という技術が開発された[5]。図 2-6(a)はアクティブダンピング法のブロック図である。通常、Q 値を下げる際には Z スキャナーの変位を測定し、その値に基づきダンピングすれば解決できるのだが、高速かつ小さい変位をモニターするのは非常に困難である。また、Z方向の変位は試料面に依存するため、予測困難である。このアクティブダンピング法では、Z スキャナーの変位を直接測定せず、Z スキャナーと同じ伝達関数を持つ LCR で構成された電気回路を擬似的な Z スキャナーとする。ピエゾドライバーに入力する信号をこの擬似的な Z スキャナーに入力し、その応答信号に基づき Q 値制御を行っており、Z スキャナーの Q 値を減らすことに成功している。図 2-6(b)は実際の Z スキャナーにアクティブダンピング法を適用した結果を示している。使用した圧電素子は PI 社製 積層型ピエゾアクチュエーター PL033.30（自己共振周波数:367kHz、寸法:3 mm×3 mm×2 mm、100 V 印加時の最大変位量:2.2 μm）である。ここで実線はアクティブダンピング適用後の特性であり、破線は適用前の特性を示している。さらに赤線は電圧利得を、青線は位相を表している。

2.3.6 ダイナミック PID(Proportional-Integral-Derivative)制御法

高速 AFM において、探針・試料間に働くタッピング力を小さくするためには、カンチレバーのバネ定数を小さくする、または、カンチレバーの自由振動振幅 A_{free} を小さくし、 A_{free} にフィードバック目標値 A_{sp} を近づけるという 2 つの選択肢がある。しかし、高速 AFM 用のカンチレバーのバネ定数をさらに小さくすることは技術的に限界に近い。また、フィードバックの目標値を A_{free} に近づける手法を用いても、カンチレバーが試料面から完全に離れ

てしまうことが頻発してしまう。この場合、探針が試料表面からいくら離れても、カンチレバーの振動振幅 A は自由振動振幅値 A_{free} となるため、フィードバックのエラー信号である $(A_{sp} - A)$ は一定の値で飽和することになる。フィードバック量は、この飽和しているわずかなエラー信号をもとにして決まるため、非常に小さな値となる。そのため、探針が再び試料表面に着地する際に長い時間を要してしまう。この現象を「パラシューティング」と呼んでおり、このパラシューティングが起こっている間、カンチレバー探針は試料表面をなぞることができず、試料表面形状の情報を得ることができなくなる。

このパラシューティングの問題を解決すべく開発されたのが、ダイナミック PID 制御法 [6]である。この手法では、ある閾値レベル(A_{upper})をフィードバック目標値 A_{sp} とカンチレバーの自由振動振幅値 A_{free} の間に設ける。カンチレバーの振幅値 A が A_{upper} を超えるとき、その引き算の信号 $(A - A_{upper})$ を増幅し、フィードバックのエラー信号に加算する。その信号が通常の PID コントローラーに入力されると、より大きなフィードバック量の信号が生成されるため、フィードバックエラー信号の飽和が起きている時間が大幅に短縮されることになる。一方で、 A が A_{sp} を下回る場合にも同じ操作を適用できる。ここで新たに閾値レベル(A_{lower})を導入し、これを A_{sp} と 0 の間に設定する。カンチレバーの振動振幅 A が A_{lower} よりも小さくなる時にその差分信号 $(A - A_{lower})$ を増幅し、フィードバックエラー信号に加算する。これにより、カンチレバー探針が試料を必要以上に強く押すことを防ぐことができる。パラシューティングとは逆に、試料の高さが急に高くなる試料などに効果が期待できる。このダイナミック PID 制御法の確立により、フィードバックの目標振幅値をカンチレバーの自由振幅値の 90%以上まで近づけることが可能となり [20]、パラシューティングの防止と試料のダメージ軽減に成功した。その他にも、フィードバック制御とフィードフォワード制御を組み合わせる手法もまた開発されている [21]。

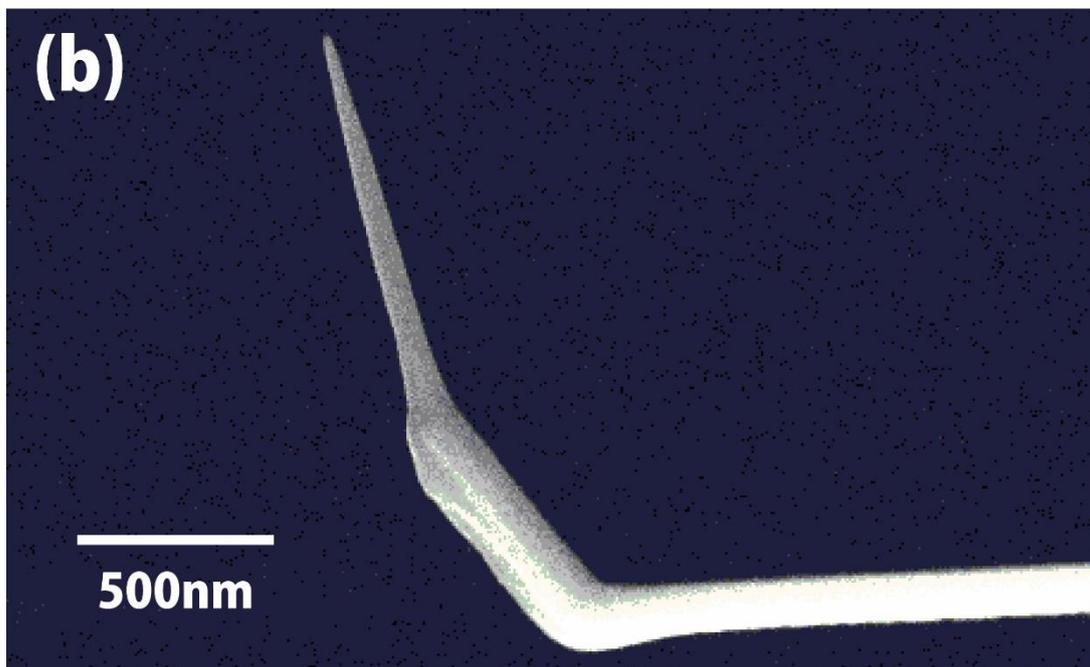


図 2-2 カンチレバー上に堆積されたフェノール探針の電子顕微鏡写真

(a)オリンパス社製 BL-AC10 高速 AFM 用カンチレバーに EBD 法を用いて、チャンバー内のフェノールを堆積させて探針を作成している。(b)探針の拡大図。

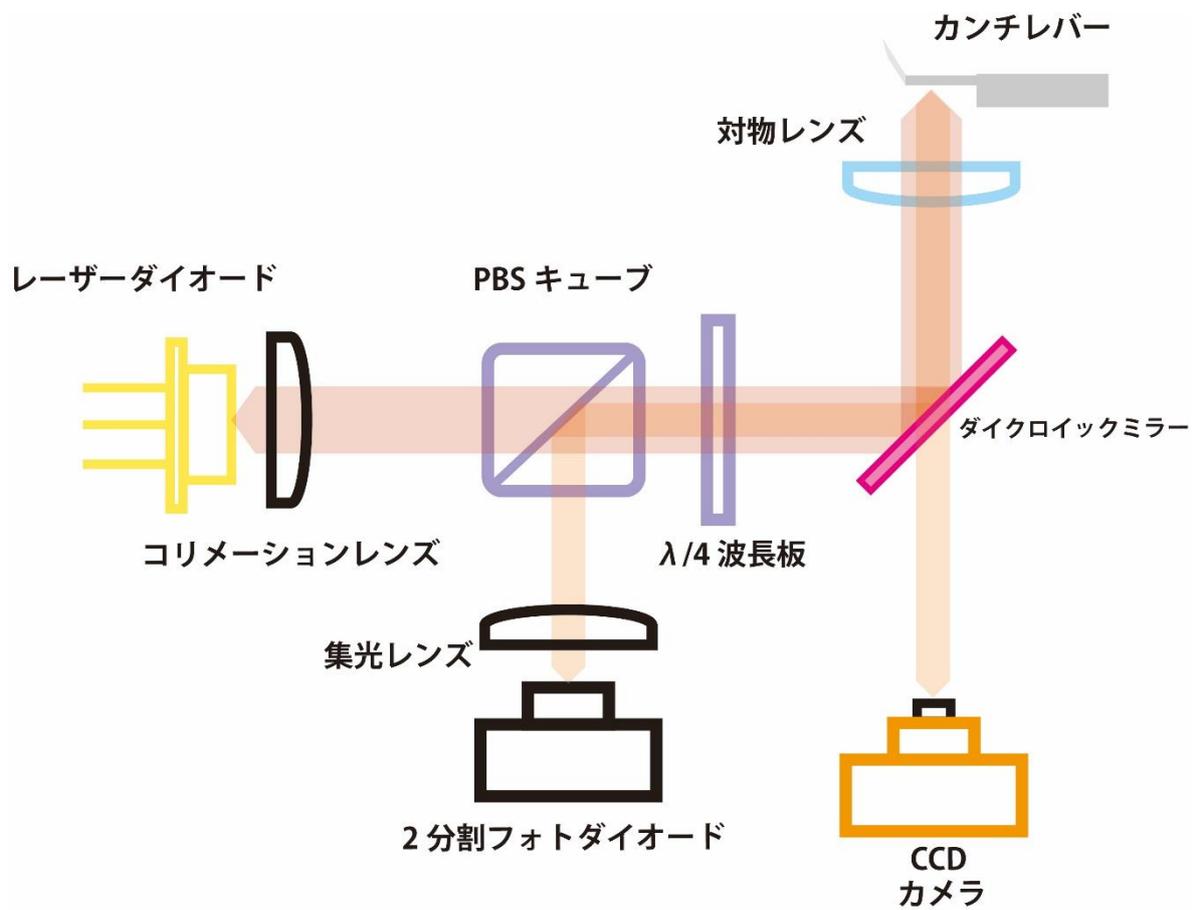
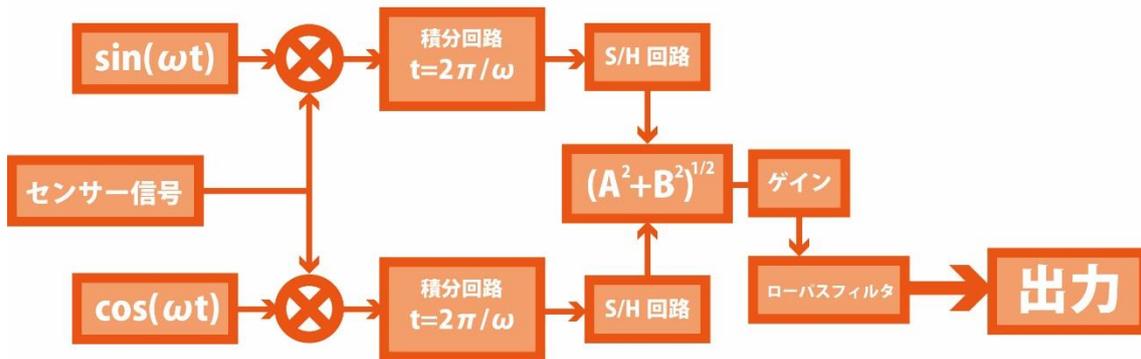


図 2-3 高速 AFM 装置の光学系のブロック図

レーザーダイオード素子から出た光はコリメーションレンズにより平行光になる。その平行光が PBS を通過し波長板を通ることで、円偏光となりカンチレバーに照射される。その反射光は PBS で光路を変えられて、2分割のフォトダイオードへ導かれる。

(a)



(b)



図 2-4 フーリエ式高速振幅計測器

(a)高速振幅計測器のブロック図。(b)フーリエ式高速振幅計測器の実機写真

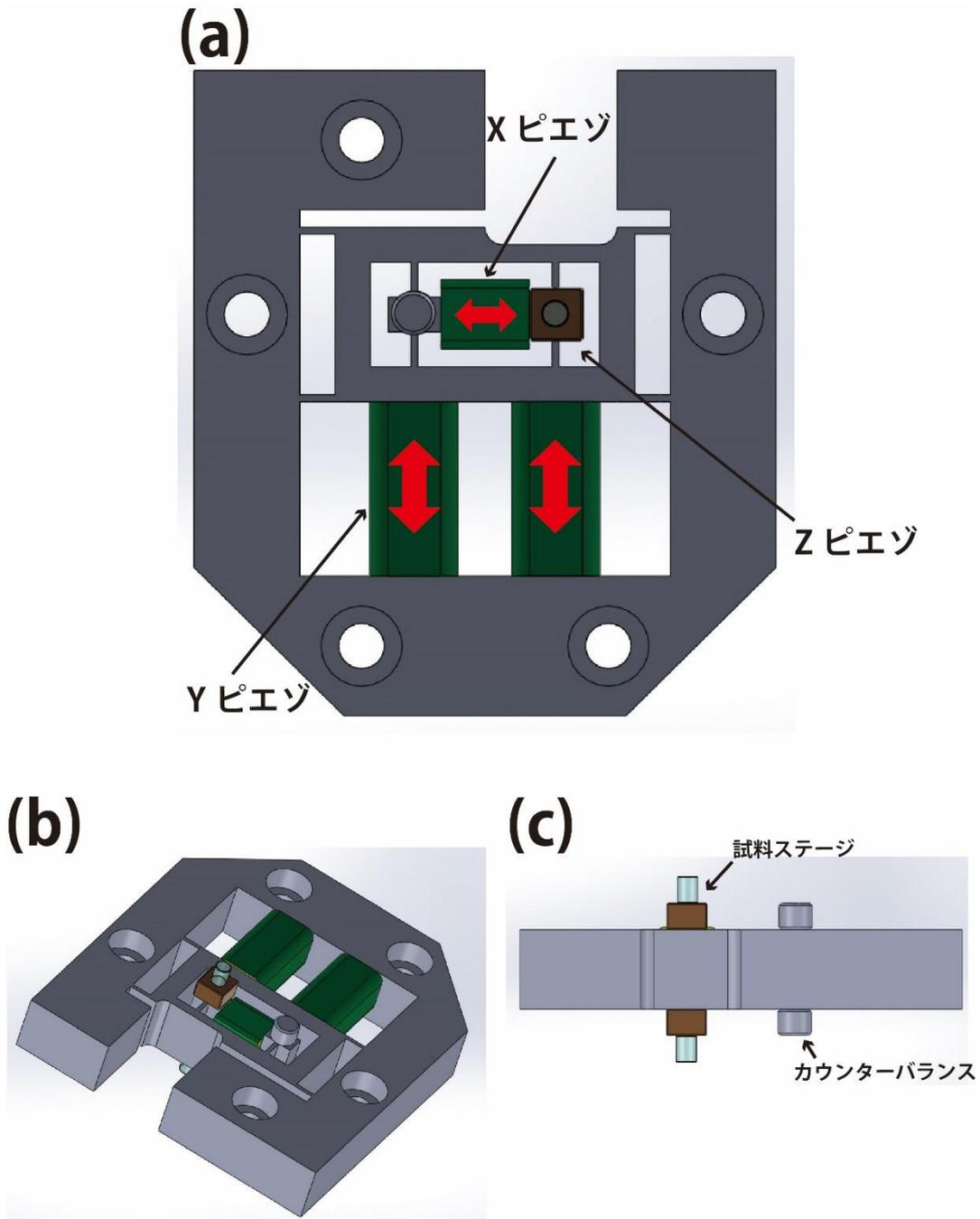


図 2-5 高速 AFM 用スキャナー

(a) 上から見た図。X ピエゾは板バネに挟まれ、Y ピエゾは片端のみ板ばねに接している。Z ピエゾは XY ピエゾで駆動される機械部に接着された構造をとっている。赤色の矢印は Piezo 素子の動く方向を表す。(b) 傾けて見た時の図。(c) 横方向から見た時の図。Z 方向には同一の Piezo 素子を対向する面に設置して、走査時の撃力を打ち消し合う。

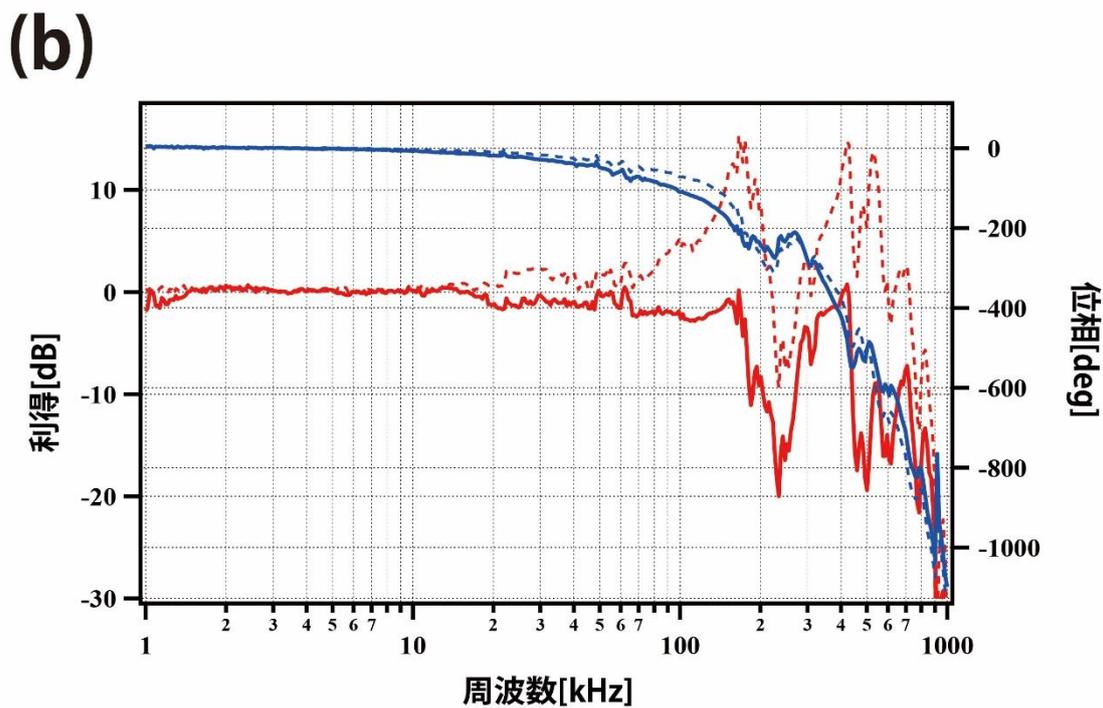
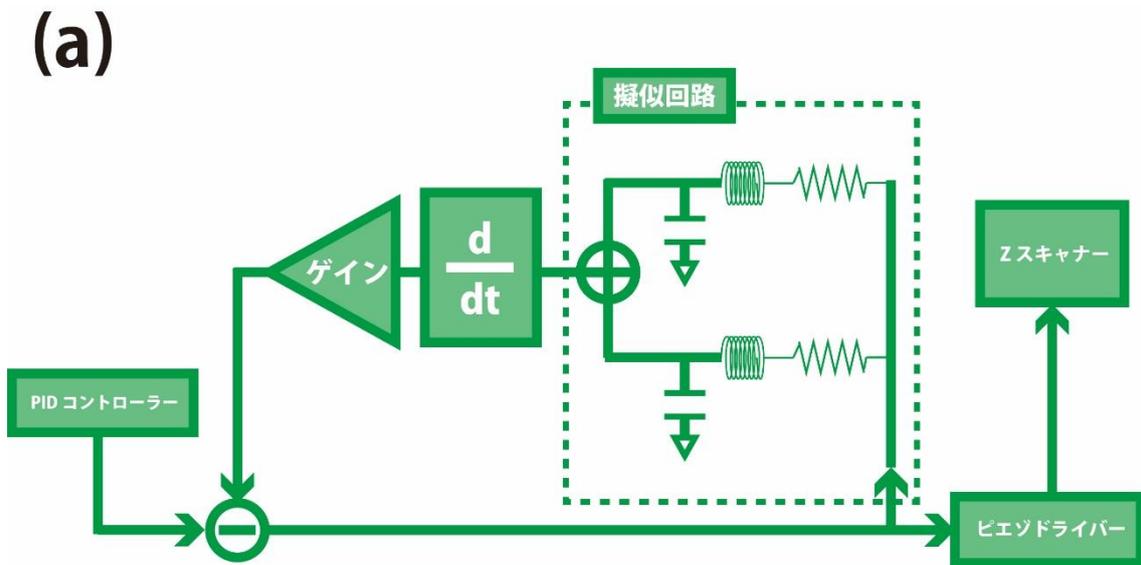


図 2-6 Z スキャナーのアクティブダンピング法

(a) Q 値制御に基づくアクティブダンピング法のブロック図。擬似的な Z スキャナーを電子回路で再現し、その応答をピエゾドライバーに入力している。(b) Z スキャナーのボード線図。実線がアクティブダンピング適用後、破線が適用前であり、赤線は電圧利得、青線は位相を示す。

第3章 高速 AFM 用広域スキャナーの開発

3.1 研究背景とその概要

これまで概説してきたように、当研究室では AFM の高速化と試料ダメージの低減化に向けて様々な技術開発を行ってきた。また、その他いくつかのグループで同じように高速 AFM の開発に力が注がれてきた[22], [23]。その結果、フィードバック帯域は ~ 100 kHz 程度にまで向上[24]し、タンパク質一分子の動態を 100 ms の時間分解能と 2-3 nm の空間分解能で捉えることが可能となった[7], [10], [11], [25]。現在では様々な精製されたタンパク質に高速 AFM が適用されている。例えば、高度好塩菌の細胞膜に存在する光駆動プロトンポンプタンパク質である bR にレーザー光を照射してその構造変化を捉えることで pH 依存性や、レーザー光の強度に依存した共同性を明らかにした[8]。また、ATP 合成酵素としてよく知られている F₁-ATPase [26] に関しても測定が行われて、この F₁-ATPase の回転に必須と考えられていた γ サブユニットを抜いた状態でも回転できることが明らかにされている[10]。その他にもシャペロンタンパク質として知られている GroEL-ES 間の相互作用の過程が高速 AFM によって、初めて明らかにされた[27]。さらには二次元結晶中における膜タンパク質のダイナミクスなども明らかにされている[28]。ここに挙げたように、高速 AFM は数々の技術開発を経て様々な種類の生体分子の動態を明らかにしてきた。

現在までその高時間・空間分解能と探針・試料間に働く力の低減化を達成するのと引き換えに、最大の走査範囲が犠牲にされてきた。現在高速 AFM 用のスキャナーとして主に用いられているタイプでは、最大走査範囲は X,Y,Z 方向で $1\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ に制限されている。これは上述のように、高速性と力の軽減化を求めた結果であり、最大走査範囲の拡大という目的とはトレードオフの関係となることは明らかであった。しかしながら、生命科学においては精製されたタンパク質を生理条件下で可視化することは、言わば切り取られた現象を見ているにすぎないという考え方もできる。可能であるならば、生きた細胞を生きた状

態のまま、その表面上の形態変化やダイナミックな現象を実空間・実時間で可視化したいという要求が高まっているのも事実である。その要求に応えるようにして、10 μm 以上の広範囲を走査できる高速 AFM いくつかのグループで開発された[29]–[31]。しかし、これらは固いシリコン製の標準試料での測定はできても、柔らかい生体分子のような試料には不向きなものであった。現在までに Fantner らのグループによって、抗菌ペプチドによって処理された大腸菌の外膜の形態変化の様子が高分解能・高速でイメージングできたとの報告がなされている[32]が、走査範囲としては高分解能イメージングの際には X,Y 方向でそれぞれ 3 μm \times 3 μm 、走査速度は 12.8 s/frame であり、また広範囲の場合には 9 μm \times 3 μm で走査速度が 128 s/frame と分の時間を要する結果となっている。ここまで述べたように、高速 AFM には課題として、広域をいかに速く走査できるかという課題がまだ残されているのである。

そこで本研究では、広範囲かつ可能な限り高速走査可能なスキャナーを開発するために、従来のスキャナーの構造を根本から見直すことに取り組んだ。今までは圧電素子を板バネで挟み込んだ構造にし、変位を拡大せずに動かしていたために最大走査範囲が著しく狭かった。そこで我々は、テコの原理をスキャナーに適用し、少ない変位から可能な限り大きな変位を生み出すことに成功した。結果として従来のスキャナーでは XY 方向で 1 μm \times 4 μm の走査範囲が限界だったが、この新しいスキャナーでは X,Y 方向でそれぞれ最大 45 μm \times 45 μm の範囲を走査できるようになった。しかし、このスキャナーでは変位量を大きくするため、長い圧電素子が組み込まれており、共振周波数が従来の 1/30 程度にまで低下してしまった。この共振周波数の低下によって高速走査時の X 方向の振動が顕著に現れたが、フィードフォワード法[29], [33]を用いてその振動を軽減させる事に成功した。また、広領域を走査する際に圧電素子の伸縮が線形に起こらないというヒステリシス現象が顕在化した。この現象も予め計測した圧電素子のヒステリシスをもとに走査信号を補正することで線形な走査が可能となった。さらには、スキャナーの構造に起因する XY スキャナー間

の干渉問題も、走査信号を補正することで軽減させることに成功した。

この章では高速 AFM 用広域スキャナーの構造から、上述のような問題に対する解決策としての諸技術に関して説明する。

3.2 広域スキャナーの設計

3.2.1 広域スキャナーの動作機構

図 3-1(a)は本研究で開発した高速 AFM 用の広域スキャナーの構造を示す図である。XY 方向に関してより大きな変位量を得るために、第三種テコの原理をスキャナーに取り入れた。材質はアルミニウム製 (A5052) であり、一枚の材から加工を行っている。通常、高速 AFM のスキャナーを作製する際には、0.4 mm 程度の非常に薄い板バネが必要であり、剛性を保つため一枚の材料から削り出している。ここで X,Y 方向ともに、圧電素子が Z スキャナーに対して対称になるように配置しており、どちらも圧入した後にエポキシ樹脂で固定している。使用している圧電素子は X,Y 方向共に NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーター AE0203D16F (自己共振周波数:69 kHz、寸法:2 mm×3 mm×20 mm、150 V 印加時の最大変位量:17.4 μm) である。図 3-1(b)はテコの原理を適用している箇所を拡大した図である。テコ (レバー) の全体の長さは 25 mm となっており、力点の位置は支点から 5 mm であり、テコ比が 1:4 になるように設計されている。Y 方向 (X 方向) の圧電素子が変位することで、支点を中心としてレバーが変位し、その変位量は作用点において設定したテコ比に従って拡大されることになる。ここで注目すべき点として、作用点の描く軌跡が挙げられる。これまでのスキャナーでは板バネを直線的に押すことで変位させていたが、第三種テコを採用した場合、必然的に支点を中心として円を描くように作用点に変位する。また、図 3-1(a)を見てもわかるように、X,Y 方向共にテコのレバーの先は、Z 方向の圧電素子が設置されている部分で連結されている。そのため、X 方向に動かしたときには Y 方向にも多少なりとも変位が発生する。Y 方向にも同様の事が言えて、Y 方向に動かした場合には X 方向にも動いてしまう。つまり、お互いがお互いを引っ張り合うことで干渉が発生することが明らかである。この解決策は後のセクションで詳細に説明する。

3.2.2 広域スキャナーにおける圧電素子の選定

スキャナーの変位を拡大するひとつの方法として、テコ比を大きく設計することが挙げられるが、走査速度（共振周波数）の低下に繋がるため限界がある。もう一つシンプルな手法として、力点における変位を大きくする方法がある。単純に考えれば圧電素子の全長が長いものを使用して変位を大きくすれば良いのだが、構造上の限界があるため、どこまでも長くすることは不可能である。そこで発生力が大きな圧電素子を選択することで、力点における変位を少しでも大きくすることができれば、結果的に作用点の変位も拡大されることになる。その考えのもとで、二種類の圧電素子を今回設計したスキャナーに設置した後、テコのレバーの各点において変位を測定し、比較した。その結果を図 3-2 に示す。ここでグラフの X 軸は変位の測定位置であり、Y 軸は測定された変位量である。使用した圧電素子はピエゾ I[NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0203D16F（自己共振周波数:69 kHz、寸法:2 mm×3 mm×20 mm、150 V 印加時の最大変位量:17.4 μm、発生力:200 N）]とピエゾ II[NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0505D16F（自己共振周波数:69 kHz、寸法:5 mm × 5 mm × 20 mm、150 V 印加時の最大変位量:17.4 μm、発生力:850 N）]の二種類である。青線はピエゾ I の測定結果であり、赤線はピエゾ II の測定結果である。さらにグラフ上の番号は、図 3-1(b)におけるテコのレバーに記された番号上で測定を行ったことを意味している。図 3-2 のグラフより、①: 支点から 5 mm の距離にある点における変位量は発生力が大きなピエゾ II の方が大きくなっているのがわかる。しかし測定位置が力点から離れるにつれて、つまり作用点に近づくのに伴って（それぞれ、②: 支点から 15 mm、③: 支点から 23 mm の距離）発生力の小さなピエゾ I の変位量が大きくなっているのがわかる。この理由としてはスキャナーの板と圧電素子との接着面積の違いが挙げられる。図 3-3 は接着面積の違いを模式的に表したものである。図 3-3(a)、(b) はそれぞれピエゾ I とピエゾ II の接着面積の違いと、変位した場合の軌跡を表している。拡大機構の構造上、支点を中心とした旋回運動が行われ、変位を大きくするためには圧電素

子変位前後の角度変化量が重要なとなる。ピエゾ II[図 3-3(b)]に関して、変位する方向（ここでは圧電素子の接着面方向）では直線的に動くことができるが、その大きな接着面積が原因で回転運動が妨げられる結果、最終的な作用点における変位が減少してしまう。そのため本研究で開発したスキャナーには、小さな面積で接着できるピエゾ I を選択した。その結果広域スキャナーの最大走査範囲は X 方向で 46.7 μm 、Y 方向でも 45.7 μm となり、変位の拡大に成功した。また、図 3-4 は実際の広域スキャナーの写真である。図 3-1(a)ではテコのレバーの周りに隙間があるが、低周波数の振動を抑制するために、ポリウレタンのゲル（人肌のゲル、株式会社エクシールコーポレーション、硬度=5、品番：H5-100）を実際には充填してある。

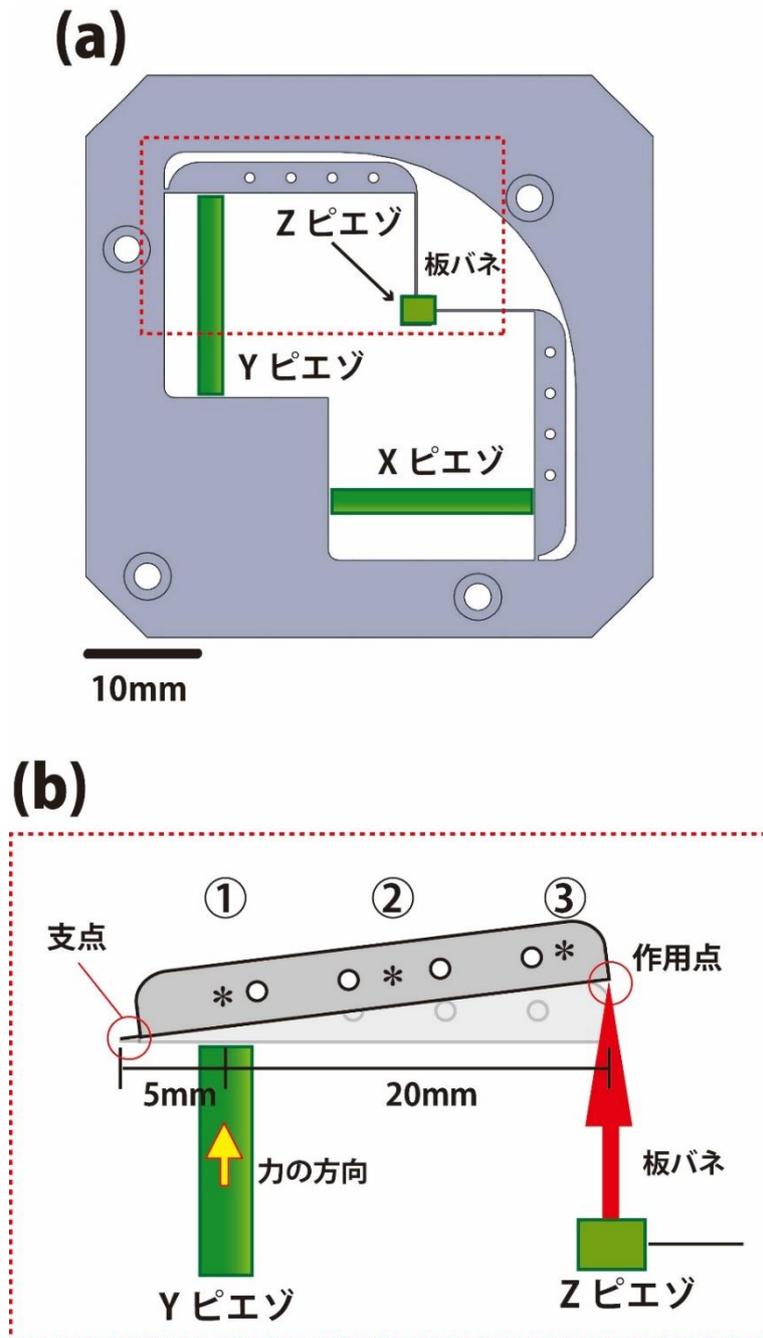


図 3-1 広域走査型高速 AFM スキャナーの模式図

(a)本研究で新たに開発された高速 AFM 用広域スキャナーの模式図。XY ピエゾの配置は Z ピエゾに対して対称になるように設計されている。(b)図 3-1(a)の赤破線部の拡大図。テコの腕の長さは 25 mm であり、テコ比は 1:4 になるように設計されている。アスタリスクは支点からの距離を示しており、①: 5 mm、②: 15 mm、③: 23 mm である。

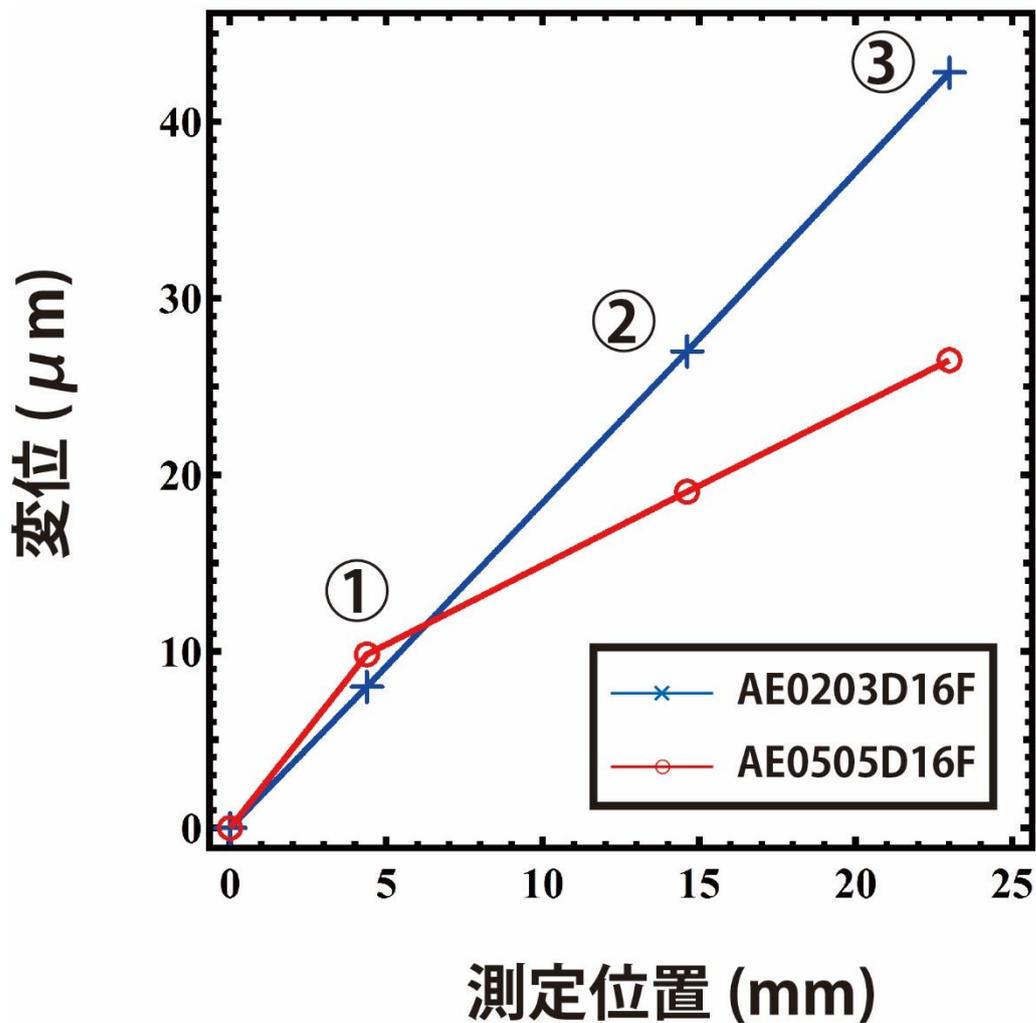


図 3-2 ピエゾ I、ピエゾ II を使用した際の最大変位量の比較

ピエゾ I (AE0203D16F : 2 mm×3 mm×20 mm、青線) とピエゾ II (AE0505D16F : 5 mm×5 mm×20 mm、赤線) をそれぞれ XY 方向のスキヤナーとして用いた時の変位量に関してレーザー変位計を用いて比較した。ここで各番号は図 3-1(b)におけるテコのレバー部に記された番号の位置で測定を行ったことを意味している。支点からの距離が離れるに連れて、発生力が小さなピエゾ I を用いた場合の変位量が大きくなることが示されている。

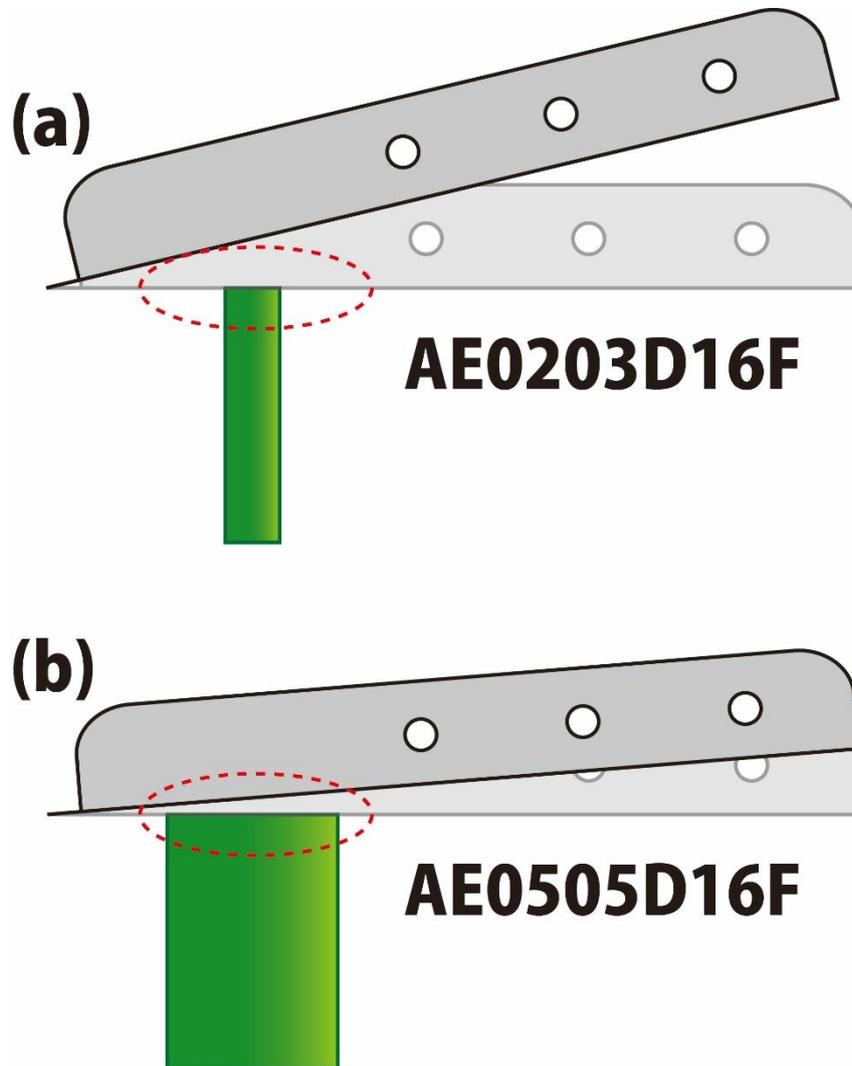


図 3-3 接着面積の違いによる変位抑制を示した模式図

テコのアームの変位に対して、ピエゾ素子の接着面積が及ぼす影響を示した模式図。(a)ピエゾ I(AE0203D16F)が変位した場合、(b)ピエゾ II(AE0505D16F)が変位した場合。発生力が大きいほど直線的な変位量は大きくなる。しかし接着面積も大きくなるため、支点を中心とした旋回運動が抑制される結果、作用点における最大変位量が小さくなる。

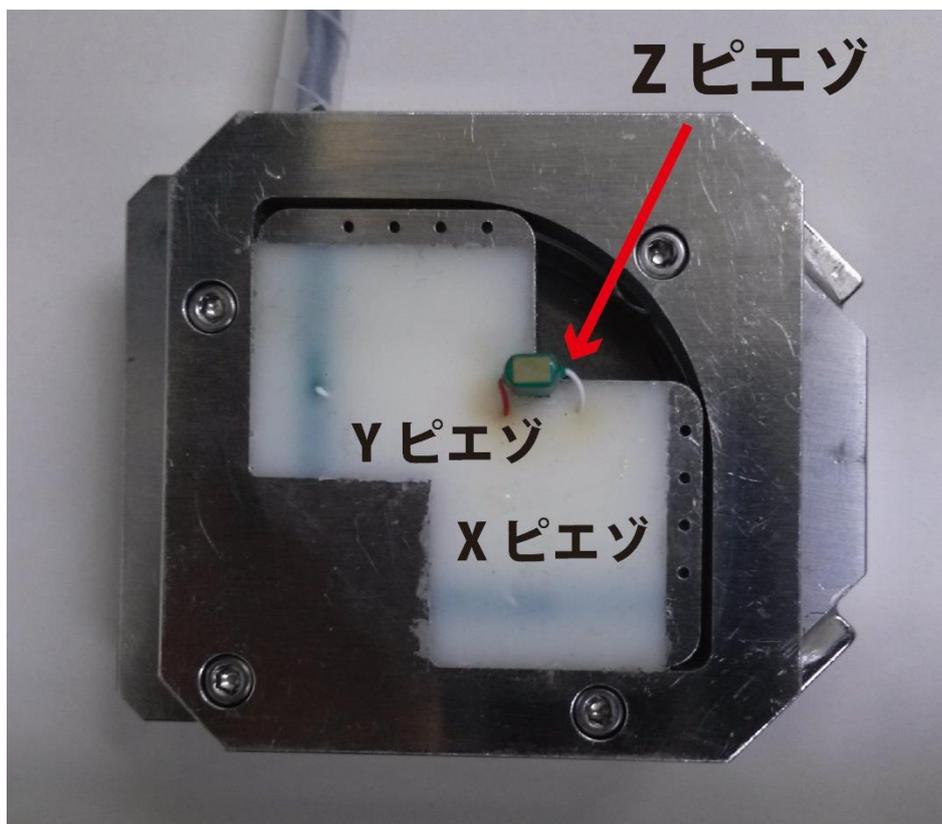


図 3-4 広域スキャナーの実機写真

本研究で開発された高速 AFM 用広域スキャナーの実機写真。写真中央部（XY ピエゾが挿入された箇所）は低周波の振動を抑制するため、ポリウレタンのゲルを充填している。

3.3 広域スキャナーの補正技術

3.3.1 X方向走査における振動問題

X方向の走査では、スキャナーは一般的に三角波で駆動される。三角波は、その折り返し点に高周波成分を持ち、次式のようにフーリエ級数展開することができる。

$$f(t) = \sum_{n=1}^{\infty} \left[\frac{8}{n^2\pi^2} \sin\left(\frac{n\pi}{2}\right) \right] \sin(n\omega t) \quad (\text{式 3.1})$$

この折り返し地点（三角波の頂点部分）の高周波成分がスキャナーに入力されると、自身の共振周波数の低さから振動が引き起こされる。一般的に、広域走査が可能な X スキャナーは共振周波数が低い。本研究で開発されたスキャナーも、従来の高速 AFM 用スキャナーと比較して低い値となっている。ここで図 3-5(a)は広域スキャナーの X 方向の振動特性を表したボード線図である。赤線は電圧利得を示しており、青線は位相の変化を表している。このグラフを見ると X スキャナーの共振周波数は約 2 kHz となっており、従来の高速 AFM 用スキャナーと比較して約 1/30 程度まで低下[20]している。ここで、X 方向の周波数特性はレーザー変位計測器（IWATSU 製、品番：ST3761）、周波数解析装置（NF 回路ブロック株式会社製、品番：FRA-5096）を用いて測定している。実際に X スキャナーに走査信号を入力し、その変位を測定した結果が図 3-5(b)である。黒線は入力信号である三角波を、赤線はその応答結果である変位を示している。入力信号の周波数は 28Hz であり、これは画像取得速度に換算すると 256 本の走査線（XY ピクセル数：256 × 256 pixel²）で 9 s/frame に相当する走査速度である。この走査速度においては、三角波の有効周波数は X スキャナーの共振周波数（約 2kHz）よりもずっと低いため、入力信号の三角波頂点部分で振動は発生していない。しかし、85 Hz の三角波を入力した場合には、三角波の高調波成分で励振され振動が起こった[図 3-6(a)]。

振動が発生せず安定な走査を実現するためには、入力信号（三角波）の基本周波数は、対

象となる機械系（ここでは X スキャナー）が持つ共振周波数の約 2%以内に抑える必要がある。この振動問題を解決するためには、根本からスキャナーの構造を変えることで機械系自身の共振周波数を向上させる方法と、振動を軽減させるように走査信号を補正する 2 つのアプローチが存在する。一つ目の機械系の共振周波数の向上であるが、ここでスキャナーの構造を変更すると走査範囲が犠牲となってしまうので選択することはできない。そこで本研究では、走査信号の補正によってこの問題を解決する。走査信号を補正することは、今までにいくつかのグループで試みられてきた。X スキャナーの走査信号として三角波の代わりに、サイン波を用いる手法がある[31]。サイン波はその頂点に高周波成分を持たず、振動問題に関して一番単純な解決方法であると考えられるが、折り返し点での線形性が失われてしまう。これには取得した画像の X 方向の両端を切り取る、もしくは伸縮したピクセル情報を再構築する等の工夫が必要であり、広域走査性が多少なりとも犠牲となってしまう。さらには走査信号として螺旋状のもの[34]や、サイクロイド曲線[35]を用いたもの、さらにはリサージュ曲線[36]を用いたものが応用されてきた。これらの曲線を走査信号として使用する際には、折り返し地点では高周波成分を含んでいないため、振動問題は解決できる。しかしながら螺旋状のものとサイクロイド曲線を走査信号としてイメージングを行うと、画像の X,Y 方向で両端が切り取られた形になり、走査範囲が小さくなってしまう。さらにはこの走査信号では通常の三角波に比べて線形性が乏しく、柔らかいカンチレバーを用いた場合にはそれが容易に捻られる方向にも走査されてしまい、試料の正確な高さ情報を得ることが困難となる。リサージュ曲線に関しては、そもそも走査信号を作成すること自体が困難なことに加えて、さらに走査信号に補正を施したい場合には計算が複雑になる。また、得られた画像自身にも再構成を施す必要があり、三角波に比べて非常に扱いづらい。そこで本研究では、走査信号は三角波をベースとして、その三角波を 2 つの手法を用いて補正することで振動問題を解決することを試みた。一つは逆伝達関数を用いたフィードフォワード式のダンピング法[28],[33] であり、もうひとつは三角波の頂点箇所を丸めることで高周

波成分を取り除くラウンディング法[20], [37]である。

図 3-6(b)はフィードフォワード式ダンピング法を走査信号に適用した後の、X スキャナーの変位である。黒線は入力信号、赤線は X スキャナーの変位を表している。この手法ではまず、図 3-5(a)で得られた X スキャナーの特性を用いて、その逆伝達関数を作成する。次にその逆伝達関数とソフトウェア上で予めフーリエ変換された走査信号を掛けあわせ、さらにその掛け合わされたものを逆フーリエ変換することで図 3-6(b)の黒線で示したような走査信号を作成している。この入力信号を見ると、三角波の頂点部分が補正されているのがわかる。この手法を適用することで、図 3-6(a)で見られた振動を打ち消すことに成功した。さらに高速な走査速度でもこのフィードフォワード式ダンピング法が適用できるのか確認するために、256 Hz の入力信号に対しても同様の測定を行った。ここで 256 Hz の速度は、画像取得速度に換算すると 256 本の走査線 (XY ピクセル数 : 256 × 256 pixel²) で 1 s/frame に相当する走査速度である。その結果を図 3-7 に示す。ここでも同様に黒線は入力信号、赤線は変位を表している。図 3-7(a)はダンピング適用前の入力信号と X スキャナーの変位を表しているが、図 3-6(a)の出力信号 (赤線) よりも大きな振動が発生している。しかし、ダンピングを適用することでこの振動も抑制することに成功しているのが確認できる[図 3-7(b)]。原理的にこのフィードフォワード式ダンピング法を用いれば、X スキャナーの動作周波数帯域を向上させることが可能である。しかし、実際に使用する場合には、電圧を供給する piezoelectric ドライバーの応答周波数やゲインも考慮しなければならず、技術的に限界がある。また、イメージングの際に試料に衝突する等の予期できない事象が起こると X スキャナーの周波数特性が多少なりとも変化する可能性がある。そのため、多く見積もっても 100 Hz を超える走査速度ではこの手法は効果が薄くなる。そこでもう一つ別の手法として、ラウンディング法[20] を X スキャナーに適用した。この手法の原理は先程のダンピング法よりも単純で、三角波に含まれる高周波成分を減らすことで振動を抑制するという手法である。技術的にも比較的容易に実行でき、三角波の頂点をどの程度丸めるのかをフーリエ級

数展開された(式 3-1) から導出して、走査信号を作成する。ここで図 3-5(a)の X スキャナーの周波数特性より、利得が増加し始める周波数が 500 Hz 付近であることがわかる。またここで、余分な振動が発生しうる利得の値が 1 dB であると仮定すると、走査信号として許容される周波数は約 780 Hz であることも図 3-5(a)からわかる。85 Hz で走査した場合を考えると、最も高い高周波成分の周波数は(式 3-1)において $n=9$ を代入した $[85 \text{ Hz} \times 9 = 765 \text{ Hz}]$ となり、780 Hz よりも低くなるのが計算できる。そこでフーリエ級数展開された三角波の第 9 次の項まで抜き出して再構成したものを走査信号として X スキャナーに入力した。図 3-8(a)にその結果を示す。黒線は走査信号で、赤線は応答信号を表している。フィードフォワード式ダンピング法を適用した場合と同様に、目立った振動が現れていないことがわかる。また、三角波の頂点を丸めてしまうことで起こる走査範囲の非線形性に関しては、線形ではない部分が走査範囲全体の 10%以内に収まっており、サイン波を入力した場合と比較して非常に小さな値となっている。実際のイメージングにはこの 2 つの手法を同時に X スキャナーへ適用しており、この X スキャナーの共振周波数の半分(約 1 kHz)の周波数で駆動させた場合でも変位の線形性が保たれていることが図 3-8(b)よりわかる。ここで図 3-8(b)の黒線は走査信号で、赤線は応答信号を表している。また、Y 方向走査に関しては、圧電素子は通常ノコギリ波で駆動させており、1 画像撮り終わる毎に初期位置に素早く引き戻される。その素早い動作が振動の原因となるが、走査線を 1 本犠牲にし、引き戻しの時間に充てることで振動を回避している。

スキャナーの変位を拡大させるために、通常の高速 AFM で使用される圧電素子よりも長いものを選択した結果、共振周波数が著しく低下した。その共振周波数の低下により、高速走査時に余分な振動が引き起こされたが、上述のようにフィードフォワード式ダンピング法とラウンディング法の 2 つの手法を適用することで、X スキャナーの共振周波数の半分の速度まで走査することが可能となった。

3.3.2 ヒステリシス特性に起因した非線形性の補正

一般的に圧電素子の変位量は、素子固有の圧電定数（伸縮係数）と印加する電圧の積に比例するため、より大きな変位を要求する場合には圧電定数の大きな材料を採用することが望ましい。また、圧電材料は自発分極を持ち、印加電圧によってその向きが反転する性質を持っている。もしも圧電定数の大きな素子を使用するならば、必然的に自発分極の大きさも増大するため、ヒステリシス（履歴）特性も著しく大きくなる傾向にある。つまり、大きな圧電定数を持つ圧電素子に電圧を印加して変位させた場合、その位置が同一の電圧において必ずしも一致しないことを意味している。具体的には、圧電素子のある一定の周波数を持つ三角波で駆動させた場合、往復の経路が必ずしも同じ経路をたどるわけではなく、非線形な領域が存在するということである[図 3-9(a)]。このヒステリシス特性はナノメートルスケールの精密な位置決めが必要な AFM のスキャナーにおいて非常に大きな問題となる。特に広域なイメージングの際に、最大走査範囲の 10~15%程度の位置情報の不一致が起こることが知られており、その影響は歪んだ AFM 像という形で現れる[38]。この問題を解決するためには、できる限りヒステリシス特性が小さい圧電素子を選択することが必要となる。しかしながら、本研究では高速 AFM 用スキャナーの変位拡大が大きな目的であり、圧電素子に関しても自身に十分な変位が要求される（圧電定数が大きい）ため、その方法は採用できない。そこで、圧電材料の非線形性を駆動方法で補償することで、この問題の解決を試みた。

広域をイメージングする AFM において、同様の問題が起こっており、いくつかのグループでその解決のための研究がなされてきた[39], [40]。基本的な手法として、圧電素子のヒステリシス特性を測定することでその非線形性を補正した入力信号を作成し、その補正信号で圧電素子を駆動させるという考え方である。この手法をスキャナー適用する際には二種類の手法に分類できるが、一つ目は閉ループ系（フィードバック方式）であり、もう一つは開ループ系（フィードフォワード方式）である。前者の閉ループ系では、実際にイメージング中にスキャナーの変位を測定しながら補正を行うため、非常に正確な駆動信号を作

成することが可能である。しかしながら、この閉ループ系を採用すると変位センサーをスキャナーに取り入れる必要があり、構造が非常に複雑になることに加えて、重量も増大するためスキャナーの周波数帯域が低下する。後者の開ループ系では、予め X,Y 方向のスキャナーのヒステリシス特性を測定しておき、その特性をもとにヒステリシス特性と逆向きの特性を持つ駆動信号を作成する。この操作はすべてソフトウェア上で行うことができるため、スキャナーの構造を変更する必要がなく、前セクションで説明したダンピング法等も合わせて適用することができる。そのため本研究では後者のフィードフォワード方式を採用した。

図 3-9(a)は広域スキャナーの X 方向におけるヒステリシス特性を示したグラフであり、X 軸は印加電圧を、Y 軸は変位量を表している。また赤線は X スキャナーを 40 μm 変位させたとき、青線は 25 μm 変位させたときの印加電圧と変位量を表している。さらに矢印は圧電素子の伸長と収縮の際の経路を示したものである。圧電素子が伸長する場合と収縮する場合で、同一の経路を辿ることはないことがこのグラフから明らかであり、同じ電圧を印加しているにもかかわらず、伸縮の方向で変位位置が変わり、正確な位置決めが困難な状態であることがわかる。また、変位量に依らずヒステリシス特性が現れているのも併せて確認できる。次にそのヒステリシスカーブの形状が、走査範囲に依らず同一であることを確認するために、図 3-9(a)で得られた特性を規格化した。その結果を図 3-9(b)に示す。先程と同様に赤線は X スキャナーを 40 μm 変位させたとき、青線は 25 μm 変位させたときの場合を表しており、黒線はこのヒステリシスカーブを多項式でフィッティングした結果を示している。このグラフより、赤線と青線がほとんど一致していることが示された。つまりヒステリシスカーブの形状は走査範囲の大小には無関係であり、ヒステリシス特性から駆動信号を作成しようとした場合、全ての走査範囲において補正が可能であることが確認できた。次に圧電素子の非線形性を打ち消すような駆動信号を作成するために、ヒステリシスカーブを多項式でフィッティングした。その際に用いた多項式は以下の様に表される。

$$f(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + a_4x^4 \quad (\text{式 3.2})$$

ここで、多項式の次数を増やせば増やすほど、より正確なヒステリシスカーブの情報を得ることができるが、実際にフィッティングを試した結果 4 次式で十分にフィッティングできると判断したため、(式 3-2)を採用した。そして、図 3-9(b)の黒線はそのフィッティングの結果を示している。このフィッティングカーブより、圧電素子のヒステリシス特性が打ち消されるような駆動信号を作成した結果が図 3-10 である。ここで黒線は作成された走査信号、赤線は応答信号を示している。この場合の走査信号は、まずヒステリシスの補正を行った後に前述したフィードフォワード式のダンピング法やラウンディング法を適用して作成されている。グラフより、圧電素子特有のヒステリシス特性を反映した（歪んだ）波形を入力する（黒線）ことで、線形な走査を可能にしていることがわかる。次にこの補正技術を用いて、10 μm のピッチを持つ標準サンプル（Budget Sensors 社、品番：HS-100MG）の測定を行った結果が図 3-11 である。図 3-11(a)で得られた AFM 像は、ヒステリシス補正を施していない入力信号でイメージングしたものであり、走査範囲は 33 μm \times 33 μm 、画像取得速度は 7 s/frame、走査線の本数は 256 本である。ここで 9 つの四角形の内、左上と右下の四角形の辺の長さを比較すると、XY 方向でそれぞれ約 20%と 15%程度変化していることがわかる。図 3-11(b)はヒステリシス特性を反映させた入力信号で、圧電素子を駆動させた場合に得られた AFM 像である。図 3-11(a)で見られた四角形の一辺の長さの変化は、補正を施すことで約 1%以内に抑えられたことが示された。ここでイメージングの条件は先程と同様に、走査範囲：33 μm \times 33 μm 、画像取得速度：7 s/frame、走査線の本数：256 本である。さらに、高速に走査した場合でもこのヒステリシス補正が有効であるか確認するために、画像取得速度 3 s/frame でイメージングした結果が図 3-11(c)である。ここでも走査範囲・走査線の本数は同一である。結果として高速で走査した場合でも、図 3-11(a)と比較して四角

形の歪みが改善されていることが確認された。

変位拡大機構を構成する際に、圧電定数が大きな圧電素子を選択することは避けられない。そのため、同一の電圧を印加した際に、圧電素子の変位位置が必ずしも一致しない（経路が非線形となる）ヒステリシス特性が顕著に現れてしまう。その問題を解決するために、フィードフォワード式のヒステリシス補正技術を XY スキャナーに適用し、線形な動作を確保することに成功した。しかしながら、図 3-11 においてグリッドの形状が正方形にはなっておらず、わずかに菱形に歪んでいるのが確認できる。これは X,Y 方向のスキャナーが互いに干渉しあって走査された結果であり、今回開発されたスキャナーの構造設計に起因する現象である。次のセクションではその干渉問題に対する解決策を説明する。

3.3.3 XY スキャナーの干渉補正

図 3-12 は Y 方向の圧電素子がテコのレバーを押した時の X スキャナーの動きを模式的に表した図である。これを見てもわかるように、テコのレバーの終端（Z スキャナーが設置されている箇所）が自由端となっており、X 方向に走査した際には Y 方向にも動き、逆に Y 方向に走査した場合でも若干ではあるが X スキャナーに影響を与えてしまう。ここで実際にどの程度の干渉があるかを確かめるために、X 方向に走査した時の Y スキャナーの変位、また Y 方向に走査した時の X 方向の変位をそれぞれ測定した。図 3-13(a)は X 方向に走査した場合の Y スキャナーの変位量を表し、(b)は Y 方向に走査した時の X スキャナーの変位量を表している。図 3-13 において、赤線は 30 μm 走査した際の変位を、緑線は 5 μm 走査した場合を表している。図 3-13(a)より、X スキャナーを 5 μm 走査した場合には Y 方向に約 120 nm 変位しており、30 μm 走査した場合には約 500nm 変位しているのがわかる。これより、干渉の割合は 0.017 (17 nm/1 μm) と計算された。同様に図 3-13(b)においては、Y スキャナーを 5 μm 走査した場合約 120 nm、30 μm 走査した場合約 700 nm 変位しているのがわかる。

この干渉の対策として、設計の段階で XY 方向どちらにももう一つ板バネを追加することで線形な動きが補償されるが、最大走査範囲が確実に抑制されてしまう。X 方向に走査している場合、スキャナーは Y 方向に多少変位しているためその変位とは逆向きに電圧を Y ピエゾに印加すれば干渉を抑えることが可能である。また同様に Y 方向に走査する際、X 方向に変位するため、打ち消す方向に X ピエゾに電圧を印加すれば互いの干渉は抑えられる。またこの方法を用いれば、前述したダンピング法やラウンディング法、ヒステリシス特性の補正等の走査信号の改変を併せて行うことが可能である。ここで、図 3-13 の黄線と黒線はそれぞれ XY 方向の干渉補正を適用した後の、5 μm 走査時と 30 μm 走査時の変位量の関係を表しており、X および Y 方向に走査した場合でもほとんど X,Y 間の干渉を抑えられていることがわかる。結果としてこの補正法を広域スキャナーに適用することで、X,Y スキャナー間で発生していた干渉を抑えることに成功した。図 3-14 はこの X,Y 干渉補正をスキャナーに適用した場合に得られたグリッド標準サンプルの AFM 像である。ここでイメージング時の条件は、走査範囲：33 μm \times 33 μm 、画像取得速度：7 s/frame、走査線の本数：256 本となっている。さらにこの測定の際には同時に、スキャナーにダンピング法とラウンディング法、さらにヒステリシス補正を施している。図 3-14(a)は XY 干渉補正を施す前の AFM 像であり、グリッドの穴部分（黒い四角形）が菱形に歪んでいるのが確認できる。図 3-14(b)はスキャナーに XY 干渉補正を施した後の標準サンプルの AFM 像であり、菱形に見えていたグリッドが正方形に修正できているのがわかる。さらに図 3-15 は図 3-14 のグリッド部分を拡大した AFM 像である。測定時の条件は、走査範囲が 15 μm \times 15 μm 、画像取得速度が 7 s/frame であり、走査線の本数は 256 本である。ここでも同様に菱形に見えていたグリッドの形状が、正方形に補正されているのが確認できる。結果として XY スキャナーにそれぞれ、反対の方向に変位するような信号を入力することでお互いの干渉を抑制することに成功した。

3.3.4 Z スキャナー

第 2 章でも記したが、柔らかい生体分子をイメージングする場合に最も重要な条件の一つとしてフィードバック帯域が挙げられる。なぜならば、試料表面をなぞる Z スキャナーの動きが遅れることで試料に対して余計な力がかかり、結果的にカンチレバーによって、柔らかいタンパク質などの生体分子は容易に破壊されてしまう。フィードバック帯域は、電気回路系の応答特性や Z スキャナーに用いられる圧電素子の応答特性、カンチレバーの共振周波数、その他にも測定条件などの様々な遅れの要素によって決定される[20], [41]。中でもフィードバック走査の遅れの原因として顕著なものが Z スキャナーの遅れである。現在高速 AFM 用の Z スキャナーとして使用されている圧電素子として、共振周波数が約 180 kHz 程度のものを使用しており、最大変位量もタンパク質分子等の小さな対象物向けに最適化されている。しかしながら、本研究において観察対象となるのは、タンパク質分子よりも遥かに巨大な、細菌や生きた哺乳類細胞である。そのため広域スキャナーには Z 方向にも大きな変位が期待できる圧電素子を適用しているのだが、変位が大きくなると必然的に共振周波数も低下する。広域スキャナーの Z スキャナーとして使用している圧電素子は NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーター AE0203D04F（自己共振周波数:261kHz、寸法:2 mm×3 mm×5 mm、150 V 印加時の最大変位量:4.6 μm）である。図 3-1(a)に示すように、この圧電素子をテコのレバーに連結した板ばねの終端にあるブロックにエポキシ樹脂で接着・固定している。また、Z 方向走査時の急な変位の際に発生する撃力を抑えるためのカウンターバランスとして、同一の圧電素子を裏側に配置している[20], [41]。図 3-16 は Z スキャナーの周波数特性を示したボード線図である。赤線は電圧利得を表しており、青線は位相を表している。また、ここで共振周波数を測定するときに、Z スキャナーに Φ1.5 mm のガラスステージを装着している。この Z スキャナーの共振周波数は 90 kHz であり、通常の高速 AFMZ スキャナーの約半分の値にまで低下している。さらにこの 90 kHz に現れるピークは、アクティブダンピング法[5] を用いて抑制しており、図 3-16

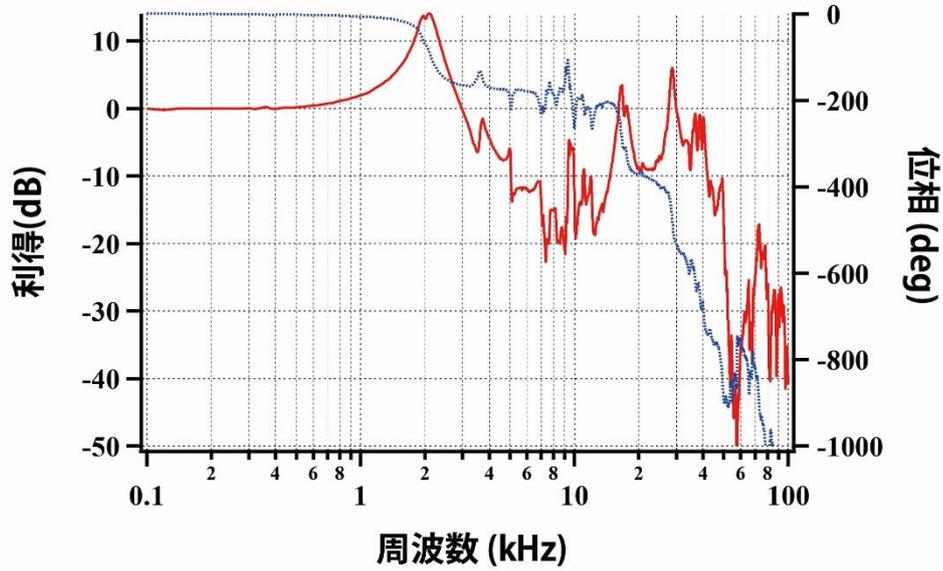
の破線がアクティブダンピング法適用後の Z スキャナーの周波数特性である。アクティブダンピング法適用後の電圧利得は約 3 dB であり、さらに抑制することも可能であるが、過剰な抑制は位相もまた遅らせてしまうことに繋がるため、この値に設定している。

Z スキャナーの走査可能速度を確認するため、前セクションで使用した標準グリッドサンプルをそれぞれ異なる画像取得速度でイメージングし、AFM 像及びエラー信号像のクロスセクションをとった。その結果を示したグラフが図 3-17 である。ここで、画像取得速度は 3 s/frame[図 3-17(a),(b)上段]、10 s/frame[図 3-17(a),(b)中段]、20 s/frame[図 3-17(a),(b)下段]であり、走査速度で換算するとそれぞれ 6.8 mm/s、2.0 mm/s、1.0 mm/s となる。また走査範囲が 33 μm \times 33 μm 、走査線の本数が 256 本という測定条件で実験を行っている。この測定の際にはダイナミック PID 制御法[6] もまた適用しており、どの走査速度でも標準グリッドサンプルの端の箇所におけるパラシューティングを抑制できていることが明らかである[図 3-17(a)]。また、図 3-17(b)は(a)と同時に取得した標準グリッドサンプルのエラー信号を表しており、3 s/frame という高速走査時においてもエラー信号はグリッドサンプルの端の部分のみで確認され、その他の平坦な範囲ではほとんどエラー信号は確認されないことがわかる。さらに図 3-18 では、図 3-17(a)で得られたクロスセクションから、グリッドの高さのヒストグラムを求めている。そのヒストグラムから得られた値はそれぞれ 276 nm[3 s/frame : 図 3-17(a)上段]、279 nm[10 s/frame : 図 3-17(a)中段]、276 nm[20 s/frame : 図 3-17(a)下段]となっており、画像取得速度に依らず Z スキャナーへのフィードバックが正確に実行されていることが示された。

この測定で用いられた Z スキャナー用の圧電素子は、最大変位が 100 V 印加時で 2.5 μm に制限されている。もしもさらに大きな変位が必要となった場合には、より長い(変位が大きな)圧電素子[NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーター AE0203D08F (自己共振周波数:138 kHz、寸法:2 mm \times 3 mm \times 10 mm、150 V 印加時の最大変位量:9.1 μm)]を使用することも可能である。しかし、この圧電素子を使用すると必然的に Z スキャナー

の共振周波数も低下することになり、画像取得速度を犠牲にすることになる。具体的には、この圧電素子を使用した場合、走査範囲が $33\ \mu\text{m} \times 33\ \mu\text{m}$ 、走査線の本数が 256 本の測定条件では画像取得速度は約 7 s/frame が最速となる。

(a)



(b)

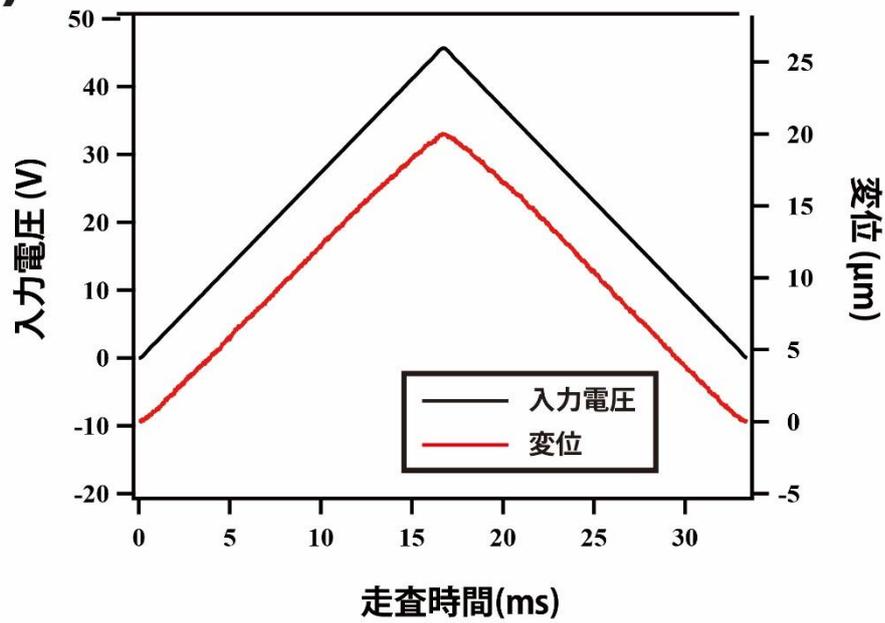


図 3-5 広域スキャナーの周波数特性

(a) 広域スキャナーの X 方向の周波数特性を示したボード線図。X スキャナーの共振周波数は約 2kHz。(b) X スキャナーに 28 Hz の三角波（黒線）を入力した場合の応答信号（赤線）。ここでは三角波に補正は施していない。

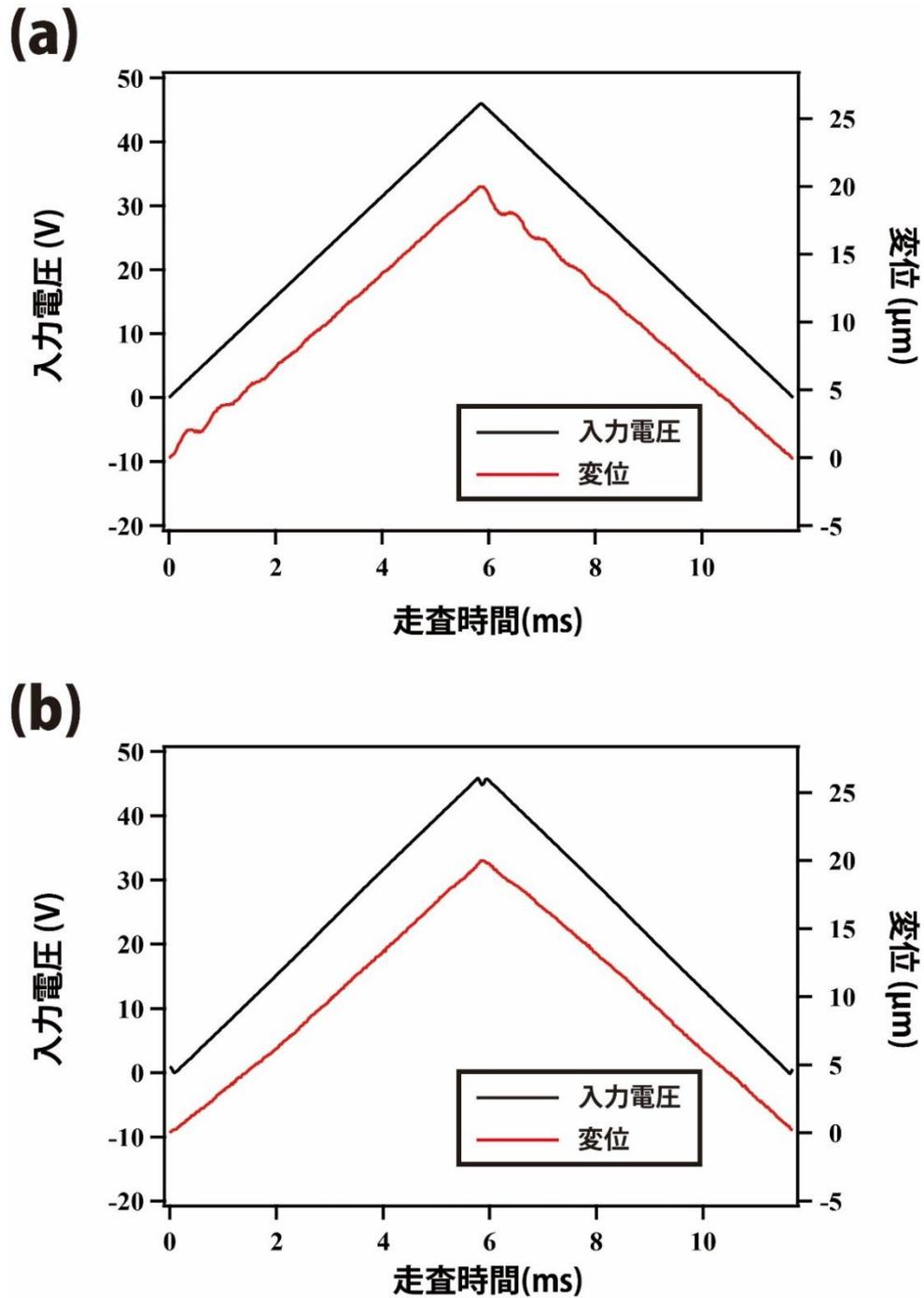


図 3-6 フィードフォワード式ダンピング法の効果(85 Hz 走査)

85 Hz の三角波を X スキャナーに入力した時の応答信号を示す。(a)補正をしていない三角波 (黒線) を入力すると、折り返し点を過ぎた直後に振動が発生する (赤線)。(b)フィードフォワード式ダンピング法を適用して補正した波形 (黒線) を入力すると、振動が抑制される (赤線)。

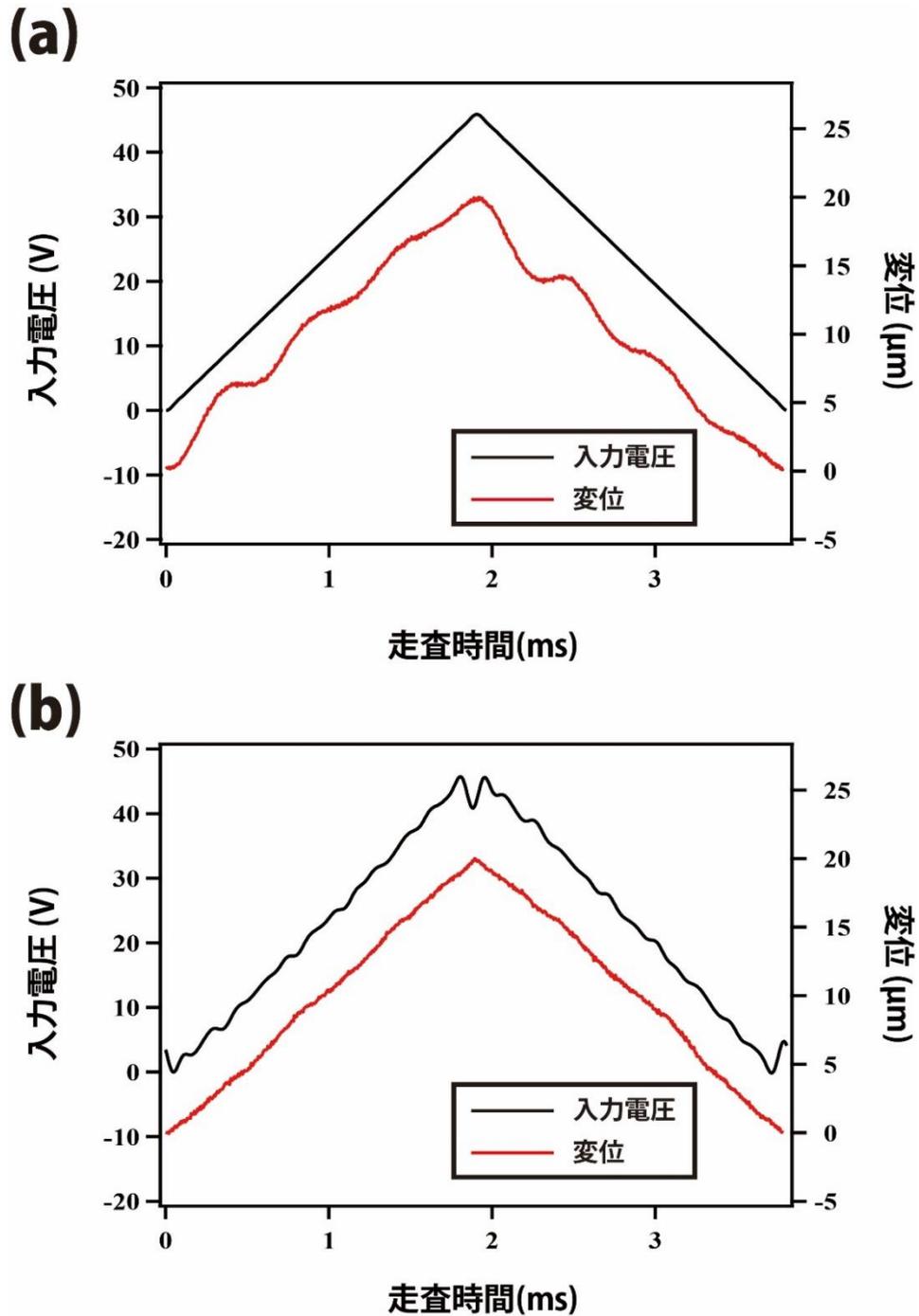


図 3-7 フィードフォワード式ダンピング法の効果(256 Hz 走査)

256 Hz の三角波を X スキャナーに入力した時の応答信号を示す。(a)補正をしていない三角波(黒線)を入力すると、図 3-6(a)の場合よりもさらに大きな振動が発生する(赤線)。(b)同様にダンピング法を適用して補正した波形(黒線)を入力すると、振動が抑制される(赤線)。

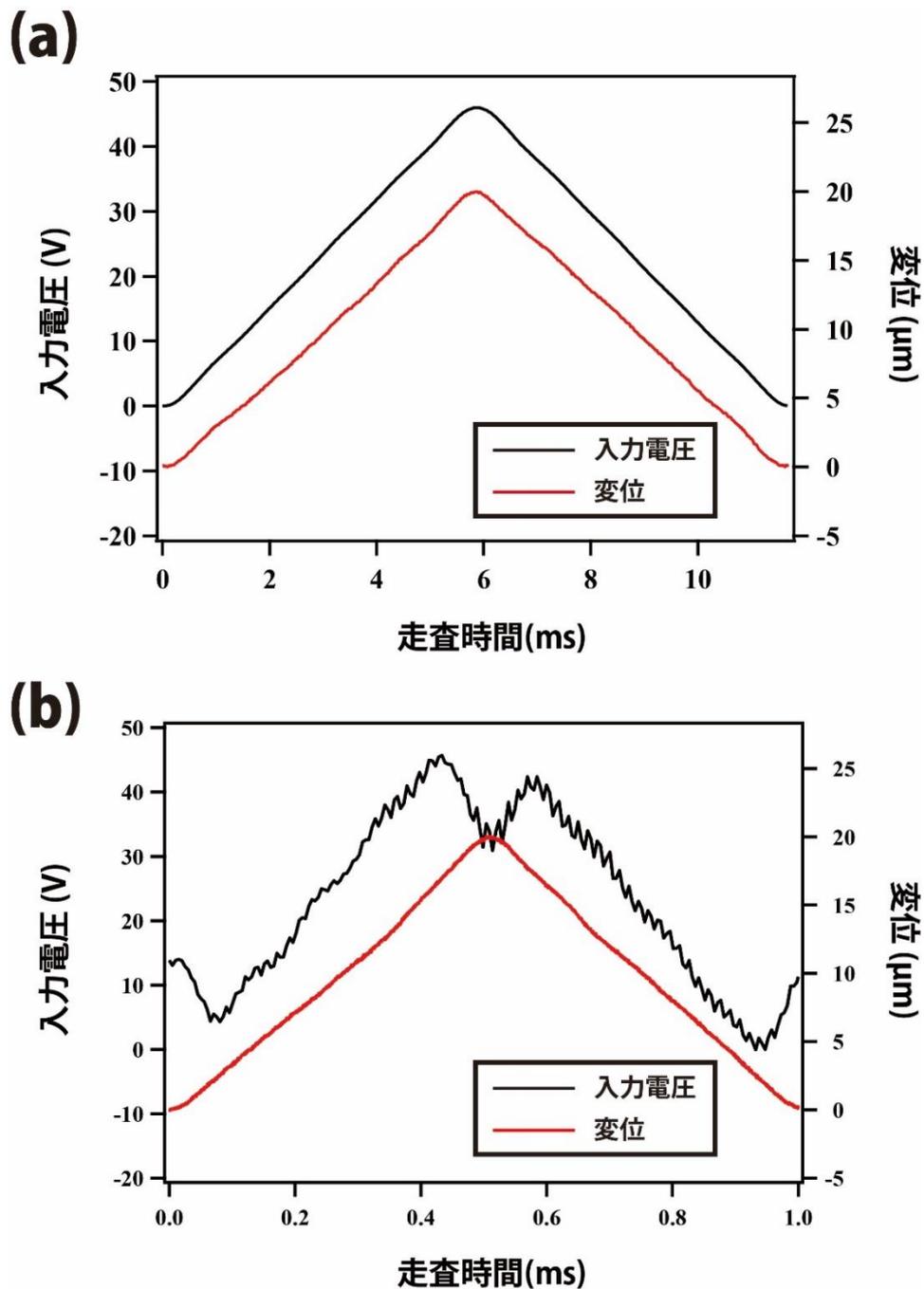


図 3-8 ラウンディング法の効果(85 Hz 走査)と組み合わせ補正の効果(1 kHz 走査)

(a) 85 Hz の三角波をフーリエ級数展開し、9 次の項までを用いて再構成した波形 (黒線) を入力した時の応答信号 (赤線)。(b) 1 kHz の三角波にフィードフォワード式ダンピング法とラウンディング法を適用した時の波形 (黒線) と応答信号 (赤線)。X スキャナーの共振周波数の半分という周波数にもかかわらず、安定な動作が可能であることが示された。

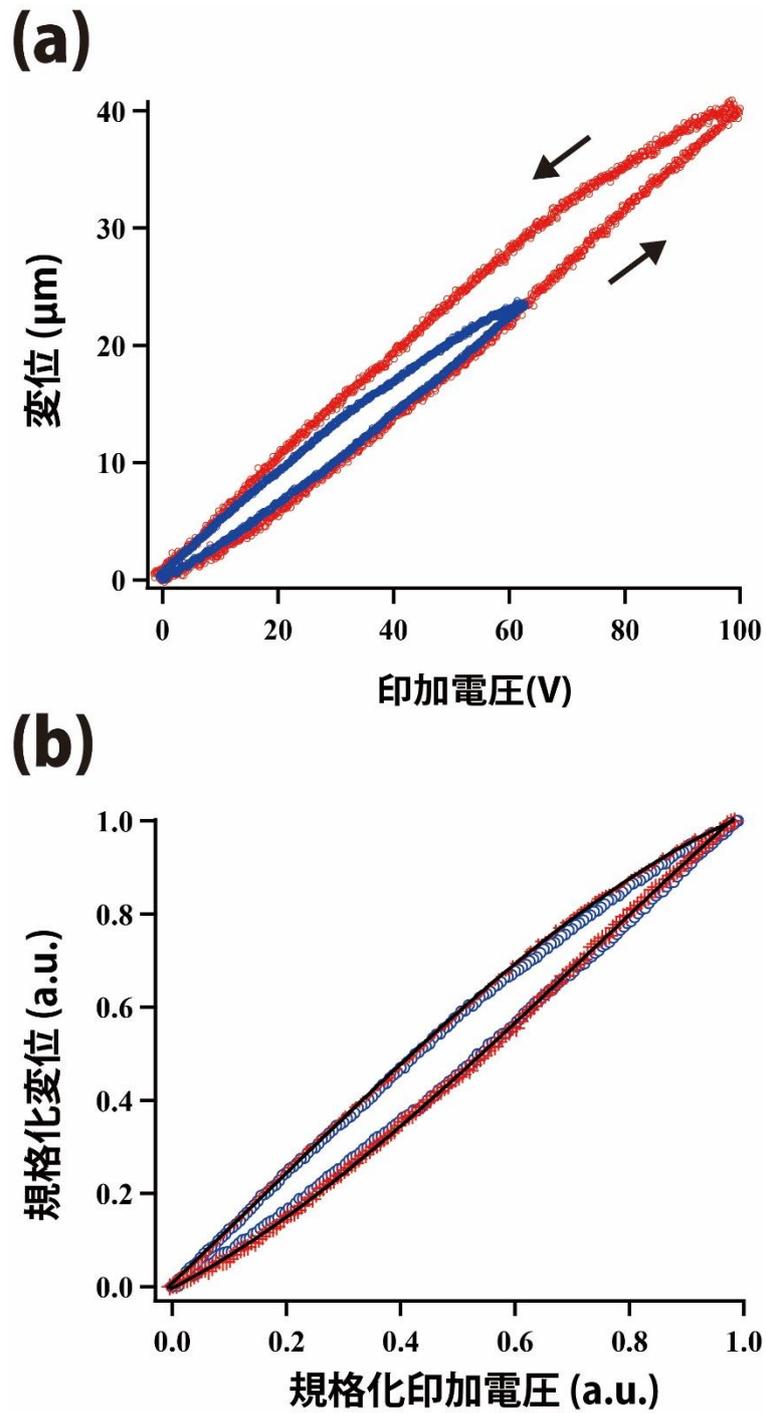


図 3-9 X スキャナーのヒステリシス特性とその補正

(a) 本研究で開発された広域スキャナーにおける X 方向のヒステリシスカーブ。走査範囲はそれぞれ $40\ \mu\text{m}$ (赤線) と $25\ \mu\text{m}$ (青線)。(b)(a)で得られたヒステリシスカーブを規格化し、フィッティングを行った時のカーブ。

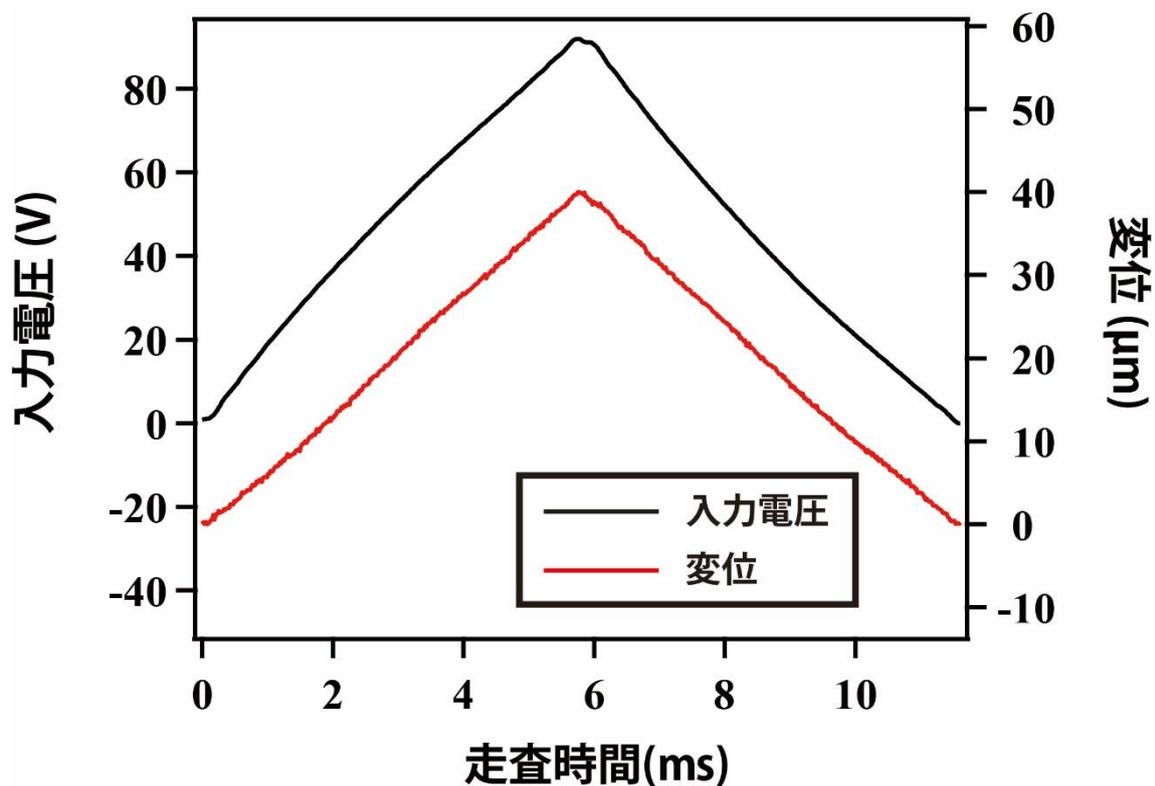


図 3-10 ヒステリシス特性の補正 (85 Hz で走査)

圧電素子のヒステリシス特性から得られた情報をもとに、補正された入力信号で駆動させた際の X スキャナーの変位を表すグラフ。ヒステリシスカーブに基づいて走査信号を作成することで歪んだ入力波形となっているが、変位は線形に保たれている。ここで走査速度は 85 Hz であり、黒線は入力電圧、赤線は応答信号。また、入力信号にはフィードフォワード式のダンピング法も併せて適用されている。

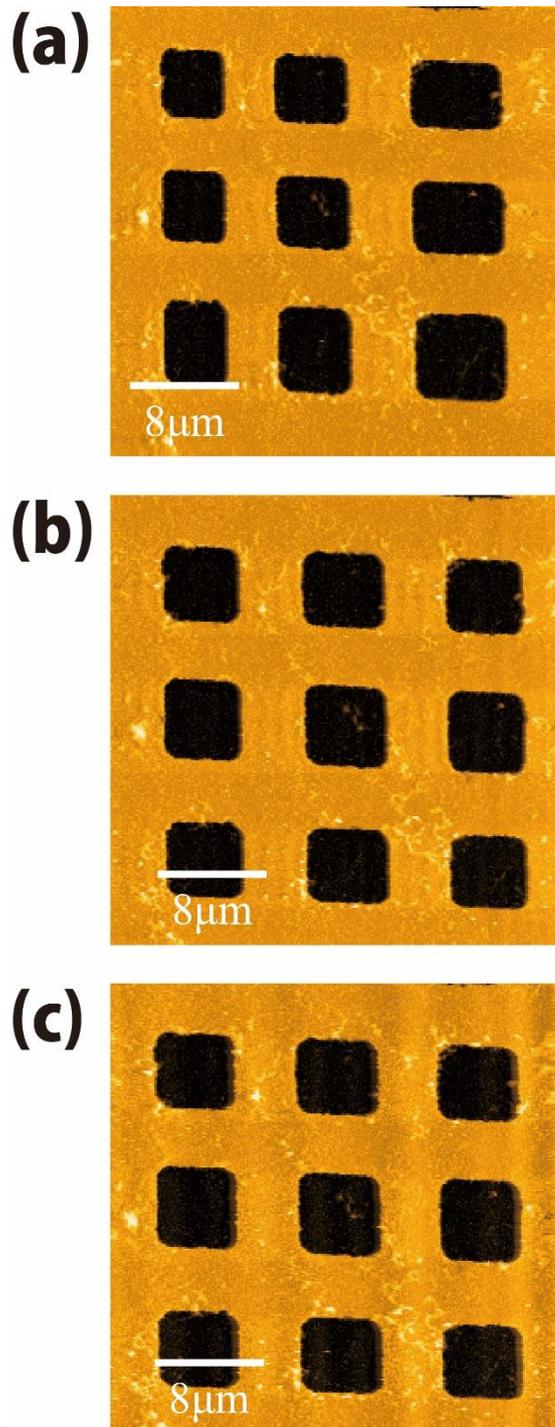


図 3-11 標準サンプル (10 μm ピッチ Si 基板) の AFM 像

10 μm ピッチを持つシリコン製標準サンプルの AFM 像。ここで、イメージング条件は走査範囲 : 33 μm \times 33 μm 、画像取得速度 : 7 s/frame、走査線の本数 : 256。(a)ヒステリシス補正を施す前の入力信号から得られた AFM 像。(b)ヒステリシス補正を施した後の AFM 像。(c)画像取得速度 3 s/frame での標準サンプルの AFM 像。ヒステリシス効果が打ち消されているのが AFM 像より明らかである。

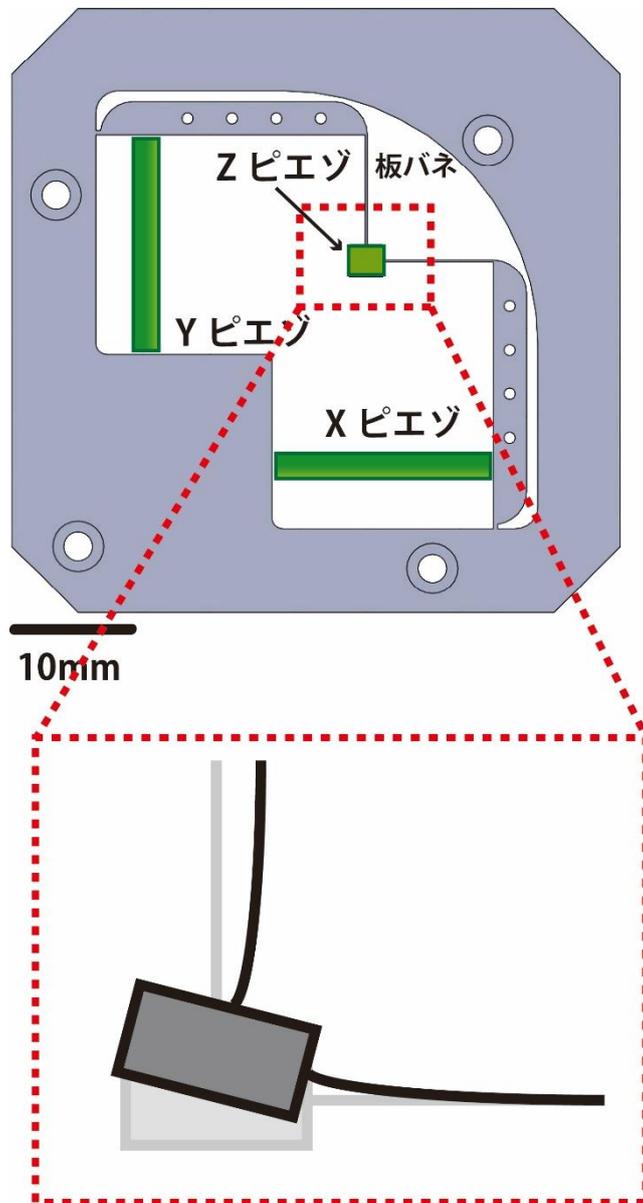
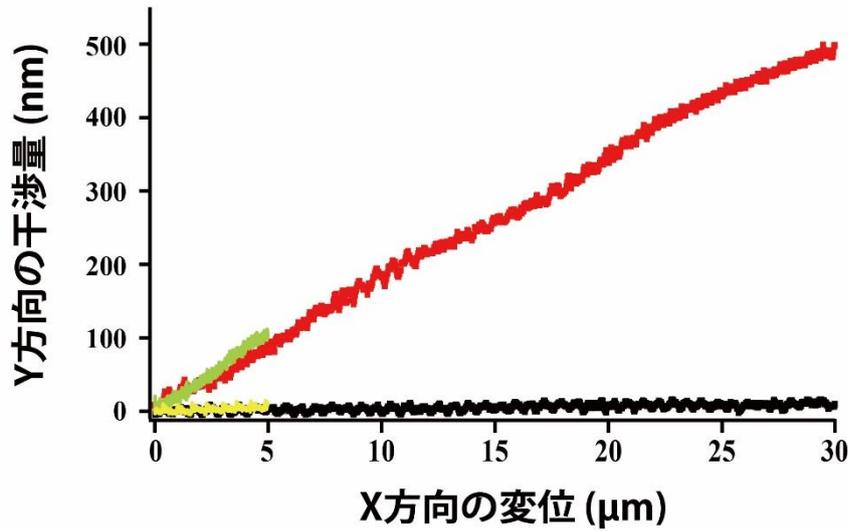


図 3-12 XY 方向スキャナー間干渉の模式図

圧電素子が Y 方向に変位した際の X 方向の干渉の模式図。ここでは簡単のために、Y 方向のみに変位した際の動きを示している。実際には X 方向にも走査しているため、さらに軌跡は複雑になる。本研究で開発されたスキャナーの構造では、テコのレバーに連結された板ばねの終端が自由端となっているため、線形に走査することが困難である。

(a)



(b)

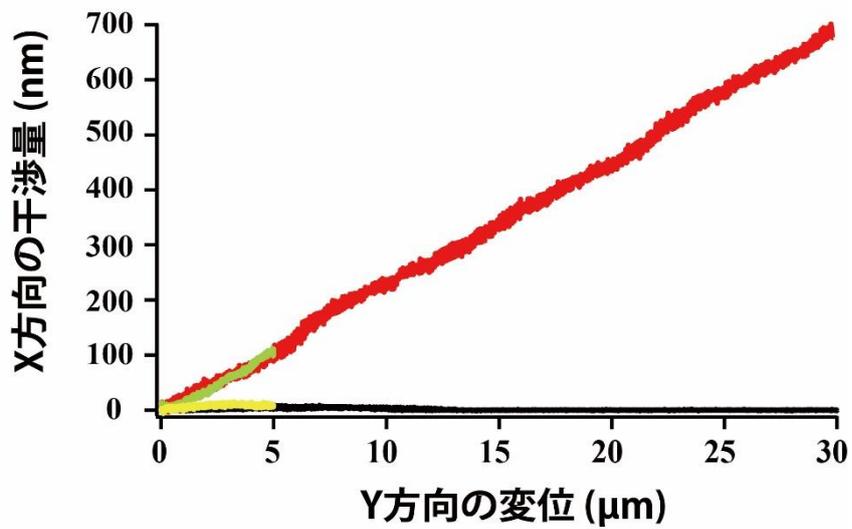
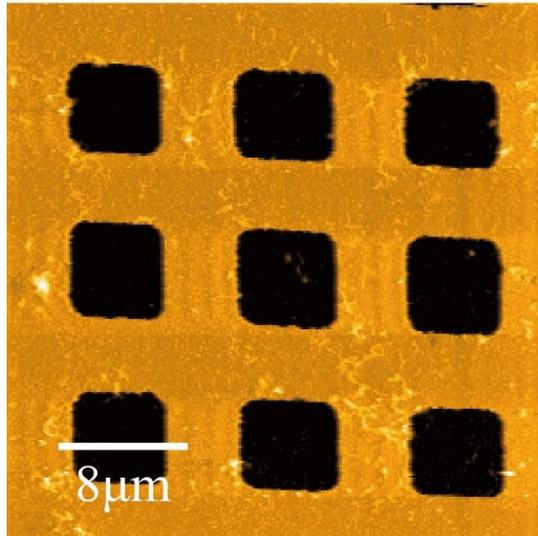


図 3-13 XY 方向スキャナー間の干渉

(a)X スキャナーを走査した場合の Y 方向の干渉量。走査範囲はそれぞれ 5 μm (緑線)と 30 μm (赤線)。黄線(5 μm)と黒線(30 μm)は補正後の信号。(b)Y スキャナーを走査した時の X 方向の干渉量。

(a)



(b)

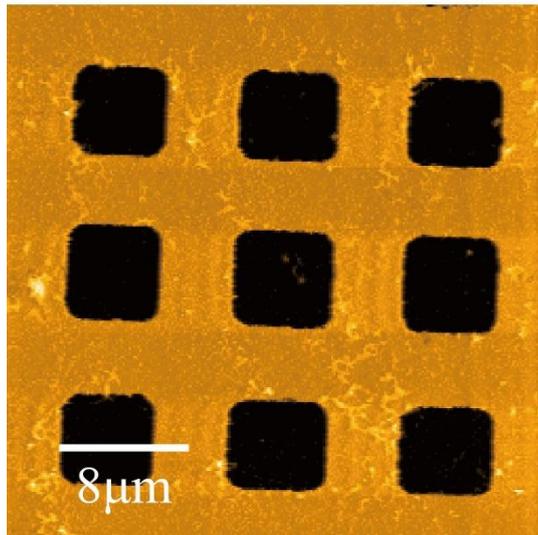
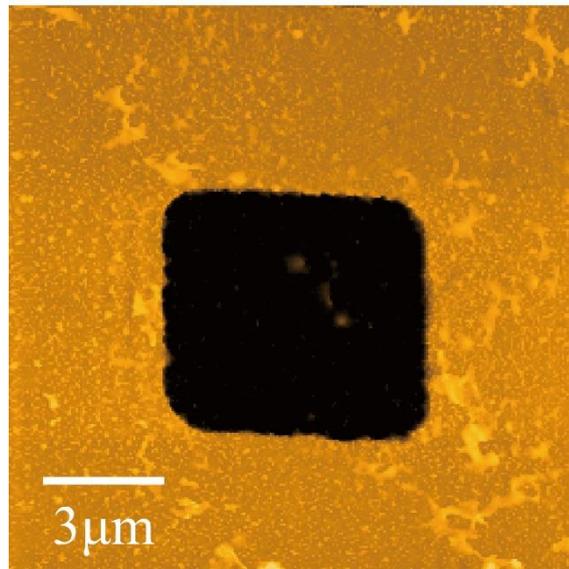


図 3-14 標準サンプル (10 μm ピッチグリッド) の AFM 像

(a)XY スキャナー干渉補正前の AFM 像。(b)補正後の AFM 像。測定時の条件は走査範囲 : 33 μm × 33 μm、画像取得速度 : 7 s/frame、走査線の本数 : 256 本。

(a)



(b)

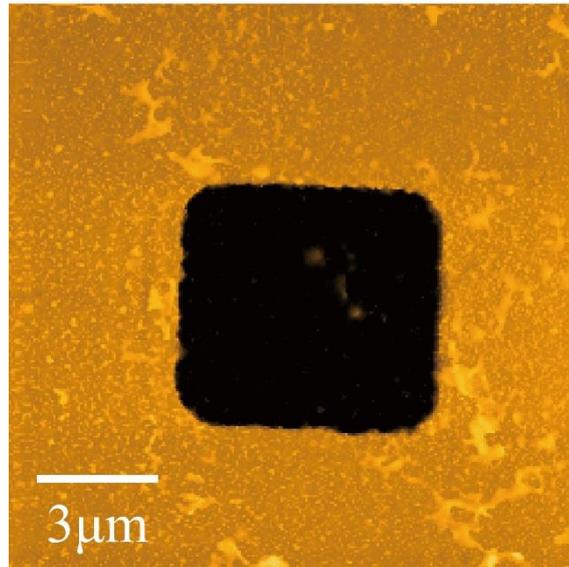


図 3-15 標準サンプル (10 μm ピッチグリッド) の拡大 AFM 像

(a)XY スキャナー干渉補正前の拡大 AFM 像。(b)補正後の拡大 AFM 像。測定時の条件は走査範囲 : 15 μm \times 15 μm 、画像取得速度 : 7 s/frame、走査線の本数 : 256 本。

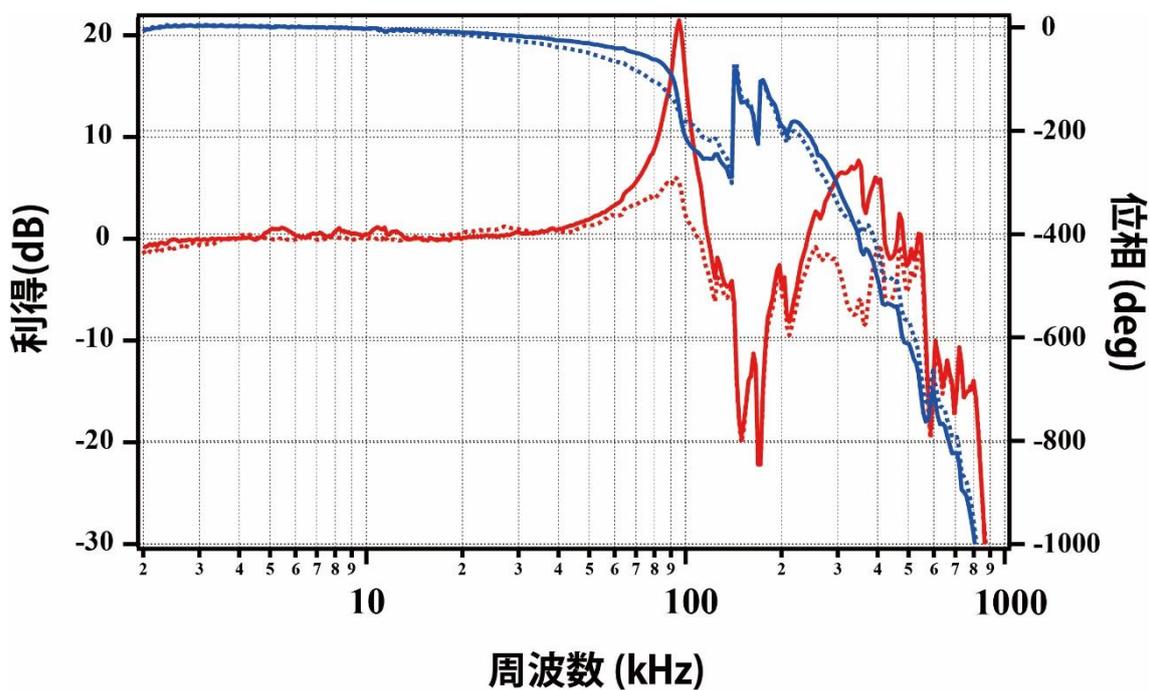


図 3-16 アクティブダンピング法が適用した Z スキャナーの周波数特性

赤線は電圧利得を表しており、青線は位相を表している。また、実線はアクティブダンピング法を適用する前の Z スキャナーの周波数特性を、点線はアクティブダンピング法適用後の周波数特性を示す。Z スキャナーの共振周波数は約 90 kHz。

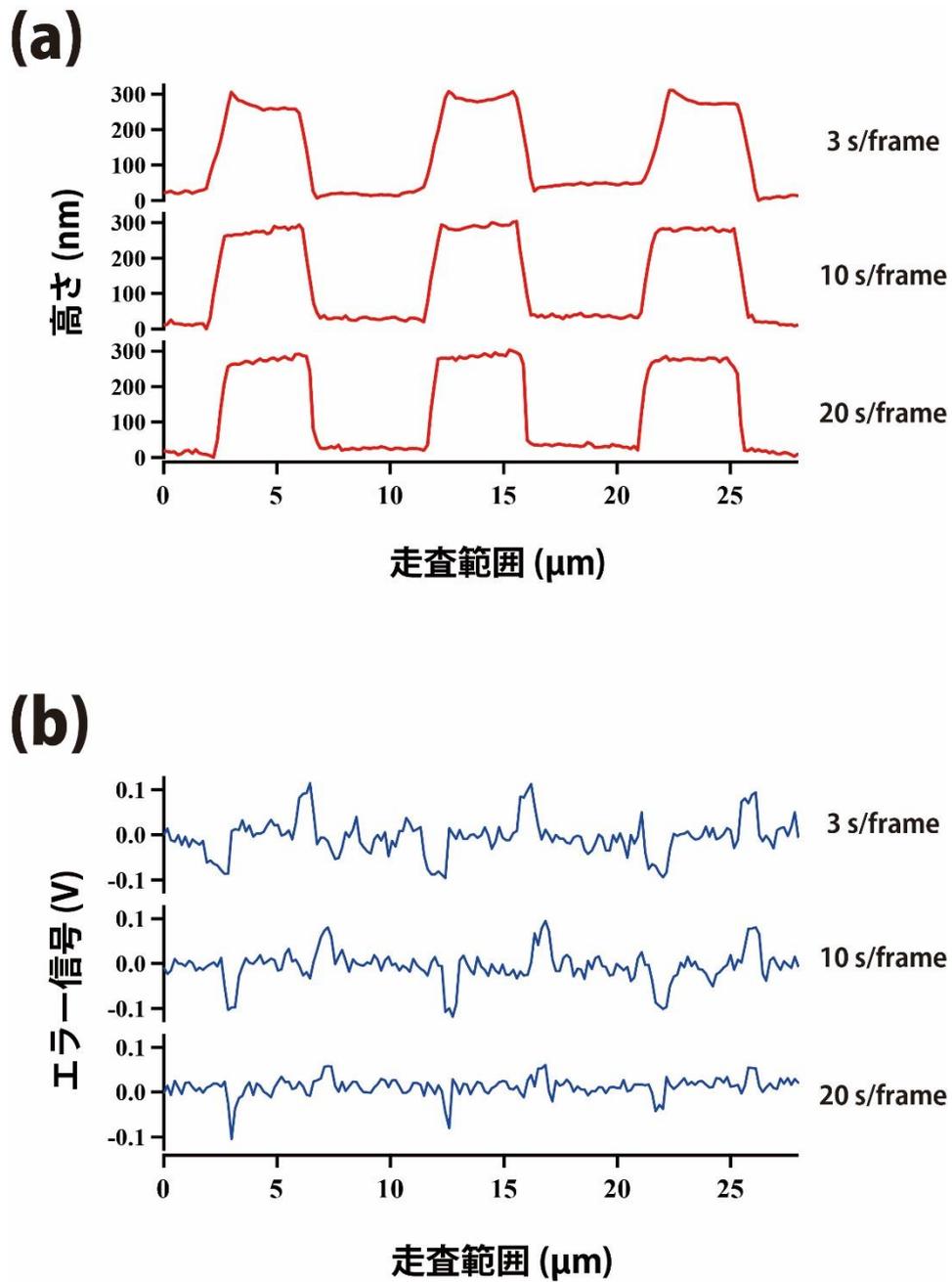


図 3-17 異なる走査速度における標準サンプルの高さ情報とエラー信号

図 3-11、図 3-14 の測定で使用した標準グリッドサンプルを 3 s/frame、10 s/frame、20 s/frame の異なる画像取得速度でイメージングした AFM 像から、クロスセクション(a)とエラー信号(b) を取得。

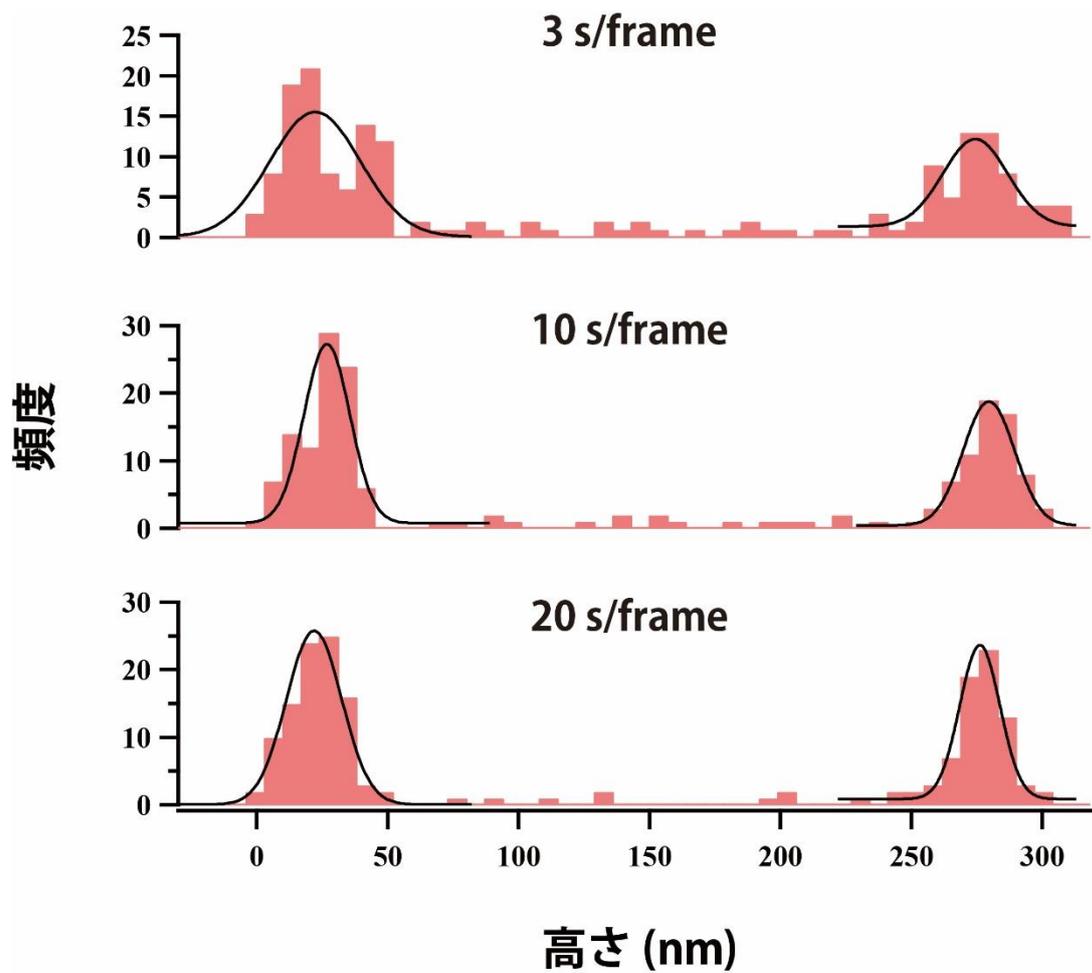


図 3-18 異なる走査速度における標準サンプルの高さ情報のヒストグラム

図 3-17(a)で得られた標準グリッドサンプルのクロスセクションからグリッドの高さ情報を取得し、ヒストグラムを作成した。高さの平均値は 276nm (上段 : 3 s/frame)、279nm (中断 : 10 s/frame)、276nm (下段 : 20 s/frame)。

第4章 広域スキャナーによる生体分子イメージング

4.1 目的と概要

第3章では本研究で開発された高速 AFM 用広域スキャナーの基本設計や変位拡大機構の原理等を説明した。さらに現在主に使用されている高速 AFM スキャナーでは起こることがなかった、最大走査範囲を拡大させることに伴う高速走査時の X 方向の振動に対してはフィードフォワード式のダンピング法を適用し、振動を抑制することに成功した。また、圧電素子が持つ固有の特性であるヒステリシス現象の顕在化や、テコの原理を広域スキャナーに適用したことによる X,Y 方向走査時の干渉問題に関しては、ソフトウェア上で改変した走査信号を入力することでこれらの現象を抑制することに成功した。また、巨大な試料をイメージングすることができるよう、Z スキャナーもより変位の大きな圧電素子に変更し、その特性やイメージング速度の限界も見積もることができた。その結果、最大走査範囲は XY スキャナーそれぞれ $45\ \mu\text{m} \times 45\ \mu\text{m}$ に到達した。通常の高速 AFM 用スキャナーの最大走査量と比較して、面積比で約 500 倍にまで拡大させることに成功した。この開発された広域スキャナーの生物試料観察に対する有効性を確認するため、枯草菌および哺乳類細胞のライブイメージングを試みた。枯草菌のイメージングに関しては、リゾチーム添加時における溶菌過程を捉えることに成功した。また、哺乳類細胞のイメージングに関しては 3Y-1B clone 細胞上におけるエンドサイトーシスのダイナミックな動態変化を観察することに成功した。加えて PtK2 細胞では、トランスフェリン存在下における、エクソサイトーシス現象を捉えることに成功している。この哺乳類細胞を観察する場合、その濃度が問題となる。通常タンパク質分子を測定する際、試料の濃度はオーダーとして数 nM のスケールで調整する。分子数にすると 10^{10} 個以上のタンパク質分子が存在している状態で基板に固定し、それをイメージングしている。そのためカンチレバーを試料台のどこにアプローチしても、タンパク質分子を見つけることが可能である。しかし、哺乳類細胞の場合、高速 AFM

で使用しているガラスステージ上に培養するため、ステージ上におけるその個体数がタンパク質に比べて極端に少なくなる。そのため細胞を蛍光色素で染色する、または緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させ、その蛍光シグナルをもとに CCD カメラで目的の細胞を探す必要がある。また細胞をイメージングする場合、その観察箇所が最も重要な点となる。細胞の中心領域にカンチレバーをアプローチさせる場合、細胞の柔らかさ故にカンチレバーが突き刺さってしまい、振幅の変化を正確に求めることが不可能となりイメージングができない。そのため蛍光シグナルを発する細胞を用意することで、CCD カメラを用いて目的細胞の端部分を狙ってアプローチすることができ、正常なイメージングが可能となる。

さらに、AFM の一番の強みはナノメートルオーダーの構造を測定できる分解能である。変位拡大機構を導入した場合、圧電定数 (伸び係数) が大きな圧電素子を選択し、さらにテコ比によって最終変位が拡大されるため最大走査範囲は容易に拡大することができるが、必然的に最小分解能との両立が困難となり、本研究で開発された広域スキャナーではタンパク質分子の測定は不可能となる。そこで、印加電圧のゲインを調整することができるピエゾドライバを開発し、タンパク質分子をイメージングする際にはゲインを最小にすることで最小分解能との両立を図った。結果として、アクチンフィラメントの 36 nm ピッチ構造だけでなく、そのフィラメントを構成する G-アクチン単体も観察することに成功した。さらに枯草菌のリゾチーム添加による溶菌過程も、高分解能で測定することに成功した。

この章では、開発された広域スキャナーを用いて、細菌および哺乳類細胞のイメージング結果について説明する。さらに哺乳類細胞イメージングのために新たに開発した簡易蛍光顕微鏡装置や、高分解能イメージングに関して説明する。

4.2 枯草菌の溶菌課程の観察

4.2.1 ペプチドグリカン層

本研究で開発された広域スキャナーの実用性を確認するため、はじめに枯草菌のイメージングを試みた。枯草菌（英語表記：*Bacillus subtilis* ; *B. subtilis*）は納豆菌としても一般的に知られており、真性細菌の一種である。直径が約 700 nm、全長が約 2 μm あり、細胞膜の外側がペプチドグリカン層と呼ばれる厚さ約 80 nm の細胞壁で覆われているグラム陽性菌に分類される細菌である。また、胞子を形成することが可能で、胞子形成時のペプチドグリカン層の構造やその形成過程などが数多く調べられており、さらに毒性が無いことや遺伝子操作の行い易さから古くより研究対象となっている[42]–[44]。

また、枯草菌の外膜は物理的な作用には耐性が高いが、化学的な作用（抗生物質等）に対する耐性が低いことが知られており、とりわけリゾチーム[45]によって良く溶菌されることが知られている。ペプチドグリカン層は図 4-1 に示すように、N-アセチルグルコサミン[図 4-1 中の(G)]と N-アセチルムラミン酸[図 4-1 中の(M)]が交互ユニットを形成しており、その 1,4- β リンカー（図 4-1 中の黒点）をリゾチームが切断すると、ペプチドグリカン層が壊れ、菌体の外膜構造が崩壊し、体外内の浸透圧が保てなくなる結果、溶菌することが知られている[43]。そこで、上述の溶菌過程を広域スキャナーでイメージングすることでその有効性を確認した。

4.2.2 枯草菌の広域イメージング

枯草菌は Penassay Broth(PB)培地で培養し、測定の際には遠心分離器を用いて集菌する。洗浄したガラス基板に Poly-L-lysine(濃度：0.1 mg/mL、和光株式会社製)を 2 μL 滴下し、完全に乾燥させる。その上から集菌した枯草菌を滴下する。30 分間インキュベートした後、測定バッファー（今回の場合は PB 培地）で数回ウォッシュすることで吸着していない枯草菌を取り除いてから測定する。図 4-2 はガラス基板に吸着した枯草菌の AFM 像である。こ

ここでイメージング条件は、走査範囲：20 μm ×20 μm 、画像取得速度：15 s/frame、走査線の本数：200 本。この像から細菌の平均の高さを算出すると、約 730 nm となり良く知られている値と一致した。次に、枯草菌の溶菌過程のイメージングに関して説明する。

4.2.3 枯草菌の溶菌過程イメージング

図 4-3 は枯草菌のリゾチームによる溶菌過程を捉えた AFM 像である。ここで測定条件は走査範囲：5 μm ×5 μm 、画像取得速度：20 s/frame、走査線の本数：256 本。枯草菌の固定は先程と同様に Poly-L-lysine(濃度：0.1mg/mL)を用いて、ガラス基板に吸着させた。また、リゾチームの最終濃度は 80 μM に調整し、測定中にバッファー中に投入した。図 4-3 より、リゾチームをバッファーに投入する前の段階($t = 0$ s)では枯草菌の表面は平滑であることがわかる。 $t = 240$ s では AFM 像が乱れているが、これは測定バッファー中にリゾチームを投入したためである。そして、 $t = 320$ s の段階で表面の形状が徐々に変化していき、表面にシワ構造が現れてくる。それと同時に菌体が膨潤してくるのがわかる($t = 1060$ s、 $t = 1460$ s、 $t = 1580$ s)。最終的に $t = 1720$ s の時点で菌体が爆発する瞬間を捉えることに成功した。これはリゾチームによってペプチドグリカン層が溶解され、外界 (バッファー中)との浸透圧によって菌体内の圧力が極端に増加した結果であり、菌体内容物が飛び出している。続いて、リゾチームによる枯草菌の形態変化をより速い画像取得速度で観察した。ここでリゾチームの最終濃度を 200 μM とし、画像取得速度は 2 s/frame、走査線の本数は 90 本(X ピクセルは 120 pixel)である。その結果を図 4-4 に示す。ここで図 4-4(a)は図 4-4(b)中の白破線部分の表面粗さを時間ごとにプロットしたもので、図 4-4(b)は各点における枯草菌の AFM 像を表している。 $t = 32$ s の時点でリゾチームを投入しており、そのときの表面粗さは約 93 nm である。その 90 秒後の $t = 120$ s の時に表面粗さが急激に変化し始めるのが分かる。その後、表面粗さが約 125 nm と一定の値に落ち着いていく。ここで $t = 300$ s か

ら表面粗さが徐々に低下していくが、これは恐らくペプチドグリカン層が分解された事によって外膜が柔らかくなり、表面の凹凸情報が取得しづらくなっていった結果である。さらにこの表面粗さの増加は指数関数で良くフィッティングすることができ、その結果は $\tau = 36.8$ (s)となる。

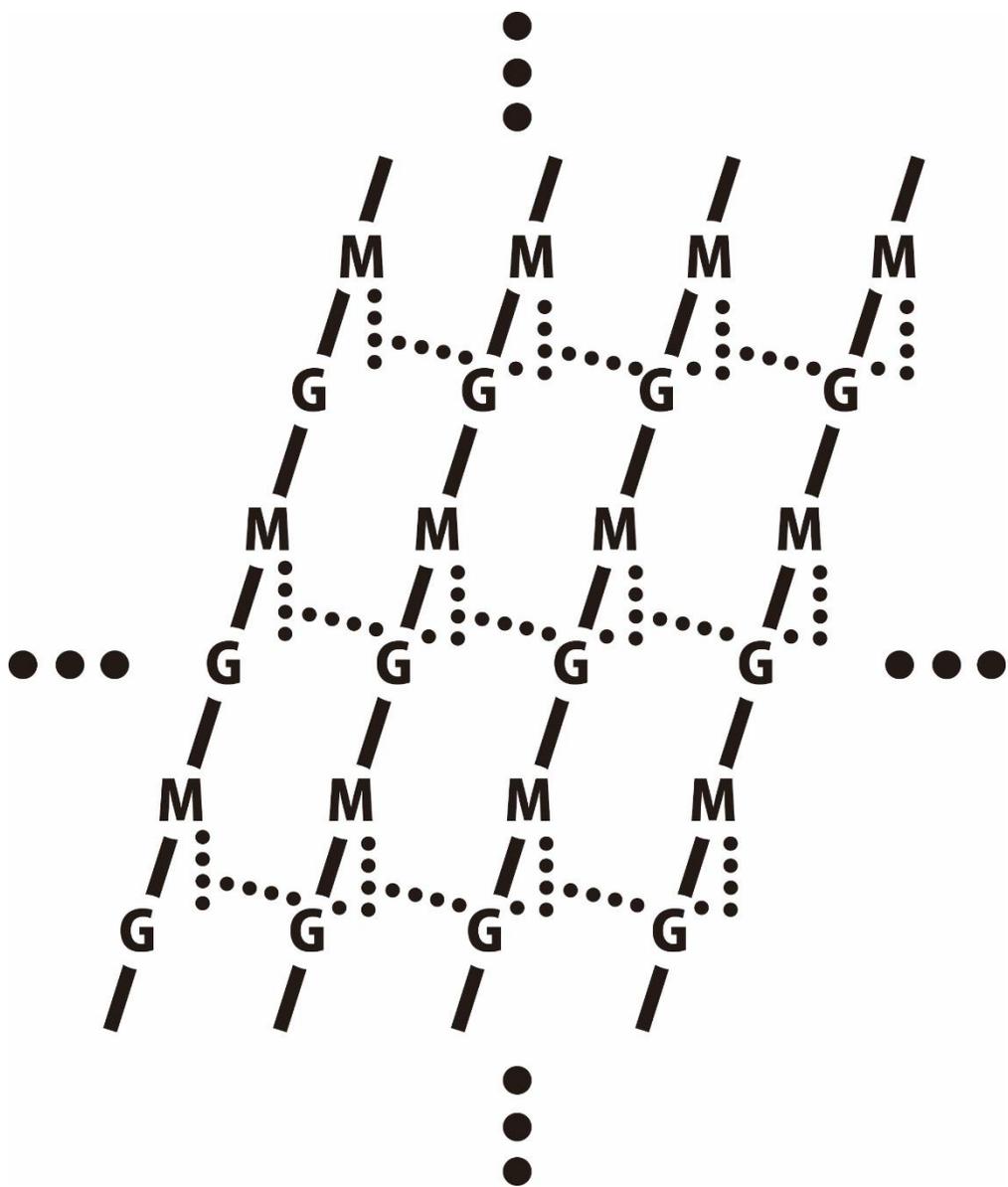


図 4-1 ペプチドグリカン層の模式図

ペプチドグリカン層の模式図。グリカン鎖は N-アセチルグルコサミン(図中 G)と N-アセチルムラミン酸(図中 M)から構成されている。垂直方向の黒点はペプチド単量体を表し、水平方向の黒点はクロスリンクペプチドを表している[43]。

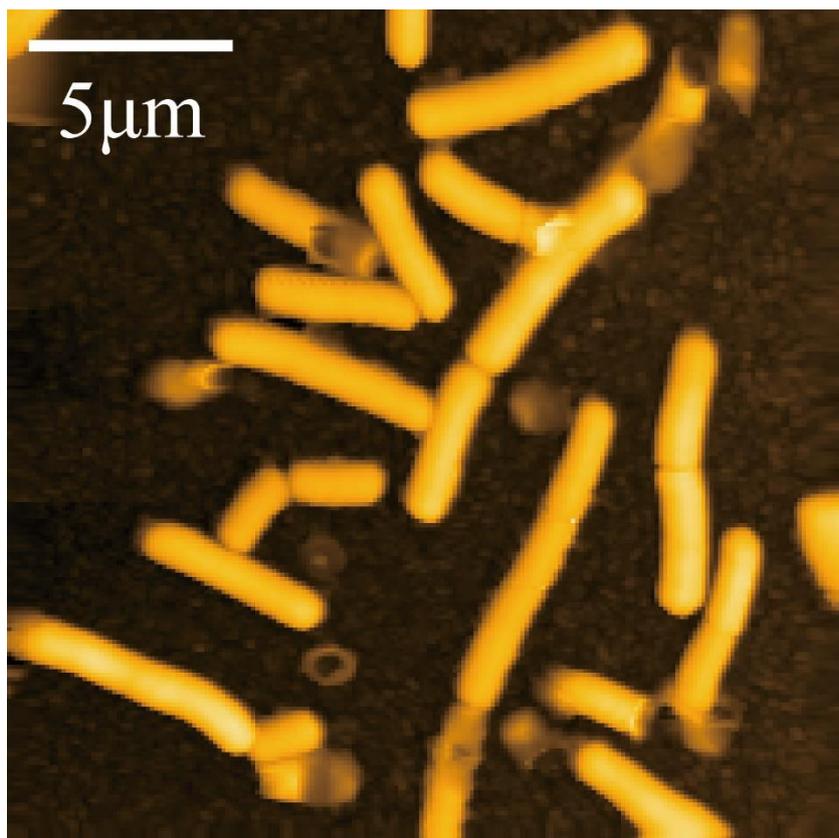


図 4-2 枯草菌の広域 AFM 像

枯草菌の培地中における広域イメージング AFM 像。ここではリゾチームを投入していない。走査範囲は $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ 、画像取得速度は 15 s/frame、走査線の本数は 200 本。

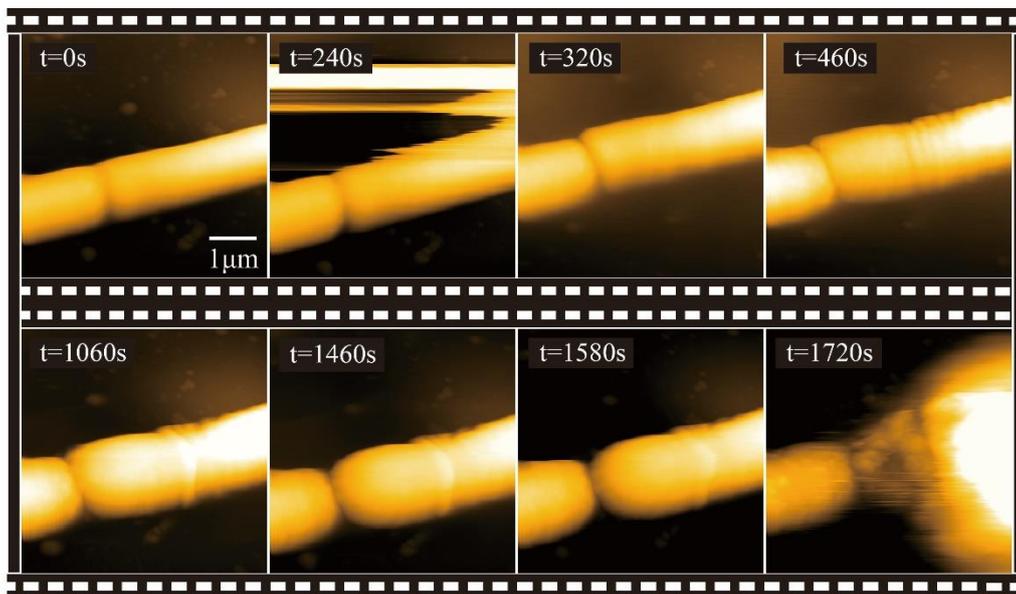


図 4-3 枯草菌の溶菌過程を示す AFM 像

枯草菌を観察中に、バッファーに最終濃度が $80 \mu\text{M}$ となるようにリゾチームを加えた時の連続 AFM 像。 $t = 240 \text{ s}$ にリゾチームを添加している。その後徐々に外膜の形態が変化していき、最終的に浸透圧によって膨潤し、爆発する様子を捉えることに成功した。

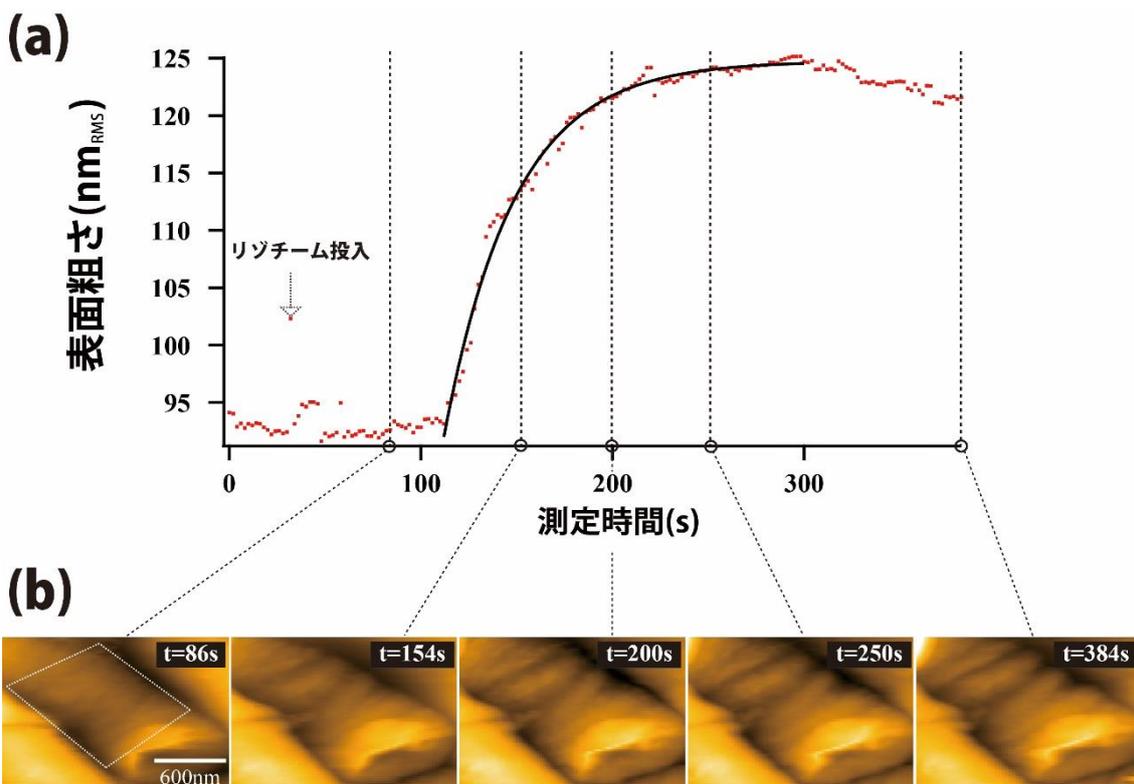


図 4-4 リゾチームによる枯草菌の表面粗さ変化を示したグラフと AFM 像

(a) 指定した範囲[(b)の白破線]における、菌体の表面粗さの平方二乗根を計算したものを時系列でプロットしたグラフ。リゾチームは $t = 32$ s の時点で添加した。黒実線は $t = 112$ s から $t = 300$ s までの範囲でフィッティングした結果 [$\tau = 36.8$ (s)] を表す。(b)(a)のグラフに示した時刻 (○で示す) における枯草菌外膜の形態変化を捉えた AFM 像。

4.3 哺乳類細胞のイメージング

4.3.1 簡易型蛍光顕微鏡装置の導入

従来の高速 AFM はタンパク質分子を対象に利用されてきたが、本研究では前セクションで述べたように細菌の観察に成功した。タンパク質分子や細菌を観察するにはステージ上に試料を吸着させるが、ある程度の試料濃度が必要となる。試料ステージ上のどの部分にカンチレバーをアプローチさせても、試料がその場に存在することで測定の効率が上がる。枯草菌の場合には集菌した後に、試料ステージへ吸着させた。しかし、接着性細胞を対象にした場合には、生きた状態で高速 AFM 観察を行うためには試料ステージ上で培養する必要がある。図 4-5(a)は高速 AFM 観察の際に用いる哺乳類細胞の培養容器の全体図である。ここで赤破線の部分は、高速 AFM 用試料ステージ(Φ1.5 mm ガラスロッド)を示している。通常、接着性細胞の培養に用いる容器（ここでは 24 ウェルを用いる）に赤破線で示した高速 AFM 用試料ステージをアセトンで薄めたマニキュアで接着し[図 4-5(b)]、その中に培地と細胞溶液を入れて培養を行う。測定の際にはピンセットで高速 AFM 用試料ステージを外し、スキャナーに設置する。培養細胞の性質上、高速 AFM 用ステージ上に存在する細胞数が極端に少ない。そこで、細胞に蛍光色素もしくは蛍光性タンパク質を導入して、その蛍光信号を頼りに試料を探すことを試みた。蛍光観察用に、簡易的な蛍光顕微鏡を高速 AFM 装置に組み込んだ[16]。その光学系のブロック図を図 4-6 に示す。既存の高速 AFM 光学系に緑色蛍光タンパク質(GFP)の吸収波長に最適化された、フィルターセットと LED ランプを組み込んだ。励起フィルターとして Thorlabs 社製のもの(型番：MF469-35、中心波長：469 nm、半値幅：35 nm)を、発光フィルターとして同社のも(型番：MF525-39、中心波長：525 nm、半値幅：39 nm)を使用し、またダイクロイックミラーも同社のも(型番：MD498、反射波長：452 - 490 nm、透過波長：505-800 nm)を使用した。LED ランプは Thorlabs 社製・Blue(470 nm) Mounted LED (型番：M470L3)を使用し、同社製の平凸レンズを用いてコリメート調整を行った。光源として LED ランプを選択した理由は、観察

の際に干渉縞が発生せず、広範囲にわたって照明が可能なのである。図 4-7 にその簡易型蛍光顕微鏡の実機写真を示す。簡易型蛍光顕微鏡の長所は、既存の高速 AFM システムのカンチレバーを観察する光路にこの蛍光顕微鏡の光学系を追加するだけでよい点である。また、蛍光フィルターと LED 光源を変更することで、様々な波長の蛍光物質に対応することができる。カンチレバーを観察するための対物レンズとしてこれまで 20 倍のもの(Nikon 製、型番 : Plan Fluor ELWD 20x/0.45)を使用してきたが、細胞の蛍光シグナルを高分解能で観察するために、60 倍の対物レンズに変更した(Nikon 製、型番 : Plan Fluor ELWD 60x/0.7)。蛍光像撮影のために、Nikon 製の蛍光顕微鏡用 CCD カメラ(型番 : DS-Fi2)とモニターを使用した[図 4-8(a),(b)]。ここで「簡易型」と呼ぶのは、実際に蛍光シグナルを観察するときに、設計上必然的にカンチレバーも視野の中に入るためである。図 4-9 に簡易型蛍光顕微鏡で取得した細胞の蛍光像を示す。細胞の接着にはコラーゲン(新田ゼラチン社製、Cellmatrix Type I-C)を pH = 2 に調整した純水で 10 倍希釈したものを使用した。ガラスステージの上にこの希釈溶液を滴下し、完全に乾燥させた後、リン酸バッファーでよく洗浄し、細胞溶液を入れ培養する。図 4-9 中央にある緑色の蛍光像は細胞で (COS-7 細胞)、真上のピンク色の光はカンチレバー上に照射されたレーザー光である。蛍光像を観察する場合には、必ずカンチレバーが視野に入るため、精密な蛍観察には不向きである。細胞の測定箇所を狙ってカンチレバーをアプローチさせる用途で使用している。蛍光観察用の緑色蛍光タンパク質の導入は以下の手順で行った。

1. AFM 測定用専用容器内で、細胞を通常通り培養する。
2. 蛍光タンパク質導入用の培地(Life technology 社製、Opti-MEM、型番 : 31985-070)50 μL 中に 1 μL のリポフェクタミン(invitrogen 製、Lipofectamine® 2000 Reagent、型番 : 11668-027)を加え、ピペッティングせずに優しく混合する。

3. Opti-MEM 50 μL 中に 5 μL の蛍光タンパク質を発現させるためのベクター(pAcGFP-C1、サイズ 20 μg)を加え、混合する。
4. 5 分間静置の後、2.と 3.で作成した溶液を混合する。ここでもピペッティングせずに優しく混合する。
5. 20 分間静置の後、4 の混合液(100 μL)を 1 つのウェルあたり 10 μL 程度滴下する。
6. 12 時間以上静置した後、培地を交換する。
7. 培地交換後、3~4 時間で観察可能な状態となる。

このベクターをリポフェクタミンで細胞内に導入する操作をトランスフェクションと呼ぶ。ベクターを導入するために用いるリポフェクタミンは抗生物質と一緒に使用すると細胞毒性を示す物質である。これは脂質が細胞の透過性を向上させることで、抗生物質までもが細胞内に入り込んでしまうことが原因である。そのためベクターを細胞に導入した後は、可能な限り早い期間で測定をすることが望ましい。

4.3.2 哺乳類細胞の高速 AFM 観察

上述した簡易型蛍光顕微鏡を用いて、実際の哺乳類細胞のイメージングを行った。図 4-10 に簡易型蛍光顕微鏡で撮影したラットカンガルー腎臓由来の PtK2 細胞 (pAcGFP-C1 ベクターを導入) の蛍光像を示す。PtK2 細胞の培養にはイーグル最小必須培地(Minimum Essential Media; MEM, Life technology 社製、型番 : 42360-032)の中に仔牛由来の血清を 10%の濃度となるように加えたものを用い、温度 37°C、二酸化炭素濃度 5%の環境で培養を行った。また、高速 AFM 測定の際にはリン酸緩衝バッファー(pH 7.4)を用いている。図中の白枠線は高速 AFM でイメージングする範囲を示しており、白点線枠はカンチレバーを表している。このように GFP が導入されていると、高速 AFM でのイメージングを行う際に位置決めが容易に行うことができる。蛍光像がない状態でカンチレバーを試料にアプロー

チした場合、細胞核の箇所にカンチレバーが着地すると、カンチレバー探針が細胞に突き刺さり、細胞死を招くだけでなく、その粘弾性からカンチレバーが引きつけられることで2分割フォトダイオードに入るべき光量が大きく減少する。その場合、正確なイメージングが不可能となる。哺乳類細胞の高速 AFM 観察では、高低差の少ない細胞の端部分を中心にイメージングを行った。図 4-11(a)に広域走査をした時の PtK2 細胞の AFM 像を示す。Z 方向の圧電素子には第 3 章でも述べた、変位がより大きな圧電素子[NEC トーキョー株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0203D08F (自己共振周波数:138kHz、寸法:2 mm×3 mm×10 mm、150 V印加時の最大変位量:9.1 μm)]を使用している。画像取得速度は 20 s/frame、走査範囲は 35 μm × 35 μm、走査線数 256 本である。こうして、本研究開発された広域スキャナーを用い、今まで不可能であったマイクロメートルオーダーの広域イメージングに成功した。柔らかい細胞を壊すことなく走査できたことから、大きな試料系でも低侵襲性を確保できている。図 4-11(b)に PtK2 細胞の連続高速 AFM 像を示す(図 4-11(a) の白枠線で示した領域)。画像取得速度は 2 s/frame、走査範囲 5 μm × 5 μm、走査線数 200 本である。なお、エンドサイトーシスを観察するために、この溶液(リン酸バッファー、pH:7.4)中には最終濃度が 285 μg/mL となるようにトランスフェリンが添加されている。

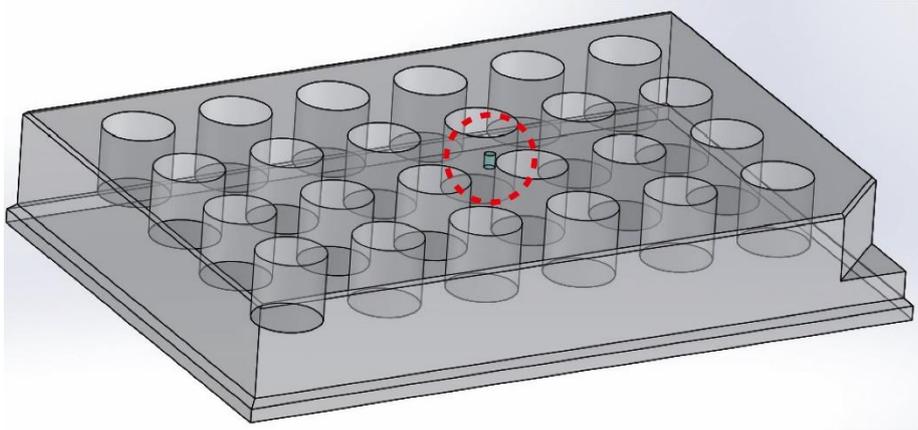
トランスフェリンとは細胞内で鉄及びその他の金属イオンと結合しその輸送を担う糖タンパク質(分子量が 80 kDa)で、互いに似ている 2 つのドメインから構成されている。それぞれに 3 価鉄イオン結合部位を一つずつ持っており、いずれも鉄イオンには 1 個のヒスチジン残基と 5 個のチロシン残基、1 個のアスパラギン残基、1 個の炭酸分子が配位している[46]。pH7.4 では鉄イオンとの親和性は非常に高い ($10^{23} M^{-1}$)[47]が、pH が 6.5 以下に下がると、鉄イオンを放出する特性を持つ[48]。つまり細胞膜外では鉄イオンと非常に親和性高く結合し、細胞膜内に取り込まれると鉄イオンを放出する。それにより、細胞内の鉄イオン濃度を一定に保つ。通常、細胞の表面にはトランスフェリン受容体[48], [49] が存在し、鉄を結合したトランスフェリンがこの受容体に結合すると、細胞膜上でエンドサイトーシ

スにより被覆小胞に含まれ、細胞膜内に輸送される。また、鉄を細胞内で放出したトランスフェリンは受容体と結合したまま細胞膜表面に再度輸送され、エクソサイトーシスによって体外に放出される。図 4-11(b)の白破線丸部分は細胞膜上に形成されたピット($t = 0$ s)と、エクソサイトーシスによって放出された、おそらくではあるが、トランスフェリン($t = 24$ s, $t = 28$ s)を示している。はじめにピットには輸送物は何も無い状態であるが、しばらく観察するとピットから粒子が放出される様子が捉えられた($t = 20$ s - 24 s)。細胞膜上には多数の分子が存在しているため、形状が似ているいくつかの分子識別することは非常に困難である。今後の課題としては、トランスフェリンに蛍光物質を結合させて高速 AFM と蛍光顕微鏡で観察することにより、捉えた分子がトランスフェリンであると同定することができるような高感度な簡易型蛍光顕微鏡を開発することが必要となる。

次にラット由来の線維芽細胞である 3Y1-B 細胞[50]–[52]のエンドサイトーシスのイメージングを試みた。ここでエンドサイトーシスとは細胞外に存在する分子やイオンなどを細胞内に取り込むための過程の一つであり、細胞膜表面で起こる最もポピュラーな現象である。この現象はタンパク質などの大きなリガンドが細胞膜上の受容体に結合することで開始する。リガンドが受容体と結合すると細胞膜上に 100 nm 程度の小さな穴（ピット）が形成され、その中に粒子が入った後ピットが細胞膜によって閉じられる。この一連の過程により、細胞は膜外からタンパク質や金属イオン等、生命活動に必要な栄養を取り込んでいる。図 4-12(a)は 3Y1-B clone 細胞の表面上で起こるエンドサイトーシス現象を捉えた連続高速 AFM 像を示している。ここで走査速度は 3 s/frame であり、走査線の本数は 256 本となっており、測定バッファーは同様に PBS を用いて、温度が約 32°C の条件下で測定している。図中の白枠で示した箇所はエンドサイトーシスが起こるピットの箇所を示しており、この小さな穴が時間の経過とともに徐々に塞がっている様子を捉えることに成功した。さらに同様に EGF[53], [54]を用いてエンドサイトーシスを誘発した場合の高速 AFM 像を示す[図 4-12(b)]。ここで EGF とは上皮成長因子(Epidermal Growth Factor; EGF)と呼ばれるタン

パク質である。細胞表面に存在している受容体(EGFR)のリガンドであり、細胞の成長や増殖などの調整に重要な役割を担うことで知られている。この EGF を測定バッファーの中に最終濃度が 15 ng/mL となるように添加して、高速 AFM 観察を試みた。先ほどの結果と同様に、白枠で示した箇所にピットが形成されているのが分かる[図 4-12(b)]。時間経過と共に徐々にピットの横から突起物が出現し、ピットが突起物に覆いかぶさる様子が観察された。同様のエンドサイトーシス現象が COS-7 細胞上でも起こることが最近 Korchev らグループにより報告されている[13]。Korchev らのグループでは細胞観察の際に高速 AFM ではなく走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) [55]を用いており、蛍光顕微鏡と SICM との同時観察に成功している。

(a)



(b)

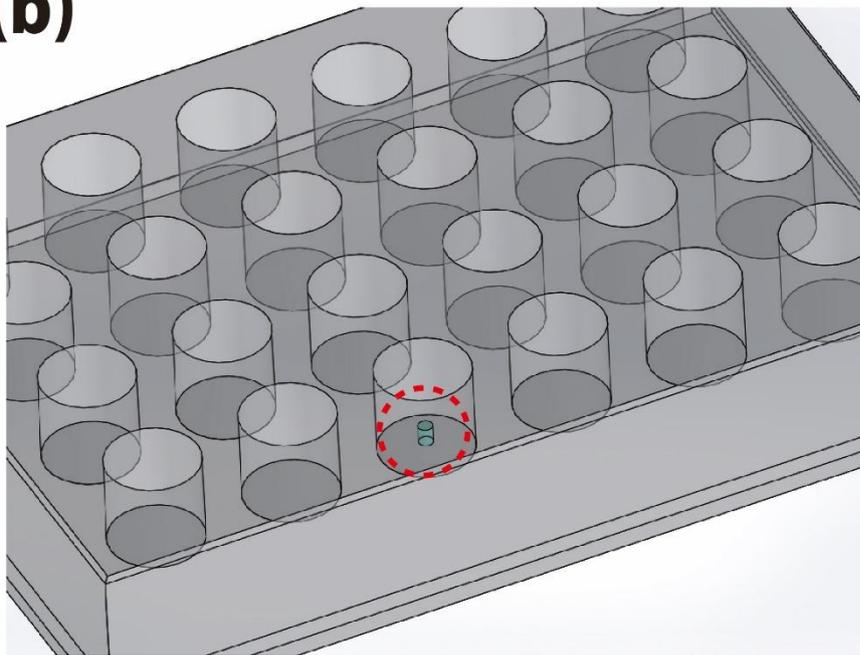


図 4-5 哺乳類細胞培養用試料ステージの模式図

(a)接着性細胞の培養に用いられる容器(24 ウェル)と高速 AFM 測定で用いられる試料ステージ(赤破線部分)。(b)試料ステージ上で培養する際には、マニキュアで培養容器に固定する。

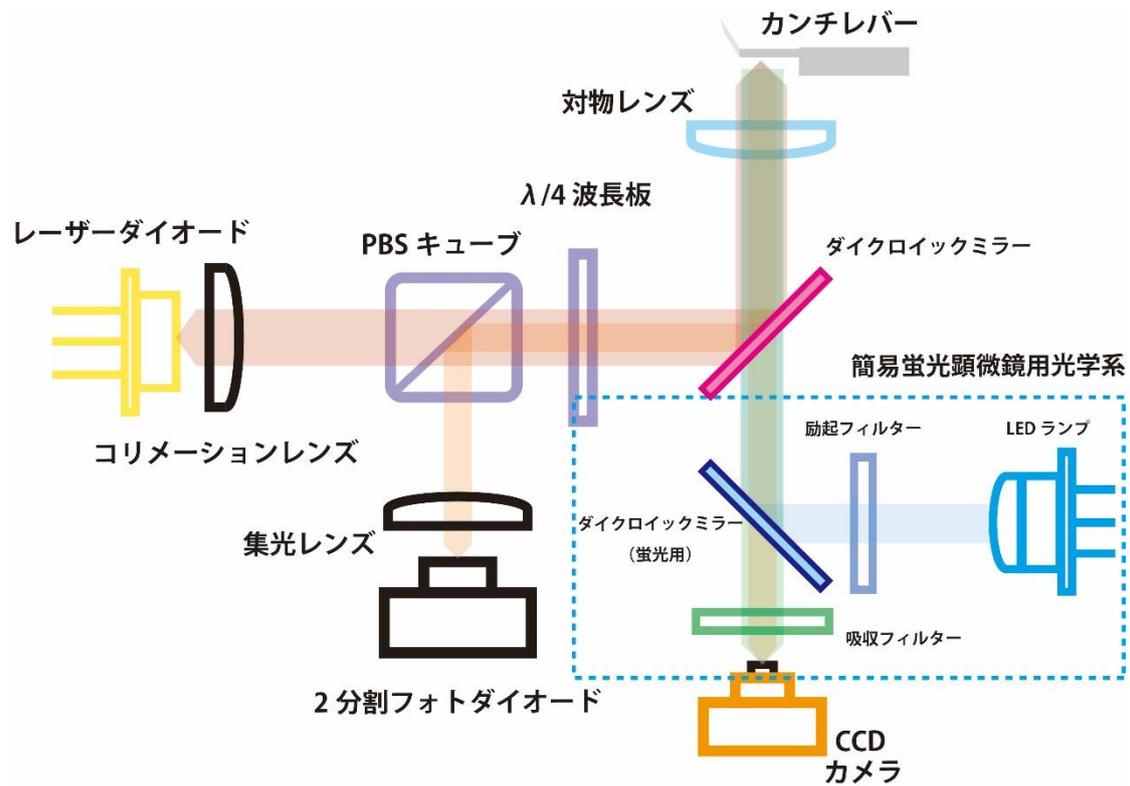
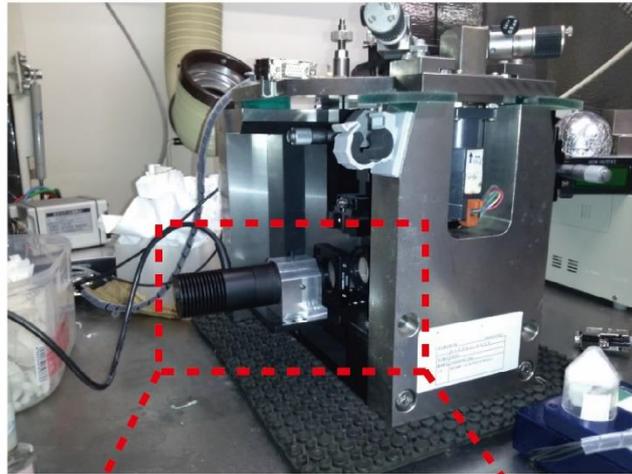


図 4-6 簡易型蛍光顕微鏡のブロック図

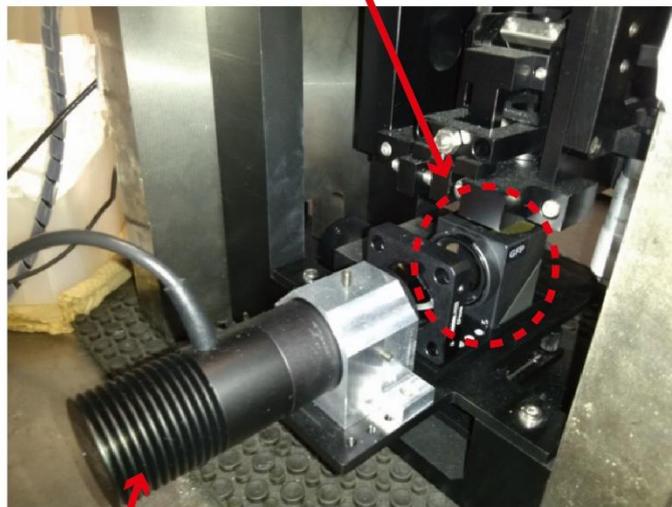
通常の高速度 AFM の光学系に簡易型蛍光顕微鏡を組み込んだときの模式図。カンチレバー観察部に蛍光フィルターとダイクロイックミラーを挿入し、光源として LED ランプを使用する。

(a)



フィルター及び
ダイクロイックミラー

(b)



LED ランプ

図 4-7 簡易型蛍光顕微鏡の実機写真

(a)簡易型蛍光顕微鏡実機写真の全体図。(b)LED ランプと蛍光フィルター及びダイクロイックミラー部分の拡大図。

(a)



(b)



図 4-8 簡易型蛍光顕微鏡で使用するカメラの実機写真

(a) 蛍光信号を検出するための CCD カメラ(Nikon 社製)。(b) 蛍光像を表示するためのモニター。

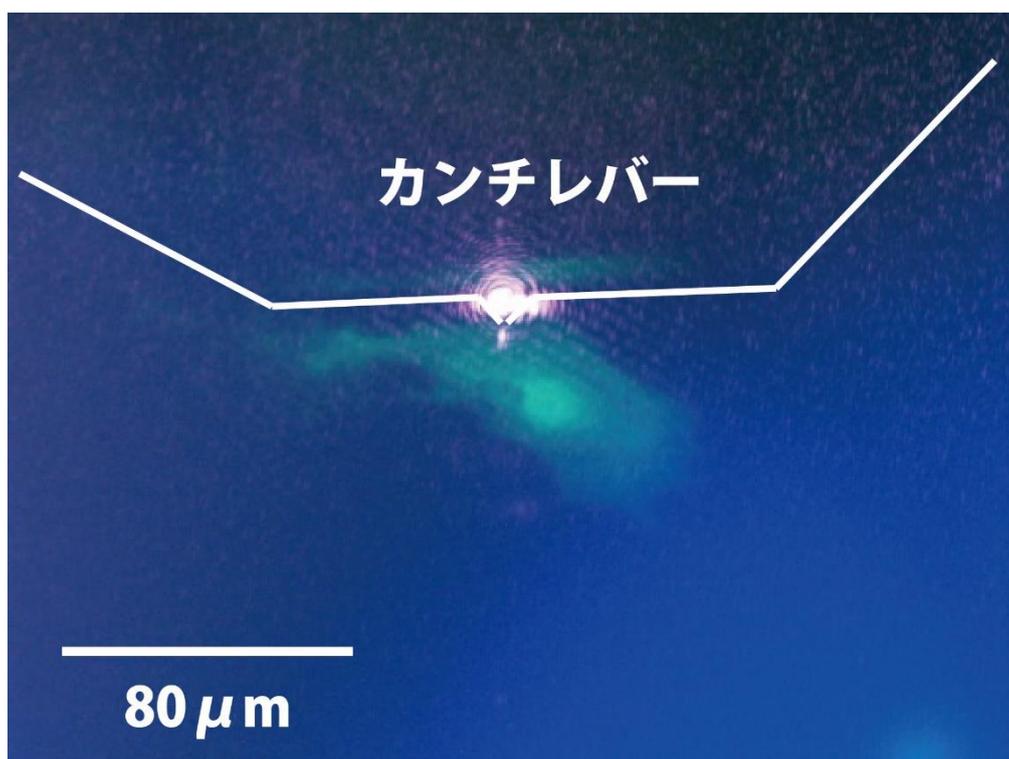


図 4-9 簡易型蛍光顕微鏡による蛍光シグナル観察

簡易型蛍光顕微鏡によって取得した蛍光シグナル像。緑色の部分が細胞(COS-7 細胞)を示しており、ピンク色の部分はカンチレバーに照射されたレーザー光を示している。また、白枠で示しているのがカンチレバーの土台である。

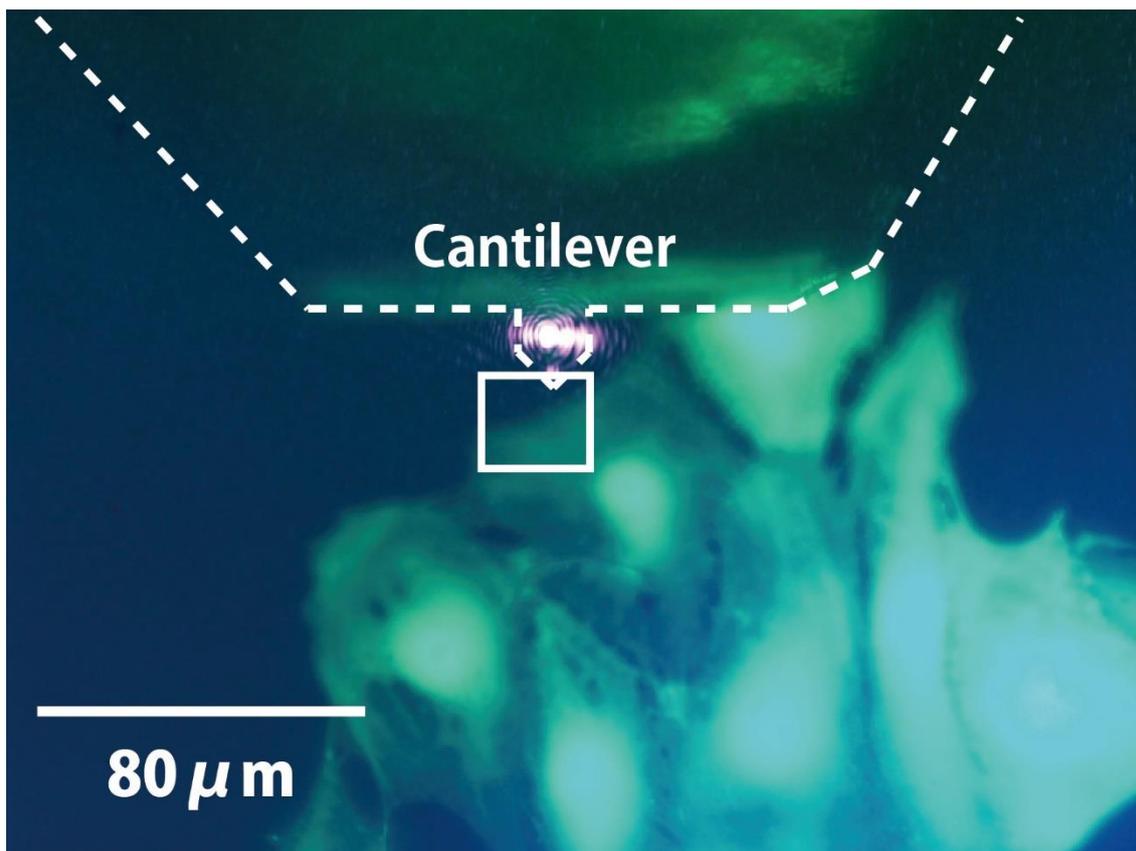
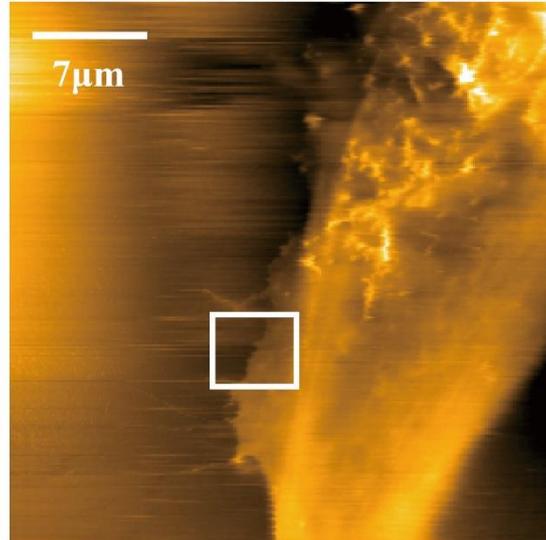


図 4-10 簡易型蛍光顕微鏡による PtK2 細胞の蛍光イメージング

簡易型蛍光顕微鏡によって取得した PtK2 細胞の蛍光シグナル像。緑色の部分が細胞を示しており、ピンク色の部分はカンチレバーに照射されたレーザー光を示している。また、白破線枠で示しているのがカンチレバーの土台であり、白実線枠は高速 AFM でイメージングを行う箇所である。

(a)



(b)

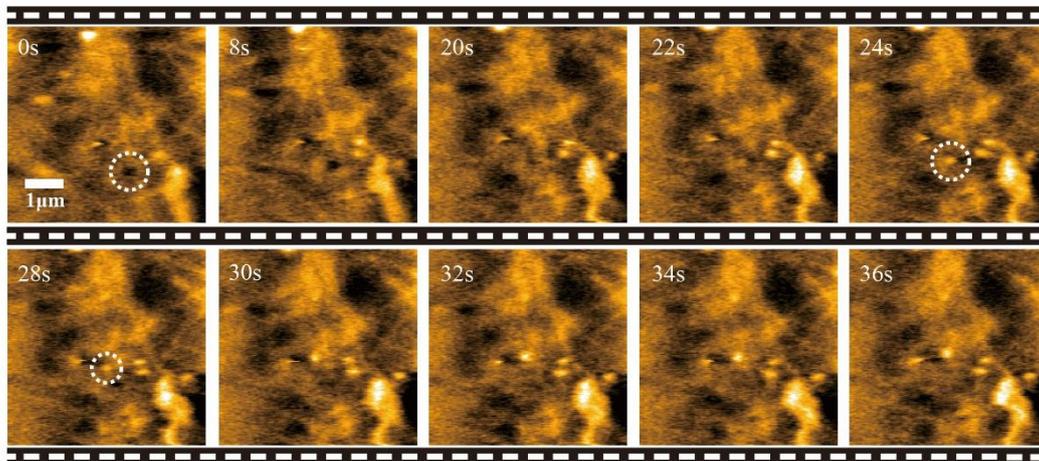
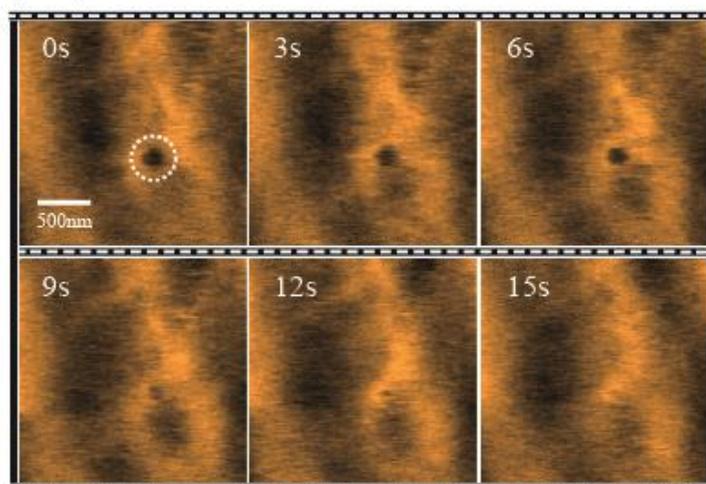


図 4-11 PtK2 細胞の高速 AFM 像

(a)図 4-10 中の簡易型蛍光顕微鏡像白枠部分を高速 AFM でイメージングした時の PtK2 細胞。(b)トランスフェリン添加によって引き起こされたエクソサイトーシス現象を示した連続高速 AFM 像。白破線丸部分はエクソサイトーシスによって排出された細胞の構成物質。

(a)



(b)

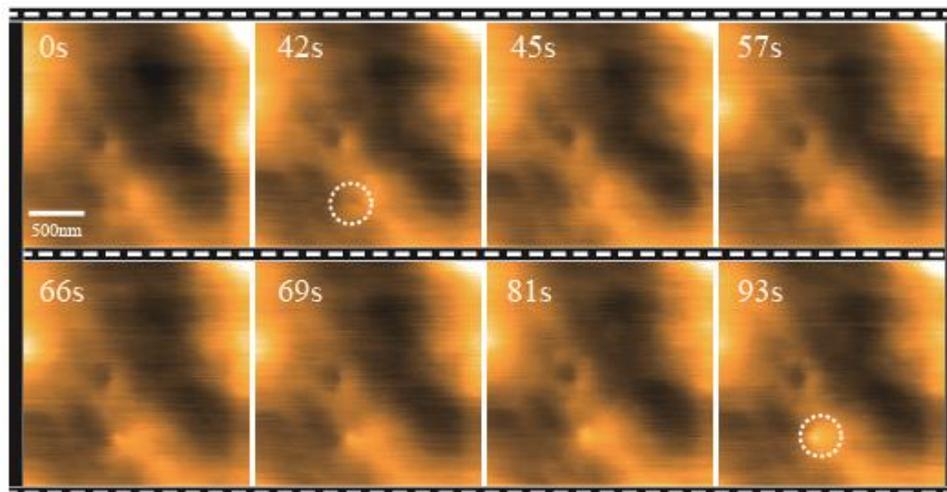


図 4-12 3Y1-B clone 細胞の高速 AFM 像

(a) 3Y1-B clone 細胞の膜上で起こるエンドサイトーシス現象を捉えた連続高速 AFM 像。
(b) 同じく 3Y1-B clone 細胞の膜上で起こる EGF によって誘発されたエンドサイトーシス現象を捉えた連続高速 AFM 像。

4.4 広域スキャナーによる高分解能観察

上述したように、本研究で開発された高速 AFM 用広域スキャナーを用いた巨大な枯草菌や哺乳類生細胞のイメージングによって、このスキャナーの有用性を実証した。本節では広域スキャナーによる高分解能イメージングのために行った工夫を述べる。実際、そのような観察は有効である。例えば、最初に生細胞の全体像をイメージングし、その後ある特定の位置を狙って高分解能イメージングを行うことで、タンパク質やペプチドなどの小さい粒子の細胞上における振る舞いや、それらの分子によって引き起こされる細胞の形態変化の過程などを可視化することができる。

第 3 章で述べたように、変位拡大を実現するためには必然的に圧電係数が大きな圧電素子を選択しなければならず、今回開発した広域スキャナーでは、X 方向 Y 方向ともに約 435 nm/V と非常に大きい。また、圧電素子に電圧を印加するために用いるピエゾドライバーの利得はこれまで 10 倍で固定であった。走査信号を出力するための D/A ボード(インターフェース社製、PCI-3305)の性能が 10V レンジの出力で 12bit の分解能しか持たないため、ピエゾドライバーの利得が 10 倍の場合には水平方向の分解能が約 11nm と制限される。広域スキャナーの広域走査性能を落とすことなく、この問題を解決するために新たに利得可変式 (1 倍、2 倍、5 倍、10 倍) のピエゾドライバーを開発した (現在ではこのピエゾドライバーは市販品となっている : メステック株式会社製、型番 : M-2345)。利得はイメージングしたいサンプルによって使い分けることができ、たとえば枯草菌などの細菌、哺乳類細胞などの巨大な分子には 10 倍利得のまま使用し、タンパク質分子等の小さな試料の場合には利得を 1~2 倍に設定して狭い範囲を走査するという使い方ができる。この利得の変更は全てソフトウェア上でできるようにした。

この利得可変式ピエゾドライバーが広域スキャナーの高分解能測定に対して有効であることを実証するために、アクチンフィラメントのイメージングを行った。図 4-14(a)-(d)にピエゾドライバーの利得を 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍と変化させた場合に取得した、アクチ

ンフィラメントの高速 AFM 像を示す。試料基板にはマイカを使用し、アクチンの固定には 0.1% の濃度で希釈したアミノシラン（信越化学工業社製、型番：KBE-903）を使用し、走査範囲は 200 nm×100 nm、ピクセル数は X 方向で 120 pixel、Y 方向で 60 pixel、画像取得速度は 0.15 s/frame である。図 4-13(a),(b) に示すように、印加電圧の利得が 1 倍及び 2 倍の時にはアクチンフィラメントの 36nm ピッチだけではなく、フィラメントを構成しているサブユニットを解像できている。一方、図 4-13 の(c),(d) に示すように、印加電圧の利得が 5 倍もしくは 10 倍の時には、AFM 像は歪んでしまい、特に利得が 10 倍の時にはアクチンフィラメントであるかどうかとも判別ができない。図 4-14(a) にリゾチームで処理する前の枯草菌の表面構造の高分解能 AFM 像を示す（ピエゾドライバーの利得は 1 倍、画像取得速度は 2 s/frame、走査範囲は 500 nm×500 nm、走査線の本数は 200 本）。網目状のペプチドグリカン層の構造がはっきりと見える。この構造は 4.2.3 のリゾチームによる溶菌過程の観察の際には見えなかった構造である[図 4-4(b), t = 0 の段階]。リゾチームを添加すると、すぐにその網目構造が分解され約 300 nm ピッチのシワ構造が現れる[図 4-14(b)]。

以上のように、本研究で開発された高速 AFM 用広域スキャナーと利得可変式ピエゾドライバーにより、広域を高速にイメージング出来るだけでなく、2-3 nm の分解能でタンパク質分子をイメージングすることが可能となった。

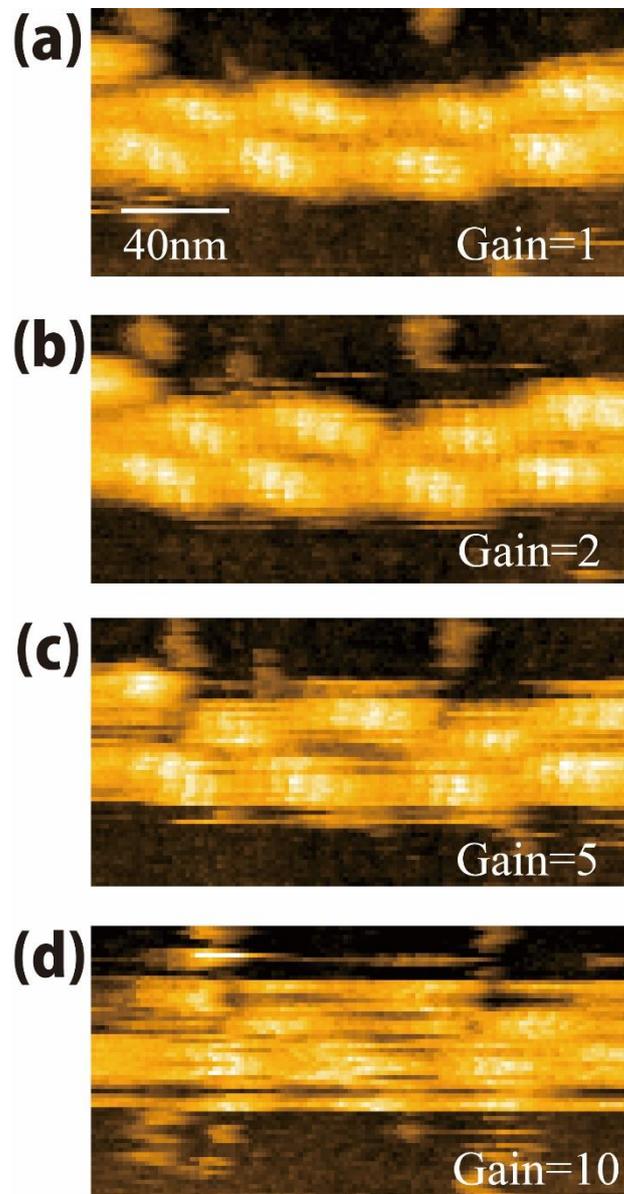
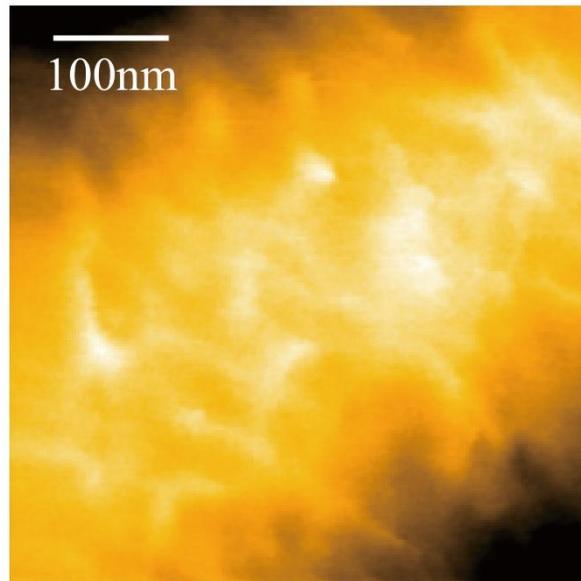


図 4-13 アクチンフィラメントの高分解能 AFM 像。

広域スキャナーと新規ピエゾドライバーを用いて得られたアクチンフィラメントの高分解能 AFM 像。2 本のアクチンフィラメントが平行に並んでいる。ピエゾドライバーのゲイン：1 倍 (a)、2 倍 (b)、5 倍 (c)、10 倍 (d)。

(a)



(b)

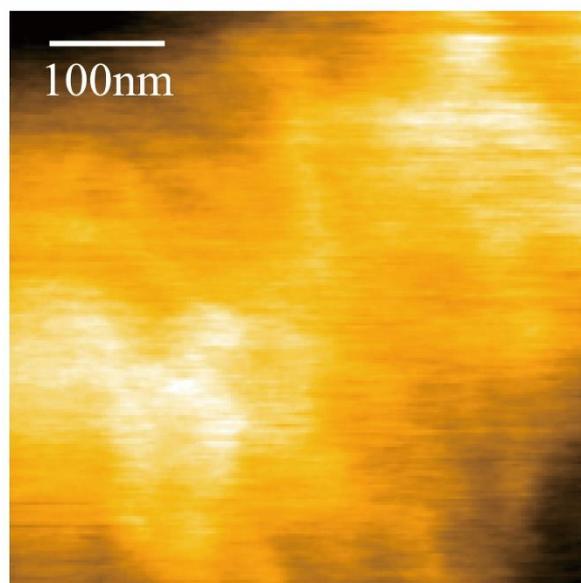


図 4-14 枯草菌表面の高分解能 AFM 像。

(a)リゾチーム添加前の枯草菌表面の高分解能高速 AFM 像。枯草菌外膜を構成している網目状のペプチドグリカン層の構造が見える。(b)リゾチーム添加後の枯草菌表面の高分解能 AFM 像。網目状の構造が崩れている。

第5章 ティップスキャン型高速 AFM の広域化に向けた要素技術開発

5.1 目的と概要

ここまで述べてきた技術は、すべてスキナーで試料を走査するサンプルスキャン方式の高速 AFM 用に開発された技術である。最近、安藤研究室ではカンチレバーを XY 方向に走査するティップスキャンタイプの高速 AFM を開発した[14], [56]。サンプルスキャン方式では、試料ステージを小さくする必要があった。しかし、ティップスキャン方式では、試料側の形状や重さに制約がない。また、高速 AFM ユニットが完全に独立しているため、光学顕微鏡など、様々な装置との融合が可能で、実際蛍光顕微鏡と高速 AFM を組み合わせた装置が開発された。

しかし、ティップスキャン型高速 AFM は、その構造的な制約から走査範囲が数 μm と限られていたため、タンパク質分子のような小さな対象しかイメージングできず、細胞や細菌などの巨大な生体分子に適用することが困難であった。この走査範囲を制限する主因は、レーザートラッキングシステムに用いられるダイクロイックミラーチルトの機構である。ティップスキャン型高速 AFM ではカンチレバーを XY 方向に走査するため、その動きを光でこ光学系のレーザー光がトラッキングする必要がある。このトラッキングのためにレーザーをチルト走査可能なミラーで反射させている。トラッキング可能な範囲を大きくするためにはミラーを大きくチルトさせなければならない。これまでのチルト機構では、ダイクロイックミラーを圧電素子と土台となる部品に直に接着しているため、チルト可動範囲を制限していた。実際、レーザートラッキング範囲は X 方向で $\sim 20 \mu\text{m}$ 、Y 方向で $\sim 3 \mu\text{m}$ である。本研究では、チルト角度を大きくするために、チルト機構の見直しを行った。チルト角度を制限する要因として、以下の 3 点が挙げられる。(1)ダイクロイックミラーの変位方向と圧電素子の変位方向の不一致、(2)ダイクロイックミラーと固定部品の接着面積、(3)圧電

素子間の距離である。これらを改良することで、トラッキング範囲を X 方向で $\sim 52 \mu\text{m}$ 、Y 方向で $\sim 33 \mu\text{m}$ まで拡大させることに成功した。

生細胞のような大きな試料を観察する場合、Z 方向についても考慮する必要がある。ティップスキャン型高速 AFM では変位測定用のレーザーの入射方向と Z ピエゾが変位する方向が異なるため、Z ピエゾが大きく変位した場合、レーザースポットはカンチレバーに対して相対的に X 方向に移動してしまう。この問題に対して、ミラーチルターの走査信号の振幅、オフセット、位相をそれぞれ調整することにより、Z 方向の大きな変位にも対応することが可能となった。

この章では、従来のダイクロイックミラーチルターの機構及び駆動方式の改善点を示し、広域化に向けて行った要素技術を説明する。

5.2 レーザートラッキングシステム

5.2.1 ティップスキャン型高速 AFM

サンプルスキャン方式では図 5-1(a)に示すように、カンチレバーは固定されており、変位検出用のレーザーは常にカンチレバー上の一定の点にフォーカスされる。だがこの方式では、試料側を高速に走査する必要があるため、試料を載せる円柱ステージの大きさが制約され、通常使用されている円柱ステージの大きさは約 $\Phi 1.5 \text{ mm}$ である。この制約に加え、蛍光顕微鏡などとの複合化が困難という問題もある。これらの顕微鏡の弱点を克服し、さらにバイオ研究に有効とするためにティップスキャン型高速 AFM が最近開発された[14], [56], [57]。この方式では、試料側の形状・重さなどの制限が無く、高速 AFM ユニットが完全に独立しているため光学顕微鏡などとの複合化が可能である。

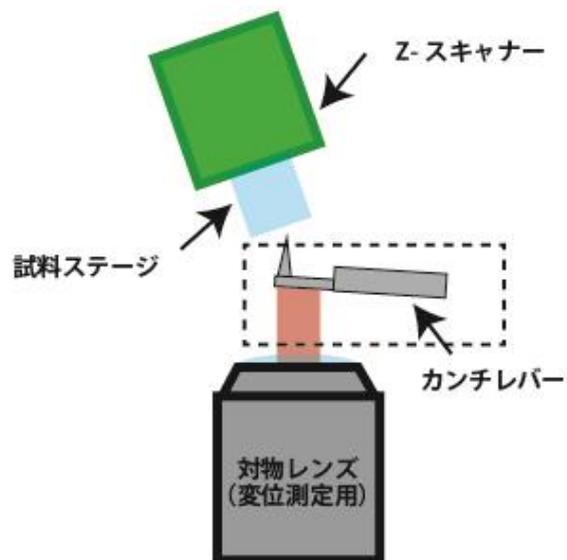
5.2.2 光学系

ティップスキャン型高速 AFM では、カンチレバーが X,Y 方向に高速に走査される。この方式では、カンチレバーに当てるレーザー光もカンチレバーの XY 方向の動きに同期して走査する必要がある。この走査について、レーザー光をフォーカスする対物レンズを走査することが考えられる。しかし、微小なカンチレバーを用いる高速 AFM では、一般の光学顕微鏡で使用されている N.A.が大きな対物レンズを採用しているため、この方法は採用できない。開発されたティップスキャン型高速 AFM では、ミラーチルター方式を採用している[12], [57]。

ミラーチルター方式では、図 5-2(a)に示すように、変位測定用のレーザーをミラーで反射させて対物レンズに導き、カンチレバー上に焦点を合わせる[図 5-3(a)]。カンチレバーで反射したレーザー光は、偏光ビームスプリッターまでは入射光と同じ経路をたどって 2 分割のフォトダイオードまで導かれる。カンチレバーは X,Y 方向に走査されているため、ミラーが固定であれば焦点位置がずれる[図 5-3(b)]。カンチレバーの走査と同期した信号でミラ

ーをチルトさせると、レーザー光は X,Y 方向に走査されているカンチレバーの動きをトラッキングする [図 5-3(c)]。図 5-2(b)で示すように、ミラー上に 2 つの圧電素子を対にして設置し、それぞれの位相を 180°ずらせて走査すること (Push-pull 方式) でミラーのチルト角度を大きくしている。

(a)



(b)

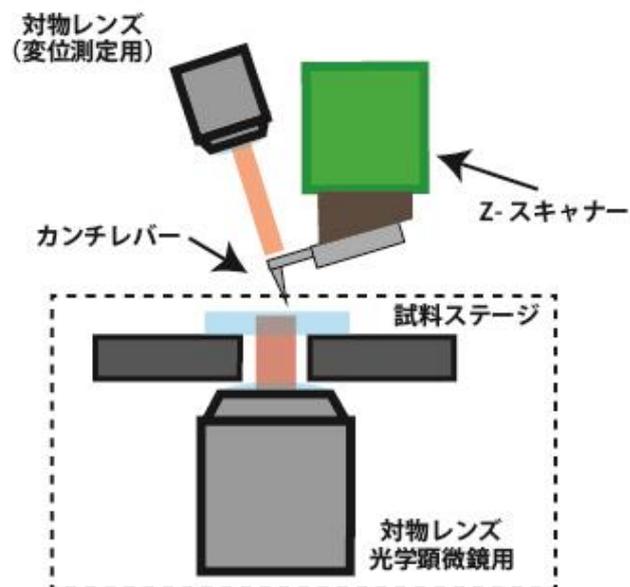


図 5-1 サンプルスキャン方式とチップスキャン方式

(a) サンプルスキャン方式の高速 AFM の概略図。カンチレバーは固定され、試料ステージが走査される。(b) チップスキャン方式の高速 AFM の概略図。この場合はカンチレバーが XY 方向に走査される。

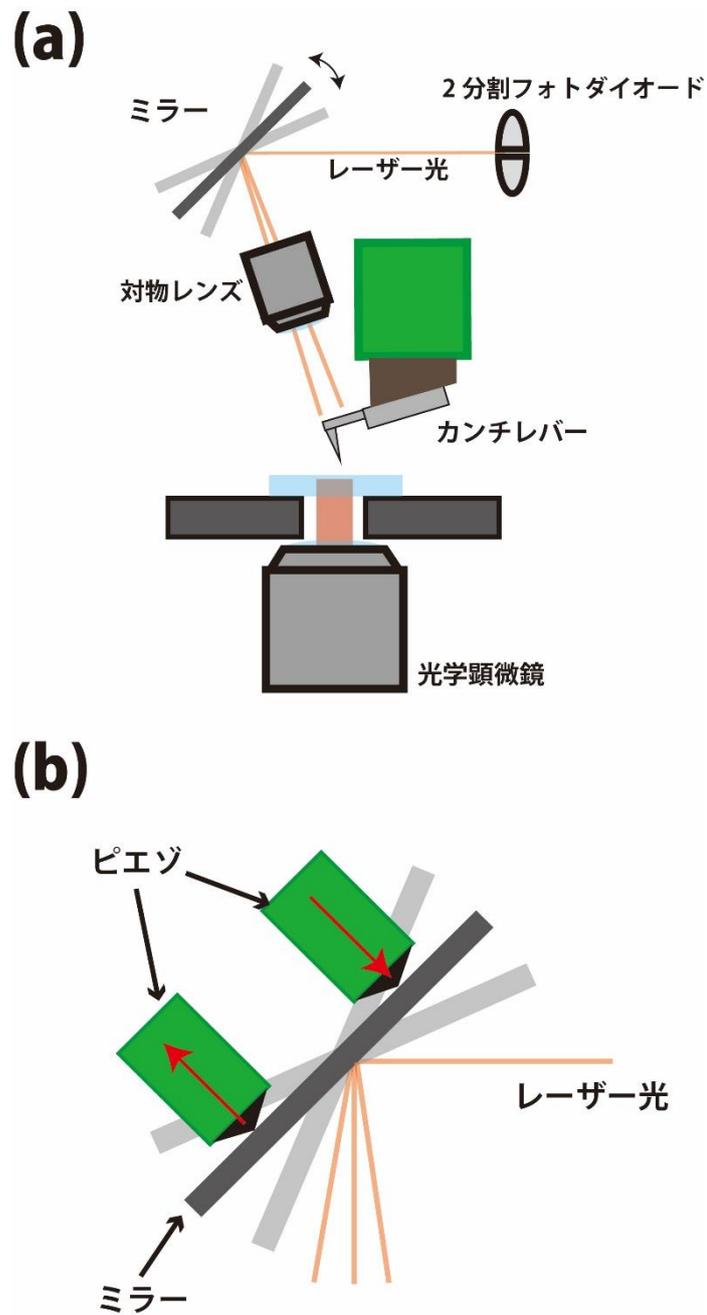


図 5-2 ミラーチルト方式

(a) ミラーチルトユニットを採用したティップスキャン型高速 AFM の概略図。出射されたレーザー光はカンチレバーで反射し、ダイクロイックミラーを通り 2 分割フォトダイオードまで導かれる。(b)ミラーチルトユニット部分の拡大図。圧電素子を 180°位相をずらせて走査することでより大きなチルト角度が得られる。

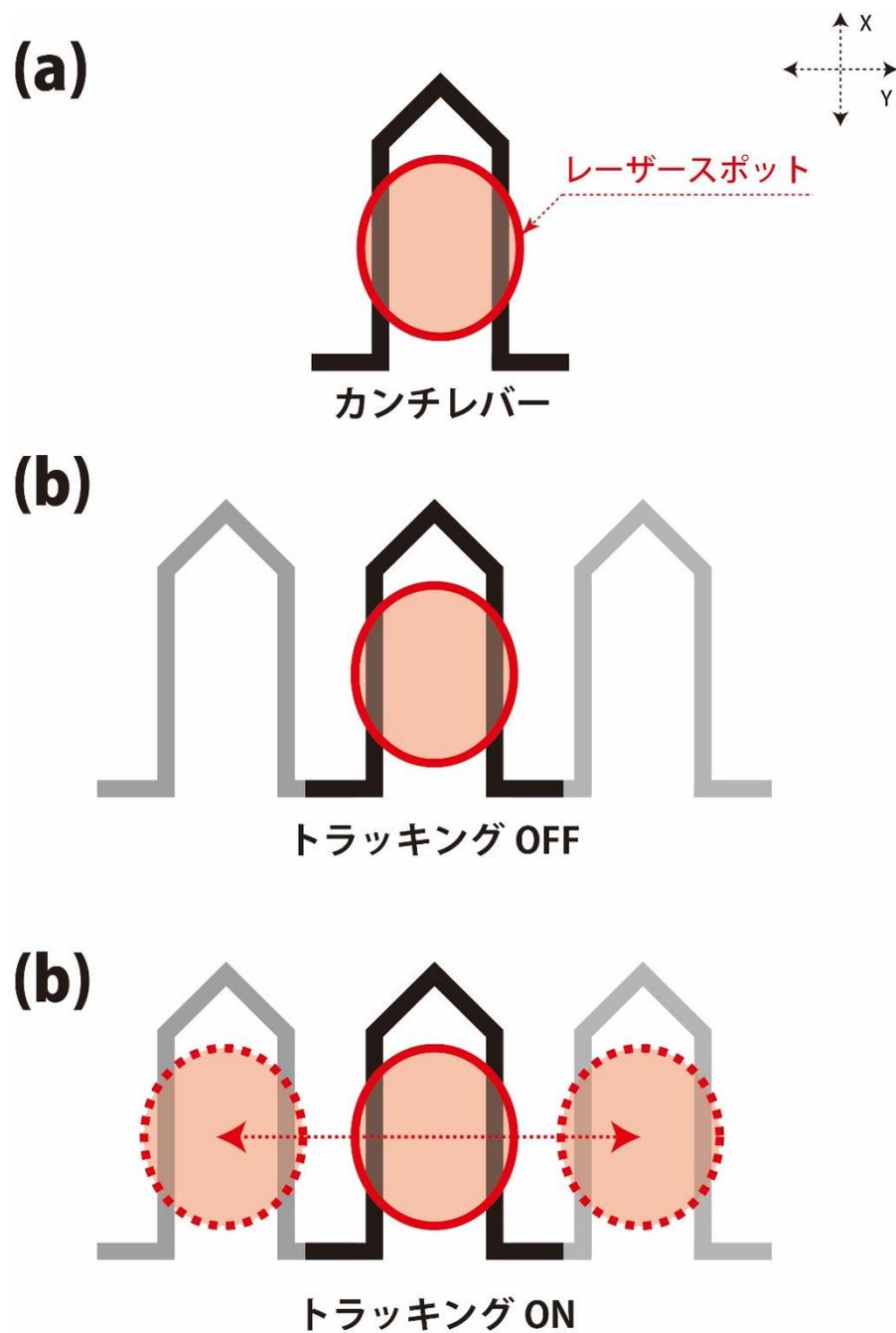


図 5-3 カンチレバーのトラッキング

(a) カンチレバーと変位測定用のレーザー光の位置関係を表した図。ここではレーザー光の焦点がカンチレバー上に合わされている。(b)レーザートラッキングがオフの場合にはレーザーのフォーカス位置がカンチレバーに対して大きくずれる。(c)トラッキングをオンにすると正確にカンチレバーの動きに追隨してレーザーのスポットが移動する。

5.3 広域ミラーフィルタユニットの開発

5.3.1 ミラーフィルタユニット

図 5-4 は現状のミラーフィルタユニットの概略図を示す[14], [56]。図 5-4(a)は X 方向のフィルタを示すミラーフィルタユニットの側面図である。このミラーフィルタユニットは以下の部品から構成されている。ダイクロイックミラー（エドモンド・オプティクス社製ホットミラー；型番：#64-464、透過波長：400~690 nm、反射波長：700~1150 nm、外形寸法：12.5 mm×12.5 mm×1.1 mm）、圧電素子（NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0203D04F；自己共振周波数:261kHz、寸法:2 mm×3 mm×5 mm、150 V 印加時の最大変位量:4.6 μm）、ミラーと圧電素子を連結させるアルミニウム製の三角形の部品、圧電素子を保持するためのアルミニウム製のブロック。X フィルタでは、圧電素子が角度をつけるための三角形の部品を介してミラーに取り付けられている。圧電素子はエポキシ接着剤を用いて接着されている。Y フィルタでは、図 5-4(b)に示すように、X フィルタも一緒に動かす。エポキシ接着剤で圧電素子を固定している。

ここで、ダイクロイックミラーの角度変化によってレーザー光がどの程度の走査範囲を持つのか、計算で見積もる。図 5-5 のように入射するレーザーをベクトル $\vec{A} = (1, 0, 0)$ とし、ダイクロイックミラーは YZ 平面上に置かれ、Y 軸を中心に 35°回転させたものとする。ダイクロイックミラーで反射されたレーザーは $\vec{B} = (\cos 70^\circ, 0, -\sin 70^\circ)$ と表すことができる。ここで 35°という値は、高速 AFM ユニットの設計上の値である。つまり、ダイクロイックミラーの法線ベクトルは $\vec{N} = (\cos 35^\circ, 0, -\sin 35^\circ)$ と表せる。この時ダイクロイックミラーやレーザーの位置・角度は、理想的な状態で調整された状態であると仮定している。任意の単位ベクトル (n_x, n_y, n_z) 周りに (x, y, z) を θ だけ回転させたときのベクトル (x', y', z') は以下の式のように表すことができる。

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} n_x^2(1 - \cos\theta) + \cos\theta & n_x n_y(1 - \cos\theta) - n_z \sin\theta & n_z n_x(1 - \cos\theta) + n_y \sin\theta \\ n_x n_y(1 - \cos\theta) + n_z \sin\theta & n_y^2(1 - \cos\theta) + \cos\theta & n_y n_z(1 - \cos\theta) - n_x \sin\theta \\ n_z n_x(1 - \cos\theta) - n_y \sin\theta & n_y n_z(1 - \cos\theta) + n_x \sin\theta & n_z^2(1 - \cos\theta) + \cos\theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix}$$

(式 5.1)

まず、X 方向の圧電素子を変位させた場合のダイクロイックミラーの変位量に関して考える。ここで、その変位量を D_x と置き、ダイクロイックミラーが図 5-5(a)のように Y 軸まわりに $\theta_x = 6.7 \times 10^{-4}$ (rad)回転した場合、反射されたレーザーのベクトルを \vec{B}'_x とすると、 \vec{B} と \vec{B}'_x との間の角 δ_x は入射と反射の法則より、 $\delta_x = 2 \times \theta_x$ と表せる。またここで、対物レンズの焦点距離を f_0 (ここで使用しているレンズは、Nikon 製、超長作動距離対物レンズ；型番：CFI L Plan EPI SLWD 20×；作動距離：24 mm、N.A. 0.35 である) とすると、最大走査範囲は以下の式で表すことができる (ただし、ここでは $f_0 = 20$ [mm])。

$$D_x = 2 \times f_0 \times \delta_x \quad (\text{式 5.2})$$

次に Y 方向の圧電素子を変位させた時のダイクロイックミラーの変化について考える。その時の変位量を D_y と置く。Y 方向の圧電素子を変位させた時のダイクロイックミラーの回転軸ベクトル \vec{M} は

$$\vec{M} = (\cos 55^\circ, 0, \sin 55^\circ) \quad (\text{式 5.3})$$

となる。ダイクロイックミラーがこのベクトル \vec{M} まわりに $\theta_y = 5.4 \times 10^{-4}$ (rad)回転したとすると、そのときの法線ベクトル \vec{N}' は

$$\vec{N}' = (\sin 55^\circ \cos \theta_y, \sin \theta_y, -\cos 55^\circ \cos \theta_y) \quad (\text{式 5.4})$$

となり、このときの \vec{N}' とレーザー光の入射ベクトルである \vec{A} の内積を求め、その間の角度 φ を求めると、

$$\cos \varphi = \cos 35^\circ (\cos^2 55^\circ - \cos^2 55^\circ \cos \theta_y + \cos \theta_y) - \sin 55^\circ \cos^2 55^\circ (1 - \cos \theta_y) \quad (\text{式 5.5})$$

$$\varphi = \arccos(\cos \varphi) \quad (\text{式 5.6})$$

ここで、 \vec{N} に垂直なベクトルである \vec{P} を求める。 \vec{P} は \vec{N} に垂直なベクトル $\vec{P} = (0,1,0)$ を \vec{M} まわりに θ_y だけ回転させたものであるから、 \vec{P} は

$$\vec{P} = (-\sin 55^\circ \sin \theta_y, \cos \theta_y, \cos 55^\circ \sin \theta_y) \quad (\text{式 5.7})$$

となる。そのベクトルを中心に \vec{A} を 2φ だけ回転させたベクトル \vec{B}'_y （これはダイクロイックミラー回転後に反射されたレーザー方向のベクトルを表している）を求めると、

$$\begin{aligned} \vec{B}'_y = & (\sin^2 55^\circ \sin^2 \theta_y (1 - \cos 2\varphi) + \cos 2\varphi - \sin 55^\circ \sin \theta_y \cos \theta_y (1 - \cos 2\varphi) \\ & + \cos 55^\circ \sin \theta_y \sin 2\varphi - \sin 55^\circ \cos 55^\circ \sin^2 \theta_y (1 - \cos 2\varphi) \\ & - \cos \theta_y \sin 2\varphi) \quad (\text{式 5.8}) \end{aligned}$$

となる。ここで \vec{B} と \vec{B}'_y との内積を求め、間の角度 δ_y を求めると、

$$\begin{aligned} \cos \delta_y = & \cos 70^\circ \{ \sin^2 55^\circ \sin^2 \theta_y (1 - \cos 2\varphi) + \cos 2\varphi \} \\ & + \sin 70^\circ \{ \sin 55^\circ \cos 55^\circ \sin^2 \theta_y (1 - \cos 2\varphi) + \cos \theta_y \sin 2\varphi \} \quad (\text{式 5.9}) \end{aligned}$$

$$\delta_y = \arccos(\cos \delta_y) \quad (\text{式 5.10})$$

したがって、ダイクロイックミラーの Y 方向の圧電素子を変位させた時のレーザー光の変位量 D_y は、

$$D_y = 2 \times f_0 \times \delta_y \quad (\text{式 5.11})$$

と表すことができる。

上記の式より、従来のミラーチルターユニットの最大トラッキング範囲は X 方向で $\sim 19 \mu\text{m}$ 、Y 方向で $\sim 3 \mu\text{m}$ と見積もることができる。X 方向と Y 方向の最大走査範囲を比較すると、Y 方向が極端に小さいのが分かる。X 方向の場合は入射・反射の法則から角度が $\delta_x = 2 \times \theta_x$ と変化するのに対し、Y 方向では走査される平面が X 方向とは異なるため、変位角が X 方向の場合よりも小さくなる。

もともと、このティップスキャン型の高速 AFM はタンパク質 1 分子測定を見据えて開発

されているため、上記のようなトラッキング範囲でも問題なく使用できたが、細胞のような大きな生体分子を観察する場合には走査範囲が全く足りない。そこで本研究ではこのミラーチルターの走査範囲（チルト角度）を制限している原因を探り、より大きな走査範囲を実現するための改良を行った。

5.3.2 ミラーチルターユニットの広域化における戦略

ここでミラーチルターのチルト角度範囲を制限している原因は、主に3点挙げられる。

1. ダイクロイックミラーの変位方向と圧電素子の変位する方向の不一致により、変位量が抑制される。
2. ダイクロイックミラーを固定するための部品の接着面積が大きすぎるため、非線形な動きを誘発してしまう。
3. 圧電素子間の距離が大きすぎるために、ダイクロイックミラーの角度変化が抑制される。

これら3点の問題に対する解決策に関して以下に説明する。

まず、1.の問題だが、図 5-4(a)、図 5-6(a)を見るとダイクロイックミラーが三角形の部品を介して約 45°の角度を持って、圧電素子に固定されていることによる。ここで圧電素子は自身が固定されているブロックに対して垂直な方向に変位する[図 5-6(a)中の赤矢印]。一方三角形の部品を介して接着されているダイクロイックミラーは、自身と垂直の方向に変位しようとする[図 5-6(a)中の黒矢印]。そのため、圧電素子の発生力が直接ダイクロイックミラーに伝達されにくい構造となっている。言い換えるならば力の分散が起こっており、ミラーの煽り角度を小さくしている。さらにダイクロイックミラーが三角形の部品の広い面積で接着されているため、非線形な変位が誘発される（詳細は後述）結果、ミラーの角度変化が小さくなっている。この点を解決するために、圧電素子とダイクロイックミラーを接着する方向を互いに垂直になるように配置した（図 5-6(b)）。図中の赤矢印は圧電素子の変位方向

を、黒矢印はダイクロイックミラーの変位方向を示している。図のような配置で接着することで圧電素子の変位方向とダイクロイックミラーの変位方向が一致する。そのため、圧電素子の発生力がそのままダイクロイックミラーに伝達されることになり、より大きな角度変化が期待できる。

次に 2.の接着面積の問題に関して説明する。図 5-4、図 5-7(a)に示すように、従来のミラーチルトユニットは X 方向、Y 方向ともに圧電素子とダイクロイックミラーもしくは土台部分を直接接着している。ここで第 3 章でも述べたように圧電素子の接着面積が広いほど、動作の非線形成分が大きくなるため変位が抑制されてしまい、結果的にダイクロイックミラーの角度変化も小さくなる。それを防ぐために図 5-7(b)のように三角形の一辺でダイクロイックミラーを接着する方法を採用した。ダイクロイックミラー自体は非常に軽量なため、接着面積が減少しても保持に問題ない。

最後に 3.の圧電素子間の距離に関して説明する。前述のようにレーザーのトラッキング範囲を拡大するためには、ミラーの角度変化を大きくする必要がある。ここで、回転軸を固定した板を押し上げる系を考えた時、力点の変位量が一定の場合には作用点の変位量は、回転軸からの距離が小さい方がより大きくなる。図 5-8(a)に示すように、従来のミラーチルトユニットでは、2 対の圧電素子間の距離が約 10 mm で設計されているが、改良版では図 5-8(b)に示すように、圧電素子間の距離が 1 mm になるようにした。

これら 3 点の改善方法により、レーザー光を広範囲で動かすことができるミラーチルトユニットを開発した。それを図 5-9 に示す。図 5-9(a) は新型ミラーチルトユニットの概略図を示している。構成部品は従来のユニットとほぼ同じである。ここでダイクロイックミラーをチルトさせるための圧電素子の個数を以前より倍の 4 個使用しているが、これは発生力をより大きくし、ダイクロイックミラーの角度変化を大きくするためである。図 5-9(b) は実機写真を示しており、ダイクロイックミラーを垂直に見た方向から撮影したものである。図 5-9(c)はそのミラーチルトユニットの実機を横方向から撮影したものである。実機

写真を見ても分かるように、変位する圧電素子間の距離が非常に小さくなっている。

5.3.3 ミラーフィルタユニットの性能評価

次に新たに作製したミラーフィルタユニットの性能に関して説明する。図 5-10 に新型ミラーフィルタユニットの X 方向の周波数特性のボード線図である。赤線は電圧利得を、青線は位相を表している。共振周波数は約 2 kHz と低いが、前述のフィードフォワード制御により余分な振動を抑制できる[14], [20]。

次に新規ミラーフィルタの最大走査範囲に関して検証を行った。図 5-11 に測定結果を示す。この測定では、光学顕微鏡の視野にカンチレバーが入るように位置調整しレーザーの焦点を合わせた後、カンチレバーのみを視野からフェードアウトさせる。そのため光学顕微鏡の視野にはカンチレバーに当たるはずであったレーザー光のみが観察される。図中の白い輝点はレーザースポットを表している。図 5-11(a)は X 方向のレーザーの最大走査範囲を示し、その値は 52.6 μm であった。また図 5-11(b)より Y 方向のレーザー最大走査範囲は 32.9 μm となった。X 方向の走査範囲では以前と比べて約 2 倍、Y 方向に関しては約 10 倍に走査範囲が拡大した。図 5-12 に新規ミラーフィルタによる振幅イメージングの結果を示す。振幅イメージングとは、カンチレバー上にレーザー光の焦点を合わせて励振させ、カンチレバーを XY 走査しつつ振幅値を各ピクセルにおいてモニターすることである。ここでは走査範囲 25 μm \times 25 μm 、走査線の本数 200 本、イメージング速度 35 s/frame で実験を行った。ミラーフィルタによるカンチレバーのトラッキングができている場合には、得られる画像は傾きの殆ど無い、平滑な像となる。図 5-12(a)はトラッキングをオフにした際の振幅イメージング画像であり、図 5-12(b)はミラーフィルタのトラッキングをオンにした時の振幅イメージング像である。また、図 5-12(a),(b)の青線、赤線はそれぞれの画像の断面図の位置を表しており、図 5-12(c)はその断面をプロファイルしたときのグラフを表している。トラッキングをオフにした時[図 5-12(a)]には画像中心部分のみが明るくなっており、これは中

心部分だけしかカンチレバーの振幅値を正しくモニターできていない結果である。実際に図 5-12(c)を見ると、グラフの中心部分だけが振幅値が高くなっており、その他の領域では振幅値がモニターされず 0 mV を示している。一方でミラーチルターのトラッキングをオンにした場合[図 5-12(b)]、オフにした時の場合よりも像が平滑になっているのが分かる。図 5-12(c)において断面図を見ると、トラッキングオンとオフの場合を比較しても振幅値がほぼ正確にモニターできているのが分かる。これらの結果より、最大走査範囲は従来のミラーチルターよりも X 方向では約 2.5 倍に当たる 52.6 μm 、さらに Y 方向では従来の約 10 倍にあたる 32.9 μm まで拡大できていることが判明した。

5.3.4 ティップスキャン型高速 AFM 用広域スキャナー

最大走査範囲を拡大したミラーチルターユニットを活用するために、本研究では新たにティップスキャン型高速 AFM 用に広域走査可能なスキャナーを開発した。その概略図を図 5-13(a),(b)に示す。変位拡大のために採用した機構は、第 3 章の高速 AFM 用広域スキャナーの場合と同じく第 3 種テコである。テコ比も同じく 1:4 に設計されており、材質も同様にアルミニウム(A5052)を用いている。また、使用している圧電素子は NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0505D16F（自己共振周波数:69 kHz、寸法:2 mm × 3 mm × 20 mm、150 V 印加時の最大変位量:17.4 μm 、発生力:850 N）である。第 3 章ではこの型の圧電素子は、接着面積の増加によって非線形な変位を誘発するため採用していなかった。しかし、圧電素子を挿入する箇所に T 字の部分設け、可能な限り非線形な変位を抑制する設計を取り入れることで、断面積は大きいものより発生力が大きな圧電素子を組み込むことに成功した。その結果、X 方向では 48 μm 、Y 方向では 52 μm の走査範囲を持つスキャナーが完成した。ここで図 5-13(b)において、Z 方向の圧電素子は従来と同様に、NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーターAE0203D04F（自己共振周波数:261kHz、寸法:2 mm × 3 mm × 5 mm、150 V 印加時の最大変位量:4.6 μm ）を用いた。

カンチレバーと圧電素子の間には 20° 傾斜をつけたカンチレバーホルダーを接着した。

このスキャナーと前節で改良を施したミラーチルターを用いて、 $10\ \mu\text{m}$ のピッチを持つ校正用標準試料の観察を行った。その結果を図 5-13(c)に示す。測定条件は走査範囲 $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ 、走査速度 $25\ \text{s/frame}$ 、走査線数 200 本である。標準試料の $10\ \mu\text{m}$ のピッチが正しく測定できている。この測定の場合も第 3 章の広域スキャナーと同様にヒステリシス補正、XY 方向における干渉の補正、フィードフォワード制御による X 方向の振動の抑制を適用している。

今まではティップスキャン型高速 AFM において、最大走査範囲が $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ という値であったが、ミラーチルターの構造変更と広域スキャナーの開発、さらに通常の高速 AFM 用広域スキャナーに対して用いた技術を適用することにより最大で $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ の範囲で走査が可能になった。

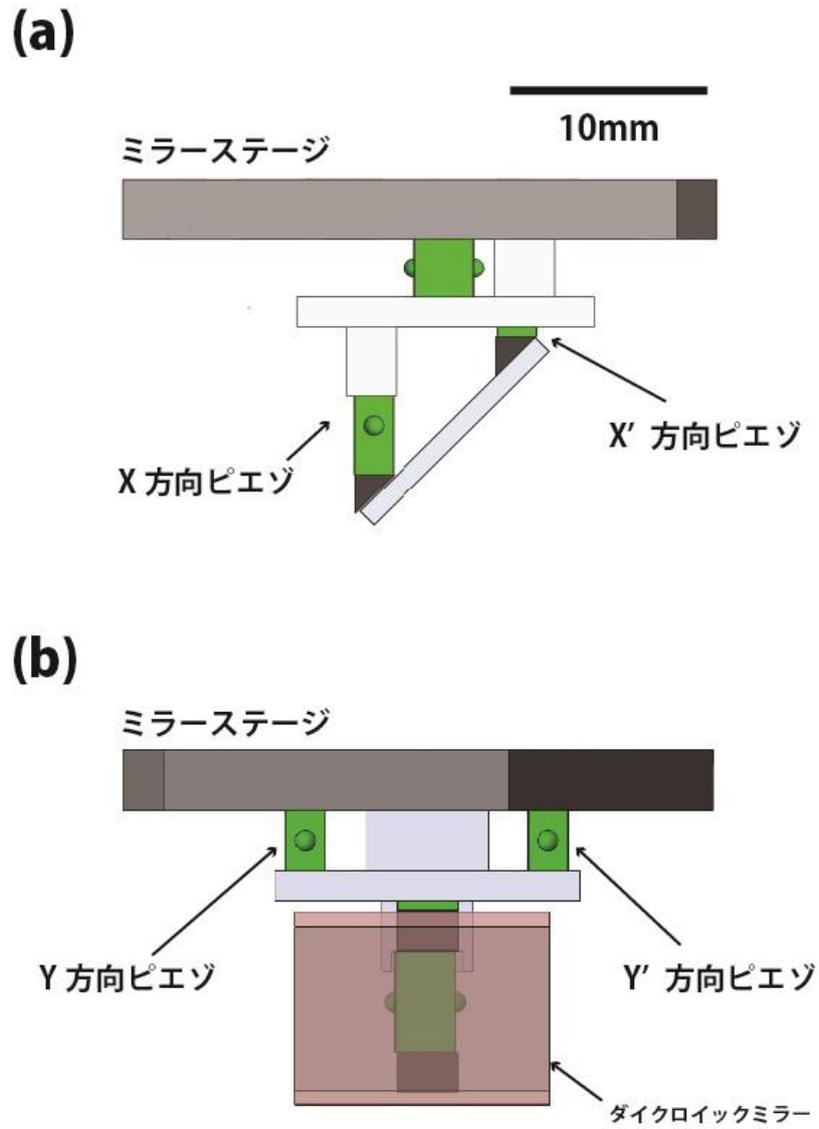


図 5-4 ミラーフィルタ（従来方式）の概略図
 (a) Y 方向から見た図。(b) X 方向から見た図。

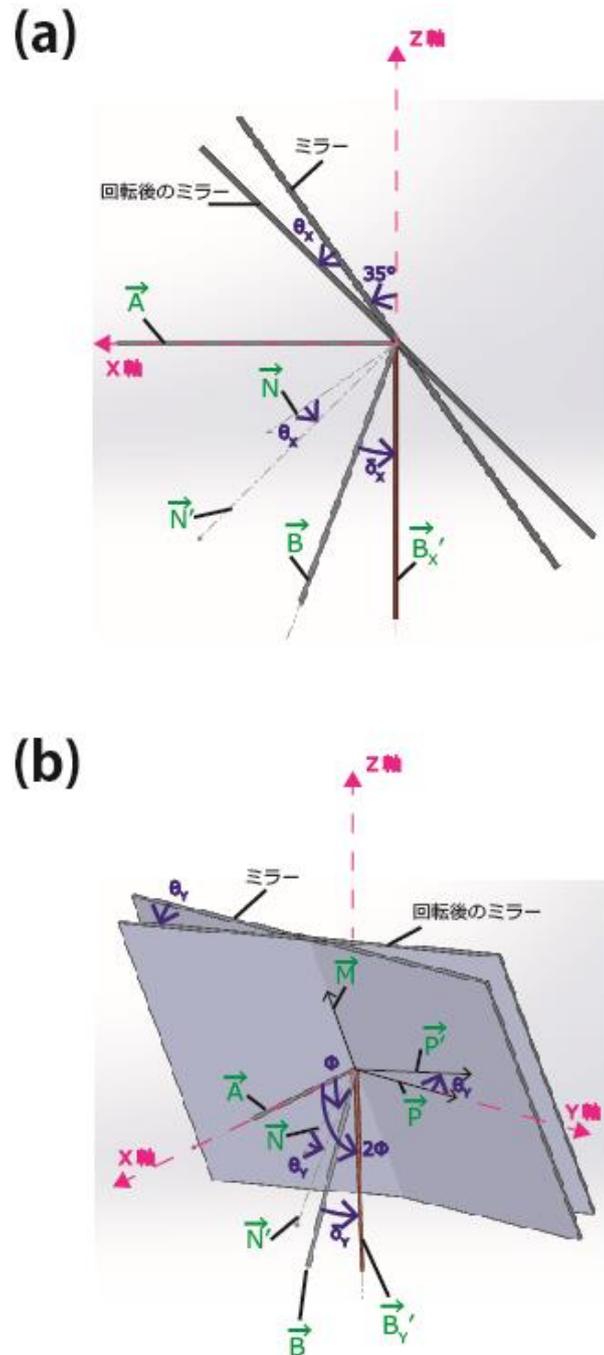


図 5-5 ミラーフィルターの角度変化の計算

(a) X 方向におけるレーザー光とダイクロイックミラーの位置関係を示した概略図。ティップスキャン型高速 AFM の設計上、前提としてダイクロイックミラーは約 35° 傾けて計算を行っている。(b) Y 方向のレーザー光とダイクロイックミラーの位置関係を示した概略図。X 方向の場合とは走査する平面が異なるため、Y 方向の最大走査範囲は X 方向のレーザー走査範囲よりも必然的に小さくなる。

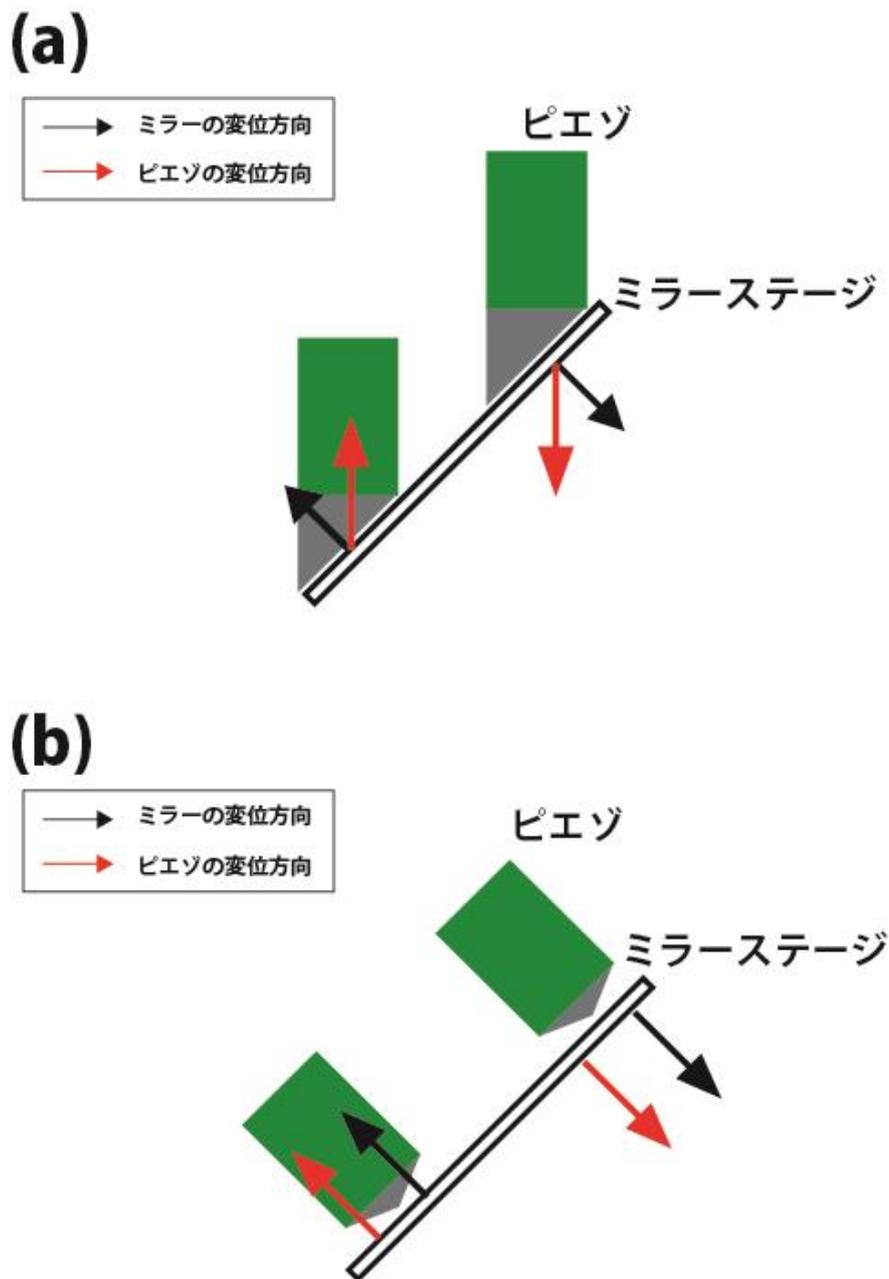


図 5-6 ミラーチルターの改善点 (1)

(a) 従来型のミラーチルターにおける、ダイクロイックミラーと圧電素子の位置関係。黒線はダイクロイックミラーの変位方向を表し、赤線は圧電素子の変位方向を表す。(b)改良後のダイクロイックミラーと圧電素子の位置関係。

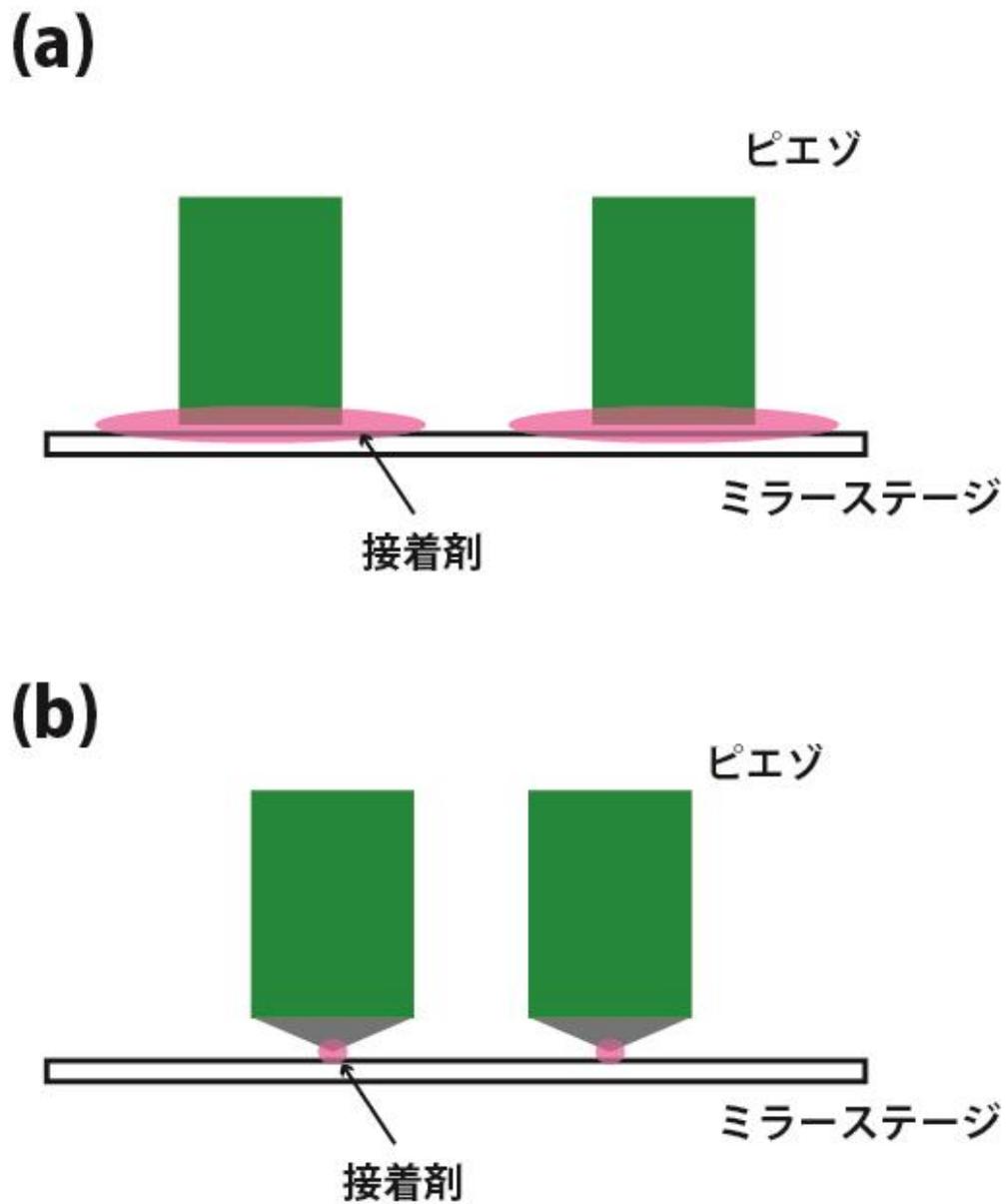


図 5-7 ミラーフィルターの改善点 (2)

圧電素子と土台の接着方法の違いを表した図。(a)圧電素子と土台を直接接着することで接着面積が増加し、非線形な変位を誘発する。(b)改良後の圧電素子と土台の位置関係。圧電素子と土台の間に三角形の部品を介入させることで、接着面積を減らした。

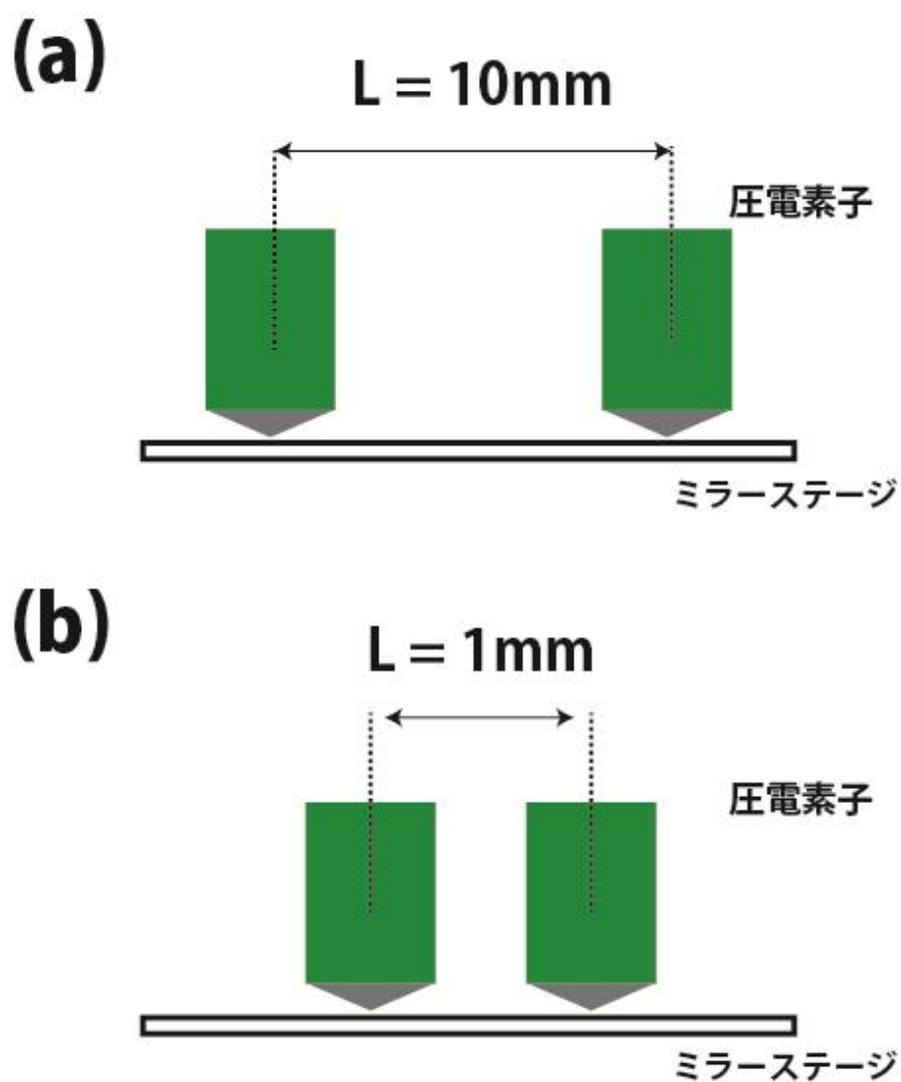


図 5-8 ミラーフィルターの改善点 (3)

ダイクロイックミラーと圧電素子の位置関係を示した概略図。(a)従来のミラーフィルターユニットにおける圧電素子の距離を表した図。(b)改良後の圧電素子間の距離を表した図。ここでは 10 mm から 1 mm に変更している。

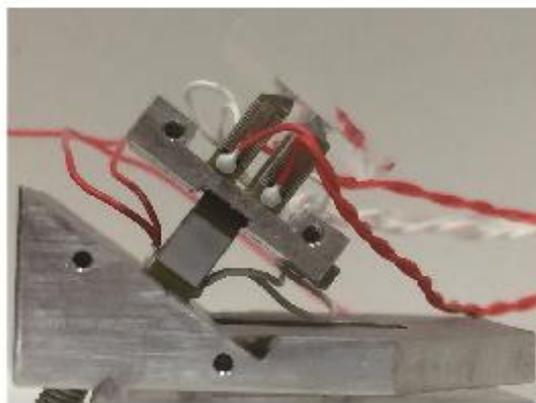
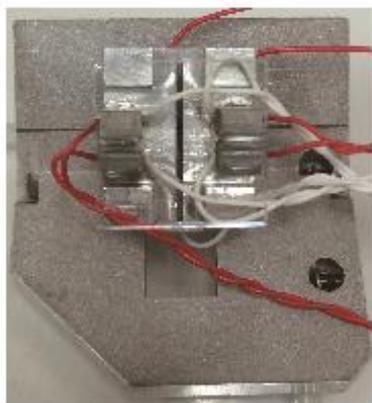
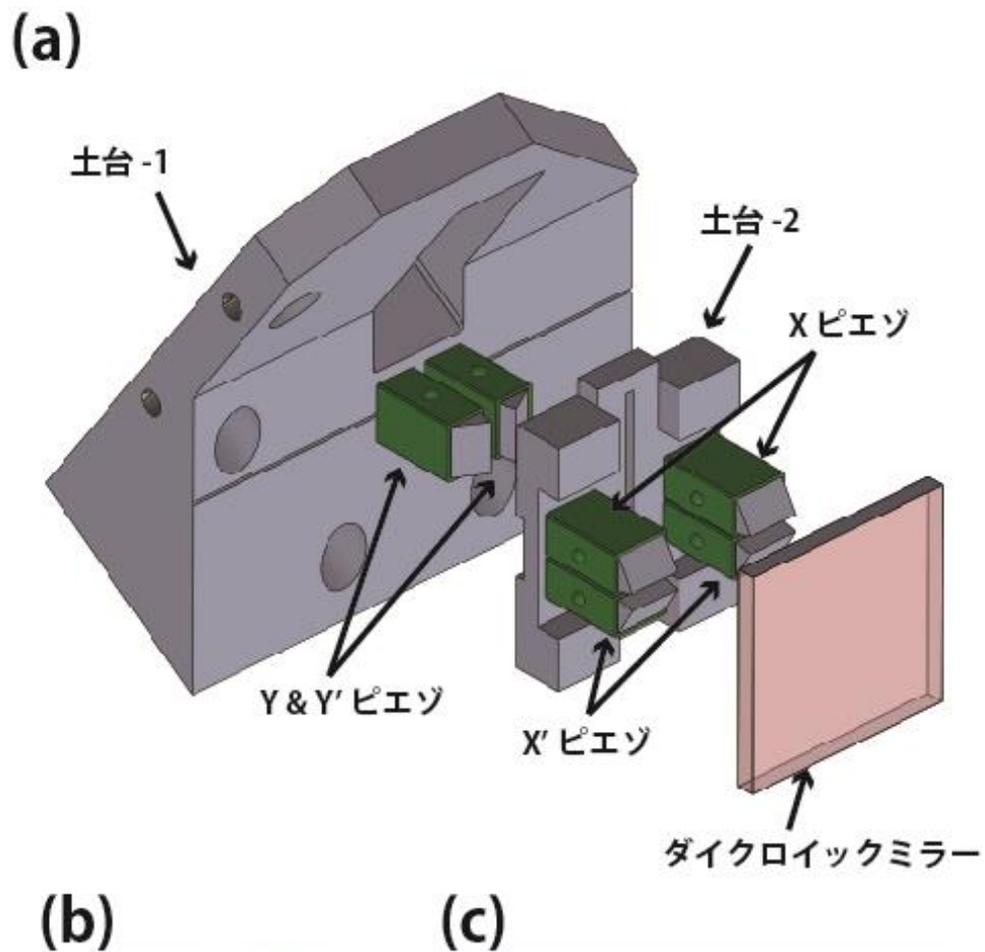


図 5-9 新型ミラーフィルターのデザイン

(a) 前述の改良点を考慮して、新たに設計したミラーフィルターユニットの概略図。(b)新規ミラーフィルターユニットをダイクロイックミラーに垂直な方向から撮影した実機写真。(c)同様に右側から撮影した実機写真。

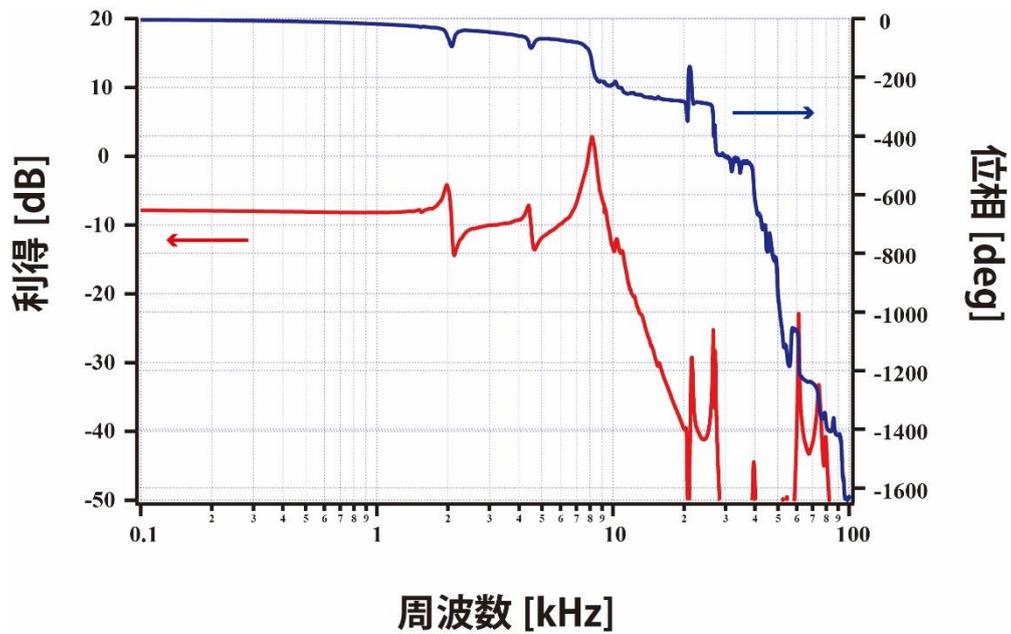
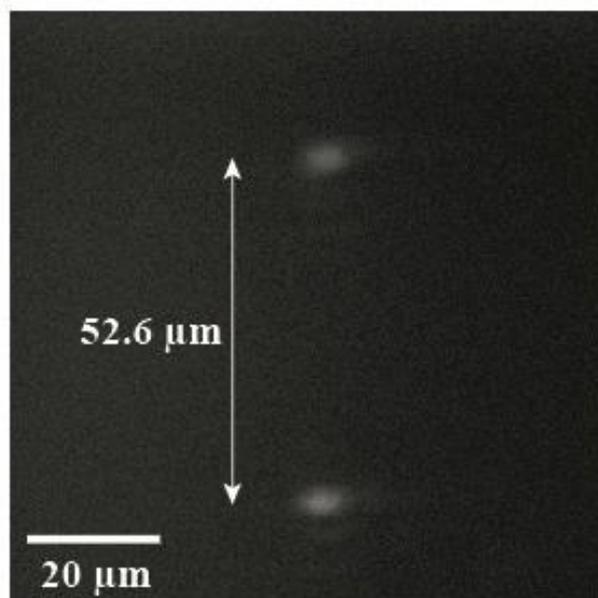


図 5-10 新型ミラーフィルターの共振周波数特性

新型ミラーフィルターユニットの X 方向の共振周波数特性を示したボード線図。このユニットの X 方向の共振周波数は約 2 kHz。

(a)



(b)

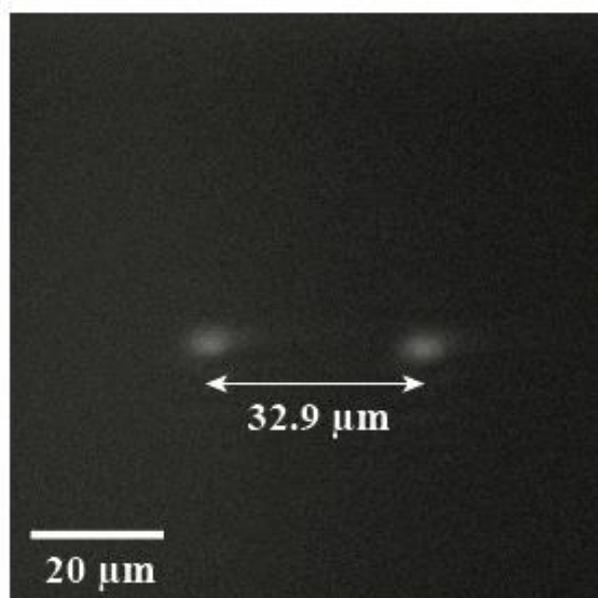


図 5-11 レーザーの最大トラッキング範囲

光学顕微鏡によって測定したレーザー光の最大走査範囲。白い輝点はレーザー光のフォーカス位置を表している。(a)X方向におけるレーザーの最大走査範囲を表した光学顕微鏡像。X方向では $52.6\ \mu\text{m}$ が最大走査範囲。(b)Y方向におけるレーザーの最大走査範囲を表した光学顕微鏡像。Y方向では $32.9\ \mu\text{m}$ が最大走査範囲。

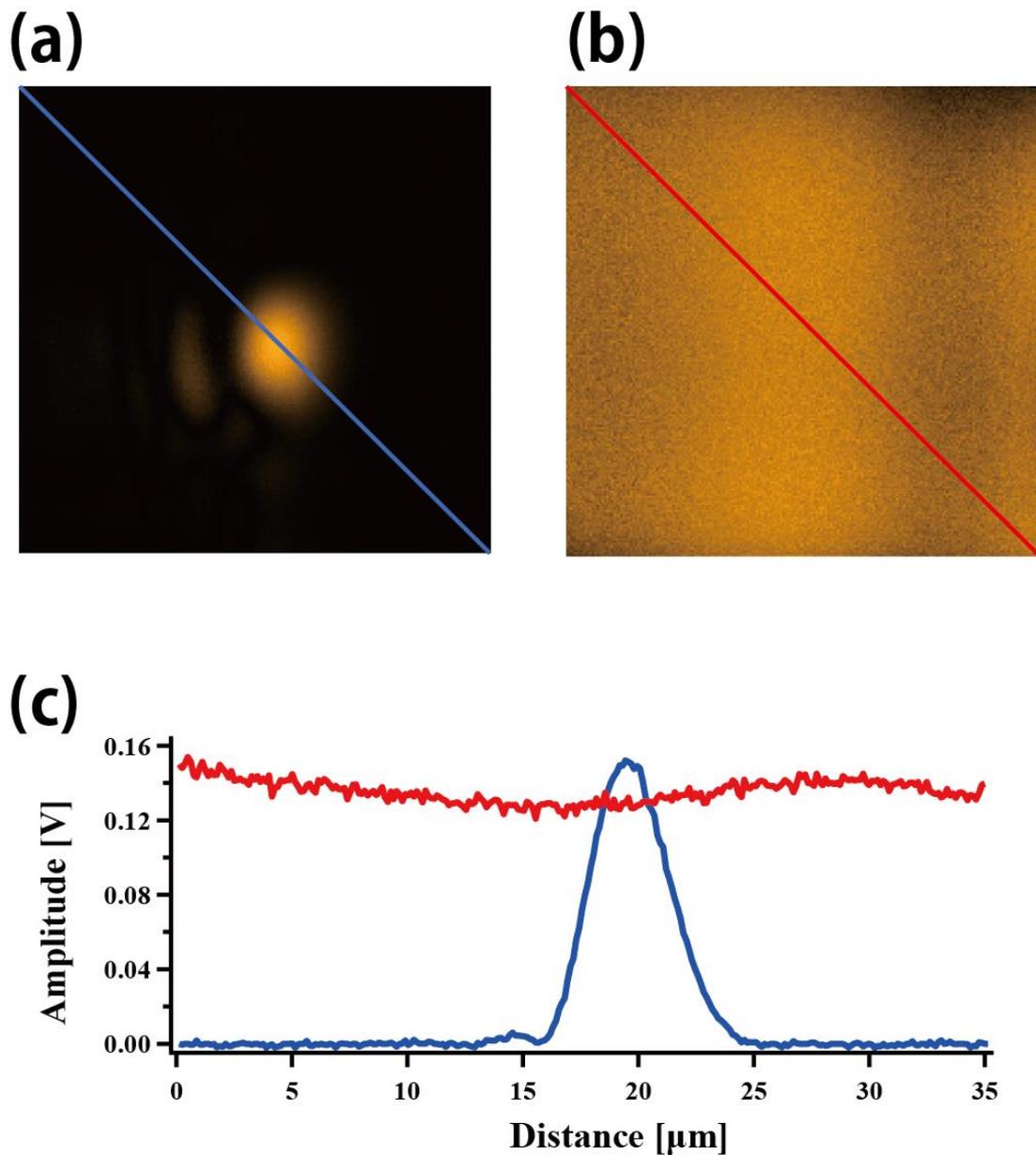


図 5-12 新型ミラーチルターによる振幅イメージング

(a) ミラーチルターユニットのトラッキング機能をオフにした時の振幅イメージング像。画像中央の輝点はトラッキングが可能な範囲を表している。(b) トラッキング機能をオンにした時の振幅イメージング像。ほぼ平坦な像となっており、カンチレバーを XY 走査しても振幅値がほぼ正確に測定されている。(c) (a),(b)の画像中心部分を通る実線における断面図。青線は(a)のトラッキングをオフにした場合、赤線は(b)のトラッキングをオンにした場合。

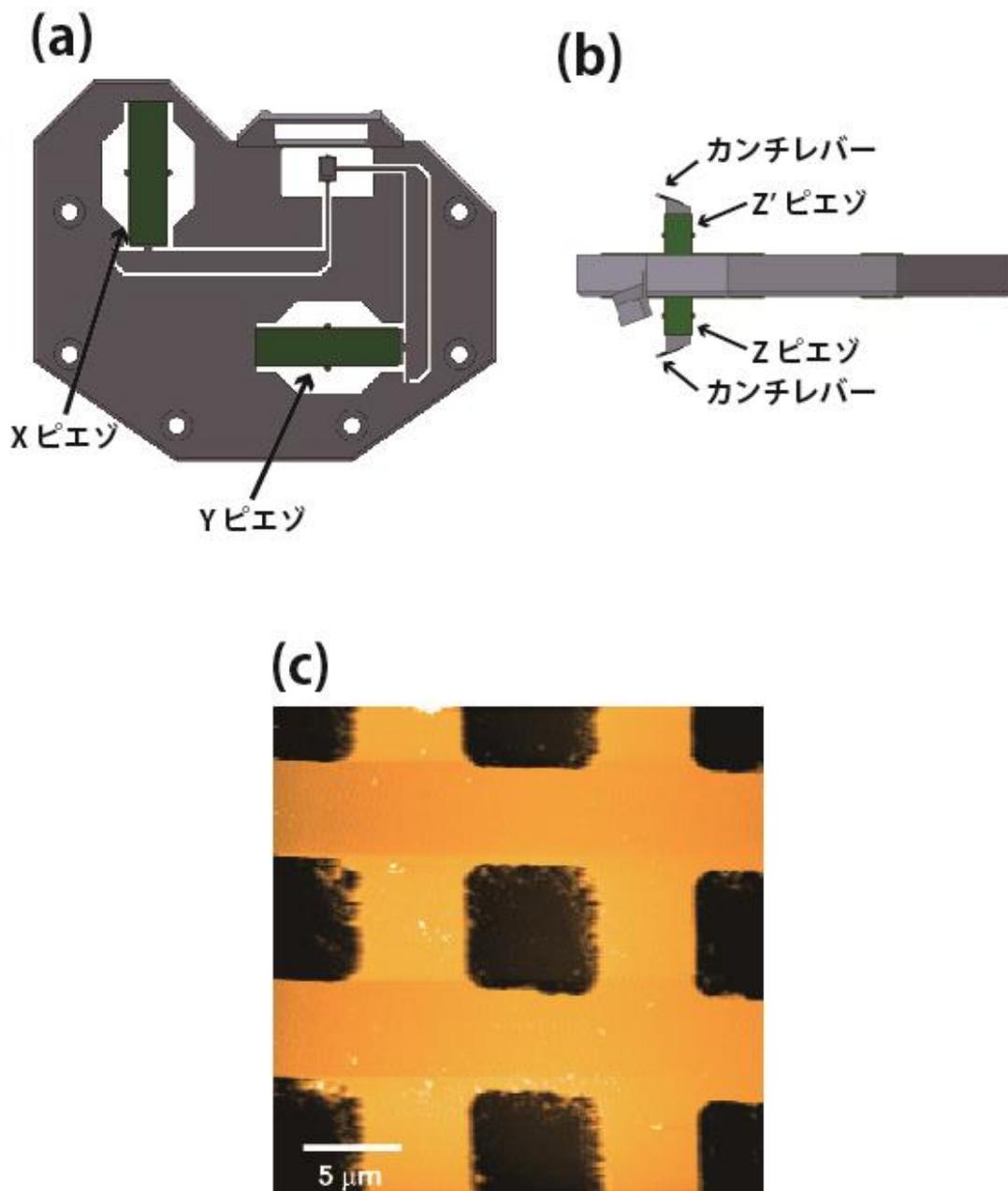


図 5-13 ティップスキャン型高速 AFM 用広域スキャナー

広域走査用ティップスキャン型高速 AFM スキャナーの概略図とイメージング画像。(a) 新たに開発した広域走査可能な高速 AFM スキャナーの概要図。変位拡大原理はサンプルスキャン型高速 AFM 用広域スキャナーと同様に第 3 種テコを採用。(b) 広域スキャナーの側面を示した図。(c) 広域ミラーフィルタユニットと広域スキャナーを用いて得られた標準試料の AFM 像。走査範囲：25 μm × 25 μm、走査速度：25 s/frame、走査線：200 本。

5.4 Z スキャナー変位に起因する X スキャナーの変位補正

上述したように、生細胞や細菌類などのタンパク質よりもはるかに巨大な生物試料系を対象とした高速 AFM 観察、及び、蛍光顕微観察との同時観察を実現するために、ティップスキャン型高速 AFM のミラーチルターユニット、及びスキャナーの走査範囲拡大を進めた。その結果、XY 方向においてそれらの拡大に成功した。しかし、対象とする試料は XY 方向に巨大なだけでなく少なからず Z 方向においても、タンパク質等の分子に比べはるかに大きい。図 5-14(a)示すように、Z スキャナーが大きく変位した時、対物レンズと Z 軸とがなす角度が 20° （言い換えると、カンチレバーと対物レンズの瞳の平面が一致している状態）となっていることにより、カンチレバーに対して相対的にレーザースポットは X 方向にも変位してしまう。この問題を解決する方法として最も単純なものは、カンチレバーと対物レンズの瞳の平面を平行にしない系[図 5-14(b)の設定]が考えられる。但し、この系では、必ずレーザーの反射光が対物レンズの瞳の口径内に入射することを前提とする。実際に理想的な状態において計算した結果を図 5-14(b)に示す通り、レーザーの反射光は対物レンズの中心から 20.1 mm ずれ、瞳径(18 mm)の中に収めることが不可能であることが判明した。株式会社オリンパスのチームが開発したティップスキャン型高速 AFM では、ミラーチルターユニットを採用しておらず、直接対物レンズを同期させて走査することでカンチレバーの動きを追従している[57]、この場合でも、Z スキャナーを大きく変位させたときに、レーザースポット位置が X 方向にずれる問題を抱えている。

そこで、本研究ではミラーチルターユニットの走査信号を改変することによりこの問題の解決を図った。図 5-15 にその概略図と結果を示す。図 5-15(a)に示すように、Z スキャナーが大きく変位した際、位相及びオフセットを改変した Z スキャナーの走査信号をミラーチルターユニットに入力することにより、レーザースポットを X 方向に変位させる。実際の測定結果を図 5-15(b)に示す。Z スキャナーに使用した圧電素子は NEC トーキン株式会社製積層型ピエゾアクチュエーター AE0203D04F（自己共振周波数:261kHz、寸法:2 mm ×

3 mm × 5 mm、150 V 印加時の最大変位量:4.6 μm) である。ここで Z スキャナーは片端をスキャナー本体に固定されているため、共振周波数は約 90 kHz となった。図 5-15(b)は Z スキャナーに 140 Hz、100 V_{p-p} の三角波を入力した時のカンチレバーの振動振幅をプロットしたグラフを表している。青線は補正前の振動振幅値を表し、赤線は補正後の振動振幅値である。ここでは振動振幅値は約 130 mV に設定した。図 5-15(b)の青線、つまり補正前のカンチレバーの振動振幅値を見ると、Z スキャナーが 0 μm から 2.5 μm まで変位するのに同期して変化しているのが分かる。凹凸の大きい試料をイメージングする場合、約 60 mV_{p-p} というみかけの振動振幅値の変化は許容範囲を遥かに超える。一方、補正を施した場合 (赤線) には、振動振幅値に変化が全く現れていないことが実証された。

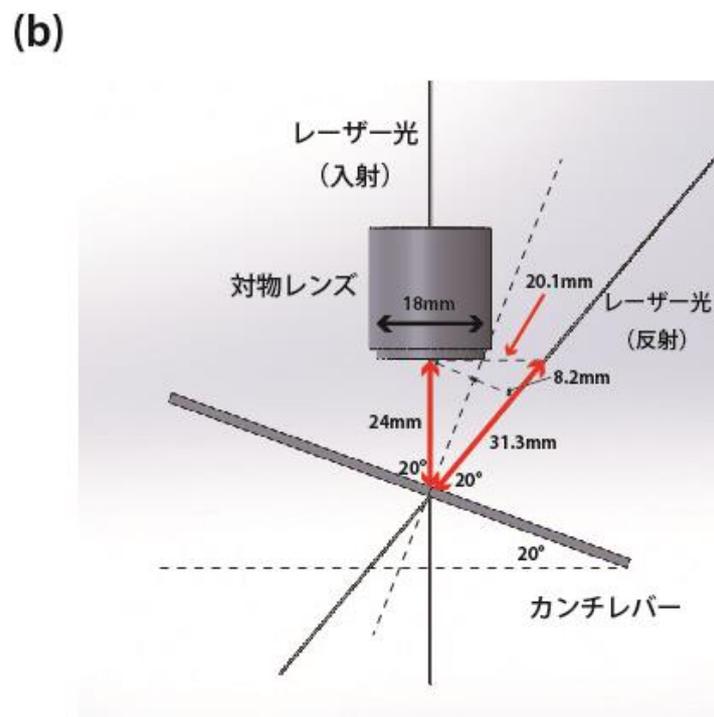
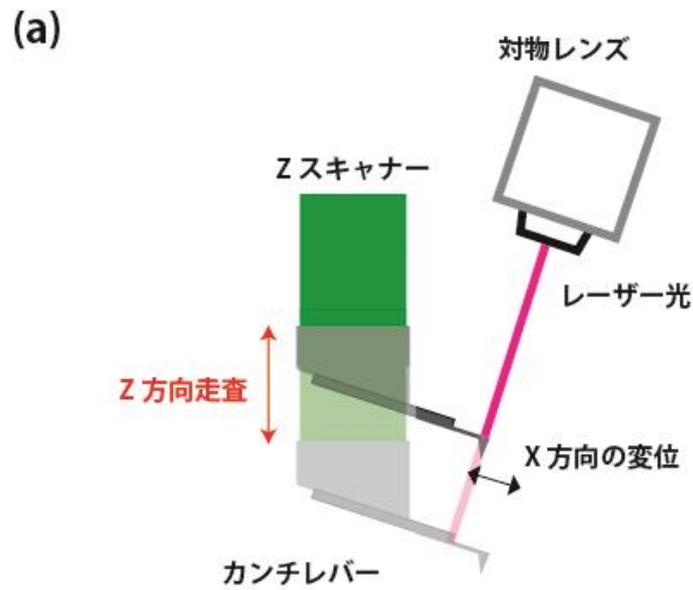
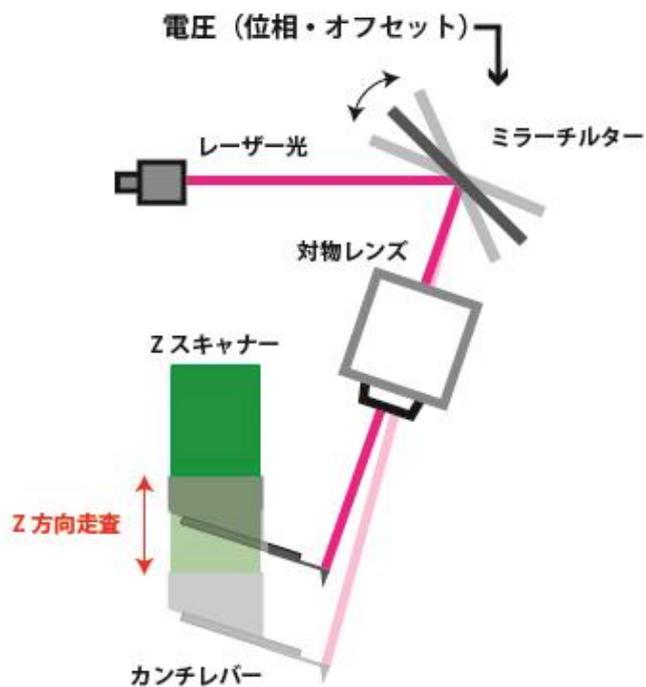


図 5-14 Z 方向の走査による X 方向の変位

(a) Z スキャナーが大きく変位した場合に起こるレーザースポットの X 方向のずれ移動を示す概略図。(b)カンチレバーの反射面と対物レンズの瞳が平行でないと仮定した時のレーザー光の反射軌跡を示した図。瞳径が 18 mm であるため、レーザーの反射光は再び対物レンズに入射することはない。

(a)



(b)

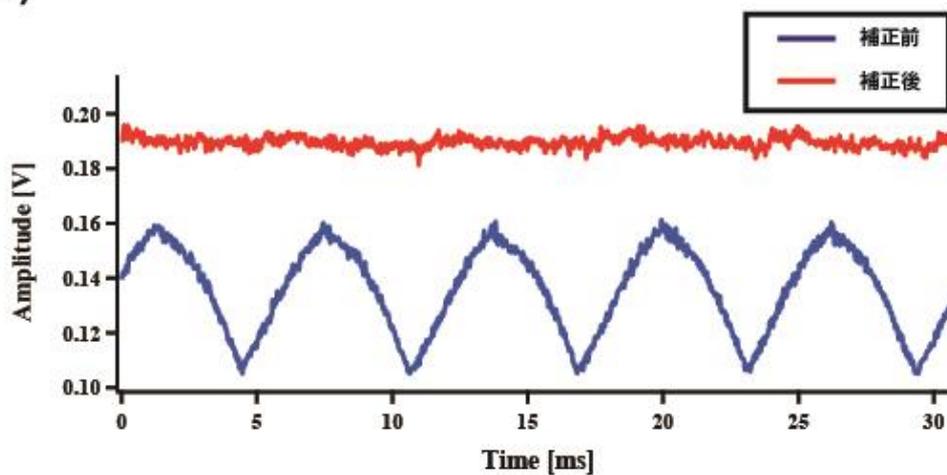


図 5-15 Z 方向の走査による X 方向の変位

(a) Z スキャナーの走査信号を改変した信号をミラーフィルタユニットに入力することにより、大きな Z 方向走査に起因するレーザースポットの X 方向のずれ移動を補正することを示す概略図。(b) Z 方向に大きく走査しつつ、カンチレバーの振幅値測定した結果をプロットしたグラフ。ここで青線は補正前の振幅値を、赤線は補正後の振幅値を表す。

第6章 総括

6.1 まとめ

現在までに高速 AFM の持つ、高い空間分解能と時間分解能によって様々なタンパク質分子の動態・機能が明らかにされてきた。しかし、実際の生命現象は生細胞や細菌などの非常に巨大な系で起こっている。実際のタンパク質分子の機能を知るためにはその細胞などの現場で起こる分子の動態、あるいは、細胞自身の動態を知ることが重要である。そこで本研究では、既存の高速 AFM のスキャナーの走査範囲を拡大し、より大きな生物試料系を高い分解能で捉えることを目標として、技術開発に取り組んだ。その結果、従来は最大でも X,Y 方向で $6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ の走査範囲が限界であったが、テコの原理を応用した機構を組み込むことで最大で $45\ \mu\text{m} \times 45\ \mu\text{m}$ まで走査範囲を拡大させることに成功した。また、この最大走査範囲を拡大させることに伴う高速走査時の X 方向の振動、圧電素子固有のヒステリシス特性の顕在化やテコの原理を適用したスキャナーの構造による XY スキャナー間の干渉問題が発生したが、それらを一つずつ解決することで生細胞や細菌のイメージングに成功した。またスキャナーを走査するための信号を出力する D/A ボードの分解能を考慮し、ピエゾドライバーの電圧利得を可変することで、アクチンフィラメントを構成する G アクチンの可視化にも成功した。

さらに、ここまでで得られた変位拡大技術を蛍光顕微鏡一体型高速 AFM (ティップスキャン型高速 AFM) に適用する技術開発を行った。従来は最大走査範囲が $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ と狭かったが、ダイクロイックミラーを走査するためのミラーチルトユニットの構造を根本から見直し、改良を加えた結果、最大走査範囲は X 方向で $52.6\ \mu\text{m}$ 、Y 方向では $32.9\ \mu\text{m}$ まで拡大させることに成功した。さらにティップスキャン型高速 AFM のスキャナーにもサンプルスキャニング型広域スキャナーの技術を適用し、走査範囲の拡大に成功した。

今後本研究で開発された、広域スキャナー、もしくは広域走査可能な蛍光顕微鏡一体型高速 AFM がさらなる生命現象の解明に寄与することが期待される。

6.2 展望

本研究で開発された高速 AFM 用広域スキャナー、および広域走査可能な蛍光顕微鏡一体型高速 AFM を用いれば従来の高速 AFM では得られなかった現象が可視化できる。しかし、この広域スキャナーは従来の高速 AFM スキャナーよりも確実に走査速度は劣る。それはトレードオフの関係として必然であるが、細胞自身の形態変化はそれほど速くはないものの、細胞上で起こるタンパク質分子の動きは速く、より高速な走査を実現させるための工夫が今後必要となる。また、タンパク質分子や細菌よりも非常に柔らかい哺乳類細胞表面上をいかにして弱い力でタッピングするか、ということも課題の一つであり、そのための技術開発も今後必要となる。さらに今後の方針として、本研究で広域化に成功した一体型高速 AFM とその他の顕微鏡との（光学顕微鏡や共焦点顕微鏡、超解像顕微鏡など）融合化を推し進め、さらなる生命科学への貢献を目指す。

謝辞

本研究は、著者が金沢大学大学院自然科学研究科博士後期課程在学中に、同大学理工研究域の安藤敏夫教授の指導をもとに行ったものである。安藤敏夫教授に深く感謝致します。また、企業を退社し博士課程への進学、及び、研究全般、それ以外の面でも多大なご支援・ご指導を賜りました同大学理工研究域の内橋貴之教授に深く感謝致します。また、日々の研究活動で様々なご助言をくださいました、金沢大学理工研究域バイオ AFM 先端研究センターの古寺哲幸准教授に深く感謝致します。博士後期課程在学中に金銭的な面で支援していただきました株式会社生体分子計測研究所代表取締役岡田孝夫殿に心より感謝致しております。本研究で開発された広域走査可能なスキャナーを用いて様々なデータを出していただき、さらに本研究においても的確な指導・ご助言をくださいました金沢大学博士研究員の柴田幹大博士に心より感謝致します。また、日々の研究活動において様々な視点からアドバイスをいただきました大阪大学助教の山下隼人博士に心より感謝致します。装置開発という本研究の特性上、事務手続きで大変お世話になりました金沢大学理工研究域物理コース秘書の森廣美さん、金沢大学生物物理学研究室私設秘書の松本文さんに心より感謝いたします。

一緒に実験を行い、時には的確なアドバイスを投げかけてくれた山中信之介君、公私共に様々なことを話し合ってきて本研究が成り立っています。本当に感謝しております。また、1年弱という短い期間でしたが一緒に実験を行いました後藤朱音さん、ありがとうございました。また、研究に関する相談だけでなくその他さまざまな協力を快く引き受けてくださいました金沢大学生物物理学研究室的メンバー皆様に心より感謝致します。ありがとうございました。

最後になりますが、企業を退職し博士後期課程に進学することに関して温かく見守りそして辛抱強く支援してくださいました両親に対しては、深い感謝の意を表して謝辞と致します。

参考文献

- [1] G. Binnig and C. F. Quate, “Atomic Force microscope,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 9, p. 930, 1986.
- [2] M. B. Viani, T. E. Schäffer, G. T. Paloczi, L. I. Pietrasanta, B. L. Smith, J. B. Thompson, M. Richter, M. Rief, H. E. Gaub, K. W. Plaxco, A. N. Cleland, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, “Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 70, no. 11, pp. 4300–4303, 1999.
- [3] T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, and A. Toda, “A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 22, pp. 12468–12472, 2001.
- [4] G. Meyer and N. M. Amer, “Novel optical approach to atomic force microscopy,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 53, no. 12, pp. 1045–1047, 1988.
- [5] N. Kodera, H. Yamashita, and T. Ando, “Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 76, no. October 2004, pp. 1–5, 2005.
- [6] N. Kodera, M. Sakashita, and T. Ando, “Dynamic proportional-integral-differential controller for high-speed atomic force microscopy,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 77, no. 8, p. 083704, 2006.
- [7] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, “Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy,” *Nature*, vol. 468, no. 7320, pp. 72–76, 2010.
- [8] M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, and T. Ando, “High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 3, pp. 208–212, 2010.
- [9] M. Shibata, T. Uchihashi, H. Yamashita, H. Kandori, and T. Ando, “Structural Changes in Bacteriorhodopsin in Response to Alternate Illumination Observed by High - Speed Atomic Force Microscopy,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 50, pp. 4410–4413, 2011.
- [10] T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando, and H. Noji, “High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Rotary Catalysis of Rotorless F1-ATPase,” *Science (80-)*, vol. 333, pp. 755–758, 2011.
- [11] K. Igarashi, T. Uchihashi, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, T. Okamoto, M. Penttila, T. Ando, and M. Samejima, “Traffic Jams Reduce Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface,” *Science (80-)*, vol. 333, no. 6047, pp. 1279–1282, 2011.

- [12] S. Kiyonaka, T. Kajimoto, R. Sakaguchi, D. Shinmi, M. Omatsu-Kanbe, H. Matsuura, H. Imamura, T. Yoshizaki, I. Hamachi, T. Morii, and Y. Mori, “Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells.,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. 12, pp. 1232–1238, 2013.
- [13] A. I. Shevchuk, P. Novak, M. Taylor, I. A. Diakonov, A. Ziyadeh-Isleem, M. Bitoun, P. Guicheney, M. J. Lab, J. Gorelik, C. J. Merrifield, D. Klenerman, and Y. E. Korchev, “An alternative mechanism of clathrin-coated pit closure revealed by ion conductance microscopy,” *J. Cell Biol.*, vol. 197, no. 4, pp. 499–508, 2012.
- [14] S. Fukuda, T. Uchihashi, R. Iino, Y. Okazaki, M. Yoshida, K. Igarashi, and T. Ando, “High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 84, no. 7, p. 073706, 2013.
- [15] H. Watanabe, T. Uchihashi, T. Kobashi, M. Shibata, J. Nishiyama, R. Yasuda, and T. Ando, “Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 84, no. 5, p. 053702, 2013.
- [16] M. Shibata, T. Uchihashi, T. Ando, and R. Yasuda, “Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells,” *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 8724, 2015.
- [17] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, and V. B. Elings, “Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy,” *Surf. Sci.*, vol. 290, pp. L688–L692, 1993.
- [18] M. Kitazawa, K. Shiotani, and A. Toda, “Batch fabrication of sharpened silicon nitride tips,” *Japanese J. Appl. Physics, Part 1 Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.*, vol. 42, no. 7, pp. 4844–4847, 2003.
- [19] T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, “Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy,” *Nat. Protoc.*, vol. 7, no. 6, pp. 1193–1206, 2012.
- [20] T. Ando, T. Uchihashi, and T. Fukuma, “High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes,” *Prog. Surf. Sci.*, vol. 83, no. 7–9, p. 337, 2008.
- [21] T. Uchihashi, N. Kodera, H. Itoh, H. Yamashita, and T. Ando, “Feed-forward compensation for high-speed atomic force microscopy imaging of biomolecules,” *Japanese J. Appl. Physics, Part 1 Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.*, vol. 45, no. 3 B, pp. 1904–1908, 2006.
- [22] M. B. Viani, L. I. Pietrasanta, J. B. Thompson, A. Chand, I. C. Gebeshuber, J. H. Kindt, M. Richter, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, “Probing protein-protein interactions in real time,” *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, no. 8, pp. 644–647, 2000.
- [23] A. D. L. Humphris, M. J. Miles, and J. K. Hobbs, “A mechanical microscope: High-

- speed atomic force microscopy,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 86, no. 3, p. 034106, 2005.
- [24] T. Ando, “High-speed atomic force microscopy coming of age.,” *Nanotechnology*, vol. 23, no. 6, p. 062001, 2012.
- [25] A. Nakamura, H. Watanabe, T. Ishida, T. Uchihashi, M. Wada, T. Ando, K. Igarashi, and M. Samejima, “Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 12, pp. 4584–4592, 2014.
- [26] P. D. Boyer, “The ATP synthase—a splendid molecular machine.,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, pp. 717–49, 1997.
- [27] D. Yamamoto, N. Nagura, S. Omote, M. Taniguchi, and T. Ando, “Streptavidin 2D crystal substrates for visualizing biomolecular processes by atomic force microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 97, no. 8, pp. 2358–67, 2009.
- [28] H. Yamashita, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, S. A. Contera, J. F. Ryan, and T. Ando, “Dynamics of bacteriorhodopsin 2D crystal observed by high-speed atomic force microscopy,” *J. Struct. Biol.*, vol. 167, no. 2, pp. 153–158, 2009.
- [29] G. Schitter and A. Stemmer, “Identification and open-loop tracking control of a piezoelectric tube scanner for high-speed scanning-probe microscopy,” *IEEE Trans. Control Syst. Technol.*, vol. 12, no. 3, pp. 449–454, 2004.
- [30] I. Choi, Y. Kim, J. H. Kim, Y. I. Yang, J. Lee, S. Lee, S. Hong, and J. Yi, “Fast image scanning method in liquid-AFM without image distortion.,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 44, p. 445701, 2008.
- [31] A. J. Fleming, B. J. Kenton, and K. K. Leang, “Bridging the gap between conventional and video-speed scanning probe microscopes,” *Ultramicroscopy*, vol. 110, no. 9, pp. 1205–1214, 2010.
- [32] G. E. Fantner, R. J. Barbero, D. S. Gray, and A. M. Belcher, “Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 4, pp. 280–285, 2010.
- [33] Y. Li and J. Bechhoefer, “Feedforward control of a closed-loop piezoelectric translation stage for atomic force microscope,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 78, no. 1, p. 013702, 2007.
- [34] I. A. Mahmood and S. O. Reza Moheimani, “Fast spiral-scan atomic force microscopy,” *Nanotechnology*, vol. 20, no. 36, p. 365503, 2009.
- [35] Y. K. Yong, S. O. R. Moheimani, and I. R. Petersen, “High-speed cycloid-scan atomic force microscopy,” *Nanotechnology*, vol. 21, no. 36, p. 365503, 2010.
- [36] A. Bazaei, Y. K. Yong, and S. O. R. Moheimani, “High-speed Lissajous-scan atomic force microscopy: scan pattern planning and control design issues.,” *Rev. Sci.*

- Instrum.*, vol. 83, no. 6, p. 063701, 2012.
- [37] K. K. Leang and A. J. Fleming, “High-speed serial-kinematic SPM scanner: design and drive considerations,” *Asian J. Control*, vol. 11, no. 2, pp. 144–153, 2009.
- [38] P. Ge and M. Jouaneh, “Tracking control of a piezoceramic actuator,” *IEEE Trans. Control Syst. Technol.*, vol. 4, no. 3, pp. 209–216, 1996.
- [39] S.-K. Hung, E.-T. Hwu, I.-S. Hwang, and L.-C. Fu, “Postfitting Control Scheme for Periodic Piezoscanner Driving,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 3B, pp. 1917–1921, 2006.
- [40] B. Mokaberi and A. A. G. Requicha, “Compensation of Scanner Creep and Hysteresis for AFM Nanomanipulation,” *IEEE Trans. Autom. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 2, pp. 197–206, 2008.
- [41] T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera, “High-Speed Atomic Force Microscopy,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 51, p. 08KA02, 2012.
- [42] A. Ryter and O. E. Landman, “Electron Microscope Study of the Relationship Between Mesosome Loss and the Stable L State (or Protoplast State) in Bacillus Subtilis Electron Microscope Study of the Relationship Between Mesosome Loss and the Stable L State (or Protoplast State) in B,” 1964.
- [43] J. Ghuyssen, “Use of Bacteriolytic Enzymes in Determination of Wall Structure and Their Role in Cell Metabolism,” vol. 32, no. 4, pp. 425–464, 1968.
- [44] T. J. Smith, S. A. Blackman, and S. J. Foster, “Autolysins of Bacillus subtilis: Multiple enzymes with multiple functions,” *Microbiology*, vol. 146, no. 2, pp. 249–262, 2000.
- [45] P. Jollès, “Lysozymes: a chapter of molecular biology.,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 8, no. 4, pp. 227–239, 1969.
- [46] R. R. Crichton and M. Charloteaux-wauters, “Iron transport and storage,” *Eur. J. Biochem*, vol. 164, pp. 485–506, 1987.
- [47] P. Aisen, “Stoichiometric Iron to Human and Site Characteristics Transferrin *,” *J. Biol. Chem.*, vol. 253, no. 6, pp. 1930–1937, 1978.
- [48] T. Moos and E. H. Morgan, “Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems.,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 77–95, 2000.
- [49] E. H. Morgan, “Transferrin, biochemistry, physiology and clinical significance,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–123, 1981.
- [50] G. Kimura, A. Itagaki, and J. Summers, “Rat cell line 3y1 and its virogenic polyoma- and sv40- transformed derivatives.,” *Int. J. Cancer*, vol. 15, no. 4, pp. 694–706, 1975.
- [51] A. Matsuzaki, K. Ohno, M. Ohtsu, and G. Kimura, “Functional Rescue of Temperature-Sensitive Defects in the Cell-Cycle Mutants of Rat 3Y1 Fibroblasts by

- the Small t-Antigen Deletion Mutant of Simian Virus 40,” *Cell Struct. Funct.*, vol. 14, pp. 375–382, 1989.
- [52] T. Ushijima, H. Makino, M. Nakayasu, S. Aonuma, M. Takeuchi, K. Segawa, T. Sugimura, and M. Nagao, “NoPresence of p53 mutations in 3Y1-B clone 1-6: a rat cell line widely used as a normal immortalized fibroblast. Title,” *Japanese J. Cancer Res.*, vol. 85, no. 5, pp. 455–8, 1994.
- [53] S. Cohen, “Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal,” *J. Biol. Chem.*, vol. 237, no. 6, pp. 1555–1562, 1962.
- [54] J. M. Taylor, S. Cohen, and W. M. Mitchell, “Epidermal growth factor: high and low molecular weight forms.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 67, no. 1, pp. 164–71, 1970.
- [55] P. K. Hansma, B. Drake, S. A. C. Gould, and C. B. Prater, “The Scanning Ion-Conductance Microscope,” vol. 3, no. 1966, pp. 3–5, 1987.
- [56] T. Uchihashi, H. Watanabe, S. Fukuda, M. Shibata, and T. Ando, “Functional extension of high-speed AFM for wider biological applications,” *Ultramicroscopy*, vol. 160, pp. 182–196, 2016.
- [57] Y. Suzuki, N. Sakai, A. Yoshida, Y. Uekusa, A. Yagi, Y. Imaoka, S. Ito, K. Karaki, and K. Takeyasu, “High-speed atomic force microscopy combined with inverted optical microscopy for studying cellular events,” *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 2131, 2013.