

タンパク質のナノダイナミクスを観る 高速撮影装置*

High-Speed Imaging Apparatus for Viewing Nanometer-Scale Dynamics of Protein

安藤敏夫**

Toshio ANDO

Key words AFM, high-speed AFM, Imaging, protein, dynamics, microscope

1. はじめに

見えないものを見えるようにしたいと思うのは人間の自然な欲求である。その強い欲求は科学を推進するひとつの原動力であった。水の中で機能しているタンパク質の動作の一部始終を手取るように見たいと思うのも自然な欲求であるが、なかなか叶えられるものではなかった。ナノメータオーダーの空間分解能、ミリ秒オーダーの時間分解能という条件のほかに、水中という条件、非破壊・非侵襲という条件が加わる。その4条件を満たす夢の顕微鏡がようやく実現しようとしている。それは従来の原子間力顕微鏡(AFM)の走査速度を飛躍的に向上させた高速AFMである^{1)~4)}。その性能を支える技術を以下に概説する。www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/bionics.htmに載せた映像で、高速AFMの威力を実感していただきたい。

2. 原子間力顕微鏡の撮像の仕組み

基板に載った試料の形状をAFMで捉える方法にはいくつかあるが、ここでは生体分子観察に最適なTappingモードでAFMの仕組みを説明する。小さく柔らかいレバーの先に先端の尖った針が付いたものをカンチレバーと呼ぶ。レバー面に垂直な方向(z方向)にカンチレバーをその共振周波数で振動させる。励振方法にはいくつかあるが、カンチレバーホルダーのそばに設置したピエゾを振動させ、その振動をカンチレバーに伝える音響励振法がよく使われる。カンチレバーの変位計測には光で光学系が広く使われている。すなわち、カンチレバーにレーザ光を当てて、その反射光を2分割フォトダイオードに導く。カンチレバーがたわむと、フォトダイオードに当たるレーザビーム

の中心位置がずれ、2つのフォトダイオードからの出力の差が変化する。この変化からカンチレバーのたわみを計測する。振動する針が試料に接するか、若干押し込むとカンチレバーの振幅が減少する。振幅値は振幅計測回路から出力される。試料ステージをXY方向に走査しながら、カンチレバーの振幅(つまり、針・試料間にかかる力)が一定に維持されるように試料ステージを上下にフィードバック走査すると、試料ステージの動きは試料形状をほぼ正確になぞることになる。従って、試料ステージを動かしている信号をパソコンに取り込めば、試料の3次元形状がパソコン内に再現される。

3. 撮影速度を律する因子

1画像取得時間 T と X 方向の走査速度 V_s との関係は、 $T = 2LN/V_s$ と表される。ここで、 L は走査範囲、 N は走査線の数、係数2は X 方向に往復するために現れる。許される V_s は、スキャナーが振動しない周波数帯域とフィードバック帯域で決まる。前者は単純であるが、後者については詳しい説明が要る。試料がサイン波形状をしており、その周期が λ であるとする。 X 走査により、空間周波数 $1/\lambda$ は時間周波数 V_s/λ に変換される。 V_s/λ 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 方向に走査する周波数(すなわち、フィードバック周波数)である。フィードバックは「後追い」であるので、試料のサイン波形状に対して常に遅れて試料ステージを上下する。フィードバック帯域とは通常45度の位相遅れが生ずるフィードバック周波数として定義される。フィードバック帯域を f_b とすると、 $f_b > V_s/\lambda$ であるので、 $T > 2LN/f_b\lambda$ となる。例えば、 $L = 250 \text{ nm}$ 、 $N = 100$ 、 $\lambda = 10 \text{ nm}$ 、 $T = 1 \text{ 秒}$ とすると、 $f_b > 5 \text{ kHz}$ となる。市販の装置ではこの程度、或いは、それ以下のフィードバック帯域しかない。1画像取得に1秒以上の時間を要する。通常は分のオーダーである。

それでは、フィードバック帯域を制限する要因は何であろうか。探針が試料に接触してから、試料ステージが Z 方向に実際に動くまでの色々なステップで遅れが生ず



*原稿受付 平成18年8月21日

**金沢大学理学部物理学科(金沢市角間町)

安藤敏夫

1980年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了、理学博士。現在JST/CRESTのチームリーダーとして高速AFMの開発と生体分子の機能解明に挑戦している。日経BP技術賞、ナノブローブテクノロジー賞、北国文化賞を受賞。

る。(1) カンチレバーの振幅計測にかかる時間、(2) カンチレバーの振幅変化が定まるまでの時間、(3) Z スキャナーが変位する時間などがある。このほかに後で述べる「パラシューティング時間」がある。これらを順に説明する。カンチレバー振幅計測の最短時間は、カンチレバーの共振周期の半分の時間、すなわち、 $1/2 f_c$ である。振動しているカンチレバーに力がかかったとき、カンチレバーは慣性をもって振動しているので振幅は直ぐに変化できず、応答時間は $Q_c/\pi f_c$ となる。ここで、 Q_c は Quality Factor で、共振スペクトルの鋭さを表す。Z スキャナーの応答時間も同様な形で表され、 $Q_s/\pi f_s$ となる (添え字 s はスキャナーを表す)。あとで説明するパラシューティング時間を T_p 、および特定していないほかの時間遅れをまとめて δ とすると、遅れの総時間 ΔT は

$$\Delta T = \frac{1}{2f_c} + \frac{Q_c}{\pi f_c} + \frac{Q_s}{\pi f_s} + T_p + \delta \quad (1)$$

となる。45度の位相遅れは、 $1/8f_b$ の時間に対応するので、結局フィードバック帯域は

$$f_b = \frac{1}{8\Delta T} = \frac{f_c}{8} / \left(\frac{1}{2} + \frac{Q_c}{\pi} + \frac{Q_s f_c}{\pi f_s} + f_c T_p + f_c \delta \right) \quad (2)$$

となる。

振動しているカンチレバー探針は X 走査中の試料を叩いているが、試料の急な降り勾配で探針は試料表面から完全に離れてしまうことも起こりえる。一旦離れると、カンチレバーの振幅は自由振動振幅 A_0 になる。試料表面からどんなに離れていても自由振動振幅のままなので、Peak-to-peak 振幅の目標値 (セットポイント A_s) との差 (エラー信号) は $(2A_0 - A_s)$ で飽和している。従って、大きく離れている場合には、試料表面に探針が再着地するまでに時間がかかる (試料表面から完全に離れて再着地することをパラシューティングと呼ぶ)。 T_p の近似値は、以下のようにして求めることができる。試料は高さ h_0 のサイン波形状をしていると仮定する。フィードバック走査に位相遅れ φ があると、カンチレバー探針は「試料形状の残差」 $\Delta S(t)$ を感じる (パラシューティングがない場合)。 $\Delta S(t)$ は以下のように表される。

$$\begin{aligned} \Delta S(t) &= \frac{h_0}{2} [\sin(2\pi f_b t) - \sin(2\pi f_b t - \varphi)] \\ &= h_0 \sin \frac{\varphi}{2} \cos \left(2\pi f_b t - \frac{\varphi}{2} \right) \end{aligned} \quad (3)$$

試料形状残差の高さは $h_0 \sin(\varphi/2)$ であるが、それは $(2A_0 - A_s)$ よりも小さくなければならない。そうでないとカンチレバーは試料表面から離れてしまう。この条件は $r = A_s/2A_0$ の最大値に制限を与える。すなわち、 $r < 1 - (h_0/2A_0) \sin(\varphi/2)$ 。パラシューティングの間、式 (3) のサイン波のボトム付近で接触できないとして T_p を見積もって見た⁵⁾。離れている平均距離は $2A_0(1-r)$ ($\tan\beta/\beta - 1$)、ここで β は $\cos^{-1}[2A_0(1-r)/h_0 \sin(\varphi/2)]$ である。フィードバックのゲインは通常、距離のエラー $2A_0(1-r)$ がカンチレバーの共振の1周期の間に解消さ

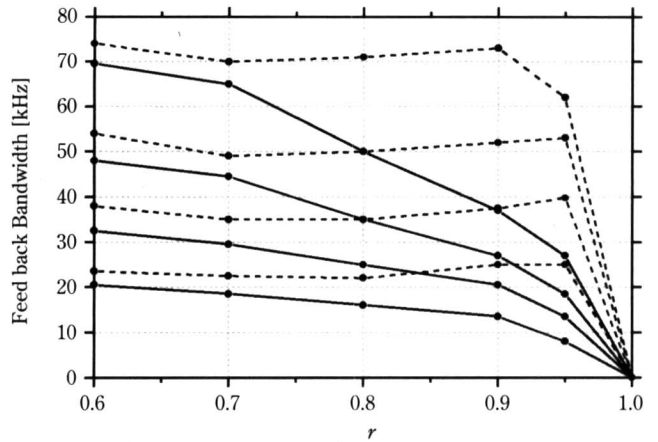


図1 フィードバック帯域に与えるセットポイント効果および試料の高さ効果。実線は通常のPID制御の場合、破線は動的PID制御の場合。4組の線は上から $2A_0/h_0 = 5, 2, 1, 0.5$ の場合。

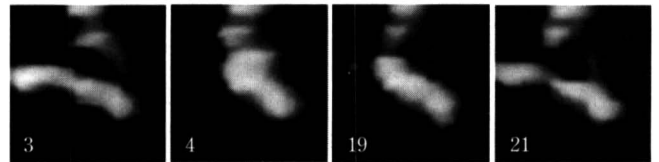


図2 ATPを添加直後のミオシンVのAFM像。250 nm四方を80 ms/フレームで撮影した像からの切抜き。数字はフレーム番号。

れる程度にかけられている。従って、 T_p はおおよそ $(\tan\beta/\beta - 1)/f_c$ と見積もられる。従って、これを式 (2) に代入すると、

$$f_b = \frac{f_c}{8} / \left(\frac{Q_c}{\pi} + \frac{Q_s f_c}{\pi f_s} + f_c \delta + \frac{\tan\beta}{\beta} - \frac{1}{2} \right) \quad (4)$$

となる。ここで、 r が $[1 - (h_0/2A_0) \sin(\pi/8)]$ よりも小さいときには、 β はゼロになり、 f_b は r に無関係になる。図1の実線に示すように、 f_b は r の増加とともに減少し、 $r > 0.9$ では急激にゼロに近づいていく (セットポイント効果)。また、 $2A_0/h_0$ (試料の高さに対するカンチレバーの自由振動振幅の比) が小さくなると f_b は低くなる (試料高さの効果)。

我々は、フィードバック帯域を上げるために以下に説明する色々な技術開発を行い、タンパク質の様に脆い試料でも高速にイメージングできる高速AFMを開発した。例として、この装置が捉えたミオシンV分子の構造変化の様子を図2に示す。

4. パラシューティング時間を短くする動的PID制御

タンパク質が脆いという以上に動的なタンパク質・タンパク質間相互作用の力は弱い。そのような弱い力で相互作用している系のダイナミクス観察が最終目標であるので、高速走査ばかりでなく、探針・試料間に働く力をいかに軽減するかも非常に重要である。ところが、この軽減化と高速化は技術的に互いに反する関係にある。例えば、力の軽減化は、(1) カンチレバーの振幅を小さくする、(2) セットポイントを自由振動振幅に近づける、(3) カンチレバーのQ値を大きくする、といったことで可能であるが、(1)

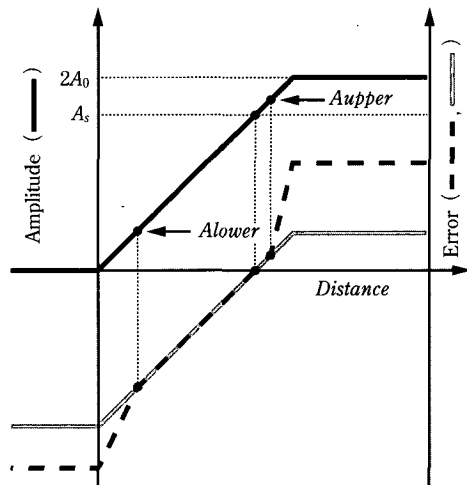


図3 動的PID制御の概念図

は試料高さの効果のため、(2)はパラシューティングを起こさせるため、(3)はカンチレバーの応答を遅くするため、フィードバック帯域を下げる。ここでは、(2)を行ってもフィードバック帯域を下げない新しいPIDフィードバック制御法について説明する(図3参照)。

エラー信号が飽和してもフィードバックのゲインを大きくすれば、 T_b を短くできる。だが、PIDフィードバックのゲインが大きいと、試料の昇り勾配の部分(特に頂点付近)でオーバーシュートしてしまい、探針は試料表面から完全に離れてしまう。結果、フィードバック制御が不安定になる。フィードバックゲインを昇り勾配と降り勾配で調節することができれば、この不安定さは解消されるはずである。昇り勾配では、カンチレバーの振幅はセットポイントよりも小さくなる傾向があり、逆に降り勾配では大きくなる傾向がある。従って、セットポイントと自由振動振幅の間に閾値を設け、カンチレバーの振幅がこの閾値よりも大きくなった場合に偽のエラー信号を真のエラー信号に加算してエラー信号を大きくすれば、昇り勾配でオーバーシュートを起こさずに T_b を短縮できる、或いは、パラシューティングを起こさないようにすることができる。PIDフィードバックゲインをこのように自動的に変更する動的PID制御回路を開発した⁵⁾。急な昇り勾配でカンチレバーの振幅がゼロ近くになった場合にも同様な操作ができるが、この場合にはもともとエラー信号が大きいのでこの操作の有効性は限られる。図1に示すように、動的PID制御により、フィードバック帯域はセットポイント0.95程度までほぼ一定に保たれることが分かる。実測のフィードバック帯域の最大値は計算値よりも40%程度改善される。これはPIDの微分操作による改善効果である。

5. 励振効率のドリフト補償

例えば、カンチレバーの自由振動のPeak-to-peak振幅を5 nm、セットポイントをその95%とすると、それらの差は0.25 nmしかない。従って、動的PID制御によりセットポイントを上げてもフィードバック帯域を下げないようにすることは可能になったものの、自由振動振幅にわずかな

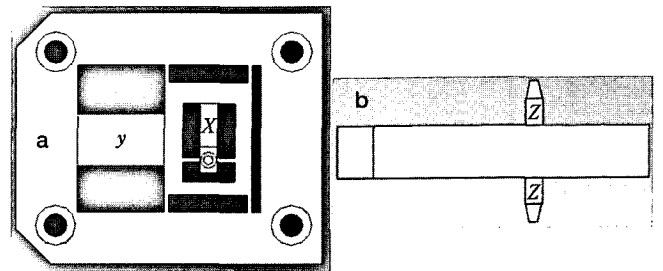


図4 高速スキャナーの構造。a) 上面図、b) 側面図。x, y, zはそれぞれピエゾ素子。Zピエゾの大きさは、 $3 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$ 。空隙は柔らかい樹脂で埋めてある。

ドリフトが起これば安定なイメージングは不可能になる。例えば、励振効率が減少すると、カンチレバーの振幅も減少する。装置はこの減少を、探針と試料が強く接触したためであると判断し、試料ステージを探針から遠ざける。やがては、探針は試料表面から完全に離れてしまう。従って、探針が試料表面にかすかに接触する状態を安定に維持するためには、励振効率のドリフトを補償する手段がなければならない。高速イメージング中にカンチレバーの自由振動振幅を検出することはできないので、このドリフトをモニターする別の信号が必要である。正弦波振動するカンチレバーは試料と接触すると波形がわずかに歪むため、正弦波の振動数の整数倍の振動数をもった振動が現れる。そこで、2倍波の振幅をモニターし、それが一定になるように励振の強度を制御することにより励振効率を補償することを検討した⁵⁾。この制御には1画像取得時間以上の時定数をもつI制御を用いた。その結果、セットポイントを自由振動振幅にかなり接近させた状態でも長時間安定なイメージングが可能になった。

6. スキャナーのアクティブダンピング

スキャナーのX, Y走査部には板ばねを利用した(図4)。Zスキャナーには上下にそれぞれピエゾを固定し、それらを同時に同じ距離だけ変位させることにより、高速走査にともなう激力を中和させた。ZスキャナーのQ値は18程度あるため、応答時間は $38 \mu\text{s}$ もある。フィードバックループの中で最も遅い。Q値を制御するのに通常アクティブQ値制御法が利用されている。すなわち、力学系の変位を計測し、それを微分し適当なゲインをかけた信号を駆動信号に加算する。みかけ上摩擦抵抗が増すため、Q値が小さくなる。しかし、Zスキャナーの場合にはその変位を計測しなければならないが、高速に変動する微小な変位を高速かつ高精度に検出することは難しい。そこで、新しいアクティブダンピング法を考案した⁶⁾。Zスキャナーとほぼ同じ伝達関数を回路で作成し、その回路に対してQ値制御を行う。その回路への入力信号をZピエゾのドライバー電源に入力すれば、ZスキャナーにQ値制御がかかる。これにより、Q値は0.5まで減少し、その結果応答時間は $1.1 \mu\text{s}$ まで短縮できた。ここで述べた方法は、X, Yスキャナーにも適用できる。

7. カンチレバーの光駆動と逆伝達関数位相補償

新しいアクティブダンピング法により Z スキャナーの応答速度を 36 倍増大させることができたが、それでも未だ十分とはいえない。使えるピエゾ素子の性能は限られており、その共振周波数は必要とする最大変位量によってほぼ一意的に決まってしまう。そこで、探針・試料間の距離制御をカンチレバーで行うことを検討した。微小カンチレバーの水中共振周波数は約 1.2 MHz であり、高速応答が期待できる。微小カンチレバーにレーザ光を入射すると、熱膨張によりカンチレバーは変位し、その DC 感度は、808 nm のレーザ光では約 1 nm/mW であった。もちろん、微小カンチレバーとはいえ、熱伝導過程は遅く、高速駆動できない。実際、数 μs と約 100 μs の遅延があった。すなわち、光に対する変位応答は 2 つの並列な 1 次ローパスフィルタの伝達関数をもつ。任意の伝達関数の近似逆伝達関数を作成できる回路を開発し逆伝達関数位相補償を行ったところ、熱伝導過程をみかけ上なくすることができた。カンチレバーによる距離制御によって、フィードバック帯域は 100 kHz 以上になり、その結果、250 nm 四方をビデオレートで撮影することができるようになった。

8. 高速位相イメージング

探針と試料との間に働く力 $F(z)$ は近似的に、

$$F(z) \approx F(0) + \left(\frac{\delta F}{\delta z}\right) z = F_0 + k'z$$

と表される。従って、カンチレバーのばね定数 k は $k-k'$ にみかけ上変化し、カンチレバーの共振周波数はシフトする。このシフト量 Δf_c はおおよそ $-0.5 f_c k'/k$ となる。ところで、一般に k' は小さく、それゆえ、 Δf_c は小さいため、それを高い精度で検出するにはロックインアンプのような遅い装置に頼るしかない。ところが、微小カンチレバーは共振周波数が高くばね定数が小さいため、 f_c/k の比は通常のカンチレバーよりも千倍程度大きい。従って、微小カンチレバーを用いれば大きな Δf_c が期待され、それ故、遅い検出装置に頼る必要がない。カンチレバーの励振を固定周波数で行うモード (AM-AFM) では、共振周波数のシフトにより位相シフト $\Delta\theta$ (励振信号とカンチレバー振動との位相差の変化) が起こる。カンチレバーの Q 値

が大きいほど $\Delta\theta$ は大きくなるが、 Δf_c が十分大きければ小さな Q 値でも $\Delta\theta$ は大きく、それゆえ、高速位相イメージングが可能ならずである。そこで、 $\Delta\theta$ をカンチレバー振動の 1 周期ごとに検出する高速検出器を開発した。信号発生器より位相調整した同じ周波数の鋸波と励振のための正弦波を出力する。カンチレバーの振動信号から矩形波を作り、その矩形波のエッジ部で発生させたトリガー信号で鋸波の電圧をサンプル・ホールドする。 $\Delta\theta$ の大きさに応じて、鋸波のホールドされる電圧値が変わる。すなわち、鋸波は位相-電圧変換器として働く。カンチレバーの振動の 1 周期中の任意の箇所位相検出でき、最も大きな $\Delta\theta$ が起こるタイミングで検出できる。この高速位相検出器を用いて、位相差像とトポグラフィ像を同時に 50 ms/frame 程度の速度でイメージングできるようになった。従って、形状ばかりでなく、タンパク質の物性マップ変化をも高速にイメージングする道が開けた。

9. おわりに

高速 AFM は生体分子の動態イメージングばかりでなく、半導体ウエハなどの迅速検査やプローブによるナノリソグラフィなどの加工を大面積に行うことを可能にするなど、広い分野で活用が期待されている。新しいナノサイエンス・テクノロジーの創成にとって不可欠なツールとなるに違なく、もっと多くの研究者の参入を期待したい。

参考文献

- 1) T. Ando et al.: A high-speed Atomic force microscope for studying biological macromolecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, (2001) 12468.
- 2) T. Ando et al.: A high-speed Atomic force microscope for studying biological macromolecules in action, Jap. J. Appl. Phys., **41**, (2002) 4851.
- 3) T. Ando et al.: A high-speed Atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. ChemPhysChem, **4**, (2003) 1196.
- 4) T. Ando et al.: High-speed AFM for Studying the Dynamic Behavior of Protein Molecules at Work, e-J. Surf. Sci. Nanotech., **3**, (2005) 384.
- 5) N. Kodera, M. Sakashita, and T. Ando: A dynamic PID controller for high-speed atomic force microscopy, Rev. Sci. Instrum., **77**, (2006) 083704.
- 6) N. Kodera, H. Yamashita and T. Ando: Active Damping of the Scanner for High-speed Atomic Force Microscopy, Rev. Sci. Instrum., **76**, (2005) 053708.