

Visualization of Hydrophobic-, Hydrophilic-, and Charged Areas of Protein by Photochromic Cantilevers

| | |
|-------|--|
| 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: Aodo, Toshio メールアドレス: 所属: |
| URL | https://doi.org/10.24517/00034839 |

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



フォトクロミックカンチレバーによる蛋白質の
疎水・親水・荷電領域の可視化

(課題番号: 10640384)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金(基盤研究C)

研究成果報告書

平成13年3月20日

研究代表者 安藤 敏夫

金沢大学附属図書館蔵



8000-89076-3

(金沢大学理学部教授)

フォトクロミックカンチレバーによる蛋白質の 疎水・親水・荷電領域の可視化

(課題番号： 10640384)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究C）
研究成果報告書

平成13年3月20日

研究代表者 安藤 敏夫

(金沢大学理学部教授)

(白 鳥 昌)

目 次

| | |
|--|----|
| はじめに | 3 |
| 研究発表 | 4 |
| 研究成果（解説） | 6 |
| 1章 背景 | 7 |
| 2章 研究の戦略 | 9 |
| 3章 フォトクロミック色素 | 10 |
| 3-1. Malachite Green の構造 | |
| 3-2. 4'-Vinyl Malachite Green の合成 | |
| 3-3. Vinyl Malachite Green のフォトクロミズム | |
| 4章 フォトクロミックプローブ | 12 |
| 4-1. フォトクロミックプローブの作成 | |
| 4-2. フォトクロミックプローブの疎水・親水変化 | |
| 5章 フォトクロミックカンチレバー-AFM による物性マッピング | 15 |
| 5-1. 走査方法 | |
| 5-2. フォトクロミックプローブの優位性 | |
| 5-3. ガラス表面の吸着カマップ | |
| 5-4. ここまでの問題点 | |
| 6章 非接触マッピングモード | 20 |
| 6-1. 非接触マッピングモード（リフトアップモード）の仕組み | |
| 6-2. カンチレバーの選択 | |
| 6-3. 試料基板とプローブとの相互作用 | |
| 6-4. リゾチームの電荷マッピング | |
| 非接触力マップ法のまとめ | |
| 7章 光輻射圧によるレバー位置制御の試み | 27 |
| 8章 高速 AFM の開発 | 29 |
| 8-1. 高速化の要件 | |
| 8-2. カンチレバーと変位検出光学系 | |
| 8-3. スキャナー | |
| 8-4. エレクトロニクス | |
| 8-5. 連続画像撮影 | |
| 発表論文別刷など | 34 |

はじめに

原子間力顕微鏡は試料の環境を選ばず、ナノメートルの空間分解能で観察可能な顕微鏡である。液中にある試料でも観察できるので、生物試料の研究に極めて有効である。本来は試料形状を観察するために開発されたが、微弱な力を検出できるため、フォースセンサーとしての利用も近年活発に行われている。いわゆるフォースカーブ計測により、試料の弾性、試料とプローブとの間に働く引力、斥力、吸着力、などを検出できる。特に、蛋白質間、蛋白質・基質間に働く力や、蛋白質のアンフォールディング時の力計測が盛んに行われている。また、試料の化学的性質（親水性や疎水性をもつ化学基の違い）を識別できることが既に素性の既知な試料において確認されている。しかし、比較的平滑で且つ識別領域がマクロな（ μm オーダー）人工的な系での観察に限られており、蛋白質表面のミクロ領域における物理化学的性質の違いをマッピングするまでには到っていない。蛋白質の構造及びダイナミクスを機能解明に結びつけるためには、形状以外の物理化学的性質をナノメートルレベルで可視化することは極めて重要であろう。いくつかの解決しなければならない問題が残されているために、AFMをこのような可視化に利用する方法は確立されていない。例えば、プローブと試料との間に働く力のマッピングから、物理化学的性質を一意的に同定できるかどうか確かでない。また、従来のフォースカーブ計測を2次元の多数の点で繰り返す方法は時間がかかりすぎ、実際的でない。本研究の目標は、これら問題を解決する道を探り、今後AFMを蛋白質の物理化学的性質の可視化に活用していく道を拓くことにあつる。フォトクロミック色素の利用、走査方法の開発、高速走査できるAFMの開発（これ自身は別の研究費援助のもとに行われたが）を行い、目標をかなり達成できたと思う。今後は、本研究の成果を一段と進展させて、蛋白質の機能に直結した物理化学的性質を明らかにしていきたい。

本研究を進めるにあたり、文部省科学研究費補助金による多大なご援助を頂いたことに深く感謝します。

研究組織

研究代表者： 安藤 敏夫 （金沢大学理学部教授）

研究経費

| | |
|--------|-------|
| 平成10年度 | 180万円 |
| 平成11年度 | 150万円 |
| 計 | 330万円 |

研究発表

[学術雑誌]

1. I. Amitani, T. Sakamoto & T. Ando
Biophys. J. **80**, 379-397 (2001)
2. T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokota & T. Ando
Biochem. Biophys. Res. Commun. **272**, 586-590 (2000)
3. K. Adachi, K. Kinoshita, Jr. & T. Ando
J. Microscop. **195**, 125-132 (1999)

[口頭発表]

1. T. Ando, D. Maruyama, K. Saito & A. Toda
The High-speed AFM and Motion Pictures.
米国生物物理学会第45回年会 2001年2月17日
2. 安藤敏夫、丸山大輔、古寺哲幸
高速AFMによる水溶液中試料の動態映像観察
生体運動研究合同班会議 2000年1月7日
3. 安江卓哉、安藤敏夫
AFMによる物性マッピング

日本生物物理学会第38回年会 2000年9月13日

4. 丸山大輔、齋藤究、安藤敏夫、戸田明敏

高速 AMF の開発

日本生物物理学会第38回年会 2000年9月13日

5. 高井英輔、戸田明敏、安藤敏夫

高速 AFM の開発

日本生物物理学会第37回年会 1999年10月3日

6. 安藤敏夫

単一分子力学

日本生物物理学会第37回年会 1999年10月2日

7. 佐伯将幸、安藤敏夫

Photochromic カンチレバーによる物性マッピング

日本生物物理学会第36回年会 1998年10月3日

8. 安藤敏夫

原子間力顕微鏡の基礎と応用

名古屋大学工学部応用物理学科 セミナー 1998年7月28日

研究成果

(解説)

フォトクロミックカンチレバーによる蛋白質の

疎水・親水・荷電領域の可視化

金沢大学理学部物理学科

安藤 敏夫

1章 背景

ここでは、本研究が何を目指して行ってきたかを明確にするために、本研究の背景となる AFM 研究、及び蛋白質構造研究について簡単に触れる。

過去 10 年近くにわたり、AFM を形状観察以外に活用する手法の開発が様々な生命・材料科学分野で行われてきた。基本的には全て AFM の力センサーとしての機能を利用している。過去の研究例を大きく分類してみると、以下の様になる。(1) プロブと試料との間に働く力をそれらの距離の関数として測定し（いわゆるフォースカーブの測定）、そのフォースカーブから粘弾性、引力、斥力、吸着力（破断力）を求める。試料は均質な場合で、XY 位置は固定である。プロブは通常のカンチレバー探針を用いる場合と、その探針に特定の性質をもつ物質を固定した場合とがある。(2) 特定の物質をプロブに固定し、その物質とのみ相互作用する物質の 2 次元配置を求める。例えば、抗体をプロブに吸着させ、そのエピトープの試料表面上での局在を可視化する。(3) (1) を 2 次元に拡大したもので、不均一な試料上の粘弾性、引力、斥力、吸着力などをマッピングする。(4) カンチレバーを振動させながら探針と相互作用させ、その相互作用による振動の位相変動をマッピングする(ダイナミックフォスマッピング)。主に粘弾性の研究に使われてきた。(5) 基板に固定した試料の一部を探針に結合させたのち、カンチレバーを引き上げていったときの力計測より、試料構造の変形や崩壊の様子を調べる。特に蛋白質のアンフォールディングの研究に応用されている。

他方、蛋白質の働きをその構造との関係で調べる研究には様々な手法が使われてきた。最も詳細な情報を与える X 線結晶解析では、ポリペプチドの主鎖の折れたたまり方から側鎖の配置まで原子レベルの情報を与える。それ故、詳細な形状や異なる化学的性質の局在などを知ることができる。しかしながら、結晶という大きな制約があり、機能している蛋白質のダイナミックな変化を追跡することはごく一部の例外を除いては不可能である。配向した準結晶のクライオ電子顕微鏡

像からも X 線結晶解析と同レベルの情報が得られる。しかし、前述の問題を抱えている。水溶液中で機能できる状態にある蛋白質の構造を調べる手法には NMR と AFM がある。NMR は原子レベルの構造情報を与えることは可能だが、高濃度の蛋白質と長い計測時間が必要であり、極簡単な機能をもつ蛋白質にしか現状では適用できない。AFM は蛋白質表面の情報を与えるが、内部の情報は全く与えない。しかし、水溶液中にある個々の分子を観察できるという大きなメリットをもつ。空間分解能は良好な場合 1-2 ナノメートル程度であり、電子顕微鏡並である。それ故、様々な種類の蛋白質の形状が観察されてきた。

上 2 つの概述から、フォースセンサーとしての AFM の性能を蛋白質の形状以外の構造観察に活用することは当然成されているように想像されるが、実の所全く成されていない。斥力、引力、吸着力の情報から、試料の親水性、疎水性、荷電などの情報が得られることは、実際に証明されている。しかし、それらの研究では性質が既知な人工試料系でのみデモンストレーションされている。性質が未知の試料について親水性領域、疎水性領域、荷電領域が明確に示された例は皆無である。他方、これらの領域の局在やその変化を知ることは蛋白質の構造・機能相関を調べる上で極めて重要である。それにも拘わらず、研究が行われていないことにはそれなりの理由がある。次の章で、この理由を明らかにした上で、問題解決の戦略を概述する。

2 章 研究の戦略

蛋白質表面の異なる物理化学的性質をここでは、親水性、疎水性、荷電に限定する。例えば、疎水性領域の局在を調べる場合、プローブを疎水性にして、試料とプローブとの間の吸着力を 2 次元マップすればよい。荷電領域の局在を調べる場合には、プローブに電荷を持たせればよい。また、ひとつのプローブで得たデータから物理化学的性質を断定することは難しいので、異なる性質をもつプローブが必要になる。しかしながら、カンチレバーを交換し、同じ領域を再度走査することは不可能であろう。また、試料の XY 各点でフォースカーブを求めることは膨大な時間を要求する。装置のドリフトは長時間の測定を不可能にする。以上のことが、AFM による蛋白質表面の物理化学的性質のマッピングを不可能にしている。

プローブの交換の問題をフォトクロミック色素の利用で解決することを本研究で提案する。フォトクロミック色素とは、或る波長の光の照射により異なる化学構

造に変換される色素のことであり、多くの化合物が知られている。異なる波長の光で可逆的変換をするものや、時間とともに他方に変換するものが知られている。また、2者の化学的性質が大きく異なるものが知られている。例えば、疎水・親水変換をするものや、疎水・荷電変換をするものがある。これをプローブに付着させておけば、光により性質を変換でき、カンチレバーを交換する必要がなくなる。マッピング時間を短縮する方策として2つが考えられる。ひとつは、XY各点でフォースカーブを取る方法に代わり、新しい走査方法を工夫する。もうひとつは、AFM装置そのものを飛躍的に高速化して、XY各点でフォースカーブを取っても短時間に計測を完了させる方法である。この高速手法は極めて理想的であるが、それ自身大きな研究テーマとなる。実際我々はこれを成し遂げたが、本研究の課題とは別の研究として独立に行った（しかし、その概略については本報告書に含めた）。

3章 フォトクロミック色素

3-1. Malachite Green の構造

フォトクロミック色素には多くの種類がある。ここでは、疎水・荷電変換するマラカイトグリーンを選んだ。この色素は図1に示すような化学的変化を示す。

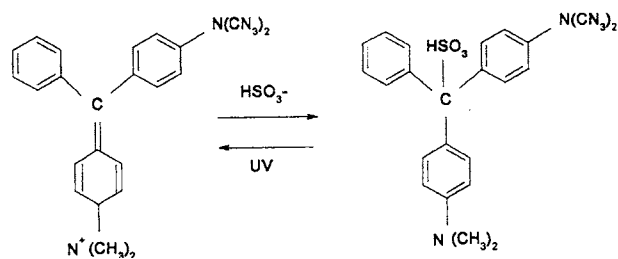


図1 Malachite Green の構造変化

亜硫酸水素イオンの結合により電荷が無くなり疎水性になる。紫外線照射で亜硫酸水素イオンが解離し、正電荷を帯びるようになる。ここで、亜硫酸水素イオンの他に、シアン、水酸イオン、ホウ酸イオン、りん酸などが使えるが、亜硫酸水素イオンは比較的速く反応し、モーター蛋白質に無害であったので、本研究で用いた。このマラカイトグリーンのままではカンチレバープローブに安定に吸着させておくことはできない。何らかの方法で共有結合させることが望ましい。そこで、ビニル基をもつマラカイトグリーンを合成した。

3-2. 4''-Vinyl Malachite Green の合成

この合成は Manecke and Kossmehl (1960)の方法に従った。各反応段階の様子を図2に示す。箇条書きで合成手順の概略を以下にまとめる。

1. 溶媒及び試薬液はモレキュラーシーブスで水分を除去し、N₂ ガスで乾燥させたものを使う。
2. 無水 Tetrahydrofuran(THF)2ml に Grignard 反応用の Magnesium 0.46g(18.9mmol)を加える。
3. Ethylene Bromide を1滴加え、攪拌しながら 80°C に熱する。
4. 1時間以内に 2.63g(18.9mmol) p-Chlorostyrene (in 3ml THF)を滴下して加える。
5. 10分熱したあと無水ベンゼン 70 ml を加え、更に Micheler's Keton 5.1g (19 mmol)を少しずつ加える。
6. 1時間熱したあと 10 ml の 10% Ammonium Chloride 水溶液を加える。
7. 水相と有機相を分液し、有機相に無水 Na₂SO₄ を加えて水分を除く。
8. 溶媒を減圧して除去する。
9. ベンゼン中から再結晶化する。

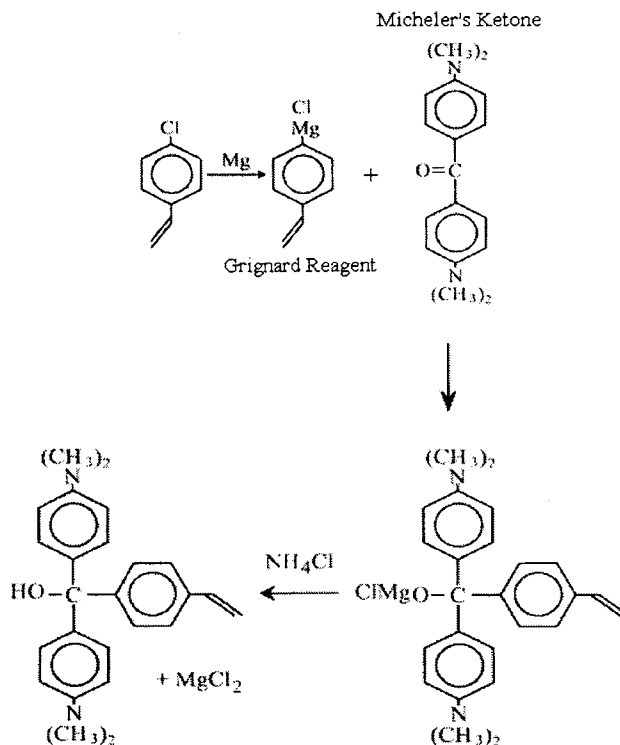


図2： 4''-Vinyl Malachite Green の合成手順

3.3 Vinyl Malachite Green のフォトクロミズム

CN⁻をこの合成した Vinyl Malachite Green に加えると、300nm 付近での励起で 400nm

に弱い蛍光が観察された。この蛍光を利用して、フォトクロミズムのアクションスペクトルを調べた。図3に示すように、アクションスペクトルは励起スペクトルにほぼ一致した。従って、おおよそ280nmから335nmの範囲の(近)紫外線を照射することで、疎水性の状態から正電荷をもった状態に変換できることが判明した。実際、 CN^- あるいは HSO_3^- を加えると、マラカイトグリーンの強い緑色は消え透明になり、水溶液中では溶けにくいので白濁する。これに上記の範囲の紫外線を照射すると緑色が回復していくのが観察された。

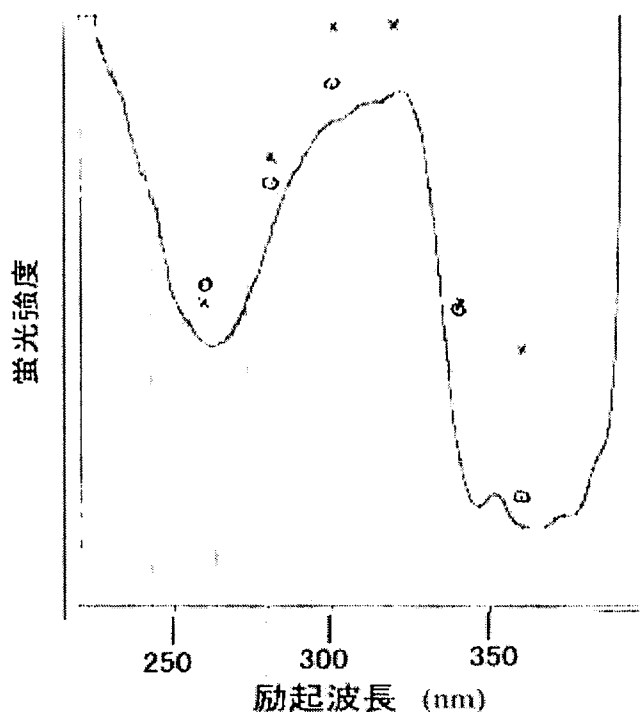


図3： Malachite Green の蛍光の励起スペクトル（実線）とフォトクロミズムのアクションスペクトル（○、×）。○は30秒間紫外線照射による蛍光の減少率、×は紫外線照射中における蛍光強度の減少の速さである。

4章 フォトクロミックプローブ

4-1. フォトクロミックプローブの作成

カンチレバー探針先端に合成した Vinyl Malachite Green を以下の手順で共有結合させた。

- (1) (3-Acryloxypropyl)trimethoxysilane をカンチレバーに蒸着させ、軽く熱して焼結させる。
- (2) 上のように処理したカンチレバーを落射蛍光顕微鏡に載った AFM 装置にセット

する。他方、Vinyl Malachite Green と紫外線による重合促進剤 (EDTA, TEMED、ビタミン B2) を含む溶液をカバーガラスにたらす。乾いてきたところで、カンチレバー探針をカバーガラスに接触させる。

- (3) 超高圧水銀ランプの光を $325 \pm 50\text{nm}$ のバンドパスフィルターに通したものをカンチレバー探針に 1 分間照射し、ビニル基とアクリロイル基を反応させる。
- (4) カンチレバーを DMF で洗ったのち、メーターノールで DMF を除く。
- (5) カンチレバーを 10mM 亜硫酸水素ナトリウムに 5 分間漬け、マラカイトグリーンを疎水状態にし、蒸留水で余分の亜硫酸水素ナトリウムを除去する。

このようにして作成したフォトクロミックプローブを電子顕微鏡で観察すると、図 4 に示すように、先端曲率半径がもとのよりも 3 倍程度大きくなっていた。先端が太くならないようにする工夫を見出す必要はあるが、まずはこのように作成したプローブの性質、及び期待したような振る舞いを示すかどうか調べることを優先させた。

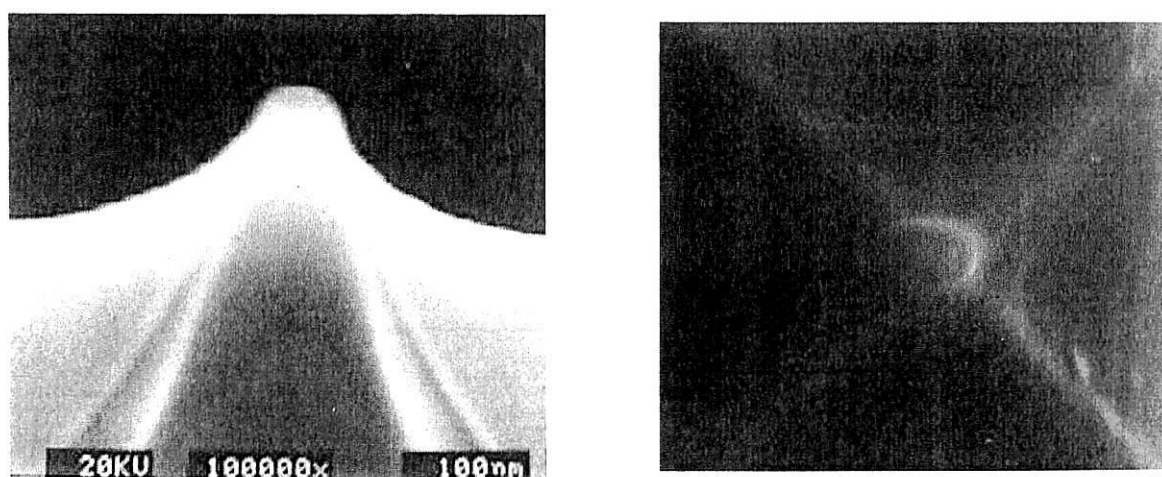


図 4： フォトクロミックプローブ先端付近の電子顕微鏡写真（左：斜め上 40 度から観察；右：真上から観察）。

4-2. フォトクロミックプローブの疎水・親水変化

プローブに固定したマラカイトグリーンでも紫外線照射によりフォトクロミズムを示すかどうかを調べた。プローブではスペクトル変化でフォトクロミズムを捉えることは難しいので、プローブと基板との吸着力変化で調べた。基板として、疎水性のアミノシランコートしたカバーガラス、負電荷をもつアクリル酸コートしたカバーガラスを用いた。図 5、図 6 に、それぞれの基板の場合に紫外線照射時間とともに吸着

力がどのように変化したかを示す。

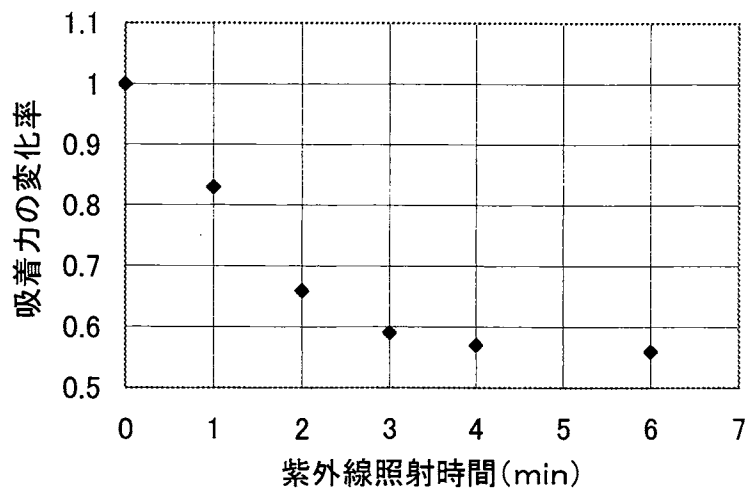


図5 アミノシランコート基板とフォトクロミックプローブとの吸着力の紫外線照射による変化。溶媒は蒸留水である。

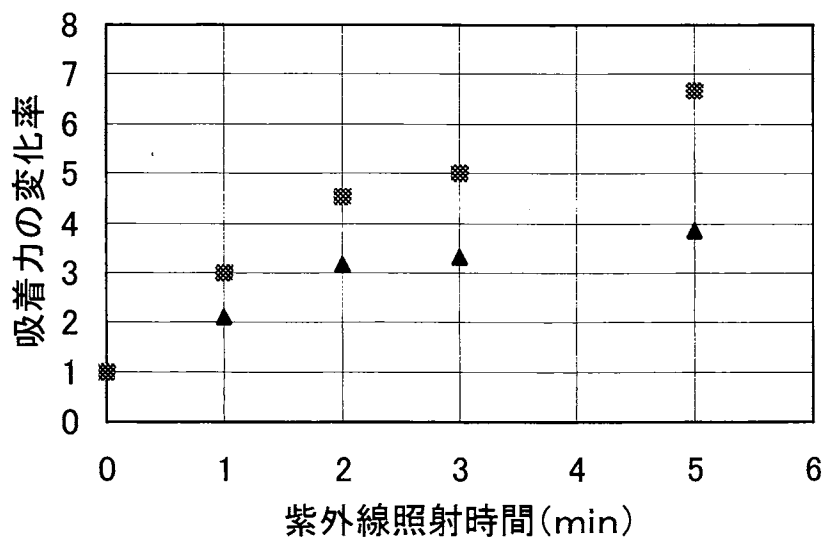


図6 アクリル酸コート基板とフォトクロミックプローブとの吸着力の紫外線照射による変化。▲：溶媒は1mM KCl、■：溶媒は蒸留水。

図5より、紫外線照射時間の増大とともに吸着力が減少することが分かる。結合して

いた亜硫酸水素イオンの解離により、マラカイトグリーンが正電荷を帯びたためと思われる。このことを、負電荷をもつ基板で更に確認した。予想したように、紫外線照射とともに吸着力が増大し、溶媒にイオンを加えるとこの吸着力の増大が部分的に抑えられた。以上により、プローブに固定したマラカイトグリーンでもフォトクロミズムを示すことが確認された。

5章 フォトクロミックカンチレバーAFMによる物性マッピング

5-1. 走査方法

フォトクロミックプローブと試料との間の吸着力は、図5、6で見たように試料の疎水性及び電荷に影響されることが分かった。試料のこれらの物理化学的性質は吸着力（破断力）ばかりでなく、試料とプローブが離れた場合における斥力や引力にも影響するであろう。それ故、どのような場合における力を計測するかが問題である。試料各点でフォースカーブを1サイクル分完全に取得すれば、すべての場合における力を計測可能であるが、1画像を得るのに非常に長い時間がかかってしまう。AMF自身が高速化されていない限り、破断力のみを計測するか、非接触での斥力・引力を計測するか絞らなければならない。この研究の時点では、高速AFMの開発は未だ端緒に付いたばかりであった。それ故、ここでは、破断力マップを観察することにした。破断力マップだけでも全走査にはかなり長い時間がかかる。そこで、走査方法に工夫を加えた。通常フォースカーブをとる場合、プローブから試料基板を引き離れた状態から接近させていき、接触後もしばらく更に接近させる。それから引き離していき、破断が観察されたあとも引き離しを続け、もとの引き離し距離まで戻す。破断力測定では、必要な情報は試料の凹凸と破断が起こる直前のカンチレバーの撓みだけである。そこで、以下の手順でこれらの情報を得ることにした。

- (1) 最初試料とプローブを接触させて目標とするカンチレバーの撓みを得られるように試料基板の垂直位置にフィードバックをかける。そのときのフィードバック量から高さ情報を得る。
- (2) この接触状態から基板を徐々に下げていく。このとき、一定距離ごとにカンチレバーの撓み（センサー値）をサンプリングし、ひとつだけ直前のサンプリング値と比較する ($dz = z(n) - z(n-1)$)。
- (3) もし dz がマイナスであれば、プローブは未だ試料と接触（吸着）しているので、更に基板を下げる（(2)の手順に戻る）。
- (4) もし dz がプラスであれば、プローブは試料から解離（破断）しているので、 $z(n-1)$ を吸着力として保存する。
- (5) 次のXY位置に移り、破断まで引き離れた距離だけ基板をプローブに再度近づ

ける。

(6) (1) から (5) の手順を繰り返す。

以上の手順を図7に図示する。

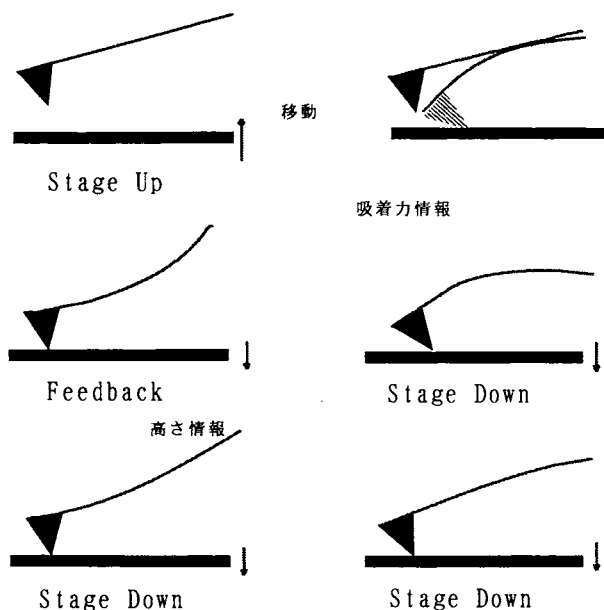


図7 凹凸・吸着力マップ画像取得の手順

この手順では、プローブ・試料間距離の或範囲におけるすべてのセンサー値をサンプリングする必要がないために1画像を得るのに必要な時間が短縮される。XY走査時にはプローブは試料と接触しておらず、プローブが試料を引きずることがない。1ステップ引き離す距離を小さくするほど吸着力マップの解像度は上がるが、あまり小さくすると、dzの値がセンサー信号のノイズレベル程度になってしまい破断したかどうかの判断にエラーが生ずる。また全走査に時間がかかることにもなる。従って、適度な1ステップ距離を選択する必要がある。

5-2. フォトクロミックプローブの優位性

フォトクロミックプローブを用いた吸着力マップは通常のプローブを用いた吸着力マップと違い、試料の物理化学的性質について正確な情報をもたらす。通常のプロ

ープを用いた場合には、吸着力の大小関係しか得られず、吸着力が疎水性相互作用に起因するのか、静電相互作用に起因するのか判断することが難しい。それに対してフォトクロミックプローブの場合には、表1にまとめたように、吸着力の大小を与えている物理的相互作用の性質（つまりは試料表面局所の性質）を特定できる。

| サンプルの性質 | 紫外線 照射前 | → | 紫外線 照射後 |
|---------|------------|---|------------|
| 疎水性 | 大 | → | 小 |
| プラス電荷 | 小 | → | さらに小 |
| マイナス電荷 | 小 | → | 大 |

表1 フォトクロミックプローブ・試料間の吸着力の大きさ及びその紫外線照射による変化と試料表面の性質との関係。

5-3. ガラス表面の吸着力マップ

まず手始めに吸着力マップの取得手順が有効かどうかを確認するために、試料として疎水・親水パターンニングが施された標準試料（(株)ニコンから供給された）、プローブとして通常のカンチレバーを用いた。次ページの図8に示すように、高さが高くパターンニングされた部分の吸着力が低く、低くパターンニングされた部分の吸着力が大きくなっていることが歴然としている。このことは標準試料の性質をよく反映している。このパターンの他にごみと思われるものが付着しており、これについては、高さ
と吸着力との間には強い相関は見られない。以上の結果から、ここで新しく採用した凹凸情報、吸着力マップを同時に得るための走査手順は有効であると判断される。標準試料は不透明のため、紫外線照射前後の比較は残念ながらできない。

図8-1 標準試料の凹凸画像

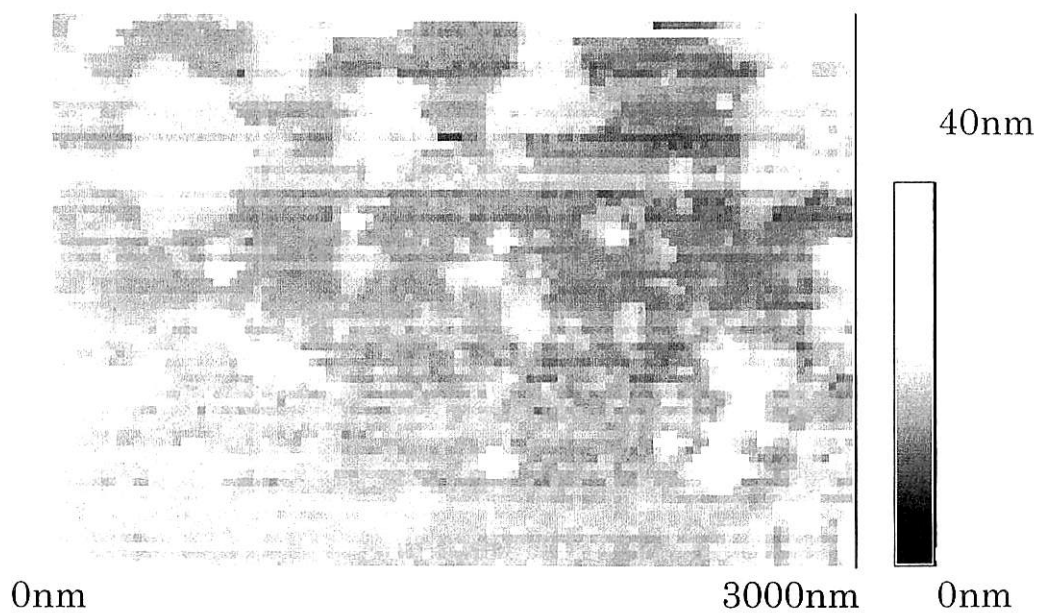
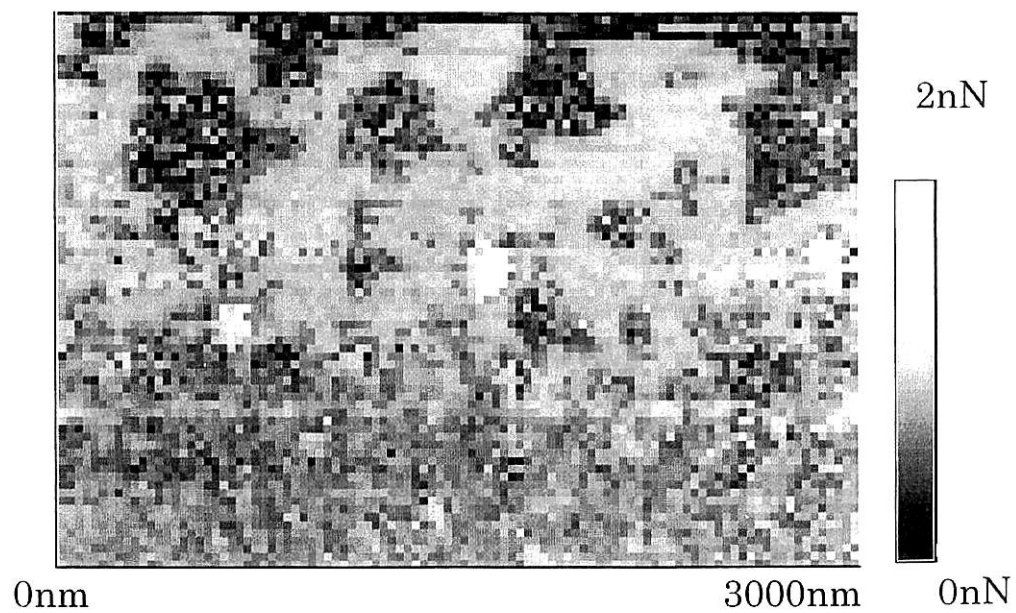


図8-2 標準試料の吸着力画像



次に、標準試料に代わって洗浄カバーガラスを使って、紫外線照射前後で吸着力マップがどのように変わるかを調べた。紫外線照射前における凹凸画像と吸着力マップを図9に示す。

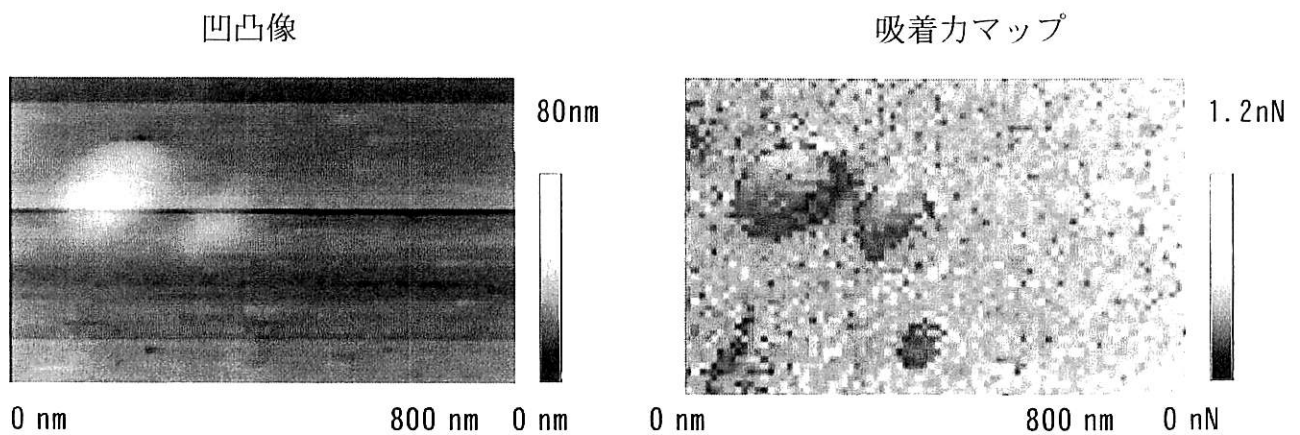


図 9-1 紫外線照射前の凹凸像と吸着力マップ

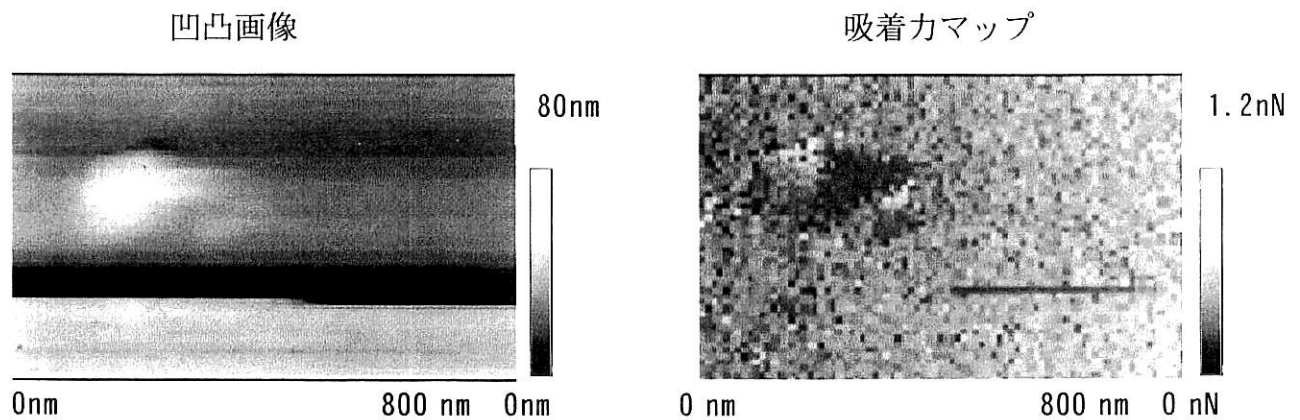


図 9-2 紫外線照射後の凹凸像と吸着力マップ

洗浄カバーガラスにごみが付着しているのが観察される。その領域の大部分における吸着力はカバーガラス表面のそれと比べ吸着力がずっと弱い。凹凸がはっきりしていない部分でも吸着力マップを見ると何か存在していることが分かる（図 9-2 吸着力マップの中央下付近）。紫外線を 3 分間照射したあとでは、左上付近にごみとして見えていた領域の吸着力は明らかに減少している。また、中央下付近に見えていた吸着力がほとんど無い領域は紫外線照射によって消失してしまったように見える。平坦なカバーガラス部分における吸着力は紫外線照射前後で変化していないように見える。表 1 を使ってごみ部分の性質を考えると、そこにはマイナス電荷が存在していると判断される。

5-4. ここまでの問題点

以上、カバーガラスという極単純な系でフォトクロミックプローブを用いて物性マップが得られること、及びマッピングのための走査手順の有効性をデモンストレーションした。図8、9を見て分かるように、吸着力マップのコントラストは凹凸像よりも優れている。言い方を変えれば、凹凸像のコントラストは悪い。吸着力はプローブと試料との破断前後のセンサー値の差であるので、装置のドリフトの影響を受けない。それに対し、高さ情報はセンサー値の絶対値から求めるために、装置のドリフトの影響を受ける。走査方法を工夫し測定時間を短縮する努力をしても、100x100点から成る図8、9の測定には30分の時間がかかっている。これを数分、出来れば1分以内に短縮できないと、ここで開発した方法を蛋白質の研究に応用することは難しい。それ故、走査時間を短縮できる新たな走査方法を開発するか、AMF装置自身を高速化する必要がある。吸着力マップ計測では、試料ステージを小さいステップ下げていき破断を観察することに最も長い時間がかかっている。カンチレバーのレバー部に直接力を加えることができれば、この部分の時間はずっと短縮される。破断のタイミングとその前後のセンサー値の差をサンプリングするために、新しい回路を作ることも考えられる。破断をセンサーの微分信号で捉え、時間差を付けてセンサー信号を常にホールドしておき、破断が起こったときのみホールドしておいたデータの差を保存する回路である。しかし、全走査時間の短縮にはAMF装置自身を高速化することが理想的である。

破断力計測による吸着力マップでは破断事象の見誤りを防ぐ必要があり試料ステージを下げる1ステップの距離を小さくできない。それ故、微弱な吸着力を計測できない。物性マッピングの分解能向上には吸着力計測に代わって、プローブ・試料間の非接触での斥力・引力計測を利用すべきであろう。

フォトクロミックプローブの先端曲率半径が大きいことも問題である。マラカイトグリーンの濃度、重合促進剤の濃度、紫外線照射時間などのパラメーターを振って、曲率半径の小さくなる条件を見出すことが重要であろう。あるいは、EBD法などで元々のカンチレバー探針先端をもっと先鋭化しておくことも重要であろう。

フォトクロミックプローブの有効性を確認できたこの時点でどのように研究をさらに進めるか考える必要があった。既に述べたようにAMFの高速化は必然の流れであり、それは当然進めなければならない。これには時間がかかるので、これと並行して蛋白質表面の物性を決める新たな走査方法を工夫することを考えた。以下の数章において、この研究内容を紹介する。それに続き、別の研究助成のもとに行われた高速AFM

の開発の概略を述べる。

6章 非接触マッピングモード

6-1. 非接触マッピングモード（リフトアップモード）の仕組み

吸着力マップ計測では時間がかかり、微弱な吸着力を計測できないという問題がある。これを解決するために、ここで新たに非接触マッピングモードを考案した。試料表面から一定の距離だけカンチレバープローブを離し、そのとき試料・プローブ間に働く力を計測するモードである。マッピングのためにZ方向に何回も走査する必要がないため、走査時間を短縮できる。また、微弱な力も検出できる。試料表面から一定の距離だけプローブを離すためには、まず試料の高さ情報が必要である。高さ情報は通常の形状観察に用いられている走査方法（コンスタントフォースモード、タッピングモード）が使える。コンスタントフォースモードではプローブは常に試料と接触しているために、プローブが試料を引きずる問題がある。それ故、高さ情報をタッピングモードで得ることにした。他方、非接触での斥力・引力マップではカンチレバーをタッピングできない。それ故、タッピング、ノントッピングを1ラインごとに切り替える必要がある。以上のことを考慮して設計したリフトアップモードの走査手順を以下に示す。

- (1) タッピングモードで1ライン分の高さ情報を得る。
- (2) タッピングを停止する。
- (3) 予め定めたリフトアップポイントまで試料ステージを下げ、プローブ・試料(基板)接触を破断させる ($X=0$ においてのみ)。
- (4) 破断後のセンサー電圧を力ゼロに対応する電圧として記録する。
- (5) (1) で得た高さ情報に基づき、試料から一定の距離だけ離れた位置 (マッピングポイント) まで試料ステージを移動する。
- (6) マッピングポイントでのセンサー値を取得し、力ゼロに対応するセンサー電圧との差分を試料・プローブ間に働く力として保存する。
- (7) X を1ステップ進め、(5)、(6) を繰り返す。
- (8) $X=0$ まで非接触で戻し、タッピングを再開する
- (9) Y を1ステップ進め、(1) から (8) を繰り返す。

以上の手順を図10に示す。

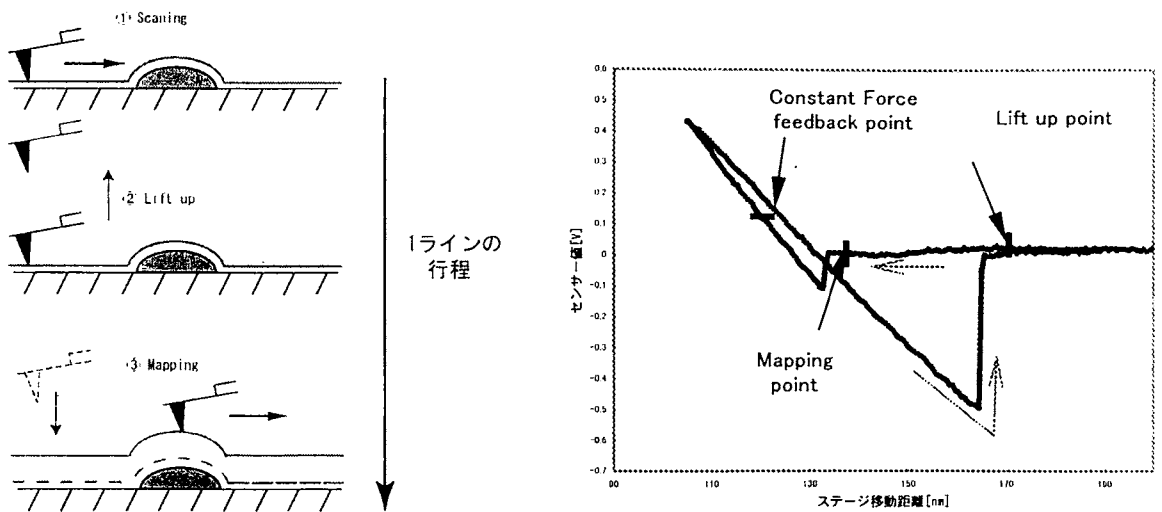


図10 リフトアップマッピング走査の手順の概略図

6-2. カンチレバーの選択

上記走査で問題になるのがカンチレバーである。一般にタッピング用のカンチレバーは共振周波数を上げるためにバネ定数大きい。これを非接触における力計測に用いると微弱な力を計測できない。出来るだけ微弱な力を計測するために、市販の最も柔らかい（バネ定数 20pN/nm）カンチレバー（TR400）を用いることにした。この液中での共振周波数は水中で 1kHz 程度であり、AFM ヘッドの様々な機械部もこのように低い周波数帯に共振周波数をもつ。それ故、カンチレバーのみを振動させることはできない。周波数を走査してカンチレバーの共振を調べたところ、図 11 に示すように、いくつかの高次周波数帯にも共振が観察された。そのうちのひとつ、12kHz 付近の振動はカンチレバーの振動によることが確認された。図 11 に示すように、高次共振のタッピングでも画像が得られることが確認できた。

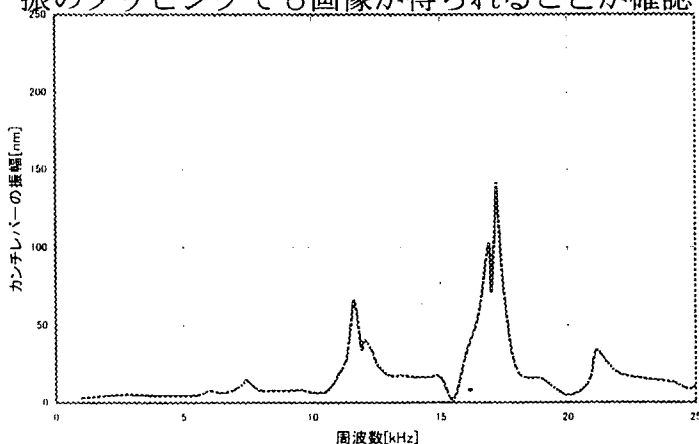


図11 TR400 カンチレバーの水中共振特性

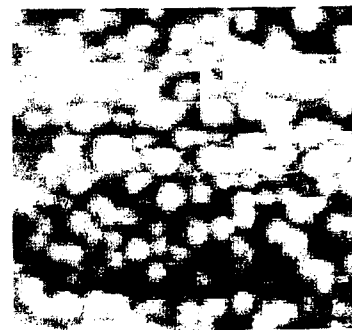


図12 リゾチーム（水溶液中）の像（400x400nm）

図13にTR400をタッピングさせたときのフォースカーブを示す。振動するセンサー信号をRMS-DCコンバーターでRMS値に変換した場合と、振動するセンサー信号をローパスフィルターにかけた場合の両方を示す。タッピングモードでは通常一定のRMSを与えるようにフィードバックをかけるのが普通であるが、TR400を高次の共振周波数で振動させるとRMS値は若干不安定であった。それ故、今後はローパスフィルターをかけた信号が一定になるようなフィードバックをかけてイメージングを行う。

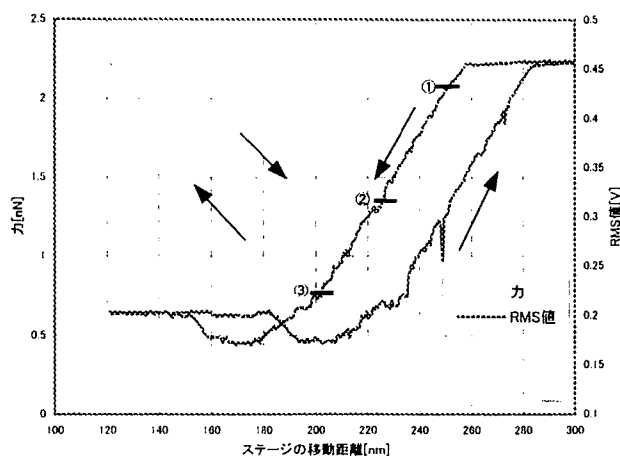


図13 タッピング時のフォースカーブ

6-3. 試料基板とプローブとの相互作用

非接触状態におけるプローブと試料間に働く微弱な力を計測する場合、基板とプローブとの間に強い力が働いているとプローブ・試料間に働く力が隠されてしまうという問題がある。試料表面から一定の距離だけ離れたところということは、高さの高い試料では基板から遠い位置になり、高さの低い試料の場所では基板に近い位置になる。それ故、プローブ・基板間に強い力が働いていると、試料の高さの違いによるプローブ・基板間に働いている力の違いを観察しているのか、プローブ・試料間に働いている力を観察しているのか分からなくなってしまう。これはかなり深刻な問題となる。試料は基板に吸着していなければならないので、基板は試料を引き付ける何らかの性質（疎水性や電荷など）をもっていなければならない。しかし、その性質が強い場合には、プローブ・基板間に強い遠達力が働いてしまう可能性が大きくなる。それ故、適切な基板を見出すことが重要な課題となる。

上記の問題を調べるために、まず AMF でよく使われるマイカ基板についてプロー

ブ・基板間に働く力がどの程度であるかを調べた。プローブとして TR400 の探針に電子顕微鏡で EBD 処理したものを用いた。PH 7.0、種々の Mg 濃度で測定したフォースカーブを図 1 4 に示す。

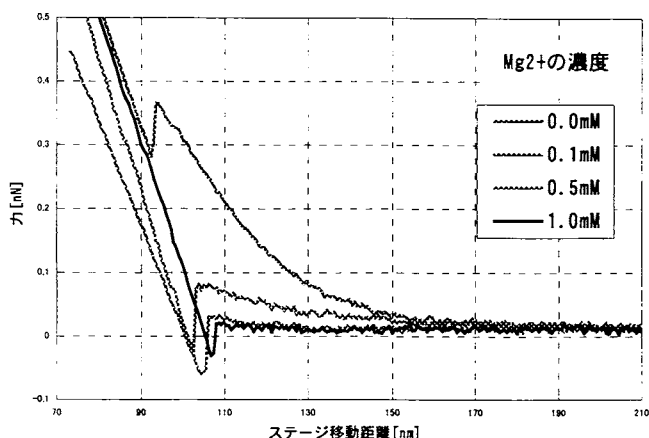


図 1 4 マイカ基板とプローブ間に働く力

2 価金属なしの条件では、極めて強い斥力が働いている。Mg の濃度を増やしていくと斥力は減少していった。プローブ側の窒化シリコンは若干マイナスに帯電しているため、マイカは強く負に帯電していることが分かる。プローブと基板を更に近づけるとジャンプインが観察された。これは静電誘導あるいはファンデルワールス引力と思われるが、Mg 濃度にあまり依存しないことから、ファンデルワールス引力と思われる。マイカ基板の負電荷の大きさはマイカの試料ごとに変動し、毎回このように大きな斥力が観察されるわけではないが、マイカ基板はマッピングに適さないと言える。次に、洗浄カバーガラス基板についても同様に調べた。その結果を図 1 5 に示す。

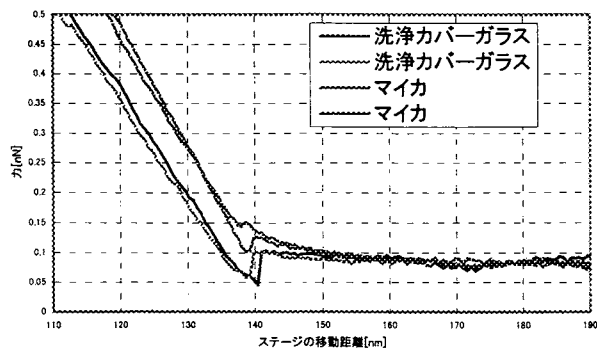


図 1 5 カバーガラスとプローブ間に働く力。マイカとの比較。

2価金属を入れていないにも拘わらずこの場合にはマイカでの大きな斥力は観察されなかった。それでもなお、カバーガラスの方が小さい斥力を示した。それ故、カバーガラスはマッピング用の基板として優れているものと思われる。

非接触での力マップを求めるために、ここではプローブ側に負の電荷をもたせることにした。負電荷をもつ化合物としてSDSを採用した、カンチレバーをシラン処理して疎水性にしたあとにSDSを探針先端に吸着させた。SDSの効果を見るために、SDS濃度を変えて、マイカおよびカバーガラスを基板としてフォースカーブを計測した。その結果を図16に示す。

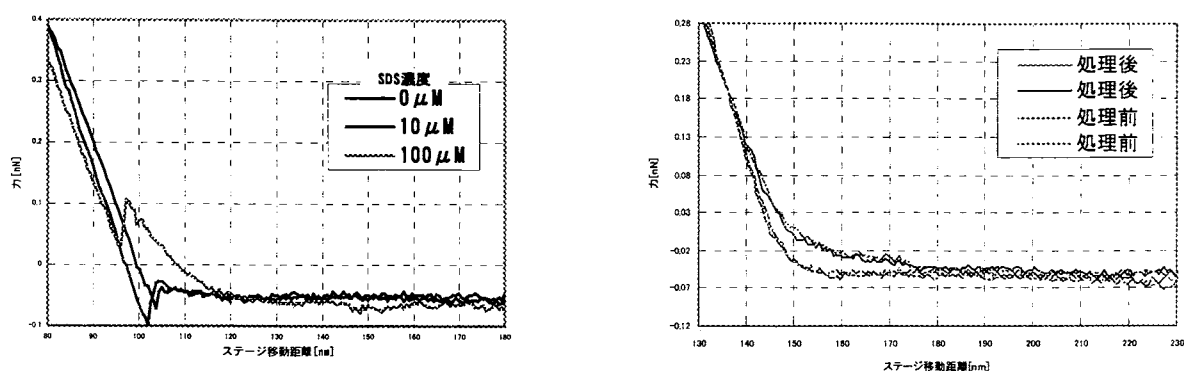


図16 SDSプローブの効果。左図はマイカ基板の場合、右図はガラス基板の場合（SDSは40 μM ）。

明らかにSDSをプローブに付けると、マイカ、ガラスの両方で斥力が増している。それ故、SDSプローブを負電荷プローブとして使えることが分かった。また、ガラスの方がやはりマイカに比べ負電荷が少ないことが再確認された。

6-4. リゾチームの電荷マッピング

塩基性蛋白質を試験材料にして非接触力マップを、SDSプローブを用いて計測した。まず負電荷が大きくリゾチームを吸着しやすいマイカを基板に用いた。その結果を図17に示す。全走査時間は約5分である。リゾチームの存在する場所で非接触力が基板におけるそれよりも小さくなって、黒っぽい非接触力マップが得られた。力の符号を調べてみると、リゾチームの存在する場所の極一部でマイナス（すなわち引力）になっていた。これは、予想したように、リゾチーム表面が基板から遠い位置にあるためマイカの強い負電荷の影響が現れていることを示している。従って、非接触力マップで観察されたコントラストは試料・プローブ間の静電相互作用を反映していない。



図17 マイカ基板上的のリゾチームの形状画像及び非接触力マップ。
走査範囲 200 x 200nm。左図は凹凸画像、右図は非接触力マップ。

図18に、この系で測定されたフォースカーブを示す。プローブ直下はリゾチームの存在しないマイカ表面領域である。明らかに強い斥力が現れている。

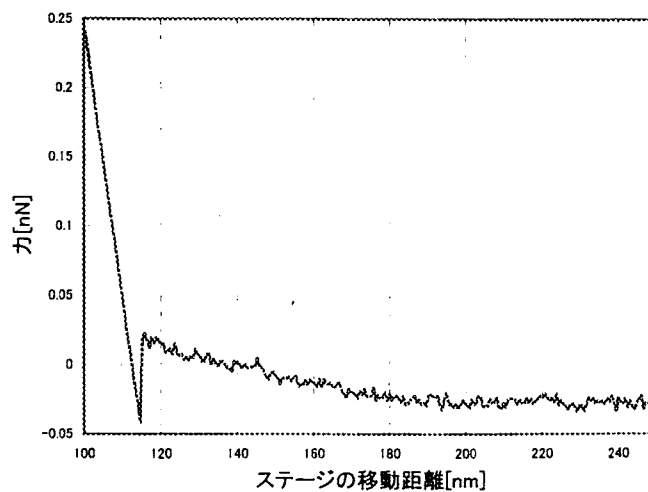


図18 図17の観察で用いたマイカ基板とプローブとの間に働く力。

次に、負電荷量の少ないカバーガラスを基板に用いて、同様の観察を行った。その結果を図19に示す。明暗のコントラストが付いた非接触力マップで力の符号を調べ

てみると、リゾチームのある場所では符号は負（引力）であった。それ故、ここで得られた非接触力マップはリゾチームの荷電状態を強く反映している。

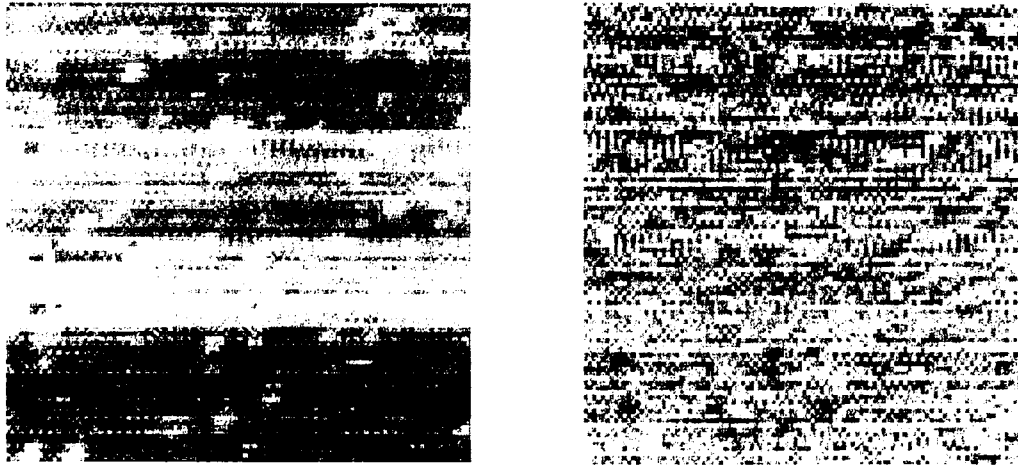


図19 カバーガラス基板上的リゾチームの形状画像及び非接触力マップ。
走査範囲 500 x 500nm。左図は凹凸画像、右図は非接触力マップ。

図20に、この系で測定されたフォースカーブを示す。プローブ直下はリゾチームの存在しないガラス表面領域である。斥力はほとんど現れていない。

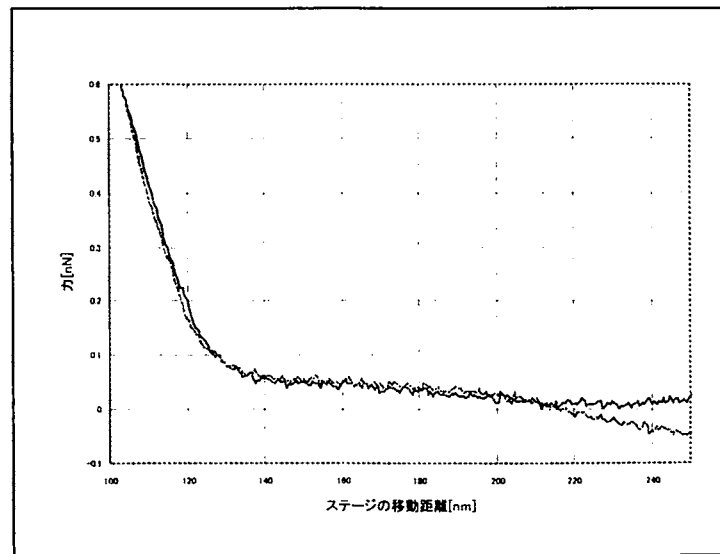


図20

6-5. 非接触力マップ法のまとめ

非接触力マップ法は吸着力マップ法に比べZ方向の走査回数が少なく、全走査時間は比較的短くできる。吸着力マップでは30分かかっていたが、非接触力マップでは5分である（それでもなお長すぎるが）。また、非接触力マップ法では検出できる力の下限は数ピコニュートンであり、吸着力マップ法に比べ優れている。但し、非接触力マップ法で疎水性相互作用を検出できるかどうか現在のところ試みておらず不明である。疎水性相互作用が遠達相互作用であるとする説も提出されているが、疎水性相互作用の物理的メカニズムはそれほど解明されておらず不確かな部分が多い。

非接触力マップ法の問題点は2つある。

- (1) 基板とプローブとの間に強い遠達力が存在すると、試料とプローブとの相互作用がかくされてしまう。従って利用できる基板が制限される。
- (2) プローブと試料との間の距離をあまり近づけられない。この距離を近づけることは技術的には難しいことではないが、この距離を一定に保てない。プローブと試料間に働く力によりレバーが撓むためである。引力の場合にはレバーが下に撓むため強い引力ではプローブと試料が接触してしまう。また、レバーの撓みのために、斥力では試料表面の場の強さよりも少なめに、逆に引力の場合には大きめに見積もられてしまう。

(2)の問題点はカンチレバーの支持部ではなく、レバー自身に外から力を加えてレバー位置を制御できれば解決される。光の輻射圧、或いはレバーを磁化させ磁場で制御する方法が考えられる。そこで、光の輻射圧で制御できるかどうか装置を試作して試みた。次章でこれについて述べる。

7章 光輻射圧によるレバー位置制御の試み

蛍光顕微鏡に搭載されたAFM装置を利用した。落射照明投光管をはずし、そこに半導体レーザー光学系(図2-1)を設けた。カンチレバー下部にある対物レンズにレーザー光を導き、カンチレバー腹面に照射する。カンチレバーに垂直に入射し完全に反射するとした場合には、785nmの光1mWあたり6.6pNの輻射圧が働く。レーザー出力20mWで130pNの力になり、20pN/nmのカンチレバーでは6.5nmの範囲でカンチレバーのレバー部の位置制御が可能である。実際どの程度の力が及ぶかを調べた。図2-2に示すように、カンチレバーの撓みの向きは、輻射圧から予想される向きと反対であった。カンチレバーの腹・背を逆にしてレーザー光を下から照射すると、カンチレバーの撓みの向きは逆になった。つまり、光を腹・背のどちらから当てても、

カンチレバーの撓む向きは腹側であった。従って、カンチレバーの撓みは輻射圧で起こるのではなく、むしろ熱作用に起因すると推測される。

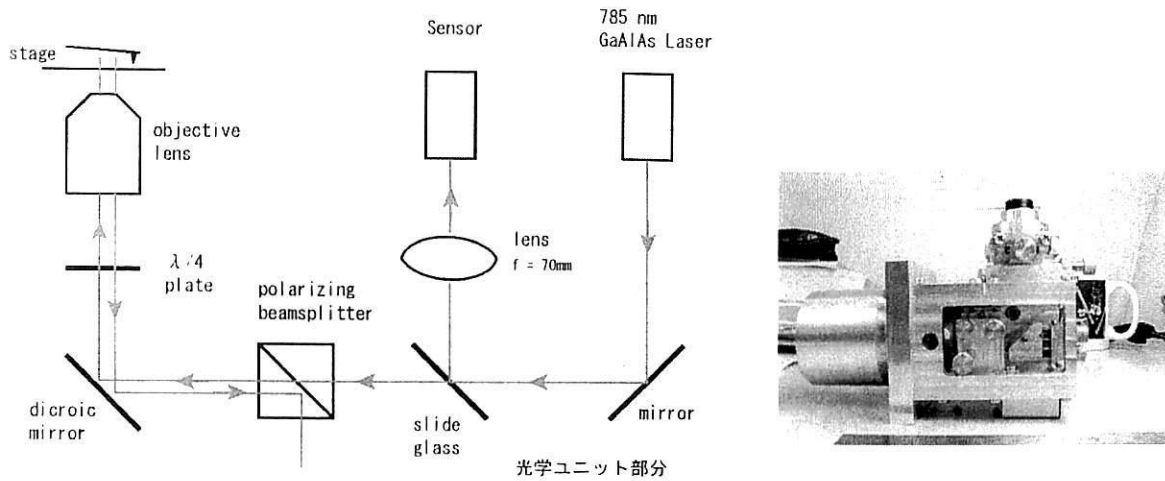


図 2 1 レーザー投光装置の構造（左図）と写真（右図）

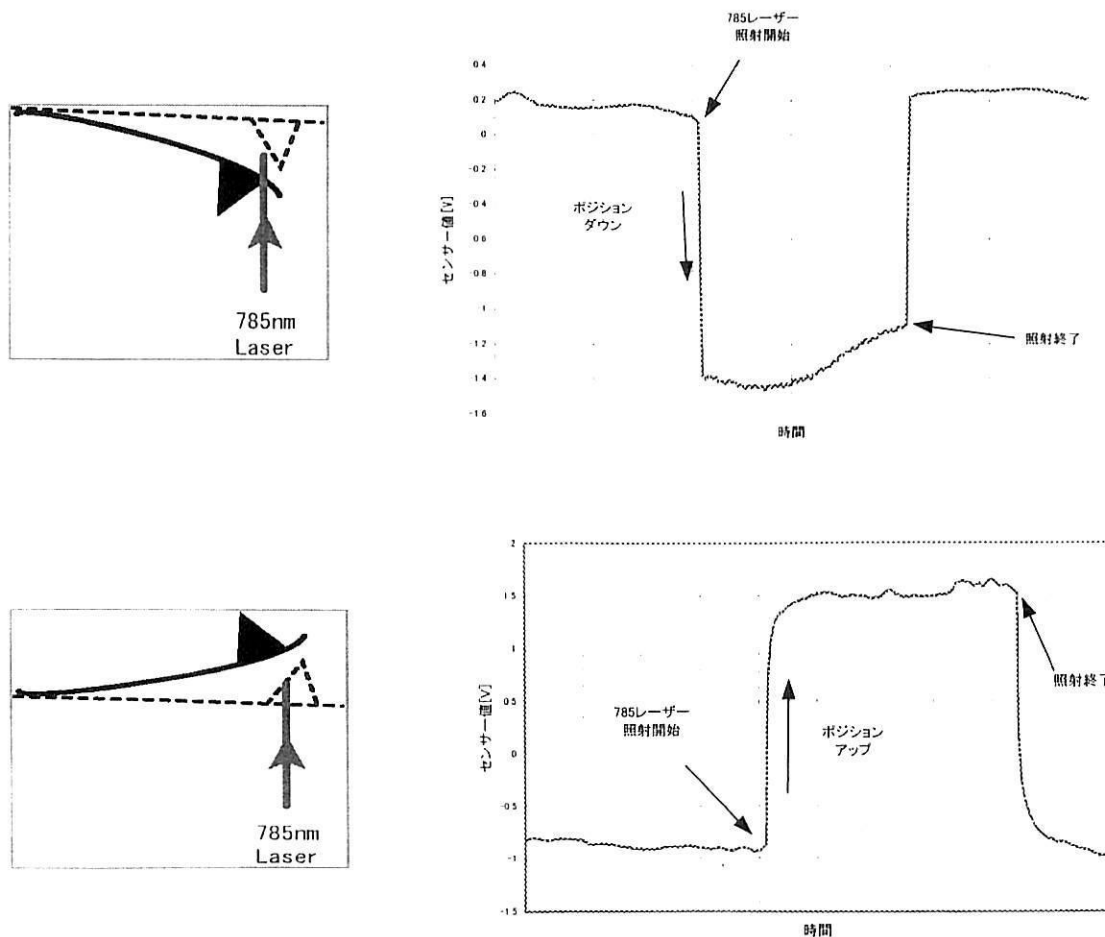


図 2 2 レーザー照射によるカンチレバー撓み方法の照射向き依存性の試験

カンチレバーは片面が金コートされているため一種のバイメタル構造をしており、その結果レーザー光の熱作用により撓むと思われる。両面金コートのカンチレバーでも輻射圧効果を調べた。熱による撓みは片面金コートに比べ少なくなったが、それでもなお無視できないほど撓みが観察された。熱作用による撓みをレバー位置制御に利用することは原理的に可能である。しかし、熱作用は、レーザー照射位置に敏感で、且つ応答速度が遅いため、実用的ではない。

8章 高速 AFM の開発

物性マップ観察は通常の AFM 装置を用いた場合には、走査方法に工夫をほどこしても長い時間を要する。それ故、ドリフトの影響が強く現れ精密な計測ができない。それ故、物性マップ取得の高速化を実現する抜本的な改良は高速 AFM の開発によるのみ可能と思われる。また、高速 AFM は物性マップ観察ばかりでなく、通常の形状観察や、XY 1 点でのフォースカーブ計測にも威力を発揮する。それ故、その開発は大変有意義である。開発それ自身大きな研究課題であり、本報告書の範囲を超えるものであるが、本報告書の物性マップ研究と並行して進めてきたので、高速 AFM の開発成果についても概略だけはここで報告しておこうと思う。本研究助成（基盤 C）で得られた成果を高速 AFM に適用することにより、将来高速に且つ高精度で蛋白質表面の物性マップが得られることになるであろう。

8-1. 高速化の要件

AFM の高速化を実現するには、カンチレバー、スキャナー、フィードバック制御系などの大幅な改良が必要である。カンチレバーについては、高い共振周波数（ばね定数は小さいままで）が必要である。その条件は小さく薄い形状によって与えられる。例えば、バネ定数 54pN/nm、大気中共振周波数 500kHz を満たすためには、長さ 15 μ m、幅 5 μ m、厚さ 100nm となる。通常のカンチレバーの 1/10 の大きさになってしまう。この程度小さくなると、カンチレバーの変位検出に従来用いられていた光テコ光学系が使えなくなる。新しい光学系を開発しなければならない。高速に走査するためには、スキャナー自身が高速に動く必要があるのは当然である。スキャナーの駆動には通常 piezo 素子が使われるが、高速化には高い共振周波数をもつ piezo 素子が必要である。また、piezo 素子が駆動する機械系はコンパクトで軽量でなければならない。更に、高速に動かしても望ましくない振動が起こってはならない。フィードバック回路、センサー回路など全てのエレクトロニクスにも高速応答性が要求される。以上全ての条件を満たしてはじめて高速 AFM が実現される。ひとつでも満たさないものがあれば、

それにより走査速度の上限が決まってしまう。

8-2. カンチレバーと変位検出光学系

我々は図 2 3 に示すカンチレバーを開発した。大気中共振周波数 1.5MHz、水中共振周波数 600kHz、ばね定数 100pN/nm である。タッピング走査モードを利用した場合、カンチレバーの振動振幅計測には通常数波長分の時間が必要であるので、1 ピクセルあたり 10 μ sec の時間となり、100x100 ピクセルの画像の場合おおよそ 0.2 秒で 1 画像が撮れることになる。従来に比べ 200 倍以上の高速化が可能になる。ここで開発したカンチレバーにはエッチングプロセスの都合上探針が付いていない。電子線照射により EBD 探針をあとから付けた。

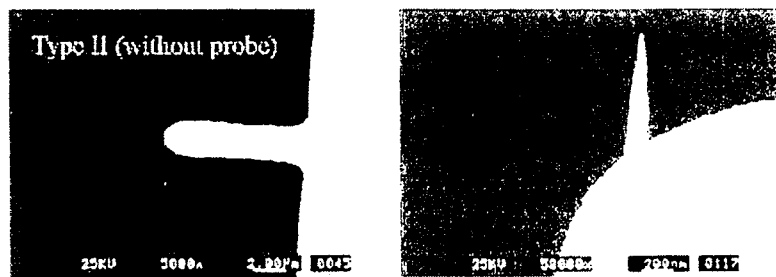


図 2 3 開発したカンチレバーの電子顕微鏡写真。右の写真は電子線照射により作成した EBD 探針である。

カンチレバーがこのように小さくなったので、光テコ用のレーザーを小さく絞らなければならない。それには焦点距離の短いレンズを使わなければならない。そうすると、反射光をレンズに通過させないわけにはいかなくなる。反射光も同じレンズで集める方式の光テコ光学系（図 2 4）を開発した。20 倍の対物レンズを用いて、スポットサイズ 3 μ m を得た。カンチレバーが短いので、変位に対して角度変化が大きく、変位検出感度が高い。

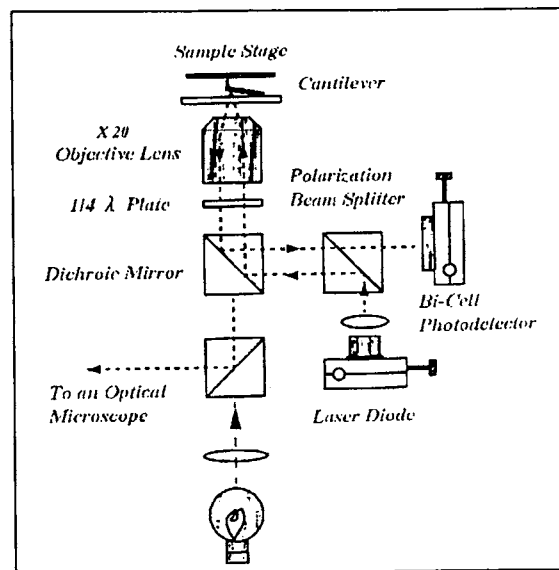


図 2 4 対物レンズ型光テコ光学系

8-3. スキャナー

スキャナーの高速化には2つの条件が必要である。第一は、使われる piezo 素子の自己共振周波数が高いこと、第2には、スキャナー全体の共振周波数が高いこと。スキャナーの共振周波数が低い場合には、走査中スキャナーが共振してしまいスキャナーの変位を正確に制御できなくなる。XYZの高速走査のうちフィードバックに使うZ走査は最も高速であることを要求される。以下に、どのくらいの走査速度が要求されるかを簡単に見積もる。

観察したい試料の大きさを S 、X走査速度を V_x とすると、Zフィードバックの周波数 f_z はおよそ、 V_x/S になる。観察領域が $L \times L$ のサイズで1画像が N ラインからなるとすると、1画像取得時間 T_m は $2NL/V_x$ となる。ここで具体的な数値を入れてみよう。 $L=200\text{nm}$ 、 $N=100$ 、 $T_m=0.1\text{sec}$ 、とすると、 $V_x=0.4\text{mm/sec}$ となる。 $S=10\text{nm}$ とすると、Zフィードバック周波数は $f_z=40\text{kHz}$ となる。

従来の AFM によく使われている円筒 piezo の共振周波数はせいぜい数 kHz 程度しかない。そこで、自己共振周波数が 260kHz の積層 piezo を用いることにした。これを XYZ の3次元に組むが、1g、数 mm サイズの機械系の共振周波数はせいぜい 20kHz 程度が限界である。従って、スキャナーの共振周波数を 40kHz 以上にすることは不可能ということになってしまう。従って、共振しにくい構造、及び共振したとしてもその振幅が小さく抑えられる構造を設計しなければならない。数種類のスキャナーを設計・試作して、最終的に図25に示す構造のものを採用した。以下の3つの特徴を有する。(1) 振動する腕自身の長さが短く、共振周波数が比較的高いと同時に共振時の変位量が少ない。(2) piezo の急激な変位にともなって生ずる撃力を打ち消す構造になっている。(3) XYZ 各軸間の干渉がない。

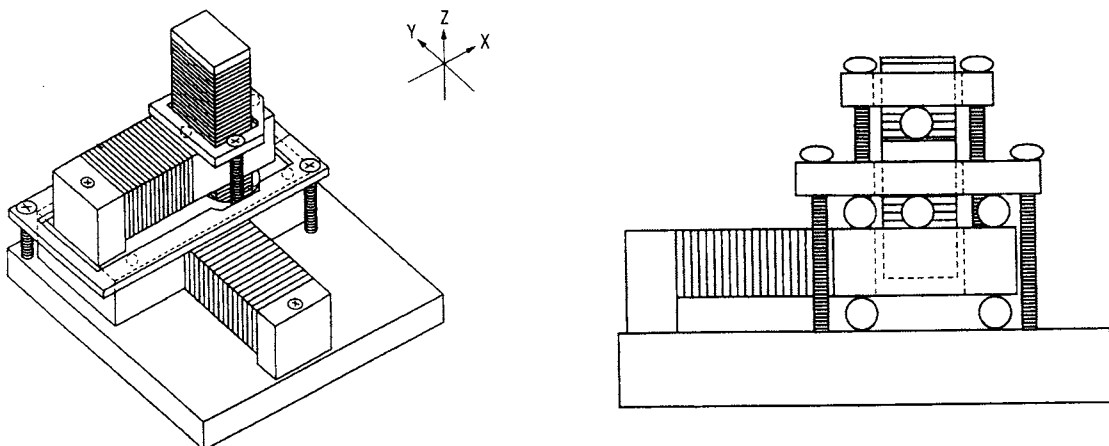


図25 スキャナーの構造

(2)の特徴は、サンプルステージをZ方向に変位させるZ Piezoと反対側に同じPiezoを付け、反対向きに変位させることで実現している。周波数を連続的に変化させてZ Piezoを振動させた場合の試料ステージの変位を測定した結果、図2.6に示す特性が得られた。ここで、試料ステージの変位は試料ステージに接触させたカンチレバーの変位計測から求めた。

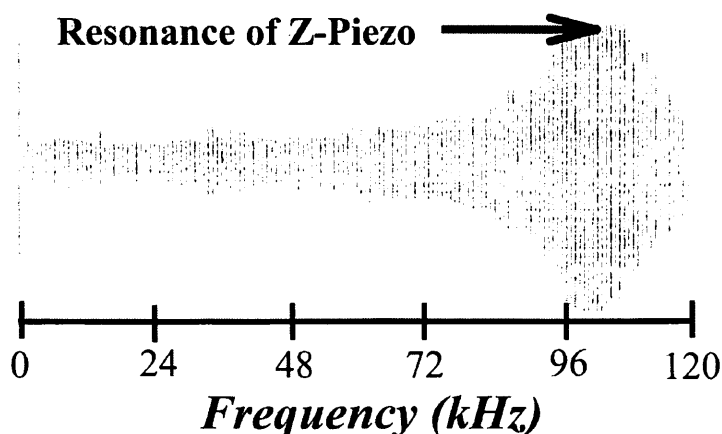


図2.6 Zスキャナーの共振特性

60kHz程度までおおよそ一定の振幅が得られた。100kHzの大きな振動はPiezo素子の共振である。15kHz、30kHz付近に若干大きな振幅が観測されたが、これはスキャナー機械部の共振である。極めて小さい共振であり、実用上問題にならない。60kHzまでフィードバックがかけられることから、上述の走査条件下では67msecで1画像を撮れることになる。

8-4. エレクトロニクス

AFMに含まれるエレクトロニクスのうち、Z Piezoドライブ電源、センサーアンプ、RMS-DC変換回路、PID制御回路は基本仕様設計し、システムハウスに製作して頂いた。センサーアンプ及びZ Piezoドライブ電源は1MHzまでの応答速度をもつ。RMS-DC回路は一般に4次ローパスフィルターを採用したRMS-DC回路（1つのLSI回路）を使うのが普通である。この場合には、振幅値の確定には数波形が必要であり、600kHzでカンチレバーを振動させた場合には、変換完了までに10 μ secかかる。100x100点からなる画像取得の場合、全変換時間はおおよそ0.2秒かかることになる。それ故、高速スキャナーの性能を生かせない。そこで新しい機構によるRMS-DC回路を考案した。センサー信号を微分し、そのゼロクロス点でセンサー信号をホールドし、それを出力する機構である。これにより、1波形で変換が完了する。PID制御回路自身は100kHzまでの制御ができる。

8-5. 連続画像撮影

開発した種々のデバイスを組上げ AMF システムを完成させた。Z フィードバックの性能からは 1 画像 67msec、すなわち 15 フレーム/sec の速度が可能であるが、実際には X Y 走査制御に比較的遅い DSP を採用しており、それに律速されて現在のところ 2.5 フレーム/sec が限界になっている。それでも、従来の装置より約 250 倍速い装置になっている。この装置で実際高速に且つ連続して画像を撮れるかどうかを試験した。ここでは、観察試料領域の大きさを連続的に変えた（ズームイン・ズームアウト）。それで得られた連続画像を図 27 に示す。

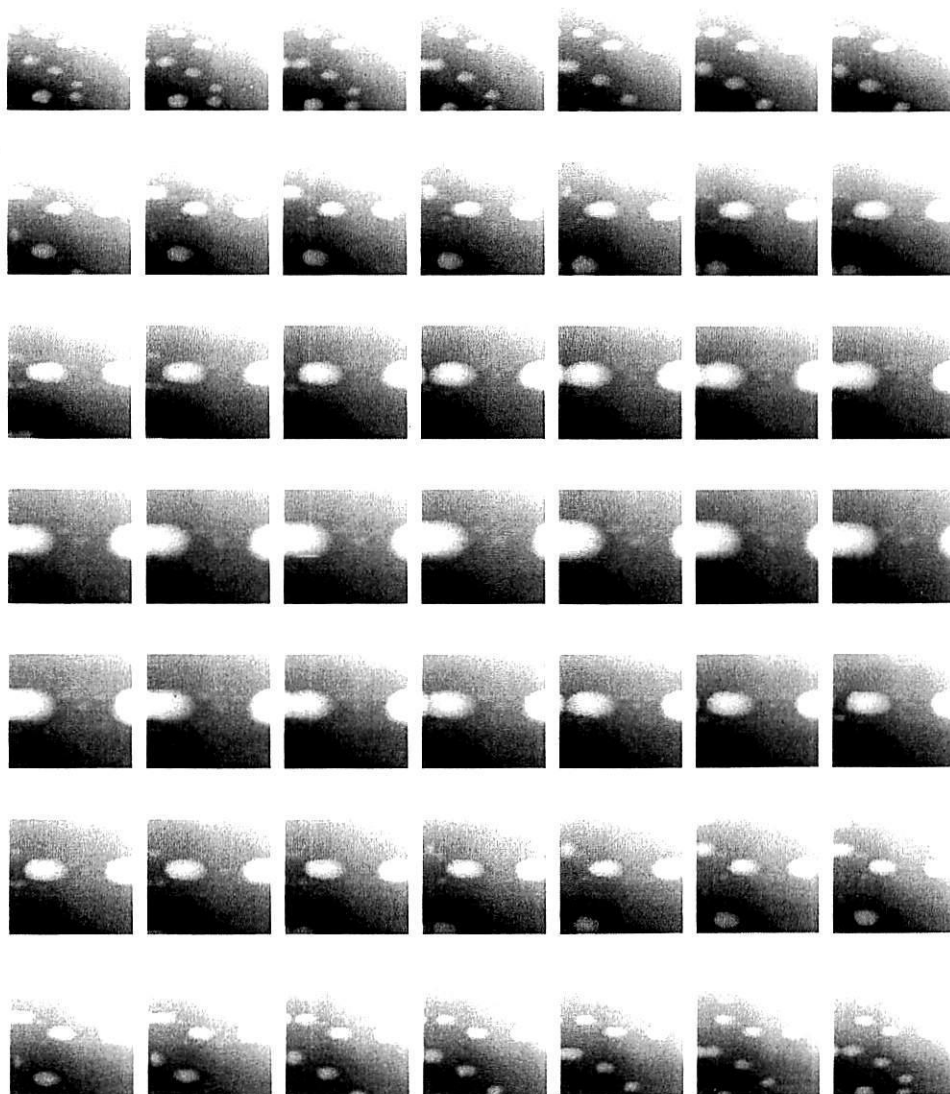


図 27 連続 AFM 画像。フレームレートは 2.5/sec である。