

最新装置開発：高速 AFM 開発について*

Development of High-speed Atomic Force Microscopy

内橋貴之** 安藤敏夫**

Takayuki UCHIHASHI and Toshio ANDO

Key words atomic force microscopy, high speed, PID control, scanner, protein dynamics

1. 緒 言

AFM は測定環境にかかわらず幅広い材料でナノメートルスケールの空間分解能で構造解析ができることから、今ではナノサイエンスに欠かせないツールの一つになっている。ところで、AFM では1枚の画像を取得するのに数分～数十分の時間が必要なことから、1つの試料を測定するのに試料のセッティングから画像を得るまでに長い時間がかかる。また、当然のことながら秒単位、またはそれ以下の短時間で起こる現象、例えば試料の構造変換などのダイナミクスを捉えることはできない。AFM による高速イメージングが実現できれば表面構造解析に必要な時間を大幅に短縮できるとともに、固体表面で生じるさまざまな動的過程をリアルタイムに観察できることが期待され、AFM の応用範囲が大きく拡大するだろう。特に、核酸やタンパク質などの生体分子の働きは、ほとんどの場合構造変換や分子間相互作用などのダイナミックな過程を伴っているため、高速 AFM によるリアルタイムイメージングは生体分子の機能解明に非常に有効であると考えられる。実際、最初期的高速イメージングは血液凝固因子タンパク質の重合過程を観察したものであった¹⁾。その後も数十秒の時間で生体分子のダイナミクス観察を試みた例はいくつかあるが、そもそも数十秒のイメージングスピードでも捉えることのできる分子過程があまりなかったために大きな成功には至らなかった。

われわれは1993年からAFMの高速化に着手し、2001年に1フレームを80msで取得できる高速AFMの開発に成功した²⁾。その後も装置開発を継続し、2008年にはタンパク質の生理機能や弱い分子間相互作用を乱すことなくリアルタイムイメージングすることが可能となった³⁾。

本稿では、高速AFMイメージングを実現した要素技術について解説し、最後に代表的なタンパク質の観察結果を紹介する。

2. 高速 AFM 技術

AFMの動作モードにはいくつかあるが、われわれの高速AFMでは弱く基板に吸着した生体分子の観察に最も適しているタッピングモード⁴⁾を採用している。タッピングモードでは、カンチレバーを機械的共振周波数でわずかに(1~10 nm_{rms})振動させて探針を試料に間欠的に接触させながら走査する。この接触によりカンチレバーの振動振幅が変化するが、PIDフィードバック制御により振動振幅が常に設定値と等しくなるよう試料の高さ位置が制御される。ラスタ走査の各ピクセル位置でのPID信号をコンピュータに取り込むことで表面形状像を得る。高速イメージングに試料ステージの高速2次元走査はもちろん重要であるが、それ以上に試料にダメージを与えないためには高さ方向の移動速度を十分速くしなければならない、すなわち高いフィードバック帯域が必要である。

走査範囲 $W \times W$ [m²] の領域を Y 方向の走査線数 N [本] で、 T [s] の時間で1画像を得るには、速度 $V_x = 2WN/T$ [m/s] で X 方向の走査を繰り返す必要がある。試料表面の構造が空間周波数 $1/\lambda$ [m⁻¹] のとき、探針が試料の表面構造に追従するには、試料ステージを周波数 $f = V_x/\lambda$ で高さ方向に移動させなければならない。現実には、フィードバック制御は振幅と設定値のズレを検出してから試料の Z 位置を変化させる後追い制御のため、完璧な追従は不可能である。そのため、一般にフィードバック帯域は位相が $\pi/4$ [rad] 遅れた周波数で定義される。現在的高速AFMのフィードバック帯域 f_B は110 kHzに達しており、通常のAFMの数100倍以上である。フィードバック制御の許容される位相遅れは、対象とする試料の脆さに依存するが、最大許容位相遅れを θ_m とすると、1画像を撮るのに必要な最短時間 T_{min} は $T_{min} = \pi WN / (2\lambda f_B \theta_m)$ と表される⁵⁾。現在達成されているフィードバック帯域 $f_B = 110$ kHzで、例えば $W = 200$ nm, $N = 100$, $\lambda = 10$ nm, $\theta_m = 20^\circ$ の条件でイメージングできる最短時間は80msとなる。フィードバック帯域は閉ループ中に含まれるさまざまな遅れ要素(カンチレバーやZ圧電体の共振周波数、 Q

*原稿受付 平成24年12月6日

**金沢大学理工研究域・数物科学系(石川県金沢市角間町)

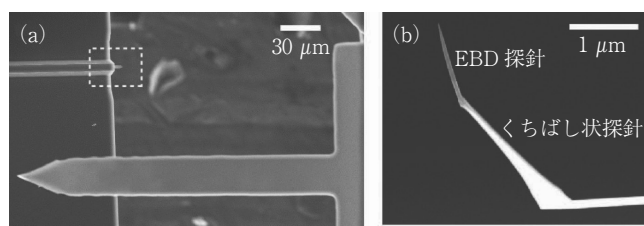


図1 (a) 高速 AFM 用微小カンチレバーと通常の AFM 用カンチレバーの比較. (b) くちばし状の探針上に形成させた EBD 探針

値、カンチレバーの振幅計測時間、カンチレバーの自由振動振幅と試料の高さの比) で決まる³⁾. 次に要素技術について個別に解説する.

2.1 カンチレバー

タッピングモードでは、試料の表面形状はカンチレバーの振動振幅の変化として検出されるため、探針は1ピクセルで最低1回は試料を叩かなければいけない. また、振幅変化の速い応答を得るためには、カンチレバーは高い周波数で振動している必要がある. つまり、高い機械的共振周波数をもつカンチレバーが必要となる. 他方、探針が試料を叩く力を小さくするにはカンチレバーはできるだけ柔らかくしなければならない. 柔らかいカンチレバーでは Q 値も低くなることから、振幅変化の過渡応答時間も短くなる. これらの要求を満たすためには、カンチレバーの形状は必然的に小さくならざるを得ない. 高速 AFM 用カンチレバーはオリンパス(株)により製造、販売されており、長さ7~10 μm 、幅2 μm 、厚さ90~110 nm と通常のカンチレバーの1/10程度のサイズである. このカンチレバーのばね定数は0.1~0.2 N/m、溶液中での共振周波数は600 kHz~1.2 MHz、 Q 値は2~3程度である(図1(a)).

小さなカンチレバーは高速化だけでなく、振幅検出感度の点でも有利である. カンチレバーの熱揺らぎの大きさは、ばね定数と温度だけに依存するので、高い共振周波数をもつカンチレバーでは熱ノイズ密度が小さくなる. タッピングモードでは共振周波数の周りで、最大でフィードバック帯域程度の周波数帯域の信号のみを検出するので、熱ノイズの影響を受けにくい. また、光テコでは反射光の角度変化を検出しており、その感度は $\Delta\theta/\Delta z = 3/2L$ で与えられる. ここで、 L はカンチレバーの長さ、 Δz と $\Delta\theta$ はカンチレバー自由端での変位と角度である. このため、微小カンチレバーの使用は光テコの検出感度の点でも有利である.

通常 AFM カンチレバーは Si あるいは Si_3N_4 結晶の異方性エッチングにより作製されるので、探針の先端は原理的には原子スケールまで先鋭化することもできる. 他方、高速 AFM 用カンチレバーは Si_3N_4 の成膜プロセスにより作製されるため、先端は曲率25~100 nm のくちばし状で、そのままでは AFM 観察に十分な分解能を得ることは難しい. 走査型電子顕微鏡チャンバー内にフェノールのガスを導入し、電子線の1点照射による EBD (Electron

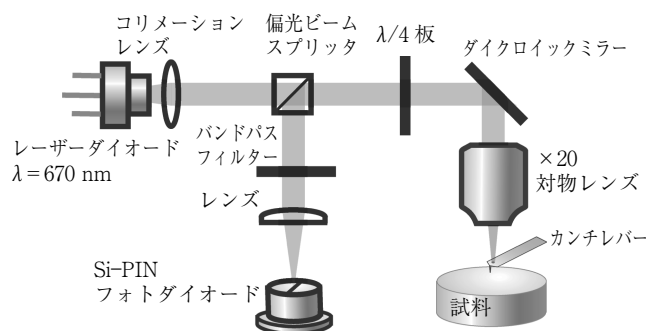


図2 高速 AFM の光テコ光学系の概略図

Beam Deposition) 法⁶⁾で長さ約1 μm のコーン状アモルファスカーボンを形成している. その後、アルゴン雰囲気中でプラズマエッチングを行うことで先端曲率半径が4 nm 以下の先鋭な探針が得られる³⁾.

2.2 変位検出システム

カンチレバーの振幅は光テコ法で検出されるが、高速 AFM で使用するカンチレバーのサイズは前述したように通常のカンチレバーに比べてかなり小さい. 振幅を感度よく検出するためには、カンチレバー背面に照射されるレーザー光が漏れないよう、スポットサイズを回折限界程度まで絞る必要がある. そのため高 NA の対物レンズ(倍率×20, NA 0.45)を使用しており、通常光テコ AFM のようにカンチレバー背面からの反射光を外に導いてフォトダイオードに入射させることは困難である.

カンチレバー背面で反射された赤色レーザー光は対物レンズにより平行光に戻され、 $\lambda/4$ 板と偏光ビームスプリッターにより入射光と分離され、反射光のみがバンドパスフィルター、集光レンズを通った後、2分割フォトダイオードに入る(図2)²⁾. 広帯域な変位検出を行うために、受光素子には高速 PIN ダイオードが使われており、プリアンプと2分割フォトダイオードの光量差の演算回路を通した後の動作帯域は20 MHz 程度である.

2.3 高速振幅検出器

高速イメージングにはカンチレバーの振幅変化を振動の1周期ごとに検出することが理想的である. ところが通常タッピングモード AFM でよく使用されるロックインアンプや RMS-DC コンバーターでは高速イメージングに必要な応答速度が得られない. われわれはサンプル・ホールド(S/H)法²⁾、あるいは、フーリエ法⁷⁾で高速な振幅計測を行っている. S/H 法ではカンチレバーのサイン波振動のピーク値とボトム値の電圧をサンプル・ホールドし、その差を振幅として検出している. S/H のタイミングは振動信号自身からコンパレータとマルチバイブレータによりトリガ信号を生成する. もしくは圧電素子の励振信号に同期した2chの発振器出力からも作られる. 後者の方法では、カンチレバーの振幅だけでなく励振信号に対する位相シフトにも出力は影響される³⁾. この方法は振幅変化を振動の半周期ごとに検出する最速の方法であるが、熱

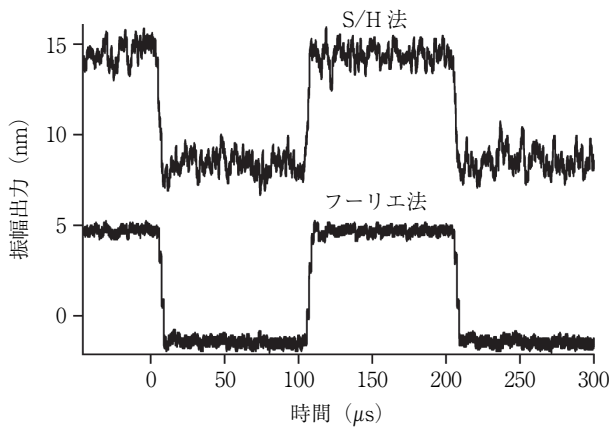


図3 Z ピエゾに矩形波信号を加えて、試料を上下に移動させたときの S/H 法とフーリエ法で計測されたカンチレバーの振動振幅変化

ノイズを含んだカンチレバーの振動振幅をそのままサンプリングするので、特に小振幅での計測では S/N が悪くなる (図 3)。一方、フーリエ法では発振器に同期した基本波成分に対してカンチレバーの振動信号のフーリエサイン係数 A およびコサイン係数 B を計算し、 $(A^2+B^2)^{1/2}$ を出力する。フーリエ法では、1 周期の間信号を積算するので振動周期より高い周波数のノイズが平滑化されて S/N が改善される (図 3)。この計算を FPGA によって高速デジタル演算することで 1 周期ごとの振幅変化を低ノイズで計測できる。さらに、 $\arctan(A/B)$ を計算することで振動の位相変化も検出できる。

2.4 高速スキャナー

高速スキャナーにはいくつかの性能 (高い機械的共振周波数、低周波数領域での少ない振動ピーク、十分な変位量、XY 軸間の小さな干渉、小さい Q 値) が要求される。これらの性能を満たすために開発した技術を述べる。

2.4.1 スキャナーの構造

スキャナーを 3 軸方向に高速移動させると、構造に由来する機械的共振周波数で容易に振動が起こる。これを防ぐためにはできるだけコンパクトにかつ機械的接合部が少ない構造にしなければならない。このために、 piezo 素子を除くすべての部分を一体加工している。また、材料としては硬くて軽いジュラルミンを使用している。XY 軸間のクロストークをできるだけ小さくするために、XY 駆動の変位方向に柔らかく、変位に直角な方向に硬いフレクシャー方式を採用している (図 4 (a))²⁾。Y 駆動用 piezo 素子は固定部と板バネの間に挿入し、X 駆動用 piezo 素子は 2 つの板バネの間に挿入して接着剤で固定している。X ピエゾの両端の質量に大きな差があると、共振周波数が低下するとともに不要な振動を生じるので、両端の質量が等しくなるようにバランス質量で調整している (図 4 (b))。

XYZ 駆動で使用している piezo 素子の共振周波数と最大変位量 (100 V 印加時) は次のようになっている (いずれもスキャナーに組み込んだ条件で計測した実測値)。Z :

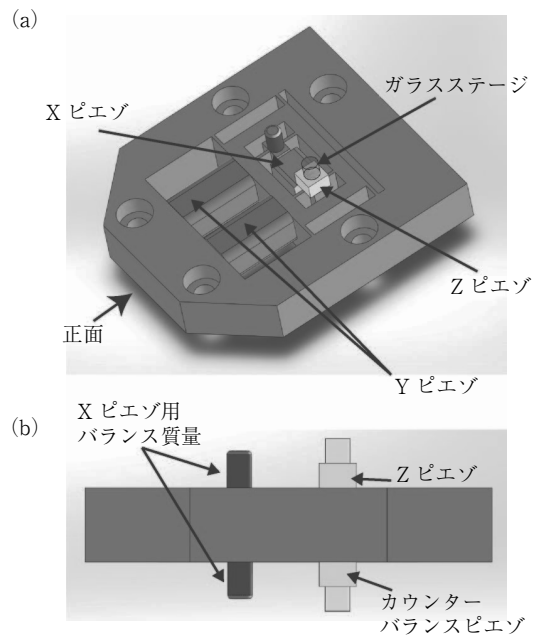


図4 (a) 高速スキャナーの 3D モデル図。 (b) 正面側から見た図

共振周波数 190 kHz, 最大変位量 $1.5 \mu\text{m}$, X : 共振周波数 60 kHz, 最大変位量 $1.2 \mu\text{m}$, Y : 共振周波数 20 kHz, 最大変位量 $3.5 \mu\text{m}$ 。

2.4.2 Z 駆動とカウンターバランス

Z piezo 素子には試料ステージとして円柱状ガラスステージ (直径 1.5 mm , 高さ 2 mm) が接着剤で貼り付けられている。試料基板にマイカを使用することが多いが、その場合には円柱ガラスにマイカディスクを貼り付けて使用する。Z piezo の急激な伸縮により支持部へは大きな激力が働き低周波数での振動を起こすため、この激力を緩和するようカウンターバランス法を導入した。Z piezo 素子が取り付けられた支持部材の反対面にもガラスステージを接着した同等の piezo 素子を貼りつけ、2 つの piezo 素子が支持部を挟んで逆方向に変位するようにする (図 4 (b))。これにより Z 駆動に起因するスキャナーの低周波数振動を抑制することができた²⁾。

2.4.3 Z 駆動のアクティブダンピング

piezo 素子を高速に駆動しようとするとき、機械的共振周波数で大きく振動するとともに位相も大きく遅延する。フィードバックループにより Z piezo を制御するとき、ゲインが 1 を超え、かつ位相が 180° 以上遅延すると発振条件を満たし制御不能となる。これを防ぐために、piezo 素子のアクティブダンピングを開発した⁸⁾。piezo 素子の移動速度に比例した信号を駆動信号に加えることにより共振ピークを抑え、実効 Q 値を下げることができるが、実際上 piezo 素子の変位をモニターすることは困難である。そこで、Z piezo 素子と同じ周波数特性をもつ LRC 回路を疑似 piezo として利用し、LRC 回路の微分成分 (速度) を駆動信号に加えてダンピングを行っている (図 5)。

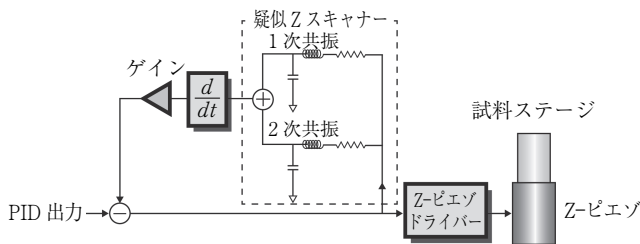


図5 疑似スキャナーを利用したZピエゾのアクティブダンピングシステムの構成

2.4.4 X走査のダンピング

2次元ラスタ走査のためにX方向のピエゾ素子には三角波信号が印加されるが、三角波の折り返し点には高周波信号が含まれるためにピエゾ素子の振動を励起する。X駆動用のピエゾ素子の共振周波数の周波数特性はあらかじめ変位計で計測できるので、三角波信号のフーリエ変換 $F(\omega)$ をピエゾ素子の周波数特性の逆伝達関数 $G(\omega)$ をもつ周波数フィルターで処理した信号 $F(\omega) \cdot G(\omega)$ を求める。これを逆フーリエ変換した信号はピエゾ素子の振動や位相遅れを補償するようになっている(図6)³⁾。逆フーリエ信号に含まれる無限級数は、最初の10項程度を取れば十分で、走査領域に対して線形な信号が得られる。

一方、Y方向の走査にはのこぎり波信号が使われるが、Y方向の走査速度はX走査に比べると二ケタ近く遅いので、共振周波数が低くても大きな振動は生じない。

2.5 ダイナミックPID制御

探針が試料をたたく力を弱くするにはカンチレバーの振動振幅をできるだけ自由振動振幅に近い値でフィードバック制御しなければならない。しかし、そのような状態では試料の急な下り勾配で探針は試料から完全に離れ、再び試料表面に接触するまでに遅れが生じる。なぜなら、飽和エラー信号は非常に小さく、その小さい信号に基づいてPID制御回路から出力される信号も小さいからである。結果として得られるAFM像は、表面形状のX走査方向に尾を引いたような画像になってしまう。この現象はパラシューティングと呼ばれ、フィードバック帯域を下げる大きな要因である³⁾。パラシューティング時間を短縮するために、ダイナミックPID制御法を開発した⁹⁾。具体的には、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を越えたときに偽エラー信号を真のエラー信号に加算することにより、大きなフィードバック信号を出力させ、探針が試料表面から完全に離れるのを回避する。これにより、振幅目標値を自由振動の95%程度に設定しても、パラシューティングは起こらず、探針が試料に軽く接触する状態を維持して高速イメージングが可能になった。

2.6 ドリフト補償制御

カンチレバーを励振させるためにカンチレバーホルダーに取り付けたピエゾ素子を振動させる。ピエゾの振動は周囲の機械部の振動を引き起こして水中を伝わり、最終的に

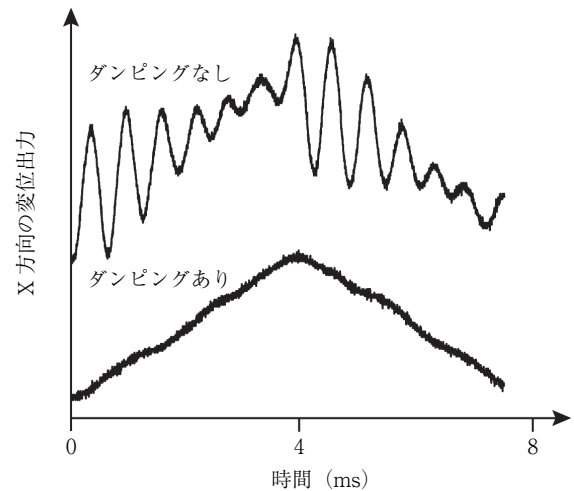


図6 フィードフォワードダンピングが有るときと無いときの試料ステージのX方向変位。Xピエゾに三角波を印加している(大型のスキャナーの場合でダンピング効果を例示)。

カンチレバーを振動させる。水の境界形状の変化やピエゾの長時間の駆動による発熱が励振効率の経時変化、すなわちドリフトを引き起こす。カンチレバーの振幅が励振効率のドリフトにより減少すると、PID制御は探針が試料に強く接触したものとみなし、試料ステージを探針から引き離そうとする。その結果、探針は試料からますます遠ざかることになり、ついには完全に離れてしまう。カンチレバーの自由振動振幅とセットポイントの差はわずかに0.1~0.5 nm程度であるので、小さなドリフトでも問題となる。自由振動振幅を知るには探針を試料から引き離さなければならないが、走査中にそれはできない。この問題を解決するために、カンチレバーの2次共振振幅を利用したドリフト補償法を開発した⁹⁾。共振周波数の2倍波は探針と試料との接触により生じ、その振幅はわずかであるが接触に敏感である。ロックインアンプで2倍波の振幅を計測し、時定数の遅い(試料の凹凸による振幅の変化が無視できる程度に遅い)積分フィードバックを用いて2倍波の振幅が一定になるように励振ピエゾの駆動電圧を制御する。これにより自由振動振幅は一定に保たれ、比較的長時間の観察でもAFM像の画質を維持することができる。

3. タンパク質の機能動態観察

上で述べたさまざまな要素技術開発を経て、高速AFMはタンパク質の一分子動態をリアルタイムに観察できる性能に達し、アクチン線維の上を歩行運動するミオシンV¹⁰⁾、光に応答するバクテリオロドプシン¹¹⁾、回転軸のないF₁-ATPaseの構造変化の回転伝播¹²⁾、セルロースを分解しながら一方方向運動するセルラーゼ¹³⁾などの動態が観察された。最も代用的な観察例としてミオシンVの歩行運動の観察結果について簡単に述べる。

ミオシンVは細胞内で物質輸送を担うモータータンパク質で、レールであるアクチン線維に沿って長距離にわたつ

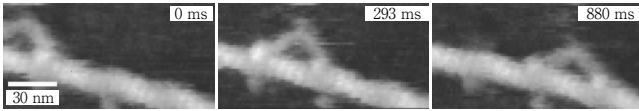


図7 ミオシン V がアクチン線維に沿って一方向運動している様子を捉えた高速 AFM 像

て直線運動することが知られている。ミオシン V は 2 本の等価な脚状の構造をもち、これまでの研究からミオシン V は ATP を加水分解しながら 2 本の脚を交互に振り出して約 36 nm ステップで前進運動すると考えられている。アクチン線維を基板に固定し、ミオシン V が観察溶液中に多数漂っている状態で、ATP 存在下で高速 AFM 観察したところ、ミオシン V が約 36 nm のステップで一方向に連続的に運動する様子を鮮明に捉えることができた (図 7)。¹⁰⁾ また、後ろ脚がアクチンから離れた直後の前脚の回転、それによる後ろ脚の前方への移動とアクチンへの結合といった一連の過程や、ADP の放出に伴う前脚の屈曲など詳細な情報が得られた。

4. む す び

本稿では、高速 AFM の実現に不可欠な要素技術について解説した。現在の最高イメージング速度は 40~80 ms/frame で、これはピエゾ素子とカンチレバーの共振周波数で律速されほぼ限界にきている。さらなる高速化には伸び係数の大きな圧電体やカンチレバー用の新しい材質の開発が必須である。ミオシン V の観察例で示したように、高速 AFM によりこれまで見ることはできなかった世界を見ることが可能になった。高速 AFM が与える映像は、これまでさまざまな計測手法を駆使して明らかにされてきた事実や仮説に関して一目瞭然の視覚的証拠を与えるばかりでなく、予想もしていなかった現象をも示すことから、生命科学分野に限らず高速 AFM の活躍の場はますます増えるものと期待される。

参 考 文 献

1) B. Drake et al.: Imaging Crystals, Polymers, and Processes in Water with the Atomic Force Microscope, *Science*, **243** (1989) 1586.

2) T. Ando et al.: A High-speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 12468.
 3) T. Ando et al.: High-speed Atomic Force Microscopy for Nano-visualization of Dynamic Biomolecular Processes, *Prog. Sur. Sci.*, **83** (2008) 337.
 4) Q. Zhong et al.: Fractured Polymer/silica Fiber Surface Studied by Tapping Mode Atomic Force Microscopy, *Surf. Sci. Lett.*, **290** (1993) L688.
 5) T. Ando: High-speed Atomic Force Microscopy Coming of Age, *Nanotechnology*, **23** (2012) 062001.
 6) M. Wendel et al.: Sharpened Electron Beam Deposited Tips for High Resolution Atomic Force Microscope Lithography and Imaging, *Appl. Phys. Lett.*, **67** (1995) 3732.
 7) J. Kokavecz et al.: Novel Amplitude and Frequency Demodulation Algorithm for a Virtual Dynamic Atomic Force Microscope, *Nanotechnology*, **17** (2006) S173.
 8) N. Kodera et al.: Active Damping of the Scanner for High-speed Atomic Force Microscopy, *Rev. Sci. Instrum.*, **76** (2005) 053708.
 9) N. Kodera et al.: Dynamic Proportional-integral-differential Controller for High-speed Atomic Force Microscopy, *Rev. Sci. Instrum.*, **77** (2006) 083704.
 10) N. Kodera et al.: Video Imaging of Walking Myosin V by High-speed Atomic Force Microscopy, *Nature*, **468** (2010) 72.
 11) M. Shibata et al.: High-speed Atomic Force Microscopy Shows Dynamic Molecular Processes in Photo-activated Bacteriorhodopsin, *Nat. Nanotechnol.*, **5** (2010) 208.
 12) T. Uchihashi et al.: High-speed Atomic Force Microscopy Reveals Rotary Catalysis of Rotorless F₁-ATPase, *Science*, **333** (2011) 755.
 13) K. Igarashi et al.: Traffic Jams Reduce Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface, *Science*, **333** (2011) 1279.



内橋貴之

金沢大学理工研究域数物科学系准教授。1998年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了(工博)。金沢大学自然科学研究科助手を経て2006年より現職。研究内容は高速 AFM の開発とバイオ応用の研究。



安藤敏夫

金沢大学理工研究域数物科学系教授。1980年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了(理博)。UC San Francisco 博士研究員・助手などを経て96年より現職。研究内容はモータータンパク質、高速 AFM の開発とバイオ応用の研究。