

高速バイオ原子間力顕微鏡

研究者：安藤 敏夫 金沢大学 理工研究域
バイオ AFM 先端研究センター 特任教授
開発企業：岡田 孝夫 株式会社生体分子計測研究所 代表取締役
(推薦者：古市 泰宏 北陸ライフサイエンスクラスター 顧問)



安藤 敏夫氏



岡田 孝夫氏

1. 技術の背景

細く尖った探針と試料表面との相互作用を検出することにより、試料表面形状を高解像で可視化する原子間力顕微鏡（AFM: Atomic Force Microscopy）は1986年に誕生した。真空中、大気中に限らず液中にある試料も観察できるため、生命科学を含む広い分野で利用されている。しかし、試料表面の各点毎に高さ情報を得る手法のため、多くのピクセルから成る1画像を撮るのに分のオーダーの時間を要する。それ故、速く動く試料を観察できない。それに対し本技術の高速AFMは従来のAFMより1,000倍ほど速く、液中のナノメータ世界で起こる動的な現象の直接観察を世界で初めて可能にした。特にタンパク質分子の観察に利用され、機能しているときの分子動態映像からそのタンパク質が機能する仕組みを詳細に理解できることが実証されている。

2. 技術の概要

図1に通常のAFMの装置構成を示す。カンチレバーとは片持ち梁のことで、その自由端に探針が付いている。通常、カンチレバーをその共振周波数で振動させ、探針が試料と接触することによる振幅の減少を計測する。

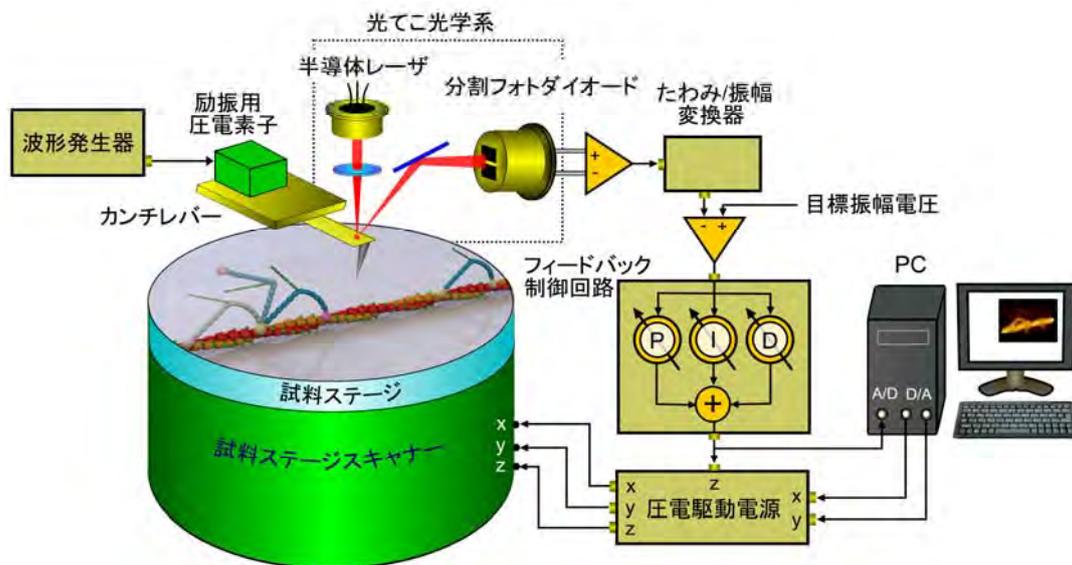


図 1 一般的な AFM の装置構成

カンチレバーにレーザー光を照射し、その反射光を分割フォトダイオードに導く。それぞれのダイオードからの出力電圧の差がカンチレバーの振幅値として計測される。その差出力と目標振幅に対応する電圧値との差（エラー信号）をフィードバック回路に入力する。フィードバック回路の出力を用いて、エラーがゼロに近づくように試料ステージスキャナーを Z 方向に走査する。試料ステージを XY 方向に走査しつつこの一連の操作を行うと、試料ステージは試料表面をなぞるように動くことになる。従って、パソコンを用いて、フィードバック回路の出力を XY 各点にプロットすると試料表面形状が再現される。空間分解能は針の形状と試料に依存するが、タンパク質分子が試料の場合、XY 方向で 1-3 ナノメートル、Z 方向で 0.1 ナノメートル程度の空間分解能が得られる。

液中でこの空間分解能を有する顕微鏡は他にはなく、AFM は非常にユニークである。しかし、イメージングに時間がかかるため、動的な現象を捉えられない。AFM のイメージング速度を飛躍的に向上させ、タンパク質分子や細胞といった生物試料で起こる動的現象を観察可能とするには、以下の 3 つの課題を達成しなければならない。(1) AFM に含まれるほとんどすべてのデバイス（特に機械的デバイスであるカンチレバーとスキャナー）の応答速度を上げる、(2) スキャナーを高速に走査したときに生ずる望ましくない振動を抑制する、(3) 高速走査と低侵襲性を両立させる。図 2 に開発し

た主な技術を示す。機械的デバイスの応答速度を上げるには、共振周波数を上げるとともに、共振の鋭さを表すQ値を小さくしなければならない。カンチレバーについては、小型軽量化によ

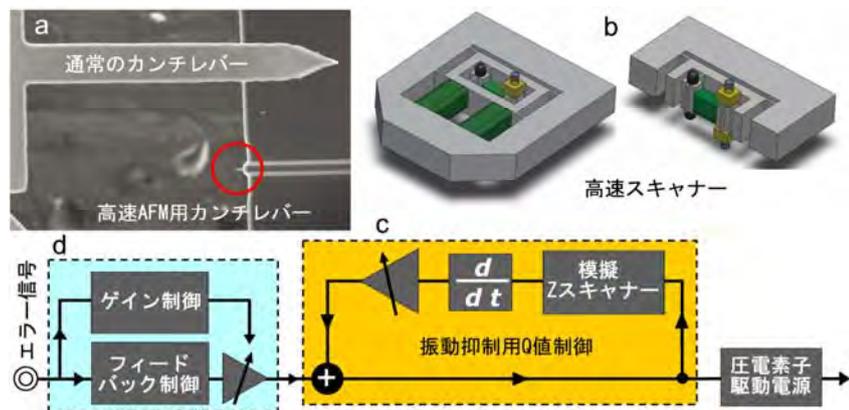


図2 高速 AFM を実現した要素技術。(a)微小カンチレバー（黒線の円内）、(b)高速スキャナー、(c)Zスキャナーの振動を抑制するQ値制御回路、(d)イメージング中にゲインを自動チューニングできるフィードバック制御回路。

るだけでばね定数を大きくせず高速応答が得られた。スキャナーについては、小型軽量化だけでは限界があるため、スキャナーの周波数応答を模擬する回路を利用したQ値制御回路を新たに考案し、高速応答を実現した。振動抑制は、このQ値制御回路に加え、走査による重心移動によって生ずる激力を中和させる工夫や、振動を起こしにくい駆動信号の考案などにより実現した。低侵襲性は生物試料にとって非常に重要だが、高速性と低侵襲性の両立は極めて難しい課題であった。探針を試料に軽く接触させるためには、カンチレバーの自由振動振幅を小さくするとともに、目標とする振幅値を自由振動振幅に近づけなければならない。しかし、この条件では、試料の降り勾配のところで探針は試料から完全に離れてしまう。一旦離れると再着地までに時間がかかるが、その間イメージング不能となる。この深刻な問題は、試料の降り勾配領域を走査中にフィードバック制御回路のゲインを自動的にチューニングする方法の考案により解決された。こうして、1993年に研究に着手してから15年目の2008年に、生物試料の機能を乱さずに1画像を最短50



図3 当社が製品化した高速 AFM 装置

ミリ秒で撮れる高速 AFM が実現した。2011 年に当社は高速 AFM の製品化に成功し（図 3）、高速 AFM は現在世界的に利用され始めている

3. 効果

タンパク質の構造は X 線結晶構造解析や電子顕微鏡で調べられてきたが、静止構造しか分からない。一方、タンパク質が実際に機能しているときの動的な振る舞いは、タンパク質分子に付けた光学プローブの動的振る舞いを通して間接的に調べられてきた。つまり、タンパク質分子の構造と動的挙動を同時に観察できない。高速 AFM の誕生によりこの技術的限界が破られた結果、タンパク質が働く仕組みの詳細理解が可能になった。実際、図 4a-c に示すようなタンパク質の機能動態の高速 AFM 像から、従来手法では垣間見ることさえできなかった重要な事実が見出され、これらのタンパク質分子が働く仕組みを詳細に解明できることが実証された。現在では、図 4d に示すように、分子よりも遥かに大きい生細胞で起こる動的現象を光学顕微鏡よりも遥かに高い解像度で観察することも可能になっており、高速 AFM の生命科学への広範な応用研究が世界的に進められつつある。

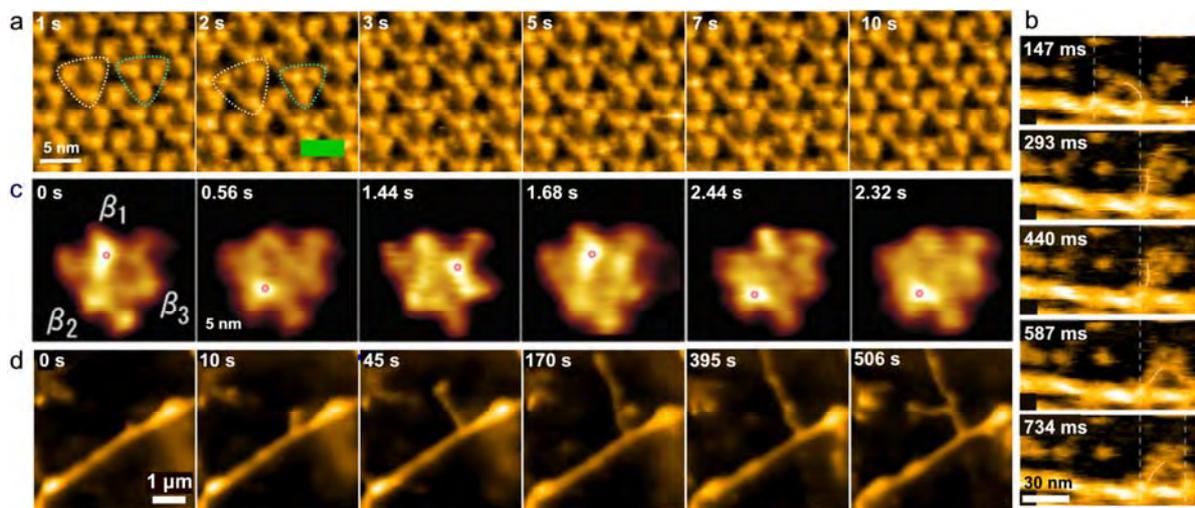


図 4 高速 AFM が捉えたタンパク質分子の機能動態（a-c）と生きた神経細胞の動態。(a)光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシンの光応答（2s のフレームで光照射）、(b)アクチン線維上を歩くミオシン V、(c)回転子である γ サブユニットを取り去った F_1 -ATPase で起こる構造変化の回転伝搬、(d)海馬ニューロンで起こる樹状突起の生成過程。

液中のナノメータ世界で起こる動的現象は生命現象に限らない。腐食、洗浄、ナノバブル、電池に代表される電気化学反応など多く存在するため、高速 AFM は様々な産業分野でも今後利用されていくものと期待される。