

Symposium (Oral) | Symposium : Technological Advances and Future Prospects in Measurement of Organic and Biological Systems by Atomic Force Microscopy

📅 Thu. Sep 19, 2024 1:30 PM - 5:45 PM JST | Thu. Sep 19, 2024 4:30 AM - 8:45 AM UTC 🏛️ A24 (TOKI MESSE 2F)

[19p-A24-1~6] Technological Advances and Future Prospects in Measurement of Organic and Biological Systems by Atomic Force Microscopy

Takashi Ichii(Kyoto Univ.), Tomohiro Hayashi(Tokyo Tech), Yoichi Otsuka(Osaka Univ.), Hitoshi Asakawa(Kanazawa Univ.)

1:30 PM - 2:25 PM JST | 4:30 AM - 5:25 AM UTC

[19p-A24-1]

Atomic Force Microscopy: Present status and future prospect in organic, bio-material fields

○Hirofumi Yamada^{1,2,3} (1.Kyoto Technosci. Center, 2.Ryukoku Univ., 3.Kyoto Univ.)

2:25 PM - 3:15 PM JST | 5:25 AM - 6:15 AM UTC

[19p-A24-2]

Advances in SPM technology and the observation of organic and biological samples

○Masatsugu Shigeno¹ (1.Hitachi High-Tech)

3:30 PM - 4:00 PM JST | 6:30 AM - 7:00 AM UTC

[19p-A24-3]

Surface structures, properties, and functions of organic and biomolecules investigated by liquid FM-AFM

○Kei Kobayashi¹ (1.Kyoto Univ.)

4:00 PM - 4:30 PM JST | 7:00 AM - 7:30 AM UTC

[19p-A24-4]

3D-AFM Analysis of Organic-Molecular or Biological Systems

○Takeshi Fukuma¹ (1.Kanazawa Univ.)

4:45 PM - 5:15 PM JST | 7:45 AM - 8:15 AM UTC

[19p-A24-5]

High-Speed Atomic Force Microscopy: Technological Advancements and Applications

○Takayuki Uchihashi^{1,2} (1.Nagoya Univ., 2.ExCELLS)

5:15 PM - 5:45 PM JST | 8:15 AM - 8:45 AM UTC

[19p-A24-6]

Advances in polymer nanomechanics using atomic force microscopy

○Ken Nakajima¹ (1.Tokyo Tech.)

原子間力顕微鏡：有機・バイオ計測の現状と今後の展開

Atomic Force Microscopy: Present status and future prospect in organic, bio-material fields

京都技術科学センター¹, 龍谷大², 京都大³, °山田 啓文^{1,2,3}

Kyoto Technosci. Center¹, Ryukoku Univ.², Kyoto Univ.³, °Hirofumi Yamada^{1,2,3}

E-mail: h-yamada@kuee.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

「触診」は、医療診断の原点とも言うべきもっとも原初的な探索法であるが、この手法を現代科学技術の粋を集めて顕微法として発展させたものが「原子間力顕微鏡」だと言っても全く過言ではないだろう。触り方も、当初は極めて単純な接触法から、軽く触れる間欠接触（タッピング）法に、さらには、超能力かと思う非接触法までに至ることになり、今や、原子・分子レベルで生体試料を観察しても不思議でなくなったことに返って感慨を覚える。本講演では、有機・生体分子試料の AFM 観察・計測の現状を述べるとともに、その課題と今後の展開について議論したい。

2. AFM イメージング法

AFM では、試料表面の各点 (x, y) で得られた力 (F) 、あるいは設定した力が得られる位置 (z) のマッピング像を取得する計測法である。非破壊での高感度の力検出を可能とするために、単純な接触法は、低雑音・高感度な振幅変調 AFM (AM-AFM) や周波数変調 AFM (FM-AFM) となることが一般的になった。この流れは、通信伝送の分野で（従って計測分野でも）、ベースバンド伝送が、AM、FM 伝送に移行したことに対応しており、雑音解析の点で非常に興味深い。現在の装置の多くは、理論感度である熱雑音レベルに迫る性能を有しており、安定な高分解能イメージングが実現し、イメージング時間の高速化も図られている[1-3]。

3. フォース分光法 (Force Spectroscopy)

イメージングにおいては、特定の z での F が使用されたが、探針-試料間相互作用力には、試料の重要な物性・機能情報が含まれることから、フォースカーブ $F(z)$ の計測がフォース分光法として発展する。特に、生体分子間の特異結合の解析への応用は動的分光法 (DFS) へと展開し、高分解能な空間マッピング法へと発展することになる。また、試料の粘弾性分布の評価法である Force Volume 法も同時期に発展した。現在、フォースマッピング法にはいくつか異なる方法があり、さまざまな応用が進んでいる。講演において詳細を解説したい。

4. おわりに

現在、2 でも触れたように、装置改善が進んだ結果、測定対象・条件によっては、今や必ずしも共振法は必須ではないように思われるが、高感度化のための変調法は依然有効であり、詳細な解析・議論が待たれる。また、今後の課題である、液中サブ分子分解能イメージング、タンパク質ドメイン電荷分布の可視化、NC-AFM における安定な探針などについても新たな展開を期待したい。

Reference

- [1] “Noncontact Atomic Force Microscopy Vol. 3” eds. S. Morita, F. J. Giessibl et al., Springer (2015.6).
- [2] “走査型プローブ顕微鏡入門” 秋永広幸監修, 秦信宏編, オーム社 (2013.8).
- [3] “Applied Scanning Probe Methods VI”, eds. B. Bhushan, S. Kawata, Springer (2016.7).

S P M技術の進歩と有機・バイオ試料観察

Advances in SPM technology and the observation of organic and biological samples

日立ハイテク ○繁野 雅次,

Hitachi High-Tech Corporation, ○Masatsugu Shigeno

E-mail: masatsugu.shigeno.kk@hitachi-hightech.com

<はじめに>

有機・バイオの世界をひも解く時、その第一歩は見ることよりはじまります。機能と形態の間には必然的な関係があり、研究者は見えるもの（見ることができる事象）より考え、観たいもの（観察したいイメージ）を推測し、見ることにより実証します。良く使用されていた光学顕微鏡、電子顕微鏡など種々の観察装置に加え、1980年代に発明されたSPM（走査型プローブ顕微鏡）は、新しい観察・分析方法を提供し、多様な現象を捉えることを可能としてきました。

<有機・バイオ観察でのSPMの特徴>

- ・電子顕微鏡では観察が難しい軽元素を含む有機・バイオ試料の直接観察
- ・溶液中、ガス中などでの、活性な状態でのその場観察
- ・最表面の高分解能形状と物性の同時観察
- ・ナノ領域でのマニピュレーション

など、これまでの顕微鏡にはなかった特徴を持っています。

<有機・バイオ観察での課題>

当初のSPMは、高分解能観察に特化した装置が多く、広範囲を低ダメージかつ高速で観察するのが不得意でした。コンタクトモードのAFMで、ソフトな有機・バイオ試料を観察すると、ダメージの発生や探針への汚れの付着などの課題もありました。レバーを共振状態にして、ノンコンタクトやサイクリックコンタクトによる動作、測定点のみで接近する間欠的な測定手法が開発され、上記課題を乗り越え応用範囲が拡大してきました。試料の原子・分子の種類を検出するために、IRやラマンとの同時測定や、同一箇所の座標情報を共有した分析装置との組み合わせへの応用も進み、新しい世界を見せてくれるように進歩してきました。

<SPMの可能性>

SPMは、微小領域を走査し形状と物性を直接検出するミクロな指を、私たちに提供してくれます。このような指があったらどんな事ができるか、今までに考えも及ばなかった様々な測定を創造する力が、今後のSPMの発展に最も重要だと思っています。今までSPM測定に関係なかった分野であっても、ナノテクノロジー技術の発展によりその恩恵を受ける日がやってくるでしょう。原子・分子スケールでの三次元形態観察に加え、色々な物性を同時に測定する技術の必要性は、ますます高まると信じています。

「見えるにあらず、観たい思い、視るを成し遂げる」観察したい熱い思いを胸に・・・

液中 FM-AFM による有機・生体分子の構造・物性・機能計測

Surface structures, properties, and functions of organic and biomolecules

investigated by liquid FM-AFM

京大工¹, [○]小林 圭¹

Kyoto Univ.¹, [○]Kei Kobayashi¹

E-mail: keicoba@iic.kyoto-u.ac.jp

周波数変調型原子間力顕微鏡 (Frequency-modulation atomic force microscopy: FM-AFM) は、振幅変調 (Amplitude Modulation: AM) 型のダイナミックモード AFM を真空中で用いる際に、カンチレバーの機械的 Q 値が高くなり測定帯域が大きく制限されてしまう問題を克服するために開発された技術であり、カンチレバーを常に共振周波数で振動させてカンチレバーの共振周波数のシフトから相互作用力を検出する手法である[1]。われわれは、カンチレバーの Q 値が極端に低下する液中であっても FM-AFM 動作させることができることを示し[2]、光てこ変位検出系のノイズ低減等の要素技術開発を行い、原子・分子分解能を達成した[3,4]。

現在、液中 FM-AFM は有機分子や生体分子の高分解能観察[5,6]や生体分子間相互作用計測[7,8]に利用されているほか、観察液中での観察液と試料表面との界面（固液界面）の水和・溶媒和構造計測[9,10]にも応用されている。本講演では、FM-AFM の原理と開発の歴史、DNA・タンパク質・脂質膜等の高分解能観察、水和構造計測、生体電荷分布や弾性率分布などの物性計測の事例を紹介するとともに、今後の展望について述べる。

1. T. R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne, and D. Rugar, *J. Appl. Phys.* **69**, 668 (1991).
2. K. Kobayashi, H. Yamada, and K. Matsushige, *Appl. Surf. Sci.* **188**, 430 (2002).
3. T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige, and H. Yamada, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 193108 (2005).
4. T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige, and H. Yamada, *Appl. Phys. Lett.* **87**, 034101 (2005).
5. H. Yamada, K. Kobayashi, T. Fukuma, Y. Hirata, T. Kajita, and K. Matsushige, *Appl. Phys. Express* **2**, 095007 (2009).
6. S. Ido, K. Kimura, N. Oyabu, K. Kobayashi, M. Tsukada, K. Matsushige, and H. Yamada, *ACS Nano* **7**, 1817 (2013).
7. S. Ido, H. Kimiya, K. Kobayashi, H. Kominami, K. Matsushige, and H. Yamada, *Nat. Mater.* **13**, 264 (2014).
8. H. Kominami, Y. Hirata, H. Yamada, and K. Kobayashi, *Nanoscale Adv.* **5**, 3862 (2023).
9. K. Kobayashi, N. Oyabu, K. Kimura, S. Ido, K. Suzuki, T. Imai, K. Tagami, M. Tsukada, and H. Yamada, *J. Chem. Phys.* **138**, 184704 (2013).
10. K. Umeda, L. Zivanovic, K. Kobayashi, J. Ritala, H. Kominami, P. Spijker, A. S. Foster, and H. Yamada, *Nat. Commun.* **8**, 2111 (2017).

有機分子・バイオシステムの液中3次元AFM解析

3D-AFM Analysis of Organic-Molecular or Biological Systems

金沢大学 NanoLSI¹ ○福間 剛士¹

WPI-NanoLSI, Kanazawa Univ.¹

E-mail: fukuma@staff.kanazawa-u.ac.jp

近年、固液界面で探針を3次元的に走査し、その間に探針に印加される力を記録する、3次元AFM (3D-AFM) 技術が開発され、固液界面の水和構造観察などに利用されている¹⁾。この計測では、探針を水和構造内に挿入する際に、その構造を部分的には破壊してしまう。しかし、探針を除去した際に、水分子が自己組織的に元の構造を構築するために、繰り返し探針を挿入・抜去し、本来の水和構造を強く反映した情報が得られる。逆に言えば、自己組織化能力のある3次元構造、すなわち3次元自己組織化構造 (3D-SOS) であれば、その内部を観察できる可能性がある。

我々は、この考えに基づき、近年様々な3D-SOSの観察に取り組んできた。例えば、脂質膜／水界面において熱揺動する脂質頭部の3次元密度分布や²⁾、サファイア表面における界面活性剤の3次元吸着構造³⁾などをサブナノスケールの分解能で可視化した。これらの計測では、計測対象の厚みが2 nm以下であったため、市販のAFM探針の先端に偶発的に存在するナノスケールの突起構造で3次元観察が可能であった。しかし、それ以上の厚みを持つ3D-SOSの観察には、その構造を大きく乱すことなく挿入できる、細長いニードル状の探針が必要である。

この考えに基づいて、我々はナノ内視鏡AFMを開発した。この技術では、あたかも細長い胃カメラを生きた人体に挿入して胃壁を観察するように、細長いニードル状のAFM探針を生きた細胞の内部に挿入し、細胞内のナノ構造・動態・力学物性を計測する。我々はこれまでに、細胞全体や、細胞核、アクチン繊維、細胞の裏打ち構造、接着斑などの3D-AFM観察に成功している。⁴⁾さらに、細胞核や接着斑表面の硬さ分布やその動的な変化も捉えることに成功している。

ナノ内視鏡AFMの開発は、適切なニードル探針さえ作ることができれば、たとえ厚さが数 μm に及ぶ3D-SOSであってもその内部をAFM観察できることを実証した。ただし、数nmの厚みを持つ界面構造と数 μm の厚みを持つ細胞の間には、数多くの3D-SOSが未だ観察できないまま残されている。特に、生命科学分野では、ほとんどの生命システムが生体分子の自己組織化で形成されており、その多くが3D-AFMの観察対象となり得る。我々は、FIB切削探針、電子線堆積探針、カーボンナノチューブ探針など、様々なサイズのニードル探針を作製し、それらの3D-SOSの3次元観察を目指した開発に取り組んでいる。

1) T. Fukuma, Y. Ueda, S. Yoshioka, and H. Asakawa, *Phys. Rev. Lett.* **104**, 016101 (2010).

2) H. Asakawa, S. Yoshioka, K. Nishimura, and T. Fukuma, *ACS Nano*. **6**, 9013 (2012).

3) T. Ikarashi, K. Nakayama, N. Nakajima, K. Miyata, K. Miyazawa, and T. Fukuma, *ACS Appl Mater Interfaces*. **14**, 44947 (2022).

4) M. Penedo, K. Miyazawa, N. Okano, H. Furusho, T. Ichikawa, S. Alam Mohammad, K. Miyata, C. Nakamura, and T. Fukuma, *Sci. Adv.* **7**, eabj4990 (2021).

高速原子間力顕微鏡の技術革新と応用展開

High-Speed Atomic Force Microscopy: Technological Advancements and Applications

名大理, ExCELLS 内橋 貴之

Nagoya Univ., ExCELLS, Takayuki Uchihashi

E-mail: uchihast@nagoya-u.jp

原子間力顕微鏡(AFM)を用いたダイナミクス観察は、AFM の発明直後の 1986 年から多くの試みが行われてきた。1989 年には、血液凝固因子であるフィブリノーゲンの重合過程が 10 秒の時間分解能で観察された例もある¹⁾。1990 年代にも、10 秒~1 分程度の時間分解能で DNA やタンパク質を観察した報告がいくつかあるが、この時間分解能で追跡できる溶液下のダイナミクス現象が限られていたことと、試料にダメージを与えずに非侵襲的に高速イメージングすることの技術的困難さから、応用分野はかなり限定的であった。

AFM の高速化に向けた要素技術開発は、スキャナーやカンチレバーを中心に世界中のグループで進められてきた。2001 年に金沢大学の安藤教授から報告された高速 AFM は、80 ms/frame という従来の AFM より圧倒的に速い時間分解能でのイメージングを達成し、タンパク質の構造を破壊しない非侵襲性を兼ね備えているという点で画期的であった²⁾。その後も非侵襲観察に向けた様々な技術改良が継続され、2008 年頃に現行性能の高速 AFM がほぼ確立した。以降、15 年近くにわたってタンパク質や核酸などの生体分子を対象としたダイナミクスイメージングに応用され、数々の成果が挙げられてきた^{3,4)}。近年ではユーザーも増加し、関連論文数は増加の一途をたどっている。

最近では、生体分子以外の人工高分子の動態観察にも高速 AFM が適用され始め、高分子分野への応用範囲が拡大している。また、試料の表面構造イメージングにとどまらず、プローブからの外力を利用した構造操作⁵⁾、局所力学特性の定量計測⁶⁾やマッピングも可能になってきている。さらに、高速 AFM の高フレームレート撮像性能を活用することで、局在化 AFM と呼ばれる超高解像イメージング技術への応用が可能となっている⁷⁾。局在化 AFM では、高速 AFM によって得られる大量の画像データを用いることで、単一分子の動態を超高解像度で可視化することができる。この手法は、生体分子の機能メカニズムの解明や、ナノスケールでの材料特性の評価など、幅広い分野での応用が期待されている。

本発表では、高速 AFM の生体分子応用の研究を紹介しつつ技術の進展について概説する。加えて、最近の合成分子のダイナミクス計測や機能拡張に関する開発動向についても述べる。

- 1) B. Drake, H. Hansma, D. Cannell, A. Weisenhorn, S. Gould, C. Quate, P. Hansma, T. Albrecht, and C. Prater, *Science* **243**, 1586 (2006).
- 2) T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, and A. Toda, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12468 (2001).
- 3) T. Ando, T. Uchihashi, S. Scheuring, *Chem. Rev.* **114**, 3120 (2014).
- 4) G. R. Heath, S. Scheuring, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **57**, 93 (2019).
- 5) T. Fukui, T. Uchihashi, N. Sasaki, H. Watanabe, M. Takeuchi, and K. Sugiyasu, *Angew. Chemie Int. Ed.* **57**, 15465 (2018).
- 6) C. Ganser and T. Uchihashi, *Nanoscale* **11**, 125 (2019).
- 7) G. R. Heath, E. Kots, J. L. Robertson, S. Lansky, G. Khelashvili, H. Weinstein, S. Scheuring, *Nature* **594**, 385 (2021).

原子間力顕微鏡を用いた高分子ナノメカニクスの進展

Advances in polymer nanomechanics using atomic force microscopy

東工大物質¹ ○中嶋 健¹

Tokyo Tech.¹ ○Ken Nakajima¹

E-mail: knakaji@mac.titech.ac.jp

原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたナノメカニクス¹ は、ナノスケールの分解能で静的および動的な弾性率や凝着エネルギーなどの像を得ることができ、高分子物理学のさまざまなトピックを調査するための強力なツールとなっている。本発表ではそのいくつかの事例を紹介する。

一つ目の事例として、圧縮ひずみ下にあるカーボンブラック (CB) 充填ゴムのナノ力学的挙動を可視化するために本手法を用いた。その結果、Fig. 1 に示すように、CB を充填したゴムは局所的に不均一な微視的変形を示すことがわかった²。また Fig. 2 の局所応力分布も不均一性を示し、圧縮時の応力は CB 粒子の近傍領域に集中していることがわかった。

二つ目の事例として、シリカナノ粒子を充填したアミン硬化エポキシ樹脂を対象にした研究では³、得られた弾性率と散逸エネルギー像から、厚さ 20 nm の界面エポキシ層の存在が証明され、この層は弾性率の低下と接着応答の弱さを示した。この柔らかい界面層を Halpin-Tsai モデルに組み込むことで、硬化したエポキシナノコンポジットの引張弾性率に及ぼすシリカ分率の影響についてもうまく説明することができる。

当日はその他の事例や、関係する ISO 標準化の最新動向についても紹介を行う予定である。

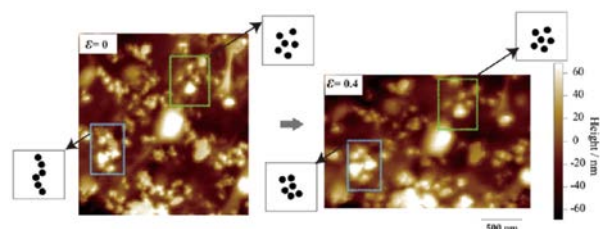


Fig. 1 In situ AFM height images of the same region at macroscopic compressive strains $\varepsilon = 0$ and 0.4.

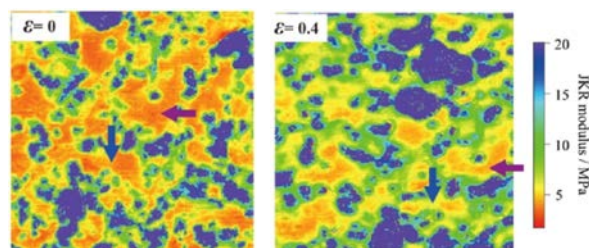


Fig. 2 In situ AFM modulus images of the same region at macroscopic compressive strains $\varepsilon = 0$ and 0.4.

1. Nakajima, K.; Ito, M.; Wang, D.; Liu, H.; Nguyen, H. K.; Liang, X.; Kumagai, A.; Fujinami, S.; *Microscopy* **2014**, 63, 193-207.
2. Liang, X.; Kojima, T.; Ito, M.; Amino, N.; Liu, H.; Koishi, M.; Nakajima, K.; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, 15, 12414-12422.
3. Nguyen, H. K.; Shunto, A.; Liang, X.; Yamamoto, S.; Tanaka, K.; Nakajima, K.; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, 14, 47213-47222.