1PA001

高速AFMの開発

○高井 英輔¹, 戸田 明敏², 安藤 敏夫¹(¹金沢大学・理・物理, ²オリンパス光学工業)

原子間力顕微鏡 (AFM) はナノメートルオーダーの高い空間分解能を持ち液中での生きた生体試料の観察が可能であるという特徴を持つ。しかしながら従来までの AFM は 1 フレームの画像化に速くても数秒の時間を要し、このため静止画像を得られるだけであった。液中の生きた試料を観察できるこの特徴を最大限に生かすためには静止画ではなく、連続的な動画として観察するべきである。本研究では画像化の速度を飛躍的に向上させ 1 フレームの画像化に 1/30 秒 (ビデオレート) を目標に走査の高速化を行った。AFM 画像を動画として取得することで生きている生体高分子の「動き」をリアルタイムに捉えることを目標にしている。

AFM の走査速度を決定している要因は、カンチレバーの応答速度 (共振周波数)、液中ダンピング、そしてピエゾの駆動速度 (共振周波数)、センサの応答速度、DAQ/AD 速度、フィードバック演算の速度がある。ビデオレートでの画像化を実現するためには 100 ドット四方の画素を取得する場合 1 ドットあたり 2 マイクロ秒程度の間にデータサンプリング、フィードバック駆動、ステージ移動の作業を行わなくてはならない。カンチレバー、ピエゾ駆動系、検出光学系、フィードバック系を大幅に改良した。カンチレバーは高速 AFM 専用のレバーを開発した。レバー部は従来のものに対して 1/10 以上短いレバー (短冊形: 長さ 15 μm 幅 5 μm 厚 0.1 μm) を作成した。柔らかさを維持したまま共振周波数が高くダンピングの小さい理想的なレバーを開発できた。1MHz という高い共振周波数を持つピエゾを利用し、かつ応答速度を高く維持するために被駆動部の質量の小さいコンパクトな高速スキャナーを製作した。また大幅に小さくなったカンチレバーで光で検出を行うための光学系を開発した。ピエゾのドライバは専用回路を製作し XY 走査の高速ドライブと同時に Z ピエゾへの高速アナログフィードバックを実現した。これまでに AFM 装置全体を組み上げ低速 (1 フレーム 1 秒) でのイメージングが行える段階に達し、現在は高速ビデオレート制御の組み込みを行っている。

今回の発表では開発した高速 AFM を紹介すると共に、高速走査によって得られた結果を報告する予定である。

Eisuke Takai, Akitoshi Toda, Toshio Ando : Development of a high-speed atomic force microscopy.

1PA003

近接場光学顕微鏡による λ DNA の観察

○村松 宏, 本間克則, 山本典孝, 十川久美子*, 嶋本伸雄*

(セイコーインスツルメンツ, *国立遺伝研)

新しく開発した AFM 制御方式の走査型近接場光学顕微鏡によって、蛍光染色した DNA の形状像、蛍光像の同時観察を行った。走査型近接場光学顕微鏡は、市販の倒立顕微鏡の上に近接場光学顕微鏡ユニットを装着したものである [1]。この近接場光学顕微鏡では、ダイナミック AFM モードで測定可能な、ペントタイプの光ファイバプローブを用いている。試料の DNA には、 λ DNA (48.5 kbp) を使い、塩基濃度 4.8 μM に対して、YOYO-1 濃度を 5 μM または 500 nM となるように調整し、 γ -APTES 処理したカバーガラス上に、滴下・乾燥させた。図 1 は、YOYO-1 濃度が 5 μM の試料について、3.5 $\times$ 3.5 μm^2 の領域を Axiophot 2 (488nm) を光源として観察した形状像と蛍光像である。DNA が束になっている部分に対応して、蛍光像における DNA 部分の蛍光強度は、整数倍を示し、形状像での DNA の断面積にも相関があることが認められた。これに対して、YOYO-1 濃度の薄い 500 nM の試料では、DNA 像内の蛍光強度は不均一であり、YOYO-1 が局在して DNA にインターカレートしていることが予想された。

[1] K. Homma, N. Yamamoto, K. Chinone and H. Muramatsu, *Technical Digest of NFO5* (1998.12) p.132.

[謝辞] 本研究の一部は、日本学術振興会の補助によって行われた。

H. Muramatsu, K. Homma, N. Yamamoto, K. Sakata-Sogawa*, N. Shimamoto*: Seiko Instruments, *National Institute of Genetics

図 1 (a)形状像 (b)蛍光像

1PA002

クライオ原子間力顕微鏡: 氷昇華技術の導入

○山本大輔、谷孝二、五藤俊明、神山勉 (名大・院・理)

原子間力顕微鏡は表面構造をナノスケールの空間分解能で解析できる装置で、生体試料への応用も広く行われている。しかし、従来の原子間力顕微鏡では、生体膜試料は非常に柔らかいために、プローブとの相互作用によって試料の元の構造が失われるという大きな問題があった。そこで我々は、-130℃以下の極低温下で生体試料を観察できるクライオ原子間力顕微鏡を開発してきた。極低温下では生体膜試料は硬くなるため、常温ではナニュートンの力で容易に構造が変化してしまう生体膜試料も数十ナニュートンという大きな力に耐えることができ、プローブからの圧力による変形が少なくなる。

今回我々は、試料温度を自在に制御できるクライオトランスファーホルダーを製作し、試料に付着した氷を大気圧冷却窒素ガス中で除去することを可能にした。生体膜試料表面に水分子が付着していると、細かい凹凸面がならされてしまい、高分解能測定が困難になると考えられるので、クライオ原子間力顕微鏡において氷昇華技術は不可欠である。クライオトランスファーホルダーを用いて、雲母基板に吸着させた紫膜 (高度好塩菌の細胞膜上に存在する膜貫通型蛋白質バクテリオロドプシンの二次元結晶) 試料の表面温度を -130℃ から -100℃ に上昇させ、試料に人為的に付着させた氷の粒が昇華するのを観察することができた。今後、クライオ原子間力顕微鏡を改良し、フリーズフラクチャー・エッチングの技術を導入することを目指している。

D. Yamamoto, K. Tani, T. Gotoh, T. Kouyama :Cryo Atomic Force Microscope equipped with an ice-sublimation sample holder.

1PA004

三次元分子間力顕微鏡プローブの開発

○大坪佑介*, 喜多村和郎*, 柳田敏雄**

(*阪大・基礎工, *科技振・1分子過程プロジェクト, **阪大・医)

ミオシンの滑り力発生メカニズムの研究において、ガラスマイクロニードルを用いた 1 分子計測によってミオシンの発生する変位と力を直接計測することが可能になった。しかしながら、その方法ではアクチンフィラメントに沿った方向 (X 軸方向) の動きしか観察することができない。「ミオシンが滑り力を発生するときのアクチンとの相互作用」や「ミオシンとアクチンの分子認識」といった分子間相互作用と機能発現のダイナミクスに迫るためには、発生する滑り力 (X 軸方向) だけではなく、分子間相互作用 (Z 軸方向) を同時に計測する必要がある。Z 軸方向の変位や力を計測する手段としては AFM に用いられている光で計測があり、最近ではタンパク質同士の結合破断力計測やタンパク分子のイメージングなどに盛んに用いられている。

以上のような背景に基づき、X-Z 同時測定を可能にする新しいプローブを開発した。X 軸方向の変位はプローブの像を 2 分割光センサーに結像させて検出する。Z 軸方向の変位は反射板にレーザーを当て、反射光の角度変化を 4 分割光センサーで検出する。弾性率 0.1 pN/nm 程度の柔らかいガラスマイクロニードルの先端に、厚さ 500 Å、直径 10 μm の金の反射板を取り付けた。作成したプローブの空間、時間分解能はそれぞれ <1 nm と <1 ms であり、目的の計測に十分な分解能を持っていることがわかった。

このプローブを用いた三次元分子間力顕微鏡で、ミオシンがアクチンフィラメントに沿って変位しているときの Z 方向の挙動や、お互いを近づけていったときの分子認識の様子を、機能発現と同時に観察することができる。

Z 方向に 1 nm の変位を与えたときのセンサ出力

Y. Otsubo, K. Kitamura, T. Yanagida: Three-dimensional intermolecular force microscopy.