

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26600097

研究課題名(和文) 探針側方のナノ構造体を検知する非破壊AFMの開発と生体分子集合体計測への応用

研究課題名(英文) Development of nondestructive AFM method and its application for investigation of biomolecular structures

研究代表者

浅川 雅 (Asakawa, Hitoshi)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号：90509605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：力センサとして用いるカンチレバーの垂直方向とねじり曲げ方向の同時励振を行い、その周波数や振幅などの信号を同時取得することにより、探針の水平方向に存在するナノ構造体を非接触で検出できる原子間力顕微鏡(AFM)手法を開発した。今後、カンチレバー形状の最適化や同時計測した信号を用いたフィードバック制御方法の確立によって、新規AFM手法の実用性を高めていくことができる。

研究成果の概要(英文)：In this project, I developed an atomic force microscopy (AFM) method that was capable to detect nanostructures existing in the horizontal direction of an AFM probe in non-contact manner. The detection of nanostructures became possible by a simultaneous excitation and monitoring of two vibration modes of cantilevers used as a force sensor. The two vibration modes are the vertical normal bending and the torsional bending vibrations. The practicality of the developed AFM method can be improved by optimizing the cantilever shape and establishing the feedback control conditions.

研究分野：ナノ計測

キーワード：原子間力顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

原子間力顕微鏡(AFM)は急速な進歩を遂げており、液中での原子分解能観察も周波数変調AFM(FM-AFM)によって実現された。それ以降、FM-AFMは液中での観察が必要な生物学分野での原子・分子分解能計測への応用が強く期待されている。液中FM-AFMでタンパク質の2次構造である $\alpha$ -ヘリックスの直接観察や、脂質-コレステロール複合体の分子分解能観察を世界に先駆けて報告した。

一方、従来のAFMでは探針に働く水平方向の相互作用力を検出できないという欠点が見られていた。これが要因となり、凹凸の大きなナノ構造体が探針の側方に存在すると、探針側面が衝突して大きな力が働き、観察試料を破壊することがたびたび問題となる。例えば、タンパク質集合体やナノ微粒子などは、柔らかいカンチレバーを用いても非破壊でAFM計測することが難しい。これらの課題を解決するためには、探針側方のナノ構造体を検出できないAFMの原理的な限界を打破する新しいAFM計測の開発が必要であった。

### 2. 研究の目的

上記のようにAFMは探針側面に働く水平方向の力を検出できないため、急峻な勾配を有するナノ構造を壊さず高分解能観察することが難しい。この問題を克服するために、カンチレバー型力センサの複数信号モードを同時に計測し、垂直方向・水平方向に生じる相互作用力を検出できる新規AFM手法を開発するのが本研究の目的である。カンチレバー型力センサを垂直曲げ方向(Bending mode)に加え、ねじり曲げ方向(Torsional mode)にも励振し、垂直方向・水平方向に生じる相互作用力を同時に検出できるか検討した。探針-試料間距離フィードバック制御を垂直・水平相互作用の両方を利用して行うことで、探針側面に衝突して生じる横方向の大きな力を抑制する。そして弱い相互作用力で集合した生体分子やナノ材料であっても、非破壊かつ原子・分子分解能観察できる高分解能AFMを開発することが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) カンチレバーの選定と光熱励振の検討

研究目的を実現するためには、カンチレバーが持つ複数の振動モードを励振し、その振動特性を同時検出する方法を確立する必要がある。そこで検証に最適なカンチレバーを探索するために、形状の異なる市販カンチレバーの機械特性・振動特性を有限要素法によって解析した。さらに有限要素法(FEM)解析によって候補になった市販カンチレバーを購入し、光熱励振法で複数の振動モードを同時励振できるか調査し、さらには同時励振で最適な励振用レーザーの照射位置について検討した。

#### (2) 水平方向の力 距離依存性の評価

探針が検出する相互作用力を評価する方法として、探針を1次元的に走査し、相互作用力変

化を連続的に記録する方法がある。しかし、一般的には探針を基板に対して垂直方向に走査し、Z方向の相互作用力変化を評価する。そのため水平方向の相互作用力を評価することへ適用できない。そこで本研究では、水平方向に探針を走査した際のカンチレバー振動特性を評価する方法を新たに確立することを検討した。具体的には、数10ナノメートルのステップ構造を有するグレーティング(回折格子)を準備し、ステップ構造に向かって探針を水平方向に走査したときに生じる振動特性(振幅・周波数)の変化をモニタリングした。

#### (3) モデル試料の調製方法確立

新規AFM手法の有用性を実証するモデル試料として、球状タンパク質のチューブリングが形成する微小管と、ナノ分子鎖の調製方法について検討した。

##### 微小管によるAFM試料の調製

微小管は直径4nmの球状タンパク質であるチューブリングが弱い相互作用で集合することで形成されており、直径が25nmと通常のAFM試料としては大きいためAFM計測で破壊されやすい。そのため本研究のモデル試料として適している。一般的に微小管をAFM計測する際は化学的な架橋を行い、機械強度を向上することが多い。そこで化学的な架橋形成を必要としない微小管の試料調製方法を確立し、新規AFM手法の有用性を検証する試料とすることを検討した。

##### ナノ分子鎖の調製方法確立

探針走査の影響を受けやすい構造体として、構造的自由度が高い直鎖状の分子が挙げられる。そこで2つ目のモデル試料として、固液界面に直鎖状の分子構造の片端を固定化したナノ分子鎖構造を形成し、AFM計測可能かどうか検討した。具体的には真空蒸着法によって調製したAu(111)上にアルカンチオール自己組織化膜(SAM)を形成し、その一部に伸び切った(All trans)状態の長さが数nmになる親水性の分子鎖モデルを導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) カンチレバーの選定と光熱励振の検討

研究目的を実現するためには、複数のカンチレバー振動モードを励振し、その振動特性を同時検出する方法を確立する必要がある。本研究では、カンチレバー励振には液中でも定量的な原子分解能計測に応用できる光熱励振法、変位検出には一般的なAFMでも用いられる光てこ法を用いた。まず複数の市販カンチレバーを有限要素法解析(COMSOL社ソフトウェア使用)によって解析し、各振動モードの共振周波数を算出した。その結果、検出可能な共振周波数領域を考慮して3つの市販カンチレバーを選定した。

つぎに選定した市販カンチレバーを購入し、光熱励振と変位検出の検討を行った。光熱励振用の半導体レーザーコントローラの外部変調入

力からカンチレバーの複数の共振周波数と一致する正弦波信号を入力し、マイクロメータを用いて励振用レーザー光スポットをカンチレバー付近で XY 方向に一定距離ずつ移動させながら、各振動モードの振幅を計測した。なお、垂直方向とねじり曲げ方向の振幅は、光てこ法で使用する4分割フォトダイオードで検出することが可能であった。

これらの結果、ねじり曲方向の振動振幅は、励振用レーザー光スポットのXY位置に強く依存することがわかった。一方、垂直方向の振動振幅はXY位置に依存するものの、ねじり曲げ振動よりもその依存性は高くなかった。そこで1次の垂直方向とねじり曲げ方向の振動を同時励振する際には、ねじり曲げ方向の振動振幅が最も大きくなる位置が最適であるということ把握できた。

#### (2) 水平方向の力 距離依存性の評価

カンチレバーの複数振動モードを用いて探針-試料間相互作用力検出を行い、どの振動モードを組み合わせることで研究目的を達成できるか検討を進める必要があった。

しかしながら、水平方向の力-距離依存性を調べる方法が確立されておらず、本研究課題で検討する必要があった。そこでステップ構造を有するグレーティングを標準試料とし、ステップ構造に向かって探針を走査しながら垂直振動・ねじり曲げ振動の両振動特性を同時計測する実験を行った。

ステップ構造に向かって探針を水平方向に走査したとき、ステップ構造から離れた非接触位置でもねじり曲げ振動の振動特性に変化が生じることが分かった。また光熱励振によって、ねじり曲げ方向の振動振幅を変化させるとステップ構造を高感度で検出できる最適な振幅が存在することを明らかにした。

#### (3) モデル試料の調製方法確立

##### 微小管による AFM 試料の調製

本研究では吸着固定化するマイカ基板のアミノプロピルシラン表面修飾の新しい手順を確立し、さらに微小管の脱重合を阻害するパクリタキセルの濃度を最適化することで、化学架橋を行なうことなく AFM 観察可能な微小管試料を調製できることを明らかにした。また微小管の試料調製時のパクリタキセル濃度を制御することで微小管の機械的な安定性を調整することも明らかにした。これらの成果により、化学架橋の影響を受けることなく本来の微小管表面を高分解能 AFM 計測することが可能となった。

##### ナノ分子鎖の調製方法確立

モデル構造として調製したナノ分子鎖を、水中で通常の周波数変調 AFM(FM-AFM)を用いて観察すると伸び切った状態の分子鎖長よりも極めて低いナノ構造として可視化されることが分かった。そこで実際の立体構造(空間分布)を理解するために、3次元走査型 AFM(3D-AFM)で観察した結果、ナノ分子鎖は3次元空間に分布

している様子が可視化された。これは通常の FM-AFM ような計測条件では、ナノ分子鎖構造の一部が可視化され、なご倒すように探針が走査された可能性が高いことが分かった。

#### (4) まとめ

本研究課題の推進により、垂直方向とねじり曲げ方向の同時励振と、周波数や振幅などの振動情報の同時取得により、探針の水平方向に存在するナノ構造体を非接触で検出できることを強く示唆する結果が得られた。

今後、カンチレバー形状の最適化による高感度化や、同時計測した垂直振動、ねじり曲げ振動の信号を用いたフィードバック制御方法の確立によって、新規 AFM 手法の実用性を高めていくことができると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

N. Inada, H. Asakawa, T. Kobayashi, T. Fukuma, Efficiency improvement in the cantilever photothermal excitation method using a photothermal conversion layer, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 査読有, Vol. 7 2016, pp. 409-417.  
DOI: 10.3762/bjnano.7.36

浅川 雅、液中原子分解能を有する原子間力顕微鏡による固液界面計測、*信学技報*、査読無、Vol. 116, 2016, pp. 1-2.  
<http://www.ieice.org/ken/paper/20160714Mb9L/>

[学会発表](計7件)

松井彩香、太田明雄、浅川毅、浅川雅、液中原子分解能 AFM によるテトラフェニルメタン骨格分子の自己組織化および単一分子内三脚構造の可視化、*日本化学会第 97 回春季年会*、2017 年 03 月 16 日 ~ 03 月 19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県、横浜市)

S. Matsui, A. Ohta, T. Asakawa and H. Asakawa, Linear assembly of tetraphenylmethane derivatives investigated by AFM, 2<sup>nd</sup> International Symposium on Center of Excellence for Innovative Material Sciences Based on Supramolecules, 2016 年 10 月 26 日 ~ 10 月 27 日、石川県文教会館(石川県、金沢市)

N. Inada, H. Asakawa, N. Oku and T. Fukuma, Molecular-scale investigation of

sulfonate-terminated alkanethiol SAMs by FM-AFM in liquid, 19<sup>th</sup> International Conference on Non-contact Atomic force, 2016 年 07 月 25 ~ 07 月 29 日、Nottingham(UK)

淺川雅、液中原子分解能を有する原子間力顕微鏡による固液界面計測、電子情報通信学会有機エレクトロニクス研究会、2016 年 07 月 14 日 ~ 15 日、金沢大学角間キャンパス (石川県、金沢市)

稲田なつみ、高尾一史、淺川雅、福間剛士、3 次元走査型力顕微鏡による揺動するナノ分子鎖の液中実空間計測、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 03 月 19 日 ~ 03 月 22 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都、目黒区)

高尾一史、淺川雅、稲田なつみ、福間剛士、3 次元走査型原子間力顕微鏡を用いた固液界面に存在するナノ分子鎖の実空間計測、第 25 回インテリジェント材料・システムシンポジウム、2016 年 01 月 08 日、東京女子医科大学先端生命研究所 (東京都、新宿区)

H. Asakawa, K. Takao, N. Inada and T. Fukuma, Spatial distribution of nanoscale flexible chains as a protein terminal model visualized by 3D scanning force microscopy, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 15 日 ~ 12 月 20 日、Hawaii(USA)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

淺川 雅 (ASAKAWA, Hitoshi)

金沢大学・理工研究域物質化学系・准教授

研究者番号 : 9 0 5 0 9 6 0 5