

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：13301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26790048
研究課題名(和文)イオン伝導顕微鏡による液中環境下での高速3次元ナノイメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of ion conductance microscopy with high spatio-temporal resolution for visualizing nanostructures of bio samples in liquid environment

研究代表者
渡邊 信嗣(Watanabe, Shinji)
金沢大学・バイオAFM先端研究センター・助教

研究者番号：70455864
交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):光の回折限界を超える液中ナノ領域で起きている生命現象のありのままを可視化する技術を創出できれば、生命科学に計り知れない進展をもたらすであろう。本研究では、現在の技術では計測困難な、液中環境における柔らかく、かつ脆弱なナノ構造上の現象を高い時空間解像度で捉える技術の開発を目指した。結果としては、先端にナノポアを有するナノピペットを探針とする非侵襲的走査プローブ技術である走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)の時空間解像度を従来よりも桁違いに向上する基盤技術の開発に成功した。10nm以下の構造を1秒/画面より高速に撮影可能であり、時間分解能は既存技術の限界を100倍以上更新した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ナノピペットを用いる走査型プローブ顕微鏡、走査型イオン伝導顕微鏡の高速化に取り組み、従来の100倍程度高速でイメージングできる装置を開発した。これを用いて、いくつかのバイオ試料のイメージングを行った。本装置は、生細胞などのダメージに弱いバイオ試料の形状のイメージングやその動態を計測するのに有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文):We have succeeded in capturing topographic images of samples located in liquid environments from over 10 um scale down to the sub-10 nm scale within a few seconds. Clearly resolved images of biological samples with sub-10-nm vertical and lateral structures demonstrate the capability of scanning ion conductance microscopy for imaging actions in biological systems with high spatial resolution.

研究分野：応用物理一般

キーワード：物理計測・制御 走査プローブ顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生命現象の仕組みをナノスケールのレベルで根本的に理解するために、生体分子が実際に機能する液中において、生体分子の挙動を計測する技術の開発が待ち望まれている。生体分子は、自身の3次元的な分子構造とその動き方により機能を発揮している故、生体分子が機能している様子を、分子のムービーとして詳細に観察できる技術を開発できれば、生命科学にとって革新的な研究ツールとなることは間違いない。

電子顕微鏡で得られる生体分子の構造(形状)は、真空環境下の静止構造に限られ、液中での生体分子の動態を直接観察できない。蛍光顕微鏡は液中での動態観察を可能にするが、見えるものは蛍光標識した特定の生体分子の位置だけで、生体分子が機能する際の構造変化や、蛍光標識していない分子の挙動が直接見えない。また蛍光標識自体が生理機能に与える影響も技術的解決困難な問題として残されている。これらの方法に対して、走査プローブ顕微鏡(SPM)は、光の回折限界を遥かに超える高い空間解像度を有し、液中において、まさに機能している最中の生体分子の構造とその動態を同時に計測しうる現在唯一の手法である。現在では、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)により、生物から単離精製した生体分子の機能を、基板上においてムービー観察が可能になっている。ムービーという極めて直感的なデータとして生体分子ダイナミクスの情報が得られる故に、いくつかの生体分子系において、その機能メカニズムの解明にSPMは決定的に重要な役割を果たしてきた。

このように、SPMで単離精製系の生体分子の観察手法が確立されつつある現在において、今後間違いなく重要になってくるのは、オルガネラや細胞膜のような、生体膜界面で実際に起きているダイナミックな生命現象をナノスケールのレベルで可視化することである。しかしながら、これは従来のSPM技術では実現するのが困難とされている。生体分子の単離精製系で活躍している高速AFMは、プローブと試料が物理的に接触する力を検出・制御して試料形状を可視化する。しかし、生体分子の多くが機能している生体膜は粘性かつ非常に柔らかい。このため、高速AFMのような接触型SPMではプローブが試料に及ぼす力のために、試料表面が変形し、空間解像度が大きく損なわれるのに加えて、しばしば試料に回復不能なダメージすら与えてしまう。

これを根本的に解決するには、非接触型のSPMを用いる他に手段はないように思われる。このような技術の候補として走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)がある(図1)。SICMは、ナノポアを有するガラスピペット(ナノピペット)をプローブとして用いる。電解液中に

てプローブ先端のナノポアを通過するイオン電流が、プローブと試料が近接した際に変化するという性質を利用して、イオン電流変化を計測して試料表面形状をナノポア程度の空間解像度で可視化するSPM技術である。ナノポアを通過するイオン電流は、プローブ先端と試料が接触せずとも変化するため、試料表面に強い力を与えることなく試料形状観察が可能である。このため、真核細胞のような柔らかく脆弱な生物試料の形状観察において、SICMの有効性が実証されている。しかし一方でSICMは、プローブ位置決め信号であるイオン電流変化の検出速度が遅く、高速に走査できないため、時間分解能が極めて低い(1画面取得に数十分程度)従って、生物試料の形状ダイナミクスに関する情報が得られないという技術的な欠点があった。

しかし、このようなSICMの走査速度の欠点は、SICMの動作原理の限界に起因するものではない。それ故、研究代表者は、SICMの走査速度を従来よりも飛躍的に向上できるものと考えた。

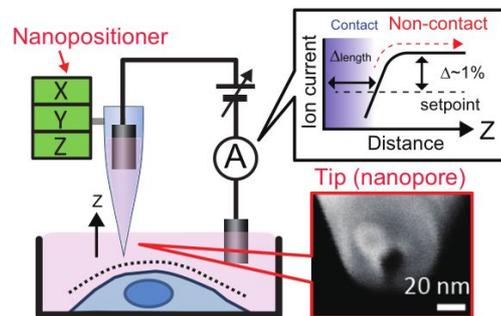


図1. SICM計測装置の概要。

2. 研究の目的

柔らかく脆弱な構造も可視化するという非接触型のSPMが有する利点を損なわずに、時間分解能を飛躍的に向上したSPM、高速走査型イオン伝導顕微鏡(高速SICM)を開発することが、本研究の目的である。SICMの時間分解能を制限する要因は、計測装置を構成するハードウェアによるもの、走査手法や制御手法などソフトウェアに起因するものがある。これまで行われたSICMの時間分解能向上に関する研究開発は、ほとんどのソフトウェアに関するものである。これは、ハードウェアの改善は、ソフトウェアのそれに対してハードルが高いと認識されているためだと思われる。このような現状から、ハードウェアの開発には改善すべき大きな余地がある。本研究では、ハードウェアが制限するSICMの時間分解能の根本的な改善を目指した。

3. 研究の方法

SICM 計測において、ハードウェアの性能改善とは、プローブの試料表面への近接速度 V_f の向上にほかならない。 V_f が従来よりも 10 倍改善できれば、SICM の画像取得時間は多くの場合で 10 倍になる。従って、本研究で行うことは、 V_f 向上のための開発である。この V_f は、プローブが試料表面に接触しないという条件から到達可能値が見積もられ、

$$V_f [\text{m/s}] \leq \Delta l_{\text{length}} / \Delta t_{\text{delay}} \quad (*)$$

と表せると考察した。ここで、 Δl_{length} は、試料表面からどの程度遠くまでイオン電流変化が検出できるかを表す距離である。これは、ナノピペット先端形状に関係し、およそナノポア直径程度となる。 Δt_{delay} はプローブと試料間距離を制御する Z ポジショナの共振周波数と電流検出計測機の帯域周波数の和の逆数の程度である。本研究の高速走査化の方針は、 Δl_{length} を大きく、 Δt_{delay} を小さくするという単純なものである。式(*)から通常の SICM の走査速度も算出すれば、ナノポア直径 50nm を有するプローブ、および市販の SICM 装置の Z ポジショナの共振周波数 ~1kHz、電流検出帯域 1kHz を用いるセットアップでは、上式に代入することより、 $V_f \sim 25\text{nm/ms}$ となる。この程度の V_f で $1\mu\text{m}$ 程度の凹凸のある表面をホッピングモードにより 100×100 ピクセルの画素数で走査すると、およそ 1000 秒の時間を要する。これが SICM の時間分解能の典型的な値である。本研究では、開発する高速 SICM の性能目標値を、 V_f を従来よりも 100 倍以上向上し、1 画像を数秒で取得できることに設定した。

4. 研究成果

(a) l_{length} を大きくする

l_{length} の値は、ナノピペット先端の円錐角により変化する。これは、ナノポアを通過するイオン電流が、ナノピペット先端と試料表面間距離に起因するアクセス抵抗 R_a 、ピペット-表面間距離に依存しないナノピペット先端付近の内部形状に起因するピペット抵抗 R_p が直列結合したものととして計測されるためである。つまり、円錐角を大きくすることで R_a/R_p 比が小さくなり、イオン電流変化の検出感度が向上し、 V_f を大きくしてもプローブが表面に衝突せずに停止できる。図 2(a) に l_{length} の円錐角依存性を有限要素法(FEM)によるシミュレーションにより見積もった結果を示す。およそ $R_a/R_p \tan(\theta)$ (θ はプローブ先端の半円錐角) なる関係があり、 l_{length} を大きくすることで l_{length} が大きくなることわかる。

本研究では、ガラス製キャピラリからナノピペットを作成する際に用いる、レーザープレー装置を制御することで l_{length} を大きくすることを考えた。例えば、レーザー照射の範囲を

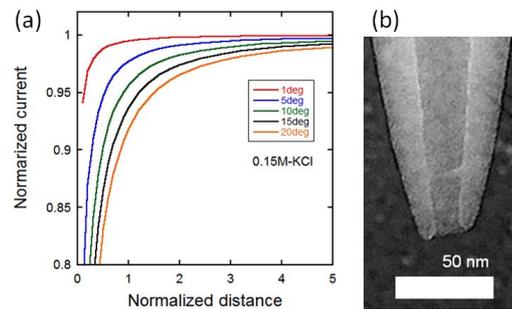


図 2. (a) SICM アプローチ曲線のシミュレーション結果。縦軸は、計測されるイオン電流を表面から十分遠い位置で計測される値で規格化したもの。横軸はプローブ-表面間距離をナノポア直径で規格化した値である。それぞれの曲線はプローブの半円錐角の値を示す。(b) 実際使用しているナノピペットの先端付近の TEM 画像。

絞り、多段引きすることで、の大きなナノピペットを作成することができる。ナノピペットの形状最適化を試み、ナノポア直径が 15nm に対して、半円錐角 ~6-9 度程度のナノピペットを歩留まりよく作成できるようになった[図 2(b)]。この程度の開口径に対するの条件としては、通常用いられるものに対して 2 倍程度の大きさがあると推察される。ただし、本研究では透過型電子顕微鏡 (TEM) によってナノピペットの円錐角を直接評価しているが、多くの従来では走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて間接的に円錐角を得ているという違いがあるため、これは大まかな比較となる。

(b) t_{delay} を小さくする

t_{delay} は電流検出帯域周波数とプローブ-試料間距離を制御する Z ポジショナの共振周波数と和の逆数の程度である。それぞれに対して行った改善の結果について述べる。

(b-1) 電流検出帯を上げる

ナノポアを通過したイオン電流は、トランスインピーダンスアンプにより計測される。このアンプの検出帯域幅 BW を大きくすれば、高速にイオン電流を計測できるが、それについてノイズも大きくなり、場合によってはイオン電流変化が計測できない。従って、BW を従来よりも増加し、かつ信号雑音比 (S/N 比) を大きくせねばならない。本研究では、イオン電流変化の信号を増幅すること、および信号入力ラインに結合する静電容量を小さくすることで、S/N 比を向上することを考えた。最初に前者に対する改善結果を示し、後者に対する結果は(b-1-2)に後述する。

(b-1-1) イオン電流変化を大きくする

イオン電流変化の S/N 比を向上することで広帯域の電流計測、すなわち高速計測が実現できる。S/N 比は様々な要因で制限されるが、本研究の SICM 計測条件では主として、 R_p の

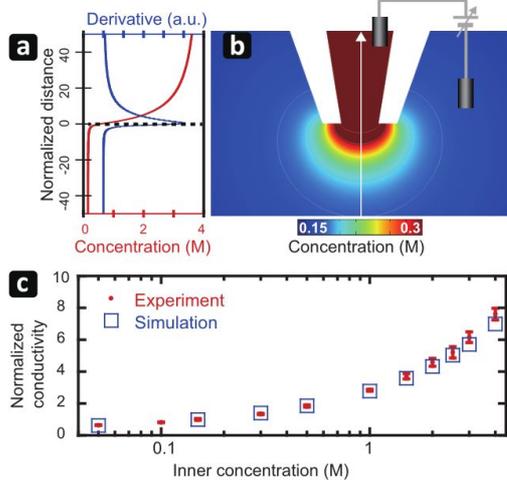


図3. (a) 濃度勾配下におけるFEM計算によって求めたイオン濃度分布。ピペット中心軸方向のラインプロファイルを抽出した。(b) ピペット内部を4M、試料空間を0.15Mの塩濃度に保ったときに実現される平衡状態でのイオン濃度空間分布をFEMにて計算した。(c) 試料空間を0.15Mに保ち、ピペット内部の塩濃度を变化した際に計測されるイオン伝導度の変化。縦軸は適当な値で規格化している。

絶対値を下げることでS/N比の向上が見込める。これは試料観察溶液の塩濃度を高めることで容易に達成可能であるが、生物試料などのSICM計測では、試料側の溶液条件を自由に選択できるとは限らない。このような状況でもS/N比を向上する手法として、本研究では、イオン濃度勾配法と称する手段を開発した。この手法の重要な点は、ナノピペット内部の電解液の塩濃度のみを高くするという点である。ピペット内部の溶液条件は、ナノポアが十分大きなインピーダンスをもち、実質的に試料が置かれた空間の電解液の塩濃度とは独立に選べると考えた。例えば、試料側を生理環境塩濃度である0.15Mに保ち、ナノピペット内部を4Mの塩濃度にしたと、ピペット内部が0.15Mの塩濃度の場合と比べて、イオン伝導度を8倍程度大きくできる(【図3(c)】)。有限要素法(FEM)によるシミュレーションの結果から、このイオン伝導度の向上は、ナノポア付近に生じるイオン濃度の空間分布によって定量的に説明できることを明らかにした(【図3(a)、(b)】)。ナノポア付近には急峻なイオン濃度勾配が生じており、イオン濃度が高い領域はナノポア付近のみに形成される。このようにして得られたイオン濃度勾配により、計測系の信号雑音比を改善できることを見出した(【図4】)。

(b-1-2) ノイズを下げる

電流検出信号ラインに結合する静電容量の合計を C_t とすれば、この値が大きいほど、ト

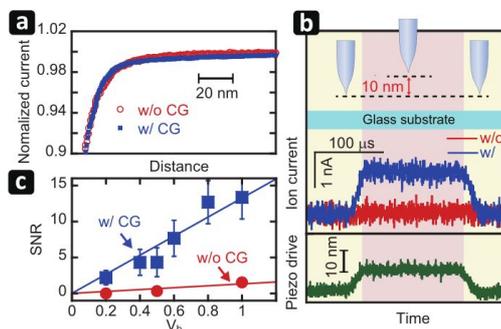


図4. (a) イオン電流-プローブ試料表面間のアプローチ曲線。ピペット内部と試料空間の塩濃度が等しい0.15Mの場合(赤)と、ピペット内部のみ4Mにした場合(青)を示す。縦軸と横軸はそれぞれ適当な値で規格化している。(b) ガラス表面付近でプローブ位置を变化した際のイオン電流変化の様子をイオン濃度勾配あり、なしで比較した。(c) バイアス変化に対する、S/N比の変化の様子。

ランスインピーダンスアンプで計測される電流ノイズが大きくなることが知られている。従って、 C_t を可能な限り小さくすることが高いS/N比を実現するのに有効であることがわかる。現実的に改善できる C_t の成分としては、試料系とアンプとを結線しているケーブル容量 C_w 、およびナノピペットが溶液に浸かっている長さ起因するピペット容量 C_p である。 C_w は、単純に結線する距離をできるかぎり短くすることにより1pF以下に下げることができた。 C_p はナノピペットと溶液間に直列にキャパシタンスを挿入することで改善を試みた。このような手法としては、ナノピペット先端を絶縁性のポリマーなどで被覆する方法が古くから知られているが、ナノピペット先端までしっかり被覆することは困難であり、本研究で使用する10nm程度のナノポアを有する細いプローブにおいて、先端近傍のみが溶液に浸かっている状況では、十分に有効な手法とはならなかった。加えて、作成したプローブ毎にポリマーを被覆するというプロセスが必要であること、ポリマーの被覆の程度を制御することが困難であること、などを考慮すると、ポリマー被覆という手法は現実的ではないと判断した。本研究では、肉厚のナノピペットを使用するという簡単な手法で C_p の減少を試みた。内径/外径比がそれぞれ0.3(肉厚)、0.7(肉薄)のガラス製キャピラリーから作成したナノピペットを0.15MのKCl溶液に浸漬したところ、浸漬する深さ(長さ)が100 μ mあたり、それぞれ40fF、80fF程度 C_p が増加することがわかった。これらは、レーザープレーのナノピペット作成条件を一定にすれば、殆ど大きさが変わらないこともわかった。従って、肉厚のキャピラリーを用いることで、歩留まりよく、通常使用される肉薄のキャピラリーに比べて C_p による増加を半分程度に低減できる手法が開発できたといえる。

(b-2) Z ポジショナの共振周波数を上げる

従来、SICM 計測に用いる Z ポジショナの共振周波数は、プローブを取付けた状態で 1kHz 程度以下であり、高速計測に全く適していない。また、多くの場合で使用されるのは試料ステージを走査する、いわゆるサンプルスキャン型であり、XY 水平方向の走査速度が試料の重量により制限されてしまう。本研究では、これらの問題点を改善するために、プローブスキャン型の SICM 専用ナノポジショナを新規に開発した。高速走査に必要な様々な条件を達成するために、ナノポジショナの構造がある程度複雑になることが避けられない。複雑な構造体の機械特性を十分よく設計するために、FEM シミュレーションを用いた。ナノポジショナの寸法、材料、達成できる機械加工精度などを検討しつつ、FEM シミュレーションと突き合わせながら、開発を進めた。これらの詳細を以下に述べる。

(b-2-1) 高速 Z ナノポジショナ

本研究で開発したナノポジショナは積層ピエゾ素子による圧電効果によりナノレベルの変位制御を行う。ナノポジショナは、このピエゾ素子の変位をプローブの変位に変換し、さらには変位の発生に伴う好ましくない振動成分を除去せねばならない。さらに時間変化の速い現象を捉えるにはナノポジショナの共振周波数が大きいことも要請される。我々は、変位発生とともに生じるピエゾ素子の慣性力を相殺する機構を有したナノポジショナを設計し[図 5(a)-(c)]、高いナノポジショナの共振周波数を実現した。

(b-2-2) 振動抑制技術

開発したナノポジショナの垂直変位に関する伝達関数を計測したところ、100 kHz 程度に共振ピークを現れる [図 5(e) w/o ctrl.]。このピークを完全に抑制するフィードフォ

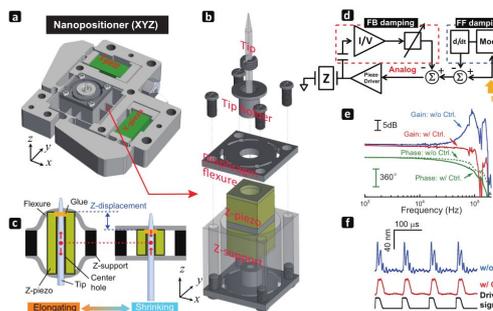


図 5 . (a) 開発したプローブ走査型高速ナノポジショナの形状。(b) Z ナノポジショナの内部。(c) Z ナノポジショナに採用した慣性相殺法。(d) Z ナノポジショナに対する振動制御手法実装のブロック図。(e) Z ナノポジショナの伝達関数。振動制御手法により、大きな効果が得られる。(f) Z ナノポジショナをパルス駆動した際に生じる振動パターン。

ードとフィードバックを駆使した制御手法を

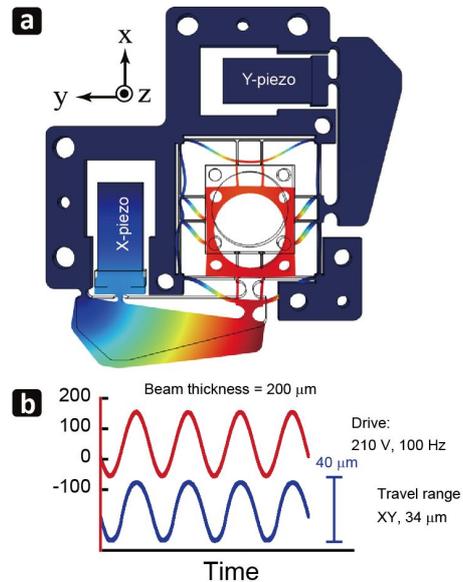


図 6 . (a) 水平方向への変位拡大機構。(b) 実測した水平方向変位。

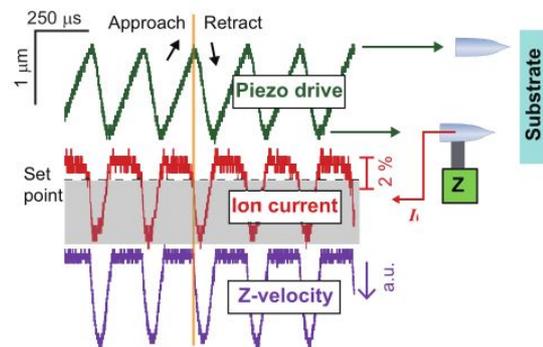


図 7 . V_f の評価。上からそれぞれ、プローブの垂直変位、イオン電流、プローブ変位速度の時間変化を示す。

開発した [図 5(d)、(e) w/ctrl.]。この結果、ナノポジショナの時間応答特性を 10 μ s 以下に改善することに成功した [図 5(f)]。これらの成果により、類似の従来型走査プローブ顕微鏡よりも 100 倍以上高速にプローブの垂直位置制御を行うことが可能になった。

(b-2-3) 水平方向走査機構

ナノポジショナの水平方向に大きな変位を発生する設計を検討した。レバーアームによる振幅拡大機構を FEM により最適化し、結果として、プローブ装着状態で水平方向の共振周波数が 2.4kHz、ストロークが 34 μ m \times 34 μ m を達成した。

(c) 近接速度の改善結果

上記の開発により、向上した V_f を評価した。図 7 はガラス表面付近でプローブを垂直方向に振動させた結果である。 $V_f \sim 7.3 \mu\text{m}/\text{ms}$ を達成しており、これは市販の SICM 装置の 250 倍程度の値に相当する。

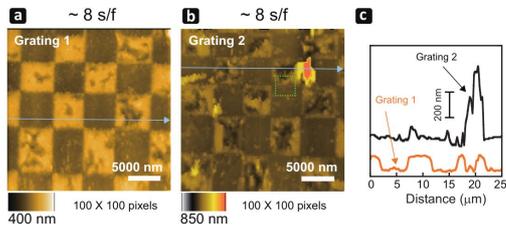


図 8 . チェックボード形状の起伏を有する試料の観察結果。(a)、(b)ともに 100×100 ピクセルの画素数を 8 秒程度で取得している。イメージ画像中の矢印に相当するラインプロファイルを(c)に示す。大きな凹凸の構造物が存在しても、走査速度を落とさずにイメージ可能である。

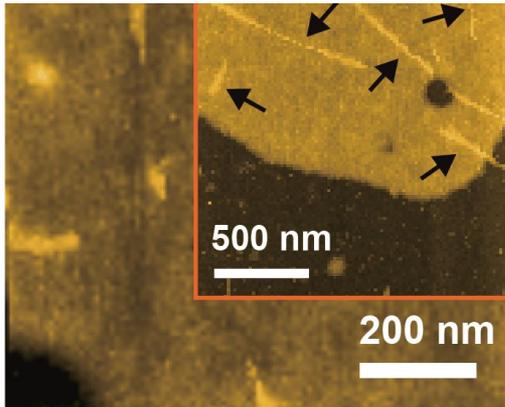


図 9 . マイカ基板上に被覆した厚さ 5nm の脂質膜上の直径 7nm のアクチン繊維の観察結果。挿入図は、広範囲の走査結果。矢印はアクチン繊維を示す。

(d)高速 SICM イメージング

本研究で開発した技術により、 V_f を従来よりも 100 倍以上向上した。これによって SICM イメージングの画像取得時間がどの程度改善できたか評価するために、数 100nm の表面粗さを有する試料を計測した。25 μm ×25 μm 程度の走査領域を 100×100 ピクセルの画素数では、8 秒程度で走査可能であることを実証した(図 8)。ここでは、プローブのナノポア直径は 20nm 以下程度、 V_f は 500nm/ms 程度の条件でイメージングを行った。また、空間解像度を評価するために、マイカ基板上に厚さ 5nm の支持脂質二重膜を作成し、直径 7nm のアクチン繊維を溶液中にてイメージングした。図 9 に数 μm ×数 μm 以下の領域を、100×100 ピクセルの画素数で、1 画面を 5 秒程度で走査した結果を示す。アクチン繊維、脂質膜とマイカ基板とのステップをともに明瞭に空間解像できた。このイメージング条件では、垂直方向の変位ノイズはサブ nm であった。

まとめ、今後の展望

本研究により、高速 SICM の基礎的な技術を大きく推進でき、従来よりも 100 倍以上高速な走査を実現した。サブ 10nm の水平方向の形状パターンの違いを計測できる感度、垂直方向はサブ nm の空間解像度を有し、数秒程度で 1 画像を取得可能である。従来の SICM が 50nm 程度の水平分解能、5nm 程度の垂直分解能、1 画像を取得するのに数 10 分程度を要するの

に比較して、飛躍的な性能向上を達成できたと言える。ただし、本研究により SICM の限界性能を達成できたわけではない。本研究の終了時点でも、ハードウェア的に更なる時空間解像度を達成しうる幾つかのアイデアを、研究代表者は既に見出している。また、走査手法などのソフトウェア的な開発によっても SICM の性能はまだ向上する余地が多く残されている。今後は、未だ残されている技術的な課題を克服していくとともに、生物試料の観察を推進し、高速 SICM の有用性の検証していく。また、本研究で得られた成果の論文文化を進める。

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)

[学会発表](計 16 件)

渡辺信嗣, "高速イオン伝導顕微鏡の開発", 日本顕微鏡学会第 41 回関東支部講演会, (東京都, 2017/2/25)

S. Watanabe and T. Ando, "High-speed ion conductance microscopy for studying biological samples", ICSPM24 (ハワイ, アメリカ, 2016/12/16)

S. Watanabe, H. Watanabe, N. Kodera, T. Uchihashi, and T. Ando, "Development of high-speed scanning ion conductance microscopy for visualizing biological samples in action", 4th Kanazawa bio-AFM workshop (金沢, 2016/10/5)

渡辺信嗣, "高速走査型イオン伝導顕微鏡の開発", 日本顕微鏡学会走査プローブ分科会, (越後湯沢, 2015/12/6)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: プローブ走査機構、プローブ装置および走査プローブ顕微鏡

発明者: 渡辺信嗣、安藤敏夫

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/084534

出願年月日: 2016 年 11 月 22 日

国内外の別: 国外

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 信嗣 (Watanabe, Shinji)

金沢大学・バイオ A F M 先端研究センター・助教

研究者番号: 70455864