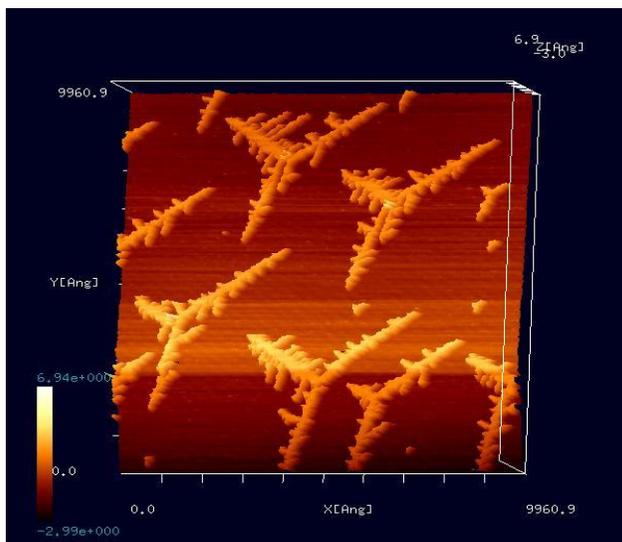
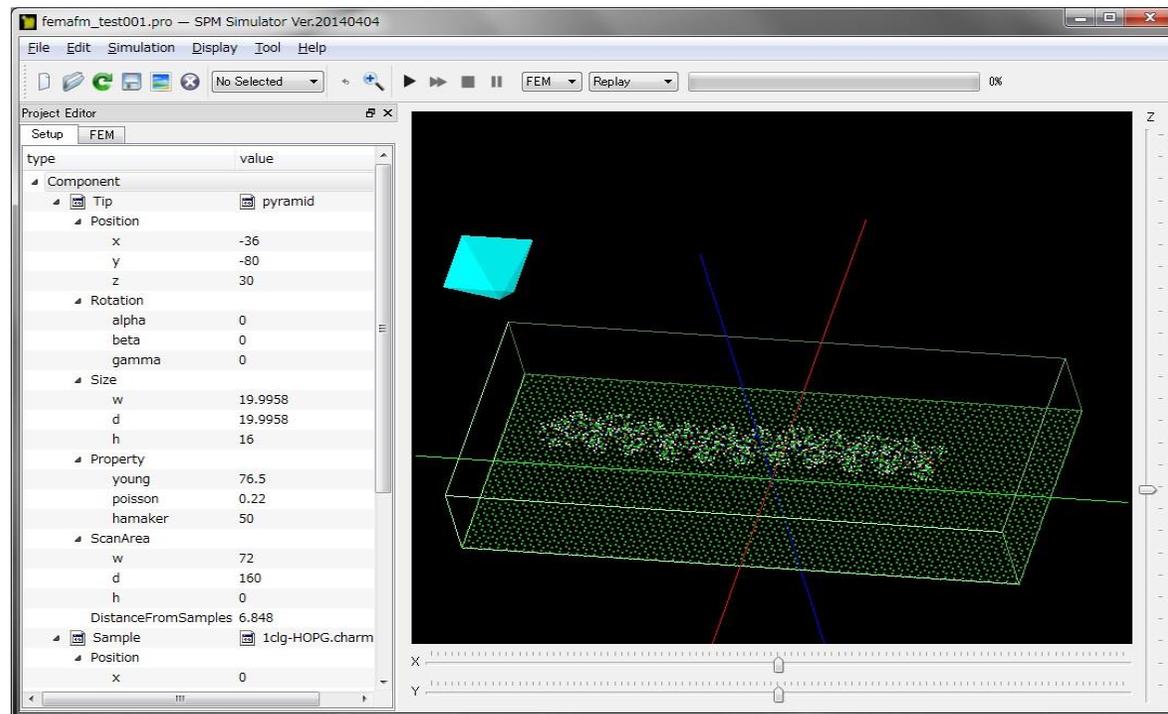


SPMシミュレータ: 走査型プローブ顕微鏡実験画像シミュレータ 用途別機能紹介資料: Part3 バイオ関連試料の観察



[東京大学生産技術研究所 福谷研究室提供
(Ir結晶表面上にAuを蒸着、アニーリングしてフラクタル島状構造を自己形成させたもの)
S. Ogura et al., Phys. Rev. B 73, 125442 (2006); S. Ogura and K. Fukutani, J. Phys.: Condens. Matter 21 (2009) 474210.]



株式会社Advanced Algorithm & Systems
2016年9月30日

SPM実験画像処理手法イノベーション

これまで、様々なSPM実験画像データ処理ソフトの代表例として、Image Metrology社のSPIPが有名でしたが、画像から何が見えるのか判別が困難という事実が常に存在していました

SPMシミュレータは、このSPIPを超えるソフトウェアを目指して、実測画像とシミュレーション計算画像を直接比較できるシミュレータとして開発が進められてきました

AFM実験画像が、そのまま試料の形状を反映しているとは限りません

- 探針の形状が、AFM実験画像に影響を与える場合が考えられます
- 探針と試料の間に、水分子が作る薄い被膜が入り込んでいるかもしれません
- 高分子の試料がコロイド溶液中にある場合、電解質の効果が影響します



SPMシミュレータは、実験画像とシミュレーション画像を比較することにより、実際の試料の形状がどのようなものであるかの、ヒントを与えてくれます
8種類の用意されたシミュレーションソルバを、上手く使い分ければ、試料の真の形状を推定することが出来ます

SPMシミュレータは、見かけのSPM実験画像から、原子の真の配置を特定できる、従来とは一線を画すイノベーションです

SPMシミュレータ用途別機能紹介

Part1: 高分子の単分子観察

Part2: 液中環境下での高分子の観察

Part3: バイオ関連試料の観察

Part4: 繊維状高分子の観察

Part5: 有機半導体の観察

Part6: 金属・無機半導体の観察

Part7: 触媒物質の観察

Part8: リチウム電池・透明電極等の特殊な用途のための材料の観察

Part3: バイオ関連試料の観察

SPMシミュレータに含まれるソルバのうちバイオ関連試料の観察をシミュレーションできるもの

GeoAFM

高速相互予測AFMシミュレータ

LiqAFM

液中ソフトマテリアルAFMシミュレータ

流体力学

SetModel

探針・試料モデル作成ツール

結晶構造を作成

CG

構造最適化AFM像シミュレータ

古典論的な力場を仮定

FemAFM_DLVO

連続弾性体AFMシミュレータ

DLVO理論を考慮することによりコロイド溶液中の高分子のAFM像がシミュレーション可能

macroKPFM_DLVO

古典電磁気学KPFMシミュレータ

DLVO理論を考慮することによりコロイド溶液中の高分子のAFM像がシミュレーション可能

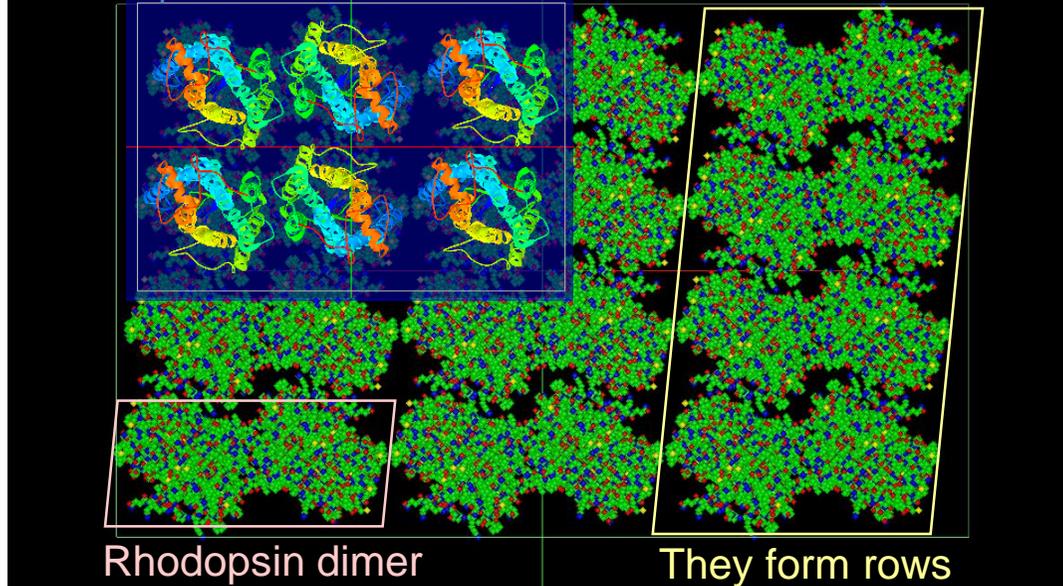
【GeoAFM】 Rhodopsin のAFM 像

ロドプシンは眼の網膜に存在し、光を認識するためのタンパク質である。ロドプシンはディスク膜中に大量に埋め込まれており、AFMによる観察が行われている。ロドプシンはダイマーの列を形成する。ロドプシン・ダイマー列が形成する準結晶を想定し、ロドプシン・ダイマー12ユニット(水素原子を除いて65904原子)から成るモデルを用意した。

Simulation

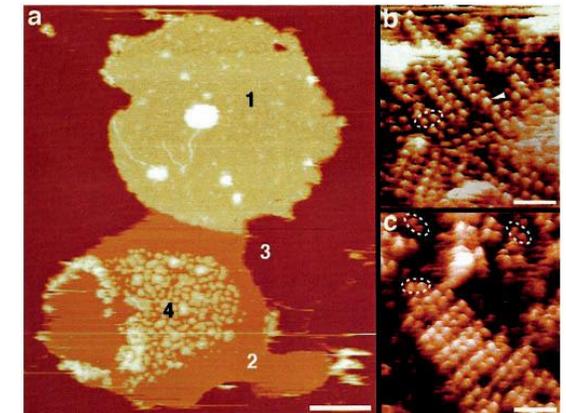
Bird view of the sample.

12 rhodopsin dimers were constructed based on the PDB 1N3M.



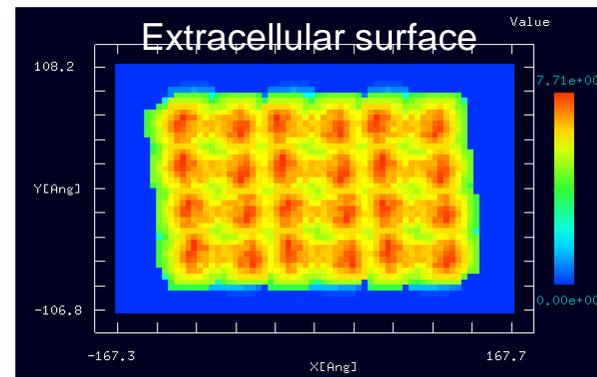
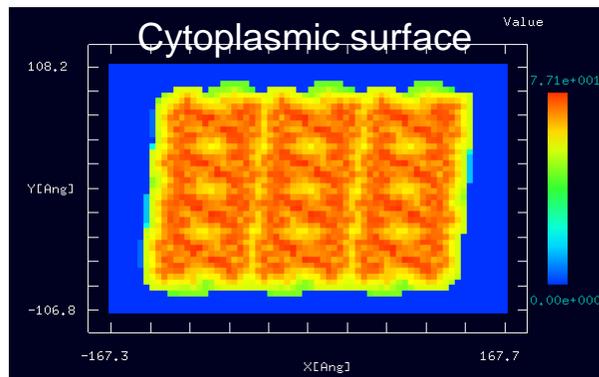
Experiment

Topography of an open, spread-flattened disk adsorbed to mica and imaged in buffer solution.



Y. Liang et al., J.Biol.Chem. 278 (2003) 21655-21662.

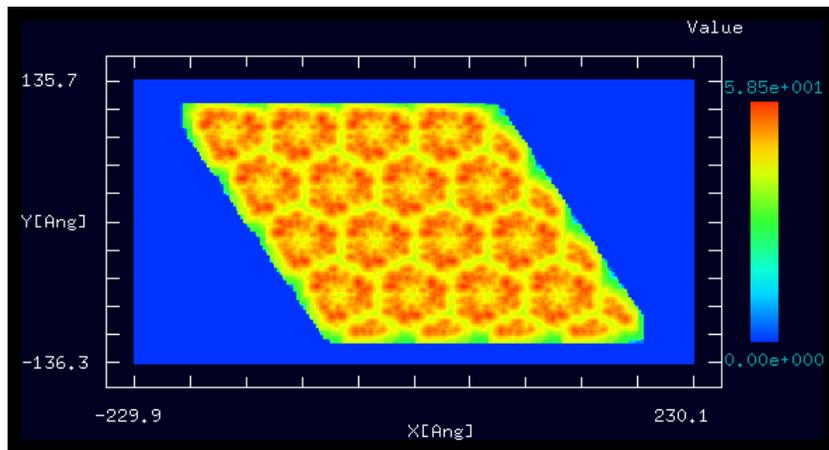
GeoAFM result is imported to Analyzer.



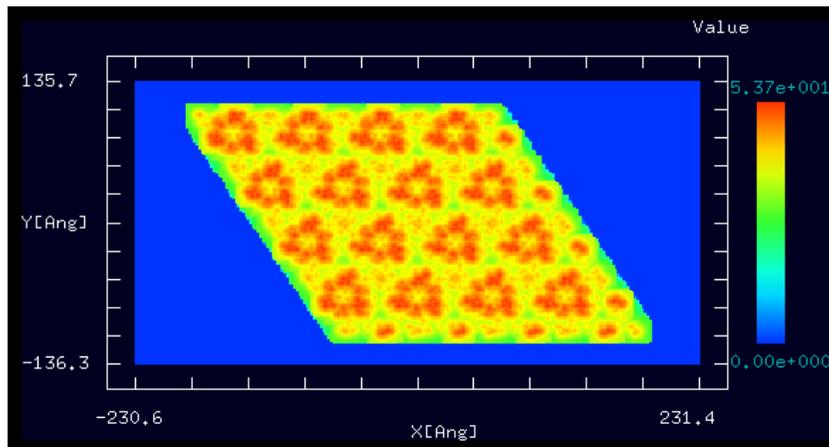
【GeoAFM】バクテリオロドプシン(bacteriorhodopsin)のAFM像

- ・ バクテリオロドプシンは高度好塩菌の膜タンパク質であり、光駆動プロトンポンプとして、プロトンを細胞質内から外へ輸送する。
- ・ ある波長の光を照射されると構造変化する。

シミュレーション結果

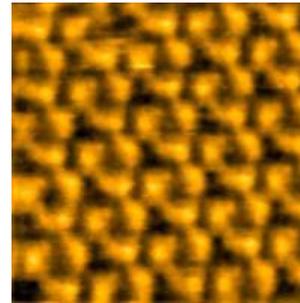


バクテリオロドプシン(1c8r:照射前)

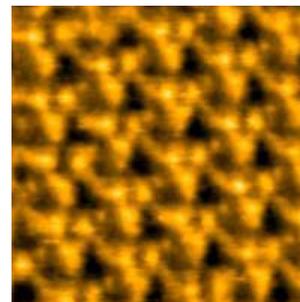


バクテリオロドプシン(1c8s:照射後)

実測画像



照射前



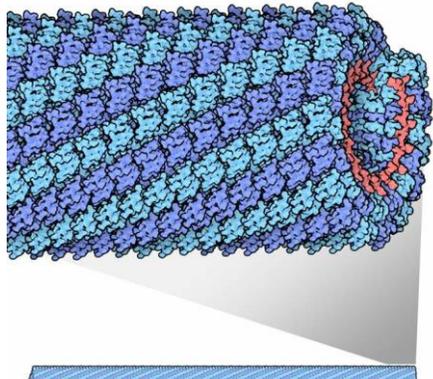
照射後

分子の構造変化を
シミュレーションで
再現

Shibata, Mikihiro; Yamashita, Hayato; Uchihashi, Tkayuki;
Kandori, Hideki; Ando, Toshio; Nature Nanotechnology,
5(3):208-212; 2010-03

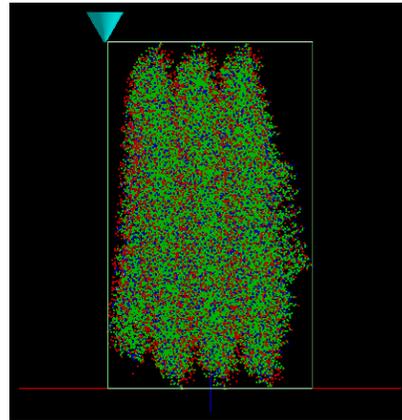
【GeoAFM】タバコモザイクウイルス(TMV)のAFM像

- タバコモザイクウイルスは、タバコなどの葉にモザイク状の斑点ができ葉の成長が悪くなるタバコモザイク病の原因である。
- その構造は螺旋状に積み重なり円筒形の形をしたタンパク質の覆いとそれに包まれた1本のRNAからなる。

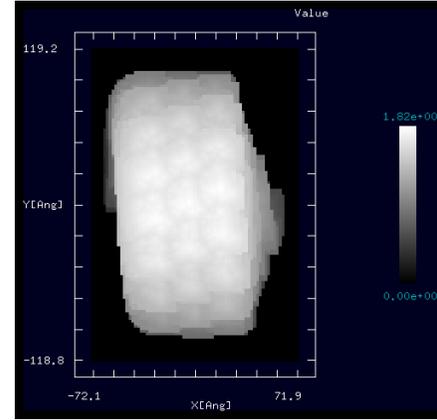


タバコモザイクウイルスの模式図[1]

シミュレーション結果



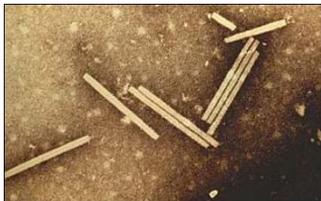
シミュレーションに用いたモデル



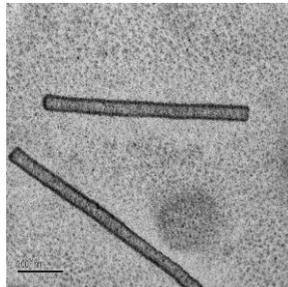
Tobacco mosaic virusのGeoAFMでのシミュレーション画像

EMやTEM、SEMではタンパク質のサブユニットを見ることは難しいが、AFMならばこのくらいははっきりと輪郭を捉えられる可能性がある。

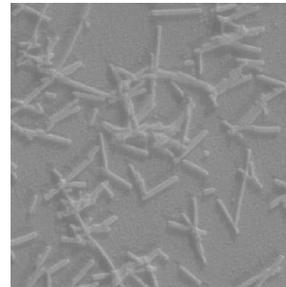
実測画像



Electron Microscopeでの実測画像[2]



Transmission Electron Microscopyでの実測画像[3]



Scanning Electron Microscopeでの実測画像[4]

数万個の原子からなる巨大分子にも対応可能

[1]:<http://pdbj.org/mom/109>

[2]:http://erec.ifas.ufl.edu/plant_pathology_guidelines/module_02.shtml

[3]:http://www.smem.uni-bayreuth.de/en/samples_gallery/Transmission-Electron-Microscopy_-_TEM_/Biological-Samples/virus/index.html

[4]:<http://www.lv-em.com/sem-tobacco-mosaic-virus>

バイオ関連

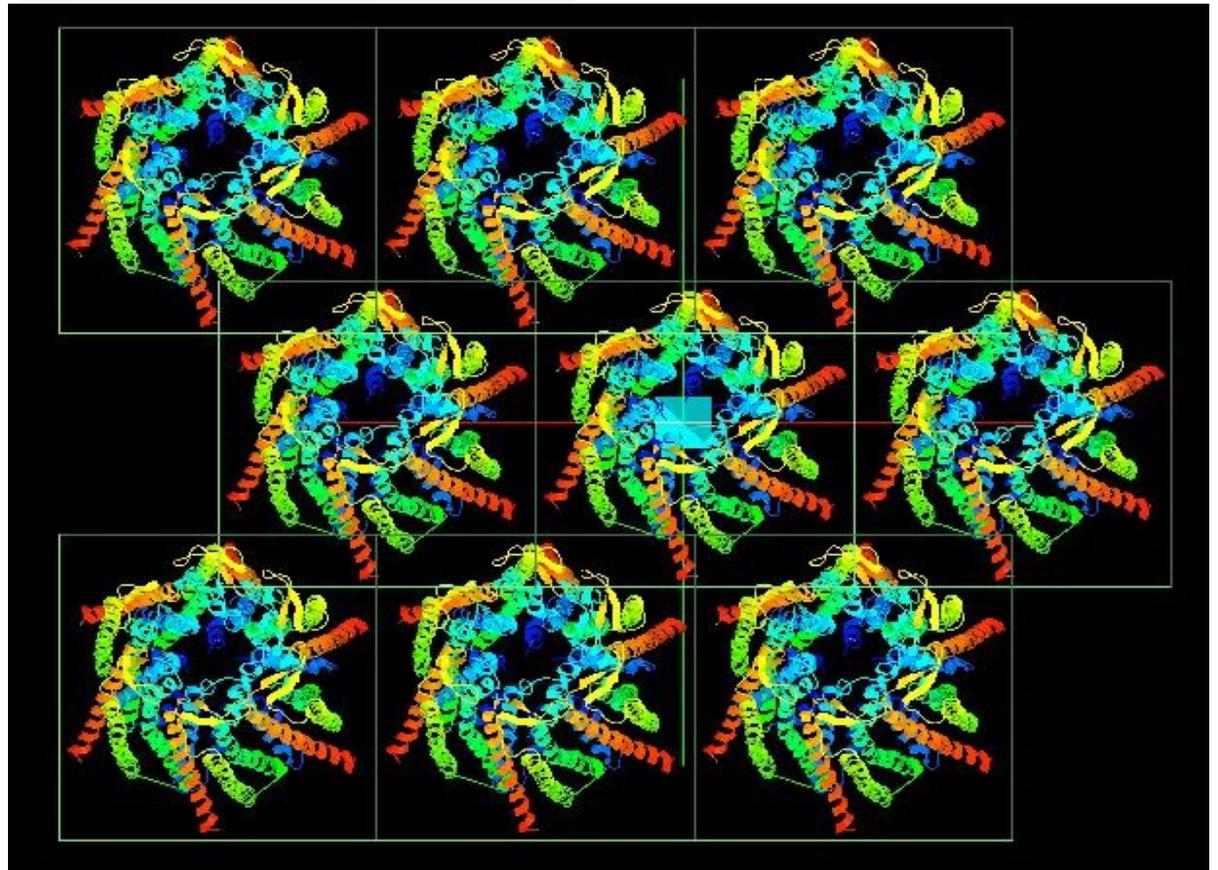
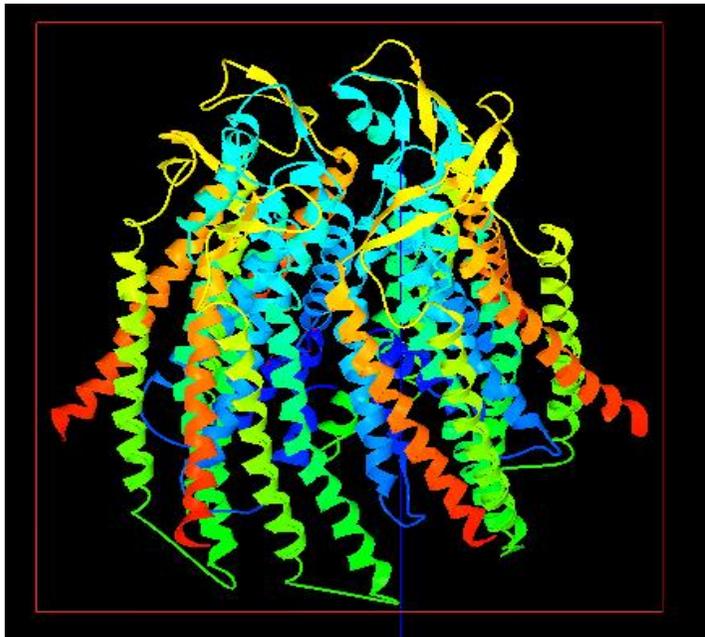
GeoAFM

整列したコネクソン(connexon、タンパク質の複合体で細胞間のチャンネルの働きをする)

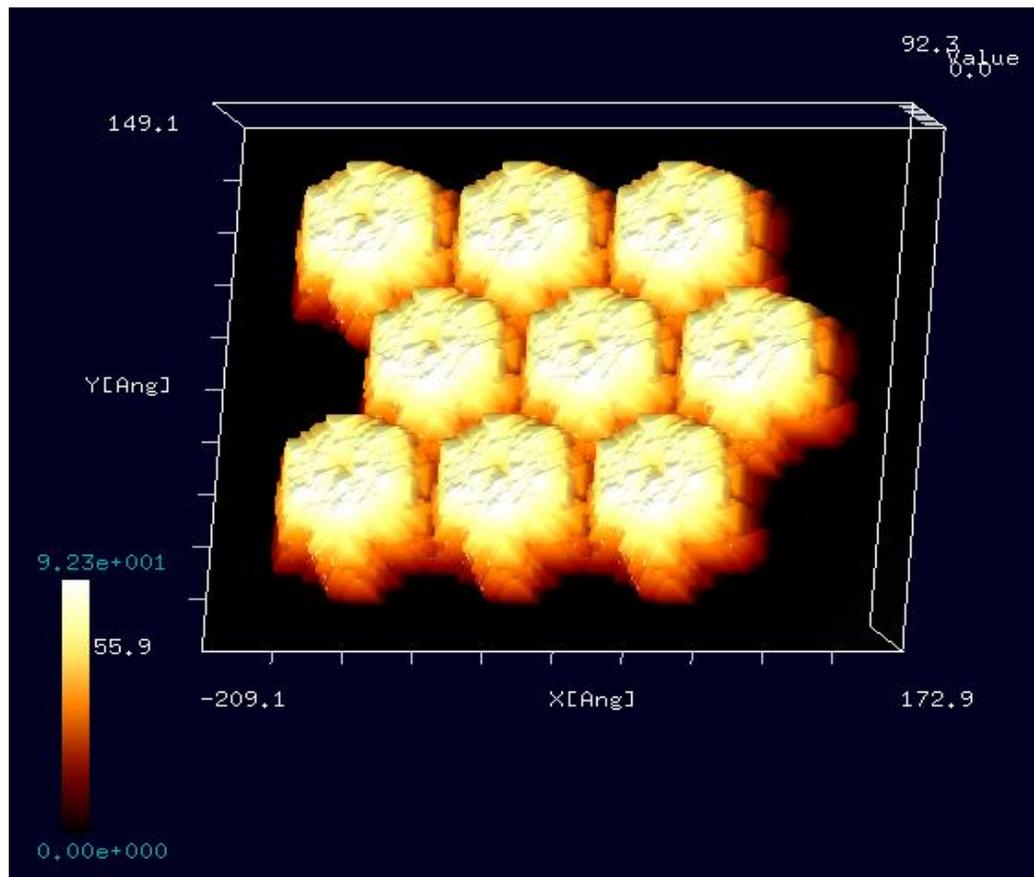
Protein Data Bank (<http://pdj.org/mine/summary/2zw3>)

2ZW3: Structure of the connexin-26 gap junction channel at 3.5 angstrom resolution

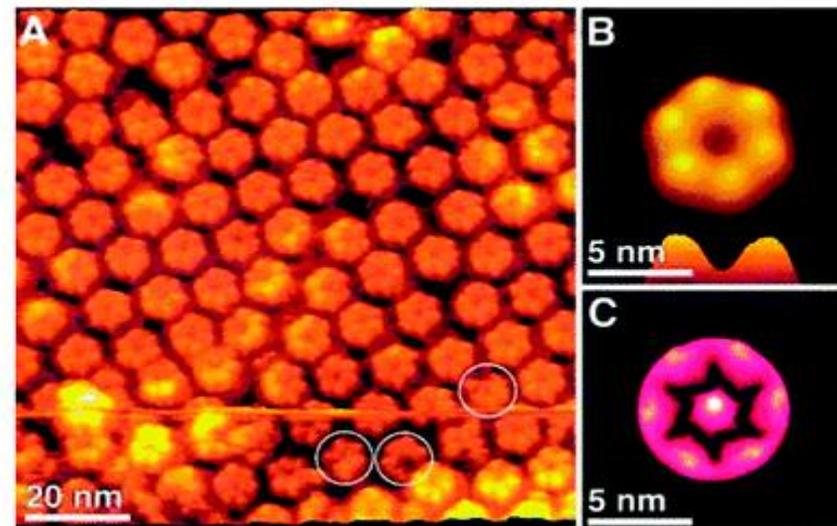
ピラミッド形探針を使用



GeoAFMによるAFMシミュレーション画像



AFM実験画像



F. Variola, 'Atomic force microscopy in biomaterials surface science', *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 2015, 17, 2950.

実験結果を良く再現

生体物質のAFM像

実験例: http://www.asylumtec.co.jp/gallery/bio_new.html

生体物質の μm オーダーのAFM像が多数ある。

計算不可能

いずれも μm オーダーあるいはそれ以上の大きさ。

SPMシミュレータは μm オーダーのシミュレートに対応していない。

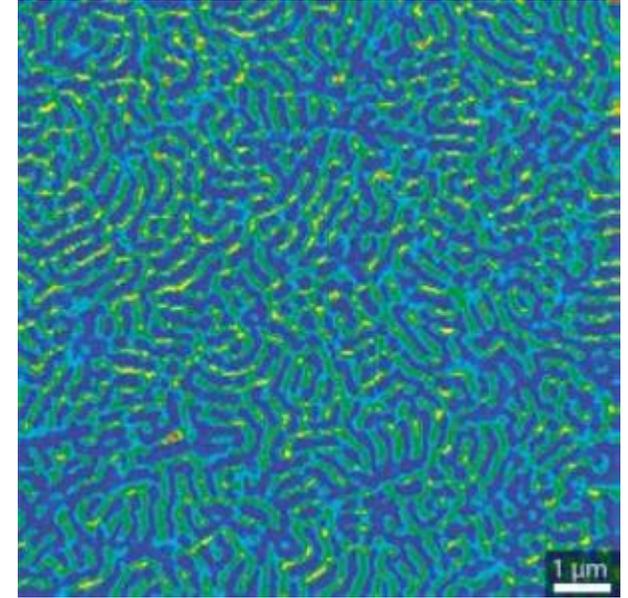
また、生体物質の分子構造データもしくは形状データを得ることができず、シミュレートできない。

GeoAFMを活用することにより、以下の新たな知見が得られます

- 様々なバイオ関連高分子のデータが登録されたサイトであるProtein Data Bankから形状データをダウンロードして、簡単にAFM画像をシミュレートすることができます
- タンパク質等の高分子を周期的に整列させた構造のAFM観察もシミュレーションできます
- シミュレーション結果と実験結果を比較することで、バイオ高分子の複雑な立体形状を確認することができます
- タンパク質の折りたたみの様子も再現可能です
- 鎖状の高分子等では、鎖構造の周期的な太さの変化等、系の特徴的な長さを、実験結果とシミュレーション結果で比較検討可能です
- 探針の形状の違いによるAFM画像の影響度も簡単に評価できます

【LiqAFM】ソフトマテリアル系材料への展望

- ナノバイオ関連分野において、AFMによる実験解析が増加傾向
- DNAなどの生体物質のAFM実験画像を時系列的に測定
- 高分子の粘弾性をAFM測定など



高分子薄膜をAFM観察し、粘弾性を可視化した図
D. Wang et al., Macromolecules 44, 8693–8697 (2011).

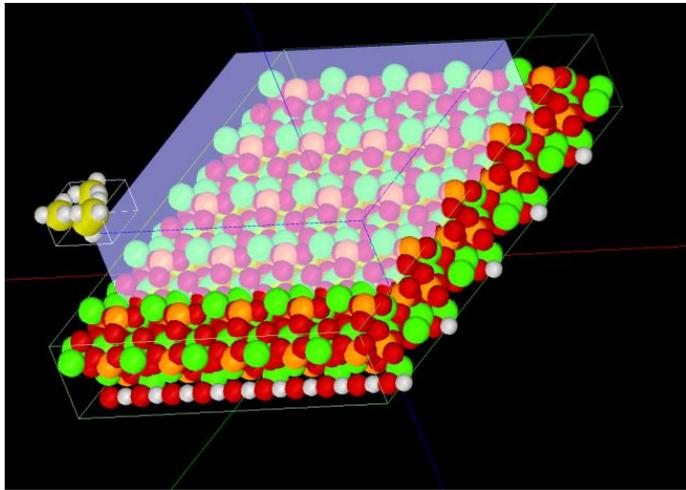
粘弾性接触解析を備えた弊社のシミュレータを発展させることで、
このような例をシミュレート可能にする。

今後、LiqAFMに、粘弾性接触解析による周波数・位相シフト像計算機能を追加予定

LiqAFMを活用することにより、以下の新たな知見が得られます

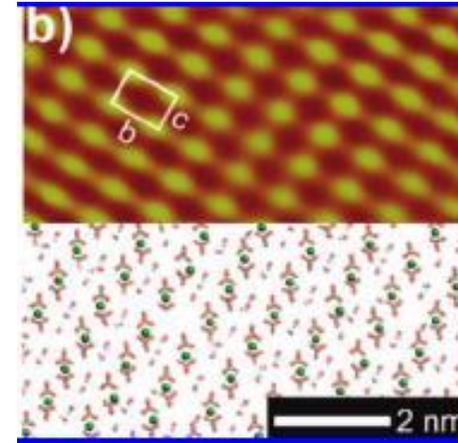
- 溶液中のバイオ試料のAFM観察をシミュレートできます
- 試料の粘弾性・表面張力を考慮したシミュレーションも可能です
- 今後は、試料表面をスキャンして、周波数シフト、位相シフトの分布図を求めるタッピング機能が追加される予定です

CG: ハイドロキシアパタイト AFM

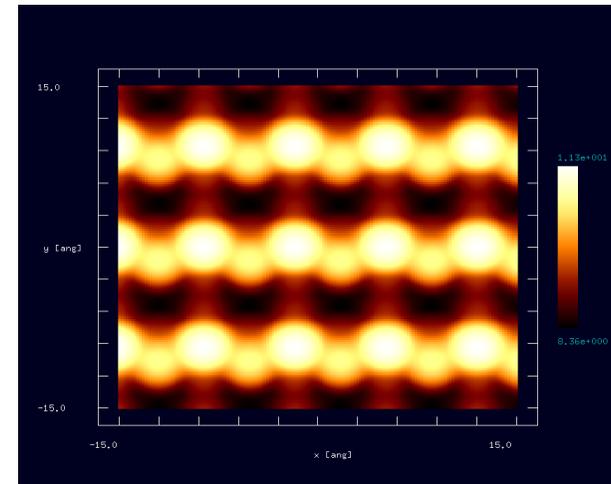


探針: シリコン
試料表面: HAP(100)

- カルシウムを主体とした結晶構造にも対応可能
- 結晶構造形状データは、専用ソフトSetModelで作成可能



AFM実験結果
Langmuir, 24, 12446-12451 (2008)



CGAFM 力一定像
原子位置固定

CGを活用することにより、以下の新たな知見が得られます

- バイオ関連材料の周波数シフトAFM像をÅオーダーで求めることができます
- SetModelを使えば、カルシウム等の生体を構成する原子の配列が簡単に作れます
- ChemSketchと呼ばれるフリーソフトにより、ほとんどあらゆる有機高分子の形状データを作成できます
- ChemSketchには、簡単な分子立体構造の最適化機能が付いています
- 百数十個程度の原子からなる、バイオ関連分子や生物を構成する材料であれば、シミュレーション可能です

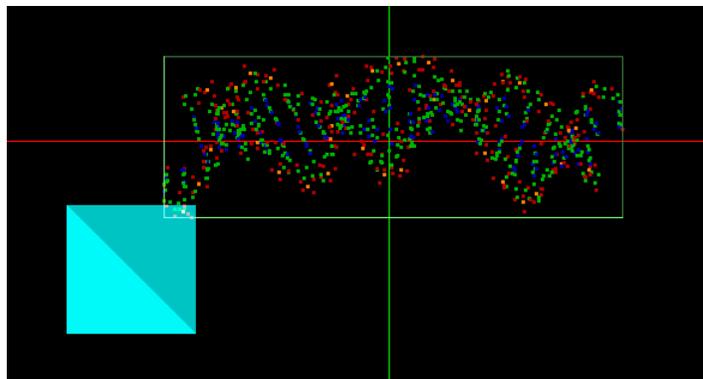
FemAFM(DLVO理論解析モード)

DNA分子のAFM画像シミュレーション

高さ一定モード

ピラミッド型SiO₂探針

探針と試料の最短距離: 7.75[Å]



DNA分子のらせん構造が
良く表れている

イオン溶液濃度: 0.5[M]

イオン電荷: $z = \pm 1$

温度: 300[K]

溶液の比誘電率: 80.4

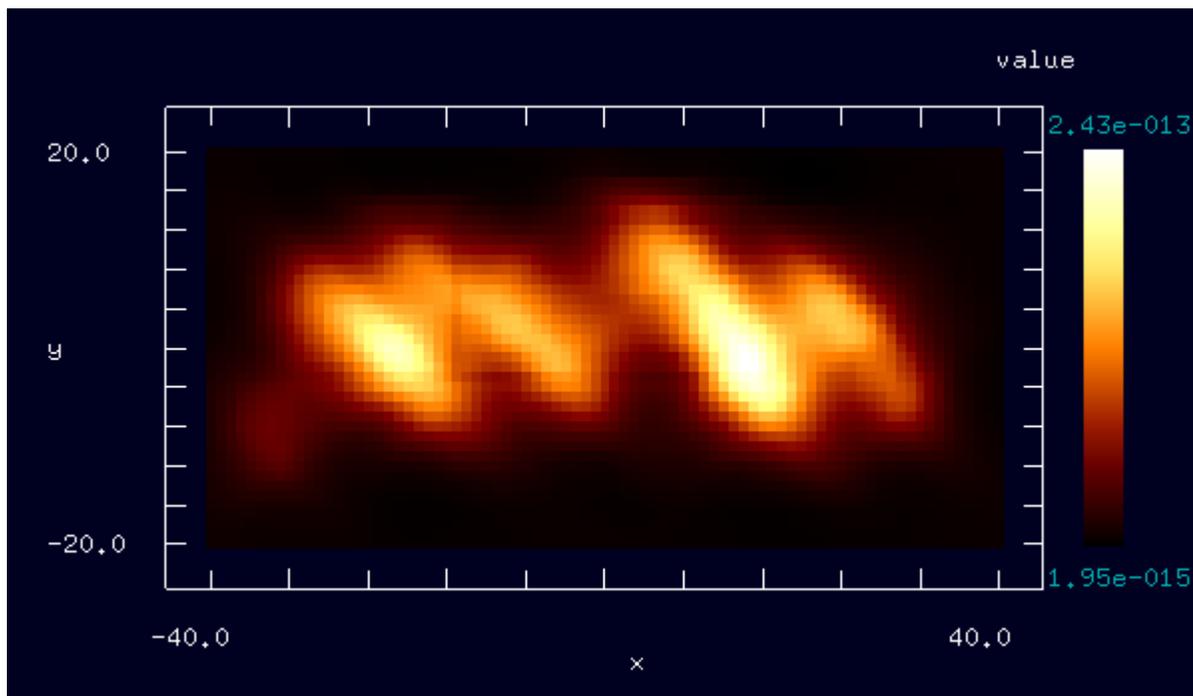
探針の表面電位(バックグラウンド一定値): - 0.025[V]

表面電位に由来する探針の表面電荷密度: -0.0407[C/m²]

試料の表面電位(バックグラウンド一定値): - 0.025[V]

表面電位に由来する試料の表面電荷密度: -0.0407[C/m²]

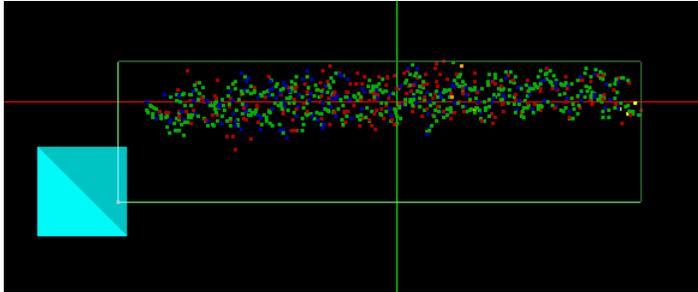
デバイ長さ: 4.37E-10[m]



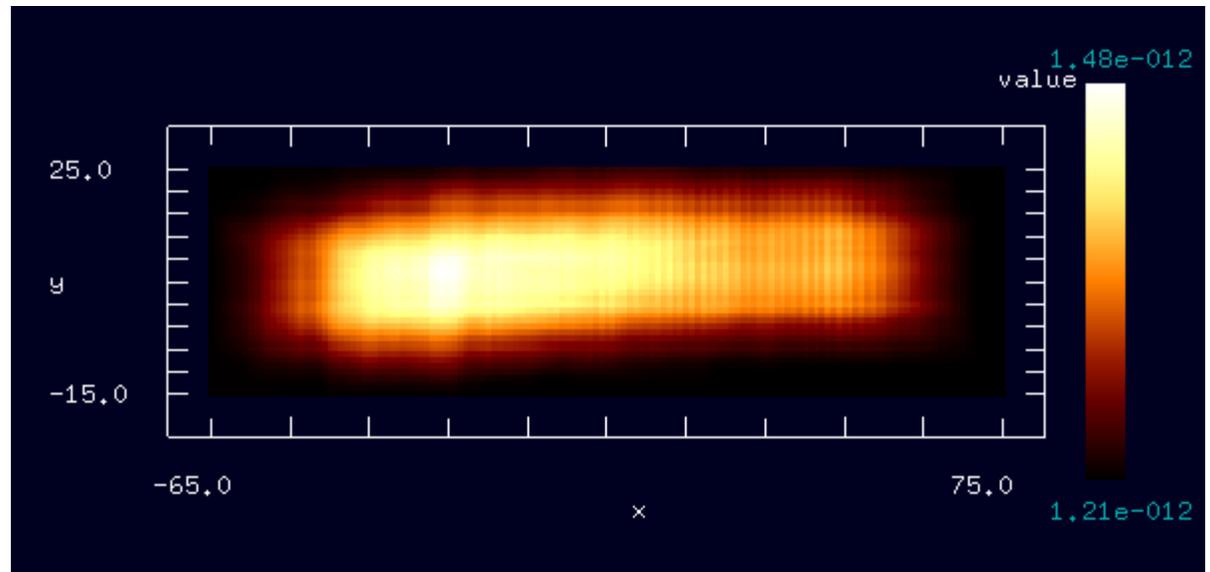
FemAFM(DLVO理論解析モード)

コラーゲン分子のAFM画像シミュレーション

高さ一定モード
ピラミッド型SiO₂探針
探針と試料の最短距離: 8.29[Å]

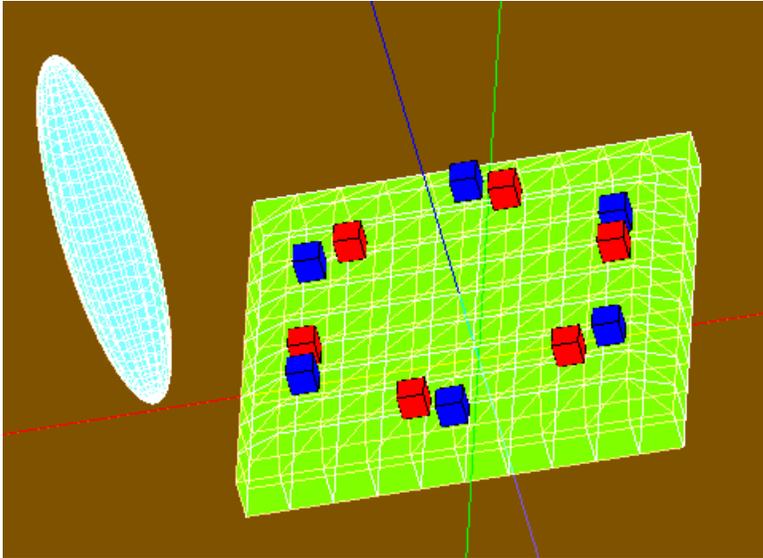


イオン溶液濃度: 0.01[M]
イオン電荷: $z = \pm 1$
温度: 300[K]
溶液の比誘電率: 80.4
探針の表面電位(バックグラウンド一定値): - 0.05[V]
表面電位に由来する探針の表面電荷密度: -0.0115[C/m²]
試料の表面電位(バックグラウンド一定値): - 0.05[V]
表面電位に由来する試料の表面電荷密度: -0.0115[C/m²]
デバイ長さ: 3.09E-9[m]



FemAFM_DLVOを活用することにより、以下の新たな知見が得られます

- コロイド溶液中のバイオ関連材料のAFM像をミクロンオーダーからナノメートルオーダーで求めることができます
- タンパク質の構造データは、ProteinDataBankと呼ばれる、一般に公開されたWeb上のデータベースから取得できます
- コロイド溶液から生じる電気二重層間の斥力を評価できます



探針と試料を取り巻く電解質溶液
イオン濃度: 1.0[M] ただし、[M]=[mol/dm³]
イオン電荷: +1
温度: 300[K]
比誘電率: 80.4
デバイ長さ: 0.309[nm]

探針: 幅2[nm]、深さ2[nm]、高さ10[nm]の回転楕円体

試料: 幅10[nm]、深さ10[nm]、高さ1.4[nm]の有機材料の基板

試料基板のメッシュ幅は1[nm]とした

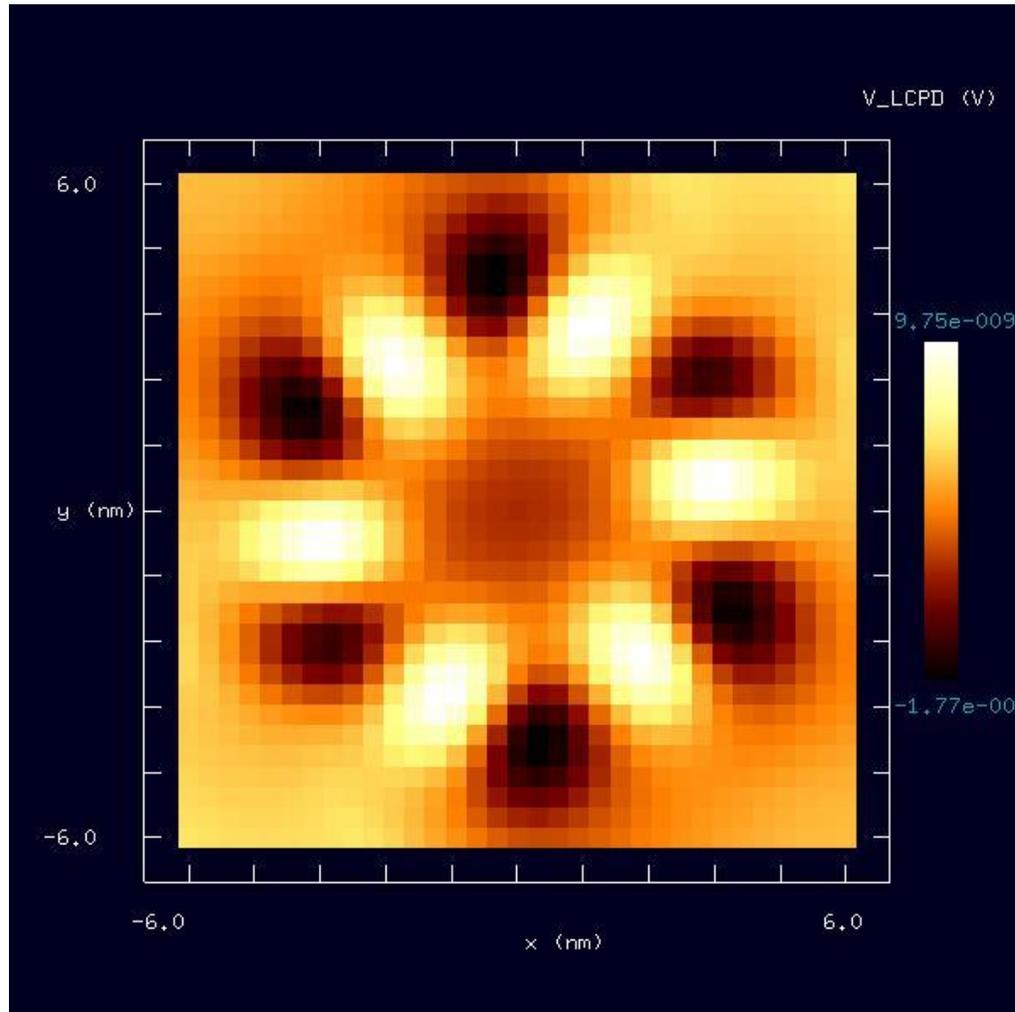
探針先端と試料の最短距離: 3[nm]

探針は導体とする

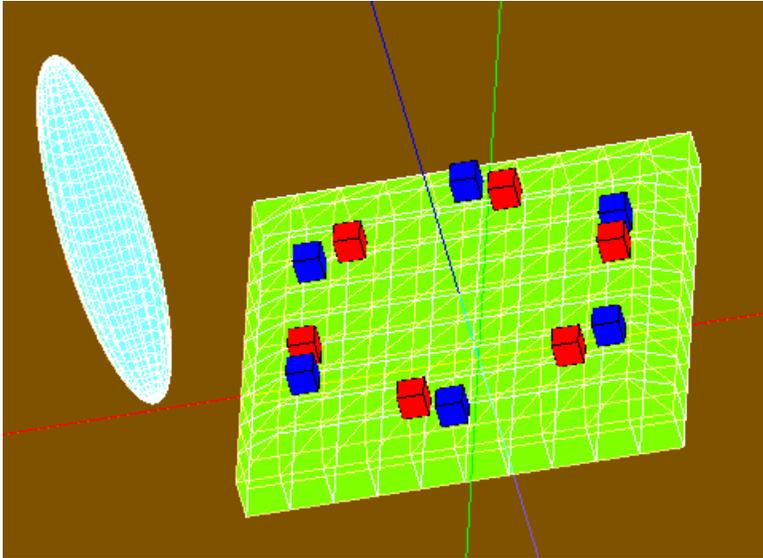
基板は電圧0[V]とする

試料は、比誘電率80.4の誘電体とする
試料表面に、 $0.38|e|$ と $-0.38|e|$ の正負の電荷を合計12個、六角形状に配置した

LCPD(局所接触電位差)像



最大值: 9.75×10^{-9} [V]
最小値: -1.77×10^{-8} [V]



探針: 幅2[nm]、深さ2[nm]、高さ10[nm]の回転楕円体

試料: 幅10[nm]、深さ10[nm]、高さ1.4[nm]の有機材料の基板

試料基板のメッシュ幅は1[nm]とした

探針先端と試料の最短距離: 3[nm]

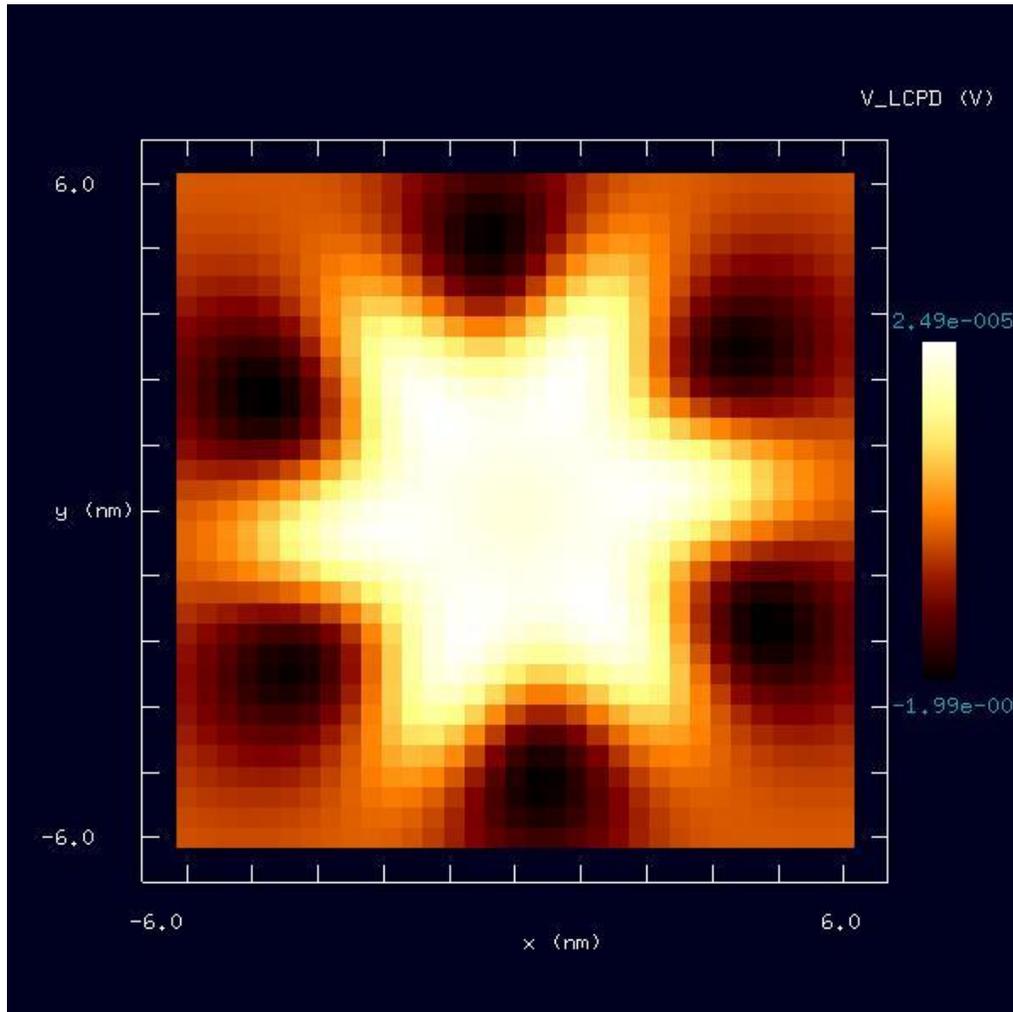
探針と試料を取り巻く電解質溶液
イオン濃度: 0.1[M] ただし、[M]=[mol/dm³]
イオン電荷: +1
温度: 300[K]
比誘電率: 80.4
デバイ長さ: 0.977[nm]

探針は導体とする

基板は電圧0[V]とする

試料は、比誘電率80.4の誘電体とする
試料表面に、 $0.38|e|$ と $-0.38|e|$ の正負の電荷を合計12個、六角形状に配置した

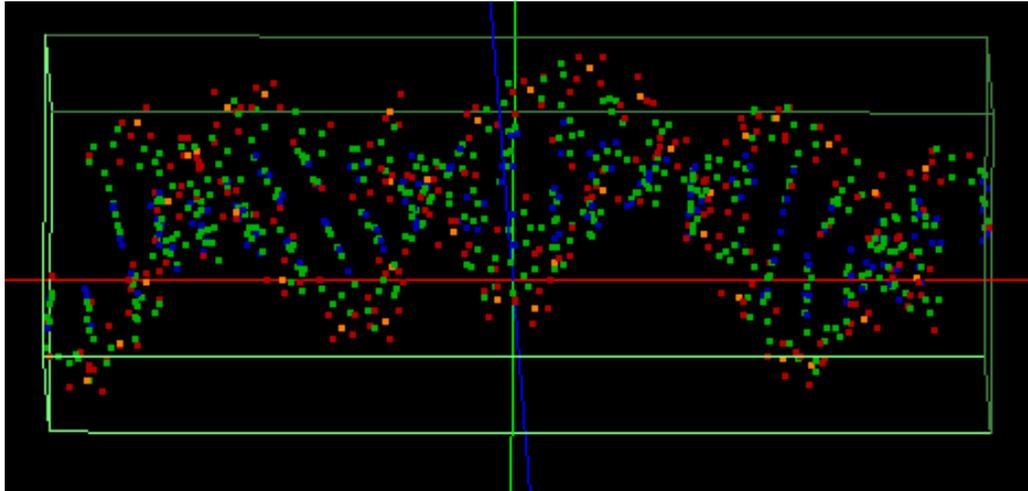
LCPD(局所接触電位差)像



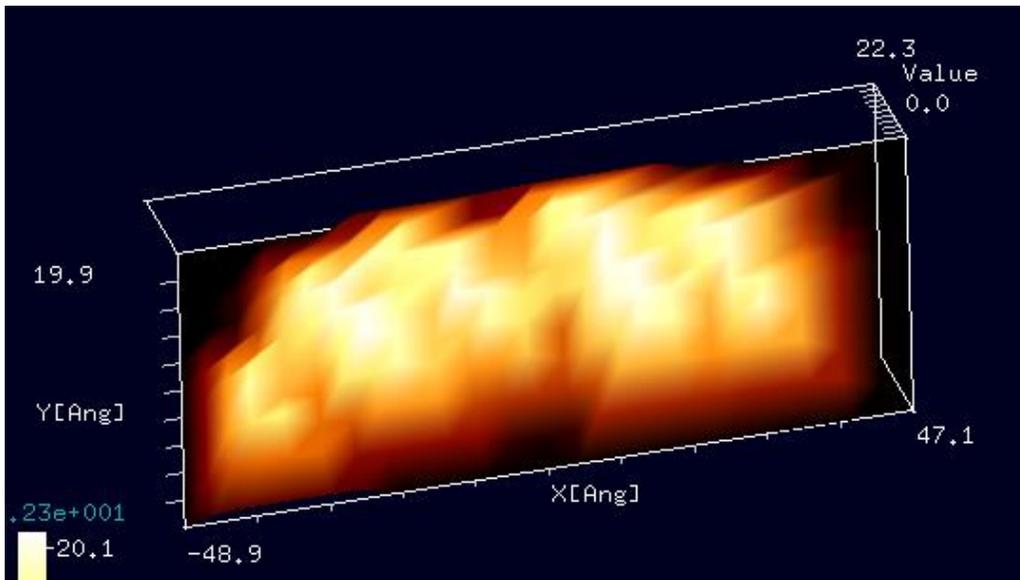
最大值: 2.49E-5[V]
最小値: -1.99E-5[V]

macroKPFM_DLVO

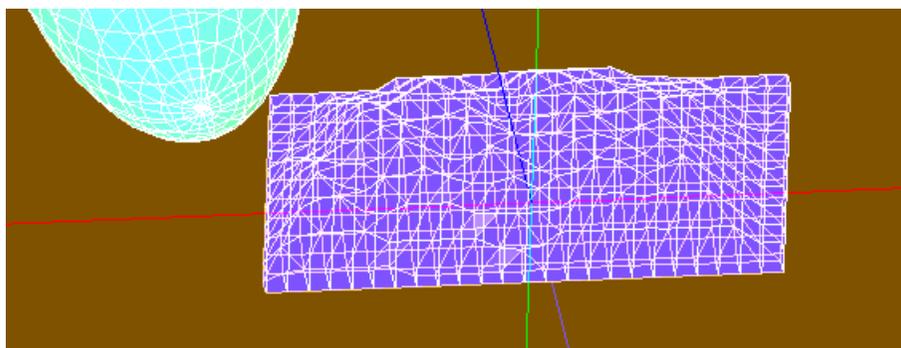
DNA分子表面に均一電荷を分布させた場合のLCPD像



DNAの分子構造図



DNA分子に対して、0.4[nm]の分解能で得られたAFM像



探針: 幅6[nm]、深さ6[nm]、高さ20[nm]の
回転楕円体

試料: 幅9.6[nm]、深さ4[nm]、高さ2.63[nm]の
DNA分子

試料のメッシュ幅は0.4[nm]とした

探針先端と試料の最短距離: 4.87[nm]

探針と試料を取り巻く電解質溶液

イオン濃度: 0.01[M] ただし、[M]=[mol/dm³]

イオン電荷: +1

温度: 300[K]

比誘電率: 80.4

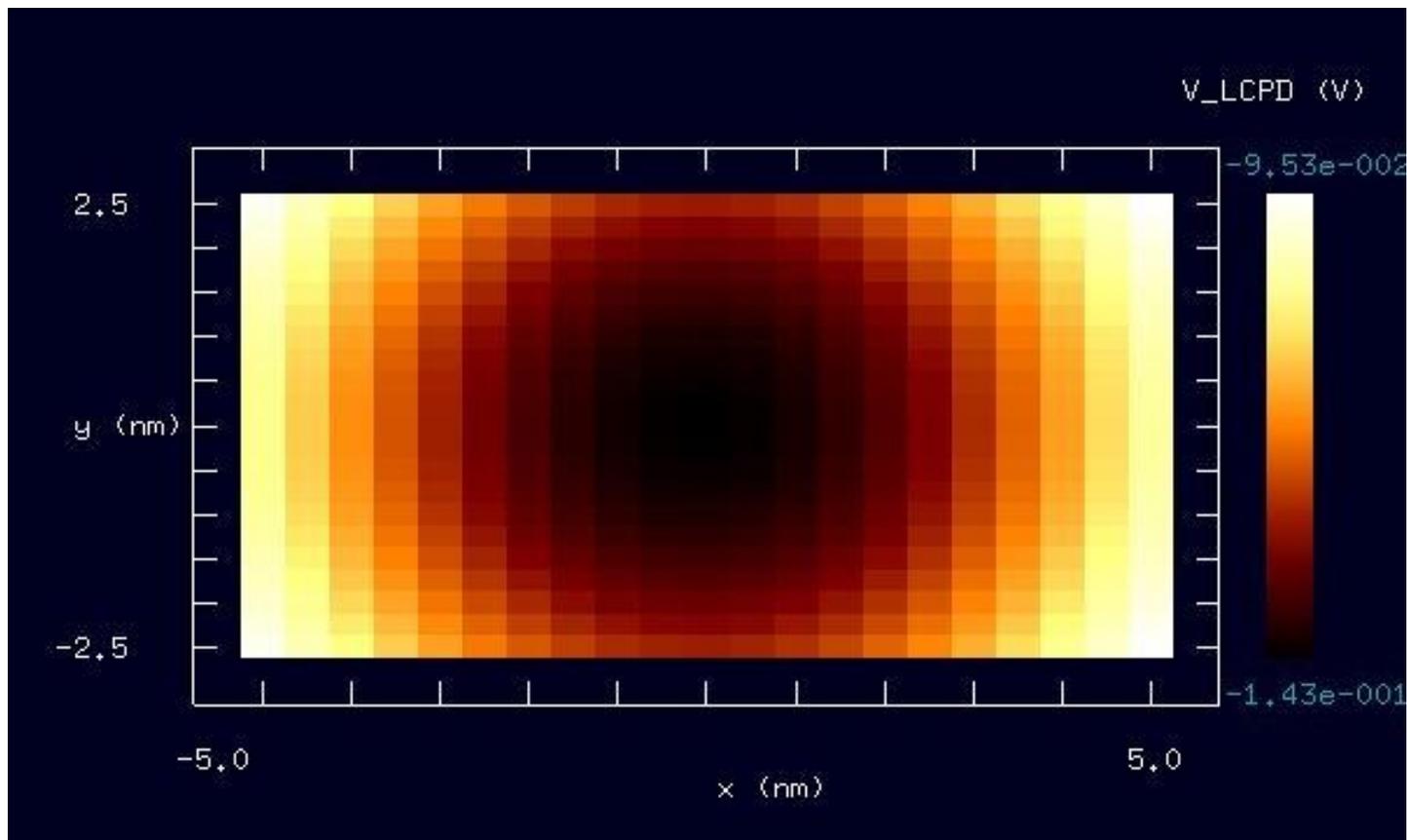
デバイ長さ: 3.09[nm]

探針は導体とする

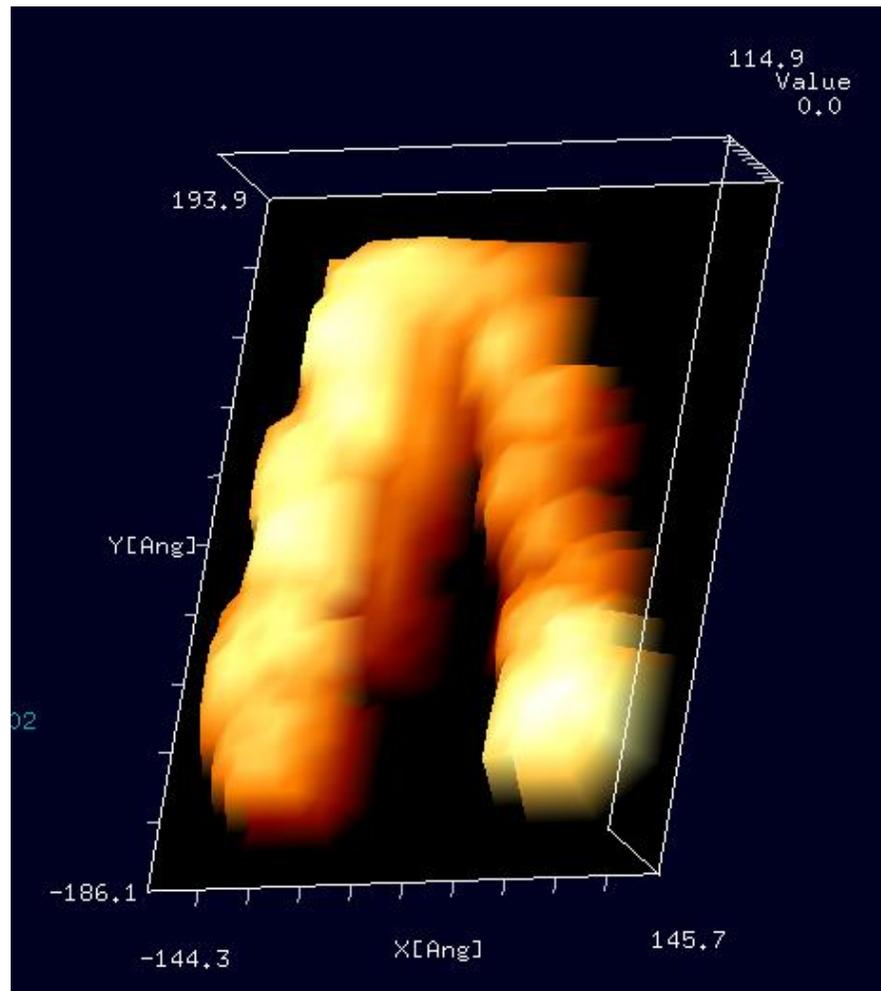
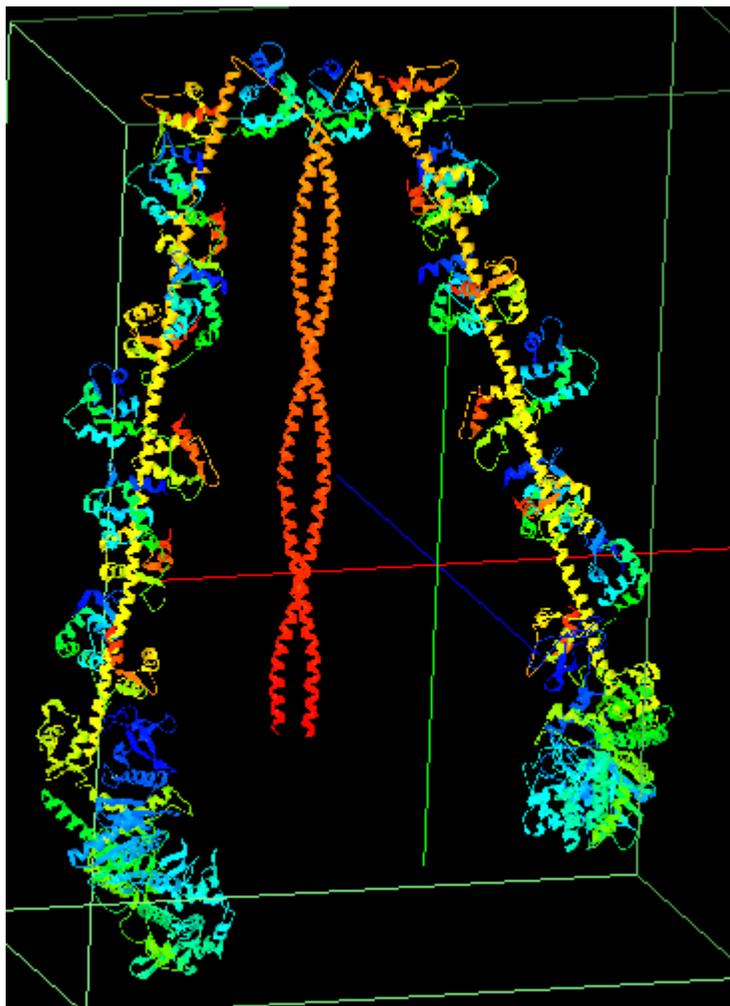
基板は電圧0[V]とする

試料は、比誘電率80.4の誘電体とする
試料表面に、 $-3.0E-1$ [C/m²]の電荷を分
布させる

LCPD(局所接触電位差)像

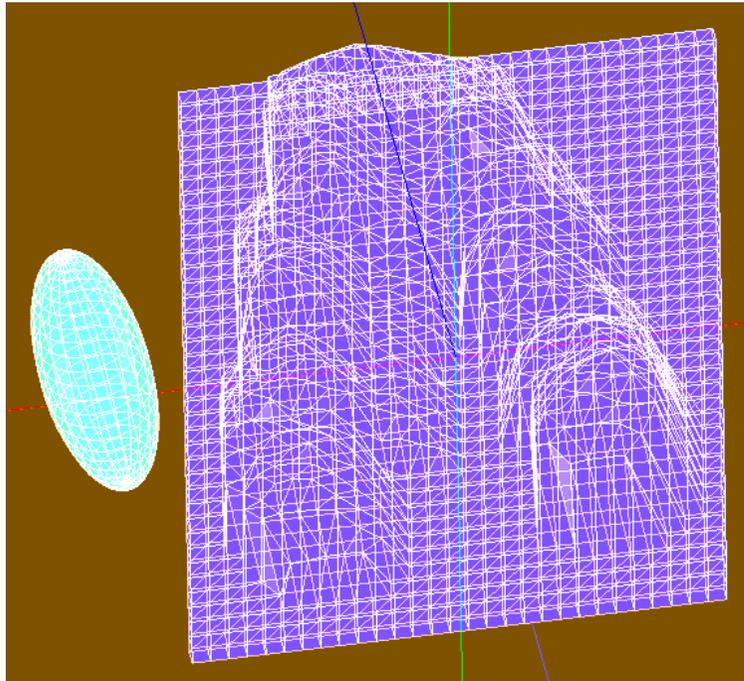


最大值: $-9.53E-2[V]$
最小値: $-1.43E-1[V]$



DNAの分子構造図

DNA分子に対して、1.0[nm]の分解能で得られたAFM像



探針: 幅6[nm]、深さ6[nm]、高さ20[nm]の
回転楕円体

試料: 幅29[nm]、深さ38[nm]、高さ12.5[nm]の
ミオシン分子

試料のメッシュ幅は1.0[nm]とした

探針先端と試料の最短距離: 5.01[nm]

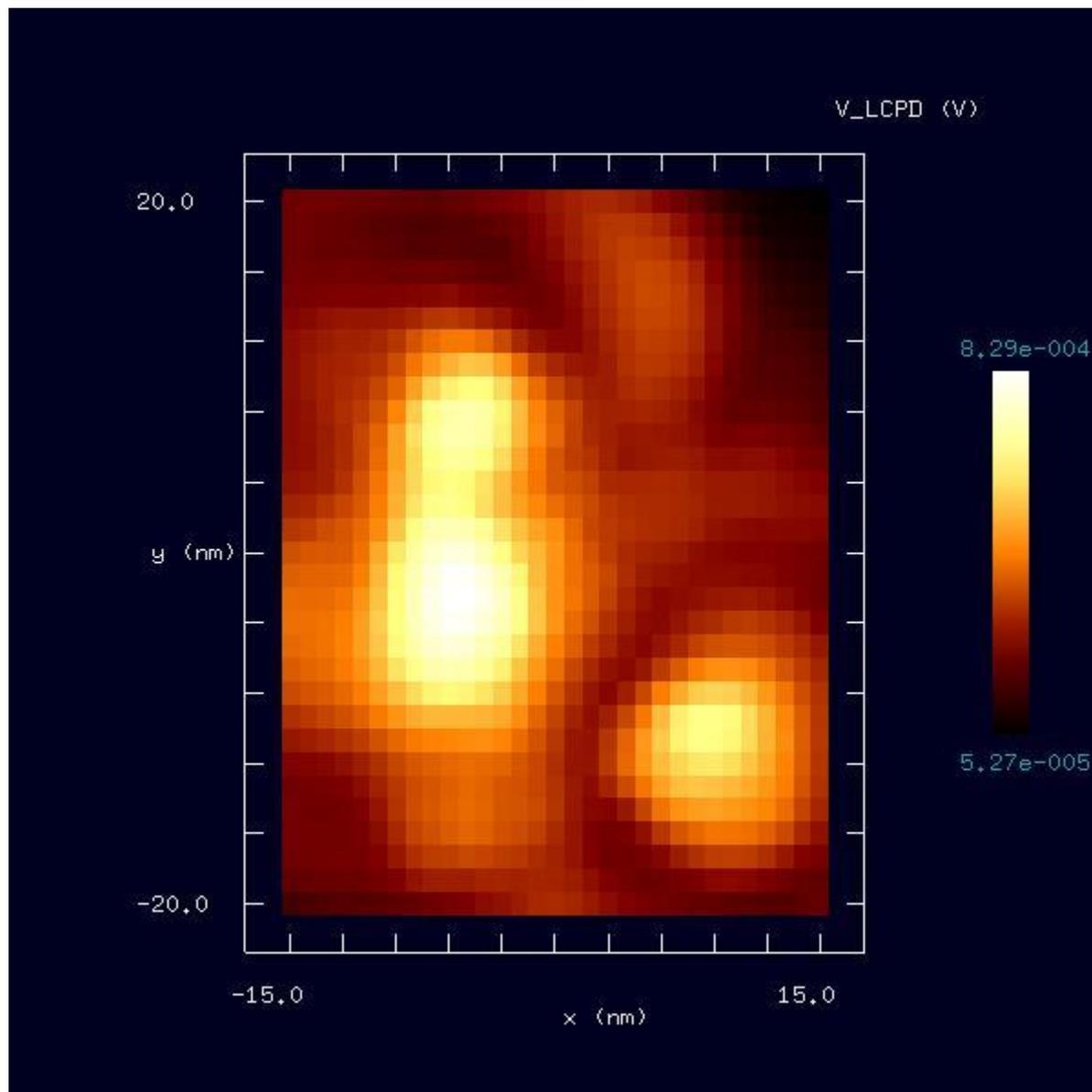
探針と試料を取り巻く電解質溶液
イオン濃度: 10.0[M] ただし、[M]=[mol/dm³]
イオン電荷: +1
温度: 300[K]
比誘電率: 80.4
デバイ長さ: 0.0977[nm]

探針は導体とする

基板は電圧0[V]とする

試料は、比誘電率80.4の誘電体とする
試料表面に、 $-1.0E-4$ [C/m²]の電荷を分
布させる

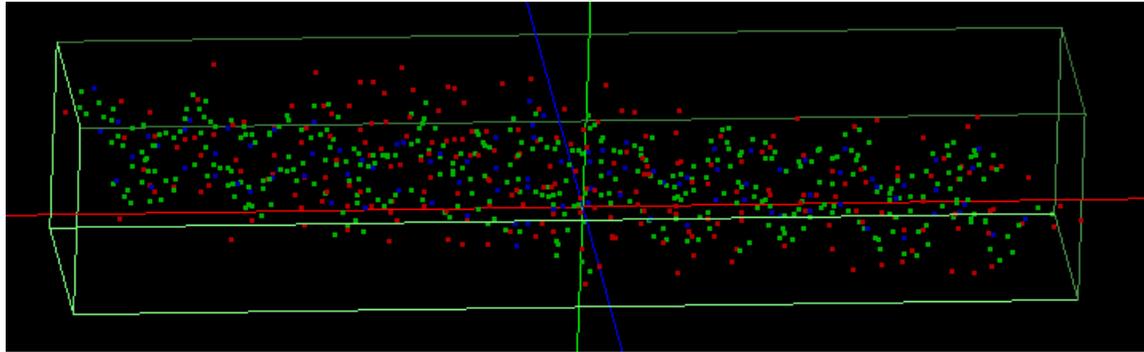
LCPD(局所接触電位差)像



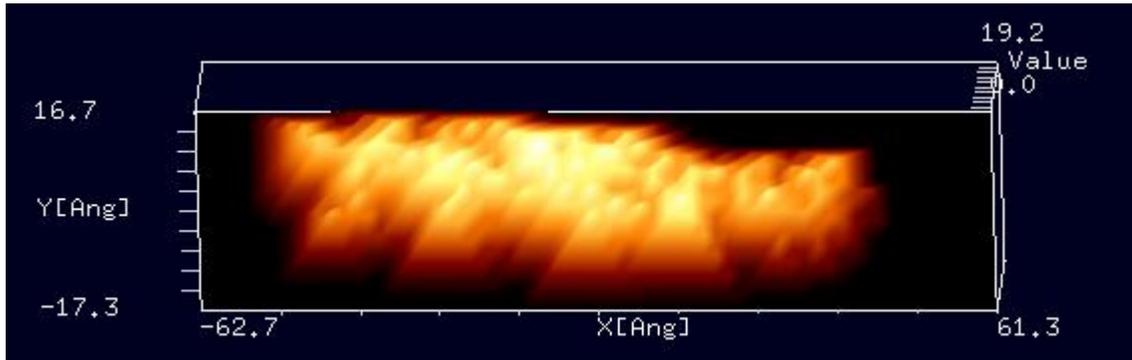
最大值: 8.29E-4[V]
最小値: 5.27E-5[V]

macroKPFM_DLVO

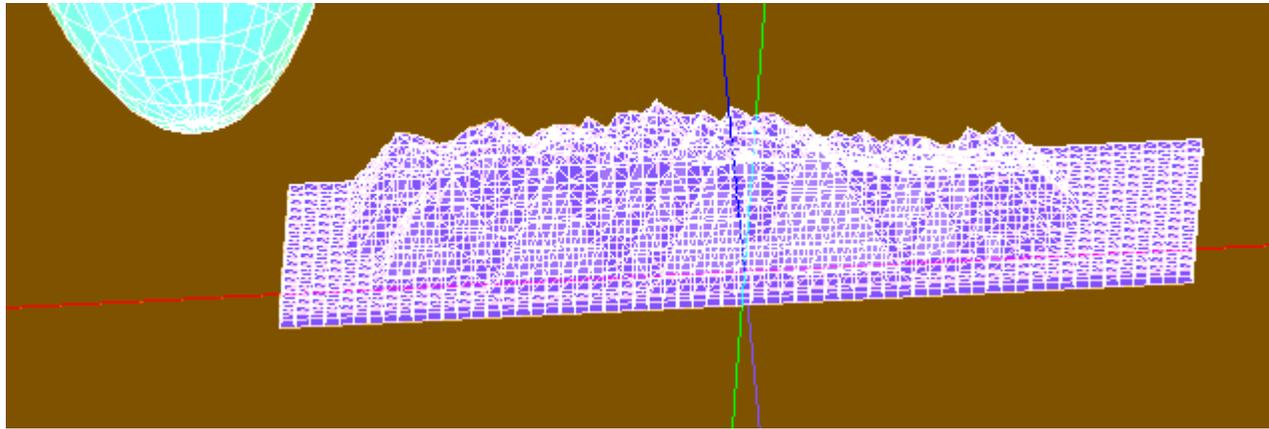
コラーゲン分子表面に均一電荷を分布させた場合のLCPD像



コラーゲンの分子構造図



コラーゲン分子に対して、0.2[nm]の分解能で得られたAFM像



探針:幅6[nm]、深さ6[nm]、
高さ20[nm]の回転楕円体

試料のメッシュ幅は0.2[nm]
とした

探針先端と試料の最短距離:
1.38[nm]

試料:幅12.4[nm]、深さ3.4[nm]、高さ2.12[nm]の
コラーゲン分子

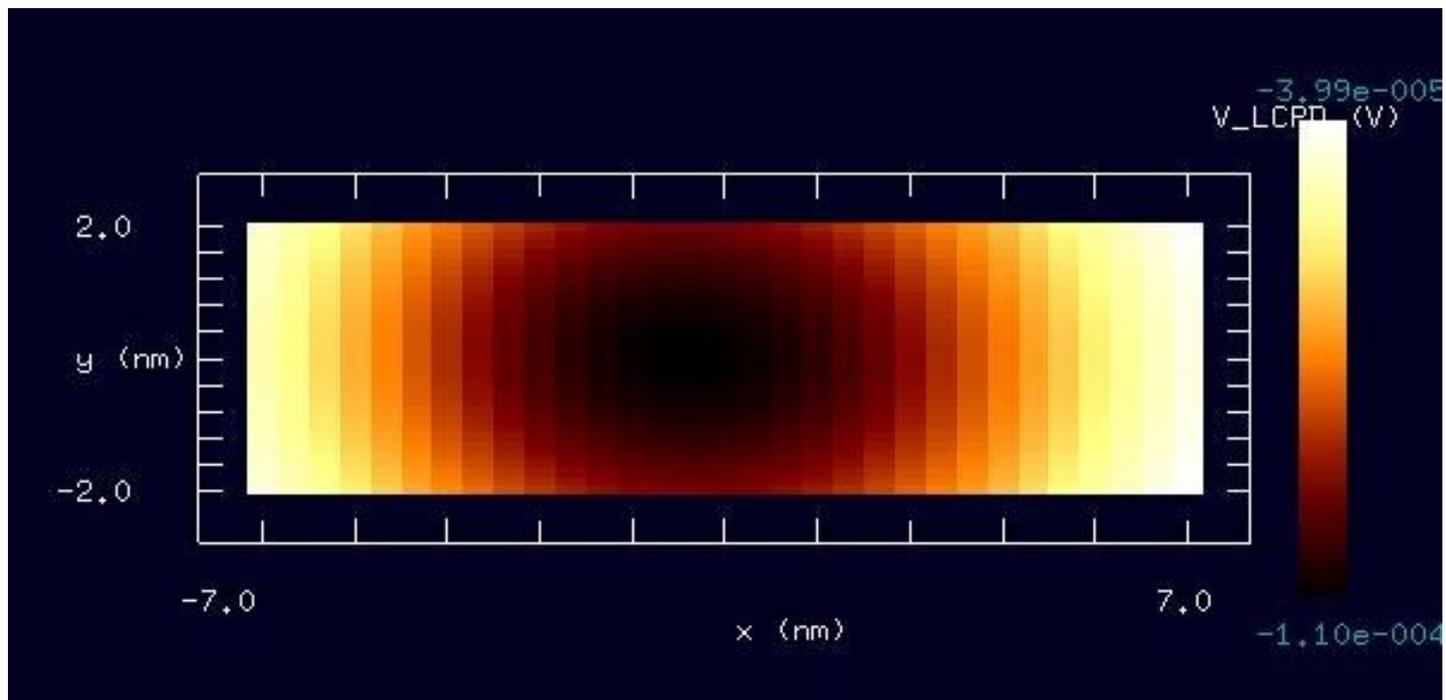
探針と試料を取り巻く電解質溶液
イオン濃度:0.1[M] ただし、[M]=[mol/dm³]
イオン電荷:+1
温度:300[K]
比誘電率:80.4
デバイ長さ:0.977[nm]

探針は導体とする

基板は電圧0[V]とする

試料は、比誘電率80.4の誘電体とする
試料表面に、 -1.0×10^{-4} [C/m²]の電荷を
分布させる

LCPD(局所接触電位差)像

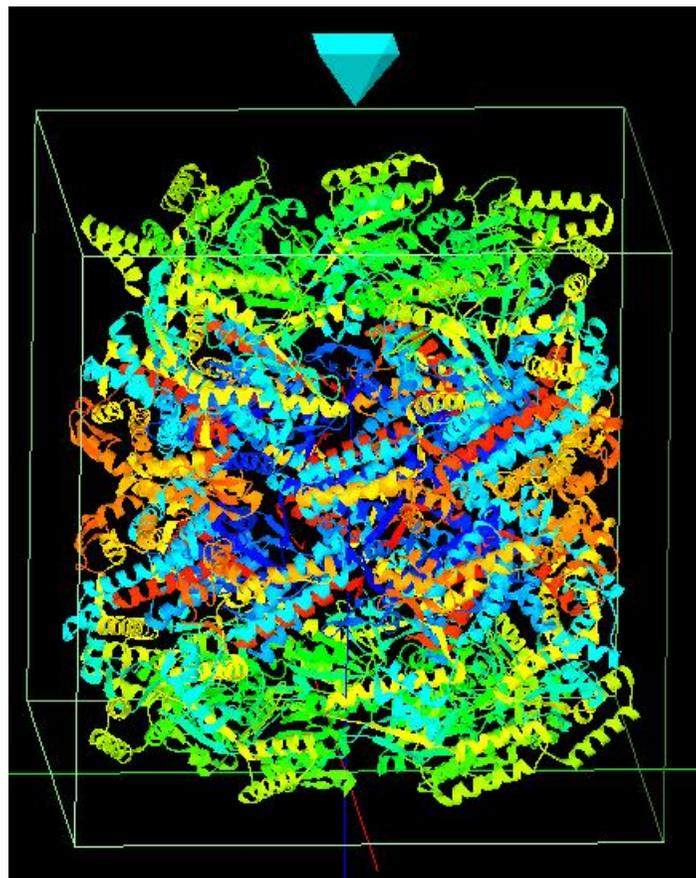


最大值: -3.99×10^{-5} [V]

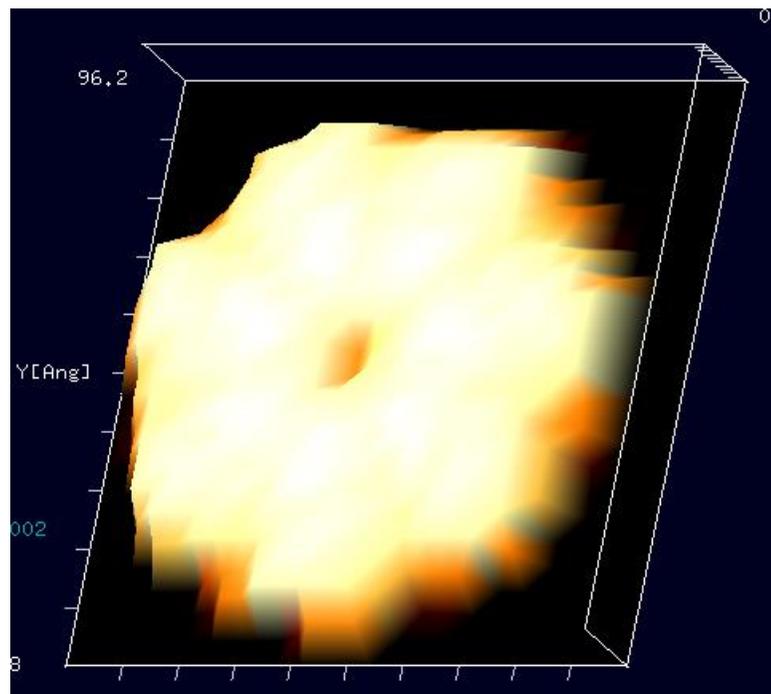
最小値: -1.10×10^{-4} [V]

macroKPFM_DLVO

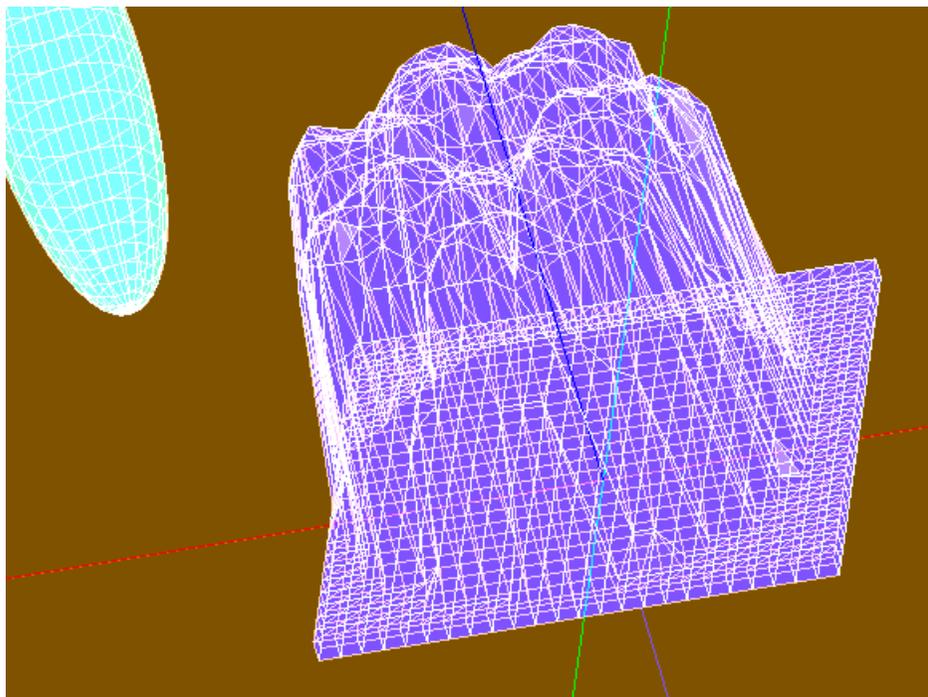
シャペロニンGroEL分子表面に均一電荷を分布させた場合の
LCPD像



シャペロニンGroELの分子構造図



シャペロニンGroEL分子に対して、
0.8[nm]の分解能で得られたAFM像



探針:幅6[nm]、深さ6[nm]、高さ20[nm]の
回転楕円体

試料のメッシュ幅は0.8[nm]とした

探針先端と試料の最短距離:2.02[nm]

探針は導体とする

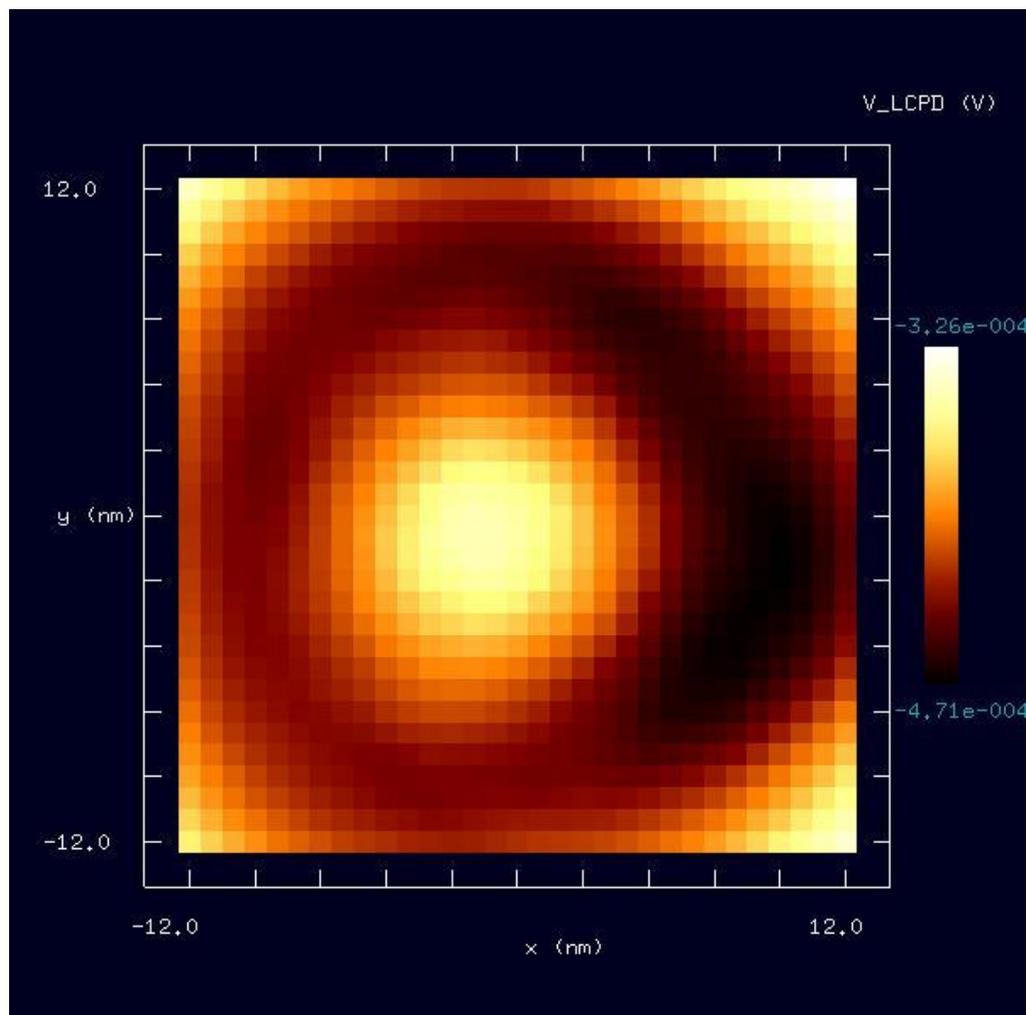
基板は電圧0[V]とする

試料は、比誘電率80.4の誘電体とする
試料表面に、 $-1.0E-4[C/m^2]$ の電荷を分
布させる

探針と試料を取り巻く電解質溶液
イオン濃度:0.1[M] ただし、 $[M]=[mol/dm^3]$
イオン電荷:+1
温度:300[K]
比誘電率:80.4
デバイ長さ:0.977[nm]

試料:幅19.2[nm]、深さ19.2[nm]
、高さ15.5[nm]のコラーゲン分子

LCPD(局所接触電位差)像



最大值: -3.26×10^{-4} [V]
最小値: -4.71×10^{-4} [V]

macroKPFM_DLVOを活用することにより、以下の新たな知見が得られます

- コロイド溶液中のバイオ関連材料のLCPD像をミクロンオーダーからナノメートルオーダーで求めることができます
- タンパク質の構造データは、ProteinDataBankと呼ばれる、一般に公開されたWeb上のデータベースから取得できます
- コロイド溶液から生じる電気二重層間の斥力を評価できます

今後の開発予定

μm オーダーの系でのKPFMシミュレーションを要望する声が多い

(具体例)基板: SiO_2 , SiC , Cu

基板の上に乗せるもの: グラフェン(単層、二層、多層)、Pt

探針: Rh(ロジウム)コートされたもの

メゾスコピックな系でのKPFMシミュレーションを行いたい
DFTBソルバは、nmオーダーなので実現は難しい



マクロKPFMシミュレータの開発

過去に、このようなソフトウェアを企画し、諸般の事情で途中で開発を中止してしまった経緯があり

境界要素法と古典電磁気学の理論を組み合わせて実現

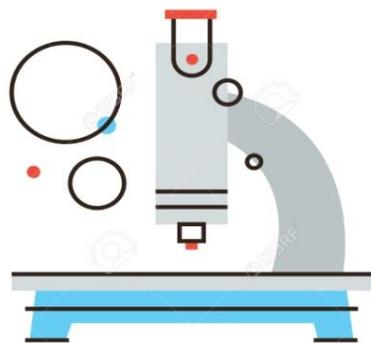
開発途中のプログラム・ソースコードが残っているので、これを利用して開発を再開させることも可能

6か月から10カ月程度の開発期間が必要

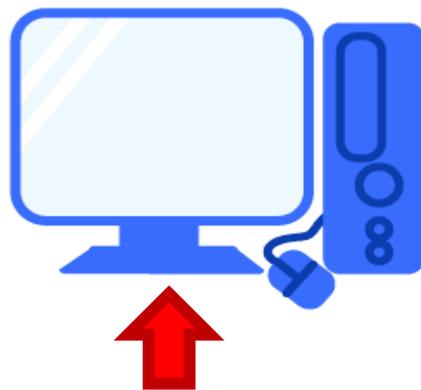
SPMシミュレータのバンドル販売方法について

- SPM実験装置をお買い上げの顧客に、SPMシミュレータの実行ファイルを収めたDVD-ROMを同時提供します
- SPM実験装置ユーザーは、すぐに、お手元のWindowsパソコンにSPMシミュレータをインストールして使用できます
- ライセンスもインターネットで簡単に登録できます

- SPMシミュレータを使えば、SPM実験装置で得られた生データを、お手元のWindowsパソコン上でデジタル処理できます
- シミュレーション計算もWindowsパソコン上で簡単操作できます



SPM実験装置



Linux, GPUにも対応しています
(ただし、Linuxにはグラフィックユーザーインターフェースが付属していません)

SPM実験装置のすぐそばのPCにSPMシミュレータをインストール