

# 周波数変調方式原子間力顕微鏡の開発と液中生体分子イメージング

山田 啓文

## Development of Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquids and Its Application to Molecular-Scale Bio-Imaging

Hirofumi YAMADA

Recent progress in frequency modulation atomic force microscopy (FM-AFM) in liquids has opened a new way to direct visualization of “*in vivo*” molecular-scale biological processes. One of the major difficulties in FM-AFM imaging in low Q-factor environments is a marked increase in the phase noise of the self-oscillation loop for the cantilever. We successfully reduced the phase noise by decreasing the coherence of the laser light used in the cantilever deflection sensor. In this article subnanometer-resolution imaging of biomolecules such as membrane proteins in liquids using the improved FM-AFM is described. In addition, by force mapping method in FM-AFM we recently succeeded in visualizing the hydration structures, which play essential roles in the stabilization of higher-order protein structures as well as in various bio-function processes.

**Key words:** frequency modulation atomic force microscopy, FM-AFM, molecular-scale imaging, hydration structure, force mapping method

周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM: frequency modulation atomic force microscopy) は、超高真空中における非破壊の高分解能観察法として (非接触原子間力顕微鏡 NC-AFM としても知られる)、すでに表面科学分野では広く使用されているが<sup>1)</sup>、現在では、この FM-AFM 技術に基づく、電荷分布、表面電位などが計測可能なケルビンプローブ原子間力顕微鏡 (KFM) や<sup>2,3)</sup>、原子識別、原子結合状態計測を可能とする三次元フォースマッピング法などの分析手法も広まりつつある<sup>4)</sup>。

一方で、原子間力顕微鏡には、その動作環境や測定試料に対する原理的な制約条件が存在しないという、他の高分解能構造観察法にはない際立った特徴をもっており、液中環境における AFM による原子・分子分解能構造観察、特に生理溶液下における生体試料の“生きたまま (*in vivo*)”高分解能観察などナノスケール生体試料評価に向けて大きな期待が寄せられている。しかしながら、FM-AFM では、高い Q 値をもつカンチレバーの機械共振を利用し

て、対象原子・分子と AFM 探針間にはたらく短距離相互作用力を周波数変化として高感度に検出していることから、Q 値が著しく低下して、力検出信号感度が大きく劣化する液中での測定にはただちには応用できなかった。近年、カンチレバー変位検出系の低雑音化、微小振幅 FM 検出が実現したことで、溶液環境での高感度・高分解能 FM-AFM イメージングが達成された<sup>5,6)</sup>。

本稿では、FM-AFM における雑音、その感度限界について考察し、開発した FM-AFM 装置を用いた生体分子イメージングの現状およびその課題と展望について述べる。

### 1. 液中動作 FM-AFM

#### 1.1 FM-AFM の動作原理および周波数雑音<sup>7-9)</sup>

FM-AFM では、図1に示すように、カンチレバーを機械的共振器とする電気-機械発振系を構成することで、カンチレバーは常に共振周波数で振動 (自励発振) するようになっている。分子間力や静電気力など探針-試料間にはた

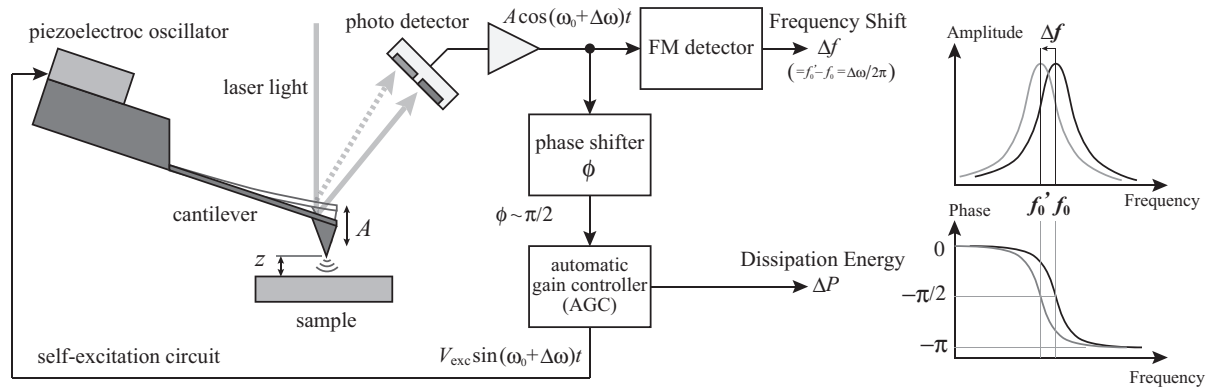


図1 左：FM-AFMの動作原理図，右上：カンチレバーの振動振幅スペクトル，相互作用力により共振周波数は $\Delta f$ シフトする．右下：位相特性．FM-AFMでは自励発振回路によりカンチレバーの振動位相遅れは常に $-\pi/2(90^\circ)$ にロックされている．

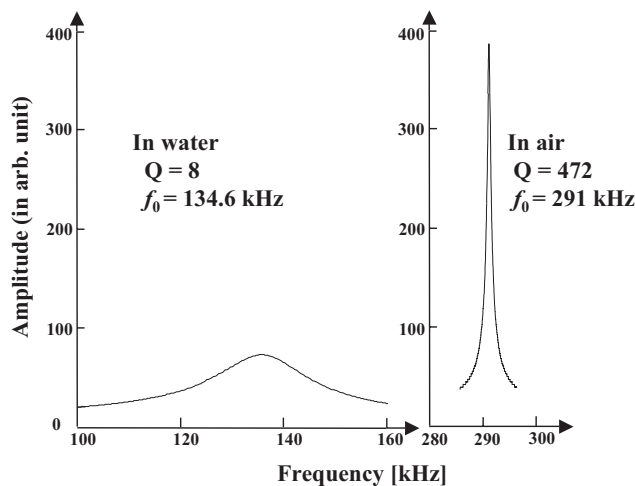


図2 カンチレバーのブラウン運動スペクトルの例．左：水中，右：大気中．比較のため縦軸および横軸のスケールは揃えてある．

らく相互作用力はカンチレバーの共振周波数を変化させるため，この発振周波数も変化する（図1左図参照）．したがって，この周波数の変化をとらえることで，探針-試料間にはたらく力を精密に制御することが可能となる．周波数シフトを検出する方法にはさまざまな方法があるが，現在，位相同期ループ回路による周波数変化検出が広く用いられている．

FM検出法によって高感度（高信号雑音比）での相互作用力検出が可能であるのは，カンチレバー力学共振系が，FM-AFMの通常の動作環境である真空中で10,000を超える高いQ値をもち，周波数ゆらぎの少ない低雑音の検出系として動作するためである．これに対して液中環境では粘性・慣性抵抗のために，Q値は通常10以下と著しく減少するため，発振系の周波数ゆらぎが大きな問題となる．図2に，大気中（ $Q=472$ ）および液中（ $Q=8$ ）で測定されたカンチレバーの熱雑音振動スペクトル（いわゆるブラウン運動スペクトル）の例を示す．FM-AFMにおける雑

音は発振系内の位相雑音（カンチレバーの変位ゆらぎと振動振幅の比に相当）に由来し，発振系を通してこの位相雑音は周波数に変換される．FM-AFMの伝統的な雑音解析では，カンチレバーの熱雑音といわゆるFM雑音だけが考慮されており，ばね定数 $k$ ，共振周波数 $f_0$ ，Q値 $Q$ のカンチレバーが，振幅 $A_0$ ，発振周波数 $f_0+f_m$ で振動しているときの周波数雑音密度 $n_{\delta f}^{(\text{high-Q})}$ （単位： $[\text{Hz}/\sqrt{\text{Hz}}]$ ）は，

$$n_{\delta f}^{(\text{high-Q})} = \sqrt{\frac{f_0 k_B T}{\pi k Q A_0^2} + \frac{2n_{\text{det}}^2}{A_0^2} f_m^2} \quad (1)$$

とされていた<sup>10)</sup>．ここで， $k_B$ はボルツマン定数， $T$ は温度， $n_{\text{det}}$ はカンチレバー変位測定系/装置の変位換算雑音密度（単位： $[\text{m}/\sqrt{\text{Hz}}]$ ）を表す．平方根中の第1項がカンチレバーの熱雑音を，第2項がFM雑音に相当する．実は最近，発振ゆらぎも含めた正確な雑音解析によると，正確な周波数雑音密度 $n_{\delta f}^{(\text{exact})}$ は，

$$n_{\delta f}^{(\text{exact})} = \sqrt{\frac{f_0 k_B T}{\pi k Q A_0^2} + \frac{2n_{\text{det}}^2}{A_0^2} f_m^2 + \frac{n_{\text{det}}^2}{2Q^2 A_0^2} f_0^2} \quad (2)$$

によって表現されることが示された<sup>7)</sup>．Q値が大きい環境（ $Q > 1000$ ）では，式（2）の第3項は無視できるため，式（1）は非常によい近似となり実効的には正しい表現となる．また，式（1）においては，低周波領域（ $f_m < 1 \text{ kHz}$ ）において第2項の寄与が小さくなるため，Q値の高い環境ではカンチレバーの熱雑音（第1項）が支配的であり，装置雑音 $n_{\text{det}}$ は測定に大きな影響を与えないことがわかる．一方，Q値が低い環境（ $Q < 10$ ）においては，第3項の影響が大きくなる．特に低周波領域では，第2項が周波数に依存しないため，第3項が支配的な雑音因子となる．このため，低Q値環境では装置雑音 $n_{\text{det}}$ を減らすことが，感度（信号雑音比）を向上する上で決定的に重要となる（FM-AFMでは信号 $\Delta f$ はQ値に依存しない）．

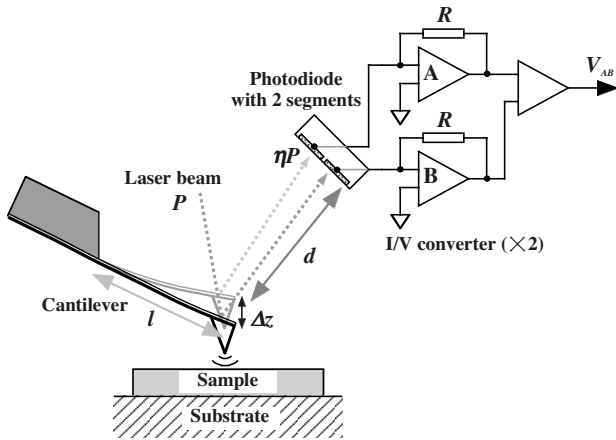


図3 光てこ法によるカンチレバーの変位測定模式図。

装置雑音は、おもにカンチレバーの微小変位測定系の雑音に起因するが、近年、この変位測定系における雑音密度が  $10 \text{ fm}/\sqrt{\text{Hz}}$  以下にまで低減できることが示された<sup>6)</sup>。市販の装置の変位測定雑音は通常  $100\sim 500 \text{ fm}/\sqrt{\text{Hz}}$  であることから、この装置改善による低雑音化は液中 FM-AFM 動作に対してきわめて有効であることがわかる。次節に変位検出系雑音およびその低減の詳細について述べる。

## 1.2 変位検出系の雑音とその低減<sup>6,9)</sup>

### 1.2.1 光てこ法における変位感度

現在、もっとも広く用いられているカンチレバーの変位測定法は、光てこ法（光ビーム偏向法）である。光てこ法は、カンチレバーの背面に当てられたレーザー光（光強度  $P$ ）の反射方向が、カンチレバーの微小な曲がり（ $\Delta z$ ）に応じて変化することを利用して、その変位を測定する方法であり、測定系は、光源となるレーザーダイオード（LD）、光ビーム方向を検出する2セグメント（あるいは4セグメント）フォトダイオード（PD、受光感度  $S$ ）、光電流-電圧変換器（ $R$ ）より構成される（図3参照）。レーザー光強度を  $P$ 、カンチレバーから PD までの距離を  $d$ 、PD 上のレーザー強度を  $\eta P$ 、スポット径を  $a$  とするとき、図3の中の2つの光電流-電圧変換器（I/V converter）A, B からの信号電位の差  $V_{AB}$  は、

$$V_{AB} = \eta SP \alpha R \frac{6d}{la} \Delta z \quad (3)$$

と表わされる<sup>6)</sup>。ただし、 $\alpha$  は PD・光電流-電圧変換器における周波数特性に起因する利得低下率を表わす。この式（3）は、測定電圧とカンチレバー変位の関係を表わし、測定電圧雑音を変位雑音に換算するための変換式として有用であり、以降の議論における変位雑音への換算はすべてこの式を用いる（電圧  $V$  から変位  $\Delta z$  への換算式として利用）。

### 1.2.2 レーザーダイオードの雑音

光源からの雑音（光源雑音密度  $n_{LD}$ ）は、レーザーダイオードの量子雑音、モードホップ雑音、戻り光雑音がある。量子雑音はキャリア注入ゆらぎおよび反転準位からの自然放出光に由来し、相対雑音強度（RIN: relative intensity noise）で表わされる。RIN はレーザー光の発振出力強度  $P$  の増加に伴って減少し（ $\propto P^{-\gamma}$ ;  $\gamma = 2\sim 3$ ）、発振閾値より十分大きな電流で駆動することにより、ショット雑音レベルにまで低減することが可能となる。一方、モードホップ雑音は、LD 内に存在する多数の発振縦モードにおけるモード間競合により発生する。実は、戻り光雑音も、LD からの出力光が反射・散乱されて再びレーザー共振器に戻り、モード間競合を引き起こすことで発生することから、モードホップ雑音のひとつともいえる。これらの雑音は、LD に高周波（ $300\sim 500 \text{ MHz}$ ）の電流を加えて、LD 光を高周波変調駆動することで低減することが知られている（高周波重畳法）<sup>11,12)</sup>。高周波電流を重畳すると、LD はモード間競合による少数/単一モード発振に至る前に、マルチモード発振状態の発振初期過程を繰り返すことになるため、LD は実効的に安定なマルチモード発振状態を保ち続け、モードホップ雑音は抑圧される。この状態は位相独立なマルチモード発振であり、レーザー光の時間コヒーレンスは低下しているため、戻り光による位相変調の影響を受けにくく、戻り光による出力強度のゆらぎを抑圧することが可能となる。

### 1.2.3 光検出器における雑音

フォトダイオードに到達する光強度（光子数）は、ポワソン分布に従うゆらぎをもち、ショット雑音電流となる。ショット雑音電流は  $\sqrt{2e\eta SPB}$  と表されるので、ショット雑音電圧  $\delta V_{\text{shot}}$  は、

$$\delta V_{\text{shot}} = \alpha R \sqrt{2e\eta SPB} \quad (4)$$

となる。式（3）より変位換算のショット雑音密度  $n_{\text{shot}}$  に換算すると、

$$n_{\text{shot}} = \frac{la}{6d} \sqrt{\frac{2e}{\eta SP}} \quad (5)$$

となる。ショット雑音は、変位測定系の原理的感度限界を与えることになるが、行路中の光損失をできるだけ小さくし、 $\eta$  を大きくすることが肝要となる。その他の雑音としては、散乱光により PD 面上に生じる空間干渉縞の変動がもたらす雑音（光干渉雑音）があるが、前述した高周波重畳駆動のレーザー光では、時間コヒーレンスを低下させることによってこの光干渉雑音は大幅に抑圧される。

### 1.2.4 信号処理系の雑音

一方、電気系の雑音は、オペアンプなど増幅器系の雑音

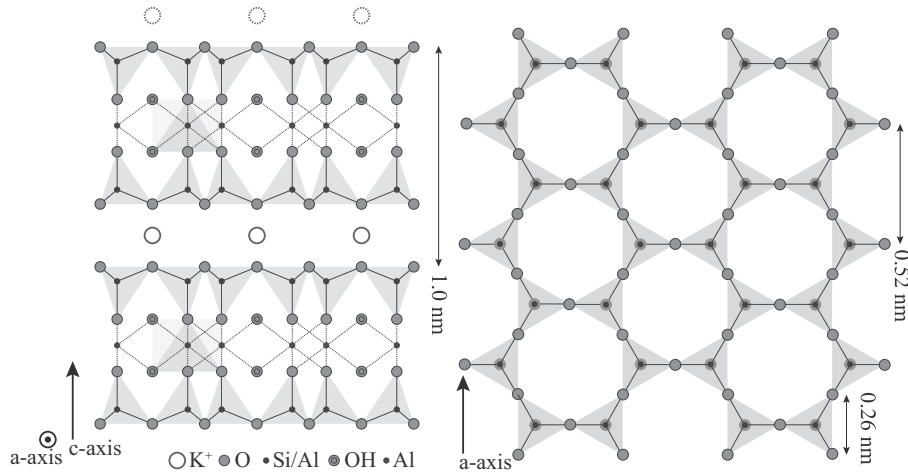


図4 マスコバイトマイカの結晶構造. 左: a軸からみた構造. 右: へき開面の構造 (K<sup>+</sup>イオンは表示していない).

が十分小さいとすれば, 電流-電圧変換器に用いられている抵抗の熱雑音 (ジョンソン雑音)  $\delta V_J$  がおもな雑音源となる.

$$\delta V_J = \sqrt{4k_B T (2R)} \quad (6)$$

変位換算雑音密度  $n_J$  に変換すると,

$$n_J = \frac{la}{6d} \frac{1}{\eta SP \alpha} \sqrt{\frac{8k_B T}{R}} \quad (7)$$

となる. このジョンソン雑音  $n_J$  を, 前項で議論した変位測定系の理論限界雑音を決めるショット雑音  $n_{\text{shot}}$  に比べて小さくするためには,  $\alpha > \sqrt{(4k_B T)/(e\eta SP R)}$  を満たす必要があり, 電流-電圧変換器の帯域を十分に大きく ( $\alpha$  を十分大きく) する必要があることがわかる.

### 1.2.5 低雑音変位測定系

変位測定系の総雑音密度  $n_{\text{det}}$  は, 上述した各種雑音のランダム和となり, 次式で表わされる.

$$n_{\text{det}}^2 = n_{\text{LD}}^2 + n_{\text{shot}}^2 + n_J^2 \quad (8)$$

われわれは, 高周波重畳法によるレーザー光の低コヒーレンス化, 光出力強度の最適化, 光検出効率の改善, 電流-電圧変換器の周波数利得低下率の向上など, 変位測定計の各要素における雑音低減を図り, 低雑音変位測定系を構築することに成功した<sup>6)</sup>. 図2で示したカンチレバーの熱雑音振動スペクトルは,  $\delta z_{\text{CL}}$  をカンチレバーの変位ゆらぎとすれば,

$$\delta z_{\text{CL}}^2 = \frac{2f_0^4}{(-f^2 + f_0^2)^2 + f_0^2 f^2 / Q^2} \left( \frac{k_B T}{\pi k f_0 Q} \right) + n_{\text{det}}^2 \quad (9)$$

と表わされる. ただし  $n_{\text{det}}$  は白色雑音であることを仮定した. したがって, 測定された熱雑音振動スペクトルと式(9)のフィッティングにより  $n_{\text{det}}$  を評価することが可能となり, すでに述べたように, 装置改善によって変位測定系の雑音密度が  $10 \text{ fm}/\sqrt{\text{Hz}}$  以下にまで低減されたことを

確認することができた.

### 1.3 小振幅モードの採用

ダイナミックモードではカンチレバーの振動振幅と変位雑音の比が位相雑音としてはたらくため, FM 検出の点では, カンチレバーの振幅を大きく設定するほうが本来有利である. しかしながら, 一般的な AFM の実験条件では, 探針が試料と相互作用するのは, 探針が試料近傍 (相互作用距離  $\lambda$  以内  $\sim 1 \text{ nm}$ ) にあるときのみであるため, 振幅が大き場合は相互作用時間が減少し, 信号レベルは小さくなる. 一方, 振幅が  $\lambda$  と同程度, あるいはそれ以下になると, 1 周期の全時間にわたって相互作用することになることから, 信号レベルは増加する. もちろんこの場合, 位相雑音は増加することになるので, 結局, S/N を最大化する振幅の最適点が存在することになる<sup>13)</sup>. いずれにしても, 一般的に使用されている振幅値は  $5 \sim 20 \text{ nm}$  程度で, 最適値よりはるかに大きいため, 小振幅化は周波数検出における S/N 改善に対して, 非常に有効となる. 小振幅化は, 位相雑音の増加とトレードオフの関係にあることから, 変位測定系の低雑音化が前提となり, 前節で述べたような低雑音化によって初めて小振幅化が可能となった.

## 2. 高分解能液中イメージング

### 2.1 マスコバイトマイカ基板の液中観察<sup>14)</sup>

マスコバイトマイカ (白雲母:  $\text{KAl}_2(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ ) 基板は, へき開性を有し, 容易に原子的平坦面を得られること, 表面が親水性で処理しやすいことなどから, 生体試料などの高分解能観察基板としてしばしば用いられる. マイカは珪酸塩鉱物の一種で,  $\text{SiO}_4$  四面体を基本骨格とする層状の結晶構造を形成し, 図4に示されるように, へき開表面はこの  $\text{SiO}_4$  四面体からなるハニカム構造 (周期  $0.52$

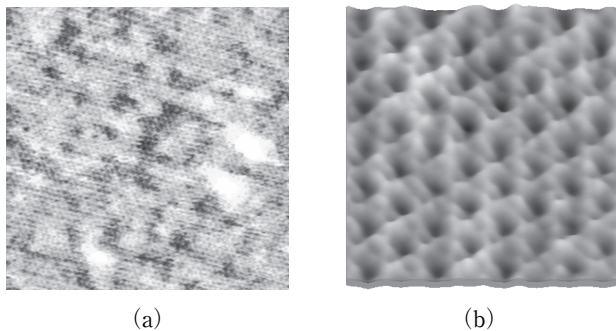


図5 (a) 純水中で得られたマイカのFM-AFM像 (走査範囲: 30 nm×30 nm,  $\Delta f = +360$  Hz,  $A_0 = 0.33$  nm) (b) 拡大像 (走査範囲: 4 nm×4 nm,  $\Delta f = +54$  Hz,  $A_0 = 0.24$  nm).

nm) によって形成される。純水中で観察されたマイカのFM-AFM像を図5に示す。0.52 nm 周期の格子が明瞭に観察される。吸着物の影響と思われるいくつかの明るい領域も存在するが、格子像が見えるにもかかわらず、観察領域全体にわたって緩やかな背景形状の変化がみられる。この緩やかな背景高さの変調は、マイカの高分解能観察時に常にみられた。現状では、その原因を特定するに至っていないが、マイカ表面の帯電あるいは水和層による静電力の変化が影響していると考えられる。図5 (b) は微小領域におけるマイカ原子像を示す。観察されたマイカ像は、コンタクトモードでよくみられるドット状あるいは三角状の六方構造ではなく、ややリング状のハニカム構造であった。マイカ表面は比較的大きな空隙をもつハニカム構造で構成されることを考えれば、観察像がハニカム構造であるのは妥当である。コンタクトモードでは単一原子スケールよりも大きな接触領域をもつため、観察は平均化され、格子周期は観察されるものの、真の原子分解能は得られない。このため、コンタクトモードでのマイカの観察像は、ほとんどの場合周期的なドット状の像となる。これに対して、FM-AFM像ではハニカム状の観察像が得られた。さらに、観察像の一部には原子スケールでの明るさの変化がみられた。この結果は、 $\text{SiO}_4$  面におけるAl置換による局所的な電荷密度の変化の可能性を示唆している。

## 2.2 バクテリオロドプシン分子のFM-AFM観察<sup>15)</sup>

光駆動プロトンポンプの役割を担う膜たんぱく質バクテリオロドプシン (bR) 分子は、高度好塩菌 (*Halobacterium salinarum*) の細胞膜の一部である紫膜 (purple membrane: PM) 内に含まれ、二次元結晶を形成している。結晶状の膜たんぱく質であることから、X線構造解析、電子顕微鏡などにより、その構造は詳細に研究されてきた。しかしながら、溶液中での高分解能構造解析や機能との関連については、直接の測定例はほとんどないため、

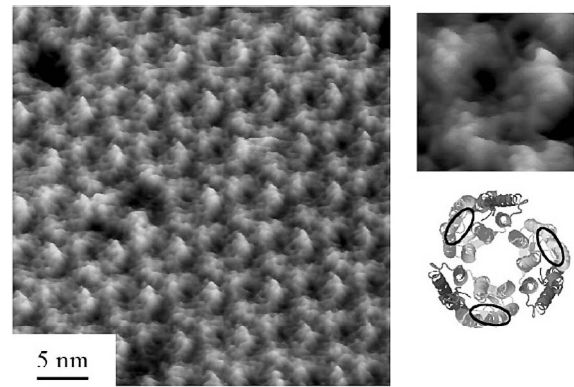


図6 左: リン酸緩衝液中の紫膜のFM-AFM像。紫膜内に六方格子状に並ぶbR分子三量体が観察される。右上: bR三量体の拡大像。右下: 細胞質面におけるbR三量体の配列モデル。

液中動作AFMによる構造計測や機能解析に大きな期待が寄せられている。

AFM観察は、リン酸緩衝液中においてマイカ基板上に吸着させた紫膜上で行われた。まず、紫膜を分散させたリン酸緩衝液 (10 mM PBS, 300 mM KCl, pH = 7.4) をマイカ基板表面に滴下し、1時間程度かけて紫膜を基板に自然吸着させる。その後、吸着していない紫膜を除くためにPBSを用いてリンスし、測定用PBS (10 mM PBS, 200 mM KCl, pH = 7.4) 中でFM-AFM観察を行った。図6に紫膜のFM-AFMによる観察例を示す。bR単量体分子は膜を貫通する7本の $\alpha$ ヘリックス (A-G) から成るが、さらに3つの分子が集まって三量体を形作り、この三量体が膜内において格子間隔 6.2 nm で六方格子状に充填し、二次元結晶を形成する。図6中の右下の図は、細胞質面における紫膜内でのbR分子の構造モデルである。観察されたFM-AFM像においても、3つの輝点が、いくつかの欠陥部を伴いながら、周期約 6 nm で配列しており、このモデルとよく対応することがわかる。詳細な対応関係を調べることで、輝点部分がEヘリックスとFヘリックスをつなぐループ部に相当することが判明した。

## 2.3 局所水和構造計測への応用

固体表面と液相との境界においては、溶液分子と固体表面との相互作用のために、図7に示すような特異な溶液密度の振動構造、溶媒和 (水の場合は水和) 構造が存在し、この水和構造は、結晶成長や固液界面物性と強く関連する。このため、以前より分子レベルでの水和構造測定が望まれていたが、局所的な溶媒/水和構造を直接調べる手段はこれまで存在しなかった。最近、われわれはFM-AFMによるフォースカーブ測定 (周波数シフトの距離依存曲線) に、この水和振動構造の影響が現れることを見だし

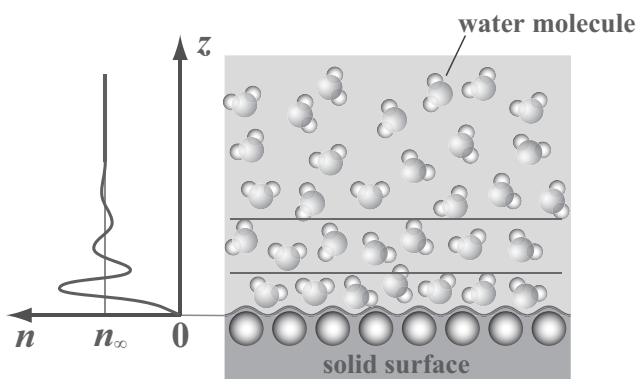


図7 固液界面における水和構造模式図. 左: 水分子の密度分布  $n(z)$  を示す ( $n_{\infty}$ はバルク水の密度).

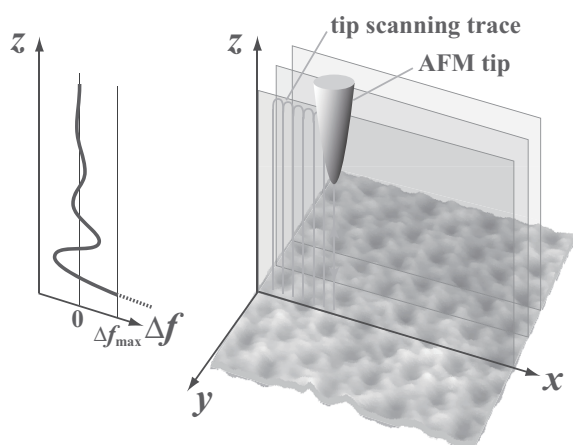


図8 三次元フォースマッピング法の動作原理図. 周波数シフト  $\Delta f$  曲線(左)を  $x$  方向に沿って取得し, この動作を  $y$  方向に沿って繰り返すことで三次元マップを得る.

た<sup>5,16)</sup>. このフォースカーブを試料上の各点で計測してマッピングすることにより(三次元フォースマッピング法, 図8参照), 試料面上の三次元的な水和構造を可視化することが可能となる.

一例として, 図9にKCl水溶液中のマイカ結晶表面上で得られた, XZ面内のフォースマッピング像(周波数マッピング像)を示す. マイカ表面上に約0.2~0.3 nm周期で現れる, 3層の水和振動層構造が再現よく観測された. これは, マイカ表面上に存在する水和層を探針が通過するときに生じる溶媒和力によるもので, この周期は, ほぼ水分子の大きさに相当する. 1層目の水和構造は, マイカ表面の結晶構造に対応して変調されていることも新たに観測された<sup>16)</sup>. このように, FM-AFMによる液中フォースマッピングは, 分子レベルで三次元的な水和構造を直接可視化できることから, 固液界面における結晶成長と分子レベルの水和構造との関連性の解析など, 今後の研究展開が期待される.

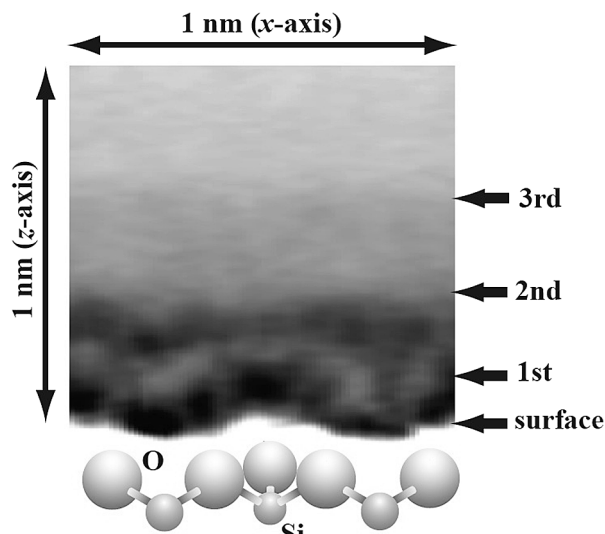


図9 KCl水溶液中におけるマイカ表面上で得られたフォースマッピング像(マイカ表面上の水和構造).

### 3. 液中FM-AFM計測の今後の展開

液中FM-AFMによる原子・分子分解能測定が実現したことにより, その応用分野は格段と広がりつつある. 特に生体試料の高分解能計測への応用は, 今後もっとも精力的に進められると思われる. 生体分子間相互作用は静電的な相互作用がベースとなっており, 生体機能の発現過程を探る上でも, 溶液中での生体分子上の局所電荷分布計測が強く望まれている. 大気・真空中での電荷分布測定では, 探針-試料間の電場変調により静電気力を検出する手法が一般的であるが, 電解質溶液中では, 電荷を有する表面には必ず電気二重層が形成され, 静電相互作用は遮蔽されるため, その測定は容易ではない. 最近, フォースマッピング法により測定される局所相互作用が電気二重層力(DLVO力)によるものであることが判明し, 液中電荷密度測定に活用できることが新たにわかった. こうしたFM-AFMに基づくさまざまな機能物性計測手法による分子スケール生体試料評価のさらなる発展に期待したい.

本稿で紹介した研究の一部は, 科学技術振興機構・先端計測分析技術・機器開発事業および日本学術振興会・科学研究費補助金基盤研究(S)の下に遂行された. また, これらの研究に関係された研究者の皆様に深く感謝いたします.

### 文 献

- 1) S. Morita, F. J. Giessibl and R. Wiesendanger: *Non-Contact Atomic Force Microscopy*, 2nd ed. (Springer, 2009).
- 2) 山田啓文: “周波数変調型ケルビンプローブ原子間力顕微鏡による有機薄膜評価”, 表面科学, **28** (2007) 253-263.
- 3) T. Eguchi, Y. Fujikawa, K. Akiyama, T. An, M. Ono, T.

- Hashimoto, Y. Morikawa, K. Terakura, T. Sakurai, M. G. Lagally and Y. Hasegawa: "Imaging of all dangling bonds and their potential on the Ge/Si(105) surface by noncontact atomic force microscopy," *Phys. Rev. Lett.*, **93** (2004) 266102.
- 4) Y. Sugimoto, M. Abe, S. Hirayama, N. Oyabu, O. Custance and S. Morita: "Atom inlays performed at room temperature using atomic force microscopy," *Nat. Mater.*, **4** (2005) 156-159.
  - 5) T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige and H. Yamada: "True molecular resolution in liquid by frequency-modulation atomic force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, **86** (2005) 193108.
  - 6) T. Fukuma, M. Kimura, K. Kobayashi, K. Matsushige and H. Yamada: "Development of low noise cantilever deflection sensor for multienvironment frequency-modulation atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **76** (2005) 053704.
  - 7) K. Kobayashi, H. Yamada and K. Matsushige: "Frequency noise in frequency modulation atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **80** (2009) 043708.
  - 8) K. Kobayashi, H. Yamada and K. Matsushige: "Reduction of frequency noise and frequency shift by phase shifting elements in frequency modulation atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **82** (2011) 033702.
  - 9) 山田啓文: "周波数検出方式原子間力顕微鏡による有機分子の溶液中高分解能計測", *真空*, **49** (2006) 667-672.
  - 10) T. R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne and D. Ruger: "Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity," *J. Appl. Phys.*, **69** (1991) 668-673.
  - 11) M. Ojima, A. Arimoto, N. Chinone, T. Gotoh and K. Aiki: "Diode laser noise at video frequencies in optical videodisc players," *Appl. Opt.*, **25** (1986) 1404-1410.
  - 12) A. Arimoto, M. Ojima, N. Chinone, A. Oishi, T. Gotoh and N. Ohnuki: "Optimum conditions for the high frequency noise reduction method in optical videodisc players," *Appl. Opt.*, **25** (1986) 1398-1403.
  - 13) F. J. Giessibl, H. Bielefeldt, S. Hembacher and J. Mannhart: "Calculation of the optimal imaging parameters for frequency modulation atomic force microscopy," *Appl. Surf. Sci.*, **140** (1999) 352-357.
  - 14) T. Fukuma, T. Ichii, K. Kobayashi, H. Yamada and K. Matsushige: "True-molecular resolution imaging by frequency modulation atomic force microscopy in various environments," *Appl. Phys. Lett.*, **86** (2005) 034103.
  - 15) H. Yamada, K. Kobayashi, T. Fukuma, Y. Hirata, T. Kajita and K. Matsushige: "Molecular resolution imaging of protein molecules in liquid using frequency modulation atomic force microscopy", *Appl. Phys. Express*, **2** (2009) 095007.
  - 16) K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai and H. Yamada: "Visualizing water molecule distribution by atomic force microscopy," *J. Chem. Phys.*, **132** (2010) 194705.

(2013年1月15日受理)