

原子間力顕微鏡(AFM)による生物試料の観察

Visualization of biological samples by Atomic Force Microscopy

竹原真紀, 太田裕治

Maki TAKEHARA, Yuji OHTA

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻

1. はじめに

顕微鏡による生物試料観察は、16世紀から17世紀にかけて開発された光学顕微鏡に始まる。光学顕微鏡では、肉眼では観察できない細胞や微生物を観察することができ、現代の生物学の基礎を築いた。試料が生命活動状態に近く、かつ非破壊的に観察することが可能で、生物観察において理想的な特徴を持っている。しかし光を用いて観察を行うため、分解能は光の波長の半分程度 ($0.2 \mu\text{m}$) が限界であり、それ以下のサイズの物体の観察は不可能である。

これを解決するものが、可視光より波長の短い電子線を利用し分解能を向上させた電子顕微鏡である。電子顕微鏡の分解能は 0.1 nm 程度であり、電子顕微鏡を用いることで、細胞の微細構造や粒子の観察が可能となる。しかし、電子顕微鏡観察ではその原理上、真空中での観察となるため、試料は乾燥状態にあり、さらに導電性を求められるため金属コーティングなどの前処理が必要となる。

一方、レンズ系の顕微鏡とは異なり、微細プローブを用いて表面観察を行う走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscopy: SPM)と呼ばれる顕微鏡が近年開発されてきた。SPMの分解能は電子顕微鏡と同程度かそれ以上である。SPMの開発は、1981年IBM社のBinnig, Rohrerらによって発表された走査型トンネル顕微鏡(Scanning Tunneling Microscopy: STM)に始まる。STMでは探針と試料間に流れるトンネル電流が一定となるように制御しながら走査し、像を得る。しかし電子顕微鏡観察と同様に

STM観察においても、試料に導電性を必要とするため、生きた状態の生物試料観察はできない。

その後1986年にBinnig, Quate, Gerberによって原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy: AFM)が発表された。AFMはSTMにおけるトンネル電流に代わり、探針と試料間に働く原子(分子)間力を利用するものである。測定原理から、真空中である必要はなく、大気中観察が可能で、さらに液体中の観察も可能である。金属や半導体だけでなく、生きた状態により近い生物試料の観察が可能となった。

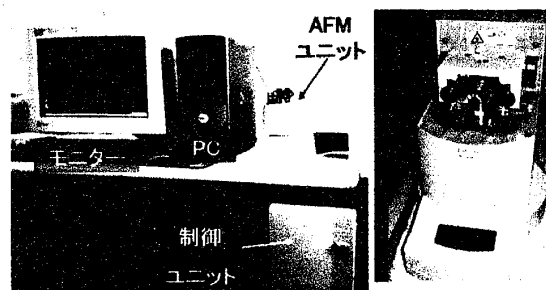


Fig.1 SPMの概観

左: SPM システム 右: AFM ユニット

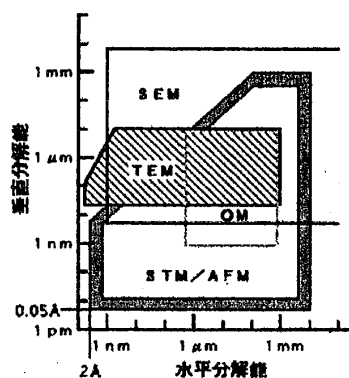


Fig.2 顕微鏡の分解能比較

2. AFM 動作原理

探針先端と試料表面との間にはレナード・ジョーンズ型のポテンシャル (Fig. 3) で近似される力学的相互作用が存在し, AFM では, この相互作用による探針位置変位を精密に検出している. 変位の計測には, レーザー光の反射を利用した「光てこ法」が用いられる. 探針を先端に取り付けたカンチレバー (バネ定数 $0.01 \text{ N/m} \sim 0.6 \text{ N/m}$ 程度) で試料表面をなぞるように走査し, カンチレバー背面に照射したレーザーの反射光をフォトダイオードにより検出する (Fig. 4).

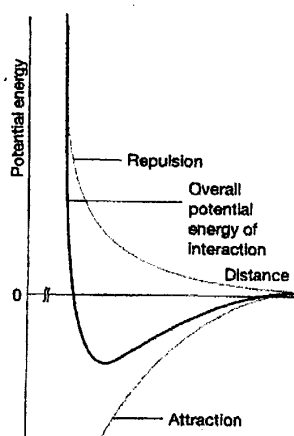


Fig. 3 レナード・ジョーンズのポテンシャルカーブ
(出典 Atkins' Physical Chemistry Seventh Edition)

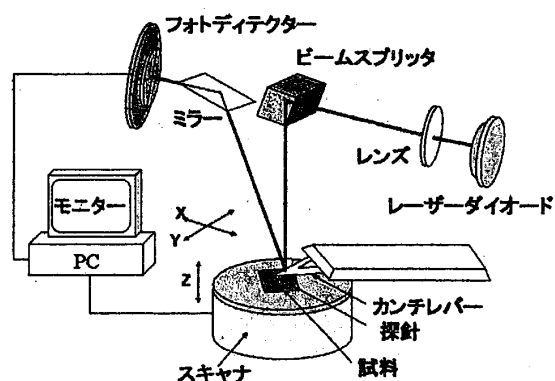


Fig.4 AFM の画像化原理

3. AFM 観察

3-1 探針の種類

AFM の探針には, 多くの場合 Si_3N_4 もしくは単結晶 Si のものが使われている (Fig.5). Si_3N_4 製探針先端の曲率半径は 20 nm 以下, 単結晶 Si 製では 10 nm 以下のものが製造されている. 探針は試料や求める分解能, 測定モードなど, 目的に応じて使い分けられる.



Fig. 5 探針形状 (出典 オリンパス社 HP)

AFM の水平分解能は探針の曲率半径に依存するため, 分解能の向上には先端曲率半径を小さくする必要がある. 通常は Si 製の探針を用いるが, 曲率半径が約 2 nm で機械的強度にも優れたカーボンナノチューブ (CNT) を付着させた探針を用いた観察例もある (Fig.6). この他にも, EBD 探針, 化学修飾探針など, さまざまな特性を持った探針の開発が進められている.



Fig. 6 CNT チップ
(出典 Nanoscience Instruments 社 HP)

3-2 測定モード

AFM では基本的な表面形状観察だけでなく, 溶液中での表面観察, さらに物性測定・電気・磁気測定, 力学測定なども可能である.

i) コンタクトモード

接触モードで, カンチレバーと試料に働く斥力が一定となるようにフィードバックをかけながら走査する. 観察時に設定するパラメーター

数が少なく、比較的容易に安定した像が得られる。通常的环境下では一番高い分解能を示す。

ii) ダイナミックモード

接触振動モードで、タッピングモードとも呼ばれる。カンチレバーを共振周波数付近で振動させながら走査する。探針が試料に接近すると斥力が働き、振幅が変化する。この振幅を一定に保ちながら走査し画像化する。探針と試料との接触が間欠的であるため、やわらかい試料に対しても試料表面を变形させにくい。

iii) ノンコンタクトモード

非接触モードで、ダイナミックモードと同様にカンチレバーを振動させながら走査するが、引力を利用しているため振幅の幅が比較的小さい。原子像を得るために真空中測定で用いられる。

iv) 水平力モード (LFM, FFM)

コンタクトモードで探針を走査させる際、試料表面と探針間には摩擦力が働く。カンチレバーの長手方向に対して垂直方向に走査した際に、探針は走査の方向と逆向き引き摺られる。水平力モードでは、引き摺られる際のレバーのねじれを測定し画像化する。

v) その他の測定モード

その他、物性・電気・磁気・力学測定などのモードには、表面試料の粘弾性によるカンチレバーの振幅の位相差を画像化する位相検出法、粘性像・弾性像を画像化する粘弾性測定、試料の磁気情報を画像化する磁気力測定、表面の電位分布を測定する電気力顕微鏡、表面の吸着力、弾性力を二次元マッピングするフォースマッピングなどがある。

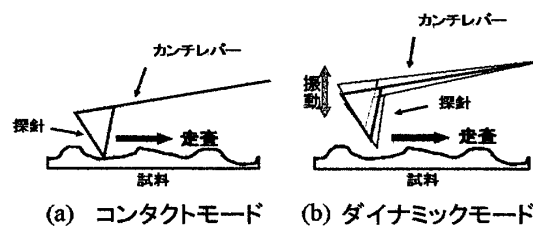


Fig. 7 接触モード

3-3 AFM による観察像

AFM を用いて観察したタンパク質試料の一例を示す。試料には、牛血清アルブミン、コラーゲンを用いた。いずれも単結晶 Si 製探針を使用し、ダイナミックモードで観察した。観察条件は、常温・大気中で、走査速度は 0.5 Hz である。2 種類のタンパク質試料の画像から、Fig.8 の左に示すアルブミンは球状タンパク質であり、Fig.8 の右に示すコラーゲン分子は線維上タンパク質であることが確認できた。

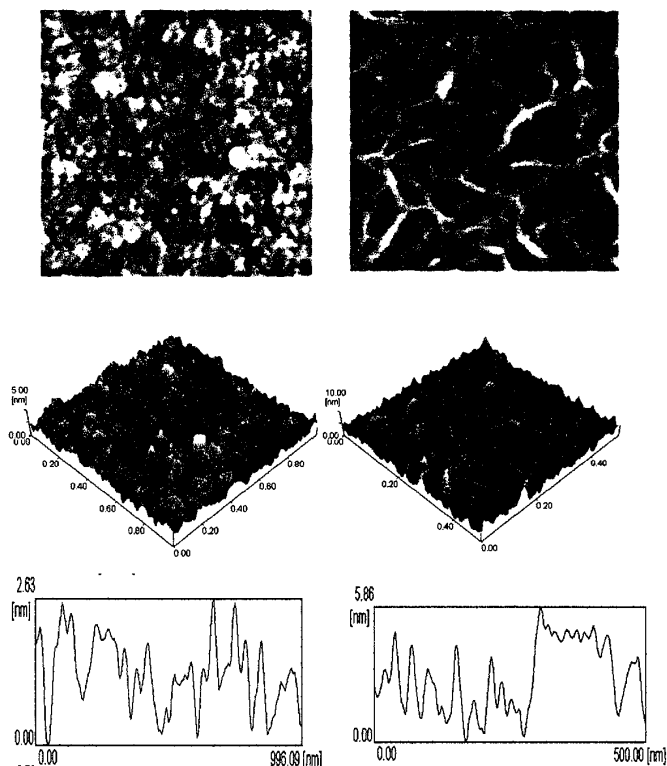


Fig. 8 タンパク質試料の AFM 像(平面・立体)と断面形状

左：アルブミン AFM 像 (走査範囲 1 μm)

右：コラーゲンの AFM 像 (走査範囲 500 nm)

4. AFM を用いた生物試料の研究例

AFM は原理的に観察環境を選ばず、また溶液中での観察も可能なため、近年では生物学や医学領域へも応用されている。AFM を用いた生物試料の観察例としては、DNA 観察が多く、大気中および液体中観察において数 10 Å の分解能を達成している。AFM は試料に対する制約が小さいため、DNA のみならず、細菌類、染色体、血液細胞、顆粒細胞、免疫グロブリン、コラーゲン、神経細胞などの観察にも用いられている。

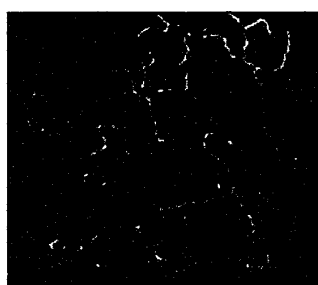


Fig.9 プラスミド DNA⁷⁾

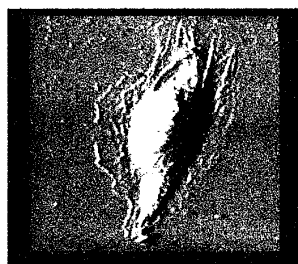


Fig. 10 生きた培養細胞の AFM 像⁸⁾

5. おわりに

AFM の分解能はオングストロームレベルとされているが、実際は、探針先端形状の異常や試料台への固定の具合、試料破壊、装置振動などの因子が、観察画像に影響する。そのため取得画像の信頼性は十分高いとは言えず、画像ごとに十分な検討を行う必要がある。生物試料の観察における分解能も原子レベルに達しているとはいえず、細胞形状や分子の集合体の画像が得られる程度である。しかし、時間とともに変化する生体物質の分子構造や物性・化学的性質の変化を、単一細胞レベルで観察できること

の意義は大きい。AFM 画像の解釈は慎重に行うべきではあるが、既存の方法論と組み合わせることで新たな真実を見いだすことが可能となろう。今後は、さらに様々なカンチレバーやその特性を活かした AFM 観察が期待できる。

参考文献

- 1) 岡本弘志, 原子間力顕微鏡を用いた細胞膜表面分子の認識に関する研究, 東洋大学大学院 (2001)
- 2) G. Binnig, H. Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Helv. Phys. Acta*, 56, 726, (1982)
- 3) G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett*, 56, 930-933. (1986)
- 4) 小堀俊郎, 横川雅俊, 竹安邦夫, 原子間力顕微鏡—ナノバイオロジーへの架け橋—, *生物物理* 44(6), 255-259. (2004)
- 5) 藤井雅俊, 走査プローブ顕微鏡(SPM)の応用, (2005)
- 6) Wong, S. S., Josekevich, E., Woolley, A. T., Cheung, C. L., and Lieber, C.M., Covalently functionalized nanotubes as nanometer-sized probes in chemistry and biology, *Nature* 394, 52-55, (1998)
- 7) Ushiki T, Hitomi J, Ogura S, Umemoto T, Shigeno M, Atomic force microscopy in histology and cytology. *Archives of Histology and Cytology* 59(5), 421-31 (1996)
- 8) Ushiki T, Hitomi J, Umemoto T, Yamamoto S, Kanazawa H and Shigeno M, Imaging of Living Cultured Cells of an Epithelial Nature by Atomic Force Microscopy, *Archives of Histology and Cytology* 62(1), 47-55, (1999)