

走査プローブ顕微鏡、何というtrickyな

東京工業大学 生命理工学部

梅村 和夫

走査プローブ顕微鏡 (SPM) が開発されて約十年、生命科学に本格的に応用され始めて約五年、未だにこれが「SPMの生物物理」だっ!、と言える研究は出てこない。データは雑然と沢山あるけれど、生物物理学の有力な知見は得られていない。従って今回のサブゼミでも、大河ドラマは描けない。

「夢のSPM」ではなかったのか? SPMは所詮、生物物理のバブルだったのか?

いやそんなはずはない。(と思う。) この辺りで話を整理してみる必要がある。SPMで何ができて何ができないのか。どこまでが実験事実でどこからがハッタリなのか。90年頃盛んに語られたSPMの「夢」は、現実のスケジュールとしてどの程度可能なのか。

本稿では、主として物理学の領域の読者の方にSPMの生物物理への応用に興味を持っていただくことを目的として、あまり生物学の細かい点には立ち入らずに、バイオSPMの、可能性に満ちた、しかし混沌とした現状を述べてみたい。

1

元祖SPMと言え、走査トンネル顕微鏡 (STM)。これが世に出たのは1982年。そして今や生物物理への応用の中心となった原子間力顕微鏡 (AFM) の開発が1986年。かくして1989年の国際STM学会で、怒涛のように生体試料測定が報告される。さらにはSTM、AFM以外にもさまざまなプローブ顕微鏡も登場して、SPMと総称されるようになった。

SPMのコンセプト。先端を鋭く尖らせたプローブを、とにかくサンプル表面に近づける。このときサンプル-プローブ間にトンネル電流が生じれば、これを検知しながらサンプル表面をなぞって走査し、STMと呼ぶ。サンプル-プローブ間にファンデルワールス力あれば、これを検知し走査してAFMと言う。磁気力なら磁気力顕微鏡 (MFM)、摩擦力なら摩擦力顕微鏡 (FFM)。ではプローブを光ファイバーで作ったら? プローブをサンプル近傍で振動させたら? **物理量は何でもいい。** サンプル-プローブ間の相互作用を、何らかの方法で検知し走査して、サンプル表面の情報を得る。物理量は何でもいい、というところが素晴らしいと思う。

もう少し具体的に記述すれば。たとえば市販のAFMの基本的なものの場合、非常に薄い板バネ (カンチレバー、先端には鋭い探針がついている。) をサンプル表面に近づける。カンチレバーのバネ定数はバイオ用なら $0.001 \sim 0.1 \text{ N/m}$ くらいなので、探針がほんの少しサンプル表面に触るだけでカンチレバーはたわむ。実はカンチレバー表面には金コートが施してあり、そこにレーザー光が当ててある。カンチレバーがたわめばレーザーの反射角が変わる。カンチレバー表面で反射したレーザー光は上下2分割フォトダイオードで検知されて

いる。ので、反射角が変われば、上のデテクタで捕捉される光量と下のデテクタのそれとの割合が変化する。かくして、カンチレバーのたわみ量が測定できる。一方サンプルは圧電体素子（ピエゾ）にとりつけられてあり、ピエゾに適当な電圧（フィードバック・ゲイン）をかければサンプルの位置を正確に制御できる。そこで、カンチレバーのたわみ量を一定にするようにフィードバックをかけながらx y方向に走査する。するとピエゾはサンプル表面の凹凸に沿って動くことになる。このピエゾの動きを画像として描き出せば、それはサンプル表面の凹凸画像（トポ像）となる。（図1参照）

書いておいて言うのも何ですが、実際に装置を見ていただいた方がずっと早く理解していただけます。

2

SPMが半導体や金属の原子構造の研究で一世を風靡した後、研究者の眼が生体試料の構造観察に向けられたのは当然の成りゆきだった。

これまで高分解能の生体観察と言え、X線解析にしろ電子顕微鏡にしろ、多くの場合「真空」と「ビーム」がつきものであった。真空中にある生体試料は「干物」であり、「死に体」ではないのか？ という疑問は口にしてもせんないことだった。ビームが生体構造を破壊してしまうのも暗黙の了解だった。それは高分解能の代償だったとさえ言えよう。（最近のクライオ電顕技術の進歩は、ゆえに画期的だ。）

片やSPMはどうか。STMもAFMも、真空中測定はもちろんメリットがあるけれど、真空は必須条件ではない。大気中・溶液中で測定ができる。サンプルにそっとプローブを近づけるだけだから、壊れやすい生体試料にダメージを与えないですむはずだ。それでいて原子分解能が得られるはずだ。さらには表面をなぞって走査するので、三次元像（物体の凹凸像）も得られるはずだ。とすれば「**生きた状態での高分解能観察ができるのではないか**」、これが最も大きな期待だった。しかしこの期待がいかに無邪気でノーテンキなものであるか、すぐに分かってくることになる……

実はもう一つの期待もあった。構造観察と同時に、「**生体表面のローカルな物性が測定できるのではないか**」、という期待だった。プローブ・サンプル間の相互作用を測るわけだから、それはそのまま表面物性を測っていることになるはずだ。細いプローブを使うから、局所的な測定ができるはずだ。これまでの物理測定の多くはマクロ、つまりサンプル全体の粘弾性とか、導電性とかを測っていたわけで、分子一個一個の弾性率や導電率を直接測るということは想像もできなかったことであろう。（最近の光学顕微鏡技術の進歩は、ゆえに画期的だ。）しかし大半の研究者はとりあえずきれいな画像を得ることにとりかかったため、こちらの方はごく最近までお預けとなる。

バイオSPMのパイオニアとはどんな人々か。当初はSPM開発のエンジニア、あるいは物理学者が多かった。これらの人々が生物学者から生体試料をもらって測定する、というパターンが多かった。SPMが市販され普及するまでは特に、自分で装置を作れるということが重要だったし、何よりも大半の生物学者はSPMがどんな装置か知らなかったから。

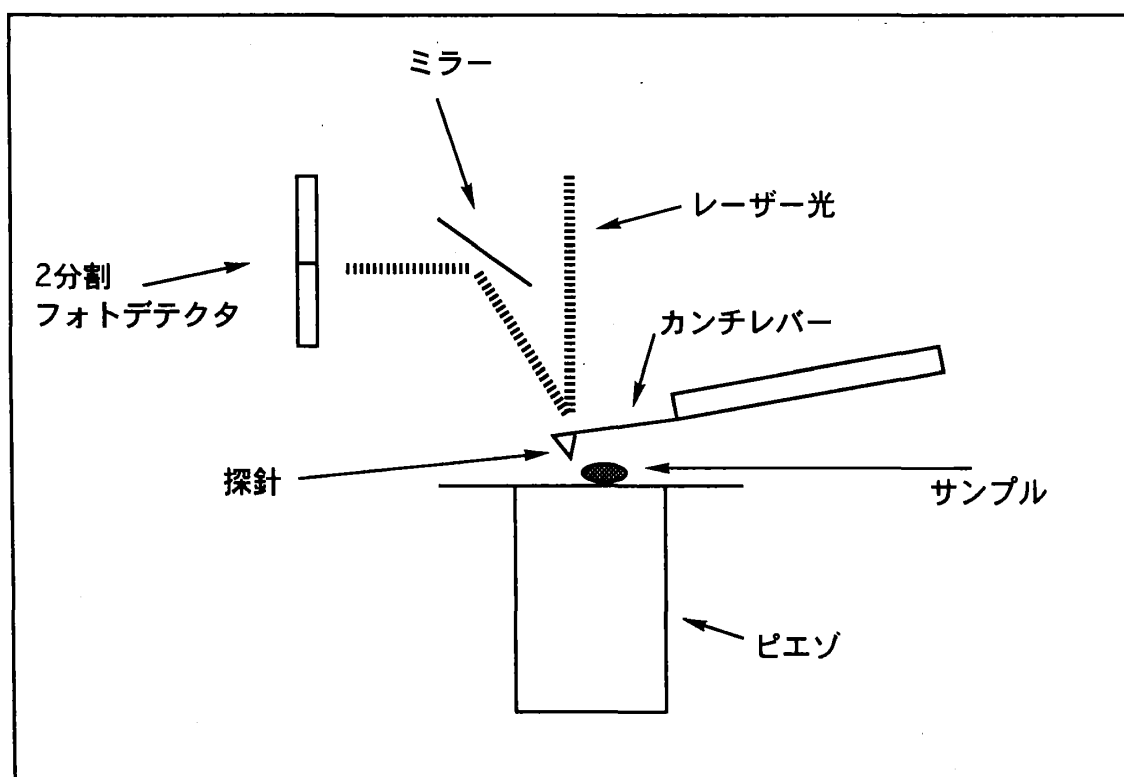


図1 AFMの概念図

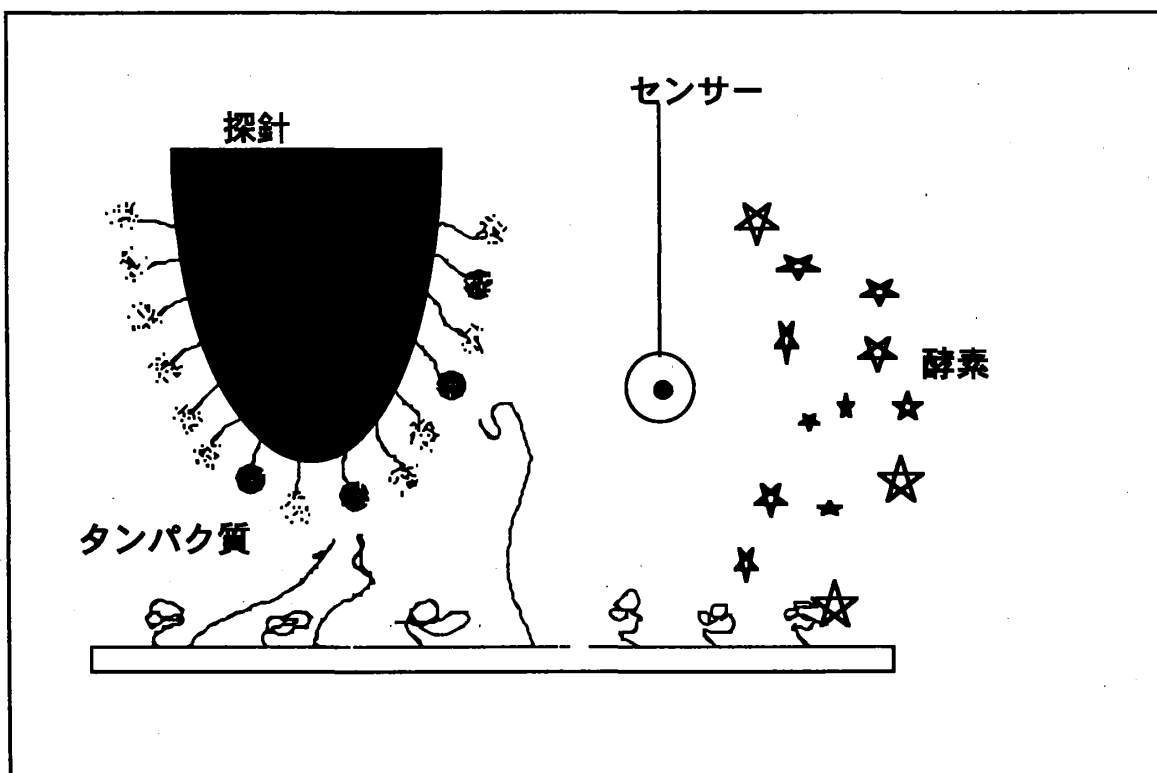


図2 様々な相互作用の測定

1990年にAFMが市販されると、まず化学者の間に急速に広がり、92年頃からはバイオの研究室にも広がってきた。と同時に、物理学者が片手間に生体試料を測定する実験は減りつつある。パイオニアの中身は徐々に変化しつつある。

と思っていたら、最近発表された「STM観察によるDNA核酸塩基の識別」⁽¹⁾という実験にはびっくり。DNAを構成している分子（アデニン、グアニン）を、結晶表面に加熱蒸着し、超高真空下、100KでSTM観察すると、アデニンとグアニンは違った形に見えた。更に電流・電圧特性を調べると、それぞれ異なる性質であった、という報告。「加熱蒸着」「超高真空下」「100K」、何という tricky な。どれも生物学者には思いつかない斬新さ。これだから物理学者はあなどれない。日本発のバイオSPMの今年の、多分トップデータ。

3

初期データの多くは、とりあえずサンプルの凹凸画像を描こうと言うものだった。平坦な基板の上に、DNAや蛋白質、細胞などをのせて観察するというものである。

なんと言ってももっとも多く観察されてきたのはDNA。しかしその初期においては、見えたものが本当にDNAなのかどうか、それが分からなかった。高配向性グラファイト（HOPG）を基板にして、そこにDNAを乗せて観察し「スジ状のものが見えた」という場合が多かったが、実はHOPG自体の表面にも無数のスジ状の段差（ステップ）があるということが、これもSPM観察から分かってきた。これまでDNA像だと思っていたものの多くは、実は基板のステップではないのか、との疑問を投げかけた C. R. Clemmer 等の

「Graphite: A Mimic for DNA and Other Biomolecules in Scanning Tunneling Microscope Studies」⁽²⁾は大変にショッキングだった。Mimic, mimic, mimic, 悪夢のような響き。

そんな論争に終止符を打ったのは Carlos Bustamante 等の「Circular DNA Molecules imaged in Air by Scanning Force Microscopy」⁽³⁾。見えているものがDNAであることの証明。彼らは輪になったDNA（Circular DNA）を観察した。すると確かに輪に見えるし、円周の長さも期待値と一致した。何という tricky な、証明。彼らは更にマグネシウムを用いてDNAを雲母に静電吸着させる方法や、DNAの見え方から逆に探針の形を推定するモデルを提案した。これはまさにDNA観察の金字塔。この報告の後、DNA観察はどうやって見るかの段階から、見て何が分かるのかを議論する段階に入った。

DNA以外についても、最初はなかなか画像そのものがうまくとれなかった。そこで、基板はどんなものがあるか、サンプル作成の手順をどう改良するか、といった類のことが実験報告の主な内容だったが、最近では画像をとること自体は、ほぼできるようになったと言える。（今でも難しいサンプルもあるが。）

見て何が分かるのか？ これは今現在の大問題。今ではいろんな生体物質の観察ができるようになったけれど、しかし大概の画像は電子顕微鏡や光学顕微鏡などで見えてしまっている。もし画像の水平分解能で勝負するならば、かなり細かい議論をしなければならない。ところが細かい議論をしようとする、探針自体がある太さを持っていることが大問題になる。よく考えてみれば、SPMでとったトポ像というのは探針とサンプルのすりあわせであって、

「探針でサンプル表面の凹凸を描く」ことは逆から見れば「サンプルで探針表面の凹凸を描いている」とも言えるわけである。大ざっぱな議論をする分には、探針がサンプルに比べて十分細いとみなしていいだろうが、ぎりぎりの議論をしようとするとう無視できなくなってくる。例えば蛋白質のサイズは普通 数 nm から 数十 nm くらい、一方探針先端の曲率半径は 10 nm から 20 nm だから、ほぼサイズが拮抗してしまう。これはなかなかやっかいである。結晶面で周期を求める実験ならばまだしも、生きた細胞や蛋白質がぶよぶよしている状態で細かい議論をするのは容易なことではない。「SPMはきれいな像は撮れるけど、いいところ電顕や光顕の追試をやっているだけで、科学としては何も新しくないのではないですか。」という批判に答えられるデータは少ない。明らかに水平分解能は光顕より高いから、液中測定で生体反応を見られたらいいのだが、いかんせん時間分解能が低いのが大きな問題で、柔らかいサンプルになると一枚絵を取るのに数分はかかってしまう。

パイオニアとしての誠意を示すためには、何とか斬り込まなければならない。そのきっかけになる実験報告が、今年になってぼろぼろでてきた。それは。

4

今春の話題を独占したのは、E.-L. Florin 等の「Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs」⁽⁴⁾。サンプルとしては蛋白質（ビオチン）で覆ったアガロース・ビーズを使い、一方AFMの探針も蛋白質（アビジン）でコートした。先ず探針をビーズに接触させ、その後ピエゾで両者を引き離す。このとき探針側の蛋白質と、ビーズ側の蛋白質が結合していれば、探針とビーズはなかなか離れないから、カンチレバーは引っ張られてたわんで行き、ある臨界力がかかったところで、ポンッと離れる。この臨界力が、アビジンとビオチンの結合力であろうというわけです。このとき、XY方向に走査はせず、探針を単に上下に動かすのです。この測定法は、業界用語では「フォースカーブ測定」と呼んでいます。今回の測定は、もちろん溶液中。但しここで求めた力は、探針表面にくっついている蛋白質の結合力の総和なので、彼らはこれを自己相関関数で解析して、分子一個当たりの結合力を求めている。スタンダードな場合で 160 pN。顕微鏡で絵をとらないで力を測るなんて、これまた何という tricky な。

続いては M. Radmacher 等の「Direct Observation of Enzyme Activity with the Atomic Force Microscope」⁽⁵⁾。彼らはAFMの探針をサンプル表面ぎりぎりまで近づけ、カンチレバーを振動させた。（探針はサンプルに接触しているか？ 彼らは表面をタップしていると表現し、これをタッピングモードAFMと名付けた。） サンプルはリゾチームという蛋白質をマイカ表面に一面に吸着させたもの。液中測定。さて、彼らはこの溶液に、リゾチームと反応する酵素を入れた場合と入れない場合の比較を行った。溶液を注入した直後から、カンチレバーの振幅の時間変化を測ったのだ。すると、酵素がないときに比べ、酵素があるときは 1 nm 程度の違いが見られたという。すなわち蛋白質が反応を起こしたときに引き起こされる表面の微小な変化を、カンチレバーの振幅の変化として捕らえれた、言い換えれば酵素活性の直接測定ができた、というわけだ。この実験でも探針は振動させてあるだけで、

XY方向の走査はしていない。走査しなかった理由はいろいろあると思われるが、その一つとして挙げられることには、彼らは走査しないことによって、50ミリ秒の時間分解能を得た。走査するのに時間がかかるわけだから、一点だけの振幅変化の測定ならば、高速測定が可能なのである。それにしても**時間分解能を上げるためには絵を捨てる**とは、何という tricky な。

まだ生物物理学に多大な貢献をするところまでには至っていないが、読んでみると幸せになれるような論文がでてきたと言えよう。これらに共通していることは、SPMはこれまで多機能顕微鏡としてその情報量の多さを売り物にしてきたが、その多機能さを捨てる、特に「画像」というもっとも情報量の多い部分をばっさり捨て去ることで鋭く斬り込んだという点である。しかし実はそのことによって、SPMでは絵をとるだけではなくてこんなことができるんですよ、とSPMの多機能さをアピールしているというパラドックスのような構造になっている。

このような発想に立てば、様々の応用が広がってくる。探針、サンプル、溶液の三者の組み合わせだけでも、かなり複雑な実験系が組めるし、画像をとるための探針と物性を測るための探針を同じカンチレバーにくっつけるとか、そばに電極を置いてみるとか、いくらでも可能性は広げられる。(図2参照)

とりあえず来年は？ 来年のことは分からないけれど、願わくばもっと幸せになれるように。

参考文献

- (1) 田中裕行、河合知二、吉信淳、河合真紀 第55回応用物理学会学術講演会講演予稿集 No.2 (1994)419
- (2) C. R. Clemmer and T. P. Beebe, JR: SCIENCE Vol.251 (1991)640-642
- (3) C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold and R. Keller: Biochemistry Vol.31 (1992)22-36
- (4) E.-L. Florin, V. T. Moy and H. E. Gaub: SCIENCE Vol.264 (1994) 415-417
- (5) M. Radmacher, M. Fritz, H. G. Hansma and P. K. Hansma: SCIENCE Vol.265 (1994)1577-1579

その他、総説をいくつか。

- (6) "From Molecule to Cells: Imaging Soft Samples with the Atomic Force Microscope" M. Radmacher, R. W. Tillmann, M. Fritz, H. E. Gaub: SCIENCE Vol.257 (1992)1900-1905
- (7) "Promises and Problems of Biological Atomic Force Microscopy" J. Yang, L. K. Tamm, A. P. Samlyo and Z. Shao: J. Microscopy-Oxford Vol.171

(1993)183-198

(8) "顕微鏡の最前線：表面への新たなトンネル"

マーク・ウェルランド (訳 魚住清彦) パリティ Vol.09 No.08 (1994)11-17

(9) "Biological Applications of Atomic Force Microscopy"

R. Lal and S. A. John: Am. J. Physiol. Cell. Physiol. Vol.266 (1994)C1-C21

注) 本稿は夏の学校のテキスト原稿を「物性研究」の読者向けに大幅に書き直したものです。