



原子間力顕微鏡 - ナノバイオロジーへの架け橋 -

京都大学大学院生命科学研究所 小堀俊郎, 横川雅俊, 竹安邦夫

Atomic Force Microscopy (AFM) plays important roles in nanobiology. We here review the recent development and application of AFM technology from the technical point of view. In the visualization mode, AFM produces not only static images at lower time-resolution in the seconds to minutes, but also motion images at higher time-resolution in the milliseconds. Furthermore, AFM combined with fluorescent techniques can now address varieties of biological questions from genes to proteins and from proteins to cells. In the force mode, the tip directly interacts with the molecules of interests to measure the inter- and/or intra-molecular physical properties.

atomic force microscopy / nanoimaging / single molecular dynamics / mechanical sensor / nanofabrication

1. はじめに

個々の生体物質のダイナミクスをナノスケールで見ることができれば、生命現象の理解はどれほど進むだろうか。そうした壮大な夢を現実のものとする可能性を秘めたツールの1つが原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy ; AFM)¹⁾である。当初、表面画像化技術として開発されたAFMも、近年ではその活躍の場を広げ、力学・化学センサとして、そしてナノハンドリングマシンとして、幅広い利用が可能となってきた²⁾⁴⁾。そこで本稿では、AFMの動作原理を概説し、AFMのナノバイオロジーへの応用について述べる。

2. AFMの動作原理

AFMは、おもに以下の4つの構成要素からなる。探針を先端にもつカンチレバー、3次元的に試料ステージの位置を制御する駆動機構 (ピエゾ素子)、カンチレバーのたわみ・振動の検出機構、検出信号に対し試料ステージの位置を制御するフィードバック回路 (Fig.1)。

AFMは微小な探針を試料表面に近接させた際に生じる力学的相互作用の分布を画像化する顕微鏡である。探針と試料との間にはレナード-ジョーンズ型のポテンシャルで近似される力学的相互作用が存在する。探針を試料遠方より近づけていった際、最初にファンデル

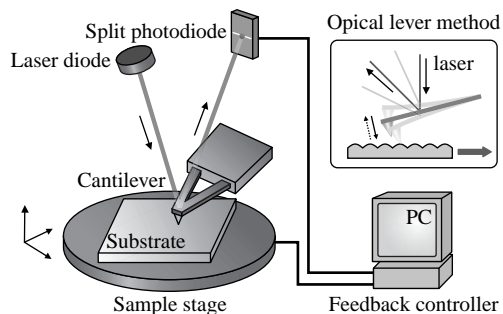


Fig.1 Principle of AFM. When AFM scans a sample on the stage, location of the tip is controlled by the feedback loop such that the force between the tip and the sample stays constant. Cantilever deflection corresponds to the surface shape of the sample. The sample height is measured by the optical lever method, which detects angular displacement of the laser beam from the back of the cantilever.

ワールス引力が働き、さらに原子結合距離程度まで近接すると斥力が強く働く。この探針 - 試料間の相互作用により、柔らかい板バネであるカンチレバーのたわみ、あるいは振動状態に変化が生じる。この変化をカンチレバー背面に照射したレーザーの反射光を通して、位置センサーである2分割フォトダイオードに当てて検出する (光てこ方式, Fig.1)。

Atomic Force Microscopy, Passport to Nanobiology

Toshiro KOBORI, Masatoshi YOKOKAWA and Kunio TAKEYASU
Graduate School of Biostudies, Kyoto University

3. AFM による画像化

3.1 画像化モード

画像化モードにはコンタクトモード、タッピングモード、およびノンコンタクトモードがあるが、生命科学ではタッピングモードが主流である (Fig.2)。タッピングモードでは、カンチレバーを共振周波数付近において振動させるが、その振幅は探針と試料の接触により減衰する。この振幅が一定となるようにステージの高さに対してフィードバックをかけながら試料表面を水平走査すれば、ステージの上下変位を各水平位置における高さとすることによって、走査範囲全体の表面形状が画像化される。この方法では、試料と探針との横方向の接触を少なくできるため、探針や試料の損傷を抑えられるという利点がある。

3.2 水平分解能の向上 - カーボンナノチューブの利用 -

AFMの表面観察における水平方向の分解能は、探針の先端径に大きく依存する。したがって、その分解能の向上には、先端曲率半径や頂角のより小さな探針の利用が必要となる。通常の画像化ではシリコン製の探針を用いるが、水平分解能を上げるために先端曲率半径が約2 nmで機械的強度にも優れたカーボンナノチューブ (CNT) を先端に付着させた探針を用いて画像化する技術が確立された⁵⁾。筆者らの研究室ではCNT探針を用いることにより、DNAポリメラーゼの機能を補助

するタンパク質複合体である、RFC複合体やPCNA複合体のサブユニット構造を解析することに成功した⁶⁾。このようにCNT探針による画像化は、分子量が巨大で結晶化の困難なタンパク質複合体の構造を観察する手段として有用である。

3.3 時間分解能への挑戦 - 液中高速AFMの開発 -

生体試料の溶液中AFM観察は、その試料のもつ本来の構造や相互作用を可視化できる点で重要な技術である。しかしながら、既存のAFMでは走査速度が遅いため、生きた生体試料の静止像は観察できても、分子レベルのダイナミックな反応や構造変化は直接観察できなかった。タッピングモードでは各ピクセル当たり少なくとも1回以上カンチレバーが振動しなくてはならないが、一般的な液中測定用カンチレバーの溶液中での共振周波数は10 kHz程度と低く、高速化の大きな制約の1つであった。

この制約はカンチレバーを通常より小さくする (長さ9 μm, 幅2 μm, 厚さ140 nm) ことで解決され、板バネとしての柔らかさを損なうことなく、溶液中で600 kHzという非常に高い共振周波数を獲得することに成功した⁷⁾。さらに、スキャナーなどの装置面の改良や新しい光てこ法の導入などにより、溶液中の試料をリアルタイムで観察することに成功した (Fig.3)⁷⁾。これによりタンパク質の構造変化や存在位置の変化といった、分

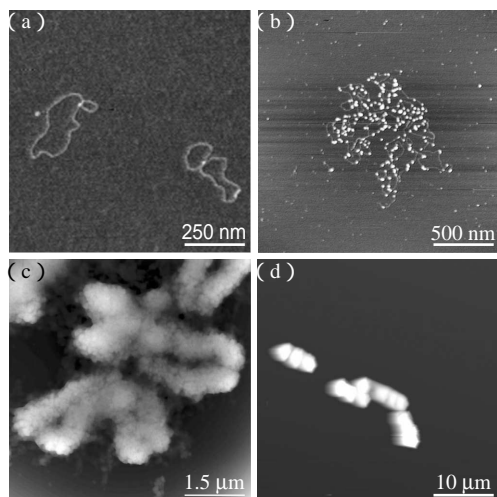


Fig.2 Examples of the tapping mode imaging. (a) Circular plasmid DNA (pBluescriptII KS(-)), 3.0 kb, 2 × 2 μm²). (b) *In vitro* reconstituted chromatin (1.5 × 1.5 μm²). (c) Human metaphase chromosome (6.2 × 6.2 μm²). (d) Yeast cells (40 × 40 μm²).

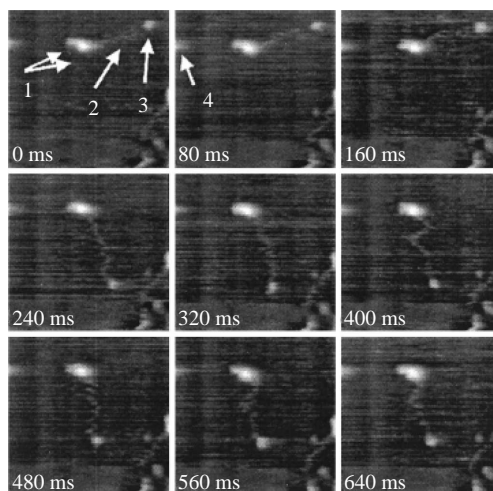


Fig.3 Real time observation of myosin V molecule in solution by fast AFM⁷⁾. Dynamics of myosin V is directly observed by the fast AFM in solution. Arrows 1, 2, and 3 indicate the head/neck region, the long tail, and the globular tail end, respectively. Scan area is 240 × 240 nm², and the frame rate is 12.5 frame/sec (80 msec/frame).

子間反応に伴うダイナミクスを1分子レベルで直接観察することが可能となった。

3.4 蛍光と表面構造のハイブリッドイメージング

蛍光観察技術とAFMとを組み合わせたハイブリッドイメージング法も開発されている。従来の倒立型蛍光顕微鏡のステージ上にAFMのスキュナを搭載し、ガラス基板上に展開した試料を上方（AFM）と下方（蛍光顕微鏡）の2方向から同時に観察する（Fig.4a）。蛍光顕微鏡に全反射蛍光観察システムを組み込んでおけば、1分子単位で基板上的蛍光分子を捉えることができる⁸⁾。

SNOM/AFM (scanning near-field optical microscope/atomic force microscope) を利用する方法もある⁹⁾。SNOM/AFMは探針先端に発生させた近接場光で試料を励起して蛍光像を取得する一方、AFMと同様に表面形状も取得できるプローブ顕微鏡である。近接場光の発生方法から開口型と散乱型の2種類に大別されるが、生命科学には開口型が適している。この装置では、AFMのカンチレバーと探針の代わりに先鋭化した光ファイバーをプローブとして用いる（Fig.4b）。光ファイバープローブの先端部には光源波長よりも小さな開口（直径50-100 nm）が設けてあり、そこからにじみ出る近接場光を利用して試料の局所領域を光励起する。SNOM/AFMの光学分解能は開口径および試料のサイ

ズにのみ依存するため、場合によっては通常の蛍光顕微鏡よりも高い分解能を発揮する。実際、光学顕微鏡では1点として観察される染色体上のテロメアシグナルが、100-200 nmを隔てた2点に分離されて観察された（Fig.4c）¹⁰⁾。このようにSNOM/AFMにより蛍光シグナルを高い光学分解能で解析することが可能になったが、こうした画像を定常的に取得するには技術的に克服すべき問題が残されている。

4. 力学測定

AFMは画像化だけでなく、探針 - 試料間の相互作用を解析するツールとしても用いられる。力学測定では、探針を垂直方向に移動させ、探針を試料に押し付けた（引き離れた）際のカンチレバーのたわみを検出する（Fig.5）¹¹⁾。このたわみの大きさとカンチレバーのパネ定数から、試料（カンチレバー）にかかる力の大きさが計算できる。一般的なAFMでは、およそ0.01-100 nN程度、この機能に特化したAFMであれば0.1 pNオーダーの力の測定が可能である。

生物物質の力学測定には大きく分けて2種類ある。1つは単一分子の力学測定である。対象分子を基板表面に吸着させた後、探針を基板表面に接触させることによって探針側にも結合させ、カンチレバーを引き離すことにより（試料の）延伸特性を評価する方法である。この方法は筋肉タンパク質の力学測定によって一般的に

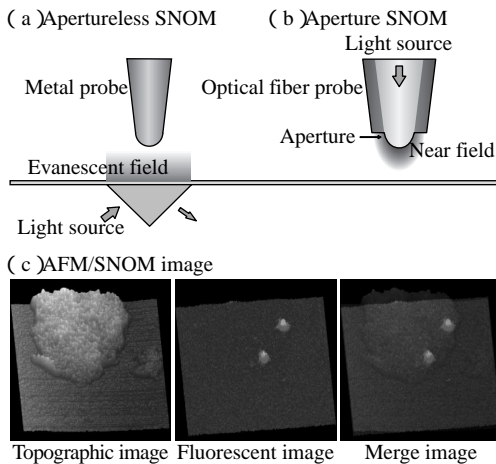


Fig.4 Combination of AFM and other fluorescent techniques. (a) AFM combined with fluorescent microscope. (b) Aperture SNOM/AFM. The evanescent light excites fluorescent molecules in the limited area just below the aperture. (c) SNOM/AFM image of the telomeric region of a barley chromosome. Topography and fluorescent signals of the telomeric repeat can be obtained simultaneously. These images are provided by the courtesy of Dr. Ohtani, National Food Research Institute.

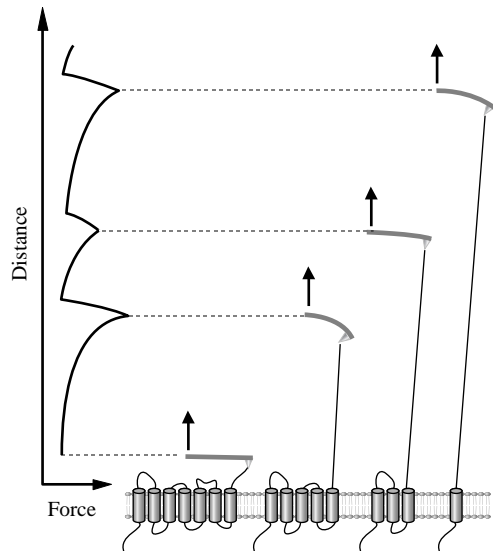


Fig.5 Single molecule force measurements. Mechanical properties of single molecule can be measured by the force mode AFM. The force can be calculated from the spring constant and deflection of the cantilever.

なったと言えるだろう。筋肉はアクチン、ミオシンあるいはタイチンなどの筋肉タンパク質が力を発生することによって伸び縮みするが、実際にピコニュートンレベルの力が発生していることが力学測定により明らかにされた¹²⁾。このほか、DNA 鎖の力学特性やタンパク質の折り畳み機構の解析に力学測定を適用する例が多く見られるが、クロマチンを延伸することによってフォールディング過程を解明する試みも行われている¹³⁾。今後はさらに高次元構造体である染色体や細胞核での研究へと進んで行こう。

もう1つは、2分子間に働く相互作用力の解析である。たとえば、リガンド - 受容体間の相互作用を解析する場合、探針に結合させたリガンドを基板上に吸着させた受容体と相互作用させた後、カンチレバーを引き上げることによって作用する力を測定できる。このとき探針によって引き起こされる、押しつぶしや引き伸ばしといった受容体の変形を避けるために非圧縮法が提案されており¹⁴⁾、今後の分子間力学測定法の標準になるだろう。最近では、表面形状と相互作用力との同時測定が可能な装置も市販されている。分子間力学測定の概要は別に記した¹⁵⁾ので、そちらを参照されたい。

当然ながら分子内あるいは分子間の相互作用だけでなく、細胞レベルでの力学特性を測定することもできる。フォースカーブを生細胞全体にわたってピクセルごとに測定したところ、弾性率分布は一様ではなくアクチンフィラメントの分布と対応することが明らかになった¹⁶⁾。さらにフォースモジュレーション法の適用により、時間分解能の向上だけでなく、試料の粘性係数の定量化が可能になり、細胞にかかる張力や硬さが細胞運動に影響することが示されている¹⁷⁾。

5. マニピュレーターとしてのAFM

AFMをマニピュレーターとして用いる試みもある。生細胞に探針を突き刺しmRNAを探針先端に付着させて遺伝子発現の分布を可視化すると、細胞集団は均一ではなく発現状態がほかとは異なる細胞が存在することが判明した¹⁸⁾。また、染色体の核小体形成領域を探針で切断し、付着した遺伝子をPCRで増幅して切断を確認した例もある¹⁹⁾。こうしたマニピュレーションを正確に、かつ再現性良く行うには、試料ステージの3次元駆動制御を担うピエゾの性能向上が必要である。従来はピエゾのヒステリシスやクリーピングに起因する非線形性はソフトウェアにより補正されていたが、最近の市販装置ではクローズドループ制御によって精度良く位置制御できるため、正確なマニピュレーションのみならず探針で基板表面上に任意のパターンを描く、

ディップペンナノリソグラフィーも可能になってきた。

さらにマニピュレーターとしての機能を大幅に向上させる探針(ナノピンセット)が開発され²⁰⁾、実用段階に入っている²¹⁾。ナノピンセットはシリコン探針の先端に2本のカーボンナノチューブを平行に取り付けたもので、電圧の印加および解除により2本のナノチューブ先端の間隔を制御できる。このときの“握力”は用途に応じて変更できるため、AFMを用いた精緻なマニピュレーションが今後一般的になっていくと期待される。

6. おわりに

生体機能は、種々の生体物質の分子構造、物性、化学的性質、細胞内での空間配置と動き、ほかの生体物質との相互作用、などに強く依存しており、時々刻々と状態を変化させている。AFMは、そのような細胞内での複雑な状況の一端を、単一分子レベル、単一細胞レベルで画像化するとともに、個々の生体物質がもつ力学物性の定量化、さらには人為的なナノマニピュレーションも可能とし、分子生物学や生化学による分子集団の解析では得られない情報をもたらした点で、非常に優位性の高い研究ツールとなった。もっとも、その特異性ゆえに結果の解釈には慎重を期すべきであることも忘れてはならないが、他方で既存の方法論との整合性を取ることにより新たな真実が浮かび上がってくることも間違いないだろう。今後は、同一試料からさまざまな情報を得るために、各カンチレバーに異なる機能を付与したマルチカンチレバーアレイをもつAFMシステムの実用化も期待される。このシステムにより、ゲノムの直接的な改変、膜タンパク質の回収、細胞小器官の移植なども当たり前のように行われる時が来るかもしれない。このように、現在は、生体物質のダイナミクスをナノメートル、ミリ秒、ピコニュートンレベルで追求するナノバイオロジー²²⁾によって、生命の本質を理解する新たな扉が開け放たれた時代だと言っても過言ではなさそうだ。

文 献

- 1) Binnig, G., Quate, C. F. and Gerber, C. (1986) *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933.
- 2) Ikai, A. and Afrin, R. (2003) *Cell Biochem. Biophys.* **39**, 257-277.
- 3) 日本顕微鏡学会 編 (2003) 電子顕微鏡 特集『走査プローブ顕微鏡の生物学への寄与』**38**, 73-97.
- 4) Ushiki, T. and Yamashina, S. (2000) *J. Electron Microsc.* "AFM special issue". **49**(3).
- 5) Wong, S. S., Joselevich, E., Woolley, A. T., Cheung, C. L. and Lieber, C. M. (1998) *Nature* **394**, 52-55.
- 6) Hohmura, K. I., Itokazu, Y., Yoshimura, S. H., Mizuguchi, G., Masamura, Y. S., Takeyasu, K., Shiomi,

- Y., Tsurimoto, T., Nishijima, H., Akita, S. and Nakayama, Y. (2000) *J. Electron Microsc.* **49**, 415-421.
- 7) Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K. and Toda, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **98**, 12468-12472.
- 8) Akamine, S., Kuwano, H. and Yamada, H. (1996) *Appl. Phys. Lett.* **68**, 579-581.
- 9) Pohl, D. W., Denk, W. and Lanz, M. (1984) *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651-653.
- 10) Fukushi, D., Shichiri, M., Sugiyama, S., Yoshino, T., Hagiwara, S. and Ohtani, T. (2003) *Exp. Cell Res.* **289**, 237-244.
- 11) Muller, D. J., Kessler, M., Oesterhelt, F., Moller, C., Oesterhelt, D. and Gaub, H. (2002) *Biophys. J.* **83**, 3578-3588.
- 12) Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. and Gaub, H. E. (1997) *Science* **276**, 1109-1112.
- 13) Leuba, S. H., Karymov, M. A., Liu, Y., Lindsay, S. M. and Zlatanova, J. (1999) *Gene Ther. Mol. Biol.* **4**, 297-301.
- 14) Sekiguchi, H., Arakawa, H., Taguchi, H., Ito, T., Kokawa, R. and Ikai, A. (2003) *Biophys. J.* **85**, 484-490.
- 15) 横川雅俊, 吉村成弘, 竹安邦夫 (2004) 蛋白質 核酸 酵素 増刊号 『バイオ高性能機器』 **49**(11), 1607-1614.
- 16) Haga, H., Sasaki, H., Kawabata, K., Ito, E., Ushiki, T., Abe, K. and Sambongi, T. (2000) *Ultramicroscopy* **82**, 253-258.
- 17) Nagayama, M., Haga, H. and Kawabata, K. (2001) *Cell Motil. Cytoskel.* **50**, 173-179.
- 18) Osada, T., Uehara, H., Kim, H. and Ikai, A. (2003) *J. Nanobiotech.* **1**, 2.
- 19) Iwabuchi, S., Mori, T., Ogawa, K., Sato, K., Saito, M., Morita, Y., Ushiki, T. and Tamiya, E. (2002) *Arch. Histol. Cytol.* **65**, 473-479.
- 20) Akita, S., Nakayama, T., Mizooka, S., Takano, Y., Okawa, Y., Miyatake, S., Yamanaka, M., Tsuji, M. and Nosaka, T. (2001) *Appl. Phys. Lett.* **74**, 1691.
- 21) Nakayama, Y., Akita, S., Okawa, T., Yamanaka, S. and Nosaka, T. (2002) *Mat. Res. Soc. Proc.* **706**, 353.
- 22) 竹安邦夫 編 (2004) ナノバイオロジー, 共立出版.