

〈学位論文の紹介〉

走査型プローブ顕微鏡による  
有機薄膜・人工膜・生体膜の構造研究

岩本 秀樹

若山 信行 (監修)

桐蔭横浜大学工学部材料工学科

岩本秀樹君は本学材料工学科、材料工学専攻博士後期課程を修了、表記題目の研究により本年3月工学博士の学位を得た。以下はその博士論文の内容を紹介するものである。

我々が日常接する規模の物質、たとえば生き物とか、プラスチック材料とか、セラミックスなどの性質を現代的な意味で理解するには、その物質の構造、すなわち、原子や分子の並んでいる様子を知ることが非常に大切であることはよく理解されている。たとえば、遺伝情報を担うDNAの構造が美しい2重らせん構造であることが示されたことにより、遺伝の仕組み、遺伝子の情報をもとに蛋白質が作られる仕組みを理解することがどんなに進んだか、改めて言及するまでもないことであろう。その構造の解明をめぐる人間臭いドラマも、よく知られていることである。また、蛋白質の性質を理解する上でも、その構造を詳しく知ることが大いに役立っている。こうした、生体高分子の構造の研究ではこれまでX線回折法が非常に有力であった。今日、蛋白質の構造は質のよい結晶さえあれば、X線回折法により、必ず解明されるというように信じられている。そして、我々が知りたい対象も、より複雑で、その機能もより精緻なものへと興味が向けられることは自然の趨勢である。そうした、結晶とは違って繰り返し構造のない対象には、生体高分子で成功したようなX線回折法はあまり有力ではない。それに代わってよく利用される方法が電子顕微鏡観察である。しかしこの方法の最大の欠点は、通常、試料を染色する必要があり、また、真空中に置かなくてはならないことである。いわば、生の魚の構造を知りたいときに、着色した干物しか調べられないという大きな欠点がある。

生体膜や脂質の集合体のように、タンパク質の構造解明にX構造解析などが威力を発揮したようなことがそのままでは期待出来ないとき、また、もう一つの有力な手法である電子顕微鏡が生きた姿を見る上では必ずしも満足できるものではないとき、近年急速に発達している走査型プローブ顕微鏡は、生きたままの実像を観察できるという特徴を生かした一つの有力な手段として期待されている。

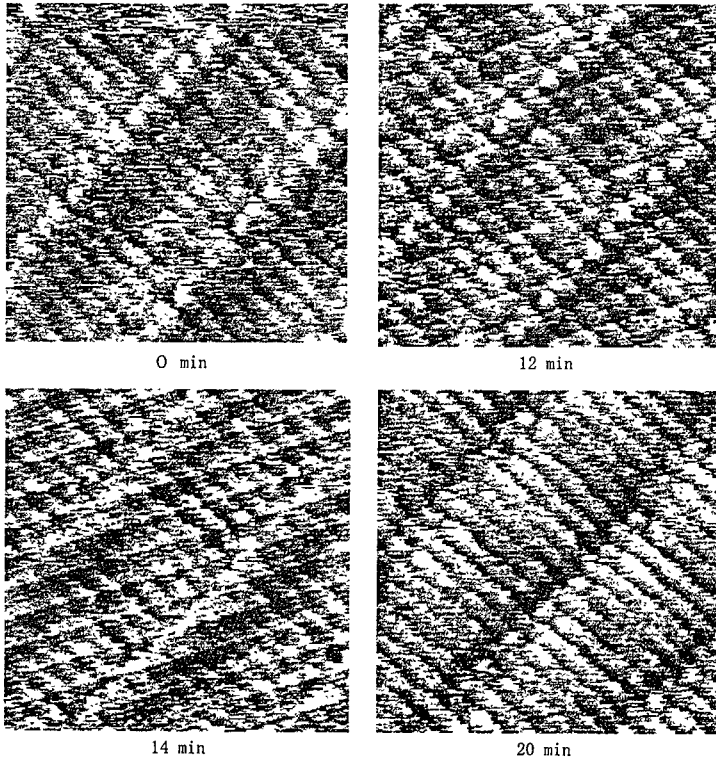
走査型トンネル顕微鏡 (STM) は1982年ローラー (Heinrich Rohrer) とビニツヒ (Gerd Binnig) により発明された。その原理は、非常に鋭利な針 (探針) の先端を導電性の試料表面に近づけると、試料と探針の間にトンネル電流が流れる。この条件で探針を試料表面に沿って移動すれば表面の形状に応じて電流値が変化する。それゆえ、その電流値を測定しながら表面を走査すれば表面の形状が調べられるというものである。その電流値は距離に極めて敏感であることから、表面の原子の配列まで知ることが出来るのである。この方法により半導体の表面構造などが詳しく調べられるようになった。しかし、この方法の欠点は、生体物質のような非導電性の物質は観察することが出来ない点である。これに対して、トンネル電流を調べる代わりに探針と試料表面の間に働く引力や斥力を測定して絶縁体の表面構造を調べることを可能にしたものが開発された。これが原子間力顕微鏡 (AFM) である。この方法は生体物質を生きた状態のまま、染色することもなく観察できる方法として期待されている。トンネル顕微鏡や、原子間力顕微鏡あるいは類似の走査型顕微鏡を総称して走査型プローブ顕微鏡と呼んでいる。

本論文の一部は、走査型トンネル顕微鏡を用いて、固体表面に吸着した分子の膜をその場で観察しながら、化学反応の進行を調べるといったものである。これは分子一つ一つを観察しながら、それを操作し思いのままの物質を作り上げるという化学の一つの夢に一步近づこうというものである。

Octadecylacrylate は紫外線照射により重合することはこれまでに知られている。この物質をフェニルオクタンに溶かし、できた溶液を高配向性グラファイト上に滴下し表面に二次元の膜を形成させる。これは走査型トンネル顕微鏡により、二次元結晶構造として観察された。この状態で、紫外線を照射すると、観察される像が変化する。これは重合反応が起きたことによるものであろう。

結晶構造 I

アクリレートが直線的に配置している  
(結晶構造 I) では光によって構造変化が起きる。



観察された結晶系にも3種類の形 (I, II, III) が存在することが見出された。それらには光化学反応のしやすさにはっきりした差異も認められた。このように、分子を目で見るように観察しながら化学反応をさせるという夢に一步近づいたものといえ、今後の、化学反応を分子を見ながら追跡するという手法は発展が期待される。

本論文の別の部分は、原子間力顕微鏡による赤血球細胞および赤血球膜の構造の研究という部分である。それに関連して走査型プローブ顕微鏡により赤血球やその膜が観察された歴史を振り返る。

赤血球はそれ自身、医学的、生物学的に重要なものであることはいうまでもないが、さらに、その均質な試料が大量に得やすいということから、基礎的な研究の材料としても広く用いられている。またその細胞から得られる膜標品も同様の理由から広く研究されている。多くの膜研究のための斬新な技術は赤血球やその膜を試金石としてその有効性が試されて来ているといっても過言ではない。原子間力顕微鏡の生体への応用という面でも例外ではなく、原子間力顕微鏡の開発当初から観察の対象となっており、分解能の向上を目指した装置の工夫、試料の取り扱いの工夫に際しても、しばしば材料として取り上げ

られてきている。それゆえ、赤血球やその膜の観察事例を振り返れば、原子間力顕微鏡の生体試料への応用のために積み重ねられた数多くの工夫の足跡を辿ることにつながり、興味深いものとなる。

A FMを用いた細胞の観察例は1990年頃から雑誌に報告された。当初は探針と試料の間の反発力を測定するコンタクトモードにより、ポリリジンを塗布したカバーガラス上にグルタルアルデヒドで固定し生理的水溶液中で観察したもの、ガラス上で乾燥させた血球、などである。分解能は30-70nm程度が限界であった。また、グルタルアルデヒドで固定したため、生きた状態からは程遠い物を観察することになってしまった。

そうした背景のなかで、倒立型の光学顕微鏡上にA FMを設置しキャピラリーによって吸引固定した生きた赤血球細胞を観察する試みが行なわれ生きた細胞を10nm程度の分解能で観察した。高張液中での膜構造の変化、糖タンパク質の分布状態の変化等の観察も試みた。

しかしながら、こうした測定の中で、生体試料をA FMで観察する際の問題点がいろいろ検討され、試料そのものの柔らかさに由来する測定の限界などが議論された。先鋭な探針を用いれば試料にかかる圧力が大となり、試料が変形し分解能を損なう、あるいは試料の損傷が起きる。その結果nN以下の力でも高分解能での観察は困難であり、せいぜい20nmであろうなどと論じられた。その対策として、試料を低温に置く事により試料を固くしてA FMの観察を行うことが提唱され、クライオ(cryo = “氷結の”、“寒冷の”)を意味する)AFMが開発され赤血球観察にも適用された。液体窒素上の窒素蒸気雰囲気中にA FMを設置し、(77-220K)の温度で観察を行なう事が出来るように設計した。その結果、分解能が著しく向上した。この条件下では赤血球細胞の試料のヤング率は数千倍となり、走査型電子顕微鏡を超え、透過型電子顕微鏡と並ぶ程度まで分解能が向上した。さらに先鋭な探針を使えば空間解像度はさらに向上することが期待される。この方法によりフィラメント状の微細な構造が観察されている。

また、従来のコンタクトモードの欠点として、探針と試料表面の強い相互作用の結果、表面構造の損傷、試料の移動が見られ、時には完全に破壊されてしまうことがあるため、安定した再現性のある像が得難い。生体の細胞など柔らかい試料とかよく固定されていない試料には適用が困難であった。それを解決するための装置上の改良として、探針を振動させて観察するタッピングモードによる方法が開発され、摩擦力を減少させ、柔らかい試料を長時間走査することが可能となった。タッピングモードを用いて、室温、空气中でグルタルアルデヒドで固定した赤血球の細胞全体を28区分に分けてそれぞれを高分解能で観察の結果、密集した粒子集合が観察され、その大きさは数nm~数十nmに分布している。特に目立つような突起、くぼみは見られず、全体は滑らかな構造であった。

一方、試料の面から、室温でも試料の柔らかさを減少させ、探針の力により試料が変形しないようにするための工夫として、本博士論文では、試料溶液をマイカ上に置き遠心力によりマイカ表面に固定し観測を試みた。この方法により従来型のコンタクトモードにより合成リン脂質のリップル構造が観察された<sup>1</sup>。また、室温でそれまでにない分解能で赤血球膜ゴースト表面の構造が観察された<sup>2</sup>。これを遠心前と遠心後の図を比較すると、遠心固定法の利点は顕著である。このように遠心固定した像ではタッピングモードで観察された像よりもずっと微細な構造が観察されている。また、クライオA FMでの結果と類似のフィラメント構造が、本法では室温において観察されている。また、このように固定した試料をより柔らかいカンチレバーを用いて小さい斥力で観察した所、円盤状の粒子が密集したような構造が観察され、また、それよりも固いカンチレバーを用いたときには、その粒状構造とフィラメント構造が同時に観察された。これは、電子顕微鏡の観察像に対応するように思われる。

遠心分離という操作は、生化学での常用の手段であり、機能を保ちながら、化学的な反応を使うことなく固定できるという大きな利点もあり有用な手法といえよう。A FMを生体物質の研究に利用しようとする試みは多いが、本研究では、比較的容易に、従来になかった分解能で試料を損傷することもなく観察する方法を初めて与えたものであり、今後広く応用されることになるであろう。

1 Iwamoto H. and Wakayama, N. :*Jpn.J. Appl. Phys.*36(1997)3913-3916

2 Iwamoto H. and Wakayama, N. :*Jpn.J. Appl. Phys.*36(1997)3872-3876